

Oxidant에 의한 신장세뇨관 물질이동계의 장애에 대한 丹參의 효과

東國大學校 韓醫科大學 內科學教室

金尙範 · 鄭智天

I. 緒論

산소유리기들 (reactive oxygen species)은 신장에서 허혈성 급성신부전, 항생제나 독성물질에 의해 유발되는 급성신부전 및 사구체신염 등과 같은 급성 및 만성 신장질환을 일으키는 원인으로 보고되고 있다.¹⁻⁴⁾

생체세포막들은 불포화지방산을 많이 함유하고 있기 때문에 산소유리기들에 의해 쉽게 공격을 받아 지질의 과산화가 발생되게 된다.^{5,6)} 산소유리기들이 직접 작용하거나 지질의 과산화를 통해서 세포막의 투과성을 증가시키고,^{5,7)} 세포막을 통한 물질이동을 억제함으로써 신장기능 장애를 유발하고 있다.^{8,9)} 그러므로 이들을 제거하거나 발생을 억제할 수 있는 약물이 개발된다면 급성신부전을 방지하거나 예방하는 길이 열릴 수 있을 것이다.

급성신부전의 치료에 관한 한약물 연구는 많이 이루어져 gentamicin sulfate로 誘發된 急性 腎不全 白鼠에 五苓散, 六味地黃湯, 壯原湯加味方, 補中治濕湯加味方, 加味八正散, 金木八正散, 加減消脹飲子, 加減五積散, 加味補中益氣湯, 加減胃苓湯 및 商陸, 甘遂 등의 약물이 絲毬體 濾過機能의 低下를 改善시키거나 尿毒物質의 蓄積을 減少시켜 利尿 효과와 함께 絲毬體 濾過率의 增加와 細尿管 再吸收 機能恢復에 有效하다고 보고되었다.¹⁰⁻¹⁶⁾ 그러나 반응성산소기와 관련된 연구는 補腎 효능을 가진 胡桃 藥鍼液에 대한 보고^{17,18)}가 있을 뿐이다.

丹參은 活血化癥 약물로서^{19,20)} 급성 및 만성 신부전의 치료에 활용되고 있으며²¹⁻²⁶⁾ 산소유리기를 소거시키고 SOD 활성을 증가시키는 등 항산화 효과도 보고되고 있다.^{27,28)}

이에 저자는 丹參 추출액이 신세뇨관에서 산소유리기에 의한 물질이동계의 장애에 어떤 효과를 나타내는지를 조사하고, 그 효과가 산소유리기들의 작용을 방지하는 효과에 기인하는지를 확인하고자 토끼 신장의 피질 조직에서 H₂O₂에 의한 손상에 대하여 근위세뇨관에서 능동적 이동과정으로 분비되는 물질로 알려진²⁹⁾ 유기양이온인 tetraethylammonium (TEA)의 이동 양상 등에 대한 영향을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재료

1) 동물

체중 1.5-2kg되는 New Zealand 백색 성토끼를 동물사육장에서 구입하여 암수 구별없이 사용하였다.

2) 약재

丹參(Salviae Radix)을 시중에서 구입하여 정선한 것을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

丹參 150g을 1,000ml round flask에 넣고 증류수 500ml를 가한 다음 냉각기를 부착하여 2시간 동안 가열 전탕하고 2회 흡인 여과한 여액을 rotary vaccum evaporator에 넣어 감압 농축시켜 액기스 분말을 얻어 본 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 신피질 절편의 제작

토끼를 희생시킨 후 신장을 들어내어 냉한 saline을 신동맥내 주입하여 혈액을 제거한 다음 Stadie-Riggs microtome으로 약 0.3 - 0.5 mm 두께의 신피질 절편을 만들어 사용하였다.

3) 신피질 절편에서 TEA 이동 실험

신피질 절편에서 TEA 이동은 10 μ M의 ¹⁴C-TEA를 포함하고 있는 용액 4 ml가 들어 있는 용기내에 약 50 mg되는 신피질 절편을 넣고 100% O₂를 공급하면서 25°C에서 incubation하였다. Incubation 후 신피질 절편을 들어내어 물기를 닦고 무게를 측정한다 다음 1 N NaOH에 녹였다. 이들 용해된 액과 incubation 용액을 적당한 양을 취하여 방사선 동위원소의 양을 scintillation counter로 측정하여 세포내 축적된 ¹⁴C-TEA의 양을 S/M (Slice/Medium) ratio 즉, 용액내의 농도에 대한 조직내 축적된 양의 비로 나타내었다.

4) 세포 손상 측정

신피질 절편에서 세포 손상 정도를 확인하기 위하여는 lactate dehydrogenase (LDH) 유리를 측정하여 판정하였는데, 적당한 조건에서 incubation한 세포들을 용액으로부터 분리한 후 세포를 마쇄시켜 incubation 용액과 마쇄된 조직액 각각 50 μ l를 취하여 LDH 활성을 LDH assay kit (Sigma Chemical)를 이용하여 측정하였다.

5) Lipid peroxidation 측정

세포막 지질의 과산화 정도는 그 산물인 malondialdehyde (MDA) 양을 Uchiyama와 Mihara 방법³⁰⁾으로 측정하여 평가하였다. 간단히 설명하면, 간조직을 차가운 1.15% KCl 용액 (5% wt/vol) 속에서 파쇄하였다. 이 조직과 쇄 균질액 0.5 ml에 1% 인산 용액 3 ml과 0.6% thiobarbituric acid 용액 1 ml을 첨가하여 끓는 물에서 45분간 가열하였다. n-Butanol 4 ml을 첨가하여 완전히 섞은 다음 2000 g에서 20분간 원심분리한 후, 상층액의 흡광도를 536와 520 nm에서 측정하였다. MDA 값은 단백질 1 mg 당 nmoles로 표시하였다. 단백질 농도는 Bradford³¹⁾의 방법으로 측정하였다.

6) 자료 정리 및 통계 처리

성적은 평균치±표준오차로 나타내었으며, 평균치간의 유의성은 Student's t-test를 이용하여 검정하였고 p 값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

III. 成 績

1. 신피질 절편에서 TEA 이동에 대한 H₂O₂의 영향

신피질 절편에서 TEA uptake를 incubation 시간별로 조사한 결과 incubation시간이 연장됨에 따라 TEA uptake는 비례하여 증가하여 5분에 S/M비가 4.28±0.83이던 것이 60분에는 16.83±2.72로 약 4배로 증가하였다. 여기에 H₂O₂를 50 mM 농도로 첨가하였을 때 TEA uptake는 유의하게 억제되었다. (그림 1)

2. H₂O₂에 의한 TEA 이동 장애에 대한 丹參의 효과

丹參추출액이 H₂O₂에 의한 TEA uptake의

억제에 어떤 영향을 나타내는 지를 확인하기 위하여 丹參추출액을 0.5%되게 H₂O₂를 처리하는 용액내에 첨가하였을 때 50 mM H₂O₂에 의해 억제되었던 TEA uptake는 거의 정상 수준까지 회복되었다 (그림 2).

그림 3은 TEA uptake를 억제하는 H₂O₂의 작용을 방지하는 丹參의 효과가 농도에 따라 어떻게 변하는 지를 조사한 결과이다. 신장 조직을 50 mM H₂O₂를 노출시켰을 때 TEA uptake의 S/M비는 15.87±1.43에서 7.49±0.55로 감소하였으며, H₂O₂를 처리할 때 丹參의 농도를 0.05%에서 1%까지 증가시켜 첨가했을 때 H₂O₂에 의해 억제되었던 TEA uptake는 丹參의 농도에 비례하여 증가하였다. 丹參의 농도가 0.1%일 때 TEA uptake의 S/M비가 10.34±0.92로 유의한 증가를 보였으며, 0.5와 1%에서는 각각 13.28±1.46과 16.32±2.55로 거의 정상값까지 회복되었다.

3. H₂O₂에 의한 세포손상에 대한 丹參의 효과

신장 조직을 50 mM H₂O₂에 노출시켰을 때 LDH 유출이 3.37±0.55%에서 25.39±2.59%로 약 7.5배로 증가함으로써 세포 손상이 현저하게 유발되었음을 알 수가 있었다. 신장 조직을 H₂O₂에 노출시키고 丹參 추출액을 0.5%되게 첨가하였을 때 LDH 유출은 5.47±1.89%로 거의 정상 수준까지 감소되었다. (그림 4)

4. H₂O₂에 의한 지질의 과산화에 대한 丹參의 효과

신장 조직을 50 mM H₂O₂에 노출시켰을 때 지질의 과산화가 223.48±23.46 pmole MDA/mg protein에서 893.50±32.92 pmole MDA/mg protein으로 약 4배 증가함으로써 H₂O₂의 세포 손상 작용이 지질의 과산화에 의

해 유발되고 있음을 암시하고 있다. 丹參 추출액을 0.5% 농도 되게 첨가하였을 때 H₂O₂에 의해 유발된 지질의 과산화는 유의하게 억제되었다. (그림 5)

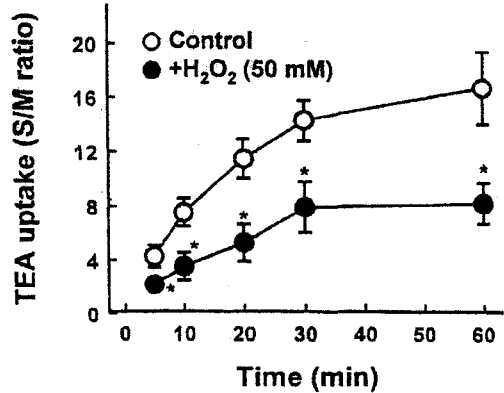


Fig. 1. Time course of tetraethylammonium (TEA) uptake in renal cortical slices. Slices were incubated at 25°C for 5-60 min in the presence and absence (control) of 50 mM H₂O₂. Data are mean±SE of three experiments. *p<0.05 compared with the respective control.

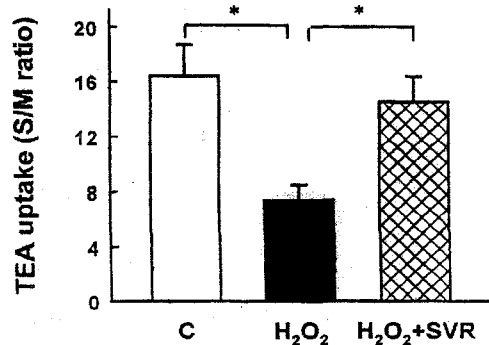


Fig. 2. Effect of Salviae-radix (SVR) extraction on H₂O₂-induced inhibition of TEA uptake in renal cortical slices. Slices were treated with 50 mM H₂O₂ at 25°C for 60 min in the presence and absence of 0.5% SVR. Data are mean±SE of three experiments. *p<0.05.

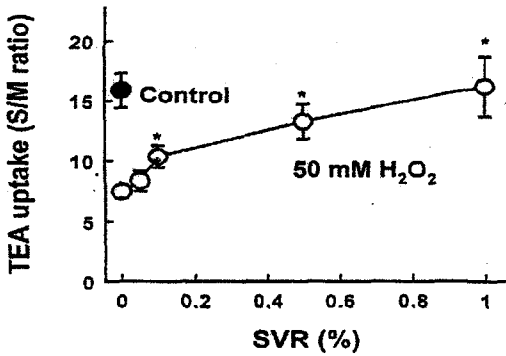


Fig. 3. Dose dependency of SVR protective effect against H_2O_2 -induced inhibition of TEA uptake in renal cortical slices. Slices were treated with 50 mM H_2O_2 at 25°C for 60 min in the presence and absence of 0.05-1% SVR. Data are mean \pm SE of four experiments. * p <0.05 compared with the absence of SVR.

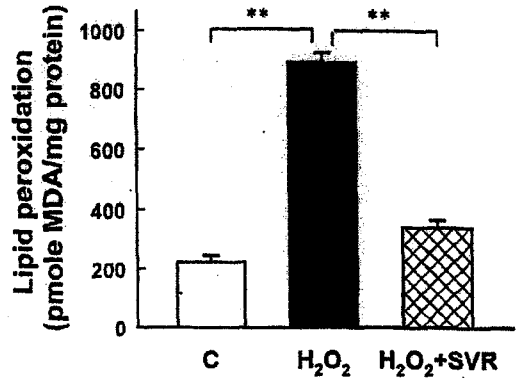


Fig. 5. Effect of SVR on lipid peroxidation induced by H_2O_2 in renal cortical slices. Slices were treated with 50 mM H_2O_2 at 37°C for 60 min in the presence and absence of 0.5% SVR. Data are mean \pm SE of four experiments. ** p <0.01.

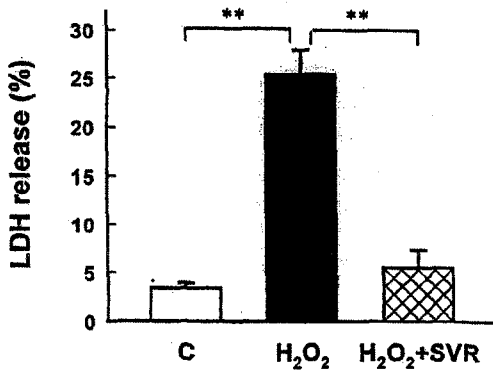


Fig. 4. Effect of SVR on lactate dehydrogenase (LDH) induced by H_2O_2 in renal cortical slices. Slices were treated with 50 mM H_2O_2 at 37°C for 60 min in the presence and absence of 0.5% SVR. Data are mean \pm SE of four experiments. ** p <0.01.

IV. 考 察

급성신부전은 한의학에서 關格, 癰閉, 浮腫, 蓄血, 中毒, 虛損 등의 범주에 속하는 것으로 치료는 利水, 解毒, 清熱, 通泄, 健脾, 補腎 및 活血化癥法 등이 활용되고 있다.^{21,26,32,33)}

丹參은 活血化癥 약물로서 性味가 苦, 微寒 하고 腎, 肝, 心에 歸經하여 破宿血, 生新血, 通利血脈, 除煩熱, 排膿生肌, 養神定志 등의 효능이 있다.^{19,20,34,35)} 관상동맥 질환, 고혈압, 뇌혈관질환 등의 치료에 활용되어 왔으며,³⁵⁾ 급만성신부전의 치료에 활용되고 있다.²¹⁻²⁶⁾ 실험적 연구에 의하면 산소유리기를 소거시키는 작용이 있으며,²⁷⁾ 老衰한 小鼠의 적혈구, 심장, 간장 및 신장의 SOD 활성을 증가시키는 효과가 있다²⁸⁾고 보고한 바 있다.

이에 저자는 丹參이 급성신부전의 치료에 유효한 지를 검토하고 그 기전을 구명하기 위하여 실험에 착수하였다. 본 실험에서는 丹參 추출액이 신세뇨관에서 산소유리기에 의한 물

질이동계의 장애에 어떤 효과를 나타내는 지를 조사하고, 그 효과가 산소유리기들의 작용을 방지하는 효과에 기인하는 지를 확인하고자 하였다.

신장 조직에서 TEA 이동을 검토하기 위해 피질 절편에서 60분 동안 incubation하였을 때 S/M비가 약 16.83까지 도달하였는데, S/M비가 16.83이라는 것은 조직내 TEA의 농도가 incubation 용액내의 농도에 비하여 16.83배 높다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 TEA가 16.83배 농도차에 역행하여 신세뇨관 세포내로 능동적으로 이동하였음을 의미하며, 다른 연구자들의 보고와 유사하다.^{36,37)} 여러 연구자들이 신장조직의 기능적 변화를 볼 때 유기 음이온이나 유기 양이온의 이동 변화를 조사하였는데, Kluwe³⁸⁾는 신피질 절편에서 이들 이온들의 이동 변화가 신장의 기능적 손상 정도를 판단하는 데 가장 예민한 방법임을 보고하였다.

이 실험에서는 腎臟 및 肝臟을 포함한 여러 조직에서 유해산소기들에 의한 細胞 損傷 기전을 연구하는데 자주 이용되고 있는 oxidant인 H_2O_2 ³⁹⁾를 처리하여 腎臟 組織에 細胞 損傷을 유발시켰다. 신장 조직을 50 mM H_2O_2 에 노출시켰을 때 TEA uptake가 유의하게 억제되어 H_2O_2 가 신세뇨관 세포에서 물질의 능동적 이동을 장애하는 것으로 나타났다. 丹參 추출액을 첨가하였을 때 H_2O_2 에 의해 억제되었던 TEA uptake가 丹參의 농도에 비례하여 유의하게 증가하였으며, 0.5와 1% 농도에서는 50 mM H_2O_2 에 의한 TEA uptake 억제를 거의 정상 수준까지 회복시킴으로서 丹參이 oxidant에 의한 물질 이동 장애를 방지하고 있음을 보였다.

또한 H_2O_2 는 LDH 유출을 현저하게 증가시키므로써 세포 손상을 유발하였고, 지질의 과산화를 현저하게 증가시키는 것으로 나타났다. 그러므로 H_2O_2 에 의한 세포 손상 작용이 지질의 과산화에 의해 유발되며, 물질의 능동적 이동을 억제하는 것과 서로 연관되어 있음을 암

시하고 있다.

H_2O_2 에 의해 유발된 TEA uptake 억제를 방지하는 丹參의 효과가 세포손상 및 지질의 과산화를 방지함으로써 나타나는 지를 확인하기 위하여 H_2O_2 에 의해 유발된 세포손상 및 지질의 과산화에 대한 丹參의 효과를 관찰한 결과 LDH 유출을 거의 정상 수준으로 감소시키고 지질의 과산화를 유의하게 억제하는 것으로 나타났다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 丹參이 oxidant에 의한 세포 손상과 지질의 과산화를 억제함으로써 TEA 이동 장애를 방지할 수 있을 것으로 여겨진다. 그러나 丹參이 어떤 기전에 의해 신장 조직에서 oxidant에 의한 물질 이동계의 장애를 방지하며, 세포손상과 지질의 과산화를 억제하는 강력한 항산화제 역할을 하는지는 더욱 추구해 보아야 밝혀질 것으로 예상된다.

V. 結 論

丹參이 신장 세포에서 oxidant에 의한 물질 이동계의 장애에 어떤 영향을 미치는 지를 확인하기 위하여 근위신세뇨관에서 능동적으로 분비되는 유기양이온인 tetraethylammonium (TEA) 이동에 대한 H_2O_2 와 丹參 추출액의 효과를 조사하였다.

토끼 신피질 절편에서 TEA uptake는 60분까지 incubation 시간에 비례하여 증가하였으며, 50 mM H_2O_2 는 TEA uptake를 유의하게 억제하였다. 50 mM H_2O_2 에 TEA uptake의 억제는 0.5% 丹參 추출액을 첨가했을 때 유의하게 방지되었다. 丹參의 방지 효과는 농도에 의존적으로 나뉘는 데, 0.5-1% 농도의 丹參 추출액은 50 mM H_2O_2 에 의한 TEA uptake 억제를 완전히 방지하였다. 50 mM H_2O_2 를 신장 조직에 노출시켰을 때 LDH 유출이 현저하게 증가하였으며, 이러한 증가는 0.5% 丹參 추출액의 첨가에 의해 완전히 방지되었다. 지질

의 과산화는 H_2O_2 의 처리에 의해 증가되었으며 이러한 증가는 0.5% 丹參 추출액의 첨가에 의해 방지되었다. 이러한 실험 결과는 丹參이 강력한 항산화효과를 나타내며, 신장 세포에서 oxidant에 의한 물질 이동계의 장애를 방지하는 丹參의 작용기전이 항산화 효과에 기인할 것으로 예상된다.

參考文獻

1. Paller MS and Neumann TV: Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. *Kid Int*, 40:1041-1049, 1991.
2. Walker PD and Shah SV: Evidence of the role of hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest*, 81:334-341, 1988
3. Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, Kunkel RG and Ward PA: Evidence for the role of oxygen free radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab Invest*, 51:396-403, 1984.
4. Weinberg JM : The biology of ischemic renal injury. *Kid Int*, 39:479-500, 1991.
5. Chance B, Sies H and Boveris A: Hydroperoxide metabolism un mammalian organs. *Physiol Rev*, 59:527-605, 1979.
6. Mead :
7. Arstila AU, Smith MA and Trump BF: Microsomal lipid peroxidation: Morphological characterization. *Science*, 175: 530-533, 1972.
8. Koko K, Kato M, Matsuoka T and Mustapha A: Depression of membrane-bound Na^+-K^+ -ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am J Physiol*, 254:C330-C337, 1988.
9. Andreoli SP, 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*, 265:F337-F384, 1993.
10. 안세영 외 : 五苓散 및 六味地黃湯이

- Gentamicin Sulfate로 유발된 백서의 급성 신부전에 미치는 영향, 경희한의대논문집, 17:145-165, 1994.
11. 강석봉 : 加減胃苓湯이 Gentamicin Sulfate로 유발된 백서 신손상에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위 논문, 1989.
 12. 김인선 : 壯原湯 加味方 및 補中治濕湯 加味方이 Gentamicin Sulfate로 유발된 백서의 급성신부전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위 논문, 1991.
 13. 손숙영 : 加減消脹飲子, 加減五積散 및 加味補中益氣湯이 Gentamicin Sulfate로 유발된 백서의 급성신부전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위 논문, 1990.
 14. 조동현 : 加味八正散 및 金木八正散이 Gentamicin Sulfate로 유발된 백서의 급성신부전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위 논문, 1989.
 15. 정정렬 : 商陸 煎湯液이 Gentamicin Sulfate로 유발된 백서의 급성신부전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위 논문, 1992.
 16. 한양희 : 甘遂 煎湯液이 Gentamicin Sulfate로 유발된 백서의 급성신부전에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 석사학위 논문, 1992.
 17. 김영해 외 : 胡桃藥鉞液의 항산화 효과에 대한 연구 (I. 신장세포에서 oxidant에 의한 손상에 미치는 영향), 대한한의학회지, 17(1):9-18, 1996.
 18. 김영해 외 : 胡桃藥鉞液의 항산화 효과에 대한 연구 (II. oxidant에 의한 세포 손상을 방지하는 기전), 대한침구학회지, 13(2) 54-66, 1996.
 19. 李尙仁 : 本草學, 서울, 醫藥社, pp. 419-420. 1975.
 20. 江蘇中醫學院 編 : 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, pp. 478-482, 1988.
 21. 曹希和 : 急性腎功能衰竭的中醫臨床研究, 中醫雜誌 (6):54-56, 1988.
 22. 陳伯煊 : 慢性腎衰中醫治則的探討, 四川中醫 (2):19-20, 1993.
 23. 劉山康 : 老年慢性腎功能衰竭治療蠡言, 江蘇中醫 (1):30-32, 1991.
 24. 胡元奎, 許建泰 : 益腎通絡湯治療慢性腎炎腎功能不全 46例, 陝西中醫 14(11):487, 1993.
 25. 張小華 : 健脾益腎活血祛瘀法治療慢性腎炎腎功能不全, 福建中醫藥 23(4):27-28, 1992.
 26. 張天, 陳以平 主編 : 實用中醫腎病學, 上海中醫學院出版社, p.638, 649, 659, 675, 1990.
 27. 許沛虎 外 : 中醫藥研究中有關自由基研究近況, 中西醫結合雜誌 15(3):185-188, 1995.
 28. 郭忠興 外 : 丹參對老齡小鼠SOD和LPO的影響, 中成藥 15(11):27-28, 1993.
 29. Rennick BR: Renal tubular transport of organic cations. In:Renal Transport of Organic Substances (ed., Greger R, Lang F and Silbernagl S), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp.178-188, 1981.
 30. Uchiyama M and Mihara M: Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. Anal Biochem, 86: 271-278, 1978.
 31. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72,248-524.
 32. 두호경 : 동의신계학, 서울, 동양의학연구원, pp.514-527, 1990.
 33. 張大寧 : 實用中醫腎病學, 天津, 中國醫藥科學技術出版社, pp.473-485, 1990.
 34. 吳儀洛 : 本草從新, 上海科學技術出版社, pp.24-25, 1982.
 35. 王浴生 主編 : 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp. 223-232. 1983.
 36. Holm J: In vitro studies on the uptake

- of ¹⁴C-labelled tetraethylammonium in mouse kidney. *Acta Pharmacol et Toxicol*, 31:129-137, 1972.
37. McIsaac RJ: The binding of organic bases to kidney cortex slices. *J Pharmacol Exp Ther*, 168:6-13, 1969.
 38. Kluwe WM: Renal functional tests as indicators of kidney injury. *Toxicol Appl Pharmacol*, 57:414-424, 1981.
 39. Farber JL, Kyle ME and Coleman JB : Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest*, 62:670-679, 1990.

ABSTRACT

**Effect of Salviae-radix on oxidant-induced impairment
of membrane transport function in renal tubules**

Sang-beum Kim, Ji-cheon Jeong

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Dong-guk University

This study was undertaken to determine whether Salviae-radix (SVR) extraction exerts beneficial effect against oxidant-induced inhibition of tetraethylammonium (TEA) uptake which is actively secreted by renal proximal tubules. TEA uptake increased as function of incubation time to 60 min. When renal cortical slices were exposed to 50 mM H₂O₂, TEA uptake was significantly inhibited. The inhibition was significantly protected by addition of 0.5% SVR extraction. The beneficial effect of SVR was dose-dependent over the concentration range of 0.1-1%; H₂O₂ (50 mM)-induced inhibition of TEA uptake was completely protected by 0.5-1% SVR extraction. H₂O₂ increased LDH release which was accompanied by an increase in lipid peroxidation in renal cortical slices. These changes were prevented by 0.5% SVR. These results suggest that SVR exerts beneficial effect against oxidant-induced impairment of membrane transport function, this effect may be due to by an antioxidant action.

Key Words : salviae radix, H₂O₂, renal cortical slices, TEA uptake, membrane transport function.