

원 저

加味行滯湯 合 六味地黃湯이 Oxidant 및 Hg에 의한 가토 간세포손상에 미치는 영향

이 수행, 김 원일, 김 우환
동의대학교 한의과대학 비계내과학교실

The Effect of *Kamihaengche-tang* Plus *Yukmijihwang-tang* on Oxidant and Hg-induced Rabbit's Liver Cell Injury

Soo-Haeng Lee, Won-Il Kim, Woo-Hwan Kim

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine Donggeui University.

Objectives : This study was carried out to determine whether *Kamihaengche-tang* plus *Yukmijihwang-tang* (KCYH) exerts a protective effect against oxidant-induced liver cell injury.

Methods : Cell injury was estimated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) and alanine aminotransferase (ALT) release, and lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde, a product of lipid peroxidation in rabbit liver slices.

Results : Oxidants (tBHP and H₂O₂) increased dose-dependently LDH release which was significantly prevented by 1% KCYH. The protective effect of KCYH against oxidant-induced cell injury was dose-dependent in the range of 0.05-1% concentrations. Similarly, KCYH inhibited oxidant-induced lipid peroxidation in a dose-dependent manner. When liver tissues were exposed to Hg (0.5 mM), ALT activity in the medium and lipid peroxidation in tissues were markedly increased. These changes were prevented by 1% KCYH. KCYH restored toxicant-induced inhibition of cellular GSH content. KCYH increased the activities of catalase and glutathion peroxidase in oxidant-treated tissues.

Conclusions : These results indicate that KCYH exerts a protective effect against oxidant-induced liver cell injury, and this effect is attributed to prevention of lipid peroxidation. These effects may be due to an increase in concentration of endogenous antioxidants.. (J Korean Oriental Med 2002;23(3):174-187)

Key Words: *Kamihaengche-tang*, *Yukmijihwang-tang*, liver cell, oxidant.

서 론

體陰而用陽이라 불리우는 간의 생리는 기능활동면

인 疎泄작용과 구조적면인 藏血기능을 가지고 있는 바, 간음과 간양사이에 평형조화가 유지될 때 정상적인 생리작용을 수행하지만 균형이 깨어지면 부족, 태과의 현상이 일어난다. 간의 병기는 간양의 疎泄과 간음의 藏血失調 및 간음양의 상호 의존제약관계의失常으로 나타나는데, 그 특징은 肝陽, 肝氣는 항상 有餘하고 肝陰, 肝血은 항상 부족함에 있다.

· 접수 : 2002년 6월 18일 · 채택 : 2002년 7월 11일
· 교신저자 : 김원일, 울산광역시 남구 신정동 479-13 동의대학교 울산한방병원 3내과 김 원일
(052-226-8103, Fax번호: 052-226-8177, e-mail: omdstar@dongeui.ac.kr)

흔히 만성간질환은 疎泄작용의 실조로 肝氣鬱結되어 목극토의 병리변화가 脾의 運化·升清작용과 胃의 腐熟·降濁작용에 영향을 미쳐 肝脾不和·肝胃不和로 나타나고, 藏血기능의 실조는 肝陰이 부족되어 肝腎相生과 水生木의 이론대로 腎陰부족으로 병발되는 등 肝·脾·腎兼證으로 나타난다¹⁹⁾.

반응성산소기들(reactive oxygen species)은 약물이 나 방사선조사와 같은 외부요인에 의해서 발생되기도 하고, 인체내 세포의 정상적인 대사과정 중에 발생하는 바, 이들은 세포막의 이온전달물질이나 단백질 유전자 등을 공격하여 노화를 촉진시키거나 암의 발생, 간손상, 동맥경화, 당뇨 등의 질병을 유발시키는 인자로 알려지고 있다¹⁰⁻¹⁴⁾.

특히 간장은 당, 단백질, 지방대사의 중추기관이 되어 영양물질의 합성, 전환 및 분해 등의 매우 많은 대사기능을 갖고 있을 뿐 아니라, 생체내 유해물질에 대한 해독작용도 하는데 그 기능 대부분을 간세포에서 하고 있다¹⁵⁾. 따라서 이들 대사과정에서 발생하는 반응성산소기들을 제거하거나 이들의 독성효과를 방지하는 것은, 점차 증가추세에 있고 만성화되어가는 간장질환의 예방 및 치료에 중요한 지표가 될 것이다.

간조직에서 항산화에 대한 실험적 연구는 단미제로 윤 등¹⁶⁾이 鹿茸藥針제제, 이 등¹⁷⁾은 白何首烏藥針제제로 한 등¹⁸⁾은 鱗鱗를, 복합제로는 김¹⁹⁾이 宣鬱通經湯으로 항산화효과를 보고하였고, 장 등²⁰⁾은 六味地黃湯이 과산화지질의 함량을 저하시켜 노화를 억제한다는 실험보고가 있었지만, 한의학 기본이론인 臟腑兼證의 논치에 입각한 肝·脾·腎 三臟의 併合方에 의한 간조직에 대한 실험은 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 임상가에서 만성간질환에 平肝健脾의 목적으로 다용되고 있는 배²¹⁾의 경험방인 加味行滯湯과, 항산화에 대해 실험적으로 입증되고^{20,22)} 肝腎同源의 치료이론^{3,5,7)}에 준한 補腎陰이 주효인 六味地黃湯을 합방한 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 간세포에서의 항산화효과를 확인해 보고저 가토의 간조직에

Oxidant인 t-butylhydroperoxide(tBHP) 및 H₂O₂와 간에 심한 독성을 나타내는 Hg로 처리하여 간세포 손상을 유발시키고, 본탕이 이러한 간세포 손상을 방지할 수 있는지를 관찰하였던 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

실험에 사용한 동물은 체중 1.5-2.0kg 되는 성숙한 뉴질랜드산 백색가토를 자웅 구분없이 실험 7일전에 Life science사(대구)에서 구입하여, 사육실에서 고품 사료(소동물용, 동양과학Co.)와 충분한 물을 자유롭게 섭취하도록 공급하고, 실험실 환경에 1주일간 적응한 상태에서 실험에 사용하였다.

2) 실험재료

실험약제는 동의대학교 부속한방병원에서 정선된 것을 한약규격집에 의거해 사용하였으며, 처방은 加味行滯湯 合 六味地黃湯으로 처방내용은 《최신한방임상학》²¹⁾과 《방약합편》²³⁾에 기재된 내용을 따랐으며 각 약물의 1첩 분량은 다음과 같다 (Table 1, 2 참조).

Table 1. Prescription of Kamihangche-tang

한약명	생약명	중량(g)
香附子	<i>Cyperi Rhizoma</i>	6
烏藥	<i>Linderae Radix</i>	4
蒼朮	<i>Atractylis Rhizoma</i>	4
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>	4
陳皮	<i>Deliciosia Perioapium</i>	4
山查肉	<i>Crataegi Fructus</i>	4
神曲	<i>Massa Medicata Fermentata</i>	4
只角	<i>Ponciri Fructus</i>	4
川芎	<i>Cidii Rhizoma</i>	4
蘇葉	<i>Perillae Folium</i>	4
檳榔	<i>Arecae Semen</i>	3
木香	<i>Costi Radix</i>	3
藿香	<i>Anisamelis Herba</i>	3
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3
茵陳	<i>Artemisiae capillaris Herba</i>	8
	Total amount	62

Table 2. Prescription of Yukmijihwang-tang

한약명	생약명	중량(g)
熟地黄	<i>Rehmanniae Rhizoma</i>	16
山藥	<i>Dioscoreae Radix</i>	8
山茱萸	<i>Macrocarpi Fructus</i>	8
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	6
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	6
白茯苓	<i>Hoelen alba</i>	6
	Total amount	50

2. 실험방법

1) 약물의 조제

加味行滯湯 合 六味地黃湯 4첩 분량 448g을 분말로 만들어 증류수 2L속에 넣고 90℃에서 4시간 동안 열탕한 후 여과지로 여과하고 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축하였다. 최종 얻어진 분말은 약 20g이었으며, 적당한 농도로 생리식염수나 incubation 용액내 녹여 사용하였다.

2) 간조직 절편의 제작

체중 1.5-2.0kg되는 토끼를 희생시킨 후 간장을 들어내어 100mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 40mM Tris-HCl(pH 7.5)로 된 냉한 용액을 간동맥내에 주입하여 혈액을 제거한 다음 Stadie-Riggs microtome으로 약 0.3-0.5mm 두께의 간조직 절편을 만들어 사용하였다.

3) 약물의 처리

본 실험에서는 산화성세포손상을 실험적으로 유도할 때 많이 이용하는 oxidant인 t-butylhydroperoxide(tBHP) 및 H₂O₂와 간에 대한 심한 독성을 나타내는 것으로 알려진²⁴⁾ 수은을 사용하였다. 조직절편 약 50mg을 4ml의 incubation용액이 들어 있는 비커속에 넣고 Dubnoff metabolic shaker내에서 100% 산소를 계속 공급 하면서 37℃에서 incubation 하였다. 기본 incubation용액의 조성은 130mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 5mM glucose, 10mM Tris-HCl(pH 7.5)로 되어 있으며, Oxidant나 Hg를 처리할 때는 이들 약물이 들어 있는 용액내에서 60분 동안 incubation하였다. Incubation후에 조직을 들어내어 세

포의 손상정도를 조사하기 위하여 lactate dehydrogenase(LDH)나 alanine aminotransferase(ALT)의 유출을 측정하였으며, 또한 세포손상이 지질의 과산화와 연관이 있는지는 그 산물인 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정하여 평가하였다^{25,26)}. 본 실험에서 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과를 조사할 때는 용액내에 적당한 농도로 녹여 사용하였다.

4) LDH 및 ALT의 측정

Oxidant나 Hg로 처리된 간조직 절편을 들어내어 증류수로 마쇄시켜 만든 조직액과 incubation용액을 각각 50μl 취하여 LDH 활성을 LDH측정 kit(Sigma Chemical)를 이용하여 측정하였으며, incubation용액내의 ALT활성은 ALT측정 kit(Sigma Chemical)를 사용하여 측정하였다.

5) 지질의 과산화(lipid peroxidation) 측정

조직세포의 지질의 과산화정도는 그 생성물인 malondialdehyde(MDA)를 측정하여 평가하였는데, 조직내 MDA함량은 Uchiyama와 Mihara 방법²⁹⁾으로 측정하였다. 간단히 설명하면, oxidant나 수은으로 처리된 간조직절편을 차가운 1.15% KCl 용액(5% wt/vol)속에서 파쇄하였다. 이 조직파쇄 균질액 0.5ml에 1% 인산용액 3ml와 0.6% thiobarbituric acid 용액 1ml를 첨가하여 끓는 물에서 45분간 가열하였다. n-Butanol 4ml를 첨가하여 완전히 섞은 다음 2000g에서 20분간 원심분리한 후, 상층액의 흡광도를 536와 520nm에서 측정하였다. 단백질 농도는 Bradford의 방법³⁰⁾으로 측정하였다.

6) Glutathione(GSH) 함량 측정

Glutathione(GSH) 함량은 Anderson의 방법³¹⁾으로 측정하였다. phosphate 완충용액 (143mM Na phosphate, 6.3mM Na₄-EDTA, pH 7.5) 에 0.248mg/ml NADPH용액 700μl, 6 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB) 용액 100μl와 증류수 198μl를 cuvette에 넣어 30℃에서 15분간 데운후 시료 2μl를 넣고 섞은 다음 266U/ml GSSG reductase 10μl를 첨가하여

412nm에서 흡광도의 변화를 관찰하였다.

7) Catalase 활성 측정

Catalase 활성은 Aebi의 방법³²⁾에 따라 H₂O₂의 분해 정도를 spectrophotometer로 추적하여 측정하였다. 간 조직절편을 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)에서 파쇄시켜 Triton X-100을 0.02% 되게 첨가한 후 40,000g 에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였으며, 2ml의 상층액에 30mM H₂O₂ 1ml을 첨가하여 반응을 시작시키고 240nm에서 30초 동안 흡광도를 측정하였다.

8) Glutathione peroxidase 활성 측정

Glutathione peroxidase의 활성측정은 Flohe와 Gunzler의 방법³³⁾으로 행하였는데, 간단히 설명하면, 간조직절편을 0.1M phosphate buffer(pH 7.0) 용액에서 파쇄시켜 사용할 때까지 4℃에 보관하였고 0.1M phosphate buffer(pH 7.0) 500μl, 시료 100μl, 2.4U/ml glutathione reductase 100μl, 100mM GSH 100μl를 semi-microcuvette에 넣어 37℃에서 10분간 preincubation하였다. 1.5mM NADPH 용액을 100μl 넣어 hydroperoxide에 무관한 NADPH 소모를 340nm에서 약 3분 동안 기록한 다음, 1.5mM H₂O₂ 100μl를 첨가하여 흡광도의 감소를 약 5분 동안 관찰하였다.

9) 산소유리기의 생성 측정

加味行滯湯 合 六味地黃湯이 산소유리기들을 제거하는 작용을 가지고 있는지는 phorbol-12, 13-dibutyrate(PDBu)로 활성화된 백혈구에 의해 생성되는 산소유리기를 측정함으로써 확인하였다. 간단히 설명하면, PDBu로 활성화된 백혈구(1x10⁶ cells/ml)를 Kreb's 링저-인산완충용액의 2ml 속에 넣고 0.96μg/ml의 luminol과 같이 incubation 하였다. 산소유리기의 발생 정도는 luminol-dependent chemiluminescence를 측정하여 평가하였으며, chemiluminescence는 chemiluminescence 분석기(Microlumat LB 96P, Berthold, Germany)를 이용하여 측정하였다. 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과를 볼 때는 적당한 농도

를 incubation 용액속에 첨가하였다. 백혈구는 건강한 사람의 혈액에서 Grishman 등³⁴⁾ 방법으로 분리하여 사용하였으며, 이 방법으로 분리한 백혈구는 95%가 살아있는 상태였다.

10) 통계처리

성적은 평균치±표준오차로 나타내었으며, 평균치 간의 유의성은 Student's t-test를 이용하여 검정하였고 P 값이 0.05미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

실험 성적

1. 간조직에서 tBHP에 의한 세포손상에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과

간조직을 여러 농도의 tBHP에 60분 동안 노출시킨 후 조직손상 정도를 확인하기 위하여 LDH유출의 변화를 조사한 결과 (Fig. 1), tBHP의 농도가 증가함에 따라 LDH의 유출이 비례하여 증가하였으며, tBHP의 농도가 0.2mM일 때 LDH 유출은 정상인 2.38±0.58에서 6.59±0.98%로 유의한 증가를 보였으며, 2mM일 때는 23.63±3.52%로 약 10배 증가하였다. 조직을 tBHP에 노출시킬 때, 加味行滯湯 合 六味地黃湯추출액 1%를 동시에 첨가하여 시험한 결과 tBHP에 의해 유발된 LDH 유출이 현저히 억제되었다. 加味行滯湯 合 六味地黃湯추출액이 없을 때는 tBHP의 농도가 0.2mM일 때 LDH 유출이 6.59±0.98%였으나 본 추출액이 1% 들어 있을 때는 2.46±0.34%로 감소하였고, tBHP가 2mM일 때는 23.63±3.52%에서 8.01±0.88%로 억제되었다.

2. 간조직에서 tBHP에 의한 지질의 과산화에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과

간조직에서 tBHP에 의한 LDH 및 ALT 유출의 증가가 지질의 과산화에 기인하는지를 조사하기 위하여 tBHP의 농도에 따른 지질의 과산화를 측정하여 그 결과를 그림 2에 나타내었다. 이 그림에서 보는 바와 같이 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 없는 경우 tBHP의 농도증가에 따라 LDH 유출의 증가현상과

유사하게 지질의 과산화도 비례하여 증가하였는데, 0.2 mM의 농도에서 지질의 과산화는 210.54 ± 33.46 에서 441.69 ± 44.45 pmole MDA/mg protein으로 증가하였고, tBHP의 농도가 2mM로 증가하였을 때 지질의 과산화는 890.35 ± 64.58 pmole MDA/mg protein으로 약 4배로 증가하였다. 이러한 결과는 tBHP에 의한 간조직의 손상은 지질의 과산화가 원인임을 알 수가 있다. LDH 유출실험에서와 유사하게 tBHP를 처리할 때 加味行滯湯 合 六味地黃湯추출액 1%를 첨가하였을 경우 tBHP에 의한 지질의 과산화는 현저하게 방지되었다.

3. tBHP의 간조직 손상에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 농도변화의 영향

加味行滯湯 合 六味地黃湯이 tBHP에 의한 간조직 손상을 방지하는 효과가 농도에 따라 어떻게 변화하는지를 관찰하기 위하여 1mM tBHP를 조직에 처리할 때 여러 농도의 加味行滯湯 合 六味地黃湯을 첨가한 후 LDH유출의 변화를 조사하였다. 그림 3에서 보는 바와 같이 tBHP로 처리했을 때 LDH유출이 정상상의 $3.56 \pm 0.46\%$ 에서 $20.43 \pm 2.58\%$ 로 증가하였는데, 여기에 0.05%에서 1%의 加味行滯湯 合 六味地黃湯추출액을 첨가되었을 경우에는 추출액의 농도가 증가함에 따라 LDH유출은 감소하여 1%농도에서 $1.38 \pm 0.43\%$ 로 정상 이하로 감소하였다. 이러한 결과는 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 tBHP에 의한 간조직의 손상을 현저하게 방지하는 효과를 가지고 있음을 가리킨다.

4. tBHP에 의한 지질의 과산화에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 농도변화의 효과

tBHP에 의한 간조직의 손상을 방지하는 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과가 농도에 따라 변화하는 정도를 조사하여 그림 4에 나타내었다. 이 그림에서 보는 바와 같이 1mM tBHP를 처리했을 때 지질의 과산화가 139.60 ± 8.63 에서 635.13 ± 29.46 pmole MDA/mg protein으로 현저하게 증가하였으며, 여기에 加味行滯湯 合 六味地黃湯을 0.05에서 1%농도로

첨가했을 때 지질의 과산화는 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 농도에 비례하여 감소되었다. 이러한 결과는 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 강력한 항산화 효과를 가지고 있으며, 이러한 항산화 효과로 인해 간조직에서 tBHP에 의한 간조직의 손상을 방지하고 있음을 가리킨다.

5. tBHP의 의한 alanine aminotransferase(ALT) 활성에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 영향

간조직의 손상정도를 평가하기 위하여 많이 이용하고 있는 ALT의 incubation 용액내 활성을 측정할 결과 그림 5에 보인 바와 같이 LDH에서와 유사하게 tBHP의 농도가 증가함에 따라 비례하여 그 활성도 증가하였는데, 정상조직에서 0.88 ± 0.25 units/g wet wt.로 나타났고 1mM의 tBHP에 의해서는 6.53 ± 1.32 units/g wet wt.로 약 7배 정도 증가하였다. 조직에 tBHP를 처리할 때 加味行滯湯 合 六味地黃湯 1%를 동시에 첨가하였을 경우 tBHP에 의해 증가되었던 ALT활성은 정상수준까지 감소하였다.

6. H₂O₂의 간조직 손상에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 영향

Peroxide 중에서 tBHP는 세포내 존재하는 항산화 효소인 glutathione peroxidase에 의해 분해되어 제거되지만 H₂O₂는 tBHP와는 달리 glutathione peroxidase 뿐만 아니라 catalase에 의해서도 분해되기 때문에³⁵⁾, 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 H₂O₂에 의한 간조직손상을 방지할 수 있는지를 관찰하기 위하여 H₂O₂에 의한 LDH유출에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯추출액의 효과를 조사하였다. 그림 6에서 보는 바와 같이 50mM H₂O₂로 처리했을 때 LDH유출이 정상상의 $2.96 \pm 0.39\%$ 에서 $20.49 \pm 1.59\%$ 로 약 7배로 증가하였는데, 여기에 0.05에서 1%의 加味行滯湯 合 六味地黃湯추출액을 첨가하여 LDH유출의 변화를 조사한 결과 추출액의 농도가 증가에 따라 LDH유출은 감소하여 1%농도에서 $3.96 \pm 2.97\%$ 로 정상 수준까지 감소하였다. 이러한 결과는 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 tBHP뿐만 아니라 H₂O₂에 의한 손상도 현저하게

방지하는 효과를 가지고 있음을 가리킨다.

7. H₂O₂에 의한 지질의 과산화에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과

H₂O₂에 의한 간조직의 손상을 방지하는 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과가 지질의 과산화를 억제하는 작용에 기인하는지를 확인하기 위하여 H₂O₂에 지질과산화에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과를 조사하였다. 그림 7에서 보는 바와 같이 50mM H₂O₂를 처리했을 때 지질의 과산화가 196.48±21.44에서 897.38±45.39pmole MDA/mg protein 현저하게 증가하였으며, 여기에 加味行滯湯 合 六味地黃湯을 0.05에서 1%농도로 첨가했을 때 지질의 과산화는 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 농도에 비례하여 감소되었다. 이러한 결과는 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 강력한 항산화 효과를 가지고 있으며, 이러한 항산화 효과로 인해 간조직에서 H₂O₂와 같은 oxidant에 의한 간조직의 손상을 방지하고 있음을 가리킨다.

8. 수은에 의한 간조직 손상에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과

加味行滯湯 合 六味地黃湯이 oxidant 뿐만 아니라 다른 독성 물질에 의한 세포손상도 방지할 수 있는지를 관찰하기 위하여 수은에 의한 ALT유출에 대한 효과를 조사하였다. 그림 8에서 보는 바와 같이 0.5mM 수은으로 처리했을 때 incubation-용액내의 ALT활성이 0.96±0.11에서 7.39±1.63units/g wet wt.로 약 7배 증가하였으며, 이러한 증가는 1% 加味行滯湯 合 六味地黃湯에 의해 2.58±0.12units/g wet wt.로 현저하게 감소하였다.

9. 간조직에서 수은에 의한 지질의 과산화에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과

加味行滯湯 合 六味地黃湯이 수은에 의한 간조직 손상을 방지하는 효과가 수은에 의한 지질의 과산화를 방지함으로써 나타내었는지를 확인하기 위한 실험을 하여 그림 9에 나타내었다. 수은은 지질의 과산화

를 현저하게 증가시킴으로서 이 약물이 oxidant들과 마찬가지로 지질의 과산화를 유발하여 세포손상을 초래하고 있음을 알 수가 있었는데, 간조직에 수은을 0.5mM 농도로 처리했을 때 지질의 과산화는 198.45±28.53에서 886.93±29.48pmole MDA/mg protein으로 약 5배정도 증가하였다. 수은을 처리할 때 加味行滯湯 合 六味地黃湯을 1% 첨가했을 경우 수은에 의해 증가되었던 지질의 과산화는 294.37±21.92pmole MDA/mg protein로 거의 정상 수준까지 감소하였다.

10. 정상조직 및 독성물질로 처리된 조직에서 glutathione (GSH)함량에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과

GSH는 여러 독성물질에 의한 세포손상을 방지하는 해독효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포내 존재하는 항산화제 역할을 하고 있는 물질이다^{36,38)}. 따라서 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 oxidant 및 수은에 의한 세포손상을 방지하는 작용이 세포내 GSH의 농도를 변화시켜 나타나는지를 확인하기 위하여 정상조직과 1mM tBHP 또는 0.5mM 수은을 처리한 조직에서 GSH 농도 변화에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과를 조사하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 정상조직에 加味行滯湯 合 六味地黃湯을 처리했을 때 GSH함량이 0.3±0.02에서 0.987±0.14μmole/g wet wt. 현저한 증가를 보였고, tBHP를 처리한 조직에서도 0.17±0.02μmole/g wet wt.로 감소되었던 GSH를 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 0.79±0.04μmole/g wet wt.로 유의한 증가를 나타내었다. 수은을 처리한 조직에서 GSH 농도가 0.30±0.02에서 0.14±0.02μmole/g wet wt.로 유의하게 감소하였고, 1% 加味行滯湯 合 六味地黃湯을 첨가한 경우 GSH 농도가 1.51±0.25μmole/g wet wt.로 현저하게 증가되었다.

11. 간조직의 catalase활성에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과

Catalase는 정상세포속에서 생성되어 H₂O₂를 분해하여 제거하는 효소이다³⁵⁾. 加味行滯湯 合 六味地黃

탕이 정상조직에서와 H₂O₂를 처리한 조직에서 catalase활성을 증가시키는지를 조사하였다. 그림 10에서 보는 바와 같이 정상조직에서 1% 加味行滯湯 合 六味地黃湯을 처리한 경우 효소의 활성이 5.09±1.88μmole/mg/min에서 7.73±2.68μmole/mg/min로 유의한 증가를 보이지 않았으나, H₂O₂를 처리한 조직에서는 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 catalase활성을 7.81±1.94μmole/mg/min에서 14.96±2.41μmole/mg/min로 유의한 증가현상을 보였다.

12. 간조직의 glutathione peroxidase활성에 대한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과

Glutathione peroxidase는 tBHP나 H₂O₂같은 peroxide를 분해하는 효소로 알려져 있다³⁵⁾. 따라서 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 정상조직에서와 tBHP를 처리한 조직에서 glutathione peroxidase활성을 증가시키는지를 조사하여 그 결과를 그림 11에 나타내었다. 이 성적에서 보는 바와 같이 정상조직에서 1% 加味行滯湯 合 六味地黃湯은 효소활성을 211.38±27.67μmole/mg/min에서 304.57±16.46μmole/mg/min로 유의하게 증가시켰으며, tBHP를 처리한 조직에서도 193.12±4.62μmole/mg/min에서 332.39±23.44μmole/mg/min로 유의한 증가 현상을 보였다.

13. 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 반응성산소기의 제거 효과

그림 12는 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 반응성산소유리기를 직접 제거하는 효과를 가지고 있는지를 실험한 결과이다. 사람의 백혈구와 luminol이 함유하는 용액내에 PDBu를 첨가했을 때 반응성산소유리기의 발생으로 나타나는 chemiluminescence의 증가를 보였고, 여기에 加味行滯湯 合 六味地黃湯추출액을 0.05% 및 0.1%되게 첨가했을 경우 chemiluminescence가 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 농도에 비례하여 감소하였다.

고 찰

한의학에서 간의 주된 생리기능은 疎泄과 藏血 두 가지로 대별 될 수 있다. 疎泄이란 氣의 승강출입운동, 정지활동, 담즙분비, 비위의 소화기능 촉진, 혈과 진액의 운행과 수포를 주로 하는 간의 기능활동면에 인식되어 肝氣·肝陽으로 표현되고, 藏血은 혈을 저장하고 혈량을 조절하는 간의 구조적인 면에 인식되어 肝血·肝陰으로 표현되므로 생리적으로 간을 體陰而用陽이라 한다.

간병의 병기는 肝陽의 疎泄과 肝陰의 藏血失調 및 肝陰陽의 상호 의존제약관계의 失常으로 나타나는 바, 그 특징은 肝陽, 肝氣는 항상 有餘하고 肝陰, 肝血은 항상 부족함에 있다.

疎泄기능이 失調되면 木剋土의 병리변화로 "肝氣犯脾·肝氣犯胃"하여 脾의 運化·升清作用과 胃의 腐熟·降濁作用에 영향을 미쳐 脇肋脹滿, 脘腹脹痛, 嘔逆, 噯氣, 吞酸 등 肝脾不和, 肝胃不和의 病症이 나타나고 점차 비위의 濕熱이 壅滯되면 다시 土壅木鬱하여 脇脹滿痛, 黃疸, 口苦, 嘔吐 등이 발생한다.

또 生化之源인 脾의 운화기능 실조로 혈액의 化源이 부족하여도 失血이 유발되어 不思飲食, 形體消瘦, 眩暈, 目乾澁 등의 肝血虛의 병증이 나타나므로 肝脾生理의 병리학적변화에 있어서 그 치료법칙도 疎肝뿐만 아니라 健脾和胃의 合治가 필요하다^{1-6,8,39)}.

肝의 藏血기능은 腎藏精과 有關한데, 肝血은 腎精의 자양을 받아 정상적인 肝의 기능을 유지하고, 腎精은 肝血의 부단한 化生으로 인해 充만케 되는데 이런 精과 血이 서로 자생하고 전화하는 관계를 "精血同源·肝腎相生"이라 설명한다. 그러므로 腎精이 虧損되면 肝血不足이 일어나고, 肝血不足은 腎精의 虧損을 초래하게 된다^{1-3,5,8,39)}.

肝陰과 腎陰의 병리에 있어서도 腎陰이 부족하면 水生木하지 못해 肝失所養으로 肝陽이 偏항되어 眩暈, 頭痛, 急躁易怒 등의 증상이 나타나며, 반대로 肝火가 太盛하면 腎陰에 손상을 미쳐 頭暈, 耳鳴, 咽乾 口燥 등의 腎陰不足의 病증이 형성되고, 그 腎陰不足

은 養肝을 하지 못해 肝陰不足을 유발하게 된다⁷⁾.

이와 같이, 肝陰은 腎陰으로부터 도움을 받아 得常하게 되는데 항상 부족되기 쉬우므로 助養되어져야 하며, 肝陰이 충실할 때 肝陽은 태과하지 않게 된다⁸⁾. 그러므로 그 치료에 있어서도 “肝腎相生·虛則補其母”의 이론대로 補腎陰의 併治가 필요하다.

임상적으로도 만성간질환은 胃脘脹痛, 食少, 嘔吐噯氣, 呃逆吞酸, 腸鳴泄瀉, 眩暈, 耳鳴, 口燥咽乾, 易怒, 肢體痲痺 등의 肝脾不和·肝胃不和·肝腎不足의 병증으로 나타나므로 용약에 있어서도 相生相剋의 이론대로 平肝健脾·滋補肝腎의 併治法으로 처방이 구성되어야 적합하다.

이런 관점에서 消導行氣, 利膽疎肝의 效로 平肝健脾 시키는 加味行滯湯²¹⁾과 補腎陰의 效로 補肝陰 할 수 있는 六味地黃湯²³⁾의 合方은 만성간질환에 적합한 처방이라 생각된다.

반응성 산소기들(reactive oxygen species)은 약물이나 방사선조사와 같은 외부 요인에 의해서 발생되기도 하고, 체내세포의 정상적인 대사과정 중에 발생도 하는 바, 이들은 세포막의 이온전달물질이나 단백질 유전자등을 공격하여 노화를 촉진시키거나 암의 발생, 간손상, 동맥경화, 당뇨 등의 질병을 유발시키는 인자로 알려지고 있다^{10,12)}. 그래서 이들의 독성효과를 방지하기 위한 방법을 찾는 데 많은 노력을 기울이고 있다. 이런 노력의 일환으로 최근에 유해산소를 제거할 수 있는 천연산이나 합성된 항산화제의 개발에 많은 관심이 집중되고 있으나 지금까지 만족한 성과를 얻지 못하고 있는 실정이다^{40,41)}.

우리 몸의 세포속에는 superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 반응성산소기들을 분해하는 효소들을 가지고 있을 뿐만 아니라 glutathione과 같은 항산화제 역할을 하는 물질을 가지고 있어 세포의 정상적인 대사과정중에 발생하는 반응성산소기들은 이들 효소나 물질들에 의해 제거되고 있다. 그러나 그 발생되는 양이 많거나 항산화제 역할을 하는 이들의 체내 농도가 감소하게 되면 세포는 손상을 받아 여러 가지 질병을 유발시키는 원인이 될 것이다^{11,12)}.

특히 간은 당, 단백질, 지질대사의 중추기관이 되고, 각 영양소 비타민 철분 등을 저장하여 필요에 따라 공급할뿐만 아니라 체내성 및 체외성 유독물질에 대한 해독작용을 한다. 그래서 인체내의 화학공장이라 일컬을 정도로 다양한 화학적 대사작용을 하는데 그 기능 대부분을 간세포에서 하고 있다¹⁵⁾. 이들 대사과정에서 발생하는 반응성산소기들을 제거하거나 이들의 독성효과를 방지하는 것은, 점차 증가 추세에 있고 만성화 되어가는 간질환의 예방 및 치료에 많은 도움을 줄 수 있다.

加味行滯湯은 현재 임상가에서 만성간질환에 多用되는, 裴²¹⁾가 作方하여 《最新臨床學》에 登載된 方으로 行氣消導시켜 健脾하는 行滯湯에, 清利濕熱하여 疎肝利膽의 效가 있는 茵陳으로 구성되었다. 특히 茵陳의 효능에 대한 실험적 연구로는 白鼠 간손상에 김⁴²⁾은 茵陳을 君藥으로 한 茵陳五苓散과, 표 등⁴³⁾은 茵陳四苓散으로 유의성을 보고하였으며, 우⁴⁴⁾는 茵陳을 증량시킨 茵陳五苓散으로, 임 등⁴⁵⁾은 茵陳增量한 清肝健脾湯이 각각 그 增量群에서 더욱 높은 유의성을 보고한 바 있다.

구성약물의 효능을 살펴보면, 香附子는 理氣解滯, 烏藥은 順氣散寒, 蒼朮은 燥濕健脾, 厚朴은 行氣溫中, 陳皮는 理氣健脾, 山查肉은 消食行滯, 神曲은 消食和胃, 只角은 行氣消痞, 川芎은 活血行氣, 蘇葉은 行氣寬中, 檳榔은 理氣消積, 木香은 行氣消食, 藿香은 和中止嘔, 甘草는 調和諸藥, 茵陳은 清利濕熱, 退黃의 효능^{46,47,48)}이 있다.

六味地黃湯은 《小兒藥證直訣》에 최초로 등재된 方^{23,49)}으로 滋陰補腎의 基礎方劑로 腎水不足을 다스린다. 실험적으로 장 등²⁰⁾은 六味地黃湯이 過酸化脂質의 含量을 저하시켜 노화를 억제한다고 보고하였고, 김 등²²⁾은 생체내 항산화효과에 대한 유의성이 있음을 입증하였다.

그 구성약물의 효능을 보면 熟地黃은 補血滋陰, 山藥은 補脾胃 益肺腎, 山茱萸는 補益肝腎, 牡丹皮는 清熱涼血, 澤瀉는 利水滲濕 泄熱, 白茯苓은 利水滲濕 健脾補中 한다⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

본 실험에서 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 반응성

산소기들에 의한 간세포손상에 어떤 효과를 가지고 있는지를 조사하기 위하여 가토의 간조직에 Oxidant 인 tBHP 및 H₂O₂와 간에 심한 독성을 나타내는 수은으로 처리하고 본탕의 효과를 실험하였다.

먼저 정상 간세포에서 tBHP와 H₂O₂의 농도가 증가함에 비례하여 LDH유출과 ALT활성이 증가하였

고 1%의 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 추출액을 첨가했을 때 LDH유출과 ALT활성이 현저히 억제되었다(Fig. 1, 5, 6). 또한 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 농도를 0.05%에서 1%까지 변화시켜 관찰한 결과 tBHP로 처리했을 경우 0.5%에서, H₂O₂의 경우는 0.1%에서 부터 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 3, 6).

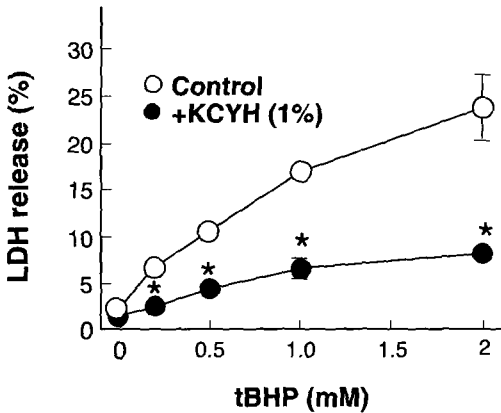


Fig. 1. Effect of KCYH on tBHP-induced LDH release in rabbit liver slices. Slices were treated with 0.2-2 mM tBHP in the presence or absence(control) of 1% KCYH for 60 min at 37°C, and LDH release was measured. Data are mean ± SE of five determinations. *P<0.05 compared with the respective control.

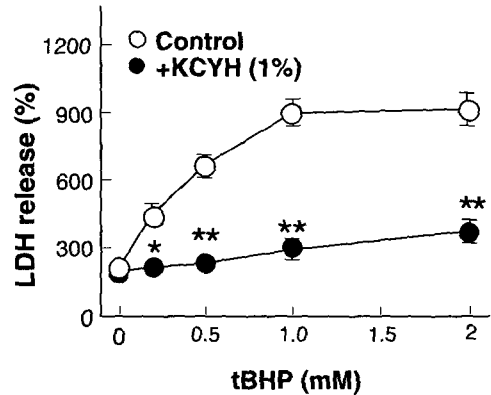


Fig. 3. Dose dependency of the protective effect of KCYH against tBHP- induced LDH release in rabbit liver slices. Slices were treated with 1 mM tBHP in the presence or absence of various concentrations of KCYH for 60 min at 37°C, and LDH release was measured. Data are mean ± SE of five determinations. *P<0.05, **P<0.01 compared with tBHP alone.

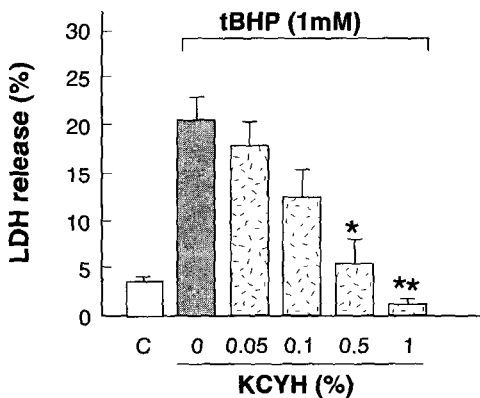


Fig. 2. Effect of KCYH on tBHP-induced lipid peroxidation in rabbit liver slices. Slices were treated with 0.2-2 mM tBHP in the presence or absence(control) of 1% KCYH for 60 min at 37°C, and lipid peroxidation was measured. Data are mean ± SE of five determinations. *P<0.05, **P<0.01 compared with the respective control.

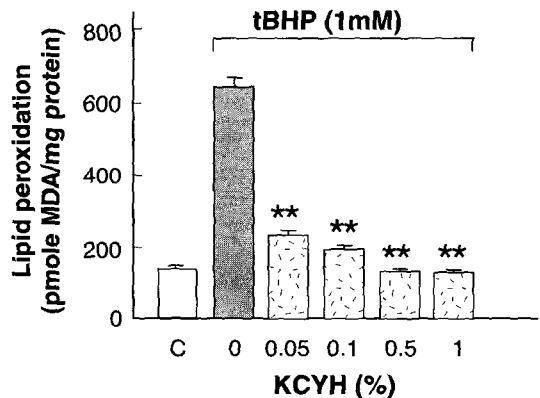


Fig. 4. Dose dependency of the protective effect of KCYH against tBHP- induced lipid peroxidation in rabbit liver slices. Slices were treated with 1 mM tBHP in the presence or absence of various concentrations of KCYH for 60 min at 37°C, and lipid peroxidation was measured. Data are mean ± SE of five determinations. **P<0.01 compared with tBHP alone.

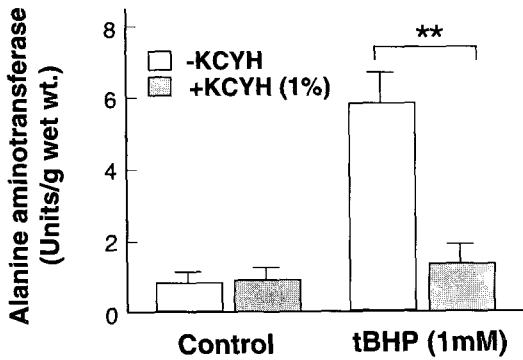


Fig. 5. Effect of KCYH on tBHP-induced alanine aminotransferase(ALT) release in rabbit liver slices. Slices were treated with 0.2-2 mM tBHP in the presence or absence(control) of 1% KCYH for 60 min at 37°C, and ALT release was measured. Data are mean ± SE of five determinations. **P<0.01.

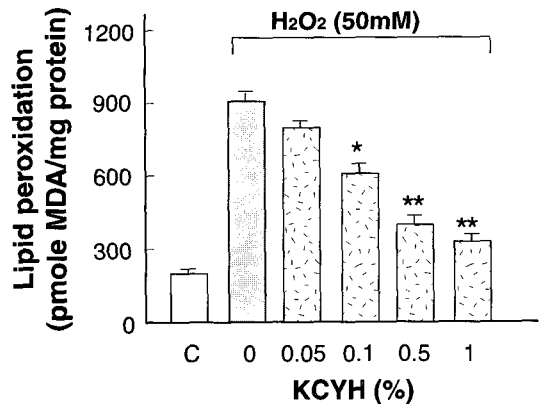


Fig. 7. Dose-dependency of the protective effect of KCYH against H₂O₂- induced lipid peroxidation in rabbit liver slices. Slices were treated with 50 mM H₂O₂ in the presence or absence of various concentrations of KCYH for 60 min at 37°C, and lipid peroxidation was measured. Data are mean ± SE of five determinations. *P<0.05, **P<0.01 compared with H₂O₂ alone.

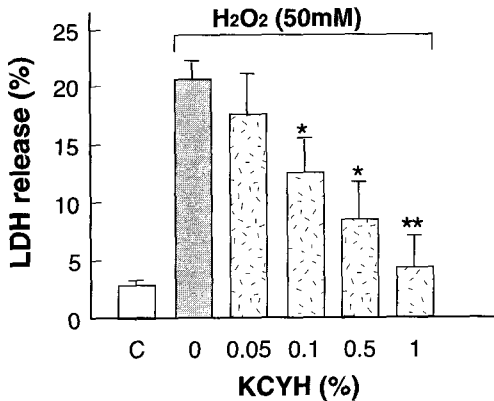


Fig. 6. Dose-dependency of the protective effect of KCYH against H₂O₂- induced LDH release in rabbit liver slices. Slices were treated with 50 mM H₂O₂ in the presence or absence of various concentrations of KCYH for 60 min at 37°C, and LDH release was measured. Data are mean ± SE of five determinations. *P<0.05, **P<0.01 compared with H₂O₂ alone.

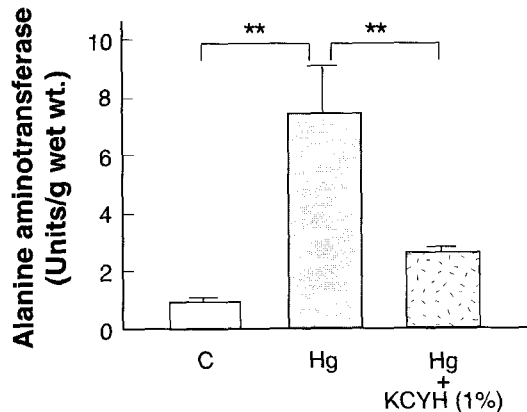


Fig. 8. Effect of KCYH on Hg-induced alanine aminotransferase(ALT) release in rabbit liver slices. ALT activity was measured in the medium in which tissues were incubated for 60 min at 37°C in the presence or absence of 0.5 mM Hg and 1% KCYH. Data are mean ± SE of five determinations. **P<0.01.

이러한 결과는 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 t-BHP와 H₂O₂에 의한 간조직의 손상을 현저하게 방지하는 효과를 가지고 있음을 가리킨다.

또한 세포손상이 산화제에 의해 유발되었는지를 지질의 과산화정도를 측정하여 확인하였는데, 산화제에 의한 세포독성을 방지하는 약물들은 지질의 과

산화를 감소시키는 효과를 가지고 있다고 알려져 있다²⁵⁾. 본 실험에서도 tBHP와 H₂O₂에 의한 지질과산화에 대해 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 효과를 조사하였는데, 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 농도를 변화시켜 관찰한 결과 농도의 비례에 따라 점차 감소되고

각기 0.05%와 1%에서 유의한 감소를 보였다(Fig. 2, 4, 7). 따라서 이러한 실험결과는 세포손상이 지질의 과산화에 의해서이고 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 그 지질의 과산화를 방지하는 작용을 가지고 있음을 보이고 있다.

그리고 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 oxidant 뿐만 아니라 다른 독성 물질에 의한 세포손상도 방지할 수 있는지를 관찰하기 위하여 Hg에 의한 ALT유출 및 지질의 과산화에 대한 효과를 조사하였다. 0.5 mM Hg로 처리했을 때 ALT유출은 그 활성이 7배로 증가하였으나 1%의 加味行滯湯 合 六味地黃湯에 의해 ALT유출은 유의하게 감소하였다(Fig. 8). 또한 지질의 과산화도 현저한 증가를 보였으나 1%의 加味行滯湯 合 六味地黃湯에 의해 유의한 감소를 보였다(Fig. 9). Hg가 세포손상을 유발시키는 기전은 반응성 산소기를 발생시켜 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있는 데⁹⁾, 본 실험에서도 간조직에 Hg를 처리했을 때 지질의 과산화가 현저하게 증가함으로써 이러한 이론을 뒷받침하였다. 따라서 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 Hg에 의한 세포손상을 방지하는 효과가 지질의 과산화를 억제하여 나타남을 알 수 있다.

加味行滯湯 合 六味地黃湯이 반응성산소기들에 의

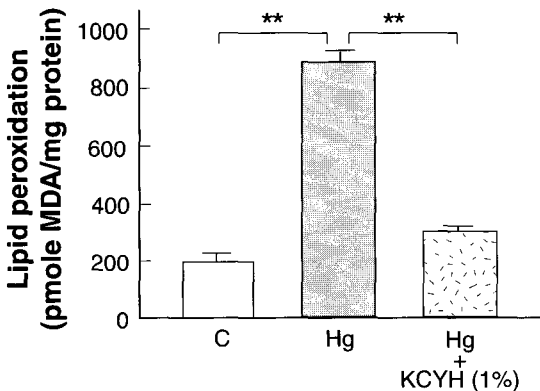


Fig. 9. Effect of KCYH on Hg-induced lipid peroxidation in rabbit liver slices. Slices were treated with 0.5 mM Hg for 60 min at 37°C in the presence or absence of and 1% KCYH, and lipid peroxidation was measured. Data are mean ± SE of five determinations. **P<0.01.

한 세포손상을 방지하는 효과를 나타내는 데는 여러 가지 기전에 기인할 수 있다. 지질의 과산화를 직접 방지함으로써 나타날 수 있고, 지질의 과산화를 직접 방지하지 않더라도 반응성산소기들을 직접 제거하는 작용을 가지고 있다면 이차적으로 지질의 과산화 및 그로 인한 세포손상이 방지 될 것이다. 또 세포 내에는 정상적으로 반응성산소기들을 제거하는 효소나 물질을 가지고 있는데, 약물이 직접 지질의 과산

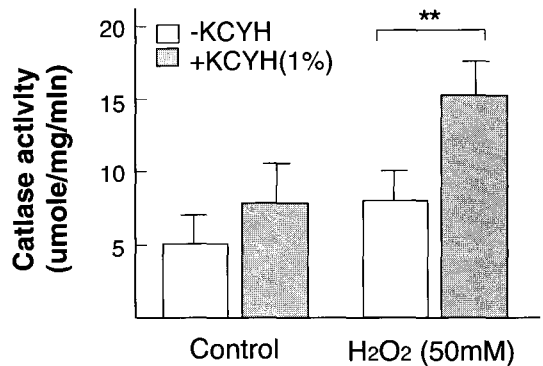


Fig. 10. Effect of KCYH on catalase activity in rabbit liver slices. Slices were treated with 50 mM H₂O₂ in the presence or absence of 1% KCYH for 60 min at 37°C, and enzyme activity was measured. Data are mean ± SE of five determinations. **P<0.01.

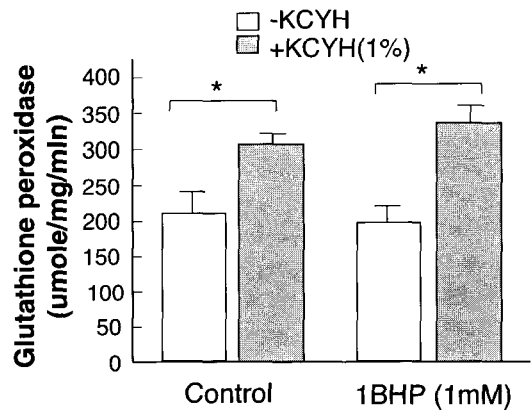


Fig. 11. Effect of KCYH on glutathione peroxidase activity in rabbit liver slices. Slices were treated with 1 mM tBHP in the presence or absence of 1% KCYH for 60 min at 37°C, and enzyme activity was measured. Data are mean ± SE of five determinations. *P<0.05.

화를 방지하지 않더라도 glutathione(GSH), catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 내재성 항산화물질과 효소들의 농도나 활성을 증가시킨다면 세포손상을 방지할 수 있을 것이다.

본 실험에서 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 어떤 기전으로 세포손상을 방지하는지를 확인하기 위하여 세포내 GSH와 항산화효소의 함량을 측정된 결과, 정상조직과 1 mM tBHP 또는 0.5 mM 수은을 처리한 조직에서 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 GSH 농도를 유의하게 증가시켰을 뿐 아니라 그 증가 정도가 정상세포에서 측정된 함량보다 더욱 높게 나타났다 (Table 3).

Table 3. Effect of KCYH on Glutathione (GSH) in Liver Tissues Treated with tBHP or Hg

Treatment	GSH content (umole/g wet wt.)
Control	0.30 ± 0.02
+ KCYH (1%)	0.98 ± 0.14*
+ tBHP (1 mM)	0.17 ± 0.02*
tBHP + KCYH	0.79 ± 0.04*.#
+ Hg (0.5 mM)	0.14 ± 0.02*
Hg + KCYH	1.51 ± 0.25*.,##

Liver slices were treated with 1mM tBHP or 0.5mM Hg in the presence or absence of 1% KCYH for 60min at 37°C, and GSH was measured. Data are mean ± SE of three determinations. *P<0.05 compared with control; #P<0.05 compared with tBHP alone; ##P<0.05 compared with Hg alone.

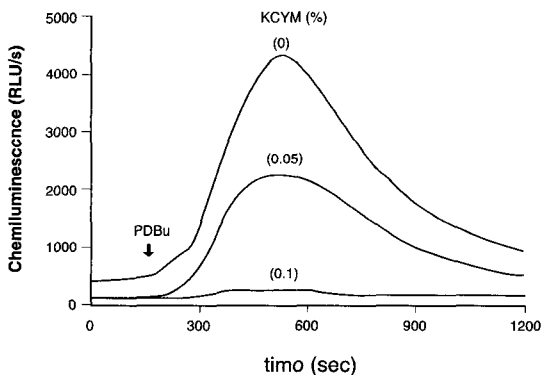


Fig. 12. Inhibition of chemiluminescence by KCYH in PDBu-stimulated human neutrophils. Neutrophils(1x10⁵ cells/ml) were mixed with luminol(0.96 µg/ml) in Kreb' s-Ringer phosphate solution. After preincubation for 5 min with KCYH, PDBu(0.05 µg/ml) were added and chemiluminescence was measured.

Catalase는 정상세포 속에서 생성되어 H₂O₂를 분해하여 제거하는 효소인데³⁵⁾ 정상조직에서 1% 加味行滯湯 合 六味地黃湯을 처리한 경우 효소의 활성이 유의한 증가를 보이지 않았으나, H₂O₂를 처리한 조직에서는 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 catalase활성이 유의한 증가현상을 보였다(Fig. 10).

Glutathione peroxidase는 tBHP나 H₂O₂같은 peroxide와 산소유리기를 분해하는 효소이다³⁶⁾. 따라서 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 정상조직에서와 tBHP를 처리한 조직에서 glutathione peroxidase활성을 증가시키는지를 조사한 결과 모두 유의한 증가를 보였다(Fig. 11). 또 반응성산소유리기를 직접 제거하는 효과를 가지고 있는지를 실험한 결과, 반응성산소유리기의 발생으로 나타나는 chemiluminescence의 증가가 加味行滯湯 合 六味地黃湯의 추출액을 0.05%에서 0.1% 되게 첨가했을 경우 chemiluminescence가 농도에 비례하여 감소하였다. 이러한 결과들은 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 직접 반응성산소기들을 제거하는 효과를 가지고 있음을 가리킨다(Fig 12).

이상의 실험결과에서 加味行滯湯 合 六味地黃湯이 지질의 과산화로 인한 세포손상을 방지하고, 세포내 존재하는 항산화 물질들의 농도를 증가시킬 뿐만 아니라 반응성산소기를 직접 제거하는 기전으로 oxidant 및 수은의 독성작용에 대한 방지효과를 발휘하는 것으로 사료된다.

결론

加味行滯湯 合 六味地黃湯이 oxidant 및 Hg에 의한 간세포손상을 방지할 수 있는지를 조사하기 위하여 가토 간조직에 tBHP 및 H₂O₂ 또는 수은으로 처리하여 세포손상을 유발시킨 후 본탕을 투여 했던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. tBHP 및 H₂O₂에 의한 LDH유출량이 유의성있게 감소되었다.
2. tBHP 와 Hg에 의한 ALT활성도 유의성있게 감소되었다.

3. tBHP, H₂O₂ 및 Hg에 의한 지질의 과산화도 유의성있게 감소되었다.

4. 정상조직과 tBHP 및 Hg로 처리한 조직 모두에서 glutathione (GSH)함량은 유의성있게 증가되었다.

5. H₂O₂에 의한 Catalase활성도 유의한 증가를 보였다.

6. 정상조직과 tBHP에 의한 glutathione peroxidase 활성은 모두 유의성을 보였다.

7. 증가된 chemiluminescence가 농도에 비례하여 감소하였다.

이상의 결과로 加味行滯湯 合 六味地黃湯은 가토의 간세포 손상을 방지하는 효과가 있었다.

참고문헌

1. 김원희, 최달영. 장부변증논치. 서울:성보사. 1985: 139-142.
2. 왕현명. 중의내과변증학. 북경:인민위생출판사. 1984:11.
3. 전국한의과대학간계내과교수 공저. 간계내과학. 서울:동양의학연구원. 1995:24-29, 31-33, 164-185.
4. 전국한의과대학비계내과교수 공저. 비계내과학. 서울:그린문화사. 1991:3-8.
5. 박찬국. 장상학. 서울:성보사. 1992:181-185, 214-215.
6. 유기원. 비위임상학. 서울:전통의학연구소. 1993:52-53.
7. 두호경. 동의신계학(상). 서울:동양의학연구원. 1991:32-34.
8. 문준진, 안규석, 최승훈. 동의병리학. 서울:고문사. 1990:199, 203, 222-223.
9. 구본홍, 박호식. 동의내과학. 서울:서원당. 1985:367.
10. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in calcinogenesis and brain ischemia. *Faseb J.* 1990;4:2587-2597.
11. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *Faseb J.* 1995;9:526-533.
12. Hallwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals,

- antioxidants, and human disease. Where are we now?. *J Lab Clin Med.* 1992;119:598-620.
13. 서울대학교의과대학 내과학교실 편. 최신지견 내과학. 서울:군자출판사. 1997:466-467.
14. 배철영, 이영진. 노인의학. 서울:고려의학. 1996:26.
15. 이문호, 전중휘, 허인목. 내과학(상). 서울:학림사. 1986:967.
16. 윤철호, 정지천, 신억섭. 흰쥐의 간조직에서 녹용약 침 제제의 항산화작용에 관한 연구. *대한한의학회지.* 1996;17(2):191-202.
17. 이종현, 성락기, 김성훈. 백하수오의 항산화작용에 관한 실험적연구. *대한한의학회지.* 1997;18(1):278-298.
18. 한정훈, 신현철, 윤철호, 김종호, 정지천, 신억섭. 제조가 Bromobenzene에 의한 흰쥐의 간손상에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 1998;19(1):49-64.
19. 김지부. 선울통경탕이 가토의 간조직 항산화효과에 미치는 영향. 동의대학교 대학원 박사학위논문. 1998.
20. 장영. 六味地黃湯及其配伍對過氧化脂質及脂褐質含量的影響. *중국중약잡지.* 1986;16(3):175-176.
21. 배원식. 최신한방임상학. 서울:남산당. 1981:207, 217-218.
22. 김우식, 이동희. 六味地黃湯 전탕액이 가토혈압 및 백서간 TBA치에 미치는 영향에 관한 연구. *경희한 의대논문집.* 1979;2:145-152.
23. 황도연. 편주방약합편. 서울:영림사. 1991:133-134.
24. Ashour H, Abdel-Rahman M, Khodair A. The mechanism of methyl mercury toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett.* 1993;69:87-96.
25. Sies H. Biochemistry of oxidant stress. *Angew Chem Int Ed.* 1986;25:1058-1071.
26. 김정천, 김정광. 임상검사법제요. 서울:고문사. 1984:454, 487, 497.
27. 길리화. 내과진단학. 서울:제일의학사. 1992:467, 494.
28. 織田敏次郎저. 간장병의 진단학. 광주:서광의학서림. 1995:975.
29. Uchiyama M, Mihara M. Determination of

- malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978;86:271-278.
30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
 31. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 1985;113:548-554.
 32. Aebi H. Catalase in vitro. *Methodes Enzymol.* 1984;105:121-126.
 33. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathion peroxidase. *Methodes Enzymol.* 1984;105:114-121.
 34. Grishman MB, Engerson TD, McCord JM, Jone HP. A comparative study of neutrophil purification and function. *J Immunol Methods.* 1985;82:315-20.
 35. Ross D, Moldeus P. Antioxident defense systems and oxidative in Membrane Lipid Oxidation. Boston:CRC Press. 1993:151-170.
 36. Meister A, Anderson ME. Gutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:711-760.
 37. Starke PE, Farber JL. Endogenous defence against the cytotoxicity of hydroge peroxide in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1985;260:86-92.
 38. Deneke SM, Fangurg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol.* 1989;257:163-173.
 39. 전승휘, 왕광기. 중의장상학. 상해:상해중의학원출판사. 1987:154-155.
 40. Greenwald RA. Therpeutic usages of oxygen radical scavengers in human diseases: myths and realities. *Free Radical Res Commun.* 1991;12:531-538.
 41. Downey JM. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Ann Rev Physiol.* 1990;52:487-504.
 42. 김우환. 인진오령산의 백서 간병변에 대한 보호 및 회복작용. 원광대학교 대학원 박사학위논문. 1988.
 43. 표입정, 이장훈, 우홍정, 김병운. 인진사령산이 흰쥐 간손상에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 1995;16(2): 281-288.
 44. 우홍정. 인진오령산과 인진증량한 구성방이 흰쥐 간 손상에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 1992;13(1): 234-241.
 45. 김병운, 우홍정, 임재훈, 김정제. 청간건비탕의 인진 증량이 백서의 손상간에 미치는 영향. *경희한의대는 문집.* 1980;3:213-218.
 46. 신길구. 신씨본초학. 서울:수문사. 1988:16, 88, 91, 101, 104, 221, 305, 357, 366, 486, 489, 490, 498, 501, 589, 592, 600, 661, 694, 707, 722, 725.
 47. 김정수. 표준본초학. 서울:진명출판사. 1975:58, 75, 84, 140, 143, 177, 204-205, 207, 229, 266, 303, 340, 343, 361, 367, 397, 427, 460.
 48. 신민교. 원색임상본초학. 서울:영림사. 1991:171, 176, 219, 243, 249, 250, 252-253, 380, 384, 386, 387-388, 394-395, 413, 415, 421, 424, 519.
 49. 강순수, 노승현, 이상인. 방제학. 서울:계축문화사. 1995:41.
 50. Yonaha M, Ohbayashi Y, Ichinose T, Sagai M. Lipid peroxidation stimulated by mercuric chloride and its relation to the toxicity. *Chem Pharm Bull.* 1982; 30:1437-1442.