

원저

## 白何首烏藥鍼液의 NO, DPPH 消去 및 IL-4 抑制效果

김동현 · 서정철 · 임성철 · 정태영\* · 한상원

경산대학교 한의과대학 침구학교실 · 제한동의학술원\*

### Abstract

## The Scavenging Effect on NO, DPPH and Inhibitory Effect on IL-4 in Radix Cynanchi Wilfordii Herbal-Acupunture Solution

Kim Dong-hyun, Seo Jung-chul, Lim Sung-chul,  
Jung Tae-young\* and Han Sang-won

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine  
Kyung-San University, \*Je-Han Oriental Medical Academy

**Objective** : For designing an optimal countermeasure against ageing and ageing related disease, it is necessary to understand the ageing mechanism and other reactive species. Free radicals are associated with the mechanism of biological ageing and age-related diseases. This study was performed to identify the scavenging effect of Radix Cynanchi Wilfordii Herbal-Acupunture Solution(RCWhA) on Nitric Oxide(NO), 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) and Interleukin-4(IL-4).

**Methods** : The activity to scavenge DPPH radicals and NO was observed in vitro. We evaluated the antioxidant activity of RCWhA by using DPPH or NO free radical method. Also the inhibitory effect on IL-4 in RCWhA was observed in vitro.

**Results** : The followings are the summary of the results ; ① There is a significant scavenging effect of RCWhA on NO in 0.1mg/ml and 10mg/ml group after 24hrs. ② There is no significant scavenging effect of RCWhA on DPPH. ③ There is a significant scavenging effect of RCWhA on IL-4 in 10µg/ml and 100µg/ml group.

- 접수 : 2003년 5월 17일 · 수정 : 2003년 5월 25일 · 채택 : 2003년 7월 12일  
· 교신저자 : 한상원, 대구광역시 수성구 상동 165번지 경산대학교 부속대구한방병원 침구과  
Tel. 053-770-2129 E-mail : chimguhan@hanmail.net

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

**Key words** : Radix Cynanchi Wilfordii, Herbal-Acupuncture, NO, DPPH, IL-4

## I. 緒 論

노화란 생명의 발전이 신체 신진대사의 힘으로 생존하는 것에서 쇠퇴를 좇고 점점 사망을 향하여 나아가는 것 혹은 성숙기 이후부터 생기는 신체변화로 기능생태학적 변화의 생물학적 과정으로 인식된다<sup>1)~2)</sup>.

노화의 기전에 대해 다양한 연구가 진행되고 있으나 가장 인정되고 있는 이론은 free radical설로서 체내 효소계, 환원대사, 화학약품, 공해물질, 광화학 반응 등의 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등에 의하여 산소가 반응성 활성산소(reactive oxygen, 예컨대 O<sup>2-</sup>, HO., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, Nitric Oxide(NO) 등)로 轉換되어 生體에 치명적인 毒性을 일으키는 것이다. 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 老化는 물론 癌을 비롯하여 심장질환, 뇌질환, 동맥경화, 피부질환, 호흡기질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자가면역질환 등의 각종 疾病을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 활성산소에 의한 지질과산화의 결과로 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 여러가지 體內 과산화물도 細胞에 대한 산화적 파괴로 인한 각종 기능장애를 惹起함으로써 老化와 疾病의 원인이 되기도 한다<sup>3)</sup>.

白何首烏는 박주가리과에 속하는 多年生 덩굴풀인 은조롱(Cynanchum wilfordii HEMS.)의 덩이뿌리<sup>4)</sup>로서 性味が 微溫無毒하고 苦甘澁한 益血祛風之品으

로서 胃에 入하여 胃의 消化力을 돕고 腸에 이르러 분해되어 흡수된다<sup>5)</sup>. 藥理作用으로는 强心배당체가 포함되어 있어 심장의 疲勞를 强壯케 하고 조혈기능 강화, 진정, 피로회복 촉진 등의 작용이 있다<sup>6)~7)</sup>. 그러나 아직까지 白何首烏藥鍼의 抗酸化效果 및 Interleukin-4(IL-4)에 대한 보고는 미흡한 상태이다.

이에 著者는 白何首烏藥鍼液의 항산화효능, 면역 반응에 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 白何首烏는 慶山大學校 附屬 大邱韓方病院 藥劑科에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였으며 藥材의 生藥名과 學名은 다음과 같다 <Table 1>.

Table 1. The Botanical Name of BAEK HASUO (白何首烏)

藥物名	生藥名	學名
白何首烏	Radix Cynanchi Wilfordii	Cynanchum Wilfordii HEMSL.

## 2. 方法

### 1) 白何首烏藥鍼液의 製造

實驗에 사용한 白何首烏藥鍼液은 白何首烏 350g 을 取해 粗末하여 圓底 flask에 넣고 蒸溜水 2,000 ml를 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 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 85% ethanol 溶液으로 되게 한 다음 攪拌하고 低溫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 低溫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, 低溫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액으로 使用하였다. 以上の 과정을 도식화하면 <Table 2>와 같다.

### 2) NO 消去效果 測定

#### (1) NO 生成化合物

NO generator로는 S-nitroso-N-acetylpenicillamine(SNAP)를 사용하였다. 먼저 NaNO<sub>2</sub> 1.63g 을 20ml에 녹였다. 20ml의 methanol과 20ml의 HCL을 섞어 1.91g의 N-acetylpenicillamine를 녹였다. 후드안에서 NaNO<sub>2</sub> 용액을 N-acetylpenicillamine 용액에 2~3ml씩 첨가하면서 dull green이 나타나는지를 확인하면서 천천히 반응시켰다. 반응이

Table 1. Preparation of Radix Cynanchi Wilfordii Herbal-Acupuncture Solution



다 끝나면 濾過를 하여 濾過紙에 2~3일 동안 호일을 덮어 공기 중에서 건조시켰다. 濾過紙에 남아있는 분말을 수거하여 다음 實驗에 사용하였다.

#### (2) NO 測定

Phosphate-buffered saline(PBS) 1ml에 SNAP 500  $\mu$ M를 첨가한 후 白何首烏藥鉞液을 농도별로 添加한 후 CO<sub>2</sub> incubator 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub> 조건하에서 24시간 동안 培養하였다. 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>8)</sup>. 이때 NaNO<sub>2</sub> 용액을 표준으로 하여 농도를 계산하였다.

#### 3) DPPH 消去效果 測定

白何首烏藥鉞液과 對照藥物群으로는 대표적인 抗氧化物質인 Vit. C를 선택하여 3차 증류수에 100mM로 녹여 보관하였다. DPPH용액은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 무수 ethanol에 녹여 540nM에서 흡광도가 0.96~0.97이 되는 농도로 희석하였다. 白何首烏藥鉞液과 Vit. C를 ethanol에 10 mM과 100  $\mu$ M로 희석하였다. 반응은 96 well 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 放置한 후, ELISA reader를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 測定하였다<sup>9)</sup>.

#### 4) IL-4 抑制效果 測定

생쥐(BALB/c)의 spleen을 적출하여 RPMI 1640 media를 添加하고 無菌상태에서 균질화하고 65  $\mu$ m mesh로 거른 후에 1,200rpm에서 4°C로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 除去하고 細胞 pellet에 滅菌된 삼차증류수를 900  $\mu$ l를 加한 후 10x PBS를 넣어 RBC를 용혈시키고 다시 1,200rpm에서 4°C

로 5분간 원심분리하였다. 65  $\mu$ m mesh로 죽은 세포들을 濾過한 후 hemocytometer를 이용하여 細胞數를 測定하였다. 24 well plate의 well 당  $1.5 \times 10^6$  개의 세포를 2ml의 RPMI 1,640 media에 분주하였으며 IL-4를 자극하기 위하여 2  $\mu$ g/ml의 농도로 Concanavalin A를 處置하였다. 동시에 白何首烏藥鉞液을 최종농도가 1, 10, 100  $\mu$ g/ml가 되도록 농도별로 처리하였다. 培養 48시간 후에 상층액을 取하여 다음 IL-4의 농도를 測定할 때까지 -70°C에 보관하였다. ELISA plate에 capture antibody를 100  $\mu$ l/well을 加하고 室溫에서 하룻밤 코팅하였다. Wash buffer(0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.4)로 3번 洗滌하고 깨끗이 除去하였다. 비특이 반응을 억제하기 위하여 1% BSA를 포함하는 PBS를 300  $\mu$ l 加하고 室溫에서 적어도 한 시간 이상 반응시켰다. 다시 Wash buffer로 세번 洗滌하고 깨끗이 건조한 후, plate를 사용할 때까지 4~8°C에 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(tetamethylbenzidine) (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

統計分析은 Statistical Package for Social Sci-

ence Software SAS(version 6.1.2)를 사용하였으며 DATA 분석은 Student's *t*-test를 이용하였고 통계적인 유의성은  $P < 0.05$ 로 하였다. 모든 실험은 독립적으로 3번 이상 반복하였고 mean  $\pm$  standard errors of means(SEM)로 나타내었다.

### III. 結 果

#### 1. NO 消去效果

白何首烏藥鍼液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  $7.4 \pm 0.1\%$ , 白何首烏藥鍼液 0.1, 1, 10mg/ml 處置群에서 각각  $19.2 \pm 1.8$ ,  $10.0 \pm 0.4$ ,  $8.3 \pm 0.4\%$ 로 나타났다.

3시간 경과 후 NO 농도는 無處置群이  $27.9 \pm 2.7\%$ , Vit. C 處置群은  $16.8 \pm 0.2\%$ , 白何首烏藥鍼液 0.1, 1, 10mg/ml 處置群에서 각각  $27.9 \pm 1.5$ ,  $22.1 \pm 0.5$ ,  $15.2 \pm 1.4\%$ 로 나타났다.

6시간 경과 후 NO 농도는 無處置群이  $50.5 \pm 4.2\%$ , Vit. C 處置群은  $21.6 \pm 3.2\%$ , 白何首烏藥鍼液 0.1, 1, 10mg/ml 處置群에서 각각  $45.1 \pm 1.6$ ,  $46.3 \pm 0.5$ ,  $28.6 \pm 3.9\%$ 로 나타났다.

24시간 경과 후 NO 농도는 無處置群이  $100.0 \pm 7.6\%$ , Vit. C 處置群은  $9.6 \pm 4.8\%$ , 白何首烏藥鍼液 0.1, 1, 10mg/ml 處置群에서 각각  $78.5 \pm 2.9$ ,  $86.7 \pm 0.9$ ,  $64.0 \pm 7.9\%$ 로 나타났으며 0.1mg/ml와 10mg/ml 處置群에서 無處置群에 비하여 有意性( $P < 0.05$ ) 있는 NO 消去效果가 있었다(Fig. 1, Fig. 2).

#### 2. DPPH 消去效果

白何首烏藥鍼液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.

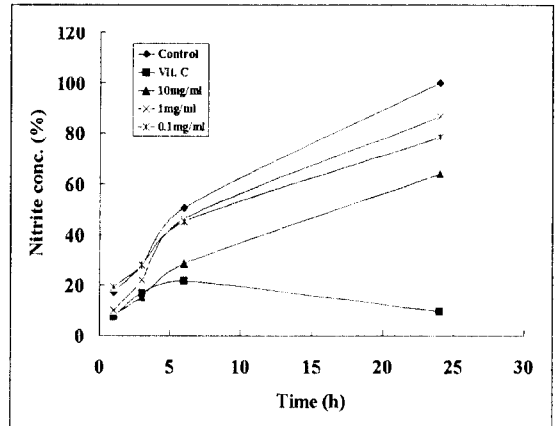


Fig. 1. Scavenging effect of Radix Cynanchi Wilfordii Herbal-Acupuncture Solution on NO

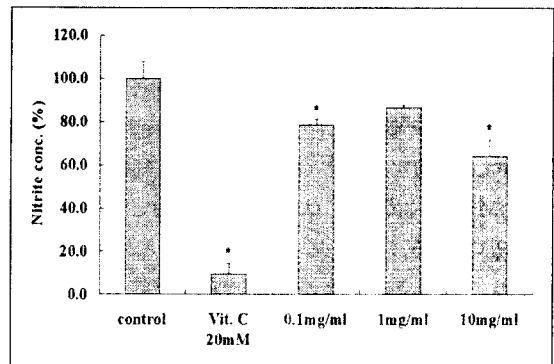


Fig. 2. Scavenging effect of Radix Cynanchi Wilfordii Herbal-Acupuncture Solution on NO after 24 hours

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

本實驗 結果 無處置群의 경우 10, 20, 30, 60분 후  $0.00 \pm 6.0$ ,  $0.7 \pm 6.1$ ,  $1.4 \pm 6.1$ ,  $2.4 \pm 6.2\%$ 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  $56.9 \pm 6.4$ ,  $52.4 \pm 6.2$ ,  $49.7 \pm 6.6$ ,  $42.8 \pm 5.7\%$ ).

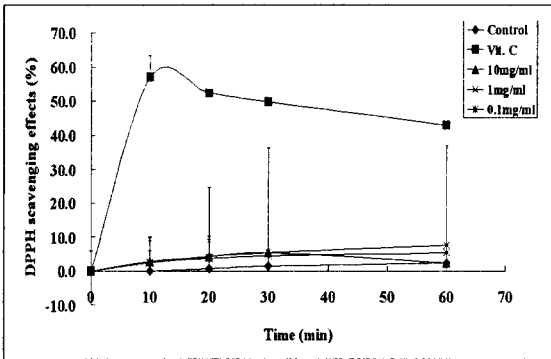


Fig. 3. Scavenging effect of Radix Cynanchi Wilfordii Herbal-Acupuncture Solution on DPPH radical

한편 10mg/ml의 白何首烏藥鍼液을 投與한 群에서는 抗酸化活性이 10, 20, 30, 60분 후 각각  $2.8 \pm 6.9$ ,  $4.2 \pm 17.9$ ,  $5.5 \pm 19.8$ ,  $2.4 \pm 24.6\%$ 로 나타났고, 1mg/ml의 白何首烏藥鍼液을 投與한 群에서는 抗酸化活性이 10, 20, 30, 60분 후 각각  $2.5 \pm 6.5$ ,  $4.3 \pm 11.7$ ,  $5.6 \pm 15.3$ ,  $7.7 \pm 16.1\%$ 로 나타났고, 0.1mg/ml의 白何首烏藥鍼液을 投與한 群에서는 抗酸化活性이 10, 20, 30, 60분 후 각각  $2.6 \pm 7.5$ ,  $3.6 \pm 7.0$ ,  $4.4 \pm 3.2$ ,  $5.4 \pm 6.7\%$ 로 나타났다.

한편 白何首烏藥鍼液에 대하여 有意性( $P < 0.05$ ) 있는 DPPH 消去效果는 보이지 않았다(Fig. 3).

### 3. IL-4 抑制效果

白何首烏藥鍼液에 대하여 IL-4 抑制效果를 확인하고자 白何首烏藥鍼液을 최종농도가 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 농도별로 처리하였다. 培養 48시간 후에 상층액만을 取하여 IL-4의 농도를 測定하였다. 對照群의 경우  $44.2 \pm 2.3\text{pg/ml}$ 이었으나 1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 白何首烏藥鍼液에서 IL-4는 각각  $39.5 \pm 8.1$ ,  $20.7 \pm 1.7$ ,  $14.0 \pm 6.0\text{pg/ml}$ 로 나타났으며 10, 100  $\mu\text{g/ml}$  投與群에서 有意性( $P < 0.05$ ) 있는 抑制效果가 나타났다(Fig. 4).

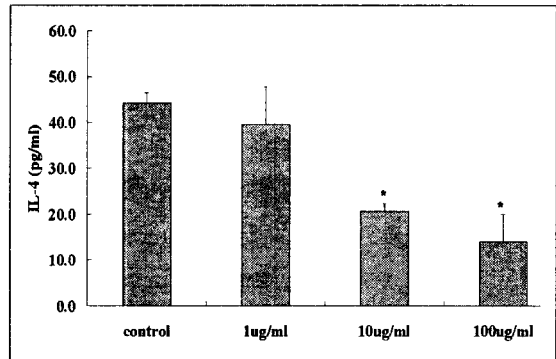


Fig. 4. Scavenging effect of Radix Cynanchi Wilfordii Herbal-Acupuncture Solution on IL-4

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

## IV. 考 察

한의학에서는 생명의 자연규율이 대체로 生, 長, 壯, 老, 死의 단계로 나눌 수 있으며 노화란 생명의 발전이 신체 신진대사의 힘으로 생존하는 것에서 쇠퇴를 좇고 점점 사망을 향하여 나아가는 것 혹은 성숙기 이후부터 생기는 신체변화로 기능생태학적 변화의 생물학적 과정으로 인식된다. 사람의 연령으로 노라는 연한을 구분하면 비교적 쉬우나 생활환경과 생활조건, 사회경력 및 신체의 품부, 생활습관과 성별차이 등에 의해 같은 연령의 사람에서도 그 노화과정도 매우 큰 차이가 있을 수 있다<sup>1),2)</sup>.

老化에 관한 學說로는 아직까지 확실하게 밝혀진 사실은 없으며 여러가지 가설이 제시되고 있는데 크게 소모설(wear and tear theory)과 유전자설(genome-based theory)의 개념으로 나누어지며 이중 소모설의 대표적인 학설인 free radical설에 많은 관심이 집중되고 있다<sup>11)</sup>. Free radical의 정의는 적어도 한 쌍의 짝을 짓지 않은 전자를 포함하는 것

이며 老化에 관한 學說로는 아직까지 확실하게 밝혀진 사실은 없으며 여러가지 가설이 제시되고 있는데 크게 소모설(wear and tear theory)과 유전자설(genome-based theory)의 개념으로 나누어지며 이중 소모설의 대표적인 학설인 free radical설에 많은 관심이 집중되고 있다<sup>11)</sup>. Free radical의 정의는 적어도 한 쌍의 짝을 짓지 않은 전자를 포함하는 것이며 전자 및 분자는 기본적으로 어떤 물질과 전자를 공유하여 안정화되려고 한다. 이러한 결합은 항구적이지 못하며 외부의 힘에 의하여 서로 분리되어 생체 내에 수많은 free radical을 생성하게 한다. 이들 free radical은 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 老化는 물론 癌을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨 병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환 등의 각종 疾病을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>3),11),12)</sup>.

최근에 이르러 특히 최근 抗酸化劑를 통하여 이러한 疾病을 치료하려는 시도가 이루어지면서 抗酸化劑의 연구개발은 식품 및 발효공업 및 의약품 분야, 농업 분야 등 多方面에서 이용되고 있기 때문에 국가적 측면에서 매우 큰 경제적, 산업적 파급효과를 기대할 수 있다. 그러나 지금까지 연구되고 알려진 抗酸化劑가 약한 活性과 毒性 및 사용상의 한계로 의약품으로 사용하는 데에 있어서 많은 문제점을 내포하고 있다<sup>13-15)</sup>. 따라서 고부가가치 창출을 위해서는 경제적이며 실용적인 실험적인 방법이 필요하다.

이에 저자는 白何首烏藥鉞液을 이용하여 free radical 消去法에 의한 抗酸化活性 검색방법을 통하여 직접 實驗管内에서 일차적으로 세포보호제로서 역할을 할 수 있는 기능을 확인하고자 하였다.

면역계 세포가 세포내 기생체에 대한 방어능력이 충분히 갖추어지기 위해서는 림프구, 특히 T세포에서 유래한 세포 활성 물질의 영향을 받아 활성화되어

야 가능하다. 일반적으로 대식세포는 T세포의 영향을 받아 NO가 생성된다. NO는 혈압조절에서 항생작용, 신경계의 정보와 기억에까지 넓은 범위에서 활성이 나타나는 생물학적 신호이다. 그러나 過量의 NO는 조직을 손상시키고 염증을 유발한다. 따라서 NO의 생성은 조절될 필요성이 있다. 과학자들은 신경 전달물질의 역할을 하는 활성산소의 하나인 NO의 억제제가 고혈압, 패혈증성 쇼크(septic shock), 뇌졸중, 癌, 성교 불능과 같은 병들을 치료하는데 유용할 것으로 생각하고 있다<sup>16,17)</sup>. 本 實驗에서는 NO generator로는 S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)를 사용하였다. 기존에 NO에 관한 論文은 金 等<sup>18)</sup>의 인체 위상피세포에서의 NO 생성을 비롯하여 매우 많다. 그러나 SNAP을 이용하여 NO 消去效果를 본 論文으로는 洋方에서는 박 等<sup>19)</sup>이 NO를 주사시 망막에 미치는 영향, 김 等<sup>20)</sup>이 안구표피 질환에서 NO의 역할 등을 보고하였고 韓方에서는 한 等<sup>21)</sup>이 數種藥鉞液의 NO 消去效果, 徐 等<sup>22)</sup>이 蜂藥鉞液의 NO 消去效果를 보고하였다.

DPPH는 활성산소의 하나로 일반적으로 반응성이 강한 DPPH radical은 抗酸化劑로부터 전자 혹은 수소원자를 얻음으로써 안정한 형태의 생성물로 전환하는 것으로 알려져 있다<sup>23,24)</sup>. 기존에 DPPH 消去效果에 관한 연구로는 李 等<sup>25)</sup>이 紅蓼에 대하여, 崔 等<sup>26)</sup>이 桂枝에 대하여, 朴 等<sup>27)</sup>이 大柴胡湯에 대하여 보고한 바가 있다.

IL-4는 cytokine의 하나로 분자량은 20kDa이고 CD4 양성 T임파구와 活性化된 mast cell에서 分泌되며, 주로 B림프구의 增殖 및 分化因子로 作用, B림프구에서 MHC(major histocompatibility complex, 主要 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>16),17)</sup>. 즉, IL-4는 IgE 및 mast cell, eosinophil 媒介性 免疫의 調節者이며<sup>28)-30)</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>16)</sup>. 한편 IL-4는 알레르기 질환에 있어서 喘息의 發病에 關여하는 重要한 cytokine으로서 휴지기 상태의 B세포에서 Ia 항원을 發現시키고 IgE 生産을 증가시킴으로써 喘息의 유발 및 아토피의 發生에 重要한 역할을 한다<sup>31),32)</sup>.

白何首烏는 박주가리과에 속하는 多年生 덩굴풀인 은조롱(*Cynanchum wilfordii* HEMSL.)의 덩이뿌리<sup>4)</sup>로서 性味가 微溫無毒하고 苦甘澁한 益血祛風之品으로서 胃에 入하여 胃의 消化力을 돕고 腸에 이르러 分解되어 흡수된다<sup>5)</sup>. 藥理作用으로는 强심배당체가 포함되어 있어 心臟의 疲勞를 强壯케 하고 조절기능 강화, 진정, 피로회복 촉진 등의 작용이 있다<sup>6),7)</sup>.

何首烏藥鍼液에 대한 연구는 많지 않은데 朴等<sup>33)</sup>은 內關·足三里穴의 何首烏藥鍼이 高콜레스테롤 血症 病態 白鼠에 미치는 영향에서 何首烏藥鍼은 정상적인 상태에서는 total cholesterol, HDL, triglyceride, fibrinogen, PT, APTT 등의 활성에 影響을 미치지 않았으며, 高콜레스테롤 혈증이 유발되었을 때에 증가 또는 감소의 적극적인 활성반응이 나타났다고 하였다.

辛<sup>34)</sup>은 CCl<sub>4</sub> 처리된 白鼠 肝組織에서 赤何首烏와 白何首烏를 투여한 후 모두 肝臟組織內 脂肪變性의 抑制效果 및 肝臟機能의 恢復을 促進하는 酵素活性이 增加되었으며 赤何首烏에 비해 白何首烏의 效能이 더욱 良好하였다.

林等<sup>35)</sup>은 AAPH 처리된 흰쥐에 대한 抗酸化作用에서 赤何首烏 藥針液은 抗酸化作用이 있는 것으로 보이나 肝과 腎臟 等の 臟器組織에 대한 抗酸化效果의 보충연구의 필요성이 제기된다고 하였다. 그러나 아직까지 白何首烏藥鍼의 抗酸化效果 및 IL-4에 대한 보고는 전혀 없는 상태이다.

이에 白何首烏藥鍼의 作用機轉을 보다 깊이 이해하고 기초 자료로 쓰일 수 있도록 NO, DPPH

消去 및 IL-4 抑制 效果를 관찰한 結果는 다음과 같다.

白何首烏藥鍼液에 대하여 抗酸化效果 中 대표적 酸化劑인 NO의 消去效果를 확인하고자 0.1, 1, 10 mg/ml의 濃도로 測定하였다. 本 實驗 結果 24시간 경과 后 NO 濃도는 無處置群이 100.0±7.6%, Vit. C 處置群은 9.6±4.8%, 白何首烏藥鍼液 0.1, 1, 10 mg/ml 處置群에서 각각 78.5±2.9, 86.7±0.9, 64.0±7.9%로 나타났다. NO 消去效果는 오랜 時間 NO를 處置한 后 그 結果를 보는 것이 더 의미가 있다. 따라서 24시간 경과 后를 보았을 때 白何首烏藥鍼液은 0.1, 10mg/ml 處置群에서 無處置群에 비하여 有意性있는 NO 消去效果가 있었다. 이는 항산화제 개발에 白何首烏藥鍼液을 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

白何首烏藥鍼液에 대하여 抗酸化活性效果를 확인하고자 10, 1, 0.1mg/ml의 濃도로 1시간 동안 DPPH 消去效果를 測定하였다. 10mg/ml의 白何首烏藥鍼液을 投與한 群에서는 抗酸化活性이 10, 20, 30, 60분 后 각각 2.8±6.9, 4.2±17.9, 5.5±19.8, 2.4±24.6%로 나타났다고, 1mg/ml의 白何首烏藥鍼液을 投與한 群에서는 抗酸化活性이 10, 20, 30, 60분 后 각각 2.5±6.5, 4.3±11.7, 5.6±15.3, 7.7±16.1%로 나타났다고, 0.1mg/ml의 白何首烏藥鍼液을 投與한 群에서는 抗酸化活性이 10, 20, 30, 60분 后 각각 2.6±7.5, 3.6±7.0, 4.4±3.2, 5.4±6.7%로 나타났다. 그러나 白何首烏藥鍼液에 대하여 유의한 DPPH 消去效果는 보이지 않았다. 白何首烏藥鍼液의 抗酸化效果를 보기 위한 本 實驗 中 DPPH 消去에서는 效果가 有意性있게 나타나지 않았는데 이는 아마도 白何首烏藥鍼液의 藥理作用이 DPPH 消去보다는 다른 機轉을 통해 이루어진다고 사료된다.

白何首烏藥鍼液에 대하여 IL-4 抑制效果를 확인하고자 白何首烏藥鍼液을 최종濃도가 1, 10, 100μg/ml가 되도록 濃도별로 처리하고 培養 48시간 후에



상층액만을 取하여 IL-4의 농도를 測定하였다. 對照群의 경우  $44.2 \pm 2.3 \text{ pg/ml}$ 이었으나 1, 10,  $100 \mu\text{g/ml}$ 의 白何首烏藥鍼液에서 IL-4는 각각  $39.5 \pm 8.1$ ,  $20.7 \pm 1.7$ ,  $14.0 \pm 6.0 \text{ pg/ml}$ 로 나타났으며 10,  $100 \mu\text{g/ml}$  投與群에서 有意性있는 抑制效果가 나타났다. 요컨대 白何首烏藥鍼液은 IL-4를 有意하게 抑制하였는데 이는 체내 면역 조절제로서의 개발에 白何首烏藥鍼液을 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

IL-4에 대한 기존연구로는 유 등<sup>36)</sup>은 少陰人 升陽益氣湯을 投與하여 면역세포인 흉선세포, 비장세포 및 대식세포에 대한 작용을 관찰한 결과 흉선세포와 비장세포에서 IL-4의 量은 변화하지 않았고, 血清 중 IL-4의 量도 변화하지 않았다고 보고하였고 이 등<sup>37)</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>38)</sup>은 행인 투여군에서는 51.6%의 전사억제효과, 桔梗投與群에서는 54.6%의 전사억제효과를 나타내었다고 보고하였는데 이는 本 實驗의 結果와 相通한다고 하겠다. 반면에 김 등<sup>39)</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 白何首烏藥鍼液의 free radical 消去效果에 있어서 NO는 有意性 있게 消去하였으나 DPPH는 별다른 효과를 보이지 않았다. 그리고 면역 반응에 미치는 효과를 알아보기 위한 IL-4 측정에서는 有意性 있는 抑制效果가 있었다. 向後 白何首烏藥鍼液의 抗酸化效果, 면역관련 작용 등에 대하여 심도있는 연구가 진행되어야 할 것으로 杼料된다.

## V. 結 論

白何首烏藥鍼液의 항산화효능과 면역반응에 미치는 효과를 알아보기 위하여 NO, DPPH 및 IL-4 측정을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NO 消去效果는 0.1,  $10 \text{ mg/ml}$  白何首烏處置群에서 24시간 경과 후 有意性 있게 나타났다.
2. DPPH 消去效果는 有意性 있게 나타나지 않았다.
3. IL-4 抑制效果는 10,  $100 \mu\text{g/ml}$  白何首烏處置群에서 有意性 있게 나타났다.

## IV. 參考文獻

1. 김광호, 김동영. 東醫老年養生學. 1. 서울 : 서원당. 1999 : 8-10.
2. 이종현, 성락기, 김성훈. 백하수오 약침의 항산화작용에 관한 실험적 연구. 대한한의학회지. 1997 ; 18(1) : 278-98.
3. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine : some problems and concepts. Arch Biochem Biophys. 1986 ; 246 : 501-14.
4. 東醫學事典編纂委員會. 新東醫學事典. 1. 서울 : 동방의학사. 2001 : 382.
5. 金載益. 臨床本草學講座. 1. 서울 : 大成醫學社. 2001 : 175-79.
6. 동의학사전 편찬위원회. 新東醫學辭典. 1. 서울

- : 동방의학사. 2001 : 382.
7. 韓大錫. 韓國·中國·日本の 生藥比較研究. 1. 서울: 永林社. 1996 : 87.
  8. 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) : 690-695.
  9. Uchiyama M, Suzuki Y, Fukuzawa K. Biochemical studies of the physiological function of tocopheronolactone. Yakuaku Zasshi. 1968 ; 88(6) : 678-83.
  10. 이홍민, 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.
  11. 安竣撤, 文振榮, 林種國. 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.
  12. 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
  13. Jeong KJ. Antibacterial and antioxidative activity of extracts from commercial teas. 강원도보건환경연구원보. 1999 ; 10 : 31-38.
  14. Kim JD et al. Development of Anti-Oxidatant Tea for Anti-aging. Bull. Yosu Nat'l Univ. 1999 ; 14 : 401-409.
  15. Shin DH. Separation of Antioxidant compounds from Persimmon leaves. J. of Korean Oil Chemists' Soc. 1997 ; 14 : 103-7.
  16. 서울大學敎 醫科大學編. 免疫學. 서울: 서울대학교출판부. 1996 : 121-34.
  17. 김세중. 免疫學. 1. 서울: 高麗醫學. 1994 : 58-9, 147-161, 260-5.
  18. 김정목 外. Helicobacter pylori 감염에 의한 인체 위상피세포로부터의 Inducible Nitric Oxide Synthase 발현 및 Nitric Oxide 생성. 대한소화기학회지. 2002 ; 39(5) : 324-34.
  19. 박영진, 임충식, 권년수, 양한남. 유색가토의 유리체강내에 Nitric Oxide를 주사시 망막에 미치는 영향에 대한 연구. 대한안과학회지. 1999 ; 40(11) : 3079-87.
  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, 안창범, 김이화, 지규용, 엄현섭. Scavenging Effect of Several Distilled Herbal Acupuncture on Nitric Oxide. 동의생리병리학회지. 2001 ; 15(6) : 1016-21.
  22. 서정철, 임강현, 김이화, 김창주, 유영민, 정주호, 인창식, 고흥균, 한상원. Scavenging Effect of Bee Venom for Acua-acupuncture against Nitric Oxide. 大韓鍼灸學會. 2001 ; 18(6) : 161-70.
  23. 裴基采. 高麗人蔘, 高麗紅蔘 및 total saponin의 抗酸化 作用. 동의병리학회지. 1998 ; 12(1) : 72-81.
  24. 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.
  25. 이종원. 홍삼으로부터 분리한 수용성 갈변물질의 항산화 활성 1. 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. 釜山水産大生命科學研究報告.

- 1995 ; 5(1) : 321-5.
27. 朴宣東, 尹炳局. 大柴胡湯이 alloxan으로 誘發된 高血糖 白鼠에 미치는 影響. 대한방제학회지. 2001 ; 9(1) : 289-317.
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. Huan-zhong S, Shouming Q, Guangwu H, Yiqiang C, Changqing X, Hui X et al. Infiltration of eosinophils into the asthmatic airways caused by IL-5. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1997 ; 16 : 220-4.
30. 韓鏞徹. 臨床呼吸器學. 서울 : 一潮閣. 1995 : 208-25.
31. Holgate ST. Asthma and allergy-disorders of civilization?. Q. J. Med. 1998 ; 91 : 171-84.
32. 金永佑. 定喘湯과 淸上補下湯이 asthma model 內的 cytokine에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 韓醫學科. 2000.
33. 朴元煥. 內關·足三里穴의 何首烏藥鍼이 高콜레스테롤 血證 病態 白鼠에 미치는 影響. 대한  
동의병리학회지. 2000 ; 14(1) : 135-47.
34. 辛民敎. 白鼠 肝組織에 미치는 赤何首烏와 白何首烏의 效能에 관한 比較研究. 생약학회지. 1985 ; 16(2) : 81-92.
35. 林樂哲. 赤何首烏 藥鍼이 AAPH 처리된 흰쥐에 대한 항산화작용. 大田大學校 韓醫學研究所 論文集. 2000 ; 8(2) : 361-74.
36. 유창렬, 송정모. 소음인 승양익기탕의 면역조절 작용. 사상의학회지. 2001 ; 13(3) : 102-113.
37. 이동생, 정희재, 이형구, 정승기. 麥門冬과 五味子が Asthma model 內的 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 影響. 慶熙醫學. 2000 ; 54 : 170-81.
38. 정옥, 정희재, 정승기, 이형구. 행인과 길경이 Asthma model 內的 Cytokine IL-4, IL-5, IL-6에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000 ; 21(1) : 31-8.
39. 김법진, 박수영, 김창환, 김철호, 문진영, 최달영, 김준기, 박선동, 박원환. 腎俞穴의 鍼刺戟과 黃耆藥鍼이 실험용 생쥐의 면역활성 Cytokine 인 IL-4의 유전자 발현에 미치는 영향. 大韓經絡經穴學會誌. 2001 ; 18(2) : 113-23.