

# 虛血/再貫流 腦 組織에서 鹿茸 藥鍼液의 抗酸化 作用에 대한 研究

東國大學校 韓醫科大學 內科學教室 \*

鄭 智 天\*

## ABSTRACT

Effects of Cervus elaphus extract solution for  
Aqua-acupuncture on Antioxidation in Rat's Brain induced  
by ischemia and reflow

Ji-Cheon Jeong\*

Department of Intenal Medicine, College of Orient Medicine,  
Dongguk University

Cervus elaphus, being known to reinforce Kidney, have tested to study the effects concerning damages of brain tissue induced by lipid peroxidation.

In vitro, the level of lipid peroxide in brain tissue was decreased proportinally according to dose by Cervus elaphus extract solution for aqua-acupuncture (CESAA). It was much more decreased, when lipid peroxidation was induced with Fe(II). And, it was seen proportinally decrease according to the dose of CESAA on xanthine oxidase

---

접수일 : 1999. 5. 10

심사일 : 1999. 7. 15

activities and type conversion ratio. However, I can not find special changes about aldehyde oxidase activities. And, I had observed the effects of CESAA on damages of rat's brain following ischemia and reflow. Before ischemia was caused, CESAA was applied 0.2 ml per 250 g through femoral vein in ischemia and reflow group and normal saline was applied in normal group. Ischemia was caused by cervical artery's clamp for 30 min and reflowed by clamp remove after 15 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 CESAA was pre-applied. However, it could not be seen special changes on aldehyde oxidase activities, either.

In conclusion, CESAA recovers the damage of brain due to ischemia and reflow by decreasing the lipid peroxidation through decreasing of xanthine oxidase activities and type conversion ratio.

Key words : Cervus elaphus, aqua-acupuncture solution, brain, ischemia and reflow, lipid peroxidation, xanthine oxidase

## I. 緒 論

정상적인 뇌기능은 최소한의 혈류만 유지되면 충분히 수행되는데, 혈관경련, 죽상반, 색전 혹은 동맥경화증과 고혈압 등에 의하여 뇌혈류가 역치 이하로 감소되어 뇌허혈이 나타나면 기능상실과 더불어 세포 괴사가 나타난다<sup>1)</sup>. 그러나, 대부분의 뇌허혈은 일시적이며 뇌허혈 당시 보다는 재관류 시에 산소가 조직으로 재공급될 때 활성酸素가 생성되어 조직 손상이 더욱 강하게 일어난다<sup>2)</sup>.

이러한 활성酸素는 매우 불안정하므로 세포막에 존재하고 있는 다價不飽和脂肪酸을 공격하여 脂質의 過酸化反應을 촉진하고 조직 세포의 손상을 초래하여<sup>3)</sup> 癌, 中樞神經系 疾患, 心筋梗塞, 急性腎不全 등 여러 질병을 유발하는 것으로 報告되고 있다<sup>3-7)</sup>.

活性酸素에는 superoxide anion radical,

hydroxyl radical( $\cdot\text{OH}$ ), hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 등이 알려져 있으며<sup>8-10)</sup>, 대표적인 生成系 酵素인 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase<sup>11)</sup> 등에 의해서 生成이 촉진되고, 分解系 酵素인 superoxide dismutase(SOD), catalase 또는 glutathione peroxidase 등에 의해 生成이 억제된다<sup>12-14)</sup>.

鹿茸은 神農本草經<sup>15)</sup>에 “治漏下惡血, 寒熱驚癇, 益氣強志, 生齒不老”라고 記載된 以後 壯腎陽, 益精血, 強筋骨, 調衝任, 托瘡毒 등의 效能으로 補腎藥劑로 널리 活用되어 왔다<sup>16,17)</sup>. 韓醫學에서 腎이 藏精하며 腦髓를 充養하므로<sup>18,19)</sup> 痴呆, 健忘 등의 治療에 補腎填精法이 活用되고 있기에<sup>18,20)</sup> 鹿茸의 補腎 效能이 腦組織 損傷에도 有效할 것으로 생각된다.

이에 著者は 鹿茸藥液이 腦組織 損傷의 恢復에 抗酸化 효과와 관련하여 어떤 영향을 나타내는지를 검토하기 위하여 試驗管内에서 脂質의 過酸化反應 및 虛血 後 再貫流에 의한 腦組織 損傷에

대한 抗酸化 作用을 관찰하여 유의성 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

良質의 뉴질랜드産 鹿茸 (Cervus elaphus) 300g을 시중에서 購入한 後 精選하여 사용하였다.

#### 2) 試藥 및 機器

Bovine serum albumin(BSA), ferrous chloride(Fe II), glutathione reduced, glutathione reductase, hematoxylin, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), p-nitrothiophenol, sodium chloride, sodium hydroxide, thiobarbituric acid sodium salt, tris base, xanthine oxidase는 Sigma社로 부터, nicotinate adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH)은 Kohjin社로부터, 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), hydrogen peroxide, xanthine sodium salt, trichloroacetic acid, uric acid는 Nakarai社로부터, hypoxanthine, potassium phosphate mono and dibasic은 Wako pure Chemical, glutathione oxidized는 Fluka社로부터, malondialdehyde (MDA)는 Aldrich社로부터, N-1-methylnicotinamide는 Tokyo Chemical社로부터 購入한 製品을 사용하였고 其他 모든 試藥은 特級品을 사용하였다.

實驗에 使用한 機器는 UV spectrophotometer (Shimazu UV-1201), refrigerated centrifuge (Hitachi 20 PR-52D), ultra centrifuge (Hitachi 70P-72), deep freezer (Revco) 등이었다.

### 3) 動物

生後 10±2 週齡되는 體重 250±20g의 外觀上 健康한 雌性 Sprague-Dawley系 흰쥐를 일정한 온도와 습도가 유지되는 조건으로 飼育한 후, 실험前 16時間 동안 물만 주고 絶食시켜 실험에 사용하였다.

實驗動物은 正常群, 對照群 (虛血 後 再貫流群) 및 實驗群 (鹿茸 藥液群) 등의 세 그룹으로 분류하였으며, 한 그룹當 個體數를 15마리 以上으로 하였다.

## 2. 方法

### 1) 抽出液의 製造

水提 alcohol 沈法<sup>21)</sup>으로 製造하였다. 鹿茸 300g을 粗末로 하여 圓底 flask에 넣고, 蒸溜水 2,000ml를 加한 後 3時間 동안 water bath에서 抽出하고 濾過하였다. 濾液을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하고 濃縮液에 蒸溜水를 加하여 全量을 200ml로 한 다음, 室溫까지 冷却하고 ethanol을 加하여 75% ethanol 溶液으로 되게 한 다음, 攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓 濃縮한 濃縮液에 蒸溜水 100ml를 加하고 溶解시킨 後, ethanol을 加하여 85% ethanol 溶液으로 되게 한 다음 攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 再次 rotary evaporator로 減壓 濃縮한 濃縮液에 蒸溜水 100ml를 加하고 溶解시킨 後, ethanol을 加하여 95% ethanol 溶液으로 되게 한 다음 攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 生成된 濃縮液에 生理食鹽水를 加하고 3% 鹽酸으로 pH. 6~7로 調節하여 全體의 量이 1,000 ml가 되게 한 다음, 低溫 (5℃ 以下)에서 12時間을 放置한 後 微量의 浮遊物을 濾別하고 加壓 滅菌하여 nucleopore filter paper (25mm, 0.45μm)로 filtration시킨 後 試料로 사용하였다.

## 2) 虛血後 再貫流 實驗<sup>22)</sup>

實驗動物은 ether로 痲醉시킨 狀態에서 手術臺에 固定시키고 한 쪽 頸動脈을 露出시켰다. 腦血流 遮斷前에 實驗群은 鹿茸 藥鍼液을 體重 250g 당 0.2ml를 大腿部 靜脈으로 1分間 서서히 注射하여 虛血 前處置를 施行하였고, 對照群은 同量의 生理食鹽水를 大腿部 靜脈으로 注射하였다. 腦 虛血을 誘導하기 爲하여 露出된 頸動脈을 血管 鉗자로 血流을 遮斷하여 虛血狀態를 誘發시켰다. 虛血 狀態로 30分 經過後 血管 鉗자를 풀고 15分間 血液을 再貫流시킨 後 腦를 切除하여 虛血/再貫流 實驗 모델에 사용하였다.

## 3) 酵素源의 調製

實驗動物을 ether로 痲醉시킨 다음 예리한 手術用 가위를 利用하여 頭蓋骨을 切斷하여 조심스럽게 腦 摘出하였다. 摘出した 腦 組織은 生理食鹽水에 씻은 다음 濾紙로 가볍게 壓迫하여 異物質 또는 生理食鹽水를 除去하였다. 組織 1g當 4倍量의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 以下 K.P. buffer로 略함)를 加하여 氷冷下에서 glass teflon homogenizer로 磨碎하였다. 이 磨碎 均質液을 600×g에서 10分間 遠心分離하여 核 및 未磨碎部分을 除去한 上澄液을 얻고 이것을 다시 10,000×g에서 20分間 遠心分離하여 mitochondrial fraction을 얻었다. 한편, mitochondrial fraction을 除去시킨 上澄液을 105,000×g에서 1時間 동안 超遠心分離하여 cytosolic fraction을 分離한 후 aldehyde oxidase 및 xanthine oxidase 活性 測定의 酵素源으로 사용하였다. 以上の 모든 操作은 0~4℃에서 行하였다.

## 4) 酵素 活性의 測定

### ① Aldehyde oxidase 活性 測定

Rajagopalan 등<sup>23)</sup>의 方法에 依해 0.1 M K.P.

buffer (pH 7.5) 一定量에 基質인 N-1-methylnicotinamide 1.5 mM과 酵素液을 添加해 37℃에서 20分間 反應시킨 다음 20% trichloroacetic acid (TCA)를 加해 反應을 終了시킨 後 生成된 pyridone을 波長 300nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 酵素의 活性度를 算定하였다. 酵素의 活性度는 1分當 1 mg의 蛋白質이 生成시킨 pyridone의 量을 nmole로 나타내었다.

### ② Xanthine oxidase 活性 測定

Stirpe 등<sup>24)</sup>의 方法에 準하여 0.1M K.P. buffer (pH 7.5) 一定量에 基質인 xanthine 60 μM 및 酵素源을 添加하여 37℃에서 5分間 反應시킨 다음 20% TCA를 加하여 制蛋白시키고 遠心分離하였다. 이때 生成되어진 uric acid를 波長 292nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 xanthine oxidase (type O)의 活性度를 算定하였다. 한편, xanthine dehydrogenase (type D)의 活性은 type O의 活性 測定 反應液에 coenzyme인 NAD<sup>+</sup> 100mM을 添加해 同一하게 反應시킨 다음 測定하여 나온 活性度 (total type: type D+O)에서 type O의 活性을 減한 값으로 算定하였다. 酵素의 活性度는 1分當 1mg의 蛋白質이 生成시킨 uric acid 量을 nmole로 나타내었다. 한편, xanthine oxidase의 型轉換比 算出은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine oxidase 反應에서 얻어진 酵素의 活性度를 利用하여 xanthine dehydrogenase (type D)에서 xanthine oxidase (type O)로의 型轉換 比率을 O/O+D의 比로 算出하였다.

## 5) 過酸化脂質 含量 測定

Ohkawa 등<sup>25)</sup>의 方法에 準하여 腦 組織 磨碎均質液 一定量에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thio-barbituric acid (TBA) 溶液을 加해 95℃에서 1時間동안 反應시키고 室溫으로 冷却한 다음 生成된 紅色의 TBA reactive substance를 n-

Butanol : Pyridine (15:1) 混液으로 履行시켜 波長 532 nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 定量하였다. 한편, in vitro 實驗에서는 Haber-W-eiss 反應<sup>26)</sup>을 利用하여 Fe(II)과 xanthine-xanthine oxidase system을 添加시킨 反應液에 濃度를 달리한 鹿茸 藥鍼液을 添加시켜 反應시킨 後 生成된 malondialdehyde (MDA)의 含量을 測定하였다. 過酸化脂質의 含量은 蛋白 1 mg當 MDA의 量을 nmole로 나타내었다.

### 6) 蛋白質의 定量 및 統計 處理

Lowry 등<sup>27)</sup>의 方法에 準하여 bovine serum albumin을 標準品으로 하여 蛋白質을 定量하였다. 한편, 實驗 結果의 有意性 檢證은 Student's t-test를 利用하여 比較하였다.

## III. 成績

### 1. 시험관내에서 과산화지질 생성 변화

정상상태의 뇌조직에서 과산화지질 함량은  $23.07 \pm 0.08$  nmoles/g of tissue이었으나, 1 ml의 반응액 중에 50  $\mu$ l의 鹿茸 藥鍼液을 첨가시킨 경우 과산화지질의 함량이  $22.28 \pm 0.10$  nmole, 100 $\mu$ l인 경우는  $21.42 \pm 0.15$  nmoles/g of tissue, 200  $\mu$ l를 첨가시켰을 때는  $19.75 \pm 0.09$  nmole, 300  $\mu$ l를 첨가시켰을 때는 과산화지질의 생성량이  $17.04 \pm 0.12$  nmole로서 대조치에 비하여 유의성 있는 감소 현상을 볼 수 있었다 (Fig.1).

### 2. 시험관내에서 Fe(II)에 의해 유도된 과산화지질 생성 변화

Haber-Weiss 반응을 이용하여 지질의 과산화를 촉진한 경우, 대조치는  $50.65 \pm 0.34$  nmoles/g of tissue인 반면, 반응액 중에 鹿茸 藥鍼液을 50  $\mu$ l 첨가시켰을 때 과산화지질의 함량이  $48.04 \pm$

0.29 nmoles/g of tissue이었으며, 100 $\mu$ l 첨가의 경우는  $42.29 \pm 0.38$  nmoles, 200  $\mu$ l의 경우는  $36.23 \pm 0.33$  nmoles, 300  $\mu$ l를 첨가시킨 경우는  $31.40 \pm 0.27$  nmoles로 대조치에 비하여 각각 6%, 17%, 29% 및 39% 정도 현저한 함량 감소 현상을 관찰할 수 있었다(Fig.2).

### 3. 시험관내에서 xanthine oxidase 활성 변화

Xanthine oxidase 활성은 type O의 경우 대조치의 활성이  $0.130 \pm 0.012$  nmoles인데 비해 鹿茸 藥鍼液의 첨가량이 25 $\mu$ l/ml의 농도에서  $0.072 \pm 0.011$  nmoles로 대조치에 비해 약 45% 정도 현저하게 억제되었으며 첨가 용량이 50 $\mu$ l/ml에서는  $0.047 \pm 0.006$  nmoles, 100 $\mu$ l/ml에서는  $0.017 \pm 0.005$  nmoles, 200 $\mu$ l/ml의 농도에서는  $0.010 \pm 0.003$  nmoles로 대조치에 비해 모두 약 64%, 87%, 93% 정도 유의성 있게 억제됨을 알 수 있었다. Type D+O의 경우도 효소 활성이 鹿茸 藥鍼液의 첨가 용량에 따라 대조치와 비교하였을 때 유의성 있는 활성 억제 효과가 관찰되었다(Fig.3).

### 4. 시험관내에서 xanthine oxidase 형전환비 변화

xanthine oxidase의 type D로 부터 type O로의 형전환비를 관찰하였을 때 대조치가  $40.1 \pm 1.74\%$ 인데 비하여 鹿茸 藥鍼液을 25  $\mu$ l/ml를 첨가시켰을 때는  $27.7 \pm 0.65\%$ , 50  $\mu$ l/ml를 첨가시킨 경우는  $19.7 \pm 0.88\%$ , 100  $\mu$ l/ml를 첨가시킨 경우는  $13.1 \pm 0.64\%$ , 200  $\mu$ l/ml를 첨가시킨 경우는  $12.8 \pm 0.52\%$ 로 첨가 농도에 의존적으로 xanthine oxidase의 형전환을 현저하게 억제시킴을 관찰할 수 있었다(Fig.4).

### 5. 시험관내에서 aldehyde oxidase 활성 변화

Aldehyde oxidase 활성은 대조치가  $0.33 \pm 0.07$  nmole이었으며 鹿茸 藥鍼液의 첨가량을 200 $\mu$ l까지 증가시켜도 별다른 영향을 미치지 않았다(Fig.5).

### 6. 뇌 허혈/재관류에 따른 과산화지질 함량 변화

생리식염수만을 투여한 정상군의 과산화지질의 함량은  $23.07 \pm 1.96$ nmoles 이었으며 허혈/재관류 실험으로 조직 손상을 유발시킨 실험군의 경우는  $34.61 \pm 2.20$ nmoles로서 정상군에 비해 약 50% 정도의 유의성 있는 함량 증가 현상이 관찰되었다. 그러나, 鹿茸 藥鍼液을 전처치한 후 허혈/재관류 실험을 실시한 실험군은  $27.78 \pm 1.49$ nmoles로 유의한 함량 감소 현상을 관찰할 수 있었다(Fig.6).

### 7. 뇌 허혈/재관류에 따른 xanthine oxidase 활성 변화

정상군의 경우 type O의 활성이  $0.130 \pm 0.014$  nmole 이었으나 허혈/재관류 실험군은  $0.192 \pm 0.016$ nmoles로서 정상군에 비해 약 48% 정도의 활성 증가현상을 관찰할 수 있었다. 鹿茸 藥鍼液을 전처치한 후 허혈/재관류를 유도한 실험군의 경우는  $0.150 \pm 0.010$ nmoles로 나타나 허혈/재관류에 의해서 증가되었던 효소 활성이 유의성 있게 억제되었다. Total type(type D+O)의 경우는 정상군, 허혈/재관류군과 녹용전처치 실험군 사이에 별다른 변화를 관찰할 수 없었다(Fig.7).

### 8. 뇌 허혈/재관류에 따른 xanthine oxidase 형전환 변화

정상군에서 뇌 조직중의 xanthine oxidase 형전환비는  $40.0 \pm 2.7\%$ 였으나 허혈/재관류 유발 실험군의 경우는  $61.1 \pm 4.8\%$ 로 정상군에 비해서 약 50% 이상의 형전환 증가 현상을 관찰할 수 있었다. 그러나, 鹿茸 藥鍼液을 전처치한 후 허혈/재관류를 유도한 경우는 xanthine oxidase의  $47.5 \pm 2.5\%$ 로 정상 수준으로 회복되어짐을 관찰할 수 있었다(Fig.8).

### 9. 뇌 허혈/재관류에 따른 aldehyde oxidase 활성 변화

정상상태에서 aldehyde oxidase 활성은  $0.33$

$\pm 0.07$ nmole이었지만 허혈/재관류 조건에서는  $0.40 \pm 0.05$ nmoles로 약 20% 정도의 활성 증가 현상이 나타났으나 유의성은 없었다. 鹿茸 藥鍼液을 전처치한 후 허혈/재관류 실험을 행한 경우의 효소 활성은  $0.36 \pm 0.05$ nmoles로서 허혈/재관류 실험군에 비해서 약간 억제되는 경향은 있었지만 큰 변화는 관찰할 수 없었다(Fig.9).

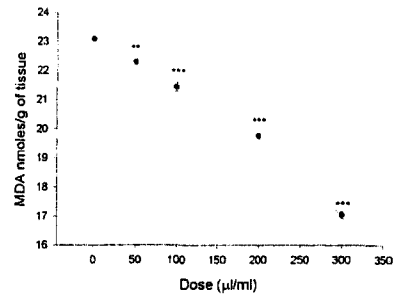


Fig. 1. Effect of *Cervus elaphus* extract *in vitro* on lipid peroxidation in brain tissue. It was measured for 1 hr. at 95°C in brain tissues treated with various dose of *Cervus elaphus* extract. Values are mean  $\pm$  S.E. for 4 separate experiments. Significantly different from control. \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

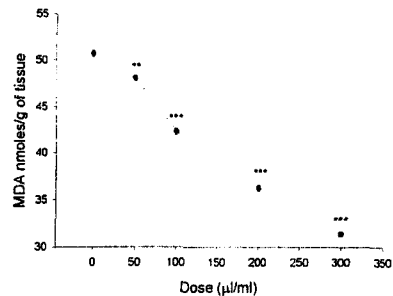


Fig. 2. Effect of *Cervus elaphus* extract *in vitro* on Fe(II)-induced lipid peroxidation in brain tissue. It was measured for 1 hr. at 95°C in brain tissues treated with Fe(II). Values are mean  $\pm$  S.E. for 4 separate experiments. Significantly different from control. \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

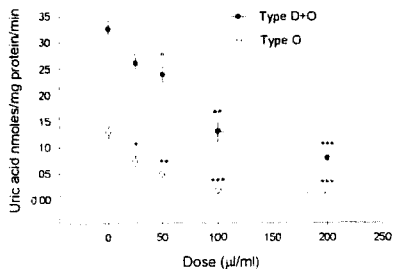


Fig. 3. Effect of *Cervus elaphus* extract *in vitro* on xanthine oxidase activity in brain tissue. It was measured in brain tissues treated with various dose of *Cervus elaphus* extract. Values are mean  $\pm$  S.E. for 4 separate experiments. Significantly different from control. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , Type O : xanthine oxidase, Type D+O : xanthine oxidase + xanthine dehydrogenase

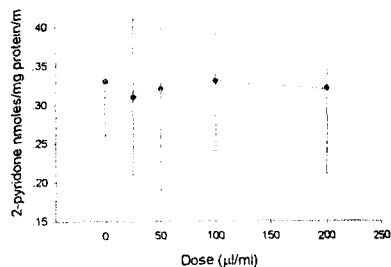


Fig. 5. Effect of *Cervus elaphus* extract *in vitro* on aldehyde oxidase activity in brain tissue. It was measured in brain tissues treated with various dose of *Cervus elaphus* extract. Values are mean  $\pm$  S.E. for 4 separate experiments.

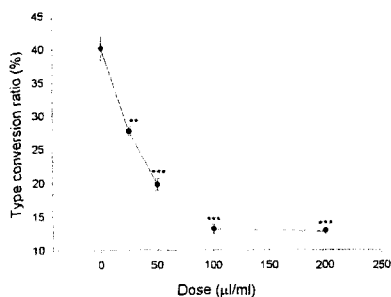


Fig. 4. Effect of *Cervus elaphus* extract *in vitro* on type conversion of xanthine oxidase in brain tissue. It was measured in brain tissues treated with various dose of *Cervus elaphus* extract. Values are mean  $\pm$  S.E. for 4 separate experiments. Significantly different from control. \*\*\*  $P < 0.001$

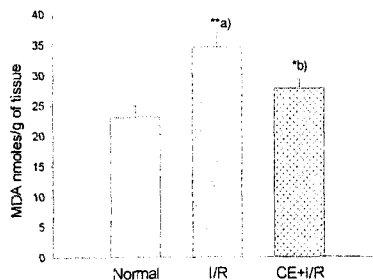


Fig. 6. Effect of *Cervus elaphus* extract on lipid peroxidation following ischemia and reflow in rat's brain. Before I/R was caused, *Cervus elaphus* extract was applied 0.2ml per 250g through femoral vein in I/R groups and normal saline was applied in control group. Ischemia was caused by cervical artery's clamp for 30 min and reflowed by clamp remove after 15 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

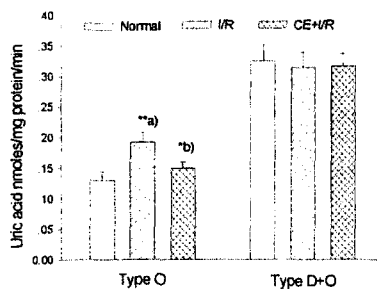


Fig. 7. Effect of *Cervus elaphus* extract on xanthine oxidase activity following ischemia and reflow in rat's brain. The assay procedure was described in Fig. 6. Values are mean  $\pm$  S.E. for 10 animals. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , a) Significantly different from normal, b) Significantly different from I/R group. I/R : Ischemia and reflow group, CE : *Cervus elaphus*-treated group

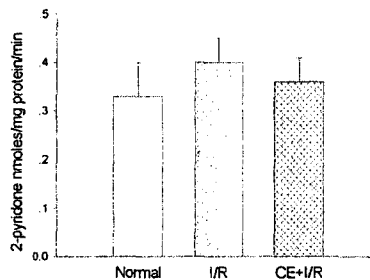


Fig. 9. Effect of *Cervus elaphus* extract on aldehyde oxidase activity following ischemia and reflow in rat's brain. The assay procedure was described in Fig. 6. Values are mean  $\pm$  S.E. for 10 animals. I/R : Ischemia and reflow group, CE : *Cervus elaphus*-treated group

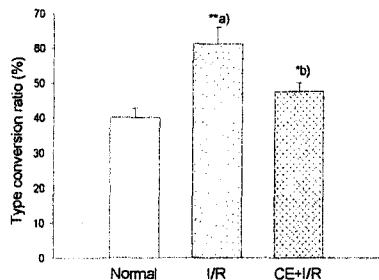


Fig. 8. Effect of *Cervus elaphus* extract on type conversion of xanthine oxidase following ischemia and reflow in rat's brain. The assay procedure was described in Fig. 6. Values are mean  $\pm$  S.E. for 10 animals. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , a) Significantly different from normal, b) Significantly different from I/R group. I/R : Ischemia and reflow group, CE : *Cervus elaphus*-treated group

## IV. 考 察

鹿茸은 神農本草經<sup>15)</sup>에 “味甘溫, 無毒, 治漏下惡血, 寒熱驚癇, 益氣強志, 生齒不老”이라고 最初로 記錄된 以後, 壯腎陽, 益精血, 強筋骨, 調衝任, 托瘡毒 등의 效能이 있어 驚癇, 虛勞如瘡, 小便數利, 瘀血在腹, 陽痿滑精, 宮冷不孕, 羸瘦神疲, 畏寒, 眩暈耳聾, 腰脊冷痛, 筋骨痿軟, 崩漏帶下, 陰疽不斂 등의 病證에 널리 활용되어 왔다<sup>16,17)</sup>. 成分은 一般 分析值로 水分 約 10%, 有機酸 約 50%, 水溶性 ext. 約 10%, 알콜 ext. 約 1.5%, 에테르 ext. 約 1.0%, 灰分 約 3.5%으로 構成되어 있으며, 좋은 品質일수록 有機酸, 水溶性 ext., 알콜 ext., 에테르 ext.의 含量은 많고 灰分量은 적은 것으로 알려져 있다<sup>28)</sup>.

構成成分 中 밝혀진 것으로는 proline, alanine, glutamic acid, leucine, arginine, lysine, serine, threonine 등 17種의 아미노산과 galactose, glucose, mannose, fucose, deoxy-ribose, ribose, arabinose, xylose 등의 糖類와 Ca, Mg, P, Fe, Na, Al, Ni, Si, Mn 등 22種의 minerals



가 確認되었고, 그밖에 neutral lipid, glycolipid, phosphoid, sphingomyelin, gangliosides 등의 物質이 檢出되었다고 報告되고 있다<sup>29,30)</sup>. 또한, 鹿茸의 velvet層에서 數種의 prostaglandin을 檢出하였고<sup>31)</sup>, 鹿茸中の 호르몬과 主成分을 處理하여 pantocrin이라는 物質을 抽出하여 脂肪酸 造成을 分析 比較하고 臨床 實驗한 結果, 人體의 神經系統의 機能改善과 老化防止 및 傷處治療에 效果가 있음이 報告되었으나<sup>30,32-34)</sup>, 이들 成分中 鹿茸의 藥效를 代表할 만한 成分은 규명되지 못한 실정이다.

地球上에 存在하는 모든 生命體는 살아가기 위한 方便으로 에너지원을 얻기 위하여 生體內에서 酸素를 利用한 呼吸反應 즉, 酸化反應을 必須적으로 同伴하여야 한다. 生體가 生命現狀을 持續하기 위하여 酸素를 利用한 呼吸反應이 이루어지는 동안 體內에서는 酸化反應의 副產物로 oxygen free radical (活性酸素)이 生成되어진다<sup>3)</sup>.

活性酸素에는 superoxide anion radical, hydroxyl radical( $\cdot\text{OH}$ ), hydrogen peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), singlet oxygen( $^1\text{O}_2$ ) 등이 알려져 있는데<sup>6-8)</sup>, 이들은 生體內에서 매우 불안정한 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한다<sup>3,14)</sup>.

특히, 최근에는 뇌경색, 뇌외상 등과 같은 손상 후의 뇌기능 장애에 미치는 활성 산소의 역할이 주목을 받고 있다. 中樞 神經系는 細胞膜에 不飽和脂肪酸이 豊富하여 활성 산소들에 의해 손상을 받기 쉬우며, free radical을 除去하는 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione peroxidase 등의 酵素가 적고, 또한 free radical을 形成하는데 作用하는 iron이 豊富하여 free radical의 損傷에 의한 可能性이 높다<sup>35)</sup>.

따라서 著者は 鹿茸 藥鍼液이 뇌조직 손상에 항산화 효능과 관련하여 효과를 나타낼 수 있는지를 검토하고자 먼저 시험관내에서 脂質의 過酸化反應과 活性酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 영향을 관찰하였다.

過酸化脂質은 細胞膜에 多量 存在하고 있는 脂質의 多價不飽和脂肪酸이 活性酸素類들의 攻擊을 받아 酸化反應이 連鎖적으로 이루어지므로 膜이 損傷을 입게 되어 生成되는데 이때 細胞膜의 破壞로 因한 細胞損傷이 나타난다고 한다<sup>36)</sup>. 따라서 細胞膜 損傷 즉, 細胞毒성을 測定하는 하나의 일반적 方法으로 脂質의 過酸化反應을 이용할 수 있다.

먼저, 試驗管內에서 脂質의 過酸化反應을 測定하는 反應液中에 鹿茸 藥鍼液의 用量을 변화시켜가면서 添加시키고 腦組織에서 過酸化脂質의 含量을 觀察한 結果, 鹿茸 藥鍼液의 添加 用量에 比例하여 過酸化脂質의 生成이 抑制되는 것을 볼 수 있었다. 한편, xanthine/xanthine oxidase system과 Fe(II)을 共存시킨 狀態에서 人爲적으로 脂質 過酸化反應을 촉진시킨 實驗 모델인 Haber Weiss 反應<sup>26)</sup>에서는 鹿茸 藥鍼液의 添加 用量에 比例하여 正常狀態의 過酸化脂質 生成 억제작용보다 더욱 강한 억제作用을 관찰할 수 있었다. 이러한 結果는 鹿茸 藥鍼液이 腦 組織에서 脂質의 過酸化를 억제하므로써 腦의 組織 損傷을 防止하는 效果가 있음을 意味하는 것으로, 正常狀態 보다는 生體內的 病態生理 條件이 附與된 疾病誘發狀態에서 더욱 敏感하게 作用을 나타내고 있음을 보여준다.

試驗管內에서 鹿茸 藥鍼液에 依한 過酸化脂質 生成 억제 效果의 作用機轉을 검토하기 위하여 대표적인 活性酸素 生成系 酵素인 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase 活性<sup>11)</sup>에 미치는 영향을 관찰하였다. Xanthine oxidase나 aldehyde oxidase는 生體 大部分의 組織細胞에 分布하고 있으며 細胞의 可溶性 分劃에 주로 存在한다. 이 酵素는 中心金屬 이온으로서 몰리브덴을 含有하고 있으며 分子量이나 性狀이 대단히 유사하며 生體內에서는 주로 酸化反應을 觸媒하는 것으로 알려져 있다<sup>23,37)</sup>. 이 酵素들에 의해서 酸化反應이 進行되는 동안 分子上의 酸素로부터 superoxide anion이나 hydroxyl radical 같은 活性酸素들이

生成된다고 報告되고 있다<sup>11)</sup>.

鹿茸 藥鍼液을 試驗管內에 添加하고 酵素液과 基質을 加하여 xanthine oxidase 活性 變化를 관찰하였을 때, 酵素 活性을 유의성 있게 억제하였는데 type O의 活性이 total type (D+O) 活性의 억제 정도보다 強하였다. 또한, type D로 부터 type O로의 型轉換比도 鹿茸 藥鍼液의 添加 用量에 比例하여 유의성 있게 억제되었다.

Xanthine oxidase와 機能이나 性狀面에서 대단히 유사한 酵素<sup>23)</sup>인 aldehyde oxidase의 活性에 대한 鹿茸 藥鍼液의 影響을 관찰하였을 때는 xanthine oxidase의 경우와 다르게 거의 反應하지 않음을 알 수 있었다. 腦 組織에서 鹿茸 藥鍼液에 의해 xanthine oxidase는 매우 敏感하게 作用하였지만 aldehyde oxidase 活性은 아무런 影響을 받지 않은 것으로 보아 鹿茸 藥鍼液은 xanthine oxidase에 선택적으로 作用하여 活性酸素類의 生成을 억제시킨 것으로 思料되어진다.

Xanthine oxidase는 正常的인 生體內에 存在할 때 type D (dehydrogenase型)로 存在하다가 蛋白質 分解酵素의 作用이나 虛血狀態 또는 病的狀態가 되면 type O (oxidase型)로 型轉換이 이루어지며 이때 活性酸素가 生成되어진다고 報告되어 있다<sup>38)</sup>. 따라서, 鹿茸 藥鍼液은 xanthine oxidase 活性和 型轉換比의 억제를 통하여 活性酸素類의 發生을 억제시키고 아울러 이러한 作用 때문에 過酸化脂質의 生成이 억제되어진 것으로 생각되어진다.

In vitro 實驗에서 鹿茸 藥鍼液이 脂質의 過酸化로 因하여 유발되는 細胞毒性에 대하여 防禦效果가 있음을 알 수 있었는데, 腦組織의 虛血/再貫流에 의한 組織 損傷에는 어떠한 작용을 나타내는 지 관찰하였다.

生體 臟器에서 血液供給의 장애로 초래되는 虛血은 組織學的 損傷을 가져오는데, 이 虛血로 인한 組織損傷은 虛血 期間에서 보다 虛血 後 再貫流時에 酸素가 豊富한 血液이 再供給되어 急速히 活性酸素들의 生成이 增加되므로 더 큰 損傷을 입

는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>.

虛血 狀態에서는 細胞膜의 保護를 위한 ATP의 消耗가 增加되고<sup>39,40)</sup>, 또한 細胞內로 calcium 이온의 流入으로 nicotinamide adenine dinucleotide를 電子收用體로 利用하는 xanthine dehydrogenase로부터 酸素를 電子收用體로 이용하는 酸化反應 過程에서 活性酸素를 生成시키는 xanthine oxidase로의 型轉換이 이루어진다<sup>38)</sup>. 再貫流時에는 虛血狀態時 細胞內에 蓄積된 hypoxanthine이 xanthine oxidase에 依하여 xanthine과 uric acid로 轉換되면서 매우 毒性이 強한 superoxide anion radical을 生成하고 連鎖적으로 活性酸素들을 生成함으로써 細胞膜의 磷脂質에 作用하여 過酸化시켜 膜의 構造變形과 機能喪失을 유발하므로 組織 損傷을 일으킨다고 한다<sup>4,9,26,40)</sup>.

虛血 後 再貫流 損傷에 대한 研究는 1960年代 Danforth 등<sup>41)</sup>이 心筋의 虛血 後 再貫流에서 A-TP의 變化에 대하여 관찰한 바가 있고, Jennings 등<sup>42)</sup>이 心筋의 虛血/再貫流後 電氣生理學的 變化和 構造的인 變化를 관찰하였으며 그 以後 肝<sup>43)</sup>, 肺<sup>44)</sup>, 腎臟<sup>45)</sup>, 腸<sup>46)</sup>, 脾臟<sup>47)</sup> 등의 여러 기관에서 臟器移植時 虛血/再貫流 損傷의 억제에 대한 研究나 活性酸素類와 關聯된 疾病에 대한 研究가 활발하게 進行되고 있다<sup>48)</sup>.

活性酸素들에 의해 나타나는 대표적인 毒性 指標인 過酸化脂質의 含量은 腦組織에서 虛血/再貫流 損傷에 의하여 약 50% 정도 유의성 있게 增加하였다. 이러한 結果는 전<sup>49)</sup>의 보고와 유사하게 나타나 허혈성 뇌손상에 지질의 과산화 반응이 관여했음을 알 수 있는 것이다. 그러나, 鹿茸 藥鍼液을 前處置한 後 虛血/再貫流를 實施한 實驗群은 過酸化脂質의 含量이 正常群의 約 20%로 增加한 것으로 나타나 鹿茸 藥鍼液이 腦組織에서 脂質의 過酸化를 억제하여 oxygen free radicals에 의한 細胞組織 損傷을 豫防하는 效能이 있음을 알 수 있었다.

虛血/再貫流를 實施한 對照群의 腦組織에서 xanthine oxidase 活性和 型轉換比를 관찰하였

을 때, type O의 活性이 正常群에 비하여 約 48% 增加하였으며 이와 더불어 xanthine oxidase의 型轉換比도 約 50% 유의성 있게 增加되었다. 그러나, 鹿茸 藥鍼液를 前處置한 實驗群에서는 虛血/再貫流로 增加되었던 type O의 活性과 型轉換比가 거의 正常群 水準으로 恢復되는 傾向을 나타내었다.

한편, 物理化學的 性狀이 xanthine oxidase와 거의 유사한 酵素인 aldehyde oxidase의 活性은 虛血/再貫流에 의해서 별다른 變化가 없었다. 이러한 成績으로 볼 때 鹿茸 藥鍼液은 生體內에서 xanthine oxidase의 type O의 活性과 型轉換을 선택적으로 억제하여 活性酸素의 生成을 沮害하므로 活性酸素에 의한 細胞損傷으로부터 生體를 防禦하는 作用을 나타내는 것으로 思料된다.

以上の 結果들을 綜合하여 볼 때, 鹿茸 藥鍼液은 試驗管内에서 뿐만 아니라 生體內的 腦組織에서 抗酸化作用을 나타내고 있으며 그 作用 機轉은 xanthine oxidase 活性과 型轉換 억제에 의한 活性 酸素의 生成 억제와 연관될 것으로 추정되나 정확한 기전은 분해계 효소 활성화 등에 대한 실험 연구를 통해 밝혀질 것으로 생각된다.

## V. 結 論

鹿茸 藥鍼液이 뇌조직 손상에 대하여 항산화 효과와 관련하여 어떤 영향을 나타내는 지를 검토하기 위하여 시험관내에서 지질의 과산화반응과 허혈/재관류에 의한 뇌조직 손상을 유발한 후 활성산소의 생성계 효소 활성화에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시험관내에서 과산화지질의 생성은 鹿茸 藥鍼液의 첨가 용량에 비례하여 유의성 있게 억제되었다.
2. 시험관내에서 xanthine oxidase 활성화와 형

전환비는 鹿茸 藥鍼液의 첨가 용량에 의존적으로 유의성 있게 억제되었다.

3. 허혈/재관류에 의한 조직 손상으로 과산화지질의 생성은 약 50% 증가되었으나 鹿茸 藥鍼液의 전처치에 의하여 유의성 있게 회복되었다.

4. 혈/재관류 조직 손상으로 xanthine oxidase의 type O 활성화와 형전환비는 각각 48%, 50% 증가하였으나 鹿茸 藥鍼液의 전처치로 유의성 있게 감소되었다.

5. Aldehyde oxidase 활성화는 鹿茸 藥鍼液의 처치에 의해 시험관내, 허혈/재관류로 인한 조직 손상 실험 모두에서 특별한 變化가 없었다.

## 參考文獻

1. Skarphedinsson, J. O., Stage, L. and Thoren, P. : Cerebral function during hypotensive haemorrhage in spontaneously hypertensive rats and wistar Kyoto rats. Acta. Physiol. Scand., 1989;128: 445~452.
2. McCord, J. M. : Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N. Engl. J. Med., 1985;312(3): 159~163.
3. Cutler, R. G. : Antioxidants, aging and longevity. Free Radicals in Biology, Academic Press, 1984;6: 371~424.
4. Floyd, R. A : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FA-SEB. J., 1990;(9): 2587~2597.
5. Reiter, R. J. : Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. FASEB. J., 1995;9(7): 526~533.
6. Halliwell, B. : Oxidants and the central nervous system : some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Park-

- inson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta. Neurol. Scand.*, 1989;126: 23~33.
7. 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.
  8. David, R. : Mechanistic toxicology: A radical perspective. *J. Pharm. pharmacol.*, 1989;41: 505~511.
  9. Barry, H. : Oxidants and human disease : Some new concepts. *FASEB. J.*, 1987;1: 358~364.
  10. Beauchamp, C. and Fridovich, I. : A mechanism for the production of ethylene from methional : The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1970;245: 4641~4646.
  11. 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.
  12. McCord, J. M. : Free radical and inflammation : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, 1974; 185:529~531.
  13. Froh, L., Gunzler, W. A. and Schock, H. H.: Glutathione peroxidase : A selenoenzyme. *FEBS Lett.*, 1973;32: 132~134.
  14. Ramzi, S. C., Vinay, K. and Stanley, L.R. : Robbins pathologic basis of disease, 4th edi., W.B. Saunders Company, 1989; 9~12.
  15. 馬繼興 主編 : 神農本草經輯注, 北京: 人民衛生出版社, 1995: 312.
  16. 李時珍 : 本草綱目(校點本) 下冊, 北京: 人民衛生出版社, 1982; 2847~2848.
  17. 唐慎微 編著 : 重修政和經史證類備用本草, 臺北: 南天書局有限公司, 1976: 376.
  18. 張明淮, 陳維華, 徐國龍 : 心-腦-神志病辨證論治, 哈爾濱: 黑龍江科學技術出版社, 1988; 105,111.
  19. 田金洲 主編 : 中醫老年病學, 天津: 天津科學技術出版社, 1994; 17,60.
  20. 張天, 陳以平 主編 : 實用中醫腎病學, 上海: 上海中醫藥大學出版社, 1990; 503~513.
  21. 錢百炎, 顧茂瑜, 王成榮 : 中草藥注射劑, 上海: 上海科學技術出版社, 1981: 70~93, 150~151.
  22. Itoh, T., Kawakami, M., Yamaguchi, Y., Schimizu, S. and Nakamura, M. : Effect of allopurinol on ischemia and reperfusion induced cerebral injury in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*, 1986;17(6): 1284~1287.
  23. Rajagopalan, K. V., Fridovich, I. and Handler, P. : Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 1962;237:922~928.
  24. 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.
  25. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95:351~358, 1979.
  26. Milan, L., Jozef, R., Vilian, K., Peter, P. and Ladislav, V. : Free radicals in chemistry and biology, CRC Press, 1989; 29~31, 283~284.
  27. 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.

28. 李仁蘭 : 動物 生藥의 成分, 생약학회지, 1984;15(3): 157.
29. 김영은, 이승기, 윤웅찬, 김정숙 : 녹용의 약효성분에 관한 연구(I), 녹용, 녹각, 고래 코 연골, 상어 척수 연골의 화학조성에 관하여, 한국생화학회지, 1975;8(2): 89~107.
30. 김영은, 임동구, 신승연 : 녹용의 약효성분에 관한 연구(V), 녹용 및 판토크린의 당지질과 인지질의 조성에 대하여, 한국생화학회지, 1977; 10(3): 153~164.
31. 김영은, 이승기, 윤웅찬, 김정숙 : 녹용의 약효성분에 관한 연구(IV), 녹용 벨렐층의 프로스타그란딘의 검출, 한국생화학회지, 1977;10(1): 1~12.
32. 김영은, 이승기, 윤웅찬, 김정숙 : 녹용의 약효성분에 관한 연구(III), 녹용 및 Pantocrin의 지방산 조성에 관하여, 한국생화학회지, 1976 ;9(4): 215~236.
33. Grzimek, Bernhard : Grzimek's animal life encyclopedia, mammals. Van Nostrand Reinhold. N.Y., 1975;V: 154~156.
34. 佐野昌之 外 : 鹿茸抽出"Pantocrin®"の一般藥理作用および抗原性實驗, 應用藥理, 1972;6: 717.
35. Demopoulos, H., S., Flamm, E., S., Seligmann, M., L., Pietronigro, D., D., Tomasula, J. and Decrescito, V. : Further study on free radical pathology in the major central nervous system disorders : Effects of very high doses of methylprednisolone on the functional outcome, morphology and chemistry of experimental spinal cord impact injury. Can. J. Physiol., Pharmacol., 1982; 60: 1415~1424.
36. Pryor, W. A., Stanley, T. P. and Blair, E. : Autoxidation of polyunsaturated fatty acids(II), Lipids, 1976;11: 370~379.
37. Parks, D. A. and Granger, D. N. : Xanthine oxidase : biochemistry, distribution and physiology. Acta Physiol. Scand. 1986;548(Suppl): 87~99.
38. 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.
39. Schwerzmann, K. and Pederson, P. L. : Regulation of the mitochondrial ATP synthesis/ATPase complex. Arch. Biochem. Biophys., 1986;250(1): 1~18.
40. 김성용, 김정희 : 흰쥐의 신허혈에서 HPLC를 이용한 핵산대사산물의 분석, 영남의대학술지, 1992;9(1): 90~101.
41. 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.
42. 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;(1): 68~78.
43. 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.
44. 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.

45. 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.
46. 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.
47. Sanfey, H., Bulkley, G. B. and Cameron, J. L. : The role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann. Surg.*, 1984;200(4): 405~413.
48. 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.
49. 전병윤 : 모래쥐(Gerbil)에서 지속적 및 간헐적 뇌혈류 차단이 뇌부종과 허혈성 신경세포 손상에 미치는 영향, 연세의대 학위논문집, 1994; 177~185.