

# 人工膜과 Rat의 肝細胞를 利用한 血府逐瘀湯의 抗酸化 作用에 關한 研究

禹大潤 · 李泰均 · 文振榮\* · 林鍾國\* · 朴元煥\*\* · 南景琇\*\*\*

## ABSTRACT

### Inhibitory Effects of H.B.T. on Peroxidation of Lecithin-Liposome and Rat Liver Cell

<sup>1</sup>Dae-Yoon WOO, <sup>1</sup>Tae-Kyun LEE, <sup>1</sup>Jin-Young MOON, <sup>1</sup>Jong-Kook LIM, <sup>1</sup>Weon-Hwan PARK  
and <sup>2</sup>Kyung-Soo NAM ; <sup>1</sup>College of Oriental Medicine, <sup>2</sup>College of Medicine, Dongguk  
University, Kyungju, 780-714

Inhibitory effects of Hyeulbuchuckeutang(H.B.T) on the peroxidations of lecithin-liposomes by active oxygens, hydroxyl radical and superoxide anion, derived from hydrogen peroxidase-Fe<sup>2+</sup> system and xanthine-xanthine oxidase system. These effects were similar to and stronger than those of catalase, mannitol, superoxide dismutase or dl- $\alpha$ -tocopherol as a scavenger or an antioxidant. H.B.T. inhibited the peroxidation of lecithin-liposome and active oxygens in concentration-dependent manner. H.B.T. also dose-dependently protected the cell death induced

---

東國大學校 韓醫科大學 附屬韓方病院 婦人科學教室

\* 東國大學校 韓醫科大學 經穴學教室

\*\* 東國大學校 韓醫科大學 診斷學教室

\*\*\* 東國大學校 醫科大學 藥理學教室

by tert-butylhydroperoxide(tBHP) and significantly increased cell viability in the rat normal liver cell(Ac2F). These results suggested that H.B.T might play a protective role in lipid peroxidation by free radicals and tBHP

(Key Words : Liposome, Antioxidant, Lipid peroxidation)

## I. 緒 論

最近 自由基(Free radical)에 의해誘導되는人體의 脂質過酸化 反應이 組織損傷, 老化 및 各種 疾患의 發生에 關與하는 것으로 밝혀져 國內外에서 이에 대한 研究가 활발한 實情이다(4,6,11,12,41)

韓醫學界에서도 韓藥이 自由基에 미치는 影響에 관한 研究는 물론 辨證類型과 脂質過酸化反應을 比較 檢討하는 등의 研究가 이루어 지고 있다<sup>22)</sup>. 그러나 이러한 研究들은 주로 老化和 關聯하여 各種 補劑가 抗酸化反應에 미치는 影響을 밝히는 研究가 主種을 이루고 있다<sup>10,11,15,16,22)</sup>.

그런데, 金<sup>6)</sup>의 報告에 의하면 人體에 대한 脂質過酸化 反應의 影響은 瘀血의 病理와도 密接한 關聯이 있음을 알 수 있다. 이러한 認識에도 불구하고 脂質過酸化 反應과 關聯한 研究는 미흡하여 桂枝茯苓丸과 桃核承氣湯에 關한 戶田<sup>24)</sup>의 研究가 있을 뿐 血府逐瘀湯에 關한 實驗 研究는 찾아볼 수 없었다.

血府逐瘀湯은 王<sup>13)</sup>의 「醫林改錯」에 처음 收載된 以來 瘀血症을 治療하는 代表的인 處方으로서 臨床에서 月經痛, 非正常子宮出血, 無月經, 血栓性靜脈炎, 腦血管疾患, 狹心症 등 瘀血과 關聯된 諸般 疾患에 널리 活用되고 있다<sup>7,14,18)</sup>

이에 著者는 血府逐瘀湯이 活性酸素로 인한

人體의 細胞膜 障碍에 대하여 어떠한 作用을 하는지 알아보기 위하여 人工膜(Liposome) 모델인 phosphatidylcholin(Lecithin) Liposome의 過酸化反應을 抑制하는 效果와 過酸化反應으로 인한 白鼠의 正常 肝細胞 壞死에 미치는 影響을 觀察하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗 材料 및 方法

### 1. 實驗材料

#### 1) 試藥

이 實驗에 使用한 試藥 中 egg phosphatidylcholine(egg lecithin), ferric chloride(FeCl<sub>3</sub>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dl- $\alpha$ -tocopherol, Wako社 (Wako Chem. Co., Tokyo, Japan) 製品을, tert-butyl hydroperoxide(t-BHP), catalase, mannitol, superoxide dismutase(SOD), xanthine oxidase(XOD) 및 thiobarbituric acid(TBA)는 Sigma社 (Sigma Chem. Co., St. Louis, M.O, U.S.A.)를 使用하였으며 그 외 모든 試藥은 特級 내지는 一級 製品을 使用하였다.

#### 2) 細胞

이 실험에 사용한 rat의 정상 肝細胞는 Ac 2F(Donryu rat liver cell)로 이는 Japanese Cancer Research Resources Bank(JCRB)로부터 分讓받았으며, 10% FBS(Fetal bovine serum, Gibco社)을 添加한 DMEM 培地(Sigma 社)를 基本으로하여, 2-mercaptoethanol, L-glutamine (Sigma社)및 antibiotic/antimycotic(Gibco社, Gibco BRL, Life Techno. Inc., NY, U.S.A.)를 添加하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 培養하여 繼代하여 使用하였다.

### 3) 血府逐瘀湯<sup>13)</sup>의 調製

血府逐瘀湯 183.76g(2貼分量)에 蒸溜水 800ml 를 넣어 回轉減壓蒸溜機(Rotavapor, BUCHI RE 121, Switzerland)에서 可能한 한 低溫에서 2時間 抽出한 다음 濾過紙를 使用하여 減壓濾過 하였으며, 남아 있는 微量의 沈澱物은 遠心分離機를 使用하여 4°C에서 2,500 rpm으로 10분간 遠心分離 하여 上層液을 實驗에 使用하였다. 實驗에 使用한 血府逐瘀湯 1貼의 構成은 다음과 같다.

血府逐瘀湯의 構成

桃 仁	Persicae Semen	15 g
當 歸	Angelical Gigantis Radix	11.25 g
生地黄	Gehmannial Rhizoma	11.25 g
紅 花	Carthami Flos	11.25 g
牛 膝	Achyranthis Bidentatae Radix	11.25 g
枳 殼	Aurantii Fructus	7.5 g
赤芍藥	Paeoniae Radix Rubra	7.5 g
桔 梗	Platycodi Radix	5.63 g
川 芎	Cnidii Rhizoma	3.75 g
柴 胡	Bupleuri Radix	3.75 g
甘 草	Glycyrrhizae Radix	3.75 g
Total Amount		91.88 g

### 4) Phosphatidylcholine liposome의 調製

Phosphatidylcholine(lecithin) liposome의 調製는 常法<sup>28)</sup>에 따라서 行하였다. 지름 1 cm의 pyrex材質의 試驗管에 100 μ mol의 egg lecithin 을 chloroform 2 ml에 溶解시킨 다음, 室溫에서 回轉減壓蒸溜機를 使用하여 溶媒를 除去하고 lipid film을 만들었다. 이 試驗管을 眞空 desigatore에 넣고 減壓하여 1時間 동안 충분히 溶媒를 除去시킨 다음 5 ml 의 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)를 添加해서 심하게 vortex한 다음, 질소 gas를 通氣시키는 가운데 5분간 초음파로 處理하여 lecithin liposome을 調製 하였다.

## 2. 實驗方法

### 1) 過酸化水素-Fe<sup>2+</sup>系의 lecithin liposome 過酸化 反應에 대한 血府逐瘀湯의 抑制作用<sup>34)</sup>

最終濃度가 2.5mM lecithin liposome, 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2.5mM 黃酸第一鐵 암모늄과 檢體인 여러 濃度의 血府逐瘀湯 혹은 catalase, mannitol, dl-α-tocopherol이 添加된 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)의 反應溶液을 1.0ml로 하여 이를 37°C에서 1時間 培養시켰다. 그후 10% trichloroacetic acid 1.0 ml를 가해, 3,000 rpm에서 10분간 遠心分離했다. 그 上層液 1.0 ml에 0.67% thiobarbituric acid(TBA) 2.5 ml를 가하고 끓는 물에 30분간 放置한다. 이어 反應液을 얼음 위로 옮기고 n-butanol: pyridine(15:1, v/v%)混合液 4 ml를 가하여 잘 混合하고 3,000 rpm에서 15분간 遠心分離하였다. 遠心分離한 後에 上層을 spectrophotometer를 이용하여 467

530 nm에서 吸光度를 測定하고 TBA에 反應하는 物質의 生成 정도를 malondialdehyde(MDA) 生成 nmol로 過酸化脂質 含量을 表示하였다.

## 2) Xanthine-xanthine oxidase (Xanthine-XOD) 系의 lecithin liposome의 過酸化 反應에 대한 血府逐瘀湯의 抑制作用<sup>40)</sup>

最終濃도가 1  $\mu$ mol lecithin liposome, 0.33 mM xanthine, 1.7 mM ADP-0.1 mM FeCl<sub>3</sub>, 0.11mM EDTA-0.1mM FeCl<sub>3</sub>, 0.1 U/ml xanthine oxidase(XOD)를 包含한 여러 濃度の 血府逐瘀湯 혹은 superoxide dismutase, dl- $\alpha$ -tocopherol이 添加된 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)의 反應溶液을 1.0 ml로하여 이를 37°C에서 1時間 反應시켰다. 그 후 反應液을 얼음 위로 옮기고 여기에 2.0ml의 TBA 試藥 (最終濃도가 0.37% TBA, 15% trichloroacetic acid, 0.04% butylated hydroxytoluene, 2% EtOH)을 加하여 충분히 混合한 다음 끓는 물 속에서 15분간 放置한 다음 冷却하고 3,000rpm에서 10분간 遠心分離하였다. 遠心分離 한 후 spectrophotometer를 使用하여 530 nm에서 上層의 吸光度를 測定하여 MDA生成 nmol로 過酸化脂質 含量을 表示하였다.

## 3) tert-butylhydroperoxide(t-BHP)의 酸化作用에 의한 細胞壞死에 미치는 血府逐瘀湯의 影響

### (1) t-BHP의 時間別 細胞壞死測定

Ac2F를 10% FBS-DMEM 培地로 培養하여 24well plate에서 最終濃도가 1mM이 되도록 t-BHP를 處理한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 時間別로 각각 0분, 30분, 60분, 120분, 150분, 180분 동안 培養시킨 후, MTT assay<sup>37)</sup>(tetrazolium

derivative reduction assay)를 이용하여 살아있는 細胞의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT dye [3-(4, 5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]가 blue formazan을 형성하는 것을 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader로 570 nm에서 吸光度를 測定하였다.

### (2) 血府逐瘀湯의 濃度別 抗酸化能 測定<sup>27)</sup>

Ac2F를 24well plate에서 10% FBS-DMEM 培地로 well당 1 x 10<sup>4</sup>개씩 2時間 동안 培養하여, PBS로 2번 洗滌하고, 血府逐瘀湯을 濃度別로 각각 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 $\mu$ l씩 분주하고 well당 total volume이 1 ml가 되도록 10% FBS- DMEM培地로 調節하였다. 그 후 18時間 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 培養시키고, PBS로 2번 洗滌하고, 最終濃도가 1mM이 되도록 t-BHP를 處理하고 serum free培地를 使用하여 用量을 1 ml로 調整하였다. 이를 다시 3時間 동안 培養시킨 후 MTT 200 $\mu$ l씩 넣고 4時間 培養시킨 다음 900 rpm에서 10분간 遠心分離하였다. 그 후 培地를 除去하고 EtOH/DMSO(1:1 v/v)를 600 $\mu$ l씩 넣고 20분간 shaking한 다음 570 nm에서 吸光度를 測定하였다.

## III. 實驗 結果

### 1. 過酸化水素-Fe<sup>2+</sup>系의 lecithin liposome 過酸化反應에 대한 血府逐瘀湯의 影響

Table 1에 나타난 바와 같이 血府逐瘀湯의 濃도가 增加함에 따라 MDA의 生成은 1.45, 2.82, 3.81 및 4.87 nmol/ml로 無添加群의 20.41 nmol/ml의 경우와 比較해 볼 때 현저하게 낮아지는 것으로 미루어 보아 血府逐瘀湯이 MDA의 生成에 抑制함을 알 수 있었으며, 原液의 경우 無添加群과 比較해 볼 때 그 抑制率은 92.90%인

것으로 나타났다. 또한 이는 抗酸化劑로 널리 알려진 dl- $\alpha$ -tocopherol 2.5 x 10<sup>2</sup>  $\mu$ M添加 때의 抑制率 96.03%와 거의 類似하게 나타나는 것으로 보아서 상당한 抑制效果가 있음을 알 수 있었다. 한편 catalase 및 mannitol을 添加했을 경우 보다도 血府逐瘀湯 添加는 훨씬 有意性인 抑制 效果가 나타남을 알 수 있었다.

Table 1. Inhibitory effect of Hyeulbuchuckeutang on peroxidation of lecithin-liposome by hydrogen peroxide-Fe<sup>2+</sup> system.

Sample	Concentration	Peroxidation of lecithin-liposome by H <sup>2</sup> O <sub>2</sub> -Fe <sup>2+</sup> system	
		MDA(nmol/ml)	% Inhibition
HBT <sup>a)</sup>	原液	1.45±0.03*	92.90±0.52*
	1/2	2.82±0.08	86.18±0.11
	1/5	3.81±0.09	81.34±0.43
	1/10	4.87±0.14	76.14±1.54
Catalase	2.5×10 <sup>2</sup> mU/ml	4.04±0.05*	80.21±0.20*
	2.5×10mU/ml	8.05±0.10	60.56±1.51
	2.5mU/ml	12.77±0.19	37.43±1.27
Mannitol	2.5×10 <sup>2</sup> $\mu$ M	12.61±0.08*	38.23±0.59*
	2.5×10 $\mu$ M	15.41±0.12	24.50±1.42
	2.5 $\mu$ M	17.75±0.21	13.03±2.04
dl- $\alpha$ -tocopherol	2.5×10 <sup>2</sup> $\mu$ M	0.81±0.03*	96.03±1.05*
	2.5×10 $\mu$ M	2.03±0.05	90.05±1.04
	2.5 $\mu$ M	2.28±0.07	88.83±2.12
None		20.41±2.15	

Values are mean±S.E. of 3 experiments

Significantly different from the control group. ( P <0.05)

HBT<sup>a)</sup>: Hyeulbuchuckeutang

## 2. Xanthine-XOD 系의 lecithin liposome 過酸化反應에 대한 血府逐瘀湯의 抑制 效果

Table 2에 나타난 바와 같이 血府逐瘀湯의 濃

도가 增加함에 따라 MDA의 生成은 0.039, 0.060, 0.082 및 0.117 nmol/ml로 無添加群의 0.261 nmol/ml보다 낮아지는 것으로 보아 血府逐瘀湯이 O<sub>2</sub>發生으로 야기되는 liposome의 peroxidation을 抑制함을 알 수 있었으며, 그

抑制率は濃도가增加할수록 높아져 原液에서는 85.06% 까지 抑制됨을 알 수 있었다. 한편, 活性酸素의 scavenger 酵素로 알려진 superoxide dismutase(SOD) 및 抗酸化劑인 dl- $\alpha$ -tocopherol 을 添加한 경우에는 대부분 90% 이상의 높은 MDA 生成 阻害率을 나타내었다.

Table 2. Inhibitory effect of Hyeulbuchuckeutang on peroxidation of lecithin-liposome by xanthine-xanthine oxidase system.

Sample	Concentration	Peroxidation of lecithin-liposome by Xanthine-XOD system	
		MDA(nmol/ml)	% Inhibition
HBT <sup>(a)</sup>	원액	0.039±0.001*	85.06±1.61**
	1/2	0.060±0.005	77.01±1.27
	1/5	0.082±0.005	68.58±1.03
	1/10	0.117±0.002	55.17±2.41
SOD	2.5×10 <sup>2</sup> mU/ml	0.021±0.001*	91.95±1.31**
	2.5×10mU/ml	0.026±0.004	90.04±3.41
	2.5mU/ml	0.052±0.001	80.08±2.01
dl- $\alpha$ -tocopherol	2.5×10 <sup>2</sup> $\mu$ M	0.018±0.002*	93.10±1.51**
	2.5×10 $\mu$ M	0.025±0.005	90.42±2.10
	2.5 $\mu$ M	0.038±0.007	85.44±1.27
None		0.261±0.042	

Values are mean±S.E. of 3 experiments.

Significantly different from the control group. (\*P <0.005, \*\*P< 0.05)

HBT<sup>(a)</sup> : Hyeulbuchuckeutang

### 3. t-BHP의 酸化作用으로 인한 細胞壞死에 미치는 血府逐瘀湯의 影響

#### 1) t-BHP의 時間別 細胞壞死 實驗

Fig. 1에는 t-BHP가 유도하는 細胞 壞死作用을 時間별로 나타내었다. t-BHP는 代表的인 酸化劑로 1mM의 濃도로 Ac2F 細胞에 前處理하였다. 그 結果 前處理 時間에 비례하여 細胞의 viability가 減少하였으며, 3時間후에는 거의

50%가 壞死하고, 약 50%의 viability를 나타낼 수 있었다. 이후 實驗에서는 50%의 壞死率을 나타내는 t-BHP投與 3時間 이후에 viability를 測定하였다.

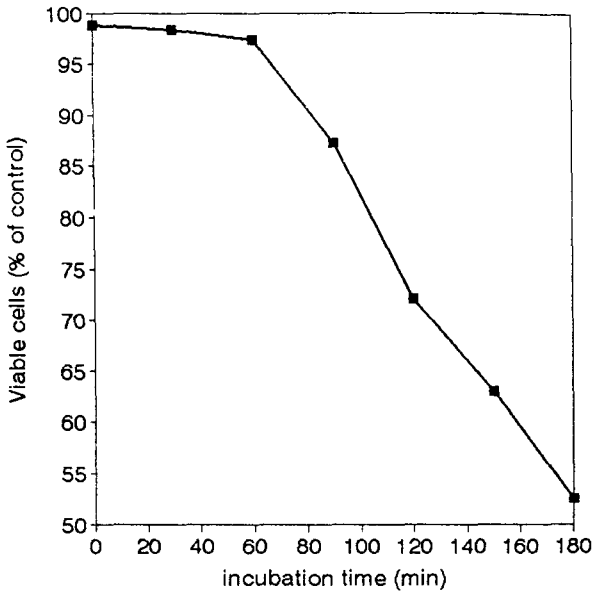


Fig.1. Cell viability in cultured rat liver cells exposed to (t-BHP).

The cells were incubated at 37°C for 0-180 min with t-BHP (final concentration 1 mM).

Viable cells were detected by MTT(tetrazolium derivative reduction) assay. The detail assay procedure was described in the material and methods. All data are the mean of triplicate determination.

2) 血府逐瘀湯의 濃度別 抗酸化測定

Fig. 2에 t-BHP의 酸化 作用으로 인한 細胞 壞死에 血府逐瘀湯이 미치는 影響에 관하여 나타내었다. 血府逐瘀湯 100  $\mu$ l(total volume의 10%)를 前處理 하고 培養한 群에서는 t-BHP에 의한 細胞損傷이 거의 정상 수준으로 回復되었으며 血府逐瘀湯의 濃度가 減少함에 따라 회복은 점차로 減少됨을 알 수 있었다. 한편 血府逐瘀湯 125  $\mu$ l(total volume의 12.5%)부터는 濃度가 增加하여도 viability는 오히려 줄어드는 傾向을 나타냄을 알 수 있었다.

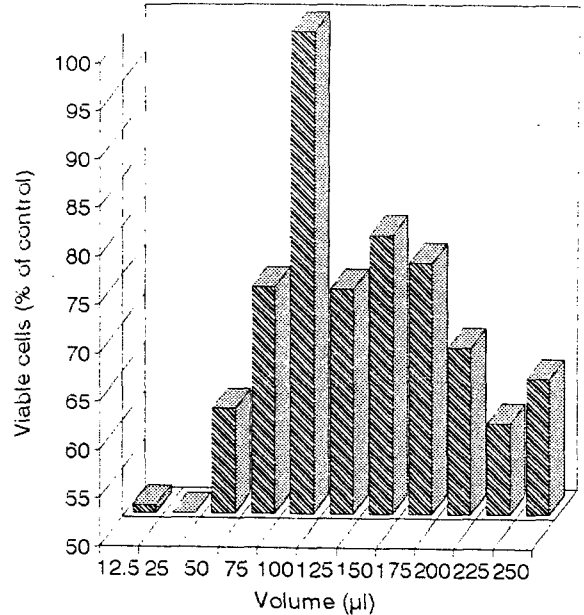


Fig.2 Effects of Hyelbuchuckeutang on t-BHP induced lipidperoxidation

The cells( $1 \times 10^4$  cells/well) were incubated at 37°C for 2hrs. After washing, Hyelbuchuckeutang was added various concentration. After preincubation for 18 hrs, t-BHP(final concentration 1mM) was added, and the reaction mixture was incubated for 3 hrs. Viable cells were detected by MTT assay. The detail assay procedure was described in the material and methods. All data are the mean of triplicated determination.

IV. 考 察

血府逐瘀湯은 王<sup>13)</sup>이 「醫林改錯」에 처음 收載한 處方으로 血府逐瘀湯所治症目에 의하면 瘀血과 關聯된 頭痛, 胸疼, 胸不任物, 胸任重物, 天亮出汗, 食自胸右下, 心裏熱, 昏悶, 急躁, 夜睡夢多, 小兒夜啼, 心躁心忙, 夜不安, 乾嘔 등의 病症에 사용할 수 있는 것으로 記述되어 있다<sup>13)</sup>. 以後 血府逐瘀湯은 瘀血症을 治療하는 代表的인

處方으로서 臨床에서 月經痛, 非正常子宮出血, 無月經, 血栓性靜脈炎, 腦血管疾患, 狹心症 등 瘀血과 關聯된 諸般 疾患에 널리 活用되고 있다(7,14,18)

한편, 瘀血은 血行障碍나 血液凝滯의 病理 變化로서 離經之血이 體內에 蓄積된 것과 經脈의 血運이 順調롭지 못하여 停滯된 것을 包括한다<sup>8)</sup>. 瘀血이 생기는 原因으로 《沈氏尊生書》에서는 “氣運乎血, 血本隨氣以周流, 氣凝則血亦凝矣.”라 하였으며, 《靈樞·經脈》篇에서는 “寒邪客于經脈之中, 則血泣而不通.”, 《素問·調經論》에서는 “氣血者喜溫而惡寒, 寒則泣而不流, 溫則消而去之.”라 하였으며, 《醫林改錯·積塊》에서는 “血受熱則煎熟成塊”라 하였고, 《靈樞·百病始生》篇에서는 “陽絡傷則血外溢, 陰絡傷則血內溢.”이라 하였다. 또한 《靈樞·賊風》篇에서는 “若有所墮墜, 惡血內留而不去,”라 하였으며, 《靈樞·百病始生》篇에서는 “若內傷于憂怒, 則氣上逆, 氣上逆則六輸不通, 溫氣不行, 凝血蘊裏而不散, 津液澁滲, 著而不去, 而積皆成矣.”라 하였다<sup>1)</sup>. 이와 같이 氣虛, 血寒, 血熱, 氣滯, 外傷, 出血 등의 病因들이 모두 瘀血을 誘發할 수 있는 것으로 보고 있다. 瘀血의 症候 特徵은 疼痛, 腫塊, 出血, 色紫暗, 脈澁或結代 등 이다. 또 瘀血의 所在에 따라 血瘀于腦, 血瘀于心, 血瘀于肺, 血瘀于肝, 血瘀胃脘 瘀血滯于腸胃, 瘀阻胞宮, 肢體局部瘀血 등으로 나누고 있다<sup>8)</sup>.

근래 瘀血은 老化의 過程에 主要한 病因·病機로 作用하는 것으로 밝혀지고 있다<sup>6,11,21)</sup>. 또한 田 등<sup>19)</sup>에 의하면 更年期障碍는 腎虛, 情志刺戟, 痰濕內阻 등과 더불어 瘀血停滯가 그 病因으로

作用한다고 한다.

한편, 老化는 生命體의 成長과 同時에 進行되는 一連의 反應으로서 生命體의 發育, 成長, 成熟과 衰退의 生物學的 過程에서 形態的·機能的 退縮, 豫備력과 適應力の 低下로 死亡에 歸着되는 普遍的 生理現狀을 말한다<sup>2)</sup>. 老化 發生의 原因說로는 DNA說, 內分泌說, 化學反應說, 免疫反應說과 自由基에 의해 誘發되는 地質의 過酸化反應說 등이 알려져 있다<sup>2,4)</sup>. 한편, 生體內의 重要한 脂質酸化에는  $\beta$ 酸化和 過酸化가 있다<sup>5)</sup>.  $\beta$ 酸化는 生體에서 不可缺한 것으로 ATP 生産에 關與하는 反應인데 반해 過酸化反應은 linolenic acid, linoleic acid, oleic acid 등과 같이 高度로 不飽和된 脂肪酸의 二重結合에 있는 炭化水素에서 水素를 빼내어 自由基(Free radical)나 活性酸素가 생기는 反應이다. 이렇게 하여 生成된 過酸化 脂質은 生體膜 등에 損傷을 입히고 細胞機能을 低下시키며 組織의 壞死에 關係하여 여러 가지 疾患을 일으킨다<sup>5)</sup>. 특히 脂質過酸化反應은 赤血球膜 障害, 虛血後 血流再開에 의한 血管障害, 關節炎, 自家免疫疾患(autoimmune disease) 등에서 나타나는 炎症과 많은 關聯性이 認定되고 있다<sup>23,26)</sup>.

高度의 不飽和脂肪酸을 가지고 있는 磷脂質은 各種 酵素, 遷移金屬 이온, 活性酸素 등의 공격을 쉽게 받아 脂質過酸化反應이 일어나서 hydroperoxide(ROOH)를 生成하게 된다<sup>23,26)</sup>. 이 過酸化物은 各種 radical과 反應하여 다양한 2차 生成物을 만들게 되는데, 그중에는 많은 細胞毒性物質이 包含되어 있다. 이러한 脂質過酸化反應은 일단 開始되면 連續的으로 進行되며, 주



위의 磷脂質도 反應에 關여하게 되어 膜磷脂質의 過酸化 反應은 細胞膜 全體에 影響을 미쳐 膜 透過性 亢進이나 膜의 流動性이 低下되어 barrier로서의 機能이 消失되어 결국 細胞膜의 崩壞 및 壞死에 이르게 된다<sup>25,29,33,35,38</sup>. 이러한 觀點에서 볼 때 膜磷脂質의 過酸化 反應의 防止는 組織損傷과 老化過程에서 뿐만 아니라 生體防禦의 側面에서도 必須的이다.

이러한 過酸化脂質의 生成을 抑制하는 一連의 研究들이 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase와 같은 酵素의 側面에서, 그리고 vitamin E, vitamin C, BHT와 BHC 등과 같은 抗酸化劑를 이용하여 多數 이루어지고 있다<sup>30,31,32,37,39</sup>.

그런데 過酸化反應 및 抗酸化劑와 關連하여 韓醫學界에서 이루어진 研究는 주로 各種 補劑가 抗酸化反應에 미치는 影響을 밝히는 것이 主種을 이루고 있다<sup>10,11,15,16,22</sup>. 따라서 既存의 補劑를 利用한 過酸化反應 抑制 研究들과 달리 老化誘發의 한 原因이 되는 瘀血을 治療하는 藥物을 利用하여 過酸化反應 抑制 效果를 檢討하는 것에 큰 意義가 있는 것으로 보인다. 이에 著者는 瘀血證의 基本方으로 널리 活用되고 있는 血府逐瘀湯이 活性酸素로 인한 細胞膜 障害에 대해서 어떠한 作用을 가지는 지를 人工膜(liposome) 모델인 phosphatidylcholine liposome을 대상으로 過酸化反應을 檢討하는 동시에 rat의 正常 肝細胞를 利用하여 過酸化反應으로 인한 細胞壞死에 미치는 影響에 關해 조사했다.

細胞膜에 있어서 過酸化脂質의 形成과 肝機能

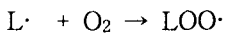
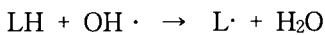
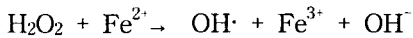
障害에 關한 研究는 주로 microsome 등의 organelle膜을 利用하여 檢討되어 왔으나, 細胞膜은 매우 복잡한 構造를 가지므로 過酸化에 의한 膜 障害를 分子論적으로 解明하기는 困難한 點이 많으므로 脂質人工膜을 利用하는 것이 一般的이다<sup>28</sup>. 脂質人工膜인 liposome은 單純한 構成成分으로 이루어져 있을 뿐만 아니라 그 物理的인 性質 및 機能에 대한 研究가 알려져 있어 生體膜의 모델로서 有用한 情報를 얻기 容易하다<sup>28</sup>. 따라서 著者는 본 實驗에서 lecithin-liposome을 細胞膜 모델로 사용하였으며, 膜 損傷은 過酸化水素-Fe<sup>2+</sup> 시스템 및 xanthine-XOD 시스템에 의해 生成되는 活性酸素를 利用하여 惹起시켰다.

그 結果, 過酸化 水素-Fe<sup>2+</sup>系의 lecithin liposome 過酸化反應에서는 血府逐瘀湯의 濃度가 增加함에 따라 MDA의 生成은 1.45, 2.82, 3.81 및 4.87 nmol/ml로 無添加群의 20.41 nmol/ml의 경우와 比較해 볼 때 顯著하게 낮아지는 것으로 미루어 보아 血府逐瘀湯이 MDA의 生成을 抑制함을 알 수 있었고, catalase 및 mannitol을 添加했을 경우 보다는도 血府逐瘀湯 添加는 훨씬 有意性 있는 抑制 效果가 나타남을 알 수 있었다.

또, Xanthine-XOD系의 lecithin liposome 過酸化反應에서는 血府逐瘀湯의 濃度가 增加함에 따라 MDA의 生成은 0.039, 0.060, 0.082 및 0.117 nmol/ml로 無添加群의 0.261 nmol/ml보다 낮아지는 것으로 보아 血府逐瘀湯이 O<sub>2</sub>發生으로 惹起되는 liposome의 peroxidation을 抑制함을 알 수 있었으며, 그 抑制率은 濃度가 增加

할수록 높아져 原液에서는 85.06% 까지 抑制됨을 알수 있었다. 또한, 活性酸素의 scavenger 酵素로 알려진 superoxide dismutase 및 抗酸化劑인 dl- $\alpha$ -tocopherol을 添加한 경우에는 大部分 90% 이상의 높은 MDA生成 阻害率을 나타내었다.

膜 損傷을 일으키는 두 시스템 중 過酸化水素-Fe系는 다음과 같은 反應 樣式으로 活性酸素를 發生시켜 lecithin liposome을 構成하는 不飽和脂肪酸의 過酸化 反應을 促進한다고 알려져 있다<sup>41)</sup>.



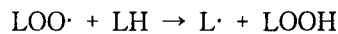
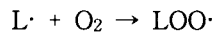
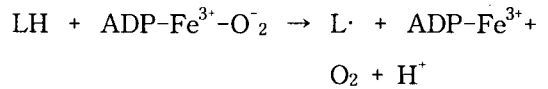
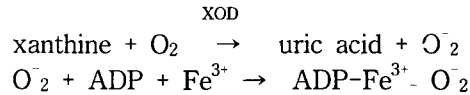
LH : unsaturated fatty acid

LOOH : fatty acid hydroperoxide

그러나 血府逐瘀湯이 위의 反應 段階 중 어느 段階를 抑制시키는가는 알 수 없었다. 다만 韓藥 成分 중의 탄닌이 金屬과 結合하기 쉬운 性質을 가지므로 血府逐瘀湯 속의 탄닌이 금속 철과 結合함으로써 過酸化脂質의 生成이 抑制되는 것으로 推測된다. 그리고 血府逐瘀湯의 抑制作用은 過酸化水素의 scavenger로 널리 알려진 catalase와 抗酸化劑인 dl- $\alpha$ -tocopherol과 거의 같은 수준의 % 까지 抑制 시키는 것으로 보아 강한 抗酸化 作用이 있음을 알 수 있었다.

또한, Xanthine-XOD系는 Tien과 Aust<sup>41)</sup>에 의하면 다음과 같은 過程에 의하여 過酸化 反應

을 進行시킨다고 알려져 있다.



LH : unsaturated fatty acid

LOOH : fatty acid hydroperoxide

血府逐瘀湯이 superoxide anion의 scavenger 作用이 있는지 혹은 superoxide anion生成 및 分解에 關與하는 酵素에 어떠한 作用을 미치는지는 알 수 없으나 TBA反應에 대한 阻害作用을 確認할 수 있었다. 血府逐瘀湯의 Xanthine-XOD系에 대한 抗酸化作用은 代表的인 抗酸化劑로 알려진 dl- $\alpha$ -tocopherol과 거의 類似한 結果를 나타내었다.

또한, rat의 正常 肝細胞를 利用하여 血府逐瘀湯으로 前處置한 後 t-BHP가 誘導하는 細胞 壞死作用을 時間別로 알아본 結果, 前處理 時間에 비례하여 細胞의 viability가 감소하였으며, 3시간후에는 거의 50%가 壞死하고, 약 50%의 viability를 나타내었다. 이와 같이 血府逐瘀湯이 人工膜에서 뿐만 아니라 肝細胞(Ac2F)에서도 뚜렷한 抗酸化 作用을 나타낸 點은 血府逐瘀湯을 臨床에서 抗酸化劑로 사용할 수 있는 可能性을 強하게 示唆하는 것으로 볼 수 있다.

한편, 血府逐瘀湯을 이루는 一部 個別 藥物에 대한 抗酸化作用 關聯 研究에 따르면 生地黃에

는  $O_2^-$ ,  $OH^-$  를 除去하는 作用을 가지고 있고<sup>20)</sup>, 當歸는 體外實驗에서 人間 血液의 SOD活性에 顯著한 促進 作用을 나타내며<sup>9)</sup>, 牛膝은 小鼠 血液의 SOD, CAT, GSP-Px의 活性을 높이고 LPO를 顯著히 떨어뜨린다고 한다<sup>17)</sup>. 이러한 單味 藥物에 관한 研究들은 본 實驗의 結果와 附合되는 面이 認定된다고 할 수 있다.

著者が 行한 實驗으로 血府逐瘀湯이 어떠한 經路와 機轉으로 脂質의 過酸化 反應을 抑制하는지 충분히 解明할 수는 없었으나, 人工膜 모델을 이용한 實驗과 rat의 正常 肝細胞를 利用한 實驗에서 모두 顯著한 過酸化反應 抑制 作用을 確認한 것에 큰 意義가 있다고 보여진다. 이러한 研究 結果는 向後 作用機轉과 關聯된 追加 研究를 통해 瘀血 및 老化和 關聯된 各種 疾病의 豫防과 治療에 應用할 수 있으리라 判斷된다. 특히 韓方婦人科 領域에서는 瘀血이 主된 病機로 作用하는 更年期의 心血管系 疾患<sup>3,7,14,19,21)</sup>에 대한 臨床과 研究에 效用性이 認定되는 것으로 思料된다.

## V. 結 論

婦人科 臨床에서 月經痛, 無月經, 非正常子宮 出血 등 瘀血과 關聯된 諸般 疾患에 廣範圍하게 活用되고 있는 血府逐瘀湯을 對象으로 人工膜 (egg lecithin-liposome)을 이용한 脂質過酸化 反應과 rat의 正常 肝細胞에서 tert-butyl hydroperoxide(t-BHP)가 誘導하는 細胞壞死에 미치는 影響을 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻

었다.

1. 過酸化 水素- $Fe^{2+}$ 系의 lecithin liposome 過酸化反應에서는 血府逐瘀湯의 濃度가 增加함에 따라 MDA의 生成은 1.45, 2.82, 3.81 및 4.87 nmol/ml로 無添加群의 20.41 nmol/ml의 경우와 비교해볼 때 현저하게 낮아지는 것으로 미루어 보아 血府逐瘀湯이 MDA의 生成에 抑制함을 알 수 있었다. 한편 catalase 및 mannitol을 添加했을 경우 보기도 血府逐瘀湯 添加는 훨씬 有意性 있는 抑制 效果가 나타남을 알 수 있었다.
2. Xanthine-XOD系의 lecithin liposome 過酸化反應에서는 血府逐瘀湯의 濃度가 增加함에 따라 MDA의 生成은 0.039, 0.060, 0.082 및 0.117 nmol/ml로 無添加群의 0.261 nmol/ml보다 낮아지는 것으로 보아 血府逐瘀湯이  $O_2^-$  발생으로 야기되는 liposome의 peroxidation을 抑制함을 알 수 있었으며, 그 抑制率은 濃度가 增加할수록 높아져 原液에서는 85.06% 까지 抑制됨을 알 수 있었다. 또한, 活性酸素의 scavenger 酵素로 알려진 superoxide dismutase(SOD) 및 抗酸化劑인 dl- $\alpha$ -tocopherol을 添加한 경우에는 대부분 90% 이상의 높은 MDA 生成 沮害率을 나타내었다.
3. t-BHP가 誘導하는 細胞 壞死作用을 時間別로 알아 본 結果 前處理 時間에 比例하여 細胞의 viability가 減少하였으며, 3時

間 後에는 거의 50%가 壞死하고, 약 50%의 viability를 나타냄을 알 수 있었다.

4. 血府逐瘀湯의 濃度別 抗酸化 效果에서 血府逐瘀湯 100  $\mu$ l(total volume의 10%)를 前處理하고 培養한 群에서는 t-BHP에 의한 細胞損傷이 거의 正常水準으로 回復되었으며 血府逐瘀湯의 濃度가 減少함에 따라 회복은 점차로 減少되었다. 한편 血府逐瘀湯 125  $\mu$ l(total volume의 12.5%)부터는 濃度가 增加하여도 viability는 오히려 줄어드는 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

以上の 實驗 結果를 綜合하면 血府逐瘀湯은 人工膜의 過酸化 反應및 rat의 正常 肝細胞의 壞死作用을 顯著하게 抑制하는 점으로 미루어 보아 組織 損傷과 血栓形成 등 瘀血의 病理 過程을 抑制하는 것으로 認識할 수 있다.

## 參 考 文 獻

1. 文潯典, 安圭錫, 崔昇勳共編 : 東醫病理學, 서울, 高文社, p.75, 1990.
2. 徐舜圭 : 成人病·老人病學, 서울, 고려의학, p.10, 1992.
3. 宋炳基 : 韓方婦人科學, 서울, 杏林出版, p.193, 1990.
4. 尹哲浩 : 左歸陰과 右歸飲이 老化 Rat의 過酸化脂質 生成 및 活性酸素 生成系 酵素活性에 미치는 影響, 東國大學校大學院 碩士學

位論文, 1994.

5. 이귀녕 外 : 임상병리과일, 서울, 의학문화사, p.117, 1990.
6. 金鳴 : 活血化瘀與抗自由基損傷, 中草藥 24(5) : 269, 1993.
7. 羅元愷 : 中醫婦科學, 上海, 上海科學技術出版社, p.86, 1986.
8. 張珍玉 : 病因病機學, 山東, 山東中醫學院, p.37, 1988.
9. 陶學勤 : 當歸超氧脂化物酶的作用, 南京中醫學院學報 8(2) : 103, 1992.
10. 孫承琳 : 人蔘對培養神經細胞自由基損傷的保護作用. 北京中醫學院報6(4) : 62-67, 1993.
11. 梁曉春 : 腎虛,衰老與自由基的關係以及補腎藥對自由基的影響, 中西醫結合雜誌 10(8) : 511-512, 1990.
12. 余月明 : 自由基衰老學說·腎虛與衰老及補腎抗衰老研究, 陣西中醫 14(4): 187-188, 1993.
13. 王清任 : 醫林改錯, 上海, 上海科學技術出版社, p.19, 1966.
14. 陸乾人 等 : 血府逐瘀湯加味治療冠心病84例, 中國中西醫結合雜誌 15(1) : 44-45, 1995.
15. 李志海 : 中藥抗衰老作用的研究探討, 中草藥 17(10) : 37-41, 1986.
16. 李春生 : 中國傳統延緩衰老藥物的現代研究概述, 中醫雜誌 29(1) : 59-62, 1988.
17. 李獻平等 : 四大懷延緩衰老作用的研究, 中西醫結合雜誌 11(8) : 486, 1991.
18. 張麗容 : 血府逐瘀湯治療婦科病309例分析, 中西醫結合雜誌 8(10) : 624, 1988.
19. 田金洲 : 中醫老年病學, 天津, 天津科學技術

- 出版社, p.605, 1994.
20. 陣文爲 等 : 清宮壽桃粉劑大鼠肝勻漿(體外)生成過酸化脂質水平影響的觀察, 中西醫結合雜誌 4(11) : 658, 1984.
  21. 韓申穎 : 論腎虛, 血瘀與衰老, 新中醫 6 : 18-19, 1992.
  22. 許沛虎 : 中醫藥研究中有關自由基研究近況, 中國中西醫結合雜誌 15(3) : 185-187, 1995.
  23. 內山 充, 松尾光芳, 嵯峨井脩 : 過酸化脂質と生體, 學會出版センタ, 東京. 1985.
  24. 戶田 靜男, 大西 基代, 木村 通郎, 戶田 知子 : 活性酸素によるレシチンリポソーム過酸化に對する桂枝茯苓丸, 桃核承氣湯の抑制作用, 和漢醫學會誌 9 : 131-136, 1992.
  25. Benedetti, A., Comporti, M. and Esterbauer, M. : *Biochim. Biophys. Acta.* 620 : 281, 1980.
  26. Freeman, B.A. and Carpo, J.D. : *Biology of Disease. Lab. Invest.* 47 : 412, 1982.
  27. Glascott, JR, E.A., Gilfor, E. and Farber, J.L. : *Mol. Pharmacology* 41 : 1155, 1992.
  28. Hauser, H.O : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45 : 1049, 1971.
  29. Kunimoto, M., Inoue, K. and Nojima, S. : *Biochim. Biophys. Acta.* 646 : 169, 1981.
  30. Leedle, R.A. and Aust, S.D. : *Lipids.* 25 : 241, 1990.
  31. Leung, H.W., Vang, M.J. and Mavis, R.D. : *Biochim. Biophys. Acta.* 664 : 266, 1981.
  32. Machlin, L.J. and Bendich, A. : *FASEB. J.* 1 : 441, 1987.
  33. Mitchell, J.R. and Horning, M.G. : *Drug Metabolism and Drug Toxicity*, New York, Raven Press, 21, 1984.
  34. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : *Anal. Biochem.* 95 : 351, 1979.
  35. Ozawa, T., Hayakawa, M., Takamura, T., Sugiyama, S., Suzuki, K., Iwata, M. Taki, F. and Tomita, T. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134 : 1071, 1986.
  36. Rose, R.C. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169 : 430, 1990.
  37. Sladowski, D., Steer, S.J., Clothier, R.H. and Balls, M. : *J. Immunol. Methods* 157 : 203, 1993.
  38. Svingen, B.A., Buege, J.A. and Aust, S.D. : *J. Biol. Chem.* 254 : 5892, 1979.
  39. Tan, K.H., Meyer, D.J., Belin, J. and Ketterer, B. : *Biochem. J.* 220 : 243, 1984.
  40. Tien, M. and Aust, S.D. : *Biochim. Biophys. Acta,* 712 : 1, 1982.
  41. Tien, M. and Aust, S.D. : *In Lipid peroxidation in biology and medicine.* ed. Yagi, K., 23, 1982.