

원저

黃芩藥鉞液이 腎臟上皮細胞에서의 H₂O₂에 의한 磷酸鹽 運搬의 抑制에 미치는 影響

조은진 · 윤현민 · 장경전 · 송춘호 · 안창범

동의대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Effect of Scutellaria Baicalensis Georgi Extraction (SbGE) on H₂O₂-induced Inhibition of Phosphate Transport in Renal Epithelial Cells

Cho Eun-jin, Youn Hyoun-min, Jang Kyung-jeon,
Song Choon-ho and Ahn Chang-beohm

Department of Acupuncture & Moxibustion,
College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Objective : This study was performed to determine if Scutellaria baicalensis Georgi extract (SbGE) prevents oxidant-induced membrane transport dysfunction in renal tubular cells.

Methods : Membrane transport function was estimated by measuring Na⁺-dependent inorganic phosphate transport in opossum kidney (OK) cells. H₂O₂ inhibited phosphate transport in a dose-dependent manner.

Results : The inhibitory effect of H₂O₂ was significantly prevented by SbGE over concentration range of 0.005-0.05%. H₂O₂ caused ATP depletion, which was prevented by SbGE. H₂O₂ induced the loss of mitochondrial function as evidenced by decreased MTT reduction and its effect was prevented by SbGE. The H₂O₂-induced inhibition of phosphate transport was not affected by a potent antioxidant DPPD, but the inhibition was prevented by an iron chelator deferoxamine, suggesting that H₂O₂ inhibits Na⁺-depend-

- 접수 : 2002년 6월 20일 · 수정 : 6월 30일 · 채택 : 2002년 7월 14일
- 교신저자 : 안창범, 부산시 진구 양정2동 산45 동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실
(Tel, 051-850-8610, E-mail, cbahn@hyomin.donggeui.ac.kr)

ent phosphate transport via an iron-dependent nonperoxidative mechanism in renal tubular cells.

Conclusion : These data suggest that SbGE may exert the protective effect against oxidant-induced membrane transport dysfunction by a mechanism similar to iron chelators in renal epithelial cells. However, further studies should be carried out to find the active ingredient(s) of SbGE that exerts the protective effect.

Key words : Scutellaria baicalensis Georgi. extract(SBGE), H₂O₂, Phosphate Transport, renal epithelial cells, antioxidant, reactive oxygen species(ROS).

I. 緒論

한의학에서 腎은 主藏精, 主骨髓, 主水液, 主納氣 하여 생식과 생명 존속에 중요한 精을 所藏하고 髓와 骨의 생성 및 기능에 관계하며, 氣化作用에 의한 水液代謝를 조절하는 기능을 하는데, 이는 서양 의학의 내분비계, 비뇨생식계, 중추신경계 등의 기능을 포함하며, 특히, 유기, 무기 물질을 여과, 재흡수, 분비함으로써 細胞 恒常성을 유지한다¹⁾.

反應性酸素基(reactive oxygen species, ROS)는 불포화지방산과 반응하여 지질과산화물을 일으키고 이로 인해 세포 구성성분인 단백질과 DNA를 손상시켜 細胞膜 구조를 변화시키며, 細胞膜 투과성 증가로 細胞膜 物質 移動系의 기능을 변화시킨다. ROS는 특히, 肝과 함께 과산화지질과 활성산소가 활발한 腎臟에서 염증성 질환을 포함하는 虛血性 急性腎不全, 항생제나 독성물질에 의한 急性腎不全 및 絲絨體腎炎 등과 같은 腎臟의 세포 및 기능 변화에 의한 질환을 일으키는 원인으로 알려져 있다^{2),3)}.

黃芩은 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 利水, 安胎의 작용을 하며, 주로 黃疸, 五淋, 血閉, 癰疽, 瘡瘍, 胎動不安 등을 치료한다⁴⁾.

黃芩에 관한 실험적 연구로 이 등⁵⁾은 黃芩이 면역기능, 미생물증식 및 세균번이에 미치는 영향을, 김⁶⁾은 黃芩의 혈관이완효과에 관한 연구를, 이 등⁷⁾

은 黃芩 및 黃連 열추출물의 亞窒酸鹽 消去作用을, 박 등⁸⁾은 활성산소의 유해작용에 대한 黃芩 성분의 생체 보호작용에 관한 연구를, 김⁹⁾은 黃芩藥液의 간세포내의 항산화효능을 보고하였다. 이처럼 黃芩은 산화방지작용 및, 세포 기능 장애를 약화시키는 효능이 보고 되어왔으나 그 효과가 腎臟上皮細胞에 선 검토되지 않았다^{10),11)}.

이에 黃芩藥液이 腎臟上皮細胞에서 H₂O₂에 의한 細胞膜 物質 移動의 변화를 抑制하는지 관찰하고자 본 실험에서는 H₂O₂로 산화손상을 유도한 細胞에서의 磷酸鹽 移動의 변화와 ATP 소모량, MTT 분석에 의한 미토콘드리아 기능을 측정하였으며, 산화방지 기전을 확정하기 위해 H₂O₂에 의한 磷酸鹽 移動에 미치는 산화방지물질의 영향과 黃芩藥液의 영향을 비교하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 藥材

黃芩(Scutellaria baicalensis Georgi) 300g을 갈아 methyl alcohol을 가하여 4시간 동안 3차례 還流시켜 추출하였고, 減壓下에 煎湯하여 남은 총량이 46g이 된 抽出物을 培養液에 용해시켰다.

2. OK 細胞의 培養

腎臟 근위세뇨관 유래 배양 細胞인 opossum kidney (OK) 細胞는 American Type Collection 社로부터 분주받아 一連의 過程下에 75cm²의 培養菌 플라스크에 보관했다. 細胞는 10% FBS(fetal bovine serum)-DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F12) 培養液에서 37°C, 95% air/5% CO₂의 조건하에 incubation하여 배양되었다. 세포가 confluence에 도달하면, 0.02% EDTA~0.05% trypsin 용액을 이용하여 2차 培養을 하였다. 세포는 10% FBS-DMEM/F12 배양기 내의 24-well 조직 배양 plate에서 培養했다. 모든 실험은 세포 培養機 바닥 전체가 한 커의 세포로 뒤 덮혀지고 난 후 3~4일 뒤에 시작되었다.

3. 산화 損傷의 誘導

세포는 지시된 濃度의 peroxide로 115 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO₃, 2 NaH₂PO₄, 1 MgSO₄, 1 CaCl₂ 와 5 glucose (pH 7.4)을 함유한 Hanks' balanced salt solution(HBSS)에서 37°C로 120분 동안 처리하였다.

4. 移動 研究

무기 磷酸鹽의 移動은 24-well plate에서 배양된 monolayer를 이용하여 측정하였다. 세포를 산화제에 노출시킨 후, 緩衝液을 제거하고 137 NaCl, 5.4 KCl, 2.8 CaCl₂, 1.2 MgSO₄와 10 HEPES(pH 7.4)를 함유한 緩衝液으로 두 번 세척하였다. 세포는 5 μM [³²P] -phosphate를 함유한 緩衝液에서

37°C로 30분 동안 incubation하였다. incubation 후 세포는 ice-cold 緩衝液에 세 번을 세척하였고, 0.2% triton X-100 0.5ml에 용해하였다. 移動을 결정하기 위해, 각 표본에서 0.4 ml를 채취해 液狀 scintillation counter(액상 섬광 계수기, TRI-CARB 2100TR, Packard, USA)로 측정하였다. 단백질은 Bradford 방법¹²⁾으로 측정하였다.

5. ATP 성분의 測定

OK 세포에서의 ATP 수치는 발광물질인 luciferin-luciferase 분석평가법으로 측정하였다. 세포를 산화제에 노출시킨 후, 500μl의 0.5% triton X-100에 용해시키고 100μl 0.6 M 과염소산에 산성화시켜 얼음 위에 놓았다. 세포 부유물은 4 mM MgSO₄(pH 7.4)을 함유한 10mM 인산 칼륨 완충제로 희석되었고, 10μl의 희석된 sample에 100μl의 20mg/ml luciferin-luciferase를 추가하였다. 빛의 방사는 20초마다 luminometer(발광계측기, MicroLumat LB96P, Berthold, Germany)로 기록하였다. 단백질 용량은 각각의 세포 표본 묶에 따라 결정되었다.

6. 미토콘드리아 기능 測定

미토콘드리아 기능은 MTT 分析評價法¹³⁾을 이용하여 평가하였다. MTT와 같은 tetrazolium 염은 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 변형되어 푸른 formazan 염료를 형성하므로 미토콘드리아 기능 측정에 유용하다. 세포는 Hanks' balanced salt solution(HBSS, Sigma 화학)으로 조심스럽게 씻어 H₂O₂에 노출하였다. 세포를 씻고 난 다음, MTT 0.5mg/ml 배양 용액을 첨가하여, 37°C에서 두 시간 동안 배양되었으며, 표면에 떠오른 上清液을 제거한 후, 세포에 형성된 formazan 결정체는 dimethyl sulfoxide 110μl에 용해시켰다. 각 표본은 100 μl를 나누어 96-well plate에 이식되었으며, 각 well의 移動정도는 ELISA Reader(Bio-Tek Instrument, EL, 311)로 550nm를 측정하였다. 결과는 H₂O₂를 제거한 상태에서 측정된 대조군을 백분율로 표시하였다.

7. 化學藥品

³²Phosphate는 American international社(Amersham, UK)로부터 구입했다. Deferoxamine (DFO), HEPES와 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl])

-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical 社 (St. Louis, Mo, USA)로부터 구입했다. N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD)은 Aldrich Chemical社 (Milwaukee, WI, USA)로부터 구입했다. 다른 화학제품들은 시판되는 최고의 것을 사용하였다.

8. 통계 분석

평균 ± SE로 데이터를 표시하였고, 두 그룹간의 차이는 Student's t-test를 이용하여 평가하였으며 오차한계는 0.05이다.

III. 結果

1. H₂O₂에 의한 磷酸鹽 移動 抑制에 대한 黃芩藥鉞液의 영향

黃芩藥鉞液을 제거한 상태에서 다양한 濃度의 H₂O₂에 세포를 노출시켰을때 磷酸鹽 移動은 濃度의 존적으로 減少하였다. 특히 0.2mM H₂O₂에서는 2.58±0.13nmole/mg/30min에서 1.88±0.16nmole/mg/30 min로 현격한 減少를 보여주었다. H₂O₂ 濃度가 1.0mM로 증가하였을 때, 磷酸鹽 移動은 control의 22% 수준(0.57 ± 0.18 nmole/mg/ 30min)까지 減少되었다. 그러나 0.005%의 黃芩藥鉞液을 첨가하였을 때, 黃芩藥鉞液은 H₂O₂ 濃度 0.1~1mM에 걸쳐 눈에 띄는 磷酸鹽의 移動 減少를 야기하진 않았다 (Fig. 1).

黃芩藥鉞液의 防禦 잠재력을 正량화하기 위해, 다양한 濃度의 黃芩藥鉞液에서 5mM H₂O₂를 처리한 세포의 磷酸鹽 移動을 測定하였다. H₂O₂는 2.51 ± 0.28 nmole/mg/30min에서 1.14 ± 0.22 nmole/mg/30min으로 대략 45% 정도 移動을 減少시켰으며, 이에 黃芩藥鉞液은 0.001%에서 유의성있게 H₂O₂에 의한 磷酸鹽 移動障碍를 防禦하였고, 0.001~0.05%까지 濃度의 존적으로 증가하였으며, 0.05%에서는

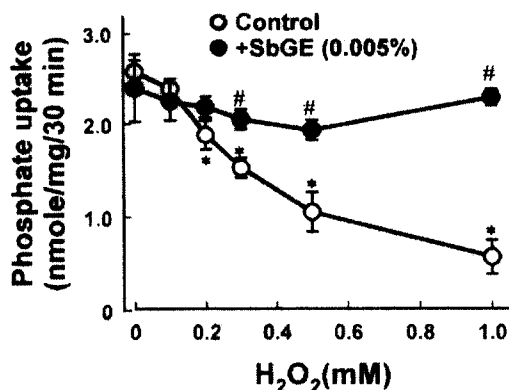


Fig. 1. Dose-dependency of H₂O₂ on Na⁺-dependent inorganic phosphate transport in ospossum kidney (OK) cells. Cells were pretreated with various concentrations of H₂O₂ at 37°C for 120 min in the presence or absence of 0.005% Scutellaria baicalensis Georgi extract(SbGE). Phosphate transport was measured for 30 min in a buffer containing Na⁺. Data are mean±SE of three experiments. *p<0.05 compared with the absence of H₂O₂ ; #p<0.05 compared with control (-SbGE).

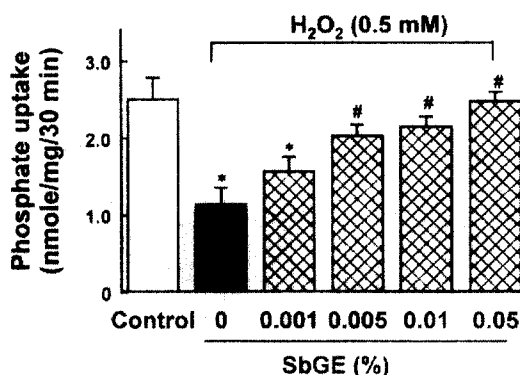


Fig. 2. Dose-dependency of Scutellaria baicalensis Georgi extract (SbGE) on H₂O₂ induced inhibition of Na⁺-dependent inorganic phosphate transport in ospossum kidney (OK) cells. Cells were pretreated with various concentrations of H₂O₂ at 37°C for 120 min in the presence or absence of various concentrations of SbGE. Phosphate transport was measured for 30 min in a buffer containing Na⁺. Data are mean±SE of three experiments. *p<0.05 compared with control; #p<0.05 compared with H₂O₂ alone (-SbGE).

control과 거의 같았다(Fig. 2).

2. H₂O₂에 의한 ATP 소모에 대한 黃芩藥碱液의 영향

ATP를 소모하는 Na⁺ 의존적 능동수송의 기전을 통해 磷酸鹽이 腎臟 中心部 上皮細胞에서 再吸收되기 때문에, ATP의 소모는 세포막을 가로지르는 Na⁺ 변화를 減少시킬 것이고 따라서, 磷酸鹽 運搬을 저하시킬 것이다³⁾. 黃芩藥碱液이 H₂O₂에 의한 ATP 소모를 방지하는지 관찰하기 위해, 0.005%의 黃芩藥碱液을 첨가하여 0.5mM H₂O₂로 처리된 세포의 ATP 含有量을 측정하였다. 세포가 0.5mM의 H₂O₂로 처리되었을 때, 세포의 ATP 含有量은 7.35±0.63 nmole/mg protein 에서 2.05±0.15 nmole/mg protein으로 減少하였으나 黃芩藥碱液에 의해 6.27±0.52 nmole/mg protein으로 유의성있게 증가되었다(Fig. 3).

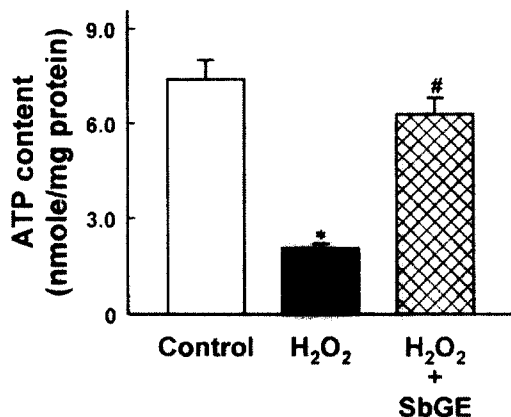


Fig. 3. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi extract (SbGE) on ATP content in ospossum kidney (OK) cells. Cells were pretreated with 0.5mM H₂O₂ at 37°C for 120min in the presence or absence of 0.005% SbGE, and ATP content was measured. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05 compared with control; #p<0.05 compared with H₂O₂ alone.

3. H₂O₂에 의한 미토콘드리아 기능 障礙에 대한 黃芩藥碱液의 영향

H₂O₂에 의한 ATP 소모는 미토콘드리아 기능 상 실로 야기되는 ATP 발생 減少로 그 원인을 돌릴 수 있을 것이다. 따라서 H₂O₂에 의한 ATP 소모를 抑制하는 黃芩藥碱液의 능력은 정상적인 미토콘드리아 기능 유지의 결과일 수 있다. 이 가능성을 관찰하기 위해 黃芩藥碱液을 첨가하거나 제거한 채 H₂O₂로 처리한 세포에서의 미토콘드리아 기능을 검사해 보았다. 그림 4에서 0.5 mM의 H₂O₂에 노출된 세포는 MTT 환원이 현격하게 減少했으며, 이는 0.005%의 黃芩藥碱液에 의해 제한되었다. H₂O₂로 처리된 세포에서 MTT 減少는 control에 대해 45.92±4.62% 수준이었으나 황금약침액을 첨가한 경우에는 control과 큰 차이가 없었다(Fig. 4).

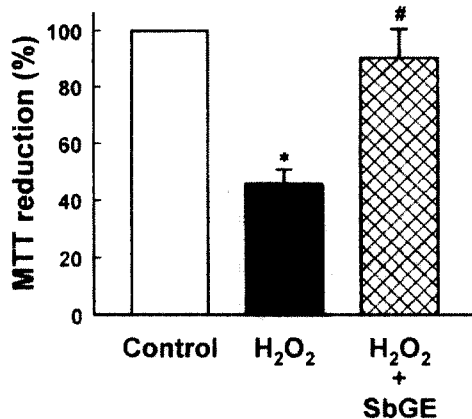


Fig. 4. Effect of *Scutellaria baicalensis* Georgi extract (SbGE) on mitochondrial dysfunction in ospossum kidney (OK) cells. Cells were pretreated with 0.5mM H₂O₂ at 37°C for 120min in the presence or absence of 0.005% SbGE, and MTT reduction was measured. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05 compared with control; #p<0.05 compared with H₂O₂ alone.

4. H₂O₂에 의한 磷酸鹽 移動에 대한 산화방지의 영향

H₂O₂가 과산화 지질에 의한 磷酸鹽 運搬을 抑制하는지, 그리고 黃芩藥液이 산화 방지 작용을 통해 防禦의 효과를 끼치는지를 알아보기 위해, H₂O₂ 抑制에 미치는 산화방지의 영향을 조사하였고 黃芩藥液의 影響과 비교되었다. 잠재적 산화방지제인 DPPD 10 μM은 H₂O₂에 의한 磷酸鹽 運搬 抑制에 영향을 끼치지 않았다. 이와는 대조적으로, 2mM의 iron chelator deferoxamine(DFO)은 0.005%의 黃芩藥液과 비슷한 수준까지 抑制를 制限하였다(Fig. 5).

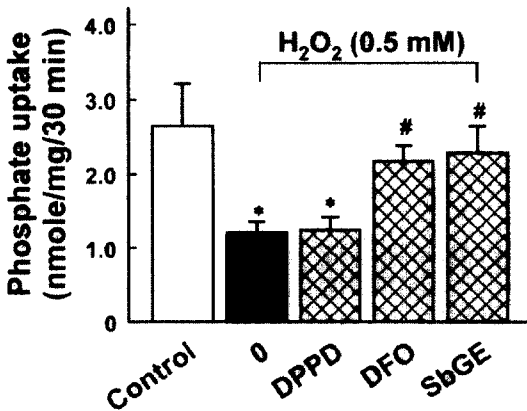


Fig. 5. Effects of antioxidant, iron chelator, and *Scutellaria baicalensis* Georgi extract (SbGE) on Na⁺-dependent inorganic phosphate transport in opossum kidney (OK) cells. Cells were pretreated with 0.5mM H₂O₂ at 37°C for 120min in the presence or absence of 10 μM DPPD, 2mM deferoxamine (DFO), and 0.005 %SbGE. Phosphate transport was measured for 30min in a buffer containing Na⁺. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05 compared with control; #p<0.05 compared with H₂O₂ alone.

IV. 考察

黃芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)은 꿀풀(唇

形)과에 속한 多年生 草本으로 性寒無毒, 味苦하고 心, 肺, 脾, 胃, 肝, 大腸, 小腸에 歸經하며, 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 利水, 解渴, 安胎하여, 黃疸, 五淋, 血閉, 癰疽, 瘡瘍, 胎動不安등을 치료한다. 黃芩은 淸熱燥濕劑로 분류되며, 이는 炎症과 水分代謝 障礙가 加해진 濕熱의 치료에 효과가 있어 水樣便, 排尿困難, 排尿痛등으로 표현되는, 腎盂炎, 膀胱炎, 細菌性 痢疾등의 치료에 이용된다^{14),15)}. 주요성분은 baicalin, baicalein, woogonin 등의 flavonoid 성분으로 지질 과산화 효소 활성억제로 인한 항알러지, 과산화지질 생성억제에 의한 간장 손상 보호, 세포면역 촉진, 신장독성 감소, 이뇨작용, 진정작용, 혈관 이완 작용, 해열, 항염, 항균, 항바이러스, 진정, 강압, 간의 이물 배설기능, 망상내피계통의 기능, 간담대사등을 향상시키는 이담작용과, 지질대사 개선, 모세혈관 투과성 抑制, 항암작용 등이 보고되었으며, 바이러스성 간염, 신염, 골반염, 담낭염, 백내장 등에 응용되고 있다¹⁶⁾⁻¹⁸⁾.

<素問上古天真論>에서 “腎者主水 受五臟六府之淸而藏之”, <素問六節藏象論>에 “腎者主蛰 封藏之本 淸之處也 其華在髮 其充在骨”, <素問逆調論>에 “腎者水臟 主津液 主臥與喘也”¹⁹⁾라 하여 腎의 수액대사 및 臟精의 기능을 설명하였다.

腎臟은 체내 혈액을 사구체 모세혈관에서 여과시키고, 신세뇨관을 지나 재흡수, 분비의 결과로 요를 형성함으로써 체액은 항상성을 유지하게 된다. 재흡수의 과정을 통해 당류, 아미노산, 대사산물, 磷酸鹽 등은 상피세포에 존재하는 특수 운반체에 의해 Na⁺와 함께 능동적으로 재흡수되며, 세포막 변화나 체내 산, 염기 상태에 따라 吸收能은 변화하게 된다^{20),21)}.

ROS는 쌍을 이루지 않은 최외각 전자의 주위 화합물과 반응하여 안정화하려는 경향으로 인해 높은 반응성을 가지기 때문에, 불포화 지방산을 많이 함유하는 체내 세포막의 세포내 지질과산화 과정에서 세포막 구조나 유동성의 변화, 막 효소의 불활성화, 단백질합성의 저해, DNA 손상등을 유발하며, 특히 간과 신장에는 미토콘드리아의 ATP 에너지 대사로 인해 과산화지질과 활성산소의 활동이 가장 활발하여

이로 인해 쉽게 세포막 구조에 변화가 오게된다²²⁾.

H_2O_2 와 같은 ROS는 생물학적 반응의 부산물 또는 외부요소로부터 종종 생성되며 혈관수축에 의한 국소빈혈, 세포 손상을 포함해 絲綫體腎炎과 gentamicin 유도성 급성신장장애등 다수의 腎臟 질환유 발에 관련되어 있다²³⁾⁻²⁸⁾. 또한 in vivo and in vitro에 대한 몇몇 연구를 통해, 신장상피 세포에서는 다양한 자극에 반응하여 ROS를 생산할 수 있는 잠재적 가능성이 있음을 알 수 있다^{29),30)}. 잠재된 ROS의 scavenger는 ROS 매개성 질병에 대한 예방 차원에서의 방해 작용이 가능하다. 따라서 최근에는 자연적 산화방지물과 식물성 성분으로 ROS scavenger를 생산하는 다른 방법에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있다.

자연 식물 성분에서 추출한 약품은 서양 의학의 실제 적용에 상당한 영향을 미친다. 대략 120가지 정도의 약품이 식물로부터 얻어지며 많은 내과 치료가 이들 약품으로 이루어지고, 현재 사용중인 다수의 약품들 역시 식물 성분을 합성시켜 만들어진 것이다. 예를 들자면, 스테로이드, 강심성 glucose, anticholinergics, 진통제, 말라리아 예방약 및 抗癌劑 등이 있다³¹⁾.

본 실험에서는 H_2O_2 에 의해 磷酸鹽 운반이 억제된 신장상피세포에 黃芩藥鉞液을 투여하여 磷酸鹽 이동의 변화의 억제 여부를 살펴보고, ATP를 소모하는 Na^+ 의존적 능동수송에 의해 물질 재흡수가 일어나므로 ATP의 소모는 세포막을 가로지르는 Na^+ 를 감소시킬 것이고 미토콘드리아 기능장애를 일으킬 것이라는 판단하에 세포의 ATP 함유량과 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 환원되는 물질의 양을 측정하였다.

모든 호기성 세포는, 효소작용을 통하든 그렇지 않든, H_2O_2 와 과산화물을 만들어 낼 수 있다. H_2O_2 와 과산화물은 정상상태에서도 세포의 변형 과정 중에 생성된다. 미토콘드리아 전자 운반 사슬은 호흡작용 제 4기에서 소모되는 산소의 약 2%로 과산화

물과 H_2O_2 와 같은 ROS의 세포 생산의 주요 장소이다³²⁾. 동시에 대다수 세포의 상당한 抗酸化力은, 효소작용에 의해서든 아니든, ROS의 세포 손상을 막아준다. 그럼에도 불구하고, 많은 경우 ROS 형성 비율이 증가하여 세포 抗酸化力을 약하게 만들거나 세포 산화 손상이 일어난다. ROS는 식세포의 식작용, 국소빈혈, 재관류 작용 중에 생성될 수 있으며, 많은 약품과 혐기성 화학 약품의 변형 과정 중에도 생성될 수 있다³³⁾. 그러므로, ROS는 많은 급성, 만성 질환의 병인론에 연루되어 왔다. 이런 관점에서 새로운 산화방지제의 개발이 요구되어왔다.

비록 실험적 신장 손상에서 ROS의 중요성에 대한 인식이 증가했지만, 신장 세포가 그런 손상을 당하게 되는 정확한 기전이나 일련의 과정은 아직껏 명확하게 이해되고 있지 않다. 산화 물질에 의한 세포 손상은 경화나 투과성 등 세포막의 물리적 기능의 변화를 초래하고, 세포막 운반 시스템 기능이나 효소 기능과 같은 세포막의 기능적 변화를 초래한다³⁾. 보고되어 온 바로는, 신장 중심부 상피세포에서 산화물질이 유산염 탈수소효소(LDH) 분비 증가를 유발하고, glucose와 磷酸鹽 운반을 억제하며, 또한 PAH 흡수 손상을 유발한다³⁴⁻³⁶⁾. 김 등³⁷⁾의 보고에서 흥미로운 사실은, 신장 외피 절편의 oxidant에 의한 LDH 분비의 기본적 기전이 세포막 기능이 변화된 경우의 기전과는 다르다는 점이다. 그들의 관찰에 따르면, oxidant에 의한 LDH 분비는 과산화 지질과 연관이 없으나, PAH 흡수의 oxidant에 의한 抑制는 과산화 지질의 매개를 받는다고 하였다. 본 연구 결과에 의하면, H_2O_2 는 黃芩藥鉞液이 제한하는 용량 의존적 방식에서 Na^+ 의존적 磷酸鹽 運搬을 抑制한다(Fig. 1). 黃芩藥鉞液의 防禦적 효과는 0.001~0.05%의 濃度 범위에 걸쳐서는 용량 의존적으로 나타나고, 0.005%이상의 濃度에서 주요한 효과가 관찰되었다(Fig. 2).

비록 oxidant에 의한 세포막 운반 장애의 정확한 기전이 아직 정의되진 않았지만, ATP 소모는 세포막

운반 기능의 손상에 있어 결정적 역할을 할 수 있다. 사실 Andreoli 등²⁹⁾이 제시한 바로는, oxidant가 ATP 소모와 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 작용의 불활성화로 인한 정상적 이온 변화의 붕괴를 초래한다. 이는 LLC-PK1 세포와 배양시킨 다른 신장 상피 세포선에서의 Na^+ 의존적 glucose와 磷酸鹽의 흡수를 방해하게 된다. 본 연구에서 H_2O_2 는 ATP 소모와 미토콘드리아 기능 상실을 유발하였다(Fig. 3,4). 따라서 만약 黃芩藥鍼液이 ATP 소모와 H_2O_2 에 의한 미토콘드리아 기능 障礙를 抑制한다면, 黃芩藥鍼液은 H_2O_2 에 의한 磷酸鹽 運搬 抑制를 개선할 수 있을 것이다. 본 연구는 이런 변화가 黃芩藥鍼液에 의해 현저하게 저하됨을 보여주었다.

黃芩藥鍼液을 첨가한 상태에서 H_2O_2 로 처리된 세포에서의 MTT 減少는 $90.29 \pm 10.29\%$ 이며, 이는 control과 큰 차이가 없었는데, 이러한 결과가 암시하는 바는, 黃芩藥鍼液은 H_2O_2 에 의한 미토콘드리아 손상을 방지한다는 점이다(Fig. 4).

세포막 운반 기능에 대한 oxidant의 억제 효과가 신장 중심부 상피세포에서의 과산화 지질과 연관된다고 보고되었기 때문에, 黃芩藥鍼液의 방어적 효과는 과산화지질 억제의 결과일 수 있다³⁶⁾. 그러나 본 연구에서는 H_2O_2 에 의한 磷酸鹽 運搬 抑制가 잠재적인 산화방지제인 DPPD에 의해 영향을 받지 않았다(Fig. 5). 이는 H_2O_2 의 영향이 과산화지질과 연관이 없음을 나타내고 있다. 이런 결과는 磷酸鹽 運搬의 H_2O_2 에 의한 억제는 OK 세포에서의 과산화지질보다는 poly (ADP-ribose)와 DNA, RNA 형성의 촉매가 되는 효소인 polymerase의 활성화와 연관되어 있다는 Min 외³⁷⁾의 연구와 일치하는데 이는 黃芩藥鍼液의 방어적 효과가 과산화 지질의 抑制로부터 생겨나지는 않았음을 제시하고 있다.

Oxidant는 철 의존적 및 지질의 과산화에 비의존적인 기전을 통해 세포 손상을 유도한다고 알려져 왔다. 본 연구에서는 iron chelator DFO가 H_2O_2 에 의한 Na^+ 의존적 磷酸鹽 吸收 抑制를 제한했는데

이것은 Min 외³⁷⁾이 보고한 결과와 일치한다. 본 연구의 결과를 통해 黃芩藥鍼液은 ATP소모와 미토콘드리아 기능장애를 제한하였으며, iron chelator와 유사한 기전을 거쳐, 磷酸鹽 運搬에 대한 H_2O_2 에 의한 抑制 효과를 미칠 수 있음을 알 수 있다.

즉, H_2O_2 는 과산화 지질과는 다른 독자적 기전을 통해 억제 효과를 내며, 이는, 黃芩藥鍼液이 산화 방지 작용보다는 iron chelator와 유사한 기전을 통해 防禦의 효과를 끼칠 수 있다는 사실이다.

이런 일련의 결과가 제시하는 바는, 黃芩藥鍼液이 신장상피세포에서의 iron chelator와 유사하게 작용하여 세포막 운반기능 장애를 유도하는 oxidant에 대해 방어적 효과를 미칠 수 있었다. 한편, 차후의 연구에서는 이런 防禦의 효과를 미치는 黃芩藥鍼液의 활성 성분을 찾는 것이 과제로 설정되어야 할 것이다.

V. 結 論

黃芩藥鍼液이 腎臟上皮細胞에서의 H_2O_2 에 의한 磷酸鹽 運搬의 抑制에 미치는 영향을 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. H_2O_2 는 0.1~0.5mM의 濃度 범위에서 濃度에 의존적으로 磷酸鹽의 移動변화를 抑制하였다.
2. 黃芩藥鍼液은 0.005~0.05% 濃度에서 H_2O_2 에 의한 磷酸鹽의 移動 障礙를 유의성있게 防禦하였다.
3. 黃芩藥鍼液은 0.005% 濃度에서 H_2O_2 에 의한 세포내 ATP 함량과 MTT 환원의 減少를 모두 유의성있게 防禦하였다.
4. H_2O_2 에 의한 磷酸鹽 移動障礙는 DPPD의 영향을 받지 않았으나, 2mM의 DFO는 黃芩藥鍼液과 유사한 수준으로 防禦하였다.

VI. 參考文獻

1. 杜鎬京. 臨床腎系學研究. 서울:성보사. 1990: 191-6.
2. 니시자키오사무. 산소의 두얼굴. 서울:해돋이. 1999.
3. 김영곤 外. 프리라디칼. 서울:여문각. 1997:32-63.
4. 鄒澍. 本經疏證. 서울:대성의학사. 2001:276-81.
5. 이정호, 신숙정, 문용. 황금 추출물이 면역기능, 미생물증식 및 세균변이에 미치는 영향. 대한면역학회지. 1998;20:343-8.
6. 金昊顯. 黃芩의 혈관이완효과에 대한 기전. 한의학연구소 논문집. 1998;1:55-70.
7. 이문조, 박진우, 김용주, 오정석, 최달영, 김준기. 黃芩 및 황련 추출물의 아질산염 소거작용에 관한 연구. 병리학회지. 2000;14(2):109-17.
8. 박수남, 홍장후, 박민경. 활성산소의 유해작용에 대한 黃芩 성분의 생체 보호작용에 관한 연구. 서울산업대. 1997;45(1):189-99.
9. 김성일, 도원석, 김갑성. 黃芩藥液의 흰쥐 간세포내의 항산화 효능에 관한 연구. 대한침구학회지. 1999;16(1):497-509.
10. Gao Z, Huang K, Yang X, Xu. H., Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1472:643-50.
11. Shao ZH, Li CQ, Vander Hoek TL, Becker LB, Schumacker PT, Wu JA, Allele AS, Yuan CS. Extract from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31:1885-95.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976;72 :248-54.
13. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*. 1986;89:271-7.
14. 김호철. 한약약리학. 서울:집문당. 2001:129-33.
15. 육창수, 김태희, 문영희, 이경, 박중희, 황원균. 아세아본초학. 서울:계축문화사. 1998:111-4.
16. 김형균. 한약의 약리. 서울:고려의학. 2000: 333-7.
17. 문관성. 약초의 성분과 이용. 평양:과학백과사전출판사. 1999:618-20.
18. 신민교. 원색임상본초학. 서울:영림사. 1992: 308-10.
19. 양유걸. 黃帝內經素問譯解. 서울:一中社. 1991: 8,90,272.
20. 박인원. 생리학. 서울:서울외국서적. 1999: 325-33.
21. 이석강. 인체생리학. 서울:계축문화사. 1999: 296-366.
22. 니와유키에. 활성산소를 다스리면 무병장수 할 수 있다. 서울:문예출판사. 2001:65-135.
23. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Biology of disease: Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest*. 1990;62:670-9.

24. Baud L, Ardaillou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol.* 1986;251:765-76.
25. Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky J. A role of oxygen free radicals in amino-nucleoside nephrosis. *Kid Int.* 1986;29:478-83.
26. Johnson RJ, Lovett D, Lehrer RI, Couser WG, Klebanoff SJ. Role of oxidants and proteases in glomerular injury. *Kid Int.* 1994;45:352-9.
27. Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, Kunkel RG, Ward PA. Evidence for the role of oxygen free radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab invest.* 1984;51:396-403.
28. Shah SV, Walker PD. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure. *Am J Physiol.* 1988;255:438-43.
29. Andreoli SP, McAteer JA, Seifert SA, Kempson SA. Oxidant-induced alterations in glucose and phosphate transport in LLC-PK1 cells: mechanisms of injury. *Am.J.Physiol.* 1993;265:377-84.
30. Rovin BH, Wurst E, Kohan DE. Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture. *Kidney Int.* 1990;37:509-1514.
31. Pezzuto JM. Plant-derived anticancer agents. *Biochem Pharmacol.* 1997;53:121-33.
32. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1972;128:617-30.
33. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Biology of disease: Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* 1990;62:670-9.
34. Ueda N, Shah SV. Role of intracellular calcium in hydrogen peroxide-induced renal tubular cell injury. *Am J Physiol.* 1992;263:214-21.
35. Salahudeen AK. Role of lipid peroxidation in H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. *Am J Physiol.* 1995;268:30-8.
36. Kim YK, Kim YH. Differential effect of Ca²⁺ on oxidant-induced lethal cell injury and alterations of membrane functional integrity in renal cortical slices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996;141:607-16.
37. Min SK, Kim SY, Kim CH, Woo JS, Jung JS, Kim YK. Role of lipid peroxidation and poly (ADP-ribose) polymerase activation in oxidant-induced membrane transport dysfunction in opossum kidney (OK) cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000;166:196-202.