

원 저

靑娥丸의 Peroxynitrite 제거 활성 및 기전

김성호, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Peroxynitrite Scavenging Activity and its Mechanism of *Cheonga-hwan*

Seong-Ho Kim, Ji-Cheon Jeong

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives: Peroxynitrite (ONOO⁻), formed from the reaction of superoxide ($\cdot O_2^-$) and nitric oxide (NO), is a cytotoxic species that can oxidize several cellular components such as proteins, lipids and DNA. It has been implicated in diseases such as aging process, Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, cancer and arteriosclerosis. Due to the lack of endogenous enzymes responsible for ONOO⁻ inactivation, developing a specific ONOO⁻ scavenger is of considerable importance. The aim of this study was to evaluate ONOO⁻ scavenging activity and its mechanism in *Cheonga-hwan* (CAH).

Methods: The ONOO⁻ scavenging activity in CAH was assayed by measuring oxidized dihydrorhodamine 123 (DHR 123) by fluorescence. The scavenging efficacy was expressed as IC₅₀, showing the concentration of each sample required to cause 50% inhibition of DHR 123 oxidation. In a separate study, the protective effect of CAH on ONOO⁻-induced nitration of bovine serum albumin (BSA) was investigated using immunoassay with a monoclonal anti-nitrotyrosine antibody, and a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody from sheep.

Results: CAH showed potent scavenging activities of ONOO⁻, NO and $\cdot O_2^-$. The data demonstrated that CAH led to decreased ONOO⁻-mediated nitration of tyrosine through electron donation. CAH showed significant inhibition on nitration of bovine serum albumin by ONOO⁻ in a dose-dependent manner.

Conclusions: CAH can be developed as an effective peroxynitrite scavenger for the prevention of the ONOO⁻ involved diseases. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(4):55-63)

Key Words: *Cheonga-hwan*, scavenging activity, peroxynitrite, nitric oxide, superoxide anion

서 론

최근에 암을 비롯한 여러 질환의 발생 기전에 관

여하고 있는 것으로 알려져 있는 활성산소로는 superoxide anion ($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H₂O₂) 및 hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등이 있으며, 이들은 세포내 과립 (mitochondria, microsome, peroxisome) 및 cytosol에서 생성된다¹⁾. 이러한 활성산소는 대식세포의 살균작용, 오래된 단백질의 제거 등에 이용되는 필수 불가결한 물질이나²⁾ 반응성이 커서 생체 내에서 유해한 작용을 나타낼 수 있다. 그러므로 활성산소종의 독성에 대한 중요성이 인식되었고, 그것들을

· 접수 : 2002년 7월 6일 · 채택 : 2002년 10월 1일
· 교신저자 : 정지천, 서울시 강남구 논현1동 37-21 동국대학교
강남한방병원 1내과
(Tel. 02-3416-9731, Fax. 02-3444-9171, E-mail :
jjcjh@hitel.net)
· 본 연구는 동국대학교 전문학술지 논문게재연구비 지원으로 이루어졌음.

제거할 수 있는 제거제 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다³⁾.

Nitric oxide (NO)는 반응성이 크고 반감기가 아주 짧은 특징을 갖는 활성질소로 대식세포, 호중구 등에서 생성되며 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine을 기질로 하여 합성되고 거의 대부분의 포유동물에서 세포내 messenger로 작용하며, 혈관의 항상성 유지 신경전달, 면역계 등에 관여한다⁴⁵⁾. 또한 NO는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성산소들과 반응할 수 있으며, 특히 $\cdot O_2$ 와 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrite (ONOO)를 생성한다. 최근에 많은 연구가 수행되어 ONOO가 세포 구성성분의 손상을 초래하여 세포 독성을 야기하며 많은 만성질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다⁶⁹⁾.

생체내에서 NO와 $\cdot O_2$ 가 동시에 발생하는 조건에서 라디칼-라디칼 반응으로 쉽게 비라디칼인 ONOO가 생성된다. 이 $\cdot O_2$ 는 강력한 산화력을 나타내며 세포 구성 성분들을 변성시키는데 그 기전으로 -SH기의 산화, 지질과산화, 방향족 아민의 니트로화 등을 들 수 있다.

Yu¹⁰⁾는 NO, ONOO, NO₂, NO₃ 등의 활성질소도 활성산소와 함께 노화과정에 기여할 뿐만 아니라 여러 노인성 질환의 주범이라는 "Oxidative Stress Hypothesis"를 제안하였다. 또한, 최근 제안된 "Inflammation Hypothesis of Aging"¹¹⁾에 의하면 노화과정에서 염증반응이 지속적으로 일어남으로써 활성산소의 생성 증가와 iNOS 유도에 따른 NO의 대량생성이 ONOO 생성을 더욱 증가시켜 세포 및 조직 손상을 가져와 노화과정을 촉진한다고 하였다. 염증, 감염 등과 같이 특정한 상태에 특히 ONOO가 대량생성되어 강한 조직 파괴력을 나타내며 여러 질병과 관련된다는 보고는 많다.

ONOO는 NO와 $\cdot O_2$ 보다 독성이 더 강한 것으로 알려져 있으며 지질, 단백질, 그리고 DNA의 산화와 니트로화 과정을 통해 혈관 평활근 세포의 이완, 혈소판 응집 저해 및 guanylate cyclase의 자극, tyrosine의 니트로화 외에도 lysine, arginine, histidine 같은 아

미노산의 변형, thiol, thioether 뿐만 아니라 peptide, 단백질의 methionine 잔기 산화 및 지질과산화의 유도에 의한 세포 독성 등에 관여한다. 또한 미토콘드리아의 호흡 억제, 세포막 펌프 억제, GSH의 고갈, ADP ribosyl transferase의 활성화로 인한 DNA 손상 및 세포 에너지 고갈, mitochondrial ATP synthase, aconitase 같은 세포질 효소의 저해를 일으켜 세포사를 유발한다고 한다. 결국 이런 ONOO의 독성 작용은 노화, 암, 관절염, 동맥경화, 피부 염증 등 여러 질환과 관련되는 것으로 보고되고 있다⁷⁹⁾.

그러므로 ONOO의 특성을 검토하고 연구하여 이것을 무독화시키는 방법은 노화과정뿐만 아니라 노인성 질환을 조절하는데 대단히 중요한 의미를 가진다. 인체 내에는 특이하게 ONOO를 제거하는 효소가 존재하지 않으므로 한약재로부터 ONOO 제거 활성을 탐색하는 것은 큰 의의가 있다. ONOO에 대한 독성을 방지하는 물질로는 uric acid, serotonin 등과 같은 내인성 ONOO 방지제, flavonoids, hydroxycinnamates와 같은 천연물 유래성분 및 salicylate 등과 같은 합성물이 있다¹²⁾.

靑娥丸은 太平惠民和劑局方¹³⁾에 최초로 기재된 이래 腎虛腰痛의 치료제로 상용되어 왔으며¹⁴⁾, 腎臟의 陽氣를 補하는 胡桃, 補骨脂, 杜沖 등의 약물로 구성되어 있다¹⁵⁾. 腎虛腰痛은 房勞傷, 陽氣不足, 勞役, 老衰 등으로 인하여 유발되는 內傷腰痛이며¹⁶⁾, 腎氣虛衰는 동양의학에서 노화의 중요 원인으로 작용한다¹⁷⁾. 또한 普濟方¹⁸⁾에는 靑娥丸을 常服하면 "壯筋骨 補虛損 益精髓 返老還童"한다고 하였으므로 補腎 효능과 함께 노화 방지 효능도 있을 것으로 보인다.

이전의 실험 연구에서 靑娥丸은 흰쥐의 신장과 뇌 조직에서 지질과산화를 억제하고 활성산소 생성계 효소 활성을 억제하며^{19,20)}, SOD, catalase 및 GSH peroxidase 등의 항산화 효소 활성을 증가시키고 활성산소를 직접 소거시키는 작용²¹⁾이 보고된 바 있다. 그러나 최근 노화과정 및 여러 만성질환에서 산화스트레스의 주범으로 강력한 산화력을 가지는 ONOO의 소거 작용에 관한 연구는 전혀 없다. 따라서 본 연구에서는 靑娥丸이 ONOO와 그 전구체인 NO 및 \cdot

O₂에 대한 제거능, 제거 기전 및 단백질의 nitration 등을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

靑娥丸의 약재는 시중에서 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 한 척의 분량은 黃¹⁸⁾에 근거하여 아래와 같이 하였다.

杜 冲	<i>Eucommiae Cortex</i>	50 g
補骨脂	<i>Pasoraliae Semen</i>	50 g
胡 桃	<i>Juglandis Semen</i>	50 g
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	31.25 g
Total amount		181.25g

2) 시약

3-Morpholinosydnonine (SIN-1), DL-peniallamine은 시그마 화학 주식회사 (ST. Louis, MO, USA)에서, dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 ONOO⁻은 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 4,5-diaminofluorescein (DAF-2)는 Dai ichi Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

靑娥丸 181.25 g을 잘게 분쇄하고 3배 량의 95% methanol을 가하여 60℃에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 추출액을 실온으로 냉각시킨 후 여지로 여과한 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 추출물을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) ONOO⁻ 측정법

Kooy 등의 방법²²⁾에 의해 ONOO⁻ 제거능을 측정하였다. 96 well microplate에 靑娥丸추출물을 취하고, 90 nM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μM diethylen-

etriaminepenta acetic acid와 10 μM DHR 123을 함유하는 sodium phosphate 완충액 (pH 7.4)를 가한다. 그리고 10 μM ONOO⁻ 첨가한 후, 형광 광도를 이용하여 excitation (500 nM)와 emission (536 nM)을 측정하였다.

3) 활성산소 측정법

DCFDA assay²³⁾로 활성산소를 측정하였다. 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/ml esterase를 -20℃에 stock solution으로 저장하였으며, 실험시 10 uM DCFDA와 6U/esterase를 혼합하여 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) 용액을 22℃에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동보관하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수 분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 되므로, excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 Fluorescence Microplate reader (FL 500, Bio-Tex instruments)로 측정하였다.

4) NO 측정법

특이적인 NO의 indicator인 4,5-diamino fluorescein (DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490-495 nm의 여기파장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. Dimethyl sulfoxide 550 μl에 DAF-2 1 mg이 녹아 있는 것을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 1:400배로 희석하였다. NO 제공 물질인 sodium nitroprusside (f.c. 2 mM)와 DAF-2 (f.c. 3.14 uM)를 96 well plate에 첨가하였다. 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO의 양에 의존한다. DAF-2와 NO의 반응에 의해 방출되는 형광은 10분 후 형광광도계 (FL500, Bio Tek사)를 이용하여 여기파장 485와 방출파장 530 nm에서 측정하였다²⁴⁾.

5) Protein nitration

Bovine serum albumin (BSA, 0.5 mg / mL) 95 μl에 농도별 시료나 혹은 용매 2.5 μl를 첨가하여 상온에서 10분간 shaking incubation한 후, ONOO⁻ (4 mM in

0.3 N NaOH) 2.5 μ l를 첨가하고 20분간 상온에서 incubation시켰다. Nitration 반응이 끝난 후, agarose gel에 전기영동하여 anti nitrotyrosine antibody를 이용하여 protein이 nitration된 정도를 nitrotyrosine으로 검사하였다.

6) 3-Nitrotyrosine 측정

靑娥丸이 ONOO⁻에 의한 tyrosine의 nitroation을 억제하는지의 여부는 이전에 기술했던 방법에 따라 측정하였다²⁵⁾. 0.3 N NaOH에 녹아 있는 ONOO⁻ (500 μ M) 용액에 靑娥丸의 존재하에 100 μ M tyrosine을 첨가하고 최종 부피를 1 ml로 맞춘다. tyrosine과 ONOO⁻의 반응에 의한 3-nitrotyrosine의 형성도 측정하였다. 430 nm에서의 peak 스펙트럼은 3-nitrotyrosine의 생성을 의미한다.

7) ONOO⁻의 제거 기전

靑娥丸의 작용 기전을 밝히기 위하여 ONOO⁻를 Pannala 등의 방법²⁶⁾에 따라 분광 광도계를 이용하여 측정하였다. 0.3 N NaOH에 녹아 있는 ONOO⁻ (500 μ M)에 靑娥丸을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 첨가하고, 최종 부피가 1 l가 되도록 한다. 각 용액을 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 shaking incubation시킨 후, 분광광도계 (Ultraspec 2000 UV-visible spectrophotometer, Pharmacia-Biotech사)를 이용하여 190 nm와 600 nm 사이의 파장에서 검색한다. ONOO⁻ 존재하에서 靑娥丸에 의한 스펙트럼의 변화는 430 nm에서 측정하며, 이는 nitration 반응이 일어났음을 의미한다.

8) 통계처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평

균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

성적

1. ONOO⁻ 제거 활성

靑娥丸의 ONOO⁻ 제거 활성을 검토한 결과, ONOO⁻ 제거제로 잘 알려져 있는 penicillamine (IC₅₀ = 3.7 μ g/ml) 보다 약하지만 비교적 강한 ONOO⁻ 제거 활성 (IC₅₀ = 13.6 μ g/ml)을 나타내었다. 이것은 靑娥丸이 crude extract로서 단일 positive control인 penicillamine 보다는 약하지만 비교적 강한 활성을 나타낸 것은 천연 약재로서 그 약효가 매우 강하다는 것을 시사한다 (Fig. 1).

2. NO 제거 활성

ONOO⁻의 전구체인 NO 제거능을 검토한 결과, 기존 NO의 제거제인 carboxy-PTIO 보다는 약하지만, 비교적 강한 NO 제거능을 나타내었다. 靑娥丸은 ONOO⁻ 뿐만 아니라 NO도 제거함으로써 ONOO⁻ 축적을 억제할 것으로 사료된다 (Fig. 2).

3. \cdot O₂ 제거 활성

ONOO⁻의 또다른 전구체인 \cdot O₂ 제거능을 검토한 결과, 기존 \cdot O₂ 제거제인 trolox 보다는 약하지만, 비교적 강한 제거 활성을 나타내어 靑娥丸이 ONOO⁻ 및 NO 뿐만 아니라, \cdot O₂를 강력하게 제거함을 알 수 있었다 (Fig. 3).

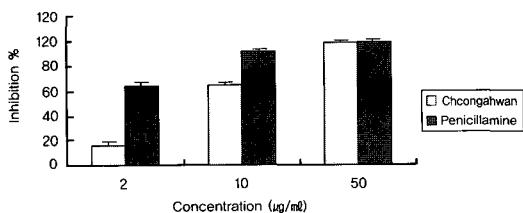


Fig. 1. ONOO⁻ scavenging activity of *Cheonga-hwan*. Each value is the mean \pm S.E. of three experiment.

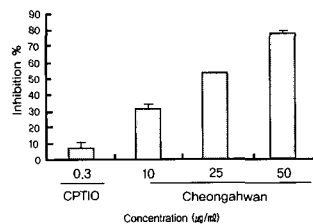


Fig. 2. NO scavenging activity of *Cheonga-hwan*. Each value is the mean \pm S.E. of three experiment.

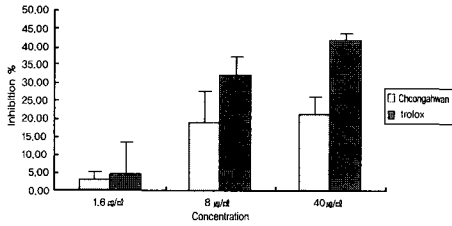


Fig. 3. O₂⁻ scavenging activity of Cheongahwan
Each value is the mean ± S.E. of three experiment.

4. ONOO⁻ 제거 기전

靑娥丸이 어떠한 기전으로 ONOO⁻를 제거하는가에 대하여 검토하였다. Tyrosine은 ONOO⁻와 반응하며 430 nm에서 최대 흡광을 가지는 3-nitrotyrosine (Fig. 4B)을 생성한다. 靑娥丸과 ONOO⁻이 반응하여 靑娥丸 성분이 nitration되어 니트로화물이 생성되는지를 검토한 결과, 430 nm에서 흡광도를 가지지 않으므로 (Fig. 4 C, D, F) 靑娥丸이 nitration되지 않고, electron donation에 의해 ONOO⁻를 제거할 가능성이 시사되었다. 그리고 Fig. 4A에서 보듯이 tyrosine 없이 ONOO⁻만 존재할 경우 430 nm에서 peak가 없으나, tyrosine을 첨가할 경우 3-nitro tyrosine의 peak가 430 nm에 나타나는데 (Fig. 4B), Fig. 4 F, G, H에서 보듯이 靑娥丸을 각각 10, 25, 50 μg/ml 첨가할 경우 농도의존적으로 3-nitrotyrosine의 peak가 줄어들음을 알 수 있다. 이것은 靑娥丸이 매우 효과적으로 tyrosine의 nitration을 억제함을 알 수 있고, 이것은 nitration 보다는 electron donation에 의해 제거함을 의미한다.

5. albumin nitration 저해 효과

Albumin의 tyrosine이 ONOO⁻에 의해 nitration 되는 정도에 靑娥丸이 미치는 영향을 anti-nitrotyrosine 항체로 검토하였다. 그 결과, 靑娥丸은 albumin의 tyrosine nitration을 농도 의존적으로 현저히 저해함을 알 수 있었다. 이것은 靑娥丸이 ONOO⁻를 효과적으로 제거함으로써 tyrosine의 nitration을 억제하여 albumin의 nitration을 저해한 것으로 사료된다 (Fig. 5).

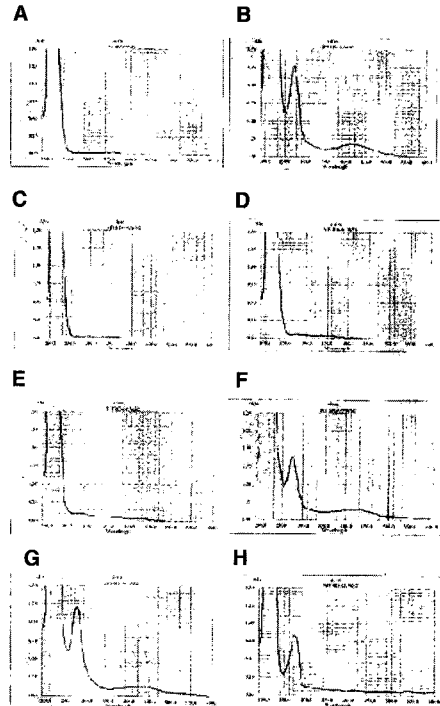


Fig. 4. Interaction of Cheongahwan with ONOO⁻ and its effect with ONOO⁻-mediated 3-nitrotyrosine.

A : ONOO⁻ (40 μM), B : Tyrosine (40 μM) with ONOO⁻ (40 μM), C : Cheongahwan (10 μM) with ONOO⁻ (40 μM), D : Cheongahwan (25 μM) with ONOO⁻ (40 μM), E : Cheongahwan (50 μM) with ONOO⁻ (40 μM), F : Tyrosine (40 μM), Cheongahwan (10 μM) with ONOO⁻ (40 μM), G : Tyrosine (40 μM), Cheongahwan (25 μM) with ONOO⁻ (40 μM), H : Tyrosine (40 μM), Cheongahwan (50 μM) with ONOO⁻ (40 μM). Each mixed solution was incubated at 37°C with shaking for 1h and scanned between 190 and 600 nm with spectrophotometric analysis. The spectrum of the peak displayed at 430 nm reflects the formation of 3-nitrotyrosine.

고찰

靑娥丸은 腎虛腰痛을 치료하고 虛損을 補하며 精髓를 더해주는 작용이 있어¹⁴⁾ 임상에서 많이 활용되는 方劑이다. 주된 구성 약물인 胡桃, 補骨脂, 杜仲 등은 모두 補腎壯陽 효능을 가지고 있어 延年益壽 약

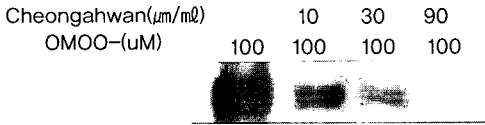


Fig. 5. Effect of *Cheonga-hwan* on albumin nitration
Cheongahwan was added to BSA. The reaction samples were incubated with shaking at 25°C for 1h. After ONOO- was added, all samples were further incubated with shaking at 25°C for 30 min.

물에 속한다¹⁷⁾. 內經 素問²⁷⁾에 ‘天壽過度氣脈常通 而腎氣有餘也’, 虞²⁸⁾가 ‘腎元盛則壽延 腎元衰則壽夭’ 라고 하여 長壽하는 것은 腎氣의 盛衰與否에 依하여 決定된다고 하였으니 腎氣虛衰는 老化의 重要 原因이다¹⁷⁾. 그러므로 靑娥丸이 노화과정과 노인성 질환 및 여러 만성질환들과 밀접한 관계를 가지고 있는 ONOO-를 제거하는 작용이 있는지를 검토하고자 하였다.

ONOO- 제거능을 검토한 실험에서 靑娥丸은 농도 의존적으로 매우 강한 ONOO- 제거능을 나타내었다. 그리고 ONOO-의 전구체인 NO와 ·O₂의 제거능을 검토한 결과, 靑娥丸은 농도 의존적으로 강한 제거 활성을 나타내었다. 靑娥丸은 ONOO-에 의해 albumin이 nitration되는 것도 농도 의존적으로 억제하였다.

ONOO- 제거능을 나타내는 물질로는 특히 천연물에서 분리된 flavonoid와 phenol성 물질들이 잘 알려져 있는데^{9,29,30)}, 靑娥丸의 구성 약물들도 flavonoid와 phenol성 물질을 다량 함유하고 있을 것이므로 靑娥丸의 강력한 ONOO- 제거능도 이들 성분에 기인할 것으로 사료된다.

Flavonoids은 과일, 채소류에 풍부히 존재하며 항산화 효과는 활성산소의 소거작용, 전이 금속과의 chelating 및 활성산소를 형성하는 효소를 저해하는 것으로 세분화할 수 있다. Flavonoids 중에서 quercetin이 강력한 항산화제로 작용하는데 이는 셀레늄을 함유한 단백질 ebselen[2-phenyl-1,2-benzisoseleazol-3-(2H)-one]과 비교해 볼 때 10배 정도

항산화작용이 강하다고 보고하였다.⁷⁾

Flavonoid의 ONOO- 소거 작용은 LDL 산화를 방지하고 CHD (심혈관계 질환)의 발병률을 저하시키므로 flavonoid의 섭취가 심혈관계 질환 발병률과 역의 상관관계가 있음을 시사하였다. 그러나 flavonoid가 내피세포와 혈관 평활근세포 사이에 축적되며 바로 그 장소에서 동맥경화가 진전되는 것으로 미루어 볼 때 flavonoid의 산화촉진제로서의 작용도 보고되고 있다²⁹⁾. Flavonols 중에서 EGCG, EC, GCG, EGC, gallate ester는 chain-breaking antioxidant로서 작용하며 LDL의 산화를 방지하고 수용성, 지용성 radical을 소거할 뿐만 아니라 ONOO-에 의한 니트로화를 감소시키고 LDL의 surface charge alteration을 제한한다.⁸⁾ Haenen 등⁷⁾은 polyphenol의 구조와 항산화활성과의 상관성을 밝혔으며, 정 등³⁰⁾은 녹차에서 추출한 EGCG 그리고 GCG가 직접 제거하는 기전으로 높은 활성을 나타내는 것을 밝혔다. 이런 활성은 OH group의 수에 따라 그 활성산소 제거능이 달라지며, 전이 금속을 chelating하여 Fenton 반응에 의한 활성산소 형성을 지연한다고 보고하였다.

Isoflavonoid 계열의 성분들로는 genistein 유도체들이 잘 알려져 있으며 콩류에 존재한다. 이들은 만성적인 염증의 발생을 감소시킨다고 알려져 있다. ONOO-와의 반응에서 genistein와 daidzein은 니트로화되며 이 과정에서 isoflavonoid가 수소 공여체로 작용할 것이라고 알려져 있다³¹⁾. 특히, genistein은 LSP로 유도된 macrophage의 iNOS를 현저히 억제하여 결국 ONOO- 형성을 방해하는 것으로 알려져 있다³²⁾.

Hydroxycinnamate는 채소, 과일 등에 존재하며, 대표적인 성분은 monohydroxamates인 ferulic acid와 coumaric acid가 있으며, catecholates인 caffeic acid와 chlorogenic acids가 있다. 이들 모두는 ONOO-를 직접 제거하고 ONOO-에 의해 생성되는 nitrotyrosine 생성을 막았다. Monohydroxamates은 ONOO-를 제거하는 과정에서 자신이 직접 니트로화되며 catecholate는 수소 공여체로 작용한다고 알려져 있다³³⁾. 枇杷葉에서 추출된 chlorogenic acid도 catecholate 구조를 가지고 있으면서 ONOO-를 직접 제거하는 강한 작용을

나타낸다고 최근 보고되었다³⁴⁾.

비타민 E는 다가 불포화지방산이며 채종유, 씨, 땅콩류 그리고 곡류에 존재하며 몸 속의 지방부분이 산화되는 것을 막으므로 항산화제로 알려져 있다. 특히, α -Tocopherol와 γ -tocopherol은 최근 ONOO⁻를 제거한다고 알려져 있는데, ONOO⁻의 존재하에서 α -tocopherol은 산화되어 α -TQ을 만들고 γ -tocopherol은 니트로화되어 5-NO₂- γ -tocopherol을 형성한다고 한다³⁵⁾. 비타민 C인 ascorbic acid는 오렌지와 같은 과일과 브로콜리, 후추, 감자 그리고 brussels sprouts와 같은 채소류에 많이 존재한다. ONOO⁻ 제거제인 ascorbic acid는 RAW 264.7 세포에서 ONOO⁻와 함께 처리하는 경우에 ONOO⁻ 단독 처리군 보다 DNA fragmentation 현상이 줄어들어, ascorbic acid가 ONOO⁻에 의한 세포사를 억제한다는 보고도 있다³⁶⁾.

이상의 고찰에서 천연물 중의 flavonoid, phenol성 비타민 E와 비타민 C가 강한 ONOO⁻ 제거 활성을 나타내었다. 靑娥丸의 杜冲, 補骨脂, 胡桃, 生薑 속의 flavonoid, phenol성 물질, 비타민 C와 E가 중요한 ONOO⁻ 제거능으로 작용할 가능성이 시사되었다. 앞으로 이들 구성 한약재들의 ONOO⁻ 제거능과 그들의 활성 성분을 규명하는 것은 매우 가치 있는 연구라 생각된다.

한편 ONOO⁻를 제거하는 기전으로는 제거제 자체가 nitration됨으로써 ONOO⁻를 제거하거나 아니면 제거제가 ONOO⁻에 전자를 공여함 (electron donation)을 통해서 제거하는 2가지 경로가 잘 알려져 있다. 본 실험에서 靑娥丸의 ONOO⁻ 제거 기전으로는 靑娥丸 자체가 nitration되지 않고 ONOO⁻를 제거하는 결과로서 electron donation에 의해 ONOO⁻를 제거함을 알 수 있었다.²⁵⁾ 또한 이러한 electron donation에 의해 ONOO⁻를 제거하는 기전에는 flavonoid 및 phenol성 물질들이 관여할 것으로 사료된다.

결론

노화 및 노인성 질환에 중요한 역할을 하는

ONOO⁻에 대한 靑娥丸의 제거능과 그 기전을 검토하였다. 靑娥丸은 ONOO⁻를 농도 의존적으로 제거하는 활성을 나타내었으며, ONOO⁻의 전구체인 $\cdot O_2$ 및 NO에 대해서도 효과적으로 제거하는 활성을 나타내었다.

靑娥丸은 electron donation에 의해 ONOO⁻를 제거하였고, ONOO⁻에 의한 tyrosine nitration을 농도 의존적으로 억제하였으며, albumin nitration도 농도 의존적으로 저해하였다. 이러한 실험 결과는 靑娥丸이 electron donation에 의해 ONOO⁻, NO 및 $\cdot O_2$ 를 매우 효과적으로 제거함으로써 노화 및 노화관련 질환의 조절약물로 개발될 가능성을 제시하였다.

참고문헌

1. Corfran RS, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia:WB. Saunders. 1989:1-31.
2. Oyanagui Y. SOD and active oxygen modulators. Tokyo:Nihon Igakukan. 1989:17-31.
3. Koo A. Microvascular techniques for *in vivo* assay of vasoactive agents from Chinese medicinal herbs, Advances in Chinese medicinal materials research. Singapore:World Scientific Publ Co. 1985:559-69.
4. Ameczua JL, Palmer RMJ, De Souza BM, Moncada S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 1989;97:1119-25.
5. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB. J.* 1992; 6:305-10.
6. Althaus JS, Oien TT, Fici GJ, Scherch HM, Sethy VH, VonVoigtlander PF. Structure activity relationships of peroxynitrite scavengers an approach to nitric oxide neurotoxicity. *Res. Commu. Chem. Patho. Pharmacol.* 1994;83:243-8.
7. Haenen GPMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 1997;236:591-6.
8. Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S.

- Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997;232:164-70.
9. Chung HY, Soung DY, Kim AR, Choi HR, Kim HJ, Choi JS, Yang R, Lee KH, Yu BP. Generation, Toxicity and Scavenging of ONOO: Its Involvement in the Aging Process. *Kor. J. Gerontol.* 2000;10:46-59.
 10. Yu BP. Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction. *Free. Rad. Biol. Med.* 1996;21:651-668.
 11. Chung HY, Kim HJ, and Kim JW. The inflammation hypothesis of aging: Molecular modulation by calorie restriction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001;928:327-335.
 12. 정해영 외. ONOO의 생성, 독성, 제거 및 노화와 관련된 성. *한국노화학회지.* 2000;10(1):46-59.
 13. 太平惠民和劑局編. 太平惠民和劑局方. 北京:人民衛生出版社. 1985:175.
 14. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1981:278.
 15. 黃度淵. 方藥合編. 서울:南山堂. 1989:216-7.
 16. 윤철호, 정지천. 내과 영역의 요통에 대한 문헌적 고찰. *대한한방내과학회지.* 1994;15(2): 318-46.
 17. 王其飛 外. 中醫長壽學. 遼寧: 遼寧 科學技術出版社. 1989:53-4, 318-23, 340-4.
 18. 朱 橚. 普濟方(欽定四庫全書 卷 22). 서울:大成文化社. 1995:480.
 19. 황영근, 윤철호, 김종대, 정지천, 신억섭. Effects of Qingewan on Antioxidation in Rat's Kidney. *한방성인병학회지.* 1996;2:119-31.
 20. 윤철호, 강정준, 신현철, 김종대, 정지천, 서종은, 신억섭. Effects of Qingewan on Antioxidation in Rat's Brain. *한의학정보학회지;*4(1):54-64
 21. 鄭智天. Increased antioxidant enzyme activities and scavenging effects of oxygen free radicals by Cheongahwan. *대한한의학회지.* 1997;18(2):355-65.
 22. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free. Radic. Res. Commun.* 1994;16:149-56.
 23. Cathcart R, Schwiens E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal. Biochem.* 1983;134: 111-16.
 24. Nagata N, Momose K, Ishida Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J. Biochem. Tokyo.* 1999;125:658-61.
 25. Park HJ, Chung HY, Kim J, Choi JS. Antioxidant activity of 2,3,6-tribromo-4,5- dihydroxy benzyl methyl ether from *Symphyclocladia latiuscula*. *J. Fish. Sci. Technol.* 1999;2:1-7.
 26. Pannala AS, Rice-Evans C, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 232:164-68.
 27. 南京中醫學院醫經教研組. 黃帝內經素問譯釋. 上海: 上海 科學技術出版社. 1983:4-5.
 28. 虞搏. 醫學正傳. 서울:成輔社. 1986:9.
 29. Neumann HA, Carlsson, K and Brom GH. Uptake and localization of O-(beta- hydroxyethyl)-rutosides in the venous wall measured by laser scanning microscopy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1992;43:423-6.
 30. Chung HY, Yokozawa T, Soung DY, Kye IS, No JK, Baek BS. Peroxynitrite- scavenging activity of green tea tannin. *J. Agric. Food Chem.* 1998;46:4484-6.
 31. Boersma BJ, Patel RP, Kirk M, Jackson PL, Muccio D, Darley-Usmar VM and Barnes S. Chlorination and nitration of soy isoflavones. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999;368:265-275.
 32. Sadowska-Krowicka H, Mannick EE, Oliver PD, Sandoval M, Zhang XJ, Eloby-Childess S, Clark DA and Miller MJ. Genistein and gut inflammation: role of nitric oxide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Mar.* 1998;217:351-7.
 33. Pannala AS, Razaq R, Halliwell B, Singh S and Rice-Evans CA. Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation?. *Free. Radic. Biol. Med.* 1998;24:594-606.
 34. Soung DY, Kim JS, Chung HY, Jung HA, Park JC and Choi JS. Flavonoids and chlorogenic acid from *Eriobotrya*

- japonica scavenge peroxynitrite. *Nat. Pro. Sci.* 1999;5:80-4.
35. Goss SP, Hogg N and Kalyanaraman B. The effect of alpha-tocopherol on the nitration of gamma-tocopherol by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999;363: 333-40.
36. Sandoval M, Zhang XJ, Liu X, Mannick EE, Clark DA and Miller MJ. Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW 264.7 cells: attenuation by L-ascorbic acid. *Free. Radic. Biol. Med.* 1997;22:489-95.