

원저

## 胡桃藥鉞液의 遊離基 消去와 抗酸化 效果에 대한 實驗的 研究

김철홍 · 윤현민 · 장경전 · 송춘호 · 안창범

동의대학교 한의과대학 침구경혈학 교실

### Abstract

## Radical Scavenging and Antioxidant Effects of Juglandis Semen Extract(JSE)

Kim Cheol-hong, Youn Hyoun-min, Jang Kyung-jeon,  
Song Choon-ho and Ahn Chang-bum

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

This study was performed to determine if Juglandis semen extract(JSE) has free radical scavenging and antioxidant activities. Superoxide anion generation by xanthine oxidase/xanthine and in neutrophils activated by phorbol-12, 13-dibutyrate was inhibited by JSE and its effect was dose-dependent. JSE also inhibited generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by glucose oxidase/glucose and in opossum kidney cells treated with antimycin A. JSE exerted a direct H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging effect. Exposure of opossum kidney cells to 1mM tBHP caused a significant increase in lipid peroxidation, which was prevented by JSE. JSE also prevented tBHP-induced LDH release.

These data suggest that JSE has free radical scavenging and antioxidant activities. However, further studies should be carried out to find the active ingredient(s) of JSE that exerts radical scavenging action.

**Key words** : Radical Scavenging, Antioxidant Effects, Juglandis Semen

- 접수 : 2003년 5월 12일 · 수정 : 2003년 5월 18일 · 채택 : 2003년 7월 12일  
· 교신저자 : 안창범, 부산광역시 진구 양정2동 산 45 동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실  
Tel. 051-850-8610 E-mail : cbahn@hyomin.dongueui.ac.kr

## I. 緒 論

老化란 人間の 生成과 成長 및 成熟 과정 후 시간 이 흐름에 따라 나타나는 形態的, 機能的인 衰退로 死亡에 귀착되는 生理的인 현상을 말하는 것으로<sup>1)</sup>, 《素問·上古天眞論》에서 女子는 “六七三陽脈衰於上 面皆焦 髮始白”하고, 男子는 “六八陽氣衰於上 面焦 髮鬢頰白 形體皆極”<sup>2)</sup>이라 하여 老化를 生, 長, 壯, 老, 死라는 人體의 生理的인 과정의 하나로 인식 하였다<sup>3)</sup>.

西醫學에서 老化에 대해 生物學的, 生化學的, 形態學的 側面에서 本 여러가지 老化學說이 제시되고 있는데, 최근 生命現狀을 營爲하는 과정에서 內的, 外的으로 生成되어진 各種 障害因子의 蓄積에 焦點이 맞추어 지고 있으며 이러한 障害 要因으로서 生體內에 생기는 free radical(自由遊離基)에 많은 관심이 집중되고 있다<sup>4),5)</sup>.

韓醫學에서 free radical과 관련된 연구는 老化의 重要 原因인 腎虛에 대하여 주로 이루어지고 있는데<sup>6),7)</sup>, 최근 藥鍼療法이 약효가 빠르고 용량이 精確하며 약물이 위장관에서 파괴되는 것을 방지하는 효과로 실험연구에 널리 쓰이고 있어<sup>8)</sup>, 이에 대해 윤<sup>9)</sup> 등의 흰쥐의 肝組織에서 鹿茸藥鍼液의 抗酸化 作用에 관한 연구, 김<sup>10)</sup> 등의 胡桃藥鍼液의 抗酸化 作用에 관한 연구가 보고된 바 있다.

胡桃(Juglandis Semen)는 胡桃科에 속한 호도나 무의 종인으로서, 補腎藥材로서 甘溫하고 腎·肺에 歸經하며 滋養固精, 通命門, 利三焦, 潤腸胃, 滋養強壯, 抗老衰, 健腦, 溫肺定喘, 補氣養血, 利小便 등의 效能이 있다<sup>11),12)</sup>.

이에 저자는 補腎, 抗老化의 效能이 있는 胡桃藥鍼液이 가지는 free radical 消去와 抗酸化 活性的 效能을 알아보기 위해, 세포내에서 superoxide

anion을 除去 혹은 發生을 抑制하고 *t*-butylhydroperoxide(*t*-BHP)로 인한 세포손상을 방지하는 작용에 대한 胡桃藥鍼液의 影響을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

本 실험에 사용한 藥材는 동의대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

#### 2) 實驗動物

체중 1.5~2.5kg의 New Zealand産 雄兔를 metabolic cages에 수용하여 2주간 우리에 적응토록 하였다.

#### 3) 試藥

Thiobarbituric acid, malonaldehyde tetraethylacetal, phorbol-12,13-dibutyrate(PDBu), 5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthal-azinedione(luminol), antimycin A, sodium hypochlorite, dihydroethidium, xanthine oxidase, xanthine, glucose oxidase와 *t*-butylhydroperoxide(*t*-BHP)는 Sigma사의 제품을 사용하였다.

2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)는 Molecular probe로부터 구입하였고, 다른 화학약품은 이용할 수 있는 가장 높은 commercial grade를 사용하였다.

### 2. 方法

#### 1) 胡桃藥鍼液 製造

胡桃 500g을 분쇄하여 methyl alcohol을 4시간

씩 3차례 역류시켜 유출한 용액을 감압 증류하여 6g의 胡桃藥鍼液을 얻었다

## 2) OK細胞의 培養

근위세뇨관에서 적출한 opossum kidney(OK) 세포는 American Type Collection社로부터 분주받아 75cm<sup>2</sup>의 배양군 플라스크에서 10% FBS(fetal bovine serum)-DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12) 배양액에 37°C, 95% air/5% CO<sub>2</sub>의 조건하에 배양하였다. 세포가 confluence에 도달하면, 0.02% EDTA-0.05% trypsin 용액을 이용하여 2차 배양을 하였다. 세포는 10% FBS-DMEM/F12 배양기내의 24-well 조직 배양 plate에서 배양했다. 모든 실험은 세포배양기 바닥 전체가 한 켄의 세포로 뒤덮여지고 난 후 3~4일 뒤에 시작하였다.

## 3) Ethidium 형광측정

OK세포(opossum kidney cell)는 2μM의 DHE를 포함한 완충용액 안에서, superoxide anion을 생성하기 위해 xanthine oxidase(0.02U/mL)/xanthine(0.4mM) system<sup>13)</sup>과 胡桃藥鍼液을 첨가한 것과 첨가하지 않은 것을 배양하였다. 화학냉광의 변화는 chemiluminescence analyzer(Biolumet LB 9505, Berthold, Germany)로 475nm와 610nm 사이에서 측정되었다.

## 4) luminol에 의한 화학냉광의 측정

Neutrophils는 New Zealand産 雄兔에서부터 Grisham 法<sup>14)</sup>에 따라 표준 dextran 침강법과 His-topaque-1077에서 경사분리를 사용하여 분리되었다. 이런 과정으로 typan blue 배제시험에 의해 95%가 생존할 수 있는 neutrophils 개체군을 얻어냈다. Neutrophils(1×10<sup>5</sup> cells/mL)는 luminol(0.96 μL/mL)을 포함한 2mL의 Kreb's Ringer-phos-

phate 완충용액에 다양한 농도의 胡桃藥鍼液을 넣거나 또는 넣지 않고 배양하고, phorbol-12, 13-dibutyrate(PDBu, 20 μM)로 활성화시켰다. 화학냉광의 변화는 chemiluminescence analyzer(Biolumet LB 9505, Berthold, Germany)를 사용하여 측정하였다.

## 5) 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 발생 측정

OK세포에 胡桃藥鍼液을 첨가한 것과 첨가하지 않은 것에서 효소적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성하기 위해 glucose oxidase(2.5U/mL)와 glucose(10mM)를 0~15분 동안 첨가하였다. 세포내에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발생의 변화는 2,7-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)를 이용하여<sup>15)</sup> 여기파장 485nm와 방출파장 530nm에서 측정하였다. 세포는 35mm petri dish에서 배양 후 배지를 제거하고 trypsin-EDTA 용액을 이용하여 플라스크에서 포집하였으며, 다시 DME M/F12로 두 번 세척하고, 형광분석을 위해 HBSS에 분산시켰다. 이 과정은 fluorescent cuvette 안에서 진행되었다.

OK세포에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 발생은 미토콘드리아의 전자 전달을 방해하는 antimycin A에 의해 유도된다. OK세포는 37°C의 온도에서 20 μM DCFH-DA와 3 mL의 flucoese-free-HBSS를 포함하여 fluorescent cuvette에서 예비배양한 후 胡桃藥鍼液을 넣거나 혹은 넣지 않고 antimycin A를 첨가하여, 여기파장 485nm, 방출파장 530nm인 spectrofluorometer(SPEX1681, SPEX Co., USA)에서 형광강도를 관측하면서 60분 이상 배양하였다. DCF 형광 증가량은 antimycin A의 첨가 전후값의 차를 취하여 계산하였다.

## 6) 세포외 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 감소 측정

외인성 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도는 Mueller法<sup>16)</sup>에 의해 화학냉광의 변화로 측정하였다. 이 방법은 NaOCl(Sodium

hypochlorite)에 의한 luminol의 산화에 근거한다. Luminol은 two-electron oxidation에서 NaOCl에 의해 diazaquinone으로 산화되고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해  $\alpha$ -hydroxy-hydroperoxide를 거쳐 여기된 aminophtalate로 변환된다. 이 반응의 짧은 발광신호는 최대 파장이 431nm이며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 10~9M 정도로 감소할 때까지 비례한다. 100  $\mu$ L의 50  $\mu$ M NaOCl는 100  $\mu$ L의 50  $\mu$ M luminol과 다양한 농도의胡桃藥鍼液를 넣거나, 넣지 않은 상태인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 들어있는 시험관에 첨가하였으며, 화학냉광의 변화는 60초 동안 측정하였다.

### 7) 脂質過酸化의 측정

脂質過酸化도는 Uchiyama와 Mihara法<sup>17)</sup>에 따라 malondialdehyde(MDA)의 腎皮質切片內 함유량을 측정하였다. 腎皮質切片을 냉각된 1.15% KCl(5% wt/vol) 용액속에서 균질화한 후, 이 균질액 0.5ml에 1% phosphoric acid 3ml와 0.6% thiobarbituric acid 溶液 1ml를 첨가하여 끓는 물에서 45분간 가열하였다. n-butanol 4ml를 첨가하여 완전히 섞은 다음 2,000g에서 20분간 원심분리한 후 diode array spectrophotometer(Hewlett Packard, 8452A)로 상층액의 흡광도를 535nm와 520nm에서 측정하였다. 그리고 준비해둔 MDA tetraethylacetal 표준과 비교하였다. MDA값은 단백질 1g당 pmoles로 표시하였고, 단백질 농도는 Bradford法<sup>18)</sup>으로 측정하였다.

### 8) Lactate dehydrogenase의 측정

세포 손상은 Lactate dehydrogenase(LDH)의 방출을 측정하는 것으로 평가하였다. 腎皮質切片은 1mM t-butylhydroperoxide(tBHP)에 60분 동안 노출시킨 후 2mL의 증류수에서 균질화 하였으며, 1,000rpm에서 5분간 원심분리한 뒤 침전물은 버리고 상층액을 사용하였다. 상층액에서의 LDH 활성도는 LDH 측정 kit(Iatron Lab., Japan)를 사용하여

측정하였다.

### 9) 統計處理

統計는 平均值 $\pm$ 標準誤差로 표현하였고 대조군과 실험군의 平均值는 Student's t-test를 이용하였으며, p값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## III. 成績

### 1. Superoxide anion 제거에 미치는 영향

Dihydroethidium(DHE)은 세포 안으로 침투하여 superoxide dismutase(SOD), hydroxyl radical을 포함한 Reactive Oxygen species(ROS, 活性酸素種)에 의해 산화되면 Eth의 형광을 얻을 수 있다. Eth는 DNA와 결합할 수 있으며(Eth-DNA), 이때 더 형광성이 증폭된다. 따라서 Eth-DNA 형태로 Eth의 산화가 증가하게 되면 Eth-DNA 형광이 증가하게 되고, 이것은 過酸化물이 생성되었음을 암시해준다<sup>19)</sup>.

Superoxide anion 발생을 위해 xanthine oxidase/xanthine<sup>13)</sup> 첨가 후 15분 동안 Eth 형광이 점차 증가된 반면,胡桃藥鍼液를 첨가한 경우 Eth 형광의 증가를 억제하였으며(Fig. 1),胡桃藥鍼液의 superoxide anion 消去 효과는 0.001~0.05% 농도에서 투여량에 유의하게 비례하였다(Fig. 2).

### 2. 백혈구 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발생 억제에 미치는 영향

다핵형 백혈구는 食菌작용을 일으키는 동안 酸化 대사에 현저한 변화를 일으킨다<sup>20)</sup>. vivo실험에서 PD Bu에 의해 neutrophils를 자극하면, protein kinase C(PKC) activators, 과산화물과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 혼합물이

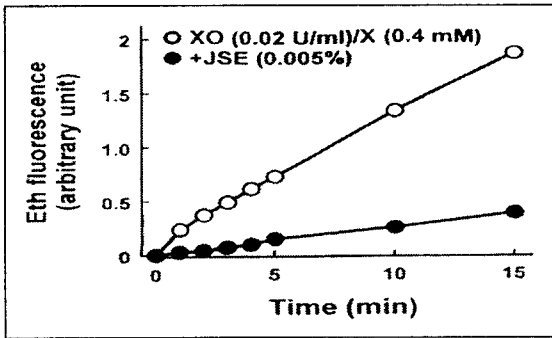


Fig. 1. Effect of Juglandis semen extract(JSE) on superoxide anion generation produced by xanthine oxidase/xanthine.

Opossum kidney cells were incubated with xanthine oxidase(0.02U/ml)/xanthine(0.4mM) in a buffer containing 2M dihydroethidium in the presence or absence of 0.005% JSE. Changes in chemiluminescence were measured at excitation 475nm and emission 610nm with using a chemiluminescence analyzer.

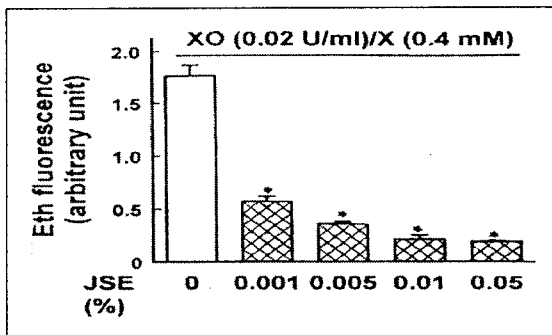


Fig. 2. Dose-dependency of Juglandis semen extract(JSE) effect on superoxide anion generation.

Experiments were performed as in Fig. 1 in the presence of various concentrations of JSE. Data are mean  $\pm$ S.E. of three experiments.

세포 표면에서 대량으로 형성된다. 과산화물, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성은 luminol에 의한 화학냉광을 이용하여 측정할 수 있으며, luminol에 의한 화학냉광의 변화는

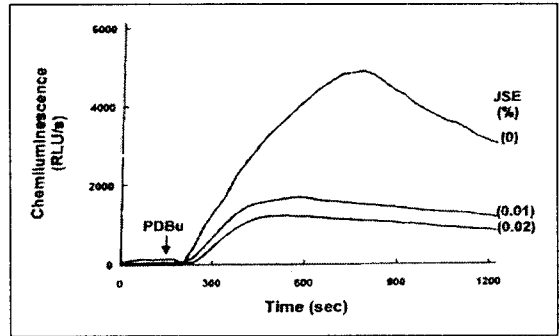


Fig. 3. Typical tracing of phorbol 12,13-dibutyrate(PDBu)-induced production of reactive oxygen species in human neutrophils.

Neutrophils(1x10<sup>5</sup>cells/ml) were incubated with luminol(0.96g/ml) in 2ml of Krebs Ringer-phosphate buffer with or without various concentrations of JSE. A phorbol ester PDBu(20M) was added and chemiluminescence was measured using a chemiluminescence analyzer.

과산화물, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 발생됨을 의미한다<sup>21)</sup>.

胡桃藥鍼液의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 발생 억제효과를 확인하기 위해 다양한 농도의胡桃藥鍼液을 첨가하거나 넣지 않은 상태에서 neutrophils를 PDBu로 자극하였다. Neutrophils를 PDBu로 자극하였을 때 화학냉광도는 급격히 증가하여 12분내에 최대치에 도달한 후 기본수준으로 줄어들었는데,胡桃藥鍼液을 첨가한 경우 투여량에 비례하여 화학냉광 최대치가 감소하였다<Fig. 3>.

### 3. OK세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발생 억제에 미치는 영향

비형광성 ester는 세포내로 침투한 후, 세포의 ester 분해효소에 의해 DCFH로 가수분해되는데, 이는 ROS의 존재하에서 급격히 산화되어 강한 형광 물질인 2,7-dichlorofluorescein(DCF)로 변화한다<sup>15)</sup>.

胡桃藥鍼液의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 발생억제 효과를 확인하

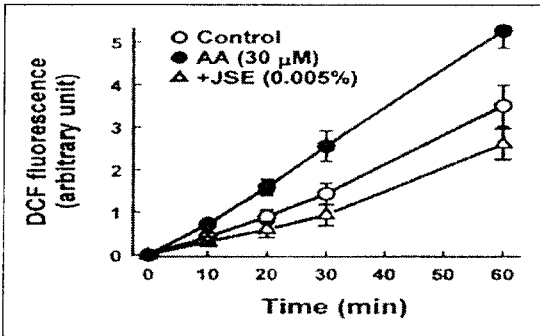


Fig. 4. Effect of Juglandis semen extract(JSE) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation produced by glucose oxidase (GO)/glucose(G).

Opossum kidney cells were incubated with GO(2.5 U/ml)/G(10mM) in a buffer containing 20 M DCFH-DA in the presence or absence of 0.005% JSE. Changes in DCF fluorescence were measured at excitation wave length 485nm and emission wave length 530nm.

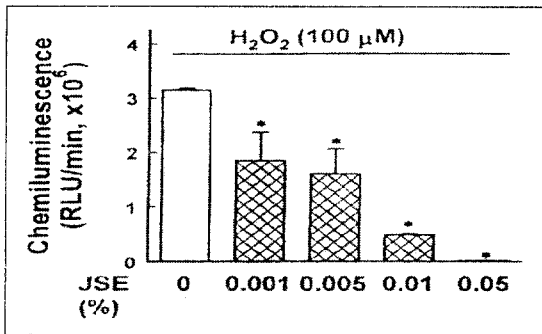


Fig. 5. Dose-dependency of Juglandis semen extract(JSE) effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation.

Experiments were performed as in Fig. 4 in the presence of various concentrations of JSE. Data are mean ± S.E. of three experiments.

가 위해 OK세포에 glucose oxidase(2.5U/mL)와 glucose(10mM)를 처리하였다<sup>22)</sup>. 그 결과 glucose oxidase/glucose-중간체에 의한 DCF 형광이 점차 가하였고, 이는 0.005%胡桃藥液에 의해 억제되었으며(Fig. 4), DCF 형광 증가에 대한胡桃藥液

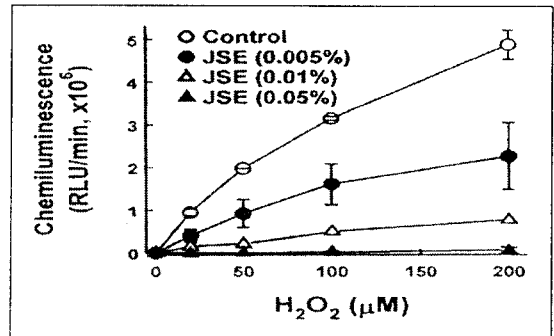


Fig. 6. Effect of Juglandis semen extract(JSE) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation produced by antimycin A.

Opossum kidney cells were treated with 30M antimycin A(AA) in the presence or absence of 0.005% JSE and changes in DCF fluorescence were measured. Data are mean ± S.E. of three experiments.

의 억제효과는 0.001~0.05%의 농도에서 투여량에 유의하게 비례하였다(Fig. 5). Site III 억제제인 Antimycin A는 세포내에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 발생시켜 DCF 형광을 증가시키는데<sup>15)</sup>, 0.005%胡桃藥液을 첨가한 경우 DCF 형광 증가를 유의하게 억제하였다(Fig. 6).

#### 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 제거에 미치는 영향

胡桃藥液의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 제거효과를 확인하기 위해 Luminol과 다양한 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 포함하는 배지에 NaOCl을 혼합시킨 결과 투여량에 비례하여 화학냉광도가 증가했는데,胡桃藥液을 첨가한 경우 NaOCl 혼합으로 인한 화학냉광도 증가를 유의하게 억제하였으며(Fig. 7),胡桃藥液 투여량에 비례하여 화학냉광도가 유의하게 감소하였다(Fig. 8).

#### 5. 腎皮質切片的 脂質過酸化에 미치는 영향

胡桃藥液의 脂質過酸化 억제효과를 확인하기 위해 腎皮質切片內 MDA를 측정하였다. 酸化劑인 t BHP(1mM)에 노출된 腎皮質切片은 脂質過酸化物이

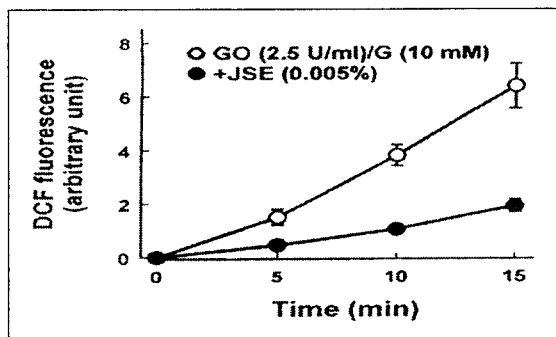


Fig. 7. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging effect of Juglandis semen extract (JSE).

A 100 l of 50M NaOCl was added to tube containing 100 l of 50M luminol and various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence or absence of JSE. Chemiluminescence was measured at 431nm for 60sec. Data are mean ±S.E. of four experiments.

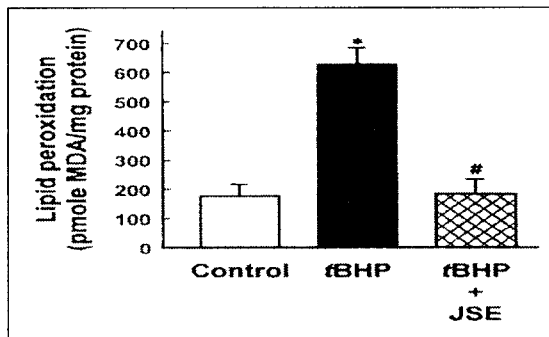


Fig. 9. Effect of Juglandis semen extract(JSE) on *t*-butylhydroperoxide(*t*BHP)-induced lipid peroxidation in rabbit renal cortical slices.

Slices were exposed to 1mM tBHP for 60min the presence or absence of 0.005% JSE. Data are mean ±S.E. of four experiments. \*p<0.05 compared with control, #p<0.05 compared with tBHP alone.

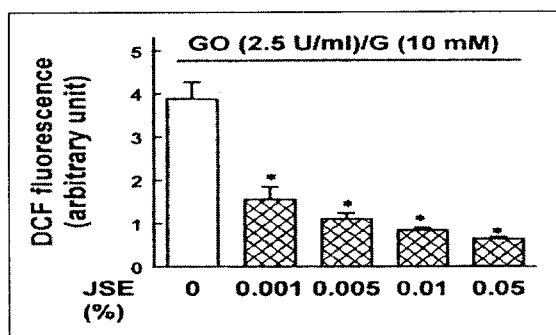


Fig. 8. Dose-dependency of Juglandis semen extract(JSE) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging.

Experiments were performed as in Fig. 7 in the presence of various concentrations of JSE. Data are mean ±S.E. of three experiments.

현재까지 증가하였으나, 0.005% 胡桃藥鍼液을 첨가한 경우 脂質過酸化물은 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

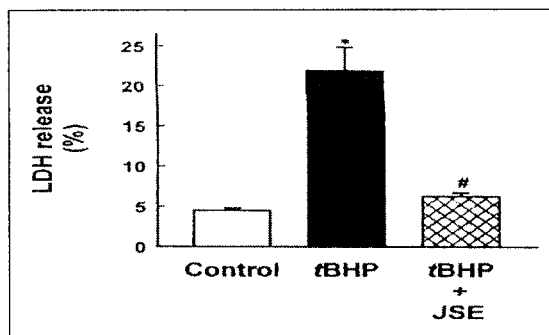


Fig. 10. Effect of Juglandis semen extract(JSE) on *t*-butylhydroperoxide(*t*BHP)-induced lactate dehydrogenase(LDH) release in rabbit renal cortical slices.

Slices were exposed to 1mM tBHP for 60min the presence or absence of 0.005% JSE. Data are mean ±S.E. of four experiments. \*p<0.05 compared with control, #p<0.05 compared with tBHP alone.

6. 腎皮質切片의 LDH 유출에 미치는 영향  
胡桃藥鍼液이 산화제에 의한 세포손상을 방지할 수 있는지를 확인하기 위하여 腎皮質切片을 tBHP

(1mM)에 노출시켰으며 그 결과 LDH유출이 증가하였으나, 0.005% 胡桃藥鍼液을 첨가한 경우 LDH 유출을 유의하게 억제하였다(Fig. 10).

## IV. 考 察

老化란 人間の 延生の 時點에 있어서 生·長·壯·老·死라는 생체의 변화과정 중에 形態的·機能的인 退縮과 豫備力·適應力의 低下, 死亡으로 귀착되는 普遍的 生理現狀을 말한다<sup>23)</sup>.

韓醫學에서는 老化를 整體觀에 의거한 有機的 關聯下에서 생체쇠퇴의 변화로 파악하였으며, 老化의 病理機轉을 腎虛, 痰飲, 瘀血 등으로 설명하고 있는데, 이중 腎虛에 관한 연구가 가장 활발히 진행되어 왔다<sup>1)</sup>. 腎의 작용은 腎陰과 腎陽의 兩方面으로 개괄되는데 腎陰은 一身의 陰液의 근본으로서 濡潤, 滋養 작용을 하며, 腎陽은 陽氣의 근본이자 先天의 眞火로서 溫照, 氣化작용을 하여 腎陰과 더불어 발육과 생식을 촉진한다<sup>24),25)</sup>. 그러므로 <素問>에 “天壽過度 氣脈相通而腎氣有餘也”<sup>26)</sup>, 虞<sup>27)</sup>가 “腎元盛則壽延 腎元衰則壽夭”라고 하여 長壽하는 것이 腎氣의 盛衰 여부에 의하여 결정된다고 하였으며, 腎氣虛衰가 老化의 重要 原因이라고 하였다.

西醫學에서 老化에 관한 학설로는 여러가지 가설이 제시되고 있는데, 이중 free radical說에 관련된 연구가 다양하게 이루어지고 있다. free radical說은 老化가 진행되는 동안 산소에서 변환된 free radical에 의해 세포내 산화적 손상이 축적되어 질병과 죽음을 초래한다는 설로, 인체에 흡입된 산소의 일부가 free radical인 ROS로 변환되어 脂質의 過酸化반응을 진행시켜 세포막의 파괴, 세포의 老化와 괴사, DNA 손상 등을 유발하여 생체의 기능을 약화시킴으로써 老化를 진행시키며, 이는 癌, 心筋梗塞, 류마티스 등 의 난치병과도 연관이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>28),29)</sup>.

過酸化물이나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등의 ROS는 허혈손상이나 사구체신염, 겐타마이신에 의한 심각한 신장기능의

감퇴 등 일부 신장병의 발병과 연관이 있으며<sup>30)</sup>, 여러가지 생체내 또는 생체의 연구에서 세뇨관세포가 다양한 자극에 대한 반응으로서 ROS를 생성할 수 있다는 것이 입증되고 있다<sup>31)</sup>. 생체막은 다량의 지방산을 포함하고 있으며, 이들은 특히 ROS에 의한 過酸化작용을 받기가 쉬워 脂質過酸化를 일으킨다<sup>32)</sup>. ROS와 脂質過酸化물은 막의 구조에 영향을 미칠 수 있어 막의 투과성이 증가하게 되고 Na-K-ATPase와 같은 펌프단백질의 기능에 영향을 미친다<sup>33)</sup>. 이에 대하여 세포의 酸化방지 효과를 가지는 화합물은 free radical의 형성을 억제, 혹은 직접 제거하거나, 세포의 抗酸化機轉을 강화시키는 작용을 할 수 있을 것이다. 그러므로, radical scavengers와 抗酸化제는 산소를 매개로 하는 질환에 대한 예방책이 될 수 있다<sup>34)</sup>.

최근 新鍼療法으로 다양하게 쓰이고 있는 藥鍼療法은 經絡學說의 원리에 의거하여 약물을 선택하여 유효성분을 추출한 다음 유관한 穴位와 壓痛點 혹은 反應點에 주입함으로써 刺鍼 자극과 藥理작용을 결합하여 질병을 치료하는 鍼灸科의 새로운 영역으로 활발한 임상응용과 연구가 이루어지고 있다<sup>35)</sup>.

본 실험에서 藥鍼療法으로 사용된 胡桃는 胡桃科 식물인 胡桃의 種仁으로, 甘溫無毒하고 腎·肺經에 歸經하며 滋養固精, 通命門, 利三焦, 潤腸胃, 滋養強壯, 抗老衰, 健腦, 溫肺定喘, 補氣養血, 利小便 등의 效能이 있어 腰痛, 脚弱, 陽痿, 遺精, 腎虛咳嗽 등의 치료에 활용되어 왔다<sup>11),12)</sup>.

최근 실험적 연구로 金 등<sup>36)</sup>은 胡桃 藥鍼液이 腎臟組織에서 oxident에 의한 세포손상과 脂質過酸化를 防止하는 效果가 있다고 하였고, 李 등<sup>37)</sup>은 토끼 간세포에서 강력한 抗酸化作用을 나타낸다고 하였으며, 李 등<sup>38)</sup>은 急性腎不全에 미치는 영향에 대한 연구 등을 보고한 바 있다.

이에 저자는 이상과 같은 이론적 근거를 토대로 補腎, 抗老化의 效能이 있는 胡桃藥鍼液이 가지는



free radical 消去와 抗酸化 活性의 效能을 확인하기 위해, 세포내 superoxide anion을 제거 또는 발생을 억제하여 *t*-BHP로 유발되는 세포손상을 보호하는 작용에 관한 胡桃藥鍼液의 영향을 관찰하였다.

細胞의 酸化防止 效果를 가지는 화합물은 free radical의 형성을 억제 혹은 직접적으로 제거하거나, 細胞의 抗酸化 메카니즘을 강화시킴으로서 작용할 것이다. 본 실험에서 胡桃藥鍼液은 superoxide anion의 생성 system<sup>13)</sup>인 xanthine oxidase/xanthine으로 인해 유도되는 Eth 형광의 증가를 투여량에 비례하여 유의하게 억제하였는데<Fig. 1, 2>, 이는 superoxide anion를 제거하였음을 나타낸다<sup>19)</sup>. 또한, 胡桃藥鍼液은 neutrophils 자극시 ROS 발생을 투여량에 비례하여 유의하게 억제하였다<Fig. 3>. 이들 결과로 胡桃藥鍼液이 superoxide anion 발생을 억제하거나 혹은 직접 제거한다고 할 수 있다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 glucose oxidase와 glucose<sup>22)</sup>, 또는 antimycin A에 의해 효소적으로 생성될 수 있는데, 胡桃藥鍼液은 투여량에 비례하여 세포내에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성을 억제하였으며<Fig. 4, 5, 6>, 또한 직접적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하는 작용을 보였다<Fig. 7, 8>.

胡桃藥鍼液은 생체막에서 酸化劑인 *t*-BHP에 의해 유도되는 脂質過酸化를 유의하게 억제하였고<Fig. 9>, 酸化劑에 의한 세포손상으로부터 보호하였다<Fig. 10>. 이 결과는 胡桃藥鍼液이 hydroxyl radical을 제거하고 抗酸化 活性을 가지고 있는 것을 나타낸다.

요약하면 胡桃藥鍼液은 細胞內에서의 superoxide anion과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 발생을 억제하였으며 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 직접적인 제거효과를 나타내었다. 胡桃藥鍼液은 脂質過酸化와 酸化劑에 의한 細胞의 損傷을 抑制하였는데, 이는 胡桃藥鍼液이 free radical 消去와 抗酸化 活性을 가지고 있는 것을 말한다. 그러나 胡桃藥鍼液에 있는 어떠한 化學的 成分에 의해 抗酸化 活性을 나타내는지는 더 연구해 보아야 할 것이다.

이상의 결과로 보아, 胡桃藥鍼液의 補腎效能이 free radical 消去와 抗酸化 작용을 나타내어 疾病治療와 老化防止에 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

## V. 結 論

胡桃藥鍼液이 雄兔의 腎皮質切片과 OK세포에서 酸化 자극에 대한 free radical 消去와 抗酸化 活性 작용에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 胡桃藥鍼液은 xanthine oxidase/xanthine에 의한 superoxide anion 생성을 투여량에 비례하여 유의하게 방지하였다.
2. 胡桃藥鍼液은 glucose oxidase/glucose와 antimycin A에 의해 유도되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성을 유의하게 방지하였다.
3. 胡桃藥鍼液은 NaOCl에 의해 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 투여량에 비례하여 유의하게 除去하였다.
4. 胡桃藥鍼液은 *t*-BHP에 의해 유도되는 脂質過酸化와 LDH 유출을 유의하게 防止하였다.

## VI. 參考文獻

1. 고기완. 老化 및 老人의 病因 病機 病證에 관한 문헌적 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 1993.
2. 程士德. 素問註釋滙粹 上冊. 北京: 人民衛生出

- 版社. 1982 : 10.
3. 안상원, 이철원. 國內文獻에 나타난 抗老化 및 抗酸化의 실험적 연구에 대한 검색. 大韓韓醫學會誌. 1998 ; 19(2) : 373-390.
  4. 최진호. 老化의 메카니즘과 연구방향. 한국생화학회지. 1985 ; 5(3) : 30-53
  5. 허근 外. 脂質過酸化 반응과 Free radical 생성계 효소활성에 미치는 Testosterone의 영향. 약학회지. 1994 ; 38(2) : 166-73.
  6. 徐月明 外. 自由基衰老學說腎虛與衰老及補腎抗衰老研究. 陝西中醫. 1993 ; 14(4) : 187-8.
  7. 許浦虎 外. 中醫藥研究中有關自由基研究近況. 中西醫結合雜誌. 1995 ; 15(3) : 185-8.
  8. 최용태 外. 鍼灸學(下). 서울 : 集文堂. 1991 : 1457.
  9. 윤철호, 정지천, 신억변. 흰쥐의 肝組織에서 鹿茸藥鉞製材의 抗酸化作用에 관한 연구. 大韓韓醫學會誌. 1996 ; 17(2) : 191-202.
  10. 김영해, 김갑성. 胡桃藥鉞液의 抗酸化 효과에 대한 연구. 大韓韓醫學會誌. 1996 ; 17(1) : 9-20.
  11. 李尙仁. 本草學. 서울 : 醫藥社. 1980 : 91.
  12. 辛民教. 臨床本草學. 서울 : 永林社. 1997 : 233-4.
  13. Gille JP, Joenje H. Biological significance of oxygen toxicity : An introduction. In Membrane Lipid Peroxidation(C Vigo-Pelfery, Ed.) vol. III. Boston : CRC Press. 1993 : 1-32.
  14. Grisham MB, Engerson TD, McCord JM, Jones HP. A comparative study of neutrophil purification and function. J. Immunol. Methods. 1985 ; 82 : 315-20.
  15. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils : a graded response to membrane stimulation. J Immunol. 1983 ; 130 : 1910-7.
  16. Mueller S. Sensitive and nonenzymatic measurement of hydrogen peroxide in biological systems. Free Radic Biol Med. 2000 ; 29 : 410-5.
  17. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem. 1978 ; 86 : 271-278.
  18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976 ; 72 : 248-54.
  19. Shao ZH, Li CQ, Vander Hoek TL, Becker LB, Schumacker PT, Wu JA, Allele AS, Yuan CS. Extract from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol. 1999 ; 31 : 1885-95.
  20. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N Eng J Med. 1978 ; 298 : 659-721.
  21. Dechatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW, Cohen M S. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. J. Immunol. 1982 ; 129 : 1589-93.
  22. Gow AJ, Branco F, Christofidou-Solomidou M, Black-Schultz L, Albelda SM, Muzykantov VR. Immunotargeting of glucose oxidase : intracellular production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and

- endothelial oxidative stress. *Am J Physiol.* 1999 ; 277 : 271-81.
23. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂 1981 : 276, 316.
24. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 서울 : 成輔社. 1985 : 282-4.
25. 杜鎬京. 東醫腎系學(上). 서울 : 東洋醫學研究院. 1993 : 10-11.
26. 南京中醫學院醫經教研組. 黃帝內經素問譯釋. 上海 : 上海科學技術出版社. 1983 : 4-5.
27. 虞搏. 醫學正傳. 서울 : 成輔社. 1986 : 9.
28. Harman D. Free radical theory of aging. *J Gerontol.* 1968 ; 23 : 476-82.
29. 오유진. 활성산소가 질병의 원인이었다. 서울 : 이화문화출판사. 1997 : 57-67.
30. Baud L, Ardaillou R. Reactive oxygen species : production and role in the kidney. *Am J Physiol.* 1986 ; 251 : 765-76.
31. Andreoli SP, Mallett CP. Reactive oxygen molecule-mediated injury in endothelial cells and renal tubular epithelial cells in vitro. *Kid Int.* 1990 ; 38 : 785-94.
32. Mead JF. Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes. In : *Free Radicals in Biology*(Pryor, W. Eds.). New York : Academic Press. 1976 : 51-68.
33. Arstila AU, Smith MA, Trump BF. Microsomal lipid peroxidation : morphological characterization. *Science.* 1972 ; 175 : 530-3.
34. Ames BN, Gold LS, Willet WC. The causes and prevention of cancer. *Procd Natl Acad Sci.* 1995 ; 92 : 5258-65.
35. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學. 서울 : 集文堂. 1988 : 1457-67
36. 金英海 外. 胡桃藥針液의 抗酸化 효과에 대한 연구. *大韓韓醫學會誌* 1996 ; 17(1) : 9-18
37. 李京美, 宋春浩. 胡桃藥針液이 水銀에 의한 肝組織損傷에 미치는 영향. *大韓鍼灸學會誌.* 1999 ; 16(3) : 221-30
38. 이병훈, 장경전 외. 胡桃藥鍼이 Glycerol에 의한 急性腎不全 유발시 尿濃縮能의 장애에 대한 영향. *大韓鍼灸學會誌.* 2001 ; 18(3) : 114-22.