

失笑散이 CCl₄ 유도 간손상 Mouse의 기능회복에 미치는 영향

- 朴 宣 東 -

(동국대학교 한의과대학 방제학교실 주임교수)

I. 緒 論

失笑散은 『太平惠民和劑局方』 등에 수록되어 있는 處方으로서 一名 斷弓弦散, 紫金丸이라고도 불리워지며, 産後 血瘀性 下腹痛이 “失笑” 할 만큼 劇痛일 때에 祛瘀, 活血, 止痛, 去惡露의 작용으로 瘀血의 阻滯로 血行이 不暢하여 나타나는 모든 痛症을 치료하는 方劑이다¹⁾.

本方의 組成은 五靈脂, 蒲黃 各等分으로 구성되어 있으며 黃酒 혹은 醋로 沖服하거나 또는 湯劑로 水煎服한다. 처방 내용 중의 五靈脂는 祛瘀止痛하며 혹은 活血(生用)하며 혹은 止血(炒用)한다. 瘀血로 인한 月經困難, 月經痛에 사용하며 특히 産後 惡露停滯로 인한 下腹痛에 효과적이다. 蒲黃은 收斂止血, 活血祛瘀하는데, 특히 産後 惡露停滯로 인한 下腹痛 등의 血瘀證에 활용된다. 五靈脂와 蒲黃의 相須작용은 活血祛瘀, 通利血脈하여 瘀痛을 그치게 한다²⁾.

主治證으로는 小腸氣, 및 心腹痛, 혹은 産後惡露不行, 혹은 月經不調, 少腹急痛 등에 활용되어 왔으며³⁾, 최근에는 瘀血 停滯로 인한 心絞痛, 胃痛, 痛經, 産後腹痛, 子宮外妊娠, 崩漏 등에 사용되어지고 있다.

本方의 약리작용으로는 抗心筋貧血, 降血脂, 動脈粥狀硬化低下, 鎮靜降壓 및 산소결핍에 대한 내수성 증진작용 등이 있다. 임상적으로는 관상동맥병, 子宮內膜異位, 만성위염, 病毒性肝炎, 비화농성 늑연골염, 상부 소화관 출혈 등에 응용되어지고 있다.

실험적 연구로는 徐⁴⁾가 endotoxin으로 유

발된 흰쥐의 抗血栓 효과, 尹⁵⁾이 흰쥐의 자궁근 수축력 증가에 대한 효과를 보고하였다.

한의학계에서는 오랫동안 CCl₄로 유도된 간손상과 관련된 효능 연구가 지속되어 왔는데 대부분 肝과 연관된 처방이 대부분을 차지하며 瘀血 치료제로서 간독성에 대해 효과적이라는 실험적 연구는 없었다.

이에 저자는 活血化瘀하는 失笑散의 항산화효과를 통하여 CCl₄ 유도 간손상 mouse의 간기능 회복에 대한 효과를 알아보기 위하여 DPPH radical 소거능을 측정하고 CCl₄로 유도된 간중독 mouse 혈청중의 AST, ALT와 ALP 및 간조직내 glutathione과 lipid peroxide의 함량, catalase의 활성을 비교 조사한 바 유의한 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 藥材

蒲黃, 五靈脂는 시중에서 구입하여 정선한 것을 사용하였고 失笑散은 東醫寶鑑⁶⁾에 준하였으며 그 用量은 다음과 같다.

4) 徐敏華: 失笑散이 Endotoxin으로 유발된 白鼠의 血栓症에 미치는 영향, 원광대학교 대학원 석사논문, 1992

5) 尹彩珍: 失笑散이 mouse 자궁근 수축력 및 자발운동에 미치는 영향, 원광대학교 대학원 석사논문, 1983

6) 許浚: 東醫寶鑑, 서울; 大星文化社, 婦人·小兒篇, p.29, 1992

1) 李尙仁 朴宣東 外: 方劑學, 서울; 永林社, pp.417-418, 1999

2) 韓醫科大學方劑學教授 共著: 方劑學, 서울; 永林社, pp.417-418, 1999

3) 申載鏞 編著: 上揭書, pp.275

失笑散

藥名	學名	各量
蒲黃	<i>Typha orientalis</i> L.	8g
五靈脂	<i>Trogopterus xanthipes</i> Milene-Edwards.	8g
總 量		16g

2) 動物

실험동물은 건강한 체중 30g 내외의 ICR 계 수컷 흰쥐로 5일간 사육실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육실 온도는 20℃ 내외, 습도는 55~60%로 유지하고 light dark cycle이 12시간 단위로 조절되게 한 후, mouse용 고형 사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

3) 試藥

본 실험에 사용한 시약은 carbon tetrachloride, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH), bovine serum albumine, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), sodium dodecyl sulfate(SDS), thiobarbituric acid(TBA), sulfosalicylic acid, potassium phosphate, Malondialdehyde tetrabutylammonium salt 등은 SIGMA사(Sigma Chem Co.)에서 구입하였으며, Hydrogen peroxide 및 n-butanol, ethanol, methanol, acetic acid와 기타 시약은 시중에서 특급품을 구입하여 사용하였으며, aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase (ALT) 측정용 kit, alkaline phosphatase (ALP) 측정용 kit는 아산제약(주)에서 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) 검액의 조제

失笑散 20첩 분량(320g)과 蒲黃, 五靈脂 150g에 3배량의 증류수를 가한 다음 3시간 동

안 1회 증탕하여 여과한 후 농축하고 동결건조 한 후 失笑散, 蒲黃, 五靈脂 추출물 각 2.831g, 16.13g, 13.27g을 얻었다.

2) DPPH radical 소거 효과 측정

失笑散 추출물의 free radical에 대한 소거 효과를 알아보기 위해 Hatano 등의 방법⁷⁾에 따라 DPPH radical 소거 효과를 측정하였다. 失笑散 추출물을 증류수에 농도별로 녹인 후 이 혼합물 4ml과 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 1 ml을 혼합하여 잘 흔들어 주고 실온에서 30분동안 방치한 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 동물의 처치

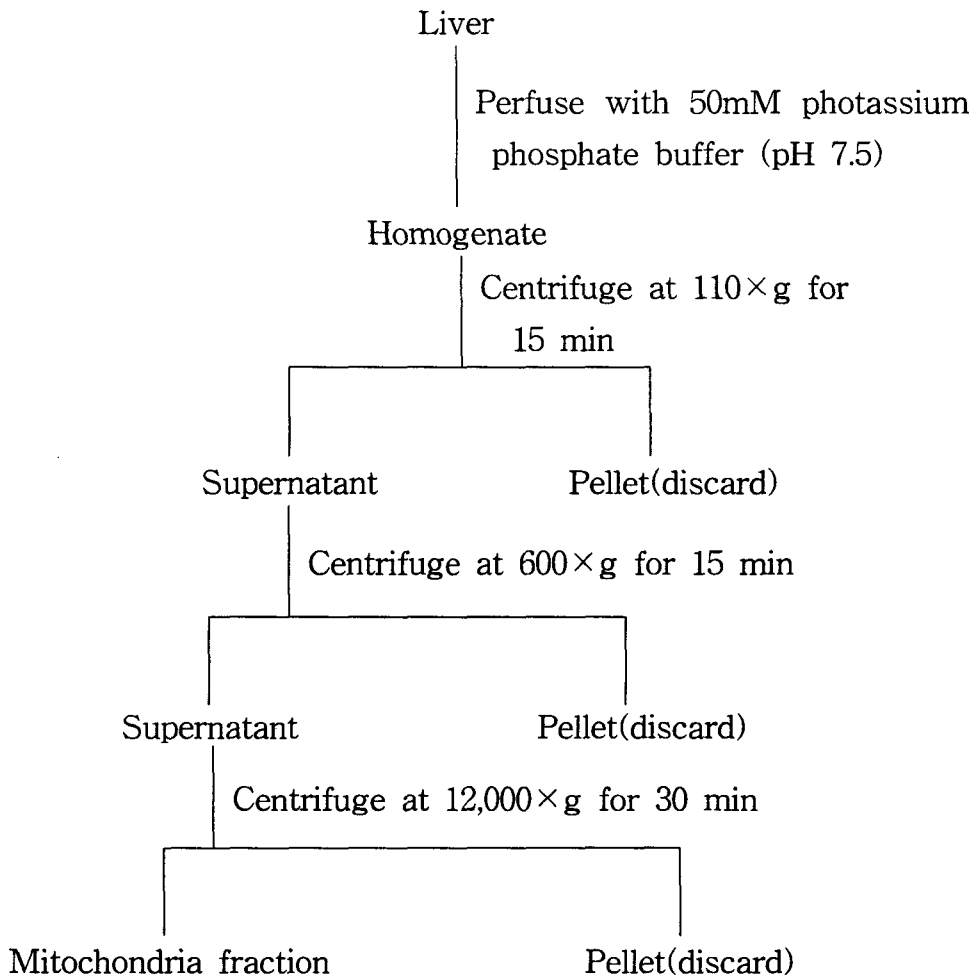
실험동물은 정상군, 대조군, 약물투여군으로 나누었다. 정상군은 마우스용 고형사료와 물을 제한 없이 공급하였으며, 대조군과 약물투여군은 7일간 마우스용 고형 사료와 물을 제한 없이 공급한 후 carbon tetrachloride (CCl₄)를 실험 동물의 체중 kg당 0.6ml을 1.

7) Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T.: Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. Chem. Pharm. Bull. (36): pp.2090-2097. 1988

일간 복강 주사하여 대조군은 마우스용 고형 사료와 물을 2주간 제한 없이 공급하였으며 약물 투여군은 失笑散(SS), 蒲黃(TO), 五靈脂(TX)투여군으로 나누어 마우스용 고형 사료와 각 추출물을 kg당 160mg씩 2주간 음용 시켰다. 모든 실험 동물은 실험전 18시간 동안 물만 주고 절식시켰다.

4) 생체 시료의 제조

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정 중선을 따라 개복하여 복부 대동맥에서 채혈 하였으며 채혈한 혈액은 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 혈청을 분리하여 AST, ALT, ALP 측정 효소원으로 사용하였다. 생리 식염수로 관류시킨 간은 조직이 손상되지 않도록 주의하여 혈액이 충분히 제거될 때까지 생리 식염수에 잘 씻어내고 whatman 여 과지로 식염수를 제거한 후 -70°C 에 동결 보존하여 사용하였다. 효소 활성도 측정을 위해 전체 조직의 4배 용량의 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 homogenizer로 4분간 균질화 하였다. 이 균질액을 $110\times\text{g}$ 에서 15분간 원심 분리하여 상층액은 과산화지질 (lipid peroxide) 및 Glutathione 함량을 측정하기 위한 시료로 사용하였고, 나머지 상층액은 $600\times\text{g}$ 에서 15분간 원심분리 하여 핵과 세포잔해를 제거한 상층액을 취한 후 다시 $12,000\times\text{g}$ 에서 30분 동안 원심분리 하여 미토콘드리아를 제거한 상층액을 Catalase의 활성도를 측정하기 위한 시료로 사용하였다. 상기 모든 조작은 특별한 규정이 없는 한 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 에서 실시하였다 (Scheme 1).



Scheme 1. Preparation of Hepatic Mitochondrial Fractions for Enzyme Studies.

5) 효소 활성의 측정

(1) 혈청중 AST 및 ALT 활성 측정

혈청중 AST 및 ALT 활성 측정은 Reitman-Frankel의 방법⁸⁾에 따라 조제된 시약 kit를 사용하여 측정하였다. AST, ALT 기질액 1.0ml을 시험관에 가하여 37°C에서 5분간 방치한 다음 혈청 0.2ml을 넣어 잘 혼합한 후 37°C에서 AST는 60분, ALT는 30분간 반응시킨 뒤 정색시액 1.0ml을 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 20분간 방치하여 반응을 종료시키고, 0.4N NaOH 용액 10ml을 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 약 10분간 방치하였다가 60분 이내에 505nm에서 증류수를 대조로 흡광도의 변화를 측정하였다. 혈청중 AST, ALT의 활성도는 작성한 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 1ml당 karmen unit로 나타내었다.

(2) 혈청중 ALP 활성 측정

혈청중 ALP 활성 측정은 Petkova 등의 방법⁹⁾에 따라 조제된 시약 kit를 사용하여 실시하였다. 기질액 2.0ml을 시험관에 가하여 37°C에서 5분간 방치한 후 여기에 혈청 0.05ml을 가하여 잘 혼합하여 37°C에서 정확히 15분간 반응시켰다. 정색시액 2.0ml을 넣고 충분히 혼합한 후 실온에서 10분 이상 방치시키고 60분 이내에 500nm에서 시

약블랭크를 대조로 흡광도의 변화를 측정하였다. 혈청중 ALP의 활성도는 표준 검량 곡선에서 산출하였으며 혈청 1ml당 King-Amstrong unit로 나타내었다.

(3) Lipid peroxide (LPO) 함량 측정

조직내 LPO함량 측정은 Ohkawa 등의 방법¹⁰⁾에 따랐다. 조직 마쇄 균질액을 1,000×g에서 원심분리한 후 상층액을 취해 8.1% sodium dodecyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 95°C에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-Butanol : Pyridine (15:1) 혼액으로 이행시켜 파장 532nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 생성된 시료의 MDA농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였으며 MDA함량은 조직 mg당 nmoles로 나타내었다.

(4) Glutathione (GSH) 함량 측정

조직내 GSH 함량측정은 Ellman 등의 방법¹¹⁾에 따랐다. 조직 균질액을 1,000×g에서 원심분리한 후 상층액에 4% sulfosalicylic acid를 가하여 혼합한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여 1mM DTNB 용액과 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 412nm에서 흡광도를 측정하였으며 GSH 함량은 protein 1mg 당 nmoles로 나

-
- 8) Reitman, S. and Frankel, S. A: colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases, Am. J. Clin. Patrol., (28): pp.58-63. 1957.
- 9) Petkoba, J., Popova, N. and Kemi leva, Z.: Changes of enzyme activity in some organs following thy mectomy, Agressologie., 14(5): pp. 323-326. 1973.

-
- 10) Ohkwa, H., Ohishi, N., Yaki, K.: Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction, Anal Biochem., (95): pp.351-358. 1979.
- 11) Ellman, G. L.: Tissue sulfhydryl group, Arch. Biochem. Biophys., (82): pp.70-77. 1959.

타내었다.

(5) Catalase 활성 측정

조직내 Catalase 활성도는 Aebi의 방법¹²⁾에 따라 측정하였다. 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 효소원 일정량을 넣고 기질로서 10mM H₂O₂ 용액을 가하여 파장 240nm에서 흡광도의 변화를 2분간 측정하였다. 대조실험으로는 기질인 10mM H₂O₂ 용액 대신에 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)을 가해 다른 조건은 위와 동일하게 하여 흡광도의 변화를 측정하였으며 효소의 활성도는 1분 동안에 1 μM의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

6) 단백질 정량 및 통계처리

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법¹³⁾¹⁴⁾에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 단백질을 정량 하였다.

실험결과는 평균과 표준 편차로 표현하고 유의성 검증은 Sigma Plot(Window용 version 3.0)을 이용하여 unpaired t-test를 실시하였다.

12) Aebi, H.: In Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U. eds.), New York, Academic Press, pp.674-678. 1974.

13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent, J. Biol. chem., 193 pp.265-75, 1951

14) Daniel M. Bollag, Stuart J. Edelstein: Protein Method, New York, Wiley-liss, pp.56-59. 1991.

III. 實驗結果

1. DPPH radical 소거 효과

失笑散의 DPPH radical에 대한 소거 효과를 관찰한 결과 失笑散의 증량 1000, 800, 600, 400, 300, 200, 100, 50 μ g에서는 각각 67.76, 45.75, 39.87, 36.60, 24.62, 23.31, 18.95, 12.20, 5.01% 이었으며 蒲黃과 五靈脂도 마찬가지로 농도 의존적인 radical 소거 효과를 나타내었다(Table. I, Fig. 1).

Table I. Scavenging effect of Silsosan(SS), Typha orientalis(TO) and Trogopteris xanthipes(TX) on DPPH radical.

Mass unit (μ g)	Activity* (%)			
	BHT	SS	TO	TX
2000	98.75	67.76	51.21	48.29
1000	95.45	45.75	48.65	49.76
800	85.98	39.87	35.51	48.07
600	81.40	36.60	33.82	45.89
400	79.31	24.62	28.74	41.55
300	70.44	23.31	27.79	38.16
200	66.32	18.95	19.81	30.19
100	58.64	12.20	16.08	14.01
50	59.41	5.01	4.83	7.25

The effects of natural products on DPPH radical were determined according to the method of Hatano*. Natural Products in 4ml of distilled water were added to a methanolic solution of DPPH(1.5×10^{-4} M, 1ml). The mixture was shaken and left to stand at room temperature for 30min; the absorbance of the resulting solution was measured spectrophotometrically at 517nm(Control O.D. \Rightarrow 4ml of distilled water + 1ml of 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH). Butylated hydroxytoluene(BHT) is positive control.

*Radical Scavenging Activity(%) = [(control O.D. - Experimental O.D.) / Control O.D.] \times 100.

Each values are the mean of triplicate experiments.

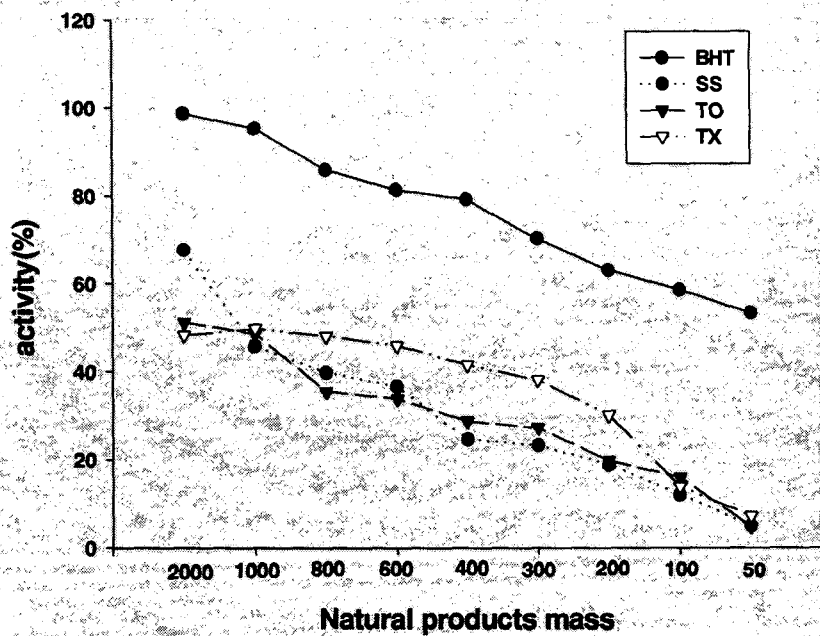


Fig. 1. Effect of the Siloson, *Typha orientalis* and *Trogopterus xanthipes* extract on DPPH radical scavenging activity.

2. 혈청중 AST 및 ALT 활성 변화

혈청중 AST 활성은 정상군이 39.83 ± 8.14 karmen unit/ml of serum 인데 비하여 각각의 실험동물을 CCl_4 로 간독성을 유발하였을 때 대조군은 152.09 ± 15.93 karmen unit/ml of serum 로 약 4배 이상 증가하였으며, 失笑散 투여군은 58.12 ± 5.14 karmen unit/ml of serum, 蒲黃 투여군은 69.22 ± 4.19 karmen unit/ml of serum 로 五靈脂 투여군은 83.73 ± 14.45 karmen unit/ml of serum 로 활성이 감소하였다 (Fig. 2).

혈청중 ALT 활성은 정상군이 13.17 ± 2.89 karmen unit/ml of serum 인데 비하여 독성유발 일주일 경과 후에는 대조군은 81.81 ± 5.60 karmen unit/ml of serum 로 약 4배 이상 증가하였으며 失笑散 투여군은 42.58 ± 4.96 karmen unit/ml of serum, 蒲黃 투여군은 38.42 ± 5.49 karmen unit/ml of serum 로 五靈脂 투여군은 39.45 ± 6.45 karmen unit/ml of serum 로 활성이 감소하였다 (Fig. 3).

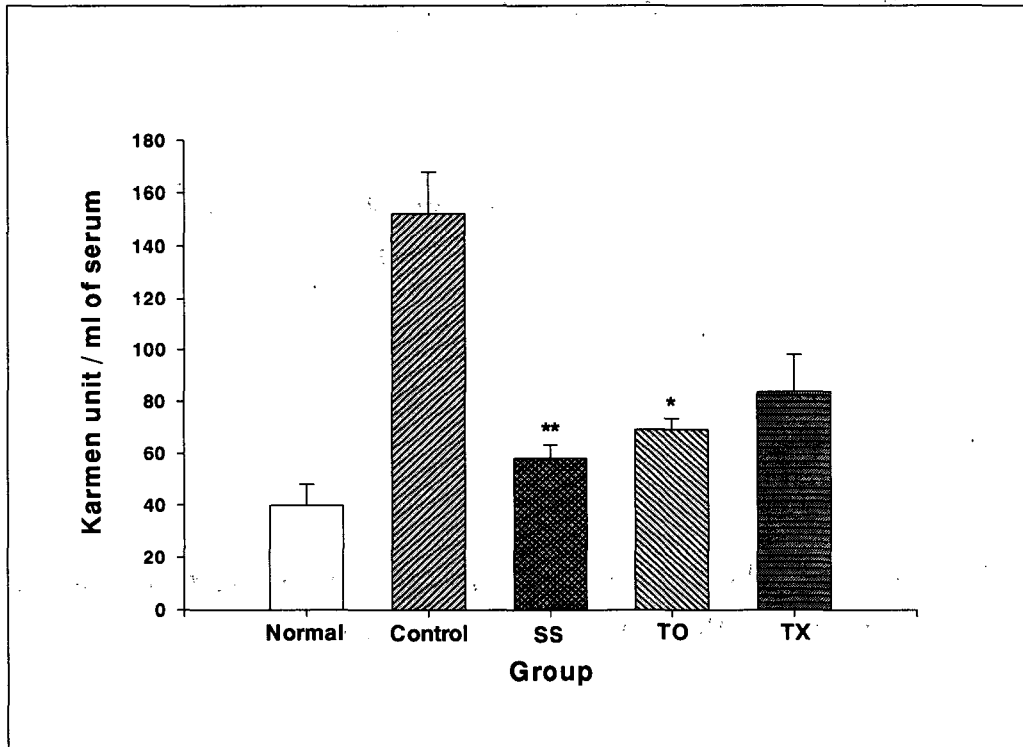


Fig. 2. Effect of the Silsosan, *Typha orientalis* and *Trogopterus xanthipes* extract on the activity of serum AST in CCl_4 -treated mouse.

** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$

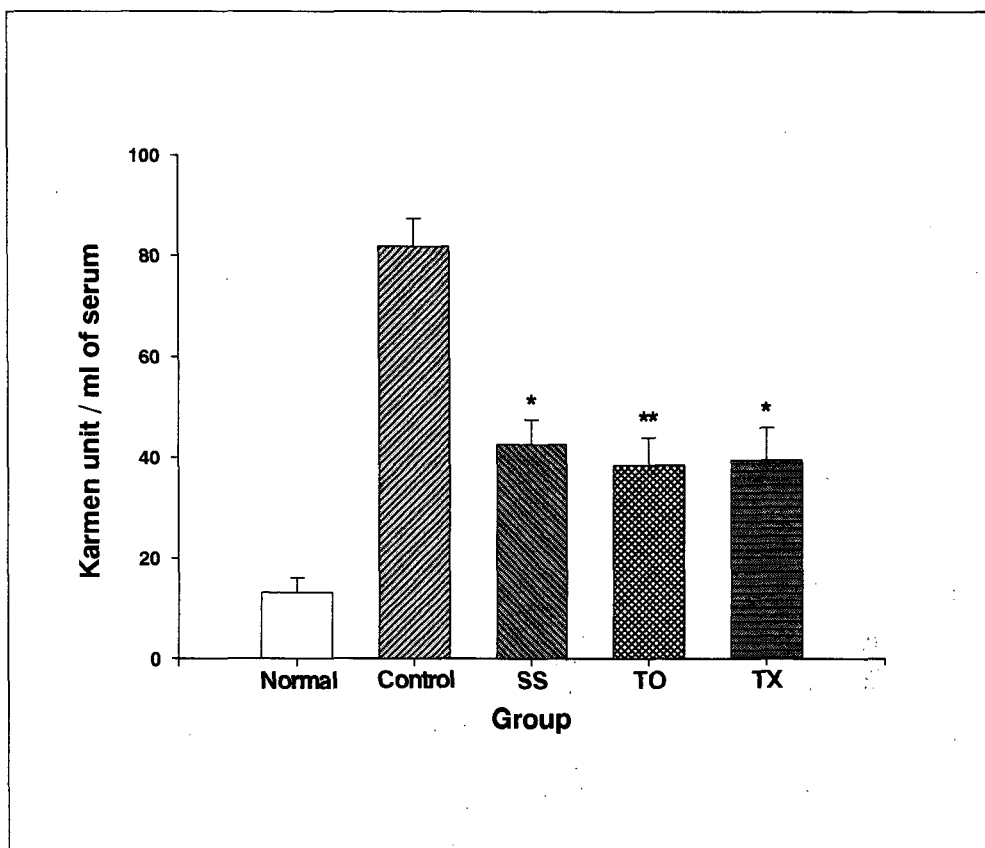


Fig. 3. Effect of the *Silsosan*, *Typha orientalis* and *Trogopterus xanthipes* extract on the activity of serum ALT in CCl₄-treated mouse.

** : P < 0.01, * : P < 0.05

3. 혈청중 ALP 활성 변화

각각의 실험 동물을 CCl₄로 간독성을 유발 하였을 때 혈청중 ALP 활성은 정상군에서는 32.09±5.54 King-Amstrong unit/dl of serum 인데 비하여 대조군에서는 83.70±10.04 King-Amstrong unit/dl of serum 로 약 2배 이상 증가하였으며, 失笑散 투여군은

54.22±6.45 King -Amstrong unit/dl of serum 이었고, 蒲黃 투여군에서는 50.83±12.83 King-Amstrong unit/dl of serum 이었으며, 五靈脂 투여군에서는 56.87±5.48 King-Amstrong unit/dl of serum 로 대조군 에 비해 감소하였다(Fig. 4).

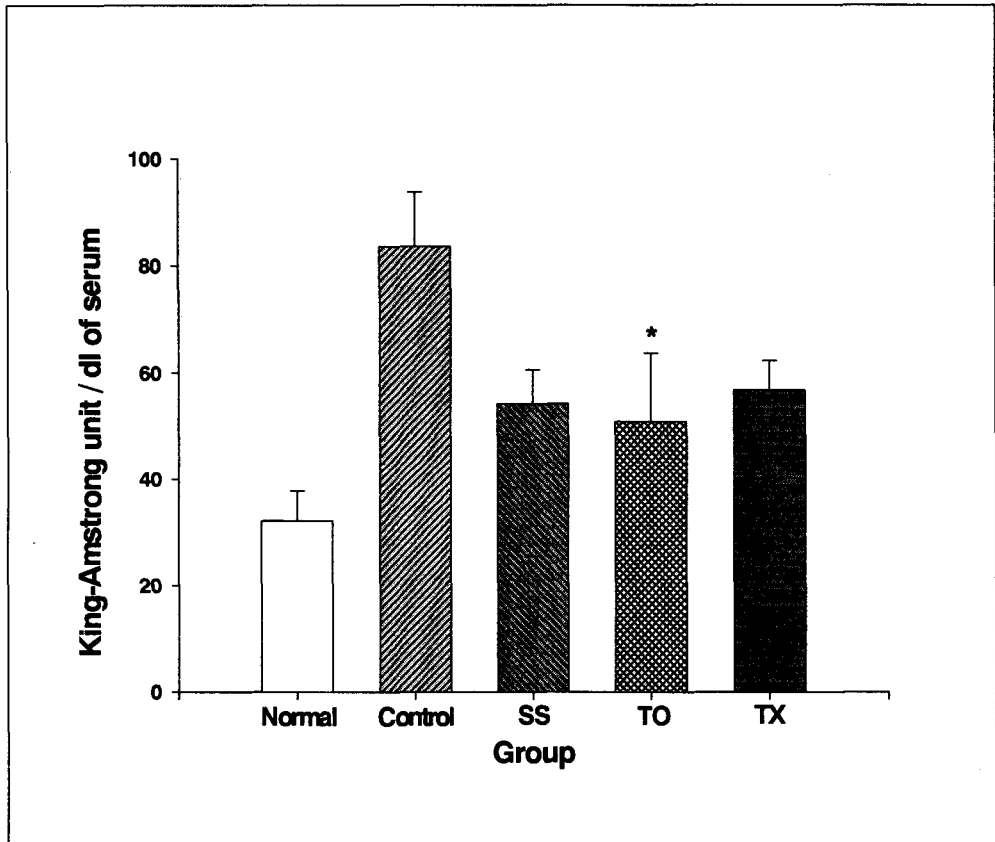


Fig. 4. Effect of the *Silsosan*, *Typha orientalis* and *Trogopterus xanthipes* extract on the activity of serum ALP in CCl₄-treated mouse.

* : P < 0.05

4. Lipid peroxide (LPO) 함량 변화

간에서의 정상군의 과산화지질 함량은 7.89 ± 1.49 MDA nmole / mg of protein 인데 비해 각각의 실험 동물을 CCl_4 로 간독성을 유발하였을 때 대조군은 32.04 ± 2.46 MDA nmole / mg of protein 으로 약 4배정도 증가

하였으나 失笑散 투여군은 26.44 ± 4.11 MDA nmole / mg of protein 이었으며, 蒲黃 투여군은 22.24 ± 1.63 MDA nmole / mg of protein 이었고 五靈脂 투여군은 28.19 ± 3.58 MDA nmole / mg of protein 으로 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 5).

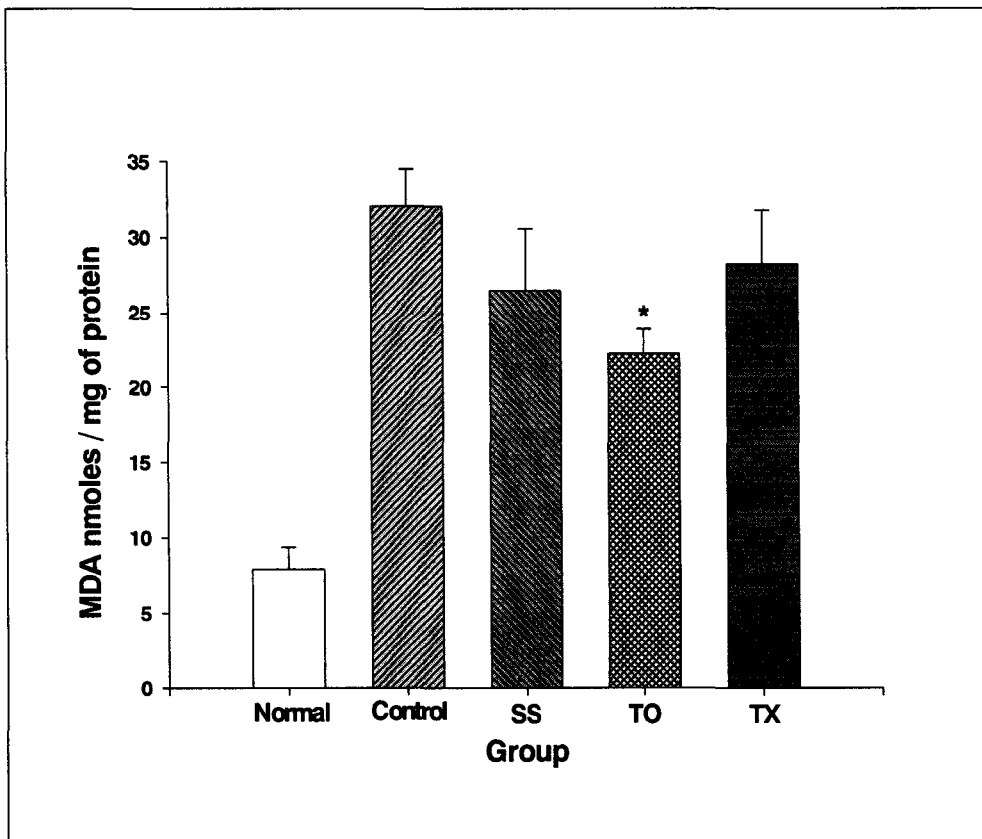


Fig. 5. Effect of the Silsosan, *Typha orientalis* and *Trogopterus xanthipes* extract on the level of hepatic lipid peroxide in CCl_4 -treated mouse.

* : $P < 0.05$

5. Glutathione (GSH) 함량 변화

간에서의 정상군의 GSH 함량은 4.59 ± 0.69 nmole / mg of protein 인데 비해 각각의 실험 동물을 CCl_4 로 간독성을 유발하였을 때 대조군은 1.92 ± 0.88 nmole / mg of protein 로 감소하였으나 失笑散 투여군은 3.53 ± 0.41

nmole / mg of protein 이었으며, 蒲黃 투여군은 3.43 ± 0.40 nmole / mg of protein 이었고, 五靈脂 투여군은 3.59 ± 0.70 nmole / mg of protein로 대조군에 비해 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다(Fig. 6).

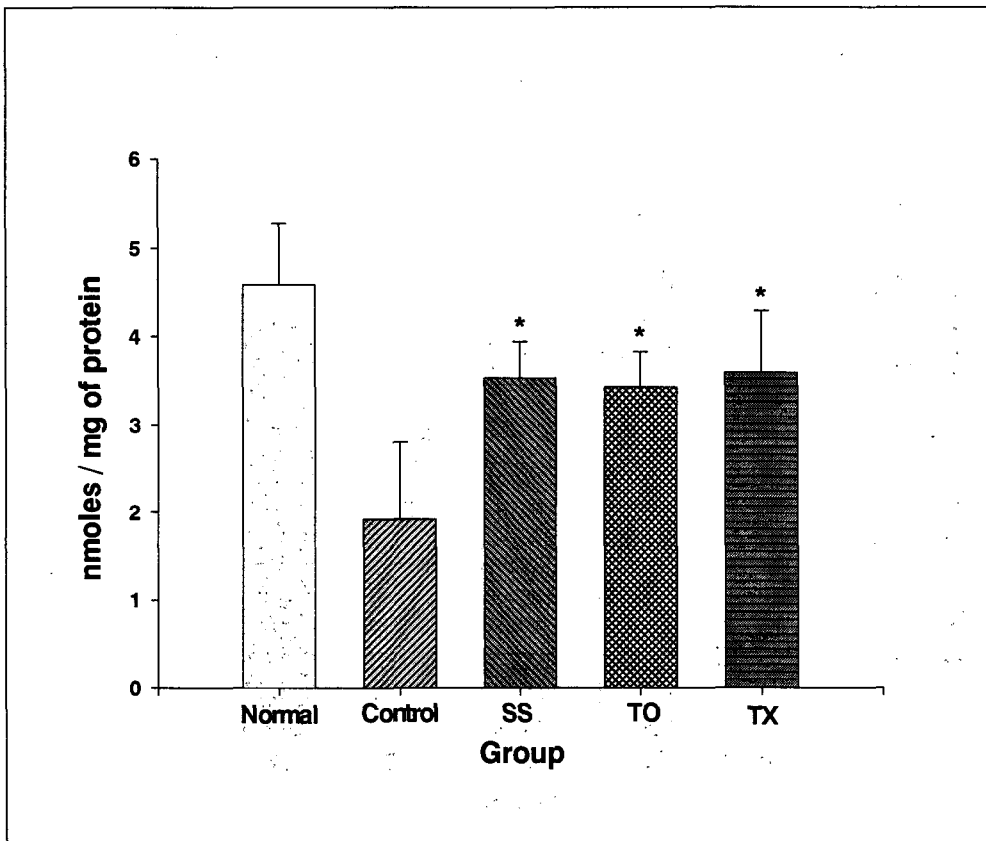


Fig. 6. Effect of the Silsosan, *Typha orientalis* and *Trogopteris xanthip es* extract on the level of hepatic in glutathione CCl_4 -treated mouse.

* : $P < 0.05$

6. Catalase 활성 변화

간에서의 정상군의 catalase ± 2.16 units / mg of protein 인데 비해 각각의 실험 동물을 CCl_4 로 간독성을 유발하였을 때 대조군은 8.17 ± 1.02 unit / mg of protein 으로 감소하였으나 失笑散 투여군은

11.33 ± 0.64 units / mg of protein 이었으며, 蒲黃 투여군은 10.35 ± 0.91 units / mg of protein 이었고, 五靈脂 투여군은 10.64 ± 0.87 units / mg of protein 대조군에 비해 유의성 ($p < 0.05$)있게 증가하였다(Fig. 7).

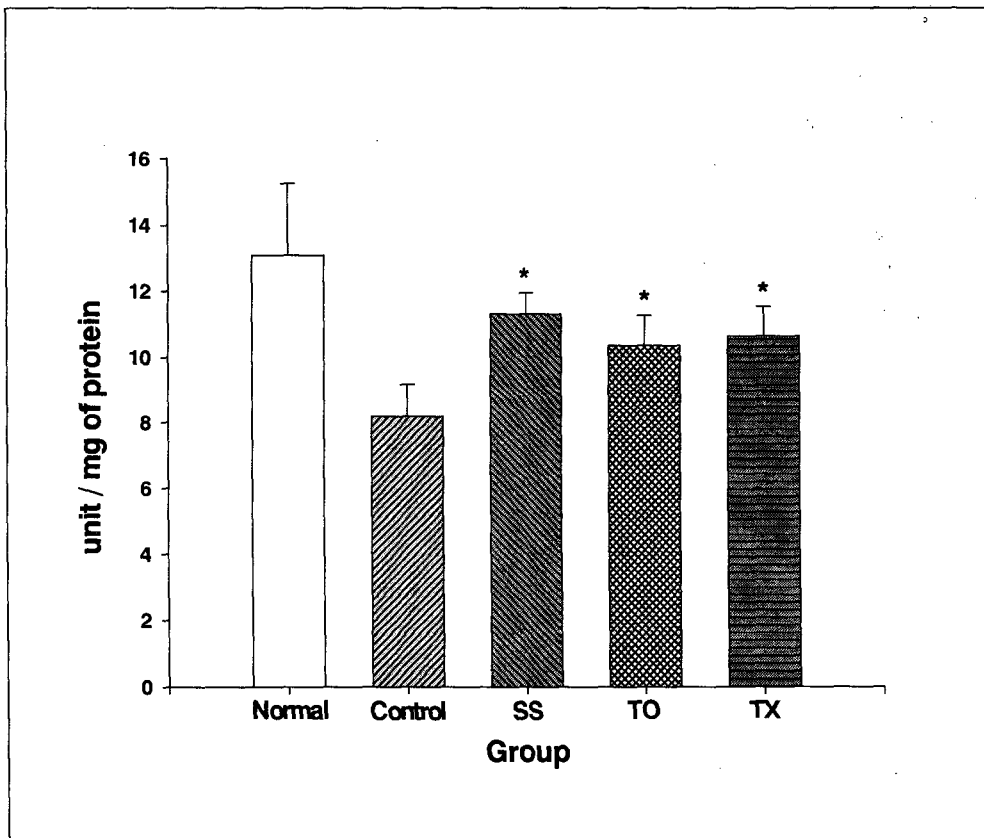


Fig. 7. Effect of the *Silsosan*, *Typha orientalis* and *Trogopterus xanthipes* extract on catalase activity of hepatic in CCl_4 -treated mouse.

* : $P < 0.05$

IV. 考 察

失笑散은 宋代 『太平惠民和劑局方』에서 “治産後心腹痛欲死 百藥不效 服此頓愈”라고 최초로 收載된 이래 많은 醫家들에 의해 배합 응용되어 온 處方이다. 失笑散이라 命名한 것은 産後 血瘀性 下腹痛이 “失笑”할 만큼 劇痛일 때에 祛瘀, 活血, 止痛, 去惡露의 작용으로 瘀血의 阻滯로 血行이 不暢하여 나타나는 모든 痛症을 다스린다고 하여 유래된 것이다¹⁵⁾. 異名으로는 斷弓弦散, 紫金丸이라고도 불리워지며¹⁶⁾, 同名異方으로서는 荊芥穗朴硝로 구성되어 腎腫을 治하는 『潔古家珍』의 失笑散, 葶撥 細辛 冰片으로 구성되어 牙痛을 治하는 『瘍醫大全』의 失笑散 등이 있다. 本方의 구성 및 복용법은 蒲黃(炒香) 五靈脂(酒研 淘去砂土)를 等分하여 이를 가루내고 食醋 2錢에 타서 끓여 膏가 되게 하고 이를 물 1盞에 넣어 7분이 되도록 달인. 후 食前에 熱服한다¹⁷⁾.

蒲黃은 『神農本草經』에서 “主心腹膀胱寒熱利小便 止血 消瘀血”이라 하여 收澁止血, 活血行瘀, 利尿通淋하는 효능이 있으며 그 主治證으로는 토혈, 각혈, 늑혈, 변혈, 뇨혈, 붕누, 외상출혈 등의 각종 出血證과 혈어로 인한 경통, 경폐, 산후오로불하, 소복동통, 심복동통, 타박손상증, 癥瘕 등증과 外敷하여 重舌口瘡 聾耳流膿 耳中出血 陰下濕痒 등의 병증 치료에 응용하고 있다¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾. 성분으로는

isorhamnetin의 glycoside, pentacosane, 精油 및 脂肪油가 함유되어 있으며 이외에도 palmitin acid, stearin acid, olein acid의 glycoside, α -typhasterol이 함유되어 있어서 심혈관에 대한 수축 및 말초혈관의 확장과 강압, 동맥내피세포에 대한 보호, 강혈지 및 항동맥죽상경화, 지혈, 이뇨, 자궁수축, 항염면역, 항결핵작용 등이 있다²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾.

五靈脂는 開寶本草에 “主療心腹冷氣 小兒五疳 辟疫 治腸風 通利氣脈 女子月閉”라고 최초로 기재되어 있다. 活血止痛, 化瘀止血, 解毒의 효능이 있어 瘀血로 인한 胸腹脇肋의 刺痛, 經閉, 經痛, 産後瘀血痛, 疝氣痛, 打撲損傷 등에 사용하며 炒用하면 瘀血을 제거하고 止痛하는 작용이 있어서 子宮出血, 月經過多 치료에도 사용한다²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾. 성분으로는 vitamin A類 물질과 樹脂, 尿素, 尿酸 등을

1991

19) 王浴生 主編: 前掲書, p.1169-1175

20) 雷載權 外 主編: 中華臨床中藥學, 北京; 人民衛生出版社, p.1264-1267, 1998

21) 陳可背 主編: 抗衰勞中藥學, 北京; 中醫古籍出版社, p.130-132, 1989

22) 王浴生 主編: 中藥藥理與應用, 北京; 人民衛生出版社, p.1169-1175, 1983

23) 中藥辭海, 北京; 中國醫藥科技出版社, p.1102-1107, 1977

24) 周金黃 外 主編: 中藥藥理學, 上海; 上海科學技術出版社, p.206-209, 1986

25) 康秉秀 外 編著: 本草學, 서울; 永林社, pp.401-402, 425-426, 1992

26) 康秉秀 外 編著: 臨床配合本草學, 서울; 永林社, p.390-391, 443-444, 1994

27) 鄒煥然 外: 廣東醫學 (2); p.21, 1966

15) 申載鏞 編著: 前掲書,

pp.275-276

16) 彭懷仁 主編: 中華名義方劑大典, 北京; 金盾出版社, pp.193-194, 1990

17) 太平惠民和劑局 編: 太平惠民和劑局方, 北京; 人民衛生出版社, p.342, 1985

18) 丁兆夢 編著: 中藥藥效與臨床, 北京; 中國醫藥科技出版社, p.445-446,

함유하고 있어서 평활근의 痙攣을 弛緩시켜 鎮痛作用이 있고 결핵균 피부진균에 대하여 억제작용이 있으며 백혈구를 증가시키는 작용도 있다²⁸⁾.

또한 食醋나 黃酒로 沖服하면 血脈을 활발하게 하여 藥의 효력을 行하게 하며 瘀血을 化하게 함으로써 活血止痛作用을 강하게 한다.

이러한 蒲黃, 五靈脂의 조성으로 失笑散은 活血祛瘀, 散結消腫의 효능이 있는데 역대 임상적으로 本方을 응용한 主治를 살펴보면 『太平惠民和劑局方』의 治婦人諸疾篇에서는 瘀血內阻로 인한 月經不調, 小腹急痛, 產後腹痛, 惡露不行 등을 治하였으며 『蘇沈良方』에서는 小腸氣를 治하는데 응용하였으며 『本草綱目』에서는 婦人 뿐만 아니라 男女老幼의 一體 心腹脇肋小腹痛, 疝氣를 治한다고 하였으며 『婦人良方大全』을 비롯한 『醫學心悟』 『醫門寶鑑』 『濟陰綱目』 등 많은 醫書에서는 兒枕痛에 응용한다고 하였다.

失笑散의 藥理作用으로는 抗心筋貧血作用, 血脂·動脈粥狀硬化 低下作用, 抗血小板聚集作用, 鎮靜降壓作用, 산소결핍에 대한 耐受性 增進作用 등이 있다²⁹⁾³⁰⁾. 임상에서는 失笑散에 加味하여 婦科의 流産, 痛經, 崩漏, 不妊, 惡露不下, 子宮外妊娠 등증과 冠狀動脈病, 子宮內膜異位證, 上部 消化管 出血, 反胃, 慢性胃炎, 幽門硬塞, 十二指腸潰瘍, 病毒性 肝炎, 紫癍 등에 응용하여 有效하다고 보고되고 있다³¹⁾³²⁾³³⁾³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾.

이외에도 임상적으로 秦³⁹⁾은 腦血栓症에, 陳⁴⁰⁾은 血尿에, 上⁴¹⁾은 石淋과 肛裂에, 張⁴²⁾은 非化膿性 肋軟骨炎에, 林⁴³⁾은 脫髮에 失笑散을 투여하여 모두 효과가 있음을 보고하였다. 이들은 病名은 다르지만 그 病機는 같아 모두 瘀血內阻로 인한 病證에 속하는 경우들이다.

간은 인체의 모든 대사 기능의 중심이 되며 유독물질에 대한 해독작용을 하는 장기이기 때문에 간의 심한 손상은 인체의 치명적

33) 湖南科技情報, (13); p.29, 1972

34) 黃泰康 外 主編: 中藥方劑現代研究大典, 北京; 科學出版社, pp. 379-380, 1996

35) 陳奇 主編: 中成藥名方藥理與臨床, 北京; 人民衛生出版社, pp. 718-719, 1998

36) 王新民 外 主編: 名方新用, 北京; 中國中醫藥出版社, pp.302- 306, 1998

37) 龐國明 外 主編: 常用名方新用途, 北京; 北京科學技術出版社, pp.319-323, 1996

38) 謝鳴 主編: 中醫方劑現代研究, 北京; 學苑出版社, pp.1084- 1086, 1997

39) 秦玉梅: 中藥通報, (5); p.57, 1986

40) 陳禮祥: 中西醫結合雜誌. (3); p.181, 1984

41) 上官鈞 外: 遼寧中醫雜誌, (3); p.40, 1991

42) 張長順: 失笑散外治非化膿性肋軟骨炎, 江蘇中醫, 9(6); p.35, 1988

43) 林治虎: 山東中醫雜誌, 8(4); p.21, 1989

28) 中國防癆雜誌 5(3); p.488, 1964

29) 謝鳴 主編: 中醫方劑現代研究, 北京; 學苑出版社, pp.1084- 1086, 1997

30) 白剛 外 主編: 中藥方劑研究與應用大典, 北京; 中國科學技術出版社, pp.328-329, 1995

31) 白剛 外 主編: 上揭書, pp.329- 331

32) 李俊彪: 新醫學 (7); p.366, 1932

결과를 초래한다⁴⁴⁾⁴⁵⁾. 간 손상을 일으키는 물질로는 CCl_4 , chloroform, phosphorus, dimethyl nitroacetamide 등이 있다.

특히 CCl_4 는 전형적인 간손상을 일으켜 혈청 transaminase의 상승 등 각종 효소 활성에 변화를 초래하며, 형태학적인 급성 변화로는 간세포의 종창, 지방성 혹은 소엽중심성 괴사 등이 일어나고⁴⁶⁾ 만성 변화로는 간경변증을 초래하는 것으로 알려져 있다. Glynn과 Himaworth⁴⁷⁾가 간손상에 대해 보고한 이래 간독성 물질의 표본으로서 수많은 연구가 진행되어 왔으며, 간중독 현상은 triglyceride의 축적에 의한 지방성 간소엽 중앙부 괴사 및 간세포의 organic transport system의 파괴 등을 주로 들 수 있다. CCl_4 에 의한 간손상의 기전은 아직 확실히 규명되지 않았으나 cytochrome p-450-dependent monooxygenase에 의해 대사되어 trichloromethyl radical 등을 생성하므로 이들이 간세포막 인지질의 peroxidative destruction을 유발시킨다는 학설이 유력시되고 있다. 또한 동물의 간에 대해 인간에서와 유사한 전형적인 간염을 일으키는 것으로 실험적인 간손상에 대응되고 있다. 산소를 이용하는 생물체의 정상적인 대사

과정에서 지속적으로 super-oxide anion(O_2^-), hydroxyl radical(OH^\cdot)과 hydrogen peroxide (H_2O_2) 등 반응성이 큰 활성 산소종이 생성된다는 증거들이 제시되었다⁴⁸⁾. 그리고 radical에 의해 세포막 인지질의 불포화지방산에 의해 생성된 불안정한 지질 과산화물들이 분해에 의해 이차적인 radical들을 생성할 수도 있다⁴⁹⁾.

생체내에서는 radical들을 효과적으로 제거하기 위한 여러 효소 및 항산화제들이 존재한다. 효소로는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등이 있는데 SOD는 우선 O_2^- 를 H_2O_2 로 변환시키며 peroxisome의 catalase는 H_2O_2 를 무해한 물과 산소로 분해하며 glutathione peroxidase는 H_2O_2 를 물로 변환시킨다⁵⁰⁾.

간臟이 어떤 침해를 받아서 간조직의 일부가 병변을 일으킨 경우에는 자신이 갖고 있는 예방력과 재생력으로 기능상의 변조를 억제하거나 혹은 병변을 급격히 심화됨을 방지하거나 병변의 재생을 완화하는 현상이 나타난다. 예를 들면 CCl_4 와 같은 물질에 의해 간이 손상받으면 이를 회복하기 위하여 생체내에서의 radical들을 효과적으로 제어하는 항산화반응이 활성화되리라고 여겨진다.

44) 金秉雲 外: 肝系內科學, 서울; 東洋醫學研究院, p.24, 1980

45) 李文鎬 外: 內科學(上), 서울; 博愛出版社, pp.967-968, 1965

46) Ashburn, L. L., endicott, K. M. Daft, F. S. and Little, R.D.: The nonportal distribution of the trabecule in dietary cirrhosis of rats and guinea pigs. Am. J. Path. 23; p.159, 1947

47) Glynn, L. E. and Himsworth, H. P.: The intra cellular circulation in acute liver injury by carbon tetrachloride. clin. sci. 6: p.235, 1948

48) Chance, B., Sies, H. and Boveris, A.: Phys. Rev., 59; pp.527-605, 1979

49) Cross, E.C., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., Mccord, J.M. and Harman, D., Ann.: Intern. Med., pp.197, 526-545, 1987

50) Aitor, A. ed.: Pathology of Oxygen. Academic Press, Newyork. 1982

失笑散의 活血化癥, 散結消腫효능은 이러한 항산화반응의 활성화와 관련성이 추정되므로 세포내에서 항산화 효소유전자의 발현능을 失笑散과 관련지어 실험적으로 조사하는 것은 의의가 있으리라 여겨진다. 따라서 CCl₄로 유발된 간 손상에 대해 失笑散과 蒲黃, 五靈脂가 간기능회복능과의 연관성을 관찰하려고 DPPH radical 소거 효과 측정, 혈청 및 간조직 중에서 AST, ALT, ALP 및 lipid peroxide(LPO), glutathione(GSH) 함량, catalase의 활성을 살펴본 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

일반적으로 항산화제는 DPPH radical에 전자 혹은 수소원자를 공여함으로써 불안정한 형태의 DPPH radical을 보다 안정한 형태로 변환시키는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서 失笑散은 농도 의존적인 자유기 소거능을 보임에 따라 失笑散의 항산화력은 약물내에 함유되어 있는 수용성 성분이 수소 혹은 전자를 자유기에 공여함으로써 활성이 강한 자유기를 보다 안정된 형태의 화합물로 변환시킴을 알 수 있었다.

AST, ALT는 아미노산으로부터 유리되는 아미노기를 알파케토산으로 전이시키는 전이 효소로서 모두 간세포 중 세포질에 분포하고 있으며 조직에 장애가 생기면 혈액 중으로 다량 유출되기 때문에 혈청 효소 활성은 증가한다. 그러나 분자량이 크므로 조직에 현저하게 농도가 높고, 혈중으로도 유출이 쉬운 혈행구조를 갖고 있는 심근, 간, 근육, 혈구에 장애가 있으면 혈청 효소 활성은 증가하지만 다른 장기에 손상이 있으면 거의 증가하지 않는다. 그러므로 간 기능 및 손상 정도를 측정하는 지표로 널리 이용되고 있다⁵¹⁾.

51) Retman, S. and Frankel, S. A.: colorimetic method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases, Am. J. Clin. Patol.,

혈청중 AST 활성은 대조군에서는 정상군에 비하여 약 4배 이상 증가하였으며 오령지 투여군, 포황투여군, 실소산투여군의 순으로 효소 활성이 유의성 있게 감소하였다. 혈청중 ALT 활성은 대조군에서는 정상군에 비하여 약 4배 이상 증가하였으며 투여군들 모두 비슷하게 활성이 감소하였다. 또한 약물 투여군들간의 활성은 큰 변화를 보이지 않았다.

ALP는 가수분해효소의 하나로서 세포 분획중 가용성 분획에 다량으로 분포되고 있으며 이 효소에는 isoenzyme이 존재하며 혈중 ALP의 활성은 isoenzyme의 총화이고 간염, 황달, 간경변, Paget병 등의 질환이 있을 때 혈중 ALP의 분포량이 증가된다고 알려져 있어 혈액중의 ALP 활성을 측정하므로써 간 기능 손상 여부를 알 수 있다⁵²⁾.

혈청중 ALP 활성 변화는 대조군이 정상군에 비해 약 2배 이상 증가하였으며 약물 투여군들 모두 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 특히 투여군 중에서는 포황이 상대적으로 가장 많이 감소하였다.

LPO의 함량은 생리조직중에서 생화학적 조직 손상의 척도로 널리 이용되며 조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로도 활용되어 진다. LPO는 세포막의 지질 성분이 독성물질들에 의해서 손상을 받게 되면 지질성분의 산화반응이 촉진되어 나타나는 반응산물이다^{53/54)}.

(28): pp.58-63, 1957.

52) Higashi, T., Tateishi, N. and sakamoto, Y.: Liver glutathione as a reservoir of L-cystine. In : Sulfur Amino Acids, : Biochemical and Clinical Aspects, Alan R. Liss, New York, pp.397-410. 1983.

53) David, R.: Mechanistic toxicology; A radical perspective. J.P harm. pharmacol., pp.41, 505-511. 1989.

간에서의 LPO의 함량은 대조군이 정상군에 비해 약 4배 정도 증가하였으며 약물 투여군은 대조군에 비하여 감소하였다.

Glutathione은 생체 내에서 생합성되어지는 tripeptide로서 구조가 단순하면서도 활발한 생리작용을 지니고 있다. 이는 간장에서 주로 생성되며 여러 장기에 널리 분포하는 해독물질이다⁵⁵⁾. 또한 외부에서부터 유입되어 들어온 해독물질들과 쉽게 포합반응을 하여 체외로 배출시키는 생화학적 기능을 지니고 있으므로⁵⁶⁾ 조직중의 glutathione 함량의 측정은 독성물질에 대한 생체의 방어능력을 간접적으로 측정할 수 있을 것이다.

실험 결과 간에서의 glutathione 함량은 대조군에서는 정상군에 비하여 감소하였으나 약물투여군에서는 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다.

catalase는 세포내 존재하는 항산화 효소로 H₂O₂를 분해하여 제거하는 작용을 가진다⁵⁷⁾.

간에서의 catalase 활성은 대조군이 정상군에 비하여 감소하였으나 약물투여군들에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 mouse에 CCl₄를 투여하여 유도된 간손상으로 AST, ALT, ALP 등의 효소 활성치의 상승이 나타났으며, 또한 과산화 지질의 함량을 증가시키며 이와 더불어 활성산소류의 생성을 증가시켜 분해계 효소인 glutathione 함량, catalase 활성을 감소시키는 것이 확인되었다. 이에 비해 失笑散 투여 약물투여군에서는 효소 활성치 및 과산화 지질 함량의 유의성 있는 감소가 나타났으며, 분해계 효소인 glutathione 함량, catalase 활성의 유의성 있는 증가를 보였다.

따라서 CCl₄로 유도된 간손상에 대한 간기능의 회복능에 失笑散이 유효한 것으로 확인되었으며 이는 CCl₄로 야기된 radical의 생성 및 독성의 완화, 방어기능의 증가를 추측할 수 있다.

-
- 54) Barry, H.: Oxidants and human disease : Some new concepts, FASEB. J., pp.1, 358-364. 1987.
 - 55) Boyland, E. and Chasseud, L. F.: The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. ADV. Enzymol., 32: pp.173-219. 1969.
 - 56) Ross, D.: Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents : mechanism of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. Pharmacol. Ther., 37(2): pp.231-239. 1988.
 - 57) Ross D and Moldeus P: Antioxidant defence systems and oxidative stress. In: Membrane Lipid Oxidation, ed. by

V. 結 論

失笑散과 蒲黃, 五靈脂가 항산화 효과와 관련하여 간독성에 대한 기능 회복에 미치는 영향을 검증하기 위하여 DPPH radical 소거 효과 측정, 혈청 및 간조직 중에서 AST, ALT, ALP 및 lipid peroxide (LPO), glutathione (GSH) 함량, catalase의 활성을 관찰한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

Vigo-Pelfrey C., Vol II, CRC Press, Boston, pp.151-170. 1993.

1. 각 약재 추출물은 DPPH radical에 대한 농도 의존적인 소거능을 나타내었다.
2. AST, ALT는 약물투여군이 대조군에 비해 활성이 감소하였다.
3. ALP는 약물투여군이 대조군에 비해 활성이 감소하였다.
4. LPO 함량은 약물투여군이 대조군에 비해 감소하였다.
5. GSH 함량 및 Catalase 활성은 약물투여군이 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다.

< 參考文獻 >

1. 許浚: 東醫寶鑑, 서울; 大星文化社, 1992
2. 太平惠民和劑局 編: 太平惠民和劑局方, 京; 人民衛生出版社, 1985
3. 韓醫科大學方劑學教授 共著: 方劑學, 서울 永林社, 1999
4. 李尙仁 朴宣東 外: 方劑學, 서울; 永林社, 1999
5. 康秉秀 外 編著: 臨床配合本草學, 서울; 永林社, 1994
6. 康秉秀 外 編著: 本草學, 서울; 永林社, 1992
7. 金秉雲 外: 肝系內科學, 서울; 東洋醫學研究院, 1980
8. 李文鎬 外: 內科學(上), 서울; 博愛出版社, 1965
9. 雷載權 外 主編: 中華臨床中藥學, 北京; 人民衛生出版社, 1998
10. 龐國明 外 主編: 常用名方新用途, 北京; 北京科學技術出版社, 1996
11. 白剛 外 主編: 中藥方劑研究與應用大典,

北京; 中國科學技術出版社, 1995

12. 謝鳴 主編: 中醫方劑現代研究, 北京; 學苑出版社, 1997
13. 謝鳴 主編: 中醫方劑現代研究, 北京; 學苑出版社, 1997
14. 王新民 外 主編: 名方新用, 北京; 中國中醫藥出版社, 1998
15. 王浴生 主編: 中藥藥理與應用, 北京; 人民衛生出版社, 1983
16. 丁兆夢 編著: 中藥藥效與臨床, 北京; 中國醫藥科技出版社, 1991
17. 周金黃 外 主編: 中藥藥理學, 上海; 上海科學技術出版社, 1986
18. 陳可背 主編: 抗衰勞中藥學, 北京; 中醫古籍出版社, 1989
19. 陳奇 主編: 中成藥名方藥理與臨床, 北京; 人民衛生出版社, 1998
20. 彭懷仁 主編: 中華名義方劑大典, 北京; 金盾出版社, 1990
21. 黃泰康 外 主編: 中藥方劑現代研究大典, 北京; 科學出版社, 1996
22. 上官鈞 外: 遼寧中醫雜誌, (3); 1991
23. 李俊彪: 新醫學 (7); 1932
24. 林治虎: 山東中醫雜誌, 8(4); 1989
25. 張長順: 失笑散外治非化膿性肋軟骨炎, 江蘇中醫, 9(6); 1988
26. 中國防癆雜誌 5(3); 1964
27. 中藥辭海, 北京; 中國醫藥科技出版社, 1977
28. 陳禮祥: 中西醫結合雜誌. (3); 1984
29. 秦玉梅: 中藥通報, (5); 1986
30. 鄒煥然 外: 廣東醫學 (2); 1966
31. 湖南科技情報, (13); 1972
32. 徐敏華: 失笑散이 Endotoxin으로 유발된 白鼠의 血栓症에 미치는 영향, 원광대학교 대학원 석사논문, 1992
33. 尹彩珍: 失笑散이 mouse 자궁근 수축력 및 자발운동에 미치는 영향, 원광대학교 대학원 석사논문, 1983
34. Boyland, E. and Chasseud, L. F.: The role of glutathione and glutathione

- S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *ADV. Enzymol.*, 32: 1969.
35. Petkoba, J., Popova, N. and Kemileva, Z.: Changes of enzyme activity in some organs following thymectomy, *Agressologie.*, 14(5): 1973.
36. Aebi, H.: In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U. eds.), New York, Academic Press, 1974.
37. Ashburn, L. L., endicott, K M. Daft, F. S. and Little, R.D.: The nonportal distribution of the trabecule in dietary cirrhosis of rats and guinea pigs. *Am. J. Path.* 23: 1947
38. Autor, A. ed.: *Pathology of Oxygen*. Academic Press, Newyork. 1982
39. Barry, H.: Oxidants and human disease : Some new concepts, *FASEB. J.*, 1987.
40. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A.: *Phys. Rev.*, 59: 1979
41. Cross, E.C., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., Mccord, J.M. and Harman, D., *Ann. Intern. Med.*, 1987
42. Daniel M. Bollag, Stuart J. Edelstrein: *Protein Method*, New York, Wiley-liss, 1991.
43. David, R.: Mechanistic toxicology: A radical perspective. *J.P. harm. pharmacol.*, 1989.
44. Ellman, G. L.: Tissue sulfhydryl group, *Arch. Biochem. Biophys.*, (82): 1959.
45. Glynn, L. E. and Himsworth, H. P.: The intra cellular circulation in acute liver injury by carbon tetrachloride. *clin. sci.* 6: 1948
46. Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T.: Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* (36): 1988
47. Higashi, T., Tateishi, N. and sakamoto, Y.: Liver glutathione as a reservior of L-cystine. In : *Sulfur Amino Acids, Biochemical and Clinical Aspects*, Alan R. Liss, New York, 1983.
48. Lowry, O. H., Rosehrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. chem.*, 193 1951
49. Ohkwa, H., Ohishi, N., Yaki, K.: Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction, *Anal Biochem.*, (95): 1979.
50. Retman, S. and Frankel, S. A.: colorimetic method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Patol.*, (28): 1957.
51. Retman, S. and Frankel, S. A.: colorimetic method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Patol.*, (28): 1957.
52. Ross D and Moldeus P: Antioxidant defence systems and oxidative stress. In: *Membrane Lipid Oxidation*, ed. by Vigo-Pelfrey C., Vol II, CRC Press, Boston, 1993.
53. Ross, D.: Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents : mechanism of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. *Pharmacol. Ther.*, 37(2): 1988.