동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 19. No. 3, 2008

蜈蚣의 항산화효과에 관한 연구

최용건, 이동웅*, 김근우, 구병수
동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실
동국대학교 과학기술대학 바이오학부*

Antioxidative Effects of Scolopendra subspinipes

Yong-Keon Choi, Dong-Ung Lee*, Geun-Woo Kim, Byung-Soo Koo
Department of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dongguk University
Division of Bioscience, College of Science and Technology, Dongguk University*

Abstract

Objective : The purpose of this study was to evaluate the antioxidative effects of the extract of Scolopendra subspinipes which has been used mainly for detoxication in the oriental medicine and reported to have sedative action, antiinflammatory effect, antihypertensive property and immunity enhancing activity.

Method : Inhibitory activities on oxygen radical generating enzymes (aldehyde oxidase and xanthine oxidase) and increasing activities on oxygen radical scavenging enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase) were investigated. Furthermore, the content of glutathione in the mouse brain, DPPH radical scavenging activity and also anti-lipid peroxidative effects in vivo and in vitro were estimated.

Results : The extract showed weak inhibitory effects on the activities of aldehyde oxidase and xanthine oxidase which are oxygen radical generating enzymes. The extract inhibited lipid peroxidation with 26.1% against control group at 500 mg/kg in vivo and with 11.2% against control group at 10 mg/kg in vitro in a dose-dependent manner, which means this drug may protect radical-induced cell damages. The extract showed dose-dependently the scavenging effect on DPPH radical with 24.8% activity at 10 mg/ml in vitro. The extract enhanced the activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase, which are oxygen radical scavenging enzymes, with 28.9%, 22.3% and 23.1%, respectively at 500mg/kg in vivo. Finally, this extract strongly increased the glutathione content in the mouse barin.

Conclusion : Above results indicated that Scolopendra subspinipes can be useful for the protection or treatment of some diseases caused by reactive oxygen species.

Key Words : Scolopendra subspinipes, Antioxidative effect, Oxygen radical generating enzyme, Oxygen radical scavenging enzyme, Anti-lipid peroxidation

---

투고일 : 10/9 수정일 : 11/4 채택일 : 11/10
* 교신저자 : 구병수, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 일산한방병원 신경정신과
Tel : 031-961-9140, Fax : 031-961-9009, E-mail: koobs@dongguk.ac.kr

Ⅰ. 緖 論

인간의 생명유지에 필수적인 산소는 체내의 전자전달계의 최종 전자수용체가 되어 각종 대사과정에 참여한 다음, 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)이라고 부르는 매우 반응성이 강한 유해물질로 변한다.

ROS는 유전자 전사, 세포신호전달, 세포사멸등의 여러 가지 세포기능 조절의 핵심적인 매개체로 사용되며,[1] 파킨슨병,[2,3] Alzheimer병[4,5] 등의 뇌신경질환과 허혈성 신경손상,[6] 기타 중추신경계 장애[7,8] 뿐만 아니라 각종 성인병, 노화[9]와 같은 병태생리현상의 원인이 ROS의 생성과 분해기구의 조절과 직접적인 관련이 있는 것으로 인정되고 있다.

즉, 이러한 조절기구의 상실로 과잉의 ROS가 세포막 지방질의 지질과산화를 유도함으로써 생체조직이 손상되어 각종 질환이 발생한다는 사실이 밝혀진 것이다.

이 가운데 뇌신경계 질환은 주로 억제성 및 흥분성 신경전달물질의 균형을 조절하는 기능의 상실에서 비롯되는 것으로 알려져 있는데[10] ROS가 많이 생성되는 oxidative stress조건에서는 흥분성 아미노산의 농도가 이상적으로 증가하는 병적 상태가 유발되는 것으로 보고되어 있다.[11] 특히, 뇌신경세포는 불포화지방산을 주요성분으로 하고 있으며 뇌조직은 많은 양의 산소를 필요로 하므로 항상 oxidative stress의 조건에 노출되어 있다고 할 수 있다.

우리 인간에게는 체내에 ROS를 생성하는 효소계가 있는 반면에 ROS를 소거하는 효소계도 아울러 가지고 있어 이들 효소계의 균형이 건강을 유지하는데 있어서 필수적인 요소이다. 따라서 한약으로부터 ROS 생성효소계를 억제하고 소거효소계를 증강시켜 ROS에 의해 유래되는 각종 질병을 예방 또는 치료할 수 있는 우수한 약재를 발굴한다면 국민건강에 이바지할 뿐만 아니라 이를 통하여 한약의 우수성도 재확인할 수 있을 것으로 기대된다.

蜈蚣은 ≪神農本草經≫[12]에 "治鬼注蠱毒 噉諸蛇蟲魚毒 殺鬼物 老精溫瘧 去三蟲"이라고 祛風鎭痙, 通絡止痛, 攻毒散結 등의 효능으로 抽慴, 口噤, 瘡瘍腫毒, 瘰癧潰爛, 毒蛇咬傷 증의 증상을 치료하는데 사용되어 왔다[13].

蜈蚣에 대한 실험 연구로는 신경안정 및 소염작용[14], 항고혈압 작용[15], 면역반응 증가[16] 등과 安 등[17]에 의해 혈전증에 유용하다는 보고는 있으나, 아직 항산화효과에 대한 보고는 없다.

본 연구에서는 오공의 항산화효능을 확인하기 위하여 활성산소종 생성계 효소인 aldehyde oxidase, xanthine oxidase에 대한 억제효과, 활성산소 소거계 효소인 superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 glutathione-S- transferase 활성증강효과, 체내 항산화물질인 glutathione의 함량변화, 라디칼에 대한 직접적 소거효과 및 세포막 지방질의 지질과산화 억제효과등을 검토하여 유의한 결과를 얻었다.

Ⅱ. 實 驗

1. 재료

1) 시약 및 기기

효소활성 측정에 사용한 모든 시약, 양성대조 약물 및 기타 항산화활성 측정에 시약은 모두 Sigma사(St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였으며 그 외 유기용매 및 buffer 제조용 무

기시약들은 국산특급을 사용하였다.

흡광도는 UV-2001S spectrophotometer (Shimadzu, 일본)로 측정하였고 원심분리는 T-2080 ultracentrifuge (Kontron, 스위스) 제품을 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물은 한국실험동물개발로부터 구입하였으며 미생물 monitoring에서 모두 음성을 나타낸 건강한 ICR계 웅성 mouse (30±1 g)를 본 대학 동물사육사에서 일정한 조건으로 사육하여 사용하였다.

사육조건은 온도는 22±1℃, 습도는 55±5% 그리고 명암은 12시간 light/dark cycle을 유지시켰다. 실험동물을 1주일간 사육실에서 적응시켰으며 실험개시전 24시간 동안 물만 먹이고 절식시켰다. 동물처치는 효소활성의 일중변동을 고려하여 오전 10-12사이에 실시하였다.

3) 약재

이 실험에 사용한 오공 (*Scolopendra subspinipes* mutilans L. Koch) 약재는 동국대학교 강남한방병원에서 구입하여 정선한 것을 분말로 한 다음, 600 g을 80% methanol 1.5 l를 넣고 약 80℃의 수욕상에서 3시간 가온하였다. 추출액을 농축기로 감압농축하여 얻은 분말을 시료로 사용하였다. 추출물의 수득량은 18.3 g이었다.

2. 효소원의 제조

실험동물의 간을 적출한 다음, 무게의 4배량에 해당하는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 빙냉하에서 homogenizer로 마쇄하였다.

이 마쇄균질액 일부는 지질과산화 억제효과 실험에 사용하였으며 나머지를 600×*g*에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 상징액을 다시 1시간 동안 100,000×*g*에서 초원심분리하여 cytosol분획을 얻었으며 이 효소원을 aldehyde oxidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase의 효소활성 시험에 사용하였다. 상기의 모든 조작은 0-4℃에서 실시하였다.

3. Aldehyde oxidase 활성 측정

Rajagopalan 등의 방법[18]에 의해 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 *N*-methylnicotinic acid amide 1.5 mM과 효소원 0.4 ml를 첨가해 37℃에서 20분간 반응시킨 다음, 20% trichloroacetic acid를 가해 반응을 종료시켰다.

반응 종료후 생성된 6-pyridone을 파장 300 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 6-pyridone의 양을 nmole로 나타내었다.

4. Xanthine oxidase 활성 측정

Stirpe 등의 방법[19]에 준해 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine mono sodium salt 60 μM 및 효소원 0.2 ml를 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 20% trichloroacetic acid 를 가하여 단백질을 제거시키고 원심분리하였다.

이때 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다.

5. 지질과산화 억제효과 측정

Ohkawa등의 방법[20]에 준해 동물의 뇌조직

마쇄균질액 0.1 ml와 각 시료 0.05 ml를 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 0.65 ml에 혼합하고 37℃에서 1시간 incubation한 다음, 여기에 8.1% sodium dodesyl sulfate 0.2 ml, 20% acetate buffer (pH 3.5) 1.5 ml 및 0.8% 2-thiobarbituric acid용액 1.5 ml를 가해 95℃에서 다시 1시간동안 반응시킨다.

이 혼액을 실온으로 냉각한 다음, 생성된 홍색의 착색물질을 *n*-butanol : pyridine (15:1, v/v) 혼액으로 이행시켜 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 그 상징액을 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 조직 1 g당 malondialdehyde (MDA)의 양을 nmole로 나타내었다.

6. DPPH radical 소거효과 측정

Blosi의 방법[21]에 따라 1.0 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5.0 mg/ml 농도의 각 시료 0.1 ml에 DPPH radical의 $1.5x10^{-5}$ M ethanol용액 4 ml를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 다음, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거효과는 대조군에 대한 %로 나타내었다.

7. Superoxide dismutase 활성 측정

Martin등의 방법[22]에 따라 다음과 같이 실시하였다. 효소원 조제 방법에 따라 분리된 cytosol에 EtOH : $CHCl_3$ (5 : 3)혼액을 0.4배량 가하여 잘 혼합한 다음, 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상징액을 얻고 이것을 superoxide dismutase 활성측정 효소원으로 사용하였다.

반응액은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5, EDTA 0.1 mM 함유) 일정량에 5 mM hematoxylin, 효소액의 용량을 달리하여 첨가하고 최종 반응액이 3.0 ml가 되게한다. 이 반응액을 25℃에서 5분간 반응시킨 다음, 560 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소 활성을 산정하였다.

효소활성의 unit는 효소를 넣지 않고 반응시킨 5 mM hematoxylin액의 흡광도 증가를 50% 억제하는 단백질의 양(units/mg protein/min)으로 산정하였다.

8. Glutathione peroxidase 활성 측정

Paglia[23]와 Lawrence[24]의 방법에 준하여 먼저 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 50 ml에 EDTA 1mM, NaN_3 1 mM, NADPH 0.2 mM, glutathione 1 mM, 그리고 glutathione reductase는 1E.U./ml를 혼합한 최대농도 반응 혼합물을 이용하여 측정하였다.

반응 혼합물 0.8 ml에 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.0)으로 희석시킨 cytosol 0.1 ml를 넣어 20℃ 항온수조에서 5분간 가온한 후, 2.2 mM H_2O_2 용액 0.1 ml를 첨가하여 340 nm에서의 NADPH 흡광도 감소로 측정하였다. 효소활성도는 μM NADPH oxidized/g protein/min로 표시하였다.

9. Glutathione-S-transferase 활성 측정

Habig의 방법[25]에 따라 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 6.5)으로 희석시킨 cytosol에 1 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)를 첨가하여 파장 340 nm에서 단백질 mg당 1분간 conjugation되는 CDNB의 양(nM CDNB conjugated/mg protein/min)으로 표시하였다.

10. Glutathione 함량 정량

Ellman의 방법[26]을 변형하여 측정하였다. 간조직 마쇄균질액을 1,000×*g*에서 원심분리한

후, 상징액 0.2 ml에 potassium phosphate buffer (pH 8.0) 0.2 mM 및 50% trichloroacetic acid를 가한 다음, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시키고 얻어진 상징액 0.3 ml에 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 2.7 ml를 혼합하여 최종 부피를 3.0 ml로 만든 다음, 실온에서 20분간 방치한 후, 412 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

11. 단백질 정량

Bradford 시약을 사용하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 정량하였다. 먼저 7개 시험관에 표준 단백질 용액과 증류수를 넣은 다음, 희석한 Bradford 시약을 각 시험관에 5 ml 씩 첨가하고 5분 방치 후, 1시간 이내 첫 번째 시험관을 대조로 하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 2번~6번까지 시험관들의 흡광도로부터 검량선을 그리고 이에 준하여 미지시료의 농도를 결정하였다.

12. 통계

모든 실험결과는 통계프로그램인 Origin (Version 3.78)으로 처리하였으며 data는 mean±S.E.로 표시하였고 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 검정하였으며 유의수준을 P value로 나타내었다.

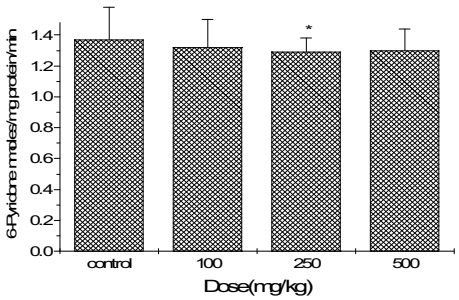
III. 實驗結果

1. Aldehyde oxidase 억제효과

Aldehyde oxidase는 활성산소종을 생성시키는 효소로서 이 효소의 억제효과가 있으면 항산화활성이 있는 것으로 평가할 수 있다. 오공 추출물의 aldehyde oxidase 억제활성을 *in vivo*에서 측정한 결과, 대조군에 비해 유의한 활성도 억제는 나타나지 않았다 (Fig. 1).

대조군의 활성이 1.37±0.21 nmoles/mg protein/min인데 비해 100 mg/kg, 250 mg/kg 및 500 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비해 각각 3.6%, 5.8%, 5.1%의 약한 억제활성을 나타내어 오공은 aldehyde oxidase와 같은 활성산소 생성계 효소에 대한 억제효과는 매우 약한 것으로 조사되었다.

Fig. 1. Inhibitory effect of the extract of Scolopendra subspinipes on the hepatic aldehyde oxidase activity in mice.



Data show the mean±S.E. (n=7). *: Significantly different from the control group at $p<0.05$.

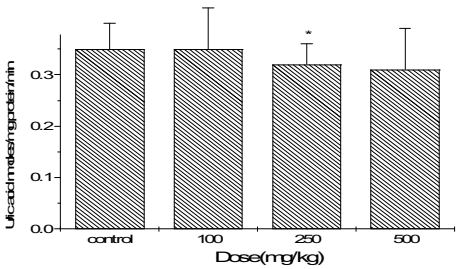
2. Xanthine oxidase 억제효과

Xanthine oxidase는 aldehyde oxidase와 마찬가지로 활성산소종을 생성시키는 효소로서 이 효소의 억제효과가 있으면 항산화활성이 있는 것으로 평가할 수 있다.

오공 추출물의 xanthine oxidase 억제활성을 *in vivo*에서 측정한 결과, 대조군에 비해 유의한 활성도 억제는 나타나지 않았다 (Fig. 2). 대조군의 활성이 0.35±0.05 uric acid nmoles/mg protein/min인데 비해 100 mg/kg 투여군에서는 대조군과 동일하였으며,

250 mg/kg 및 500 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비해 각각 8.6%, 11.4%의 약한 억제활성을 나타내어 오공은 xanthine oxidase와 같은 활성산소 생성계 효소에 대한 억제효과는 매우 약한 것으로 평가되었다.

Fig. 2. Inhibitory effect of the extract of Scolopendra subspinipes on the hepatic xanthine oxidase activity in mice.



Data show the mean±S.E. (n=7). *: Significantly different from the control group at p<0.05.

3. 지질과산화 억제효과

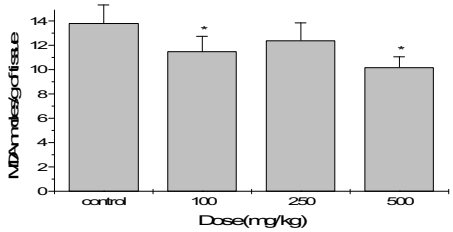
1) *In vivo*에서의 억제효과

조직에서의 지질과산화 반응은 세포막 구성성분을 산화시켜 세포손상을 초래함으로서 각종 질병을 야기시킨다.

오공 추출물을 용량별로 투여한 실험동물의 간조직을 대상으로 지질과산화 억제활성을 측정한 결과, 모든 용량에서 대조군에 비해 지질과산화 억제활성을 보여주었다 (Fig. 3).

즉, 100 mg/kg 투여시는 MDA량이 11.5±1.23 nmoles/g of tissue로서 16.7% 감소하였고 250 mg/kg 투여시는 MDA량이 12.4±1.42 nmoles/g of tissue로서 10.1% 감소하였으며 500 mg/kg 투여군에서는 26.1%의 억제효과를 타나내어 오공은 세포막의 지질과산화를 억제하여 세포를 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

Fig. 3. Inhibitory effect of the extract of Scolopendra subspinipes on the hepatic lipid peroxidation in vivo.

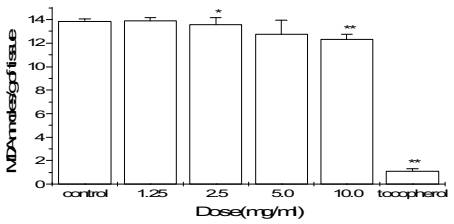


Data show the mean±S.E. (n=7). *: Significantly different from the control group at p<0.05.

2) *In vitro* 에서의 억제효과

오공 추출물의 지질과산화 억제활성을 *in vitro*에서 측정한 결과, 용량의존적으로 활성이 증가하였으나 그 활성도는 그리 강하지 못하였다. 낮은 농도에서는 모두 10% 미만의 억제활성을 나타내었으나 10 mg/ml에서는 12.33±0.41 nmoles/g of tissue로서 대조군에 비해 11.2% 정도의 지질과산화 억제효과를 나타내었다Fig. 4). 양성대조약물인 α-tocopherol의 경우, 1.0 mg/ml에서 지질과산화 억제효과가 91.9%로 나타나 매우 우수한 효과를 보여주었다.

Fig. 4. Inhibitory effect of the extract of Scolopendra subspinipes on the hepatic lipid peroxidation in vitro.

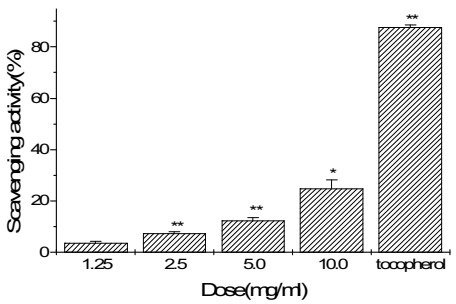


Data show the mean±S.E. for 3 independent experiments. *: Significantly different from the control group at p<0.05. **: Significantly different from the control group at p<0.01.

4. DPPH radical 소거효과

항산화활성을 측정하는 또 다른 지표로서 사용되는 DPPH 라디칼 소거효과에서는 오공 추출물은 용량이 증가함에 따라 소거효과도 다소 증가하는 경향을 보였는데 추출물 10 mg/ml의 농도에서 24.8%의 라디칼 소거활성을 나타내었다 (Fig. 5). 천연 항산화제인 α-tocopherol은 1 mg/ml에서 87.7%의 우수한 라디칼 소거효과를 보였다.

Fig. 5. Dose-dependent DPPH radical scavenging activity of the extract of Scolopendra subspinipes in vitro.



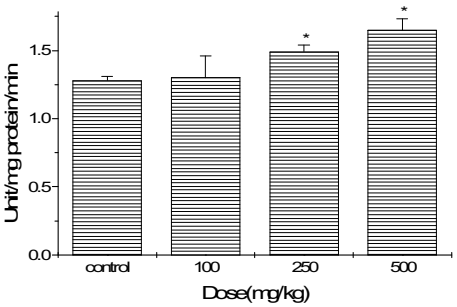
Data show the mean±S.E. for 3 independent experiments. *: Significantly different from the control group at p<0.05. **: Significantly different from the control group at p<0.01.

5. Superoxide dismutase 활성 변화

Superoxide dismutase는 생체방어 시스템에서 유독성 수퍼옥사이드 라디칼을 과산화수소로 바꿈으로서 세포손상을 보호하는 역할을 하는 효소이다.

대조군의 효소활성도는 1.28±0.03 unit/mg protein/min인데 비해 추출물 투여군은 용량의존적으로 활성을 증가시켰는데 100 mg/kg 투여시에는 대조군과 차이가 없었으나 250 mg/kg 투여시는 16.4% 증가하였고 500 mg/kg 투여시는 대조군에 비해 28.9%의 활성 증가를 나타내어 오공은 이 효소의 활성을 강화시키는 항산화효과를 가지고 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 6).

Fig. 6. Effect of the extract of Scolopendra subspinipes on the hepatic superoxide dismutase activity in vivo.



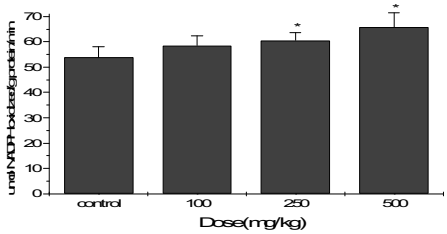
Data show the mean±S.E. (n=7). *: Significantly different from the control group at p<0.05.

6. Glutathione peroxidase 활성 변화

Glutathione peroxidase는 glutathione 존재하에서 지질과산화물과 과산화수소의 분해를 촉매하는 효소이다.

대조군의 효소활성도는 53.8±4.2 μM NADPH oxidized/g protein/min인데 비해 추출물 투여군은 용량의존적으로 활성을 증가시켰는데 100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg 투여시 대조군에 비해 각각 8.7%, 12.5%, 22.3%의 활성 증가를 나타내어 오공이 이 효소의 활성을 강화시키는 항산화효과를 가지고 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 7).

Fig. 7. Effect of the extract of Scolopendra subspinipes on the hepatic glutathione peroxidase activity in vivo.



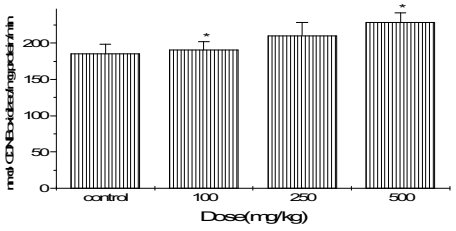
Data show the mean±S.E. (n=7). *: Significantly different from the control group at p<0.05.

7. Glutathione-S-transferase 활성 변화

Glutathione-S-transferase는 여러 가지 기능을 하는 단백질로서 독성을 가진 알킬 화제들과 공유결합을 형성하여 불활성화함으로서 해독작용에 관여하는 중요한 효소이다.

대조군의 효소활성도는 185.5±12.6 nM CDNB oxidized/mg protein/min인데 비해 추출물 투여군은 용량의존적으로 활성을 증가시켰는데 100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg 투여시 대조군에 비해 각각 2.7%, 13.2%, 23.1%의 활성 증가를 나타내어 오공이 이 효소의 활성을 강화시키는 항산화효과를 가지고 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 8).

Fig. 8. Effect of the extract of Scolopendra subspinipes on the hepatic glutathione-S-transferase activity in vivo.



Data show the mean±S.E. (n=7). *: Significantly different from the control group at p<0.05.

8. Glutathione 함량 변화

Glutathione은 glutathione peroxidase의 작용에 의해서 해로운 과산화물을 분해하는 환원제로서의 역할을 한다. 대조군의 glutathione의 함량이 9.56±0.87 μmol/g protein인데 비해 오공 추출물 투여후에는 함량이 20.4±1.69 μmol/g protein으로서 큰 폭으로 증가하여 오공이 조직중의 glutathione을 크게 증가시킴으로서 항산화활성을 나타내는 것으로 분석된다 (Table 1).

Table 1. Effect of the Extract of Scolopendra subspinipes on the Glutathione Content in Mice.

Treatment	Content (μmol/g protein)
Control	9.56±0.87
Extract 500mg/kg	20.4±1.69*

Data represent the mean±S.E. (n=7). *: Significantly different from the control group at p<0.05.

Ⅳ. 考　察

산소는 체내의 전자전달계의 최종 전자수용체가 되어 각종 대사과정에 참여한 다음, 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)이라고 부르는 매우 반응성이 강한 유해물질로 변한다. ROS는 흔히 라디칼 (radical)이라고 부르는 반응성이 큰 화학종뿐만 아니라 중성분자 형태의 안정한 물질을 포함해서 일컫는다. 산소라디칼에는 superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical ($^{\cdot}OH$), peroxy radical ($ROO^{\cdot}$)등이 있으며 중성분자로는 과산화수소(H_2O_2), 단일항 산

소 (singlet oxygen, $^1O_2$)등이 있다. 이들 라디칼의 생성과정을 살펴보면 다음과 같다. 정상적인 산소(삼중항 산소, $^3O_2$)는 대사를 거친 후, 최종적으로 물이 되는데 이 때, 모두 4개의 전자를 필요로 한다. 산소분자가 4개의 전자를 받아서 두 분자의 물로 완전히 환원되는 것은 세포에 있어서 대단히 중요한 반응이다. 산소분자가 전자 하나를 받으면 superoxide anion radical로 되며 이 라디칼은 다시 하나의 전자와 두 개의 수소이온 (proton)과 반응하여 과산화수소로 변하며 이 중성 활성산소종은 계속 하나의 전자와 수소이온을 받아 peroxy radical로 변한다. 이 라디칼은 결국 마지막으로 전자 한개와 수소이온 한 개를 받아 안정한 물분자로 바뀌는 것이다. 이러한 과정에서 생성된 각종 라디칼들은 전자가 한 개 부족하므로 이를 채우기 위해 강한 공격성을 나타낸다. 따라서 라디칼은 세포막을 구성하고 있는 인지질을 과산화시켜 세포막을 손상시킬 뿐만 아니라 단백질분자를 변형시키며 핵산의 당분자를 공격함으로서 DNA를 손상시키기도 한다. 산소라디칼은 생체내에서 생성될 뿐만 아니라 생체외부로부터도 얻어지는데 대기오염, 흡연, 발암물질, 자외선, 특정 금속, 방사선 등이 그 주요 원인이 된다.

오늘날, ROS는 유전자 전사, 세포신호전달, 세포사멸등의 여러 가지 세포기능 조절의 핵심적인 매개체로 사용되며[1], 파킨슨병[2,3], Alzheimer병[4,5] 등의 뇌신경질환과 허혈성 신경손상[6], 기타 중추신경계 장애[7,8] 뿐만 아니라 각종 성인병 (당뇨병, 암, 고혈압, 백내장등)[9], 노화[9]와 같은 병태생리현상의 원인이 ROS의 생성과 분해기구의 조절과 직접적인 관련이 있는 것으로 인정되고 있다. 즉, 이러한 조절기구의 상실로 과잉의 ROS가 세포막 지방질의 지질과산화를 유도함으로써 생체조직이 손상되어 각종 질환이 발생한다는 사실이 밝혀진 것이다. 이 가운데 뇌신경계 질환은 주로 억제성 및 흥분성 신경전달물질의 균형을 조절하는 기능의 상실에서 비롯되는 것으로 알려져 있는데[10] ROS가 많이 생성되는 oxidative stress조건에서는 흥분성 아미노산의 농도가 이상적으로 증가하는 병적 상태가 유발되는 것으로 보고되어 있다[11]. 특히, 뇌신경세포는 불포화지방산을 주요성분으로 하고 있으며 뇌조직은 많은 양의 산소를 필요로 하므로 항상 oxidative stress의 조건에 노출되어 있다고 할 수 있다.

우리 인간에게는 체내에 활성산소를 생성하는 효소계 (generating enzyme system)인 aldehyde oxidase, xanthine oxidase, cytochrome P_{450}이 있는 반면에 활성산소를 소거하는 효소계 (scavenging enzyme system)인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase등도 아울러 가지고 있어 이들 효소계의 균형이 건강을 유지하는데 있어서 필수적인 요소이다. 따라서 한약으로부터 활성산소 생성효소계를 억제하고 소거효소계를 증강시켜 활성산소에 의해 유래되는 각종 질병을 예방 또는 치료할 수 있는 우수한 약재를 발굴한다면 국민건강에 이바지할 뿐만 아니라 이를 통하여 한약의 우수성도 재확인할 수 있을 것으로 기대된다.

蜈蚣은 왕지네과에 속하는 충류로 扁平長條形이고 길이 9-17cm, 너비 0.5-1cm가량으로 22개의 環節을 가지고 있으며 天龍이라고도 불리운다[27]. 성미는 辛溫無毒[28,29,30,31]하며 肝經에 入하여[28,29,31,32] 鎭痙息風, 解毒散結, 通絡止痛하는 효능[28,30-32]이 있어 임상에서 주로 急慢驚風, 破傷風, 中風, 口眼喎斜[28-33], 痺症[34] 등에 응용되고 있다.

蜈蚣의 효능에 대하여 ≪神農本草經≫[12]에 "治鬼注蠱毒 噉諸蛇蟲魚毒 殺鬼物 老精溫瘧 去三蟲"이라고 최초로 언급된 이래 ≪本草綱

目≫[35]에서는 蜈蚣은 裁風의 효능이 있어 小兒驚癲, 風癲, 臍風 및 口禁 등의 風證과 蛇毒을 치료할 수 있다고 하였으며, 揮[36]는 驚風에는 蟲蛇藥이 특효약인데 蜈蚣은 全蝎의 味가 제압하지 못하는 風症을 능히 제압할 정도로 효능이 맹렬하다고 주장하였고, ≪本草求眞≫[37]에서는 蜈蚣의 毒이 蛇毒, 癩瀝 및 便毒 등을 치료할 수 있는 것은 以毒攻毒의 효능이라고 언급하였으며, ≪名醫別錄≫[38]에서는 "主治心腹寒熱結聚 墮胎 去惡血"이라 하여 蜈蚣의 祛瘀通絡에 대한 효능을 기술하였는데, 이는 祛風鎭痙, 通絡止痛, 攻毒散結 등의 효능으로 抽慉, 口噤, 瘡瘍腫毒, 瘰癧潰爛, 毒蛇咬傷 증의 증상을 치료하는데 사용되어 왔음을 말하는 것이다. 蜈蚣에 대한 실험 연구로는 신경안정 및 소염작용[14], 항고혈압 작용[15], 면역반응 증가[16] 등과 安 등[17]에 의해 血栓症에 유용하다는 보고는 있으나, 아직 항산화효과에 대한 보고는 없다.

먼저, 오공 추출물이 활성산소 생성계 효소인 aldehyde oxidase와 xanthine oxidase에 대해 억제활성을 나타내는지를 검토하였다. Cytosol enzyme인 aldehyde oxidase (aldehyde:oxygen oxidoreductase; EC 1.2.3.1)는 xanthine oxidase (xanthine:oxygen oxidoreductase; EC 1.2.3.2)와 물리화학적 특성이 유사한 효소지만[39] 서로 구별되는 효소로[40] 1940년 Gordon등[41]에 의해 돼지 간조직에서 처음 flavoprotein으로 정의된 이래, 여러 연구에 의해 척추동물[42]을 비롯한 무척추동물[43], 식물[44,45]에 존재한다고 알려졌다. Aldehyde oxidase는 acetaldehyde, 핵산염기, pyridoxal 등의 산화에 관여하나 xanthine을 기질로 하지 않는다는 점에서 xanthine oxidase와 구별된다. Xanthine oxidase는 모든 생물종에 널리 분포되어 있으며 동물에서는 간 및 소장의 세포질(cytosol)에서 활성이 높다고 알려져 있다[46]. 이 효소는 radical 생성과정에서 xanthine dehydrogenase로부터 형전환되어 생화학적 반응을 촉매하는 중요한 역할을 하고 있다[47,48].

생체내의 조효소로서 다양한 생화학적 산화반응에 관여하며 여러 종류의 생리기능을 조절, 보존하여 항상성유지에 중요한 역할을 하는 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)의 대사산물인 *N*-methylnicotinic acid amide를 기질로 하고 실험동물의 뇌 cytosol분획을 효소원으로 하여 aldehyde oxidase의 활성변화를 관찰한 결과, 오공은 이 효소에 대한 억제효과가 매우 약한 것으로 조사되었으며 또 다른 활성산소 생성계 효소인 xanthine oxidase 억제 효과도 약하여 오공은 활성산소를 생성하는 효소에 대한 억제효과는 매우 약한 것으로 평가되었다.

다음으로 오공의 지질과산화 억제효과를 *in vivo*와 *in vitro*에서 측정하였다.

세포막을 구성하는 성분인 인지질의 불포화지방산은 활성산소에 의해 지질과산화반응(lipid peroxidation)을 일으키며, 이 때 생성된 과산화지질 (lipid peroxides)은 뇌신경세포를 비롯한 세포막 손상의 주요 원인이 되어 각종 조직에 손상을 가져오는 것으로 파악되고 있다. 따라서 지질과산화 반응의 억제는 한약의 항산화활성 검정에서 가장 중요한 지표로 이용되고 있다. *In vivo* 시험에서는 오공 추출물을 용량별로 투여한 실험동물의 간조직을 대상으로 지질과산화 억제활성을 측정한 결과, 모든 용량에서 대조군에 비해 지질과산화 억제활성을 보여주어 오공은 세포막의 지질과산화를 억제하여 세포를 보호하는 효과가 있음을 알 수 있었다. *In vitro* 시험에서는 오공 추출물의 지질과산화 억제활성은 용량의존적으로 활성이 증가하였으나 그 활성도는 그리 강하지 못하였다.

항산화활성을 측정하는 또 다른 지표로서

DPPH 라디칼 소거효과를 관찰하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 비교적 안정한 라디칼로서 불안정한 라디칼인 ·OH나 $·O_2^-$와 달리 반응시 취급이 용이하므로 많이 이용되고 있다. 자유라디칼은 홀수개의 전자를 가진 대단히 불안정한 화학종으로서 강력한 산화작용에 의해 생체분자 (단백질, 지방질, 탄수화물, DNA등)를 공격하여 이들을 변형시킨다[1,7,49]. 일반적으로 oxidative stress가 발생되는 세포에서는 자체내 방어기전 (항산화기전)을 가지고 있는데, 라디칼의 형성정도와 그것에 대한 방어기전의 불균형에 의해 손상이 일어난다. 이러한 손상의 근본원인은 유해물질의 생산증가이며 항산화능력의 저하, 세포의 복구능력저하 등도 중요한 원인들이다. 오공 추출물은 용량이 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거효과도 다소 증가하는 경향을 보였으며 천연 항산화제인 α-tocopherol은 1 mg/ml에서 87.7%의 우수한 라디칼 소거효과를 보였다.

다음으로는 활성산소종 소거계 효소가운데 먼저 superoxide dismutase 활성에 오공추출물이 미치는 변화를 관찰하였다. Superoxide dismutase (SOD)는 생체방어 시스템에서 유독성 superoxide ion radical을 과산화수소로 바꿈으로서 세포손상을 보호하는 역할을 하는 효소이다. 이 때, 생성된 과산화수소는 catalase에 의해 물과 산소로 바뀌면서 제거된다. SOD는 보조인자로서 4종류의 금속을 필요로 하는데 그람양성 박테리아는 망간을 함유한 MnSOD만을 함유하나 그람음성 박테리아에서는 MnSOD와 철을 함유한 FeSOD가 함께 발견된다[50]. 한편, 인간의 간조직에서 mitochondria에는 MnSOD만이 발견되나 cytosol에는 MnSOD와 구리 및 아연을 함유한 CuZnSOD가 모두 함유되어 있다[51]. 오공은 용량의존적으로 SOD 효소활성을 증가시킴으로서 항산화효과를 가지고 있는 것으로 나타났다.

다음으로 또 다른 활성산소 소거계 효소인 glutathione peroxidase 활성 변화를 검토하였다. Glutathione peroxidase (gluthathione:H_2O_2 oxidoreductase; EC 1.11.1.9)는 glutathione 존재하에서 지질과산화물과 과산화수소의 분해를 촉매하는 효소로서 Mills[52]에 의해 처음으로 발견되어 특성과 부분정제가 이루어 졌다[53]. 이 효소는 셀레늄(Se)을 강하게 결합하고 있으며[54,55] 효소 활성은 셀레늄 섭취에 의해 영향을 받는 것으로 보고되었다[56,57]. 이 효소는 과산화수소의 파괴작용으로부터 세포를 보호하기 위해 펩티드인 glutathione과 함께 어울려 작용한다. 오공 추출물 투여군은 용량의존적으로 glutathione peroxidase의 효소활성을 증가시켜 역시 활성산소 제거에 의한 항산화효과를 나타내었다.

다른 활성산소 소거계 효소인 glutathione-S-transferase 활성 변화도 검토해 보았다. Glutathione-S-transferase (EC 2.5.1.18)는 여러 가지 기능을 하는 단백질로서 독성을 가진 알킬화제 (alkylating agent)들과 공유결합을 형성하여 불활성화함으로서 해독작용에 관여하는 중요한 효소이다[58-60]. 이 효소는 SH기를 가진 glutathione과 친전자부위를 가진 다른 화합물과의 반응을 촉매시켜 최종적으로 glutamate, glycine 및 mercapturic acid로 분해시킨다[61]. 오공은 용량의존적으로 이 효소의 활성을 증가시키는 항산화효과를 보여 주었다.

마지막으로 오공투여시 뇌조직중의 glutathione의 함량 변화를 분석해 보았다. Glutathione (GSH)은 glutathione peroxidase의 작용에 의해서 해로운 과산화물을 분해하는 환원제로서의 역할을 하며 그 외, 세포막의 유지 등에 필요한 물질이다. GSH는 L-glutamic acid, L-cysteine, glycine으로 이루어진 tripeptide이며 모든 동물세포중에 고농도로 존

재하고 있다. GSH의 기능중의 하나는 glutathione peroxidase작용에 의해서 해로운 과산화물을 분해하는 환원제로서의 역할을 하는 것이다.

즉, 적혈구내의 hemoglobin의 철은 2가철이지만 과산화수소에 의해 산화되어 3가철로 변하여 methemoglobin이 생성되는데, glutathione peroxidase가 이 과산화수소를 분해함으로서 methemoglobin이 생성되지 않도록 보호하는 작용을 하는 것이다. GSH는 또한 세포막을 통한 아미노산의 운반에도 관여한다고 생각되고 있다. 오공 추출물을 투여한 뇌조직중의 glutathione 함량은 대조군의 약 2배에 달할 정도로 큰 폭으로 증가하여 오공이 조직중의 glutathione을 크게 증가시킴으로서 항산화활성을 나타내는 것으로 분석된다.

Ⅴ. 結　論

오공 추출물의 항산화효과를 확인하기 위하여 활성산소종 생성계 효소에 대한 억제효과, 활성산소 소거계 효소의 활성 증가효과, 뇌 중 항산화물질의 함량 정량, 라디칼 소거효과 및 지질과산화 억제효과를 조사한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 오공 추출물은 활성산소종 생성계 효소인 aldehyde oxidase와 xanthine oxidase의 활성을 억제하는 효과는 미약하였다.

2. 오공 추출물의 *in vivo*에서의 지질과산화 억제효과는 500 mg/kg 투여군에 가장 강하게 나타나 대조군에 비해 26.1%의 억제효과를 나타내었으며 *in vitro* 에서는 10 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해 11.2% 정도의 지질과산화 억제효과를 나타내었다.

3. 오공 추출물의 DPPH 라디칼 소거효과는 추출물의 용량에 비례하여 증가하는 경향을 보였는데 10 mg/ml의 농도에서 24.8%의 라디칼 소거활성을 나타내었다.

4. 오공 추출물은 활성산소 소거계 효소인 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase 활성을 용량의존적으로 증강시켰는데, 500 mg/kg 투여시 대조군에 비해 각각 28.9%, 22.3%, 23.1%의 효소활성 증가를 나타내었다.

5. 오공 추출물은 뇌조직중의 glutathione의 함량을 증가시켰는데, 추출물 500 mg/kg에서 glutathione 함량은 대조군의 약 2배에 달하였다.

이상의 실험결과, 오공은 항산화활성을 가지고 있으며 특히, 활성산소 소거계 효소에 대한 활성증가 효과가 우수하여 체내에서 생성되는 활성산소종을 효과적으로 제거함으로서 이로 인한 각종 질병의 예방 및 치료에 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science. 1978;201, 875.
2. Marttila RJ, Lorenz H, Rinne UK. Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. J. Neurol. Sci. 1988;86, 321.

3. Johannsen P, Velander G, and Mai J. Glutathione peroxidase in early and advanced Parkinson's disease. J. Neurol. Neurolsurg. Psychiat. 1991;54, 679.
4. Zelman FA, Thienhaus OJ, Bosmann, HB. Superoxide Dismutase activity in Alzheimer's disease. possible mechanism for paired helical filament formation. Brain. Res. 1988;476, 160.
5. Frlich I, Riederer P. Free Radical mechanisms in Dementia of Alzheimer Type and the Potential for Antioxidative Treatment. Arzneim-Forsch. Drug Res. 1995;45, 443.
6. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroi F. Excitatory amino acid release and free radicals formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J. Neurosci. 1990;10, 1035.
7. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem. 1992;59, 1609.
8. Hall ED, Braughler MJ. The role of oxygen radical-induced lipid peroxidation in acute CNS trauma. Oxygen radicals and tissue injury (ed. Hallwell, B.). FASEB Bethesda, M.D. 1988;92.
9. Marx JL. Oxygen free radicals linked to many diseases. Science. 1987;35, 529-531.
10. Harman DJ. Gerontol. 1956;11, 298.
11. Gilman SC, Bonner MJ, Pellmar TC. Effect of oxidative stress on excitatory amino acid release by cerebral cortical synaptesomes. Free Rad. Biol. & Med. 1993;15, 671.
12. 馬繼興 主編. 神農本草經輯主. 北京:人民衛生出版社. 1995:449.
13. 신민교. 원색임상본초학. 서울:영림사. 1991; 665-666.
14. 김종희, 김성훈, 송효정. 오공(蜈蚣)의 진통, 소염, 진경 및 독성작용에 관 한 실험적 연구. 대한한의학회지 1993;14.
15. 이동희, 김호철, 안덕균. 蜈蚣의 항고혈합 작용에 관한 연구. 대한본초학회지. 1997;12(2):39-49.
16. 김길섭, 서운교, 정지천. 蜈蚣이 老齡에 따른 mouse의 면역 기능에 미치는 영향. 대한 한방내과학회지. 1998;19(1):477-490.
17. 안규석. 蚯蚓, 水蛭, 蟅螬 및 蜈蚣이 血栓症에 미치는 영향. 대한한의학회지.1990;11(2):92-101.
18. Rajagopalan KV, Fridovich I, Handler P. Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. J. Biol. Chem.1962; 237, 922.
19. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase : Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). J. Biol. Chem. 1969;244, 3855.
20. Ohkawa H, Ohishi N, Yaki, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 1979;95, 351.
21. Blosi MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181, 1199.
22. Martin JP, Dailey M, Sugarman E. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. Arch. Biochem. Biophys. 1987;255, 329.

23. Paglia DE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. Lab. Clin. Med. 1967;70, 158.
24. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-dificient rat liver. Biochem. Biophysi. Res. Comm. 1976;71, 952.
25. Habig WH, Pabst MJ, Jabby WB. Glutathione-S-transferase: the first enzymatic step mercapturic acid formation. J. Biochem. 1974;249.
26. Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. Arch. Biochem. Biophys. 1959;82, 70-77.
27. 전국한의과대학본초학교실主編. 본초학. 서울:영림사. 1991;508.
28. 이상인. 본초학. 서울:수서원. 1981;239-240.
29. 이상인 외. 한약임상응용. 서울:성보사. 1986.
30. 張樹生. 百藥效用奇觀. 北京:中國古籍出版社. 1987;87.
31. 范崔生 主編. 中藥的應用. 北京:人民衛生出版社. 1989;370.
32. 楊永良 主編. 中藥學. 湖北:湖北科學技術出版社. 1989;232.
33. 江蘇新醫學院篇. 中藥大辭典. 上海:上海科學技術出版社. 1979;2472.
34. 黎新源. 痺證, 熱鬱胸膈, 鼻堉辨治, 新中醫. 1990;1:14.
35. 이시진. 도해본초강목. 서울. 고문사. 1975;1324-1325.