

太陰調胃湯의 抗酸化 效能에 의한 肝細胞 保護 效果에 관한 研究

김만우* · 박성식*

Abstract

Effects of Taeumjowetang on Lipid Peroxidation by Free Radicals and Oxidative Damage of Hepatocytes by tert-Butyl Hydroperoxide

Kim Man-woo · Park Seong-sik

Department of Sasang Constitution Medicine, College of Orient Medicine, Dongguk University.

Effects of Taeumjowetang on Lipid Peroxidation by Free Radicals and Oxidative Damage of Hepatocytes by tert-Butyl Hydroperoxide

1. Purpose

The present study was carried out to evaluate the antioxidant effects of Taeumjowetang in vitro.

2. Methods

In this study, antioxidant effects of TJJ on lipid peroxidation were determined according to the method of TBA. (Abbreviation) TJJ : Taeumjowetang, TBA : 2-thiobarbituric acid

3. Results

- 1) TJJ inhibited markedly peroxidation of linoleic acid during the autoxidation.
- 2) TJJ inhibited lipid peroxidation induced by hydroxyl radical derived from $H_2O_2-Fe^{2+}$ in rat liver homogenate.
- 3) TJJ showed 66% scavenging effect on DPPH radical.
- 4) TJJ exhibited a 25% inhibitory effect on superoxide generation from xanthine-xanthine oxidase system.
- 5) To investigate the antioxidative effects of TJJ on the hepatocytes, cultured normal rat liver cells(Ac2F) were prepared and incubated with or without TJJ. After 16~18hr, cells placed in DMEM medium without serum, and then incubated with 1mM t-BHP for 2hr. Viable cells were detected by MTT assay. In this test, TJJ protected the cell death induced by t-BHP and significantly increased cell viability in the normal rat liver cell. (Abbreviation) DPPH : α, α -diphenyl- β -picryl hydrazyl, DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium, t-BHP : tert-butyl hydroperoxide,

4. Conclusion

These results suggested that TJJ might play a protective role in lipid peroxidation by free radicals.

Key words : Taeumjowetang, Lipid Peroxidation, Damage of Hepatocytes, t-BHP

* 동국대학교 한의과대학 사상체질과

교신저자 : 김만우 (주소) 경기도 부천시 원미구 심곡2동 155-5 부천한의원 전화) 032-666-7575(8000) E-mail)manjai1@hanmail.net

I. 緒論

四象醫學은 陰陽論의 특징에 바탕을 둔 四物類의 要約精神에 입각하여 臟腑形局의 大小에 따라 크게 네 가지 유형으로 體質을 분류하고 각 體質의 正氣를 중심으로 陰陽의 升降緩急을 조절하는 데 치료의 主안점을 둔 體質醫學이다.¹⁾

太陰調胃湯은 李濟馬(1837~1900)의 『東醫壽世保元』에 最初로 수록된 處方으로 臟腑形局이 肝大肺小한 太陰人의 胃脘受寒表寒病에 응용되어 왔다.^{1,2)} 本方은 發汗과 潤燥시키는 방법으로, 부족한 肺의 呼散之氣를 강화하여 그 상대 臟器인 肝의 吸聚之氣가 過旺되는 것을 억제할 목적으로 使用하였다.^{3,4)} 本方을 李²⁾는 食滯痞滿 腿脚無力 泄瀉 咳嗽 등, 元⁵⁾은 水積 氣脹 食脹 黃疸 등, 朴⁶⁾은 酒傷 積聚 便血 脇痛 등, 洪⁷⁾은 中風虛證 黃疸 下血 眩暈 등에 응용할 수 있다고 하였다.

肝疾患에 相應하는 韓醫學的 臨床證狀은 頭痛, 眩暈, 黃疸, 脇痛, 積聚, 脹滿, 酒傷, 衄血, 嘔血, 吐血, 咯血, 便血⁸⁾ 등으로 언급되어 왔으며 이는 食滯痞滿, 脹滿, 黃疸, 酒傷, 積聚, 眩暈^{2,5,7)} 등에 활용해 온 太陰調胃湯의 適應證과 유사하다 하겠다.

最近에 肝保護 효과에 대한 실험적 연구로는 이⁹⁾의 淸暑益氣湯이 白鼠 損傷肝의 회복에 미치는 영향, 이¹⁰⁾의 當歸藥針 및 黃芪藥針이 CCl₄에 의한 肝損傷의 회복효과에 관한 실험적 연구, 김¹¹⁾의 加味枳朮丸 및 保和丸이 損傷된 肝組織에서의 膠原質生成 및 肝細胞再生에 미치는 영향, 강¹²⁾의 黃芩煎湯液이 肝損傷에 대한 방어 및 회복에 미치는 영향, 김¹³⁾의 生肝健脾湯이 肝臟의 代謝와 再生機能에 미치는 영향, 문¹⁴⁾의 龍膽瀉肝湯 및 茵陳五苓散이 膽道結紮로 유발된 白鼠의 損傷肝에 미치는 영향 등의 보고가 있었다.

한편 太陰調胃湯에 대한 실험적 연구로는 박¹⁵⁾의 太陰調胃湯의 潰瘍抑制效能에 관한 연구, 김¹⁶⁾의 太陽人·太陰人의 處方과 藥材가 脂肪細胞(3T3-L1)의 증식·분화억제에 미치는 영향, 이⁴⁾의 太陰調胃湯이 白鼠의 肥滿症 및 誘導肥滿細胞에 미치는 효과, 김¹⁷⁾의 太·少陰人, 少陽人의 處方이 Gold thioglucose로 유발된 白鼠의 肥滿症에 미치는 효과, 백¹⁸⁾의 四象體質과 肥滿의 상관성에 관한 임상적 연구

등의 보고가 있었으나, 주로 肥滿症에 관한 연구가 대부분이었고 太陰調胃湯의 肝細胞 보호 효과에 대한 실험적 연구는 보고된 바가 없었다. 이에 著者는 太陰人의 保命之主인 呼散之氣^{19,20)}를 강화시키는 胃脘受寒表寒病의 代表적 處方인 太陰調胃湯의 抗酸化 효능에 의한 肝細胞 보호 효과를 검토하기 위하여 지질의 자동산화계, DPPH radical, H₂O₂-Fe²⁺계, xanthine-xanthine oxidase계 및 세포배양제를 이용하여 太陰調胃湯의 抗酸化 효과 및 자유기 소거능을 관찰함과 동시에 흰쥐의 정상 肝細胞를 이용하여 t-BHP로 유도한 肝細胞의 괴사에 대한 太陰調胃湯의 肝細胞 보호 효과를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 太陰調胃湯(Taeumjowetang : TJT)의 처방 구성은 『東醫壽世保元』²⁾에 준하였고, 한 첩의 용량은 다음과 같다.

韓藥名	生藥名	重量(g)
薏苡仁	Coicis Semen	12.0
乾 栗	Castanaee Semen	12.0
蘿藦子	Raphani Semen	8.0
麥門冬	Ophiopogonis Radix	4.0
石菖蒲	Acori Graminei Rhizoma	4.0
桔 梗	Platycodi Radix	4.0
五味子	Schizandrae Fructus	4.0
麻 黃	Ephedrae Herba	4.0
總 量		52.0

2) 세포 및 실험동물

흰쥐의 정상 肝細胞(Ac2F)는 日本 HSRRB로 부터 분주받아 使用하였고 체중 200g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대한 동물 실험 센터에서 구입하여 使用하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

太陰調胃湯 8첩 분량(416g)을 취해 3배량의 증류수를 가한 다음, 환류추출한 후 여과하였다. 여액은 rotary evaporator로 감압농축한 다음, 동결건조기 중에서 건조하였다. 분말상의 太陰調胃湯 추출물 140.15g (수율 33.69%)을 얻어 시료로 사용하였다.

2) Linoleic acid의 자동산화 억제 효과 측정

(1) Linoleic acid emulsion의 제조

Linoleic acid emulsion은 Osawa 등의 방법²¹⁾에 따라 제조하여 太陰調胃湯 추출물을 농도별로 첨가한 다음 시험관에 넣고 40℃에서 배양하여 자동산화를 촉진시켰다.

(2) 지질과산화물의 함량 측정

TBA법에 의한 MDA 정량은 Ohkawa 등의 방법²²⁾에 따라 실시하여 과산화지질의 함량은 malondialdehyde tetrabutylammonium salt(MDA)로 검량표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA μM 로 표기하였다.

3) DPPH radical 소거효과 측정

太陰調胃湯의 DPPH radical에 대한 scavenging 효과를 알아보기 위하여 Harano 등의 방법²³⁾에 따라 먼저 농도별 太陰調胃湯 추출물과 증류수의 혼합물 4ml를 $1.5 \times 10^{-4}\text{M}$ DPPH/MeOH 1ml와 혼합하여 실온에서 30분 동안 방치한 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Fenton 반응계에서의 항산화 효과 측정

(1) 간조직 균질액 조제

흰쥐를 diethyl ether로 가볍게 마취한 다음, KCl 완충용액으로 간을 perfusion시킨 다음 적출하고, 세척한 후, 수분을 완전히 제거시키고 무게를 평량하였다. 다시 빙냉상태에서 조직균질기를 사용하여 완충용액으로 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄 균질액을 원심분리한 후, 상층액을 취하였으며, 실험에 사용할 때까지 -70℃에서 냉동보관하였다.

(2) Hydroxyl radical에 의한 지질과산화 반응에 대한 효과 측정

조제된 흰쥐 간조직 균질액과 10mM FeCl_2 , 30mM

H_2O_2 및 농도별 太陰調胃湯 추출물이 첨가된 반응용액을 1ml로하여 37℃에서 10분간 반응시킨 다음, TBA법으로 과산화지질의 함량을 측정하였다.

5) Xanthine-xanthine oxidase계에서 super-oxide의 생성 억제효능 측정

太陰調胃湯 추출물이 X-XOD계에서 생성되는 O_2^- 에 대한 억제 효과를 측정하기 위하여 먼저 250 μM xanthine 0.5ml과 농도별 太陰調胃湯 추출물 0.1ml을 실온에서 3분간 정치한 다음, 0.1unit xanthine oxidase를 첨가하여, 반응용액의 총량을 2ml로 조절한 후, 290nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하였다.

6) 세포배양계에서의 항산화작용 측정

(1) 세포배양

정상 肝細胞(Ac2F)를 10% FBS-DMEM 배지로 배양하여, plastic flask에서 subculture하여 세포주를 유지하였다.

(2) 농도별 太陰調胃湯의 세포독성 측정

정상 肝細胞(Ac2F)에 대한 太陰調胃湯 추출물의 세포독성을 관찰하기 위하여, 먼저 배양 肝細胞에 太陰調胃湯 추출물을 농도별로 희석하여 well당 200 μl 씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM 배지로 총량을 2ml로 조절하여 18시간 배양한 다음, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

(3) 항산화작용 측정

太陰調胃湯 추출물이 t-BHP로 유도되는 肝細胞의 산화 및 괴사에 대한 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 肝細胞에 太陰調胃湯 추출물을 농도별로 희석하여 well당 200 μl 씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM 배지로 총량을 2ml로 조절하여 18시간 배양하였다. 그 후 t-BHP의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가한 다음, 이를 다시 120분 배양시킨 후, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

(4) MTT assay

MTT assay는 Sladowski 등의 방법²⁴⁾을 따라 행하였다. 肝細胞를 배양시킨 96-well plate에 MTT를 총

용량의 10%가 되도록 넣고, 4시간 배양시킨 다음, 10분간 원심분리하였다. 그 후 배지를 제거하고 EtOH/DMSO(1:1 v/v)를 600 μ l씩 넣고 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT dye가 blue formazan을 형성하는 것을 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 통계 처리

본 실험에서 얻은 실험군간의 결과에 대하여 Student's t-test를 실시하여 유의성 여부를 검증하였고, 그 결과 p값이 0.05 이하인 경우에 유의성을 인정하였다.

III. 實驗結果

1. Linoleic acid 자동산화 억제효과

불포화지방산인 linoleic acid의 자동산화로 유도되는 과산화지질의 함량을 배양 시간별로 TBA법으로 측정하였다. 배양 11일째 지질과산화물의 함량을 측정된 결과, 太陰調胃湯 추출물을 첨가하지 않은 대조군에서 MDA 농도는 40.61 μ M이었다.

반면 항산화제인 BHT, BHA 및 Tocopherol을 첨가한 실험군에서 MDA 농도는 각각 1.06, 1.28 및 10.07 μ M로 대조군의 40.61 μ M에 비해 지질과산화물의 생성이 현저하게 억제되었다. 太陰調胃湯 추출물을 농도별로 8000, 4000, 2000, 1000 및 800 μ g을 첨가한 실험군에서는 지질과산화물의 함량이 각각 1.42, 1.42, 2.43, 13.12 및 13.31 μ M로 대조군에 비해 지질과산화물의 생성이 강하게 억제되었는데 이는 항산화제인 BHT, BHA 및 Tocopherol의 항산화력과 거의 유사하였다. 또한 太陰調胃湯 추출물 400, 200, 100 및 50 μ g을 첨가한 실험군에서도 지질과산화물의 함량이 각각 23.66, 33.21, 33.79 및 37.81 μ M로 대조군에 비해 MDA의 생성이 억제되었다.(Table I)

Table I. Antioxidative Activity of Taeumjowetang in the Linoleic Acid System as Measured by the TBA Method (unit : MDA μ M)

Groups	Incubation time (day)		
	3	7	11
Control	2.29 \pm 0.09	15.63 \pm 0.73	40.61 \pm 6.27
BHT	0.92 \pm 0.00	0.92 \pm 0.02	1.06 \pm 0.03
BHA	0.87 \pm 0.01	0.89 \pm 0.00	1.28 \pm 0.08
Tocopherol	0.90 \pm 0.01	1.03 \pm 0.01	10.07 \pm 2.50
TJT(μ g)	-	-	-
8,000	0.94 \pm 0.01	1.05 \pm 0.02	1.42 \pm 0.11
4,000	0.94 \pm 0.01	1.03 \pm 0.01	1.42 \pm 0.02
2,000	0.91 \pm 0.01	1.01 \pm 0.02	2.43 \pm 0.51
1,000	0.98 \pm 0.00	1.40 \pm 0.03	13.12 \pm 1.64
800	0.98 \pm 0.02	1.84 \pm 0.06	13.31 \pm 0.78
400	1.33 \pm 0.02	5.32 \pm 0.06	23.66 \pm 0.32
200	1.36 \pm 0.08	10.15 \pm 0.24	33.21 \pm 0.75
100	1.82 \pm 0.04	12.72 \pm 0.25	33.79 \pm 0.30
50	2.10 \pm 0.20	14.74 \pm 0.69	37.81 \pm 3.56

Each values are the mean \pm standard error of triplicate experiments.

Control : Non-treated group.

BHT : 1% BHT treated group.

BHA : 1% BHA treated group.

Tocopherol : 1% Tocopherol treated group.

TJT : Taeumjowetang treated group.

2. DPPH radical 소거효과

DPPH radical을 이용하여 太陰調胃湯 추출물의 자유기 소거능을 관찰한 결과, 항산화제인 BHT, BHA 및 Tocopherol을 첨가한 실험군에서 88.27, 84.14 및 85.35%의 강한 자유기 소거능을 나타내었다. 한편 太陰調胃湯 추출물을 농도별로 20000, 4000 및 2000 μ g을 첨가한 실험군에서는 자유기 소거능이 각각 66.67, 54.71 및 52.54%로 모두 50%가 넘는 자유기 소거능을 나타내었다. 또한 太陰調胃湯 추출물을 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400 및 300 μ g을 첨가한 실험군에서도 각각 46.74, 44.93, 43.12, 37.32, 32.97, 28.62, 28.26 및 21.37%로 모두 20% 이상의 농도 의존적인 자유기 소거능을 보였다.(Table II)

Table II. Scavenging Effect of Taeumjowetang on DPPH Radical

Groups	Concentration	RSA(%)* of control
	(μg)	(%)
BHT	-	88.27 \pm 1.32
BHA	-	84.14 \pm 2.10
Tocopherol	-	85.35 \pm 1.74
TJT	20,000	66.67 \pm 3.11
	4,000	54.71 \pm 5.14
	2,000	52.54 \pm 4.77
	1,000	46.74 \pm 2.51
	900	44.93 \pm 1.64
	800	43.12 \pm 3.36
	700	37.32 \pm 2.89
	600	32.97 \pm 2.01
	500	28.62 \pm 1.48
	400	28.26 \pm 3.96
	300	21.37 \pm 1.56
	200	15.58 \pm 2.77
	100	9.78 \pm 1.71
50	3.62 \pm 0.48	

Each values are the mean \pm standard error of triplicate experiments.
 *RSA : Radical Scavenging Activity(%) = [(Control O.D. - Experimental O.D.)/Control O.D.] \times 100.

3. Fenton 반응계에서의 항산화 효능

원취의 간조직 균질액을 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$ 와 반응시킨 대조군에서는 지질과산화물의 생성량이 37.83 μM 이었다. 한편 항산화제인 BHT를 첨가한 실험군에서는 지질과산화물의 함량이 2.92 μM 로 대조군에 비해 약 92%의 억제 효과를 보였다.

또한 太陰調胃湯 추출물을 농도별로 1000, 800, 400, 200, 100, 80 및 40 μg 씩을 첨가한 실험군에서는 지질과산화물의 함량이 각각 16.71, 20.15, 22.72, 25.39, 28.78, 33.49 및 36.05 μM 로 太陰調胃湯 추출물 첨가로 인해 대조군에 비하여 최고 55.83%의 지질과산화물 생성 억제 효과를 보였다.(Table III)

Table III. Effect of Taeumjowetang on the Lipid Peroxidation of Rat Homogenate induced by Fenton Reaction System

Groups	Concentration	MDA	Inhibition	
	(μg)	(μM)	(%)	
Control	-	37.83 \pm 0.83	-	-
BHT	-	2.92 \pm 0.26	**	92.29
TJT	1,000	16.71 \pm 0.61	**	55.83
	800	20.15 \pm 1.32	**	46.72
	400	22.72 \pm 0.23	**	39.93
	200	25.39 \pm 0.04	**	32.88
	100	28.78 \pm 0.14	**	23.93
	80	33.49 \pm 0.44	**	11.46
	40	36.05 \pm 1.04	*	4.70

Each values are the mean \pm standard error of triplicate experiments. Values statistically significant as compared with control data of each group. (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

4. Superoxide의 생성에 미치는 효과

Xanthine-xanthine oxidase 반응계로부터 O_2^- 의 생성에 미치는 효과를 관찰한 결과 太陰調胃湯 추출물을 2000, 1800, 1600, 1400, 1200, 1000 및 800 μg 씩을 첨가한 실험군에서 각각 25.68, 14.54, 13.18, 12.05, 9.77, 8.64 및 2.95%의 superoxide 생성 억제 효과를 보였다.(Table IV)

Table IV. Inhibitory Effect of Taeumjowetang on Superoxide Generation Induced by Xanthine-Xanthine Oxidase System

Groups	Concentration	Inhibition of control
	(μg)	(%)
TJT	2,000	25.68 \pm 2.45
	1,800	14.54 \pm 2.77
	1,600	13.18 \pm 1.16
	1,400	12.05 \pm 1.85
	1,200	9.77 \pm 0.97
	1,000	8.64 \pm 2.14
	800	2.95 \pm 0.58

All data are the mean \pm standard error of triplicate experiments.

5. 배양 정상 肝細胞에 대한 太陰調胃湯의 세포 독성

원취의 배양 정상 肝細胞에 농도별 太陰調胃湯 추출물을 전처리한 다음, 세포 생존률을 MTT assay로 측정된 결과 아무런 처치도 하지 않은 실험군의

세포 생존율을 100%로 보았을 때 太陰調胃湯을 well 당 2000, 1000, 500 및 250 μ g을 첨가한 실험군에서는 19.86, 29.27, 38.10 및 74.72%의 세포 생존율을 보여 현저한 세포 독성이 관찰되었다.

반면 太陰調胃湯을 well당 100, 50, 25, 10 및 5 μ g을 첨가한 실험군에서는 모두 100%에 가까운 세포 생존율을 보여 세포 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.(Table V)

Table V. Cytotoxicity of Taeumjowetang on Cultured Normal Rat Liver Cell

Groups	Concentration (μ g/well)	Viability(%) of control (%)	
TJT	2,000	19.86 \pm 7.48	**
	1,000	29.27 \pm 4.17	**
	500	38.10 \pm 10.02	**
	250	74.72 \pm 5.30	*
	100	98.42 \pm 3.79	
	50	99.63 \pm 3.94	
	25	98.54 \pm 1.62	
	10	98.95 \pm 1.25	
	5	99.47 \pm 2.80	

All data are the mean \pm standard error of triplicated determination. Values statistically significant as compared with control data of each group. (* : p<0.05, ** : p<0.01)

6. 세포배양계에서의 太陰調胃湯의 항산화 효능

원취의 배양 정상 肝細胞에 太陰調胃湯 추출물을 농도별로 전처리 한 다음, 1mM의 t-BHP를 첨가하고 120분간 배양하여 세포막의 지질과산화물 동반하는 肝細胞의 괴사를 유발시킨 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, t-BHP만을 처리한 실험군에서는 약 50%의 세포 생존율을 나타내었다.

한편 太陰調胃湯 추출물을 농도별로 2000, 1000, 500 및 250 μ g을 전처리한 다음, t-BHP를 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 각각 16.08, 21.91, 19.97 및 41.25%로 t-BHP 단독 처리군에 비하여 낮은 세포 생존율을 나타내었다. 이 결과에서 세포 생존율이 감소한 것은 t-BHP의 세포 독성과 고농도의 太陰調胃湯 자체의 세포 독성이 함께 작용한 결과임을 알 수 있었다.

반면 太陰調胃湯 추출물을 100, 50, 25 및 10 μ g을 전처리한 다음, t-BHP를 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 각각 60.43, 61.06, 57.33 및 57.02%로 t-BHP 단독 처리군의 50.26%에 비하여 높은 세포 생존율을 보였다.(Table VI)

Table VI. Effect of Taeumjowetang on t-BHP induced Lipid Peroxidation in Cultured Normal Rat Liver Cell

Groups	Concentration (μ g/well)	Viability(%) of control (%)	
t-BHP		50.26 \pm 2.68	
TJT	2,000	16.08 \pm 1.98	
	1,000	21.91 \pm 0.58	
	500	19.97 \pm 1.48	
	250	41.25 \pm 3.65	
	100	60.43 \pm 1.91	*
	50	61.06 \pm 0.26	**
	25	57.33 \pm 1.72	
	10	57.02 \pm 1.58	
	5	43.67 \pm 4.79	

All data are the mean \pm standard error of triplicated determination. Values statistically significant as compared with control data of each group. (* : p<0.05, ** : p<0.01)

t-BHP : t-BHP treated group.

TJT : Taeumjowetang pretreated and t-BHP treated group.

IV. 考 察

四象醫學은 타고난 性命에 의한 體質의 差等關係에서 비롯되는 性情의 偏急現狀을 發病의 重要한 原因이라 보고 이를 陰陽升降緩束의 원리에 입각하여²⁵⁾ 知人正己를 통한 修己治人の 방법으로³⁾ 인체의 自律的 調節機能을 극대화 시키는데 主要點을 맞춘 治心治病醫學이다.²⁵⁾

臟腑形局이 肝大而肺小한 太陰人의 病證은 크게 胃脘受寒表寒病과 肝受熱裏熱病으로 구분되고, 다시 胃脘受寒表寒病은 太陽寒厥證과 胃脘寒證으로, 肝受熱裏熱病은 肝燥熱證과 燥澁便閉證으로 분류된다.¹⁾

宋²⁶⁾은 胃脘受寒表寒病의 病理를 “太陰人은 肝大肺小하기 때문에 肝陰이 過旺하고 肺陽이 不足하여

肝에는 鬱熱이 생기기 쉽고 肺는 虛寒하기 쉽다.” 등으로 설명하고 있다. 즉 太陰人은 本是 肝大肺小 하여 肺의 呼散之氣는 부족하고 상대적으로 肝의 吸聚之氣는 過旺되기 쉬운 체질이므로 부족한 呼散之氣를 강화함으로써 過旺된 吸聚之氣를 억제해 두 氣運의 힘의 편차를 최소화 하는 것이 自律的 調節 機能을 유지하는 관건인 것이다.^{19,20,27)}

또한, 宋²⁸⁾은 “四象醫學의 특징은 相互 對待關係에 있는 臟氣를 興奮 또는 沈靜시킴으로써 체질적인 臟氣의 불균형을 조절하는데 있다.”고 하였는데 朴²⁹⁾이 “四象人 病證論은 모두 本에 해당하는 小한 臟이 중심이 되어 있다.”라고 하였듯이 치료면에 있어서도 小한 臟의 機能正常化를 통하여 機能이 非正常한 大한 臟의 機能正常化를 꾀했음을 알 수 있는 것이다. 이는 體質別 臟腑 大小關係와 『東醫壽世保元』 新定方에 사용된 藥材의 歸經別 분포의 반비례에서도 알 수 있는데 太陰調胃湯 구성약물의 歸經을 살펴봐도 入肺經, 胃經이 많은 반면 入肝膽經은 全無하다.²⁸⁾ 그런 故로 太陰人의 小한 臟인 肺의 呼散之氣를 강화하여 大한 臟인 肝의 생리적 불균형을 치료할 수 있는 것이다.

太陰調胃湯²⁾은 薏苡仁, 乾栗, 蘿菥子, 五味子, 麥門冬, 石菖蒲, 桔梗, 麻黃으로 構成되어 胃脘受寒表寒病으로 발생³⁾된 食滯痞滿, 腿脚無力, 泄瀉, 咳嗽, 水積, 黃疸, 酒傷, 積聚, 脇痛, 眩暈^{2,5,7)} 등의 證狀을 發汗과 潤燥의 治法으로서 치료하기 위하여 응용된 處方이다.³⁾ 本方에 사용된 각 藥物의 效能을 살펴보면 薏苡仁은 味甘하여 專除濕痺 筋脈拘攣하며 開肺之胃氣 而消食進食하고, 乾栗은 酸溫하여 益氣厚腸 補腎耐飢하며 역시 開肺之胃氣 而消食進食하고, 蘿菥子는 味辛하여 喘欬下氣 倒壁衝牆 脹滿消去하고, 五味子는 酸溫하여 生精止渴 久嗽虛勞하며 健肺直肺한다. 아울러 麥門冬은 甘寒하여 解渴祛煩 補心清肺하며 補肺和肺하고, 石菖蒲는 性溫하여 開心通竅 祛痺除風하며 錯綜肺氣 參伍勻調하고, 桔梗은 味苦하여 療咽腫痛 載藥上升 開鬱利壅하며 壯肺而有外攘之勢하고, 麻黃은 味辛하여 解表出汗 風寒發表하며 解肺之表邪한다.³⁰⁾

전체적인 藥物의 구성이 祛濕, 消食, 潤肺, 發汗 등의 效能이 있음을 알 수 있으며, 아울러 모든 藥物이 肺의 呼散之力을 증강하는 의미를 담고 있다.

肺의 呼散之力이 증강되어야만이 상대장기인 肝의 吸聚之力을 억제하여 정상적인 肝의 機能을 유지할 수 있는 것이다. 또한 현대적으로 알려져 있는 肝의 중요한 機能은 肝門脈을 통하여 小腸으로부터 수송되어져 온 영양분의 解毒, 分解, 合成에 있다. 그러므로 肝臟病에 있어 중요한 치료원칙 중 하나는 腸의 機能을 정상화시키는 것인데 太陰調胃湯은 이에 부합되는 效能인 消食進食, 脹滿消去 등의 效能을 가지고 있음을 알 수 있다.³¹⁾

肝疾患 치료에 太陰調胃湯을 사용하는 문헌 및 임상적 근거는 이와 같다. 그러나 현재까지 太陰調胃湯의 效能에 관한 실험적 연구는 주로 肥滿症¹⁶⁻¹⁸⁾에 관한 것이 대부분이었고, 본 處方의 肝細胞 보호 效果에 관해서는 실험적으로 연구되어진 바 없었다. 이에 본 연구에서는 太陰調胃湯의 肝細胞 보호 效果를 규명하기 위한 일환으로 항산화능에 의한 세포 보호 效果를 알아보고자 먼저 지질의 자동산화에 대한 본 약물의 항산화 效果를 관찰하였다. 지질의 자동산화는 분자상의 산소와 불포화지방산이 반응하기 위해서 주로 지질이 활성화되는 이른바 지질과산화 반응의 일종이라 할 수 있다. 본 연구에서는 太陰調胃湯 추출물이 지질과산화 반응에 어떠한 영향을 미치는가를 관찰하고자 불포화지방산인 linoleic acid의 자동산화계에서 시간경과에 따른 지질과산화물의 함량을 측정하였다. 그 결과, 太陰調胃湯 추출물 첨가군은 무첨가군에 비해 지질과산화물의 생성을 현저하게 억제하였으며, 특히 항산화제인 BHT, BHA 및 Tocopherol과 거의 유사한 수준의 억제 效果를 보였다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 太陰調胃湯 추출물의 항산화능은 지질과산화 반응의 개시과정 혹은 진행과정 중에서 생성되는 지질라디칼을 소거함에 기인한다는 판단하에 DPPH radical에 대한 본 약물의 자유기 소거능을 관찰하였다. DPPH radical은 자유기 형태(DPPH·)에서는 진보라색의 색깔을 나타내지만 항산화제로부터 수소 혹은 전자를 공여받아 안정한 형태(DPPH-H)가 되면 색깔이 연해지거나 무색으로 변하게 되므로, 이러한 성질을 이용하여 특정 藥物의 자유기 소거능을 관찰할 수 있다. 본 실험의 결과 太陰調胃湯 추출물은 농도 의존적인 자유기 소거능을 보였으며, 특히 본 실험에서는 최고 66%에 이르는 강한 소거 效果를 보였다.

Hydroxyl radical은 superoxide anion과 더불어 생체 내에서 세포의 산화적 손상을 야기하는 주된 자유기로 알려져 있으며³²⁾ 그 반응성은 superoxide anion보다 훨씬 강하다. Hydroxyl radical은 hydrogen peroxide(H₂O₂)가 이가의 철이온(Fe²⁺)과 반응할 경우 생성되며, 이러한 Fenton 반응계에서 생성된 hydroxyl radical을 흰쥐의 간조직과 반응시킴으로써 과산화지질의 생성이 야기된다. 본 연구에서는 太陰調胃湯이 세포의 산화적 손상에 주요 역할을 담당하는 hydroxyl radical에 의해 야기되는 지질과산화 반응에 대한 효과를 관찰하였다. 그 결과 太陰調胃湯 추출물은 hydroxyl radical에 의한 흰쥐 간조직 중의 지질과산화물의 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 특히 최고 55%에 이르는 강한 항산화 효과를 보였다.

세포의 산화적 손상을 유발하는 주된 자유기 중의 하나인 superoxide는 방사선, 세포의 산화과정, 염증반응 등으로부터 생성되어 세포막 파괴 및 DNA 손상으로 인한 암발생에 관여한다.^{33,34)} Superoxide에 의한 산화적 손상을 방어하기 위하여 생체내에는 superoxide dismutase(SOD)라는 항산화 효소가 존재하지만 superoxide가 과도하게 생성될 경우 세포막의 산화적 손상 및 암이 초래될 수 있다. 본 연구에서는 superoxide 생성계로서 xanthine-xanthine oxidase 시스템을 사용하여 太陰調胃湯 추출물의 superoxide 생성 억제 효과를 관찰하였다. 그 결과, 太陰調胃湯 추출물은 xanthine-xanthine oxidase 반응계로부터 생성되는 superoxide를 최고 25% 정도 억제하였다.

太陰調胃湯의 항산화능에 의한 肝細胞 보호효과를 규명하기 위한 일환으로 본 실험에서는 먼저 太陰調胃湯 추출물의 肝細胞 독성을 평가하였다. BHT, BHA 등과 같은 기존의 인공 합성 항산화제는 그 효능이 뛰어나지만 세포독성 및 변이원성 등과 같은 부작용이 초래될 수 있다고 알려져 있다.³⁵⁾ 따라서 본 연구에서는 太陰調胃湯 추출물이 肝細胞에 안전한 농도 범위를 먼저 규명하고, 그 범위의 농도 내에서 세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과를 나타내는가를 관찰하고자 하였다. 흰쥐 배양 정상 肝細胞를 대상으로 太陰調胃湯 추출물의 肝細胞 독성 여부를 평가하기 위하여, 肝細胞에 농도별 太陰調胃湯 추출물을 전처리한 후, 일정시간 배양하여 세포

생존율을 검토한 결과, 고농도(250~2,000 μ g/well)에서는 강한 세포 독성을 보였으나 희석배수가 증가(100 μ g 이하/well)함에 따라서 세포 독성은 나타나지 않음을 알 수 있었다.

흰쥐의 배양 정상 肝細胞를 대상으로 太陰調胃湯 추출물의 항산화 효능에 의한 세포 보호 효과를 규명하기 위하여 본 실험에서는 t-BHP를 처리함으로써 肝細胞의 산화적 손상 및 괴사를 유발시켰다. t-BHP는 급성 산화적 스트레스로 인한 비가역적인 세포 손상의 기전 연구에 주요 모델로서 빈번하게 사용되고 있다. 또한 肝細胞에 대한 t-BHP의 독성 발현은 본 약물에 의해 肝細胞의 막을 구성하는 인지질의 과산화 반응에 기인하는 것으로 보고되었으며, 배양 肝細胞에서의 이러한 산화적 손상은 특히 1mM 이하로 처리할 경우 유발되는 것으로 알려져 있다.³⁶⁾

본 실험에서는 t-BHP에 의한 肝細胞의 산화적 손상 및 괴사에 대해 太陰調胃湯 추출물이 어떠한 영향을 미치는가를 관찰하였다. 그 결과, 太陰調胃湯 무첨가군에서는 약 50%의 세포 생존율을 보인 반면, 太陰調胃湯 추출물 첨가군에서는 최고 60%에 가까운 세포 생존율을 보였다.

이상을 종합해 보면 太陰調胃湯 추출물은 강한 자유기 소거능을 가지며, 이러한 효능에 의해 지질의 과산화 반응은 현저하게 억제될 수 있음이 실험적으로 규명되었다. 또한 본 약물은 肝細胞에 안전한 농도 범위내에서 肝細胞의 산화적 손상을 방어할 수 있음을 알 수 있었다.

V. 結 論

太陰調胃湯의 抗酸化 효능에 의한 肝細胞 보호 효과를 검토하기 위하여 linoleic acid의 자동산화계, DPPH radical, H₂O₂-Fe²⁺계, xanthine-xanthine oxidase 계 및 세포배양계를 이용하여 抗酸化 효과 및 자유기 소거능을 관찰하고, t-BHP로 유도한 肝細胞의 괴사에 대한 肝細胞 보호 효과를 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. linoleic acid의 자동산화계에서 太陰調胃湯 추출물 첨가군은 무첨가군에 비해 지질과산화물의 생성

을 현저하게 억제하였다.

2. 자유기 소거 효과에서 太陰調胃湯 추출물은 농도 의존적인 자유기 소거능을 보였으며, 최고 66%의 DPPH radical 소거효과를 보였다.
3. 太陰調胃湯 추출물은 $H_2O_2-Fe^{2+}$ 계에서 생성되는 hydroxyl radical에 의한 간조직의 지질과산화물 농도 의존적으로 억제하였으며, 최고 55%까지 억제하였다.
4. 太陰調胃湯 추출물은 xanthine-xanthine oxidase계로부터 생성되는 superoxide에 대하여 최고 25% 정도의 생성 억제 효과를 나타내었다.
5. 太陰調胃湯의 肝細胞 독성 여부를 MTT assay로 검토한 결과, 고농도(250~2,000 μ g/well)에서는 강한 세포 독성을 보였으나 희석배수가 증가(100 μ g 이하/well)함에 따라서 세포 독성은 나타나지 않았다.
6. t-BHP에 의해 유도된 肝細胞의 과산화반응 억제 효과는 太陰調胃湯 무침가군에서 약 50%의 세포 생존율을 보인 반면, 太陰調胃湯 침가군에서는 세포독성에 대하여도 비교적 안전한 농도인 100 μ g 부근에서 최고 60%에 가까운 세포 생존율을 보였다.

參 考 文 獻

1. 宋一炳 外. 四象醫學, 서울; 集文堂, 1998; 47~48, 50, 76, 153, 157, 555.
2. 李濟馬. 東醫壽世保元, 서울; 杏林出版社, 1986; 7, 107~111, 123.
3. 宋一炳. 알기 쉬운 四象醫學, 서울; 하나미디어, 1993; 148, 214~225, 248~251.
4. 李基珠, 田炳燾, 金敬堯. 太陰調胃湯이 白鼠의 肥滿症 및 誘導肥滿細胞에 미치는 效果. 서울, 四象醫學會誌 1996; 8(2): 220, 231, 234.
5. 元德必. 東醫四象新編(國譯韓醫學大系 13권), 서울; 海東醫學社, 1999; 109, 112, 114.
6. 朴奭彦. 東醫四象大典, 서울; 醫道韓國社, 1977; 404, 409, 430, 493.
7. 李乙浩, 洪淳用. 四象醫學原論, 서울; 杏林出版社, 1982; 301.
8. 肝系內科學教授共著. 肝系內科學, 서울; 東洋醫學

- 研究院出版部, 1989; 7~8.
9. 李克魯. 清暑益氣湯이 白鼠 損傷肝의 回復에 미치는 影響. 이리, 圓光大學校大學院, 1990.
10. 이주봉. 當歸藥針 및 黃芪藥針이 CCl₄에 의한 肝損傷의 回復效果에 關한實驗的 研究. 이리, 圓光大學校大學院, 1994.
11. 金成桓. 加味枳朮丸 및 保和丸이 損傷된 肝組織에서의 膠原質生成 및 肝細胞再生에 미치는 影響. 이리, 圓光大學校大學院, 1995.
12. 姜秉淇. 黃芩煎湯液이 肝損傷에 대한 防禦 및 回復에 미치는 影響. 이리, 圓光大學校大學院, 1985.
13. 金秉雲 外. 生肝健脾湯이 肝臟의 代謝와 再生機能에 미치는 影響. 서울, 慶熙韓醫大論文集 1982; 5: 19~40.
14. 文大煥. 龍膽瀉肝湯 및 茵陳五苓散이 膽道結紮로 誘發된 白鼠의 損傷肝에 미치는 影響. 이리, 圓光大學校大學院, 1993.
15. 朴東彦, 金達來. 太陰調胃湯의 潰瘍抑制效能에 關한 研究. 서울, 四象醫學會誌 1997; 9(2): 227~243.
16. 金樹凡, 高炳熙, 宋一炳. 太陽人, 太陰人의 處方과 藥材가 脂肪細胞(3T3-L1)의 增殖·分化抑制에 미치는 影響. 서울, 四象醫學會誌 1998; 10(2): 533~564.
17. 金敬堯. 太·少陰人, 少陽人의 處方이 Gold thioglucose로 誘發된 白鼠의 肥滿症에 미치는 效果. 서울, 四象醫學會誌 1996; 8(1): 295~318.
18. 백태현, 김달래. 四象體質과 肥滿의 相關性에 關한 臨床的 研究. 서울, 四象醫學會誌 1996; 8(1): 319~336.
19. 宋一炳. 四象人病證藥理의 成立過程과 그 運營精神에 대한 考察. 서울, 四象醫學會誌 1996; 8(1): 6~8.
20. 宋一炳. 四象人의 體質病證藥理에 關한 考察. 서울, 四象醫學會誌 1998; 10(2): 9~10, 12.
21. Osawa, T., Namiki, M.. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. Agric. Biol. Chem. 1981; 45: 735~739.
22. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.. Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid

- reaction. *Analytical Biochem.* 1978; 95: 351~358.
23. Harano, 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.
24. Sladowski, D., Steer, S. J., Clothier, R. H. and Balls, M.. An improved MTT assay. *J. Immun. Methods* 1993; 157: 203~207.
25. 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. 서울, 四象醫學會誌 1995; 7(2): 184.
26. 李壽瓊, 高炳熙, 宋一炳. 東醫壽世保元의 文獻的 資料에 근거한 太陰人 病證에 대한 考察. 서울, 四象醫學會誌 1995; 7(1): 108.
27. 民族醫藥研究所編. 朝醫學(附錄1『四象醫學草本卷』), 延邊: 延邊朝鮮族自治州民族醫藥研究所, 1985; 8.
28. 宋炳基. 傷寒論과 四象說의 比較. 서울, 四象醫學會誌 1995; 7(1): 20.
29. 朴性植. 東醫壽世保元 四象人 表裏病證 篇名에 대한 小考. 四象醫學會誌 1994; 6(1): 83.
30. 李濟馬. 東武遺稿(國譯韓醫學大系 15권), 서울; 海東醫學社, 1999; 52~54, 56~57, 60, 64~65.
31. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 내과학, 서울; 군자출판사, 1996; 480~505.
32. 大柳善彦. SODと活性酸素調節劑その藥理作用と臨床應用, 東京; 日本醫學館, 1989; 9.
33. Musarrat, J. and Wani, A. A.. Quantitative immunoanalysis of promutagenic 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in oxidized DNA. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2037~2043.
34. Oberley, L. W. and Buettner, G. R.. Role superoxide dismutase in cancer. *Cancer Res.* 1979; 39: 1141~1149.
35. Branen, A. L.. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS* 1975; 52: 59~63.
36. Masaki, N., Kyle, M. E., Serroni, A., Farber, J. L.. Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989; 270: 672.