

원저

## 四君子湯 및 그 構成藥物이 白鼠 腎皮質 切片의 細胞損傷과 脂質過酸化에 미치는 影響

趙秀仁\* · 金敬喆\*\* · 李鏞泰\*\*

### ABSTRACT

Effects of Sagunja-Tang on cytotoxicity and lipid peroxidation  
in rat renal cortical slices

Cho, Su-In\* · Kim, Gyung-Chul\*\* · Lee, Yong-Tae\*\*

\* Department of Herbology

\*\*Department of Physiology, College of Oriental medicine, Dong-Eui University, Pusan, Korea.

This study was carried out to investigate whether water extract of Sagunja-Tang and its composing herbs have the inhibitory effects on cytotoxicity and lipid peroxidation induced by oxidant in rat renal cortical slices. Cytotoxicity was estimated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity and lipid peroxidation was examined by measuring malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation. When rat renal cortical slices were treated with tert-butylhydroperoxide (t-BHP) of 1 mM and water decocted herbs, LDH release from the slices was inhibited in dose dependent manner at low concentrations of herbs. It shows that herbs can reduce cytotoxicity, but overdose of herbs can be toxic to the slices. And MDA measurements show each herb has its own activities of preventing cytotoxicity from oxidants. So further studies should be followed to make clear the mechanisms of anti-oxidative effects of herbs.

Key Words : cytotoxicity, lipid peroxidation, rat renal cortical slice, lactate dehydrogenase, malondialdehyde.

### I. 서 론

四君子湯은 「太平惠民和劑局方」<sup>1)</sup>에 最初로 記載된 處方으로 人蔘·白朮·茯苓 및 甘草로 構成되어 補氣健脾·利水消腫의 效能이 있으며 補氣의 基本處方으로 補氣劑의 대부분은 여기에 加減하여 만들어진다.<sup>2)</sup>

四君子湯의 適應症이 되는 氣虛는 큰 病을 앓고 난 후이거나 혹은 勞動을 과도하게 하여 元氣가 損傷된 경우를 말하며 이러한 때의 治法은 補益中氣이며 四君子湯 加減方을 쓰는 것이 일반적인 治法이며,<sup>3)</sup> 元氣가 虛할 경우 生長 발육이 지연되고 生식능력이 저하될 뿐 아니라 모든 生理활동이 감퇴된다.<sup>4)</sup>

\* 東義大學校 韓醫科大學 本草學教室

\*\* 東義大學校 韓醫科大學 生理學教室

## 접수일: 99. 5. 25    연락처: 조수인 T.051-850-8636

韓醫學의 古典인 「黃帝內經 素問」 生氣通天論에서도 “陽氣者 若天與日 失其所 則折壽而不彰”<sup>5)</sup>라 하여 사람이 氣를 얻으면 능히 살어나갈 수 있으며, 氣가 끊어지면 죽는다 하였으므로 韓醫學의 觀點에서는 사람이 질병에 이환되거나 노화가 진행되는 과정에 氣虛가 關係함이 당연한 이치라 하겠다.

본 實驗에서는 oxidant에 의한 細胞 損傷 研究에 많이 이용되고 있는 藥物 모델<sup>6)</sup>인 t-butylhydroperoxide(이하 t-BHP)를 이용하여 細胞 損傷을 誘發하였고, 이렇게 活性 酸素種이 과잉 생성된 상태가 人體가 疾病에 이환 되기 쉬운, 즉 韓醫學에서 氣虛의 상태와 類似하다고 보고 氣虛의 基本處方인 四君子湯을 實驗에 응용하였다.

四君子湯 또는 그 構成藥物에 대한 研究로 林<sup>7)</sup>, 朴<sup>8)</sup>, 金<sup>9)</sup>, 李<sup>10)</sup>, 李<sup>11)</sup>, 沈<sup>12)</sup> 등의 實驗의 研究가 있었으나 細胞 損傷과 脂質의 過酸化에 미치는 影響에 대한 報告는 없었다.

이에 四君子湯 및 그 構成藥物이 腎臟 皮質 切片에서의 細胞 損傷과 脂質의 過酸化를 어느 정도 防止하는가를 조사하기 위하여 Lactate dehydrogenase(이하 LDH)의 活性과 脂質 過酸化의 產物인 Malondialdehyde(이하 MDA)의 含量을 測定하여 그 結果를 報告하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 實驗材料

#### 1) 動物

實驗動物은 體重 250 g 內외의 Sprague Dawley계 수컷 흰 쥐(대한실험동물센터, 한국)를 固形飼料(삼양 배합사료 실험동물용, 삼양유지사료, 한국)와 물을 충분히 供給하면서 2週 以上 實驗室 環境에 適應시킨 후 사용하였다.

#### 2) 藥材

人蔘·白朮·茯苓 및 甘草를 市中에서 購入·精選하여 사용하였고, 甘草는 炙하지 않은 生甘草를 사용하였으며, 四君子湯의 處方 內容 構成 비율은 본 處方이 최초로 記載된

「太平惠民和劑局方」<sup>1)</sup>에 따라 各 等分하였으며, 抽出을 위해서 各 80 g 씩을 煎湯하였다.(Table 1)

Table 1.

Prescription of Sagunja-Tang.

韓藥名	生藥名 및 學名	重量
人蔘	RADIX GINSENG Panax ginseng C. A. MEYER	各 等分
	白朮	
茯苓	FORIA Poria cocos (SCHW.) WOLF	
	甘草	

### 3) 試藥

NaCl, KCl, Tris-HCl, CaCl<sub>2</sub>, glycine, glutamate, glucose, phosphoric acid, thiobarbituric acid 등은 Sigma(Sigma Chemical, USA) 제품을 사용하였고, 1-Butanol은 Junsei(Junsei Chemical, Japan) 제품을 사용하였다.

## 2. 實驗方法

### 1) 藥材의 抽出

人蔘·白朮·茯苓·甘草 개개의 藥材 80 g 과 이들로 構成된 四君子湯 80 g 각각에 蒸溜水 1000 ml을 가한 후 대용약탕기(DWP-99000T, 한국)로 2 시간 정도 煎湯한 후 濾液 약 500 ml을 건조기(Vision, 비전과학, 한국)에서 건조하여 抽出物을 얻었으며 최후의 乾燥物은 人蔘이 23.1 g, 白朮이 32.0 g, 茯苓이 1.5 g, 甘草가 19.7 g, 四君子湯이 17.3 g 이었으며, 사용치 않을 때에는 냉동 보관해 두었다가 실험 직전에 필요한 濃度에 맞춰 稀釋하여 신선하게 사용하였다.

### 2) 腎組織 切片의 製作

實驗用 흰 쥐를 犧牲시킨 후 腎臟을 들어 내어 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)로 된 차가운 溶液을 腎動脈에 注入하여 血液을 除去하고 바깥의 단단한 皮膜을 除去한 다음 Stadie-Riggs

microtome(Tomas Co. USA)으로 약 1 cm<sup>2</sup> 넓이와 약 0.3~0.5 mm 두께의 腎皮質組織 切片을 만들어 사용하였다.

3) 組織의 培養

組織 切片 약 30 mg을 4 ml의 incubation 溶液이 들어 있는 비이커 속에 넣고 water bath 내에서 100 % 산소를 계속 공급하면서 37 °C에서 incubation하였다. 기본 incubation 溶液의 조성은 130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)로 되어 있으며, 이들 藥物이 들어 있는 溶液 내에서 60 분 동안 incubation하였다.

Incubation 후에 組織을 들어내어 細胞의 損傷 정도를 조사하기 위하여 kidney slice 전체 LDH 含量에 대한 incubation 溶液으로의 LDH의 流出을 測定하여 % LDH 濃도를 나타내었으며, 또한 細胞 損傷이 脂質의 過酸化와 연관이 있는 지는 그 生成物인 MDA의 含量을 測定하여 평가하였다.

4) LDH의 活性 測定

腎組織 切片을 蒸溜水와 함께 磨碎시켜 만든 組織液과 incubation 溶液을 각각 50 μl 취하여 LDH 活性을 LDH 測定 kit(아산제약 주식회사, 한국)를 이용하여 測定하였다.

5) MDA 含量 測定

肝組織 및 腎組織 내 MDA 含量은 Uchiyama와 Mihara의 方法<sup>13)</sup>에 준하여 測定하였는데, 간단히 설명하면, 肝組織과 腎組織 切片을 1 % phosphoric acid 3 ml과 0.6 % thiobarbituric acid 溶液 1 ml을 첨가하여 끓는 물에서 60 분 간 가열하였다. 1-Butanol 4 ml을 첨가하여 완전히 섞은 다음 3000 rpm에서 25 분 간 遠心分離 한 후, 上層液의 흡광도를 534 nm와 510 nm에서 測定하였다. MDA 값은 단백질 1 mg 당 pmoles로 표시하였으며, 단백질 농도는 Bradford의 方法<sup>14)</sup>으로 測定하였다.

6) 統計處理

實驗成績은 平均值±標準誤差(Mean±S.E.)로 나타내었으며, 對照群과 實驗群과의 平均의 差異를 檢定할 때에는 student's t-test로

檢定하여 p 값이 0.05 미만일 때 有意한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 실험성적

1. 人蔘 抽出物에 의한 kidney slice에서의 LDH 流出의 變化

Kidney slice에서의 LDH 流出을 觀察하기 위하여 1 mM t-BHP를 處理하였을 경우 正常群에서는 15.45±0.95 %인데 반해 對照群에서는 48.80±4.00 %로 有意하게 增加하였으므로 1 mM t-BHP에 의해 kidney slice에 損傷이 誘發되었음을 보였다.

이러한 kidney slice에서의 LDH 流出은 人蔘 實驗群의 경우 人蔘 抽出物이 2 % 함유된 상태에서는 39.45±1.83 %로 減少의 경향을 보였으나 有意하지는 않았으며, 1 %와 0.5 %에서는 각각 32.00±3.49 %와 29.38±2.11 %로 有意한 減少가 있었으며, 0.25 %에서는 39.90±5.22 %로 減少의 경향을 보였으나 有意하지는 않았다.(Figure 1)

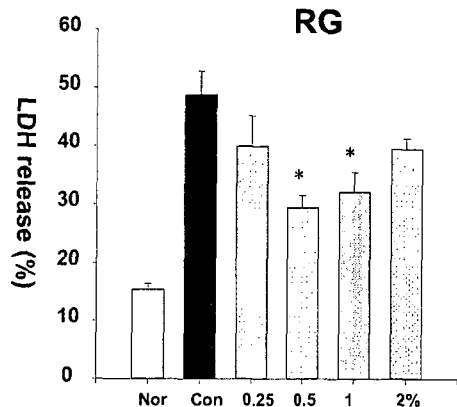


Figure 1.

Effect of RADIX GINSENG(RG) on t-BHP induced LDH release in rat kidney slices. Slices were treated with 1 mM t-BHP in the absence or presence of several concentrations of RG for 60 min at 37°C, and LDH release was measured. Data are mean±SE of eight experiments.

\* : Significantly different from the control(p<0.05)

Nor : Normal

Con : Control

## 2. 白朮 抽出物에 의한 kidney slice에서의 LDH 流出의 變化

白朮 實驗群의 경우 白朮 抽出物이 4 %, 2 % 및 1 % 含有된 상태에서 각각  $23.76 \pm 1.21$  %,  $23.36 \pm 1.30$  % 및  $29.10 \pm 1.29$  %로 有意한 減少가 있었으며, 0.5 % 含有된 상태에서는  $42.62 \pm 3.22$  %로 減少의 傾向을 보였으나 有意하지는 않았다.(Figure 2)

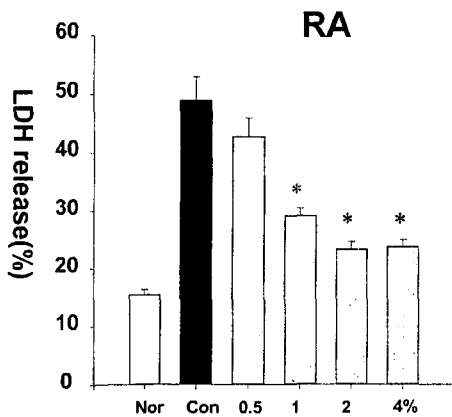


Figure 2.

Effect of RHIZOMA ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE (RA) on t-BHP induced LDH release in rat kidney slices. Slices were treated with 1 mM t-BHP in the absence or presence of several concentrations of RA for 60 min at 37°C, and LDH release was measured. Data are mean  $\pm$  SE of eight experiments.

\* : Significantly different from the control ( $p < 0.05$ )  
 Nor : Normal  
 Con : Control

## 3. 茯苓 抽出物에 의한 kidney slice에서의 LDH 流出의 變化

茯苓 實驗群의 경우 茯苓 抽出物이 2 %, 1 %, 0.5 % 및 0.25 % 含有된 상태에서 각각  $21.94 \pm 1.10$  %,  $17.49 \pm 0.47$  %,  $19.23 \pm 0.86$  % 및  $21.70 \pm 1.44$  %로 모두 有意한 減少를 보였다.(Figure 3)

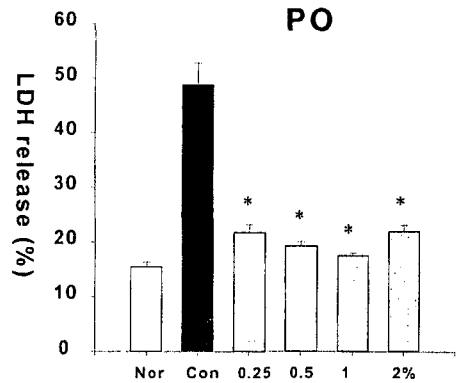


Figure 3.

Effect of PORIA(PO) on t-BHP induced LDH release in rat kidney slices. Slices were treated with 1 mM t-BHP in the absence or presence of several concentrations of PO for 60 min at 37°C, and LDH release was measured. Data are mean  $\pm$  SE of eight experiments.

\* : Significantly different from the control ( $p < 0.05$ )  
 Nor : Normal  
 Con : Control

## 4. 甘草 抽出物에 의한 kidney slice에서의 LDH 流出의 變化

甘草 實驗群의 경우 甘草 抽出物이 2 %, 1 %, 0.5 % 및 0.25 % 含有된 상태에서 각각  $25.70 \pm 1.46$  %,  $23.60 \pm 1.95$  %,  $25.03 \pm 1.70$  % 및  $34.85 \pm 1.76$  %로 모두 有意한 減少를 보였다.(Figure 4)

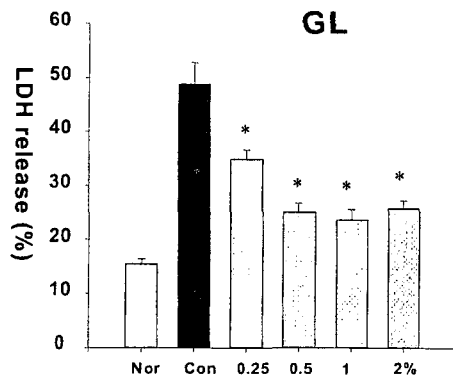


Figure 4.

Effect of RADIX GLYCYRRHIZAE(GL) on t-BHP induced LDH release in rat kidney slices. Slices were treated with 1 mM t-BHP in the absence or presence of several concentrations of GL for 60 min at 37°C, and LDH

release was measured. Data are mean±SE of eight experiments.

\* : Significantly different from the control(p<0.05)  
Nor : Normal  
Con : Control

### 5. 四君子湯 抽出物에 의한 kidney slice에 서의 LDH 流出의 變化

四君子湯 實驗群의 경우 四君子湯 抽出物이 2 %, 1 %, 0.5 % 및 0.25 % 含有된 상태에서 각각 20.84±0.97 %, 13.09±1.00 %, 20.47±1.95 % 및 35.19±3.56 %로 모두 有意한 減少를 보였다.(Figure 5)

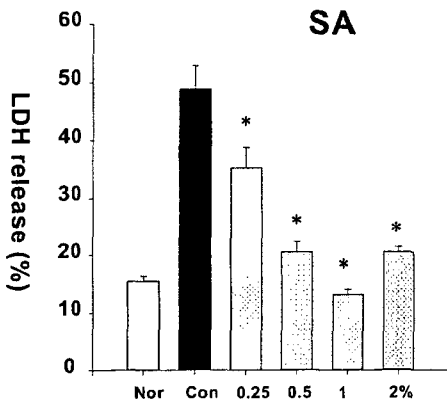


Figure 5.

Effect of Sagunja-Tang(SA) on t-BHP induced LDH release in rat kidney slices. Slices were treated with 1 mM t-BHP in the absence or presence of several concentrations of SA for 60 min at 37oC, and LDH release was measured. Data are mean±SE of eight experiments.

\* : Significantly different from the control(p<0.05)  
Nor : Normal  
Con : Control

### 6. LDH 流出 抑制에 대한 最高 效果 濃度 에서의 MDA 含量 測定

Kidney slice에서의 MDA 含量을 觀察하기 위하여 1 mM t-BHP를 處理하였을 경우 正常群에서는 116.76±9.41 pmole MDA/mg protein인데 반해 對照群에서는 2104.61±62.18 pmole MDA/mg protein로 有意하게 增加하였으므로 1 mM t-BHP에 의해 kidney slice에 脂質의 過酸化가 誘發되었음을 보였

다.

이러한 kidney slice에서 MDA 含量은 人蔘 抽出物이 0.5 % 含有된 상태에서 2385.32 ±103.59 pmole MDA/mg protein로 有意하게 增加하였으며, 白朮 抽出物이 4 % 含有된 상태에서는 1529.43±126.44 pmole MDA/mg protein 有意하게 減少하였으며, 茯苓 抽出物이 1 % 含有된 상태에서는 1885.32±82.96 pmole MDA/mg protein로 減少의 경향을 보였으나 有意하지는 않았으며, 甘草 抽出物이 1 % 含有된 상태에서는 993.52±43.87 pmole MDA/mg protein으로 有意하게 減少하였으며, 四君子湯 抽出物이 1 % 含有된 상태에서는 1470.84±48.85 pmole MDA/mg protein으로 有意하게 減少하였다.(Figure 6)

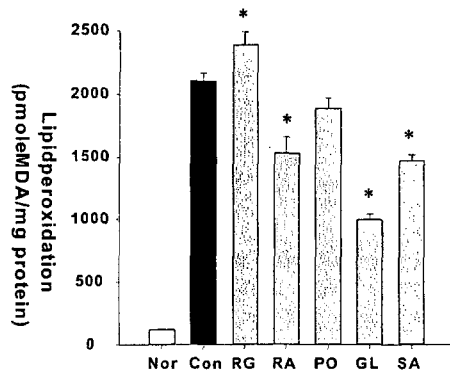


Figure 6.

Effect of Sagunja-Tang and its composing herbs on t-BHP induced lipid peroxidation in rat kidney slices. Slices were treated with 1 mM t-BHP in the presence of most effective concentrations of inhibition of LDH release for 60 min at 37oC, and lipid peroxidation was measured. Data are mean±SE of eight experiments.

\* : Significantly different from the control(p<0.05)

## IV. 고 찰

韓醫學의 古典인 「黃帝內經 素問」 生氣 通天論에서 “陽氣者 若天與日 失其所 則折壽 而不彰”<sup>5)</sup>라 하여 사람이 氣를 얻으면 능히 살아나갈 수 있으며 氣가 끊어지면 죽는 것으로 認識하고 있는 것에서 알 수 있듯이 韓醫學의 人 觀點에서 사람이 살아가는 동안 健

康을 維持하며 오래 사느냐 아니면 疾病에 쉽게 걸리면서 빨리 老化하느냐 하는 과정에 氣가 관여하고 있다는 것을 알 수 있다.

이러한 氣가 虛한 상태인 氣虛란 全身的인 機能低下에 따른 일련의 症候로서 中樞의 흥분성저하·물질대사 특히 同化作用의 減弱·免疫能의 低下·低蛋白血症·貧血狀態 등이 관련된다.<sup>2)</sup>

氣虛의 原因을 구체적으로 살펴보면, 先天的으로 不足하게 태어났거나 後天的으로 營養을 失調하였거나 臟腑의 功能이 失調되어 氣의 生産에 영향을 주었거나 過勞하여 氣를 많이 損傷하였거나 房勞가 過하여 腎精을 損傷하였거나 심한 병이나 오랜 病 혹은 汗吐下가 지나치거나 혹은 피를 많이 흘리는 등으로 氣를 과다하게 消耗한 경우로 나눌 수 있다.<sup>4)</sup>

韓醫學에서는 氣를 여러 종류로 나누어 元氣와 衛氣 등으로 표현하기도 하는데, 元氣가 虛할 경우 성장 발육이 지연되고, 생식능력이 저하될 뿐 아니라 모든 생리활동이 감퇴되며, 衛氣는 全身을 따뜻하게 하고 外邪를 방어하므로 만약 衛氣가 虛하게 되면 환자는 추워하고 땀을 잘 흘리며 외부의 邪氣가 자주 침범하게 된다.<sup>4)</sup> 그러므로 인체 각 臟腑의 機能에 異常이 생겨 疾病이 발생한다거나 이로 인해 老化가 비정상적으로 빨리 진행되는 과정이 氣虛와 연관되어 있음을 알 수 있다.

이러한 氣虛의 상태에서는 補益中氣의 治法을 이용하고 일반적으로 四君子湯 加減方이 많이 應用되고 있는데, 人蔘·白朮·茯苓 및 甘草가 이의 構成藥物이 된다.<sup>3)</sup>

人蔘은 補氣藥類로 分類되어 大補元氣·補脾益氣·生津止渴·寧神益智 등의 效能이 있으며, 白朮은 補氣藥類로 分類되어 補脾益氣·燥濕利水·固表止汗·安胎의 效能이 있으며, 茯苓은 利水藥類로 分類되어 利水滲濕·健脾補中·寧心安神의 效能이 있으며, 甘草는 補氣藥類로 分類되어 補脾益氣·潤肺止咳·緩急止痛·清熱解毒의 效能이 있다.<sup>15)</sup>

위의 藥物들로 構成된 四君子湯은 「太平惠民和劑局方」<sup>1)</sup>에 最初로 記載된 處方으로,

人蔘·白朮·茯苓·甘草로 構成되어 榮衛氣虛·臟腑怯弱·心腹脹滿·不思食·腸鳴泄瀉·嘔噦吐逆을 治療한다고 記錄되어 있으며, 현대적인 分類로는 補氣劑에 속하여 補氣健脾·利水消腫의 效能이 있고 脾胃氣虛가 適應症이 된다. 또 補氣의 基本處方으로서 補氣劑의 대부분은 本方을 加減하여 만들어지며 補氣의 效能이 있는 人蔘이 主藥이 되고 補氣健脾·利水の 效能을 가진 白朮과 健脾利水の 效能을 가진 茯苓이 이를 도우며 補氣의 效能과 諸藥을 調和하는 效能을 가진 炙甘草가 배합되어 있어 모든 藥物이 寒熱에 치우치지 않는 平性이라 해서 平補의 方劑라고도 한다.<sup>2)</sup> 이러한 效能으로 인해 四君子湯은 현대에 와서는 胃腸運動을 억제하고 抗胃潰瘍의 작용을 하며, 면역기능을 높일 뿐 아니라 抗腫瘍과 抗突然變異의 效能도 있음이 밝혀지고 있다.<sup>16)</sup>

細胞는 면역 또는 염증반응에 관여하는 호중구·림프구 등 여러 細胞나 화학적 인자 등과 접촉함으로써 여러 형태의 損傷을 받게 되며,<sup>17)</sup> 부분적으로 환원된 活性化된 산소기(O<sup>-2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>)는 여러 병적 상태에서 細胞死를 일으키는 중요한 매개체로 작용하고 있으며, 이러한 프리 라디칼은 細胞 내에서 脂質過酸化(lipid peroxidation)의 원인이 되어 細胞에 다른 유해한 영향을 미치게 된다.<sup>17, 18)</sup>

老化는 體內에서 漸次的이고 法則的으로 이루어지는 生理現狀으로, 過程이 複雜하여 그 原因 및 메카니즘을 糾明하기란 매우 어렵다. 老化에 대한 假說은 生物學的, 生化學的, 形態學的 側面에서 본 여러 가지가 있지만, 現在 가장 有力視되고 있는 理論은 自由遊離基說(free radical theory)이다.<sup>19)</sup>

반응성 산소기들(reactive free radicals)은 藥物이나 방사선과 같은 외부 요인에 의하여 발생되기도 하고 생체 내에서 細胞의 정상적인 대사과정 중에 발생되기도 하는데, 이들은 細胞膜의 이온전달물질이나 단백질 유전자 등을 공격하여 노화를 촉진시키거나 암의 발생, 동맥경화, 당뇨, 간손상 등 여러 가지 질병을 誘發시키는 인자로 알려지고 있다. 이

반응성 산소기들은 細胞 내에 존재하는 抗酸化劑에 의해서 제거되기 때문에 그 한도 내에서는 細胞가 損傷을 받지 않지만 만약 산소기들의 양이 많거나 또는 抗酸化劑의 양이 減少하게 되면 細胞는 損傷을 받게 될 것이다.<sup>20~22)</sup>

酸化劑들이 細胞損傷을 일으키는 機轉 중의 하나는 脂質의 過酸化이기 때문에<sup>23)</sup> 일반적으로 脂質의 過酸化 정도를 測定하여 細胞損傷이 酸化劑로 인해 誘發되었는지를 확인하고 있으며, 生體 細胞膜들은 불포화지방산을 많이 含有하고 있기 때문에 free radical들의 공격을 쉽게 받아 脂質의 過酸化가 발생되게 되고,<sup>24)</sup> 細胞膜 脂質의 過酸化는 細胞膜의 透過性を 變化시키고, 物質 移動系에 관여하는 蛋白質들의 機能을 저해하기 때문에 細胞機能 損傷의 중요한 原因으로 인정되고 있다.<sup>6, 24~27)</sup> 이러한 脂質의 過酸化 產物인 MDA는 다불포화지방산이 직접적 또는 간접적으로 過酸化 과정을 통해 분해됨으로써 생성되는데, 脂質이 過酸化되면 결과적으로 細胞損傷을 일으키며 細胞膜에 결합된 효소의 활성도를 떨어뜨리는 등 細胞膜의 생리 화학적인 성질을 變化시키는 요인이 된다.<sup>23, 28)</sup> 따라서 酸化劑에 의한 細胞 毒性을 防止하는 藥物들은 脂質의 過酸化를 減少시키는 효과를 가지고 있다는 것을 알 수 있다.

그러므로 프리 라디칼에 의하여 細胞 構成 성분들인 脂質, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적 파괴작용을 함으로써 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등의 각종 질병 및 노화를 일으킬 수 있으므로 프리 라디칼을 소거할 수 있는 물질 또는 過酸化 物 생성 억제물질과 같은 抗酸化物質들이 이들 酸化物들에 의하여 야기되는 각종 질환 치료제 및 노화 억제제로서 기대된다. 현재 합성 抗酸化劑로 여러 가지 화합물들이 개발되어 의약품 또는 연구시약으로 시판되고 있으나 강한 抗酸化 活性和 함께 毒性을 가지고 있어 의약품으로서의 사용에 한계를 지니

고 있다.<sup>29)</sup> 따라서 인체에 독성이 비교적 적은 천연물, 즉 韓藥材에서의 抗酸化劑 검색이 더욱 활발해져야 할 것으로 생각된다.

본 實驗에서는 oxidant에 의한 細胞損傷 研究에 많이 이용되고 있는 藥物 모델<sup>6)</sup>인 t-BHP를 이용하여 細胞損傷을 誘發하였고, 이렇게 活性 酸素種이 과잉 생성된 상태가 人體가 疾病에 이환 되기 쉬운, 즉 韓醫學에서 氣虛의 상태와 類似하며, 프리 라디칼에 의한 人體의 여러 가지 損傷과 이와 관련된 疾病의 發生 및 老化의 과정이 韓醫學에서의 氣虛와 連관성이 있을 것이라 생각하여 氣虛의 基本處方인 四君子湯을 우선 選定하게 되었으며 韓藥材 각각의 效能과 處方으로 配合되었을 때의 效能을 비교함으로써 抗酸化劑의 탐색에서 韓醫學에서의 藥物 配合 原理의 사용여부 등의 자료로 참고하고자 하였다.

四君子湯 및 그 構成藥物에 대한 研究로 林<sup>7)</sup>의 「四君子湯 煎湯液이 家兔의 生體活性에 미치는 影響」, 朴<sup>8)</sup>의 「四君子湯 投與가 젓산내성 및 회복율에 미치는 영향에 관한 연구」, 金<sup>9)</sup>의 「人蔘의 항암成分에 관한 研究」, 李<sup>10)</sup>의 「白朮·黃芪·龍葵의 免疫調節作用 및 알레르기 低減에 관한 研究」, 李<sup>11)</sup>의 「茯苓이 家兔의 血壓 및 腎機能에 미치는 影響」, 沈<sup>12)</sup>의 「감초 추출물이 면역응답에 미치는 영향」 등의 實驗的 研究가 있었으나 細胞損傷과 脂質의 過酸化에 미치는 影響에 대한 報告는 없었다.

四君子湯 및 構成藥物들이 脂質의 過酸化를 직접 防止함으로써 나타낼 수도 있고, 藥物이 脂質의 過酸化를 직접 防止하지 않더라도 반응성 산소기들을 직접 제거하는 작용을 가지고 있다면 2차적으로 脂質의 過酸化 및 그로 인한 細胞損傷이 防止될 것이다. 또한 細胞 내에는 정상적으로 산소유리기들을 제거하는 효소나 물질을 가지고 있는데, 藥物들이 이들 내재성 항산화 효소나 물질들의 活性이나 농도를 증가시킨다면 細胞의 損傷이 또한 防止될 것이다.

따라서 본 實驗에서는 細胞死와 脂質의 過酸化를 測定<sup>30)</sup>하는데 각각 사용되는 % LDH

의 流出과 MDA 生成 정도를 測定하였는데, 우선 1 % 濃度を 기준으로 하여 LDH 流出을 測定한 후 藥物의 濃도를 2 배씩 增加 또는 稀釋시키면서 LDH 流出의 增減을 살펴 最高 抑制 濃도를 검색하였으며, 다시 最高 抑制 濃도를 이용하여 MDA 生成 정도를 測定하여 藥物로 인한 細胞의 損傷 防止가 脂質의 過酸化 抑制와 관련이 있는가를 살펴 보았다.

人蔘 抽出物에 의한 kidney slice에서의 LDH 流出의 變化를 觀察하기 위하여 1 mM t-BHP를 處理하였을 경우 正常群에서는  $15.45 \pm 0.95$  %인데 반해 對照群에서는  $48.80 \pm 4.00$  %로 有意하게 增加하였으므로 1 mM t-BHP에 의해 kidney slice에 損傷이 誘發되었음을 보였다. 이러한 kidney slice에서의 LDH 流出은 人蔘 實驗群의 경우 人蔘 抽出物이 2 % 含有된 상태에서는  $39.45 \pm 1.83$  %로 減少의 경향을 보였으나 有意하지는 않았으며, 1 %와 0.5 %에서는 각각  $32.00 \pm 3.49$  %와  $29.38 \pm 2.11$  %로 有意한 減少가 있었으며, 0.25 %에서는  $39.90 \pm 5.22$  %로 減少의 경향을 보였으나 有意하지는 않았다.(Figure 1)

白朮 實驗群의 경우 白朮 抽出物이 4 %, 2 % 및 1 % 含有된 상태에서 각각  $23.76 \pm 1.21$  %,  $23.36 \pm 1.30$  % 및  $29.10 \pm 1.29$  %로 有意한 減少가 있었으며, 0.5 % 含有된 상태에서는  $42.62 \pm 3.22$  %로 減少의 경향을 보였으나 有意하지는 않았다.(Figure 2)

茯苓 實驗群의 경우 茯苓 抽出物이 2 %, 1 %, 0.5 % 및 0.25 % 含有된 상태에서 각각  $21.94 \pm 1.10$  %,  $17.49 \pm 0.47$  %,  $19.23 \pm 0.86$  % 및  $21.70 \pm 1.44$  %로 모두 有意한 減少를 보였다.(Figure 3)

甘草 實驗群의 경우 甘草 抽出物이 2 %, 1 %, 0.5 % 및 0.25 % 含有된 상태에서 각각  $25.70 \pm 1.46$  %,  $23.60 \pm 1.95$  %,  $25.03 \pm 1.70$  % 및  $34.85 \pm 1.76$  %로 모두 有意한 減少를 보였다.(Figure 4)

四君子湯 實驗群의 경우 四君子湯 抽出物이 2 %, 1 %, 0.5 % 및 0.25 % 含有된 상태에서 각각  $20.84 \pm 0.97$  %,  $13.09 \pm 1.00$  %,  $20.47 \pm 1.95$  % 및  $35.19 \pm 3.56$  %로 모두 有意한 減少를 보였다.(Figure 5)

이상의 LDH 流出 測定에서 四君子湯 및 이를 構成하는 모든 藥物에서 물 抽出物의 경우 濃度依存的으로 細胞損傷을 抑制하고 있었으나 일정 濃도를 넘어서면 오히려 細胞의 損傷을 가져온다는 것을 알 수 있으므로 높은 濃度の 韓藥 抽出物은 人體에 좋지 않은 結果를 招來할 수도 있음을 알 수 있다. 또한 각각의 構成藥物의 效果에서 보다 이들이 配合되어진 四君子湯의 效果가 가장 뛰어난 것을 볼 수 있는데 이는 韓醫學에서의 藥物 配合 理論을 糾明하는데 좋은 실마리가 될 수 있을 것으로 생각한다.

LDH 流出 抑制에 대한 最高 效果 濃度에서 kidney slice에서의 MDA 含量을 觀察하였는데, 1 mM t-BHP를 處理하였을 경우 正常群에서는  $116.76 \pm 9.41$  pmole MDA/mg protein인데 반해 對照群에서는  $2104.61 \pm 62.18$  pmole MDA/mg protein로 有意하게 增加하였으므로 1 mM t-BHP에 의해 kidney slice에 脂質의 過酸化가 誘發되었음을 보였다. 이러한 kidney slice에서 MDA 含量은 人蔘 抽出物이 0.5 % 含有된 상태에서는  $2385.32 \pm 103.59$  pmole MDA/mg protein로 有意하게 增加하였으며, 白朮 抽出物이 4 % 含有된 상태에서는  $1529.43 \pm 126.44$  pmole MDA/mg protein 有意하게 減少하였으며, 茯苓 抽出物이 1 % 含有된 상태에서는  $1885.32 \pm 82.96$  pmole MDA/mg protein로 減少의 경향을 보였으나 有意하지는 않았으며, 甘草 抽出物이 1 % 含有된 상태에서는  $993.52 \pm 43.87$  pmole MDA/mg protein으로 有意하게 減少하였으며, 四君子湯 抽出物이 1 % 含有된 상태에서는  $1470.84 \pm 48.85$  pmole MDA/mg protein으로 有意하게 減少하였다.(Figure 6)

이상의 結果를 보면 細胞의 損傷을 防止하여 LDH 流出을 抑制한 藥物의 濃度에서 脂質의 過酸化가 모두 防止되지는 않았으며 특히 人蔘의 경우는 對照群에 비해 脂質의 過酸化 정도가 더욱 심하게 나타났다. 이로 미루어 細胞 損傷의 防止가 脂質의 過酸化 抑



制 效果에 起因하기도 하지만, 이에 全的으로 依存하지는 않음을 알 수 있으며, 藥物에 따라 脂質의 過酸化를 직접 防止하지 않더라도 반응성 산소기들을 직접 제거하여 細胞損傷을 防止하거나, 細胞 내에 존재하는 항산화 효소나 항산화 물질들의 活性이나 濃度を 增加시키는 작용이 있음을 알 수 있었다.

### V. 결 론

四君子湯 및 그 構成藥物이 腎臟 皮質 切片에서의 細胞 損傷과 脂質의 過酸化를 어느 정도 防止하는가를 조사하기 위하여 LDH의 活性과 MDA의 含量을 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 人蔘 抽出物에 의한 kidney slice에서의 LDH 流出의 變化를 觀察하기 위하여 1 mM t-BHP를 處理한 결과 1 %와 0.5 %에서 有意한 減少가 있었다.

2. 白朮 實驗群의 경우 白朮 抽出物이 4 %, 2 % 및 1 % 含有된 상태에서 有意한 減少가 있었다.

3. 茯苓 抽出物이 2 %, 1 %, 0.5 % 및 0.25 % 含有된 상태에서 有意한 減少가 있었다.

4. 甘草 抽出物이 2 %, 1 %, 0.5 % 및 0.25 % 含有된 상태에서 有意한 減少가 있었다.

5. 四君子湯 抽出物이 2 %, 1 %, 0.5 % 및 0.25 % 含有된 상태에서 有意한 減少가 있었다.

6. LDH 流出의 測定에서 四君子湯 및 이를 構成하는 모든 藥物에서 물 抽出物의 경우 濃度依存的으로 細胞損傷을 抑制하고 있었으나 일정 濃度を 넘어서면 오히려 細胞의 損傷을 가져왔으며, 전체적인 效果를 살펴보면 각각의 構成藥物의 效果보다 이들이 配合되어진 四君子湯의 效果가 가장 뛰어났다.

7. LDH 流出 抑制에 대한 最高 效果 濃度에서 MDA 含量의 變化를 觀察하기 위해 1 mM t-BHP를 處理한 결과, 白朮 抽出物이 4 %, 甘草 抽出物이 1 %, 四君子湯 抽出物이 1 % 含有된 상태에서 MDA 含量이 有意하게

減少하였다.

8. LDH 流出을 抑制한 藥物의 濃度에서 脂質의 過酸化가 모두 防止되지는 않았으므로, 細胞 損傷의 防止가 脂質의 過酸化 억제 效果에 起因하기도 하지만, 이에 全的으로 依存하지는 않으며 藥物에 따라 脂質의 過酸化를 직접 防止하지 않더라도 반응성 산소기들을 직접 제거하여 細胞損傷을 防止 하거나, 細胞 내에 존재하는 항산화 효소나 항산화 물질들의 活性이나 濃度を 增加시키는 작용이 있을 것으로 생각된다.

### 참고문헌

1. 陳師文 等編. 太平惠民和劑局方 : 旋風出版社 : p. 115.
2. 成輔社 編譯. 天眞處方解說. 서울 : 成輔社, p. 38, 1987.
3. 索延昌. 虛證論. 北京 : 人民衛生出版社, p. 11, 1997.
4. 최승훈. 한방병리학. 서울 : 一中社, pp. 170-172, 1997
5. 洪元植 校合編纂. 精校黃帝內經素問. 서울 : 東洋醫學研究院, p. 16, 1985.
6. Farber JL, Kyle ME and Coleman JB : Biology of disease : Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Lab Invest, 62 : 670-679, 1990.
7. 林圭岸. 四君子湯 煎湯液이 家兔의 生體活性에 미치는 影響. 이리 : 圓光大學校, 학위논문(박사), 1988.
8. 朴晶鉉. 四君子湯 投與가 腎臟내성 및 회복에 미치는 影響에 관한 연구. 원주 : 尙志大學校, 학위논문(석사), 1997.
9. 金信一. 人蔘의 항암成分에 關한 研究. 대전 : 忠南大學校, 학위논문(박사), 1988
10. 李克魯. 白朮·黃芪·龍葵의 免疫調節作用 및 알레르기 低減化에 關한 研究. 경산 : 慶山大學校, 학위논문(박사), 1997.
11. 李源哲. 茯苓이 家兔의 血壓 및 腎機能에 미치는 影響. 서울 : 慶熙大學校, 학위논문(박사), 1985.
12. 沈豪基. 감초 추출물이 면역응답에 미치는 영향. 경산 : 慶山大學校, 학위논문(석사), 1996.

13. Uchiyama M. and Mihara M. : Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* Vol. 86, pp. 271-278, 1987.
14. Bradford M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. *Anal. Biochem.* Vol. 72, pp. 248-524, 1976.
15. 辛民教. 臨床本草學. 서울 : 永林社, p. 172, 179, 188, 649, 1997.
16. 珍奇. 中藥名方藥理與應用. 台北 : 南天書局, p. 247, 1993.
17. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사, p. 33, 34, 39, 40, 1995.
18. Stanley L. Robbins, Vinay Kumar. : Basic Pathology. W.B. Saunders Company, p. 7, 1987.
19. Harman, D. : Free radical theory of aging : Role of free radicals in the organization and evolution of life, aging and disease process : Free Radicals, Aging and Degenerative Disease(ed. Johnson, J. E. et al.), Alan R. Liss. inc., New York, pp. 3-49, 1986.
20. Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*, 4 : 2587-2597, 1990.
21. Reiter RJ. : Oxidative process and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*, 9 : 526-533, 1995.
22. Halliwell B and Gutteridge JMC and Cross CE. : Free radicals, antioxidants, and human disease. Where are we now? *J Lab Clin Med*, 119 : 598-620, 1992.
23. Sies H. : Biochemistry of oxidant stress. *Angew Chem Int Ed*, 25 : 1058-1071, 1986.
24. Chance B, Sies H and Boveris A. : Hydroperoxide metabolism un mammalian organs. *Physiol Rev*, 59 : 527-605, 1979.
25. Arstila AU, Smith MA and Trump BF. : Microsomal lipid peroxidation: Morphological characterization. *Science*, 175 : 530-533, 1972.
26. Koko K, Kato M, Matsuoka T and Mustapha A. : Depression of membrane-bound Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am J Physiol*, 254 : C330-C337, 1988.
27. Andreoli SP, McAteer JA, Seifert SA and Kempson SA. : Oxidant-induced alterations in glucose and phosphate transport in LLC-PK1 cells. Mechanisms of injury. *Am J Physiol*, 265 : F337-F384, 1993.
28. 金永坤, 金永杓. 프리라디칼. 서울 : 麗文閣, p. 81, 82, 1997.
29. 신물질탐색연구회 편저. 신물질탐색. 서울 : 自由아카데미, p. 325, 340, 1996.
30. Zager RA and Burkhart KM and Conrad DS and Gmur DJ. Iron, heme oxygenase, and glutathione : effects on myohemoglobinuric proximal tubular injury. *Kidney Int. Nov* ; 48(5) : 1624-34, 1995.