

# 鹿茸 藥針液이 虛血후 再貫流에 의한 腎臟 組織 損傷에 미치는 影響

동국대학교 한의과대학 내과학교실 \*  
동국대학교 의료원 약제과 \*\*

尹哲浩 · 鄭智天\*, 申億燮\*\*

## ABSTRACT

Effects of Cervus elaphus Acua-Acupuncture's solution on damage of Rat's Kidney induced by Ischemia and Reflow

Cheol-Ho Yoon · Ji-Cheon Jeong,\* Uk-Seob Shin\*\*

\* Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,  
Dongguk Univ.

\*\* Dept. of Pharmacy, Dongguk Medical Center

Cervus elaphus (CE), being known to reinforce Kidney, have tested to study the effects concerning damages of renal tissue induced by oxygen free radicals.

I had observed the effects of CE extract on damages of rat's kidney following ischemia and reflow. Before ischemia was caused, CE extract was applied 0.2ml per 250g through femoral vein in ischemia and reflow group and normal saline was applied in normal group. Ischemia was caused by renal artery's clamp for 60 min and reflowed by clamp remove after 30 min. It was increased on the content of lipid peroxidation, activities and type conversion ratio of xanthine oxidase following ischemia and reflow.

---

접수일 : 1999. 5. 10

심사일 : 1999. 7. 15

by clamp remove after 30 min. It was increased on the content of lipid peroxidation, activities and type conversion ratio of xanthine oxidase following ischemia and reflow. However, they were decreased when CE extract was pre-applied. Glutathione level was decreased in ischemia and reflow group, and increased in CE extract's pre-applied group. However, it could not be seen special changes on aldehyde oxidase activities, either.

In conclusion, CE extract recovers the damage of kidney due to ischemia and reflow by decreasing the lipid peroxidation.

Key Words : Cervus elaphus, acua-acupuncture's solution, renal damage, ischemia and reflow, lipid peroxidation

## I. 緒 論

생체내에서 혈액공급의 장애로 초래되는 臟器의 허혈은 조직학적 손상을 가져오는데, 허혈기간에서 보다 허혈 후 재관류시에 산소가 풍부한 혈액이 재공급되어 급속히 활성산소들의 생성이 증가되므로 더 큰 손상을 입는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

이러한 활성산소는 매우 불안정하므로 세포막의 다가불포화지방산을 공격하여 지질의 과산화반응을 촉진하고 조직 세포의 손상을 초래하여<sup>2)</sup> 암, 중추신경계 질환, 심근경색, 급성 신부전 등 여러 질병을 유발하는 것으로 보고되고 있다<sup>3-5)</sup>. 그러므로, 1960년대 Danforth 등<sup>6)</sup>의 보고 이후, 肝<sup>7)</sup>, 肺<sup>8)</sup>, 腎臟<sup>9,10)</sup>, 腸<sup>11)</sup> 등의 여러 기관에서 장기이식 시 허혈 후 재관류 손상의 억제에 대한 연구나 활성산소류와 관련된 질병에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다<sup>12)</sup>.

활성산소에는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen 등이 알려져 있으며<sup>13-15)</sup>, xanthine oxidase와 aldehyde oxidase<sup>16)</sup> 등에 의해서 생

성이 촉진되고, superoxide dismutase(SOD), catalase 또는 glutathione peroxidase 등에 의해 생성이 억제된다<sup>17-19)</sup>.

한의학에서는 급·만성 신부전, 낭창성신염 등 신장 질환의 경우 과산화지질의 함량이 상승되고 SOD 활성이 현저히 저하된다고 보고되고 있는데, 病情이 重할수록 病程이 길거나 證候가 多樣할수록 SOD의 活性이 더욱 低下되어 있었다<sup>20-21)</sup>.

그리고, 實驗 報告에 依하면 補腎 效能이 있는 熟地黃, 肉蓯蓉, 淫羊藿, 何首烏 등의 藥物<sup>22,23)</sup>과 保腎丸<sup>21)</sup> 등의 處方이 過酸化脂質의 含量을 低下시키고 SOD 活性을 增加시키며 superoxide anion radical을 除去하여 慢性 腎炎의 治療에 效果가 있는 것으로 報告되고 있다.

鹿茸은 神農本草經<sup>24)</sup>에 “味甘溫 無毒, 治漏下惡血, 寒熱驚癇, 益氣強志, 生齒不老”라고 最初로 記載된 以後 壯腎陽, 益精血, 強筋骨, 調衝任, 托瘡毒<sup>25)</sup>하는 效能으로 補腎 藥劑로 널리 活用되어 왔다<sup>26)</sup>.

그러므로, 저자들은 鹿茸이 허혈 후 재관류로 인한 신장 조직 손상에 효과가 있는지를 알아 보기 위하여 실험 동물에서 신장 동맥의 허혈 후 재관류를 유도한 후 과산화지질과 활성산소 생성 및 분해계 효소 활성 변화 등을 살펴보았다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

양질의 뉴질랜드산 鹿茸(Cervus elaphus) 300g을 시중에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

#### 2) 試藥 및 機器

Bovine serum albumin(BSA), ferrous chloride(Fe II), glutathione reduced, glutathione reductase, hematoxylin, nicotineamide adenine dinucleotide(NAD), p-nitrothiophenol, sodium chloride, sodium hydroxide, thiobarbituric acid sodium salt, tris base, xanthine oxidase는 Sigma사로부터, nicotineamide adenine dinucleotide phosphate reduced form(NADPH)은 Kohjin사로부터, 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), hydrogen peroxide, xanthine sodium salt, trichloroacetic acid, uric acid는 Nakarai사로부터, hypoxanthine, potassium phosphate mono and dibasic은 Wako pure Chemical, glutathione oxidized는 Fluka사로부터, malondialdehyde(MDA)는 Aldrich사로부터, N-1-methylnicotinamide는 Tokyo Chemical사로부터, 혈중 BUN kit 시약은 Eiken사로부터 구입한 제품을 사용하였고 기타 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 UV spectrophotometer (Shimazu UV-1201), refrigerated centrifuge (Hitachi 20 PR-52D), ultra centrifuge (Hitachi 70P-72), deep freezer(Revco), chemiluminescence 분석기(Microlumat LB 96P, Berthold, Germany) 등이었다.

### 3) 動物

일정한 온도와 습도가 유지되는 조건으로 사육한 외관상 건강하고 체중이 약  $250 \pm 20$  g 내의이며 생후 약  $10 \pm 2$  주령의 웅성 Sprague Dawley계 흰쥐를 실험전 16시간 동안 물만 주고 절식시킨 후 실험에 사용하였다.

실험동물은 정상군, 대조군(허혈 후 재관류군) 및 실험군(녹용 약침액 전처치후 허혈 재관류군) 등의 세 그룹으로 분류하였으며, 한 그룹당 개체수를 15마리 이상으로 하였다.

## 2. 方法

### 1) 추출액의 제조

水提 alcohol 沈法<sup>27)</sup>으로 제조하였다. 녹용 300g을 조말로 하여 둥근 flask에 넣고, 증류수 2,000ml를 가한 후 3시간 동안 water bath에서 추출하고 여과하였다. 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하고 농축액에 증류수를 가하여 전량을 200ml로 한 다음, 실온까지 냉각하고 ethanol을 가하여 75% ethanol 용액으로 되게 한 다음, 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporator로 감압 농축한 농축액에 증류수 100ml를 가하고 용해시킨 후, ethanol을 가하여 85% ethanol 용액으로 되게 한 다음 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 재차 rotary evaporator로 감압 농축한 농축액에 증류수 100ml를 가하고 용해시킨 후, ethanol을 가하여 95% ethanol 용액으로 되게 한 다음 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporator로 감압 농축하여 생성된 농축액에 생리식염수를 가하고 3% 염산으로 pH. 6~7로 조절하여 전체의 양이 1,000ml가 되게 한 다음, 저온(5°C 이하)에서 12시간을 방치한 후 미량의 부유물을 여별하고 가압 멸균하여 nucleopore filter paper (25mm, 0.45 $\mu$ m)로 filtration

시킨 후 시료로 사용하였다.

## 2) 虛血 後 再貫流 實驗<sup>9)</sup>

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 수술대에 고정시키고 복부 정중선을 따라 개복한 후 양측 신장과 신문부를 노출시켰다. 신 허혈을 유도하기 전에 먼저 녹용 약침액을 대퇴부 정맥을 통하여 체중 250g당 0.2ml을 1분 이상 서서히 주입하여 허혈 전처치를 시행하였고, 대조군은 동량의 생리식염수를 대퇴부 정맥으로 주사하였다. 허혈 전처치한 후 혈관검자를 이용하여 신동맥을 60분간의 혈류차단으로 허혈상태를 유도한 다음 혈관검자를 풀고 30분간 재관류시켜 신장조직을 적출하여 허혈 후 재관류 실험에 이용하였다.

## 3) 酵素源의 調製

동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복한 후 복부대동맥으로 부터 혈액을 채취하고 0.9% 생리식염수로 관류시킨 신장을 적출하였다. 적출된 신장을 생리식염수에 씻은 다음 여지로 가볍게 압박하여 이물질 또는 생리식염수를 제거하였다. 조직 1g당 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 이하 K.P. buffer로 약함)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄 균질액을 600×g에서 10분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 상정액을 얻고 이것을 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 얻었다. 다시, 이 mitochondrial fraction을 제거시킨 상정액을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosolic fraction을 분리한 후 aldehyde oxidase 및 xanthine oxidase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0-4℃에서 행하였다.

## 4) 酵素 活性의 測定

### ① Aldehyde oxidase 활성 측정

Rajagopalan 등<sup>28)</sup>의 방법에 의해 0.1M K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 N-1-methyl-nicotinamide 1.5mM과 효소액을 첨가해 37℃에서 20분간 반응시킨 다음 20% trichloroacetic acid (TCA)를 가해 반응을 종료시킨 후 생성된 pyridone을 파장 300nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 생성시킨 pyridone의 양을 nmole로 나타내었다.

### ② Xanthine oxidase 활성 측정

Stirpe 등<sup>29)</sup>의 방법에 준하여 0.1M K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine 60 μM 및 효소원을 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 20% TCA를 가하여 제단백시키고 원심분리하였다. 이때 생성되어진 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 xanthine oxidase (type O)의 활성도를 산정하였다. 한편, xanthine dehydrogenase (type D)의 활성은 type O의 활성 측정 반응액에 coenzyme인 NAD<sup>+</sup> 100 mM을 첨가해 동일하게 반응시킨 다음 측정하여 나온 활성도 (total type: type D+O)에서 type O의 활성을 감한 값으로 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 생성시킨 uric acid 양을 nmole로 나타내었다. 한편, xanthine oxidase의 형전환비 산출은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine oxidase 반응에서 얻어진 효소의 활성도를 이용하여 xanthine dehydrogenase (type D)에서 xanthine oxidase (type O)로의 형전환 비율을 O/O+D의 비로 산출하였다.

## 5) 과산화지질 함량 측정

Onkawa 등<sup>30)</sup>의 방법에 준하여 신장 조직 마쇄 균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 95℃에

서 1시간동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-Butanol : Pyridine (15:1) 혼액으로 이행시켜 파장 532nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 단백 1mg당 생성된 malondialdehyde (MDA)의 양을 nmole로 나타내었다.

### 6) Glutathione 함량 측정

Ellman의 방법<sup>31)</sup>에 준하여 조직 마쇄액 일정량에 4% sulfosalicylic acid를 가해 제단백시켜 얻은 상정액 일정량에 0.1mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)를 함유한 0.1M sodium phosphate buffer (pH 8) 일정량을 넣고 반응시켜 생성된 p-nitrothiophenol의 흡광도를 파장 412 nm에서 측정하여 농도를 산정하였다. GSH 함량은 조직 1g당 함유되어 있는 GSH의 양을  $\mu$  mole로 나타내었다.

### 7) 단백질의 정량 및 통계 처리

Lowry 등<sup>32)</sup>의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 단백질을 정량하였다. 한편, 실험 결과의 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 비교하였다.

## III. 成績

### 1. 신장의 허혈 후 재관류에 따른 과산화지질 생성에 대한 영향

생리식염수만을 투여한 정상군의 과산화지질 함량은  $11.35 \pm 0.98$  nmoles 이었으며, 신동맥의 허혈을 유도한 후 재관류시켜 신조직 손상을 유발시킨 대조군의 경우는  $16.59 \pm 1.07$  nmoles로 정상군에 비해 약 45% 정도의 현저한 과산화지질 생성 증가현상이 관찰되었다. 그러나, 녹용 약침액을 미리 전처치한 후 허혈/재관류 실험을 실시한

실험군은  $13.27 \pm 1.04$  nmoles로 정상군의 약 80%로 나타나 허혈/재관류 실험군에 비해 유의성 있는 과산화지질의 생성 감소 현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

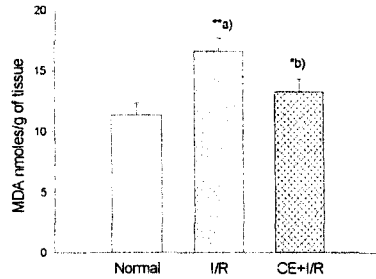


Fig. 1. Effect of *Cervus elaphus* extract on lipid peroxidation following ischemia and reflow in rat's kidney. Before I/R was caused, *Cervus elaphus* extract was applied 0.2ml per 250g through femoral vein in I/R groups and normal saline was applied in control group. Ischemia was caused by renal artery's clamp for 60 min and reflowed by clamp remove after 30 min. Values are mean  $\pm$  S.E. for 10 animals. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , a) Significantly different from normal, b) Significantly different from I/R group. I/R : Ischemia and reflow group, CE : *Cervus elaphus*-treated group

### 2. 신장의 허혈 후 재관류에 따른 glutathione 함량에 대한 영향

정상군의 glutathione 함량은  $2.07 \pm 0.18$   $\mu$  moles 이었으나 허혈 후 재관류를 행한 대조군은  $1.14 \pm 0.19$   $\mu$  moles로 정상군에 비해 약 55%로 나타나 glutathione 함량이 유의성 있게 감소되었다. 한편, 녹용 약침액을 전처치한 후 허혈/재관류를 행한 실험군은 glutathione 함량이 정상군의 약 81%인  $1.68 \pm 0.14$   $\mu$  moles로 나타나 정상수준에 거의 가깝게 회복되어짐을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2).

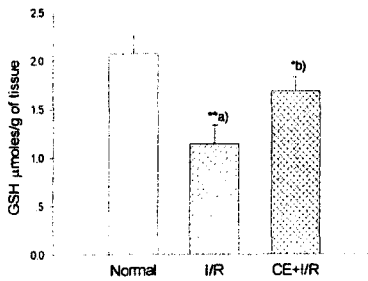


Fig. 2. Effect of *Cervus elaphus* extract on glutathione level following ischemia and reflow in rat's kidney. The assay procedure was described in Fig. 1. Values are mean  $\pm$  S.E. for 10 animals. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , a) Significantly different from normal, b) Significantly different from I/R group. I/R : Ischemia and reflow group, CE : *Cervus elaphus*-treated group

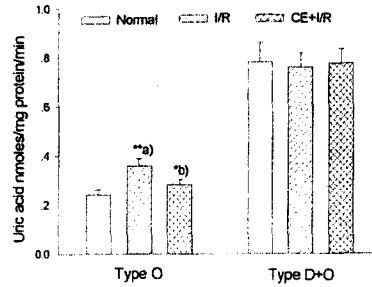


Fig. 3. Effect of *Cervus elaphus* extract on xanthine oxidase activity following ischemia and reflow in rat's kidney. The assay procedure was described in Fig. 1. Values are mean  $\pm$  S.E. for 10 animals. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , a) Significantly different from normal, b) Significantly different from I/R group. I/R : Ischemia and reflow group, CE : *Cervus elaphus*-treated group

### 3. 신장의 허혈 후 재관류에 따른 xanthine oxidase 활성에 대한 영향

정상군의 경우 type O의 활성이  $0.240 \pm 0.02$  nmole 이었으나 허혈 후 재관류 실험군은  $0.358 \pm 0.03$  nmole로서 정상군에 비해 약 50% 정도의 활성 증가현상을 관찰할 수 있었다. 그러나, 녹용 약침액을 미리 전처치한 실험군에서는 효소활성이  $0.282 \pm 0.02$  nmole로 나타나 허혈 후 재관류 대조군에 비하여 약 21% 정도 유의성 있게 효소활성이 억제되는 것을 관찰하였다. Total type (type D+O)의 경우는 정상군과 실험군 사이에 별다른 활성변화를 나타내지는 않았다 (Fig. 3).

### 4. 신장의 허혈 후 재관류에 따른 xanthine oxidase 형전환에 대한 영향

정상군에서 xanthine oxidase의 형전환비는 약  $30.8 \pm 2.41\%$ 이었으나 허혈 후 재관류 유발군의 경우는 형전환비가 약  $47.2 \pm 3.76\%$ 로 정상군에

비해서 약 50% 정도의 현저한 형전환 증가현상을 관찰할 수 있었다. 그러나, 녹용 약침액을 전처치한 실험군에서는 xanthine oxidase의 형전환비가  $36.7 \pm 3.04\%$ 로 나타나 허혈/재관류군에 비하여 형전환이 약 22% 정도 유의성 있게 억제됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4).

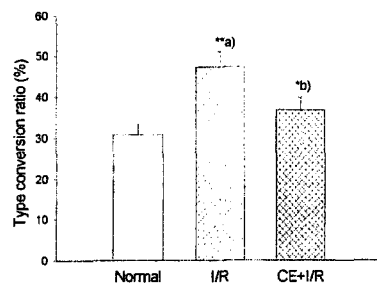


Fig. 4. Effect of *Cervus elaphus* extract on type conversion of xanthine oxidase following ischemia and reflow in rat's kidney. The assay procedure was described in Fig. 1.

Values are mean  $\pm$  S.E. for 10 animals. \* P<0.05, \*\* P<0.01. a) Significantly different from normal, b) Significantly different from I/R group. I/R : Ischemia and reflow group, CE : *Cervus elaphus*-treated group

### 5. 신장의 허혈 후 재관류에 따른 aldehyde oxidase 활성에 대한 영향

정상상태에서 흰쥐의 신장 aldehyde oxidase 활성은  $0.97 \pm 0.11$  nmole이었지만 허혈 후 재관류 조건에서는 효소활성이  $1.18 \pm 0.16$  nmoles로 약 20% 정도의 활성증가 현상을 볼 수는 있었으나 유의성은 없었다. 녹용 약침액으로 전처치한 후 허혈/재관류 실험을 행한 경우 효소활성은  $1.06 \pm 0.10$  nmoles로서 허혈/재관류 실험군에 비해서 약간 억제되는 경향은 있었지만 큰 변화는 관찰할 수 없었다 (Fig. 5).

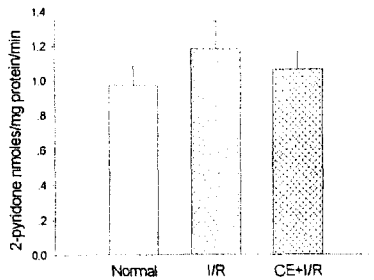


Fig. 5. Effect of *Cervus elaphus* extract on aldehyde oxidase activity following ischemia and reflow in rat's kidney. The assay procedure was described in Fig. 1. Values are mean  $\pm$  S.E. for 10 animals. I/R : Ischemia and reflow group, CE : *Cervus elaphus*-treated group

## IV. 考 察

생체 장기에서 혈액공급의 장애로 초래되는 허혈은 조직학적 손상을 가져오는데, 이 허혈로 인한 조직손상은 허혈기간에서 보다 허혈 후 재관류

시에 산소가 풍부한 혈액이 재공급되어 급속히 활성산소들의 생성이 증가되므로 더 큰 손상을 입는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

허혈 상태에서는 세포내 전자전달계로 부터 ATP생성이 억제되며 세포막의 보호를 위한 ATP의 소모가 증가되고<sup>3,3)</sup>, 또한 세포내로 calcium이온의 유입으로 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)를 전자수용체로 이용하는 xanthine dehydrogenase로 부터 산소를 전자수용체로 이용하는 산화반응 과정에서 활성산소를 생성시키는 xanthine oxidase로의 형전환이 이루어진다<sup>3,4)</sup>.

재관류시에는 허혈상태시 세포내에 축적된 h-yperoxanthine이 xanthine oxidase에 의하여 xanthine과 uric acid로 전환되면서 매우 독성이 강한 superoxide anion radical을 생성하고 연쇄적으로 활성산소들을 생성함으로써 세포막의 인지질에 작용하여 mitochondria막, lysosome막 및 원형질막을 lipid peroxidation시켜 막의 구조변형과 기능상실을 유발하므로 조직손상을 일으킨다고 한다<sup>3,14)</sup>.

허혈 후 재관류 손상에 대한 연구는 1960년대 Danforth 등<sup>6)</sup>이 심근의 허혈 후 재관류에서 ATP의 변화에 대해 관찰한 바가 있고, Jennings 등<sup>35)</sup>이 심근의 허혈/재관류후 전기생리학적 변화와 구조적인 변화를 관찰하였으며 그 이후 간<sup>7)</sup>, 폐<sup>8)</sup>, 신장<sup>9,10)</sup>, 장<sup>11)</sup> 등의 여러 기관에서 장기이식시 허혈 후 재관류 손상의 억제에 대한 연구나 활성산소류와 관련된 질병에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다<sup>12)</sup>.

이러한 활성산소들에 의한 세포손상은 조직손상으로 이어지고 궁극적으로는 생체의 전반적인 노화반응을 촉진하거나<sup>3)</sup> 암, 중추신경계 질환, 심근경색, 급성 신부전 등 여러가지 질병을 유발하는 것으로 보고되고 있다<sup>4-5)</sup>.

과산화지질은 세포막에 다량 존재하고 있는 인지질의 다가불포화지방산이 활성산소류들의 공격을 받아 산화반응이 연쇄적으로 이루어지므로서

막이 손상을 입게되어 생성되는데 이때 세포막의 파괴로 인한 세포손상이 나타난다고 한다<sup>36)</sup>. 따라서 세포막 손상 즉, 세포독성을 측정하는 하나의 일반적 방법으로 지질의 과산화반응을 이용할 수 있다.

활성산소들에 의해 나타나는 대표적인 독성지표인 과산화지질의 함량은 신장조직에서 허혈 후 재관류 손상에 의하여 유의성 있게 약 45%( $P < 0.01$ ) 증가하여 문<sup>37)</sup>과 Kim<sup>38)</sup>의 보고와 유사하게 나타났다. 그러나, 녹용 약침액으로 미리 전처치한 후 허혈/재관류를 실시한 실험군은 과산화지질의 함량이 정상수준의 약 80%로 회복되어 짐을 볼 수 있어 녹용 약침액은 oxygen free radicals에 의한 세포조직 손상을 방지하는 효능이 있음을 알 수 있었다. 한편, 본 실험에서는 허혈시의 과산화지질 함량을 측정하지 않았으나, 문 등<sup>37,38)</sup>의 보고에 의하면 과산화지질 생성은 허혈 시에는 정상군에 비하여 유의성없이 다소 증가되고 재관류시에 급격히 증가되는 것으로 나타나 oxygen free radicals은 산소가 없는 상태에서는 생성되지 못하다가 산소가 공급되면 생성되어 지질의 과산화를 초래한다는 것을 뒷받침하고 있다.

생체내에서 생합성되어지는 tripeptide로서 구조가 단순하면서도 활발한 생리작용을 지니고 있는 glutathione은 간장에서 주로 생성되며 여러 장기에 널리 분포하는 해독물질이다<sup>39)</sup>. Glutathione은 외부에서부터 유입되어 들어온 독성물질들과 쉽게 포합반응을 하여 체외로 배설시키는 생화학적 기능을 지니고 있으므로<sup>40)</sup> 조직중의 glutathione 함량을 측정함으로써 독성물질에 대한 생체의 방어능력을 간접적으로 측정할 수 있을 것이다.

실험동물에 녹용 약침액으로 전처치한 후 허혈/재관류를 실시하고 신장 조직중의 glutathione 함량 변화를 관찰하였을 때, 허혈 후 재관류에 의한 조직손상으로 현저히 저하되었던 glutathione 함량이 녹용 약침액의 전처치에 의하여 정상군의 약 81%까지 유의성 있게 증가되는 결과가 관찰되었

다. 이는 녹용 약침액이 생체내에서 활성산소에 의해 유발될 수 있는 세포손상을 어느 정도 차단시키는 작용을 지니고 있음을 암시하고 있다고 여겨진다.

Xanthine oxidase는 정상적인 생체내에 존재할 때 type D(dehydrogenase형)로 존재하나 허혈 상태 또는 병적상태가 되면 type O(oxidase형)로 형전환이 이루어지며 이때 활성산소가 생성된다고 보고되어 있다<sup>34)</sup>. 따라서, xanthine oxidase 활성과 형전환비의 억제는 활성산소류의 발생을 억제시키고 아울러 과산화지질의 생성 억제로 이어질 수 있다고 여겨진다.

허혈 후 재관류를 실시한 대조군의 신장 조직에서 xanthine oxidase 활성 및 형전환비를 관찰하였을 때, oxidase (type O)의 활성이 현저하게 증가하였으며 이와 더불어 xanthine oxidase의 형전환비도 Kim 등<sup>38)</sup>과 유사하게 유의성 있게 증가되었다. 그러나, 녹용 약침액을 전처치한 다음 허혈/재관류를 실시한 실험군에서는 증가되었던 type O의 활성과 형전환비가 거의 정상군 수준으로 회복되는 경향을 나타내었다.

한편, 물리화학적 성상이 xanthine oxidase와 거의 유사한 효소인 aldehyde oxidase의 활성은 허혈 후 재관류에 의해서 별다른 변화가 없었다. 이러한 성적으로 볼 때 녹용 약침액은 생체내에서 xanthine oxidase의 type O 활성과 형전환을 선택적으로 억제하여 활성산소의 생성을 저해하므로 활성산소에 의한 세포손상으로 부터 생체를 방어하는 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

최근의 보고에 의하면, 만성신염, 만성신기능부전, 낭창성신염, 만성신우신염 및 허혈성 손상으로 인한 신부전 등의 신장질환에서 과산화지질의 생성<sup>21,37)</sup>과 xanthine oxidase의 형전환비<sup>38)</sup>는 유의성 있게 증가되고 catalase, SOD 및 glutathione peroxidase 활성은 유의성 있게 감소(20,37)되는 것으로 보고되고 있다.

본 실험에서 녹용 약침액은 신장 조직의 허혈 후 재관류에 의한 독성 실험에서 과산화지질의 생



성 및 xanthine oxidase 활성과 형전환을 유의성 있게 억제하는 것으로 나타났는데, 신장의 기능 저하에 대한 보고<sup>20,21,37,38)</sup>들을 고려할 때 녹용 약 침액은 신장 조직 손상으로 인한 질병의 치료에 유효할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

녹용 약침액이 신장의 허혈후 재관류로 인한 조직손상에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 실험 동물에서 신장 조직의 손상을 유발한 후 활성산소의 생성계 및 분해계 효소 활성에 미치는 영향을 관찰하였다.

먼저 녹용 약침액을 대퇴부 정맥을 통하여 미리 주입한 후 신동맥을 60분 동안 차단하여 허혈을 유도하고 30분간 재관류시켜 실험에 이용하였다. 허혈 후 재관류로 과산화지질의 생성은 약 45% 증가되었으나 녹용 약침액을 전처치한 경우 정상수준의 약 80%로 유의성 있게 회복되었으며, glutathione 함량은 허혈 후 재관류로 약 55% 현저히 감소되었으나 녹용 약침액에 의하여 정상수준의 약 81%로 유의성 있게 증가되었다. 허혈 후 재관류로 인하여 현저히 증가되었던 xanthine oxidase의 type O 활성과 형전환비는 녹용 약침액의 전처치로 유의성 있게 감소되었다. 그러나, aldehyde oxidase 활성은 특별한 변화가 없었다.

이상의 결과로 볼 때, 녹용 약침액은 허혈후 재관류로 인한 신장 조직손상을 억제하는 것으로 나타났다.

## 參考文獻

- 1) McCord, J. M. : Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N. Engl. J. Med., 1985;312(3):159~163.
- 2) Cutler, R. G. : Antioxidants, aging and longevity. Free Radicals in Biology, Academic Press, 1984;vol.6:371~424.
- 3) Pryor, W. A. : Freeradicalin biology : Involvement of radical reactioninagingand - carcinogenesisinmedicinal chemistry. Elsevier, Amsterdam. 1977:331~361.
- 4) 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., 1989;126:23~33.
- 5) Walker, P. D. and Shah, S. V. : Evidence of the role of hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. J. Clin. Invest., 1988;81:334~341.
- 6) Danforth, W. H., Naegle, S. and Bing, R. J. : Effect of ischemia/ reoxygenation on glycolytic reactions and adenosine triphosphate in heart muscle. Circ. Res., 1960;8(5):965~971.
- 7) Atalla, S.L., Toledo-Pereyra, L. H., McKenzie, G. H. and Cederna, J. P. : Influence of oxygen derived free radical scavengers on ischemic livers. Transplantation, 1985;40(6):584~589.
- 8) Stuart, R. S., Baumgartner, W. A., Borkon, A. M., Bulkley, G. B., Brown, J. D., DelaMonte, S. M., Hutchins, G. M. and Reitz, B. A. : Five-hour hypothermic lung preservation with oxygen free radical scavengers. Transplant. Proc., 1985;17(1) :1454~1456.
- 9) Hansson, R., Gustafsson, B., Jonsson, O., Lundstam, S., Pettersson, S., Schersten, T. and Waldenstrom, J. : Effect of xanthine oxidase inhibition on renal circulation after

- ischemia. *Transplant Proc.*, 1982;14(1) :51~58.
- 10) Ouriel, K., Smedira, N. G. and Ricotta, J. J. : Protection of the kidney after temporary ischemia : Free radical scavengers. *J. Vasc. Surg.*, 1985;2(1) :49~53.
- 11) Parks, D. A., Burkley, G. B., Granger, D. N., Hamilton, S. R. and McCord, J. M. : Ischemic injury to the cat small intestine : Role of superoxide radicals. *Gastroenterology*, 1982;82(1):9~15.
- 12) Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., McCord, J. M. and Harman, D. : Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.*, 1987;107(4):526~545.
- 13) David, R. : Mechanistic toxicology: A radical perspective. *J. Pharm. pharmacol.*, 1989;41:505~511.
- 14) Barry, H : Oxidants and human disease : Some new concepts. *FASEB J.*, 1987;1:358~364.
- 15) Beauchamp, C. and Fridovich, I. : A mechanism for the production of ethyl-ene from methional : The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1970;245:4641~4646.
- 16) Kreintsky, T. A., Tuttle, J. V., Cattau, E. L. and Wang, P. : A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1974;49B:687~703.
- 17) McCord, J. M. : Free radical and inflammation : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, 1974;185:529~531.
- 18) Froh, L., Gunzler, W. A. and Schock, H. H. : Glutathione peroxidase : A selenoenzyme. *FEBS Lett.*, 1973;32 :132~134.
- 19) Ramzi, S. C., Vinay, K. and Stanley, L., R. : Robbins pathologic basis of disease, 4th ed., W.B. Saunders Company, 1989:9~12.
- 20) 陳晏珍, 江家貴, 楊宏德 : 腎虛與超氧化物歧化酶關係初探, *中醫雜誌*, 1989;30(4):42~43.
- 21) 鄒燕勤, 章永紅, 余承惠, 陸念祖, 陳正芳, 蔡新, 孫偉, 仇正南, 徐國平 : 保腎丸結合辨證治療對腎炎患者LPO水平的影響, *中西醫結合雜誌*, 1990;10(7):404~405.
- 22) 羅佩卓, 甄漢深, 龍盛京 : 20種補益中藥對氧自由基清除作用的研究, *湖北中醫雜誌*, 1995;17(6):47~49.
- 23) 舒守琴, 余美娟, 李祝, 姚曉渝, 周恩萍 : 27種中藥及SOD對體外大白鼠路均漿過氧化脂質生成的影響, *山東中醫學院學報*, 1991;15(3):70~72.
- 24) 馬繼興 主編 : 神農本草經輯注, 人民衛生出版社, 1995:312.
- 25) 中華人民共和國衛生部藥典委員會 編 : 中華人民共和國藥典一九八五年版一部, 人民衛生出版社, 1985:284.
- 26) 李挺 : 原本編註醫學入門(上), 南山堂, 1985 :780.
- 27) 錢百炎, 顧茂瑜, 王成榮 : 中草藥注射劑, 上海科學技術出版社, 1981:70~93, 150~151.
- 28) Rajagopalan, K. V., Fridovich, I. and Handler, P. : Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 1962;237:922~928.
- 29) Stirpe, F. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase: Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.*, 1969;244:3855~3863.
- 30) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues

- by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 1979;95:351~358.
- 31) Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959;82: 70~77.
- 32) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951;193:265~275.
- 33) Schwerzmann, K. and Pederson, P. L. : Regulation of the mitochondrial ATP synthesis/ATPase complex. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986;250(1):1~18.
- 34) 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.*, 1973;131:191~198.
- 35) Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A. and Linn, H. : Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Pathol.*, 1960;70(1):68~78.
- 36) Pryor, W. A., Stanley, T. P. and Blair, E. : Autoxidation of polyunsaturated fatty acids(II), *Lipids*, 1976;11:370~379.
- 37) 문철용, 정종훈, 박찬국, 이승일, 배학연, 장경식, 김만우, 정춘해, 홍순표, 이병래, 김호중 : 백서에서 신 허혈성 손상에 미치는 칼슘 길항제의 효과, *朝鮮大醫大論文集*, 1993;18(1): 11~19.
- 38) Myoung-Choel Kim, Byoung-Rai Lee : Alterations of O<sub>2</sub> metabolite scavengers and production of superoxide radicals in ischemic rat kidney, *朝鮮大醫大論文集*, 1991;16(2):224~238.
- 39) Boyland, E. and Chasseud, L. F. : Therole of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.*, 1969;32:173~219.
- 40) Ross, D. : Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents : Mechanism of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. *Pharmacol. Ther.*, 1988;37(2):231~239.