

원저

腎臟上皮細胞에서 胡桃藥鍼液이 t-Butylhydroperoxide에 의한 細胞膜物質移動系の 障礙에 미치는 影響

남상필 · 조태성 · 김철홍 · 윤현민 · 장경전 · 송춘호 · 안창범

동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Abstract

Effect of Juglans sinensis Dode aquacupuncture(JS) on t-butylhydroperoxide-induced alterations in membrane transport function in renal epithelial cells

Narm Sang-pil, Cho Tai-sung, Kim Cheol-hong, Youn Hyoun-min,
Jang Kyung-jeon, Song Choon-ho and Ahn Chang-beohm

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

Juglans sinensis Dode has been reported to have antioxidant activity. However, the effect of Juglans sinensis Dode aquacupuncture(JS) on reactive oxygen species(ROS)-induced alterations in membrane transport function in renal tubular cells. This study was performed to evaluate the effect of JS on the organic hydroperoxide t-butylhydroperoxide(tBHP)-induced inhibition of Na^+ -dependent phosphate(Na^+ -Pi) uptake in opossum kidney (OK) cells, an established renal proximal epithelial cell line. tBHP inhibited Na^+ -Pi uptake in a time-dependent manner. The inhibitory effect of tBHP was prevented by JS over concentration range of 0.05-1mg/100ml in a dose-dependent manner. Kinetic studies showed that tBHP caused a decrease in V_{max} for Na^+ -Pi uptake without any a significant change in K_m . Na^+ -dependent phosphonoformic acid binding, a irreversible inhibitor of renal Na^+ -Pi uptake, was decreased by tBHP treatment. The reduction in V_{max} and phosphonoformic acid binding by tBHP was prevented by JS. tBHP induced lipid peroxidation and its effect was completely inhibited by JS and antioxidant N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine.

- 접수 : 2003년 9월 9일 · 수정 : 2003년 9월 12일 · 채택 : 2003년 9월 20일
· 교신저자 : 안창범, 부산광역시 진구 양정2동 산 45 동의대학교 한의과대학 침구학교실
Tel. 051-850-8610 Fax. 051-853-4036 E-mail : cbahn@dongeui.ac.kr

These data suggest that the oxidant inhibits phosphate uptake by a reduction in the number of active carrier across the membrane. JS may prevent oxidant-induced inhibition of membrane transport function by a mechanism similar to antioxidants in renal epithelial cells. Although the precise constituents remain to be explored, JS may be employed as a useful candidate herb for drug development to prevent and treat oxidant-mediated renal failure.

Key words: Juglans sinensis, Reactive oxygen species, membrane transport function

I. 緒 論

腎臟은 濾過 分泌하고 人體 體液代謝를 調節하며, 生體의 基本物質인 精을 藏하고 骨과 髓를 主管한다^{1),2)}. 《素問·逆調論》³⁾에 “腎者水臟, 主津液”이라 하였는데 이는 水液代謝를 調節하는 것으로, 腎의 水液代謝異常으로 나타나는 症狀은 小便不利, 小便不通, 浮腫, 關格, 虛勞, 風水, 尿濁 등이 있다²⁾.

tBHP는 tert-Butylhydroperoxide(C₄H₁₀O₂)로서 重合反應(polymerization reaction)을 일으키는 觸媒로 작용하며, radical의 置換反應(substitution reaction)을 일으키는 peroxy group의 酸化劑로 널리 사용되고 있는 藥物이다⁴⁾. 또한 反應性酸素基(Reactive oxygen species ; ROS)는^{5),6)} 여러가지 腎臟 疾患들의 病因으로 認定되고 있으며 다수의 研究에서 腎細尿管 細胞가 다양한 刺戟에 反應하여 反應性酸素基을 生産할 수 있음이 報告되었다⁷⁾. 生體 細胞膜들은 不飽和脂肪酸을 많이 含有하고 있어 이는 反應性酸素基에 의한 攻擊을 쉽게 받아 脂質 過酸化가 發生한다⁸⁾ 反應性酸素基과 脂質 過酸化는 細胞膜에 영향을 미쳐 透過性を 증가시키고, 細胞膜 物質移動 같은 本質적인 蛋白質의 機能을 변화시킨다^{8),9)}. 酸化劑는 腎臟細尿管細胞에서 글루코스와 磷酸移動을 抑制시키는데¹⁰⁾ 이러한 변화는 抗酸化劑에

의해 防止될 수 있다¹¹⁾.

抗酸化劑에 대한 韓醫學的인 研究는 주로 瀉火解毒藥劑인 柴胡¹²⁾, 黃芩¹³⁾ 등이나 瘀血과 관련한 活血化瘀劑인 丹蔘¹⁴⁾, 紅花子¹⁵⁾ 등을 중심으로 진행되어 왔는데 최근엔 老化를 防止하는 補劑인 胡桃¹⁶⁾, 冬蟲夏草¹⁷⁾ 등도 抗酸化劑의 역할을 담당하는 것으로 研究되어지고 있다.

胡桃(Juglandis Semen)는 性味가 甘·溫·無毒하고 補腎益精·強腰膝·斂肺定喘·潤腸 등의 效能이 있어 腎虛精虧·腰痛·筋骨無力·虛寒喘咳·腸燥便秘 등의 病症을 治療하는데 사용되어져 왔으며¹⁸⁾, 最近 胡桃藥液의 抗酸化 酵素活性에 대하여 유의한 效能이 있음이 報告¹⁹⁾되는 등 實驗을 통하여 胡桃藥液의 效能을 究明하기 위한 노력을 계속하고 있어 天然 抗酸化劑로서의 개발과 治療領域의 확대가 기대되고 있다.

이에 著者는 胡桃藥液이 腎臟細尿管에서 酸化劑에 의한 物質移動系의 機能障礙를 防止할 수 있는지를 확인하기 위하여, opossum kidney(OK) 細胞에서 tBHP에 의한 Na⁺-Pi uptake의 抑制作用, Na⁺-dependent PFA binding의 減少作用, 脂質 過酸化의 變化를 측정하고 이에 대한 胡桃藥液의 影響을觀察하였던 바 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 胡桃藥鹼液 製造

胡桃(*Juglans sinensis* Dode)를 市中에서 購入하여 300g을 粉碎하여 증류수로 100℃, 4시간 동안 加熱하여 抽出하였고, 減壓下에 煎湯하여 남은 總(total) 量이 15.5g이 된 抽出物을 生理食鹽水에 溶解시켰다.

2. Opossum kidney(OK) 細胞의 培養

腎臟 近位細尿管 유래 培養 細胞인 opossum kidney(OK) 細胞는 American Type Culture Collection(Rockville, MD)社로부터 分주받아 一連의 過程下에 75cm²의 培養菌 플라스크에 보관했다(Costar, Cambridge, MA). 細胞는 10% FBS(fetal bovine serum)-DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12, Sigma Chemical Co.) 培養液에서 37℃, 95% air/5% CO₂의 조건하에 incubation하여 培養되었다. 細胞가 confluence에 도달하면, 0.02% EDTA-0.05% trypsin 溶液을 이용하여 2차 培養을 하였다. 細胞는 10% fetal bovine serum-DMEM/F12 배양기내의 組織培養 plate에서 培養했다. 모든 實驗은 細胞 培養이 이루어지는 3~4일 뒤에 시작되었다.

3. 酸化 損傷의 誘導

細胞는 지시된 濃度의 tBHP로 115 NaCl, 5 KCl, 25 NaHCO₃, 2 NaH₂PO₄, 1 MgSO₄, 1 CaCl₂와 5 glucose(pH 7.4)을 함유한 Hanks' balanced salt solution(HBSS)에서 37℃로 120分 동안 처리하였다.

4. Uptake 研究

Na⁺-Pi uptake는 24-well plate에서 培養된 monolayer를 이용하여 측정하였다. 細胞를 酸化劑에 露出시킨 후 緩衝液은 除去하고 137 NaCl, 5.4 KCl, 2.8 CaCl₂, 1.2 MgSO₄와 10 Hepes(pH 7.4)

를 含有한 緩衝液으로 두번 세척하였다. 細胞는 5 μM [³²P]-phosphate를 含有한 緩衝液에서 37℃로 30分 동안 incubation하였다. Incubation 후 細胞는 ice-cold 緩衝液에 세번을 세척하였고, 0.2% Triton X-100 0.5ml에 溶解하였다. Uptake를 결정하기 위해 각 표본에서 0.4ml를 채취해 液狀 섬광계수기(liquid scintillation counter[TRI-CARB 2100 TR, Packard, USA])로 측정하였다. 蛋白質은 Bradford²⁰⁾ 方法으로 측정하였다.

5. [14C] PFA binding 研究

[14C] PFA binding은 24-well plate에서 培養된 monolayer를 이용하여 측정하였다. 細胞를 tBHP에 露出시킨 후 緩衝液으로 두번 세척하였고, 1mM [¹⁴C]PFA를 含有한 緩衝液에서 37℃로 30分 동안 incubation하였다. Incubation 후 細胞는 ice-cold 緩衝液에서 세번을 세척하였고, 0.2% Triton X-100 0.5ml에 溶解하였다. 각 細胞 표본을 섬광병(scintillation vials)에 옮기고 방사능에 의해 위에 기술한 液狀 섬광계수기(liquid scintillation counter)로 측정하였다.

6. 脂質 過酸化 測定

脂質 過酸化의 程度는 Uchiyama와 Mihara²¹⁾의 方法으로 그 產物인 malondialdehyde(MDA)의 量을 측정함으로써 계측하였다. 腎臟細胞는 tBHP로 처리하여 차가운 1.15% KCl(5% wt/vol)溶液에서 均質化하였다. 이 組織破碎 均質液 0.5ml에 1% phosphoric acid 3ml와 0.6% thiobarbituric acid 용액 1ml를 添加하여 끓는 물에서 45分間 加熱하였다.

n-butanol 4ml를 添加하여 완전히 섞은 다음 2,000g에서 20分 동안 遠心分離한 후 上層液의 吸光度를 535와 520nm에서 測定하였고(Hewlett Packard, 8452A), MDA값은 단백질 1mg當 nmoles

로 表示하였다.

7. 試藥

[³²P]-phosphate와 [¹⁴C]Phosphonoformic acid (PFA)는 Amersham international社(Amersham, UK)로부터 購入했다. t-butylhydroperoxide(tBHP), Hepes, N, N'-diphenyl-p-phenylenediamine(DP PD)는 Sigma-Aldrich Chemical社(St. Louis, MO, USA)로부터 購入했다. 다른 化學製品들은 시판되는 최고의 것을 사용하였다.

8. 資料整理 및 統計處理

成績은 平均±標準誤差로 나타내었으며, 두 그룹 간의 차이는 Student's t-test를 이용하여 평가하였으며, p값이 0.05 未滿일 때 有意性이 있는 것으로 判定하였다.

III. 實驗成績

1. Na⁺-Pi uptake에 따른 tBHP의 영향

Na⁺-Pi uptake의 시간적 추이를 결정하기 위해서 0.5 mM tBHP를 처치한 것과 처치하지 않은 것을 다양한 시간(0~60 min)으로 incubation하였다. Uptake는 30分 이내에는 직선으로 增加했고, 이후 60分까지는 천천히 增加했다. 그러나 tBHP를 처치한 쪽에서 uptake는 全時間 동안 抑制되었다<그림 1>.

細胞를 0.5 mM tBHP로 30分~180分 동안 처치하였을 때, Na⁺-Pi uptake는 처치된 時間에 따라 減少하였다. Uptake는 대략 60分에 61%에서, 180分에는 38%로 각각 抑制되었다. 그러한 uptake의 抑制가 1mg/100ml 胡桃藥液을 加함으로써 상당히 防止되었다<그림 2>.

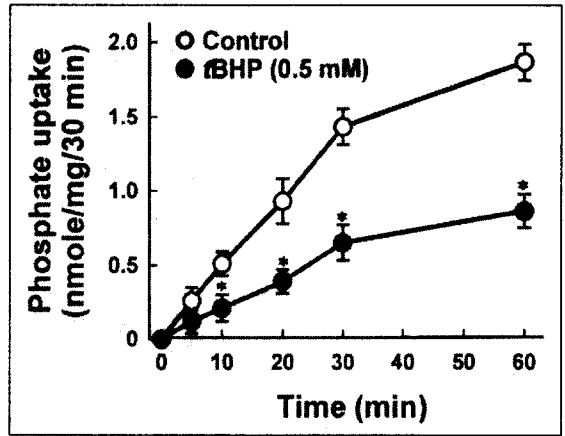


Fig. 1. Time course of Na⁺-dependent phosphate uptake in opossum kidney(OK) cells.

The uptake was measured for various time points at 37°C in the presence or absence of 0.5 mM t-butylhydroperoxide(tBHP). Data are mean±SE of three experiments. *p<0.05 compared with control.

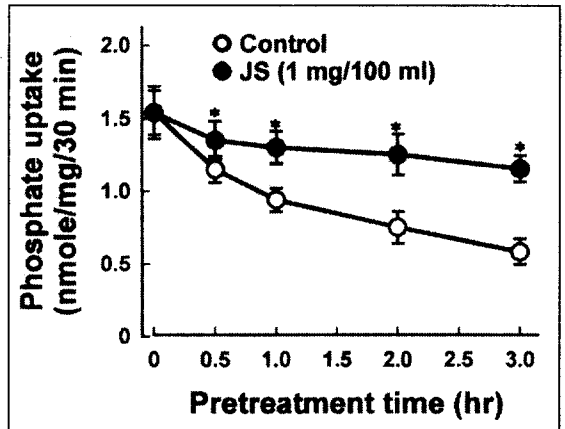


Fig. 2. Effect of t-butylhydroperoxide(tBHP) on Na⁺-dependent phosphate uptake in opossum kidney(OK) cells.

Cells were pretreated with 0.5 mM tBHP for 0.5~3 hr in the presence or absence of 1mg/100ml Juglans sinensis Dode aquacupuncture(JS). Phosphate uptake was measured for 30 min in a buffer containing Na⁺. Data are mean±SE of four experiments. *p<0.05 compared with control.

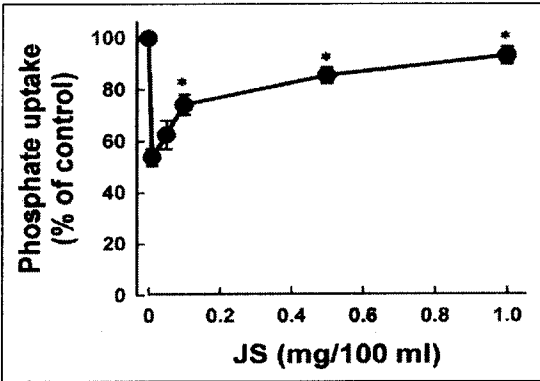


Fig. 3. Dose-dependency of *Juglans sinensis* Dode aquacupuncture(JS) on t-butylhydroperoxide(tBHP)-induced inhibition of Na^+ -dependent phosphate uptake in opossum kidney(OK) cells.

Cells were pretreated with 0.5 mM tBHP at 37°C for 2 hr in the presence of various concentrations of JS, and phosphate uptake was measured for 30 min in a buffer containing Na^+ . Data are mean \pm SE of five experiments. * $p < 0.05$ compared with tBHP alone(-JS).

2. tBHP에 의한 Na^+ -Pi uptake 抑制에 대한 胡桃藥鍼液의 영향

Na^+ -Pi uptake의 抑制을 誘發한 tBHP에 대한 胡桃藥鍼液의 防禦力을 正량화하기 위해서 細胞를 0.5mM tBHP로 處理하여 다양한 濃度의 胡桃藥鍼液으로 변화시키고 관찰하였다. <그림 3>에서 나타난 바와 같이 tBHP가 處理되었을 때 uptake는 대략 54%까지 減少되었고, 그 영향이 正량화된 胡桃藥鍼液에 의해 防止되었다. 胡桃藥鍼液은 0.1mg/100ml에서 $74.17 \pm 3.90\%$, 0.5mg/100ml에서 $85.39 \pm 3.15\%$ 그리고 1.0mg/100ml에서는 $92.91 \pm 3.36\%$ 로 uptake가 각각 增加되었다. 그러나 胡桃藥鍼液은 tBHP를 處理하지 않은 對照群에서는 어떤 效果도 발휘하지 못했다.

3. Na^+ -Pi uptake 역학에 대한 tBHP와 胡桃藥鍼液의 영향

Na^+ -Pi uptake에 대한 tBHP와 胡桃藥鍼液의 조절구조에 대한 識見을 얻기 위해서 동력학적인 분석이 行되었다. 對照群과 tBHP로 處理한 細胞는 처음 15分 동안에(data에서는 나타나지 않음) phosphate (Pi) uptake가 직선모양으로 增加함을 보였고, 15分 동안의 uptake는 初速度를 선택했다.

<그림 4>는 phosphate concentration의 상관관계에 따라 전체적인 것과 수동적인 uptake가 변화함을 나타낸다. 비록 주어진 phosphate concentration에서 tBHP만 處理한 細胞보다 對照群에서 값이 더 높게 나타났더라도 對照群, tBHP를 處理한 것, tBHP와 胡桃藥鍼液을 함께 處理한 것, 능동적이고 수동적인 uptake를 포함한 전체 uptake는 phosphate concentration의 增加에 따라 곡선으로 增加하였다. 胡桃藥鍼液을 添加한 것은 거의 對照群 수준만큼 uptake가 增加하였다. 반면에 Na^+ (N-methyl-glucamine

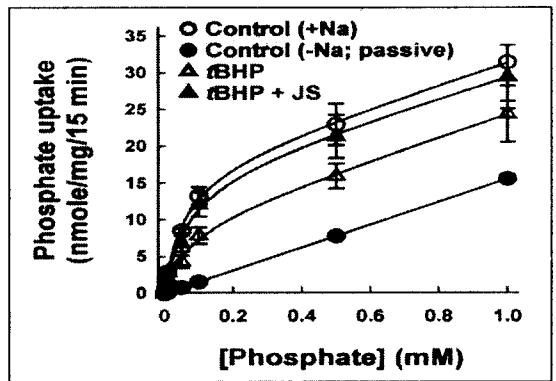


Fig. 4. Kinetic analysis of Na^+ -phosphate uptake in opossum kidney(OK) cells.

Cells were pretreated with or without(control) 0.5 mM t-butylhydroperoxide(tBHP) at 37°C for 2 hr in the presence or absence of 1 mg/100 ml *Juglans sinensis* Dode aquacupuncture(JS). Phosphate uptake was measured for 15 min in a buffer containing various concentrations($5\mu\sim 1\text{mM}$) of phosphate and in the presence (total uptake) or absence(passive uptake) of Na^+ . Data are mean \pm SE of nine experiments.

으로 치환한 것)이 결여되어 측정된 수동적인 uptake에서는 phosphate의 濃度가 溶液內에서 직선으로 增加하였다. tBHP나 胡桃藥碱液으로 처치한 細胞에서 수동적인 uptake는 對照群과 현저히 다르지 않았다(data에는 나타나지 않음) <그림 4>. 능동적인 uptake는 각 그룹에서 얻은 전체 uptake에서 수동적인 uptake를 減하여 계산하였다 <그림 5A>. 동력학적인 모수관계를 결정하기 위해서 Eadie-Hofstee plot이 이용되었다. Na⁺-dependent uptake의 Eadie-Hofstee 변환은 각 그룹에서 uptake(V)와 V/

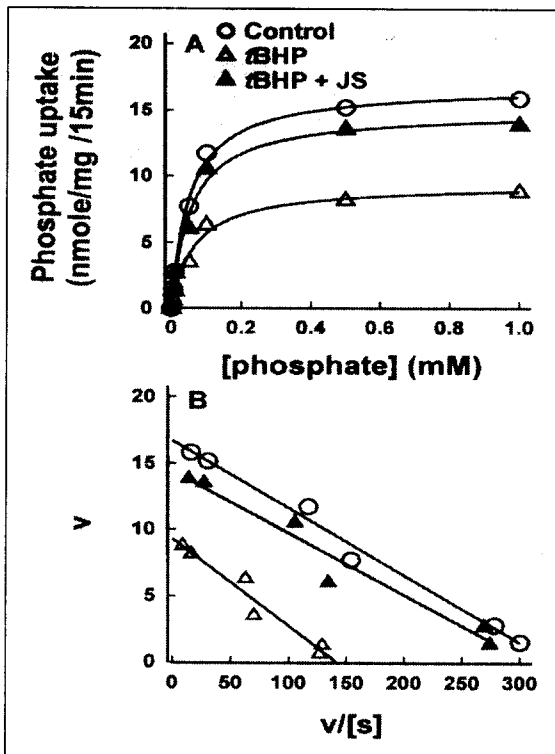


Fig. 5. The active Na⁺-phosphate uptake(A) and Eadie-Hofstee plot of the data(B).

The active uptake was computed by subtracting the passive uptake, measured in the absence of Na⁺(replaced by N-methyl-glucamine), from the total uptake obtained in Fig. 4.

Table 1. Effects of t-butylhydroperoxide(tBHP) and Juglans sinensis Dode aquacupuncture(JS) on kinetics of Na⁺-phosphate cotransport in opossum kidney(OK) cells

Conditions	Km (M)	Vmax (nmole/mg/15min)
Control	56.70±0.88	17.68±1.28
tBHP	61.51±2.16	9.88±1.52*
tBHP+JS	66.37±10.54	16.55±2.49*

Cells were treated with 0.5 mM tBHP in the presence or absence of 1mg/100ml JS for 120 min at 37°C and washed, and Na⁺-pi uptake was measured for 15 min in the presence of medium phosphate concentrations ranging from 5 μM to 1 mM. Data are mean±SE of nine experiments. *p<0.05 compared with control; #p<0.05 compared with tBHP alone.

[phosphate]의 관계가 직선이었음을 보여준다 <그림 5B>. 이는 각 그룹에서 능동적인 uptake가 Michaelis-Menten 역학 즉, $V = V_{max} \times [\text{phosphate}] / (K_m + [\text{phosphate}])$ 을 따름을 보여주는 것인데 여기서 Vmax는 최대 uptake를, Km은 Vmax/2를 위한 [phosphate] 값이다. 결론은 <Table 1>에서 요약되었듯이 tBHP가 Na⁺-phosphate 輸送의 Vmax를 減少시켰음을 나타냈다. 반면에 胡桃藥碱液을 添加한 것은 Km값에는 변화없이 tBHP가 Vmax를 減少시키는 것을 防止했다.

4. Na⁺-Pi 輸送 蛋白質의 PFA binding

PFA는 腎臟의 brush-border 膜을 가로질러 Na⁺-Pi 輸送의 특별하고 경쟁적인 阻害劑로 작용하고, 다양한 刺戟에 반응하여 發生하는 細胞膜에서 수많은 Na⁺-Pi 輸送의 變화를 감지하는 等^{22),23)} 수송체계의 研究를 위한 消息子 역할을 해왔다^{22),24)}. 그래서 PFA binding에 대한 tBHP와 胡桃藥碱液의 영향이 OK cell로 研究되었다. <그림 6>에서 나타난 바

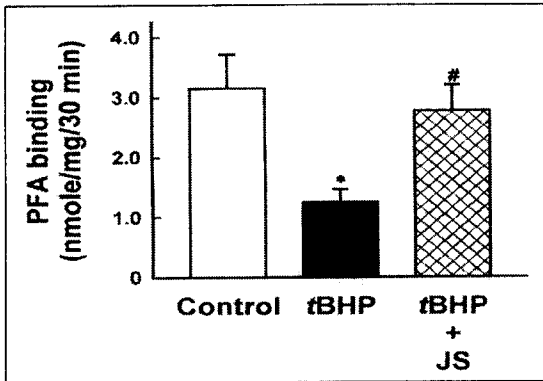


Fig. 6. Effect of t-butylhydroperoxide(tBHP) and Juglans sinensis Dode aquacupuncture(JS) on Na^+ -dependent phosphonoformic acid(PFA) binding in OK cells.

Cells were exposed to 0.5 mM tBHP for 2 hr. Total PFA binding was measured for 30 min in a buffer with or without Na^+ (replaced by NMG). Na^+ -dependent binding was calculated by subtracting the binding in the absence of Na^+ from the total binding in the presence of Na^+ . Data are mean \pm SE of four experiments. * $p < 0.05$ compared with control ; # $p < 0.05$ compared with tBHP alone.

와 같이 tBHP가 Na^+ -dependent PFA binding의 현저한 減少를 야기했고 그 영향은 胡桃藥鍼液 1mg/100ml를 加함으로써 거의 완전히 防止되었다. 이러한 결과는 tBHP가 細胞膜에서 수많은 Na^+ -Pi 輸送者의 數를 減少시키므로 Na^+ -Pi uptake를 阻害함을 나타내는 것이다.

5. Na^+ -Pi uptake를 阻害하는 tBHP에 대한 脂質 過酸化의 역할

胡桃藥鍼液의 영향이 抗酸化 活動의 結果인지를 확인하기 위하여 tBHP에 의해 유발된 脂質의 過酸化에 대한 胡桃藥鍼液의 效果를 조사하였다. 脂質 過酸化는 tBHP에 의해서는 有意하게 증가하였으나, 胡桃藥鍼液과 강한 抗酸化劑인 DPPD에 의해서는

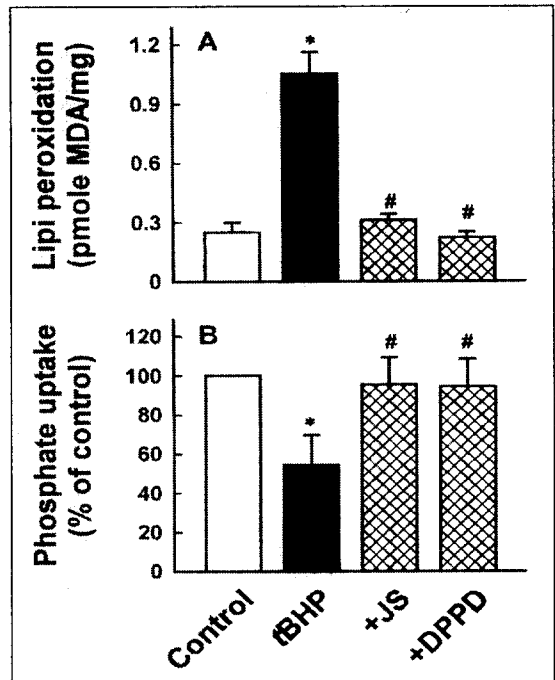


Fig. 7. Effects of Juglans sinensis Dode aquacupuncture(JS) and antioxidant on lipid peroxidation(A) and inhibition of Na^+ -phosphate uptake (B) induced by t-butylhydroperoxide(tBHP) in opossum kidney(OK) cells.

Cells were pretreated with 0.5 mM tBHP at 37°C for 2 hr in the presence or absence of 1mg/100ml JS and 10 μ M N, N'-diphenyl-p-phenylenediamine(DPPD). Data are mean \pm SE of four experiments. * $p < 0.05$ compared with control ; # $p < 0.05$ compared with tBHP alone.

완전히 阻害되었다<그림 7A>.

胡桃藥鍼液 1mg/100ml와 0.01 mM DPPD는 유사한 效能으로 tBHP의 阻害력을 防止하였다<그림 7B>. 이 實驗 結果는 tBHP가 脂質 過酸化 능동 구조를 통해 Na^+ -Pi uptake를 抑制하는데 이를 胡桃藥鍼液이 抗酸化 作用을 통해 細胞膜 物質移動 機能障礙에 反하여 保護하는 效果를 가져옴을 나타내는 것이다.

IV. 考 察

腎에 關聯하여 《素問·上古天真論》³⁾에 “腎者主水，受五臟六腑之精而藏之” 《素問·逆調論》³⁾에 “腎者水臟 主津液”이라 하였고, 主骨髓, 主納氣, 通於腦, 開竅於耳, 司二陰, 其華在髮하여 生長發育, 生食, 老衰 및 水液代謝를 調節하는데^{2), 3), 25)} 이는 西洋醫學의 內分泌系, 泌尿器系, 生殖器系, 思惟活動과 관련된 中樞神經系 等の 機能을 廣範하게 包含한다^{2), 25)}.

水液代謝는 脾胃의 傳受와 運化機能 肺의 宣發하며 水道를 通調하는 機能, 腎의 開闔을 主管하며 水量을 排泄하는 氣化作用에 의해 이루어지며 이는 三焦氣化라 할 수 있다. 三焦氣化는 一定的한 熱에너지로 水液의 代謝, 排泄를 調節하는 것으로 腎陽의 推動에 의해 氣化作用이 일어나는 것이다.

만약 膀胱이 腎陽의 氣化作用을 받지 못하면 小便不利, 失禁, 遺尿 等の 症이 나타나며, 津液의 吸收, 輸布에 있어서 腎陽의 氣化作用을 받지 못하면 水腫 等이 발생하게 된다³⁴⁾. 따라서 腎陽虛나 命門火衰는 慢性腎炎에서 腎虛水乏은 腎症性腎炎(nephrosonephritis)에서, 腎氣不固는 慢性腎炎, 尿崩症, 遺尿 等の 病變에서 나타날 수 있다²⁶⁾.

西洋醫學에서 腎臟은 老廢物의 除去, 水分均衡과 電解質均衡의 調節, 滲透壓 調節, 酸鹽基 平衡調節(acid-base balance), 動脈血壓調節, 赤血球生産 調節機能 等이 있는데, 排泄, 調節 및 內分泌機能이 腎臟의 대표적인 機能이며 生體內 環境의 恒常性維持에 중요한 역할을 한다^{2), 27)}. 病變이 있으면 浮腫, 蛋白尿, 高血壓, 尿血, 貧血, 減尿 等이 誘發되거나, 惡心, 乾嘔, 頭痛, 不嗜食, 全身衰弱, 尿濁 等の 症狀이 나타난다²⁾.

腎臟實質의 損傷을 일으키는 機轉은 免疫의 異常,

血液凝固의 異常, 血管疾患, 遺傳 및 代謝障礙, 腎臟毒素, 感染, 尿管閉鎖, 腫瘍 等の 8가지로 분류할 수 있다. 이 중 腎臟毒素은 腎細胞에 대한 直接的인 毒性을 일으키는 경우, 腎細尿管內의 沈澱 또는 結晶化로 細尿管의 閉鎖를 招來하는 경우, 結晶이 間質에 沈着하여 慢性炎症을 일으키는 경우, 腎臟循環의 障礙를 招來하는 경우, 過敏反應을 일으키는 경우에 損傷을 야기할 수 있다²⁾.

最近 新鍼療法으로 藥鍼療法은 經絡學說의 原理에 依據하여 有關한 穴位나 壓通點 및 反應點에 精製된 各種藥物을 注入하는 刺鍼效果和 藥物作用을 結合한 것으로 비교적 높은 效果를 내고 있는 鍼灸科의 새로운 領域으로 활발한 臨床應用과 研究가 이루어지고 있다^{28, 29)}.

本 實驗에서 藥鍼療法으로 사용된 胡桃는 胡桃나무과(胡桃科: Juglandaceae)에 속한 落葉喬木인 胡桃나무 果實의 種仁으로 核桃肉, 核桃仁, 唐楸子 等の 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 lino acid, oleic acid 등을 주로 한 脂肪油가 40~50%, 단백질, 당분, 灰分, vitamin A·B·C·E 등이라고 알려져 있고³⁰⁾, 그 效能은 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, 肉潤 溫肺潤腸 補氣養血 助腎火 潤燥 養血 等이며, 主治證은 腰痛脚弱, 腰脚虛痛 心腹諸痛 遺精 腸燥便秘 腎虛咳嗽 虛寒咳嗽 心腹疝痛 血痢腸風 散腫毒 瘡腫諸毒 殺蟲治瘡 發頭瘡 制銅毒 等이다^{31), 32)}.

反應性酸素基는 正常細胞의 미토콘드리아에서 代謝過程中 발생되고, 細胞內에 있는 여러 종류의 oxidase들에 의해 서로 發生된다. 이와 같이 生成된 反應性酸素基는 여러가지 方法으로 細胞機能에 障礙를 誘發할 수 있다. 그러나 우리 몸속에는 反應性酸素基를 除去하는 酵素 및 非酵素性 物質들을 가지고 있는데 이들 酵素에는 superoxide를 분해

하는 superoxide dismutase, H_2O_2 를 분해하는 catalase와 glutathione peroxidase 등이 있으며 이들은 反應性酸素基에 의한 細胞損傷을 防止하고 있다. 그러나 藥物또는 細胞內 環境의 變化로 反應性酸素基의 發生이 增加되거나 反應性酸素基을 除去하는 防禦作用이 軟弱하게 되었을 때, 細胞는 損傷을 받게 될 것이고 甚하면 細胞의 死亡까지 이르게 된다. 그러므로 酸化體는 많은 急性, 慢性 疾患의 病因論에 연루되었고, 이런 관점에서 새로운 酸化防止劑의 개발이 요구되어 왔다³³. 이같이 實驗的인 腎臟損傷에 있어서 酸素遊離基의 重要性에 대한 認識이 增加되고 있음에도 불구하고 正確한 機轉이나, 腎臟細胞가 그러한 損傷을 입게 되는 一連의 狀況들이 明確하게 理解되지 않고 있다³⁴. 酸化劑에 의한 細胞損傷은 強度나 透過性 같은 細胞膜의 物理的인 性質이 細胞膜移動系 惑은 酵素의 機能과 같은 機能的인 性質과 相互 關係가 있을 것이다³⁵. 그래서 本 實驗에서는 Na^+ -Pi uptake의 阻害를 야기하는 tBHP의 구조와 이를 抑制하는 胡桃藥鹼液의 效果에 대해 알아보았다.

tBHP는 시간의존적 방법으로 Na^+ -Pi uptake를 阻害하고<그림 2>, 그러한 tBHP의 영향은 胡桃藥鹼液에 의해 有意性 있게 防止되었다. 胡桃藥鹼液의 防禦力은 0.05~1mg/100ml의 농도 변화로 약물 정량화하여 관찰하였다<그림 3>.

Na^+ -Pi uptake의 역학적인 분석에서 tBHP로 처리한 細胞에서 物質移動의 V_{max} 는 K_m 값의 현저한 變化 없이 대략 對照群의 50%가 減少되었다. 그러나 細胞를 胡桃藥鹼液과 함께 tBHP로 처리한 경우에는 V_{max} 값이 對照群과 다르지 않았다<그림 5, Table 1>. V_{max} 는 2개의 요소 즉 ① carrier system의 能力 ② 單位時間에 앞 방향에서 解離하는 吸收된 分子의 比率로 결정지어진다³⁶.

前者는 carrier site의 數에 주로 의존하며 後者는 주어진 시간에 carrier site로부터 解離한 기

질의 확률과 細胞膜을 가로지르는 carrier의 傳導率에 의존한다. 本 實驗에서 기질 친화력으로 언급한 K_m 값이 변하지 않았기 때문에 carrier 기질 解離를 변화시킨 것 같지는 않고 tBHP가 대다수의 機能的인 carrier 단위나 傳導率을 減少시킨 것 같다.

PFA 결합이 Na^+ -pi 輸送 數를 정확히 어렵할 수 있다고 한다면^{23,37} PFA binding 研究 結果는 <그림 6> V_{max} 의 감소가 기능적인 carrier 단위들의 숫자 減少에 의한 것일지도 모른다는 것을 나타내는 것이다. tBHP에 의한 脂質 過酸化의 增加는 그러한 변화들에 대한 이유일 수 있다. 小腸에서 만들어진 微細絨毛膜의 過酸化가 Na^+ -glucose 輸送에서 V_{max} 의 減少를 야기한다고 報告되어진 바 있다³⁸.

실제로 本 研究 結果에 의하면 tBHP는 脂質 過酸化의 현저한 增加를 야기하였고, 그것은 胡桃藥鹼液과 抗酸化劑인 DPPD에 의해 완전히 차단되었다<그림 7>. 그러므로 胡桃藥鹼液에 의한 tBHP 防禦力은 脂質 過酸化를 야기하는 tBHP를 阻害하는데 공헌할는지 모른다. 要約하면 tBHP는 細胞膜 物質 移動 機能을 阻害함을 야기했고, 이는 胡桃藥鹼液에 의해 防止되었다. tBHP는 많은 carrier의 減少에 의해 야기된 K_m 값에서 有意한 變化를 가진 Na^+ -Pi uptake의 V_{max} 값을 減少시켰으며 그러한 영향은 胡桃藥鹼液에 의해 有意性 있게 防止되었다. tBHP는 脂質 過酸化의 현저한 增加를 야기하였고, 그것은 胡桃藥鹼液과 抗酸化劑에 의해서 완전히 抑制되었다. 이러한 結果는 胡桃藥鹼液이 抗酸化 反應을 통해 oxidative stress로부터 細胞를 보호하였으므로 臨床에서 腎臟疾患에 활용할 수 있을 것으로 생각한다. 그러나 胡桃藥鹼液의 抗酸化劑 活動을 보여주는 정확한 구성요소가 밝혀지지 않아 이에 대한 活性 成分을 찾는 것이 課題로 設定되어야 할 것으로 보인다.

V. 結 論

胡桃藥鍼液이 opossum kidney(OK) 細胞에서 tBHP에 의한 細胞膜 物質移動系의 機能障礙에 미치는 영향을 調査하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. Na^+ -Pi uptake는 incubation 시간에 따라 增加하였으며 tBHP는 처리시간에 따라 Na^+ -Pi uptake를 減少시켰다.

2. 胡桃藥鍼液은 濃도에 비례하여 tBHP에 의한 Na^+ -Pi uptake 減少를 防止하였다.

3. tBHP는 Km값에는 변화없이 V_{max} 를 減少시켜 Na^+ -Pi uptake를 減少하였으며 胡桃藥鍼液은 tBHP에 의한 V_{max} 減少를 防止했다.

4. tBHP는 PFA의 결합을 減少시킴으로써 細胞膜에 존재하는 Na^+ -Pi 운반체 數를 減少시켰으며 胡桃藥鍼液은 tBHP에 의한 PFA binding 減少를 防止했다.

5. 胡桃藥鍼液은 抗酸化劑인 DPPD와 유사하게 tBHP에 의한 脂質 過酸化와 Na^+ -Pi uptake 減少를 防止하였다.

VI. 參考文獻

1. 두호경. 臨床腎系學研究. 서울:成輔社. 1995 : 191-192, 195-196, 293-297.
2. 두호경. 東醫腎系內科學. 서울:東洋醫學研究

- 院. 1989 : 5-8, 425-427, 437.
3. 홍원식. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院 出版部. 1983 : 16, 39, 42, 57, 73, 109, 157.
4. Susan Budavari. Merck Index twelfth edition. Merck & Co. Inc., New Jersey, 1996 : 259.
5. Rehan, A., Johnson, K. J., Wiggins, R. C., Kunkel, R. G., Ward, P. A. Evidence for the role of oxygen radicals in acute nephrotoxic nephritis. Lab. Invest. 1984 : 51, 396-403.
6. Shah, S. V. Oxidant mechanisms in glomerulonephritis. Semin. Nephrol. 1991 : 11, 320-326.
7. Guidet, B. R., Shah, S. V. In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. Am. J. Physiol. 1989 : 256, F158-F164.
8. Mead, J. F. Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes. In Free Radicals in Biology (Pryor, W. Ed.). Academic Press, New York. 1976 : 51-68.
9. Arstila, A. U., Smith, M. A., Trump, B. F. Microsomal lipid peroxidation : morphological characterization. Science. 1972 : 175, 530-533.
10. Andreoli, S. P, McAteer JA, Seifert SA and Kempson SA, "Oxidant-induced alterations in glucose and phosphate transport in LLC-PK1 cells", mechanisms of injury. Am J Physiol. 1993 : 265, F377-F384.
11. Kim, Y. K. and Kim, Y. H., "Differential effect of Ca^{2+} on Oxidant-induced lethal cell injury and alterations of membrane functional integrity in renal cortical slices", Toxi-

- col. Appl. Pharmacol, 1996:141, 607-616.
12. 문진영, 최미정, 남경수, 임종국. 柴胡가 free radical에 의한 脂質 過酸化 生成에 미치는 영향. 東國論集 自然科學編. 1996 : 15 : 361-375.
 13. 신국현, 채운정, 정명숙, 이희주. 黃芩의 Flavonoid 성분들이 Rat 수정체의 백내장 형성과 Polyol 축적에 미치는 영향. 生理學會誌. 1994 : 25(1) : 41-46.
 14. 이호동, 윤현민, 장경전, 송춘호, 안창범. 丹蔘藥鹼液이 腎臟近位細尿管細胞에서 酸化劑에 의한 磷酸의 移動抑制에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2000 : 17(3) : 208-218.
 15. 김여진, 장경전, 송춘호, 안창범. 紅花子藥鹼液이 Oxidant에 의한 家兔의 腎臟 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1998 : 15(1) : 493-502.
 16. 김영해, 김갑성. 胡桃藥鹼液의 抗酸化效果에 대한 研究. 대한한의학회지. 1996 : 17 : 9-12.
 17. 천갑술, 서정철, 윤현민, 장경전, 송춘호, 안창범. 冬蟲夏草藥鹼液이 家兔 腎皮質切片에서 細胞膜物質移動系의 기능장애에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001 : 18(3) : 123-133.
 18. 신민교. 臨床本草學. 서울 : 永林社. 1997:233, 234.
 19. 강형정. 胡桃水鹼이 家兔 腎臟의 抗酸化酵素 活性에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1998 : 15 (1) : 473-481.
 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. 1976 : 72, 248-254.
 21. Uchiyama, M., Mihara, M. Determination of malonaldehyde Oprecursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem. 1978 : 86, 271-278.
 22. Hoppe, A., Lin, J.T., Onsgard, M., Knox, F.G., and Dousa, T.P. Quantitation of the $\text{Na}^+ - \text{Pi}$ cotransporter in renal cortical brush border membranes. [14C] phosphoformic acid as a useful probe to determine the density and its change in response to parathyroid hormone. J. Biol. Chem. 1991 : 266, 11528-11536.
 23. Yusufi, A. N., Szczepanska, K. M., Hoppe, A., Dousa, T.P. Different mechanisms of adaptive increase in $\text{Na}^+ - \text{Pi}$ cotransport across renal brush-border membrane. Am. J. Physiol. 1989 : 256, F852-F861.
 24. Szczepanska, K. M., Yusufi, A. N., Lin, J. T., Dousa, T.P. Structural requirement of monophosphates for inhibition of $\text{Na}^+ - \text{Pi}$ cotransport in renal brush border membrane. Biochem. Pharmacol. 1989:38, 4191-4197.
 25. 大韓東醫生理學會編. 東醫生理學. 서울 : 慶熙大學校出版局. 1993 : 318-332, 324-326.
 26. 문준준, 안규석, 최승홍 공편. 東醫病理學. 서울 : 高文社 1990 : 337-341.
 27. 서울대학교 의과대학편. 腎臟學. 서울 : 서울대학교 출판부. 1985 : 31, 37, 255, 257.
 28. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學教室. 鍼灸學. 서울 : 集文堂. 1988 : 1457-1467.
 29. 권용택. 藥鍼의 臨床的 效能을 통한 藥鍼定義와의 符合性에 관한 文獻의 考察. 「慶熙大博士中間論文」. 1988.
 30. 이상인, 안덕균, 신민교. 韓藥臨床應用. 서울 : 成輔社. 1986 : 194-195.
 31. 이시진. 本草綱目. 서울 : 高文社, 1983:1033.
 32. 上海中醫學院編. 新編中醫學教材 中草藥學 再

- 版. 上海：商務印書館. 1981：540.
33. Freeman B. A and Crapo J. D., "Biology of disease : Free radicals and tissue injury. Lab. Invest. 1982 : 47 : 412-426.
34. Kim, Y. K., and Kim, Y. H. Differential effect of Ca^{2+} on oxidant-induced lethal cell injury and alterations of membrane functional integrity in renal cortical slices. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1996 : 141, 607-616.
35. Gardes-Albert, M., Jore, D., Ferradini, C. Membrane lipid peroxidation : Pulse and g-radiolysis in oxyradical research. In Membrane Lipid Oxidation(Vigo-Pelfery, C. Ed.). CRC Press, Boston. 1993 : 1-30.
36. Neame, K.D., and Richards, T.G.(1972). Elementary Kinetics of Membrane Carrier Transport. ed. Blackwell Scientific Publications, New York.
37. Szczepanska, K. M., Yusufi, A. N., Dousa, T. P. Interactions of [14C]phosphonoformic acid with renal cortical brush-border membranes. Relationship to the Na^{+} -phosphate co-transporter. J. Biol. Chem. 1987 : 262, 8000-8010.
38. Jourd'heuil, D., Vaananen, P., Meddings, J. B. Lipid peroxidation of the brush-border membrane : membrane physical properties and glucose transport. Am. J. Physiol. 1993 : 264, G1009-G1015.