

肺 組 織 中 胡 桃 抽 出 液 이 酸 化 性 細 胞 損 傷 의 防 禦 機 轉 에 미 치 는 影 響

李 佑 憲 · 徐 雲 教 · 鄭 智 天

東國大學校 韓醫科大學 內科學敎室

〈초록〉胡桃는 補陽藥으로써 下焦를 溫補하고 元氣를 攝納하며 潤肺腎하는 效能이 있어 오래된 虛寒咳嗽, 喘息의 治療에 사용되어 왔는데 肺 組織內에서 酸素遊離基들에 의한 細胞 損傷의 防止 여부를 알아보기 爲하여 酸化劑인 t-butylhydroperoxide(t-BHP)와 H₂O₂로써 細胞 損傷을 유발한 후 胡桃 抽出液의 抗酸化 效果 및 抗酸化 酵素의 活性에 미치는 影響과 酸素遊離基에 對한 직접 消去 效果를 調査하였다.

이 결과 胡桃는 肺 組織에서 脂質의 過酸化를 抑制함으로써 oxidant에 의한 肺浮腫 誘發을 防止할 수 있음을 보여주었고 細胞內 glutathione의 濃度 및 抗酸化 酵素 中 catalase 와 superoxide dismutase의 活性에는 變化를 유발하지 못하였으나 glutathione peroxidase의 活性을 有意하게 增加시켰으며, superoxide radical과 hydroxyl radical의 生成을 減少시켰다. 따라서, 肺 組織에서 酸化性 細胞 損傷에 對한 胡桃의 保護 效果는 부분적으로 細胞內 抗酸化 酵素의 活性 增加와 酸素遊離基들을 直接 消去시키는 作用에 起因하는 것으로 사료된다.

중심 낱말 : 호도(胡桃), 脂質의 過酸化, 抗酸化 酵素, 酸化劑, 자유라디칼.

I. 緒 論

酸素遊離基들(oxygen free radicals)은 老化 및 癌 誘發에 關係할 뿐만 아니라^{1,2)}, 痴呆, 心筋梗塞, 腎不全 등 많은 疾病을 일으키는 重要한 病因으로 認定되고 있다.^{1,3,4,5)}

肺에서 酸素遊離基들은 虛血-再貫流에 의한 細胞 損傷^{6,7)}과 여러 가지 呼吸障礙證候群⁸⁾을 일으키는 原因으로 알려져 있다. 特히 肺는 大氣에 露出되어 있기 때문에 오존과 같은 強力한 oxidant들이 包含하고 있는 汚染物質에 의해 損傷을 받을 可能性이 많다.^{9,10)} 따라서 大氣汚

染이 날로 增加하고 있고 그로 인한 肺機能障礙가 深刻하게 考慮되고 있는 狀況에서 肺에서 酸素遊離基에 의한 細胞 損傷을 防止할 수 있는 對策을 수립하는 것은 매우 重要하다.

이들 酸素遊離基들이 正常的인 細胞에서도 發生되고 있으나 몸속에는 또한 이들을 除去하는 酵素나 物質들을 가지고 있어 細胞속에서 發生되는 有害酸素基들이 細胞 損傷을 일으키지 못하도록 調節^{11,12)}하고 있는데 肺를 包含한 여러 組織에서 甚한 毒性을 나타내므로 이들을 除去하거나 發生을 抑制하며 몸속에서 이들에 對한 防禦機轉을 強化시키는 藥物이나 飲食物 또는

天然 抗酸化劑를 開發하고 利用하는데 關心이 增大되고 있다.

東醫學에서는 주로 補陽藥物들^{13,14,15)}이 生體內 抗酸化 酵素의 하나인 superoxid dismutase의 活性을 增大시킴으로써 老化 防止나 疾病의 治療에 利用된다고 하였으며, 김 등¹⁶⁾은 대표적인 補氣藥인 人蔘이 생쥐의 腎臟에서 抗酸化 酵素 活性을 增大시킴으로써 酸素遊離基의 生成이 抑制되었다고 報告하였다.

胡桃는 腎, 肺에 歸經하여 溫肺定喘 鎮咳化痰의 效能으로 오래된 咳嗽, 喘息 등 주로 慢性 呼吸器 疾患의 治療에 活用되어^{17,18,19)} 肺 組織에서 抗酸化 作用에 效果가 있을 것으로 여겨지나 이에 關한 報告는 별로 보이지 않는다.

이에 著者는 胡桃에 의한 肺 組織에서의 有害酸素基들에 對한 細胞 損傷의 防止 效果를 확인하고 抗酸化 酵素의 活性에 미치는 影響과 酸素遊離基에 對한 직접 消去 效果를 觀察하였던 바 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바 이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 動物 및 藥材

1) 動物

體重 1.5-2.0kg되는 토끼를 使用하였다.

2) 藥材

韓國產 胡桃(Juglandis Semen)를 市中에서 購入, 精選하여 使用하였다.

2. 方法

1) 檢液의 製造

胡桃 150g을 1,000ml round flask에 넣고 蒸溜水 500ml를 加한 다음 冷却器를 附着하여 2 時間 동안 加熱 煎湯하고 2回 吸引 濾過한 濾液을 減壓濃縮器로 濃縮하여 抽出液 100ml를 얻어 實驗에 使用된 溶液內에 適當한 濃度로 녹여 使用하였다.

2) 肺 組織 切片의 製作

토끼를 희생시킨 후 肺를 摘出하여 Stadie-Riggs microtome으로 약 0.3-0.5mm 두께의 肺切片을 만들어 使用하였다.

3) Oxidant의 處理

肺切片 약 50mg을 4ml의 incubation 溶液이 들어 있는 Beaker 속에 넣고 Dubnoff metabolic shaker 內에서 100% 酸素를 계속 供給하면서 37°C에서 incubation하였다. 기본 incubation 溶液의 造成은 130mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 5mM glucose, 10mM Tris-HCl(pH 7.5)로 되어 있으며, t-BHP이나 H₂O₂를 處理할 때는 이들 oxidant가 들어 있는 溶液內에서 60分 동안 incubation하였다. Incubation 後에 肺切片을 들어내어 細胞의 損傷 정도를 調查하기 爲하여 肺 組織의 浮腫 정도를 測定하였으며, 또한 細胞 損傷이 脂質의 過酸化와 聯關이 있는 지를 調查하였다.

4) 肺 組織의 浮腫 測定

肺 組織의 浮腫 狀態는 組織內 물의 含水量을 測定하여 評價하였는데, 간단히 說明하면 다음과 같다. Oxidant로 處理된 肺切片을 들어내어 濾過紙로 물기를 닦은 다음 무게를 잰 후, 80°C의 乾燥器에 넣고 48時間 동안 무게가 一定할 때까지 乾燥시켜 얻은 組織의 무게와 乾燥하기 前의 組織의 무게 差異로서 물의 含水量을 測定 하였다.

5) Malondialdehyde 含量 測定

細胞膜 脂質의 過酸化 정도는 그 產物인 malondialdehyde(MDA)량을 Uchiyama와 Mihara의 方法²⁰⁾으로 測定하여 評價하였다. 간단히 說明하면, oxidant로 處理된 肺切片을 차가운 1.15% KCl 溶液(5% wt/vol)속에서 破碎하였다. 이 組織破碎 均質液 0.5ml에 1% 磷酸 溶液 3ml과 0.6% thiobarbituric acid 溶液 1ml을 添加하여 끓는 물에서 45分間 加熱하였다. n-Butanol 4ml을 添加하여 完全히 섞은 다음 2000×g에서 20 分間 遠心分離한 후, 上澄液의 吸光度를 536과

520nm에서 測定하였다. 蛋白質 含量은 Bradford의 方法²¹⁾으로 測定하였으며, MDA 값은 蛋白質 1mg 當 nmoles로 表示하였다.

6) Glutathione(GSH) 含量 測定

GSH 含量은 Anderson의 方法²²⁾으로 測定하였다. 0.248mg/ml NADPH(143mM sodium phosphate, 6.3mM Na₄-EDTA, pH 7.5) 溶液 700 μ l, 6mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 溶液 100 μ l와 蒸溜水 198 μ l를 cuvette에 넣어 30°C에서 15分間 데운 후 試料 2 μ l를 넣고 섞은 다음 266U/ml GSSG reductase 10 μ l를 添加하여 412nm에서 吸光度의 變化를 觀察하였고 單位는 μ g/k protein으로 나타내었다.

7) 抗酸化 酵素 活性의 測定

① Catalase 活性 測定

Catalase 活性은 Aebi의 方法²³⁾에 따라 H₂O₂의 分解 정도를 spectrophotometer로 추적하여 測定하였다. 肺臟 組織을 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)에서 破碎시켜 Triton X-100을 0.02% 되게 添加한 후 40,000g에서 30分間 遠心分離하여 上澄液을 取하였으며, 2ml의 上澄液에 50mM H₂O₂ 1ml을 添加하여 反應을 시작시키고 240nm에서 30초 동안 吸光度를 測定하였다. 上澄液의 蛋白質 濃度를 Bradford²¹⁾의 方法으로 測定하여 catalase 活性은 nmole/min/mg protein으로 나타내었다.

② Superoxide dismutase(SOD) 活性 測定

Xanthine-xanthine oxidase와 superoxide에 의해 ferricytochrome c가 환원되는 反應을 SOD가 抑制시키는 원리를 이용하여 그 活性을 測定하였다.²⁴⁾ 肺臟 組織을 50mM phosphate buffer(pH 7.8) 溶液에서 破碎시켜 使用할 때까지 4°C에 보관하고 아래의 實驗은 室溫에서 行하였으며, 3ml 用量의 試驗管에 incubation 溶液(50 μ M xanthine, 0.1mM NaOH, 20 μ M cytochrome c, 0.1mM EDTA, 50mM phosphate buffer, pH 7.8)을 2.9ml 씩 넣고 試料(蒸溜水, SOD-standard 또는 tissue homogenate)를 50 μ l씩 添加

하였다. 0.1mM EDTA 溶液에 0.2U/ml xanthine oxidase를 만들어 50 μ l씩 添加하고 섞은 후 550 nm에서 吸光度를 測定하였으며, 그 單位는 nmol/min/mg protein으로 表示하였다.

③ Glutathione peroxidase 活性 測定

Glutathione peroxidase 活性 測定은 Flohe와 Gunzler의 方法²⁵⁾으로 行하였는데, 간단히 설명하면, 토끼 肺臟 組織을 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) 溶液에서 破碎시켜 使用할 때까지 4°C에 보관하였고 0.1M phosphate buffer(pH 7.0) 500 μ l, 試料 100 μ l, 2.4U/ml glutathione reductase 100 μ l, 100mM GSH 100 μ l를 semi-microcuvette에 넣어 37°C에서 10分間 preincubation하였다. 1.5mM NADPH 溶液을 100 μ l 넣어 hydroperoxide에 무관한 NADPH 消耗을 약 3分 동안 기록한다. 2mM t-BHP 100 μ l를 添加하여 340 또는 365nm에서 吸光度의 減少를 약 5分 동안 觀察하였다. 單位는 nmol/min/mg protein으로 表示하였다.

8) Superoxide radical 含量 測定

Superoxide radical 含量 測定은 Azzi 등의 方法²⁶⁾에 準해 50mM K.P. buffer(pH 7.5) 一定量에 基質인 90mM succinate, 150mM KCL, 30mM KCN, 0.3mM cytochrome c 및 mitochondria 酵素源을 添加하여 最終 反應液이 3.0ml가 되게 하였다. 이 反應液을 37°C에서 2分間 反應시키면서 550nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 superoxide radical의 含量을 算定하였다. Superoxide radical의 含量은 1mg의 蛋白質이 1分間 生成시킨 reduced cytochrome C의 量을 nmoles로 나타내었다.

9) Hydroxyl radical 含量 測定

Hydroxyl radical의 含量 測定은 Richmond 등의 方法²⁷⁾에 따라 0.1M KH₂PO₄ · KOH buffer (pH 7.4)에 2.5mM sodium salicylate, 0.3mM EDTA, 0.1mM FeSO₄, 1mM H₂O₂, 0.2mM hypoxanthine 및 xanthine oxidase를 添加시켜 25°C에서 90分間 反應시킨 다음 11.65 N HCL로

反應을 終了시키고 反應 産物을 ether로 이행, 抽出, 乾燥시킨 후 蒸溜水 1ml에 녹여 10% TCA, 10% sodium tungstate, 0.5% sodium nitrite 및 0.5 M KOH 溶液을 加해 發色시킨 후 波長 510 nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 hydroxyl radical의 含量을 算定하였다.

Hydroxyl radical의 含量은 上記 反應에서 salicylic acid로부터 hydroxyl radical에 의해 生成된 2,3-dihydroxy benzoic acid 量을 nmoles로 나타내었다.

10) 統計處理

成績은 平均值 ± 標準誤差로 나타내었으며, 平均值間의 有意性은 Student's t-test를 利用하여 檢定하였고 p<0.05일 때 有意한 것으로 判定하였다.

III. 實驗 成績

1. Oxidant로 處理된 肺 組織에서 물의 含量에 對한 效果

Oxidant를 處理한 肺 組織에서 물의 含量에 對한 胡桃 抽出液의 效果를 觀察한 結果 正常 組織에서 t-BHP 5mM를 處理했을 경우 組織內 물의 含量이 82.30±

1.77%에서 92.32±1.75%로 增加함으로서 oxidant에 依해 肺 組織의 浮腫 狀態가 誘發되었음을 보였다. 여기에 胡桃 抽出液 5%를 添加했을 때 oxidant에 依해 增加되었던 물의 含量은 83.15±1.28%로 有意한 減少를 나타내어 正常 組織에서와 같은 水準까지 回復되었다.(Fig. 1. A)

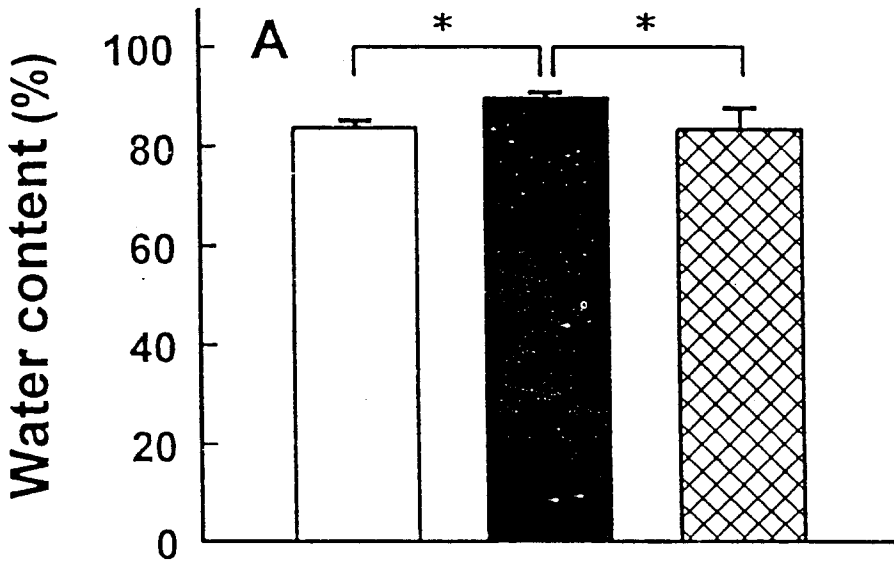


Fig. 1. A) Effect of Juglandis extraction(JS) on alterations in tissue water content induced by t-butylhydroperoxide(t-BHP) in rabbit lung slices.

Tissue water content was measured for 60 min. at 37°C in tissues treated with 5mM t-BHP in the presence or absence of 5% JS.

Data are mean±S.E. of five determinations.

*p<0.05 compared with control and the value obtained in the presence of t-BHP alone.

2. 脂質의 過酸化에 對한 效果

胡桃 抽出液이 oxidant에 依한 肺 組織 損傷을 防止하는 效果가 脂質의 過酸化를 抑制하여 나타내는 지를 確認하기 爲하여 t-BHP에 依해 發生되는 脂質의 過酸化에 對한 胡桃 抽出液 效果를 調査하였다. t-BHP를 處理하지 않은 正常 組織에서 脂質의 過酸化는 156.57 ± 7.95 pmole MDA/mg protein였으며, 5mM t-BHP를 處理했을 경우 脂質의 過酸化는 579.02 ± 77.65 pmole MDA/mg protein으로 약 3.6배 이상 顯著히 增加하였다. 여기에 5% 胡桃 抽出液을 添加한 結果 t-BHP에 依해 誘發된 脂質의 過酸化는 364.44 ± 19.04 pmole MDA/mg protein으로 有意하게 抑制되었다.(Fig. 1. B)

3. 細胞의 抗酸化 作用에 對한 效果

1) 細胞內 GSH 濃度에 對한 效果

GSH는 여러 毒性物質에 依한 細胞 損傷을 防止하는 解毒 效果를 나타낼 뿐만 아니라, 細胞內 존재하는 抗酸化劑 역할을 하고 있음은 잘 알려져 있다.^{2,24} 따라서 胡桃 抽出液이 oxidant에 依한 細胞 損傷을 防止하는 作用이 細胞內 GSH의 濃度를 變化시켜 나타나는 지를 확인하기 爲하여 2mM t-BHP를 처리한 組織에서 GSH 濃度 變化에 對한 胡桃 抽出液의 效果를 조사하였다. 그림 2에서 보는 바와 같이 2mM t-BHP를 처리한 組織에서 GSH 濃度가 유의하게 減少하였고, 5% 胡桃 抽出液이 添加되었을 때는 正常 組織이나 t-BHP를 처리한 組織에서나 GSH

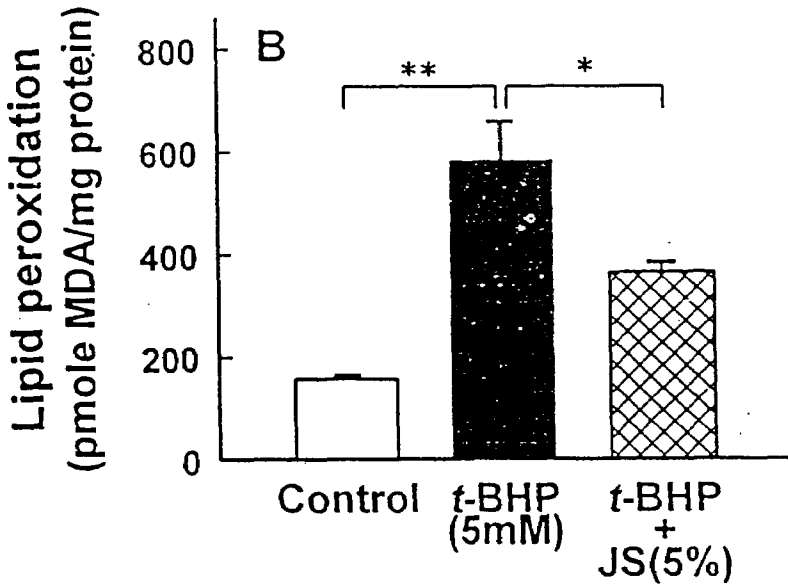


Fig. 1. B) Effect of Juglandis extraction(JS) on lipid peroxidation induced by t-BHP in rabbit lung slices

Lipid peroxidation was measured for 60 min. at 37°C in tissues treated with 5mM t-BHP in the presence or absence of 5% JS.

Data are mean \pm S.E. of five determinations.

*p<0.05 compared with the value obtained in the presence of t-BHP alone.

**p<0.01 compared with control.

濃度에는 有意한 變化가 나타나지 않았다.

2) Catalase 活性에 對한 效果

50mM H₂O₂를 처리한 組織에서 catalase 活性의 變化에 대한 胡桃 抽出液의 影響을 조사한 결과, H₂O₂를 처리했을 때 catalase의 活性은 현저하게 抑制되었으나 正常 組織에서나 H₂O₂를 처리한 組織에서 catalase의 活性은 胡桃 抽出液에 의해 影響을 받지 않았다.(Fig. 3)

3) Glutathione peroxidase 活性에 對한 效果

胡桃 抽出液의 抗酸化 效果가 glutathione peroxidase의 活性을 增加시켜 나타나는 現象인지

를 관찰하기 위하여 正常 組織과 t-BHP를 처리한 組織에서 酵素의 活性을 조사한 결과, 正常 組織에서나 2mM t-BHP를 처리한 組織에서 胡桃 抽出液이 酵素의 活性을 有意하게 增加시켰다. (Fig. 4)

4) SOD 活性에 對한 效果

superoxide를 分解하는 酵素인 SOD의 活性이 胡桃 抽出液에 의해 影響을 받는지를 조사한 결과, 이 성적에서 보는 바와 같이 胡桃 抽出液을 처리했을 경우 SOD의 活性은 有意한 變化를 보이지 않았다.(Fig. 5)

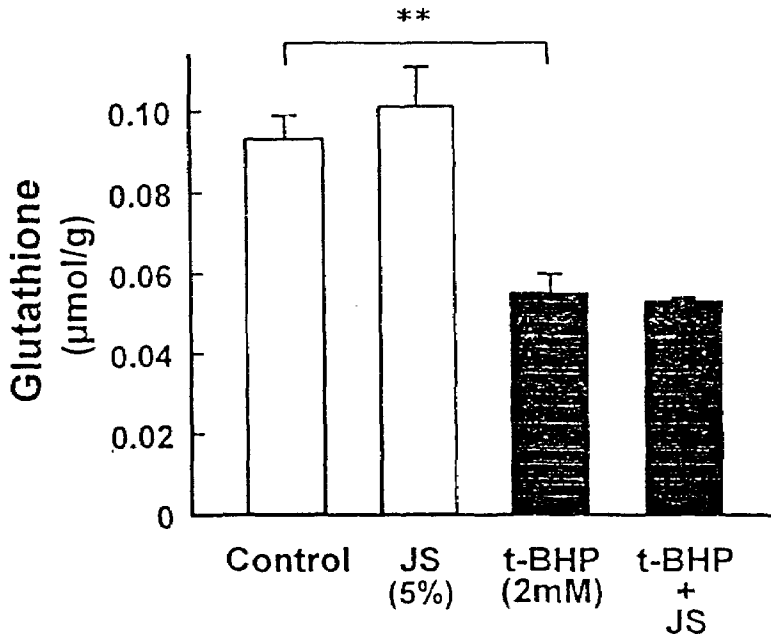


Fig. 2. Effect of Juglandis extraction(JS) on cellular glutathione content.

Glutathione content was measured in tissues treated with 2mM t-BHP for 60 min. at 37°C in the presence or absence of 5% JS.

Data are mean ± S.E. of four determinations.

**p<0.01.

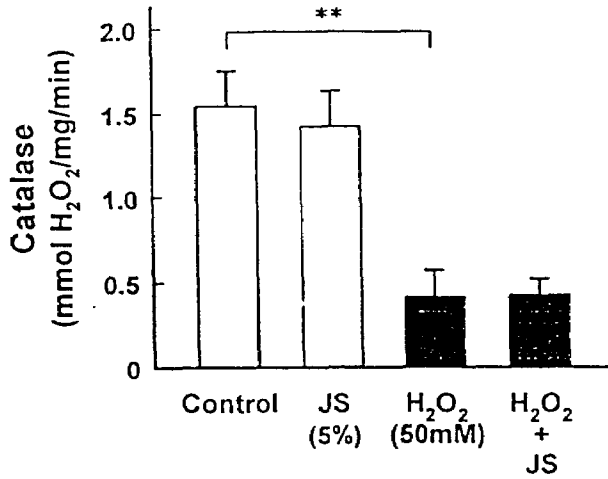


Fig. 3. Effect of Juglandis extraction(JS) on catalase activity

The enzyme activity was measured in tissues treated with 50mM H₂O₂ for 60 min. at 37°C. in the presence or absence of 5% JS.

Data are mean ± S.E. of four determinations.

**p<0.01.

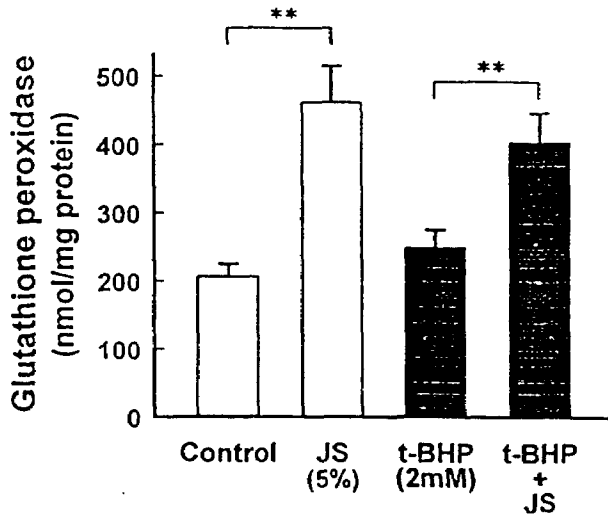


Fig. 4. Effect of Juglandis extraction(JS) on glutathione peroxidase activity

The enzyme activity was measured in tissues treated with 2mM t-BHP for 60min. at 37°C in the presence or absence of 5% JS.

Data are mean ± SE of four determinations.

**p<0.01.

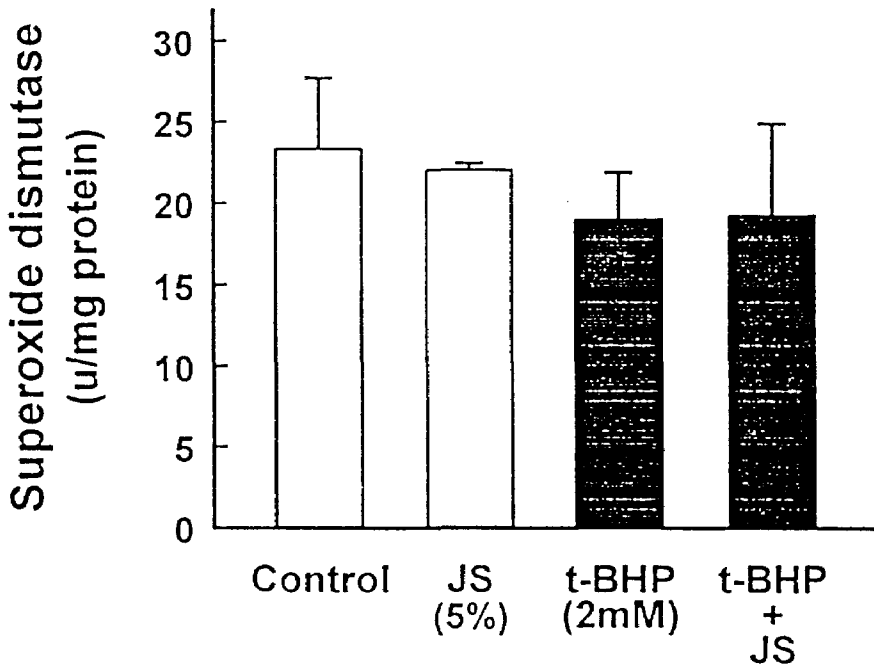


Fig. 5. Effect of Juglandis extraction(JS) on superoxide dismutase activity

The enzyme activity was measured in tissues treated with 2mM t-BHP for 60min. at 37°C in the presence or absence of 5% JS.

Data are mean ± SE of four determinations.

4. 酸素遊離基에 對한 消去 效果

1) 試驗管内에서 superoxide radical의 生成에 미치는 影響

試驗管内에서 一時的으로 superoxide radical의 含量을 增加시키는 조건에서 胡桃 抽出液의 影響을 살펴보기 위하여 胡桃 抽出液의 濃度를 增加시키면서 superoxide radical의 生成을 관찰하였으며, 胡桃 抽出液의 濃度를 0.5% 지 變化시켜 관찰한 결과, 濃度 依存的으로 superoxide radical의 生成이 減少되어 添加 濃度가 0.25% 일때 superoxide radical의 含量이 10.54 ± 0.66 nmoles/mg protein/hr에서 5.44 ± 0.38 nmoles/mg protein/hr로 약 50%의 減少를 나타내어 su-

peroxide radical의 生成을 有意하게 抑制시켰다. (Fig. 6)

2) 試驗管内에서 hydroxyl radical의 生成에 미치는 影響

試驗管内에서 hydroxyl radical의 生成에 미치는 影響을 알아보기 위하여 胡桃 抽出液의 添加 濃度를 增加시키면서 hydroxyl radical의 生成을 觀察한 결과, 添加 濃度에 比例하여 hydroxyl radical의 生成이 減少되었으며 0.5% 濃度의 胡桃 抽出液에서 hydroxyl radical 含量이 30.27 ± 2.77 nmoles/mg protein/hr에서 10.29 ± 1.72 nmoles/mg protein/hr로 약 67%의 減少를 나타내어 顯著하게 抑制되었다.(Fig. 7)

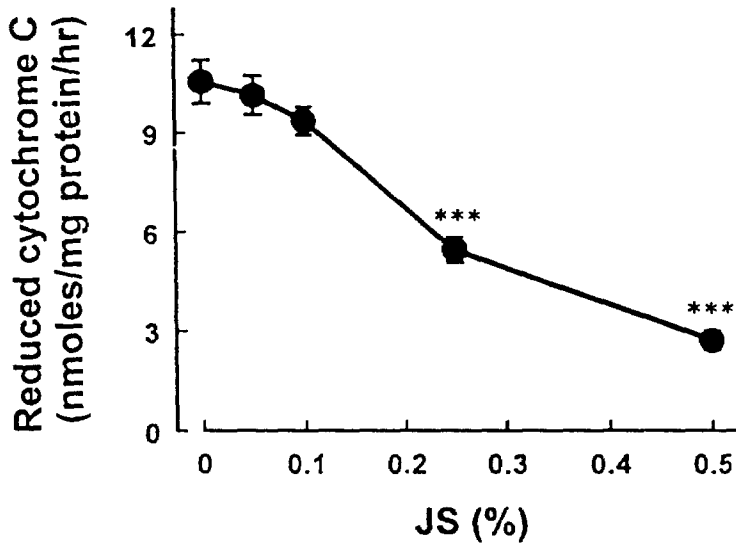


Fig. 6. Effect of Juglandis extraction(JS) on the level of superoxide radical in vitro
The assay procedure was described in the experimental methods.
Data are mean \pm S.E. of three determinations.
*** $p < 0.001$.

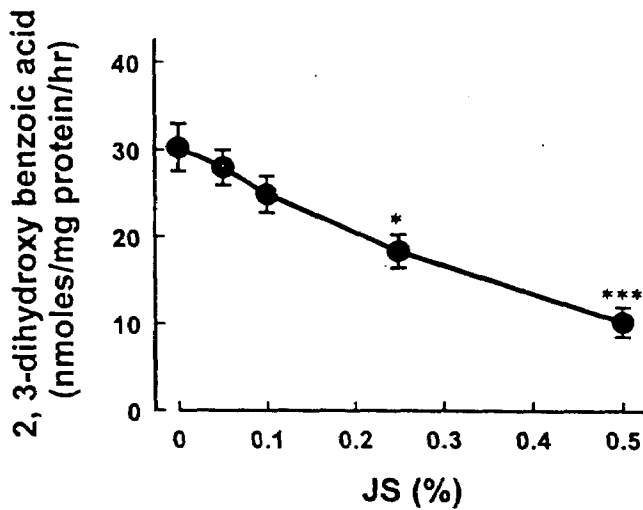


Fig. 7. Effect of Juglandis extraction(JS) on the level of hydroxyl radical in vitro
The assay procedure was described in the experimental methods.
Data are mean \pm S.E. of three determinations.
* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

IV. 考 察

酸素遊離基들(oxygen free radicals)은 老化 및 癌 誘發에 關係할 뿐만 아니라¹²⁾, 癱疾, 痴呆, parkinson 病과 같은 中樞神經性 疾病, 心筋梗塞 等の 心臟疾患, rheumatism 및 關節炎 等 여러 疾病에서 重要한 病因으로 認定되고 있다.^{13,45)}

酸素遊離基들은 分子 狀態의 酸素가 生體內 酸化還元 反應의 電子受容體로 利用되므로서 持續的으로 還元되어 가는 中에 生成되는 不完全한 酸素의 還元 形態로 superoxide anion(O₂⁻), hydroxyl radical(OH) 및 hydrogen peroxide (H₂O₂) 等³⁰⁾이 있다. 이들은 매우 不安定한 狀態로 存在하므로 生體內的 다른 組織 細胞들과 쉽게 反應을 하여 組織 細胞의 損傷을 招來하는 것으로 알려져 있다.³¹⁾ 酸素遊離基들에 依한 細胞 損傷 作用은 組織 損傷으로 이어지고 窮極的으로 是疾病이나 老化反應을 促進하는 生化學的 反應으로 報告³²⁾되어지고 있다.

東洋醫學에서 이와 관련된 研究는 老化의 重要原因인 腎虛를 中心으로 이루어지고 있다.^{33,34,35,36)} 그 가운데 腎陽虛는 陽氣가 虛損하여 機能이 減退 또는 衰弱하고 機體反應性이 低下하며 代謝活動이 減退하고 熱量이 不足하게 되는 陽氣 衰弱의 代表적인 病理狀態³⁷⁾로서, 呼吸機能에 영향이 미치면 腎의 納氣 機能 失調나 腎陽의 升清降濁 機能의 喪失로 말미암아 水液이 머물러 肺를 上迫함으로써 咳嗽, 呼吸困難 等이 생길 수 있다.^{19,38,39)} 따라서 臨床에서 腎陽을 補하는 藥物 들은 滋養強壯, 生長發育의 促進, 人體의 抵抗力 增進 等の 效能을 나타낼 뿐만 아니라 肺腎兩 虛로 인한 氣喘 等에도 使用된다.^{18,19,39)} 韓藥物의 抗酸化 作用에 對한 研究로는 人蔘에 관하여 한 等⁴⁰⁾이 抗酸化 活性이 강한 韓藥材라고 하였고, 김 等^{16,41)}은 脂質過酸化를 유도하는 活性 酸素의 生成을 억제시키는 酵素인 catalase, glutathione peroxidase 및 除去하는 機能을 가진 SOD의 活性 增加에 유의한 效果가 있는 것으로 報告 하였다. 補陽藥物 中에서는 肉苻蓉, 補骨脂, 菟 絲子, 巴戟天 等이 白鼠의 腦組織에서 細胞膜

脂質의 過酸化를 유의하게 抑制하였다는 實驗 報告¹⁰⁾가 있으며, 抗酸化 酵素의 活性 增加에 미치는 藥物의 實驗 研究로는 曾 等^{35,42,43)}이 枸杞子, 山茱萸, 肉桂 等の 藥物에 依한 SOD의 活性 增加를 報告하였고, 李¹⁰⁾는 熟地黃, 山藥, 牛膝 等이 SOD 및 glutathione peroxidase의 活性을 增加시킨다고 하였다.

胡桃는 補陽藥으로 性味가 甘, 溫하고 通命門, 利三焦, 補腎強腰膝, 溫補下焦, 潤肺腎, 納氣定喘 潤腸 等の 效能으로 腎虛腰痛, 陽痿, 腎虛咳嗽, 肺腎不足으로 인한 氣喘, 老弱人의 腸燥便秘 等 에 應用^{17,18,19,44,45,46)} 되는데 특히 虛寒咳嗽가 오래 도록 낫지 않은 者를 治愈하며 抗衰老, 滋養強 壯劑로서 緩和 收斂의 效가 있으므로 身體虛弱, 虛咳虛喘 等に 適用하여 效果가 있다고 하였다.¹⁶⁾ 따라서 久患肺喘 氣喘과 肺腎不足으로 인한 喘急 胸滿 및 硅肺症 等으로 長期間의 肺組織 損傷時 惹起되는 呼吸機能의 減退 및 全身衰弱症狀, 老年慢性呼吸器 疾患 等を 治療하는 杏仁煎, 安喘 至聖丹, 人蔘胡桃湯⁴⁷⁾, 五果茶⁴⁸⁾와 止咳丸⁴⁹⁾ 等の 處方に 重要 構成藥物로 들어 있다.

이에 著者는 胡桃가 肺 組織內에서 抗酸化 機轉에 일정한 效果가 있을 것으로 보고 實驗 動物의 肺 組織을 有害酸素基들에 依한 細胞 損傷機轉을 研究하는 데 자주 利用되고 있는 oxidant인⁴⁹⁾ t-butylhydroperoxide(t-BHP)와 H₂O₂로 處理한 後 胡桃 抽出液을 添加하는 方法으로 胡桃 抽出液의 抗酸化 效果 및 抗酸化 酵素의 活性에 미치는 影響을 調査하였으며, 직접적인 酸素遊離基의 含量 變化에 미치는 影響을 알아 보기 위하여 酸素遊離基의 含量을 增加시키는 조건에 胡桃 抽出液을 添加하여 實驗을 하였다.

本 實驗에서 肺 組織에 oxidant인 t-BHP를 5 mM 濃度로 處理한 結果, 組織內 물의 含量이 增加함으로써 肺浮腫이 誘發되었음을 알 수가 있었고, 이러한 肺浮腫 發生은 5% 胡桃 抽出液이 存在할 時 有意하게 減少함을 觀察할 수 있었다. 따라서 胡桃 抽出液이 oxidant에 依한 肺 組織 細胞의 損傷을 防止할 수 있음을 보여주었다. Oxidant들이 細胞 損傷을 일으키는 機轉 中의

하나는 脂質의 過酸化인데^{49,50} 胡桃 抽出液이 oxidant에 의한 肺浮腫 發生을 防止하는 效果가 細胞膜에서 脂質의 過酸化를 抑制하여 나타나는 作用인지를 確認하기 爲하여 5mM 濃度の t-BHP를 처리하여 觀察한 結果, 脂質의 過酸化가 顯著히 增加함으로써 t-BHP가 脂質의 過酸化를 통해 肺浮腫을 誘發시키고 있음을 알 수 있었다. 이러한 t-BHP에 의한 脂質의 過酸化를 胡桃 抽出液이 強力하게 抑制시킴으로써 胡桃 抽出液이 肺浮腫을 防止하는 效果가 脂質의 過酸化를 막음으로써 나타날 可能性을 보였다.

이와같은 胡桃에 의한 脂質의 過酸化反應 抑制 效果의 機轉을 알아보기 爲하여 細胞內 內在性으로 존재하는 酸化 防禦機轉인 抗酸化 酵素의 活性에 미치는 胡桃 抽出液의 影響을 觀察한 結果, 細胞內에서 抗酸化劑 역할을 하는 것으로 알려진 glutathione의 活性에 有意한 變化가 나타나지 않았으며, H_2O_2 를 分解하는 酵素인 catalase⁵¹ 및 superoxide를 分解하는 酵素인 SOD⁵¹의 活性에도 有意한 變化가 나타나지 않았다. 그러나 H_2O_2 뿐만 아니라 t-BHP와 같은 organic peroxide를 分解시키는 生體內的 또 다른 抗酸化 酵素 中의 하나인 glutathione peroxidase⁵¹의 活性은 正常 組織에서나 2mM t-BHP를 처리한 組織에서 모두 胡桃 抽出液에 의하여 有意하게 增大되었다. 이 實驗에서 t-BHP를 처리했을 때 glutathione peroxidase의 活性의 減少가 나타나지 않은 점에 대해서는 알 수가 없으나 oxidant를 처리한 상태에서 抗酸化 酵素의 活性이 오히려 增加한다는 研究結果들이 보고된 바 있다.⁵²

한편 試驗管內에서 胡桃의 酸素遊離基들에 대한 직접적인 消去 效果를 調查한 結果, 胡桃 抽出液은 濃도에 依存的으로 superoxide radical의 生成을 抑制하였으며, 活性 酸素 中 가장 強力한 活性을 지니고 있는 것으로 알려진 hydroxyl radical의 生成을 현저하게 減少시키는 것으로 나타났다. 따라서 胡桃 抽出液이 細胞 組織內에 發生하는 酸素遊離基들을 직접 消去함으로써 組織 損傷을 防止할 수 있음을 보였다.

以上の 結果를 綜合하면 胡桃 抽出液이 肺 組織에서 脂質의 過酸化 反應을 抑制하여 oxidant에 의한 肺浮腫을 防止함으로써 天然產 抗酸化劑로의 活用に 使用될 수 있을 可能性을 提示하고 있으며 이러한 胡桃 抽出液의 抗酸化 效果가 부분적으로 內在性 抗酸化 酵素의 活性增加와 酸素遊離基들에 대한 직접적인 消去 作用에 起因하는 것으로 나타났으나 抗酸化 酵素의 活性의 增加가 酵素 蛋白質의 合成 增加로 인해 나타났는 지 또는 酵素 活性 자체를 增加시켰는 지는 알 수가 없었으며 이에 대한 研究가 필요할 것으로 思料된다.

V. 結 論

胡桃 抽出液이 肺에서 酸素遊離基들에 依한 細胞 損傷을 防止할 수 있는 지를 알아보기 爲하여 酸化劑인 t-butylhydroperoxide(t-BHP)와 H_2O_2 로 유발시킨 細胞 損傷에서 胡桃 抽出液의 抗酸化 效果 및 抗酸化 酵素의 活性에 미치는 影響과 酸素遊離基에 對한 직접 消去 效果를 調查하였다.

1. t-BHP를 處理한 肺 組織에서 물의 含量이 增加하였으며, 이러한 增加는 5% 胡桃 抽出液에 依해 有意하게 減少되었으며, 또한 脂質의 過酸化도 有意하게 抑制 하였다.

2. 胡桃 抽出液은 細胞內 glutathione의 濃度에는 變化를 유발하지 못하였다.

3. 胡桃 抽出液은 抗酸化 酵素 中 catalase 및 superoxide dismutase의 活性에는 變化를 유발하지 못하였다.

4. 正常 組織에서나 2mM t-BHP를 처리한 組織에서 모두 胡桃 抽出液이 glutathione peroxidase의 活性을 有意하게 增加시켰다.

5. 胡桃 抽出液은 濃도에 比例하여 superoxide radical과 hydroxyl radical의 生成을 減少시켰다.

以上の 結果를 綜合하면, 胡桃 抽出液이 肺 組織에서 酸化劑에 依한 浮腫 誘發을 防止하고

脂質의 過酸化를 抑制하는 效果는 부분적으로 細胞內 抗酸化 酵素의 活性 增加와 酸素遊離基들을 직접 消去시키는 作用에 起因하는 것으로 보인다.

VI. 參 考 文 獻

- 1) Floyd RA. : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FA-SEB J*, 4 : 2587-2597, 1990.
- 2) Reiter RJ. : Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*, 9 : 526-533, 1995.
- 3) Halliwell B. : Oxidants and the central nervous system : some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurol Scand*, 126 : 23-33, 1989.
- 4) Halliwell B., Gutteridge JMC. and Cross CE. : Free radicals, antioxidants, and human disease : Where are we now? *J Lab Clin Med*, 119 : 598-620, 1992.
- 5) Jaeschke H. : Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med*, 209 : 104-111, 1995.
- 6) Fisher AB., Dodia C., Ran Z., Ayene I. and Exkenhoff RG. : Oxygen-dependent lipid peroxidation during lung ischemia. *J Clin Invest*, 88 : 674-679, 1991.
- 7) Fisher PW., Huang Y-C T., Kennedy TP. and Piantadosi CA. : PO_2 -dependent hydroxyl radical production during ischemia-reperfusion lung injury. *Am J Physiol*, 265 : L279-L285, 1993.
- 8) Stevens WH., Conlon PD. and O'Byrne PM. : Ozone-induced oxygen radical release from bronchoalveolar lavage cells and airway hyper-responsiveness in dogs. *J Physiol*, 486 : 257-265, 1995.
- 9) Van del Vliet A., O'Neill CA., Eiserich JP. and Cross CE. : Oxidative damage to extracellular fluids by ozone and possible protective effects of thiols. *Arch Biochem Biophys*, 321 : 43-50, 1995.
- 10) Watkinson WP., Wiester MJ. and Highfill JW. : Ozone toxicity in the rat. I. Effect of changes in ambient temperature on extrapulmonary physiological parameters. *J Appl Physiol*, 78 : 1108-1120, 1995.
- 11) Freeman BA. and Crapo JD. : Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47 : 412-426, 1982.
- 12) Halliwell B. : Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*, 49 : 1341-1348, 1995.
- 13) 舒守琴 外 : 27種中藥及SOD對體外大白鼠腦均漿過氧化脂質生成的影響, *山東中醫學院學報*, 15(3) : 70-72, 1991.
- 14) 李獻平 外 : 四大懷藥延緩衰老作用的研究, *中西醫結合雜誌*, 11(8) : 486-487, 1991.
- 15) 蔣 莹 外 : 六味地黃湯及其配伍對過氧化脂質及脂褐質含量的影響, *中國中藥雜誌*, 16(3) : 175-176, 1991.
- 16) 김동조 外 : 감마선 조사 전 홍삼추출물 투여가 생쥐 신장에서 항산화 효소활성과 지질과산화 수준에 미치는 영향, *高麗人蔘學會誌*, 18(1) : 25-31, 1994.
- 17) 辛民教 : 原色臨床本草學, 永林社, pp. 194-195, 1991.
- 18) 李尚仁 : 本草學, 修書院, pp.92-93, 1981.
- 19) 全國韓醫科大學本草學教授編 : 本草學, 永林社, p.544, 1991.
- 20) Uchiyama M. and Mihara M. : Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 86 : 271-278, 1978.
- 21) Bradford MM. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram qua-

- ntities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72 : 248-524, 1976.
- 22) Anderson ME. : Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*, 113 : 548-554 1985.
- 23) Aebi H. : Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105 : 121-126, 1984.
- 24) Flohe L. and Otting F. : Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*, 105 : 93-104, 1984.
- 25) Flohe L. and Gunzler WA. : Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 105 : 114-121, 1984.
- 26) Azzi A., Montecucco C. and Richter C. : The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 65 : 597-603, 1975.
- 27) Richmond R., Halliwell B., Chauhan J. and Darbre A. : Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals : Detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal Biochem*, 118 : 328-335, 1981.
- 28) Meister A. and Anderson ME. : Glutathione. *Annu Rev Biochem*, 52 : 711-760, 1983.
- 29) Starke PE. and Farber JL. : Endogenous defence against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 260 : 86-92, 1985.
- 30) Batteli N. G., Lorenzoni E. and Stirpe F. : Milk xanthine oxidase type D(dehydrogenase) and type O(oxidase) : Purification and interconversion and some properties. *Biochem J*, 131 : 191-198, 1973.
- 31) Cutler RG. : Antioxidants, aging and longevity. *Free Radicals in Biology*, Academic Press, Vol. 6, pp 371-424, 1984.
- 32) Pryor WA. : Free radical in biology : Involvement of radical reaction in aging and carcinogenesis in medicinal chemistry. Elsevier, Amsterdam, pp.331-361, 1977.
- 33) 梁曉春 外 : 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.
- 34) 王學美 外 : 五子衍宗液延緩衰老的臨床觀察, *中國中西醫結合雜誌*, 12(1) : 23-25, 1992.
- 35) 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.
- 36) 陳晏珍 外 : 腎虛與超氧化物歧化 關係初探, *中醫雜誌*, 30(4) : 42, 1989.
- 37) 文濬典 外 : 東醫病理學, 高文社, p.125, 1990.
- 38) 桑樹榮 外 : 補腎長壽奇方妙述, 黑龍江科學技術出版社, pp.15-16, 1993.
- 39) 杜鎬京 : 東醫腎系內科學, 東洋醫學研究院, p.73, 1987.
- 40) 한병훈 外 : 인삼의 항산화활성과 성인병 예방효과, *高麗人蔘學會誌*, 16(2) : 169, 1992.
- 41) 이동욱 外 : 인삼의 항산화 작용, *高麗人蔘學會誌*, 19(1) : 31-38, 1995.
- 42) 曾一飛 外 : 補腎抗衰口服液抗自由基損傷的實驗研究, *四川中醫*, 10 : 12-14, 1992.
- 43) 李 爲 外 : 口服枸杞子對老年人血中超氧化物歧化酶, 血紅蛋白和過氧化脂質含量的動態觀察, *中草藥*, 22(6) : 251, 1991.
- 44) 上海中醫學院編 : 中藥臨床手冊, 上海人民出版社, pp.386-387, 1977.
- 45) 蕭培根 外 : 中國本草圖錄 卷一, 人民衛生出版社 商務印書館有限公司, p.24, 1989.
- 46) 中國藥物大全編委會 : 中國藥物大全, 人民衛生出版社, p.341, 1991.
- 47) 顧保君 : 呼吸系病實用方, 江蘇科學技術出版社, pp.170-171, 338-347, 1993.
- 48) 黃度淵 : 方藥合編, 杏林出版, pp.147-148, 1986.

- 49) Farber JL., Kyle ME. and Coleman JB. :
Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Lab Invest, 62 : 670-679, 1990.
- 50) Sies H. : Biochemistry of oxidant stress. Angew Chem Int Ed, 25 : 1058-1071, 1986.
- 51) Ross D. and Moldeus P. : Antioxidant defence systems and oxidative stress. In : Membrane Lipid Peroxidation, ed. by Vigo-Pelfrey C., CRC Press, Boston, Vol II, pp. 151-170, 1993.
- 52) Nilanjana Maulik DU., Moraru II, Kreutzer DL. and Das DK. : Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress. Am J Physiol, 264 : C715-C722, 1993.

=Abstract=

The beneficial effect of Juglandis Semen extraction on oxidant-induced lung cell injury

Woo-Heon Lee · Woon-Gyo Seo · Ji-Cheon Jeong

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

This study was undertaken to determine whether Juglandis Semen extraction(JS) has a protective effect against the lung cell injury caused by oxidants, t-butylhydroperoxide(t-BHP) and H₂O₂ in rabbit lung slices.

JS significantly prevented an increase in water content induced by t-BHP. Similarly, JS significantly prevented the lipid peroxidation induced by t-BHP. Cellular concentration of glutathione, and the activities of catalase and superoxide dismutase were significantly not altered by 5% JS. However, JS at 5% concentration significantly increased the glutathione peroxidase activity in oxidant-treated and control tissues. JS decreased directly the production of superoxide or hydroxyl radical.

These results indicate that JS prevents the cell injury and lipid peroxidation induced by oxidants in the lung. Such an antioxidant effect is attributed to enhancement of major endogenous antioxidant defence systems such as glutathione peroxidase and direct inhibition of oxygen free radical production.

Key Word : Juglandis Semen, water content, lipid peroxidation, glutathione, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, oxygen free radical.