

원 저

露蜂房의 Peroxynitrite 제거 효과

정지천, 신원용

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Peroxynitrite Scavenging Activity of *Vespae Nidus*

Ji-Cheon Jeong, Won-Yong Shin

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

Objectives : Peroxynitrite (ONOO⁻), superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$) and nitric oxide (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 for ONOO⁻ and its precursors, NO and $\cdot\text{O}_2^-$ of *Vespae Nidus*.

Methods : Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2) and dihydrorhodamine 123 (DHR 123) were used to investigate scavenging activities of ONOO⁻, NO, $\cdot\text{O}_2^-$. Six-months-old ICR mice were used. After mice were injected with lipopolysaccharides (LPS), kidney organization was evaluated. Three comparison groups of ICR mice were used : a normal group, an experimental group that was fed *Vespae Nidus* extract and then injected with LPS, and a control group that was injected with LPS. Scavenging activities of ONOO⁻, NO, $\cdot\text{O}_2^-$ in these groups were measured in the same way.

Results : *Vespae Nidus* markedly scavenged authentic ONOO⁻, $\cdot\text{O}_2^-$ and NO. It also inhibited ONOO⁻ induced by $\cdot\text{O}_2^-$ and NO which are derived from SIN-1. Furthermore, it inhibited ONOO⁻, $\cdot\text{O}_2^-$, and NO generation by *Vespae Nidus* in LPS-treated ICR mouse kidney postmitochondria.

Conclusions : These results suggest that *Vespae Nidus* might be developed as an effective ONOO⁻, $\cdot\text{O}_2^-$, and NO scavenger for the prevention of the aging process and age-related diseases.

Key Words: *Vespae Nidus*, peroxynitrite, nitric oxide, reactive oxygen species.

緒 論

노화란 연령이 증가함에 따라 발생하는 점진적인 구조적 변화로서 질병이나 사고에 기인하지 아

니하고 궁극적으로 사망을 초래하는 것이다¹⁾. 노화에 관한 여러 가지 학설 중 최근 제안된 산화 스트레스 가설²⁾에 의하면 활성산소 및 활성질소가 세포 및 조직 손상을 초래하여 노화 과정을 촉진한다고 하였으며, 최근 노화의 염증 가설³⁾에 의하면 peroxynitrite (ONOO⁻)가 세포 및 조직 손상을 가져와 노화 과정을 촉진한다고 하였다.

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)과 활성질소종 (reactive nitrogen species, RNS)은 세포막 내의 불포화 지방산, nucleotides, sulfhydryl 결합과 반응함으로써 세포의 생화학적 특성 변

· 접수 : 2006년 5월 24일 · 논문심사 : 2006년 5월 25일
· 채택 : 2006년 6월 20일
· 교신저자 : 신원용, 경기도 고양시 일산구 석사동 814번지
동국대학교 일산한방병원 6층 한방내과 의국
(Tel: 031-961-9046, Fax: 031-961-9009,
E-mail: cytocare@dreamwiz.com)

화를 포함한 조직의 손상을 초래하게 된다. ROS와 RNS는 세포내 여러 구성 성분인 지질, 단백질, 핵산 그리고 DNA를 산화시켜 염증을 유발하고 세포사를 일으키며 암, 동맥경화, 류마티스 관절염, 알레르기 및 노화 등에 관련되는 것으로 알려져 있다^{4,7)}.

특히, ONOO⁻는 NO보다 더욱 짧은 반감기의 라디칼로서 내피세포, 신경세포, 중성구, 그리고 대식세포에서 주로 생성된다⁸⁻¹¹⁾. 이는 단백질과 펩타이드의 methionine 잔기, thiols, thioether의 산화 및 지질 과산화를 유도하여 세포독성을 야기할 뿐 아니라 생리적 pH에서 proton화 되거나 분해되기 전에 세포막의 산화 또는 세포막을 통과한 후 매우 빠르게 반응하므로 반응 속도는 H₂O₂에 비해 수천 배에 이르는 것으로 알려져 있어 짧은 시간 내에 급속한 손상을 유발하는 등 만성 질환과 관련되는 것으로 보고되었다^{12,13)}.

생체는 이러한 활성질소, 활성산소의 유해 작용에 대하여 생체내 항산화제인 glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase, GSH peroxidase, nonprotein-SH, protein-SH 등을 이용하여 활성산소를 제거함으로써 생체의 항상성을 유지하고 있다¹⁴⁾. 하지만 ONOO⁻를 제거하는 scavenger로 selenium을 포함하는 D(-) penicillamine과 ebselen 등이 알려져 있으나¹⁵⁾, 인체 내에는 ONOO⁻를 불활성화시킬 수 있는 제거 효소가 밝혀져 있지 않다. 따라서 한약재로부터 ONOO⁻ 제거 활성을 탐색하는 것은 생체내 항산화계의 활성을 높임으로써 생체 내 독성을 유발하는 활성산소를 제거하는 것과 함께 노화과정뿐만 아니라 노인성 질환을 조절하는데 큰 의미가 있다.

露蜂房 (*Vespaes Nidus*)은 胡蜂科 (말벌과; Vespidae)에 속한 곤충인 果馬蜂 (*Polistes olivaceous* Degeer), 日本長脚胡蜂 (*P. japonicus* Saussure) 혹은 異腹胡蜂 (*Parapolybia varia* Fabricius)의 벌집을 채취하여 晒乾하거나 약간 삶은 후 죽은 벌이나 번데기를 제거하고 건조하여 사용하는 본초를 말한다¹⁶⁾.

일명 ‘蜂腸’이라고도 하며, 놀라서 생기는 癩疾과 근육경련을 다스리고 癩疾, 痔疾을 다스린다고 하였으며¹⁷⁾, 최근 김 등은 露蜂房의 항산화 작용에 관한 연구에서 catalase 활성도 및 SOD 활성도를 증가시키고, glutathione 함량을 유의성 있게 증가시키는 것을 밝혔다¹⁸⁾. 하지만, 최근 노화 과정 및 여러 만성 질환에서 산화 스트레스의 주범으로 강력한 산화력을 가지는 ONOO⁻의 소거 작용에 관한 연구는 없다.

이에 본 연구에서는 露蜂房의 노화 억제 효능을 검토하기 위한 일환으로 ONOO⁻ 및 그 전구체인 ·O₂와 NO에 대하여 제거능이 있는지를 조사하고, in vitro 및 in vivo에서 lipopolysaccharide (LPS) 처리에 의해 유도한 ONOO⁻, ·O₂ 및 NO 생성에 대한 억제 효과를 관찰하였다.

材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

露蜂房 (*Vespaes Nidus*)을 시중에서 구입하고 정선하여 사용하였다.

2) 시약

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

생후 6주령된 체중 25g 내외의 외관상 건강한 ICR mouse를 Light dark cycle 12h, 온도 25%, 습도 60% 유지되는 조건에서 적응 사육하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

露蜂房 200 g을 round flask에 넣고 95% methanol을 가하여 3시간씩 3회 가열 추출하여 추출액을 얻었다. 추출액을 실온으로 냉각시킨 후 여지로 여과한 여액을 rotary evaporator로 감압 농축한 다음 동결 건조시켜 추출물 22g (수율 11%)을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) ONOO⁻ 제거능 측정법

Kooy 등의 방법¹⁹⁾에 의해 ONOO⁻ 제거능을 측정하였다. 96 well microplate에 露蜂房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. ONOO⁻ 생성원으로는 시판 ONOO⁻ (Cayman Chemical CO.)와 SIN-1을 처리하여 생성되는 $\cdot O_2^-$ 와 NO에 의해 생성되는 ONOO⁻ 제거능을 평가하였다.

3) 활성산소 측정법

DCFDA assay²⁰⁾로 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. 이때 활성산소 생성원으로 총 활성산소 제거능 검토시 신장 homogenate의 postmitochondria 분획을 얻어서

SIN-1의 처리로 생성된 $\cdot O_2^-$ 의 제거능을 분석하였다.

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 측정하였다²¹⁾.

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

마우스에 LPS (5 mg/kg)를 24시간 처리하여 활성산소·질소 생성계를 유도한 후에 신장조직을 균질화하고 露蜂房추출물을 처리한 후에 DCFDA를 처리하고 형광광도계 (여기파장 490 nm / 방출파장 520 nm)로 형광을 측정하여 활성산소 생성계에 미치는 영향을 검토하였다²⁰⁾. 또한 DHR 123을 처리한 후 여기파장 500 nm / 방출파장 536 nm에서 형광을 측정하여 ONOO⁻ 제거능¹⁹⁾, DAF-2를 처리하여 여기파장 485 nm / 방출파장 530 nm에서 NO 제거능²¹⁾ 평가하였다.

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

아무런 처리도 하지 않은 정상군, LPS를 처리한 대조군 및 露蜂房추출물을 투여하고 LPS를 처리한 실험군으로 분류하였으며, 각 군에 5마리씩 배정하였다. 露蜂房추출물의 투여는 체중 kg당 10, 20, 50 mg의 용량을 1일 1회 경구로 5일간 투여하였고, 대조군에는 동량의 증류수를 투여하였

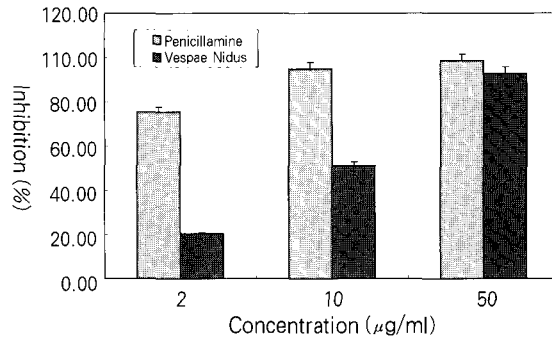


Fig. 1. ONOO⁻ scavenging activity of *Vespaee Nidus*. Each value is the mean±S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by authentic ONOO⁻ (10 µM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

다. LPS 처리는 6일째 5 mg/kg을 복강내 주입하였으며 5시간 후에 ether로 가볍게 흡인 마취시킨 상태에서 복부 정중선을 따라 개복하고 신장을 적출하였다. ONOO⁻, O₂⁻, 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.

성績

1) ONOO⁻ 제거 활성

露蜂房에 ONOO⁻ 자체를 직접 제거하는 활성이 있는지를 검토한 결과 2, 10, 50 µg/ml 농도에서 각각 20, 51, 92%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 저해 활성

SIN-1에 의해 생성되는 O₂⁻ 및 NO의 상호 작용에 의해 생성되는 ONOO⁻ 생성 억제 작용을 검토해 본 결과 露蜂房추출물은 2, 10, 50 µg/ml 농도에서 각각 25, 45, 90% 억제 활성을 나타내었

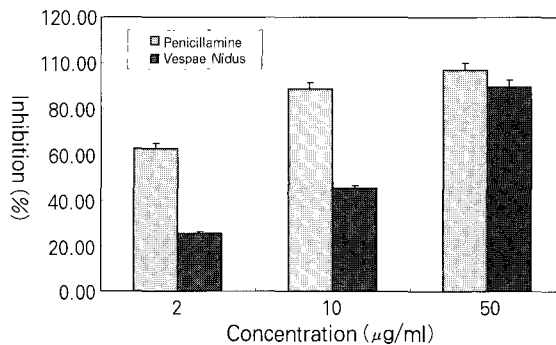


Fig. 2. Effect of *Vespaee Nidus* on SIN-1-derived ONOO⁻ generation. Each value is the mean±S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by SIN-1 (20 µM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

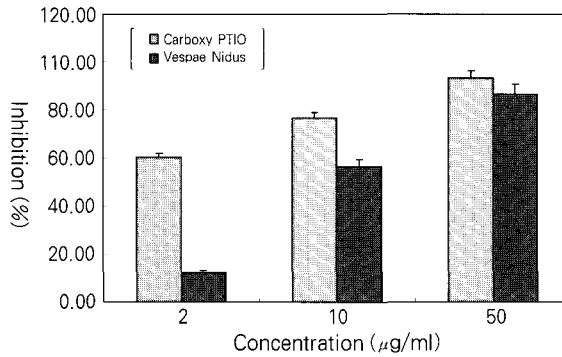


Fig. 3. Effect of *Vespaee Nidus* on sodium nitroprusside-derived NO generation. Each value is the mean±S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by sodium nitroprusside (2 mM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

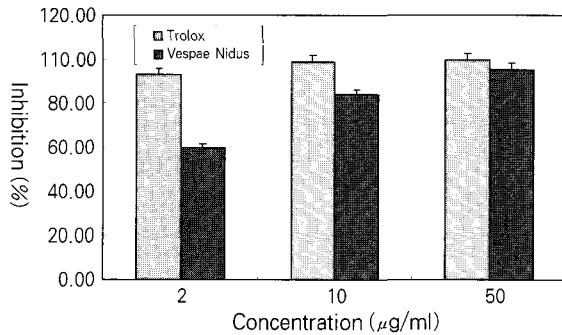


Fig. 4. Effect of *Vespaee Nidus* on SIN-1-derived $\cdot O_2^{\cdot -}$ generation. Each value is the mean±S.E. of three experiments. The oxidation of DHR 123 to fluorescent rhodamine 123 mediated by SIN-1 (20 µM) was measured with the change of fluorescence every 5 min for 30 min.

다. ONOO⁻ 직접 제거제인 pencillamine과 비교할 때 다소 약하지만, 비교적 강한 억제 활성을 나타내었다(fig. 2).

3) SNP에 의해 생성되는 NO 제거 활성

ONOO⁻의 전구체인 NO 제거능을 검토한 결과 露蜂房추출물은 2, 10, 50 µg/ml 농도에서 각각 12, 56, 86%의 억제 활성을 나타내어 기존 NO의 제거제인 carboxy-PTIO 보다는 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 露蜂房추출물 2, 10, 50 µg/ml 농도에서

각각 59, 83, 95% 제거 활성을 나타내었다. 기존의 ·O₂^{·-} 제거제인 trolox보다는 약하지만 ·O₂^{·-} 제거 활성을 어느 정도 나타내어 露蜂房이 ONOO⁻와 NO 뿐만 아니라, ·O₂^{·-}도 제거함을 알 수 있었다 (fig. 4).

5) LPS 처리로 유도된 ONOO⁻, ROS 및 NO 생성에 미치는 영향

LPS로 활성산소 및 질소 생성계가 유도된 마우스 신장균질액에서 ONOO⁻, NO 및 ·O₂^{·-} 억제능을 측정한 결과 露蜂房추출물은 2, 10, 50 µg/ml 농도에서 ONOO⁻ 생성을 각각 8, 26, 34% 억제하였고(fig. 5), ·O₂^{·-} 생성을 각각 14, 42, 50% 억제하였

으며(fig. 6), NO 생성에 대하여 각각 7, 24, 61% 억제하였다(fig. 7).

6) LPS 처리 마우스에서 ROS 생성에 미치는 영향

정상군의 ROS 생성은 $32.20 \pm 1.61\%$ 이었으나 LPS를 처리한 대조군에서는 $47.29 \pm 2.36\%$ 로 증가되었다. 露蜂房추출물 10, 20, 50 mg/kg을 경구 투여하고 LPS를 처리한 실험군에서는 44.21 ± 2.21 , 42.40 ± 2.12 , $34.93 \pm 1.75\%$ 로 농도 의존적으로 저하되었다(fig. 8).

7) LPS 처리 마우스에서 ONOO⁻ 생성에 미치는 영향

정상군의 ONOO⁻ 생성은 $14.51 \pm 0.44\%$ 이었으나 대조군에서는 $23.27 \pm 0.70\%$ 로 증가되었다. 반면에 실험군에서는 21.60 ± 0.65 , 20.82 ± 0.62 , $17.93 \pm 0.53\%$ 로 농도 의존적으로 저하되었다(fig. 9).

8) LPS 처리 마우스에서 NO 생성에 미치는 영향
정상군의 NO 생성은 $17.44 \pm 0.52\%$ 이었으나 대조군에서는 $23.50 \pm 0.71\%$ 로 증가되었다. 실험군에서는 22.85 ± 0.71 , 21.45 ± 0.64 , $19.08 \pm 0.57\%$ 로 농도 의존적으로 저하되었다(fig. 10).

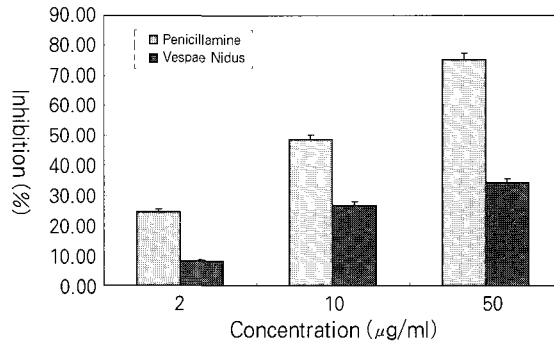


Fig. 5. Inhibition of ONOO⁻ generation by *Vespaee Nidus* in LPS-treated ICR mouse kidney homogenate. Each value is the mean±S.E. of three experiments. ONOO⁻ generation from LPS-challenged mouse kidney homogenate was determined by the change of fluorescence every 5 min for 30 min using DHR 123 fluorescent probe.

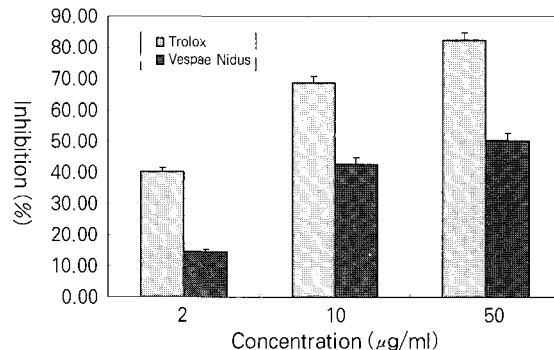


Fig. 6. Inhibition of ROS generation by *Vespaee Nidus* in LPS-treated ICR mouse kidney homogenate. Each value is the mean±S.E. of three experiments. ROS generation from LPS-challenged mouse kidney homogenate was determined by the change of fluorescence every 5 min for 30 min using DCFDA.

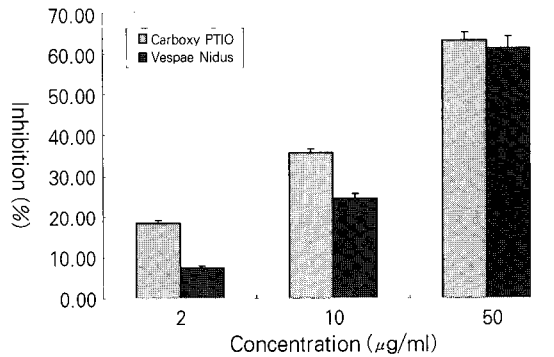


Fig. 7. Inhibition of NO generation by *Vespaee Nidus* in LPS-treated ICR mouse kidney postmitochondria. Each value is the mean±S.E. of three experiments. NO generation from LPS-challenged mouse kidney homogenate was determined by the change of fluorescence every 5 min for 30 min using DAF-2.

考 察

ONOO⁻는 노화 과정뿐만 아니라 노인성 질환에 중요한 발병 요인으로 주목받고 있는 산화력이 강한 내인성 독성물질이다. 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 하였다²²⁾. 활성산소는 단백질과 DNA의 손상 및 세포막 지질의 과산화를 촉진하여 생체 조직을 손상시킴으로

서 노화를 유발할 뿐만 아니라 당뇨병, 심장병, 신부전, 암 등의 병인으로 인정되고 있다²³⁾.

실험에 사용된 露蜂房은 말벌과의 대황봉 혹은 그에 가까운 같은 과 곤충의 집이다²⁴⁾. 露蜂房의 효능으로 <本經疏證>¹⁷⁾에는 驚癇瘦瘵, 癩疾, 鬼精, 腸痔 등에 쓰인다 하였으며, <景岳全書>²⁵⁾에는 惡疽附骨疽疔腫諸毒, 赤白痢, 遺尿失禁, 陰痿, 乳癰, 風蟲牙痛, 熱病後毒氣衝目 등에 쓰인다고 하였으며, <蟲類中藥與效方>²⁶⁾에는 抗癌, 抗炎, 鎮痛, 解熱 효과가 있다고 하였다. 또한 <東醫寶鑑·湯液編>²⁷⁾에는 ‘性平 味苦鹹 無毒 一云微毒

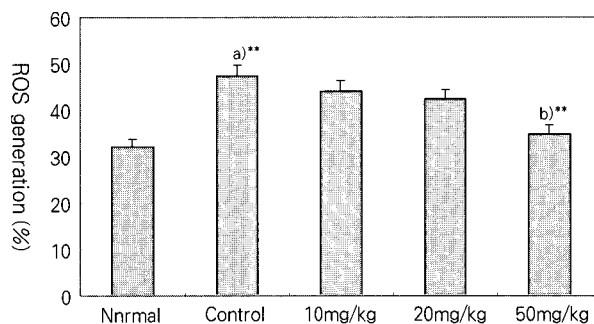


Fig. 8. Inhibition of ROS generation by *Vespaee nidus* in LPS-treated ICR mouse kidney. Mice were administrated *Vespaee nidus* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. The generation of reactive species was measured by DCFH-DA fluorescence probe. Results are mean±S.E. (n=5). a) Significantly different from the normal. b) Significantly different from the control.(**p<0.01)

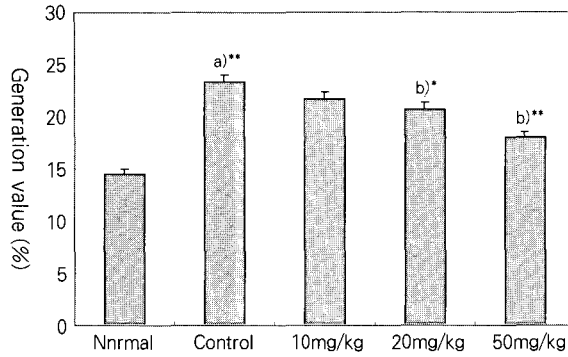


Fig. 9. Inhibition of ONOO⁻ generation by *Vespae nidus* in LPS-treated ICR mouse kidney. Mice were administrated *Vespae nidus* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. ONOO⁻ generation from LPS-treated mouse kidney homogenate was determined 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)

主驚癇瘕瘕 療癰腫不消 及乳癰 齒痛 惡瘡’ 이라 하여 예로부터 각종 질환에 널리 사용되었음을 알 수 있다. 민간에서 당뇨, 고혈압, 관절염, 악성 종양 등의 성인질환에 두루 이용되고 있음에도 한의 학적인 效能 主治에 있어 관련된 서술은 증양에 관련한 것들이 주를 이루고 있다. 이에 露蜂房이 실제 노화 과정과 노인성 질환 및 여러 만성질환 들과 밀접한 관계를 가진 ONOO⁻와 활성산소,

NO를 제거하는 작용이 있는지를 검토하였다.

露蜂房의 성분은 주로 蜜蠟과 樹脂이다²⁸⁾. 추출 물로 propolis가 있는데 이는 잎, 꽃, 열매 및 새싹 을 보호하기 위해 분비된 항균성과 방수성, 절연 성을 가진 식물의 수지화합물과 벌들의 타액효소 가 혼합되어 만들어진 황갈색 또는 암갈색의 물질 을 말한다¹⁸⁾. 최근 propolis에 대한 관심이 증가하 면서 이에 대한 연구가 진행되면서 露蜂房의 효능

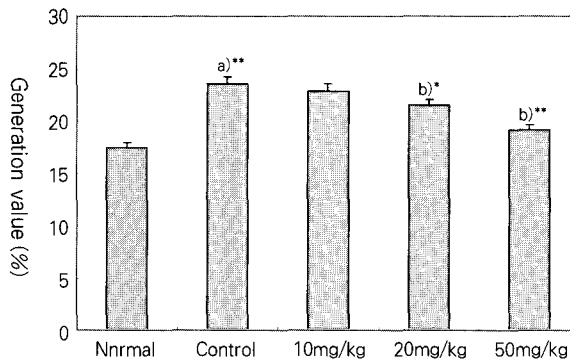


Fig. 10. Inhibition of NO generation by *Vespae nidus* in LPS-treated ICR mouse kidney. Mice were administrated *Vespae nidus* (10, 20, 50 mg/kg) for 5 days and injected LPS (5 mg/kg). Mice were sacrificed 5 hours after injection. NO generation from LPS-challenged mouse kidney homogenate was determined 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)

을 유추하는데 도움을 주고 있다. 이에 대한 연구로 Krol²⁹⁾ 등은 propolis ethanol 추출물의 항산화 효과는 polyphenol 화합물에 기인된다고 하였으며, Scheller³⁰⁾ 등도 propolis의 항산화 활성이 주로 지질의 peroxy radical에 대한 flavonoid의 소거 효과에 기인한다고 하였다. Flavonoid는 propolis의 주성분으로 DPPH 라디칼에 대한 강한 소거 활성, 지질과산화 억제 활성, superoxide anion 라디칼 소거 활성, DNA에 대한 방사선 방어효과 등이 알려져 있다³¹⁾. Pascual³²⁾ 등은 free radical 종류에 따른 propolis의 소거기능을 비교 연구하였으며, 임³³⁾ 등이 산화안정도 측정기를 이용하여 propolis 추출물의 항산화력을 조사하여 유의한 결과를 얻었고, 송³⁴⁾은 아까시나무 및 밤나무 유래 propolis에 대한 항산화 및 항균 활성도를 조사하였다. 근래에 항암, 항염증, 면역조절, 항괴양, 항고혈압, 항산화 및 항균 활성도의 유의성이 있음이 많이 보고되었다³⁵⁻³⁹⁾.

露蜂房의 ONOO⁻를 제거하는 능력을 ONOO⁻와 특이하게 반응하여 형광을 내는 DHR 123을 이용하여 측정한 결과, 露蜂房추출물이 ONOO⁻ 자체를 제거할 뿐만 아니라, SIN-1에 의해 생성되는 ·O₂⁻와 SNP에 의해 생성되는 NO에 의해 만들어지는 ONOO⁻에 대해서도 제거하는 활성이 관찰되었다. 또한, 이들 ONOO⁻의 전구체인 ·O₂⁻와 NO의 제거능을 직접 검토한 결과, 露蜂房이 ·O₂⁻와 NO를 모두 제거하는 활성을 나타내었다. 이는 露蜂房이 ONOO⁻를 직접 제거할 뿐만 아니라 ·O₂⁻, NO도 직접 제거함으로써 ONOO⁻ 생성 과정에도 관여하여 ONOO⁻ 축적을 억제할 가능성을 시사해 주었다.

LPS로 ·O₂⁻ 및 NO 생성을 유도한 신장의 균질액에서도 ONOO⁻ 및 그 전구체인 ·O₂⁻와 NO를 억제하였다. 또한, 마우스에 LPS를 처리하였을 때 ONOO⁻ 및 그 전구체인 ·O₂⁻와 NO의 생성이 현저하게 증가되었으나 露蜂房추출물을 5일간 경구 투여하고 LPS를 처리한 경우에 농도 의존적으로

유의성 있게 억제되는 것으로 나타났다. 露蜂房의 ·O₂⁻의 제거 작용은 이미 밝혀진 propolis의 작용과 밀접한 관계가 있을 것이라 여겨지며, ONOO⁻, NO 제거 작용은 아직도 연구되고 있는 propolis의 작용과 관계가 있을 것이라 사료된다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 露蜂房은 ONOO⁻, 활성산소 및 활성질소를 제거하고 생성을 억제하여 노화 방지 및 노인성 질환 예방과 치료에 밀접한 관계가 있는 유효한 약물이 될 가능성을 시사해 준다.

結 論

露蜂房이 노화 과정 및 노인성 질환에 중요한 역할을 하는 ONOO⁻ 및 그 전구체인 ·O₂⁻와 NO에 대한 제거능이 있는지를 검토하였다. 露蜂房추출물은 ONOO⁻와 ·O₂⁻를 농도 의존적으로 직접 소거하였고, SIN-1에 의해 생성되는 ·O₂⁻와 NO에 의해 생성되는 ONOO⁻도 억제하였다. 또한 SIN-1에 의해 생성되는 ·O₂⁻와 SNP-1에 의해 생성되는 NO에 대하여도 효과적으로 소거하였다. 露蜂房추출물은 마우스 신장 homogenate에서 LPS 처리로 유도된 ONOO⁻, NO 및 ·O₂⁻의 생성을 유의하게 억제하였다. LPS 처리로 산화 스트레스를 유도한 마우스에서 ONOO⁻, NO 및 ·O₂⁻의 증가되었으나 露蜂房추출물 경구 투여에 의해 유의하게 억제되었다. 이상의 결과로서 露蜂房은 ONOO⁻, NO 및 ·O₂⁻를 효과적으로 소거하고 생성을 억제하여 노화 및 노인성 질환의 조절 약물로 작용할 가능성이 시사되었다.

參考文獻

1. 김동석. 공중보건학. 서울: 수문사 1997: 379.
2. Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. Free Radic Biol Med. 1996; 21: 651-68.

3. 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.
4. Virag L, E Szabo, P Gergely and C szabo. Peroxynitrite induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett*. 2003; 140-1: 113-124.
5. Balavoine GGA and YV Geletii. Peroxynitrite scavenging by different antioxidants part 1: convenient assay, Nitric Oxide. *Biology and Chemistry*. 1999; 3: 40-54.
6. Patel RP, J McAndrew, H Sellak, CR White, H Jo, BA Freeman and VM Darley-Usmar. Biological aspects of reactive nitrogen species, *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411: 385-400.
7. Hogg N and B Kalyanaraman. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411;378-84.
8. Beckman JS, Bechman TW, Chen J, Marchall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87: 1620-4.
9. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton AS. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad USA*. 1995; 92: 7162-6.
10. Fukuyama N, Ichimori K, Su Z, Ishida H, Nakazawa H. Peroxynitrite formation from activated human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 224: 414-9.
11. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckam JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 298: 446-51.
12. Haenen GRM, JBG Paquay, REM Korthouwer and A Bast. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochim Biophys Res Commun*. 1997; 236: 591-3.
13. Lin KT, JY Xue, FF Sun and PYK Wong. Reactive oxygen species participate in peroxynitrite induces apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 230: 115-9.
14. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals transition metals and disease. *Biochem J*. 1984; 1: 219.
15. Choi HR, JS Choi, YN Han, SJ Bae and HY Chung. Peroxynitrite scavenging activity of Herb Extracts. *Phytotherapy Res*. 2002 ; 16: 364-7.
16. 전국한외과대학 본초학교수. *本草學*. 서울: 영림사. 1991: 647-8.
17. 鄒澍. *本經疏證*. 서울: 대성의학사. 2001: 343.
18. 김영대, 이명중. 露蜂房의 항산화 작용에 관한 연구. *한방재활의학회지*. 2003; 13: 11-22
19. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Res Commun*. 1994; 16: 149-56.
20. Cathcart R, Schwiens E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal Biochem*. 1983; 134: 111-6.
21. 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.
22. Kim HJ, YU BP, Chung HY. Molecular inflammation hypothesis of aging based in the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Free Radical Biol Med*. 2002; 10: 991-1005.

23. Simon RH, Scogging CM and Patterson D. Hydrogen peroxide cause the fatal injury to human fibroblast exposed to oxygen radicals. *J Biol Chem.* 1981; 266: 7181-6.
24. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 서울: 도서출판 정담. 1998: 966.
25. 張景岳. 景岳全書. 서울: 도서출판 정담. 1999: 1054.
26. 張金鼎, 鄭治文. 蟲類中藥與效方. 北京: 中醫古籍出版社. 2002: 333.
27. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 대성문화사. 1992: 197.
28. Wanscher B. Contact dermatitis from propolis. *J Dermatol.* 1976; 94: 451-5.
29. Krol W, Czuba Z and Sheller S. Działanie etanolowego ekstraktu propolisu (EEP) I flavonoidów na chemiluminescencję ludzkich neutrofilów, *Immunologia polska*, II. 1986: 292.
30. Scheller S, Wilczok T, Imielski S, Krol W, Gabrys J and Shani J. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *Int J Radiat Biol.* 1990; 57(3): 461-5.
31. 정일윤. 프로폴리스에서 분리한 플라보노이드 화합물의 항산화 활성 및 방사선 방어효과. *한국식품영양학회지.* 2005; 34: 162-6.
32. Pascual C, Gonzalez R and Torricella TG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacology.* 1994 ; 41: 9-13.
33. 임대관, 최웅, 신동화, 정용섭. Propolis 추출물의 유지 산화 억제 효과 비교. *한국식품과 학회지.* 1994; 26: 622-6.
34. 송효남. 아까시나무와 밤나무 유래 프로폴리스의 특성과 항산화 및 항균 활성. 서울대학교 대학원 박사학위논문. 1999.
35. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology.* 1983; 32: 1141-8.
36. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SAH, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol.* 1991; 35: 77-82.
37. Frenkel K, Wei H, Bhimani R, Ye J, Zaduanisky JA, Huang M, Ferraro T, Conney AH, Grunberger D. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res.* 1993 ; 53: 1255-61.
38. Pascual C, Gonzalez R, Toricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol.* 1994; 41: 9-13.
39. Munstedt K. Propolis, current and future medical uses. *American Bee J.* 2001; 141: 506-7.