

원저

腎細尿管 上皮細胞에서 酸化로 誘發된 apoptosis에 대한 胡桃藥鍼液의 防禦效果

박인범 · 안창범 · 장경전 · 송춘호 · 윤현민 · 김철홍

동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Abstract

Protective effect of *Juglans sinensis* Dode extract (JS) on oxidant-induced apoptosis in renal epithelial cells

Park In-bum, Ahn Chang-beohm, Jang Kyung-jeon,
Song Choon-ho, Yoon Hyoun-min and Kim Cheol-hong

Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Objective : This study was undertaken to evaluate the role of lipid peroxidation in oxidant-induced apoptosis and effect of JS on the apoptosis in opossum kidney (OK) cells, an established renal proximal tubular cells.

Methods : Exposure of cells to 0.1mM tBHP for 2hr did not induce apoptosis, but subsequent incubation in normal culture medium for 18hr after tBHP treatment induced apoptotic cell death which is dependent of tBHP concentration.

- 접수 : 2004년 3월 11일 · 수정 : 2004년 5월 15일 · 채택 : 2004년 5월 15일
· 교신저자 : 안창범, 부산시 부산진구 양정 2동 산 45-1 동의대학교 부속한방병원 침구과
Tel. 051-850-8610 E-mail : omdir@demc.or.kr

Results : JS decreased tBHP-induced apoptotic cell death in a dose-dependent fashion and at concentrations higher than 0.01 mg/ml completely prevented the apoptosis. tBHP-induced apoptosis was prevented by the lipid soluble antioxidant *N,N'*-diphenyl -p-phenylenediamine (DPPD) and water-soluble antioxidant Trolox. tBHP increased lipid peroxidation, which was inhibited by JS and DPPD. tBHP-induced DNA damage was prevented by JS and DPPD.

Conclusion : These results indicate that tBHP induces apoptosis through a lipid peroxidation-dependent mechanism and JS exerts the protective effect against the apoptosis by preventing peroxidation of membrane lipids.

Key words : JS, apoptosis, tBHP

I. 緒 論

韓醫學에서 腎은 主藏精, 主納氣, 主津液, 司二陰, 藏志하며 腦髓를 滋生하는 작용, 骨骼을 充養하는 기능들이 있다¹⁾. 「素問·上古天眞論」에서 “腎者主水 受五藏六府之精而藏之”라 하였으니²⁾, 腎은 先天之本으로 成長發育, 老衰, 生殖, 水液代謝 등을 주관한다^{1,3)}.

活性 酸素種 (Reactive oxygen species ; ROS)은 局所 貧血을 誘發시키는 急性 腎不全과 化學的 腎毒性을 포함하는 많은 腎臟 疾患들의 病因과 관련이 있는 것으로 생각되었다⁴⁾. 여러 가지 生體內 그리고 生體外 研究에서 腎細尿管 細胞가 다양한 자극들에 반응하여 活性 酸素種을 생성할 수 있다는 것이 입증되어 왔다⁵⁾.

정상환경 아래에서 모든 好氣性 細胞들은 酵素, 非酵素에 의해서 superoxide anions, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals 같은 活

性 酸素種을 발생시킨다. 정상적으로 活性 酸素種의 생성은 glutathione, tocopherol, ascorbic acid 같은 抗酸化 化合物들과, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 같은 抗酸化 酵素들을 포함하는 방어 시스템에 의해서 대체로 균형되어진다⁵⁻⁸⁾.

그러나 營養缺乏으로 인한 抗酸化劑의 부족, 상승된 酸素 濃도에 노출됨으로써 活性 酸素種의 과도한 생산, 自由 遊離基를 생산하도록 新陳代謝 되는 毒素들의 출현, radical을 생산하는 시스템의 과도한 활동은 細胞 損傷을 惹起하곤 한다⁹⁾. 따라서 抗酸化 약물들을 사용하는 새로운 치료상의 접근들이 다른 치료들로는 非效果의인 질병들에서 특별히 요구되어졌다.

細胞死는 形態狀 判定基準에서 necrosis와 apoptosis로 분류된다¹⁰⁻¹¹⁾. Necrosis는 細胞가 환경적 결과에 의해서 非可逆적으로 損傷되는 受動的 사건으로 생각된다. 반면에 apoptosis는 細胞 자체가 생리학적 자극 또는 환경적 스트레스에 반응하여 細胞死를 일으키는 분자 조직

을 시작하는 能動的 과정이다^{10,12)}.

酸化가 necrosis와 apoptosis를 통해 細胞死를 誘發한다는 것이 알려져 있는데, 細胞死의 모델은 細胞 類型, 毒性, 毒 損傷의 강도와 지속에 의존하여 매우 곧잘 변해왔다¹³⁾. Apoptosis는 일반적으로 보다 낮은 毒의 濃度에 의해 誘發되며 반응에 늦는 것으로 알려져 있다^{11,14)}. 따라서 細胞 損傷을 誘發시키는 酸化에 대항하는 약물의 방어 효과는 두 과정 사이에서 차이가 있을 수 있다¹⁵⁾.

韓醫學에서는 抗酸化와 관련해 鹿茸藥鍼液의 抗酸化作用¹⁶⁾, 胡桃藥鍼液의 抗酸化作用¹⁷⁾ 등에 대한 연구가 보고된 바 있으며 이전의 연구에서 胡桃藥鍼液이 家兎에서 急性 腎不全을 誘發시키는 水銀 化合物에 대해 방어하는 것이 관찰되었다¹⁸⁾. 그러나 胡桃藥鍼液이 抗酸化作用을 발휘하는 것으로 알려져 있지만 胡桃藥鍼液이 腎細尿管 上皮細胞에서 酸化로 誘發된 apoptosis를 막는 것인지 아닌지는 분명치 않다.

이에 著者は 胡桃藥鍼液이 opossum kidney (OK) 細胞에서 tert-Butylhydroperoxide (tBHP)에 의해 誘發된 apoptosis를 막아내는지 여부를 결정하기 위해서, 그리고 酸化로 誘發된 apoptosis에서 脂質過酸化의 역할을 평가하기 위해서 胡桃藥鍼液의 防禦作用을 관찰하여 有意한 結果를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實驗方法

1. 胡桃藥鍼液 製造

胡桃는 東義大學校 附屬韓方病院에서 購入

하여 精選한 후, 胡桃 500g을 粉碎하여 증류수로 100°C, 4시간 동안 加熱하여 抽出하였고, 減壓下에 煎湯하여 남은 總量이 8.5g이 된 抽出物을 生理食鹽水에 溶解시켰다.

2. Opossum kidney(OK) 細胞의 培養

Opossum Kidney(OK) 細胞는 American Type Culture Collection (Rockville, MD社)에서 분주 받아 75cm² 배양 플라스크(Costar, Cambridge, MA)에서 10% FBS (fetal bovine serum) - DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12, Sigma Chemical Co.) 배양액에 37°C, 95% air/5% CO₂ 조건하에 培養하였다. 細胞가 confluence에 도달하면, 0.02% EDTA-0.05% trypsin 용액을 사용하여 2차 배양을 시작하였다. 細胞는 10% fetal bovine serum-DMEM/F12 배양기내의 조직 배양판에서 培養하였다. 모든 실험은 세포배양기 바닥 전체가 한 층의 細胞로 뒤덮여지고 난 후 3-4일 뒤 시작하였다.

3. 細胞 生存能力 分析

細胞 生存能力은 trypan blue 排除 分析에 의해 결정하였다. 細胞는 0.025% trypsin을 사용해 수납하고, 4% trypan blue 용액으로 배양하며, 光顯微鏡 아래서 血球計算機를 사용해 계산하였다. 염료를 제거하지 못한 細胞는 生存할 수 없는 것으로 간주하였으며, data는 生存 못한 細胞들의 백분율로 표현하였다.

4. 細胞死의 測定

Apoptosis는 형광 염료로 着色시켜 측정하였다. 細胞는 6-well plates에 있는 22mm 유리 coverslip에서 培養하였다. 細胞를 Hanks

Balanced Salt Solution (HBSS)에서 2시간 동안 tBHP에 노출시켰고 18시간 동안 정상 배양 배지에서 培養하였다. 細胞를 HBSS로 두 번 洗滌하였으며 4°C에서 60분 동안 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 고정된 細胞를 PBS로 두 번 洗滌하였으며 37°C에서 15분 동안 10µM Hoechst 33258로 着色하였다. 그 이후 다시 細胞를 PBS로 두 번 洗滌하였으며 confocal microscopy (LSM510, ZEISS, Germany)로 검사하였다. Apoptotic 細胞는 細胞核의 응축과 분열에 의해서 확인하였다. Apoptotic 細胞는 또한 situ Apoptosis Detection Kit, horse-radish peroxidase (POD)에서 사용한 기술인 terminal deoxy-nucleotidyl transferase(TdT) mediated fluorescein-dUTP nick-end labeling (TUNEL)으로 평가하였다 (Boehringer Mannheim, Germany). TUNEL 着色後, 細胞는 다시 hematoxylin으로 着色하였고 光顯微鏡(BX50, Olympus, Japan) 아래서 분석하였다. Apoptotic 細胞의 수는 5개의 무작위로 선택된 field에서 평가하였다.

5. 脂質過酸化의 測定

脂質過酸化는 Uchiyama와 Mihara의 방법¹⁹⁾으로 OK 細胞에서 malondialdehyde (MDA)의 함유량을 測定함으로써 평가하였다. 細胞는 tBHP로 처리하였고 차가운 1.15% KCl (5% wt/vol)에서 均質化 되었다. 한개의 0.5ml 균질 표본은 1% phosphoric acid 3ml, 0.6% thiobarbituric acid 1ml와 혼합하였다. 혼합물을 끓은 물에서 45분간 加熱하였다. n-butanol 4ml를 첨가한 후 내용물들을 강력하게 섞어서 20분 동안 2000g에서 遠心分離시켰다. 上層液의 吸光度는 diode array spectrophotometer (Hewlett Packard, 8452A)로 535nm와 520nm

에서 측정하였고 준비해둔 MDA tetraethylacetal 標準과 비교하였다.

6. DNA single-strand breaks의 測定

DNA strand breaks는 Olive에 의해 개발된 DNA 침전 분석 평가²⁰⁾에 의해 測定하였다. 細胞는 35mm diameter dish에서 배양하였으며 24시간 동안 [3H]methylthymidine (0.25 Ci/ml)의 存在下에서 분류하였다. 細胞는 HBSS로 洗滌하였으며 tBHP에 노출시켰다. 처치 후, 細胞는 HBSS로 洗滌하였고 10mM EDTA, 50mM NaOH, 2% SDS와 10mM Tris/HCl (pH 12.4)을 포함한 1ml lysis buffer를 가진 10ml 일회용 tube에 넣어서 0.12M KCl를 추가시켰다. 이렇게 만들어진 混合液은 10분 동안 65°C에서 培養하다가 5분 동안 冷却시켜 급격한 冷却期로 培養하였다.

DNA-protein K-SDS 침전은 이러한 상태에서 형성되었으며, 이것으로부터 low-molecular-mass broken DNA는 풀어졌다. 이 DNA는 10°C 200g에서 10분 遠心沈澱시켜 上層液은 50mM HCl 1ml가 들어있는 vial로 옮겼다. 침전된 pellet(완전 이중 나선 DNA)는 65°C 물 1ml에서 용해시켰다. Tube는 1ml 물로 씻었으며, 8ml scintillation 용액을 각각의 vial에 추가시켰다. 남아있는 이중 나선 DNA의 總量은 각 sample에서 pellet의 dpm value÷(pellet+표면에 뜨는 물질의 전체 dpm value)×100함으로써 계산하였다.

7. 化學 藥品

[3H]methylthymidine은 Amersham international (Amersham, UK)로부터 구했다. tBHP, Trolox, Hoechst 33258, malondialdehyde tetraethylacetal

그리고 N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD)는 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO)로부터 구매하였다. 모든 다른 화학약품들은 이용 가능한 최상급 공업용 제품을 사용하였다.

8. 統計處理

成績은 平均±標準誤差로 나타내었으며 두 그룹간의 비교는 unpaired t-test를 利用해서 檢定하였다. 다중 그룹 비교는 Dunnett's test를 따른 平方편차 일방 분석을 利用해서 檢定하였다. P값이 0.05 未滿일 때 有意性이 있는 것으로 判定하였다.

III. 實驗成績

1. tBHP로 처리된 細胞에서 apoptotic 細胞死의 誘發

tBHP가 OK 細胞에서 apoptosis를 誘發시키는지를 알아보기 위해서 螢光性 染料 (Hoechst33258) 着色이 HBSS에서 2시간 동안 0.1mM tBHP로 처리된 細胞에서 이뤄지도록 했다. 후속 培養이 없을 때는 tBHP에 노출된 細胞核은 대조구 細胞와 유사했다. 그러나 tBHP 처리 후 18시간 동안의 2차 培養에서 apoptosis의 典型的, 特徵的 DNA 모양이 나타났다.

Apoptotic 細胞死에서의 tBHP의 영향을 알아보기 위해서 細胞를 tBHP의 다양한 濃度에 노출시켰다. tBHP는 0.05-0.5의 濃度에서 投與量에 비례해서 細胞 生存 能力의 損傷을 惹起시켰다. tBHP 濃度가 높아질수록 細胞 生存 能力이 비례하여 떨어짐을 볼 수 있다. 그러나,

0.01mg/ml 胡桃藥鉞液을 첨가한 경우 tBHP에 노출된 細胞는 細胞 生存 能力에서 현저한 증가를 나타내었다(Fig. 1).

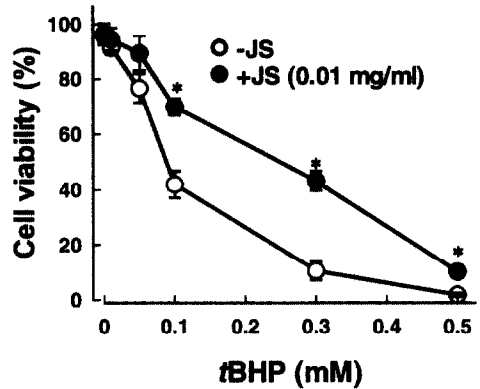


Fig. 1. Dose-dependency of tBHP-induced apoptotic cell death in opossum kidney cells. Cells were exposed to various concentrations of tBHP of 2 hr in the presence or absence of 0.01mg/ml *Juglans sinensis* Dode extract (JS) and incubated for 18 hr in normal culture medium. The cell viability was measured by a trypan blue exclusion assay. Data are mean S.E. of five experiments. *p<0.05 compared with tBHP alone

2. tBHP에 의해 誘導된 apoptosis에 대한 胡桃藥鉞液의 效果

tBHP에 의해 誘導된 apoptosis에 대한 胡桃藥鉞液의 效果는 TUNEL 분석평가와 螢光性 染料 着色을 사용해 평가하였다. 細胞가 tBHP에 노출된 후 18시간 동안 2차 培養되었을 때 apoptotic 細胞는 확연히 나타났다. 그러나 0.01mg/ml 胡桃藥鉞液을 첨가한 경우 tBHP에 노출된 細胞에서 apoptosis가 상당히 억제되었다. 胡桃藥鉞液의 防禦效果의 有效性을 결정하기 위해서, 細胞를 胡桃藥鉞液의 다양한 濃度 속에서 tBHP에 노출시켰다. 胡桃藥鉞液은 濃度에 비례해서 細胞死를 방어하는 效果가 나타

났는데 0.005mg/ml에서 상당히 의미있는 방어로 細胞死를 막아냈으며, 0.01mg/ml보다 많은 胡桃藥鍼液 濃度에서 生存能力은 대조구와 차이가 없었다(Fig. 2).

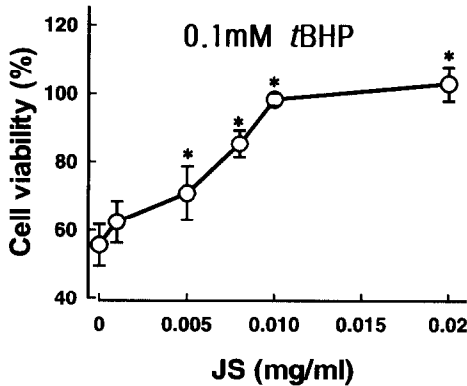


Fig. 2. Dose-dependency of *Juglans sinensis* Dode extract (JS) protection against *t*BHP-induced apoptosis in opossum kidney cells. Experiments were performed as in Fig. 3 in the presence of various concentrations of JS. The cell viability was measured by a trypan blue exclusion assay. Data are mean S.E. of four experiments. * $p < 0.05$ compared with the absence of JS

3. *t*BHP에 의해 誘導된 apoptosis에서 脂質過酸化 作用의 役割

脂質過酸化 作用이 *t*BHP에 의해 誘導된 apoptosis와 연관된 것인지, 그리고 胡桃藥鍼液의 방어효과가 抗酸化 作用에 의한 것인지를 확실하게 하기 위해, *t*BHP에 의해 誘導된 apoptotic 細胞死를 대상으로, 잘 알려진 抗酸化劑의 효력을 실험하였다. *t*BHP에 의해 誘導된 細胞死는 脂溶性 抗酸化劑 DPPD와 水溶性 抗酸化劑 Trolox에 의해 완벽하게 防止되며 (Fig. 3), 이것은 *t*BHP에 의해 誘導된 apoptosis가 脂質過酸化 作用과 관련된다는 것

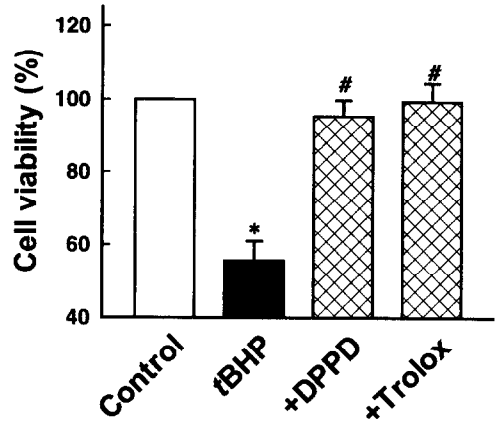


Fig. 3. Effects of antioxidants on *t*BHP-induced apoptotic cell death in opossum kidney cells. Experiments were performed as in Fig. 3 in the presence of 0.01mM DPPD and 1mM Trolox. The cell viability was measured by a trypan blue exclusion assay. Data are mean S.E. of four experiments. * $p < 0.05$ compared with the control; # $p < 0.05$ compared with *t*BHP alone

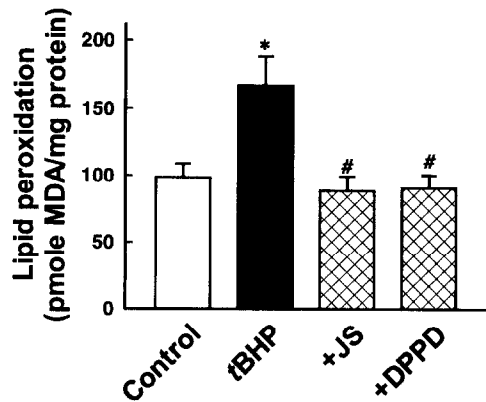


Fig. 4. Effects of *Juglans sinensis* Dode extract (JS) and antioxidant on *t*BHP-induced lipid peroxidation in opossum kidney cells. Experiments were performed as in Fig. 3 in the presence of 0.01mg/ml JS and 0.01mM DPPD. Data are mean S.E. of five experiments. * $p < 0.05$ compared with the control; # $p < 0.05$ compared with *t*BHP alone

을 가리킨다. tBHP는 脂質過酸化 작용의 뚜렷한 증가를惹起했고, 그 작용은 胡桃藥鉞液과 DPPD에 의해 완벽하게 防止되었다(Fig. 4). 이러한 結果는 tBHP가 脂質過酸化를 통해 apoptosis를 誘發시키며 胡桃藥鉞液의 防禦效果는 그것의 抗酸化 작용 때문일 수도 있다는 것을 암시한다.

4. tBHP에 의해 誘導된 DNA 損傷에 대한 胡桃藥鉞液의 效果

실험의 마지막 단계에서 胡桃藥鉞液이 tBHP에 의해 誘導된 DNA 損傷에 대해 有效한 效果를 발휘하는지를 실험하였다. DNA 損傷은 0.01mg/ml 胡桃藥鉞液이 있을 때와 없을 때로 나뉘어 tBHP 처리된 細胞에서 測定하였다. tBHP에 대한 細胞 노출은 double stranded DNA의 감소로 증명되듯이, DNA 損傷에 있어 눈에 띄는 증가를 초래한다(61.28±3.94 vs. 89.43±

4.28% in the control). 이러한 변화는 0.01mg/ml 胡桃藥鉞液을 첨가한 경우 방지되었다(80.30±3.18%). 유사하게, DPPD도 tBHP에 의해 誘導된 DNA 損傷의 의미있는 감소를 가져왔다(Fig. 5).

IV. 考 察

韓醫學에서 腎은 潛伏과 平衡에 관한 기능이 있으니 즉 主藏精, 主納氣, 主津液, 司二陰, 藏志하며 腦髓를 滋生하는 작용, 骨骼을 充養하는 기능들이 있다. 또한 腎은 先天之本으로 成長發育, 老衰, 生殖, 水液代謝 등을 주관한다.^{1,3)} 腎에 대해 「素問·上古天眞論」에서 “腎者主水 受五藏六府之精而藏之”²⁾이라 하였고, 「素問·逆調論」에서 “腎者水臟 主津液”²⁾이라 하였으니, 韓醫學에서 九竅中 耳, 前陰, 後陰은 腎과 관련이 있으며 그의 華는 髮에 나타난다.

그 主要機能은 精을 간직하고 水와 骨을 主管하며, 髓를 生하고 또한 納氣하며 人體의 生殖, 生長發育, 老衰와 밀접한 관계가 있는 것으로 되어 있다. 이는 韓醫學的 腎의 機能이 西洋醫學의 泌尿, 生殖, 內分泌 및 中樞神經系統 등, 이들 각 부분의 機能에 이르기까지를 包括하는 것으로 보여진다. 現代 生理學에서 腎臟은 生體의 恒常性을 유지하고 이를 조절하는 器官으로 水分均衡의 조절과 電解質 均衡의 조절, 그리고 代謝産物과 異物質을 배설하며, 動脈血壓을 조절하고 또한 赤血球의 生産을 조절하는 작용을 한다²¹⁾.

藥鉞療法은 요즘 사용되는 新鉞療法 중 하나로서 다양한 실험과 임상응용이 이루어지고

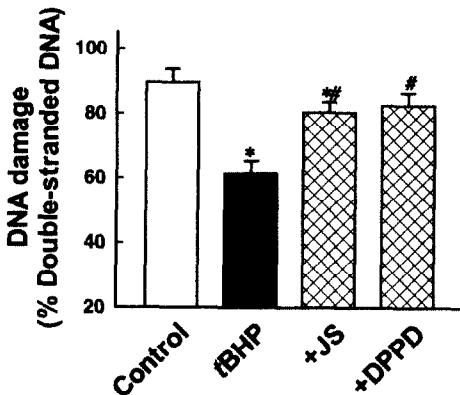


Fig. 5. Effects of *Juglans sinensis* Dode extract (JS) and antioxidant on tBHP-induced DNA damage in opossum kidney cells. Experiments were performed as in Fig. 6. Data are mean S.E. of five experiments. *p<0.05 compared with the control; #p<0.05 compared with tBHP alone

있으며, 다양한 보고가 이뤄지고 있다. 水鍼 또는 穴位注射療法이라고도 하는 藥鍼療法은 鍼刺戟과 藥物의 注入을 結合시킨 療法으로 이는 經絡學說의 原理에 依據하여 藥物을 有關穴位, 壓通點 혹은 體表에 나타나는 陽性反應點에 注入함으로써 鍼刺戟으로서의 作用과 藥物의 效能이 上昇效果를 나타내어 疾病을 治療하는 療法이다²²⁾.

본 실험에 사용된 胡桃 (Juglandis Semen)는 호도나무 果實의 種仁으로 性味が 甘, 溫, 無毒하며 歸經은 肺·腎이고 補腎強腰膝·斂肺定喘·潤腸 등의 효과가 있어서 腎虛腰痛脚弱·肺腎不足의 氣喘·腸燥便秘 등의 病症을 治療하는데 사용되어 왔다²³⁾. 주성분은 lino acid, oleic acid 등을 주로 한 脂肪유가 40-50%, 단백질, 당분, 회분, vitamin A·B·C·E 등이라고 알려져 있다²⁴⁾.

胡桃藥鍼은 여러 실험에 사용되어 다양한 效能이 보고되었으나, 腎臟에서 oxidant에 의한 能動的 物質移動系의 障礙에 대해 효과가 있다는 실험보고²⁵⁾, 毒性物質에 의해 誘發된 家兎의 急性腎不全에 효과가 있다는 실험보고²⁶⁾, Glycerol에 의한 急性腎不全 誘發時 尿濃縮能의 障礙에 효과가 있다는 실험보고²⁷⁾, 人間의 신경고종 細胞에 誘發된 低酸素症에 대해 防禦效果가 있다는 실험보고²⁸⁾, 水銀(Hg)에 의한 肝組織 損傷의 회복에 효과가 있다는 실험보고²⁹⁾ 등 다양한 실험연구가 보고된 바 있다.

비록 胡桃藥鍼液은 腎臟 細胞에서 抗酸化劑 역할을 한다고 알려져 왔지만¹⁸⁾, 胡桃藥鍼液이 酸化로 誘發된 apoptosis를 防止하는지는 확실하지 않다. Apoptosis는 細胞를 제거하기 위한 특별한 프로그램이며 에너지의존성 과정이다. 이러한 유형의 세포사망을 프로그램된 細胞死 (programmed cell death)라고 하며 심한 損傷

으로 인한 細胞 壞死 (necrosis)와는 구별된다³⁰⁾.

Apoptosis와 necrosis는 여러 면에서 구분되지만 서로 겹치는 부분이 있다. 구분되는 점은 apoptosis는 자극이 生理的·病的이며, 單一細胞에 침범하고 apoptosis體를 형성한다. DNA 단절이 規則的이며, Endonuclease 등의 효소 활성화 기전을 가지며, 조직반응은 炎症反應이 없다. Necrosis는 자극이 病的이며, 細胞 集團을 침범하고 細胞腫脹 또는 凝固壞死가 일어난다. DNA 단절은 不規則的·未滿性이며, ATP 감소·세포막 손상 등의 기전을 가지며, 조직반응은 炎症反應을 일으킨다. 어떤 細胞는 자극의 강도와 지속 시간, 변화의 속도, ATP 소실 정도 등에 따라 apoptosis를 일으키기도 하고 necrosis를 일으키기도 한다.

Apoptosis는 여러 生理的 또는 病的 상태에서 일어나니, 예를 들어 발생과 변태과정 중 예정된 프로그램에 의한 細胞死, 호르몬에 의한 퇴화, 증식성 세포군에서 세포의 제거, 腫瘍에서 발생하는 細胞死, 급성 염증반응에서 중성구의 細胞死, 면역세포의 細胞死, 세포 독성 T 세포에 의한 細胞死, 분비관 폐쇄 후 실질장기의 病的 萎縮 등에서 일어난다. 특히 壞死를 일으킬 수 있는 자극이라도 강도를 낮추면 apoptosis를 일으키며, 가벼운 熱損傷, 放射線, 細胞毒性 抗癌劑, 低酸素血症 등도 apoptosis를 일으킨다³¹⁾.

Apoptosis에 있어서 DNA의 변화를 살펴보면 apoptosis가 일어나면 핵속 nucleosome의 linker DNA 부분이 효소적으로 절단되며 nucleosome 단위의 단편화가 일어난다. 단 미토콘드리아 DNA의 단편화는 일어나지 않는다³²⁾.

이러한 apoptosis는 局所 貧血과 腎臟 切開術에 의해 誘發된 急性 腎不全에서 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다³³⁾. 그러므로 酸

화로誘發된 apoptosis에서 脂質過酸化 작용의 역할과 apoptosis에 대한 胡桃藥鍼液의 영향은 腎細尿管 上皮細胞에서 검토된 것이다.

본 실험에서 酸化를 誘發하기 위해 사용된 tBHP는 tert-Butylhydroperoxide (C₄H₁₀O₂)로서 重合反應(polymerization reaction)을 일으키는 觸媒로 작용하며, radical의 置換反應(substitution reaction)을 일으키는 peroxy group의 酸化劑로 널리 사용되고 있는 藥物이다³⁴⁾.

이번 연구에서 2시간 동안의 細胞에 대한 tBHP 노출은 apoptosis를 誘發하지는 않지만, 그 보다 더 오랜 tBHP 처리 培養은 apoptosis를 誘發한다. tBHP는 다양한 濃도에 비례해서 apoptotic 細胞死를 惹起했고(Fig. 1), 胡桃藥鍼液 또한 다양한 濃도에 비례해서 tBHP에 의해 誘發된 apoptosis에 대해 의미있는 방어를 하였다(Fig. 2).

脂質過酸化가 酸化로 誘發된 細胞損傷의 증거로 여겨져 왔지만⁶⁾, 酸化로 誘發된 apoptosis에서의 脂質過酸化의 역할은 아직 논쟁의 여지가 있다. 抗酸化劑는 oligodendroglia³⁵⁾와 인간 남성 germ cell³⁶⁾에서 酸化劑에 의해 誘發된 apoptosis를 防止한다. 그러나 DPPD 같은 抗酸化劑는 LLC-PK1 細胞³⁷⁾에서 酸化를 발생시키는 약품에 의해 誘發된 apoptosis에는 아무런 효과가 없다. 抗酸化劑는 쥐의 lymphocytic hybridoma 細胞³⁸⁾에서 H₂O₂에 의해 誘發된 apoptosis를 증가시킨다고 보고되어 왔다. 이처럼 抗酸化劑는 細胞의 종류 등에 따라 apoptosis에 대해 防禦하기도 하고, 효과가 없기도 하며, 오히려 apoptosis를 증가시키기도 한다. 이번 연구에서는 脂溶性(DPPD)과 水溶性(Trolox) 抗酸化劑 모두 tBHP에 의해 誘發된 apoptotic 細胞死를 防止하는 데 효과적이었

다(Fig. 3). tBHP 또한 脂質過酸化를 증가시켰고, 그 효과는 抗酸化劑에 의해 억제되었다(Fig. 3, 4). 마찬가지로 tBHP에 의해 誘發된 DNA 損傷은 胡桃藥鍼液과 DPPD에 의해 防止되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 tBHP에 의해 誘發된 細胞死는 脂質過酸化에 의해 매개된다는 것을 말한다. 즉 tBHP가 脂質過酸化를 통해 apoptosis를 誘發시키고 胡桃藥鍼液은 脂質膜의 過酸化를 지지함으로써 apoptosis에 대항하는 防禦效果를 발휘한다는 것을 가리킨다.

胡桃藥鍼液은 腎臟에서 抗酸化 작용이 있고¹⁸⁾, 이번 연구에서 tBHP에 의해 誘發된 脂質過酸化 작용을 억제했으므로(Fig. 4), 胡桃藥鍼液의 apoptosis에 대한 防禦效果는 胡桃藥鍼液의 抗酸化 특성 때문인 것으로 생각할 수 있다. 胡桃藥鍼液이 抗酸化 작용을 가지게 하는 活動因子는 아직 밝혀지지 않은 상태이다. 그러나 胡桃藥鍼液은 미래에는 酸化를 誘發하는 神經毒性物質을 방지하는 藥物로 개발될 수도 있을 것으로 생각되며 이를 위해서는 抗酸化 작용에 관련된 活動因子 연구 등 더 자세한 연구가 필요할 것으로 보인다.

V. 結 論

본 연구는 腎細尿管 上皮細胞에서 酸化로 誘發된 apoptosis에서 脂質過酸化의 役割과 apoptosis에 대한 胡桃藥鍼液의 效果를 평가하기 위해 시작되었으며 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 胡桃藥鍼液은 濃도에 비례해서 tert-

Butylhydroperoxide (tBHP)에 의해 誘發된 apoptosis를 減少시켰으며 0.01mg/ml 이상의 濃度에서는 apoptosis를 완벽하게 防止하였다.

2. tBHP로 誘發된 apoptosis는 脂溶性 抗酸化劑 *N,N'*-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD)와 水溶性 抗酸化劑 Trolox에 의해 防止되었다.
3. tBHP는 脂質過酸化를 증가시켰으며, 이것은 胡桃藥鉞液과 DPPD에 의해 防止되었다.
4. tBHP로 誘發된 DNA 損傷은 胡桃藥鉞液과 DPPD에 의해 防止되었다. 이러한 결과로 보아 tBHP가 脂質過酸化를 통해 apoptosis를 誘發시키고 胡桃藥鉞液은 脂質膜의 過酸化를 抑制함으로써 apoptosis에 對항하는 防禦效果를 발휘한다는 것을 알 수 있었다.

VI. 參考文獻

1. 두호경. 東醫腎系學(上). 서울 : 東洋醫學研究院. 1993 : 5-12, 51-52, 230-231.
2. 곽갈춘. 黃帝內經素問校註語譯. 서울 : 一中社. 1991 : 4.
3. 김완희, 최달영. 臟腑辨證論治. 서울 : 成輔社. 1985 : 85-87, 284-286.
4. Paller, M.S. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J.Invest. Med.* 1994 ; 42 : 632-639.
5. Baud, L., and Ardaillou, R. Reactive oxygen species : production and role in the kidney. *Am.J.Physiol.* 1986 ; 251 : F765-F776.
6. Farber, J.L., Kyle, M.E., and Coleman, J.B. Biology of disease : Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* 1990 ; 62 : 670-679.
7. Ross, D., and Moldeus, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In *Membrane Lipid Oxidation* (Vigo-Pelfrey, C. Ed.). CRC Press. Boca Raton. 1993 : 151-170.
8. Turrens, J.F., Crapo, J.D., and Freeman, B.A. Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J.Clin.Invest.* 1984 ; 73 : 87-95.
9. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., and Cross, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease : Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 1992 ; 119 : 598-620.
10. Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., and Sellins, K.S. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol.* 1992 ; 10 : 267-293.
11. Lieberthal, W., and Levine, J.S. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol.* 1996 ; 271 : F477-488.
12. Gerschenson, L.E., and Rotello, R.J. Apoptosis : a different type of cell death. *Faseb J.* 1992 ; 6 : 2450-2455.
13. Raffray, M., and Cohen, G.M. Apoptosis and necrosis in toxicology : a continuum

- or distinct modes of cell death? Pharmacol Ther. 1997 ; 75 : 153-177.
14. Eastman, A. Apoptosis : a product of programmed and unprogrammed cell death. Toxicol Appl Pharmacol. 1993 ; 121 : 160-164.
 15. Filipovic, D.M, Meng, X., and Reeves, W.B. Inhibition of PARP prevents oxidant-induced necrosis but not apoptosis in LLC-PK1 cells. Am.J.Physiol. 1999 ; 277 : F428-F436.
 16. 윤철호, 정지천, 신억변. 흰쥐의 肝組織에서 鹿茸藥鍼製材의 抗酸化作用에 관한 연구. 大韓韓醫學會誌. 1996 ; 17(2) : 191-202.
 17. 김영해, 김갑성. 胡桃藥鍼液의 抗酸化 效果에 대한 연구. 大韓韓醫學會誌. 1996 ; 17(1) : 9-20.
 18. Ahn, C.B., Song, C.H, Kim, W.H, and Kim, Y.K. Effects of Juglans sinensis Dode extract and antioxidant on mercury chloride-induced acute renal failure in rabbits. J. Ethnopharmacol. 2002 ; 82 : 45-49.
 19. Uchiyama, M, and Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem. 1978 ; 86 : 271-278.
 20. Olive, P.L. DNA precipitation assay : a rapid and simple method for detection DNA damage in mammalian cells. Environ.Mol.Mutagen. 1988 ; 11 : 487-495.
 21. 대한동의생리학회. 東醫生理學. 서울 : 경희대학교 출판국. 1993 : 342-352.
 22. 정현철, 송춘호. 胡桃藥鍼이 Glycerol로 誘發된 急性腎不全 白鼠의 利尿에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 2000 ; 17(1) : 107-117.
 23. 신민교. 臨床本草學. 서울 : 永林社. 1994 : 194-195.
 24. 이상인, 안덕균, 신민교. 한약임상응용. 서울 : 成輔社. 1986 : 194-195.
 25. 나정선, 장경전, 송춘호, 안창범. 腎臟에서 oxidant에 의한 能動的 物質移動 系의 障礙에 對한 胡桃藥鍼液의 效果. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(1) : 297-304.
 26. 서정호, 장경전, 송춘호, 안창범. 胡桃水鍼이 毒性物質에 의해 誘發된 家兔의 急性腎不全에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(1) : 473-484.
 27. 이병훈, 서정철, 윤현민, 송춘호, 안창범, 장경전. 胡桃藥鍼이 Glycerol에 의한 急性腎不全 誘發시 尿濃縮能의 障礙에 대한 影響. 大韓鍼灸學會誌. 2001 ; 18(3) : 114-122.
 28. 윤현민, 허재영, 안창범. 胡桃藥鍼이 人間の 신경교종 細胞에 誘發된 低酸素症에 대한 防禦效果. 大韓鍼灸學會誌. 2003 ; 20(2) : 173-183.
 29. 이경태, 송춘호. 胡桃藥鍼液이 水銀(Hg)에 의한 肝組織 損傷에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 1999 ; 16(3) : 221-230.
 30. 송계용. 핵심병리학. 서울 : 고려의학. 1998 : 29-32.
 31. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 2000 : 1-20.
 32. 오즈카 기비치, 아비꼬 요시미쯔. 생명과학을 위한 비주열 생화학·분자 생물학. 서울 : 해돈이. 2000 : 96-97.
 33. Ueda, N., Kaushal, G.P., and Shah, S.V. Apoptotic mechanisms in acute renal failure. Am J Med. 2000 ; 108 : 403-415.

34. Susan Budavari. Merck Index twelfth edition. Merck & Co. Inc., New Jersey. 1996 : 259.
35. Richter-Landsberg, C., and Vollgraf, U. Mode of cell injury and death after hydrogen peroxide exposure in cultured oligodendroglia cells. *Exp Cell Res.* 1998 ; 244 : 218-229.
36. Erkkila, K., Hirvonen, V., Wuokko, E., Parvinen, M., and Dunkel, L. N-acetyl-L-cysteine inhibits apoptosis in human male germ cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 ; 83 : 2523-2531.
37. Van de Water, B., Kruidering, M., and Nagelkerke, J.F. F-actin disorganization in apoptotic cell death of cultured rat renal proximal tubular cells. *Am J Physiol.* 1996 ; 270 : F593-a603.
38. Lepri, E., Gambelunghe, C., Fioravanti, A., Pedini, M., Micheletti, A., and Rufini, S. N-acetylcysteine increases apoptosis induced by H₂O₂ and mo-antiFas triggering in a 3DO hybridoma cell line. *Cell Biochem Funct.* 2000 ; 18 : 201-208.