

三精丸의 Peroxynitrite 제거 효과

이동준, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Peroxynitrite Scavenging Activity of *Samjunghwan*

Dong-joon Lee, Ji-cheon Jeong

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

Objectives : Peroxynitrite (ONOO⁻), $\cdot O_2$ and nitric oxide (NO) are 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 ONOO⁻ scavenging activities, and that of its precursors, NO and $\cdot O_2$ of *Samjunghwan*.

Methods : To investigate ONOO⁻, NO, $\cdot O_2$ scavenging activities, fluorescent probes, namely 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) and dihydrorhodamine 123 (DHR 123) were used.

Results : *Samjunghwan* 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, *Samjunghwan* inhibited ONOO⁻, $\cdot O_2$ and NO generation in LPS-treated ICR mouse kidney postmitochondria.

Conclusions : These results suggest that *Samjunghwan* is an effective ONOO⁻, $\cdot O_2$ and NO scavenger, and that this substance has a potential role as an inhibitor of aging process, and in therapy against age-related diseases.

Key Words: *Samjunghwan*, peroxynitrite, nitric oxide, reactive oxygen species

1. 緒 論

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 superoxide anion radical ($\cdot O_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2), 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, NO_2 , HNO_2 , ONOO⁻ 등의 질소화합물들을 총칭하는 것으

로², 최근 ROS와 RNS에 의한 oxidative stress가 노화 및 노인성 질환의 발생 과정에 관여한다는 것이 잘 알려져 있다^{3,4}. NO는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성산소들과 반응할 수 있으며, 특히 $\cdot O_2$ 와 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrite (ONOO⁻)를 생성한다⁵.

ONOO⁻는 NO와 $\cdot O_2$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며, 염증, 감염 등과 같이 특정한 상태에서 대량 생성되어 강한 조직 파괴력을 나타낼 뿐만 아니라 여러 노인성 질병과 밀접하게 관련된다 고 알려져 있다^{2,6}. 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 미토콘드리아의 호흡 억제, 세포막 펌프 억제, GSH의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지

· 접수 : 2006. 2. 14. · 채택 : 2006. 2. 27.
· 교신저자 : 정지천, 경북 경주시 석장동 1090-1
(Tel. 054-770-1265, Fax. 054-770-1500
E-mail : jicjh@paran.com)

고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 이러한 ONOO⁻의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다^{5,7-9}. 인체 내에는 특이하게 ONOO⁻를 제거하는 효소가 밝혀져 있지 않으므로 한약재로부터 ONOO⁻ 제거 활성을 탐색하는 것은 큰 의미가 있다.

三精丸은 東醫寶鑑¹⁰에 久服輕身 延年益壽 而如童子한다고 기재되어 있으며, 滋補肝腎 健脾燥濕 등의 효능을 가지고 있다^{11,12}. 蒼朮 (*Atractylis Rhizoma*)에 天精이 있고 地骨皮 (*Lycii Cortex Radicis*)에 地精이 있으며 桑椹子 (*Mori Fructus*)에 人精이 있다고 하여 三精이라고 하였다. 주로 脾腎에 작용하여 脾虛濕阻 肝腎虧虛 體力不支 記憶力衰退 視力模糊 鬚髮早白 등의 증상을 나타내는 中老年人이 常服하기에 가장 적합하며¹¹, 老人 肥胖人이 장기 응용하는 처방으로 소개되어 있다¹². 脾腎의 虛弱은 한의학에서 노화의 주된 원인이므로¹³ 三精丸은 노화 억제 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

본 연구에서는 三精丸의 노화 억제 효능을 검토하기 위한 일환으로 ONOO⁻ 및 그 전구체인 NO와 ·O₂에 대하여 제거능이 있는지를 관찰하고 *in vitro* 및 *in vivo*에서 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도한 ONOO⁻, NO 및 ·O₂ 생성 억제 효과 등을 관찰하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

三精丸의 구성 약재인 蒼朮, 桑椹子, 地骨皮를 시장에서 구입하고 정선하여 사용하였다.

2) 시약

3-Morpholinosydnonine (SIN-1), DL-penicillamine은 Sigma chemical Co. (ST. Louis, MO, USA)에서, dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)은 Molecular

Prescription of Samjunghwan

약명	생약명	중량(g)
桑椹子	<i>Mori Fructus</i>	125
蒼朮	<i>Atractylis Rhizoma</i>	60
地骨皮	<i>Lycii Cortex Radicis</i>	60
합계		245

Probes (Eugene, OR, USA)에서 ONOO⁻는 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 Dai ichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

3) 동물

일정한 온도와 습도가 유지되는 조건에서 사육되고 생후 6주령된 체중 25g 내외의 외관상 건강한 ICR mouse를 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

잘게 분쇄한 三精丸 245g에 3배량의 95% methanol을 가하고 60℃에서 증탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 실온으로 냉각시키고 여지로 여과한 다음 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 三精丸추출물 21.8 g (수율 8.9%)을 얻어 실험에 사용하였다.

2) ONOO⁻ 측정법

Kooy 등의 방법¹⁴에 의해 ONOO⁻ 제거능을 측정하였다. 96 well microplate에 杜冲추출물을 취하고, 90nM NaCl, 5mM KCl 및 100μM diethylenetriaminepenta acetic acid와 10μM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액 (pH 7.4)를 가한다. 그리고 10μM ONOO⁻를 첨가한 후, 형광 광도를 이용하여 여기파장 500nm와 방출파장 536nm에서 측정하였다. ONOO⁻ 생성원으로는 시판 ONOO⁻ (Cayman Chemical CO.)와 SIN-1을 처리하여 생성되는 ·O₂와 NO에 의해 생성되는 ONOO⁻ 제거능을 검토하였다.

3) 활성산소 측정법

DCFDA assay¹⁵로 활성산소를 측정하였다. 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5mM DCFDA와 3차 증류수에

용해한 600U/ml esterase를 -20℃에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 10μM DCFDA와 6U/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 485nm 및 방출파장 530nm에서 Fluorescence Microplate reader (FL 500, Bio-Tex instruments)로 측정하였다. 이때 활성산소 생성원으로 총 활성산소 제거능 검토시 신장 homogenate의 postmitochondria 분획을, $\cdot O_2^-$ 제거능 검토시 SIN-1을 사용하였다.

4) NO 측정법

특이적인 NO의 indicator인 4,5-diamino fluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490~495nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. Dimethyl sulfoxide 550μl에 DAF-2 1mg이 녹아 있는 것을 50mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1:400배로 희석하였다. NO 제공 물질인 sodium nitroprusside (2mM)와 DAF-2 (3.14μM)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 530nm에서 측정하였다¹⁶.

5) LPS 처리 마우스 신장 homogenate에서 ONOO⁻, $\cdot O_2^-$ 및 NO 억제 활성 측정

마우스에 LPS (5mg/kg)를 24시간 처리하여 활성산소 및 질소 생성계를 유도한 후에 신장 조직을 균질화하고 三精丸추출물을 처리한 후에 DCFDA를 처리하고 형광광도계 (여기파장 490nm / 방출파장 520nm)로 형광을 측정하여 활성산소 생성계에 미치는 영향을 검토하였다¹⁵. 또한 DHR 123을 처리한 후 여기파장 500nm / 방출파장 536nm에서 형광을 측정하여 ONOO⁻ 제거능을¹⁴, DAF-2를 처리하여 여

기파장 485nm / 방출파장 530nm에서 NO 제거능을¹⁶ 평가하였다.

6) LPS 처리 마우스에서 ONOO⁻, $\cdot O_2^-$ 및 NO 억제 활성 측정

아무런 처리도 하지 않은 정상군, LPS를 처리한 대조군 및 三精丸추출물을 투여하고 LPS를 처리한 실험군으로 분류하였으며, 각 군에 5마리씩 배정하였다. 三精丸추출물의 투여는 체중 kg당 10, 20, 50mg의 용량을 1일 1회 경구로 5일간 투여하였고, 대조군에는 동량의 증류수를 투여하였다. LPS 처리는 6일째 5mg/kg을 복강내 주입하였으며 5시간 후에 ether로 가볍게 흡인마취시킨 상태에서 복부 정중선을 따라 개복하고 신장을 적출하였다. ONOO⁻, $\cdot O_2^-$ 및 NO 억제 활성 측정은 상기와 같이 시행하였다.

7) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student's *t*-test를 이용하여 통계 처리하였다.

III. 成績

1. ONOO⁻ 제거 활성

三精丸추출물이 ONOO⁻ 자체에 대하여 직접 제거 활성을 나타내는지를 검토한 결과 2, 10, 50μg/ml 농도에서 각각 18, 49, 85%의 제거 활성을 나타내었다. ONOO⁻ 제거제로 잘 알려져 있는 penicillamine 보다 약하지만 비교적 강한 ONOO⁻ 제거 활성을 나타내었다(Fig. 1).

2. ONOO⁻ 생성 억제 활성

SIN-1에 의해 생성되는 ONOO⁻에 대한 억제 활성을 검토해 본 결과 三精丸추출물 2, 10, 50 μg/ml 농도에서 각각 22, 42, 94%의 강한 생성 억제 활성을 나타내었다(Fig. 2).

3. NO 생성 억제 활성

SNP에 의해 생성되는 NO에 대한 억제 활성을 검토한 결과, 三精丸추출물 2, 10, 50μg/ml 농도에서

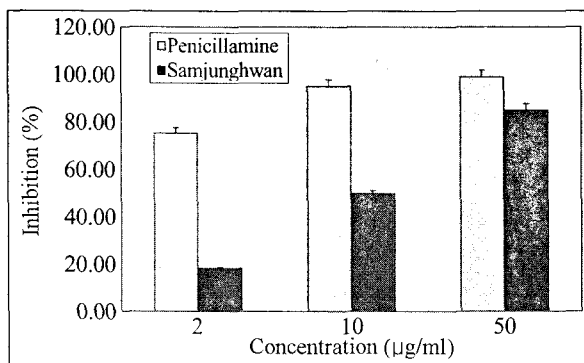


Fig. 1. Inhibition of ONOO⁻ generation by *Samjunghwan*.

Samjunghwan (2, 10, 50 µg/ml) and ONOO⁻ were added to each well. The Generation of reactive species was measured by DHR 123 fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.E.

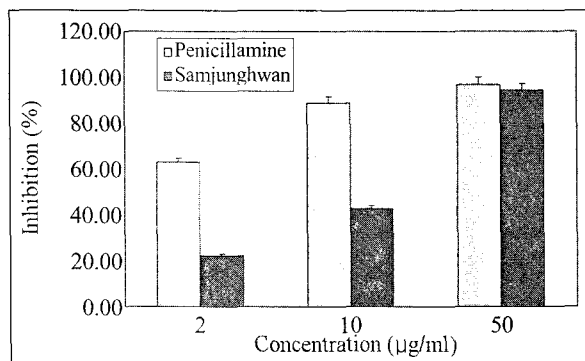


Fig. 2. Effect of *Samjunghwan* on SIN-1-induced ONOO⁻ generation.

Samjunghwan (2, 10, 50 µg/ml) and SIN-1 were added to each well. The Generation of reactive species was measured by DHR 123 fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.E.

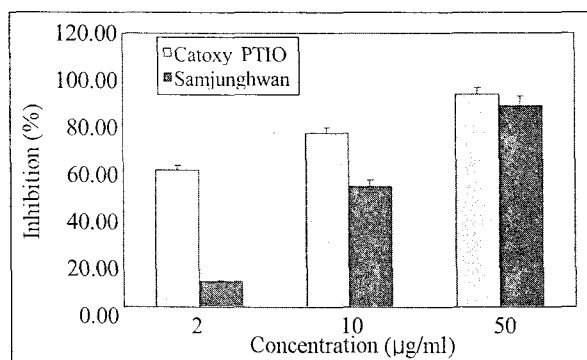


Fig. 3. Effect of *Samjunghwan* on SNP-induced NO generation.

Samjunghwan (2, 10, 50 µg/ml) and SNP were added to each well. The Generation of NO was measured by DAF-2 fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.E.

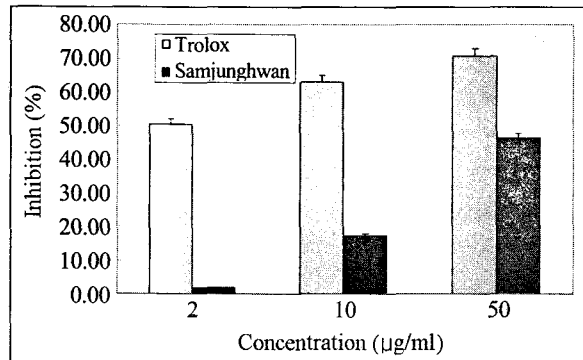


Fig. 4. Effect of *Samjunghwan* on H₂O₂-induced reactive species generation.

Samjunghwan (2, 10, 50µg/ml) and H₂O₂ were added to each well. The Generation of reactive species was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.E.

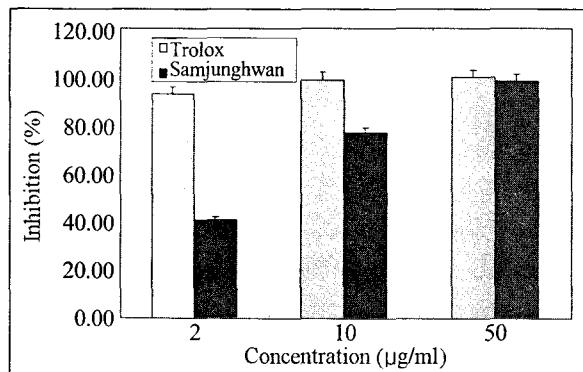


Fig. 5. Effect of *Samjunghwan* on SIN-1-induced reactive species generation.

Samjunghwan (2, 10, 50µg/ml) and SIN-1 were added to each well. The Generation of reactive species was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.E.

각각 11, 53, 88%의 억제 활성을 나타내어 기존 NO의 제거제인 carboxy-PTIO보다는 약하지만 비교적 강한 NO 제거능을 나타내었다(Fig. 3).

4. ·O₂⁻ 제거 활성

ONOO⁻의 또 다른 전구체인 ·O₂⁻ 제거능을 검토한 결과, 三精丸추출물 2, 10, 50µg/ml 농도에서 각각 2, 17, 46%의 제거 활성을 나타내어 기존 ·O₂⁻ 제거제인 trolox보다는 약하지만 ·O₂⁻ 제거 활성을 어느 정도 나타내었다(Fig. 4).

5. ·O₂⁻ 생성 억제 활성

SIN-1에 의해 생성되는 ·O₂⁻에 대한 억제 활성을

검토한 결과, 三精丸추출물 2, 10, 50µg/ml 농도에서 각각 41, 78, 97%의 제거 활성을 나타내어 강한 ·O₂⁻ 생성 억제 활성을 나타내었다(Fig. 5).

6. LPS 처리 마우스 신장 homogenate에서 ONOO⁻, ·O₂⁻ 및 NO 생성에 미치는 영향

三精丸추출물은 2, 10, 50µg/ml에서 ONOO⁻ 생성을 각각 4, 26, 41% 억제하였고 (Fig. 6), 활성산소 생성을 각각 23, 33, 49% 억제하였다 (Fig. 7). 또한 NO 생성에 대하여 각각 8, 27, 62% 억제하였다 (Fig. 8).

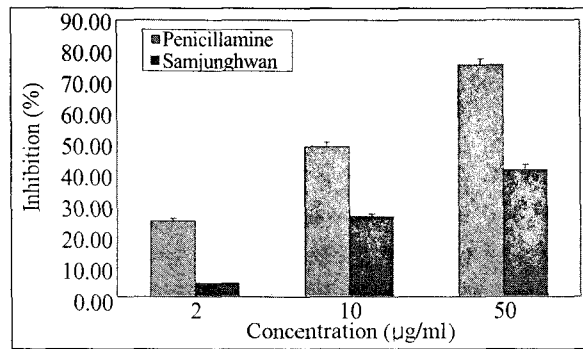


Fig. 6. Effect of *Samjunghwan* on LPS-induced ONOO⁻ generation in mouse kidney.

Mice were injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection.

Samjunghwan (2, 10, 50 µg/ml) and postmitochondria of the mouse kidney were added to each well. The Generation of reactive species was measured by DHR123 fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.E.

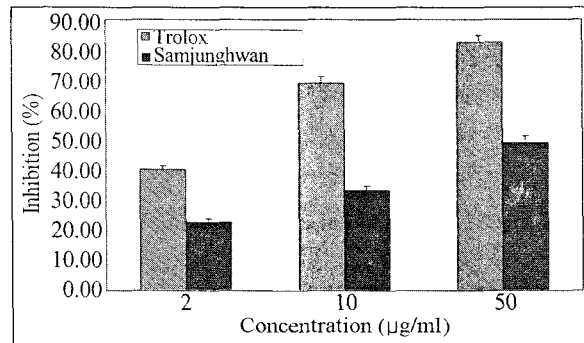


Fig. 7. Effect of *Samjunghwan* on LPS-induced reactive species generation in mouse kidney.

Mice were injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection.

Samjunghwan (2, 10, 50 µg/ml) and postmitochondria of the mouse kidney were added to each well. The Generation of reactive species was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.E.

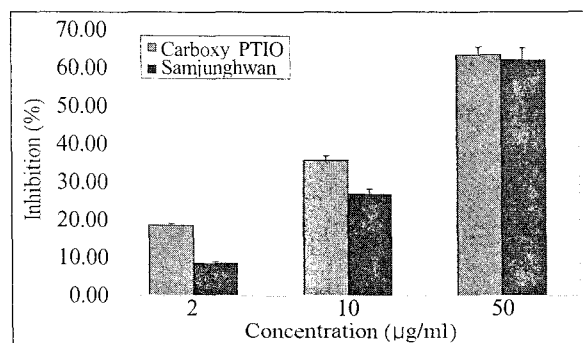


Fig. 8. Effect of *Samjunghwan* on LPS-induced NO generation in mouse kidney.

Mice were injected LPS (5mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection.

Samjunghwan (2, 10, 50 µg/ml) and postmitochondria of the mouse kidney were added to each well. The Generation of reactive species was measured by DAF-2 fluorescence probe. Each values are the mean of triplicate experiments. Results are mean±S.E.

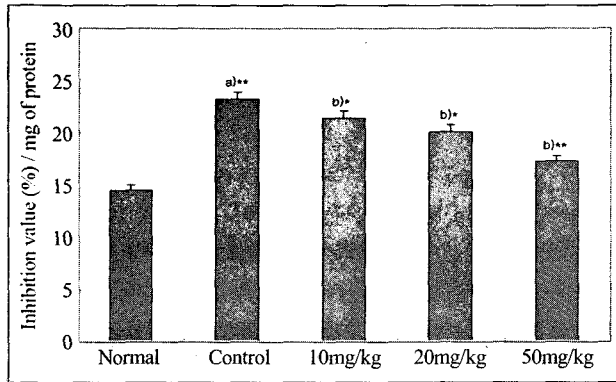


Fig. 9. Inhibition of ONOO⁻ generation by *Samjunghwan* in LPS-treated ICR mouse kidney.

Mice were administrated *Samjunghwan* (10, 20, 50mg/kg) for 5 days and injected LPS (5mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. ONOO⁻ generation from LPS-treated mouse kidney homogenate was determined by the change of fluorescence every 5 min for 30 min using DHR 123 fluorescent probe. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control. ** p < 0.01, * p < 0.05.

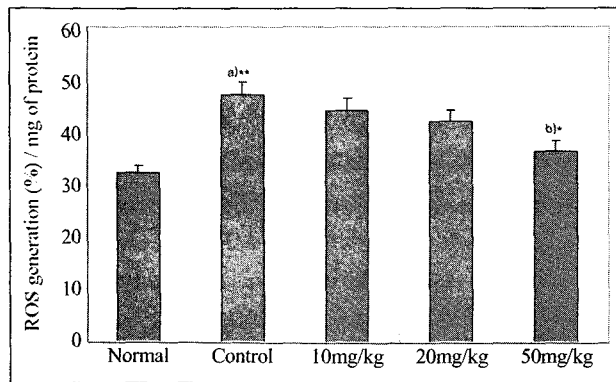


Fig. 10. Effect of *Samjunghwan* on LPS-induced reactive species generation in mouse kidney.

Mice were administrated *Samjunghwan* (10, 20, 50mg/kg) for 5 days and injected LPS (5mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. The Generation of reactive species was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control. ** p < 0.01, * p < 0.05

7. LPS 처리 마우스에서 ONOO⁻ 생성에 미치는 영향
정상군의 ONOO⁻ 생성은 14.51±0.44%/mg이었으나 LPS를 처리한 대조군에서는 23.27±0.70%/mg으로 증가되었다. 三精丸추출물을 10, 20, 50mg/kg 농도로 경구투여한 실험군에서는 각각 21.50±0.64, 20.12±0.60, 17.27±0.52%/mg으로 농도 의존적으로 저하되었다(Fig. 9).

8. LPS 처리 마우스에서 ·O₂⁻ 생성에 미치는 영향
정상군의 활성산소 생성은 32.20±1.61%/mg이었

으나 LPS를 처리한 대조군에서는 47.29±2.36%/mg으로 증가되었다. 三精丸추출물을 10, 20, 50mg/kg 농도로 경구투여한 실험군에서는 각각 44.17±2.21, 42.13±2.11, 36.55±1.83%/mg으로 농도 의존적으로 저하되었다(Fig. 10).

9. LPS 처리 마우스에서 NO 생성에 미치는 영향
정상군의 NO 생성은 17.44±0.52%/mg이었으나 LPS를 처리한 대조군에서는 23.50±0.71%/mg으로 증가되었다. 三精丸추출물을 10, 20, 50mg/kg 농도로

경구투여한 실험군에서는 각각 22.33 ± 0.67 , 21.22 ± 0.64 , $19.31 \pm 0.58\%/mg$ 으로 농도 의존적으로 저하되었다(Fig. 11).

III. 考 察

ONOO⁻는 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^{4,7,8}. 최근 제안된 "Inflammation Hypothesis of Aging"¹⁷에 의하면 노화 과정에서 염증 반응이 지속적으로 일어남으로써 활성산소의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 NO의 대량 생성이 ONOO⁻ 생성을 더욱 증가시켜 세포 및 조직 손상을 가져와 노화과정을 촉진한다고 하였다. 이와 같이 ONOO⁻는 노화 과정뿐만 아니라 노인성 질환에 중요한 발병 요인으로 주목받고 있는 매우 산화력이 강한 내인성 독성물질이다^{2,7,8}.

본 실험에 사용된 三精丸은 예로부터 久服輕身 延年益壽 등의 효능이 있다고 하여¹⁰⁻² 노화를 억제

할 가능성이 기대되는 처방이다. 구성 약물을 살펴 보면 桑椹子는 性味が 甘酸溫으로 心, 胃, 小腸, 膀胱經에 歸經하여 補腎水 利五臟 安魂鎮神 聰耳明目 生津止渴 利水消腫 解酒烏髮 등의 효능을 가지고 있으며^{18,19}, 항산화 작용을 나타내었다고 보고되었다²⁰. 蒼朮은 性味が 苦辛溫이며 肺, 脾, 胃, 大腸, 小腸經에 歸經하여 燥胃強脾 發汗除濕 散風寒濕 能升發胃中陽氣 등의 효능을 가지고 있으며^{18,19}, 비만 白鼠와 3T3-L1 지방세포에 효과를 나타내었다고 보고되었다²¹. 地骨皮는 性味が 苦寒辛으로 三焦經에 歸經하여 清熱涼血 助正氣 除肝腎虛熱 降肺中伏火 등의 효능을 가지고 있으며^{18,19}, 고지방 식이로 유발된 白鼠의 고지혈증에 효과를 나타내었다고 보고되었다²².

그러므로 三精丸은 先天의 근본인 腎과 後天의 근본인 脾를 함께 보충하고 조절하는데, 脾腎의 虛損은 한의학에서 노화의 주된 원인으로 인식되고 있다. 따라서 三精丸이 노화과정과 노인성 질환 및 여러 만성질환들과 밀접한 관계를 가지고 있는 ONOO⁻를 제거하는 작용이 있는지를 검토하고자 하였다.

三精丸의 ONOO⁻를 제거하는 능력을 ONOO⁻과 특이하게 반응하여 형광을 내는 DHR 123을 이용하여 측정된 결과, 三精丸 추출물이 ONOO⁻ 자체를 강력히

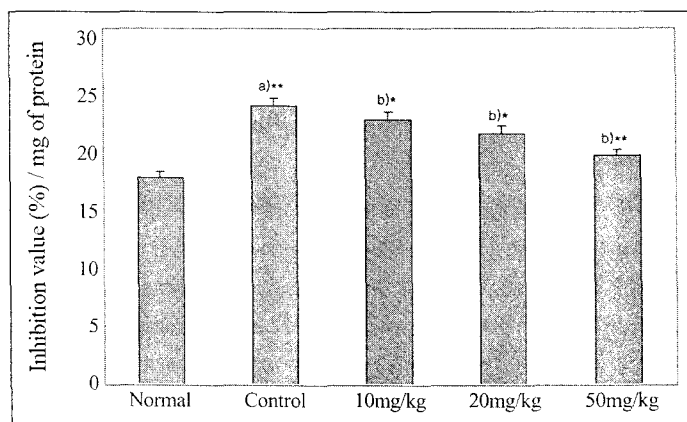


Fig. 11. Inhibition of NO generation by *Samjunghwan* in LPS-treated ICR mouse kidney.

Mice were administrated *Samjunghwan* (10, 20, 50mg/kg) for 5 days and injected LPS (5mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. NO generation from LPS-challenged mouse kidney homogenate was determined by the change of fluorescence every 5 min for 30 min using DAF-2. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control. ** p < 0.01, * p < 0.05

제거할 뿐만 아니라, SIN-1에 의해 생성되는 ONOO⁻에 대해서도 강력하게 억제하는 활성을 나타내었다. 또한 ONOO⁻의 전구체인 ·O₂⁻에 대하여 三精丸이 직접 제거하는 활성을 나타내었으며, SIN-1에 의해 생성되는 ·O₂⁻와 SNP에 의해 생성되는 NO에 대하여도 억제 효과를 나타내었다. 따라서 三精丸의 ONOO⁻ 억제능에는 ONOO⁻를 직접 제거하는 활성과 ·O₂⁻와 NO를 각각 제거하는 능력을 가지고 있으므로 ONOO⁻ 축적을 억제할 것으로 사료된다.

LPS로 활성산소 및 활성질소 생성계를 유도한 신장의 균질액에서 三精丸은 ONOO⁻ 및 그 전구체인 ·O₂⁻와 NO 생성을 억제하였다.

마우스에 LPS를 처리한 대조군에서 정상군에 비하여 ONOO⁻ 및 그 전구체인 ·O₂⁻와 NO 생성이 현저하게 증가되었으나 三精丸추출물을 5일간 경구 투여한 경우에 농도 의존적으로 유의성 있게 억제되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 三精丸이 ONOO⁻ 생성을 억제할 뿐만 아니라, 그 전구체인 활성산소와 활성질소에 대하여도 생성을 억제하므로 효과적으로 ONOO⁻ 제거 및 억제 활성을 나타낸다고 사료된다.

본 연구의 결과를 종합해 보면, 三精丸은 ONOO⁻, 활성산소 및 활성질소의 소거와 생성 억제 작용을 가지므로 노화 과정 및 노인성 질환을 조절하는데 유효한 약제가 될 것으로 사료된다,

V. 結 論

三精丸이 노화 과정 및 노인성 질환에 중요한 역할을 하는 ONOO⁻ 및 그 전구체인 ·O₂⁻와 NO에 대한 제거능이 있는지를 검토하였다. 三精丸은 ONOO⁻를 농도 의존적으로 직접 소거하였고, SIN-1에 의한 ONOO⁻의 생성을 억제하였다. 또한 三精丸은 SIN-1에 의해 생성되는 ·O₂⁻와 SNP에 의해 생성되는 NO에 대하여도 억제 효과를 나타내었다. 三精丸은 마우스 신장 homogenate에서 LPS에 의해 유도된 ONOO⁻, NO 및 ·O₂⁻의 생성을 효과적으로 억제하였다. LPS로 산화스트레스를 유도한 마우스에서 三精丸 경구

투여에 의해 ONOO⁻, NO 및 ·O₂⁻의 생성이 억제되었다. 이상의 결과로서 三精丸은 ONOO⁻를 효과적으로 소거하여 노화 및 노인성 질환의 조절 약물로 작용할 가능성이 시사되었다.

參考文獻

1. Chung HY. Aging and Carcinogenic Mechanisms 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. NO와 NOS. 内分泌, 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, Choi JS and Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Micro Res Techniq.* 2002;59:264-72.
7. 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.
8. Haenen GPMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236:591-6.
9. Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys*

- Res Commu.* 1997;232:164-70.
10. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂; 1981, p.78.
 11. 何紹奇, 宋乃光 編著. 中老年保健養生方. 北京: 學苑出版社. 2002, p.219-20.
 12. 王毅, 靳長金 朱君波 編著. 益壽效方 120. 北京: 中國醫藥科技出版社; 1989, p.95.
 13. 王其飛 外. 中醫長壽學. 遼寧: 遼寧科學技術出版社; 1989, p.53-4, 327-9, 331-4.
 14. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Res Commun.* 1994;16:149-56.
 15. Cathcart R, Schwiens E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem.* 1983;134:111-6.
 16. 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.
 17. Chung HY, Kim HJ, and Kim JW. The inflammation hypothesis of aging: Molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;928:327-35.
 18. 李尙仁. 本草學. 서울: 醫藥社; 1981, p.135, 241-2, 509-10.
 19. 吳儀洛. 本草從新. 上海: 上海科學技術出版社; 1982, p.12.
 20. 朴涌基, 康秉秀. 桑椹子の抗酸化 작용에 관한 연구. *대한본초학회지.* 1999;14(2):43-50.
 21. 김동윤. 蒼朮추출액이 비만 백서와 3T3-L1 지방세포 분화에 미치는 영향. 원광대학교 대학원 석사학위논문.
 22. 이성두. 地骨皮가 고지방 식이로 유발된 백서의 고지혈증에 미치는 영향. 경산대학교 대학원 박사학위논문.