

胡桃藥鉞液이 家兔 腦組織의 Na⁺-pump 活性 障礙에 미치는 影響

金東勳* · 張慶田* · 宋春浩* · 安昌範*

ABSTRACT

The Effects of t-butylhydroperoxide (tBHP) and Juglandis Semen on Brain Na⁺-Pump Activity

Dong-Hoon Kim*, Kyung-Jeon Jang*, Choon-Ho Song*, Chang-Beohm Ahn*

* Dept. of Acu. & Mox., College of Oriental Medicine, Dong Eui UNIV

This study was undertaken to determine whether *Juglandis Semen* (JAS) extraction exerts protective effect against oxidant-induced inhibition of Na⁺-pump activity in cerebral cortex. Na⁺-pump activity was estimated by measuring ouabain-sensitive oxygen consumption. The oxygen consumption significantly inhibited by 1 mM t-butylhydroperoxide (tBHP), which was prevented by addition of 2% JAS extraction. The oxygen consumption was increased by an increase in Na⁺ concentration from 5 to 100mM, K⁺ concentration from 0.5 to 10 mM, and Mg⁺⁺ concentration from 0.2 to 5 mM. These changes in ion concentrations did not affect the inhibitory effect of tBHP and protective action of JAS on oxygen consumption. tBHP(1mM) produced a significant increase in lipid peroxidation in cerebral cortex, which was prevented by 2% JAS extraction.

* 東義大學校 韓醫科大學 鍼灸經穴學教室

These result suggest that JAS exerts protective effect against tBHP-induced inhibition of Na^+ -pump activity in the cerebral cortex, this effect may be due to by an antioxidant action.

I. 緒 論

細胞膜에 存在하는 能動的 移動機轉 (active transport mechanism)인 Na^+ -pump의 Na^+ - K^+ -ATPase에 依하여 Na^+ 이 細胞 안에서 밖으로 移動되고 K^+ 은 細胞 밖에서 안으로 移動되며¹⁾, Na^+ 의 移動으로 神經細胞나 心筋細胞에서 安定膜電壓이 維持되므로 興奮의 傳達이나 筋肉의 收縮 등 여러 生體에 重要한 生理的 機能이 수행되고 있다. 따라서 Na^+ -pump가 損傷되었을 때 神經의 正常機能에 決定的인 障礙가 誘發되게된다^{2,3)}.

大腦 細胞膜은 反應性 酸素基의 攻擊對象인 不飽和 脂肪酸을 많이 含有하고 있기 때문에 이들에 依한 細胞損傷이 흔하게 나타날 수 있으며, 또한 腦細胞는 內在性 酸化劑인 catalase, glutathion peroxidase, vitamin E의 含有量이 매우 낮기 때문에 反應性 酸素基에 依해 損傷받기가 쉽다⁴⁾.

反應性 酸素基가 脂質에 作用하여 過酸化를 誘發하게 되면 細胞膜의 透過性이 增加되고^{5,6)}, Na^+ -pump같은 細胞膜을 통한 能動的 物質移動界가 抑制되어 細胞機能에 障礙가 誘發되게 되며^{7,8)}, 組織에서 Na^+ -pump가 脂質의 過酸化에 依해 顯著하게 沮害되고 있음이 報告된 바 있다⁹⁾.

內經에서는 腦에 對해 奇恒之府¹⁰⁾, 髓之海¹¹⁾, 精明之府¹⁰⁾라 하여, 中樞神經의 機能活動을 意味하는 陰陽表裏의 臟腑라 하였다¹²⁾.

胡桃는 補腎, 溫腎藥物로서, 性味が 甘, 溫, 熱하고 腎과 肺에 歸經하여, 澁精固腎, 溫肺潤腸, 通命門, 利三焦, 斂肺定喘, 補氣養血, 通潤血脈, 潤肌, 利小便, 治石淋 등의 效能을 가진 藥物이다¹³⁻¹⁷⁾.

最近 金 등¹⁸⁾과 姜¹⁹⁾은 胡桃藥鍼液이 酸化酵素의 活性에 對하여 有意한 效能이 있음을 報告한 바 있다.

이에 酸化劑에 依한 腦組織의 Na^+ -pump活性 障礙에 對한 胡桃藥鍼液의 效果를 살펴보기 위해 Na^+ -pump活性과 脂質의 過酸化度を 測定하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 動物

實驗에 사용한 動物은 體重 1.5~2.0kg되는 New Zealand産 白色 成兔를 動物飼育場에서 구입하여 雌雄 區別없이 使用하였다.

2) 藥材

實驗에 使用한 胡桃(*Juglandis Semen*)는 市中에서 구입하여 精選使用하였다.

2. 方法

1) 藥鍼液의 製造

胡桃肉 500g을 methyl alcohol로 抽出한 후 n-hexane과 methyl alcohol이 1:1의 比로 된 液속에 넣고 煎湯하여 n-hexane層을 分離 除去하고 methyl alcohol層에 남은 成分을 濃縮하여 約 6g이 되게 하였으

며, 이를 溶液속에 適當한 濃도가 되게 녹여 使用하였다.

2) Na⁺-pump 活性 測定

腦組織에서 Na⁺-pump活性은 家兔의 大 腦皮質을 들어내어 冷한 saline 溶液內에 담긴 다음 Stadie-Rigg's microtome으로 約 0.3~0.5mm 두께의 腦皮質 切片을 만들어 使用하였다. 腦皮質 切片에서 酸素消耗量은 oxygen monitor (Yellow Spring Instrument Co., model 53)를 利用하여 測定하였다. 約 50mg의 組織切片을 測定溶液 (100mM NaCl, 3mM KCl, 1.23mM MgSO₄, 15mM phosphate buffer, pH 7.4, 24mM glucose)이 들어 있는 測定容器 속에 넣고 15분 동안 酸素消耗量을 Clark electrode를 利用하여 測定하였다. 酸素消耗量을 1mMouabain이 들어있는 溶液과, 들어있지 않은 溶液內에서 測定한 다음 그 差異를 Na⁺-pump活性으로 하였다. 腦組織에서 蛋白質 濃도는 Bradford의 方法²⁰⁾으로 測定하였다.

3) Lipid peroxidation 測定

細胞膜 脂質의 過酸化 程度는 그 產物인 malondialdehyde (MDA) 量을 Uchiyama와 Mihara方法²¹⁾으로 測定하여 評價하였다. 간단히 說明하면, 腦組織을 차가운 1.15% KCl 溶液(5% wt/vol) 속에서 破碎하였다. 이 組織破碎 均質液 0.5ml에 1% 磷酸 溶液 3ml와 0.6% thiobarbituric acid 溶液 1ml를 添加하여 끓는 물에서 45分間 加熱하였다. n-Butanol 4ml를 添加하여 完全히 섞은 다음 2,000g에서 20分間 遠心分離한 後, 上層液의 吸光度를 536과 520nm에서 測定하였다. MDA 값은 蛋白質 1mg 당 pmole로 表示하였다. 蛋白質 濃도는 Bradford의 方法²⁰⁾으로 測定하였다.

4) 統計 處理

成績은 平均值±標準誤差로 나타내었으며, 平均值間의 有意性은 Student's t-test²²⁾를 利用하여 檢定하였고 p값이 0.05미만일 때 有意한 것으로 判定하였다.

III. 成績

1. 胡桃藥鉞液이 Na⁺-pump活性에 미치는 影響

正常組織에서 酸素消耗量은 6.46±1.26 μ mole O₂/mg/hr였으며, 1mM tBHP를 處理하였을 때 그 값은 1.36±1.26 μ mole O₂/mg/hr으로 有意性(p<0.05)있는 減少를 보였다. 그러나 tBHP를 處理하는 溶液內에 2%胡桃藥鉞液을 添加하였을 때 酸素消耗量은 6.15±1.42 μ mole O₂/mg/hr로 有意性(p<0.05)있는 增加를 보였다(Table I, Fig. 1).

Table I. Effect of *Juglandis Semen* (JAS) Extraction on tBHP-Induce Inhibition of Ouabain-Sensitive Oxygen Consumption in Homogenate of Cerebral Cortex

Group	Oxygen consumption (μ mole O ₂ /mg/hr)
Control	6.46±1.26
tBHP	1.36±1.26*
tBHP+JAS	6.15±1.42*

Data are mean±SE

control : Untreated Group

tBHP : Group with tBHP

tBHP + JAS : Group with *Juglandis Semen*

Statistically significant value compared with control data of each group (*: p<0.05)

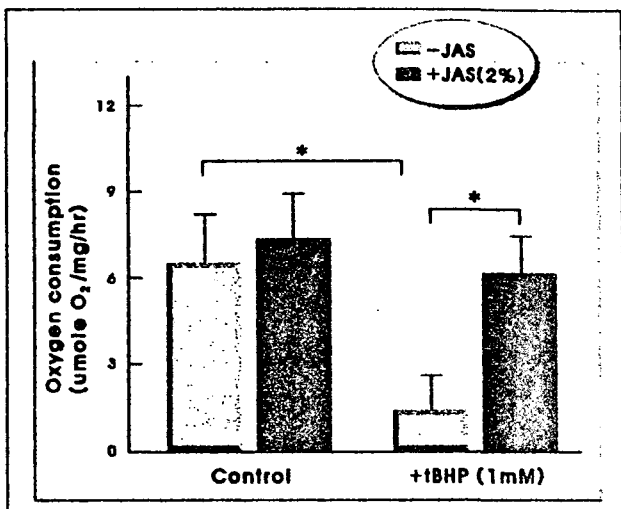


Fig. 1. Effect of *Juglandis Semen* (JAS) extraction on tBHP-induced inhibition of ouabain-sensitive oxygen consumption in homogenate of cerebral cortex. The oxygen consumption was measured at 37°C for 15 min in a buffer containing 100mM NaCl, 3mM KCl, 1.25mM MgSO₄, 15mM phosphate buffer (pH 7.4), and 24mM glucose in the presence of JAS and/or 1 mM tBHP. Data are mean ± SE. (*: p < 0.05)

2. Incubation溶液內的 Na⁺濃度變化의 效果

Na⁺濃度を 5와 100mM로 變化시키고 tBHP의 抑制效果를 調査한 結果, Na⁺濃도가 5mM일 때 酸素消耗量이 2.23 ± 0.46 μ mole O₂/mg/hr에서 0.97 ± 0.05 μ mole O₂/mg/hr로 有意性(p < 0.05)있게 減少되었고, Na⁺濃도가 100mM일 때도 酸素消耗量은 8.26 ± 1.26 μ mole O₂/mg/hr에서 1.08 ± 0.27 μ mole O₂/mg/hr로 有意性(p < 0.05)있게 減少되었다. 胡桃藥鍼液을 投與하였을 때, Na⁺濃도가 5mM일 때 2.26 ± 0.17 μ mole O₂/mg/hr, 100mM일 때 7.37 ± 1.26 μ mole O₂/mg/hr으로 둘 다 有意性(p < 0.05)있게 恢復되었다(Table II, Fig. 2).

Table II. Effect of *Juglandis Semen* (JAS) Extraction on tBHP-Induced Inhibition of Ouabain-Sensitive Oxygen Consumption in the Presence of two Na⁺ Concentrations in Homogenate of Cerebral Cortex

Group I (5mM Na ⁺)	Oxygen consumption (μ mole O ₂ /mg/hr)
Control	2.23 ± 0.46
tBHP	0.97 ± 0.05*
tBHP+JAS	2.26 ± 0.17*

Group II (100mM Na ⁺)	Oxygen consumption (μ mole O ₂ /mg/hr)
Control	8.26 ± 1.26
tBHP	1.08 ± 0.27*
tBHP+JAS	7.37 ± 1.26*

Data are mean ± SE

control : Untreated Group

tBHP : Group with tBHP

tBHP + JAS : Group with *Juglandis Semen*

Statistically significant value compared with control data of each group (*: p < 0.05)

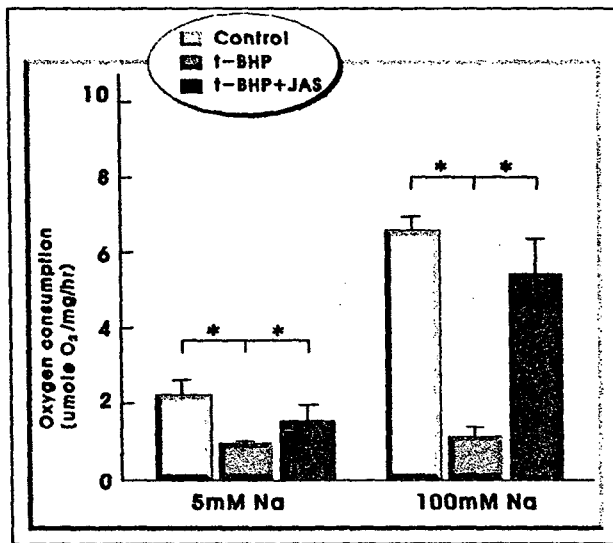


Fig. 2. Effect of *Juglandis Semen* (JAS) extraction on tBHP-induced inhibition of ouabain-sensitive oxygen consumption in the presence of two Na⁺ concentrations in homogenate of cerebral cortex. The oxygen consumption was measured at 37°C for 15 min in a buffer containing 5 or 100mM NaCl, 3mM KCl, 1.25mM MgSO₄, 15mM phosphate buffer (pH 7.4), and 24mM glucose in the presence of JAS and/or 1 mM tBHP. Data are mean ± SE. (*: p < 0.05)

3. Incubation 溶液內의 K⁺濃度變化의 效果

溶液內의 K⁺濃度를 0.5와 10mM로 變化시키고 tBHP의 抑制效果를 調査한 結果 K⁺濃도가 0.5mM일 때 酸素消耗量이 1.67 ± 0.14 μmole O₂/mg/hr에서 0.56 ± 0.05 μmole O₂/mg/hr로 有意性(p < 0.05)있 게 抑制되었고, K⁺濃도가 10mM일 때 酸素消耗量이 6.57 ± 0.46 μmole O₂/mg/hr에서 1.08 ± 0.27 μmole O₂/mg/hr로 有意性(p < 0.05)있 게 抑制되었다. 胡桃藥鉞液을 投與하였을 때, K⁺濃도가 0.5mM일 때 1.57 ± 0.47 μmole O₂/mg/hr, 10mM일 때 5.32

± 1.14 μmole O₂/mg/hr으로 들 다 有意性(p < 0.05)있 게 恢復되었다(Table III, Fig. 3).

Table III. Effect of *Juglandis Semen* (JAS) Extraction on tBHP-Induced Inhibition of Ouabain-Sensitive Oxygen Consumption in the Presence of two K⁺ Concentrations in Homogenate of Cerebral Cortex

Group I (0.5mM K ⁺)	Oxygen consumption (μmole O ₂ /mg/hr)
Control	1.67 ± 0.14
tBHP	0.56 ± 0.05*
tBHP+JAS	1.57 ± 0.47*

Group II (10mM K ⁺)	Oxygen consumption (μmole O ₂ /mg/hr)
Control	6.57 ± 0.46
tBHP	1.08 ± 0.27*
tBHP+JAS	5.32 ± 1.14*

Data are mean ± SE

control : Untreated Group

tBHP : Group with tBHP

tBHP + JAS : Group with *Juglandis Semen*

Statistically significant value compared with control data of each group (*: p < 0.05)

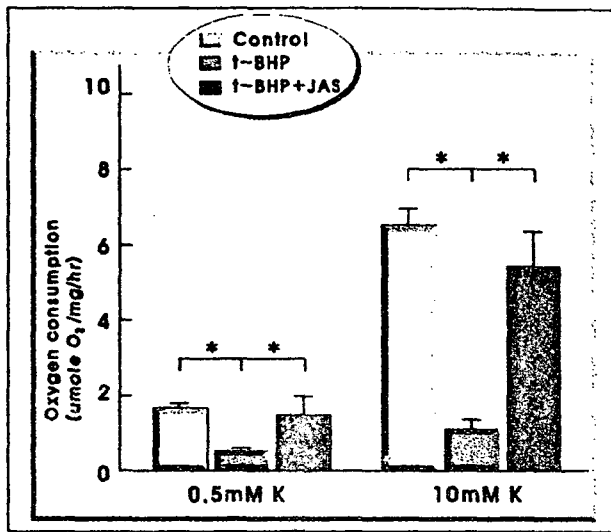


Fig. 3. Effect of *Juglandis Semen* (JAS) extraction on tBHP-induced inhibition of ouabain-sensitive oxygen consumption in the presence of two K⁺ concentrations in homogenate of cerebral cortex. The oxygen consumption was measured at 37°C for 15min in a buffer containing 100mM NaCl, 0.5 or 10mM KCl, 1.25mM MgSO₄, 15mM phosphate buffer (pH 7.4), and 24 mM glucose in the presence of JAS and/or 1mM tBHP. Data are mean ± SE. (*: p < 0.05)

4. Incubation溶液內的 Mg⁺⁺濃度變化의 效果

溶液內的 Mg⁺⁺濃度を 0.2와 5mM로 變化시키고 tBHP의 抑制效果를 調査한 結果 Mg⁺⁺濃도가 0.2mM일 때 酵素의 活性은 1.45 ± 0.11 μmole O₂/mg/hr에서 0.65 ± 0.06 μmole O₂/mg/hr로 有意性(p < 0.05)있게 抑制되었고, Mg⁺⁺濃도가 5mM일 때도 酵素의 活性이 8.07 ± 1.39 μmole O₂/mg/hr에서 2.36 ± 0.19 μmole O₂/mg/hr로 有意性(p < 0.05)있게 抑制됨으로서 Mg⁺⁺도 變化에 따라 tBHP의 抑制效果는 影響을 받지 않았다. 胡桃藥鍼液을 投與하였을 때, Mg⁺⁺

濃도가 0.2mM일 때 1.08 ± 0.09 μmole O₂/mg/hr, 5mM일 때 7.64 ± 1.62 μmole O₂/mg/hr으로 둘 다 有意性(p < 0.05)있게 恢復되었다(Table IV, Fig. 4).

Table IV. Effect of *Juglandis Semen* (JAS) Extraction on tBHP-Induced Inhibition of Ouabain-Sensitive Oxygen Consumption in the Presence of two Mg⁺⁺ Concentrations in Homogenate of Cerebral Cortex

Group I (0.2mM Mg ⁺⁺)	Oxygen consumption (μmole O ₂ /mg/hr)
Control	1.45 ± 0.11
tBHP	0.65 ± 0.06*
tBHP+JAS	1.08 ± 0.09*
Group II (5mM Mg ⁺⁺)	Oxygen consumption (μmole O ₂ /mg/hr)
Control	8.07 ± 1.39
tBHP	2.36 ± 0.19*
tBHP+JAS	7.64 ± 1.62*

Data are mean ± SE

control : Untreated Group

tBHP : Group with tBHP

tBHP + JAS : Group with *Juglandis Semen*

Statistically significant value compared with control data of each group (*: p < 0.05)

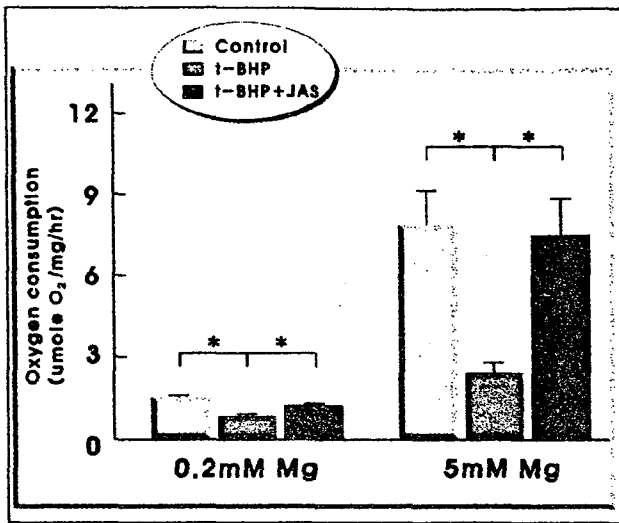


Fig. 4. Effect of *Juglandis Semen* (JAS) extraction on tBHP-induced inhibition of ouabain-sensitive oxygen consumption in the presence of two Mg⁺⁺ concentrations in homogenate of cerebral cortex. The oxygen consumption was measured at 37°C for 15min in a buffer containing 100mM NaCl, 3mM KCl, 0.2 or 5mM MgSO₄, 15mM phosphate buffer (pH 7.4), and 24mM glucose in the presence of JAS and/or 1mM tBHP. Data are mean ± SE. (*: p<0.05)

5. tBHP에 의한 脂質의 過酸化에 對한 胡桃藥鉞液의 效果

腦組織을 1mM tBHP에 漏出시켰을 때 脂質의 過酸化는 143.47 ± 20.43pmole MDA/mg protein에서 895.68 ± 45.95pmole MDA/mg protein으로 增加함으로써 脂質의 過酸化가 顯著的 有意性(p<0.01)이 있게 增加되었음을 알 수가 있었다. tBHP를 處理할 때 胡桃藥鉞液을 2%濃度가 되게 添加하였을 때, tBHP에 의해 增加되었던 脂質의 過酸化는 539.46 ± 32.38pmole MDA/mg protein으로 현저한 有意性(p<0.01)이 있는 減少를 보였다(Table V,

Fig. 5).

Table V. Effect of *Juglandis Semen* (JAS) Extraction on Lipid Peroxidation Induced by tBHP in Homogenate of Cerebral Cortex

Group	Lipid peroxidation (pmole MDA/mg protein)
Control	143.47 ± 20.431
tBHP	895.68 ± 45.95**
tBHP+JAS	539.46 ± 32.38**

Data are mean ± SE

control : Untreated Group

tBHP : Group with tBHP

tBHP + JAS : Group with *Juglandis Semen*

Statistically significant value compared with control data of each group (**: p<0.01)

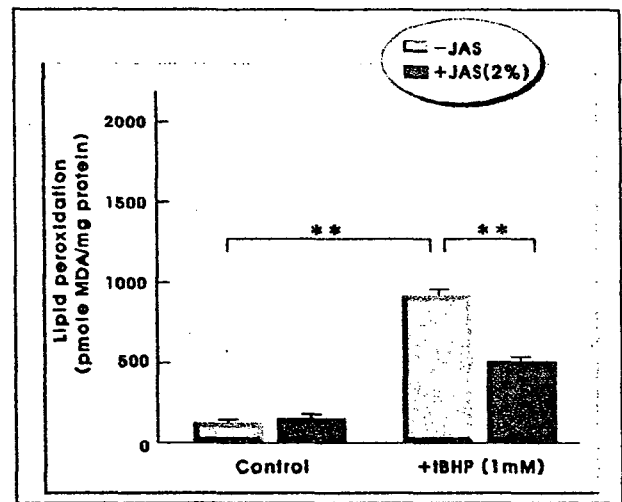


Fig. 5. Effect of *Juglandis Semen* (JAS) extraction on lipid peroxidation induced by tBHP in homogenate of cerebral cortex. The tissues was treated with 1mM tBHP at 37°C for 60min in the presence and absence of 2% JAS. Data are mean ± SE(**: p<0.01)

IV. 考 察

腦는 《靈樞·經脈篇》¹¹⁾에 “人始生 先 成精 精成而腦髓生”이라 하고, 《素問·解 精微論》¹⁰⁾에 “腦者陰也 髓者骨之充也... 水 之精爲志 火之精爲神 水火相感 神志俱悲 是而目之水生也”라 하였고, 《素問·五藏 生成論》¹⁰⁾에 “諸髓者 皆屬於腦”라 하였으 며, 《素問·骨空論》¹⁰⁾에 “督脈者 與太陽 起於目內眥 上額交巔 上入絡腦”라 하여 腦 髓는 運動機能, 感覺, 知覺機能을 營爲함을 알 수 있으니, 中樞神經, 末梢神經 및 自律 神經을 營爲하는 器官으로 表現되고 있다¹²⁾.

또한, 《靈樞·海論》¹¹⁾에 “腦爲髓之海, 其輸上在於其蓋, 下在風府..髓海有餘則輕勁 多力, 自過其度, 髓海不足則 腦轉耳鳴, 脛 痠眩冒, 目無所見, 懈怠安臥”라 하였고, 《素問·脈要精微論》¹⁰⁾에 “頭者 精明之府, 頭傾視深, 精神將奪矣”라 하였고, 《靈樞· 口問篇》¹¹⁾에 “上氣不足 腦爲之不滿 耳爲 之苦鳴 頭爲之苦傾 目爲之眩”이라 하였고, 《靈樞·經脈篇》¹¹⁾에 “膀胱足太陽之脈 起 於目內眥 上額交巔 其支者 從巔至耳上角 其直者 從巔入絡腦.....是動則病衝頭痛 目似 脫 項如拔 脊痛 腰似折 髀不可以曲 腦如結 蹇如裂 是爲蹠厥 是主筋 所生病者 痔 瘡 狂 癲疾 頭顛項痛”이라 하여, 腦髓와 關聯 된 疾患들을 表現하고 있다.

胡桃는 胡桃나무과(胡桃科: *Juglandaceae*)에 屬한 落葉喬木인 胡桃나무果實의 種 仁^{23,24)}으로 核桃肉, 核桃仁, 唐楸子 등의 異名이 있으며, 性은 溫, 熱, 無毒하고, 味 는 甘하며, 肺經, 腎經에 入한다. 主成分은 linoleic acid, oleic acid 등을 主로 한 脂肪 油가 40~50%, 蛋白質, 糖分, 灰分,

vitamin A·B·C·E 등이라고 알려져 있으 며²⁵⁾, 壯陽固精·通命門·利三焦·潤腸胃·滋 養強壯·抗老衰·健腦·通潤血脈·潤肌·利小便 등의 效能으로 腰痛脚弱·陽痿·遺精·腸燥便 秘·腎虛咳嗽·心腹疝痛·血痢腸風·散腫毒·發 頭瘡·制銅毒 등의 主治症을 가진다¹³⁻¹⁷⁾.

tBHP는 tert-Butylhydroperoxide(C₄H₁₀ O₂)로서 重合反應(polymerization reaction) 을 일으키는 觸媒로 作用하며, radical의 置換反應(substitution reaction)을 일으키 는 peroxy group의 酸化劑로 널리 使用되 고 있는 藥物이다²⁶⁾.

Na⁺-pump는 細胞內外의 Na⁺과 K⁺의 分 布를 調節하여 神經과 筋肉의 作用을 可能 케 하고 細胞의 容積을 一定하게 維持시키 며 體內 電解質含量과 滲透質 濃度 調節에 寄與하고 細胞內 酵素作用을 위한 適切한 條件을 附與하는 등 正常的인 細胞의 機能 에 重要的 役割을 하고 있으며²⁷⁾, 특히 腦 細胞에서는 安靜膜電壓의 發生과 維持 및 興奮의 傳達 등 神經細胞의 機能에 決定的 인 役割을 하고 있다.

Na⁺-pump는 細胞膜에 存在하기 때문에 이의 活性을 알아보기 위하여는 細胞膜을 分離하여 化學的인 方法으로 Na⁺-K⁺-ATPase活性을 測定하여 評價하고 있으나, 이 方法은 細胞가 살아 있는 狀態에서 測定하는 方法이 아니기 때문에 正確한 Na⁺-pump活性이라고 보기가 힘들다. 살아 있는 세포에서는 ouabain-sensitive oxygen consumption을 測定하여 評價하고 있는데, 살아 있는 細胞는 生存을 위해 계 속 酸素를 使用하고 있으므로 Na⁺-pump 를 抑制시킨 狀態에서 酸素消耗量을 測定 하게 되면 細胞가 使用하는 總酸素量에서 그 값을 減하여 Na⁺-pump가 使用하는 酸 素消耗量을 算定할 수가 있다.

本 實驗에서는 1mM ouabain을 處理하게 되면 Na^+ -pump活性이 完全히 抑制된다는 事實을 利用하여 腦皮質切片에서 ouabain이 없는 溶液 內에서 總 酸素消耗量을 測定하고, 1mM ouabain을 處理한 狀態에서 酸素消耗量을 測定하여 Na^+ -pump 活性으로 하였다. Akera 등²⁸⁾과 Gubitz 등²⁹⁾도 이러한 方法으로 살아있는 神經細胞에서 Na^+ -pump活性을 測定하였다.

Superoxide, hydrogen, peroxide, hydroxyl radical과 같은 反應性 酸素基 (reactive oxygen species)들은 老化, 癌誘發 및 腦貧血과 관계가 있을 뿐만 아니라^{30,31)} 파킨슨병, 알츠하이머병, 虛血性 神經損傷 및 癩疾을 包含한 여러 가지 急性 및 慢性 神經性 疾患의 病因으로 認定되고 있다³²⁻³⁵⁾. 이들 反應性 酸素基들이 正常的인 細胞에서도 發生되고 있으나 몸속에는 또한 이들의 有害酸素基들을 除去하는 酵素나 物質들을 가지고 있어 細胞속에서 發生되는 有害酸素基들이 細胞損傷을 일으키지 못하도록 調節하는 抗氧化酵素가 存在하고 있다^{36,37)}. 따라서 外部刺戟에 의해 細胞內에서 反應性 酸素基들이 過量으로 發生하거나, 有害酵素에 대한 防禦機轉들의 機能이 低下되면 細胞는 損傷을 받게 될 것이다.

그림 1은 oxidant인 tBHP가 Na^+ -pump 活性에 어떤 影響을 미치며, 또한 胡桃藥鉞液이 正常 組織 및 tBHP를 處理한 組織에서 酵素의 活性에 어떤 影響을 미치는지를 觀察한 結果이다. 그림에서 보는 바와 같이 酸素消耗量은 tBHP에 의해 有意性있는 減少를 보였고, tBHP를 處理한 溶液內에 2%胡桃藥鉞液을 添加하였을 때 酸素消耗量은 有意性있는 增加를 보였다. 胡桃藥鉞液을 正常組織에 添加하였을 때에는

酸素消耗量에 有意한 變化를 보이지 않았다.

Na^+ -pump活性은 Na^+ , K^+ 및 Mg^{++} 에 의해 活性化되는 것으로 알려져 있기 때문에³⁾ tBHP 및 胡桃藥鉞液의 效果가 이들 ion들의 濃度變化에 따라 影響을 받을 수도 있다. 따라서 本 研究에서 이들 ion들의 濃度を 變化시키고 tBHP의 抑制作用 및 胡桃藥鉞液의 恢復效果를 調査하였다.

本 實驗에서는 ouabain-sensitive oxygen consumption이 溶液內의 Na^+ , K^+ , Mg^{++} 濃도가 增加함에 따라 細胞膜을 分離하여 化學적으로 測定한 報告들과 一致하였다^{3,38,39)}.

그림 2는 溶液內 Na^+ 濃度を 變化시키고 調査한 結果이다. 이 그림에서 보는 바와 같이 溶液內의 Na^+ 濃度を 5mM과 100mM로 變化시키고 tBHP의 抑制효과를 調査한 結果, 두 濃度 모두 有意하게 抑制되었다. Na^+ 濃度變化에 따른 胡桃藥鉞液의 恢復效果를 調査한 結果, Na^+ 濃도가 5mM일 때와 100mM일 때 모두 tBHP에 의한 酸素消耗量은 2%胡桃藥鉞液에 의해 有意하게 恢復되었다.

그림 3은 溶液內 K^+ 濃度を 變化시키고 調査한 結果이다. 이 그림에서 보는 바와 같이 溶液內의 K^+ 濃度を 0.5와 10mM로 變化시키고 tBHP의 抑制效果를 調査한 結果, 두 濃度 모두 有意하게 抑制되었고, tBHP에 의한 酸素消耗량의 抑制作用을 恢復시키는 胡桃藥鉞液의 效果가 K^+ 濃度變化에 따라 影響을 받는 지를 調査한 結果, K^+ 이 0.5mM일 때와 10mM일 때 모두 胡桃藥鉞液 添加는 거의 正常水準까지 有意하게 酸素消耗量을 恢復시켰다.

그림 4는 溶液內 Mg^{++} 濃度を 變化시키고 調査한 結果이다. 이 그림에서 보는 바

와 같이 溶液內의 Mg^{++} 濃도를 0.2mM과 5mM로 變化시키고 tBHP의 抑制效果를 調査한 結果, 두 濃度 모두 有意하게 抑制되어 濃度變化에 따른 tBHP의 抑制效果는 影響을 받지 않았다. 또한 tBHP에 依한 酵素의 抑制作用을 恢復시키는 胡桃藥鉞液의 效果가 Mg^{++} 濃度變化에 따라 影響을 받는 지를 調査한 結果, 胡桃藥鉞液은 Mg^{++} 농도가 0.2mM일 때와 5mM일 때 모두 tBHP의 抑制作用을 有意性있게 恢復시켰다.

上記 結果와 같이 Na^+ -pump는 溶液內의 Na^+ , K^+ 및 Mg^{++} 에 依해 活性化되는 것으로 알려져 있으므로 Na^+ -pump活性을 抑制하는 藥物들이 이들 ion들의 作用을 妨害하여 나타날 수 있다. 그러나 本 研究에서 tBHP에 依한 抑制는 溶液內의 Na^+ , K^+ 또는 Mg^{++} 濃度 變化에 따라 影響을 받지 않음으로써 tBHP가 Na^+ -pump와 이들 ion들과의 相互作用에는 影響을 미치지 못함을 가리키고 있다. 또한, 胡桃藥鉞液의 恢復作用도 溶液內의 여러 電解質들의 濃度變化에 따라 影響을 받지 않음으로써 胡桃藥鉞液이 Na^+ -pump에 대한 이들 ion들의 作用을 變化시켜 恢復작용을 나타내고 있지 않음을 알 수 가 있다.

tBHP에 依한 酵素의 活性을 恢復시키는 胡桃藥鉞液의 效果가 脂質의 過酸化를 減少시킴으로써 나타나는 지를 確認하기 爲하여 tBHP에 依해 誘發된 脂質의 過酸化에 對한 胡桃藥鉞液의 效果를 調査하였다.

그림 5에서 보는 바와 같이 腦組織을 1mM tBHP에 漏出시켰을 때 脂質의 過酸化는 顯著한 有意성이 있는 增加를 나타냈으며, 胡桃藥鉞液을 2%濃度되게 添加하였을 때 tBHP에 依해 增加되었던 脂質의 過酸化는 顯著한 有意성이 있는 減少현상을

보였다. 正常組織에 胡桃藥鉞液을 處理했을 때는 脂質의 過酸化가 影響을 받지 않았다. 本 實驗에서는 酸素消耗量이 tBHP에 依해 抑制되어 Na^+ -pump活性이 oxidant에 依해 沮害되고 있음을 보였다. 이러한 結果는 Sun⁹⁾이 원숭이의 大腦皮質에서 分離한 Na^+ - K^+ -ATPase活性이 脂質의 過酸化에 依해 抑制된다는 結果와 一致한다.

以上の 實驗結果, 胡桃는 tBHP에 依한 酸素消耗量 抑制를 強力하게 恢復시키는 效果가 있음을 보임으로써, 毒性 藥物이나 酸化劑들에 依한 細胞機能 障礙를 豫防, 治療할 수 있는 藥物로 開發될 수 있을 可能性을 보였다. 그러나, 어떤 機轉으로 恢復시키는지는 더욱 研究해 보아야 밝혀질 것으로 생각된다.

V. 結 論

腦組織의 Na^+ -pump活性 障礙에 對하여 胡桃藥鉞液의 效果를 실험하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. Na^+ -pump 活性에 對하여 酸素消耗量은 有意한 增加를 보였다.
2. Na^+ 濃度 變化에 따른 酸素消耗量은 有意한 增加를 보였다.
3. K^+ 濃度 變化에 따른 酸素消耗量은 有意한 增加를 보였다.
4. Mg^{++} 濃度 變化에 따른 酸素消耗量은 有意한 增加를 보였다.
5. 脂質의 過酸化는 有意한 減少를 보였다.

參考文獻

1. Albers R.W., "Biochemical aspects of active transport", *Ann Rev. Biochem.*, Vol. 36, 1967, pp. 727-756.
2. Hokin L.E. and Dahl J.L., *The sodium-potassium adenosinetriphosphatase*, In: *Metabolic Pathways, 3rd ed., VI. Metabolic Transport*, edited by Hokin KE, Academic Press Inc., 1972, pp. 270-315.
3. Schwartz A, Lindenmayer G.E. and Allen J.C., "The sodium-potassium adenosine triphosphatase", Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.*, Vol. 27, 1975, pp. 3-134.
4. Olanow C. W. "A radical hypothesis for neurodegeneration", *Trends-Neurosci.*, Vol. 16, 1993, pp. 439-444.
5. Chance B., Sies H. and Boveris A., "Hydroperoxide metabolism un mammalian organs", *Physiol. Rev.*, Vol. 59, 1979, pp. 527-605.
6. Arstila A. U., "Microsomal lipid peroxidation", *Morphological characterization science.*, Vol. 175, 1972, pp. 530-533.
7. Koko K., Kato M., Matsuoka T. and Mustapha A., "Depression of membrane-bound Na^+ - K^+ -ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney", *Am. J. Physiol.*, Vol. 254, 1988, pp. C330-C337.
8. Andreoli V., "Phosphatidyl serine synthesis in rat cerebral cortex: effects of hypoxia, hypocapnia and development", *Mol-Cell-Biochem.*, Vol. 126, 1993, pp. 101-107.
9. Sun A. Y., "The effect of lipoxidation on synaptosomal (Na^+ + K^+)-ATPase isolated from the cerebral cortex of squirrel monkey", *Biophys. Acta.*, Vol. 266, 1972, pp. 350-360.
10. 洪元植, 「精校黃帝內經素問」, 서울: 東洋醫學研究院出版部, 1983, p. 39, 42, 57, 209, 324.
11. 洪元植, 「精校黃帝內經靈樞」, 서울: 東洋醫學研究院出版部, 1983, p. 81, 159, 174.
12. 具本泓, 李京燮, 裴亨燮, 金永錫, 李源哲, 「東醫心系內科學」, 서울: 書苑堂, 1991, p. 27, 36.
13. 楊東喜, 「本草備要解析」, 新竹: 國興出版社, 1991 p. 432.
14. 李時珍, 「本草綱目(下卷)」, 서울: 一中社, 1991, pp. 1803-1804.
15. 皇宮, 「本草求真」, 臺北: 宏業書局, 1981, p. 49.
16. 尹吉榮, 「東醫臨床方劑學」, 서울: 明寶出版社, 1992, p. 606.
17. 지형주, 이상인, 「대한약전의 한약(생약)규격집」, 서울: 한국 메디칼인덱스사, 1989, p. 421.
18. 金永海, 金甲成, "胡桃藥鍼液의 抗酸化效果에 對한 研究 II. oxidant에 의한 細胞損傷을 防止하는 機轉", *大韓鍼灸學會誌*, 13권, 2호, 1996, pp. 54-66.
19. 姜亨定, "胡桃水鍼液이 家兔腎臟의 抗酸化酵素活性에 미치는 影響", *東義大學校 大學院*, 1996.

20. Bradford M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, Vol. 72, 1976, pp. 248-524.
21. Uchiyama M and Mihara M., "Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test", *Anal. Biochem.*, Vol. 86, 1978, pp. 271-278.
22. Snedecor G.H. and W.G. Cochran, *Statistical methods*, 6th ed., Ames, Iowa State Univ., 1967.
23. 辛民教, 「原色臨床本草學」, 서울: 永林出版社, 1986, p. 194.
24. 李載熙, 「圖說 韓方藥理·藥能의 臨床應用」, 서울: 學林社, 1985, p. 577.
25. 李尙仁 外, 「韓藥臨床應用」, 서울: 成輔社, 1986, pp. 194-195.
26. Susan Budavari., *Merck Index* twelfth edition, Merck & Co Inc., New Jersey, 1996, p. 259.
27. 姜斗熙, 「生理學」, 3版, 서울: 新光出版社, 1988, 2장 p. 20, 27.
28. Akera T., Gubitx R.H., Brody T.M. and Tobin T., "Effects of monovalent cations on (Na^+K^+) -ATPase in rat brain slice s", *Eur. J. Pharmacol.*, Vol. 55, 1979, pp. 281-292.
29. Gubitx R.H., Akera T. and Brody T.M., "Control of brain slice respiration by (Na^+K^+) -activated adenosine triphosphatase and the effects of enzyme inhibitors", *Biochem. Biophys. Acta.*, Vol. 459, 1977, pp. 263-277.
30. Floyd R.A., "Role of Oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia", *FASEB J.*, Vol. 4, 1990, pp. 2587-2597.
31. Reiter R. J., "Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the ageing brain", *FASEB J.*, Vol. 9, 1995, pp. 526-533.
32. McCord J. M., "Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury", *N-ENGL-J-Med.*, Vol. 312, 1985, PP. 159-163.
33. Halliwell B., "Oxidants and the central nervous system-some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke?", *Acta Neurol. Scand.*, Vol. 126, 1989, pp. 23-33.
34. Traystman R. J., "Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion", *J-Apple-physiol.*, Vol. 71, 1991, pp. 1185-1195.
35. Brondy S. C., Lebel C. P., "The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the CNS", *Free-Radic-Biol-Med.*, Vol. 14, 1993, pp. 633-642.
36. Halliwell B., "Antioxidant characterization. methodology and mechanism", *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 49, 1995, pp. 1341-1348.
37. Jaeschke H., "Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue

injury” , Proc-Soc-Exp-Biol-Med.,
Vol. 209, 1995, pp. 104-111.

38. Skou J.C., “Further investigation
on a Mg^{++} Na^+ -activated adenosine
triphosphatase, possibly related to the
active, linked transport of Na^+ and K^+
across the nerve membrane” ,
Biophys. Acta., Vol. 42, 1960, pp.
6-23.

39. Whittam R., Ager M.E., “Vectorial
aspects of adenosine-triphosphatase
activity in erythrocyte membrane” ,
Biochem. J., Vol. 93, 1964, pp.
337-348.