

원저

작약 약침액이 tert-butyl hydroperoxide로 유도된 흰쥐 배양 간세포의 지질과산화반응 및 항산화효소 활성화에 미치는 영향

문진영

동국대학교 한의과대학 경혈학교실

Abstract

Effects of Paeoniae Radix Aqua-Acupuncture Solution on Tert-Butyl Hydroperoxide Induced Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzymes in Cultured Rat Liver Cells

Jin-Young, Moon

Department of AM-Pointology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : This study was purposed to investigate the antioxidative effects of Paeoniae radix aqua-acupuncture solution(PR) on culture liver cell system, lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in tert-butyl hydroperoxide(t-BHP) treated conditions.

Methods : Cultured normal rat liver cell(Ac2F) were prepared and incubated with or without PR(at 2% volume in culture medium). After 16~18hr, cells placed in DMEM medium without serum, and then incubated with 1mM t-BHP for 2hr. Viable cells were detected by MTT assay, and the levels of lipid peroxide(LPO) were measured by TBA method. And catalase activity was measured as the decrease in hydrogen peroxide absorbance at 240nm on spectrophotometer using 30mM hydrogen peroxide.

· 본 연구는 2,000년도 동국대학교 학술논문 연구비의 지원으로 수행되었음.

· 접수 : 2000년 8월 10일 · 수정 : 8월 22일 · 채택 : 8월 26일

· 교신저자 : 문진영, 경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 경혈학교실 (Tel: 054-770-2665)

Superoxide dismutase(SOD) were assayed by recording the inhibition of nitro blue tetrazolium reduction with xanthine and xanthine oxidase. Glutathione peroxidase(GPX) activity was determined by the modified coupled assay developed by Paglia and Lawrence. The reaction was started by addition of 2.2mM hydrogen peroxide as substrate. The change in absorbance at 340nm was measured for 1min on spectrophotometer. Glutathione-S-transferase(GST) activity was assayed with CDNB as substrate and enzyme activity of GST towards the glutathione conjugation of CDNB.

Results : Cell killing was significantly enhanced by addition of t-BHP compared to those of untreated group. PR pretreated cell resisted the toxic effects of t-BHP. LPO levels of t-BHP treatment group were significantly higher than other groups. This increased level was significantly reduced by PR pretreatment. The t-BHP treatment resulted in a decrease of catalase, GPX and GST activities. By contrast, PR pretreatment markedly increased compare to those of untreated groups.

Conclusions : T-BHP which can produce intracellular free radical was used for inducer of the peroxidation of cellular lipids. PR protected the cell death induced by t-BHP and significantly increased cell viability in the normal rat liver cell, and showed effective inhibition of lipid peroxidation, and elevations of catalase, GPX and GST activities. These results suggested that PR might play a protective role in lipid peroxidation by free radicals.

Key words : Paeoniae radix, t-BHP, lipid peroxide, antioxidative enzyme, Ac2F

I. 서론

세포내에서 자유기(Free radical)는 방사선 흡수¹⁾, 체내의 정상 대사 과정에서의 산화반응과 같은 내인적 요소²⁾, 및 CCl₄, t-BHP 등의 독성 화학물질이나 알콜 음용과 같은 외인적 요소³⁾ 등에 의한 체내 효소적 대사 과정 중에서 생성될 수 있다. 자유기가 세포내에서 과다 생성되면 생물학적 분자들, 세포를 구성하고 있는 지질, 단백질 및 DNA 등에 심각한 손상을 일으켜 생체의 산화적 손상을 야기한다⁴⁻⁶⁾. 한편 자유기에 의한 생체의 산화적 손상

은 catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX), glutathione-S-transferase(GST)와 같은 항산화 효소와 vitamin A, vitamin C, vitamin E 및 glutathione(GSH)과 같은 비효소적 항산화 물질에 의하여 어느 정도 방어되어 진다⁷⁻⁸⁾.

최근의 연구 결과에 의하면 이러한 세포내 항산화 방어기구는 활성산소종의 생체내 생성을 최소화하거나 소거함으로써 자유기에 의한 산화적 손상을 억제한다고 하며^{9,10)}, 특히 몇몇 천연물들은 지질과 산화에 의한 손상을 효과적으로 보호함으로써 종양 및 노화의 예방에 있어서도 매우 중요한 역할을 수행함을 보여주고 있다¹¹⁻¹²⁾. 그러므로 천연 항산화 물질의 탐색에 많은 관심이 집중되어 왔으며 특히

약침액을 대상으로 하는 연구 또한 다양한 한약제를 대상으로 진행되고 있는데 이와 관련한 연구로 황금¹³⁾, 호도¹⁴⁾, 당귀¹⁵⁻¹⁶⁾, 시호¹⁷⁻¹⁸⁾ 등과 같은 약침액의 항산화 활성이 검토되어 보고된 바 있다.

작약(*Paeoniae radix*)은 미나리 아재비과에 속한 다년생 초본인 참작약, 산작약의 뿌리로서 性은 微寒無毒하고 味는 微苦 微甘 微酸하며, 歸經은 脾 肺 肝 三經으로 瀉肝火, 養血柔肝, 緩中止痛 등의 목적으로 사물탕, 작약감초탕, 당귀작약산 등의 다수 처방에 주요 구성 약물로서 사용되어 왔다.

한편 작약 약침액의 항산화 효능과 관련한 기존의 연구로는 실험동물을 대상으로 acetaminophen의 대량 투여로 유도되는 간장 손상에 대한 보호 효과를 보고¹⁹⁻²¹⁾ 하였으나, 이를 순수하게 세포 수준에서 검토한 연구는 지금까지 이루어진 바 없다.

따라서 본 연구는 작약 약침액의 항산화 효능을 세포수준에서 관찰함으로써 본 약물의 작용 기전을 보다 심도있게 규명하고자 t-BHP로 유도된 정상 간세포의 산화적 손상에 대해 작약 약침액이 어떠한 영향을 미치는가를 세포생존률, 지질과산화물 생성량 및 항산화효소 활성 변화를 중심으로 검토하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시료 및 세포

본 실험에서 작약 약침액을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 작약을 정선하여 사용하였고, 추출용매인 물은 이온교환수지를 통과시킨 증류수를 사용하였다. 또한 본 실험에서 사용한 배양 정상 간세포(Ac2F)는 일본 HSRB(Health Science Resources Bank, Osaka, Japan)로

부터 분주받아 사용하였다.

2) 시약

본 실험에 사용된 시약으로서 Fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 GIBCO사(GIBCO-BRL, Grand Island, New York, USA)로 부터, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), glutamine, tert-butyl hydroperoxide (t-BHP), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulphoxide(DMSO), 2-thiobabituric acid(TBA), 1,1,3,3-tetraethoxypropane(TEP), ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA), superoxide dismutase (SOD : from bovine liver), xanthine, xanthine oxidase(XOD), nitro blue tetrazolium (NBT), catalase(from bovine liver), diethylene triamine pentaacetic acid(DETAPAC), reduced glutathione(GSH), oxidized glutathione-reductase(GSSG-reductase), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(β -NADPH) 등은 Sigma사(Sigma Chem. Co. St. Louis, USA)로 부터, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB), Na₂S₂O₃ 등은 Aldrich사(Aldrich Chem. Co. Milwaukee, WI)로 부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 작약 약침액의 제조

본 실험에서는 수제-알콜 침법²²⁾에 의해 다음과 같이 작약 약침액을 제조하였다. 먼저 작약 60g을 조말하여 수직으로 환류냉각관이 부착된 원저 flask에 넣고, 증류수 400ml를 가한 후, 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 그 후 여과액 중에 남아 있는 미량의 침전물을 제거하기 위해 4℃에서 2,500rpm으로 10분간 원심분리하여, 그 상층액을 취하였다.

상층액을 다시 rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)로 감압농축하고, 농축액에 증류수를 가하여 전량을 50ml이 되도록 한 다음, membrane filter (0.22 μ m, Whatman[®], Germany)로 여과하였다. 위의 방법으로 제조한 작약 추출액 50ml에 ethanol을 가하여 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 이 때 ethanol은 99.9% ethanol을 사용하였으며, 첨가량은 작약 물 추출액이 단계별로 75%, 85% 및 95% ethanol 용액이 되게하면서 침전물을 제거한 다음, 감압농축하였다. 감압농축하여 생성된 농축액에 생리식염수를 가하고 1N NaOH로 pH 7.0으로 조절하여 전량이 200ml가 되게 한 다음, 저온에서 24시간 방치한 후, membrane filter (0.22 μ m, Whatman[®], Germany)로 여과하여 작약 약침액(PR)의 원액으로 사용하였다.

2) 세포배양

정상 간세포(Ac2F)를 sodium bicarbonate (44mM), penicillin(100units/ml), streptomycin (100 μ g/ml)과 Fungizone(0.25 μ g/ml)를 함유하는 10% FBS-DMEM 배지(pH 7.0)로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건에서 배양하여, 2~3일마다 한번씩 75-cm² plastic flask(Corning Co., U.S.A)에서 subculture하여 세포주를 유지하였다.

3) 작약 약침액의 t-BHP에 의한 세포괴사 보호 효과 측정

작약 약침액이 t-BHP의 산화작용으로 인한 세포괴사에 미치는 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 96-well plate에 간세포를 1 \times 10⁴ cells/well이 되도록 분주하고 농도별 작약 약침 원액 및 2배, 5배, 10배, 20배, 40배, 100배 희석액을 well당 20 μ l씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM배지로 total volume을 200 μ l로 조절하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건에

서 16~18시간 배양하였다. 그 후 CMF-PBS로 2회 세척하고 serum free medium(SFM)을 well당 180 μ l씩 가하고, t-BHP의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가한 다음, 이를 다시 120분 배양시킨 후, MTT assay로 세포의 생존률을 측정하였다.

4) MTT assay

MTT assay는 Sladowski 등의 방법²³⁾을 따라 행하였다. 먼저 96-well plate에서 t-BHP 처리 후 120분간 배양한 간세포에 MTT(5mg/ml, PBS)를 well당 총용량의 10%가 되도록 넣고, 이를 다시 4시간 배양시킨 다음, 90 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 그 후 배지를 제거하고 EtOH/DMSO(1:1 v/v)를 150 μ l씩 넣고 20분간 shaking한 다음, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT dye [3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]가 blue formazan을 형성하는 것을 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 작약 약침액의 항산화 효과

(1) 실험군 분류 및 시료처리

실험군은 세포에 아무런 처치도 하지 않은 실험군[Control], t-BHP만을 단독 처리한 실험군[BHP], 작약 약침액만을 처리한 실험군[PR], 그리고 작약 약침액을 전처리 한 다음 t-BHP를 처리한 실험군[BHP+PR]으로 분류하였다. 또한 작약 약침액만을 처리한 실험군[PR]은 농도별로 원액을 처리한 실험군[PR1]과 2배 희석액을 처리한 실험군[PR2]으로 분류하였다. 실험군에 따라서 작약 약침액의 전처리와 t-BHP 처리는 다음과 같은 실험방법에 의해 진행하였다. 즉, 75-cm² plastic flask내에서 배양된 Ac2F 세포에 농도별 PRAS를 배양액 총량의 10% volume이 되도록 전처리하고 16~18시간 배양하였다. 배양 완료 후, 세포를 37 $^{\circ}$ C ph-

osphate-buffered saline (PBS)으로 세척하고, 배지를 serum-free medium으로 교환한 다음, t-BHP를 최종농도가 1mM이 되도록 처리하였다. 이로부터 다시 2시간 배양한 다음, 지질과산화물의 함량과 항산화 효소 활성을 측정하였다(Table 1).

Table 1. Classification of Experimental Groups

Groups	PR (10% volume)	Incubation (16~18hr)	t-BHP (1mM)
Control	-	+	-
BHP †	-	+	+
PR1 ‡	+	+	-
PR2	+	+	-
BHP+PR1	+	+	+
BHP+PR2	+	+	+

† BHP : t-BHP treated group.

‡ PR : Paeoniae Radix Aqua-Acupuncture Solution treated group.

(2) 지질과산화물 함량 측정

지질과산화물 함량은 Glascott의 TBA법²⁴⁾에 의해 측정하였다. 먼저 실험군별로 t-BHP를 처리한 다음 2시간 동안의 배양이 완료되는 시점에서 플라스크로부터 세포를 scraping하여 수집하였다. 플라스크로부터 분리한 세포에 trichloroacetic acid (TCA)를 최종농도가 4.5%가 되도록 가하고, 4℃에서 초음파를 이용하여 세포막을 파쇄한 다음, 8,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리후 상층액을 이용하여 지질과산화물의 함량과 단백질을 정량하였다. 지질과산화물의 함량을 측정하기 위해 상층액에 TCA 1ml, TBA 용액(0.45% TBA, 7.5% acetic acid, pH 4.15) 2ml를 가하였다. 이 반응액이 들어있는 튜브를 boiling water bath에서 5분간 방치한 다음, 수도물로 튜브를 냉각시키고 파

장 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 과산화 지질의 함량은 malondialdehyde tetrabutyl ammonium salt (MDA)로 검량 표준 곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도(nmol/mg protein)로 표기하였다.

(3) 항산화효소 활성 측정

① Catalase 활성 측정

간세포의 catalase 활성은 Aebi의 방법²⁵⁾에 준하여 측정하였다. 먼저 원심분리한 간세포 파쇄액의 상층액에 30mM H₂O₂ 용액을 가하여 파장 240nm에서 H₂O₂의 분해에 따른 흡광도의 감소로 측정하였다. 효소의 활성도는 1분동안 분해된 1mM의 H₂O₂를 1 unit로 정의하였고 단백질 1mg을 기준으로 환산하여 표기하였다.

② Glutathione peroxidase 활성 측정

GPX의 활성은 Paglia와 Lawrence의 방법^{26~27)}에 준하여 측정하였다. 먼저 50mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0) 50ml에 EDTA 1mM, NaN₃ 1mM, NADPH 0.2mM, GSH 1mM, 그리고 GSSG-reductase는 1E.U./ml를 혼합한 최대농도 반응 혼합물을 이용하여 측정하였다. 반응 혼합물 0.8ml에 50mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 희석시킨 간세포 파쇄액 0.2ml를 넣어 20℃ 항온수조에서 5분간 가온한 후 2.2mM H₂O₂ 용액 0.1ml를 첨가하여 파장 340nm에서 1분 동안의 흡광도 감소로 측정하였다. 효소의 활성도는 단백질 mg당 1분 동안 산화되는 NADPH μmol을 1unit로 환산하여 표기하였다.

③ Glutathione-S-transferase 활성 측정

GST 활성도는 chlorodinitro-benzene (CDNB)과 GSH를 기질로 사용한 Habig의 방법²⁸⁾으로 측정하였다. 먼저 0.1M potassium phosphate 완충

용액(pH 6.5)으로 희석시킨 간세포 파쇄액에 1mM GSH, 1mM CDNB를 첨가하여 25℃에서 1분 동안 파장 340nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다. 효소의 활성도는 단백질 mg당 1분간 conjugated되는 CDNB의 μmol 을 1unit로 환산하여 표기하였다.

④ Superoxide dismutase

SOD 활성도는 Oberley와 Oyanagui의 방법²⁹⁻³⁰⁾에 의하여 xanthine과 xanthine oxidase(XOD) 반응계에서 생성되는 superoxide anion(O_2^-)이 SOD에 의해 분해됨으로써 환원형 NBT의 생성량 감소 정도를 파장 560nm에서 2분 동안 흡광도의 변화로 측정하였다. 효소의 활성도는 NBT의 최대 환원을 50% 저지하는데 필요한 SOD의 양을 1unit로 표기하였다.

(4) 단백질 정량

배양 정상 간세포의 단백질 정량은 bicinchoninic acid protein assay kit를 이용하여 bovine serum albumin을 표준단백질 용액으로 이용한 표준검량선을 구하고 그 양을 산출하였다³¹⁾.

6) 통계적 처리

본 실험에서 얻은 실험군간의 결과에 대하여 Student's *t*-test를 실시하여 유의성 여부를 검증하였고, 그 결과 *p*값이 0.05 이하인 경우에 유의성을 인정하였다.

III. 실험결과

1. *t*-BHP에 의한 배양 정상 간세포 괴사에 대한 작약 약침액의 보호 효과
본 실험에서 *t*-BHP로 유도되는 간세포 괴사를

작약 약침액이 어느 정도로 보호하는가를 관찰하였다. 먼저 배양 간세포에 농도별 작약 약침액을 전처리한 다음, *t*-BHP를 최종농도가 1mM이 되도록 처리한 후, 세포 생존률을 MTT assay로 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 실험군의 세포생존률을 100%로 보았을 때 *t*-BHP를 처리한 실험군에서는 세포 생존률이 55.02%로 유의성있는 감소를 보였으므로 약 45%의 세포가 *t*-BHP의 처리로 인한 산화적 손상으로 괴사되었음을 알 수 있었다. 반면, 작약 약침액을 농도별로 원액, 2배, 4배, 8배 희석하여 전처리한 다음 *t*-BHP를 처리한 실험군에서는 각각 90.95, 98.67, 73.96, 70.22%의 높은 생존률을 보였으므로 작약 약침액은 *t*-BHP에 의한 배양 간세포의 괴사를 농도의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Table 2).

Table 2. Effect of Paeoniae Radix Aqua-Acupuncture Solution on *t*-BHP Induced Cell Death in Cultured Normal Rat Liver Cell

Groups	PR dilution factor	Viability(%) of control factor
BHP †		55.02±1.51
BHP+PR †	1	90.95±3.07 ***
	2	98.67±6.10 ***
	4	73.96±2.16 ***
	8	70.22±1.83 ***
	20	59.05±1.02
	40	58.10±1.33
	100	55.48±0.95

† BHP: *t*-BHP treated group.

‡ PR : Paeoniae Radix Aqua-Acupuncture Solution treated group.

All data are the mean±S.E. of triplicated determination. (*** : $p < 0.01$)

2. 배양 간세포의 지질과산화물 함량 변화

배양 정상 간세포에 t-BHP를 처리한 실험군에서 지질과산화물의 생성량을 측정한 결과, 5.61nmol로 아무런 처리도 하지 않은 대조군의 1.14nmol에 비해 현저한 증가를 보였다. 이 결과로부터 t-BHP는 배양 정상 간세포에 대해 매우 강한 산화적 손상을 야기함을 알 수 있었다. 한편 작약 약침액 자체의 산화적 손상 효과의 여부를 관찰하기 위해 작약 약침액을 농도별로 원액 및 2배 희석액을 전처리한 실험군에서 지질과산화물의 함량이 각각 1.70, 2.01nmol로 아무런 처리도 하지 않은 대조군과 유사한 수준의 생성량을 보였으므로 작약 약침액은 정상 간세포에 산화적 손상을 야기하지 않음을 알 수 있었다. 또한 작약 약침액을 농도별로 원액 및 2배 희석액을 전처리한 다음, t-BHP를 처리한 실험군에서는 지질과산화물의 생성량이 각각 1.99, 2.91nmol로 t-

BHP 단독 처리군의 5.61nmol에 비해 현저한 감소를 보였다. 따라서 작약 약침액은 t-BHP에 의한 정상 간세포에서의 산화적 손상을 효과적으로 방어할 수 있음을 알 수 있었다(Table 3).

3. 항산화 효소 활성 변화

1) Catalase 및 superoxide dismutase 활성 변화
 배양 정상 간세포에 t-BHP만을 처리한 실험군에서 catalase의 활성도를 관찰한 결과 4.42unit로 아무런 처리도 하지 않은 대조군의 9.19unit에 비해 현저한 유의성이 인정되는 감소를 보였다. 한편 작약 약침 원액 및 2배 희석액을 전처리한 실험군에서는 각각 6.04, 6.72unit로 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 작약 약침액 2배 희석액을 전처리한 다음, t-BHP를 처리한 실험군에서는 6.73unit로 t-BHP 단독 처리군에 비해 유의

Table 3. Effect of Paeoniae Radix Aqua-Acupuncture Solution on Levels of Lipid Peroxide in Cultured Normal Rat Liver Cell

Groups	Lipid Peroxide (MDA nmol/mg protein)
Control	1.14±0.07
BHP †	5.61±0.12 *** ^{a)}
PR1 ‡	1.70±0.05
PR2	2.01±0.02
BHP+PR1	1.99±0.09 *** ^{b)}
BHP+PR2	2.91±0.11 *** ^{b)}

† BHP : t-BHP treated group.

‡ PR : Paeoniae Radix Aqua-Acupuncture Solution treated group.

All data are the mean±S.E. of triplicated determination.

a) : values statistically significant as compared with control group.

b) : values statistically significant as compared with t-BHP data of each group. (*** : p<0.01)

Table 4. Effects of Paeoniae Radix Aqua-Acupuncture Solution on Activities of Catalase and Superoxide Dismutase in Cultured Normal Rat Liver Cell

Groups	Catalase activity	SOD activity
	(unit/mg protein)	
Control	9.19±0.14	13.73±0.78
BHP †	4.42±0.11 *** ^{a)}	14.26±1.42
PR1 ‡	6.04±0.07	12.12±2.20
PR2	6.72±0.22	14.52±0.65
BHP+PR1	4.00±0.17	11.55±0.92
BHP+PR2	6.73±0.06 * ^{b)}	13.87±0.45

† BHP : t-BHP treated group.

‡ PR : Paeoniae Radix Aqua-Acupuncture Solution t-treated group.

All data are the mean±S.E. of triplicated determination.

a) : values statistically significant as compared with control group.

b) : values statistically significant as compared with t-BHP data of each group. (* : p<0.05, *** : p<0.01)

성있는 증가를 보였다(Table 4).

SOD 활성도는 *t*-BHP 단독 처리군에서 14.26 unit로 대조군의 13.73unit에 비해 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다. 또한 작약 약침액만을 농도별로 원액 및 2배 희석액 전처리한 실험군에서는 각각 12.12, 14.52unit로 대조군과 거의 유사한 활성을 보였다. 한편 작약 약침 원액 및 2배 희석액을 전처리한 다음, *t*-BHP를 처리한 실험군에서도 11.55, 13.87unit로 *t*-BHP 단독 처리군에 비해 다소 감소하였으나 유의성있는 변화는 관찰되지 않았다(Table 4).

2) Glutathione peroxidase 및 Glutathione-S-transferase 활성 변화

GPX 활성도는 *t*-BHP 단독 처리군에서 4.45 unit로 대조군의 11.34unit에 비해 현저한 유의성이

인정되는 감소를 보였다. 또한 작약 약침액 단독 처리군에서는 각각 8.49, 14.37unit로 원액 처리군에서는 대조군에 비해 감소하였으나, 2배 희석액 처리군에서 대조군에 비해 다소 증가하는 경향을 보였다. 한편 작약 약침액 원액 및 2배 희석액을 전처리한 다음, *t*-BHP를 처리한 실험군에서는 6.05, 11.04unit로 *t*-BHP 단독 처리군의 4.45unit에 비해 유의성있는 증가를 보였다.(Table 5)

GST 활성도는 *t*-BHP 단독 처리군에서 0.14unit로 대조군의 2.88unit에 비해 현저한 유의성이 인정되는 감소를 보였다. 또한 작약 약침액 단독 처리군에서는 각각 0.83, 1.08unit로 대조군에 비해 감소하였다. 한편 작약 약침액 원액 및 2배 희석액을 전처리한 다음, *t*-BHP를 처리한 실험군에서는 1.11, 0.84unit로 *t*-BHP 단독 처리군의 0.14unit에 비해 유의성있는 증가를 보였다.(Table 5)

Table 5. Effect of Paeoniae Radix Aqua-Acupuncture Solution on Glutathione Peroxidase and Glutathione-S-Transferase Activities in Cultured Normal Rat Liver Cell

Groups	GPX activity	GST activity
	(unit/mg protein)	
Control	11.34±2.08	2.88±0.17
BHP †	4.45±0.17 *** ^{a)}	0.14±0.01 *** ^{a)}
PR1 †	8.49±1.12	0.83±0.07
PR2	14.37±2.69	1.08±0.08
BHP+PR1	6.05±0.45 * ^{b)}	1.11±0.11 ** ^{b)}
BHP+PR2	11.04±1.82 *** ^{b)}	0.84±0.03 * ^{b)}

† BHP : *t*-BHP treated group.

† PR : Paeoniae Radix Aqua-Acupuncture Solution treated group.

All data are the mean±S.E. of triplicated determination.

a) : values statistically significant as compared with control group.

b) : values statistically significant as compared with *t*-BHP data of each group.

(* : p<0.05, ** : p<0.02, *** : p<0.01)

IV. 고찰

본 연구는 작약 약침액의 항산화효과를 세포수준에서 규명하고자 배양 간세포를 이용하여 *t*-BHP로 유도된 세포 독작용에 대해 본 약물이 어떤 영향을 미치는가를 실험적으로 관찰하였다.

본 연구에서 간세포에 산화적 손상을 유발하기 위하여 사용된 약물인 *t*-BHP의 독성은 급성 oxidative stress로 인한 세포의 비가역적 손상에 관한 기전연구의 모델로서 자주 사용되어 왔는데 특히 1mM 이하의 저농도에서 유발되는 간세포의 과사기전은 세포막 지질의 과산화반응이 수반된다고 알려져 있다³²⁾. 또한 Shertzer 등은 *t*-BHP를 간세포에 처리할 경우 항산화 물질인 세포내 GSH은 즉시 감소하지만 DPPD, deferoxamine와 같은 항산화제를 전처리하면 세포내 GSH 함량 변화는 일어나지 않는다고 보고한바 있다³³⁾.

먼저 작약 약침액의 항산화 효능을 규명하기 위한 일환으로 *t*-BHP로 유도되는 배양 정상 간세포의 괴사에 대한 본 약물의 보호효과를 관찰하기 위해 배양 정상 간세포에 농도별 작약 약침액을 전처리한 다음, *t*-BHP를 최종농도가 1mM이 되도록 처리한 후 세포생존률을 관찰한 결과, 작약 약침액 처리군은 90% 이상의 높은 세포 생존률을 보였다. 이 결과에서 작약 약침액은 *t*-BHP에 의한 간세포의 괴사에 대한 강한 보호효과가 있음을 알 수 있었다.

한편 작약 약침액이 지질과산화물의 생성 억제 효능을 관찰하기 위하여 과산화지질(MDA)의 생성량을 측정된 결과, 정상 간세포에 *t*-BHP를 처리함으로써 MDA 생성량은 대조군에 비해 약 5배 정도로 현저하게 증가하였으나, 작약 약침액의 전처리로 인하여 MDA 생성량은 현저하게 억제됨을 알 수 있었다. 이와 같은 실험 결과에서 정상 간세포에 대한 *t*-BHP의 처리로 인해 세포 괴사 및 MDA 생성량이 증가한 것은 Glascott³⁴⁻³⁵⁾의 실험 결과와 그 경향성이 일치하며, 특히 본 실험에서 작약 약침액은 *t*-BHP에 의한 이와같은 세포 독작용 및 산화적 손상을 효과적으로 보호함을 알 수 있었다. 또한 작약 약침액의 항산화 효능에 대한 기전을 규명하기 위하여 본 약물이 catalase, SOD, GPX 및 GST와 같은 항산화 효소계에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 정상 간세포에서의 catalase, GPX 및 GST 활성은 *t*-BHP 처리로 인해 현저하게 감소하였으나 작약 약침액 전처리에 의하여 이와 같은 항산화 효소 활성의 저하가 억제됨을 알 수 있었다. 반면 SOD 활성은 전 실험군에서 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다. 이상과 같은 실험 결과로부터 작약 약침액은 배양 정상 간세포에서 *t*-BHP 처리에 의해 유도되는 catalase, GPX 및 GST와 같은 항산화 효소계의 활성 저하를 강하게 억제함으로써 결국 간세포의 산화적 손상을 효과적으로 보호한

것으로 사료되며, 그 결과 과산화지질의 생성량 및 간세포의 괴사를 억제한 것으로 판단된다.

V. 결론

작약 약침액의 항산화 효능을 세포수준에서 검토하기 위하여 배양 정상 간세포를 이용하여 *t*-BHP로 유도되는 간세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과를 세포 생존률과 지질과산화물의 생성량과 관련하여 관찰함과 더불어 항산화 효소계의 활성 변화에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 작약 약침액은 *t*-BHP에 의한 정상 간세포의 괴사를 농도 의존적으로 억제하였으며, 특히 원액 및 2배 희석액 첨가군에서는 90% 이상의 높은 세포 생존률 나타내었으므로 본 약물은 간세포의 산화적 손상에 대해 강한 보호 작용이 있음을 알 수 있었다.
2. 저농도의 *t*-BHP 처리로 인해 지질과산화물의 생성량이 현저하게 증가하였으므로 *t*-BHP는 정상 간세포에 대하여 매우 강한 산화적 손상을 야기하였다. 반면, 작약 약침액 전처리로 인해 지질과산화물의 생성량이 현저하게 억제됨으로써 본 약물은 배양 정상 간세포에서 강한 항산화 활성을 보였다.
3. 작약 약침액의 항산화 활성에 대한 기전을 규명하기 위하여 간세포에서의 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 관찰하였다. 본 연구에서 *t*-BHP의 처리로 인해 catalase, GPX 및 GST 활성이 현저하게 저하되었다. 반면, 작약

약침액 전처리하는 이들 항산화 효소 활성의 저하를 강하게 억제함을 알 수 있었다.

이상과 같은 본 연구의 결과, 작약 약침액은 흰쥐의 배양 정상 간세포에서 강한 항산화 활성 및 세포 보호 작용을 나타내었으므로 향후 본 약물이 간세포의 산화적 손상과 관련한 제반 질환의 치료제로 개발될 수 있을 가능성이 시사되며, 이에 관한 지속적인 연구를 진행할 계획이다.

VI. 참고문헌

1. Brattin WJ, Glende EA and Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1985 ; 1 : 27~38
2. Sakaida I, Marlene E and Farber JL. Autophagic degradation of protein generates a pool of ferric iron required for the killing of cultured hepatocytes by an oxidative stress. *Mol. Pharmacol.* 1989 ; 37 : 435~442
3. Nordmann R, Ribiere C and Rouach H. Implication of free radical mechanism in ethanol induced cellular injury. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1992 ; 12 : 219~240
4. Masaki N, Kyle ME and Farber JL. tert-Butyl hydroperoxide kills cultured hepatocytes by peroxidizing membrane lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989 ; 269 : 390~399
5. Masaki N, Kyle ME and Farber JL. Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989 ; 270 : 672~680
6. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1990 ; 8 : 583~599
7. Halliwell B. Free radical, antioxidant and human disease. *Lancet.* 1994 ; 344 : 721~724
8. Seifter E, Mendecki J, Holtzman S, Kanofofsky JD, Freidenthal E, Davis L and Weinzweig J. Role of vitamin A and β -carotene in radiation protection, relation to antioxidant properties. *Pharmacol. Ther.* 1988 ; 39 : 357~365
9. Schrauzer GN. Selenium. Mechanistic aspects of anticarcinogenic action. *Biol. Trace Elem. Res.* 1992 ; 33 : 51~62
10. Ip C, Hayes C, Budnick RM and Ganther HE. Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention. *Cancer Res.* 1991 ; 51 : 595~600
11. Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Norinobu S, Choi SW, Kawakishi S and Osawa T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O- β -D-Glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* 1994 ; 42 : 2407~2410
12. Ruch RJ, Cheng SJ and Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. *Carcinogenesis.* 1989 ; 10 : 1003~1008

13. 김성일, 문진영, 김갑성, 김두희, 남경수, 임종국. 자유기에 의한 지질과산화 반응에 대한 황금 약침액의 항산화 효능. 대한예방한의학회지. 1997 ; 1 : 48~54
14. 김영해, 김갑성. 호도약침액의 항산화 효과에 대한 연구. 대한한의학회지. 1996 ; 17(1) : 9~20
15. 안준철, 문진영, 임종국. 당귀 약침액의 항산화효능에 관한 연구. 대한침구학회지. 1996 ; 13 : 254~262
16. 안준철, 문진영, 임종국. 당귀 약침액의 항산화효능에 관한 연구(II). 대한침구학회지. 1997 ; 14 : 383~395
17. 문진영, 임종국. 시호 약침제제의 자유기 소거능 및 지질과산화 억제효능에 관한 연구. 대한침구학회지. 1998 ; 15(2) : 135~145.
18. 문진영, 임종국. 시호 약침이 마우스의 항산화효소계 및 지질과산화물 생성에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999 ; 16(4) : 245~255.
19. 손영준, 문진영, 임종국. 담수, 중완혈의 작약 약침 자극이 acetaminophen으로 유발된 흰쥐의 손상간에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1996 ; 13(2) : 263~279
20. 임창수, 김갑성. 작약 약침액의 항산화효능에 관한 연구. 대한침구학회지. 1997 ; 14(2) : 191~198
21. 임창수, 김갑성. 작약 약침의 항산화효능에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999 ; 16(3) : 269~286
22. 전백염. 중초약주사제. 상해 : 상해과학기술출판사. 1981 : 71~132
23. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH and Balls M. An improved MTT assay. J. Immunol. Methods. 1993 ; 157 : 203~207
24. Glascott PA Jr, Gilfor E and Farber JL. Effects of vitamin E on the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. Mol. Pharmacol. 1992 ; 41 : 1155~1162
25. Aebi H. Catalase. Methods of enzymatic analysis. 2nd ed. edited by Hans Ulrich Bergmeyer. 1974 : 673~684
26. Paglia DE and Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 1967 ; 70: 158~169
27. Lawrence RA and Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976 ; 71 : 952~958
28. Habig WH, Pabst MJ and Jabby WB. Glutathione-S-transferase; the first enzymatic step mercapturic acid formation. J. Biochem. 1974 ; 249 : 7130~7139
29. Oberley LW and Spitz PR. Methods in Enzymology. edited by Colowick SP and Kaplan NO. Acad. Press 105(ed. Packer L), 1984 : 457~464
30. Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Anal. Biochem. 1984 ; 42 : 290~296
31. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke BJ and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 1986 ; 162 : 156~159

- onic acid. Anal. Biochem. 1985 ; 150 : 76~85
32. Masaki N, Kyle ME and Farber JL: Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. Arch. Biochem. Biophys. 1989 ; 270 : 672~680
33. Shertzer HG, Bannenberg GL, Zhu H, Liu RM and Moldeus P: The role of thiols in mitochondrial susceptibility to iron and tert-butyl hydroperoxide-mediated toxicity in cultured mouse hepatocytes. Chem. Res. Toxicol. 1994 ; 7 : 358~366
34. Glascott PA Jr, Gilfor E and Farber JL : Effects of vitamin E on the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. Mol. Pharmacol. 1992 ; 41 : 1155~1162
35. Glascott PA Jr, Gilfor E and Farber JL: Relationship of the metabolism of vitamin C and E in cultured hepatocytes treated with tert-butyl hydroperoxide. Mol. Pharmacol. 1995 ; 48 : 80~88