

원저

H₂O₂로 유발된 뇌신경세포 상해에 대한 구진의 보호효과

안성훈 · 구성태 · 김선영 · 김경식 · 손인철

원광대학교 한의과대학 경혈학교실

Abstract

The protective effects of Moxi-tar on injury induced by H₂O₂ in C6-glioma

Ahn Sung-hun, Koo Sung-tae, Kim Sun-young, Kim Kyung-sik and Sohn In-cheul

Dept. of Meridian & Acupoint, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objective : This study was produced to examine the effects of moxibustion that had been played important role to traditional oriental medical treatment on disease. Recently, it was reported that moxi-tar which is generated in the process of moxibustion as burning combustibles decreased NO and iNOS generation in C6-glioma and RAW 264.7 cells in our lab.

Methods : C6-glioma cells were cultured in RPMI 1640 with FBS 10% in CO₂ incubator. To study the protective effects of moxi-tar, we observed cell viability, DPPH activity, SOD activity, catalase activity and cell morphology after injury with H₂O₂.

Results and Conclusions : Moxi-tar increased cell viability about twice as much as that of being injury by H₂O₂ (moxi-tar 40 μ g/ml, H₂O₂ 500 μ M). And the results of free radical scavenger activity(80 μ g/ml : 78.91 \pm 4.4%), SOD activity and catalase activity(80 μ g/ml : 21.6unit/mg protein) were

- 접수 : 2004년 3월 19일 · 수정 : 2004년 5월 15일 · 채택 : 2004년 5월 15일
· 교신저자 : 손인철, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 경혈학교실
Tel. 063-850-6448 Fax. 063-857-6458 E-mail : ichsohn@wonkwang.ac.kr

increased by moxi-tar as dose-dependent manner. So we concluded that the effects of moxibustion which is played important role in Oriental medicine, might be free radical scavenger effects induced by moxi-tar.

Conclusion : These results indicate that tBHP induces apoptosis through a lipid peroxidation-dependent mechanism and JS exerts the protective effect against the apoptosis by preventing peroxidation of membrane lipids.

Key words : Moxibustion, Moxi-tar, H₂O₂, oxidation, peroxidation

I. 緒 論

애구요법은 內經¹⁾ 異法方宜論에 北方者, 天地之所閉藏之域也. 其地高陵居. 風寒冰冽. 其民藥野處而乳食. 藏寒生滿病. 其治宜艾熯. 故艾熯者. 亦從北方來. 에서 알 수 있듯이 風寒邪에 의한 질병을 치료하는 한의학의 침구치료 수단으로 많이 사용되어 왔다.

최근에 艾灸療法의 치료작용을 증명하려는 많은 연구진의 노력은 크게 경혈부위에 가해진 溫熱刺戟으로 설명하려는 경향과 艾絨의 燃燒生成物, 즉 애구요법의 치료과정을 경혈부위에 가해진 애구의 化學的 刺戟으로 설명하려는 경향으로 대별되어질 수 있다. 우선 온열자극에 대한 연구로 林²⁻³⁾은 문헌적 고찰을 통하여 애구의 연소과정 중에 발생하는 溫熱刺戟이 경혈부위의 국소조직에 가해짐으로써 열분해물질을 생성되어 치료효과를 나타낸다 하였고, 華⁴⁾는 온열의 弱刺戟은 補의 작용을, 強刺戟은 瀉의 작용을 일으킨다 하였다. 化學的 刺戟에 대한 연구로는 西谷有子는 艾

絨의 燃燒生成物만을 이용해 온열자극을 배제한 후 疣贅治驗의 症例를 보고하여⁵⁾ 화학적 자극에 의한 애구요법을 치료효과를 증명하였다. 또한 施灸를 했을 때 施灸皮膚의 과산화지질을 저하하는 작용은 艾灸의 溫熱作用이 아니라 燃燒生成物에 의한 것임을 증명하였다⁶⁾. 또한 안⁷⁾과 안⁸⁾ 등은 구진이라 칭한 애구의 연소생성물이 NO 억제와 iNOS 생성을 억제한다고 보고하여 애구요법의 항염 효과에 대한 기전을 설명하였고 김²⁸⁾ 등은 구진약침이 일과성 전뇌 허혈 손상을 예방하고 치료하는데 효과적이라고 보고하였다.

인체의 신진대사 과정 중 부산물로 생성되는 활성산소는 생체 내 여러 가지 병태생리적인 반응에 관여하게 된다. 그중 Hydrogen peroxide(H₂O₂)는 superoxide(O²⁻), hydroxy radical(OH) 등을 포함하는 활성 산소종(reactive oxygen species)의 하나로 심혈관계나 노화 등 각종 질환의 발병인자로 인식되고 있다⁹⁻¹⁰⁾. 활성산소는 세포에 손상을 줌으로서 세포의 퇴화나 사멸을 초래하는데¹¹⁾ 이 현상의 하나는 활성산소가 세포의 항산화계에 손상을 주어 그 결과 항산화효소의 활성저해 내지는

방해함으로서 그 결과 불필요한 산소라디칼이 누적되어 세포손상을 유도한다¹²⁻¹³)고 알려져 있다.

뇌신경세포에 있어서 활성산소에 의한 산화적 손상은 노인성 치매를 비롯하여 근위축성측삭경화증이나 뇌졸중과 같은 신경질환의 병인으로 밝혀져 있다¹⁴).

특히, 근위축성측삭경화증과 같은 병변에서는 산소라디칼에 의한 뇌조직의 손상과 지질과 산화를 통하여 중추신경내 고분자물질의 손상을 초래할 뿐만 아니라¹⁵), 대뇌의 항산화효소인 glutathione peroxidase나 catalase의 활성의 감소 등이 관찰되었으며¹⁵⁻¹⁶), 산화적 손상에 의한 뇌조직의 손상은 이차적으로 세포의 신호전달 체계나 칼슘의 항상성 및 효소의 활성변화와 같은 현상을 유발할 수 있는 가능성을 가지고 있기 때문에 활성산소에 의한 산화적 손상은 병변의 유발기전과 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 제시되었다^{12,17-18}).

이에 저자는 C6-glioma cell에 H₂O₂를 투여하여 산화적 손상을 유도하고 애용의 연소생성물인 구진을 처리한 후 세포생존율, DPPH, SOD, catalase activity과 세포의 형태학적 관찰을 통하여 다음과 같은 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 구진 취득

구진은 애용의 연소생성물로서 안의 방법⁷⁻⁸)을 근거하여 취득하였다. 간기하면 삼각 플라스크 입구에 링을 올려놓고, 뜸쭉(봉래구관, 서울) 5g을 원뿔 모양으로 만들어 연소한 후 삼

각 플라스크 바닥으로 흐르는 구진을 모은다. 플라스크 바닥에 모인 구진을 methanol 100%로 녹이고 column을 이용하여 재 등의 불순물을 제거하고 40±2℃를 중탕증류기를 이용하여 methanol을 90% 증발시킨다. 구진과 methanol 혼합물을 -70℃의 냉동동결건조기를 이용하여 72시간 건조시킨 후, culture용 DMSO(sigma)를 용매로 100mg/ml의 농도로 분류하여 실험에 사용하였다.

2. 세포배양

C6-glioma 세포는 10% FBS와 Penicillin/streptomycin(10μl/ml)을 첨가한 RPMI1640배양액으로 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

3. 세포생존율 측정

C6-glioma 세포를 1.5×10⁵cells/ml 농도로 희석하여 24 well plate에 1ml 씩 분주한 후 24시간 배양한 다음 10~100μg/ml 농도의 구진 농도별과 H₂O₂처리 30분전에 구진 처리한 후 16 hr 배양하여 MTT assay를 시행하였다. MTT (5mg/ml) assay 용액을 50μl씩 세포배양액에 첨가하고, 4시간동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양액을 흡입하여 제거한 다음 dimethylsulfoxide 용액 1ml를 첨가하고 shaker에서 10분간 흔들어 준 후 ELSA reader로 540nm에서의 흡광도를 판독하였다¹⁹).

4. 광학현미경 세포형태 관찰

C6-glioma 세포를 1.5×10⁵cells/ml의 세포를 24well plate에 배양하여, 구진 단독 처리와 구진과 H₂O₂를 같이 처리하여 4시간 후에 세포 형태를 광학현미경(Leica DMIRB)으로 관찰하였다.

5. DPPH 법에 의한 항산화력 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 사용한 항산화 활성검정법으로 여러 농도의 시료를 methanol에 녹여 1.5×10^{-4} M DPPH methanol 용액 1ml를 첨가한 후, 30분간 실온에서 방치하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 감소시키는 데 필요한 시료의 양(μ g)을 RC₅₀으로 나타냈다²⁰⁾.

$$\text{Radical scavenging activity(\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}})}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

6. CAT activity

C6-glioma 세포를 1.5×10^5 cells/ml의 세포 seed 하여 24hr간 배양하였다. 그 후 구진 농도별 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 그 후 1시간 배양하여 세포를 수집한다. CAT활성은 Carrillo(1991)의 방법²¹⁾에 준하여 50mM phosphate buffer(pH 7.0)에 3%(v/v) H₂O₂, 12 μ l와 세포균질화 시킨 상층액 100 μ l와 혼합하여 2분 동안 37°C에 배양하였다. 배양된 sample은 5분 동안 240nm에서 흡광도를 측정하였다. CAT의 1unit는 1mg 단백질이 1분 동안 H₂O₂를 분해시킨 것을 240nm에서 측정한 흡광도 변화(ΔA_{240} /mg protein/min)와 같다.

7. Superoxide dismutase(SOD) activity

C6-glioma 세포를 1.5×10^5 cells/ml의 세포를 100mm plate에 배양하여 구진 농도별 처리하여 1시간 동안 배양하였다. SOD 활성은 Beachamp 등의(1971)방법²²⁾에 준하여 세포를 균질화 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에 3mM xanthin, 0.75mM NBT, 3mM EDTA, 1.5mg/ml BSA

에 세포를 균질화시켜 원심분리한 상층액을 50 μ l를 넣어 혼합한다. 그리고 50 μ l xanthine oxidase(0.1mg/ml)를 넣고 실온에 30분 방치한 후 6mM copper(II) chloride을 넣어 주면 반응 멈춘다. 1500rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 560nm의 흡광도에서 측정한다. SOD의 1unit는 1mg 단백질이 1분 동안 H₂O₂를 분해시킨 것을 240nm에서 측정한 흡광도 변화(ΔA_{560} /mg protein/min)와 같다.

8. Annexin-V FITC 결합에 의한 flow-cytometric 분석

세포를 구진과 함께 12시간 동안 배양 후 수거한 다음, 상온에서 annexin V-FITC와 PI를 포함하는 결합완충액(10mM HEPES, 140mM NaCl, 12.5mM CaCl₂, pH 7.4)에서 annexin-V FITC와 특이반응을 약 15분간 실행하였다. 배양이 끝난 후, 수건된 세포는 FACScan analyzer(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로 분석되었으며, annexin⁻/PI⁻는 세포괴사로 annexin⁺/PI⁻는 세포고사로 판정하였다.

9. 통계처리

실험결과는 Mean \pm S.E.M.로 나타내었고, 통계검정은 unpaired student t-test를 사용하였다.

III. 실험결과

1. H₂O₂에 의한 뇌신경 세포 상해 효과
H₂O₂에 의한 세포상해 정도를 알아보기 위

하여 용량 의존적으로 처치한 후, 대조군을 100%로 환산하였을 경우, 각기 다른 H₂O₂ 농도에 대한 세포 상해정도는 Fig. 1과 같다.

IC₅₀은 443.48±0.09 μM (initial 102.93±2.02, final 18.08±1.70)이었다.

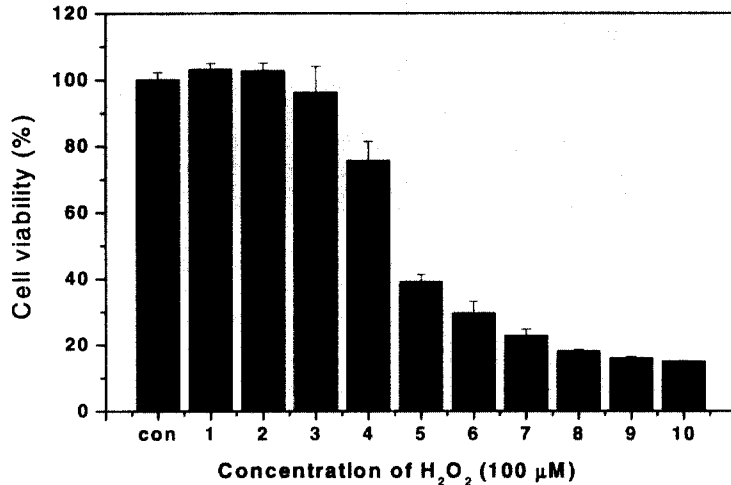


Fig. 1. Effects of H₂O₂ on cell viability in C6-glioma Cell were cultured in RPMI 1640 with FBS 10% for 12 hours after initial time of H₂O₂ treat

2. H₂O₂로 유발된 세포 상해에 대한 구진의 보호효과

구진(Moxi-tar)은 애용의 연소생성물로 한방의 구 치료시 환자의 피부에 직접적으로 노출되는 물질이다. Fig. 1에서 알아본 바와 같이 H₂O₂에 의해서 뇌신경세포는 용량의존적으로 상해를 받는데 구진은 이를 효과적으로 방어한다(Fig. 2). H₂O₂ 500μM을 처리한 후 12시간이 경과하면 약 40%의 세포생존율을 보여 약 60%의 세포독성을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이러한 실험결과를 바탕으로 구진을 단독 처리하였을 경우, 40μg/ml까지 다소 증가하였음을

관찰할 수 있었으나 구진 100μg/ml까지 농도의존적으로 다소 감소하였으며 구진 100μg/ml에 84.31±1.89 %로 구진에 의하여 약간의 상해작용이 있음이 관찰되었다.

구진과 H₂O₂ (500μM, 100μM), 를 동시처리하였을 경우, 구진의 농도가 증가함에 따라 세포생존율 또한 증가하여 구진의 농도 80μg/ml에서는 82.01±1.23% (H₂O₂ 500μM), 75.12±1.87%(H₂O₂ 100μM)의 세포생존율을 각각 나타내어 양성대조군 대비 1.99배 (H₂O₂ 500μM), 5.68배 (H₂O₂ 100μM)의 세포생존율 증가를 나타내었다(Fig. 2).

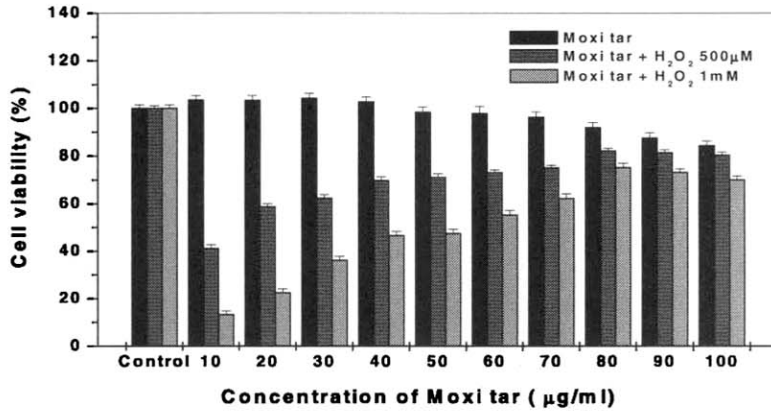


Fig. 2. The protective effects of moxi-tar on injury induced by H₂O₂. Cell were treated for 12 hours with Moxi-tar and H₂O₂

3. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 의한 항산화 활성 효과

H₂O₂로 유도된 세포상해작용을 막는 구진의 보호작용을 알아보기 위하여 항산화 활성도를 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 free radical

scavenging activity는 구진 10µg/ml에서 9.71±3.5%로 나타내었고, 구진 80µg/ml에서 78.91±4.4%로서 최고치를 나타내었고 그 후 다시 감소하는 결과를 나타내어 구진의 농도의존적으로 증가하였다(Fig. 3).

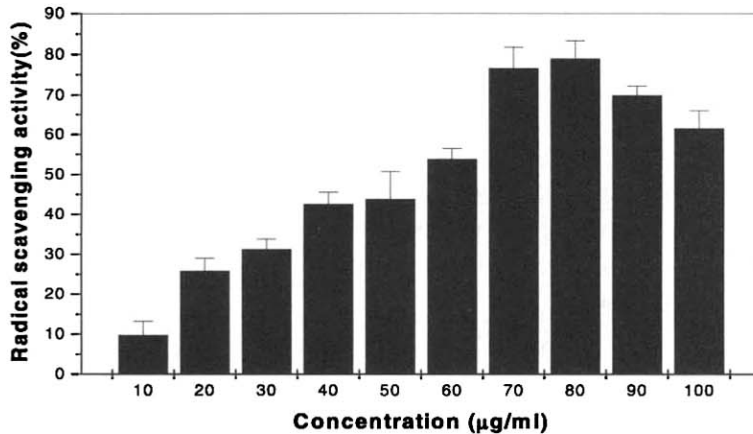


Fig. 3. The Radical scavenging effects of moxi-tar on C6-glia cell

4. 구진이 Catalase 활성도에 미치는 영향
 다음은 농도 의존적으로 구진이 Catalase 활성도에 미치는 영향을 알아보았다. 각각 구진의 농도 0, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 catalase 활

성도는 12.0, 15.2, 17.2, 19.2, 20.4 unit/mg protein로 농도 의존적으로 catalase 활성도가 증가되는 것을 관찰하였다.

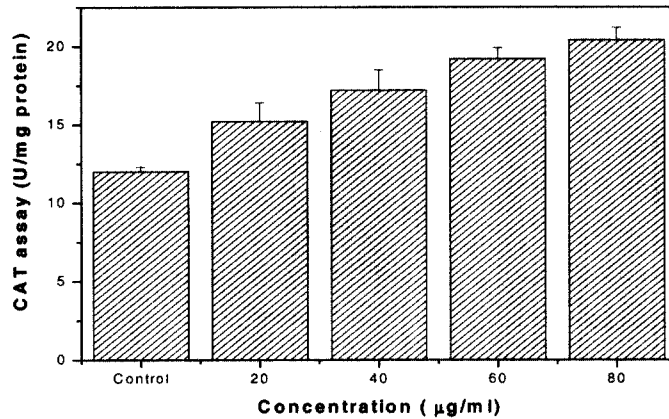


Fig. 4. The effects of moxi-tar on catalase activity in C6-glia

5. 구진이 Superoxide dismutase (SOD)에 미치는 영향
 Control group에서의 SOD 활성도 값은 13.7 unit/mg protein이었지만 구진 농도 20, 40, 60,

80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 16.5, 18.3, 18.9, 21.6 unit/mg protein으로 농도 의존적으로 SOD 활성도가 증가되는 것을 관찰하였다.

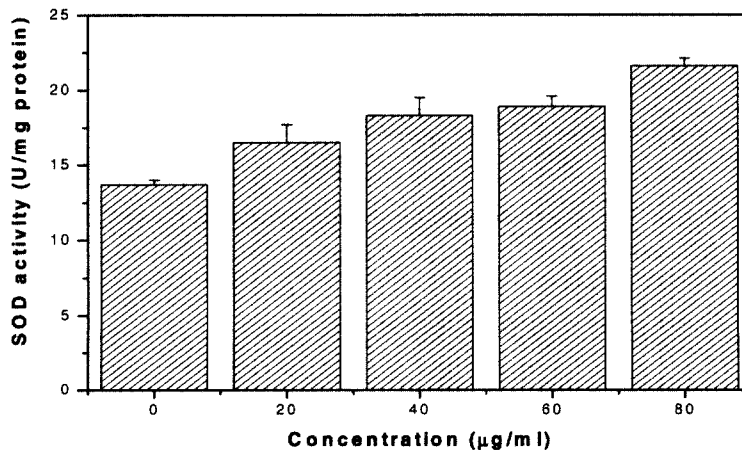


Fig. 5. The effects of moxi-tar on Superoxide dismutase activity in C6-glia cell

6. Flow-cytometric 분석결과

Control 군에서 세포괴사율은 26.49%로 비교적 양호한 수치를 나타내었으나, H₂O₂ 군에서의 세포괴사율은 71.05%로 비율이 증가하였음

을 알 수 있었다. 이때의 H₂O₂와 구진의 혼합 군에서는 25.87%의 세포괴사율을 보여 구진이 H₂O₂가 유도한 세포상해에 대해서 보호효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 6).

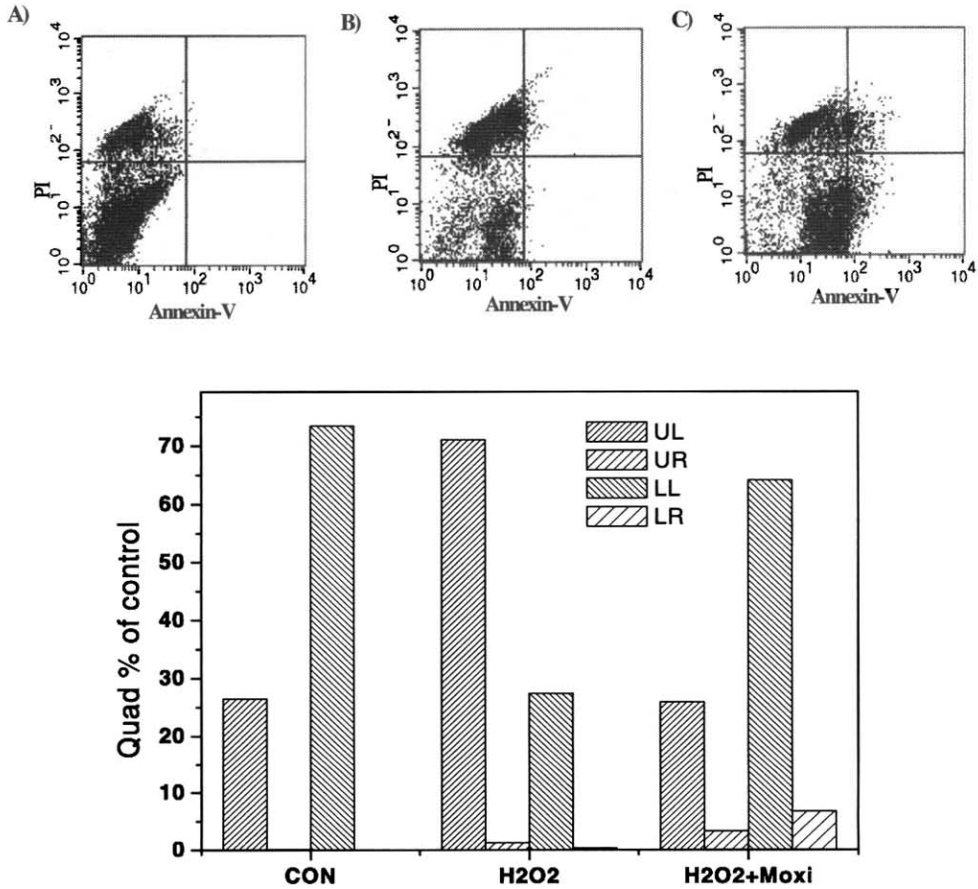


Fig. 6. The effects of moxi-tar on flow-cytometric of in C6-glia cell

A) Control

B) H₂O₂ 0.5mM

C) H₂O₂ 0.5mM+Moxi-tar 40μg/ml

7. 광학 현미경을 통한 광학적 관찰 결과

다음은 C6-glioma의 세포형태적 관찰 결과이다. 먼저 Control 군에서는 세포의 분화과정이 보이고 정상적일 뻔한 건강한 축삭돌기의 모습이 관찰되었다(A). H₂O₂ 군에서는 세포의 수가 현저히 줄어들었음을 알 수 있었고, 관찰

되는 세포의 축삭돌기가 매우 작고 적음을 알 수 있었으며(B), 구진 자체만의 자극으로는 control 군과 유사한 형태와 수를 나타나 세포 자체에 영향이 없음을 알 수 있었으며(C), H₂O₂와 구진의 혼합군에서는 Control 군과 구진군보다는 못하지만 H₂O₂ 군의 상해정도를 대부분 회복하고 있음을 알 수 있었다(D).

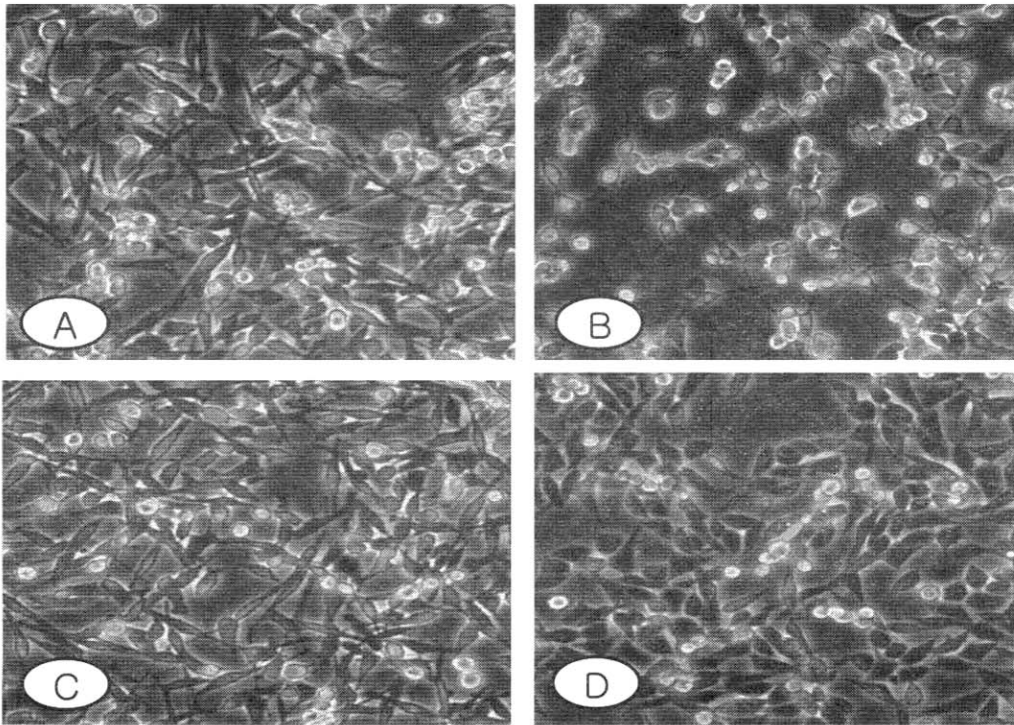


Fig. 7. The protective effects of moxi-tar on injury induced by H₂O₂. Cell were treated for 12 hours with Moxi-tar and H₂O₂

- A) Control
- B) H₂O₂ 0.5mM
- C) Moxi-tar 40μg/ml
- D) H₂O₂ 0.5 mM+Moxi-tar 40μg/ml

IV. 고찰 및 결론

인체는 출생, 성장, 성숙, 노화의 신진대사 과정을 거치게 되는데, 노화란 인체의 생성과 성장 및 성숙 과정 후 시간의 흐름에 따라 진행되는 일련의 퇴행성 변화로서, 형태적, 기계적으로 쇠퇴하여 사망에 귀착되는 생리적인 현상을 의미한다. 서양의학에서 노화에 대한 가설은 지금까지 약 200여 가지가 제안되었으나 그 중에서 가장 유력시되고 있는 것은 자유유리기설이다. 자유유리란 신진대사 과정 중 부산물로 생성되는 산소자유기를 말하는 것으로 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 구조적인 특성상 생체 내 여러 가지 병태생리적인 반응에 관여하게 된다²³⁻²⁶⁾.

산소자유기는 세포를 손상시키는 유해인자의 하나로 다른 물질과 반응력이 강하여 세포 내 핵산물질을 비롯하여 단백질을 손상시키며 동시에 세포의 정상적인 대사를 방해한다^{13,27)}. 이의 산화적 손상은 세포막의 지질과산화반응을 활성화시키고 항산화효소계에 영향을 주며, 특히 lipofuscin이나 malondialdehyde 및 carbonyl group 등을 세포나 조직에서 증가시킴으로서 세포손상을 가속화시킨다. 또한 superoxide anion 이나 hydroxyl radical로서 인체의 조직이나 기관을 구성하고 있는 세포에 산화적 손상을 줌으로서 세포의 고사나 세포사멸을 유도하여 결국 병변을 초래하게 된다. 산소자유기는 다른 물질과 반응력이 강하여 세포내 핵산물질을 비롯하여 단백질을 손상시키며 동시에 세포의 정상적인 대사를 방해함으로써 질환의 병리적 원인의 하나로 밝혀지고 있다^{11,13-14,27)}.

자유유리기설은 1956년 Harman이 자유유리기로 인해 생성된 해로운 물질의 축적된 결과로 노화와 만성 퇴행성질환의 근본적인 원인이라고 주장한 이래로 많은 연구가 진행되고 있다. 자유유리기설은 생체내 정상대사 과정에서 생긴 자유유리가 생분자와 반응하여 세포에 손상을 주는데 이러한 자유유리의 생성은 나이가 증가함에 따라 증가하고 따라서 세포기능이 점차 감퇴되어 노쇠현상을 초래하게 된다는 가설이다. 자유유리에 의한 손상을 최소화하기 위해서는 superoxide anion (O²⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂) 등의 산소자유기를 대사과정에서 형성 되는대로 제거해야 한다²⁶⁾.

애구요법은 內經¹⁾ 異法方宜論에 北方者. 天地之所閉藏之域也. 其地高陵居. 風寒冰冽. 其民藥野處而乳食. 藏寒生滿病. 其治宜艾熯. 故艾熯者. 亦從北方來에서 알 수 있듯이 풍한사에 의한 질병을 치료하는 한의학의 침구치료수단으로 많이 사용되어 왔다.

최근에 艾灸療法の 치료작용을 증명하려는 많은 연구진의 노력은 크게 경혈부위에 가해진 溫熱刺戟으로 설명하려는 경향과 艾絨의 燃燒生成物, 즉 애구요법의 치료과정을 경혈부위에 가해진 애구의 化學的 刺戟으로 설명하려는 경향으로 대별되어질 수 있다. 우선 온열자극에 대한 연구로 林²⁻³⁾은 문헌적 고찰을 통하여 애구의 연소과정 중에 발생하는 溫熱刺戟이 경혈부위의 국소조직에 가해짐으로써 열분해물질을 생성되어 치료효과를 나타낸다 하였고, 華⁴⁾는 온열의 弱刺戟은 補의 작용을, 強刺戟은 瀉의 작용을 일으킨다 하였다. 化學的 刺戟에 대한 연구로는 西谷有子는 艾絨의 燃燒生成物만을 이용해 온열자극을 배제한 후 疣贅治驗의 症例를 보고하여⁵⁾ 화학적 자극에 의한 애구요법을 치료효과를 증명하였다. 또한 施灸를 했을 때

施灸皮膚의 과산화지질을 저하하는 작용은 艾 灸의 溫熱作用이 아니라 燃燒生成物에 의한 것임을 증명하였다⁶⁾. 또한 안⁷⁾과 안⁸⁾ 등은 구진이라 칭한 애용의 연소생성물이 NO 억제와 iNOS 생성을 억제한다고 보고하여 애구요법의 항염 효과에 대한 기전을 설명하였다.

따라서, 본 연구는 애구요법시 생성되는 연소생성물인 구진이 애구효과의 주 인자임을 가정하고 뇌신경교세포에서 H₂O₂로 유도된 세포상해에 대한 보호효과를 알아보기 위하여 상기 실험을 진행하였다.

H₂O₂에 의한 세포상해 정도를 알아보기 위하여 용량 의존적으로 처치한 후, 대조군을 100%로 환산하였을 경우, IC₅₀은 443.48±0.09 μM로 관찰되었다(Fig. 1). 구진(Moxi-tar)은 애용의 연소생성물로 한방의 구 치료시 환자의 피부에 직접적으로 노출되는 물질로 H₂O₂에 의해서 발생하는 상해를 효과적으로 차단함이 관찰되었다(Fig. 2). 보호효과 정도는 H₂O₂ 500 μM 12시간 처리시 약 40%의 세포생존율을 보여 약 60%의 세포독성을 보이는 데 비하여 구진과 H₂O₂ (500μM, 100μM), 를 동시처리 하였을 경우, 구진의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율 또한 증가하여 구진의 농도 80μg/ml에서는 82.01±1.23% (H₂O₂ 500μM) 세포생존율을 각각 나타내어 양성대조군 대비 약 200% 세포 생존율 증가를 나타내었다(Fig. 2).

이러한 실험결과는 西谷有子⁵⁻⁶⁾와 안⁷⁾, 안⁸⁾ 등의 결과와 유사한 결과로 사료되며, 이는 구진의 항산화 작용 때문일 것으로 유추되었다. 따라서, 구진의 항산화 활성도를 측정된 결과, free radical scavenging activity는 구진 80μg/ml에서 78.91±4.4%의 수치가 관찰되었다(Fig. 3). 구진이 Catalase 활성도에 미치는 영향은 구진 80μg/ml에서 20.4unit/mg protein로

catalase 활성도가 증가되는 것을 관찰하였다(Fig. 4). 구진의 SOD 활성도 값은 구진 80μg/ml에서 21.6 unit/mg protein으로 활성도가 증가되는 것을 관찰하였다(Fig. 5).

또한 annexin-V를 이용한 flow-cytometric 분석결과에서 구진은 H₂O₂에 의한 세포상해에 대해서 보호효과가 있음이 관찰되었으며(Fig. 6), 세포의 형태학적 관찰결과 또한 H₂O₂에 의한 세포상해에 대해서 보호효과가 있다고 관찰되었다(Fig. 7).

상기실험 결과는 구진이 H₂O₂로 유도된 세포상해작용에 대해서 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었으며, 이는 구진이 H₂O₂ 자극시 발생하는 산소자유기를 제거하여 발생한다고 사료된다. 이어서, 구진의 성분학적 분석에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. 張馬合註. 黃帝內經. 素門靈秋 裕昌德書店. 1960 : 100.
2. 林鍾國. 灸治療의 文獻的 觀察. 서울 : 동양의학. 1976 : 2권 1호.
3. 林鍾國. 艾灸의 生體反應에 관한 文獻的 考察. 서울 : 동양의학. 1976 : 2권 3호.
4. 華延會. 關元俞 등에 대한 刺鍼이 부신피질의 기능에 주는 영향. 중의임상. 1992 : 4, 88.
5. 西谷郁子. 灸およびモグサし燃燒生成物による疣贅治療2症例報告. 全日本灸學會雜誌. 1987 : 37卷 3號
6. 西谷郁子 植田伸夫. 艾の燃燒生成物に含

- まれる抗酸化作用物質について. 全日本灸學會雜誌. 1988 : 38卷 1號.
7. 안성훈, 구성태, 도진우, 김종성, 김광수, 양범식, 김경식, 손인철. 구진(Moxi tar)이 면역세포에서 iNOS 합성에 미치는 영향. 대한경락경혈학회지. 2000 ; 17(1) : 33-46.
 8. 안영남, 안성훈, 양기중, 김풍식, 김광수, 김종성, 도진우, 김경식, 손인철. 구진(Moxi tar)이 뇌신경세포에서 Nitric Oxide 생성에 관하여 미치는 영향, 대한경락경혈학회지. 2000 ; 17(2) : 25-44.
 9. Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In free radicals in biology and medicine. 2nd Ed. Oxford : Clarendon Press. 1989 : 22-31.
 10. Halliwell B, Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems : the superoxide theory of oxygen toxicity. In free radicals in biology and medicine. 2nd Ed. Oxford : Clarendon Press. 1989 : 86-89.
 11. Loft S., Astrup A., Buemann B., Poulsen H.E.. Oxidative DNA damage correlates with consumption in human. FASEB J. 1994 ; 8 : 534-537.
 12. Kim YS, Kim SU. Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. J Neurosci Res. 1991 ; 29 : 100-106.
 13. Jacobson J. M., Michael J. R., Jafri M. H., Gurtner G. H. Antioxidants and actioxidant enzymes protect against pulmonary oxygen toxicity in the rabbit. J Appl Physiol. 1990 ; 68 : 1252-1259.
 14. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. Diabetes. 1991 ; 40 : 405-412.
 15. Jang YJ, Park H, Kim HS, Hong HN, Kim MK. The role of increased oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. Korean J Pharmacology. 1995 ; 31 : 95-102.
 16. Park ST. Study on the effect of iron-chelator on oxygen radical-induced neurotoxicity. Korean J Phys Anthrop. 1995 ; 8 : 113-121.
 17. Jain S. K. Hyperglycemic can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. J Biolo Chem. 1989 ; 264 : 21340-21345.
 18. Camerone NE, Cotter MA, Maxfield EK. Antioxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. Diabetologia. 1993 ; 36 : 299-304.
 19. Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K.. Re-amination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/ cell kill. Journal of Immunological Methods. 1989 ; 119 : 203-210.
 20. Blosi, M.S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. Nature. 1958 ; 181 : 1199-1200.
 21. Carrillo, M.C., Kanai, S., Nokubo, M., Kitani, K. Deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and

- catalase but not glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sciences*. 1991 ; 48 : 517-521.
22. Beauchamp, C., Fridovich, I. Assays of superoxide dismutase. *Analytical Biochemistry*. 1971 ; 44 : 276-287.
23. 徐舜圭. 성인병 노인의학. 서울 : 고려의학. 1992 ; 10-13 : 225-228.
24. 이정복. 장수학. 서울 : 의성당. 1993 : 1325-1388.
25. 최진호. 노화의 메카니즘과 연구방향. *생화학뉴스*. 한국생화학회. 1997 ; 5(3) : 39-53.
26. 김숙희, 김화영. 노화. 서울 : 민음사. 1995 : 83-85.
27. Chuyen N. V., Utsunomiya N., Hodaka A. and Kato H. Antioxidative effect of Maillard reaction products in vivo. *nutrition and physiology*2. ed. PA Pinot Birkhauser Verlag Basel. 1990 : 285-290.
28. 김재호, 이관형, 안영남, 김용득, 김경식, 손인철. 애엽 및 구진 약침이 일과성 전뇌 허혈 손상에 미치는 효과. *대한경락경혈학회지*. 2003 ; 20(3) : 61-80.