

원저

胡桃藥鍼液이 *t*-Butylhydroperoxide에 의한 肝損傷에 미치는 影響

박상원 · 김철홍 · 윤현민 · 장경전 · 안창범 · 송춘호

동의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

Abstract

The Effects of Juglandis Semen Herbal Acupuncture on *t*-Butylhydroperoxide-induced Liver Damage

Park Sang-won, Kim Cheol-hong, Youn Hyoun-min, Jang Kyung-jeon, Ahn Chang-beohm and Song Choon-ho

Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Dongeui University

Objectives : This study was undertaken to examine whether Juglandis Semen herbal acupuncture (JGA) exerts protective effect against oxidant-induced cell injury in rabbit liver.

Methods : The cell damage was estimated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release, and lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde (MDA) in rabbit liver slices.

Results : *t*-Butylhydroperoxide (tBHP) caused an increase in LDH release and lipid peroxidation in a dose-dependent manner over concentrations of 0.5-2 mM, which were prevented by addition of 0.05% JGA. The protective effect of JGA was dose-dependent in concentration range of 0.005 to 0.1%. The concentrations of 0.005 and 0.1% JGA completely prevented the LDH release and lipid peroxidation by 1 mM tBHP. When liver tissues were exposed to 1 mM tBHP, alanine aminotransferase (ALT) activity in the medium was significantly increased, which was prevented by 0.05% JGA. tBHP (2 mM) decreased GSH content and the effect was prevented by 0.05% JGA.

Conclusion : These results suggest that JGA exerts protective effect against oxidant-induced cell injury by antioxidant action resulting from enhancement of GSH content in the liver.

· 접수 : 2005년 9월 10일 · 수정 : 2005년 9월 10일 · 채택 : 2005년 9월 10일
· 교신저자 : 송춘호, 부산광역시 부산진구 양정2동 산 45-1 동의대학교 한의과대학 경혈학교실
Tel. 051-850-8643 Fax. 051-853-4036 E-mail : chsong@deu.ac.kr

Key words : Juglandis Semen, Herbal acupuncture, tBHP, Liver Damage

I. 緒 論

內經에서는 肝에 對해 “將軍之官謀慮出焉”¹⁾, “肝藏血 血舍魂” “主爲將 使之候外”²⁾ 라하여 肝이 外部로부터의 病邪에 對抗하고 人體內에서 血液을 貯藏하고 血量을 調節하는 臟器로 나타내고 있다.

西洋醫學에서는 肝은 藏血을 통한 血液調節을 擔當하며 糖質, 蛋白質, 脂質 및 콜레스테롤, 비타민, 鐵代謝에 關與하며 造血과 破血作用, 血液凝固作用, 膽汁酸代謝 解毒作用, 核酸代謝 및 肝組織再生, 호르몬代謝 등, 生化學的 物質代謝를 擔當하는 重要な 臟器이다³⁾.

胡桃(Juglandis Semen)는 補腎 藥物로서 性味甘平, 溫無毒하고 腎과 肺에 歸經하여 通潤血脈, 治石淋, 補氣養血, 潤燥化痰, 益命門, 利三焦, 溫肺潤腸, 補腎強腰膝, 斂肺定喘, 潤腸通便, 助腎火, 潤燥養血의 效能을 가진 藥物이다⁴⁻⁶⁾.

Superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 과 같은 反應性 酸素基(reactive oxygen species, ROS)들은 파킨슨病, 알츠하이머病과 같은 神經性疾患⁷⁻¹²⁾, 老化 및 癌發生의 原因이 될 뿐만 아니라 急性 및 慢性 腎臟疾患을 일으키는 原因으로 알려져 있고¹³⁻¹⁵⁾, 또한 肝에서 反應性酸素基들은 毒性藥物에 依한 組織損傷에 重要な 役割을 하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁹⁾.

生體細胞膜들은 不飽和脂肪酸을 많이 含有하고 있기 때문에 反應性酸素基들에 의해 쉽게 脂質의 過酸化가 發生되게 되고²⁰⁾ 細胞膜 脂質의 過酸化는 反應性酸素基에 依한 細胞機能損傷의 重要な 原因으로 認定되고 있다²¹⁾. 따라서 反應性酸素基에 依한 細胞損傷을 防止할 수 있는 天然韓藥材의 開發은 臨床의 으로도 대단히 重要하다. 金 등²²⁾과 姜²³⁾은 胡桃藥液이 抗酸化酵素 活性에 대하여 有意한 效能이 있으며 神經組織에서 oxidant에 依한 物質移動 障礙를 防止하는 作用이 있음을 報告한 바 있다.

이에 胡桃藥液이 肝組織에서 oxidant에 의한 細胞損傷을 防止할 수 있는지를 살펴보기 위해 肝組織에서 t-butylhydroperoxide (tBHP)를 處理하여 oxidant에 依한 細胞損傷防止效能과 tBHP의 濃도에 따른

lactate dehydrogenase (LDH) 流出, alanine aminotransferase (ALT)流出, 細胞損傷에 對한 脂質의 過酸化度, Glutathione (GSH)含量的 變化를 測定하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 動物

實驗에 사용한 動物은 體重 1.5-2.0kg되는 New Zealand産 白色成兔를 動物飼育場에서 구입하여 雌雄 區別없이 使用하였다.

2) 藥材

實驗에 使用한 胡桃는 충북 영동산 胡桃를 동의 대학교 부속한방병원에서 구입하여 精選 使用하였다.

2. 方法

1) 藥液의 製造

胡桃肉 600g을 methanol 2,000ml에 가하여 水浴上에서 8시간씩 3회 熱 環流하여 抽出하고 前 methanol 抽出液을 減壓 濃縮하여 15g 정도의 抽出液을 얻어 實驗에 使用하였다.

2) 肝組織 切片의 製作

토끼를 희생시킨 후 肝臟을 들어내어 100mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 40mM Tris-HCl (pH 7.5)로 된 冷한 溶액을 肝動脈內에 주입하여 혈액을 제거한 다음 Stadie-Riggs microtome으로 약 0.3-0.5 mm 두께의 肝組織 切片을 만들어 使用하였다.

3) Oxidant의 處理

Oxidant에 의한 細胞損傷을 誘發하기 위하여 이러한 實驗에 많이 이용하고 있는 藥物인 tBHP를 使

用하였다. 肝組織 切片 약 50mg을 4ml의 incubation 溶液이 들어 있는 비이커속에 넣고 dubnoff metabolic shaker內에서 100% 酸素를 계속 供給하면서 37 °C 에서 incubation하였다. 기본 incubation溶液의 造成 은 130mM NaCl, 10mM KCl, 1.5mM CaCl₂, 5mM glucose, 10mM Tris-HCl (pH 7.5)로 되어 있으며, tBHP를 처리할 때는 tBHP가 들어 있는 溶液內에서 60分동안 incubation하였다. Incubation 後에 組織을 들어내어 細胞의 損傷정도를 調査하기 위하여 LDH 나 ALT의 流出을 測定하였으며, 또한 細胞損傷이 脂質의 過酸化와 聯關이 있는지를 調査하였다.

4) LDH 및 ALT의 測定

tBHP로 處理된 肝組織 切片을 들어내어 증류수 로 마쇄시켜 만든 組織液과 incubation溶液을 각각 50μl 취하여 LDH assay kit (Sigma Chemical)를 이용하여 LDH活性을 測定하였으며, 또한 incubation溶液內의 ALT活性은 ALT assay kit (Sigma Chemical)를 사용하여 測定하였다.

5) Malondialdehyde 含量 測定

細胞膜 脂質의 過酸化 정도는 그 産物인 malondialdehyde (MDA) 量을 Uchiyama와 Mihara 方法²⁴⁾으로 測定하여 評價하였다. 즉, tBHP로 處理된 肝組織切片을 차가운 1.15% KCl 溶液 (5% wt/vol)속에서 파쇄한 후, 이 組織파쇄 均질액 0.5 ml에 1% 인산 溶液 3ml와 0.6% thiobarbituric acid 溶液 1ml를 添加하여 끓는 물에서 45分間 가열하였다. n-butanol 4ml를 添加하여 완전히 섞은 다음 2,000g에서 20分間 원심분리한 후, 상층액의 흡광도를 536과 520nm에서 測定하였다. 단백질 농도는 Bradford의 方法²⁵⁾으로 測定하였다.

6) GSH 含量 測定

GSH 含量은 Anderson의 方法²⁶⁾으로 測定하였다. 0.248mg/ml NADPH (143mM sodium phosphate, 6.3mM Na₄-EDTA, pH 7.5를 含有) 溶液 700μl, 6mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 溶液 100μl와 증류수 198μl를 cuvette에 넣어 30°C에서 15분간 데운후 시료 2μl를 넣고 섞은 다음 266U/ml GSSG reductase 10μl를 첨가하여 412nm에서 흡광도의 변화를 관찰하였고 단위는 μg/mg protein으로 나타내었다.

7) 統計 處理

成績은 平均值±標準誤差로 나타내었으며, 平均值間의 有意性은 Student's paired t-test²⁷⁾를 利用하여 檢定하였고 p값이 0.05 미만일 때 有意한 것으로 判定하였다.

III. 實驗成績

1. 肝組織에서 tBHP의 細胞損傷 效果와 胡桃藥鉞液의 影響

肝組織에서 0.05% 胡桃藥鉞液이 들어 있는 경우와 들어 있지 않은 경우에 여러 濃度의 tBHP를 60分동안 處理하였을 때 組織損傷 정도를 確認하기 위하여 LDH유출의 변화를 조사하였다. LDH 유출은 正常群의 3.82±0.67%에서 tBHP의 濃度가 0.5mM 일 때 9.89±1.84%, 2mM일 때는 23.97±2.87%로 둘 다 增加를 보였다. 그러나 tBHP를 處理할 때 0.05% 胡桃藥鉞液을 同時에 첨가한 結果, tBHP의 濃度가 0.5 mM일 때 LDH 유출은 9.89±1.84%에서 4.89±0.77%, 2mM일 때는 23.97±2.87%에서 8.36±1.13%로 둘 다 有意性(p<0.05)있는 減少를 보였다 (Table 1, Fig. 1).

2. 肝組織에서 脂質의 過酸化에 對한 tBHP의 效果와 胡桃藥鉞液의 影響

肝組織에서 LDH流出에 대한 tBHP 및 胡桃藥鉞液의 效果가 脂質의 過酸化의 變化에 기인하는 지를 調査하기위하여 LDH유출을 試驗한 것과 동일한 方法으로 tBHP의 濃度에 따른 脂質의 過酸化를 測定하였다. 脂質의 過酸化는 188.36±25.48 pmole MDA/mg protein에서 tBHP의 濃度가 0.5mM일 때 583.93±47.37 pmole MDA/mg protein, 2mM일 때 890.89±48.27 pmole MDA/mg protein으로 둘 다 增加를 보였다. 그러나 tBHP를 處理할 때 0.05% 胡桃藥鉞液을 同時에 添加한 結果, tBHP의 濃度가 0.5mM일 때 脂質의 過酸化는 243.85±35.27, 2mM일 때는 352.84±43.92 pmole MDA/mg protein로 둘 다 有意性(p<0.05)있는 減少를 보였다(Table 2, Fig. 2).

Table 1. Dose-dependency of t-butylhydroperoxide (tBHP) on LDH Release in the Presence or Absence of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) in the Liver Tissues.

(M±S.E.)	
Group I (0.5 mM)	LDH release(%)
Normal	3.82±0.67
Control	9.89±1.84
Sample	4.89±0.77*
Group II (2 mM)	
Normal	LDH release(%)
Normal	3.82±0.67
Control	23.97±2.87
Sample	8.36±1.13*

M±S.E.; Mean ± Standard Error
 Normal; untreated group
 Control; group with tBHP
 Sample; group with tBHP and Juglandis Semen
 P-value; statistically significant value compared with control data of each group (*: p<0.05)

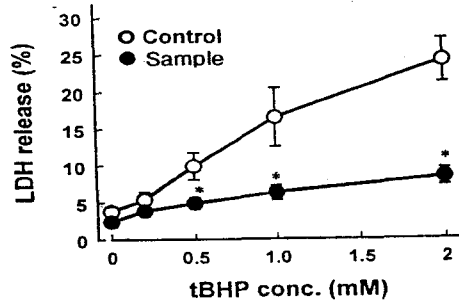


Fig. 1. Dose-dependency of t-butylhydroperoxide (tBHP) on LDH Release in the Presence or Absence of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) in the Liver Tissues. The tissues were treated with various concentrations of tBHP for 60 min at 37 oC in the presence or absence of 0.05% JGA, and LDH release was measured. Data are mean±S.E. of five experiments. *p<0.05 compared with the respective control.

3. tBHP로 인한 肝組織의 損傷에 對한 胡桃藥鉞液의 濃度變化 影響

胡桃藥鉞液이 oxidant에 의한 肝組織損傷을 防止할 수 있는 效果가 濃度變化에 따라 어떤 影響을 받는지를 調査하기 위하여 胡桃藥鉞液의 濃度を 0.005

Table 2. Dose-dependency of t-butylhydroperoxide (tBHP) on Lipid Peroxidation in the Presence or Absence of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) in the Liver Tissues.

(M±S.E.)	
Group I (0.5 mM)	Lipid peroxidation(pmole MDA/mg protein)
Normal	188.36±25.48
Control	583.93±47.37
Sample	243.85±35.27*
Group II (2 mM)	
Normal	Lipid peroxidation(pmole MDA/mg protein)
Normal	188.36±25.48
Control	890.89±48.27
Sample	352.84±43.92*

M±S.E.; Mean ± Standard Error
 Normal: untreated group
 Control: group with tBHP
 Sample: group with tBHP and Juglandis Semen
 P-value; statistically significant value compared with control data of each group (*: p<0.05)

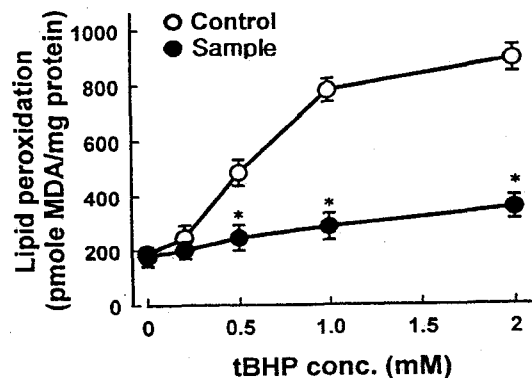


Fig. 2. Dose-dependency of t-butylhydroperoxide (tBHP) on Lipid Peroxidation in the Presence or Absence of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) in the Liver Tissues. The tissues were treated with various concentrations of tBHP for 60 min at 37 oC in the presence or absence of 0.05% JGA, and lipid peroxidation was measured. Data are mean±S.E. of five experiments. *p<0.05 compared with the respective control.

에서 0.1% 까지 變化시켜 觀察하였다. 1mM tBHP에 의해 LDH유출이 正常群의 5.38±0.35%에서 24.53±1.97%로 約 5배 增加하였고, 여기에 0.005% 胡桃藥鉞液을 添加하였을 때 LDH流出은 17.34±1.57%, 0.1% 일 때는 3.38±0.53%로 둘 다 有意性(p<0.05) 있는 減少를 보였다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Dose-dependency of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) Protective Effect against t-butylhydroperoxide (tBHP)-Induced LDH Release in Rabbit Liver.

(M±S.E.)	
Group I (0.005%)	LDH release(%)
Normal	5.38±0.35
Control	24.53±1.97
Sample	17.34±1.57*
(M±S.E.)	
Group II (0.1%)	LDH release(%)
Normal	5.38±0.35
Control	24.53±1.97
Sample	3.38±0.53*

M±S.E.; Mean ± Standard Error
 Normal; untreated group
 Control; group with tBHP
 Sample; group with tBHP and Juglandis Semen
 P-value; statistically significant value compared with control of each group (*: p<0.05)

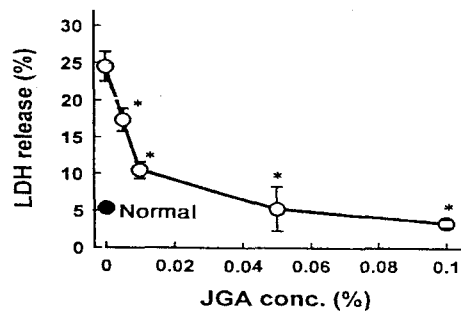


Fig. 3. Dose-dependency of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) Protective Effect against t-butylhydroperoxide (tBHP)-Induced LDH Release in Rabbit Liver. The tissues were treated with 1 mM tBHP for 60 min at 37 oC in the presence or absence of 0.005-1% JGA, and LDH release was measured. Data are mean±S.E. of five experiments. * p<0.05 compared with tBHP alone.

4. tBHP에 의한 脂質의 過酸化에 對한 胡桃藥鍼液의 濃度變化 影響

tBHP에 의한 肝組織의 損傷을 防止하는 胡桃藥鍼液의 濃度變化의 效果가 脂質의 過酸化를 防止하는 效果에도 類似하게 나타나는지를 確認하기 위하여 tBHP에 의한 脂質의 過酸化에 對한 여러 濃度の 胡桃藥鍼液의 效果를 觀察하였다. 1mM

Table 4. Dose-dependency of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) Protective Effect on t-butylhydroperoxide (tBHP)-Induced Lipid Peroxidation in Rabbit Liver.

(M±S.E.)	
Group I (0.005%)	Lipidperoxidation(pmol MDA/mg protein)
Normal	184.36±41.44
Control	888.27±45.39
Sample	304.25±38.43*
(M±S.E.)	
Group II (0.1%)	Lipidperoxidation(pmol MDA/mg protein)
Normal	184.36±41.44
Control	888.27±45.39
Sample	177.49±40.18*

M±S.E.; Mean ± Standard Error
 Normal; untreated group
 Control; group with tBHP
 Sample; group with tBHP and Juglandis Semen
 P-value; statistically significant value compared with control of each group (*: p<0.05)

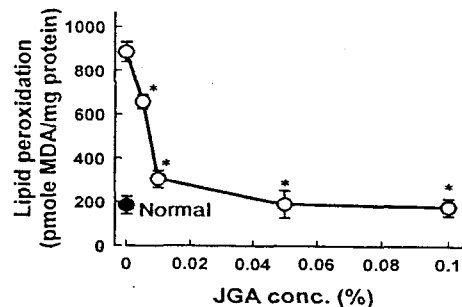


Fig. 4. Dose-dependency of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) Protective Effect on t-butylhydroperoxide (tBHP)-Induced Lipid Peroxidation in Rabbit Liver. The tissues were treated with 1mM tBHP for 60 min at 37 oC in the presence or absence of 0.005-1% JGA, and lipid peroxidation was measured. Data are mean±S.E. of five experiments. *p<0.05 compared with tBHP alone.

tBHP에 의해 脂質의 過酸化는 正常群의 184.36±41.44 pmole MDA/mg protein에서 885.27±45.39 pmole MDA/mg protein으로 約 4.8倍 增加하였고, 여기에 0.005% 胡桃藥鍼液을 添加하였을 때 脂質의 過酸化는 304.25±38.43 pmole MDA/mg protein, 0.1% 일 때는 177.49±40.18 pmole MDA/mg protein 으로 둘 다 有意性(p<0.05) 있는 減少를 보였다 (Table 4, Fig. 4).

Table 5. Effect of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) on tBHP-Induced Alanine Aminotransferase Activity in Rabbit Liver.

Group	ALT activity(Units/g wet wt)
Normal	0.99±0.06
Control	7.84±1.22
Sample	1.98±0.69*

M±S.E.; Mean ± Standard Error

Normal; untreated group

Control; group with tBHP

Sample; group with tBHP and Juglandis Semen

P-value; statistically significant value compared with control data of each group (*: p<0.05)

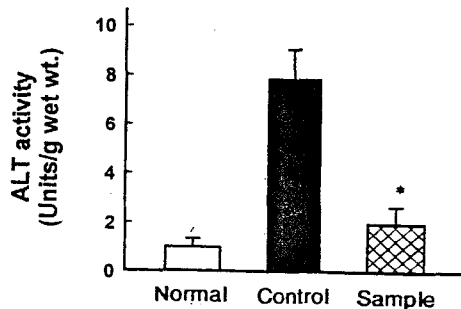


Fig. 5. Effect of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) on tBHP-Induced Alanine Aminotransferase Activity in Rabbit Liver. The tissues were treated with 1 mM tBHP for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.05% JGA, and alanine aminotransferase activity was measured in the incubation medium. Data are mean±S.E. of five experiments.

* p<0.05 compared with control.

5. tBHP에 의한 ALT流出에 대한胡桃藥鍼液의影響

一般的으로 肝組織의 損傷程度를 評價하기 위하여 많이 이용하고 있는 ALT의 incubation 溶液內 活性를 測定한 結果 LDH에서와 類似하게 1mM tBHP에 의해 0.99±0.06 Units/g wet wt.에서 7.84±1.22 Units/g wet wt.로 增加하였고, 여기에 0.05% 胡桃藥鍼液을 添加하였을 때 1.98±0.69 Units/g wet wt.로 거의 正常 水準까지 有意性(p<0.05) 있는 減少를 보였다(Table 5, Fig. 5).

Table 6. Effect of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) on tBHP-Induced Reduction of Glutathione (GSH) Content in Rabbit Liver.

Group	GSH(umole/g wet wt)
Normal	2.26±0.06
Control	1.89±0.05
JGA	2.35±0.05
Sample	2.15±0.08*

M±S.E.; Mean ± Standard Error

Normal; untreated group

Control; group with tBHP

JGA; untreated group with Juglandis Semen

Sample; group with tBHP and Juglandis Semen

P-value; statistically significant value compared with control data of each group (*: p<0.05)

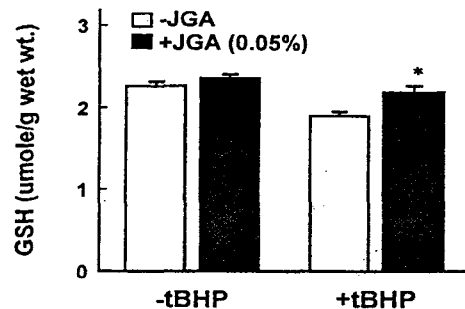


Fig. 6. Effect of Juglandis Semen Herbal Acupuncture (JGA) on tBHP-Induced Reduction of Glutathione (GSH) Content in Rabbit Liver. The tissues were treated with 2 mM tBHP for 60 min at 37 °C in the presence or absence of 0.05% JGA, and GSH content was measured in the incubation medium. Data are mean±S.E. of five experiments.

* p<0.05 compared with control.

6. 正常組織 및 tBHP로 處理된 組織에서 glutathione (GSH)

含量에 대한 胡桃藥鍼液의 影響

GSH는 여러 毒性物質에 의한 細胞損傷을 防止하는 解毒效果를 나타낼 뿐만 아니라, 細胞內 存在하는 抗酸化劑 役割을 하고 있는 物質이다^{28,29)}. 따라서 胡桃藥鍼液이 tBHP에 의한 細胞損傷과 脂質의 過酸化를 防止하는 作用이 細胞內 GSH의 濃度를 變化시켜 나타나는 지를 確認하기 위하여 正常 組織과 2mM tBHP를 處理한 組織에서 GSH 濃度 變化

에 對한 胡桃藥鍼液의 效果를 調査하였다. 正常組織에 胡桃藥鍼液을 處理했을 때 GSH含量은 $2.26 \pm 0.06 \mu\text{mole/g wet wt.}$ 에서 $2.35 \pm 0.05 \mu\text{mole/g wet wt.}$ 로 有意한 變化가 없었다. 組織에 tBHP를 處理한 結果 GSH는 $1.89 \pm 0.05 \mu\text{mole/g wet wt.}$ 로 減少되었고, 여기에 0.05% 胡桃藥鍼液을 添加하였을 때는 $2.15 \pm 0.08 \mu\text{mole/g wet wt.}$ 로 有意性($p < 0.05$) 있는 增加를 보였다(Table 6, Fig. 6).

IV. 考 察

肝에 대하여 <素問·靈蘭秘典論>¹⁾에서는 “肝者將軍之官 謀慮出焉”, <靈樞·師傳篇>²⁾에서는 “肝者主爲將 使之候外”, <素問·至眞要大論>과 <素問·陰陽應象大論>¹⁾에서는 “諸風掉眩皆屬於肝” “風氣通於肝”이라 하여 肝은 風臟으로서 風病의 發生, 經過, 治療恢復에 關係된 臟器로 보았다.

<素問·六節臟象論>¹⁾에서는 “肝者 罷極之本 魂之居也 其華在爪 其充在筋 以生血氣 其味酸 其色蒼 此謂陰中之少陽 通於春氣”라 하였는데 動作이나 勞動이 甚한 狀態를 罷라 하여, 肝은 筋을 主하고 사람의 運動이 모두 筋力에 依存하므로 肝을 罷極之本으로 보았다. <靈樞·本神篇>²⁾에서는 “肝藏血”이라 하여 肝臟이 血液을 貯藏하여 血液量을 調節하고, 造血하고 血液成分을 調節하는 意味를 包含하고 있다.

肝은 作用面에서 木性을 지니고 膽과 協調하여 情志安靜, 助養消化, 氣血循環에 關係된 疏泄機能과 全身의 氣를 舒展, 通暢條達시키는 意味를 지닌 舒暢氣機의 作用을 發揮하는 臟器이다³⁾.

內經에서는 肝疾患을 일으키는 原因과 症狀들에 對하여 表現하고 있는데 <素問·上古天真論>¹⁾에서는 “男子七八肝氣衰 筋不能動 天癸竭 精少 腎氣衰 形體皆極”, <素問·生氣通天論>¹⁾에서는 “風客淫氣 精乃亡 邪傷肝也” “味過於酸 肝氣以津”이라 하여 男子 나이 56歲 前後의 肝氣衰退, 風邪나 酸味の 過多가 肝病의 原因이 됨을 나타내고 있다. <素問·臟氣法時論>¹⁾에서는 “肝病者 兩脇下痛 引少腹 令人善怒 虛則目眩 無所見 耳無所聞 善恐如人將捕之 氣逆則頭痛 耳聾不聽 頰腫”이라 하여 肝病의 症狀를 說明하고 있다.

西洋醫學에서는 肝은 人體內에서 糖質을 攝取하여 glycogen形態로 肝에 貯藏하였다가 必要에 따라 解糖作用을 하는 糖質代謝, 蛋白質의 合成과 異化作用을 擔當하는 蛋白質代謝, 中性脂肪(triglyceride), 磷脂質(phospholipid), sterol 등 糖脂質의 代謝, cholesterol代謝, vitamin A, D, B₁₂ 등의 vitamin代謝, 鐵을 多量으로 貯藏하고 있는 主된 臟器로서 鐵代謝에 關與하며, 血球細胞의 生産, 赤血球의 破壞, transferrin 生産, 活性化된 凝固因子의 處理 및 破壞, bilirubin代謝와 分泌, vitamin B₁₂ 葉酸鹽과 鐵을 위한 貯藏器具, 凝固因子들의 生産, 血漿成分 生成 및 代謝와 關聯된 造血과 破血作用에 關與하며, 脂肪分解로 消化機能을 도와주는 膽汁酸代謝, 生體에 對해 有害한 異物質을 無害한 것으로 바꾸는 解毒作用; 肝組織內에서 활발히 일어나는 核酸代謝 및 肝組織再生能, 코티솔, 에스트로젠, 안드로젠 등 스테로이드 호르몬 또는 기타 많은 호르몬이 肝臟內에서 주로 分解, 合成되는 호르몬 代謝가 이루어지고 있는 生化學的 物質代謝를 擔當하고 있는 重要한 臟器이다³⁾.

胡桃는 胡桃나무과(胡桃科: Juglandaceae)에 屬한 落葉喬木인 胡桃나무果實의 種仁^{30) 31)}으로 核桃肉, 核桃仁, 唐楸子 등의 異名이 있으며, 性은 溫, 熱, 無毒하고, 味는 甘하며, 肺經, 腎經에 入한다. 主成分은 lino acid, oleic acid 등을 주로 한 脂肪油가 40-50%, 단백질, 당분, 灰分, vitamin A·B·C·E 등 이라고 알려져 있고³²⁾, 그 效能은 壯陽固精·通命門·利三焦·潤腸胃·滋養強壯·抗老衰·健腦·通潤血脈·潤肌·利小便·肉潤·溫肺潤腸·補氣養血·助腎火·潤燥養血 등이며, 主治證은 腰痛脚弱·腰脚虛痛·心腹諸痛·陽痿·遺精·腸燥便秘·腎虛咳嗽·虛寒咳嗽·心腹疝痛·血痢腸風·散腫毒·瘡腫諸毒·殺蟲治瘡·發頭瘡·制銅毒 등이다⁴⁻⁶⁾.

tBHP는 tert-Butylhydroperoxide(C₄H₁₀O₂)로서 重 合反應(polymer-ization reaction)을 일으키는 觸媒로 作用하며, radical의 置換反應(substitution reaction)을 일으키는 peroxy group의 酸化劑로 널리 使用되고 있는 藥物이다³³⁾.

反應性酸素基는 正常細胞의 미토콘드리아에서 代謝過程中 發生되고, 細胞內에 있는 여러 種類의 oxidase들에 의해 서로 發生된다. 이와 같이 生成된 反應性酸素基는 여러가지 方法으로 細胞機能에 障 碍을 誘發할 수 있다. 그러나 우리 몸속에는 反應性酸素基를 除去하는 酵素 및 非酵素性 物質들을 가지고

있어 反應性酸素基에 의한 細胞損傷을 防止하고 있다. 그러나 藥物 또는 細胞內 環境의 變化로 反應性酸素基의 發生이 增加되거나 反應性酸素基을 除去하는 防禦作用이 軟弱하게 되었을 때, 細胞는 損傷을 받게될 것이고 심하면 細胞의 死亡까지 이르게 된다³⁴⁾.

反應性酸素基의 細胞損傷 機轉에는 脂質의 過酸化, 細胞膜 蛋白質의 酸化 및 遺傳子損傷 등이 있으나 그 중에서도 특히 細胞膜에 있는 脂質에는 不飽和脂肪酸이 많기 때문에 反應性酸素基같은 物質의 攻擊對象이 되고 있다. 따라서 反應性酸素基가 不飽和脂肪酸에 作用하여 過酸化를 誘發하게 되면 細胞膜透過性的 變化 및 細胞膜에 있는 蛋白質의 機能이 阻害되기 때문에 이러한 脂質의 過酸化는 反應性酸素基에 의한 細胞機能障礙의 重要한 原因으로 認定되고 있다^{16,35-36)}.

그림 1은 肝組織에서 0.05% 胡桃藥鍼液이 들어 있는 경우와 들어 있지 않은 경우에 여러 濃度의 tBHP를 60분동안 處理하였을 때 組織損傷 정도를 觀察하기 위하여 LDH流出의 變化를 測定한 結果이다. 그림에서 보는 바와 같이 0.05% 胡桃藥鍼液을 添加하였을 때 LDH流出은 有意性 있는 減少를 나타냈다.

그림 2는 肝組織에서 LDH流出에 대한 tBHP 및 胡桃藥鍼液의 效果가 脂質의 過酸化의 變化에 基因하는지를 調査하기 위하여 tBHP의 濃度에 따른 脂質의 過酸化를 測定한 結果이다. 그림에서 보는 바와같이 0.05% 胡桃藥鍼液을 添加하였을 때 脂質의 過酸化는 有意性 있는 減少를 나타냈다. 이러한 結果는 tBHP에 의한 肝組織의 損傷은 脂質의 過酸化에 의해 誘發되고 있으며, 胡桃藥鍼液의 防止效果도 脂質의 過酸化를 抑制하여 나타날 可能性을 보이고 있다.

그림 3은 胡桃藥鍼液이 oxidant에 의한 肝組織損傷을 防止할 수 있는 效果가 濃度變化에 따라 어떤 影響을 받는지를 調査하기 위하여 胡桃藥鍼液의 濃度を 0.005에서 0.1% 까지 變化시켜 觀察한 結果이다. 그림에서 보는 바와 같이 1mM tBHP에 의해 正常의 約 5倍로 增加하였고, 여기에 0.005%와 0.1% 胡桃藥鍼液을 添加하였을 때 有意한 減少를 보였다. 이와 같이 胡桃藥鍼液의 防止效果는 濃度에 比例하여 增加하는 傾向을 보였다.

그림 4는 tBHP에 의한 肝組織의 損傷을 防止하는 胡桃藥鍼液의 濃度變化의 效果가 脂質의 過酸化를 防止하는 效果에도 類似하게 나타나는지를 確認

하기 위하여 tBHP에 의한 脂質의 過酸化를 防止하는 效果가 濃度의 胡桃藥鍼液의 效果가 如何한지 比較하기 위하여 그림 5와 같이 2mM tBHP에 의해 LDH流出이 約 4.8倍 增加하였고, 여기에 0.005% 胡桃藥鍼液을 添加했을 때는 胡桃藥鍼液의 濃度에 依하여 有意性 있게 減少되었다. 이러한 結果는 胡桃藥鍼液이 強力한 抗酸化 效果를 가지고 있으며, 이러한 效果로 인해 肝組織에서 tBHP에 의한 細胞損傷을 防止하고 있음을 알 수 있다.

그림 5는 肝組織의 損傷程度를 評價하기 위하여 많이 이용하고 있는 ALT의 incubation 時間을 測定한 結果이다. 그림에서 보는 바와 같이 tBHP에 의해 增加하였고, 여기에 0.05% 胡桃藥鍼液을 添加하였을 때는 거의 正常 水準까지 有意하게 減少하였다.

그림 6은 胡桃藥鍼液이 tBHP에 의한 肝組織의 脂質의 過酸化를 防止하는 作用이 如何한지 濃度를 變化시켜 나타나는지를 確認하기 위하여 正常組織과 2mM tBHP를 處理한 組織에서 脂質의 變化에 對한 胡桃藥鍼液의 效果를 調査한 結果이다. GSH는 여러 毒性物質에 의한 細胞損傷을 防止하는 解毒效果를 나타낼 뿐만 아니라, 細胞內에서 強力한 抗酸化劑 役割을 하고 있는 物質이다³⁷⁾. 그림에서 보는 바와 같이 正常組織에 胡桃藥鍼液을 添加했을 때 GSH含量은 有意한 變化가 없었다. 그러나 tBHP를 處理한 結果 GSH는 減少되었고, 여기에 胡桃藥鍼液을 添加하였을 때는 有意한 增加를 나타내었다.

本 實驗에서는 oxidant인 tBHP가 肝組織에서 濃度에 比例하여 LDH流出을 增加시켰고, 脂質의 過酸化를 誘發하였다. 따라서 이러한 結果로 tBHP가 肝組織에서 脂質의 過酸化를 誘發하여 細胞損傷을 일으키고 있음을 間接적으로 證明할 수 있었다. 肝組織을 tBHP에 露出시키면서 胡桃藥鍼液을 0.05% 濃度로 添加하였을 때 有意하게 減少한 LDH流出 및 脂質의 過酸化가 有意하게 減少되었다. 또한 胡桃藥鍼液의 效果가 濃度에 依하여 나타남으로써 胡桃藥鍼液이 神經組織 뿐만 아니라 肝組織에서도 強力한 抗酸化 效果가 있음을 證明하였다.

위에서 언급한 대로 正常細胞속에는 여러 種의 抗酸化物質들이 있다. 이들 物質中에서 GSH는 強力한 抗酸化劑 役割을 가지고 있다²⁷⁻²⁹⁾. 따라서 胡桃藥鍼液이 細胞內 GSH含量을 增加시켜 抗酸化 效果를 나타내었다.

는지를 觀察한 結果, 胡桃藥鍼液이 正常組織에서는 GSH含量에 變化를 나타내지 못했지만 tBHP에 의해 減少되었던 GSH는 正常 水準까지 恢復되었다. 이러한 結果는 胡桃藥鍼液이 細胞內 GSH含量을 增加시킴으로써 抗酸化 效果를 나타냄을 가리킨다. 그러나 胡桃藥鍼液이 肝組織에서 抗酸化 酵素의 活性을 變化시키는지 또는 直接 反應性酸素基를 除去하는 作用을 하는지는 더욱 研究해 보아야 할 것이며 向後 肝疾患治療에도 藥鍼療法을 應用할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 結 論

家兎의 肝組織에 tBHP로 細胞損傷을 誘發하여 胡桃藥鍼液의 效果를 實驗한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 胡桃藥鍼液은 LDH流出 및 脂質의 過酸化를 有意性있게 減少 시켰다.
2. 胡桃藥鍼液은 ALT活性을 有意性있게 減少시켰다.
3. 胡桃藥鍼液은 GSH含量을 有意性있게 增加시켰다.

VI. 參考文獻

1. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울 : 東洋醫學研究院出版部. 1985 : 11, 16, 17, 25, 34, 36, 69, 89, 303.
2. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울 : 東洋醫學研究院出版部. 1985 : 69, 165.
3. 金秉雲 外. 肝系內科學. 서울 : 東洋醫學研究院出版部. 1989 : 164-85.
4. 李時珍. 本草綱目. 서울 : 高文社. 1983 : 1033.
5. 上海中醫學院編. 新編中醫學教材 中草藥學. 上海 : 商務印書館. 1981 : 540.
6. 汪詡庵. 本草備要. 臺北 : 文光圖書有限公司. 1977 : 150-1.
7. Mccord JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. N-ENGL-J-Med. 1985 ; 312 : 159-63.
8. Halliwell B. Oxidants and the central nervous system-some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke?. Acta. Neurol. Scand. 1989 ; 126 : 23-33.
9. Floyd RA. Role of Oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J. 1990 ; 4 : 2587-97.
10. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. J-Apple-Physiol. 1991 ; 71 : 1185-95.
11. Brondy SC, LeBel CP. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the CNS. Free-Radic-Biol-Med. 1993 ; 14 : 633-42.
12. Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. Pro-Soc-Exp-Biol-Med. 1995 ; 209 : 104-11.
13. Paller MS, Neumann TV. Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. Kid. Int. 1991 ; 40 : 1041-49.
14. Walker PD, Shah SV. Evidence of the role of hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. J. Clin. Invest. 1988 ; 81 : 334-41.
15. Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, Kunkel RG, Ward PA. Evidence for the role of oxygen free radicals in acute nephrotoxic nephritis. Lab. Invest. 1984 ; 51 : 396-403.
16. Smith MT, Thor H, Orrenius S. The role of lipid peroxidation in the toxicity of foreign compounds to the liver. Biochem Pharmacol. 1983 ; 32 : 763-4.
17. Babbs CF, Salaris SC, Turek JJ. Cytochemical studies of hydrogen peroxide generation in postischemic hepatocytes. Am. J. Physiol. 1991 ; 260 : H123-9.
18. Caraceni P, Gasbarrini A, Van Thiel DH, Rorle AB. Oxygen free radical formation by

- rat hepatocytes during postanoxic reoxygenation, scavenging effect of albumin. *Am. J. Physiol.* 1984 ; 266 : G451-8.
19. Mathews WR, Guido DM, Fisher MA, Jaeschke H. Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. *Free-Radic-Biol-Med.* 1994 ; 16 : 763-70.
 20. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 1979 ; 59 : 527-605.
 21. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Biology of disease : Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* 1990 ; 62 : 670-9.
 22. 金永海, 金甲成. 胡桃藥鍼液의 抗酸化效果에 對한 研究 II. oxidant에 依한 細胞損傷을 防止하는 機轉. *大韓鍼灸學會誌.* 1996 ; 13(2) : 54-66.
 23. 姜亨定. 胡桃水鍼이 家兔腎臟의 抗酸化酵素活性에 미치는 影響. *東義大學校 大學院.* 1996.
 24. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* 1978 ; 86 : 271-8.
 25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976 ; 72 : 248-54.
 26. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 1985 ; 113 : 548-54.
 27. Snedecor GH, Cochran WG. *Statistical methods.* 6th ed. Ames : Iowa State Univ. 1967.
 28. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1983 ; 52 : 711-60.
 29. Starke PE, Farber JL. Endogenous defence against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 1985 ; 260 : 86-92.
 30. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울 : 永林出版社. 1986 : 194.
 31. 李載熙. 圖說 韓方藥理·效能의 臨床應用. 서울 : 學林社. 1985 : 577.
 32. 李尙仁, 安德均, 辛民教. 韓藥臨床應用. 서울 : 成輔社. 1986 : 194-5.
 33. Susan Budavari. *Merck Index.* twelfth edition. Merck & Co. Inc. : New Jersey. 1996 : 259.
 34. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease : Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982 ; 47 : 412-26.
 35. Smith MT, Thor H, Hartzell P, Orrenius S. The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1982 ; 31 : 19-26.
 36. Tribble DL, Aw TY, Jones DP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology.* 1987 ; 7 : 377-86.