

흰쥐의 肝 組織에서 鹿茸 藥針 製劑의 抗酸化作用에 關한 研究

尹 哲 浩 · 鄭 智 天* · 申 億 燮**

ABSTRACT

Effects of *Cervus elaphus* for herb-acupuncture solution on Antioxidation in Rat's liver

Yoon Cheol-Ho · Jeong Ji-Cheon* · Shin Uk-Seob**

*Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk Univ.

**Dept. of Pharmacy, Dongguk Medical Center

Cervus elaphus for herb-acupuncture solution(CEHAS) was tested for the effects of free radical generating enzyme and lipid peroxidation in rat's liver. *In vitro*, levels of lipid peroxide in tissues of liver were proportionally decreased to concentration of CEHAS. They were much more decreased, when lipid peroxidation was induced with ferrous iron (Fe^{+2}). Also, enzyme activities of xanthine oxidase were decreased. The ratio of type conversion of xanthine oxidase was lowered, too. But, there was not special changes on enzyme activities of aldehyde oxidase.

These results suggest that CEHAS decrease the activities of free radical generating enzymes such

* 東國大學校 韓醫科大學 內科學教室

** 東國大學校 醫療院 藥劑科

as xanthine oxidase which form lipid peroxide.

Key Words : Cervus elaphus, herb-acupuncture solution, lipid peroxidation, xanthine oxidase, aldehyde oxidase

I. 緒論

活性酸素(oxygen free radicals)는 生體가 酸素를 利用하여 呼吸 反應을 하는 동안 體內에서 生成되는 中間 代謝 産物로⁴⁹⁾ superoxide anion radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide 等³⁸⁾이 알려져 있다. 이들은 脂質과 蛋白質로 構成된 細胞膜에 作用하여 不飽和脂肪酸을 過酸化시켜 細胞損傷을 招來하는 강한 活性 物質로서^{27,48)} xanthine oxidase 와 aldehyde oxidase 等の 酵素 作用에 依한 酸化 反應에 依해서 生成이 促進되어진다.⁴⁷⁾

또한, 活性 酸素는 細胞膜에서 脂質의 過酸化反應에 關與하므로서 過酸化脂質의 生成을 誘導하여 糖尿病, 心臟病, 腎不全, 癌 等の 疾病을 誘發하거나 老化를 促進한다고 알려져 있다.^{27,34,38,43,55)}

東醫學에서 이와 關聯된 研究는 主로 腎虛와 聯關되어 있는데 活性 酸素의 生成에 따른 組織 損傷과 老衰 現象이 腎虛와 아주 類似하다고 하였다.³⁰⁾ 또한, 年齡이 增加함에 따라 腎虛의 頻度³²⁾와 過酸化 脂質의 含量이 比例하여 增加되었는데^{35,36)} 腎虛群에서는 過酸化脂質 含量이 上昇하여 있었다.³⁰⁾ 그리고, 補腎 效能을 가진 五子衍宗液³¹⁾, 清宮長春丹³⁵⁾ 및 六味地黃湯³⁶⁾ 等の 處方들이 過酸化脂質의 含量을 低下시켜 老化를 抑制한다고 實驗 報告되고 있다.

鹿茸(*Cervus elaphus*)은 神農本草經²⁶⁾에 最初로 記載된 以後 “久服耐老”²⁵⁾, “療虛勞, 羸瘦”²⁴⁾, “生精補髓, 養血益陽, 強筋健骨”²⁸⁾의 效能으로 主로 發育不全, 元氣不足, 陽萎證 等 峻補元陽하는 補陽劑로 活用되고 있다.^{2,4)}

한편, 藥針療法은 藥效가 빠르고, 用量이 正確하며, 藥物이 胃腸管에서 破壞되는 것을 防止하는 效

果가 있으므로⁵⁾, 老年의 補陽劑로 많이 使用되고 있는 鹿茸^{29,33)}을 藥針 製劑로 活用하면 胃腸管 內 吸收 面積의 減少로 因하여 藥物의 吸收 障礙가 있는 高齡 患者³⁾의 治療에 適合하리라 여겨진다.

그러나, 鹿茸에 對한 實驗 研究로는 副腎皮質^{7,18)}, 內分泌⁸⁾, 高脂血症^{16,21)}, 造血機能^{12,13,14)}, 免疫機能^{6,9,11,20,22)} 等に 關한 實驗이 있을 뿐 藥針 製劑의 抗酸化 作用과 關聯된 研究는 別로 보이지 않는다.

이에 著者는 鹿茸 藥針 製劑의 抗酸化 效能에 미치는 影響을 살펴보기 爲한 一環으로 肝臟 組織에서 過酸化脂質의 含量 및 活性 酸素 生成系 酵素인 xanthine oxidase 活性和 型轉換率 및 aldehyde oxidase 活性 變化를 測定하였던 바 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

本 實驗에 使用한 藥材는 良質의 뉴질랜드産 赤茸(*Cervus elaphus*) 300g을 東國大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였다.

2) 試藥 및 機器

Hypoxanthine, potassium phosphate mono and dibasic은 Wako pure Chemical社로 부터, bovine serum albumin(BSA), ferrous chloride(Fe II), nicotineamide adenine dinucleotide, thiobarbituric acid sodium salt, xanthine oxidase는 Sigma社로 부터, xanthine sodium salt, trichloroacetic acid는 Nakarai社로 부터, malondialdehyde는 Aldrich社로 부터, N-1-methyl-nicotinamide는 Tokyo Chemical社

로부터 購入한 製品을 使用하였고 其他 모든 試藥은 市中에서 購入한 特級品을 使用하였다.

實驗에 使用한 機器는 UV spectrophotometer (Shimazu UV-1201), refrigerated centrifuge (Hitachi 20 PR-52D), ultra centrifuge (Hitachi 70P-72), deep freezer (Revco) 등이었다.

3) 動物 및 試料의 投與

實驗에 使用한 動物은 一定한 溫度와 濕度가 維持되는 條件으로 飼育한 外觀上 健康하고 體重이 $250 \pm 20g$ 內外이며 生後 10 ± 2 週齡의 雄性 Sprague-Dawley系 흰쥐이며, 實驗前 16時間 동안 물만 주고 絶食시켜 使用하였다.

2. 實驗 方法

1) 抽出液의 調製法²⁹⁾

水提 alcohol法²⁹⁾으로 製造하였다. 鹿茸 300g을 粗末로 하여 圓底 flask에 넣고, 蒸溜水 2000ml를 加하여 3時間 동안 水浴에서 抽出하고 過한 다음, 濾液을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 全量을 200ml로 하였다. 室溫까지 冷却하고, 95% ethyl alcohol 100ml를 加하여 室溫에서 攪拌 後 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하였다. 濾液에 다시 85% ethyl alcohol 100ml를 加하여 잠시 reflux하고, 放置하여 生成된 沈澱物을 濾別하고, 다시 濾液에 75% ethyl alcohol 100ml를 加한 後, 같은 操作을 2回 反復하였다. 그 다음, 濾液中 ethyl alcohol을 減壓 溜去하여 殘渣全量을 100ml가 되게 한 後, 여기에 全體分量이 1000ml되게 生理食鹽水를 加하고, 3% 鹽酸으로 pH. 6~7로 調節하여 低溫(5°C以下)에서 12時間을 放置한 다음, 微量의 浮遊物을 濾別하고 加壓滅菌하여 nucleopore filter paper(25 mm, 0.45 μ m)로 filtration시켜 試料로 使用하였다.

2) 酵素源의 調製

動物을 ether로 痲醉시킨 다음 腹部 正中線을 따라 開腹한 後 腹部大動脈으로 부터 血液을 採取하고 0.9% 生理食鹽水로 貫流시킨 肝臟을 摘出하였

다. 摘出된 肝臟을 生理食鹽水에 씻은 다음 濾紙로 가볍게 壓迫하여 異物質 또는 生理食鹽水를 除去하였다. 組織 1g當 4 培量의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 以下 K.P. buffer로 略稱)를 加하여 氷冷下에서 glass teflon homogenizer로 磨碎하였다. 이 磨碎 均質液을 600 $\times g$ 에서 10分間 遠心分離하여 核 및 未磨碎部分을 除去한 上澄液을 얻고 이것을 다시 10,000 $\times g$ 에서 20分間 遠心分離하여 mitochondrial fraction을 除去하였다. 한편, mitochondrial fraction을 除去시킨 上澄液을 105,000 $\times g$ 에서 1時間 동안 超遠心分離하여 cytosolic fraction을 分離한 後 aldehyde oxidase와 xanthine oxidase 活性 測定의 酵素源으로 使用하였다. 以上の 모든 操作은 0-4°C에서 行하였다 (Scheme I).

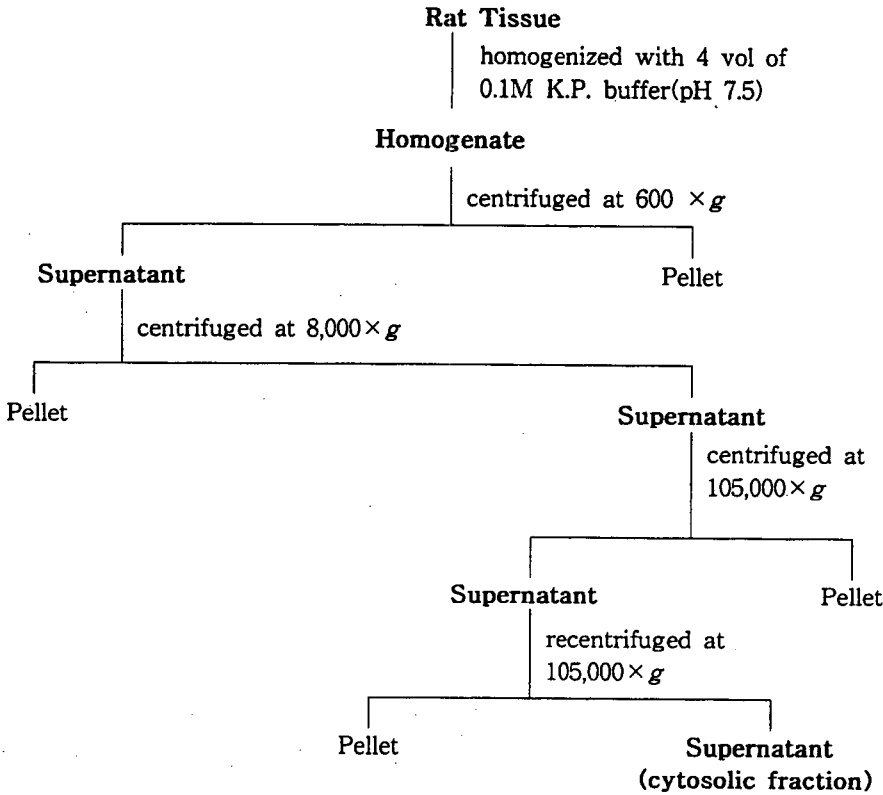
3) 酵素 活性의 測定

① Aldehyde oxidase 活性 測定

Aldehyde oxidase 活性 測定은 Rajagopalan 等の 方法⁵⁴⁾에 依해 0.1M K.P. buffer (pH 7.5) 一定量에 基質인 N-1-methylnicotinamide 1.5mM과 酵素液을 添加해 37°C에서 20分間 反應시킨 다음 20% trichloroacetic acid(TCA)를 加해 反應을 終了시켰다. 反應 終了後 生成된 pyridone을 波長 300nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 酵素의 活性度를 算定하였다. 酵素의 活性도는 1分當 1mg의 蛋白質이 生成시킨 pyridone의 量을 nmole로 나타내었다.

② Xanthine oxidase 活性 測定

Xanthine oxidase (type O) 活性 測定은 Stirpe 等の 方法⁵⁶⁾에 準해 0.1M K.P. buffer (pH 7.5) 一定量에 基質인 xanthine 60 μ M 및 酵素源을 添加하여 37°C에서 5分間 反應시킨 다음 20% TCA를 加하여 制蛋白質시키고 遠心分離하였다. 이때 生成되어진 uric acid를 波長 292nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 酵素의 活性度를 算定하였다. 한편, xanthine dehydrogenase(type D)의 活性은 type O의



Scheme I. Preparation of enzyme source

活性測定反應液에 coenzyme인 NAD⁺ 100mM 을添加해 同一하게反應시킨 다음測定하여 나온活性度 (total type: type D+O) 에서 type O의活性을減한값으로算定하였다. 酵素의活性도는1分當 1mg의蛋白質이生成시킨 uric acid 量을 nmole로 나타내었다. 한편, xanthine oxidase의型轉換比産出은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine oxidase反應에서 얻어진 酵素의活性도를利用하여 xanthine dehydrogenase (type D)에서 xanthine oxidase (type O)로의型轉換比率를 O/O+D의比로産出하였다.

4) 過酸化脂質含量測定

過酸化脂質含量測定은 Ohkawa 等の方法⁵⁰⁾에

準해 磨碎均質液 一定量에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 溶液을加해 95℃에서 1時間동안反應시키고 室溫으로冷却한 다음生成된紅色의 TBA reactive substance를 n-Butanol: Pyridine (15:1) 混液으로移行시켜 波長 532nm에서吸光度의變化를測定하여 定量하였다. 한편, in vitro 實驗에서는 Haber-Weiss反應⁴⁸⁾을利用하여 Fe(II)과 xanthine-xanthine oxidase system을添加시킨反應液에濃度を달리한 鹿茸製劑를添加시켜反應시킨後生成된 malondialdehyde(MDA)의含量을測定하였다. 過酸化脂質의含量은 蛋白 1mg당 MDA의量을 nmole로 나타내었다.

5) 蛋白質의 定量

蛋白質의 定量은 Lowry 等の 方法⁴⁶⁾에 準해 bovine serum albumin을 標準品으로 하여 行하였다. 한편, 實驗 結果의 有意性 檢證은 Student's t-test를 利用하여 相互 比較하였다.

III. 實驗 成績

1. 試驗管內에서 過酸化脂質 生成에 미치는 影響

脂質 過酸化 反應을 測定하는 反應液中에 鹿茸 製劑의 濃度를 달리하면서 試驗管內에 添加시키고 生體條件과 同一하게 反應을 進行시키기 爲하여 37℃에서 一定時間 加溫한 後 肝 組織中의 過酸化脂質의 含量을 觀察하여 그림 1.에 나타내었다.

正常狀態 卽, 鹿茸 藥針 製劑를 添加시키지 않은 反應條件에서는 過酸化脂質 含量이 13.35 nmoles/g of tissue이었다. 그러나, 反應液中에, 鹿茸 製劑를 濃度別로 添加시킨 後 觀察한 過酸化脂質의 含量은 鹿茸 製劑 添加濃度에 依存的으로 含量減少 現狀을 나타내었으며 添加量이 100 μ l 되게 하였을 때는 過酸化脂質의 含量이 12.62 nmoles/g of tissue, 200 μ l 인 경우는 11.96 nmoles/g of tissue, 300 μ l 인 경우는 11.07 nmoles/g of tissue로 對照值에 비해 有意性 있는 抑制現狀을 觀察할 수 있었다.

2. 試驗管內에서 Fe(II)에 依해 誘導된 過酸化脂質 生成에 미치는 影響

人爲的으로 細胞膜 損傷 모델條件을 만들기 爲해서는 活性酸素 生成系를 反應液中에 添加시켜 生成된 活性酸素에 依해서 脂質의 過酸化反應을 促進시킨 病態生理모델을 利用할 수 있다. 試驗管藍에서 活性酸素 生成系인 Fe(II)과 xanthine/xanthine oxidase系를 利用하여 脂質의 過酸化反應 誘導한 後 鹿茸 藥針 製劑의 抗酸化 效果를 檢討코자 하였다.

Haber-Weiss 反應을 利用한 過酸化脂質 測定 反應液中에 鹿茸 製劑의 濃度를 달리하면서 添加시키

고 37℃에서 一定時間 反應시킨 後 過酸化脂質의 含量을 觀察하여 그림 2.에 나타내었다. 肝組織 磨碎液 一定量에 活性酸素 生成系를 利用하여 人爲的으로 脂質의 過酸化反應을 誘導한 實驗에서는 過酸化脂質의 含量이 31.12 nmoles/g of tissue이었다. 그러나, 反應液中에 50 μ l의 鹿茸 製劑를 添加시킨 경우는 30.04 nmoles, 100 μ l의 鹿茸 製劑를 添加시킨 條件에서는 過酸化脂質의 含量이 27.22 nmole, 200 μ l를 添加시켰을 때는 24.96 nmole, 300 μ l를 添加시켰을 때는 過酸化脂質의 生成量이 22.98 nmole로서 對照值에 比하여 有意性 있는 過酸化脂質 生成 抑制現狀을 나타내었다.

3. 試驗管內에서 xanthine oxidase 活性 變化에 미치는 影響

Xanthine oxidase 活性를 測定하는 反應液中에 酵素源과 基質인 xanthine 및 用量을 달리한 鹿茸 藥針 製劑를 添加시키고 xanthine oxidase의 活性 變化를 觀察한 것이 그림 3.이다. 試驗管內에 鹿茸 製劑의 添加 用量을 달리하면서 xanthine oxidase의 活性를 觀察하였을 때 type O의 경우 對照值의 活性이 0.345 nmoles 인데 比해 鹿茸 製劑의 添加 用量이 100 μ l/ml 以上の 濃度에서는 酵素 活性이 抑制되어 200 μ l/ml에서는 0.284 nmoles, 300 μ l/ml에서는 0.227 nmoles로 對照值에 比해 有意性 있게 抑制됨을 알 수 있었다. Type D+O의 경우도 type O의 경우와 마찬가지로 添加用量에 比例하여 xanthine oxidase의 活性이 抑制되었으며 添加量이 100 μ l/ml의 濃度에서 부터 有意性 있는 抑制效果가 觀察되었다.

4. 試驗管內에서 xanthine oxidase 型轉換에 미치는 影響

試驗管 實驗에서 xanthine oxidase의 型轉換比를 測定하는 反應液中에 濃度를 달리하면서 鹿茸 藥針 製劑를 添加시키고 肝臟 組織中의 xanthine oxidase의 型轉換比를 檢討한 것이 그림 4.이다. 鹿

茸 製劑의 添加 用量을 달리하면서 xanthine oxidase의 type D로 부터 type O로의 型轉換比를 觀察하였을 때, 對照值의 型轉換比가 13.1% 인데 比하여 鹿茸 製劑를 100 $\mu\text{l/ml}$ 를 添加시켰을 때는 11.5%, 200 $\mu\text{l/ml}$ 를 添加시킨 경우는 10.2%로 鹿茸 製劑의 添加濃度 依存的으로 肝臟中의 xanthine oxidase의 型轉換을 抑制시킴을 觀察할 수 있었다.

5. 試驗管內에서 aldehyde oxidase 活性에 미치는 影響

鹿茸 藥針 製劑가 試驗管內에서 肝臟 組織中에서 aldehyde oxidase 活性에 어떠한 影響을 미치는 지를 觀察하고자 하였다. 一定 濃度의 基質과 cytosol 酵素液을 包含하는 反應液中에 用量을 달리하면서 鹿茸 製劑를 添加시키고 aldehyde oxidase 酵素活性을 測定하였을 때 肝臟의 경우 對照值의 酵素活性이 1.49 nmole이었으며 鹿茸 製劑의 濃度를 增加시키면서 添加시켜도 aldehyde oxidase 活性에는 別다른 影響을 미치지 않음을 알 수 있었다.(그림 5.)

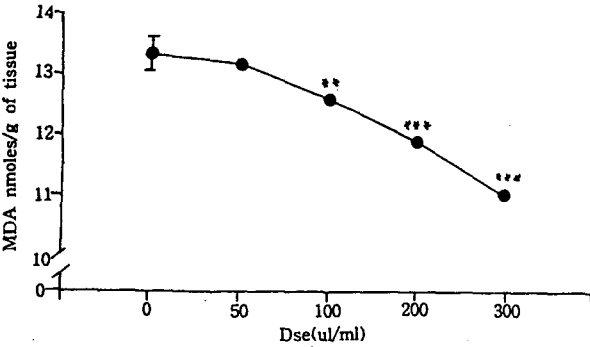


Fig. 1. Effect of the extract of *Cervus elaphus* for aqua-acupuncture on the hepatic lipid peroxidation *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods.

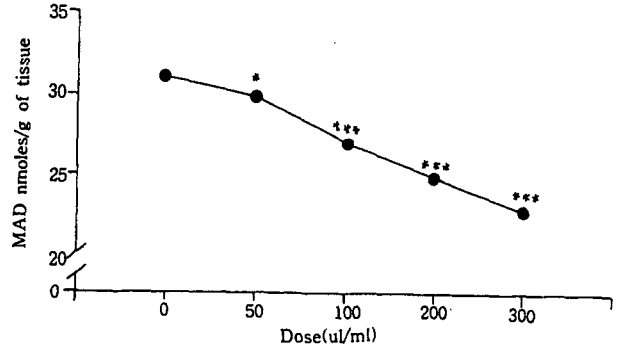


Fig. 2. Effect of the extract of *Cervus elaphus* for aqua-acupuncture on the Fe(II)-induced hepatic lipid peroxidation *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 4 separate experiments. Significantly different from control (*:P<0.05, ***:P<0.001).

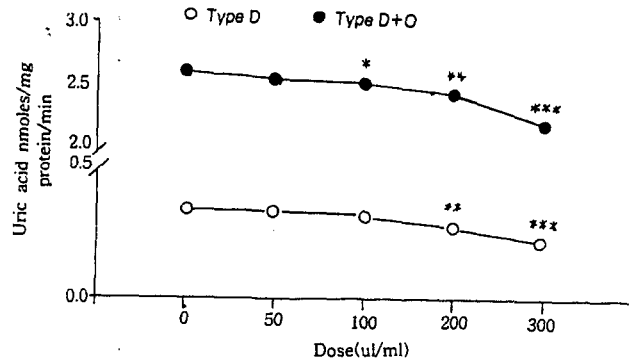


Fig. 3. Effect of the extract of *Cervus elaphus* for aqua-acupuncture on the hepatic xanthine oxidase activity *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.E. for 4 separate experiments. Significantly different from control (*:P<0.05, **:P<0.01, ***:P<0.001).

Type O : xanthine oxidase
 Type D+O : xanthine oxidase + xanthine dehydrogenase.

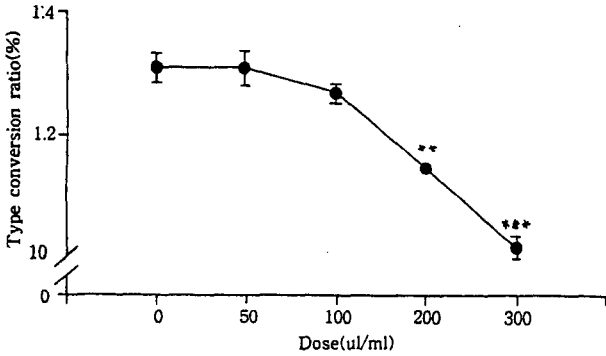


Fig. 4. Effect of the extract of *Cervus elaphus* for aqua-acupuncture on the type conversion of hepatic xanthine oxidase *in vitro*.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 4 separate experiments.

Significantly different from control

(**: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$).

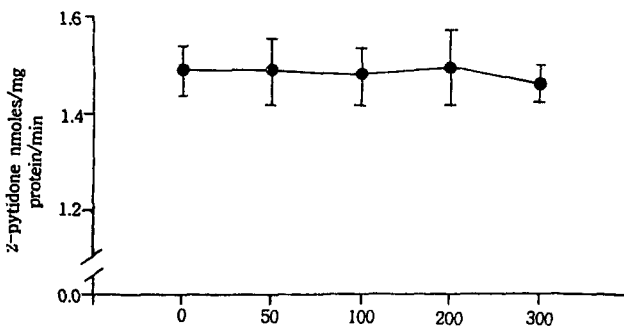


Fig. 5. Effect of the extract of *Cervus elaphus* for aqua-acupuncture on the hepatic aldehyde oxidase activity *in vitro*.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 4 separate experiments.

IV. 考察

老化現狀은 生命體의 誕生 및 成長과 더불어 進行되는 可할수 없는 生化學的 反應이다. 老化를 誘發 또는 促進시키는 因子들은 대단히 많이 알려져 있지만 가장 널리 알려지고 또한 脚光을 받는 理論은 free radical에 의한 老化 促進說이다.^{23,42)} 地球上에 存在하는 모든 生命體는 살아가기 爲한 方便으로 에너지源을 얻기 爲하여 生體內에서 酸素를 利用한 呼吸反應 卽, 酸化 反應을 必的으로 同伴하여야 한다. 生體가 生命現狀을 持續하기 爲하여 酸素를 利用한 呼吸反應이 이루어지는 동안 體內에서는 酸化 反應의 副產物로 oxygen free radical (活性酸素)이 生成되어진다.

活性酸素類에는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide 등이 알려져 있지만 superoxide anion radical과 hydroxyl radical이 강한 毒性을 지니고 있다고 한다.^{37,39,41,52)} 이러한 活性酸素類들은 매우 不安定한 狀態로 存在하므로 生體內의 다른 組織 細胞들과 쉽게 反應을 하여 組織 細胞의 損傷을 招來하는 것으로 알려져 있다.⁴⁰⁾ 活性酸素類들에 의한 細胞損傷 作用은 組織 損傷으로 이어지고 窮極의으로는 生體 全般的인 老化反應을 促進하는 生化學的 反應으로 報告되어지고 있다.⁵²⁾

東醫學에서는 活性 酸素의 生成에 따른 組織 損傷과 老化 現象이 腎虛와 아주 類似하다고 여기고 있다.³⁰⁾ 實驗 研究에 依하면 年齡이 增加함에 따라 腎虛의 頻度³²⁾와 過酸化 脂質의 含量이 比例하여 增加되었는데^{35,36)} 腎虛群에서는 過酸化脂質 含量이 上昇하여 있었다.³⁰⁾ 또한, 補腎 效能을 가진 五子衍宗液³¹⁾, 清宮長春丹³⁵⁾ 및 六味地黃湯³⁶⁾ 등의 處方들이 過酸化脂質의 含量을 低下시켜 老化를 抑制한다고 報告되고 있다.

鹿茸은 神農本草經²⁶⁾에 最初로 記載된 以後 “久服耐老”²⁵⁾, “療虛勞, 羸瘦”²⁴⁾, “生精補髓, 養血益陽, 強筋健骨”²⁸⁾의 效能으로 主로 發育不全, 元氣不足, 陽

萎證^{2,4)}과 高血壓, 虛弱證, 婦人諸病¹⁾, 神經衰弱, 失眠, 心臟衰弱 等 老年의 脾腎陽虛症에 많이 使用되고 있다.^{29,33)} 鹿茸이 適用되는 前記 臨床 症狀들은 대다수가 生體의 老化現狀과 더불어 나타나는 慢性疾患의 一種으로서 鹿茸 製劑에 依한 老人性 難治性 疾患들의 治療 效果는 곧 抗酸化 效果를 지니고 있음을 意味하기도 한다.

그러나, 鹿茸에 對한 實驗 研究로는 副腎皮質^{7,18)}, 內分泌系⁸⁾, 高脂血症^{16,21)}, 動脈硬化症¹⁵⁾, 造血機能^{12,13,13)}, 免疫機能^{6,9,11,20,22)}, 骨多孔症¹⁰⁾, 糖尿病^{17,19)} 等에 關한 實驗이 있을 뿐 藥針 製劑의 抗酸化 作用과 關聯된 研究는 그다지 보이지 않는다. 이에 著者는 老年 脾腎陽虛症에 많이 使用되는 鹿茸 藥針 製劑의 抗酸化 作用을 觀察하기 爲한 一環으로 活性酸素의 生成系 酵素에 미치는 影響을 觀察하였다.

過酸化脂質은 細胞膜에 多量 存在하고 있는 磷脂質의 多價 不飽和脂肪酸이 活性酸素類들의 攻擊을 받아 酸化反應이 連鎖的으로 이루어지므로서 細胞膜이 損傷을 입게되어 生成되는 一種의 生體毒性 反應으로서⁵³⁾, 이때 細胞膜의 破壞로 因한 細胞損傷이 나타나 老化의 進行을 促進시키거나 疾病의 誘發과 密接한 關聯性을 지니고 있는 것으로 알려져 있다.^{45,48)} 그러므로, 細胞膜 損傷 卽 細胞毒性을 測定하는 一般의 方法으로 脂質의 過酸化反應을 利用할 수 있다.

鹿茸 藥針 製劑의 抗酸化 作用을 살펴보기 爲하여 脂質의 過酸化反應을 測定하는 反應液에 鹿茸 製劑의 添加濃도를 變化시켜 가면서 一定時間 동안 反應시켰을 때 鹿茸 製劑의 濃도에 比例하여 肝 組織에서 過酸化脂質의 生成을 有意性 있게 抑制시키는 것을 觀察할 수 있었다. 한편, 過酸化脂質의 含量 測定 反應液 中에 xanthine/xanthine oxidase system과 Fe(II)을 共存시킨 狀態에서 人爲的으로 脂質 過酸化反應을 促進시킨 實驗모델인 Haber-Weiss反應⁴⁸⁾에서는 試驗管內에 鹿茸 製劑를 濃도를 달리하면서 添加시켰을 때 正常 狀態에서 나타나는 過酸化脂質 生成 抑制作用 보다 더욱 强

한 抑制作用을 觀察할 수 있었는데 이는 鹿茸 藥針 製劑가 正常 狀態보다는 生體內의 病態生理 條件이 附與된 疾病 誘發 狀態에서 더욱 敏感하게 作用을 나타내고 있음을 나타내주고 있다. 한편, 이러한 鹿茸 藥針 製劑의 優秀한 過酸化脂質 生成 抑制作用은 過酸化脂質의 含量은 年齡이 增加함에 따라서 比例하여 增加되어^{35,36,57)}, 老年의 境遇 青年에 비해 約 1.5배 增加되었다는 報告³¹⁾를 考慮할 때 老化를 防止하는 것과 關聯性이 깊을 것으로 여겨진다.

이와 같이 나타난 鹿茸 藥針 製劑에 依한 過酸化脂質 生成 抑制 現狀의 機轉을 檢討하기 爲하여 代表的인 活性酸素의 生成系 酵素인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase⁴⁴⁾의 活性에 미치는 影響을 檢討하였다.

Xanthine oxidase나 aldehyde oxidase는 生體 大部分의 組織 細胞에 分布하고 있으며 細胞의 可溶性 分割에 주로 存在한다. 이 酵素는 中心 金屬 이온으로서 몰리브덴을 含有하고 있으며 分子量이나 性狀이 대단히 類似하며 生體內에서는 主로 酸化反應을 觸媒하는 것으로 알려져 있다.^{51,54)} 이 酵素들에 依해서 酸化反應이 進行되는 동안 分子上의 酸素로 부터 superoxide anion이나 hydroxyl radical 같은 活性酸素類들이 生成되어 진다고 報告되어 있다.⁴⁴⁾ 이러한 活性酸素類들은 細胞膜의 不飽和脂肪酸과 쉽게 反應하여 膜의 過酸化를 誘發시켜 毒性을 招來하는 것으로 알려져 있다.⁴⁰⁾

鹿茸 藥針 製劑를 試驗管內에 濃度別로 添加하고 酵素液과 基質을 加하여 xanthine oxidase의 活性 變化를 觀察하였을 때 xanthine oxidase의 活性을 有意性 있게 抑制하였으며 type O의 活性이 total type(D+O)活性的 抑制정도 보다 强하였다. 또한, type D로 부터 type O로의 邱轉換比도 鹿茸 製劑의 添加濃도에 比例하여 抑制되었다. xanthine oxidase는 正常的인 生體內에 存在할 때 type D(dehydrogenase型)로 存在하다가 蛋白 分解酵素의 作用나 虛血 狀態 또는 病的 狀態가 되면 type O(oxidase型)로 型轉換이 이루어지며 이때 活性酸

素가 生成되어진다고 報告³⁸⁾되고 있다. 따라서, 鹿茸 藥針 製劑에 依한 xanthine oxidase 活性 抑制 現狀과 型轉換정도의 抑制는 鹿茸 製劑가 活性酸素類의 生成을 어느 정도 遮斷하는 것을 나타내는 實驗 成績이라고 생각되며 이러한 作用 때문에 過酸化脂質의 生成이 抑制되어진 것으로 여겨진다.

Xanthine oxidase와 機能이나 性狀面에서 대단히 類似한 酵素⁵⁴⁾인 aldehyde oxidase의 活性에 미치는 鹿茸 藥針 製劑의 影響을 觀察하였을 때는 xanthine oxidase의 경우와는 다르게 이 酵素 活性에는 鹿茸 製劑가 거의 反應하지 않음을 알 수 있었다. Xanthine oxidase는 肝 組織에서 鹿茸 製劑에 依해서 매우 敏感하게 作用하였지만 aldehyde oxidase 活性에는 아무런 影響을 미치지 않는 것으로 보아 鹿茸 製劑는 xanthine oxidase에 選擇적으로 作用하여 活性酸素類의 生成을 抑制시킨 것으로 思料되어진다.

以上的 結果들을 綜合하여 보면, 鹿茸 藥針 製劑는 抗酸化作用을 나타내고 있음을 알 수 있었으며 그 作用機轉은 活性酸素 生成系 酵素인 xanthine oxidase의 活性과 型轉換을 顯著하게 抑制시키므로서 superoxide anion radical, hydroxyl radical 또는 hydrogen peroxide과 같은 oxygen free radicals의 生成을 阻害함으로써 過酸化脂質의 生成을 抑制한 것으로 생각되어지며, 活性酸素 分解系 酵素 活性 등에 對한 研究가 必要하리라 여겨진다.

V. 結論

老年 脾胃陽虛症에 많이 使用되는 鹿茸 藥針 製劑의 抗酸化作用을 觀察하기 爲하여 흰쥐의 肝 組織에서 脂質 過酸化反應 및 活性酸素 生成系 酵素들의 活性變化에 미치는 影響을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 脂質 過酸化反應에 미치는 影響을 觀察하였을 때 鹿茸 藥針 製劑의 添加濃도에 比例하여 有意性 있는 脂質의 過酸化反應 抑制現狀이 觀察되

었으며, 特히 人爲적으로 Haber-Weiss反應을 利用하여 活性酸素의 生成을 促進시킨 狀態에서는 正常 狀態에서 보다 훨씬 強力한 抑制效果가 觀察되었다.

2. Xanthine oxidase 活性 및 型轉換에 미치는 影響을 檢討하였을 때 添加量에 依存的으로 type O의 活性과 type D+O의 活性이 모두 有意性 있게 抑制되었으며, xanthine oxidase의 型轉換보다 鹿茸 藥針 製劑의 添加 濃도에 比例하여 有意性 있게 抑制되었다.

3. Aldehyde oxidase 活性은 鹿茸 藥針 製劑가 別 다른 影響을 나타내지 않았다.

以上的 實驗 結果들을 綜合하여 보면 鹿茸 藥針 製劑는 活性酸素 生成系 酵素인 xanthine oxidase의 活性과 型轉換을 현저하게 抑制시켜 oxygen free radicals의 生成을 阻害함으로써 過酸化脂質의 生成을 抑制한 것으로 여겨지며, 活性酸素 分解系 酵素 活性에 關한 研究가 必要하리라고 思料된다.

參 考 文 獻

- 1) 南相千 : 經絡(4), 宇宙經絡社, p.149,151,167, pp.136-137,162-165, 1976.
- 2) 辛民教 : 臨床本草學, 永林社, p.184, 1991.
- 3) 醫學教育研修院 編 : 全訂版 家庭醫學, 서울大 學校 出版部, pp. 945-946, 1995.
- 4) 李尙仁 外 : 漢藥臨床應用, 成輔社, p.332, 1986.
- 5) 崔용태 外 : 鍼灸學(下), 集文堂, p. 1457, 1991.
- 6) 高炳熙 : 鹿茸, 熟地黃, 人蔘, 五加皮가 免疫反應 및 NK細胞活性도에 미치는 影響, 慶熙大學 校 大學院 博士 學位 論文, 1986.
- 7) 金甲麗 : 鹿茸水鍼이 白鼠의 副腎皮質機能不全에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1987.
- 8) 金敬彬 : 鹿茸類가 白鼠의 內分泌機能에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士 學位 論文, 1984.

- 9) 金卿顯 : 人蔘 및 鹿茸水鍼이 免疫機能에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1988.
- 10) 金根模 : 鹿茸 및 六味地黃湯加鹿茸이 白鼠의 運動抑制性 骨多孔症에 미치는 影響, 慶山大學校 大學院 博士 學位 論文, 1994.
- 11) 金大洙 : 鹿茸, 人蔘 및 靈芝水鍼이 免疫反應에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士 學位 論文, 1992.
- 12) 金美貞 : 鹿茸 有效分劃이 생쥐의 造血系에 미치는 免疫生物學的 研究, 仁荷大學校 大學院 博士 學位 論文, 1995.
- 13) 金容熙 : 鹿茸投與가 白鼠의 血清 蛋白質 含量 및 Prothrombin time에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1978.
- 14) 金璨圭 : 랫트의 造血 機能에 미치는 鹿茸의 影響에 對한 研究, 建國大學校 農畜大學院 碩士 學位 論文, 1993.
- 15) 閔勝源 : 鹿茸이 動脈硬化症에 미치는 影響에 關한 實驗的 研究, 漢陽大學校 大學院 博士 學位 論文, 1977.
- 16) 朴基晚 : 鹿茸 藥針 刺戟이 흰쥐의 高脂血症에 미치는 影響, 東國大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1994.
- 17) 朴鍾賢 : 鹿茸이 Streptozotocin糖尿에 미치는 影響에 對한 免疫組織學的 研究, 慶山大學校 大學院 博士 學位 論文, 1994.
- 18) 朴重秀 : 鹿茸 水鍼이 副腎皮質機能低下에 미치는 影響, 東義大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1994.
- 19) 卞晟禧 : 六味地黃湯 및 鹿茸加味方이 흰쥐 糖尿에 對한 免疫組織化學的 研究, 慶山大學校 大學院 博士 學位 論文, 1994.
- 20) 李栽東 : 鹿茸, 黃芝, 當歸水鍼이 放射線 被曝에 의한 免疫機能 低下에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院 博士 學位 論文, 1993.
- 21) 韓娜英 : 鹿茸中에 存在하는 脂質 및 Gangliosides에 關한 研究, 梨花女子大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1993.
- 22) 黃慶愛 : 人蔘 및 鹿茸水鍼의 時間經過에 따른 免疫效果 研究, 慶熙大學校 大學院 碩士 學位 論文, 1988.
- 23) 최진호 : 노화의 메카니즘과 연구방향, 생화학 뉴스, 한국생화학회, 5(3):39-53, 1985.
- 24) 唐慎微 : 重修政和經史證類備用本草, 大星文化社, p.199,376,377, 1983.
- 25) 陶弘景 : 名醫別錄, 人民衛生出版社, p.180, 1986.
- 26) 孫星衍, 孫馮翼 輯 : 神農本草經, 北京, 建築工井出版社, p.84, 1982.
- 27) 王其飛 外 : 中醫長壽學, 遼寧科學技術出版社, pp.50,53-54, 1989.
- 28) 李時珍 : 本草綱目(下), 商務印書館, 第25卷 第26項, 1991.
- 29) 錢百炎 外 : 中草藥注射劑, 上海科學技術出版社, pp.70-93,150-151, 1981.
- 30) 梁曉春 外 : 腎虛,衰老與自由基的關係以及補腎藥對自由基的影響, 中西醫結合雜誌, 10(8):511-512, 1990.
- 31) 王學美 外 : 五子衍宗液延緩衰老的臨床觀察, 中國中西醫結合雜誌, 12(1):23-25, 1992.
- 32) 姚培發 : 祖國醫學抗老年齡問題初探, 上海中醫藥雜誌, (6):2-4, 1981.
- 33) 張桂寶 : 鹿茸精注射液治療老年脾腎陽虛泄瀉 11例, 中醫雜誌, 25(5):30, 1984.
- 34) 張文彭 外 : 老年腎虛證血漿過氧化脂質高密度脂蛋白膽固醇及其亞組分水平變化, 中醫雜誌, 30(2):43-46, 1989.
- 35) 張文彭 外 : 清宮長春丹對老年腎虛證血漿過氧化脂質高密度脂蛋白膽固醇水平影響的研究, 中醫雜誌, 30(3):34-38, 1989.
- 36) 蔣莹 外 : 六味地黃湯及其配伍對過氧化脂質及脂褐質含量的影響, 中國中藥雜誌, 16(3):175-176, 1991.
- 37) Barry, H : Oxidants and human disease :

- Some new concepts. *FASEB. J.*, 1:358-364 (1987)
- 38) Batteli, N. G., Lorenzoni, E. and Stirpe, F. : Milk xanthine oxidase type D(dehydrogenase) and type O(oxidase) : Purification and interconversion and some properties. *Biochem. J.*, 131:191-198 (1973)
- 39) Beauchamp, C. and Fridovich, I. : A mechanism for the production of ethylene from methional : The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 245:4641-4646 (1970)
- 40) Cutler, R. G. : Antioxidants, aging and longevity. *Free Radicals in Biology*, Academic Press, Vol. 6, pp.371-424 (1984)
- 41) David, R. : Mechanistic toxicology: A radical perspective. *J.Pharm. pharmacol.*, 41:505-511 (1989)
- 42) Feher, J., Csomos, G. and Vereckei, A. : The free radical theory of aging. *Free Radicals Reactions in Medicine*, Springer-Verlag, Berlin, pp.57-59 (1987)
- 43) Harman, D. : Free radical theory of aging ; Role of free radicals in the organization and evolution of life, aging and disease processes. *Free Radicals, Aging and Degenerative Disease* (ed. Johnson, J.E. et al.), Alan R.Liss.Inc., New York, pp.3-49 (1986)
- 44) Kreintsky, T. A., Tuttle, J. V., Cattau, E. L. and Wang, P. : A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 49B:687-703 (1974)
- 45) Larry, W. O and Terry, B. O : Free radicals, aging and degenerative disease. *Alan R. Liss. Inc.* pp.325-371 (1986)
- 46) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275 (1951)
- 47) Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S. G., Howell, L. G. and Engel, P. C. : The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoprotein with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 36:891-897 (1969)
- 48) Milan, L., Jozef, R., Vilian, K., Peter, P. and Ladislav, V. : Free radicals in chemistry and biology, CRC Press, pp.29-31,283-283 (1989)
- 49) Nohl, H. and Hegener, D. : Do mitochondria produce oxygen radical in vivo?, *Eur.J.Biochem.* 82:563-567 (1978)
- 50) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95:351-358 (1979)
- 51) Parks, D. A. and Granger, D. N. : Xanthine oxidase : biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand.* 548, Suppl. 87-99 (1986)
- 52) Pryor, W. A. : Free radical in biology : Involvement of radical reaction in aging and carcinogenesis in medicinal chemistry. *Elservier, Amsterdam.* pp.331-361 (1977)
- 53) Pryor, W. A., Stanley, T. P. and Blair, E. : Autoxidation of polyunsaturated fatty acids(II), *Lipids*, 11:370-379 (1976)
- 54) Rajagopalan, K. V., Fridovich, I. and Handler, P. : Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 237:922-928 (1962)
- 55) Simon, R. H., Scogging, C. M. and Patterson, D. : Hydrogen peroxide cause the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen

radicals. J. Biol. Chem., 266:7181-7186 (1981)

56) Stirpe, F. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase : Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). J. Biol. Chem., 244:3855-3863 (1969)

57) Yagi, K.: Lipid peroxides and diseases, Chem. and Phys. of Lipid, 45:337(1987)