대한한의학회지 제26권 제3호(2005년 9월)
J Korean Oriental Med 2005;26(3):204-214

원 저

加減荊防地黃湯 熱水 추출물이 抗酸化 작용에 미치는 影響

한진수, 박성식
동국대학교 한의과대학 사상체질과

Antioxidant Property of the *Gagam-Hyungbang-Gihwang-tang* Using Biochemical Markers of Carcinogenesis

Jin-Soo Han, Seong-Sik Park
Department of Oriental Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives : The verity extract of the Gagam-Hyungbang-Gihwang-tang (GHG) was assessed to determine the mechanisms of its antioxidant activity.

Methods : The following effects were measured : GHG exhibited a concentration-treatment; scavenging α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) radical, linoleic acid oxidation in a thiocyanate assay system, and superoxide anion, hydroxyl radical-induced DNA nicking. We investigated mRNA levels such as superoxide-dismutase.

Results : The GHG extract showed dose-dependent free radical scavenging activity, including DPPH radicals, hydroxyl radicals, and superoxide anion, using different systems. The GHG was also found to be effective in protecting plasmid DNA against the strand breakage induced by hydroxyl radicals in Fenton' s reaction mixture. Furthermore, SOD-1 mRNA expression levels increased in rat hepatoma H4IIE cells.

Conclusions : We expect that GHG will be helpful to the development of antioxidant activity treatments.

Key Words: *Hyungbang-Gihwang-tang,* antioxidant activity, DPPH, *superoxide anion, superoxide dismutase-1*

緖 論

생체는 영양분의 섭취와 호흡의 과정에서 과산화물을 만드는데, 이들의 연속적인 반응으로 인하여 세포의 유전물질인 DNA를 손상시키거나 癌을 유발한다고 알려져 있다[1-3]. 세포의 老化와 관련이 있는 이러한 과산화물을 활성산소종 혹은 자유기 (free radicals)라고 일컫으며. 활성산소가 세포막의 형성 불능이나 파괴를 일으키고, 축적되는 가역 혹은 비가역적인 일련의 과정을 통하여 인체는 여러 가지 疾病을 유발한다고 알려져 있다[4]. 따라서 원인물질을 생성하는 酸化物의 생성을 억제하기 위한 抗酸化劑 (antioxidants)의 개발이 많이 연구되고 있다.

그러나 단일 抗酸化劑의 경우에는 그 효능이 충분하지 않고, 복합물의 경우에는 부작용이 있다는 점에서 엄격하게 제한되고 있어서[5] 인체에 부작용이 적고 안정성이 있는 抗酸化 물질의 개발이 필요한 실정이다.

· 접수 : 2005년 3월 20일 · 논문심사 : 2005년 5월 21일
· 채택 : 2005년 6월 29일
· 교신저자 : 박성식. 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2 동국대학교 분당한방병원 사상체질과
(Tel : 031)710-3723, 3735 , Fax : 031)710-3780, E-mail : nlnorae@hanmail.net, parkss@dongguk.edu)

許[6]는『東醫寶鑑』積聚門에서 "痞塊와 積聚가 가운데 있으면 痰飮이 되고, 우측에 있으면 食積이되고, 좌측에 있으면 血積이 된다. 塊는 有形之物로서 氣가 塊를 형성할 수 없으니, 痰과 食積 死血로 인한 것이다.…… 癥은 단단하고 이동할 수 없고, 瘕는 단단하나 이동할 수 있는 것으로, 모두 痰飮 食積 死血로 인하여 塊가 형성된 것이니, 積聚 癥瘕 痃癖은 실제로 한 종류이다." 라고 하였다.

王[7]은『醫林改錯』에서 "肚腹結塊, 必有形之血也, 血受寒則, 凝結成塊, 血受熱則, 煎熬成塊" 라 하여 瘀血이 癌의 형성과정에 중요한 병리기전임을 주장하였다. 서양의학에서도 血栓이 轉移 유발인자로 작용한다는 사실이 밝혀졌으며[8], 임상에서도 癌患者들에게서 高粘度血證이 자주 관찰되어 活血化瘀法이 암 치료에 유용한 치법으로 대두되고 있다[9]. 따라서 저자는 생체가 대사하는 과정에서 過酸化物이 생성되어 축적되고, 發癌물질이 활성화 되는 과정을 血證의 범주에서 접근하였다.

加減荊防地黃湯은『東醫壽世保元』荊防地黃湯의 변화가감 처방이다.『東醫壽世保元』荊防地黃湯의 처방편에서 "'血證에는 玄蔘 牧丹皮를 가하고,……頭痛 煩熱과 血證에는 生地黃을 쓰고, 石膏를 가하는 때는 山茱萸를 뺀다." [주1] 라고 하였다[10]. 이에 저자는 荊防地黃湯에서 熟地黃 山茱萸를 빼고 生地黃 玄蔘 牧丹皮를 가하였으며, 解毒 抗酸化 및 抗癌작용이 있다고 알려진 蜈蚣[11-13]을 가하여 加減荊防地黃湯을 구성하였다.

본 논문에서는 加減荊防地黃湯을 재료로 하여 熱水 추출물(GHGWS)을 조제하고, 抗酸化 능력을 개발하기 위한 검증법으로 사용되는 DPPH free radical의 소거능과 lipid peroxidation을 저해하는 정도를 관찰하였다.

그리고 흰쥐의 肝조직에서 자동산화계에 의한 脂質過酸化를 억제하는 정도를 살펴보고, 초나선 유전자 (super-coiled DNA)를 강제 분절시킨 후 加減荊防地黃湯이 이를 어느 정도 억제하는지 측정하였다. 또한, 한약 추출물의 superoxide anions의 소거 효과와 SOD-1의 발현을 mRNA 수준에서 검토하여 熱水 추출물(GHGWS)을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

주1) 辛丑本 少陽人 泛論 新定 少陽人病 應用要藥 十七方 荊防地黃湯條. 咳嗽 加前胡, 血證 加玄蔘 牧丹皮, 偏頭痛 加黃連 牛蒡子, 食滯·滿者 加牧丹皮, 有火者 加石膏, 頭痛煩熱與血證者 用生地黃 加石膏者 去山茱萸

材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

본 실험에서 사용한 加減荊防地黃湯 (Gagam-Hyung-Bang-Gi-Hwang -Tang, GHG) 약재는 東國大學校 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였고, 처방 내용과 구성은 Table 1 과 같다.

2) 試料製造

(1)加減荊防地黃湯 熱水 추출물(Gagam-Hyung-Bang-Gi-Hwan-Tang water-extracted solution, 이하 GHGWS)

加減荊防地黃湯 재료 두 첩(112g)에 증류수 800*ml*을 가한 뒤 한류냉각관이 부착된 전탕기 (heating mantle, HMI-F300, hana INS.)에서 3시간 끓이고 여과한 후 4℃, 2,500rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 rotary evaporator (EYELA N-1000, Japan)에서 70℃ 30분 동안 감압 농축하여 pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24시간 방치하여 membrane filter (0.22 ㎛, Whatman. Germany)로 여과하였다. 여과된 熱水 추출물(GHGWS)의 건조중량을 측정하기 위하여 freezer dryer (LABCONCO 77530, USA)에서 완전 건조시킨 후 (회수율 : 13.3%) 각 실험 조건의 농도에 알맞게 멸균수, 세포배양용 배지 그리고 phosphate buffered saline (PBS)에 희석시켜 실험에 사용하였다.

2. 方法

1) 抗酸化에 미치는 영향

(1) DPPH free radical 소거능 측정

실험 재료의 DPPH radical에 대한 소거 활성(scavenger activity)을 알아보기 위하여 Gyamfi et al.

의 방법[14]을 일부 수정하여 본 실험에 사용하였다. 즉 3차 증류수에 녹인 50㎕의 농도별 熱水 추출물(GHGWS)을 0.1 mM DPPH-ethanol 용액 1㎖과 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 450㎕ 첨가하여 교반시킨 후 실온에서 30분간 반응시켰다. DPPH free radical의 환원능력 (reduction)을 구하기 위하여 흡광도 517nm에서 측정 (UV/VIS spectrophotometer, OPTIZEN II, Korea)하였으며, 본 실험의 양성대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 계산 방법은 다음과 같다.

% inhibition = [(absorbance of control - absorbance of test sample) /absorbance of control] × 100

(2) 脂質過酸化 반응에 대한 활성 억제 측정

加減荊防地黃湯 추출물이 lipid peroxidation (LPO) 억제에 미치는 효과를 알아보기 위하여, ammonium thiocyanate assay[15]를 참고하여 실험하였다. 기질 용액인 농도별 加減荊防地黃湯 추출물 (0.01 to 10 ㎎/㎖, distilled water) 400㎕에 200㎕의 linoleic acid (25㎎/㎖ 99% EtOH)을 첨가하고, 다시 400㎕의 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)을 섞은 후 40℃ 에서 30분간 반응시켰다. 반응물 100㎕를 3㎖의 70% ethanol이 들어있는 시험관에 분주하고, ammonium thiocyanate (300㎎/㎖, distilled water)와 FeCl2 (2.45㎎/㎖, 3.5% HCl)를 각각 100㎕ 씩 첨가하여 발색 반응을 유도하였다. 그리고 실온에서 3분이 경과한 후 흡광도 500nm에서 지질과산화 반응에 대한 加減荊防地黃湯 추출물의 억제 효과를 측정하였다.

(3) Hydroxyl radical에 의한 흰쥐 肝조직의 脂質過酸化 반응 억제 측정

흰쥐의 간조직 중 加減荊防地黃湯 추출물이 脂質過酸化物의 함량에 미치는 영향은 Ohkawa의 TBA 법[16]에 의하여 측정하였다. 즉 肝조직 균질액 7.5㎎/㎖과 1mM FeCl2, 3mM H_2O_2 그리고 농도별 시료를 혼합하여 최종 부피가 1㎖이 되도록 조정한 다음, 37℃에서 10분간 반응시키고 90℃ 항온 수조에서 발색반응을 유도시킨 후 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Fenton's reagent에 의한 super-coil DNA 분절 억제 측정

농도별 시료가 supercoiled pBR322에서 추출한 plasmid DNA의 분절을 억제하는 효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 실험[17]하였다. 즉 0.5㎍의 DNA를 Fenton's reagents (30mM H_2O_2, 0.05mM ascorbic acid, and 0.08mM $FeCl_3$)를 첨가하고, 여기에 각 농도별 加減荊防地黃湯 추출물을 처리하여 최종 부피가 20㎕가 되도록 조정하였다. 혼합물을 37℃에서 30분 동안 정치시키고 ethidium bromide 염색법에 의하여 1% agarose gel에서 분석하였다.

(5) Superoxide anions의 소거 활성 측정

加減荊防地黃湯 추출물이 superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$)을 소거하는 활성을 알아보기 위하여 Gotoh 와 Niki의 방법[18]을 일부 수정하여 활성 측정을 실험하였다. 즉, 50 ㎕의 시료를 30mM EDTA (pH 7.4) 100㎕와 50mM NaOH에 녹아있는 30mM hypoxanthine 10㎕ 그리고 200㎕의 nitro blue tetrazolium (NBT) 반응액에 넣었다. 이를 실온에서 3분간 반응시킨 후, 0.5 unit/㎖ xanthine oxidase를 100㎕ 첨가하고 50mM phosphate buffer (pH 7.4)로 최종 부피를 3㎖로 조정하였다. 반응액을 다시 실온에서 20분간 반응하게 한 후, 흡광도 560nm에서 활성을 측정하였다.

(6) RT-PCR을 이용한 superoxide dismutase-1 (SOD-1) 발현의 측정

역전사 (reverse transcription, RT)에 의한 중합연쇄반응 (polymer chain reaction, PCR)을 이용하여 H4IIE 세포에서 시료의 항산화 활성을 측정하기 위하여 다음과 같이 실험[19]하였다. Total RNA는 Trizol-Reagent를 이용하여 추출하고, 6 well plate (Falcon, Becton Dickinson and Company, U.S.A)에 4×10^4 농도로 세포를 seeding 하여 24시간 이 경과한 후 각기 다른 농도의 加減荊防地黃湯 추출물을 세포에 처리하고, 시료가 세포에 미치는 독성을 평가하여 안정된 범위를 선정하였다. 그리고 농도가 선정 (0.01 to 1.0 ㎎/㎖)된 加減荊防地黃湯 추출물을 H4IIE 세포에 처리하여 rat SOD-1 (superoxide dismutase-1)의 발현 변화 양상을 분석하였다. PCR 생산물 (cDNA)의 분석은 1.2% agarose gel에 loading 하였고, ethidium

Table 1.

	sense oligonucleotide 5'-3'	antisense oligonucleotide 5'-3'
① GAPDH	GCCTTCCGTGTTCCTACC	ACTCCTTGGAGGCCATGT
② SOD-1	GGCGTCATTCACTTCGAG	GTACGGCCAATGATGGAA

bromide staining 방법을 사용하였다. 실험군의 primer는 다음과 같다.

(7) 통계 처리

모든 실험은 3번 실행하고 이를 평균하였으며, 모든 data는 평균값과 표준편차(means±S.D.)로 나타내었다. 통계처리는 Sigma plot (SigmaPlot 8.0)을 이용하여 student *t*-test로 구하였으며, 그 결과 *p*값이 0.05 이하인 경우를 유의성으로 인정하였다.

結 果

1. 抗酸化효과

1) DPPH free radical 소거능 측정

加減荊防地黃湯 熱水 추출물을 통하여 DPPH radical에 대한 소거 활성을 알아본 결과, 1㎎/*ml*에서 4%, 5㎎/*ml*에서 25%, 10㎎/*ml*에서 48%의 억제 정도가 나타나 고농도에서 억제 정도가 높게 나타났다. 양성대조군으로 사용된 L-ascorbic acid의 경우 농도(0.1 to 10 ㎎/*ml*)에 따른 소거 활성이 모두 70% 이상에서 최고 82%까지 매우 높게 나타났다(Fig. 1).

2) 脂質過酸化 반응에 대한 활성 억제 측정

加減荊防地黃湯 추출물에서 熱水 추출물(GHGWS)이 lipid peroxidation (LPO)을 억제하는 효과를 측정한 결과, 농도별 熱水 추출물(GHGWS) (0.01 to 10 ㎎/*ml*(0.01, 5, 10), distilled water)은 각각 11%, 42% 그리고 63%의 억제 활성을 나타내었다(Fig. 2).

3) Hydroxyl radical에 의한 흰쥐 肝조직의 脂質過酸化 반응 억제 측정

흰쥐의 肝조직을 대상으로 hydroxyl radical에 의한 자동산화과정을 억제하는 효과를 加減荊防地黃湯 熱水 추출물(GHGWS)을 시료로 살펴본 결과 (0.1 to 10 ㎎/*ml*(0.1, 0.5, 1, 5, 10㎎/*ml*)) 농도에서 각각 12%, 13%, 34%, 48% 그리고 52%의 비교적 높은 반응 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 3).

4) Fenton's reagent에 의한 super-coil DNA 분절 억제 분석

농도별 (0.1, 0.5, 1 ㎎/*ml*) 시료가 supercoiled pBR322에서 추출한 plasmid DNA의 분절을 억제하는 효과는 熱水 추출물(GHGWS)의 경우에 시료를 처리한 저농도와 고농도 모두에서 DNA 분절을 저해하는 활성을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

5) Superoxide anions의 소거 활성 측정

加減荊防地黃湯 추출물 중 熱水 추출물(GHGWS)이 superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$)을 소거하는 활성을 측정한 결과, (0.1, 5, 10 ㎎/*ml*) 각각의 농도에서 5%, 45% 및 48%의 소거 활성 효과를 나타내었다(Fig. 5).

6) RT-PCR을 이용한 superoxide dismutase-1(SOD-1) 발현 분석

RT-PCR을 이용하여 H4IIE 세포에서 시료의 SOD-1 활성 변화를 측정한 결과, 熱水 추출물(GHGWS)

Table 2. Composition of GHG(*Gugam-Hyung-Bang-Gi-Hwan-Tang*

韓藥名	生藥名	重量(g)
生地黃	*Rehmanniae Radix*	8 g
白茯苓	*Poria*	8 g
澤瀉	*Alismatis Rhizoma*	8 g
玄參	*Scrophulariae Radix*	4 g
牧丹皮	*Moutan Cortex*	4 g
車前子	*Plantaginis Semen*	4 g
羌活	*Notopterygii Rhizoma*	4 g
獨活	*Angelicae Pubescentis Radix*	4 g
荊芥	*Schizonepetae Herba*	4 g
防風	*Ledebouriellae Radix*	4 g
蜈蚣	*Scolopendra*	4 g
總量		56 g

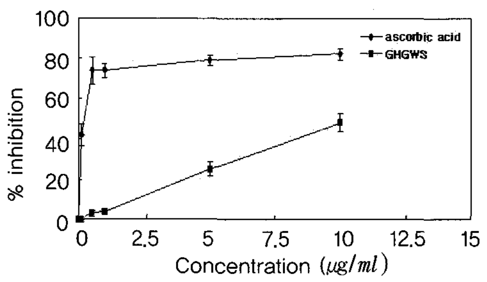

Fig. 1. Free radical scavenging activities of GHGWS (Gagam-Hyung-Bang-Gi-Hwan-Tang water-extracted solution) measured using the DPPH assay. The direct scavenging activities of GHGWS and ascorbic acid on DPPH radicals is expressed as the % inhibition. The concentrations tested ranged from 1 to 10mg/ml. The results are the means of three separate experiments.

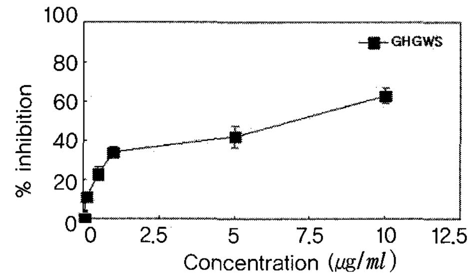

Fig. 2. Inhibitory effects of GHGWS on hydroxyl radical-mediated linoleic acid oxidation. Hydroxyl radicals were generated by Fenton's reaction using an ammonium thiocynate assay system, and the scavenging of hydroxyl radical by GHGWS is expressed as the % inhibition. The concentration of GHGWS extract tested ranged from 0.1 to 10 mg/ml. The results are the means of three separate experiments.

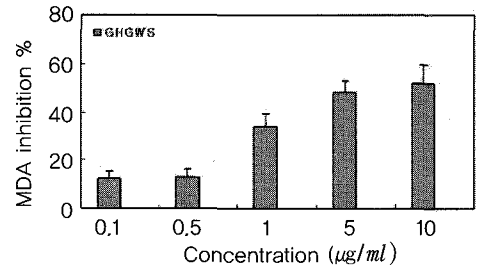

Fig. 3. Inhibitory effects of GHGWS on H_2O_2-$FeCl^{2+}$ system -mediated lipid peroxidation. Hydroxyl radicals were generated by Fenton's reaction using a H2O2-$FeCl^{2+}$ assay system and the scavenging of hydroxyl radical by GHGWS is expressed as the % inhibition. The concentration of GHGWS sample tested ranged from 0.1 to 10 mg/ml. The results are the means of three separate experiments.

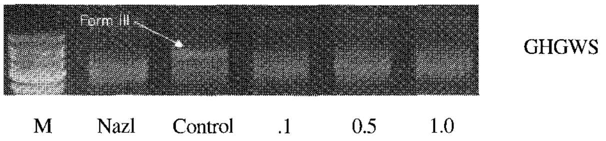

Fig. 4. Inhibitory effects of GHGWS on DNA nicking caused by hydroxyl radicals. The DNA nicking reaction were initiated by the addition of 0.5mg of pBR322 plasmid DNA.

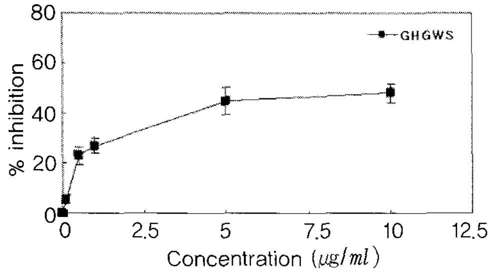

Fig. 5. Inhibitory effects of GHGWS on NBT reduction. The inhibitory effects of GHGWS was tested by monitoring NBT reduction caused by superoxide anions using the hypoxanthine-xanthine oxidase system, as described in the Materials and Metheds section. The results are expressed as the mean values of triplicate experiments.

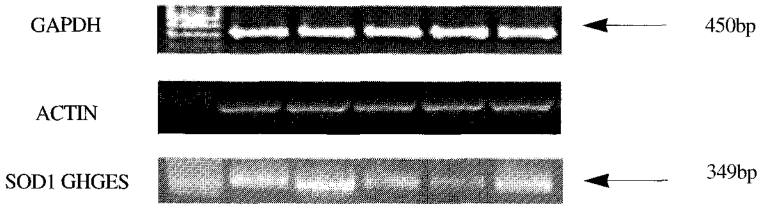

Fig. 6. Superoxide dismutase-1 (SOD-1) mRNA expression in H4IIE cells after GHGWS exposure. A PCR blot of SOD-1 and GAPDH mRNAs obtained by RT-PCR after exposure of H4IIE cells to indicated concentrations of GHGWS for 24hrs.

을 농도별 (0.1, 0.5, 1 ㎎/㎖)로 처리하였을 때, 일반적인 실험 대조군인 GAPDH와 Actin의 경우에는 활성을 그대로 유지하였다. 그러나 熱水 추출물(GHGWS)을 처리하였을 때 저농도 (0.1㎎/㎖)에서 발현이 감소하는 추세를 보이다가 고농도로 올라가면서 증가 (1㎎/㎖)하는 양상을 나타내었다(Fig. 6).

考 察

東武 李濟馬는 『東醫壽世保元』 에서 臟局의 大小에 따라 사람의 체질을 太小陰陽人 네 가지로 구분하여 설명하고 있다. 少陽人은 脾大腎小라는 臟腑 특징을 가지고 있고, 이로 인하여 少陽人만의 특유

한 病證을 형성하게 되고, 이는 크게 脾受寒表寒病과 胃受熱裏熱病으로 나눌 수 있다. 表病證은 다시 少陽傷風證과 亡陰證으로 구분되고, 裏病證은 胸膈熱證과 陰虛午熱證으로 구분된다[20].

荊防地黃湯은 이 중 脾受寒表寒病의 亡陰證에 사용되는 代表的 처방으로 熟地黃, 山茱萸, 白茯苓, 澤瀉, 車前子, 羌活, 獨活, 荊芥, 防風 등으로 구성되어 있다[10]. 『正傳』의 六味地黃湯과 『草本卷』의 黃柏地黃湯에서 유래된 처방으로 辛丑本에 처음 등장하는 처방이다. 주로 少陽人 表證의 身寒, 泄瀉, 亡陰證과 浮腫의 初結證 그리고 頭腹痛, 泄瀉, 凡虛弱者에 활용되는 처방이다[20].

荊防地黃湯의 처방편에서 血證에 관한 記述이 나오는데 "血證에는 玄蔘 牧丹皮를 가하고,……頭痛煩熱과 血證에는 生地黃을 쓰고, 石膏를 가하는 때는 山茱萸를 뺀다[주2)]"라고 하였다[10]. 이에 저자는 活血祛瘀의 작용을 유도하기 위해 荊防地黃湯에 熟地黃 山茱萸를 빼고 生地黃 玄蔘 牧丹皮를 가하고 解毒 抗酸化 및 抗癌에 효과가 있는 蜈蚣[11-13]을 가하여 加減荊防地黃湯을 구성하였다. 生地黃은 性寒 味甘苦 하며 清熱生津 凉血止血 하는 효능이 있어 熱風傷陰, 舌絳煩渴, 發斑發疹, 吐血, 衄血, 咽喉腫痛을 치료한다. 玄蔘은 性寒 味甘苦鹹 하며 滋陰清熱 解毒滑腸의 효능이 있어 熱病傷陰, 舌絳煩渴, 溫毒發斑, 傷津便秘, 骨蒸勞嗽, 目赤, 咽痛, 瘰癧, 白喉, 癰腫瘡毒 등을 치료한다. 牧丹皮는 性微寒 味苦辛하며 清熱凉血 活血散瘀의 효능이 있어 溫毒發斑, 吐血衄血, 無汗骨蒸, 經閉痛經, 癰腫瘡毒 등을 치료한다. 蜈蚣은 性溫 味辛하며 息風止痙 解毒散結 通絡止痛의 효능이 있어 小兒驚風, 抽蓄痙攣, 中風口渦, 半身不遂, 破傷風症, 瘡瘍, 瘰癧 등을 치료한다[21].

瘀血病機에 관한 현대적인 연구에서는 다음과 같은 病理變化를 포괄하고 있다. 즉 첫번째로 혈액순환장애 특히 微循環障碍로 일어나는 缺血, 鬱血, 出血, 血栓形成 및 水腫 등 病理變化가 主가 된다. 다음으로 炎症으로 일어나는 組織滲出, 變性, 壞死, 萎縮 및 增生 등이며, 세번째가 代射障碍로 일어나는 組織 病理反應, 그리고 마지막으로 組織의 무제한적인 增殖이나 細胞分化 不良 등 이다[22].

한편, 老化의 정의는 생명체의 성장과 동시에 진행되는 필수적 반응으로서 생명체의 發育, 成長, 成熟과 衰退의 생물학적 과정에서 행태적 기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저하로 사망에 귀착되는 보편적인 생리현상을 말한다[23]. 이러한 일련의 반응을 통하여 생체는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 혹은 자유기 (free radicals)를 발생시키게 되는데 이는 자외선, 방사선, 흡연, 그리고 음주와 약물복용 등과 같은 외부 환경적 요인을 따르기도 한다[24]. 체내에서 발생되는 활성산소종에는 superoxide radical (O_2^-), hydroxyl radical (HO^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 잘 알려져 있는데, 이들 활성산소종은 원자의 최외곽 전자가 소실되거나 과포화된 상태에서 벗어나기 위한 안정화의 과정에서 높은 반응성을 갖는다. 이러한 활성산소종은 주로 세포막의 불포화지방산들과 결합하여 脂質過酸化 (lipid peroxidation) 반응을 일으키며, 세포 내의 거대분자들과 반응하여 세포의 酸化的 손상 (oxidative damage)을 야기함과 동시에 老化의 주요 원인이 된다고 알려져 있다[25].

천연물에서 추출한 抗酸化劑 혹은 抗酸化 물질은 酸化속도를 억제하는 물질로 그 기능에 따라 크게 둘로 구분한다. 첫번째는 1차 혹은 연쇄반응 차단 抗酸化劑(chain breaking antioxidants)로 지질 자유기 (lipid radical)와 반응하여 이를 안정한 물질로 전환시키는 것이고, 다음으로 방어적 抗酸化 개념 (preventive antioxidants)으로 抗酸化 물질의 여러 기작을 통하여 酸化 연쇄반응의 개시속도를 지연시키는 것이다[1]. 잘 알려진 식품첨가 천연抗酸化劑로는 tocopherol, flavone, quercetin과 일부 vitamin 등이 보고 되어 있고, olanzapine 과 합성 抗酸化劑인 BHT, BHA, TBHQ 등이 있다[26-33].

본 연구에서는 加減荊防地黃湯이 이러한 활성산

주2) 辛丑本 少陽人 泛論 新定 少陽人病 應用要藥 十七方 荊防地黃湯條. 咳嗽 加前胡, 血證 加玄蔘 牧丹皮, 偏頭痛 加黃連 牛蒡子, 食滯·滿者 加牧丹皮, 有火者 加石膏, 頭痛煩熱與血證者 用生地黃 加石膏者·去山茱萸

소종으로부터 세포를 보호하고 老化를 방지하는 효과를 측정하기 위하여 일반적으로 널리 쓰이는 DPPH free radical 소거에 관한 방법과 지질과산화 억제 그리고 SOD -1을 유도하는 실험을 진행하였다.

먼저 DPPH free radical은 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (α,α-diphe nyl-β-picryl -hydrazyl, DPPH)의 구조로 대부분의 라디칼은 이러한 형태의 불균형한 모습을 가진다. DPPH free radical은 짙은 보라색(deep violet color)을 띄고 있으나, 수소 원자가 충족되어 안정화된 구조로 변하게 되면 이러한 색깔을 잃게 되는 반응[34-35]을 나타내게 되는데 최근 여러 가지 기법을 이용하여 급속하고 간단한 조사 방법이 본격적으로 개발되고 있다. 위와 같은 원리를 이용하여 본 실험에서는 加減荊防地黃湯이 DPPH free radical을 환원하는 능력을 흡광도 520nm에서 측정하였다. 결과에서 살펴본 바와 같이 加減荊防地黃湯의 추출물인 熱水 추출물(GHGWS)은 양성대조 활성군인 L-ascorbic acid의 소거능력과 유사하게 접근하는 높은 free radical 소거 활성을 보였다.

脂質의 過酸化반응은 분자상의 산소가 불포화지방산에 부과되는 반응이며, 脂質의 자동산화는 분자상의 산소와 불포화지방산이 반응하기 위하여 주로 脂質이 활성화되는 이른바 脂質過酸化 (lipid peroxidation, LPO) 반응의 일종이라고 할 수 있다. 脂質過酸化반응의 대사과정은 반응성이 강한 free radical이 세포막을 구성하고 있는 인지질의 불포화지방산에서 수소를 탈취함으로써 fatty acid radical이 생성되며, 이렇게 활성화된 지질은 산소 분자와 결합하는 일련의 반응을 통하여 연쇄적인 脂質過酸化物 (hydroperoxide)을 형성하게 된다[1-4,36-38]. 본 연구에서는 이러한 脂質過酸化 작용의 연쇄적인 반응을 억제하는 加減荊防地黃湯 추출물의 효과를 측정하고자, 불포화지방산인 linoleic acid를 강제 산화시켜 脂質過酸化物 생성량을 살펴본 결과 加減荊防地黃湯 熱水 추출물(GHGWS)이 최고 농도에서(10 ㎎/*ml*) 63%의 높은 억제 활성을 나타내었다. 이를 다시 흰쥐의 肝조직을 대상으로 hydroxyl radical에 의한 자동산화과정을 억제하는 효과를 측정하였을 때 52%의 높은 반응 억제 효과를 나타내었다.

활성산소종은 세포내 유전물질인 핵산 및 리보핵산 (DNA, RNA)에 손상을 일으키는 영향을 미치기도 한다[1-3]. 이러한 DNA 손상은 세포내 유전적 결함을 가져와 돌연변이를 일으키거나 각 종 癌을 유발하는 경우도 있으며, 정상적 생체대사를 저해하여 세포막 형성의 불능이나 파괴, 심혈관질환, 만성염증질환, 호흡기질환, 자가면역질환 등 여러 가지 질병을 유발하고, 老化와 치매에도 관계한다고 알려져 있다. 다시 말해 활성산소종에 의한 세포내 유전체의 결함은 심각한 질병을 일으킬 수 있는 소지가 있으므로 이를 저해하는 활성을 가진 생약물을 발견하는 것은 현대과학이 수행하고 있는 중요한 과제 중 하나이다. 따라서 加減荊防地黃湯이 세포 내 유전물질인 DNA의 분절현상을 억제하는 것을 증명하고자 super-coil로 형성된 DNA를 pBR322에서 얻고, 이를 nicking 할 수 있는 과산화수소를 적정농도(30mM)로 처리한 다음 시료가 이를 억제하는 정도를 농도별로 평가해 보았다. 결과적으로 加減荊防地黃湯을 처리하지 않은 대조군은 각각의 nicking 현상이 다각도로 진행이 되는 것을 관찰하였고 (Form I ; super-coil DNA, Form II ; single -stranded nicked DNA, Form Ⅲ ; double-stranded nicked DNA), 농도별 시표를 처리하였을 경우 0.1 에서 1 ㎎/*ml* 모두에서 Form I을 증가시키는 효과를 관찰할 수 있었다. 즉, 加減荊防地黃湯은 활성산소종에 의한 DNA 손상을 저해하거나, 이를 강력하게 막아주는 것으로 사료된다. 그러므로 돌연변이에 의한 癌의 발생이나 각종 질병의 초기 예방이 가능할 것으로 기대할 수 있다.

생체 내에서 脂質過酸化를 매개하는 물질은 여러 가지 알려져 있으나, 일상에서 흔히 접할 수 있는 X-ray, 자외선 등의 외부자극이나 생물체 내에서 자연 발생하는 생물화학적 요인에 의하여 일반적 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 보다도 강력한 superoxide ($O_2^{\cdot-}$)가 발생한다. 세포 내의 superoxide는 주로 마이토콘드리아 (mitochondria) 또는 마이크로좀 (microsome), 그리고 핵막 등의 세포 소기관에

서 생성되며, 자체적으로 더욱 강한 hydroxyl radical을 생성시키는 전구물질로서 중요한 역할을 담당하게 된다. 이러한 과정을 통하여 세포막 및 세포 거대분자에 직접적인 손상을 일으킨다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에 사용된 加減荊防地黃湯 熱水 추출물(GHGWS)이 superoxide radical (O2˙⁻)을 48% 이상 소거 하였으므로, superoxide radical에 의한 세포내 손상을 막고, 脂質過酸化에 관련된 일련의 과정을 억제하리라 사료된다. 아울러 생체 내에서 이러한 활성산소종에 대항하는 방어체계에 있어 catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) 등과 같이 효소적 방어체계를 이루고 있는 중요한 요소인 superoxide dismutase-1 (SOD-1) 활성을 측정한 결과에서도, 고농도의 加減荊防地黃湯 熱水 추출물(GHGWS)이 전사체의 일부를 유도시키거나 유지하는 양상을 나타내었다.

이상의 결과로 보았을 때 加減荊防地黃湯의 熱水 추출물(GHGWS)은 세포의 대사과정에서 발생하는 酸化的 손상을 억제할 것이라 사료되며 또한 천연물로부터 부작용이 적은 抗酸化劑의 개발하는데 좋은 효과가 있을 것으로 기대된다.

結 論

加減荊防地黃湯을 재료로 하여 이를 熱水 추출하여 抗酸化 능력을 DPPH radical 소거 방법과 脂質過酸化 억제 그리고 자동산화 반응계의 저해 및 supercoiled DNA의 분절 억제, $O_2^{\cdot-}$ 소거, superoxide dismutase-1의 mRNA 발현 양상 분석을 통하여 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 熱水 추출물(GHGWS)을 농도별로 처리하여 DPPH radical의 scavenging activities를 검토하였을 때, 농도에 따라 의존적으로 자유기 소거능을 나타내었다.

2. 熱水 추출물(GHGWS)은 lipid peroxidati on (脂質過酸化)를 억제하는 효과를 나타내었다.

3. 흰쥐의 肝조직에서 자동으로 발생하는 脂質過酸化 반응을 熱水 추출물(GHGWS)에서 일부 억제하는 효과를 관찰하였다.

4. 세포의 유전물질인 DNA를 보호하는 효과를 pBR322를 매개로 측정한 결과, 熱水 추출물(GHGWS)은 DNA의 분절을 억제하는 효과가 있었다.

5. Superoxide anions를 소거하는 능력을 熱水 추출물(GHGWS)에서 측정한 결과, 농도 의존적으로 이들의 활성을 억제하는 효과를 관찰하였다.

6. 熱水 추출물(GHGWS)이 SOD-1을 mRNA 수준에서 발현시키는 양상의 변화를 관찰한 결과, 최고농도에서 발현을 증가시켰다.

참고문헌

1. Barnen, A. L. : Toxicological and biochemistry of BHA, BHT. J. *Am. Oil Chem. Soc*. 1975 ; 52 : 59-64.
2. Chung, I. M., Kim, K. H and Ahn, J. K. :. Screening of Korean medicinal and food plants with antioxidant activity. *Kor. J. of Med. Sci*. 1998 ; 6 : 311-322.
3. Hofeman, D. G. and W. G. Hoekstra. : Protein against carbon tetrachloride induced lipid peroxidation in the rat by dietary vitamin E selenium and methionine as measured by ethan evolution. *J. Nutr*. 1977 ; 107 : 667-670.
4. Yagi, K. : Lipid peroxides and human disease. *Chem. Phys. Lipids*. 1987 ; 45 : 337.
5. Rohrdanz, E., Bittner, A., Taran-Thi Q. and Kahl, R. : The effect of quercetin on the mRNA expression of different antioxidant enzymes in hepatoma cells. *Arch. Toxicol*. 2003 ; 77 : 506-510.
6. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울 : 대성문화사. 1992 :

298-302
7. 王淸任. 醫林改錯. 서울 : 일중사. 1992 : 66-109
8. Fidler IJ. : Review on biologicheterogeneity of cancer metastasis. Breast Cancer Res. Treat. 1987 ; 9 : 17.
9. 중국중서의결합연구회 중국중의연구원. 惡性腫瘤 中西醫結合 硏究成就. 중서의결합잡지. 1980 ; 2(1) : 24.
10. 李濟馬. 東醫壽世保元. 서울 : 행림서원. 2003 : 103.
11. 김창인, 심민교, 안덕균, 이경순. 中藥大辭典. 서울 : 정담출판사. 1997 : 3026-3027
12. 催鏞健. 蜈蚣의 抗酸化 效能에 관한 硏究. 동국대학교 대학원 석사학위논문. 2003.
13. 金吉燮. 蜈蚣이 마우스의 免疫反應 및 2단계 發癌化 과정에 미치는 影響. 동국대학교 대학원 박사학위논문. 1999.
14. Gyamfi, M. A., Yonamine M. and Aniya, Y. : Free-radical scavenging action of medicinal herbs from *Ghana : Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *Gen. Pharmacol.* 1999 ; 32 : 661-667.
15. Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A. and Sakata, K. : A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994 ; 58 : 1780-1783.
16. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochem.* 1978 ; 95 : 351-358.
17. Lee, J. C., Kim, H. R., Kim, J. and Jang, Y. S. : Antioxidant property of ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten. J. Agric. Food Chem.* 2002 ; 50 : 6490-6496.
18. Gotoh, N. and Niki, E. : Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and realted compound as measured by chemiluminesxence. *Biochem. Biophys.* Acta. 1992 ; 1115 : 201-207.
19. Rohrdanz, E., Obertrifter, B., Ohler, S. and Kahl, R. : Influence of adriamycin and paraquat on antioxidant enzyme expression in primary rat. *Arch. Toxicol.* 200 ; 74 : 231-237.
20. 全國韓醫科大學 四象醫學敎室. 四象醫學. 서울 : 집문당. 2004 : 200, 394-395, 702.
21. 全國韓醫科大學 本草學敎授. 本草學. 서울 : 永林社. 1994 : 190-194, 508.
22. 文濬典, 安圭錫, 崔昇勳. 東醫病理學. 서울 : 고문사. 1993 : 76.
23. 沈吉浩. 老化의 槪念과 豫防. 서울 : 成文出版社. 1987 : 15-17.
24. Ames, B. N., Cahcart, R., Schwiers, E. and Hochstein, P. : Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer. A Hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981 ; 78 : 6858-6862.
25. Aruoma, O. I., Kaur, H. and Halliwell, B. : Oxygen free radicals and human diease. *J. Roy. Soc. Health.* 1991 ; 111 : 172-177.
26. Bishov, S. j., Masuoka, Y and Kapsalis, J. G. : Antioxidant effect of spices herbs and hydrolyzates in freeze dried model system synergistic action with synthtic antioxidants. *J. Food Proc. Preserv.* 1977 ; 1 : 153-159.
27. Chang, S. S., Biserka, O. M., Olive A. L. and Huang, C. L. : Natural antioxidants from rosemary and sage. *J. Food Sci.* 1977 ; 42 : 1102-1107.
28. Fukuda, Y., Osawa T., Kawagishi, S. and Namiki, H. : Oxdative stability of foods fried with sesame oil. *N. S. K. G.* 1988 ; 38 : 28-30.
29. Kim, S. W., Kim, E. S. and Kim, Y. S. : Studies on the polysaccharide extracted from Ganderma Lucidum. *J. Kor. Soc. Food Sci. Natr.* 1995 ; 24 : 147-150.
30. Kim, Y. J., Kim, C. K. and Kwon, Y. J. : Isolation

of antioxidative components of Perillae semen. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 1997 ; 29 : 38-44.

31. Naom, M., Gestetner, B., Bondi, A. and Birk, Y. : Antioxidantive and antihemolytie of sobean isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* 1976 ; 24 : 1174-1176.
32. Lin, C. C., Wu, S. J., Chang, C. H. and Ng, L. T. : Antioxidant activity of *Cinnamomum cassia. Phytother. Res.* 2003 ; 17 : 726-730.
33. Wei, Z., Bai, O., Richardson, J. S., Mousseau, D. D. and Li, X. M. : Olanzapine protects PC12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *J. of Neuro. Res.* 2003 ; 73 : 364-368.
34. Philip M. : The use of the stable free radical diphenylricrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004 ; 26 : 211-219.
35. Abdalla, A. E and Roozen, J. P. : Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chem.* 1999 ; 64 : 323-329.
36. Hermes, L. M. and Storey, K. B. : Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am J Physiol.* 1995 ; 268 : 1386-1393.
37. Aritake, K., Wakai, S., Asano, T. and Takakura, K. : Peroxidation of arachidonic acid and brain edema. *No To Shinkei.* 1983 ; 35 : 965-973.
38. Kryzhanovskii, G. N., Nikushkin, E.V., Braslavskii, V. E. and Glebov, R. N. : Lipoperoxidation in the hyperactive focus of rat cerebral cortex. *Biull Eksp Biol Med.* 1980 ; 89 : 14-16.