

加減溫脾湯合五苓散 完製(WHW[®])의 항산화 효과에 대한 연구

정진기, 박용기

동국대학교 한의과대학 본초학교실·동국대학교 한방신약개발센터

Antioxidative Activities of Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san (WHW[®]) *in vitro*

Jin-Ki Jung, Yong-Ki Park

Department of Herbology, College of Oriental Medicine and Oriental Medicine Drug R&D Center, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea.

Objectives: The objective of this study was to investigate the antioxidant effects of manufactured Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san (WHW[®]) *in vitro*.

Methods: WHW[®] was prepared by the pilot manufacture of WHW water extract from a GMP system appointed company. Antioxidative activities were determined by *in vitro* tests as follows: the scavenging activities of oxygen free radicals including 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, superoxide anion, hydrogen peroxide and nitric oxide radicals, as well as ferrous ion chelating capacity and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC).

Results: WHW[®] significantly scavenged oxygen free radicals such as DPPH (IC₅₀=115.28 ± 0.25 μg/ml), superoxide anion (IC₅₀=8.56 ± 0.08 μg/ml), hydrogen peroxide (IC₅₀=240.36 ± 3.41 μg/ml) and nitric oxide (IC₅₀=162.28 ± 0.21 μg/ml) radicals. WHW[®] also showed ferrous ion chelating activity (IC₅₀=543.19 ± 4.85 μg/ml) and Trolox equivalent effects (IC₅₀=45.311 μg/ml) in TEAC and ORAC assay, respectively.

Conclusion: This study demonstrates that WHW[®] has strong antioxidative properties through free radical scavenging activity. These data suggest that WHW[®] be used as an antioxidant agent.

Key Words : Traditional Korean medicine, Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san, antioxidation, free radicals

서론

최근 노령인구의 증가와 현대인의 건강에 대한 관심이 증가됨에 따라 노화억제 및 질병예방에 관한 연구가 많이 이루어지고 있는데, 특히 스트레스나 노화와 관련된 각종 질환의 발병이 활성산소로부터 비롯된다는 보고가 많다¹⁾. Superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등과 같은 활성산소종은 인간의 대사과정 중 끊임없이 발생되어 세포구성 성

분인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적이고 비가역적인 파괴작용을 함으로써 노화는 물론 암, 신장질환, 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머병 등의 뇌질환, 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기 질환, 류마티스관절염, 자기면역질환, 염증질환 등 각종 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 활성산소로부터 지질과산화로 인해 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 여러 가지 체내 과산화물 또한 세포에 대한 산화적 파괴로 다양한 기능 손상을 유발

• Received : 3 July 2009

• Revised : 31 August 2009

• Accepted : 31 August 2009

• Correspondence to : 박용기(Yong-Ki Park)

경북 경주시 석장동 707번지 동국대학교 한의과대학 본초학교실

Tel : +82-54-770-2661, Fax : +82-54-770-2281, E-mail : yongki@dongguk.ac.kr

함으로써 노화와 각종 질병의 원인이 된다^{4,5)}. 따라서 활성산소종의 생성을 억제하기 위한 항산화물질에 대한 연구는 주로 노화억제나 각종 질병의 예방 및 치료제 개발을 중심으로 이루어지고 있다⁶⁾. 최근에는 각종 한약재로부터 보다 안전하고 항산화활성이 우수한 천연 항산화제를 개발하기 위한 연구가 많이 이루어지고 있다.

加減溫脾湯合五苓散(Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san; WHW)은 韓方臨床에서 慢性腎不全患者의 요독증 증상이 脾腎陽虛로 濁陰이 上逆하여 발생하는 것에 기초하여 利水劑인 五苓散에 脾腎陽虛를 도우는 溫脾湯을 加減한 것이다. 五苓散은 張仲景의 傷寒論⁷⁾에 기재된 처방으로 太陽經의 表邪가 未解하며 안으로 太陽膀胱經에 傳入되어 膀胱의 氣化作用이 불리하게 되고 下焦에 蓄水하여 太陽經府가 같이 병을 얻어 水腫 泄瀉 小便不利 頭痛 發熱 煩渴 臍下 動悸 霍亂吐瀉 등 증상의 脾腎陽虛로 인한 수액대사이상을 치료하는데 사용하는 것으로 알려져 있고⁸⁻¹¹⁾, 溫脾湯은 중국의 孫思邈이 만든 처방으로 부종과 관련하여 脾腎陽虛로 인하여 濁陰이 上逆하는 경우에 사용하는 것으로 알려져 있다⁹⁻¹²⁾. 五苓散과 溫脾湯에 관한 실험 연구로는 사구체 신염이 유발된 흰쥐에서 creatinine과 BUN 수치의 감소를 통한 급성 사구체 신염에 대한 개선효과¹³⁾, 급성신부전 흰쥐의 사구체에서 TGF-β 억제를 통한 신장 보호효과¹⁴⁾, 당뇨병성 신부전 쥐에서 혈청 과산화지질과 creatinine 수치의 감소효과¹⁵⁾ 등 주로 신장 질환과 관련된 연구가 보고되어 있다. 또한 급성 신부전 흰쥐에서의 五苓散과 六味地黃湯¹⁶⁾, 加味八正散과 金木八正散¹⁷⁾, 溫脾湯과 當歸芍藥散¹⁸⁾, 柴苓湯과 補中益氣湯¹⁹⁾의 치료 효과에 대한 보고가 있다. 최근 본 연구자는 加減溫脾湯合五苓散에 대한 실험연구로 TGF-β에 의한 신장세노관세포의 섬유화 억제효과²⁰⁾, 급성신부전 쥐에서의 신장조직의 섬유화와 콜라겐화 억제효과^{21,22)}, 및 항염증효과²³⁾ 등에 대해 보고한 바 있다.

본 연구에서는 WHW 완제(WHW[®])의 항산화 효과를 *in vitro* 실험을 통해 확인하였으며, 유의한 결

과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 材料

1) 藥材

본 실험에 사용된 WHW[®]의 표1의 처방내용으로 구성약재는 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 원료시험성적서에서 합격한 표준품을 구입하여 사용하였다.

2) 試藥

실험에 사용된 시약은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), nitro blue tetrazolium salt (NBT), phenazine methosulfate (PMS), dimethyl sulphoxide (DMSO), thiobarbituric acid (TBA), trichloro acetic acid (TCA), sodium nitroprusside, sulphanilic acid, N-(1-Naphthyl) ethylene diaminedi hydrochloride, Ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazole-6-sulphonic acid (ABTS), FeSO₄ · 7H₂O, deoxyribose, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydro chloride (AAPH), and trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetra methylchroman-2-carboxylic acid), vitamin C 등으로 모두 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) WHW[®]의 제조

실험에 사용된 WHW[®]은 표 1에서의 14가지 한약재로 구성된 처방으로 일정한 규격품의 제제를 만들기 위해 의약품 GMP 시설체인 (주)한풍제약(전주, 한국)으로부터 각 50kg씩 3 Batch의 물추출 제조방법으로 Pilot 제작하였다. WHW[®]의 평균 수득율은 24%였으며, 4℃ 냉장 보관하고 실험 직전에 3차 증류수에 완전히 녹여 사용하였다.

2) DPPH radical assay

WHW[®]의 DPPH 소거효과를 Gyamfi 등²⁴⁾에 의

Table 1. Herbal prescription of WHW

藥材名	학명
黨參	<i>Codonopsis pilosula</i> (Fr.) N _{ANNF.}
丹蔘	<i>Salvia miltiorrhiza</i> B _{GE.}
半夏	<i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breitenbach
黃連	<i>Coptis japonica</i> M _{AKINO.}
吳茱萸	<i>Evodia rutaecarpa</i> (Juss.) B _{ENTH.}
淫羊藿	<i>Epimedium koreanum</i> N _{AKAI}
大黃	<i>Rheum palmatum</i> L.
紫蘇葉	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> K _{UIDO}
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> F _{ISCH.}
茵陳	<i>Artemisia capillaris</i> T _{HUNB.}
茯苓	<i>Poria cocos</i> W _{OLF}
白朮	<i>Atractylodes japonica</i> K _{OIDZ.}
猪苓	<i>Polyporus umbellatus</i> F _{RIES}
桂枝	<i>Cinnamomum cassia</i> P _{RESL}

한 방법으로 측정하였다. 즉, 일정 농도로 희석한 시료 2 ml에 absolute ethanol에 0.2 mM 농도로 희석한 DPPH 용액 1 ml을 가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며 시료 첨가 전과 후의 흡광도 차이를 %로 나타내었다.

3) Superoxide radical scavenging assay

WHW[®]에 의한 superoxide radical(O₂⁻) 저해활성은 Robak 등²⁵⁾의 방법을 통해 측정하였다. 즉, 시료 1 ml에 20 μM PMS, 156 μM NADH, 25 μM nitro blue tetrazolium이 포함된 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) 1.9 ml을 넣은 후 실온에서 2분간 반응시켰다. 이 반응액을 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Nitric oxide radical assay

WHW[®]에 의한 nitric oxide radical(NO⁻) 저해활성은 Marcocci 등²⁶⁾의 방법을 통해 측정하였다. 즉, sodium nitroprusside 용액은 10 mM sodium nitroprusside를 20 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 녹여 사용하였다. 2 ml 시료와 0.5 ml의 sodium nitroprusside 용액을 섞은 후 25°C에서 150분간 반응시켰다. 반응액 0.5 ml에 sulphanylic acid reagent 1 ml을 넣은 후 5분간 반응시키고 1 ml의 Griess Illosvoy

용액(0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride)을 넣어 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액의 흡광도를 540 nm에서 측정하였다.

5) Hydrogen peroxide decomposition assay

WHW[®]에 의한 hydrogen peroxide(H₂O₂) 분해활성은 Marcocci 등²⁶⁾의 방법을 통해 측정하였다. 즉, 1 ml 시료에 4 ml의 80 mM H₂O₂ 용액과 5 ml phosphate buffer를 넣어 반응시켰다. 반응액 1 ml에 2 ml의 dichromate/acetic acid 용액을 넣고 10 분간 반응시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Ferrous ion chelating capacity assay

WHW[®]에 의한 금속이온제거능(ferrous ion chelating capacity)을 Decker 등²⁷⁾의 방법을 통해 측정하였다. 먼저 5 ml 시료에 0.1 ml의 2 mM FeCl₂ 용액과 0.2 ml 5 mM ferrozine을 넣고 흡광도 값의 조정을 위해 methanol을 일정량 혼합한 다음 실온에서 10분간 반응시켰다. 이 반응액의 Fe²⁺/ferrozine을 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 금속이온제거능(ferrous ion chelating capacity; %)은 시료 첨가구와 비첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 표시하여 나타내었다.

7) Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) assay

WHW[®]의 총 항산화능은 TEAC 방법²⁸⁾을 이용하여 측정하였다. 즉, 산성 pH에서 무색의 환원형 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonate) (ABTS)는 H₂O₂에 의해 청록색의 ABTS⁺로 산화되게 되므로 시료 내에 항산화물질이 존재하게 되면, 이들 농도에 비례하여 ABTS⁺는 탈색되게 된다. TEAC 반응을 위해 먼저 2.45 mM K₂S₂O₈이 포함된 7 mM ABTS 용액을 제조하고 암반응 조건에서 12-48 시간 동안 안정화하였다. 대조액으로써 ascorbic acid를 사용하였으며, Trolox를 표준액으로 사용하였다. 시료, 대조액 및 표준액에 1980 μl의 ABTS⁺ 용액을 넣은 후 실온에서 6분 동안 반응시켰으며 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 TAC 활성은 nmol Trolox equivalent로 표기하였다.

8) Oxygen radical absorbance capacity(ORAC) assay

ORAC assay는 Cao 등²⁸⁾의 방법에 따라 측정하였다. 형광물질로는 fluorescein을 사용하였으며, peroxy radical을 생성하는 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)를 사용하였다. 먼저 시료 20 μl에 16.7 nM β-phycoerythrin 용액 120 μl를 넣은

후 실온에서 15 분간 반응시키고 다시 32 mM AAPH 용액 60 μl를 넣고 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 530 nm에서 2분 간격으로 60분 동안 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로 0, 0.02, 0.2, 1.0 및 2.0 nmol의 Trolox를 사용하였으며, 표준시약과 시료의 AUC (area under the curve)를 측정하였다. ORAC는 표준시약 농도와 AUC 간의 회귀곡선을 이용하여 nmol 농도로 표기하였다(AUC_{net}=AUC_{sample}/standard_AUC_{blank}).

9) 통계학적 검정

시료의 50% 자유기 소거능에 대한 결과는 3회 반복실험에 대한 평균(mean) ± 표준오차(standard deviation; SD)로 나타내었으며, 통계학적 분석은 GraphPad Prism 4.0(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 이용하여 one-way analysis를 실시하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. DPPH radicals 소거 효과

WHW[®]의 항산화 효과를 측정하기 위하여 DPPH

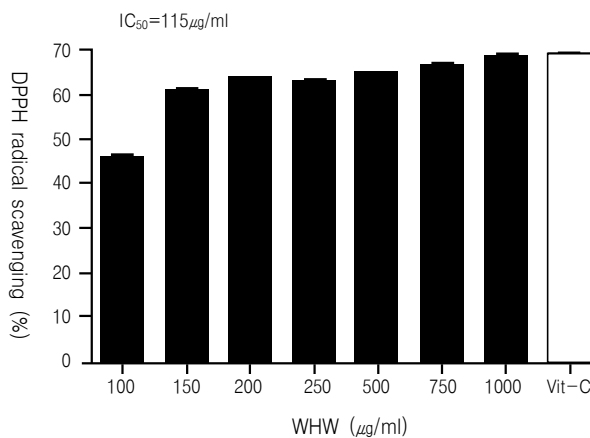


Fig. 1. DPPH radical inhibition activity of WHW[®]. Scavenging of DPPH free radical was measured by the basis of a common antioxidant assay. All values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Vit-C, vitamin-C(10 μg/ml)-treated group.

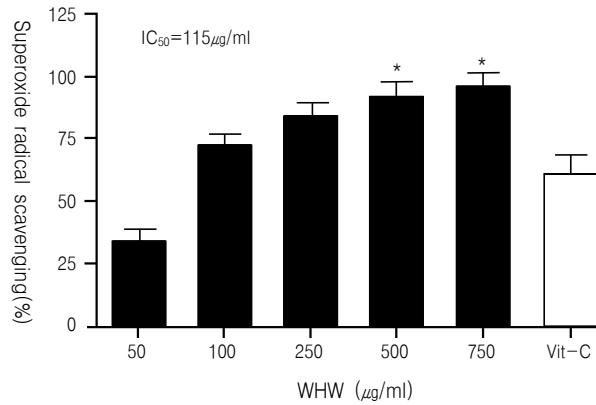


Fig. 2. Superoxide radical inhibition activity of WHW[®]. All values are expressed as mean±SD of triplicate determinations. *p<0.05 is significantly different by one way analysis of the differences between two groups (WHW[®] vs. Vit-C).

radicals이 환원되어 활성 radicals에 전자를 공여함으로써 자체 정색성을 소실하는 특성을 이용한 방법으로 전자공여작용을 조사하였다. WHW[®]의 전자공여능은 1000 µg/ml 농도에서 68.84 ± 0.53%로 vitamin-C 10 µg/ml 농도에서의 69.41 ± 0.47%와 유사한 것으로 나타났다(IC₅₀=115.28 µg/ml, Fig. 1).

2. Superoxide radicals 소거 효과

활성산소인 superoxide radical(O₂⁻)의 생성은 생

물체내에서 여러 종류의 ROS를 발생시키는 첫 단계로써 proton이 부가되어 반응성이 높은 perhydroxyl radical(H₂O₂[·])을 생성하거나 dismutation되어 H₂O₂를 생성하게 된다. 따라서 WHW[®]의 O₂⁻ radicals에 대한 소거효과를 측정된 결과, WHW[®]의 농도에 의존적으로 O₂⁻ radicals의 소거능력이 증가하였다(IC₅₀=8.564 µg/ml; Fig. 2). WHW[®]의 1000 µg/ml 농도에서 O₂⁻ radicals 소거능은 94.83 ± 10.99%였으며, vitamin-C 10 µg/ml 농도에서는 50.22 ± 24.57%

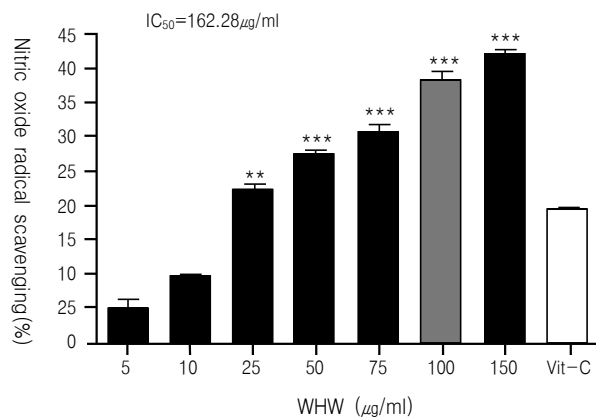


Fig. 3. Nitric oxide radical inhibition activity of WHW[®]. All values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Vit-C, vitamin-C(10 µg/ml)-treated group.

p<0.01 and *p<0.001 are significantly different by one way analysis of the differences between two groups (WHW[®] vs. Vit-C).

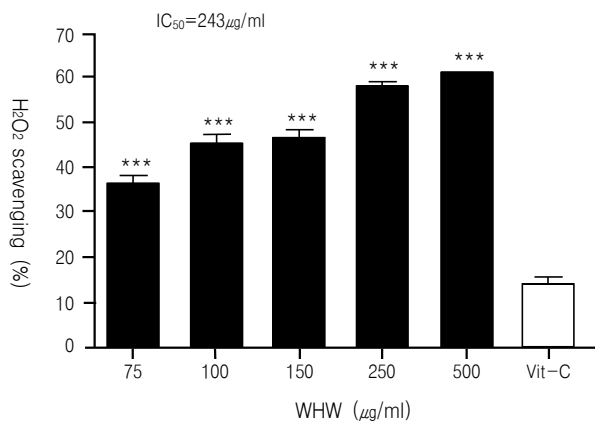


Fig. 4. Hydrogen peroxide inhibition activity of WHW[®]. All values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Vit-C, vitamin-C(10 μg/ml)-treated group.

***p<0.001 are significantly different by one way analysis of the differences between two groups (WHW[®] vs. Vit-C).

의 O₂⁻ radicals 소거효과를 나타내었다.

3. Nitric oxide radicals 소거 효과

Nitric oxide(NO)는 대식세포로부터 분비되는 ROS의 일종으로서 세포독성이 강하며 염증이나 암 그리고 다른 병리학적 조건을 유발하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 따라서 WHW[®]의 NO radicals에 대한 소거효과를 측정 한 결과(Fig. 3), WHW[®]의 농도에 의

존적으로 NO radicals의 소거효과가 증가되었다 (IC₅₀=162.28 μg/ml). WHW[®] 100 μg/ml 농도에서는 NO radicals의 소거능력이 38.11 ± 2.33%였으며, vitamin-C 10 μg/ml 농도에서는 19.36 ± 0.74%로 나타났다.

4. Hydrogen peroxide 소거 효과

Superoxide radical(O₂⁻)로부터 H₂O₂가 생성되면

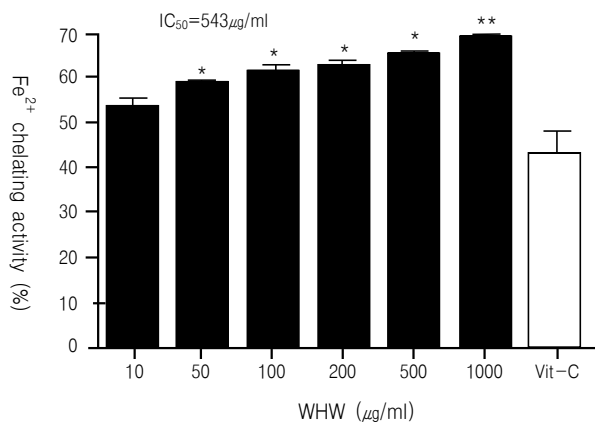


Fig. 5. Ferrous ion chelating activity of WHW[®]. All values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations.

*p<0.05 and **p<0.01 are significantly different by one way analysis of the differences between two groups (WHW[®] vs. Vit-C).

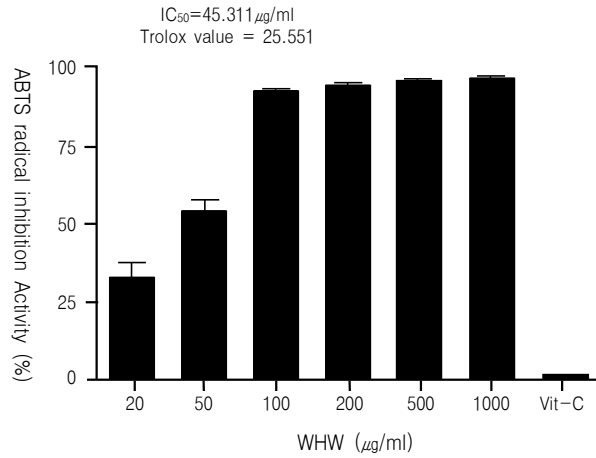


Fig. 6. The equivalent antioxidant capacity of WHW[®]. Data results were expressed as in terms of percentage of ABTS radical inhibition activity. All values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Vit-C, vitamin-C(10 µg/ml)-treated group.

자체적으로 강력한 산화효과는 없지만 전이금속이 존재할 경우 Haber-Weiss 또는 Fenton 반응을 통해 훨씬 반응성이 높은 ·OH를 형성하게 된다. 따라서 WHW[®]의 superoxide radical에 대한 소거효과를 측정할 결과, WHW[®]의 250 µg/ml과 500 µg/ml 농도에서 ·OH를 50% 이상 제거하는 것으로 나타났다 (IC₅₀=240.36 µg/ml, Fig. 4).

5. 금속이온 제거 효과

NO가 환원되면 heme 속의 금속이온(Fe)이 ferrous 상태로 전환되어 자동산화(autooxidation)를 유발하게 된다. 따라서 WHW[®]의 항산화 효과를 금속이온 제거능 측정을 통해 조사한 결과(Fig. 5), WHW[®]는 금속이온제거능이 있었으며, 0.25 mg/ml과 0.5 mg/ml 농도에서 57.41 ± 1.91%와 60.72± 0.266%로 나타

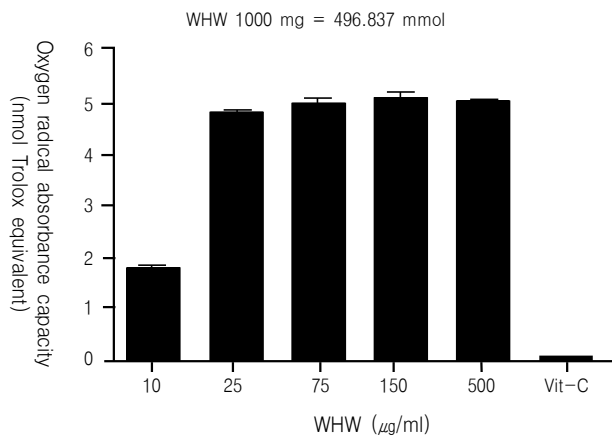


Fig. 7. Oxygen radical absorbance capacity of WHW[®]. Data results were expressed as in terms of nmol Trolox equivalent. Each bar represents the mean ± SD of triplicate determinations.

났다(IC₅₀=543.19 μg/ml).

6. Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC) assay

WHW의 총산화능(total antioxidant capacity; TAC)을 ABTS radical inhibition activity를 이용하여 TEAC assay법으로 측정하였다. 그 결과 WHW[®]의 TAC는 20, 50, 100, 200, 500 및 1000 μg/ml 농도에서 32.24 ± 7.82%, 53.84 ± 6.05%, 92.42 ± 0.16%, 94.36 ± 0.83%, 95.60 ± 1.11% 및 96.73 ± 0.12%로 측정되었다(IC₅₀=45.311 μg/ml; Fig. 6). WHW[®]는 100 μg/ml 농도에서 vitamin C와 유사한 TAC를 나타내었다.

7. Oxygen radical absorbance capacity(ORAC) assay

TEAC와 더불어 ORAC assay는 AUC를 측정함으로써 free radical 손상에 대한 억제 시간과 억제율을 모두 반영하는 총 항산화능 측정 방법이다. 따라서 WHW[®]의 ORAC를 측정한 결과, WHW[®] 25, 75, 150 및 500 μg/ml 농도에서 4.77 ± 0.053, 4.97 ± 0.154, 5.07 ± 0.148 및 5.10 ± 0.019 nmol의 ORAC를 나타내었고(Fig. 7), WHW[®]과 ORAC 간 회귀분석(Y=4.715+ 0.1052X)을 수행한 결과, WHW[®] 1000 mg/ml은 496.83 nmol의 총 항산화능이 있는 것으로 나타났다.

고 찰

질병의 원인 중 하나로 알려져 있는 free radical은 생체에 치명적인 산소독성을 일으키며, 세포막 분해, 단백질 분해, 지질 산화, DNA 변성 등을 초래하여 세포의 기능 장애를 유발하고 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 염증, 노화, 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다¹⁻⁵⁾. 따라서 활성산소를 방어하는 항산화물질은 이러한 질병들의 치료 가능

성 때문에 관심의 대상이 되고 있다⁶⁾. 현재 사용되고 있는 항산화제로는 BHT, BHA 등과 같은 합성 항산화제와 α-tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids, 탄닌 등과 같은 일부 천연 항산화제 및 SOD와 같은 항산화 효소에 국한되어 있는 실정이다. 그러나 이들 항산화제는 독성, 저활성 및 용도의 한계성 등의 여러 가지 문제로 인하여 사용에 제한을 받고 있다²⁾. 최근 천연 항산화제에 대한 연구가 이루어지고 있는데 특히 다양한 한약재 소재로부터 보다 안전하고 생리활성이 우수한 천연 항산화제 개발을 위한 연구가 활발히 수행되고 있다.

加減溫脾湯合五苓散(WHW)은 五苓散에 溫脾湯을 加減한 것으로서 慢性腎不全患者의 요독증 증상이 脾腎陽虛로 濁陰이 上逆하여 발생하는 것에 기초하여 利水劑인 五苓散에 脾腎陽虛를 도우는 溫脾湯을 가미한 것이다. 현재 加減溫脾湯合五苓散은 韓方 臨床에서 腎不全 환자 치료에 사용하고 있다. 加減溫脾湯合五苓散에 대한 연구로는 최근 저자에 의해 TGF-β1에 의한 신장세포 섬유화에 대한 억제효과¹⁹⁾, 급성신부전 쥐에서 항산화효과와 신장조직의 섬유화 억제효과^{20,21)}, 당뇨병성 신부전 쥐에서 혈청 과산화지질과 크레아틴 수치의 감소효과²²⁾, 및 대식세포에서의 항염증효과²³⁾ 등이 보고되었다. 본 연구에서는 WHW가 항산화효과를 통해서 산화적 스트레스로부터 신장조직을 보호할 수 있는지 확인하기 위해 WHW[®]의 항산화 활성을 *in vitro* 방법으로 평가하였다.

Free radical의 반응성은 산소분자처럼 낮은 것에서부터 superoxide radical(O₂^{·-}), hydroxyl radical(OH[·]), hydrogen peroxide(H₂O₂), nitric oxide radical(NO[·]), singlet oxygen(¹O₂)과 같은 높은 것까지 다양하게 존재한다^{3,4)}. 유해한 free radical을 억제하는 생리작용으로는 전자공여작용, 항산화효소(SOD) 및 항산화물질(GSH, vitamin C, vitamin E, 베타카로틴, 노산, 타우린, 빌리루빈 등) 유사활성 등이 있다. 항산화작용 중 전자공여작용은 산화성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 것이며, SOD나 GSH 유사활성은 생체 내에서 생성되고 전자 환원으로 반

응성과 파괴성이 큰 superoxide anion radical을 정상 상태의 산소로 전환시켜주는 것이다^{25,30}. 최근에는 한약소재를 포함하여 한약재나 음식물에서 활성산소를 방어하는 항산화물질을 흡수함으로써 인체 내 산화로 인한 장애를 방어하고, 질병을 예방하거나 치료하는 효과를 얻고자하는 연구가 활발히 이루어지고 있다^{5,6}. 본 연구에서 WHW[®]는 DPPH, superoxide, nitric oxide와 같은 저해성 free radicals을 효과적으로 제거하는 것으로 나타났다. 또한 WHW[®]는 hydrogen peroxide 분해활성을 나타내었고 금속이온제거능이 있는 것으로도 확인되었다.

1980년대 중반 자유기 생성물질과 항산화물질을 함유한 실험계에서 최대 산소소비에 요하는 시간을 측정하여 그 결과를 수용성 vitamin E 유도체인 Trolox로 측정된 시간과 비교하는 total radical trapping antioxidant parameter(TRAP)법이 개발되었다³¹). 이 방법을 활용하여 몇 가지 항산화 활성 측정법이 제안되었는데 시료와 대조군의 AUT 차이를 측정하는 ORAC와 TEAC 측정법이 이에 해당된다. 즉, 시료 내에 항산화 물질이 존재하면 ROO·나 ·OH가 phycoerythrin (PE)에 주는 화학적 손상을 PE가 산화되며 방출하는 형광의 감소로 측정하게 되며 Trolox는 표준시약으로 TAC 활성을 Trolox equivalent로 표기한다. 본 연구에서도 WHW[®]의 총 항산화 능력을 ORAC와 TEAC assay 방법으로 측정하였는데 그 결과, WHW[®]는 활성 산소종에 의한 독성에 대한 저항성이 있는 것으로 나타났다. 본 연구결과를 통해 WHW[®]는 저해성 free radicals을 효과적으로 제거함으로써 항산화 활성을 나타내며, 이는 WHW[®]가 항산화 활성을 통해서 산화적 스트레스와 같은 손상으로부터 신장을 포함하여 인체 조직을 보호할 수 있음을 의미한다.

WHW[®]의 구성약재 중 甘草³², 丹蔘³³, 大黃³⁴, 猪苓³⁵은 항산화 효과가 보고되었으며, 五苓散을 구성하는 약재 중 桂枝와 猪苓이 溫陽化水 作用을 하며 消化器에 분포하는 迷走神經의 興奮性 작용과 유사하다고 보고되었다³⁶. 또한 五苓散의 간독성에 대한 억제작용³⁷과 gentamicin sulfate로 유발된 급성

신부전 동물의 신장세뇨관 손상에 대한 보호효과³⁸가 보고되었다. 五苓散은 저밀도지단백의 산화억제 효과가 보고되어 신장의 사구체경화증의 위험도를 감소시킬 수 있다고 하였다³⁹. 본 연구결과로부터 WHW 완제는 항산화 효과가 인정되며, 이는 기존에 보고한 바와 같이 WHW가 신부전 동물의 신장에서 항산화효소의 활성을 증가시키고 지질과산화를 억제시킴으로써 항산화 효과를 나타내는 것과 함께 WHW[®]가 산화적 스트레스로부터 신장조직을 보호할 수 있고, 또한 항산화제로도 개발되어질 수 있음을 의미한다.

결론

본 연구에서는 WHW 완제(WHW[®])의 항산화 효과를 *in vitro* 실험을 통해 확인하였다.

1. WHW[®]는 DPPH radicals 소거능을 나타내었다(IC₅₀=115.28 μg/ml).
2. WHW[®]는 nitric oxide radicals 소거능을 나타내었다(IC₅₀=162.28 μg/ml).
3. WHW[®]는 superoxide radicals 소거능을 나타내었다(IC₅₀=8.56 μg/ml).
4. WHW[®]는 ferrous ion chelating activity를 나타내었다(IC₅₀=543.19 μg/ml).
5. WHW[®]의 총산화능은 1000 mg/ml 농도에서 496.83 nmol로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 보건복지가족부의 한방신약개발사업연구비 지원(B070044)에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann N Y Acad Sci 2000;899:

- 136-47.
2. Kim SK. Evaluation of antioxidant activity. *Safe Food* 2008;4:35-40.
 3. Cross EE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease (clinical conference). *Ann. Intern. Med.* 1987;107:526-45.
 4. Adelson R, Saul RL, Ames BN. Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic and life span. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85: 2706-8.
 5. Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.* 2004: 794-804. Review.
 6. Nelson L, Perrone J. Herbal and alternative medicine. *Emerg Med Clin North Am.* 2000; 18: 709~22.
 7. Jang DM. Practical sinbyeonghak of Chinese Medicine. Beijing;Chinise Medicine Publication. 1990 pp. 344-46.
 8. Jang GB. Gyeongakjeonsu. Seoul;Dae Sung Printing. 1988 p. 467.
 9. Gang GM, Pomyeonghye. Simplicity bangje dictionary. Beijing;Chinise Medicine Publication. 1989. pp. 173, 887, 1146.
 10. Nanjing Institute of Chinese medicine. Chinese medicine bangje dictionary;Beijing. People's Medical Publishing House. 1997. pp. 10844-47.
 11. Zhongshan Medical Institute. Junguibangjeseongang. Guangdong;Guangdong Science & Technology Press. 1981. pp. 84-9.
 12. Sun S. Qian-Jin-Yi- Fang. Taebuk;Jipmunseoguk. 1989. p. 238
 13. Takizawa Y, Morita T, Fujitsuka N, Kido A, Shindou S, Tomisawa H, et al. Pharmacokinetics of TJ-8117(Onpi-to), a drug for renal failure (II) : Effects of food, repeated administration and renal failure to plasma concentration of [3H]-(-) epicatechin 3-O-gallate in rats. *Eur J Drug metabolism and pharmacokinetics*, 2005;30:175-80.
 14. Hattori T, Fujitsuka N, Kurogi A, Shindo S. Effect of Onpi-to on TGF-beta 1 in rats with 5/6 nephrectomized chronic renal failure, *Nippon Jinzo, Gakkai Shi.* 1996;38:475-83.
 15. Yokozawa T, Satoh A, Nakagawa T, Yamabe N. Attenuating effects of wen-pi-tang treatment in rats with diabetic nephropathy. *Am J Chin Med.* 2006;34:307-21.
 16. Kim KT, Doo HK. Effects of Yukmijihwangang on the Alloxan-induced Diabetic and Renal Damage Rats. *K.H.M.* 1988;4:280-97.
 17. Hwang WD. A Report on Clinical application of Chenxiang about Chronic Renal Failure. *Korean Oriental Internal Medicine.* 2004;25:368-78.
 18. Ahn YM, Ahn SY, Doo HK. The immunoregulatory effects of Onbi-tang and Dangguijakyak-san in minimal change nephrotic syndrome. *J Korean Oriental Med.* 2000;21:20-8.
 19. Doo HK, Oh SD, Ahn SY, Cho DH. Effects of Akebia quinata DENCE and Stephania tetrandra S. MOORE on Rats with Acute Renal Failure Induced by Gentamicin Sulfate. *K.H.M.* 1994;10: 13-25.
 20. Lee SI, Kim HJ, Baek MC, Park KM, Park Y, Yoon CH, et al. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san, an oriental herbal prescription, attenuates epithelial-mesenchymal transdifferentiation stimulated by TGF-beta1 in kidney cells. *Phytother Res.* 2007; 21:548-53.
 21. Seok YM, Kim J, Park MJ, Boo YC, Park YK, Park KM. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san attenuates kidney fibrosis induced by ischemia/reperfusion in mice. *Phytother Res.* 2008;22:1057-63.
 22. Seok YM, Kim J, Choi KC, Yoon CH, Boo YC, Park Y, et al. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san attenuates kidney ischemia/reperfusion injury in mice. A role for antioxidant enzymes and heat-shock proteins. *J Ethnopharmacol.* 2007;112:

- 333-40.
23. Jung HW, Yoon CH, Kim YH, Boo YC, Park KM, Park YK. Wen-Pi-Tang-Hab-Wu-Ling-San extract inhibits the release of inflammatory mediators from LPS-stimulated mouse macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2007;114:439-45.
 24. Gyamfi MA, Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally induced liver injuries. *General Pharmacology* 1999; 32:661-67.
 25. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology* 1988;36:317-22
 26. Marcocci PL, Sckaki A, Albert GM. Antioxidant action of *Ginkgobiloba* extracts EGP761. *Methods in Enzymology* 1994;234:462-75.
 27. Decker EA, Welch B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 1990;38:674-77.
 28. Schlesier K, Harwat M, Böhm V. and Bitsch, R. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research* 2002;36:177-87.
 29. Cao G, Verdon CP, Wu AHB, Wang H, Prior RL. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. *Clinical Chemistry* 1995;41:1738-44.
 30. Kuramoto T. Development and application of food materials from plant extracts such as SODUp to date *Food Processing* 1992;27:22-3.
 31. Prior RL, Wu X, Chaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005;52:4290- 302.
 32. Kim SJ, Kweon DH, Lee JH. Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of Licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). *Korean J Food Sci Technol* 2006;38;584-8.
 33. Yang SA, Im NK, Lee IS. Effects of Methanolic Extract from *Salvia miltiorrhiza* Bunge on *in vitro* Antithrombotic and Antioxidative Activities. *Korean J Food Sci Technol* 2007;39:83-7.
 34. Kim CJ, Suh HJ. Antioxidant Activities of Rhubarb Extracts Containing Phenolic Compounds. *Korean J Food Culture.* 2005;20:77-85.
 35. Kim DG, Son DH, Choi UK, Cho YS, Kim SM. The Antioxidant Ability and Nitrite Scavenging Ability of *Poria cocos*. *J Korean Soc Food Sci Nitr* 2002;31:1097-101.
 36. Nam HS, Cho CS, Kim CJ. A Study on the Healing Mechanism of Herbal Medicine, Oryoungsan. *Oriental Medicine Journal of Daejeon University.* 2001;10:157-66.
 37. Kang YH, Kwon OS, Choi HS, Lee JH. Effect of the Oryungsan on the injured liver in CCl4-treated rats. *Oriental Medicine Journal of Dongguk University.* 1996;5:131-47.
 38. Cho DH, Doo HK, Kim IS, Son SY, Jung YH, Han YH, et al. Effects of Gamioryeongsan, Gamiyukmijihwangtang and Vinegar on Rats with Acute Renal Failure Induced by Gentamicin Sulfate. *K.H.M.* 1991;7:287-312.
 39. Lee JJ, Lee TW, Chang HH, Kim HJ, Ihm CG, Kim MJ. Inhibitory Effects of Siryungtang and Onbitang on Oxidation of Low Density Lipoprotein. *The Korean J Nephrology* 2001;20:478-85.