

원저

澤瀉藥鍼의 抗酸化效果에 關한 實驗的 研究

이종무* · 이병렬**

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

The Experimental Study about Antioxidant Activities of *Alismatis Rhizoma* Herbal Acupuncture

Lee Jong-moo* and Lee Byung-ryul**

Department of Acupuncture and Moxibustion,
College of Oriental Medicine, Tae-Joen University

Objective : The purpose of this study is to investigate the antioxidant activities of *Alismatis Rhizoma* herbal acupuncture by experimental methods.

Methods : For this purpose, first, we put an emphasis on the control of enzymes of the antioxidant system in various changes inside the cell; these changes caused by the proliferation or the activation of the cell which were brought about by the handling of PMA and TNF- α into the THP-1 monocyte cell of the body each other. After that, we caused the acute oxidant symptom by the injection of AAPH into the mouse' abdominal cavity, and then applied the herbal acupuncture on S36 point(足三里), and finally, we measured the change of blood ingredient and the resistance against the activated oxygen of the red blood cell membrane, MDA, SOD, and catalase.

Results : In vitro the revelation of IL-1 β , IL-8, TNF- α , NOSII and IL-6 were decreased and the revelation of IL-10, TGF- β , GM-CSF IL-12, GM-CSF and SOD were increased. The DNA-binding of NF- κ B and AP-1 were activated and the formation of ROS in the THP-1 cell line was decreased.

- 접수 : 2002년 10월 29일 · 수정 : 2002년 12월 10일 · 채택 : 2003년 1월 18일
· 교신저자 : 이병렬, 충북 청주시 용담동 173-9 대전대 청주한방병원
Tel. 043-229-3721 E-mail : acup@dju.ac.kr

In vivo IL-1 β among producing the cytokine inside the plasma was meaningfully dwindled and the INF- γ was meaningfully increased. The resistance of red blood cell membrane against the activated oxygen was meaningfully increased and the MDA formation was meaningfully dwindled. In the activation of hepatic antioxidantase, the SOD was meaningfully increased.

Conclusions : *Alismatis Rhizoma* herbal acupuncture by experimental methods had effected on the antioxidant activities.

Key words : antioxidant activities, *Alismatis Rhizoma*, NF- κ B, AP-1, SOD, catalase.

I. 緒 論

最近 生活環境의 改善, 食生活의 豊饒와 醫學의 發達 등으로 因하여 老齡人口가 急增하고 있다¹⁾. 世界保健機構(WHO)에서도 老人에 대한 醫療를 2000年代의 健康目標 中 重要한 部分으로 強調하였으며, 現在 이에 대한 研究가 活潑히 進行되고 있다²⁾.

韓醫學에서의 老化에 대한 觀點은 모든 萬物이 生長化收藏의 陰陽五行의 規律에 의해 變化하는 過程으로 認識함으로써 人間의 出生, 發育, 成長, 成熟, 老化의 過程을 腎氣의 盛衰로 說明하고 있다³⁾⁻⁵⁾.

老化는 退行的 老化(degenerative aging)와 計劃的 老化(programmed aging)로 나눌 수 있는데, 退行的 老化는 無作爲의 으로 일어난 有害한 機作들에 의한 老化로 成熟期 以後에 생기는 變化로서 그 個體의 生存能力이 進行性으로 떨어지는 것이라고 보는 것이며, 計劃的 老化는 計劃에 依據하여 發生 成長 段階의 마지막 終着地로서 일어난다는 것으로 受精한 때로부터 始作하여 死亡할 때까지의 生體의 變化로 보는 것이다⁶⁾.

老化의 機轉에 대하여 最近에는 活性酸素에 의한 損傷이 老化와 壽命決定에 重要하다고 생각하는 活性酸素說⁶⁾⁻¹⁰⁾이 老化된 個體에서의 酸化의 損傷을 찾는 研究들과 分子生物學의 技法을 利用한 遺傳子實驗에서 얻어진 結果들¹¹⁾⁻¹³⁾에 의하여 注目을 받고 있다.

抗老化 및 抗酸化에 대하여 胡桃, 當歸, 鹿茸 등¹⁴⁾⁻¹⁷⁾의 藥鍼 및 人蔘, 紅蔘 등^{18),19)}의 經口投與 方法을 利用하여 效果를 立證한 報告가 있었으나 澤瀉의 抗酸化作用을 밝힌 研究는 接할 수 없었다.

이에 著者는 澤瀉²⁰⁾⁻²²⁾로 藥鍼液을 製造한 후 人體의 THP-1 單核球 細胞²³⁾에 phorbol myristate acetate (PMA)²³⁾와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)^{11)-13),23)}를 각각 處理하여 細胞의 分化 및 活性酸素를 誘發하여, 抗酸化系 酵素들의 變化를 觀察하였고, SD系 생쥐에서 AAPH [2, 2'-azobis(2-aminodinopropane) hydrochloride]²⁴⁾를 腹腔에 注入하여 實驗的 急性酸化症을 誘發시킨 후 理脾胃, 消風化濕, 調和氣血, 扶正培元하는 足三里(S36)²⁵⁾에 澤瀉藥鍼하여 血液成分의 變化, 赤血球膜의 活性酸素에 대한 耐性, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase(SOD) 및 catalase를 測定하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 動物

本實驗 생쥐는 體重 280~300g의 Sprague-Dawley系(韓國化學研究所) 雌性 흰쥐를 使用하였으며, 實驗 當日까지 固形飼料[조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, (주)삼양사 배합 사료]와 물을 充分히 供給하고 溫度 22±2℃를 繼續 維持하고 2週日間 實驗室 環境에 適應시킨 후 實驗에 使用하였다.

2) 藥物

實驗에 使用된 澤瀉(Alismatis Rhizoma)는 大田 大學校 附屬 韓方病院에서 精選한 것을 使用하였다.

3) 藥鍼液의 製造

澤瀉 55g을 粗末로 하여 원형 flask에 넣고 蒸溜水 300ml에 각각 加하여 3時間 동안 shaking water bath에서 流出하고 濾過한 다음, 이 沈澱物을 3M paper로 3回 濾別한 후 rotary evaporator로 減壓濃縮하였다. 澤瀉 濃縮液에 95% ethyl alcohol 30ml를 加하여 室溫에서 攪拌한 후, 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하고, 餘液을 다시 rotary evaporator로 減壓濃縮하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 餘液을 다시 85% ethyl alcohol 30ml를 加하여 잠시 攪拌하고 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하고, 다시 餘液을 75% ethyl alcohol 30ml를 加한 후 같은 操作을 2回 反復한 후 餘液 中 ethyl alcohol을 減壓留去하여 殘渣全量을 20g이 되게 하고 1N NaOH로 pH 6.8로 調節하여 低溫에서 12時間 放置한 후, 微量의 浮遊液을 濾別한 다음, 滅菌하여 10%와 20% 澤瀉 藥鍼液으로 稀釋하여 使用하였다.

4) 試藥 및 機器

(1) 試藥

試藥	製造會社	製造國
1-chloro-2,4-dinitrobenzen(cDNB), 7-ethoxycoumarin, acetic acid, acetyl acetone, ammonium acetate, ascorbic acid, Ba(OH) ₂ , benzphetamine, catalase, chloroform, Cholinesterase kit, cumene hydroperoxide, CuSO ₄ ·5H ₂ O, cytochrome C, DNase type I, Diethyl pyrocarbonate(DEPC), DL-dithiothreitol(DT T), Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS), EDTA, epinephrine, ethidium bromide(EtBr), Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether), ferric chloride, folin reagent, formaldehyde, HEPES, hydrogen peroxide(H ₂ O ₂), isopropanol, leupetin, magnesium chloride(Mg Cl ₂), malonaldehyde bis(diethyl acetatal), N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA), Na ₂ S ₂ O ₄ (sodium hyrosulfite), NaCl, NADPH, naphthyl ethylene diamine dihydrochloride, Nonidet P-40, ortho-phosphoric acid, phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), polyacrylamide, potassium cyanide, potassium ferricyanide, RP MI-1640 培養液, scopalamine, sodium azide, sodium deoxycholate, Sodium tartratesulfonylamide, Thio-barbituric acid(TBA), ZnSO ₄ , trichloroacetic acid(TCA), Tris-HCl, xanthine	Sigma	USA
逆傳寫酵素(Molecy Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase ; M-MLVRT), RNase inhibitor	Promega	
RNAzolB	Tel-Test	
우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)	Hyclone	
Agarose	FMC	
anti-mouse Ig HRP-conjugated sceondary Ab, anti-human Ig HRP-conjugated sceondary Ab ECL-Hybond film, [methyl-3H] thymidine	Amersham	
containing collagenase A	BM	
ELISA kit	PharMingen R&D system Endogen	
hrTNF-α	PharMingen R&D system	
anti-human SOD antibody, anti-p38 antibody	Boehringer Mannheim	
Taq polymerase, Deoxynucleotide triphosphate(dNTP)	TaKaRa	Japan
2, 2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride(AAPH)	Polyscience	

以外 試藥들은 特級 및 一級을 使用하였다.

(2) 機器

機 器	製 造 會 社	製 造 國
ELISA reader	molecular devices	USA
flow cytometer	Becton Dickinson	
homogenizer	OMNI	
plate shaker	Lab-Line	
遠心分離器	Centrikon, Sigma	
유리섬유여지 (Glass microfiber filter)	Whatman	
자동생화학분석기 (Express 550)	Ciba-Coring Co.	
細胞收集器 (Cell Harvester) 방사선 측정기	LKB	France
자동혈구측정기	MINOS-Roche	
Primus 96 Legal PCR system	MWG	Germany
spectrophotometer	Shimadzu	Japan
bio-freezer	Sanyo	
ice-maker	vision科學	Korea

2. 方法

1) *In vitro*

(1) 細胞 培養

생쥐의 正常 lung fibroblast cell(mLFC)은 BA LB/c 생쥐의 肺 組織을 cool D-PBS로 3回 洗滌한 후 작은 조각으로 切斷한 후, conical tube(15ml)에 넣어 1,400rpm으로 5分間 遠心分離하고, tube에 D MEM(containing collagenase A(5mg/ml)와 DNase type I (0.15mg/ml), antibiotics(penicillin 10⁴U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25μg/ml))을 넣어 37℃ 상태의 CO₂ 培養器에서 2 時間 동안 培養하였다. 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 添加한 후 30 分間 繼續 培養하였다. 培養 후 인산완충 생리

식염수(PBS)로 약 2回 1,500rpm으로 遠心分離한 후, DMEM-10% FBS에 1週日 동안 培養하였다. 1 週日 후 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 mLFC를 分離하여 使用하였다. THP-1 細胞柱는 human monocytic leukemia cell line(ATCC, CRL1324)으로 RPMI-1640 培養液에 10% 우태아혈청, penicillin (100U/ml), streptomycin(100μg/ml) 그리고 10μg/ml의 gentamycin이 含有된 培養液에 37℃ 상태의 95% air, 5% CO₂인 培養器에서 培養하였다.

(2) 細胞毒性 測定

細胞毒性 測定은 SRB assay法²⁶⁾을 약간 變形하여 實驗에 使用하였다. 正常 생쥐 mLFC와 THP-1 細胞柱는 37℃ 상태의 5% CO₂ 培養器에서 자란 것을 Trysin-EDTA 溶液으로 單一細胞들이 되도록 떼어 내고, 2.0×10⁴개의 細胞를 96 well plate에 分柱하고, 37℃ 상태의 5% CO₂ 培養器에서 2時間 培養한 후 最終濃度 500, 250, 125, 62.5, 10, 1μg/ml인 澤瀉藥鍼液을 각각 48時間 동안 處理하였다. 培養終了 후에 培養液을 버리고, 인산완충용액으로 2回 洗滌하였다. 각 well에 50% TCA(trichloroacetic acid)를 50μl를 加하고, 1時間 동안 4℃에 放置하였다. 蒸溜水로 5回 洗滌한 후, well plate를 공기 중에서 乾燥하였다. SRB(0.4%/1% acetic acid) 溶液을 100μl/well로 加하고 室溫(room temperature)에서 30分間 染色하였다. 그리고 0.1% acetic acid溶液으로 약 4~5回 洗滌한 후 공기 중에서 乾燥하고 10mM Tris Base로 100μl/well로 溶解시켰다. 이 plate를 plate shaker에서 3.5 speed로 5分間 shaking 하고, ELISA reader로 540nm에서 吸光度를 測定하였다.

(3) THP-1 細胞柱에서 mRNA 遺傳子 發顯測定

① 澤瀉藥鍼液 處理

THP-1 細胞는 24 well plate에 1×10⁶ 細胞로 각 well에 分柱하고, 100, 10, 1μg/ml 濃度の 澤瀉藥鍼液을 각각 處理하고, 1時間 후 TNF-α를 100ng/ml씩 각각의 well에 添加하여 6時間 동안 培養하였다.

② RNA 抽出(total RNA)

6시간 培養한 후 2,000 rpm으로 5분간 遠心分離하여 上層液을 除去한 후 RNAzol^B 500 μ l를 넣고 溶解될 때까지 混合하였다. 이 混合 浮遊液에 chloroform(CHCl₃) 50 μ l를 添加한 후, 15秒間 混合하였다. 얼음에 15分間 放置한 후 13,000rpm으로 遠心分離한 후 약 200 μ l의 上層液을 回收하여 2-propanol 200 μ l와 同量混合 후 천천히 흔들고 얼음에서 15分間 放置하였다. 다시 13,000rpm으로 遠心分離한 후 80% EtOH로 水洗하고 3分間 vacuum pump에서 乾燥하여 RNA를 抽出하였다. 抽出한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 處理한 20 μ l의 蒸溜水에 녹여 heating block 75 $^{\circ}$ C에서 不活性化시킨 후 first strand cDNA合成에 使用하였다.

③ 逆傳寫-重合酵素 連鎖反應(RT-PCR)

逆傳寫(reverse transcription)反應은 준비된 total RNA 3 μ g을 75 $^{\circ}$ C에서 5分間 變性(denaturation)시키고, 이에 2.5 μ l 10mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides(25pmole/25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor(20U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5 \times RT buffer(250mM Tris-HCl, pH 8.3, 375mM KCl, 15mM Mg Cl₂)를 加한 후, 1 μ l의 M-MLV RT(200U/ μ l)를 다시 加하고, DEPC 處理된 蒸溜水로서 最終 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 反應 混合液을 잘 섞은 뒤 2,000rpm으로 5秒間 遠心沈降하여 37 $^{\circ}$ C 恒溫 수조에서 60分 동안 反應시켜 first-strand cDNA를 合成한 후, 95 $^{\circ}$ C에서 5分 동안 放置하여 M-MLV RT를 不活性化 시킨 후 合成이 完了된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 使用하였다.

④ cDNA PCR

PCR은 Primus 96 Legal PCR system(with high pressure lid)를 利用하여 수행하였다. 反應은 이미 合成된 3 μ l의 cDNA를 주형으로 使用하고, 주형에 대한 primer는 β -actin, interleukin-1(IL-1 β), IL-

6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , NOS-II를 增幅하기 위하여 sense primer(20pmole/ μ l)와 antisense primer(20pmole/ μ l)를 混合하여 1 μ l를 加하고, 다시 3 μ l 2.5mM dNTPs, 3 μ l 10 \times PCR buffer(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂), 그리고 0.18 μ l Taq polymerase (5U/ μ l)를 添加한 후 最終 부피가 30 μ l가 되도록 滅菌蒸溜水를 加하고 predenaturation은 95 $^{\circ}$ C에서 5分 동안, denaturation은 95 $^{\circ}$ C에서 5分 동안(2 cycle부터 25 cycle까지는 1分), annealing은 55 $^{\circ}$ C에서 1分 동안, elongation은 72 $^{\circ}$ C에서 1分 동안 수행하는 것을 25 cycles한 뒤 postelongation을 72 $^{\circ}$ C에서 3分 동안의 조건으로 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 20 μ l씩 1.2% agarose gel에 loading하여 120V 조건에서 20分間 전기영동을 통하여 分析하였다

Oligonucleotide의 鹽基配列은 다음과 같다

IL-1 β	sense oligonucleotide	5'-CCTCTTCTTGAGCTTCAAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-AGCCCATGAGTTTCATTCAC-3'
IL-6	sense oligonucleotide	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'
IL-8	sense oligonucleotide	5'-GCAGCTCTGTGTGAAGTGCAG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GCATCTGGCAACCTACAACAG-3'
IL-10	sense oligonucleotide	5'-GCAGCTCTGTGTGAAGTGCAG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GCATCTGGCAACCTACAACAG-3'
GM-CSF	sense oligonucleotide	5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'
IL-18	sense oligonucleotide	5'-GGCTCACAGGCTCTGTTGGTT-3'
	antisense oligonucleotide	5'-TOGTGAACACTGCTGAAAGTG-3'
TNF- α	sense oligonucleotide	5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'
TGF- β	sense oligonucleotide	5'-GGCTCACAGGCTCTGTTGGTT-3'
	antisense oligonucleotide	5'-TOGTGAACACTGCTGAAAGTG-3'
NOS-II	sense oligonucleotide	5'-COGTCGATAGTGGCATCCATGAAAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-GGACCAATAOCTGCTATAGGG-3'
β -actin	sense oligonucleotide	5'-TGGAACTOCTGTGGTCCATGAAAC-3'
	antisense oligonucleotide	5'-TAAACCGCAGCTCAGTAAACAGTCCG-3'

PCR product의 양은 Windows 1D main program(AAB, USA)을 이용하여 최고값(height, Ht)으로測定하였다.

(4) ELISA에 의한 싸이토카인 및 SOD測定

THP-1細胞를 實驗 3日前에 subculture(1×10^5 cells/ml)하여 12 well plate에 2×10^6 細胞를 각 well에 分柱한 후 우태아혈청결핍 RPMI-640 培養液으로 overnight시켰다. 100, 10, 1 μ g/ml 濃度の 澤瀉藥鍼液을 각각 處理하고, 1時間 후 TNF- α 를 100ng/ml씩 각각의 well에 添加하였다. 6時間 후 RPMI-1640 培養液으로 각 well을 洗滌한 후 새로운 培養液과 澤瀉藥鍼液을 處理하고 48時間 동안 CO₂ 組織培養器에서 培養하였다. 培養이 終了된 후에 全體 培養液을 2,000rpm으로 5時間 遠心分離하여 上騰液을 回收하여, IL-1 β 는 ELISA(enzyme-linked immuno-sorbent assay) kit(Endogen), GM-CSF와 TNF- α 는 ELISA kit(R&D system)으로 生産量을 測定하였다.

SOD는 spectrophotometer를 525nm에서 zero를 잡고 각 blank와 sample tube에 900 μ l의 buffer를 넣었다. 그리고 40 μ l의 培養 上層液을 넣고, 다시 SOD kit의 R2 溶液 30 μ l를 추가한 후 vortex 하고 37 $^{\circ}$ C에서 1時間 培養한 후 다시 R1 溶液 30 μ l를 넣고, 짧게 vortex 하고 즉시 1時間 time scan 吸光度를 測定하였다.

(5) Western blots

① 細胞性 蛋白質 抽出

THP-1細胞에 100, 10, 1 μ g/ml 濃度の 澤瀉藥鍼液을 각각 處理하고, 1時間 후 100ng/ml의 hr TNF- α 와 24時間 동안 同時 培養한 후 3회 PBS로 細胞를 水洗하였다. 細胞性 lysate를 얻기 위하여 50 μ l의 lysis 완충용액{Tris-HCl(200mM ; pH 8.0), 150mM NaCl, 0.5%(v/v) Nonidet P-40, 0.1mM EGTA, 1mM PMSF, 0.1 mM DTT, 10 μ g/ml leupetin}을 混合한 후 얼음에서 30時間 培養하고 5分

間 遠心分離하여 細胞性 lysate를 얻어 Bradford 染色法으로 蛋白質定量하여 50 μ g으로 調整하였다.

② 細胞性 Cu/Zn-SOD의 immunoblotting 分析

細胞性 lysate(50 μ g)를 12% SDS-PAGE gel에 걸고 PDVF membrane에 轉移시켰다. 2% BSA로 2時間 blocking한 후 anti-p38 antibody(22C11)를 處理하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight시켰다. 그리고 anti-human Ig HRP-conjugated sceondary Ab(1 : 4000)와 反應시킨 후 ECL-Hybond film으로 immunoblotting을 하여 分析하였다.

(6) Electromobility shift assay(EMSA)

① 細胞培養 및 澤瀉藥鍼液處理

THP-1細胞柱를 6 well plate의 각 well에 1×10^7 細胞씩 分柱하고, 우태아혈청결핍 RPMI-1640 培養液으로 overnight하였다. 100, 10, 1 μ g/ml 濃度の 澤瀉藥鍼液을 각각 處理하고, 1時間 후 100 ng/ml의 hrTNF- α (PharMingen)와 4時間 동안 同時 培養한 후 3회 PBS로 細胞를 水洗하였다.

② nuclear extract

培養한 細胞를 4 $^{\circ}$ C에서 1,200rpm으로 10時間 遠心分離하여 上層液을 除去한 후 生理食鹽水로 水洗하였다. 이 細胞에 3배 부피의 완충용액 A(10mM HEPES, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, pH7.8)를 첨가하고 얼음에 10時間 放置한 후 2,000rpm으로 10時間 遠心分離하여 上層液을 除去하고 다시 완충용액 A를 加하고 0.1%濃도가 되도록 NP-40을 添加하고, Dounce homogenizer B pestle을 이용하여 細胞를 磨碎하여 均質化하고 4 $^{\circ}$ C에서 2,000rpm으로 10時間 遠心分離하여 上層液을 除去하였다. 이 細胞에 완충용액 C(20 mM HEPES, 25% Glycerol, 0.35mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, pH7.9)를 2.5ml 添加하고, 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 rpm으로 1時間 동안 遠心分離한 후 上騰液을 回收하여 18時間 50배 부피의 완충용액 D(20mM HE

PES, 20% glycerol, 0.2M KCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, pH7.9)에서透析하였다.透析된試料를 4℃에서 12,000rpm으로 1時間遠心分離한 후 上騰液만을回收하였다.

③ Gel mobility shift assay

EMSA를 위한 gel shift oligonucleotide 鹽基配列은 다음과 같다.

NF- κ B : 5'-GGCAACTGCTCACTCTCCC
TTT-3'

AP-1 : 5'-TGACTCA-3'

NF- κ B와 AP-1을 α^{32} P-ATP와 klenow 酵素를 사용하여 3'-end를 채우고, 5'-end를 labelling하여 probes로 사용하였다. DNA와 核蛋白質과의 結合反應은 20 μ g의 nuclear extract, 2 μ g의 poly (dl-dC)가 들어있는 反應液(10mM Tris-Cl, pH 8.0, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 2mM DTT, 250 μ g/ml BSA)에 competitor를 添加하지 않고 얼음 위에서 30分間 反應시키고 미리 준비한 각각의 labelled-probe들(0.5~1.0ng, 100,000~2,000,000cpm)을 添加한 후 다시 30分間 얼음 위에서 反應시켰다. 6% polyacrylamide gel을 20分間 prerun을 하여 反應液을 loading 한 후, 150V, 10mA로 3時間 동안 전기영동을 하였다. Bromophenol blue(BPB) dye가 밑으로부터 1~2cm 정도 까지 移動하게 되면 전기영동을 멈추고 이를 vacuum gel dryer에서 약 한 時間 건조한 후 X-ray film에 露出시켜 感光시켰다.

(7) THP-1 細胞 增殖 抑制 測定

hrTNF- α (R&D system) 등을 處理한 THP-1 細胞의 增殖抑制程度를 測定하기 위하여 96 well plate의 각 well에 2 \times 10⁶ 細胞씩 添加하고, 100, 10, 1 μ g/ml의 澤瀉藥碱液과 hrTNF- α 를 濃度別로 處理한 후 細胞를 37℃에서 40時間 培養 후 50 μ Ci/ml의 [methyl-3H] thymidine을 添加한 후 最終

48시간 培養하였다. 細胞內로 吸收된 방사선 동위원소의 양을 測定하기 위하여 細胞만을 細胞收集器를 사용하여 유리섬유 濾紙위에 포획하고, 乾燥한 후 방사선 측정기를 이용하여 방사선 동위원소의 양을 測定하였다.

(8) Nitric oxide(NO) 生成量 測定

NO生成量を 測定하기 위한 試藥인 Griess 試藥²⁷⁾은 溶液A(0.2% Naphthylethylene diamine dihydrochloride in D.W.)와 溶液 B(2% Sulfonylamide in 5% H₃PO₄)를 製造하고 冷暗所에 保管하며, 使用 直前に 두 溶液을 1:1로 混合하여 混合溶液을 사용하였다. hrTNF- α (R&D system) 등을 處理한 THP-1 細胞內의 NO를 測定하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5 \times 10⁵ 細胞씩 添加하고, 100, 10, 1 μ g/ml의 澤瀉藥碱液과 hrTNF- α 를 각각 處理한 후 細胞를 37℃에서 48時間 培養하였다. 培養이 終了된 후 培養 上層液 100 μ l를 96 well plate에 分柱하고 다시 混合溶液 100 μ l를 分柱한 뒤 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 吸光度를 測定하였고, 표준검량곡선은 Sodium Nitrite를 0~80 μ M사에서 測定하였다.

(9) 細胞內 reactive oxygen species(ROS)의 分析

hrTNF- α (R&D system) 등을 處理한 THP-1 細胞內의 ROS를 測定하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5 \times 10⁵ 細胞씩 添加하고, 100, 10, 1 μ g/ml의 澤瀉藥碱液과 hrTNF- α 를 濃度別로 處理한 후 細胞를 37℃에서 48時間 培養하였다. 培養이 終了된 후 DCFH-DA 50 μ M을 處理하고 5分間 培養하고 2回 水洗한 후 flow cytometer로 細胞內 螢光 DCF 또는 ROS를 測定하였다.

2) In vivo

(1) 藥碱液 注入 및 抗酸化 모델 誘發

환취 10마리를 각 群으로 하여 正常群, 對照群,

ascorbic acid 投與群, 10% 및 20% 澤瀉藥錠群으로 區分하여 藥錠群에는 7日間 1日 1回, 0.2ml의 澤瀉藥錠液을 足三里(S36)²⁵⁾에 藥錠하고, 모든 群에 AAPH (50mg/kg)를 藥錠液 注入 終了 후 腹腔에 注射하였다.

(2) 白血球, 赤血球, 血色素, 血小板數 測定

흰쥐에 AAPH 注射 60分 후 ethyl ether로 麻醉한 후 心臟採血法으로 10ml의 血液을 採血하였다. 그중 2ml는 CBC bottle에 넣어 白血球數, 赤血球數, 血小板數의 測定에 使用하였고, 나머지 8ml의 血液은 血清分離에 使用하였다.

① 白血球數 測定

白血球數는 心臟穿刺法으로 採血한 血液을 자동혈구측정기로 Fonio法²⁸⁾에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

② 赤血球數 및 血色素數 測定

赤血球數 및 血色素數를 Fonio法²⁸⁾에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

③ 血小板數 測定

血小板數를 Fonio法²⁸⁾에 準하여 Minos-ST로 測定하였다.

(3) 血漿 및 血清成分의 測定

① 血漿成分 測定

Heparin處理된 CBC bottle에 血液을 分離하여 血漿을 얻었다. 血漿중 albumin, total bilirubin, uric acid의 含量 測定은 Biuret法²⁹⁾에 準하여 自動生化學分析器(Cheical analyzer)로 測定하였다.

② 血清成分의 測定

血清중 LDL cholesterol, creatinine, glucose는 Talke-Schubert法³⁰⁾에 準하여 自動生化學分析器를 使用하여 測定하였다.

③ 인터루킨-1베타(IL-1 β) 및 인터페론 감마(IFN- γ) 測定

IL-1 β 와 IFN- γ 는 ELISA kit(Pharmingen)로 흰쥐의 血清에서 分泌量을 測定하였다. 각각의 흰쥐

血清을 well plate에 100 μ l씩 分柱하였다. 1時間 동안 室溫에서 放置한 후 2回 washing 완충용액으로 洗滌한 후 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 處理하고, 1時間 동안 室溫에서 放置한 후 다시 洗滌하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 分柱하고 暗所에서 30分間 放置한 후 50 μ l의 stop 溶液을 處理한 후 ELISA reader로 450nm에서 吸光度를 測定하였다.

④ 赤血球膜의 活性酸素에 대한 耐性 比較

Niki등의 方法³¹⁾에 따라 흰쥐의 血液을 시험관에 넣고 10mM potassium phosphate buffered saline (pH7.4, PBS)溶液을 添加하여 遠心分離(1,400rpm, 10分)하였다. 3回 反復하여 血液을 洗滌한 후 20% RBC 溶液 1ml를 넣고 50mM AAPH 溶液 1ml를 添加하여 37 $^{\circ}$ C에서 3時間 동안 培養하였다. 이 溶液을 50 μ l를 取하여 2ml saline溶液에 넣은 것을 A溶液이라 하고, 또 50 μ l를 取하여 2ml 蒸溜水에 넣은 것을 B溶液이라 하였다. 각각의 두 溶液을 잘 混合한 후 540nm에서 吸光度를 測定하였다. 그리고 (A溶液의 吸光度 / B溶液의 吸光度) \times 100(%)을 hemolysis value로 計算하였다.

⑤ 脂質過酸化度 測定(TBA測定)

TBA測定은 Suematsu등의 方法³²⁾에 따라 clean test tube에 血清 200 μ l를 넣고, 8.1% sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225 μ l를 加하고 5秒間 vortex mixer로 mixing하였다. 20% acetic acid 1.5ml를 加하고 75 μ l 蒸溜水를 넣고 5秒間 vortex mixer로 mixing하였다. 1.2% thiobarbituric acid solution을 각각 1ml씩 tube에 더하고, clean dry marble(유리구슬)로 cover한 후, 30分間 water bath에서 끓였다. 그리고 室溫에서 30分間 cooling한 후에 3,000rpm으로 20分間 遠心分離하여 上層液을 實驗에 使用하였다. 532nm에서 吸光度를 測定하였다.

(4) 肝의 異物質代謝系 活性 測定

① 肝 組織의 分割

肝을 摘出하여 30mM HEPE 완충용액에 넣어 -84℃ bio-freezer에 保管하였다가 Bansal 등의 方法³³⁾에 따라 摘出した 흰쥐의 肝을 잘게 썰고 4배의 150mM KCl을 含有한 30mM HEPES 완충액(pH 7.4)으로 稀釋하여 均質化한 후, 遠心分離管에 넣고 1차 遠心分離(700×g, 20分)하였다. 그 上騰液을 遠心分離管에 取하고 2차 高速遠心分離(11,000×g, 30分)하여 2차 上騰液을 取하여 다시 3차 超高速遠心分離(105,000×g, 60分)하고 그 3차 上騰液으로 細胞質 分割을 얻었다. 그리고 105,000×g pellet은 130mM KCl 含有 HEPES 완충액으로 씻어낸 후, 다시 超高速遠心分離(105,000×g, 60分)하고 얻은 pellet을 같은 완충액으로 再均質化하여 microsome 分割을 얻었다. Microsome과 細胞質 分割을 分離하는 全過程은 0~4℃ 低溫室에서 수행하였으며 -70℃에 保管 하면서 각종 實驗에 使用하였다.

② 蛋白質 定量

Bovine serum albumin(BSA)을 標準 物質로 使用하여 Lowry 등의 方法³⁴⁾에 따라 蛋白質 濃度を 決定하였다.

③ 肝의 抗酸化 活性 測定

㉠ Superoxide dismutase의 活性度 測定

이 酵素의 活性度 測定은 McCord 등의 方法³⁵⁾에 따라 xanthine과 xanthine oxidase의 존재하에 생성되는 superoxide anion이 cytochrome C의 환원을 抑制시키는 反應 原理를 利用하였다. 즉 3.0ml 용량의 cuvette에 0.1nm EDTA를 含有하는 50ml인 산염 완충액(pH7.8) 2.1ml와 0.5nm xanthine 0.3ml 및 0.1nm cytochrome C 0.3ml를 加한 후 cytochrome oxidase에 의한 환원형의 cytochrome의 再酸化를 막기 위해 反應液에 50 μM potassium cyanide 0.1ml를 加하였다. 反應液의 微粒子를 分解시키기 위하여 sodium deoxycholate(0.1mg/ml)를 0.1ml 넣어 0.033%가 되도록 하였다. 混合液을 잘 섞은 후 xanthine oxidase 0.1ml와 細胞質 分割

20μl를 添加한 후 550nm에서 吸光度의 增加率을 決定하였다. 吸光度 增加에 대한 基準은 xanthine oxidase의 濃度を 調節하여 吸光度 增加를 分當 0.021이 되도록 하였다.

㉡ Catalase 活性度 測定

Aebi의 方法³⁶⁾에 따라 3.0ml cuvette에 130nm 인산염 완충액(pH7.0) 500μl, 細胞質 分割 40μl, 蒸溜水 660μl와 基質인 15mM H₂O₂ 濃도에 의한 吸光度의 減少率을 測定하였다. 酵素의 活性도는 1分 동안에 1μM의 H₂O₂를 分解시키는 酵素의 量을 1 unit로 表示하였다.

3. 統計處理

結果는 mean±standard error로 기록하였다. 有意性 檢證은 Student's t-test³⁷⁾에 의해 判定하였다.

III. 成績

1. 細胞毒性 測定

mLFC에서 對照群은 100±2.7%이었고, 1, 10, 100 및 200μg/ml 澤瀉藥鍼處理群은 각각 99.5±3.4, 96.1±3.1, 97.5±2.4 및 91.3±2.5 %로 나타나 200μg/ml 澤瀉藥鍼處理群 以外の 모든 群에서 細胞毒性이 없었다.

THP-1 cell line에서는 對照群은 100±3.6%이었고, 1, 10, 100, 200μg/ml 澤瀉藥鍼處理群은 각각 98.3±3.3, 95.4±2.9, 94.8±3.5 및 93.2±4.0%로 모든 群에서 有意한 細胞毒性이 없었다.

2. Pro-inflammatory cytokines의 mRNA 發顯 測定

IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, NOS-II와 같

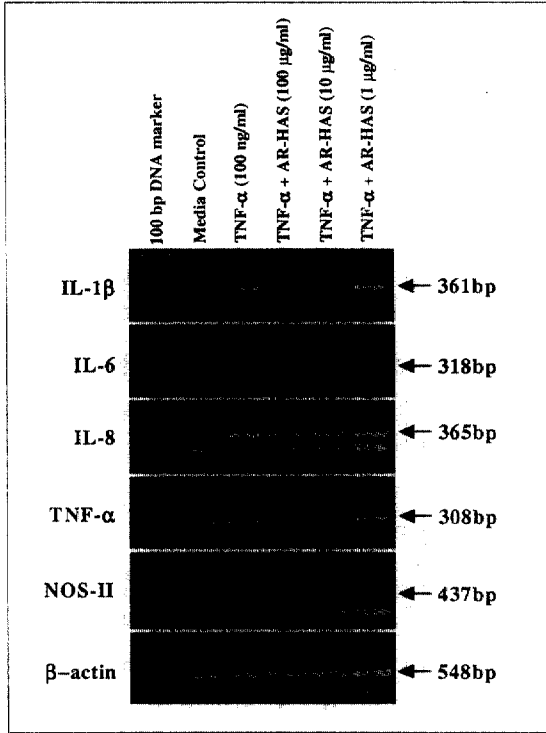


Fig. 1. The effects of AR-HAS on pro-inflammatory cytokines mRNA expression level in THP-1

Promonocytic leukemia cell line of THP-1 were pretreated with various concentration AR-HAS(100, 10, 1mg/ml) plus recombinant tumor necrosis factor- α (rTNF- α) for 6hrs respectively.

Amplified PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gel, and the analysis(Hit) was used to 1D-density program.

The other methods for assay were performed as described in *Materials and Methods*.

The gene expression were observed IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , NOS-II mRNA expression and internal control(β -actin).

은 Pro-inflammatory cytokines의 mRNA 發顯에 대하여 測定한 結果 <Fig. 1>과 같았다.

3. Antioxidants-like cytokines의 mRNA 發顯 測定

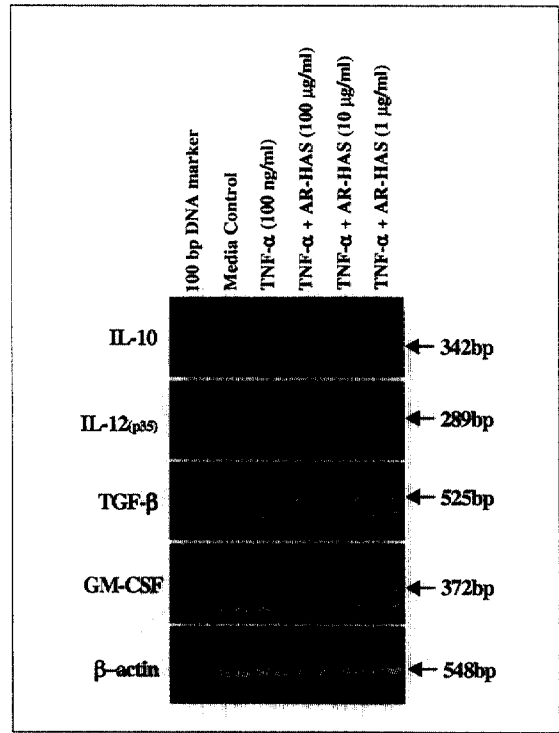


Fig 2. The effects of AR-HAS on antioxidants-like cytokines mRNA expression level in THP-1

IL-10, IL-12(p35), TGF- β , GM-CSF와 같은 Antioxidants-like cytokines의 mRNA 發顯에 대하여 測定한 結果 <Fig. 2>와 같았다.

4. Pro-inflammatory cytokines 生産量 測定

IL-1 β 의 生産量(pg/ml)은 rTNF- α 處理群에 비하여 100, 10, 1 μ g/ml의 澤瀉藥鍼處理群에서 有意하게 減少하였다<Table 1>.

TNF- α 의 生産量(pg/ml)은 rTNF- α 處理群에 비하여 100, 10 μ g/ml의 澤瀉藥鍼處理群에서 有意하게 減少하였다<Table 1>.

Table 1. The Effects of AR-HAS on pro-inflammatory cytokines production level in THP-1 cells culture supernatants

Group	AR-HAS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cytokines Production(pg/mL)	
		IL-1 β	TNF- α
Media	0	91 \pm 5.0	368 \pm 26.4
	0	359 \pm 20.1	799 \pm 55.1
rTNF- α (100 ng/mL)	100	164 \pm 14.6***	390 \pm 48.7***
	10	277 \pm 18.1**	593 \pm 44.5*
	1	339 \pm 31.5	776 \pm 67.4

Promonocytic leukemia cell line of THP-1 were pretreated with various concentration AR-HAS(100, 10, 1ng/mL) plus recombinant tumor necrosis factor-alpha (rTNF- α) for 6hrs respectively.

The supernatants were collected after 72 hrs cultured, and IL-1 β , TNF- α concentration in the culture supernatants were assayed by ELISA kit, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

The results are expressed the mean \pm S.E(N=10).

Statistically significant value compared with control group data by t-test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

5. Antioxidants protein과 cytokines 生産量 測定

GM-CSF의 生産量(pg/mL)은 rTNF- α 處理群에 비하여 모든 澤瀉藥鍼處理群에서 顯著하게 增加하였다<Table 2>.

SOD의 生産量(103U/mL)은 rTNF- α 處理群에 비하여 모든 澤瀉藥鍼處理群에서 有意하게 增加하였다<Table 2>.

6. SOD protein activity 測定

澤瀉藥鍼液을 處理한 實驗群에서 SOD protein activity가 增加하였다<Fig. 3>.

7. NF- κ B와 AP-1의 DNA-binding 活性 測定

Table 2. The Effects of AR-HAS on anti-oxidants protein and cytokines production level in THP-1 cells culture supernatants

Group	AR-HAS ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Anti-oxidants cytokine and protein production	
		GM-CSF (pg/mL)	SOD (10 ³ U/mL)
Media	0	26 \pm 2.8	2.72 \pm 0.05
	0	33 \pm 2.5	2.98 \pm 0.08
rTNF- α (100 ng/mL)	100	180 \pm 14.7***	4.88 \pm 0.25***
	10	272 \pm 11.3***	4.97 \pm 0.43***
	1	104 \pm 6.9***	3.25 \pm 0.46*

Promonocytic leukemia cell line of THP-1 were pretreated with various concentration AR-HAS(100, 10, 1ng/mL) plus recombinant tumor necrosis factor-alpha (rTNF- α) for 6hrs respectively.

The supernatants were collected after 72 hrs cultured, and GM-CSF, superoxide dismutase(SOD) concentration in the culture supernatants were assayed by ELISA kit, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

The results are expressed the mean \pm S.E(N=10).

Statistically significant value compared with control group data by t-test(*p<0.05, ***p<0.001).

Statistically significant value compared with control group data by t-test(*p<0.05, ***p<0.001).

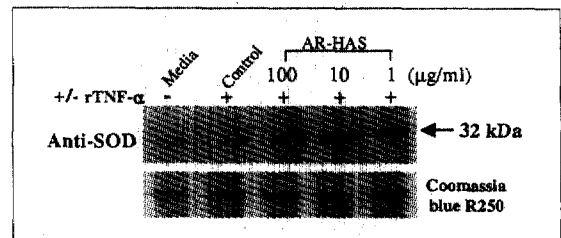


Fig 3. The effect of AR-HAS on the SOD protein in antioxidant enzyme production from rTNF- α stimulated THP-1 by Western blot analysis

SOD protein activity was measured by immune Western blot assay.

Cell lysate(50mg/lane) was separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred PDVF membranes.

Anti-SOD was analyzed by use of anti-phospho Ig-HRP.

Lane 1, RPMI-1640 media control was not treated

Lane 2, rTNF- α (100ng/mL) was control

Lane 3-5, rTNF- α plus AR-HAS(100, 10, 1ng/mL).

澤瀉藥鍼液을 處理한 實驗群에서 NF- κ B와 AP-1의 DNA-binding이 活性化 되는 것을 볼 수 있었다<Fig. 4>.

8. Reactive oxygen species 生成量에 測定
澤瀉藥鍼液을 處理한 群에서 ROS가 減少하여 正常群쪽으로 가까워지는 것을 볼 수 있었다<Fig. 5>.

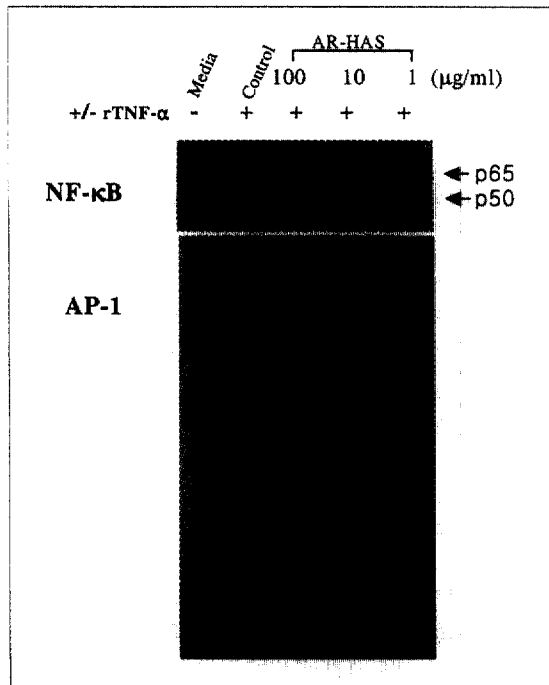


Fig 4. The effects of AR-HAS on DNA-binding activity of NF- κ B and AP-1 in THP-1

Human THP-1 were pretreated with various concentration AR-HAS(100, 10, 1mg/ml) in the presence or absence rTNF- α (100ng/ml) for 6 hrs.

Nuclear extracts from THP-1 were incubated with a 32P-labeled DNA probe and analyzed by 6% polyacrylamide gels.

Electrophoretic mobility shift assay by NF- κ B and AP-1 DNA-binding activity.

Lane 1, RPMI-1640 media control was not treated

Lane 2, rTNF- α (100ng/ml) was control

Lane 3-5, rTNF- α plus AR-HAS(100, 10, 1mg/ml).

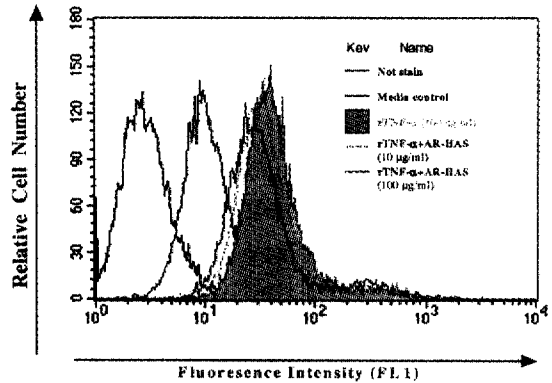


Fig 5. The effect of AR-HAS on the ROS production in THP-1 cell line

Human THP-1 were pretreated with various concentration AR-HAS in the presence or absence rTNF- α (100ng/ml) for 48 hrs.

After cultured, DCFH-DA reagent(50mM) treatment and the cells were harvested, and assayed for ROS production by flow cytometry, and the other methods for assay were performed as described in Materials and Methods.

Not stain ; not treated THP-1 group

Media control ; rTNF- α was treated

rTNF- α + AR-HAS(100mg/ml) ; rTNF- α plus AR-HAS(100mg/ml)

rTNF- α + AR-HAS(10mg/ml) ; rTNF- α plus AR-HAS(10mg/ml)

9. 血漿內 cytokine 生産量 測定

IL-1 β 의 生産量(pg/ml)은 20% 澤瀉藥鍼群에서 有意하게 減少하였다<Table 3>.

IFN- γ 의 生産量(pg/ml)은 모든 澤瀉藥鍼群에서 有意하게 增加하였다<Table 3>.

10. 活性酸素에 대한 赤血球膜의 耐性 測定

모든 澤瀉藥鍼群에서는 有意하게 增加하였다.<Table 4>.

11. 血漿內 MDA 測定

血漿內 MDA(μg/ml)는 20% 澤瀉藥鍼群에서 有意

하게 減少하였다<Table 5>.

Table 3. The effects of AR-HAS on serum of cytokine production level in rats treated with AAPH

Group	Animal No.	Cytokine Production (pg/ml)	
		IL-1 β	IFN- γ
Normal	10	32 \pm 4.2	55 \pm 2.4
Control	10	138 \pm 5.7	43 \pm 2.8
Ascorbic acid	10	86 \pm 3.3***	121 \pm 7.5***
AR-HAS(20%)	10	105 \pm 6.9**	74 \pm 3.6***
AR-HAS(10%)	10	127 \pm 5.7	57 \pm 2.3**

Alismatis Rhizoma herbal acupuncture solution(AR-HAS) was subjected to intrathecal(i.t) injection on S36 point of SD rats for 7days.

Data represent means \pm S. E(N=10).

Normal ; not treated

Control ; injected AAPH(50mg/kg i.p)

Ascorbic acid ; ascorbic acid plus injected AAPH(50 mg/kg i.p)

20% AR-HAS ; 20% AR-HAS plus injected AAPH (50mg/kg i.p)

10% AR-HAS ; 10% AR-HAS plus injected AAPH (50mg/kg i.p)

Data was analyzed for serum IL-1 β and IFN- γ level was assayed by ELISA kit. as described in *Material and Methods*.

Statistically significant value compared with control group data by t-test(**p<0.01, ***p<0.001).

Table 4. The effects of AR-HAS on the resistance of RBC membrane against oxidative stress in rats serum induced by AAPH

Group	Normal	Control	Ascorbic acid	AR-HAS (20%)	AR-HAS (10%)
RBC lysis value (%)	344 \pm 2.7	237 \pm 7.3	299 \pm 14.8***	283 \pm 4.9***	265 \pm 3.9**

Statistically significant value compared with control group data by t-test(**p<0.01, ***p<0.001).

Table 5. The effects of AR-HAS on the formation of malondialdehyde in rats serum induced by AAPH

Group	Normal	Control	Ascorbic acid	AR-HAS (20%)	AR-HAS (10%)
MDA (μ g/ml)	114 \pm 6.8	280 \pm 25.1	152 \pm 9.8***	201 \pm 16.4*	278 \pm 20.0

Statistically significant value compared with control group data by t-test(*p<0.05, ***p<0.001).

Table 6. The effects of AR-HAS on the antioxidant enzymes activities in rat liver treated with AAPH

Group	SOD (103U/ml)	Catalase (U/mg/min)
Normal	4.22 \pm 0.19	355 \pm 21.5
Control	4.07 \pm 0.56	108 \pm 18.9
Ascorbic acid	8.97 \pm 0.74***	156 \pm 14.7*
AR-HAS (20%)	8.54 \pm 0.86***	136 \pm 11.7
AR-HAS (10%)	5.67 \pm 0.68*	121 \pm 17.2

Statistically significant value compared with control group data by t-test(*p<0.05, ***p<0.001).

12. Antioxidants enzymes活性 測定

SOD(103U/ml)는 모든 澤瀉藥鍼群에서 有意하게 增加하였다<Table 6>.

Catalase(U/mg/min)는 모든 澤瀉藥鍼群에서 有意한 變化를 나타내지 않았다<Table 6>.

IV. 考 察

여러가지 老化에 대한 理論中 Harman⁷⁾에 의하여 提唱되어 最近 擡頭되고 있는 學說은 遊離基 理論⁶⁾⁻¹⁰⁾이다. 遊離基 理論은 이 理論에 立脚하여 實

施된 老化된 個體에서의 酸化의 損傷을 찾는 研究 들과 分子生物學의 技法을 利用한 遺傳子實驗에서 얻어진 結果들^{11)-13),38)}에 의하여 注目받고 있다.

人體內에는 活性酸素의 毒性으로부터 組織을 保護하고 恒常性을 維持하려는 防禦役割의 抗酸化系인 SOD와 catalase가 存在한다⁷⁾. 防禦機轉⁸⁾은 活性酸素의 發生을 抑制하는 機能과 生成된 活性酸素들을 除去하는 機能이 있다. 이는 SOD와 catalase가 老化의 遲延에 關與될 수 있으며, oxidative stress가 老化의 重要한 原因이라는 것을 나타내기도 한다.

本 實驗에서 생쥐 肝에서의 SOD와 catalase의 活性度를 測定하여 본 結果 SOD의 活性은 增加하였으나, catalase는 變化를 나타내지 않았으며, 上 臍腺에서의 SOD와 THP-1 細胞柱를 cell lysate 하여 細胞內部에 存在하는 SOD의 活性을 測定한 結果 增加한 것을 알 수 있었다. 이는 澤瀉藥鍼液이 생쥐 肝의 異物質代謝系에서 SOD를 增加시킬 수 있으며, 細胞質에 存在하는 Cu/Zn-SOD와 미 토콘드리아에 存在하는 Mn-SOD의 活性에도 影響을 미치는 것은 細胞內部에까지 作用을 하여 SOD를 活性化시키는 效果가 있는 것으로 思慮된다.

單核球의 分化를 抑制함으로써 活性酸素의 發生을 抑制할 수 있는데 本 實驗에서는 澤瀉藥鍼液이 THP-1 細胞柱의 分化를 強力하게 抑制하여 活性酸素의 生成을 抑制하여 抗酸化作用에 關與할 수 있음을 알 수 있었다.

脂質過酸化의 過程을 통해 細胞膜을 堅固하게 함으로써 柔軟性이 減少되어 細胞膜이 쉽게 破壞될 수 있는데, 本 實驗에서 血漿內 MDA 形成과 活性酸素에 대한 赤血球膜의 耐性을 測定한 結果 MDA의 形成이 澤瀉藥鍼液에 의해서 減少되었고, 赤血球膜의 耐性은 增加한 것을 알 수 있었다. 이것은 澤瀉藥鍼液이 脂質過酸化의 最終物質인 MDA의 生成을 抑制시키고, 脂質過酸化에 의한 赤血球膜의

變成을 防禦하는 機能이 있음으로서 抗酸化作用이 있음을 알 수 있었다.

生體內에는 脂質過酸化 反應을 促進하는 因子로서 가장 重要한 活性酸素種(Reactive oxygen species : ROS)이 存在한다. 이러한 遊離基들은 酸素의 減少로부터 에너지를 導出해내는 好氣性 機關들의 酸素代謝 동안에, 특히 미토콘드리아의 電子 傳達體系에 의한 酸素의 感受에서 不可避하게 形成되어 지는 적은 量의 O_2^- , OH, H_2O_2 에 의해 損傷을 일으키기 쉽다. 本 實驗에서 澤瀉藥鍼液이 ROS의 生成에 미치는 效果를 測定하여 본 結果 澤瀉藥鍼液을 處理한 群에서는 THP-1 細胞柱에서의 ROS의 生成이 적어진 것을 볼 수 있었다.

NO는 病理的 血管擴張, 細胞毒性, 組織損傷 등 生體에 有害한 作用을 나타내고, 炎症狀態에서 血管 透過性, 浮腫 등 炎症反應을 促進시키는 것으로 알려져 있다. 本 實驗에서 NO 生成抑制 效果를 測定한 結果 澤瀉藥鍼液處理群에서 減少를 나타내어 NO 生成抑制 效果가 있는 것을 알 수 있었다.

GM-CSF의 分泌 및 生成은 免疫細胞의 成長 및 分化過程에서 細胞內의 遺傳子 發顯 programming과 細胞外部로부터의 刺戟에 의해 決定되어 진다. 本 實驗에서 GM-CSF의 THP-1 細胞에서의 生産量에 대하여 測定한 結果 增加되었고, mRNA 發顯도 增加되었다. 以上の 結果를 볼 때 澤瀉藥鍼液은 GM-CSF의 mRNA 發顯과 細胞內에서의 生産量을 增加시킴으로서 抗酸化作用에 影響을 미치는 것을 알 수 있었다.

IFN- γ 는 大食細胞의 活性化에 關與하며, macrophage scavenger receptor의 發顯과 活性을 抑制시키는 機能을 가지고 있다고 알려져 있다¹²⁾. 本 實驗에서도 澤瀉藥鍼液은 생쥐 血漿內의 IFN- γ 産物을 增加시켜 抗酸化作用을 나타내는 것으로 나타났다.

IL-1 β 는 炎症과 免疫反應에 關系되는 細胞의

機能과 분화를促進시키며, ROI와 상관없이 傳寫因子인 NF- κ B의 活性를 誘導하며, 刺戟을 통해 Mn-SOD產物을 發顯시키는 機能을 가지고 있다¹¹⁾. IL-1 β 의 血漿과 THP-1 細胞內에서의 生産量은 澤瀉藥鍼液에 의해 減少되었다. 또한 mRNA 發顯도 顯著하게 減少되는 것으로 나타났다.

TNF- α 는 大食細胞에서 주로 分泌되고 活性酸素를 生成²³⁾시킨다. 本 實驗에서 THP-1 細胞의 培養液 上層液에서의 TNF- α 의 生産量은 澤瀉藥鍼液에 의해 減少하였으며, mRNA發顯도 顯著하게 減少된 것으로 나타났다. 以上の 結果를 볼 때 澤瀉藥鍼液은 THP-1 細胞에서의 TNF- α 의 生産量과 mRNA의 發顯을 抑制함으로써 抗酸化 作用을 하는 것을 알 수 있었다.

Mn-SOD에 의한 抗酸化作用의 分子水準에서의 機轉을 理解하기 위해서는 細胞막의 刺戟을 細胞內部の 核에 傳達하는 transcription factor³⁸⁾에 대한 分析이 필요하므로, 本 實驗에서는 澤瀉藥鍼液이 antioxidant enzyme를 活性化할 때 細胞內部의 信號傳達에 있어 어느 部位에서 作用하는지 알아보기 위해 NF- κ B, AP-1의 DNA-binding 活性에 대하여 觀察하였다. 本 實驗에서도 澤瀉藥鍼液이 NF- κ B와 AP-1의 DNA-binding 活性를 增加시킴으로써 細胞內의 核에서 일어나는 遺傳子傳寫에 影響을 미쳐 抗酸化作用이 나타나는 것으로 思慮된다.

以外에도 IL-6, IL-8, IL-10과 TGF- β 의 mRNA發顯效果를 살펴본 結果 pro-inflammatory cytokines의 mRNA發顯은 減少되고, anti-oxidants-like cytokines의 mRNA 發顯은 增加되었다. 이는 細胞內部인 核에서 일어나는 mRNA 傳寫過程에 澤瀉藥鍼液이 影響을 미쳐 抗酸化 過程에 作用하는 것이며, mRNA 發顯에 대한 經路는 NF- κ B와 AP-1과 같은 transcription factor를 調節함으로써 수행되어지는 것으로 思慮된다.

以上の 結果를 綜合하면 澤瀉藥鍼液은 THP-1 cell line에서의 IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , NOS-II와 같은 pro-inflammatory cytokines의 mRNA 發顯을 抑制하고, IL-10, IL-12(p35), TGF- β , GM-CSF와 같은 antioxidants-like cytokines의 mRNA發顯은 增加시켰다.

IL-1 β 와 TNF- α 같은 pro-inflammatory cytokines의 生産量은 減少시키고, GM-CSF와 SOD 같은 antioxidants protein과 cytokines의 生産量을 增加시키고, SOD protein의 activity를 增加시켰으며, THP-1 cell line에서 NF- κ B와 AP-1과 같은 transcription factor의 DNA-binding을 活性化시켰다. 이러한 結果는 澤瀉藥鍼液이 細胞內部的 核에서 일어나는 遺傳子傳寫에까지 影響을 미치는 것으로 思慮된다.

THP-1 細胞柱의 分化를 抑制하여 活性酸素의 生成을 防止하였고, NO와 ROS의 生成을 減少시켰다.

血漿內의 cytokine인 IL-1 β 는 減少시키고, IFN- γ 는 增加시키며, 活性酸素에 대한 赤血球膜의 耐性を 增加시켜 細胞破壞를 抑制하는 것으로 나타났다. 以外에 血漿內의 MDA形成을 減少시키고, 생쥐 肝의 異物質代謝系에서 antioxidants enzyme인 SOD의 生産을 增加시킴으로써 抗酸化 效果를 增加시키는 것으로 나타났다.

앞으로 이러한 澤瀉藥鍼의 細胞水準에서의 正確한 機轉에 대한 研究가 더욱 必要할 것으로 思慮된다.

V. 結 論

澤瀉의 抗酸化作用을 實驗적으로 立證하고자 人體의 THP-1 單核球 細胞에 PMA와 TNF- α 를

각각 處理하여 細胞의 分化 및 活性酸素를 誘發하여, 細胞의 分化 및 活性化에 따라 惹起되는 細胞內 여러가지 變化 중 抗酸化系 酵素들의 調節에 重點을 두어 施行하였고, SD系 생쥐에 AAPH를 腹腔에 注入하여 實驗的 急性酸化症을 誘發시킨 후 足三里(S36)에 澤瀉藥鍼하고 血液成分의 變化, 赤血球膜의 活性酸素에 대한 耐性, MDA, SOD 및 catalase를 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

In vitro

1. 澤瀉藥鍼液은 200 μ g/ml의 澤瀉藥鍼處理群을 除外한 모든 群에서 細胞毒性이 없었다.

2. IL-1 β , IL-8, TNF- α 및 NOS-II의 mRNA發顯은 對照群에 비하여 모든 澤瀉藥鍼處理群에서 減少하였고, IL-6의 mRNA發顯은 10 μ g/ml의 澤瀉藥鍼處理群을 除外한 모든 群에서 對照群에 비하여 減少하였다.

3. IL-10, TGF- β 및 GM-CSF의 mRNA發顯은 모든 澤瀉藥鍼處理群에서 對照群에 비하여 增加하였고, IL-12(p35)mRNA發顯은 1 μ g/ml의 澤瀉藥鍼處理群을 除外한 모든 群에서 對照群에 비하여 增加하였다.

4. IL-1 β 와 TNF- α 의 生産量은 100, 10 μ g/ml의 澤瀉藥鍼處理群에서 對照群에 비하여 有意하게 減少하였다.

5. GM-CSF와 SOD의 生産量은 모든 澤瀉藥鍼處理群에서 對照群에 비하여 有意하게 增加하였다.

6. THP-1 cell line에서의 SOD protein activity는 모든 澤瀉藥鍼處理群에서 對照群에 비하여 增加하였다.

7. NF- κ B와 AP-1의 DNA-binding이 澤瀉藥鍼液에 의해 活性化되었다.

8. THP-1 cell line에서 澤瀉藥鍼液이 ROS의 生成을 減少시켰다.

In vivo

9. 血漿內 cytokine 生産中 IL-1 β 는 20% 澤瀉藥鍼群에서 對照群에 비하여 有意하게 減少하였고, IFN- γ 는 모든 澤瀉藥鍼群에서 對照群에 비하여 有意하게 增加하였다.

10. 活性酸素에 대한 赤血球膜의 耐性は 모든 澤瀉藥鍼群에서 對照群에 비하여 有意하게 增加하였다.

11. MDA 形成은 20% 澤瀉藥鍼群에서 對照群에 비하여 有意하게 減少하였다.

12. 肝 抗酸化酵素 活性에서 SOD는 모든 澤瀉藥鍼群에서 對照群에 비하여 有意하게 增加하였고, catalase는 有意性 있는 變化를 나타내지 않았다.

VI. 참고문헌

1. 白上龍 : 老化에 對한 研究(黃帝內經을 中心으로), 慶熙韓醫大論文集, 22(1) : 107~118, 1999.
2. 배철영 : 노인병의학의 소개, Family Physician, 11(2) : 1~6, 1990.
3. 王其飛 外 : 中醫長壽學, 遼寧科學技術出版社, p.50,53,54, 1989.

4. 이충보 外 : 傳統老年醫學, 湖南省, 湖南科學技術出版社, pp.173~191, 1986.
5. 具本泓 外 : 東醫內科學, 서울, 書苑堂, p.313, 314, 1982.
6. 서순규 : 성인병 노인병학, 서울, 高麗醫學, pp. 10~14, 18~19, 1992.
7. Harman, D. : Free radical theory of aging : Role of free radicals in the organization and evolution of life, aging and disease process. Free Radicals, Aging and Degenerative Disease(ed. Johnson, J.E. et al.), Alan R. Liss. inc., New York, pp.3~49, 1986.
8. McCord J. M. and I. Fridovich, J. Biol. Chem., 244 : 6049, 1996.
9. Babior B. M. et al., J. Clin. Invest., 52 : 741, 1973.
10. Granger D. N. et al., Gastroenterology, 81 : 22, 1981.
11. Misao H., Saori S., Yoshiaki O. and Makoto A. : Endogenous production of tumor necrosis factor is required for manganese superoxide dismutase expression by irradiation in the human monocytic cell line THP-1, Biochem. J., p.328, pp.615~623, 1997.
12. Hsien-Yeh Hsu, Andrew C. Nicholson and David P. Hajjar : Inhibition of macrophage scavenger receptors activity by tumor necrosis factor- α is transcriptionally and post-transcriptionally regulated, J. Biol. Chem., 271(13) : 7767~7773, 1996.
13. Nancy Gertzberg, Richard Clements, Ilona Jaspers, Thomas J. Ferro, Paul Neumann, Elizer Flescher and Arnold Johnson : Tumor necrosis factor- α -induced activating protein-1 activity is modulated by nitric oxide-mediated protein kinase G activation, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 22 : 105~115, 2000.
14. 金永海 外 : 胡桃 藥鍼液의 抗酸化 效果에 대한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(2) : 9~20, 1996.
15. 文振榮 外 : 當歸藥鍼液의 抗酸化 效能에 關한 研究(II), 大韓鍼灸學會誌, 14(1) : 383~396, 1997.
16. 申億燮 外 : 鹿茸 藥鍼 製劑가 흰쥐 腎臟 組織의 抗酸化 作用에 미치는 影響, 韓國韓醫學研究院論文集, 2(1) : 192~204, 1996.
17. 朴涌基 外 : 補骨脂의 抗酸化作用에 關한 研究, 大韓本草學會誌, 11(2) : 101~114, 1996.
18. 金聖勳, 曹永周 : 高麗人蔘·高麗紅蔘 및 total saponin의 抗酸化 作用, 東醫病理學會誌, 12(1) : 72~81, 1998.
19. 이종원 外 : 홍삼으로부터 분리한 수용성 갈변 물질의 기능성 연구 2. Linoleic acid, Ox-brain autoxidant 및 Fe²⁺ ADP/NADP system에서 抗酸化 活性 中心으로, J. Gienseng Res., 24(1) : 35~40, 2000.
20. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.252~253, 1986.
21. 李尙仁 : 本草學, 서울, 學林社, pp.285~286, 1986.
22. 姜秉秀 外 : 本草學, 서울, 永林社, pp.305~306, 1991.
23. 김은지, 강신성, 이영섭 : 단핵구 세포분화에 따른 항산화계 효소의 조절, Korean J. Immunol., 19 : 121~127, 1997.
24. 임홍빈, 이동욱, 조성희 : 흰쥐의 혈장 항산화 물질들에 대한 2,2-azobis(2-amidino-propane) hydrochloride의 영향, Kor. J. Ger-

- ontol., 3(2) : 68~74, 1993.
25. 崔容泰 外 : 鍼灸學(上), 서울, 集文堂, pp.382~384, 1991.
 26. 주영승 外 : 九仙王道糕가 前脂肪細胞 3T3-L 1의 增殖, 抗補體活性 및 細胞毒性에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 20(3) : pp.105~114, 1999.
 27. Griess S. S., E. A. Jaffe, R. Levi and R. G. Kilbourn : Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide sythease which of tetrahydrobiopterin-dependent calmodium-independent of activated macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 178 : 823~829, 1991.
 28. Hoffler U., Oette K. : Comparative studies on four thrombocyte counting methods : counting in the smear preparation after Fonio, chamber counting in the phase contrast microscope, counting with the Coulter Thrombocounter, and the Technicon Auto-Counter, *Z Klin Chem Klin Biochem*, 12(5) : 198~206, 1974.
 29. Biurret G., and Kingsely. G. J., *Lab. chin. Med.*, 21 : 840~845. 1942.
 30. Talke, H., and Schubert. G. E., *Klin. uschr.*, 43, 1965.
 31. Niki E., Komuro E., Takahashi M., Urano S., Ito E. and Terao K. : Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers, *J. Biol. Chem.*, 263 : 19809~19814, 1988.
 32. Suematsu T., Kamada T., Abe H., Kikuchi S., and Yagi K. : Serum lipoperoxide levels in patients suppering from liver disease, *Clin. Chem. Acta.*, 79 : 267~770, 1977.
 33. Bansal S. K., Love J. and Gurtoo H. L. : High pressure liquid chromatographic separation of multiple forms of cytochrome P-450, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117 : 268~274, 1983.
 34. Lowry O. H., Rosenberg N. J., Farr A. L. and Randall R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 : 265~275, 1951.
 35. McCord J. R., Colby M. D. and Fridovich I. : Superoxide dismutase, Enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, 231 : 6049~6055, 1972.
 36. Aebi H. : Catalase erythrocytaire, in : *Exposes Annuels de Biochamie Medicale*, 29 ieme serie, Masson & Cie(eds), Paris, pp.139~164, 1969.
 37. Danniell W. W. : A foundation for analysis in the health science, *Biotics*, pp.136~146, 1983.
 38. Gary S. Firestein and Anthony M. Manning : Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease, *Arthritis & Rheumatism*, 42(4) : 609~621, 1999.