

還少丹이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

徐元熙, 李相龍

I. 緒 論

老化는 한 個體에서 時間의 進行에 比例하여 일어나는 漸進의이고 內的인 退行性 變化로 構造的·機能的 變化가 招來되어 外部環境에 대해 反應하는 能力이 低下되는 것으로¹⁾ 腦의 老化는 20代 後半부터 시작되어 神經細胞의 數는 減少되고 軸索은 變成되면서 lipo-fuscin과 같은 代謝產物들이 蓄積되고 肉眼的으로도 여러 가지 變化를 일으키면서 質量이 減少되어 60歲가 지나면서 50~150g정도 줄어든다²⁻⁹⁾.

韓醫學에서는 《靈樞·海論》¹⁰⁾에서 “腦爲髓之海 … 髓海不足 則腦轉耳鳴 脛痠眩冒 目無所見 懈怠安臥”, 《素問·刺禁論篇》¹¹⁾에서 “腦爲髓之海 眞氣之所聚”라 하였으며 《靈樞·經脈篇》¹⁰⁾에서는 “人始生 先生精 精成而腦髓生”이라 하여 腦와 精과의 相關性을 示唆하였다.

還少丹은 AD 1170年 宋代의 《洪氏集驗方》¹²⁾에 처음 收錄된 것으로 溫補脾胃, 養心安神의 效能을 가지며 《實用中醫腦病學》¹³⁾에서는 精氣兩虛로 인한 痴呆의 症狀인 “年老表情呆滯 行動遲緩 記憶力減退 …”에 사용되었으며 中國에서는 老年性 黃斑變性¹⁴⁾에 관한 臨床事例가 報告되고 있다.

西洋醫學에서는 老化의 原因에 대하여 遺傳學說, error破滅說, 體細胞突然變異說, 代謝產物蓄積說, 自由遊離基說, 生體防禦機構障礙說, stress說 등의 細胞·細胞下單位 老化說과 個體單位에서의 老化學說로 多樣하게 提示하고 있는데^{2,15,16,17,18)} 그 중 自由遊離基說(free ra-

dical theory)은 內的, 環境的 因子에 의해 體內에 自由遊離基가 많이 發生하고 抗氧化劑는 減少하며 lipo-fuscin과 같은 過酸化脂質이 蓄積되어 老化가 促進된다는 理論이다^{2,16)}.

自由遊離基 理論을 證明하기 위해 Harman과 Kohn이 抗氧化劑를 먹여 老化를 遲延시키는 研究를 始作¹⁵⁾한 以後로 老化의 防止를 위하여 抗氧化作用을 나타내는 物質을 찾는 實驗研究가 이루어지고 있는데 이 등¹⁹⁾은 浮萍草 化學成分 및 抗氧化效果에 관한 研究를, 백 등²⁰⁾은 綠茶로부터 分離된 epicatechin 3-O-gallate의 抗氧化作用 機轉에 관한 研究를 하였다.

最近에 韓醫學에서는 抗氧化作用에 대한 많은 研究가 이루어지고 있는데 安 등²¹⁻²⁴⁾은 當歸藥針, 胡桃藥針, 白何首烏藥針, 杜冲葉藥針을 蘇 등²⁵⁻²⁸⁾은 鹿蓼地黃湯, 血府逐瘀湯, 左歸飲과 右歸飲 등에 관한 實驗的 研究를 報告한 바 있으며 腦의 老化에 관한 研究로는 朴 등²⁹⁾이 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 酸素 活性에 미치는 影響을, 徐³⁰⁾가 聰明湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 影響을 發表하였고 中國에서는 張³¹⁾이 中醫治療腦萎縮近況을 張³²⁾이 略論腎骨髓腦的同病共治를 龔³³⁾이 腎腦相關論用治現代腦病的理論探析을 報告한 바 있으나 還少丹이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響에 대한 研究는 접하지 못하였다.

이에 著者는 還少丹이 腦組織의 抗氧化作用에 미치는 影響을 糾明할 目的으로, 흰쥐의 腦組織에서 細胞質 分割을 分離하여, malondialdehyde(MDA) 生成 抑制 活性, 過酸化水素(hydrogen peroxide)의 生成, super-

oxide dismutase

(SOD)의 活性度, catalase 活性度, NADPH- cytochrome P-450 reductase 活性度を 測定하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 藥 劑

實驗에 使用된 藥物은 《醫方集解》³⁴⁾에 收載된 還少丹으로 大田大學校 附屬韓方病院에서 購入한 것을 精選하여 使用하였는데 各各 1貼의 處方內容과 分量은 다음과 같다.

Priscription of HWANSODAN(HSD)

韓 藥	生 藥 名	重 量(g)
熟地黃	Rhizoma Rehmanniae	3.750
山 藥	Rhizoma Dioscoreae	1.875
牛 膝	Radix Achyranthis	1.875
枸杞子	Fructus Lycii	1.875
山茱萸	Fructus Corni	1.875
茯 苓	Poria	1.875
杜 冲	Cortex Eucommiae	1.875
遠 志	Radix Polygalae	1.875
五味子	Fructus Schizandrae	1.875
楮 實	Fructus Broussonetiæ	1.875
小茴香	Fructus Foeniculi	1.875
巴戟天	Radix Morindae	1.875
肉蓯蓉	Caulis Cistanchis	1.875
石菖蒲	Rhizoma Acori Graminei	0.938
大 棗	Fructus Zizyphi jujubae	1.875
Total amount		29.063

2) 動 物

動物은 雌雄 區分 없이 體重 400±20g의 Spraque-Dawley系(韓國化學研究所) 흰쥐를 使用하였고, 固型飼料(삼양사 배합 사료 Co.)와 물을 充分히 供給하고 4週日間 實驗室 環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다.

3) 試藥 및 機器

Thiobarbituric acid(TBA), Malondialdehyde bis(diethyl acetatal), Ascorbic acid, Trichloroacetic acid(TCA), HEPES, Sodium tartrate, Folin reagent, Na₂S₂O₄(Sodium Hyrosulfite), Cytochrome c, NADPH, Chloroform, Msgnesium chloride(MgCl₂), Hydrogen peroxide(H₂O₂), Catalase, Sodium deoxycholate, Xanthine, Potassium cyanide, Sodium deoxycholate, Xanthine oxidase 등(sigma, U.S.A)과 , Methanol, Ethanol, alc Acetic acid 등(merck, germany)을 使用하였고, 그 외 試藥들은 特級 및 一級을 使用하였다.

本 實驗에 使用된 機器는 centrifuge (Beckman Co.(GS-6R)), rotary vaccum evaporator(Büchi 461), autoclave(Hirayama, japan), Spectrophotometer(shimadzu. japan), Ultracentrifuge (kontron, sweden), High centrifuge(kontron, sweden), Bio-freezer(sanyo, japan), Ice-maker(비전과학) 및 Homogenizer(OMNI, U.S.A)등을 使用하였다.

2. 方 法

1) 檢液의 調製

還少丹 4貼 分量 116.252g을 3,000ml round flask에 蒸溜水 1,500ml와 함께 넣은 다음 冷却器를 附着시키고 2時間 동안 加熱流出하여 濾過한다. 그 濾液을 減壓濃縮器(rotary vaccum evaporator, Buchi 461)에서 減壓濃縮하여 超低溫 冷凍庫(deep freezer, Sanyo Co., Japan)에서 1時間 동안 放置하고 冷凍乾燥器(freeze dryer, EYELA Co., Japan)로 凍結乾燥하여 乾燥엑기스 45.6g을 얻었다. 檢液의 濃度는 400mg/kg로 2ml의 蒸溜水에 녹여 實驗에 使用하였다.

2) 檢液投與

實驗動物 各 群에 6마리씩을 配定하여 아무런 處置를 하지 않은 對照群(negative control ; NC)과 100 unit/ml vitamin E 投與群(positive control ; PC) 및 400mg/kg 還少丹 投與群(HSD) 등으로 區分하여 1日 1回 15日間 經口投與 하였다.

3) 腦組織 細胞質 分割의 分離

Bansal 등³⁵⁾의 方法에 따라 摘出한 흰쥐의 腦를 잘게 썰고 4배의 150mM KCl을 含有한 30mM Hepes 緩衝液(pH 7.4)으로 稀釋하여 均質化한 다음, 遠心分離管에 넣고 1次 遠心分離(700xg, 20分)하였다. 그 上澄液을 遠心分離管에 취하고 2次 高速遠心分離(11,000xg, 30分)하여 2次 上澄液을 얻었으며, 그 pellet은 除去하였다. 2次 上澄液은 3次 超高速遠心分離(105,000xg, 60分)하여 上澄液을 除去하고 細胞質 分割(microsome)을 얻었다. 細胞質 分割은 130mM KCl 含有 Hepes 緩衝液으로 다시 씻어낸 다음 再均質化하여 超高速遠心分離(105,000xg, 60分)로 細胞質 分割을 얻었다. 細胞質 分割을 分離하는 全過程은 4°C에서 遂行하였으며, 超低溫 冷凍庫(deep freezer, Sanyo Co., Japan)에 保管하여 實驗에 使用하였다.

4) 蛋白質 定量

Bovine serum albumin(BSA)을 標準 物質로 使用하여 Lowry 등³⁶⁾의 方法에 따라 蛋白質 濃度を 決定하였다.

5) Malondialdehyde(MDA) 生成 抑制 活性度 測定

MDA 活性度 測定은 YU 등³⁷⁾의 方法에 따라 試驗管에 細胞質 分割(700 μ g/ml)을 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) 溶液 225 μ l를 加하고 5초 동안 震盪混合器(vortex mixer)로 混合한다. 20% 醋酸(acetic acid) 1.5ml을 加하고 그리고 75 μ l 蒸溜水를 넣고 5초 동안 混合한다. 1.2% Thiobarbituric acid 溶液을 各各의 1ml씩 試驗管에 더하고, clean dry marble(유리구슬)로 密封한 후, 30分間 water bath에서 끓인다. 그리고 室溫에서 30分間 冷却한 후에 3000rpm에서 20分間 遠心分離(Beckman Co., GS-6R)하여 上澄液을 取하여 UV-spectrophotometer (shimadzu, japan)로 532nm에서 Malondialdehyde

(MDA) 生成 抑制 活性度を 測定한다.

6) 過酸化水素(hydrogen peroxide) 測定

Alfred 등³⁸⁾의 方法에 따라 試驗管에 100mM Tris

緩衝液(pH 7.5) 500 μ l, 細胞質 分割(2mg/ml) 100 μ l, 3M KCl 50 μ l, 1M methanol 50 μ l, catalase(3.2 mg/ml) 50 μ l, 0.2M MgCl₂ 50 μ l와 5mg/ml NADPH 25 μ l를 넣고, 蒸溜水를 添加하여 總 1ml로 調節한 다음 反應을 始作하였다. 恒溫水槽(visiovn과학, 30°C)에서 15分間 反應시킨 다음 15% TCA을 넣고 遠心分離(3,000rpm, 15分)하였다. 그리고 上澄液 1.5ml을 取하여 1.5ml Nash 試藥을 添加한 후 恒溫水槽(visiovn과학, 58°C)에서 8分동안 保溫하여 發色시켰다. 412 nm에서 吸光度를 測定하여 mM 吸光計數 17.8 cm-1mM-1로 計算하였다.

7) Superoxide dismutase의 活性度 測定

이 酵素의 活性度 測定은 McCord 등³⁹⁾의 方法에 따라 xanthine과 xanthine oxidase의 存在下에 生成되는 superoxide anion이 cytochrome c의 還元을 抑制시키는 反應 原理를 利用하였다. 즉 3.0ml 容量의 cuvette에 0.1 mM EDTA를 含有하는 50 mM 磷酸鹽 緩衝液(pH 7.8) 2.1ml와 0.5mM xanthine 0.3ml 및 0.1 mM cytochrome c 0.3ml을 加한 다음 cytochrome oxidase에 의한 還元型의 cytochrome c의 再酸化를 막기 위해 反應液에 50 μ M potassium cyanide 0.1ml을 加하였다. 反應液의 微粒子를 分散시키기 위해서 sodium deoxycholate(0.1 mg/ml)를 0.1ml 넣어 0.033%가 되도록 하였고, 混合液을 잘 섞은 다음 xanthine oxidase 0.1ml와 細胞質 分割(3mg/ml) 0.1ml를 添加한 후 550nm에서 吸光度의 增加率을 決定하였다. 吸光度 增加에 대한 基準은 xanthine oxidase의 濃度を 調節하여 吸光度 增加를 分當 0.021이 되도록 하였다.

8) Catalase 活性度 測定

Aebi의 方法⁴⁰⁾에 따라 3.0ml cuvette에 30% H₂O₂가 含有된 50mM 磷酸鹽 緩衝液(pH 7.0) 2.9ml을 넣고, catalase(50units/ml) 0.1ml를 添加한 후 240nm에서 吸光度 減少率을 決定하였다. 實驗群 測定에서 細胞質 分割(700 μ g/ml) 0.1ml를 添加하여 吸光度 減少率을 測定하였고, 酵素의 活性도는 吸光度가 0.40~0.45까지 減少되는 時間을 μ moles/H₂O₂/min으로 標示하였다.

9) NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性化 測定

William과 Kamin의 方法⁴¹⁾에 따라 分光光度計의 基準 및 試料 cuvette에 200nM cytochrome c 0.3ml와 細胞質 分割(0.25mg/ml)을 0.3ml 넣고 0.5M 磷酸鹽 緩衝液(pH 7.7)으로 總 用量을 1.5ml로 한 다음 37°C에서 分光光度計의 吸光度를 0으로 맞추었다. 그리고 試料 cuvette에 0.1μ M의 NADPH 0.1ml를 添加하고 550nm에서 3-4分間 吸光度 變化를 測定하였다. 吸光度의 差異로부터 mM 吸光計數 21 cm-1mM-1를 利用하여 cytochrome c의 還元 速度를 計算하였다.

10) 統計處理

實驗結果는 mean과 standard error로 나타내고 student's t-test로 檢定하였다.

III. 成績

1. 細胞質 分割에서 malondialdehyde 生成에 미치는 影響

흰쥐의 腦細胞質 分割에서 malondialdehyde 生成에 미치는 影響을 살펴본 結果 正常 對照群의 malondialdehyde 吸光度值는 0.029±0.005 O.D. at 532nm이고 vitamin E 投與群은 0.017±0.008 O.D. at 532nm로 減少가 있었으나 有意성이 없었고 還少丹 投與群은 0.030±0.011 O.D. at 532nm로 增加하여 有意성이 없었다 (Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effect of HSD on the Malondialdehyde(MDA) Reactive Substances in Brain Microsomes of Rats

Group	No. of Animals	Malondialdehyde (O.D. at 532nm)	P-value
NC	6	0.029±0.005a)	-
PC	6	0.017±0.008	-
HSD	6	0.030±0.011	-

a): Mean ± Standard Error

Negative control(NC) : None-treated group

Positive control(PC) : 100unit/ml vitamin E treated group

Hwansodan(HSD) : solid of extract of 400mg/kg HSD treated group

* : Statistically significant value compared with NC data

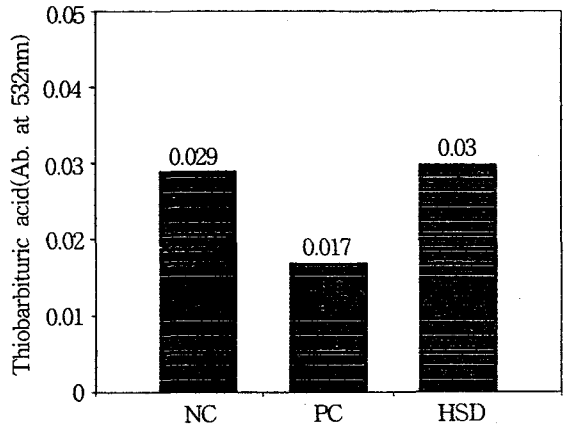


Fig. 1. Effect of HSD on the Malondialdehyde(MDA) Reactive Substances in Brain Microsomes of Rats.

Negative control(NC) : None-treated group

Positive control(PC) : 100unit/ml vitamin E treated group

Hwansodan(HSD) : solid of extract of 400mg/kg HSD treated group

2. 細胞質 分割에서 過酸化水素(hydrogen peroxide) 生成에 미치는 影響

흰쥐의 腦細胞質 分割에서 過酸化水素(hydrogen peroxide) 生成에 미치는 影響을 살펴본 結果 正常 對照群은 0.98±0.027 nM/mg protein/min이고 vitamin E 投與群은 1.20±0.032 nM/mg protein/min(p<0.001)으로 增加하였으며 還少丹 投與群은 1.05±0.015 nM/mg protein/min(p<0.05)로 增加하였다 (Table 2, Fig. 2).

Table 2. Effect of HSD on the Hydrogen Peroxide Formation in Brain Microsomes of Rats.

Group	No. of Animals	Hydrogen peroxide (nM/mg protein/min)	P-value ^a
NC	6	0.98±0.027a)	
PC	6	1.20±0.032	<0.001
HSD	6	1.05±0.015	<0.05

a): Mean ± Standard Error

Negative control(NC) : None-treated group

Positive control(PC) : 100unit/ml vitamin E treated group

Hwansodan(HSD) : solid of extract of 400mg/kg HSD treated group

* : Statistically significant value compared with control data

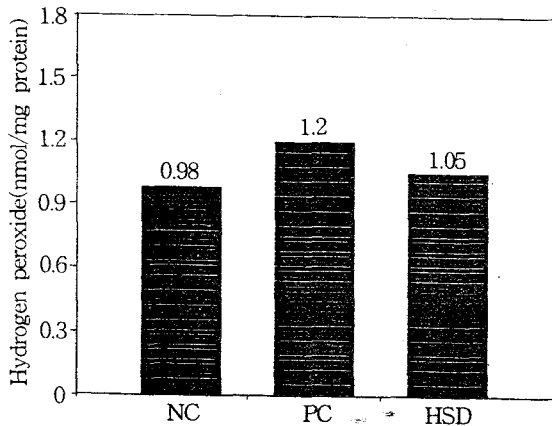


Fig. 2. Hydrogen Peroxide Formation in Brain Microsomes of Rats.

Negative control(NC) : None-treated group

Positive control(PC) : 100unit/ml vitamin E treated group

Hwansodan(HSD) : solid of extract of 400mg/kg HSD treated group

3. 細胞質 分割에서 superoxide dismutase의 活性化에 미치는 影響

원취의 腦細胞質 分割에서 superoxide dismutase의

活性化에 미치는 影響을 살펴본 結果 正常 對照群은 0.69±0.09 units/mg protein이고 vitamin E 投與群은 1.75±0.40 units/mg protein(P<0.05)로 有意性 있는 增加를 보였으며 還少丹 投與群은 1.15±0.16 units/mg protein(P<0.05)로 增加하여 有意性이 있었다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Effect of HSD on the Changes of Superoxide Dismutase Activities in Brain Microsomes of Rats

Group	No. of Animals	Superoxide dismutase activity (units/mgprotein)	P-value
NC	6	0.69±0.09a)	-
PC	6	1.75±0.40	<0.05
HSD	6	1.15±0.16	<0.05

a): Mean ± Standard Error

Negative control(NC) : None-treated group

Positive control(PC) : 100unit/ml vitamin E treated group

Hwansodan(HSD) : solid of extract of 400mg/kg HSD treated group

* : Statistically significant value compared with control data

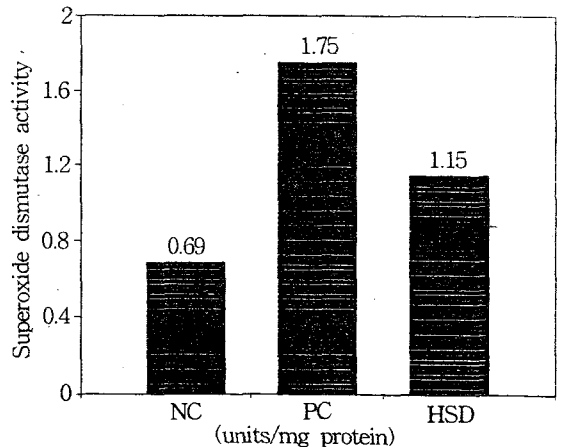


Fig. 3. Effect of HSD on the Changes of Superoxide Dismutase Activities in Brain Microsomes of Rats.

Negative control(NC) : None-treated group
 Positive control(PC) : 100unit/ml vitamin E treated group
 Hwansodan(HSD) : solid of extract of 400mg/kg HSD treated group

4. 細胞質 分割에서 catalase 活性도에 미치는 影響

원취의 腦細胞質 分割에서 catalase 活性도에 미치는 影響을 살펴본 結果 正常 對照群은 $0.22 \pm 0.01 \mu \text{ moles/H}_2\text{O}_2/\text{min}$ 이고 vitamin E 投與群은 $0.62 \pm 0.04 \mu \text{ moles/H}_2\text{O}_2/\text{min}$ ($P < 0.001$)로 有意한 增加를 보였고 還少丹 投與群은 $0.39 \pm 0.15 \mu \text{ moles/H}_2\text{O}_2/\text{min}$ 로 增加하였으나 有意性은 보이지 않았다(Table 4, Fig. 4).

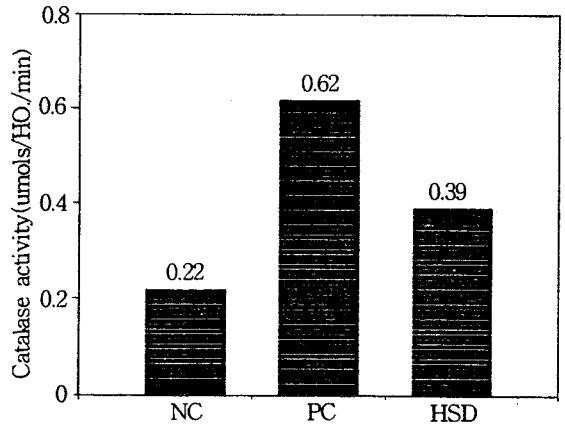


Fig. 4. Effect of HSD on the Changes of Catalase Activities in Brain Microsomes of Rats.

Table 4. Effect of HSD on the Changes of Catalase Activities in Brain Microsomes of Rats

Group	No. of Animals	Catalase activity ($\mu \text{ moles/H}_2\text{O}_2/\text{min}$)	P-value
NC	6	$0.22 \pm 0.01a$	-
PC	6	0.62 ± 0.04	<0.001
HSD	6	0.39 ± 0.15	-

a): Mean \pm Standard Error
 Negative control(NC) : None-treated group
 Positive control(PC) : 100unit/ml vitamin E treated group
 Hwansodan(HSD) : solid of extract of 400mg/kg HSD treated group
 * : Statistically significant value compared with control data

Negative control(NC) : None-treated group
 Positive control(PC) : 100unit/ml vitamin E treated group
 Hwansodan(HSD) : solid of extract of 400mg/kg HSD treated group

5. 細胞質 分割에서 NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性도에 미치는 影響

원취의 腦細胞質 分割에서 NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性도에 미치는 影響을 살펴본 結果 正常 對照群은 $67.2 \pm 2.11 \text{ nmole/mg protein}$ 이고 vitamin E 投與群은 $78.9 \pm 2.23 \text{ nmole/mg protein}$ ($P < 0.01$)로 유의한 增加를 보였으며 還少丹 投與群은 $74.7 \pm 2.13 \text{ nmole/mg protein}$ ($p < 0.05$)로 增加하여 有意性이 있었다 (Table 5, Fig. 5).

Table 5. Effect of HSD on the Cytochrome P-450 Reductase Activities in Brain Microsomes of Rats.

Group	No. of Animals	Cytochrome P-450 reductase(nmole/mg protein)	P-valuea)
NC	6	$67.2 \pm 2.11a$)	
PC	6	78.9 ± 2.23	<0.01
HSD	6	74.7 ± 2.13	<0.05

a): Mean \pm Standard Error

Negative control(NC) : None-treated group
 Positive control(PC) : 100unit/ml vitamin E treated group
 Hwansodan(HSD) : solid of extract of 400mg/kg HSD treated group
 * : Statistically significant value compared with control data

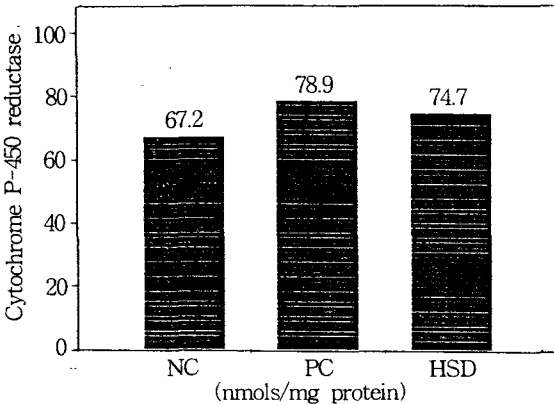


Fig. 5. Effect of HSD on the Cytochrome P-450 Reductase Activities in Brain Microsomes of Rats.

Negative control(NC) : None-treated group
 Positive control(PC) : 100unit/ml vitamin E treated group
 Hwansodan(HSD) : solid of extract of 400mg/kg HSD treated group

IV. 考 察

老化란 人間の 出生부터 死亡까지 體內에서 漸次的으로 法則的으로 이루어지는 機能形態學的 變化的 生物學的 過程이라고 定義할 수 있다. 卽 老化는 機能的으로는 有機體의 活動能力과 그의 豫備力, 周圍環境에 대한 適應能力이 줄어들고 內部環境의 均衡이 破綻되 기 쉬운 狀態로서 回復過程이 늦어지는 것으로 나타나 며 形態學的으로는 萎縮과 變性過程, 機械的負荷에 대 한 反應過程으로 나타나는 것이다^{2,42)}. 腦는 最大 發育 時에 平均 1400g 정도에서 20代 後半부터 神經 細胞의 數는 減少되고 軸索은 變成되면서 lipofuscin과 같은 代

謝產物들이 蓄積되고 또 肉眼的으로도 gyrus는 좁아지 고 sulcus는 넓어지면서 여러 가지 變化를 일으키고 質 量도 減少되어 60歲가 지나면서 50~150g 정도 줄어든 다²⁻⁹⁾.

老化的 發生原因에 대해서는 遺傳學說, error破滅說, 體細胞突然變異說, 代謝產物蓄積說, 自由遊離基說, 生體 防禦機構障礙說, stress說 등의 細胞·細胞下單位 老化 說과 個體單位에서의 老化學說 등이 多樣하게 提示되 고 있다^{2,15,16,17,18)}.

自由遊離基說(free radical theory)은 內的, 環境的 因 자에 의해 體內에 自由遊離基가 많이 發生하고 抗氧化 劑는 減少하며 lipofuscin과 같은 過酸化脂質이 蓄積되 어 老化가 促進된다는 理論이다^{2,9)}.

生體內 正常代謝 過程에서 생긴 自由遊離基는 物質 과 細胞를 酸化시켜 破壞시키기도 하고 染色體(DNA) 를 變化시킬 수 있으며 不飽和脂肪酸을 酸化 重合시켜, lipofuscin과 같은 不活性物質을 體內에 蓄積시키기도 한다^{2,15,16,17)}. 自由遊離基에 의한 損傷을 最小化하기 위 해서는 O₂-와 H₂O₂ 등을 代謝過程에서 形成되는 대로 除去해야 한다^{15,43)}. 細胞는 自由遊離基로부터 細胞를 保 護하기 위해 superoxide dismutase(SOD), catalase와 같이 細胞內에서 生成되어 抗氧化作用을 하는 酵素와 vitamin A, C, E, 카로틴과 같이 外部에서 供給可能한 防禦體系를 가지고 있다^{2,15,43)}.

過酸化脂質(lipid peroxides)은 自動酸化反應에 의한 多佳不飽和脂肪酸에 O₂가 附加된 生成物의 總稱으로 生體膜들에 損傷을 입히고 細胞機能을 低下시키며 壞 死에 關係하여 여러 가지 疾病을 惹起한다^{2,43)}. 脂質過 酸化反應은 生體膜의 不飽和脂肪酸으로부터 hydroper- oxide, malondialdehyde(MDA)가 生成되는 自動觸媒反 應으로 生體의 酸化的 損傷에 대한 指標로 酸化劑 혹 은 抗氧化劑 들에 대한 相對的 潛在力 測定을 위해서 使用되어진다

酸化的 損傷의 指標로 使用되는 脂質過酸化(Malon- dialdehyde) 生成 抑制 活性에서 Lim 등⁵⁰⁾은 AAPH를 投與하여 酸化的 損傷을 誘發시킨 후 尿酸(uric acid), ascorbic acid 그리고 GSH를 投與하여 TBA 反應性物 質의 含量을 測定한 結果에서 酸化的 損傷이 效果的으로 抑制되었다고 報告하고 있다.

cytochrome P-450/P450 reductase는 生體內에서 異物質의 代謝過程에 關與⁵¹⁾하는데 이러한 過程은 吸收, 分配, 生化學的인 轉換과 排泄의 過程을 거쳐 進行되며 大部分의 異物質들은 phase I과 phase II 두가지 酵素群에 의해 代謝가 이루어 진다. phase I 酵素들은 化合物에 作用基를 添加함으로써 極性を 增加시키는 役割을 하며, phase II 酵素들은 化合物의 作用基에 아미노산이나 펩티드를 結合하게 하여 無毒化시켜 尿를 통하여 쉽게 排出될 수 있게 하는 것으로 알려졌다⁵²⁾. Phase I의 代表的인 酵素係인 microsomal mixed function oxidase system(MFOS)은 많은 異物質(drugs, carcinogen, insecticides and environmental pollutants 등) 뿐만 아니라 여러 生體內 物質들(vitamin D, 脂肪酸, hormone, steroides)의 酸化에도 重要的 役割을 한다⁵²⁾. 이 酵素係는 두 개의 電磁誘導係 즉 cytochrome P-450/P450 reductase와 cytochrome b5/b5 reductase를 必要로 하며 이들 中 P-450은 약 40個種의 同位 酵素가 存在하는 酵素이다⁵¹⁾.

Superoxide dismutase(SOD)는 O_2^- 를 H_2O_2 와 酵素로 轉換시키는 作用을 하며 哺乳動物의 細胞에선 두 種類의 SOD 卽, CuZnSOD의 細胞質性 抗酸化酵素와 미토콘드리아에 存在하는 MnSOD를 들 수 있다. 이러한 SOD의 作用에 關하여는 虛血의 回復 및 浮腫과 炎症의 治療, 癌 또는 腫瘍의 治療와 老化의 抑制에 대하여 實驗的 研究가 報告되어지고 있다⁵³⁾.

Catalase는 大部分 peroxisome內에, 分布하는 酵素로서 H_2O_2 의 蓄積으로부터 細胞를 防護하며 이와 같은 防護效果는 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 不均化시킴으로써 또는 peroxidase처럼 酸化劑로서 利用함으로써 可能하며 H_2O_2 가 關與된 여러 過程에서 主要 解毒劑로서 利用되어 왔다⁵³⁾.

이러한 自由遊離基說을 證明하기 위해 Harman과 Kohn이 抗酸化劑를 먹여 老化를 遲延시키는 研究를 시작한 以後¹⁵⁾로 이 등¹⁹⁾은 浮萍草 化學成分 및 抗酸化效果에 關한 研究를 백 등²⁰⁾은 綠茶로부터 分離된 Epicatechin 3-O-Gallate의 抗酸化作用 機轉에 關한 研究를 金 등⁴⁴⁾은 대두유 및 대두유-물 에밀존 기질에서의 각종 페놀화합물의 抗酸化作用에 關한 研究를 하는 등 抗酸化劑의 開發에 많은 關心이 集中되고 있다.

韓醫學에서는 老化에 대하여 《靈樞·衛氣失常》¹⁰⁾에는 “人年五十以上爲老”라 하여 一般的으로 五十以上을 老라고 表現하였으며 《素門·陰陽應象大論》¹¹⁾에서는 “年五十體重 耳目不總明矣 年六十陰痿氣大衰 九竅不利…”로 老化에 따른 各藏器의 機能的 構造的 變化를 말하였고, 《靈樞·營衛生會》¹⁰⁾에서는 “老子之氣血衰 其肌肉故 氣道泄…”이라하여 氣血變化에 의한 身體的 變化를 말하였으며 《靈樞·天年》¹⁰⁾에는 “五十歲 肝氣始衰 肝葉始薄 目始不明… 六十歲 心氣始衰… 七十歲 脾氣虛… 八十歲 肺氣虛… 九十歲 腎氣焦… 百歲 五臟皆虛 腎氣皆怯…”이라하여 五臟의 老化 順序에 대하여 說明하였으며 腦의 老化에 關하여서는 《靈樞·海論》¹⁰⁾에서 “腦爲髓之海 …… 髓海不足 則腦轉耳鳴 脛痠眩冒 目無所見 懈怠安臥”, 《素問·刺禁論篇》¹¹⁾에서 “腦爲髓之海 眞氣之所聚”라 하였으며 《靈樞·經脈篇》¹⁰⁾에서는 “人始生 先生精 精成而腦髓生”이라 하여 사람은 나이가 들어, 稟賦不足하거나 腎氣가 점차 衰하여 陰精이 虧損되면 精이 缺乏되어 腦에 上充하지 못함으로써 髓海가 空虛해지고 元神이 失養케되어 神明이 聰明함을 잃는다고 言及하였다³¹⁾.

老化의 原因에 대하여 杜⁴²⁾는 稟賦不足으로 先天의 腎氣不足인 先天不足과 後天的인 形體의 調攝, 精氣의 培養, 飲食起居의 失調로 인한 後天失調과 精神의 思考方向에 따른 精神失調로 說明하였고 《實用中醫腦病學》¹³⁾에서는 腦의 老化에 대하여 稟賦不足, 精氣兩虛, 痰濕阻竅, 氣血瘀阻로 區分하여 說明하였다.

還少丹은 宋代 《洪氏集驗方》¹²⁾에 처음으로 記載된 것으로서 溫補脾胃, 養心安神하여 虛損勞傷, 脾胃虛寒, 心血不足 등에 使用하였다.

本 實驗에 使用된 것은 《醫方集解》³⁴⁾에 收錄된 處方으로 《洪氏集驗方》¹²⁾의 處方に 大棗를 加한 것이며 方中의 肉蓯蓉⁴⁵⁻⁴⁸⁾과 巴戟⁴⁵⁻⁴⁸⁾은 腎經血分으로 入하고 茴香⁴⁵⁻⁴⁸⁾은 腎經氣分으로 들어가 命門相火의 不足을 補하니 火旺則土強하여 脾能健運하게 되고 熟地黃⁴⁵⁻⁴⁸⁾과 枸杞子⁴⁵⁻⁴⁸⁾는 補水之藥으로 水足則有以濟火하여 不亢不害하게 되고 杜仲⁴⁵⁻⁴⁸⁾과 牛膝⁴⁵⁻⁴⁸⁾은 補腰膝하고 助腎하며 茯苓⁴⁵⁻⁴⁸⁾과 山藥⁴⁵⁻⁴⁸⁾은 滲滋熱以助脾하고 山茱萸⁴⁵⁻⁴⁸⁾와 五味子⁴⁵⁻⁴⁸⁾는 生肺液而固精하고 遠志⁴⁵⁻⁴⁸⁾와 石菖蒲⁴⁵⁻⁴⁸⁾는 通心氣而交腎하고 大棗⁴⁵⁻⁴⁸⁾는 補氣益血하여

潤肺強脾하고 楮實⁴⁵⁻⁴⁸⁾은 助陽補虛하니 능히 脾胃交補之劑라 할 수 있어 脾胃虛寒, 血氣虧乏, 不思飲食, 發熱盜汗, 遺精白濁, 陰痿不起, 肌體瘦弱 등^{12,34,49)}에 사용되었으며 특히 《實用中醫腦病學》¹³⁾에서는 精氣兩虛로 인한 痴呆에서 나타나는 “年老表情呆滯 行動遲緩 記憶力減退 言語遲鈍…悲視失望 忽哭忽笑…”에 사용되었다.

最近에 韓醫學에서는 抗氧化作用에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는데 安 등²¹⁻²⁴⁾은 當歸藥針, 糊桃藥針, 白何首烏藥針, 杜仲葉藥針을 蘇 등²⁵⁻²⁸⁾은 鹿蔘地黃湯, 血府逐瘀湯, 左歸飲과 右歸飲 등에 관한 實驗의 研究를 報告한 바 있으며 腦의 老化에 관한 研究로는 朴 등²⁹⁾이 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 酸素 活性에 미치는 影響을, 徐³⁰⁾가 聰明湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 影響을 發表하였고 中國에서는 張³¹⁾이 中醫治療腦萎縮近況을 張³²⁾이 略論腎骨髓腦의 同病共治를 龔³³⁾이 腎腦相關論治現代腦病的理論探析을 報告한 바 있으나 還少丹이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響에 대한 研究는 접하지 못하였다.

이에 著者는 溫補脾胃하고 養心安神하는 還少丹이 腦組織의 抗氧化作用에 미치는 影響을 糾明할 目的으로 各各 10個月 정도 老化된 흰쥐를 特別한 處置를 加하지 않은 正常 對照群(negative control)과 vitamin E를 15日間 投與한 實驗群(positive control)과 還少丹을 15日間 投與한 實驗群(HSD)으로 나누어, 흰쥐의 腦組織에서 microsome을 分離하고 腦組織 內의 酸化物質의 量을 測定하기 위하여 Malondialdehyde(MDA) 生成 抑制 活性도와 hydrogen peroxide의 生成을 살피고, 抗氧化物質의 程度를 보기 위해 superoxide dismutase의 活性度, catalase 活性度, NADPH-cytochrome

P-450 reductase 活性도를 測定하였다.

Malondialdehyde 生成에 미치는 影響을 測定한 結果 正常 對照群의 MDA吸光度值은 0.029 ± 0.005 O.D. at 532nm이고 vitamin E 投與群은 0.017 ± 0.008 O.D. at 532nm로 減少가 있었으나 有意성이 없었고 還少丹 投與群은 0.030 ± 0.011 O.D. at 532nm로 增加하여 有意성이 없었다(Table 1, Fig. 1).

過酸化水素(hydrogen peroxide) 生成에 미치는 影響

을 測定한 結果 正常 對照群의 hydrogen peroxide 生成度는 0.98 ± 0.027 nmol/mg protein/min이고 vitamin E 投與群은 1.20 ± 0.032 nmol/mg protein/min으로 增加하였으며 還少丹 投與群은 1.05 ± 0.015 nmol/mg protein/min로 增加하여 有意한 結果를 얻을 수 없었다.(Table 2, Fig. 2).

SOD 活性도의 變化를 測定한 結果 正常 對照群의 SOD 活性도는 0.69 ± 0.09 units/mg protein이고 vitamin E 投與群은 1.75 ± 0.40 units/mg protein ($P < 0.05$)로 有意性 있는 增加를 보였으며 還少丹 投與群은 1.15 ± 0.16 units/mg protein ($P < 0.05$)로 增加하여 有意성이 있었다(Table 3, Fig. 3).

Catalase 活性도를 測定한 結果 正常 對照群의 catalase 活性도는 0.22 ± 0.01 μ moles/H₂O₂/min이고 vitamin E 投與群은 0.62 ± 0.04 μ moles/H₂O₂/min ($P < 0.001$)로 有意한 增加를 보였고 還少丹 投與群은 0.39 ± 0.15 μ moles/H₂O₂/min로 有意성은 認定되지 않았으나 增加하였다.(Table 4, Fig. 4).

NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性도를 測定한 結果 正常 對照群의 NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性도는 67.2 ± 2.11 nmole/mg protein이고 vitamin E 投與群은 78.9 ± 2.23 nmole/mg protein ($P < 0.01$)로 有意性 있는 增加를 보였으며 還少丹 投與群은 74.7 ± 2.13 nmole/mg protein ($P < 0.05$)로 增加하여 有意성이 있었다(Table 5, Fig. 5).

以上の 實驗을 考察한 結果 還少丹은 SOD와 NADPH-cytochrome P-450 reductase의 活性도를 有意性 있게 增加시켰고 catalase 活性도는 有意성은 認定되지 않았으나 增加值을 나타내어 自由遊離基에 의해 進行되는 腦組織의 酸化作用에 關與하여 老化를 遲延시키는 效果가 있으리라 思慮된다.

그러나 還少丹은 抗氧化作用을 통한 治療效果가 있다고 보이나 全般的인 抗氧化作用 機轉中 MDA 生成 抑制 活性度 測定에서는 有意성이 나타나지 않았고 hydrogen peroxide 生成은 오히려 增加하여 이에 대한 深度 있는 研究가 持續되어야 할 것으로 思慮된다.

IV. 結 論

還少丹이 腦組織의 抗酸化作用에 미치는 影響을 糾明할 目的으로, 원쥐의 腦組織에서 細胞質 分割을 分離하여, malondialdehyde(MDA) 生成 抑制 活性, 過酸化水素(hydrogen peroxide)의 生成, superoxide dismutase(SOD)의 活性度, catalase 活性度, NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性도를 測定하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. MDA 吸光度値는 實驗群 모두에서 有意성이 없었다.
2. 過酸化水素(hydrogen peroxide) 生成은 實驗群에서 모두 增加하여 有意성이 認定되지 않았다.
3. Superoxide dismutase의 活性도는 vitamin E 投與群과 還少丹 投與群 모두에서 有意性있는 增加를 나타내었다.
4. Catalase의 活性도는 vitamin E 投與群에서는 有意한 增加를 나타내었고 還少丹 投與群에서는 增加하였으나 有意성은 認定되지 않았다.
5. NADPH-cytochrome P-450 reductase의 活性도는 vitamin E 投與群과 還少丹 投與群 모두에서 有意性있는 增加를 나타내었다.

以上の 結果로 보아 還少丹은 SOD와 NADPH-cytochrome P-450 reductase의 活性도를 有意性있게 增加시켰고 catalase 活性도는 有意성은 認定되지 않았으나 增加를 나타내어 抗酸化作用이 있는 것으로 思慮되지만 MDA 生成 抑制 活性 및 hydrogen peroxide 生成은 有意성이 認定되지 않아 追後 深度있는 研究가 이루어져야 할 것으로 思慮된다.

參 考 文 獻

1. 張錫泰 : 皮膚科學, 서울, 呂文閣, pp.23-25, 1994.
2. 리정복 : 장수학, 서울, 醫聖堂, p.41, pp.64-69, 88-93, 1987.
3. 이광우 외 : 임상신경학, 서울, 고려의학, pp.199-210, 1997.
4. 朴贊國 : 臟象學, 서울, 一中社, pp.167-168, 1992.
5. 鄭隆燦 : 圖解腦神經外科學, 서울, 第一醫學, pp. 30-31, 1992.
6. 黃義完 외 : 東醫精神醫學, 서울, 현대의학서적사, pp.256-257, 262-266, 1987.
7. 지제근 : 신경병리학, 서울, 서울대학교출판부, pp.111-115, 1990.
8. 李定均 : 精神醫學, 서울, 一潮閣, pp.514-515, 1981.
9. 배철영 외 : 노인의학, 서울, 고려의학, pp.24-27, 30-31, 1996.
10. 裴秉哲 : 今釋黃帝內經靈樞, 서울, 傳統醫學研究院, p.210, pp.297-298, p.436, 414, 1994.
11. 裴秉哲 : 今釋黃帝內經素問, 서울, 傳統醫學研究院, pp.54-55, p.93, 1994.
12. 宗全和 : 中醫方劑通釋, 河北, 河北科學技術出版社, pp.151-152, 1995.
13. 陳輝 외 : 實用中醫腦病學, 北京, 學苑出版社, pp. 245-237, 784-791, p.794, 1993.
14. 王錫夫 외 : 明目還少丹治療老年性黃斑變性的臨床研究, 山東中醫雜誌, 15(5):214-215, 1996
15. 김숙희 외 : 老化, 서울, 민음사, pp.77-80, 83-85, 1995.
16. 徐舜圭 : 成人病·老人醫學, 서울, 고려의학, pp. 10-14, 1992.
17. 김주섭 : 노화촉진 생쥐의 각종장기에서 산화성 변성과 산소라디칼 제거 효소계의 활성화에 관한 연구, 서울대학교 대학원 의학박사학위논문, 1991.
18. 양재수 : 노화촉진 생쥐에서 산소라디칼 관련물질의 검색에 관한 연구, 서울대학교 대학원 의학박사학위논문, 1986.

19. 이효은 외 : 浮萍草 化學成分 및 抗酸化效果에 관한 研究, 부산대학교 약학연구지, 29(2):29~39, 1995.
20. 백봉숙 외 : 綠茶로부터 分離된 Epicatechin 3-O-Gallate의 抗酸化作用 機轉에 관한 研究, 부산대학교 약학연구지, 29(2):49~56, 1995.
21. 安俊徹 외 : 當歸藥針液의 抗酸化 效能에 관한 研究, 大韓鍼灸學會誌, 13(2):254-262, 1996.
22. 金永海 외 : 胡桃藥針液의 抗酸化 效果에 대한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(1):9-20, 1996.
23. 李鍾賢 : 白何首烏 藥針의 抗酸化作用에 관한 實驗的 研究, 大田大 學校大學院, 1997.
24. 成日煥 : 抗酸化作用에 대한 杜冲藥針의 實驗的 研究, 大田大 學校大學院, 1997.
25. 蘇敬順 외 : 鹿蓼地黃湯이 抗老衰에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 18(2):127-148, 1995.
26. 禹大潤 외 : 人工膜과 Rat의 肝細胞를 利用한 血府逐瘀湯의 抗酸化 作用에 관한 研究, 大韓韓醫學會誌, 7(1):465-477, 1996.
27. 鄭智天 : 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性 酸素類의 消去作用과 抗酸化 酵素系의 活性 增加 效果에 대한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(2): 21-36, 1996.
28. 尹哲浩 외 : 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 肝 過酸化脂質 生成 및 活性酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌, 16(1): 62-67, 1995.
29. 朴宣東 외 : 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, 大韓韓醫學會誌, 6(2):349-364, 1995.
30. 徐敏華 : 聰明湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化와 神經細胞의 損傷에 미치는 影響, 圓光大 大學院, 1996.
31. 張吉 : 中醫治療腦萎縮近況, 天津, 天津中醫 13(1) :45-46, 1996.
32. 張爲群 : 略論腎骨髓腦的同病共治, 上海, 上海中醫藥雜誌 5:10-12, 1996.
33. 龔文德 : 腎腦相關論用治現代腦病的理論探析, 實用中西醫結合誌 264-265, 1996.
34. 王認庵 : 醫方集解, 台北, 文光圖書有限公司, pp. 6-7, 1975.
35. Bansal, S.K., Love, J. and Gurtoo, H.L.(1983). High pressure liquid chromatographic separation of multiple form of cytochrome P-450. Biochem. Biophys. Res. Commun.(117), 268-274
36. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R. J.(1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol.Chem. (193). 265-275
37. Yu, B.P., LEE, D.W., Marler, C.G. and Choi, J. H.(1990)/. Mechanism of feed restriction ; protection of cellular homeostasis. Proc. Soc. Exptl Biol. Med.(193) 13-15
38. Alfred, G., Hildebrandt, Ivar. Roots. (1962). Mei Tjoe and Gerhard heinemeyer. pp.158
39. McCord, J.R., Colby, M.D. and Fridovich, I. (1972). Superoxide dismu tase Enzymatic function for erythrocyuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. (231) 6049-6055
40. Aebi, H.(1969). Catalase erythrocytaire in ; Exposes Annuels deBioch amie Medicale, 29 ieme serie. Masson & Cie(eds), Paris, pp.139-164
41. Williams, C.H., Jr. and Kamin, M.(1962). Mi-crosomal triphos-phopyridine nucleotide- cytochrome c reductase of liver. J. Biol. Chem .(237) 587-595
42. 杜胡京 : 東醫腎系學, 서울, 東洋醫學研究院, pp. 1327-1334, 1985.
43. 이귀녕·이중순 : 임상병리과일, 서울, 醫學文化社, pp.138-139, 1990.
44. 김동훈 외 : 대두유 및 대두유-물 에멀존 기질에 서의 각종 폐놀화합물의 항산화작용, 農林論輯, 24:93-99, 1984.
45. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 永林社, pp171-172, 174-175, 190-194, p.219, pp.241-245, 257-258, 370-371, 374-375, 468-470, 1986.

46. 楊東喜 : 本草備要解析, 서울, 一中社, PP.43-47, 49-51, 134-135, 238-239, 259-260, 303-305, 316-317, 319-321, 323-326, p.250, pp.407-408, 491-496, 1991.
47. 上海中醫學院 : 中草藥學, 上海, 常務印書館, pp.161-162, 307-308, 313-314, 325-326, 388-389, 521-522, 524-525, 537-538, 541-542, 555-557, 561-562, 580-582, 589-592, 1983.
48. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp.36-38, 40-41, 55-58, 77-79, 92-95, 101-106, 110-112, 134-135, 183-188, 357-362, 514-516, 527-529, 719-720, 1988.
49. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 大星文化社, pp.3:496-497, 1992.
50. Lim, H. B., Lee, D. W and Cho, S.H.(1993) Effect of AAP H on plasma antioxidants in rat. kor. J. Gerontol.(2) 68-74
51. Lee, D. W.(1991). Oxidative stress and agere-lated changes in microsomal mixed function oxidase activity. kor. J.Geron tol.(2) 187-201
52. Naldler, S.G. and Strobel, H.W.(1988). Role of electrostatic interaction in the reaction of NADPH-cytochrome P-450 re ductase with cytochrome P-450. Arch. Biochem. Biophys. (261) 418-429
53. 金永坤 외 : 프리라디칼, 서울, 여문각, pp.263-279, p384, 396, pp.415- 426, 1997.

= Abstract =

The Antioxidant Effects of HWANSODAN on the Brain Tissue of aged Rat

Won Hee Seo,
Sang Ryong Lee

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental
Medicine, Taejon University, Taejon, Korea

The effect of HWANSODAN(HSD), on the level of brain antioxidants was examined in aged rat. The experimental groups were divided into three groups and treated as follows ; normal group(negative control), Vt.E admistrated group(positive control), HSD administrated Group(HSD). The purified microsome from brain tissue, those were measured the amounts of oxidant materials like Malondialdehyde (MDA) and H2O2, then activities of antioxidants enzymes like superoxide dismutase, catalase, NADPH -cytochrome P-450 reductase.

The results were as follows:

1. In TBA reaction to measure the amount of MDA, HSD group and Vt.E group did not showed significant decrease.
2. In the formation of Hydrogen peroxide, HSD group and Vt.E group showed a little increase.
3. The activity of Superoxide dismutase was increased significantly in HSD group and Vt.E group.

4. In the activity of Catalase, Vt.E group was increased significantly and HSD group a little increased.

showed significantly increase

5. The activity of NADPH-cytochrome P-450 reductase in the HSD group and Vt.E group

According to the above results, it is suggested that HWANSODAN(HSD) has some antioxidant effects on the tissue of brain.