

平胃散 藥鍼液의 활성산소 및 활성질소 소거능

이호승 · 문진영*

심혈관계질환 천연물개발연구센터 & 동국대학교 한의과대학 경혈학교실

Scavenging Property of Pyungwi-san Herbal-acupuncture Solution on ROS and RNS

Hyo Seung Yi, Jin Young Moon *

Cardiovascular Medical Research Center and Department of AM-Pointology, College of Korean Medicine, Dongguk University

Pyungwi-san(PWS) have been using as a basic prescription of digestive disorder in Korean traditional medicine. This study was performed to examine the in vitro antioxidant activity of the extract using different antioxidant tests including by 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH) radical scavenging, superoxide anion radical scavenging, metal chelating hydrogen peroxide scavenging, lipid peroxydation protective effect and scavenging effect of nitric oxide and peroxynitrite. Herbal-acupuncture solution of PWS(PWS-HS) exhibited a concentration-dependent inhibition of DPPH radical adduct formation and it showed dose-dependent free radical scavenging activity onto superoxide anions. In addition, the result of metal chelating hydrogen peroxide scavenging and ammonium thiocyanate experiments showed that PWS-HS was an active scavenger of hydroxyl radicals. Furthermore, it was also found to be effective in scavenging nitric oxide and peroxynitrite, well-known cytotoxic species that can oxidize several cellular components such as proteins, lipids and DNA.

Key words : Pyungwi-san(PWS), PWS-HS, antioxidant, free radical

서 론

심혈관계질환(cardiovascular disease: CVD)은 우리나라에서 사망원인 2위를 차지하는 중대 질병으로 病因에 따라 선천성, 류마티스성, 고혈압성 및 동맥경화성으로 분류되며, 이 중 동맥경화는 동맥벽에 cellular element의 축적을 포함하는 하나의 복잡한 과정으로 이 과정을 유발시키는 원인에 있어서 산화적 손상은 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{1,3}. 특히 superoxide anion(O₂⁻·), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxyl radical(·OH) 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 peroxynitrite (ONOO⁻), nitric oxide(NO)와 같은 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)에 의한 산화적 손상이 동맥경화 및 심혈관계질환의 발병과 진행에 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다⁴.

平胃散은 宋代에 편찬된 《太平惠民和劑局方》에 최초로 수록된 처방으로 脘腹脹滿, 不思飲食, 口淡無味, 惡心嘔吐, 噯氣吞

* 교신저자 : 문진영, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 한의과대학

· E-mail : ampmoon@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2665

· 접수 : 2006/12/18 · 수정 : 2007/01/12 · 채택 : 2007/02/02

酸 등과 같은 소화기 병증에 基本方으로서 多用되어왔다⁵. 한편 《東醫寶鑑》의 기록에 의하면 평위산이 九種心痛 중 食心痛과 六種心痛 중 積心痛의 치료에 사용된다고 언급되어 있다⁶. 본 처방에 대한 실험적 연구는 주로 소화기 질환이나 항암 효능에 대해 보고되어 왔으나^{7,8}, 심혈관계질환에 대한 효능 연구는 현재까지 접할 수 없었다. 따라서 저자 등은 평위산이 전통적으로 食心痛 및 積心痛 치료에 대표적 처방으로 사용되어 온 점에 착안하여 본 처방이 동맥경화 및 심혈관계질환의 발병과 진행에 어떠한 영향을 미치는가를 실험적으로 규명하고자 하였다. 그 일환으로 본 연구에서는 동맥경화 및 심혈관계질환의 주요 병인으로 알려져 있는 활성산소종 및 활성질소종에 대한 평위산의 소거능을 검토하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약

본 실험에 사용된 모든 plastic 제품은 Falcon Labware (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)사로부터 구입하여 사용

하였으며, L-ascorbic acid (vitamin C), deoxyribose, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), EDTA, ferric chloride (FeCl₃), hydrochloride, hydrogen peroxide (H₂O₂), hypoxanthine, linoleic acid, nitro blue tetrazolium (NBT), trichloroacetic acid (TCA), 2-thiobarbituric acid (TBA), tris[hydroxymethyl] aminomethane, xanthine oxidase, 3-morpholinopyridone(SIN-1), 4,5-diaminofluorecein (DAF-2)는 Sigma사 (St. Louis, Mo, U.S.A)에서 구입하였다. Agarose, ethidium bromide (EtBr)과 6X orange-blue dye는 Promega사 (Promega, Madison, WI) 제품을 이용하였으며, 그 외에 사용한 시약들은 모두 Merck (Merck KGaA, Germany)사 및 Junsei (Junsei Chemical Co. Ltd. Japan)사의 특급 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 재료 및 추출액의 제조

1) 재료

평위산은 *Atractylodis rhizoma*(蒼朮), *Magnoliae cortex*(厚朴), *Citri pericarpium*(陳皮), *Glycyrrhizae radix*(甘草), *Zingiberis rhizoma recens*(生薑), *Jujubae fructus*(大棗)로 구성되었다⁹⁾(Table 1).

Table 1. Component of Pyungwi-san.

本草名	生藥名	용량(g)
蒼朮	<i>Atractylodis rhizoma</i>	37.5
厚朴	<i>Magnoliae cortex</i>	22.5
陳皮	<i>Citri pericarpium</i>	22.5
甘草	<i>Glycyrrhizae radix</i>	10
生薑	<i>Zingiberis rhizoma recens</i>	3.75
大棗	<i>Jujubae fructus</i>	3.75
	Total	100

2) 시료 추출

평위산 약침액(PWS-HS)은 수제 알콜침법¹⁰⁾에 근거하여 조제하였다. 먼저 평위산 100g을 조말하여 1000 mL의 증류수를 가한 뒤 3 시간 전탕하여 추출하고 여과한 후 4℃, 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 상등액을 전량 200 mL가 되도록 감압 농축하였다. 이 농축된 용액에 99.9% ethanol을 가하여 75%, 85%, 95%의 ethanol 용액이 되게 하여 침전물을 여별하고, pH 7.4로 적정한 후 저온에서 24 시간 방치하여 membrane filter로 여과하였다. 이를 동결건조 하여 최종 6%의 분말을 회수하여 실험에 사용하였다.

3. DPPH free radical의 제거 활성 측정

PWS-HS의 DPPH 자유기 소거 효과를 검증하기 위하여 Gyamfi et al¹¹⁾의 방법을 따라 실험하였다. 먼저 50 µL의 PWS-HS를 여러 농도로 증류수에 녹이고 (0.01 to 8 mg/mL), 여기에 1 mL의 0.1 mM DPPH (dissolved absolute ethanol) 용액과 450 µL의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 잘 섞었다. 이 혼합물을 실온에서 30 분간 정치 한 후 분광광도계 (UV2120*, MECASIS, Korea)에서 흡광도 517 nm 측정하였다. 실험에 사용

한 대조군은 L-ascorbic acid이며, DPPH radical의 억제율을 % inhibition로 환산하여 표기하였다.

4. Superoxide anions의 제거 활성 측정

PWS-HS의 superoxide radicals (O₂^{·-}) 제거 활성은 Gotoh et al¹²⁾의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 우선 다양한 농도 (0.05 to 10 mg/mL)의 PWS-HS 30 µL를 100 µL의 30 mM EDTA (pH 7.4)와 50 mM의 NaOH에 녹인 30 mM hypoxanthine 10 µL, 그리고 100 µL의 3 mM nitro blue tetrazolium (NBT)를 시험관에서 잘 섞어 주었다. 이 용액을 실온에서 3 분간 정치시키고, 100 µL의 0.5 U/mL xanthine oxidase 첨가한 후 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 최종 부피를 3 mL로 조정하였다. 혼합물을 실온에서 20 분간 반응시키고, 흡광도 560 nm에서 제거 활성을 측정하였다.

5. Deoxyribose의 활성 변화 측정

PWS-HS의 직접적인 hydroxyl radicals (non-site-specific scavenging assay)의 제거효과 및 chelate iron ions 제거 측정 (site-specific scavenging assay)은 Halliwell et al¹³⁾의 방법을 고려하여 실험하였으며, PWS-HS의 전산화 유도효과 (pro-oxidant effect) 억제 측정은 위의 방법을 일부 수정하여 사용하였다.

1) Non-site-specific scavenging assay (hydroxyl radicals directly, ·OH)

50 µL의 시료를 reaction buffer (0.1 mM FeCl₂, 0.1 mM EDTA, 1.5 mM H₂O₂, 2.5 mM deoxyribose, and 0.1 mM L-ascorbic acid, pH 7.4) 1 mL과 섞고, 이를 37℃에서 1 시간 동안 반응 시켰다. 그리고 1 mL의 0.5 % TBA in 0.025 M NaOH와 1 mL의 2.8% TCA를 첨가한 후 80℃ 항온수조에서 30 분간 정치하였다. 마지막으로 혼합물을 4℃ 얼음에서 반응을 정지시키고, 흡광도 532 nm에서 ·OH의 제거 효과를 측정하였다.

2) Site-specific scavenging assay (chelate iron ions)

PWS-HS의 chelate iron ions과 hydroxyl radicals generation의 간섭을 측정하는 실험은 위 non-site-specific scavenging assay에서 사용된 reaction buffer에서 EDTA를 제거시킨 후 이를 반응하여 실험하였다.

3) PWS-HS의 전산화 유도 억제 효과

Fe³⁺-EDTA complex가 Fe²⁺-EDTA complex로 활성되어 산화가 진행되는 것에 PWS-HS가 미치는 간섭을 확인하기 위하여, non-site-specific assay에 사용된 혼합물에 L-ascorbic acid를 제외하고 활성을 측정하였다. 전산화 유도율은 다음과 같은 공식에 따라 구하였다.

$$\% \text{ stimulation} = [(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{control}}) / OD_{\text{control}}] \times 100.$$

6. Linoleic acid를 이용한 지질과산화 억제 측정

지질과산화를 억제하는 PWS-HS의 활성을 검증하기 위하여 ferric thiocyanate assay¹⁴⁾를 일부 수정하여 실시하였다. 100 µL의 농도별 시료 (0.5 to 10 mg/mL)와 50 µL의 희석된 linoleic acid (25 mg/mL 99% ethanol), 그리고 50 mM의 phosphate

buffer (pH 7.0) 100 μ L를 혼합하였다. 이를 40°C, dark screw cap 시험관에서 15분 동안 반응하게 하였다. 시료의 지질과산화 억제 활성 측정은 3 mL의 70% ethanol이 들어있는 시험관에 혼합 용액 100 μ L를 분주하고, 100 μ L의 ammonium thiocyanate (300 mg/mL distilled water)와 100 μ L의 ferrous chloride (2.45 mg/mL 3.5% HCl)를 각각 첨가한 후 실온에서 3분간 정치하여, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Peroxynitrite 소거활성 측정

Crow의 방법¹⁵⁾에 의해 ONOO⁻ 소거활성을 측정하였다. 96-well microplate에 sample을 농도별로 취하고, 90 mM NaCl, 5 mM KCl 및 100 μ M diethylenetriaminepenta acetic acid와 10 μ M DHR 123을 함유하는 sodium phosphate(pH 7.4)를 가했다. 그리고 10 μ M ONOO⁻를 첨가한 후 형광광도를 이용하여 excitation (485 nm)과 emission (530 nm)을 측정하였다. ONOO⁻ 생성원으로는 시판되는 peroxynitrite를 직접 사용하여 소거 활성능을 검토하였다.

8. Nitric oxide 소거활성 측정

특이적인 NO의 indicator인 4,5-diaminofluorescein(DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490-495 nm의 여기과장에서 green의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO양에 의존한다. PWS-HS에 DAF-2가 1 mg이 녹아있는 것을 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)로 400 배로 희석하였다. NO 제공물질인 SIN-1와 DAF-2(3.14 μ M)를 96-well plate에 첨가하였으며, DAF-2와 NO의 반응에 의해 방출되는 형광은 10분 후 excitation wavelength 485 nm 및 emission wavelength 530 nm에서 측정하였다¹⁶⁾.

9. 통계학적 처리

통계 분석은 SPSS Ver. 12.0 package program을 이용하여 각 군의 평균과 표준편차를 산출하고 군 간의 차이 유무를 one-way ANOVA로 분석한 뒤 $\alpha=0.05$ 에서 유의한 차이가 있는 경우 Turkey법을 이용하여 사후검정하였다.

실험결과

1. DPPH radical의 소거 효과

자유기 소거 효과를 측정하기 위하여 DPPH radical을 이용한 실험에서 PWS-HS는 광범위한 제거 활성을 나타내었다. 시료 0.01 to 8 mg/mL를 처리하였을 때 PWS-HS는 각각 3, 4, 17, 38, 67, 77%의 소거 활성을 보였다. 이는 DPPH radical의 소거에 양성 대조군으로 잘 알려진 L-ascorbic acid (vitamin C)의 소거 활성과 비교하였을 때 일정 농도 이상에서는 비슷한 효과를 보인 것이며, 특히 PWS-HS의 농도에 의존적인 소거 효과를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). 그러나 8 mg/mL 이상의 고농도에서 더 높은 소거 활성은 발견 되지 않았다 (data not shown).

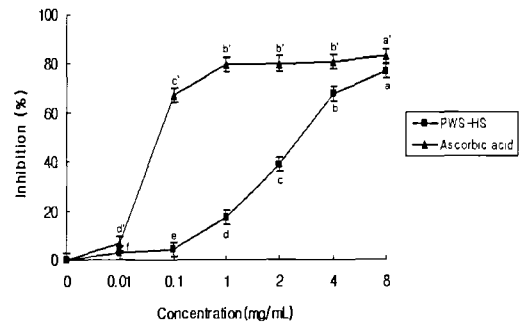


Fig. 1. Free-radical scavenging activities of PWS-HS measured using the DPPH assay. The direct scavenging activities of PWS-HS (■) and ascorbic acid (▲) on DPPH radicals is expressed as the inhibition %. The concentrations tested ranged from 0.01 to 8 mg/mL. The results are the means of three separate experiments. Values with the different letters are not significantly different ($p < 0.05$).

2. Superoxide Anions의 소거 효과

PWS-HS의 superoxide anions 소거 활성은 xanthine oxidase-mediated에 의한 hypoxanthine의 감소로써 생성되는 superoxide anions에 대한 NBT 환원능으로 측정하였다. Superoxide는 생체 내에서 다양한 산화제 효소를 변환시키거나 활성화 하는 것으로 알려져 있는 것에 반하여, PWS-HS는 이를 유의성 있게 방어 하는 것으로 나타났다. (Fig. 2),

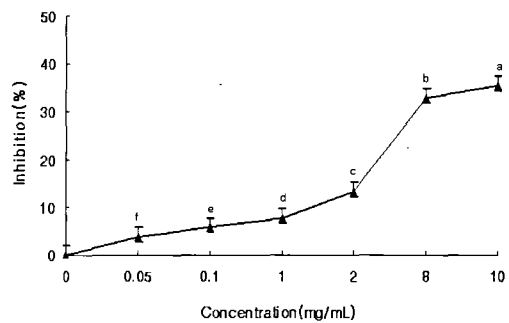


Fig. 2. Inhibitory effects of PWS-HS on NBT reduction. The inhibitory effect of PWS-HS was tested by monitoring NBT reduction caused by superoxide anions using the hypoxanthine-xanthine oxidase system, as described in the Materials and Methods section. The results are the means of three separate experiments. Values with the different letters are not significantly different ($p < 0.05$).

3. Hydroxyl Radical의 소거 효과

PWS-HS의 항산화 활성을 DPPH와 superoxide의 소거 효과에서 살펴본 바와 같이 hydroxyl radical에서도 측정된 결과, PWS-HS는 다양한 농도에서 직접적으로 hydroxyl radical을 감소 시켰다 (Fig. 3). 또한 chelating metal ions에 의하여 변화되는 hydroxyl radical의 소거능 측정에서는 매우 높은 소거가 관찰 되었다 (Fig. 3). Fig. 3에서 나타난 바와 같이 PWS-HS는 농도 의존적인 저해 효과를 보였으며, 최고 70%에 가까운 소거 활성을 보였다. PWS-HS에 의한 전산화 유도를 제어하는 효과를 관찰한 결과 모든 농도에서 pro-oxidant 효과는 관찰 되지 않았다 (Table 2).

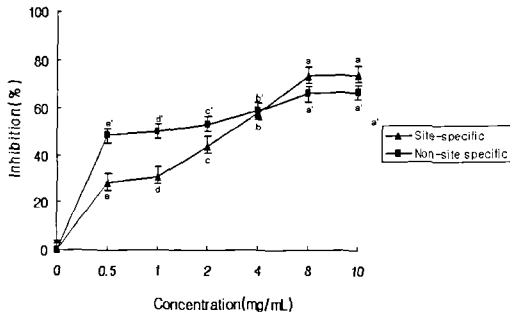


Fig. 3. Inhibitory effects of PWS-HS on hydroxyl radical-mediated deoxyribose degradation. Hydroxyl radicals were generated by Fenton's reaction using a deoxyribose assay system, and the non-site-specific (■) and site-specific (▲) scavenging activities of hydroxyl radicals by PWS-HS are expressed as the inhibition % . The concentrations of PWS-HS tested ranged from 0.5 to 10 mg/mL. The results are the means of three separate experiments. Values with the different letters are not significantly different (p<0.05).

Table 2. Pro-oxidant effects of PWS-HS on Iron-dependent hydroxyl radical generation.

amount of PWS-HS (mg/ml)	optical density (A ₇ nm)	% stimulation
control	0.030±0.006	0
0.5	0.029±0.006C	0
1	0.029±0.006C	0
2	0.033±0.006C	0
4	0.039±0.006C	0
8	0.040±0.006C	0
10	0.040±0.006C	0

Experiments were conducted essentially as described by Halliwell et al., except that L-ascorbic acid was omitted. The results are the mean values of three separate experiments. Values with the different letters are not significantly different (p<0.05).

4. Linoleic acid의 지질과산화 억제 효과

지질막을 구성하는 불포화 지방산의 일종인 linoleic acid의 산화를 억제하는 효과를 관찰하기 위하여 PWS-HS를 농도별로 처리하고 3분이라는 아주 짧은 시간 동안 반응하였을 때도, PWS-HS는 농도 및 시간에 의존적으로 산화를 억제하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 4).

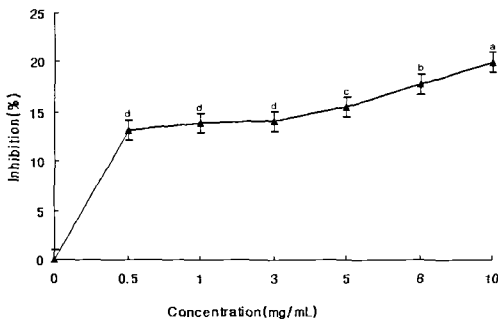


Fig. 4. Inhibitory effects of PWS-HS on hydroxyl radical-mediated linoleic acid oxidation. The concentrations tested from 0.5 to 10 mg/mL. Absorbance of PWS-HS by FTC method with 3 min. incubation time. The results are the means of three separate experiments. Values with the different letters are not significantly different (p<0.05).

5. Peroxynitrite 소거 효과

RNS 중 가장 독성이 강한 것으로 알려진 ONOO⁻에 대한

PWS-HS의 소거 활성을 조사하였다. 시판되는 ONOO⁻를 직접 사용하여 ONOO⁻를 생성시키고, 0.5에서 100 μg/mL까지의 농도별로 PWS-HS를 처리하여 소거 활성을 살펴보았다. 그리고 ONOO⁻의 scavenger로 잘 알려진 penicillamine의 소거 활성과 비교해 보았다(Fig. 5). 0.5에서 50 μg/mL의 저농도에서는 positive control의 효과가 더 우수했지만, 그 이상의 농도에서는 유사한 효과를 보여 PWS-HS 역시 우수한 ONOO⁻ scavenger임을 알 수 있었다.

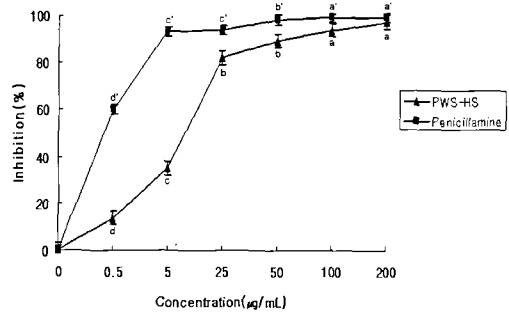


Fig. 5. Peroxynitrite scavenging activity of PWS-HS. The concentrations tested from 0.5 to 200 μg/mL. The results are the means of three separate experiments. Values with the different letters are not significantly different (p<0.05).

6. Nitric oxide 소거 효과

SIN-1은 NO와 ·O₂를 생성해서 결국은 ONOO⁻를 만들게 된다. SIN-1에 의해서 생성된 NO를 PWS-HS가 소거하는 능력을 DAF-2를 이용하여 측정하였다. 5에서 50 μg/mL의 낮은 농도에서도 최대 90% 이상의 높은 소거능을 나타냄으로써, PWS-HS가 효과적인 NO의 scavenger임을 알 수 있었다(Fig. 6).

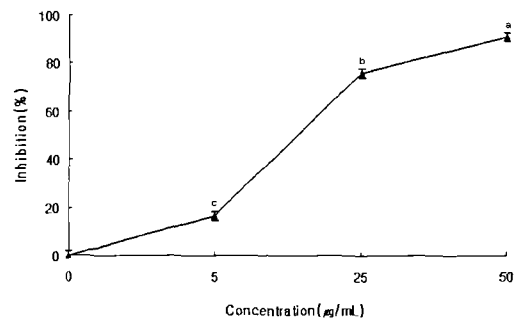


Fig. 6. Nitric Oxide scavenging activity of PWS-HS. The concentrations tested from 5 to 50 μg/mL. The results are the means of three separate experiments. Values with the different letters are not significantly different (p<0.05).

고 찰

ROS와 RNS에 의한 oxidative stress는 암을 비롯하여 노화와 관련된 여러 질환의 발생 기전에 관여하고 있는 것으로 알려져 있으며 특히, myocardial infarction, Alzheimer's disease, autoimmune disease와 같은 질병과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다¹⁷⁾. ROS에는 superoxide, H₂O₂ 및 hydroxyl radical 등이 있고, 이와 더불어 지질과산화물이나 할로겐화산소, 내피유래

이완인자로서 동정된 NO도 넓은 의미의 활성산소이다.

특히, peroxynitrite와 NO, NO₂, HNO₂ 등의 질소화합물들을 총칭하여 RNS라 하는데, 최근 이에 대한 많은 연구가 수행되고 있다. 이러한 ROS/RNS는 세포막과 핵산의 주성분인 당질, 지질, 단백질 및 DNA와 같은 분자들을 과산화시키며, 세포사(apoptosis)와 같은 심각한 세포손상을 초래한다. 또한 이것들은 대식세포의 살균작용, 오래된 단백질의 소거 등에 이용되는 필수 불가결한 물질이지만¹⁸⁾ 반응성이 매우 크기 때문에 유해한 작용을 나타낼 수 있다.

노화를 방지하거나, 산화적 스트레스를 방어하기 위한 연구는 천연물과 식물자원을 이용하여 실험적으로 다양한 접근을 해왔다. 평위산은 소화기 질환에 대표적 기본방으로 다용되어왔고 그 과학적인 효과도 검증된 바 있다^{7,8)}. 그러나 노화를 비롯하여 암, 염증 반응에 이르기까지 밀접한 관련을 갖고 있는 oxidative stress에 대한 효능 연구는 아직까지 구체적으로 진행되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 평위산 약침액(PWS-HS)을 이용하여 ROS/RNS계통의 다양한 활성산소의 소거능 및 지질과산화 억제능을 검토하였다.

먼저 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)은 불균형한 구조를 가진 free radical으로, 액체 상태에서 짙은 보라색을 띠다가 수소 원자를 얻어 안정된 구조로 변형하게 되면 색깔을 잃게 되는 성질을 가진다^{19,20)}. 이러한 성질을 이용하여 PWS-HS의 DPPH radicals 소거능을 측정할 결과, 비교적 높은 소거 활성을 나타냈다(Fig. 1).

Superoxide anions는 일상에서 흔히 접하는 X-ray나 자외선 등에 노출 되었을 때 생체에서 발생하는, 보다 강력한 활성산소 종으로 세포 내의 superoxide는 주로 미토콘드리아(mitochondria) 또는 마이크로솜(microsome), 그리고 핵막 등의 세포 소기관에서 생성되며, 자체적으로 더욱 강한 hydroxyl radical을 생성시키는 전구물질로서 중요한 역할을 담당하게 된다. 이러한 과정을 통하여 세포막 및 세포 거대 분자에 직접적인 손상을 일으킨 다고 알려져 있다²¹⁾. PWS-HS는 superoxide anions radical을 억제 하였으며, 최고 10 mg/mL의 농도에서 30% 이상을 억제하는 활성을 나타내었다(Fig. 2). 따라서 superoxide radical에 의한 세포 내 손상을 억제함과 동시에 지질 과산화에 관련된 일련의 반응 매개를 억제할 것으로 사료된다.

다음으로 hydroxyl radical에 의하여 유도되는 deoxyribose의 감소는 site-specific 및 non-site-specific assays 모두에서 강력한 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3). 이러한 결과는 Fe³⁺-의존성 hydroxyl radical의 발생을 억제하는 강력한 증거로 보인다. 또 PWS-HS가 Fe³⁺-EDTA complex에서 Fe²⁺-EDTA complex로 매개하는 산화 능력을 저농도에서부터 고농도까지 다양하게 실험한 결과 유도 반응은 관찰할 수 없었다(Table 2).

주로 세포막을 구성하고 있는 인지질의 불포화 지방산에서 수소를 탈취함으로써 fatty acid radical이 생성되며, 이렇게 활성화된 지질이 산소 분자와 결합하는 일련의 반응을 통하여 연쇄적인 지질과산화물(hydrogen peroxide)을 형성하는 것을 지질과산화반응이라고 한다. 본 연구에서는 이러한 지질과산화 작용의 연쇄적인 반응을 PWS-HS가 억제하는 효과를 측정할 결과,

시료를 처리하지 않은 대조군에 비하여 낮은 지질 산화 정도를 나타내었다(Fig. 4).

NO는 호중구, 대식세포 등에서 생성되는 활성산소로, nitric oxide synthase에 의해 L-arginine을 기질로 하여 합성된다. NO는 반응성이 크고 반감기가 짧은 것이 특징이고, 혈관의 항상성 유지, 포유동물의 세포내 신호전달, 신경전달 등에 관여하고 있다²²⁾. NO는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성 산소들과 반응할 수 있다는 점에서 문제를 일으킬 수 있는데, 특히 ·O₂와 반응하여 ONOO를 생성하는 것이 세포내 독성작용을 야기할 수 있다는 점에서 문제가 된다. 생체 내에는 항산화계가 존재하여 활성산소 및 질소의 축적으로 인한 세포손상을 막을 수 있지만, ONOO를 제거하는 항산화계는 없다. 따라서, 이로 인한 세포손상을 막을 수 있는 항산화제의 개발은 중요한 의미가 있다. PWS-HS는 NO의 경우 25 µg/mL의 낮은 농도에서도 80%에 가까운 높은 소거 활성을 보였고(Fig. 6), ONOO의 경우에서도 50 µg/mL의 낮은 농도에서도 90% 정도의 소거 활성을 보였다(Fig. 5). 이는 positive control로 사용된 penicillamine과 비교해도 거의 유사한 수준의 높은 소거 활성을 보인 것으로 PWS-HS가 아주 우수한 RNS의 scavenger임을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 PWS-HS는 ROS/RNS 계통의 다양한 활성산소종을 효과적으로 제거하거나 이들의 활성을 저해하였고, 지질과산화 역시 유의성 있게 방어 하였다. 최근의 연구 결과에서 oxidative stress가 cardiovascular disease의 병리과정에서 중요한 역할을 하고 있음이 보고되었다²³⁾. 현재 저자 등은 PWS-HS가 항산화 효소계의 발현 여부 등에 관한 실험을 진행 중에 있으며, 향후 추출법을 보다 다양화하여 세포수준에서 본 처방이 atherosclerosis의 발병과 진행에 어떤 영향을 미치는가를 규명할 계획이다.

결 론

PWS-HS가 항산화에 미치는 효과를 관찰한 결과, 다음과 같은 결과를 얻었다. PWS-HS는 DPPH free radical 소거 효과에서, 양성 대조군인 L-ascorbic acid에는 미치지 못하지만, 유의성 있는 결과를 보였다. Superoxide anions의 소거 활성에서는 높은 소거 효과를 보이지는 않았지만, hydroxyl radical을 직접적으로 소거하는 능력을 살펴보았을 때 매우 높은 소거 활성을 나타내었다. 특히 hydroxyl radical의 generation을 방해하는 효과와 직접적인 radical의 소거 능력을 비교해 보았을 경우, 두 가지 모두에서 우수한 소거능을 보였다. 또한 PWS-HS가 산화를 유도하는 현상을 관찰하였을 때 모든 농도에서 유도 반응이 관찰 되지 않았다. 한편 불포화 지방산인 linoleic acid를 이용하여 PWS-HS의 지질과산화 억제 효과를 관찰 하였을 때 짧은 시간 안에도 농도 의존적으로 이를 저해하였다. 마지막으로 RNS에 속하는 ONOO와 NO의 소거 능력을 측정할 결과, 50 µg/mL의 농도에서 90%에 가까운 뛰어난 소거능을 보였다. 따라서 PWS-HS는 ROS에 대한 소거능 보다는 RNS에 대한 소거능이 더욱 강하였으며, 특히 ONOO에 대하여 더욱 강력한 소거능을 지닐 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 과학기술부 과학재단 기초과학연구사업 심혈관계질환 천연물개발연구센터 (HRCC, No.R13-2005-013-01000-0)의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Hur, E.S. and Lee K.H. Cardiovascular Disease and Natural Antioxidants. *Journal of Human Ecology* 5:19-35, 2001.
- Diane L.T. Antioxidant Consumption and Risk of Coronary Heart Disease: Emphasis on Vitamin C, Vitamin E, and β -carotene. *Circulation* 99:591-595, 1999.
- 조성희. Protagonist of Antioxidant. 한국지질학회·대한동맥경화학회 추계공동학술대회집, 81-85, 2000.
- Hou, Y.Z., Zhao, G.R., Yang, J., Yuan, Y.J., Zhu, G.G., Raimo, H. Protective effect of *Lingusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* on endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *Life Science* 75:1775-1786, 2004.
- 金相贊·金先熙·盧昇鉉 外 8人. 方劑學. 영림사, 서울, pp 486-487, 1999.
- 허 준. 동의보감. 법인문화사, 서울, pp 661-668, 1999.
- Park, D.W., Kim, J.S., Ryu, B.H., Ryu, K.W., Park, S.H. A Study on the Effects of Pyungwee-san and Compounding of Medicine in Pyungwee-san on the Movement of Gastrointestinal Smooth Muscles, Anticatharsis and Central Nervous System. *J. of Oriental. Chr. Dis.* 6:184-196, 2000.
- Jeong, H.C. and Son, I.C. Effects of Pyeongwoe-San Aqua - Acupuncture at Chok-Samni (ST 36) points on Gastric in Rabbits. *The J. of Korean Acupuncture & Moxibustion Society* 13:321-334, 1996.
- 黃度淵 原著·裴元植 監修, 對譯證脈方藥合編, 南山堂, 서울, 142-143, 2000.
- 錢百炎, 中草藥注射劑, 上海科學技術出版社, 上海, 71-132, 1981.
- Gyamfi, M.A., Yonamine, M. and Aniya, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana. *Gen. Pharmacol* 32:661-667, 1999.
- Gotoh, N. and Niki, E. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 1115:201-207, 1992.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Aruoma, O.I. The deoxyribose method: simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reaction of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165:215-219, 1987.
- Osawa, T., and Namiki, M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agric. Biolog. Chem.* 45:735-740, 1981.
- Crow, J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1:145-157, 1997.
- Sutherland, H., Khundkar, R., Zolle, O., McArdle, A., Simpson, A.W., Jarvis, J.C. and Salmons, S. A fluorescence-based method for measuring nitric oxide in extracts of skeletal muscle. *Nitric Oxide* 5:475-481, 2001.
- Delanty, N. and Dichter, M.A. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand* 98:145-153, 1998.
- Brune, B., Zhou, J. and Von Knethen, A. Nitric oxide, oxidative stress and apoptosis. *Kidney Int Suppl.* 84:22-24, 2003.
- Philip, M. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26:211-219, 2004.
- Abdalla, A.E. and Roozen, J.P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chem.* 64:323-329, 1999.
- 大柳善彦, SOD よ活性酸素調節濟よの 薬理作用 よ 臨床應用, 日本醫學館, 東京, p 9, 1989.
- Ameczua, J.L., Palmer, R.M.J., De Souza, B.M. and Moncada, S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol* 97:1119-1124, 1989.
- Francesco, V. and Roberto, C. Antioxidants and cardiovascular disease. *Current Opinion in Investigation Drugs* 6:895-900, 2005.