

腎臟組織에서 白殭蠶 抽出物の 抗酸化 作用에 關한 研究

李武炯 · 尹哲浩 · 鄭智天

東國大學校 韓醫科大學 內科學教室

【초록】 白殭蠶 추출물이 신장조직에서 반응성 산소기들에 의한 지질의 과산화와 세포 손상을 방지하는지를 관찰하기 위하여 정상조직과 t-BHP를 처리한 조직에서 白殭蠶 추출물의 효과를 조사하였다. 지질의 과산화와 LDH 유출은 t-BHP의 농도에 비례하여 증가되었으나, 白殭蠶 추출물의 첨가로 유의하게 억제되었다. 그리고, t-BHP에 의한 지질의 과산화 및 LDH 유출은 白殭蠶 추출물의 농도에 비례하여 억제되었다. 또한, 白殭蠶 추출물은 oxidant를 처리하지 않은 정상조직에서도 지질의 과산화 및 LDH 유출을 유의성 있게 감소시켰다. 그리고, catalase 활성화에는 영향이 없는 반면, 정상 조직과 t-BHP를 처리한 조직에서는 glutathione peroxidase 활성을 유의성 있게 증가시켰다. 한편, 반응성 산소기의 발생은 白殭蠶 추출물의 농도에 비례하여 억제되었다. 이러한 결과로 볼 때, 白殭蠶 추출물은 신장 조직내 항산화 효소의 활성을 증가시키고 동시에 직접 반응성 산소기의 발생을 억제하므로 신장 조직에서 지질의 과산화와 세포손상을 방지하는 효과가 있을 것으로 여겨진다.

중심단말 : 白殭蠶, 지질 과산화, catalase, glutathione peroxidase, 반응성 산소기

I. 緒 論

반응성 산소기(reactive oxygen species)는 산소가 가지고 있는 화학적 특성으로 인하여 생성되는 것으로 superoxide radical, H_2O_2 , hydroxyl radical 및 여러 종류의 산소 화합물들이 포함된다. 이들은 성인병, 노화 및 암 유발에 관계할 뿐만 아니라, 중추신경성 질환, 심장 질환, 호흡장애 증후군, 류마치스 및 관절염 등 여러 종류의 질병에서 중요한 병인으로 인정되고 있기 때문에(1-5) 관심이 증대되고 있다. 또한, 신장에서 허혈성 급성 신부전, 항생제나 독성 물질에 의한 급성 신부전 및 사구체 신염 등과 같은 여러 급성 및 만성 신장질환을

일으키는 원인으로 알려져 있다.(6-8)

이들 반응성 산소기들이 정상적인 세포에서도 발생되고 있으나 몸 속에는 또한 이들을 제거하는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxide 및 glutathione 등(9-11)이 있어 세포 속에서 발생하는 반응성 산소기들이 세포 손상을 일으키지 못하도록 조절하고 있다.(4,12) 따라서 외부 자극에 의해 세포내에서 이들 산소기들이 과량으로 발생하거나, 그에 대한 방어기전들의 기능이 저하되게 되면 세포는 손상을 받게 될 것이다.

이와 같이 산소 유리기들이 여러 조직에서 심한 독성을 나타내고 있기 때문에 이들을 제거하거나 체내에서 이들에 대한 방어기전을 증

대사키는 약물들을 개발하는 것은 대단히 중요하기 때문에 이에 대한 연구들이 많이 행해지고 있으나, 그 결과는 아직도 만족한 수준에 도달하지 못하고 있음이 현실이다.

白殭蠶은 누에가 白殭菌에 감염되어 죽은 蠶體로서 熄風解痙, 疏散風熱, 化痰散結하는 효능(13)을 가져 중풍(14), 당뇨병(15)의 치료에 많이 활용되고 있으며, 신장 질환의 치료에도 이용되고 있다.(16,17)

白殭蠶에 대한 실험 연구로는 張(18) 등이 鎮痙 효과를, 金(19) 등이 抗糖尿 작용을 보고한 바 있다. 한편, 한의학에서 산소 유리기와 관련된 신장 손상에 대한 연구로는 胡桃藥鉞液(20), 蟾蟾(21), 丹參(22) 등의 보고가 있다.

따라서 본 연구에서는 白殭蠶 추출물이 항산화작용을 가지고 있는지를 검토하기 위하여 신장조직에서 oxidant에 의한 지질의 과산화 및 세포손상에 대한 효과를 조사하였다.

II. 實驗

1. 材料

1) 藥材

白殭蠶 (*Bombycis corpus*)은 동국대학교 부속 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

2) 動物

체중 1.5 - 2kg 되는 New Zealand 백색 성토를 전문 동물 사육장(Life Science, 대구)에서 구입하여 암수 구별없이 사용하였다.

2. 方法

1) 白殭蠶 추출물의 製造

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

2) 腎皮質 切片의 製作

토끼를 희생시킨 후 신장을 적출하여 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 40 mM Tris-HCl (pH, 7.5)로 된 찬 용액을 신동맥내에 주입하여 혈액을 제거한 다음 Stadie-Riggs microtome으로 약 0.3 - 0.4 mm 두께의 신피질 절편을 만들어 사용하였다. 이렇게 제작된 신피질 절편은 대부분이 근위세뇨관으로 구성되어 있으며, 여러 독성 물질에 의한 신장 기능 변화를 연구하는데 많이 이용되고 있다.(23,24)

3) Oxidant의 處理

본 실험에서 oxidant로는 약물 모델로 많이 이용되고 있는 t-butylhydroperoxide (t-BHP)를 사용하였다. 조직절편 약 50 mg을 4 ml의 incubation 용액이 들어 있는 비이커 속에 넣고 Dubnoff metabolic shaker 내에서 100% 산소를 계속 공급하면서 37°C에서 incubation하였다. 기본 incubation 용액의 조성은 130 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 되어 있으며, t-BHP를 처리할 때는 이들 oxidant가 들어 있는 용액내에서 60분 동안 incubation하였다. Incubation 후에 조직을 들어내어 지질의 과산화를 측정하였고, 세포의 손상정도를 조사하기 위하여 lactate dehydrogenase (LDH) 유출을 측정하였다. 본 실험에서 白殭蠶 추출물은 실험에 사용된 용액내에 적당한 농도로 녹여 사용하였다.

4) LDH 測定

Oxidant로 처리된 신피질 절편을 들어내어 증류수로 마쇄시켜 만든 조직액과 incubation 용액을 각각 50 μl 취하여 LDH 활성을 LDH assay kit (Sigma Chemical)를 이용하여 측정하였다.

5) Malondialdehyde 含量 測定

세포막 지질의 과산화 정도는 그 산물인 malondialdehyde (MDA) 양을 Uchiyama 등의

방법(25)으로 측정하여 평가하였다. 간단히 설명하면, oxidant로 처리된 신피질 절편을 차가운 1.15% KCl 용액 (5% wt/vol)속에서 파쇄하였다. 이 조직파쇄 균질액 0.5 ml에 1% 인산 용액 3 ml와 0.6% thiobarbituric acid 용액 1 ml를 첨가하여 끓는 물에서 45분간 가열하였다. n-Butanol 4 ml를 첨가하여 완전히 섞은 다음 2000×g에서 20분간 원심분리한 후, 상층액의 흡광도를 536와 520 nm에서 측정하였다. MDA 값은 단백질 1 mg 당 pmoles로 표시하였다. 단백질 농도는 Bradford의 방법(26)으로 측정하였다.

6) Catalase 活性 測定

Catalase 활성은 Aebi의 방법(27)에 따라 H₂O₂의 분해 정도를 spectrophotometer로 추적하여 측정하였다. 신장 절편을 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에서 파쇄시켜 Triton X-100을 0.02% 되게 첨가한 후 40,000×g 에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였으며, 2 ml의 상층액에 30 mM H₂O₂ 1 ml를 첨가하여 반응을 시작시키고 240 nm에서 30초 동안 흡광도를 측정하였다. 상층액의 단백질 농도를 측정하여 catalase 활성은 nmole/min/mg protein으로 나타내었다.

7) Glutathione peroxidase 活性 測定

Glutathione peroxidase 활성 측정은 Flohe와 Gunzler의 방법(28)으로 행하였는데, 토끼 신장 절편을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 용액에서 파쇄시켜 사용할 때까지 4°C에 보관하였고 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 500 μl, 시료 100 μl, 2.4 U/ml glutathione reductase 100 μl, 100 mM GSH 100 μl를 semi-microcuvette에 넣어 37°C에서 10분간 preincubation하였다. 1.5 mM NADPH 용액을 100 μl 넣어 hydroperoxide에 무관한 NADPH 소모를 약 3분 동안 기록한다. 1.5 mM H₂O₂ 100 μl를 첨가하여 340 또는 365 nm에서 흡광도의 감소를 약 5분 동안 관찰하였다. 단위는 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

8) 酸素 유리기의 生成 測定

白殭蠶 추출물이 반응성 산소기들을 제거하는 작용을 가지고 있는 지는 phorbol-12, 13-dibutyrate (PDBu)로 활성화된 백혈구에 의해 생성되는 산소유리기에 대한 白殭蠶 추출물의 효과를 측정함으로써 확인하였다. PDBu로 활성화된 백혈구 (1×10⁵ cells/ml)를 Kreb's 링거-인산 완충용액의 2 ml 속에 넣고 0.96 μg/ml의 luminol과 같이 incubation하였다. 반응성 산소기의 발생정도는 luminol-depedent chemiluminescence를 측정하여 평가하였으며, chemiluminescence는 chemiluminescence 분석기 (Microumat LB 96P, Berthold, Germany)를 이용하여 측정하였다. 白殭蠶 추출물의 효과를 볼 때는 적당한 농도를 incubation 용액 속에 첨가하였다. 백혈구는 건강한 사람의 혈액에서 Grishman 등의 방법(29)으로 분리하여 사용하였으며, 이 방법으로 분리한 백혈구는 95%가 살아 있는 상태였다.

9) 統計 處理

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

Ⅲ. 成績

1. 정상 신장 조직에서 지질의 과산화 및 LDH유출에 대한 t-BHP 및 白殭蠶 추출물의 효과

신장조직에서 t-BHP가 지질의 과산화를 유발하는 지를 확인하고, 이러한 지질의 과산화 유발에 白殭蠶 추출물이 어떤 영향을 미치는 지를 조사하기 위하여 신장 조직을 白殭蠶 추출물을 첨가하지 않은 용액과 0.5% 白殭蠶 추출물을 첨가한 용액 내에서 0.1-1 mM 농도의 t-BHP에 60분 동안 노출시킨후 지질의 과산화를 측정하였다. 그 결과, 白殭蠶 추출물이 없는

용액내에서 t-BHP의 농도가 증가함에 따라 지질의 과산화는 증가하여 t-BHP이 0.2 mM일 때 지질의 과산화는 정상조직의 148.45 ± 20.54 pmole MDA/mg protein에서 407.08 ± 38.42 pmole MDA/mg protein으로 유의한 증가를 보였고, t-BHP이 1 mM일 때는 894.39 ± 53.63 pmole MDA/mg protein으로 t-BHP를 처리하지 않은 대조군에 비하여 약 6배 증가하였다. 그러나, 白僵蠶 추출물이 들어 있는 용액내에서는 지질의 과산화발생이 유의하게 감소되었다. (Fig. 1)

t-BHP가 지질의 과산화를 증가시킴으로써 세포 손상을 유발하는 지를 확인하고, 또한 지질의 과산화를 방지하는 白僵蠶 추출물의 효과가 세포 손상도 방지할 수 있는 지를 밝히기 위하여 지질의 과산화에 대한 약물의 효과를 위의 실험과 동일한 방법으로 조직을 약물에 노출시킨 후 LDH 유출을 측정하였다. 그림 2에서 보는 바와 같이 지질의 과산화에 대한 효과에서와 같이 t-BHP의 농도가 증가함에 따라 LDH유출도 증가하였으며, 白僵蠶 추출물이 존재시에는 또한 이러한 LDH유출이 유의하게 감소하였다.

2. t-BHP로 처리된 조직에서 지질의 과산화 및 LDH 유출에 대한 여러 농도의 白僵蠶 추출물의 효과

t-BHP에 의한 지질의 과산화를 방지하는 白僵蠶 추출물의 효과가 농도 변화에 따라 어떤 영향이 있는 지를 조사하여 그 결과를 그림 3에 나타내었다. 이 그림에서 보는 바와 같이 정상 조직에서 지질의 과산화는 166.45 ± 15.34 pmole MDA/mg protein으로 나타났고, 여기에 1 mM t-BHP를 처리한 결과 지질의 과산화는 845.92 ± 35.48 pmole MDA/mg protein으로 약 5배 증가하였다. t-BHP를 처리하는 용액내에 白僵蠶 추출물을 0.05-1% 농도로 첨가한 결과, t-BHP에 의한 지질의 과산화는 白僵蠶 추출물의 농도에 비례하여 억제되어 白僵蠶 추출물의 농도가 1%일 때는 지질의 과산화가 305.28 ± 38.94 pmole MDA/mg protein으로 거의 정상

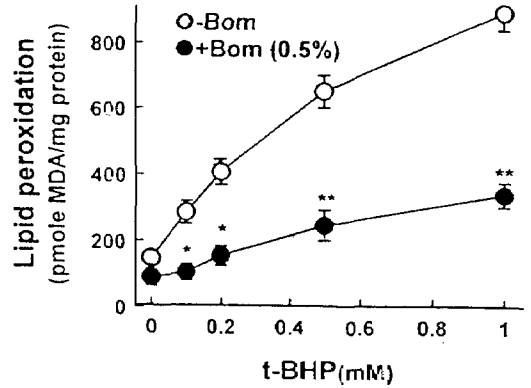


Fig. 1. Effect of various concentrations of t-BHP on lipid peroxidation in the presence or absence of *Bombycis Corpus extract* (Bom) in rabbit renal cortical slices. Lipid peroxidation was measured for 60 min at 37°C in the presence of 0.1-1.0 mM t-BHP with or without 0.5% Bom. Data are mean \pm S.E. of four determinations. *p<0.05, **p<0.01 compared with the respective control.

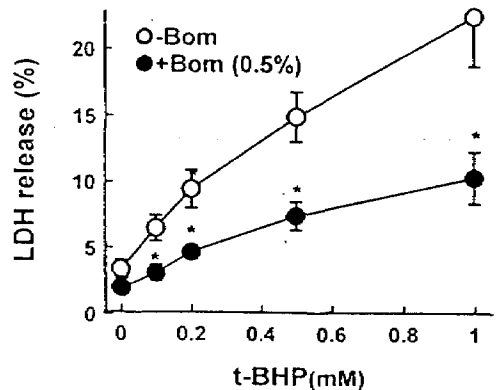


Fig. 2. Effect of various concentrations of t-BHP on LDH release in the presence or absence of Bom in rabbit renal cortical slices. LDH was measured for 60 min at 37°C in the presence of 0.1-1.0 mM t-BHP with or without 0.5% Bom. Data are mean \pm S.E. of four determinations. *p<0.05 compared with the respective control.

수준까지 감소되었다.

지질의 과산화를 억제하는 白蠟蠟 추출물의 작용효과가 oxidant에 의한 세포 손상에도 유사한 양상으로 나타나는 것을 확인하기 위하여 LDH 유출에 대한 白蠟蠟 추출물의 효과를 조사하였다. 그림 4에서 보는 바와 같이 정상 조직에서 LDH 유출은 $2.56 \pm 0.55\%$ 였고, 여기에 1 mM t-BHP를 처리한 결과 LDH 유출은 $19.84 \pm 1.39\%$ 로 약 7.6배 증가하였다. 그러나, t-BHP를 처리하는 용액내에 白蠟蠟 추출물을 0.05에서 1% 농도로 첨가한 결과 LDH 유출은 白蠟蠟 추출물의 농도에 비례하여 감소되었는데, 白蠟蠟 추출물의 농도가 1%일 때는 LDH 유출이 $7.83 \pm 1.52\%$ 로 정상조직의 약 3배 수준까지 감소되었다.

3. 정상 조직에서 지질의 과산화 및 LDH 유출에 대한 白蠟蠟 추출물의 효과

白蠟蠟 추출물이 oxidant로 처리된 조직 뿐만 아니라 oxidant가 처리되지 않은 정상 조직에서 나타나는 지질의 과산화를 방지할 수 있는 것을 확인하기 위하여 白蠟蠟 추출물을 60분 동안 처리하여 조사하였다. 그림 5에서 보는 바와 같이 정상조직에서 지질의 과산화는 192.70 ± 21.48 pmole MDA/mg protein이었고, 여기에 白蠟蠟 추출물을 1% 및 2% 처리한 결과 지질의 과산화는 각각 125.38 ± 15.32 와 118.35 ± 15.74 pmole MDA/mg protein으로 유의한 감소현상을 보였다.

같은 방법으로 LDH 유출에 대한 白蠟蠟 추출물의 효과를 조사한 결과 지질의 과산화에 대한 효과와 비슷하게 白蠟蠟 추출물이 정상 조직에서도 LDH 유출을 유의하게 감소시켰다. (Fig. 6)

4. Catalase 활성에 대한 白蠟蠟 추출물의 효과

정상 조직과 H_2O_2 를 처리한 조직에서 catalase 활성에 미치는 白蠟蠟 추출물의 효과를 조사하였다. 그림 7에서 보는 바와 같이 정상 조직에서 catalase 활성은 7.18 ± 0.76 mmole /mg/min이었고, 50 mM H_2O_2 를 처리한 결과

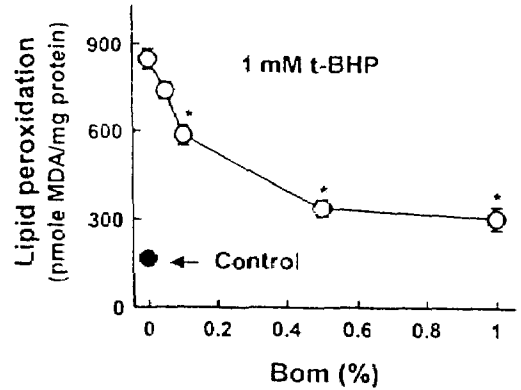


Fig. 3. Effect of Bom on lipid peroxidation induced by t-BHP in rabbit renal cortical slices. Lipid peroxidation was measured for 60 min at 37°C in the presence or absence of various concentrations of Bom/or 1 mM t-BHP. Data are mean \pm S.E. of four determinations. * $p < 0.05$ compared with value in the absence of Bom.

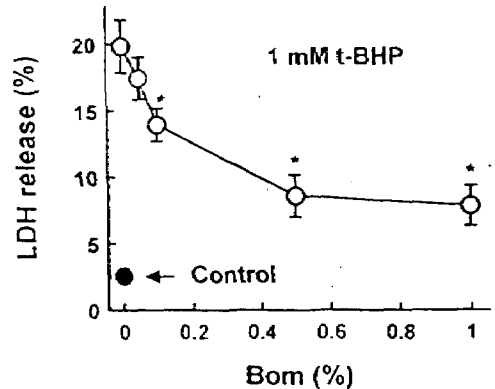


Fig. 4. Effect of Bom on LDH release induced by t-BHP in rabbit renal cortical slices. LDH release was measured for 60 min at 37°C in the presence or absence of various concentrations of Bom/or 1 mM t-BHP. Data are mean \pm S.E. of four determinations. * $p < 0.05$ compared with value in the absence of Bom.

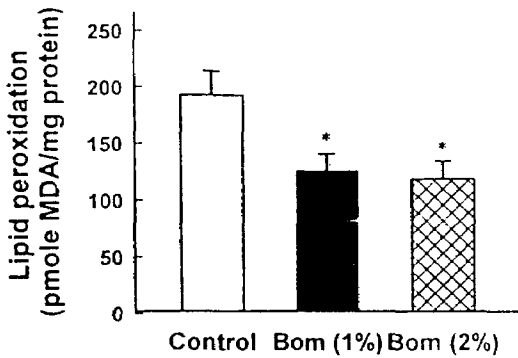


Fig. 5. Effect of Bom on lipid peroxidation in normal rabbit renal cortical slices. Lipid peroxidation was measured for 60 min at 37°C in the presence or absence of 1 and 2% Bom. Data are mean ± S.E. of four determinations. *p<0.05 compared with control.

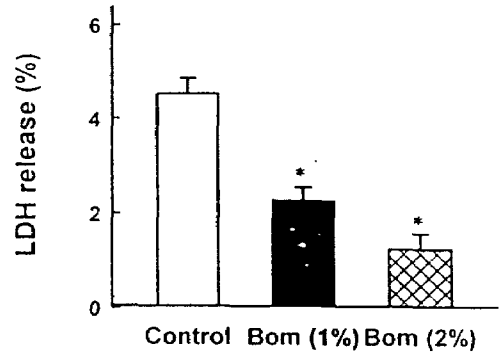


Fig. 6. Effect of Bom on LDH release in normal rabbit renal cortical slices. LDH release was measured for 60 min at 37°C in the presence or absence of 1 and 2% Bom. Data are mean ± S.E. of four determinations. *p<0.05 compared with control.

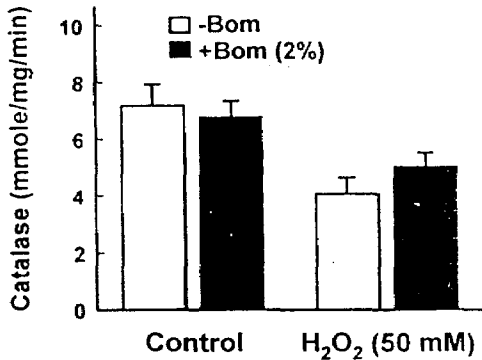


Fig. 7. Effects of H₂O₂ and Bom on catalase activity in rabbit renal cortical slices. Tissues were treated with Bom (2%) and/or H₂O₂ (50 mM) for 60 min at 37°C, and then catalase activity was measured. Data are mean ± S.E. of eight determinations.

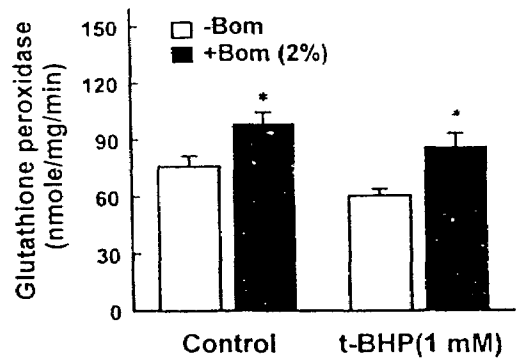


Fig. 8. Effects of t-BHP and Bom on glutathione peroxidase activity in rabbit renal cortical slices. Tissues were treated with Bom (2%) and/or t-BHP (1 mM) for 60 min at 37°C, and then glutathione peroxidase activity was measured. Data are mean ± S.E. of eight determinations. *p<0.05 compared with the absence of Bom.

4.06±0.57 mmole/mg/min으로 감소현상을 보였으며, 여기에 2% 白蠟蠶 추출물을 첨가했을 때 효소의 활성은 5.02±0.49 mmole/mg/min로 유의한 변화가 나타나지 않았고, H₂O₂를 처리하지 않은 정상 조직에 2% 白蠟蠶 추출물을 처리했을 때 catalase활성은 6.77±0.58 mmole/mg/min로 유의한 변화를 보이지 않았다.

5. Glutathione peroxidase 활성에 대한 白蠟蠶 추출물의 효과

t-BHP에 의한 지질의 과산화 및 LDH 유출을 억제하는 白蠟蠶 추출물의 효과가 glutathione peroxidase의 활성을 증가시켜 나타나는 현상인지를 조사하여 그 결과를 그림 8에 나타내었다. 이 그림에서 보는 바와 같이 정상 조직에 2% 白蠟蠶 추출물을 처리했을 경우 효소의 활성이 75.91±5.76 nmole/mg/min에서 98.39±6.47 nmole/mg/min로 유의한 증가 현상을 보였으며, t-BHP로 처리된 조직에서도 2% 白蠟蠶 추출물이 동시에 첨가되었을 경우에는 효소의 활성이 60.34±3.62 nmole/mg/min에서 86.09±7.29 nmole/mg/min로 유의한 증가를 보였다.

6. 반응성 산소유리기 발생에 대한 白蠟蠶 추출물의 효과

白蠟蠶 추출물이 직접 반응성 산소유리기를 제거하는 효과를 가지고 있는지를 확인하기 위하여 사람의 백혈구를 PDBu로 자극하여 반응성 산소유리기를 발생시키고, 이러한 발생이 白蠟蠶 추출물의 전처리로 영향을 받는지를 조사하였다. 그림 9에서 보는 바와 같이, 백혈구에 PDBu를 첨가했을 때 반응성 산소유리의 발생으로 나타나는 chemiluminescence의 증가를 보였고, 白蠟蠶 추출물을 0.01%, 0.05% 및 0.1%되게 전처리했을 때 chemiluminescence가 白蠟蠶 추출물의 농도에 비례하여 감소하였다. 이러한 결과들은 白蠟蠶 추출물이 직접 반응성 산소기들을 제거하는 효과를 가지고 있음을 가르킨다.

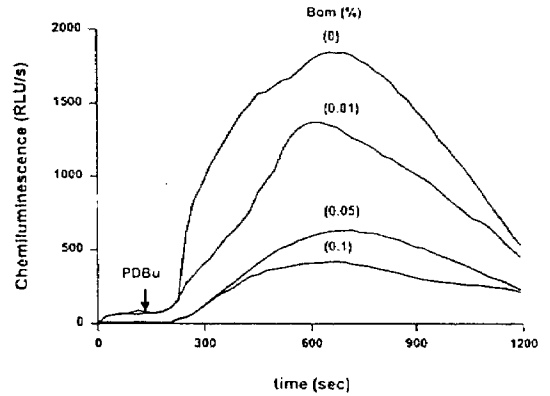


Fig. 9. Inhibition of chemiluminescence by Bom in PDBu-stimulated human neutrophils. Neutrophils (1×10^5 cells/ml) were mixed with luminol ($0.96 \mu\text{g/ml}$) in Krebs-Ringer phosphate solution. After preincubation for 5 min with Bom, PDBu ($0.05 \mu\text{g/ml}$) were added and chemiluminescence was measured.

IV. 考 察

Oxidant들에 의한 세포 손상이 세포막 지질의 과산화 유발과 관계있다는 결과는 여러 연구자들에 의해 제시되었다.(30,31) 세포막에 지질의 과산화가 유발되게 되면 세포막에 투과성이 증가되고(32,33), 세포막을 통한 물질 이동체의 장애가 생기게 됨으로서 세포의 기능이 저해되고 심하면 세포의 죽음까지 이르게 된다.(34,35)

산소 유리기에는 superoxide radical, H₂O₂, hydroxyl radical 등이 알려져 있는데(36-39), superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione peroxide 등(9-11,40)에 의하여 H₂O로 대사되어 무독화된다.

腎臟은 세뇨관을 통해 유기 및 무기물질을 재흡수 또는 분비함으로써 체내 모든 세포의 항상성을 유지시키는 결정적 역할을 하고 있기 때문에 腎臟의 기능에 이상이 발생하게 되면 체내 모든 기관 및 세포 기능에 직접 또는 간접으로 영향을 미치게 되고 심하면 치명적인

결과를 초래하게 된다. 급성 신부전은 허혈(41)에 의해 유발되거나 독성물질(42-44)에 의해 유발되는데, 이들 모두 산소 유리기가 결정적 역할을 하는 것으로 알려져 있다.(41)

따라서 산소 유리기를 제거하거나 이들의 발생을 억제하는 약물을 사용하면 급성 신부전을 방지할 수 있음이 보고되고 있다. 현재까지 급성신부전을 방지하기 위한 여러 방법들이 많이 시도되었고(45-47), 독성물질에 의한 신부전을 방지할 수 있는 약물의 개발이 관심의 대상으로 되었다.(48,49) 특히, 자연에서 얻을 수 있는 약물을 이용함으로써 부작용 없이 급성 신부전을 방지할 수 있는 방법이 절실히 요구되고 있다.

中醫의 보고에 의하면 만성신염, 만성신기능부전, 狼瘡性腎炎, 腎病綜合症, 만성신우신염 등의 경우 세포 손상으로 인한 혈장 과산화지질의 함량은 정상인 경우보다 높게 나타나고(50), 산소 유리기를 제거하는 SOD 활성이 현저히 저하(51)되어 있었는데 病態가 위중할수록, 이환기간이 길거나 합병증을 겸할수록 SOD의 활성이 더욱 저하되어 있었다(52). 그리고, 保腎丸(48)과 黃芪, 何首烏 등으로 구성된 中藥(49)의 활용으로 인하여 과산화지질의 함량을 저하시키고 SOD 활성은 증가시켜 BUN, creatine 등 신기능의 검사항목 지표를 현저히 개선시켜 신장 질환의 치료에 유효하다고 보고되고 있다.

그러므로, 저자는 腎臟 질환의 치료에도 이용(16,17)되는 白殭蠶이 산소 유리기로 인해 발생된 신장 조직의 손상에 어떠한 작용이 있는지를 알아보기 위하여 다음의 실험을 행하였다.

먼저, 신장조직에서 t-BHP가 지질의 과산화를 유발하는 지를 확인하기 위하여 신장 조직을 白殭蠶 추출물을 첨가하지 않은 용액 내에서 0.1-1 mM 농도의 t-BHP에 60분 동안 노출시킨 후 지질의 과산화를 측정하였다. 그 결과, t-BHP가 1 mM보다 낮은 농도에서도 신장 조직에서 지질의 과산화를 유발하였고, 비슷한 양상으로 LDH 유출을 증가시켰다. 신장 조직에서 LDH 유출의 증가는 비가역적인 세포 손상을 의미하기 때문에 본 실험의 결과는 t-BHP

가 지질의 과산화를 유발시켜 세포 손상을 일으키고 있음을 나타내고 있다. 이러한 실험을 통하여 신장 조직에 t-BHP를 처리함으로써 oxidant에 의한 세포손상을 유발시킬 수 있고, 따라서 白殭蠶의 항산화효과를 쉽게 조사할 수 있음을 확인하였다.

白殭蠶 추출물이 oxidant에 의한 지질의 과산화 및 세포 손상에 어떠한 영향을 나타내는지를 확인하기 위하여 신장 조직을 t-BHP에 노출시켜 지질의 과산화 및 LDH 유출 증가를 유발한 후 白殭蠶 추출물을 첨가하여 그 효과를 본 결과, 白殭蠶 추출물이 t-BHP에 의해 유발된 지질의 과산화를 억제하였고 유사한 양상으로 t-BHP에 의한 LDH 유출도 억제하였다. 또한, 이러한 白殭蠶 추출물의 효과는 농도에 비례하여 나타남으로서 白殭蠶 추출물이 oxidant에 의한 세포 손상을 방지할 수 있음을 보여주고 있다.

정상 조직에도 일정 농도의 반응성 산소기를 발생시키기 때문에 지질의 과산화가 생긴다. 정상 조직에서 발생하는 지질의 과산화를 白殭蠶 추출물이 억제할 수 있는 지를 조사한 결과 1%와 2% 농도에서 지질의 과산화를 억제하였으며, 정상 조직에서 나타나는 LDH 유출도 억제하였다. 이러한 실험 결과들은 白殭蠶 추출물이 항산화 작용을 가지고 있음을 가르킨다.

약물이 항산화 효과를 나타내는 데는 조직내 함유하고 있는 항산화효소의 활성을 증가시키거나 약물이 직접 반응성 산소기를 제거하는 작용에 기인 할 수 있다. 조직내에서 hydroperoxide를 분해시키는 효소에는 catalase와 glutathione peroxidase가 있는데, catalase는 t-BHP를 분해시키지는 못하나 H₂O₂를 분해시켜 제거하는 작용을 가지고 있고, glutathione peroxidase는 H₂O₂ 뿐만 아니라 t-BHP를 분해시키는 효소로 알려져 있다(40). 따라서, 본 실험에서는 catalase 및 glutathione peroxidase 활성에 대한 白殭蠶 추출물의 효과를 조사한 결과 白殭蠶 추출물이 catalase 활성에는 영향이 없었으나, glutathione peroxidase 활성은 유의하게 증가시켰으며, 이러한 효과는 1 mM

t-BHP 존재시에도 나타남으로서 白殭蠶 추출물의 항산화 작용에는 조직내 내재성 항산화 효소의 활성 증가가 연관되어 있음을 알 수가 있다.

白殭蠶 추출물의 항산화 작용이 반응성 산소기를 직접 제거하는 효과에 기인하고 있는지를 확인하기 위하여 백혈구에 PDBu를 처리하여 반응성 산소기를 발생시킬 때 白殭蠶 추출물을 전처리하여 그 발생이 영향을 받는지를 조사하였다. 그 결과 반응성 산소기의 발생이 白殭蠶 추출물의 농도에 비례하여 억제되었다. 이러한 결과로 보아 白殭蠶 추출물이 직접 반응성 산소기를 제거하는 효과를 가지고 있음을 알 수 있다.

따라서, 白殭蠶 추출물이 정상 조직과 t-BHP를 처리한 조직에서 glutathione peroxidase 활성을 증가시키는 효과가 반응성 산소기를 직접 제거하는 작용에 기인할 가능성이 있다. 그러나, catalase 활성을 증가시키지 못하는 것으로 보아 白殭蠶 추출물이 glutathione peroxidase의 활성을 증가시키는 효과를 가지고 있을 가능성을 배제할 수가 없다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 白殭蠶 추출물은 신장 조직에서 항산화 효능을 나타내고 있으며, 이러한 효과는 조직내 항산화 효소의 활성을 증가시킴과 동시에 반응성 산소기를 직접 제거하는 작용에 기인하는 것임을 확인하였다. 그러나, 白殭蠶 추출물의 이러한 작용이 약물내에 항산화 물질을 함유하고 있기 때문인지는 더욱 추구해 보아야 밝혀질 것으로 사료된다.

V. 結 論

白殭蠶 추출물이 반응성 산소기들에 의한 지질의 과산화 및 세포 손상을 방지할 수 있는지를 밝히기 위하여 t-BHP를 처리하거나 처리하지 않은 정상 조직에서 白殭蠶 추출물의 효과를 조사하였다. 세포 손상 정도는 lactate dehydrogenase (LDH) 유출을 측정하여 평가하였고, 지질의 과산화는 그 산물인 malondial-

dehyde (MDA)의 농도를 측정하여 평가하였다.

신장 조직에서 t-BHP를 0.1에서 1 mM까지 증가시킨 결과 지질의 과산화가 t-BHP의 농도에 비례하여 증가하였으며, LDH 유출 또한 유사한 양상으로 t-BHP의 농도에 비례하여 증가하였다. t-BHP에 의한 지질의 과산화 및 LDH 유출은 0.5% 白殭蠶 추출물의 첨가로 유의하게 억제되었다. 또한 白殭蠶 추출물을 0.05에서 1% 농도로 조직에 처리한 결과 1.0 mM t-BHP에 의한 지질의 과산화 및 LDH 유출이 白殭蠶 추출물의 농도에 비례하여 억제되었다. Oxidant를 처리하지 않은 정상조직에 1%와 2%의 白殭蠶 추출물을 처리한 결과 지질의 과산화 및 LDH 유출이 유의하게 감소하였다. 白殭蠶 추출물은 2% 농도에서 catalase 활성에는 영향이 없었으나, 정상 조직 및 1.0 mM t-BHP를 처리한 조직에서 glutathione peroxidase 활성을 유의하게 증가시켰다. 白殭蠶 추출물은 농도에 비례하여 반응성 산소기의 발생을 억제하였다.

이러한 결과는 白殭蠶 추출물이 oxidant로 처리한 조직과 처리하지 않은 조직에서 지질의 과산화와 세포손상을 방지하며, 그 작용기전은 白殭蠶 추출물이 세포내 항산화 효소의 활성을 증가시킴과 동시에 직접 반응성 산소기의 발생을 억제하는 효과에 기인함을 알 수 있다.

VI. 參考文獻

1. Floyd RA : Role of reactive oxygen species in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*, 4:2587-2597, 1990.
2. Halliwell B : Oxidants and the central nervous system : some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurol Scand*, 126:23-33, 1989.
3. Halliwell B, Gutteridge JMC and Cross CE: Free radicals, antioxidants, and human

- disease: Where are we now? *J Lab Clin Med*, 119:598-620, 1992.
4. Jaeschke H : Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med*, 209:104-111, 1995.
 5. Reiter RJ : Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the ageing brain. *FASEB J*, 9:526-533, 1995.
 6. Paller MS and Neumann TV : Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. *Kid Int*, 40:1041-1049, 1991.
 7. 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.
 8. Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, Kunkel RG and Ward PA : Evidence for the role of reactive oxygen species in acute nephrotoxic nephritis. *Lab Invest*, 51:396-403, 1984.
 9. Ramzi SC, Vinay K and Stanley LR: Robbins pathologic basis of disease, 4th ed., W.B. Saunders Company, pp.9-12, 1989.
 10. McCord JM : Free radical and inflammation : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, 185:529-531, 1974.
 11. Froh L, Gunzler WA and Schock HH: Glutathione peroxidase : A selenoenzyme. *FEBS Lett.*, 32, 132-134, 1973.
 12. Halliwell B : Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*, 49:1341-1348, 1995.
 13. 辛民教 : 原色臨床本草學, 永林社, pp.663-664, 1991.
 14. 李中梓 : 醫宗必讀, 上海科學技術出版社, p.132, 1987.
 15. 毛德西 編著 : 消渴病中醫防治, 中醫古籍出版社, p.55, 1988.
 16. 李文良 : 中醫藥治療腎病綜合證的體會, 上海中醫藥雜誌, 4:12-13, 1993.
 17. 胡元奎, 許建秦 : 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.
 18. 張逸鎮, 高炯均, 金昌煥 : 天麻와 白殭蠶水鍼이 鎮痙效果에 미치는 영향, 경희한의대 논문집, 11:175-182, 1988.
 19. 金亨奎 外 : 纒絲, 白殭蠶, 蠶絲 및 原蠶蛾의 抗糖尿作用에 관한 연구, 대한한의학회지, 13(1):187-201, 1992.
 20. 金永海, 金甲成 : 胡桃藥針液의 抗酸化效果에 대한 研究, I. 胡桃藥針液이 腎臟細胞에서 oxidant에 의한 損傷에 미치는 影響, 대한한의학회지, 17(1):9-20, 1996.
 21. 문상원, 정지천 : 蟻螞가 Oxidant에 의한 腎臟 조직 손상에 미치는 효과, 대한한방성인병학회지, 3(1):93-100, 1997.
 22. 김상범, 정지천 : Oxidant에 의한 腎臟 세포 관 물질 이동계의 장애에 대한 丹參의 효과, 대한한방내과학회지, 18(1):147-155, 1997.
 23. Phelps JS, Gandolfi AJ, Brendel K and Dorr RT : Cisplatin nephrotoxicity: In vitro studies with precision-cut rabbit renal cortical slices. *Toxicol Appl Pharmacol*, 90:501-512, 1987.
 24. Ricardo SD, Bertram JF and Ryan GB: Reactive oxygen species in puromycin aminonucleoside nephrosis : In vitro studies. *Kid Int*, 45:1057-1069, 1994.
 25. Uchiyama M and Mihara M : Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 86: 271-278, 1978.
 26. Bradford MM : 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, 1976.
 27. Aebi H : Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105: 121-126, 1984.

28. Flohe L and Gunzler WA : Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 105:114-121, 1984.
29. Grishman MB, Engerson TD, McCord JM and Jones HP : A comparative study of neutrophil purification and function. *J Immunol Methods*, 82:315-320, 1985.
30. Farber JL, Kyle ME and Coleman JB : Biology of Disease: Mechanisms of cell injury by activated oxygen spesices. *Lab Invest*, 62:670-679, 1990.
31. Sheridan AM, Fitzpatrick S, Wang C, Wheeler DC and Lieberthal W : Lipid peroxidation contributes to hydrogen peroxide induced cytotoxicity in renal epithelial cells. *Kid Int*, 49:88-93, 1996.
32. Chance B, Sies H and Boveris A: Hydroperoxide metabolism un mammalian organs. *Physiol Rev*, 59:527-605, 1979.
33. Arstula AU, Smith MA and Trump BF: Microsomal lipid peroxidation : Morphological characterization. *Science*, 175:530-533, 1972.
34. Koko K, Kato M, Matsuoka T and Mustapha A : Depression of membrane-bound Na⁺-K⁺-ATPase activity induced by free rradicals and by ischemia of kidney. *Am J Physiol*, 254:C330-C337, 1988.
35. 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.
36. David R : Mechanistic toxicology: A radical perspective. *J.Pharm. pharmacol.*, 41:505-511, 1989.
37. Barry H : Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB. J.*, 1: 358-364, 1987.
38. Pryor WA : Free radical in biology: Involvement of radical reaction in aging and carcinogenesis in medicinal chemistry. *Elservier, Amsterdam*. pp. 331-361, 1977.
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. Ross D and Moldeus P: antioxidant defence systems and oxidative stress. In: *Membrane Lipid Oxidation*, ed. by Vigo-Pelfrey C., Vol II, pp.151-170, CRC Press, Boston, 1993.
41. Paller MS, Hoidal JR and Ferris TF: Oxygen free radicals in ischemia acute renal failure in the rat, *J. Clin. Invest.* 74:1156-1164, 1984.
42. Byrd L and Sherman RL : Radiocontrast induced acute renal failure : A clinical and pathophysiological review. *Medicine*, 58:270, 1979.
43. Matzke GR, Lucarotti RL and Shapiro HS: Controlled comparison of gentamycin and tobramycin nephrotoxicity, *Am. J. Nephrol.*, 3:11, 1983.
44. Blackshear JL, Davidman M and Stillman MT : Identification of risk for renal insufficiency from nonsteroidal antiinflammatory drugs, *Arch. Intern. Med.* 143:1140, 1983.
45. Adachi T, et al : Effects of superoxide dismutase on glomerular nephritis, *Biochem. pharmacol.* 35(2):341, 1986.
46. Hansson R, et al. : Effects of free radical scavengers on renal circulation after ischemia in the rabbit, *Clinical Science*, 65:605, 1983.
47. 문철용 외 : 백서에서 신 허혈성 손상에 미치는 칼슘 길항제의 효과, *朝鮮大醫大論文集*, 18(1):11-19, 1993.
48. 鄒燕勤 外 : 保腎丸結合辨證治療對腎炎患

- 者LPO水平的影響, 中西醫結合雜誌, 10(7): 404-405, 1990.
49. 張竹映, 楊麥貴, 文代新: 中藥加抗氧化劑治療小兒急性腎小球腎炎, 中國中西醫結合雜誌, 14(8):499, 1994.
50. 孫軼秋 外: 涼血化瘀法對小兒紫癍性腎炎血漿LPO,SOD水平的影響, 北京中醫, 2:16-17, 1995.
51. 羅陸一, 劉增印: 腎氣虛患者紅細胞超氧化物歧化酶的測定, 遼寧中醫雜誌, 10:37-38, 1987.
52. 陳晏珍, 江家貴, 楊宏德: 腎虛與超氧化物歧化酶關係初探, 中醫雜誌, 30(4):42-43, 1989.

= Abstract =

Antioxidant action of *Bombycis corpus* extraction in renal tissues

Moo-Hyung Lee · Cheol-Ho Yoon · Ji-Cheon Jeong

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study was undertaken to determine whether *Bombycis Corpus* extract (Bom) has antioxidant action. Kidney tissues were exposed to t-butylhydroperoxide (t-BHP) to induce oxidative stress.

Lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, and cell injury was estimated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release in rabbit renal cortical slices. t-BHP increased lipid peroxidation and LDH release in a dose-dependent manner over the concentration range of 0.1-1 mM. Such effects of t-BHP on lipid peroxidase and LDH release were prevented by 0.5% Bom. When tissues were treated with t-BHP in the presence of various concentrations of Bom, lipid peroxidation and LDH release were dose-dependently inhibited by Bom. Bom at 1 and 2% concentrations inhibited lipid peroxidation and LDH release in normal tissues. Bom at 2% concentration increased glutathione peroxidase activity in tissues treated or untreated with 1.0 mM t-BHP. However, catalase activity was not altered by addition of Bom. Bom inhibited generation of reactive oxygen species.

These results indicate that Bom inhibits lipid peroxidation and cell injury in tissues treated with or without oxidant and this effect is, at least in part, attributed to increased activity of glutathione peroxidase and a direct scavenging action.