

生薑의 Peroxynitrite 제거 기전

신상국, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Peroxynitrite Scavenging Mechanism of *Zingiberis Rhizoma*

Sang-Guk Shin, Ji-Cheon Jeong

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : Peroxynitrite (ONOO⁻), formed from the reaction of O₂⁻ and NO, is a cytotoxic species that can oxidize several cellular components such as proteins, lipids and DNA. It has been involved in the aging process and age-related diseases such as Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, cancer and atherosclerosis. The aim of this study was to investigate scavenging activities of ONOO⁻ and its precursors, NO and O₂⁻ and its scavenging mechanism of *Zingiberis Rhizoma* (ZR).

Methods : To investigate scavenging activities of ONOO⁻, NO, O₂⁻ and its scavenging mechanism, we used fluorescent probes like DCFDA, DAF-2 and DHR 123. The ONOO⁻ scavenging activity on ZR was assayed by measuring oxidized dihydrorhodamine 123 (DHR 123) by fluorometry. The scavenging efficacy was expressed as IC50, showing the concentration of each sample that is required to cause 50% inhibition of DHR 123 oxidation. In a separate study, the protective effect of ZR on ONOO⁻-induced nitration of bovine serum albumin was investigated through immuno-assay with a monoclonal anti-nitrosylated antibody, and a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody from sheep.

Results : ZR markedly scavenged authentic ONOO⁻, O₂⁻ and NO. It also inhibited ONOO⁻ induced by O₂⁻ and NO which are derived from SIN-1. The data demonstrated that ZR led to decreased ONOO⁻ mediated nitration of tyrosine through electron donation. It also inhibited the nitration of bovine serum albumin induced by ONOO⁻ in a dose-dependent manner. Furthermore, it blocked LPS-induced ROS and RNS generation.

Conclusions : These results suggest that ZR can be developed as an effective ONOO⁻ scavenger for the prevention of aging process and age-related diseases.

Key Words: Peroxynitrite, Scavenging Mechanism, *Zingiberis Rhizoma*, nitric oxide, superoxide anion

1. 緒 論

생체내에서는 NO와 O₂⁻가 동시에 발생하는 조건

에서 산화력이 매우 강한 peroxynitrite (ONOO⁻)가 생성된다¹⁾. 최근 보고된 'Inflammation Hypothesis of Aging'²⁾에 의하면 노화과정에서 염증 반응이 지속적 으로 일어남으로써 활성산소의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 NO의 대량 생성이 ONOO⁻ 생성을 더욱 증가시켜 세포 및 조직 손상을 가져와 노화과정을 촉진한다고 하였다. 염증, 감염 등과 같이 특정한 상태에 특히 ONOO⁻가 대량 생성되어 강한 조직 파괴

· 접수 : 2002년 12월 6일 · 채택 : 2003년 2월 11일
· 교신저자 : 정지천, 서울특별시 강남구 논현1동 37-21 동국대
학교 강남한방병원 1내과
(Tel: 02-3416-9731 Fax: 02-3444-9171, E-mail:
jjcjh@hite1.net)

력을 나타내며 여러 질병과 관련된다는 보고는 많다.

ONOO⁻는 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanylate cyclase의 자극, tyrosine의 니트로화 외에도 lysine, arginine, histidine 같은 아미노산의 변형, thiol, thioether 뿐만 아니라 peptide, 단백질의 methionine 잔기 산화 및 지질과산화의 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다. 또한 미토콘드리아의 호흡 억제, 세포막 펌프 억제, GSH의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 결국 이런 ONOO⁻의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 당뇨병, 고혈압, 피부염증 등 여러 질환과 관련 있는 것으로 보고되고 있다^{3,6,7}.

그러므로 ONOO⁻를 무독화시키는 방법은 노화과정뿐만 아니라 노인성 질환을 조절하는데 대단히 중요한 의미를 가진다. 인체 내에는 특이하게 ONOO⁻를 제거하는 효소가 밝혀져 있지 않으므로 한약재로부터 ONOO⁻ 제거 활성을 탐색하는 것은 큰 의의가 있다.

生薑 (Zingiber officinale Roscoe)은 생강과 (Zingiberaceae)에 속한 根莖으로 祛寒發表, 解鬱調中, 消水氣 등의 효능이 있어 感冒風寒 嘔吐 痰飲 喘咳 등에 활용되고 있다^{8,9}. 실험 보고에 의하면 生薑은 항산화 효과가 있으며^{10,11}, 生薑이 포함된 靑娥丸은 흰쥐의 신장과 뇌조직에서 지질과산화를 억제하고 활성산소 생성계 효소 활성을 억제하며,^{12,13} 항산화 효소 활성을 증가시키고 활성산소를 직접 소거¹⁴시켰을 뿐만 아니라, ONOO⁻, NO를 효과적으로 제거¹⁵하는 작용을 나타내었다.

본 연구에서는 生薑이 ONOO⁻에 대한 제거 활성이 있는지 검토하고자 ONOO⁻와 그 전구 물질인 NO, ·O₂⁻ 소거 작용과 제거 기전, 단백질 nitration 억제 작용, 그리고 lipopolysaccharide (LPS) 처리에 의해 유도된 ONOO⁻ 및 그 전구 물질들의 제거 활성에 대해 조사하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

生薑 (Zingiberis Rhizoma)은 市中에서 購入하여 精選하여 使用하였다.

2) 시약

3-Morpholinosydnonine (SIN-1), DL-penillamine은 sigma chemical Co. (ST. Louis, MO, USA)에서, dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서, ONOO⁻은 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서, 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 Dai ichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

3) 동물

생후 6주령된 체중 25g 내외의 외관상 건강한 ICR mouse를 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

生薑 (Zingiberis Rhizoma) 200g을 잘게 분쇄하고 3배 량의 95% methanol을 가하여 60℃에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 추출액을 실온으로 냉각시킨 후 여지로 여과한 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) ONOO⁻ 측정법

Kooy 등의 방법¹⁶에 의해 ONOO⁻ 제거능을 측정하였다. 96 well microplate에 生薑추출물을 취하고, 90 nM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 μM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액 (pH 7.4)를 가한다. 그리고 10 μM ONOO⁻를 첨가한 후, 형광 광도를 이용하여 excitation (500 nM)와 emission (536 nM)을 측정하였다.

3) 활성산소 측정법

DCFDA assay¹⁷로 활성산소를 측정하였다. 99.9%

의 에탄올에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600U/ml esterase를 -20℃에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 10 uM DCFDA와 6 U/esterase를 혼합하여 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) 용액을 22℃에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동보관하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 되므로, excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 Fluorescence Microplate reader (FL 500, Bio-Tex instruments)로 측정하였다. 이때 활성산소 생성원으로 총활성산소 제거능 검토시 신장 homogenate의 postmitochondria 분획을, $\cdot O_2^-$ 제거능 검토시 SIN-1을 사용하였다.

4) NO 측정법

특이적인 NO의 indicator인 4,5-diamino fluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490-495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. Dimethyl sulfoxide 550 μ l에 DAF-2 1 mg이 녹아 있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1:400배로 희석하였다. NO 제공 물질인 sodium nitroprusside (f.c. 2 mM)와 DAF-2 (f.c. 3.14 uM)를 96 well plate에 첨가하였다. 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO의 양에 의존한다. DAF-2와 NO의 반응에 의해 방출되는 형광은 10분 후 형광광도계 (FL500, Bio Tek사)를 이용하여 여기파장 485와 방출파장 530 nm에서 측정하였다¹⁸.

5) Protein nitration 측정

Bovine serum albumin (BSA, 0.5 mg / mL) 95 μ l에 농도별 시료나 혹은 용매 2.5 μ l를 첨가하여 상온에서 10분간 shaking incubation한 후, ONOO⁻ (4 mM in 0.3 N NaOH) 2.5 μ l를 첨가하고 20분간 상온에서 incubation시켰다. Nitration 반응이 끝난 후, agarose gel에 전기영동하여 anti-nitrotyrosine antibody를 이용하여 protein이 nitration된 정도를 nitrotyrosine으로

검사하였다.

6) 3-Nitrotyrosine 측정

生薑이 ONOO⁻에 의한 tyrosine의 nitroation을 억제하는지의 여부는 이전에 기술했던 방법에 따라 측정하였다⁹. 0.3 N NaOH에 녹아 있는 ONOO⁻ (500 uM) 용액에 生薑의 존재하에 100 uM tyrosine을 첨가하고 최종 부피를 1 ml로 맞춘다. tyrosine과 ONOO⁻의 반응에 의한 3-nitrotyrosine의 형성도 측정하였다. 430 nm에서의 peak 스펙트럼은 3-nitrotyrosine의 생성을 의미한다.

7) ONOO⁻의 제거 기전

生薑의 작용 기전을 밝히기 위하여 ONOO⁻를 Pannala 등의 방법⁴에 따라 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 0.3 N NaOH에 녹아 있는 ONOO⁻ (500 uM)에 生薑추출물을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 첨가하고, 최종 부피가 1 l가 되도록 한다. 각 용액을 혼합한 후 37℃에서 1시간 동안 shaking incubation시킨 후, 분광광도계 (Ultraspec 2000 UV-visible spectrophotometer, Pharmacia-Biotech사)를 이용하여 190 nm와 600 nm 사이의 파장에서 검색한다. ONOO⁻ 존재하에서 生薑에 의한 스펙트럼의 변화는 430 nm에서 측정하며, 이는 nitration 반응이 일어났음을 의미한다.

8) LPS 처리 마우스에서 $\cdot O_2^-$, NO 및 ONOO⁻ 억제 활성 측정

마우스에 LPS (5 mg/kg)를 처리하여 활성산소, 질소 생성계를 유도한 후에 신장 조직을 균질화하고 生薑추출물을 처리한 후에 DCFDA를 처리하고 형광광도계 (Ex 490 nm/Em 520 nm)로 형광을 측정하여 활성산소 생성계에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 DHR 123을 처리한 후 Ex 500 nm / Em 536 nm에서 형광을 측정하여 ONOO⁻ 제거능을,¹⁶ DAF-2를 처리하여 Ex 485 nm/Em 530 nm에서 NO 제거능을¹⁸ 평가하였다.

9) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student's t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

III. 成績

1. ONOO⁻ 제거 활성

生薑이 ONOO⁻ 자체에 대하여 직접 제거 활성을 나타내는 지를 검토한 결과, 2, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 18, 27, 74%의 강한 제거 활성을 나타내었다. ONOO⁻ 제거제로 잘 알려져 있는 penicillamine 보다 약하지만 비교적 강한 ONOO⁻ 제거 활성을 나타내었다(Fig. 1).

2. SIN-1에 의해 생성되는 ONOO⁻ 생성 저해 활성

SIN-1에 의해 생성되는 NO와 $\cdot\text{O}_2^-$ 의 상호 작용에 의해 생성되는 ONOO⁻ 생성 억제 작용을 검토해 본 결과 生薑추출물 2, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 19, 44, 86%의 억제 활성을 나타내어 ONOO⁻ 생성 억제 활성도 관찰되었다(Fig. 2).

3. NO 제거 활성

ONOO⁻의 전구체인 NO 제거능을 검토한 결과, 生薑추출물 10, 50, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 5, 29, 71%의 억제 활성을 나타내어 기존 NO의 제거제인 carboxy-PTIO보다는 약하지만, 비교적 강한 NO 제거능을 나타내었다(Fig. 3).

4. $\cdot\text{O}_2^-$ 제거 활성

ONOO⁻의 또 다른 전구체인 $\cdot\text{O}_2^-$ 제거능을 검토한 결과, 生薑추출물 2, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 18, 36, 63%의 제거 활성을 나타내었다. 따라서 기존의 $\cdot\text{O}_2^-$ 제거제인 trolox보다는 약하지만 $\cdot\text{O}_2^-$ 제거 활성을 어느 정도 나타내어 生薑이 ONOO⁻ 및 NO 뿐만 아니라 $\cdot\text{O}_2^-$ 도 제거함을 알 수 있었다(Fig. 4).

5. ONOO⁻ 제거 기전

生薑이 어떠한 기전으로 ONOO⁻를 제거하는 가에 대하여 검토하였다. Tyrosine은 ONOO⁻와 반응하며 430 nm에서 최대 흡광을 가지는 3-nitrotyrosine(Fig. 5B)을 생성한다. 生薑과 ONOO⁻가 반응하여 生薑 성분이 nitration되어 nitro화물이 생성되는가를 검토한 결과, 430 nm에서 흡광도를 가지지 않으므로(Fig. 5 C,D,F) 生薑이 nitration되지 않고, electron donation에 의해 ONOO⁻ 제거할 가능성이 시사되었다. 그리고 Fig. 5A에서 보듯이 tyrosine 없이 ONOO⁻만 존재할 경우 430 nm에서 peak가 없으나, 거기에 tyrosine을 첨가할 경우 430 nm에서 peak가 나타나는데 (Fig. 5B), Fig. 5 F, G, H에서 보듯이 生薑추출물을 각각 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가할 경우 3-nitrotyrosine의 peak가 줄어드는 것을 알 수 있다.

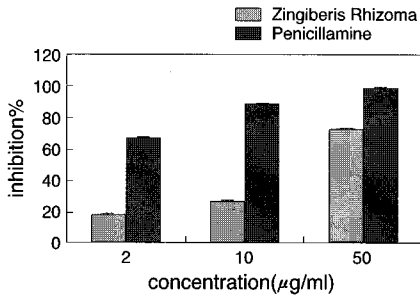


Fig. 1. ONOO⁻ scavenging activity of *Zingiberis Rhizoma*. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by authentic ONOO⁻ (10 μM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

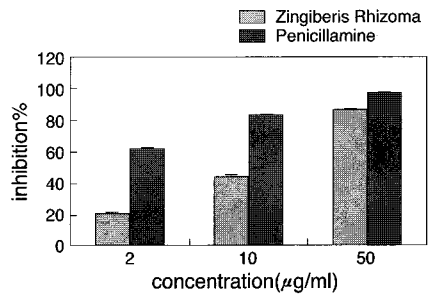


Fig. 2. Effect of *Zingiberis Rhizoma* on SIN-1-derived ONOO⁻ generation. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by SIN-1 (20 μM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

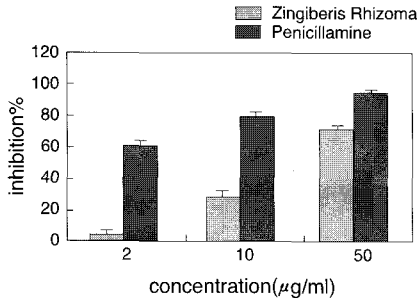


Fig. 3. Effect of *Zingiberis Rhizoma* on sodium nitroprusside-derived NO generation. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by sodium nitroprusside (2 mM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

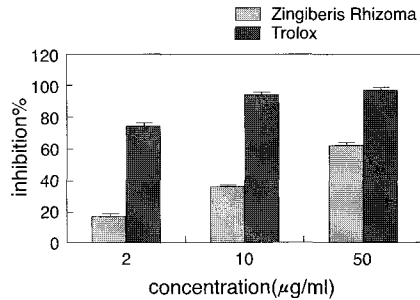


Fig. 4. Effect of *Zingiberis Rhizoma* on SIN-1-derived $\cdot O_2^-$ generation. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by SIN-1 (20 μM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

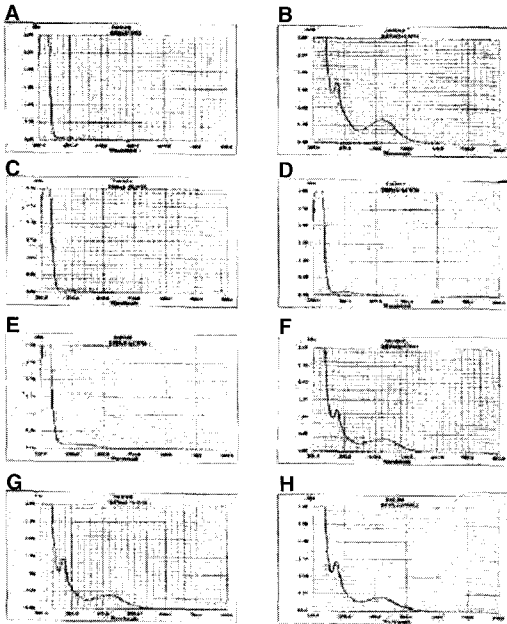


Fig. 5. Interaction of *Zingiberis Rhizoma* with $ONOO^-$ and its effect on $ONOO^-$ -mediated 3-nitrotyrosine. A : $ONOO^-$ (40 μM), B : Tyrosine (40 μM) with $ONOO^-$ (40 μM), C : *Zingiberis Rhizoma* (10 $\mu g/ml$) with $ONOO^-$ (40 μM), D : *Zingiberis Rhizoma* (25 $\mu g/ml$) with $ONOO^-$ (40 μM), E : *Zingiberis Rhizoma* (50 $\mu g/ml$) with $ONOO^-$ (40 μM), F : Tyrosine (40 μM), *Zingiberis Rhizoma* (10 $\mu g/ml$) with $ONOO^-$ (40 μM), G : Tyrosine (40 μM), *Zingiberis Rhizoma* (25 $\mu g/ml$) with $ONOO^-$ (40 μM), H : Tyrosine (40 μM), *Zingiberis Rhizoma* (50 $\mu g/ml$) with $ONOO^-$ (40 μM). Each mixed solution was incubated at 37 $^{\circ}C$ with shaking for 1h and scanned between 190 and 600 nm with spectrophotometric analysis. The spectrum of the peak displayed at 430 nm reflects the formation of 3-nitrotyrosine.

6. albumin nitration 저해 효과

Albumin의 tyrosine이 $ONOO^-$ 에 의해 nitration되는 정도에 생薑이 미치는 영향을 anti-nitrotyrosine 항체로 검토하였다. 그 결과, 생薑이 albumin의 tyrosine nitration을 농도 의존적으로 현저히 저해함을 알 수 있었다(Fig. 6).

7. LPS 처리 마우스에서 $\cdot O_2^-$, NO 및 $ONOO^-$ 생성에 미치는 영향

生薑추출물은 2, 10, 50 $\mu g/ml$ 농도에서 $ONOO^-$ 생성을 각각 7, 20, 40%를 억제하였고 (Fig. 7), $\cdot O_2^-$ 생성에 대해서는 각각 23, 51, 67%를 억제하였다 (Fig. 8). 특히 NO 생성에 대하여 생薑추출물은 2, 10, 50 $\mu g/ml$ 농도에서 각각 11, 32, 53% 억제하여 표준물질인 Carboxy PTIO 와 거의 유사한 활성을 나타내었다 (Fig. 9).

IV. 考 察

生薑은 發散風寒 약물로서 性味が辛,溫하고 肺脾胃에 歸經하며 行陽分而祛寒發表, 宣肺氣而解鬱調中, 消水氣, 行血痺, 通神明 등의 효능이 있어 感冒風寒 嘔吐 痰飲 喘咳 腹滿 泄瀉 解藥毒魚蟹肉毒 등에 활용되고 있다^{8,9}. 주성분은 辛味 성분으로 zingerone,

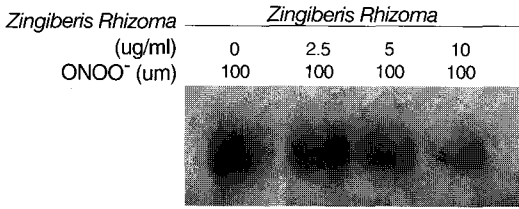


Fig. 6. Effect of *Zingiberis Rhizoma* on albumin nitration. *Zingiberis Rhizoma* was added to BSA. The reaction samples were incubated with shaking at 25 °C for 1h. After ONOO⁻ was added, all samples were further incubated with shaking at 25 °C for 30 min.

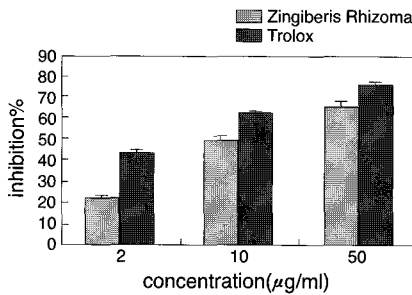


Fig. 8. Inhibition of $\cdot O_2^-$ generation by *Zingiberis Rhizoma* in LPS-treated ICR mouse kidney postmitochondria. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments. ROS generation from LPS-challenged mouse kidney homogenate was determined by the change of fluorescence every 5 min for 30 min using DCFDA.

shogaol, gingeron, 芳香 성분으로 精油를 함유하고 있는데 zingiberol, zingiberene 등이 있다^{8,20}.

실험 연구에 의하면 生薑은 항산화 작용이 크므로^{10,11} 노화 방지 및 노인성 질환의 치료에 유효할 것으로 여겨지는데, 腎虛를 補하는 補腎 處方으로 노화 방지 효능이 있는 靑娥丸²¹의 구성 약물이다. 靑娥丸은 농도 의존적으로 매우 강한 ONOO⁻와 그 전구체인 NO, $\cdot O_2^-$ 에 대하여 강한 제거 활성을 나타내었다¹⁵. 그러므로 生薑이 노화 과정과 노인성 질환 및 여러 만성질환들과 밀접한 관계를 가지고 있는 활성 산소와 NO 및 ONOO⁻를 제거하는 작용이 있는지를 검토하였다.

활성산소 (reactive oxygen species, ROS)는 일반적으로 superoxide ($\cdot O_2^-$), 과산화수소(H₂O₂), hydroxyl

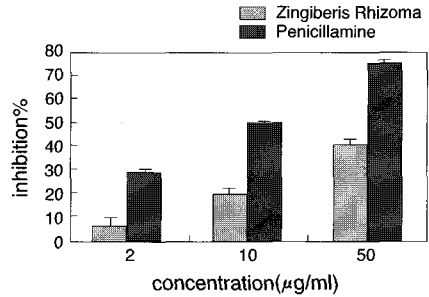


Fig. 7. Inhibition of ONOO⁻ generation by *Zingiberis Rhizoma* in LPS-treated ICR mouse kidney postmitochondria. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments. ONOO⁻ generation from LPS-challenged mouse kidney homogenate was determined by the change of fluorescence every 5 min for 30 min using DHR 123 fluorescent probe.

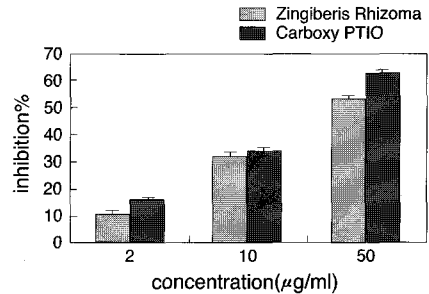


Fig. 9. Inhibition of NO generation by *Zingiberis Rhizoma* in LPS-treated ICR mouse kidney postmitochondria. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments. NO generation from LPS-challenged mouse kidney homogenate was determined by the change of fluorescence every 5 min for 30 min using DAF-2.

radical ($\cdot OH$) 등의 산소종으로 내피의존성 이완 작용의 장애, 세포 증식, 혈관 염증 유발 등을 일으키고 고혈압, 동맥경화, 심부전 등 순환기계 질환의 발생에 깊이 관여한다²².

최근 NO, NO₂, HNO₂, ONOO⁻ 등의 질소화합물들을 총칭하여 활성질소 (reactive nitrogen species, RNS)라고 한다²³. Nitric oxide (NO)는 반응성이 크고 반감기가 아주 짧은 특징을 갖는 활성질소로 대식세포, 호중구 등에서 생성되며, nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine을 기질로 하여 합성되고, 거의 대부분의 포유동물에서 세포내 messenger로 작

용하며, 혈관의 항상성 유지 신경전달, 면역계 등에 관여한다^{24,25}.

NO는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성산소들과 반응할 수 있으며, 특히 $\cdot O_2^-$ 와 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrite ($ONOO^-$)를 생성한다²³. $ONOO^-$ 는 NO와 $\cdot O_2^-$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 노화과정뿐만 아니라 노인성 질환에 중요한 발병 요인으로 주목받고 있는 매우 산화력이 강한 내인성 독성물질이다^{13,7}.

$ONOO^-$ 제거능을 검토하고자 $ONOO^-$ 와 특이하게 반응하여 형광을 내는 DHR 123을 이용하여 측정된 결과, 생薑 추출물은 $ONOO^-$ 자체를 강력히 제거할 뿐만 아니라, SIN-1에 의해 생성되는 $\cdot O_2^-$ 와 NO에 의해 만들어지는 $ONOO^-$ 도 강력하게 제거하는 활성을 나타내었다. 생薑은 $ONOO^-$ 의 전구체인 $\cdot O_2^-$ 와 NO도 제거하는 활성을 나타내었다. 따라서 생薑의 $ONOO^-$ 억제능에는 $ONOO^-$ 를 직접 제거하는 활성과 $\cdot O_2^-$ 와 NO를 각각 제거하여 $ONOO^-$ 축적을 억제하는 활성을 가지는 것으로 사료된다.

이러한 생薑의 $ONOO^-$ 제거 작용에는 함유 성분 가운데 gingerol, zingerone, shogaol 등의 phenol성 물질과 관련이 있을 것으로 추측된다. 실제 여러 phenol성 물질들이 $ONOO^-$ 를 효과적으로 제거한다는 많은 보고가 있다²⁶.

Phenol성 화합물은 과일, 채소류에 풍부히 존재하며 활성산소를 소거시키고 전이금속과의 chelating 및 활성산소를 형성하는 효소를 저해함으로써 항산화 활성을 나타낸다. Phenol성 화합물의 $ONOO^-$ 소거 작용은 low density lipoprotein(LDL)의 산화를 방지하고 만성심장질환의 발병률을 저하시키므로 phenol성 화합물의 섭취가 심혈관계 질환 발병률과 역의 상관관계가 있음을 시사하였다²⁷. Haenen 등은 polyphenol의 항산화능의 구조적인 특징을 밝혔으며, 정 등²⁸은 녹차에서 추출한 EGCG 그리고 GCG가 직접 제거하는 기전으로 높은 활성을 나타내었다. 이런 활성은 OH group의 수에 따라 그 활성산소 제거능이 달라지며, 전이금속을 chelating하여 Fenton 반응에 의한 활성산소 형성을 지연한다고 보고하였다. 이러

한 phenol성 물질의 $ONOO^-$ 제거 활성은 생薑 중의 phenol성 물질들이 $ONOO^-$ 제거 활성에 주로 관여하리라는 것을 시사해 준다.

LPS로 유도한 활성산소, NO 및 $ONOO^-$ 생성계에 미치는 영향을 검토한 실험에서 생薑은 $ONOO^-$ 및 그 전구체인 $\cdot O_2^-$ 와 NO의 생성을 억제하였다. 따라서 생薑이 $ONOO^-$ 자체를 제거할 뿐만 아니라, 그 전구체인 $\cdot O_2^-$ 와 NO 생성계에도 영향을 미쳐 효과적으로 $ONOO^-$ 의 제거 및 억제 활성을 나타낸다고 사료된다. 특히 SIN-1에 의해 생성되는 $\cdot O_2^-$ 나 SNP에 의해 생성되는 NO를 제거하는 능력보다 LPS로 유도된 $\cdot O_2^-$ 와 NO 억제능이 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 이것은 생薑이 $\cdot O_2^-$ 와 NO 제거 작용 외에 $\cdot O_2^-$ 생성계 효소인 xanthine oxidase, cyclooxygenase, NADPH oxidase 등이나 NO 생성계 효소인 NOS의 저해 작용도 가질 것으로 사료된다. 생薑이 포함된 靑娥丸은 활성산소 생성계 효소인 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase 활성을 억제한다는 보고¹²가 있다.

생薑의 $ONOO^-$ 제거 기전을 검토하기 위하여 $ONOO^-$ 와 생薑추출물과의 반응으로부터 검토한 결과, 생薑추출물의 농도 의존적으로 3-nitrotyrosine의 peak가 줄어드는 것으로 나타났다. 따라서 생薑이 매우 효과적으로 tyrosine의 nitration을 억제함을 알 수 있고, 이것은 electron donation에 의해 제거함을 의미한다.

또한 단백질의 tyrosine은 $ONOO^-$ 에 의해 쉽게 nitration되어 nitrotyrosine이 됨으로써 기능 변성을 초래하게 되는데, Albumin의 tyrosine이 $ONOO^-$ 에 의해 nitration되는 정도에 생薑이 미치는 영향을 anti-nitrotyrosine 항체로 검토한 결과 생薑추출물은 단백질 속의 tyrosine의 nitration을 농도 의존적으로 억제하였다. 이것은 생薑이 $ONOO^-$ 를 electron donation에 의해 효과적으로 제거함으로써 albumin의 nitration을 저해한 것으로서, 생薑이 세포 구성성분인 단백질의 변성을 보호하는데 중요한 활성을 나타낼 것으로 사료된다.

이상의 결과로 보아 생薑은 $ONOO^-$ 를 electron

donation에 의해 효율적으로 제거하였으며, ONOO⁻의 전구체인 ·O₂⁻와 NO도 제거하는 능력을 가져 노화과정 및 노인성 질환을 조절하는데 유효한 약재가 될 가능성을 시사해 준다.

V. 結 論

노화과정 및 노인성 질환에 중요한 역할을 하는 ONOO⁻ 및 그 전구체인 ·O₂⁻와 NO에 대한 生薑의 제거능과 그 기전을 검토하였다. 生薑은 ONOO⁻를 농도 의존적으로 직접 소거하였고, SIN-1에 의해 생성되는 ·O₂⁻와 NO에 의해 생성되는 ONOO⁻도 억제하였다. 生薑은 SIN-1에 의해 생성되는 ·O₂⁻와 sodium nitroprusside에 의해 생성되는 NO에 대하여도 효과적으로 소거하였다. 生薑은 electron donation에 의해 효과적으로 ONOO⁻를 소거하였고, albumin의 tyrosine이 ONOO⁻에 의해 nitration되는 것을 강력히 저해하였다. 生薑은 마우스에서 LPS에 의해 유도된 ONOO⁻ 및 그 전구체인 NO와 ·O₂⁻를 효과적으로 억제하였다. 이상의 결과로서 生薑은 ONOO⁻를 효과적으로 소거하여 노화 및 노인성 질환의 조절 약물로 작용할 가능성이 시사되었다.

參考文獻

1. Chung HY, Soung DY, Kim AR, Choi HR, Kim HJ, Choi JS, Yang R, Lee KH and Yu BP. Generation, Toxicity and Scavenging of ONOO⁻: Its Involvement in the Aging Process. *Kor. J. Gerontol.* 2000;10:46-59.
2. Althaus JS, Oien TT, Fici GJ, Scherch HM, Sethy VH, VonVoigtlander PF. Structure activity relationships of peroxynitrite scavengers an approach to nitric oxide neurotoxicity. *Res. Commu. Chem. Patho. Pharmacol.* 1994;83:243-8.
3. Haenen GPMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;236:591-6.
4. Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;232:164-70.
5. Chung HY, Kim HJ, and Kim JW. The inflammation hypothesis of aging: Molecular modulation by calorie restriction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001;928:327-335.
6. 平田結善緒. NO 와 NOS. 内分泌, 糖尿病科. 1996;2:207-214.
7. Chung HY, Kim HJ, Jung KJ, Yoon JS, Yoo MA, Kim KW and Yu BP. The inflammatory process in aging. *Reviews in Clinical Gerontology.* 2000;10:207-222.
8. 李尙仁. 本草學. 서울:醫藥社;1983, p202-3.
9. 吳儀洛. 本草從新. 上海:上海科學技術出版社;1982, p222.
10. 김은정. 생강추출물의 항산화효과에 관한 연구. 성신여자대학교 대학원 석사학위논문. 1990.
11. 유장성. 생강의 methanol 추출물중 항산화물질. 전북대학교 대학원 석사학위논문. 1989.
12. 황영근, 윤철호, 김종대, 정지천, 신익섭. Effects of Qingwan on Antioxidation in Rat's Kidney. *한방성인병학회지* 1996;2:119-31.
13. 윤철호, 강정준, 신현철, 김종대, 정지천, 서종은, 신익섭. Effects of Qingwan on Antioxidation in Rat's Brain. *한의학정보학회지* 4(1):54-64
14. 鄭智天. Increased antioxidant enzyme activities and scavenging effects of oxygen free radicals by Cheongahwan. 대한한의학회지 1997;18(2):355-65.
15. 김성호, 정지천. 靑娥丸의 Peroxynitrite 제거 활성 및 기전. 대한한의학회지 2002;23(3):255-62.
16. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free. Radic. Res. Commun.* 1994;16:149-56.
17. Cathcart R, Schwieters E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal. Biochem.* 1983;134:111-6.
18. Nagata N, Momose K, Ishida Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J. Biochem. Tokyo.* 1999; 125:658-61.
19. Park HJ, Chung HY, Kim J, Choi JS. Antioxidant activity of 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxy benzyl methyl ether from *Symphocladia latiuscula*. *J. Fish. Sci. Technol.* 1999;2:1-7.
20. Namba T. The encyclopedia of Wakan-Yaku.

- Hoikusha. Tokyo. 1993;1:222-3.*
21. 黃度淵. 方藥合編. 서울:南山堂;1989, p.216-7.
 22. Corfran RS, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia:WB. Saunders;1989, p.1-31.
 23. Carr, A.C. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species : reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20:1716-23.
 24. Amezcua JL, Palmer RMJ, De Souza BM, Moncada S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 1989;97:1119-25.
 25. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB. J.* 1992; 6:305-10.
 26. Choi JS, Chung HY, Kang SS, Jung MJ, Kim JW, No JK and Jung HA. The Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Scavengers of Peroxynitrite. *Phytother. Res.* 2002;16:232-5.
 27. Neumann HA, Carlsson, K and Brom GH. Uptake and localization of O-(beta-hydroxyethyl)-rutosides in the venous wall measured by laser scanning microscopy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1992;43:423-6.
 28. Chung HY, Yokozawa T, Soung DY, Kye IS, No JK and Baek BS. Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin. *J. Agric. Food Chem.* 1998;46 :4484-6.