

# 五味子藥鍼液의 NO, DPPH 消去 및 IL-4에 대한 抑制效果

조현열<sup>1</sup> · 윤종석<sup>1</sup> · 서보명<sup>1</sup> · 이세연<sup>1</sup> · 김성웅<sup>1</sup> · 백정한<sup>2</sup> ·  
박치상<sup>2</sup> · 서정철<sup>1</sup> · 한상원<sup>1</sup>

<sup>1</sup>경산대학교 한의과대학 침구학교실 · <sup>2</sup>제한동의학술원

## The Scavenging Effect on NO, DPPH and Inhibitory Effect on IL-4 in Schizandrae Fructus Herbal-Acupuncture Solution

Hyun-Yeul Cho<sup>1</sup>, Jong-Seok Yoon<sup>1</sup>, Bo-Myung Seo<sup>1</sup>, Sea-Youn Lee<sup>1</sup>, Sung-Woong Kim<sup>1</sup>,  
Jung-Han Baek<sup>2</sup>, Chi-Sang Park<sup>2</sup>, Jeong-Chul Seo<sup>1</sup>, Sang-Won Han<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Kyung-san University;  
<sup>2</sup>Je-Han Oriental Medical Academy

### Abstract

**Backgrounds :** It has been investigated about ageing theory. However, ageing mechanism still remains to be unknown. Since Harman proposes that ageing and ageing related diseases might be due to oxidative damage and these are modifiable by genetic and environmental factors. For designing an optimal nutritional countermeasure against ageing and ageing related disease, it is necessary to understand the ageing mechanism and other reactive species.

**Objectives :** Schizandra Chinesis has been clinically used to treat brain disease, respiratory or inflammatory disease etc. in Oriental medicine. The purpose of this study is to investigate the scavenging effect of Schizandrae Fructus herbal-acupuncture solution(SFHA) on NO, DPPH and IL-4.

**Results :** The results are summarized as follows;

- ① There is a significant scavenging effect of SFHA on NO in 0.1, 1, 10mg/ml group after 24hrs.
- ② There is a significant scavenging effect of SFHA on DPPH in 1, 10µg/ml group.
- ③ There is a significant inhibitory effect of SFHA on IL-4 in 1, 10, 100µg/ml group.

**Conclusions :** These findings indicate that SFHA can be used as antioxidant or antiinflammatory drug. But further study is needed about the effect of SFHA.

**Key words :** Schizandrae Fructus, Herbal-acupuncture, NO, DPPH, IL-4.

## I. 緒 論

老化란 생명의 발전이 신체 신진대사의 힘으

로 생존하는 것에서 쇠퇴를 좇고 점점 사망을 향하여 나아가는 것으로서 韓醫學에서는 생명의 자연규율을 대체로 生, 長, 壯, 老, 死의 단계로 나누고 있다<sup>1)</sup>.

· 교신저자: 한상원, 대구광역시 수성구 상동 165 경산대학교 부속  
대구한방병원 침구과(TEL : 053-770-2129)  
E-mail : hansw@kyungsan.ac.kr

老化的 機轉에 관한 많은 연구가 있었으나

현재까지도 이에 대하여서는 해결되지 않은 중요한 과학적인 문제로 남아있다<sup>2)</sup>. 老化에 관한 學說로는 아직까지 확실하게 밝혀진 사실은 없으며 여러 가지 가설이 제시되고 있는데 크게 소모설(wear and tear theory)과 유전자설(genome-based theory)의 개념으로 나누어지며 이중 소모설의 대표적인 free radical설에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있다<sup>3)</sup>. 분자상태의 산소는 細胞의 대사와 에너지의 생산에 기초가 되는 것이지만 산소가 분해된 산물인 활성산소(reactive oxygen)는 細胞에 중대한 毒性을 일으킬 수 있다. 활성산소류에는 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical(HO·), nitric oxide(NO) 등이 있으나 superoxide와 hydroxyl radical이 細胞에 대한 毒性이 가장 강하다. 이들 활성산소는 生體內에서 지질과산화 반응을 일으켜 細胞膜을 파괴하고 결국은 細胞를 파괴할 수 있으며 효소와 결합조직에 포함되어 있는 단백질에 작용하여 細胞와 組織에 변화를 가져올 뿐만 아니라 효소의 감소에도 관여하며 매일 10,000개 이상의 활성산소가 體內細胞를 공격하여 細胞의 變異를 초래하여 老化와 癌뿐만 아니라 호흡기 질환, 심장질환, 관절염, 당뇨, 노인성 치매, 퇴행성 안질환, 유전적 출산결함 등의 질병을 야기시킨다<sup>4,5)</sup>.

五味子是 木蘭科에 속한 落葉 木質藤本인 五味子(北五味子) *Schizandra chinensis*(TURCZ.) BAILL. 또는 華中五味子(南五味子) *S. sphenanthera* REHD. et WILS.의 完熟한 果實을 乾燥한 것<sup>6)</sup>으로 味酸하고 性溫하며 斂肺滋腎, 澁精止瀉, 生津斂肝<sup>7,8)</sup>하며 中樞神經興奮, 鎮咳去痰, 子宮興奮, 抗菌 등의 藥理作用<sup>9)</sup>이 있고 최근에는五味子が 함유한 Schizandrin 등 數種의 成分이 肝細胞에 대해 일정한 보호작용을 가져

肝細胞의 지방성 변화를 막으며 만성간염환자의 혈청 GPT감소의 효과를 가지고 있음이 밝혀졌다<sup>8,9)</sup>. 그러나 아직까지 五味子藥鍼의 抗酸化效果 및 Interleukin-4(IL-4)에 대한 보고는 미비한 상태이다.

이에 著者는 五味子藥鍼液의 항산화효능, 면역반응에 미치는 효과를 알아보기 위하여 NO, DPPH 및 IL-4 측정을 한 결과, 유의한 바가 있어 다음과 같이 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

本實驗에서 사용한五味子是 慶山大學校 附屬 大邱韓方病院 藥劑科에서 구입하여 精選한 것을 사용하였으며 藥材의 生藥名과 學名은 다음과 같다(Table 1).

### 2. 方法

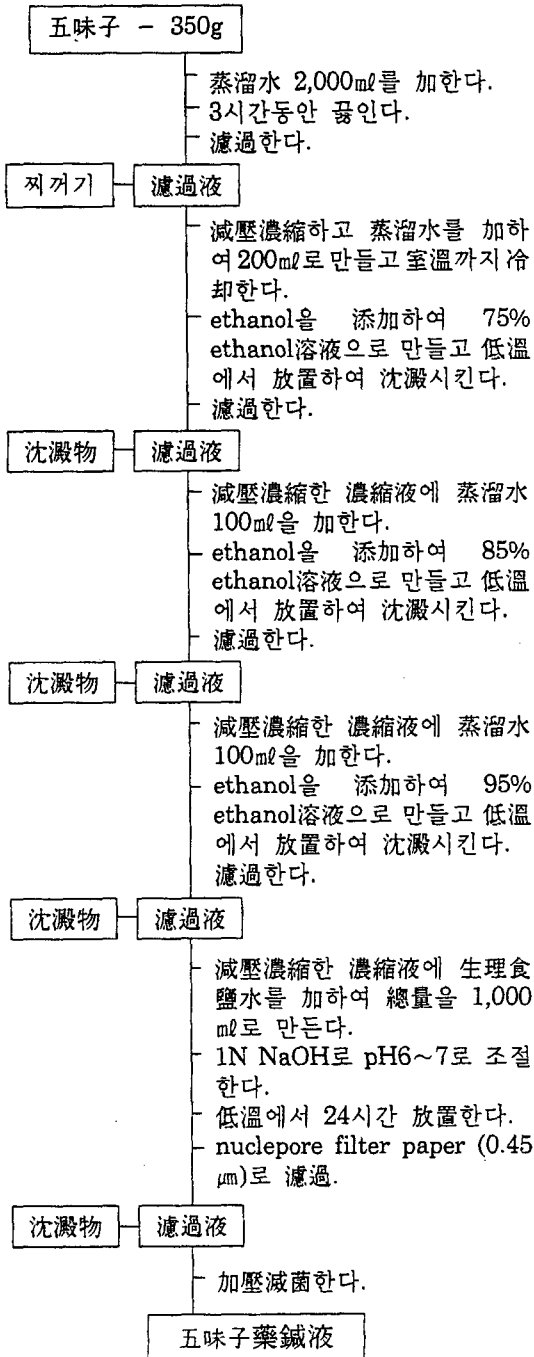
#### 1) 五味子藥鍼液의 製造

實驗에 사용한五味子藥鍼液은五味子 350g을 取해 粗末하여 圓底 flask에 넣고 蒸溜水 2,000ml를 加한 後 3時間 煎湯하여 抽出하고 濾過하였다. 濾液은 rotary evaporator로 減壓濃縮하고 濃縮液에 蒸溜水를 加하여 全量을 200ml이 되도록 한 다음, 室溫까지 冷却하고 ethanol을 加하여 75% ethanol 溶液으로 되게 한 다음, 攪拌하고 低溫에서 放置하여 生成된

Table 1. The Botanical Name of OMIZA(五味子).

藥物名	生藥名	學名
五味子	Schizandrae Fructus	<i>Schizandra Chinensis</i> BAILL.

Table 2. Preparation of Schizandrae Fructus Herbal-Acupuncture Solution.



沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮한 濃縮液에 蒸溜水 100 ml를 加하고 溶解시킨 後 ethanol을 加하여 85% ethanol 溶液으로 되게 한 다음 攪拌하고 低温에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮한 濃縮液에 蒸溜水 100ml를 加하고 溶解시킨 後 ethanol을 加하여 95% ethanol 溶液으로 되게 한 다음 攪拌하고 低温에서 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 生成된 濃縮液에 生理食鹽水를 加하고 3% NaOH로 pH 6~7로 調節하여 全量이 1,000ml가 되게 한 다음, 低温에서 24時間 放置한 後 nuclepore filter (0.45μm, 직경 25mm, U.S.A.)로 濾過하고 加壓 滅菌하여 試料의 原液으로 使用하였다. 이상의 과정을 도식화하면 Table 2와 같다.

## 2) NO 消去效果 測定

### (1) NO 生成化合物

NO generator로는 S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)를 使用하였다. 먼저 NaNO<sub>2</sub> 1.63g을 20ml에 녹였다. 20ml의 methanol과 20ml의 鹽酸을 섞어 1.91g의 N-acetylpenicillamine를 녹였다. 후드 안에서 NaNO<sub>2</sub> 용액을 N-acetylpenicillamine 용액에 2-3ml 씩 첨가하면서 dull green이 나타나는지를 확인하면서 천천히 반응시켰다. 반응이 다 끝나면 濾過를 하여 濾過紙에 2-3일 동안 호일을 덮어 공기 중에 乾燥시켰다. 濾過紙에 남아 있는 분말을 수거하여 다음 실험에 使用하였다.

### (2) NO 測定

Phosphate-buffered saline (PBS) 1ml 에 SNAP 500μ M를 添加 한 후 五味子藥鉞液을

농도별로 첨가한 후 CO<sub>2</sub> 인큐베이터 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 동안 배양하였다. 각 조건별로 100 $\mu$ l씩 3개씩 96-well plate를 사용하여 분주한 후 100 $\mu$ l의 Griess 용액을添加하여 550nm 파장에서 흡광도를 측정하였다<sup>10)</sup>. 이 때 NaNO<sub>2</sub> 용액을 표준으로 하여 농도를 계산하였다.

### 3) DPPH 消去效果 測定

五味子藥鉞液과 對照藥物群으로는 대표적인 抗酸化物質인 Vit. C를 선택하여 3차 蒸溜水에 100mM로 녹여 보관하였다. DPPH 용액은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 무수 ethanol에 녹여 540nM에서 흡광도가 0.96-0.97이 되는 농도로 희석하였다.五味子藥鉞液과 Vit. C를 ethanol에 10mM과 100 $\mu$  M로 희석하였다. 반응은 96well plate에 ethanol 40 $\mu$ l, 試藥 10 $\mu$ l를 넣은 후 위에 조성한 DPPH 용액을 50 $\mu$ l를 넣어 100 $\mu$ l로 만들어(최종농도가 1, 0.1mg/ml가 되도록 함) vortex로 균일하게 혼합한 다음 室溫에서 1시간 방치한 후 ELIZA reader를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 測定하였다<sup>11,2)</sup>.

### 4) IL-4 消去效果 測定

생쥐(BALB/c)의 spleen을 적출하여 RPMI 1,640media를 添加하고 無菌상태에서 균질화하고 65 $\mu$ m mesh로 濾過한 후에 1,200rpm에서 4℃로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 細胞 pellet에 멸균된 삼차중류수를 900 $\mu$ l를 가한 후 10x PBS를 넣어 RBC를 溶血시키고 다시 1,200rpm에서 4℃로 5분간 원심분리하였다. 65 $\mu$ m mesh로 죽은 세포들을 濾過한 후 hemocytometer를 이용하여 細胞數를 測定하였다. 24well plate의 well 당 1.5 × 10<sup>6</sup>개의 細胞를 2ml의 RPMI 1,640media에 분

주하였으며 IL-4를 자극하기 위하여 2 $\mu$ g/ml의 농도로 Concavalin A를 처치하였다. 동시에 五味子藥鉞液을 최종농도가 1, 10, 100 $\mu$ g/ml가 되도록 농도별로 처리하였다. 배양 48시간 후에 상층액을 取하여 다음 IL-4의 농도를 측정할 때까지 -70℃에 보관하였다. ELISA plate에 capture antibody를 100 $\mu$ l/well을 加하고 室溫에서 하루동안 코팅하였다. Wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.4)로 3번 洗滌하고 깨끗이 除去하였다. 비특이 반응을 抑制하기 위하여 1% BSA를 포함하는 PBS를 300 $\mu$ l 加하고 室溫에서 적어도 한시간 이상 반응시켰다. 다시 Wash buffer로 세 번 洗滌하고 깨끗이 乾燥한 후, plate를 사용할 때까지 4-8℃에 보관하였다. Sample과 standard 용액을 96 well plate에 100 $\mu$ l 加하고 가볍게 섞은 후 室溫에서 2시간 동안 반응시켰다. Wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.4)로 3번 洗滌하고 깨끗이 除去하였다. Biotinylated detection antibody를 100 $\mu$ l 加하고 室溫에서 2시간 동안 반응시켰다. Wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.4)로 3번 洗滌하고 깨끗이 除去하였다. Streptavidin HRP (R & D Systems)를 100 $\mu$ l 加하고 室溫에서 30분간 반응시켰다. Wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.4)로 3번 洗滌하고 깨끗이 除去하였다. Substrate solution [1:1 mixture of Color Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and Color Reagent B (tetramethylbenzidine) (R & D Systems)]을 50 $\mu$ l 加하고 잘 섞은 후 30분 이내에 microplate reader를 이용하여 450nm에서 흡광도 測定하였다.

### 5) 統計處理

통계분석은 Statistical Package for Social Science software SAS (version 6.1.2)를 사용

## 五味子藥鉞液의 NO, DPPH 消去 및 IL-4에 대한 抑制效果

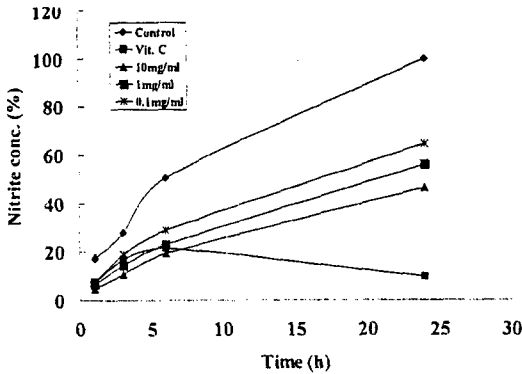


Figure 1. Scavenging effect of Schizandrae Fructus Herbal-Acupuncture Solution on NO.

하였으며 DATA 분석은 Student's t-test를 이용하였고 통계적인 有意性은  $P < 0.05$ 로 하였다. 실험은 독립적으로 3번 이상 반복하였고 mean  $\pm$  standard errors of means (SEM)로 나타내었다.

### III. 結 果

#### 1. NO 消去效果

五味子藥鉞液에 대하여 NO 消去效果를 測定한 結果 1시간 경과 후 NO 농도는 無處置群이  $17.3 \pm 1.7\%$ , Vit. C 處置群은  $7.4 \pm 0.1\%$ ,五味子藥鉞液 0.1, 1, 10mg/ml에서 각각  $7.5 \pm 0.5$ ,  $6.5 \pm 0.8$ ,  $4.9 \pm 0.7\%$ 로 나타났다.

3시간 경과 후 NO 농도는 無處置群이  $27.9 \pm 2.7\%$ , Vit. C 處置群은  $16.8 \pm 0.2\%$ ,五味子藥鉞液 0.1, 1, 10mg/ml에서 각각  $19.0 \pm 0.9$ ,  $14.4 \pm 1.8$ ,  $10.7 \pm 1.5\%$ 로 나타났다.

6시간 경과 후 NO 농도는 無處置群이  $50.5 \pm 4.2\%$ , Vit. C 處置群은  $21.6 \pm 3.2\%$ ,五味子藥鉞液 0.1, 1, 10mg/ml에서 각각  $29.0 \pm 1.3$ ,  $23.2 \pm 0.8$ ,  $19.4 \pm 1.2\%$ 로 나타났다.

24시간 경과 후 NO 농도는 無處置群이  $100.0 \pm 7.6\%$ , Vit. C 處置群은  $9.6 \pm 4.8\%$ , 五

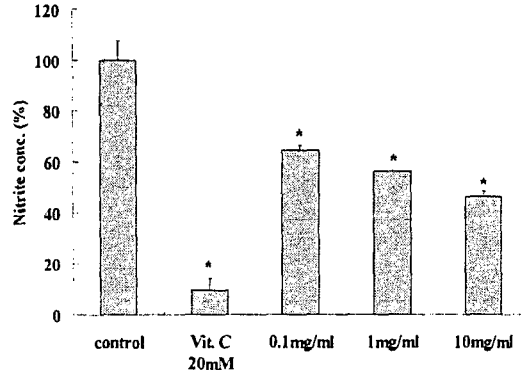


Figure 2. Scavenging effect of Schizandrae Fructus Herbal-Acupuncture Solution on NO after 24 hours.

\* ; significantly different from control group ( $P < 0.05$ )

五味子藥鉞液 0.1, 1, 10mg/ml에서 각각  $64.7 \pm 1.8$ ,  $56.1 \pm 0.2$ ,  $46.4 \pm 2.1\%$ 로 나타났으며 無處置群에 비하여 0.1, 1, 10mg/ml 處置群에서 有意性( $p < 0.05$ )있는 NO 消去效果가 있었다 ( $P < 0.05$ )(Figure 1, Figure 2).

#### 2. DPPH 消去效果

五味子藥鉞液에 대하여 抗酸化活性效果를 확인하고자 10, 1, 0.1mg/ml의 농도로 1시간 동안 DPPH 消去效果를 측정하였다.

無處置群의 경우 10, 20, 30, 60분 후 DPPH 소거 效果는 각각  $0.00 \pm 6.0$ ,  $0.7 \pm 6.1$ ,  $1.4 \pm 6.1$ ,  $2.4 \pm 6.2\%$ 로 抗酸化活性이 거의 없었으나 강력한 抗酸化劑인 Vit. C에서는 시간이 지남에 따라 抗酸化活性이 높게 유지되었다 (10, 20, 30, 60분 후  $56.9 \pm 6.4$ ,  $52.4 \pm 6.2$ ,  $49.7 \pm 6.6$ ,  $42.8 \pm 5.7\%$ ).

한편 10mg/ml의五味子藥鉞液을 투여한 군에서는 항산화 활성이 10, 20, 30, 60분 후 DPPH 소거 效果는 각각  $126.1 \pm 12.5$ ,  $28.0 \pm 5.3$ ,  $22.0 \pm 2.4$ ,  $15.0 \pm 15.8\%$ 로 나타났으며 모두 對照群에 비하여 有意性( $P < 0.05$ )있는

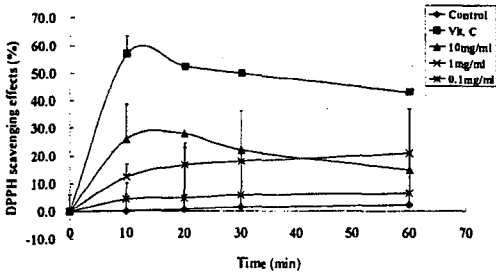


Figure 3. Scavenging effect of Schizandrae Fructus Herbal-Acupuncture Solution on DPPH radical.

DPPH 소거 효과가 있었다.

1mg/ml의五味子藥鍼液을 투여한 군에서는 항산화 활성이 10, 20, 30, 60분 후 DPPH 소거 효과는 각각  $12.3 \pm 4.5$ ,  $16.7 \pm 5.3$ ,  $17.9 \pm 5.8$ ,  $21.0 \pm 6.5\%$ 로 나타났으며 모두 對照群에 비하여 유의성( $P < 0.05$ )있는 DPPH 소거 효과가 있었다.

0.1mg/ml의五味子藥鍼液을 투여한 군에서는 항산화 활성이 10, 20, 30, 60분 후 DPPH 소거 효과는 각각  $4.4 \pm 5.7$ ,  $5.0 \pm 5.7$ ,  $5.7 \pm 5.5$ ,  $6.5 \pm 5.7\%$ 로 나타났으며 對照群에 비하여 유의성( $P < 0.05$ )있는 DPPH 소거 효과가 없었다 (Figure 3).

### 3. IL-4 抑制效果

五味子藥鍼液의 IL-4 消去效果는 對照群의 경우  $44.2 \pm 2.3\text{pg/ml}$ 이었으나 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의五味子藥鍼液에서 각각  $9.6 \pm 8.7$ ,  $16.8 \pm 5.1$ ,  $16.5 \pm 7.0\text{pg/ml}$ 로 나타나 모두 有意性( $P < 0.05$ )이 나타났다(Figure 4).

## IV. 考 察

老化란 생명의 발전이 신체 신진대사의 힘으로 생존하는 것에서 쇠퇴를 좇고 점점 사망을 향하여 나아가는 것으로서 생명체의老化와 관

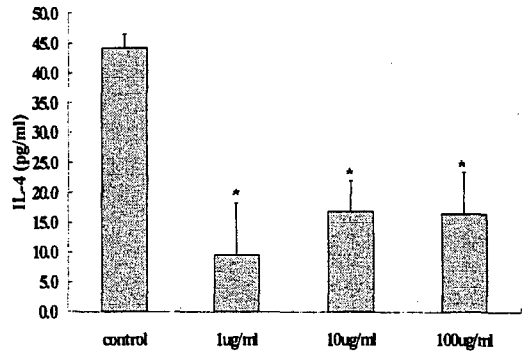


Figure 4. Scavenging effect of Schizandrae Fructus Herbal-Acupuncture Solution on IL-4  
\* ; significantly different from control group ( $P < 0.05$ ).

련하여 아직까지는 해결되지 않은 문제로 남아 있으나 지난 수년간 抗酸化劑를 통한 연구가 괄목할 만큼 발전되어왔다. 몇몇 이론들 중에서는 생명체의 壽命이 어떠한 種에 있어서는 고정되어 있다고 하였으나 壽命은 실제로 그 種의 일부에서는 환경에 의해서 변화되는 것을 볼 수 있다. 같은 種이라 할지라도 유전학적인 특징은 동일하나 음식섭취, 외부온도 등의 차이에 의해 壽命이 달라질 수 있다<sup>1, 13)</sup>.

老化의 원인과 疾病의 원인은 free radical로부터 시작한다. 물질을 구성하고 있는 원자나 분자는 바깥에 전자궤도를 한 개 이상 가지고 있는데 이 중 최외각 전자궤도에서 서로 반대 방향으로 회전하고 있는 전자가 짝을 이루고 있으면 그 물질은 안정상태에 있지만 외부로부터 여분의 전자를 한 개 받거나 다른 물질에 빼앗겨서 쌍으로 존재하지 않는 전자가 한 개 이상 있을 때 이를 free radical이라고 한다<sup>14)</sup>. 이상적인 영양의 척도를 연구하기 위해서 이들 free radical과 活性酸素類의 生成과 消去에 대한 機轉의 이해는 반드시 필요하였으며 지금으로부터 약 60년 전 Haber와 Weiss가 수용액 속에서 분자산소에 의해  $\text{O}^2(\text{superoxide})$ 이 생성됨을 보고한 이래 생명체 내에서 free

radical의 생성은 생물체 병리현상의 병인으로 까지 간주하기에 이르렀다. 1969년 superoxide dismutase(SOD)라는 효소가 있음을 발견하였고 1988년에는 nitric oxide(NO)의 합성이 발견된 이래로 free radical이론은 급속도로 확산되었고 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 허혈성 심질환, 암, 치매, 파킨슨병, 죽상경화증, 류마티스 관절염, 신경계의 변성, 당뇨병 등의 각종 질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있다(4-5, 13).

이러한 이론의 바탕하에서 疾病을 치료하려는 시도가 이루어지면서 抗酸化劑의 연구개발은 식품 및 발효공업 및 의약품 분야, 농업 분야 등 다방면 분야에서 이용되고 있기 때문에 국가적 측면에서 매우 큰 경제적, 산업적 파급 효과를 기대할 수 있다. 그러나 지금까지 연구되고 알려진 抗酸化劑가 약한 活性과 毒性 및 使用上의 한계로 의약품으로 사용하는 데 있어서 많은 문제점을 내포하고 있다<sup>15-6)</sup>. 따라서 고부가가치 창출을 위해서는 경제적이며 실용적인 실험적인 방법이 필요하다.

NO는 수용성 가스로 수초동안의 아주 짧은 반감기를 가지는 물질로서 생체에서는 혈관 내피세포와 대식세포 및 신경원세포에서 생성되는데 두 종류의 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)가 있다. 즉, 세포내에 항상 존재하며 소량의 NO를 생성하는 constitutive NOS(cNOS)와 염증 등의 자극에 의해 활성화된 대식세포 등에서 유도되는 inducible NOS(iNOS)가 있다. cNOS에 의한 NO는 신경전달물질로 작용을 하고 내피세포에서는 혈관 확장작용을 한다. 반면 iNOS에 의해 과량으로 생성된 NO는 조직을 손상시키는 염증매개물로 작용한다<sup>17)</sup>. 따라서 NO의 생성은 조절될 필요성이 있다. 과학자들은 신경전달물질의 역할을

하는 활성산소의 하나인 NO의 抑制劑가 고혈압, 패혈증성 쇼크(septic shock), 뇌졸중, 암, 성교 불능과 같은 병들을 치료하는 데 유용할 것으로 생각하고 있다. 本 實驗에서는 NO generator로는 SNAP를 사용하였다. 기존에 NO에 관한 논문은 장 등<sup>18)</sup>의 배서 폐동맥 내피세포에서의 NO 생성을 비롯하여 매우 많다. 그러나 SNAP을 이용하여 NO 消去效果를 본 연구로는 洋方에서는 박 등<sup>19)</sup>이 NO를 주사시 망막에 미치는 영향, 김 등<sup>20)</sup>이 안구표피질환에서 NO의 역할 등을 보고하였고 韓方에서는 韓 등<sup>21)</sup>이 數種藥鍼液의 NO 消去效果, 徐 등<sup>22)</sup>이 蜂藥鍼液의 NO 消去效果를 보고하였다.

DPPH는 일반적으로 반응성이 강하고 抗酸化劑로부터 전자 혹은 수소원자를 얻음으로써 안정한 형태의 생성물로 轉換하는 것으로 알려져 있다<sup>23)</sup>. 기존에 DPPH 消去效果에 관한 연구로는 朴 등<sup>24)</sup>이 薏苡仁和 苦蔘에 대하여, 이 등<sup>25)</sup>이 紅蔘에 대하여, 최 등<sup>26)</sup>이 桂枝에 대하여 보고한 바가 있다.

IL-4는 여러종류의 細胞에 다양한 기능을 나타내는 분자량 20kDa cytokine으로 活性化된 CD4+ T세포와 活性化된 mast cell에서 分泌되며, 主로 B림프구의 增殖 및 分化因子로 작용, B림프구에서 MHC(major histocompatibility complex, 主조직 적합성 복합체)class II 抗原의 發顯增進, mast cell의 增殖因子 및 B림프구와 대식세포에서 CD23(IgE의 Fc에 대한 수용체)의 發顯을 誘導하는 作用을 한다<sup>27)</sup>. 즉, IL-4는 IgE 및 mast cell, eosinophil 媒介性 免疫의 調節者이며<sup>28)</sup>, 休止期 상태의 B림프구에서 抗原의 發顯을 增進시키고, 나아가 即時型 過敏反應의 媒介物인 IgE의 生成을 促進시키는 機能을 한다<sup>27, 29)</sup>. 한편 IL-4는 알레르기 질환에 있어서 喘息의 發病에 관여하는 중

요한 cytokine으로서 휴지기 상태의 B세포에서 Ia 항원을 발현시키고 IgE 생산을 증가시킴으로써 천식의 유발 및 아토피의 발생에 중요한 역할을 한다<sup>30)</sup>.

이에 저자는五味子藥鍼液을 이용하여 free radical 消去法에 의한 抗酸化活性 검색방법을 통하여 직접 실험관내에서 일차적으로 細胞保護劑로서 역할을 할 수 있는 기능을 확인하고자 하였다.

五味子是 木蘭科에 속한 落葉 木質藤本인 五味子(北五味子) *Schizandra chinesis*(TURCZ.) BAILL. 또는 華中五味子(南五味子) *S. sphenanthera* REHD. et WILS.의 完熟한 果實을 乾燥한 것<sup>6)</sup>으로 味酸하고 性溫하며 斂肺滋腎, 澁精止瀉, 生津斂肝<sup>7,8)</sup>하며 中樞神經興奮, 鎮咳去痰, 子宮興奮, 抗菌 등의 藥理作用<sup>9)</sup>이 있다. 최근에는五味子の 성분 중에서 毒物質에 의한 肝損傷을 방지할 수 있는 유효성분을 추출하였고 이와 비슷한 물질인 diphenyldimethyl-dicarboxylate(PMC)라는 물질을 인공 합성하는데 성공하였는데 PMC는 동물실험에서 CCl<sub>4</sub>에 의한 肝損傷에 대해 억제작용이 있을 뿐만 아니라 藥理와 毒性實驗에서도 안전한 것으로 밝혀졌다<sup>31,2)</sup>. 또 송 등<sup>33)</sup>은 만성활동성간염 및 간경변증으로 확진받은 환자에게 PMC를 장기 투여한 결과 혈청 Transaminase, 특히 ALT치와 AST치가 PMC를 투여받지 않은 群에 비해 의미있게 저하되는 것을 확인할 수 있었으며 부작용도 없었을 뿐 아니라 이학적 및 검사소견에도 악영향을 초래하지 않아 PMC의 만성활동성 간질환에 대한 치료제로서의 가능성을 충분히 시사한다고 보고하였다. 그러나 아직까지五味子藥鍼의 抗酸化效果 및 IL-4에 대한 보고는 미흡한 상태이다. 이에五味子藥鍼의 작용기전을 보다 깊이 이해하고

기초자료로 쓰일 수 있도록 NO, DPPH 및 IL-4 消去效果를 관찰한 결과는 다음과 같다.

五味子藥鍼液에 대하여 抗酸化效果 중 대표적인 酸化劑인 NO의 消去效果를 확인하고자 0.1, 1, 10mg/ml의 농도로 測定하였다. 本實驗結果 24시간 경과 후 NO 농도는 無處置群이 100.0±7.6%, Vit. C 處置群은 9.6±4.8%,五味子藥鍼液 0.1, 1, 10mg/ml 處置群에서 각각 64.7±1.8, 56.1±0.2, 46.4±2.1%로 나타났다. NO 消去效果는 오랜 시간 NO를 處置한 후 그 결과를 보는 것이 더 의미가 있다. 따라서 24시간 경과 후를 보았을 때五味子藥鍼液은 0.1, 1, 10mg/ml 處置群에서 모두 無處置群에 비하여 有意한 NO 消去效果가 있었다.

五味子藥鍼液에 대하여 抗酸化活性效果를 확인하고자 10, 1, 0.1mg/ml의 농도로 1시간 동안 DPPH 消去效果를 測定하였다. 本實驗結果 10mg/ml의五味子藥鍼液을 투여한 군에서는 항산화 활성이 10, 20, 30, 60분 후 DPPH 소거效果는 각각 126.1±12.5, 28.0±5.3, 22.0±2.4, 15.0±15.8%로 나타났으며 모두 對照群에 비하여 有意성(P<0.05)있는 DPPH 소거效果가 있었다. 1mg/ml의五味子藥鍼液을 투여한 군에서는 항산화 활성이 10, 20, 30, 60분 후 DPPH 소거效果는 각각 12.3±4.5, 16.7±5.3, 17.9±5.8, 21.0±6.5%로 나타났으며 모두 對照群에 비하여 有意성(P<0.05)있는 DPPH 소거效果가 있었다. 0.1mg/ml의五味子藥鍼液을 투여한 군에서는 항산화 활성이 10, 20, 30, 60분 후 DPPH 소거效果는 각각 4.4±5.7, 5.0±5.7, 5.7±5.5, 6.5±5.7%로 나타났으며 對照群에 비하여 有意성(P<0.05)있는 DPPH 소거效果가 없었다.五味子藥鍼液의 抗酸化效果를 보기 위한 本實驗 중 NO 消去뿐만 아니라 DPPH 消去에서도 효과가 有意性있게 나타났



다.

五味子藥鍼液에 대하여 IL-4 抑制效果를 확인하고자五味子藥鍼液을 최종농도가 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 농도별로 처리하고 48시간 후에 상층액만을 취하여 IL-4의 농도를 측정하였다. 對照群의 경우  $44.2 \pm 2.3 \text{pg/ml}$ 이었으나 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의五味子藥鍼液에서 IL-4는 각각  $9.6 \pm 8.7$ ,  $16.8 \pm 5.1$ ,  $16.5 \pm 7.0 \text{pg/ml}$ 로 나타났으며 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$  投與群에서 모두 有意性이 나타났다고( $P < 0.05$ ). 요컨대五味子藥鍼液은 IL-4를 유의하게 억제하였다.

IL-4에 대한 기존연구로는 유 등<sup>34)</sup>은 少陰人 升陽益氣湯을 投與하여 면역세포인 흥선세포, 비장세포 및 대식세포에 대한 작용을 관찰한 결과 흥선세포와 비장세포에서 IL-4의 양은 변화하지 않았고, 血清 중 IL-4의 양도 변화하지 않았다고 보고하였고 이 등<sup>35)</sup>은 RBL(rat basophilic leukemia)-2H3 세포주를 이용한 實驗에서 麥門冬 投與群에서는 IL-4의 전사에 있어 對照群에 비하여 발현도가 53.2%의 전사억제효과를 나타내었고五味子投與群에서는 49.1%의 전사억제효과를 나타내었다고 보고하였고 정 등<sup>36)</sup>은 杏仁投與群에서는 51.6%의 전사억제효과, 桔梗投與群에서는 54.6%의 전사억제효과를 나타내었다고 보고 하였는데 이는 本實驗의 結果와 相通한다고 하겠다. 반면에 김 등<sup>37)</sup>은 腎俞穴 일반 鍼을 자극하였을 때 IL-4 유전자는 30분 후에 약간 발현되었고 黃耆藥鍼 자극시에는 반응초기에는 나타나지 않았으나 藥鍼處置후 15분에서는 大量으로 발현되었고 30분 이후부터 3시간까지 점차로 減少하였다고 보고하였는데 本實驗의 結果와 相反되었다.

이상과 같이五味子藥鍼液의 free radical 消去效果에 있어서 NO와 DPPH에 대하여 모두 有意性이 있었다. 면역반응에 미치는 效果를

알아보기 위한 IL-4 측정에서도 有意性이 있어 尙後五味子藥鍼液의 抗酸化效果, 면역관련 작용 등에 대한 研究가 활성화되어야 할 것으로 思料된다.

## V. 結 論

五味子藥鍼液의 항산화효능과 면역반응에 미치는 效果를 알아보기 위하여 NO, DPPH 및 IL-4 측정을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NO 消去效果는 0.1, 1 및 10 $\text{mg/ml}$  處置群에서 모두 24시간 경과 후 有意性이 있었다.
2. DPPH 消去效果는 1, 10 $\mu\text{g/ml}$  處置群에서 각각 有意性이 있었다.
3. IL-4 消去效果는 1, 10 및 100 $\mu\text{g/ml}$  處置群에서 모두 有意性이 있었다.

## 參考文獻

1. 김광호, 김동영. 東醫老年養生學. 1판. 서울 : 서원당. 1999 : 8-10.
2. Floyd RA, West M, Hensley K. Oxidative biochemical markers; clues to understanding aging in long-lived species. *Experimental Gerontology*. 2001 ; 36 : 619-40.
3. 이흥민, 서정철, 김용석. 老化의 研究動向에 관한 考察. *大韓鍼灸學會誌*. 2001 ; 18(1) : 146-56.
4. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993 ; 23 : 21-48.
5. 安垞撤, 文振榮, 林鍾國. 當歸藥鍼液의 抗酸化 效能에 관한 研究. *大韓鍼灸學會誌*. 1996 ; 13(2) : 254-62.

6. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 2판. 서울 : 永林社. 1992 : 622-3.
7. 江蘇醫學院. 中藥大辭典. 上海 : 上海科學技術出版社. 1977 : 386-9.
8. 赤松金芳. 和漢藥. 東京 : 醫齒藥出版株式會社. 1973 : 430-1.
9. 旺容生 外. 中藥藥理與應用. 北京 : 人民衛生出版社. 1983 : 177-86.
10. Fox JB, Doerr RC, Lakritz L. Interaction between sample preparation techniques and three methods of nitrite determination. *J Assoc Off Anal Chem.* 1982 ; 65(3) : 690-5.
11. Uchiyama M, Suzuki Y, Fukuzawa K. Biochemical studies of the physiological function of tocopheronolactone. *Yakugaku Zasshi.* 1968 ; 88(6) : 678- 83.
12. Ratty AK, Sunamoto J, Das NP. Interaction of flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. *Biochem Pharmacol.* 1988 ; 37(6) : 989-95.
13. Gutteridge JM. Aging and free radicals. *Med Lab Sci.* 1992 ; 49(4) : 313-8.
14. 김영균, 김영곤. 프리라디칼. 1판. 서울 : 麗文閣. 1997 : 1, 521, 564-69.
15. Kim JD et al. Development of Anti-Oxidatant Tea for Anti-aging. *Bull. Yosu Nat'l Univ.* 1999 ; 14 : 401-9.
16. Shin DH. Separation of Antioxidant compounds from Persimmon leaves. *J of Korean Oil Chemists' Soc.* 1997 ; 14 : 103-7.
17. 대한병리학회 대구·경북지부학회. 간추린 병리학. 2판. 서울 : 정문각. 2000 : 72.
18. 장상호, 장준, 박전한, 김세규, 김세중, 김서규 등. 폐동맥내피세포에서의 cytokine 및 내독소에 의한 nitric oxide형성과 미토콘드리아 aconitase 활성도의 관계. *대한내과학회지.* 1999 ; 36(2) : 174-81.
19. 박영진, 임충식, 권년수, 양한남. 유색가트의 유리체강내에 Nitric Oxide를 주사시 망막에 미치는 영향에 대한 연구. *대한안과학회지.* 1999 ; 40(11) : 379-87.
20. Jae Chan Kim. The role of nitric oxide in ocular surface diseases, *Korean Journal of Ophthalmology.* 2001 ; 15(2) : 59-66.
21. 한상원, 임강현, 서정철, 윤현민, 장경전, 송춘호 외. Scavenging Effect of Several Distilled Herbal Acupunctures on Nitric Oxide. *동의생리병리학회지.* 2001 ; 15(6) : 1016-21.
22. 서정철, 임강현, 김이화, 김창주, 유명민, 정주호 외. Scavenging Effect of Bee Venom for Acua-acupuncture against Nitric Oxide. *大韓鍼灸學會誌.* 2001 ; 18(6) : 161-70.
23. 林鍾國, 文振榮. 柴胡藥鍼製劑의 自由基 消去能 및 脂質過酸化 抑制效能에 관한 研究. *大韓鍼灸學會誌.* 1998 ; 15(2) : 135-45.
24. 朴涌基, 康秉秀. 薏苡仁과 苦蔘의 抗酸化作用에 관한 研究. *大韓本草學會誌.* 2000 ; 15(2) : 57-67.
25. 이종원. 홍삼으로부터 분리한 수용성 갈변 물질의 항산화 활성. DPPH의 수소공여능 및 hydrogen peroxide 소거능 중심으로. *高麗人蔘學會誌.* 1999 ; 23(3) : 176-81.

26. Choi Jae Sue 外. Alaternin, Cassiaside and Rubrofusarin gentiobioside, Radical Scavenging Principles from the Seeds of Cassia tora on 1,1-Diphenyl -2-picrylhydrazyl(DPPH) Radical. 釜山水產大生命科學研究報告. 1995 ; 5(1) : 321-5.
27. 김세종. 免疫學. 1판. 서울 : 高麗醫學. 1994 : 58-9, 147-161, 260-5.
28. 정승원, 이미애, 하대유. Cytokine이 Th1 細胞의 Mitogens에 대한 增殖反應에 미치는 影響. Korean J Immunol. 1997 ; 19 : 73-81.
29. 韓鏞徹. 臨床呼吸器學. 서울 : 一潮閣. 1995 : 208-25.
30. 金永佑. 定喘湯과 清上補下湯이 asthma model 內의 cytokine에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 韓醫學科. 2000.
31. 雷載權, 張廷模主編. 中華臨床中藥學. 4판. 北京 : 人民衛生出版社. 1998 : 1623-7.
32. 丁兆夢編著. 中藥藥效與臨床. 北京 : 中國醫藥科技出版社. 1판. 1999 : 247-50.
33. 송인성, 김용태, 정현채, 이효석, 김정용, 윤용범. 만성활동성 간질환 환자에서 diphenyl-dimethyl-dicarboxylate의 혈청 Alanine Aminotransferase치 저하효과에 관한 전향적 무작위 선정 대조연구. 대한 내과학회지. 1991 ; 40(2) : 172-3.
34. 유창렬, 송정모. 소음인 승양의기탕의 면역 조절작용. 사상의학회지. 2001 ; 13(3) : 102-13.
35. 이동생, 정희재, 이형구, 정승기. 麥門冬과五味자가 Asthma model 內의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響. 慶熙醫學. 2000 ; 54 : 170-81.
36. 정옥, 정희재, 정승기, 이형구. 杏仁과 桔梗이 Asthma model 內의 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향. 大韓韓方內科學會誌. 2000 ; 21(1) : 31-8.
37. 김법진, 박수영, 김창환, 김철호, 문진영, 최달영, 김준기, 박선동, 박원환. 腎俞穴의 鍼刺戟과 黃耆藥鍼이 실험용 생쥐의 면역 활성 Cytokine인 IL-4의 유전자발현에 미치는 영향. 大韓經絡經穴學會誌. 2001 ; 18(2) : 113-23.