

胡桃藥鍼液이 家兔 腦의 Synaptosome에서 Oxidant에 의한 物質移動系의 障礙에 미치는 影響

김태국 · 윤현민 · 장경전 · 송춘호 · 안창범*

The Effect of Juglandis Semen Extract Solution on Oxidant-Induced Alteration of Glutamate Uptake in Rabbit Brain Synaptosome

Tae-Kook Kim · Hyoun-Min Youn · Kyung-Jeon Jang · Choon-Ho Song · Chang-Beohm Ahn*

*Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Donggeui University

Abstract

This study was undertaken to determine whether *Juglandis semen* extract solution (JLS solution) exerts protective effect against oxidant-induced inhibition of glutamate uptake by synaptosomes. Synaptosome was prepared from rabbit brain cortex. Glutamate uptake increased by incubation time during 10 minutes, which was significantly inhibited by 1mM t-butylhydroperoxide(t-BHP). JLS solution prevented t-BHP-induced inhibition of glutamate uptake in a dose-dependent manner. t-BHP reduced glutamate uptake in dose-dependent fashion, which was significantly prevented by 2% JLS solution. t-BHP(1mM) and ascorbate/Fe²⁺(50/1μ M) increased lipid peroxidation in synaptosomes by 5-fold, and it was significantly prevented by 2% JLS solution. HgCl₂(0.1mM) inhibited glutamate uptake and increased lipid peroxidation. These changes were prevented by 2% JLS solution. Synaptosomal Na-K-ATPase activity was inhibited by t-BHP(1mM) and H₂O₂(50mM), which was prevented by 2% JLS solution.

The results indicate that JLS solution prevents oxidant-induced inhibition of glutamate by synaptosomes, and this may result from inhibition of lipid peroxidation induced by oxidants.

I. 緒 論

『內經』¹⁾에 “諸髓者皆屬於腦”라 하였고, 『醫鑑重磨』²⁾에 “精爲身本充腦陰”이라 하여 腦는 骨髓의 대표격으로서 精이 充滿한 곳으로 髓海가 不足하면 腦轉耳鳴 뿐 아니라 각종 질환이 발생하므로,³⁾ 腦의 損傷을 회복시키고 나아가서 老化를 지연시키고자 하는 의학적 노력은 부단히 계속되어 오고 있다.

Superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl

radical과 같은 反應性 酸素基(reactive oxygen species, ROS)들은 파킨슨병, 알츠하이머병, 虛血性 神經損傷 및 癩疾을 포함한 여러 가지 急性 및 慢性 神經性疾患의 病因으로 인정되고 있다.⁴⁻⁸⁾ 특히 大腦 細胞膜은 ROS의 공격대상인 不飽和脂肪酸을 많이 함유하고 있기 때문에 oxidant에 의한 細胞 損傷이 흔하게 나타날 수 있으며, 또한 腦細胞는 內在性 抗酸化劑인 catalase, glutathione peroxidase, vitamin E의 함유량이 매우 낮기 때문에 ROS에 의해 손

Key Words : *Juglandis Semen*, Oxidant, Glutamate uptake, Synaptosome, t-BHP

* : 동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

상받기가 쉽다.⁹⁾

Glutamate는 腦細胞 내의 神經傳達物質로서,¹⁰⁾ 神經細胞 外液內에 glutamate가 過量으로 축적되게 되면 虛血性 神經損傷을 일으키는 것으로 알려지고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 정상 조건에서는 神經傳達過程에서 synaptic cleft로 遊離된 glutamate는 시냅스전 神經末端 細胞膜을 통해 Na-dependent mechanism에 의해 細胞內로 이동되지만, 이 移動系에 장애가 생기게 되면 synaptic cleft 내에 glutamate의 축적이 나타나게 되고 이로 인해 神經細胞의 損傷이 유발되게 된다. 神經細胞에서 Na-dependent glutamate 이동이 ROS에 의해 감소된다는 결과가 보고되었으며^{14,15)} 이는 虛血性 神經損傷의 중요한 病因으로서, ROS에 의한 이 移動系의 장애를 방지하는 것은 임상적으로 대단히 중요하다.

胡桃는 藥鍼療法에 사용되고 있는 약물의 하나로 氣味가 平易하면서도 腎·肺經에 歸經하여 “肥健 潤肌 黑鬚髮 通潤血脈 補氣養血 滋養強壯 潤燥化痰 溫肺潤腸 腰痛脚弱” 등의 효능이 있으므로¹⁶⁻²¹⁾ 腦神經의 회복을 도울 수 있는지를 연구하였다. 胡桃藥鍼液을 이용한 동물 실험에서 세포내 內在性 抗酸化酵素의 活性化,^{22,23)} oxidant에 의한 腎不全 또는 肝損傷,²⁴⁻²⁶⁾ 腦組織 Na⁺-pump 活性障跡에 대한 報告²⁷⁾ 등이 있었으나, oxidant에 의한 glutamate의 축적 변화에 대한 報告는 없었다.

이에 胡桃藥鍼液이 神經 末端에서 oxidant에 의한 物質移動系의 장애에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여 家兔 大腦에서 분리한 synaptosome에서 glutamate의 이동에 대한 oxidant와 胡桃藥鍼液의 영향을 조사하고 胡桃藥鍼液 효과의 기전을 규명하기 위해 본 연구를 시도하여 有意한 결과를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 동물 및 약재

1) 동물

실험동물로는 체중 1.5-2.0kg 되는 뉴질랜드산 白色家兔를 雌雄 구별없이 실험 7일 전에 동물사육장(대구 Life Science사)에서 구입하여 1주일 동안 동물사육실에서 적응시킨 후 고품사료(소동물용, 동양과학 Co.)와 충분한 물을 자유롭게 섭취하도록 공급하며 실험하였다.

2) 약재

胡桃(*Juglandis Semen*)를 시중에서 구입하여 去殼한 후 精選해서 사용하였다.

3) 試藥

[14C]-L-glutamate는 Amersham International (U.K.)에서 구입하였고, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (Hepes)는 Sigma사(St. Louis, Mo., U.S.A.)에서 구입하였으며, 기타 일반 試藥들은 최고의 순수성을 가진 것들을 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 藥鍼液의 제조

胡桃(*Juglandis Semen*) 500g을 麤末하여 증류수 2,000ml 속에 넣고 4시간 동안 熱湯하여 여과한 후 여과액을 rotary evaporator로 감압농축하고 농축액을 증류수 200ml에 녹여 실온까지 냉각하였다. 여기에 ethanol을 가하여 충분히 혼든 다음 실온에서 방치한 후 여과하고 감압농축하여 약 100ml가 되게 하였다. 실험에 사용할 때는 이를 원액으로 하여 용액 내에 적당한 농도로 첨가하였다.

2) Synaptosome의 분리

家兔의 大腦로부터 Hajos 방법²⁸⁾에 따라 synaptosome을 분리하였다. 家兔를 희생시킨 후 大腦皮質을 분리하여 0.3M sucrose를 조직의 10% 되게 가하여 Potter-Elvehjem homogenizer를 이용하여 균등질을 만들어 1,500g에서 10분 동안 원심침전시킨 후 상층액을 얻어

9,000g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.3M sucrose로 浮游시켰다. 이를 0.8M sucrose 용액 위에 넣고 9,000g에서 25분간 원심분리하여 0.8M sucrose 속에 분포된 성분들을 0.3M sucrose 속에 浮游시켜 20,000g에서 30분간 원심침전시켰다. 여기에서 얻은 침전물은 대부분 synaptosome으로 이루어져 있으며, 이를 110mM KCl, 10mM NaCl, 1.2mM CaCl₂, 10mM glucose, 20mM Hepes/Tris(pH 7.4)로 된 용액 속에 浮游시켜 사용하였다.

3) Glutamate 이동 측정

먼저 incubation 시간에 따른 glutamate 이동을 대조군으로 하고 tert-butylhydroperoxide(t-BHP)를 첨가한 것을 처리군으로 하여 glutamate 이동을 측정하였다. 다음으로胡桃藥鉞液의 농도별 영향을 보기 위해 synaptosome을 대조군으로 하고 1mM의 t-BHP로 처리한 용액을 처리군으로 하여 여기에胡桃藥鉞液을 0.2%에서 5% 되게 첨가하여 glutamate 이동을 측정하였다. 그 다음胡桃藥鉞液의 효과가 t-BHP의 농도 변화에 의해 어떤 영향을 받는지를 조사하기 위하여 2%胡桃藥鉞液을 첨가하지 않은 것을 대조군, 첨가된 것을 처리군으로 하여 여기에 t-BHP의 농도를 0.1에서 2mM까지 변화시켜 관찰하였다.

Synaptosome에 의한 glutamate 이동은 급속여과방법을 이용하여 측정하였다. Synaptosome(5mg/ml)을 37°C에서 incubation medium과 10:1의 비율이 되게 첨가하여 반응을 시작하였으며, 일정한 시간이 경과된 후 반응액 100 μ l를 취하여 millipore filter를 통해 진공하에서 급히 여과하였다. 그 후 filter를 정지용액 5ml로써 세척하고 methoxyethanol 1.0ml 속에서 녹여 scintillation cocktail 10ml를 더하여 synaptosome 내에 이동된 방사선동위원소의 양을 liquid scintillation spectrometry(Packard Tricarb 300C)를 이용하여 측정하였다.

본 실험에서 incubation 용액의 조성은 10 μ M [¹⁴C]-L-glutamate, 115mM NaCl, 5mM KCl, 1.2mM CaCl₂, 10mM glucose, 20mM

Hepes/Tris(pH 7.4)였으며, 정지용액의 조성은 위의 incubation 용액과 동일하였으나 기질이 포함되지 않았다. Synaptosome 내로 들어가지 않고 膜의 외부와 filter에 결합된 방사선동위원소의 양(nonspecific binding)은 0.1% deoxycholate가 함유된 용액 내에서 synaptosome을 incubation하여 측정하였으며, 측정 결과에서 nonspecific binding 양을 뺀 것을 이동된 양으로 산정하였다. 단백질의 함량은 표준용액으로 γ -globulin을 이용하여 Bradford의 방법²⁹⁾으로 측정하였다. 약물의 효과를 실험할 때는 synaptosome에 약물을 첨가하여 37°C에서 60분간 처리한 후 glutamate 이동을 측정하였다. 본 실험에 사용한 oxidant는 酸化劑에 의한 細胞 損傷을 연구하는 데 널리 이용되고 있는 약물인 t-BHP를 사용하였다.

4) 脂質의 過酸化 측정

t-BHP같은 oxidant들의 독성작용은 脂質의 過酸化에 기인하는 것으로 알려져 있기 때문에³⁰⁾胡桃藥鉞液이 oxidant에 의한 脂質의 過酸化를 방지하는지 확인하기 위하여 1mM t-BHP를 처리하지 않은 것을 대조군으로 하고, 처리한 용액과 여기에 다시 2%胡桃藥鉞液을 첨가한 것을 처리군으로 하여 각각 脂質의 過酸化를 측정하였다. 또한 酸素遊離基를 발생시켜 脂質의 過酸化를 유발하는 것으로 알려진³¹⁾ ascorbate/Fe²⁺ 50 μ M과 1 μ M을 synaptosome(대조군)에 처리하여 脂質의 過酸化를 유발시킨 뒤 여기에 2% 藥鉞液을 첨가하여 대조군과 비교하였다.

Synaptosomal membrane에서 lipid peroxidation은 그 분해산물인 malondialdehyde(MDA) 양을 Buege와 Aust 방법³²⁾으로 측정하였다. Synaptosome을 t-BHP 또는 ascorbate/FeSO₄가 들어 있는 용액에 각각 넣어 37°C에서 60분 동안 처리하였다. Synaptosome 150 μ l를 0.5mM EDTA가 들어 있는 10% trichloroacetic acid 용액 850 μ l 및 0.67% thiobarbituric acid와 혼합하여 80°C에서 20분간 가열하였다. 試料를 식힌 후에 2,500g에서

15분 동안 원심분리하여 상층액을 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Hg로 유발된 독성작용과 脂質의 過酸化에 대한 효과

急性腎不全을 실험적으로 유발시키기 위해 Hg를 주로 이용하는데,³³⁾ Hg가 腎臟毒性을 유발할 때 有害酸素基가 중요한 역할을 하므로³⁴⁾ 胡桃藥鉍液이 Hg에 의한 독성을 방지할 수 있는지를 조사하였다. 먼저 synaptosome(대조군)에 0.1mM HgCl₂를 처리한 것과 여기에다 藥鉍液을 함께 처리한 것을 처리군으로 하여 glutamate의 이동량을 측정하였다. 그 다음으로 대조군과 처리군을 위와 같이 하여 脂質의 過酸化를 측정하였다.

6) Synaptosomal Na-K-ATPase 活性 측정

먼저 synaptosome(대조군)에 藥鉍液을 처리하여 Na-K-ATPase 活性을 측정하였다. 다음으로 t-BHP를 처리한 것을 대조군으로 하고 여기에 藥鉍液을 첨가한 것을 처리군으로 하여 Na-K-ATPase 活性을 측정하였다.

Synaptosome을 t-BHP가 있는 용액과 없는 용액 내에서 0.1% deoxycholate를 첨가하여 30분 동안 preincubation한 후 3mM ATP를 함유하는 용액 내에서 incubation하여 ATP로부터 遊離되어 나오는 무기인산(Pi)의 농도를 Fiske와 SubbaRow의 방법³⁵⁾으로 측정하여 ATPase 活性으로 하였다. 총 ATPase 活性을 측정하기 위한 용액의 조성은 100mM NaCl, 20mM KCl, 3mM MgCl₂, 2mM EDTA 및 40mM imidazole(pH 7.4)이었으며, Mg-ATPase 活性은 상기 용액 중 KCl을 빼고 1mM ouabain을 첨가한 상태에서 측정하여 총 ATPase 活性과 Mg-ATPase 活性의 차이를 Na-K-ATPase 活性으로 하였다.

7) 통계 처리

실험결과는 평균치±표준편차로 나타내었으며, 두 군간의 차이는 Student's *t*-test로 분석하여 *p*값이 0.05이하일 때를 有意한 것으로 하

였다.

III. 實驗 結果

1. Incubation 시간에 따른 glutamate 이동과 t-BHP의 영향

Synaptosome 내로 glutamate가 이동하는 양은 incubation 시간이 길어짐에 따라 증가하여 30초에 369.33±23.09pmole/mg protein에서 10분에는 2368.00±103.81pmole/mg protein으로 증가하였으나, 1mM의 t-BHP를 60분간 처리했을 때 glutamate 이동량은 현저하게 감소되었다.(Fig. 1)

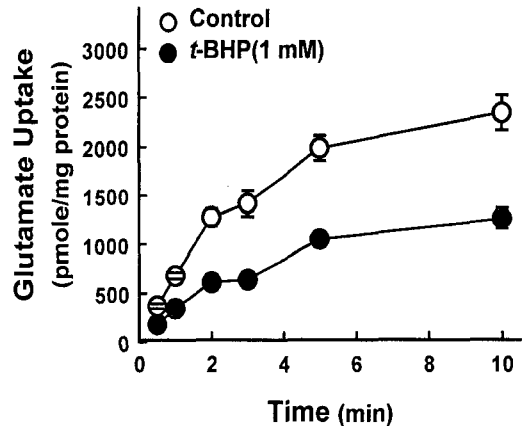


Fig. 1. The time course of glutamate uptake by synaptosomes in the presence or absence of 1mM t-BHP. Synaptosomes were pretreated in a medium with or without 1 mM t-BHP for 60 min. at 37°C, and glutamate uptake was measured. Data are mean±SE of three experiments.

2. t-BHP 처리로 감소된 glutamate 이동에 미치는 藥鉍液의 농도별 영향

Synaptosome을 1mM의 t-BHP로 처리한 용액 내에 胡桃藥鉍液을 0.2%에서 5%되게 첨가하여 glutamate 이동을 측정하였다. t-BHP를 처리하지 않은 정상 synaptosome에 胡桃藥鉍

液을 처리했을 때는 glutamate 이동이 영향을 받지 않았으나 t-BHP가 처리된 synaptosome에서는 t-BHP에 의해 glutamate 이동이 감소되던 것이胡桃藥鉞液의 농도에 비례하여 점차 정상화되었다.胡桃藥鉞液이 없을 때는 1mM t-BHP에 의해 glutamate 이동이 1362.00 ± 69.30 pmole/mg protein/5min에서 752.50 ± 63.97 pmole/mg protein/5min으로 약 50% 감소되었으나($p < 0.01$), 여기에 0.5%胡桃藥鉞液을 첨가했을 때는 1099.17 ± 49.80 pmole/mg protein/5min으로 有意하게($p < 0.05$) 증가되었으며, 5%胡桃藥鉞液을 첨가했을 때는 1366.00 ± 70.25 pmole/mg protein/5min로 정상치까지 증가되었다. (Fig. 2)

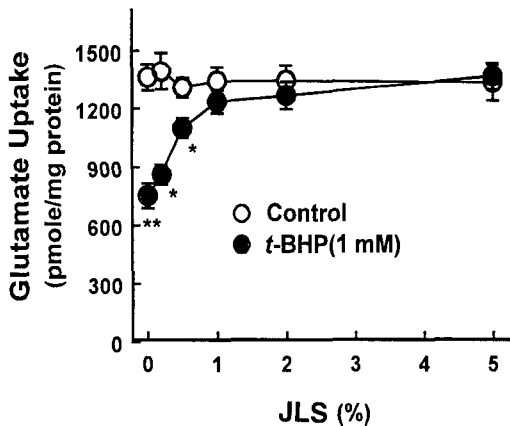


Fig. 2. Effect of JLS(Juglandis Semen Extract Solution) in t-BHP-induced inhibition of glutamate uptake by synaptosomes. Synaptosomes were pretreated with 1mM t-BHP in the presence of various concentrations of JLS for 60 min. at 37°C, and glutamate uptake was measured. Data are mean \pm SE of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

3. t-BHP 농도 변화에 따른 영향

胡桃藥鉞液의 효과가 t-BHP의 농도 변화에 의해 어떤 영향을 받는지를 조사하기 위하여

2%胡桃藥鉞液이 첨가된 상태에서 t-BHP의 농도를 0.1에서 2mM 까지 변화시켜 관찰하였다.胡桃藥鉞液이 첨가되지 않았을 때는 glutamate의 이동이 t-BHP의 농도에 비례하여 감소되었다. 0.2mM t-BHP에서 glutamate의 이동은 1449.50 ± 91.90 pmole/mg protein/5min에서 1073.33 ± 60.83 pmole/mg protein/5min으로 有意하게($p < 0.05$) 감소하였으며, 2mM t-BHP에서는 557.83 ± 43.10 pmole/mg protein/5min으로 正常値의 약 38%로 감소하였다($p < 0.01$). 그러나 2%胡桃藥鉞液이 첨가되었을 때는 t-BHP에 의한 감소 현상이 방지되어, 단지 2mM의 t-BHP에서만 대조군에 비해 有意한 차이를 보였을 뿐 t-BHP의 모든 농도에서 glutamate의 이동이 대조군과 有意한 차이를 보이지 않았다. (Fig. 3)

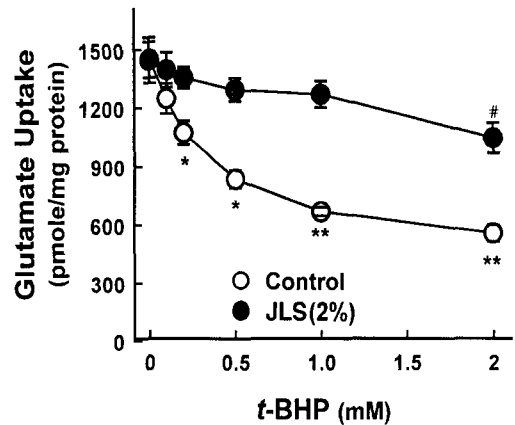


Fig. 3. Effect of various concentrations of t-BHP on glutamate uptake by synaptosomes in the presence or absence of 2% JLS. Synaptosomes were pretreated with various concentrations of t-BHP in the presence or absence of 2% JLS for 60 min. at 37°C, and glutamate uptake was measured. Data are mean \pm SE of three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control. # $p < 0.05$ compared with the absence of t-BHP (0 t-BHP)

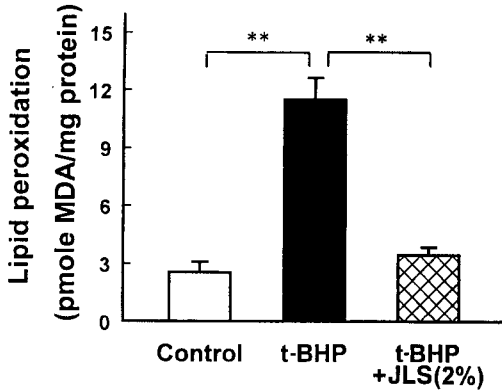


Fig. 4. Effect of JLS in t-BHP-induced lipid peroxidation in synaptosomes. Synaptosomes were pretreated with 2% JLS in the presence or absence of 1 mM t-BHP for 60 min. at 37°C, and lipid peroxidation was measured. Data are mean \pm SE of three experiments. **p<0.01 compared with the control.

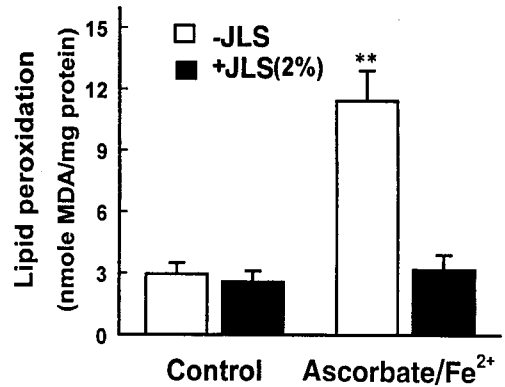


Fig. 5. Effect of JLS in ascorbate/Fe²⁺-induced lipid peroxidation in synaptosomes. Synaptosomes were pretreated with 2% JLS in the presence or absence of ascorbate/Fe²⁺ (50/1 μ M) for 60 min. at 37°C, and lipid peroxidation was measured. Data are mean \pm SE of three experiments. **p<0.01 compared with the control.

4. 脂質의 過酸化에 대한 영향

1mM t-BHP를 처리한 용액 내에 2%胡桃藥鉞液을 첨가하여 脂質의 過酸化를 측정 한 결과 1mM t-BHP는 脂質의 過酸化를 현저하게 증가시켰으나(p<0.01), 2%胡桃藥鉞液은 이러한 脂質의 過酸化 증가를 거의 정상치로 감소시켰다(p<0.01). (Fig. 4)

또한 ascorbate/Fe²⁺를 처리했을 경우 脂質의 過酸化가 대조군의 2.94 \pm 0.54nmole MDA/mg protein에서 11.43 \pm 1.49nmole MDA/mg protein으로 4배가량 증가하였으나(p<0.01), 2%胡桃藥鉞液을 처리한 군은 3.17 \pm 0.72nmole MDA/mg protein으로 거의 정상치로 감소하였다.胡桃藥鉞液 자체는 대조군에서 脂質의 過酸化에 어떤 영향도 미치지 않았다.(Fig. 5)

5. Hg로 유발된 독성작용과 脂質의 過酸化에 대한 영향

Synaptosome에 0.1mM Hg를 처리했을 때 대조군은 1513.67 \pm 110.21pmole/mg protein/5min이었고 처리군은 860.00 \pm 46.92pmole/mg

protein/5min으로서, glutamate 이동이 약 50%로 감소되었으며(p<0.01), 2%胡桃藥鉞液을 첨가했을 때 거의 정상치로 증가하였다(p<0.01). (Fig. 6)

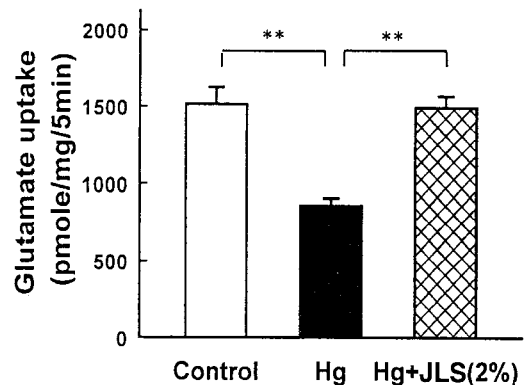


Fig. 6. Effect of JLS in Hg-induced inhibition of glutamate uptake by synaptosomes. Synaptosomes were pretreated with 0.1mM HgCl₂ in the presence of 2% JLS for 60 min. at 37°C, and glutamate uptake was measured. Data are mean \pm SE of three experiments. **p<0.01 compared with the control.

胡桃藥鉞液이 家兔 腦의 Synaptosome에서 Oxidant에 의한 物質移動系의 障礙에 미치는 影響

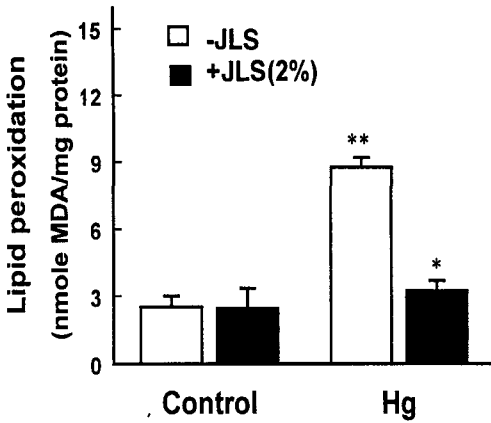


Fig. 7. Effect of JLS in Hg-induced lipid peroxidation in synaptosomes. Synaptosomes were pretreated with 0.1mM HgCl₂ in the presence of 2% JLS for 60 min. at 37°C, and lipid peroxidation was measured. Data are mean±SE of three experiments. *p<0.05, **p<0.01 compared with the control.

을 때 脂質의 過酸化가 2.52±0.48nmole MDA/mg protein에서 8.77±0.44nmole MDA/mg protein으로 有意하게(p<0.01) 증가되었으며, 이러한 증가는 2% 胡桃藥鉞液에 의해 有意하게(p<0.05) 감소하였다. (Fig. 7)

6. t-BHP로 유발된 Na-K-ATPase 活性 저하에 대한 영향

1mM t-BHP를 처리했을 때 Na-K-ATPase의 活性은 有意하게(p<0.05) 감소함으로써 t-BHP가 synaptosome에서 효소의 活性을 저하시켜 glutamate 이동을 저해하고 있음을 보였고, t-BHP에 의해 저하되었던 효소의 活性은 胡桃藥鉞液을 첨가했을 때 거의 정상치까지 증가되었다. (Fig. 8)

다른 oxidant인 H₂O₂ 50mM의 효과를 관찰한 것인데, t-BHP에서와 유사한 감소 현상이 나타났으며(p<0.01), 이러한 감소는 2% 胡桃藥鉞液에 의해 회복되었다. (Fig. 9)

또한 synaptosome에 0.1mM Hg를 처리했

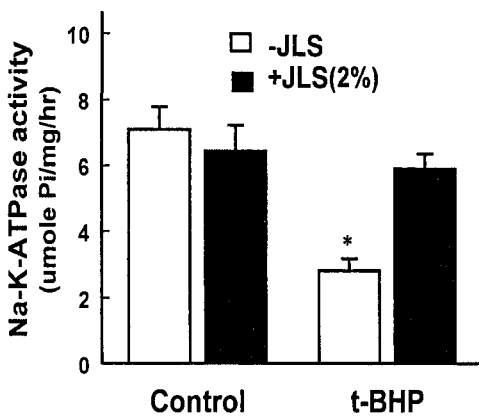


Fig. 8. Effect of JLS in t-BHP-induced inhibition of Na-K-ATPase activity in synaptosomes. Synaptosomes were pretreated with 1mM t-BHP in the presence of 2% JLS for 60 min. at 37°C, and the enzyme activity was measured. Data are mean±SE of three experiments. *p<0.05 compared with the control.

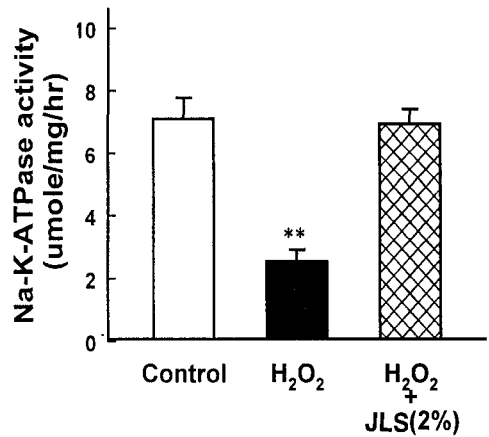


Fig. 9. Effect of JLS in H₂O₂-induced inhibition of Na-K-ATPase activity in synaptosomes. Synaptosomes were pretreated with 50mM H₂O₂ in the presence of 2% JLS for 60 min. at 37°C, and the enzyme activity was measured. Data are mean±SE of three experiments. **p<0.01 compared with the control.

IV. 考 察

『素問』¹⁾에 腦는 奇恒之府의 하나로서 “藏於陰而象於地 故藏而不瀉”하는 性情을 가지고 있으며 “頭者 精明之府 頭傾視深 精神將奪矣”라 하여 頭腦는 人體에서 가장 精明한 府인만큼 머리를 기울이고 골똘히 쳐다보는 등 思慮를 과도히 하면 思則氣結로 精神이 상한다고 하였고, 『靈樞』³⁾에서는 “髓海不足則腦轉耳鳴”이라 하여 老衰나 虛弱으로 髓海가 不足해지면 腦轉耳鳴 등 제반 神經虛弱 症狀이 多發함을 말하고 있다. 알츠하이머병이나 파킨슨병 역시 老化 과정에서 생기는 中樞神經系 疾病으로서 精神력이 떨어지고 髓海가 不足한 것과 無關하지 않을 것이다.

Glutamate는 大腦에서 학습 및 기억에 중요한 역할을 하는 神經 전달물질로 알려져 있으나 虛血性 상태에서와 같이 세포외액내에 과량으로 축적되게 되면 神經 독성물질로 작용하고 있어,¹¹⁻¹³⁾ glutamate의 유리를 증가시키거나 재흡수를 방해하게 되면 神經細胞에 毒性을 일으키게 되고 심하면 神經細胞를 壞死시키게 된다. 본 실험에 사용된 酸化劑인 t-BHP는 synaptosome에서 glutamate의 이동을 강력하게 억제하였는데, 이것은 인체내에서 有害酸素의 발생이 증가되거나 외부로부터 들어온 毒性物質들에 의해 有害酸素基의 발생이 증가하게 되면 glutamate의 재흡수가 방해되어 심각한 神經細胞 毒性을 유발할 수 있을 것으로 생각된다.

有害酸素基들이 노화나 암의 유발 뿐만 아니라 여러가지 급성 및 만성질환의 病因임이 인정된 후 이들을 제거할 수 있는 天然產이나 합성된 抗酸化劑의 개발이 요구되고 있으나 지금까지 성과는 미미한 실정이다. α-tocopherol이 건강에 필수적일 뿐만 아니라 酸素遊離基들을 제거하는 효과를 가지고 있어 有害酸素基로 인해 유발되는 질병상태의 치료에 이용 가능성이 제기되어 왔으나 일부 연구자들은 이 약물이 치료 목적으로 투여하는 데는 효력이 없을 것으로 주장하고 있다.^{36,37)}

질병 치료를 위하여 최근에는 鍼刺戟과 藥物을 結合시킨 藥鍼療法이 鍼灸科의 새로운 영역으로 비교적 높은 치료 효과를 나타내고 있어 활발한 임상 응용과 연구가 이루어지고 있다.^{38,39)} 藥鍼療法에 사용되고 있는 약재로는 大戟, 人蔘, 鹿茸, 草龍膽, 胡桃, 防風, 木香, 當歸, 秦艽, 魚腥草, 天麻, 白殭蠶, 酸棗仁, 黃芪, 牡丹皮 등이 주로 사용되고 複合製劑로는 理中湯 등이 있다.⁴⁰⁾

胡桃는 호도나무과에 속하는 落葉喬木인 호도나무의 種子로서⁴¹⁾ 肉質이 潤하고 맛이 좋아 약재 겸 식품으로 우리나라에서는 정월대보름날 부럼으로도 먹어왔는데, 다만 氣가 熱한지 冷한지에 대해 異論이 있어왔다.¹⁷⁾ 그러나 일반적으로 性熱한 약재를 보면 火藥의 원료로 쓰이는 硫黃이나 高熱에서 만들어진 靈砂를 제외한 식물성 약재는 대개 辛熱한데 비해 胡桃는 맵거나 쓰지 않으므로 平溫하다 하는 게 이치적일 것이다. 이와 같이 質이 매우 潤하고 氣味가 甘平溫無毒한 胡桃의 藥性으로 미루어 보면 “肥健 潤肌 黑髮髮 通潤血脈 補氣養血 滋養 強壯 潤燥化痰 溫肺潤腸 腰痛脚弱” 등의 主治^{16-18,21)}를 이해할 수 있겠다. 일찍이 『內經』¹⁾에 “諸髓者皆屬於腦”라 한 바와 같이 최근 문헌^{19,20)}에는 腎肺를 潤燥하는 胡桃의 藥性을 응용하여 健腦 抗衰老에도 사용한다 하였고, 김의 연구²⁷⁾로 미루어보면 腦의 老化로 야기되는 각종 질환에도 응용해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에 사용된 t-BHP는 tert-butylhydroperoxide(C₄H₁₀O₂)로서 重合反應(polymerization)을 일으키는 촉매로 작용하며, radical의 置換反應(substitution reaction)을 일으키는 peroxy group의 酸化劑로 널리 사용되는 약물이다.⁴²⁾

본 연구에서는 胡桃藥鍼液이 抗酸化 기능을 가지고 있는지를 확인하기 위하여 oxidant인 t-BHP를 처리하여 細胞 損傷이 유발된 synaptosome에서 胡桃藥鍼液의 효과를 조사하였다. 먼저 incubation 시간에 따른 효과를 측정하였던 바 시간의 경과에 비례하여 glutamate가

synaptosome 내로 이동하는 반면, t-BHP를 처리하면 glutamate 이동이 현저히 억제되었다(Fig. 1). 이는 synaptosome에서 glutamate의 이동이 oxidant에 의해 장애를 받고 있는 것으로 생각된다.

t-BHP를 처리한 synaptosome에胡桃藥鉞液을 첨가하였을 때 glutamate의 이동에 미치는 효과를 측정하였던 바 정상 synaptosome에胡桃藥鉞液을 처리했을 때는 glutamate 이동에 변화가 없었으나 1mM t-BHP로 처리된 synaptosome에胡桃藥鉞液을 첨가하였을 때는 0.5에서 5% 농도 범위 내에서 t-BHP에 의한 glutamate 축적을 현저하게 감소시켰다(Fig. 2).

t-BHP의 농도 변화에 대한 효과는 t-BHP로 처리한 군에서 그 농도를 증가시킴에 따라 glutamate가 비례적으로 축적되었으나,胡桃藥鉞液을 첨가했을 때는 t-BHP의 농도를 증가시켜도 glutamate의 축적이 현저히 방지되었다(Fig. 3).

이상의 두 실험으로胡桃藥鉞液이 oxidant에 의한 神經細胞 損傷을 有意하게 감소시키는 抗酸化 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다.

Oxidant들이 細胞 損傷을 일으키는 기전 중의 하나는 脂質의 過酸化이기 때문에^{30,43)} 일반적으로 脂質의 過酸化 정도를 측정하여 oxidant에 기인된 細胞 損傷인지를 확인하고 있다. 따라서 oxidant에 의한 細胞 毒性을 방지하는 藥物들은 oxidant에 의한 脂質의 過酸化를 減少시키는 효과를 가지고 있음은 잘 알려진 사실이다.

胡桃藥鉞液의 보호효과가 oxidant에 의한 脂質의 過酸化를 방지함으로써 나타나는지를 확인하기 위하여 1mM t-BHP를 처리한 용액 내에 2%胡桃藥鉞液을 첨가하여 脂質의 過酸化를 측정하였던 바 1mM t-BHP는 脂質의 過酸化를 현저하게 증가시켰으나, 2%胡桃藥鉞液은 이러한 脂質의 過酸化 증가를 거의 정상치까지 감소시켰다(Fig. 4). Synaptosome에 ascorbate/Fe²⁺를 처리하여 脂質의 過酸化를 유발시킨 뒤胡桃藥鉞液을 첨가한 결과를 측정하

였던 바 脂質의 過酸化가 거의 정상치까지 감소하였다(Fig. 5).

이상의 두 실험으로胡桃藥鉞液의 세포손상 방지효과가 脂質의 過酸化 억제에 기인할 가능성을 보였다.

또한 본 실험에서는胡桃藥鉞液이 Hg에 의한 glutamate 이동 장애와 脂質의 過酸化를 방지하는지를 실험하였다. Hg를 처리한 synaptosome에서 glutamate의 이동이 약 50% 억제되었으나胡桃藥鉞液을 첨가했을 때는 거의 정상치까지 증가되었고(Fig. 6), synaptosome에 Hg를 처리하여 脂質의 過酸化를 유발시킨 후胡桃藥鉞液을 첨가했을 때 脂質의 過酸化가 有意하게 감소하였다(Fig. 7).

이로써胡桃藥鉞液이 oxidant 뿐만 아니라 다른 毒性物質에 의한 glutamate 이동 장애도 방지할 수 있음을 보여주는 것으로 생각된다.

Synaptosome에서 glutamate 이동은 Na-dependent mechanism에 의해 일어나기 때문에,⁴⁴⁻⁴⁶⁾ Na-K-ATPase 活性이 저하되면 세포내 측과 외측사이에 Na의 농도경사가 감소하여 glutamate 이동이 억제될 수 있다. 따라서 본 실험에서는 synaptosome의 Na-K-ATPase 活性이 t-BHP에 의해 억제되는지의 여부와, 만일 그렇다면 이러한 억제가胡桃藥鉞液에 의해 방지되는지를 조사하였던 바 효소의 活性이 각각 t-BHP나 H₂O₂를 처리했을 때 감소함으로써 oxidant가 Na-K-ATPase 活性을 방해하여 glutamate 이동을 저해하고 있음을 보였다(Fig. 8, Fig. 9).

胡桃藥鉞液은 이들 oxidant에 의한 효소활성 저하를 정상치까지 증가시킴으로써 이 약물이 물질이동계에 대한 oxidant의 작용을 직접 억제하거나 Na-K-ATPase 活性에 대한 oxidant의 작용을 억제하여 glutamate 이동 장애를 방지할 수 있는 가능성을 보였다.

본 실험의 결과를 총괄하면胡桃藥鉞液이 synaptosome에서 oxidant 및 毒性物質에 의한 glutamate 이동 장애를 방지하는 효과를 가지고 있음을 나타내며, 이러한 효과는 脂質의 過酸化 억제 및 Na-K-ATPase 活性 증가에 기인

하여 나타날 가능성을 보여주고 있다.

V. 結 論

胡桃藥鉞液이 大腦의 synaptosome에서 oxidant에 의한 glutamate 이동 장애에 어떤 영향을 미치는지를 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Synaptosome에서 glutamate 이동은 10분까지 incubation 시간이 연장됨에 따라 증가하였으며, 1mM t-BHP에 의해 有意하게 감소하였다.

2. 1mM의 t-BHP에 의해 감소한 glutamate 이동은 0.5% 이상 농도胡桃藥鉞液의 첨가에 의해 有意하게 증가되었다.

3. 0.2-2mM t-BHP의 농도 범위에 비례하여 감소한 glutamate 이동은 2%胡桃藥鉞液에 의해 有意하게 증가되었다.

4. t-BHP 또는 Ascorbate/Fe²⁺(50/1μ M)로 유발된 脂質의 過酸化는 2%胡桃藥鉞液에 의해 각각 有意하게 방지되었다.

5. 0.1mM HgCl₂의 독성효과로 유발된 glutamate 이동장애와 脂質의 過酸化는 2%胡桃藥鉞液에 의해 각각 有意하게 방지되었다.

6. 1mM의 t-BHP와 50mM의 H₂O₂에 의해 저하된 Na-K-ATPase 活性은胡桃藥鉞液에 의해 각각 有意하게 증가되었다.

參 考 文 獻

1. 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.
2. 李圭駿, 「醫鑑重磨」, 대구: 石谷齋, 1923, p. 164.
3. 洪元植, 「精校黃帝內經靈樞」, 서울: 東洋醫學研究院出版部, 1983, p. 174.
4. McCord, J. M., "Oxygen-derived radicals in post-ischemic tissue injury", *N-Engl-J-Med.*, Vol. 312, 1985, pp. 159-163.
5. 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.

6. Floyd, R. A., "Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia", *FASEB J.*, Vol. 4, 1990, pp. 2587-2597.
7. Traystman, R. J., Kirsch J. R., and Koehler R. C., "Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion", *J. Appl. physiol.*, Vol. 71, 1991, pp. 1185-1195.
8. Brondy, S. C., and LeBel C. P., "The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system", *Free Radic. Biol. Med.*, Vol. 14 1993, pp. 633-642.
9. Olanow, C. W., "A radical hypothesis for neurodegeneration", *TINS*, Vol. 16, 1993, pp. 439-444.
10. Wakins, J. C. and Evans R. H., "Excitatory amino acid transmitters", *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Vol. 21, 1981, pp. 165-204.
11. Jorgensen, M. B., and Diemer N. H., "Selective neuron loss after cerebral ischemia of the rat: possible role of transmitter glutamate", *Acta. Neurol. Scand.*, Vol. 66, 1982, pp. 536-546.
12. Olney, J. W., *Excitotoxins: an overview*. In: *Excitotoxins*, edited by Flux, K., Roberts P., and Schwarz R., Macmillan, London, 1983, pp. 82-96.
13. Meldrum, B., "Excitatory amino acids and anoxic-ischemic brain damage", *Trends Neurosci.*, Vol. 8, 1985, pp. 47-48.
14. Pellar, T. C., Golman S. C., Keyser D.

- O., Lee K. H., Lepinski D. L., Livengood D., and Myers L. S., "Reactive oxygen species on neural transmission", In: *The Neurobiology of NO. and OH.*, edited by Chiu, C. C., Gilbert D. L., and Colton C. A., Ann New York Acad. Sci. Vol. 738, 1994, pp. 141-152,
15. Volterra, A., Trotti D., Florid S., and Racagni G., "Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes" *J. Neurosci.*, Vol. 14, 1994, pp. 2924-2932.
 16. 楊東喜, 「本草備要解析」, 新竹: 國興出版社, 1991, p. 432.
 17. 李時珍, 「本草綱目」, 서울: 高文社, 1973, pp. 26-28.
 18. 黃宮綉, 「本草求真」, 臺北: 宏業書局, 1991, p. 49.
 19. 尹吉榮, 「東醫臨床方劑學」, 서울: 明寶出版社, 1992, p. 606.
 20. 지형준 · 이상인, 「대한약전의 한약(생약)규격집」, 서울: 한국메디컬인덱스사, 1988, p. 421.
 21. 李尙仁, 「本草學」, 서울: 醫藥社, 1980, p. 91.
 22. 金永海 · 金甲成, "胡桃藥鍼液의 抗酸化效果에 對한 研究", 「大韓韓醫學會誌」 Vol. 17, no. 1, 1996, pp. 9-20.
 23. 姜亨定, "胡桃水鍼이 家兔腎臟의 抗酸化酵素 活性化에 미치는 영향", 「大韓鍼灸學會誌」 Vol. 15, no. 1, 1998, pp. 473-481.
 24. 徐正浩, "胡桃水鍼이 毒性物質에 의해 유발된 家兔의 急性腎不全에 미치는 영향", 「大韓鍼灸學會誌」 Vol. 16, no. 1, 1999, pp. 473-484.
 25. 宋世勳, "胡桃水鍼이 Glycerol에 의해 유발된 家兔의 急性腎不全에 미치는 영향", 동의대학교 대학원, 1997.
 26. 朴尙諫, "胡桃藥鍼液이 t-butylhydroperoxide에 의한 肝損傷에 미치는 영향", 동의대학교 대학원, 1999.
 27. 金東勳, "胡桃藥鍼液이 家兔 腦組織의 Na⁺-pump 活性障礙에 미치는 영향", 동의대학교 대학원, 1998.
 28. Hajos, F., "An improved method of the preparation of synaptosomal fraction in high purity", *Brain Res.*, Vol. 93, 1975, pp. 485-489.
 29. 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.
 30. Farber, J. L., Kyle M. E., and Coleman J. B., "Biology of disease : Mechanisms of cell injury by activated oxygen species", *Lab. Invest.*, Vol. 62, 1990, pp. 670-679.
 31. Miller, D. M., and Aust S. D., "Studies on ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation", *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 271, 1989, pp. 113-119.
 32. Weinberg, J. M., "The cellular basis of nephrotoxicity", In: *Disease of the Kidney*, 5th ed., Vol II, edited by Schrier, R. W., and Gottschalk C. W., Boston, Little, Brown and Company, 1993, pp. 1031-1098.
 33. Nath, K. A., Croatt A. J., Likely S., Behrens T. W., and Warden D., "Renal oxidant response induced by mercury", *Kid. Int.*, Vol. 50, 1996, pp. 1031-1043.
 34. Buege, J. A., and Aust S. D., "Microsomal lipid peroxidation", *Methods Enzymol*, Vol. 52, 1978, pp. 302-310.
 35. Fiske, C. H., and SubbaRow Y., "The colorimetric determination of phosphorus", *J. Biol. Chem.*, Vol. 66, 1925, pp. 375-400.
 36. Greenwald, R. A., "Therapeutic usages of oxygen radical scavengers in human diseases: myths and realities", *Free*

- Radical Res. Commun.*, Vol. 12-13, 1991, pp. 531-538.
37. Downey, J. M., "Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion", *Ann. Rev. Physiol.*, Vol. 52, 1990, pp. 487-504.
38. 全國韓醫大 鍼灸·經穴學教室, 「鍼灸學」, 서울: 集文堂, 1988, pp. 1457-1467.
39. 千永實·李載東·崔道永, "藥鍼療法の 刺鍼部位別 吸收에 關한 研究", 「大韓鍼灸學會誌」 Vol. 12, no. 1, 1995, pp. 302-309.
40. 崔旼燮·高炯均·金昌煥, "水鍼療法에 關한 考察", 「大韓鍼灸學會誌」 Vol. 7, no. 1, 1990, pp. 315-329.
41. 辛民交, 「原色臨床本草學」, 서울: 永林出版社, 1986, p. 194.
42. Budavari, Susan., *Merck Index*, twelfth edition, Merck & Co., 1996, p. 259.
43. Sies, H., "Biochemistry of oxidant stress", *Angew Chem. Int. Ed.*, Vol. 25, 1986, pp. 1058-1071.
44. Inversen, I. L., Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic transmission., *Br. J. Pharmacol.*, Vol. 41, 1971, pp. 571-591.
45. Logan, W. J., and Snyder S. H., "Unique high affinity uptake systems for glycine, glutamate, and aspartic acids in central nervous tissue of the rat", *Nature*, Vol. 234, 1971, pp. 297-299.