

二精丸이 노화과정에 미치는 영향

현민경, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of Ichungwhan on the Aging Process

Min-Kyung Hyun, Ji-Cheon Jeong

Dept. of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University.

Objectives: It is well known that aging and aging-related diseases are linked to the increased level of oxidative stress caused by reactive oxygen species(ROS) and reactive nitrogen species(RNS). Nonprotein-SH decreases during aging, while substances such as ROS, nitric oxide(NO), peroxynitrite(ONOO⁻), myeloperoxidase(MPO), and dityrosine show a significant increase. This study investigated the effect of Ichungwhan on the aging process by examining its effect on the generation of the above-mentioned substances.

Methods: Four comparison groups of SD rats were used. They were 6 month-old rats, 24 month-old rats, and 24 month-old rats fed with food containing 0.1% and 0.3% of Ichungwhan extract. The amount of NO, ONOO⁻, and ROS in the rats' kidneys were examined using a fluorescence microplate reader. The reagents used for this purpose include: dihydrorhodamine 123 (DHR 123), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, diacetate(DCFDA), and 4,5-diaminofluorescein(DAF-2). A spectrophotometer was used to investigate the reactivity of nonprotein-SH and myeloperoxidase(MPO), using reagents such as trichloroacetic acid(TCA) and tetramethylbenzidine(TMB). The amounts of MPO protein and dityrosine were measured by western blot.

Results: The observed effects of Ichungwhan on rats were as follows: increase of nonprotein-SH; effective decrease of RNS level by suppression of the generation system of ONOO⁻ and NO; decrease of ROS level; decrease of the MPO reactivity and the subsequent reduction of amount of MPO protein; retardation of dityrosine formation. It can be hypothesized, therefore, that Ichungwhan affects both the earlier and later phases of the molecular inflammatory process, and retards the aging process.

Conclusions: Empirical evidence in this study supports a role for Ichungwhan in generation mechanisms of aging-process-linked substances ROS, NO, ONOO⁻, nonprotein-SH, MPO and dityrosine. Affects contrary to the aging process observed in rats beg further empiricism to investigate potential application of Ichungwhan as a medication for age-related diseases in humans.

Key Words: Ichungwhan, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, myeloperoxidase, dityrosine

1. 緒 論

천노화에 따른 인체내 장기 기능의 저하는 생물체 내외의 요인으로부터 초래되는 산화적 스트레스

(oxidative stress)를 견뎌낼 수 있는 능력을 상실하게 하고, 세포내의 항상성을 잃게 한다. 최근의 노화 가설들 중 프리라디칼 가설¹과 산화적 손상 가설², 분자 염증 가설³로 노화현상을 잘 설명할 수 있다. 이들 가설들은 노화 연구 분야 뿐만 아니라, 다른 생물의학 분야의 연구자들로부터 주목을 받고 있다.

노화 및 노인성 질환의 발생 과정에 관여하는 산화적 스트레스의 원인으로는 활성산소종(reactive

· 접수 : 2005. 4. 16. · 채택 : 2005. 5. 23.
· 교신저자 : 현민경, 서울특별시 강남구 논현동 37-21
동국대학교 강남한방병원 내과
(Tel. 02-3416-9791 Fax. 02-3416-9790
E-mail : mk3three@hanmail.net)

oxygen species, ROS)과 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS) 등이 있다¹. RNS는 NO, NO₂, HNO₂, ONOO⁻ 등의 질소화합물들을 총칭하는데, 이 중 nitric oxide(NO)는 항상 일정하게 발현되는 constitutive NO synthase(cNOS)와 어떤 자극에 의해 유도되는 inducible NO synthase(iNOS)에 의해 생성되며, 특히 노화, 노인성 질환, 염증성 질환시에는 iNOS가 현저히 유도되어 과도한 NO가 생성된다는 보고가 많이 있다^{3,5}. 이러한 NO는 노화과정 및 염증, 허혈성 질환, 동맥경화, 암 등과 같은 질환에서 다량 생성되는 ROS의 일종인 superoxide anion radical($\cdot O_2^-$)와 반응하여 산화력이 매우 강한 peroxynitrite radical(ONOO⁻)를 생성한다. ONOO⁻는 염증, 감염 등과 같이 특정한 상태에 대량 생성되어 강한 조직 파괴력으로 조직의 손상을 촉진할 뿐 아니라 지질, 단백질, 그리고 유전자(DNA)의 산화와 니트로화 과정을 통해 세포질 효소 활성을 저해하여 세포사를 유발하므로 노화과정 및 노인성 질환을 발생시키는데 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다^{3,4,6}.

그밖에도 최근에 많은 연구가 되고 있는 노화지표로 Nonprotein-SH와 Myeloperoxidase(MPO)가 있다. 세포내 Sulfhydryl groups(protein or nonprotein)은 만성염증을 줄이는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있고, 특히 Glutathione(GSH), N-acetylcysteine(NAC) 같은 Nonprotein sulfhydryl compounds는 hydrogen peroxide(H₂O₂)를 제거해서 여러 세포에서 우리 몸을 산화적 손상(oxidative damage)로부터 보호한다고 알려져 있다⁷. MPO는 neutrophil에 있는 주요한 단백질로써 monocyte에도 존재한다. MPO는 neutrophil의 azurophilic granule에 존재하면서 외부물질이 우리 몸 속으로 침입했을 때 방출되어 hydrogen peroxide(H₂O₂)와 반응하여 강력한 oxidant인 hypochlorous acid(HOCl) 등을 생성하여 식균작용에 관여하지만, MPO의 과다한 발현과 활성은 인접한 세포들과 조직들의 단백질을 tyrosine을 dityrosine으로 변화시켜 단백질 기능의 변화와 손상을 초래한다⁸.

二精丸은 聖濟總錄⁹에 助氣固精 補填丹田 活血駐顏

長生不老의 효능이 있다고 수록된 이래 肝腎陰虛 精氣虛少 頭暈目眩 早衰 등의 치료에 常用되어 왔다¹⁰. 補脾益氣 潤肺滋陰하는 약재인 黃精(*Polygonati sibirici Rhizoma*)과 滋補肝腎 益精明目 固髓健骨 潤肺補虛하는 枸杞子(*Lycii Fructus*)로 구성되어 補脾腎 健脾 益精氣의 효능을 나타낸다^{10,11}. 실험 연구에 의하면 二精丸은 세포배양계에서 ONOO⁻와 그 전구체인 NO, $\cdot O_2^-$ 의 생성을 억제하고 단백질 속의 tyrosine이 nitration되어 nitrotyrosine됨으로써 단백질의 기능변성이 되는 것을 억제하였으므로 노화를 억제할 가능성이 있는 처방일 것으로 시사되었다¹². 또한, 枸杞子は 활성산소를 제거하고 지질과산화물을 억제하며 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase의 활성을 증가시키는 강한 항산화 작용을 내어 노화 지연작용이 있는 것으로 보고되어 있다¹³.

한편 腎陰의 虛弱은 동양의학에서 老化의 주요 원인으로 작용하고, 黃精과 枸杞子は 久服輕身不老의 효능이 있어 延年益壽 약물에 속한다¹¹.

본 연구에서는 二精丸이 노화 과정에서 감소하는 Nonprotein-SH와 현저히 증가하는 ROS, NO, ONOO⁻, MPO 및 dityrosine 생성에 대해 미치는 영향을 검토하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

二精丸의 구성 약재인 黃精과 枸杞子を 동국대학교 부속 한방병원에서 購入한 후 精選하여 使用하였다.

2) 시약

2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFDA)와 dihydrorhodamine 123(DHR 123)는 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)에서, 4,5-diaminofluorescein(DAF-2)는 Dai ichi Pure Chemical Co.(Tokyo, Japan)에서, sodium nitroprusside, trichloroacetic acid(TCA), Sulfanic acid ammonium, Sulfanilamide, N-1-naphthylene, NaNO₂, H₂SO₄, HgCl₂, tetrame-

thylbenzidine(TMB), sodium acetate, H_2O_2 는 Sigma Aldrich(USA) 구입하여 사용하였다.

3) 동물

6개월령 및 24개월령의 Sprague-Dawley(SD) 수컷 흰쥐를 샘타코(경기도 오산, 한국)에서 구입하여 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 실험환경에 적응시킨 다음 실험에 착수하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

二精丸을 구성하는 黄精과 枸杞子를 각 100g씩, 200g을 잘게 분쇄하고 3배 량의 95% methanol을 가하여 60℃에서 중탕으로 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 얻었다. 추출액을 실온으로 냉각시킨 후 여지로 여과한 여액을 회전 감압농축기를 사용하여 건조시켜 14%의 추출물을 얻어 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2) ROS 측정법

DCFDA assay¹⁴로 ROS를 측정하였다. 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600U/ml esterase를 -20℃에서 원액(stock solution)으로 저장하였으며, 실험시 10 μ M DCFDA와 6U/ml esterase를 혼합하여 조제된 2',7'-dichlorodihydrofluorescein(DCFH) 용액을 22℃에서 20분간 배양한 후에 사용하기 전까지 어두운 곳에서 냉동보관하였다. 지용성의 DCFDA가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 ROS에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)이 되므로, Microplate Fluorescence Genios(Tecan, Austria)를 이용하여 여기파장(excitation wavelength) 485nm 및 방출파장(emission wavelength) 530nm에서 측정하였다. 이때 총활성산소 제거능 검토시 6개월령 및 24개월령의 흰쥐와 二精丸 추출물이 0.1%, 0.3% 함유된 식이를 투여한 24개월령의 흰쥐의 신장조직을 분리하고 균질화하여 postmitochondria 분획을 사용하였다.

3) NO 측정법

특이적인 NO의 indicator인 4,5-diamino fluorescein(DAF-2)는 자신의 2개의 아미노기 사이에 NO를 포집하여, 490~495nm의 여기파장에서 녹색의 형광을 방출하는 triazolofluorescein을 만든다. Dimethyl sulfoxide 550 μ 에 DAF-21mg이 녹아 있는 것을 50mM phosphate buffer(pH 7.4)로 1:400배로 희석하였다. 6개월령 및 24개월령의 흰쥐와 二精丸 추출물이 0.1%, 0.3% 함유된 식이를 투여한 24개월령의 흰쥐의 신장 조직을 균질화하여, NO 제공 물질인 sodium nitroprusside(f.c. 2mM) 및 DAF-2(f.c. 3.14 μ M)를 함께 96 well plate에서 반응시켰다. 형광의 세기는 DAF-2에 의해 포집된 NO의 양에 의존한다. DAF-2와 NO의 반응에 의해 방출되는 형광은 10분 후 Microplate Fluorescence Genios(Tecan, Austria)를 이용하여 여기파장 485nm와 방출파장 530nm에서 측정하였다¹⁵.

4) ONOO⁻ 측정법

Kooy 등의 방법¹⁶에 의해 ONOO⁻ 제거능을 측정하였다. 6개월령 및 24개월령의 흰쥐와 二精丸 추출물이 0.1%, 0.3% 함유된 식이를 투여한 24개월령의 흰쥐의 신장 조직을 균질화하고, DHR 123을 처리한 후 Microplate Fluorescence Genios(Tecan, Austria)를 이용하여 여기파장 500nm와 방출파장 536nm에서 형광을 측정하여 ONOO⁻ 제거능을 측정하였다.

5) Nonprotein-SH 측정법

6개월령 및 24개월령의 흰쥐와 二精丸 추출물이 0.1%, 0.3% 함유된 식이를 투여한 24개월령의 흰쥐의 신장 조직을 균질화하여 10% trichloroacetic acid (TCA)와 혼합한 후에 원심분리 후 상층액에 0.01 M $NaNO_2$ 와 0.2 M H_2SO_4 를 넣고 방치 후 0.5% Sulfanic acid ammonium, 1% $HgCl_2$, 3.4% Sulfanilamide와 0.1% N-1-naphthylene을 넣은 후 발색되면 Genios TECAN Spectrophotometer(Tecan, Austria)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Myeloperoxidase(MPO) 활성 측정법

MPO/ H_2O_2 system에 의해 tetramethylbenzidine (TMB)의 산화정도를 측정한다. 6개월령 및 24개월

령의 흰쥐와 二精丸 추출물이 0.1%, 0.3% 함유된 식이를 투여한 24개월령의 흰쥐의 신장 조직을 균질화하여 reacting reagent(15mM TMB, 100mM sodium acetate, 60mM H₂O₂)를 첨가하고 30분간 Genios TECAN Spectrophotometer(Tecan, Austria)로 650nm에서 측정한다. 결과는 mU/mg, protein으로 나타나고, 활성 one unit은 1분간 H₂O₂ 1umol을 이용하는 효소의 양으로 정의한다. 이 실험 방법에서 MPO 1mU은 650 nm에서 1분당 0.0114의 흡광도 변화를 나타낸다.

7) Myeloperoxidase(MPO) 단백질 발현량 측정법
6개월령 및 24개월령의 흰쥐와 二精丸 추출물이 0.1%, 0.3% 함유된 식이를 투여한 24개월령의 흰쥐의 신장 조직을 균질화하여 MPO 단백질 발현량을 측정하였다. sample 70μg을 30% acrylamide gel에 전기영동(western blot)하여 anti-MPO를 이용하여 단백질이 발현된 정도를 검사하였다.

8) Dityrosine 측정법

6개월령 및 24개월령의 흰쥐와 二精丸 추출물이 0.1%, 0.3% 함유된 식이를 투여한 24개월령의 흰쥐의 신장 조직을 균질화 한 sample 70μg을 acrylamide gel에 전기영동하여 anti-dityrosine을 이용하여 단백질 내의 tyrosine이 dityrosine화된 정도를 검사하였다.

9) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

III. 成 績

1. ROS에 미치는 영향

ROS는 6개월령 흰쥐군에서 34.11±0.4F/min였으나 24개월령의 흰쥐군에서는 37.42±0.71F/min로 증가된 것으로 나타났다. 24개월령 흰쥐에 二精丸 추출물이 0.1% 함유된 식이를 10일간 투여한 군은 21.33±1.75F/min, 0.3% 함유된 식이를 투여한 군은 25±1.2F/min로 감소하여, ROS가 농도 비의존적으로 감소되는 경향을 보였다(Fig. 1).

2. NO에 미치는 영향

NO는 6개월령 흰쥐군에서 23.21±1.2F/min였으나 24개월령의 흰쥐군에서는 51.68±3.6 F/min로 증가된 것으로 나타났다. 24개월령 흰쥐에 二精丸 추출물이 0.1% 함유된 식이를 10일간 투여한 군은 34.21±3.1F/min, 0.3% 함유된 식이를 투여한 군은 28.6±1.6F/min로 감소하여, 0.1%, 0.3% 함유된 식이를

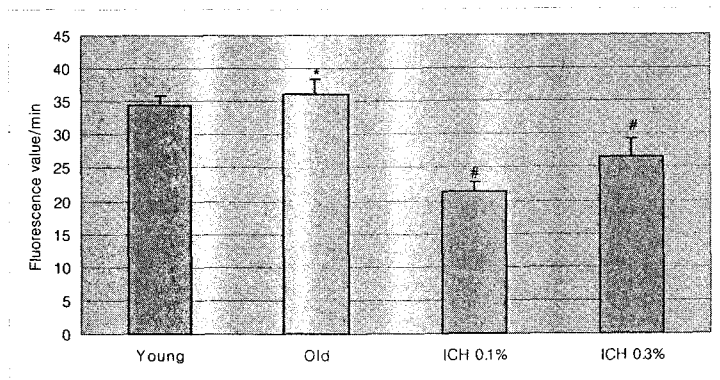


Fig. 1. Inhibition effects of Ichungwhan on ROS generation in aged SD rats.

The rats were administrated extracts of Ichungwhan for 10 days. The Kidney was isolated, homogenized, and analyzed. The levels of ROS were determined by fluorometric assay with DCFDA. Each value is the mean±S.E. of 5 rats. Young: 6 months, Old: 24 months. Ichungwhan(ICH): Ichungwhan treated-rat(24 months). Statistical significance:

*p<0.05 vs. Young, #p<0.05 vs Old.

투여한 군에서 NO가 유의성 있게 감소되는 경향을 보였다(Fig. 2).

3. ONOO⁻에 미치는 영향

ONOO⁻는 6개월령 흰쥐군에서 52.12±0.9F/min였으나 24개월령의 흰쥐군에서는 76.23±2.3F/min로 증가된 것으로 나타났다. 24개월령 흰쥐에 二精丸 추출물이 0.1% 함유된 식이를 10일간 투여한 군은 68.32±8.1F/min, 0.3% 함유된 식이를 투여한 군은

55.36±3.1F/min로 감소하여, 0.3% 함유된 식이를 투여한 군에서 ONOO⁻가 유의성 있게 감소되는 경향을 보였다(Fig. 3).

4. Nonprotein-SH 유도 효과

Nonprotein-SH는 6개월령 흰쥐군에서 68.41±2.3 μM/mg였으나 24개월령의 흰쥐군에서는 57.78±6.1 μM/mg로 감소된 것으로 나타났다. 24개월령 흰쥐에 二精丸 추출물이 0.1% 함유된 식이를 10일간 투여한

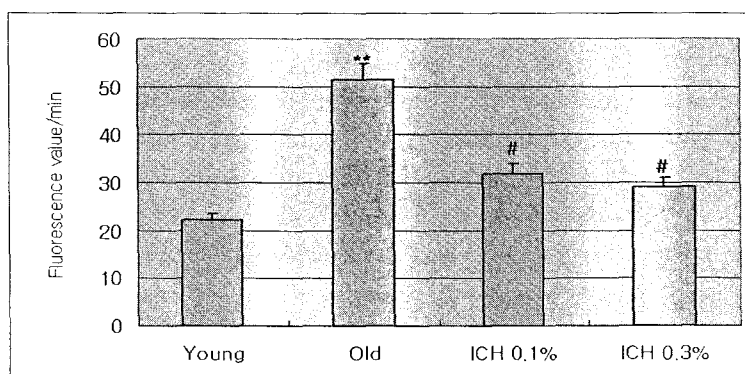


Fig. 2. Inhibition effects of Ichungwhan on NO generation in aged SD rats.

The rats were administrated extracts of Ichungwhan for 10 days. The Kideny was isolated, homogenized, and analyzed. The levels of ·NO were determined by DAF-2DA. Each value is the mean±S.E. of 5 rats. Young: 6 months, Old: 24 months. Ichungwhan(ICH): Ichungwhan treated-rat(24 months). Statistical significance:

**p<0.01 vs Young, #p<0.05 vs Old.

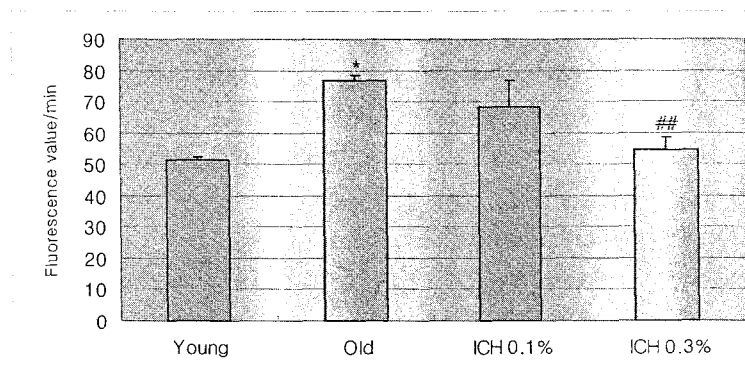


Fig. 3. Inhibition effects of Ichungwhan on ONOO⁻ generation in aged SD rats.

The rats were administrated extracts of Ichungwhan for 10 days. The Kideny was isolated, homogenized, and analyzed. The levels of ONOO⁻ were determined by DHR 123. Each value is the mean±S.E. of 5 rats. Young: 6 months, Old: 24 months. Ichungwhan(ICH): Ichungwhan treated-rat(24 months). Statistical significance:

*p<0.05, vs. Young; ##p<0.01 vs Old.

군은 $101 \pm 8.1 \mu\text{M}/\text{mg}$, 0.3% 함유된 식이를 투여한 군은 $99.79 \pm 5.8 \mu\text{M}/\text{mg}$ 로 증가하여, 二精丸을 투여한 군에서 Nonprotein-SH가 유의성 있게 증가되는 경향을 보였다(Fig. 4.).

5. MPO 활성에 미치는 영향

MPO는 6개월령 흰쥐군에서 $0.27 \pm 0.01 \text{mU}/\text{min}/\text{mg}$ 였으나 24개월령의 흰쥐군에서는 $0.34 \pm 0.3 \text{mU}/\text{min}/\text{mg}$ 로 약 20% 증가된 것으로 나타났다. 24개월령

흰쥐에 二精丸 추출물이 0.1% 함유된 식이를 10일간 투여한 군은 $0.18 \pm 0.06 \text{mU}/\text{min}/\text{mg}$ 로 30% 감소되었고, 0.3% 함유된 식이를 투여한 군은 $0.16 \pm 0.03 \text{mU}/\text{min}/\text{mg}$ 로 35% 감소되어, 0.1%, 0.3% 함유된 식이를 투여한 군에서 MPO가 유의성 있게 감소되는 경향을 보였다(Fig. 5.).

6. MPO 단백질 발현에 미치는 영향

MPO 단백질 양은 6개월령 흰쥐군에 비해 24개월

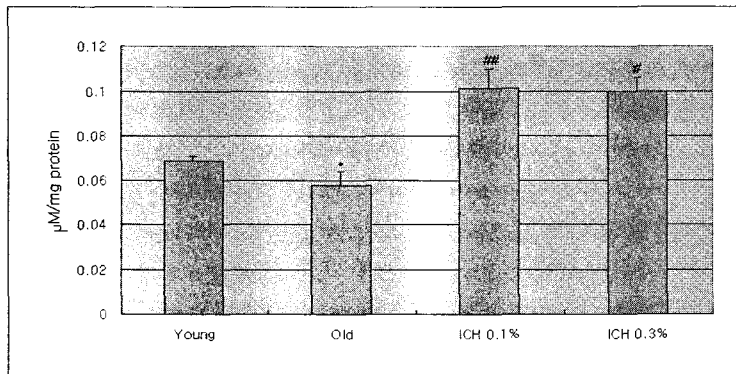


Fig. 4. The Effects of Nonprotein-SH by Ichungwhan in aged SD rats.

The rats were administrated extracts of Ichungwhan for 10 days. The Kideny was isolated, homogenized, and analyzed. Each value is the mean±S.E. of 5 rats. Young: 6 months, Old: 24 months. Ichungwhan(ICH): Ichungwhan treated-rat(24 months). Statistical significance: * $p < 0.05$ vs Young, # $p < 0.05$ vs Old, ## $p < 0.01$ vs Old.

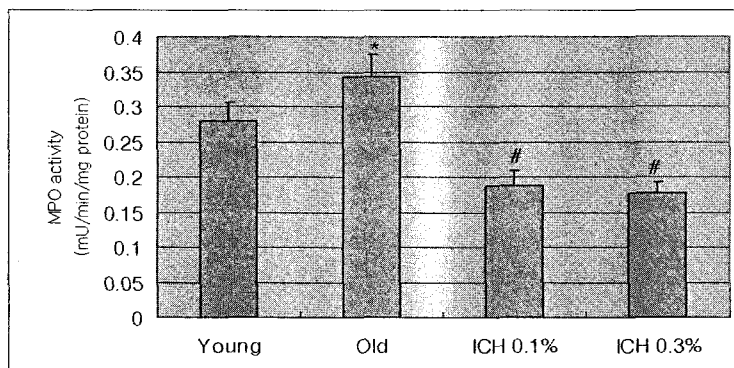


Fig. 5. Inhibition effects of Ichungwhan on Myeloperoxidase activity in aged SD rats.

The rats were administrated extracts of Ichungwhan for 10 days. The Kideny was isolated, homogenized, and analyzed. The activity of MPO were determined by tetramethylbenzidine. Each value is the mean±S.E. of 5 rats. Young: 6 months, Old: 24 months. Ichungwhan(ICH) : Ichungwhan treated-rat(24 months).

Statistical significance: * $p < 0.05$ vs Young, # $p < 0.05$ vs Old.

령의 흰쥐군에서 약 20% 증가하였다. 24개월령 흰쥐에 二精丸 추출물이 0.1%, 0.3% 함유된 식이를 10일간 투여한 군에서는 농도의존적으로 억제되었고, 0.3% 함유된 식이를 투여한 군에서 유의성 있게 억제되는 경향을 보였다(Fig. 6).

7. dityrosine 생성 효과

dityrosine 생성은 6개월령 흰쥐군에 비해 24개월령의 흰쥐군에서 증가하였다. 24개월령 흰쥐에 二精丸 추출물이 0.1%, 0.3% 함유된 식이를 10일간 투여한 군에서는 유의성 있게 억제되는 경향을 보였다(Fig. 7).

IV. 考 察

二精丸은 肝臟과 腎臟의 陰氣가 부족하여 발생하는 精氣虛少 精神萎靡 頭暈 目眩 早衰 등의 치료에 활용되는 方劑이다^{10,11}. 處方을 구성하는 黃精과 枸杞子는 모두 補陰 藥물로서 黃精은 補脾益氣 潤肺 滋陰하여 주로 脾에 들어가 後天을 돕고 枸杞子는 滋腎養肝 補精氣하여 腎에 들어가 先天을 補하므로 先天後天, 陰陽을 兼顧하는 妙를 가지게 된다. 諸虛 勞損 年老體弱 精氣兩衰의 證에 비교적 安만한 調 補作用을 나타낸다^{11,17}. 腎臟의 陰氣는 一身의 陰液의 根本으로서 濡潤과 滋養作用을 하며 腎陽과 더불어 生長發育과 生殖을 주관한다¹⁸. 內經 素問¹⁹에

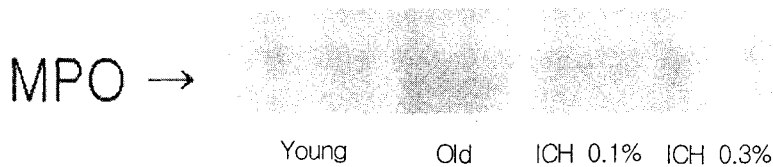


Fig. 6. Inhibition effects of Ichungwhan on Myeloperoxidase level in aged SD rats.

Western blot analysis was performed to detect myeloperoxidase protein levels in kidney rats. One representative blot of each protein is shown from three experiments that yielded similar results, respectively.

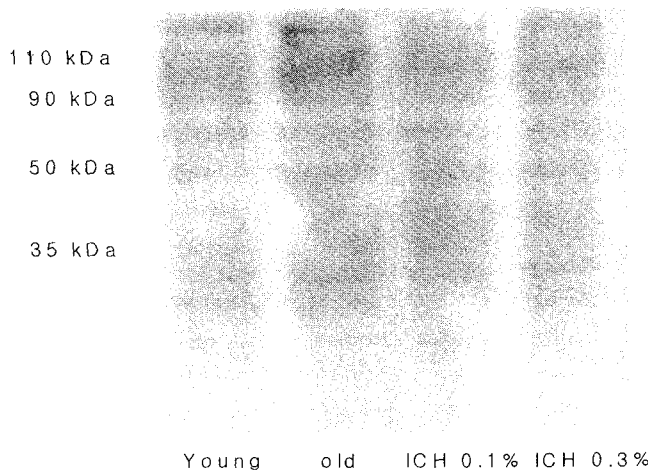


Fig. 7. Inhibition effects of Ichungwhan on Dityrosine Formation level in aged SD rats.

Western blot analysis was performed to detect dityrosine formation in kidney rats. One representative blot of each protein is shown from three experiments that yielded similar results, respectively.

‘天壽過度 氣脈常通而腎氣有餘也’, 庚²⁰가 ‘腎元盛則壽延 腎元衰則壽夭’라고 하여 長壽하는 것은 腎氣의 盛衰與否에 依하여 決定된다고 하였으나 腎氣虛衰는 老化的 重要 原因이다²¹.

실험연구에 의하면 黃精은 streptozotocin(STZ)으로 당뇨병을 유발시켜 발기부전 모델을 만든 흰쥐의 음경해면체내의 NOS 활성과 nitrite, 과산화지질 및 glutathione 함량을 정상 수준으로 조절하였다²². 枸杞子는 tetrachlorocarbon(CCl₄)로 지방간 및 간손상을 유도한 mouse에서 간장내 인지질과 콜레스테롤 함량을 개선시켜 지방간 및 간손상을 억제하고²³, 간장의 지질 및 체지방의 증가와 지방세포의 증식 및 분화를 억제하고²⁴, mouse의 세포성 및 체액성 면역 반응을 증강시키고²⁵, 혈압 강화 작용이 있으며²⁶, 實驗動物의 壽命을 延長시키는 效果가 있다²⁷.

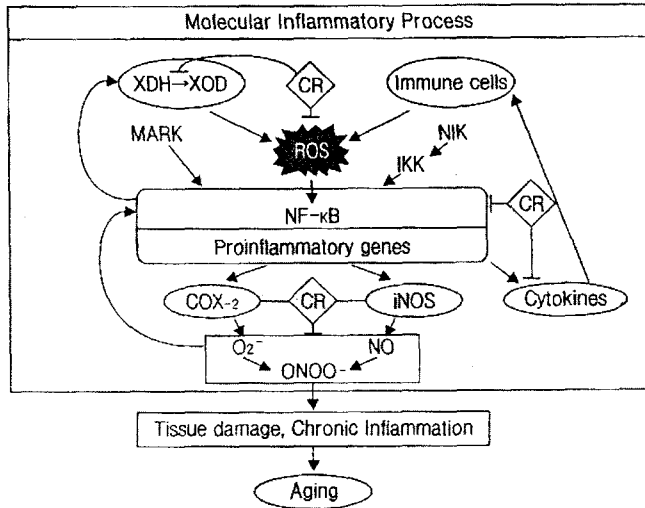
또한, 黃精에는 convallamarin, convallarin, azetidine-2-carboxylic acid 등과 더불어 flavonoids인 kaempferol-glycoside, quercitrin-glycoside 등이 함유되어 있으며, 枸杞子에는 carotenoid, zeaxanthine, physaligen, betaine, β-sitosterol, cinnamic acid, diterpene sugiol, kukoamine A, rutin 등이 함유되어 있다²⁸. 실제 Polyphenol의 화합물인 flavonoid 및 carotenoid 물질들은 ROS와 ONOO⁻를 효과적으로 제거한다는 많은 보고가 있는데²⁹, flavonoid는 low density lipoprotein(LDL) 산화를 방지하고 만성 심장 질환의 발병률을 저하시키므로 이의 섭취가 노인성 질환 발병률과 역의 상관관계가 있다고 할 수 있다³⁰. 즉, 이는 黃精에 함유된 kaempferol 및 quercitrin과 枸杞子에 함유된 carotenoid 및 rutin 등이 ROS와 ONOO⁻ 제거 활성에 주로 관여해서, 二精丸이 노화 방지 및 노인성 질환 예방과 밀접한 관계가 있음을 시사한다.

Macrophage나 neutrophil 등과 같은 면역 세포들에서 다량으로 생성되는 ROS와 RNS들은 감염이나 염증 반응에서 이물질을 제거하는데 중요한 역할을 한다. 또한 그들은 면역계를 활성화시키는데 중요한 역할을 하지만, 과다한 양이 장기간 지속적으로 생성되어 축적되면 세포구성 성분의 손상을 초래하게

된다. 예를 들면, neutrophil, monocyte, eosinophils, macrophage와 같은 세포들에서, NADPH를 사용하여 산소를 O₂⁻로 환원시키는 과정에서 촉매로 작용하는 NADPH oxidase의 과다한 O₂⁻ 생성은 염증 반응에 의해 일어나는 조직 손상의 주요원인이 된다¹⁵. 특히 노화된 생물에서 생리적 조절이 손상되어 발생하는 염증 반응은 염증 촉진 단계(proinflammatory state)가 지속적으로 반복되어 일어나는 만성적인 것을 의미한다. 노화 과정의 주요한 원인인 염증반응과 이와 관련된 염증촉진 과정을 검토한 연구에서, 이러한 염증반응에서는 ROS와 RNS 자체뿐만 아니라, cyclooxygenase-2(COX-2), iNOS, xanthine oxidase(XOD), NADPH oxidase와 같은 활성종을 생성하는 효소들이 중요한 역할을 담당하고 있다고 보고하였다³⁻⁵. 최근에는 노화기전과 이들과 관련된 노인성 질환들을 분자수준에서 규명하고자 노화에 대한 분자 염증 가설(Molecular Inflammatory Hypothesis, Chung, 2000)이 제안되었다(Scheme 1)⁶. 이 가설에서는 기존의 염증 증세에서 나타나는 염증반응과 구별하여 분자수준에서의 염증 초기단계를 분자염증이라고 정의하고, 이의 노화과정에서의 역할을 규명하였다. 특히 분자염증은 만성적 염증을 가져오는 전조 단계이므로 그 분자 기전과 변화가 중요하다.

본 연구에서 저자들은 24개월령 흰쥐에 二精丸 추출물이 0.1%, 0.3% 함유된 식이를 투여하고 ROS, NO, ONOO⁻ 및 Nonprotein-SH의 생성량, 그리고 MPO 활성과 MPO 단백질 양, dityrosine의 생성을 관찰하였다.

ROS 생성은 6개월령 흰쥐에 비하여 24개월령 흰쥐에서 증가되었으나 二精丸 추출물이 함유된 식이의 투여에 의해 감소되었다. Nonprotein-SH는 6개월령 흰쥐에 비하여 24개월령 흰쥐에서 감소되었으나 二精丸 추출물이 함유된 식이의 투여에 의해 증가되었다. NO, ONOO⁻, MPO 활성, MPO 단백질 양 및 dityrosine 생성은 6개월령 흰쥐에 비하여 24개월령 흰쥐에서 현저하게 증가되었으나 二精丸 추출물이 함유된 식이를 10일간 투여한 경우에 유의성



Scheme 1. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of CR. XDH, xanthine dehydrogenase; XOD, xanthine oxidase; ROS, reactive oxygen species; COX-2, cyclooxygenase-2; iNOS, inducible NO synthase; ONOO⁻, peroxynitrite; CR, calorie restriction.

있게 감소되었다. MPO는 염증 또는 노화과정에서 증가되는 polymorphonuclear leukocyte(PMN)을 측정하는 지표로써 사용되는데, 二精丸이 MPO 활성을 감소시켜 MPO 단백질 발현량을 억제함으로써 MPO/H₂O₂ system에서 생성될 수 있는 HOCl 등 다양한 oxidant의 생성을 저해시킬 것으로 판단된다. 이 결과를 확인하기 위해 ROS에 의한 단백질 산화(protein oxidation)의 지표인 dityrosine의 생성을 확인하였더니, MPO 활성과 MPO protein 양에 비례적으로 dityrosine 생성 역시 증가하는 경향을 보였고, 二精丸 추출물이 이를 억제 시켜주는 것으로 나타났다.

그래서 二精丸의 노화조절 효과가 유의적이라고 말할 수 있으며, ROS의 억제는 농도 비의존적이었지만 NO, ONOO⁻, MPO 활성 감소는 고농도인 0.3%에서 유의성이 있었으므로, 二精丸이 분자염증과정(Molecular inflammatory Process)의 상위단계와 하위단계 모두에서 작용할 것으로 사료된다. 이로서 二精丸은 노화 과정 및 노인성 질환을 조절하는데 유효한 약제가 될 가능성을 시사해 준다.

V. 結 論

二精丸의 노화 조절 효과를 검토하기 위하여 노화 과정에서 감소하는 Nonprotein-SH와 현저히 증가하는 ROS, NO, ONOO⁻, MPO 및 dityrosine 생성에 미치는 영향을 6개월령 및 24개월령 흰쥐의 신장조직에서 비교 관찰하였다.

ROS 생성은 6개월령 흰쥐에 비하여 24개월령 흰쥐에서 증가되었으나 二精丸추출물이 함유된 식이 투여에 의해 유의하게 감소되었다. NO, ONOO⁻, MPO 활성, MPO 단백질 양 및 ROS에 의한 단백질 손상의 주요 지표인 dityrosine 생성은 6개월령 흰쥐에 비하여 24개월령 흰쥐에서 현저하게 증가되었으나 二精丸추출물이 함유된 식이 투여에 의해 감소되었다. Nonprotein-SH는 6개월령 흰쥐에 비하여 24개월령 흰쥐에서 감소되었으나 二精丸추출물이 함유된 식이 투여에 의해 증가되었다.

이상의 결과로 二精丸은 ROS, NO, ONOO⁻, Nonprotein-SH, MPO 및 dityrosine 등의 노화지표의 생성에 영향을 미쳐 노화 조절 효과가 있으므로 노화 과정 및 노인성 질환을 조절하는 약물로 작용할 가능성이 시사되었다.

參 考 文 獻

1. Harman D. Free radical theory of aging: nutritional implications. *Age*. 1978;1:143-50.
2. Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic. Biol. Med.* 1996;21:651-68.
3. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Chio JS and Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Micro. Res. Techniq.* 2002; 59:264-72.
4. Chung HY, Kim HJ, Jung KJ, Yoon JS, Yoo MA, Kim KW, Yu BP. The inflammatory process in aging. *Rev. Clin. Gerontol.* 2000;10: 207-22.
5. Carr AC. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20:1716-23.
6. Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP. The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001;928:327-35.
7. Santangelo F., Intracellular thiol concentration modulating inflammatory response: influence on the regulation of cell functions through cysteine prodrug approach., *Curr Med Chem.* 2003;10: 2599-610.
8. Ernst M, Thomas B, Hermann JG. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney International.* 2003;64:1956-67.
9. 趙 佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社; 2002, p.2263.
10. 王毅, 靳長金 朱君波 編著. 益壽效方 120. 北京: 中國醫藥科技出版社;1989, p.31-2.
11. 王其飛 外. 中醫長壽學. 遼寧:遼寧科學技術出版社;1989, p.53-4, 327-9, 331-4.
12. 남원기, 정지천. 二精丸의 Peroxynitrite 제거 기전. *대한한방성인병학회지.* 2003;9(1):1-10.
13. Kim HP, Lee EJ, Kim YC, Kim J, Kim HK, Park JH, Kim SY, Kim YC. Zeaxanthin dipalmitate from Lycium chinense fruit reduces experimentally induced hepatic fibrosis in rats. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:390-2.
14. Cathcart R, Schwiers E, Ames BN. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal. Biochem.* 1983;134:111-6.
15. Nagata N, Momose K, Ishida Y. Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J. Biochem. Tokyo.* 1999;125:658-61.
16. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free. Radic. Res. Commun.* 1994;16:149-56.
17. 陳維華, 徐國龍, 張明淮, 蔡永亮. 藥對論. 서울: 一中社;1996, p.301.
18. 金完熙, 崔達永 編著. 臟腑辨證論治. 서울: 成輔社;1985, p.282-4.
19. 南京中醫學院醫經教研組. 黃帝內經素問譯釋. 上海: 上海科學技術出版社;1983, p.4-5.
20. 虞 搏. 醫學正傳. 서울:成輔社;1986, p.9.
21. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京:人民衛生出版社; 1983, p.998-1000.
22. 이상헌, 신현철, 정지천. 黃精 抽出物이 SD rat 의 음경해면체 조직에서 nitric oxide synthase 활성 및 Nitrite 함량에 미치는 영향. *한방성인 병학회지.* 1999;5(1):163-75.
23. 江蘇新醫學院編. 中藥大辭典. 上海:上海科學技術出版社;1983, p.501-3, 1964-6.
24. 김남수, 송용선. 枸杞子抽出液이 白鼠이 肥滿模型에 미치는 影響. *한방재활의학회지.* 1997;7 (2):65-83.

25. 김영희, 이병렬. 枸杞子分劃藥鍼이 마우스의 免疫機能에 미치는 影響. 대한침구학회지. 1996; 13(2):67-86.
26. 이호섭, 류도곤, 윤용갑, 유윤조. 枸杞子煎湯液이 實驗的 腎性 高血壓 白鼠의 血壓과 血漿 Renin 活性度 및 ANP 濃도에 미치는 影響. 대한한의 학회지 1996;17(1):37-47.
27. 劉小英. 枸杞의 抗衰藥理研究與臨床應用概述, 四川中醫, 1993;7:18-9.
28. 채영복, 김완주, 지옥표, 안미자, 노연주. 한국유 용식물자원 연구총괄. 대전. 화학연구소. 1988, 576-8.
29. Choi JS, Chung HY, Kang SS, Jung MJ, Kim JW, No JK and Jung HA. The Structure-Activity Relationship of Flavonoids as Scavengers of Peroxynitrite. *Phytother. Res.* 2002;16:232-5.
30. Neumann HA, Carlsson K and Brom GH. Uptake and localization of O-(beta-hydroxyethyl)-rutosides in the venous wall measured by laser scanning microscopy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1992;43:423-6.