

원저

黃芩藥鉞液이 家兔의 腎皮質切片에서 Oxidant로 유발된 유기양이온의 이동장애에 미치는 影響

손인석 · 조태성 · 권혜연 · 조미형 · 윤현민 · 장경전 · 송춘호 · 안창범

동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Abstract

Effect of Scutellaria baicalensis Georgi Extract on Oxidant-Induced Inhibition of Organic Cation in Rabbit Renal Cortical Slices

In-suk, Son · Tae-sung, Cho · Hae-yon, Kwon · Mi-hyeong, Jo · Hyoun-min, Youn
Kyung-jeon, Jang · Choon-ho, Song · Chang-beohm, Ahn

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

Objective : This study was undertaken to determine whether Scutellaria baicalensis Georgi extract (SbG) exerts the protective effect against oxidant-induced alterations in organic cation transport in the renal proximal tubule.

Methods : Organic cation transport was estimated by examining alterations in tetraethylammonium (TEA) uptake in rabbit renal cortical slices. The slices were treated with 0.2 mM tBHP for 60 min at 37°C. tBHP caused an inhibition in TEA uptake by renal cortical slices. Such an effect was accompanied by depressed Na⁺-K⁺-ATPase activity and ATP depletion.

Result : SbG prevented tBHP-induced inhibition of TEA uptake in a dose-dependent manner at the concentration ranges of 0.05-0.1%. SbG also prevented H₂O₂-induced reduction in TEA uptake. tBHP-induced inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity and ATP depletion were significantly prevented by 0.05% SbG. Oxidants increased LDH release, which was blocked by SbG. Oxidants caused a significant increase in lipid peroxidation and its effect was prevented by SbG.

Conclusion : These results suggest that SbG prevents oxidant-induced alterations in organic cation transport in rabbit renal cortical slices. Such protective effects of SbG may be attributed to inhibition of peroxidation of membrane lipid.

- 접수 : 2002년 3월 7일 · 수정 : 3월 12일 · 채택 : 2002년 3월 20일
· 교신저자 : 장경전, 부산시 진구 양정2동 동의대부속한방병원 침구2과 (Tel:051-850-8612)
E-mail : kjjang@demc.or.kr

Key words : Scutellaria baicalensis Georgi Extract(SbG), Oxidant, Organic Cation, Renal Cortical Slices

I. 서론

腎臟은 濾過 分泌하고 人體 體液代謝를 調節하며, 生體의 基本物質인 精을 藏하고 骨과 髓를 主管한다¹⁾. 腎臟은 後腹腔 脊椎 兩側 제11, 12늑골사이에 위치하고 콩 모양의 쌍으로 있는 기관이다. 무게는 체중의 0.5% 정도로 작으나 단위 시간당 혈류량은 많아서 심박출량의 1/4 정도나 된다. 腎臟의 구조는 복잡하며 30여종 이상의 다양한 세포로 구성되어 있다. 또한 기능도 다양하여 체액과 전해질 조절기능, 혈압 조절기능, 산·염기 평형유지기능 및 내분비 기능 등을 가지고 있다²⁾.

反應性酸素基(Reactive Oxygen Species; ROS)는 細胞膜에 있는 고도의 불포화지방산을 공격하여 脂質過酸化 반응을 일으키며, 이러한 결과로 생성된 副産物들은 세포의 구성성분인 단백질과 DNA를 손상시켜 세포막구조의 변화, 산소활성의 저하 및 세포의 변이를 초래한다.

ROS는 老化促進 및 癌誘發 등에 관계할 뿐만 아니라, 腎臟에서는 炎症性疾患을 포함하는 虛血性 急性腎不全, 항생제나 독성물질에 의한 急性腎不全 및 絲毬體腎炎 등과 같은 여러 急性 및 慢性疾患을 일으키는 원인으로 알려져 있다³⁾.

최근 이러한 ROS를 제거할 수 있는 韓藥劑의 開發 및 研究가 다양하여, 산화제에 의해 손상된 腎臟 세포에 대한 실험적 연구로 丹蔘⁴⁾, 紅花⁵⁾ 등의 藥鉞液이 腎臟세포에서 ROS에 대해 방어적 효과를 발휘함이 밝혀진 바 있다.

黃芩은 清熱燥濕, 止血安胎하는 效能이 있어 黃

疸, 熱淋, 吐衄, 崩漏, 目赤腫痛, 胎動不安, 癰腫 등을 치료한다⁶⁾. 따라서 腎臟의 炎症性 疾患과 관련된 熱淋을 치료하는 黃芩이 ROS로 유발된 腎臟의 기능적, 물리적 장애에도 방어역할을 할 수 있을 것으로 판단되었다.

이에 黃芩藥鉞液이 家兔의 腎皮質切片에서 oxidant로 유발된 유기양이온의 이동장애를 방지할 수 있는지 살펴보기 위하여 tBHP 및 H₂O₂로 유발된 TEA 이동, Na⁺-K⁺-ATPase 활성도, ATP 함량, LDH 유출 및 脂質過酸化의 변화를 측정하고 이에 대한 黃芩藥鉞液의 영향을 관찰하였던 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 黃芩藥鉞液(SbG) 제조

黃芩 300g을 분쇄한 후 메틸알콜을 가하여 4시간씩 3회 열환류추출하고, 추출액을 감압농축하여 46 g이 되게 하였으며 이것을 배지에 용해시켜 사용하였다.

2. 腎皮質切片 제작

몸무게가 1.5~2kg되는 뉴질랜드산 흰 토끼를 犧牲시킨 후 재빨리 신장을 들어내어 가능한 혈액을 빨리 제거하기 위하여 140mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM CaCl₂로 된 차가운 용액을 즉시 주입하였다. Stadie-Riggs microtome을 사용하여 약 0.4~0.5mm두께의 腎皮質切片을 준비하고, 130mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 5mM Na acetate, 5mM glucose, 20mM Tris/HCl (pH

7.4)를 함유한 차가운 Cross-Taggart medium용액에 저장하였다.

3. t-Butylhydroperoxide(tBHP)와 H₂O₂ 처리

腎皮質切片에 100% 산소를 공급하면서 37°C에서 60분간 Cross-Taggart medium용액에서 0.2mM tBHP 와 50mM H₂O₂를 처리하였다.

4. Tetraethylammonium (TEA) Uptake 측정⁷⁾

腎皮質切片 약 50mg(wet wt.)을 4ml Cross-Taggart medium용액을 넣은 20ml 비이커에 옮기고, 10μM ¹⁴C-TEA를 함께 배양하였다. 100% 산소를 공급하면서 25°C의 Dubnoff metabolic shaker 안에서 60분동안 배양시켰다. 배양후 즉시 조직을 들어내어 물기를 닦고 무게를 측정한다. 다음 1 N NaOH에 용해시켰다. 이들 용해된 액과 배양 용액을 적당량 취하여 aquasol(New England Nuclear)을 함유하고 있는 scintillation병에 피펫으로 따르고, 방사선동위원소의 양을 liquid scintillation counter(Packard Tricarb 300C)로 측정하여 切片내 축적된 TEA uptake를 S/M(Slice/Medium)ratio 즉 용액내의 농도(mole/ml medium)에 대한 조직내 축적된 양(mole/g wet tissue)의 비로 나타내었다.

5. Na⁺-K⁺-ATPase 활성도 測定

Na⁺-K⁺-ATPase 활성도 測定은 Kim 등⁸⁾의 방법에 따라 측정하였다. Microsome切片은 아무처치를 하지 않은 control과 tBHP를 처리한 토끼의 腎皮質組織으로부터 준비하였다. 절편의 ATPase 활성도는 3mM ATP(Sigma)를 포함하고 있는 용액에 microsome切片을 培養하는 동안 ATP의 加水分解에 의해서 유출된 무기인산(Pi)을 測定하여 결정하였다. 총 ATP의 활성도는 100mM Na⁺, 20mM K⁺, 3mM Mg²⁺, 2mM EDTA 그리고 40mM imida-

zole(pH 7.4)로 구성된 용액속에서 측정하였다. Mg²⁺-ATPase 활성도는 총 ATPase 활성도를 측정하는 용액내에서 K⁺를 제외하고 대신 1mM ouabain을 첨가하여 측정하였으며, 총 ATPase 활성도와 Mg²⁺-ATPase 활성도의 차이를 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도로 하였다. 37°C에서 5분동안 前培養한 후에 microsome切片을 첨가하여 반응을 시작하였으며 10분간 培養 後에 차가운 6% perchloric acid를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 混合液을 3,500g에서 遠心分離한 후 상층액내의 무기인산 농도를 Fiske와 Sub-barow 방법⁹⁾으로 측정하였다.

6. ATP 함량 측정

腎皮質切片에서 ATP함량은 luciferin-luciferase 방법¹⁰⁾으로 측정하였다. Oxidant에 노출시킨 후, cells은 0.5% Triton X-100 500μl로 용해시켰고, 0.6M perchloric acid 100μl로 산화시킨 후 얼음 위에 놓아 두었다. Cell 현탁액은 4mM MgSO₄(pH 7.4)을 함유한 10mM potassium phosphate buffer로 희석시켰고, 20mg/ml luci-ferin-luciferase 100μl를 10μl의 희석액에 첨가하였다. luciferase 활성도는 luminometer(MicroLumat LB96P, Berthold, Germany)로 20초마다 기록하였다. 단백질 함량은 cell 현탁액으로 측정하였다.

7. Lactate Dehydrogenase (LDH) 측정

LDH 양을 측정하기 위해 腎皮質切片을 2ml의 중류수에 파쇄시키고, 이 파쇄 균질액을 5분동안 1,000r.p.m.으로 원심분리시켰다. 이후 침전물은 버리고 상층액을 이용하였으며, 상층액에서의 LDH 활성도는 LDH 측정 kit(Iatron Lab., Japan)를 사용하여 측정하였다.

8. 脂質過酸化 측정

脂質過酸化는 Uchiyama와 Mihara법¹¹⁾에 따라서

Malondialdehyde (MDA)의 양을 측정하였다. 腎皮質切片을 차가운 1.15% KCl 용액(5% wt/vol) 속 에서 파쇄한 후 이 파쇄 균질액 0.5ml에 1% 인산 용액 3ml와 0.6% thiobarbituric acid용액 1ml를 첨가하여 끓는 물에서 45분간 가열하였다. n-b-utanol 4ml를 첨가하여 완전히 섞은 다음 2,000 g 에서 20분간 遠心分離한 후 上層液의 吸光度를 535와 520nm에서 spectrophotometer (Hewlett Packard, 8452A)로 측정하였다. 그리고 준비해둔 MDA tetraethylacetal 표준과 비교하였다. MDA값 은 단백질 1mg당 pmoles로 표시하였고, 단백질농도 는 Bradford방법¹²⁾으로 측정하였다.

9. 試藥

Thiobarbituric acid와 Tris, tBHP, H₂O₂는 Sigma Chemical(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. ¹⁴C-TEA와 Aquasol은 New England Nuclear(Boston, MA)로부터 구입하였고, 다른 모든 시약은 가장 높은 등급으로 구입하였다.

10. 統計學的 處理

통계는 평균치 ± 표준오차로 표현하였고 對照群 과 實驗群의 平均値는 Student's t-test를 이용하였으며, P 값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 成績

1. 腎皮質切片에서 TEA 이동의 시간변화

이동은 배양 후 60분까지 증가하였으나, 배양시간이 120분까지 되었을 때는 오히려 60분 때와 비슷하였다. 따라서 계속되는 실험에서는 60분동안만 이동을 측정하였다. 0.2mM tBHP를 배양액에 첨가

하였을 때 TEA 이동은 20분 후부터 有意性있게 減少하였다(Fig. 1).

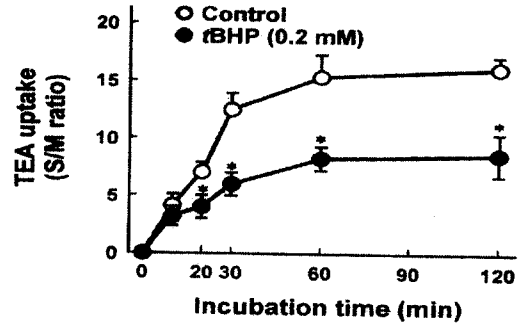


Fig. 1. Time course of TEA uptake in the presence or absence of 0.2mM tBHP in renal cortical slices. Slices were incubated for 60 min at 37°C. Data are mean ± SE of four experiments.

* p<0.05 compared with control.

2. 黃芩藥鍼液이 TEA 이동에 미치는 영향

黃芩藥鍼液이 활성산소로 유발된 TEA 이동장애에 미치는 영향을 검사하기 위해 0.2mM tBHP를 처리한 절편에 여러 농도의 黃芩藥鍼液을 처리하였다. 黃芩藥鍼液은 0.01%에서 有意性있게 tBHP로 인한 TEA 이동장애를 방지하였고, 0.01~0.1%까지 黃芩藥鍼液의 방지효과는 농도 의존적으로 높아졌으며, 0.1%에서는 control과 거의 같았다(Fig. 2).

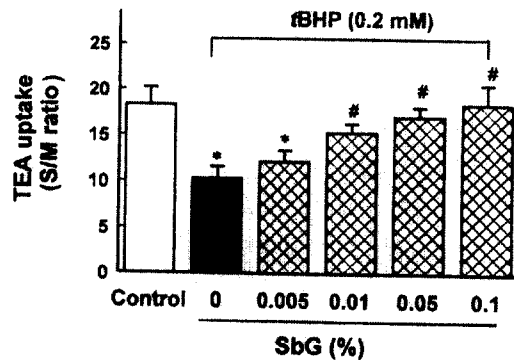


Fig. 2. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi extract (SbG) on tBHP-induced inhibition of TEA uptake in renal cortical slices. Slices were incubated in the presence or absence of 0.2mM tBHP in a medium containing various concentrations of SbG for 60 min at 37°C. Data are mean \pm SE of four experiments.

- * p<0.05 compared with control.
- # p<0.05 compared with tBHP alone.

黃芩藥液이 H₂O₂로 유발된 TEA 이동장애에 미치는 영향을 검사하기 위해 절편에 0.05% 黃芩藥液을 처리한 후 50mM H₂O₂를 처리하였다. Fig. 3에서 보이는 바와 같이 黃芩藥液은 有意性있게 H₂O₂로 유발된 TEA 이동장애를 방지하였다(Fig. 3).

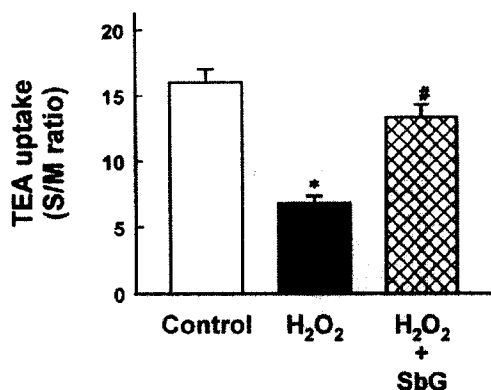


Fig. 3. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi extract (SbG) on H₂O₂-induced inhibition of TEA uptake in renal cortical slices. Slices were incubated in the presence or absence of 0.05% SBG in a medium containing 50mM H₂O₂ for 60min at 37°C and then the enzyme activity was measured. Data are mean \pm SE of four experiments.

- * p<0.05 compared with control.
- # p<0.05 compared with H₂O₂ alone.

3. 黃芩藥液이 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도와 ATP 함량에 미치는 영향

TEA는 근위세뇨관의 기저외막에서 능동적으

로 이동하기에, 黃芩藥液이 tBHP로 유발된 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도의 減少와 ATP 소모를 방지할 수 있는지 조사하였다. tBHP는 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도를 38.92 \pm 4.94에서 22.84 \pm 2.27 μ M Pi/ mg/hr로 有意性있게 減少시켰다. 그러나 tBHP가 처리된 절편에 0.05% 黃芩藥液을 처리한 것은 35.27 \pm 0.58 μ M Pi/mg/hr로 有意性있게 增加하였다(Fig. 4).

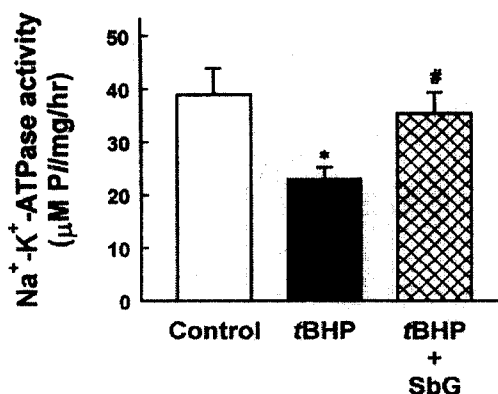


Fig. 4. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi extract (SbG) on tBHP-induced inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase activity in microsomal fraction prepared from renal cortical slices. Microsomal fraction was incubated in the presence or absence of 0.05% SBG in a medium containing 0.2mM tBHP for 60min at 37°C and then the enzyme activity was measured for 10min. Data are mean \pm SE of four experiments.

- * p<0.05 compared with control.
- # p<0.05 compared with tBHP alone.

비슷한 결과가 tBHP로 유발된 ATP 소모에서도 관찰되었다. Control에서 ATP 함량은 9.48 \pm 1.11 nmole/mg protein이었고, 0.2mM tBHP를 처리한 후 5.27 \pm 0.89 nmole/mg protein으로 減少되었으나, 0.05% 黃芩藥液을 처리한 것은 8.55 \pm 0.88 nmole/mg protein으로 有意性있게 增加하였다(Fig. 5).

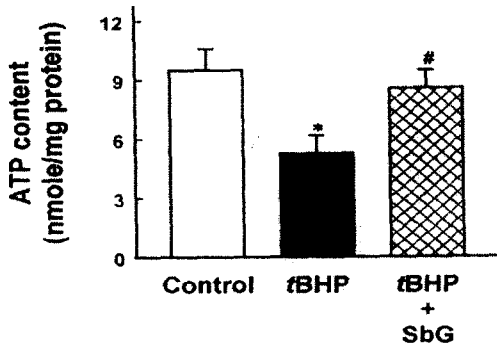


Fig. 5. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi extract (SbG) on tBHP-induced ATP depletion in renal cortical slices. Slices were incubated in the presence or absence of 0.05% SBG in a medium containing 0.2mM tBHP for 60 min at 37°C and then the enzyme activity was measured. Data are mean \pm SE of four experiments.

* $p < 0.05$ compared with control.
$p < 0.05$ compared with tBHP alone.

4. 黃芩藥液이 Oxidant로 유발된 LDH 유출에 미치는 영향

黃芩藥液이 oxidant로 유발된 세포 손상을 방지할 수 있는지 알아 보기 위해, 黃芩藥液이 oxidant로 유발된 LDH 유출에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 6에서 보여지는 바와 같이 0.2mM tBHP를 처리한 후 LDH 유출은 control($3.14 \pm 0.76\%$)에 비해 $18.99 \pm 2.99\%$ 로 有意性있게 增加하였으나, 0.05% 黃芩藥液을 함께 처리한 후 $6.28 \pm 1.67\%$ 로 有意性있게 減少하였다(Fig. 6A). 유사한 결과가 H_2O_2 로 유발한 LDH 유출에도 관찰되었다(Fig. 6B).

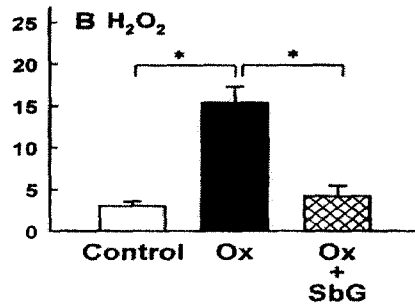
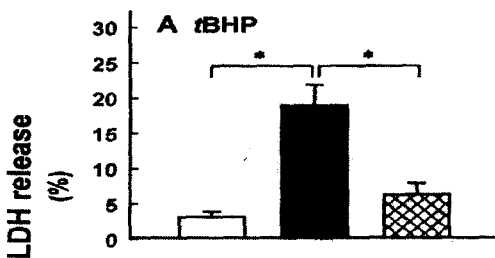


Fig. 6. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi extract (SbG) on oxidant-induced release of lactate dehydrogenase (LDH) in renal cortical slices. Slices were incubated in the presence or absence of 0.05% SBG in a medium containing 0.2mM tBHP or 50mM H_2O_2 for 60 min at 37°C and then LDH release was measured. Data are mean \pm SE of four experiments.

* $p < 0.05$ compared with control and oxidants.

5. 黃芩藥液이 Oxidant로 유발된 脂質過酸化에 미치는 영향

Fig. 7에서 보여지는 바와 같이 0.2mM tBHP를 처리한 후 脂質過酸化는 增加하였고, 0.05% 黃芩藥液을 처리한 후 有意性있게 減少하였다(Fig. 7A). 유사한 결과가 H_2O_2 로 유발한 脂質過酸化에도 관찰되었다(Fig. 7B).

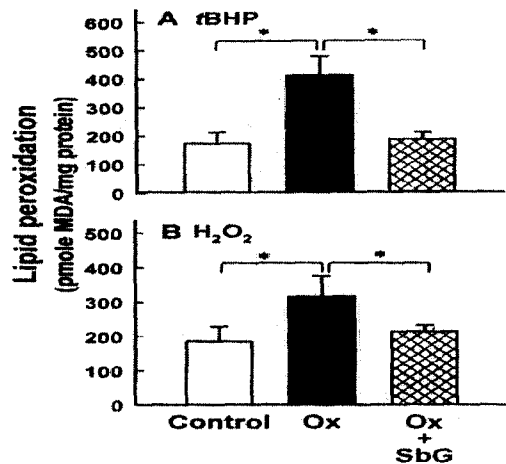


Fig. 7. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi extract (SbG) on oxidant-induced lipid peroxidation in renal cortical slices. Slices were incubated in the presence or absence of 0.05% SBG in a medium containing 0.2mM tBHP or 50mM H₂O₂ for 60min at 37°C and then lipid peroxidation was measured. Data are mean ± SE of four experiments.

* p<0.05 compared with control and oxidants.

IV. 考 察

『內經』¹³⁾에서는 腎에 대해 “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 技巧出焉”이라 하여 인체의 생식, 성장, 발육, 노쇠, 비뇨 작용에 관계됨을 나타내고 있다. 서양의학에서 腎臟은 小便을 분비하는 외부비기능을 하며, 小便속에는 인체에서 영양물질의 분해로 생긴 대사 분해산물인 요소, creatinine, 요산과 같은 질소화합물과 腎臟을 통해서 배출되는 그 밖의 이물질들이 들어 있다. 또한 腎臟은 물과 전해질의 평형을 유지하고, 인체 내 삼투압을 조절하며 산·염기의 평형을 유지한다. 腎臟은 배설기능 외에 renin과 erythropoietin을 분비하는데, renin은 혈압과 sodium의 조절에 관여하고 erythropoietin은 골수에서 적혈구생산을 조절하여 내부비기능을 갖는다.

『神農本草經』¹⁴⁾에 “治諸熱黃疸, 逐水, 下血閉, 惡瘡疽蝕, 火瘍”이라고 수록된 黃芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)은 꿀풀(脣形)과에 속한 다년생 초본식물로서 性은 寒無毒, 味苦하고, 心, 肺, 脾, 胃, 肝, 大腸, 小腸에 歸經하며, 淸熱燥濕, 止血安胎, 瀉火解毒하는 效能이 있어 黃疸, 熱淋, 吐衄, 崩漏, 目赤腫痛, 胎動不安, 癰腫 등을 치료한다¹⁵⁾. 주요성분으로 baicalin, baicalein, woogonin, woogonoside, β-sitosterol 등이 함유되어 있으며, 혈당 상승, 혈압 강하, 해열, 해독, 항균, 항알레르기, 근육이완, 모세혈관 투과성 억제, 지질대사 개선, 이

뇨, 항암작용 등이 보고되었다¹⁵⁾.

黃芩의 效能에 관한 실험적 연구로 이 등¹⁶⁾은 면역기능, 미생물증식 및 세균번이에 미치는 영향을, Yuan 등¹⁷⁾은 심근세포의 oxidants stress에 미치는 영향을 보고하였다.

ROS는 藥物이나 放射線과 같은 外部要因에 의하여 發生하기도 하고 生體內에서 細胞의 정상적인 代謝過程 중에 발생하기도 하는데 그 예로 미토콘드리아의 전자전달계, peroxisome의 지방산대사과정, cytochrome p-450반응 및 포식세포들에 의한 respiratory burst과정(박테리아 지질과 단백질의 치명적 산화과정) 등을 들 수 있다.

ROS는 지질과산화, 단백질 변형 및 DNA 절단 과정을 통해 조직에 손상을 주는 것으로 오랫동안 알려져 왔고, 산화되기 쉬운 조성을 가진 뇌조직은 특히 ROS에 의해 손상받을 가능성이 많다. H₂O₂와 hydroxyl radical(OH·) 등과 같은 ROS는 심근의 허혈성 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾.

本 實驗에서는 oxidant에 의한 細胞損傷研究에 많이 이용되고 있는 藥物모델인 tBHP와 H₂O₂를 이용하여 細胞損傷을 유발한 다음 TEA 이동, Na⁺-K⁺-ATPase 활성도, ATP 함량, LDH 유출 및 MDA량을 측정하고 黃芩藥液 투여 후의 변화를 관찰하였다.

tBHP는 tert-Butylhydroperoxide(C₄H₁₀O₂)로서 중합반응을 일으키는 촉매로 작용하며, radical의 치환반응을 일으키는 peroxy group의 산화제로 널리 사용되고 있는 약물이다.

일반적으로 배양세포에 대한 tBHP의 毒性은 急性 oxidative stress로 인한 細胞의 비가역적인 손상에 관하여 기전 연구의 모델로 자주 사용되어 왔다. 細胞內에서 tBHP의 작용은 다양하지만 특히 1mM이하의 저농도에서 유발되는 培養腎細胞의 과사기전에는 세포기질의 過酸化反應이 수반된다고 알려져 있다¹⁹⁾.

H_2O_2 는 그 자체로서는 분자산소에 의해 매개되는 독성에서 중요한 역할을 하지는 않는다. 그러나 이들이 Fe^{2+} 또는 O_2^- 와 반응시 극도로 독성이 강한 $OH \cdot$ 를 생성시키기 때문에 생물학적으로 매우 중요하다.

TEA는 腎臟의 近位細尿管에서 능동적으로 분비되는 유기 양이온성물질로서 신장조직의 기능적 변화를 볼 때 많이 이용하게 되는데 腎臟을 통과하면서 얼마나 배설되었는지를 보아서 slice에서의 uptake 增加는 腎細胞의 排泄量 增加로 인식되어진다. 특히 Kluwe는 腎皮質切片에서 이들 이온들의 移動變化가 腎臟의 機能的 損傷 정도를 판단하는데 가장 銳敏한 방법임을 보고하였다.

$Na^+-K^+-ATPase$ 는 Na^+ -pump의 중요한 일부분으로서 모든 종류의 細胞에 존재하여 여러 가지 細胞의 機能을 調節하게 되는데 단순히 細胞内外의 이온분포를 조절하는 것 이외에도 神經의 傳導活動, 心臟의 活動, 筋肉收縮 그리고 여러 上皮組織에서 物質의 分泌 및 再吸收 등 여러 가지 生理현상에 參與한다²⁰⁾.

細胞膜을 구성하는 불포화지방산은 직접적으로 또는 간접적으로 과산화과정을 통해 분해되어 결과적으로 MDA를 形成하게 된다. 이 物質은 蛋白質의 제 1차 아미노그룹과 격렬하게 반응할 수 있기 때문에 細胞膜에 결합된 酵素의 활성도를 떨어뜨리거나 脂質層의 단단한 堅固性을 增加시키며 老衰함에 따라 많은 호르몬수용, 복합체의 활성도를 떨어뜨린다²¹⁾. 따라서, 脂質過酸化는 세포막의 생리 화학적인 성질을 변화시키는 요인이 된다.

본 연구에서 tBHP와 H_2O_2 는 家兔의 腎皮質切片에서 TEA 이동을 현저하게 억제하였다. 黃芩藥鍼液은 0.01-0.1% 농도에서 tBHP로 인한 TEA이동장애에 농도 의존적으로 방지효과를 보여주었고 (Fig. 2), H_2O_2 로 인한 TEA 이동장애에도 방지효과가 관찰되었다 (Fig. 3). TEA는 腎臟의 近位細尿

管의 기저외막에서 능동적으로 이동되므로²²⁾, 세포의 $Na^+-K^+-ATPase$ 활성과 ATP 함량의 변화는 腎皮質切片의 TEA 이동에 영향을 미친다. 본 연구에서 tBHP는 $Na^+-K^+-ATPase$ 활성도를 減少시켰고, ATP 함량을 減少시켰다 (Fig. 4, 5). 이러한 결과는 oxidant가 腎皮質切片에서 $Na^+-K^+-ATPase$ 활성도 減少와 ATP 함량 減少로 인해 TEA 이동을 억제시킨다는 것을 보여준다. 그러나 tBHP와 H_2O_2 는 TEA 이동과는 반대로 LDH 유출을 현저하게 增加시켰는데 (Fig. 6), 이는 oxidant로 인한 TEA 이동장애가 일정부분 세포사망에 기여한다는 것을 나타낸다. 黃芩藥鍼液 방지효과는 oxidant로 인한 $Na^+-K^+-ATPase$ 활성도 減少, ATP함량 減少, 그리고 LDH 유출 增加에 모두 나타났다. 본 연구에서 oxidant는 有意性있게 脂質過酸化를 增加시켰고, 黃芩藥鍼液은 oxidant로 인한 신장세포손상에 중요한 역할을 하는 脂質過酸化를 減少시켰다 (Fig. 7).

이상의 결과에서 黃芩藥鍼液은 oxidant로 유발된 TEA 이동장애, $Na^+-K^+-ATPase$ 활성도와 ATP 함량 減少, LDH 유출 增加 및 脂質過酸化 增加에 有意性 있는 방지효과를 나타내어 過酸化로 인한 腎臟의 기능적, 물리적 장애에 방지역할의 가능성을 보여주었고, oxidant로 유발된 TEA의 이동억제에 대한 黃芩藥鍼液의 효과는 산화방지효과에 의한 것으로 생각되나, 黃芩藥鍼液의 산화방지효과에 대한 정확한 기전은 계속 연구되어야 밝혀질 것으로 보인다.

V. 結 論

黃芩藥鍼液이 家兔의 腎皮質切片에서 oxidant로 유발된 유기양이온의 이동장애에 미치는 影響을 實驗하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 0.2mM tBHP를 배양액에 첨가하였을 때 TEA 이동은 20분 후부터 有意性있게 減少하였다.
2. tBHP와 H₂O₂에 의한 TEA 이동장애는 0.01~0.1% 黃芩藥鍼液에서 有意性있게 방지되었다.
3. tBHP에 의한 Na⁺-K⁺-ATPase 활성도와 ATP 함량 減少는 0.05% 濃度에서 모두 有意性있게 增加하였다.
4. tBHP와 H₂O₂에 의한 LDH 유출 增加는 0.05% 濃度에서 有意性있게 減少하였다.
5. tBHP와 H₂O₂에 의한 脂質過酸化 增加는 0.05% 濃度에서 有意性있게 減少하였다.

VI. 참고문헌

1. 杜鎬京. 臨床腎系學研究. 서울:成輔社. 1995: 191-2, 195-6, 293-7.
2. 서울대학교 의과대학 생리학교실. 생리학. 서울:의학문화사. 1997: 301.
3. Baud L, and Ardaillou, R, Reactive oxygen species : production and role in the kidney. Am.J.Physiol. 1986;251, F765-F776,
4. 이호동·윤현민·장경전·송춘호·안창범. 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. 大韓鍼灸學會誌. 2000;17(3):208-18.
5. 金麗眞·張慶田·宋春浩·安昌範. 紅花子藥鍼液이 Oxidant에 의한家兔의 腎臟Na⁺-K⁺-ATPase에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1998;15(1):493-502.
6. 辛民教 編著. 原色臨床本草學. 서울:泳林出版社. 1988:308-310.
7. Friedrich A, George R.L, Bridges C.C, Prasad P.D, Ganapathy V. Transport of

- choline and its relationship to the expression of the organic cation transporters in a rat brain microvessel endothelial cell line(RBE4). A. Friedrich et al./Biochimica et Biophysica Acta. 2001 ;1512: 299-307.
8. Kim YK, Byun HS, Kim YH, Woo JS, Lee SH. Effect of cisplatin on renal function in rabbits: Mechanism of reduced glucose reabsorption. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1995;130:19-26.
9. Fiske C.H, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus J. Biol. Chem. 1925;66:375-400.
10. 채범석 역. 생화학. 서울외국어서적. 1995:407.
11. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem. 1987;86:271-8.
12. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dry binding. Anal. Biochem. 1976;72:248-54.
13. 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.
14. 馬繼興 主編. 神農本草經輯注. 北京:人民衛生出版社. 1995:215-6.
15. Kimuya Y, Kubo M, Tani T, Arichi S, Okuda H. Studies on Scutellariae Radix. IV. Effects on lipid peroxidation in rat liver, Chem Pharm Bull (Tokyo) 1981 Sep;29(9):2610-7.
16. 이정호·신숙정·문용. 황금 추출물이 면역

- 기능, 미생물증식 및 세균변이에 미치는 영향. 대한면역학회지 1998;20:343-348.
17. Chun-Su Yaun et al. Extract from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1885-95.
 18. Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 1989;80:1049-62.
 19. Clarkson TW. The pharmacology of mercury compounds. *Annual Review of pharmacology* Vol. 12, ed. Elliott H W, Okun R, George R. California:Annual Review INC. 1972:375-406.
 20. 李炳熙. 生理學. 서울:신광출판사. 1987:78.
 21. 김영곤. 김영균. 프리라디칼. 서울:여문각. 1997:62, 82.
 22. Hohage H, Morth DM, Querl IU and Grefen J. Regulation by protein kinase C of the contraluminal transport system for organic cations in rabbit kidney S2 proximal tubules. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;268:897-901.