

葛根의 항산화작용에 의한 위점막 보호효과와 내인성 Sulphydryl 화합물의 영향

Antioxidants Effects and Roles of Endogenous Sulphydryls in the Gastric Mucosal Protection of *Puerariae Radix*

최호정 · 신홍묵*

I. 緒論

葛根은 『神農本草經』⁶⁾에서 中品藥으로 분류하고, 그 效能을 “味는 甘하고 平하며 消渴, 身大熱, 嘔吐, 諸痺, 起陰氣解諸毒을 다스린다”하고 李時珍⁸⁾은 그 응용의 목표를 止渴, 解酒, 發散表邪 및 發瘡疹難出的 4가지로 요약하였다.

일반적으로 葛根은 傷寒論의 葛根湯이나 葛根解肌湯의 方中에서 發汗, 解表, 解肌熱의 목적으로 사용되고 있다. 그러나 起陰氣解諸毒하고 胃氣의 上行을 항진시키며 津液의 생성 및 解酒毒에 대한 효능은 脾胃기능의 활성화 개선이라는 측면에서 위장질환에의 활용에 중요한 근거가 되고 있다. 또 이러한 약효는 약리학적으로 공격인자의 제거, 방어인자의 강화, free radical 발생의 예방 등에 중요하다고 생각되는 위점막의 혈류증가²⁾에 유익하게 작용하여 소화성궤양의 치료에 일정한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

한편 위점막 손상과 궤양치료에 있어서 내인성 sulphydryl 화합물(SHs)은 위점막을 보호하는 세포보호 작용이 있다. 내인성 SHs는 위장내 대표

적 보호인자로 점막층의 방어기전에 직접적으로 관여하여 free radical을 제거하고 세포막의 투과성을 조절하며 효소활성도를 조절하는 역할을 한다^{13,20,21,26)}. 또 cysteine, methionine, glutathione 등 SH기 함유 화합물은 위점막의 출혈성 미란의 방어와 치료에 중요한 역할을 하고, 이러한 세포 보호효과는 iodoacetamide와 같은 SH기 차단인에 의하여 억제되는 것으로 알려졌다²⁸⁾.

이상의 배경에 기초하여 위점막 방어기구의 유지나 조직복구의 촉진에 대한 한약재의 유용성을 검증하기 위한 일환으로, ethanol에 의한 위점막의 병태모델을 통하여 解酒毒의 효능이 있는 葛根의 항산화작용과 내인성 nonprotein SHs과의 관련성을 관찰한 바, 유의한 결과를 보고하고자 한다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 약재

본 실험에 사용한 葛根(*Pueraria thunbergiana* Benth; *Puerariae radix*)은 정선하여 사용하였다.

* : 동국대학교 한의과대학 생리학교실

2) 실험동물

체중 200g 내외의 Sprague-Dawley계 수컷 흰 쥐를 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 7일간 실험실 환경에 적응시켰으며, 실험 전 24시간동안 절식시킨 후 사용하였다.

2. 方法

1) 葛根 추출액의 제조

葛根 200g을 round flask에 넣고 증류수 1000ml을 가하여 가열 추출한 후 추출액을 여과지로 여과하고, 이 추출액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 냉동건조하여 27.17g의 분말을 얻었다. 동물실험시 葛根 분말은 1% CMC를 포함한 0.9% NaCl을 에 녹여 사용하였고, linoleic acid 유도 지질과산화반응 억제효과와 DPPH radical 소거효과측정시 사용한 葛根 추출분말은 증류수에 녹여 사용하였다.

2) 실험동물의 처치

급성 위점막 손상의 유발은 1ml의 absolute ethanol을 위장내로 투여하여 야기시켰다.

실험동물은 흰쥐 6마리씩을 1군으로하여 아무런 처치를 하지 않은 정상군, absolute ethanol 투여 30분 전 1% CMC(1.5ml)를 투여한 대조군, 葛根(2.5g/kg, i.g)를 전 처치한 실험군과 葛根(2.5g/kg, i.g)과 iodoacetamide(50mg/kg, s.c)를 전 처치한 실험군으로 구분하였다. 대조군과 실험군의 동물은 ethanol 투여 1시간 후 ether로 마취하에 위장을 적출하였다.

3) 효소원의 조제

적출한 胃腸은 胃점막이 손상되지 않도록 주의하여 혈액과 胃잔류물을 차가운 생리식염수에 잘 씻어내고 Whatman여과지로 식염수를 제거한 후 -70℃에서 보존하여 사용하였다.

효소활성도 측정을 위해 전체 胃조직의 4배 용량(v/w)의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가한 다음 homogenizer (Janke

& Kunkel사의 Ultra-Turrax 25)로 4분간 균질화하였고, 이를 1000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액은 과산화지질(lipid peroxide) 및 glutathione함량을 측정하기위한 시료로 사용하였고, 나머지 상층액은 600×g에서 15분간 원심분리하여 핵과 세포잔해를 제거한 상층액을 취한 후 다시 12,000×g에서 30분동안 원심분리하여 미토콘드리아를 제거한 상층액을 superoxide dismutase 및 catalase활성도를 측정하기 위한 효소원으로 사용하였다. 위의 모든 과정은 4℃이하에서 수행하였다.

4) Linoleic acid 유도 지질과산화반응 억제 효과 측정

지질과산화반응의 억제는 linoleic acid emulsion을 사용한 Osawa²³⁾등의 방법에 따라 측정하였다. Linoleic acid emulsion은 0.39ml, 99% ethanol 10ml, 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 10ml를 혼합하고 증류수로 전체 용액이 25ml가 되도록 제조하였다.

Linoleic acid emulsion 600μl에 葛根을 농도별로 첨가한 다음, 증류수로 total volume이 8ml가 되도록 조절하여 이 혼합액을 Falcon tube에 넣고, 순환진탕기에서 37℃에서 72시간 배양하여 자동산화를 촉진시켰다.

지질과산화도는 malondialdehyde(MDA) 농도로 나타내었으며 MDA 정량은 TBA법에 의하여 Ohkawa²²⁾등의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 37℃에서 배양시킨 linoleic acid 혼합액 0.8ml에 8.1% SDS 0.2ml, 20% acetic acid(pH 3.5) 1.5ml, 0.8% TBA 1.5ml를 가한 다음, 95℃에서 1시간동안 반응시킨 뒤, 차가운 수돗물로 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였다.

5) DPPH radical 소거효과 측정

葛根 추출액의 free radical에 대한 소거효과를 보기위해 Yoshida³⁰⁾등의 방법에 따라 DPPH radical 소거효과를 측정하였다. 농도별 葛根 희

석액과 증류수 혼합물 4ml에 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 1ml를 첨가하여 잘 혼합하고 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517nm에서 흡광도를 측정하였다. Vehicle로는 0.9% NaCl을 포함한 1% CMC를 사용하였다.

6) 과산화지질 함량 측정

과산화지질(Lipid peroxide : LPO) 함량은 Ohkawa²²⁾ 등의 방법에 따라 측정하였으며 과산화지질정도를 나타내는 malondialdehyde(MDA)의 양으로 나타내었다. 위조직 시료 0.2ml에 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 0.6 ml, 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2ml, 20% acetate buffer(pH 3.5) 1.5ml 및 0.8% 2-thiobarbituric acid(TBA)용액 1.5ml를 가해 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응액을 차가운 물에서 냉각시킨 후 생성된 홍색의 TBA 반응물질을 n-butanol : pyridine (15:1) 혼합액 4 ml를 가하여 혼합하고 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액으로 이행시킨 후 532nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였으며 MDA함량은 조직 1g당 nmole로 나타내었다.

7) Glutathione 함량 측정

위조직내 glutathione(GSH) 함량은 Ellman¹⁴⁾ 등의 방법에 따라 측정하였다. 위조직 시료 0.2ml에 8% sulfosalicylic acid 0.5ml를 가하여 혼합한 후 3000rpm에서 20분동안 원심분리하였다. 상층액 0.3ml씩을 취하여 1mM DTNB 2.7ml용액과 혼합한 후 실온에서 20분간 방치한 다음 412nm에서 흡광도를 측정하였고, GSH 함량은 조직 1g당 nmole로 나타내었다.

8) Superoxide dismutase 활성 측정

Superoxide dismutase(SOD) 활성은 McCord와 Fridovich¹⁷⁾의 방법에 의해 측정하였다. 반응액은 0.6mM EDTA를 함유한 300mM 인산염 완충액(pH 7.8) 0.5ml, 6×10^{-5} M cytochrome c 0.5

ml, 0.3mM xanthine 0.5ml, 10 mM KCN을 함유한 증류수 1.3ml를 넣고 xanthine oxidase 0.2ml를 첨가하여 550nm에서 흡광도가 1분당 0.025 증가하는 양을 표준증가율로 정한다. 이후 동일한 조건에서 증류수는 효소시료양을 뺀양만큼 가하고 시료를 가하여 잘 혼합한 후 xanthine oxidase를 가하여 반응을 개시하였다. SOD 1 unit는 전체 반응액 3ml, 25°C, pH 7.8의 조건하에서 cytochrome c 양을 50%억제하는 양으로 측정하였다.

9) Catalase 활성 측정

Catalase 활성은 Decker¹²⁾의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 50mM 인산염 완충액(pH 7.0)에 희석한 59mM H₂O₂용액 1ml와 증류수 1.9ml에 효소시료 희석액 0.1ml를 가하여 240nm에서 흡광도의 변화를 2분간 측정했다. 효소의 활성도는 1분 동안에 1μM의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

10) 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry¹⁶⁾등의 방법에 준해 bovine serum albumin을 표준단백으로하여 측정하였다.

11) 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차로 표현하고, 유의성 검증은 Sigma Plot(윈도우용 버전3.0)을 이용하여 unpaired t-test를 실시하였다.

III. 實驗成績

1. Linoleic acid의 지질과산화 억제효과

葛根 희석액을 농도별로 200, 400, 600, 800μg씩 반응시킨 다음, 과산화지질의 함량변화를 측정된 결과, linoleic acid만을 배양했을 때의 25.92nmole에 비해 26.02, 17.57, 16.78, 3.88nmoles로서 용량 의존적으로 억제하는 경향

을 나타내었으며, 특히 800 μ 에서 대조군에 비해 85%의 강한 억제효과를 보여주었다(Table I).

Table I. Effects of *puerariae radix* extracts(PRE) on linoleic acid-induced lipid peroxidation, in vitro.

PRE μ g	MDA nmole
Control	25.92
200	26.02
400	17.57
600	16.78
800	3.88

After auto-oxidation of linoleic acid in the water-alcohol system for three days, the degree of oxidation was measured by the TBA method. Each values are mean, n = 3. MDA, malondialdehyde.

2. DPPH radical 소거효과

葛根의 DPPH radical에 대한 소거효과를 관찰한 결과, 葛根 희석액은 농도 50, 150, 300, 600, 800, 1000 μ g에서 각각 8.0%, 18.5%, 34.5%, 49.0%, 55.0%, 58.5%의 radical 소거효과를 나타내었으며 그 효과는 용량 의존적 경향을 보여주었다(Table II).

Table II. DPPH radical scavenging effect of PRE, in vitro.

PRE μ g	Activity(%)
Control	0
50	8.0
150	18.5
300	34.5
600	49.0
800	55.0
1000	58.5

Radical Scavenging Activity (%) = [(Control O.D. - Experimental O.D.)/Control O.D.] \times 100. Each values are mean \pm S.D., n = 3. RSA, radical scavenging activity.

3. 과산화지질含量 변화

위조직의 과산화지질 함량은 ethanol 투여 전에 CMC로 전 처치한 대조군이 정상군에 비하여 유의하게 증가(24.7%)하였다. 葛根을 전 처치한 실험군과 葛根과 iodoacetamide를 전 처치한 실험군에서 각각 4.61 \pm 0.48(27.2%), 4.67 \pm 0.61(26.7%)nmoles/g tissue로 대조군에 비해 유의하게 감소한 것으로 나타나 葛根의 지질과산화 억제효과는 iodoacetamide에 의하여 영향을 받지 않았다(Table III, Figure 1).

Table III. Effects of PRE and iodoacetamide on lipid peroxidation in ethanol-induced gastric lesions.

Group	Pretreatment	LPO(MDA nmoles/g tissue)
Normal	None	5.11 \pm 0.75
Control	CMC	6.37 \pm 0.19*
Sample 1	PRE	4.61 \pm 0.48***
Sample 2	PRE + IDA	4.67 \pm 0.61***

Rats were pretreated with 1% CMC (1.5ml, i.g.), PRE (2.5g/kg, i.g.) or PRE (2.5g/kg, i.g.) plus IDA (50mg/kg, s.c.), and 30min later absolute ethanol(1ml) was administered intragastrically. The animals were killed 1 hour later. Values are mean \pm S.D., n = 6. *# p<0.01 as compared with normal group. *** p<0.001 as compared with the control group. CMC, carboxymethyl cellulose sodium salt; IDA, iodoacetamide(sulphydryl blocking agent); LPO, lipid peroxidation; MDA, malondialdehyde.

4. Glutathione含量 변화

위조직의 glutathione(GSH) 함량 변화는 정상군이 2.44 \pm 0.36 nmoles/g tissue이었으며, ethanol 처치 전 CMC를 투여한 대조군은 1.83 \pm 0.28 nmoles/g tissue로 정상군에 비하여 25% 정도 유의하게 감소하였다.

葛根을 전 처치한 실험군에서는 2.39 \pm 0.38 nmoles/g tissue로 대조군에 비해 매우 유의하게 증가하여 정상군 수준으로 회복하였으며, 葛根과 iodoacetamide를 처치한 실험군에서는 1.98 \pm 0.46 nmoles/g tissue로 葛根의 GSH함량의 증가효과는 iodoacetamide에 의하여 유의하게 억제되었다(Table IV, Figure 2).

Table IV. Effect of PRE and iodoacetamide on glutathione level in ethanol-induced gastric lesions.

Group	Pretreatment	GSH (nmoles/g tissue)
Normal	None	2.44 \pm 0.36
Control	CMC	1.83 \pm 0.28**
Sample 1	PRE	2.39 \pm 0.38*
Sample 2	PRE + IDA	1.98 \pm 0.46

Values are mean \pm S.D., n = 6. *# p<0.01 as compared with normal group. * p<0.05 as compared with the control group. GSH, glutathione.

5. Superoxide dismutase活性 변화

위조직의 Superoxide dismutase(SOD) 활성의 변화는 정상군이 5.60 \pm 0.49 units/mg protein이었으며, ethanol 투여 전 CMC를 투여한 대조군은 4.60 \pm 0.24 units/mg protein으로 정상군에 비하여 유의하게(17.9%)감소하였다.

葛根을 전 처치한 실험군에서는 5.30 ± 0.46 units/mg protein으로 SOD 활성이 대조군에 비해 15.2% 증가하여 ethanol에 의한 SOD 활성의 감소를 유의하게 억제시켰으며, 葛根과 iodoacetamide를 전 처치한 실험군에서는 4.94 ± 1.01 units/mg protein으로 iodoacetamide의 처치는 葛根의 SOD 활성의 증가효과를 감소시켰다 (Table V, Figure 3).

Table V. Effect of PRE and iodoacetamide on SOD activity in ethanol-induced gastric lesions.

Group	Pretreatment	SOD (units/mg protein)
Normal	None	5.60 ± 0.49
Control	CMC	4.60 ± 0.24 *
Sample 1	PRE	5.30 ± 0.46 *
Sample 2	PRE+IDA	4.94 ± 1.01

Values are mean \pm S.D. n=6. # p(0.05 as compared with normal group. * p(0.05 as compared with the control group. SOD, superoxide dismutase.

6. Catalase 活性 變化

위조직의 catalase(CAT) 활성의 변화는 정상군이 17.87 ± 1.15 units/mg protein이었으며, ethanol 투여 전 CMC를 투여한 대조군은 20.24 ± 1.53 units/mg protein으로 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다.

葛根을 전 처치한 실험군에서는 21.45 ± 5.93 , 葛根과 iodoacetamide를 전 처치한 실험군에서는 21.58 ± 4.58 units/mg protein으로 iodoacetamide의 처치는 葛根의 catalase 활성변화에 영향을 미치지 않았다(Table VI, Figure 4).

Table VI. Effect of PRE and iodoacetamide on catalase activity in ethanol-induced gastric lesions.

Group	Pretreatment	Catalase (units/mg protein)
Normal	None	17.87 ± 1.15
Control	CMC	20.24 ± 1.53 *
Sample 1	PRE	21.45 ± 5.93
Sample 2	PRE+IDA	21.58 ± 4.58

Values are mean \pm S.D. n=6. # p(0.05 as compared with normal group.

IV. 考察

Ethanol이나 aspirin에 의한 위점막 손상은 점

막의 출혈과 미란이 주된 소견이다. 이러한 미란은 prostaglandins의 전 처치나 SH기 함유화합물에 의하여 훨씬 적거나 완하되는데, 이를 세포보호(cytoprotection)라 한다.

세포의 보호기작은 알려지지 않았으나^{19,24)} 위점액성 다당류가 보호역할을 할 것이라고 보며²³⁾, 내인성 nonprotein SHs의 주요성분인 고농도의 환원형 glutathione 특히 thiol은 반응성이 강한 free radical과 결합하여¹⁵⁾ 조직손상을 방어할 수 있으므로, Boyd등¹¹⁾은 궤양생성에 있어서 위내 glutathione의 조절역할의 가능성을 제시하였다. 또 Szabo 등^{25,26)}에 의하면 ethanol은 위점막내의 nonprotein SHs의 농도를 저하시키며, nonprotein SHs 함량의 증가는 위장의 세포를 보호하고, SH기 차단인자들은 prostaglandin F2 β 의 세포보호효과를 저해하며 nonprotein SHs의 함량을 감소시킴을 보고하였다.

이상에서 적어도 두가지의 다른 기전, 즉 prostaglandin류나 SHs류에 의하여 방어될 수 있음을 알 수 있으며 cysteamine, demercaprol, dimercaptosuccinic acid, penicillamine 등과 같은 SH기 함유 약품은 위점막 손상의 보호와 궤양치료에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고 있다²⁴⁾. 이에 본 실험에 앞서 수종 한약제(山查, 葛根, 麥芽, 牡蠣, 鷄內金)의 nonprotein SHs 함량을 비교 측정하고 상대적으로 높은 활성을 나타낸 葛根을 선택하여 위점막 보호효과에 대한 역할을 규명하고자 하였다.

葛根의 味는 甘, 辛하고 性은 平하며 陽明經에 歸經하고 아울러 脾經에도 작용한다. 發表解肌, 透發麻疹, 解熱生津, 升陽止瀉, 起陰氣 및 解諸毒의 효능이 있어 解熱, 透疹에 효과가 있을 뿐 아니라 胃氣의 기능조절을 통하여 津液을 생성하고 酒毒을 풀며 脾胃虛弱의 泄瀉를 다스린다^{1,7,8,9)}. 특히 胃氣의 기능조절을 통한 津液의 생성, 升陽止瀉 및 起陰氣解諸毒 등 효능은 약리학적으로 공격인자의 제거, 방어인자의 강화, free radical의 발생예방 등에 중요한 위점막의 혈류증가²⁾에 유의하게 작용하여 위점막의 방어기전에 일정한

영향을 미칠 것으로 사료된다.

한편 葛根에 대한 연구로는 肝損傷에 대한 보호효과³⁾와 심혈관계통, 뇌혈류량, 혈당강화 등에 대한 연구¹⁰⁾가 알려졌으나, 위점막 손상에 대한 항산화작용은 보고된 바 없다.

이러한 배경하에 본 실험에서는 葛根의 위점막 방어효과를 항산화작용과 연계하여 관찰하고, 위점막 보호에 있어서 SHs의 역할을 규명하고자 free radical에 의한 세포막손상시 발생하는 malondialdehyde, 위조직의 glutathione함량, superoxide dismutase활성 및 catalase의 활성을 측정하고, 또 위점막의 방어기전에 대한 SHs의 역할을 규명하기 위하여 SHs의 차단제인 iodoacetamide를 선택적 SHs 알킬화 시약으로 사용하였다.

葛根 추출액의 항산화 효능을 검토하기 위한 in vitro실험에서 葛根은 불포화지방산인 linoleic acid의 자동산화계에서 용량의존적으로 지질과산화물의 생성을 억제하였으며, free radical 소거능을 알아보기 위하여 DPPH radical 소거 효과를 측정한 결과, 葛根은 추출액의 농도 1mg에서 58.5%의 강한 소거능을 나타내었다.

Ethanol의 급성 위점막 손상은 지질과산화를 일으키는 free radical에 의하여 야기되는데²⁹⁾, 본 실험에서 葛根 추출액의 전 처치는 ethanol에 의한 지질과산화물의 생성을 유의하게 억제(27.2%)시켰다. 그러나 iodoacetamide를 처치한 경우에도 26.7%의 억제 효과를 나타내어 iodoacetamide는 葛根 추출액의 지질과산화물 억제 효과에 거의 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

위점막의 내인성 방어인자로 알려져있는 SHs의 대표적인 glutathione은 간장뿐 아니라 거의 모든 위장관점막에 풍부하게 존재하며 점막층의 방어기전에 직접적으로 관련하여 free radical을 제거하고 세포막의 투과성을 조절하며 효소활성도를 조절하는 역할을 한다^{5,20,21,26)}. 본 실험에서 葛根 추출액은 ethanol에 의한 위조직손상에 대하여 내인성 nonprotein SHs의 주 성분인 환원형 glutathione^{11,15)}을 대조군에 비해 유의하게 증

가시킴으로써 위장 보호효과에 유용하게 작용할 것으로 기대된다. 한편 SHs 차단제인 iodoacetamide의 처치는 葛根 추출액의 glutathione 함량증가 효과를 억제하였다. 이는 SHs의 위장 보호효과가 이들의 차단 인자인 iodoacetamide나 N-ethylmaleimide(NEM)에 의하여 억제된다는 Szelenyi와 Brunem²⁹⁾의 연구와 일치하였다. 또 환원형 glutathione은 위점막 괴사의 주 원인으로 간주되는 free radical을 제거할 수 있다¹⁸⁾는 보문과 in vitro실험에서의 free radical의 강한 소거효과로 보아, 葛根은 활성산소의 직접적인 제거에 관여하며 이러한 항산화효능은 ethanol에 의한 위점막의 산화적 손상에 일정한 보호효과가 있을 것으로 추정된다.

SOD는 산소라디칼을 hydrogen peroxide(H₂O₂)와 O₂로 전환시키는 효소이며 생체에서 생성되는 superoxide radical의 독성을 방어하는 중요한 역할을 하는데, 葛根 추출액은 SOD의 활성을 유의하게 증가시켰으나, iodoacetamide의 처치에 의하여 그 활성의 증가가 억제되므로써 SOD 활성에 대한 葛根의 효능은 내인성 SHs와 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다.

Catalase는 SOD에 의하여 전환된 H₂O₂를 H₂O로 전환시켜 세포를 superoxide radical로부터 보호하는 효소로, catalase의 활성변화는 대조군과 실험군이 정상군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다. 대조군에서 catalase의 활성증가는 ethanol의 산화적 스트레스에 대한 자체의 방어기전의 하나로 추정되며李등⁴⁾의 연구에서도 이와 유사한 경향을 보였는데, 이에 대한 정확한 기전은 앞으로 연구할 과제로 사료된다.

이러한 효과는 葛根의 胃氣의 기능조절을 통한 津液의 생성, 升陽止瀉 및 起陰氣解諸毒 등 효능에 의한 脾胃의 생리적 활성이 ethanol의 위점막 손상에 있어서 항산화작용의 활성화를 통하여 위점막의 공격인자와 방어인자들 사이의 균형에 의한 保全(integrity)²⁵⁾에 효과적으로 작용한 결과로 보인다.

이상의 결과로부터 葛根 추출액은 ethanol-유도 위점막 손상에 대한 항산화작용을 나타내므로서 위점막의 보호에 유용할 것으로 기대되며, 葛根의 항산화작용은 부분적으로 내인성 SHs와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

V. 結論

Ethanol에 의한 위점막 손상에 대한 葛根의 항산화 작용과 이러한 항산화작용의 SHs와의 관련성을 관찰한 바 다음의 결론을 얻었다.

1. 葛根은 in vitro에서 지질의 자동산화물 현저하게 억제하였으며, 지질과산화반응의 주 원인이 되는 free radical에 대한 강한 소거능을 나타내었다.

2. 葛根은 ethanol에 의한 위조직의 지질과산화물 생성을 유의하게 억제하였으며, iodoacetamide와 葛根을 동시에 처치한 경우에도 지질과산화물 생성이 유의하게 억제되었다.

3. 葛根은 ethanol에 의한 위조직내 glutathione 함량의 유의한 감소를 억제하였으며, iodoacetamide는 葛根에 의한 glutathione 함량의 증가를 유의하게 차단하였다.

4. 葛根은 ethanol에 의한 위조직의 SOD활성의 감소를 유의하게 억제시켰다. 이러한 葛根에 의한 SOD 활성 증가효과는 iodoacetamide의 처치에 의하여 감소하였다. Catalase 활성은 ethanol의 처치에 의하여 유의하게 증가하였으며 葛根과 iodoacetamide의 처치는 ethanol에 의한 catalase 활성변화에는 유의한 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과로부터 葛根은 항산화작용을 통하여 위점막 손상을 보호할 것으로 기대되며, 내인성 SHs는 葛根의 SOD 활성과 glutathione 함량 변화에 중요하게 관여하는 것으로 나타났다.

= Abstract =

Antioxidants Effects and Roles of

Endogenous Sulfhydryls in the Gastric Mucosal Protection of *Puerariae Radix*

Choi, Ho-Jeong*, Shin, Heung-Mook*

Dept. of Physiology, College of Oriental Medicine, Dong-Guk University

Ethanol induces compoundhemorrhagic gastric lesions and causes a dose-dependent decrease in the concentration of endogenous nonprotein sulfhydryls in rat gastric mucosa. Sulfhydryl-containing drugs protect rats from ethanol - induced gastric lesions.

Based on this findings, we investigated the involvement of sulfhydryl compounds in the antioxidant effects of *Puerariae radix*, a traditional herbal medicine, against ethanol - induced gastric lesions in the absence and presence of iodoacetamide(IDA, sulfhydryl blocking agent) in rats, respectively.

Because of the known role of sulfhydryls in gastric cytoprotection, its role in gastric antioxidation was of interest. In vitro, *Puerariae radix* extract(PRE) reduced linoleic acid autooxidation and exert DPPH radical scavenging effect. In vivo, PRE increased antioxidants(SOD, catalase, GSH) and reduced lipid peroxide level in ethanol-induced gastric mucosal lesions. But treatment with PRE plus IDA significantly inhibit the antioxidant effects such as SOD and GSH but did not affect catalase levels.

These results suggest that *Puerariae radix* may play roles in the gastric cytoprotection through antioxidant effects and increase of SOD activity and GSH level are dependent of endogenous sulfhydryls.

參考文獻

1. 康秉秀, 金永坂, 臨床配合本草學, 서울, 永林社,

- pp.477-478, 1994.
2. 서울대학교 의과대학 내과학교실, 내과학 II, 서울, 군자출판사, p.8, 1998.
 3. 禹弘楨, 李長勳, 金榮哲, 茵蔯과 葛根이 d-galactosamide, 急性 alcohol中毒 및 CCl4中毒 白鼠의 肝損傷에 미치는 影響, 대한한의학회지, 18(1):411-429, 1997.
 4. 申興默, 金吉萱, 李圭玄: ethanol-유도 위점막손상에 대한 葛花解醒湯의 항산화효과, 동국논총, 37:249-263, 1998.
 5. 임현성, 정중훈, 문철웅: 만성 신부전증 환자에서 혈액 글루타치온치와 적혈구 항산화효소 활성도 변화, 대한신장학회지, 12(3):369-376, 1993.
 6. 吳晉等, 神農本草經, 北京, 科學技術文獻出版社, p.58, 1996.
 7. 姚瀾, 本草分經, 上海, 上海科學技術出版社, p.104, 1994.
 8. 李時珍 : 本草綱目, 서울, 고문사, pp.740-741, 1980.
 9. 仲昂庭, 本草崇原集說, 北京, 人民衛生出版社, pp.89-91, 1997.
 10. 陳可冀 主編, 抗衰老中藥學, 北京, 中醫古籍出版社, pp.186-7, 1989.
 11. Boyd, S. C., Sasame, H. A. and Boyd, M. R., : High concentrations of glutathione in glandular stomach Possible implications for carcinogenesis. Science, 205:1010-1012, 1997.
 12. Decker, L. A. : Worthington enzyme Manual ; Catalase, Worthington Biochemical Co, pp.63-64, 1977.
 13. Dupuy D., Szabo S. : Protection by metals against ethanol induced gastric mucosal injury in the rat. Comparative biochemical and pharmacologic studies implicate protein sulfhydryls. Gastroenterology, 91:966-974, 1986.
 14. Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl group, Arch. Biochem. Biophys., 82:70-77, 1959.
 15. Kosower, N. S. and Kosowe, E. M. : The glutathione status of cells. In International Review of Cytology, Edited by Bourne, G.H. and Danielli, J.F., vol 54 p.109-160. Academic Press, New York, 1978.
 16. Lowry, O. H. : Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., protein measurement with folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193:265~275, 1951.
 17. McCord, J. M., Fridovich, I. : Superoxide dismutase, An enzymatic function for erythrocyte protein (hemocuprein), J. Biol. Chem., 244:6049-6055, 1967.
 18. Mead, S. F. : Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes. In Free Radicals in biology, Edited by Pryor, W. A., p.51-68, Academic Press, New York, 1976.
 19. Miller, T. A. and Jacobson, E. D., Gut 20:75, 1979.
 20. Nagy L, Jenkins J. M., Moraler R. E., Nagy G, Szabo S. : protein and nonprotein sulfhydryls and disulfides in the early phase of gastric mucosal injury caused by ammonia, ethanol, HCl, NaOH and NaCl in rats. Gastroenterology, 104:A154, 1993.
 21. Nagy L, Johnson B. R., Saha B, et al. : Correlation between gastroprotection and inhibition of cysteine proteases by new maleimide derivatives. Dig Dis Sci., 35:1037-1039, 1990.
 22. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction, Anal Biochem., 95:351~358, 1979.
 23. Osawa, T., Namiki, M. : A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. Agric. Biol. Chem. 45:735-739, 1981.
 24. Robert, A. : Gastroenterology, 77:761, 1979.
 25. Shay, H., Komarov, S. A., Fels, S. S., Meranze, D., Gruenstein, M., Siple, H. : A

- Simple Method for the uniform production of gastric ulceration in the rat, *Gastroenterology*, 5:43-60, 1945.
26. Szabo S, Nagy L, Plebani M. : Glutathione, protein sulfhydryls and cysteine proteases in gastric mucosal injury and protection. *Clin Chim Acta.*, 206:95-105, 1992.
 27. Szabo S., Trier J. S. :Pathogenesis of acute gastric mucosal injury ; Sulphydryls as a protector, adrenal cortex as a modulator, and vascular endothelium as atarget. In mechanism of mucosal protection in the upper gastrointestinal tract, Edited by Allen A., Flemstrom G., Garner A., Silen W. and Turnberg L.A., p.287-293, Raven press, New York, 1984.
 28. Szabo S., Trier J. S. and Frankel P. W. : Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection, *Science*, 214(9, October):200-202, 1981.
 29. Szelenyi, I., Brunem, K. : Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats, *Dig. Dis. Sci.*, 33(7):865-871, 1988.
 30. Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Momagoe, K., Fujita, Y., Okuda, T. : Studies on inhibition mechanism of autooxidation by Tannins and Flavonoids. V. Radical-Scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Chem pharm Bull*, 37(1):1919-1921, 1989.