

H₂O₂에 의한 腎臟 세포 손상에 대한 丹參 추출물의 방지 효과

金尙範·鄭智天*

ABSTRACT

Protective effect of *Salviae-radix* extraction in H₂O₂ induced renal cell injury

Sang-beum Kim, Ji-cheon Jeong

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Dong-guk University

This study was undertaken to determine whether *Salviae-radix* (SVR) extraction prevents the oxidant-induced cell injury and thereby exerts protective effect against oxidant-induced inhibition of tetraethylammonium uptake (TEA) in renal cortical slices. SVR (5%) attenuated H₂O₂-induced inhibition of TEA uptake. H₂O₂ increased LDH release and lipid peroxidation in a dose-dependent manner. These changes were prevented by SVR extraction. The protective effect of SVR on LDH release was dose-dependent over the concentration range of 0.1-0.5%, and that on lipid peroxidation over the concentration ranges of 0.05-2%. SVR significantly prevented Hg-induced lipid peroxidation. SVR extraction (0.5%) increased cellular GSH content in normal and H₂O₂-treated tissues. When slices were treated with 100 mM H₂O₂, catalase activity was decreased, which was prevented by 0.5% SVR extraction. The activity of glutathione peroxidase but not superoxide dismutase was significantly increased by 0.5% SVR extraction in H₂O₂-treated tissues.

These results suggest that SVR has an antioxidant action and thereby exerts beneficial effect against oxidant-induced impairment of membrane transport function. This effect of SVR is attribu-

* 東國大學校 韓醫科大學 內科學教室

ted to an increase in endogenous antioxidants such as GSH, catalase and glutathione peroxidase.

Key Words : *Salviae-radix*, H₂O₂, catalase, glutathione peroxidase, glutathione

I. 서 론

腎臟은 세노관세포를 통해 유기 및 무기물질을 재흡수 또는 분비함으로써 체내 모든 세포의 항상성을 유지시키는 결정적 역할을 하고 있기 때문에 腎臟의 기능에 이상이 발생하게 되면 체내 모든 기관 및 세포 기능에 직접 또는 간접으로 영향을 미치게 되고 심하면 치명적인 결과를 초래하게 된다. 급성 신부전은 허혈에 의해 유발되거나 독성물질에 의해 유발되는데, 이들 모두 산소유리기가 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁴⁾

따라서 산소유리기를 제거하거나 이들의 발생을 억제하는 약물을 사용하면 급성 신부전을 방지할 수 있음이 보고되고 있다.^{4,5)} 현재까지 급성 신부전을 방지하기 위한 여러 방법들이 많이 시도되었고, 독성물질에 의한 신부전을 방지할 수 있는 약물의 개발이 관심의 대상으로 되었다.⁶⁾ 특히, 자연에서 얻을 수 있는 약물을 이용함으로써 치료 약물 자체로 인한 어떤 부작용 없이 급성 신부전을 방지할 수 있는 방법이 절실히 요구되고 있다.

한의학에서 급성 신부전은 關格, 癰閉, 浮腫, 蓄血, 中毒, 虛損 등의 범주에 속하는 것으로 치료에는 利水, 解毒, 淸熱, 通泄, 健脾, 補腎 및 活血化瘀法 등이 활용되고 있다.⁷⁻¹⁰⁾

丹參은 活血化瘀 약물로서 破宿血, 生新血, 通利血脈, 除煩熱, 排膿生肌, 養神定志 등의 효능이 있으며,¹¹⁻¹⁴⁾ 관상동맥 질환, 고혈압, 뇌혈관 질환¹⁴⁾ 및 급만성 신부전의 치료에 활용되고 있다.^{7,8,15-18)} 실험적 연구에 의하면 산소유리기를 소거시키는 작용이 있으며,¹⁹⁾ 老衰한 小鼠의 적혈

구, 심장, 간장 및 腎臟의 SOD 활성을 증가시키는 효과가 있다²⁰⁾고 보고한 바 있다.

이전 실험에서 본 연구자들은 신장 세노관에서 丹參 추출물이 반응성산소기에 의한 물질이동계의 장애를 강력하게 방지하고 있음을 확인하였다.²¹⁾ 따라서 본 연구에서는 丹參 추출물이 어떤 기전으로 물질이동계의 장애를 방지하는지를 밝히기 위하여 oxidant에 의한 세포 손상과 지질의 과산화에 대한 丹參의 효과와 세포내 항산화작용을 가진 물질이나 효소의 활성 변화를 중점적으로 조사하고자 하였다.

II. 실험

1. 재료

1) 동물

체중 1.5-2kg 되는 New Zealand 백색 성토를 구입하여 암수 구별 없이 사용하였다.

2) 약제

丹參(*Salviae-radix*)을 시중에서 구입하여 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 丹參 추출물의 제조

丹參 150g을 1,000ml round flask에 넣고 증류수 500ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간 동안 가열 전탕하고 2회 흡인 여과한 여액을 rotary vacuum evaporator에 넣어 감압 농축시켜 엑기스 분말을 얻어 본 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 신피질 절편의 제작

토끼를 희생시킨 후 腎臟을 들어내어 냉한 saline으로 신동맥내 주입하여 혈액을 제거한 다음 Stadie-Riggs microtome으로 약 0.3 - 0.5 mm 두께의 신피질 절편을 만들어 사용하였다.

3) Oxidant의 처리

신피질 절편 약 50 mg을 4 ml의 incubation 용액이 들어 있는 비커 속에 넣고 Dubnoff metabolic shaker 내에서 100% 산소를 계속 공급하면서 37°C에서 incubation하였다. 기본 incubation 용액의 조성은 130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 되어 있으며, H₂O₂를 처리할 때는 이들 oxidant가 들어 있는 용액내에서 60분 동안 incubation하였다.

4) 신피질 절편에서 TEA 이동 실험

신피질 절편에서 TEA 이동은 10 μM의 ¹⁴C-TEA를 포함하고 있는 용액 4 ml가 들어 있는 용기내에 약 50 mg 되는 신피질 절편을 넣고 100% O₂를 공급하면서 25°C에서 incubation하였다. Incubation 후 신피질 절편을 들어내어 물기를 닦고 무게를 측정한다 다음 1 N NaOH에 녹였다. 이들 용해된 액과 incubation 용액을 적당한 양을 취하여 방사선 동위원소의 양을 scintillation counter로 측정하여 세포내 축적된 ¹⁴C-TEA의 양을 S/M (Slice/Medium) ratio 즉, 용액내의 농도에 대한 조직내 축적된 양의 비로 나타내었다.

5) 세포 손상 측정

신피질 절편에서 세포 손상 정도를 확인하기 위하여는 lactate dehydrogenase (LDH) 유리를 측정하여 판정하였는데, 적당한 조건에서 incubation한 세포들을 용액으로부터 분리한 후 세포를 마쇄시켜 incubation 용액과 마쇄된 조직액

각각 50 μl를 취하여 LDH 활성을 LDH assay kit (Sigma Chemical)를 이용하여 측정하였다.

6) Lipid peroxidation 측정

세포막 지질의 과산화 정도는 그 산물인 malondialdehyde (MDA) 양을 Uchiyama와 Mihara 방법²²⁾으로 측정하여 평가하였다. 간단히 설명하면, 腎臟 조직을 차가운 1.15% KCl 용액 (5% wt/vol) 속에서 파쇄하였다. 이 조직파쇄 균질액 0.5 ml에 1% 인산 용액 3 ml와 0.6% thiobarbituric acid 용액 1 ml를 첨가하여 끓는 물에서 45분간 가열하였다. n-Butanol 4 ml를 첨가하여 완전히 섞은 다음 2,000×g에서 20분간 원심분리한 후, 상층액의 흡광도를 536과 520 nm에서 측정하였다. MDA 값은 단백질 1 mg 당 nmoles로 표시하였다. 단백질 농도는 Bradford의 방법²³⁾으로 측정하였다.

7) Glutathione (GSH) 함량 측정

Glutathione (GSH) 함량은 Anderson의 방법²⁴⁾으로 측정하였다. 0.248 mg/ml NADPH (143 mM sodium phosphate, 6.3 mM Na₄-EDTA, pH 7.5를 함유하고 있는) 용액 700 μl, 6 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 용액 100 μl와 증류수 198 μl를 cuvette에 넣어 30°C에서 15분간 데운후 시료 2μl를 넣고 섞은 다음 266 U/ml GSSG reductase 10 μl를 첨가하여 412 nm에서 흡광도의 변화를 관찰하였고 단위는 μg/mg protein으로 나타내었다.

8) Catalase 활성 측정

Catalase 활성은 Aebi의 방법²⁵⁾에 따라 H₂O₂의 분해 정도를 spectrophotometer로 추적하여 측정하였다. 腎臟 절편을 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에서 파쇄시켜 Triton X-100을 0.02% 되게 첨가한 후 40,000×g 에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였으며, 2 ml의 상층액에 30 mM H₂O₂ 1 ml를 첨가하여 반응

을 시작시키고 240 nm에서 30초 동안 흡광도를 측정하였다. 상층액의 단백질 농도를 측정하여 catalase 활성은 nmole/min/mg protein으로 나타내었다.

9) Glutathione peroxidase 활성 측정

Glutathione peroxidase 활성 측정은 Flohe와 Gunzler의 방법²⁶⁾으로 행하였는데, 간단히 설명하면, 토끼 신질편을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 용액에서 파쇄시켜 사용할 때까지 4°C에 보관하였고 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 500 μ l, 시료 100 μ l, 2.4 U/ml glutathione reductase 100 μ l, 100 mM GSH 100 μ l를 semi-microcuvette에 넣어 37°C에서 10분간 preincubation하였다. 1.5 mM NADPH 용액을 100 μ l 넣어 hydroperoxide에 무관한 NADPH 소모를 약 3분 동안 기록한다. 1.5 mM H_2O_2 100 μ l를 첨가하여 340 또는 365 nm에서 흡광도의 감소를 약 5분 동안 관찰하였다. 단위는 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

10) Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

Xanthine-xanthine oxidase와 superoxide에 의해 ferricytochrome c가 환원되는 반응을 superoxide dismutase (SOD)가 억제시키는 원리를 이용하여 그 활성을 측정하였다.²⁷⁾ 신질편을 50 mM phosphate buffer (pH 7.8) 용액에서 파쇄시켜 사용할 때까지 4°C에 보관하며 아래의 실험은 실온에서 행하였으며, 3 ml 용량의 시험관에 incubation 용액 (50 μ M xanthine, 0.1 mM NaOH, 20 μ M cytochrome c, 0.1 mM EDTA, 50 mM phosphate buffer, pH 7.8)을 2.9 ml 씩 넣고 시료 (증류수, SOD-standard 또는 tissue homogenate)를 50 μ l 씩 첨가하였다. 0.1 mM EDTA 용액에 0.2 U/ml xanthine oxidase를 만들어 50 μ l 씩 첨가하고 섞은 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 단위는 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

11) 자료 정리 및 통계 처리

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

III. 성 적

1. H_2O_2 에 의한 TEA 이동 장애에 대한 *丹參*의 효과

그림 1은 신피질 절편에서 TEA uptake에 대한 H_2O_2 의 영향을 조사한 결과이다. TEA uptake의 S/M 비는 정상 조직에서 18.45 ± 3.21 로 나타났는데, H_2O_2 를 50 mM 농도로 첨가하였을 때 6.29 ± 2.16 으로 유의하게 억제되었다. H_2O_2 를 처리하는 용액내에 *丹參* 추출물 0.5%를 동시에 첨가했을 때, TEA uptake의 S/M비는 15.47 ± 3.09 로 거의 정상 수준까지 회복되었다. 이러한 결과는 *丹參* 추출물이 근위세뇨관에서 oxidant에 의한 물질이동계의 장애를 유의하게 방지하고 있음을 보여주는 것으로 본 연구자의 이전 연구 결과와 동일하였다.

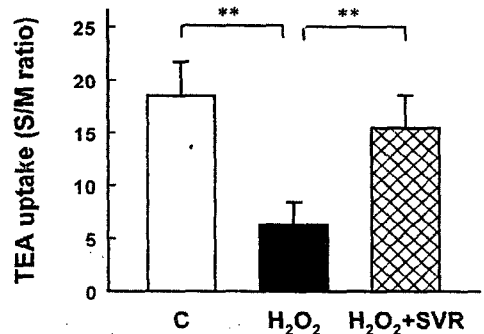


Fig. 1. Effect of *Salviae-radix* (SVR) extraction on H_2O_2 - induced inhibition of TEA uptake in renal cortical slices. Slices were treated with 50 mM H_2O_2 at 25°C for 60 min in the presence and absence of 0.5% SVR. Data are mean \pm SE of three experiments. * $p < 0.05$.

2. H₂O₂의 농도에 따른 세포 손상과 지질의 과산화의 변화

腎臟 조직에서 H₂O₂ 농도 변화에 따른 LDH 유출의 정도를 조사하였다. H₂O₂를 여러 농도로 변화시켜 관찰한 결과 H₂O₂가 들어 있지 않을 때 LDH 유출이 4.13±0.53%이던 것이 H₂O₂를 10, 20, 50 및 100 mM로 증가시킨 결과 각각 7.62±1.45, 10.24±2.43, 13.52±2.95 및 15.67±3.63%으로 H₂O₂ 농도가 증가함에 따라 LDH 유출도 비례하여 증가하였다. (그림 2)

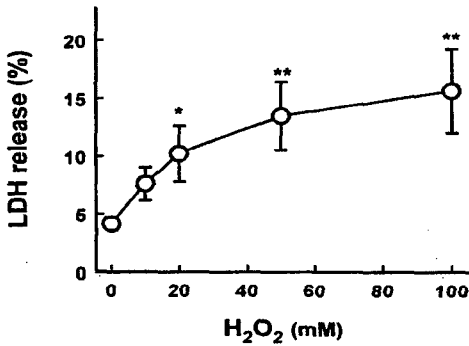


Fig. 2. Dose dependency of H₂O₂ on lactate dehydrogenase (LDH) release in renal cortical slices. Slices were treated with various concentrations (10-100 mM) H₂O₂ at 37°C for 60 min. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05, **p<0.01 compared with the absence of H₂O₂.

H₂O₂에 의한 LDH 유출의 변화 정도가 지질의 과산화의 증가와 일치하는 지를 조사하여 그 결과를 그림 3에 나타내었다. LDH 유출에서와 유사하게 H₂O₂ 농도가 증가함에 따라 지질의 과산화도 비례하여 증가하였는데, H₂O₂를 처리하지 않은 조직에서 지질의 과산화가 188.46±36.53

pmole MDA/mg protein이던 것이 H₂O₂ 농도가 100 mM로 증가함에 따라 지질의 과산화도 1066.38±41.98 pmole MDA/mg protein으로 약 5.7배 증가하였다.

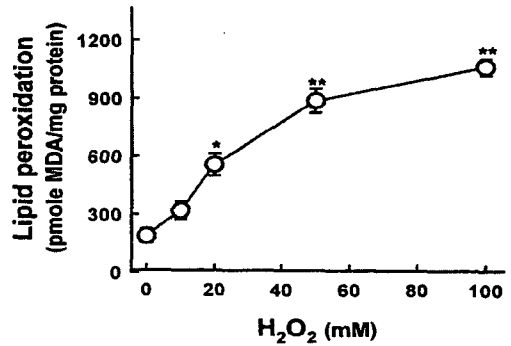


Fig. 3. Dose dependency of H₂O₂ on lipid peroxidation in renal cortical slices. Slices were treated with various concentrations (10-100 mM) H₂O₂ at 37°C for 60 min. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05, **p<0.01 compared with the absence of H₂O₂.

3. H₂O₂에 의한 세포 손상에 대한 丹參의 효과

丹參 추출물이 H₂O₂에 의해 유발된 세포 손상에 어떤 영향을 나타내는 지를 확인하기 위하여 여러 농도의 丹參 추출물을 H₂O₂를 처리하는 용액내에 첨가하여 관찰하였다. 그림 4에서 보는 바와같이 100 mM H₂O₂를 처리했을 때 LDH 유출은 5.47±0.43%에서 15.57±1.75%로 증가하였으며, 丹參의 농도를 0.05에서 2%까지 증가시켜 첨가했을 때 H₂O₂에 의해 증가되었던 LDH 유출은 丹參의 농도에 비례하여 감소하였다. 丹參의 농도가 0.05%일 때 LDH 유출은 11.53±2.73%로 유의한 감소를 보였으며, 0.5% 농도에서는 4.27±

0.46%로 정상까지 회복되었다. 그러나 丹參의 농도를 1%와 2%로 증가시켰을 때는 LDH 유출이 8.27 ± 0.65 및 $12.57 \pm 1.34\%$ 로 오히려 증가함으로써 丹參의 농도가 과도하게 증가하게 되면 oxidant에 의한 세포 손상을 방지하기 보다 오히려 丹參 자체가 세포 손상을 일으킬 수 있음을 보여주고 있다.

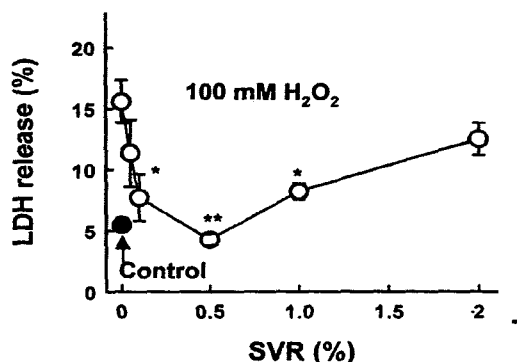


Fig. 4. Dose dependency of SVR protective effect against H_2O_2 -induced LDH release in renal cortical slices. Slices were treated with 100 mM H_2O_2 at $37^\circ C$ for 60 min in the presence and absence of 0.05-2% SVR. Data are mean \pm SE of four experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the absence of SVR.

4. H_2O_2 에 의한 지질의 과산화에 대한 丹參의 효과

丹參 추출물이 H_2O_2 에 의한 지질의 과산화에 어떤 영향을 나타내는지를 확인하기 위하여 여러 농도의 丹參 추출물을 H_2O_2 를 처리하는 용액 내에 첨가하여 관찰하였다. 그림 5에서 보는 바와같이 100 mM H_2O_2 를 처리했을 때 지질의 과산화는 268.64 ± 36.43 pmole MDA/mg protein에서 1166.28 ± 58.55 pmole MDA/mg protein으로

증가하였으며, 丹參의 농도를 0.05에서 5%까지 증가시켜 첨가했을 때 H_2O_2 에 의해 증가되었던 지질의 과산화는 丹參의 농도에 비례하여 감소하였다. 丹參의 농도가 0.05%일 때 지질 과산화는 529.46 ± 44.70 pmole MDA/mg protein으로 유의한 감소를 보였으며, 0.5% 농도에서는 321.76 ± 30.82 pmole MDA/mg protein으로 정상 수준으로 회복되었고, 1%와 2% 농도일 때는 각각 68.62 ± 22.19 와 40.57 ± 6.32 pmole MDA/mg protein으로 정상 조직에서 보다 유의하게 감소하였다.

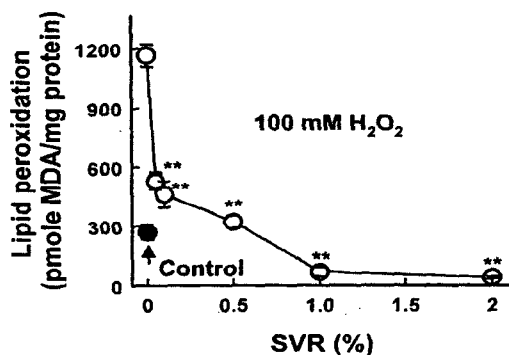


Fig. 5. Dose dependency of SVR protective effect against H_2O_2 -induced lipid peroxidation in renal cortical slices. Slices were treated with 100 mM H_2O_2 at $37^\circ C$ for 60 min in the presence and absence of 0.05-2% SVR. Data are mean \pm SE of four experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the absence of SVR.

5. $HgCl_2$ 에 의한 세포막 지질의 과산화에 대한 丹參의 효과

수은을 0.5 mM 농도로 처리했을 때 지질의 과산화는 217.54 ± 32.34 pmole MDA/mg protein에서 887.45 ± 42.49 pmole MDA/mg protein으로

약 4배 정도 증가하였다. 수은 처리와 동시에 0.5% 丹參 추출물을 첨가하였을 때 수은에 의한 지질의 과산화는 342.67 ± 38.48 pmole MDA/mg protein으로 현저하게 억제되었다. (그림 6)

$\pm 1.18 \mu\text{mole/g wet wt.}$ 로 통계학적 유의성은 없었으나 증가 현상을 보였다. (그림 7)

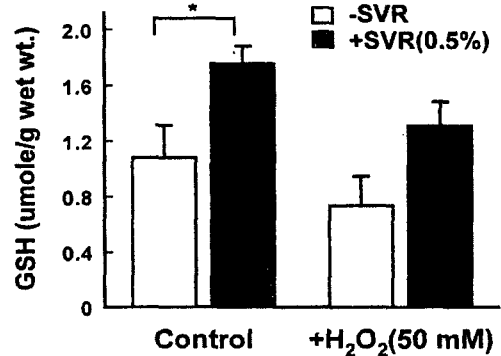
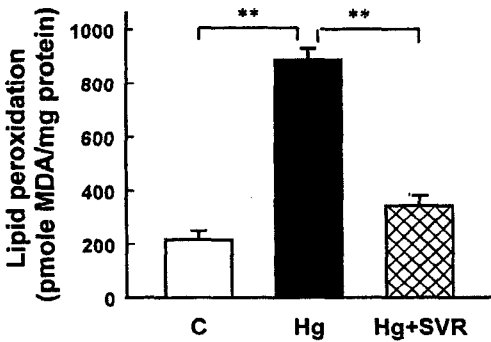


Fig. 6. Effect of SVR on lipid peroxidation induced by H₂O₂ in renal cortical slices. Slices were treated with 100 mM H₂O₂ at 37°C for 60 min in the presence and absence of 0.5% SVR. Data are mean \pm SE of four experiments. **p<0.01.

Fig. 7. Effect of SVR on glutathione (GSH) content in renal cortical slices. Slices were treated with 100 mM H₂O₂ at 37°C for 60 min in the presence and absence of 0.5% SVR. Data are mean \pm SE of four experiments. *p<0.05.

6. 세포내 glutathione (GSH) 농도에 대한 丹參의 효과

丹參 추출물이 oxidant에 의한 세포 손상을 방지하는 작용이 세포내 GSH의 농도를 변화시키 나타나는 지를 확인하기 위하여 정상 조직과 H₂O₂를 처리한 조직에서 GSH 농도 변화에 대한 丹參 추출물의 효과를 조사하였다. H₂O₂를 처리하지 않은 정상 조직에 0.5% 丹參 추출물을 첨가하였을 때 세포내 GSH 농도는 $1.08 \pm 0.23 \mu\text{mole/g wet wt.}$ 에서 $1.75 \pm 0.13 \mu\text{mole/g wet wt.}$ 로 유의하게 증가하였다. 腎臟 조직에 50 mM H₂O₂를 처리한 결과 세포내 GSH 농도는 유의하게 감소하지 않았으나, 0.5% 丹參 추출물이 첨가되었을 때 $0.74 \pm 0.21 \mu\text{mole/g wet wt.}$ 에서 1.31

7. Catalase 활성에 대한 丹參의 영향

정상 조직과 50 mM H₂O₂를 처리한 조직에서 catalase 활성의 변화에 대한 丹參 추출물의 영향을 조사하였다. 그림 8에서 보는 바와 같이 조직에 H₂O₂를 처리한 결과 catalase 활성은 7.73 ± 0.81 mmole/mg/min에서 4.96 ± 0.60 mmole/mg/min으로 유의한 감소 현상을 보였으며, 여기에 0.5% 丹參 추출물을 첨가하였을 때 억제되었던 효소의 활성은 7.57 ± 0.72 mmole/mg/min로 정상 수준까지 회복되었다. 본 실험에서 H₂O₂를 처리하지 않은 정상 조직에 0.5% 丹參 추출물을 처리했을 때 catalase 활성은 8.51 ± 1.94 mmole/mg/min로 정상 조직에서와 비교하여 유의한 변화를 보이지 않았다.

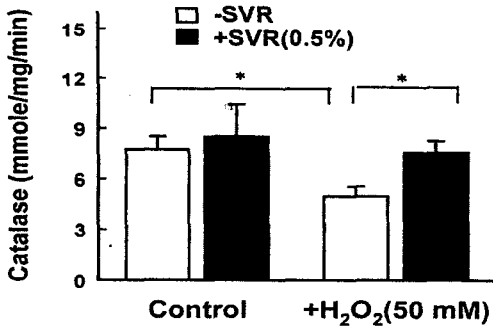


Fig. 8. Effect of SVR on catalase activity in renal cortical slices. Slices were treated with 100 mM H₂O₂ at 37°C for 60 min in the presence and absence of 0.5% SVR. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05.

8. Glutathione peroxidase 활성에 대한 丹參의 영향

丹參 추출물의 항산화 효과가 glutathione peroxidase의 활성을 증가시켜 나타나는 현상인지를 관찰한 결과를 그림 9에 나타내었다. 50mM H₂O₂를 처리했을 경우 효소의 활성이 유의한 변화를 보이지 않았으나 0.5% 丹參 추출물을 첨가하였을 때 효소의 활성이 정상 조직에서 보다 높은 134.86±16.04 nmole/mg/min로 증가하였다. 정상 조직에서 효소의 활성은 72.50±2.40 nmole/mg/min였다.

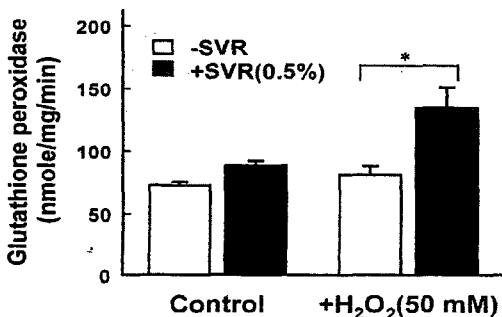


Fig. 9. Effect of SVR on glutathione peroxidase activity in renal cortical slices. Slices were treated with 100 mM H₂O₂ at 37°C for 60 min in the presence and absence of 0.5% SVR. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05.

9. Superoxide dismutase 활성에 대한 丹參의 영향

丹參이 superoxide dismutase (SOD)의 활성에 어떤 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 정상 조직과 50 mM H₂O₂를 처리한 조직에 0.5% 丹參 추출물을 첨가하여 SOD의 활성 변화를 조사하였다. 그림 10에서 보는 바와 같이 정상 조직에서나 oxidant를 처리한 조직에서 SOD의 활성은 丹參에 의하여 영향을 받지 않았다.

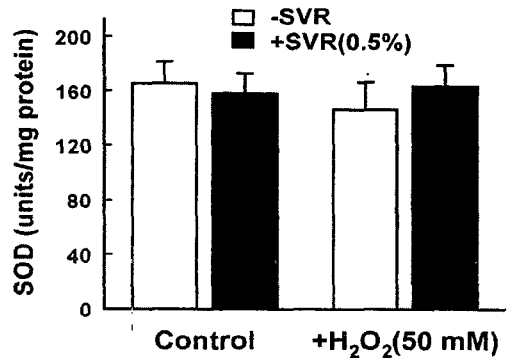


Fig. 10. Effect of SVR on superoxide dismutase activity in renal cortical slices. Slices were treated with 100 mM H₂O₂ at 37°C for 60 min in the presence and absence of 0.5% SVR. Data are mean±SE of four experiments.

IV. 고 찰

한의학에서 腎不全의 치료에 活血化癥法이 활용되는 경우가 있는데 특히 急性 腎不全의 少尿, 無尿期에 중요하게 쓰인다. 活血 약물 중에 丹參은 利水 약물과 함께 사용되어 急慢性 腎不全의 치료에 효과를 나타내고, 丹參 주사액을 조기에 정맥 주사하여 少尿期를 단축시키고 血尿가 소실되었다고 한다.⁷⁻⁹⁾

이전 연구에서 본 연구자들은 근위세뇨관에서 능동적으로 분비되는 물질로 알려진²⁸⁾ 유기양이온인 tetraethylammonium (TEA)가 oxidant에 의해 그 이동이 유의하게 억제되며, 이러한 억제 작용이 丹參 추출물을 처리함으로써 유의하게 방지됨을 확인한 바 있다.²¹⁾ 따라서 본 연구에서는 이러한 丹參의 효과가 어떤 기전으로 나타나는지를 조사하기 위하여 oxidant에 의해 유발되는 腎臟 조직 손상에 대한 丹參의 방지 효과를 조사하였다.

본 실험에서 腎臟 조직을 H₂O₂에 노출시켰을 때 세포 손상의 지표인 LDH 유출이 10-100 mM 농도 범위내에서 H₂O₂의 농도에 비례하여 증가하였다. 일반적으로 腎臟 세포를 포함한 여러 세포에서 산소유리기와 같은 oxidant들은 지질의 과산화를 초래하여 세포의 기능을 저해하는 것으로 알려져 있는데,^{29,30)} 지질의 과산화도 유사한 양상으로 증가함으로써 H₂O₂가 腎臟 조직에서 지질의 과산화를 일으켜 세포 손상을 유발하고 있음을 보였다. 이러한 H₂O₂에 의한 세포 손상과 지질의 과산화가 丹參 추출물을 동시에 첨가하였을 때 유의한 방지 효과가 나타남으로서 丹參이 腎臟 조직에서 강력한 항산화효과를 가지고 있음을 보였다. 또한 丹參이 H₂O₂ 뿐만아니라 강력한 腎臟 독성을 나타내는 약물로 腎臟 조직에서 산소유리기를 발생시켜 강력한 독성을 나타내는 것으로 알려진 Hg³¹⁾에 의한 지질의 과산화를 방지함으로써 oxidant 뿐만아니라 독성물질에 의한

세포 손상도 방지할 수 있음을 보였다.

정상 세포 속에는 산소유리기들을 분해하는 효소들을 가지고 있는데 이들 효소에는 superoxide를 분해하는 superoxide dismutase, H₂O₂를 분해하는 catalase와 glutathione peroxidase 등이 있다.³²⁾ 이 이외에도 체내에 존재하는 항산화제 역할을 하는 물질로는 tocopherol, ascorbic acid 및 glutathione(GSH) 등이 있으며,³²⁾ 이들 효소나 물질들의 체내 농도가 감소하게 되면 세포는 손상을 받아 여러 가지 질병을 유발시키는 원인이 될 것이다.^{33,34)} 특히 GSH는 여러 독성 물질에 의한 세포 손상을 방지하는 해독효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포내에서 항산화제 역할을 하고 있기 때문에 어떤 약물이 세포내 GSH 농도를 증가시키게 되면 oxidant를 포함한 여러 독성 물질에 대한 방어 능력이 증가됨은 잘 알려져 있다.^{35,36)} 따라서 丹參이 만약 세포내 존재하는 항산화 능력을 증대시키는 작용을 가지게 되면 항산화 작용을 나타내게 될 것이다.

본 연구에서 丹參이 어떤 기전으로 항산화 작용을 나타내는지를 확인하기 위하여 내인성 항산화제인 GSH와 항산화 효소인 catalase, glutathione peroxidase 및 superoxide dismutase의 활성을 조사하였다. 그 결과 丹參이 H₂O₂를 처리하지 않은 정상 세포에서 GSH의 함량을 유의하게 증가시켰으며, H₂O₂를 처리한 조직에서도 통계적인 유의성은 없으나 GSH 함량을 증가시키는 결과를 보였다. 또한 丹參은 H₂O₂를 처리한 조직에서 항산화 효소인 catalase와 glutathione peroxidase의 활성을 유의하게 증가시키는 효과를 나타내었다. 그러나 superoxide dismutase 활성에는 영향을 미치지 못하였다.

본 실험의 결과는 丹參이 GSH나 항산화 효소 등 세포내 내재성으로 존재하는 抗酸化力을 증가시킴으로서 oxidant에 의한 세포 손상과 지질의 과산화를 방지하는 효과가 있음을 분명히 보여주고 있다. 그러나 이러한 효과를 나타내는 정확한

기전은 분자생물학적인 실험을 통해 밝혀질 것으로 사료된다.

V. 결 론

丹參이 腎臟 세포에서 oxidant에 의한 능동적인 물질이동계의 장애를 방지하는 효과가 항산화 작용에 기인하는 지를 확인하기 위하여 腎臟 조직에 H₂O₂를 처리하여 세포 손상과 지질의 과산화를 유발시킨후 丹參 추출물을 첨가하여 방지 효과를 조사하였다.

H₂O₂는 10-100 mM 농도 범위에서 LDH 유출을 농도에 비례하여 증가시켰으며, 丹參은 0.05-0.5% 농도 범위에서는 농도에 비례하여 LDH 유출을 방지하였으나 2% 농도에서는 유의한 방지 효과를 보이지 않았다. 유사하게 H₂O₂는 농도에 비례하여 지질의 과산화를 증가시켰으나 丹參에 의해 농도 의존적으로 방지되었다. Hg는 지질의 과산화를 증가시켰으며, 이러한 효과는 丹參에 의해 방지되었다. 丹參은 H₂O₂를 처리하지 않은 정상 조직에서 GSH의 함량을 증가시켰으며, H₂O₂를 처리한 조직에서도 통계적인 유의성은 없으나 GSH 함량을 증가시켰다. 丹參은 H₂O₂를 처리한 조직에서 catalase와 glutathione peroxidase의 활성을 유의하게 증가시켰다.

이러한 결과는 丹參이 腎臟 세포에서 강력한 항산화 작용을 나타내며, 이러한 효과는 내재성 항산화 물질의 함량과 효소의 활성을 증가시켜 나타나는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Paller MS and Neumann TV : Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. *Kid Int*, 40:1041-1049, 1991.
2. Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, Kunkel

- RG and Ward PA : Evidence for the role of oxygen free radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab Invest*, 51:396-403, 1984.
3. Walker PD and Shah SV : Evidence of the role of hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest*, 81:334-341, 1988.
4. Weinberg JM: The biology of ischemic renal injury. *Kid Int*, 39:479-500, 1991.
5. Bonventre JV: Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kid Int*, 43:1160-1178, 1993.
6. Borch RF and Markman M: Biochemical modulation of cisplatin toxicity. *Pharmacol Ther*, 41:371-380, 1989.
7. 曹希和 : 急性腎功能衰竭的中醫臨床研究, *中醫雜誌* (6):54-56, 1988.
8. 張天, 陳以平 主編 : '實用中醫腎病學, 上海中醫學院出版社, p.638, 649, 659, 675, 1990.
9. 卍호경 : 동의신제학, 서울, 동양의학연구원, pp.514-527, 1990.
10. 張大寧 : 實用中醫腎病學, 天津, 中國醫藥科學技術出版社, pp.473-485, 1990.
11. 李尙仁 : 本草學, 서울, 醫藥社, pp. 419-420, 1975.
12. 江蘇中醫學院 編 : 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, pp. 478-482, 1988.
13. 吳儀洛 : 本草從新, 上海科學技術出版社, pp. 24-25, 1982.
14. 王浴生 主編 : 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp. 223-232, 1983.
15. 陳伯煊 : 慢性腎衰中醫治則的探討, *四川中醫* (2):19-20, 1993.
16. 劉燦康 : 老年慢性腎功能衰竭治療蠡言, *江蘇中醫* (1):30-32, 1991.
17. 胡元奎, 許建泰 : 益腎通絡湯治療慢性腎炎腎

- 功能不全 46例, 陝西中醫 14(11):487, 1993.
18. 張小華 : 健脾益腎活血祛瘀法治療慢性腎炎腎功能不全, 福建中醫藥 23(4):27-28, 1992.
19. 許沛虎 外 : 中醫藥研究中有關自由基研究近, 中西醫結合雜誌 15(3):185-188, 1995.
20. 郭忠興 外 : 丹參對老齡小鼠SOD和LPO的影響, 中成藥 15(11):27-28, 1993.
21. 金尙範, 鄭智天 : Oxidant에 의한 신장세포 관 물질 이동계의 장애에 대한 丹參의 효과, 대한한방내과학회지, 18(1):147-155, 1997.
22. Uchiyama M and Mihara M: Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. Anal Biochem, 86: 271-278, 1978.
23. Bradford, M. M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72,248-524.
24. Anderson ME: Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods Enzymol, 113:548-554 1985.
25. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol, 105: 121-126, 1984.
26. Flohe L and Gunzler WA: Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol, 05:114-121, 1984.
27. Flohe L and Otting F: Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol. 105:93-104, 1984.
28. Rennick BR: Renal tubular transport of organic cations. In:Renal Transport of Organic Substances (ed., Greger R, Lang F and Silbernagl S), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp.178-188, 1981.
29. Farber, J. L., Kyle, M. E. and Coleman, J. B. (1990) Biology of disease: Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Lab. Invest., 62:670-679.
30. Salahudeen AK: Role of lipid peroxidation in H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. Am j Physiol, 268:F30-F38, 1995.
31. Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW and Warden D: Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. Kid Int, 50:1032-1043, 1996.
32. Ross D and Moldeus P: antioxidant defence systems and oxidative stress. In: Membrane Lipid Oxidation, ed. by Vigo-Pelfrey C., Vol II, pp.151-170, CRC Press, Boston, 1993.
33. 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.
34. Reiter RJ: Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the ageing brain. FASEB J, 9:526-533, 1995.
35. Meister A and Anderson ME: Glutathione. Annu Rev Biochem, 52:711-760, 1983.
36. Starke, PE and Farber JL: Endogenous defence against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. J Biol Chem, 260:86-92., 1985.