

八物君子湯이 Cytochrome P450 酵素 활성에 미치는 영향

류정만 · 박성식

동국대학교 분당한방병원 사상체질과

Abstract

The Effects of Palmulgunja-tang(八物君子湯) Enzyme Activity on Cytochrome P450 Isozyme

Ryu Jung-Man, Park Seong-sik

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk Univ.

1. Objectives

The purpose of this study was to investigate the effects of the enzyme activity of Palmulgunja-tang with administered orally solution on cytochrome P450 isozyme

2. Methods

This study was carried on through following methods.

We treated the rat with the β -naphthoflavone (β NF) of 80mg/kg for 3 days i.p injection. Firstable, microsomal protein was separated and total intracellular protein test was done. Then GOT and GPT were measured and assay of cytochrome P450 1A1/2 enzyme activity was performed according to the method of EROD and MROD. (Ethoxyresorufin-O-deethylase(EROD) activity was used to measure cytochrome P450 1A1 activity and methoxyresorufin O-demethylase(MROD) activity was used to measure cytochrome P450 1A2 activity.)

3. Results and Conclusions

- 1) PGT recovered the liver damage on β NF inducible CYP 1A1/2 by pre-post and high-low condition.
- 2) At concentration of post-treated 50mg/kg of PGT, the inhibiting of β NF metabolites to liver of rat cytochrome P450 1A1 was inhibited by 53.0% respectively.
- 3) PGT showed 36.0% inhibition of β NF-induced 1A2 activity at the concentration post-treated 50mg/kg.

Key Words : Palmulgunja-tang, Cytochrome P450 isozyme, Enzyme activity

I. 序 論

八物君子湯은 李濟馬의 『東醫壽世保元』에 처음 수록된 처방으로 少陰人이 腎受熱表熱病으로 表陽이 上升하지 못하고 鬱滯되어 형성된 腎陽困熱로 인하여 氣運이 원활하게 소통되지 못하는 상황에 사용되는 처방으로 少陰人에서 나타나는 中風, 鬱狂證, 陽明病胃家實證, 虛勞 등 여러 가지 병증

에 아주 폭넓게 응용되는 處方이다.

통계청이 발표한 韓國人の 주요 死亡率 변동 추이를 보면 지난 10년 이상 癌에 의한 死亡率은 꾸준히 증가하여 가장 위험한 死因으로 분류되고 있다.

Cytochrome P450(CYP) 酵素系는 대부분이 肝臟內的 실질세포인 肝細胞의 endoplasmicreticulum에 존재하며^{2,3} 상황에 따라 化學物質을 대사시켜 보다 쉽게 體外로 배출하는 역할을 하고, 대부분 外部의 發癌物質을 cytochrome p-450-dependent mono-oxygenase system에 의해 대사시켜 電子親和的 성격을 가진 物質로 만들어 細胞內的 단백질 및 核酸들과 결합하여 毒性和 發癌性, 돌연변이원으로 作

• 접수일 2005년 6월 23일; 승인일 2005년 8월 12일
• 교신저자: 박성식
463-020 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2
동국대학교 분당한방병원 사상체질과
TEL : +82-31-710-3723, FAX : +82-31-710-3780
E-mail : parkss@dongguk.edu

用한다고 알려져 있다^{4,5}.

八物君子湯에 대한 연구로는 폭넓은 임상응용에도 불구하고, 自律神經機能에 미치는 영향에 대한 연구⁶와 陽虛證에 미치는 研究⁷ 등이 進行되었을 뿐, 毒性學的 해석이나 CYP 酵素係에 관한 보고가 미흡한 실정이다.

이에 저자는 흰쥐에 CYP 1A1/2 유도물질로 잘 알려진 β -naphthoflavone (β NF)을 前처리 혹은 後처리한 다음 八物君子湯을 농도별로 음용하게 하고, 해부학적인 肝의 변화와 GOT, GPT 측정치에 대하여 살펴보았다. 또한 CYP 1A1/2 효소를 강제 유도한 후에 八物君子湯이 이를 억제하는 활성 정도를 검정하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 藥材

본 실험에서 사용한 八物君子湯 (Palmulgunja-Tang, PGT)은 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다(Scheme 1). 처방의 용량과 구성은 다음과 같이 하였다.

2. 試料調製

八物君子湯 41.25g에 증류수 400ml을 가한 뒤 한류냉각관이 부착된 전탕기 (heating mantle, HMI-F300, hana INS.)에서 3시간 끓이고 여과한 후 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상

Scheme 1. Composition of PGT

藥材	Medicinal herb name	Dose amount(g)
人蔘	Ginseng Radix(<i>Panax ginseng</i>)	7.5
黃芪	Astragali Radix(<i>Astragalus membranaceus</i>)	3.75
白朮	Atractylis Rhizoma(<i>Atractylodes japonica</i>)	3.75
白芍藥	Paeoniae Radix(<i>Paeonia japonica</i>)	3.75
當歸	Angelicae gigantis Radix(<i>Angelica gigas</i>)	3.75
川芎	Cnidii Rhizoma(<i>Cnidium officinale</i>)	3.75
陳皮	Aurantii nobilis Radix(<i>Citrus nobilis</i>)	3.75
炙甘草	Glycyrrhizae Radix (<i>Glycyrrhiza uralensis</i>)	3.75
生薑	Zingiberis Rhizoma (<i>Zingiber officinale</i>)	3.75
大棗	Zyphi inermis Fructus (<i>Zizyphus jujuba</i>)	3.75
Total amounts		41.25

층 액을 rotary evaporator(EYELA N-1000, Japan)에서 70°C에서 30분 동안 감압 농축하여 pH7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 μ m, Whatman, Germany)로 여과하였다. 여과된 八物君子湯의 건조중량을 측정하기 위하여 freezer dryer (LABCONCO 77530, USA)에서 완전 건조시킨 후 (회수율 : 30%) 각 실험 조건의 농도에 알맞게 정수된 음용수에 희석시켜 실험에 사용하였다(Scheme 2).

3. 試藥

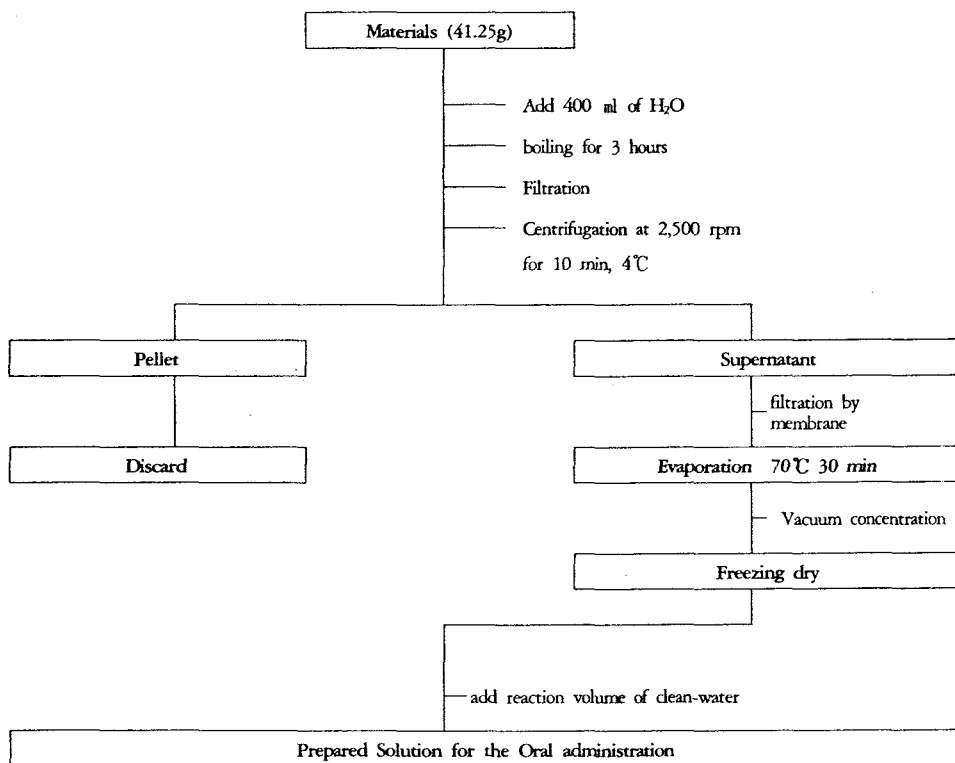
Ethyl alcohol anhydrous, Methyl alcohol anhydrous는 Merck사 (Merck GaA, Germany), glutamate oxaloacetate transaminase(GOT) 및 glutamate pyruvate transaminase(GPT) 측정용 kit는 아산제약(Korea), NaCl, KCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaH₂PO₄, Tris-HCl, bovine serum albumin(BSA), β -naphthoflavone(β NF), glucose-6-phosphate, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP+), yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase, dicoumarol, potassium phosphate, KH₂PO₄, Na-phosphate, Na-EDTA, ethoxyresorufin(EROD), methoxyresorufin(MROD), resorufin standard, bicinchoninic acid protein kit, resveratrol, flavone 은 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였고, KOH, HCl, CaCl₂ · H₂O, MgSO₄ · 7H₂O는 Junsei사(Junsei chemical Co., Japan)의 특급 시약을 사용하였다.

4. 實驗動物 및 處理

체중 140±20g의 웅성 Sprague Dawley계 흰쥐를 실험 시작 전 1주일간 동물사육 항온습습기 (LS-2105, LS TECH, Korea)에서 일정한 조건 (온도: 24±2°C, 습도 : 60%)에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

실험군은 정상군, 대조군, 저농도 前처리군, 고농도 前처리군, 저농도 後처리군, 고농도 後처리군으로 나누었으며, 각 군당 6마리를 사용하였다. 정상군은 고행사료와 정수된 음용수를 제한 없이 공급하였으며, 대조군은 실험 전 3일간 80mg/kg body weight/day β -naphthoflavone (β NF)을 corn oil에 희석하여 복강 주사하여 CYP 1A1/2 효소계 유도를 하였다. 八物君子湯 前처리군은 저농도 50mg/kg body weight/day을 정수된 음용수에 녹여 4일간, 그리고

Scheme 2. Preparation of the PGT Water Extracted Solution



고농도 前처리군은 200mg/kg body weight/day을 음용수에 녹여 4일간 고품 사료와 함께 자유롭게 먹게 하였다.

그리고 80mg/kg body weight/day βNF을 corn oil에 희석하여 3일간 복강 주사하였다. 八物君子湯 後 처리군은 먼저 3일간 80mg/kg body weight/day βNF을 corn oil에 희석하여 3일간 복강 주사하고 八物君子湯을 저농도 50mg/kg body weight/day와 고농도 200mg/kg body weight/day을 음용수에 녹여 4일간 고품 사료와 함께 자유롭게 먹게 하였다. 이들은 각각 24 시간 후에 GOT, GPT 측정을 위하여 심장에서 혈액을 취하고, 경추탈골을 하여 쥐를 처치한 후 肝을 적출하였다.

5. Microsomal protein의 分離

적출된 흰쥐의 肝組織에 1.15% KCl 완충용액을 이용하여 perfusion하여 組織 중 혈액을 제거하고,

여러 번 세척 후, 흡습지로 수분을 완전히 제거시켰다. 수분이 제거된 肝은 마쇄(099C-K44, Glas-Col, U. S. A.)한 후, 1.15% KCl 완충용액을 첨가하여 마쇄 액을 만들었다. 이 마쇄 균질액을 7,000×g에서 10분간 원심분리한 후, 침전물을 제외한 상층 액을 다시 0.1M CaCl₂ in 0.25M sucrose에 적당한 용량으로 희석시키고 77,000×g에서 60분간 초원심분리하였다. 여기에서 형성된 침전물을 0.05 M Tris-HCl buffer (pH7.5)에 재현탁하여 microsome 분획으로 실험에 사용하였다. 이상의 모든 과정은 4°C에서 실시하였다.

6. 細胞內 總蛋白質 檢量

細胞內 總蛋白質은 bicinchoninic acid protein kit를 사용하여 BSA를 표준 단백질 용액으로 이용한 표준 검량 선을 구하고 각 실험군의 단백질 양을 산출하였다. 정량된 분획은 일정량씩 나누어 실험

에 사용할 때까지 -70°C deep freezer에서 냉동 보관하였다.

7. 解剖學的 觀察

처치가 완료된 실험 군에 대하여 肝을 적출하는 과정에서 각각의 실험군의 肝損傷 정도의 유의성을 검증하기 위하여 광학 카메라(Canon digital IXUS II, 320 mega pixels, Japan)를 이용하여 촬영하였다.

8. GOT, GPT 測定

각 군에서 분리한 혈청 중의 GOT, GPT활성 측정은 일반적으로 널리 알려진 Reitman-Frankel방법⁸으로 시행하였다. 즉 GOT와 GPT 기질 액 1.0ml을 시험관에 가하여 37°C 온 육조(SM01, JEIO Tech. Korea)에서 5분간 방치한 다음 준비된 각 군의 혈청을 0.2ml씩 넣어 잘 혼합시킨 후 GOT는 60분간, GPT는 30분간 반응시켰다. 그리고 정색 시액 (2,4 dinitrophenylhydrogen) 1.0ml을 넣어 20분간 실온에서 방치시키고, 0.4 N NaOH를 10ml을 가하여 실온에서 방치한 후 60분 이내에 흡광도 505 nm에서 GOT, GPT 함량을 측정(UV/VIS spectrophotometer, OPTIZEN II, Korea)하였다. 검량 곡선은 측정 kit에 포함되어 있는 표준곡선용 시액을 사용하여 산출하였으며, GOT와 GPT의 단위는 혈청 1ml 당 karmen으로 나타내었다.

9. Cytochrome P450 1A1/2 酵素系 活性的 測定

Cytochrome P450 1A1은 ethoxyresorufin-O deethylase(EROD)활성으로 측정하였고, cytochrome P450 1A2의 활성은 methoxyresorufin O-demethylase(MROD)활성²⁵을 이용하여 측정하였다. 즉 각 군의 흰쥐의 肝으로부터 분리한 microsomal protein (1.0mg/ml) 200µl에 640µl의 0.05M Tris-HCl buffer (ph7.5), 100µl의 BSA (10mg/ml in Tris-HCl buffer), 20µl의 0.25M MgCl₂, 40µl의 cofactor solution (NADP+and glucose-6-phosphate in KCl buffer), 2.5unit의 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 10µl의 substrate(1mg of ethoxyresorufin in 10ml of methanol and 1mg of methoxyresorufin in 10ml of methanol)를 첨가하였다. 그리고 모든 시약들을 잘 섞은 후 37°C에서 4분간 반응시키고, 2ml의 methanol로 반응을 종결시켰다. 2,000×g

에서 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 취하고, 형광분광광도계(BIO-TEK SFM25, USA)로 측정 (550nm excitation and 585nm emission) 하였다. 이상 CYP 1A1의 양성 대조군으로는 2nmol 농도의 resveratrol을 사용하였고, CYP 1A2의 경우에는 1nmol flavone를 사용하였다. 각각의 결과는 대조군에 대한 각 八物君子湯 前·後 처리군의 저해도 정도를 백분율로 나타내었다. 그리고 각각의 억제 정도를 pmol resorufin/min/mg protin.으로 환산하여 표시 하였다.

10. 統計 處理

實驗 結果에 대한 統計的 處理 및 유의성 분석은 통계 처리 프로그램인 Sigma plot (SigmaPlot 8.0 Demo version, OS Window XP)을 이용하여 student's t-test를 하였으며, 평균값과 오차 (means ± SD)로 나타내었다. 그리고 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 結果

1. 解剖學的 觀察

각 실험군의 흰쥐에게 80mg/kg body weight/day의 βNF을 복강주사하고, 이를 개복하여 육안으로 살펴본 결과, 정수된 음용수와 고형사료만을 처리한 정상군의 肝 (Fig. 1A)은 짙은 紅色을 띠고 있었으며, 肝組織의 형태가 분명하고 표면의 상태도 균질하게 보였다. 그러나 八物君子湯의 前 혹은 後 처리 없이 βNF 만을 복강주사한 대조군의 경우 (Fig. 1B)에는 肝의 체적 변화는 크게 관찰되지 않았으나, 組織 주변으로 지방 덩어리 등이 체적 되는 것이 관찰 되었으며 肝의 색깔도 희석이 되었다. 八物君子湯을 前처리한 경우에는 저농도(50mg/kg/day, Fig. 1C)와 고농도(200mg/kg/day, Fig. 1D) 모두 그림에서 보는 것과 같이 육안으로 관찰한 肝組織의 변화 정도가 정상에 가깝게 보였으며 역시 肝의 체적에 변화는 크게 없어 보였다. βNF를 먼저 복강주사하고 八物君子湯을 각각의 농도별로 後처리한 경우에는 肝의 표면이 비교적 정상적으로 관찰 (Fig. 1E, F)되었으며, 단순히 βNF에 의한 肝損傷의 정도는 모든 실험 군에서 현격한 차이를 나타내지는 않았다.

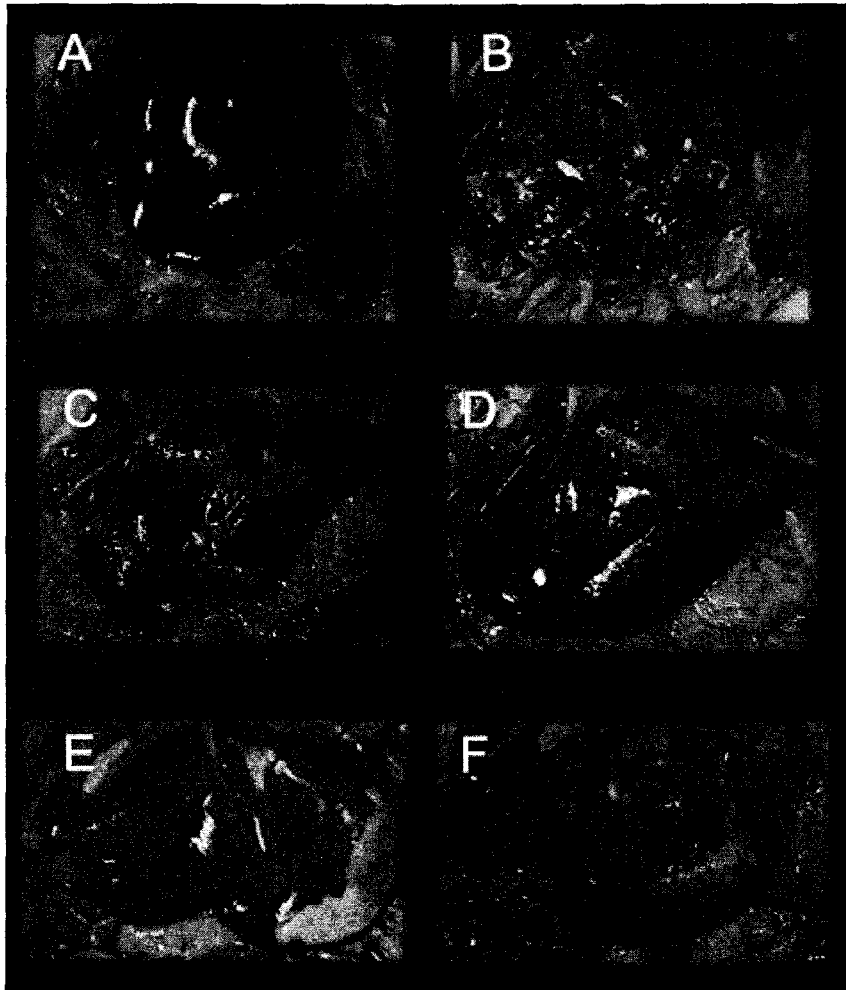


Fig 1. Light Observation of Rat Liver Tissues. All tissues were observed with 320 mega pixel digital camera.

(A) Photograph showed a normal condition taken from rat liver. (B) Photograph of a tissues taken from the liver of rat treated with only β NF. (C) Photograph of a tissues taken from the liver of rat pre-treated with 50mg/kg PGT. (D) Photograph of a tissues taken from the liver of rat pre-treated with 200mg/kg PGT. (E) Photograph of a tissues taken from the liver of rat post-treated with 50mg/kg PGT. (F) Photograph of a tissues taken from the liver of rat post-treated with 200mg/kg PGT.

2. GOT 및 GPT 活性의 變化

혈청 중 GOT 및 GPT의 활성 변화에 미치는 八物君子湯의 영향을 살펴본 결과 정상군의 경우 GOT 수치가 39.6 ± 0.9 karmen/ml로 나타났고, GPT 수치가 22.78 ± 5.1 로 나타났다. 대조군의 경우에는 GOT와 GPT 수치가 각각 32.9 ± 1.8 과 9.1 ± 3.0 으로

나타났으며, 모든 실험 군에서 GOT의 경우에는 後 처리군 저 농도 (50mg/kg/day)에서 나타난 28.4 karmen/ml을 제외하고 정상치 기준인 8~40 karmen/ml 단위 범위에서 GOT 활성의 현격한 변화는 관찰되지 않았다. 또한 GPT의 경우에도 모든 군에서 정상치의 범위인 5~35 karmen/ml에 모두 속하였다.

그러므로 단순히 β NF를 처리하였을 때 유발되는 심각한 독성의 정도는 관찰되지 않았고, 八物君子湯 역시 GOT 및 GPT의 활성을 농도 의존적으로 억제하거나 유도하지는 않았다.

3. Cytochrome P450 1A1/2 酵素系 活性 測定

1) Cytochrome P450 1A1의 활성 측정

八物君子湯을 처리한 각 군의 cytochrome P450 1A2 활성에 미치는 효과를 측정한 결과 양성 대조군인 2nmol resveratrol이 대조군에 비하여 11%의 억제 효과를 나타내었다. 그리고 八物君子湯 前처리군에서는 각각의 저 농도 및 고농도에서 8%와 16%의 저해 효과를 관찰할 수 있었다. 특히 八物君子湯 後처리군에서 실험동물인 흰쥐의 무게당 50mg/day의 약물을 응용시킨 결과에서 53%의 저해 효과를 관찰할 수 있었으며, 고농도에서도 19%의 억제가 보였다(Fig. 2). 이를 분(分)당 생성되는 picomol resotufin으로 환산하였을 경우 대조군 생성(179 pmol/min/mg protein)에 비하여 저농도 後처리군(83pmol/min/mg protein)이 현저한 저하를 나타내었다(Table 2).

2) Cytochrome P450 1A2의 활성 측정

八物君子湯으로 cytochrome P450 1A계열 2의 활성에 미치는 영향을 측정하여 본 결과 양성대조군인 1nmol flavone은 37%의 1A2 효소 활성 억제를 시

Table 1. The Effects of PGT on Serum GOT and GPT Levels Induced by β NF

Groups	GOT activity(karmen/ml)	GPT activity(karmen/ml)
A	39.6 ± 1	22.8 ± 5
B	32.9 ± 2	9.1 ± 3
C	38.4 ± 1	12.3 ± 2
D	34.4 ± 2	6.0 ± 0
E	28.4 ± 3	16.9 ± 2
F	31.9 ± 2	19.0 ± 2

Each groups were treated with 1 ml/kg of corn oil (A), 80 mg/kg of β NF for 3 days (B), 80mg/kg of β NF injected by *i.p* before (pre-treated) oral surfer of 50mg/kg PGT (C), pre-treated oral surfer of 200mg/kg PGT for 4 days (D), 80 mg/kg of β NF injected by *i.p* after (post-treated) oral surfer of 50mg/kg PGT (E) and post-treated oral surfer of 200 mg/kg PGT for 4 days (F). All data are represent means ± SD. Numbers in parentheses indicate a karmen of induction.

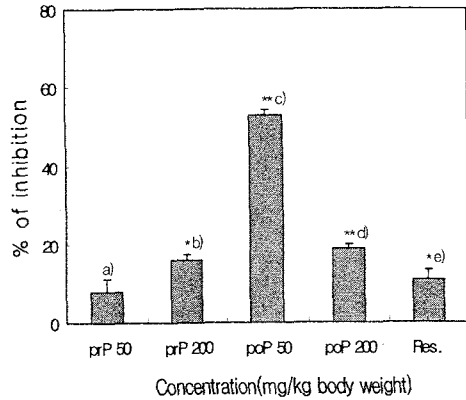


Fig 2. Effect of PGT on cytochrome P450 1A1 activity. Values represent mean±SD (n=3, n은 실험 횟수). * : p<0.05, ** : p<0.01 as compared to control.

Table 2. Inhibition of β -naphthoflavon Induced Rat Liver Microsomal Cytochrome P450 1A1-Dependent Ethoxyresorufin O-dedthylase (EROD) Activity by PGT from Concentration of Water Extracted Solution

Groups	EROD activity(pmol resorufin min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
Normal	10 ± 0.3
Control	179 ± 5
prP 50 a	164 ± 8
prP 200 b	150 ± 3
poP 50 c	83 ± 3
poP 200 d	145 ± 2
Res.e	170 ± 2

^a80mg/kg of β NF injected by *i.p* before(pre-treated) oral surfer of 50mg/kg PGT.

^bpre-treated oral surfer of 200mg/kg PGT for 4 days.

^c80mg/kg of β NF injected by *i.p* after(post-treated) oral surfer of 50mg/kg PGT.

^dpost-treated oral surfer of 200mg/kg PGT for 4 days.

^eRes. means 2 noml resveratrol from grapes.

켰으나, 각 실험군에서는 저농도 後처리군 만이 양성대조군과 비슷한 36%의 억제 효과를 나타내었고(Fig. 3), 다른 실험군에서는 유의성 있는 억제를 관찰할 수 없었다(Table 3).

IV. 考 察

최근 自然親和的인 韓方治療法이 각광 받으면서 韓藥材 선별 및 本草에 根據한 處方의 비중이

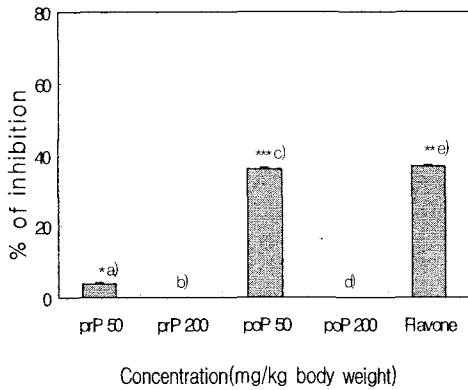


Fig 3. Effect of PGT on cytochrome P40 1A2 activity. Values represent mean±SD (n=3). * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : <0.005 as compared to control.

Table 3. Inhibition of β-naphthoflavon Induced Rat Liver Microsomal Cytochrome P450 1A2-dependent Methoxyresorufin O-deethylase (MROD) Activity by PGT from Concentration of Water Extracted Solution.

Groups	MROD activity (pmol resorufin min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
Normal	4 ± 0.1
Control	18 ± 0.6
prP 50 ^a	17 ± 0.8
prP 200 ^b	23 ± 0.4
poP 50 ^c	11 ± 0.4
poP 200 ^d	21 ± 0.4
flavone ^e	11 ± 0.3

^a80mg/kg of βNF injected by i.p before(pre-treated) oral surfer of 50mg/kg PGT.

^bpre-treated oral surfer of 200mg/kg PGT for 4 days.

^c80mg/kg of βNF injected by i.p after(post-treated) oral surfer of 50mg/kg PGT.

^dpost-treated oral surfer of 200mg/kg PGT for 4 days.

^e1 nmol flavone from herbal plants.

점차 높아지고 있다. 따라서 傳統의 古書에 의존한 處方과 方劑 구성의 중요성이 증대되고 있는 한편 각종 新方이 조제 되어 임상에 응용되고 있는 현실이다. 따라서 韓醫學이 가지고 있는 고유의 生藥 資源으로부터 외부에서 침투하는 여러 가지 化學 物質 및 發癌性原을 예방하거나 저해하는 效果의 性分을 찾기 위한 노력은 반드시 필요하다. 또한 抗酸化 물질의 探究나 각종 毒性學的 해석이 첨가 되어야 하며, 이에 더하여 性分의 분석 및 품질의 개선에도 특히 노력을 기울여야 한다고 생각된다.

그리고 本草 및 方劑가 가지는 特異性 등을 實驗 的으로 분석하는 것도 매우 중요한 과제 중 하나 이다.

韓醫學을 근간으로 최근 발표된 論文을 살펴보면 발암과정 중 예방에 초점을 두고 연구한 업적 이 많다. 이러한 논문 등에서는 韓藥材를 분획 추출하여 여러 가지 과학적 근거로 한 실험을 하거나 活血化癥 등 특정 활성이 기대되는 각종 韓藥 材를 선택하여 cytochrome P450의 여러 효소계 저 해를 보고하고 있다²⁶.

한편 이러한 한약물의 藥理性分의 분석에 대등 하게 각종 湯劑의 활용성에도 그 중요성을 인식하 여야 한다.

韓醫學에서 腫瘍의 발생기전은 審證求因에 근 거하여 經絡瘀阻, 氣血虧虛, 氣滯瘀血 등을 病理學 的 소견으로 주장되어 왔다²⁷. 그리고 癰疽의 감별 은 脈像으로 구분¹⁰하였고, 扁鵲心書 등에서는 寒 氣가 經絡에 侵犯하여 血氣가 불통한다는 內經說¹¹ 을 주장하고 있다. 이러한 癰疽나 腫瘍이 형성되는 과정을 서양 의학에서 살펴보면 포유동물의 cytochrome P450(CYP) 약물대사 酵素係가 아주 중요한 역할을 차지하고 있다.

Cytochrome P450(CYP) 酵素系는 대부분이 肝臟 內的 실질세포인 肝細胞의 endoplasmicreticulum에 존재하며, NADPH-cytochrome P450 還元 酵素와 he-moprotein isozymes CYP 대사에 의하여 毒性物質로 변화되는 대표적인 것으로 polyaromatic hydrocarbons 와 aromatic amines 그리고 carbon tetrachloride(CCl₄) 등이 있고, 또한 각종 저분자 物質과 기타 食品의 조리중에 생성되는 nitrosamine 등이 해당되며 醫藥 品으로 사용되는 acetaminophen 등도 CYP에 의하여 毒性이 증가된다¹²⁻¹⁵. 일반적으로 CYP 酵素는 광범 위한 기질 특이성을 갖고 있지만 外部에서 유입된 化學物質의 대사에 가장 많이 관여하는 몇몇의 物 質의 경우에 기질 특이성을 이용한 酵素測定法등 을 통하여 검색되고 있다¹⁶⁻¹⁸. 최근 이러한 韓藥物 을 이용한 CYP 酵素 억제에 관한 보고가 꾸준히 발표되고 있다¹⁹⁻²². 특히 CYP 효소계는 필요시 외 부로부터 유입되는 化學物質을 대사시키는 역할을 가져 이를 보다 쉽게 체외로 배출시킨다고 알려져 있으나, 또한 毒性 物質을 전자 친화적 성질을 가

지게 하여 세포내 핵산 및 단백질에 발암성으로 작용한다. 여기에는 醫藥品으로 잘 알려진 acetaminophen(AAP)이 포함되어 있으며 대표적인 發癌性物質로 여러 실험에서 -입증된 carbon tetrachloride(CCl₄) 등이 있다. 또한 CYP에는 여러 종류의 isoform이 알려져 있으며 각각의 대사 및 진행에 관해서도 많이 研究되어 현재 보고가 되어있다. 그리고 이러한 癌의 유발 과정시에 이를 억제하는 것 들에는 生藥 자원뿐만 아니라 각종 植物에서 유래 된 것도 있는데 마늘에서 추출한 garlic²³ 성분이나 포도주에서 유래한 resveratrol²⁴ 등이 그것이다.

이상에서 살펴본 바와 같이 본 실험에서는 특히 八物君子湯이 癌의 형성 과정시의 대사에 미치는 影響을 實驗的으로 접근하여 해석을 시도해 보았다. 우선 八物君子湯을 藥湯法에 의하여 물로 추출한 다음 이것을 시료로 하였다. 八物君子湯 시료를 50mg/kg과 200mg/kg으로 설정하여 정수된 음용수에 녹여 4일간 먹인 것은 농도 의존적인 방법, 그리고 八物君子湯 시료를 CYP 1A1/2의 유도제인 βNF 처리 전·후군으로 나눈 것은 藥物의 效果에 있어 豫防 및 治療에 의존적 方法을 선택하였다. 이를 解剖學的 관찰을 하기 위하여 흰쥐를 각각의 조건 처리 후 개복하였을 때 corn oil만 처리한 정상군의 경우에는 肝의 표면에 주름이 없고 짙은 적색의 정상적인 상태로 판명되었다. 하지만 βNF 단독 처리군의 경우에는 肝의 표면에 간헐적으로 지질층과 같은 막이 형성되어 있었으며, 이를 八物君子湯 전후 처리 및 고저 농도 처리 군에서 살펴보았을 때 βNF 단독 처리군에 비하여 육안적으로 훨씬 良好한 상태를 보였다. 그러나 이러한 결과는 단지 가시적으로 제시된 것이므로 이러한 관찰을 통하여 βNF의 처리가 肝損傷에 심각한 영향을 준다고 판명하기는 힘들었다. 또한 현재까지 βNF가 肝의 대사에 CYP 1A1/2의 발현에 영향을 미친다는 보고는 있으나, 肝 독성에 직접적으로 관여한다는 보고는 없다. 이를 직접적인 肝損傷 측정 지표인 GOT, GPT활성을 통하여 검증해 본 결과에서는 실험군 모두가 GOT, GPT 수치가 정상적인 상태의 범위에서 큰 유의성 없었다. 이를 통하여 βNF가 실험쥐의 肝에 직간접적인 손상을 입힌다고 볼 수는 없었다. βNF의 처리 및 八物君子湯의 처리를

통하여 CYP 1A1/2 대사 효소계의 활성을 살펴 본 결과 八物君子湯 후처리군 저농도 (50mg/kg)에서 모두 특이적으로 沮害를 높이는 것으로 나타났다. 이는 八物君子湯이 癌化 과정의 豫防의인 것보다 發癌의 진행시에 비교적 저농도에서 처리하였을 때 치료의 효과가 있는 것으로 사료되었다. 그러나 이것은 쥐의 경우에 나타나는 경향이며, 이를 보다 구체적으로 증명하기 위하여 향후 핵산 (DNA) 및 리보핵산 (RNA) 수준에서의 분자생물학적인 기법과 단백질 수준에서의 면역활성법(Immune blot) 발현 양상을 비교 검토해 볼 필요성이 있다고 생각된다.

V. 結 論

Cytochrome P450 1A1/2 유도제를 투여한 흰쥐에 八物君子湯을 각각 저농도 및 고농도 그리고 前·後처리군으로 분류하여 음용시킨 결과 해부학적 변화와 肝독성을 측정하는 수치인 GOT 및 GPT를 측정해 보았다. 그리고 발암과정에 중요한 대사로 여겨지는 CYP 효소계의 변화를 살펴보았다.

1. 八物君子湯을 각 농도별 그리고 前·後처리군으로 분류하여 음용시켰을 때 해부학적으로 주목할 만한 변화를 관찰할 수 있었다. 특히 八物君子湯 後처리군의 경우에는 흰쥐의 肝이 대조군에 비하여 정상적인 모습으로 바뀌었음을 육안으로 관찰하였다.

2. 八物君子湯에 의한 肝毒性 및 損傷의 정도를 알아보기 위하여 GOT, GPT 활성을 검증해본 결과 β-naphthoflavone 단순 처리 대조군 및 八物君子湯 의한 肝毒性이나 組織의 損傷이 현저하게 관찰되지 않고 모두 정상의 범위 안에 속했다.

3. 八物君子湯으로 cytochrome P450 1A1-의존적인 ethoxyresorufin O-dedthylase (EROD) 활성을 측정해 본 결과 八物君子湯 後 처리군 50mg/kg에서 높은 억제 효과를 나타내었으며, 다른 실험군에서도 농도 의존적인 저해 결과를 얻을 수 있었다.

4. Cytochrome P450 1A2에 의존적인 methoxyresorufin O-dedthylase(MROD) 활성을 통하여 八物君子湯의 저해 효과를 측정해 본 결과 모든 처리군에서 유의성 있는 효과를 나타내지 않았다. 다만 後 처

리군 50mg/kg 농도에서 양성대조군과 비슷한 높은 억제 효과를 나타내었으며, 이는 유의성 있는 결과이다.

이상으로 八物君子湯을 통하여 발암과정 대사에 중요한 역할을 하는 cytochrome 1A 계열의 효소 (1A1 및 1A2)를 측정하여 본 결과 八物君子湯이 癌化過程시 이를 억제하는 효과가 클 것으로 기대된다.

VI. 參考文獻

1. 李濟馬. 東醫壽世保元. 여강출판사, 서울, 1994: 85-102, 193-234.
2. Guengerich, F.P. Role of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 1988;48: 2646-2954.
3. Shimada, T., Yun, C.H., Yamajaki, H., Gautier, J.C., Beaune, P.H. and Guengerich, F.P. Characterization of human lung microsomal Cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol. Pharmacol.* 1992;41:856-864.
4. Ioannides, C., Lum P.Y. and Parke, D.V. Cytochrome P448 and the activation of toxic chemicals and carcinogens. *Xenobiotica.* 1984;14:119-137.
5. Denison, M.S., Mitchell, J.R., Timbrell, J.A., Snodgrass, W.R. and Corcoran, G.B. Isoniazid and iproniazid activation of metabolites to toxic intermediates in man and rat. *Science.* 1976;193:901-903.
6. 宋正模, 宋一炳, 高炳熙. 太少陰人の處方이 스트레스 誘發 白鼠의 自律神經機能에 미치는 影響. 사상체질의학회지. 1995;7(2):185-186.
7. 김진성. 少陰人 八物君子湯과 升陽益氣湯이 Hydrocortisone Acetate로 誘發된 陽虛證에 미치는 實驗的 研究. 대한한의학학회지. 1987;9(1):42-61.
8. Reitman, S. and Frankel, S. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *J. of Clin. Pathol.* 1957; 28:58-63.
9. 全國 韓醫科大學 四象醫學敎室 엮음. 四象醫學. 集文堂, 서울, 2000:549, 556.
10. 장기. 金櫃要略. 국풍출판사, 中國, 1968:89.
11. 보재. 扁鵲心書. 杏林書院, 서울, 1972:31.
12. Seeff, L.B., Cuccherini, B.A., Zimmerman, H.J., Alder, E. and Benjamin, S.B. Acetaminophen hepatotoxicity in alcoholics. *Ann. Intl. Med.* 1986;104:399-404.
13. Lewis, J.G., Stewart, W. and Asams, D.O. Role of oxygen radicals in induction of DNA damage by metabolites of benzen. *Cancer Res.* 1988;48:4762-4765.
14. English, J.C. and Ander, M.W. Evidence for the metabolism of N-nitrosodimethylamine and carbon tetrachloride by a common isozyme of cytochrome P450. *Drug Metabol. Dispos.* 1985;13:449-452.
15. Koop, D.R., Laethem, C.L. and Schnier, G.G. Identification of ethanol-inducible P450 isozyme 3a (P4502E1) as a benzen and phenol hydroxylase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1989;98:278-288.
16. Lubet, R.A., Mayer, R.T., Cannon, J.W., Nims, R.W., Burke, M.D., Wolf, T. and Guengerich, F.P. Dealkylation of pentoxifyresoroin: A rapid and sensitive assay for measuring induction of cytochrome P450 by phenobarbital and other xenobiotics in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 1985;238:43-78.
17. Burke, M.D., Thompson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haparanta, T. and Mayer, R.T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* 1985;34: 3337-3345.
18. Luet, R.A., Nims, R.W., Mayer, T.C. and Schechman, L.M. Measurement of cytochrome P450 dependent dealkylation of alkoxyphenoxazone in hepatic S9s and hepatocyte homogenates : Effect of dicumarol. *Mutation Res.* 1985;142:127-131.
19. 김경아, 이지숙, 박희준, 김창주, 심인섭, 한승무, 임사비나. 인체 간 Microsome 에서의 우슬 추출물의 Cytochrome P450 약물 대사에 대한 억제작용. 대한한의학학회지. 2003;24(2):40-46.
20. 이경성, 김형순, 배영춘, 이상민, 김경요, 원경숙. 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯의 肝損傷 保護作用에 대한 연구. 사상체질학회지. 2003;15(1): 90-108.
21. 박신화, 임종국. 땃싸리 夏枯草 藥鉞液의 암예방 활성. 대한경락경혈학회지. 2001;18(1):11-20.
22. 한상훈, 노동일, 이기택, 손윤희, 백태선, 남경수,

- 임종국. In vitro에서 발암물질에 의한 발암진행에 미치는 천궁약침액의 영향. 대한경락경혈학회지. 2002;19(1):7-13.
23. Schaffer, E.M., Liu, J-Z and Milner, J.A. Garlic powder and allyl sulfur compounds enhance the ability of dietary selenite to inhibit 7,12-dimethylbenz [a]-anthracene-induced mammary DNA adducts. *Natr. Cancer*. 1997;27:162-168.
24. Goldberg, D.M. More on antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clin Chem*. 1996;42:113-114.
25. Burke, M.D., Thompson, S., Weaver, R.J., Wolf, C.R. and Mayer, R.T. Cytochrome P4 50 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Pharmacol*. 1994;48:923-936.
26. 정해광, 유호진, 장영수, 박성준, 문영희, 우은란. 생약추출물의 cytochrome P450 약물대사 효소계 저해 활성. 생약학회지. 2002;33:35-41.
27. 최승훈. 東醫腫瘍學. 杏林書院, 서울, 1995:15-42,