

원저

紅花藥鍼液이 t-Butylhydroperoxide에 의한 家兔의 腦組織 Na⁺-K⁺-ATPase 活性障碍에 미치는 影響

김철웅 · 서정철 · 윤현민 · 장경전 · 송춘호 · 안창범

동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Abstract

Effect of Carthami-Flos aquacupuncture on t-Butylhydroperoxide- induced inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity in cerebral synaptosomes

Kim, Cheol-Woong · Seo, Jung-Chul · Youn, Hyoun-Min · Jang, Kyung-Jeon
Song, Choon-Ho · Ahn, Chang-Beohm

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

Objectives ; This study was undertaken to determine whether Carthami-Flos aquacupuncture (CFA) exerts protective effect against oxidant-induced inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity in cerebral synaptosomes.

Methods and Results ; The enzyme activity was dependent on incubation time and enzyme protein concentrations. An oxidant t-butylhydroperoxide (tBHP) at 1 mM concentration caused a significant inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity, which was prevented by addition of 0.01% CFA. tBHP inhibition and CFA protection were independent on incubation time or enzyme protein concentrations. The enzyme activity was increased by ATP in a dose dependent manner. Effects of tBHP and CFA were not affected by ATP concentrations. tBHP (1 mM) produced a significant increase in lipid peroxidation in cerebral synaptosomes, which was prevented by 0.01% CFA. CFA decreased oxygen free radicals generated induced by the phorbol-ester in a dose-dependent manner in human neutrophil.

Conclusions ; These results suggest that CFA exerts protective effect against tBHP-induced inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity, which is due to by an antioxidant action resulting from a direct scavenging effect of oxygen free radicals in the cerebral synaptosomes.

Key Words : Carthami-Flos, antioxidant, cerebral synaptosomes

· 접수 : 3월 8일 · 수정 : 3월 16일 · 채택 : 3월 22일

· 교신저자 : 안창범, 부산시 부산진구 양정2동 산 45 동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실(TEL. 051-850-8610)

E-mail : cbahn@hyomin.donguei.ac.kr

I. 서론

腦는 元神之府라 하여 精神思慮活動을 主管하고¹⁾, <靈樞·海論篇>²⁾에 “腦爲髓之海, …, 髓海不足, 則腦轉耳鳴, 脛痠眩冒, 目無所見, 懈怠安臥”라 하여 腦는 肢體의 運動을 圓滑히 維持하고 耳目을 똑똑하게하는 作用이 있다³⁾.

紅花(Carthusmus tinctorius L.)의 性味는 辛溫 無毒하며^{4,5)} 心·肝·脾에 歸經하고⁴⁻⁶⁾, 主要效能은 活血潤燥, 通經, 止痛消腫하여 産後血暈口噤, 腹內惡血不盡故痛, 跌撲損傷, 瘡毒腫脹等を 治療하는⁶⁻⁸⁾ 活血祛瘀의 要藥이다⁹⁾.

Na^+-K^+ -ATPase는 正常的인 細胞의 機能에 重要的 役割을 하고 있으며, 특히 腦細胞에서는 安定膜電壓의 發生 및 維持, 또한 興奮의 傳達等 神經細胞의 機能에 決定的인 役割을 하고 있음은 잘 알려진 사실이다. 酸素遊離基를 包含한 oxidant들이 이 酵素의 活性을 抑制하여 細胞膜의 物質移動界와 細胞機能에 障礙를 誘發하고 있는 것으로 報告되고 있다¹⁰⁾.

反應性 酸素基(reactive oxygen species)들은 파킨슨병, 알츠하이머병, 虛血性 神經損傷 및 癱瘓을 包含한 여러 가지 急性 및 慢性 神經性疾患의 病因으로 認定되고 있다^{11-14,15)}. 특히 大腦 細胞膜은 反應性酸素基의 攻擊對象인 不飽和脂肪酸을 많이 含有하고 있기 때문에 이들에 의한 細胞損傷이 흔하게 나타날 수 있으며, 또한 腦細胞는 內在性 抗酸化劑인 catalase, glutathione peroxidase, vitamin E의 含有量이 매우 낮기 때문에 反應性酸素基에 의해 損傷받기가 쉽다¹⁶⁾.

最近 紅花藥鍼에 대한 實驗的 연구로 朴等¹⁷⁾, 孫等¹⁸⁾의 報告로 血栓, 疼痛에 關한 것이 있었고, 活血化瘀法의 臨床研究로 水腫¹⁹⁾, 腎機能不全等²⁰⁾의 治療에 關한 것이 있었으며, 酸化劑에 의해 抑制된

腦組織의 Na^+-K^+ -ATPase活性에 關하여 金等²¹⁾의 胡桃藥鍼을 利用한 보고는 있었으나 紅花에 關聯된 보고는 없었다.

따라서 本研究은 oxidant인 t-butylhydroperoxide(tBHP)에 의한 腦組織損傷을 紅花藥鍼液이 防止할 수 있는지를 확인하기 위하여, 家兔의 大腦皮質에서 分離한 synaptosome에서 t-BHP에 의한 Na^+-K^+ -ATPase活性抑制作用에 대한 紅花藥鍼液의 影響을 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 실험 방법

1. 實驗材料

實驗材料로는 體重 1.5~2kg되는 New Zealand 家兔를 動物飼育場에서 購入하여 암수 區別없이 使用하였다.

2. 藥物의 製造

東義大學校 韓醫科大學 附屬 韓方病院에서 購入한 紅花 387g을 methanol 2000ml에 加하여 水浴上에서 8時間씩 3回 熱還流하여 抽出하고 全methanol抽出液을 減壓 濃縮하여 10.4g 정도의 抽出液을 얻어 實驗에 使用하였다.

3. 大腦 synaptosome 分離

토끼 大腦皮質에서 Hojos의 方法²²⁾으로 synaptosome을 分離하였다. 토끼를 犧牲시킨 後 大腦皮質을 分離하여 組織의 約 10倍되게 0.3M sucrose溶液을 添加하여 Potter-Elvehjem homogenizer로 均等質를 만들었다. 이를 遠心分離器(Sorvall RC-5B)를 利用하여 1,500g에서 10分間 遠心分離하여 上層液을 얻어 다시 9,000g에서 20分間 遠心分離하여 얻은 沈澱液을 0.3M sucrose液

에 浮游시켰다. 이 浮游液을 0.8M sucrose 溶液위에 넣고 9,000g에서 25分間 遠心分離하여 0.8M sucrose 溶液屬에 包含된 部分을 0.3M sucrose 溶液에 浮游시켜 20,000g에서 30分間 遠心分離하여 그 沈澱物을 synaptosome으로 利用하였고, 이를 110KCl, 20mM NaCl, 1.2mM CaCl₂, 10mM glucose 및 20mM HEPES/Tris (pH 7.4)로 된 溶液에 浮游시켜 使用하였다.

4. Na⁺-K⁺-ATPase 活性測定

分離된 synaptosome에서 Na⁺-K⁺-ATPase 活性은 ATP로부터 分解되어 遊離되는 無機磷酸(Pi)의 濃度를 測定하여 評價하였다. 總 (total) ATPase 活性은 100mM Na⁺, 10mM K⁺, 3mM Mg²⁺, 20mM Tris/HCl (pH 7.4), 3mM ATP가 存在하는 溶液屬에서 測定하였으며, Mg²⁺-ATPase 活性은 總 ATPase 活性을 測定하는 溶液內에서 K⁺을 除外하고 대신 1mM ouabain을 添加하여 測定하고 總 ATPase와 Mg²⁺-ATPase 活性의 差異를 Na⁺-K⁺-ATPase 活性으로 하였다. ATP가 들어 있지 않은 上記 溶液內 synaptosome을 0.25 mg/ml 되게 添加하여 37°C에서 10分間 preincubation한 後 ATP를 添加하여 反應을 始作하였으며 10分 後에 冷한 6% perchloric acid 0.2ml를 加하여 反應을 停止시켰다. 反應液을 3,500g에서 10分間 遠心分離한 後 上層液內 無機磷酸의 濃度를 Fiske와 SubbaRow의 方法²³⁾으로 測定하였고, 蛋白質 濃度는 Bradford의 方法²⁴⁾으로 測定하였다.

5. Lipid peroxidation 測定

細胞膜 脂質의 過酸化 程度는 그 產物인 malondialdehyde (MDA) 量을 Uchiyama와 Mihara 方法²⁵⁾으로 測定하여 評價하였다. 간단히 說明하면, synaptosome을 차가운 1.15% KCl 溶液 (5% wt/vol)屬에서 破碎하여, 이 組織破碎 均質液

0.5ml에 1% 磷酸 溶液 3ml과 0.6% thiobarbituric acid 溶液 1ml를 添加하여 끓는 물에서 45分間 加熱하였다. n-Butanol 4ml를 添加하여 完全히 섞은 다음 2000g에서 20分間 遠心分離한 後, 上層液의 吸光度를 536와 520nm에서 測定하였다. MDA 값은 蛋白質 1 mg 當 nmoles로 表示하였다. 蛋白質 濃度는 Bradford의 方法²⁴⁾으로 測定하였다.

6. 酸素遊離基의 生成測定

紅花藥鍼液이 酸素遊離基들을 除去하는 作用을 가지고 있는 지는 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)로 活性化된 白血球에 의해 生成되는 酸素遊離基를 測定함으로써 確認하였다. 간단히 說明하면, PMA로 活性化된 白血球 (1×10⁵ cells/ml)를 Kreb's 링거-磷酸緩衝溶液의 2ml屬에 넣고 0.96 μg/ml의 luminol과 같이 incubation하였다. 酸素遊離基의 發生程度는 luminol-dependent chemiluminescence를 測定하여 評價하였으며, chemiluminescence는 chemiluminescence 分析器 (MicroLumat LB 96P, Berthold, Germany)를 利用하여 測定하였다. 紅花藥鍼液의 效果를 볼 때는 適當한 濃度를 incubation 溶液屬에 添加하였다. 白血球는 健康한 사람의 血液에서 Grishman 등의 方法²⁶⁾으로 分離하여 使用하였으며, 이 方法으로 分離한 白血球는 95%가 살아있는 狀態였다.

7. 資料整理 및 統計處理

成績은 平均值±標準誤差로 나타내었으며, 平均值間의 有意性은 Student's t-test²⁷⁾를 利用하여 檢定하였고 p값이 0.05未滿일 때 有意한 것으로 判定하였다.

III. 실험 성적

1. $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性的 time course에 대한 tBHP 및 紅花의 效果

그림 1은 大腦皮質에서 分離한 synaptosome에서 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活성에 대한 tBHP 및 紅花藥 液의 影響을 여러 incubation時間에 따라 觀察한 結果이다. 그림에서 보는 바와 같이 synaptosome에서 incubation時間을 2分에서 20分까지 變化시킨 結果, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活성은 時間에 따라 比例하여 增加하였다. Incubation時間이 2分이었을 때 酵素의 活性이 $4.28 \pm 1.12 \mu\text{M Pi/mg protein/hr}$ 이었으며, 20分일 境遇는 $27.49 \pm 2.97 \mu\text{M Pi/mg protein/hr}$ 로 增加하였다. 溶液內 tBHP의 濃度を 1mM 添加하였을 때 酵素의 活性은 有意하게 減少되었고, 여기에 紅花藥液을 0.01%되게 添加한 結果, tBHP에 의해 抑制되었던 活性은 增加하여 거의 正常 水準까지 回復되었다. tBHP에 의한 抑制程度는 incubation時間差에 따라 差異가 없었으며, 紅花藥液에 의한 防止效果도 incubation時間에 따라 差異가 없었다. 그러므로 紅花藥液은 t-BHP의 活性抑制를 防止할 수 있었다.

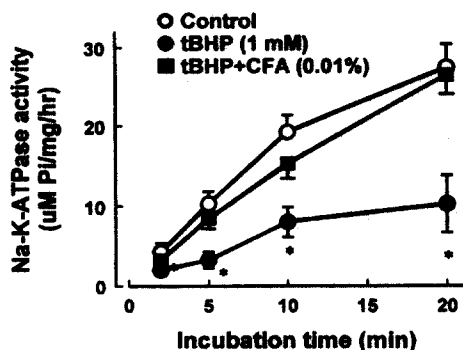


Fig. 1. Effects of tBHP and Carthami-Flos aquacup -uncture (CFA) on time course of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ activity in cerebral synaptosomes. The enzyme activity was measured at 37°C for 2-20 min in 100 mM Na^+ , 10mM K^+ ,

3mM Mg^{2+} , 20mM Tris/HCl (pH 7.4), and 3mM ATP in the presence or absence of 1mM tBHP and/or 0.01% CFA. Data are mean \pm SE of four experiments. * $p < 0.05$ compared with the control.

2. 酵素蛋白質濃度變化에 따른 tBHP 및 紅花의 效果

$\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活성이 酵素蛋白質濃도에 따라 어떻게 影響을 받으며, tBHP 및 紅花藥液의 效果가 蛋白質의 濃度變化에 따라 달라지는 지를 觀察하여 그림 2에 나타내었다. 이 그림에서 보는 바와 같이 蛋白質濃도를 5에서 50 μg 까지 變化시켜 觀察한 結果, 酵素의 活性은 0.13 ± 0.02 에서 $0.97 \pm 0.06 \mu\text{M Pi/hr}$ 로 增加함으로써 酵素의 活性이 蛋白質의 濃도에 比例하여 增加하였다. 溶液內 1mM tBHP를 添加하여 調査한 結果, 酵素의 活性은 蛋白質의 濃도에 關係없이 有意하게 減少되었으며, 紅花藥液을 0.01%되게 添加한 結果, tBHP에 의해 抑制되었던 活性은 有意하게 增加하여 거의 正常 水準까지 回復되었다. 이러한 紅花藥液의 效果는 蛋白質의 濃度變化에 의해 影響을 받지 않았다.

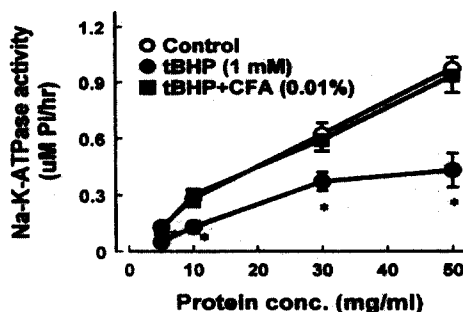


Fig. 2. Effect of enzyme protein concentration on tBHP inhibition and Carthami-Flos aquacupuncture (CFA) protection of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ activity in cerebral synaptosomes. The enzyme activity was measured at 37°C for

10 min in 100mM Na⁺, 10mM K⁺, 3mM Mg²⁺, 20mM Tris/HCl (pH 7.4), and 3mM ATP in the presence or absence of 1mM tBHP and/or 0.01% CFA with 5-50μg enzyme protein concentrations. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05 compared with the control.

3. tBHP에 의한 酵素活性抑制에 대한 紅花藥鍼液의 濃度變化의 效果

tBHP에 의한 Na⁺-K⁺-ATPase活性障碑를 防止하는 紅花藥鍼液의 效果가 濃도에 따라 影響을 받는 지를 確認하기 위하여 溶液內 紅花藥鍼液의 濃도를 0.0005에서 0.01%까지 變化시키고 觀察하였다. 그림 3에서 보는 바와 같이 1mM tBHP가 處理되었을 때 酵素의 活性은 21.65±2.95μM Pi/mg protein/hr에서 8.49±1.33μM Pi/mg protein/hr으로 抑制되었고, tBHP와 同時에 紅花藥鍼液을 添加하였을 때 tBHP에 의해 抑制되었던 酵素의 活性은 紅花藥鍼液의 濃도가 增加함에 따라 比例하여 回復되었다. 紅花藥鍼液의 防止效果는 0.01%에서 有意하게 14.28±1.55μM Pi/mg protein/hr로 增加하였고, 0.01%에서는 22.56±3.29μM Pi/mg protein/hr로 正常 數值까지 回復되었다. 따라서 tBHP에 의해 抑制되었던 酵素의 活性은 紅花藥鍼液의 濃도에 比例하여 回復되었다

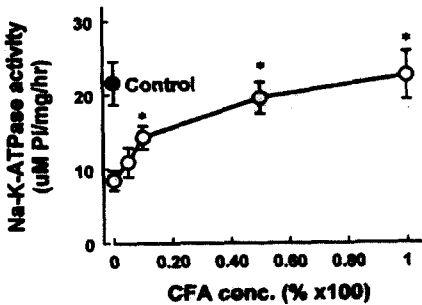


Fig. 3. Effect of various concentrations of Carth-

ami-Fios acupuncture (CFA) on tBHP-induced inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity in cerebral synaptosomes. The enzyme activity was measured at 37°C for 10min in 100mM Na⁺, 10mM K⁺, 3mM Mg²⁺, 20mM Tris/HCl (pH 7.4), and 3mM ATP in the presence or absence of 1mM tBHP and/or 0.0005-0.01% CFA. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05 compared with the tBHP alone.

4. Incubation溶液內의 ATP濃度變化의 效果

Na⁺-K⁺-ATPase는 ATP를 分解하는 酵素이기 때문에 ATP濃도가 增加함에 따라 酵素의 活性은 增加하게 된다. 따라서 本 實驗에서는 ATP濃度變化가 tBHP 및 紅花藥鍼液의 效果에 影響을 미치는 지를 調査하여 그림 4에 나타내었고 tBHP의 抑制效果를 調査한 結果, ATP濃도가 0.5mM일 때 酵素의 活性은 5.88±1.05μM Pi/mg/hr에서 ATP濃도가 5mM일 때 酵素의 活性은 22.38±3.43μM Pi/mg/hr로 豫想한 대로 ATP濃도가 增加함에 따라 酵素의 活性이 增加하였다. 여기에 1mM tBHP를 添加하였을 때 酵素의 活性은 抑制되어 ATP濃도가 0.5mM일 때 2.99±0.66μM Pi/mg/hr까지 減少하였고 (約 49% 抑制), ATP濃도가 5mM일 때는 酵素의 活性이 24.38±3.43μM Pi/mg/hr에서 12.16±2.98μM Pi/mg/hr로 有意하게 減少되어 (約 50% 抑制) 그 抑制程度는 ATP濃度變化에 따라 tBHP의 抑制效果는 影響을 받지 않는 것으로 나타났다. tBHP에 의한 酵素의 抑制作用을 防止하는 紅花藥鍼液의 效果가 ATP濃度變化에 따라 影響을 받는 지를 調査한 結果 ATP가 0.5mM일 때 4.76±0.46μM Pi/mg/hr로 正常數值의 約 81%까지 回復되었고, ATP가 5mM일 때는 21.58±2.86μM Pi/mg/hr로 正常값의 約 88%까지 回復시킴으로써 ATP濃도가 0.5mM에서 5mM까지 變化되어도 紅花藥鍼의 防止效果는 비슷하였다. 따라서 tBHP에 의한 酵素의 抑制作用을 防止하는 紅花藥鍼液의 效果는 ATP濃度變化에 따라 影響을 받지 않았다.

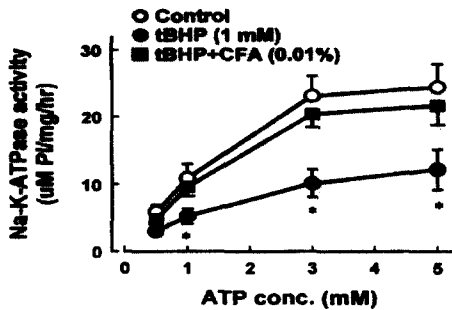


Fig. 4. Effect of Carthami-Flos aquacupuncture (CFA) on tBHP-induced inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity in cerebral synaptosomes. The enzyme activity was measured at 37°C for 10 min in 100mM Na⁺, 10mM K⁺, 3mM Mg²⁺, 20mM Tris/HCl (pH 7.4), and 0.5-5mM ATP in the presence or absence of 1mM tBHP and/or 0.01% CFA. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05 compared with the control.

5. tBHP에 의한 脂質의 過酸化에 대한 紅花藥鍼液의 效果

tBHP에 의한 酵素의 活性을 防止하는 紅花藥鍼液의 效果가 脂質의 過酸化를 防止함으로써 나타나는 事를 確認하기 爲하여 tBHP에 依해 誘發된 脂質의 過酸化에 對한 紅花藥鍼液의 效果를 調査하였다. 그림 5에서 보는 바와같이 synaptosome을 1mM tBHP에 漏出시켰을 때 脂質의 過酸化는 3.957±0.55 nmole MDA/mg protein에서 15.02±3.28 nmole MDA/mg protein으로 有意하게 增加함으로써 脂質의 過酸化가 顯著하게 增加되었음을 알 수가 있었다. tBHP을 處理할 때 紅花藥鍼液을 0.01%濃度되게 添加하였을 때 tBHP에 依해 增加되었던 脂質의 過酸化는 5.38±1.67 nmole MDA/mg protein으로 有意한 減少를 보였다. 正常組織에 紅花藥鍼液을 處理했을 때는 脂質의 過酸化는 4.02±1.79 nmole MDA/mg protein으로 正常組織

에서와 다르지 않았다. 따라서 tBHP에 의한 酵素의 活性을 防止하는 紅花藥鍼液의 效果는 脂質의 過酸化를 防止함으로써 나타났다.

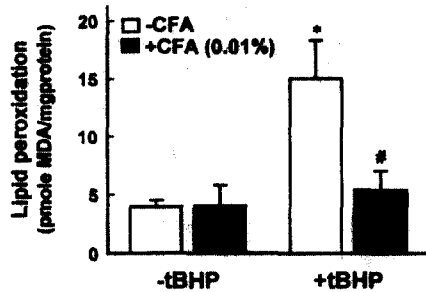


Fig. 5. Effect of Carthami-Flos aquacupuncture (CFA) on tBHP-induced lipid peroxidation in cerebral synaptosomes. Synaptosomes were treated with 1mM tBHP at 37°C for 60 min in the presence and absence of 0.01% CFA. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05 compared with -CFA; #p<0.05 compared with tBHP alone.

6. 紅花藥鍼液의 反應性酸素遊離基 除去 效果

그림 6은 紅花藥鍼液이 反應性酸素遊離基를 直接 除去하는 效果를 가지고 있는 事를 實驗한 結果이다. 사람의 白血球와 luminol이 含有하는 溶液內에 PMA를 添加했을 때 反應性酸素遊離基의 發生으로 나타나는 chemiluminescence의 增加를 보였고, 여기에 紅花藥鍼液을 0.002 및 0.01%되게 添加했을 境遇, chemiluminescence가 紅花藥鍼液의 濃度에 比例하여 減少하였다. 이러한 結果들은 紅花藥鍼液이 直接 反應性酸素基들을 除去하는 作用을 가지고 있음을 意味한다.

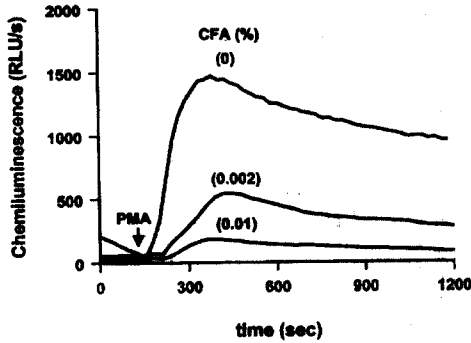


Fig. 6. Inhibition of chemiluminescence by Carthami-Flos aquacupuncture (CFA) in PMA-stimulated human neutrophils. Neutrophils (1×10^5 cells/ml) were mixed with luminol ($0.96 \mu\text{g/ml}$) in Krebs Ringer phosphate solution. After preincubation for 5 min with CFA, PMA ($0.05 \mu\text{g/ml}$) were added and chemiluminescence was measured.

IV. 고찰

腦는 奇恒之府의 하나로서 藏於陰而象於地 故藏而不瀉하고²⁸⁾, <素問·五臟生成篇>²⁸⁾에 “諸髓者蓋屬於腦”라 하고, 腦는 元神之府라 하여 모든 骨髓는 腦에 屬하며 元神이 居處하는 곳으로 精神思慮活動을 主管한다¹⁾. <靈樞·海論篇>²⁾에 “腦爲髓之海, …, 髓海不足, 則腦轉耳鳴, 脛痠眩冒, 目無所見, 懈怠安臥”라 하여 腦는 肢體의 運動을 圓滑히 維持하고 耳目을 똑똑케하는 作用이 있다³⁾.

西醫學의 腦組織의 病變은 腦血管障礙로 대부분 招來되며 이는 韓醫學에서 中風의 範疇에 屬한다. 中風의 病理를 살펴보면 <素問·生氣通天論>²⁸⁾에 “陽氣者, 大怒則形氣絕而血菀于上, 使人薄厥”이라 하여 五志過極을²⁹⁾, <素問·玉機真藏論>²⁸⁾에 “脾氣孤藏, 中央土, 以灌四旁, 其太過, 則令人四肢不去, …”라 하여 脾氣太過를³⁰⁾, <素問·通評虛實論>²⁸⁾에 “消痺, 仆擊, 偏枯, 痿厥, 氣滿發逆, 肥貴人則膏梁之

疾, …”라 하여 肥貴人의 膏梁之疾임을³⁰⁾, <素問·風論>²⁸⁾에 “風之傷人也, 或爲寒熱, 或爲熱中, 或爲寒中, 或爲厲風, 或爲偏枯, …”라 하여 外感風說을²⁹⁾, <素問·至眞要大論>²⁸⁾에 “諸風掉眩, 皆屬於肝, …, 諸痙項強, 皆屬於濕, …, 諸脈衝上, 皆屬於火, …, 諸風強直, 皆屬於風”이라 하여 風, 火, 濕, 熱이 原因이 되고³⁰⁾, <靈樞·海論>²⁾에 “腦爲髓之海, …, 髓海不足, 則腦轉耳鳴, …”이라 하여 腦髓不足에서도 中風에 該當되는 症 및 原因이 言及되었다^{29,30)}. 歷代醫家別 原因을 살펴보면 外·內風說, 火熱說, 濕痰說, 瘀血說, 虛說 등으로 整理할 수 있다^{29,30)}.

여기서 瘀血은 이미 生理的機能을 喪失한 血液이 凝聚하여 形成된 一種의 病理產物이며, 血液運行循環障礙로 血液速度減少의 病理常態를 包括한다³¹⁾. 原因은 氣虛, 氣滯, 血寒, 血熱, 飲食失調, 外傷, 出血 및 內出血이 消散 或 排出이 안되어 생긴다³¹⁾.

中風發病에서 氣滯와 血瘀는 항상 原因과 結果가 될 수 있어 氣滯血瘀로 脈絡을 막아 오래되면 卒中이 된다²⁹⁾. 最近 瘀血에 대한 研究를 보면 血液循環障礙 특히 微循環障礙로 일어나는 鬱血, 出血, 血栓形成 및 血液變成, 體成分變成, 高粘度血症狀態, 全血清度增加狀態 등과 關係된 有意한 報告들이 있다³¹⁾.

以上の 觀點으로 볼 때 瘀血은 血液循環의 障礙 및 血液成分의 變化와 密接한 關係가 있으며 이는 腦血液循環障礙로 腦疾患을 일으킬 수 있을 것으로 생각되며, 瘀血의 治法³²⁾으로 益氣活血, 理氣活血, 溫經活絡, 攻逐血瘀, 祛瘀止血 등의 治法이 運用되고 있다.

最近 新鍼療法으로 水鍼療法은 經絡學說의 原理에 依據하여 有關한 穴位나 壓痛點 및 反應點에 精製된 各種藥物을 注入하는, 刺鍼效果와 藥物作用을 結合한 것으로 비교적 높은 效果를 내고 있는 鍼灸科의 새로운 領域으로 활발한 臨床應用과 研究가 이루어지고 있다^{33,34)}.

本實驗에서 藥鍼療法으로 使用된 紅花(*Carthamus tinctorius* L.)는 菊花科 一年生 草木인 잎꽃으로 性味는 辛溫·無毒하고^{4,5)} 心·肝·脾에 歸經하며⁴⁻⁶⁾, safflower yellow, carthamin 等の 性分을 含有하였고⁶⁾, 主要效能은 活血潤燥, 破瘀血, 通經, 止痛消腫하여 産後血暈口噤, 腹內惡血不盡故痛, 跌撲損傷, 瘡毒腫脹, 産後瘀血作痛等을 治療하는⁶⁻⁸⁾ 活血祛瘀의 要藥이다⁹⁾. 藥理作用으로 子宮興奮作用, 血壓降下作用, 心臟興奮(少用量) 或 抑制(大用量)作用, 腸管興奮作用, 抗炎作用, 鎮痛作用等³⁵⁾ 이 있다. 最近 臨床研究로 中風後遺症의 半身不遂에 黃芪, 當歸等과 함께 用하는 補陽還五湯을 使用하여 虛血性 腦疾患을 治療하였고⁸⁾, 實驗的 研究로 沙土鼠에 紅花注射液을 左總頸動脈에 注射하여 虛血性 腦卒中, 腦水腫을 輕減시켜 腦卒中發生 및 死亡率을 떨어뜨리는 報告가 있었다³⁵⁾.

動物細胞에서는 細胞膜에 存在하는 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 에 의하여 Na^+ 濃度는 外部가 内部보다 높게되고 K^+ 은 内部가 外部보다 높은 濃度로 維持되고 있어³⁶⁾ 神經細胞의 安定膜電壓의 發生 및 維持, 興奮의 傳達이 可能하게 한다. 또한 이 酵素는 心筋을 包含한 여러 筋肉細胞들이 收縮할 수 있게 하는 등^{37,38)}, 여러 가지 生理的 機能에 關係하고 있다. 이러한 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酵素는 1957년에 S-kou³⁹⁾가 개의 末梢神經細胞에서 처음 發見한 後 이 酵素의 役割이 잘 알려지게 되었다. 따라서 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 가 抑制되게 되면 細胞機能에 變化가 招來되고 甚하면 細胞死亡까지 이르게 된다.

이에 著者는 以上과 같은 理論的 根據를 土臺로 하여 紅花藥鍼液이 神經組織에서 oxidant인 tBHP에 의한 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性抑制에 어떤 影響을 미치는 지를 確認하기 위하여 白色成兔의 大腦皮質에서 分離한 synaptosome에서 tBHP의 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性 抑制作用에 대한 紅花藥鍼液의 效果를 調査하였다.

本 實驗에서 tBHP가 0.1~2mM 範圍에서 濃度에 比例하여 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性을 抑制하였고, 類似한 程度로 脂質의 過酸化를 誘發시킴으로써 酵素의 活性 抑制가 脂質의 過酸化를 通하여 나타날 可能性을 보이고 있다. 따라서 tBHP과 같은 oxidant들은 脂質의 過酸化를 誘發하여 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性을 抑制함으로써 細胞機能을 阻害하고 細胞損傷을 일으키는 作用을 할지도 모른다. 이러한 結果는 Sun⁴⁰⁾이 원숭이의 大腦皮質에서 分離한 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性이 脂質의 過酸化에 의해 抑制된다는 結果와 一致한다.

實驗結果를 要約하면 紅花藥鍼液이 tBHP에 의한 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性 抑制를 防止하는 效果를 나타내었으며, 이러한 效果는 incubation時間이나, 酵素蛋白質의 濃度 및 溶液內의 ATP濃度 變化에 의해 影響을 받지 않았다. 紅花藥鍼液이 tBHP에 의해 誘發된 脂質의 過酸化를 有意하게 防止하였으며, 그 效果는 抑制된 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性을 回復시키는 程度와 類似하였다. 이러한 結果로 보아 紅花藥鍼液이 脂質의 過酸化를 抑制하는 作用機轉으로 tBHP에 의한 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性 抑制를 防止하는 것으로 推測된다.

紅花藥鍼液이 脂質의 過酸化를 防止하는 作用은 細胞內 抗酸化力을 增大시키든지 또는 直接 oxidant를 除去하는 機轉에 起因될 수 있다. 本 研究에서 紅花藥鍼液이 白血球에서 發生되는 酸素遊離基를 直接 除去하는 作用을 確認함으로써 tBHP에 의한 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性 抑制를 防止하는 紅花藥鍼液의 作用機轉이 oxidant를 除去하는 作用에 起因됨을 알 수가 있었다. 그러나 神經細胞에서 紅花藥鍼液이 細胞內 抗酸化力을 增大시키는 效果가 있는 지는 더욱 研究해야 될 것으로 生覺된다.

以上の 結果로 보아 紅花藥鍼液이 tBHP에 의한 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性 抑制로 인해 惹起된 腦組織損傷을 防止할 수 있었으므로 中風에 應用될 수 있

다고 生覺된다.

V. 결론

紅花藥鍼液이 家兔의 腦組織에서 t-BHP에 의한 Na⁺-K⁺-ATPase活性抑制에 미치는 影響을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 紅花藥鍼液은 tBHP에 의한 Na⁺-K⁺-ATPase活性抑制을防止하였다.

2. 紅花藥鍼液의 活性效果는 incubation時間, 蛋白質의 濃度變化, ATP濃度變化에 影響을 받지 않았다.

3. 紅花藥鍼液은 濃도에 比例하여 tBHP에 의해 抑制되었던 酵素의 活性을 回復 시켰다.

4. 紅花藥鍼液은 脂質의 過酸化를 防止함으로써 tBHP에 의한 酵素의 抑制을 防止하였다.

5. 紅花藥鍼液은 反應性酸素遊離基를 直接 除去하였다.

VI. 참고문헌

1. 大韓東醫生理學會編, 「東醫生理學」, 서울 : 慶熙大學校出版局, 1993, pp. 325~326.
2. 洪元植, 「精校黃帝內經靈樞」, 서울 : 東洋醫學研究院出版部, 1983, p. 174.
3. 朴炳烈, 「東洋醫學概論」, 대구 : 한림원, 1987, p.131
4. 辛民教, 「原色 臨床本草學」, 서울 : 永林社,

- 1991, pp. 467~468.
5. 顏正準 主編, 「中藥學」, 北京 : 人民衛生出版社, 1991, pp. 556~557.
6. 李尙仁, 「本草學」, 서울 : 醫藥社, 1975, pp. 448~449.
7. 李時珍, 「本草綱目」, 香港 : 商務印書館香港分館, 1979, p. 313.
8. 電載機, 張廷模 主編, 「中華臨床中藥學」, 北京 : 人民衛生出版社, 1998, pp. 1109~1111.
9. 陳存仁, 「圖說漢方醫藥大辭典」, 서울 : 東部文化史, 1984, p. 130.
10. Andreoli SP · McAteer JA · Seifert SA · Kempson SA, "Oxidant-induced alterations in glucose and phosphate transport in LLC-PK1 cells, mechanisms of injury", Am J Physiol, 1993, pp. 265, F377~F384.
11. McCord, J. M., "Oxygen-derived radicals in postischemic tissue injury", N. Eng. J. Med., 1985, pp. 159~163, 312.
12. 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, pp. 23~33, 126.
13. Floyd RA, "Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia", FASEB J, 1990, pp. 4, 2587~2597.
14. Traystman, R. J. · Kirsch, J. R. · Kohler, R. C., "Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion", J. Appl. Physiol., 19

- 91, pp. 71, 1185~1195.
15. Brondy, S. C. · LeBel, C. P., "The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system", *Free. Radic. Biol. Med.*, 1993, pp. 14, 633~642.
 16. Olanow, C. W., "A radical hypothesis for neurodegeneration", *TINS*, 1993, pp. 16, 439~444.
 17. 朴恩熟 · 尹種和 · 金甲成 · 宋春浩 · 安昌範, "紅花水鍼이 Endotoxin에 의한 白鼠血栓症에 미치는 影響", 「大韓鍼灸學會誌」, Vol.10, no.1, 1993, pp. 267~287.
 18. 孫鐵薰 · 金在圭 · 安秉哲, "濃度別 紅花水鍼刺戟이 흰쥐 腦部位別 Catecholamine含量에 미치는 影響", 「大韓鍼灸學會誌」, Vol.9, no.1, 1992, pp. 53~69.
 19. 楊忠貴 · 黃學華, "運用活血化瘀法治療水腫初探", 「中醫函授通訊」, Vol.12, no.5, 1993, pp. 29~30.
 20. 曹式麗 外, "祛瘀生新法治療慢性腎功能不全 遠期療效分析", 「天津中醫」, Vol.1, 1992, pp. 10~11.
 21. 金泰國 · 宋春浩, "토끼 腦의 synaptosome에서 Oxidant에 의한 glutamate蓄積 變化에 대한 胡桃藥鍼液의 效果", 「大韓鍼灸學會誌」, Vol.15, no.1, 1998, pp. 447~455.
 22. Hojos F, "An improved method of the preparation of synaptosomal fraction in high purity. *Brain Res*", 1975, pp. 93, 485~489.
 23. Fiske CH and SubbaRow Y, "The colorimetric determination of phosphorus", *J Biol chem*, 1925, pp. 66, 375~400.
 24. Bradford M, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem*, 1976, pp. 72, 248~524.
 25. Uchiyama M · Mihara M, "Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*", 1978, pp. 86, 271~278.
 26. Grishman MB · Engerson TD · McCord JM · Jones HP, "A comparative study of neutrophil purification and function", *J Immunol Methods*, 1985, pp. 82, 315~320.
 27. Sendecor, George W. and W. G. Cochran: *Statistical Methods*, 6th ed., Ames, Iowa State University Press, 1967.
 28. 洪元植, 「精校黃帝內經素問」, 서울: 東洋醫學研究院出版部, 1983, p. 16, 39, 42, 57, 73, 109, 157, 303, 304.
 29. 金永錫, "中風의 病因 病理에 關한 文獻의 考察", 「東洋醫學」, Vol7, no1, 1981, pp. 42~54
 30. 金永錫, "中風의 病因 病理에 關한 文獻의 考察", 「東洋醫學」, Vol7, no1, 1981, pp. 42~54
 31. 文濬典 · 安圭錫 · 崔昇勳共編, 「東醫病理學」, 서울: 高文社, 1990, pp. 74~76.
 32. 金完熙 · 崔達永, 「臟腑辨證論治」, 서울: 成輔社, 1990, pp. 371~372.
 33. 全國韓醫科大學 鍼灸 · 經穴學教室, 「鍼灸學」, 서울: 集文堂, 1988, pp. 1457~1467.
 34. 權龍澤, "藥鍼의 臨床的 效能을 통한 藥鍼定義와 의 符合性에 關한 文獻의 考察", 「慶熙大博士中間論文」, 1988.
 35. 謝宗萬 主編, 「全國中草藥匯編」, 北京: 人

- 民衛生出版社, 1996, pp. 395~396.
36. Albers RW, "Biochemical aspects of active transport", *Ann RevBiochem*, 1967, pp. 36, 727~756.
37. Hokin LE·Dahl JL, "the sodium potassium adenosinetriphosphatase", In *Metabolic Pathways*, 3rd ed., VI. *Metabolic Transport*, edited by Hokin KE, Academic Press Inc, 1972, pp. 270~315.
38. Schwartz A Lindenmayer GE·Allen JC, "The sodium-potassium adenosine triphosphatase, Pharmacological, physiological and biochemical aspects", *Pharmacol Rev*, 1975, pp. 3~134.
39. Skou JC, "The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves", *Biochim Biophys Acta*, 1957, pp. 23, 394~401.
40. Sun AY, "The effect of lipoxidation on synpatosomal($\text{Na}^{++}\text{K}^{++}$)-ATPase isolated from the cerebral cortex of squirrel monkey", *Biochim Biophys Acta*, 1972, pp. 266, 350~360.