

# 胡桃藥鍼液이 毒性物質에 의한 肝組織 損傷에 미치는 影響

이경태<sup>1</sup> · 김철홍<sup>2</sup> · 윤현민<sup>2</sup> · 장경전<sup>2</sup> · 안창범<sup>2</sup> · 송춘호<sup>1</sup>

동의대학교 한의과대학 <sup>1</sup>경혈학교실, <sup>2</sup>침구학교실

## Effect of Juglandis Semen Herbal Acupuncture on Toxic Agent-Induced Liver Cell Damage

Kyung-Tae Lee<sup>1</sup>, Cheol-Hong Kim<sup>2</sup>, Hyoun-Min Youn<sup>2</sup>, Kyung-Jeon Jang<sup>2</sup>,  
Chang-Beohm Ahn<sup>2</sup>, Choon-Ho Song<sup>1</sup>

Dept. of <sup>1</sup>Meridian & Acupoint, <sup>2</sup>Acupuncture & Moxibustion,  
College of Oriental Medicine, Donggeui University

### Abstract

**Objectives** : This study was carried out to determine whether Juglandis Semen herbal acupuncture (JSA) exerts the protective effect against toxic agent-induced liver cell damage.

**Methods** : The cell damage was estimated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release, and lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde (MDA), a product of lipid peroxidation, in rabbit liver slices.

**Results** : When tissues were incubated with 0.5 mM Hg for 10~120 min, LDH release and lipid peroxidation were increased as a function of incubation time, and these effects were significantly prevented by addition of 0.1% JSA. Hg increased LDH release and lipid peroxidation in dose-dependent manner over the range of 0.1~1 mM concentrations, which were reduced by 0.1% JSA. When tissues were treated with 0.5 mM Hg in the presence of 0.05~1 % JSA, LDH release and lipid peroxidation induced by Hg were prevented by JSA in a dose-dependent fashion. JSA at 0.5 and 1% prevented completely effects of 0.5 mM Hg. When tissues were treated with 0.5 mM Hg for 60 min, LDH release and lipid peroxidation were increased, which were significantly prevented by addition of 0.1 % JSA. tert-Butyl hydroperoxide (tBHP) increased LDH release and lipid peroxidation, which were significantly reduced by 0.1 % JSA. Such protective effects were similar to those of *N,N*-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD), a potent antioxidant. When tissues were treated with 0.5 mM Hg, activities of catalase and glutathione peroxidase were inhibited, and glutathione content was also reduced. Such effects were prevented by JSA, but not by DPPD. JSA prevented Hg-induced morphological changes.

**Conclusions** : These results indicate that JSA exerts the protective effect against liver cell injury induced by toxic agents through antioxidant action, and this effect may be attributed to an increase in activities of endogenous antioxidant enzymes and GSH content. However, antioxidant effect of JSA is different from that of a well-known potent antioxidant DPPD.

**Key words** : Juglandis Semen, Herbal acupuncture, Liver cell damage, LDH, MDA, tBHP, DPPD

· 교신저자 : 송춘호, 부산광역시 부산진구 양정2동 산 45-1, 동의대학교  
한의과대학 경혈학교실, Tel. 051-850-8643,  
Fax. 051-853-4036, E-mail : chsong@deu.ac.kr

· 접수 : 2005/03/07 · 수정 : 2005/03/21 · 채택 : 2005/03/22

## I. 緒 論

胡桃 (Juglandis Semen)는 性味가 甘溫無毒하고 補腎益精強腰膝·斂肺定喘潤腸 등의 效能이 있어 腎虛精虧·腰痛筋骨無力·虛寒喘嗽腸燥便秘 등의 病症을 治療하는데 사용되어져 왔으며<sup>1)</sup>, 最近 胡桃藥鍼液의 抗酸化酵素 活性에 대하여 有意한 效能이 있음이 報告<sup>2, 3)</sup>되는 등 實驗을 통하여 胡桃藥鍼液의 效能을 究明하기 위한 노력을 계속하고 있어 天然 抗酸化劑로서의 개발과 治療領域의 확대가 기대되고 있다.

肝은 탄수화물·지방·단백질 등과 약물·호르몬·기타 물질의 代謝에 관여하고, 식균작용, 빌리루빈의 배설, 비타민 및 철을 저장하는 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며<sup>4)</sup>, 韓醫學에서는 肝을 “將軍之官 謀慮出焉”<sup>5)</sup>, “肝者 罷極之本”<sup>5)</sup>, “肝藏血”<sup>6)</sup>이라 하여 外部로부터의 病邪에 對抗하고 運動 機能을 調節하며 體內에서 血液을 貯藏하는 臟器로 표현하고 있다.

水銀은 대부분 食物을 통해 체내에 들어와 여러 組織에 分布되지만 주로 腎臟·肝臟 및 腦에 蓄積이 일어나기 때문에 이들 臟器가 水銀에 의해 影響을 많이 받게 된다<sup>7, 8)</sup>. 水銀은 細胞의 sulfhydryl group과 反應하여 free sulfhydryl group들을 減少시키는 등의 작용<sup>9, 10)</sup>이 있어 肝을 포함한 우리 몸의 여러 臟器에서 강력한 毒性을 나타내는 것으로 알려져 있으며<sup>11)</sup>, 白鼠에서 水銀을 生體 내에 注入한 결과 脂質의 過酸化가 增加되고<sup>12-14)</sup>, 試驗管 내에서 肝細胞를 水銀에 露出し켰을 때 脂質의 過酸化가 增加되며<sup>15)</sup>, 腎臟細胞에서 水銀이 직접 反應性酸素基 (reactive free radical)를 發生시킨다<sup>16)</sup>는 研究들이 발표되었다.

현재 酸化와 관련된 細胞의 損傷을 防止하기 위한 방법을 찾기 위해 많은 노력을 기울이고 있으며 이런 노력의 일환으로 最近에 反應性酸

素基들을 除去할 수 있는 天然 또는 合成된 抗酸化劑의 개발에 많은 관심이 집중되고 있으나 지금까지 만족한 성과를 얻지 못하고 있는 실정이다.

따라서 본 研究에서는 毒性物質에 의한 肝組織의 損傷을 胡桃藥鍼液이 防止할 수 있는지를 確認하기 위해, 水銀 및 tert-butyl hydroperoxide (tBHP)에 의한 細胞 損傷 및 脂質 過酸化의 變化를 調査하고 이에 대한 胡桃藥鍼液의 影響을 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 動物

動物은 體重 1.5~2.0 kg의 Newzealand White 種 토끼를 국내 전문사육장 (효창 사이언스, 한국)에서 구입하여 암수 구별 없이 사용하였으며, 고형사료(삼양 배합사료 실험동물용, 삼양유지사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경(溫度: 20±2 °C, 濕度: 40~60 %, 明暗: 12시간 light/dark cycle) 하에서 2 주 適應 후 實驗에 사용하였다.

#### 2) 藥材

實驗에 사용한 胡桃는 충북 영동산 胡桃를 동의대학교 부속한방병원에서 購入·精選하여 사용하였다.

### 2. 方法

#### 1) 藥鍼液의 製造

胡桃 500 g을 粉末로 만들어 蒸溜水 2,000 ml 속에 넣고 4 시간 동안 煎湯하여 濾過한 후 濾過液을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하고 濃縮

液을 蒸溜水 200 ml에 稀釋하여 室溫까지 냉각 하였다. 여기에 ethanol을 가하여 振蕩한 다음 室溫에서 放置한 후 濾過하고 減壓 濃縮하여 약 100 ml 되게 하여 實驗에 사용하였다. 이상의 과정을 간단히 정리하면 Table 1 과 같다.

Table 1. Preparation of Juglandis Semen Herbal Acupuncture

Juglandis Semen 500 g  
 ↓ homogenization  
 powder + 2,000 ml of distilled water  
 ↓ boil for 4 h at 100 °C  
 filtration  
 ↓  
 rotary evaporation  
 ↓ ← add 200 ml of distilled water  
 incubate at R.T.  
 ↓ ← add EtOH  
 shaking  
 ↓  
 incubate at R.T.  
 ↓  
 filtration  
 ↓  
 rotary evaporation  
 ↓  
 100 ml

## 2) 肝組織 切片의 製作

體重 1.5~2.0 kg 되는 토끼를 犧牲시킨 후 肝臟을 들어내어 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 40 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 된 차가운 溶液을 肝動脈 內에 注入하여 血液을 제거한 다음 Stadie-Riggs microtome(Microm, Ge-

rmany)으로 약 0.3~0.5 mm 두께의 肝組織 切片을 만들어 사용하였다.

## 3) 水銀 · tBHP 및 胡桃藥鉞液의 處理

組織 切片 약 50 mg을 4 ml의 incubation 용액이 들어 있는 비커속에 넣고 Dubnoff metabolic shaker 內에서 100% 산소를 계속 공급하면서 37 °C에서 incubation 하였다. 기본 incubation 용액의 조성은 130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 되어 있으며, 水銀 및 tBHP(Sigma Chemical Co., USA)를 처리할 때는 水銀 및 tBHP가 들어 있는 용액 內에서 60 분 동안 incubation하였다. Incubation 후에 組織을 들어내어 細胞의 損傷 정도를 조사하기 위하여 lactate dehydrogenase (LDH)의 流出을 測定하였으며, 또한 細胞 損傷이 脂質의 過酸化와 연관이 있는지는 그 생성물인 malondialdehyde (MDA)의 含量을 測定하여 평가하였다. 본 實驗에서 胡桃藥鉞液의 효과를 조사할 때는 용액 內에 實驗에 필요한 濃度로 녹여 사용하였다.

## 4) LDH 活性 測定

水銀 및 tBHP로 처리된 肝組織 切片을 들어내어 蒸溜水로 磨碎시켜 만든 組織液과 incubation 용액을 각각 50 µl 取하여 LDH 活性을 LDH assay kit (Sigma Chemical Co., USA)를 이용하여 測定하였다.

## 5) 脂質의 過酸化 測定

組織 內 脂質의 過酸化 정도를 평가하기 위하여 그 생성물인 MDA 含量을 Uchiyama와 Mihara의 방법<sup>17)</sup>으로 測定하였는데 간단히 설명하면, 水銀 및 tBHP로 처리된 肝組織 切片을 차가운 1.15% KCl 용액 (5% wt/vol) 속에서 破碎하였다. 이 組織 破碎 均質液 0.5 ml에 1% 磷

酸 용액 3 ml와 0.6% thiobarbituric acid 용액 1 ml를 첨가하여 끓는 물에서 45 분간 加熱하였다. n-butanol 4 ml를 첨가하여 완전히 섞은 다음 2,000×g에서 20 분간 원심분리한 후, 上層液의 吸光度를 536 nm와 520 nm에서 測定하였다. 단백질 농도는 Bradford의 방법<sup>18)</sup>으로 測定하였다.

#### 6) Reduced Glutathione (GSH) 含量 測定

GSH 含量은 Anderson의 방법<sup>19)</sup>으로 測定하였다. Phosphate 완충액(143 mM sodium phosphate, 6.3 mM Na<sub>4</sub>-EDTA, pH 7.5를 함유하고 있는)에 0.248 mg/ml NADPH(Sigma Chemical Co., USA) 용액 700  $\mu$ l와 6 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Sigma Chemical Co., USA) 용액 100  $\mu$ l 및 증류수 198  $\mu$ l를 cuvette에 넣어 30 °C에서 15 분간 데운 후 시료 2  $\mu$ l를 넣고 섞은 다음 266 U/ml GSSG reductase (Boehringer Mannheim, Germany) 10  $\mu$ l를 첨가하여 412 nm에서 吸光度의 變化를 관찰하였다.

#### 7) Catalase 活性 測定

Catalase 活性은 Aebi의 방법<sup>20)</sup>에 따라 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 분해 정도를 spectrophotometer(Hewlett Packard, USA)로 추적하여 測定하였다. 肝組織 切片을 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4, Sigma Chemical Co., USA)에서 破碎시켜 Triton X-100(Amresco, USA)을 0.02% 되게 첨가한 후 40,000×g에서 30 분간 원심분리하여 上層液을 취하였으며, 2 ml의 上層液에 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 ml를 첨가하여 反應을 시작시키고 240 nm에서 30 초 동안 吸光度를 測定하였다. 上層液의 단백질 농도를 測定하였고 catalase 活性은 nmole/min/mg protein으로 나타내었다.

#### 8) Glutathione Peroxidase 活性 測定

Glutathione peroxidase 活性의 測定은 Flohe와 Gunzler의 방법<sup>21)</sup>으로 실시하였다. 肝組織 切片을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0, Sigma Chemical Co., USA) 용액에서 破碎시켜 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 500  $\mu$ l, 시료 100  $\mu$ l, 2.4 U/ml glutathione reductase(Boehringer Mannheim, Germany) 100  $\mu$ l, 100 mM GSH (Boehringer Mannheim, Germany) 100  $\mu$ l를 semi-microcuvette에 넣어 37 °C에서 10 분간 preincubation하였다. 1.5 mM NADPH 용액을 100  $\mu$ l 넣어 hydroperoxide에 무관한 NADPH 消耗를 340 nm에서 약 3 분 동안 기록한 다음 1.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu$ l를 첨가하여 吸光度의 減少를 약 5 분 동안 관찰하였다.

#### 9) 形態學의 研究

肝組織 切片을 固定용액, 0.5 mM 水銀이 함유된 용액 및 水銀이 함유된 용액 내 0.1 % 胡桃藥碱液이 들어 있는 용액 내에서 60 분간 incubation한 후 肝組織을 들어 내어 1 mm<sup>2</sup>로 잘라 1/2 Karnovsky 고정액에 고정하였으며, 통상적인 전자현미경 조직표본 제작과정을 거쳐 조직을 epon에 포매하였다. Ultramicrotome(Microm, Germany)으로 1  $\mu$ m 두께의 조직을 잘라서 toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 10) 統計 處理

成績은 平均值  $\pm$  標準誤差 (Mean  $\pm$  S.E.)로 나타내었고, 통계분석은 SigmaPlot version 6.0을 사용하였으며, 평균치 간의 有意性은 Student's t-test를 이용하여 檢定하였고 p 값이 0.05 미만일 때 有意한 것으로 判定하였다.

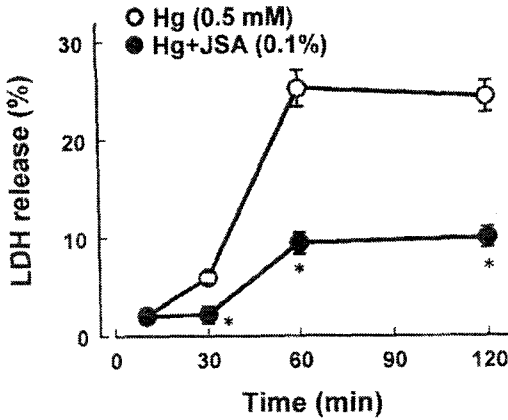


Fig. 1. Time course of Hg-induced LDH release in rabbit liver tissues. The tissues were incubated with 0.5 mM Hg for 10~120 min at 37 °C in the presence or absence of 0.1% Juglandis Semen herbal acupuncture (JSA), and LDH release was measured. Data are mean ± S.E. of five determinations. \*p<0.05 compared with the respective control.

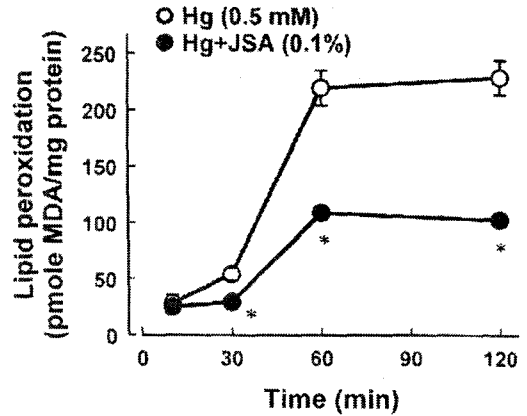


Fig. 2. Time course of Hg-induced lipid peroxidation in rabbit liver tissues. The tissues were incubated with 0.5 mM Hg for 10~120 min at 37 °C in the presence or absence of 0.1% JSA, and lipid peroxidation was measured. Data are mean ± S.E. of five determinations. \*p<0.05 compared with the respective control.

### Ⅲ. 結 果

#### 1. 肝組織에서 incubation에 따른 水銀의 細胞 損傷 效果와 胡桃藥鍼液의 影響

正常 肝組織에서 水銀의 細胞 損傷 效果를 incubation 시간에 따라 調査하였다. 0.5 mM 농도의 水銀을 용액 내에 넣고 肝組織을 10 분에서 120 분 동안 incubation하여 LDH 流出 정도를 測定한 결과 incubation 시간이 延長됨에 따라 LDH 流出도 비례하여 증가하는데, incubation 시작 후 10 분에서 LDH 流出이  $2.09 \pm 0.56$  %였고, 30 분에는  $5.94 \pm 0.54$  %로 增加하였으며, 60 분에는  $25.23 \pm 1.87$  %로 增加하였다. 그러나 incubation 시간을 120 분까지 延長시켰을 때는 LDH 流出이 60 분에 비해 더 增加하지 않았다. 따라서 이후 實驗에서는 incubation 시간을 60 분으로 하였으며, 肝組織에 水銀을 처리할 때 胡桃藥鍼液을 0.1 % 되도록 첨가한 결과,

水銀에 의한 LDH 流出이 有意하게 減少하였다 (Fig. 1).

#### 2. 肝組織에서 incubation에 따른 脂質의 過酸化에 대한 水銀의 效果와 胡桃藥鍼液의 影響

水銀의 細胞 損傷 效果가 脂質의 過酸化에 起因하는지를 확인하기 위하여 水銀에 의한 脂質의 過酸化를 incubation 시간에 따라 調査하였다. 水銀에 의한 脂質의 過酸化는 incubation 시작 후 30 분에 正常의  $28.96 \pm 6.97$  pmole MDA/mg protein에서  $53.89 \pm 5.48$  pmole MDA/mg protein으로 增加를 보였고, 60 분에는  $219.36 \pm 15.18$  pmole MDA/mg protein으로 약 7.5 배 增加하였다. 그러나 incubation 시간을 120 분까지 延長시켰을 때는 脂質의 過酸化는 LDH 流出에서와 같이 60 분에 비해 더 增加하지 않았다. 水

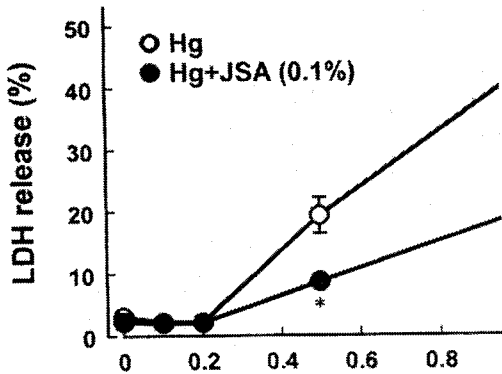


Fig. 3. Effect of various Hg concentrations on LDH release in rabbit liver tissues. The tissues were incubated with 0.1~1 mM Hg for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.1% JSA, and LDH release was measured. Data are mean ± S.E. of five determinations. \*p<0.05 compared with the respective control.

銀을 처리하는 용액 내에 胡桃藥鉞液을 0.1 % 되게 첨가한 결과, 水銀에 의한 脂質의 過酸化는 有意하게 減少하여 30 분 incubation에서는 53.89 ± 5.48 pmole MDA/mg protein에서 29.33 ± 5.74 pmole MDA/mg protein으로 有意하게 抑制되었고, 60 분 incubation에서는 219.36 ± 15.18 pmole MDA/mg protein에서 108.46 ± 15.29 pmole MDA/mg protein으로 有意하게 抑制되었다 (Fig. 2).

### 3. 肝組織에서 水銀의 濃度에 따른 細胞 損傷의 變化와 胡桃藥鉞液의 影響

肝組織에서 水銀의 濃度 變化에 의한 細胞 損傷 정도를 調查하기 위하여 組織을 여러 濃度의 水銀이 들어 있는 용액 내에 넣고 60 분 동안 露 出시킨 결과, 水銀의 濃度가 0.2 mM까지는 別 變化가 없었으나 0.5 mM로 增加되었을 때 LDH 流出이 갑자기 增加하여 정상의 3.11 ± 0.55 % 에서 19.30 ± 2.88 %로 나타났으며, 1 mM일 때

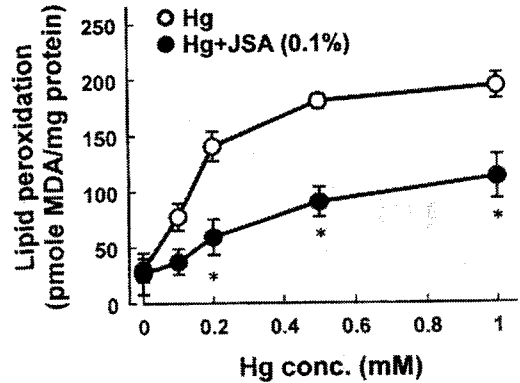


Fig. 4. Effect of various Hg concentrations on lipid peroxidation in rabbit liver tissues. The tissues were incubated with 0.1~1 mM Hg for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.1% JSA, and lipid peroxidation was measured. Data are mean ± S.E. of five determinations. \*p<0.05 compared with the respective control.

는 41.89 ± 3.65 %로 약 14 배 增加하였다. 水銀 을 처리하는 용액 내에 胡桃藥鉞液을 0.1 % 되게 첨가한 결과, 0.5 mM 水銀에 의한 LDH 流出이 19.30 ± 2.88 %에서 8.67 ± 0.74 %로 有意하게 減少되었고, 이와 같은 현상은 1 mM 水銀에서도 나타났다 (Fig. 3).

### 4. 肝組織에서 水銀의 濃度에 따른 脂質 的 過酸化와 胡桃藥鉞液의 影響

水銀의 濃度에 따른 脂質의 過酸化를 測定한 結果, LDH 流出의 增加 현상이 현저하지 않은 0.1 mM에서도 脂質의 過酸化는 有意하게 增加 하였으며, 水銀의 濃度가 더욱 增加함에 따라 脂 質의 過酸化도 비례하여 增加하였는데, 水銀의 濃度 0.1 mM에서의 脂質의 過酸化는 水銀을 처리하지 않았을 때의 29.73 ± 10.27 pmole MDA/ mg prtotein에서 77.25 ± 12.35 pmole MDA/mg prtotein으로 增加하였고, 0.2 mM, 0.5 mM 및 1 mM로 水銀의 濃度를 增加시켰을 때 脂質의 過

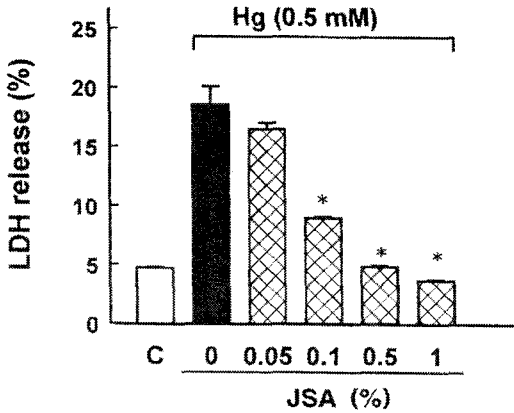


Fig. 5. Dose-dependency of JSA protective effect against Hg-induced LDH release in rabbit liver tissues. The tissues were incubated with 0.5 mM Hg for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.05~1% JSA, and LDH release was measured. Data are mean  $\pm$  S.E. of five determinations. \* $p$ <0.05 compared with Hg alone. C, control.

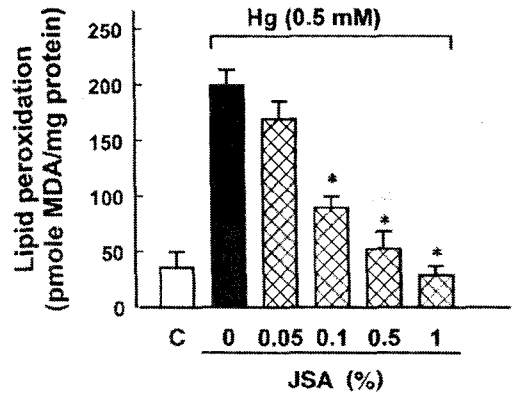


Fig. 6. Dose-dependency of JSA protective effect against Hg-induced lipid peroxidation in rabbit liver tissues. The tissues were incubated with 0.5 mM Hg for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.05~1% JSA, and lipid peroxidation was measured. Data are mean  $\pm$  S.E. of five determinations. \* $p$ <0.05 compared with Hg alone. C, control.

酸化는 각각  $140.54 \pm 13.15$  pmole MDA/mg prtotein,  $180.20 \pm 6.45$  pmole MDA/mg prtotein 및  $193.31 \pm 11.57$  pmole MDA/mg protein으로 증가하였다. LDH 流出 實驗에서와 같이 水銀을 처리하는 용액 내에 胡桃藥鉞液을 0.1 % 되도록 첨가한 결과, 水銀의 濃度가 0.2 mM, 0.5 mM 및 1 mM 이었을 경우에 脂質의 過酸化가 각각  $58.92 \pm 15.94$  pmole MDA/mg prtotein,  $90.26 \pm 13.38$  pmole MDA/mg prtotein 및  $112.54 \pm 19.95$  pmole MDA/mg protein으로 有意하게 減少되었다 (Fig. 4).

### 5. 水銀의 肝組織 損傷에 대한 胡桃藥鉞液 濃度 變化의 影響

胡桃藥鉞液이 水銀에 의한 肝組織 損傷을 防止하는 效果가 濃度 變化에 따라 어떤 樣相을 보이는지를 관찰하기 위하여 여러 濃度의 胡桃藥鉞液이 들어 있는 용액 내에서 水銀에 의한 LDH 流出을 測定하였다. 0.5 mM 水銀을 肝組

織에 처리했을 때 LDH 流出이 정상에서의  $4.69 \pm 0.07$  %에서  $18.54 \pm 1.59$  %로 增加하였는데, 여기에 胡桃藥鉞液을 0.1 % 濃度로 첨가하였을 때 水銀으로 인해 增加되었던 LDH 流出은  $8.97 \pm 0.13$  %로 有意하게 減少하였고, 0.5 %와 1 %에서는 각각  $4.84 \pm 0.08$  %와  $3.66 \pm 0.08$  %로 정상 수준으로까지 有意하게 減少하였다 (Fig. 5).

### 6. 水銀에 의한 脂質 過酸化에 대한 胡桃藥鉞液 濃度 變化의 影響

水銀에 의한 肝組織의 損傷을 防止하는 胡桃藥鉞液의 濃度 變化의 效果가 脂質의 過酸化의 防止에도 유사하게 나타나는지를 확인하기 위하여 水銀에 의한 脂質의 過酸化에 대한 여러 濃度의 胡桃藥鉞液의 效果를 관찰하였다. 肝組織에 0.5 mM 水銀을 처리했을 때 脂質의 過酸化가  $35.49 \pm 14.33$  pmole MDA/mg prtotein에서  $198.88 \pm 14.48$  pmole MDA/mg protein으로 약

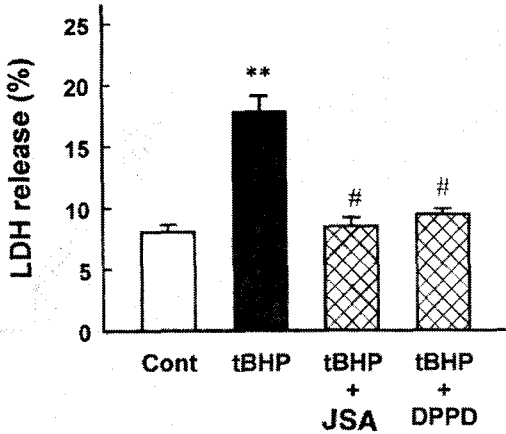


Fig. 7. Effect of JSA and *N,N'*-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD) on tert-butyl hydroperoxide (tBHP)-induced LDH release in rabbit liver tissues. The tissues were treated with 2 mM tBHP for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.1% JSA and 20 μ M DPPD, and LDH release was measured. Data are mean ± S.E. of five determinations. \*\**p*<0.01 compared with control (Cont). #*p*<0.05 compared with tBHP alone.

5.7 배 增加하였고, 여기에 胡桃藥鉞液을 0.05 % 에서 1 % 첨가했을 때 脂質의 過酸化는 胡桃藥鉞液의 濃度에 比例하여 減少되었다 (Fig. 6).

### 7. tBHP에 의한 細胞 損傷 및 脂質의 過酸化에 대한 胡桃藥鉞液의 影響

앞의 結果 (Fig. 4)에서 胡桃藥鉞液이 水銀에 의한 脂質의 過酸化를 防止하는 效果가 있음을 보였기 때문에 실제로 胡桃藥鉞液이 oxidant에 의한 細胞 損傷을 직접 防止할 수 있는지를 확인하기 위하여 유기 hydroperoxide인 tBHP에 의해 誘發된 細胞損傷 및 脂質의 過酸化에 대한 胡桃藥鉞液의 影響을 調査하였다. 肝組織을 2 mM tBHP에 露出시켰을 때 LDH 流出이 8.02 ± 0.61 %에서 17.77 ± 1.33 %로 약 2 배 增加하였

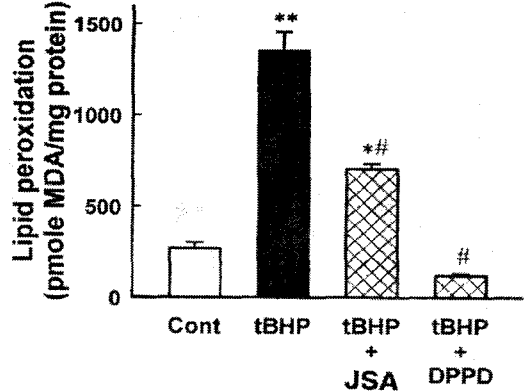


Fig. 8. Effect of JSA and DPPD on tBHP-induced lipid peroxidation in rabbit liver tissues. The tissues were treated with 2 mM tBHP for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.1% JSA and 20 μ M DPPD, and lipid peroxidase was measured. Data are mean ± S.E. of five determinations. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 compared with control (Cont). #*p*<0.05 compared with tBHP alone.

으므로 細胞 損傷이 현저하게 誘發되었음을 알 수가 있다. 肝組織을 tBHP에 露出시킬 때 0.1 % 胡桃藥鉞液을 첨가하였을 경우 LDH 流出은 8.47 ± 0.72 %로 有意하게 減少되었으며, tBHP에 의한 細胞損傷에 대한 胡桃藥鉞液의 效果를 강력한 抗氧化劑인 *N,N'*-diphenyl-*p*-phenylenediamine (DPPD)의 效果와 비교 한 결과, 20 μ M DPPD도 2 mM tBHP에 의한 LDH 流出을 거의 정상 수준 까지 有意하게 減少시켰다 (Fig. 7).

tBHP에 의한 細胞損傷이 脂質의 過酸化에 의해 誘發되는지와 胡桃藥鉞液이 脂質의 過酸化를 防止할 수 있는지를 調査하였다. 肝組織을 2 mM tBHP에 露出시켰을 때 脂質의 過酸化가 268.11 ± 34.32 pmole MDA/mg protein에서 1312.15 ± 154.50 pmole MDA/mg protein으로 현저하게 增加하였다. 그러나 0.1 % 胡桃藥鉞液을 첨가하였을 때는 702.00 ± 30.16 pmole MDA



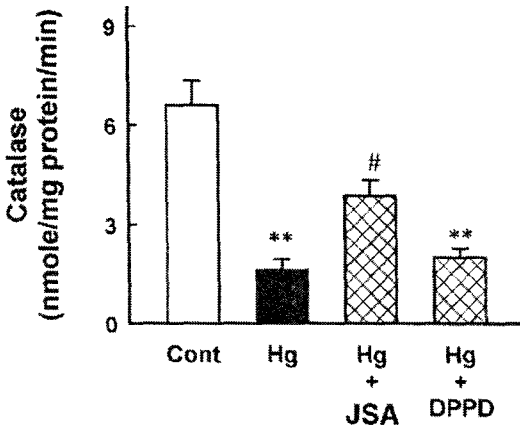


Fig. 9. Effect of JSA and DPPD on Hg-induced alterations in catalase activity in rabbit liver tissues. The tissues were treated with 0.5 mM Hg for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.1% JSA and 20 μ M DPPD, and the catalase activity was measured. Data are mean ± S.E. of five determinations. \*\*p<0.01 compared with control (Cont). #p<0.05 compared with Hg alone.

/mg protein으로 有意한 減少를 보였고, 20 μ M DPPD에 의해서는 119.14 ± 13.78 pmole MDA/mg protein까지 有意하게 抑制되었다 (Fig. 8).

### 8. 胡桃藥鍼液의 Catalase 活性에 대한 影響

胡桃藥鍼液이 細胞 내에 존재하는 항산화 효소인 catalase 活性에 어떤 影響을 미치는지를 調査하였다. 肝組織에 0.5 mM 水銀을 처리한 결과 효소의 活性이 6.60 ± 0.74 nmole/mg/min에서 1.62 ± 0.32 nmole/mg/min로 현저한 減少를 보였으며, 여기에 0.1 % 胡桃藥鍼液을 첨가하였을 때 효소의 活性이 3.88 ± 0.48 nmole/mg/min로 有意한 增加를 보였다. 그러나 抗酸化劑인 DPPD에 의해서는 2.01 ± 0.28 nmole/mg/min로 變化를 보이지 않았다 (Fig. 9).

### 9. 胡桃藥鍼液의 Glutathione Peroxidase 活性에 대한 影響

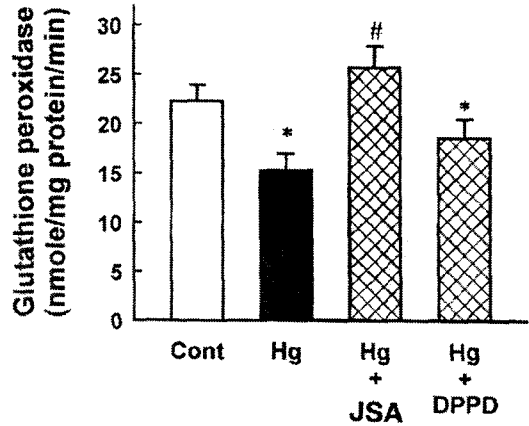


Fig. 10. Effect of JSA and DPPD on Hg-induced alterations in glutathione peroxidase activity in rabbit liver tissues. The tissues were treated with 0.5 mM Hg for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.1% JSA and 20 μ M DPPD, and the glutathione peroxidase activity was measured. Data are mean ± S.E. of five determinations. \*p<0.05 compared with control (Cont). #p<0.05 compared with Hg alone.

胡桃藥鍼液이 glutathione peroxidase 活性에 어떤 影響을 주었는가를 調査하였다. 肝組織에 0.5 mM 水銀을 처리했을 경우 효소의 活性이 22.23 ± 1.67 nmole/mg/min에서 15.29 ± 1.62 nmole/mg/min로 有意하게 抑制되었으며, 여기에 0.1 % 胡桃藥鍼液을 첨가하였을 때는 효소의 活性이 25.63 ± 2.22 nmole/mg/min로 효소의 活性이 정상 수준까지 有意하게 회복되었다. 그러나 강력한 抗酸化劑인 DPPD를 첨가하였을 경우에는 18.54 ± 1.89 nmole/mg/min로 효소 活性의 抑制가 影響을 받지 않았다 (Fig. 10).

### 10. 胡桃藥鍼液의 GSH 濃도에 대한 影響

胡桃藥鍼液이 毒性物質에 의한 細胞 損傷을 防止하는 작용이 細胞 내 GSH의 濃度を 變化시켜 나타나는지를 확인하기 위하여 水銀을 처리

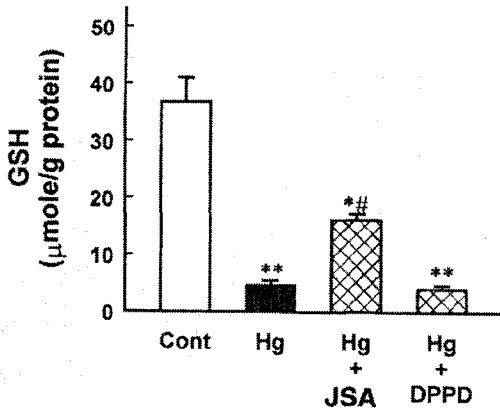


Fig. 11. Effect of JSA and DPPD on Hg-induced alterations in glutathione content in rabbit liver tissues. The tissues were treated with 0.5 mM Hg for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.1% JSA and 20 μ M DPPD, and the glutathione content was measured. Data are mean ± S.E. of five determinations. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with control (Cont). #p<0.05 compared with Hg alone.

한 組織에서 GSH 濃度 變化에 대한 胡桃藥鹼液의 效果를 調査하였다. 肝組織에 0.5 mM 水銀을 처리한 結果 細胞 內 GSH 濃度는 36.83 ± 4.20 μ mole/g protein에서 4.69 ± 0.76 μ mole/g protein으로 현저한 減少가 나타났으며, 여기에 0.1 % 胡桃藥鹼液이 첨가되었을 때 16.13 ± 1.07 μ mole/g protein으로 有意한 增加를 보였다. 그러나 抗酸化劑인 DPPD를 처리했을 경우에는 4.08 ± 0.64 μ mole/g protein으로 有意한 變化를 보이지 않았다 (Fig. 11).

### 11. 形態學的인 變化에 대한 胡桃藥鹼液의 影響

水銀에 의한 肝組織 損傷에 대해 胡桃藥鹼液이 形態學的인 變化에도 影響이 있는지를 調査하였다 (Fig. 12). 肝組織 切片을 정상 용액 내에

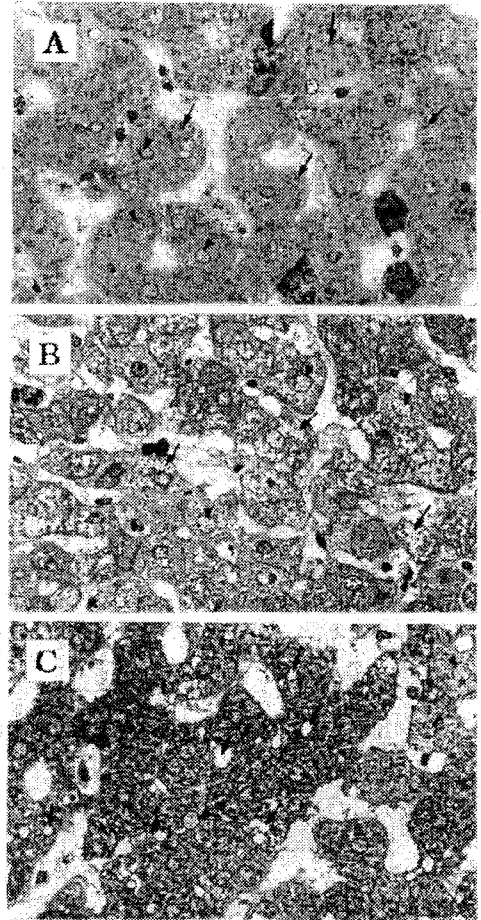


Fig. 12. Light photomicrographs of effect of JSA on Hg-induced morphological changes in rabbit liver tissues. The tissues were incubated for 60 min at 37 °C in various media, and fixed with 1/2 Karnovsky solution. Samples were processed for embedding in Epon. Sections (1 μm) were prepared using ultramicrotome and stained with toluidine blue. A, control; B, 0.5 mM Hg; C, 0.5 mM Hg plus 0.1% JSA. Magnitude ×40.

서 60 분간 incubation 하였을 때 다각형의 肝細胞 속에는 무형질의 細胞質에 과립상의 물질 (arrows)이 고루 분산되어 있고, 둥근핵 (arrow heads)을 가지고 있는 정상 肝細胞 소견을 보였 다 (Fig. 12A). 肝組織 切片을 0.5 mM 水銀이

들어 있는 용액 내에 露出시켰을 때 肝細胞들은 細胞質이 없는 밝은 빈 공간 (arrows)이 많이 나타났고, 대부분의 핵 (arrow heads)은 正常群에 비해 커져 있고 핵질이 변성되어 밝게 보였다 (Fig. 12B). 그러나 水銀을 처리할 때 0.1 % 胡桃藥鍼液을 첨가하였을 경우에는 細胞 속에 細胞質이 짙어 차있고 핵 (arrow heads)은 正常群에 비해 조금 커져 있으나 水銀만을 처리했을 때보다는 변화가 크지 않아 水銀에 의한 形態學的인 變化를 胡桃藥鍼液이 防止하고 있음을 보이고 있다 (Fig. 12C).

#### IV. 考 察

肝은 우리 몸에서 가장 큰 血液 저장소이면서 肝을 통과하는 血液 중의 불필요한 물질을 除去하는 機能이 있으며, 細胞 내에서 일어나는 수많은 生化學的 反應을 통하여 여러 가지 物質을 만들어 이들을 다른 器官에 供給하는 등 탄수화물·지방·단백질의 代謝에 관여하고, 治療의 目的으로 쓰이는 藥物 외에도 消化管이나 呼吸器를 통해 들어온 여러 異物質들을 非活性化시켜 膽汁을 통하여 排泄시키며, 이 밖에도 食菌作用, 빌리루빈의 排泄, 비타민 및 鐵을 貯藏하는 등의 役割을 한다<sup>4)</sup>.

이러한 肝의 機能에 관해 韓醫學에서는 「靈樞本神篇」<sup>6)</sup>에서 “肝藏血”이라 표현하여 藏血의 機能으로 인해 血液의 貯藏 및 血량을 調節하며, 「素問六節藏象論」<sup>5)</sup>에서는 “肝者 罷極之本”이라 하여 肝이 全身의 筋肉活動을 主管하여 運動으로 인한 疲勞를 調節하며, 「素問靈蘭秘典論」<sup>5)</sup>에서 “將軍之官 謀慮出焉”이라 표현하여 人體를 정상 상태로 유지하거나 邪氣로부터 防禦하기 위한 복잡한 代謝活動을 수행하는데 필요한 情報를 創出하는 곳으로 認識하였다. 이 외에도 疏泄의 機能으로 인해 氣機를 調暢하게 하

여 氣血의 循環이 순조롭고 經絡이 잘 통하게 하며 臟腑器官 活動의 正常的 維持, 情緒의 安靜, 消化 등에도 關與하고 있다<sup>22)</sup>.

본 實驗에서는 毒性物質을 肝組織에 처리하여 損傷이 誘發된 조건에서 胡桃藥鍼液이 이러한 酸化的 損傷을 防止하여 肝의 機能이 正常的으로 調節됨으로써 藏血의 機能, 運動으로 인한 疲勞의 회복, 邪氣로부터의 防禦 등 生理的 活動을 維持할 수 있는지를 確認하기 위해 毒性物質에 의한 細胞 損傷 및 脂質 過酸化와 이에 대한 胡桃藥鍼液의 影響을 觀察하였다.

胡桃의 使用에 관한 東洋醫學에서의 記錄은 「備急千金要方」<sup>23)</sup>에 最初로 나타나는데 “味甘 冷滑無毒, 不可多食, 動痰飲, 令人惡心吐水吐食”이라 記錄되어 있고, 近來의 本草書에서는 補陽藥으로 分類하였고 胡桃仁·胡桃肉·核桃仁 등의 異名이 있으며, 性味が 甘溫·無毒하고 肺·腎·大腸·三焦에 歸經하여 補腎益精·強腰膝·斂肺定喘·潤腸通便 등의 效能이 있어 腎虛精虧·腰痛·筋骨無力·虛寒喘嗽·腸燥便秘 등의 病症을 치료하는데 사용되어져 왔다<sup>1, 24)</sup>. 최근 胡桃藥鍼液의 抗酸化酵素 活性에 대한 實驗的 研究를 수행한 결과 有意한 效能이 있음이 報告되는 등<sup>2, 3)</sup> 胡桃藥鍼液의 效能을 究明하기 위한 노력이 계속되고 있어 天然 抗酸化劑로서의 開發과 治療領域의 확대가 기대되고 있다.

水銀은 肝을 포함한 우리 몸의 여러 器官에서 강력한 毒性을 나타내며<sup>11)</sup> 이러한 毒性은 反應性酸素基를 발생시켜 脂質의 過酸化를 誘發함으로써 나타낸다는 實驗 結果들이 여러 研究者들에 의해 報告되고 있어<sup>12, 14, 15)</sup> 抗酸化劑가 水銀에 의한 細胞 損傷을 防止할 수 있는지에 대한 관심이 집중되고 있다. 햄스터를 대상으로한 實驗 研究에서 비타민 E가 水銀에 의한 神經조직 損傷을 防止한다는 結果<sup>25)</sup>가 報告되는 한편  $\alpha$

-tocopherol을 처리했을 때 수은에 의해 증가된 지방질의 과산화는 억제되거나 세포 독성은 방지하지 못한다는 결과<sup>26)</sup>도 보고되는 등 항산화제가 수은에 의한 세포 독성을 방지할 수 있는지는 명확하지 않다. 그러나 최근腎臟細胞에서 수은이 반응성酸素基를 발생시킨다는 것이 確認되었고 이러한 반응性酸素基의 生成 및 細胞 毒性이 反應性酸素基를 除去하는 藥物에 의해 防止된다는 結果가 報告된 바 있다<sup>16)</sup>.

이렇게 生成된 反應性酸素基들은 老化뿐만 아니라 癌의 發生과 여러 가지 疾病을 誘發시키는 것으로 알려져 있으며<sup>27)</sup>, 肝에서는 虛血 이후의 再灌流 및 毒性物質에 의한 細胞 損傷을 媒介하는 것으로 認定되고 있다<sup>28-33)</sup>. 따라서 疾病의 發生과 老化의 進行을 抑制하기 위해 反應性酸素基들에 의한 細胞 損傷을 防止하기 위한 방법을 찾는 데 많은 노력을 기울이고 있으며, 이러한 노력의 일환으로 最近에 反應性酸素基들을 除去할 수 있는 天然 또는 合成된 抗酸化劑의 開發에 많은 관심이 집중되고 있으나 아직 만족한 성과를 얻지 못하고 있다.

본 研究에서는 肝組織에서 水銀 및 tBHP가 反應性酸素基의 生成 指標인 脂質의 過酸化를 誘發하는지를 調査하고, 胡桃藥鉞液이 水銀에 의한 脂質의 過酸化 및 細胞 損傷을 防止할 수 있는지를 調査하였다.

肝組織에서 incubation에 따른 水銀의 細胞 損傷 效果와 胡桃藥鉞液의 影響을 調査하기 위해 0.5 mM 濃度の 水銀을 용액 내에 넣고 肝組織을 10 분에서 120 분 동안 incubation하여 LDH 流出 정도를 測定하였으며 (Fig. 1), 水銀의 細胞 損傷 效果가 脂質의 過酸化에 起因하는지를 確認하기 위하여 水銀에 의한 脂質의 過酸化를 incubation 시간에 따라 調査하였다 (Fig. 2). 그 結果 肝組織을 水銀에 露出시켰을 때 肝

細胞 損傷의 指標인 LDH 流出이 增加하고 유사한 정도로 水銀이 脂質의 過酸化를 誘發함으로써 水銀에 의한 肝組織 損傷이 脂質의 過酸化와 聯關되어 있을 가능성이 있으며, 水銀을 처리하는 용액 내에 胡桃藥鉞液을 첨가한 결과 水銀에 의해 增加되었던 LDH 流出과 脂質의 過酸化가 減少함으로써 胡桃藥鉞液이 肝組織에서 毒性物質인 水銀에 의한 細胞 損傷을 防止할 수 있음을 알 수 있는데, 이는 胡桃藥鉞液이 강력한 抗酸化 效果를 가지고 있으며 이러한 效果로 인해 肝組織에서 水銀에 의한 肝組織의 損傷을 防止하고 있음을 意味한다.

水銀의 濃度 變化에 따른 肝組織에서의 細胞 損傷 정도를 調査하기 위하여 組織을 여러 濃度の 水銀이 들어 있는 용액 내에 넣고 60 분 동안 露出시켰으며 (Fig. 3), 또한 胡桃藥鉞液의 濃度 變化에 따라 水銀에 의한 肝組織 損傷이 어떤 樣相을 보이는지 관찰하기 위하여 여러 濃度の 胡桃藥鉞液이 들어 있는 용액 내에서 水銀에 의한 LDH 流出을 測定하여 보았다 (Fig. 5). 그 結果 LDH 流出의 增加 현상이 현저하지 않은 0.1 mM에서도 脂質의 過酸化는 有意하게 增加하였으며, 水銀의 濃도가 더욱 增加함에 따라 脂質의 過酸化도 比例하여 增加하였는데, 이러한 結果는 水銀에 의한 脂質의 過酸化 정도가 낮을 때는 非可逆적인 細胞 損傷을 일으키지 못하나 脂質의 過酸化가 높을 때는 細胞 損傷이 脂質의 過酸化에 起因함을 意味하며, 水銀을 처리하는 용액 내에 胡桃藥鉞液을 0.1 % 되도록 첨가한 結果 脂質의 過酸化는 有意하게 減少하였다 (Fig. 4). 胡桃藥鉞液의 濃度 變化에 따라 肝組織의 損傷을 防止하는 效果가 脂質의 過酸化의 防止에도 유사하게 나타나는지를 確認하기 위하여 水銀에 의한 脂質의 過酸化에 대한 여러 濃度の 胡桃藥鉞液의 效果를 관찰한 結果 脂質의

過酸化는 胡桃藥鉍液의 濃度에 比例하여 減少되었다 (Fig. 6). 그러므로 胡桃藥鉍液이 水銀에 의한 細胞 損傷을 防止하는 것과 유사하게 脂質의 過酸化를 防止하였으며, 이러한 實驗 結果는 肝組織에서 胡桃藥鉍液이 水銀에 의한 細胞 損傷을 防止하는 效果가 脂質의 過酸化를 防止하는 작용에 起因하고 있음을 意味한다.

앞의 結果 (Fig. 4)에서 胡桃藥鉍液이 水銀에 의한 脂質의 過酸化를 防止하는 效果가 있음을 보였기 때문에 실제로 胡桃藥鉍液이 oxidant에 의한 細胞 損傷을 직접 防止할 수 있는지를 확인하기 위하여 유기 hydroperoxide인 tBHP에 의해 誘發된 細胞損傷 및 脂質의 過酸化에 대한 胡桃藥鉍液의 影響을 調査하였는데, 肝組織을 2 mM tBHP에 露出시켰을 때 細胞 損傷이 현저하게 誘發되었으며 여기에 0.1 % 胡桃藥鉍液을 첨가하였을 때 LDH 流出은 현저하게 減少되었다 (Fig. 7). tBHP에 의한 細胞損傷에 대한 胡桃藥鉍液의 效果를 抗酸化劑인 DPPD와 비교한 결과 20  $\mu$  M DPPD도 2 mM tBHP에 의한 LDH 流出을 거의 정상 수준 까지 減少시켰다. 또한 tBHP에 의한 細胞損傷이 脂質의 過酸化에 의해 誘發되며 胡桃藥鉍液이 脂質의 過酸化를 防止할 수 있는지를 調査한 結果, 肝組織을 2 mM tBHP에 露出시켰을 때 脂質의 過酸化가 增加하였으며 0.1 % 胡桃藥鉍液을 첨가하였을 때는 有意한 減少를 보였다 (Fig. 8).

細胞 내에 存在하는 抗酸化 효소로  $H_2O_2$ 를 分解하여 除去하는 작용을 가진<sup>34)</sup> catalase의 活性에 胡桃藥鉍液이 어떤 影響을 미치는지를 調査하기 위해 肝組織에 0.5 mM 水銀을 처리한 결과 효소의 活性에 有意한 減少를 보였으며, 여기에 0.1 % 胡桃藥鉍液을 첨가하였을 때 효소의 活性에 有意한 增加를 보였다. 그러나 抗酸化劑인 DPPD에 의해서는 有意한 變化를 보이지 않

았다 (Fig. 9).

胡桃藥鉍液이 peroxide를 분해시키는 강력한 內在性 抗酸化 효소<sup>34)</sup>인 glutathione peroxidase 活性에 어떤 影響을 주었는가를 調査하기 위해 肝組織에 0.5 mM 水銀을 처리했을 경우 효소의 活性이 抑制되었으며, 여기에 0.1 % 胡桃藥鉍液을 첨가하였을 때는 효소의 活性이 정상 수준까지 회복되었다. 그러나 강력한 抗酸化劑인 DPPD를 첨가하였을 경우에는 水銀에 의한 효소 活性의 抑制가 影響을 받지 않았다 (Fig. 10).

GSH는 여러 毒性物質에 의한 細胞損傷을 防止하는 解毒 效果를 나타낼 뿐만 아니라, 細胞 내에서 抗酸化劑 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있는데<sup>35, 36)</sup>, 胡桃藥鉍液이 毒性物質에 의한 細胞 損傷을 防止하는 작용이 細胞 내 GSH의 濃度を 變化시켜 나타나는지를 확인하기 위하여 水銀을 처리한 結果, 細胞 내 GSH 濃度は 현저히 減少하였으며 여기에 0.1 % 胡桃藥鉍液이 첨가되었을 때 有意한 增加를 보였다. 그러나 抗酸化劑인 DPPD를 처리했을 경우에는 有意한 變化를 보이지 않았다 (Fig. 11).

또한 形態學的인 變化에 있어서도 肝組織 切片을 60 분간 incubation 하였을 때 水銀에 의한 形態學的인 變化를 胡桃藥鉍液이 防止하고 있음을 보이고 있다 (Fig. 12).

본 實驗 結果, 水銀 및 tBHP가 肝組織에서 LDH 流出 및 脂質의 過酸化를 增加시켰고 胡桃藥鉍液이 이러한 增加를 防止하였다. 이러한 結果만으로 볼 때는 胡桃藥鉍液이 抗酸化 作用을 통해 細胞 損傷을 防止한 것으로 解析될 수도 있다. 하지만 水銀에 의한 LDH 流出 및 脂質의 過酸化가 강력한 抗酸化劑인 DPPD에 의해 抑制되지 않았으므로 水銀이 脂質의 過酸化를 誘發하여 細胞 損傷을 나타내었다고 보기 힘들며 이러한 脂質의 過酸化는 細胞 損傷의 原因이기

보다 細胞 損傷으로 인해 나타난 結果일 可能性이 크다. 따라서 胡桃藥鍼液이 水銀에 의한 肝細胞 損傷을 防止하는 機轉은 細胞 내 GSH 含量을 增加시켜 毒性物質에 대한 防禦 機能을 增大시키거나 細胞 내 反應性酸素基를 직접 除去하는 抗酸化 효소들의 活性 增加에 起因할 可能性을 보였다. 그러므로 胡桃藥鍼液이 肝組織에서 抗酸化 작용을 통해 毒性 物質에 의한 細胞 損傷을 防止하는 效果는 內在性 抗酸化 효소의 活性 增加와 抗酸化 物質의 濃도를 增加시켜 나타날 可能性을 暗示하고 있으며 胡桃藥鍼液의 이러한 抗酸化 作用은 잘 알려진 抗酸化劑인 DPPD와는 다르게 나타났다.

以上の 實驗 結果로 미루어 胡桃藥鍼液은 毒性物質에 의한 肝組織의 酸化的 損傷을 防止함으로써 藏血·罷極·邪氣로부터의 防禦·疏泄 등 肝의 生理的 機能이 正常的으로 維持될 수 있도록 할 수 있으며, 反應性酸素基들로 인한 老化의 進行과 기타 여러 가지 疾病의 發生을 抑制할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 胡桃藥鍼液의 이러한 效果가 나타나게 되는 正確한 機轉은 앞으로 더욱 研究가 進行되어야만 밝혀질 것으로 생각된다.

## V. 結 論

胡桃藥鍼液이 水銀에 의한 肝組織 細胞 損傷에 어떤 效果를 가지고 있는지를 確認하기 위하여 肝組織에 水銀 및 tBHP를 처리하여 細胞 損傷을 誘發시키고 이에 대한 胡桃藥鍼液의 影響을 觀察한 결과, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 胡桃藥鍼液은 0.5 mM의 水銀을 처리한 肝組織 切片에서 incubation 時間에 따라 增加된 LDH 流出 및 脂質의 過酸化를 有意하게 抑制하였다.
2. 胡桃藥鍼液은 肝組織 切片을 60 분간

incubation 시켰을 때 水銀의 濃도에 따라 增加된 LDH 流出 및 脂質의 過酸化를 有意하게 抑制하였다.

3. 胡桃藥鍼液은 0.1~1 % 범위에서 0.5 mM 水銀에 의한 LDH 流出 및 脂質의 過酸化를 有意하게 抑制하였으며, 특히 0.5~1% 濃도에서는 正常 水準까지 有意하게 抑制하였다.
4. 胡桃藥鍼液은 tBHP에 의한 LDH 流出 및 脂質의 過酸化를 抑制하였으며, 특히 0.1 % 胡桃藥鍼液은 LDH 流出에 대하여 抗酸化劑인 DPPD 20  $\mu$  M 效果와 類似하였다.
5. 胡桃藥鍼液은 0.5 mM 水銀을 처리한 肝組織에서 減少된 catalase와 glutathione peroxidase의 活性和 GSH 濃도를 有意하게 회복시켰으나 DPPD는 影響을 미치지 못하였다.
6. 胡桃藥鍼液은 水銀 처리에 의해 誘發된 形態學的인 損傷을 防止하였다.

## 參 考 文 獻

1. 辛民教. 臨床本草學. 서울 : 永林社. 1997 : 233-4.
2. 金永海, 金甲成. 胡桃藥鍼液의 抗酸化效果에 對한 研究 II, Oxidant에 의한 細胞損傷을 防止하는 機轉. 大韓鍼灸學會誌, 1996 ; 13(2) : 54-66.
3. 姜亨定. 胡桃水鍼이 家兔 腎臟의 抗酸化酵素 活性에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌, 1998 ; 15(1): 473-81.
4. 姜斗熙. 生理學. 서울 : 新光出版社. 1988 : 11章 53-8.
5. 洪元植 編纂. 精校黃帝內經 素問. 서울 : 東洋醫學研究院出版部. 1985 : 34-6.
6. 洪元植 編纂. 精校黃帝內經 靈樞. 서울 : 東洋醫

- 學研究院出版部. 1985 : 69.
7. Nielsen JB, Andersen O. Disposition and retention of mercuric chloride in mice after oral and parenteral administration. *J Toxicol Environ Health*. 1990 ; 30 : 167-80.
  8. Zalups RK. Progressive losses of renal mass and the renal and hepatic disposition of administered inorganic mercury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1995 ; 130 : 121-31.
  9. Goyer RA. Toxic effects of metals. In : Amdur MO, Doull J, Klassen CD. Casarell and Doull's toxicology : The basic science of poisoning, 4th ed. New York : Pergmon Press. 1991 : 629-81.
  10. Bohets HH, van Thielen MN, van der Biest I, van Landeghem GF, D'Haese PC, Nouwen EJ, DeBroe ME, Dierickx PJ. Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK<sub>1</sub>, MDCK and human proximal tubular cells. *Kid Int*. 1995 ; 47 : 395-403.
  11. Clarkson TW. The pharmacology of mercury compounds. In: Elliott HW, Okun R, George R. Annual Review of Pharmacology. California : Annual Reviews INC. 1972 : Vol 12 375-406.
  12. Yonaha M, Ohbaushi Y, Ichinose T, Sagai M: Lipid peroxidation stimulated by mercuric chloride and its relation to the toxicity. *Chem Pharm Bull*. 1982 ; 30 : 1437-42.
  13. Fukino H, Hirai M, Hsueh YM, Yamane. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984 ; 73 : 395-401.
  14. LeBel CP, Ali SF, McKee SFA, Bondy SC. Organometal-induced increases in oxygen reactive species : The potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990 ; 104 : 17-24.
  15. Stacey NH, Kappus H. Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury. *Toxicol appl Pharmacol*. 1982 ; 63 : 29-35.
  16. Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D. Renal oxidant response induced by mercury. *Kid Int*. 1996 ; 50 : 1031-43.
  17. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978 ; 86 : 271-8.
  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 : 248-524.
  19. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*. 1985 ; 113 : 548-54.
  20. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984 ; 105 : 121-6.
  21. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984 ; 105 : 114-21.
  22. 金秉雲, 禹弘楨, 金德鎬 등 編. 肝系內科學. 서울 : 東洋醫學研究院出版部. 1989 : 24-30.
  23. 孫思邈. 備急千金要方. 北京 : 人民衛生出版社 1982 : 467.
  24. 顏正華 主編. 中藥學. 北京 : 人民衛生出版社. 1991 : 779-81.
  25. Chang LW, Gilbert M, Sprecher J. Modification of methylmercury neurotoxicity by

- vitamin E. *Environ Res.* 1978 ; 17 : 356-66.
26. Sarafian T, Verity MA. Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity. *Int J Neurosci.* 1991 ; 9 : 147-53.
27. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 1990 ; 4 : 2587-97.
28. Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Jaseschke H. The 21-aminosteroid tirilazad mesylate protects against liver injury via membrane stabilization not inhibition of lipid peroxidation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 ; 277 : 714-20.
29. Zar HA, Pretto EA. Posts ischemic hepatic lipid peroxidation, monitored by chemiluminescence, depends on duration of ischemia. *Transplant Proc.* 1996 ; 28 : 2980-2.
30. Yamaguchi T, Terakado M, Horio F, Aoki K, Tanaka M, Nakajima H. Role of bilirubin as an antioxidant in an ischemia-reperfusion of rat liver and induction of heme oxygenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 ; 223 : 129-35.
31. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatogastroenterology.* 1996 ; 43 : 898-905.
32. Karwinski W, Soreide O. Allopurinol improves scavenging ability of the liver after ischemia/reperfusion injury. *Liver.* 1997 ; 17 : 139-43.
33. Pahan K, Smith BT, Singh AK, Singh I. Cytochrome P-450 2E1 in rat liver peroxisomes : downregulation by ischemia/reperfusion-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1997 ; 23 : 963-71.
34. Ross D, Moldeus P. Antioxidant defence systems and oxidative stress. In: Vignani P. *Membrane Lipid Oxidation.* Boston : CRC Press. 1993 : Vol II 151-70.
35. Meister A and Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983 ; 52 : 711-60.
36. Starke PE, Farber JL. Endogenous defence against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1985 ; 260 : 86-92.