

## 茵陳清肝湯의 알코올성 산화스트레스에 대한 보호효과 연구

김영태, 우홍정  
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

### Protective Effects of *Yinjinchunggan-tang* (YJCGT) on Alcohol-induced Oxidative Stress

Young-tae Kim, Hong-jung Woo

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University

#### ABSTRACT

**Objectives** : Oxidative stress seems to play a major role in mechanisms by which ethanol causes liver injury. Previous studies have shown that treatment with *Yinjinchunggan-tang* (*Yinchenqinggan-tang*, YJCGT) has protective effects on alcoholic liver disease. The aim of this study was to investigate the protective effects of YJCGT on alcohol-induced oxidative stress.

**Materials and Methods** : *In vitro*, we evaluated the inhibitory activities of YJCGT on DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl), xanthine oxidase, trypsin, and hyaluronidase. In a cell culture model, we measured cell viability and proliferation, and the activities of superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) after YJCGT treatment in C34 and E47 cell lines, and HepG2 cells transfected with/ without cytochrome P450 II E1 (CYP2E1) gene. *In vivo*, we estimated serum level of hepatic biochemical markers, and alcohol concentration in the blood.

**Results** : YJCGT showed significant free radical scavenging activity against DPPH and xanthine oxidase and decreased hyaluronidase activity effectively *in vitro*. YJCGT also increased cell viability, and proliferation in C34 and in E47 cell lines, and increased activities of superoxide dismutase, and catalase in C34 and in E47 cell lines. YJCGT reduced serum AST, LDH, and total cholesterol level in some of the results, and reduced blood alcohol concentration *in vivo* as well.

**Conclusions** : This study suggests that YJCGT has protective effects on oxidative stress by inhibiting alcohol-induced suppression of antioxidant enzyme activities.

**Key words** : *Yinjinchunggan-tang* (*Yinchenqinggan-tang*), antioxidant effect, oxidative stress, CYP2E1, alcohol

### 1. 緒 論

모든 호기성 동물은 호흡을 통해 산소를 이용하여 에너지 대사를 수행하며 살아간다. 이 과정 중 일부 산소의 약 1-3%가 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)으로 변환되고<sup>1</sup>, 불안정한 상태에서 세포내 단백질, 지질, DNA 등에 손상을 일으키게

된다<sup>2,3</sup>. 생체 내에서는 이들에 대한 방어기구로 다양한 항산화 효소 및 항산화 물질이 존재하여 스스로를 보호하게 되는데, 과도한 활성산소의 발생은 산화스트레스를 야기하게 된다<sup>4,5</sup>.

우리나라의 서구화 및 독특한 음주문화로 인해, 만성적인 알코올 섭취가 간질환에서 차지하는 비율이 점차 증가하고 있으며 이에 따라 고위험군의 빈도가 높아지는 추세이다. 2009년 국민건강 영양 조사의 결과<sup>18</sup>를 보면, 월간음주율(만19세 이상)은 2009년 남자 75.7%, 여자 43.3%로 2008년과 유사한 수준이었으며, 미국에 비해 우리나라 남자 월간음

· 교신저자: 우홍정 서울시 동대문구 회기동 1번지  
경희의료원 한방병원 간계내과학교실  
TEL: 02-958-9118 FAX: 02-958-9120  
E-mail: hjwoo@khu.ac.kr

주율은 높고, 여자는 유사한 수준이었다. 고위험음 주율(만19세이상)은 2009년 남자 24.6%, 여자 7.3%로 2008년에 비해 비록 소폭 감소하였지만, 여전히 알코올성 간질환에 대한 사회적인 문제에 대한 관심이 많이 필요한 실정이다.

만성적인 알코올 섭취는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione 등과 같은 항산화 물질의 생성이나 작용을 저해하고 산화스트레스를 촉진하여 간세포 손상을 일으키게 되고<sup>8</sup>, 연구결과에서는 알코올성 간손상의 원인으로 지목되고 있는 산화스트레스의 발생에서 cytochrome P450 II E1(CYP2E1)의 대사가전이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>23</sup>.

茵陳清肝湯<sup>9</sup>은 清熱利濕, 消積祛瘀를 목표로 만성 간질환에 사용되고 있다.茵陳清肝湯에 대한 연구로는 급성 및 아급성, 만성 경구독성시험에서 약물의 안전성을<sup>10</sup>, 전격성 간염을 일으킨 마우스 생존율을 증가를<sup>11</sup>, 만성 B형간염 환자의 간기능 개선과 HBeAg의 음전율을 높이는 임상보고를<sup>12</sup>, C형간염에 적용하여 Anti-HCV의 역가를 낮추고 간세포 파괴의 억제를<sup>13</sup>, 수침스트레스에 의한 간경변증에 간손상 회복과 진행억제를<sup>14</sup>, 분자생물학적인 연구를 통해 茵陳清肝湯加味方이 유전자 조절을 통해 세포사멸을 억제한다고 보고하였다<sup>15,16</sup>. 또한 최근에는 茵陳清肝湯의 간세포 보호하고 간섬유화를 억제한다고 보고하였다<sup>17,19-22</sup>.

본 연구에서는 알코올성 간손상의 주된 원인이 산화스트레스임에 착안하여, 알코올에 의해 유발된 산화스트레스에 대한 茵陳清肝湯의 보호효과를 알아보기 위해 실험을 진행하였다. 먼저 시험관 내에서 알코올로 인한 CYP2E1 관련 산화스트레스에 대한 항산화 효소들의 활성을 확인하고 항산화 및 항염증 반응에 관련된 효소 활성에 미치는 영향을 관찰하였으며, 그 다음 CYP2E1 transfected HepG2 cell을 이용하여 茵陳清肝湯이 세포 활성 및 증식에 미치는 영향을 확인하였고, 동물 실험에서는 茵陳清肝湯이 혈청 중의 간과 관련된 각종 생화학적 지표 및 혈중 알코올 농도에 미치는 영향을 관찰

하여 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 재 료

#### 1) 약 재

본 실험에 사용된 藥材는 대한약전 및 대한약전의 한약규격집<sup>24</sup>에 근거하여 경희의료원 한방병원 약제과에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며, 茵陳清肝湯(이하 YJCGT)처방의 내용과 용량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of *Injinchunggan-tang* (YJCGT).

韓藥名	Scientific Name	Volume (g)
茵 陳	Artemisiae capillaris Herba	50
地 榆	Sanguisorbae Radix	15
白 朮	Atractylodis Rhizoma Alba	12
茯 苓	Hoelen	12
豬 苓	Polyporus	12
覆盆子	Rubi Fructus	12
生 薑	Zingiberis Rhizoma	12
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	8
蘿蔔子	Raphani Semen	8
青 皮	Aurantii Pericarpium	6
甘 草	Glycyrrhizae Radix	6
Total amount		153

#### 2) 동 물

본 연구에 사용된 실험동물은 체중 25~40 g의 8주된 ICR 계통으로, 알비토 중형이며 Institute of Cancer Research(U.S.A)에서 육종된 대표적인 실험동물(mouse)로 썬타코(Seoul Korea)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 시험관 실험

#### 1) DPPH 저해 활성도 측정

Free radical scavenging 작용은 비교적 안정한 free radical인 DPPH를 이용한 Blois의 방법<sup>27</sup>을 사용하

여 측정하였다. 샘플을 methanol에 녹여 검액으로 준비한 후 1 ml씩 취하고 DPPH 용액(5.92 mg/MeOH 100 ml)을 0.25 ml 넣고 상온에서 30분간 방치하였다. 반응이 진행된 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 free radical 소거활성능을 계산하였으며, 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다. 각 농도별로 저해율을 측정하여 ED<sub>50</sub>을 계산하였다.

#### 2) Xanthine oxidase 저해 활성도 측정

0.05 M의 sodium carbonate buffer(pH 10.5)를 1.05 ml 넣고, 3 mM xanthine(as substrate), 3 mM EDTA(as media), 0.15% bovine serum(as stabilizer), 0.75 mM NBT(as colorizer)를 50 µl씩 넣고 검액을 150 µl 넣은 후 10분간 상온에서 방치하였다. 6 mM의 xanthine oxidase(as start soln)를 50 µl 넣고 20분 간 상온에서 반응시킨 후 6 mM의 CuCl<sub>2</sub>로 반응을 종결시켰다. 560 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율을 계산하였으며, 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다. 각 농도별로 저해율을 측정하여 ED<sub>50</sub>을 계산하였다.

#### 3) Trypsin 저해 활성도 측정

Trypsin 효소 저해활성은 Anson<sup>28</sup>과 Tsutomu<sup>29</sup> 등의 방법에 준하였다. 즉 trypsin 20 µg/ml 및 시료를 1/15 M phosphate buffer(pH 7.6)에 용해시킨 검액을 각각 40 µl와 100 µl씩 취하고 0.5% casein 용액을 0.36 ml 가한 후 37 °C에서 10분간 가온하였다. 5% trichloroacetic acid를 1 ml씩 넣어 반응을 종결시킨 후, 0.05 M HCl을 40 µl 넣은 후 3000 rpm, 4 °C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 각 상등액을 0.25 ml을 취한 후 증류수 0.2 5 ml와 혼합한 후 0.5 M NaOH를 1 ml 가했다. Phenol 희석액을 0.3 ml씩 가한 후에 37 °C 수욕 상에서 15 분간 incubation하고 660 nm에서 흡광도를 측정하여 억제율을 계산하였다.

#### 4) Hyaluronidase 저해 활성도 측정

각 검액을 0.1 ml씩 취하고 hyaluronidase 용액(71.8 mg/10 ml)을 0.05 ml 가한 후 잘 혼합한 다음 37 °C에서 20분 간 incubation한 다음, activator로

서 12.5 mM CaCl<sub>2</sub>를 가하고 잘 혼합하여 다시 20 분 간 incubation한다. 기질로서 0.12% hyaluronic acid-K 용액(36 mg/30 ml)을 0.25 ml 가한 다음 다시 40분 간 incubation하고, 0.4 N NaOH 0.1 ml 및 potassium boate 용액(boric acid 49.44 g에 증류수 1 L를 넣어 녹인 용액에 KOH 22.4 g을 가하여 용해한 용액) 0.1 ml를 가하여 100 °C의 끓는 수욕 상에서 3분간 가열하였다. 흐르는 물에 식힌 후 발색제로서 DMAB 시약(p-dimethylaminobenzaldehyde 10 g을 빙초산:10N HCl(7:1) 용액 100 ml에 녹인 용액을 다시 빙초산으로 10배 희석함) 3 ml를 가하여 37 °C에서 20분 간 incubation한 다음 585 nm에서 흡광도를 측정하여 저해 활성을 산출하였다<sup>30,31</sup>.

### 3. 세포 실험

#### 1) Cell culture

세포주는 HepG2 cell에 CYP2E1 유전자를 transfection 시킨 E47세포와 pCI-Neo vector만 들어있는 C34 세포를 이용하였다(Arthur I. Cederbaum 제공). 세포 배양은 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamine이 포함된 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C로 배양하였다. 약재처리 시에는 1% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamine이 포함된 배지에 약재를 필요한 농도로 희석하여 처리하였다.

#### 2) 약재 준비 및 처리

실험에 사용한 검액의 조제는茵陳清肝湯 1첩 분량(153 g)을 증류수 1000 ml에 넣고 3시간씩 2회 환류추출한 후 rotary evaporator에서 감압 농축시킨 후, 동결건조기를 이용하여 20.66 g의 건조추출물(수율 13.5%)을 얻었다. 이 추출물을 세포배양액에 100 mg/ml의 농도로 녹이고 0.22 µm syringe filter를 이용하여 멸균한 다음 필요한 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

#### 3) 세포 활성도 검사(MTT assay)

세포의 활성을 확인하기 위해서 MTT assay(3-(4,5 dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

assay)를 이용하였다. MTT solution(2 mg of MTT in 1 ml of DMEM)을 준비한 후, 각각의 배지에 200  $\mu$ l의 solution을 가한다. 이것을 45분간 37  $^{\circ}$ C로 incubating 한 후에 시료를 제거하고 100  $\mu$ l N-propanol을 각각의 배지에 가하고 5-10분간 흔들어 준다. 각 배지의 solution에서 50  $\mu$ l를 취한 후 96-well plate로 옮긴 후 570 nm에서 ELISA Reader로 분석하였다.

#### 4) 세포 증식도 검사(BrdU assay)

세포 증식도는 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III를 이용한 BrdU assay(Roche, Swiss)로 측정하였다. 계대배양한 세포를 96-well plate에 5000/well씩 분주하고 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하고 각 well에 BrdU labeling solution을 첨가하여 37  $^{\circ}$ C에서 3시간 배양하였다. 배양배지를 제거하고 wash medium(containing 10% serum per well)로 세포를 세척한 후 precooled fixative로 25  $^{\circ}$ C에서 30분간 세포를 고정한 후 wash medium(containing 10% serum per well)로 세척하였다. 그런 다음 nucleases working solution(per well)으로 30분간 37  $^{\circ}$ C(in the absence of CO<sub>2</sub>)에서 세포를 배양한 후, 100  $\mu$ l of anti-BrdU-POD, Fab fragments, working solution으로 37  $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였으며, peroxidase substrate without을 각 well에 첨가하여 positive sample들이 녹색으로 보일 때까지 30분간 배양한 후 microplate reader로 405 nm에서 sample들의 흡광도를 측정하였다.

#### 5) 항산화효소 활성도 측정

##### (1) Superoxide dismutase(SOD) assay

Superoxide dismutase(SOD) 활성은 SOD assay kit(Cayman Chemical Company, USA)를 이용하여 실험하였다. SOD 활성 측정은 xanthine과 xanthine oxidase의 반응에서 생성된 superoxide anion radical이 tetrazolium salt와 반응하여 formazan dye를 형성하는 원리를 이용하였다<sup>25</sup>. 즉, cell scraper를 이용하여 세포를 수거한 후 1000 xg로 4  $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하고, 이렇게 얻은 pellet에 1mM EGTA,

210 mM mannitol, 70 mM sucrose 및 20 mM HEPES를 첨가하여 차가운 상태로 sonicator를 이용하여 균질화한 다음, 4  $^{\circ}$ C에서 1500 xg로 원심분리하고 상청액을 수거하여 측정에 사용하였다. SOD의 측정은 각 well에 200  $\mu$ l의 희석된 radical detector와 10  $\mu$ l의 검액을 넣은 후 20  $\mu$ l의 xanthine oxidase를 첨가하여 반응을 개시하였다. 20분 간 흔들어 주면서 실온에서 반응시킨 후 460 nm에서 흡광도를 측정하였다.

##### (2) Catalase(CAT) assay

Catalase(CAT) 활성은 CAT assay kit(Cayman Chemical Company, USA)를 이용하여 측정하였다. CAT 활성 측정은 methanol이 적절한 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 하에서 효소와 반응하는 것을 이용한 것으로, 생성된 formaldehyde의 양은 4-amino-3-hydrozino-5-mercapto-1,2,4-triazole(Purpald)이 aldehyde와 bicyclic heterocycle을 형성하여 보라색으로 변하는 비색법으로 측정하였다<sup>26</sup>. 즉, cell scraper를 이용하여 세포를 수거한 후 1000 xg로 4  $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하고, 이렇게 얻은 pellet에 1 mM EDTA, 50 mM potassium phosphate를 함유하는 1 ml의 차가운 용액을 첨가하고 sonicator를 이용하여 균질화한 다음, 4  $^{\circ}$ C에서 1500 xg로 원심분리하고 상청액을 수거하여 측정에 사용하였다. CAT의 측정은 각 well에 100  $\mu$ l의 assay buffer, 30  $\mu$ l의 methanol과 함께 20  $\mu$ l의 검액을 넣은 후 20  $\mu$ l의 hydrogen peroxide를 첨가하여 반응을 개시하였다. 20분간 흔들어 주면서 실온에서 반응시킨 후 30  $\mu$ l의 potassium hydroxide를 각 well에 첨가하여 반응을 정지시키고, 다시 30  $\mu$ l의 Purpald를 첨가한 후 실온에서 10분간 흔들어 주면서 추가로 반응시킨 다음 10  $\mu$ l의 potassium periodate를 첨가하여 실온에서 추가로 5분간 흔들어 주면서 반응시키고, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 4. 동물 실험

### 1) 실험군 및 검액 투여

혈청검사로부터 각종 감염이 인정되지 않고, 일 반증상과 체중감소가 없는 것으로 확인된 실험동물에게 멸균한 polycarbonate cage에 방사선 멸균한 시판 고형사료(대한실험동물센터)와 정제한 물을 자유 공급하였으며 1주 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험을 시작하였다. 실험기간동안 명암주기 12시간 간격, 온도 25±2 °C, 습도 55%로 실험실 환경을 유지하였다.

실험동물들을 (1) 무처리군(naive, normal diet without any treatment), (2) 대조군(ethanol only), (3)茵陳清肝湯 1 g군(ethanol +茵陳清肝湯 1 g/kg), (4)茵陳清肝湯 2 g군(ethanol +茵陳清肝湯 2 g/kg)의 4군으로 나누고 군 당 6마리씩 배치하였다. 본 실험에 사용한 약재의 내용 및 용량은 Table 1과 동일하며, 얻어진 동결건조 엑기스를 증류수에 희석하여 사용하였다.

#### 2) 혈청 중 간효소 활성화도 측정

채혈한 혈액은 헤파린이 처리된 vacuum tube에 옮긴 뒤 4 °C, 3000 rpm에서 20분 간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중 aspartic acid transaminase (AST)와 alanine transaminase(ALT)는 UV-Rate 법<sup>32</sup>에 따라, alkaline phosphatase(ALP)는 *p*-니트로페닐인산 기질법<sup>33</sup>, lactate dehydrogenase(LDH)는 UV-Rate법<sup>34</sup>,  $\gamma$ -glutamyltransferase( $\gamma$ -GTP)는  $\gamma$ -Glutamyl-*p*-Nitroanilide 법<sup>35</sup>으로 측정용 kit(Asan Pharm. Co.)를 사용하여 prime automatic clinical chemistry analyzer로 측정하였다.

#### 3) 혈청 중 total cholesterol, triglyceride의 정량

채혈한 혈액은 헤파린이 처리된 vacuum tube에 옮긴 뒤 4 °C, 3000 rpm에서 20분 간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중 total cholesterol과 triglyceride 함량측정은 효소법<sup>36,37</sup>에 준하여 측정용 kit(Asan Pharm. Co.)를 사용하여 prime automatic clinical chemistry analyzer로 측정하였다.

#### 4) 혈중 알코올 농도 측정

실험동물에 sample을 경구투여한 후, 30분 뒤에 40% 알코올을 10 ml/kg의 용량으로 구강 투여하였다.

그로부터 30분 뒤 실험동물의 심장으로부터 혈액을 채취하고 헤파린이 처리된 vacuum tube에 옮긴 뒤 4 °C, 3000 rpm에서 20분 간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청내의 ethanol 함량을 효소비색법에 입각한 NAD-ADH reagent kit를 사용하여 340 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다<sup>38</sup>.

### 4. 통계처리

본 실험에서 얻어진 정상군과 대조군 및 실험군의 자료는 SPSS 14.0을 이용하여 Student t-test에 의해 검정하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우를 각 군 간의 차이가 통계학적 유의성을 갖는 것으로 보았다.

## III. 結果

### 1. 시험관 실험

#### 1) DPPH, xanthine oxidase 저해 활성화도

DPPH 소거능이茵陳清肝湯의 농도에 비례하여 증가하였으며, ED<sub>50</sub>은 0.007 mg/ml로 대조군인 vitamin C의 0.003 mg/ml와 거의 비슷한 항산화 활성을 나타내었다(Table 2). XO 저해 활성화도 또한茵陳清肝湯의 농도가 높아짐에 따라 증가하였으며, ED<sub>50</sub>을 계산한 결과는 0.0151 mg/ml로 대조군인 vitamin C의 0.0443 mg/ml에 비해 좀 높은 항산화 활성 효과를 나타내었다(Table 3).

Table 2. DPPH Inhibitory Activity.

YJCGT		Vit. C	
Concentration (mg/ml)	Inhibitory ratio (%)	Concentration (mg/ml)	Inhibitory ratio (%)
0.0005	7.5	0.0001	3.3
0.001	19.1	0.0005	6.3
0.005	33.2	0.001	10.8
0.01	72.1	0.0025	44.2
0.025	91.6	0.005	90.6
ED <sub>50</sub> (mg/ml)	0.007	ED <sub>50</sub> (mg/ml)	0.003

Table 3. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity.

YJCGT		Vit. C	
Concentration (mg/ml)	Inhibitory ratio (%)	Concentration (mg/ml)	Inhibitory ratio (%)
-	-	0.0016	11.83
0.008	3.46	0.008	19.02
0.04	20.49	0.004	26.10
0.2	64.23	0.02	39.95
1	96.32	0.1	87.05
ED <sub>50</sub> (mg/ml)	0.0151	ED <sub>50</sub> (mg/ml)	0.0443

2) Trypsin, Hyaluronidase 저해 활성도

茵陳清肝湯의 농도가 올라감에 따라 trypsin 활성을 억제하였으나, ED<sub>50</sub>을 계산한 결과 16.789 mg/ml로 대조군인 trypsin inhibitor에 비해 저해 활성효과가 낮았다(Table 4). 반면茵陳清肝湯의 hyaluronidase 저해활성은 ED<sub>50</sub>이 15.952 mg/ml였다(Table 5).

Table 4. Trypsin Inhibitory Activity.

YJCGT		Trypsin Inhibitor	
Concentration (mg/ml)	Inhibitory ratio (%)	Concentration (mg/ml)	Inhibitory ratio (%)
0.01	6.1	0.001	1.2
0.1	12.1	0.005	18.3
1	18.4	0.01	31.5
5	20.8	0.05	91.0
10	35.1	-	-
ED <sub>50</sub> (mg/ml)	16.789	ED <sub>50</sub> (mg/ml)	0.025

Table 5. Hyaluronidase Inhibitory Activity.

YJCGT	
Concentration (mg/ml)	Inhibitory ratio (%)
10	22.46
25	91.86
50	96.18
100	-
ED <sub>50</sub> (mg/ml)	15.952

2. 세포 실험

1) 세포 활성도(cell viability)

먼저 ethanol만을 투여한 군에서는 C34, E47세포 모두에서 활성도가 유의하게 감소하였으며, E47세포가 C34세포에 비해 활성도가 조금 더 감소하는 경향을 보였는데, 이는 CYP2E1와 관련성이 있는 것으로 보인다.茵陳清肝湯은 ethanol 투여로 인한 활성도 감소를 C34, E47세포에서 대체로 억제하는 결과를 보였다. 구체적으로 보면 C34세포에서는 24시간 경과시에茵陳清肝湯 농도가 올라갈수록 대체적으로 세포활성도가 증가하는 경향을 보였으나 농도의존 경향은 뚜렷하지 않았고, 48시간 경과시에는 활성도가 증가하기는 하였지만 유의한 차이를 보이지 않았다. E47세포에서는 24시간 경과시에 세포활성도를 증가시켰지만 200 μg/ml에서만 유의성있는 증가를 보였고, 특히 48시간 경과시에는 ethanol 단독 투여시보다茵陳清肝湯을 투여한 모든 군에서 활성도가 유의하게 증가됨이 확인되었다. Fig. 1은 정상군의 활성도를 100으로 하여 대조군 및 실험군들의 효과를 비교한 것인데,茵陳清肝湯의 투여가 ethanol에 의한 세포활성도 억제를 감소시키는 것을 확인할 수 있다(Fig. 1).

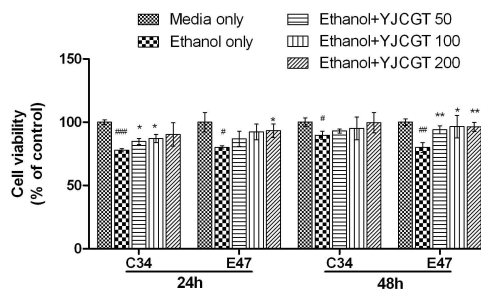


Fig. 1. Effect of YJCGT on cell viability (MTT sssay).

C34 cell is pCI-Neo vector transfected HepG2 cell. E47 cell is CYP2E1 transfected HepG2 cell. All data is converted on the basis of media data is 100. (#: p<0.05 compared with media group, ##: p<0.01 compared with media group, ###: p<0.001 compared with media group, \*: p<0.05 compared with ethanol group, \*\*: p<0.01 compared with ethanol group, \*\*\*: p<0.001 compared with ethanol group.)

2) 세포 증식도(cell proliferation)

ethanol을 투여하고 24시간 경과한 후 C34, E47 세포 모두에서 증식도가 떨어진데 반해, 48시간 경과한 후에는 C34, E47세포 모두에서의 증식도가 정상군에 비해 별다른 차이를 보이지는 않았다. 茵陳清肝湯을 함께 투여한 경우 E47세포에서는 24, 48시간 경과시 모두에서 세포 증식도를 유의하게 증가시키는 결과를 보였으며, C34세포에서도 가장 높은 농도인 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  경우를 제외하고는, 대체로 유의하게 세포 증식도를 증가시키는 결과를 보였다. 따라서 茵陳清肝湯 투여가 ethanol에 의한 세포증식도 저하를 억제하는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

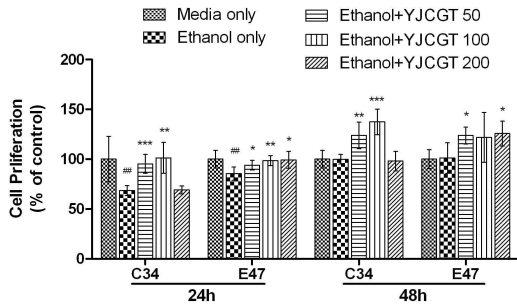


Fig. 2. Effect of YJCGT on cell viability (BrdU assay).

C34 cell is pCI-Neo vector transfected HepG2 cell. E47 cell is CYP2E1 transfected HepG2 cell. All data is converted on the basis of media data is 100. (#:  $p < 0.05$  compared with media group, ##:  $p < 0.01$  compared with media group, ###:  $p < 0.001$  compared with media group, \*:  $p < 0.05$  compared with ethanol group, \*\*:  $p < 0.01$  compared with ethanol group, \*\*\*:  $p < 0.001$  compared with ethanol group.)

### 3) 항산화 활성도

#### (1) Superoxide dismutase(SOD) 활성도

茵陳清肝湯의 항산화 효과를 확인하기 위하여 항산화효소 중의 하나인 SOD 활성을 측정하였다. 먼저 ethanol 투여로 인하여 C34, E47세포에서 SOD 활성도가 모두 감소하였다. 茵陳清肝湯을 투여한 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  군의 C34, E47세포에서 모두 SOD 활성 저하를 억제하는 경향성을 보였으며, E47세

포보다는 C34세포에서의 SOD 활성 저하 억제효과가 좀 더 관찰되었다(Fig. 3).

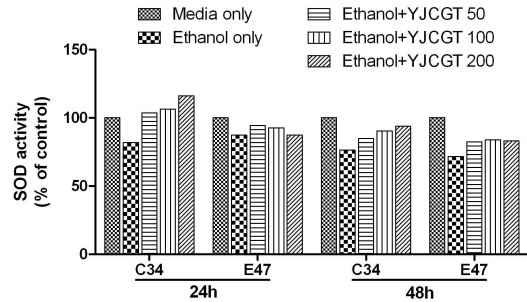


Fig. 3. Effect of YJCGT on SOD activity.

C34 cell is pCI-Neo vector transfected HepG2 cell. E47 cell is CYP2E1 transfected HepG2 cell. All data is converted on the basis of media data is 100.

#### (2) Catalase(CAT) 활성

ethanol 투여로 인하여 C34, E47세포 모두에서 CAT 활성도가 떨어졌으며, E47세포가 C34세포보다 좀 더 활성도가 떨어지는 경향성을 보였다. 茵陳清肝湯을 투여한 모든 실험군에서 CAT 활성도를 회복시키는 효과를 보였으며, 이는 E47세포에서 좀 더 뚜렷하였으며, 농도에 따른 경향성도 관찰되었다(Fig. 4).

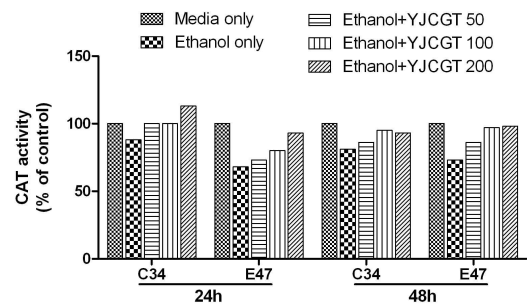


Fig. 4. Effect of YJCGT on CAT activity.

C34 cell is pCI-Neo vector transfected HepG2 cell. E47 cell is CYP2E1 transfected HepG2 cell. All data is converted on the basis of media data is 100.

### 3. 동물 실험

#### 1) 혈청 중 간효소 활성도

AST 수치는 茵陳清肝湯을 투여해도 별다른 변화를 보이지 않았지만, ALT 수치는 茵陳清肝湯 1 g/kg, 2 g/kg 투여군 모두에서 ethanol 군보다 유의하게 감소하였다(p<0.01).  $\gamma$ -GTP 수치는 ethanol

군에 비해 茵陳清肝湯 투여로 낮아지는 변화를 보였으나 유의성은 없었으며, ALP는 별다른 변화를 보이지 않았다. LDH는 茵陳清肝湯 투여로 ethanol 군보다 농도변화에 따라 낮아지는 결과를 보였으며, 특히 茵陳清肝湯 2 g/kg 투여군에서는 유의한 감소를 보였다(p<0.01)(Table 6).

Table 6. Activities of AST, ALT, ALP, LDH and  $\gamma$ -GTP in Serum.

	Naive	Control (ethanol)	YJCGT (1 g/kg)	YJCGT (2 g/kg)	Silymarin
AST	136±33	739±431 <sup>#</sup>	537±316	744±305	347±25
ALT	26±6	838±213 <sup>#</sup>	310±196 <sup>**</sup>	373±80 <sup>**</sup>	267±120 <sup>***</sup>
$\gamma$ -GTP	7.0±5.2	6.7±4.9	3.2±2.9	3.5±1.4	4.2±3.4
ALP	405±78	1007±866 <sup>#</sup>	651±177	733±179	673±147
LDH	719±263	628±117	557±193	383±131 <sup>**</sup>	725±41

All values are mean ± standard deviations (n=6).

# : Statistically significant compared with normal group (# : p<0.05, ## : p<0.01, ### : p<0.001).

\* : Statistically significant compared with control group (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001).

2) 혈청 중 total cholesterol, triglyceride의 정량 茵陳清肝湯은 TC에 대해서는 유의한 변화를 일으키지 않았으나, ethanol 투여로 증가한 TG수치

를 감소시키는 결과가 관찰되었으며, 특히 茵陳清肝湯을 2 g/kg 투여한 군에서는 유의한 감소를 보였다(p<0.05)(Table 7).

Table 7. Concentrations of Total Cholesterol and Triglyceride in Serum.

	Naive	Control (ethanol)	YJCGT (1 g/kg)	YJCGT (2 g/kg)	Silymarin
Total cholesterol (mg/dl)	62±10	33±9	38±16	35±13	39±15
Triglyceride (mg/dl)	110±24	277±163 <sup>#</sup>	142±59	113±53 <sup>*</sup>	103±53 <sup>*</sup>

All values are mean ± standard deviations (n=6).

# : Statistically significant compared with normal group (# : p<0.05).

\* : Statistically significant compared with control group (\* : p<0.05).

#### 3) 혈중 알코올 농도 변화

茵陳清肝湯을 투여한 경우는 대조군에 비하여 9.24%의 유의한 감소를 보였다(p<0.05)(Table 8).

Table 8. Changes of Alcohol Concentration in Serum.

	Control	YJCGT (1 g/kg)
ethanol (mg/dl)	41.406±2.8	37.582±3.4 <sup>*</sup>
inhibitory effect		9.24%

All values are mean ± standard deviations (n=10).

\* : Statistically significant compared with control group (\* : p<0.05).



#### IV. 考 察

인간을 포함한 모든 호기성 동물은 호흡이라는 과정을 통해 산소를 이용하여 에너지 대사를 진행하며 살아나가고 있다. 그러나 이러한 대사과정에서 생체가 이용한 산소 중 약 1-3%는 각종 물리적, 화학적, 생물학적 스트레스로 인해 유해한 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)으로 변환하게 된다<sup>1</sup>. 이 ROS는 가장 안정한 형태의 산소인 삼중항산소(<sup>3</sup>O<sub>2</sub>)가 산화, 환원과정에서 환원을 받아 생성되는 일중항산소인 superoxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 과산화 산소(hydrogen peroxide: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl free radical(<sup>•</sup>OH) 등이 있으며, 이 외에도 nitric oxide와 nitrogen dioxide(NO<sub>2</sub>), hypochlorous acid(HOCl), hypobromous acid(HOBr), peroxyxynitrite(ONOO<sup>-</sup>) 등이 있다. 이러한 유해 활성산소종을 free radical이라 하며 불안정한 성격을 띠고 있어서 주위의 물질과 반응성이 아주 강해 세포내 단백질이나 지질분자는 물론이고 유전정보를 함유한 DNA까지에도 산화적 손상을 입히며 결과적으로는 세포에 치명적인 피해를 입히는 것으로 알려져 있다<sup>2,3</sup>.

이렇게 정상적인 세포대사과정 중에서 일정 정도의 free radical과 기타 활성산소 및 과산화물이 생성되고 있으나, 생체내에는 이들에 대한 방어기구로서 superoxide dismutase(SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, 요산 등과 같은 항산화물질이 존재하여 스스로를 보호하고 있다. 그러나 이와 같은 생체방어구에 이상이 초래되거나 각종 물리적, 화학적 요인들에 의하여 활성산소의 생성이 생체방어계의 용량을 초과하게 될 경우 산화스트레스(oxidative stress)가 야기된다<sup>4,5</sup>.

알코올은 위장에서 섭취된 후 주로 간에서 대사되게 되는데, 간세포질의 알코올 분해효소인 alcohol dehydrogenase(ADH)와 microsomes의 cytochrome P450 II E1(CYP2E1) 및 peroxisomes의 catalase 등의 세가지 효소계를 통해 acetaldehyde로 산화되게

된다. 이들 대사에 의해 유도되는 aldehyde oxidase, NADPH oxidase, CYP2E1, xanthine oxidase 등은 생체 내의 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)을 생성하고, 과량의 알코올 대사에서 이러한 효소들은 다량의 자유 유리기(free radical)를 발생시켜 생체 내 산화스트레스(oxidative stress)를 유발하게 되어 알코올성 간손상의 주된 원인이 된다. 과도하게 생성된 acetaldehyde는 acetaldehyde-protein 부산물과 지질과산화물의 생성을 유발해 간독성에 관여하며, NADH/NAD<sup>+</sup> 산화환원 비율이 산화로 기울게 되어 cytosol과 mitochondria에서 대사이상을 야기할 수 있다<sup>6,7</sup>. 또한 만성적인 알코올 섭취는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione 등과 같은 항산화 물질의 생성이나 작용을 저해하여 산화스트레스를 촉진하여 간세포 손상을 일으킨다<sup>8</sup>.

최근 연구결과에서는 알코올성 간손상의 원인으로 지목되고 있는 산화스트레스의 발생에서 cytochrome P450 II E1(CYP2E1)의 대사기전이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>23</sup> 소량의 알코올의 경우 ADH효소를 통해 빠르게 산화될 수 있는 반면, 과량의 알코올을 마시거나 만성적인 음주에 노출될 경우 ADH만으로는 ethanol 대사가 어려워져서 CYP2E1과 catalase효소 등이 동원되게 된다. 이는 만성적인 음주를 하는 경우 CYP2E1이 정상인에 비해 5-10배 항진된 채 유지되는 보고에서 확인할 수 있는데, 만성적인 음주자는 CYP2E1이 알코올 대사에서 차지하는 역할이 정상인에 비하여 상대적으로 커지게 된다. 이러한 CYP2E1에 의한 대사과정은 인체내 활성산소종(ROS)과 지질과산화물들을 생성하는 주된 원인으로 지목되고 있다<sup>40,41,42,43</sup>.

따라서 알코올성 간손상과 산화스트레스(oxidative stress)는 밀접한 관계가 있으며, 그 과정에서 CYP2E1의 중요성이 부각되고 있다. 이에 따라 CYP2E1 억제제 및 항산화제의 투여를 통하여 간손상을 줄이려는 연구가 계속되고 있으며, 유의한 효과뿐만 아니라 안정성이 확보되어 장기간 사용이 가능

한 약재 개발이 요구되고 있는 실정이다.

본 실험에서 사용한茵陳淸肝湯은 2천여년 전부터 張仲景이 黃疸의 치료에 사용되어 온 茵陳五苓散<sup>9</sup>의 加味方으로서, 茵陳五苓散에서 肉桂를 除하고, 涼血止血, 下氣行滯之材인 地榆, 靑皮, 蘿藦子, 覆盆子 등을 가미한 처방이다. 임상에서는 淸熱利濕, 消積祛瘀를 목표로 만성 간질환에 사용되고 있다.

본 연구에서는 알코올성 간손상의 주된 원인이 산화스트레스임에 착안하여, 알코올에 의해 유발된 산화스트레스에 대한 茵陳淸肝湯의 보호효과를 알아보기 위해 실험을 진행하였다. 먼저 시험관 내에서 알코올로 인한 CYP2E1 관련 산화스트레스에 대한 항산화 효소들의 활성을 확인하고 항산화 및 항염증 반응에 관련된 효소 활성에 미치는 영향을 관찰하였으며, 그 다음 CYP2E1 transfected HepG2 cell을 이용하여 茵陳淸肝湯이 세포 활성 및 증식에 미치는 영향을 확인하였고, 동물 실험에서는 茵陳淸肝湯이 혈청 중의 간과 관련된 각종 생화학적 지표 및 혈중 알코올 농도에 미치는 영향을 관찰하였다.

먼저 茵陳淸肝湯의 항산화 효과를 알아보기 위하여, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), xanthine oxidase(XO)효소에 대한 저해 활성도를 측정하였다. DPPH는 free radical의 일종으로 ascorbic acid, 토코페롤, 방향족 화합물, 방향족 아민류 등의 항산화 물질과 반응하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로써 전자공여능의 측정이 가능하여 항산화 활성 측정에 이용된다. 이러한 radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 radical에 대한 소거작용이 있다고 판단할 수 있다. XO는 xanthine을 기질로 하여 uric acid를 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소이며, xenobiotics 중 CCl<sub>4</sub>, ethanol 및 toluene 등을 투여할 때 간 또는 혈액 중의 XO활성이 증가한다고 알려져 있다<sup>46</sup>.

실험 결과, 茵陳淸肝湯은 DPPH와 XO 활성도

를 농도에 비례하여 억제시켜 항산화 활성이 있음을 보여주었다. ED<sub>50</sub>을 계산한 결과는 DPPH는 0.007 mg/ml, XO는 0.0151 mg/ml였으며, 이는 茵陳淸肝湯이 항산화제인 Vitamin C에 비해 DPPH의 경우는 비슷한 항산화 활성을, XO의 경우는 좀 더 강한 항산화 활성을 가지는 것으로 보인다(Table 2, 3).

茵陳淸肝湯이 산화스트레스에 의한 염증반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 염증에 관여하는 효소인 trypsin과 hyaluronidase의 활성 억제도를 측정하였다. Trypsin은 serine protease 중 하나로 혈관 확장이나 모세혈관의 투과성 항진 등을 촉진하여 백혈구의 순환을 간접적으로 촉진하여 염증에 관여하는 chemical mediator인 kinin의 유리에 관여하는 효소로 알려져 있다<sup>49</sup>. Hyaluronidase는 mucopolysaccharide-splitting enzyme의 하나로써 모세혈관 투과성에 관여하고, chemical mediator의 유리에 관여하는 등 염증발현과 관련이 있는 효소로, hyaluronidase 저해활성 검색법이 천연물로부터 항염증제 개발을 위한 screening법으로도 이용되고 있다<sup>50</sup>.

실험 결과, 茵陳淸肝湯은 trypsin의 경우 항염증 활성효과를 보여주지 못하였지만, hyaluronidase 경우 항염증 활성효과가 있는 것으로 측정되었다. 즉, 茵陳淸肝湯의 trypsin 저해 활성도는 ED<sub>50</sub>이 16.789 mg/ml로 대조군인 trypsin inhibitor의 0.025 mg/ml보다 현저히 낮은 활성효과가 있었던 반면, hyaluronidase 저해 활성도는 ED<sub>50</sub>이 15.952 mg/ml으로 기존 보고들에서 유의성 있는 한약물의 경우 5-10 mg/ml의 농도에서 50% 이상의 hyaluronidase 저해 활성도를 보여주었다는 것을 고려할 때 높은 항염증 활성효과가 있는 것으로 사료된다<sup>51,52</sup>(Table 4, 5).

세포실험으로 MTT assay를 시행하여 茵陳淸肝湯이 CYP2E1 transfection과 ethanol 처리에 대하여 세포 활성도에 미치는 영향을 관찰한 결과, CYP2E1 transfection된 E47세포는 ethanol 투여로 인해 세포의 활성도가 저하되었으며, 茵陳淸肝湯은 이러한

활성도 저하를 대체로 유의하게 억제하는 결과를 보이고 특히 48시간 경과시에는 활성도 증가가 제일 두드러졌다(Fig. 1).

BrdU assay를 시행하여茵陳清肝湯이 세포 증식도에 미치는 영향을 관찰한 결과, ethanol 투여로 인하여 24시간 경과한 후 C34, E47(CYP2E1 transfected)세포 모두에서 증식도가 감소한데 반해, 48시간 경과한 후에는 C34, E47세포 모두에서 증식도가 normal 군에 비해 별다른 차이를 보이지 않았다.茵陳清肝湯을 함께 투여한 경우 E47세포에서는 24, 48시간 경과시 모두에서 세포 증식도를 유의하게 증가시키는 결과를 보였으며, C34세포에서도 가장 높은 농도인 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  경우를 제외하고는, 50,100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  도두에서 유의하게 세포 증식도를 증가시키는 결과를 보였다. 따라서茵陳清肝湯 투여가 ethanol에 의한 세포증식도 저하를 억제하는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Superoxide는 과산화음이온으로 세포막, DNA, 조직을 파괴하고 돌연변이나 암을 유발하기도 하며, 생리적 기능을 저하시켜 질병과 노화를 유발하기도 한다. SOD는  $\text{O}_2$ 가 한 개의 전자를 받아들여 불안전하게 산화된  $\text{O}_2^-$ 이온을  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 전환시키는 과정을 촉매하는 효소이며, superoxide anion radicals에 의해 생기는 산화스트레스에 대한 세포의 방어에 일차적으로 관여하는 항산화 효소로 알려져 있다<sup>44</sup>. 실험 결과,茵陳清肝湯은 CYP2E1 transfection과 ethanol 처리 후 저해된 SOD 활성을 회복시키는 경향성을 보였다(Fig. 3).

Catalase(CAT)는 포유동물의 조직에서 광범위하게 발견되며, cytochrome계를 가지고 있는 모든 호기성 세포에 널리 분포되어 있는 효소로서 특히 간에 가장 많이 함유되어 있다. 이는 과산화음이온의 환원산물인 과산화수소수( $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 산소와 물로 분해시키는 과정에서 촉매로 작용하는 효소이며, 많은 대사 반응에서 생성되는 과산화물의 축적을 막아서 과산화물에 의한 손상으로부터 조직을 보호하는 역할을 한다<sup>45</sup>. 실험 결과,茵陳清肝湯은 CYP2E1

transfection과 ethanol 처리에 대한 CAT 활성도 저하를 회복시키는 경향성을 보였다(Fig. 4).

茵陳清肝湯이 간세포 손상에 미치는 영향을 알아보기 위해, ethanol로 간독성을 유발시킨 mouse에서 혈청 ALT, AST, ALP, LDH,  $\gamma$ -GTP 효소 활성을 관찰하였다. AST와 ALT는 생체내 TCA 회로에 있어 대사산물과 아미노산 사이에서 아미노 전이를 조절하는 효소로서 간, 신장, 심장 등에 많이 분포되어 있으나 혈중에서는 활성치가 낮은 것으로 알려져 있으며, 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>32</sup>. 실험 결과, AST 수치는茵陳清肝湯을 투여해도 별다른 변화를 보이지 않았지만, ALT 수치는茵陳清肝湯 1 g/kg, 2 g/kg 투여군 모두에서 ethanol 군보다 유의하게 감소하였다( $p<0.01$ ).  $\gamma$ -GTP 수치는 ethanol 군에 비해茵陳清肝湯 투여로 낮아지는 변화를 보였으나 유의성은 없었으며, ALP는 별다른 변화를 보이지 않았다. LDH 수치는茵陳清肝湯 투여로 ethanol 군보다 낮아지는 결과를 보였으며, 특히茵陳清肝湯 2 g/kg 투여군에서는 유의한 감소를 보였다( $p<0.01$ )(Table 6). 특히 ALT의 경우 간세포 손상을 좀 더 특이적으로 확인할 수 있는 지표인데, ALT가 유의하게 낮아졌다는 것은茵陳清肝湯이 간세포 보호작용을 가지고 있음을 시사하는 바이다.

Cholesterol은 세포막의 구성요소이며, steroid hormone과 vitamin D의 전구물질로서 생체내에서 필수불가결한 성분이지만, 고지혈증, 동맥경화증, 심장질환과 담석증 등 각종 심혈관계 및 순환기계 질환의 중요한 원인이 된다<sup>53</sup>. 혈청 중 triglyceride의 증가는 지방조직으로부터 지방산 방출의 증가, 간에서 합성 항진, 말초조직의 lipoprotein lipase 활성의 저하 등으로 일어나며, 식이성 대사이상, 내분비 질환, 간질환, 신장질환, 알코올 및 약물 투여 특히 간담질환 중에서도 폐색성 황달 및 지방간에서 증가를 보인다<sup>54</sup>.茵陳清肝湯이 지질대사에 미치는 영향을

을 관찰하기 위해 ethanol로 간독성을 유발시킨 mouse에서 혈청 중 total cholesterol(TC)과 triglyceride(TG) 양을 측정하였다. 실험 결과,茵陳淸肝湯은 TC에 대해서는 유의한 변화를 일으키지 않았으나, TG 수치를 감소시키는 결과가 관찰되었으며, 특히茵陳淸肝湯을 2 g/kg 투여한 군에서는 유의한 감소를 보였다( $p<0.05$ )(Table 7).

일반적으로 혈중 알코올 농도는 알코올의 산화 속도와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으므로, 이는 생체내에서 알코올의 약리작용을 확인할 수 있는 중요한 지표로 알려져 있다<sup>39</sup>. 실험 결과,茵陳淸肝湯을 투여한 경우는 대조군에 비하여 9.24%의 유의한 감소를 보였으며( $p<0.05$ ), 이는茵陳淸肝湯이 생체내의 알코올 대사를 촉진시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Table 8).

이상에서,茵陳淸肝湯은 DPPH와 xanthine oxidase의 활성을 유의하게 억제하였고, hyaluronidase를 억제하여 항염증 활성 효과가 확인되었으며, 세포 활성도 및 증식도를 증가시켰고, CYP2E1에 의한 항산화 효소(SOD, CAT)의 활성 저하를 억제하는 작용이 있었으며, 혈청 중 ALT, LDH, TG 수치를 일부 유의하게 감소시켰으며, 혈중 알코올 농도를 낮추는 효과가 있었다. 향후茵陳淸肝湯의 항산화 효과와 관련하여 추출 방법에 따른 추가 연구와 처방구성 내의 개별 약재의 지표 성분별 연구도 필요할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

茵陳淸肝湯의 ethanol로 유발된 산화스트레스에 대한 항산화 효과를 알아보기 위하여, 항산화와 관련된 효소 및 radical 소거능력, 세포 활성도 및 증식도를 측정하였으며, 관련된 각종 생화학적 지표를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1.茵陳淸肝湯은 DPPH와 xanthine oxidase의 활성을 유의하게 저해하였다.

- 2.茵陳淸肝湯은 항염증 효과와 관련하여 hyaluronidase를 억제하였으나, trypsin 저해 활성은 미미하였다.
- 3.茵陳淸肝湯은 ethanol 투여 후 저하된 세포 활성도 및 증식도 저하를 유의하게 증가시켰다.
- 4.茵陳淸肝湯은 ethanol 투여로 인해 저하된 항산화 효소인 SOD, CAT의 활성을 회복시키는 경향성을 보여 주었다.
- 5.茵陳淸肝湯은 혈청 중 ALT, LDH, TG 수치를 일부 유의하게 감소시켰다.
- 6.茵陳淸肝湯은 혈중 알코올 농도를 유의하게 감소시켰다.

이상에서茵陳淸肝湯은 ethanol로 유발된 산화스트레스에 대한 항산화 효과가 있는 것으로 관찰되었으며, 향후茵陳淸肝湯의 추출 방법에 따른 추가 연구와 처방구성 내의 개별 약재의 지표 성분별 연구도 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit and cancer. II. mechanisms. *Cancer Causes Control* 1991;2:427-42.
2. Freidovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann NAY Acad Sci* 1999;893:13-5.
3. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism : Nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998;336:1-6.
4. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ulung island. *Korean J Food Sci Technol* 2005;37:233-40.
5. Shin EM, Kim DH, Kwon YB, Kim YS. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of the botanical product AMP-365TM. *Korean J*

- Pharmacogn* 2006;37:212-6.
6. Tuma DJ, Casey CA. Dangerous by-products of alcohol breakdown - focus on adducts. *Alcohol Res Health* 2003;27:285-90.
  7. Das SK, Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Science* 2007;81(3):177-87.
  8. Castillo T, Koop DR, Kamimura S, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-carbon tetrachloride and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology* 1992; 16:992-6.
  9. 張仲景. 仲景全書. 서울: 大星文化社; 1984. p. 225, 240, 249, 250, 408, 411.
  10. 金榮哲, 李長勳, 禹弘楨. 茵陳清肝湯의 안전성에 관한 연구. 경희한의대논문집 1997;20(1): 57-89.
  11. 金珍珠. 茵陳清肝湯이 MHV-2로 유발된 마우스의 손상간에 미치는 영향. 학위논문(석사). 경희대학교 대학원; 1996.
  12. 禹弘楨. 만성B형간염에 대한 茵陳清肝湯의 효과. 제2회 한중 학술대회 참가 논문집(간장병) 1995:18-53.
  13. 강우성. HCV 환자에서 茵陳清肝湯가미방 투여 후 Anti-HCV역가의 변화관찰 15예. 전국한의학 학술대회 논문집 1998:85-6.
  14. 姜京台, 李長勳, 禹弘楨. 茵陳清肝湯가미방이 실험적 흰쥐의 간경변증에 미치는 영향. 경희한의대논문집 1997;20(2):133-50.
  15. 朴容禎, 金榮哲, 李長勳, 禹弘楨. 茵陳清肝湯가미방이 간세포의 증식능력에 미치는 영향. 대한한의학회지 1998;19(1):145-64.
  16. 洪尙勳, 李長勳, 禹弘楨. 茵陳清肝湯가미방이 간세포활성세포주기 및 apoptosis에 미치는 영향. 대한한의학회지 1998;19(2):337-72.
  17. 승현석, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯이 간보호 및 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2003;24(1):21-32.
  18. 2009 국민건강통계. 국민건강영양조사 제4기 3차년도(2009). 보건복지부, 질병관리본부; 2010. p. 22-3.
  19. 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯이 흰쥐의 간장 비실질세포의 procollagen 합성억제에 미치는 효과에 관한 연구. 대한한방내과학회지 2003;24(4):817-25.
  20. 박상백, 김영철, 이장훈, 우홍정. 茵陳清肝湯이 DMN 유발 간섬유화와 단백질 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2008;29(1):200-18.
  21. 박신명, 이장훈, 김영철, 우홍정. TAA로 유발된 간섬유화 동물모델에서 茵陳清肝湯의 효과. 대한한방내과학회지 2009;30(2):270-87.
  22. 이홍일, 김영철, 우홍정, 이장훈. 茵陳清肝湯이 간성상세포의 섬유화 억제에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2009;30(1):74-84.
  23. Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 2009;83:519-48.
  24. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울: 한국메디칼인텍스사; 1998. p. 58-700.
  25. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte(hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
  26. Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 1988; 174(1):331-6.
  27. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;181:1199-200.
  28. Anson ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 1938;22:79-89.
  29. Uchiyama T, Kamikawa H, Ogita ZI. Antiinflammatory effect of extract from *Phellodendri cortex*. *J Med Pharm Soc Wkan Yaku* 1989;6:158-64.

30. Bergmeyer HU, Bernt E, Schmidt F, Stork H. Methods of Enzymatic Analysis(Bergmeyer, H.U., ed.). New York: Verlag Chemie, Weinheim, and Academic Press: 1974, p. 944.
31. Kim YS, Noh YK, Lee GI, Kim YK, Lee KS, Min KR/ Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor J Pharmacogn* 1995;26(3):265-72.
32. Reitman S, Flankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pthol* 1992;40:2287-91.
33. Shanmugasundaram P, Venkataraman S. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Hygrophila auriculata*(K. Shum) Heine Acanthaceae root extract. *J Ethnopharm* 2006;104:124-8.
34. Wroblewski F, LaDue JS. Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1955; 90:210-3.
35. Szasz G. A kinetic photometric method for serum  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. *Clin Chem* 1969;15: 124-36.
36. Haglund O, Luostarinen R, Wallin R, Wibell L, Saldeen T. The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malodialdehyde in humans supplemented with Vitamin E. *J Nutr* 1991;121:165-9.
37. Sardesai VM, Manning JA. The determination of triglycerides in plasma and tissues. *Clin Chem* 1968;14:156-61.
38. Cho MH, Shim SM, Lee SR, Mar W, Kim GH. Effect of *Evodiae fructus* extracts on gene expressions related with alcohol metabolism and antioxidation in ethanol-loaded mice. *Food Chem Toxicol* 2005;43(9):1365-71.
39. Lieber CS, Baraona E, Hernandez-Munoz R, Kubota S, Sato N, Kawano S, et al. Impaired oxygen utilization. A new mechanism for the hepatotoxicity of ethanol in sub-human primates. *J Clin Invest* 1989;83(5):1682-90.
40. Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M, Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 1997;25:351-5.
41. Kessova I, Cederbaum AI. CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003;3:509-18.
42. Morimoto M, Hagbjork AL, Wan YJ, Fu PC, Clot P, Albano E, et al. Modulation of experimental alcohol-induced liver disease by cytochrome P450 2E1 inhibitors. *Hepatology* 1995;21:1610-7.
43. Bradford BU, Kona H, Isayama F, Kosyk O, Wheeler MD, Akiyama TE, et al. Cytochrome P450 CYP2E1, but not nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase is required for ethanol-induced oxidative DNA damage in rodent liver. *Hepatology* 2005;41:336-44.
44. Korycka-Dahl M, Richardson T, Hicks C. Superoxide Dismutase Activity in Bovine Milk Serum. *J Food Protection* 1979;42:867-71.
45. Baudrimont I, Ahouandjivo R, Creppy EE. Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in vero cells in culture by several agents. *Chem Biol Interact* 1997;104:29-40.
46. Cassidy DA, Mcleod R, Clarke DJ. Regulation of hepatic xanthine oxidoreductase expression by treatment of rats with xenobiotic agents. *Biochem Soc Trans* 1997;25(4):563.
47. 김은영, 백인희, 김정현, 김성란, 유미라. 항산화 활성을 나타내는 약용식물 소재 탐색. *한국식품과학회지* 2004;36(2):333-8.
48. 문지숙, 김선재, 박윤미, 황인식, 김의형, 박정욱, 등. 약용식물 추출물에 대한 항미생물 활성

- 검색과 폴리페놀 함량. 한국식품저장유통학회지 2004;11(2):207-13.
49. McCord JM. Free radicals and inflammation: protection of synorial fluid by superoxide dismutase. *Science* 1974;185:529-31.
50. 문태철, 정광원, 정규찬, 손건호, 김현표, 강삼식, 등. 천연물로부터 염증성 포스포리파제 A2 저해제 검색. 약학회지 1997;41(5):565-70.
51. 박중훈, 최혁재, 정석희, 김남재, 김동현. 빈용 한약재의 진통 소염 활성. 생약학회지 2001;32(4): 257-68.
52. 최수임, 이윤미, 허태련. 생약재 추출물의 hyaluronidase 저해 및 라디칼 소거 활성 검색. 한국생물공학회지 2003;18(4):282-8.
53. Inkeles S, Eisenberg D. Hyperlipidemia and coronary atherosclerosis. *Medicine(Baltimore)* 1981;60:110-23.
54. Elko EE, Wooles WR, Diluzio NR. Alterations and mobilization of lipids in acute ethanol-treated rats. *Amer J Physiol* 1961;201:923-6.