

원저

## 丹蔘藥鍼液이 腎臟 近位細尿管細胞에서 酸化劑에 의한 磷酸의 移動抑制에 미치는 影響

이호동 · 윤현민 · 장경전 · 송춘호 · 안창범

동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

### Abstract

#### The Effect of Salviae Radix on Oxidant-Inhibition of Phosphate Uptake in Renal Proximal Tubular Cells

Ho-Dong, Lee · Hyoun-Min, Youn · Kyung-Jeon, Jang  
· Choon-Ho, Song · Chang-Beohm, Ahn

Department of Acupuncture & Moxibustion,  
College of Oriental Medicine, Dong Eui University

This study was undertaken to determine if Salviae Radix (SR) exerts protective effect against oxidant-induced inhibition of phosphate uptake in renal proximal tubular cells. Membrane transport function and cell death were evaluated by measuring phosphate uptake and trypan blue exclusion, respectively, in opossum kidney (OK) cells, an established proximal tubular cell line.  $H_2O_2$  was used as a model oxidant.  $H_2O_2$  inhibited the phosphate uptake in a dose-dependent manner over the concentration range of 0.1-0.5 mM. Similar fashion was observed in cell death. However, the phosphate uptake was more vulnerable to  $H_2O_2$  than cell death, suggesting that  $H_2O_2$ -induced inhibition of phosphate uptake is not totally attributed to cell death. Decreased phosphate uptake was associated with ATP depletion and inhibition of  $Na^+$ -pump activity as determined by direct inhibition of  $N^+-K^+$ -ATPase activity.

· 접수 : 2000년 8월 12일 · 수정 : 8월 22일 · 채택 : 8월 26일

· 교신저자 : 송춘호, 부산시 부산진구 양정2동 산45, 동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실(Tel. 051-850-8643)

When cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of 0.05% SR, the inhibition of phosphate uptake and cell death induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was significantly attenuated. SR restored ATP depletion and decreased Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity, and this is likely responsible for the protective effect of SR on decreased phosphate uptake. The protective effect of SR was similar to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger catalase. SR reacts directly with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to reduce the effective concentration of the oxidant. The iron chelator deferoxamine prevented the inhibition of phosphate uptake and cell death induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggesting that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell injury is resulted from an iron-dependent mechanism.

These results indicate that SR exerts the protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced inhibition of phosphate uptake by reacting directly with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, like the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger enzyme catalase, in OK cells. However, the underlying mechanism remains to be explored.

**key words** : Salviae Radix, oxidant-inhibition, phosphate uptake, renal proximal tubular cells

## I. 서론

腎은 先天之本으로서 膀胱과 表裏關係를 이루어 體에 있어서는 骨이 되고 그 華는 毛髮에 있으며 成長發育, 生殖, 水液代謝 등의 機能이 있는데, 이러한 腎의 水液代謝 異常으로 나타나는 臨床症狀는 韓醫學의 觀點에서 關格, 小便不利, 小便不通, 浮腫, 虛損 등의 範疇에 屬한다고 볼 수 있다<sup>1,2)</sup>.

反應性酸素基는 急性腎不全, 腎炎 등과 같은 腎臟 疾患을 일으키는 原因이 되며 生體 細胞膜들은 不飽和 脂肪酸를 많이 함유하고 있기 때문에 反應性 酸素基에 의한 攻撃을 쉽게 받아 脂質의 過酸化가 발생한다<sup>3-7)</sup>. 反應性酸素基는 직접 작용하거나 脂質의 過酸化를 통해서 細胞膜 透過性を 증가시켜<sup>3,8)</sup> 細胞死亡을 일으키므로 이들의 발생을 방지하는 것은 腎臟 疾患의 治療와 豫防에 중요한 關鍵이 된다

고 할 수 있다. 또한 反應性酸素基는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase와 같은 必須 蛋白質과 細胞膜 物質移動系の 機能을 變化시키는데,<sup>9-12)</sup> 이러한 變化는 抗酸化劑에 의해 防止될 수 있다.

丹蔘은 性味が 苦·微寒하고 心·肝에 歸經하며, 活血化瘀, 養血安神, 消炎止痛의 效能으로 心絞痛, 月經不調, 驚悸不眠, 惡瘡腫毒 등을 치료한다<sup>13-15)</sup>. 최근 金 등<sup>16-18)</sup>은 丹蔘藥鍼液이 토끼의 腎臟組織內에서 反應性酸素基에 대해 防禦的 效果를 발휘하고 老齡 小鼠의 superoxide dismutase (SOD) 活性을 증가시키며 免疫機能 중 脾臟細胞를 증가시킴으로써 免疫力를 增強시키는 효과가 있음을 確認하였다.

이에 丹蔘藥鍼液이 腎臟 近位細尿管細胞에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유발된 細胞膜 物質移動의 變化를 防止할 수 있는지를 確認하고자 磷酸移動의 變化, 顆粒體 分屑에서의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性度 變化, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 除去 效果의 變化 등을 測定하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 실험 개요 및 방법

### 1. 丹蔘藥鉍液(Salviae Radix, SR)의 製造

丹蔘 2kg을 잘게 부순 후 methyl alcohol을 역류시켜 4시간 동안 추출하고 總 抽出液은 壓力을 낮춘 상태에서 蒸發시켜 168g으로 만들었다. 50g의 methyl alcohol 추출물은 n-hexane을 이용하여 지방제거를 하였고 이를 다시 물 속에 용해시킨 후 butanol로 추출하여 6.8g을 얻었다.

### 2. OK 細胞의 培養

腎臟 近位細尿管 由來 培養 細胞인 opossum kidney (OK) 細胞는 American Type Culture Collection 社로부터 구입하여 一連의 過程下에 75 cm<sup>2</sup>의 培養菌 플라스크에 보관했다. 細胞는 10% FBS (fetal bovine serum)-DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium /Ham's F12) 배양액에서 37 °C 95% air/5% CO<sub>2</sub>의 조건하에 incubation하여 세포가 confluence에 到達하게 되면 0.02% EDTA-0.05% trypsin 溶液을 이용하여 2차 培養을 하였다. 細胞는 10% FBS를 함유한 DMEM/F12 培養基내의 24-well 組織培養 plates에서 培養했다.

### 3. 移動 實驗

磷酸의 移動은 24-well plate에서 培養된 monolayer를 이용하여 측정하였다. 세포를 酸化劑에 露出시킨 후, 緩衝液을 除去하고 137mM NaCl, 5.4mM KCl, 2.8mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM Hepes를 含有한 緩衝液으로 2번 세척하였다. 세포는 5 μM [<sup>32</sup>P] -phosphate를 含有한 緩衝液에서 37 °C로 30분 동안 incubation하였다.

incubation 후에는 細胞를 ice-cold 緩衝液에 3번 세척하였고, 0.2% Triton X-100 0.5 ml에 녹였다. 移動을 決定하기 위해, 각 sample 0.4 ml를 취하여 液狀의 scintillation counter로 측정하였다. 蛋白質의 容量은 Bradford 方法<sup>19)</sup>에 따라 決定하였고 移動은 細胞蛋白質 mg당 pmole로 表示하였다.

### 4. 細胞의 生存能力

細胞를 24-well dish에서 confluence에 이르기까지 培養하고 37 °C 95% air/5%CO<sub>2</sub> 상태로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 含有한 HBSS에서 120분 동안 incubation한 후 0.025% trypsin을 이용하여 細胞를 분리하였다. 細胞는 4% trypan blue 溶液에 incubation하여 색소 排除 정도를 측정하였는데 색소를 排除하지 못한 細胞들은 사망한 세포로 看做하였고, data는 사망한 細胞의 百分率로 表現하였다.

### 5. ATP 數値의 測定

ATP 數値는 luciferin-luciferase 分析評價法으로 測定하였다. 細胞를 酸化劑에 露出시킨 후 500 μl의 0.5% Triton X-100에 溶解시키고 100 μl 0.6 M perchloric acid에 酸性化시켜 얼음위에 놓았다. 그리고 나서 細胞 浮游物은 4mM MgSO<sub>4</sub>를 담은 10mM 磷酸 칼륨 緩衝液으로 稀釋시켰다. 그리고 10 μl의 稀釋된 sample에 20 mg/ml luciferin -luciferase 10 μl를 追加하였다. light emission은 luminometer를 이용하여 20초 동안 記錄하였다. 蛋白質의 容量은 細胞 sample의 量에 따라 決定되었다.

### 6. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性의 測定

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性은 OK細胞로부터 마련된 microsomal fraction에서 測定하였다. 細胞를 100 mM petri dish에서 confluence에 도달하도록 培養하

였다. 4℃에서 10mM mannitol과 2mM Tris/HCl 안에 있는 petri dish에서 긁어모아 간단히 파쇄시켰다. 그리고 나서 細胞 融解質은 粉碎되지 않은 細胞를 除去하기 위해 2,000g에서 2분동안 遠心分離시켰다. 壓搾 結晶 上段의 軟粉紅層을 除去하고 10ml mannitol과 2mM Tris/HCl에 浮游시켰다. microsomal fraction은 tBHP로 37℃에서 60분동안 處理하고 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase를 測定하였다. ATPase 活性은 無機磷酸鹽을 測定함에 따라 決定하였는데 이는 基質로 作用하는 3mM ATP를 含有하는 적절한 緩衝液으로 microsomal fraction을 incubation하는 동안 ATP 加水分解에 의해 遊離된 것이다. 總 ATPase 活性은 100mM NaCl, 20mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM EDTA와 40mM imidazol로 構成된 溶液속에서 測定하였고, Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性은 K<sup>+</sup>를 除外하고 1.0mM ouaban을 添加하여 測定하였으며 總 ATPase 活性과 Mg<sup>2+</sup>-ATPase 活性의 差異를 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性으로 하였다. 10분 후 incubation이 끝날 때, 冷한 6% pechloric acid를 加하여 反應을 停止시켰다. 反應液을 3,500g에서 10분 동안 遠心分離한 후 上層液 內에 있던 無機磷酸의 濃度를 Fiske와 SubbaRow의 方法<sup>20)</sup>으로 測定하였다. 蛋白質은 Bradford의 方法<sup>19)</sup>으로 測定하였다.

### 7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 除去의 測定

丹蔘藥鍼液이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 직접 反應하는지 評價하기 위해, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 多様な 濃縮을 含有한 培養液에 0.05% 丹蔘藥鍼液을 첨가하여 10분동안 incubation하였다. 吸光度는 240 nm diode spectrophotometer (分光光度計)로 測定하였다. 吸光度가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>自體의 것인지를 알기 위해 catalase의 效果를 동시에 調査하였다.

### 8. 試藥

<sup>31</sup>Phosphate는 American International 社로부터 購入하였다. Catalase와 deferoxamine은 Sigma

Chemical 社로부터 購入했다. N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD)은 Aldrich Chemical 社로부터 購入하였고 다른 試藥들은 市販品中 最高의 것을 使用하였다.

### 9. 統計處理

實驗成績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 p값이 0.05미만일 때 有意한 것으로 判定하였다.

## III. 실험성적

### 1. 移動 實驗

細胞가 120분간 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 多様な 濃度에 露出되었을 때, 磷酸의 移動은 濃度에 依存的으로 抑制되었다 (그림 1). 正常細胞에서 磷酸의 移動은 565.24 ± 23.25 pmole/mg protein/30 min 이었고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

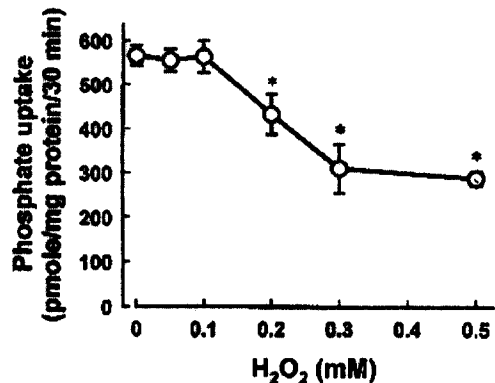


Fig. 1. Dose dependency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effect on phosphate uptake in OK cells. Cells were pre-treated with 0.05-0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 120 min, and then the phosphate uptake was measured for 30 min. Data are mean SE of four experiments. \*p<0.05 compared with the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

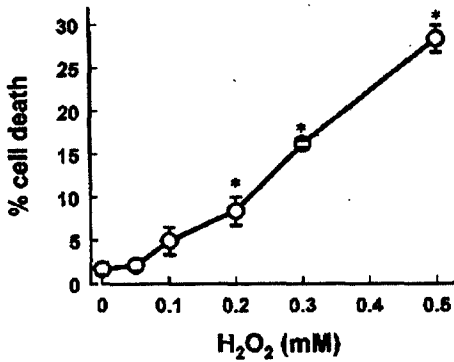


Fig. 2. Dose dependency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effect on cell death in OK cells. Cells were pretreated with 0.05–0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 120 min, and then the cell death was measured by trypan blue exclusion assay. Data are mean SE of four experiments. \*p<0.05 compared with the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

가 0.2, 0.3, 0.5mM일 때 각각 432.55±45.21, 309.43±55.01, 286.96±15.35 pmole/mg protein/30 min으로 현저히 줄어들었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 磷酸移動의 減少가 非可逆의인 細胞損傷 때문인지를 밝히기 위해, 細胞死亡에 대한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 效果를 調査하였다. 그림 2에서 보는 바와 같이, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 濃度에 依存하여 細胞死亡을 일으켰다. 細胞死亡은 正常細胞에서의 1.67±0.69%에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 0.2, 0.3, 0.5mM일 때 각각 8.39±1.68, 16.12±0.42, 28.28±1.59%로 增加하였다. 비록 細胞死亡에 대한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 效果가 磷酸의 移動에서와 같이 濃度에 依存적으로 나타났으나, 磷酸의 移動에 대한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 毒性效果보다도 훨씬 높았다. 移動의 抑制은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 0.2, 0.3, 0.5mM일 때 각각 23.5, 45.3, 49.2%였다. 이는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 誘發한 磷酸移動의 抑制이 部分的으로 細胞死亡과는 관계없는 獨立的인 機轉 때문에 일어남을 意味한다.

다음의 一連의 實驗에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 誘發한 磷酸移動 阻害에 대한 丹蔘藥液의 效果를 調査하였고

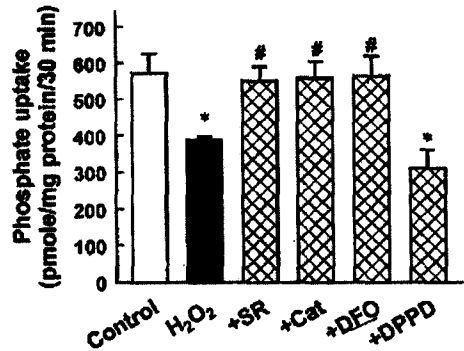


Fig. 3. Effects of Salviae Radix (SR), catalase (Cat), DPPD, and deferoxamine (DFO) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced inhibition of phosphate uptake in OK cells. Cells were pretreated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 120 min in the presence or absence of 0.05% SR, 500 units/ml Cat, 20 μM DPPD, and 2 mM DFO, and then the phosphate uptake was measured for 30 min. Data are mean SE of four experiments. \*p<0.05 compared with the control; #p<0.05 compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone.

이를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 除去酵素인 catalase와 酸化劑의 效果와도 比較하였다 (그림 3). 0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 있을 때 磷酸移動은 對照群의 約 68%인 387.56±10.78 pmole/mg protein/30 min이었다. 그런데, 0.05%의 丹蔘藥液이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 處理된 培養液에 더해졌을 때 移動은 550.38±38.73 pmole/mg protein/30 min으로 增加했는데 이는 對照群의 값과 큰 差異가 나는 것은 아니었다. 同一한 結果가 catalase와 鐵錯鹽劑인 deferoxamine에서도 觀察移 되었다. 흥미롭게도, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 效果는 酸化劑인 DPPD에 의해서는 影響을 받지 않았다. 마찬가지로, 丹蔘藥液, catalase, deferoxamine은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 誘發한 細胞死亡을 방지하였다. 그러나 DPPD는 效果가 없었다(그림 4). 이 實驗에 使用된 DPPD의 濃度는 토끼의 腎臟皮質 薄片에서 酸化劑가 誘發한 細胞損傷과 脂質의 過酸化를 效果의으로 막았던 實驗에서의 濃度와 同一하였다<sup>21)</sup>.

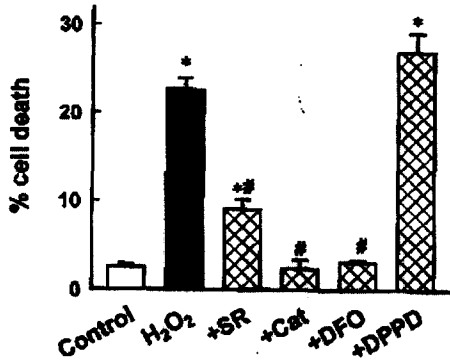


Fig. 4. Effects of Salviae Radix (SR), catalase (Cat), DPPD, and deferoxamine (DFO) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in OK cells. Cells were pretreated with 0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 120min in the presence or absence of 0.05% SR, 500 units/ml Cat, 20μM DPPD, and 2mM DFO, and then the cell death was measured by trypan blue exclusion assay. Data are mean SE of four experiments. \*p<0.05 compared with the control; #p<0.05 compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone.

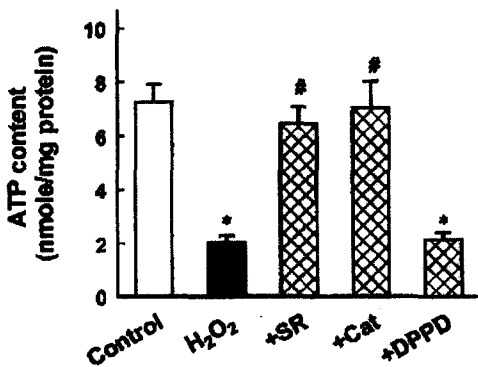


Fig. 5. Effects of Salviae Radix (SR), catalase (Cat), and DPPD on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced depletion of ATP in OK cells. Cells were pretreated with 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 120 min in the presence or absence of 0.05% SR, 500units/m Cat, and 20μM DPPD, and then the ATP content was measured. Data are mean SE of four experiments. \*p<0.05 compared with the control; #p<0.05 compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone.

이전의 연구에서 세포가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 노출되면 近位細尿管細胞에서의 ATP 數値는 減少함을 보였다<sup>22)</sup>. 그러므로 丹蔘藥液이 ATP 枯渴을 遮斷함으로써 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 誘發한 磷酸移動의 阻害를 막을 수 있는지의 與否를 알기 위해 0.05%의 丹蔘藥液이 각각 있을 때와 없을 때에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 露出된 細胞內에서의 ATP 容量을 測定하였다. 그림 5에 보는 바와 같이 ATP 數値는 0.05mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 露出된 細胞內에서 顯著히 減少하였고, 丹蔘藥液 (0.05%)과 catalase(500 units/ml)에 의해서는 상당히 增加하였다. 이는 對照群의 數値와도 큰 差異가 없는 것이었다. 그런데 DPPD는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 誘發한 ATP 枯渴을 막지 못했다.

## 2. microsomal fraction에서의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性

腎臟 近位細尿管細胞에서 磷酸의 移動은 Na<sup>+</sup>와 共同移動을 하기 때문에 Na<sup>+</sup>의 濃度傾斜維持가 磷酸의 移動에 중요하다. 이와 같은 Na<sup>+</sup>의 濃度傾斜는

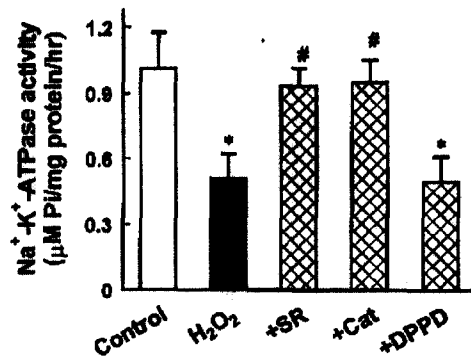


Fig. 6. Effects of Salviae Radix (SR), catalase (Cat), and DPPD on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in microsomal fraction prepared from OK cells. Cells were pretreated with 0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 120 min in the presence or absence of 0.05% SR, 500 units/ml Cat, 20μM DPPD, and 2mM DFO, and then the enzyme activity was measured. Data are mean SE of four experiments. \*p<0.05 compared with the control; #p<0.05 compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone.

Na<sup>+</sup>-pump에 의해서 維持되기 때문에 Na<sup>+</sup>-pump의 活性이 抑制되게 되면 磷酸의 移動이 阻害될 것이다. 따라서 microsomal fraction에서의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性을 측정하였다. 그림 6에 나타난 바와 같이, 對照群에서의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性度는 1.01±0.614 μM Pi/mg protein/hr 였다. 細胞가 丹蔘藥鍼液이나 catalase 存在하에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 露出되었을 때 活性度는 對照群의 數値와 크게 다르지는 않았다. 對照의 爲로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 誘發한 活性度의 阻害는 D-PPD에 의해서는 影響을 받지 않았다.

### 3. 丹蔘藥鍼液에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 除去效果

實驗의 마지막 過程에서, 丹蔘藥鍼液이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 직접 反應하여 酸化劑의 效果의인 濃度를 줄이는지 조사하기 위하여 多樣한 濃度의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 含有한 培養液에서 吸光度의 變化를 0.05% 丹蔘藥鍼液이 있을 때와 없을 때 각각 測定하였다 (그림 7).

240 nm에서 測定된 吸光度는 培養液에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 濃度와 直接的으로 關聯되었고 catalase가 追加됨에 따라 거의 0에 가까이 줄어들었다. 丹蔘藥鍼液

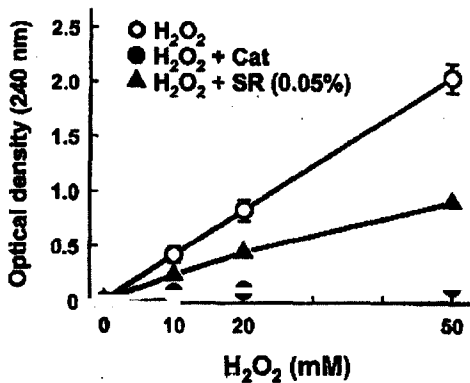


Fig. 7. Effect of Salviae Radix (SR) and catalase (Cat) on the optical density measured at 240 nm in the medium containing various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The optical density was measured in the presence or absence of 0.05% SR or 500 units/ml Cat. Data are mean ± SE of three experiments.

의 追加는 吸光度를 減少시켰는데 이는 丹蔘藥鍼液이 細胞밖에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 直接 相互作用함을 意味한다.

## IV. 고찰

韓醫學에서 腎의 機能은 主藏精, 主骨髓, 主水液, 主納氣로서 이는 西洋醫學의 內分泌系, 泌尿生殖系, 中樞神經系 등의 機能을 廣範하게 包含하고 있으며 人體의 生長 發育과 老衰 및 生殖을 主管하며 水液 代謝를 調節한다.<sup>1,2)</sup>

西洋醫學에서 體液의 維持는 腎臟에서 이루어지며 血液이 絲球體를 通過하는 동안 血球과 血漿蛋白은 絲球體 基底膜에 걸리고 나머지는 細尿管을 通過하게 되는데 Na, Cl, K, glucose, amino acid, phosphate, uric acid, protein 등은 再吸收되고, 나머지 몸에 필요 없는 H, organic acid, p-aminohippuric acid (PAH), phenol red, penicillin 등은 尿의 形態로 體外로 排泄된다.<sup>23,24)</sup>

Na와 水分의 排泄調節 障壁로 浮腫이 오며 이를 惹起하는 疾患으로는 腎症候群, 急性絲球體腎炎 등이 있다.<sup>23)</sup> 이러한 水液代謝 異常으로 나타나는 臨床症狀는 韓醫學의 觀點에서 볼 때 關格, 小便不利, 小便不通, 浮腫, 虛損 등의 範疇에 屬하는 것으로 그 原因은 크게 脾, 肺, 腎의 機能 失調로 說明할 수 있다.<sup>2)</sup>

反應性 酸素基는 直接 作用하거나 脂質의 過酸化를 통해서 細胞膜 透過性을 增加시킴으로써<sup>3,8)</sup> 細胞死亡을 일으켜 腎症候群과 急性絲球體腎炎 등을 일으키는 原因으로 報告되고 있다.<sup>5-7,25)</sup>

본 實驗에 使用된 丹蔘은 꿀풀과에 屬한 多年生 草本植物<sup>13)</sup>로 「本草綱目」<sup>26)</sup>에는 “氣味 苦微寒 無毒 主治心腹邪氣…破癥除瘕止煩…養血去心腹痼疾…調婦人經脈不均…惡瘡腫毒排膿…” 이라 하였고, 「本草秘要」<sup>27)</sup>에는 “味苦氣平…破宿血 生新血 安生胎 墮死胎 調經血 除煩熱” 이라 하였으며, 「中草藥學」

14)에는 “入心 心包 味苦 性微寒 活血化癥 涼血 養血安神”이라 하였고, 主成分은 tanshinone A·B·C, vitamin C, cryptotanshinone 등으로 알려져 있으며<sup>28)</sup> 腦血管 疾患, 高血壓 등에 많이 活用되어 왔다<sup>29,30)</sup>.

한편 張 등<sup>31)</sup>은 丹蔘의 活血化癥效能을 應用하여 家兔의 血液循環을 改善하고 成長收縮力을 增強시키며 組織生成을 調節하고 凝血을 抑制시키는 등의 效果를 거두었으며 丹蔘의 利尿作用으로 腎血流 循環을 促進하여 腎絲球體 濾過率을 增加시켜 急慢性 腎不全에 有效한 效果를 거두었다고 報告하였고, 郭 등<sup>32)</sup>은 老齡 小鼠의 赤血球, 心臟, 肝臟 및 腎臟의 SOD 活性을 增加시키는 效果가 있다고 報告하였다. 최근에 朴 등<sup>33)</sup>은 丹蔘藥鍼이 rhabdomyolysis에 의한 急性腎不全을 防止하는 效果가 있다고 報告하였다.

酸化劑 發生이 增加하거나 抗酸化劑 防禦機轉이 減少하게 되면 酸化劑와 抗酸化劑의 均衡이 파괴되어 細胞損傷이 일어나게 된다. 腎臟 細尿管 細胞에서 酸化劑가 細胞損傷을 일으킬 때 나타나는 초기 반응은 ATP 감소인 것으로 알려져 있다. 반면 細胞體의 용해로 인해 초래되는 細胞死亡은 ATP 감소 이후에 나타난다<sup>9,22,34)</sup>.

本 研究에서 磷酸移動은 酸化劑에 의해 阻害됨을 보이고 있다. 磷酸移動의 阻害는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃도가 0.2mM 보다 높은 농도에서 有意하였으며, 유사한 反應이 細胞死亡에서도 觀察되었다. 그런데 細胞死亡에 대한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 效果의 程度는 磷酸移動阻害에 대한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>效果의 程度보다 낮았다. 이러한 結果는 細胞膜 移動機能의 變化가 細胞死亡보다 더 初期의 反應임을 意味한다. 이러한 結果들은 細胞膜의 機能의 損傷과 非可逆的인 細胞損傷에서의 變化가 腎臟 皮質 薄片에서 서로 다른 機轉에 의해 誘發된다는 假說과 일치한다<sup>21)</sup>.

過酸化물을 파괴하는 酸化酵素인 catalase는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 細胞死亡과 磷酸移動의 減少를 억제시

켰으며 (그림 3,4), 鐵 錯鹽劑인 deferoxamine도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 細胞損傷을 현저하게 방지하는 작용을 나타내었다 (그림 3,4). 이와 같은 結果는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 磷酸移動의 阻害와 세포손상에 鐵이 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다. 동일한 結果가 다른 논문에서도 보고되었다.<sup>9,22)</sup> 脂質의 過酸化는 酸化劑가 誘發한 細胞損傷에 하나의 證據가 된다고 알려져 있다. 그럼에도 불구하고 脂質의 過酸化가 酸化劑로 인해 誘發된 致命的인 細胞損傷에 決定的인 役割을 한다는 것에 대해서는 論難의 餘地가 많다<sup>35-37)</sup>. 脂質의 過酸化는 細胞損傷의 原因이라기 보다는 오히려 細胞損傷의 結果이거나 細胞死亡의 附隨 現象일 수도 있다<sup>38)</sup>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 誘發된 細胞死亡과 磷酸移動의 阻害가 脂質의 過酸化로부터 起因하는 것인지 알아내기 위해 細胞를 抗酸化劑인 DPPD가 있는 狀態에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 處理하였다. 이 DPPD는 높은 效力을 나타내는 腎臟 近位細尿管細胞와 腎臟 皮質薄片에서 酸化劑에 의해 誘發된 細胞損傷을 방지할 수 있는 것으로 알려져 왔다.<sup>21,39)</sup> DPPD는 강력한 抗酸化劑로 잘 알려진 대표적인 물질로서, 독성이 매우 강하여 副作用을 일으키므로 人體에는 사용할 수 없는 것으로 알려져 있다. 脂質의 過酸化가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 誘發된 細胞損傷에 중요한 역할을 한다면 磷酸移動의 阻害와 細胞死亡은 DPPD에 의해 방지될 수 있을 것이다.

그러나 本 研究에서는 磷酸의 移動阻害와 細胞死亡이 DPPD에 의해 影響을 받지 않았다 (그림 3,4). 이러한 結果는 OK 細胞에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 誘發한 細胞損傷은 脂質 過酸化에 의해 영향을 받지 않음을 意味한다.

本 研究에서 세포를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 露出시켰을 때 ATP 枯竭과 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性의 阻害를 가져왔는데 (그림 5,6), 磷酸移動이 細胞內外의 Na<sup>+</sup> 濃度傾斜에 依存하기 때문에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 誘發한 正常 ion 濃度の 變化가 磷酸移動의 減少에 중요한 役割을 했을 것으로 생각된다.



丹蔘藥鍼液을 incubation 培養液에 加했을 때,  $H_2O_2$ 가 誘發한 磷酸移動의 減少와 細胞死亡이 有意하게 방지되었다(그림 3,4). 더불어  $Na^+-K^+-ATPase$  活性 抑制과 ATP 枯渴 또한 방지되었다. 따라서  $H_2O_2$ 가 誘發한 磷酸移動의 減少와 細胞死亡의 減少에 대한 丹蔘藥鍼液의 防禦의인 效果는 ATP 濃度の 回復과  $Na^+-pump$ 의 增加된 活性和 關聯이 있는 것으로 생각된다.

본 研究結果 丹蔘藥鍼液의 防禦 效果는 catalase 의 效果와 同一하였으나 抗酸化劑인 DPPD는  $H_2O_2$ 의 效果에 影響을 주지 못했다. 이러한 結果는 또한 OK 細胞에서  $H_2O_2$ 가 誘發한 細胞損傷이 脂質의 過酸化에 의해 영향을 받지 않음을 나타낸다. 이러한 資料에 基礎하여 볼 때  $H_2O_2$ 가 誘發한 細胞損傷에 있어서 丹蔘藥鍼液의 防禦의 效果는 酸化劑의 效果의인 濃度を 줄이는  $H_2O_2$ 와의 直接的인 反應 때문인 것처럼 보인다. 사실, 本 研究로 볼 때 丹蔘藥鍼液이  $H_2O_2$ 에 대한 吸光度를 減少시키고 잘 알려진  $H_2O_2$  除去酵素인 catalase처럼  $H_2O_2$ 와 直接的으로 反應함을 알 수 있었다.

이러한 結果로 OK細胞에서 丹蔘藥鍼液이 效果的으로  $H_2O_2$ 濃度を 줄임으로써  $H_2O_2$ 가 誘發한 細胞死亡과 磷酸移動의 阻害에 대하여 防止效果를 發揮함을 알 수 있었다. 丹蔘藥鍼液은 抗酸化劑인 DPPD와는 달리 抗酸化劑로서 작용하는 것은 아니고 직접  $H_2O_2$ 를 除去하여  $H_2O_2$ 에 의한 細胞損傷을 防止하였다. 本 實驗에서 酸化劑에 의한 物質移動系의 障礙와 細胞死亡을 磷酸의 移動으로 確認하였는데 丹蔘藥鍼液이 酸化劑에 의해 誘發된 細胞死亡과 物質移動系의 障礙도 防止하고 있었다. 作用機轉을 밝히기 위해 實驗한 바  $H_2O_2$  除去 catalase 효과와도 비슷했으나 抗酸化劑인 DPPD와는 달랐다. 이로써 丹蔘藥鍼液이 抗酸化劑로서 작용하는 것이 아님을 알 수 있었으며, 丹蔘藥鍼液이  $H_2O_2$ 를 직접 除去해서 防禦效果를 나타내는지 밝히기 위해 實驗한 바, 丹蔘藥鍼液이 catalase와 마찬가지로  $H_2O_2$ 를 직접

除去하였다. 따라서 OK細胞에서는 丹蔘藥鍼液이 抗酸化作用보다는  $H_2O_2$ 를 직접 除去하여  $H_2O_2$ 에 의한 細胞損傷과 物質移動系 障礙를 防止함을 알 수 있었다. 그러나, 丹蔘藥鍼液이 어떠한 機轉에 의해  $H_2O_2$  除去效果를 가지는지는 더욱 研究해보아야 할 것이다.

以上的 結果에서 丹蔘藥鍼液은 catalase와 같이  $H_2O_2$ 와 직접 反應하여ATP 濃度を 減少시킴으로써  $H_2O_2$ 에 의한 磷酸의 移動抑制을 防止하는 것으로 생각된다. 따라서 丹蔘藥鍼液은 強力한 抗酸化 效果를 나타내며 腎臟 近位細尿管細胞에서 脂質의 過酸化를 抑制하고 oxidant에 의한 物質移動系障礙를 抑制함으로써 腎臟機能 障礙로 인한 疾患의 防止藥物로 開發될 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 結 論

腎臟 近位細尿管細胞에서 oxidant에 의한 細胞膜 物質移動系의 障礙에 대한 丹蔘藥鍼液의 效果를 實驗하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1.  $H_2O_2$ 는 0.1~0.5mM의 濃度 範圍에서 濃도에 依存的으로 磷酸의 移動을 抑制하였다.
2.  $H_2O_2$ 는 細胞內 ATP 濃度を 減少시키고  $Na^+-pump$  活性을 抑制하였다.
3. 丹蔘藥鍼液은  $H_2O_2$ 에 의한 磷酸의 移動과 細胞死亡을 防止하였다.
4. 丹蔘藥鍼液은  $H_2O_2$ 에 의한 細胞內 ATP 濃度 減少를 防止하였다.
5. 丹蔘藥鍼液은  $Na^+-pump$  活性 抑制을 防止하

였다.

## VI. 참고문헌

1. 金完熙, 崔達永, 「臟腑辨證論治」, 서울, 成輔社, 1985, pp. 85~87, 284~286.
2. 杜鎬京, 「東醫腎系內科學」, 서울, 東洋醫學研究院, 1987, pp. 5~9, 75~79, 205~209, 383, 409~437, 461~462.
3. Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Res.* 59, 527~605.
4. Mead, J. F. (1976). Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes. In *Free Radicals in Biology*(W. Pryor, Ed.), pp. 51 ~ 68. Academic Press, New York.
5. Paller, M.S., Hoidal, J.R., and Ferris, T.F., (1984). Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J. Clin. Invest.* 74, 1156~1164.
6. Rehan, A., Johnson, K. J., Wiggins, R. C., Kunkel, R. G., and Ward, P. A. (1984). Evidence for the role of oxygen free radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab. Invest.* 51, 396~403.
7. Walker, P. D., and Shah, S. V. (1988). Evidence of the role of hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J. Clin. Invest.* 81, 334~341.
8. Arstila, A. U., Smith, M. A., Trump, B. F. (1972). Microsomal lipid peroxidation : Morphological characterization. *Science* 175, 530~533.
9. Andreoli, S. P., McAteer, J. A., Seifert, S. A., and Kempson, S. A. (1993). Oxidant-induced alterations in glucose and phosphate transport in LLC-PK<sub>1</sub> cells: mechanisms of injury. *Am. J. Physiol.* 265, F377~F384.
10. Kako, K., Kato, M., Matsuoka, T., and Mustapha, A.(1988). Depression of membrane-bound Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am. J. Physiol.* 254, C330~C337.
11. Elliott, S. J., and Koliwad, S. K. (1995). Oxidant stress and endothelial membrane transport. *Free Rad. Biol. Med.* 19, 649~658.
12. Jourd'Heuil, D., Vaanen, P., and Meddings, J. B. (1993). Lipid peroxidation of the brush-border membrane: membrane physical properties and glucose transport. *Am. J. Physiol.* 264, G1009~G1015.
13. 辛民教, 「臨床本草學」, 서울, 南山堂, 1986, pp. 372~373.
14. 上海中醫學院 編, 「中草藥學」, 香港, 商務印書館, 1975, pp. 376~378.
15. 陳存仁, 「漢方醫藥大事典」, 서울, 東都文化社, 1984, pp. 154~157.
16. 金尙範, 鄭智天, "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 腎臟 細胞 損傷에 대한 丹蔘抽出물의 防止效果", 大韓韓醫學會誌, Vol.19, no.1, 1998, pp.38~48.
17. 金尙範, 鄭智天, "Oxidant에 의한 腎臟細尿管物質 移動系의 障礙에 대한 丹蔘의 效果", 大韓韓方內科學會誌, Vol. 18, no. 1, 1997, pp. 147~154.
18. 羅京洵, "丹蔘의 免疫 機能에 대한 實驗的 研究", 大田大學校大學院碩士學位論文, 1997.
19. 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, 248~254.
20. Fiske, C. H., and SubbaRow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66,375~400.
  21. Kim, Y. K., and Kim, Y. H. (1996). Differential effect of  $Ca^{2+}$  on oxidant-induced lethal cell injury and alterations of membrane transport functional integrity in renal cortical slices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141, 607~616.
  22. Andreoli, S. P., and McAteer, J. A. (1990). Reactive oxygen molecule mediated injury in endothelial and renal tubular epithelial cells in vitro. *Kid. Int.* 38, 785~794.
  23. 서울대학교 의과대학 편, 「腎臟學」, 서울, 서울대학교 출판부, 1985, pp. 8~10, 96.
  24. 李三悅, 「臨床病理檢査法」, 서울, 연세대학교 출판부, 1979, p. 19,20, 59.
  25. 金永海, 金甲成, 「胡桃藥鍼液이 腎臟細胞에서 oxidant에 의한 損傷에 미치는 影響」, 大韓韓醫學會誌, Vol. 17, no. 1, 1996, pp. 9~20.
  26. 李時珍, 「本草綱目」欽定四庫全書 41, 서울, 大星文化社, 1995, pp. 42~43.
  27. 楊東喜, 「本草秘要解析」, 新竹, 一中社, 1973, pp. 29~30.
  28. 金泰姬 外, 「아세아 본초학」, 서울, 癸丑文化社, 1998, p. 323.
  29. 李尙仁, 「本草學」, 서울, 修書院, 1981, p. 429.
  30. 顏正華, 「中藥學」, 北京, 人民衛生出版社, 1991, pp. 544~549.
  31. 張步振 外, 「丹蔘對 急性腎衰的療效觀察及 機理研究」, 中國醫藥學報, Vol.6, no.2, 1991, pp.26~27.
  32. 郭忠興 外, 「丹蔘對老齡小鼠 SOD和 LPO的 影響」, 中成藥, 1993, 15(11):27~28.
  33. 朴世貞 外, 「丹蔘藥鍼液이 Rhabdomyolysis에 의한 急性腎不全에 미치는 影響」, 大韓鍼灸學會誌, Vol.16, no.2, 1999, pp. 233~240.
  34. Lash, L. H., and Tokarz, J. J. (1990). Oxidative stress in isolated rat renal proximal and distal tubular cells. *Am. J. Physiol.* 259, F338~F347.
  35. Masaki, N., Kyle, M.E., Serroni, A., and Farber, J.L., (1989). Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. *Arch.Biochem. Biophys.* 270, 672~680.
  36. Rush, G.F., Gorski, J.R., Ripple, M.G., Sowinski, J., Bugelski, P.,and Hewitt, W.R.,(1985). Organic hydroperoxide induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 78, 473~483.
  37. Salahudeen, A.K.,(1995). Role of lipid peroxidation in  $H_2O_2$ -induced renal epithelial (LLC-PK<sub>1</sub>) cell injury. *Am.J.Phyiol.* 268, F30~F38
  38. 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.
  39. Chen, Q. and Stevens, J.L., (1991). Inhibition of iodoacetamide and tbutylhydroperoxide toxicity in LLC-PK<sub>1</sub> cells by antioxidants: a role for lipid peroxidation in alkylation induced cytotoxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 284, 422~430.