

## 茵陳蒿湯과 吳茱木瓜湯의 抗酸化 및 肝細胞 保護效果

이상현, 김영복\*  
홍익한의원, \*동서한의원

### ABSTRACT

## Antioxidative and Hepatoprotective Effects of Injinho-Tang and Osumogwa-Tang

Sang-Hyun Lee, Young-Bok Kim\*  
Hong ik Oriental Clinic, \*Dong suh Oriental Clinic

Korean traditional medicine has been used for the treatment of the various diseases based on both oriental medicinal theory and clinical trials. Thus, the prescriptions of Korean traditional medicine would be useful for the development of new therapeutics. This research focuses on the fundamental study in Korean traditional prescriptions for the development of new hepatoprotective agents. We found two prescriptions, Injinho-Tang and Osumogwa-Tang, showed the significant DPPH free radical scavenging and hepatoprotective effect, respectively. It is well-known that free radical scavenging effect is related to the prevention of various pathological events including liver injury. This paper deals with hepatoprotective effects on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells, free radicals scavenging on both DPPH and superoxide of above two prescriptions.

Hot water extract of Injinho-Tang did not show the significant hepatoprotective effect on

- 
- 교신저자 : 김영복
  - 경기도 부천시 소사구 삼곡본동 670-9 동서한의원
  - Tel : 032-651-7575 E-mail : bowha98@hanmail.net
  - 접수 : 2008/ 06/ 04 1차수정 : 2008/ 06 /08 2차수정 : 2008/ 06 /12 채택 : 2008/ 06/ 16

tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells, however, it shows the significant scavenging effects for both DPPH and superoxide radicals. On the other hand, all of the hot water extracts of constituent herbal drugs in Injinho-Tang exhibited the promising protective effect on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. Of these, water extract of Rhei Rhizoma showed the most prominent effect on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. Bioassay-guided fractionation of Rhei Rhizoma extract has furnished four compounds, and their chemical structures have been identified by comparison of their spectral data with those of literature as chrysophanol (1), emodin (2), 3,5-dihydroxy-4'-methoxystilbene (3), and rhapontigenin (4), respectively. Among the isolated compounds, compounds 2-4 revealed the significant hepatoprotective effect *in vitro* when their  $EC_{50}$  values compare with that of silybin, as a positive control. It also exhibited that emodin possessed the most hepatoprotective effect among these active compounds.

In case of Osumogwa-Tang, its hot water extract showed the moderate protective effect on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. Hot water extract of Chaenomelis Fructus, one of the constituent herbal drug of this prescription, exhibited the significant hepatoprotective effect with  $EC_{50}$  value of  $7.8 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ , however, it showed strong cytotoxicity in Hep G2 cells above the concentration of  $25 \mu\text{g/ml}$ . It was revealed that both hot water extract of Evodiae Fructus and its butanol soluble fraction showed the moderate hepatoprotective effect but concentration-dependent activity in Hep G2 assay system. Two quinolone alkaloids, evocarpine and dihydroevocarpine, also tested for their hepatoprotective effects on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells, however, these two compounds derived from the Evodiae Fructus as the major constituents did not show *in vitro* hepatoprotective effect. From these results, it would be necessary to further isolation of its hepatoprotective compounds from the butanol soluble fraction of the hot water extract of Evodiae Fructus.

**Key word** : Injinho-Tang, Osumogwa-Tang, Free radical scavenging, Hepatoprotective

## 1. 緒 論

肝 질환은 우리나라에서 癌과 糖尿病 다음으로

높은 발병율과 사망률을 나타내고 있으며 계속적으로 증가 추세를 나타내고 있다. 이 疾患은 뚜렷한 診斷指標가 없을 뿐만 아니라 自覺症狀이 거의

없이 진행되다가 증세 발현시에는 치료가 매우 어려운 상태가 된다. 또한 현재까지 뚜렷한 치료제가 개발되지 않고 있으며 대증적인 치료만이 가능한 상태라는 점이 이 질환의 극복에 커다란 문제점으로 지적되고 있다<sup>1)</sup>.

이와 같이 肝 질환은 사회적 경제적으로 중요한 질환으로 인식되어 새로운 치료제 개발이 시급한 상태이다. 천연물은 합성 화합물에 비하여 비교적 안전하다고 인정되고 있어 장기간 투여가 필요한 肝 질환 치료약물의 특성상 중요한 의약품 개발 자원으로 생각되고 있다. 특히 오랜 기간동안 韓醫學的 이론과 臨床經驗을 통하여 그 효능이 인정되어 肝 질환 치료목적으로 이용되고 있는 韓方處方은 새로운 肝 질환 치료제 개발을 위한 일차적인 후보약물로 생각할 수 있다.

黃疸은 주로 급성바이러스성 간염, 만성간염, 간경화, 담낭 및 담도 질환 등에서 볼 수 있는 주요 증상이다. 그러므로 한의학에서 肝 질환은 黃疸과 가장 밀접한 연관성이 있는 것으로 해석할 수 있으며, 이와 같은 肝膽疾患에 활용한 대표적인 처방중의 하나가 茵陳蒿湯이다. 茵陳蒿湯은 肝膽의 濕熱을 제거하는 清熱利膽法에 해당되는 處方이며, 吳茱萸木瓜湯은 陰黃에 활용하는 처방 중의 하나로 溫肝散寒法에 해당되는 方劑이다.

한편 茵陳蒿湯은 A.D. 약 200년경 張<sup>2)</sup>의 傷寒論에 수록된 처방으로 藥物構成은 茵陳, 梔子, 大黃으로 되어 있으며, “傷寒七八日 身黃而橘子色 小便不利 腹微滿者 茵陳蒿湯主之”라하여 利小便, 退黃逐熱하는 효능으로 여러 醫家<sup>3-6)</sup>들에 의하여 黃疸을 치료하는 처방으로 널리 사용하였고 최근에는 傳染性肝炎, 急性病毒性肝炎, 膽道蛔蟲症 및 膽系 感染 疾患에 응용되고 있으며, 保肝作用<sup>7)</sup>도 있는 것으로 보고 되고 있다.

吳茱萸木瓜湯은 鮑<sup>8)</sup>의 驗方新編에 수록된 처방으로 藥物구성은 吳茱萸, 木瓜, 食鹽이며, 肝寒凝滯, 手足轉筋을 치료한다고<sup>9)</sup> 하였으며, 특히, 肝寒凝滯와 연관해서 간세포 보호효과에 대한 연구가 진행

되고 있다.

肝 질환에 대한 실험적 연구로는 천연자원을 이용한 간 기능 향상 및 간 질환 치료제의 개발을 위한 연구가 시도되어 왔으며 이들 중 마리아영경귀의 씨로부터 얻어진 silymarin, 오미자로부터 분리된 schizadrine, gomisin A<sup>10)</sup>, 식나무(*Acuba japonica*)로부터 분리한 aucubin이 肝細胞內 과산화지질 생성억제, 간 세포내 약물 대사효소에 작용하여 肝細胞에 대한 보호효과<sup>1)</sup>가 있는 것으로 알려져 있으며 茵陳이나 茵陳이 主藥으로 配合된 處方의 肝膽疾患 치료에 대한 실험적 연구도 진행되고 있다<sup>11,12)</sup>.

이에 저자는 새로운 肝 질환 예방 또는 치료제의 발견 및 개발을 목적으로 그 효과가 예상되는 茵陳蒿湯과 吳茱萸木瓜湯을 선정하고 각 처방 구성 약물의 전탕액 또는 분획물에 대하여 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 자유라디칼과 superoxide 소거활성 및 인간 간암세포주인 Hep G2 cell line을 이용한 간세포 보호활성 등 in vitro 활성검색법을 이용하여 肝 보호 효능 연구를 시행하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料 및 抽出物 製造

실험에 사용한 약물은 원광대학교 익산 한방병원에서 구입하였으며, 外部形態 등을 확인하고 세 말하여 사용하였다. 본 연구에서 사용한 茵陳蒿湯(IJHT)과 吳茱萸木瓜湯(OSMGT)은 각각 出典에 따른 용량을 정확히 취하여 등근 플라스크에 넣고 3배량의 증류수를 가하여 100℃에서 2시간 가열 추출하였다. 가열이 끝난 후 열시에 여과하고 여액은 감압농축기를 사용하여 농축한 다음 동결건조하여 각각의 추출물을 얻었다. 단, 吳茱萸木瓜湯(OSMGT)의 경우에는 食鹽이 세포에 미치는 영

향을 고려하여 전탕액의 제조에서 제외하였다. 茵陳蒿湯(IJHT)의 구성약물인 茵陳蒿(*Artemisiae capillaris Herba*; ACH), 梔子(*Gardeniae Fructus*; GF), 大黃(*Rhei Rhizoma*; RR)과 吳茱萸木瓜湯(OSMGT)의 구성 약물인 吳茱萸(*Evodiae Fructus*; EF), 木瓜(*Chaenomelis Fructus*; CF) 전탕액은 茵陳蒿湯(IJHT)과 吳茱萸木瓜湯(OSMGT) 전탕액과 동일한 방법으로 제조하였다.

## 2. 試藥 및 機器

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), L-ascorbic acid, silybin, Trolox, MTT 시약은 Sigma사에서 구입하였으며, FBS는 Hyclone사에서, RPMI medium 1640, trypsin-EDTA, antibiotic은 Gibco life technologies사에서 구입하였다. 吸光度는 UV-vis recording spectrophotometer (Amer Sham Pharmacia Biotech, U.S.A.)를 사용하여 514 nm에서 측정하였다. NMR spectrum은 JEOL JNM-ECP 500 ( $^1\text{H}$ , 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz)을, ESI-MS는 API-2000 spectrometer를 사용하여 측정하였다.

## 3. Tacrine 유발 毒性에 대한 肝 細胞 보호활성 검색

인간 肝癌 세포주인 Hep G2 세포는 한국세포주은행으로부터 분양받아 계대 배양하여 사용하였다. 培地는 penicillin G (100 IU/ml), streptomycin (100 mg/ml)이 포함된 RPMI-1640으로 FBS를 전체양의 10%가 되도록 혼합한 다음 pH 7.4로 조절한 뒤 CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리시키고 각 well당  $2 \times 10^5$  cells/ml가 되도록 96 well plate에 분주하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 예비 배양하였다. 농도별로 희석한 시료용액(1, 10, 50, 75, 100 µg/ml)과 50% 세포 사멸효과를 나타내는 tacrine 1 mM을 처리한 후 CO<sub>2</sub> incubator에서 2시간 동안 배양하고 MTT assay를 실시하였다.

## 4. MTT assay

PBS에 용해한 MTT용액(5 mg/ml)을 50 µl씩 가하고 CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 동안 방치하고 상층액을 제거한 뒤 DMSO 150 µl를 넣고 10분간 shaking하여 formazan을 용해시키고 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 실험은 3회 이상 반복하여 각각의 평균치로 EC<sub>50</sub>값을 계산하였다. 陽性 대조약물은 silybin을 사용하였다. 실험 결과는 mean ± S.D.로 나타냈으며, 통계처리는 one-way ANOVA test를 사용하였다.

## 5. DPPH 라디칼 消去活性 검색

0.1 mM DPPH 에탄올 용액 (1 ml), 에탄올 (1 ml), 0.05 M Tris-HCl 완충용액 (pH 7.4; 0.95 ml)의 혼합용액에 시료 에탄올 용액 (50 µl)을 넣고 실온에서 30분간 반응시켜 각 반응액의 흡광도를 517 nm에서 측정하였다. 대조군으로는 시료 대신 에탄올을 넣어 시료의 흡광도 감소 정도를 검토하였으며, DPPH 라디칼을 50% 소거시키는 시료의 농도를 IC<sub>50</sub>치로 나타내었다. 시료는 단계별로 희석한 4가지 농도를 이용하였으며, 각각 3회 측정하여 평균치를 구하였다. 陽性 대조약물로는 L-ascorbic acid를 사용하여 DPPH 자유라디칼 消去活性을 비교하였다.

## 6. Superoxide 라디칼 消去活性 검색

Dojindo molecular technologies사 제품 사용서에 준하여 실험하였으며, 간단히 설명하면 다음과 같다. 농도별로 희석한 시료용액(1, 5, 10 µg/ml)을 96 well plate에 20 µl씩 넣은 후 reagent working 용액(200 µl)과 enzyme working 용액(20 µl)을 각각 넣고 37°C에서 20분 동안 방치한 다음 ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 시료 대신 증류수를 사용하며, 陽性 대조약물로는 Trolox를 사용하였다.

SOD activity (inhibition rate, %) =

$$[(S1-S3)-(SS-S2)/(S1-S3)] \times 100$$

S1: slope of blank 1

S2: slope of blank 2

S3: slope of blank 3

SS: slope of sample

### 7. 大黃의 肝細胞 保護活性 물질의 抽出 및 分離

건조하여 세절한 大黃 68 g을 속슬렛 추출장치를 이용하여 *n*-hexane (500 ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 ml) 및 EtOAc (500 ml)를 순차적으로 3 시간씩 추출하고 여액을 감압농축하여, *n*-hexane 추출물 (1.1 g), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 추출물 (0.8 g) 및 EtOAc 추출물 (0.25 g)을 얻었다. 이 중 유의한 肝細胞 보호효과를 나타낸 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 추출물(EC<sub>50</sub> = 50 mg/ml)을 Sephadex LH-20 컬럼에 충전하고 CHCl<sub>3</sub>:MeOH (10:1)을 용출용매로 크로마토그래피를 실시하여 TLC에서 유사한 양상을 보이는 용출액을 합하고 농축하여 4개의 분획물(Fr. A-D)을 얻었다. 분획물 A (160 mg)는 다시 실리카 젤 컬럼을 이용하여 *n*-hexane : EtOAc (8:1)로 용출용매로 크로마토그래피를 실시하여 화합물 1 (25 mg, 0.037 w/w%)을 얻었다.

또한, 肝細胞 보호활성을 나타낸 분획물 B (410 mg, EC<sub>50</sub> = 40 mg/ml)는 다시 Sephadex LH-20 컬럼에 충전하고 CHCl<sub>3</sub>:MeOH(10:1)을 용출용매로 크로마토그래피를 실시하여 TLC에서 유사한 양상을 보이는 용출액을 합하고 농축하여 4개의 분획물 (Fr. B1-B4)을 얻었다. 이 중 분획물 B2 (215 mg)를 실리카 젤 컬럼을 이용하여 *n*-hexane:EtOAc(5:1)을 용출용매로 크로마토그래피를 실시하여 화합물 2 (20 mg, 0.029 w/w%)를 얻었다. 분획물 B3 (45 mg)는 실리카 젤 컬럼을 이용하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH(25:1)을 용출용매로 크로마토그래피를 실시하여 화합물 3 (31 mg, 0.046 w/w%)을 얻었다. 분획물 B4 (100 mg)는 실리카 젤 컬럼을 이용하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH(20:1)을

용출용매로 크로마토그래피를 실시하여 화합물 4 (52 mg, 0.076 w/w%)를 얻었다.

## III. 實驗 結果

### 1. 茵陳蒿湯 및 구성약물배합에 따른 DPPH 라디칼 消去 活性

茵陳蒿湯(IJHT)과 구성 약물 및 구성 약물 배합물의 전탕액에 대하여 DPPH 라디칼 消去 활성을 검토한 결과, 茵陳蒿湯(IJHT) 전탕액의 DPPH 라디칼 消去 활성은 43.4±2.6 mg/ml의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내, 陽性 대조약물인 L-ascorbic acid (IC<sub>50</sub> = 8.85±1.4 mg/ml)에 비하여 낮은 활성을 나타내었다(Table 1).

한편, 茵陳蒿湯(IJHT)의 구성 약물 중 茵陳蒿(ACH)와 大黃(RR) 전탕액은 25.6±0.9, 26.4±1.7 μg/ml의 IC<sub>50</sub> 값을 나타낸 반면, 梔子(GF) 전탕액은 DPPH 라디칼 消去 활성을 보이지 않았다. 또한, 茵陳蒿湯(IJHT)의 구성 약물들의 배합물에 대한 DPPH 라디칼 消去 활성을 검토하였으나, 모든 경우에 있어서 相乘 작용은 관찰되지 않았다.

### 2. 茵陳蒿湯 및 구성약물배합에 따른 superoxide 라디칼 消去 活性

茵陳蒿湯(IJHT) 전탕액의 superoxide 라디칼 消去 활성은 1.73±0.2 mg/ml의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내, 陽性 대조약물인 Trolox (IC<sub>50</sub> = 13.1±2.3 mg/ml)에 비하여 뛰어난 라디칼 消去 활성을 나타냈다 (Table 2).

茵陳蒿湯(IJHT)의 구성 약물의 전탕액에 대한 superoxide 라디칼 消去 활성은 DPPH 라디칼 消去 활성 실험 결과와 동일한 양상으로 茵陳蒿(ACH)와 大黃(RR) 전탕액이 우수한 효과를 나타냈다. 그러나 茵陳蒿湯(IJHT)의 구성 약물들의 配合物에 있어서는 superoxide 라디칼 消去 활성의 相乘 작용은 관찰되지 않았다.

Table 1. DPPH free radical scavenging effects of the water extracts of Injinho-Tang and its constituent herbal drugs.

Sample*	DPPH radical scavenging effect IC <sub>50</sub> (mg/ml)
IJH-1	43.4±2.6
IJH-2	38.2±1.9
IJH-3	39.8±2.4
IJH-4	44.6±1.1
IJH-5	25.6±0.9
IJH-6	>200
IJH-7	26.4±1.7
L-Ascorbic acid	8.85±1.4

Data are presented as mean ± S.D. (N=4).

\* IJH-1: IJHT, IJH-2: ACH(60g)+GF(9g), IJH-3: ACH(60g)+RR(9g), IJH-4: GF(9g)+RR(9g), IJH-5: ACH, IJH-6: GF, IJH-7: RR IJHT : Injinho-Tang  
ACH : Artemisiae capillaris Herba  
GF : Gardeniae Fructus;  
RR : Rhei Rhizoma

Table 2. *In vitro* superoxide free radical scavenging effects of the water extracts of Injinho-Tang and its constituent herbal drugs.

Sample*	Superoxide radical scavenging effect IC <sub>50</sub> (mg/ml)
IJH-1	1.73±0.2
IJH-2	1.77±0.9
IJH-3	2.03±0.8
IJH-4	4.49±1.1
IJH-5	1.45±0.8
IJH-6	8.91±1.4
IJH-7	1.33±0.6
Trolox	13.1±2.3

Data are presented as mean ± S.D. (N=4).

\* IJH-1: IJHT, IJH-2: ACH(60g)+GF(9g), IJH-3: ACH(60g)+RR(9g), IJH-4: GF(9g)+RR(9g), IJH-5: ACH, IJH-6: GF, IJH-7: RR IJHT : Injinho-Tang  
ACH : Artemisiae capillaris Herba  
GF : Gardeniae Fructus; RR : Rhei Rhizoma

### 3.茵陳蒿湯 및 구성약물배합에 따른 肝細胞 보호 활성

茵陳蒿湯(IJHT)과 구성 약물의 전탕액이 유의한 DPPH와 superoxide 라디칼 消去 활성을 나타내 肝細胞 보호 활성이 기대되어 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 細胞에 대한 보호 효과를 검토한 결과, 구성 약물인 茵陳蒿(ACH), 梔子(GF) 및 大黃(RR)의 전탕액은 모두 200 µg/ml 이하의 농도에서 肝細胞 보호 효과를 나타낸 반면, 茵陳蒿湯(IJHT) 전탕액은 300 µg/ml 이하의 농도에서는 보호 효과를 나타내지 않았다.

한편, 茵陳蒿湯(IJHT)을 구성하고 있는 개별 약물의 전탕액에 대한 肝細胞 보호 효과를 검토한 결과, 3종의 약물은 모두 200 µg/ml 이하의 농도에서 肝細胞 보호활성을 나타냈으며 특히 大黃(RR) 전탕액은 73.7±13.3 µg/ml의 EC<sub>50</sub> 값을 나타내 우수한 효과가 관찰되었다. 본 처방의 구성 약물 간의 配合物에 대한 肝細胞 보호 효과에 있어서의 相互作用은 梔子(GF)와 大黃(RR)의 배합물만이 完化한 보호 효과를 나타내었고, 다른 구성약물들의 배합에서는 相乘 效果를 관찰할 수 없었다 (Table 3).

### 4. 大黃의 肝細胞 保護活性 物質

大黃(RR)의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 추출물로부터 얻어진 화합물 1-4의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 및 mass spectrum의 data를 문헌치와 비교하여, 화합물 1과 2는 anthraquinone系에 속하는 chrysophanol과 emodin으로, 화합물 3과 4는 stilbene系에 속하는 3,5-dihydroxy-4'-methoxystilbene과 rhapontigenin으로 同定하였다<sup>13,14)</sup> (Fig. 1).

### 5. 化合物 1-4의 肝細胞 保護活性

大黃(RR)의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 추출물로부터 얻어진 화합물 1-4의 肝細胞 보호활성을 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 細胞에 대하여 검토한 결과, 3종의 화합물 2-4가 유의한 효과를 나타냈다(Table 4). 화합물

2-4는 陽性 대조약물인 silybin에 비하여 모두 우수한 肝細胞 보호활성을 나타냈으며, 특히 anthraquinone系 물질인 emodin(2)은  $11.5 \pm 0.8$  mg/ml의  $EC_{50}$ 值를 나타내 가장 우수한 효과가 관찰되었다.

Table 3. *In vitro* hepatoprotective effects of the water extracts of Injinho-Tang and its constituent herbal drugs.

Sample*	Hepatoprotective effect $EC_{50}$ (mg/ml)
IJH-1	>300
IJH-2	>300
IJH-3	>300
IJH-4	$130.7 \pm 2.8$
IJH-5	$150.4 \pm 19.8$
IJH-6	$91.2 \pm 2.3$
IJH-7	$73.7 \pm 13.3$
Silybin	$33.3 \pm 1.6$

Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (N=4).

\* IJH-1: IJHT, IJH-2: ACH(60g)+GF(9g),  
IJH-3: ACH(60g)+RR(9g),  
IJH-4: GF(9g)+RR(9g), IJH-5: ACH,  
IJH-6: GF, IJH-7: RR IJHT : Injinho-Tang  
ACH : Artemisiae capillaris Herba  
GF : Gardeniae Fructus; RR : Rhei Rhizoma

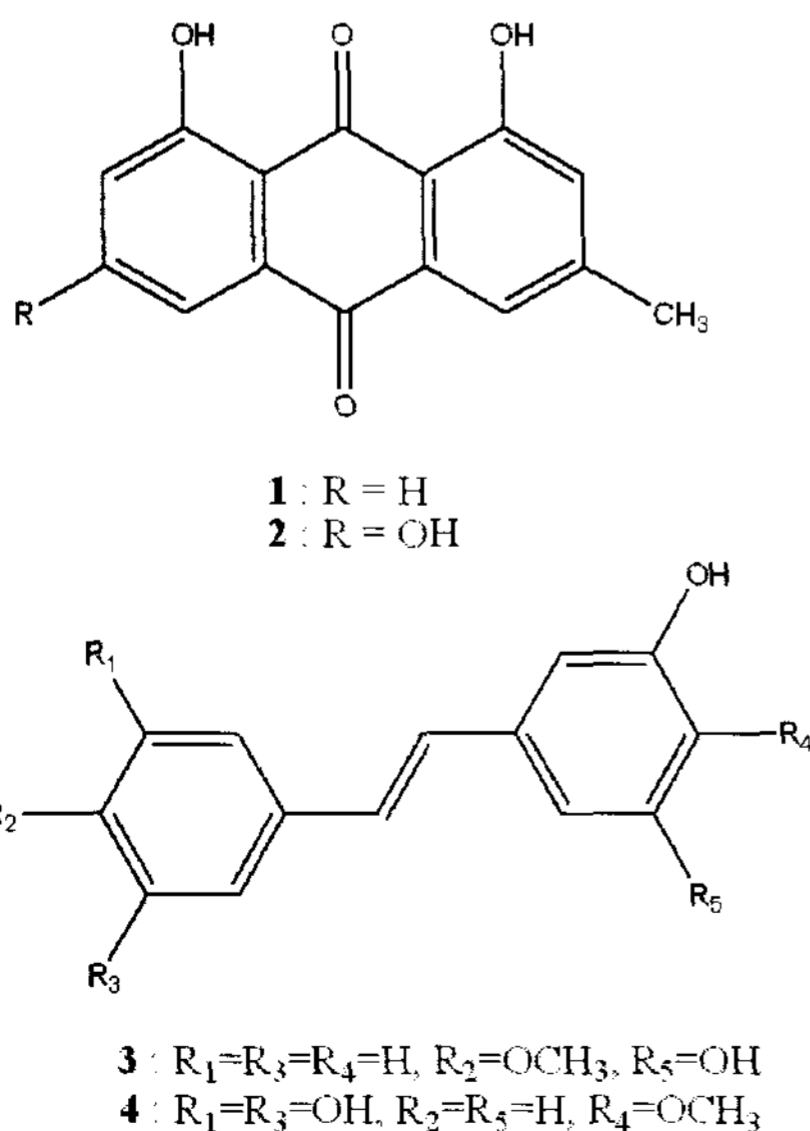


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1-4.

Table 4. Hepatoprotective effects of compounds 1-4 on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells.

Compound	Hepatoprotective effect $EC_{50}$ (mM)
Chrysophanol (1)	>100
Emodin (2)	$11.5 \pm 0.8$
3,5-Dihydroxy-4'-methoxy stilbene (3)	$26.1 \pm 2.3$
Rhapontigenin (4)	$23.0 \pm 0.3$
Silybin	$69.0 \pm 3.4$

Table 5. Hepatoprotective effects of the water extracts of Osumogwa-Tang and its constituent herbal drugs on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells.

Sample**	weight (g)	distribution ratio (%)	$EC_{50}$ ( $\mu$ g/ml)
OSMGT	-	-	$231.8 \pm 8.6$
EF	6	33.3	>300
CF	12	66.7	$7.8 \pm 0.1^*$
Silybin	-	-	$38.4 \pm 1.3$

Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (N=4).

\* $P < 0.05$  compare to the control (silybin) (one-way ANOVA test)

\*\*OSMGT: Osumogwa-Tang, EF: Evodiae Fructus, CF: Chaenomelis Fructus

## 6. 吳茱木瓜湯과 構成 藥物의 肝細胞 保護活性

吳茱木瓜湯(OSMGT)과 구성 약물의 전탕액이 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 細胞에 대한 보호 효과를 MTT를 이용하여 세포 생존률을 계산하고, 보호 효과를  $EC_{50}$ 值로 나타내어 비교하였다(Table 5, Fig. 2).

吳茱木瓜湯(OSMGT)의 전탕액은 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 細胞에 대한 보호 효과가  $231.8 \pm 8.6$   $\mu$ g/ml의  $EC_{50}$ 值를 나타내었으며, 본 처방의 구성 약물에 대한 肝細胞 보호효과의 검토에서는 木瓜(CF) 전탕액( $EC_{50} = 7.8 \pm 0.1$   $\mu$ g/ml)이 陽性 대조약물인 silybin( $EC_{50} = 38.4 \pm 1.3$   $\mu$ g/ml)에 비교하여 현저한 효과를 나타냈다.

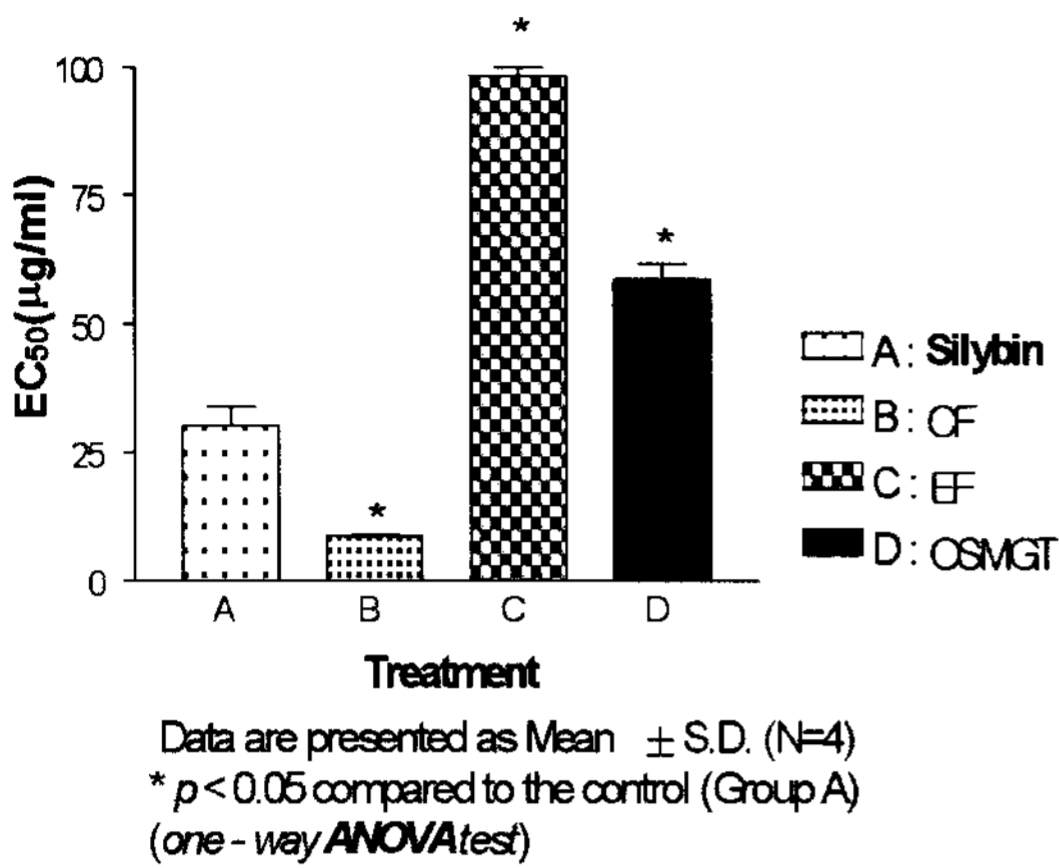


Fig. 2. Hepatoprotective effects of Osumogwa-Tang and its herbal drugs.

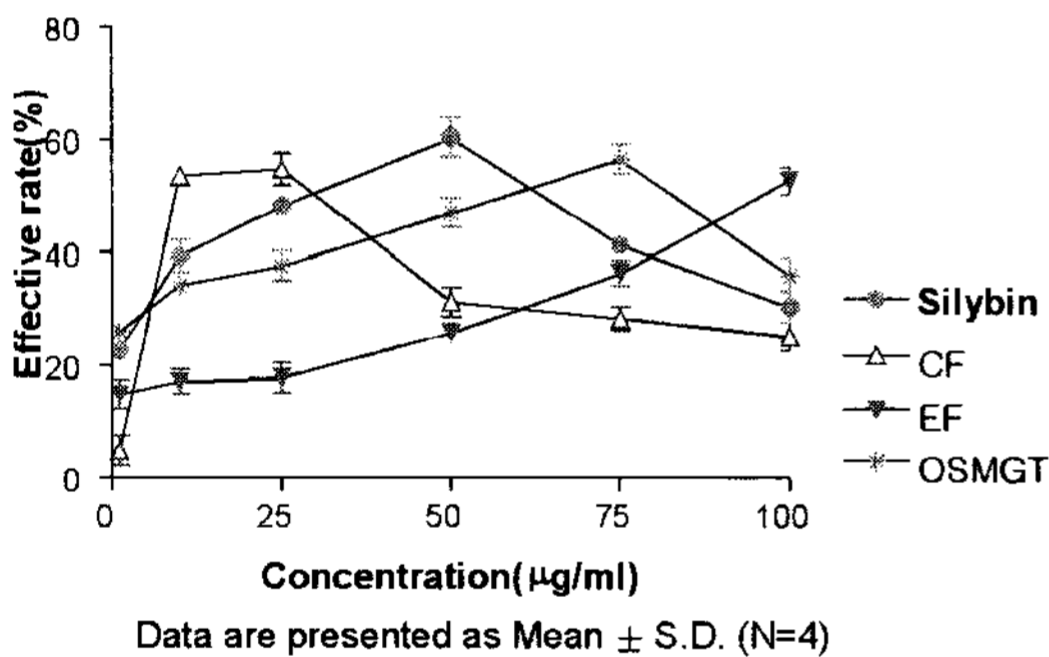


Fig. 3. Effective rates of hepatoprotective effects for Osumogwa-Tang and its herbal drugs.

Fig. 3은 吳茱萸木瓜湯(OSMGT)과 구성 약물의 전탕액의 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 細胞에 대한 보호 효과를 濃度-活性 상관관계의 관점에서 관찰한 결과이다.

木瓜(CF) 전탕액은 저농도에서는 우수한 肝細胞 보호 효과를 나타냈으나, 25 µg/ml 이상의 농도에서는 현저한 세포 독성이 관찰되었다. 한편, 吳茱萸木瓜湯(OSMGT) 전탕액의 경우에는 25 µg/ml까지는 吳茱萸(EF)와 木瓜(CF) 전탕액의 보호효과의 평균치를 나타냈으나, 50-70 µg/ml의 농도에서는 相乘效果가 관찰되었다. 또한, 吳茱萸(EF) 전탕액은 농도 의존적으로 肝細胞 보호활성이 증가됨을 알 수 있었다. 즉, 100 µg/ml의 농

도에서는 다른 시료에 비하여 가장 우수한 肝細胞 보호 효과를 나타내었다.

### 7. 吳茱萸木瓜湯 分劃物의 肝細胞 保護活性

吳茱萸木瓜湯(OSMGT) 전탕액이 유의한 肝細胞 보호활성을 나타냈기 때문에 활성물질을 규명할 목적으로 본 처방의 分劃物에 대한 Hep G 細胞 보호 효과를 검토하였다. 즉, 吳茱萸木瓜湯(OSMGT) 전탕액을 부탄올로 分配하여 부탄올 가용부와 수층을 각각 농축하여 분획물을 얻고 이들의 농도에 따른 肝細胞 보호 효과를 검토하였다 (Fig. 4).

吳茱萸木瓜湯(OSMGT) 전탕액의 부탄올 分劃物 (BuOH Fr.) 및 水層(Aqueous Fr.)은 모두 농도 의존적으로 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 細胞에 대하여 보호 효과를 나타냈으나, 陽性 대조 약물인 silybin의 보호효과와 비교할 때 유의성이 관찰되지 않았다. 또한, 吳茱萸木瓜湯(OSMGT) 전탕액의 水層이 부탄올 分劃物에 비하여 상대적으로 우수한 보호효과를 나타냈다.

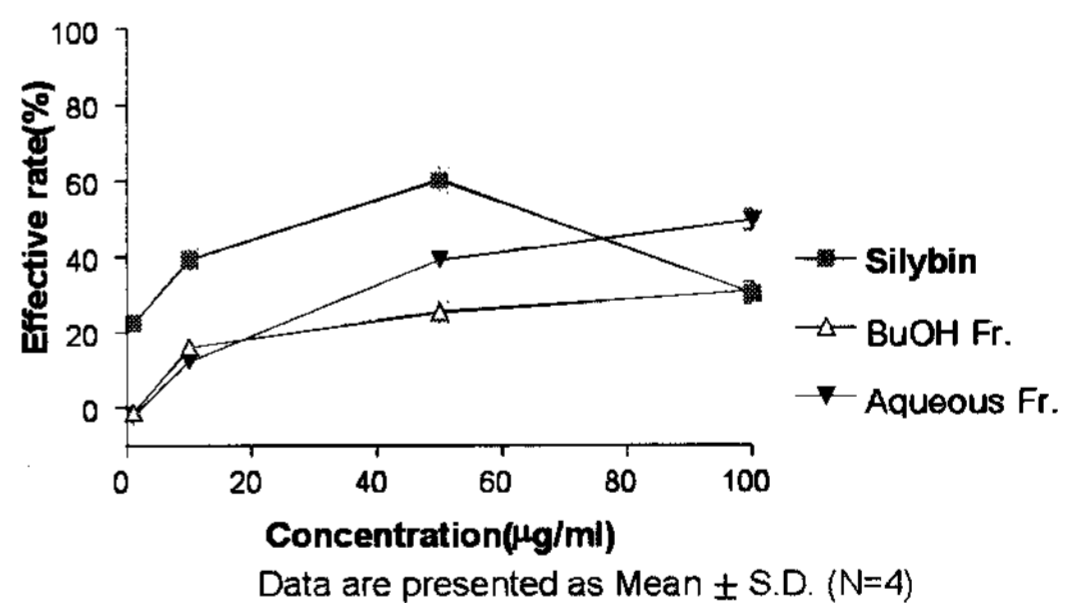


Fig. 4. Effective rates of hepatoprotective effects for Osumogwa-Tang and its fractions.

### 8. 吳茱萸 分劃物의 肝細胞 保護活性

吳茱萸(EF) 전탕액에 대해서도 吳茱萸湯의 경우와 동일한 방법으로 분획물을 조제하고 각각의 분획물의 肝細胞 보호효과를 관찰하였다. 완화된 肝細胞 보호효과를 나타냈던 吳茱萸(EF) 전탕액은 활성물질이 부탄올 분획으로 이행되었음을 알



수 있었다(Fig. 5).

즉, 吳茱萸(EF) 전탕액의 부탄올 分劃物(BuOH Fr.)이 水層 分劃物(Aqueous Fr.)에 비하여 상대적으로 높은 肝細胞 보호활성을 나타냈다. 이는 부탄올 분획물로 활성물질이 이행되었음을 의미하며, 본 연구실에서 확보하고 있는 吳茱萸(EF)의 주성분인 2종의 quinolone系 alkaloid인 evocarpine과 dihydroevocarpine(Fig. 6)이 활성을 나타낼 가능성이 판단되었기 때문에 이들 물질에 대하여 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 細胞 보호 효과를 검토하였으나, 이들 2종의 화합물은 모두 100 mM 이하의 농도에서는 활성을 나타내지 않음을 알 수 있었다(data not shown).

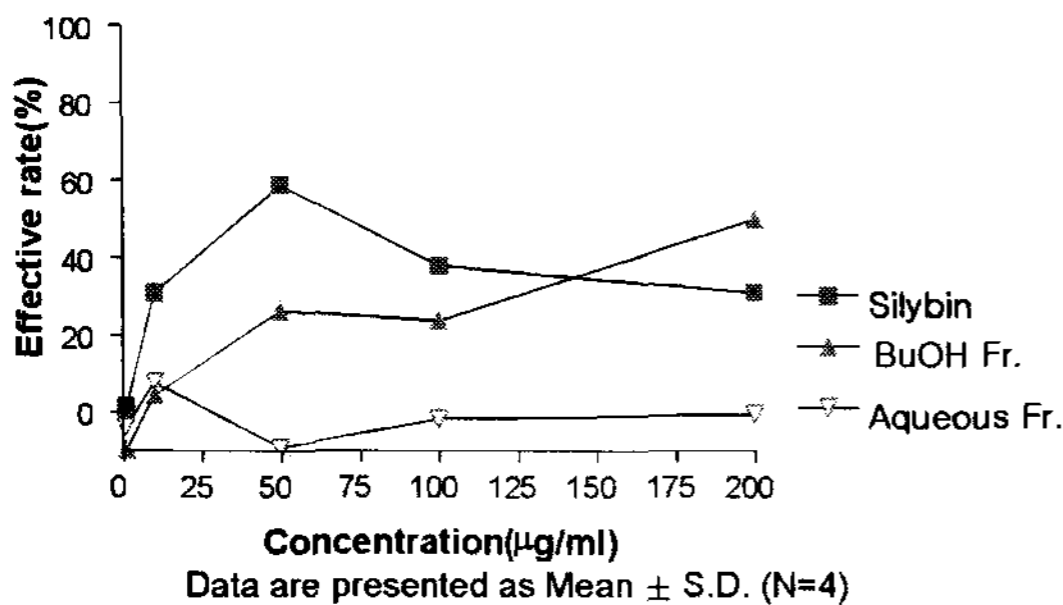
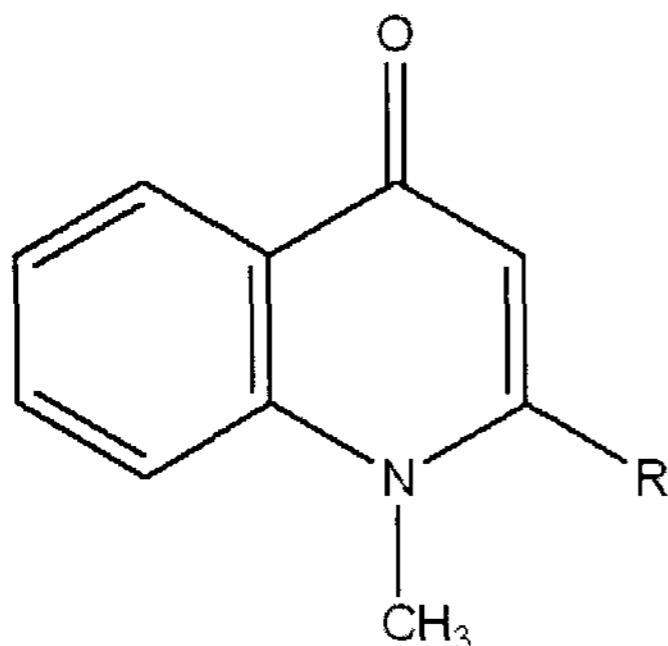


Fig. 5. Effective rates of hepatoprotective effects for the solvent fractions of Evodiae Fructus.



R = C<sub>13</sub>H<sub>25</sub> (Evocarpine)

R = C<sub>13</sub>H<sub>27</sub> (Dihydroevocarpine)

Fig. 6. Structures of evocarpine and dihydroevocarpine.

## IV. 考 察

한의학에서의 肝은 서양의학의 해부학적 臟器만을 뜻하는 것이 아니고<sup>18)</sup> 肝機能系가 갖고 있는 神經, 精神, 筋肉, 血 등 광범위한 의미로 포함하고 있기 때문에 서양의학의 肝 질환 治療와 가장 밀접한 연관성을 갖고 있는 한의학 病症은 黃疸이라고 할 수 있다.

그러므로 본 연구에서는 새로운 肝 질환 치료제 개발을 위한 기초 연구의 일환으로 한의학에서 黃疸에 이용되고 있는 처방을 중심으로 예비검색을 실시하고 선정된 2종의 처방인 茵陳蒿湯과 吳茱萸木瓜湯에 대하여 肝細胞 보호 효과를 검토하고자 하였다.

茵陳蒿湯은 傷寒論<sup>15)</sup>에는 外感으로 유발된 黃疸에, 그리고 金匱要略方論<sup>16)</sup>에는 內傷으로 인한 黃疸에 수록된 이후로 주로 脾膽濕熱型의 陽黃에 응용되어 왔다. 黃疸은 脾胃와 肝膽에 濕熱이 薰蒸하여 나타나는 증후이며 黃疸을 陽黃과 陰黃으로 나누고 陽黃은 濕熱이 주원인이며 陰黃은 氣血不足과 陽虛와 관련 있는 것이라고 하였다<sup>17)</sup>.

陽黃의 主症狀은 황달색이 선명하고 발열하며 口渴이 있고 尿量은 적으며 색은 붉던가 노랗다. 大便은 硬便이며 腹滿하고 舌苔는 두터우며 노랗다. 치료는 清熱利濕을 주로 하는 茵陳蒿湯이 대표적으로 사용된다.

陰黃의 主症狀은 색이 선명하지 않고 어두우며 식욕이 없고 腹滿하며 軀幹과 手足이 冷하고 舌苔는 膩, 脈은 沈遲하다<sup>17)</sup>. 치료는 祛寒濕 하는 吳茱萸木瓜湯을 응용 할 수 있다

茵陳蒿湯 중에 茵陳은 苦 平하여 濕熱로 인한 黃疸을 치료하는 제일의 要藥이고, 梔子是 苦 寒하여 清熱瀉火, 涼血解毒하며 濕熱을 小便으로 배출하고, 大黃은 苦 寒하며, 瀉熱通便하고 清熱利膽하며 濕熱을 大便으로 배설한다<sup>19-22)</sup>. 약리학적으로는 茵陳은 解熱, 抗炎, 利膽作用 및 補肝作用이

있고 梔子は 抗炎, 利膽作用, 肝臟의 保護作用이 있으며 大黃은 抗菌, 抗腫瘤作用, 利膽作用, 肝 損傷의 보호작용이 있다<sup>23,24)</sup>.

또한, 吳茱萸木瓜湯 중에 吳茱萸는 辛苦 溫하여 溫中止痛, 疎肝解鬱 溫肝散寒의 효능이 있고 木瓜는 酸 溫하며 平肝舒筋 和胃化濕하여 治吐瀉轉筋에 사용한다<sup>25)</sup>. 즉, 吳茱萸의 辛熱한 性味로 溫肝解鬱시키고 木瓜의 酸溫한 性味로 平肝舒筋하여 능히 散寒舒筋의 效를 발휘하여 능히 霍亂轉筋을 治하며<sup>9)</sup> 肝主筋의 이론과 溫肝散寒의 主治로 陰黃에 응용 할 수 있다. 약리학적으로는 吳茱萸는 抗菌, 鎮痛, 抗病毒, 補肝作用이 있으며 木瓜는 抗菌, 抗腫瘍, 補肝作用이 있다<sup>23,24)</sup>.

한편, 현재 肝 保護 효과를 검색하기 위하여 이용되고 있는 검색법의 대부분은 肝 毒性 유발물질로서 사염화탄소, 갈락토사민 등을 사용하고 있다. 그러나, 이들 독성물질은 현실적으로 사람에게는 접촉할 기회가 거의 없는 것들이기 때문에 실생활에서 肝 損傷을 일으키기 쉬운 에탄올, 곰팡이 毒 및 肝 毒性 유발 의약품 등을 肝 毒性 유발물질로 사용하는 것이 보다 바람직하다고 생각 된다. 임상에서 의약품으로 사용되는 tacrine(1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine hydrochloride)은 acetylcholinesterase 저해제로서 알츠하이머 症候群 치료제로 사용되고 있는 약물이다. 그러나, 이 약물은 투여용량에서 30-50%의 환자에 있어서 가역성 肝 毒性을 나타내는 부작용을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>26)</sup>. Hep G2 細胞는 不滅화된 사람 肝癌 세포로서 일차배양 肝 細胞와 유사한 기능을 가진다는 사실이 알려져 있으며<sup>27)</sup>, Hep G2 細胞와 흰 쥐 일차배양 肝 細胞는 tacrine 유발 독성에 대하여 상관성이 인정되고 있다<sup>28)</sup>. 한편, tacrine의 肝 毒性에 대한 작용기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않은 상태이지만 酸化的 스트레스가 하나의 원인으로 생각되고 있다<sup>29)</sup>. 이와 같은 배경에 입각하여 본 저자는 새로운 肝 질환 치료제 개발을 위한 기초연구의 일환으로서 tacrine으로 유발한 Hep G2 細胞에 대

한 보호 활성을 검색하였다.

또한, superoxide와 같은 자유라디칼이나  $H_2O_2$ 와 같은 다른 酸素種들은 생체 내에서 지속적으로 생성된다는 사실은 잘 알려져 있다. 따라서 생체는 자유라디칼에 대항하기 위하여 항산화적 방어 시스템과 산화적으로 손상된 분자들의 축적을 방지할 수 있는 복구시스템을 가지고 있다. 그러나, 과량으로 생성된 자유라디칼은 많은 질병과 연관되어 있음이 잘 알려져 있으며, 자유라디칼은 生體膜의 불포화 지방산을 공격하여 생체막 지질의 과산화를 일으키고, 이는 老化, 發癌, 動脈硬化 및 肝 질환 등과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고 되었으며<sup>30-32)</sup>, DNA를 공격하여 변이를 유발하고 癌을 일으키는 것으로도 알려져 있다<sup>33)</sup>. 이상과 같이 자유라디칼은 직·간접적으로 肝 損傷과 관련이 있기 때문에 본 연구에서는 시료의 DPPH와 superoxide 라디칼 소거활성을 검토하였다.

DPPH 라디칼은 합성품으로서 다른 분자로부터 불안정한 수소를 끌어올 수 있는 성질을 가진 물질로 알려져 있으며<sup>34,35)</sup>, DPPH 라디칼의 消去能과 지질 과산화 억제능과의 상관성이 인정되고 있다<sup>36,37)</sup>.

陽黃證에 쓰이는 茵陳蒿湯의 肝 보호활성을 확인하기 위하여 우선 DPPH 라디칼 소거활성을 검토한 결과, 茵陳蒿湯 전탕액은  $43.4 \pm 2.6$   $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50%의 라디칼 소거활성을 나타냈으며 (Table 1), 이는 抽出物 수준에서는 높은 활성을 나타낸 것으로 판단된다. 茵陳蒿湯 전탕액이 superoxide 라디칼 생성에 미치는 영향을 관찰한 실험에서는 陽性 대조약물로 사용한 vitamin E 유도체 중의 하나인 Trolox에 비하여 우수한 활성을 나타내었다 (Table 2). 이상과 같이 茵陳蒿湯 전탕액이 유의한 자유라디칼 소거활성을 나타내어 肝 細胞 보호활성이 기대되었기 때문에 tacrine을 毒性 유발물질로 이용한 Hep G2 細胞 보호효과를 검토하였으나, 300  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도에서는 유의한 효과가 관찰되지 않았다 (Table 3). 한편, 본 처방을 구성하고 있는 개별 약물의 전탕액에서는 완

화한 肝 細胞 보호활성이 관찰되었다(Table 3). 즉, 茵陳蒿, 梔子, 大黃 등의 모든 구성 약물이 200  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도에서 보호활성이 나타났으며, 특히 大黃 전탕액은  $73.7 \pm 13.3 \mu\text{g/ml}$ 의  $\text{EC}_{50}$  값을 나타내 가장 높은 활성을 나타냈다(Table 3). 한편, 본 방제를 구성하고 있는 약물 간의 相互作用을 검토할 목적으로 Table 3에 표시한 바와 같이 3가지의 조성물에 대하여 肝 細胞 보호활성을 검토하였으나, 뚜렷한 相乘作用은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로부터 본 처방을 구성하고 있는 大黃이 유의한 肝 細胞 보호활성을 나타냄을 알 수 있었고, 따라서 大黃 중에 함유된 肝 細胞 보호활성 물질을 규명할 목적으로 大黃을 다양한 유기용매로 추출하고  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  추출물을 각종 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 4종의 순수 화합물(1-4)을 얻었다. 얻어진 물질은 NMR, MS 스펙트럼 등의 기기 분석적 방법을 이용하여 그들의 구조를 각각 chrysophanol(1), emodin(2), 3,5-dihydroxy-4'-methoxystilbene(3), rhapontigenin(4)으로 同定하였다(Fig. 1).

大黃의  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  추출물로부터 얻어진 화합물 1-4의 肝 細胞 보호활성을 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 細胞에 대하여 검토한 결과, 3종의 화합물 2-4가 유의한 효과를 나타냈다(Table 5). 化合物 2-4는 陽性 대조약물인 silybin에 비하여 모두 우수한 肝 細胞 보호활성을 나타냈으며, 특히 anthraquinone系 물질인 emodin(2)은  $11.5 \pm 0.8 \text{ mg/ml}$ 의  $\text{EC}_{50}$  값을 나타내 가장 우수한 효과가 관찰되었다. 마디풀과(Polygonaceae)를 비롯한 식물에서 발견되는 anthraquinone系 물질인 emodin은 흰 쥐의 肝 纖維化 모델을 이용한 실험에서의 肝 보호효과가 보고되었으며<sup>38)</sup>, 3,5-dihydroxy-4'-methoxystilbene에 대해서는 抗補體 활성이 알려져 있다<sup>39)</sup>.

또한, rhapontigenin은 抗補體 活性<sup>39)</sup>, 血小板 凝集 抑制效能<sup>40)</sup>, nitric oxide 生成 抑制效能<sup>41)</sup> 및 抗 allergy 活性<sup>42)</sup> 등 다양한 생리활성이 밝혀져 있다. 그러나, 현재까지 3,5-dihydroxy-4'-methoxystilbene

과 rhapontigenin에 대한 肝 保護效果는 보고된 바 없으며 따라서, 이들 물질은 새로운 肝 保護 활성 식·의약품 개발을 위한 선도물질로서의 중요한 가치를 가지는 것으로 판단된다.

吳茱木瓜湯의 出典은 驗方新編으로서 조성은 吳茱萸, 木瓜, 食鹽으로 구성되어 있으며, 효능은 溫肝, 解鬱, 舒筋하며 陽黃에 사용하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 處方을 구성하고 있는 약물 중 식염이 세포에 미칠 영향을 고려하여 제외시켜 추출물을 조제하였다. 吳茱木瓜湯의 전탕액은 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 細胞에 대한 보호 효과가  $231.8 \pm 8.6 \mu\text{g/ml}$ 의  $\text{EC}_{50}$  값을 나타내었으며, 이는 추출물 수준에서는 유의한 肝 細胞 보호효과로 판단된다(Table 5, Fig. 2). 한편, 木瓜 전탕액은 저농도에서는 우수한 肝 細胞 보호 효과를 나타냈으나, 25  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 현저한 세포 독성이 관찰되었다. 한편, 吳茱木瓜湯 전탕액의 경우에는 25  $\mu\text{g/ml}$ 까지는 吳茱萸와 木瓜 전탕액의 보호효과의 평균치를 나타냈으나, 50-70  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 相乘效果가 관찰되었다. 또한, 吳茱萸 전탕액은 농도 의존적으로 肝 細胞 보호활성이 증가됨을 알 수 있었다. 즉, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 다른 시료에 비하여 가장 우수한 肝 細胞 보호 효과를 나타내었다(Fig. 3). 吳茱木瓜湯 전탕액의 부탄올 분획물 및 수층은 모두 농도 의존적으로 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 세포에 대하여 보호 효과를 나타냈으나, 吳茱木瓜湯 전탕액의 수층이 부탄올 분획물에 비하여 상대적으로 우수한 보호효과를 나타냈다(Fig. 4).

천연물화학적인 관점에서 부탄올 분획물에는 일반적으로 저분자 내지는 중간 정도의 분자량을 가지는 유기화합물이 존재하게 되며, 수층에는 糖類, 蛋白質 등의 극성물질 또는 고분자물질이 존재하는 것으로 알려져 있다. 그러므로, 의약품 개발의 용이성 및 가능성의 차원에서 활성물질의 부탄올 분획으로의 이행을 우선적인 판단 기준으로 하고 있다. 따라서, 吳茱木瓜湯 전탕액의 수층이

부탄을 분획물에 비하여 상대적으로 우수한 보호 효과를 나타냈으며, 木瓜 전탕액에서는 현저한 세포 독성이 관찰되었기 때문에 다음 단계로 吳茱萸 전탕액의 분획물에 대한 보호효과를 검토하였다. 吳茱萸 전탕액은 활성물질이 부탄을 분획으로 이행되었음을 알 수 있었다(Fig. 5). 즉, 吳茱萸 전탕액의 부탄을 분획물이 수층 분획물에 비하여 상대적으로 높은 肝細胞 보호활성을 나타냈다. 이는 부탄을 분획물로 활성물질이 이행되었음을 의미하며, 본 연구실에서 확보하고 있는 吳茱萸의 주성분인 2종의 quinolone系 alkaloid인 evocarpine과 dihydroevocarpine(Fig. 6)이 활성을 나타낼 가능성이 판단되었기 때문에 이들 물질에 대하여 tacrine으로 독성을 유발한 Hep G2 細胞 보호 효과를 검토하였으나, 이들 2종의 화합물은 모두 100 mM 이하의 농도에서는 활성을 나타내지 않음을 알 수 있었다(data not shown). 이상의 결과로부터 吳茱萸의 肝細胞 보호활성 물질을 도출하기 위해서는 吳茱萸 전탕액의 부탄을 분획물에 함유된 evocarpine과 dihydroevocarpine을 제외한 다른 물질에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## V. 結 論

새로운 肝 질환 치료제 개발을 위한 기초 연구의 일환으로 茵陳蒿湯과 吳茱萸木瓜湯 및 그 구성약물에 대하여 tacrine으로 毒性을 유발한 사람 肝癌細胞인 Hep G2 세포에 대한 보호 효과, DPPH 및 superoxide 라디칼 消去 효과 등을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 茵陳蒿湯의 전탕액은 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 細胞에 대하여 유의한 肝細胞 보호효과를 나타내지 않았으나, 유의한 DPPH 및 superoxide 라디칼 소거활성이 관찰되었다.
2. 茵陳蒿湯 및 구성 약물들 간의 肝細胞 보호효

과에 대한 상승적 상호 작용은 관찰되지 않았으나, 茵陳 梔子 大黃 3종의 구성 약물 전탕액은 모두 肝細胞 보호활성을 나타내었다.

3. 茵陳蒿湯의 구성 약물 중의 하나인 大黃이 가장 현저한 肝細胞 보호 효과를 나타냈으며, 활성물질의 분리 연구를 수행하여 4종의 화합물을 얻었다.
4. 大黃으로부터 얻어진 4종의 화합물은 각종 기기분석적 결과를 종합하여 그들의 구조를 각각 chrysophanol (1), emodin (2), 3,5-dihydroxy-4'-methoxystilbene (3), rhapontigenin (4)으로 同定하였다.
5. 大黃으로부터 얻어진 4종의 화합물 중 3종의 화합물 2-4는 모두 陽性 대조약물인 silybin에 비하여 우수한 肝細胞 보호 효과를 나타냈으며, 특히 emodin이 가장 현저한 보호효과를 나타냈다.
6. 吳茱萸木瓜湯 전탕액은 tacrine으로 毒性을 유발한 Hep G2 細胞에 대하여 완화된 肝細胞 보호 효과를 나타냈다.
7. 吳茱萸木瓜湯의 구성 약물 중의 하나인 木瓜 전탕액은  $7.8 \pm 0.1$   $\mu\text{g/ml}$ 의 EC50値를 나타냈으나, 25  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 현저한 세포 독성이 관찰되었다.
8. 吳茱萸木瓜湯의 구성 약물인 吳茱萸는 전탕액 및 부탄을 분획물이 모두 농도 의존적으로 肝細胞 보호 활성이 증가됨을 알 수 있었다.
9. 吳茱萸로부터 분리 확보된 2종의 주성분으로서 quinolone系 alkaloid인 evocarpine과 dihydroevocarpine은 肝細胞 보호 활성의 주체가 아님을 알 수 있었으며, 따라서 활성물질 도출을 위한 추가 연구의 수행이 필요할 것으로 사료된다.

## 參考文獻

1. 정옥삼: 達原飲의 抗酸化 및 肝細胞 保護 效

- 果, 익산, 원광대학교 대학원(2003).
2. 張機: 仲景全書, 서울,大成文化社, 409, 494, 611 (1984).
  3. 許浚: 東醫寶鑑, 서울,南山堂, 383, 513 (1987).
  4. 孫思邈: 備急千金要方, 서울,一中社影印, 196 (1988).
  5. 李挺: 醫學入門, 서울,南山堂, 1502 (1985).
  6. 張介賓: 景岳全書, 서울,麗江出版社, 657 (1987).
  7. 陣偉 外: 中醫기초이론계열 총서 방제학, 서울, 의성당, 382-383 (1993).
  8. 鮑相璈: 驗方新編, 북경, 인민위생출판사, 171 (1990).
  9. 陳潮祖: 中醫治法與方劑, 북경, 인민위생출판사, 629-630 (1975).
  10. 김산: 冬蟲夏草가 사염화탄소로 유발된 간손상 및 간암세포증식에 미치는 영향, 익산, 원광대학교 대학원 (2001).
  11. 김성동: 茵陳蒿湯이 損傷肝 및 高脂血症에 미치는 影響, 대전, 대전대학교대학원 (1992).
  12. 김원규: 茵陳蒿湯 煎湯液의 經時的 效果變化에 關한 研究, 대전, 대전대학교 대학원 (1991).
  13. Kim D.K., Choi S.U., Ryu S.Y., Lee K.R., Zee O.P. Cytotoxic constituents of *Rumex japonicus*. *Yakhak Hoeji* 42, 233-237 (1998).
  14. Ryu S.Y., Choi S.U., Lee C.O., Lee S.H., Ahn J.W., Zee O.P. Antitumor activity of some phenolic compounds in plants. *Arch. Pharm. Res.* 17, 42-44 (1994).
  15. 蔡仁植: 傷寒論譯詮, 서울, 고문사, 176, 189 (1975).
  16. 張仲景: 金匱要約방론, 북경, 인민위생출판사, 52 (1978).
  17. 姜允皓: 동의임상내과, 서울, 서원당, 267-268 (1990).
  18. 久保道德 外: 한방의약학, 서울, 동남출판사, 162-163 (1984).
  19. 李文瑞: 傷寒論湯證論治, 서울, 의성당, 327 (1993).
  20. 이상인: 본초학, 서울, 의약사, 292-296, 479-480, 496-497 (1975).
  21. 辛民教: 임상본초학, 서울, 남산당, 259, 279, 463, 602 (1986).
  22. 上海中醫學院方藥教研組編: 中醫臨床手冊, 상해, 상해인민출판사, 45, 68, 158 (1977).
  23. 王浴生: 中藥藥理與應用, 북경, 인민위생출판사, 67, 757, 933 (1983).
  24. 苗明三 外: 法定中藥藥理與應用, 서안, 세계도서출판공사, 79-83, 197, 577-580, 815-817, 857-859 (1998).
  25. 李尙仁 外: 漢藥臨床應用, 서울, 정보사, 206, 234 (1982).
  26. Watkins P.B., Zimmerman H.J., Knapp M.J. Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of the American Medical Association* 271: 992-8 (1994).
  27. Grant M.H., Duthie S.J., Gray A.G. Mixed Function Oxidase and UDP-glucuronyltransferase Activities in the Human Hep G2 Hepatoma Cell Line. *Biochemical and Pharmacology* 37: 4111-6 (1988).
  28. Viau C.J., Curren R.D., Wallace K. Cytotoxicity of Tacrine and Velnacrine Metabolites in Cultured Rat, Dog, and Human Hepatocytes. *Drug & Chemical Toxicology* 16: 227-39 (1993).
  29. Osseni R.A., Debbasch C., Christen M.O. Tacrine-induced Reactive Oxygen Species in a Human Liver Cell Line: the Role of Anethole Dithiolethione as a Scavenger. *Toxicology In Vitro* 13: 683-8 (1999).
  30. Floyd R.A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4, 2587-2597 (1990).
  31. Yagi K. Lipid peroxides and human diseases.

- Chem. Phys. Lipids*, 45, 337-341 (1987).
32. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Gross E.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*, 119, 598-620 (1992).
33. Ames B.N., Gold L.S., Willett W.C. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 5258-5265 (1995).
34. Constantin M., Bromont C., Fickat R., Massingham, R. Studies on the activity of Bepridil as a scavenger of free radicals. *Biochem. Pharmacol.*, 40, 1615-1622 (1990).
35. Matsubara N., Fuchimoto S., Iwagaki H., Nonaka Y., Kimura T., Kashino H., Edamatsu R., Hiramatsu M., Orita K. The possible involvement of free radical scavenging properties in the action of cytokines. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 71, 239-242 (1991).
36. Ratty A.K., Sunamoto J., Das N.P. Interaction of flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical liposomal membranes and soyabean lipoxygenase 1. *Biochem. Pharmacol.*, 37, 989-995 (1988).
37. Reka E., Kouroanakis P.N. Effect of hydroxyethyl rutenosides and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. Some structural aspects. *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 486-491(1991).
38. Zhan Y., Li D., Wei H., Wang Z., Huang X., Xu Q., Lu H. Emodin on hepatic fibrosis in rats. *Chin. Med. J.* 113, 599-601 (2000).
39. 'Oh S.R., Ryu S.Y., Park S.H., Jung K.Y., Lee I.S., An K.S., Lee J.J., Lee H.K. Anticomplementary activity of stilbenes from medicinal plants. *Arch. Pharm. Res.* 21, 703-706 (1998).
40. Ko S.K., Lee S.M., Whang W.K. Anti-platelet aggregation activity of stilbene derivatives from *Rheum undulatum*. *Arch. Pharm. Res.* 22, 401-403 (1999).
41. Matsuda H., Kageura T., Morikawa T., Toguchida I., Harima S., Yoshikawa M. Effects of stilbene constituents from rhubarb on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 323-327 (2000).
42. Matsuda H., Tomohiro N., Hiraba K., Harima S., Ko S., Matsuo K., Yoshikawa M., Kubo M. Study on anti-Oketsu activity of rhubarb II. Anti-allergic effects of stilbene components from *Rhei undulati Rhizoma*(dried rhizome of *Rheum undulatum* cultivated in Korea). *Biol. Pharm. Bull.* 24, 264-267 (2001).