

호도약침액이 가토 뇌조직의 Na⁺-pump 활성 장애 개선에 미치는 영향

김동훈 · 송종욱¹ · 이상길^{2,3} · 김주현⁴ · 홍용근^{1,2,3*}

김동훈 한의원, ¹인제대학교 대학원 뇌과학협동과정, 인제대학교 의생명공학대학, ²물리치료학과, ³심혈관 및 대사성질환 연구센터, ⁴경상대학교 수의과대학 수의학과 및 동물의학연구소

The Effect of Juglandis Semen Extract on Improvement of tBHT-induced Na⁺-pump Inactivity in Rabbit Cerebral Cortex

Dong-hoon Kim, Jong-wook Song¹, Sang-kil Lee^{2,3}, Joo-heon Kim⁴, Yonggeun Hong^{1,2,3*}

Kim Dong-hoon Oriental Medical Clinic, ¹Graduate Program in Neuroscience, ²Department of Physical Therapy, ³Cardiovascular & Metabolic Disease Center, College of Biomedical Science & Engineering, Inje University, Gimhae 621-749, Korea, ⁴Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract – This study was undertaken to determine whether Juglandis Semen (JAS) extract exerts protective effect against oxidant-induced inhibition of Na⁺-pump activity in cerebral cortex. Na⁺-pump activity was estimated by measuring ouabain-sensitive oxygen consumption. The oxygen consumption significantly inhibited by 1 mM t-butylhydroperoxide (tBHP), which was prevented by addition of 2% JAS extract. The oxygen consumption was increased by an increase in Na⁺ concentration from 5 to 100 mM, K⁺ concentration from 0.5 to 10 mM, and Mg²⁺ concentration from 0.2 to 5 mM. These changes in ion concentrations did not affect the inhibitory effect of tBHP and protective action of JAS on oxygen consumption. tBHP (1 mM) produced a significant increase in lipid peroxidation in cerebral cortex, which was prevented by 2% JAS extraction. These results suggest that JAS exerts protective effect against tBHP-induced inhibition of Na⁺-pump activity in the cerebral cortex, probably through action as antioxidant.

Key words – Juglandis Semen (JAS), Na⁺-pump, t-butylhydroperoxide (tBHP), cerebral cortex

세포막에 존재하는 능동적 이동기전(active transport mechanism)인 Na⁺-pump의 Na⁺-K⁺-ATPase에 의하여 Na⁺이 세포 안에서 밖으로 이동되고 K⁺은 세포밖에서 안으로 이동되며,¹⁾ Na⁺의 이동으로 신경세포나 심근세포에서 안정막 전압이 유지되므로 흥분의 전달이나 근육의 수축 등 여러 생체에 중요한 생리적 기능이 수행되고 있다. 따라서 Na⁺-pump가 손상되었을 때 신경의 정상기능에 치명적인 장애가 유발 된다.^{2,3)}

대뇌 세포막은 반응성 산소기의 공격대상인 불포화 지방산을 많이 함유하고 있기 때문에 이들에 의한 세포손상이 흔하게 나타날 수 있으며, 또한 뇌세포는 내재성 항산화제인 catalase, glutathion peroxidase, vitamin E의 함유량이 매우 낮기 때문에 반응성 산소기에 의해 손상받기 쉽다.⁴⁾

반응성 산소기가 지질에 작용하여 과산화유발하게 되면 세포막의 투과성이 증가되고,^{5,6)} Na⁺-pump와 같은 세포막을 통과한 능동적 물질이동계가 억제되어 세포기능에 장애가 유발 되며,^{7,8)} 조직에서 Na⁺-pump가 지질의 과산화에 의해 현저하게 저해되고 있음이 보고된 바 있다.⁹⁾

내경(內經)에서는 뇌에 대해 기항지부(奇恒之府),¹⁰⁾ 주지해(髓之海),¹⁰⁾ 정명지부(精明之府)¹⁰⁾라 하여, 중추신경의 기능활동을 의미하는 음양표리(陰陽表裏)의 장부(臟腑)라 하였다.¹¹⁾

호도는 보신(補腎), 온신약물(溫腎藥物)로서, 성미(性味)가 감(甘), 온(溫), 열(熱)하고 신장(腎)과 폐(肺)에 기경(歸經)하여, 삼정고신(滋精固腎), 온폐윤장(溫肺潤腸), 통명문(通命門), 이삼초(利三焦), 염폐정천(斂肺定喘), 보기양혈(補氣養血), 통윤혈맥(通潤血脈), 윤기(潤肌), 이소변(利小便), 치석림(治石淋) 등의 효능을 가진 약물이다.¹²⁻¹⁶⁾

*교신저자(E-mail) : yonghong@inje.ac.kr
(FAX) : 055-329-1678

최근 김 등¹⁷⁾은 호도약침액이 항산화효소의 활성에 대하여 유의한 효능이 있음을 보고한 바 있다.

이에 산화제에 의한 뇌조직의 Na⁺-pump의 활성 장애에 의한 호도약침액의 효과를 살펴보기 위해 Na⁺-pump의 활성과 지질의 과산화도를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험동물 - 실험에 사용한 동물은 체중 1.5-2.0 kg의 New Zealand산 백토 성토를 공인된 공급업체(효창 Science Co. 한국)에서 구입하여 자용 구별 없이 사용하였다.

약제 - 실험에 사용한 한국산 호도(Juglandis Semen)는 부산시 소재 전문업체에서 구입하여 정선 사용하였다.

약침액의 추출 - 호도육 500 g을 methyl alcohol로 추출한 후 *n*-hexane과 methyl alcohol이 1:1의 비로 된 혼합액속에 넣고 진탕하여 *n*-hexane층을 분리 제거하고 methyl alcohol층에 남은 성분을 농축하여 약 6 g이 되게 하였으며, 이를 측정용 용액속에 과포화 농도가 되게 녹여 사용하였다.

Na⁺-pump의 활성 측정 - 뇌조직에서 Na⁺-pump의 활성은 가토의 대뇌지질을 들어내어 냉한 saline 용액내에 담긴 다음 Stadie-Rigg's microtome으로 약 0.3-0.5 mm 두께의 뇌지질 절편을 만들어 사용하였다. 뇌지질 절편에서 산소소모량은 oxygen monitor (Yellow Spring Instrument Co., model 53)를 이용하여 측정하였다. 약 50 mg의 조직절편을 측정용액(100 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.23 mM MgSO₄, 15 mM phosphate buffer, pH 7.4, 24 mM glucose)이 들어 있는 측정용기 속에 넣고 15분 동안 산소 소모량을 Clark electrode를 이용하여 측정하였다. 산소 소모량을 1 mM ouabain이 들어있는 용액과, 들어있지 않은 용액내에서 측정하는 다음 그 산도를 Na⁺-pump의 활성으로 하였으며 뇌조직의 단백질 농도는 Bradford 방법¹⁸⁾으로 측정하였다.

Lipid peroxidation 측정 - 세포막 지질의 과산화 농도는 그 산물인 malondialdehyde (MDA) 양을 Uchiyama와 Mihara방법¹⁹⁾으로 측정하여 평가하였다. 간단히 설명하면, 뇌조직을 차가운 1.15% KCl 용액(5% wt/vol) 속에서 파쇄하였다. 이 파쇄조직의 지질액 0.5 ml에 1% 린산 용액 3 ml와 0.6% thiobarbituric acid 용액 1 ml를 첨가하여 끓는 물에서 45분간 가열하였다. *n*-Butanol 4 ml를 첨가하여 완전히 섞은 다음 2,000×g에서 20분간 원심분리한 후, 상층액의 흡광도를 536과 520 nm에서 측정하였다. MDA 값은 단백질 1 mg당 pmole로 표시하였다.

통계 처리 - 성적은 평균값±표준편차로 나타내었으며, 평균값간의 유의성은 Student's *t*-test²⁰⁾를 사용하여 검증하였고 *p*값이 0.05미만일 때 유의한 것으로 결정하였다.

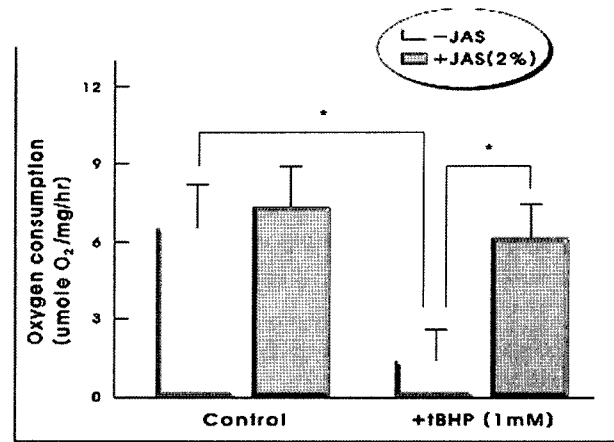


Fig. 1. Effect of Juglandis Semen (JAS) extract on tBHP-induced inhibition of ouabain-sensitive oxygen consumption in homogenate of cerebral cortex. The oxygen consumption was measured at 37°C for 15 min in a buffer containing 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.25 mM MgSO₄, 15 mM phosphate buffer (pH 7.4), and 24 mM glucose in the presence of JAS and/or 1 mM tBHP. Data are mean±SE. (**p*<0.05).

결 과

호도약침액이 Na⁺-pump 활성에 미치는 영향 - 정상조직에서 산소소모량은 6.46±1.26 μmole O₂/mg/hr였으며, t-butylhydroperoxide(tBHP) 1 mM을 처리하였을 때 그 값은 1.36±1.26 μmole O₂/mg/hr으로 유의성(*p*<0.05)있는 감소를 보였다. 그러나 tBHP를 처리한 용액내에 2% 호도약침액을 첨가하였을 때 산소소모량은 6.15±1.42 μmole O₂/mg/hr로 유의성(*p*<0.05)있는 증가를 보였다(Fig. 1).

Incubation 용액내의 Na⁺ 농도변화의 효과 - Na⁺ 농도를 5와 100 mM로 변화시키고 tBHP의 유리효과를 조사한 결과, Na⁺ 농도가 5 mM일 때 산소소모량이 2.23±0.46 μmole O₂/mg/hr에서 0.97±0.05 μmole O₂/mg/hr로 유의성(*p*<0.05)있게 감소되었고, Na⁺ 농도가 100 mM일 때 산소소모량은 8.26±1.26 μmole O₂/mg/hr에서 1.08±0.27 μmole O₂/mg/hr로 유의성(*p*<0.05) 있게 감소되었다. 호도약침액을 투여하였을 때, Na⁺ 농도가 5 mM일 때 2.26±0.17 μmole O₂/mg/hr, 100 mM일 때 7.37±1.26 μmole O₂/mg/hr으로 두 경우 유의성(*p*<0.05)있게 회복되었다(Fig. 2).

Incubation 용액내의 K⁺ 농도변화의 효과 - 용액내의 K⁺ 농도를 0.5와 10 mM로 변화시키고 tBHP의 유리효과를 조사한 결과 K⁺ 농도가 0.5 mM일 때 산소 소모량이 1.67±0.14 μmole O₂/mg/hr에서 0.56±0.05 μmole O₂/mg/hr로 유의성(*p*<0.05) 있게 억제되었고, K⁺ 농도가 10 mM일 때 산소소모량이 6.57±0.46 μmole O₂/mg/hr에서 1.08±0.27 μmole O₂/mg/hr로 유의성(*p*<0.05) 있게 억제되었다. 호도약침액을 투여하였을 때, K⁺ 농도가 0.5 mM일 때 1.57±

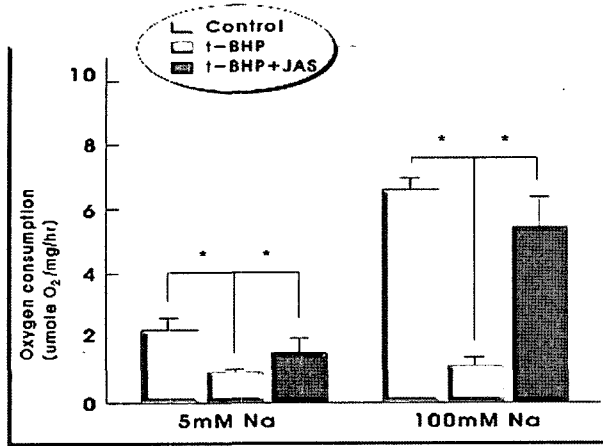


Fig. 2. Effect of Juglandis Semen (JAS) extract on tBHP-induced inhibition of ouabain-sensitive oxygen consumption in the presence of two Na⁺ concentrations in homogenate of cerebral cortex. The oxygen consumption was measured at 37°C for 15 min in a buffer containing 5 or 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.25 mM MgSO₄, 15 mM phosphate buffer (pH 7.4), and 24 mM glucose in the presence of JAS and/or 1 mM tBHP. Data are mean±SE. (**p*<0.05).

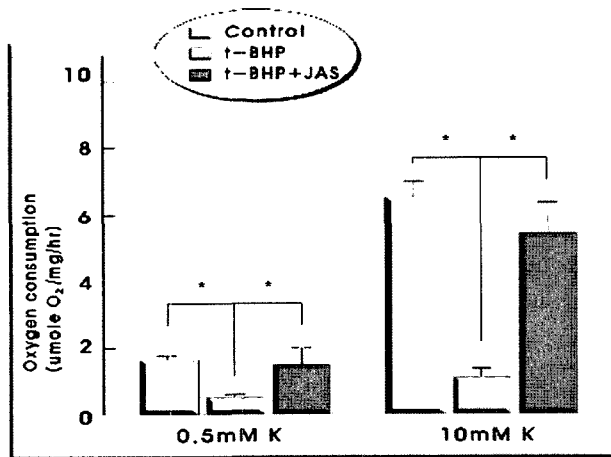


Fig. 3. Effect of Juglandis Semen (JAS) extract on tBHP-induced inhibition of ouabain-sensitive oxygen consumption in the presence of two K⁺ concentrations in homogenate of cerebral cortex. The oxygen consumption was measured at 37°C for 15 min in a buffer containing 100 mM NaCl, 0.5 or 10 mM KCl, 1.25 mM MgSO₄, 15 mM phosphate buffer (pH 7.4), and 24 mM glucose in the presence of JAS and/or 1 mM tBHP. Data are mean±SE. (**p*<0.05).

0.47 μmole O₂/mg/hr, 10 mM일 때 5.32±1.14 μmole O₂/mg/hr으로 두 경우 모두 유의성(*p*<0.05) 있게 회복되었다 (Fig. 3).

Incubation 용액내의 Mg²⁺ 농도변화의 효과 - 용액내의 Mg²⁺ 농도를 0.2와 5 mM로 변화시키고 tBHP의 억제효과를 조사한 결과 Mg²⁺ 농도가 0.2 mM일 때 효소의 활성은

1.45±0.11 μmole O₂/mg/hr에서 0.65±0.06 μmole O₂/mg/hr로 유의성(*p*<0.05)있게 억제되었고, Mg²⁺ 농도가 5 mM일 때 효소의 활성이 8.07±1.39 μmole O₂/mg/hr에서 2.36±0.19 μmole O₂/mg/hr로 유의성(*p*<0.05) 있게 억제됨으로써 Mg²⁺ 농도 변화에 따라 tBHP의 억제효과는 영향을 받지 않았다. 호도약침액을 투여하였을 때, Mg²⁺ 농도가 0.2 mM일 때 1.08±0.09 μmole O₂/mg/hr, 5 mM일 때 7.64±1.62 μmole O₂/mg/hr으로 두 경우 모두 유의성(*p*<0.05)있게 회복되었다(Fig. 4).

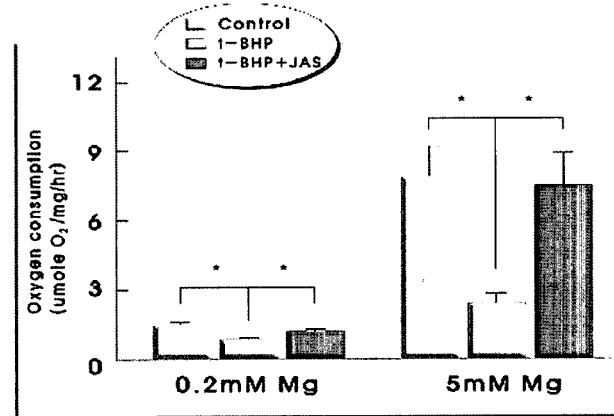


Fig. 4. Effect of Juglandis Semen (JAS) extract on tBHP-induced inhibition of ouabain-sensitive oxygen consumption in the presence of two Mg²⁺ concentrations in homogenate of cerebral cortex. The oxygen consumption was measured at 37°C for 15 min in a buffer containing 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.2 or 5 mM MgSO₄, 15 mM phosphate buffer (pH 7.4), and 24 mM glucose in the presence of JAS and/or 1 mM tBHP. Data are mean±SE. (**p*<0.05).

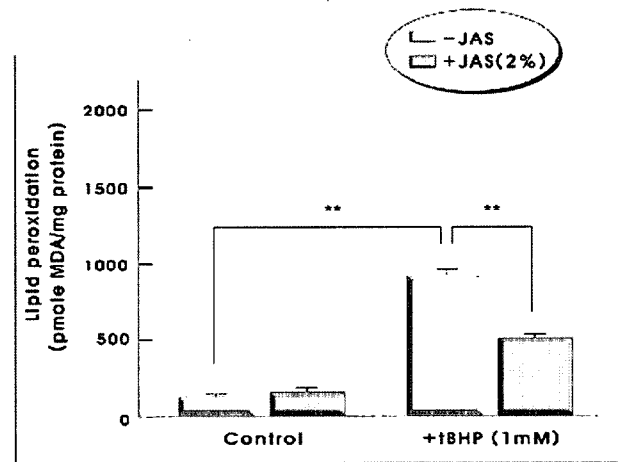


Fig. 5. Effect of Juglandis Semen (JAS) extract on lipid peroxidation induced by tBHP in homogenate of cerebral cortex. The tissues was treated with 1 mM tBHP at 37°C for 60 min in the presence and absence of 2% JAS. Data are mean±SE. (***p*<0.01).

tBHP에 의한 지질의 과산화에 대한 호도약침액의 효과 - 뇌조직을 1 mM tBHP에 노출시켰을 때, 지질의 과산화는 143.47 ± 20.43 pmole MDA/mg protein에서 895.68 ± 45.95 pmole MDA/mg protein으로 증가함으로써 지질의 과산화가 유의성($p < 0.01$)이 있게 현저히 증가되었음을 알 수 있었다. tBHP의 존재하에서 호도약침액을 2% 농도가 되게 첨가하였을 때, tBHP에 의해 증가되었던 지질의 과산화는 539.46 ± 32.38 pmole MDA/mg protein으로 유의성($p < 0.01$)이 현저하게 감소되는 경향을 보였다(Fig. 5).

고 찰

뇌는 영추·경맥편(靈樞·經脈篇)¹⁰에 “인시생 선성정 정성 이뇌수생(人始生 先成精 精成而腦髓生)”이라 하고, 소문·해정미론(素問·解精微論)¹⁰에 “뇌자음야(腦者陰也) 수자골지 충야(髓者骨之充也)...수지정위지(水之精爲志) 화지정위신(火之精爲神) 수하상감(水火相感) 신지구비(神志俱悲) 시이목지 수생야(是而目之水生也)”라 하였으며, 소문·오장생성론(素問·五藏生成論)¹⁰에 “제수야(諸髓者) 개속어뇌(皆屬於腦)”라 하였으며, 소문·골공론(素問·骨空論)¹⁰에 “독맥자(督脈者) 여태 양기어목내자(與太陽起於目內眥) 상액교전(上額交巔) 상입 락뇌(上入絡腦)”라 하여 뇌수는 운동기능, 감각, 지각기능을 영위함을 알 수 있으니, 중추신경, 말초신경 및 자율신경을 영위하는 기관으로 표현되고 있다.¹¹⁾

또한, 영추·해론(靈樞·海論)¹⁰에 “뇌위수지해(腦爲髓之海), 기수상재어기개(其輸上在於其蓋), 하재풍부(下在風府), 수해유여칙경경다력(髓海有餘則輕勁多力), 자과기도(自過其度), 수해부족칙(髓海不足則) 뇌전이명(腦轉耳鳴), 경산현모(脛痠眩冒), 목무소견(目無所見), 해태안와(懈怠安臥)”라 하였으며, 소문·맥요정미론(素問·脈要精微論)¹⁰에 “두자(頭者) 정명지부(精明之府), 두경시심(頭傾視深), 정신장탈의(精神將奪矣)”라 하였으며, 영추·구문편(靈樞·口問篇)¹⁰에 “상기부족(上氣不足) 뇌위지불만(腦爲之不滿) 이위지고명(耳爲之苦鳴) 두위지고경(頭爲之苦傾) 목위지현(目爲之眩)”이라 하였으며, 영추·경맥편(靈樞·經脈篇)¹⁰에 “방광족태양지맥(膀胱足太陽之脈) 기어목내자(起於目內眥) 상액교전(上額交巔) 기지자(其支者) 종전지이상각(從巔至耳上角) 기직자(其直者) 종전입락뇌(從巔入絡腦)...시동척병충두통(是動則病衝頭痛) 목사팔(目似脫) 향여발(項如拔) 척통(脊痛) 요사절(腰似折) 비불가이곡(脾不可以曲) 껍여결(膈如結) 단여열(踰如裂) 시위과결(是爲踝厥) 시주근(是主筋) 소생별자(所生病者) 치(痔) 학(瘡) 광(狂) 전질(癱疾) 두신항통(頭顛項痛)”이라 하여, 뇌수와 관련된 질환들을 표현하고 있다.

호도는 호도나무과(호도과: Juglandaceae)에 속한 낙엽교목인 호도나무과실의 종인^{21,22)}으로 핵도육, 핵도인, 당추자들의 다른 이름이 있으며, 성(性)은 온(溫), 열(熱), 무독(無

毒)하고, 미(味)는 감(甘)하며, 폐경(肺經), 신경에 입(入)한다. 주 성분은 linoleic acid, oleic acid 등을 주로 한 지방유가 40-50%, 단백질, 당분, 회분, vitamin A·B·C·E 등이라고 알려져 있으며,²³⁾ 장양고정(壯陽固精)·통명문(通命門)·리삼초(利三焦)·윤장위(潤腸胃)·자양강장(滋養強壯)·항로쇠(抗老衰)·건뇌(健腦)·통윤혈맥(通潤血脈)·윤기(潤肌)·리소편(利小便) 등의 효능으로 요통각약(腰痛脚弱)·양위(陽痿)·유정(遺精)·장조편비(腸燥便秘)·신허해수(腎虛咳嗽)·심복산통(心腹疼痛)·혈리장풍(血痢腸風)·산종독(散腫毒)·발두창(發頭瘡)·제동독(制銅毒) 등의 주치증을 가진다.¹²⁻¹⁶⁾

tBHP는 tert-Butylhydroperoxide(C₄H₁₀O₂)로서 중합반응(polymerization reaction)을 일으키는 촉매로 작용하며, radical의 치환반응(substitution reaction)을 일으키는 peroxy group의 산화제로 널리 사용되고 있는 약물이다.²⁴⁾

Na⁺-pump는 세포내외의 Na⁺과 K⁺의 분포를 조절하여 신경과 근육의 작용을 가능하게 하고, 세포의 용질을 일정하게 유지시키며, 체내 전해질함량과 삼투질 농도 조절에 기여하고 세포내 효소작용을 위한 적절한 조건을 부여하는 등 정상적인 세포의 기능에 중요한 역할을 하고 있으며,²⁵⁾ 특히 뇌세포에서는 안정막전압의 발생과 유지 및 흥분의 전달 등 신경세포의 기능에 결정적인 역할을 하고 있다.

Na⁺-pump는 세포막에 존재하기 때문에 이의 활성을 알아보기 위하여는 세포막을 분리하여 화학적인 방법으로 Na⁺-K⁺-ATPase 활성을 측정하여 평가하고 있으나, 이 방법은 세포가 살아 있는 상태에서 측정하는 방법이 아니기 때문에 정확한 Na⁺-pump 활성이라고 보기가 힘들다. 살아있는 세포에서는 ouabain-sensitive oxygen consumption을 측정하여 평가하고 있는데, 살아 있는 세포는 생존을 위해 계속 산소를 사용하고 있으므로, Na⁺-pump를 억제시킨 상태에서 산소소모량을 측정하게 되면, 세포가 사용하는 총산소량에서 그 값을 감하여 Na⁺-pump가 사용하는 산소소모량을 산정할 수가 있다.

본 실험에서는 1 mM ouabain을 처리하게 되면 Na⁺-pump 활성이 완전히 억제된다는 사실을 이용하여 뇌피질절편에서 ouabain이 없는 용액 내에서 총 산소소모량을 측정하고, 1 mM ouabain을 처리한 상태에서 산소소모량을 측정하여 Na⁺-pump 활성으로 결정 하였다. Akera 등²⁶⁾과 Gubitz 등²⁷⁾도 이러한 방법으로 살아있는 신경세포에서 Na⁺-pump 활성을 측정하였다.

Superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등과 같은 반응성 산소기(reactive oxygen species)들은 노화, 암 유발 및 뇌빈혈과 관계가 있을 뿐만 아니라,^{28,29)} 파킨슨병, 알츠하이머병, 허혈성 신경손상 및 간질을 포함한 여러 가지 급성 및 만성 신경성 질환의 병인으로 인정되고 있다.^{30,33)} 이들 반응성 산소기들이 정상적인 세포에서도 발생되고 있으나, 몸속에는 또한 이들의 유해산소기들을 제거하는 효소나 물질들을 가지고 있어, 세포속에서 발생하는 유해산소기

들이 세포손상을 일으키지 못하도록 조절하는 항산화효소가 존재하고 있다.^{34,35)} 따라서 외부자극에 의해 세포내에서 반응성 산소기들이 과량으로 발생하거나, 유해효소에 대한 방어기전들의 기능이 저하되면 세포는 손상을 받게 될 것이다.

그림 1은 oxidant인 tBHP가 Na⁺-pump 활성화에 어떤 영향을 미치며, 또한 호도약침액이 정상 조직 및 tBHP를 처리한 조직에서 효소의 활성화에 어떤 영향을 미치는지를 관찰한 결과이다. 그림에서 보는 바와 같이 산소소모량은 tBHP에 의해 유의성있는 감소를 보였고, tBHP를 처리한 용액내에 2% 호도약침액을 첨가하였을 때 산소소모량은 유의성 있는 증가를 보였다. 호도약침액을 정상조직에 첨가하였을 때에는 산소소모량에 유의한 변화를 보이지 않았다.

Na⁺-pump 활성화는 Na⁺, K⁺ 및 Mg²⁺에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있기 때문에³⁾ tBHP 및 호도약침액의 효과가 이들 이온들의 농도변화에 따라 영향을 받을 수도 있다. 따라서 본 연구에서 이들 이온들의 농도를 변화시키고 tBHP의 억제작용 및 호도약침액의 회복효과를 조사하였다.

본 실험에서는 ouabain-sensitive oxygen consumption^o 용액내의 Na⁺, K⁺, Mg²⁺의 농도가 증가함에 따라 세포막을 분리하여 화학적으로 측정된 보고들과 일치하였다.^{3,36,37)}

그림 2는 용액내 Na⁺ 농도를 변화시키고 조사한 결과이다. 이 그림에서 보는 바와 같이 용액내의 Na⁺ 농도를 5 mM과 100 mM로 변화시키고 tBHP의 억제효과를 조사한 결과, 두 농도 모두 유의하게 억제되었다. Na⁺ 농도변화에 따른 호도약침액의 회복효과를 조사한 결과, Na⁺ 농도가 5 mM일 때와 100 mM일 때 모두 tBHP에 의한 산소소모량은 2% 호도약침액에 의해 유의하게 회복되었다.

그림 3은 용액내 K⁺ 농도를 변화시키고 조사한 결과이다. 이 그림에서 보는 바와 같이 용액내의 K⁺ 농도를 0.5와 10 mM로 변화시키고 tBHP의 억제효과를 조사한 결과, 두 농도 모두 유의하게 억제되었고, tBHP에 의한 산소소모량의 억제작용을 회복시키는 호도약침액의 효과가 K⁺ 농도변화에 따라 영향을 받는 지를 조사한 결과, K⁺이 0.5 mM일 때와 10 mM일 때 모두 호도약침액 첨가는 거의 정상수준까지 유의하게 산소소모량을 회복시켰다.

그림 4는 용액내 Mg²⁺ 농도를 변화시키고 조사한 결과이다. 이 그림에서 보는 바와 같이, 용액내의 Mg²⁺ 농도를 0.2 mM과 5 mM로 변화시키고 tBHP의 억제효과를 조사한 결과, 두 농도 모두 유의하게 억제되어 농도변화에 따른 tBHP의 억제효과는 영향을 받지 않았다. 또한 tBHP에 의한 효소의 억제작용을 회복시키는 호도약침액의 효과가 Mg²⁺의 농도 변화에 따라 영향을 받는 지를 조사한 결과, 호도약침액은 Mg²⁺의 농도가 0.2 mM일 때와 5 mM일 때 모두 tBHP의 억제 작용을 유의성 있게 회복시켰다.

상기 결과와 같이 Na⁺-pump는 용액내의 Na⁺, K⁺ 및 Mg²⁺에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있기 때문에, Na⁺-pump

활성을 억제하는 약물들의 작용은 이들 이온들의 작용을 방해함으로써 나타날 수 있다. 그러나 본 연구에서 tBHP에 의한 억제는 용액내의 Na⁺, K⁺ 또는 Mg²⁺ 농도 변화에 따라 영향을 받지 않음으로써 tBHP가 Na⁺-pump와 이들 이온들과의 상호작용에는 영향을 미치지 못함을 가리키고 있다. 또한, 호도약침액의 회복작용도 용액내의 여러 전해질들의 농도변화에 따라 영향을 받지 않음으로써 호도약침액이 Na⁺-pump에 대한 이들 이온들의 작용을 변화시켜 회복작용을 나타내고 있지 않음을 알 수 있다.

tBHP에 의한 효소의 활성을 회복시키는 호도약침액의 효과가 지질의 과산화를 감소시킴으로써 나타나는 지를 확인하기 위하여 tBHP에 의해 유발된 지질의 과산화에 대한 호도약침액의 효과를 조사하였다.

그림 5에서 보는 바와 같이 뇌조직을 1 mM tBHP에 노출시켰을 때 지질의 과산화는 현저한 유의성이 있는 증가를 나타냈으며, 호도약침액을 2% 농도가 되도록 첨가하였을 때 tBHP에 의해 증가되었던 지질의 과산화는 현저한 유의성이 있는 감소현상을 보였다. 정상조직에 호도약침액을 처리했을 때는 지질의 과산화가 영향을 받지 않았다. 본 실험에서 산소소모량이 tBHP에 의해 억제되어 Na⁺-pump활성이 oxidant에 의해 저해되고 있음을 보였다. 이러한 결과는 Sun⁹⁾이 원숭이의 대뇌피질에서 분리한 Na⁺-K⁺-ATPase 활성이 지질의 과산화에 의해 억제된다는 결과와 일치한다.

이상의 실험결과, 호도는 tBHP에 의한 산소소모량 억제를 강력하게 회복시키는 효과가 있음을 보임으로써, 독성 약물이나 산화제들에 의한 세포기능 장애를 예방, 치료할 수 있는 약물로 개발될 수 있을 가능성을 보였다. 이러한 활성은 어떠한 기전을 통하여 회복시키는지는 추가적인 연구해 통해 밝혀질 것으로 생각된다.

결 론

뇌조직의 Na⁺-pump 활성화 장애에 대하여 호도약침액의 효과를 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. tBHP 처리로 감소된 산소소모량이 2% 호도약침액의 첨가로 Na⁺-pump 활성화에 의한 산소소모량이 유의적으로 증가하였다.
2. Na⁺ 농도 변화에 의해 감소된 산소소모량이 2% 호도약침액의 첨가로 인해 유의적으로 증가하였다.
3. K⁺ 농도 변화에 의해 감소된 산소소모량이 2% 호도약침액의 첨가로 인해 유의적으로 증가하였다.
4. Mg²⁺ 농도 변화에 의해 감소된 산소소모량이 2% 호도약침액의 첨가로 인해 유의적으로 증가하였다.
5. tBHP에 의해 유의적으로 증가된 뇌조직의 지질 과산화는 2% 호도약침액의 첨가에 의해 유의적으로 현저히 감소하였다.

사 사

본 연구는 농림부 바이오장기 생산 연구사업의 연구비(번호 200508010801) 지원을 받아 수행되었음.

인용문헌

1. Albers, R. W. (1967) Biochemical aspects of active transport, *Ann. Rev. Biochem.*, **36**: 727-756.
2. Hokin, L. E. and Dahl, J. L. (1972) *The sodium-potassium adenosinetriphosphatase*, In: *Metabolic Pathways, 3rd ed., VI. Metabolic Transport*, Edited by Hokin KE, 270-315, Academic Press Inc.
3. Schwartz, A., Lindenmayer, G. E. and Allen, J. C. (1975) The sodium-potassium adenosine triphosphatase, Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol Rev.*, **27**: 3-134.
4. Olanow, C. W. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration, *Trends-Neurosci.*, **16**: 439-444.
5. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.*, **59**: 527-605.
6. Arstila, A. U. (1972) Microsomal lipid peroxidation, *Morphological Characterization Science*, **175**: 530-533.
7. Koko, K., Kato, M., Matsuoka, T. and Mustapha, A. (1988) Depression of membrane-bound $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity induced by free radicals and by ischemia of kidney, *Am. J. Physiol.*, **254**: C330-C337.
8. Andreoli, V. (1993) Phosphatidyl serine synthesis in rat cerebral cortex: effects of hypoxia, hypocapnia and development, *Mol-Cell-Biochem.*, **126**: 101-107.
9. Sun, A. Y. (1972) The effect of lipoxidation on symptosomal ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) isolated from the cerebral cortex of squirrel monkey, *Biophys Acta*, **266**: 350-360.
10. 홍원식 (1983) 정교황제내경소문, 39, 42, 57, 81, 159, 174, 209, 327, 동양의학연구원출판부, 서울.
11. 구분홍, 이경섭, 배형섭, 김영석, 이원철 (1991) 동의심계 내과학, 27, 36, 서원당, 서울.
12. 양동희 (1991) 본초비요해석, 432, 국홍출판사, 신죽.
13. 리시진 (1991) 본초강목(하권), 1803-1804, 일중사, 서울.
14. 황궁 (1981), 본초구진, 49, 광업서국, 대북.
15. 윤길영 (1992) 동의림상방제학, 606, 명보출판사, 서울.
16. 지형주, 이상인 (1989), 대한약전의 한약(생약)규격집, 421, 한국 메디칼인텍스사, 서울.
17. 김영해, 김갑성 (1996) 호도약침액의 항산화효과에 대한 연구 II. oxidant에 의한 세포손상을 방지하는 기전, 대한 침구학회지, **13**(2): 54-66.
18. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**: 248-524.
19. Uchiyama, M. and Mihara, M. (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test, *Anal. Biochem.* **86**: 271-278.
20. Snedecor, G. H. and Cochran, W. G. (1967) *Statistical methods*, 6th ed. 432-465, Iowa State Univ. Ames, USA.
21. 신민교 (1986) 원색림상본초학, 194, 영림출판사, 서울.
22. 이재희 (1985) 도설 한방약리·약능의 임상응용, 577, 학림사, 서울.
23. 리상인 외 (1986) 한약림상응용, 194-195, 정보사, 서울.
24. Susan Budavari (1996) *Merck Index 12th edition*, 259, Merck & Co. Inc. New Jersey, USA.
25. 강두희 (1988) 인체생리학 3판, 20-27, 신광출판사, 서울.
26. Akera, T., Gubitz, R. H., Brody, T. M. and Tobin, T. (1979) Effects of monovalent cations on ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) in rat brain slices, *Eur. J. Pharmacol.*, **55**: 281-292.
27. Gubitz, R. H., Akera, T. and Brody, T. M. (1977) Control of brain slice respiration by ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$)-activated adenosine triphosphatase and the effects of enzyme inhibitors, *Biochem Biophys Acta*, **459**: 263-277.
28. Floyd, R. A. (1990) Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia, *FASEB J.*, **4**: 2587-2597.
29. Reiter, R. J. (1995) Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain, *FASEB J.*, **9**: 526-533.
30. M_cord, J. M. (1985) Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury, *New Engl. J. Med.*, **312**: 159-163.
31. Halliwell, B. (1989) 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.
32. Traystman, R. J. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion, *J. Appl Physiol.*, **71**: 1185-1195.
33. Brondy, S. C. and Lebel, C. P. (1993) The relationship between cytotoxicity and oxidative stress in the CNS, *Free Radic Biol. Med.*, **14**: 633-642.
34. Halliwell, B. (1995) Antioxidant characterization. methodology and mechanism, *Biochem Pharmacol.*, **49**: 1341-1348.
35. Jaeschke, H. (1995) Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **209**: 104-111.
36. Skou, J. C. (1960) Further investigation on a $\text{Ca}^{2+}\text{-Na}^+\text{-ATPase}$ activated adenosine triphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane, *Biophys Acta*, **42**: 6-23.
37. Whittam, R. and Ager, M. E. (1964) Vectoral aspects of adenosine-triphosphatase activity in erythrocyte membrane, *Biochem J.*, **93**: 337-348.

(2006년 9월 8일 접수)