

小柴胡湯이 CCl₄로 유발된 Rat의 간 장해 前後에 미치는 영향

당청운 · 한경희 · 한상묵 · 김명동*

상지대학교 한의과대학 생리학교실

The Pro and Post Effects of Soshiho-tang on Rat's Liver Damage induced by CCl₄

Chung Woon Dang, Kyung Hee Han, Sang Mook Han, Myung Dong Kim*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Sangji University

In studying the specific effects of some drugs, animals under experiments get some stress through laboratory environments, drug injection, and adaptation period. These stimuli do harms on liver function. Nowadays studies on liver intoxication and its protection are under research, but the function of dissolution is rarely under studies. It is widely accepted that *Soshiho-tang* has function of clearing away low spirits, and that it enables liver bloods to move stronger, and to have calm mind. So I injured rats liver by injectioning CCl₄. And the rats took in *Soshiho-tang* solution. I made a comparison between the functions before and after rat's liver damage. There are many representative serums used to note an index on liver damage. I used total protein, albumin, ALP, GOT, GPT activity, P450, SOD, Catalase, GST, GR, and GPx. I got the following results. When *Soshiho-tang* was injected after CCl₄ intoxication, total protein and albumin decreased. When *Soshiho-tang* was injected, ALP decreased, compared with control group. When *Soshiho-tang* was injected after CCl₄ intoxication, AST and ALT decreased. When *Soshiho-tang* was injected before CCl₄ intoxication, P450 was restrained. When *Soshiho-tang* was injected, LPO was all restrained. When *Soshiho-tang* was injected, SOD, Catalase, GST, GR, and, GPx increased. These results show that blood test reveals that it is good to inject *Soshiho-tang* after CCl₄ intoxication, but that it is good to inject *Soshiho-tang* before CCl₄ intoxication in case of P450, LPO, SOD, Catalase, GST, GR, and GPx. It is estimated that the medication period and time of liver damage by CCl₄ have counter results, and that it needs more modified study.

Key words : *Soshiho-tang*, CCl₄, Liver

서 론

간은 疏泄과 藏血을 주관^{1,3)}하고, 체내의 혈량을 조절하고 각종 대사, 분비, 학성을 관여하는 중요한 장기이며,⁴⁾ 각종 화학물질의 생성, 해독, 담즙분비, 조혈, 혈액저장 등이 다양한 역할을 수행한다.^{5,6)}

소설은 간이 전신의 기, 혈액, 진액 등을疏通, 發泄하여 그 것으로 하여금 條達, 宣泄하는 작용이 있음을 의미한다.³⁾ 간의 소설기능이 정상이면 氣機가 調暢하게 되고, 氣血이 조화로워지며, 經絡이 通利하에 되어 장부 기관의 활동도 또한 정상적으로

조화롭게 되고,^{2,3)} 정신이 舒暢하게 된다. 간의 소설기능을 잃으면 情志는 抑鬱되게 되어 정신정지활동에 장애가 발생하게 되며, 또한 外界의 精神刺戟, 内部의 大怒, 혹은 情緒의 과도한 抑鬱 등으로 또 다시 간에 영향을 주어 소설기능을 잃게 되면 肝氣鬱結 혹은 肝氣橫逆 등의 병리현상이 나타나게 되며²⁾ 간은 병리적으로는 대사물질에 의한 중독에 민감하게 반응하여 간세포의 변성, 괴사, 지방축적, 간 효소의 류출 등의 간장애를 나타낸다.⁷⁾

小柴胡湯은 傷寒論에 少陽證의 寒熱往來, 胸脇苦滿, 不欲飲食, 心煩喜嘔 等症을 치료하는 방제로서,⁸⁾ 柴胡는 解熱鎮靜藥으로 黃芩과 함께 강력한 消炎作用을 발휘하면서 더욱 뚜렷한 解熱作用과 鎮靜作用을 한다. 半夏는 炎症, 기타 질병의 산물인 痰을 제거하고, 人蔘은 생리기능을 강화하여 免疫力を 증진시키며, 감초는 消炎·鎮靜과 藥性의 調和 등의 작용을 하여 완벽한 방제

* 교신저자 : 김명동, 강원도 원주시 우산동660 상지대학교 한의과대학

· E-mail : drmdkim@hanmail.net, · Tel : 033-730-0670

· 접수 : 2004/08/03 · 수정 : 2004/09/07 · 채택 : 2004/10/12

를 구성하고 있다. 生薑은 半夏의 微毒을 제거하고 위장 점막을 자극하여 약의 吸收를 촉진시켜 그 효과를 높여주워 消炎, 解熱, 鎮靜, 祛痰의 효능이 있어 感冒, 热病, 肺膜炎, 脑膜炎, 肺炎, 咽喉炎, 中耳炎, 氣管支炎, 急·慢性肝炎, 膽囊炎, 腹膜炎 등 半表半裏 부위의 병을 치료하는데 효과가 있으며,⁹⁾ 특히, 간염, 담낭염, 담결석, 황달 등의 간기능장애에 많이 활용된다.¹⁰⁾ 정¹¹⁾, 김¹²⁾은 소시호탕이 사염화탄소로 유도된 Rats의 간장에 미치는 영향에 대하여 보고하였다.

약물의 특정효과를 살펴보는 연구에 있어서 실험동물의 적응기간 동안 실험실 환경이나 약물투여, 검액 채취시에 실험동물이 얼마간의 스트레스를 받게 된다. 이러한 자극은 간의 기능에 장애로 초래하게 되는데 소시호탕이 간의 독성을 작용하는 것 이외에 간의 기능을 보호하는 작용에 대한 연구가 없는 실정에 있다. 사람을 비롯한 모든 종에 대하여 간손상을 일으키는 대표적 약물로 알려져 있는 사염화탄소¹³⁾를 이용하여 간 손상을 시시키 전·후에 소시호탕을 투여하여 소시호탕이 정신적인 안정과 관련이 있는 소설기능에 얼마나 도움이 되는지를 알아보기 위하여 간 손상에 대한 지표로 이용되는 혈청중 Total Protein, Albumin, ALP, GOT, GPT 활성도 및 P450과 SOD, Catalase, GST, GR, GPx를 측정하였고, 이에 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

실험 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약재

실험에 사용된 한약재는 상지대학교 한의과대학 본초학교실에서 精選한 것을 사용하였으며 실험에 사용한 소시호탕은 상한론에 수재된 처방을 사용하였다.(Table. 1)

Table 1. Prescription of Soshiho-tang

Herbal Name	Pharmaceutical Name	Scientific Name	Amount (g)
柴胡	Bupleuri Radix	<i>Bupleurum chinense</i> De Candolle	12
黃芩	Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	8
人蔘	Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey	4
半夏	Pneilliae Rhizoma	<i>Pinellia pedatisecta</i> Schott	4
甘草	Glycyrrhize Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer ex De Candolle	2
生薑	Zingiberis Rhizoma ecens	<i>Zingiber officinale</i> ROSC.	4
大棗	Jujubae Fructus	<i>Zizyphus jujuba</i> Mill. Var. <i>inermis</i> REHDER	4
總量			38(g)

2) 실험동물

실험에 사용된 동물은 Sprague-Dawley계 Rat(SD-Rat)으로 대한바이오링크로부터 구입하여 온도 21℃, 습도 55%를 유지하며 사료와 수돗물을 자유롭게 급식하면서 항온항습기(명진기계, 한국)에서 1주일간 적응 후 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시료의 추출과 제조

소시호탕 처방구성의 10첩 분량을 細切하여 물 3000cc와 함

께 5000cc의 플라스크에 넣어 3시간 전탕 하고 16겹의 거즈로 여과한 후 동결건조기에 넣어 -60℃에서 72시간 동결 건조하여 건조 분말 60.4 g을 얻었다. 수득율은 18.89 %이었다.

2) 실험군의 분류 및 처치방법

흰쥐를 평균 체중에 가까운 개체들이 골고루 들려가도록 무작위로 나누어 사용하였으며, 1群에 6마리 씩 배정하여 약물을 처치하지 않은 正常群과 Nomal Saline을 5일간 연속 경구 투여하고 CCl₄으로 처리한 군(NS+CCl₄군), CCl₄ 처리 후 24시간 뒤부터 5일간 연속 Normal Saline을 경구 투여한 군(CCl₄+NS군), 소시호탕을 5일간 연속 경구 투여하고 CCl₄으로 처리한 군(SSHT+CCl₄군), CCl₄ 처리 후 24시간 뒤부터 5일간 연속 소시호탕을 경구 투여한 군(CCl₄+SSHT군)으로 나누었다.

간 독성을 유발은 사염화탄소 (Carbon tetrachloride, CCl₄, Junsei cem. co., Ltd., Japan)를 Olive oil(Shinyo pure chemicals co., Ltd., Japan)과 1:1로 혼합 한 용액을 뒤 SD-Rat kg당 0.2ml 를 복강 주입한 후, 혈액검사로 간손상을 확인한 뒤 소시호탕을 100 mg/ml의 농도로 적정 한 뒤 매일 0.2ml씩 존대를 이용하여 경구 투여하였으며, Normal Saline은 동량을 같은 방법으로 경구투여 하였다.

3) 채혈 및 혈청의 분리

소시호탕 투여 및 CCl₄를 처리한 실험 종료일에 급식을 중단하고 다음날 혈액 및 간을 적출하였다. 럼푼(Rompun, BAYER, 한국) : 케타민(Ketamine, 유한양행, 한국)을 2:3의 비율로 혼합 후 0.2ml씩 근육 주사하여 마취 후에 복부 정중선을 따라 개복한 뒤, 복대정맥을 통해 혈액을 5ml씩 채취하고, 즉시 혈액응고제가 포함된 vacutainer tube(vacutainer, BECTON, DICKINSON, USA)에 넣었고, 원심분리기(HRT-601V, 한일과학, 한국)에서 3000rpm으로 10분간 원심 한 뒤 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다. 간의 적출은 혈액 채취 이후에 조심스럽게 간을 적출 하였으며, 적출 즉시 -20℃의 냉장고(삼성전자, 한국)에서 1시간 보관 후 -80℃의 냉동고(Heto, Denmark)로 옮겨 실험에 사용하였다.

3. 측정항목 및 방법

1) 생화학 검사

상기의 방법으로 얻어진 혈청을 이용하여 생화학 검사를 실시하였다. 검사항목은 Total Protein, Albumin, Alkaline phosphatase, Aspartate aminotransferase, Alanine aminotransferase를 실시하였다. 검사는 생화학분석기(TBA-120FR, Toshiba, Japan)를 이용하였으며, 각각의 측정 방법에 맞는 시약(生研, 일본)을 이용하다. Total Protein, Albumin, Alkaline phosphatase, Aspartate aminotransferase, Alanine aminotransferase 법으로 측정하였다.

2) Cytochrome P450 mRNA 발현

① Total RNA 분리 및 정량

Total RNA의 분리는 RNazol B(Friendswood, Texas)을 사용하였다. -80℃에 보관 중이던 간 조직 0.2g을 homogenizer (Corning, USA)로 잘 분쇄하여 lysis시킨 후, 전체분량의 1/10의 chloroform(Sigma, USA)을 첨가하였다. 이후에 Voltex하여 얼음에 2분간 방치하였다가 원심분리기(Micro17R, 한일과학, 한국)를

이용하여 12,000rpm으로 10분간 원심분리하고, 상층액에 두 배의 ethanol(Sigma, USA)를 첨가한 후 잘 훤플고, 12,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액만 버린 후, 가라앉은 pellet에 70% Diethyl pyrocarbonate(DEPC; Sigma, USA)-treated ethanol로 세척하여 14,000rpm으로 1분간 원심분리 하였다. 이후에 상층액을 완전히 제거하고 공기 중에 3분간 방치하였다가 0.1% DEPC-treated H₂O에 녹여 분광광도계(U-2000, Hitachi, Japan)에서 260/280 nm로 Total RNA를 정량하여 다음 실험에 사용하였다.

② RT-PCR

cDNA 합성은 Promega RT kit(Promega, USA)를 사용하였다. Total RNA 1 μ g/ μ l에 2.5mM MgCl₂, 10X PCR buffer, RNase free dH₂O, 10mM dNTP, AMV RTase, 2.5pmole oligo dT를 전체 20 μ l되게 넣어 준 다음 60°C에서 10분간 반응시키고, 42°C에서 30분간 annealing하였다. PCR은 1 μ l의 RT product에 0.5 μ l primer(100 pmol), 10X PCR buffer 5 μ l, 2.5mM dNTP 1 μ l, taq polymerase 1 μ l에 sterile dH₂O를 첨가하여 총부피가 25 μ l가 되도록 하였다. 반응은 94°C에서 5분간, 95°C에서 60초, 54°C 1분, 72°C 90초동안 25 cycle 반응시키고 72°C에서 5분간 신장하였다. 각각의 PCR product는 5 μ l씩 1.2% agarose gel 상에서 전기영동하여 EtBr로 염색하고, UV transilluminator (Spectroline TR-302, USA)위에서 관찰하였으며 micro 렌즈와 UV 및 red filter를 부착한 사진기(Polaroid H-3, USA)를 사용하여 자외선 조명 하에서 촬영하였다.

사용된 Cytochrome P450(CYP2E1)의 primer는 다음과 같고, 보한바이오사(한국)에 의뢰하여 합성하였다.

sense primer : 5'ACCACCAGCACAACTCTGAGA3'

antisense primer : 5'CAATTCCATGGGGCCAGGCC3'

3) 항산화 활성 측정

① 균질액의 준비

효소활성도 측정을 위하여 전체 조직의 4배 용량의 50 mM photassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 4°C에서 균질화하였다. 이 균질액을 1000 $\times g$ 에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액으로 과산화지질(lipid peroxide) 및 Glutathione-S-transferase, Glutathione Peroxidase 및 Superoxide dismutase를 측정하기 위한 시료로 사용하였다. 위의 모든 실험은 4°C 하에서 실행하였다.

② Cytosol 분획

Cytosolic fraction은 균질액 준비에서 얻어진 상층액에 ethanol : chloroform(5:3) 용액을 0.4배량을 첨가하여 섞어 준 다음 10,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻어 Superoxide Dismutase 측정에 사용하였다. 위의 모든 실험은 4°C 하에서 실행하였다.

③ 미토콘드리아 분획

Mitochondrial 분획은 균질액의 준비에서 얻은 상층액을 600 $\times g$ 에서 15 분간 원심분리하여 핵과 세포잔해를 제거한 상층액을 최한 후 다시 12,000 $\times g$ 에서 30분간 원심분리하여 미토콘드리아를 모아 catalase 활성도를 측정하기 위한 시료로 사용하였다. 위의 모든 실험은 4°C 하에서 실행하였다.

4) 단백질정량

단백질 정량은 Bicinchoninic Acid(BCA, Sigma, USA) 용액

을 이용하여 bovine serum albumin(BSA, Sigma, USA)을 표준 곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1 μ g/ μ l)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16 μ g/ μ l에 BCA 용액 100 μ l를 첨가하여 20분간 37°C에서 방치한 다음 흡광도 540nm에서 측정하여 표준 곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 μ l와 BCA 용액 100 μ l을 섞은 뒤 20분간 37°C에서 방치한 후 540nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

5) Lipid Peroxidation

조직내 지질 과산화물의 함량 측정은 Ohkawa 등¹⁴⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 조직 마쇄 균질액을 1,000 $\times g$ 에서 15분간 원심분리한 후 20% 간 조직 균질액 0.1ml에 8.1% Sodium dedecyl sulfate(SDS, Sigma, USA) 0.1 ml, 20% acetate buffer(pH 3.5) 0.75ml과 2.1% Thiobarbituric acid(TBA, Sigma, USA) 0.5ml를 가한 다음 100°C에서 30분 동안 반응시키고 실온에서 냉각한 다음 혼합액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 TBA 반응물질이 존재하는 상층액을 취하여 분광광도계(U-2000, Hitachi, Japan)에서 540nm로 흡광도를 측정한 후 조직 단위 당 과산화지질의 농도를 아래 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{흡광도} \times \text{factor} = \text{nmoles/g of tissue} \quad (\text{factor} : 32.051)$$

6) Superoxide dismutase(SOD) 활성도 측정

Cytosolic 분획의 상층액 10 μ l를 0.1mM ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA; Sigma, USA)가 첨가된 50mM potassium phosphate buffer 2.93ml에 가한 후 실온에서 15분간 반응시켰다. 여기에 50mM hematoxylin(Sigma, USA) 60 μ l를 첨가한 후 560nm에서 흡광도를 측정하였으며, SOD 활성도는 아래 식에 의해 산출하였다.

Unit: 50% inhibition of autooxidation of hematoxylin

$$= \frac{\text{Control unit}}{\text{test OD/mg protein}}$$

Control unit : (control 4분 OD - control 0분 OD)/2. Test OD : sample 4분 OD - sample 0분 OD

7) Catalase 활성도 측정

조직 내의 catalase 활성도는 Goth and Vitai¹⁵⁾의 방법에 따라 측정하였다. Mitochondrial fraction에 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 2 ml를 넣고 얼렸다 녹였다 하는 과정을 3회 반복하여 막단백질인 catalase를 유리시켰다. 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 0.5ml에 원액 H₂O₂ 용액(30%)을 가하여 25°C에서 5분간 예비 반응시킨 다음 mitochondria 분획 20 μ l를 넣어 섞어 준 후 30초 후에 32.4 mM의 ammonium molybdate 0.1ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 분광광도계에서 402nm로 흡광도를 측정하였다. 대조실험으로 기질인 H₂O₂ 용액과 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)를 가하여 다른 조건은 위와 동일하게 하여 흡광도변화를 측정하였으며, 효소의 활성도는 30초 동안에 1 μ M의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1unit로 하였다.

Unit : nmole H₂O₂decreases/mg protein/m =
흡광도 X 사용한 효소량에 해당하는 protein 양

Factor : 24.390 nmole/cc × time(sec) × total volume(ml)

8) Glutathione-S-transferase(GST) 활성도 측정

GST 활성도 측정은 Habig 등¹⁶⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 간조직 균질액 50μl, 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 890μl, 100mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB; Sigma, USA) 10 μl, 20mM GSH 50μl를 cuvette에 넣고 분광광도계에서 402nm로 흡광도 변화를 10분 간격으로 60분간 측정하였다. 활성도는 분당 mg 단백질로 나타내었다.

9) Glutathione Reductase(GR) 활성도 측정

GR의 활성측정은 Racker¹⁷⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 간 조직 균질액 20μl, 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 2.5μl, 26.978mM EDTA 100μl, 66.01mM glutathione disulphide(GSSG; Sigma, USA) 200μl, 9.148mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH; Sigma, USA) 50μl를 cuvette에 넣고 분광광도계에서 402nm로 흡광도 변화를 10분 간격으로 60분간 측정하였다. 활성도는 분당 mg 단백질로 나타내었다.

10) Glutathione Peroxidase(GPx)활성도 측정

GPx의 활성측정은 Flohe 등¹⁸⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 즉 간 조직 균질액 25μl, 0.3M sodium phosphate buffer 500μl, 25.5mM sodium azide (Sigma, USA) 250μl, 1mM hydroperoxide(Sigma, USA) 160μl, 294.37mM glutathione(Sigma, USA) 30μl, 8.4mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH; Sigma, USA) 55μl, glutathione reductase(Sigma, USA)(2.5mg/ml) 5μl를 cuvette에 넣고 분광광도계에서 402nm로 흡광도 변화를 측정하였다.

4. 통계처리

실험에 사용한 통계프로그램은 STATISTICA 6.0(StatSoft, USA)을 이용하였으며, 통계방법은 student's T-test를 하였으며, p<0.05인 경우 유의성을 인정하였다.

실험 결과

1. Total Protein

Normal군은 4.40 ± 0.72 (mg/ml), NS+CCl₄군은 4.83 ± 0.52 (mg/ml), CCl₄+NS군은 5.20 ± 0.20 (mg/ml), SSHT+CCl₄군은 4.88 ± 0.40 (mg/ml), CCl₄+SSHT군은 4.70 ± 0.66 (mg/ml)을 나타내었다(Table 2, Fig. 1).

2. Albumin

Normal군은 2.90 ± 0.46 (mg/ml), NS+CCl₄군은 3.28 ± 0.30 (mg/ml), CCl₄+NS군은 3.53 ± 0.15 (mg/ml), SSHT+CCl₄군은 3.28 ± 0.26 (mg/ml), CCl₄+SSHT군은 3.12 ± 0.41 (mg/ml)을 나타내었다(Table 3, Fig. 2).

Table 2. Effect of Sosihotang on the Serum Total Protein Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Group	Total Protein(mg/ml)
Normal	4.40 ± 0.72
NS+CCl ₄	4.83 ± 0.52
CCl ₄ +NS	5.20 ± 0.20 ^a
SSHT+CCl ₄	4.88 ± 0.40
CCl ₄ +SSHT	4.70 ± 0.66

a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05) Normal : None treated group NS+CCl₄ : Normal saline treated group before CCl₄ intoxication CCl₄+NS : Normal saline treated group after CCl₄ intoxication SSHT+CCl₄ : Sosihotang treated group before CCl₄ intoxication CCl₄+SSHT : Sosihotang treated group after CCl₄ intoxication

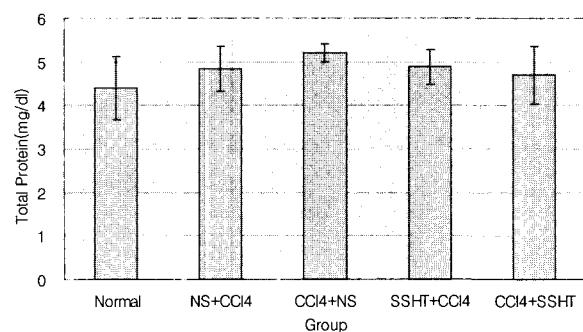


Fig. 1. Effect of Sosihotang on the Serum Total Protein Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Table 3. Effect of Sosihotang on the Serum Albumin Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Group	Albumin(mg/ml)
Normal	2.90 ± 0.46 ^a
NS+CCl ₄	3.28 ± 0.30
CCl ₄ +NS	3.53 ± 0.15
SSHT+CCl ₄	3.28 ± 0.26
CCl ₄ +SSHT	3.12 ± 0.41 ^c

a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05) c) Statistical significant (vs CCl₄+NS) (p<0.05)

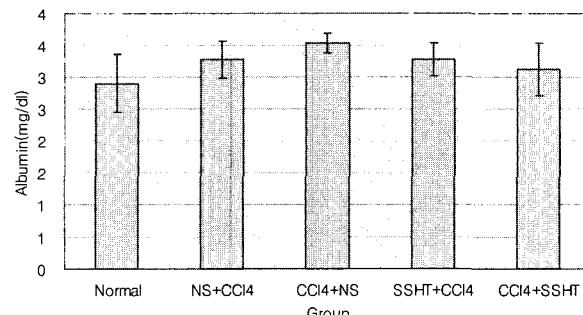


Fig. 2. Effect of Sosihotang on the Serum Albumin Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

3. Alkaline Phosphatase

Normal군은 478.67 ± 140.30 (U/L), NS+CCl₄군은 632.00 ± 62.62 (U/L), CCl₄+NS군은 538.50 ± 137.25 (U/L), SSHT+CCl₄군은 570.00 ± 131.04 (U/L), CCl₄+SSHT군은 480.40 ± 94.20 (U/L)을 나타내었다(Table 4, Fig. 3).

Table 4. Effect of *Soshihotang* on the Serum Alkaline Phosphatase Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Group	Alkaline Phosphatase(U/L)
Normal	478.67 ± 140.30
NS + CCl ₄	632.00 ± 62.62
CCl ₄ + NS	538.50 ± 137.25
SSHT + CCl ₄	570.00 ± 131.04
CCl ₄ + SSHT	480.40 ± 94.20 ^b

b) Statistical significant (vs NS + CCl₄) (p<0.05)

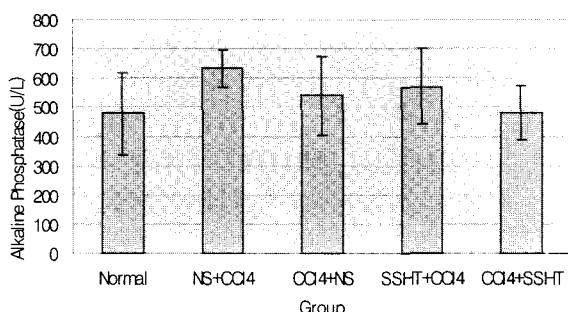


Fig. 3. Effect of *Soshiho-tang* on the Serum Alkaline Phosphatase Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

4. Aspartate aminotransferase

Normal군은 101.17 ± 32.21 (U/L), NS+CCl₄군은 741.75 ± 63.91 (U/L), CCl₄+NS군은 107.50 ± 14.25 (U/L), SSHT+CCl₄군은 585.40 ± 227.57 (U/L), CCl₄+SSHT군은 67.20 ± 19.52 (U/L)을 나타내었다(Table 5, Fig. 4).

Table 5. Effect of *Soshiho-tang* on the Serum Aspartate Aminotransferase Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Group	Aspartate aminotransferase(U/L)
Normal	101.17 ± 32.21
NS + CCl ₄	741.75 ± 63.91 ^b
CCl ₄ + NS	107.50 ± 14.25 ^c
SSHT + CCl ₄	585.40 ± 227.57 ^{a,c}
CCl ₄ + SSHT	67.20 ± 19.52 ^{a,b}

a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05) b) Statistical significant (vs NS+CCl₄) (p<0.05) c) Statistical significant (vs CCl₄+NS) (p<0.05) d) Statistical significant (vs SSHT+CCl₄) (p<0.05)

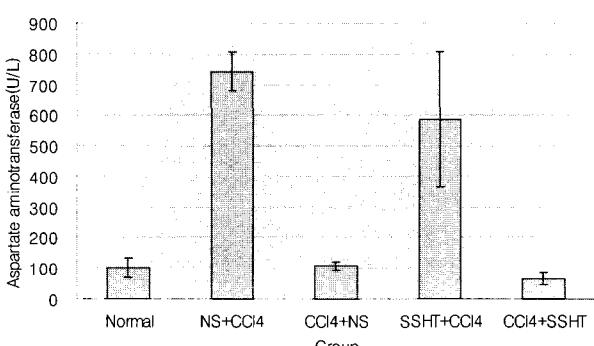


Fig. 4. Effect of *Soshiho-tang* on the Serum Aspartate Aminotransferase Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

5. Alanine aminotransferase

Normal군은 41.50 ± 5.50 (U/L), NS+CCl₄군은 358.00 ± 66.47 (U/L), CCl₄+NS군은 41.38 ± 7.47 (U/L), SSHT+CCl₄군은 254.20 ± 159.94 (U/L), CCl₄+SSHT군은 34.00 ± 7.52 (U/L)을 나타내었다(Table 6, Fig. 5).

Table 6. Effect of *Soshiho-tang* on the Serum Alanine Aminotransferase Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Group	Alanine aminotransferase(U/L)
Normal	41.50 ± 5.50
NS + CCl ₄	358.00 ± 66.47 ^a
CCl ₄ + NS	41.38 ± 7.47 ^b
SSHT + CCl ₄	254.20 ± 159.94 ^{a,c}
CCl ₄ + SSHT	34.00 ± 7.52 ^{b,d}

a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05) b) Statistical significant (vs NS+CCl₄) (p<0.05) c) Statistical significant (vs CCl₄+NS) (p<0.05) d) Statistical significant (vs SSHT+CCl₄) (p<0.05)

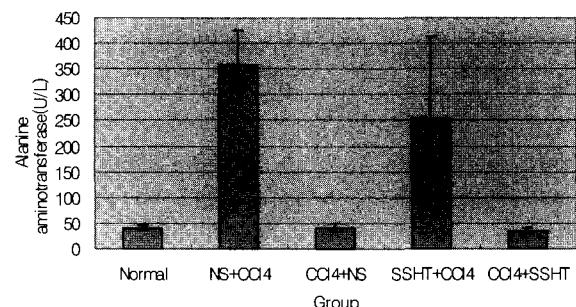


Fig. 5. Effect of *Soshiho-tang* on the Serum Alanine Aminotransferase Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

6. P405 mRNA의 발현

소시호탕이 P450의 발현에 관여하는지 여부를 측정한 결과 정상군에서는 P450 mRNA가 적게 발현되었으나 CCl₄를 처리한 대조군에서는 높게 발현되었다. 그러나 소시호탕을 전처리한 실험군은 정상군과 마찬가지로 mRNA가 적게 발현되었으나 후처리군에서 많이 발현되었다(Fig. 6).

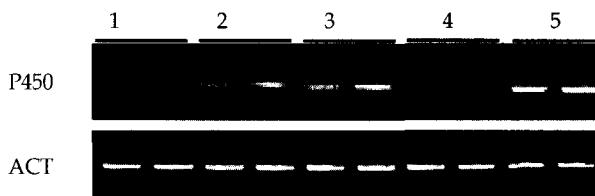


Fig. 6. mRNA expression of Rat P450 2E1(CYP2E1) through RT-PCR. 1 : Normal ; None treated group 2 : NS + CCl₄ : Normal saline treated group before CCl₄ intoxication 3 : CCl₄ + NS : Normal saline treated group after CCl₄ intoxication 4 : SSHT + CCl₄ : Soshiho-tang treated group before CCl₄ intoxication 5 : CCl₄ + SSHT : Soshiho-tang treated group after CCl₄ intoxication

7. LPO

Normal군은 3.86 ± 0.51 (μmoles/mg protein/min), NS+CCl₄군은 10.26 ± 0.31 (μmoles/mg protein/min), CCl₄+NS군은

4.17 ± 0.13 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$), SSHT+CCl₄군은 4.49 ± 0.20 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$), CCl₄+SSHT군은 8.65 ± 0.27 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$)을 나타내었다(Table 7, Fig. 7).

Table 7. Effect of Sosihotang on the LPO Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Group	LPO($\mu\text{moles/mg protein/min}$)
Normal	3.86 ± 0.51
NS + CCl ₄	10.26 ± 0.31 ^a
CCl ₄ + NS	4.17 ± 0.13 ^b
SSHT + CCl ₄	4.49 ± 0.20 ^b
CCl ₄ + SSHT	8.65 ± 0.27 ^{a,b,c,d}

a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05) b) Statistical significant (vs NS+CCl₄) (p<0.05) c) Statistical significant (vs CCl₄+NS) (p<0.05) d) Statistical significant (vs SSHT+CCl₄) (p<0.05)

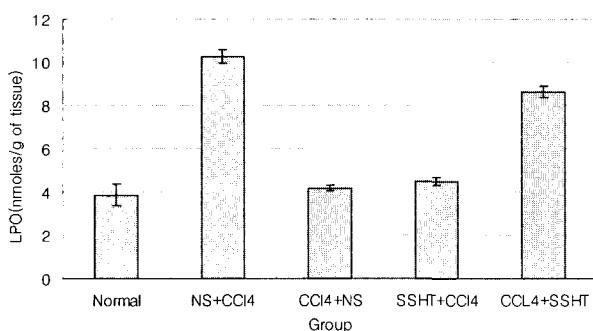


Fig. 7. Effect of Sosihotang on the LPO Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

8. SOD

Normal군은 138.65 ± 5.85 (unit/mg protein/hour), NS+CCl₄군은 127.08 ± 13.05 (unit/mg protein/hour), CCl₄+NS 군은 144.22 ± 8.03 (unit/mg protein/hour), SSHT+CCl₄군은 275.36 ± 14.36 (unit/mg protein/hour), CCl₄+SSHT군은 149.25 ± 7.09 (unit/mg protein/hour)을 나타내었다(Table 8, Fig. 8).

Table 8. Effect of Sosihotang on the SOD Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Group	SOD(unit/mg protein/hour)
Normal	138.65 ± 5.85
NS + CCl ₄	127.08 ± 13.05
CCl ₄ + NS	144.22 ± 8.03
SSHT + CCl ₄	275.36 ± 14.36 ^{a,b,c}
CCl ₄ + SSHT	149.25 ± 7.09 ^d

a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05) b) Statistical significant (vs NS+CCl₄) (p<0.05) c) Statistical significant (vs CCl₄+NS) (p<0.05) d) Statistical significant (vs SSHT+CCl₄) (p<0.05)

9. Catalase

Normal군은 293.93 ± 6.38 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$), NS+CCl₄군은 355.67 ± 7.20 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$), CCl₄+NS군은 356.10 ± 5.62 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$), SSHT+CCl₄군은 377.07 ± 6.67 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$), CCl₄+SSHT군은 369.03 ± 12.24 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$)을 나타내었다(Table 9, Fig. 9).

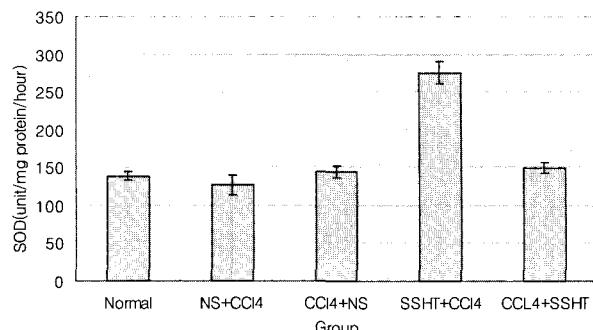


Fig. 8. Effect of Sosihotang on the SOD Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Table 9. Effect of Sosihotang on the Catalase Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Group	Catalase($\mu\text{moles/mg protein/min}$)
Normal	293.93 ± 6.38
NS + CCl ₄	355.67 ± 7.20 ^a
CCl ₄ + NS	356.10 ± 5.62 ^a
SSHT + CCl ₄	377.07 ± 6.67 ^{a,b,c}
CCl ₄ + SSHT	369.03 ± 12.24 ^d

a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05) b) Statistical significant (vs NS+CCl₄) (p<0.05) c) Statistical significant (vs CCl₄+NS) (p<0.05) d) Statistical significant (vs SSHT+CCl₄) (p<0.05)

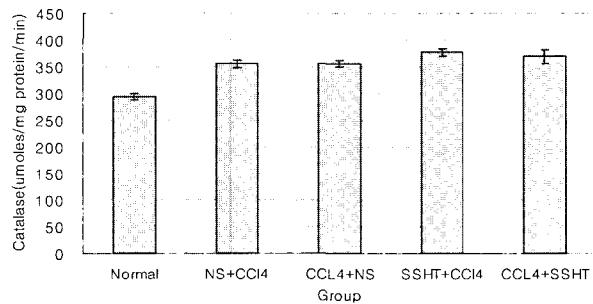


Fig. 9. Effect of Sosihotang on the Catalase Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

10. GST

Normal군은 250.00 ± 8.16 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$), NS+CCl₄군은 263.67 ± 8.38 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$), CCl₄+NS 군은 280.33 ± 8.18 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$), SSHT+CCl₄군은 353.67 ± 5.79 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$), CCl₄+SSHT군은 312.67 ± 8.99 ($\mu\text{moles/mg protein/min}$)을 나타내었다(Table 10, Fig. 10).

Table 10. Effect of Sosihotang on the GST Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Group	GST($\mu\text{moles/mg protein/min}$)
Normal	250.00 ± 8.16
NS + CCl ₄	263.67 ± 8.38
CCl ₄ + NS	280.33 ± 8.18 ^{a,b}
SSHT + CCl ₄	353.67 ± 5.79 ^{a,b,c}
CCl ₄ + SSHT	312.67 ± 8.99 ^{a,b,c,d}

a) Statistical significant (vs Normal) (p<0.05) b) Statistical significant (vs NS+CCl₄) (p<0.05) c) Statistical significant (vs CCl₄+NS) (p<0.05) d) Statistical significant (vs SSHT+CCl₄) (p<0.05)

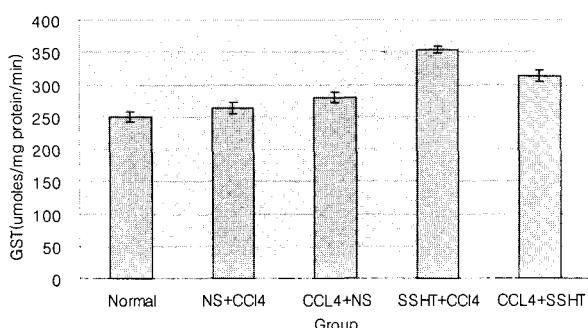


Fig. 10. Effect of *Sosihotang* on the GST Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

11. GR

Normal군은 61.33 ± 5.00 (umoles/mg protein/min), NS+CCl₄군은 77.00 ± 5.72 (umoles/mg protein/min), CCl₄+NS군은 79.33 ± 7.41 (umoles/mg protein/min), SSHT+CCl₄군은 86.00 ± 4.08 (umoles/mg protein/min), CCl₄+SSHT군은 81.67 ± 4.92 (umoles/mg protein/min)을 나타내었다(Table 11, Fig. 11).

Table 11. Effect of *Sosihotang* on the GR Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Group	Glutathione Reductase(umoles/mg protein/min)
Normal	61.33 ± 5.00
NS+CCl ₄	77.00 ± 5.72^b
CCl ₄ +NS	79.33 ± 7.41^b
SSHT+CCl ₄	86.00 ± 4.08^{ab}
CCl ₄ +SSHT	81.67 ± 4.92

a) Statistical significant (vs Normal) ($p<0.05$) b) Statistical significant (vs NS+CCl₄) ($p<0.05$) c) Statistical significant (vs CCl₄+NS) ($p<0.05$) d) Statistical significant (vs SSHT+CCl₄) ($p<0.05$)

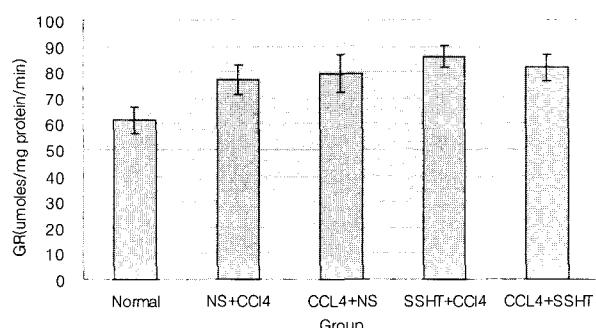


Fig. 11. Effect of *Sosihotang* on the Glutathione Reductase Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

12. GPx

Normal군은 51.33 ± 5.79 (unit/mg protein/min), NS+CCl₄군은 30.00 ± 3.27 (unit/mg protein/min), CCl₄+NS군은 33.67 ± 4.11 (unit/mg protein/min), SSHT+CCl₄군은 71.00 ± 6.98 (unit/mg protein/min), CCl₄+SSHT군은 60.67 ± 5.73 (unit/mg protein/min)을 나타내었다(Table 12, Fig. 12).

Table. 12. Effect of *Sosihotang* on the GPx Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

Group	Glutathione Peroxidase(unit/mg protein/min)
Normal	51.33 ± 5.79
NS+CCl ₄	30.00 ± 3.27^b
CCl ₄ +NS	33.67 ± 4.11^{ab}
SSHT+CCl ₄	71.00 ± 6.98^{abc}
CCl ₄ +SSHT	60.67 ± 5.73^{bc}

a) Statistical significant (vs Normal) ($p<0.05$) b) Statistical significant (vs NS+CCl₄) ($p<0.05$) c) Statistical significant (vs CCl₄+NS) ($p<0.05$) d) Statistical significant (vs SSHT+CCl₄) ($p<0.05$)

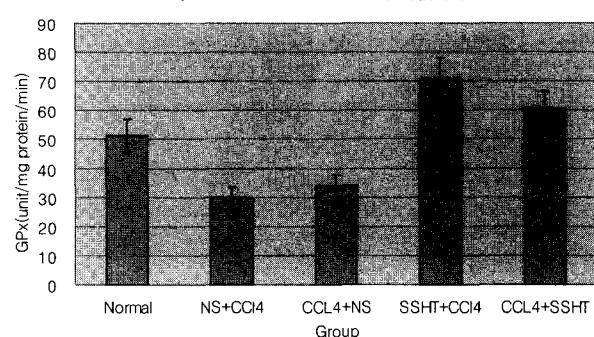


Fig. 12. Effect of *Sosihotang* on the Glutathione Peroxidase Level of SD Rat injured by CCl₄ solution.

고 칠

간은 疏泄과 藏血을 주관하며,^{1,3)} 각종 대사기능의 중추기관이 될 뿐 아니라 각종 화학물질의 생성, 해독, 담즙분비, 조혈, 혈액저장 등이 다양한 역할을 수행하고 있다.^{2,5)} 疏泄은 풀어서 펴고 원활하게 소통시킨다는 뜻으로²⁾ 간이 전신의 기, 혈액, 진액 등을 疏通, 發泄하여 그 것으로 하여금 條達, 宣泄하는 작용이 있음을 의미하며,³⁾ 疏泄機能이 正常이면 精神이 舒暢하며 기기가 조창하게 되고, 기혈이 조화로워지며, 경락이 통리하게 되어 장부 기관의 활동도 또한 정상적으로 조화롭게 된다.³⁾

간의 소설기능을 앓으면 情志는 抑鬱되는데 이것은 간장의 기능이 人體 精神情志活動에 대하여 影響을 주는 일면이며, 外界的 精神刺戟, 內部의 大怒, 혹은 情緒의 과도한 抑鬱 등으로 또 다시 간의 소설기능이 그 정상을 앓게 되면 肝氣鬱結 혹은 肝氣橫逆 등의 병리현상이 나타나게 된다.²⁾ 情志는 七情과 五志의 악정으로서 사람의 정신, 의식, 사유활동을 가리킨다. 이것은 심에 의해 주관되나, 간의 소설기능과도 밀접한 관계가 있다. 사람의 정상적인 생리활동은 주로 氣血의 정상적인 운행에 의존한다. 따라서 간의 소설기능이 氣機를 고루 퍼지게 하고 혈액의 운행을 촉진시키는 등의 생리작용을 일체의 氣血이 정상적으로 운행하는데 있어서 매우 중요한 조건이 되는 까닭에 肝의 소설 기능은 情志를 고루 퍼지게(調暢)하는 작용이 있다.¹⁹⁾ 간담계통의 생리기능은 매우 복잡하며 그중 疏泄機能이 가장 중요하다.

간장의 생리기능은 疏泄로써 개괄되는데 膽腑·目竅·筋膜 등 기초물질의 生化 및 유통과도 관계가 있다. 그 중에서도 전신의 氣機를 疏泄하고 血液를 저장하여 조절하는 기능이 가

장 중요하다.

간장의 疏泄機能을 주로 여섯 방면으로 나타나는데 첫째로 전신의 氣機를 疏泄한다. 인체는 氣는 운행을 그치지 않으며 상승하고 하강함에 度를 두고出入에 節을 두는데 이는 전적으로 肝의 疏泄, 條達作用에 의존한다. 둘째로 전신의 혈액을 저장하여 조절한다. 혈액은 인체에서 장부·경맥·百骸를 潤養하고 형체를 충실히 하는 작용을 한다. 셋째로 筋膜을 부드럽게 한다. 筋膜의 부드러움과 원활함은 淚血의 濡養과 陽氣溫煦에 의존한다. 넷째로 胆汁를 疏泄하여 運化를 촉진한다. 肝의 정상적인 疏泄은 脾胃의 정상적인 運化와 傳導를 유지시키는 중요 조건이다. 다섯째로 精을 눈으로 운반한다. 눈이 五臟六腑와 모두 연계되나 肝과 目竅의 관계는 더욱 밀접하다. 肝이 疏泄과 肝血의 충분한 條達에 의해서 보장되기 때문이다. 여섯째로 精神情志를 원활하게 한다. 정신적인 명랑과 유쾌 및 정서의 안정과 기능에 이상이 발생하므로 煩躁하여 쉽게 화를 내거나 혹은 情志가 억울되어 답답해하고 즐겁지 않으며, 胸脇이 脹滿하는 등의 증상이 나타난다.²⁾

약물의 특정효과를 살펴보는 연구에 있어서 실험동물의 적응기간 동안 실험실 환경이나 약물투여, 검역 채취시에 실험동물이 얼마간의 스트레스를 받게 된다. 이러한 자극은 간의 기능에 장애로 초래하게 되는데 소시호탕이 간의 독성과 간기능을 보호하는 작용에 대한 연구를 활발하게 진행되고 있으나, 간의 情志의 안정에 관여하는 소설기능에 대한 연구는 전무한 실정이다. 이에 저자는 疏肝解鬱 작용이 있는 柴胡劑의 대표적인 처방인 小柴胡湯이 간손상을 개선하고, 간혈류량을 증가시켜 간장을 보호하는 작용이 精神情志를 원활하게 하여 정서의 안정을 도모할 수 있는 것으로 생각하여 사람을 비롯한 모든 종에 대하여 간손상을 일으키는 대표적 약물로 알려져 있는 사염화탄소¹³⁾를 이용하여 간 손상을 시키기 전·후에 소시호탕을 투여하여 소시호탕이 정신적인 안정과 관련이 있는 소설기능에 얼마나 도움이 되는지를 알아보기 위하여 간 손상에 대한 지표로 이용되는 혈청중 Tatal Protein, Albumin, ALP, AST, ALT 활성도 및 P450과 SOD, Catalase, GST, GR, GPx를 측정하였다.

小柴胡湯은 傷寒論에 少陽證의 寒熱往來, 胸脇苦滿, 不欲飲食, 心煩喜嘔 等症을 치료하는 방제로서,⁸⁾ 소시호탕의 구성약재를 살펴보면 柴胡는 少陽經의 主藥으로 升陽解表하여 少陽의 氣를 達表하게 하며 鎮痛, 解熱, 亢炎, 肝保護作用이 있다.^{20,21)}

소시호탕의 구성약물에 대해서 살펴보면, 최근 연구결과에서 柴胡煎劑는 CCl₄ 등이 일으킨 실험성 간 손상에도 일정한 보호작용이 있으며 간세포의 변성괴사를 현저하게 경감시키며, AChT와 AGT의 저하를 촉진하여 간기능을 정상으로 회복시키며 간세포내에 축적된 당분 및 핵당핵산 함량의 대부분을 정상으로 회복시키거나 정상에 가까운 수치를 나타내게 한다고 하였고, 柴胡사포닌은 간내 단백질의 합성을 증가하여 단백질의 생신과 간세포 재생 수요를 만족시키고 간 기능의 회복을 촉진한다고 보고되었다.

또한 간섬유 증식을 억제하는 작용을 있어 간경화의 발생을 방지할 수 있고, 조기 간경변의 치료에 사용되며, 利膽 작용이 뚜렷하여 실험 동물의 담즙 배출량을 증가시키고 담즙증에 담산,

담색소와 콜레스테롤의 농도를 저하시키는 등 많은 임상 자료를 통하여 柴胡가 여러 종류의 간장병에 모두 비교적 좋은 치료 효과가 있다한다.²²⁾

시호는 疏肝解鬱 작용이 있는데, 이와 관련되어 간 기능 보호, 혈중 지질함량 감소, 이담 작용이 실험적으로 증명되었다. 고지혈증을 유발한 동물에 시호 saponin을 근육주사하면 cholesterol, triglyceride 및 phospholipid의 수치가 낮아지고, 특히 triglyceride 수치가 뚜렷이 배설을 촉진하며 이 외에도 bupleurmol이나 α-spinasterol은 실험적으로 cholesterol 수치를 높인 동물의 혈청 cholesterol 수치를 낮추며, CCl₄ · alcohol · 장티푸스 백신 · albumin · d-galactosamine 등 여러 원인으로 인한 동물의 간 기능 장애에 대해 치료 작용이 있어 AST와 ALT를 낮추고 조직손상을 감소시키며 간 기능을 정상으로 회복시킨다. 시호의 보간 작용은 消遙散, 小柴胡湯 등의 복합처방에서 효과가 뚜렷하게 나타난다. 시호의 간기능 보호작용 기전은 saponin이 생체막 부신의 glucocorticoids의 분비와 관계가 있다는 설이 있다.²³⁾

黃芩은 養陰退熱作用, 利膽, 抗알러지 등의 작용이 있으며,^{20,24)} 黃芩 추출물은 에틸알콜, CCl₄, 황곡균(황곡곰팡이)β1이 일으킨 급성 동물의 간손상을 보호하며 肝글리코겐 함량을 증가시키고, 黃芩煎劑에서 黃芩사포닌은 利膽작용이 있어 실험동물 담즙 분비량을 증가시킨다고 보고되었다.²⁵⁾ 고지방 음식으로 유발한 동물의 고지혈증이나 지방간에 대하여 개선 작용이 있다.²³⁾ 半夏는 除上焦火散逆氣하며,^{20,24)} 생강의 매운 성분인 gingerol과 shogaol은 CCl₄와 galactosamine으로 유발한 간손상을 억제하는 작용을 가진다. CCl₄로 간손상을 유발한 흰쥐에 생강유를 투여하면 혈청 ALT치가 뚜렷이 감소한다. 또한 CCl₄로 유발한 생쥐의 간손상에 대해서도 생강은 예방 작용을 가지며 BSP의 저류량을 감소시킨다.²³⁾

人蔘 甘草는 補脾, 和中하고, 大棗 生薑은 和榮衛한다.^{20,24)} 소시호탕이 간에 미치는 영향을 고찰한 연구로 윤,¹⁰⁾ 정,¹¹⁾ 김¹²⁾은 소시호탕이 사염화탄소로 유도된 Rats의 간장에 미치는 영향에 대하여 보고하였고, 구,²⁵⁾ 김,²⁶⁾ 김,²⁷⁾ 염,²⁸⁾ 등은 간질환치료에 소시호탕이 우수한 효능이 있다고 기술하였다.

최근 소시호탕에 대한 연구논문을 살펴보면, 신²⁹⁾은 ANIT로 유발된 간장애에서 인진사령산이 소시호탕에 비하여 뚜렷한 간기능 개선효과를 나타내어 임상에서 현재까지 알려진 바이러스 성 질환 뿐 아니라, 담즙정체성 간장애에도 활용될 수 있을 것이라고 하였다. 최³⁰⁾는 小柴胡湯과 柴苓湯의 간장치료제로서의 효과를 규명하기 위하여 흰쥐에 사염화탄소로 간손상을 일으킨 후 소시호탕과 시령탕을 투여하여 제1일, 3일, 5일, 7일, 9일의 순으로 경경하여 소시호탕 투여 제9일 소견에서 대조군에 비해 간세포 증식이 현저하였고 색상배열이 인정되었고, 시령탕 투여 제5일 소견에서는 간세포가 거의 정상으로 회복을 나타내어 소시호탕의 투여가 간손상회복에 유효하게 작용하였으며, 시령탕은 더 좋은 효과가 있음을 보고하였다. 윤¹⁰⁾은 소시호탕액기스의 500, 1000mg/kg의 투여는 독성이 약간 있음을 알 수 있으며 300mg/kg의 투여량이 가장 적당한 양이라고 보고하였다.

김³¹⁾은 소시호탕액기스와 인진호탕액기스의 단독투여 및 소

시호탕 엑기스와 인진호탕 엑기스의 병용투여시에 사염화탄소 투여로 유발한 백서 간장해에 미치는 예방효과를 관찰하여 혈청 GOT는 소시호탕이 인진호탕보다 더 효과적이고, GPT는 소시호탕과 인진호탕의 병용투여시 유의성 있는 결과가 나왔으며, 인진호탕보다 나은 억제효과를 나타내었고 척출 간장의 조직학적 변화는 소시호탕 또는 인진호탕을 투여한 실험군에서 중심정맥주위의 지방변성이 대조군에 비하여 감소되었으며, 소시호탕과 인진호탕 병용투여한 실험군에서는 모두 조직병변이 현저히 감소되었다고 보고하여 소시호탕이 간장해에 효과가 있음을 밝혔다. 정11)은 간염치료에 임상적으로 실용되고 있는 Prednisolone과 소시호탕을 사염화탄소 유도 간손상 동물에 단독 또는 동시 투여했을 때 유도된 간손상에 대하여 소시호탕엑기스는 사염화탄소로 폭로한 Rat에 소시호탕엑기스를 투여한 결과 생체계측 생화학적 소견 및 조직학적 소견에서 독성을 전반적으로 유의하게 개선하였고, Prednisolone은 사염화탄소로 폭로 야기한 Rat에 독성을 강화시켰으며 소시호탕엑기스와 Prednisolone을 동시에 투여한 군은 소시호탕만을 투여한 군에 비하여 독성을 강화시켰다고 보고하였다.

小柴胡湯은 간손상 작용을 개선하여 간세포의 괴사를 억제하며 CCl₄ 등의 원인으로 유발된 간 손상을 개선한다. CCl₄의 주사로 유발한 작은 쥐의 간손상 병리 모형 실험에서 관찰한 바 복용 이후 1, 3, 5, 6 개월에 모두 간교원섬유의 증식을 억제하고, 조직학 소견에서 간섬유화 정도에도 6개월에 저하된다고 하였다.²²⁾

그 밖에 소시호탕은 알콜성 지방간의 발생을 억제하며 간내 지질과산화물의 수치를 저하시켜 알콜성 지방간을 보호하는 작용이 있고, 항간섬유화의 형성 작용이 있으며, 또한 큰쥐의 간장을 2/3 절제한 다음 매일 小柴胡湯으로 치료한 결과 각각 수술 후 1, 2, 3, 5일 간생검, 간중량, 간단백, RNA 및 DNA 함량을 측정한 결과 상술한 4가지 지표가 모두 대조군 보다 현저히 상승시켜 간세포의 재생을 촉진하고, 매일 유사분열 지수 최고치가 2배로 증가시켜 소시호탕이 자극이나 수술 이후 간세포를 증식하는 작용이 있다고 하였다.²²⁾

그리고 小柴胡湯은 간혈류량을 증가시켜 간장을 보호한다. 실험군은 小柴胡湯을 사료에 첨가하여 주고, 대조군은 보통 사료를 주어 일정기간 복용시킨 뒤에 대퇴부 정맥에 간혈류량을 감소시키는 주사액을 주입하기 이전에 각 군에 간혈류량을 측정한 결과 각 군의 차이는 없었는데 주사한 다음 대조군의 혈류량이 주사전 보다 13% 감소되어 현저한 차이가 나타난 반면에 실험군에서는 간혈류량의 감소가 없고 전과 비교하여 차이가 나타나지 않았다고 보고되었다.

실험연구에 따르면 小柴胡湯證인 “胸脇苦滿”인 환자에게 小柴胡湯을 복용시키고 담낭을 초음파로 형태를 관찰하여 본 결과 小柴胡湯을 복용한 이후 오디씨팔약근이 이완하게 되고, 담즙을 배출하며 다음에는 간담즙이 대량으로 분비되는 것이 확인되었고, 또한 담낭 결석을 연구한 결과 小柴胡湯은 담즙증에 담즙산과 빌리루빈의 함량을 향상시켜 담즙분비와 배설을 촉진하는 작용이 있음이 밝혀졌다.²²⁾

간손상에 의한 실험모델로는 사염화탄소(CCl₄), d-galactosamine,

thioacetamide ethionine 등을 이용하여 독성 동물모델을 만들 수 있다. 이중 가장 일반적으로 이용되는 것은 사염화탄소를 이용한 모델로서 free radical에 의한 세포손상을 유도하기 위하여 많이 사용한다. 사염화탄소는 사람을 비롯한 모든 종에 대하여 간손상을 일으키는 대표적 약물로 알려져 있다.¹³⁾

사염화탄소는 그 자체로는 무해하지만 간세포의 소포체(endoplasmic reticulum)에 포함되어 있고, 지용성 약제나 기타 화합물의 대사에 관여하는 cytochrome P450에 의해 반응성이 높은 free radical인 CCl₄-로 전환되어 세포손상을 일으킨다.^{32,33)} CCl₄-는 OH-처럼 지질과산화를 일으키는 강력한 물질로서 세포막의 인지질 내에 있는 불포화지방산에서 수소원자를 뺏어와 자신은 CHCl₃으로 변하고 불포화지방산에 여분의 전자를 줌으로써 지질의 free radical를 유발하며, 이 radical이 산소와 반응하여 과산화를 유도함으로써 유기과산화물(organic peroxide)을 형성한다. 이 유기과산화물은 그 자체가 free radical로 작용하여 새로운 free radical을 형성하며, 따라서 세포막의 인지질을 빠르게 산화시킨다.³⁴⁾

사염화탄소를 투여하면 생체막의 endoplasmic reticulum (ER)에서 사염화탄소 homolytic cleavage에 의해 활성대사체인 trichloromethyl free radical로 대사되거나 CCl₄가 산소와 반응하여 생성된 trichloromethyl peroxy free radical(Cl₃COO[·])로 산화되어 세포막의 불포화지방산을 과산화시킴으로서 막의 구조나 기능을 파괴하여,^{35,36)} 간에서 단백합성을 저해하고, 간 glycogen 양을 감소시키며, 혈중으로 GOT와 GPT 등의 유출을 일으키고 또한 조직학적으로는 간조직의 지방변성, 괴사 등을 일으킨다고 알려져 있다.^{37,38)}

Rees연구에 의하면 CCl₄투여 후 24시간후에 간독작용이 가장 강하게 나타났다고 보고³⁹⁾하여, 본 실험에서 CCl₄로 간 손상을 일으킨 후 24시간 뒤에 실험하였다. Total Protein은 간합성능 및 글로불린 증기를 파악하기 위하여 행해지는데,⁴⁰⁾ 본 실험의 경우 NS+CCl₄와 SSHT+CCl₄를 비교할 때 증가하였고, CCl₄+NS와 CCl₄+SSHT를 비교할 때 감소 하였으며, Normal과 비교할 때 모두 증가하였다. 이는 만성적인 간손상에서 보여지는 결과이다. 또한 소시호탕투여 전후의 변화를 보면 약간 감소하는 경향을 보이고 있다.

Albumin은 주로 간에서 합성되어 순환혈류를 분비되지만 조직간액이나 피부, 근육등에도 분포하여 생체의 전신적인 환경에 따라 서로 이행된다.⁴¹⁾ 본 실험의 경우 간 보호 여부를 보는 NS+CCl₄와 SSHT+CCl₄의 경우는 차이가 없었고, 손상된 간의 회복을 보는 CCl₄+NS는 CCl₄+SSHT보다 증가하였으며, 정상군에 비하여 모두 증가하는 경향을 보였다. SSHT투여 전후를 비교할 때 약간 감소하는 경향을 보이고 있다.

Alkaline Phosphatase는 간담도계 질환, 골질환 등에서 증가하며 임상적 의의는 크다.⁴²⁾ 본 실험의 경우 정상군과 비교하여 전반적으로 증가하는 경향을 보이고 있다. 그러나 NS+CCl₄와 SSHT+CCl₄를 비교할 때 SSHT+CCl₄가 감소하였고, CCl₄+NS와 CCl₄+SSHT를 비교하였을 때도 감소하였다. 또한 CCl₄ 투여 후에 ALP의 증가가 더 뚜렷하였고, 시간이 지남에 따라 감소하는 경

향을 보이고 있으며, 소시호탕의 투여가 이러한 증가를 억제하는 것으로 생각된다. 소시호탕투여 전후를 비교할 때 약간 감소하는 경향을 보이고 있다.

Aspartate aminotransferase(AST)는 세포질과 미토콘드리아에 존재하여 심근, 간에 많고, Alanine aminotransferase(ALT)는 간세포질내에 존재하며 간, 신장에 많고, 이를 효소가 혈중에 증가하는 기전은 간질환으로 인하여 세포질과 미토콘드리아막의 투과성이 항진되기 때문으로 설명되고, 간질환에서 AST와 ALT는 증상발현 전에 증가한다.⁴²⁾ 본 실험의 경우 AST는 NS+CCl₄에 비하여 SSHT+CCl₄는 감소하였으며, CCl₄+NS에 비하여 CCl₄+SSHT은 현저히 감소하였다. ALT의 경우는 CCl₄+NS군과 CCl₄+SSHT은 정상군과 비슷한 결과를 보여주었고, NS+CCl₄군과 SSHT+CCl₄군은 현격히 증가하였다. 세포괴사가 일어나도록 병변이 진행되면 미토콘드리아에 풍부한 AST가 유출되어 ALT/AST의 비율이 감소하게 되는데, 본 실험에서도 같은 결과를 보이고 있다. 소시호탕투여 전후를 비교할 때 현저히 감소하는 경향을 보이고 있다.

조직의 세포내 소기관 중 소포체(endoplasmic reticulum)에 존재하는 cytochrome P450은 체외에서 들어오는 환경물질을 분해 대사하는 중추적 역할을 하는 효소로서 대사과정 중 oxygen radical이나 과산화수소(H₂O₂)를 생성한다.⁴³⁾ 그러므로 소시호탕의 효과를 증명하기 위하여 P450의 mRNA를 RT-PCR를 통하여 증명하였다. Fig. 6에서 보여 주는 바와 같이 정상군에서는 P450 mRNA가 적게 발현되었으나 CCl₄를 처리한 대조군에서는 높게 발현되었다. 그러나 소시호탕을 전처리한 실험군은 정상군과 마찬가지로 mRNA가 적게 발현되었으나 후처리군에서 많이 발현되었다. 그러므로 소시호탕에 의한 효과는 cytochrome P450의 전사억제와 관련 있음을 시사한다.

Cytochrome P450에는 여러 가지 다양한 효소가 존재하는데, 그 중에서 에탄올에 의해서 유도되는 cytochrome P450 2E1(CYP2E1)이 사염화탄소에 의한 간손상에 주로 관여하는 것으로 알려져 있다.⁴⁴⁾ Wong 등⁴⁵⁾에 의하면 CYP2E1 유전자를 결실시킨 생쥐에 사염화탄소를 투여하여도 정상 쥐와는 달리 GOT와 GPT 수치가 증가하지 않았으며 간손상이 발생하지 않음을 보고하여 CYP2E1이 사염화탄소에 의한 간손상에 중요한 인자임을 증명하였다.

따라서 본 실험에서는 소시호탕이 사염화탄소를 통하여 유발되는 CYP2E1 유전자의 발현에 영향을 주는지에 대하여 RT-PCR 분석방법으로 조사하였다. 그 결과 CCl₄를 처리하지 않은 정상군에서는 CYP2E1이 낮은 농도로 발현하였고 CCl₄를 처리한 대조군에서는 매우 높은 농도로 발현하고 있었으며, 이에 비하여 소시호탕을 전처리한 실험군에서는 CYP2E1이 거의 발현되지 않았으나 소시호탕을 후처리한 실험군에서는 대조군과 마찬가지로 발현되었다.

외부물질에 의한 세포 내의 방어에 관련된 항산화효소로는 SOD, catalase, glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR), glutathione S-transferase(GST) 등이 존재하며 이를 효소에 의하여 O₂⁻, H₂O₂ 및 OH- 라디칼 등의 독성을 무력화

시켜 세포로 하여 생존하게 만든다. 특히 이들 중 SOD, catalase, GPx 등은 많은 연구가 시행되고 있다.⁴⁶⁾ 본 연구에서는 CCl₄ 투여에 따른 세포막 지질의 과산화와 그에 관련된 항산화효소의 활성을 알아보기 위하여 지질산화물(lipid peroxidation: LPO) 및 항산화효소인 SOD, catalase, GPx, GR, GST의 활성을 측정하였다.

지질과산화(LPO)는 식물 및 동물에서 잘 정립된 세포상해기 전으로 세포나 조직에 있어서 산화적 스트레스의 지표로서 사용되고 있다. 과산화지질은 매우 불안정하여 반응성 carbonyl 화합물을 포함한 여러 가지 화합물로 분해된다. 불포화지방산이 과산화되면 malonaldehyde(MDA)와 4-hydroxyalkenals로 분해됨으로써 이들을 측정함으로써 세포의 과산화정도를 알 수 있다. 본 실험에서는 각각의 실험군에서 간조직을 채취한 후 균질화하여 원심분리 한 후 지질과산화물을 측정한 결과 정상군에 비하여 CCl₄를 처리한 대조군에서는 증가하였으며, 소시호탕을 전처리한 실험군에서는 활성이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 8).

활성산소종의 하나인 과산화수소는 정상적인 호기성대사과정 및 병리적인 ROS 생성에 의한 독성 산물이다. 특히 OH- 라디칼이 SOD에 의하여 과산화수소로 전환되면 catalase는 dismutation을 통하여 과산화수소를 물로 전환시켜 세포손상을 막는 역할을하게 된다. 본 실험에서는 SOD의 경우 정상군에 비하여 소시호탕 전처리군에서 유의성 있게 증가하는 경향을 보였으나 catalase는 약간 증가하는 경향을 보였다(Fig. 7, 12).

Glutathione(GSH)은 핵친화적으로 대사과정에 있어서 중심적 역할을 하는 자연발생적인 tripeptide이다.⁴⁷⁾ GSH는 glutathione peroxidase, glutathione reductase(GR) 및 glutathione S-transferase 등 여러 가지 효소에 중요한 역할을 하는 조효소로 작용한다. 본 실험에서는 이들 효소들이 정상군과 실험군에 비하여 소시호탕을 전처리군에서 모두 증가하는 경향을 보여 주었다(Fig. 9, 10, 11).

이상의 결과에서 소시호탕은 CCl₄로 유발된 간손상에 대하여 보호효과가 있으며, 그 기전은 항산화효소의 활성증가와 약물 자체의 항산화작용 및 CCl₄를 독성라디칼로 전환하는 효소인 cytochrome P450 2E1의 전사억제와 관련 있음을 시사한다.

결 론

CCl₄를 처리하여 간 손상을 시키기 전·후에 소시호탕을 투여하여 소시호탕이 정신적인 안정과 관련이 있는 소설기능에 얼마나 도움이 되는지를 알아보고자 간손상에 대한 지표로 이용되는 혈청중 Tatal Protein, Albumin, ALP, GOT, GPT 활성도 및 P450과 SOD, Catalase, GST, GR, GPx를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

Total Protein, Albumin은 CCl₄처리 후에 소시호탕을 투여하였을 때 감소하는 경향을 보였다. ALP는 소시호탕을 투여하였을 때 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다. AST와 ALT는 소시호탕을 CCl₄ 처리후에 투여 하였을 때 감소하는 경향을 보였다. P450은 소시호탕을 CCl₄ 처리 전에 투여 하였을 때 발현이 억

제 되었다. LPO는 소시호탕 투여시 모두 억제하는 경향을 보였다. SOD, Catalase, GST, GR, GPx는 소시호탕 투여시 모두 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과로 볼 때 혈액검사에서는 소시호탕이 CCl₄처리 후에 투여함이 좋은 결과를 보였으나, 간조직내의 P450, LPO, SOD, Catalase, GST, GR, GPx들은 CCl₄처리전에 소시호탕 투여가 좋은 결과를 보이고 있다. 약물 투여 기간이나 CCl₄에 의한 간 손상의 시간등의 문제로 서로 상반되는 결과가 나온 것으로 추측되며, 차후 문제점을 보완한 연구가 필요하리라 생각된다.

참고문헌

- 유길영, 동의학방법론연구, 서울, 성보사, p.37, 1983.
- 유도곤, 동의생리학강의, 익산, 원광대학교출판부, pp.661-662, 646-647, 1999.
- 나창수 외, 한의학총강, 서울, 의성당, p.240-242, 2001.
- 김우겸 외, 생리학, 서울, 서영출판사, p.151, 1986.
- 서울대학출판부, 가정의학, 서울, 일조각, p.277, p.285, 1990.
- 이문호 외, 내과학, 서울, 박애출판사, pp.967~968, 1965.
- 장중경, 급궤요략, 서울, 행림서원, p.392~394, 1978.
- 강순수, 바른방제학, 서울, 대성문화사, p.132-133, 1996.
- 윤정미, 소시호탕 액기스가 사염화탄소로 손상시킨 Rats의 간장에 미치는 영향, 조선대학교대학원, 1984.
- 정대영, 랫트에 있어서 사염화탄소 독성에 대한 소시호탕액 기스와 Prednisolone의 영향, 원광대학교대학원, 1985.
- 김덕한 외, 소시호탕이 사염화탄소에 의해 유도된 흰쥐의 간 장해에 미치는 영향, 대한위생과학회지, 4(2), p.1-6, 1988.
- Doull, J. : Carbon tetrachloride Casarett and Doull's Toxicology, 2nd ed., Macmillan Publishing Co., New York, p.472, 1984.
- Ohkawa S, Fukatsu K, Miki S, Hashimoto T, Sakamoto J, Doi T, Nagai Y, Aono T. 5-amino coumarans: dual inhibitors of lipid peroxidation and dopamine release with protective effects against central nervous system trauma and ischemia. *J Med Chem.* 40:559-73, 1997.
- Goth L, Vitai M. The effects of hydrogen peroxide promoted by homocysteine and inherited catalase deficiency on human hypocatalasemic patients. *Free Radic Biol Med.* 35:882-8, 2003.
- Hibig WH, Pabst MJ, Jaloby WB, Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139, 1974.
- Racker E, Glutathione Reductase from baker's yeast and beef liver. *J. Biol. Chem.* 217: 855-865, 1955.
- flohe L, Gunzler WA: Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105: 114-121, 1984.
- 전통의학연구소 : 기초한의학, 성보사, p318. 1997.
- 신길구, 신씨본초학, 서울, 수문사, p.233~231, 650-651, 1988.
- 안덕균, 현대본초학, 서울, 고문사, p.272, 1972.
- 董康, 遠德培 : 中醫十大名方 小柴胡湯, 中國中醫藥出版社, pp.18, 21, 42, 43, 44, 1998.
- 김호철, 한의부뇨학, 서울, 집문당, p.85, pp.96~p97, 132, 2001.
- 전국한의과대학 본초학교수, 본초학, 서울 영림사, p.149, 178, 448, 531, 540, 1991.
- 구본홍, 소화기질환의 한방임상, 행림출판사, 서울, p.232, 1977.
- 김정제, 김병운, 동의간계내과학, 동양의학연구원, 서울, p.12, 17, 21, 23, 1978.
- 김정제 외, 간질환에 대한 한방치료제에 관한 연구(제IV집) 염태환, 동의처방대전, 행림서원, 서울, p.316, 1975.
- 신상만 외, 인진사령산과 소시호탕이 ANIT로 유발된 담즙 물체성 간장애에 미치는 영향, 경희대학교대학원, 1996.
- 최상경, 소시호탕과 시령탕이 CCl₄로 유발된 흰쥐 간장애에 미치는 영향, 원광대학교대학원, 1982.
- 김정수, 소시호탕액기스와 인진호탕액기스의 병용투여에 관한 연구, 중앙대학교, 1983.
- 대한병리학회 : 병리학, 고문사 p45, 1994.
- Poli G. Liver damage due to free radicals. *Br Med Bull.* 49(3):604-620, 1993.
- Weddle CC, Hornbrook KR, McCay PB. Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. *J Biol Chem.* 25:251(16), pp.4973-4978, 1976.
- Goodman Gilman, A : Carbon tetrachloride. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 7th ed., Macmillan Publishing Co. New York, p.1635, 1985.
- Recknagel, R. O. : Carbon tetrachloride hepatotoxicant. *Rew.*, 19, p.145, 1967.
- Kobayash, J. : Fatty liver by hepatotoxic agent and lipid metabolism in rat(2). *Yakugaku Zasshi*, 80, p.1612, 1960.
- Stowell, R. E. and Lee, C. S. : Histochemical studies of mouse liver after single feeding of carbon tetrachloride, *Arch Path.*, 50, 519, 1950.
- Ress, K. R. : Reversible nature of liver cell damage due to carbon tetrachloride as demonstrated by the use of phenylmercury, *Nature*, 190, 27, 1962.
- 의학교육연수원 : 증상별 임상검사, 서울대학교출판부, pp 390-395, 1991.
- 대한임상의학연구소 : 임상병리파일, 의학문화사, pp171-172, 229-230, 1993.
- 이규범 : 임상병리 핸드북, 고문사, pp 386-387, 1994.
- 김병운 외, 동의간계내과학, 서울, 동양의학연구원출판부, pp.254-271, 1998.
- Noguchi T, Fong KL, Lai EK, Alexander SS, King MM, Olson L, Poyer JL, McCay PB. Specificity of a phenobarbital-induced cytochrome P-450 for metabolism of carbon tetrachloride to the trichloromethyl radical.

- Biochem Pharmacol. 1;31(5), pp.615-624, 1982.
43. Raiford DS, Thigpen MC. Kupffer cell stimulation with *Corynebacterium parvum* reduces some cytochrome P450-dependent activities and diminishes acetaminophen and carbon tetrachloride-induced liver injury in the rat. Toxicol Appl Pharmacol. 129(1), pp.36-45, 1994.
44. Wong FW, Chan WY, Lee SS. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. Toxicol Appl Pharmacol. 153(1), pp.109-118, 1998.
45. Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem Toxicol. 37(9-10), pp.949-962, 1999.
46. Fujii J, Taniguchi N. Down regulation of superoxide dismutases and glutathione peroxidase by reactive oxygen and nitrogen species. Free Radic Res.,31(4), pp.301-308, 1999.