

清肝解酒湯이 인체간세포의 Glutathione 생성에 미치는 영향

윤여광, 김영철, 이장훈, 우홍정
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

The Effects of Chungganhaeju-Tang on glutathione synthesis in HepG2 cell

Yeo-Kwang Yoon, Young-Chul Kim, Jang-Hoon Lee, Hong-Jung Woo
Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

Objectives : The aim of this study is to investigate the inhibitory effect of Chungganhaeju-Tang on alcohol induced human hepatic cell apoptosis by synthesis of glutathione.

Methods : The amount of glutathione in HepG2 cell was measured with colorimetric glutathione assay kit and glutathione-conjugated CDNB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene) at 37°C and then measured by spectrometry to assess the activity of glutathione S-transferase.

Results : The synthesis of glutathione and the activity of glutathione S-transferase in HepG2 cell were promoted by Chungganhaeju-Tang and increased in dose/time-dependent manner. Chungganhaeju-Tang inhibited apoptosis induced by ethanol and acetaldehyde dependent to treatment dosage.

In Buthione sulfoximine, a glutathione synthesis inhibitor, treated case, the synthesis of glutathione was inhibited and in Chungganhaeju-Tang treated case, the synthesis of glutathione is promoted with or without Buthione sulfoximine.

The present findings suggest that Chungganhaeju-Tang inhibits alcohol induced apoptosis by synthesis of glutathione in HepG2 cell.

Conclusions : The result indicates that Chungganhaeju-Tang protects human hepatic cell by glutathione synthesis and made the liver recover from alcohol induced damage.

Key Words: Chungganhaeju-Tang, Glutathione, Apoptosis

1. 緒 論

최근 우리나라는 경제성장과 생활양식의 변화, 사회 문화적 요인등으로 알코올 소비가 늘어나면서 알코올성 간질환이 증가하고 있는 추세이다¹. 우리나라의 주된 간질환의 원인으로 알려진 바이러스성 간염이 감소하고 지방간, 알코올성 간염, 알코올성

간경변증 등 알코올성 간질환이 매년 증가한다고 보고하고 있다². 알코올에 의한 간질환은 최근 그 비율이 점점 증가하여 만성간질환 중에 5~10% 정도를 차지하고 있는 추세이다³. 따라서 바이러스성 간염뿐 아니라, 알코올로 인한 간질환에 대한 대책이 시급한 실정이다.

한의학에서는 알코올로 인한 간질환을 酒傷으로 파악하고 있으며 酒傷에 관해 內經에서는 飲酒過度 하면 氣가 上逆하여 肝浮膽橫한다 하였고⁴, 醉飽入房하면 酒氣와 穀氣가 相搏하여 中焦盛熱하고 內熱이 생겨 尿赤한다고 하였다⁵. 이후 酒傷과 관련하여

· 접수 : 2004년 1월 29일 · 채택 : 2004년 3월 10일
· 교신저자 : 김영철, 서울특별시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 간계내과학교실
(Tel. 02-958-9118 Fax. 02-958-9120 E-mail :
yckim@khmc.or.kr)

酒疸, 酒癰, 酒積 등 다양한 증후로 관찰하여 왔다^{6,7}. 또한 酒傷의 병인병리는 濕毒과 熱毒뿐만 아니라 痰飲의 대사이상이 관여하는 것으로도 파악되고 있다⁸.

淸肝解酒湯은 對金飮子에 茵陳四苓散을 합방하고 解毒酒시키는 葛根과 赤楊 등을 가미하여 구성된 방제로 濕毒을 다스릴 뿐 아니라 濕熱과 痰飲을 제거하기 위해 사용되고 있다. 淸肝解酒湯의 지금까지 연구에서 알코올에 의한 간손상과 간기능저하에 효과가 있는 것으로 보고하고 있다^{9,10}. 최근 연구에서 金 등¹¹은 淸肝解酒湯은 에탄올과 아세트알데히드에 의해 유발된 HepG2 cell의 감소된 세포활성과 세포증식을 증가시키고, apoptosis를 감소시키며, TNF- α , IL-1 β 의 발현을 감소시켜 간세포를 보호하는 효과가 있음을 보고하였으며, 金 등¹²이 淸肝解酒湯은 ethanol과 acetaldehyde에 의해 저하된 간세포의 활성을 높이고 alcohol 유도성 apoptosis를 억제하는 간보호 작용이 있음을 확인하였다.

Glutathione은 각종질환 특히 간질환에 있어서 혈중 및 간장내의 함량이 감소된다고 지적되어 있다^{13,14}. glutathione의 생물학적 작용은 그 분자중 cystein의 SH기에 의한다고 하며 체내에 있어서 산화, 환원, 해독작용, SH효소의 부활, 혈액소의 산소

결합에 중요한 역할을 하며 단백질대사에도 영향을 미치는 등 많은 작용이 증명되어 있다. 특히 간에는 대량포함되어 있어서 그 합성과 필요장기로서 큰 의의를 갖고 있다. 따라서 알콜성 간질환에 효과적인 淸肝解酒湯은 인체간세포의 glutathione 생성에도 효과가 있을 것으로 기대되었다.

이에 저자는 淸肝解酒湯이 glutathione 생성과 관련하여 ethanol 및 acetaldehyde에 의해 유도되는 apoptosis를 억제하고 간세포를 보호하는 작용을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 약재

약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해¹⁵에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄정한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

2) 검액의 조제

실험에 사용한 검액의 조제는 淸肝解酒湯 1첩 분량(118g)을 3차 증류수 1000ml를 가하여 2시간씩 2회 환류추출한 후 면으로 여과하여 그 남은 액을 80

Table 1. Prescription of Chungganhaeju-tang

韓藥名	生藥名	Dose
茵 陳	Artemisiae capillaris Herba	30g
陳 皮	Aurantii Nobilis Pericarpium	12g
葛 根	Puerariae Radix	12g
赤 楊	Alny Cortex et Ramulus	12g
白 朮	Atractylodis Rhizoma Alba	8g
茯 苓	Hoelen	8g
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	8g
豬 苓	Polyporus	8g
厚 朴	Machili Cortex	8g
貢砂仁	Amomi Fructus	6g
甘 草	Glycyrrhizae Radix	6g
Total		118g

℃ 물 증탕 위에서 감압 농축하고, 동결건조기 (Christ LDC-1, Alpha/4, Germany)를 이용하여 32.4g의 건조추출물을 얻었다. 얻어진 추출물을 DMEM 배지 110ml에 더하여 37℃에서 3시간 동안 섞었다. 원심분리하여 남아있는 시료를 제거한 상층액을 0.45 μ m 필터(Millipore사)로 여과하여 멸균하고 4℃에 저장하였다.

2. 방법

1) HepG2 cell에 대한 검액의 처리

淸肝解酒湯이 Glutathione 생성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 HepG2 cell을 1×10^5 /well의 밀도로 배양한 후 淸肝解酒湯을 1, 10, 50, 100 μ g/ml의 농도로 48시간 동안, 그리고 10 μ g/ml의 농도로 12, 24, 48, 72시간동안 처리하였다. 淸肝解酒湯을 처리한 HepG2 cell과 처리하지 않은 cell(대조군)은 trypsinization을 통해 회수하였다. Ethanol 및 acetaldehyde에 의해 유도되는 apoptosis에 대한 淸肝解酒湯의 영향을 분석하기 위해 ethanol(1, 10, 50, 100mM), acetaldehyde(100, 200, 400 μ M) 투여 6시간 전에 淸肝解酒湯을 처리하였으며 apoptotic cell은 trypan blue exclusion assay를 통하여 관찰하였다. Glutathione synthesis inhibitor인 buthionine sulfoximine(BSO)는 淸肝解酒湯 처리 20시간전에 0.5mM 농도로 투여하였다.

2) Glutathione content 분석

HepG2 cell내에 glutathione 양의 분석은 colorimetric glutathione assay kit를 이용하여 수행하였다. 淸肝解酒湯이 처리된 또는 처리되지 않은 대조군 HepG2 cell을 trypsinization으로 회수하여 2×10^6 개의 cell을 PBS에 현탁하여 homogenizer로 분쇄하였다. 분쇄된 세포는 4℃에서 100,000 \times g로 약 50분간 원심분리하였다. 100 μ l의 상층액에 800 μ l의 buffer 용액(200mM potassium phosphate, pH 7.8, 0.2mM diethylenetriamine pentaacetic acid, 0.025% lubrol)을 혼합한 후 여기에 다시 50 μ l의 reagent A(0.012M chromogenic reagent in 0.2M HCL)와 50 μ l의 reagent B(30% aqueous sodium

hydroxide)를 순차적으로 혼합하였다. 혼합액을 약 10분간 실온에 방치한 뒤 400 nm에서의 흡광도를 분석하였으며 glutathione 농도는 μ g/ 10^6 cells의 단위로 산출하였다.

3) Glutathione S-transferase(GST) 활성도 분석

HepG2 cell을 6-well plate에 1×10^5 /well로 분주하고 배양한 후 淸肝解酒湯을 농도별 또는 시간별로 처리하였다. 淸肝解酒湯이 처리된 또는 처리되지 않은 대조군 세포를 회수한 후 sonicator를 이용하여 분쇄하였으며, 4℃에서 10,000 \times g로 약 30분간 원심분리하였다. 원심분리를 통해 얻어진 상층액을 125mM potassium phosphate buffer(pH 6.5), 1mM glutathione, 1mM CDNB가 포함된 반응액에 혼합하였다. GST의 활성도는 37℃에서의 glutathione-conjugated CDNB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene)의 형성정도를 spectrometry를 이용하여 측정(340nm에서의 흡광도)함으로써 산출하였으며 nmole of dinitrophenylglutathione(DNP-SG) formed/min per mg of protein로 나타내었다.

III. 結 果

1. 淸肝解酒湯이 glutathione 생성에 미치는 영향

1) 투여농도에 따른 glutathione content 변화

HepG2 cell을 1×10^5 cells/well로 배양하여 淸肝解酒湯을 48시간 동안 각각 1, 10, 50, 100 μ g/ml의 농도로 처리한 후 세포상층액을 분리하고 reagent를 혼합한후 400nm에서의 흡광도를 측정하여 glutathione content를 μ g/ 10^6 cells의 단위로 산출하였다. 정상대조군에 비하여 淸肝解酒湯을 처리한 군에서 glutathione content가 증가되었으며 특히 처리군내에서 淸肝解酒湯의 농도가 증가함에 따라 glutathione content도 증가하였다(Table 2).

2) 처리시간에 따른 glutathione content 변화

HepG2 cell을 1×10^5 cells/well로 배양하여 淸肝解酒湯을 10 μ g/ml 농도로 각각 12, 24, 48, 72시간 처리한 후 세포상층액을 분리하고 reagent를 혼합한 후 400nm에서의 흡광도를 측정하여 glutathione

content를 $\mu\text{g}/10^6$ cells의 단위로 산출하였다. 정상대조군에 비하여 淸肝解酒湯을 처리한 군에서 glutathione content가 증가되었으며 특히 처리군내에서 淸肝解酒湯의 처리시간이 증가함에 따라 glutathione content도 증가하였다(Table 3).

2. 淸肝解酒湯이 glutathione S-transferase(GST) activity에 미치는 영향

1) 투여농도에 따른 GST activity 변화

HepG2 cell을 1×10^5 cells/well로 배양하여 淸肝解酒湯을 48시간 동안 각각 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 세포상층액을 분리하고 reaction reagent를 혼합한 후 340nm에서의 흡광도를 측정하여 GST activity를 nmole of DNP-SG/min per mg of protein의 단위로 산출하였다. 정상대조군에

비하여 淸肝解酒湯을 처리한 군에서 GST activity가 증가되었으며 특히 처리군내에서 淸肝解酒湯의 농도가 증가함에 따라 GST activity도 증가하였다 (Table 4).

2) 처리시간에 따른 GST activity 변화

HepG2 cell을 1×10^5 cells/well로 배양하여 淸肝解酒湯을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 각각 12, 24, 48, 72시간 처리한 후 세포상층액을 분리하고 reaction reagent를 혼합한 후 340nm에서의 흡광도를 측정하여 GST activity를 nmole of DNP-SG/min per mg of protein의 단위로 산출하였다. 정상대조군에 비하여 淸肝解酒湯을 처리한 군에서 GST activity가 증가되었으며 특히 처리군내에서 淸肝解酒湯의 처리시간이 증가함에 따라 GST activity도 증가하였다 (Table 5).

Table 2. Dose Dependent Effect of Chungganhaeju-tang(CGHJT) on Glutathione Production in HepG2 Cell

	Control	CGHJT Treated ($\mu\text{g}/\text{ml}$; 48hrs)			
		1	10	50	100
Exp. 1	11.6	12.8	15.0	17.0	18.2
Exp. 2	12.4	13.4	15.4	17.2	17.8

Each value represents produced glutathione content ($\mu\text{g}/10^6$ cells)

Table 3. Time Dependent Effect of CGHJT on Glutathione Production in HepG2 Cell

	Control	CGHJT Treated (hrs: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			
		12	24	48	72
Exp. 1	11.6	13.0	14.8	15.4	16.8
Exp. 2	12.4	13.6	14.2	15.8	17.4

Each value represents produced glutathione content ($\mu\text{g}/10^6$ cells)

Table 4. Dose Dependent Effect of CGHJT on GST Activity in HepG2 Cell

	Control	CGHJT Treated ($\mu\text{g}/\text{ml}$; 48hrs)			
		1	10	50	100
Exp. 1	77.4	80.6	92.4	102.6	118.2
Exp. 2	74.2	80.2	91.6	102.2	116.8

Each value represents nmole of DNP-SG/min per mg of protein

3. 淸肝解酒湯의 alcohol 유도성 세포사멸 억제작용과 glutathione 생성촉진작용과의 연관성

1) Ethanol에 의한 HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 영향

HepG2 cell을 1×10^5 cells/well로 배양하여 淸肝解酒湯을 각각 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 6시간 동안 전처리하고 다시 ethanol을 36시간동안 각각 1, 10, 50, 100mM의 농도로 처리한 후 trypan blue exclusion assay를 이용하여 apoptotic cell을 측정하여 apoptotic cells/total cells의 단위로 산출하였다. Ethanol의 농도가 증가할수록 apoptotic cell의 수가 증가되었으며 淸肝解酒湯의 처리농도가 증가될수록 apoptotic cell의 수는 감소되었다(Table 6).

2) Acetaldehyde에 의한 HepG2 cell의 apoptosis에 미치는 영향

HepG2 cell을 1×10^5 cells/well로 배양하여 淸肝解酒湯을 각각 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 6시간 동안 전처리하고 다시 acetaldehyde를 36시간동안 각각 10, 100, 200, 400 μM 의 농도로 처리한 후 trypan blue exclusion assay를 이용하여 apoptotic cell을 측정하여 apoptotic cells/total cells의 단위로 산출하였다. Acetaldehyde의 농도가 증가할수록 apoptotic cell의 수가 증가되었으며 淸肝解酒湯의 처리농도가 증가될수록 apoptotic cell의 수는 감소되었다(Table 7).

Table 5. Time Dependent Effect of CGHJT on GST Activity in HepG2 Cell

	Control	CGHJT Treated (hrs: 10 $\mu\text{g/ml}$)			
		12	24	48	72
Exp. 1	77.4	82.8	87.8	93.0	108.2
Exp. 2	74.2	81.2	87.2	92.2	106.4

Each value represents nmole of DNP-SG/min per mg of protein

Table 6. Inhibitory Effect of CGHJT on Ethanol-Induced HepG2 cell Apoptosis

CGHJT ($\mu\text{g/ml}$)	Ethanol (mM)				
	0	1	10	50	100
0	58/500	82/500	162/500	204/500	316/500
1	54/500	72/500	144/500	162/500	222/500
10	54/500	70/500	122/500	130/500	182/500
50	50/500	62/500	108/500	116/500	140/500
100	44/500	56/500	72/500	102/500	124/500

Each value represents apoptotic cells/total cells

Table 7. Inhibitory Effect of CGHJT on Acetaldehyde-Induced HepG2 Cell Apoptosis

CGHJT ($\mu\text{g/ml}$)	Acetaldehyde (μM)				
	0	10	100	200	400
0	52/500	94/500	174/500	226/500	348/500
1	56/500	92/500	140/500	168/500	248/500
10	50/500	88/500	120/500	132/500	176/500
50	48/500	74/500	104/500	116/500	144/500
100	50/500	62/500	76/500	90/500	120/500

Each value represents apoptotic cells/total cells

3) Glutathione생성에 미치는 BSO의 영향

HepG2 cell을 1×10^5 cells/well로 배양하여 glutathione 합성 저해제인 BSO를 0.5mM의 농도로 20시간동안 전처리하고 清肝解酒湯을 각각 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간동안 처리한 후 세포 상층액을 분리하고 reagent를 혼합한 후 400 nm에서의 흡광도를 측정하여 glutathione content를 $\mu\text{g}/10^6$ cells의 단위로 산출하였다. BSO를 처리한 군에서는 glutathione의 생성이 억제되는 것으로 나타났다. 清肝解酒湯 투여는 BSO 비처리군에서 뿐만 아니라 BSO 처리군에서도 모두 glutathione의 생성을 촉진하는 것으로 나타났으며 清肝解酒湯의 처리 농도가 증가함에 따라 glutathione content도 증가하였다(Table 8).

4) 清肝解酒湯의 ethanol-induced apoptosis 억제

작용과 glutathione 생성촉진과의 연관성 분석

HepG2 cell을 1×10^5 cells/well로 배양하여 glutathione 합성 저해제인 BSO를 0.5mM의 농도로 20시간동안 전처리한 후 ethanol을 50mM의 농도로 36시간동안 처리하고 清肝解酒湯을 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 trypan blue exclusion assay를 수행하였다. Ethanol을 처리하지 않은 군에서는 清肝解酒湯과 BSO의 처리 유무에 관계없이 apoptotic cell의

수에 큰 변화가 없었다. Ethanol 처리는 apoptosis를 증가시키는 것으로 나타났으며, 清肝解酒湯 투여는 apoptosis를 억제하는 것으로 나타났다. 清肝解酒湯과 BSO를 같이 투여한 군에서는 清肝解酒湯을 단독으로 투여한 군보다는 apoptotic cell의 수가 증가되었지만 대조군에 비해 감소되었다(Table 9).

5) 清肝解酒湯의 acetaldehyde-induced apoptosis 억제작용과 glutathione 생성촉진과의 연관성 분석

HepG2 cell을 1×10^5 cells/well로 배양하여 glutathione 합성 저해제인 BSO를 0.5mM의 농도로 20시간동안 전처리한 후 acetaldehyde를 50mM의 농도로 36시간동안 처리하고 清肝解酒湯을 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 trypan blue exclusion assay를 수행하였다. Acetaldehyde를 처리하지 않은 군에서는 清肝解酒湯과 BSO의 처리 유무에 관계없이 apoptotic cell의 수에 큰 변화가 없었다. Acetaldehyde 처리는 apoptosis를 증가시키는 것으로 나타났으며, 清肝解酒湯을 투여하였을 때 apoptosis cells의 수는 감소되었다. 清肝解酒湯과 BSO를 같이 처리한 군에서는 清肝解酒湯 단독처리군에서 보다는 apoptotic cell의 수가 증가되었지만 대조군에 비하여는 적은 것으로 나타났다(Table 10).

Table 8. Effect of CGHJT on Glutathione Production in HepG2 Cell Treated with BSO

	CGHJT Treated ($\mu\text{g/ml}$; 48 hrs)				
	0	1	10	50	100
BSO -	12.2	13.4	15.6	17.8	18.8
BSO +	3.6	3.2	4.6	6.4	8.0

Each value represents produced glutathione content ($\mu\text{g}/10^6$ cells)

Table 9. Inhibitory Effect of CGHJT on Ethanol-Induced HepG2 Cell Apoptosis with/without BSO

	Ethanol (50mM)					
	-			+		
	Control	CGHJT	CGHJT + BSO	Control	CGHJT	CGHJT + BSO
Exp.1	56/500	54/500	58/500	212/500	118/500	196/500
Exp.2	50/500	56/500	52/500	208/500	122/500	192/500

Each value represents apoptotic cells/total cells

Table 10. Inhibitory Effect of CGHJT on Acetaldehyde-Induced HepG2 cell Apoptosis with/without BSO

	Acetaldehyde (200 μ M)					
	-			+		
	Control	CGHJT	CGHJT + BSO	Control	CGHJT	CGHJT + BSO
Exp.1	56/500	58/500	50/500	234/500	120/500	208/500
Exp.2	52/500	54/500	52/500	228/500	114/500	204/500

Each value represents apoptotic cells/total cells

IV. 考 察

술은 「內經」¹⁶에서 熱穀之液으로 그 氣가 悍慄하며 淸하다 하였고, 李¹⁷는 大熱하되 그 質은 濕하다 하였으며, 朱¹⁸는 酒性喜升한다 하였다. 따라서 酒性은 大熱大毒하여 그 氣가 悍慄하고 質은 濕한 물질이라 할 수 있다.

韓醫學에서 飲酒過多로 인한 內傷을 酒傷이라 하며¹⁹ 이후 酒傷과 관련하여 酒疴²⁰, 酒風²¹, 酒癖²², 酒嗽¹⁹, 酒痰²³, 酒髓鼻¹⁹ 등의 症候로 다양하게 관찰하여 왔다.

알코올은 체내에서 90-98%가 대사되며 이중 90%가 肝臟에서 이루어지고 만성적 음주는 알코올성간염, 지방간, 알코올성 간경변 등의 간손상을 야기한다²⁴. 알코올의 대부분은 간세포에서 일정한 속도로 분해되어 acetaldehyde가 되는데, 알코올 분해 효소인 ADH(alcohol dehydrogenase)와 MEOS(microsomal ethanol oxidation system), catalase 등이 관여한다. 보통의 경우 ADH가 90% 정도를 담당하게 되며, catalase에 의한 대사는 거의 고려하지 않는다. 간세포의 알코올 분해 능력을 초과한 알코올을 섭취하면 NADH/NAD⁺비가 크게 증가하고 지방산 산화가 억제되어 지방이 축적되며 lactic acid 생성 증가, 요산 생성 증가, ketoacidosis, 당대사장애 등이 나타나게 된다. 또한 대사항진 상태가 유발되어 간내 저산소증 상태가 발생되고 특히 세정맥주위 저산소증(perivenular hypoxia)이 심하게 발생된다. ADH가 분해할 수 있는 양을 초과한 알코올 섭취 후에는 MEOS가 활성화되어 toxic free radical을 만들게 되고, 처리되지 못한 중간 대사산물인

acetaldehyde는 지방의 과산화(peroxidation) 촉진, 소정맥주위 공간에 교원질(collagen)형성의 증가와 미토콘드리아 호흡의 억제, 비타민B₆ 대사의 변화, 여러 간세포내 단백질과의 acetaldehyde protein adduct를 형성, 간의 심각한 기능 및 구조장애를 초래하게 되며, 또한 독소나 약제에 의한 간손상의 감수성이 증가하게 된다²⁵.

질병은 여러 가지 원인에서 복합적으로 오는 합병증의 형태가 많고 그 원인을 분명히 규명하기가 어려운 경우가 많다. 따라서 많은 학자들은 보다 근본적인 병의 원인을 찾아 이를 제거하기 위해 부단히 노력하고 있는데, 이러한 연구 중의 하나가 free radical이다. 동물체의 대부분은 생명현상을 유지하기 위해 많은 양의 산소를 생체 내에서 이용하게 된다. 이때 산소는 active oxygen이나 free radical의 형태로 작용하여 생체내의 불포화 지방산에 쉽게 과산화 반응을 일으킬 수 있고, 이렇게 생긴 과산화물은 직접 또는 간접적으로 조직세포에 손상을 주게 되어 세포의 기능을 저하시켜서 간장질환, 노화 및 각종 퇴행성 질환을 유발시키게 된다²⁶. 따라서 활성화된 산소를 제거하는 일은 여러 가지 질병을 예방할 뿐만 아니라 노화를 억제하고 지연시킬 것이라는 생각이 모아지고 있고 이를 밝히려는 시도가 활발히 행하여지고 있다²⁷.

생체내에는 이들 free radical을 제거하는 항산화 효소들이 존재하는데, H₂O₂를 제거하는 catalase, nucleus에 풍부하게 존재하는 glutathione(GSH), peroxide를 제거하는 glutathione peroxidase 등이 생체 내에서 oxidative stress에 대항하는 효소들이다. 1888년 프랑스의 De Rey-Pailbade는 효모나 동물조

직 내에 유향을 환원하는 물질을 발견하여 philotin 이라고 명명하였다. 그 물질은 약 30년 후 1921년 Hopkin, 1929년 Kendall 등에 의하여 결정이 분리되었고, Hunter는 이것을 인체의 혈중에서 증명하였다. 그리고 1935년 Harington, Mead 등에 의하여 그 구조가 γ -L-glutamyl-L-cysteinyl glycine으로 판명되었고, 1949년 Block은 이것을 in vitro로서 생합성에 성공하였다. 이것은 cystein, glutamic acid, glycine으로 되어 있는 tripeptide이며 동물의 여러 조직 중에 존재하며 산화형과 환원형이 있으며 조직 중에서는 주로 환원형으로서 혈액 중 특히 적혈구 내에 대부분 존재하고 있다. 이 물질의 일반명은 glutathione이며 생물학적 작용은 그 분자 중 cystein의 SH기에 의한다고 하며 체내에 있어서 산화, 환원, 해독작용, SH효소의 부활, 혈액색소의 산소결합에 중요한 역할을 하며 단백질대사에도 영향을 미치는 등 많은 작용이 증명되어 있다. 특히 간에는 대량 포함되어 있어서 그 합성과 필요 장기로서 큰 의의를 갖고 있다.

Glutathione은 각종질환 특히 간질환에 있어서 혈중 및 간장내의 함량이 감소된다고 지적되어 있다^{13,14}. 간장애에 대한 glutathione의 효과는 ethionin에 의한 급성 간장애에 있어서 glutathione은 간세포내 glycogen 감소나 지방침착 등을 어느 정도 저지시킨다는 것²⁸ 등이 보고되어 있다. 더욱 glutathione의 활성 SH기에 의한 생체내의 산화환원계 관련 각종 SH계 효소의 활성보호 특히 Co-enzyme A라든지 Vitamin C의 산화에 의한 비활성화방지 그리고 γ -glutamyl기를 거쳐서 단백질대사에 관여하는 등 역할이 많다. 이러한 반응의 대부분은 간에서 생기는 것이며 간장애가 있는 경우에는 혈중 glutathione량의 저하를 나타낸다.

淸肝解酒湯은 酒傷에 대표적으로 활용되는 對金飮子에 砂仁을 넣고 茵陳四苓散을 합방하여 葛根赤楊을 加味한 처방이다. 淸肝解酒湯에 대한 연구로 郭⁹은 淸肝解酒湯이 알코올 대사과정에서 acetaldehyde의 생성을 억제하고 알코올에 의해 저하된 간기능을 회복시키는 작용이 있음을 보고하였

고, 李¹⁰는 알코올성 지방간 환자에 있어 淸肝解酒湯 투여 후 혈청 AST, ALT, GGT, TG가 통계적으로 유의한 감소와 임상증상의 개선효과가 있음을 보고한 바 있으며, 金 등¹¹은 淸肝解酒湯은 에탄올과 아세트알데히드에 의해 유발된 HepG2 cell의 감소된 세포활성과 세포증식을 증가시키고, apoptosis를 감소시키며, TNF- α , IL-1 β 의 발현을 감소시켜 간세포를 보호하는 효과가 있음을 보고하였으며, 金 등¹²이 淸肝解酒湯은 ethanol과 acetaldehyde에 의해 저하된 간세포의 활성을 높이고 alcohol 유도성 apoptosis를 억제하는 간보호 작용이 있음을 확인하였다.

淸肝解酒湯의 약물 중 對金飮子は 濕毒을 다스릴 뿐 아니라 濕熱과 痰飲을 제거하는데 平胃散에서 蒼朮을 減量하고 宣通疎利하며 和平한 陳皮를 倍加하여 酒積이나 酒痰을 自消하게 한 것이다²⁹. 金³⁰과 柳³¹는 알코올로 인한 酒傷病에 加味對金飮子가 肝機能회복에 유의성이 있음을 보고하였다.

淸肝解酒湯 구성 중 茵陳四苓散은 淸熱利濕의 대표방인 茵陳五苓散에서 溫補虛寒하는 肉桂를 뺀 처방으로, 利小便하는 五苓散에 黃疸의 要藥인 茵陳을 더하여 역대 의가들에 의해 濕熱黃疸에 많이 쓰였으며³² 현재 여러 간질환에 기본처방으로 활용되고 있다. 茵陳四苓散과 관련된 연구로는 禹³³가 茵陳五苓散과 茵陳을 증량한 構成方이 흰쥐 損傷肝에 미치는 영향을 보고하였고, 李³⁴는 간보호작용과 이담작용 및 지질강화작용 등의 효능이 있음을 보고하였다. 朴³⁵은 알코올로 유발된 흰쥐의 간손상으로 인한 지질대사, 당질대사, 단백질대사의 이상으로 인한 혈청 중 triglyceride, glucose, BUN 함량의 증가에 대해 모두 유의한 억제효과가 있음을 보고하였으며 表³⁶와 金³⁷은 茵陳五苓散이 흰쥐의 간손상에 보호와 회복작용이 있음을 보고하였다. 表³⁸는 茵陳四苓散이 HepG2 cell에서 간세포 활성을 높이고 세포주기에서 세포증식을 증가시키며 Cpp32 protease 활성도를 감소시키고 Fas, Cpp32를 억제하고 Bcl-2, Bcl-XL을 촉진하는 gene regulation을 통하여 apoptosis를 억제한다고 하였으며, 高³⁹는 茵陳

四苓散의 각 분획물 중 butanol 분획에서 뚜렷한 반응을 나타내어 HepG2 cell에서 간세포활성을 높이고 Fas-mediated apoptosis에 관여하는 유전자 조절 및 세포손상을 억제한다고 보고하였다.

본 연구에서는 淸肝解酒湯이 glutathione 생성을 통해 ethanol 및 acetaldehyde에 의해 유도되는 apoptosis를 억제하고 간세포를 보호하는 작용을 관찰하고자 HepG2 cell 내에 glutathione양을 colorimetric glutathione assay kit를 이용하여 분석하였다. 淸肝解酒湯을 투여한 실험군에서 대조군에 비해 glutathione의 양의 증가를 관찰할 수 있었고, 특히 淸肝解酒湯의 처리농도 증가에 따라 glutathione양이 증가하였고(Table 2), 淸肝解酒湯의 처리시간에 따른 glutathione양도 증가되어(Table 3) 淸肝解酒湯이 HepG2 cell내에 glutathione의 생성을 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다.

다음으로 GST(Glutathione S-transferase)의 활성도를 관찰하고자 37°C에서의 glutathione-conjugated CDNB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene)의 형성 정도를 spectrometry로 조사하였다. 대조군에 비해 淸肝解酒湯을 투여한 군에서 GST 활성도의 증가가 관찰되었고, 특히 淸肝解酒湯의 투여농도가 높을수록 GST 활성도도 증가되었으며(Table 4), 淸肝解酒湯의 처리시간에 따라서도 GST 활성도가 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Table 5).

이러한 淸肝解酒湯의 glutathione 생성 촉진과 GST 활성도의 증가 효과를 바탕으로 ethanol과 acetaldehyde의 처리로 유발되는 HepG2 cell의 apoptosis에 대한 淸肝解酒湯의 효능을 관찰하고자 trypan blue exclusion assay를 시행하였다. Ethanol과 acetaldehyde는 농도의존적으로 HepG2 cell의 apoptosis를 증가시키는 것으로 관찰되었으며, 淸肝解酒湯은 ethanol과 acetaldehyde로 유발된 apoptosis를 억제하여 간세포를 보호하는 효능이 있고, 淸肝解酒湯의 투여농도의 증가에 따라 HepG2 cell의 apoptotic cell의 수가 감소되었다.(Table 6,7).

Glutathione 합성 저해제인 BSO는 HepG2 cell의 glutathione 합성을 현저히 저해하는 것으로 나타났

으며, 이 경우에도 淸肝解酒湯은 농도 의존적인 glutathione 합성 증가 작용을 보였다(Table 8). HepG2 cell에 ethanol을 처리하였을 때 apoptosis가 증가하고, glutathione 합성을 촉진하는 淸肝解酒湯 투여는 apoptosis를 억제해 주지만 glutathione 합성 저해제인 BSO를 같이 처리하였을 때에는 덜 효과적인 것으로 나타났다(Table 9). HepG2 cell에 acetaldehyde를 처리하였을 때에도 ethanol을 처리하였을 때와 비슷한 결과를 보였다(Table 10).

茵陳四苓散이 HepG2 cell에서 간세포 활성을 높이고 세포주기에서 세포증식을 증가시키며 Cpp32 protease 활성도를 감소시키고 Fas, Cpp32를 억제하고 Bcl-2, Bcl-XL을 촉진하는 gene regulation을 통하여 apoptosis를 억제한다는 연구 결과에 기초할 때³⁸, 淸肝解酒湯은 이러한 유전자 발현과 관련한 효과로 apoptosis를 억제하는 것 외에 cell 수준에서 glutathione 생성 및 GST 활성을 증가시켜서 간세포를 보호하는 효능도 가지고 있음을 알 수 있었으며, 향후 이와 관련된 연구가 좀더 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 glutathione 이외의 apoptosis 억제물질의 생성과 활성도 증가에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

淸肝解酒湯이 glutathione 생성과 GST 활성 증가와 관련하여 ethanol 및 acetaldehyde에 의해 유도되는 apoptosis를 억제하여 간세포를 보호하는 작용을 알아보기 위하여, HepG2 cell 내에 glutathione 양, GST의 활성도 및 apoptotic cell의 수를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 淸肝解酒湯은 glutathione 생성을 처리 농도 및 시간에 의존적으로 증가시켰다.
2. 淸肝解酒湯은 GST 활성을 처리 농도 및 시간에 의존적으로 증가시켰다.
3. 淸肝解酒湯은 ethanol 및 acetaldehyde에 의하여 유발되는 apoptosis를 처리농도에 의존적으로 억제하였다.

4. Glutathione 합성 억제제인 BSO를 처리한 경우에서는 glutathione의 생성이 억제되었으며, 淸肝解酒湯 투여는 BSO 비처리군과 BSO 처리군 모두 glutathione의 생성을 촉진하였다. 또한 淸肝解酒湯의 처리농도가 증가함에 따라 glutathione contents도 증가하였다.
 5. Ethanol 및 acetaldehyde 처리는 apoptosis를 증가시켰으며, 淸肝解酒湯 투여는 apoptosis를 억제하는 것으로 나타났다. 淸肝解酒湯과 BSO를 같이 투여한 군에서도 대조군에 비해 apoptotic cell의 수가 감소되었다.
- 이상에서 淸肝解酒湯은 glutathione의 생성을 촉진하고 GST 활성을 증가시키며, apoptosis를 억제함으로써 간세포를 보호하고 alcohol성 간손상을 차단하는 것으로 추론된다.

參考文獻

1. 통계청. 2001 한국의 사회지표. 2002, pp.254-256, 294-297, 300, 301, 303.
2. 통계청. 2001 사망원인 통계연보. 2002, pp.7-13, 20-32.
3. 지선하, 서일, 김일순. 한국인 간질환의 변천. 서울: 한국간협회; 1998, pp.25-26, 66, 93.
4. 洪元植 校合. 精校黃帝內經靈樞. 서울: 東洋醫學研究院; 1985, p.233.
5. 洪元植 校合. 精校黃帝內經素問. 서울: 東洋醫學研究院; 1985, p.17, 169.
6. 張仲景. 金匱要略. 서울: 杏林書院; 1978, pp.74-76, 119-120, 392-394, 438.
7. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 北京: 人民衛生出版社; 1983, pp.395-397, 598, 619-620, 750-753, 768-769.
8. 전국 한의과대학 간계내과학 교수 공저. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원 출판부; 2001, p.95, pp.118-124, 223, 262, 304-314, 830-843.
9. 광미애, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올대사 및 손상간에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21(1):68-76.
10. 이장훈, 박신명, 김영철, 우홍정. 淸肝解酒湯이 알코올성 지방간에 미치는 영향에 대한 임상적 연구. 대한한의학회지. 2001;22(4):107-113.
11. 김병삼, 김영철, 이장훈, 우홍정. 淸肝解酒湯이 에탄올 매개성 cytokine 발현에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2003;24(1):190-201.
12. 김영태, 김영철, 이장훈, 우홍정. 청간해주탕이 alcohol 대사관련 유전자 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2003;24(1):123-133.
13. Bhattacharya SK, Robson JS, Stewart CP. Biochem. J. 1955;60:696.
14. Barnes MM, James SP, Wood PB. Biochem. J. 1959;71:680.
15. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인텍스사; 1998, p.638.
16. 王氷注. 황제내경소문. 서울: 고문사; 1972, p.141, 349.
17. 李用粹. 證治彙補. 臺北: 旋風出版社; 1965, pp.102-105.
18. 朱震亨. 格致餘論(東垣十種醫書中). 서울: 大星出版社; 1983, p.491.
19. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂; 1989, p.131, pp.239-240, 431-432, 473, 492, 512.
20. 張仲景. 金匱要略. 서울: 成輔社; 1985, p.74-76.
21. 徐靈胎. 徐靈胎 醫書全集. 臺北: 五洲出版社; 1981, p.69.
22. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北: 旋風出版社; 1975, pp.98-99.
23. 康命吉. 濟衆新編. 서울: 杏林書院; 1975, p.41, 85, 175.
24. 全國韓醫科大學 肝系內科學教授共著. 肝系內科學. 서울: 東洋醫院研究院出版部; 1987, pp.230-231, 598-611.
25. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 최신지견내과학II. 서울: 군자출판사; 1998, pp.18-27.
26. Demopoulos HB. The basis of free radical pathology. Fed: Proc; 1973;32:1859-1861.

27. McCord JM, Fridovich K. Superoxide dismutase; An enzymatic function for erythrocyte(hemocuprein). J. Biol. Chem. 1969;224:6049-6055.
28. Hayano K, Fumio I, Yamamurd Y. J. Biochem. 1965;59:34.
29. 윤길영. 동의임상방제학. 서울: 명보출판사; 1985, pp.65, 187.
30. 김영철, 우홍정, 김병운. 加味對金飲子の 효능에 대한 실험적 연구. 경희한의대논문집. 1993;16: 7-29.
31. 류기원, 구본홍. 酒傷病에 응용되는 加味對金飲子가 Ethanol로 인한 白鼠의 간손상에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1980;3(3):1-14.
32. 虞博. 醫學正傳. 서울: 醫藥社; 1972, p.544.
33. 우홍정. 茵陳五苓散과 茵陳증량한 구성방이 흰 쥐 손상간에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1994;13(1):234-241.
34. 이장훈. 간질환치료제의 효능에 관한 실험적 연구. 제2회 韓·中 학술대회 참가논문집 -간장편 -. 대한한의사협회. 1995, pp.123-163.
35. 박형규, 김동우, 이장훈, 우홍정, 김병운. 茵陳四苓散이 급성 Alcohol, 고지혈증 및 Galactosamine중독 白鼠의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1993;14(2):254-269.
36. 표임정, 이장훈, 우홍정, 김병운. 인진오령산이 흰쥐의 간손상에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1995;16(2):281-298.
37. 김우환. 인진오령산의 백서 간병변에 대한 보호 및 회복작용. 원광대학교 대학원. 1988.
38. 표임정, 이장훈, 우홍정. 인진사령산이 간세포활성, 세포주기 및 FAS-mediated Apoptosis에 미치는 영향. 경희대의대논문집. 1999;22(1): 119-140.
39. 고홍, 이장훈, 우홍정. 인진사령산분획물이 간세포활성, 세포주기 및 FAS-mediated Apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2000;21(3): 174-185.