

十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯의 肝損傷 保護作用에 대한 연구

이경성* · 김형순* · 배영춘* · 이상민* · 김경요* · 원경숙**

Abstract

Study in the Hepatoprotective Effect of Sipyimiguanjung-tang and Osuyubujaijung-tang

Lee Kyung-seong* · Kim Hyoung-soon* · Bae Young-chun* · Lee Sang-min* · Kim Kyung-yo* · Won Kyung-sook*

*Dept. of Sasang constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang Univ.

** Dept. of Nuclear Medicine, College of Medicine, Keimyung Univ.

Osuyubujaijung-tang(OBT) and Sipyimiguanjung-tang(SGT) has been developed as prescriptions for the Soyeumin constitution. The hepatoprotective effect of the water extract of Osuyubujaijung-tang(OBT) and Sipyimiguanjung-tang(SGT) was investigated against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic damage. A single intra-peritoneal injection of CCl₄ produced liver damage in rats as manifested by the significant rise of aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), and alkaline phosphatase(ALP) in serum as compared to those of untreated normal group. Pretreatments of rats with Osuyubujaijung-tang(OBT) and Sipyimiguanjung-tang(SGT) 500 mg/kg for 7 days) were significantly reduced AST, ALT, and ALP levels compared with CCl₄-treated control group. Treatment of rats with CCl₄ led to significantly increase in lipid peroxidation and significantly decrease in cytochrome P450 and P450 reductase. The oral administration of Osuyubujaijung-tang(OBT) and Sipyimiguanjung-tang(SGT) water extract significantly inhibited the accumulation of microsomal thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) and increased the cytochrome P450 and P450 reductase activity. All these biochemical alterations resulting from CCl₄ administration were inhibited by the pretreatment with Osuyubujaijung-tang(OBT) and Sipyimiguanjung-tang(SGT) extract. These results suggest that Osuyubujaijung-tang(OBT) and Sipyimiguanjung-tang(SGT) water extract can be useful as a hepatoprotective agent. And the effect of NO modulation by NO synthesis or precursors, and Osuyubujaijung-tang(OBT) and Sipyimiguanjung-tang (SGT) water extract was researched on chronic liver damage induced by CCl₄ administration. It was observed that endogenous NO protected the liver from lipid peroxidation, fibrosis, and damage. Osuyubujaijung-tang(OBT) and Sipyimiguanjung-tang(SGT) water extract showed the hepatoprotective effect on the chronic liver cirrhosis model and relationship with NO modulation.

Key word : Hepatoprotective Effect, Sipyimiguanjung-tang, Osuyubujaijung-tang

* 원광대학교 한의과대학 사상체질과 ** 계명대학교 의과대학 핵의학과
교신저자 : 이경성 (주소) 서울시 강북구 미아5동 465-38 홍의한의원 전화) 02-982-1075
E-mail) hongik4@hitel.net

I. 緒 論

韓醫學에서 肝의 주요 생리기능인 疎泄作用은 承發과 透泄의 의미로 人體 氣機의 순환에 영향을 미치는 기본적인 기능을 하는 장기로 脾胃의 소화작용과 정지활동을 유지하는 기본이 된다. 아울러 간은 장혈작용으로 정상적 생리기능에 중요한 역할을 수행한다.¹⁾

少陰人 十二味寬中湯은 원지상의 東醫四象新編²⁾에 나오는 처방으로 임상활용에 있어서 少陰人의 吐瀉痞亂·積聚·氣脹·食脹·悶坐腰痛·臂痛등을 치료한다²⁻⁴⁾. 少陰人 吳茱萸附子理中湯은 이제마의 東醫壽世保元 新定 少陰人病 應用要約二十四方に 수록되어 있으며, 少陰人의 陰實證, 즉 四肢가 逆冷하거나 온몸이 차며 만성 대장염, 傷寒, 陰毒證, 太陰證, 少陰病의 危境할 때 쓴다⁵⁾.

현대적 의미의 간은 신체에서 여러 가지 약물이나 이물질들(xenobiotics)의 해독에 중요한 기능을 수행하는 장기이다. 섭취, 흡입, 피부, 또는 주사 등을 통해 체내에 흡수된 다양한 약물 및 이물질들(carcinogen, environmental pollutant, insecticide 등)은 간에서 생체변환되어 독성이 적거나 무독한 물질로 전환된다. 이러한 변화를 촉매하는 일련의 효소계가 간에 다량 존재한다. 대부분의 이물질들은 간 microsome의 phase I과 phase II 두가지 효소군에 의해서 대사가 이루어진다. Phase I 효소들은 화합물에 작용기를 첨가함으로써 독성을 증가시키는 역할을 하며, phase II 효소들은 화합물의 작용기에 아미노산이나 펩티드를 결합시키므로 무독화시키고 체외로 쉽게 배설될 수 있도록 하는 역할을 한다⁶⁾. 우리나라의 간 질환 발생률은 외국에 비해 상당히 높은 편이며, 현대 의학의 발전에도 불구하고 간 질환은 특효약이나 효과적인 치료법이 제시되지 않아 치료에 어려움을 겪고 있는 분야 중의 하나이다.

최근 간 질환에 대한 관심의 고조와 더불어 천연자원으로부터 간 기능 향상 및 간 질환

치료제의 개발을 위한 연구가 시도되어 왔으며, 이들 중 glycyrrhizin, gomisin 및 silymarin 등은 현재 급·만성 간 질환 치료제로 이용되고 있다. 최근 간 기능 향상 및 간 기능 보호 작용을 나타내는 것으로 보고된 것은 *Artemisia absinthium* 및 *Ambrosia maritima* 추출물, *Hymenaea martiana*로부터 추출한 flavonoid인 astilbin⁷⁾, 그리고 *Picrorhiza kurroa*로부터 분리한 picroliv⁸⁾ 등이 있다. 국내에서는 담자균류인 영지(*Ganoderma lucidum*) 자실체로부터 추출한 G009도 간세포 보호효과가 있다고 보고되었다⁹⁾. 또한 한의학에서 자양 및 강장제로 널리 사용되는 갈화(*Pueraria lobata*) 추출물은 알코올 해독에 효과가 있으며¹⁰⁾, 구기자(*Lycii fructus*)도 간세포 독성을 현저히 완화시키며, 물분획물의 주요 성분인 비테인이 사염화탄소로 인하여 저하된 대사능력을 회복시킴으로서 간 보호효과가 있는 것으로 보고되었다¹¹⁾.

본 연구에서는 少陰人 裏病 病證論에서 포괄적인 치료 목적으로 임상에서 폭넓게 사용되는 처방인 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯이 사염화탄소로 유발한 급만성 간독에 미치는 효과를 관찰하였다. 또한 두 처방의 만성적 간손상에 대한 보호작용과 그 작용 기전의 일부를 관찰하기 위하여 사염화탄소의 장기 투여로 유발한 간손상의 보호효과와 NO 합성에 미치는 영향을 조사하여 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 實驗動物 및 사육조건

급성 독성 실험을 위하여 실험동물은 생후 6주 경과한 180~200 g의 Sprague-Dawley(SD)계 흰쥐 수컷을 사용하고 만성적 간기능 손상모형을 위하여는 80 g의 Wistar 흰쥐 수컷만을 선별하여 사용하였다. 동물사육실의 조건은 conventional system으로 온도 23±1℃, 습도 55±5%, 배기 10~18 회/hr, 형광등

명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 rat 용 폴리카보네이트 사육상자 (240W×400L×180H mm)에 2마리씩 넣어 사육하였다. 실험동물의 사료는 신촌사료(주) 제품의 고품사료를 사용하였으며 깔짚은 (주)삼육 제품의 버드나무송으로 만든 것을 사용하였다. 음수는 멸균된 수돗물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 藥材

실험에 사용된 韓藥材는 시중에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 처방은 『동의사상신편』과 『東醫壽世保元』의 “新定少陰人病 應用要藥二十四方”에 기재된 十二味寬中湯, 吳茱萸附子理中湯으로 하였으며 一貼의 처방내용 다음과 같다(Table 1, 2). 처방에 사용되는 약재들을 cutting mill로 세절한 다음 각 처방의 200 g 분량의 한약재를 2 L의 증류수로 3 시간 동안 열수 추출하였다. 추출액은 거즈로 거른 다음 원심분리 및 여과지로 여과하였으며, 추출액을 50℃ 하에서 회전감압농축기로 농축하였다. 농축된 시료는 동결건조기로 완전 건조를 하여 얻어진 분말을 필요에 따라 농도를 조절하여 사용하였다.

Table 1. The components of Osuyubujijung-tang(吳茱萸附子理中湯, OBT)

Herbal Name	Scientific Name	Weight(g)
人蔘	RADIX GINSENG	8
白朮	RHIZOMA ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE	8
乾薑炮	RHIZOMA ZINGIBERIS SICCATUM	8
宮桂	CORTEX CINNAMOMI	8
白芍藥	RADIX PAEONIAE LACTIFLORAE	4
陳皮	PERICARPIUM CITRI NOBILIS	4
甘草炙	RADIX GLYCYRRHIZAE	4
吳茱萸	FRUCTUS EVODIAE	4
小茴香	FRUCTUS FOENICULI	4
破古紙	SEMEN PSORALEAE	4
附子炮	RADIX ACONITI	4
Total amount		60

Table 2. The components of Sipyimiguanjung-tang(十二味寬中湯, SGT)

Herbal Name	Scientific Name	Weight(g)
白何首烏	RADIX CYNANCHI WILFORDII	4
赤何首烏	RADIX POLYGONI MULTIFLORI	4
良薑	RHIZOMA ALPINIAE OFFICINARUM	4
乾薑	RHIZOMA ZINGIBERIS SICCATUM	4
陳皮	PERICARPIUM CITRI NOBILIS	4
青皮	PERICARPIUM CITRI NOBILIS VIRIDE	4
香附子	RHIZOMA CYPERI	4
益智仁	FRUCTUS ALPINIAE OXYPHYLLAE	4
厚朴	CORTEX MAGNOLIAE	2
枳實	FRUCTUS IMMATURUS PONCIRI	2
木香	RADIX SAUSSUREA	2
大腹皮	PERICARPIUM ARECAE	2
大棗	FRUCTUS ZIZYPHI JUJUBAE	6
Total amount		46

2. 實驗方法

1) 시료의 처치 및 실험군

급성 독성실험을 위하여 정상군은 독성물질 투여나 시험물질의 균질액을 급여하지 않고 생리식염수만을 경구 투여하였으며, CCl₄ 단독 투여군인 대조군은 생리식염수를 경구투여하면서 독성물질인 사염화탄소를 복강 투여하였다. 사염화탄소는 corn oil에 1:1 (V/V)의 비율로 혼합하여 체중 kg 당 1 ml의 용량을 1 회 복강 투여하여 간 독성을 유발시켰다. 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 열수추출물 투여군인 OBT500과 SGT500은 각각 체중 kg 당 500 mg에 해당하는 농도로 1 일 1 회씩 7 일 동안 경구 투여하였다. 500 mg의 농도는 예비 실험을 통하여 유효 농도를 검색하여 결정하였다. 검액의 최종 투여 후 사염화탄소를 체중 kg 당 1 ml의 용량을 복강주사로 투여하였다. 사염화탄소 투여 후 24 시간 사육한 흰쥐를 20%

urethane으로 마취한 다음 심장천자로 혈액을 채취하였다. 채혈 후 회복하여 간을 적출하였으며 실험군의 동물 수는 각각 6 마리 씩 사용하였다.

만성적 독성실험을 위하여 대조군 즉 실험군I은 CCl₄(0.4 g/kg of body weight)를 mineral oil에 녹여 1 주에 3 회씩 8 주 동안 복강 주사하였다. 실험군II는 CCl₄ 와 L-NAME(100 mg/kg, p.o., 1 일 2회)를, 실험군III은 CCl₄와 AG(4 g/L), 실험군IV는 CCl₄와 L-arginine(500 mg/kg, p.o., 1 일 2 회)을 처치하였으며, 실험군V, VI, VII은 L-NAME, L-arginine, AG를 vehicle로 동일하게 투여하였다. 또한 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 열수추출물 500 mg/kg/day을 물에 녹여 경구 투여하였다.

2) 간세포독성 및 한약추출물의 방어효과 분석

① 혈청의 간 기능 지표효소 측정

채취한 혈액은 실온에서 30 분 간 방치한 후 3,000 rpm에서 15 분 간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청의 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ -GTP, 그리고 alkaline phosphatase (ALP)는 혈청 자동분석기(Hitachi-7150, Hitach medical Co.)로 측정하였다.

② 간 조직의 Microsome 분리

Bansal¹²⁾ 등의 방법에 따라 적출한 흰쥐의 간을 잘게 썰고, 150 mM KCl을 함유한 30 mM HEPES 완충액(pH 7.4)으로 5 배 희석하여 균질화한 다음 원심분리관에 넣고 700 g로 20 분 동안 원심분리하였다. 상등액은 원심분리 및 초고속원심분리과정을 거쳐 최종 pellet을 얻었으며 HEPES 완충액으로 재균질화하여 microsome 분획을 얻었다. Microsome을 분리하는 전 과정은 4°C하에서 수행하였으며 시료는 -70°C에 보관하면서

각종 실험에 사용하였다.

③ 단백질 정량

Bovine serum albumin (BSA)을 표준 물질로 사용하여 Lowry¹³⁾ 등의 방법에 따라 단백질 농도를 측정하였다.

④ 간 조직의 TBA 반응성물질의 함량측정
Microsomal membrane의 지질과산화 정도를 비교하기 위하여 시험관에 microsome을 넣은 후 0.1 mM NADPH와 ADP-Fe²⁺ (0.5 mM ADP, 0.02 mM Fe²⁺)를 첨가하고 37°C에서 30 분 간 반응시켰다. 반응액은 Suematsu¹⁴⁾ 등의 방법에 따라 532 nm에서 흡광도를 측정으로 thiobarbituric acid 반응성물질의 함량을 결정하였다.

⑤ 간의 이물질대사효소 활성측정

Cytochrome P450의 함량은 Omura와 Sato¹⁵⁾ 등의 방법을 따랐으며 간 microsome 단백질이 1.0 mg/ml의 농도가 되도록 30 mM HEPES 완충액(pH 7.4)으로 희석하여 측정하였다. Cytochrome P450은 파장 450 nm와 490 nm에서의 흡광도 차이로 환산하였으며, cytochrome P450 reductase의 활성도는 William와 Kamin¹⁶⁾ 등의 방법에 따라 550 nm에서 3 분 간 흡광도 변화를 측정하여 mM 흡광계수 21 mM⁻¹cm⁻¹를 이용하여 cytochrome c의 환원속도로 계산하였다.

⑥ 혈청 내 Nitrite + Nitrate 분석

혈청내의 NO⁻² + NO⁻³의 수준은 Gries 반응⁷⁾에 기초하여 실시하였다. 혈액을 채취한 후 바로 10 분 동안 4,000 rpm에서 원심분리를 실시하였다. 혈청을 분리하여 분석하기 전까지 -70°C에 보관하였다. 혈청과 potassium phosphate 완충액을 동량으로 하여 ultrafilter (ultrafree MC microcentrifuge device, UFC: Millipore)에 넣고 2,000 g에서 45 분 동안 원심분리하여 10 kDa 보다 큰 것은

제거하고 원심분리된 것을 분석에 사용하였다. nitrates는 분석을 위하여 양적으로 nitrites로 전환하였다. nitrate에 nitrite로 전환시키는 것은 coenzyme(NADPH, FAD)을 이용하여 하였다. incubation 단계에서 nitrate reductase의 존재하에 실시하였다. N-1-(Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, sulfanilamide와 incubation 용액을 1:1:2(v/v)로 혼합하고 이 혼합액을 5 분 동안 약한 불빛 아래의 실온에서 배양한 후 540 nm에서 측정하였다. 1.0 mM의 sodium nitrite가 nitrite 결정을 위한 표준으로 사용되었으며, 80 mM의 potassium nitrite가 nitrate의 결정을 위한 표준으로 사용되었다.

⑦ 만성적 간 손상의 지질과산화와 당원함량의 측정

지질과산화는 간균질액의 MDA를 측정하였으며 Ohkawa¹⁷⁾ 등의 thiobarbituric acid 법을 이용하여 측정하였다. 당원 측정을 위하여 anthrone 시약을 이용하여 간조직 절편을 채취하였다¹⁸⁾. 단백질 정량은 Bradford⁶⁾ 방법으로 시행하였다.

⑧ 콜라젠 측정

콜라젠 농도는 간조직의 hydroxyproline을 정량하여 측정하였다¹⁹⁾. Sodium acetate/citric acid buffer, pH 6.0, Chloramine-T solution, sodium thiosulfate, Ehrlich's reagent를 사용하였다. 신선한 간조직 100 mg을 병에 넣고 2 mL의 6NHCl을 첨가하고 봉입한 후 100 °C에서 24 시간 동안 가수분해하였다. 그 다음 24 시간 동안 50°C에서 증발시킨 후 3 mL의 sodium acetate/citric acid buffer로 재현탁하고 활성탄 0.5 g을 첨가하여 혼합한 후 5.000 g에서 10 분 동안 원심 분리하였다. hydroxyproline 산화는 1 mL의 0.05 M chloramine T를 첨가하여 개시하였다. 혼합액을 실온에서 20 분 방치한 후

2 M sodium thiosulfate와 1 N sodium hydroxide를 첨가하여 반응을 정지시켰다. hydroxyproline으로부터 나온 산화물은 샘플을 끓여서 pyrrole로 전환하였다. pyrrole을 함유한 샘플은 Ehrlich's reagent로 30 분 동안 배양한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량으로는 이미 알려진 간조직의 양을 참고로 유산 간조직을 이용하였다.

3) 통계학적 분석

실험결과는 각 군의 mean±SE로 표기하였으며, 정상군 및 대조군과 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물 투여군과의 상호비교는 ANOVA와 Student's t-test로 교차 검정하여 유의성을 P<0.05 이하의 경우 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

Ⅲ. 實驗結果

1. 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)이 AST, ALT, ALP와 지질과산화에 미치는 영향

정상군의 AST와 ALT활성은 117와 45 IU/L인데 반해 사염화탄소 단독 투여군은 1,876와 638 IU/L으로 나타내어 사염화탄소의 단독 투여군은 정상군에 비해 AST와 ALT의 활성도가 각각 17 배와 15 배로 증가되었다(Table 3). 또한 간장질환 및 담도계 질환의 지표로 사용되는 담도계 효소 ALP도 정상군이 510 IU/L인데 반해 대조군은 838 IU/L으로 1.5 배 증가되었다. 이러한 결과로 사염화탄소의 투여에 의해 간 손상이 유도되었음을 확신할 수 있었다. 반면 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물 및 사염화탄소를 모두 투여한 OBT500과 SGT500 실험군들에서 AST의 활성이 각각 697과 724 IU/L으로 대조군인 사염화탄소 단독 투여군(1,876 IU/L)에 비해 현저한 감소를 나타내었으나 정상군(117 IU/L)의

수준까지 회복되지는 못하였다. 또한 모든 실험군에서 ALT의 활성도는 각각 287, 354 IU/L으로 대조군인 사염화탄소 단독 투여군(638 IU/L)에 비해 유의한 감소를 나타내었으나 AST와 마찬가지로 정상군(45 IU/L)의 수준까지는 회복되지 못하였다.

반면 alkaline phosphatase (ALP)는 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물의 투여군들에서 각각 603, 673 IU/L의 수준으로 정상군과 유사한 수준으로 회복되었음을 알 수 있었다(Table 3). 또한 위에서 얻어진 혈청의 간 기능 지표 효소들의 결과를 뒷받침하기 위하여 간 조직의 lipid peroxidation을 측정하였다. 정상군의 MDA 함량은 0.21 nmol/mg protein을 나타낸 반면 사염화탄소의 단독 투여군은 0.49 nmol/mg protein으로 정상군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 吳茱萸附子理中湯(OBT500)과 十二味寬中湯(SGT500) 추출물을 투여한 OBT500과 SGT500 실험군은 각각 0.30, 0.32 nmol/mg protein으로 모든 실험군들이 사염화탄소를 투여한 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내면서 정상군과 유사한 수준으로 회복시킴을 관찰하였다(Table 3).

Table 3. Effects of the water extract of Osuyubujaijung-tang(OBT) and Sipyimiguanjung-tang(SGT) on AST, ALT, ALP and lipid peroxidation in carbon tetrachloride-intoxicated rats

Experimental Groups	Serum Biochemical Parameters(IU/L)			Lipid peroxidation (nmol MDA/mg protein)
	AST	ALT	ALP	
Normal	117±18	45±6	510±21	0.21±0.01
CCl ₄	1,876±48 ¹	638±29 ¹	838±31 ¹	0.49±0.05
OBT500	697±31 ^{1,2}	287±24 ^{1,2}	603±25 ²	0.30±0.03 ²
SGT500	724±30 ^{1,2}	354±20 ^{1,2}	673±34 ²	0.32±0.04 ²

The water extracts of Osuyubujaijung-tang (OBT500: OBT water extracts 500 mg/kg body weight) and Sipyimiguanjung-tang(SGT500: SGT water extracts 500 mg/kg body weight) mixed in saline were given orally for 7 day. Normal and control(CCl₄) animals were saline treatment. After 24hr administration of CCl₄, all animals were sacrificed, and liver was quickly removed and weighted. the values are expressed as mean±SE of eight rats in each group. ¹: Significantly different from the normal group(p<0.05). ²: Significantly different from the CCl₄ group(p<0.05).

2. 한약추출물이 cytochrome P450에 미치는 영향

간 독성물질인 사염화탄소는 lipid peroxidation 및 liver necrosis를 유발하며 cytochrome P450 및 그와 연관된 효소의 파괴로 효소 활성도가 현저히 감소되는데, 본 연구 결과에서도 사염화탄소의 단독투여군의 cytochrome P450과 P450 reductase는 0.56 nmole/mg protein 및 25.7 nmoles/min/mg protein으로 정상군(0.80 nmole/mg protein 및 45.4 nmoles/min/mg protein)에 비해 유의한 감소가 확인되었다. 반면 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물을 투여한 실험군들에서는 각각의 두 가지 효소 값이 0.71 nmole/mg protein 및 38.2 nmoles/min/mg protein과 0.68 nmole/mg protein 및 35.8 nmoles/min/mg protein 내외로 대조군에 비해 모두 유의한 증가를 나타내었으나 정상군의 수준으로 회복되지는 않았다 (Table 4).

Table 4. Effects of the water extract of Osuyubujayijung -tang(OBT) and Sipyimiguanjung-tang(SGT) on liver microsomal cytochrome P450 and P450 reductase in carbon tetrachloride-intoxicated rats

Experimental Groups	Enzyme Activity	
	Cytochrome P450 (nmoles/mg of protein)	P450 reductase (nmoles/min/mg of protein)
Normal	0.80±0.07	45.4±4.2
CCl ₄	0.56±0.05 ¹	25.7±3.4 ¹
OBT500	0.71±0.04 ^{1,2}	38.2±4.5 ²
SGT500	0.68±0.08	35.8±3.1 ²

The water extracts of Osuyubujayijung-tang(OBT500: OBT water extracts 500 mg/kg body weight) and Sipyimiguanjung-tang(SGT500: SGT water extracts 500 mg/kg body weight) mixed in saline were given orally for 7 days. After 24 hr administration of CCl₄, all animals were sacrificed, and liver was quickly removed and weighted. Liver microsome fractions were prepared by centrifugation according to the method of Bansal *et al.* [2]. The values are expressed as mean±SD of eight rats in each group. ¹: Significantly different from the normal group (p<0.05). ²: Significantly different from the CCl₄ group (p<0.05).

3. 한약 추출물이 NO 생성에 미치는 영향

사염화탄소와 L-arginine을 만성적으로 투여한 실험군에서 NO의 최종 산물인 NO₂⁻ + NO₃⁻의 혈청 내 수준이 3 배 가까이 증가하였으며, 사염화탄소와 L-arginine을 동시에 투여한 군에서는 더욱 증가하는 양상을

보였다(Fig. 1). NO 합성저해제인 L-NAME와 aminoguanidine(AG)을 투여한 군에서는 이러한 NO 대사산물의 혈청 내 증가가 억제되었다. 또한 L-NAME와 aminoguanidine(AG)의 투여는 NO₂⁻ + NO₃⁻의 혈청 내 정상적인 농도를 감소시켰다(Fig. 1). 또한 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)만을 투여한 OBT500군과 SGT500군에서는 NO 생성을 약간 상승시켰으나 유의성있는 결과를 보이지 않았으며, 사염화탄소와 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)을 함께 투여한 CCl₄ + OBT500 군과 CCl₄ + SGT500 군에서도 사염화탄소로 인한 NO 생성의 증가에 큰 영향을 보이지 않았다(Fig. 1).

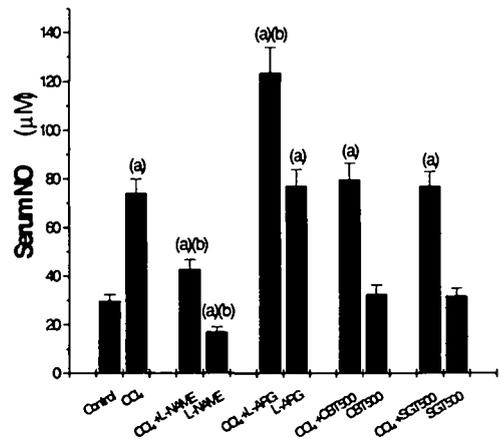


Fig. 1. NO end products expressed as NO₂⁻ + NO₃⁻ concentration in serum from rats treated chronically with CCl₄ and with L-NAME, OBT500, SGT500 and L-NAME, L-arginine (L-ARG) or OBT500, SGT500 alone or in combination with CCl₄. Each bar represents the mean ± SEM; all determinations were performed in duplicate assays with samples obtained from ten different

animals. Key: (a) significantly different from the control, $p < 0.05$; and (b) significantly different from the CCl_4 -treated group, $p < 0.05$.

4. 한약추출물과 NO 생성 억제제가 지질과산화 및 collagen 생성에 미치는 영향

사염화탄소를 만성적으로 투여하면 지질과산화의 정도가 2 배정도 증가하는 결과를 보였으며, NO 생성 억제제인 L-NAME을 동시에 투여하면 이러한 경향을 더욱 강화시켰다. L-arginine, L-NAME 만을 투여한 군에서는 지질과산화가 증가하지 않는 것을 확인하였다. 사염화탄소와 L-arginine을 함께 투여한 군에서도 L-arginine이 지질과산화에 특별한 효과를 보이지는 않았다(Fig. 2). 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)을 투여한 OBT500군과 SGT500군에서는 사염화탄소로 증가한 지질과산화를 억제하는 결과를 보였다(Fig. 2).

사염화탄소의 만성적 투여로 간의 콜라겐 양은 2 배 정도 증가하는 결과를 보였으며, L-NAME을 동시에 투여하여도 유의성있는 콜라겐의 증가를 나타내지는 않았다. 그러나 L-arginine은 사염화탄소로 유발된 섬유화과정을 부분적으로 억제하는 효과를 보였지만 유의성을 확인할 수는 없었다. 반면에 L-arginine 만을 투여한 군에서는 간의 콜라겐 양이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3). 또한 사염화탄소와 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)을 함께 투여한 CCl_4 +OBT500군과 CCl_4 +SGT500 군에서는 사염화탄소로 유발된 콜라겐 생성의 증가를 억제하는 결과를 보였으며, 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 만을 투여한 OBT500군과 SGT500군에서는 콜라겐 생성의 증가에 영향을 미치지 않았다(Fig. 3).

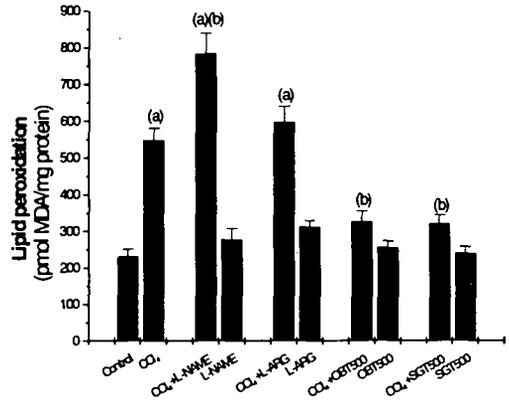


Fig. 2. Effect of L-NAME, AG, L-arginine (L-ARG) or OBT500, SGT500 on CCl_4 -induced MDA formation in liver homogenates. Each bar represents the mean \pm SEM; all determinations were performed in duplicate assays with samples obtained from ten different animals. Key: (a) significantly different from the control, $p < 0.05$; and (b) significantly different from the CCl_4 -treated group, $p < 0.05$.

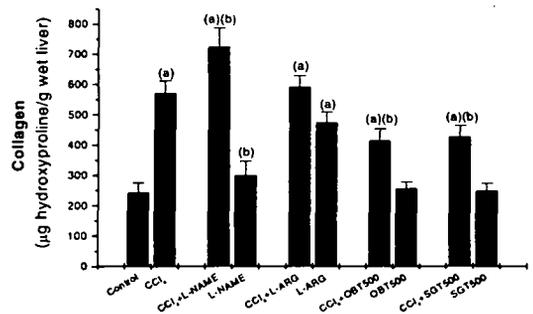


Fig. 3. Collagen content determined in livers from rats intoxicated with CCl_4 and treated with L-NAME, L-arginine (L-ARG) or OBT500, SGT500. Each bar represents the mean \pm SEM; all determinations were

performed in duplicate assays with samples obtained from ten different animals. Key: (a) significantly different from the control, $p < 0.05$; and (b), significantly different from the CCl_4 -treated group, $p < 0.05$.

5. 한약추출물과 NO 생성 억제제가 당원 및 빌리루빈 생성에 미치는 영향

사염화탄소의 투여로 당원의 함량은 정상수준의 30 % 정도로 감소하였으며, 사염화탄소와 L-NAME을 동시에 투여하면 15 % 수준까지 감소하였다. 반면에 L-arginine, L-NAME 만을 투여한 군에서는 별다른 변화를 보이지 않았으며, 사염화탄소와 L-arginine을 동시에 투여한 군에서는 당원의 감소가 억제되는 효과를 보였다(Fig. 4). 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)과 사염화탄소를 함께 투여한 $CCl_4 + OBT500$ 군과 $CCl_4 + SGT500$ 군에서는 당원의 감소가 억제되었으며, 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)(JYH500) 만을 투여한 군에서는 사염화탄소로 감소한 당원을 증가하는 결과를 보였다(Fig. 4).

사염화탄소의 투여로 빌리루빈의 양은 6 배 정도 증가하였으며 L-NAME을 동시에 투여한 군에서는 별다른 변화를 보이지 않았다. L-arginine과 L-NAME 만을 투여한 군에서는 정상 수준과 차이가 없었으며, L-arginine의 투여는 사염화탄소로 유발된 빌리루빈의 증가를 약간 억제하는 효과를 보였다(Fig. 5). 또한 사염화탄소와 함께 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)을 투여한 $CCl_4 + OBT500$ 군과 $CCl_4 + SGT500$ 군에서는 빌리루빈의 생성이 억제되는 양상을 보였고, 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 만을 투여한 군에서는 별다른 영향을 미치지 않았다(Fig. 5).

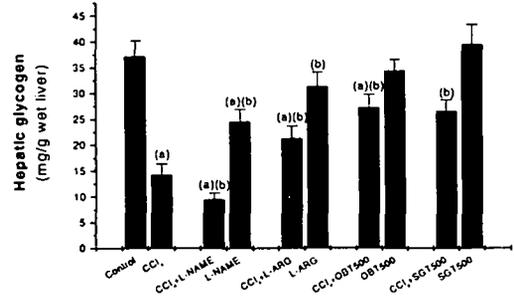


Fig. 4. Glycogen content determined in livers from rats intoxicated with CCl_4 and treated with L-NAME, L-arginine(L-ARG) or OBT500, SGT500. Each bar represents the mean \pm SEM; all determinations were performed in duplicate assays with samples obtained from ten different animals. Key: (a) significantly different from the control, $p < 0.05$; and (b) significantly different from the CCl_4 -treated group, $p < 0.05$.

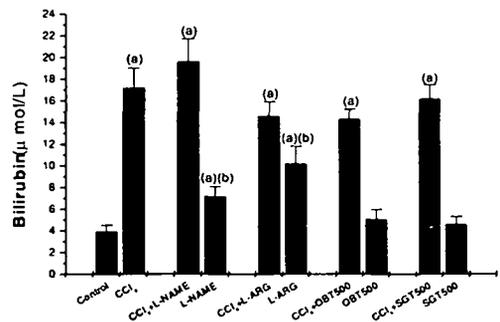


Fig. 5. Concentration of bilirubins determined in serum from rats intoxicated With CCl_4 and treated with L-NAME, L-arginine (L-ARG) or OBT500, SGT500. Each bar represents the mean \pm SEM; all determinations were performed in duplicate assays with samples obtained from ten different animals. Key: (a) significantly different from the control, $p < 0.05$; and (b) significantly different from the CCl_4 -treated group, $p < 0.05$.

6. 한약추출물과 NO 생성억제제가 혈청효소활성에 미치는 영향

ALT, ALP와 γ -GTP등의 혈청 내 효소 활성은 사염화탄소의 투여로 2 배 정도 증가하였고, L-NAME을 동시에 투여한 군에서는 더욱 상승하는 효과를 보였다(Table 5). 반면에 L-arginine과 L-NAME 만을 투여한 군에서는 별다른 변화를 나타내지 않았으며, 사염화탄소의 투여로 증가된 효소활성의 증가가 L-arginine의 투여로 억제되지는 않았다(Table 5). 吳茱萸附子理中湯(OBT500)과 十二味寬中湯(SGT500)의 투여는 사염화탄소로 유발된 혈청효소활성의 증가를 억제하였으며, 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 만의 투여는 효소활성에 영향을 미치지 않았다(Table 5).

Table 5. Effects of the water extract of Osuyubujayijung-tang(OBT) and Sipyimiguanjung-tang(SGT) on enzyme activities of alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, and γ -glutamyl transpeptidase determined serum from the liver chronically damaged rats induced by the chronic administration of carbon tetrachloride

Experimental Groups	Serum Biochemical Parameters(1N/L)		
	Alanine aminotransferase ($\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}$)	Alkaline Phosphatase ($\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}$)	γ -Glutamyl transpeptidase ($\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}$)
Control	42.8±3.0	122.5±8.1	9.6±1.3
CCl ₄	74.3±5.8 ¹	245.7±15.1 ¹	15.7±1.6 ¹
CCl ₄ + L-NAME	87.4±6.3 ¹	295.4±21.9 ¹	19.8±1.5 ¹
L-NAME	56.4±3.7 ¹	136.8±12.8	11.4±2.0
CCl ₄ + L-ARG	70.7±6.2 ¹	177.5±14.9 ^{1,2}	16.1±1.7 ¹
L-ARG	48.5±4.6	130.7±8.9	9.9±1.0
CCl ₄ + OBT500	50.4±4.3 ²	147.9±11.5 ²	11.7±1.4 ²
OBT500	45.3±4.7	126.7±10.7	10.1±1.5
CCl ₄ + SGT500	49.6±6.1 ²	141.9±9.8 ²	11.9±1.9 ²
SGT500	44.8±4.0	126.6±9.5	10.3±1.2 ²

The water extracts of Osuyubujayijung-tang(OBT500: OBT water extracts 500 mg/kg body weight) and Sipyimiguanjung-tang(SGT500: SGT water extracts 500 mg/kg body weight) mixed in saline were given orally for 8 weeks. The enzyme activities determined in serum from rats intoxicated with CCl₄. The values are expressed as mean±SD of eight rats in each group. ¹: Significantly different from the normal group (p<0.05). ²: Significantly different from the CCl₄ group (p<0.05).

IV. 考 察

東醫壽世保元の 병증론은 기존 病症觀을 사상체질병증관으로 재조명하였는데 소음인 병증은 크게 腎受熱表熱病과 胃受寒裏寒病으로 대별된다²⁰⁾. 소음인 胃受寒裏寒病은 소음인이 脾小한 특징을 지니므로 항상 脾陽이 부족하여 생긴 陰實之氣의 輕重에 의해 太陰證과 少陰證으로 구별된다. 鬱滯된 陰實之氣를 내려주는 것을 근본으로 하여 태음증은 溫氣가 寒氣를 밀어내는 것으로 溫氣를 도와주면서 裏陰을 내려주는 溫胃絳陰法이고 少陰證은 심부에 영향이 미친 상태이므로 脾氣를 도와주면서 降陰시키는 健脾絳陰法이다. 裏病證 太陰證을 치료하는 十二味寬中湯은 白何首烏, 赤何首烏, 良薑, 乾薑, 陳皮, 青皮, 香附子, 益智仁, 厚朴, 枳實, 木香, 大腹皮로 구성되는 소음인의 順氣理氣之劑이며 四肢倦怠, 小便不快, 陽道不興에 사용되는 처방이다. 裏病證 少陰證을 치료하는 吳茱萸附子理中湯은 人蔘, 白朮, 乾薑, 官桂, 白芍藥, 陳皮, 甘草, 吳茱萸, 小茴香, 破古紙, 附子로 구성된 처방이다 2-5)

상기의 주치증들이 간장질환의 증상들과 비슷한 면이 많고 근래 들어 한약이 간에 미치는 영향에 대한 연구가 많이 진행되고 있어 소음인에게 다용되는 吳茱萸附子理中湯(OBT)

과 十二味寬中湯(SGT)이 간 기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 사염화탄소로 급성 간 독성을 유발한 흰쥐를 사용하여 실험하였다. 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 물 추출물을 7 일 동안 흰쥐에 경구 투여하였으며 간 독성물질로 잘 알려진 사염화탄소를 1 회 복강 투여함으로써 급성 간 손상을 유도하여 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 물 추출물이 손상된 간의 기능 회복에 미치는 영향을 조사하였다.

생체내에서 간은 영양물질들의 물질대사를 담당하는 동시에 해독작용을 수행하는 중요한 장기이다. 간 기능과 관련된 transaminase 들은 아미노기 전이 반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 체내에 널리 존재하는 효소이다. Aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)는 모든 장기에 존재하나 AST의 경우 간, 심장, 골격근에 많이 존재하는 반면 ALT는 간세포에 특이적으로 높게 존재하는 것이 특징이다. 혈청 AST와 ALT 활성은 간세포의 변성이나 괴사를 반영하는 효소로서 간 조직 손상시 다량 혈중으로 유출된다²¹⁾. 간 기능이 손상되면 혈액내 총 단백질 또는 albumin 수치가 감소하고 AST, ALT 및 ALP가 상승되며, bilirubin 및 γ -GTP 활성 등이 증가하는 것으로 알려져 있다^{22,23)}. 본 실험에서 사용한 사염화탄소는 간 독성 유발물질로 잘 알려진 화학물질로써 free radical 생성에 의해 간 손상이 유발되는 것으로²⁴⁾ 간 질환 연구에 많이 이용되고 있다. 정상군의 AST와 ALT활성은 117와 45 IU/L인데 반해 사염화탄소 단독 투여군은 1,876와 638 IU/L으로 나타나 사염화탄소의 단독 투여군은 정상군에 비해 AST와 ALT의 활성도가 각각 17 배와 15 배로 증가되었다(Table 3). 이러한 결과는 간 기능의 지표로 사용되는 AST와 ALT의 값이 독성물질에 노출되었을 때 증가하는 경향과 매우 잘 일치하고 있다^{19,25)}. 또한 간 장질환 및 담도계 질환의 지표로 사용되는 담

도계 효소 ALP도 정상군이 510 IU/L인데 반해 대조군은 838 IU/L으로 약 1.5 배 정도 증가되었다. 이러한 결과는 사염화탄소의 투여시 일반적으로 혈청내 효소들(AST, ALT, ALP 등)의 활성도가 급격히 증가된다는 보고^{26,27)}와 일치하여 사염화탄소의 투여에 의해 간 손상이 유도되었음을 확신할 수 있었다(Table 3). 반면 사염화탄소와 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)을 함께 투여한 $CCl_4 + OBT500$ 군과 $CCl_4 + SGT500$ 군에서는 AST의 활성이 대조군인 사염화탄소 단독 투여군에 비해 현저한 감소를 나타내었으나 정상군의 수준까지 회복되지는 못하였다. 또한 모든 실험군에서 ALT의 활성도는 대조군인 사염화탄소 단독 투여군에 비해 유의적인 감소를 나타내었으나 AST와 마찬가지로 정상군의 수준까지는 회복되지 못하였다. 반면 alkaline phosphatase (ALP)는 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물의 투여군들에서 정상군과 유사한 수준으로 회복되었음을 알 수 있었다(Table 3). 본 실험결과는 간 기능 향상효과가 있는 것으로 알려진 *Fructus schisandrae*¹⁷⁾, *Swertia chirata*²⁷⁾ 그리고 *Teucrium stocksianum*²⁸⁾의 투여로 인해 증가된 이들 효소의 활성이 유의하게 감소된다고 보고한 결과와 일치함을 보여준다. 이상의 결과들에서 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물이 사염화탄소 투여에 의해 증가된 혈청의 간기능 지표들(AST, ALT, ALP)의 활성을 현저히 감소시키는 결과를 볼 때 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물은 사염화탄소에 의해 유도된 간세포 손상을 어느 정도 회복시키는 효과가 있음을 시사해준다.

간 독성 물질인 사염화탄소는 독성 중간대사산물인 trichloromethyl (CCl_3), trichloromethylperoxy (CCl_3O_2), 혹은 chlorine (Cl)과 같은 free radical을 형성하여 lipid peroxidation을 증가시킬 뿐만 아니라, cytochrome P450의 파괴로 인하여 liver microsomal cytochrome

P450과 연관된 효소들이 급격히 감소되며 결국에는 liver necrosis를 유발한다²⁹⁻³⁰⁾. 따라서 위에서 얻어진 혈청의 간 기능 지표 효소들의 결과를 뒷받침하기 위하여 간 조직의 lipid peroxidation 및 이물질대사효소들의 활성을 측정하였다. 간 조직의 지질과산화 지표로 이용되는 thiobarbituric acid (TBA) 반응성 물질의 함량은 NADPH와 ADP-Fe²⁺를 첨가하여 지질과산화 반응을 유도한 후 malondialdehyde (MDA) 생성량을 측정하였다. 사염화탄소의 단독 투여군은 MDA 함량이 정상군에 비해 유의한 증가를 나타내었다. 이는 사염화탄소가 체내에서 free radical을 형성하도록 유도하고 그로 인해 세포막의 불포화지방산을 산화시킴으로써 막 기능을 파괴하게 된다³¹⁾. 즉 사염화탄소 투여군의 간 microsome에서 지질과산화 생성물이 증가되었다는 것을 암시해 준다. 반면 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물을 투여한 CCl₄ + OBT500군과 CCl₄ + SGT500 군에서는 사염화탄소 만을 투여한 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내면서 정상군과 유사한 수준으로 회복시킴을 관찰하였다(Fig. 1). 사염화탄소는 지질과산화의 지표인 MDA 수준을 증가시키며 반면 간 기능 회복효과가 있는 *Schisandra chinensis*의 추출물¹⁷⁾이나 α -tocopherol³²⁾을 처리한 경우 증가된 MDA 수준을 감소시키는 것을 보여주었으며, 이는 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 사염화탄소로 유도되는 MDA 수준을 감소시키는 본 실험결과와 일치함을 보여주었다. 본 연구에서 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물을 투여한 경우 지질과산화물 생성을 억제하는 것은 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 약재 조성물(Table 1,2) 중 항산화 활성이 높은 인삼³³⁾ 및 백작약³⁴⁾ 등이 포함되어 있으므로 이들의 항산화 작용으로 간 조직의 산화적 손상이 방지되는 것으로 사료된다.

간 독성물질인 사염화탄소는 lipid peroxidation

및 liver necrosis를 유발하며 cytochrome P450 및 그와 연관된 효소의 파괴로 효소 활성도가 현저히 감소되는데, 본 연구 결과에서도 사염화탄소의 단독투여군의 cytochrome P450과 P450 reductase는 정상군에 비해 유의한 감소가 확인되었다. 반면 사염화탄소와 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)을 함께 투여한 CCl₄ + OBT500 군과 CCl₄ + SGT500 군에서는 두 가지 효소 값이 대조군에 비해 모두 유의한 증가를 나타내었으나 정상군의 수준으로 회복되지는 않았다(Table 4). 이외에도 수컷 wistar rat에서 CCl₄를 투여한 경우 cytochrome P450 및 b₅가 모두 감소되었으나 eugenol을 처리한 경우 이들 phase I component의 감소를 유의하게 억제하였고 CCl₄에 의해 유도된 microsomal lipid에 대한 손상 및 TBARS의 축적에 의한 peroxidative damage에 대해 보호효과를 나타낸 연구결과가 있다¹⁸⁾. 또한 송악(*Hedera rhombea*) 추출물의 투여시 사염화탄소의 독성으로 감소되었던 cytochrome P450의 7-ethoxyresorufin-O-deethylation (EROD) 및 7-benzyloxyresorufin-O-dealkylation (BROD) 활성이 회복됨을 보고한 바 있다³⁵⁾. 이러한 연구결과와 마찬가지로 본 실험에서도 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물의 투여는 해독작용에 관여하는 이물질대사효소의 활성을 증가시켜 간 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 사염화탄소의 투여로 급성으로 유발한 간손상에 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 물 추출물은 항산화 효과가 탁월하므로 이물질대사효소(cytochrome P450 및 P450 reductase)의 수준을 정상적인 수준으로 회복시키는 동시에 free radical의 소거작용으로 지질과산화물 생성을 억제하여 간 보호효과를 나타내는 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서 사용된 투여농도들 중에 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 물 추출물 500

mg/kg 투여한 경우 간기능 지표효소들의 회복이 좋게 나타났으므로, 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 물 추출물은 500 mg/kg의 농도가 사염화탄소로 유발된 급성 간손상의 회복에 가장 좋은 것으로 판단된다.

반응성 산소중간대사산물은 간손상을 유발시키는 중요한 요인이다³⁶⁾. 반응성 산소중간대사산물은 짝을 이루지 못하는 전자를 가지는 물질로서 프리라디칼로 작용한다. 즉 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등이다. 이러한 물질은 세포막과 DNA의 손상 및 지질과산화반응으로 인하여 간세포의 손상과 죽음을 유발하는 작용과 관련이 있다^{37,39)}. NO는 항산화제로서 역할을 하며, superoxide anion 및 다른 라디칼과 반응하여 독성이 적은 물질을 전환한다는 보고가 있다^{40,41)}. 사염화탄소의 간손상은 탄소와 염소 결합의 단절과 세포막의 지질의 과산화성 분해로 유발되는 것으로 인식된다. 사염화탄소로 유발한 간경화의 모델은 인간의 여러 가지 원인으로 인한 간경화와 유사한 특성을 지니므로 인간의 간경화 질환에 적절한 간경화모델로 여겨진다⁴²⁾. 따라서 본 연구에서는 NO 합성 억제와 전구물질을 사용하여 NO 생성조절이 사염화탄소로 유발된 간경화모델에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하였으며, 앞의 급성 간손상 모델에서 예상되는 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 항산화효과등이 이러한 모델에 미치는 만성적인 간손상에 보호효과를 보이는지를 관찰하고 NO와 관련된 기전을 이해하고자 하는 것이다.

실험결과들은 NO가 만성적인 사염화탄소로 유발된 간독성을 억제하는 효과를 보였다. 즉 NO가 superoxide anion 및 다른 프리라디칼과 반응하여 독성이 낮은 다른 라디칼로 전환시킨다는 보고와 일치하는 결과라고 볼 수 있다^{40,41)}. 사염화탄소의 간독성의 결과로 신속하고 광범위한 세포막지질의 과산화가

나타나며, 이러한 사실은 이미 광범위하게 입증되었다⁴³⁾. 따라서 본 연구의 결과에서도 사염화탄소는 지질과산화를 증가시켰고, NO 합성억제제인 L-NAME은 이러한 경향을 강화시킨 것으로 보인다. 산화적 스트레스로부터 조직과 세포의 손상 및 염증을 방어하는 작용은 조직과 세포에 분포하는 metallothionein의 라디칼 청소작용에 부분적으로 기인한다는 것이 일반적인 학설이다⁴⁴⁾. 이 metallothionein이 NO의 생성에 중요한 역할을 한다고 알려졌다⁴⁵⁾. 사염화탄소와 LPS의 단회 투여로 간손상과 NO의 과다생성이 유도된다는 보고가 되었다⁴⁶⁾. 이러한 보고는 NO의 독성효과를 나타내는 것이지만, N-monomethylarginine으로 유도한 NO의 합성억제는 같은 모델에서 간손상을 증가시켰다⁴⁶⁾. 이러한 결과는 NO가 간보호물질로 작용한다는 것을 시사하는 것이며³⁶⁾, CCl₃로 유도된 산화적 스트레스와 지질과산화 및 간손상과 관련된 것으로 알려진 TNF- α 에 의하여 간손상이 진행되는 것으로 보여진다⁴⁷⁾. 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 물 추출물 500 mg/kg를 투여한 실험군에서는 사염화탄소로 인한 NO생성의 증가를 감소시키지 않았으며, 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 물 추출물 500 mg/kg 만을 투여한 실험군에서도 NO생성에 별다른 영향을 미치지 않았다(Fig. 1). 이러한 결과는 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 항산화효과가 NO생성과는 직접적인 관련은 적은 것으로 생각된다.

ALP는 간세포의 원형질막의 ectoenzyme이다. 혈청 내의 ALP 증가는 간세포막의 손상을 알려주는 지표인 것이다⁴⁸⁾. γ -GTP는 간세포 원형질막에 함유된 효소이며, 이 효소의 혈청 내 분비 역시 간세포 손상의 지표가 되는 것이다^{49,50)}. ALT는 간세포의 세포질 효소이다. 혈청 내 이 효소의 증가는 간세포의 원형질막의 투과성이 증가된다는 것을 의미하므로 세포의 사망과 관련이 있는 것이다⁵⁰⁾. 이

러한 효소들의 혈청 내 활성의 증가가 사염화탄소의 만성적인 투여로 유도되고, NO 합성 억제제인 L-NAME을 동시에 투여하면 이러한 경향이 증가하는 것은 NO의 간세포보호 기능을 간접적으로 나타내는 것이다. NO 합성의 유도는 간 재관류모델에서 재관류 손상을 최소화하며^{51,52)}, NO 생성의 억제는 dimethyl-nitrosamine으로 유도된 간손상을 증가시킨다는 보고도 있다⁵³⁾. 본 연구에서 나타내는 결과는 이러한 보고들과 틀리지 않으며, NO의 간세포 보호작용을 나타내는 결과를 보여준 것이다. 그러나 만성적인 간손상 모델에서 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 물 추출물의 투여로 이러한 간기능 지표인 혈청 내 효소활성이 억제되지만 NO 관련성을 정확하게 설명할 수는 없다 (Fig. 2, Table 5).

당원은 간 에너지의 주요 원천이다. 당원을 원천으로 에너지가 필요한 간기능을 수행한다. 사염화탄소로 유발된 만성 간손상은 간세포막 변화를 유도하는데 콜레스테롤 함량과 콜레스테롤/인지질 및 cAMP 함량을 증가시켜서 간세포막을 변화시킨다³⁹⁾. cAMP가 증가하면 당원 함량이 떨어지게 되게 된다. 한편 NO는 간의 탄수화물대사를 변화시킨다⁵⁴⁾. 또한 guanyl cyclase를 활성화시키며, 차례로 cGMP는 cGMP 자극에 의한 cAMP phosphodiesterase에 의해서 cAMP가 가수분해되는 것을 자극하며, 이것은 당원파괴를 방지한다. 본 연구에서는 NO 합성억제는 당원고갈을 촉진시키고 L-arginine은 당원고갈을 억제하는 효과를 보였다. 또한 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 물 추출물 500 mg/kg 투여는 당원고갈을 억제하는 효과를 보였다(Fig. 4). 간섬유화는 만성 간질환의 중요한 현상이다. 정상적인 간 실질이 결합조직으로 대체되고 간의 정상적 구조를 파괴하며 기능을 손상시킨다. 간섬유화의 중요한 결과는 간동양 주위의 결합조직의 침착과 혈관확산 장벽의 파괴 및 동양혈관의 혈

류가 협착되는 결과를 초래한다. 결과적으로 문맥고혈과 내재성 외인성 대사산물의 처리가 되지 않아 간기능 부전에 빠지게 된다. 콜라젠은 섬유성 조직의 주요 요소이므로 콜라겐량을 측정하여 사염화탄소로 유발된 간섬유화에 미치는 NO의 효과를 관찰하였다. L-arginine은 부분적으로 사염화탄소독성에 의한 간 섬유화의 증가를 억제하는 효과를 보였다. 또한 L-arginine만을 투여한 군에서는 콜라겐 양이 증가하였다. 이러한 결과는 NO의 분비 증가는 mesangial 세포와 배양한 혈관근육세포에서 콜라젠을 증가시키며^{55,56)}, L-arginine의 투여는 TGF- β 의 발현을 증가시키고 이것은 세포의 기질 침착을 유발하고 섬유화를 증가시킨다는 보고와 일치한다⁵⁷⁾. 이러한 기전에 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 물 추출물 500 mg/kg의 투여는 콜라겐의 생성 억제 효과를 보이므로, 이러한 기전을 통하여 이루어지는 것으로 추측할 수는 있지만, 직접적인 효과 기전에 대해서는 추가적인 연구가 있어야 할 것이다(Fig. 3).

결론적으로 사염화탄소 투여로 혈청 내의 $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ 농도를 증가시키고 L-arginine은 유사한 결과를 보였다. 이 두가지 화합물을 동시에 처리하였을 때는 더욱 증가하는 양상을 보였다. 이것은 L-arginine이 섬유화를 억제하는 효과를 반영하며 이것은 일반적인 간기능과 관련이 있으며, 특히 빌리루빈과 탄수화물대사와 관련이 있다. 한편 L-arginine 투여는 막 지질과산화물을 억제하지는 못하였고 혈청내로 효소의 분비를 억제하지는 못하였다. 그러나 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 물 추출물의 만성적 간손상에 대한 보호효과는 NO 생성과 간접적으로 관련할 것으로 추측되지만 만성적 간손상의 효과를 분명하게 나타내므로 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 간기능 보호작용에 대한 연구는 NO 생성 외에 다른 보호 기전에 대한 연구를 할 필요가 있을 것이다. L-arginine의 투여로 유도된 NO 생

성 증가는 지질 프리라디칼을 청소하기에 충분하지 못하였으며, 이것은 NO가 매우 짧은 활동기를 가진 친수성 화합물이기 때문 일 것으로 생각된다. 이 경우에 지질과산화에 의하여 발생하는 원형질막 손상은 막성 효소인 ALP와 γ -GTP 및 세포질 효소인 ALT를 혈청 내로 방출하는 것이다. 간략하게 요약하면 본 연구 결과는 내인성 NO는 만성적인 사염화탄소의 투여로 유발되는 간세포 손상을 억제하는 역할을 하며, 이것은 프리라디칼독성을 감소시키며 간의 탄수화물대사를 조절하고 콜라겐 생성을 억제하는 기능을 통하여 이루어지게 된다는 것이다. 또한 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 투여는 이러한 기전에 간접적으로 역할을 할 것으로 생각된다.

이상의 실험결과로 少陰人 裏病證에 사용되는 十二味寬中湯, 吳茱萸附子理中湯이 독소에 의한 간손상을 억제하는 효과가 높은 것으로 나타났다. 추후 각각의 약물에 대한 기전의 구명 및 성분에 대한 연구가 별도로 필요하며, 이에 따른 유효성분에 대한 실험도 진행하여 기전을 구명해야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

1. 사염화탄소의 투여는 간 손상을 유발시켰으며, 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물을 전 처리한 흰쥐에서는 사염화탄소 단독 투여군인 대조군에 비해 AST, ALT, ALP의 유의한 감소양상이 관찰되었다.

2. 사염화탄소의 투여로 microsome의 지질과산화가 유도되었으며 이물질대사효소(cytochrome P450 및 P450 reductase)의 유의한 감소를 확인되었다. 吳茱萸附子理中湯(OBT)과

十二味寬中湯(SGT) 추출물의 경구투여는 간의 지질과산화 지표인 microsome의 TBARS 생성을 억제하였으며 cytochrome P450 및 P450 reductase 활성도가 대조군에 비해 유의한 증가로 정상수준으로 회복을 하였다.

3. 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)는 혈청 내의 $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ 의 수치를 상승시켰다. 그러나 NO 합성 억제제인 L-NAME은 이러한 상승효과를 억제하였다.

4. 사염화탄소를 투여한 대조군의 간 조직에서 지질과산화와 콜라겐 농도가 증가하였으며, L-NAME 투여군은 이러한 효과를 증시시켰다. 그러나 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)을 투여한 군에서는 지질과산화와 콜라겐의 생성이 억제되는 결과를 보였다.

5. 사염화 탄소 투여 후 ALT, ALP, γ -GTP등의 혈청 내 효소 활성 및 빌리루빈 양은 2 배 내지 5 배 정도 증가하였으며, L-NAME 투여군에서는 이러한 효소 활성의 경향을 더욱 강화시켰다.

이상의 실험 결과를 살펴보면 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)은 혈청 내 효소 활성을 억제하였으며, 이러한 결과는 NO가 산화적 간 손상을 보호하는 효과를 보여 주었으며, 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT) 추출물의 투여는 사염화탄소의 투여에 따른 생화학적 지표들의 변화를 억제하는데, 이러한 실험결과에서 吳茱萸附子理中湯(OBT)과 十二味寬中湯(SGT)의 추출물은 사염화탄소로 유도한 간 독성에 대하여 해독작용 및 간 보호효과가 있는 것으로 판단된다.

參 考 文 獻

1. 한상모 외 10인 : 동의학개론. 서울, 여강출판사, pp.84-86.
2. 원지상 : 동의사상신편, 서울, 문우사, 1974 p.70.
3. 전국한의과대학사상의학교실 : 사상의학, 서울, 집문당, 1992, p531, 530.
4. 박석언 : 동의사상대전, 서울, 의도한국사, 1975, p203.
5. 홍순용 · 이을호 : 사상의학원론, 서울, 행림출판사, 1994, 233.
6. Ozawa, N. and E.P. Guengerich. 1983. Evidence for the formation of an S-(2-N7-guanyl-ethyl) glutathione adduct in glutathione-mediated binding of the carcinogen 1,2-dibromoethanol to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 7124-7128.
7. Closa, D., M. Torres, G. Hotter, G. Bioque, O.S. Leon, E. Gelpi, J. Rosello-Catafau. 1997. Prostanoids and free radicals in CCl₄-induced hepatotoxicity in rats: effect of astilbin. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **56**, 331-334.
8. Saraswat, B., P.K. Visen, G.K. Patnaik and B.N. Dhawan. 1997. Protective effect of picroliv, active constituent of *Picrorhiza kurroa*, against oxytetracycline induced hepatic damage. *Indian J. Exp. Biol.* **35**, 1302-1305.
9. Lee, J-W., H. Jeong, M-D. Han, S-J. Baek, Y-S. Kim and S-M. Kang. 1996. Effect of G009 on CCl₄-induced hepatic injury and lipid peroxidation in rats. *Korean. J. Pharmacogn.* **27**, 159-166.
10. Lee, J-S., N-Y. Kim, K-H Lee, G-S. Kim, H-J Park, J-W Choi and S-H. Kim. 2000. Effects of flower of *Pueraria lobata* on lipid peroxidation and activities of alcohol metabolic enzymes in alcohol-treated rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 935-942.
11. Kim, S.Y., H.P. Kim, M.K. Lee, S.H. Kim, H.M. Han, A. Moon, H. Huh and Y.C. Kim. 1993. Effects of betaine on the CCl₄-induced toxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Yakhak Hoeji* **37**, 499-503.
12. Bansal, S.K., J. Love and H.L. Gurtoo. 1983. High pressure liquid chromatographic separation of multiple forms of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 268-274.
13. Lowry, O.H., H.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
14. Suematsu, T., T. Kamada, H. Abe, S. Kikuchi and K. Yagi. 1977. Serum lipoperoxide levels in patients suppering from liver disease. *Clin. Chim. Acta.* **79**, 267-770.
15. Omura, T. and R. Sato. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378.
16. William, C.H.Jr. and M. Kamin. 1962. Microsomal NADPH cytochrome c reductase of liver. *J. Biol. Chem.* **237**, 578-595.
17. Ko, K.M., S.P. IP, M.K.T. Poon, S.S. Wu, C.T. Che, K.H. Ng and Y.C. Kong. 1995. Effect of a lignan-enriched fructus *Schisandrae* extract on hepatic glutathione status in rats: Protection

against carbon tetrachloride toxicity. *Planta Med.* **61**, 134-137.

18. Kumaravelu, P., D.P. Dakshinamoorthy, S. Subramaniam, H. Devaraj and N.S. Devaraj. 1995. Effect of eugenol on drug-metabolizing enzymes of carbon tetrachloride-intoxicated rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 1703-1707.

19. Masevich, T.G. and L.G., 2000. Chronic hepatitis: indicators of disease activity. *Ter. Arkh.* **72**, 17-18.

20. 김정희 · 송정모 : 소음인 병증 및 처방에 나타난 계지탕의 변용에 대한 고찰, 사상의학 회지, 11(1), 1999.

21. Takeda, Y., A. Ichihara, H. Tanioka and H. Inove. 1964. The biochemistry of animal cells, the effect of corticosteroids on leakage of enzyme from dispersed rat liver cell. *J. Biol. Chem.* **239**, 3590-3596.

22. Dinman, B.D., E.A. Hamdin, C.F. Fox, W.J. Frajola. 1963. CCl₄ toxicity. III. Hepatostructural and enzyme change. *Arch. Environ. Health* **7**, 630-646.

23. Zinkle, J.G., J.G. Vos, J.A. Moore and B.N. Gupta. 1973. Hematologic and clinical chemistry effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals. *Environ. Health Perspectives* **9**, 111-118.

24. Horvath, T., E. Karge, T. Javor and W. Klinger. 1987. Effects allopurinol, (+)-cyanidanol-3 and dihydroquinoline- type antioxidants on rat hepatic microsomal cytochrome P-450 and monooxygenases. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **25**, 201-203.

25. Cohen, J.A. and M.M. Kaplan. 1979. The SGOT/SGPT ratio-an indicator

of alcoholic liver disease. *Dig. Dis. Sci.* **24**, 835-838.

26. Berman, E., D.E. House, J.W. Allis and J.E. Simmons. 1992. Hepatotoxic interactions of ethanol with allyl alcohol or carbon tetrachloride in rats. *J. Toxicol. Environ. Health* **37**, 161-176.

27. Mukherjee, S., A. Sur and B.R. Maiti. 1997. Hepatoprotective effect of *Swertia chirata* on rat. *Indian J. Exp. Biol.* **35**, 384-388.

28. Rasheed, R.A., B.H. Ali and A.K. Bashir. 1995. Effect of *Teucrium stocksianum* on paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Gen. Pharmacol.* **26**, 297-301.

29. Castro, J.A., H.A. Sasame, H. Sussman and J.R. Gillette. 1968. Diverse effects of SKF 525-A and antioxidants on carbon tetrachloride-induced changes in liver microsomal P-450 content and ethylmorphine metabolism. *Life Sci.* **7**, 129-136.

30. Recknagel, R.O. and E.A. Giende. (1973). Carbon tetrachloride hepatotoxicity: A example of lethal cleavage. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **2**, 263-297.

31. Recknagel, R.O. 1967. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **19**, 145-208.

32. Padron, A.G., E.G.D. De Toranzo and J.A. Castro. 1996. Depression of liver microsomal glucose 6-phosphatase activity in carbon tetrachloride- poisoned rats. Potential aynergistic effects of lipid peroxidation and of covalent binding of haloalkane-derived free radicals to cellular components in the process. *J. Free Rad. Biol. Med.* **21**, 81-87.

33. Paik, T.H., J.T. Hong and S.Y.

Hong. 1982. Studies on the antioxygenic substances in *Panax ginseng* roots. *Korean J. Food Sci. Technol.* 14, 130-135.

34. Lim, D-K, U. Choi and D-H. Shin. 1996. Antioxidative activity of ethanol extract from Korea medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28, 83-89.

35. Hong, Y-S., H-L. Kim, Y-S. Pae and S-S. Park. 1995. Chemoprotective effect of methanol extract of *Hedera rhombea* leaves on the reversal of cytochrome P-450 activities induced by carbon tetrachloride. *J. Appl. Pharmacol.* 3, 245-250.

36. Muriel P. Peroxidation of lipids and liver damage. In: Anti-oxidants, Oxidants, and Free Radicals (Eds. Baskin SI and Salem H), pp. 237-257. Taylor & Francis, Washington, DC, 1997.

37. Arthur MJP. Reactive oxygen intermediates and liver injury-J *Hepatol* 6: 125-131, 1988.

38. Tribble DL, Aw TY and Jones DP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology* 7: 377-386, 1987.

39. Muriel P and Mourelle M. Characterization of membrane fraction lipid composition and function of cirrhotic rat liver. Role of S-adenosyl-L-methionine. *J Hepatol* 14: 16-21, 1992.

40. McCall TB, Boughten-Smith NK, Palmer RMJ, Whittle BJR and Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 261: 293-296, 1989.

41. Kanner J, Harel S and Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys* 289: 130-136, 1991.

42. Pérez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 3: 112-120, 1983.

43. Recknagel RO and Glende EA. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol* 2: 263-297, 1973.

44. Sato M and Bremmer I. Oxygen free radicals and metallo-thionein. *Free Radic Biol Med* 14: 325-337, 1993.

45. Arizono K, Kagawa S, Hamada H and Ariyoshi T. Nitric oxide mediated metallothionein induction by lipopolysaccharide. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 90: 49-58, 1995.

46. Chamulitrat W, Jordan SJ and Mason RP. Nitric oxide production during endotoxic shock in carbon tetrachloride-treated rats. *Mol Pharmacol* 46: 391-397, 1994.

47. Chamulitrat W, Blazka ME, Jordan SJ, Luster MI and Mason RP. Tumor necrosis factor- α and nitric oxide production in endotoxin-primed rats administered carbon tetrachloride. *Life Sci* 57: 2273-2280, 1995.

48. Kaplan MM. Serum alkaline phosphatase-Another Piece is added to the puzzle. *Hepatology* 6: 226-228, 1986.

49. Plaa GL and Hewitt WR. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In: Principles and Methods of Toxicology (Ed. Hayes W),

pp. 407-445. Raven Press, NewYork, 1982.

50. Bulle F, Mavier P, Zafrani ES, Preaux A-M, Lescs M-C, Siegrist S, Dhumeaux D and Guellaën G, Mechanism of γ -glutamyl transpeptidase release in serum during intrahepatic and extrahepatic cholestasis in the rat: A histochemical, biochemical and molecular approach. *Hepathology* 11: 545-550, 1990.

51. Jones SM and Thurman RC, L-Arginine minimizes reperfusion injury in a low flow, reflow model of liver perfusion. *Hepatology* 24: 163-168, 1996.

52. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A and Takagi H, Role of endogenous nitric oxide in ischemia- reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 59:772-779, 1995.

53. Nagase S, Isobe H, Ayukawa K, Sakai H and Nawata H, Inhibition of nitric oxide production increases

dimethylnitro-samine-induced liver injury in rats. *J Hepatol* 23: 601-604, 1995.

54. Borgs M, Bollen M, Keppens S, Yap SH, Stalmans W and Vanstapel F, Modulation of basal hepatic glycogenolysis by nitric oxide. *Hepatology* 23: 1564-1571, 1996.

55. Trachtman H, Futterweit S and Singhal P, Nitric oxide modulates the synthesis of extracellular matrix proteins in cultured rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 120-125, 1995.

56. Kollpakov V, Gordon D and Kulik TJ, Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 76: 305-309, 1995.

57. Narita I, Border WA, Ketteler M, Rouslahti E and Noble NA, L-Arginine may mediate the therapeutic effects of low protein diets. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4552-4556, 1995.