

茵陳蒿湯의 조합에 따른 간 보호 효과

최재우, 배창욱, 박소영, 윤현정, 박선동
동국대학교 한의과대학 방제학교실

Abstract

Protective effect of injinhotang and its components on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats.

Choi Jae Woo, Bae chang wook, Park So Young, Yun Hyun Joung, Park Sun Dong
Department of Herbal pharmacology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Acetaminophen, which causes acute liver injury in humans and animals, has made useful inducer of hepatotoxicity for studying hepatopreventive drugs.

Injinhotang is known as one of the hepatopreventive drugs. However, its mechanism of recovery of hepatotoxicity treated with acetaminophen is poorly understood. this study was performed to observe the antioxidative effect of injinhotang extract and its several combination groups.

The results were obtained as follows:

1. In the study on free radical scavenging effect in vitro(the suppressing effect on peroxidation of linoleic acid on concentration, the scavenging effect of DPPH radical, inhibitory effect of superoxide in xanthine-xanthine oxidase system and the inhibitory effect on lipid peroxidation reaction by hydroxy radical in H2O2-Fe2+ system, injinhotang have more effect than its components groups relatively.
2. In the study on antioxidants system in vivo(the level of serum LPO, the level of

교신저자 : 박 선 동

경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실

Tel : 054-770-2654 e-mail : sundong@dongguk.ac.kr

접수 : 2005/ 06/ 14 채택 : 2005/ 06/ 18

hepatic LPO, catalase, GSH, GST), only injinhotang has a significant effect.

3. In the study on hepatotoxicity(GOT, GPT, γ -GTP, ALP, LDH, bilirubin), only injinhotang has a significant effect.

These results suggest that injinhotang has the protective effect on acetaminophen-induced hepatotoxicity. The mechanisms of these are supposed to be involved in antioxidant and three drugs' cooperative synergy effect.

Key Word : injinhotang, acetaminophen, hepatotoxicity

I. 緒 論

茵陳蒿湯은 茵陳·大黃·梔子로 구성되었으며, AD 200년경 張1)이 최초로 '傷寒七八日, 身黃而梔子色, 小便不利, 腹微滿者, 茵陳蒿湯主之'라고 한 이후, 주로 급성바이러성 간염, 만성간염, 간경화, 담낭 및 담도질환 등에서 볼 수 있는 주증상인 黃疸에 활용되어 온 처방이다²⁻³⁾.

본 처방의 한방약리에 의하면, 茵陳은 濕熱을 淸利시켜 黃疸을 제거하고 利膽작용으로 간기능을 회복시키는 君藥이며, 梔子は 臣藥으로서 苦寒한 약성으로 淸熱瀉火, 涼血解毒하는 효능을 갖고 濕熱을 소변으로 導出한다. 그리고 大黃은 佐藥으로 腸胃를 蕩滌하는데 茵陳과 配伍되어 濕熱을 대변으로 導出하는 기전을 가진다고 한다. 따라서 본 방은 淸熱利濕 退黃疸하는 주요한 方劑이다⁴⁻⁵⁾.

각 약물의 현대적인 약리기전을 보면, 茵陳蒿속의 esculetin은 담즙의 분비를 촉진하고, 山梔子の geniposide와 협력하여 담즙분비를 더욱 촉진하며 또 담관말단의

Oddi괄약근을 이완하여 담즙의 배설을 촉진한다. 또한 혈중의 cholesterol과 β -lipoprotein을 저하하여 혈관벽에 지방이 침착하는 것을 방지한다. 梔子は crocin, crocetin이 담즙의 분비와 배설을 촉진하고 혈중 bilirubin치를 저하시켜 황달을 소퇴시킨다. 그리고 大黃중의 sennoside는 대장내에서 rhein anthrone이 되어서 장점막을 자극하여 연동운동을 항진시키고 수분 및 Na흡수를 저해하여 설사를 유발한다. 또한 간손상을 보호하고 황달성간염을 치료하며, B형 간염에 대한 억제작용이 있다⁶⁾.

이러한 개별약물의 치료작용을 근거로 複方으로서 茵陳蒿湯은 그 효능의 극대화와 부작용의 최소화를 도모하는 것으로 인식되어 왔으며, 이에 대한 다양한 실험연구로서는 김⁷⁾은 고지혈증에 활용할 수 있다고, silymarin과 병용투여로 간기능 개선효과가 있다고 하였으며, 이⁸⁾는 茵陳蒿湯 약침투여가 경구투여보다 간기능 개선에 효과적이라고 하였으며, 박⁹⁾이 투여방법을 달리한 茵陳蒿湯이 간기능에 미치는 영향을 보고하였고, 배¹⁰⁾는 茵陳蒿湯에서 분리

된 화합물의 항균활성이 우수함을 보고하였으며, 정¹¹⁾은 담석증 병태모형에 대하여 담석형성을 억제하고 형성된 담석을 줄인다고 하였으며, 菊谷¹²⁾은 임상효과를 발표하였다.

그러나 茵陳蒿湯의 개별약물이 가지는 특성이 조합으로 인하여 어떠한 상관관계

를 가지고 藥力을 나타내는지에 대한 연구 보고는 보이지 않았다. 따라서 저자는 간 독성 흰쥐에 茵陳蒿湯 각 조합을 투여하여 상호 약물 간에 어떠한 반응으로 약효가 발휘되는지를 알아 본 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 부속 한방병원에서 정선하여 구입하였으며, 茵陳蒿湯의 내용 및 한 貼의 비율 및 총량은 다음과 같다.

Table 1. Composition and contents of Injinhotang

Item	A+B+C	A+B	A+C	B+C
Artemisiae Capillaris Herba (A)	150	150	150	.
Gardeniae Fructus (B)	75	75	.	75
Rhei Radix et Rhizoma (C)	45	.	45	45
Total (g)	270	225	195	120

2) 시약

본 실험에 사용한 시약은 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), bovine serum albumine, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), sodium dodecyl sulfate (SDS), thiobarbituric acid (TBA), sulfosalicylic acid, potassium phosphate, malondialdehyde tetrabutyl-ammonium

salt, linoleic acid, xanthine, xanthine oxidase, butylated hydroxytoluene (BHT), tocopherol, sulfanilic acid, N-(1-Naphthyl)-ethyl-enediamine 등은 SIGMA사에서 구입하였으며, hydrogen peroxide 및 ethanol, methanol, acetic acid 와 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하였고, GOT, GPT, ALP, γ -GTP, LDH, bilirubin

측정용 kit는 아산제약에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 UV-VIS spectrophotometer (UV-2401PC SHIMADZU Co.)를 사용하였고, 그 외 실험에 사용한 모든 시약들은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액 조제

茵陳蒿湯에 3배량의 80% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하고, 이 과정을 2회 반복하여 여과한 후 농축하고 동결 건조하였다.

2) in vitro에서의 항산화 효과

(1) 지질자동산화계에서의 항산화능

Linoleic acid 유지 혼탁액은 Osawa 등의 방법(13)에 따라 제조하였다. linoleic acid 0.13 ml, 99.0% ethanol 10 ml, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 10 ml을 혼합하고, 각 약제 추출물을 농도별로 첨가한 다음, 증류수로 total volume이 25 ml이 되도록 조절하였다. 이 혼합액을 test tube에 넣고, 40°C 배양기에서 배양하여 자동산화를 촉진시켰다.

TBA법에 의한 MDA 정량은 Ohkawa 등의 방법(14)에 따라 실시하였다. 즉, 40°C에서 배양시킨 linoleic acid 혼탁액 50 μ l에 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.2 ml, 20% acetic acid (pH 3.5, 10N NaOH) 1.5 ml, 0.8% TBA 수용액 1.5 ml을 넣고, 증류수로 이 혼합액의 total volume을 4 ml로 조절한 다음, 5°C에서 60분간 방치하고, 다시 95°C에서 60분간 발색시킨 뒤, 흐르는 수돗물에서 냉각시킨

후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 과산화지질의 함량은 MDA로 표준 검량곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA μ M로 표기하였다.

(2) DPPH radical 소거능

약제 추출물의 free radical에 대한 소거 효과를 알아보기 위해 Hatano 등의 방법(15)에 따라 DPPH radical 소거효과를 측정하였다. 각 추출물을 증류수에 농도별로 녹인 후 이 혼합물 4 ml과 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 1 ml를 혼합하여 잘 흔들어 주고 실온에서 30분 동안 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Xanthine-xanthine oxidase계에서 superoxide의 생성 억제능

Xanthine-xanthine oxidase계에서 생성되는 superoxide에 대한 각 추출물의 억제 효과를 측정하기 위하여 다음과 같은 반응용액을 조제하였다. 먼저 250 μ M xanthine 0.5 ml과 농도별 추출액 0.1 ml 및 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 1.3 ml을 함유하는 반응용액을 실온에서 3분간 정지한 다음, 0.1 unit xanthine oxidase를 첨가하여 반응용액의 총량을 2 ml로 조절한 후 290 nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하였다(16).

(4) H₂O₂-Fe²⁺계에서 지질과산화 반응 억제능

최종농도가 7.5 mg/ml인 흰쥐의 간조직 균질액, 1 mM FeCl₂, 3 mM H₂O₂를 함유하는 fenton 반응계에서 H₂O₂-Fe²⁺계의 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응에 대한 억제능을 살펴보기 위해 농도별 약물 추출

물이 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)의 반응용액을 1 ml로 하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음, TBA법(13)으로 과산화지질의 함량을 측정하였다.

3) 동물

(1) 동물의 처치

실험동물은 각 군당 10마리씩 5개의 군으로 나누었고, 모든 실험동물은 실험 전 5일간 rat용 고형사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

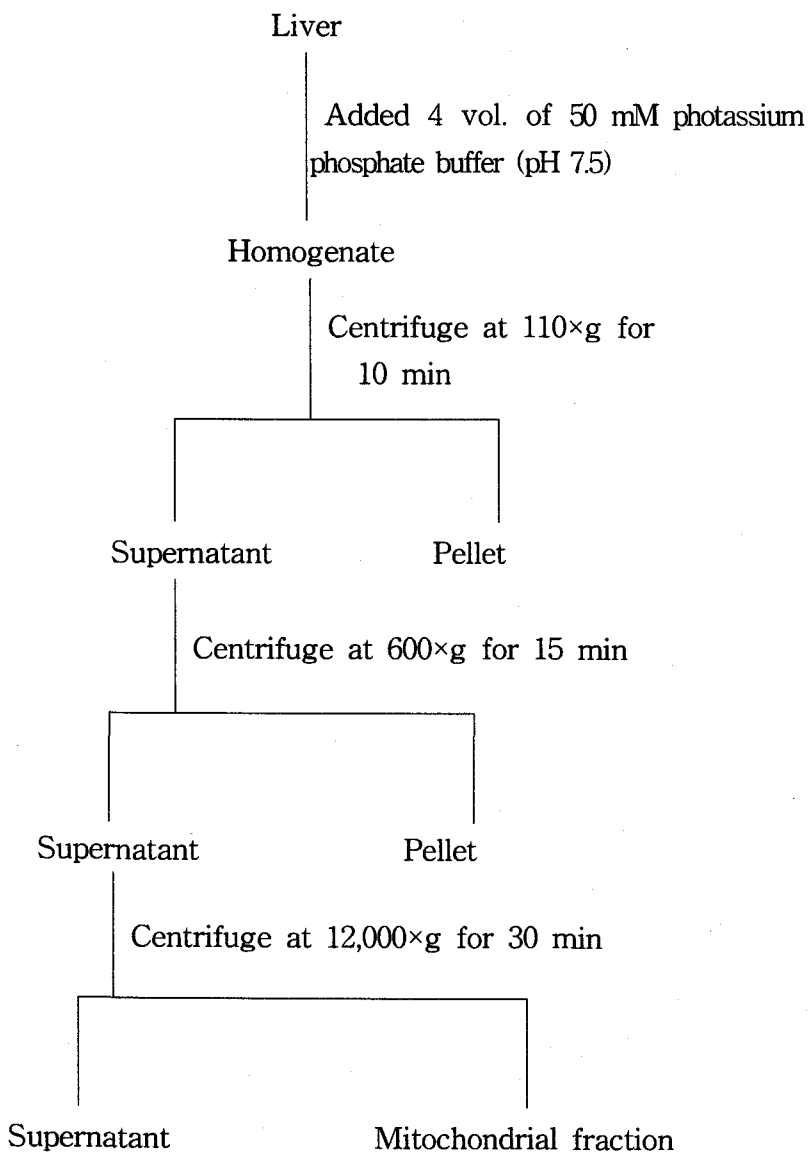
대조군은 고형사료와 물을 5일간 제한 없이 공급한 후, acetaminophen 500 mg/kg/DMSO를 복강 주사하였으며, 실험군은 처방군으로서 茵陳蒿湯, 茵陳+梔子, 茵陳+大黃, 梔子+大黃으로 나누었으며 실험군 모두 각 추출물을 500 mg/kg/H₂O의 농도로 5일간 음용시킨 후, acetaminophen 500 mg/kg/DMSO를 1회 복강 주사하였다. 모든 실험동물은 생체시료 채취 전 12시간 동안 물만 주고 절식시켰다.

(2) 생체시료의 제조

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복하여 심장에서 채혈하였으며, 채혈한 혈액은 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 혈청을 분리하여 TBA 반응 측정 효소원으로 사용하였다.

생리 식염수로 관류시킨 간은 조직이 손상되지 않도록 주의하여 혈액이 충분히 제거될 때까지 생리 식염수에 잘 씻어내고 whatman 여과지로 식염수를 제거한 후 -70°C에 동결 보존하여 사용하였다. 효소 활성도 측정을 위해 전체 조직 중 일부를

4배 용량의 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 얼음물 안에서 homogenizer로 4분간 균질화하였다. 이 균질액을 110×g에서 10분간 원심분리하여 상층액은 과산화지질 (lipid peroxide) 함량을 측정하기 위한 시료로 사용하였고, 나머지 상층액은 600×g에서 15분간 원심분리하여 핵과 세포잔해를 제거한 상층액을 취한 후 다시 12,000×g에서 30분 동안 원심분리하여 상층액을 제외한 Pellet에 potassium phosphate buffer로 재희석한 다음 catalase, glutathione, glutathione-S-transferase 활성도를 측정하기 위한 시료로 사용하였다. 상기 모든 조작은 특별한 규정이 없는 한 0~4°C에서 실시하였다 (Scheme 1).



Scheme 1. Preparation of hepatic mitochondrial fractions for enzyme studies

4) in vivo에서의 항산화 효과

(1) 혈청중 lipid peroxide 함량

TBA측정은 Suematsu 등의 방법(17)에 따라 clean test tube에 혈청 200 μ l를 넣고, 8.1% sodium dodesyl sulfite (SDS) solution 225 μ l, 20% acetic acid 1.5 ml.

증류수 75 μ l, 1.2% thiobarbituric acid solution 1 ml를 넣고 잘 섞어준 후 30분간 water bath에서 끓였다. 이후 실온에서 30분간 cooling하고 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 532 nm에서 측정하였다.

(2) 간조직중 lipid peroxide 함량

조직내 LPO함량 측정은 Ohkawa 등의 방법(14)에 따랐다. 조직 마쇄 균질액을 1,000×g에서 원심분리한 후 상층액을 취해 8.1% sodium dodecyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 95°C에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-butanol : pyridine (15:1) 혼액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 생성된 시료의 malondialdehyde (MDA) 농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였으며 MDA함량은 조직 mg당 nmole로 나타내었다.

(3) 간조직중 catalase 활성

조직내 catalase 활성도는 Aebi의 방법(18)에 따라 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 효소원 일정량을 넣고 기질로서 10 mM H₂O₂ 용액을 가하여 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 2분간 측정하였다. 대조실험으로는 기질인 10 mM H₂O₂ 용액 대신에 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)를 가해 다른 조건은 위와 동일하게 하여 흡광도의 변화를 측정하였으며 효소의 활성도는 1분 동안에 1 μM의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

(4) 간조직중 glutathione 함량

조직 내 GSH 함량 측정은 Ellman 등의 방법(19)에 따랐다. 조직 균질액을 1,000×g에서 원심분리 한 후, 상층액에 4%

sulfosalicylic acid를 가하여 혼합한 후 1000×g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 1 mM DTNB 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였으며 GSH 함량은 protein 1 mg 당 nmole로 나타내었다.

(5) 간조직중 glutathione-s-transferase 활성

간조직내 GST 활성은 chlorodinitro-benzene (CDNB)과 GSH를 기질로 사용한 Habig의 방법(20)으로 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate 완충용액 (pH 6.5)으로 희석시킨 간 부유액에 1 mM GSH, 1 mM CDNB를 첨가하여 파장 340 nm에서 단백질 mg당 1분간 conjugated되는 CDNB의 nmole로 표기하였다.

(6) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법(21)에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 단백질을 정량하였다.

5) in vivo에서 간 관련 혈청조성변화 측정

(1) 혈청중 GOT 활성 측정

혈청중 GOT 활성은 Reitman-Frankel의 방법(22)에 따라 조제된 시약 kit를 사용하여 측정하였다. GOT 기질액 1.0 ml을 시험관에 가하여 37°C에서 5분간 방치한 다음, 혈청 0.2 ml을 넣어 잘 혼합한 후 37°C에서 60분간 반응시킨 뒤 정색시액 1.0 ml을 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 20분간 방치하여 반응을 종료시키고, 0.4 N NaOH 용액 10 ml을 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 약 10분간 방치하였다가 60분

이내에 505 nm에서 증류수를 대조로 흡광도의 변화를 측정하였다. 혈청 중 GOT 활성도는 작성한 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 1 ml당 karmen unit으로 나타내었다.

(2) 혈청중 GPT 활성 측정

혈청중 GPT 활성은 Reitman-Frankel의 방법²²⁾에 따라 조제된 시약 kit를 사용하여 측정하였다. GPT 기질액 1.0 ml을 시험관에 가하여 37°C에서 5분간 방치한 다음, 혈청 0.2 ml을 넣어 잘 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 정색시액 1.0 ml을 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 20분간 방치하여 반응을 종료시키고, 0.4 N NaOH 용액 10 ml을 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 약 10분간 방치하였다가 60분 이내에 505 nm에서 증류수를 대조로 흡광도의 변화를 측정하였다. 혈청중 GPT의 활성도는 작성한 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 1 ml당 karmen unit으로 나타내었다.

(3) 혈청중 v-GTP 활성 측정

혈청중 v-GTP 활성은 5-Aminosalicic acid법²³⁾에 따라 조제된 시약 kit를 사용하여 측정하였다. v-GTP 기질액 1.0 ml을 시험관에 가하여 37°C에서 5분간 방치한 다음, 혈청 0.02 ml을 넣어 잘 혼합한 후 37°C에서 정확히 20분간 방치한 후 정색 시액 3.0 ml을 잘 섞어준 후 실온에 20분간 방치하였다가 60분 이내에 635 nm에서 시약 blank를 대조로 흡광도를 측정하였다. 혈청중 v-GTP 활성도는 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 mU/ml로 나타내었다.

(4) 혈청중 ALP 활성 측정

혈청중 ALP 활성은 Kind-King 등의 방법²⁴⁾에 따라 조제된 시약 kit를 사용하여 측정하였다. 기질액 2.0 ml을 시험관에 가하여 37°C에서 5분간 방치한 후 여기에 혈청 0.05 ml을 가하여 잘 혼합하여 37°C에서 정확히 15분간 반응시켰다. 정색시액 2.0 ml을 넣고 충분히 혼합한 후 실온에서 10분 이상 방치시키고 60분 이내에 500 nm에서 시약 blank를 대조로 흡광도의 변화를 측정하였다. 혈청중 ALP의 활성도는 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 dl당 king-armstrong unit으로 나타내었다.

(5) 혈청중 LDH 활성 측정

혈청중 LDH 활성은 효소법²⁵⁾에 따라 조제된 시약 kit를 사용하여 측정하였다. 기질액 0.5 ml과 정색시액 0.5 ml을 시험관에 가하여 37°C에서 5분간 방치한 다음, 증류수로 5배 희석한 혈청 0.05 ml을 가하여 잘 혼합하여 37°C에서 정확히 10분간 반응 시켰다. 희석 반응 정지액 3.0 ml을 넣고 충분히 혼합한 후 60분 이내에 570 nm에서 시약 blank를 대조로 흡광도의 변화를 측정하였다. 혈청중 LDH의 활성도는 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 wroblewski unit으로 나타내었다.

(6) 혈청중 bilirubin 함량 측정

혈청중 bilirubin 활성은 Michaelsson의 방법²⁶⁾에 따라 조제된 시약 kit를 사용하여 측정하였다. 혈청 0.1 ml, 다이피린시액 1.0 ml과 디아조시액 1.0 ml을 시험관에 가하여 잘 혼합하여 10분간 실온에 방치한 후 페링 시액 1.0 ml을 넣고 충분히 혼합하고 2시간 이내에 시약 blank를 대조로

600 nm 파장에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 혈청중 bilirubin의 활성도는 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 mg/dl로 나타내었다.

3. 통계처리

실험결과는 평균과 표준 편차로 표현하고 유의성 검증은 Sigma Plot 2001 (Window용 version 7.0)을 이용하여 unpaired t-test를 실시하였다.

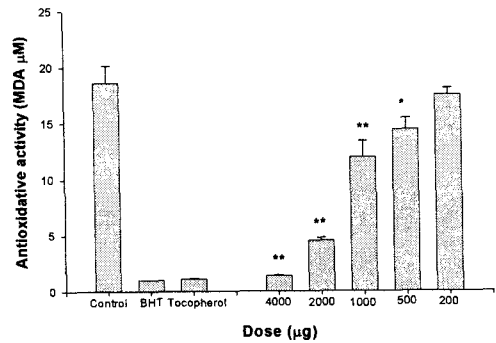
Ⅲ. 實 驗 結 果

1. in vitro에서 자유기 소거 효과

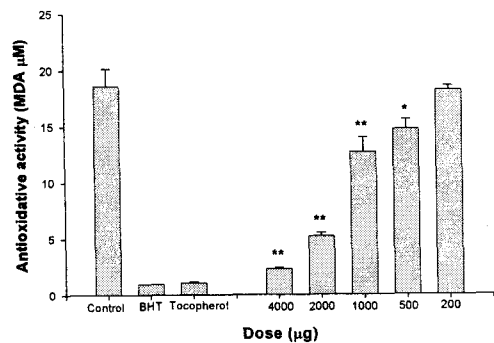
1) 지질자동산화계에서의 항산화 효과

불포화지방산의 일종인 linoleic acid의 자동산화계를 이용하여 농도별 추출물들의 지질과산화물 생성 억제 효과를 배양 시간별로 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군에서의 지질과산화물의 함량은 시간이 경과함에 따라 점점 증가하여 배양 10일째에는 $18.61 \pm 1.54 \mu\text{M}$ 로 현저한 증가를 보였다. 항산화제인 BHT 및 tocopherol을 첨가한 실험군에서는 배양 10일째에 각각 0.97 ± 0.02 , $1.11 \pm 0.07 \mu\text{M}$ 로 대조군에 비해 지질과산화물의 생성이 현저하게 억제되었다. 이에 비하여 약물 투여군에서는 전반적으로 농도가 높아질수록 억제 효과가 현저하게 나타났다.茵陳蒿湯은 배양 10일째 추출물 농도가 1000, 2000, 4000 μg 일 때 각각 12.00 ± 1.46 , 4.51 ± 0.27 , $1.39 \pm 0.06 \mu\text{M}$ 로 매우 유의성 ($p < 0.01$) 있게 억제되었다.茵陳+梔子是 배양 10일째

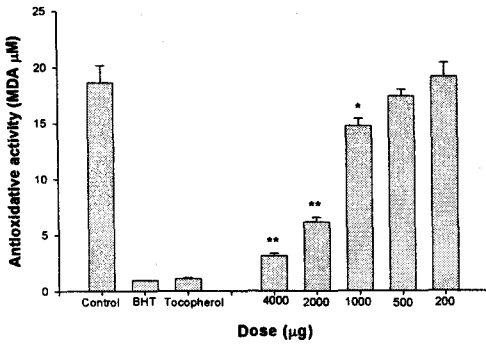
추출물 농도가 1000, 2000, 4000 μg 일 때 각각 12.67 ± 1.32 , 5.21 ± 0.30 , $2.3 \pm 0.12 \mu\text{M}$ 로 나타나 매우 유의성 ($p < 0.01$) 있게 억제되었다.茵陳+大黃은 배양 10일째 추출물 농도가 2000, 4000 μg 일 때 6.14 ± 0.40 , $3.11 \pm 0.20 \mu\text{M}$ 로 나타나 매우 유의성 ($p < 0.01$) 있게 억제되었다.梔子+大黃은 배양 10일째 추출물 농도가 2000, 4000 μg 일 때 5.70 ± 0.45 , $2.67 \pm 0.36 \mu\text{M}$ 로 나타나 매우 유의성 ($p < 0.01$) 있게 억제되었다 (Fig. 1).



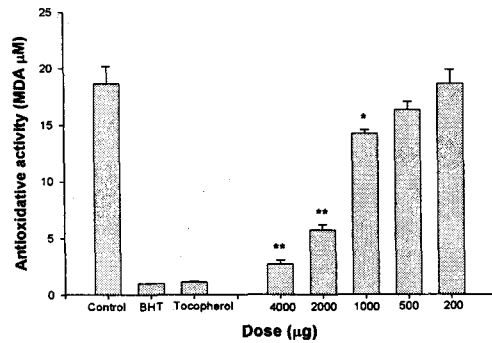
[A] Injinhotang : A + B + C



[B] Artemisiae Capillaris Herba + Gardeniae Fructus : A+B



[C] Artemisiae Capillaris Herba + Rhei Radix et Rhizoma : A+C



[D] Gardeniae Fructus + Rhei Radix et Rhizoma : B+C

Fig. 1. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts in linoleic acid system on antioxidative activity after 10 days.

Each values are the mean ± S.D of triplicate experiments

(** : p<0.01, * : p<0.05).

BHT, tocopherol ; positive control

[A] Injinhotang : A + B + C

[B] Artemisiae Capillaris Herba + Gardeniae Fructus : A+B

[C] Artemisiae Capillaris Herba + Rhei Radix et Rhizoma : A+C

[D] Gardeniae Fructus + Rhei Radix et Rhizoma : B+C

2) DPPH radical 소거 효과

각 추출물들의 농도별 희석액에 대한 DPPH radical 소거효과를 관찰한 결과, 대부분의 농도에서 농도 의존적인 radical 소거효과가 나타났다. 특히, 추출물 농도 4000 μg에서 茵陳蒿湯, 茵陳+梔子, 茵陳+大黃, 梔子+大黃은 각각 82.56, 68.93, 79.69, 53.25%로 매우 강력한 소거 효과가 나타났다 (Fig. 2).

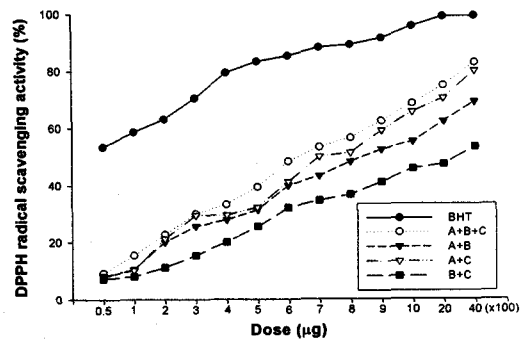


Fig. 2. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on DPPH radical scavenging activity

*Radical scavenging activity(%) = [(control O.D. - experimental O.D.)/Control O.D.]×100

Each values are the mean of triplicate experiments.

3) Xanthine-xanthine oxidase계에서 superoxide의 생성 억제 효과

각 추출물들의 농도별 희석액에 대한 superoxide의 생성 억제효과를 관찰한 결과, 각 추출물에서 농도 의존적인 superoxide의 생성 억제효과를 보였다. 추출물 질량 1000 μg 일 때茵陳蒿湯 27.56,茵陳+梔子 23.99,茵陳+大黃 26.47,梔子+大黃 20.98%로茵陳蒿湯의 효과가 구성약물 조합군 보다 양호한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

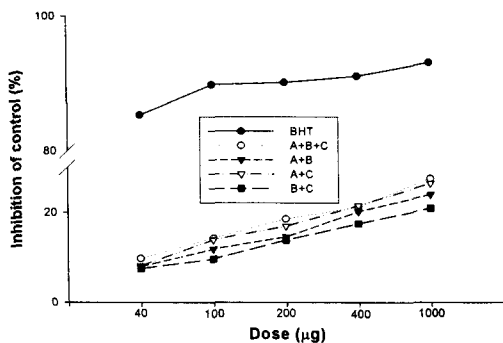


Fig. 3. Inhibitory effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on superoxide generation induced by xanthine-xanthine oxidase system.

Each values are the mean of triplicate experiments.

4) H₂O₂-Fe²⁺계에서 지질과산화 반응 억제효과

Hydroxyl radical에 대한 억제 효과를 관찰해 본 결과, 대조군에서의 과산화지질의 함량은 38.72 μM 이었으나, 항산화제인 BHT를 첨가한 실험군에서는 3.09 μM 로 나타나 대조군에 비해 약 91%의 억제 효과를 보였다. 실험군에서는 대조군에 비하여 모두 농도 의존적인 억제 효과를 나타내었는데, 추출물의 양이 1000 μg 일 때,茵

陳蒿湯 6.35 μM ,茵陳+梔子 8.54 μM ,茵陳+大黃 7.55 μM ,梔子+大黃 9.56 μM 로茵陳蒿湯에서 보다 양호한 지질과산화물 생성 억제 효과가 나타났다 (Fig. 4).

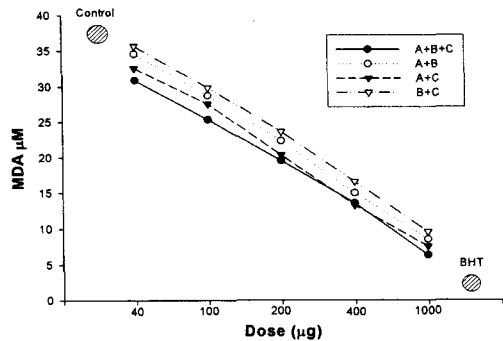


Fig. 4. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on lipid peroxidation in H₂O₂-Fe²⁺ system rat liver

Each values are the mean of triplicate experiments.

2. in vivo에서 항산화 효과

1) 혈청중 lipid peroxide 함량에 미치는 영향

혈청에서의 정상군의 MDA 함량은 2.31±0.40 MDA nmole/ml 인데 비해 대조군은 7.26±1.84 MDA nmole/ml 로 정상군에 비해 3배 이상 증가하였다. 실험군에서는茵陳蒿湯 5.84±1.14,茵陳+梔子 6.62±1.02,茵陳+大黃 6.99±1.45,梔子+大黃 6.98±1.60 MDA nmole/ml 로 감소함을 알 수 있었다(Fig. 5).

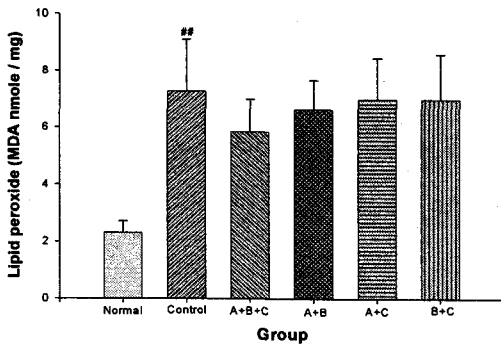


Fig. 5. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on the level of serum lipid peroxide in acetaminophen-treated rat

Results are expressed as the mean \pm S.D.

In each values are the mean of triplicate experiments.

: Significantly different from normal (## : $p < 0.01$)

2) 간조직중 lipid peroxide 함량에 미치는 영향

간에서의 과산화지질 함량을 보면 정상군에서의 함량은 11.67 ± 1.99 MDA nmole/mg 인데 비해 대조군은 30.35 ± 4.72 MDA nmole/mg 으로 3배 이상 증가하였다. 실험군에서는茵陳蒿湯 24.89 ± 3.41 ,茵陳+梔子 27.62 ± 4.11 ,茵陳+大黃 28.35 ± 4.90 ,梔子+大黃 30.10 ± 5.72 MDA nmole/mg 으로茵陳蒿湯이 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 6).

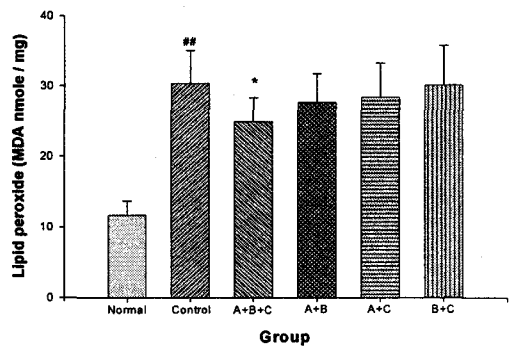


Fig. 6. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on the level of serum lipid peroxide in acetaminophen-treated rat

Results are expressed as the mean \pm S.D.

In each values are the mean of triplicate experiments.

: Significantly different from normal (## : $p < 0.01$)

* : Significantly different from control (* : $p < 0.05$)

3) 간조직중 catalase 활성에 미치는 영향

간에서의 정상군의 catalase 활성은 10.44 ± 1.04 units/mg 인데 비해 대조군은 6.55 ± 0.71 unit/mg 으로 활성이 감소하였다. 실험군에서는茵陳蒿湯 8.28 ± 0.85 ,茵陳+梔子 7.62 ± 1.07 ,茵陳+大黃 7.51 ± 0.69 ,梔子+大黃 7.64 ± 1.41 units/mg 으로茵陳蒿湯이 매우 유의성 ($p < 0.01$) 있게 증가하였다 (Fig. 7).

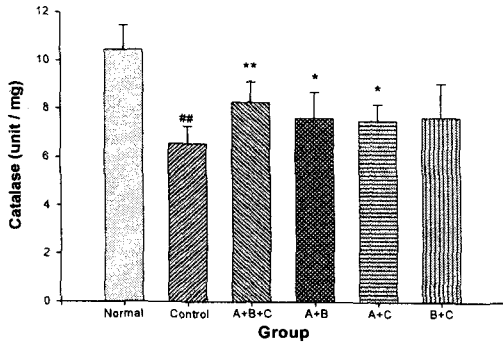


Fig. 7. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on the level of hepatic catalase in acetaminophen-treated rat

Results are expressed as the mean \pm S.D.

In each values are the mean of triplicate experiments.

: Significantly different from normal (## : $p < 0.01$)

, * : Significantly different from control (: $p < 0.01$, * : $p < 0.05$)

4) 간조직중 glutathione 함량에 미치는 영향

간에서의 정상군의 GSH 함량은 19.56 ± 1.94 nmole/mg 인데 비해 대조군은 15.92 ± 1.15 nmole/mg 으로 감소하였다. 실험군에서는茵陳蒿湯 17.45 ± 1.14 ,茵陳+梔子 16.85 ± 1.67 ,茵陳+大黃 16.89 ± 1.49 ,梔子+大黃 16.54 ± 1.78 nmole/mg 으로茵陳蒿湯이 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가하였다 (Fig. 8).

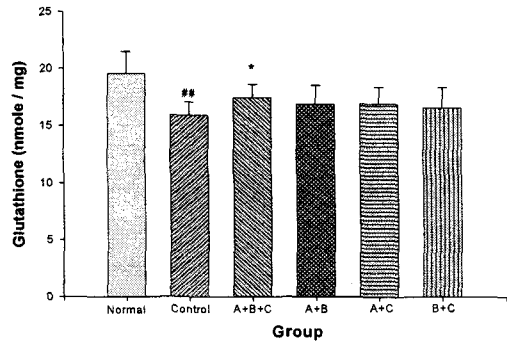


Fig. 8. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on the level of hepatic glutathione in acetaminophen-treated rat

Results are expressed as the mean \pm S.D.

In each values are the mean of triplicate experiments.

: Significantly different from normal (## : $p < 0.01$)

* : Significantly different from control (* : $p < 0.05$)

5) 간조직중 glutathione-s-transferase 활성에 미치는 영향

간에서의 정상군의 glutathione-s-transferase 활성은 2.58 ± 0.13 nmole/mg 인데 비해 대조군은 3.82 ± 0.33 nmole/mg 으로 증가하였다. 실험군에서는茵陳蒿湯 3.23 ± 0.22 ,茵陳+梔子 3.53 ± 0.30 ,茵陳+大黃 3.53 ± 0.30 ,梔子+大黃 3.59 ± 0.48 nmole/mg 으로茵陳蒿湯만 매우 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였다 (Fig. 9).

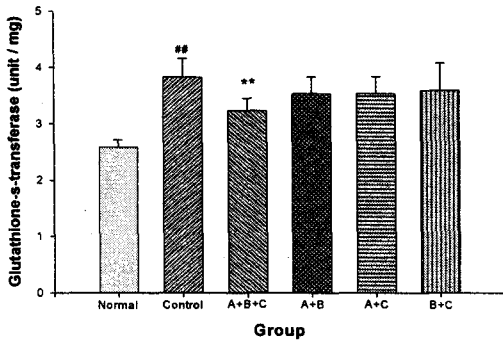


Fig. 9. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on the level of hepatic glutathione-s-transferase in acetaminophen-treated rat

Results are expressed as the mean ± S.D.

In each values are the mean of triplicate experiments.

: Significantly different from normal (## : p<0.01)

** : Significantly different from control (** : p<0.01)

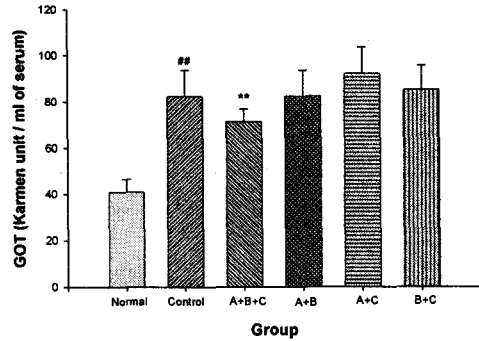


Fig. 10. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on the level of serum GOT in acetaminophen-treated rat

Results are expressed as the mean ± S.D.

In each values are the mean of triplicate experiments.

: Significantly different from normal (## : p<0.01)

** : Significantly different from control (** : p<0.01)

4. in vivo에서 간관련 혈청조성변화

1) GOT 활성에 미치는 영향

혈청에서의 정상군의 GOT 활성은 40.94±5.69 karmen unit/ml 인데 비해 대조군은 82.22±11.25 karmen unit/ml 로 활성이 2배 가량 증가하였다. 실험군에서는茵陳蒿湯 71.25±5.51,茵陳+梔子 82.22±11.2,茵陳+大黃 91.99±11.48,梔子+大黃 84.99±10.48 karmen unit/ml 로茵陳蒿湯이 매우 유의성 (p<0.01) 있게 감소하였다 (Fig. 10).

2) GPT 활성에 미치는 영향

혈청에서의 정상군의 GPT 활성은 23.24±7.69 karmen unit/ml 인데 비해 대조군은 46.90±3.52 karmen unit/ml 로 활성이 2배 가량 증가하였다. 실험군에서는茵陳蒿湯 39.69±2.00,茵陳+梔子 41.98±5.23,茵陳+大黃 51.62±4.98,梔子+大黃 47.79±3.75 karmen unit/ml 로茵陳蒿湯이 유의성 (p<0.05) 있게 감소하였다 (Fig. 11).

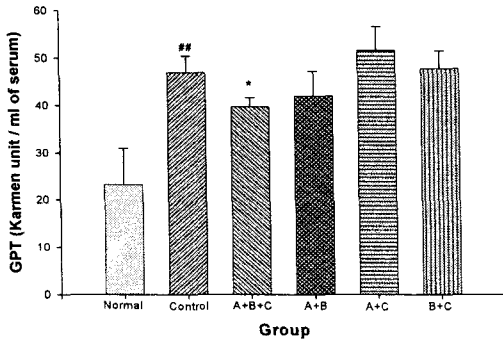


Fig. 11. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on the level of serum GPT in acetaminophen-treated rat

Results are expressed as the mean \pm S.D.

In each values are the mean of triplicate experiments.

: Significantly different from normal (## : $p < 0.01$)

* : Significantly different from control (* : $p < 0.05$)

3) γ -GTP 활성에 미치는 영향

혈청에서의 정상군의 γ -GTP 활성은 40.81 ± 5.44 mU/ml 인데 비해 대조군은 70.63 ± 7.21 mU/ml 로 활성이 2배 가량 증가하였다. 실험군에서는茵陳蒿湯 56.63 ± 3.68 ,茵陳+梔子 64.97 ± 9.40 ,茵陳+大黃 69.36 ± 9.85 ,梔子+大黃 70.36 ± 10.29 mU/ml 로茵陳蒿湯이 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 12).

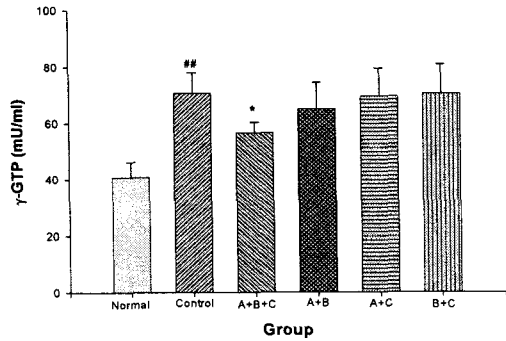


Fig. 12. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on the level of serum γ -GTP in acetaminophen-treated rat

Results are expressed as the mean \pm S.D.

In each values are the mean of triplicate experiments.

: Significantly different from normal (## : $p < 0.01$)

* : Significantly different from control (* : $p < 0.05$)

4) ALP 활성에 미치는 영향

혈청에서의 정상군의 ALP 활성은 33.22 ± 4.52 king-amstrong unit/dl 인데 비해 대조군은 64.35 ± 8.53 king-amstrong unit/dl 로 활성이 2배 가량 증가하였다. 실험군에서는茵陳蒿湯 53.04 ± 4.25 ,茵陳+梔子 56.23 ± 15.23 ,茵陳+大黃 61.36 ± 15.65 ,梔子+大黃 64.69 ± 18.59 king-amstrong unit/dl 로 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 13).

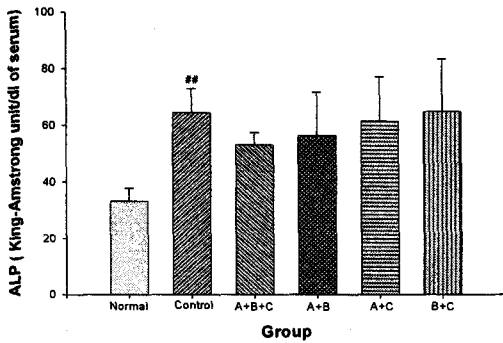


Fig. 13. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on the level of serum ALP in acetaminophen-treated rat

Results are expressed as the mean \pm S.D.

In each values are the mean of triplicate experiments.

: Significantly different from normal (## : $p < 0.01$)

5) LDH 활성에 미치는 영향

혈청에서의 정상군의 LDH 활성은 713.25 ± 41.32 wroblewski unit인데 비해 대조군은 1142.50 ± 79.39 wroblewski unit으로 활성이 2배 가량 증가하였다. 실험군에서는茵陳蒿湯 956.24 ± 42.41 ,茵陳+梔子 1078.58 ± 165.74 ,茵陳+大黃 1105.86 ± 135.69 ,梔子+大黃 1128.38 ± 237.48 wroblewski unit으로茵陳蒿湯이 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 14).

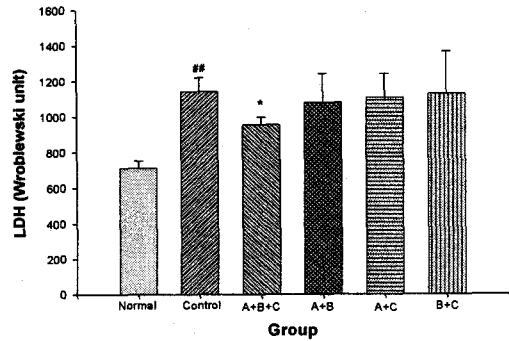


Fig. 14. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on the level of serum LDH in acetaminophen-treated rat

Results are expressed as the mean \pm S.D.

In each values are the mean of triplicate experiments.

: Significantly different from normal (## : $p < 0.01$)

* : Significantly different from control (* : $p < 0.05$)

6) Bilirubin 함량에 미치는 영향

혈청에서의 정상군의 Bilirubin 함량은 40.56 ± 5.45 mg/dl 인데 비해 대조군은 69.42 ± 6.06 mg/dl 로 2배 가량 증가하였다. 실험군에서는茵陳蒿湯 57.88 ± 4.67 ,茵陳+梔子 65.63 ± 10.36 ,茵陳+大黃 67.43 ± 9.97 ,梔子+大黃 74.43 ± 7.38 mg/dl 로茵陳蒿湯이 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 15).

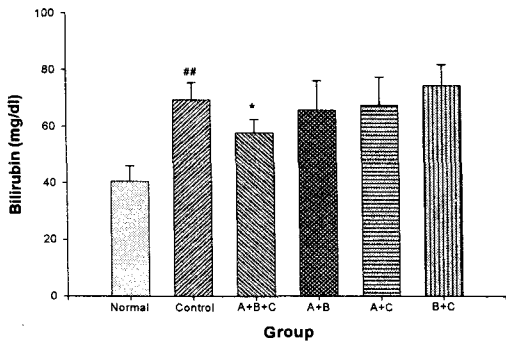


Fig. 15. Effect of the Injinhotang (A+B+C, A+B, A+C, B+C group) extracts on the level of serum bilirubin in acetaminophen-treated rat

Results are expressed as the mean \pm S.D.

In each values are the mean of triplicate experiments.

: Significantly different from normal (## : $p < 0.01$)

, * : Significantly different from control (: $p < 0.01$, * : $p < 0.05$)

IV. 考 察

茵陳蒿湯은 茵陳·大黃·梔子로 구성되었으며, AD 200년경 張1)이 최초로 ‘陽明病, 發熱汗出, 此爲熱越, 身必發黃, 茵陳蒿湯主之, 傷寒七八日, 身黃而梔子色, 小便不利, 腹微滿者, 茵陳蒿湯主之’라고 한 이후, 千金要方27)에서는 熱結身黃에, 醫方集解28)에서는 濕熱陽黃에 사용되어 왔으며, 현대에 이르러서는 주로 급성바이러스성 간염, 만성간염, 간경화, 담낭 및 담도질환 등에 활용되어 온 처방이다²⁻³⁾.

본 처방의 한방약리에 의하면, 茵陳은 濕熱을 淸利시켜 黃疸를 제거하고 利膽작용으로 간기능을 회복시키는 君藥이며, 梔子は 臣藥으로서 苦寒한 약성으로 淸熱瀉火, 涼血解毒하는 효능을 갖고 濕熱을 소변으로 導出한다. 그리고 大黃은 佐藥으로 腸胃를 蕩滌하는데 茵陳과 配伍되어 濕熱을 대변으로 導出하는 기전을 가진다고 한다. 따라서 본 방은 淸熱利濕 退黃疸하는 주요한 方劑이다⁴⁻⁵⁾.

한편 역대 문헌에서 세 약물간의 상호작용에 대한 설명으로는 茵陳, 梔子, 大黃 순으로 약동학적 상승작용을 대부분 언급하였으며, 특히 熱의 작용이 강한 황달에 梔子와 大黃이 보조적인 역할을 한다고도 하였으며, 또한 標와 本으로 나누어 梔子 大黃과 茵陳간의 역할을 설명하기도 하였다. 실험적으로는 세 약물 모두 利膽작용이 있으며 간세포재생촉진작용을 하는데 大黃은 茵陳의 장관운동운동의 부작용을 조절하고, 熱毒으로 인한 변비를 조절하며, 利膽작용을 협조한다. 梔子是 茵陳의 약효를 북돋우어 利膽작용을 강화하고 혈중 bilirubin치를 내려 淸熱利膽작용을 한다고 하였다²⁹⁾.

茵陳蒿湯과 유사한 약리작용을 가진 처방으로는 茵陳五苓散이 있는데 이는 본 방과 비교하여 熱의 증상보다는 濕이 과다한 황달에 활용되며, 梔子大黃湯은 증상이 신체의 상부에 집중될 때 활용되며, 大黃硝石湯은 瘀熱이 보다 심할 경우에 활용된다고 하였다. 그리고 梔子柏皮湯과 麻黃連翹赤小豆湯은 신체의 내부보다는 외부에서 원인적인 요소가 많을 때 활용된다고 하였으며, 茵陳朮附湯과 茵陳四逆湯은 茵陳蒿湯과는 반대로 寒한 증상으로 나타날 때

활용된다고 하여 그 차이가 있음을 설명하였다³⁰⁾.

각 약물의 현대적인 약리기전을 보면,茵陳蒿속의 esculetin은 담즙의 분비를 촉진하고, 山梔子의 geniposide와 협력하여 담즙분비를 더욱 촉진하며 또 담관말단의 Oddi괄약근을 이완하여 담즙의 배설을 촉진한다. 또한 혈중의 cholesterol과 β -lipoprotein을 저하하여 혈관벽에 지방이 침착하는 것을 방지한다. 梔子는 crocin, crocetin이 담즙의 분비와 배설을 촉진하고 혈중 bililubin치를 저하시켜 황달을 소퇴시킨다. 그리고 大黃중의 sennoside는 대장내에서 rhein anthrone이 되어서 장점막을 자극하여 연동운동을 항진시키고 수분 및 Na흡수를 저해하여 설사를 유발한다. 또한 간손상을 보호하고 황달성간염을 치료하며, B형 간염에 대한 억제작용이 있다⁶⁾.

이러한 개별약물의 치료작용을 근거로 複方으로서 茵陳蒿湯은 그 효능의 극대화 와 부작용의 최소화를 도모하는 것으로 인식되어 왔으며, 이에 대한 다양한 실험연구로서는 김⁷⁾은 고지혈증에 활용할 수 있고, silymarin과 병용투여로 간기능 개선효과가 있다고 하였으며, 이⁸⁾는 茵陳蒿湯 약침투여가 경구투여보다 간기능 개선에 효과적이라고 하였으며, 박⁹⁾이 투여방법을 달리한 茵陳蒿湯이 CCl₄ 유도 家兔에서 간보호 효과를 보고하였고, 배¹⁰⁾는 茵陳蒿湯에서 분리된 화합물의 항균활성이 우수함을 보고하였으며, 정¹¹⁾은 담석증 병태모형에 대하여 담석형성을 억제하고 형성된 담석을 줄인다고 하였으며, 김³¹⁾은 시간경과에 따른 효능변화를 관찰하여 TAA에 의한 급성 간중독에 유의한 효과를 보

고하였다.

그러나 茵陳蒿湯의 개별약물이 가지는 특성이 조합으로 인하여 어떠한 상관관계를 가지고 藥力을 나타내는지에 대한 연구 보고는 보이지 않았다. 따라서 저자는 간독성 흰쥐에 茵陳蒿湯 각 조합을 투여하여 상호 약물 간에 어떠한 반응으로 약효가 발휘되는지를 알아보았다.

간독성 실험동물모델에서 흔히 사용되는 약품으로는 CCl₄와 acetaminophen이 있는데, 이 중 acetaminophen은 해열진통제로서 흔히 사용되어지고, 간에서 대사되어 소변으로 배설되는데, 일부는 cytochrome p450에 의해 강한 독성물질인 n-acetyl-benzoquinoneimine (NAPQI)이 생성된다. 이 물질은 glutathione에 의해 환원되어 대사되지만, 고용량을 사용할 경우 glutathione이 모자라게 되고, NAPQI가 세포 내에 축적되어 간독성을 일으키는 것으로 알려졌다. 최근의 연구에 의하면 NAPQI의 독성만으로는 acetaminophen의 간독성을 설명하는데 충분하지 않다고 하며, NAPQI의 독성 이외에 활성산소(ROS)와 NO의 생성, 지질 과산화물의 생성, 미토콘드리아의 기능부전, 칼슘항상성의 붕괴, apoptosis의 유도 등이 모두 acetaminophen의 간독성 유발기전에 관여하는 것으로 보고되고 있다³²⁻³⁵⁾.

茵陳蒿湯과 개별 약물 조합군들의 간보호작용 기전을 알아보고자 acetaminophen의 독성작용 중 활성산소에 대한 항산화능력을 측정하였다. In vitro 상의 항산화 효과에서 linoleic acid 산화억제 효과, DPPH radical 소거효과, xanthine-xanthine oxidase system에서 superoxide 억제효과, hydroxy radical에 의한 지질과산화 반응

억제 효과 등을 측정하였다.

지질과산화물의 생성은 세포막 인지질을 구성하는 불포화지방산의 이중결합 부위에 superoxide radical, hydroxy radical 등이 수소를 탈취하여 fatty acid radical을 생성하며 이는 다시 산소분자와 결합하여 peroxy radical을 생성하고 이는 다시 인접한 부위에 있는 탄화수소와 연쇄적으로 반응하여 지질과산화물을 형성한다³⁶). 불포화지방산인 linoleic acid의 자동산화계를 이용하여 지질과산화물 생성 억제 효과를 관찰한 결과, 지질과산화물의 함량은 시간이 경과함에 따라 점점 증가하여 대조군에서는 현저한 증가를 보였으며, 항산화제인 BHT 및 tocopherol을 첨가한 실험군에서는 대조군에 비해 지질과산화물의 생성이 현저하게 억제되었다. 이에 비하여 약물투여군에서는 전반적으로 농도가 높아질수록 억제 효과가 현저하게 나타났다. 그중茵陳蒿湯과茵陳+梔子是 배양 10일째 추출물 농도가 500, 1000, 2000, 4000 μg 일 때 유의성 ($p < 0.01$, $p < 0.05$) 있게 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 1).

DPPH radical은 반응성이 강하여, 항산화제로부터 전자 혹은 수소원자를 얻음으로써 안정한 형태의 생성물로 전환하는 것으로 알려져 있다³⁷⁻³⁸). 각 추출물들의 농도별 희석액에 대한 DPPH radical 소거효과를 관찰한 결과, 대부분의 농도에서 농도 의존적인 radical 소거효과가 나타났다. 특히,茵陳蒿湯,茵陳+大黃군은 다른 실험군들보다 양호한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

Superoxide는 생체내의 방어기전에 중요한 역할을 담당하지만 지질과산화반응을 유발시킬 뿐만 아니라 더 반응성이 높은

hydroxy radical을 생성시키는 전구물질이 되기도 한다²¹). 각 추출물들의 농도별 희석액에 대한 superoxide의 생성 억제효과를 관찰한 결과, 각 추출물에서 농도 의존적인 superoxide의 생성 억제효과를 보였다. 추출물 질량 1000 μg 일 때茵陳蒿湯과茵陳+大黃군의 효과가 다른 실험군들보다 양호한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

Hydroxy radical은 superoxide anion 및 hydrogen peroxide 등의 활성산소에 비하여 활성이 훨씬 강하여 생체 세포막의 지질과산화 반응을 개시하며 세포막 및 거대분자에 대한 직접적 손상을 일으키는 주된 free radical로 알려져 있다³⁹). Hydroxyl radical에 대한 억제 효과를 관찰해 본 결과, 항산화제인 BHT를 첨가한 실험군에서는 대조군에 비해 약 91%의 억제 효과를 보였고, 실험군에서는 대조군에 비하여 모두 농도 의존적인 억제 효과를 나타내었는데, 추출물의 양이 1000 μg 일 때茵陳蒿湯에서 보다 양호한 지질과산화물 생성 억제 효과가 나타났다 (Fig. 4).

이상의 *in vitro* 실험 결과로 보아, acetaminophen의 독성작용 중 활성산소에 대한 항산화능력에 있어서茵陳蒿湯은 모든 측정 항목에서,茵陳+大黃은 DPPH radical 소거효과, xanthine-xanthine oxidase system에서 좀 더 나은 효과를 나타내었다 (Fig. 1-4).

*In vivo*상의 항산화 효과에서는 항산화와 관련된 lipid peroxide의 함량, catalase 활성, glutathione 함량, GST 활성 등을 측정하였다.

Lipid peroxide는 세포막의 지질성분이 산화되어 나타나는 반응산물이므로, 생체 조직중에서 생화학적 조직 손상의 척도로

널리 이용되며 조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로도 활용된다⁴⁰⁻⁴¹⁾. 혈청과 간조직에서의 MDA 함량은 대조군이 정상군에 비해 약 3배 증가하였으며, 실험군들 중 茵陳蒿湯 투여군이 대조군에 비해 감소하였다 (Fig. 5-6).

Catalase는 세포내 존재하는 항산화효소로서, H₂O₂를 분해하여 제거하는 작용을 가진다⁴²⁾. 간조직에서의 catalase 활성을 측정한 결과 대조군은 정상군에 비해 감소하였으며, 실험군에서는 茵陳蒿湯 투여군이 매우 유의성 ($p < 0.01$) 있게 증가하였고, 茵陳+梔子 및 茵陳+大黃 투여군도 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가하였다 (Fig. 7).

Glutathione은 외부에서 유입된 유독물질과 포합반응을 하여 체외로 배출시키므로⁴³⁻⁴⁴⁾, 독성물질에 대한 생체의 방어능력을 간접적으로 측정할 수 있는 기준이 될 수 있다. 간에서의 glutathione은 단백질이나 DNA합성, amino acid의 이동반응 및 thiol기의 저장등과 같이 생물학적인 중요한 여러 가지 반응에 직접 관여한다. 여러 가지 해독반응에서 체내에서 일차적으로 산화된 대사물을 포함하는 과정에서 내인성 반응체인 glutathione을 이용하여 체내의 독성물질을 전이 분해시키는 역할을 GST가 하는 것으로 알려져 있다⁴⁵⁻⁴⁷⁾. 간조직에서의 glutathione 함량은 대조군은 정상군에 비해 감소하였고, 실험군에서는 茵陳蒿湯 투여군이 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가하였다 (Fig. 8).

Glutathione-s-transferase는 독성물질을 해독하며, 이종 생리물질을 체외로 배설하는 작용을 촉매하며 organic hydroperoxide를 peroxidation하여 지방산화를 방지하며 세포의 내성을 증가시키는 중요한

작용을 한다⁴⁸⁻⁴⁹⁾. 간조직에서의 glutathione-s-transferase 활성은 대조군은 정상군에 비해 증가하였고, 실험군에서는 茵陳蒿湯 투여군이 매우 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였다 (Fig. 9).

이상에서 *in vivo*에서의 항산화 방어계에 미치는 영향을 살펴본 바 茵陳蒿湯은 간기능을 일정하게 개선시키며, 또한 항산화계에서의 효소 활성화 및 지질과산화물 제거에 일정한 영향을 미치는 것으로 보여진다.

전형적인 간손상은 간에서 단백질합성을 억제하고, 간 glycogen양의 감소, ATP 양의 감소, 혈청 transaminase의 상승 등을 일으켜, 조직학적으로 간세포의 응고괴사, 수종변성, 지방변성, 소엽중심성괴사 등이 일어나며, 만성변화로는 간경변증을 초래하는 것으로 알려져 있다⁵⁰⁾. 간경변시에는 혈액화학적으로 혈액중의 T-BIL, bile acid, GOT, GPT, γ -GTP 및 ALP가 상승되는 반면 BUN (blood urea nitrogen), glucose, albumin 및 총 단백질량은 감소되고, 그 외 creatinine, cholesterol, triglyceride, Ca, P, Na, K, 탄산 (HCO₃), Cl, CPK (creatine phosphokinase), amylase, lipase 및 globulin의 양은 정상수치를 나타낸다. 또한 혈액학적으로는 총적혈구수, hemoglobin, hematocrit 및 망상적혈구의 수적감소가 관찰될 뿐 기타 총백혈구수, band neutrophil, 중성호성백혈구, 임파구, 단핵구, 산호성 백혈구, 염기호성 백혈구, MCV, 유핵 적혈구, Heinz bodies 및 혈소판은 정상범위로 관찰된다⁵¹⁾. 이중에서도 GOT, GPT, ALP, LDH는 간장질환의 경우 조직세포의 손상에 의하여 혈청중의 활성도가 증가하기 때문에 간

질환의 진단 및 예후를 파악하는데 지표가 된다.

이에 茵陳蒿湯과 그 구성 약물군들의 acetaminophen으로 유도된 간독성에 대한 간기능 개선 효과를 알아보기 위해 GOT, GPT, γ -GTP, ALP, LDH 그리고 bilirubin치를 측정하였다.

일반적으로 GOT로 알려져 있는 aspartate transferase는 미토콘드리아에 부착되어 있는 효소이다. 이 효소는 일반적인 체 조직에서 쉽게 관찰되나 간과 횡문근 (striated muscle)에 특히 높은 활성도를 나타내는 것으로 알려져 있다. GOT는 횡문근의 괴사 또는 간세포의 변성 및 괴사 시에 증가됨에 따라, 용혈 (hemolysis) 또는 지방혈증 (lipema) 시에도 약간의 증가가 인정되나 일반적으로 GOT 상승은 근육의 괴사 또는 간세포의 괴사를 의미 하는 것으로 받아들여지고 있다 (51-52). 혈청에서의 GOT 활성은 대조군이 정상군에 비해 2배 가량 증가하였고, 실험군에서는 茵陳蒿湯 투여군이 매우 유의성 ($p < 0.01$) 있게 감소하였다 (Fig. 10).

흔히 GPT라 불리는 alanine transferase는 포유류의 간세포 (hepatocyte)에 다량 존재하는 효소로, 간세포의 파괴 또는 손상기 혈중으로 유리되는 것으로 알려져 있다. GPT의 상승은 그 원인과 가역성은 알 수 없으나, 심한 간세포의 손상이 존재한다는 하나의 지표로 이용될 수 있으며, 정상 수치 보다 3배 이상의 상승이 관찰되면 2~5일 이내에 심각한 간 손상이 유발되었다고 말할 수 있는 것으로 알려져 있다 (51-52). 혈청에서의 GPT 활성은 대조군이 정상군에 비해 2배 가량 증가하였으며, 실험군에서는 茵陳蒿湯 투여군이 유의성

($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 11).

γ -GTP는 간의 문맥 이상시 증가되는 효소로 근본적인 상승 원인과 상승폭은 ALP와 유사하나, 더 민감하게 반응하는 효소로 알려져 있다 (51-52). GOT, GPT와 마찬가지로 간세포 중 세포질에 다량으로 분포하며 기질인 γ -glutamylpeptide의 γ -glutamyl기를 다른 amino acid 또는 peptide로 전이시키는 효소이다. 간염, 담즙울체, 간경변, 간암 등의 손상이 오면 혈액 중 다량으로 유출되며 혈중 γ -GTP 활성의 증가 현상을 관찰하여 세포독성 여부를 알 수 있다 (53). 혈청에서의 γ -GTP 활성은 대조군이 정상군에 비해 2배 가량 증가하였으며, 실험군에서는 茵陳蒿湯 투여군이 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 12).

흔히 ALP로 알려져 있는 alkaline phosphatase는 간과 뼈 조직에서 확인되는 물질로 혈중 ALP 농도의 상승은 간의 담관정체 및 corticosteroid 제제의 부작용시 관찰된다 (51-52). 따라서 혈중 ALP의 상승은 간과 뼈의 괴사에 의해 유발되기보다는 담관울체성 질환의 존재를 의미한다. CCl4 투여시 유발되는 섬유화와 담관의 증식에 의해 담즙의 분비 장애가 초래되므로 혈중 ALP의 상승은 간경변을 진단하는 하나의 지표로 사용되어 진다 (54). 혈청에서의 ALP 활성은 대조군이 정상군에 비해 2배 가량 증가하였으며, 실험군에서는 茵陳蒿湯 투여군과 茵陳+梔子 투여군이 대조군에 비해 감소함을 알 수 있었으나 유의성은 보이지 않았다 (Fig. 13).

LDH는 세포 분획중 가용성 분획에 존재하는 효소로서 동물조직에 널리 분포하고 주로 혈청을 검체로 하여 분석하며,

LDH의 상승은 간장, 심장, 신장 등의 각종 질환과 악성종양, 악성빈혈 등에서 관찰되어 간질환에 대한 약물의 효과를 평가하는 하나의 지표로 이용되고 있다⁵⁴⁾. 혈청에서의 LDH 활성은 대조군이 정상군에 비해 2배 가량 증가하였고, 실험군에서는茵陳蒿湯 투여군이 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 14).

Bilirubin은 간 또는 비장의 망내계세포에서 효소에 의한 산화 환원반응으로 생긴 terrapyrrol 화합물로 물에 불용이며 혈액소 (hemoglobin)의 파괴 시 생산되는 물질로 혈중에서 conjugate 또는 unconjugate 형태로 순환되며, 혈청 중 T-BIL의 상승은 체내 용혈의 항진, 간내 담즙울체, 간의 담즙울체, 간세포의 bilirubin처리과정의 이상에서 나타나며⁵⁵⁾ 간질환을 의미하는 하나의 지표로 사용되고 있다^{51,56-57)}. 혈청에서의 bilirubin 함량은 대조군이 정상군에 비해 2배 가량 증가하였으며,茵陳蒿湯 투여군이 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 15).

이상의 결과에서茵陳蒿湯만 acetaminophen으로 유도된 간독성에 대한 간보호 효과가 현저하고, 약물 조합군은 독성회복 능력이 뚜렷하지 않음을 보여주고 있는데, 이에 대한 깊은 연구가 더욱 필요한 것으로 생각된다.

V. 結 論

茵陳蒿湯의 자유기 소거능, 항산화 방어 체계에 미치는 영향 및 간독성에 대한 회복 능력을 알아보기 위하여 acetaminophen으로 유도된 간독성 모델 흰쥐에茵陳蒿湯과

구성약물군 조합을 투여하여 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. In vitro 상의 항산화 효과에서 linoleic acid 산화억제 효과, DPPH radical 소거효과, xanthine-xanthine oxidase system에서 superoxide 억제효과 등을 측정한 결과, 각 추출물 모두 비슷하였으나茵陳蒿湯은 모든 실험 항목에서 상대적으로 좀 더 나은 효과를 나타내었다.
2. In vivo 상의 항산화 효과에서 혈청 LPO, 간조직 LPO, catalase, GSH, GST를 측정한 결과茵陳蒿湯은 혈청 LPO를 제외한 모든 부분에서 유의성을 나타내었다.
3. 간기능회복 효과에서는 GOT, GPT, γ -GTP, ALP, LDH 활성, bilirubin 함량을 측정한 결과, ALP 활성을 제외한 검사항목에서茵陳蒿湯만 유의성을 나타내었다.

이와 같은 결과로 보아茵陳蒿湯이 acetaminophen으로 유도된 간손상에 일정한 보호효과가 있음을 알 수 있었고, 그 기전에는 항산화 작용이 크게 작용한 것으로 추정할 수 있었다. 약물 배합 비율에 따른 비교실험에서茵陳蒿湯이 보다 유의함을 알 수 있었다. 이러한 결과로 보아茵陳蒿湯의 간독성에 대한 간 보호 작용은 항산화 작용과 각 약물의 복합작용에 의한 효능이라 생각되며, 앞으로 이에 대한 기전연구가 더욱 필요하다고 사료된다.

參 考 文 獻

1. 장중경 : 증경전서, 서울, 대성문화사, p.409, 494, 611, 1984.
2. 허준 : 동의보감, 서울, 남산당, p.383, 513, 1987.
3. 沈金鰲 : 中醫對肝炎, 肝硬化的 辨證論治, 山西人民衛生出版社, 중국, pp.30-33, 1983.
4. 江蘇新醫學院編 : 中藥大사전, 香港, 山海科學技術 출판사, pp.102-108, 1588--1591, 1984-1987.
5. 汪詡庵 : 醫方集解, 서울, 행림출판사, pp.248-249, 1977.
6. 박영순 : 한방의 약리해설, 서울, 아카데미서적, p.125,153,165, 2002
7. 김성동 :茵陳蒿湯이 손상간 및 고지혈증에 미치는 영향, 한국, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 1992.
8. 이승우 : 茵陳蒿湯의 약침과 경구투여가 손상간에 미치는 영향의 비교연구, 한국, 대한침구학회지, 1999;16(1).
9. 박동원 : 茵陳蒿湯 투여방법이 CCl₄ 중독 및 가토의 간기능에 미치는 효과에 관한 연구, 서울, 경희대학교 대학원, 석사학위논문, 1977.
10. 배오성 : 풍한습주치처방의 항균력검색과 茵陳蒿湯 항균효능 및 성분과 관한 연구, 서울, 경희대학교대학원, 박사학위논문, 1998.
11. 정승식 : 茵陳蒿湯 및 茵陳蒿湯加味方이 생쥐의 담석증모형에 미치는 영향, 서울, 동의병리학회지, 1991;6.
12. 菊谷豊彦 : 급성간염에 대한 茵陳蒿湯의 효과, 제1회 아시아학술대회발표, 1971.
13. Osawa T., Namiki M. : A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. Agric. Biol. Chem. 1981;45:735-739.
14. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. : Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochem. 1978;95:351-358.
15. Hatano T., Kagawa H., Yasuhara T., Okuda T. : Two new flavonoids and other constituents in licorice root their relative astringency and radical scavenging effects. Chem. Pharm. Bull. 1988;36:2090-2097.
16. Huang B., Zhang J., Hou J., Chen C. : Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro. Free Radic Biol Med. 2003;35(7):805-13.
17. Suematsu T., Kamada T., Abe H., Kikuchi S., Yagi K. : Serum lipoperoxide levels in patients suppering from liver disease. Clin. Chim. Acta. 1977;79:267-770.
18. Aebi H. : In Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U. eds.), New York, Academic press. pp.674-678, 1974.
19. Ellman G. L. : Tissue sulfhydryl group, arch. Biochem. Biophys., 1959;82:70-77.
20. Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. : Glutathione S-transferase. the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 1974;249:7130-7139.

21. Lowry O. H., Rosehrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. chem.*, 1951;193:265-275.
22. Retman S., Frankel S. A. : colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Patrol.*, 1957;(28):58-63.
23. Divon D. M. : Serum gamma glutamyl transpeptidase activity in diseases of the liver and gallbladder (except infectious jaundice), *Vnitr. Lek.*, 15(4):347-356. 1969.
24. Petkoba J., Popova N., Kemileva Z. : Changes of enzyme activity in some organs following thymectomy, *Agresologie.*, 1973;14(5):323-326.
25. 熊崎平膝 : 岐醫大紀. 日本. 1958;(6):-94.
26. Mashige F., Tanaka N., Maki A., Kamei S., Yananaka M. : *Clinical Chemistry* 27, 1981;(8):1352-1356.
27. 孫思邈 : 備急千金要方, 서울, 대성문화사, p.346, 1986.
28. 汪昂 : 國醫醫方集解, 서울, 대성문화사, pp.401-402, 1986.
29. 金家浚 外 : 중의백가방론회취, 중국, 중경출판사, pp.799-802, 1994.
30. 경희한의대졸준위학술부 : 금계요략탕 증론치, 서울, 도서출판정담, pp.468-472, 2001.
31. 김원규 : 茵陳蒿湯 전탕액의 경시적 효능변화에 관한 연구, 대전대학교대학원, 석사학위논문, 1991.
32. 홍사석 외 : 이우주의 약리학 제3판, 서울, 의학문화사, pp.341-342, 1993.
33. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 고문사, pp.12-13, 2000.
34. Waters E, Wang JH., Redmond HP., Wu QD., Kay E., Bouchier-Hayes D. : Role of taurine in preventing acetaminophen-induced hepatic injury in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 ;280(6):G1274-9.
35. Jaeschke H., Gores GJ., Cederbaum AI., Hinson JA., Pessayre D., Lemasters JJ. : Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2002 ;65(2):166-76.
36. 尹哲浩 外 : 흰쥐의 肝組織에서 鹿茸藥 鍼製劑의 抗酸化作用에 관한 研究, 大韓韓醫學會誌, 1996;17(2):191-202.
37. 裴基采 : 高麗人蔘, 高麗紅蔘 및 total saponin의 抗酸化 作用, 大田大學校大學院, 1997.
38. 文振榮 外 : 柴胡가 free radical에 의한 脂質過酸化物 生成에 미치는 效果. 東國 論文集 自然科學篇, 1996;15:361-375.
39. 金永坤, 金永杓 : 프리라디칼, 서울,麗文閣, pp.64-65, 1997.
40. David R. : Mechanistic toxicology, A radical perspective. *JP. harm. pharmacol.*, pp.41, 505-511, 1989.
41. Barry H. : Oxidants and human disease, Some new concepts, *FASEB. J.*, pp.1, 358-364, 1987.
42. Ross D., Moldeus P. : Antioxidant defence systems and oxidative stress. In *Membrane Lipid Oxidation*, ed. by Vigo-Pelfrey C., Vol II, CRC

- Press, Boston, pp.151-170, 1993.
43. Boyland E., Chasseud, L. F. : The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *ADV. Enzymol.*, 1969;-32:173-219
 44. Ross D. : Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents mechanism of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. *Pharmacol. Ther.*, 1988;37(2):231-239.
 45. Chance B., Sies H., Boveris A. : Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 1979 ;59:527-605.
 46. Ploemen J. H., van Ommen B., van Bladeren P. J. : Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochem. Pharmacol.* 1990;40:1631-1635.
 47. Vos R. M., van Bladeren P. J. : Glutathione S-transferase in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* 1990;75:241-265.
 48. Armstrong R. N. : Glutathione S-transferases Structure and mechanism of an archetypical detoxification enzyme. *Adv. Enzymol.* 1994:-69:1-44.
 49. Hayes J. D., T. J. Mantle, C. B. Pickett : Glutathione S-transferase and drug resistance. Taylor and Francis. London. 1990.
 50. 박재현 외 : Carbon tetrachloride 독성에 미치는 인진호 및 인삼의 효과, *우석의대잡지*, 1970;7(2):473-481.
 51. Sodikoff CH. : Laboratory propiles of small animal diseases. A guide to laboratory diagnosis. 2nd ed., Mosby-Year Book Inc., St. Louis, 1995.
 52. Willard MD. : Small animal clinical diagnosis by laboratory method, Saunders, Philadelphia, 1989.
 53. Konobu K., Yamamoto E., Toyomoto M., Sawanishi, K. : Effect of uremic middle molecules removed during hemifiltration on the enzyme activity in rat liver cystol, *Nippon-Jinzo-Gakkaishi*, 1991;33(1):1105-1110.
 54. Millward-Salder W., Karran A. : Liver and biliary disease, 2nd edition, Bailliere Tindall, London, 1985.
 55. John D. Bauer : Clinical laboratory methods 9th edition, The C.V.Mosby Company ST.Louis, pp.575-578, 580-583, 1982.
 56. Coles EH. : Veterinary clinical pathology. 4th ed., Saunders, Philadelphia, 1986.
 57. Kaneko JJ. : Clinical biochemistry of domestic animals. 3rd ed., Academic press, San Diego, 1980.