

左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 腦 過酸化 脂質 生成 및 活性酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響

尹 哲 浩 · 鄭 智 天 * · 朴 宣 東 **

ABSTRACT

Effects of Jwagyuyueum and Woogyuyueum on Free Radical Generating
Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Senile Rat's Brain

Yoon Cheol-Ho · Jeong Ji-Cheon * · Pak Sun-Dong **

College of Oriental Medicine, Dongguk University

* Dept. of Internal Medicine

** Dept. of Oriental Medicine Prescription

Jwagyuyueum and Woogyuyueum, being known to reinforce *Kidney*-yin and -yang, were tested for the effects of on free radical generating enzyme and lipid peroxidation in senile rat brain. *In vitro*, levels of lipid peroxide in tissues of brain were proportionally decreased to concentration of extracts prepared from Jwagyuyueum and Woogyuyueum. They were much more

* 東國大學校 韓醫科大學 內科學教室

** 東國大學校 韓醫科大學 方劑學教室

※ 본 논문은 1995년 9월 23일 대한한의학회에 제출된 논문임.

decreased, when lipid peroxidation was induced with ferrous iron (Fe^{+2}). *In vivo*, after both herbs were administered to the rat, levels of lipid peroxide in brain were decreased, especially it was much more decreased using Jwagyuyeum. Also, enzyme activities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in brain were decreased. The ratio of type conversion of the brain xanthine oxidase was lowered in both, especially Jwagyuyeum was much more done. These results suggest that Jwagyuyeum and Woogyuyeum decrease the activities of free radical generating enzymes such as xanthine oxidase and aldehyde oxidase which form lipid peroxide. Consequently both herbs might delay aging.

I. 緒 論

左歸飲은 張²¹⁾이 腎의 眞陰이 虧乏하고 髓海 不足한 경우¹⁵⁾에 補腎養陰¹⁷⁾益精²⁰⁾의 治法으로 創方된 壯水之劑²¹⁾이며, 右歸飲 또한 張²¹⁾이 溫腎填精^{17,20)}하는 效能으로 腎陽이 虛衰되어 氣怯神疲^{15,17)}한 것을 治療하는 益火之劑²¹⁾로 各其腎陰, 腎陽을 補하는 代表的인 處方이다.^{16,20)}

腎陰과 腎陽은 發育과 生殖을 主管하므로^{1,2)} 腎氣의 盛衰與否에 依하여 生長發育과 老化, 死亡이 決定된다고 할 수 있는데^{18,31)} 病理現象이 招來되면 面焦髮墮, 耳目不明, 健忘, 痴呆, 小便失禁, 陽痿, 經閉 等 老化와 關聯된 症候가 發生한다.^{1,2,14,18,24)}

老化는 生命體의 成長과 同時에 進行되는 一連의 反應으로서¹²⁾ 이에 對한 學說이 多樣하나 最近에는 自由 라디칼(free radical)에 依해 進行되는 脂質의 過酸化反應과 密接한 關係가 있는 것으로 報告되고 있다.^{13,18,40,52,54,58,64)}

脂質과 蛋白質로 構成된 細胞膜에¹²⁾ 自由 라디칼들이 作用하면 不飽和脂肪酸을 過酸化시켜 細胞膜의 透過性을 變化시키고 이로 因해 細胞

膜의 破壞를 招來하여 細胞毒性을 誘發시키는 것으로 알려져 있다.^{18,30,33,64)} 最近 많은 研究 報告들에 依하면 自由 라디칼들에 依한 過酸化脂質의 生成은 成人病의 發病過程과 疾病의 進行 및 老化現象과 密接한 關係가 있다고 알려져 있다.^{12,13,18,40,58,64)}

脂質의 過酸化 反應은 xanthine oxidase⁵⁶⁾와 aldehyde oxidase⁴⁹⁾같은 酸化酵素들에 依해서 生成되는 superoxide anion radical이나 hydroxyl radical($\cdot OH$)⁴⁸⁾ 등의 活性 酸素에 依해서 促進되며, 또한 이러한 活性 酸素들을 分解시키는 酵素인 SOD (superoxide dismutase)^{33,63)}, catalase⁴⁴⁾ 및 glutathione peroxidase⁶⁰⁾ 等에 依해서 抑制되어진다.

Yagi 等^{41,70)}은 年齡이 增加함에 따라 過酸化脂質의 含量이 比例적으로 增加한다고 하였는데, 正³⁴⁾에 依하면 老年群의 境遇 青年群에 比하여 約 1.5倍 程度의 含量增加 現象이 觀察되었다. 또한, 最近 中醫에서 老年群의 臟腑別 虛症 檢出率에 對한 調査에서 腎虛의 境遇가 83.6%로 가장 높게 나타났는데⁴¹⁾, 腎虛群에서는 過酸化脂質 含量이 上昇하고³²⁾ SOD 活性이 低下되어 있으며⁴³⁾, 腎을 補하는 五子衍宗液³⁴⁾,

還少丹²⁵⁾, 清宮長春丹⁴²⁾ 등의 處方들이 過酸化脂質의 含量을 低下시키고 SOD 活性을 上昇시켜 老化를 抑制한다고 報告하고 있다.

著者들은 左歸飲과 右歸飲이 主로 抗老衰作用을 가진 藥物들로 構成되어 있고¹⁸⁾ 腎精을 補하여 腦髓를 充養하므로^{22,24)} 腦의 老化 防止에도 有效할 것으로 생각되며, 痴呆, 健忘 등의 治療에 補腎填精法이 活用되고 있으므로^{22,23)}, 脂質의 過酸化 反應에 一定한 作用을 할 것으로 여겨져 腦에서의 過酸化脂質 含量 및 活性酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響을 檢討하였던 바 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

(1) 藥材

이 實驗에 使用한 藥材는 東國大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였으며, 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

1) 左歸飲

熟地黄	Rehmanniae Radix	12 g
山藥	Dioscoreae Rhizoma	8 g
枸杞子	Lycii Fructus	8 g
山茱萸	Corni Fructus	8 g
白茯苓	Hoelen Alba	4 g
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	4 g
Total amount		44 g

2) 右歸飲

熟地黄	Rehmanniae Radix	12 g
山藥	Dioscoreae Rhizoma	8 g
枸杞子	Lycii Fructus	8 g
杜仲鹽製	Eucommiae Cortex	8 g
山茱萸	Corni Fructus	4 g
肉桂	Cinnamomi loureirii Cortex	4 g
附子炮	Aconiti Tuber	4 g
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	4 g
Total amount		52 g

(2) 實驗動物

實驗動物은 外觀上 健康한 400g 内外의 老化된 雄性 Sprague-Dawley系 rat을 實驗前 16時間 동안 물만 주고 絶食시켜 使用하였다.

(3) 試藥 및 機器

Bovine serum albumin(BSA), β -nicotinamide adenine dinucleotide(β -NAD), xanthine sodium salt, thiobarbituric acid(TBA), N-methylnicotinamide(NMN), malondialdehyde(MDA), sodium dodesyl sulfate(SDS), xanthine oxidase는 Sigma社의 製品을 使用하였으며 此外 實驗에 使用한 모든 試藥들은 市中에서 購入한 特級 내지는 一級品을 使用하였다.

實驗에 使用한 機器는 refrigerated centrifuge(Hanil supra 22K), ultracentrifuge (Dupont Sorval OTD 65B), spectrophotometer (Shimadzu 2021) 등이었다.

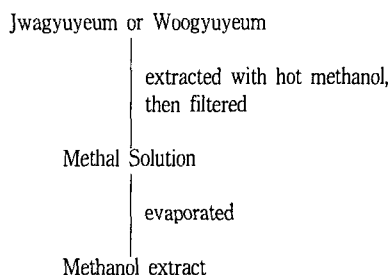
2. 實驗方法

(1) 左歸飲 및 右歸飲의 抽出物 製造

左歸飲 및 右歸飲 3貼 分量에 各各 500ml의

methanol을 가한 다음 60°C에서 24시간 間隔으로 3회 反復 抽出하여 濾過한 後, 濾液을 減壓 濃縮器로 濃縮하여 methanol extract 左歸飲 26g 및 右歸飲 28.6g을 얻었다. (Scheme 1.)

試料는 1% CMC(carboxymethyl cellulose)溶液에 懸濁시킨 左歸飲 및 右歸飲 抽出物을 實驗動物의 體重 kg當 200mg의 用量으로 1日 1回 15日間 esophagus needle을 使用해 經口投與하였으며, 對照群은 같은 方法으로 1% CMC 溶液만 經口投與하였다.

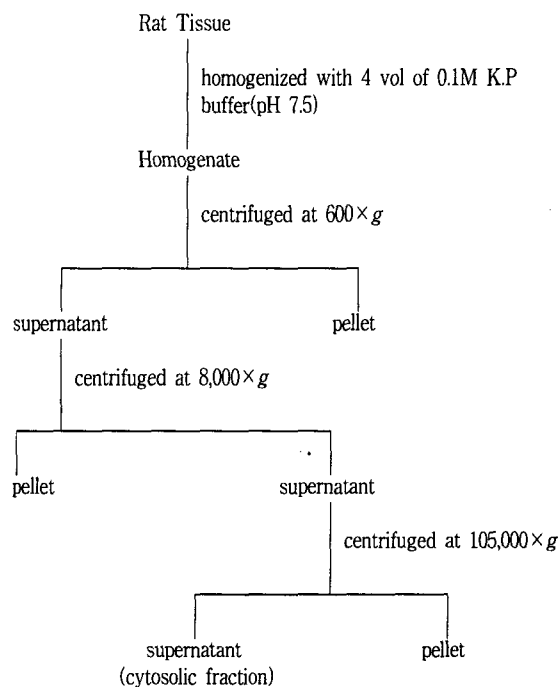


Scheme 1. Extraction of Jwagyuyeu or Woogyuyeu with Methanol

(2) 酵素源의 調製

動物은 ether로 痲醉시킨 다음 腹部 正中線을 따라 開腹하여 腹部 大動脈에서 採血한 後, 生理食鹽水로 貫流시킨 腦를 摘出하여 食鹽水로 깨끗이 씻고 濾紙로 남아있는 血液 및 生理食鹽水를 除去한 後 組織 1g當 4倍量의 0.1M potassium phosphata buffer(pH 7.5, 以下 K.P buffer로 略稱)를 加하여 氷冷下에서 glass teflon homogenizer로 磨碎하여 均質液을 만들었다. 이 磨碎均質液을 脂質의 過酸化反應 測定 試料로 使用하였다. 調製된 磨碎均質液을 600×g에서 10分間 遠心分離하여 核 및 未磨碎

部分을 除去하고 8000×g에서 다시 20分間 遠心分離하여 上澄液을 얻었다. 이 上澄液을 105,000×g에서 1時間 동안 超遠心分離하여 cytosol分劃을 얻고 이 分劃을 aldehyde oxidase 및 xanthine oxidase活性 測定 酵素源으로 使用하였다. 以上の 모든 操作은 0-4°C에서 行하였다. (Scheme 2.)



Scheme 2. Preparation of enzyme source

(3) 酵素活性의 測定

1) Aldehyde oxidase 活性測定

Aldehyde oxidase 活性測定은 Rajagopalan 等⁶⁶⁾의 方法에 依해 0.1M K.P.buffer (pH 7.5) 一定量에 基質인 N-methylnicotinamide 1.5mM 과 酵素液을 添加해 37°C에서 20分間 反應시킨

다음 20% trichloroacetic acid(TCA)를 加해 反應을 終了시켰다. 反應 終了後 生成된 pyridone을 波長 300nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 酵素의 活性도를 算定하였다. 酵素의 活性도는 1分當 1mg의 蛋白質이 生成시킨 pyridone의 量을 nmole로 나타내었다.

2) Xanthine oxidase 活性 및 型轉換率 測定
Xanthine oxidase(type O) 活性 測定은 Stirpe 等⁶⁸⁾의 方法에 準해 0.1M K.P.buffer (pH 7.5) 一定量에 基質인 xanthine 60 μ M 및 酵素源을 添加하여 37 $^{\circ}$ C에서 5分間 反應시킨 다음, 20% TCA를 加하여 制蛋白시키고 遠心 分離하였다. 이때 生成되어진 uric acid를 波長 292nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 酵素의 活性도를 算定하였다. 한편, xanthine dehydrogenase (type D)의 活性은 type O의 活性 測定 反應液에 coenzyme인 NAD⁺ 100mM을 添加해 同一하게 反應시킨 다음, 測定하여 나온 活性度 (total type : type D+O)에서 type O의 活性을 減한 값으로 算定하였다. 酵素의 活性도는 1分當 1mg의 蛋白質이 生成시킨 uric acid 量을 nmole로 나타내었다.

한편, xanthine oxidase의 型轉換比 算出은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine oxidase 反應에서 얻어진 酵素의 活性도를 利用하여 xanthine dehydrogenase (type D)에서 xanthine oxidase (type O)로의 型轉換 比率을 O/(O+D)의 比로 算出하였다.

(4) 過酸化脂質 含量 測定

過酸化脂質 含量 測定은 Ohkawa 等⁶⁵⁾의 方

法에 準해 brain 磨碎均質液 一定量에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 溶液을 加해 95 $^{\circ}$ C에서 1時間동안 反應시키고 室溫으로 冷却한 다음, 生成된 紅色의 TBA reactive substance를 n-Butanol : Pyridine(15:1) 混液으로 移行시켜 波長 532nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 定量하였다. 한편, *in vitro* 實驗에서는 Haber-Weiss反應⁶⁴⁾을 除外시킨 實驗條件과 Haber-Weiss反應을 利用하여 300 μ M의 Fe²⁺와 xanthine-xanthine oxidase system을 添加시킨 實驗條件에서 脂質의 過酸化反應을 測定하였다. 過酸化脂質의 含量은 組織 1g當 malondialdehyde(MDA)의 量을 nmole로 나타내었다.

(5) 蛋白質의 定量

蛋白質의 定量은 Lowry 等⁶¹⁾의 方法에 準해 bovine serum albumin을 標準品으로 하여 定量하였다. 한편, 實驗 結果의 有意性 檢定은 Student's *t*-test를 利用하여 相互比較하여 觀察하였다.

III. 實驗 成績

1. 試驗管內에서 腦 過酸化脂質의 含量 變化

試驗管內에서 腦 過酸化脂質의 含量變化는 對照值가 21.97 nmoles이었고, 各各의 methanol 抽出物

의 添加量을 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1.0 mg/ml로 增加시킴에 따라 左歸飲 添加群은 各各 16.12 nmoles, 12.52 nmoles, 8.12 nmoles 및 8.00 nmoles로 減少하여 對照值에 比하여 0.1 mg/ml에서 $p < 0.01$, 0.5 mg/ml와 1.0 mg/ml에서 $p < 0.001$ 의 有意性 있는 減少를 나타내었고, 右歸飲 添加群의 경우 各各 20.65 nmoles, 14.06 nmoles, 12.33 nmoles 및 10.11 nmoles로 減少하여 對照值에 比하여 0.1 mg/ml와 0.5 mg/ml에서 $p < 0.01$, 1.0 mg/ml에서 $p < 0.001$ 의 有意性 있는 減少를 나타내었다. (Table 1, Fig. 1.)

Table 1. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu on the Brain Lipid Peroxidation *in vitro*.

Dose(mg/ml)	MDA nmoles/g of tissue	
	Jwagyuyeu	Woogyuyeu
0	21.97±1.98	21.97±1.98
0.05	16.12±1.68*	20.65±1.92
0.1	12.52±1.30**	14.06±1.40**
0.5	8.12±0.94***	12.33±1.10**
1.0	8.00±0.91***	10.11±0.98***

Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

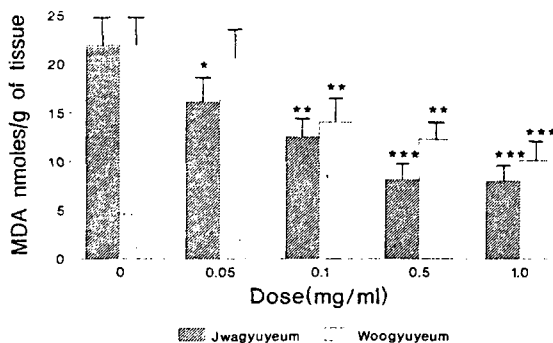


Fig. 1. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu on the brain lipid peroxidation

in vitro.

Values are mean ± S.E. for 3 separate experiments.

Significantly different from control (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

2. 試驗管内에서 Fe^{+2} 에 의해 誘導된 腦 過酸化脂質의 含量 變化

Haber-Weiss反應에 依해서 誘導된 試驗管内 腦 過酸化脂質의 含量 變化는 對照值는 56.91 nmoles이었고, 添加量을 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1.0 mg/ml로 增加시킴에 따라 左歸飲 抽出物의 경우는 各各 56.84 nmoles, 53.50 nmoles, 28.46 nmoles 및 18.21 nmoles로 減少하여 對照值에 比하여 0.5 mg/ml와 1.0 mg/ml에서 $p < 0.001$ 의 有意性 있는 減少를 나타내었고, 右歸飲 添加時는 各各 55.20 nmoles, 37.29 nmoles 및 26.49 nmoles로 減少하여 對照值에 比하여 0.5 mg/ml에서 $p < 0.01$, 1.0 mg/ml에서 $p < 0.001$ 의 有意性 있는 減少를 나타내었다.(Table 2, Fig. 2.)

Table 2. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu on the Fe^{+2} -induced Brain Lipid Peroxidation *in vitro*.

Dose(mg/ml)	MDA nmoles/g of tissue	
	Jwagyuyeu	Woogyuyeu
0	56.91±2.72	56.91±2.72
0.05	56.84±2.69	56.91±2.48
0.1	53.50±2.72	55.20±2.55
0.5	28.46±1.48***	37.29±2.47**
1.0	18.21±1.19***	26.49±1.30***

Significantly different from control (**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

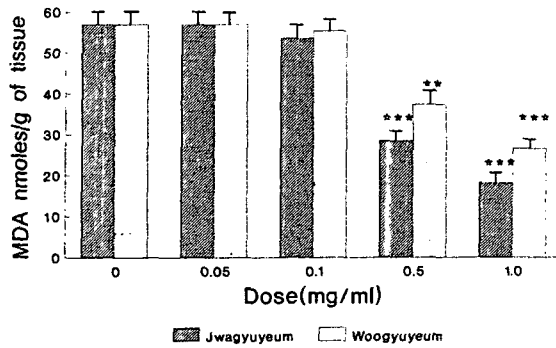


Fig. 2. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu on the Fe²⁺-induced brain lipid peroxidation *in vitro*. Values are mean ± S.E. for 3 separate experiments. Significantly different from control (**:p<0.01, ***:p<0.001).

3. 投與 期間에 따른 rat의 腦 過酸化脂質의 含量 變化

試驗管内 實驗에서 左歸飲 및 右歸飲이 脂質의 過酸化反應을 顯著하게 抑制시킴을 確認할 수 있었다. 따라서 이러한 左歸飲 및 右歸飲이 生體內에서도 類似하게 作用하는지를 確認하기 爲하여 實驗動物에 各各의 抽出物을 投與하여 아래의 여러 實驗을 行하였다. Rat의 體重 1kg 當 左歸飲과 右歸飲의 methanol 抽出物 200mg 을 各各 經口投與한 다음, 投與 期間에 따른 腦 過酸化脂質의 含量 變化를 觀察하였을 때 對照群의 경우 21.97 nmoles이었고 5日, 10日 및 15日의 投與期間에 따라 左歸飲 投與群은 各各

18.48 nmoles, 14.39 nmoles 및 8.65 nmoles로 減少하여 投與 10日, 15日째에 對照群에 比하여 各各 P<0.05, P<0.01의 有意性 있는 過酸化脂質 含量의 減少를 나타내었다. 한편, 右歸飲 投與群은 各各 18.86 nmoles, 16.21 nmoles 및 13.01 nmoles로 減少하여 投與 15日째부터 對照群에 比하여 P<0.01의 有意性 있는 減少를 나타내었다.(Table 3, Fig. 3.)

Table 3. Content of Brain Lipid Peroxides depending on the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu in Rat. (doses:200mg/kg, p.o)

Dose(mg/ml)	MDA nmoles/g of tissue	
	Jwagyuyeu	Woogyuyeu
0	21.97±1.98	21.97±1.98
5	18.48±2.24	18.86±1.94
10	14.39±1.68*	16.21±1.88
15	8.65±1.21**	13.01±1.49**

Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

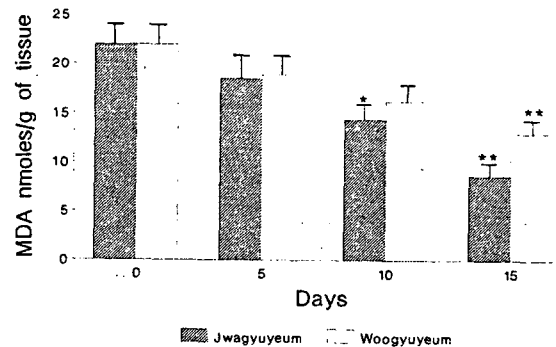


Fig. 3. Content of brain lipid peroxides depending on the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu in rat.(doses:200mg/kg, p.o) Values are mean ± S.E. for 5 animals. Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

4. 投與量에 따른 rat의 腦 過酸化脂質의 含量 變化

左歸飲과 右歸飲의 methanol 抽出物을 投與量을 달리하면서 15日間 投與하고 投與量에 따른 rat의 腦 過酸化脂質의 含量 變化를 觀察한 結果, 對照群은 21.97 nmoles이었으며 50, 100 및 200 mg/kg의 投與量에 따라 左歸飲 投與群은 各各 17.99 nmoles, 11.27 nmoles 및 8.65 nmoles로 減少하여 對照群에 比하여 100 mg/kg에서 $P<0.05$, 200 mg/kg에서 $P<0.01$ 의 有意性 있는 減少를 나타내었으며, 右歸飲 投與群은 各各 20.48 nmoles, 16.25 nmoles 및 13.01 nmoles로 減少하여 對照群에 比하여 200 mg/kg에서 $P<0.01$ 의 有意性 있는 減少를 나타내었다.(Table 4, Fig. 4)

Table 4. Content of Brain Lipid Peroxides depending on the MeOH extracts of Jwagyuyueum and Woogyuyueum in Rat. (duration: 15days)

Dose(mg/ml)	MDA nmoles/g of tissue	
	Jwagyuyueum	Woogyuyueum
0	21.97±1.98	21.97±1.98
50	17.99±1.74	20.48±1.69
100	11.27±1.60*	16.25±1.72
200	8.65±1.21**	13.01±1.49**

Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

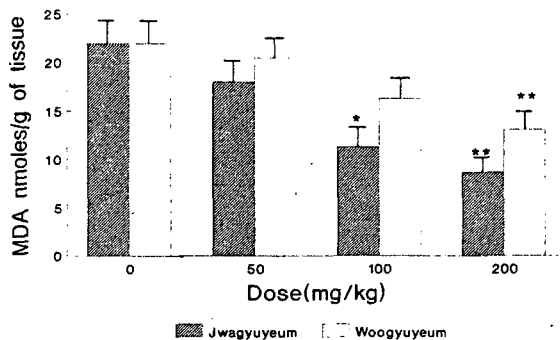


Fig. 4. Content of brain lipid peroxides depending on the MeOH extracts of Jwagyuyueum and Woogyuyueum in rat. (duration: 15days) Values are mean ± S.E. for 5 animals. Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01).

5. Rat의 腦 xanthine oxidase 活性 變化

左歸飲과 右歸飲의 methanol 抽出物 200mg/kg을 15日間 各各 投與하였을 때, rat의 腦 xanthine oxidase 活性 變化는, Type O의 경우 對照群이 0.14 nmoles인 反面 左歸飲 投與群은 0.06 nmoles로 減少되어 對照群에 比하여 $P<0.01$ 의 有意性 있는 減少를 나타내었으며, 右歸飲 投與群의 경우 0.09 nmoles로 減少되었으나 有意性은 없었다. Type D+O의 경우 對照群이 0.30 nmoles인 反面, 左歸飲 投與群은 0.34 nmoles, 右歸飲 投與群은 0.34 nmoles로 약간 增加하였지만 別다른 變化가 없었다. (Table 5, Fig. 5.)

Table 5. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyueum and Woogyuyueum on the Brain Xanthine Oxidase Activity in Rat. (doses:200mg/kg, duration:15days)

Group	Specific Activity	
	Type 0	Type D+0
Control	0.14±0.02	0.30±0.06
Jwagyuyueum	0.06±0.01**	0.34±0.04
Woogyuyueum	0.09±0.02	0.34±0.03

Significantly different from control (**:p<0.01).

: Uric acid nmoles/mg protein/min

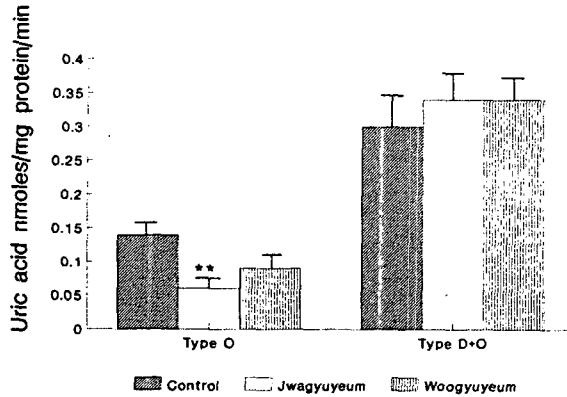


Fig. 5. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu on the brain xanthine oxidase activity in rats. Rats were received the MeOH extracts of Jwagyuyeu or Woogyuyeu (200mg/kg, p.o.) for 15 days. Values are mean \pm S.E. for 5 animals. Significantly different from control (**:p<0.01).

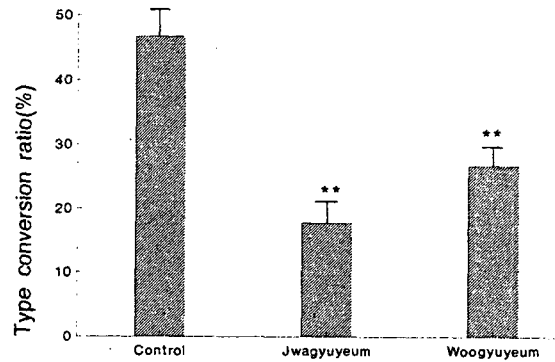


Fig. 6. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu on the type conversion of brain xanthine oxidase in rats. Rats were received the MeOH extracts Jwagyuyeu or Woogyuyeu (200mg/kg, p.o.) for 15 days. Values are mean \pm S.E. for 5 animals. Significantly different from control (**:p<0.01).

6. Rat의 腦 xanthine oxidase 型轉換 變化

左歸飲과 右歸飲의 methanol抽出物 200mg/kg을 15日間 各各 投與하였을 때, rat의 腦 xanthine oxidase 型轉換 變化는, 對照群이 46.7%인 反面 左歸飲 投與群은 17.7%로, 右歸飲 投與群의 경우 26.5%로 減少되어 모두 對照群에 比하여 P<0.01의 有意性 있는 減少를 나타내었다.(Table 6, Fig. 6.)

Table 6. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu on the Type Conversion of Brain Xanthine Oxidase in Rat. (doses: 200mg/kg, duration:15days)

Group	Type conversion ratio(%)
Control	46.7 \pm 5.4
Jwagyuyeu	17.7 \pm 3.8**
Woogyuyeu	26.5 \pm 3.2**

Significantly different from control (**:p<0.01).

7. Rat의 腦 aldehyde oxidase 活性 變化

左歸飲과 右歸飲의 methanol 抽出物 200mg/kg을 15日間 各各 投與하였을 때, rat의 腦 aldehyde oxidase 活性 變化는 對照群이 0.18 nmoles인 反面, 左歸飲 投與群은 0.08 nmoles로 減少하여 對照群에 比하여 p<0.05의 有意性 있는 減少를 나타내었고, 右歸飲 投與群의 경우 0.14 nmoles로 減少하였다. (Table 7, Fig. 7.)

Table 7. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu on the Aldehyde Oxidase Activity in Rat Brain. (doses:200mg/kg, duration:15days)

Group	Specific Activity#
-------	--------------------

Control	0.18±0.04
Jwagyuyeuem	0.08±0.02*
Woogyuyeuem	0.14±0.02

Significantly different from control. (*:p<0.05)
: 2-pyridone nmoles/mg protein/min

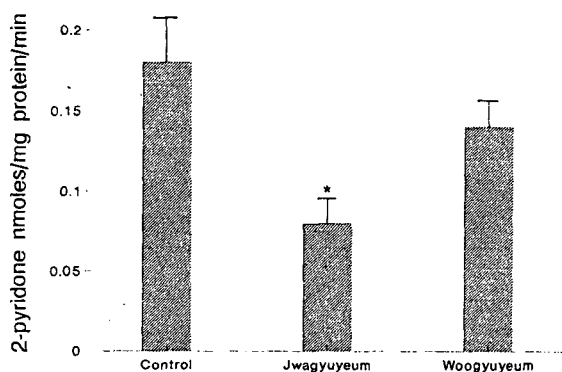


Fig. 7. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeuem and Woogyuyeuem on the aldehyde oxidase activity in rat brain.

Rats were received the MeOH extracts of Jwagyuyeuem or Woogyuyeuem (200mg/kg, p.o.) for 15 days.

Values are mean ± S.E. for 5 animals.

Significantly different from control. (*:p<0.05)

IV. 考 察

老化는 반드시 人生의 後半에 限定된 것이 아니고 成長과 同時에 進行되는 것으로¹²⁾ 이와 關聯된 主要 原因으로는 DNA說, 內分泌說, 化學反應說, 免疫說 等⁵⁰⁾이 있으나 最近에는 自由 라디칼(free radical)에 依해서 誘導되는 脂質의 過酸化反應이 老化現象과 密接한 關係가 있는 것으로 報告되고 있다.^{13,18,34,40,52,54,58,64)}

Harman⁵⁸⁾에 依하면 生體가 外部로 부터 放射線 또는 紫外線을 받거나 重金屬 및 有機溶

劑의 吸入, 抗生劑 等 合成藥品의 濫用, 過度한 肉體的, 精神的 스트레스 等を 받게 되면 生體內에서 生化學的 酸化反應이 促進되고 이와 並行하여 free radical의 生成이 增加하게 되는데 이러한 free radical類에 依하여 細胞나 組織이 損傷을 받게 되거나 過酸化脂質의 生成이 誘導되기 때문에 老化를 促進한다고 報告하고 있다.

生體의 基本 單位인 細胞는 脂質과 蛋白質로 構成된 細胞膜으로 둘러 싸여 있는데¹²⁾ 刺戟이 繼續되면 不飽和脂肪酸을 包含한 脂質이 變化하여 free radical이 生成되고 여기에 活性化된 酸素가 作用하여 peroxy radical이 生成되어 다른 脂質成分과 連鎖反應하여 過酸化脂質이 生成되고 있다.^{12,18,30,33,34)}

過酸化脂質 生成의 原因이 되는 活性 酸素類들은 分子 狀態의 酸素(O₂)가 生體內 酸化還元反應의 電子受容體로 利用되므로서 持續的으로 還元되어 가는 過程 中에 生成되는 不完全한 酸素의 還元形態로 superoxide anion, hydrogen peroxide(H₂O₂) 및 hydroxyl radical (·OH) 等⁴⁸⁾이 있으며, 이들 中 hydroxyl radical이 가장 強力한 活性을 지니는 것으로 알려져 있다.^{46,53,67)} 生體內에서 活性酸素는 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase⁶²⁾ 및 microsomal mixed function oxidase⁵⁵⁾, catecholamines⁵¹⁾의 自動 酸化에 依해서도 生成된다.

韓醫學에서는 素問¹⁴⁾에 ‘女子…五七陽明脈衰, 面始焦, 髮始墮, 六七三陽脈衰于上, 面皆焦, 髮始白, 七七任脈虛, 太沖脈衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形壞而無子也, 丈夫…五八腎氣衰, 髮墮齒槁, 六八陽氣衰

于上,面焦,髮鬢頽去,七八肝氣衰,筋不能動,天癸竭,精少,腎藏衰,形體皆極,八八則齒髮去'라고 年齡의 增加에 따른 老化現象에 對하여 記述하였으며 또한, 素問¹⁴⁾에 '天壽過度,氣脈常通,而腎氣有餘也', 虞¹⁹⁾는 '腎元盛則壽延,腎元衰則壽夭'라고 하여 長壽하는 것이 腎氣의 盛衰與否에 依하여 決定된다고 하였다.

生長發育, 老衰와 密接한 關係가 있는 腎의 作用은 腎陰과 腎陽의 兩 方面으로 概括되어 腎陰은 一身의 陰液의 根本으로서 濡潤, 滋養作用을 하고, 腎陽은 人體 陽氣의 根本이자 先天의 眞火로서 溫煦, 氣化作用을 하여 腎陰과 더불어 發育과 生殖을 促進하는데^{1,2)} 病理現象이 招來時 治療를 爲하여 左歸飲과 右歸飲 등이 基本的으로 使用된다.^{16,20)}

右歸飲은 張²¹⁾이 八味地黃湯에서 清熱의 牡丹皮, 澤瀉, 茯苓을 去하고 補腎益精의 枸杞子, 杜仲을 加하고 再次 補中益氣의 炙甘草를 加하여 補而不瀉하고 溫補腎陽의 效能을 增強시킨 益火之原의 方劑로서 腎陽虛가 比較的 重한 경우에 使用된다. 左歸飲 또한, 張²¹⁾이 六味地黃湯에서 涼性의 牡丹皮와 泄腎經之火하는 澤瀉를 去하고 滋補肝腎하는 枸杞子和 益氣健脾하는 炙甘草를 加하여 補而不瀉하고 補益腎陰의 效能을 增強시킨 純補壯水之劑로 腎陰虛가 比較的 重한 경우에 使用된다.^{15,16,17,20)}

構成 藥物에 對한 實驗 研究에 依하면 熟地黃^{26,28,40)}, 山茱萸^{26,28,40)}, 枸杞子^{28,37)}, 杜仲²⁸⁾, 肉桂^{26,39)} 등의 藥物이 過酸化脂質의 生成을 抑制시키고, 枸杞子^{31,37)}, 山藥⁴⁰⁾, 熟地黃⁴⁰⁾ 등의 藥物은 SOD의 活性을 增加시켰으며, 枸杞子^{27,35)}, 杜仲²⁷⁾, 肉桂²⁷⁾ 등은 實驗動物의 壽命을 延長시키는 效果가 있

음이 밝혀졌다. 그리고, 枸杞子는 細胞의 免疫機能을 增強시켜³⁸⁾ 免疫系에 作用하는 脾臟과 胸腺의 重量을 增加시켰으며^{4,26)} 熟地黃과 더불어 大腦 發育을 促進하여 大腦의 老化와 萎縮을 防止하였다.²⁶⁾ 또한, 附子^{26,38)}는 細胞內 DNA와 RNA의 合成率을 增加시키고, 山藥^{29,38)}은 大食細胞의 食食能力을 向上시키며, 甘草³⁸⁾의 glycyrrhizin成分은 副腎皮質 刺戟 호르몬과 類似한 機能이 있음이 報告되고 있다. 이를 보건데, 左歸飲과 右歸飲은 主로 抗老衰 作用이 있는 藥物들로 構成되어 있으며 腎精을 補하고 腦髓를 充養하므로^{22,24)} 腦의 老化에도 影響을 줄 것으로 여겨진다.

左歸飲과 右歸飲에 對한 實驗研究로는 金⁷⁾의 左歸飲이 腎臟機能과 血漿 Aldosterone 濃도에 미치는 影響, 姜³⁾의 右歸飲이 家兔 腎臟機能과 血漿 Aldosterone 濃도에 미치는 影響, 金⁸⁾의 右歸飲이 Cyclosporin A의 肝毒性에 對한 影響, 禹¹¹⁾의 右歸飲이 Hydrocortisone에 依한 白鼠의 副腎皮質 萎縮에 미치는 影響, 金⁵⁾의 右歸飲이 Hydrocortisone 投與로 誘發된 家兔의 副腎皮質機能低下에 미치는 影響, 李³⁶⁾의 右歸飲이 免疫器官인 脾와 胸腺에 미치는 影響 등이 있으나, 老化와 關聯된 報告로는 申¹⁰⁾의 右歸飲과 右歸飲加肉蓯蓉이 血中 호르몬 및 SOD 活性에 미치는 影響에 對한 報告가 있을 뿐이다.

그러므로, 本 實驗은 腎陰과 腎陽을 補하는 左歸飲, 右歸飲이 腦의 老化에 미치는 影響을 살펴보기 爲하여 腦에서의 過酸化脂質 生成과 oxygen free radical 生成系 酵素 活性에 미치는 影響에 關하여 檢討해 보았다.

生體膜 損傷의 程度를 나타내는 過酸化脂質의 含量⁵⁹⁾은 試驗管内 實驗에서 左歸飲 및 右歸飲 抽出物을 用量別로 添加한 後 脂質의 過酸化反應을 測定하였을 때 모두 過酸化脂質의 含量을 有意性 있게 抑制하였으며, 또한 Haber-Weiss反應⁶⁴⁾을 利用하여 人爲的으로 過酸化脂質의 生成을 促進시킨 實驗條件에서는 過酸化脂質의 生成 抑制程度가 더욱 強力하였다. 이는 左歸飲이나 右歸飲의 作用이 正常的인 條件에서 보다 病的狀態에서 作用이 훨씬 強하게 나타나고 있음을 示唆하고 있다.

試驗管内 實驗에서 觀察된 이런 現狀이 生體内에서는 어떤 樣相으로 나타나는지를 檢討하기 爲하여 各各의 抽出物을 期間과 用量을 달리하여 實驗動物에 投與하였을 때, 投與期間과 投與用量에 比例하여 左歸飲, 右歸飲 投與群 모두 過酸化脂質의 含量이 有意性 있게 減少되었으며 左歸飲 投與群에서 有意性이 더욱 強하였다. Rat의 體重 1kg當 200mg을 15日間 投與하였을 때 減少效果가 가장 높게 나타나 對照群의 21.97 nmoles에 比하여 左歸飲 投與群은 8.65 nmoles로 나타나 約 60%의 有意性 있는 減少를 보였다.

이러한 結果는 脂質의 過酸化反應과 老化的 進行과는 相當한 聯關性이 있다는 研究報告^{13,34,41,70)} 및 加齡에 따라 rat의 腦에서 生成되는 過酸化脂質의 含量이 增加한다는 Yoshikawa⁷¹⁾의 報告와 함께 枸杞子가 腦細胞의 神經軸索 突起生成을 促進시키고⁹⁾ 熟地黃과 더불어 腦細胞에 營養을 供給하여 大腦의 老化和 萎縮을 防止한다는²⁶⁾ 報告와 聯關지어 볼 때, 左歸飲과 右歸飲은 腦의 老화를 防止하여 腦動脈硬化, 腦

血栓 等の 豫防과 治療에 效果的인 可能性을 示唆하고 있으며 老人性 痴呆, 健忘의 治療에도 有效할 것으로 思料된다.

Xanthine oxidase는 生體内에 널리 分布되어 있으며 活性酸素 生成의 生化學的 酸化反應을 觸媒하는 重要한 酵素로 알려져 있다.⁵⁶⁾ 正常過程에서 이 酵素는 電子 受容體로 NAD^+ 를 利用하는 xanthine dehydrogenase(type D) 形態로 存在하나 病態 生理 條件이 附與될 때에는 酸素를 電子 受容體로 利用하여 活性 酸素를 生成시키는 xanthine oxidase(type O) 形態로 轉換된다는 事實이 밝혀지고 있다.^{47,68,69)}

Xanthine dehydrogenase로부터 xanthine oxidase로 型轉換이 이루어져야만 活性酸素의 生成에 參與할 수 있으며^{47,68)} 病態 生理條件이 附與될 때 型轉換이 急進的으로 促進되며⁵⁷⁾ 實驗動物의 나이에 따라 xanthine oxidase 活性 및 型轉換이 增加된다는 報告^{6,13)}로 미루어 볼 때 xanthine oxidase의 活性 및 型轉換에 對한 抑制는 老화를 抑制시키는 것과 關聯性이 強할 것으로 여겨진다. 本 實驗에서는 左歸飲과 右歸飲 投與群 모두에서 xanthine oxidase의 活性和 型轉換을 有意性 있게 抑制하였는데, 특히 左歸飲의 경우 對照群의 46.7%에서 17.7%로 減少하여 約 63%의 型轉換 抑制를 보였다.

Aldehyde oxidase는 細胞質 分割에 存在하는 molybden含有 flavoprotein酵素로서 pyridoxal 等の 外因性 物質과 內因性 物質을 代謝시키는 反應을 觸媒하는 基質 非特異性 酸化酵素이다.⁴⁹⁾ 이 酵素가 觸媒하는 酸化反應이 進行되는 過程에 分子狀態의 酸素에 基質의 電子를 傳達하는 生化學的 反應으로 superoxide anion을

生成하는 機能을 遂行하게 된다.⁴⁵⁾

酵素 活性에 對한 左歸飲과 右歸飲의 抑制 作用은 xanthine oxidase의 生化學的 性狀과 機能이 類似한 aldehyde oxidase^{13,59)}에 對해서 도 xanthine oxidase와 類似하게 나타나 左歸飲, 右歸飲 모두 aldehyde oxidase의 活性을 抑制하였으나 左歸飲 投與群에서 더욱 有意性 있게 抑制하여 對照群의 0.18 nmoles에서 0.08 nmoles로 約 55%의 酵素 活性 抑制를 보였다.

以上の 實驗 結果들을 綜合하면 左歸飲과 右歸飲은 腦에서 free radical의 生成系 酵素인 xanthine oxidase의 活性 및 型轉換率과 aldehyde oxidase의 活性을 有意性 있게 抑制 시킴으로서 活性酸素의 生成을 沮害하여 活性 酸素에 依해 誘導되는 脂質의 過酸化反應을 抑制시킨 것으로 생각되어진다. 또한, 左歸飲과 右歸飲은 老化 防止에도 有效할 것으로 思料되며 活性 酸素 分解系 酵素活性에 미치는 影響 等에 對한 研究가 必要할 것으로 여겨진다.

V. 結 論

左歸飲과 右歸飲이 老化와 關聯된 parameter 에 미치는 影響을 알아보기 爲한 一環으로 腦에서 過酸化脂質 含量 變化와 xanthine oxidase 活性 및 型轉換率, aldehyde oxidase의 活性 變化를 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 試驗管内 過酸化脂質 生成反應에서 用量別로 左歸飲과 右歸飲 抽出物을 添加하였을 때 모두에서 用量 依存的으로 有意性 있게

減少하였고 左歸飲에서 더욱 有意性 있게 減少하였다. 한편, Fe^{+2} 로 脂質의 過酸化反應을 誘導한 後 過酸化脂質 生成量도 左歸飲과 右歸飲 添加時 모두에서 用量 依存的으로 有意性 있게 減少하였으며 左歸飲에서 더욱 有意性 있게 減少하였다.

2. 生體內에서 過酸化脂質 含量 變化는 左歸飲, 右歸飲 投與群 모두에서 減少하였는데 左歸飲 投與群에서 有意性이 있었고, 이러한 減少效果는 200mg/kg을 15日間 投與하였을 때 가장 效果가 높았다.
3. 生體內에서 xanthine oxidase 活性度는 type O에서는 左歸飲, 右歸飲 投與群 모두 減少하였으며 左歸飲 投與群에서 有意性 있게 減少하였고, type D+O에서는 別다른 變化는 없었다. 또한, xanthine oxidase의 型轉換率은 左歸飲과 右歸飲 投與群 모두에서 有意性 있게 減少하였으며 特히 左歸飲 投與群에서 減少率이 높았다.
4. 生體內 aldehyde oxidase 活性度는 左歸飲, 右歸飲 모두에서 減少하였고 特히 左歸飲 投與群에서 有意性 있게 減少하였다.

以上の 結果로 보아 左歸飲과 右歸飲은 腦에서 oxygen free radical 生成系 酵素인 xanthine oxidase의 活性 및 型轉換率과 aldehyde oxidase의 活性을 抑制시켜 活性酸素類의 生成을 沮害하므로 過酸化脂質의 生成을 抑制시킨 것으로 여겨지며 아울러 腦의 老化 防止에 有效할 것으로 思料된다.

參考文獻

- 1) 金完熙,崔達永 : 臟腑辨證論治, 成輔社, pp.282-284, 1985.
- 2) 杜鎬京 : 東醫腎系學(上), 東洋醫學研究院, pp.10-11, 1993.
- 3) 姜仁守,李彥政,柳志允 : 右歸飲과 八味地黃湯煎湯液 投與가 家兔 腎臟機能 및 血漿 Aldosterone 濃度에 미치는 影響, 원광 韓醫學, 원광 大學校 韓醫學 研究所, 2(1):65-85, 1992.
- 4) 김미숙 外 : 수중 생약 수침 엑기스의 면역증강 작용에 관한 연구, 생약학회지, 19(3):193-200, 1988.
- 5) 金榮陸 外 : 右歸飲이 Hydrocortisone 投與로 誘發된 家兔副腎皮質機能低下에 미치는 影響, 大韓東醫病理學會誌, 4:142-159, 1989.
- 6) 金永文 : Xanthine oxidase 型 轉換에 關한 研究,嶺南大學校 大學院 博士學位論文,1993.
- 7) 金炯均 : 左歸飲과 六味地黃湯煎湯液 投與가 家兔 腎臟機能 및 血漿 Aldosterone 濃度에 미치는 影響, 원광 大學校 大學院 碩士學位論文, 1992.
- 8) 金昊顯 外 : Cyclosporin A의 肝毒性에 對한 右歸飲의 影響,東國大學校 韓醫學研究所 論文集, 2(2):1-15, 1993.
- 9) 박미정,송진호,김영중 : 수중생약이 일차배양한 계배의 뇌세포에 미치는 영향, 생약학회지, 20(1):32-36; 1989.
- 10) 中興默 外 : 命門動氣의 生理作用에 對한 實驗的 研究-右歸飲과 右歸飲加肉蓯蓉이 飢餓白鼠 血中 호르몬 및 SOD活性에 미치는 影響,東醫生理學會誌, 6(1):1-23, 1991.
- 11) 禹元洪,鄭遇悅 : 右歸飲이 Hydrocortisone 에 依한 白鼠副腎皮質萎縮에 미치는 影響, 大韓東醫病理學會誌, 3:18-29, 1988.
- 12) 최 진호 : 노화의 메카니즘과 연구방향, 생화학뉴스, 한국생화학회, 5(3):39-53, 1985.
- 13) 허 근,신억섭,박종민 : 지질과산화 반응과 Free Radical 생성계 효소활성에 미치는 Testosterone의 영향, 약학회지, 38(2):166-173, 1994.
- 14) 南京中醫學院醫經教研組 : 黃帝內經素問譯釋, 上海科學技術出版社, pp.4-5, 1983.
- 15) 方文賢 : 中醫名方臨證秘用, 中國中醫藥出版社, pp.242,246, 1993.
- 16) 楊蘊祥 : 古今名方, 河南科學技術出版社, pp.132-133, 1983.
- 17) 連建偉 : 歷代名方精編, 江科學技術出版社, pp.271-273, 284-287, 1987.
- 18) 王其飛 外 : 中醫長壽學, 遼寧科學技術出版社, pp.50,53,54, 1989.
- 19) 虞 搏 : 醫學正傳,成輔社,p.9,1986.
- 20) 于世良 : 中醫名方精釋, 中醫古籍出版社, pp.139, 145-146, 1993.
- 21) 張介賓 : 景岳全書(下), 大成文化社, pp.416-417, 1988.
- 22) 張明淮 外 : 心-腦-神志病辨證論治, 黑龍江科學技術出版社, pp.105,111, 1988.
- 23) 張 天 外 : 實用中醫腎病學, 上海中醫學院出版社, pp.503-513, 1990.
- 24) 田金洲 外 : 中醫老年病學, 天津科學技術出版社, pp.17,60, 1994.
- 25) 杜 辛 外 : 還少丹膠囊抗衰老及治療腎陽虛

- 臨床觀察, 中國中西醫結合雜誌, 12(1):20-22, 1992.
- 26) 馬瑞珩 : 中藥的抗衰延年作用, 浙江中醫學院學報, 15(6):49-51, 1991.
- 27) 莫新民 外 : 抗衰延壽方對家蠅壽命的影響, 中草藥, 24(7):358-359, 1993.
- 28) 舒守琴 外 : 27種中藥及SOD對體外大白鼠賂均漿過氧化脂質生成的影響, 山東中醫藥院學報, 15(3):70-72, 1991.
- 29) 聶桂華 外 : 山藥的研究概況, 中草藥, 24(3):158-160, 1993.
- 30) 孫承琳 外 : 人蔘對培養神經細胞自由基損傷的保護作用, 北京中醫學院學報, 16(4):62-67, 1993.
- 31) 曾一飛 外 : 補腎抗衰口服液抗自由基損傷的實驗研究, 四川中醫, 10:12-14, 1992.
- 32) 梁曉春 外 : 腎虛, 衰老與自由基的關係以及補腎藥對自由基的影響, 中西醫結合雜誌, 10(8):511-512, 1990.
- 33) 余月明 外 : 自由基衰老學說, 腎虛與衰老及補腎抗衰老研究, 陝西中醫, 14(4):187-188, 1993.
- 34) 王學美 外 : 五子衍宗液延緩衰老的臨床觀察, 中國中西醫結合雜誌, 12(1):23-25, 1992.
- 35) 劉小英 : 枸杞的抗衰藥理研究與臨床應用概述, 四川中醫, 7:18-19, 1993.
- 36) 李貴海 外 : 右歸飲溫陽作用的實驗觀察, 中西醫結合雜誌, 10(9):547-548, 1990.
- 37) 李 爲 外 : 口服枸杞子對老年人血中超氧化物歧化酶, 血紅蛋白和過氧化脂質含量的動態觀察, 中草藥, 22(6):251, 268, 1991.
- 38) 李志海 : 中藥抗衰老作用的研究探討, 中草藥, 17(10):37-41, 1986.
- 39) 李春生 : 中國傳統延緩衰老藥物的現代研究概述, 中醫雜誌, 29(1):59-62, 1988.
- 40) 李獻平 外 : 四大懷藥延緩衰老作用的研究, 中西醫結合雜誌, 11(8):486-487, 1991.
- 41) 張文彭 外 : 老年腎虛證血漿過氧化脂質高密度脂蛋白膽固醇及其亞組分水平變化, 中醫雜誌, 30(2):43-46, 1989.
- 42) 張文彭 外 : 清宮長春丹對老年腎虛證血漿過氧化脂質, 高密度脂蛋白, 膽固醇水平影響的研究, 中醫雜誌, 30(3):34, 1989.
- 43) 陳晏珍 外 : 腎虛與超氧化物歧化酶關係初探, 中醫雜誌, 30(4):42, 1989.
- 44) Aebi, H. : Catalase erythrocytaire, in : Exposes Annuels de Biochimie Medicale, 29 ieme serie, Masson & Cie(eds), Paris, pp.139-164 (1969).
- 45) Badwey, J.A., Robinson, J.M., Karnovsky, M.J. and Karnovsky, M.L.: Superoxide production by an unusual aldehyde oxidase in guinea pig granulocytes. Characterization and cytochemical localization, *J.Biol.Chem.*, 256(7):3479-3486 (1981)
- 46) Barry, H : Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB.J.*, 1, pp.358-364(1987)
- 47) Battelli, M.G. : Enzymatic conversion of rat liver xanthine oxidase from dehydrogenase to xanthine. *FEBS Letters.* 113:47-51 (1980)
- 48) Battelli, N.G., Lorenzoni, E. and Stirpe, F. : Milk xanthine oxidase type D(dehydrogenase) and type O(oxidase):

- Purification and interconversion and some properties. *Biochem.J.*, **131**:191-198 (1973)
- 49) Bell,R.R., Blanchard,C.A. and Haskell,B.E. :Metabolism of vitamine B₆ in the 1-strain mouse. *Arch. Biochem. Biophys* **147**:602 (1971)
- 50) Biozzi, G., Stiefel, C.M., Bouthillier,Y. and Deceusefound, G.A. : Kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immnuized intraveosly with sheep erythrocyte.*J.Immunol.*, **14**:7-15 (1968)
- 51) Bodanes,R.S. and Chan,P.C. : Singlet oxygen as a mediator in hematoporphyrin-catalyzed photooxidation of NADPH to NADP⁺ in deuterium oxide. *J.Biol.Chem.*, **252**, 8554-8560 (1977)
- 52) Cutler, R.G. : Antioxidants, aging and longevity. *Free Radicals in Biology* (ed. Pryor, W.), Academic Press, Vol.6, pp.371-424 (1984)
- 53) David, R. : Mechanistic toxicology : A radicalperspective. *J.Pharm.pharmacol.*, **41**, 505-511 (1989)
- 54) Feher,J.,Csomos,G. and Vereckei,A : The free radical theory of aging. *Free Radicals Reactions in Medicine*, Springer- Verlag, Berlin, pp.57-59 (1987)
- 55) Freemann,B.A. and Crapo,J.D.: Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab.Invest.*, **47**, 412-426 (1982)
- 56) Fridovich,I. and McCord,J.M. : Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyuprein(hemocuprein).*J.Biol.Chem.*, **244**, 6049-6055 (1969)
- 57) Granger,D.N.,Rutili,G. and McCord,J.M. : Role of superoxide radicals in intestinal ischemia.*Gastroenterol.*, **81**:22 (1981)
- 58) Harman,D : Free radical theory of aging :Role of free radicals in the organization and evolution of life, aging and disease processes. *Free Radicals, Aging and Degenerative Disease* (ed. Johnson,J.E. et al.), Alan R.Liss.Inc., New York, pp.3-49 (1986)
- 59) Huff,S.D. and Chaykin,S. : Kinetics of testosterone action, *in vivo*, on liver N-methylnicotinamide oxidase activity in mice. *Endocrinology*, **83**, 1259(1968)
- 60) Little,C. and O'Brien,P.J. : An intracellular GSH-peroxidase with lipid peroxide substrate. *Biochem. Biophys.Res. Comm.*, **31**, pp.145-150 (1968)
- 61) Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. and Randall,R.J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 62) Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S.G., Howell, L.G. and Engel, P.C. : The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoprotein with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **36**, 891-897 (1969)
- 63) McCord,J.M.: Free radical and inflammation

- : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, **185**, 529-531 (1974)
- 64) Milan L., Jozef R., Vilian K., Peter P. and Ladislav V.: Free Radicals in Chemistry and Biology, CRC Press, pp.29-31, 283-284 (1989)
- 65) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358 (1979)
- 66) Rajagopalan, K.V., Fridovich, I. and Handler, P.: Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **237**, 922-928 (1962)
- 67) Simon, R.H., Scogging, C.M. and Patterson, D.: Hydrogen peroxide cause the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, **266**, 7181-7186 (1981)
- 68) Stirpe, F. and 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.*, **244**, 3855-3863 (1969)
- 69) Tubaro, E., Banci, F., Lotti, B. and Croce, C.: Xanthine oxidase activation in animal liver during infections processes. *Arzneim Forsch. (Drug Res.)*, **26**, 2185 (1976)
- 70) Yagi, K.: Lipid peroxides and diseases, *Chem. and Phys. of Lipid*, **45**:337 (1987)
- 71) Yoshikawa, M. and Hirai, S.: Lipid peroxide formation in the brain of aging rats. *J. Gerontol.*, **22**, 162-5 (1967)