

補骨脂의 Peroxynitrite 제거 기전

정지천, 장용석, 민건우*

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 자인한방병원 내과*

Peroxynitrite Scavenging Mechanism of *Psoralea corylifolia*

Ji-Cheon Jeong, Yong-Suk Jang, Gun-Woo Min*

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Dept. of Internal Medicine, Jain Oriental Hospital*

Objective : 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 implicated in the aging process and age-related disease 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 using fluorescent probes, DCFDA, DAF-2 and DHR 123.

Methods : *Psoralea corylifolia* was crushed. The crushed *Psoralea corylifolia* was extracted 3 times, each time with 3 volumes of methyl alcohol at 60°C for 24 h. The extract was filtered and evaporated under reduced pressured using a rotary evaporator to yield 16 g. This was done to investigate scavenging activities of ONOO⁻, NO, O₂⁻ and its scavenging mechanism using fluorescent probes, DCFDA, DAF-2 and DHR 123.

Results : After *Psoralea corylifolia* was added authentic ONOO⁻, O₂⁻ and NO was markedly scavenged. Also, ONOO⁻ induced by O₂⁻ and NO (these derived from SIN-1) was inhibited. The data showed a decrease in ONOO⁻ mediated nitration of tyrosine through electron donation after *Psoralea corylifolia* was added. Data showed a dose-dependent correlation with inhibition of nitration of bovine serum albumin induced by ONOO⁻. Furthermore, LPS-induced ROS and RNS generation was blocked.

Conclusions : These results suggest potential for use of *Psoralea corylifolia* as an effective ONOO⁻ scavenger to counter the aging process and age-related diseases.

Key Words: Peroxynitrite, Scavenging Mechanism, *Psoralea corylifolia*

1. 緒 論

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 superoxide ($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등으로 내피 의존성 이완 작용의 장애,

세포 증식, 혈관 염증 유발 및 리모델링 형성을 일으키고 고혈압, 동맥경화, 심부전 등 순환기계 질환의 발생에 깊이 관여한다¹. 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)은 NO, NO₂, HNO₂, ONOO⁻ 등의 질소화합물들을 총칭하는 것으로², 최근 ROS와 RNS에 의한 oxidative stress가 노화 및 노인성 질환의 발생 과정에 관여한다는 것이 잘 알려져 있다^{3,4}. NO는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성산소종들과 반응할 수 있으며, 특히 $\cdot O_2^-$ 와 쉽게 반응하여 반응성이 매우

· 접수 : 2004년 4월 23일 채택 : 2004년 5월 13일
· 교신저자 : 정지천, 서울시 강남구 논현1동 37-21 동국대학교
강남한방병원 1내과
(Tel : 02)3416-9731, Fax : 02)3444-9171, E-mail :
jjcjh@hitel.net

높은 산화제인 peroxynitrite (ONOO)를 생성한다⁵.

염증, 감염 등과 같이 특정한 상태에서 ONOO가 대량 생성되어 강한 조직 파괴력을 나타낼 뿐만 아니라 여러 노인성 질병과 밀접하게 관련된다는 보고는 많으며, 또한 ONOO가 노화과정에 중요한 역할을 한다는 것이 최근 밝혀졌다.

ONOO는 NO와 $\cdot O_2$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 세포질 효소 활성의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 결국 이런 ONOO의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다^{2,7,8}. 그러므로 ONOO의 특성을 검토하고 연구하여 이것을 무독화시키는 방법은 노화과정뿐만 아니라 노인성 질환을 조절하는데 대단히 중요한 의미를 가진다. 인체 내에는 특이하게 ONOO를 제거하는 효소가 밝혀져 있지 않으므로 한약재로부터 ONOO 제거 활성을 탐색하는 것은 큰 의의가 있다.

補骨脂 (*Psoraleae Fructus*)는 콩과 (Leguminosae)에 속하는 1년생 草本인 補骨脂 (*Psoralea corylifolia L.*)의 성숙한 種子를 건조한 것으로 破故紙라는 異名이 있다. 補腎助陽 溫脾 固精 縮尿 止瀉 등의 효능이 있어 五勞七傷 腎陽虛衰 陽痿 遺精 遺尿 腰膝冷痛 五更泄 등의 치료에 활용되고 있다^{9,11}. 특히 補骨脂는 노화 방지 효과가 밝혀진 靑娥丸¹²을 비롯하여 四神丸, 斑龍丸¹³ 등의 補腎 처방에 들어가는 약재이므로 補腎 효능과 함께 노화 방지 효과를 가질 것으로 보인다.

실험 연구에 의하면 補骨脂는 활성산소를 직접 소거시키고 생성계 효소 활성을 억제하는 항산화 효과가 있으며¹⁴, 난소 적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 유효하고¹⁵, 補骨脂 水鍼은 부신피질 기능부전의 치료와 회복에 효과¹⁶를 나타내었다.

본 연구에서는 補骨脂의 ONOO 소거 작용과 그 전구체인 NO 및 $\cdot O_2$ 제거 기전, 단백질 nitration과 세포 배양계에서 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 활성질소 생성 억제 기전 등에 대하여 검토하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

補骨脂 (*Psoralea corylifolia L.*)를 市中에서 購入하여 精選하여 使用하였다.

2) 시약

3-Morpholinosydnonine (SIN-1), DL-penicillamine은 시그마 화학 주식회사 (ST. Louis, MO, USA)에서, dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)은 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.

2. 方法

1) 검액의 조제

補骨脂 (*Psoralea corylifolia L.*) 200 g을 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 추출물 16g (수득률 8%)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) ONOO 측정법

Kooy 등의 방법¹⁷에 의해 ONOO 제거능을 측정하였다. 96 well microplate에 補骨脂추출물을 취하고, 90 nM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μ M diethylenetriaminepentaacetic acid와 10 μ M DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액 (pH 7.4)를 가한다. 그리고 10 μ M ONOO을 첨가한 후, 형광 광도를 이용하여 excitation (500 nM)와 emission (536 nM)을 측정하였다. ONOO 생성원으로는 시판 ONOO (Cayman Chemical CO.)와 SIN-1을 처리하여 생성되는 $\cdot O_2$ 와 NO에 의해 생성되는 ONOO 제거능을 검토하였다.

3) 활성산소 측정법

DCFDA assay¹⁸로 활성산소를 측정하였다. 99.9%의

에탄올에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/ml esterase를 -20℃에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 10 μM 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 총 활성산소 제거능 검토시 신장 homogenate의 postmitochondria 분획을, ·O₂ 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 μl에 DAF-2 1 mg이 녹아 있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1:400배로 희석하였다. NO 제공 물질인 sodium nitroprusside (2 mM)와 DAF-2 (3.14 μM)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 측정하였다⁹⁾.

5) Protein nitration 측정

Bovine serum albumin (BSA, 0.5 mg) 95 μl에 농도별 시료나 혹은 용매 2.5 μl를 첨가하여 상온에서 10분간 shaking incubation한 후, ONOO· (4 mM in 0.3 N NaOH) 2.5 μl를 첨가하고 20분간 상온에서 incubation시켰다. Nitration 반응이 끝난 후, agarose gel에 전기영동하여 anti-nitrotyrosine antibody를 이용하여 protein이 nitration된 정도를 western blot으로 검토했다.

6) 3-Nitrotyrosine 측정

補骨脂가 ONOO·에 의한 tyrosine의 nitration을 억제하는지의 여부는 이전에 기술했던 방법에 따라 측정하였다¹⁰⁾. 0.3 N NaOH에 녹아 있는 ONOO· (500 μM) 용액에 補骨脂추출물의 존재하에 100 μM 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

補骨脂의 작용 기전을 밝히기 위하여 ONOO·를 pannala 등의 방법¹¹⁾에 따라 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 0.3 N NaOH에 녹아 있는 ONOO· (500 μM)에 補骨脂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 補骨脂추출물에 의한 스펙트럼의 변화는 430 nm에서 측정하며, 이는 nitration 반응이 일어났음을 의미한다.

8) 세포 배양

Raw 246.7 cell (ATCC)을 각각 75 cm² tissue culture flask (Corning Co., New York, U.S.A.)에 2×10⁶ cells/ml의 밀도가 되게 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 10% fetal calf serum 함유하고 여기에 glutamine (5.84 mg/ml), amphotericin B (0.25 μg/ml), penicillin (100 U/ml) 및 streptomycin (100 U/ml)을 첨가하였다. 그리고 NaHCO₃을 가하여 pH 7.4~7.6으로 조절한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM : Nissui, Tokyo, Japan)로 37℃, 5% CO₂의 조건에서 배양하였으며, 2일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다.

9) 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay

MTT stock solution은 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)에 MTT가 5 mg/μl가 되도록 녹여 암소에서 냉동 보관하였으며, Raw 246.7 cell을 각각 48-well plates에 배양하여 배지를 제거하고 D-PBS로 1회

세척한 후 serum free media 450 μ l를 넣는다. 補骨脂추출물을 가하고 30분 후에 세포에는 1 mM SIN-1을, 가하여 24시간 배양하였다. 그런 다음 MTT 50 μ l를 가하고 CO₂ 배양기 (5% CO₂, 37°C)에서 3시간 배양하여 살아 있는 세포의 mitochondria dehydrogenases의 환원 반응에 의하여 MTT를 formazan products로 변화시킨 후 acidic-isopropanol Triton-X 100 500 μ l를 각 well에 가하고 생성된 보라색의 결정 물질을 완전히 용해시켜 용출되도록 하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) 배양 Raw 264.7 세포에서 활성산소· 질소 생성 억제 활성 측정

배양 Raw 264.7 세포에 LPS (100 mg/ml)를 24시간 처리하고 24시간 후에 활성산소· 질소 생성계를 유도한 후에 세포를 harvest한 후에 세포 pellet에 buffer를 가한 후 초음파 처리하여 세포 extract를 만들어서 補骨脂추출물을 처리한 후에 DCFDA를 처리한 후 형광광도계 (Ex 490 nm/Em 520 nm)로 형광을 몇 분간 측정하여 활성산소 생성계에 미치는 영향을 검토하였다. 또한 NO 생성능을 DAF-2DA를 이용하여 Ex 485 nm/530 nm에서 측정하였다⁹⁾.

11) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 Student t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

III. 成績

1) ONOO⁻ 제거 활성

補骨脂에 ONOO⁻ 자체를 직접 제거하는 활성이 있는지를 검토한 결과 2, 10, 50 μ g/ml에서 각각 37, 95, 100%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 억제 활성

SIN-1에 의해 생성되는 NO와 \cdot O₂의 상호 작용에 의해 생성되는 ONOO⁻ 생성 억제 작용을 검토해 본 결과 補骨脂 추출물 2, 10, 50 μ g/ml에서 각각 5, 64, 100% 억제 활성을 나타내었다 (Fig. 2).

3) NO 제거 활성

ONOO⁻의 전구체인 NO 제거능을 검토한 결과 補骨脂 추출물 10, 50, 200 μ g/ml에서 각각 61, 70, 82%의 억제 활성을 나타내어 기존 NO의 제거제인 carboxy-PTIO 보다는 약하지만 비교적 강한 NO 제거능을 나타내었다. 補骨脂는 ONOO⁻ 직접 제거뿐만 아니라 NO도 직접 제거함으로써 ONOO⁻ 축적을 억제할 것으로 사료된다 (Fig. 3).

4) SIN-1에 의해 생성되는 \cdot O₂ 제거 활성

ONOO⁻ 또 다른 전구체인 \cdot O₂ 제거능을 검토한 결과 補骨脂 추출물 2, 10, 50 μ g/ml에서 각각 2, 7,

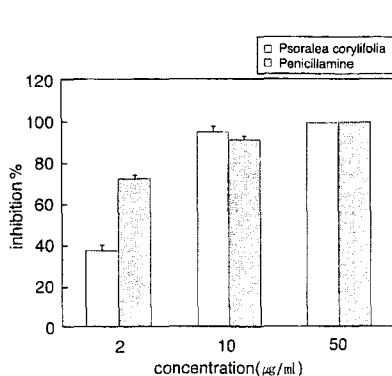


Fig. 1. ONOO⁻ scavenging activity of *Psoralea corylifolia*. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments.

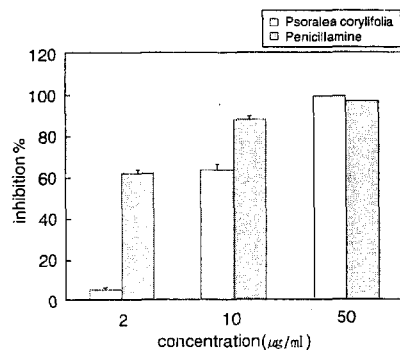


Fig. 2. Effect of *Psoralea corylifolia* on SIN-1-derived ONOO⁻ generation. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments.

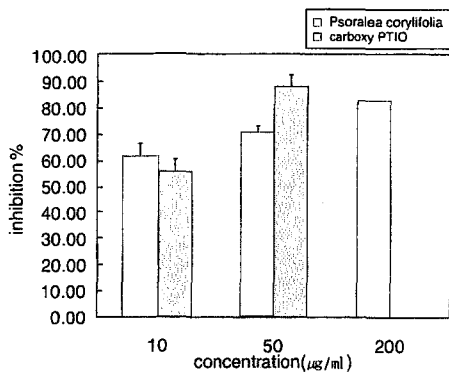


Fig. 3. Effect of *Psoralea corylifolia* on sodium nitroprusside-derived NO generation. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments.

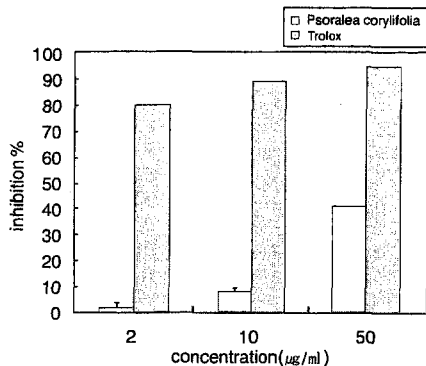


Fig. 4. Effect of *Psoralea corylifolia* on SIN-1-derived \cdot O₂ generation. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments.

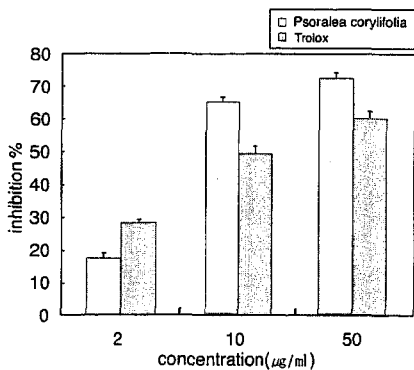


Fig. 5. Effect of *Psoralea corylifolia* on total reactive oxygen species generation. Each value is the mean \pm S.E. of three experiments.

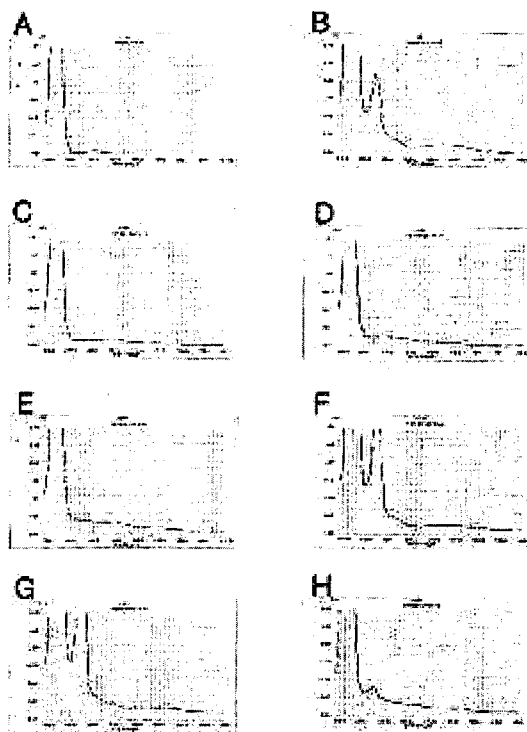


Fig. 6. Interaction of *Psoralea corylifolia* (PS) with ONOO⁻ and its effect on ONOO⁻-mediated 3-nitrotyrosine. A : ONOO⁻ (40 μ M), B : Tyrosine (40 μ M) with ONOO⁻ (40 μ M), C : PS (10 mg/ml) with ONOO⁻ (40 μ M), D : PS (25 $\beta\delta/\beta\phi$) with ONOO⁻ (40 μ M), E : PS (50 mg/ml) with ONOO⁻ (40 μ M), F : Tyrosine (40 μ M), PS (10 mg/ml) with ONOO⁻ (40 μ M), G : Tyrosine (40 μ M), PS (25 mg/ml) with ONOO⁻ (40 μ M), H : Tyrosine (40 μ M), PS (50 mg/ml) with ONOO⁻ (40 μ M). Each mixed solution was incubated at 37°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.

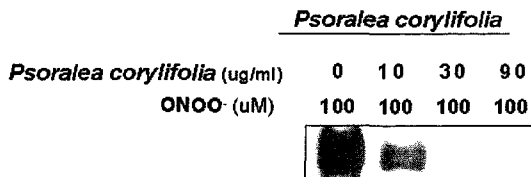


Fig. 7. Effect of *Psoralea corylifolia* on albumin nitration.

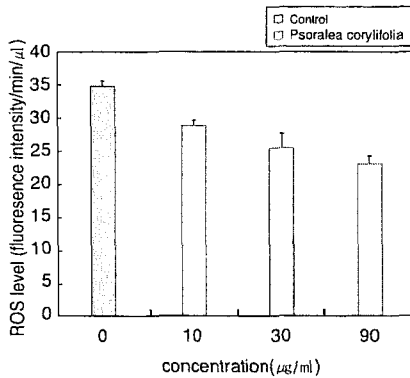


Fig. 8. Inhibition of total reactive oxygen species generation by *Psoralea corylifolia* in LPS-treated Raw 264.7 cell extract. Each value is the mean \pm S.E. of triplicate measurements.

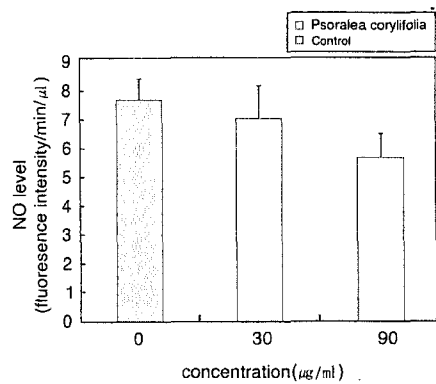


Fig. 9. Inhibition of NO generation by *Psoralea corylifolia* in LPS-treated Raw 264.7 cell extract. Each value is the mean \pm S.E. of triplicate measurements.

40% 제거 활성을 나타내었다. 기존의 $\cdot O_2$ 제거제인 trolox보다는 약하지만 제거 활성을 어느 정도 나타내어 補骨脂가 ONOO 및 NO 뿐만 아니라, $\cdot O_2$ 도 제거함을 알 수 있었다 (Fig. 4).

5) 총활성산소 제거 활성

마우스 homogenate의 postmitochondria 분획에 補骨脂 추출물을 처리한 후 30분간 총활성산소 제거능을 검토한 결과 2, 10, 50 $\mu g/ml$ 에서 각각 19, 65, 73%의 제거 활성을 나타내어 강한 항산화 활성을 가지고 있었다 (Fig. 5).

6) ONOO 제거 기전

補骨脂가 어떠한 기전으로 ONOO를 제거하는지를 검토하였다. Tyrosine은 ONOO와 반응하며 430 nm에서 최대 흡광을 가지는 3-nitrotyrosine (Fig. 6B)을 생성한다. 補骨脂와 ONOO가 반응하여 補骨脂 성분이 nitration되어 nitro화물이 생성되는가를 검토한 결과, 430 nm에서 흡광도를 가지지 않으므로 (Fig. 6 C, D, E) 補骨脂가 nitration되지 않고 electron donation에 의해 ONOO를 제거할 가능성이 시사되었다. 그리고 Fig. 6A에서 보듯이 tyrosine 없이 ONOO만 존재할 경우 430 nm에서 peak가 없으나, 거기에 tyrosine을 첨가할 경우 430 nm에서 peak가 나타나 (Fig. 6 B), Fig. 6 F, G, H에서 보듯이 補骨脂추출물을 각각 10, 25, 50 $\mu g/ml$ 첨가할 경우 농도 의존적으로 3-nitrotyrosine의

peak가 사라짐을 알 수 있다. 이것은 補骨脂가 매우 효과적으로 tyrosine의 nitration을 억제함을 알 수 있고, 이것은 electron donation에 의해 제거함을 의미한다.

7) albumin nitration 저해 효과

Albumin의 tyrosine이 ONOO에 의해 nitration되는 정도에 補骨脂가 미치는 영향을 anti-nitrotyrosine 함체로 검토하였다. 그 결과, 補骨脂추출물은 albumin의 tyrosine nitration을 농도 의존적으로 현저히 저해함을 알 수 있었다. 이것은 補骨脂가 electron donation에 의해 효과적으로 ONOO를 제거함으로써 albumin의 nitration을 저해한 것으로 사료된다 (Fig. 7).

8) 배양 Raw 264.7 세포 extract에서 활성산소·질소 생성계에 미치는 영향

배양 Raw 264.7 세포에 LPS를 처리하여 $\cdot O_2$ 생성계를 활성화시킨 세포 extract에 補骨脂추출물을 처리하였다. 이때 활성산소 생성계에 미치는 영향을 검토한 결과 10, 30, 90 $\mu g/ml$ 에서 각각 23, 25, 28% 억제하여 補骨脂는 강한 활성산소 생성 억제 활성을 나타내었다 (Fig. 8).

補骨脂추출물이 활성질소 생성계에 미치는 영향을 10, 30, 90 $\mu g/ml$ 에서 검토한 결과 농도 의존적으로 NO 생성을 현저히 억제하였다 (Fig. 9).

IV. 考 察

ONOO는 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 ONOO의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다^{4,7,22}. 이와 같이 ONOO는 노화 과정뿐만 아니라 노인성 질환에 중요한 발병 요인으로 주목받고 있는 매우 산화력이 강한 내인성 독성물질이다^{27,22}.

노화 과정에서 염증 반응이 지속적으로 일어남으로써 활성산소의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 NO의 대량 생성이 ONOO 생성을 더욱 증가시켜, 세포 및 조직 손상을 가져와 노화 과정을 촉진한다고 하였다²³.

補骨脂는 補腎 藥物로서 辛苦 溫燥한 性味를 가지고 있으며 腎, 脾, 命門, 心包 經絡에 歸經하여 작용을 나타낸다. 補腎壯陽 煖丹田 壯元陽 縮小便 溫脾止瀉 納氣 등의 효능이 있어 腎陽이 부족하고 下元이 虛冷不固하여 생기는 滑精·遺尿·尿頻 등의 遺精證을 비롯하여 陽痿, 腰膝冷痛 腎虛泄瀉 및 腎虛喘 등에 활용된다²⁴.

노화 방지 효과가 밝혀진 靑娥丸²⁵을 비롯하여 四神丸, 斑龍丸²⁶ 등의 補腎 처방에 들어가는 약제이므로 補腎 효능과 함께 노화 방지 효과를 가질 것으로 보인다.

실험 연구에 의하면 補骨脂는 활성산소를 직접 소거시키고 생성계 효소 활성을 억제하는 항산화 효과가 있으므로²⁷ 노화 방지 및 노인성 질환의 치료에 유효할 것으로 여겨진다. 補骨脂는 腎虛를 補하는 補腎

處方인 靑娥丸의 구성 약물인데, 靑娥丸은 ONOO와 그 전구체인 NO, ·O₂에 대하여 농도 의존적으로 강한 제거 활성을 나타내었다²⁸. 그러므로 補骨脂가 노화 과정과 노인성 질환 및 여러 만성질환들과 밀접한 관계를 가지고 있는 활성산소와 NO 및 ONOO를 제거하는 작용이 있는지를 검토하였다.

補骨脂의 ONOO 제거능을 ONOO과 특이하게 반응하여 형광을 내는 DHR 123을 이용하여 측정된 결과 ONOO 자체를 강력히 제거할 뿐만 아니라, SIN-1에 의해 생성되는 ·O₂와 NO에 의해 만들어지는 ONOO에 대해서도 강력하게 제거하는 활성이 관찰되었다. 이들 ONOO의 전구체인 ·O₂와 NO의 제거능을 직접 검토한 결과 ·O₂와 NO를 모두 제거하는 활성을 나타내었다. 이는 補骨脂의 ONOO 억제능에 ONOO를 직접 제거하는 활성과 ·O₂와 NO를 각각 제거하는 능력을 가지고 있는 것으로 사료된다.

補骨脂의 주요 성분으로는 coumarin樣 化合物로는 psoralen, isopsoralen, angelicin, psoralidin, isopsoralidin, corylidin 등이 밝혀졌고, flavon類 化合物로는 bavachin, bavachinin, isobavachin, isobavachalcone, bavachalcone, isobavachalcone corylifolinin 등이 밝혀져 있다. 그밖에 樹脂, 精油, bakuchiol, psoraldehyde, saponin 등이 보고되어 있다²⁴⁻²⁶. 실제 여러 flavonoid들은 ONOO를 효과적으로 제거한다는 많은 보고가 있다²⁷. 補骨脂에 함유되어 있는 flavonoid들이 ONOO 제거에 주된 역할을 한 것으로 추측된다.

Flavonoids은 과일, 채소류에 풍부히 존재하며 항산화 효과는 활성산소의 소거작용, 전이금속과의 chelating 및 활성산소를 형성하는 효소를 저해하는 것으로 세분화할 수 있다. ONOO에 대한 항산화 작용은 free aromatic hydroxyl group과 관련되는데 flavonol은 구조적으로 2개의 pharmacophore를 가진다. Flavonoids 중에서 quercetin이 강력한 항산화제로 작용하는데 이는 셀레늄을 함유한 단백질인 ebselen[2-phenyl-1,2-benziselenazol-3-(2H)-one]과 비교해 볼 때 10배 정도 항산화 작용이 강하다고 보고하였다.⁷ Flavonoid의 ONOO 소거 작용은 low density lipoprotein (LDL) 산화를 방지하고 만성 심장질환의

발병률을 저하시키므로 flavonoid의 섭취가 심혈관계 질환 발병률과 역의 상관관계가 있음을 시사하였다. 그러나 flavonoid가 내피세포와 혈관 평활근 세포 사이에 축적되며 바로 그 장소에서 동맥경화가 진전되는 것으로 미루어 볼 때 flavonoid의 산화촉진제로서 작용도 보고되고 있다²⁸. Flavonols 중에서 EGCG, EC, GCG, EGC, gallate ester(GE)는 chain-breaking antioxidant로서 작용하며 LDL의 산화를 방지하고 수용성, 지용성 radical을 소거할 뿐만 아니라 ONOO에 의한 니트로화를 감소시키고 LDL의 surface charge alteration을 제한한다²⁹. Haenen 등은 polyphenol의 항산화능의 구조적인 특징을 밝혔으며, 녹차에서 추출한 EGCG 그리고 GCG가 직접 제거하는 기전으로 높은 활성을 나타내었다³⁰. 이런 활성은 OH group의 수에 따라 그 활성산소 제거능이 달라지며, 전이 금속을 chelating하여 Fenton 반응에 의한 활성산소 형성을 지연한다고 보고하였다.

補骨脂의 ONOO 제거 기전을 검토하기 위하여 ONOO와 補骨脂 추출물과의 반응으로부터 검토한 결과, 補骨脂가 ONOO 제거시 electron donation에 의해서 ONOO를 제거하리라 사료된다.

Raw 264.7 배양 세포에 LPS를 처리하여 $\cdot O_2$ 생성체를 활성화시킨 후 補骨脂추출물이 활성산소 생성체에 미치는 영향을 검토한 결과 강한 생성 억제 효과를 나타내었다. 활성 질소 생성체에 대하여도 농도 의존적으로 NO 생성을 현저히 억제하였다

이상의 실험 결과로 補骨脂는 ONOO와 그 전구체인 $\cdot O_2$ 와 NO를 제거하는 효과를 나타내므로 노화 과정 및 노인성 질환을 조절하는데 유효한 약재가 될 가능성을 시사해 준다.

V. 結論

노화 과정 및 노인성 질환에 중요한 역할을 하는 활성산소와 활성질소에 대한 補骨脂의 제거능과 제거 기전을 검토하였다. 補骨脂는 ONOO를 농도 의존적으로 직접 제거하였으며, SIN-1에 의해 생성되는

$\cdot O_2$ 와 NO의 상호작용에 의해 생성되는 ONOO의 생성도 억제하였다. 補骨脂는 SIN-1에 의해 생성되는 $\cdot O_2$ 와 NO 생성체인 sodium nitroprusside에 의해 생성되는 NO도 효과적으로 제거하는 활성을 나타내었으며, 신장 homogenate에 의해 생성되는 총활성산소도 효과적으로 제거하였다. 補骨脂는 electron donation에 의해 ONOO를 제거하였고, albumin의 tyrosine이 ONOO에 의해 nitration되는 것을 농도 의존적으로 억제하였다. 補骨脂는 Raw 264.7 배양 세포의 extract에서 LPS에 의해 유도되는 활성산소 및 활성질소의 생성을 효과적으로 억제하였다. 이러한 실험 결과는 補骨脂가 electron donation에 의해 ONOO, NO 및 $\cdot O_2$ 를 효과적으로 소거하여 노화 및 노인성 질환의 조절약물로 개발될 가능성을 제시하였다.

參考文獻

1. Chung HY. Aging and Carcinogenic Mechanism Induced by Free Radicals. *Kor J Gerontol.* 1992;2:1-11.
2. 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.
3. Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med.* 1996;21:651-68.
4. 平田結善緒. NO 와 NOS. 內分泌, 糖尿病科. 1996;2:207-14.
5. Carr AC. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1716-23.
6. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Chio JS and Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Micro Res Technol.* 2002;59:264-72.
7. Haenen GPM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236:591-6.
8. 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.
9. 李尙仁. 本草學. 서울:醫藥社;1983, p.69-70.
 10. 吳儀洛. 本草從新, 上海:上海科學技術出版社;1982, p.39.
 11. 李時珍. 本草綱目(上冊). 北京:人民衛生出版社;1982, p.877-80.
 12. 김성호, 정지천. 靑娥丸의 Peroxynitrite 제거 활성 및 기전. 대한한의학회지. 2002;23(4):55-63.
 13. 黃度淵. 方藥合編. 서울:南山堂;1989, p.193, 204.
 14. 박용기, 강병수. 補骨脂의 항산화 작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 1996;11(2):101-14.
 15. 권혁대, 서부일, 김선희, 김미려. 補骨脂가 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1997;12(2):21-38.
 16. 공복철, 고운채. 補骨脂 수침이 백서의 부신피질 기능부전에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1995;10(1):165-76.
 17. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Res Commun*. 1994;16:149-56.
 18. Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem*. 1983;134:111-6.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Chung HY, Kim HJ, Jung KJ, Yoon JS, Yoo MA, Kim KW Yu BP. The inflammatory process in aging. *Reviews in Clinical Gerontology*. 2000;10:207-22.
 23. Chung HY, Kim HJ, Kim JW. The inflammation hypothesis of aging: Molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;928:327-35.
 24. Namba T. The encyclopedia of Wakan-Yaku. Hoikusha, Tokyo. 1993;1:222-3.
 25. 中國醫藥科學院 藥物研究所. 中藥志(第三冊). 北京:人民衛生出版社;1984, p.429-35.
 26. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京:人民衛生出版社;1983, p.547-50.
 27. Choi JS, Chung HY, Kang SS, Jung MJ, Kim JW, No JK, Jung HA. The Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Scavengers of Peroxynitrite. *Phytother Res*. 2002;16:232-5.
 28. Neumann HA, Carlsson K, 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.
 29. Chung HY, Yokozawa T, Soung DY, Kye IS, No JK, Baek BS. Peroxynitrite-scavenging activity of green tea tannin. *J Agric Food Chem*. 1998;46: 4484-6.