大韓鍼灸學會誌 第15券 第2號
Vol.15, No.2, December, 1998

시호 약침제제의 자유기 소거능 및 지질과산화 억제효능에 관한 연구

문진영 · 임종국*

ABSTRACT

Scavenging Effects on Free Radicals and Inhibitory Effects on Lipid Peroxidation of Bupleury Radix Aqua-Acupuncture Solution *in Vitro*

Jin-Young Moon, O.M.D., Ph.D. and Jong-Kook Lim, O.M.D., Ph.D.*

Dept. of AM-Pointology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Bupleury radix has been used for the treatment of fever, liver disease, inflammation in traditional medicine. The present study was carried out to evaluate the antioxidant effects of *Bupleury radix* aqua-acupuncture solution(BRAS) *in vitro*. Oxygen derived free radicals produced in the course of normal aerobic life, such as superoxide anion radical($O_2^{-}\cdot$), hydroxyl radical(·OH), hydrogen peroxide(H_2O_2) and singlet oxygen($^1O_2$) can attack polyunsaturated fatty acid in cell membranes, enzymes, other cell compounds, and give rise to lipid peroxidation, DNA damage, lipofuscin accumulation, structure alteration of cell membrane and cell death. In this study, antioxidant effects of BRAS on lipid peroxidation were determined according to the method of TBA. BRAS inhibited markedly peroxidation of linoleic acid during the autoxidation, and also inhibited lipid peroxidation induced by hydroxyl radical derived from H_2O_2-Fe^{2+} in rat liver homogenate. And BRAS showed 30% scavenging effect on DPPH radical, also exhibited a 53% inhibitory effect on superoxide generation from xanthine-xanthine oxidase system. In addition, BRAS protected the cell death induced by *tert*-butyl hydroperoxide(*t*-BHP) and significantly increased cell viability in the normal rat liver cell(Ac2F).

Key words : *Bupleury radix*, Antioxidant, Free radicals, Lipid peroxidation,

*동국대학교 한의과대학 경혈학교실

※본 연구는 "97년도 한의학발전 연구지원사업"의 지원에 의하여 이루어진 것임.

Ⅰ. 서 론

藥鍼療法은 穴位注射療法 혹은 中草藥注射療法[16]으로도 명명되고 있으며, 단방 혹은 복방을 정제하여 이를 유관한 혈위, 압통점 혹은 체표의 촉진으로 얻어진 양성 반응점에 주입함으로써 침자극 효과와 약물의 삼투에 의한 자극효과 및 약물 자체의 약리작용에 의해 질병을 예방하고 치료하고자 하는 新鍼療法으로 약침 정제법, 유효성 시험 및 독성 시험에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[15,17]. 특히 본 요법은 약물이 경구적으로 투여되는 경우와는 달리, 소화관에서의 대사과정을 거치지 않으므로 약물고유의 성분이 표적부위에서 신속하게 효과를 발휘할 수 있다는 장점이 있으므로 한방 치료의 새로운 영역으로 많은 관심이 집중되고 있다. 시호는 미나리과에 속한 다년생초본인 시호의 뿌리 및 전초로서, 성질은 약간 차고(微寒) 맛은 약간 쓰며(苦) 독이 없고 족소양경과 족궐음경으로 들어가는 약(行經藥)이다[5,6]. 본 약물은 能散十二經瘧疸血凝氣滯 退熱升陽 消炎退腫 推陳治新 發表和裏 解鬱調經 疏肝鬱邪의 효능이 있어 胸脇苦滿 口苦耳聾 頭痛目眩 寒熱往來와 氣虛下陷 久瘧脫肛 子宮下垂 月經不調 肝氣鬱結에 대한 主治를 가지고 있다. 그리고 시호의 주성분으로는 bupleurmol, oleic acid, linolenic acid, palmitic acid, stearic acid, 포도당 및 saikosaponin 등의 다양한 saponin 성분이 함유되어 있다[1,2,3,4]. 또한 시호는 小柴胡湯, 柴胡加龍骨牡蠣湯, 大柴胡湯, 柴胡桂枝湯, 淸肝解鬱湯 등의 다수 처방에 주요 구성약물로서 본 약물은 少陽病症에 주로 활용되고 있으며, 특히 한방 임상에서는 간장 질환, 염증, 발열 및 통증의 치료에 유효한 것으로 알려져있다.

생체가 생명을 유지해 나가는 정상적인 호기성 대사과정 및 다양한 외부적 원인, 즉 약물남용, 흡연, 과음, 방사선, 농약, 식품첨가물, 화공약품 등으로 인하여 superoxide anion(O_2^-), hydroxyl radical(·OH), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen($^1O_2$) 등의 자유기(free radical) 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 부산물로 생성되며, 이러한 부산물들은 세포막 인지질을 과괴하여 지질과산화 반응을 일으킬 뿐 아니라, 단백질, DNA 등과 같은 세포내 거대분자들을 손상하여 세포괴사, 돌연변이, 유전적 출산결함, 암, 노화 등을 초래할 수 있다고 보고되고 있다[26,27]. 최근 자유기에 의한 산화적 손상으로부터 생체를 보호하고자 비교적 생체에 무해하다고 여겨지는 천연물들을 대상으로 항산화성분을 검색하고 분리하고자 하는 연구보고를 다수 접할 수 있다[29,32,33,35,36]. 한편 한의학 분야에서도 한약 및 약침제제를 대상으로 항산화 효능을 규명하는 연구가 이루어고 있는데 이들 연구들은 주로 抗老化 연구와 관련되어 진행되어왔다. 따라서 이들 연구에서 사용된 약물들은 老化의 주요 원인으로 인식되는 腎虛와 瘀血의 예방과 치료에 유효한 補劑[8,13,14,20,21,22,23] 또는 活血化瘀劑[10,11,12,19,25]가 대부분이었다. 그러나 최근 저자등은 간장 보호, 소염 및 해열제 등의 목적으로 널리 사용되고 있는 시호煎湯, 황금 약침 제제 등을 대상으로 연구한 결과, 이들 약물들이 *in vitro*에서 매우 현저한 항산화 효능을 나타낸다는 결과를 보고[7,9]한 바 있다. 본 연구에서는 시호 약침제제의 항산화 효능을 규명하기 위한 일환으로 본 약물의 자유기 소거능 및 지질과산화 억제효과, 그리고 정상 간세포에 대한 보호효과 및 간세포 독성 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

A. 실 험 재 료

1. 시료 및 세포

본 실험에서 시호 약침액을 제조하기 위하여 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 시호를 정선하여 사용하였고, 추출용매인 물은 이온교환수지를 통과시킨 증류수를 사용하였다. 또한 본 실험에서 사용한 배양 정상 간세포(Ac2F)는 HSRB (Health Science Resources Bank, Osaka, Japan)로부터 분주받아 사용하였다.

2. 시 약

시호 약침액의 항산화 효능 측정에 사용된 시약으로서 linoleic acid, 2-thiobarbituric acid(TBA), lauryl sulfate sodium(SDS), α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH), *tert*-butylhydroperoxide(*t*-BHP), (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), Dulbecco's Modified

Eagle Medium(DMEM), L-glutamine, butylated hydroxytoluene(BHT), 3-t-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)은Sigma사(Sigma Chem. Co. St. Louis, MO., U.S.A.), fetal bovine serum(FBS) 및 antibiotic/antimycotics은 Gibco사(Gibco BRL, Life Techno. Inc., NY, U.S.A.)로부터, malondialdehyde tetrabutyl ammonium salt(MDA)는 Fluka사(Fluka Chemie AG, Switzerland), DL-α-tocopherol은 Wako사(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan), trichloroacetic acid(TCA)는 Janssen Chimica(Belgium)로부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

B. 실 험 방 법

1. 시호 약침액의 제조

본 실험에서는 水提-알콜 沈法[18]에 의해 다음과 같이 시호 약침액을 제조하였다. 먼저 시호 60g을 조말하여 수직으로 환류냉각관이 부착된 원저 flask에 넣고, 증류수 400ml를 가한 후, 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 그 후 여과액 중에 남아 있는 미량의 침전물을 제거하기 위해 4℃에서 2,500rpm으로 10분간 원심분리하여, 그 상층액을 취하였다. 상층액을 다시 rotary evaporator(BUCHI RE121, Switzerland)로 감압농축하고, 농축액에 증류수를 가하여 전량을 50ml이 되도록 한 다음, membrane filter(0.22㎛, Whatman®, Germany)로 여과하였다. 위의 방법으로 제조한 시호 추출액 50ml에 ethanol을 가하여 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 이 때 ethanol은 99.9% ethanol을 사용하였으며, 첨가량은 시호 물 추출액이 단계별로 75%, 85% 및 95% ethanol 용액이 되게하면서 침전물을 제거한 다음, 감압농축하였다. 감압농축하여 생성된 농축액에 생리식염수를 가하고 1N NaOH로 pH 7로 조절하여 전량이 200ml가 되게 한 다음, 저온에서 24시간 방치한 후, membrane filter(0.22㎛, Whatman®, Germany)로 여과하여 시호 약침액의 원액으로 사용하였다.

2. 지질자동산화계에서의 항산화 효과 검토

① Linoleic acid emulsion의 조제

Linoleic acid 유지 혼탁액은 Osawa 등의 방법[33]에 따라 제조하였다. 즉 linoleic acid 0.13ml, 99.0% ethanol 10ml, 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 10ml을 혼합하고, 시호 약침액을 농도별로 첨가한 다음, 증류수로 total volume이 25ml이 되도록 조절하였다. 이 혼합액을 test tube에 넣고, 40℃ 배양기(VS-1203P3N, Vision Scientific Co., Korea)에서 배양하여 자동산화를 촉진시켰다.

② 지질과산화도 측정

TBA법에 의한 MDA 정량은 Ohkawa 등의 방법[31]에 따라 실시하였다. 즉 40℃에서 배양시킨 linoleic acid 혼탁액 50㎕에 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2ml, 20% acetic acid(pH 3.5, 10N NaOH) 1.5 ml, 0.8% TBA 수용액 1.5 ml을 넣고, 증류수로 이 혼합액의 total volume을 4ml로 조절한 다음, 5℃에서 60분간 방치하고, 다시 95℃에서 60분간 발색시킨 뒤, 흐르는 수돗물에서 냉각시켜 spectrophotometer (Gilford, Response™, U.S.A)를 사용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 과산화지질의 함량은 MDA로 표준검량곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA μM로 환산하여 표기하였다.

3. DPPH radical 소거효과 측정

시호 약침액의 DPPH radical에 대한 scavenging 효과를 알아보기 위하여 Hatano 등의 방법[28]에 따라 다음의 실험을 실시하였다. 먼저 농도별 시호 약침액과 증류수의 혼합물 4ml을 1.5×10^{-4}M DPPH/MeOH 1ml와 혼합하여 잘 흔들어 준 다음, 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Fenton 반응계에서의 항산화 효과 측정

최종농도가 7.5mg/ml 흰쥐 간 조직 균질액, 1mM $FeCl_2$, 3mM H_2O_2와 농도별 시호 약침액이 첨가된 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4)의 반응용액을 1ml로하여 37℃에서 10분간 반응시킨 다음, TBA법으로 과산화지질의 함량을 측정하였다.

5. Superoxide의 생성 억제효능 측정

Xanthine-xanthine oxidase계에서 생성되는 O_2^-·에 대한 시호 약침액의 억제효과를 측정하기 위하여 다음과 같은 반응용액을 조제하였다. 먼저

250㎛M xanthine 0.5ml과 농도별 시호 약침액 0.1ml 및 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 1.3ml을 함유하는 반응용액을 실온에서 3분간 정치한 다음, 0.1unit xanthine oxidase를 첨가하여, 반응용액의 총량을 2ml로 조절한 후, 290nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하였다.

6. 세포배양계에서의 항산화효능 측정

① 세포배양

정상 간세포(Ac2F)를 10% FBS-DMEM 배지로 37℃, 5% CO_2의 조건에서 배양하여, 2~3일마다 한번씩 75-cm^2 plastic flask(Corning Co., U.S.A)에서 subculture하여 세포주를 유지하였다.

② 시호 약침액의 세포독성 측정

정상 간세포(Ac2F)에 대한 농도별 시호 약침액의 세포독성을 관찰하기 위하여, 먼저 24-well plate에 배양 간세포를 5×10^4cells/well이 되도록 넣고, 시호 약침액을 농도별로 6배 농축액, 4배 농축액, 2배 농축액, 원액, 2배 희석액, 5배 희석액, 10배 희석액, 20배 희석액을 well당 200㎕씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM배지로 total volume을 2ml로 조절하여 37℃, 5% CO_2의 조건에서 18~20시간 배양한 다음, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

③ 시호 약침액의 항산화작용 측정

t-BHP의 산화작용으로 인한 세포괴사에 시호 약침액이 미치는 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 24-well plate에 간세포를 5×10^4cells/well이 되도록 넣고, 시호 약침액을 농도별로 2배 농축액, 원액, 2배 희석액, 5배 희석액, 10배 희석액을 well당 200㎕씩 첨가한 다음, 10% FBS- DMEM 배지로 total volume을 2ml로 조절하여 37℃, 5% CO_2의 조건에서 18~20시간 배양하였다. 그 후 CMF-PBS로 2회 세척하고 SFM을 well당 2ml씩 가하고, *t*-BHP의 최종농도가 1mM이 되도록 첨가한 다음, 이를 다시 120분 배양시킨 후, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

④ MTT assay

MTT assay는 Sladowski 등의 방법[34]을 따라 행하였다. 간세포를 배양시킨 24-well plate에 MTT를 총 용량의 10%가 되도록 넣고, 4시간 배양시킨 다음, 90×g에서 10분간 원심분리하였다. 그 후 배지를 제거하고 EtOH/DMSO(1:1 v/v)를 600㎕씩 넣고 20분간 shaking한 다음, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT dye[3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide]가 blue formazan을 형성하는 것을 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ⅲ. 실험결과 및 고찰

1. 지질 자동산화 억제효과

지질의 자동산화는 분자상의 산소와 불포화지방산이 반응하기 위해서 주로 지질이 활성화되는 이른바 지질과산화 반응의 일종이라 할 수 있다. 본 연구에서는 시호 약침이 지질과산화 반응에 어떠한 영향을 미치는가를 관찰하고자 불포화지방산인 linoleic acid의 자동산화계에서 시간경과에 따른 지질과산화물의 함량을 측정하였다. 그 결과, 시호 약침액을 농도별로 2배 농축액, 원액, 2배, 5배희석액을 첨가한 실험군에서 배양 6일째에 MDA의 생성량이 각각 4.70, 4.52, 1.68, 5.09㎛M로 시호 약침액 무첨가군의 23㎛M에 비해 MDA의 생성이 현저하게 감소되어 나타났으며, 이는 항산화제로 알려져 있는 BHA와도 유사한 수준이었다(Table Ⅰ). 이 결과에서 시호 약침액 첨가군이 높은 항산화 효과를 나타낸 것은 연쇄적인 지질과산화 반응과정중에서 주된 역할을 담당하는 활성화된 지질 라디칼의 생성을 억제하거나 직접적으로 소거함으로써 과산화지질의 생성이 억제된 것으로 생각된다.

2. DPPH radical 소거효과

본 연구에서는 시호 약침액의 자유기 소거능을 알아보기 위한 방법의 일환으로 DPPH radical과 농도별 시호 약침액을 반응시킨 다음, 자유기에 대한 직접적 소거능을 관찰하였다. 그 결과 시호 약침액을 농도별로 2배 농축액, 원액 및 2배, 5배, 10배, 20배, 50배 희석액을 첨가한 실험군에서 시호 약침액 무첨가군에 비하여 각각 44.74, 33.54 27.26, 23.96, 17.44, 9.27, 6.59%의 농도 의존적인 자유기 소거효과를 보였다(Table Ⅱ). 일반적으로

항산화제는 DPPH radical에 전자 혹은 수소원자를 공여함으로써 불안정한 형태의 DPPH radical을 보다 안정한 형태로 변환시키는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서 시호 약침액은 최고 45% 정도의 자유기 소거능을 보임에 따라 시호 약침액의 항산화력은 본 약물이 자유기에 대하여 전자 공여자(electron donor)로 작용할 수 있는 성분을 함유함으로써 활성이 강한 자유기를 보다 안정된 형태의 화합물로 변환시키기 때문으로 판단된다.

3. Fenton 반응계에서의 지질과산화 반응에 대한 억제효과

Hydroxyl radical은 현재까지 알려진 자유기 가운데 반응성이 가장 강한데, 일반적으로 superoxide 및 hydrogen peroxide 등의 활성산소에 비해서도 활성이 훨씬 강하므로 생체 세포막에서 지질과산화 반응을 개시하는 동시에 세포막 및 거대분자에 대한 직접적 손상을 일으키는 주된 자유기로 인식되어지고 있다[24]. 본 실험에서 Fenton 시스템에서 생성된 hydroxyl radical($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$)은 흰쥐 간조직 중에 함유되어있는 불포화지방산 탄화수소(LH) 이중결합 부위로부터 수소를 탈취함으로써 fatty acid radical이 생성($LH + \cdot OH \rightarrow L\cdot + H_2O$)되며, 이렇게 활성화된 지질은 산소분자와 결합함으로써 peroxy radical을 생성($L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot$)하고, peroxy radical은 다시 인접한 부위에 있는 탄화수소와 반응하여 과산화지질($LOO\cdot + LH \rightarrow L\cdot + LOOH$)을 생성한다. 이 반응단계에서 과산화지질(LOOH)과 함께 생성된 지질 라디칼(L·)은 다시 산소분자와 결합함으로써 지질과산화 반응은 연쇄적으로 진행된다. 본 실험에서는 시호 약침액이 Fenton 반응계에서 생성되는 hydroxyl radical에 의한 흰쥐 간 조직의 지질과산화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 시호 약침액을 농도별로 2배 농축액, 원액 및 2배, 5배, 10배, 20배, 50배 희석액을 첨가한 실험군에서 무첨가군인 대조군에 비하여 각각 91.11, 66.86, 57.58, 23.23, 14.21, 16.49, 8.14%의 지질과산화물의 생성 억제 효과를 나타내었다(Table Ⅲ). 이 결과에서 특히 시호 약침액 2배 농축액은 항산화제인 BHT와 거의 비슷한 수준의 현저한 항산화 효능을 보였다. 본 실험의 결과만으로 시호 약침액이 과산화지질의 생성을 억제한 기전에 대해서는 정확하게 설명될 수는 없겠으나, 다만 몇 가지의 가능성은 제시될 수 있다고 생각된다. 먼저 위의 DPPH radical을 이용한 실험결과(Table Ⅱ)에서 살펴본 바와 같이 시호 약침액의 유효 성분이 전자 공여자로 작용하여 Fenton 반응계로부터 과산화지질이 생성되기까지의 일련의 반응과정에 주된 역할을 하고 있는 여러 종류의 자유기를 직접적으로 소거할 수 있기 때문으로 판단된다. 그러나 본 약물이 어떤 자유기를 보다 특이적으로 소거하는지, 그리고 과산화지질의 연쇄적 생성 경로 중 어느 단계를 주로 차단할 수 있었는지에 대해서는 본 실험만으로는 규명할 수 없었다. 한편 시호 약침액이 Fenton 반응계로부터 유도된 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응을 억제하는 기전에 관한 또 하나의 가능성은 본 약물의 성분들 중에 철이온과 chelate되기 쉬운 유효 성분이 존재할 가능성을 생각해볼 수 있으므로 향후 이에 관한 연구를 계속 진행할 계획이다.

4. Xanthine-xanthine oxidase계에서의 superoxide 생성 억제효과

본 실험에서는 시호 약침제제의 superoxide 생성에 미치는 효과를 검토하기 위하여 superoxide 생성계로써 xanthine-xanthine oxidase 시스템을 이용하였다. 즉 xanthine-xanthine oxidase 시스템에서 생성된 superoxide가 전자수용체로 작용하는 cytochrome c에 전자를 공여함으로써 발생하는 cytochrome c의 환원정도를 단위시간당 흡광도의 변화로 측정하였다. 그 결과, 시호 약침액을 농도별로 2배 농축액, 원액 및 2배, 5배, 10배, 20배, 50배 희석액을 첨가한 실험군에서 무첨가군인 대조군에 비하여 각각 53.11, 34.65, 31.45, 25.42, 23.92, 22.03, 18.27%의 농도 의존적인 superoxide의 생성 억제 효과를 보였다(Table Ⅳ). 일반적으로 superoxide는 방사선과 같은 외부적인 요인에 의하여 생성될 뿐만 아니라 catecholamine, ferrohemoprotein, thiols, ascorbate, hydroquinone 등과 같은 생물학적 관련분자들의 자동산화에 의해서 생성되며, xanthine oxidase, NAD(P)H oxidase 등과 같은 산화효소들의 작용에 의해서도 생성된다. 또한 superoxide는 염증반응 과정중

에서도 생성되는데 염증성 자극에 의하여 유리된 arachidonic acid가 cyclooxygenase 경로를 거치면서 prostaglandin의 생합성 과정에서 생성되며, 또한 NADH 혹은 NADPH의 존재하에서 lipoxygenase 경로를 거치는 과정중에서도 생성된다고 알려져 있다. 이와 같이 superoxide는 생체내에서 매우 다양한 경로로 생성되며, 생체의 정상적인 대사과정에서 중요한 역할을 담당하지만 superoxide dismutase와 같은 항산화 효소의 방어체계를 넘어서 과다하게 생성될 경우 세포막 및 세포 소기관에 손상을 초래할 수 있다. 특히 superoxide는 그 자체가 유해한 영향을 초래할 수 있지만 반응성이 훨씬 더 높은 hydroxyl radical의 전구체로 작용하기 때문에 중요시되고 있다. 본 실험의 결과에서 시호 약침액은 superoxide의 생성을 최고 53% 정도 억제하였으므로 superoxide에 의한 산화적 손상을 효과적으로 방어할 수 있을 것으로 생각된다.

5. 배양 정상 간세포에 대한 시호 약침액의 세포독성

기존의 항산화제 중, 천연 항산화제인 tocopherol 등은 생체에 비교적 무해하지만 BHT와 같은 인공 합성 항산화제에 비해 항산화력이 부족하고, 또한 인공 합성 항산화제는 항산화력은 뛰어난 반면 변이원성, 세포독성과 같은 생체에 유해한 영향을 미치므로 그 사용이 제한되거나 금지되고 있다. 따라서 시호 약침제제의 항산화 효과에 대한 유효성 규명도 중요하지만 그 안전성 검토 또한 중요시되므로 본 실험에서는 배양 정상 간세포를 이용하여 농도별 시호 약침액의 세포독성 여부를 관찰해 보았다. 그 결과, 시호 약침액을 첨가하지 않는 대조군의 세포생존률을 100%로 보았을때 시호 약침액을 농도별로 6배 농축액 및 4배 농축액을 첨가한 실험군에서 세포 생존률이 각각 51.66, 80.57%로 현저하게 감소되어 나타났다. 이 결과로부터 4배 농축액 이상의 고농도의 시호 약침액은 세포 독성을 나타냄을 알 수 있었다.

반면 시호 약침 2배 농축액, 원액 및 2배, 5배, 10배, 20배 희석액을 첨가한 실험군에서는 모두 100%에 가까운 생존률을 보였다. 따라서 본 실험에서 사용한 시호 약침액은 4배 농축액 이상의 고농도에서는 배양 간세포에 독성을 나타지만, 2배 농축액부터 희석배수를 높여서 사용할 경우에는 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다 (Table V).

6. *t*-BHP로 유도된 정상 간세포 괴사에 대한 시호 약침액의 항산화 작용

일반적으로 *t*-BHP는 세포에 급성 산화적 스트레스를 유발함으로써 비가역적인 손상을 일으키는데, 그 작용기전은 다양하지만 특히 1mM 이하의 저농도에서 유발되는 배양 간세포의 괴사기전에는 세포막 지질의 과산화반응이 수반된다고 알려져있다[30]. 따라서 본 실험에서는 *t*-BHP로 유도되는 간세포 괴사를 시호 약침제제가 어느 정도로 보호할 수 있는가를 관찰하였다. 먼저 배양 간세포에 농도별 시호 약침액을 전처리한 후, *t*-BHP를 최종농도가 1mM이 되도록 처리한 다음 세포의 생존률을 MTT assay로 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 실험군의 세포생존률을 100%로 보았을 때 *t*-BHP를 처리한 실험군에서는 52.57%로 세포 생존률이 감소되어 나타났으므로 약 47%의 세포가 *t*-BHP의 독작용에 의하여 괴사되었음을 알 수 있었다. 반면, 시호 약침액을 농도별로 2배 농축액, 원액 및 2배, 5배, 10배 희석액을 첨가한 실험군에서는 각각 95.70, 93.50, 92.27, 71.05, 68.11%의 높은 생존률을 보였으므로 시호 약침액은 *t*-BHP에 의한 배양 간세포의 괴사를 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다(Table VI). 특히 시호 약침액이 정상 간세포에 독성을 나타내지 않는 범위, 즉 2배 농축액, 원액 및 2배 희석액에서 모두 90% 이상의 세포 생존률을 보였으며, 시호 약침액 무첨가군에 비해 세포 생존률이 최고 43% 정도 증가됨을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해볼 때, 시호 약침액은 자유기를 소거하거나 혹은 자유기의 생성을 강하게 억제함으로써 지질과산화 반응을 억제하였다. 이는 시호 약침액 성분 중에 자유기에 대해서 전자 혹은 수소원자를 쉽게 공여할 수 있는 유효성분이 함유되어 있는 것으로 생각되며, 이에 관한 연구는 계속 진행할 계획이다. 한편 정상 간세포를 이용한 실험에서 시호 약침액은 세포독성을 나타

내지 않은 농도범위내에서도 강한 항산화력을 나타내었으므로 향후 효과적이고 안전성있는 항산화제 및 간장 보호제로 개발될 수 있을 가능성이 시사되고 있다.

Table I. Antioxidative Activity of BRAS in the Linoleic Acid System as Measured by the TBA Method

Groups	Incubation time (day)			
	0	1	2	3
Control	[a)]0.0000	0.0000	0.1330	11.5560
1% BHA	0.0000	0.0000	0.2468	1.6533
1% BHT	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
BRAS ×2	0.0000	0.1813	0.4525	0.4244
×1	0.0000	0.0722	0.5429	0.2966
1/2	0.0000	0.0000	0.0504	0.2468
1/5	0.0000	0.2281	0.1408	0.2686
1/10	0.0000	0.0847	0.0286	0.1439
1/20	0.0000	0.1096	0.2655	0.2842
1/50	0.0000	0.1314	0.1470	2.1670

Groups	Incubation time (day)		
	4	5	6
Control	12.4350	23.2736	22.6480
1% BHA	2.4817	2.9494	3.9282
1% BHT	0.0000	0.0391	0.0765
BRAS ×2	0.8609	1.5529	4.6997
×1	0.9170	2.4756	4.5205
1/2	0.7362	1.6152	1.6776
1/5	0.3340	3.8877	5.0940
1/10	0.7143	16.8771	17.8309
1/20	2.3602	15.4618	18.5292
1/50	16.5809	21.9924	22.3945

At intervals during autoxidation of linoleic acid in the water-alcohol system, the degree of oxidation was measured by the TBA method. The reaction mixture contained 50㎕ of sample, 0.2㎖ of 8.1% sodium dodecylsulfate(SDS), 1.5㎖ of 20% acetic acid solution(pH 3.5), and 1.5㎖ of 0.8% aqueous solution of TBA. The pH of 20% acetic acid solution was adjusted with 10N NaOH. The mixture was finally made up to 4.0 ㎖ with distilled water, and placed at 5℃ for 60min, and then heated at 95℃ for 60min. After cooling with tap water, the absorbance was measured at 532nm.

a) : MDA μM

Each values are the mean of triplicate experiments.

Table II. Scavenging Effect of BRAS on DPPH Radical

Groups	RSA(%)* of control
1% BHA	84.93±2.01
1% BHT	88.34±4.62
1% Tocopherol	85.67±4.65
BRAS ×2	44.74±4.26
×1	33.54±3.41
1/2	27.26±1.80
1/5	23.96±2.70
1/10	17.44±2.84
1/20	9.27±1.49
1/50	6.59±1.06

The effects of BRAS on DPPH radical were determined according to the method of Hatano. BRAS in 4㎖ of distilled water were added to a methanolic solution of DPPH(1mM, 1㎖). The mixture was shaken and left to stand at room temperature for 30min ; the absorbance of the resulting solution was measured spectrophotometrically at 517nm.

*Radical Scavenging Activity(%) = [(Control O.D. - Experimental O.D.) /Control O.D.]×100. Each values are the mean±S.E. of triplicate experiments.

Table Ⅲ. Effect of BRAS on Fenton Reaction System Induced Lipid Peroxidation

Groups		Inhibition(%) of control
1% BHT		94.22±2.42
BRAS	×2	91.11±0.31
	×1	66.86±4.78
	1/2	57.58±2.09
	1/5	23.23±1.70
	1/10	14.21±3.53
	1/20	16.49±2.84
	1/50	8.14±1.39

BRAS in 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) were added to homogenate(7.5mg/ml), 1mM $FeCl_2$, 3mM H_2O_2. The mixture was shaken at 37℃ for 10min. The level of lipid peroxidation induced by hydroxyl radical derived from H_2O_2-Fe^{2+} in rat liver homogenate was determined according to the method of TBA. Each values are the mean±S.E. of triplicate experiments.

Table Ⅳ. Inhibitory Effect of BRAS on Superoxide Generation Induced by Xanthine-Xanthine Oxidase System

Groups		Inhibition(%) of control
BRAS	×2	53.11±3.55
	×1	34.65±1.35
	1/2	31.45±2.20
	1/5	25.42±1.73
	1/10	23.92±1.32
	1/20	22.03±2.49
	1/50	18.27±2.03

The reaction mixture contained BRAS, 250 μM xanthine, 0.1M phosphate buffer(pH 7.0) was left to stand at room temperature for 3min. After 0.1unit of xanthine oxidase was added, the absorbance of reaction mixture was measured spectrophotometrically at 290nm for 1min. All data are the mean±S.E. of triplicated determination.

Table Ⅴ. Cytotoxicity of BRAS on Normal Rat Liver Cell

Groups	Viability(%) of control
BRAS ×6	51.66±2.21 ***
×4	80.57±1.48 ***
×2	98.27±2.78
×1	97.60±1.50
1/2	99.91±0.73
1/5	98.19±4.58
1/10	98.61±1.24
1/20	99.53±2.31

Normal rat liver cells(Ac2F) were plated on 75-cm^2 plastic flasks in 20mℓ of DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum. And cells were incubated under 5% CO_2, 95% air, at 37℃. The cells(5×10^4cells/well) were incubated at 37℃ for 2hrs. After washing, BRAS were added various concentration. Viable cells were detected by MTT assay. All data are the mean±S.E. of triplicated determination.

values statiscally significant as compared with control data

of each group. (*** : $p<0.01$)

Table Ⅵ. Effect of BRAS on *t*-BHP Induced Lipid Peroxidation in Cultured Normal Rat Liver Cell

Groups	Viability(%) of control
t-BHP	52.57±1.67
BRAS ×4	48.39±2.17
×2	95.70±4.70
×1	93.50±3.04
1/2	92.27±3.31
1/5	71.05±3.12
1/10	68.11±3.99

Normal rat liver cells(Ac2F) were plated on 75-cm^2 plastic flasks in 20㎖ of DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum. And cells were incubated under 5% CO_2, 95% air, at 37℃. The cells(5×10^4cells/well) were incubated at 37 ℃ for 2hrs. After washing, BRAS were added various concentration. After preincubation for 18hrs, *t*-BHP(final concentration 1mM) was added, and the reaction mixture was incubated for 2hrs. Viable cells were detected by MTT assay. All data are the mean±S.E. of triplicated determination.

Ⅳ. 결 론

시호 약침제제의 자유기 소거효과 및 지질과산화 억제효과, 그리고 세포배양계에서 세포독성 및 간세포 보호효과를 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 불포화지방산의 일종인 linoleic acid에 농도별 시호 약침액을 첨가한 다음, 이를 고온에서 배양하여 지질의 자동산화를 유발시키고, 시간 경과별로 TBA법으로 지질과산화도를 관찰한 결과, 시호 약침액은 항산화제인 BHA와 유사한 수준의 지질과산화 억제효과를 보였다.

2. DPPH radical을 이용한 자유기 소거능 측정 결과, 시호 약침액은 농도의존적으로 자유기를 소거하였으며, 특히 2배 농축액에서 최고 45% 정도의 강한 소거능을 보였으므로 본 약물이 자유기를 직접적으로 소거할 수 있음을 알 수 있었다.

3. H_2O_2-Fe^{2+}로 구성된 Fenton 반응계로부터 생성되는 hydroxyl radical에 의한 흰쥐 간조직의 지질과산화 반응을 시호 약침액이 최고 91%정도로 강하게 억제하였다. 특히 이 결과는 강력한 항산화제로 알려져있는 BHT의 효능과도 거의 유사한 수준이었다.

4. 시호 약침액은 xanthine-xanthine oxidase계에서의 superoxide 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 특히 2배 농축액에서 최고 53% 정도의 생성 억제효과를 보였다.

5. 정상 배양 간세포에 농도별 시호 약침액을 전처리한 다음, MTT assay로 세포 생존률을 관찰한 결과, 6배 농축액에서 4배 농축액까지 강한 세포독성을 나타낸 반면, 2배 농축액부터는 희석배수가 높아질수록 세포 독성이 없음을 알 수 있었다.

6. 농도별 시호 약침액을 전처리하고 *t*-BHP를 처리함으로써 지질과산화를 수반하는 간세포의 괴사를 유도시킨 다음, 세포 생존률을 관찰한 결과 시호 약침액은 독성을 나타내지 않은 2배 농축액, 원액 및 2배 희석액에서 모두 세포괴사를 강하게 억제하였다.

결론적으로 시호 약침액은 자유기를 직접적으로 소거함과 동시에 자유기의 생성도 강하게 억제함으로써 지질의 연쇄적 과산화 반응을 차단하며, 결국 과산화지질의 생성을 강하게 억제함을 알 수 있었다. 특히 본 약물의 이러한 효과는 BHA, BHT 및 tocopherol 등의 항산화제와도 거의 유사한 수준임을 알 수 있었으며, 세포독성을 나타내지 않는 농도 범위내에서도 *t*-BHP에 의한 간세포의 괴사를 효과적으로 방어하였다. 따라서 시호 약침액은 향후 자유기에 의한 생체의 산화적 손상과 관련한 제반 질환의 예방 및 치료에 안전하고도 효과적인 약물로 개발될 수 있을 가능성이 시사되므로 본 연구의 결과를 바탕으로

생체에서의 유효성과 안전성을 계속 검토할 계획이다.

참고문헌

1. 강병수, 김영판 : 임상배합본초학, 서울, 성보사, pp. 494-497, 1994
2. 신민교 : 원색임상본초학, 서울, 남산당, pp. 313-314, 538-540, 1986.
3. 이상인 : 본초학, 서울, 학림사, pp.198-199, 1986.
4. 이상인, 안덕균, 신민교 : 한약임상응용, 서울, 성보사, pp.74-76, pp.136-137, 1982.
5. 허준 : 동의보감, 서울, 남산당, p.721, 1986.
6. 허준 : 동의보감, 서울, 여강출판사, pp.2723-2724, 1994.
7. 김성일, 문진영, 김갑성, 김두희, 남경수, 임종국 : 자유기에 의한 지질과산화 반응에 대한 황금 약침액의 항산화 효능. 대한예방한의학회지 1 : 48-54, 1997.
8. 김영해, 김갑성 : 호도약침액의 항산화 효과에 대한 연구. 대한한의학회지 17 : 9-20, 1996.
9. 문진영, 최미정, 남경수, 임종국 : 시호가 free radical에 의한 지질과산화물 생성에 미치는 효과. 동국논집(자연과학편) 15 : 361-375, 1996.
10. 안준철, 문진영, 임종국, 당귀 약침액의 항산화효능에 관한 연구. 대한침구학회지 13 : 254-262, 1996.
11. 안준철, 문진영, 임종국 : 당귀 약침액의 항산화효능에 관한 연구(II). 대한침구학회지 14 : 383-395, 1997.
12. 우대윤, 이태균, 문진영, 임종국, 박원환, 남경수 : 인공막과 Rat의 간세포를 이용한 혈부축어탕의 항산화 작용에 관한 연구. 대한한의학회지 17 : 465-477, 1996.
13. 정지천 : 좌귀음과 우귀음에 의한 활성 산소류의 소거작용과 항산화효소계의 활성증가 효과에 대한 연구. 대한한의학회지 17 : 21-36, 1996.
14. 최미정, 최명원, 김영규, 김철호, 문진영, 남경수 : 배양간세포에서 지질과산화와 항산화효소에 미치는 녹용추출물의 영향. 대한면역학회지 19 : 49-57, 1997.
15. 郭同經 : 穴位注射療法, 香港, 商務印書館, p.9, 32, 1975.
16. 泗聯中心衛生院 : 中草藥製劑方法, 香港, 商務印書館, p.120, 1978.
17. 楊甲三 : 鍼灸學, 北京, 人民衛生出版社, pp.252-293, 1989.
18. 錢百炎 : 中草藥注射劑, 上海, 上海科學技術出版社, pp.71-132, 1981.
19. 金鳴 : 活血化瘀與抗自由基損傷. 中草藥 24 : 269, 1993.
20. 徐月明 : 自由基衰老學說. 腎虛與衰老及補腎抗衰老研究. 陣西中醫 14 : 187-188, 1993.
21. 孫承琳 : 人蔘對培養神經細胞自由基損傷的保護作用. 北京中醫學院報 6 : 62-67, 1993.
22. 梁曉春 : 腎虛, 衰老與自由基的關係以及補腎藥對自由基的影響. 中西醫結合雜誌 10 : 511-512, 1990.
23. 許沛虎 : 中醫藥研究中有關自由基研究近況. 中國中西醫結合雜誌 15 : 185-187, 1995.
24. 大柳善彦 : SODと活性酸素調節劑その藥理作用と臨床應用, 東京, 日本醫學館, p.9, 1989.
25. 戶田 靜男, 大西 基代, 木村 通郎, 戶田 知子 : 活性酸素によりレシチンリポソーム過酸化に對する桂枝茯苓丸, 桃核承氣湯の抑制作用. 和漢醫學會誌 9 : 131-136, 1992.
26. Ames, B. N., Cahcart, R., Schwiers, E., Hochstein, P. : Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer. A hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78 : 6858-6862, 1981.
27. Aruoma, O. I., Kaur, H. and Halliwell, B. : Oxygen free radicals and human disease. J. Roy. Soc. Health 111(5) : 172-177, 1991.
28. Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T. : Two new flavonoids and other constituents in licorice root : their relative astringency and radical scavenging effects. Chem. Pharm. Bull. 36 : 2090-2097, 1988.
29. Katsuzaki, H,. Kawakishi, S., Osawa, T. :

Structure of novel antioxidative lignan triglucoside isolated from sesame seed. Heterocycles 36 : 933-936, 1993.

30. Masaki, N., Kyle, M. E., Serroni, A., Farber, J. L. : Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by *tert*-butyl hydroperoxide. Arch. Biochem. Biophys. 270 : 672, 1989
31. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. : Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochem. 95 : 351-358, 1978.
32. Okamura, H., Mimura, A., Yakou, Y., Niwano, M., Takahara, Y. : Antioxidant activity of tannins and flavonoids in Eucalyptus rostrata. Phytochemistry 33 : 557-561, 1993.
33. Osawa, T., Namiki, M. : A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. Agric. Biol. Chem. 45 : 735-739, 1981.
34. Sladowski, D., Steer, S. J., Clothier, R. H. and Balls, M. : An improved MTT assay. J. Immun. Methods 157 : 203-207, 1993.
35. Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Sang-Won Choi., Kawakishi, S., Osawa, T. : Antioxidative activity of the Anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-D-Glucoside and cyanidin. J. Agric. Food Chem. 42 : 2407-2410, 1994.
36. Yen, G. C., Chen, H. Y. : Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J. Agric. Food Chem. 43 : 27-32, 1995.