

加味小建中湯이 D-galactose로 老化를 誘發시킨 白鼠의 抗酸化能에 미치는 影響

朴宣映, 徐廷旻, 白政翰

대구한의대학교 한의과대학 소아과학교실

Effect of *Gamisogunjung-tang* on Antioxidation Activity in Rats Induced Aging by D-Galactose

Park Sun Young, Seo Jung Min, Baek Jung Han

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Objective : This experiment has been done to evaluate the effects of *Gamisogunjung-tang*(GST) on antioxidant capability and lipidic concentration in blood which are presumed to be related to aging.

Methods : In this study, we divided 14 weeks old SD rats into normal group, control group and GST group. Control and GST group were induced aging by D-galactose. At the same time GST group were administered extract of *Gamisogunjung-tang* for 6 weeks. After then we took blood, and measured the activities of SOD, GSH-px, catalase in erythrocytes and measured TBARS values, concentrations of total lipid, tryglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol in plasma.

Results : The activities of SOD, GSH-px, catalase in erythrocytes increased significantly in GST group compared with control group. The value of TBARS and the concentration of total lipid, total cholesterol in plasma decreased significantly in GST group compared with control group. The concentration of HDL-cholesterol increased significantly in GST group compared with control group. The concentration of triglyceride were not noticeable.

Conclusions : it is considered that *Gamisogunjung-tang* has an influence on control aging by activation the antioxidative enzyme systems in erythrocytes and decreasing the concentration of lipid in blood plasma.

Key words : *Gamisogunjung-tang*, aging, anti-oxidation, thiobarbituric acid reactive substance(TBARS), superoxide dismutase(SOD).

접 수 : 2005년 6월 27일, 채택일자: 2005년 8월 13일

교신저자 : 서정민, 경북 구미시 송정동 458-7 대구한의대학교 구미한방병원 소아과
(Tel. 054-450-7795, E-mail: sjmestel@hanmail.net)

I. 緒 論

노화란 시간 경과에 따른 연속적 현상으로, 일정한 외부 환경에 대한 적응력의 점진적 소실로 인해 생명력이 감퇴되어가는 자연적인 과정이다. 백발의 출현이나 피부의 주름, 그리고 동맥경화는 노화과정에 나타나는 대표적인 현상이다¹⁾.

노화의 원인과 그 기전을 밝히려는 많은 가설들이 있으나, 그 중에서도 Harman²⁾에 의해 제안된 'Free Radical Theory of Aging'이 가장 널리 인정되고 있는 가설 중의 하나이다. 이는 생체내의 대사과정 중에 발생하는 free radical에 의해 세포 노화가 초래되며³⁾, 또한 체내에는 항산화 효소계 및 다양한 항산화제가 존재하여 free radical의 생성을 억제하고 조절한다는 것이다.

한의학에서는 노화의 원인을 陰陽의 不調和, 形身衰弱, 氣血 및 腎氣衰弱 등으로 설명하고 있으며⁴⁾, 크게는 先天 稟賦不足과 後天 攝生失調로 나누어 보고 있다. 이러한 관점에서 노화의 치료원칙 또한 첫째는 陰精, 즉 先天之精을 保存하는 것이고, 둘째는 脾胃 後天之氣를 補益하는 것이라 하였다⁵⁾.

지금까지 국내 한의학계에서 이루어진 항노화 연구들은 處方의 선택에 있어 六味地黃湯^{6,7)}, 補腎丸⁸⁾, 玄菟固本丸⁹⁾, 斑龍丸¹⁰⁾, 延齡固本丹¹¹⁾ 등 先天之精을 保存하는 補腎의 관점에서 이루어진 것이 많았고, 後天之氣의 補益이라는 관점에서 補脾益氣와 노화를 다룬 연구는 많지 않았다.

小建中湯은 《東醫寶鑑·虛勞門》의 虛勞 通治方 중 하나로, 膠飴와 芍藥이 君劑가 되어 虛勞, 裏急, 腹痛, 夢寐失精, 四肢痠疼, 手足煩熱, 咽乾口燥를 다스리는 처방이다¹²⁾.

이러한 小建中湯에 虛勞門 單方에 소개된 36가지 藥味 중 黃芪, 當歸, 鹿茸의 세가지를 더하여 加味小建中湯이라고 명명하였다. 본 연구에서는 加味小建中湯의 항산화 효능을 실험적으로 규명하고자 흰쥐에게 D-galactose로 노화를 유발시키면서 加味小建中湯 추출물을 투여한 후, 혈장 중의 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 함량 및 총지방, 중성지방, 총cholesterol, HDL-cholesterol 농도를 측정하고 적혈구의 항산화효소계인 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase, catalase의 활성도를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 動物 및 材料

1) 動物

12주된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 구입하여 2주일간 일정한 실험실 환경(24±2°C, 40-60%, 주야 12시간 교대 150-300 Lux)에서 고형배합사료(서울, 삼양사)로 적응시켰다. 실험동물은 한 마리씩 분리하여 stainless steel cage에서 사육하였고, 사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 적응기간 후 체중이 400±20g인 쥐들을 실험에 사용하였다.

2) 材料

본 實驗에서 사용된 藥材는 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약재과에서 구입한 것을 정선하여 使用하였으며 處方은 《東醫寶鑑》¹²⁾에 수록된 小建中湯에 黃芪, 當歸, 鹿

茸을 加한 것으로 處方內容과 한 貼의 用量은 다음과 같다.

Composition of Gamisogunjung-tang

Herb	Scientific name	dose(g)
飴糖	<i>Saccharum Granorum</i>	40.0
白芍藥	<i>Radix Paeoniae Lactiflorae</i>	20.0
大棗	<i>Fructus Zizyphi Jujubae</i>	20.0
桂枝	<i>Ramulus Cinnamomi</i>	12.0
生薑	<i>Rhizoma Zingiberis</i>	10.0
甘草	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	4.0
黃芪	<i>Radix Astragali</i>	4.0
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4.0
鹿茸	<i>Cervi Pantotrichum Cornu</i>	4.0
總量		118.0

2. 實驗方法

1) 實驗群의 區分

14주령의 SD계 흰쥐를 체중별로 고르게 분포시켜 무처치군(Normal group, 정상군)과 D-galactose 투여군(Control group, 대조군), 加味小建中湯 투여군(GST group, 실험군)으로 나누어 각 군에 6마리씩 배정하였다.

정상군은 어떤 처치도 하지 않고 고형사료와 물만을 6주간 충분히 공급하였다. 대조군은 D-galactose를 6주간 피하주사하여 노화를 유발하였다. 실험군은 D-galactose를 6주간 피하주사함과 동시에 加味小建中湯 추출물 200.0mg/200g을 경구 투여하였다.

2) 老化 誘發

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

3) 檢液의 調劑

加味小建中湯 5貼 분량인 590.0g을 5,000cc의 등근 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 한 시간 방치한 후 freezer dryer(EYELA, Japan)로 24시간 동안 동결 건조하여 加味小建中湯 엑기스 96.0g(수율 : 16.27%)를 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

加味小建中湯 추출물은 200.0mg/200g의 비율로 檢液을 증류수로 희석하여 실험군 흰쥐에 1일 1회(오후 2-3시) 6주간 경구 투여하였다.

5) 血液의 採取

실험기간이 종료된 실험동물은 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 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

지방 수준을 측정하기 위해 -80°C deep freezer(SANYO, Japan)에 보관하였다.

아래층의 적혈구는 ice cold saline을 첨가하여 2,800rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하는 세척과정을 세 차례 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 측정하기 전까지 -80°C deep freezer에 보관하였다.

6) 血漿의 thiobarbituric acid reactive substance 含量 測定

Yagi¹³⁾의 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 상층액을 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°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 luminance 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°C에서 30분간 원심분리(MICRO 17R+, Korea)하여 얻은 상층액을 SOD 활성을 측정하기 위한 효소원으로 이용하였다. SOD 활성은 Flohé 등¹⁴⁾의 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°C로 유지시킨 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 Flohé¹⁵⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 적혈구 현탁액에 10배의 증류수를 가하여 적혈구를 용혈시키고 다시 증류수로 이 hemolysate를 희석한 후 Drabkin용액을 hemolysate와 1:1의 비율로 혼합하여 hemoglo-

bin (Hb)을 cyanomethemoglobin으로 전환시킨 후 효소원으로 사용하였다.

Glutathione peroxidase의 활성 측정은 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°C에서 10분간 배양시킨 후 1.5mM NADPH 100 μ l를 넣어 다시 3분간 배양시켰다. 여기에 미리 37°C로 데워진 12mM t-butyl hydroperoxide를 가하여 반응을 개시시킨 후 spectrophotometer로 365nm에서 30초 간격으로 3분간 GSH-px의 활성을 측정하여 unit 단위로 나타내었다. 여기에서 1 unit은 1분 동안 1.0 μ M의 GSH가 H₂O₂의 작용으로 GSSG로 산화되는 것을 측매한다.

9) 赤血球의 catalase 活性 測定

적혈구의 catalase 활성은 Johansson과 Håkan법¹⁶⁾에 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°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°C에서 10

분간 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 및 중성지방 濃度 測定

혈장의 총지방 농도는 Frings법¹⁷⁾으로 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°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.

12) 血漿의 총cholesterol 및 HDL- cholesterol 濃度 測定

혈장의 총cholesterol 농도는 효소법을 이용한 kit(영동제약)를 이용하여 측정하였고, 혈장의 HDL-cholesterol 농도는 LDL 및 VLDL을 침전시킨 후 효소법으로 HDL-cholesterol의 농도를 측정하는 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)로 분석하였고, 유의수준은 0.05이하로 하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 血漿의 thiobarbituric acid reactive substance 含量 變化

加味小建中湯이 혈장의 脂質過酸化에 미치는 영향을 알아보기 위해 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 함량을 측정한 결과 정상군, 대조군, 실험군에서 각각 35.34 ± 3.93 , 46.79 ± 6.06 , 39.85 ± 3.68 nmol/100ml로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=9.110$, $p=0.003$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 대조군이 정상군에 비해 有意하게 증가하였고, 실험군이 대조군에 비하여 有意하게 감소하였다. 정상군과 실험군 사이에 차이는 없었다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effect of *Gamisogunjung-tang* Extract on the Plasma TBARS Levels in Rats

Group	No. of animal	Plasma TBARS levels (nmol/100ml)	Duncan grouping
Normal	6	$35.34 \pm 3.93^{1)}$	A ²⁾
Control	6	46.79 ± 6.06	B
GST	6	39.85 ± 3.68	A
F-value:		9.110*	

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 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

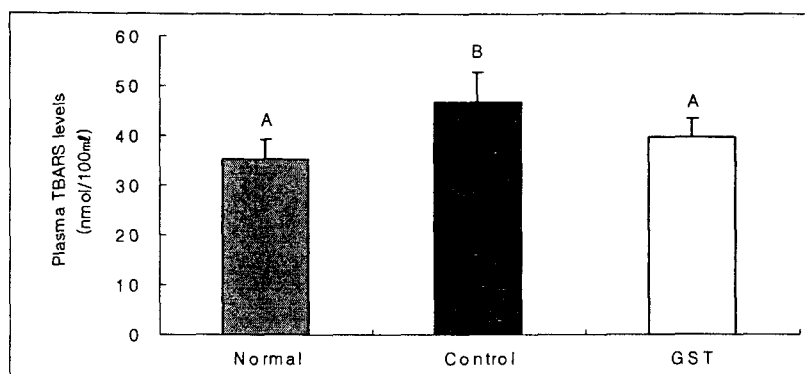


Fig. 1. Effect of *Gamisogunjung-tang* extract on the plasma TBARS levels in rats. (A : Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test. $p<0.05$)

Normal : not specially treated in 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose (50mg/kg/rat) for 6 weeks

2. 赤血球의 superoxide dismutase(SOD) 活性 變化

加味小建中湯이 적혈구에서의 항산화효소들의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD)의 활성을 측정 한 결과 정상군, 대조군, 실험군에서 각각 18.76 ± 3.45 , 10.99 ± 2.73 , 17.10 ± 3.08 unit/

min/mg protein으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=10.451$, $p=0.001$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였고, 실험군이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다. 정상군과 실험군 사이에는 없었다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Effect of *Gamisogunjung-tang* 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	$18.76\pm 3.45^{1)}$	A ²⁾
Control	6	10.99 ± 2.73	B
GST	6	17.10 ± 3.08	A
F-value:		10.451*	

1) Mean \pm 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 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

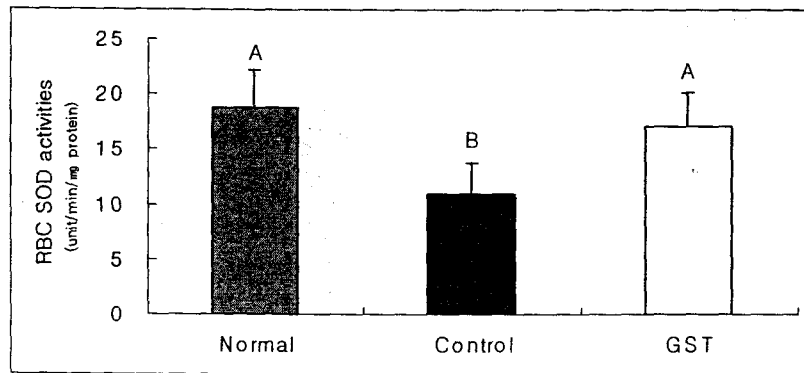


Fig. 2. Effect of *Gamisogunjung-tang* extract on the erythrocyte antioxidative enzyme(SOD) activities in rats. (A : Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test. $p<0.05$)

Normal : not specially treated in 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose (50mg/kg/rat) for 6 weeks

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

加味小建中湯이 적혈구에서의 항산화효소들의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 항산화효소인 glutathione peroxidase(GSH-px)의 활성을 측정된 결과 정상군, 대조군, 실험군에서 각각 0.159 ± 0.025 , 0.086 ± 0.012 , $0.125\pm$

0.019 unit/mg protein으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 ($F=20.391$, $p=0.000$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 실험군은 대조군에 비하여 有意하게 증가하였고, 정상군에 비하여 有意하게 감소하였다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Effect of *Gamisogunjung-tang* 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	$0.159\pm 0.025^{1)}$	A ²⁾
Control	6	0.086 ± 0.012	B
GST	6	0.125 ± 0.019	C
F-value:		20.391^*	

1) Mean \pm 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 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

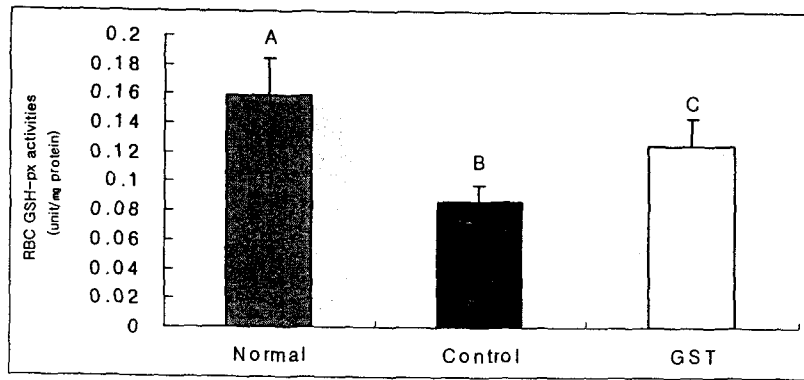


Fig. 3. Effect of *Gamisogunjung-tang* extract on the erythrocyte antioxidative enzyme(GSH-px) activities in rats. (A : Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test. $p<0.05$)

Normal : not specially treated in 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose (50mg/kg/rat) for 6 weeks

4. 赤血球의 catalase 活性 變化

加味小建中湯이 적혈구에서의 항산화효소들의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 항산화효소인 catalase의 활성을 측정된 결과 정상군, 대조군, 실험군에서 각각 5359.25 ± 247.31 , 4666.20 ± 195.54 , 5009.77 ± 308.45 unit/

mg protein으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=11.111$, $p=0.001$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 실험군은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고, 정상군에 비하여 유의하게 감소하였다.(Table 4, Fig. 4).

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

Group	No. of animal	RBC catalase activities (unit/mg protein)	Duncan grouping
Normal	6	$5359.25 \pm 247.31^{1)}$	A ²⁾
Control	6	4666.20 ± 195.54	B
GST	6	5009.77 ± 308.45	C
F-value:		11.111*	

1) Mean \pm 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 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

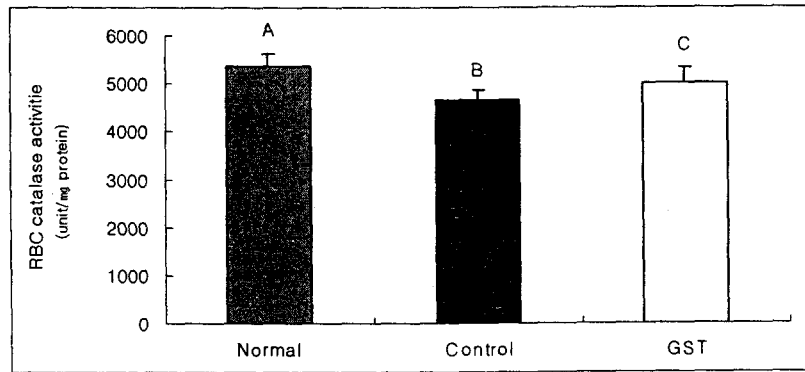


Fig. 4. Effect of *Gamisogunjung-tang* extract on the erythrocyte antioxidative enzyme(catalase) activities in rats. (A : Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test. $p<0.05$)

Normal : not specially treated in 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose (50mg/kg/rat) for 6 weeks

5. 血漿內 총지방 및 중성지방 농도 변화

加味小建中湯이 혈장 지질농도에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈장내 총지방의 농도를 측정하고 결과 정상군, 대조군, 실험군에서 각각 185.46 ± 33.13 , 320.73 ± 46.76 , $267.32 \pm 37.82 \text{mg}/100\text{ml}$ 으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=17.721$, $p=0.000$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's

method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 실험군은 대조군에 비하여 有意하게 감소하였고, 정상군에 비하여 有意하게 증가하였다(Table 5, Fig. 5).

혈장내 중성지방의 농도를 측정하고 결과 정상군, 대조군, 실험군에서 각각 77.78 ± 8.69 , 88.15 ± 12.53 , $85.45 \pm 7.71 \text{mg}/100\text{ml}$ 으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 없었다($F=1.786$, $p=0.202$, ANOVA test)(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Effect of *Gamisogunjung-tang* 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	$185.46 \pm 33.13^{1)}$	A ²⁾	$77.78 \pm 8.69^{1)}$	A ²⁾
Control	6	320.73 ± 46.76	B	88.15 ± 12.53	A
GST	6	267.32 ± 37.82	C	85.45 ± 7.71	A
F-value:		17.721^*		1.786^*	

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 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

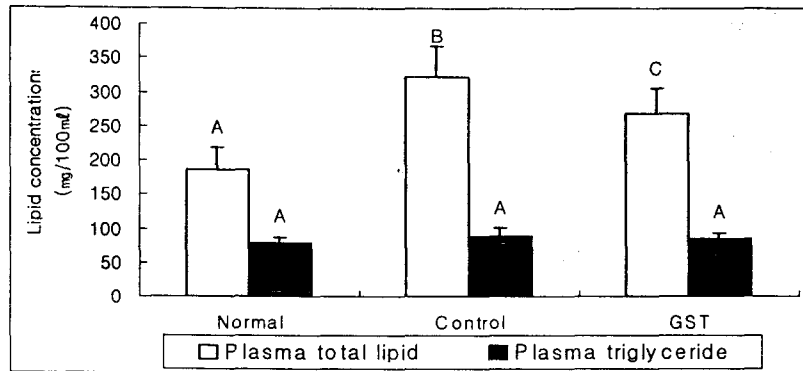


Fig. 5. Effect of *Gamisogunjung-tang* extract on the plasma total lipid and triglyceride concentrations in rats. (A : Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test. in total lipid $p<0.05$)

Normal : not specially treated in 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose (50mg/kg/rat) for 6 weeks

6. 血漿內 총cholesterol 및 HDL-cholesterol 濃度 變化

加味小建中湯이 혈장 지질농도에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈장내 총cholesterol

농도를 측정된 결과 정상군, 대조군, 실험군에 서 각각 48.67 ± 5.57 , 63.31 ± 7.63 , 50.85 ± 7.84 mg/100ml로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=7.452$, $p=0.006$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)

Table 6. Effect of *Gamisogunjung-tang* Extract on the Plasma Total Cholesterol and HDL-cholesterol Concentrations in Rats

Group	No. of animal	Plasma total cholesterol (mg/100ml)	Duncan grouping	Plasma HDL-cholesterol (mg/100ml)	Duncan grouping
Normal	6	$48.67\pm5.57^{1)}$	A ²⁾	$27.78\pm5.40^{1)}$	A ²⁾
Control	6	63.31 ± 7.63	B	17.86 ± 2.66	B
GST	6	50.85 ± 7.84	A	24.15 ± 3.63	A
F-value:		7.452*		8.965*	

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 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

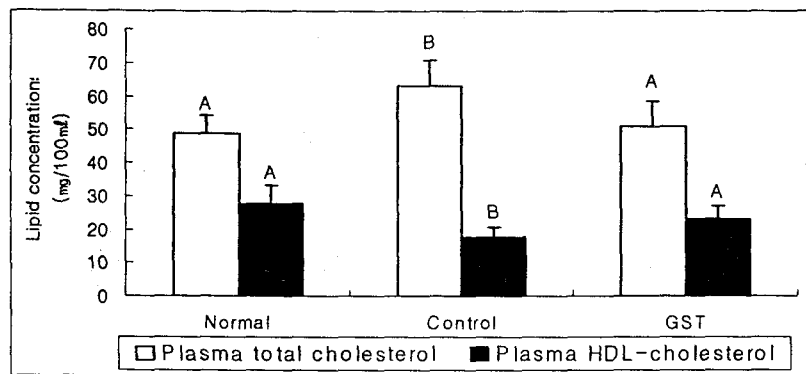


Fig. 6. Effect of *Gamisogunjung-tang* extract on the plasma total cholesterol and HDL-cholesterol concentrations in rats. (A : Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test. $p<0.05$)

Normal : not specially treated in 20weeks-old rat

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

GST : treated with *Gamisogunjung-tang* extracts and D-galactose (50mg/kg/rat) for 6 weeks

를 통하여 각 집단간 차이의 有意性を 검정한 결과 대조군이 정상군에 비하여 有意하게 증가하였고, 실험군이 대조군에 비하여 有意하게 감소하였다. 정상군과 실험군 사이에 차이는 없었다(Table 6, Fig. 6).

혈장내 HDL-cholesterol 농도를 측정한 결과 정상군, 대조군, 실험군에서 각각 27.78 ± 5.40 , 17.86 ± 2.66 , $24.15 \pm 3.63 \text{mg}/100\text{ml}$ 로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=8.965$, $p=0.003$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 대조군이 정상군에 비하여 有意하게 감소하였고, 실험군이 대조군에 비하여 有意하게 증가하였다. 정상군과 실험군 사이에 차이는 없었다 (Table 6, Fig. 6).

IV. 考 察

노화란 나이가 들어감에 따라 초래되는 신체 형태의 변화와 기능적 장애, 그리고 생체 항상성을 유지할 수 있는 능력이 떨어져 병에 잘 걸리거나, 스트레스에 대한 저항력이 떨어져 죽음에 이르는 현상으로 이해되고 있다^{4,18)}.

이러한 노화 기전을 설명하기 위해 많은 가설들이 제안되고 있는데 그 중 주요한 몇 가지 이론들을 살펴보면, 노화는 유전적으로 예정된 대로 진행되는 수동적인 과정이라 보는 계획이론(programmed theory), 생체 내 정상 대사 과정에서 생긴 free radical이 生分子(biomolecule)와 반응하여 세포에 손상을 준다는 산화기 이론(free radical theory), 정보 전달과정의 오류로 인하여 잘못 만들어진 체단백질이 축적된 결과라고 설명하는 오류설(error catastrophe theory), DNA에 돌연변

이가 일어나면 체세포 기능에 이상을 가져오게 되고 이러한 변화가 축적되어 세포는 죽게 된다고 생각하는 체세포 돌연변이설(somatic mutation theory), DNA가 합성된 후 변형 중 가장 중요한 과정인 시토신의 메틸화 과정에서 세포의 분화와 노화가 일어난다고 하는 DNA 변형설 등이 현재 연구의 주종을 이루고 있다¹⁹⁻²⁴⁾.

많은 이론들 중에서도 Harman²⁾에 의해 제안된 'Free Radical Theory of Aging'은 현재까지 널리 인정되고 있는 가설 중의 하나로써, 이에 의하면 노화는 정상적인 대사과정 중이나 외부로부터의 어떤 유발인자들(예: 자외선 등)에 의해 발생한 활성산소의 해로운 영향으로 인한 불가역적인 변화에 의해 일어난다고 한다. 이 이론은 지질, 단백질 및 DNA의 산화가 나이가 들어갈수록 증가하며, 몇몇 항산화제가 감소하고 활성산소의 발생은 나이가 들어갈수록 증가한다는 여러 보고들에 의해 뒷받침되고 있다¹⁸⁾.

Free radical은 분자 혹은 원자 최외각 전자궤도에 부대전자를 가진 불안정한 화합물을 말한다. 특히 산소를 함유하고 있는 free radical을 활성산소라 지칭하며, 이러한 반응산물은 O₂가 H₂O로 되는 환원과정에서 생성되는 중간물질이다. 포유류에서 일어나는 free radical 반응은 대부분이 산소대사 과정에서 발생하는 산소라디칼(O₂, H₂O₂, OH-)에 의한 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 이들 산소라디칼은 반응성이 매우 강해서 여러 세포내 거대분자를 변형시킬 수 있는데, 특히 불포화 지방산을 포함한 지질을 쉽게 산화시켜 lipid peroxidation을 초래하고 결국 여러 세포막 구조의 기능을 상실케 한다²⁶⁾.

또한 생체 내에는 이러한 free radical의 생성을 억제하고 생성된 free radical을 효율적

으로 제거하기 위한 효소 및 항산화제들이 존재하여 지질의 과산화를 억제하고 생체의 항상성을 유지한다. 항산화 효소로는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-px), catalase 등이 있으며, 항산화제로는 β-carotene, tocopherol, uric acid, ceruloplasmin, transferrin 및 알부민 등이 있어 방어기전에 관여한다. 이 중 GSH-px, catalase, ceruloplasmin, 알부민 등은 활성산소의 생성을 억제하고, SOD, vitamin E, vitamin C 등은 활성산소의 scavenger로 관여하고 있다^{27,28)}.

한의학에서는 精血虛衰가 노화현상의 기본이다. 노화는 生體衰退의 변화로, 整體觀에 의거한 有機的 關係 하에 고찰하여야 하며, 陰陽의 변화, 臟腑의 변화, 氣血의 변화, 精神의 변화를 총체적으로 고려해야 한다⁴⁾.

《靈樞·天年篇》²⁹⁾에서는 “五十歲 肝氣始衰…九十歲 腎氣焦 四臟經脈空虛 百歲 五臟皆虛 腎氣皆去 形骸獨居而終矣”라 하였으며, 《素問·陰陽應象大論》³⁰⁾에서는 “年四十而陰氣自半也 起居衰矣 年五十體重 耳目不聰明矣 年六十 陰痿 氣大衰 九竅不利 下虛上實 涕泣俱出矣 故曰 知之則強 不知則老”라 하여 五十歲 以上이 되면 노인으로서의 변화가 나타나므로, 이를 알고 養生을 하여야 한다고 설명하였고, 노화 현상의 표현으로 《東醫寶鑑》¹²⁾에서는 “七竅反常 卽 啼哭無淚 笑反有淚 鼻多濁涕 耳作善鳴 喫食口乾 寐則涎溢洩 尿自遺 便燥或泄 晝則多睡 夜臥惺惺不眠 此老人之病也”라고 언급하였으며, 노화의 원인에 대하여 陰陽의 不調和, 形身衰弱, 氣血 및 腎氣衰弱 등으로 설명하고 있고⁴⁾, 크게는 先天 稟賦不足과 後天 攝生失調로 나누어 보고 있으며, 노화를 다스리는 치료원칙으로 陰精, 즉 先天之精을 保

存하는 것이 첫째이고, 둘째로脾胃의 後天之氣를 補益하기를 언급하였다⁵⁾. 白⁵⁾은 노인병과 虛勞는 발병과정에 차이가 있으나 그 病證과 病機가 유사하므로 虛勞의 치료법을 통해 노인병의 치료원칙을 찾아볼 수 있을 것이라고 하였다.

지금까지 국내 한의학계에서 이루어진 항노화 연구들은 處方의 선택에 있어 先天之精을 保存하는 補腎의 관점에서 접근한 것이 많은데, 六味地黃湯^{6,7)}, 左歸飲과 右歸飲³¹⁾, 補腎丸⁸⁾, 玄菟固本丸⁹⁾, 班龍丸¹⁰⁾, 延齡固本丹과 八味地黃湯¹¹⁾ 등이 있다. 그 외 소수에서 定志丸³²⁾, 補肝丸³³⁾, 醒心散³⁴⁾, 補脾湯³⁵⁾, 補肺散³⁶⁾ 등으로 살펴본 연구가 있으나, 後天之氣의 補益이라는 관점에서 연구 보고된 바가 많지 않다.

小建中湯은 《傷寒論》³⁷⁾에 처음 소개된 이후 《東醫寶鑑·虛勞門》에 虛勞通治方 중 하나로, 虛勞, 裏急, 腹痛, 夢寐失精, 四肢痠疼, 手足煩熱, 咽乾口燥를 다스리는 처방이다¹²⁾. 이러한 小建中湯에 虛勞門 單方에 소개된 36가지 藥味 중 虛勞羸瘦, 諸虛不足을 다스리는 黃芪, 當歸, 鹿茸의 세 가지를 더하여 加味小建中湯이라고 命名하였다.

이 실험에 사용된 加味小建中湯은 潤肺脾하는 膠飴³⁸⁾, 養血柔肝 緩中止痛하는 芍藥, 溫經通脈 助陽化氣하는 桂枝, 和中緩急하는 甘草, 解表散寒 溫中止嘔하는 生薑, 補脾和胃하는 大棗, 益衛固表하며 補中益氣하는 黃芪, 補血和血하는 當歸, 壯元陽 補氣血하는 鹿茸으로 구성되어 있다³⁹⁾.

小建中湯의 효능 연구로는 抗潰瘍⁴⁰⁾, 成長發育 促進⁴¹⁾, 免疫活性 효과⁴²⁾에 관하여 보고된 바가 있고, 黃芪建中湯의 피로회복⁴³⁾, 항알레르기⁴⁴⁾, 免疫增進 효과⁴⁵⁾에 대한 보고가 있다.

본 연구에서는 加味小建中湯이 노화와 관련된 항산화능 및 혈중 지질농도에 미치는 영향을 규명하고자 14주령의 SD계 흰쥐를 정상군, 대조군, 실험군으로 나누고 대조군과 실험군은 D-galactose 피하주사로 노화를 유발하고 실험군에만 6주 동안 加味小建中湯 추출물을 증류수에 녹여 경구 투여한 후 혈액을 채취하여 적혈구의 항산화효소계인 SOD, GSH-px, catalase의 활성 및 혈장의 脂質過酸化物(TBARS) 함량, 총지방, 중성지방, 총cholesterol, HDL-cholesterol의 농도를 측정하였다.

過酸化脂質(TBARS) 함량은 노화를 유발한 대조군에서 유의성 있게 증가하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며(p=0.003), 정상군과 실험군 사이에 차이는 없었다. 過酸化脂質은 생체막의 불포화지방산과 활성산소가 반응하여 발생하는 물질로 생체막과 조직의 손상을 유도하는 것으로 알려져 있으며, thiobarbituric acid(TBA)의 반응물질인 thiobarbituric acid reacting substance(TBARS)함량을 정량분석하여 과산화지질의 양을 판단할 수 있다⁴⁶⁾. 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 있다⁴⁷⁾. 본 실험결과는 加味小建中湯이 지질과산화물 함량을 감소시키는 효능이 있음을 보여준다.

SOD의 활성은 노화를 유발한 대조군에서 유의성 있게 감소하였고, 실험군은 대조군에

비하여 유의성 있게 증가하였으며($p=0.001$), 정상군과 실험군 사이에 차이는 없었다. SOD는 활성산소 scavenger로서 산소 대사과정에서 가장 먼저 생성되는 산소라디칼을 제거하는 효소이다($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + 2H_2O_2$)^{48,49}. SOD와 catalase, glutathione peroxidase 등과는 달리 지질과산화 유도반응을 제거하여 지질과산화를 억제하는 항산화 작용을 나타내는 것으로 미루어 볼 때 加味小建中湯은 free radical을 포착, 제거하는 작용에 우수한 효능을 나타내는 결과로 추측 된다⁵⁰.

Glutathione peroxidase(GSH-px) 활성은 加味小建中湯 추출물을 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고, 정상군에 비하여 유의하게 감소하였다($p=0.000$). Glutathione은 모든 조직에 분포하여 세포의 유지 및 생존에 필수적인 방어기구를 수행하며, 특히 방사선 장애에 대한 방어, 세포막의 유지, 효소의 SH기의 유지, 이물질의 해독 등 생명 유지에 중요한 작용을 하고 있으며⁵¹, Glutathione peroxidase(GSH-px)는 glutathione을 산화시키는 과정에서 hydrogen peroxidase나 lipid peroxidase 등을 제거하는 효소이다($2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$)⁵². 실험 결과로 加味小建中湯이 노화촉진원위에서 hydrogen peroxide나 lipid peroxide 등을 제거하는 효소의 활성을 증강시키는 효능이 있음을 보여준다.

Catalase 활성은 加味小建中湯 추출물을 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고, 정상군에 비하여 유의하게 감소하였다($p=0.001$). Catalase는 세포내에서 과산화수소를 제거하는 효소로($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) 생체의 모든 주요 기관에 존재하며, 특히 간장과 적혈구에 많이 분포 한다⁵³. 실험 결과로 加味小建中湯이 유해한 과산화물이 체내

에 축적되는 것을 막아주는 효소 활성을 증강시키는 효능이 있음을 보여준다.

총지방 농도는 加味小建中湯 추출물을 투여한 실험군이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고, 정상군에 비하여 유의하게 증가하였다($p=0.000$). 중성지방 농도는 통계적으로 有意한 차이가 없었다.

총cholesterol의 농도는 노화를 유발한 대조군에서 유의성 있게 증가하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고($p=0.006$), 정상군과 실험군 사이에 차이는 없었다. HDL-cholesterol의 농도는 노화를 유발한 대조군에서 유의성 있게 감소하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고($p=0.003$), 정상군과 실험군 사이에 차이는 없었다.

혈액속의 지질 형태는 cholesterol, 중성지방 등의 형태로 존재하며 cholesterol은 다시 저밀도(LDL) 콜레스테롤, 고밀도(HDL) 콜레스테롤 등으로 세분화된다. 콜레스테롤은 모든 인간의 세포막을 구성하는 필수적인 요소이며 중성지방은 음식으로부터 세포로 에너지를 이동시키는 것을 도와준다. 혈관으로 콜레스테롤을 운반함으로써 관상동맥질환을 유발시키는 것은 LDL-cholesterol인데 이것은 총 콜레스테롤 중 약 62%를 차지하고 있으며, 반면에 혈관 조직에 침착된 콜레스테롤을 제거하는 작용과 더불어 저밀도 지단백이 세포에 축적되는 것을 막는 것이 전체의 29%를 차지하는 HDL-cholesterol이다⁵⁴. 노화는 각 세포의 저밀도지단백의 상승으로 인한 고지혈증을 일으켜 과산화지질의 형성을 촉진하며, free radical 소거 기능을 저하시켜 과산화지질 증가를 더욱 조장 한다⁵⁵. 실험 결과는 加味小建中湯이 노화와 관련된 혈중 지질량 조절에 유의한 효능이 있음을 보여준다.

이상의 결과에서 D-galactose로 노화를 유발한 흰쥐에 加味小建中湯 추출물을 투여한 결과, 적혈구 항산화 효소계 중 free radical을 제거하는 SOD와 생성억제 효소인 GSH-px, catalase 활성이 유의성 있게 증가되었고($p < 0.05$), 과산화지질의 지표인 TBARS 함량과 노화유발로 증가된 혈장 총지방, 총cholesterol 농도는 유의성 있게 감소하였으며($p < 0.05$), 혈장 HDL-cholesterol 농도는 유의성 있게 증가하였고($p < 0.05$), 중성지방 농도는 유의한 변화를 보이지 않았다.

以上の結果로 加味小建中湯은 노화유발 흰쥐에 있어 적혈구 항산화 효소계를 활성화하고 혈장 중 지질의 농도를 낮추어 노화를 억제하는 효과가 있을 것으로 思慮된다. 한의학에서 노화를 예방하고 지연시키는 방제로 補腎精하는 延年益壽藥이 많이 거론되어 왔으나, 본 연구를 통해 補脾益氣하는 加味小建中湯의 항노화 효과를 검증해 볼 수 있었으며, 향후 보다 다양한 실험방법을 통해 실제 임상 활용에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

加味小建中湯의 항노화 작용을 연구하기 위하여 흰쥐에게 D-galactose로 노화를 유발시키면서 6주간 加味小建中湯 추출물을 투여하고 혈장 TBARS 함량과 적혈구의 SOD, GSH-px, catalase 활성을 측정하고, 혈장 중의 총지방, 중성지방, 총cholesterol, HDL-cholesterol 농도를 측정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈장 지질과산화물(thiobarbituric acid reactive substance) 함량은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, 정상군과 실험군 간의 차이는 없었다.
2. 적혈구의 superoxide dismutase(SOD) 활성은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며, 정상군과 실험군 간의 차이는 없었다.
3. 적혈구의 glutathione peroxidase(GSH-px) 활성은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.
4. 적혈구의 catalase 활성은 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.
5. 혈장내 총지방 농도는 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하였다. 중성지방 농도는 유의한 차이가 없었다.
6. 혈장내 total-cholesterol 농도는 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였고, 정상군과 실험군 간의 차이는 없었으며, HDL-cholesterol 농도는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였고, 정상군과 실험군 간의 차이는 없었다.

以上の結果로 加味小建中湯은 혈중 지질농도를 감소시켰으며, 항산화 효소의 활성을 증가시켜 노화와 관련된 산화작용을 억제하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

參考文獻

1. 하배진. 노화촉진 생쥐의 지질과산화와 효소 활성에 관한 비교 연구. 신라대학교 논문집. 제50輯(자연과학대학편). 2001:265-78.
2. Harman D. Aging- A theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. 1956;11:298-300.
3. 李民化. 老化研究. 서울 : 遺傳工學. 1991:34-8.
4. 杜鎬京. 東醫腎系學. 서울 : 東洋醫學研究院. 1991:1325-83.
5. 白上龍. 老化에 대한 研究. 大韓韓醫學原典學會誌. 1999;12(2):175-83.
6. 安相源, 李哲浣. 熟地黃과 六味地黃湯이 老化過程 腎臟에서의 抗酸化機轉에 미치는 影響. 大田大學校 韓醫學研究所 論文集. 1999;8(1):593-623.
7. 尹一智. 六味地黃湯이 노화 Rat의 肝內 過酸化脂質 및 代謝酸素系에 미치는 影響. 大田大學校 大學院. 1997.
8. 孫旻成, 吳旻錫, 宋泰元. 老化過程의 腎臟에서 補腎丸이 腎臟의 代謝酸素系에 미치는 影響. 大田大學校 韓醫學研究所 論文集. 1999;8(1):659-74.
9. 崔祐碩. 玄菟固本丸이 老化誘發 白鼠의 抗酸化能에 미치는 影響. 대구한의대학교 대학원. 2004.
10. 崔瑛娥. 斑龍丸이 D-galactose로 유발된 노화 腎臟의 抗酸化能에 미치는 影響. 대구한의대학교 대학원. 2004.
11. 朴英濬. 延齡固本丹 및 八味地黃湯이 Rat의 피부섬유아세포, 사구체 메산지음세포 및 혈관내피세포의 老化 遲延에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院. 2002.
12. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1996:81, 452, 455-6.
13. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. Methods Enzymol. 1984;105:328-31.
14. Flohé L. Becker R. Brigelius R. Lengfelder E. Ötting F. Convenient assays for superoxide dismutase. CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. 1992:287-93.
15. Flohé L. Determination of glutathione peroxidase. CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. 1992:281-6.
16. Johansson LH. Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. Analytical Biochemistry. 1988;174(1):331-6.
17. 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.
18. Eric Dufour. Nils-Göran Larsson. review -Understanding aging: revealing order out of chaos. Biochimica et Biophysica Acta. 2004;1658:122-32.
19. 이정복. 長壽學. 서울 : 과학·백과사전출판사. 1987:11-99, 492-576.
20. 김숙희, 김화영. 老化. 서울 : 민음사. 1995:13-5, 77-106, 253-99.
21. James D.Porterfield. Richard St.Pierre . 老化와 건강. 서울 : 대한미디어. 1995:27-39.

22. 후지모토 다이사부로. 老化는 왜 일어나는가: 젊음을 잃게 하는 메카니즘. 서울: 전파과학사. 1987:31-55.
23. 과학·백과사전 출판사 編. 자연치료건강학. 서울: 일월서각. 1990:465-8.
24. 윤방부. 임상가정의학. 서울: 수문사. 1991: 130-1.
25. Cohen G. The generation of hydroxyl radicals in biological system. Photo-biol. 1978;28:669-75.
26. Kellogg EW 3rd. Fridovich I. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. J Biol Chem. 1977 Oct 10;252(19):6721-8.
- 27.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.
28. 정해영. 노화촉진 마우스에서 노화와 gin-senoside Rb2가 free radical 생성 및 제거능에 미치는 영향. 생명과학심포지움. 제 4회. 1993:72, 94-8.
29. 楊維傑 編. 黃帝內經靈樞譯解. 서울: 一中社. 1991:397.
30. 楊維傑 編. 黃帝內經素問譯解. 서울: 一中社. 1991:54-5.
31. 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.
32. 河在原. 定志丸이 老化에 미치는 影響. 大田大學校 大學院. 1996.
33. 趙漢淑. 吳旼錫. 宋泰元. 老化過程의 環 쥐에서 補肝丸이 肝臟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):711-26.
34. 郭重文. 吳旼錫. 宋泰元. 老化過程의 環 쥐에서 醒心散이 心臟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):625-41.
35. 李東濬. 吳旼錫. 宋泰元. 老化過程의 環 쥐에서 補脾湯이 脾臟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):689-710.
36. 金仁洙. 高光贊. 吳旼錫. 宋泰元. 老化過程의 環 쥐에서 補肺散이 肺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):643-57.
37. 문준진 외. 傷寒論精解. 서울: 경희대학교출판국. 1998:225-30.
38. 黃度淵. 對譯 證脈方藥合編 懷中版. 서울: 南山堂. 1992:286.
39. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울: 永林社. 1995:124-5, 136-7, 534-6, 540-3, 545-6, 578-82.
40. 김태중. 이윤희. 최우석. 변준석. 박순달. 小建中湯 加 龍骨. 牡蠣가 環 쥐의 실험적 위궤양에 미치는 影響. 대한한방내과학회지. 2002;22(1):13-20.
41. 尹漢龍. 小建中湯과 六辰丹이 白鼠의 成長발육에 미치는 影響. 大田大學校 大學院 碩士學位論文. 2002.
42. 徐榮. 小建中湯 추출액과 露劑의 면역활성도 및 항암효과 비교연구. 대구한의대학교 대학원. 2004.
43. 趙仁珠. 황기건중탕 및 가미황기건중탕이 環 쥐의 운동피로회복에 미치는 영향. 東義大 大學院 碩士學位論文. 1995.
44. 이정훈. 황기건중탕이 알레르기에 미치는 영향. 東義大 大學院 碩士學位論文.

- 2004.
45. 구진숙, 백정환. 黃芪建中湯이 methotrexate로 유도된 흰쥐의 免疫機能低下에 미치는 影響. 대한한방소아과학회지. 2004;18(1):27-48.
 46. 이귀영. 임상병리과일. 서울 : 의학문화사. 1990:138-9, 241, 348-9.
 47. Yamazaki. S. Cholesterol 7-hydroperoxides in rat skin as a marker for lipid peroxidation - The free-radical theory of aging revisited. Biochemical pharmacology. 1999;58(9):1415-23.
 48. Bourg. E. L. Fournier. D. Is Lifespan Extension Accompanied by Improved Antioxidant Defences? A Study of Superoxide Dismutase and Catalase in *Drosophila Melanogaster* Flies that Lived in Hypergravity at a Young Age. Biogerontology. 2004;5(4):261-6.
 49. Kubota. Y. Takahashi. S. Sato. H. Significant contamination of superoxide dismutases and catalases with lipopolysaccharide-like substances. Toxicology in vitro. 2004;18(5):711-8.
 50. 양재수. 노화촉진 생쥐에서 산소라디칼 관련 물질의 검색에 관한 연구. 서울대학교 대학원. 1989.
 51. Sakamoto Y. Kinoshita S. Glutathione. 3. Scientific. 1989:5.
 52. Ozturk. O. Gumuslu. S. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase. copper. zinc-superoxide dismutase and catalase activities. glutathione and its metabolizing enzymes. and lipid peroxidation in rat erythrocytes with age. Experimental gerontology. 2004;39(2): 211-6.
 53. Al-Omar. M. Free Radicals in Biology and Medicine. Third Edition. Saudi pharmaceutical journal. 2003;11(4):207.
 54. 全國漢醫科大學肝系內科學教授共著. 肝系內科學. 서울 : 東洋醫學研究院. 1989:200, 764-71.
 55. Aging and Changes in Cholesterol Levels .U.S. pharmacist. 1993;18(3):17.