

현토고본환이 노화유발 백서의 항산화능에 미치는 영향

최우석, 강석봉

대구한대학교 한의과대학 내과학교실

Effect of *Hyuntogobon-hwan* on Antioxidation Activity in Induced Aging Rats

Woo-Suk Choi, Seok-Bong Kang

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Gu Hanny University

Objectives : This experiment was done to evaluate the effects of *Hyuntogobon-hwan*(HTG) on antioxidant capability and lipidic concentration in blood, both of which are presumed to be related to aging.

Methods : 12 week-old SD rats were divided into controlled group, uncontrolled group and HTG group. As controlled and HTG groups were given subcutaneous injection of D-galactose(50mg/kg/rat), at the same time HTG group was administered extract of *Hyuntogobon-hwan*(270mg/200g). HTG injections continued for 6 weeks. After initial injections, blood was drawn from each group and the following were measured: the activity of SOD, GSH-px, catalase in erythrocytes, TBARS value, concentration of total lipid, tryglyceride in blood plasma.

Results : The activities of SOD and GSH-px in erythrocytes increased significantly in HTG group compared with controlled group. The activity of catalase seemed to increase slightly, but it was barely noticeable. The concentration of total lipid in plasma decreased significantly in HTG group compared with controlled group. The value of TBARS in plasma seemed to decrease slightly, but it was barely noticeable.

Conclusions : According to the above results, *Hyuntogobon-hwan* has an influence on aging by virtue of activation of antioxidative enzyme systems in erythrocytes and concentrations of lipid in blood plasma.

Key Words: *Hyuntogobon-hwan*, Antioxidation Activity

1. 緒 論

노화란 加齡이라는 시간의 경과에 따라 점차적으로 진행되는 생리적 기능의 저하로서¹, 동물의 발육, 성장, 성숙과 노화의 생물학적 과정에서 형태적 기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저하로 사망에 귀착되는 보편적인 생리적 현상²이라고 할 수 있다.

노화의 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않고 있으며, 노화 이론 중의 하나인 free radical theory³에 의

하면 생체내의 대사과정 중에 발생하는 free radical에 의해 세포노화가 초래되며¹, 또한 생체내의 항산화 효소계 및 항산화제에 의해 free radical의 생성이 억제되거나 제거된다^{4,5}.

한의학에서는 항노화의 개념으로 '耐老', '延年', '益壽', '不老', '養老' 등의 표현이 있어 왔으며⁶, 노화를 陰陽의 변화, 臟腑의 변화, 氣血의 변화, 精神의 변화로 나누어 설명하고 있다⁶⁻⁸.

노화의 원인으로는 크게 先天 稟賦不足과 後天 攝生失調로 나누어 보고 있으며^{6,8-10}, 그 중에서도 腎氣의 虛衰, 精血의 虧虛를 노화의 큰 원인으로 지목하고 있다^{6,7,11}.

玄菟固本丸은 <丹溪心法>¹²에 記載된 처방으로

· 접수 : 2004. 10. 11 · 채택 : 2004. 10. 28
· 교신저자 : 강석봉, 대구광역시 수성구 상동 165
대구한대학교 한의과대학 신계내과교실
(Tel. 053-770-2102 Fax. 053-770-2055
E-mail : kangsb@dh.ac.kr)

心血과 腎精을 充實하게 하여 鬚髮不白하고 顏貌不衰하며 延年益壽하는 효과가 있어, <東醫寶鑑>¹¹에 노화를 억제하는 養性延年藥餌로 소개되어 있다.

최근 국내 한의학계의 노화에 대한 논문으로는 左歸飲과 右歸飲¹³, 六味地黃湯^{5,14,15}, 補腎丸⁷, 五子地黃飲子⁴, 補中益氣湯⁵, 延齡固本丹⁶ 등의 처방이 연구되었으나 玄菟固本丸에 대한 연구는 아직까지 없었다.

이에 저자는 玄菟固本丸의 노화억제와 관련된 항산화효능을 규명하기 위하여 D-galactose로 노화가 유발된 흰쥐에 玄菟固本丸 추출물을 투여한 후, 적혈구의 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase의 활성 및 혈장의 脂質過酸化物 함량과 총지방, 중성지방의 농도를 측정된 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 動物 및 材料

1) 動物

10주된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 구입하여 2주일간 일정한 실험실 환경(24±2℃, 40-60%, 주야 12시간 교대 150-300 Lux)에서 고형배합사료(조단백질 21.1%이상, 조지방 3.5%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.6%이상, 삼양사)로 적응시켰다. 실험동물은 한 마리씩 분리

하여 stainless steel cage에서 사육하였고, 사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 적응기간 후 체중이 400±20g인 쥐들을 실험에 사용하였다.

2) 材料

본 실험에서 사용된 약재는 대구한의대학교 부속 대구한방병원에서 정선한 것이며, 처방내용은 <丹溪心法>¹²에 수록된 玄菟固本丸으로 한 첩의 용량은 아래와 같이 하였다.

2. 實驗方法

1) 實驗群의 區分

12주령의 SD계 흰쥐를 체중별로 고르게 분포시켜 無處置群(Normal group, 正常群)과 D-galactose 投與群(Control group, 對照群), 玄菟固本丸 投與群(HTG group, 實驗群)으로 나누어 각 군에 6마리씩 배정하였다.

正常群은 어떤 처치도 하지 않고 고형사료와 물만을 6주간 충분히 공급하였다. 對照群은 D-galactose를 6주간 피하주사하여 노화를 유발하였다. 實驗群은 D-galactose를 6주간 피하주사함과 동시에 玄菟固本丸 추출물 270.0mg/200g을 경구 투여하였다.

2) 老化 誘發

老化促進誘發은 D-galactose를 피하주사하는 방법을 사용하였다. D-galactose(Sigma, USA)를 50mg/kg의 비율로 1일 1회(오전 11-12시) 6주간 연속으로 背部에 피하주사하였다.

The Compositions of Hyuntogobon-hwan(HTG)

韓藥名	生藥名	用量(g)
菟絲子	<i>Cuscutae Semen</i>	8.0
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	8.0
乾地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	8.0
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	8.0
麥門冬	<i>Liriope Tuber</i>	8.0
五味子	<i>Maximowicziae Fructus</i>	8.0
茯神	<i>Poria</i>	8.0
山藥	<i>Dioscoreae Radix</i>	6.0
蓮肉	<i>Nelumbinis Semen</i>	4.0
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4.0
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	4.0
總量		8.0

3) 檢液의 調劑

玄菟固本丸 5첩 분량인 370.0g을 5,000cc의 둥근 플라스크에 3,000cc의 증류수와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 3시간 동안 煎湯하여 0.2 μ m filter(Corning, USA)로 여과한 濾液을 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 -80 $^{\circ}$ C deep freezer(SANYO, Japan)에서 한시간 방치한 후 freezer dryer(EYELA, Japan)로 24시간 동안 동결건조하여 玄菟固本丸 액 기스 82.0g(수율:22.16%)을 얻어 이를 실험에 필요한 농도로 증류수에 녹여 조정하여 50ml conical tube(Falcon, USA)에 넣어 2-4 $^{\circ}$ C의 냉장고에 보관하였으며, 사용할 때 water bath에 넣어 gel상태를 완전히 녹여 사용하였다.

4) 檢液 投與

玄菟固本丸 추출물은 270.0mg/200g의 비율로 檢液을 증류수로 희석하여 實驗群 흰쥐에 1일 1회(오후 2-3시) 6주간 경구 투여하였다.

5) 血液의 採取

실험기간이 종료된 실험동물은 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 회복한 후 10ml 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 이때 주사기는 혈액응고를 방지하기 위해 3.8% sodium citrate 용액 0.1ml로 내부를 coating하여 사용하였다. 채취된 혈액은 응고되는 것을 방지하기 위해 EDTA(ethylene diamine tetra acetate)가 들어있는 polystyrene 원심분리관에 담아 ice bath에 20분간 방치한 후 2,800rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리(HERMLE, Germany)하여 아래층의 적혈구와 혈장을 분리하고, 혈장은 혈장내 지질과산화물양과 지방수준을 측정하기 위해 -80 $^{\circ}$ C deep freezer(SANYO, Japan)에 보관하였다.

아래층의 적혈구는 ice cold saline을 첨가하여 2,800rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하는 세척과정을 세차례 반복하여 washed RBC를 얻었다. 이 RBC를 0.9% NaCl 용액과 부피비가 1:1이 되도록 희석하여 50% hematocrit suspension(RBC suspension)을 만든 후 항산화효소의 활성을 측정하

기 전까지 -80 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관하였다.

6) 血漿의 thiobarbituric acid reactive substance 含量 測定

Yagi¹⁶의 방법을 이용하여 혈장의 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 함량을 측정하였다. 혈장 20 μ l에 1/12N 황산 4ml와 10% phosphotungstic acid 0.5ml를 넣고 5분간 방치한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리(HERMLE, Germany)하여 상층액은 버리고, 침전물은 위의 과정을 다시 한번 반복하였다. 이때 얻어진 침전물에 증류수 2ml와 thiobarbituric acid(TBA) reagent 1ml를 가하여 잘 섞은 후 뚜껑을 단단히 막고 95 $^{\circ}$ C water bath에서 1시간동안 배양시켰다. 여기에 n-butanol 3ml를 가하여 격렬히 섞은 후 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액에 있는 TBARS의 양을 1,1,4,4-tetramethoxypropane을 표준용액으로 하여 luminescence spectrometer(Perkin Elmer, LS50)로 excitation 515nm, emission 553nm에서 정량하였다.

7) 赤血球의 superoxide dismutase 活性 測定

적혈구의 superoxide dismutase(SOD) 활성은 적혈구 현탁액 200 μ l를 10mM Tris-1mM EDTA buffer(pH 7.4) 1.8ml로 용혈시킨 후, 이 hemolysate에 chloroform과 ethanol을 부피비가 5:3이 되도록 만든 용액을 hemolysate 부피의 0.4배 가하고 vortex로 강하게 2분간 잘 섞은 다음 hemoglobin을 침전시켰다. 여기에 280 μ l의 증류수를 가하여 20,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리(MICRO 17R+, Korea)하여 얻은 상층액을 SOD 활성을 측정하기 위한 효소 원으로 이용하였다. SOD 활성은 Flohé 등¹⁷의 방법으로 측정하였는데, xanthine이 xanthine oxidase에 의해 superoxide를 생성하고, 이 superoxide가 ferricytochrome C(Fe⁺⁺⁺)를 ferrouscytochrome C(Fe⁺⁺)로 환원시키는데 이때 SOD가 존재하면 SOD가 superoxide에 대해 경쟁하여 cytochrome C의 환원속도가 감소된다는 원리를 이용하여 측정하는 방법을 사용하였다. 0.1mM EDTA를 함유한 50mM phosphate buffer(pH 7.8)에 xanthine과 cytochrome C(Fe⁺⁺⁺)를 넣고 혼합한 후 25 $^{\circ}$ C로 유지

시킨 용액 2ml에 효소시료 50 μ l를 가하고, 사용 직전에 xanthine oxidase 용액을 제조하여 50 μ l를 첨가시켜 ferricytochrome C의 환원이 방해되는 정도를 550nm에서 30초 간격으로 3분간 비색정량하였다. 이때 SOD의 분당 활성 정도는 ferricytochrome C의 환원을 50% 방해하는 SOD의 양을 1 unit으로 하여 나타내었다.

8) 赤血球의 glutathione peroxidase 活性 測定

적혈구의 glutathione peroxidase(GSH-px) 활성은 Flohé¹⁸의 방법을 이용하여 측정하였다. 적혈구 현탁액에 10배의 증류수를 가하여 적혈구를 용혈시키고 다시 증류수로 이 hemolysate를 희석한 후 Drabkin용액을 hemolysate와 1:1의 비율로 혼합하여 hemoglobin (Hb)을 cyanomethemoglobin으로 전환시킨 후 효소원으로 사용하였다.

GSH-px의 활성측정은 GSH-px가 환원형 glutathione(GSH)과 H₂O₂의 반응을 촉진시켜 산화형 glutathione(GSSG)으로 전환시키고, GSSG는 glutathione reductase의 작용으로 NADPH의 H를 받아 다시 환원형인 GSH로 되는데, 이때 형광을 띠는 NADPH는 H를 빼앗겨 형광을 띠지 않는 산화형 NADP가 된다는 원리를 이용하였다. Tube에 0.1M phosphate buffer 500 μ l, 10mM GSH 100 μ l, glutathione reductase 100 μ l를 넣고, 효소원 100 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양시킨 후 1.5mM NADPH 100 μ l를 넣어 다시 3분간 배양시켰다. 여기에 미리 37 $^{\circ}$ C로 데워진 12mM t-butyl hydroperoxide를 가하여 반응을 개시시킨 후 spectrophotometer로 365nm에서 30초 간격으로 3분간 GSH-px의 활성을 측정하여 unit단위로 나타내었다. 여기에서 1 unit은 1분동안 1.0 μ M의 GSH가 H₂O₂의 작용으로 GSSG로 산화되는 것을 측정한다.

9) 赤血球의 catalase 活性 測定

적혈구의 catalase 활성은 Johansson과 Håkan¹⁹에 의해 측정하였다. 적혈구 현탁액을 10배의 10mM Tris-1mM EDTA buffer(pH 7.4)로 용혈시킨 후 0.01M phosphate buffer(pH 7.0)로 희석하여 효소원으로 사용하였다. 250mM KH₂PO₄-NaOH(pH 7.0)

300 μ l, 100% methanol 300 μ l, 0.27% H₂O₂ 60 μ l를 polystyrene tube에 넣고 여기에 효소원을 600 μ l 가하여 20 $^{\circ}$ C에서 20분간 shaking시키면서 반응이 일어나게 한 후 7.8M KOH 300 μ l를 가하여 반응을 종결시키고, 34.2mM Purpald 용액을 600 μ l를 가하여 20 $^{\circ}$ C에서 10분간 shaking시킨 후 65.2mM potassium periodate를 300 μ l를 가하여 발색시켰다. 이를 9,500 \times g에서 10분간 원심분리(MICRO 17R+, Korea)시켜 spectrophotometer(DU530, Beckman)로 550nm에서 흡광도를 측정한 후 formaldehyde를 표준용액으로 하여 얻은 표준곡선으로부터 활성을 계산하였다.

10) 酵素原의 蛋白質 含量 測定

각 효소들의 활성측정을 위해 사용된 적혈구의 단백질 함량은 bovine serum albumin(Sigma)을 표준용액으로 하여 측정하였다. 먼저 2.0% Na₂CO₃, 0.4% NaOH, 0.16% sodium potassium tartrate, 1.0% sodium dodecyl sulfate(SDS)를 포함하는 solution A와 4.0% CuSO₄인 solution B를 100:1(v:v)로 혼합하여 solution C를 만들었다. 효소원 50 μ l에 solution C 3ml를 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 여기에 동량의 증류수로 희석된 phenol reagent 300 μ l를 넣어 실온에서 45분간 방치하였다가 파장 660nm에서 spectrophotometer로 비색정량하였다.

11) 血漿의 총지방, 중성지방 濃度 測定

혈장의 총지방 농도는 Frings²⁰으로 측정하였다. 혈장 100 μ l에 진한 H₂SO₄ 2ml를 첨가하고 boiling water bath에서 10분간 가열하여 산분해시킨 후 ice cold bath에서 5분간 냉각시켰다. 다시 이 용액 100 μ l를 취해 5ml phospho-vanillin reagent를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C water bath에서 15분간 배양하여 발색시키고 이를 실온에서 5분간 냉각시킨 후 spectrophotometer(DU530, Beckman)로 파장 540nm에서 비색정량하였다. 혈장의 중성지방 농도는 GPO-PAP법을 이용한 kit(영동제약)로 측정하였다.

3. 統計分析

모든 통계분석은 윈도우용 SPSS(ver. 11.0)를 이용하여 실시하였다. 기술통계학적 분석을 통해 각

집단에서의 측정값을 평균±표준편차로 요약하였으며, 각 집단간의 유의성은 ANOVA test with multiple comparisons (Duncan's method)으로 분석하였고. 유의수준은 0.05로 하였다.

III. 結 果

1. 血漿의 脂質過酸化 物 含量 變化

玄菟固本丸이 혈장의 지질과산화에 미치는 영향을 알아보기 위해 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 함량을 측정된 결과 normal군이 36.04±3.94nmol/100ml, control군이 47.52±6.98nmol/100ml, HTG군이 39.93±4.40nmol/100ml로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다

(F=1.224, p=0.322, ANOVA test)(Table 1).

2. 赤血球의 superoxide dismutase(SOD) 活性 變化
玄菟固本丸이 적혈구에서의 항산화효소들의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD)의 활성을 측정된 결과 normal군이 17.28±2.33, control군이 10.60±0.98, HTG군이 13.34±1.38으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 있었으며(F=4.077, p=0.039, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 control군이 normal군에 비해 유의하게 감소하였고, HTG군이 control군에 비하여 증가하는 경향을 나타내었다(Table 2).

Table 1. Effect of *Hyuntogobon-hwan* Extract on the Plasma TBARS Levels in Rats

Group	No. of animal	Plasma TBARS levels (nmol/100ml)	Duncan grouping
Normal	6	36.04±3.94 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	47.52±6.98	A
HTG	6	39.93±4.40	A
F-value:		1.224*	

1) Mean±SE.

2) Means with the same letter are not significantly different at α=0.05 level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Normal : not specially treated in 18weeks-old rat

Control : D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks

HTG : treated with *Hyuntogobon-hwan* extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

Table 2. Effect of *Hyuntogobon-hwan* Extract on the Erythrocyte Antioxidative Enzyme(SOD) Activities in Rats

Group	No. of animal	RBC SOD activities (unit/min/mg protein)	Duncan grouping
Normal	6	17.28±2.33 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	10.60±0.98	B
HTG	6	13.34±1.38	AB
F-value:		4.077	

1) Mean±SE.

2) Means with the same letter are not significantly different at α=0.05 level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Normal : not specially treated in 18weeks-old rat

Control : D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks

HTG : treated with *Hyuntogobon-hwan* extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

3. 赤血球의 glutathione peroxidase(GSH-px) 活性 變化

玄菟固本丸이 적혈구에서의 항산화효소들의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 항산화효소인 glutathione peroxidase(GSH-px)의 활성을 측정한 결과 normal군이 0.147±0.019, control군이 0.070±0.002, HTG군이 0.118±0.014로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 있었으며(F=8.124, p=0.004, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 HTG군이 control군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Table 3).

4. 赤血球의 catalase 活性 變化

玄菟固本丸이 적혈구에서의 항산화효소들의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 항산화효소인

catalase의 활성을 측정한 결과 normal군이 5387.68±184.58, control군이 4650.26±85.83 HTG군이 5017.96±377.65으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(F=2.216, p=0.143, ANOVA test)(Table 4).

5. 血漿內 총지방 및 중성지방 濃度 變化

玄菟固本丸이 혈장 지질농도에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈장내 총지방의 농도를 측정한 결과 normal군이 185.33±22.78, control군이 321.00± 38.36, HTG군이 263.83±22.41으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 있었으며(F=5.584, p=0.015, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 유의성을 검정한 결과 control군이 normal군에 비해 유의하게 증가하였고, HTG군이 control군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었

Table 3. Effect of *Hyuntogobon-hwan* Extract on the Erythrocyte Antioxidative Enzyme(GSH-px) Activities in Rats

Group	No. of animal	RBC GSH-px activities (unit/mg protein)	Duncan grouping
Normal	6	0.147±0.019 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	0.070±0.002	B
HTG	6	0.118±0.014	A
F-value:		8.124*	

1) Mean±SE.

2) Means with the same letter are not significantly different at α=0.05 level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Normal : not specially treated in 18weeks-old rat

Control : D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks

HTG : treated with *Hyuntogobon-hwan* extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

Table 4. Effect of *Hyuntogobon-hwan* Extract on the Erythrocyte Antioxidative Enzyme(Catalase) Activities in Rats

Group	No. of animal	RBC catalase activities (unit/mg protein)	Duncan grouping
Normal	6	5387.68±184.58 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	4650.26±85.83	A
HTG	6	5017.96±377.65	A
F-value:		2.216*	

1) Mean±SE.

2) Means with the same letter are not significantly different at α=0.05 level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Normal : not specially treated in 18weeks-old rat

Control : D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks

HTG : treated with *Hyuntogobon-hwan* extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

Table 5. Effect of *Hyuntogobon-hwan* Extract on the Plasma Total Lipid and Triglyceride Concentrations in Rats

Group	No. of animal	Plasma total lipid (mg/100ml)	Duncan grouping	Plasma triglyceride (mg/100ml)	Duncan grouping
Normal	6	185.33±22.78 ¹⁾	A ²⁾	76.67±14.68 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	321.00±38.36	B	82.50±13.62	A
HTG	6	263.83±22.41	AB	85.33±16.71	A
F-value:		5.584*		0.086*	

1) Mean±SE.

2) Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test

* calculated by ANOVA test

Normal : not specially treated in 18weeks-old rat

Control : D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks

HTG : treated with *Hyuntogobon-hwan* extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

다.

혈장내 중성지방의 농도를 측정된 결과 normal군이 76.67±14.68, control군이 82.50±13.62, HTG군이 85.33±16.71으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(F=0.086, p=0.918, ANOVA test)(Table 5).

IV. 考 察

노화란 수정에서 죽음까지의 생체변화를 이르는 광의의 노화(加齡현상, aging)와 성숙기 이후의 생체 변화만을 가리키는 협의의 노화(老化, senescence)로 구분할 수 있으나^{3,21}, 일반적으로 노화란 加齡이라는 시간의 경과에 따라 점차적으로 진행되는 생리적 기능의 저하로서¹, 동물의 발육·성장·성숙과 노화의 생물학적 과정에서 형태적 기능적 퇴축·예비력과 적응력의 저하로 사망에 귀착되는 보편적인 생리적 현상을 말하며², 백발의 출현이나 피부의 주름, 동맥경화 등은 노화과정에 나타나는 대표적인 현상이다²².

생체의 노화기전에 대해 여러 가설 중 free radical theory에 따르면 산소를 소비하는 모든 생물은 산소에서 유래된 free radical에 의하여 세포내 산화적 손상이 축적되어 질병과 노화가 초래된다²³.

Free radical 반응은 활성산소 즉, 분자 혹은 원자의 최외각 전자궤도에 부대전자를 가진 불안정한

화합물로서 $\cdot O_2^-$, H_2O_2 , $\cdot OH$ 등의 유독성 산소대사물 및 지방산과 반응할 수 있는 peroxy radical($LOO\cdot$)이나 alkoxy radical($LO\cdot$) 등에 의해 일어난다^{24,25}.

이들 free radical은 핵산, 단백질, 지질 등 모든 세포내 거대분자를 변성 내지 파괴시키며, 특히 세포막의 불포화지방산을 과산화시켜 세포막의 투과성을 변화시키므로써 세포독성을 유발한다^{5,24,26}. 이러한 free radical의 연쇄반응인 지질과산화는 노화에 관여하며, 노화되어 가면서 생체내 각 조직에 lipofuscin과 과산화지질 등의 free radical 반응산물이 증가한다는 것은 잘 알려져 있다^{5,24,27}. 최근 많은 연구 보고들에 의하면 free radical에 의한 과산화지질의 생성은 성인병의 발병과정과 질병의 진행 및 노화현상과도 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다^{13,28,29}.

한의학에서는 항노화의 개념으로 ‘耐老’, ‘延年’, ‘益壽’, ‘不老’, ‘養老’ 등의 표현이 있으며⁶, 노화를 陰陽의 변화, 臟腑 經絡의 변화, 氣血의 변화, 精神의 변화로 나누어 설명하였다^{6,8}.

<靈樞·天年篇>³⁰에서는 연령에 따른 五臟의 노화순서를 말하였는데 50세부터 肝心脾肺腎의 순으로 노화하고 百歲에는 五臟이 모두 虛해지고 腎氣가 없어진다고 하였으며, <素問·上古天眞論>³¹에서는 腎氣의 虛衰에 따른 노화과정을 여자는 7세, 남자는 8세를 주기로 經絡의 쇠퇴와 외모의 변화로 설

명하였다.

한의학에서는 노화의 원인을 크게 先天 稟賦不足과 後天 攝生失調로 나누고 있으며⁶, 그 중에서도 腎氣(腎精)의 虛衰를 노화의 큰 원인으로 지목하고 있다^{6,7,11,32}. 이에 대해 <素問·金匱眞言論>³¹에서는 “夫精者 身之本也”라 하여 精이 인체의 근본임을 역설하였고, <東醫寶鑑·身形·老因血衰>¹¹에서는 精血의 虧虛를 노화의 가장 큰 원인으로 지목하였으며, <素問·上古天眞論>³¹과 <靈樞·天年篇>³⁰에서도 腎氣의 虛衰에 따라 老化가 진행되며, 後天調理를 하여 腎精을 보존하여야 長壽할 수 있다고 설명하고 있다.

따라서 抗老衰의 원칙으로 精을 보존하는 것을 중요하게 여겼는데, 구체적인 방법으로는 精神調養, 藏精, 調氣, 起居調攝, 食餌, 自然順應, 按摩導引 등의 養生法과¹⁰, 補精血하여 延年益壽하고 노화를 억제하는 약물을 복용할 것을 제시하였다^{6,11}.

玄菟固本丸은 <丹溪心法>¹²에 記載된 처방으로 生地黃, 熟地黃, 麥門冬, 天門冬, 人蔘, 菟絲子, 山藥, 蓮肉, 茯神, 五味子, 枸杞子 등 의 약물로 구성되어 있으며, 心血과 腎精을 充實하게 하여 鬚髮不白하고 顏貌不衰하며 延年益壽하는 효과가 있다.

<醫學入門>³³에 의하면 玄菟固本丸의 처방구성은 腎虛에 쓰는 小兒菟絲子丸에 五味子와 枸杞子를 加하고 心虛에 쓰는 人蔘固本丸을 合方한 것이며, 처방 중 熟地黃은 滋陰補血, 益精填髓하고 天門冬은 滋腎養陰하는 효능이 있어³⁴ 腎精을 補하고, 生地黃은 淸熱涼血, 養陰生津하고 麥門冬은 養陰潤肺, 淸心除煩하며, 人蔘은 大補元氣, 固脫生津, 安神하는 효능이 있어³⁴ 心血을 生하고 心氣를 通하게 하며, 菟絲子는 補肝腎, 益精髓, 固精하고 蓮子肉은 益腎澁精, 養心安神하며 山藥은 健脾, 補肺, 固腎, 益精하고 茯神은 寧心, 安神, 利水하며, 五味子는 斂肺, 滋腎, 生津, 澁精하고 枸杞子는 滋腎生精, 補肝養血하는 효능이 있어³⁴ 補益精血, 固精, 養心安神하므로 전체적으로는 精血을 充實하게 하여 노화를 억제하는 효능이 있을 것으로 사료된다.

최근 국내 한의학계의 노화에 대한 연구로는 人

蔘, 熟地黃, 黃芪, 鹿茸, 柴胡 등의 單味劑를 이용한 실험과 複合處方을 이용한 실험 및 약침제제를 이용한 실험 등이 있었으며³⁵, 複合處方을 이용한 실험으로 尹¹³은 左歸飲과 右歸飲, 孫⁷은 補腎丸, 安¹⁵은 熟地黃과 六味地黃湯을 노화된 SD계 흰쥐에 투여하여 항산화효능이 있음을 확인하였고, 河³⁶는 定志丸, 朴⁵은 補中益氣湯과 六味地黃湯을 SAM (senescence-accelerated mouse)에 투여하여 항산화효능이 있음을 확인하였다. 또 programmed aging theory에 입각한 노화연구로 朴⁶의 延齡固本丹에 대한 연구 등이 있었으나, 玄菟固本丸에 대한 실험적 연구는 없었다.

이에 본 연구에서는 玄菟固本丸이 노화와 관련된 항산화능 및 혈중 지질농도에 미치는 영향을 규명하고자 12주령의 SD계 흰쥐를 正常群, 對照群, 實驗群으로 나누고 對照群과 實驗群은 D-galactose 피하 주사로 노화를 유발하고 實驗群에만 6주 동안 玄菟固本丸 추출물을 증류수에 녹여 경구 투여한 후 혈액을 채취하여 적혈구의 항산화효소계인 SOD, GSH-px, catalase의 활성 및 혈장의 脂質過酸化化合物량, 총지방·중성지방의 농도를 측정하였다.

SOD는 활성산소 scavenger로서 산소의 대사과정에서 가장 먼저 생성되는 superoxide anion radical ($\cdot O_2^-$)을 제거하는 효소로 2분자의 O_2 를 반응시켜 O_2 와 H_2O_2 로 변화시킨다($2\cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + 2H_2O_2$)^{5,37-39}. Glutathione은 모든 조직에 분포하여 세포의 유지 및 생존에 필수적인 방어기구를 수행하며, 특히 방사선장애에 대한 방어, 세포막의 유지, 효소의 SH기의 유지, 이물질의 해독 등 생명유지에 중요한 작용을 하고 있다^{5,40}. GSH-px는 glutathione을 산화시키는 과정에서 hydrogen peroxidase나 lipid peroxidase 등을 제거하는 효소로서($2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$) 이러한 과정에서 glutathione reductase에 의하여 다시 환원된다⁴¹. Catalase는 세포내에서 과산화수소를 제거하는 효소로($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) 생체의 모든 주요 기관에 존재하며, 특히 간장과 적혈구에 많이 분포한다^{5,42}.

본 실험에서는 SOD의 활성을 측정한 결과, 노화

를 유발한 對照群에서는 SOD의 활성이 유의성 있게 감소하였고($p=0.039$), 實驗群에서는 SOD 활성이 對照群에 비하여 유의성 있게 증가하는 경향을 나타내었다. GSH-px의 활성도 對照群에서는 유의성 있게 감소하였고, 實驗群에서는 對照群에 비하여 유의성 있게 증가하였다($p=0.004$).

Catalase의 활성은 實驗群이 對照群에 비하여 증가하는 경향을 나타냈으나 유의성은 없었다. 이는 六味地黃湯을 투여한 처⁵의 실험에서도 SOD나 GSH-px는 12주령부터 유의성이 나타났으나 catalase는 40주령에서 유의성이 나타난 것으로 보아 실험동물의 주령에 의한 결과로 생각된다.

過酸化脂質은 생체막의 불포화지방산과 활성산소가 반응하여 발생되는 물질로 생체막과 조직의 손상을 유도하는 것으로 알려져 있으며, thiobarbituric acid(TBA)의 반응물질인 thiobarbituric acid reacting substance(TBARS)함량을 정량분석하여 과산화지질의 양을 판단할 수 있다^{43,44}. Free radical이 불포화지방산과 작용하여 지질과산화물(lipid peroxide)을 만들고 이것이 단백질, 핵산 등의 아미노기와 반응하면 그 반응산물로 형광물질인 lipofuscin이 형성된다. 이러한 불포화지방산과의 반응은 연쇄적으로 일어나 계속적으로 많은 free radical 형성을 유도하므로, 불포화지방산의 산화는 세포내에서 일어나는 free radical 형성 반응으로는 가장 중요하게 생각되고 있다^{3,43}.

본 실험에서는 玄菟固本丸이 혈장 지질의 과산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 TBARS 함량을 측정된 결과, 實驗群이 對照群에 비하여 감소하는 경향을 나타냈으나 유의성은 없었다. 尹¹³, 孫⁷, 安¹⁵, 河³⁶ 등의 실험에서는 뇌, 간, 신장 및 혈중의 지질 과산화물이 유의하게 감소하였는데 이들은 모두 32주령 이상의 노화된 실험동물을 사용하였으며, 본 실험에서 유의성이 나타나지 않은 것은 실험동물의 주령과 관련된 결과로 생각된다.

연령의 증가에 따라서 혈장내의 지방이나 지단백질 함량의 증가는 동맥경화를 유발하는 위험성을 증가시킨다고 보고되고 있다^{3,45}. 또 노화가 진행되

면서 신체 장기의 세포막에 함유된 지방량이 변화하고 이에 따라서 막의 기능 변화가 보고되어 있으며³, 노화는 각 세포의 저밀도지단백의 상승으로 인한 고지혈증을 일으켜 과산화지질의 형성을 촉진하며, free radical 소거 기능을 저하시켜 과산화지질 증가를 더욱 조장한다²².

본 실험에서는 玄菟固本丸이 노화유발 흰쥐의 혈장 지질에 미치는 영향을 파악하기 위하여 혈장내 총지방, 중성지방의 농도를 측정하였다.

총지방 농도는 對照群이 正常群에 비하여 유의하게 증가하였고($p=0.015$), 實驗群은 對照群에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 중성지방에서는 實驗群과 對照群 모두 正常群보다 약간 증가하였으나 유의성은 없었다.

이상의 결과에서 D-galactose로 노화를 유발한 흰쥐에 玄菟固本丸 추출물을 투여한 결과, 적혈구 항산화효소계 중 free radical을 제거하는 SOD와 생식억제 효소인 GSH-px활성이 유의성 있게 증가되었고($p<0.05$, $p<0.01$), 노화유발로 증가된 혈장 총지방 농도가 유의성 있게 감소하였다($p<0.05$). 적혈구 항산화효소 중 catalase 농도는 증가하는 경향을 나타내고, 혈장 TBARS 함량은 감소하는 경향을 나타냈으나 유의성은 없었다.

따라서 延年益壽藥餌인 玄菟固本丸은 노화유발 흰쥐에 있어 적혈구 항산화효소계를 활성화하고 혈장 중 지질의 농도를 낮추어 노화를 억제하는 효과가 있을 것으로 사려된다. 향후에는 이러한 약물들의 인체내 항산화작용에 대한 연구가 이루어져야 할 것이며, 아울러 더 많은 延年益壽處方에 대한 다양한 실험적 검증과 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

玄菟固本丸의 항노화작용을 연구하기 위하여 노화를 유발한 흰쥐에 玄菟固本丸 추출물을 투여하고 혈장 TBARS 함량과 적혈구의 SOD, GSH-px, catalase 활성을 측정하고, 혈장 중의 총지방, 중성지방 농도를 측정된 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 적혈구의 SOD 활성은 對照群에서는 유의성 있게 감소하였고, 玄菟固本丸 投與群에서는 對照群에 비하여 유의성 있게 증가하는 경향을 나타내었다.
2. 적혈구의 GSH-px 활성은 對照群에서는 유의성 있게 감소하였고, 玄菟固本丸 投與群에서는 對照群에 비하여 유의성 있게 증가하였다.
3. 혈장의 총지방 농도는 對照群에서는 유의성 있게 증가하였고, 玄菟固本丸 投與群에서는 對照群에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다.
4. 적혈구의 catalase 활성은 玄菟固本丸 投與群에서 對照群에 비하여 증가하는 경향을 나타냈으나 유의성은 없었다.
5. 혈장의 TBARS 함량은 玄菟固本丸 投與群에서 對照群에 비하여 감소하는 경향을 나타냈으나 유의성은 없었고, 중성지방 농도는 유의한 변화가 없었다.

이상의 결과로 보아 玄菟固本丸은 노화유발 흰쥐에 있어 적혈구 항산화효소계를 활성화하고 혈장 중 지질의 농도를 낮추어 노화를 억제하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

參考文獻

1. 李民化. 老化研究. 遺傳工學. 1991;34:34-8.
2. 徐舜圭. 成人病 老人醫學. 서울:고려의학; 1992, pp.10-3, 40-9, 225-8, 429-37.
3. 金숙희, 김화영. 노화(대우학술총서). 서울:민음사; 1995, pp.13-5, 77-106, 253-99.
4. 서경석, 이상룡. 五子地黃飲子가 老化白鼠의 血液變化와 血清·腦組織의 抗酸化活性에 미치는 影響. 동의신경정신과 학회지. 1999;10(1):79-93.
5. 朴成敏. 補中益氣湯과 六味地黃湯이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. 慶山大學校 大學院. 2000.
6. 朴英濬. 延齡固本丹 및 八味地黃湯이 Rat의 피부 섬유아세포, 사구체 메산지움세포 및 혈관내피세포의 老化 遲延에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院. 2002.

7. 孫旻成, 吳旼錫, 宋泰元. 老化過程의 흰쥐에서 補腎丸이 腎臟의 代謝酵素系에 미치는 影響. 大田大學校 韓醫學研究所 論文集. 1999;8(1): 659-60.
8. 金正숙, 이제현, 마진열, 전원경. 노화 방지를 위한 한약재의 효능 연구(I). 한국한의학회지 논문집. 1995;1(1):402.
9. 杜鎬京. 東醫腎系學. 서울:東洋醫學研究院; 1993, p.1333, pp.1348-61.
10. 金광호, 김동영. 東醫老年養生學. 서울:서원당; 1999, p.125-6, pp.259-60, 273-4.
11. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂; 2001, pp.78-86.
12. 朱震亨/方廣. 丹溪心法附餘. 서울:大成文化社; 1989, pp.678-9.
13. 尹哲浩, 鄭智天, 朴宣東. 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. 대한한의학회지. 1994;16(2):348-64.
14. 尹一智. 六味地黃湯이 노화 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. 1997.
15. 安相源, 李哲浚. 熟地黃과 六味地黃湯이 老化過程 흰쥐에서의 抗酸化機轉에 미치는 影響. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1999;8(1):593-623.
16. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. Methods Enzymol. 1984;105:328-31.
17. Flohé L, Becker R, Brigelius R, Lengfelder E, Ötting F. Convenient assays for superoxide dismutase. CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. 1992, pp.287-93.
18. Flohé L. Determination of glutathione peroxidase. CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. 1992, pp.281-6.
19. Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. Analytical Biochemistry. 1988;174(1):331-6.
20. Frings CS, Dunn RT. A colorimetric method for

- determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Am J Clin Pathol.* 1970;53(1):89-91.
21. 유형준. 노화와 내분비계. *대한내분비학회지.* 1993;8(1):1-2.
 22. 하베진. 노화촉진 생쥐의 지질과산화와 효소 활성에 관한 비교 연구. *신라대학교 논문집.* 2001;50(자연과학대학편):265.
 23. Harman D. Free radical theory of aging:history. *EXS.* 1992;62:1-10.
 24. 정해영. 노화촉진 마우스에서 노화와 ginsenoside Rb₂가 free radical 생성 및 제거능에 미치는 영향. *생명과학심포지움.* 1993;제4회:72, 94-8.
 25. Cohen G. The generation of hydroxyl radicals in biologic systems:toxicological aspects. *Photochem Photobiol.* 1978;28(4-5):669-75.
 26. Kellogg EW 3d, Fridovich I. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1977;252(19):6721-8.
 27. Yoshikawa M, Hirai S. Lipid peroxide formation in the brain of aging rats. *J Gerontol.* 1967;22(2):162-5.
 28. 최진호. 노화의 메카니즘과 연구방향. *생화학뉴스. 한국생화학회.* 1985;5(3):39-53.
 29. 허근, 신억섭, 박종민. 지질과산화 반응과 Free Radical 생성계 효소활성에 미치는 Testosterone의 영향. *약학회지.* 1994;38(2):166-73.
 30. 王永註. 黃帝內經靈樞. 3. 臺灣:中華書局; 1972, 198-200.
 31. 王永註. 黃帝內經素問. 3. 臺灣:中華書局; 1972, 17-26, 46.
 32. 안현국, 유창순, 김준한. 老化豫防 및 老人保健에 관한 文獻的 考察. *大韓醫療氣功學會誌.* 2000;4(1):244-69.
 33. 李槿. 原本 編註 醫學入門(下). 서울:南山堂; 1985, pp.2064-83.
 34. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울:永林社; 1995, p.3, pp.190-1, 302-3, 531-2, 537-8, 568-9, 580-1, 588-90, 596-7, 622-4.
 35. 이홍민, 서정철, 김용석. 老化의 研究動向에 관한 考察. *대한침구학회지.* 2001;18(1):146-56.
 36. 河在原. 定志丸이 老化에 미치는 影響. *大田大學 校 大學院.* 1996.
 37. Cand F, Verdetti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radical Biol Med.* 1989;7(1):59-63.
 38. Semsei I, Rao G, Richardson A. Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech Ageing Dev.* 1991;58(1):13-9.
 39. Kellogg EW 3rd, Fridovich I. Superoxide dismutase in the rat and mouse as a function of age and longevity. *J Gerontol.* 1976;31(4):405-8.
 40. Sakamoto Y, Kinoshita S. Glutathione. 3. *Scientific.* 1989, p.5.
 41. Watabe T, Ishizuka T, Isobe M, Ozawa N. A 7-hydroxymethyl sulfate ester as an active metabolite of 7,12-dimethylbenzanthracene. *Science.* 1982;215(4531):403-5.
 42. Barry H, John MCG. Free radicals in biology and medicine. Oxford:Clarendon press. 1989, pp.86-123.
 43. 서인교, 김상찬, 이진태, 변준석, 변성희. 白花蛇舌草 抽出物の 抗菌實驗 및 SOD類似活性, 電子供與能에 關한 研究. *大韓韓醫學方劑學會誌.* 2000;8(1):299-318.
 44. 백승규, 김희연, 양승돈, 송창우, 신태균, 한상섭. 손마타 선인장(*Opuntia ficus-indica*) 열매가 노화촉진 마우스(Senescence-accelerated mouse)의 항산화능에 미치는 영향. *한국노화학회지.* 1999;9(1):70-7.
 45. Kreisberg RA, Kasim S. Cholesterol metabolism and aging. *Am J Med.* 1987;82(1B):54-60.