

老化過程의 흰쥐에서 補脾湯이 脾臟의 代謝酵素系에 미치는 影響

李東濬 · 吳岐錫 · 宋泰元*

Abstract

The effect of Bobitang(BBT) water extract on spleen metabolic enzyme system as to aging process in rats

Lee Dong-jun, Oh Min-suk, Song Tae-won
Dept. of Oriental Medicine
Graduate School, Taejeon University

Bobitang(BBT) is one of the most important prescription that has been used in oriental medicine(dongyibogam) for recovering spleen condition. The study was done to evaluate effects of BBT water extract on the spleen lipid peroxide content and metabolic enzyme system changes.

After pretreatment of BBT I(100mg/kg), BBT II(250mg/kg), BBT III(350mg/kg), BBT IV(500mg/kg) for 1 week, lipid peroxide content and metabolic enzyme system changes of the spleen was measured in 8 months rats. The results were obtained as follows :

1. The content of spleen lipid peroxide was significantly decreased in all experimental groups as compared with control, and best in BBT III · IV treated groups.
2. The activity of spleen superoxide generation was significantly decreased in all experimental groups as compared with control, and best in BBT IV · III treated groups.
3. The activity of cytochrome P-450 and aminopyrine demethylase wasn't significant change.
4. The activity of aniline hydroxylase was significantly decreased in BBT IV · II treated groups, xanthine oxidase was significantly decreased in all experimental groups, aldehyde oxidase was significantly decreased in BBT IV treated group as compared with control.
5. The activity of antioxidant enzymes as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase was significantly increased in all experimental groups as compared with control.
6. The activity of glutathion S-transferase was significantly increased in all experimental groups, the concentration of spleen glutathione was significantly increased in BBT IV treated group as compared with control.
7. The activity of γ -glutamylcystein synthetase was significantly increased in BBT III · IV · I treated groups as compared with control, the activity of glutathione reductase wasn't significant

* 大田大學校 韓醫科大學 再活醫學教室

change.

From the above results, BBT is considered to have effect of remove peroxide content and free radical that was made during ageing process.

It is expected that treatment of BBT can be applied in future clinical study of delaying the ageing process.

I. 緒 論

人體는 出生, 成長, 成熟, 老化的 過程으로 이어지게 되는데¹⁾ 이 中 老化란 生命體의 成長과 時間 經過에 따라 進行되는 一連의 退行性 變化로 外部 環境에 對한 適應力이 떨어져 形態的, 機能的으로 退縮되어 生命力이 減退되는 現象을 意味한다²⁻⁴⁾.

韓醫學에서는 老衰의 原因을 陰陽의 不調和, 形身衰弱, 氣血 및 腎氣衰弱 等으로 說明하고 生體의 老衰를 陰陽의 變化, 臟腑의 變化, 氣血의 變化, 經絡의 變化 및 精神의 變化로 보고 있다^{1,5)}. 《黃帝內經》의 <素問·上古天真論>⁶⁾에서는 “女子……五七, 陽明脈衰, 面始焦, 髮始墮. 六七, 三陽脈衰於上, 面皆焦, 髮始白.……丈夫……五八, 腎氣衰, 髮墮齒槁. 六八, 陽氣衰竭於上, 面焦, 髮鬢頰白.”이라 하고, <靈樞·天年篇>⁷⁾에서는 “四十歲,……腠理始疏, 榮華頰落, 髮頗斑白,……五十歲, 肝氣始衰, 肝葉始薄, 膽汁始減, 目始不明. 六十歲, 心氣始衰,……七十歲, 脾氣虛, 皮膚枯. 八十歲, 肺氣衰,……九十歲, 腎氣焦, 四臟經脈空虛. 百歲, 五臟皆虛, 神氣皆去,”라 하여 加齡에 따른 身體 各部位의 變化 및 各臟腑의 機能 低下를 說明하고 있다.

西洋醫學에서는 老化에 對한 原因 및 發生機轉으로 生物學的, 生化學的, 生理學的 및 形態學的原因說 등이 있는데^{1,4,8-9)}, 最近에는 生化學的 原因說의 하나인 free radical에 依해 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^{2,10-11)}.

抗老化에 對한 韓醫學 分野의 研究들을 살펴보면 單味劑¹²⁻¹⁴⁾, 複合處方¹⁵⁻²³⁾, 藥針液²⁴⁻³⁴⁾ 및 理學的 因子를 利用한 研究³⁵⁾ 等으로 區分할 수 있는데, 藥物이나 複合處方 等の 選擇에 있어서 歸經이 腎經이거나 補腎하는 藥物 및 處方이 主從을

이루고 있어 다른 臟腑와 關聯된 研究는 不足한 實情이다. 한편, 脾臟은 “後天之本 氣血生化之源”이고 “倉廩之官 五味出焉”하여 萬物生長의 母體이고 發生의 根本이며 人體의 生理活動을 維持하는 重要한 臟腑中的 하나이니³⁶⁾, 老化和 關聯지어 脾臟機能을 살펴보는 것도 意味있는 일이라 생각한다.

이에 著者는, 老化는 各臟腑와의 相關性이 緊密하고⁷⁾ 老化的 原因이 各臟腑의 變化에 따른 것^{1,5)} 이라는 理論에 着眼하여, 16世紀까지의 韓國 韓醫學 發展成果를 集大成한 《東醫寶鑑》^{37,38)}에서 代表的인 補脾處方으로 收載된 補脾湯을 選定하여, 補脾湯煎湯液의 老化抑制 效能을 實驗的으로 糾明하기 위해 老化白鼠(8個月齡, 550g 內外)의 脾臟組織內 過酸化脂質 含量 및 代謝酵素系에 미치는 影響을 觀察한 結果, 有意性 있는 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 試藥 및 器具

試藥中 aminopyrine HCl, aniline HCl, xanthine sodium, hypoxanthine sodium, NMN, reduced glutathione, glutathione reductase, thiobarbituric acid, sodium dodecyl sulfate, glutathione, bovine serum albumin, NADP, NADPH, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, oxidized glutathione, cyanide, cytochrome C, hydroxylamine, hydrochloride, xanthine oxidase, naphthylethylenediamine은 Sigma社로부터, malondialdehyde, EDTA, trichloroacetic acid, ninhydrin, cysteine, glycerol, sodium cholate,

Triton N-101, sodium dithionite, semicarbazide Tris. HCl, L-glutamic acid, ATP는 Aldrich社로부터 購入하였으며, 그 外 試藥은 特級 또는 一級 試藥을 使用하였다.

實驗에 使用한 器機로는 Spectrophotometer (Shimadzu UV-240), High centrifuge(Hanil, HMR-1610V), Ultra centrifuge(Hitachi, 695-7), Cold Lab. Chamber(Korean Manhattan, KMC-8512) 등을 使用하였다.

2) 藥材

本 實驗에 使用한 藥材는 大田大學校 附屬 韓方 病院에서 嚴選한 것을 使用하였으며, 處方의 構成과 用量은 東醫寶鑑³⁸⁾에 收載된 補脾湯에 따른 것으로 1貼의 處方 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of BOBITANG(BBT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
麥芽炒	Hordei Fructus Germinatus	4.6
甘草炙	Glycyrrhizae Radix	4.6
人參	Ginseng Radix	3.1
白茯苓	Hoelon Alba	3.1
草果	Tsaoko Fructus	3.1
乾薑炮	Zingiberis Rhizoma	3.1
厚朴	Magnoliae Cortex	2.2
陳皮	Citri Pericarpium	2.2
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	2.2
	Total amount	28.2

3) 動物

實驗動物로는 韓國實驗 動物開發로부터 分讓 받은 雄性 Sprague-Dawley系³⁹⁾ 正常흰쥐(2個月齡, 180±10g) 및 老化흰쥐(8個月齡, 550±10g)로 實驗室에서 1週日 동안 適應시킨 後, 一定한 條件(溫度: 20±2°C, 濕度: 50%, 明暗: 12時間 light/dark cycle)에서 飼育한 後 使用하였다. 實驗 始作前 24時間 동안 물만 주고 絶食하였다. 이 때 酵素活性의 日中 變動을 考慮하여 實驗動物를 一定時間(午前 10:00-12:00)內에 處置하였다.

2. 方法

1) 檢液의 製造

補脾湯의 20貼 分量 564g을 水洗하여 蒸溜수로

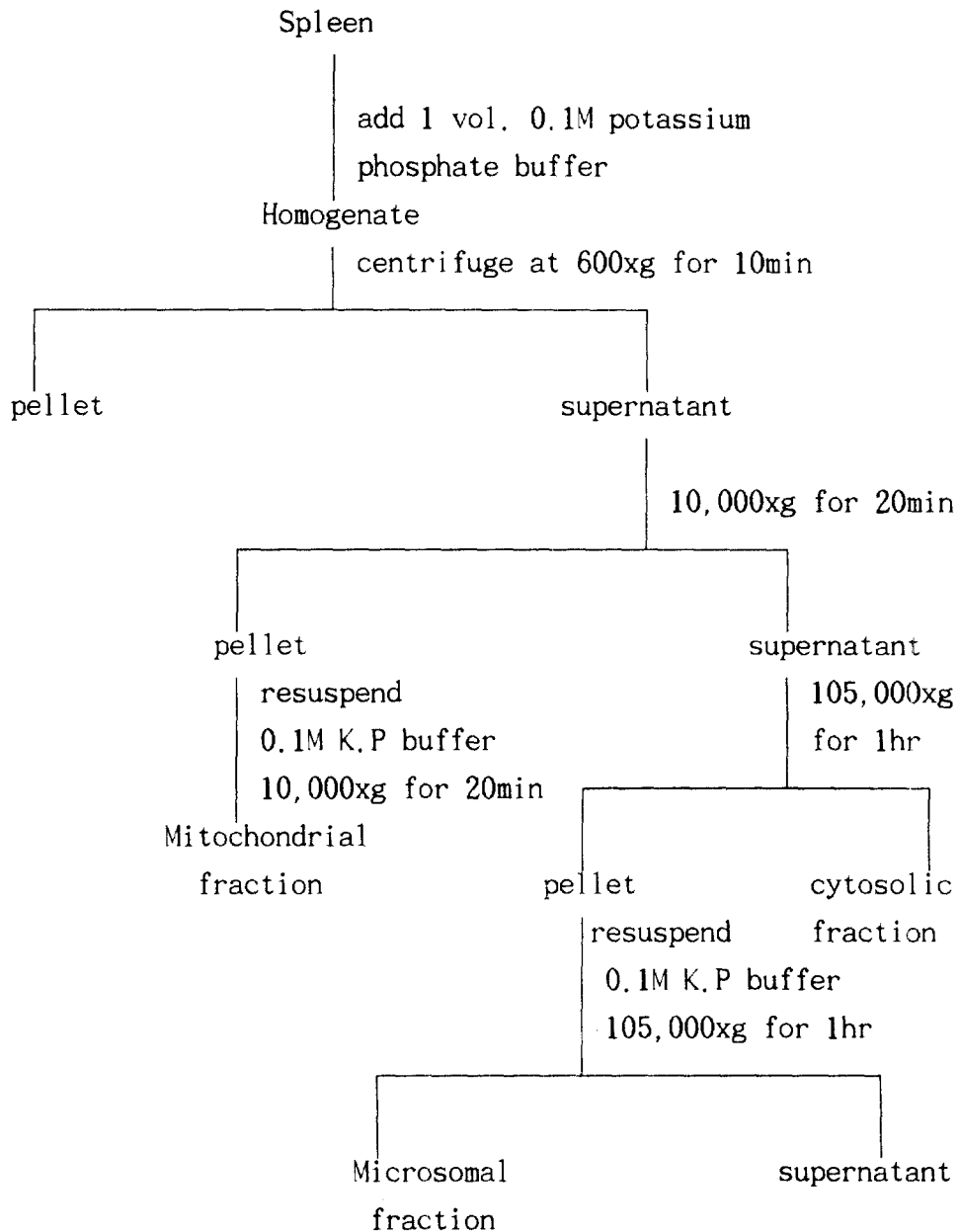
2回 8時間씩 3回 加熱 濃縮하고 吸入 濾過한 濾液을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 稠粘狀의 抽出物을 冷凍 乾燥하여 粉末 205.8g을 얻어 本 實驗에서 必要로 하는 濃度로 生理食鹽水에 稀釋하여 使用하였다.

2) 檢液의 投與

檢液의 投與는 2個月齡의 正常흰쥐 8마리 1群과 8個月齡의 老化흰쥐 8마리를 5群으로 나누어, 全期間 동안 正常흰쥐에 生理食鹽水만 投與한 正常群(Normal), 老化흰쥐에 生理食鹽水만 投與한 對照群(Control), 老化흰쥐에 100mg/kg의 補脾湯煎湯液을 投與한 群(BBT I), 老化흰쥐에 250mg/kg의 補脾湯煎湯液을 投與한 群(BBT II), 老化흰쥐에 350mg/kg의 補脾湯煎湯液을 投與한 群(BBT III), 老化흰쥐에 500mg/kg의 補脾湯煎湯液을 投與한 群(BBT IV)으로 各各 區別하였다. 補脾湯煎湯液의 投與 用量과 期間은 豫備實驗을 行하여서 補脾湯煎湯液 100mg/kg, 250mg/kg, 350mg/kg, 500mg/kg을 1週間 經口投與하였다.

3) 酵素源의 調製

實驗動物를 CO₂ gas로 麻酔시킨 後 腹部 正中線을 따라 切開하고 腹部 大動脈에서 血液을 採取하여 失血死 시키고, 脾臟은 生理食鹽水로 씻은 다음 濾紙로 血液 및 其他 異物質을 除去하고 平量한 다음 組織 1g當 1倍量의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 加하여 glass teflon homogenizer로 磨碎하였다. 이 磨碎液을 600xg에서 10分間 遠心分離하여 核 및 未磨碎 部分을 除去한 上澄液을 10,000xg에서 20分間 遠心分離하였다. 이 上澄液을 105,000xg에서 1時間 超遠心分離하여 cytosolic fraction으로, 그 沈澱物에 同-한 量의 0.1M potassium phosphate buffer를 加하여 懸濁시킨 液을 microsomal fraction으로 하였다. 磨碎液은 lipid peroxide와 glutathione의 含量을 測定하였으며, cytosolic fraction은 superoxide dismutase, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase 및 γ-glutamylcystein synthetase, xanthine oxidase, aldehyde oxidase 活性의 酵素源으로, microsomal fraction은 cytochrome P-450, aminopyrine



Scheme I. Preparation of mitochondrial, microsomal and cytosolic fractions

N-demethylase 및 aniline hydroxylase 活性 測定에 使用하였다. 한편 mitochondria 分割은 catalase 活性 測定の 酵素源으로 使用하였다. 以

위의 모든 造作은 따로 規程이 없는 한 4°C以下에서 施行하였다(Scheme I).

4) 脾臟組織中 脂質過酸化의 含量 測定

Ohkawa等의 方法⁴⁰⁾에 準하여 脾臟組織 1g 當 9倍量의 生理食鹽水를 加하여 磨碎한 다음, 이 磨碎液 0.4ml에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2ml, 20% acetate buffer(pH 3.5)와 發色의 目的으로 0.8% thiobarbituric acid를 加한 後 95°C에서 1時間 동안 反應시키고 室溫에서 冷却한 다음, 蒸溜水 1.0ml와 n-BuOH : pyridine(15:1) 5.0ml를 添加하여 잘 섞은 後 15分間 遠心分離하여 n-BuOH : pyridine層을 取하여 波長 532nm에서 生成되는 紅色의 malondialdehyde의 量을 測定하여 標準檢量線에 準하여 算定하였으며, 含量은 脾臟組織 1g 當 malondialdehyde nmole로써 表示하였다.

5) Superoxide의 生成能 測定⁴¹⁻⁴²⁾

Superoxide 遊離機의 生成은 superoxide dismutase를 抑制할 수 있는 ferricytochrome C의 還元되는 速度를 測定하였다.

즉, 0.1mM EDTA를 含有한 phosphate buffer(pH 7.8) 420 μ l에 cyanide의 濃도가 50 μ M이 되도록 20mM cyanide 溶液을 加한 後 37°C에서 10分間 preincubation시켰다. 이 溶液에 postnuclear fraction 300 μ l와 0.1mM cytochrome C 50 μ l를 넣어 spectrophotometer로 cuvette를 37°C로 維持시키면서 550nm에서 測定하였다. 이때 cytochrome C의 量은 分子吸光計數 19,500M⁻¹cm⁻¹로 計算하였다.

6) 酵素活性의 測定

(1) Cytochrome P-450의 活性 測定

Omura와 Sato 等의 方法⁴³⁾에 準해 試驗管에 1mM EDTA, 20% glycerol, 0.5% sodium cholate 및 0.4% Triton N-101이 含有된 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 microsomal suspension(1mg protein/ml)을 添加한 後 sodium dithionite를 넣고 混合한다. 다음 CO gas를 1分間 bubbling시킨다. Bubbling이 끝난 後 波長 400-500nm에서 吸光度를 測定하고 450-490nm에서 吸光度의 差異를 cytochrome P-450 CO complex에 依한 吸光量 吸光計數 91mM⁻¹cm⁻¹를 利用하여 算定하였다.

(2) Aminopyrine demethylase의 活性 測定

Nash等의 方法⁴⁴⁾을 若干 變更하여 反應液 2ml

中 0.1M Na⁺/K⁺ phosphate buffer(pH 7.5)에 2mM aminopyrine HCl, 0.5mM NADPH, 10mM MgCl₂, 150mM KCl, 1mM semicarbazide 및 酵素液(30-400 μ g의 蛋白質)을 加해 이 反應液을 37°C에서 30分間 反應시킨 다음, 15% ZnSO₄와 飽和 Ba(OH)₂를 加하여 反應을 終了시키고 5分間 放置 後 10分間 遠心分離하여 여기서 얻은 上澄液 5ml에 發色의 目的으로 Nash reagent를 添加하고 60°C에서 30分間 反應시킨 後 다시 遠心分離하여 上澄液을 取하여 波長 415nm에서 그 吸光度를 測定하고 標準曲線에 準하여 活性度를 算定하였다.

(3) Aniline hydroxylase의 活性 測定

Bidlack等의 方法⁴⁵⁾에 準하여 反應液 2ml中 10mM MgCl₂와 150mM KCl이 含有된 50mM Tris. HCl 緩衝液(pH 7.4)에 基質인 1mM aniline HCl, 0.5mM NADPH 및 酵素液(300-400 μ g의 蛋白質)을 加하여 이 液을 37°C에서 20分間 反應시킨 다음, 反應을 終了시킬 目的으로 20% trichloroacetic acid를 加한 後 10分間 遠心分離하여 上澄液에 發色의 目的으로 10% Na₂CO₃와 0.2N-NaOH(2% phenol 含有)를 넣고 37°C에서 30分間 反應시킨 後, 波長 640nm에서 그 吸光度를 읽고 標準曲線에서 活性度를 算定하였다.

(4) Xanthine oxidase의 活性 測定

Stripe과 Della의 方法⁴⁶⁾에 準하여 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 3.0ml에 酵素液 0.4ml를 加하고 基質인 60 μ M의 sodium xanthine 0.1ml를 加하여 37°C에서 反應시킨 다음 20% trichloroacetic acid를 加하여 除蛋白시키고 上澄液을 取해 生成된 uric acid를 波長 292nm에서 吸光度를 測定하고 標準檢量線에 準하여 活性度를 算定하였다. 酵素活性의 單位는 1分當 1mg protein이 生成하는 uric acid nmole로 나타내었다.

(5) Aldehyde oxidase의 活性 測定

Rajagopalan等의 方法⁴⁷⁾에 準하여 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 基質인 N-methylnicotinamide chloride와 酵素液을 加하여 反應시킨 後 生成되는 2-pyridone을 波長 300nm에서 吸光度를 測定하고 標準檢量線에 準하여 活性度를 算定하였다. 酵素活性의 單位는 1分

當 1mg protein이 生成하는 2-pyridone의 量을 nmole로 表示하였다.

(6) Superoxide dismutase의 活性 測定⁴⁸⁾

7.5mM xanthine 50 μ l와 10mM hydroxylamine hydrochloride 50 μ l에 濃度別 稀釋試料 0.5ml, blank로서 65mM phosphate buffer(pH 7.8) 0.5ml를 取해 37°C에서 10分間 preincubation시켰다. 0.42unit/ml의 xanthine oxidase를 0.2ml 加한 後 20分間 incubation시키고 sulfanilamide溶液 1ml와 naphthylethylenediamine 1ml를 加하여 室溫에서 20分間 放置 後 540nm에서 吸光度를 測定하여 總 SOD活性을 구한 뒤 4mM KCN을 0.2ml 넣고 測定한 Mn-SOD 값을 除하여 Cu, Zn-SOD 값을 구하였다.

(7) Catalase의 活性 測定⁴⁹⁾

50mM phosphate buffer(pH 7.0) 1.5ml에 酵素源 100 μ l를 加하고 30mM H₂O₂ 溶液의 3倍 稀釋液을 1ml를 加하여 240nm에서 吸光度 變化를 2分間 觀察하여 測定하였다.

(8) Glutathione peroxidase의 活性 測定

Paglia와 Valentine의 方法⁵⁰⁾에 準해 hydrogen peroxide 및 glutathione이 含有된 0.1mM Tris. buffer(pH 7.2)中에서 酵素液을 加하여 波長 340nm에서 吸光度를 測定하고 標準檢量線에 準하여 活性度를 算定하였다. 酵素活性의 單位는 1分當 1mg protein이 生成하는 NADP의 量을 nmole로 表示하였다.

(9) Glutathione S-transferase의 活性 測定

Habig 등의 方法⁵¹⁾에 準하여 反應液 3.5ml에 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.5)에 1mM glutathione, 1mM 1-chloro 2,4-dinitrobenzene 및 0.1ml 酵素液을 加하여 25°C에서 2分間 反應시킨 後, 이 때 生成되는 thioether를 340nm에서 吸光度의 變化를 읽고 吸光計數 9.6mM⁻¹cm⁻¹를 利用하여 酵素의 活性度를 算定하였다.

(10) 脾臟組織中 glutathione의 定量

Ellamn의 方法⁵²⁾을 若干 變更하여 10% 脾臟組織 1ml에 1mM EDTA가 含有된 5% trichloroacetic acid를 加하여 遠心分離한 後, 上澄

液 0.5ml를 取하여 0.5ml ninhydrin 試藥을 加한 後, 10分間 加熱하여 冷水에 冷却하고서 560nm에서 吸光度를 測定하였다. 이 곳에서 non-protein-SH에서 cysteine을 除한 값을 glutathione의 量으로 하였다.

(11) γ -Glutamylcystein synthetase의 活性 測定

Meister와 Richman의 方法⁵³⁾에 準하여 反應液 3.5ml中 0.1M Tris. HCl buffer(pH 8.0), 8.9mM L-glutamic acid, 0.94mM EDTA, 3.2mM MgCl₂, 1.35mM ATP와 酵素液(100-300 μ g 蛋白質)을 加하여 37°C에서 10分間 反應시킨 後 spectrophotometer를 利用하여 吸光度 600nm에서 酵素의 活性을 測定하였다.

(12) Glutathione reductase의 活性 測定

Mize and Langdon의 方法⁵⁴⁾에 準하여 反應液 3.0ml中 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5), 0.94mM EDTA, 4.6mM oxidized glutathione, 0.16mM NADPH 및 酵素液(400-600 μ g 蛋白質)을 加하여 37°C에서 10分間 反應시킨 後 340nm에서 NADPH의 減少되는 量을 測定하였다.

7) 蛋白質 定量 및 統計處理

蛋白質의 含量은 Lowry 등의 方法⁵⁵⁾에 準하여 bovine serum albumin (Sigma Fr. V)을 標準品으로 하여 測定하였으며, 本 實驗에서 얻어진 結果는 平均値±標準偏差로 表示하였고, 統計의 有意性 檢證은 Duncan's multiple range test를 利用하였다.

III. 成績

1. 補脾湯의 用量別 投與가 흰쥐의 脾 脂質過酸化 含量에 미치는 影響

補脾湯煎湯液의 投與 用量 및 期間을 設定하기 위한 豫備實驗으로 用量別(100, 250, 350, 500mg/kg)로 1週에서 4週間 投與하고서 老化흰쥐의 脾 脂質過酸化 含量(單位:MDA nmole/g of tissue) 變化를 觀察하였다. 그 結果, 各 實驗群에서 1週 投與 後부터 有意性 있게 減少하였고 特히

Table 1. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen lipid peroxide content in eight months rats

Dose Group(mg/kg)	Content(MDA* nmole/g of tissue)				
	0	1	2	3	4(week)
Normal	3.04±0.42 ^a				
Control	7.56±0.34 ^b				
BBT I 100		7.36±0.32 ^b	7.13±0.28 ^b	6.39±0.49 ^c	6.42±0.36 ^c
BBT II 250		6.83±0.27 ^{b,c}	6.32±0.33 ^c	5.98±0.38 ^c	5.77±0.51 ^{c,d}
BBT III 350		5.17±0.46 ^d	5.08±0.20 ^d	5.23±0.30 ^d	4.92±0.46 ^c
BBT IV 500		5.36±0.21 ^d	5.19±0.19 ^d	5.01±0.22 ^{d,e}	5.11±0.31 ^d

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one to four weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

* : malondialdehyde

BBT III, IV 群에서 더욱 顯著하였다. 그러나 期間에 따른 有意性은 없었다(Table 1, Fig. 1).

이 結果를 上臺로 하여 以後의 實驗에서는 補脾湯煎湯液을 100, 250, 350, 500mg/kg씩 1週間 投與하였다.

2. Superoxide 生成能에 미치는 影響

Superoxide 生成能(單位:nM/mg protein)에 미치는 影響을 觀察한 結果, 正常群의 100%(23.8±

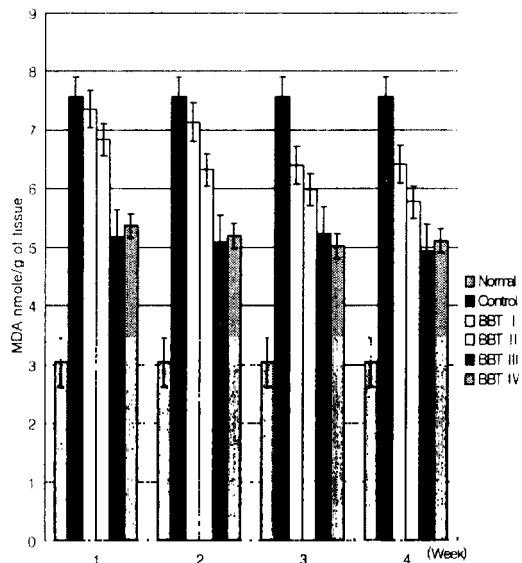


Fig. 1. Effect of water extract from Bobitang (BBT) on spleen lipid peroxide content in eight months rats.

2.28)에 對하여 對照群이 163%(38.9±3.36)로 有意性 있게 增加한 것과 比較하여, 全 實驗群에서 有意性 있게 減少하였고 특히 BBT IV 群에서 106%(25.3±2.30), BBT III 群에서 111%(26.4±3.27)로 顯著하였다(Table 2, Fig. 2).

3. Cytochrome P-450의 活性에 미치는 影響

Cytochrome P-450의 活性(單位:nmole/mg protein)에 미치는 影響을 觀察한 結果, 正常群의 100%(0.145±0.027)에 對하여 對照群은

Table 2. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen superoxide generation in eight months rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	
	nM/mg protein	% of Normal
Normal	23.8±2.28 ^a	100
Control	38.9±3.36 ^b	163
BBT I 100	32.5±2.30 ^{b,c}	137
BBT II 250	33.7±3.42 ^c	142
BBT III 350	26.4±3.27 ^d	111
BBT IV 500	25.3±2.30 ^d	106

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one week. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Fig. 2. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen superoxide generation in eight mont

101%(0.147±0.050)로 若干의 增加를 나타내었으나 有意性은 없었고 BBT III 群에서 96%(0.139±0.034)로 有意性 있게 減少하였다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Effect of water extract from Bobitang (BBT) on spleen microsomal cytochrome P-450 activity in eight months rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	% of Normal
	nmole/mg protein	
Normal	0.147±0.050 ^a	100
Control	0.147±0.050 ^a	101
BBT I 100	0.142±0.036 ^{a,b}	98
BBT II 250	0.150±0.049 ^c	103
BBT III 350	0.139±0.034 ^d	96
BBT IV 500	0.143±0.056 ^d	99

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one week. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Fig. 3. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen microsomal cytochrome P-450 activity in eight months rats.

4. Aminopyrine demethylase의 活性에 미치는 影響

Aminopyrine demethylase의 活性(單位:HCHO nmole/mg protein/min)에 미치는 影響을 觀察한 結果, 正常群의 100%(0.411±0.025)에 對하여 對照群이 109%(0.448±0.016)로 多少 增加된 것과 比較하여, BBT III 群에서 97%(0.399±0.019)로 有意性 있게 減少하였다(Table 4, Fig. 4).

Fig. 4. Effect of water extract from Bobitangn(BBT) on spleen aminopyrine N-demethylase activity in eight months rats.

Table 4. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen aminopyrine N-demethylase activity in eight months rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	
	HCHO nmole/mg protein/min	% of Normal
Normal	0.411 ± 0.025 ^a	100
Control	0.448 ± 0.016 ^{a,b}	109
BBT I 100	0.449 ± 0.030 ^b	109
BBT II 250	0.440 ± 0.028 ^{a,b}	107
BBT III 350	0.399 ± 0.019 ^a	97
BBT IV 500	0.442 ± 0.021 ^{a,b}	99

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one week. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

5. Aniline hydroxylase의 活性에 미치는 影響

Aniline hydroxylase의 活性(單位 : p-amino-phenol nmole/mg protein/min)에 미치는 影響을 觀察한 結果, 正常群의 100%(0.178 ± 0.020)에 對하여 對照群은 120%(0.213 ± 0.014)로 有意性 있게 增加한 것과 比較하여, 全 實驗群에서 有意性 있게 減少하였다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen aniline hydroxylase activity in eight months rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	
	p-aminophenol nmole/mg protein/min	% of Normal
Normal	0.178 ± 0.020 ^a	100
Control	0.213 ± 0.014 ^b	120
BBT I 100	0.193 ± 0.031 ^{a,b}	108
BBT II 250	0.189 ± 0.026 ^a	106
BBT III 350	0.201 ± 0.022 ^{a,b}	113
BBT IV 500	0.182 ± 0.018 ^a	102

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one week. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

6. Xanthine oxidase의 活性에 미치는 影響

Xanthine oxidase의 活性(單位:uric acid nmole/mg protein/min)에 미치는 影響을 觀察한 結果, 正常群의 100%(0.35 ± 0.028)에 對하여 對照群은 114%(0.40 ± 0.037)로 有意性 있게 增加한 것과 比較하여, 全 實驗群에서 有意性 있게 減少하였다(Table 6, Fig. 6).

Fig. 5. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen aniline hydroxylase activity in eight months rats.

Fig. 6. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen xanthine oxidase activity in eight months rats.

Table 6. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen xanthine oxidase activity in eight months rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	
	uric acid nmole/mg protein/min	% of Normal
Normal	0.35 ± 0.028 ^a	100
Control	0.40 ± 0.037 ^b	114
BBT I 100	0.38 ± 0.032 ^{a,b}	109
BBT II 250	0.33 ± 0.021 ^a	94
BBT III 350	0.32 ± 0.029 ^a	91
BBT IV 500	0.36 ± 0.033 ^a	103

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one week. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

7. Aldehyde oxidase의 活性에 미치는 影響

Aldehyde oxidase의 活性(單位:2-pyridone nmole/mg protein/min)에 미치는 影響을 觀察한 結果, 正常群의 100%(2.17 ± 0.20)에 對하여 對照群이 110%(2.39 ± 0.24)로 有意性 있게 增加한 것과 比較하여, 全 實驗群에서 減少하였고 特히 BBT IV 群에서 102%(2.21 ± 0.26)로 有意性 있게 減少하였다(Table 7, Fig. 7).

Table 7. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen aldehyde oxidase activity in eight months rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	
	2-pyridone nmole/mg protein/min	% of Normal
Normal	2.17 ± 0.20 ^a	100
Control	2.39 ± 0.24 ^b	110
BBT I 100	2.27 ± 0.15 ^{a,b}	105
BBT II 250	2.31 ± 0.18 ^{a,b}	106
BBT III 350	2.30 ± 0.31 ^{a,b}	106
BBT IV 500	2.21 ± 0.26 ^a	102

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one week. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Fig. 7. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen aldehyde oxidase activity in eight months rats.

8. Superoxide dismutase의 活性에 미치는 影響

Superoxide dismutase의 活性(單位:unit*/mg protein/min)에 미치는 影響을 觀察한 結果, 正常群의 100%(10.51 ± 0.23)에 對하여 對照群은 52%(5.43 ± 0.36)로 有意性 있게 減少한 것과 比較하여, 全 實驗群에서 有意性 있게 增加하였고 特히 BBT IV 群에서 89%(9.36 ± 0.55), BBT III 群에서 79%(8.27 ± 0.30)로 顯著하였다(Table 8, Fig. 8).

Table 8. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen superoxide dismutase activity in eight months rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	
	unit*/mg protein/min	% of Normal
Normal	10.51 ± 0.23 ^a	100
Control	5.43 ± 0.36 ^b	52
BBT I 100	7.12 ± 0.21 ^c	68
BBT II 250	7.28 ± 0.26 ^c	69
BBT III 350	8.27 ± 0.30 ^d	79
BBT IV 500	9.36 ± 0.55 ^e	89

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one week. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

*unit : 1 unit of superoxide dismutase activity was defined as the which inhibited the reduction of alkaline DMSO-mediated cytochrome C by 50%

BBT II 群 78%(10.20±0.18), BBT I 群 64%(8.39±0.10)의 順으로 有意性 있게 增加하였다 (Table 9, Fig. 9).

Fig. 8. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen superoxide dismutase activity in eight months rats.

9. Catalase 및 glutathione peroxidase의 活性에 미치는 影響

Catalase의 活性(單位:hydrogen peroxide decreased μ mole/mg protein/min) 및 glutathione peroxidase의 活性(單位:oxidized NADPH nmole/mg protein/min)에 미치는 影響을 觀察한 結果, 正常群 各各의 100%(1.41±0.027 및 13.07±0.23)에 對하여 對照群이 各各 55%(0.78±0.014) 및 48%(6.27±0.14)로 有意性 있게 減少한 것과 比較하여, catalase는 BBT III 群 83%(1.17±0.020), BBT IV 群 77%(1.09±0.025), BBT II 群 73%(1.03±0.024)의 順으로, glutathione peroxidase는 BBT IV 群 92%(11.97±0.22), BBT III 群 89%(11.65±0.16),

Table 9. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen catalase and glutathione peroxidase activities in eight months rats

Dose Group (mg/kg)	Activity (% of Normal)	
	Catalase*	Glutathione peroxidase*
Normal	1.41±0.027 ^a (100)	13.07±0.23 ^a (100)
Control	0.78±0.014 ^b (55)	6.27±0.14 ^b (48)
BBT I 100	0.95±0.018 ^{bc} (67)	8.39±0.10 ^c (64)
BBT II 250	1.03±0.024 ^c (73)	10.20±0.18 ^{ca} (78)
BBT III 350	1.17±0.020 ^d (83)	11.65±0.16 ^d (89)
BBT IV 500	1.09±0.025 ^{dc} (77)	11.97±0.22 ^d (92)

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one week. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

* : hydrogen peroxide decreased μ mole/mg protein/min
** : oxidized NADPH nmole/mg protein/min

Fig. 9. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen catalase and glutathione peroxidase activities in eight months rats.

10. Glutathione S-transferase의 活性에 미치는 影響

Glutathione S-transferase의 活性(單位:nmole/mg protein)에 미치는 影響을 觀察한 結果, 正常群의 100%(7.58±0.41)에 對하여 對照群이 83%(6.29±0.30)로 有意性 있게 減少한 것과 比較하여, BBT III 群에서 96%(7.30±0.35), BBT II 群에서 94%(7.12±0.22)로 有意性 있게 增加하였

다(Table 10, Fig. 10).

Table 10. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen glutathione S-transferase activity in eight months rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	% of Normal
	nmole/mg protein	
Normal	7.58 ± 0.41 ^a	100
Control	6.29 ± 0.30 ^b	83
BBT I 100	6.98 ± 0.29 ^{b,c}	92
BBT II 250	7.12 ± 0.22 ^c	94
BBT III 350	7.30 ± 0.35 ^c	96
BBT IV 500	6.83 ± 0.37 ^c	90

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one week. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Fig. 10. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen glutathione S-transferase activity in eight months rats.

11. 脾臟組織中 glutathione의 含量에 미치는 影響

脾臟組織中 glutathione의 含量(單位: μ mole/mg protein)에 미치는 影響을 觀察한 結果, 正常群의 100%(1.78 ± 0.33)에 對하여 對照群이 75%(1.34 ± 0.37)로 有意性 있게 減少한 것과 比較하여, BBT II 群을 除外한 全 實驗群에서 全般的으로 增加되었고 特히 BBT IV 群에서 88%(1.56 ± 0.47)로 有意性 있게 增加하였다(Table 11, Fig. 11).

Table 11. Effect of water extract from Bobitang (BBT) on spleen glutathione concentration in eight months rats

Dose Group (mg/kg)	Concentration	% of Normal
	μ mole/mg protein	
Normal	1.78 ± 0.33 ^a	100
Control	1.34 ± 0.37 ^b	75
BBT I 100	1.48 ± 0.21 ^{a,b}	83
BBT II 250	1.27 ± 0.25 ^{b,c}	71
BBT III 350	1.43 ± 0.22 ^{a,b}	80
BBT IV 500	1.56 ± 0.47 ^a	88

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one week. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Fig. 11. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen glutathione concentration in eight months rats.

12. Glutathione 生成系의 活性에 미치는 影響

γ -Glutamylcystein synthetase의 活性(單位:Pi nmole/mg protein/min)에 미치는 影響을 觀察한 結果, 正常群의 100%(3.26±0.18)에 對하여 對照群이 92%(2.99±0.20)로 有意性 있게 減少한 것과 比較하여, BBT III 群에서 97%(3.17±0.19), BBT IV 群에서 96%(3.12±0.16)로 有意性 있게 增加하였고, glutathione reductase(單位:glutathione nmole/mg protein/min)에서는 별다른 變化가 없었다(Table 12, Fig. 12).

Table 12. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen glutathione biosynthesis system in eight months rats

Dose Group (mg/kg)	Activity (% of Normal)	
	γ -Glutamylcystein synthetase*	Glutathione reductase**
Normal	3.26±0.18 ^a (100)	8.75±0.33 ^a (100)
Control	2.99±0.20 ^b (92)	8.43±0.29(96)
BBT I 100	3.06±0.22 ^{ab} (94)	8.93±0.40(102)
BBT II 250	2.97±0.13 ^b (91)	8.12±0.42(93)
BBT III 350	3.17±0.19 ^a (97)	8.70±0.38(99)
BBT IV 500	3.12±0.16 ^a (96)	8.62±0.30(99)

Rats were orally administered water extract from Bobitang(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one week. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

* : Pi nmole/mg protein/min
 ** : glutathione nmole/mg protein/min
 ns : not significant

IV. 考 察

老化란 生命體의 成長과 同時에 時間 經過에 따른 連續的인 現象으로 生物學的 過程인, 漸進的이고 內的인 退行性 變化로서 構造的, 機能的 變化가 招來되어 外部 環境에 對해 反應하는 豫備力과 適應力이 低下되어 形態的, 機能的으로 退縮, 生命力이 減退되는 現象을 意味하는 것으로²⁻⁴⁾, 人間의 壽命이 漸次 延長됨에 따라 老化로 因한 疾患 또한 增加되고 있는 實情이다⁵⁶⁻⁵⁸⁾.

年齡 增加에 따른 老化現象의 變化로는 頭髮, 皮膚 等の 外觀上 變化와 身體, 臟器 重量 減少

Fig. 12. Effect of water extract from Bobitang(BBT) on spleen glutathione biosynthesis system in eight months rats.

등의 形態的 變化 및 知的, 人格의 機能 低下, 心理的 變化 등이 나타난다.^{1,4,8,59)}

韓醫學에서는 <內經> <素問·上古天真論>⁶⁾에 “女子……五七, 陽明脈衰, 面始焦, 髮始墮. 六七, 三陽脈衰於上, 面皆焦, 髮始白. 七七, 任脈虛, 太衝脈衰少, 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, 陽氣衰弱於上, 面焦, 髮鬢頰白. 七八, 肝氣衰, 筋不能動, 天癸竭, 精少, 腎臟衰, 形體皆極. 八八則齒髮去,”라 하고, <靈樞·天年篇>⁷⁾에 “四十歲……腠理始疏, 榮華頰落, 髮頰斑白,……五十歲, 肝氣始衰, 肝葉始薄, 膽汁始減, 目始不明. 六十歲, 心氣始衰,……七十歲, 脾氣虛, 皮膚枯. 八十歲, 肺氣衰,……九十歲, 腎氣焦, 四臟經脈空虛. 百歲, 五臟皆虛, 神氣皆去,”라 하여 加齡에 따른 身體 各部位의 變化와 各臟腑의 機能 低下에 對해 記述하고 있다.

老化的 原因 및 發生機轉을 살펴보면, 西洋醫學에서 生物學的, 生化學的, 生理學的 및 形態學的原因說 등이 있는데^{1,4,8-9)}, 生物學的原因說로 消耗說, 新陳代謝速度說, 內分泌說, 生氣說, 衝擊說, 中毒說, 臟器의 原發性 萎縮說, 細胞學說, 突然變異說, 細胞遺傳學說, 自己免疫說 등이 있고, 生化學的原因說로는 DNA說, 化學反應說, collagen의 老化說, free radical說, 酵素作用障礙說 등이 있으며, 形態學的原因說로는 組織再生機能, 結合組織, 細胞數 및 核의 老化 등이 있으며, 生理學的原因說로는 恒常性的 破綻, 適應力의 缺陷, 反應力의 變化, 臟器들의 豫備力 減少說 등이 있는데^{1,4,8-10,56,58,60-62)}, 最近에는 活性酵素와 關聯된 學說이 注目을 받고 있는 바, 이는 定常的인 細胞內 代謝過程에서 生産되는 遊離基(free radical)들이 漸進的으로 細胞內에 蓄積되면서 細胞內 酵素, 細胞膜, 蛋白質, 脂肪, DNA를 損傷시킨다는 學說이다^{10,63-64)}.

Free radical이란 分子 或은 原子 最外角 電子軌道에 附帶電子(짝지어지지 않은 電子)를 가진 不安定한 化合物을 말하는데, 生體內에서 問題가 되는 것은 代謝過程에서 附隨的으로 생기는 活性酸素로 superoxide(O₂⁻), 過酸化水素(hydrogen peroxide, H₂O₂), hydroxy radical(-OH) 등이 該當되고 이들

은 細胞內 顆粒 및 cytosol에서 生成되며 또한 macrophage, 白血球에서도 生成된다⁴⁸⁾. 여러 酵素系에 依해 生成되는 superoxide radical은 金屬이온 存在下에 여러 hydroperoxides와 反應하여 反應性이 큰 alkoxyl radical(RO·)이나 hydroxyl radical이 되어 生體 分子를 攻擊하여 組織 損傷을 일으키게 된다. 이러한 活性酸素는 macrophage의 殺菌作用, 오래된 蛋白質의 除去 등에 利用되는 物質이나, 反應性이 커서 生體內 有害한 作用을 나타낼 수 있다. 勿論 生體에는 이런 free radical 反應의 有害作用을 抑制하고 活性酸素의 毒性으로부터 組織을 保護하고 恒常性を 維持하려는 防禦役割을 하는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione(GSH), glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, protein-SH, nonprotein-SH, 비타민 E 등의 抗酸化系가 存在한다. 그러나 끊임없이 生成되는 酸素라디칼의 一部는 細胞機能을 低下시켜 老化過程을 誘發할 것으로 推測되고 있다⁵⁵⁾.

韓醫學에서는 老衰의 原因을 陰陽의 不調和, 形身衰弱, 氣血 및 腎氣衰弱 등으로 說明하고 生體의 老衰를 陰陽의 變化, 臟腑의 變化, 氣血의 變化, 經絡의 變化 및 精神의 變化로 보고 있으며¹⁵⁾, 治療觀點은 補腎益元¹⁶⁾, 補脾腎^{36,58)}, 調心補腎, 補氣虛, 補益化痰⁶⁰⁾, 補益扶正^{56,58)} 등으로 接近하고 있는 實情이다.

韓醫學에서의 抗老化에 對한 實驗的 研究로서, 첫째 單味劑를 利用한 論文으로 高麗人蔘, 高麗紅蔘¹²⁾, 熟地黃, 黃芪, 鹿茸¹³⁾, 柴胡¹⁴⁾ 등이 있고, 둘째 複合處方을 利用한 論文으로 鹿蔘地黃湯¹⁵⁾, 六味地黃湯¹⁶⁾, 定志丸¹⁷⁾, 延年丸¹⁸⁾, 左歸飲과 右歸飲^{19,20)}, 平補湯²¹⁾, 更年1號丸²²⁾, 聰明湯²³⁾ 등이 있으며, 셋째 藥針製劑를 利用한 論文으로 杜沖²⁴⁾, 白何首烏²⁵⁾, 胡桃²⁶⁾, 鹿茸²⁷⁾, 當歸²⁸⁾, 芍藥²⁹⁾, 桂枝³⁰⁾, 巴戟³¹⁾, 益智仁³²⁾, 淫羊藿³³⁾, 山茱萸 藥針³⁴⁾ 등이 있고, 넷째 理學的 因子를 利用한 論文으로 B.E.P.³⁵⁾가 있는 바, 以上에서 使用된 藥劑 및 複合處方들은 主로 補腎之劑 및 腎臟과 關係를 가지고 있다. 이는 最近의 老化防止 研究들이 腎虛 및 老化와 關聯된 補劑의 活用을 통해 抗酸化效能을

科明하려는 試圖로 解釋할 수 있으나 다른 臟腑와 관련된 研究는 不足한 實情이다.

이에, 著者는 老化和 各臟腑와의 相關性이 緊密하고⁷⁾ 老化的 原因이 各臟腑의 變化에 따른 것^{1,5)} 이라는 理論에 着眼하여, 人體의 生理活動을 維持하는 重要한 臟腑中의 하나로 “後天之本 氣血生化之源”이라고 한³⁶⁾ 脾臟機能을 살펴보는 것도 意味 있는 일이라 생각한다.

脾臟은 中央土로서 萬物生長의 母體이며 發生의 根本이기 때문에 脾胃를 五行中에 土에 歸屬시켜 놓았으며, 人體의 生理活動을 維持하는 重要한 臟腑中의 하나로 “脾胃爲後天之本 氣血生化之源” “脾胃者 倉廩之官 五味出焉”한다고 하였다³⁶⁾. 脾의 解剖學的인 形象은 馬蹄 또는 刀鎌과 類似하며 胃脘에 內包되어 土型을 象徵한다고 하였고, 脾는 中焦에 位置하여 脾主運化·脾統血·脾主肌肉·脾主四肢·脾開竅于口 하는 重要한 生理機能을 가지고 있다³⁶⁾.

補脾湯은 陳의 《三因極一病證方論》⁶⁷⁾에 처음으로 收錄된 以後, 許의 《東醫寶鑑》에서 脾虛에 宜用한다 하였고³⁸⁾ 脾臟虛冷 嘔吐 泄瀉 飲食不消 腹滿 氣逆 心煩不得臥 腸鳴 虛脹 勞倦 虛羸 喜噫 四肢厥逆 多臥少起 情意不樂 等の 症狀를 治療하며 麥芽炒 甘草炙 人蔘 白茯苓 草果 乾薑炮 厚朴 陳皮 白朮로 構成된다^{38,67)}. 그러나 《東醫寶鑑》³⁸⁾과 《三因極一病證方論》⁶⁷⁾에서 構成藥物의 種類만 一致할 뿐 藥量과 服用法에 있어서는 다른 記述을 하고 있다. 《東醫寶鑑》³⁸⁾에서는 麥芽炒 甘草炙 各一兩半, 人蔘 白茯苓 草果 乾薑炮 各一兩, 厚朴 陳皮 白朮 各七錢半으로 記述되어 있는 反面, 《三因極一病證方論》⁶⁷⁾에서는 麥芽炒 甘草炙 人蔘 白茯苓 草果 乾薑炮는 同量이나 厚朴 陳皮 白朮은 各三分으로 減量되어 記述하고 있고, 《東醫寶鑑》³⁸⁾에서는 “右挫 五錢 水煎服”이라 되어 있는 反面, 《三因極一病證方論》⁶⁷⁾에서는 “右爲挫散 每服四錢 水一盞半 煎七分 去滓 食前服”이라 되어 있어 服用法에서도 差異를 보이고 있다. 本實驗에서는 《東醫寶鑑》³⁸⁾에 準하여 藥量을 算定하였는데, 五錢씩 하루 3回 服用한다고 假定하고 一般的으로 2貼이 하루 服用量이니 五錢씩 3回 服

用量을 2로 나누어 1貼의 藥量으로 算定하였다.

脾虛에 宜用하는 補脾湯煎湯液의 老化에 따른 活性酸素 生成能의 變化와 이에 對한 生體內 防禦 機轉을 實驗的으로 科明하기 위하여, 2個月齡(180 ± 10g)의 正常흰쥐를 正常群, 8個月齡(550 ± 10g)의 老化흰쥐를 對照群으로 設定하고 實驗群으로는 8個月齡의 老化흰쥐에 各各 100mg/kg, 250mg/kg, 350mg/kg, 500mg/kg의 補脾湯煎湯液을 投與한 後, 抗老化測定指標인 superoxide 生成能, cytochrome P-450, aminopyrine demethylase, aniline hydroxylase, xanthine oxidase, aldehyde oxidase, superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, glutathione 生成系의 活性和 脾臟組織中 glutathione 含量의 變化를 檢討하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

過酸化脂質은 活性酸素의 反應物로 自動酸化反應에 依한 多價不飽和脂肪酸에 酸素가 附加된 生成物의 總稱인데, 生體內 脂質酸化에서 重要한 것은 β酸化和 過酸化(自動酸化)로 β酸化는 生體內에서 없어서는 안되는 것이며 에너지(ATP)生産에 關與하는 反應이고, 過酸化는 高度로 不飽和된 脂肪酸의 二重結合에 炭化水素에서 水素를 빼내어 free radical이나 活性酸素가 생기는 反應이다⁵⁸⁾. 過酸化脂質의 生成은 病態生理現象이나 組織의 損傷 程度를 나타내는 指標로, 細胞膜의 透過性을 充進시킬 뿐만 아니라 全般的인 細胞毒性을 招來하여 細胞機能을 低下시키며 壞死에 關係하여 老化現象이나 이에 따른 여러 가지 疾患의 病理現象을 誘發하여 發癌過程에도 關與할 것으로 생각되고 있다. 그러나 生體內에서는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, vitamin E 等に 依한 過酸化反應 防禦機構가 있기 때문에 通常은 過酸化脂質이 大量으로 蓄積되지는 않으나 年齡 增加에 따른 血管壁의 退行性 病變이나 肝疾患, 糖尿病 等에서는 過酸化脂質이 增加한다고 報告되어 있다⁶⁸⁾.

이에 補脾湯의 過酸化脂質에 對한 抗酸化作用을 알아보고 또한 補脾湯煎湯液의 投與 用量 및 期間을 設定하기 爲한 豫備實驗으로, 補脾湯煎湯液이 老化흰쥐의 脾 脂質過酸化 含量에 미치는 影響을 實驗하였는데, 投與 用量(100·250·350·

500mg/kg)과 投與 期間(1·2·3·4週)을 다르게 하면서 老化흰쥐의 脾 脂質過酸化 含量 變化를 觀察한 結果, 各 實驗群은 1週 投與 後부터 有意性 있게 減少하였고 特히 BBT III, IV 群에서 더욱 顯著하였다. 그러나 期間에 따른 有意性은 發見되지 않았다(Table 1, Fig. 1). 이는 補脾湯煎湯液의 投與로 因하여 脾臟內 過酸化脂質이 效果의으로 줄어들어 補脾湯煎湯液 投與가 脾臟內 細胞毒性 除去에 有用함을 보여주는 것으로, 上記 實驗結果를 上臺로 本 研究에서는 補脾湯煎湯液을 100, 250, 350, 500mg/kg씩 1週間 投與한 것을 基準으로 하여 補脾湯이 老化에 미치는 影響 및 機轉을 檢索하였다.

Superoxide는 過酸化物로서 많은 生物學的 酸化에 있어서 혼한 中間產物인데 高度의 反應性인 酸素이온 O_2^- 을 含有한 化合物의 總稱으로¹⁸⁾, 生體內에서 superoxide(O_2^-)의 發生機轉에 對해서 過去에는 主로 紫外線, X線 等の 放射線에 露出된 境遇와 關聯하여 言及되었으나 現在는 catecholamine, ferrohemoprotein, thiols, ascorbate, hydroquinone 等과 같은 生化學的 關聯分子들의 自動酸化에 依해서 生成되며, 또한 xanthine oxidase, NAD(P)H oxidase 等과 같은 酸化酵素들의 作用에 依해서도 生成된다고 알려져 있다. 그리고 生成 部位別로 보면 superoxide는 主로 mitochondria, microsome, 核酸 等の 細胞小器官에서 生成되며, 또한 貪食細胞가 細菌을 貪食하여 殺菌하는 機轉中에서 重要な 役割을 擔當하고 있다. 이와 같이 superoxide는 恒常 有害하게 作用하는 것은 아니지만 大部分의 境遇에서 有益하다고 보다는 有害한 쪽으로 作用하며, 그 自體가 脂質過酸化 反應을 誘發시킬 뿐만 아니라, 보다 더 反應性이 높은 hydroxyl radical(-OH)을 生成시키는 前驅物質로서 重要하게 認識되고 있다¹⁴⁾.

Superoxide 生成能에 미치는 影響을 觀察한 結果, 實驗群은 全般的으로 有意性 있게 減少하였으며 特히 BBT IV 群, BBT III에서 顯著하였다 (Table 2, Fig. 2). 이로 미루어 볼 때 補脾湯煎湯液은 活性酸素를 能動的으로 減少시키지만 그 投與 濃도가 350mg/kg以上에서 優秀한 것으로 나타

나 臨床應用時 이를 基準으로 하는 것이 效果的이라고 判斷된다.

一般的으로 肝은, 生體內에서 生成되는 各種 產物들 및 生體外로부터 들어오는 異物質中 定常的인 炭素, 窒素 代謝를 거치지 못하거나 또는 一般的인 經路에 依하여 體外 排出이 못되어 體內에 蓄積되므로 非正常的인 生理活性을 나타내어 生體에 毒性을 일으키는 有毒한 產物들을 水溶性 形態로 바꾸어 體外로, 主로 小便을 通하여 排出하도록 하는 役割을 擔當하고 있다¹⁹⁾. 이 解毒作用이 이루어지는 機轉은 크게 두 가지로 첫째는 cytochrome P-450系를 主로 利用한 異物質 處理方案이며, 둘째는 肝組織의 固有機能中의 하나로 bilirubin代謝이다. 生體內로 들어온 異物質은 大部分 脂溶性이므로 生體膜을 透過하기도 쉽고, 體液에서 lipoprotein에 依해 쉽게 運搬될 수 있는 特性을 가지고 있는데 肝은 脂溶性의 異物質을 가능한 水溶性이 높은 形態의 化合物로 迅速하게 바꾸어 尿中이나 膽汁中으로 排泄하기 쉽게 만들어 解毒作用을 이루는 것이다²⁰⁾.

異物質代謝의 第一段階 反應은 肝細胞內 內形質網에 存在하는 複合酵素系에 依하여 複合酸化作用이 일어난다. 이 때 主로 cytochrome P-450의 酸化酵素系에 依하여 進行되지만, cytochrome P-450 依存性이 아닌 microsome性 酸化系인 amine 酸化酵素로도 代謝되고, 肝細胞內 microsome 分割이 아닌 mitochondria 또는 다른 곳에 있는 酸化酵素系에 依해서도 代謝가 일어난다. 그 외 NADPH, NADH, FAD 等を 利用하여 非酵素的으로, 또는 酵素系를 利用한 還元反應과 加水分解反應 및 epoxide 水化作用 等도 일어난다¹⁹⁾. 第一段階 反應에서 主로 關與하는 cytochrome P-450은 藥物이 結合하는 形態 및 存在組織에 따라 다른 spectrum을 나타내는 Type I 과 Type II 로 나누어진다^{69,72)}. Type I 系의 藥物을 代謝하는 酵素는 aminopyrine HCl을 基質로 하여 formaldehyde를 生成하는 aminopyrine demethylase(AD)이며, Type II 系의 藥物을 代謝하는 酵素는 anilinin HCl을 基質로 하여 P-aminopyrine을 生成하는 anilinin hydroxylase(AH)이다^{69,72)}.

第二段階 反應은 보다 水溶性으로 만들기 위한 抱合反應으로, 異物質 또는 異物質中 第一段階를 거친 代謝產物로서 hydroxyl, amino, carboxyl, epoxide, halogen 等の 機能氣를 갖는 物質들은 抱合反應으로 代表되는 生合成的 過程을 거침으로써 보다 水溶性이 높아지고, 脂溶性이 減少되며, 보다 毒性이 弱하고, 體外로 排出되기 容易한 化合物로 轉換되고 있다. 이러한 抱合反應은 異物質 또는 그 代謝產物이 體內에서 生成되어 있는 糖質, polypeptide 또는 sulfure化合物的 誘導體들과 抱合을 이루며, 一般的으로 energy를 消耗하여, 高에너지 中間體를 媒介體로 하여 이루어진다. 여기에는 glycoside抱合, sulfate抱合, methyltransferase反應, glutathione S-transferase反應, acylation反應 등이 있다^{69,73)}.

本 實驗에서, 第一段階 反應에 主要 關與하는 cytochrome P-450의 活性은 正常群에 比하여 對照群이 若干의 增加를 하였고 BBT III 群에서 有意性 있게 減少하였다(Table 3, Fig. 3). 그리고 Type I 系의 藥物을 代謝하는 酵素인 aminopyrine demethylase의 活性은 正常群에 比하여 對照群이 多少 增加하였고 BBT III 群에서 有意性 있게 減少하였다(Table 4, Fig. 4). 또한, Type II 系의 藥物을 代謝하는 酵素인 aniline hydroxylase의 活性은 全 實驗群에서 有意性 있게 減少하였다(Table 5, Fig. 5). 따라서 補脾湯이 酸化酵素를 抑制시키는 데에 어느 程度 關與한다는 事實을 알 수 있다.

肝에서 일어나는 解毒作用은 위에서 言及하였듯이 第一段階 反應(phase I)과 第二段階 反應(phase II)으로 나눌 수 있으며⁶⁹⁾, 그 中 第一段階 反應에 關與하는 cytochrome P-450은 mixed function oxidase로서 microsomal protein의 約 20%를 차지하며 生體內 異物質을 포함한 外因性 物質을 酸化시키는 酵素이고^{72,74-75)}, 또 다른 第一段階 反應에 關與하는 酵素系인 non-microsomal oxidation 酵素로서 free radical을 生成하는, xanthine oxidase와 aldehyde oxidase는 cytosol 分割에 存在하는 molybdenum(水鉛) 含有 酸化酵素로서, 生體內的 遊離基는 大部分이 酸化物質이

므로, 生化學的 反應을 觸媒하는 過程에서 反應液 中の 酸化分子를 電子 受容體로 換用하여 superoxide anion, hydrogen peroxide 및 最終的으로 hydroxyl radical을 生成한다⁷⁶⁻⁷⁷⁾.

本 實驗에서 xanthine oxidase의 活性을 測定한 結果, 全 實驗群에서 有意性 있게 減少하였으며 特히 BBT III 群과 BBT II 群에서 더욱 顯著하였다(Table 6, Fig. 6). 그리고 aldehyde oxidase의 活性을 測定한 結果, 全 實驗群에서 減少하였으며 特히 BBT IV 群에서 有意性 있게 減少하였다(Table 7, Fig. 7). 이것으로 보아 老化에 依한 活性酸素의 生成增加는 non-microsomal oxidation에 關與하는 酵素系를 活性化시켜 나타나는 結果로, 補脾湯煎湯液 投與는 이 酵素系를 調節하는 것으로 推定된다.

또한, glucuronic acid나 sulfate를 抱合시킴으로써 毒性을 減少시키고, 脂溶性 物質을 水溶性 物質로 轉換시켜 體外 排出를 促進시키는 第二段階 反應의 媒介酵素로 superoxide dismutase(SOD)와 catalase 및 glutathione peroxidase 등이 있는데^{69-70,78-79)}, superoxide dismutase(SOD)는 人體內에 過酸化反應 防禦機具(抗酸化 機具)中 하나이며 生體 異物質로 因하여 生成된 xanthine oxidase, aldehyde oxidase 等の 酵素 反應의 結果로 生成되어진 superoxide anion radical를 H₂O₂로 쉽게 轉換시키는 것으로 活性酸素를 除去하는 作用을 가지고 있고⁶⁸⁾, catalase는 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 分解하는 酵素中에 強力한 것으로 알려져 있고 脂肪酸이나 alcohol의 酸化에도 關與하고 있으며 SOD, glutathione peroxidase와 더불어 效果가 있는 것으로 생각되고 있고⁶⁸⁾, Se가 主元素로 되어 있는 glutathione peroxidase 亦是 free radical을 H₂O로 變換시켜 生成된 活性酸素를 體外로 排泄시키는 解毒系 酵素이다⁶⁸⁾.

本 實驗에서 superoxide dismutase의 活性은 正常群에 對해 對照群이 減少한 것과 比較하여 BBT IV 群, BBT III 群, BBT II 群, BBT I 群의 順으로 有意性 있게 增加하였으며 特히 BBT IV 群과 BBT III 群에서 顯著하였다(Table 8, Fig. 8). Catalase의 活性은 正常群에 對해 對照群

이 減少한 것과 比較하여 BBT III 群, BBT IV 群, BBT II 群의 順으로 有意性 있게 增加하였으며 glutathione peroxidase의 活性은 全 實驗群에서 有意性 있게 增加하였다(Table 9, Fig. 9). 이로 보아 補脾湯煎湯液의 投與가 過酸化反應 防禦機構에 能動的으로 作用한 것으로 생각된다.

Glutathione S-transferase는 內因性 glutathione 을 利用하여⁸⁰⁾ 以外的 다른 解毒系에 關與하여 毒性을 減少시키고⁸¹⁾, glutathione의 含量은 glutathione S-transferase의 活性에 必然적으로 要求되며⁸⁰⁾, γ -glutamylcystein synthetase는 glutathione의 細胞內 含量을 維持시키는 作用을 가지고 있고⁸²⁾, glutathione reductase는 酸化型 glutathione을 還元시키는 作用을 가지고 있다⁸²⁾.

Glutathione S-transferase는 細胞質 glutathione S-transferase와 mitochondria 및 小胞體膜 glutathione S-transferase로 大別되는데, 兩 glutathione S-transferase는 生體 全體組織에 含有되어 있지만, 肝에서 最高의 含量을 나타내며 副腎等에도 兩 glutathione S-transferase가 高濃度로 分布되어 있다⁸³⁾. 細胞質 glutathione S-transferase의 體內 重要한 役割의 하나는 親電子性的 發癌性 活性 代謝物의 解毒作用으로서 最終적으로 N-acetyl conjugate로 尿中 排泄시키는 最初段階의 反應을 觸媒한다는 事實이 一般的으로 알려져 있다⁸⁴⁾.

따라서 glutathione S-transferase를 活性化시켜 抗老化作用이 있다고 할 수 있는 바, 本 實驗에서 glutathione S-transferase의 活性에 미치는 影響을 觀察한 結果, BBT III 群과 BBT II 群에서 有意性 있게 增加하였다(Table 10, Fig. 10).

Glutathione(GSH)은 哺乳動物의 細胞內에서 가장 豊富한 非蛋白質인 thiol을 지니며 트리펩타이드를 包含하고 있는 시스테인이다. Glutathione은 glutathione transferase와 glutathione peroxidase를 위한 基質로서 알려져졌으며, 異物質性 化合物의 脫毒性을 위한 反應을 促進하며 역시 反應酸素들이나 free radical의 抗酸化劑를 위한 反應을 觸媒한다. 細胞內 還元劑로서 觸媒라든가 物質代謝를 包含해서 細胞內 輸送이나 貯藏, 細胞 酸化還元の

均衡調節, DNA 合成, 免疫機能 및 細胞增殖에서 매우 重要하다⁸²⁾. Glutathione은 모든 組織에서 分布하며 glutathione peroxidase의 作用을 받아 過酸化水素를 無毒한 물로 變換시키는 대신 自身은 酸化型이 되고 肝에서는 glutathione S-transferase의 作用을 받아 外部로부터 온 化合物質과 結合하여 化合物質을 無毒化 시키고 最終적으로는 mercapturic acid로 排出한다⁸⁵⁾.

本 實驗에서 脾臟組織中 glutathione의 含量에 미치는 影響을 觀察한 結果, BBT II 群을 除外한 全 實驗群에서 全般的으로 增加하였고 特히 BBT IV 群에서 有意性 있게 增加하였다(Table 11, Fig. 11).

Glutathione 生成系의 活性에 미치는 影響을 觀察한 結果로, glutathione의 細胞內 含量을 維持시키는 作用을 가지고 있는 γ -glutamylcystein synthetase⁸²⁾는 對照群이 減少한 것과 比較하여 BBT III 群과 BBT IV 群에서 有意性 있게 增加하였다. 한편, 酸化型 glutathione을 還元시키는 作用을 가지고 있는 glutathione reductase⁸²⁾는 別다른 變化가 없었다(Table 12, Fig. 12).

以上の 實驗結果를 綜合해보면 補脾湯煎湯液의 投與는 350mg/kg以上을 投與했을 때 特히 效果的인 것으로 思慮되며, 生體內 正常 代謝過程에서 생긴 free radical이 biomolecule과 反應하여 細胞에 損傷을 주게 되는 過程에 作用하여, 抗酸化酵素 및 抗過酸化脂質의 作用으로 老化를 抑制해 주는 것으로 생각된다. 또한 老化過程에서 쌓이게 되는 老廢物의 除去에도 有意性이 있음을 볼 때 補脾湯은 老化의 抑制 및 老化의 過程에서 생기게 되는 老廢物의 除去에 效果的인 것으로 생각되며, 이는 老化가 單純히 腎臟機能의 低下 뿐만 아니라 脾臟機能의 低下와도 關聯되며 追後 他 臟腑와의 關聯性에 對하여도 研究가 必要할 것으로 思慮된다.

V. 結 論

補脾湯이 老化의 抑制 및 恢復에 미치는 效果를

實驗的으로 糾明하고자, 補脾湯煎湯液이 老化白鼠(8個月齡, 550±10g)의 脾臟內 過酸化脂質 含量과 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴본 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 脾臟內 過酸化脂質의 含量은 全 實驗群에서 有意性 있게 減少하였고 特히 BBT III, IV 群에서 顯著하였다.

2. Superoxide 生成能은 全 實驗群에서 有意性 있게 減少하였고 特히 BBT IV, III 群에서 顯著하였다.

3. Cytochrome P-450과 aminopyrine demethylase는 別다른 變化가 없었다.

4. Aniline hydroxylase는 BBT IV, II 群에서, xanthine oxidase는 全 實驗群에서, aldehyde oxidase는 BBT IV 群에서 有意性 있게 減少하였다.

5. 抗酸化系 酵素인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase는 全 實驗群에서 有意性 있게 增加하였다.

6. 過酸化反應 防禦機具인 glutathione S-transferase는 全 實驗群에서, glutathione은 BBT IV 群에서 有意性 있게 增加하였다.

7. γ -Glutamylcystein synthetase는 BBT III, IV, I 群의 順으로 有意性 있게 增加하였으나, glutathione reductase는 別다른 變化가 없었다.

以上の 結果로 보아 補脾湯煎湯液의 投與는 老化의 過程中에 發生하는 過氧化物과 活性酸素의 抑制에 關與함을 알 수 있으며, 向後 이에 對한 臨床的 研究가 必要하리라 思慮된다.

參考文獻

1. 杜鎬京 : 東醫腎系學, 서울, 東洋醫學研究院, 1991, pp.1093-1100, 1325-1383.
2. 張錫泰 : 피부과학, 서울, 여문각, 1994, pp.23-25.
3. 디팍 초프라 : 사람은 늙지 않는다, 서울, 정신세계사, 1994, pp.21-22, 102-103.
4. 徐舜圭 : 成人病·老人病學, 서울, 高麗醫學, 1992, pp.9-18, 28-30, 33-35, 73-77, p.107, pp.251-254,

- 277-280, 343-344, p.402, pp.475-477, 505-506.
5. 柳熙英 : 東醫精神科學, 서울, 南山堂, 1988, pp.116-120.
6. 洪元植 : 校勘直譯黃帝內經素問, 서울, 傳統文化研究會, 1993, pp.19-20.
7. 河北醫學院 : 靈樞經校釋(下冊), 北京, 人民衛生出版社, 1982, p.126, 160.
8. 李정복 : 長壽學, 서울, 醫聖堂, 1987, pp.11-99, 492-576.
9. 李吉相 : 世界 長壽村 探訪, 서울, 大光文化社, 1978, p.200, pp.234-235, 241-242, p.248.
10. 金숙희, 김화영 : 老化, 서울, 민음사, 1995, pp.77-80, 83-84, p.94.
11. 李獻平 外 : 四大懷藥延緩衰老作用의 研究, 서울, 中西醫結合雜誌, 1991, 11(8):pp.486-487.
12. 裴基采 : 高麗人蔘, 高麗紅蔘 및 total saponin의 抗酸化 作用, 大田大學校大學院, 1997.
13. 金정숙 外 : 老化防止를 위한 韓藥劑의 效能 研究, 韓國韓醫學研究所, 1995.
14. 문진영 外 : 柴胡가 free radical에 의한 脂質 過氧化物 生成에 미치는 效果, 東國論集 自然科學篇, 1996, Vol.15, pp.361-375.
15. 蘇敬順 外 : 鹿蔘地黃湯이 抗老衰에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校論文集, 1995, 18(2):pp.127-148.
16. 尹一智 : 六味地黃湯이 老化 RAT의 肝內 過酸化脂質 및 代謝酵素系에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 1998.
17. 河在原 : 定志丸이 老化에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 1996.
18. 朴載彥 : 延年丸이 老化에 따른 免疫機能低下에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 1992.
19. 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, 1996, 17(1):pp.465-477.
20. 尹哲浩 外 : 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, 1995, 16(2):pp.348-364.
21. 金潤子 : 平補湯이 老化에 미치는 影響, 東國

大學校大學院, 1996.

22. 이현숙 : 更年1號丸의 抗酸化 活性에 관한 研究, 東國論集, 1996, Vol.15, pp.343-357.

23. 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, 圓光大學校大學院, 1996.

24. 成日煥 : 抗酸化作用에 對한 杜沖葉 藥針의 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1996.

25. 李鐘賢 : 白何首烏 藥針의 抗酸化 作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1997.

26. 金永海 外 : 胡桃藥針液의 抗酸化 效果에 對한 研究, 大韓韓醫學會誌, 1997, 17(2):pp.8-18.

27. 尹哲浩 外 : 鱈魚의 肝組織에서 鹿茸 藥針 製劑의 抗酸化 作用에 關한 研究, 大韓韓醫學會誌, 1996, 17(2):pp.191-202.

28. 安坡徹 外 : 當歸 藥針液의 抗酸化 效能에 關한 研究, 大韓鍼灸學會誌, 1996, Vol.13, No.2, pp.254-262.

29. 林昌秀 外 : 芍藥 藥針液의 抗酸化 效能에 關한 研究, 大韓鍼灸學會誌, 1997, Vol.14, No.2, pp.191-198.

30. 박태균 : 桂枝 藥針의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1998.

31. 이종무 : 巴戟 藥針의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1998.

32. 우상욱 : 益智仁 藥針의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1998.

33. 박겨울 : 淫羊藿 藥針의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1998.

34. 朴炫宣 : 山茱萸 藥針의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1998.

35. 楊棟元 : B.E.P.照射가 老化 RAT의 肝內 過酸化脂質 및 代謝酵素系에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 1998.

36. 全國韓醫科大學脾系內科學教授 : 脾系內科學, 서울, 그린文化社, 1991, p.3.

37. 김동일 外 : 동의학사전, 서울, 驪江出版社, 1989, pp.222-223.

38. 許 浚 : 東醫寶鑑, 大星文化社, 서울, 1990, 內景篇 p.353.

39. White, B. A. : the use of change in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic & nonnarcotic analgesic, british J. pham., 1964, p.22, pp.246-258.

40. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, Anal. Biochem., 1979, p.95, pp.351-358.

41. McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythro cuprein, J. Biol. Chem., 1969, p.244, 6049.

42. Chan, P. C. and Bielski, B. H. J. : Enzyme catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotide, J. Biol. Chem., 1974, p.249, 1317.

43. F. Omura and R. Sato : The carbon monoxide binding pigments of liver microsomes. In : Evidence for its hemoprotein nature, J. Biol. Chem., 1964, p.239, 2370.

44. T. Nash : The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hentsch reaction, J. Biol. Chem., 1953, p.55, 416.

45. W. R. Bidlack and G. L. Lowery : Multiple drug metabolism : p-mitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation, Biochem. pharmacol., 1982, p.31, 311.

46. F. Strip and C. E. Della : 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, p.24, 3855.

47. K. V. Rajagopalan, I. Fridovich and P. Handler : Hepatic aldehyde oxidase, In : Purification and properties, J. Biol. Chem., 1962, p.237, 922.

48. Oyanagui, Y. : Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity, Anal. Biochem., 1948, p.42, 290.

49. Chance, B. and Maehly, A. C. : Assay of catalase and peroxidase, Vol. II, Academic Press., 1956, pp.764-775.

50. E. D. Paglia and W. N. Valentine : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes gluathion peroxidase, J. Lab. Clin.

Med., 1967, p.70, 158.

51. W. H. Habig, M. J. Pabst and W. B. Jakoby : Glutathione S-transferase : The first enzymatic step in mercapturic acid formation, J. Biol. Chem., 1974, p.249, 7130.

52. G. I. Ellman : Tissue sulfhydryl group, Arch. Biochem. B. O. physis., 1959, p.30, 2409.

53. A. Meister and P. G. Richman : Regulation of γ -Glutamylcystein synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione, J. Biol. Chem., 1975, p.250, 1422.

54. C. E. Mize and R. G. Langdon : Hepatic glutathione reductase, In : Purification and general kinetic properties, J. Biol. Chem., 1962, p.237, 1589.

55. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Rendall : Protein measurement with folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 1951, p.193, pp.265-275.

56. 金光湖 : 東醫豫防醫學, 서울, 慶熙大學校韓醫科大學豫防醫學敎室, 1995, pp.57-60, 139-146, 240-244.

57. 이근후 外 : 최신임상정신의학, 서울, 하나의학사, 1988, p.138, pp.216-228.

58. 李聰甫 : 傳統老年醫學, 湖南, 湖南科學技術出版社, 1988, pp.212-215.

59. Gaitonide, M. K. : A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids, Biochem. J., 1967, p.104, 627.

60. 林乾良 : 養生壽老集, 上海, 上海科學技術出版社, 1982, pp.26-27, 110-125, p.113, pp.132-143, 190-191, 194-209.

61. Cutler, R. G. : Antioxidants, aging and longevity, Free Radicals in Biology(ed. Pryor, W.), Academic Press., Vol.6, 1984, pp.371-424.

62. Feher, J., Csomos, G. and Vereckei, A. : The free radical theory of aging, Free Radicals Reactions in Medicine, Springer-Verlag, Berlin, 1987, pp.57-59.

63. 오유진 : 활성산소가 질병의 원인이었다, 서울, 이화문화출판사, 1997, pp.57-67.

64. 이영돈 : 생로병사의 비밀, 서울, KBS문화사업

단, 1997, pp.224-247.

65. 中國中西醫結合雜誌編輯委員會 : 中國中西醫結合雜誌, 서울, 一社, 1993, 13(4):p.14, pp.17-18, 13(5):pp.101-102.

66. 虞搏 : 醫學正傳, 서울, 成輔社, 1986, p.9.

67. 陳無擇 : 三因極一病證方論, 서울, 一社, 1992, p.95.

68. 이귀녕 外 : 임상병리과일, 서울, 의학문화사, 1993, p.138, 139, 241, 348, 349.

69. 全國韓醫科大學肝系內科學敎授 : 肝系內科學, 서울, 東洋醫學研究院, 1989, pp.182-184.

70. J. R. Gillette : A perspective on the chemically reactive metabolism. II, Alteration in kinetics of covalent binding, Biochem. Pharmacol., 1986, p.23, 292, 610.

71. S. R. Howell, G. A. Hazelton and C. D. Klassen : Depletion of hepatic UDP-glucuronic acid by drugs that are glucuronidated, J. Pharmacol. EXP. Ther., 1986, p.236, 610.

72. J. B. Schenkman, H. Remmer and R. W. Estabrook : Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome, Mol. Pharmacol., 1967, p.3, 113.

73. P. A. Routledge and D. G. Shand : Presystemic drug elimination, Ann. Res. Pharmacol. Toxicol., 1979, p.19, 447.

74. R. P. Murlin and E. C. David : Effect of diabetes on rat Liver cytochrome P-450, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982, p.31, 3329.

75. V. Leonard and J. B. Schenkman : Decrease in the levels of a constitutive cytochrome P-450 in hepatic microsomes of diabetic rats, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, p.142, 623.

76. V. Massey, S. Strickland, G. S. Mayhew, L. G. Howell and P. C. Engel : The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, p.36, 891.

77. D. N. Granger and D. A. Parks : Role of oxygen radicals in the pathogenesis of intestinal

ischemia, *The Pharmacologist*, 1983, p.25, 159.

78. J. R. Dawson and J. W. Bridge : Guinea pig intestinal sulfotransferase : An investigation using the cytosol fraction, *Biochem. Pharmacol.*, 1981, p.30, 2409.

79. L. A. Reike, M. J. Meyer and K. A. Notley : Diminished rates of glucuronidation and sulfation in perfused rat liver after chronic ethanol administration, *Biochem. Pharmacol.*, 1986, p.35, 439.

80. J. T. Ahokas, F. A. Nichollas, P. J. Ravenscroft and B. T. Emmerson : Inhibition of purified rat liver glutathione S-transferase isozymes by diuretic drugs, *Biochem. pharmacol.*, 1985, p.34, 2157.

81. W. B. Jakoby : The glutathione S-transferase, A group of multifunctional detoxication proteins, *Adv. Enzymol.*, 1978, p.46, 383.

82. 金永坤 外 : 프리라디칼, 서울, 麗文閣, 1997, p.455, 564.

83. 土田成記, 佐藤清美 : Glutathione S-transferase isozyme, glutathione 研究 のエホシワ, 蛋白質, 核酸, 酵素., 臨時増刊, 1988, p.33, 1564.

84. Watabe, T., Ishizuka, T., Isobe, M. and Ozawa, N. : 7-hydroxymethylsulfate ester as an active metabolic of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene, *Science*, 1982, p.215, 403.

85. 徐廷旭 : 老化促進 마우스에서 加齡에 따른 抗酸化能 및 生理的, 血液學的 變化, 忠南大學校大學院, 1994.