

不老丸을 투여한 흰쥐 뇌의 항산화효과에 관한 연구

박진성, 고성규, 이선동*

상지대학교 한의과대학 심계내과학교실, *상지대학교 한의과대학 예방의학교실

Effect of Bulohwan-Decoction on Antioxidant Enzyme in Rat Brain

Jin-Sung Park, Seong-Kyu Goh, Sun-Dong Lee*

Dept. of Oriental Medicine Graduate School Sangji University,

*Division of Preventive Medicine, Dept. of Oriental Medicine College, Sangji University

Objectives: Recently Oxidative stress of brain was proved the cause of Alzheimer and stroke sequel. It has important significance in prevention and treatment of cerebropathia that Bulnohwan used as formula of senescence delay have antioxidative effect. The purposes of this study is to investigate the effect of Bulnohwan on antioxidant defense systems such as thiobarbituric acid reactive substances(TBARS), Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GSH-PX), Glutathione S-transferase (GST), Glutathione (GSH) in rat brain.

Method: Sprague - Dawley rats were divided into 3 groups; saline solution administered control group, Bulnohwan extract administered Experimental group I and Bulnohwan administrated, 40% dietary restricted Experimental group II. Animals were sacrificed at 12 weeks after treatment. TBARS, SOD, CAT, GSH-PX, GST and GSH were measured in rats brain.

Results: weight of brain was no stastical significance.($p>0.05$) TBARS contents were significant decrease in Experimental group I, II. ($p<0.001$) SOD activity was stastical significance in Experimental group II, whereas it was no stastical significance Experimental group II.($p<0.0001$) Catalase activites were significant increase in . ($p<0.001$) Glutathione Peroxidase activites were significant increase in Experimental group I, II. ($p<0.0001$) Glutathione S-transferase activites were significant increase in Experimental group I, II. ($p<0.0001$) However there were no statistical significance each other. Glutathione contents were significant increase in Experimental group I, II. ($p<0.001$)

Conclusions: According to the above results, it is considered that Bulohwan has antioxidants effect in rat brain. When Bulohwan goes with diet restriction, there has more Antioxidants effect in rat brain. but this study was perfored retrospectively. So more prospective studies about mutual relation of drugs are needed

Key words: Antioxidative enzyme, *Bulohwan*, Senescence

서론

뇌의 산화적 스트레스는 오늘날 중풍후유증과 Alzheimer 병의 중요한 병인으로 증명되고 있다

1). 이러한 측면에서 고려할 때 고대부터 노화 지연의 중요한 처방으로 사용되어온 불로환²⁾의 항산화적 기능에 접근은 뇌질환의 예방 및 치료에 있어서 중요한 의미를 갖는다 할 수 있다.

전통적으로 한방에서 노화와 관련된 많은 처방이 있다. 특히 불로환은 여러 처방 중에서 대표적인 것으로 특히 중국에서 많은 사람들에게 복용되어 왔다³⁾. 그러나 오늘날 처방전의 효능에도 불구하고 과학적 근거의 빈약으로 대중적 건강에 대한 기여도가 상당히 낮다. 따라서 서양의학적 노화에 대한 기전과 더불어 불로환의 효과에 대한 이해는 한방의 대중화에 필수적이라고 사료된다.

항산화 효과란 전자성이 대단히 뛰어난 활성산소에 의해 세포가 파괴되는 것을 막는 것을 말한다. 활성산소는 세포의 DNA, RNA와 단백질의 질소 원자 및 -SH기뿐만 아니라 불포화지방산과 인지질 등의 탄소이중결합을 공격하여 지질과산화(lipid peroxidation)같은 연쇄반응을 유도하여 궁극적으로 질병과 노화를 촉진한다⁴⁾. 활성산소의 세포파괴를 막는다는 것은 노화를 억제한다는 의미가 있다.

현재 미국을 비롯한 유럽 등 서구에서는 산화적 스트레스에 의한 노화와 질병의 예방을 위해 항산화제로서 DHEA (dehydroepiandrosterone), melatonin 등이 애용되고 있다. 그러나 DHEA인 경우는 전립선암과 유방암의 위험, melatonin의 경우 역시 과량 또는 시기적으로 부적절한 복용시 부작용이 있는 것으로 알려졌다⁵⁻⁷⁾. 아시아 쪽에서는 항산화제로서 한국 및 중국의 한약재가 서구에 다소 알려져 있다. 대표적인 것으로는 인삼, 은행잎 추출물과 영지 그리고 황기 등의 항산화제로서의 역할에 대한 연구가 다소 되어 왔다.

그러나 한약재 개별적 항산화성에 대한 연구는 다소 이루어져 왔으나 한방 종합 처방에 대한 연구는 극히 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 세포내 세 가지 분류의 항산화적 방어 기전중 예방적 효과가 가장 큰 항산화 효소의 활성에 대한 영향을 통해 노화의 종합 처방전인 불로환의 과학적 효과를 제시하고자 하였다.

본 연구에서는 補肝腎, 益氣血, 養心神의 延年

益壽를 목적으로 사용되어왔고, 최근에는 항피로와 耐寒능력이 매우 좋은 것으로 연구⁸⁾되고 있는 불로환의 항산화적 기능을 뇌의 에너지 대사와 관련하여 산화적 스트레스에 대해 항산화적 효소의 활성을 유도, 산화적 상해를 감소시키는 것으로 널리 알려진 식이제한 (caloric restriction)과 비교하여 보겠다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

동물사육실에서 사육된 Sprague - Dawley 흰쥐의 체중이 210g - 340g인 10주령 암수 48마리 (체중 ♂ 340-290g, ♀ 210-240g)를 공급받아 2주일 동안 항온항습기에 적응(온도 18℃ - 22℃, 습도 50%-60%)시킨 후 실험에 사용하였다. 12주동안 매주 체중증가를 기록하고 사료섭취량을 체크하였다.

2) 급여사료

실험기간 동안 급여사료는 실험동물용 펠리트 사료(제조원 : 제일제당주식회사)를 무제한 공급하여 섭취된 양을 측정하였으며 음료로는 수돗물을 자유로이 섭취토록 하였다. 실험기간 동안 사용된 사료의 성분은 표1과 같다.

Table 1. Composition of Animal Feed

| Compositions | rates(%) |
|--------------|----------|
| 조단백질 | 20.0%이상 |
| 조지방 | 3.0%이상 |
| 조섬유 | 10.0%이하 |
| 조회분 | 10.0%이하 |
| 칼슘 | 0.6%이상 |
| 인 | 0.4%이상 |

3) 불로환 및 불로환 추출

(1) 불로환의 내용 및 분량

본 실험에서 사용된 약재는 시중에서 구입하

여 정선한 것을 사용하였고 처방내용은 기존의 의서⁹⁾에 준하였으며 내용, 분량은 표2와 같다.

Table 2. Drug names, Scientific names, Dosage of *Bulohwan*-Decoction

| Drug names | Scientific names | Dosage |
|------------|-------------------------------------|--------|
| 인삼(人蔘) | <i>Panax ginseng Radix</i> | 6.0g |
| 우슬(牛膝) | <i>Achyranthes bidentatae Radix</i> | 6.0g |
| 당귀(當歸) | <i>Angelicae gigas Radix</i> | 6.0g |
| 토사자(菟絲子) | <i>Cuscutae semen</i> | 6.0g |
| 파극천(巴戟天) | <i>Morindae officinalis Radix</i> | 6.0g |
| 두충(杜仲) | <i>Eucommiae Cortex</i> | 4.5g |
| 생지황(生地黃) | <i>Rehmanniae Radix</i> | 3.0g |
| 숙지황(熟地黃) | <i>Rehmanniae Radix Preparat</i> | 3.0g |
| 백자인(栝子仁) | <i>Biotae Semen</i> | 3.0g |
| 석창포(石菖蒲) | <i>Acori Graminei Rhizoma</i> | 3.0g |
| 구기자(枸杞子) | <i>Lycii Fructus</i> | 3.0g |
| 지골피(地骨皮) | <i>Lycii Radicis Cortex</i> | 3.0g |
| total | | 52.5g |

(2) 불로환의 추출

불로환(첨당 52.5g) 1제분량(10일)인 1050.0g를 깨끗한 부직포에 넣어 고압한약추출기(제조회사명 : 삼익)에 수돗물 5700cc 과 함께 120℃~122℃에서 전탕하여 원액을 얻고 Rotary Vacuum Evaporator(EYELA, Tokyo Rikakikai co.Ltd)로 감압증류한 후에 다시 동결건조하였다. 실험군에 투여시에는 쥐의 체중을 재고, 인간 체중(60kg 기준)을 기준으로 하여 섭취량을 쥐의 각 군당 평균체중으로 환산하여 투여하였다.

2. 실험설계

1) 실험설계

실험군은 체중에 큰 차이가 없도록 하여 대조군과 실험 I, 실험 II군으로 나누었으며, 대조군은 사료의 제한하지 않고 Saline을 경구투여하였고 실험 I 군은 식이제한을 하지 않고 불로환을 경

구투여하였으며 인간체중 60kg 투여량 100cc를 기준으로 하여 쥐의 체중당 투여량을 결정하였다. 매주 쥐의 체중을 재어서 투여량을 조정하였다. 실험 II군은 적용 후 실험 시작시점부터 대조군을 기준으로 하여 체중당 섭취사료량을 60%로 조정하였으며 또한 경구투여하는 불로환의 양도 투여시마다 체중을 기준으로 조정하였다.

Table 3. Experimental Design

| Groups | No. of Animals | Diet Restriction | Feed | Dosage Method |
|-----------------------|----------------|------------------|---|---------------|
| Control | 16 | No | saline × 1 | P.O |
| Experimental Group I | 16 | No | 100cc/60kg(person) <i>Bulohwan</i> × 1 | P.O |
| Experimental Group II | 16 | 40% | 100cc/60kg(person) <i>Bulohwan</i> × 1 | P.O |

2) 체중측정과 사료섭취량 측정

실험과정중 생리적 변화를 측정하기 위하여 체중은 매주 측정하였고, 사료섭취량은 매주 월요일과 목요일에 주2회 측정하였다.

3. 해부 및 효소원의 조제

쥐는 해부직전 몸무게를 측정하고 마취(약물명 : 케타라, 유한양행)하여 심장천자로 혈액을 제거하고 즉시 단두하여 뇌를 분리하였으며 ice bath안에서 차가운 생리식염수로 뇌를 세척하고 여과지로 표면의 수분을 제거한 후에 뇌의 중량을 측정하였다. 그 후에 액체질소에 급냉시켰으며, 효소원의 제조후에는 시료분석전까지 적당량을 나누어 -70℃의 냉동고에 보관하였다.

뇌는 좌우로 나누어서 한쪽은 지질과산화와 Glutathione을 측정하였고, 다른 한쪽은 그외의 항산화관련효소 측정에 사용하였다.

뇌조직의 효소원조제(Fig.1.1)는 Ice cold 0.25M Sucrose에 뇌 약 1g을 담근 후에 Homogenization Medium(0.25M sucrose, 0.001M

EDTA, 0.05M Tris-HCl pH 7.4)를 뇌 중량의 9배 첨가하여 Homogenizer로 마쇄하여 균질화시켰다. 이것을 600×g 4℃에서 10분간 원심분리하여 그 상층액을 다시 10,000×g로 20분간 원심분리하고 상층액(cytosol)과 pellet(mitochondria)으로 나누었다. 그중 상층액을 취해 105,000×g 4℃에서 원심분리하여 그 상층액을 취하여 cytosol 분획으로 사용하였으며 이를 GSH-Px와 GST측정에 시료로 사용하였다. 또한 이 cytosol 분획에 ethanol : chloroform을 25 : 15로 한 용액을 0.4 vol로 첨가하여 SOD 측정에 사용하였다. 위의 pellet(mitochondria용)에 Homogenization medium을 첨가하여 10,000×g 4℃에서 20분간 원심분리하고 그 상층액을 버린 후에 다시 Homogenization medium을 첨가하여 suspension하여 catalase 측정에 사용하였다.

이 모든 작업은 4℃에서 실시하였으며 시료는 실험전까지 -70℃ deep freezer에 보관하였다.

4. 지질과산화측정(TBARS)

뇌조직의 thiobarbituric acid reactive substances 함량은 Uchiyama와 Mihara의 방법¹⁰⁾에 따라 지질과산화 정도의 지표로써 측정하였다. 적출한 뇌 중량의 9배 부피의 0.05M potassium phosphate buffer를 가하고 마쇄한 후에 균질액 0.1ml를 취해 10% sodium dodecylsulfate(SDS) 용액 0.2ml와 0.1N HCl 1ml와 1% thiobarbituric acid(TBA) 0.5ml를 혼합한 뒤 증류수로 총 부피가 3ml 되도록 맞추었다. 그 후에 vortexing하여 glass stopper와 parafilm으로 밀봉하고 95℃에서 1시간 동안 교반하면서 incubation 하였다. Incubation 후에 실온에서 냉각시킨 후에 3ml의 n-butanol을 가해 2분간 vortexing하고 다시 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 532nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. 표준검량선은 1,1,3,3-Tetraethoxy propane(TEP)를 사용하였으며 단위는 nmol/mgprotein으로 나타내었다¹¹⁾.

5. 항산화효소의 측정

1) Superoxide dismutase(SOD) 활성도 측정
SOD의 활성도는 Marklund 등의 방법¹²⁾과 Winterbourn 등의 방법¹³⁾을 수정하여 pyrogallol의 autooxidation을 SOD가 억제하는 정도를 통하여 측정하였다. Tris-HCl buffer(50mM Tris/10mM EDTA, pH8.5) 1.5ml에 뇌 cytosol 효소용액 0.1ml를 넣고 7.2mM pyrogallol 0.1ml를 가함으로서 반응을 시작시킨 다음 25℃에서 정확히 10분간 반응시킨 후 1N HCl 0.05ml를 가해 반응을 정지시켜 산화된 pyrogallol의 흡광도를 420nm에서 측정하였다. 그리고 효소활성의 1 unit은 반응액중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

2) Catalase 활성 측정

Catalase 활성도는 Aebi 등의 방법¹⁴⁾에 따라 소모되는 H₂O₂의 양으로 측정하였다. 즉, 50mM phosphate buffer(pH7.0) 2.0ml에 mitochondria 분획의 시료를 0.05ml를 가하여 혼합한 후 10mM H₂O₂ 용액 1.0ml를 가하여 혼합하고 240nm에서 5분간 변화되는 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 1분동안에 1μM의 H₂O₂를 분해시키는 효소량을 1 unit으로 하였다.

3) Glutathione peroxidase(GSH_{px}) 활성도 측정

Glutathione peroxidase(GSH_{px}) 활성도 측정은 Lawrence and Burk 등의 방법¹⁵⁾을 사용하여 1mM의 EDTA를 함유하는 pH 7.0의 0.1M potassium phosphate buffer 1.72ml에 뇌 cytosol 효소용액 0.1ml와 0.2mM NADPH 0.3ml, glutathione reductase 100 unit, 1mM sodium azide 0.3ml 및 1mM 환원형 glutathione(GSH)용액 0.3ml를 넣고 0.25mM H₂O₂용액 0.3ml를 가함으로서 반응을 시작시켜 340nm에서 측정하였다. 그리고 효소활성은 NADPH의 분자흡광계수 6.22mM⁻¹cm⁻¹을 사용하여 계산하였고, 1 unit은 1분동안 1μmol의 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양으로 나타내었다.

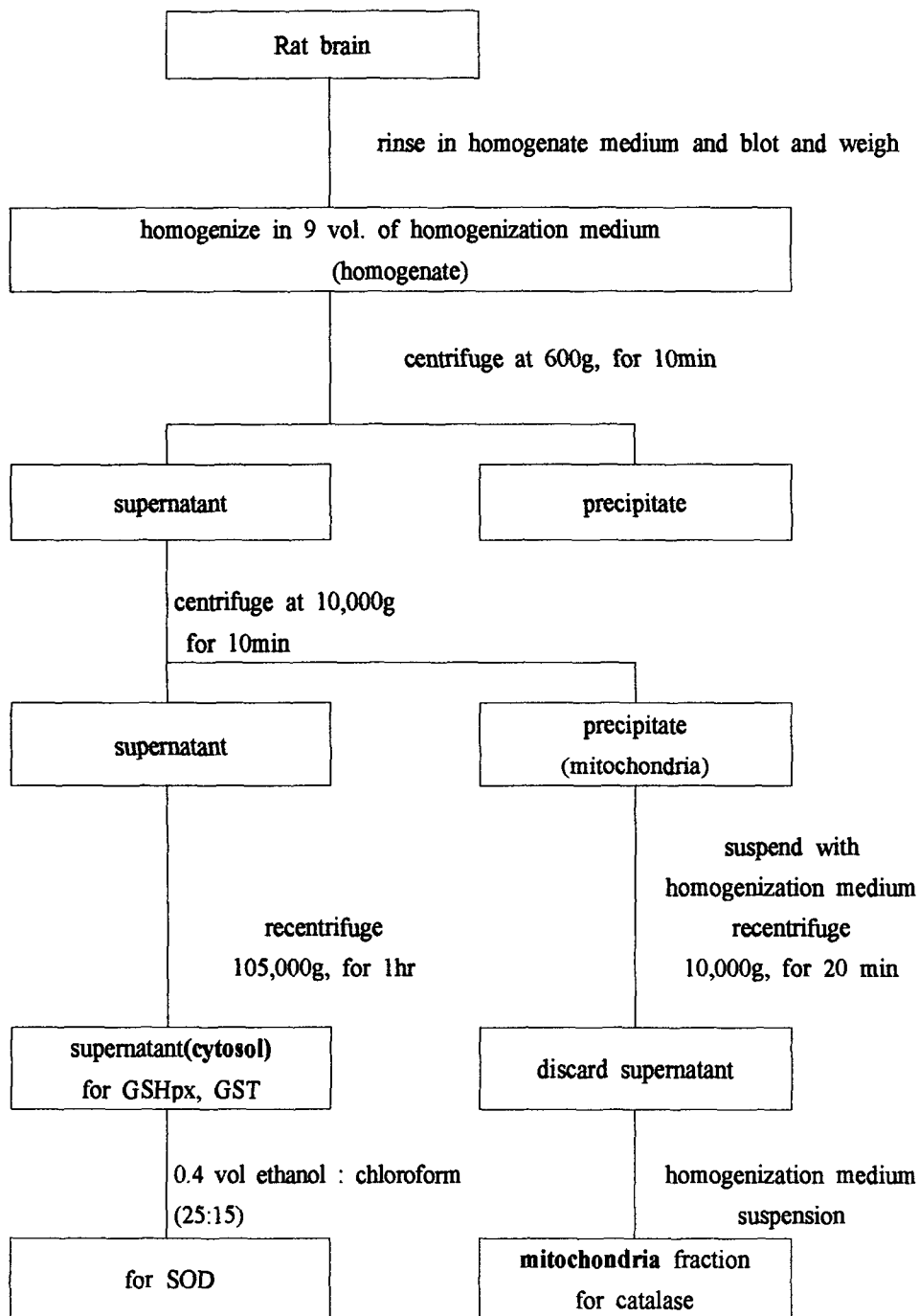


Fig 1. Fractionation of rat brain mitochondria, cytosol

4) Glutathione S-transferase(GST)의 측정

GST 측정은 Habig 등의 방법(16)을 사용하여 0.1M K. P buffer(pH 6.5) 2.8ml, 뇌 cytosol 시료 0.1ml, 0.04M reduced glutathione 75 μ l, 0.12M 2,4-dinitrochlorobenzene(2,4-DNCB) 25 μ l를 혼합하여 25 $^{\circ}$ C에서 2분동안의 흡광도변화를 spectrophotometer 340nm에서 측정하였다. 단위는 1분간 mg protein당 생성된 GSH-DNCB conjugate의 분자흡광도계수 9.6mM \cdot 1cm \cdot 1를 이용하여 나타내었다.

5) Glutathione의 측정

뇌 조직에서의 총 glutathione의 농도는 Griffith의 방법(17)을 변형하여 이용하였다. 뇌를 1%(w/v) picric acid 2ml로 균질화하고 원심분리시켜 제단백한 후 그 상층액을 glutathione 측정에 이용하였다. NADPH/buffer 용액(125mM phosphate, 6.3mM EDTA, 0.3mM NADPH ; pH 7.5) 0.7ml, 6mM DTNB용액 0.1ml를 cuvette에 넣고 제단백한 시료 100 μ l 첨가하여 412nm에서 spectrophotometer를 사용하여 2분동안의 흡광도 감소를 측정하였으며 표준용액으로는 glutathione을 사용하였으며, 단위는 뇌 조직 wet tissue 1g에 대한 glutathione의 μ moles로 표시하였다.

6. 단백질 정량

뇌 조직의 mitochondria 분획 및 cytosol 분획 등 실험에 사용된 시료의 단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA)를 표준용액으로 Bradford 방법(18)을 사용하여 측정하였다.

7. 실험 data의 통계처리

실험의 결과는 SPSS통계프로그램(19)을 이용하여 처리하였다. 각 실험군마다 데이터의 평균과 표준편차를 산출하였고, 각 실험군의 평균치간의 차이의 유의성은 ANOVA test를 통해 검증하였다. 또한 대조군과 실험1군, 실험2군, 그리고, 실험1군과 실험2군의 평균치간의 차이를 t-test를 통해 검증하였다.

실험결과

총 12주동안 블로당을 투여한 실험 I 군과 같은 조건에서 60%로 식이제한하면서 블로당을 투여한 실험 II군의 뇌조직에서 본 실험결과는 다음과 같다.

1. 각 군간의 체중변화

실험기간동안 생리적 변화를 알아보기 위해 12주동안 수행한 실험에서 각 군에서의 체중증가는 다음과 같다.

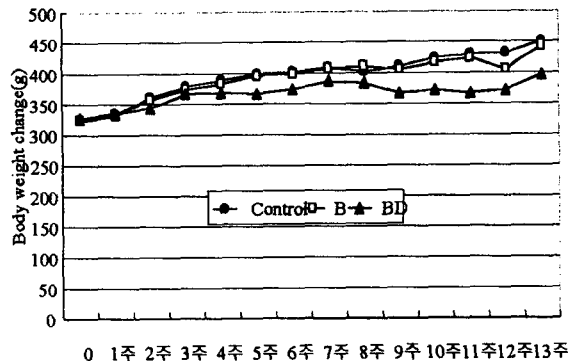


Fig 2. Weight Growth of the Rats

C : Control Group. B : *Bulohwan*-Decoction extract administrated group. BD : *Bulohwan*-Decoction extract administrated and 40% dietary restricted group.

2. 뇌의 중량

실험에 사용된 동물의 뇌중량은 대조군이 1.93 \pm 0.21g, 실험 I 군이 1.96 \pm 0.22g, 실험 II군이 1.83 \pm 0.24g으로 나타나, 뇌 중량의 차이는 통계적으로 유의성이 없었다(p=0.227). 그러나, 블로환을 투여한 실험 I 군에서는 대조군에 비해 약

간 증가하는 추세를 보였으며, 또한 식이제한을 병행한 실험II군에서는 약간 감소하는 경향이 있었다.

Table 4. Comparison of Brain Weight

| Groups | No. of Animals | Brain weight (g) |
|-----------------------|----------------|------------------|
| Control | 16 | 1.93±0.21 |
| Experimental Group I | 16 | 1.96±0.22 |
| Experimental Group II | 16 | 1.83±0.24 |
| p-value | | (p>0.05) |

3. 지질과산화(TBARS)

쥐의 뇌중에 TBA는 대조군에서 0.6054±0.0673 nmoles / mg protein, 실험 I군에서 0.4643±0.0807 nmoles / mg protein이며 실험 II군에서 0.3907±0.0358 nmoles / mg protein로 유의성 있게 감소하였다.(p<0.001)

Table 5. Effect of *Bulhwan*-Decoction on TBA Reactive Substance in Rat Brain

| Groups | No. of Animals | TBA Reactive Substance |
|-----------------------|----------------|-------------------------|
| Control | 16 | 0.6054±0.0673 |
| Experimental Group I | 16 | 0.4643±0.0807 |
| Experimental Group II | 16 | 0.3907±0.0358 |
| P value(t-test) | | a 0.001 b 0.001 c 0.006 |

a : P values means difference between Control Group and Experimental I Group
 b : P values means difference between Control Group and Experimental II Group
 c : P values means difference between Experimental Group I and Experimental II Group

4. 항산화효소

SOD는 대조군에서 3.4302±0.4597 unit/mg protein이었고 실험 I군에서 3.3007±0.6582 unit/mg protein으로 감소경향을 보였고 실험II

군에서 4.3954±0.6470 unit/mg protein에서 유의성 있는 증가를 보였다. (p<0.0001)(Table 1.6, Fig 1.4) 그러나, 대조군과 실험 I군을 t-test로 검증한 결과에서 통계적 유의성이 없는 것으로 나타나 실험II군에서의 SOD 증가는 식이제한에 의한 결과로 사료된다.

Catalase는 대조군에서 1.7008±0.1810 unit / mg protein이고 실험 I군에서 2.0083±0.2215 unit / mg protein이었으며 실험II군에서 2.5280±0.4269 unit / mg protein으로 각각 유의성 있는 증가를 보였다. (p<0.001)

GSH-Px는 대조군에서 24.0736±1.7784 nmoles / NADPH oxidased / min /mg protein, 실험 I군에서 31.2936±2.5626 nmoles / NADPH oxidased / min /mg protein이고 실험II군에서 36.9260±2.4476 nmoles / NADPH oxidased / min /mg protein으로 각각 유의성 있는 증가를 보였다. (p<0.0001)

GST는 대조군에서 122.0862±8.7461 nmoles / min /mg protein, 실험 I군에서 143.2002±9.1608 nmoles / min /mg protein이었고 실험II군에서 147.3518±14.5896 nmoles / min /mg protein으로 각각 유의성 있게 증가했다. (p<0.0001) 또한 실험 I, II군간의 t-test에서 유의적인 차이를 보이지 않은 것으로 나타나 실험 I, II군에서 GST 증가는 식이제한보다 불로환의 효과로 사료된다.

GSH는 대조군에서 1.3656±0.1716 μmoles / g wet weight of brain, 실험 I군에서 1.9160±0.1381 μmoles / g wet weight of brain이고 실험II군에서 2.3348±0.3358 μmoles / g wet weight of brain으로 각각 유의성 있는 증가를 보였다.(p<0.001)

Table 6. Effect of *Bulohwan*-Decoction on Superoxide Dismutase in Rat Brain

| Groups | No. of Animals | Superoxide Dismutase | Catalase | Glutathione peroxidase | Glutathione S-transferase | Glutathione |
|------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Control | 16 | 3.4302±0.4597 | 1.7008±0.1810 | 24.0736±1.7784 | 122.0862±8.7461 | 1.3656±0.1716 |
| Group I | 16 | 3.3007±0.6582 | 2.0083±0.2215 | 31.2936±2.5626 | 143.2002±9.1608 | 1.9160±0.1381 |
| Group II | 16 | 4.3954±0.6470 | 2.5280±0.4269 | 36.9260±2.4476 | 147.3518±14.5896 | 2.3348±0.3358 |
| P value (t-test) | | a 0.524 b 0.001 c 0.001 | a 0.008 b 0.001 c 0.001 | a 0.001 b 0.001 c 0.001 | a 0.001 b 0.001 c 0.282 | a 0.001 b 0.001 c 0.008 |

a : P values means difference between Control Group and Experimental I Group

b : P values means difference between Control Group and Experimental II Group

c : P values means difference between Experimental Group I and Experimental II Group

고 찰

세포내 활성산소의 생성에 대한 생체 방어 시스템 역시 존재하는데 크게 세가지 측면에서 이들을 분류할 수 있다. 첫 번째로 활성산소의 생성 자체를 저해하는 예방적인 항산화제(preventive antioxidants)를 들 수 있다. 이들은 세포내 활성산소의 주요 원천지에서 생성되는 superoxide anion이나 H₂O₂를 제거하여 다른 활성산소의 생성을 예방한다. 대표적인 것으로 glutathione peroxidase (GSH-Px), Glutathione-S-transferase (GST), catalase를 비롯하여 superoxide dismutase (SOD) 등의 효소가 preventive antioxidants로서 분류된다. 두 번째 분류군으로는 세포막의 지질 또는 단백질에 작용하여 손상을 유도하는 활성산소를 제거하는 항산화제(radical-scavenging antioxidants)를 들 수 있다. 세번째 항산화 기전으로는 활성산소에 의해 상해를 입은 세포내 거대분자들의 수복(repair)효소를 들 수 있다.

본 연구에서는 불로환의 항산화적 효과를 알

아보기 위해 예방적 효과가 가장 높은 항산화효소의 활성을 측정하였다. 특히 식이제한은 산화적 스트레스와 관련하여 뇌노화지연에 중요한 예방적 방법으로 제시되고 있으며³⁾ 항산화적 효소의 유전자 발현을 증가시키고 활성산소의 생성을 억제한다는 것은 이미 알려진 연구 결과이다²⁰⁻²¹⁾. 따라서 식이제한과 불로환의 항산화 효소에 대한 활성의 비교는 불로환의 항산화 효능을 입증하는데 중요한 자료로 사료된다.

본 연구에서 지질과산화(lipid peroxidation)의 지표인 TBARS의 양은 식이제한-불로환 투여군과 불로환 투여군에서 대조군과 비교하여 각각 76%와 65%에 감소하였다. TBA는 활성산소에 의해 다불포화 지방산이 과산화성 분해로 생긴 물질이다. 다불포화성 지방산은 생체막의 중요 형성물질이기 때문에 지질과산화는 세포의 파괴를 비롯하여 세포내 물질의 활성을 저해하게 되므로 TBARS의 양의 감소는 산화의 억제를 의미한다.

뇌 조직에서의 SOD의 활성도는 식이제한-불로환 투여군에서는 유의성 있게 증가하였으나 불로환 투여군에서는 대조군에 비해 유의성이 없었다. SOD는 인체내에서 강한 독성으로 작용하는 O₂⁻를 과산화수소로 바꾸는 작용을 한다²²⁾.

Hilton등²³⁾은 에탄올 투여시 SOD의 활성도 증가는 에탄올 투여로 생성된 활성산소를 소거시키려는 생리적응 현상으로 설명하는데, 본 실험에서 불로환 투여군에서 SOD의 활성도 감소는 불로환이 활성산소의 생성을 억제하는 다른 항산화제들의 효과가 더 많이 작용 했던 것으로 사료되나 정확한 기전에 대해서는 지속적인 연구가 필요하겠다.

Catalase는 SOD에 의해 생성된 과산화수소와 유기과산화물을 물로 배설함으로써 생체를 보호하는 효소이다²²⁾. 불로환 투여군과 식이제한-불로환 투여군에서 대조군에 비해 각각 유의성 있는 증가를 보였다.

GSH-Px(Glutathione peroxidase)는 과산화 수소와 과산화지질을 동시에 환원시킴으로써 세포 구성 성분을 산화적 손상으로부터 보호해 주는 작용을 한다²⁴⁾. 불로환 투여군과 식이제한-불로환 투여군에서 대조군에 비해 각각 유의성 있는 증가를 보였다.

GST(Glutathione S-transferase)는 독성물질을 Glutathione의 -SH group과 결합시켜 더 배설되기 쉬운 형태로 만들어 줌으로써 지질과산화 반응으로부터 생체를 보호하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. GST의 활성도 불로환투여군과 식이제한-불로환투여군에서 각각 유의성 있게 증가했다.

GHS(Glutathione)은 GSH-Px를 위한 기질로서 알려졌다며 이물질성 화합물의 탈독성을 위한 반응을 촉진하며 역시 반응산소들이나 활성산소의 항산화제를 위한 반응을 촉매한다²⁶⁾. 대조군에 비해 불로환 투여군과 식이제한-불로환 투여군이 유의성 있게 증가했다.

이상으로 보아 불로환 투여가 뇌의 산화적 스트레스를 억제함을 알 수 있었다. 특히 식이제한을 병행했을 경우 그 효과가 더욱 커지는 것을 알 수 있었다.

생체내에서 식이에 의한 에너지 대사과정중 산화적 스트레스가 유발된다. 에너지 대사는 미

토콘드리아의 전자전달계를 통해 이루어진다. 세포가 사용하는 산소의 90%가 미토콘드리아의 전자전달계에서 소비되기 때문에 미토콘드리아가 활성산소의 생성에 있어서 가장 큰 장소라 할 수 있다. 실제로 여러 연구에 의해 간과 뇌에서 분리된 미토콘드리아 DNA (mtDNA)는 핵(nuclear) DNA보다 10배 이상 산화적 손상이 크다고 보고되었다²⁷⁾. 미토콘드리아는 세포의 에너지원인 ATP를 생산하기 때문에 신체의 모든 세포에 아주 많이 존재한다. 따라서 미토콘드리아의 기능 저하는 정상적인 세포 활동과 다양한 생리적 스트레스에 적응하는데 상당한 문제점을 초래할 수 있다. 또한 미토콘드리아의 산화적 스트레스에 의한 손상이 노화의 주요한 원인으로 제시되고 있다²⁸⁾. 이러한 점은 식이제한(restriction diet)이 노화를 지연시킨다는 것과 상통한다. 즉 식이제한(restrictive diet)은 미토콘드리아의 ATP생성의 부담을 감소시킴으로써 산화적 손상을 감소시킴으로써 노화를 지연시킨다는 연구결과에 부합한다²⁹⁾. 따라서 식이제한군에서 TBARS에서의 감소는 이러한 미토콘드리아의 ATP 부담을 감소에 기인되며 GSH의 농도와 GSH-Px의 활성을 증가시키는 것으로 보고되었다³⁰⁾. 본 연구에서도 식이제한군의 Catalase, GSH-Px, GSH, GST와 SOD의 활성이 대조군과 비교하여 유의하게 증가되었으며 지질과산화 정도의 감소는 감소된 에너지 대사에 의한 활성산소의 생성 감소와 항산화 효소 및 물질이 뇌에서 유의한 증가에 기인하는 것으로 사료된다. 식이제한에 의한 항산화 효소의 활성은 효소와 관련된 호르몬의 신호전달을 통해 유전자 발현을 통해 이루어지는 것으로 보고되었다³¹⁾. 이러한 측면은 불로환에 의한 항산화 효소의 증가도 불로환의 성분에 의한 직,간접적으로 발현을 촉진시키는 것으로 추정할 수 있다.

불로환의 구성약재 중 인삼(人蔘)은 대보원기(大補元氣)하고 고탈생진(固脫生津)하며 안신(安神)하는 효능이 있다⁴⁰⁾. 최근 ginseng을 포함한

여러 식물 추출물을 혼합한 복합물이 평균 수명 연장과 노화를 지연하였다는 것이 노화-유도 마우스 (senescence accelerated mouse: SAM)를 이용한 연구에서 확인되었다³²⁾. Ginsenoside를 투입한 실험 쥐의 간에서 지질과산화의 정도가 약 30%까지 감소되었고 이는 Rb1과 Rg1에 의해 세포내 항산화 효소인 catalase와 GSH-Px 활성의 증가에 의해 기인한다고 보고되었다³³⁾. 그러나 Rb1에 의한 SOD 활성의 변화는 없었다. 이는 저산소증에 의해 증가된 뇌의 지질과산화가 Rb1에 의한 SOD 활성 증가에 기인한다는 연구 결과³⁴⁾와 비교하여 볼 때 조직이나 기관에 따라 항산화 효소의 활성을 달리 할 수 있다는 것을 의미한다. 당귀(當歸)는 보혈화혈(補血和血)하고 조경지통(調經止痛)하고 윤조활장(潤燥滑腸)하는 효능⁴⁰⁾이 있으며 과학적으로도 세포내 활성산소의 생성 장소의 하나인 hypoxanthine oxidase 계에서 생성되는 superoxide anion과 Fenton 반응을 통해 형성되는 hydroxyl radical를 당귀 추출물이 제거하는 것으로 확인되었다³⁵⁾. 구기자(枸杞子)는 자신훈폐(滋腎潤肺) 하며 보간(補肝)하는 효능⁴⁰⁾이 있으며 당귀와 유사하게 xanthine oxidase에 의해 생성되는 활성산소에 대한 항산화 효능을 보이는 것으로 확인되었다³⁶⁾. 또 H₂O₂에 의한 세포막의 지질과산화에 대한 손상도 감소되었다는 보고가 있다³⁷⁾. 특히 구기자(枸杞子)의 다당류 성분이 활성산소에 대한 항산화 기능이 가진 것으로 확인되었다³⁸⁾. 청열제에 속하는 지골피(地骨皮)도 보음퇴열(補陰退熱)의 요약⁴¹⁾으로, 항산화효과가 과학적으로 증명되었다³⁹⁾.

4가지 이외의 약재중 항산화 기능을 보이는 약재들은 대부분 프라보노이드 성분들이 많이 함유되어 있다. 프라보노이드는 pheylchrome의 부수체로서 관속식물 가운데 널리 분포되어 있는 광범위한 화합물에 해당된다. 최근에는 플라보노이드는 활성산소를 분해할 수 있는 능력 때문에 항산화제로서 이용되고 있다. 따라서 앞서 언급한 4가지 외에도 기타 약재 역시 항산화적 기능이

있을 것으로 사료되며 한의학에서도 우슬(牛膝)은 보간신(補肝腎)하여 강근골(強筋骨)하는 효과가 있고 토사자(菟絲子)는 보간신(補肝腎)하고 익정수하는 효능이 있다, 파극(巴戟)도 보신양(補腎陽)하고 장근골(壯筋骨)하는 효능이 있고, 두충(杜仲)도 보간신(補肝腎)하고 장근골(壯筋骨)하는 효능이 있고, 보혈약에 속하는 생지황(生地黃)은 청열생진(淸熱生津)하고, 숙지황은 자음보혈(滋陰補血)하고 익정진수(益精填髓)하는 효능이 있다, 안신약인 백자인(柏子仁)은 양심안신(養心安神)하는 효능이 있고, 석창포(石菖蒲)는 개규활담(開竅豁痰)하고 성신익지(醒神益智)하는 효능이 있다. 불로환은 대부분이 보기(補氣)하고 보혈(補血)하는 보익제(補益劑)와 안신익지(安神益智)하는 약재와 청열하면서 보음(補陰)하는 약재로 구성되어 있다⁴⁰⁾.

이와 같이 본 연구를 통해 식이제한과 불로환 처방이 암과 노화를 비롯하여 여러 질병의 원인이 되는 산화적 스트레스를 쥐의 뇌에서 25-35% 정도 감소시켰다. 그러나 실험군의 항산화적 기능이 외부적으로 산화를 촉진시킨 자극이 없다는 점을 고려해볼 때 불로환 투여군이 단순히 식이제한 만 한 군에 비해 그 기능이 능가할 것으로 사료되나 이를 위해서는 연구가 더 필요하다.

본 연구를 통해 노화, 뇌종양을 비롯하여 여러 뇌질환의 중요한 원인으로 고려되는 산화적 스트레스가 불로환에 의해 정상적 상태의 그 정도를 감소되었다는 것은 예방을 위해 중요한 방법으로 제시될 수 있음을 확인하였다. 특히 불로환은 고대 문헌에 노화지연의 한 방법으로서 처방되어온 것을 고려한다면 불로환 처방에 의한 세포의 항산화적 기능 즉 GSH, GSH-Px, Catalase, SOD를 비롯하여 GST의 증가는 한방의 과학적 설득력을 더 할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

不老丸과 식이제한이 Rat 뇌조직의 항산화효소에 미치는 영향을 알아보기 위하여 13주간 약물투여군과 약물투여와 식이제한을 병행한 군의 TBARS, SOD, CAT, GST, GSH-Px, GSH를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 뇌중량은 실험 I군(블로환투여군)은 $1.93 \pm 0.21\text{g}$ 이고 실험 II군(블로환과 40% 식이제한을 병행한 군)은 $1.83 \pm 0.24\text{g}$ 로 대조군의 $1.93 \pm 0.21\text{g}$ 비해 통계적 차이를 보이지 않았다. ($p > 0.05$)

2. 지질과산화의 지표인 TBARS의 양은 대조군과 비교하여 실험 I군, 실험 II군에서 각각 유의한 감소를 보였다. ($p < 0.001$)

3. 뇌조직의 항산화효소 실험에서 SOD의 함량은 대조군과 비교하여 실험 II군에서는 유의한 증가를 보였으나, 블로환만 투여한 실험 I군에서는 감소경향을 보였으며 유의한 변화를 보이지는 않았다. ($p < 0.0001$)

4. 뇌조직의 항산화효소 실험에서 Catalase의 활성도는 대조군과 비교하여 실험 I군, 실험 II군에서 각각 유의한 증가를 보였다. ($p < 0.001$)

5. 뇌조직의 항산화효소 실험에서 Glutathione Peroxidase의 함량은 대조군과 비교하여 실험 I군, 실험 II군에서 각각 유의적으로 증가하였다. ($p < 0.0001$)

6. 뇌조직의 항산화효소 실험에서 Glutathione S-transferase는 대조군과 비교하여 실험 I군, 실험 II군에서 각각 유의한 증가를 나타냈다. ($p < 0.0001$)

7. 뇌조직의 항산화효소 실험에서 Glutathione의 함량은 대조군과 비교하여 실험 I군, 실험 II에서 각각 유의적으로 증가하였다. ($p < 0.001$)

이상의 실험결과를 종합해 보면 블로환이 흰쥐의 뇌에서 항산화효과가 인정되었으며 식이제한을 병행하면 그 효과가 더욱 커짐을 알 수 있

었으나 앞으로 약물상호간의 작용 및 기전에 대해 더욱 연구가 필요하리라 사료된다.

참고문헌

1. Christen Y, Oxidative stress and Alzheimer disease, *Am J Clin Nutr*, 2000;71(2): 621S-629S
2. 최삼섭, 손숙영, 한방양생학, 성보사, 서울, 1997
3. Radak Z., Asano K, Fu Y, Nakamura A, Nakamoto H, Ohno H, Goto S, The effect of high altitude and caloric restriction on reactive carbonyl derivatives and activity of glutamine synthetase in rat brain, *Life Sci* 1998;62(15):1317-22
4. Knight JA, Disease related to oxygen-derived free radicals, *Annals of clinical and laboratory science*, 25(2):111-121.
5. Jones JA, Nguyen A, Straub M, Leidich RB, Veech RL, Wolf S, Use of DHEA in a patient with prostate cancer: a case report and review, *Urology*, 1997, 50(5):784-788.
6. Cauley JA, Lucas FL, Kuller LH, Stone K, Browner W, Cummings SR, Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. Study of osteoporotic fractures research group. *Ann Intern Med*. 1999 16: 130:270-277.
7. Guardiola-Lemaitre B, Toxicology of melatonin, *J Biol Rhythms*, 1997, 12(6):697-706.
8. 王蕾, 不老丸對小鼠應激反應適影響, *中醫研究*, 1998, 11(5) : 13-14
9. 陳直, 壽親養老新書, 人民衛生出版社, 1987
10. Uchiyama, M., and Mihara, M., determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* 86 : 271-278(1978)
11. Ohakawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anl. Biochem.*, 95, 1979, pp 351

12. Marklund S. and Marklund G. Eur., Involvement of the superoxide anino-radical in the autooxidation of pyrogallol and a convient assay for superoxide dismutase., J. Bio Chem. 47:469-474(1974)
13. Winterbourn, c.c., Hawkins, R.E., Brian, M and Carrell, W.C. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J. Lab. Clin. Med. 85, 337-341(1975)
14. Aebi, H. Catalase, methods of enzymatic analysis, H.V. Bergmeyer(Eds), Academic Press, New York, 1974, pp.674
15. Lawrence, R.A. and Burk, R.F., Glutathione peroxidase activity in selenium-dificent rat liver, Biochem. Biophys. Res. Commn., 71, 1976, pp.952
16. Habig, W. H., Pabist, M.J. and Jakoby, W.B., lutathione S-transferase. The first step in mercapturate acid formation. J. Biol. Chem., 249, 7130(1974)
17. Griffith, O. W., Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal. Biochem., 106 207(1980)
18. Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. Anal. Biochem. 72 : 240-254(1979)
19. 원태연, 정성원, 한글SPSS통계조사분석, 고려정 보산업, 서울, 1998
20. Masoro, E.J., Katz, M.S., McMahan, C.A., Evidence for the glycation hypothesis of aging from the food-restricted rodent model. J. Gerontol. Biol. Sci., 1989, 44, B20-B22.
21. Sohal, R.S., Agarwal, S., Cadas, M., Forster, M.J. & Lal. H. Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. Mech. Ageing Dev. 1994, 76, 215-224.
22. Yoon, Y. H. and Rhee, S. J.: Effects of Korean green tea, oolong tea and bleak tea beverage on the antioxidative detoxification in rat poisoned with cadmium. Kor. J. Nutr., 27, 1007-1017(1994)
23. Hilton, J. W., Hodson, P. V. and Slinger, S. J.:The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo Gairdneri*). J. Nutr., 110, 2527-2523(1980)
24. Chow, C. k. :Glucose and dietary vitamin E protection against catalase inactivation in the red sells oh rats. internat. J. Vit. Nutr. Res., 50, 364-371(1980)
25. Burk, R, F., Trumble, M. and Alawrence, R. :Rat hepatic cytosolic glutation-dependent enzyme protection against lipid peroxidation in the NADPH microsomal lipid peroxidation system. biochemm Biophys. Acta, 618, 35-42(1980)
26. 김영근, 김영균. 프리라디칼. 려문각, 서울, 1997
27. Chung MH, Kasai H, Nishimura S, Protection of DNA damage by dietary restriction. Free Rad Biol Med 1992, 12:523-525
28. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN, Oxidative damage and mitochondrial decay in ageing, Proc Natl Acad Sci, 1994;91:10771-10778.
29. Weindruch R. Related Articles, Caloric restriction and aging., Sci Am. 1996 Jan;274(1):46-52.
30. Cadenas S, Rojas C, Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Barja G, Caloric and carbohydrate restriction in the kidney: effects on free radical metabolism, Exp Gerontol, 1994, 29(1):77-88.
31. Bowles JT, The evolution of aging: a new approach to an old problem of biology, Med Hypotheses, 1998, 51(3):179-221
32. Zhang Y, Takashina K, Saito H, Nishiyama N, Anti-aging effect of DX-9386 in senescence

- accelerated mouse. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(6): 866-868
33. Deng HL, Zhang JT, Anti-lipid peroxidative effect of ginsenoside Rb1 and Rg1, *Chin Med J (Engl)*, 1991, 104(5):395-398.
34. Li X, Chen JX, Sun JJ, Protective effects of *Panax notoginseng* saponins on experimental myocardial injury induced by ischemia and reperfusion in rat, *Chung Kuo Yao Li Hsu도 Pao*, 1990, 11(1):26-29.
35. Wu H, Kong L, Wu M, Xi P, Effects of different processed products of radix *Angelica sinensis* on clearing out oxygen free radicals and anti-lipid peroxidation, *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 1996 21(10):599-601, 639
36. Zhang B, Zhang X, Li W, The injury of *Xenopus laevis* oocytes membrane and its acetylcholine receptor by free radical and the protection of *lycium barbarum* polysaccharide. *Chung Kuo Ying Yung Sheng Li Hsueh Tsa Chih*, 1997, 13(4):322-5
37. Ren B, Ma Y, Shen Y, Gao B, Protective action of *Lycium barbarum*. (LBL) and betaine on lipid peroxidation of erythrocyte membrane induced by H₂O₂, *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 1995, 20(5):303-4
38. Zhang X, Experimental research on the role of *Lycium barbarum* polysaccharide in anti-peroxidation, *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 1993, 18(2):110-2, 128
39. Kim HP, Kim, SY, Lee EJ, Kim YC, Kim YC, Zeaxanthin dipalmitate from *Lycium chinense* has hepatoprotective activity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1997, 97(3):301-14
40. 전국한의학대학교 본초학교수 공편저, 본초학, 영림사, 서울, 1991
41. 신길구. 신씨본초학. 수문사, 서울, 1987