

五子丸의 Peroxynitrite 제거 작용

김형준, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Peroxynitrite Scavenging Mechanism of *Ojawhan*

Hyung-Joon Kim, Ji-Cheon Jeong

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : Peroxynitrite (ONOO⁻), formed from the reaction of $\cdot O_2^-$ 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. Due to the lack of endogenous enzymes to thwart ONOO⁻ activation, developing a specific ONOO⁻ scavenger is remarkably important. The aim of this study was to investigate scavenging activities of ONOO⁻ and its precursors, NO and $\cdot O_2^-$ and its scavenging mechanism of *Ojawhan*.

Methods : To investigate scavenging activities of ONOO⁻, NO, $\cdot O_2^-$ and its scavenging mechanism using fluorescent probes, DCFDA, DAF-2 and DHR 123. The ONOO⁻ scavenging activity on *Ojawhan* was assayed by measuring oxidized dihydrorhodamine 123 (DHR 123) by fluorometry. Oxidative stress was induced by strong oxidants *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP). Endothelial cell (YPEN-1) was used for detection of intracellular oxidative stress.

Results : *Ojawhan* markedly scavenged authentic ONOO⁻, $\cdot O_2^-$ and NO. It also inhibited ONOO⁻ induced by $\cdot O_2^-$ and NO which are derived from SIN-1. Furthermore, *Ojawhan* blocked lipopolysaccharide (LPS)-induced ONOO⁻, $\cdot O_2^-$ and NO generation utilizing kidney homogenates of LPS-injected mouse and inhibited *t*-BHP-induced ROS and ONOO⁻ in endothelial cell culture system.

Conclusions : These results suggest that *Ojawhan* be developed as an effective ONOO⁻ scavenger for the prevention of ONOO⁻ involved diseases and age-related diseases.

Key Words: Peroxynitrite, Scavenging Mechanism, *Ojawhan*, *t*-butylhydroperoxide(*t*-BHP)

1. 緒 論

최근 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 과 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)에 의한 oxidative stress가 노화 및 노인성 질환의 발생 과정에 관여한다는 것이 잘 알려져 있다^{1,2}. NO는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성산소들과 반응할 수 있으며, 특히 $\cdot O_2^-$ 와 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성

한다³. 산화 스트레스 가설에 의하면 활성질소·산소가 세포 및 조직 손상을 초래하여 노화 과정을 촉진한다고 하였으며¹, 최근 노화의 엄중 가설에 의하면 이 때 생성되는 ONOO⁻가 노화의 주범이라고 제안하였다⁴.

ONOO⁻는 NO와 $\cdot O_2^-$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 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

· 접수 : 2005. 1. 20 · 채택 : 2005. 2. 18
· 교신저자 : 정지천, 경북 경주시 용강동 동국대학교
경주한방병원 2내과
(Tel. 054-770-1254 Fax. 054-773-8493
E-mail : jjcjh@paran.com)

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 ONOO⁻의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 당뇨병, 심근장애, 패혈증, 고혈압, 피부염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다³⁻⁷.

이러한 ONOO⁻를 제거하는 scavenger로 selenium을 포함하는 D-(-)- penicillamine과 ebselen 등이 알려져 있다. 인체 내에는 ONOO⁻를 불활성화시킬 수 있는 제거 효소가 밝혀져 있지 않으므로 한약재로부터 ONOO⁻ 제거 활성을 탐색하는 것은 노화과정 뿐만 아니라 노인성 질환을 조절하는데 큰 의의가 있다.

五子丸은 ONOO⁻를 제거하여 노화를 조절하는 약물을 개발하고자 식물의 종자들로 구성된 五子衍宗丸에서 車前子 대신 女貞子를 넣은 처방이다. 五子衍宗丸은 <丹溪心法>⁸에 “治男人精虛無子 陽事不舉”라고 수록된 이래 補肝腎陰 助補腎陽 益精髓 등의 효능으로 腎陰과 腎陽의 부족으로 인한 陰損陽虛, 陽痿早泄, 男子無嗣 등의 치료에 활용되어 왔다⁹⁻¹¹. 이전의 연구에 의하면 五子衍宗丸은 흰쥐에서 성호르몬을 증가시키고 항피로 효과를 나타내었고¹², 노화 흰쥐의 뇌조직을 개선시키는 효과를 나타내었으며¹³, 노쇠에 대한 임상 관찰이 보고되었다¹⁴. 女貞子は 肝腎의 陰氣를 補하여 久服肥健 輕身不老의 효능이 있어 延年益壽 약물에 속하는데^{15,16}, ROS, ONOO⁻, t-BHP 및 HNE 등의 산화 스트레스에 대하여 강한 억제 작용을 나타내어 세포사를 억제하고 노화를 조절할 가능성이 제기된 二至丸¹⁷의 구성 약물이다.

본 연구에서는 五子丸이 노화 조절에 유효한지 탐색하고자 ONOO⁻ 소거 작용과 lipopolysaccharide (LPS) 처리로 유도한 활성산소·질소 생성계에서 ONOO⁻ 및 그 전구체들의 제거 활성에 대하여 검토

하고, t-butylhydroxypoxide (t-BHP)에 의한 세포 손상에 대하여 방지 효과를 나타내는 지를 조사하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

五子丸의 구성 약물인 枸杞子, 菟絲子, 覆盆子, 女貞子 및 五味子를 시중에서 구입하고 정선하여 사용하였으며, 처방 내용은 다음과 같다.

Prescription of *Ojawhan*

약명	생약명	중량
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	100 g
菟絲子	<i>Cuscutae Semen</i>	100 g
覆盆子	<i>Rubi Fructus</i>	100 g
女貞子	<i>Ligustri Fructus</i>	100 g
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	100 g
		계 500 g

2) 시약

3-Morpholinodisodnonine (SIN-1), DL-peniallamine은 Sigma chemical Co. (ST. Louis, MO, USA)에서, dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서, ONOO⁻은 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서, 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 Daiichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

3) 동물

생후 6주령된 체중 25g 내외의 ICR계 웅성 mouse를 24±1℃, 50±10% 습도에서 사육하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

五子丸 500g을 잘게 분쇄하고 3배 량의 95%

methanol을 가하여 60℃에서 증탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 추출액을 실온으로 냉각시킨 후 여지로 여과한 여액을 회전 감압 농축기를 사용하여 건조시켜 추출물을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) ONOO⁻ 측정법

Kooy 등의 방법¹⁸에 의해 ONOO⁻ 제거능을 측정하였다. 96 well microplate에 五子丸추출물을 취하고, 90 nM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 μM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액 (pH 7.4)을 가한다. 그리고 10 μM ONOO⁻를 첨가한 후, 형광 광도를 이용하여 여기파장 500 nm와 방출파장 536 nm에서 측정하였다.

3) 활성산소 측정법

DCFDA assay¹⁹로 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, 여기파장 485 nm 및 방출파장 530 nm에서 Fluorescence Microplate reader (FL 500, Bio-Tex instruments)로 측정하였다. 이 때 활성산소 생성원으로 총활성산소 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 녹

아 있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1:400배로 희석하였다. NO 제공 물질인 sodium nitroprusside (f.c. 2 mM)와 DAF-2 (f.c. 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 485 nm와 방출파장 530 nm에서 측정하였다²⁰.

5) LPS 처리 마우스에서 ·O₂⁻, NO 및 ONOO⁻ 억제 활성 측정

마우스에 LPS (5 mg/kg)를 처리하여 활성산소·질소 생성계를 유도한 다음 신장을 적출하여 조직을 균질화하고 五子丸추출물을 처리한 후에 DCFDA를 처리하고 형광광도계 (여기파장 490 nm / 방출파장 520 nm)로 형광을 측정하여 활성산소 생성계에 미치는 영향을 검토하였다¹⁹. 또한 DHR 123을 처리한 후 여기파장 500 nm / 방출파장 536 nm에서 형광을 측정하여 ONOO⁻ 제거능¹⁸을, DAF-2를 처리하여 여기파장 485 nm / 방출파장 530 nm에서 NO 제거능²⁰을 평가하였다.

6) 혈관 내피세포에서 ROS와 ONOO⁻ 소거능의 현미경적 분석

흰쥐 혈관내피세포인 YPEN 세포를 10 cm culture dish (Corning Co., New York, USA.)에서 DMEM 배지에 배양하였고, 사용한 배지에는 5% heat-inactivated fetal calf serum, glutamine (5.84 mg/ml), amphotericin B (0.25 μ/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, 2-3일에 1회씩 subculture하여 세포주를 유지하였다. 세포를 5% heat-inactivated fetal calf serum을 함유한 DMEM에 8×10⁴ cells/ml의 밀도가 되게 12-well plates에 seeding하고 다음날, serum free media로 배지를 갈아준 뒤 t-BHP 혹은 10, 50, 100 μM의 二至丸을 농도별로 함께 처리하

여 1-4시간 더 배양하였다. 세포내 생성된 ROS와 ONOO⁻ 는 형광현미경 (Zeiss Co., Japan)을 통해 분석하였다.

7) 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

五子丸추출물이 ONOO⁻ 자체에 대하여 직접 제거 활성을 나타내는 지를 검토한 결과 2, 10, 50 μg/ml 농도에서 각각 12, 23, 60%의 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 ·O₂⁻의 상호 작용

에 의해 생성되는 ONOO⁻ 생성 억제 작용을 검토해 본 결과 五子丸추출물 2, 10, 50 μg/ml 농도에서 각각 37, 67, 89%의 억제 활성을 나타내어 ONOO⁻ 생성 억제 활성도 관찰되었다(Fig. 2).

3. SNP에 의해 생성되는 NO 제거 활성

ONOO⁻의 전구체인 NO 제거능을 검토한 결과, 五子丸추출물 2, 10, 50 μg/ml 농도에서 각각 12, 55, 79%의 억제 활성을 나타내어 기존 NO의 제거제인 carboxy-PTIO보다는 약하지만 비교적 강한 NO 제거능을 나타내었다(Fig. 3).

4. SIN-1에 의해 생성되는 ·O₂⁻ 제거 활성

ONOO⁻의 또 다른 전구체인 ·O₂⁻ 제거능을 검토한 결과, 五子丸추출물 2, 10, 50 μg/ml 농도에서 각각 19, 43, 74%의 제거 활성을 나타내어 기존 ·O₂⁻ 제거제인 trolox보다는 약하지만 ·O₂⁻ 제거 활성을 어느 정도 나타내어 五子丸이 ONOO⁻ 및 NO뿐만 아니라, ·O₂⁻도 제거함을 알 수 있었다(Fig. 4).

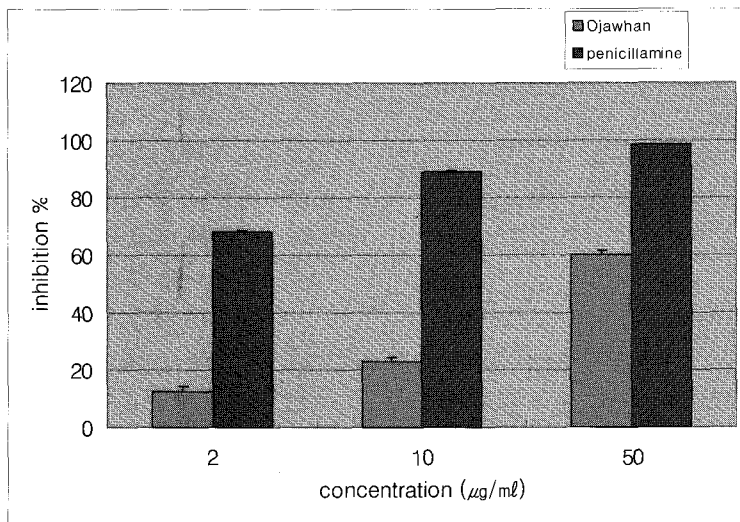


Fig. 1. ONOO⁻ scavenging activity of *Ojawan*.

Each value is the mean±S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by authentic ONOO⁻ (10 uM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

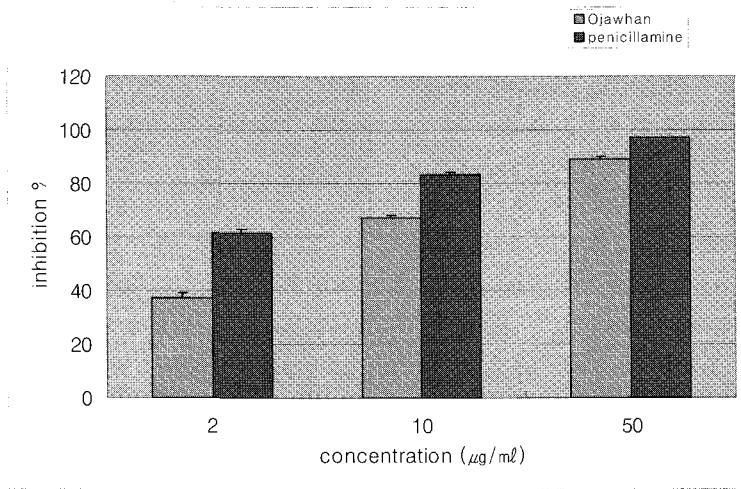


Fig. 2. Effect of *Ojawan* on SIN-1-derived ONOO⁻ generation.

Each value is the mean±S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by SIN-1 (20 µM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

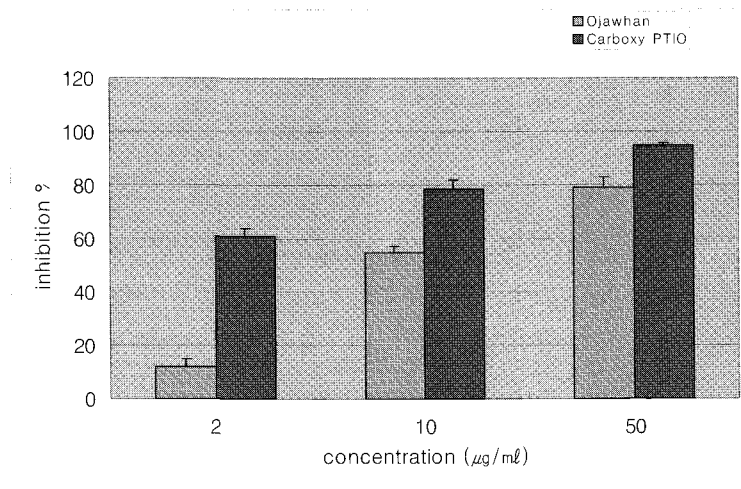


Fig. 3. Effect of *Ojawan* on sodium nitroprusside-derived NO generation.

Each value is the mean±S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by sodium nitroprusside (2 mM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

5. LPS로 유도된 $\cdot O_2^-$, NO 및 ONOO⁻ 생성에 미치는 영향

五子丸추출물은 2, 10, 50 µg/ml 농도에서 ONOO⁻ 생성을 각각 5, 18, 36% 억제하였고(Fig.

5), 총활성산소 생성을 각각 20, 37, 58% 억제하였다(Fig. 6). 또한 NO 생성에 대하여 각각 7, 27, 60% 억제하여 표준물질인 Carboxy PTIO와 거의 유사한 활성을 나타내었다(Fig. 7).

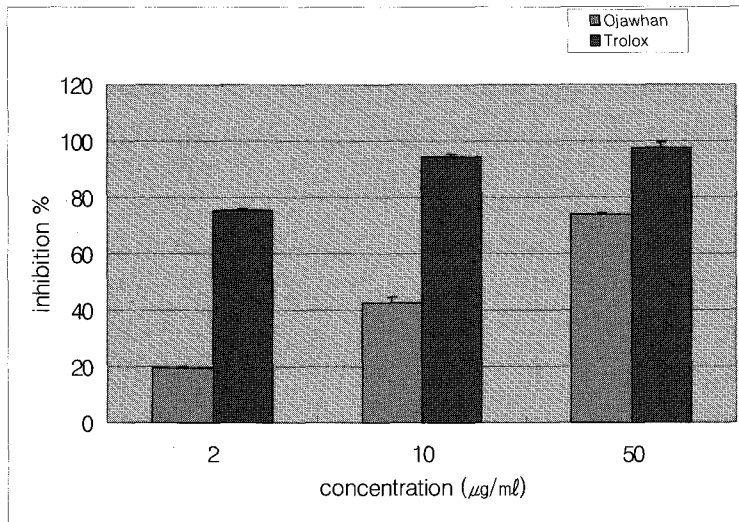


Fig. 4. Effect of *Ojawan* on SIN-1-derived $\cdot O_2^-$ generation.

Each value is the mean \pm S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by SIN-1 (20 μM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

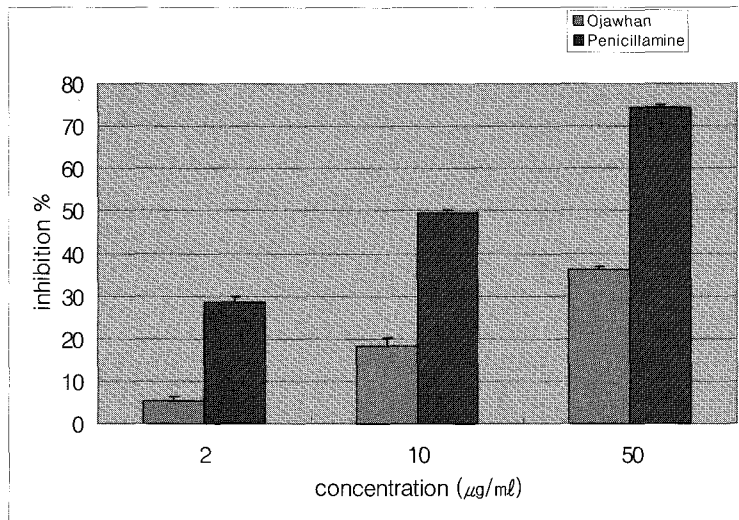


Fig. 5. Inhibition of ONOO⁻ generation by *Ojawan* in LPS-treated ICR mouse kidney homogenate.

Each value is the mean \pm S.E. of three experiments. ONOO⁻ generation from LPS-challenged mouse kidney homogenate was determined by the change of fluorescence every 5 min for 30 min using DHR 123 fluorescent probe.

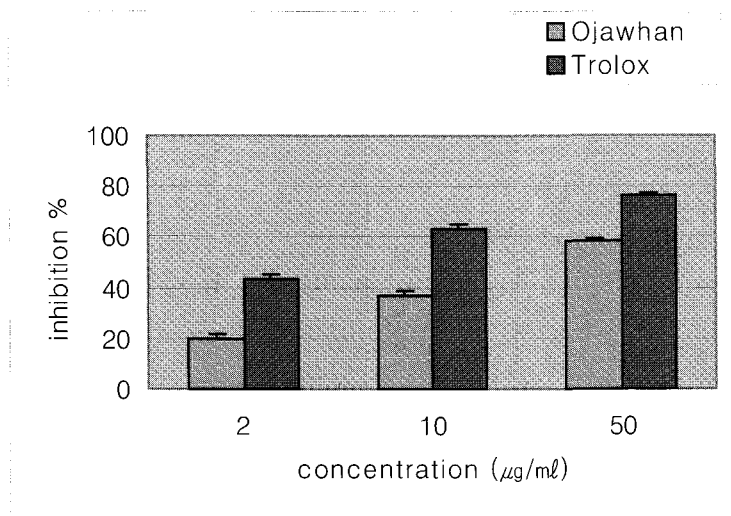


Fig. 6. Inhibition of ROS generation by *Ojawhan* in LPS-treated ICR mouse kidney homogenate.

Each value is the mean±S.E. of three experiments. ROS generation from LPS-challenged mouse kidney homogenate was determined by the change of fluorescence every 5 min for 30 min using DCFDA.

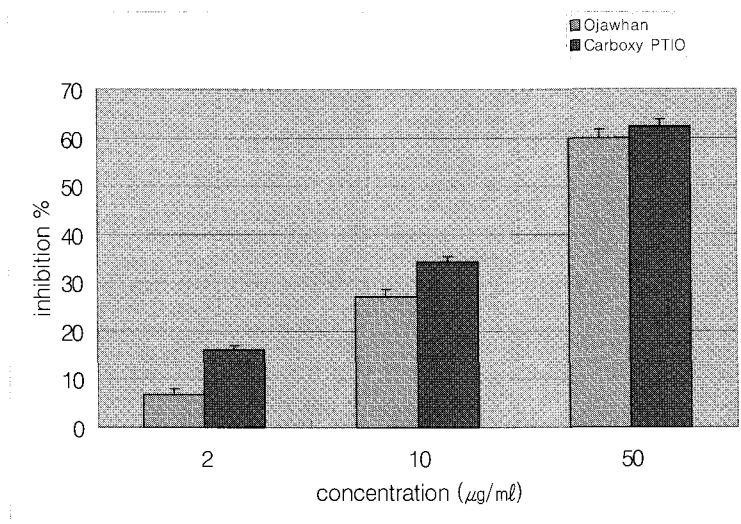


Fig. 7. Inhibition of NO generation by *Ojawhan* in LPS-treated ICR mouse kidney postmitochondria.

Each value is the mean±S.E. of three experiments. NO generation from LPS-challenged mouse kidney homogenate was determined by the change of fluorescence every 5 min for 30 min using DAF-2.

6. 혈관 내피세포에서 *t*-BHP에 의해 유도된 ROS 및 ONOO⁻ 생성에 미치는 영향

혈관 내피세포에서 *t*-BHP에 의해 ROS 생성이 대조군에 비하여 증가되었으나, 五子丸을 2, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 경우에 농도 의존적으로 감소되었다.

특히, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군은 대조군 수준 이하로 감소되었다(Fig. 8). 또한 *t*-BHP에 의해 ONOO⁻ 생성도 대조군에 비하여 현저히 증가되었으나, 五子丸을 2, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리한 군에서 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 9).

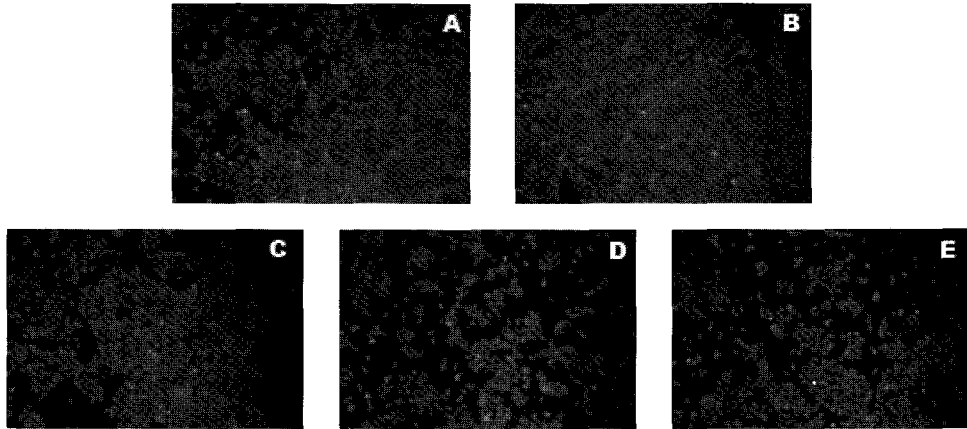


Fig. 8. The suppression of intracellular ROS generation by *Ojawan* in *t*-BHP-stimulated cell.

YPEN cells grown to subconfluence on 6 well plate were incubated with serum free medium containing *t*-BHP and *Ojawan*. Following stimulation for 3hr, cells were washed with PBS, incubated with 10 μM DCFDA for an additional 10 min, and mounted in the microscope stage. The morphological analysis performed with fluorescence microscopy. A : untreated control, B : 10 μM *t*-BHP, C : 10 μM *t*-BHP + 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Ojawan*, D : 10 μM *t*-BHP + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Ojawan*, E : 10 μM *t*-BHP + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Ojawan*.

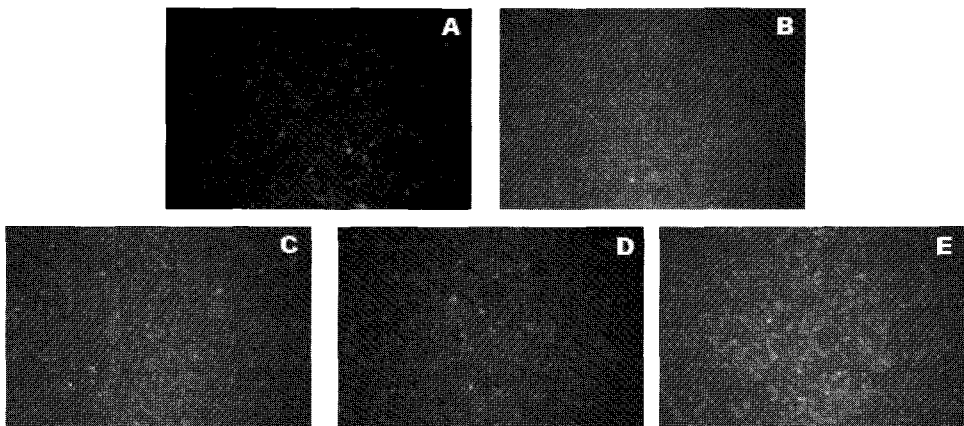


Fig. 9. The suppression of intracellular ONOO⁻ generation by *Ojawan* in *t*-BHP-stimulated cell.

YPEN cells grown to subconfluence on 6 well plate were incubated with serum free medium containing *t*-BHP and *Ojawan*. Following stimulation for 3hr, cells were washed with PBS, incubated with 5mM DHR123 for an additional 10 min, and mounted in the microscope stage. The morphological analysis performed with fluorescence microscopy. A : untreated control, B : 10 μM *t*-BHP, C : 10 μM *t*-BHP + 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Ojawan*, D : 10 μM *t*-BHP + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Ojawan*, E : 10 μM *t*-BHP + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Ojawan*.

IV. 考 察

五子丸은 腎陰과 腎陽의 부족으로 인한 陰損陽虛, 陽痿早泄, 男子無嗣 등의 치료에 활용되고 있는 五子衍宗丸에서 市前子 대신 女貞子를 넣은 처방이다. 女貞子는 肝腎의 陰氣를 補하는 延年益壽약물로서 久服肥健 輕身不老의 효능이 있어^{15,16}, 補腎 효능이 더욱 강화될 것으로 여겨진다. 腎陰은 一身의 陰液의 근본으로서 濡潤, 滋養作用을 하며, 腎陽과 더불어 生長發育과 生殖을 주관한다^{21,22}. 그러므로 <內經 素問>²³에 ‘天壽過度 氣脈常通 而腎氣有餘也’, 虞²⁴는 ‘腎元盛則壽延 腎元衰則壽夭’라고 하여 長壽하는 것은 腎氣의 盛衰與否에 의하여 결정된다고 하였으니 腎氣虛衰는 老化的 重要 原因이다¹⁵. 따라서 五子丸이 老化 과정과 노인성 질환 및 여러 만성 질환들과 밀접한 관계를 가지고 있는 ONOO⁻를 제거하는 작용이 있는지를 검토하고자 하였다.

구성 약물에 대한 性味, 歸經 및 효능을 살펴보면 枸杞子는 甘平한 性味로 肝, 腎經에 歸經하고 滋補 肝腎, 益精明目 등의 효능이 있으며, 菟絲子는 辛甘平한 性味로 肝, 腎經에 歸經하고 補肝腎, 益精髓 등의 효능이 있다. 覆盆子는 甘酸平한 性味로 肝, 腎經에 歸經하고 補肝腎, 澀精縮尿 등의 효능이 있으며, 五味子는 酸溫한 性味로 肺, 腎經에 歸經하고 斂肺滋腎, 生津澀精 등의 효능이 있고, 女貞子는 甘苦涼한 性味로 益肝腎 安五臟 強腰膝 明目烏鬚 髮 등의 효능이 있다^{25,26}.

五子丸의 구성 약물의 주요 성분을 살펴보면 枸杞子는 betaine, rutin, kukoamine A, β -sitosterol 등이 있다. Betaine은 간장과 위장의 기능 촉진, 동맥 경화와 고혈압 예방, 근골 강화와 빈혈 예방 효과를 나타내는데, coline이 산화되어 betaine aldehyde가 되고 이것이 다시 산화되면서 인체에 중요한 생리 기능을 가진 methyl기의 공급원인 betaine이 된다. Rutin은 황색 또는 담황색의 polyphenol 화합물인 flavonoid의 일종으로 quercetin에 rutinoside가 결합된 물질로서 혈당과 혈청 콜레스테롤 저하 효과가 강해 성인병 예방에 좋다. Kukoamine A는 地骨皮

에서 분리한 성분으로 고fructose를 급여하여 고혈압을 유도한 쥐에 대하여 혈압을 강하시키고 체온 강하작용과 해열작용이 있다. β -sitosterol은 콜레스테롤의 흡수 억제 효과가 뛰어나 전립선비대의 치료, 고지단백 형성 억제 등의 효과가 있어 콜레스테롤 및 고지방에 의한 성인병의 치료 및 예방 효과가 있다²⁷.

覆盆子의 유효 성분은 열매에는 탄수화물, 유기산, 비타민, 색소 성분, 기타 미량 성분 등이 들어 있고, 탄수화물로는 포도당(43%), 과당(8%), 서당(6.5%), 펙틴, 탄닌, 찌아니딘클로리드, 아세토인, 벤즈알데히드, 점액, 트리테펜 배당체 등이 들어 있다. 유기산으로는 레몬산, 사과산, 포도주산, 살리실산, 카프론산, 개미산, 아스코르빈산 등이 들어 있다. 비타민으로는 비타민 B, C가 들어 있다. 색소 성분으로는 카로틴과 폴리페놀, 안토시안, 염화시아닌 배당체, 벤즈알데히드 등이 들어 있다. 열매의 탄닌 성분은 함암 효과가 있어 암을 예방하고 폴리페놀이 다량 함유되어 항산화 작용이 있어 노화를 방지한다. 사포닌은 거담, 진해, 콜레스테롤 대사를 촉진하고 시스토테롤은 강심, 이뇨, 담즙 분비를 촉진한다²⁷.

五味子는 Schizandrin, Gomisin A~Q, Citral, α -Ylangene, Citric acid, Malic acid, β -chamigrene 등을 주요 성분으로 가지며 중추신경 조절작용, 동맥경화 억제, 혈당 저하, 저혈압 치료, 간염 치료 등의 임상실험에서 뚜렷한 효과를 나타내었다²⁷.

女貞子는 오레아놀산, 만니톨, 포도당, 팔리틴산, 스테아린산, 올레인산, 리놀레인산이 들어 있다. 열매껍질에는 올레아놀산, 아세틸올레아놀산, 우르솔산이 들어 있다. 올레아놀산 성분은 간보호 작용, 강심이노 작용을 일정하게 나타내고 화학요법이나 방사선 치료 후에 감소된 백혈구를 증가시키는 작용을 나타낸다²⁸.

ONOO⁻는 NO와 $\cdot O_2$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 미토콘드리아의 호흡억제, 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 ONOO⁻의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다^{7,29,30}. 이와같이 ONOO⁻는 노인성 질환 및 만성 질환에 중요한 발병요인으로 주목받고 있는 매우 산화력이 강한 내인성 독성물질이다.

생체 내에서 NO와 $\cdot O_2$ 가 동시에 발생하는 조건에서 라디칼-라디칼 반응으로 쉽게 비라디칼인 ONOO⁻가 생성된다. 이 $\cdot O_2$ 는 강력한 산화력을 나타내며 세포 구성 성분들을 변성시키는데 그 기전으로 -SH기의 산화, 지질과산화, 방향족 아민의 니트로화 등을 들 수 있다. 노화과정에서 염증 반응이 지속적으로 일어남으로써 활성산소의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 NO의 대량 생성이 ONOO⁻ 생성을 더욱 증가시켜, 세포 및 조직 손상을 가져와 여러 노인성 질환을 촉진한다고 하였다³¹.

五子丸의 ONOO⁻를 제거하는 능력을 ONOO⁻과 특이하게 반응하여 형광을 내는 DHR 123을 이용하여 측정된 결과, 五子丸 추출물이 ONOO⁻ 자체를 강력히 제거할 뿐만 아니라, SIN-1에 의해 생성되는 $\cdot O_2$ 와 NO에 의해 만들어지는 ONOO⁻에 대해서도 강력하게 제거하는 활성이 관찰되었다. 또한 ONOO⁻의 전구체인 $\cdot O_2$ 와 NO에 대하여 五子丸이 직접 제거하는 작용이 있는지를 검토한 결과, 五子丸은 $\cdot O_2$ 와 NO를 제거하는 활성을 나타내었다. 따라서 五子丸의 ONOO⁻ 억제능에는 ONOO⁻를 직접 제거하는 활성과 $\cdot O_2$ 와 NO를 각각 제거하는 능력을 가지고 있으므로 ONOO⁻ 축적을 억제할 것으로 사료된다.

LPS로 활성산소 및 질소 생성계를 유도한 신장 의 균질액에서도 五子丸은 ONOO⁻ 및 그 전구체인 $\cdot O_2$ 와 NO 생성을 억제하였다. 이상에서 보는바와 같이 五子丸은 ONOO⁻를 직접 제거할 뿐만 아니라 생성을 억제하고, 그 전구체인 활성산소와 활성 질소에 대하여도 직접 제거하고 생성을 억제하므로

효과적으로 ONOO⁻ 제거 및 억제 활성을 나타내다고 사료된다.

특히 五子丸은 SIN-1에 의해 생성되는 $\cdot O_2$ 나 SNP에 의해 생성되는 NO를 제거하는 능력보다 LPS로 유도된 $\cdot O_2$ 와 NO 억제능이 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 이것은 五子丸이 $\cdot O_2$ 와 NO 제거보다는 오히려 $\cdot O_2$ 생성계 효소인 xanthine oxidase, cyclooxygenase, NADPH oxidase 등이나 NO 생성계 효소인 NOS에 대한 저해 작용도 가질 가능성이 시사된다.

혈관 내피세포에서 五子丸이 t-BHP에 의해 생성되는 ROS와 ONOO⁻ 억제능이 있는지를 현미경을 통해 관찰한 결과 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다. ROS의 경우 五子丸 처리에 의해 대조군 이하로 제거되는 경향을 보여, 혈관 내피세포에서 五子丸의 ROS 제거 효과가 크게 나타남을 알 수 있었다.

이상의 실험 결과로 五子丸은 ONOO⁻와 그 전구체인 $\cdot O_2$ 와 NO를 제거하는 효과를 나타내므로 노화 과정 및 노인성 질환을 조절하는데 유효한 약제가 될 가능성을 시사해 준다. 아울러 五子丸의 구성 약물 속에 함유되어 있는 다양한 성분들이 항산화 효과를 나타내어 활성에 주된 역할을 하리라 추측된다.

V. 結 論

노화 과정 및 노인성 질환에 중요한 역할을 하는 ONOO⁻에 대한 제거능 및 ONOO⁻의 전구체인 $\cdot O_2$ 와 NO에 대한 五子丸의 소거능을 검토함으로써 그 기전을 살펴보았다. 五子丸은 ONOO⁻를 농도 의존적으로 직접 소거하였고, SIN-1에 의해 생성되는 $\cdot O_2$ 와 NO에 의해 생성되는 ONOO⁻도 억제하였다. 五子丸은 SIN-1에 의해 생성되는 $\cdot O_2$ 와 sodium nitroprusside에 의해 생성되는 NO에 대하여도 효과적으로 소거하였다. 五子丸은 마우스에서 LPS에 의해 유도된 ONOO⁻ 및 그 전구체인 NO와 $\cdot O_2$ 를 효과적으로 억제하였다. 혈관내피세포 배양

계에서 *t*-BHP에 의한 ROS 및 ONOO의 생성을 五子丸이 농도 의존적으로 억제하였다. 이상의 결과로서 五子丸은 ONOO를 효과적으로 소거하여 노화 및 노인성 질환의 조절 약물로 작용할 가능성이 시사되었다.

參考文獻

1. Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med.* 1996;21:651-68.
2. 平田結善緒. NO and NOS. 内分泌, 糖尿病科. 1996;2:207-14.
3. Carr AC. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1716-23.
4. 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.
5. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Chio JS, Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Micro Res Techniq.* 2002;59:264-72.
6. Haenen GPMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236:591-6.
7. 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.
8. 朱丹溪. 丹溪心法 (附錄). 서울: 대성문화사; 1990, p.763-70.
9. 李 梴. 醫學入門 (傷寒雜病編). 서울: 대성문화사; 1990, p.416.
10. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울: 남산당; 1989, p.603.
11. 廬祥之 編著. 益壽延年二百方. 北京: 中國中醫藥出版社; 1991, p.168.
12. 정인명, 강석봉. 五子衍宗丸이 백서의 성호르몬 및 항피로 효과에 미치는 영향. 제한동의 학술원 논문집. 1998;3(1):216-31.
13. 김종길, 박종운, 강승범, 강익현, 문병순. 五子衍宗丸이 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1999;20(2):77-92.
14. 王學美 外. 五子衍宗液延緩老衰的臨床研究. 中國中西醫結合雜誌. 1992;12(1):23-35.
15. 王其飛 外. 中醫長壽學. 遼寧: 遼寧科學技術出版社; 1989, p.53-4, 317, 366-7.
16. 송선복, 안덕균. 女貞實類의 效能에 關한 比較研究. 本草分科學會誌. 1991;6(1):13-9.
17. 박원영, 정지천. 二至丸의 항산화 작용에 의한 세포 보호 효과. 대한한방내과학회지 2003; 24(4):807-16.
18. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Res Commun.* 1994;16:149-56.
19. Cathcart R, Schwiens E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem.* 1983;134:111-6.
20. 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.
21. 金完熙, 崔達永 編著. 臟腑辨證論治. 서울: 成輔社; 1985, p.282-4.
22. 鄒高祈 編著. 中醫補腎法. 山西: 山西科學技術出版社; 1992, p.30-4.
23. 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, p.4-5.
24. 虞搏. 醫學正傳. 서울: 成輔社; 1986, p.9.
 25. 辛民教. 臨床本草學. 서울: 永林出版社; 1989, p.202, 208, p.241-2, 244, 584.
 26. 吳儀洛. 本草從新, 上海: 上海科學技術出版社; 1982, p.179.
 27. Jiao Shu-De, Ten lectures on the use of medicinals from the personal experience of Jiao Shu-De. Paradigm Publications. MA 2003.
 28. Tang W and Eisenbrand G. Chinese drugs of plant origin. Springer-Verlag. NY 1992.
 29. Haenen GPMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236:591-6.
 30. Chung HY, Kim HJ and Kim JW. The inflammation hypothesis of aging: Molecular modulation by calorie restriction. *Ann NY Acad Sci.* 2001;928:327-35.
 31. Namba T. The encyclopedia of Wakan-Yaku. Hoikusha, Tokyo. 1993;1:222-3.