

자유기에 의한 지질과산화 반응에 대한 황금 약침액의 항산화 효능

김성일² · 문진영^{1*} · 김갑성² · 김두희³ · 남경수⁴ · 임종국¹

동국대학교 한의과대학 ¹경혈학교실, ²침구학교실,
의과대학 ³예방의학교실, ⁴면역약리학교실

Antioxidative Effects of *Scutellariae Radix* Aquaacupuncture Solution on Lipid Peroxidation Induced by Free Radicals

Sung-Il Kim², Jin-Young Moon¹, Kap-Sung Kim², Doo-Hie Kim³,
Kyung-Soo Nam⁴ and Jong-Kook Lim^{1*}

¹Department of AM-Pointology and ²Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine,
³Department of Preventive Medicine, ⁴Department of Pharmacology, College of Medicine,
Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

Abstract: *Scutellariae radix*, has been used as a natural drug for fever, inflammation, cataract, and liver disease in traditional medicine. This study was performed in order to investigate the antioxidative effects of *Scutellariae radix* aqua-acupuncture solution (SRAS) on lipid peroxidation by free radicals. Lipid peroxidation levels were determined by TBA method during the autoxidation of linoleic acid. In this linoleic acid autoxidation system, SRAS markedly exhibited antioxidant activity, which inhibited 89% of linoleic acid peroxidation. SRAS showed scavenging effects on α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) radical, inhibited superoxide generation in xanthine-xanthine oxidase system, and also inhibited lipid peroxidation of rat liver tissue by hydroxyl radical derived from H_2O_2 - Fe^{+2} system. These effects were similar to those of *dl*- α -tocopherol, BHA and BHT. In addition, SRAS protected the cell death induced by tert-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) and significantly increased cell viability in the normal rat liver cell (Ac2F). On the basis of these results, it is suggested that SRAS might play a protective role in lipid peroxidation by free radicals.

I. 서 론

생물학 혹은 의학적으로 관심사가 되고 있는 자유기(free radicals) 및 활성산소종(reactive oxygen species)은 외부로부터 침입하는 세균을 대식세포가 제거하는 과정 등 정상적인 생명현상의 유지에 필수적인 역할을 담당하고 있으나, 이러한 물질들이 생체내에서 과도하게 생성됨으로써 생체가 산화적 스트레스에 노출될 경우, 세포막의 파괴와 유전자 손상이 일어나고, 이로 인해 결국 노화, 돌연변이, 암, 동맥경화 등의 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다. 특히 근 수십년간 급속한 산업발전의 부작용으로서 대기오염, 수질오염, 토양오염 등의 생활환경 파괴와 약물남용, 농약사용, 식품첨가물 등으로 인하여 생체는 산화적 스트레스에 노출될 가능성이 날로 높아지고 있는 실정이다. 한편 생체의 산화적 손상에 대한 예방

및 치료와 관련한 한의학적 연구는 주로 노화의 방지와 관련하여 연구되어 왔는데, 특히 腎虛와 瘀血을 노화의 주요원인으로 인식하고, 補劑⁽¹⁻⁶⁾ 및 活血化瘀劑⁽⁷⁻¹¹⁾를 중심으로 연구가 이루어지고 있다. 그러나 최근에 文⁽¹²⁾ 등은 간 손상에 대한 보호효능을 가진 藥材의 작용기전이 자유기에 의한 산화적 손상을 제어하는 기전과 밀접한 관련성이 있음을 시호 추출물을 이용한 연구보고에서 제시한 바 있다. 한편 황금⁽¹³⁾은 시호와 더불어 소시호탕의 주요 구성약물로 性이 寒無毒, 味는 苦하고 心, 肺, 大腸, 小腸 및 肝膽經으로 入하며 瀉火解毒하는 작용이 있는 것으로 알려져 있으나, 지금까지 황금 약침액의 기능에 관한 구체적인 연구보고는 거의 찾아볼 수 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 생체의 산화적 손상을 효과적으로 예방할 수 있는 약물개발을 위한 기초적 연구의 일환으로서, in vitro에서 황금 약침액의 항산화효능을 규명하고자 실시되

었다. 즉 linoleic acid의 자동산화계 및 $H_2O_2-Fe^{2+}$ 계에서 유도한 지질과산화물의 생성에 미치는 효과를 검토함과 동시에, 세포 배양계에서 t-BHP로 유도한 간 세포의 괴사에 대한 황금 약침액의 보호효능 등을 검토하여 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 시료로 사용한 황금은 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였고, 정상 간세포(Ac 2F)는 일본 cell bank로부터 분주받아 사용하였다. 또한 본 실험에 사용된 시약으로서 linoleic acid, 2-thiobarbituric acid(TBA), lauryl sulfate sodium(SDS), α, α -diphenyl- β -picryl hydrazyl(DPPH), tert-butyl hydroperoxide(t-BHP), MTT, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), L-glutamine, butylated hydroxytoluene(BHT), 3-t-Butyl-4-Hydroxyanisole(BHA), hydrogen peroxide(H_2O_2)는 Sigma사(Sigma Chem. Co. St. Louis, MO)로 부터, 그리고 fetal bovine serum(FBS) 및 antibiotic/antimycotics는 Gibco사(Gibco BRL, Life Techno. Inc., NY, U.S.A)로부터, malondialdehyde tetrabutylammonium salt(MDA)는 Fluka사(Fluka Chemie AG, Switzerland)로부터, DL- α -Tocopherol은 Wako사(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 특급을 사용하였다.

2. 실험방법

2-1. 황금 약침액 제조

황금 약침액은 수제-알콜침법¹⁴⁾에 준하여 제조하였는데, 먼저 황금(*Scutellariae Radix*) 300 g을 취해 조말하여 원저 flask에 넣고, 증류수 2,000 ml를 가한 후, 3시간 전탕하여 추출하고 여과하였다. 여액을 rotary evaporator로 감압농축하고 농축액에 증류수를 가하여 전량을 200 ml이 되도록 한 다음, 실온까지 냉각하고 ethanol을 가하여 75% ethanol 용액으로 되게 한 다음, 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporator로 감압농축한 농축액에 증류수 100 ml를 가하고 용해시킨 후, ethanol을 가하여 85% ethanol 용액으로 되게 한 다음 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporator로 감압농축한 농축액에 증류수 100 ml를 가하고 용해시킨 후, ethanol을 가하여 95%

ethanol 용액으로 되게 한 다음 교반하고 저온에서 방치하여 생성된 침전물을 여별하였다. 여액을 다시 rotary evaporator로 감압농축하여 생성된 농축액에 생리식염수를 가하고 1N NaOH로 pH 7.0으로 조절하여 전량이 1,000 ml가 되게 한 다음, 저온에서 24시간 방치한 후 membrane filter(0.22 μ m, 직경 25 mm, Millipore Co., U.S.A)로 여과하고 가압멸균하여 시료의 원액(H1)으로 사용하였고, 또한 이 원액을 농도별로 2배(H2), 5배(H5), 10배(H10), 20배(H20), 50배(H50), 100배(H100)로 희석하여 실험에 사용하였다.

2-2. Linoleic acid emulsion의 제조

Linoleic acid emulsion은 Osawa 등의 방법¹⁵⁾에 따라 제조하였다. 즉 linoleic acid 0.13 ml, 99.0% ethanol 10 ml, 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 10 ml을 혼합하고, 황금 약침액 추출액을 농도별로 첨가한 다음, 증류수로 total volume이 25 ml가 되도록 조절하였다. 이 혼합액을 test tube에 넣고 40°C에서 배양하여 자동산화를 촉진시켰다.

2-3. 지질과산화도 측정

TBA법에 의한 MDA 정량은 Ohkawa 등의 방법¹⁶⁾에 따라 실시하였다. 즉 40°C에서 배양시킨 linoleic acid 혼합액 50 μ l에 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 0.2 ml, 20% acetic acid(pH 3.5, 10N NaOH) 1.5 ml, 0.8% TBA 수용액 1.5 ml를 넣고, 증류수로 이 혼합액의 total volume을 4 ml로 조절한 다음, 5°C에서 60분간 방치하고, 다시 95°C에서 60분간 발색시킨 뒤, 흐르는 수돗물에서 냉각시켜 spectrophotometer(Gilford, ResponseTM, U.S.A)를 사용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 과산화지질의 함량은 malondialdehyde tetrabutylammonium salt(MDA)로 검량표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA μ M로 표기하였다.

2-4. DPPH radical 소거효과 측정

황금 약침액의 DPPH radical에 대한 scavenging 효과를 알아보기 위하여 Hatano 등의 방법¹⁷⁾에 따라 다음의 실험을 실시하였다. 먼저 농도별 황금 약침액과 증류수의 혼합물 4 ml을 1.5×10^{-4} M DPPH/MeOH 1 ml와 혼합하여 잘 흔들어 준 다음, 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2-5. $H_2O_2-Fe^{2+}$ 계의 환위 간 조직의 지질과산화 반응에 대한 억제효과 측정

최종농도가 7.5 mg/ml homogenate, 10 mM $FeCl_2$, 30 mM H_2O_2 와 농도별 황금 약침액이 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)의 반응용액을 1 ml로 하여 37°C에

서 10분간 반응시킨 다음, TBA법으로 과산화지질의 함량을 측정하였다.

2-6. Xanthine-xanthine oxidase계에서 superoxide의 생성 억제효능 측정

Xanthine-xanthine oxidase계에서 생성되는 $O_2^{\cdot -}$ 에 대한 황금약침액의 억제효과를 측정하기 위하여 다음과 같은 반응용액을 조제하였다. 먼저 250 μ M xanthine 0.5 ml과 농도별 황금약침액 0.1 ml 및 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 1.3 ml를 함유하는 반응용액을 실온에서 3분간 정치한 다음, 0.1 unit xanthine oxidase를 첨가하여, 반응용액의 총량을 2 ml로 조절한 후, 290 nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하였다.

2-7. 세포배양계에서의 항산화작용 측정

2-7-1. 세포배양

정상 간세포(Ac2F)를 10% FBS-DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하여, 2~3일마다 한번씩 75-cm² plastic flask(Corning Co., U.S.A)에서 subculture하여 세포주를 유지하였다.

2-7-2. 황금 약침액의 세포독성 측정

정상 간세포(Ac2F)에 대한 농도별 황금 약침액의 세포독성을 관찰하기 위하여, 먼저 24-well plate에 간세포를 5 × 10⁴ cells/well이 되도록 넣고, 황금 약침액을 농도별로 원액, 2, 5, 10, 20, 50배 희석하여 well당 200 μ l씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM배지로 total volume을 2 ml로 조절하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18~20시간 배양한 다음, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

2-7-3. 황금 약침액의 항산화작용 측정

t-BHP의 산화작용으로 인한 세포괴사에 황금 약침액이 미치는 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 24-well plate에 간세포를 5 × 10⁴ cells/well이 되도록 넣고, 황금 약침액을 농도별로 원액, 2, 5, 10, 20배 희석하여 well당 200 μ l씩 첨가한 다음, 10% FBS-DMEM배지로 total volume을 2 ml로 조절하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 18~20시간 배양하였다. 그 후 CMF-PBS로 2회 세척하고 SFM을 well당 2 ml씩 가하고, *t*-BHP의 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가한 다음, 이를 다시 120분 배양시킨 후, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

2-7-4. MTT assay

MTT assay는 Sladowski 등의 방법¹⁸⁾을 따라 행하였다. 간세포를 배양시킨 24-well plate에 MTT를 총 용량의 10%가 되도록 넣고, 4시간 배양시킨 다음, 90 × g에서 10분간 원심 분리하였다. 그 후 배지를 제거하고 EtOH/DMSO(1:1 v/v)

를 600 μ l씩 넣고 20분간 shaking한 다음, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT dye [3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]가 blue formazan을 형성하는 것을 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

III. 실험결과 및 고찰

1. Linoleic acid 자동산화 억제효과

Fig. 1은 불포화지방산의 일종인 linoleic acid의 자동산화로 유도되는 과산화지질의 함량을 TBA법으로 측정할 결과이다. 이 결과에서 황금 약침액을 첨가하지 않은 대조군에서는 배양 3일째에 이미 MDA 농도가 15 μ M 이상으로 증가되었다. 그러나 항산화제인 BHA, BHT 그리고 황금 약침액 원액, 2배 희석액, 5배 희석액 첨가군에서는 배양 3일째에 MDA 농도가 각각 1.44, 0.00, 0.61, 0.53, 4.18 μ M로서 대조군에 비해 모두 강한 항산화력을 나타내었다. 그리고 배양 6일째 MDA 생성농도는 황금 약침액을 농도별로 원액, 2배 희석액

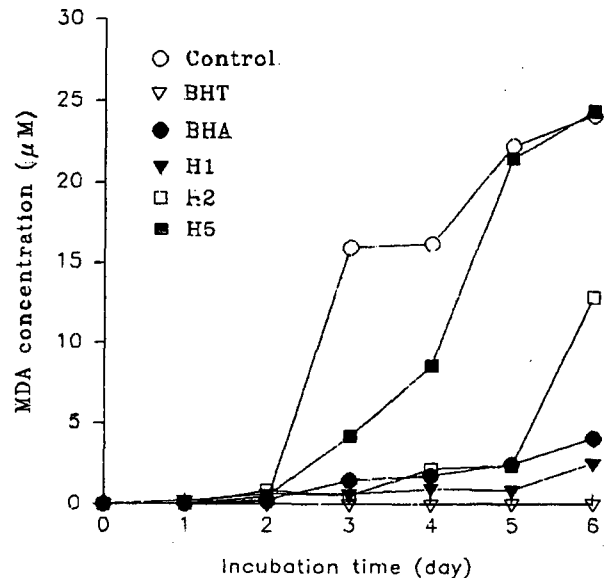


Fig. 1. Inhibitory effect of SRAS on lipid peroxidation in the linoleic acid autoxidation system.

At intervals during autoxidation of linoleic acid in the water-alcohol system, the degree of oxidation was measured by the TBA method. The reaction mixture contained 50 μ l of sample, 0.2 ml of 8.1% sodium dodecylsulfate (SDS), 1.5 ml of 20% acetic acid solution (pH 3.5), and 1.5 ml of 0.8% aqueous solution of TBA. The pH of 20% acetic acid solution was adjusted with 10N NaOH. The mixture was finally made up to 4.0 ml with distilled water, and placed at 5°C for 60 min, and then heated at 95°C for 60 min. After cooling with tap water, the absorbance was measured at 532 nm. Each value are the mean of triplicate experiments. —■—; Control, —+—; BHA, —▽— BHT, —□—; H1, —×—; H2, —▲—; H3.

첨가군에서 각각 2.51, 12.84 μM 로 황금 약침액 무첨가군의 24.10 μM 에 비해 MDA의 생성이 현저하게 억제되었다. 일반적으로 지질의 자동산화는 자유기가 고도의 불포화지방산의 탄화수소사슬에서 탄소와 탄소사이의 이중결합부위로부터 수소원자를 탈취함으로써 지질라디칼을 형성하며, 이러한 지질라디칼은 산소분자와 반응함으로써 결국 과산화지질이 생성되는데, 이 반응이 일단 개시되면 인접한 지질과 연쇄적으로 반응하게 된다. 황금 약침액이 지질과산화물의 생성을 강하게 억제한 것은 이러한 반응의 진행에 있어서 주된 역할을 담당하는 자유기의 생성을 억제하거나 이미 생성된 자유기를 소거하는 효능이 있음을 시사하는 것이라 생각된다.

2. DPPH radical 소거효과

Fig. 1에서 황금 약침액이 linoleic acid의 자동산화를 강하게 억제한 것은 본 약물이 자유기를 소거할 수 있음을 시사하는 것이므로, Fig. 2에서는 황금 약침액이 DPPH radical에 대한 소거효과를 관찰하였다. 황금 약침액을 농도별로 원액, 2, 5, 10, 20, 50, 100배 희석하여 첨가한 후, DPPH radical에 대한 소거효과를 관찰한 결과, 황금 약침액 원액 및 2, 5, 10, 20, 50, 100배 희석액 첨가군에서 각각 70.23, 50.54, 46.96, 49.88, 39.97, 21.05, 12.35%의 소거효과를 보였다. 또한 항산화제로 잘 알려져 있는 BHA, BHT, tocopherol은 각각 85.94, 85.70, 85.67%의 소거효과를 나타내었다. 시험

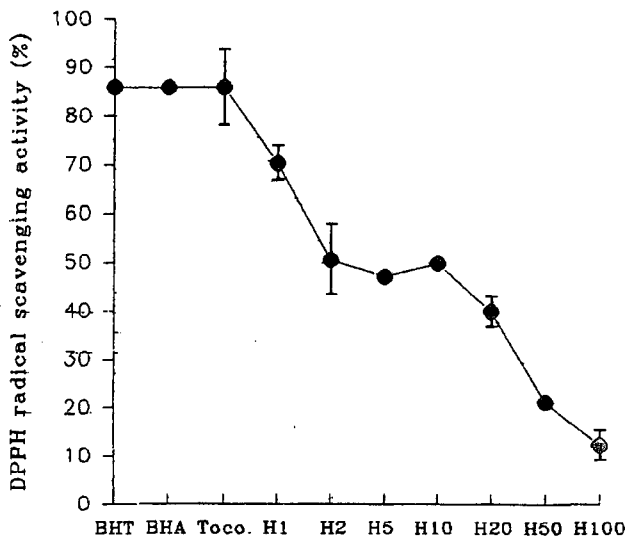


Fig. 2. Scavenging effect of SRAS on DPPH radical. The effect of SRAS on DPPH radical was determined according to the method of Hatano. SRAS in 4 ml of distilled water were added to a methanolic solution of DPPH(1 mM, 1 ml). The mixture was shaken and left to stand at room temperature for 30 min; the absorbance of the resulting solution was measured spectrophotometrically at 517 nm. Each values are the mean of triplicate experiments.

관에서 진한 보라색의 DPPH radical은 항산화제로부터 수소를 얻어서 환원되면 색깔이 연해지면서 투명하게된다. 본 실험에서 황금 약침액이 DPPH radical을 최고 70%까지 강하게 소거한 것은 활성이 강한 자유기에 수소원자를 쉽게 공여해줌으로써 자유기를 보다 안정한 형태로 변형시킬 수 있는 성분이 황금 약침액에 존재함을 의미하는 것이다.

3. H₂O₂-Fe²⁺계의 흰쥐 간 조직의 지질과산화 반응에 대한 억제효과

Fig. 3은 H₂O₂-Fe²⁺계에서 생성되는 hydroxyl radical(OH·)에 의하여 흰쥐 간 조직의 지질과산화에 대한 황금 약침액의 억제효과를 관찰한 결과이다. 이 결과에서 황금 약침액을 농도별로 원액, 2, 5, 10, 20, 50배 희석하여 첨가한 실험군에서 무첨가군인 대조군에 비하여 지질과산화물의 생성을 각각 100, 100, 100, 97.86, 74.36, 42.32%의 억제효과를 나타내었다. 그리고 항산화제인 BHT는 94.77%의 억제효과를 보였다. Hydroxyl radical(OH·)은 superoxide anion(O₂^{·-}) 및 hydrogen peroxide(H₂O₂)보다 활성이 훨씬 강하므로 생체의 세포막에서 과산화지질을 생성하는 동시에 세포구성 성분을 파괴하는 주된 자유기로 알려져 있다. 본 실험의 결과, 황금 약침액은 hydroxyl radical에 의한 과산화지질의 생성을 100% 억제함으로써 효능이 뛰어나면서도 안정성있는 항산화

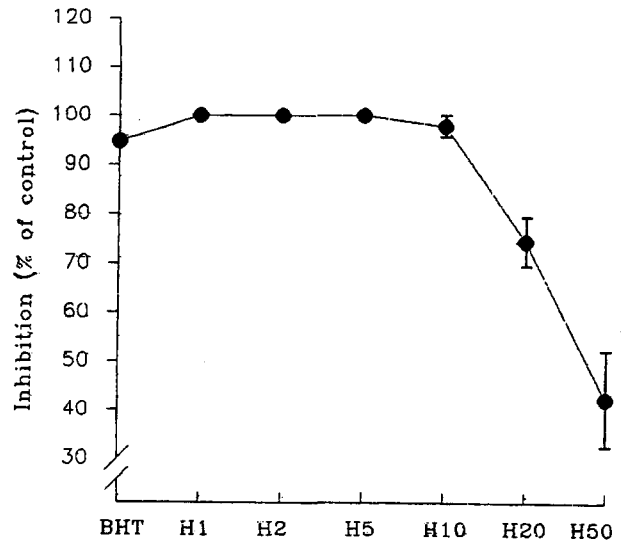


Fig. 3. Inhibitory effect of SRAS on H₂O₂-Fe²⁺ system induced lipid peroxidation in rat liver. SRAS in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) were added to homogenate (7.5 mg/ml), 10 mM FeCl₂, 30 mM H₂O₂. The mixture was shaken at 37°C for 10 min. The level of lipid peroxidation induced by hydroxyl radical derived from H₂O₂-Fe²⁺ in rat liver homogenate was determined according to the method of TBA. Each values are the mean \pm S.E. of triplicate experiments.

제로 사용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

4. Xanthine-xanthine oxidase계에서 superoxide의 생성 억제효능

Fig. 4에 농도별 황금약침액이 xanthine-xanthine oxidase 계로부터 생성되는 superoxide(O₂^{-·})에 대한 생성억제 효과를 나타내었다. 황금약침액 원액, 2배 희석액, 5배 희석액, 10배 희석액 첨가군에서 각각 86.44, 80.41, 72.50, 53.30%의 억제효능을 보였다. Superoxide는 생체내에서 자외선, X선 등의 방사선에 노출될 경우, 그리고 catecholamine, ferrohempotein, thiols, ascorbate, hydroquinone 등과 같은 생물학적 관련분자들의 자동산화에 의해서도 생성되며, 또한 xanthine oxidase, NAD(P)H oxidase 등과 같은 산화효소들의 작용에 의해서도 생성된다. 또한 superoxide는 주로 mitochondria, microsome, 핵막 등의 세포소기관에서 생성되며, 또한 탐식세포(phagocyte)가 세균을 탐식하여 살균하는 기전 중에서 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서 superoxide는 생체내에서 호기성 대사과정의 부산물로서 생성될 뿐만 아니라 외부로부터의 다양한 산화적 손상 유발인자에 의해 생성되어지며, 생명 유지에 필수적인 역할을 담당하고 있지만, 이것이 항산화 방어체계를 넘어 과도하게 생성되

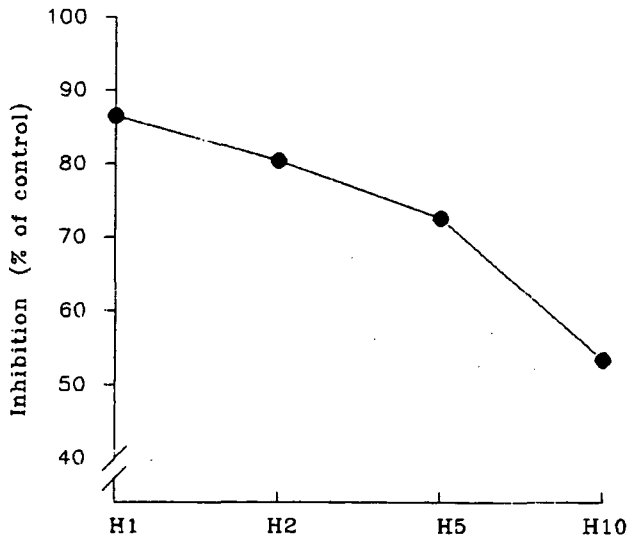


Fig. 4. Inhibitory effect of SRAS on H₂O₂-Fe²⁺ system induced lipid peroxidation in rat liver.

The reaction mixture contained of SRAS in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), homogenate (7.5 mg/ml), 10 mM FeCl₂ and 30 mM H₂O₂ were shaken at 37°C for 10 min. The level of lipid peroxidation induced by hydroxyl radical derived from H₂O₂-Fe²⁺ in rat liver homogenate was determined according to the method of TBA. Each values are the mean of triplicate experiments.

면 세포의 손상 및 지질과산화 반응을 유발시키게 된다. 또한 superoxide는 그 자체가 산화적 손상을 일으킬 뿐만 아니라 보다 더 반응성이 높은 hydroxyl radical을 생성시키는 전구 물질로서 중요하게 인식되고 있다. 본 실험의 결과, 황금약침액은 xanthine-xanthine oxidase계로부터 생성되는 superoxide에 대하여 현저한 억제효과를 나타내었다.

5. 배양 정상 간세포에 대한 황금 약침액의 세포독성

앞에서 살펴본 바와 같이 황금 약침액은 강한 자유기 소거능과 지질과산화 억제효능을 보였다. 그러나 기존의 항산화제인 BHT 등은 그들의 강한 항산화력에도 불구하고 강한 세포독성을 가지고 있기 때문에 사용이 제한되거나 금지되고 있다. 따라서 본 실험에서는 황금 약침액의 세포독성을 평가하여 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 황금 약침액의 세포독성을 관찰하기 위하여 정상 간세포에 농도별 황금 약침액을 전처리한 다음, 세포 생존률을 MTT assay로 측정한 결과이다. 이 결과에서 황금 약침액 원액 첨가군에서 75.96%의 생존률을 보인 반면, 황금 약침액 2, 5, 10, 20, 50배 희석액 첨가군에서는 모두 100%에 가까운 생존률을 보였다. 따라서 본 실험에서 사용한 황금 약침액 원액은 배양 간 세포에 독성을 나타내며, 2배 희석액부터는 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

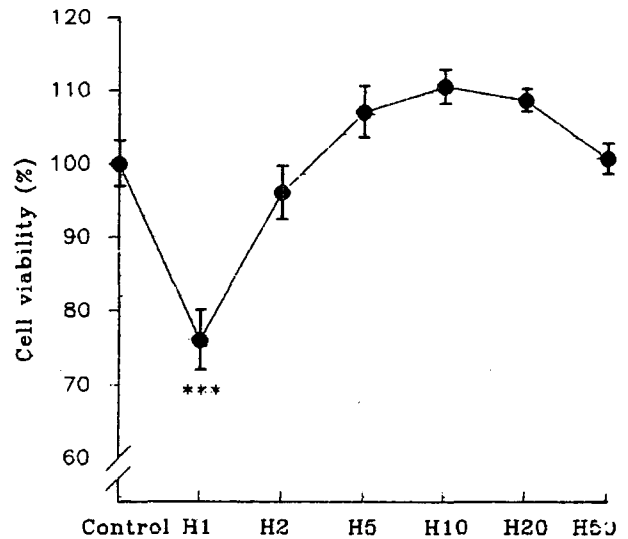


Fig. 5. Cytotoxicity of SRAS on cultured normal rat liver cell.

Normal rat liver cells (Ac2F) were plated on 75-cm² plastic flasks in 20 ml of DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum. And cells were incubated under 5% CO₂, 95% air, at 37°C. The cells (5×10⁴ cells/well) were incubated at 37°C for 2 hrs. After washing, SRAS were added various concentration. Viable cells were detected by MTT assay. All data are the mean of triplicated determination. ***p<0.01.

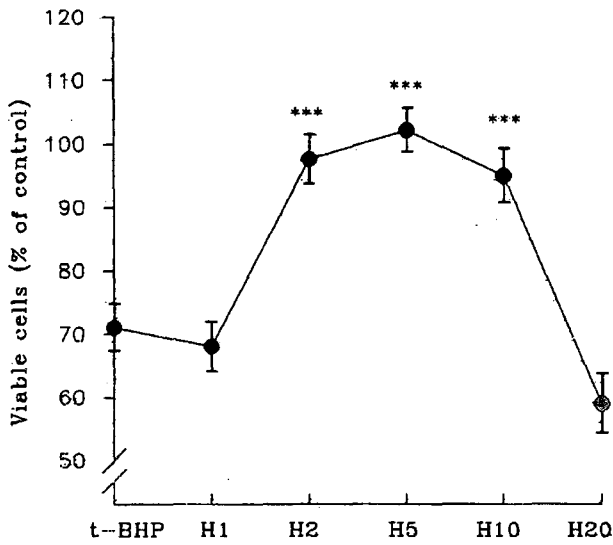


Fig. 6. Effect of SRAS on *t*-BHP induced lipid peroxidation in rat liver cell.

Normal rat liver cells (Ac2F) were plated on 75-cm² plastic flasks in 20 ml of DMEM, 10% heat-inactivated fetal bovine serum. And cells were incubated under 5% CO₂, 95% air, at 37°C. The cells (5×10⁴ cells/well) were incubated at 37°C for 2 hrs. After washing, SR aqua-acupuncture solution were added various concentration. After preincubation for 18 hrs, *t*-BHP (final concentration 1 mM) was added, and the reaction mixture was incubated for 2 hrs. Viable cells were detected by MTT assay. All data are the mean of triplicated determination. ***p<0.01.

6. *t*-BHP로 유도된 세포 괴사에 대한 황금 약침액의 항산화 작용

Fig. 6은 배양 간 세포에 황금 약침액을 농도별로 전처리 한 다음, 1 mM 수준의 *t*-BHP로 세포막의 지질과산화를 동반하는 간 괴사를 유발시킴으로써 황금 약침액의 항산화 효능을 관찰한 결과이다. 즉, *t*-BHP의 최종농도를 1 mM이 되도록 하여, 120분 동안 배양한 후, 세포의 생존율을 측정한 결과, 황금 약침액을 농도별로 원액, 2, 5, 10, 20배 희석하여 첨가한 실험군에서 각각 68.01, 97.51, 102.07, 94.96, 59.05%의 생존율을 나타내었다. 이 결과에서 특히 황금 약침액 2, 5, 10배 희석액 첨가군에서 무첨가군의 71.09%에 비해 높은 생존율을 보였다.

IV. 결 론

황금 약침액의 항산화 효능을 검토하기 위하여 지질의 자동산화계, H₂O₂-Fe²⁺계 및 세포배양계를 이용하여 항산화효과를 알아보고, 또한 자유기의 소거효과를 관찰한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 황금 약침액의 항산화 효능을 알아보기 위하여 고도의 불포화지방산인 linoleic acid의 자동산화계에서 지질과산화물 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 황금 약침액 원액 및 2배 희석액 첨가군에서 무첨가군에 비해 지질과산화물의 생성을 현저하게 억제하였으며, 특히 원액 첨가군은 항산화제인 BHA 및 BHT와 유사한 수준의 억제효과를 보였다.

2. 자유기에 대한 황금 약침액의 소거효과를 알아보기 위하여 농도별 황금 약침액을 DPPH radical과 반응시키고 흡광도의 변화를 관찰한 결과, 황금 약침액 첨가군에서 최고 70%의 DPPH radical 소거효과를 보였다.

3. 황금 약침액은 H₂O₂-Fe²⁺계에서 생성되는 hydroxyl radical에 의한 간조직의 지질과산화를 최고 100%까지 억제하였으며, 특히 본 실험에서 항산화제로 첨가된 BHA군 이상의 억제효과를 보였다.

4. 황금 약침액은 xanthine-xanthine oxidase계로부터 생성되는 superoxide에 대하여 약 85% 정도의 억제효과를 나타내었다.

5. 황금 약침액의 세포독성 여부를 평가하기 위하여, 배양 정상 간세포에 농도별 황금 약침액을 전처리한 후, 일정시간 배양하여 세포생존율을 MTT assay로 검토한 결과, 황금 약침액 원액 첨가군에서 세포독성을 보였으며, 2배 희석액부터는 세포독성을 나타내지 않았다.

6. 황금 약침액이 *t*-BHP에 의해 유도된 간세포의 과산화 반응 억제효과를 알아보기 위해 배양 간세포에 황금 약침액을 농도별로 전처리하고, *t*-BHP를 1 mM 수준의 저농도로 처리하여 세포생존율을 관찰한 결과, 황금 약침액 무첨가군에서는 71%의 세포생존율을 보인 반면, 황금 약침액 2배, 5배 및 10배 희석액 첨가군에서 모두 90% 이상의 생존율을 보였다.

이상의 결과에서 황금 약침액은 지질과산화 반응을 강하게 억제함을 알 수 있었다. 이는 황금 약침액의 자유기 소거능에 의한 것이며, 문헌적으로 알려져 있는 본 약물의 간보호 및 해독기능도 이러한 항산화 기전과 밀접한 관련이 있다고 생각되어진다. 또한 본 연구의 결과로부터 황금 약침액은 산화적 스트레스로 인한 생체의 손상을 예방할 수 있는 약물로 사용될 수 있는 가능성이 강하게 시사되고 있다. 따라서 본 실험에서는 황금 약침액의 항산화기전에 대한 더욱 심도있는 이해를 위하여 실험동물을 대상으로 본 약물이 항산화효소계 및 항산화물질에 미치는 영향을 검토하고 있다.

참고문헌

1. 김영해, 김갑성: 호도약침액의 항산화 효과에 대한 연구. 대

- 한한의학회지, 17: 9-20, 1996.
2. 최미정, 최명원, 김영규, 김철호, 문진영, 남경수: 배양간세포에서 지질과산화와 항산화효소에 미치는 녹용추출물의 영향. 대한면역학회지, 19: 49-57, 1997.
 3. 정지천: 좌귀음과 우귀음에 의한 활성 산소류의 소거작용과 항산화 효소계의 활성증가 효과에 대한 연구. 대한한의학회지, 17: 21-36, 1996.
 4. 孫承琳: 人蔘對培養神經細胞自由基損傷的保護作用. 北京中醫學院報, 6: 62-67, 1993.
 5. 梁曉春, 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: 511-512, 1990.
 6. 余月明: 自由基衰老學說. 腎虛與衰老及補腎抗衰老研究, 陝西中醫, 14(4): 187-188, 1993.
 7. 안준철, 문진영, 임종국: 당귀 약침액의 항산화효능에 관한 연구. 대한침구학회지, 13: 254-262, 1996.
 8. 안준철, 문진영, 임종국: 당귀 약침액의 항산화효능에 관한 연구(II). 대한침구학회지, 14: 383-395, 1997.
 9. 우대윤, 이태균, 문진영, 임종국, 박원환, 남경수: 인공막과 Rat의 간세포를 이용한 혈부축 어당의 항산화 작용에 관한 연구. 대한한의학회지, 17: 465-477, 1996.
 10. 金 鳴: 活血化癥與抗自由基損傷. 中草藥, 24: 269, 1993.
 11. 許沛虎: 中醫藥研究中有關自由基研究近況. 中國中西醫結合雜誌, 15: 185-187, 1995.
 12. 문진영, 최미정, 남경수, 임종국: 시호가 free radical에 의한 지질과산화물 생성에 미치는 효과. 동국논집(자연과학편), 15: 361-375, 1996.
 13. 이상인: 본초학. 서울: 수서원, 505-507, 1981.
 14. 錢百炎: 中草藥注射劑. 上海: 上海科學技術出版社, 71-132, 1981.
 15. Osawa, T. and Namiki, M.: A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. Agric. Biol. Chem. 45: 735-739, 1981.
 16. Okawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochem. 95: 351-358, 1978.
 17. Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T. and Okuda, T.: Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. Chem. Pharm. Bull. 36: 2090-2097, 1988.
 18. Sladowski, D., Steer, S. J., Clothier, R. H. and Balls, M.: An improved MTT assay. J. Immun. Methods. 157: 203-207, 1993.