

원저

瓦松藥鍼液이 腎臟細胞에서 H₂O₂에 의한 細胞死亡 및 DNA 損傷에 미치는 影響

박상원 · 송춘호

동의대학교 한의과대학 경혈학교실

Abstract

The Effects of *Orostachys Japonicus* A. Berger Aquacupuncture on Cell Death and DNA Damage Induced by H₂O₂ in Renal Tubular Cell

Park, Sang-Won · Song, Choon-Ho

Department of AM-Meridian & Pointology,
College of Oriental Medicine, Dong Eui University

Objectives : This study was performed to determine if *Orostachys japonicus* A. Berger aquacupuncture (OjB) provides the protective effect against the loss of cell viability and DNA damage induced by oxidant in renal proximal tubular cells.

Methods : The cell viability was evaluated by a MTT reduction assay and DNA damage was estimated by measuring double stranded DNA breaks in opossum kidney (OK) cells, an established proximal tubular cell line. Lipid peroxidation was determined by measuring malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation.

Results : H₂O₂ increased the loss of cell viability in a time-dependent manner, which were prevented by 0.1% OjB. The protective effect of OjB was dose-dependent over concentration range of 0.05-0.5%. H₂O₂ caused ATP depletion and DNA damage, which were prevented by OjB and the hydrogen peroxide scavenger catalase. The loss of cell viability by H₂O₂ was not affected by the antioxidant DPPD, but lipid peroxidation by the oxidant was completely inhibited by DPPD.

Conclusions : These data suggest that H₂O₂-induced death results from a lipid peroxidation-independent mechanism and the protective effect of OjB is not associated with its antioxidant activity.

Key words : *Orostachys Japonicus* A. Berger, Cell death, DNA damage, H₂O₂, Renal tubular cell

· 접수 : 1월 7일 · 수정 : 1월 14일 · 채택 : 1월 17일

· 교신저자 : 송춘호, 부산시 부산진구 양정2동 산45번지 동의대학교 한의과대학 경혈학교실(Tel. 051-850-8643)
E-mail: chsong@hyomin.dongeu.ac.kr

I. 서론

內經에서는 腎에 對해 “腎者主水 受五臟六腑之精而藏之 故五臟盛 乃能瀉” “作強之官 伎巧出焉”¹⁾이라 하여 人體의 生殖, 成長, 發育, 老衰, 泌尿作用에 關係된 臟器로 나타내고 있다. 西洋醫學에서 腎臟은 尿의 生成, 酸과 鹽基의 平衡, 滲透壓調節 등 體液의 恒常性을 維持하며 生殖, 內分泌, 免役能監視, 中樞神經系統의 部分的인 生理機能들을 包含하고 있다²⁻³⁾.

瓦松은 氣味가 涼·無毒, 酸·苦·平하고 清熱解毒, 利濕, 消腫, 癰毒, 通經破血, 牙齦腫痛, 脣裂生瘡, 惡瘡不斂 등을 다스리는 效能이 있다⁴⁻⁵⁾.

反應性酸素基(reactive oxygen species, ROS)는 血管收縮에 의한 局所貧血, 絲球體腎炎, gentamicin에 의한 急性腎臟疾患과 같은 많은 腎臟疾患의 病因에 關係되어 있다⁶⁾. 다양한 刺戟에 대한 反應으로 腎臟組織細胞는 酸素遊離基(oxygen free radicals)들을 發生시킬수 있는 可能性을 가지고 있음이 여러 生體 實驗과 研究를 통하여 立證되고 있다⁷⁾.

生體細胞膜은 不飽和脂肪酸을 많이 含有하고 있기 때문에 酸素遊離基들에 의해 쉽게 脂質의 過酸化가 發生하게 되는데⁸⁾, 酸素遊離基들이 직접 作用하거나 脂質의 過酸化를 통해 結果적으로 細胞의 透過性を 增加시키고⁹⁾ Na-K-ATPase와 같은 필수단백질에 影響을 미친다. 단백질, 지방, 탄수화물, DNA, RNA는 모두 oxidant에 의한 細胞損傷의 對象이 될 수 있지만¹⁰⁾ DNA分子에 대한 약간의 損傷은 다른 어떤 細胞에 대한 損傷보다도 더 큰 結果를 얻어낼 수가 있다.

天然植物에서 抽出한 藥은 西洋醫學에서 큰 影響력을 발휘하고 있다. 약 120여종의 藥들이 植物에서 抽出되고 있고 이중 많은 藥들이 여러 治療活動

에 사용되고 있으며 현재 사용중인 藥들 중에는 이러한 植物에서 추출하여 만들어진 것이 많다. 그러나 이러한 藥들이 急性腎臟疾患을 豫防할 수 있는지는 아직 알려져 있지 않다. 최근 윤 등¹¹⁾은 瓦松藥鍼液이 神經細胞에서 H₂O₂ 로 인한 apoptosis를 豫防한다고 하였다. 본 研究에서는 瓦松藥鍼液이 oxidant에 의해 처리된 opossum kidney(OK) 細胞에서 細胞死亡과 DNA 損傷을 豫防할 수 있는지를 實驗하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 瓦松藥鍼液(Orostachys japonicus A. Berger aquacupuncture : OjB)의 製造

483g의 粉碎된 加工되지 않은 藥에 6,000 ml의 증류수를 가한 후 100℃에서 3시간 加熱후 抽出하였으며, 전체 抽出物은 減壓濃縮하여 78.2g이 되었다. 乾燥狀態의 抽出物은 Hank's balanced salt solution(HBSS, Sigma Co. USA)에 사용하기 직전 溶解시켰다.

2. 주머니쥐 OK 細胞 培養

OK 細胞는 American Type Culture Collection(Rockville, MD)에서 구입하여 75 cm² culture flask에서 일련의 단계를 거쳐 보관하였다(Costar, Cambridge, MA). 이 細胞들은 10%의 fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium 과 Ham's F12(DMEM/F12, Sigma Chemical Co.)培養液으로 CO₂ 培養器(37℃, 5% CO₂)에서 培養하였다.

培養된 細胞의 subculture는 0.02% EDTA-0.05% trypsin 溶液을 사용하여 준비하였고, 이 細胞들은 10%의 fetal bovine serum을 含有하고 있

는 DMEM/F12 培養液으로 24-well culture plates에서 培養되었다. 모든 實驗은 細胞 培養이 이루어지는 3~4日 이후에 시작되었다. 細胞는 115 NaCl, 5KCl, 25NaHCO₃, 2NaH₂ PO₄, 1MgSO₄, 1CaCl₂와 5glucose(pH7.4)를 含有하고 있는 H-ank's balanced salt solution(HBSS, Sigma Co. USA)에서 H₂O₂로 處理되었다.

3. 細胞 生存率 測定

細胞 生存率 測定은 MTT assay를 이용하였다. 細胞는 24-well dishes에서 培養된 후 HBSS로부터 37℃ 5% CO₂ 培養器에서 圖表에 따라 지정된 時刻에 H₂O₂에 露出시켰다. 細胞를 씻은 후 HBSS에 0.5mg/ml를 포함하고 있는 500μl의 MTT溶液을 각각의 24-well dishes에 加하고 위에 펼쳐진 環境條件을 除去하고 나서 60分 동안 細胞를 培養하였다. 그리고 5分동안 3DMSO 110μl를 加한 후, 초소형 plate 눈금을 이용해서 550 nm에서 吸光度를 測定하였다(Molecular Device Co- rp., Menlo Park, CA, USA). data는 control의 percentage로 資料를 나타냈으며 이는 H₂O₂가 없는 상태에서 실시되었다.

4. DNA 단일나선구조 測定

DNA 가닥 破壞는 DNA 凝結分析에 의해 測定되었다¹²⁾. 24-wells에서 培養된 細胞들은 0.25 uCi/ml [³H]methylthymidine에 24시간 동안 있게한 후 라벨을 붙여 놓았다.

세포들을 HBSS를 이용하여 철저히 씻은 후 0.5ml의 lysis buffer(10mM Tris/HCl, 10 nM EDTA, 50mM NaOH, 2% SDS, pH 12.4)와 함께 effendorf tube에 溶解시킨 후 0.12 M KCl 0.5ml를 追加하였다. lysate는 65℃에서 10分間 培養後 다시 5分間 얼음위에서 식힌 후 凝結시켰다. 이러한 狀態에서 DNA 단백질인 K-SDS 凝結物이 形成되

고 여기서 저입자의 끊어진 DNA가 放出되도록 하였다. 이 DNA는 10℃, 200g에서 10分間 원심분리 하여 recover된 후 200mM HCl 1ml를 含有하고 있는 液體의 閃光약병(scintillation vial)으로 옮겨졌다. 이중나선구조의 DNA에서 그대로 保存된 凝結物은 65℃, 1ml의 물속에서 溶解되었다. 試驗管을 1ml의 물로 씻고 8ml의 閃光액을 각각의 약병에 添加하였으며, 남아 있는 이중 나선구조의 DNA 量을 각각 sample에 대해서 計算하였다.

계산 방법

$$= \frac{d.p.m값}{전체 d.p.m값 + 위에 뜨는 내용물} \times 100$$

DNA 損傷程度는 단일나선구조 DNA 對 전체나선구조 DNA(이중나선구조+단일나선구조)로 표현되었다.

5. ATP 內容物 測定

細胞內的 ATP 水準은 luciferin-luciferase 分析에 의해 測定되었다. oxidant stress에 露出된 後 細胞들은 0.5% Triton X-100의 500μl에 溶解시켰고, 0.6 M perchloric acid 100μl에서 酸化시킨 후 얼음위에 놓아 두었다. 細胞의 suspension은 4mM MgSO₄ (pH 7.4)를 含有하고 있는 10mM의 potassium phosphate buffer를 넣고 稀釋시킨 後, 稀釋前 이 10μl의 sample에 100μl의 20mg/ml luciferin-luciferase를 加하였다. Luminometer (MicroLumat LB96P, Berthold, Germany)에 빛의 放出이 20s로 나타나도록 하였으며, 단백질용량은 細胞 suspension의 aliquot에 의해 決定하였다.

6. 脂質의 過酸化 測定

脂質의 過酸化는 Uchiyama와 Mihara의 方法¹³⁾으로 그 產物인 Malondialdehyde (MDA)의 量을

測定하여 評價하였다. 腎臟 細胞는 차가운 1.15% KCL(5% wt/vol) 溶液속에서 破碎하였다. 이 組織 破碎 均質液 0.5ml에 1% phosphoric acid 3ml와 0.6%의 thiobarbituric acid 溶液 1ml를 添加하여 끓는 물에서 45분 동안 加熱하였다.

n-butanol 4ml 를 添加하여 완전히 섞은 다음 2,000g에서 20분 동안 遠心分離한 後 上層液의 吸光度를 535와 520nm에서 測定하였다(Hewlett Packard, 8452A). MDA 값은 단백질 1 mg 당 pmoles로 表示하였고, 단백질 濃度는 Bradford의 方法¹⁴⁾으로 測定하였다.

7. ROS 生成 測定

ROS의 生成은 phorbol esters에 의해 活性化된 neutrophils속에 있는 luminol-dependent chemiluminescence를 사용해서 測定하였다¹⁵⁾. 人體의 neutrophils 는 standard dextran sedimentation 과 gradient separation on Histopaque 를 사용해서 건강한 지원자들의 末梢血液에서 分離하였다. 이러한 절차를 통해 건강한 neutrophils를 95% 生成해냈다. Neutrophils(1×10^5 cells/ml)는 3분 동안 OjB와 함께 또는 없이 Krebs Ringer-phosphate buffer 2ml 속의 luminol(0.96 μ g/ml)과 培養되었다. Phorbol ester PDBu(20 μ M)가 添加되었고 chemiluminescence는 chemiluminescence 分析器(Biolumet LB 9505, Berthold, Germany)를 사용해서 測定하였다.

8. 試藥

Hydrogenperoxide(H_2O_2), catalase, luciferin-luciferase, thiobarbituric acid, malonaldehyde t-etraethylacetal, phorbol-12, 13-dibutyrate(PDBu), 5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione(luminol), and(3-[4,5-dimethylthiaz

ol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA)社로부터 [³H]methylthymidine는 American International(Amersham, UK)社로부터 N, N'-diphenyl-p-phenylenediamine(DPPD)는 Aldrich Chemical(Milwaukee WI, USA)社로부터 購入한 製品을 사용하였고 그 외 기타 모든 試藥은 特級品을 사용하였다.

9. 統計處理

實驗成績은 平均值 \pm 標準誤差(Mean \pm S.E.)로 나타내었으며 對照群과 實驗群과의 平均의 差異를 檢定할 때는 Student's t-test로 檢定하여 p값이 0.05미만일 때 有意성이 있는 것으로 判定하였다.

III. 실험성적

1. OjB가 있을 때와 없을 때 細胞 生存率에 H_2O_2 가 影響을 미치는 時間過程

H_2O_2 에 의한 細胞死亡의 時間過程을 決定하기 위해서 細胞를 10分에서 180分 동안 0.5mM H_2O_2 에 露出시켰다. 細胞 生存率의 重大한 損失은 H_2O_2 에 露出시킨지 30分 後에 나타났고 최고 180분까지 增加했다. 그러나 細胞生存率의 損失은 0.1%의 OjB를 添加함으로써 豫防되었다.

OjB의 豫防效力을 알아보기 위해 細胞를 다양한 OjB 濃度를 가진 0.5mM H_2O_2 에 露出시켰다. 結果는 그림2에 要約되어 있다. OjB 濃度에 比例하여 H_2O_2 로 인한 細胞死亡은 豫防되었고 뚜렷한 豫防效果가 0.05%에서 나타났다. OjB는 H_2O_2 處理되지 않은 對照群 細胞에서는 아무런 效力을 發揮하지 않았다(Fig.1, 2).

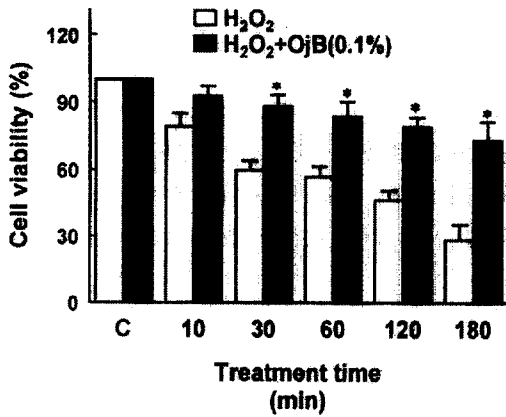


Fig. 1. Time course of H₂O₂-induced cell death in opossum kidney (OK) cells. Cells were exposed to 0.5 mM H₂O₂ for various times in the presence or absence of 0.1% *Orostachys japonicus* A. Berger aquacupuncture (OjB). Cell death was evaluated by a MTT reduction assay. Data are Mean ± S.E. of six experiments.

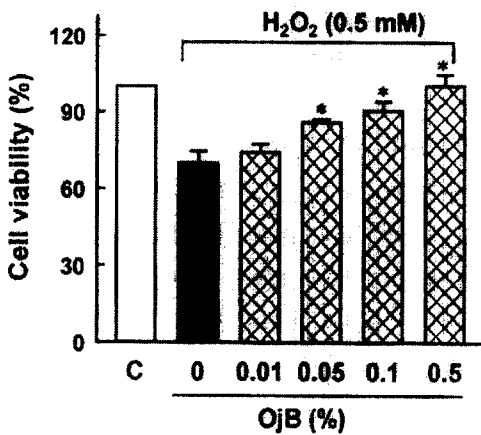


Fig. 2. Effect of *Orostachys japonicus* A. Berger aquacupuncture (OjB) on H₂O₂-induced cell death in opossum kidney (OK) cells. Cells were exposed to 0.5 mM H₂O₂ for 60 min the presence or absence of various concentrations of OjB. Cell death was evaluated by a MTT reduction assay. Data are Mean ± S.E. of six experiments. *p<0.05 compared with control (C).

2. H₂O₂에 의한 ATP 枯渴에 대한 OjB의 效力

ATP 枯渴현상은 oxidative stress에 대한 細胞들의 初期 反應현상임이 立證되었다¹⁶⁻¹⁷. 이것은 oxidant에 의한 細胞死亡의 病因論과 관련이 있는 것으로 알려져 있다¹⁸. 이리하여 OjB가 oxidant에 의한 ATP 枯渴 현상을 豫防할 수 있는지 없는지를 調査했다. 그림3 에서 보는바와 같이 H₂O₂는 ATP 水準을 對照群(3.44±0.18 vs 8.23±0.56 nmole/mg protein in control)의 약 42% 水準으로 減少시켰다. H₂O₂ 로 인한 ATP 枯渴현상은 0.5% OjB에 의해 豫防되었고, 예상대로 H₂O₂ scavenger enzyme catalase 는 ATP 枯渴을 완전히 豫防하였다(Fig. 3).

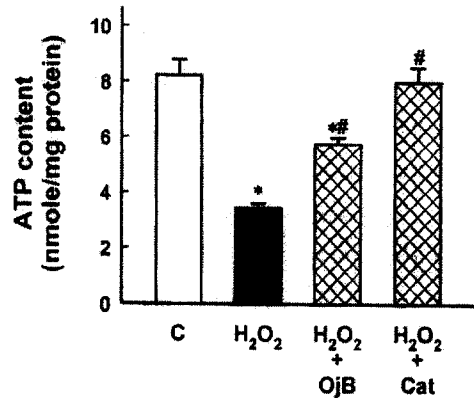


Fig. 3. Effect of *Orostachys japonicus* A. Berger aquacupuncture (OjB) and hydrogen peroxide scavenger on H₂O₂-induced ATP depletion in opossum kidney (OK) cells. Cells were exposed to 0.5 mM H₂O₂ for 60 min the presence or absence of 0.5% and 300 u/ml catalase. Data are Mean ± S.E. of four experiments. *p<0.05 compared with control (C), #p<0.05 compared with H₂O₂ alone.

3. Oxidant로 인한 DNA 損傷에 대한 OjB 效力

OjB가 H₂O₂로 인한 DNA 損傷에 대해 豫防效果가 있는지를 調査해 보기 위해 0.5% OjB가 있는 것과 없는 것으로 구분해서 H₂O₂로 處理된 細胞속에서 DNA 破損程度를 測定했다. 그림4에서 보듯이 0.5mM H₂O₂에 露出된 細胞는 結果적으로 DNA 損傷에 엄청난 增加를 가져 왔으며 이중나선 구조의 DNA 減少로 나타났다(37.02 ± 4.19 vs 86.55 ± 5.93% in control). 이러한 變化는 0.5% OjB(60.95 ± 4.27)를 添加함으로 해서 크게 豫防되었다. 이와 유사하게 H₂O₂에 의한 DNA 損傷은 catalase에 의해 豫防되었다(Fig. 4).

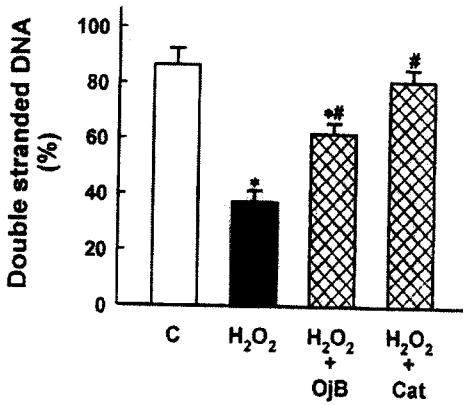


Fig. 4. Effect of *Orostachys japonicus* A. Bergeraquacupuncture (OjB) and hydrogen peroxide scavenger on H₂O₂-induced DNA damage in opossum kidney (OK) cells. Cells were exposed to 0.5 mM H₂O₂ for 60min the presence or absence of 0.5% and 300 u/ml catalase. Data are Mean ± S.E. of four experiments. *p<0.05 compared with control (C), #p<0.05 compared with H₂O₂ alone.

4. H₂O₂로 인한 細胞死亡에 대한 OjB와 Antioxidant의 效力比較

H₂O₂로 인한 細胞死亡에 대하여 antioxidant의 效能이 OjB의 效能과 比較되었다. 結果는 그림5에

요약되어 있다. OjB(0.5%)와 catalase(300 u/ml)는 0.5mM H₂O₂에 의한 細胞 生存率의 損失을 완전히 豫防하였다. 對照적으로 아주 강력한 antioxidant인 DPPD 20 uM은 H₂O₂에 의한 細胞生存率 損失에 影響을 미치지 못했다. 이는 H₂O₂로 인한 細胞死亡이 lipid peroxidation과 연관되어 있지 않음을 나타낸 것이다. H₂O₂로 인한 細胞死亡에 DPPD의 豫防效果가 없는 것은 oxidant가 이 研究에서 사용된 濃度에서 lipid peroxidation을 誘導해 내지 못했기 때문일 수도 있거나 아니면 DPPD가 lipid peroxidation을 抑制하지 못했기 때문이다. 가능성 있는 實驗을 위하여 lipid peroxidation에 대한 H₂O₂와 DPPD의 效能이 研究되었다. 그 結果는 그림6에 요약되어 있다. H₂O₂는 lipid peroxidation을 눈에 띄게 增加 시켰으며 이것은 OjB와 DPPD에 의해 완전히 豫防되었다(Fig. 5, 6).

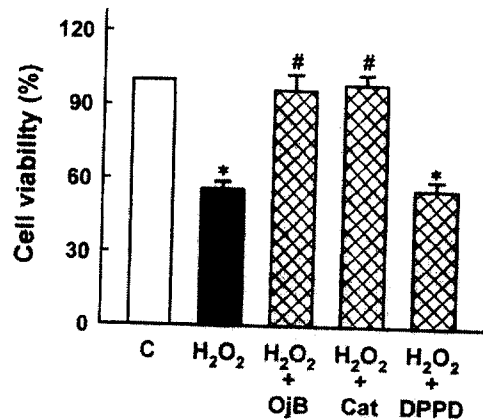


Fig. 5. Comparison of effects of *Orostachys japonicus* A. Berger aquacupuncture (OjB), hydrogen peroxide scavenger, and antioxidant on H₂O₂-induced cell death in opossum kidney (OK) cells. Cells were exposed to 0.5 mM H₂O₂ for 60 min the presence or absence of 0.5% and 300 u/ml catalase, and 20 M N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD). Data are Mean ± S.E. of four experiments. *p<0.05 compared with control (C), #p<0.05 compared with H₂O₂ alone.

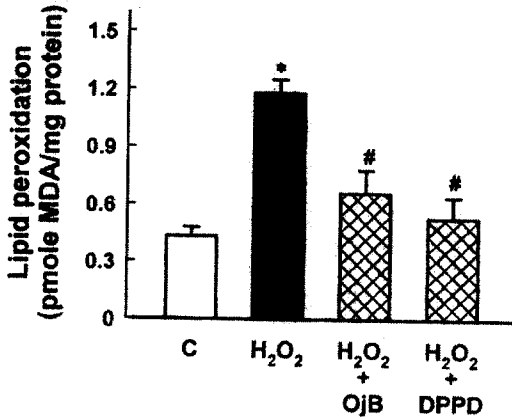


Fig. 6. Effect of *Orostachys japonicus* A. Berger aquacupuncture (OjB) and antioxidant on H₂O₂-induced lipid peroxidation in opossum kidney (OK) cells. Cells were exposed to 0.5 mM H₂O₂ for 60 min in the presence or absence of 0.5% and 20 M N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD). Data are Mean ± S.E. of four experiments. *p<0.05 compared with control (C), #p<0.05 compared with H₂O₂ alone.

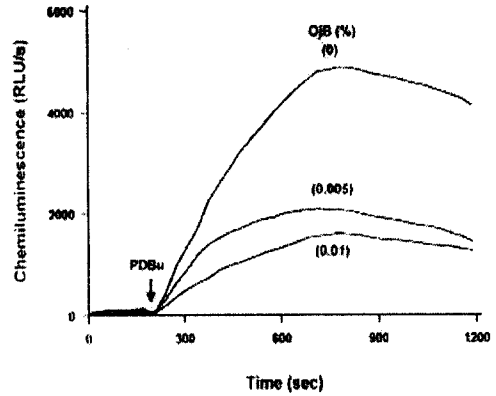


Fig. 7. Effect of *Orostachys japonicus* A. Berger aquacupuncture (OjB) on in phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)-induced production of reactive oxygen species in human neutrophils. Neutrophils (1x10⁵ cells/ml) were incubated with luminol (0.96 μg/ml) in 2 ml of Krebs-Ringer-phosphate buffer in the absence or presence of OjB for 3 min. A phorbol ester PDBu (20 μM) was added and chemiluminescence was measured using a chemiluminescence analyzer.

5. 人體의 Neutrophils에서 ROS 生成에 미치는 OjB의 效力

Neutrophils가 phorbol ester PDBu에 露出되면 ROS 生成이 增加되었는데 證據로서 chemiluminescence가 增加했다. 이러한 增加는 OjB에 의해 최저 0.005%까지 줄어 들었다(Fig. 7).

IV. 고찰

瓦松은 돈나물과(crassulaceae)에 속한 多年生草 本人 바위솔(지붕지기)의 全草로 昨葉荷草, 屋上無根草, 向天草 등의 異名이 있으며 氣味가 酸·平·無毒하고 口中乾痛, 水穀血痢, 止血, 行女子經路, 大腸下血, 小便沙淋, 通經破血, 頭風白屑, 牙齦腫痛, 脣

裂生瘡, 湯火灼傷, 惡瘡不斂, 風狗咬傷을 다스리는 效能이 있다 하였다⁴⁾. 主成分은 大量的 oxalic acid 를 含有하고 있고 그 效能은 涼血시키어 行血하는 作用이 있어 胃熱, 酒積, 煙火 및 金石丹毒으로 血痢, 腸風이 된 것을 治療하고 여자의 血熱로 經絡이 不行하고 通하지 못하여 생기는 月經不順을 涼血시키어 行血시키므로 淸熱解毒, 止血, 利濕, 消腫, 治吐血, 鼻衄, 血痢, 肝炎, 血疾, 熱淋, 痔瘡, 濕疹, 癰毒, 痔瘡, 湯火灼傷 등을 다스린다⁵⁾.

反應性酸素基는 老化, 發癌 그리고 心筋梗塞, 關節炎 그리고 알츠하이머와 같은 여러 가지 急性 및 慢性 神經性疾患의 病因으로 인정되고 있다¹⁹⁻²⁰⁾. ROS는 正常細胞의 미토콘드리아에서 代謝過程中 發生되고 있으나 몸속에는 이들을 除去하는 酵素나 物質들을 가지고 있어 細胞속에서 發生되는 有害酸素基들이 細胞損傷을 일으키지 못하도록 調節하고

있다. 그러나 藥物 또는 細胞內 環境의 변화로 反應性酸素基의 發生이 增加되거나 反應性酸素基을 除去하는 防禦作用이 軟弱하게 되었을 때 細胞는 損傷을 받게 되고 심하면 死亡까지 이르게 된다²¹⁾. 따라서 反應性酸素基에 의한 細胞損傷을 防止할 수 있는 새로운 antioxidant 藥의 開發이 요구되어져 왔다.

天然植物에서 抽出한 藥은 현재까지 약 120여종에 달하며 대표적인 것으로는 steroids, cardiotonic glycosides, anticholinergics, analgesics, antimalarials, anticancer agents²²⁾ 등을 들 수 있다. 하지만 이러한 藥이 急性腎臟疾患을 사전에 예방할 수 있는지에 대해서는 아직 알려진 바 없다.

최근에 보고되고 있는 抗酸化관련 實驗研究들은 單味劑, 複合處方, 藥鍼製劑, 理學的 因子 등을 이용하여 腎臟機能, 肝機能, 腦·神經組織 등에서의 oxidant에 의한 물질 移動障碍를 防止하는 作用이 있음을 보고한 바 있다²³⁾.

본 研究에서는 腎臟細胞에서 oxidant인 H₂O₂를 處理하여 細胞死亡 및 DNA 損傷에 미치는 瓦松藥液의 效果를 調査하였다.

그림1은 OK 細胞에서 H₂O₂로 인한 細胞死亡의 時間過程을 나타낸 것으로 細胞生存率의 損失은 H₂O₂에 露出시키기 시작한 30分 後부터 減少를 나타내었다.

그림2는 OK 細胞에서 H₂O₂로 인한 細胞死亡에 대한 OjB의 豫防效力能에 대한 실험으로 OjB는 H₂O₂로 인한 細胞死亡을 豫防하였다.

Catalase는 free radical에 의한 細胞 毒性時 初期에 反應하는 중요한 抗酸化 酵素로 hydrogen peroxide를 分解함으로써 hydrogen peroxide 增加에 따른 組織損傷을 防止하는 效果가 있으며 여러 臟器에서 다양하게 존재하지만 腎臟과 肝臟에서 活性도가 특히 높게 나타나는데²⁴⁾ 그림3은 OK 細

胞에서 H₂O₂로 인한 ATP 枯渴에 OjB와 hydrogen peroxide scavenger의 效能에 대한 실험으로 OjB는 H₂O₂로 인한 ATP 枯渴현상을 豫防하였고 H₂O₂ scavenger enzyme catalase는 ATP 枯渴을 완전히 豫防하였다.

그림4는 OK 細胞에서 H₂O₂로 인한 DNA 損傷에 OjB와 hydrogen peroxide scavenger의 效能에 대한 실험이다. DNA 損傷은 生體內에서 白血球가 貪食作用을 할 때 H₂O₂를 發生시키는데 이때 100 uM미만의 낮은 농도의 H₂O₂ 정도로도 주위 細胞에 損傷을 줄 수 있으며 다양한 target 細胞중에서 DNA배열과괴로 유도할 수 있다²⁵⁻²⁷⁾. 세포는 DNA 損傷에 엄청난 增加를 가져왔으며 이중나선 구조의 DNA 減少로 나타났다. 이러한 變化는 OjB를 添加함으로써 豫防되었다.

그림5는 OK 細胞에서 H₂O₂로 인한 細胞死亡에 대하여 OjB와 hydrogen peroxide scavenger와 antioxidant의 效能比較에 대한 실험으로 OjB와 catalase는 H₂O₂에 의한 細胞 生存率의 損失을 완전히 豫防하였지만 DPPD는 影響을 미치지 못했다.

그림6은 lipid peroxidation에 대한 H₂O₂와 DPPD의 效能에 대한 실험으로 H₂O₂는 lipid peroxidation을 增加시켰으며 OjB와 DPPD에 의해 완전히 豫防되었다.

그림 7은 human neutrophils에서 reactive oxygen species(ROS)의 生成을 誘發한 phorbol 12, 13-dibutyrate(PDBu)에 대한 OjB의 效能 研究이다. neutrophils가 phorbol ester PDBu에 露出되면 ROS 形成이 增加되었으며 그 證據로서 chemiluminescence가 增加하였으나 OjB에 의해 최저 0.005%까지 줄어 들었다.

이상의 실험을 종합해 볼 때 OjB는 antioxidant 活動을 하지만 OjB의 豫防效果는 antioxidant 活動때 문이 아닐 가능성이 크다. 왜냐하면 H₂O₂는 lipid peroxidation과는 獨立的인 方法을 통해 細胞의 生

存率 損失을 誘發하기 때문이다.

본 研究에서 OjB는 腎臟 epithelia 細胞에서 oxidant인 H₂O₂로 誘發되는 細胞生存率의 損失을 豫防하였다. 이와 같이 OjB는 oxidant에 의한 ATP 枯渴을 豫防하였다. 비록 ATP 枯渴이 oxidant로 인한 細胞死亡의 病因에 관련되어 있는 것으로 主張되고 있지만²⁸⁾ 다른 研究들에 의하면 oxidant에 의한 損傷은 ATP 枯渴과는 관계가 없는 것으로 밝혀졌다²⁹⁻³¹⁾. 그러므로 H₂O₂로 인한 細胞死亡이 OjB에 의해 豫防된다는 것이 ATP 枯渴의 豫防에 의한 것인지는 명확하지 않다.

이와 같이 만약 OjB가 antioxidant 활동을 한다면 OjB는 H₂O₂로 인한 細胞死亡을 豫防할 수 있다. 실제로 OjB는 강력한 antioxidant 물질인 DPPD와 같이 H₂O₂에 의한 脂質의 過酸化를 크게 抑制했다. 그리고 直接的으로 phorbol ester에 의해 活性化된 neutrophils로부터 ROS 生成을 除去했다(그림 6, 7). 이것은 OjB가 antioxidant 활동을 하고 있음을 나타낸 것이다. 이 資料들을 根據로하여 OjB는 oxidant로 인한 細胞死亡에 대해 豫防效力을 나타낸다고 主張할 수 있다.

H₂O₂로 인한 脂質의 過酸化는 antioxidant에 의해 완전히 抑制되기는 했지만 그림에도 불구하고 H₂O₂로 인한 細胞死亡은 antioxidant인 DPPD에 의해 변화되지 않았다(그림 5, 6).

이러한 結果는 H₂O₂는 脂質의 過酸化와는 독립된 mechanism을 통해서 細胞死亡을 誘發함을 나타낸다. 이와 유사한 것이 antioxidant에 의한 細胞損傷을 脂質의 過酸化와 별개로 보는 것이 腎臟 proximal tubules를 사용한 研究³¹⁻³²⁾와 hepatocytes를 이용한 研究³⁴⁾에서 밝혀졌다. 이 資料들을 바탕으로 볼 때 OjB의 豫防效果는 antioxidant 물질 활동이 아닌 다른 mechanism에 의해 發生된 것일 가능성이 많다. DNA는 oxidant stress의 중요한 細胞, 分子의 對象이다. oxidant stress는 단일 구조

과괴의 유도, 베이스 수정 또는 apoptosis誘導로 인한 DNA 損傷을 가져오는 結果를 招來한다³³⁻³⁶⁾.

本 研究은 OjB가 마치 hydrogenperoxide scavenger catalase와 같은 H₂O₂로 誘發되는 DNA 損傷을 效果적으로 豫防함을 立證했다. 하지만 DNA 損傷과 celllysis 사이의 관계가 논란이 되고 있기 때문에 本 研究 結果만으로는 OjB의 豫防效力이 DNA 損傷 豫防에 影響을 미치는지 分明하지는 않다. 많은 研究家들이 DNA 損傷이 細胞死亡에 중요한 작용을 하고 있다고 발표하였다^{33,34,37)}. 반면에 DNA 損傷은 腎臟 epithelial細胞¹⁶⁾와 hepatocytes³⁸⁾에서 oxidant stress로 發生하는 細胞死亡의 주요한 매개체는 아니다.

結論적으로 H₂O₂는 OK 세포에서 細胞 生存率의 損失, ATP 枯渴 그리고 DNA 損傷을 誘發한다. 이와 같은 變化는 OjB에 의해 크게 豫防되어졌다. OjB는 H₂O₂로 誘發되는 脂質의 過酸化를 抑制하고 PDBu에 의해 活性化된 neutrophils로부터 ROS 生成을 직접 없앤다. Antioxidant인 DPPD는 oxidant로 인한 脂質의 過酸化를 완전히 抑制함에도 불구하고 H₂O₂로 인한 細胞死亡을 變化시키지는 못했다. 그러므로 OjB의 豫防效力이 antioxidant 活動에 의한 것은 아닐 가능성이 높다고 생각되어지며 앞으로 이에 대한 研究가 더 進行되어야 할 것으로 보여진다.

V. 結 論

瓦松藥液이 腎臟細胞에서 H₂O₂에 의한 細胞死亡 및 DNA 損傷에 미치는 影響을 實驗한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 細胞生存率에 對한 重大한 損失은 H₂O₂에 露出시킨지 30分 後에 나타났고 0.1%의 OjB에 의

해 減少하였다.

2. H₂O₂로 인한 細胞死亡에 對한 OjB의 效能은 濃도에 比例하여 防止되었고 뚜렷 한 豫防效果는 0.05%에서 나타났다.

3. H₂O₂로 ATP 枯渴現狀은 ATP 水準을 對照群의 42% 水準으로 減少시켰고 0.5%의 OjB에 의해 豫防되었다.

4. H₂O₂로 인한 DNA 損傷에 對하여 0.5% OjB를 添加함으로써 防止되었다.

5. H₂O₂로 인한 細胞死亡에 對하여 0.5% OjB와 catalase(300 u/ml)는 細胞生存率의 損失을 완전히 防止하였다.

6. H₂O₂는 lipid peroxidation을 눈에 띄게 增加시켰으며 이것은 OjB와 DPPD에 의해 완전히 豫防되었다.

7. OjB는 human neutrophils에서 ROS 生成을 減少시켰다.

6. Baud L and Ardaillou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol.* 1986;251:765~776.

7. Andreoli SP, McAteer JA, Seifert SA and Kempson SA. Oxidant-induced alterations in glucose and phosphate transport in LLC-PK1 cells: mechanisms of injury. *Am J Physiol.* 1993;265:377~384.

8. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979;59:527~533.

9. Arstila AU, Smith MA and Trump BF. Microsomal lipid peroxidation: Morphological characterization. *Science.* 1972;175:530~533.

10. Badway JA and Karnovsky ML. Active oxygen species and the functions of phagocytic leucocytes. *Annu Rev Biochem.* 1980;49:695~726.

11. Yoon Y, Kim KS, Hong SG, Kang BJ, Lee MY and Cho DW. Protective effects of *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae) on H₂O₂-induced apoptosis in GT1-1 mouse hypothalamic neuronal cell line. *J Ethnopharmacol.* 2000; 69:73~78.

12. Olive PL. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen.* 1988;11:487~495.

13. Uchiyama M and Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978;86:271~278.

14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for

VI. 참고문헌

1. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울 : 東洋醫學研究院出版部. 1985:11,34.
2. 崔虎錫. 漢方臨床入門. 서울 : 成輔社. 1985 :42~44.
3. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 서울 : 成輔社. 1985:281,284,287~288,298,302.
4. 李時珍. 本草綱目. 서울 : 高文社. 1983:814.
5. 李尚仁. 本草學. 서울 : 修書院. 1981:531.

- the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248~254.
15. Dechatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW and Cohen MS. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J Immunol.* 1982;129:1589~1593.
 16. Andreoli SP and Mallett CP. Dissociation of oxidant-induced ATP depletion and DNA damage from early cytotoxicity in LLC-PK1 cells. *Am Physiol.* 1997;272:729~735.
 17. Andreoli SP. Mechanisms of endothelial cell ATP depletion after oxidant injury. *Pediatr Res.* 1989;25:97~101.
 18. Thies RL and Autor AP. Reactive oxygen injury to cultured pulmonary artery endothelial cells: mediation by poly (ADP-ribose) polymerase activation causing NAD depletion and altered energy balance. *Arch Biochem Biophys.* 1991; 286:353~363.
 19. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 1990;4:2587~2597.
 20. Bondy SC. The relation of oxidative stress and hyperexcitability to neurological disease. *Pro Soc Exp Biol Med.* 1995;208: 337~345.
 21. Freeman BA and Crapo JD. Biology of disease: Free radical and tissue injury. *Lab Invest.* 1982;47:412~426.
 22. Balandrin MF, Kinghorn AD, Farmsworth NR. Plant-derived natural products in drug discovery and development. An overview ed.. Washington, D.C. : American Chemical Society Books. 1993:2~12.
 23. 安相源, 李哲浣. 國內文獻에 나타난 抗老化 및 抗酸化의 實驗的 研究에 對한 檢索. 大韓 韓醫學會誌. 1998;19(2):373~390.
 24. 鄭智天. 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性酸素類의 消去作用과 抗酸化 酵素系의 活性增加 效果에 對한 研究. 大韓 韓醫學會誌. 1996; 17(1):465~477.
 25. Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH and Cochrane CG. Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest.* 1988;82:1040~1050.
 26. Schraufstatter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, Spragg RG and Cochrane CG. Oxidant injury of cells: DNA strand breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest.* 1986;77: 1312~1320.
 27. Schraufstatter IU, Revak SD and Cochrane CG. Protease and oxidants in experimental pulmonary inflammatory injury. *J Clin Invest.* 1984;73:1175~1184.
 28. Thies RL and Autor AP. Reactive oxygen injury to cultured pulmonary artery endothelial cells: mediation by poly (ADP-ribose) polymerase activation causing NAD depletion and altered energy

- balance. Arch Biochem Biophys.1991; 286:353~363.
29. Andreoli SP and Mallett CP. Dissociation of oxidant-induced ATP depletion and DNA damage from early cytotoxicity in LLC-PK1 cells. Am J Physiol.1997; 272:729~735.
30. Frenkel K. and Gleichauf C. Hydrogen peroxide formation by cells treated with a tumor promoter. Free Radic Res Commun. 1991;12~13:783~794.
38. Zager RA and Burkhart KM. Differential effects of glutathione and cysteine on Fe^{2+} , Fe^{3+} , H_2O_2 and myoglobin-induced proximal tubular cell attack. Kidney Int. 1998;53:1661~1672.
31. Kim YK and Kim YH. 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. 1996;141:607~616.
32. Farber JL, Kyle ME and Coleman JB. Biology of disease: Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. Lab Invest. 1990;62:670~679.
33. Janssen YM, Houten BV, Borm PJA and Mossman BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. Lab Invest. 1993;69:261~274.
34. Nath KA, Enright H, Nutter L, Fischereeder M, Zou JN and Hebbel RP. Effect of pyruvate on oxidant injury to isolated and cellular DNA. KidInt. 1994;45:166~176.
35. Ueda N and Shah SV. Endonuclease-induced DNA damage and cell death in oxidant injury to renal tubular epithelial cells. J Clin Invest. 1992;90:2593~2597.
36. Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH and Cochrane CG. Oxidant-induced DNA damage of target cells. J Clin Invest. 1988;82:1040~1050.
37. Lautour I, Demoulin JB and Buc-Calderon P. Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. FEBS Lett. 1995:299~302,373.