

千金延壽丹이 노화 유발된 흰쥐의 항산화효능에 미치는 영향

宋暎惠, 徐廷旻, 白政翰

대구한의대학교 한의과대학 소아과교실

An anti-oxidative Effects of *Cheongeumyeonsudan* on Rats Induced Aging by D-Galactose.

Song Kyoung Hye, Seo Jung Min, Beak Jung Han

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

Objectives : The purpose of this study is to find out the effect of antioxidation related to aging of *Cheongeumyeonsudan* which is written on Dongui-bogam experimentally.

Method : 14 weeks aged SD albino rats were separated into uncontrolled group, controlled group and CGY group. As controlled and CGY groups were induced aging by subcutaneous injection of D-galactose, at the same time we administered the extract of *Cheongeumyeonsudan* to CGY group for 6 weeks. After then we drew blood from each group, and took measurements; the activity of SOD, GSH-px, catalase in erythrocytes, TBARS value, concentration of total lipid, tryglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol in blood plasma.

Results : The activities of SOD, GSH-px in erythrocytes were significantly increased in the CGY group compared with control group. The activity of catalase showed a tendency to increase, but it was not remarkable. The concentration of total lipid, the values of TBARS and total cholesterol was significantly decreased in the CGY group compared with control group, and the concentration of plasma HDL-cholesterol was not remarkable. The concentrations of tryglyceride in plasma showed a tendency to decrease.

Conclusions : it is suggested that *Cheongeumyeonsudan* decrease the activities of free radical, the concentrations of lipid in plasma and generate enzyme which form lipid peroxide.

Key words : *Cheongeumyeonsudan*, antioxidation, SOD, GSH-px, total lipid, TBARS, total cholesterol

접 수 : 2006년 3월 30일, 채택일자: 2006년 4월 22일
교신저자 : 백정환, 대구시 수성구 상동 165 대구한의대학교 부속한방병원 소아과학교실
(Tel. 053-770-2111, E-mail: lee100@dhu.ac.kr)

I. 緒 論

노화는 생명체의 성장과 시간 경과에 따라 진행되는 일련의 퇴행성변화를 일으키는 자연적인 변화 과정으로 신체내의 평형이 깨어져 내적 외적 환경에 대한 적응을 어렵게 만드는 신체의 구조와 기능의 점진적인 저하를 유발하여 질병을 증가시키고 궁극적으로는 사망을 초래하는 것을 의미한다¹⁾.

노화에 대한 기전은 크게 developmentally programmed aging說²⁾과 damage accumulation aging說^{3,4)}로 나뉘는데, 전자는 노화과정도 유전자에 미리 program되어 있다는 이론이며 후자는 free radical theory^{3,4)}, 체세포 돌연변이설⁵⁾, 폐기부산물 축적설²⁾ 등이 있지만 생체의 노화과정의 본체는 아직 확실히 밝혀지지 않았으며 최근에는 생체내에서 끊임없이 일어나고 있는 여러 free radical이 노화를 유발한다는 설^{3,4)}이 주목받고 있다.

한의학은 《素問·上古天真論》⁶⁾, 《靈樞·天年篇》⁷⁾에서 노화의 과정 중 가장 중요한 것이 腎氣의 虛衰에 달려 있다고 보았으며, 《醫學正傳》⁸⁾에서는 장수하는 것이 腎氣의 성쇠여부에 의하여 결정된다고 보았다.

한의학에서 항노화의 개념은 '耐老', '延年', '益壽', '不老', '養老'로 표현하고 있고 노화를 예방 또는 지연시키는 방제로 腎精을 補하는 延年益壽藥이 많이 거론되어 왔으며⁹⁾ 최근 노화 관련 항산화효능에 대한 실험적 연구로 左歸飲과 右歸飲¹⁰⁾, 六味地黃湯¹¹⁾, 補脾湯¹²⁾ 등에 대하여 보고된 바 있다.

千金延壽丹은 《醫學正傳》⁸⁾에 언급된 처방으로 益精髓, 強筋骨하여 延年益壽하는 효능이 있다. 이에 저자는 千金延壽丹의 노화와 관련된 항산화작용을 규명하고자 14주령의 흰

쥐에게 6주간 D-galactose를 피하주사하여 노화를 유발시키면서 千金延壽丹 추출물을 투여한 다음 혈장중의 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances) 함량 및 총지방, 중성지방, total-cholesterol, HDL-cholesterol 농도를 측정하고 적혈구 항산화효소계인 SOD(super-oxide dismutase), glutathione peroxidase, catalase의 활성도를 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 動物 및 材料

1) 動物

12주령 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 구입하여 2주일간 일정한 실험실 환경(24± 2°C, 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 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 약제는 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 구입한 것을 엄선해서 사용하였으며 처방내용은 《東醫寶鑑》¹³⁾에 기재된 千金延壽丹으로 내용과 한 貼의 용량은 다음과 같다.

〈 Composition of Cheongeumyeonsudan 〉

韓藥名	生藥名	用量(g)
肉蓯蓉	<i>Cistanches Herba</i>	8.0
菟絲子	<i>Cuscutae Semen</i>	4.0
五味子	<i>Maximowicziae Fructus</i>	4.0
牛膝	<i>Achyranthis Bidentatae Radix</i>	4.0
杜沖	<i>Eucommiae Cortex</i>	4.0
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4.0
山藥	<i>Dioscoreae Radix</i>	4.0
天門冬	<i>Asparagi Radix</i>	4.0
麥門冬	<i>Liriois Tuber</i>	4.0
乾地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	4.0
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	4.0
人參	<i>Ginseng Radix</i>	2.0
白茯苓	<i>Poria</i>	2.0
茴香	<i>Foeniculi Fructus</i>	2.0
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	2.0
地骨皮	<i>Lycii Radicis Cortex</i>	2.0
鹿茸	<i>Cervi Pantotrichum Cornu</i>	2.0
石菖蒲	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	2.0
川椒	<i>Zanthoxyli Fructus</i>	2.0
巴戟	<i>Morindae Officinalis Radix</i>	2.0
遠志	<i>Polygalae Radix</i>	2.0
覆盆子	<i>Rubi Proctus</i>	2.0
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	2.0
柏子仁	<i>Biotae semen</i>	2.0
總量		74.0

2. 實驗方法

1) 實驗群의 區分

14주령의 SD계 흰쥐를 체중별로 고르게 분포시켜 正常群(Normal group, 無處置群)은 어떤 처치도 하지 않고 고형사료와 물만을 6주간 충분히 공급하였다. 對照群(Control group, D-galactose 投與群)은 D-galactose를 6주간 피하주사하여 노화를 유발하였다. 實驗群(CGY group, 千金延壽丹 投與群)은 D-galactose를 6주간 피하주사함과 동시에 千金延壽丹 추출물 200.0mg/200g을 경구 투여하였으며 각 군에 6마리씩 배정하였다.

2) 老化 誘發

노화의 유발은 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

千金延壽丹 5貼 분량인 370.0g을 5,000cc의 등근 플라스크에 3,000cc의 증류수와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 3시간 동안 煎湯하여 0.2µm filter(Corning, USA)로 여과한 濾液을 rotary vacumn evaporator(EYELA, Japan)에서 감압 농축하였다. 이 농축액을 -80℃ deep freezer(SANYO, Japan)에서 한 시간 방치한 후 freezer dryer(EYELA, Japan)로

24시간 동안 동결건조하여 千金延壽丹 엑기스 76.0g(수율:20.54%)을 얻어 이를 실험에 필요한 농도로 증류수에 녹여 조정하여 50ml conical tube(Falcon, USA)에 넣어 2-4°C의 냉장고에 보관하였으며, 사용할 때 water bath에 넣어 gel상태를 완전히 녹여 사용하였다.

4) 檢液 投與

千金延壽丹 추출물은 200.0mg/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 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°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 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance) 含量 測定

Yagi¹⁴⁾의 방법을 이용하여 혈장의 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 TBA(thiobarbituric acid) 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 luminescence spectrometer(Perkin Elmer, LS50)로 excitation 515nm, emission 553nm에서 정량하였다.

7) 赤血球의 SOD(superoxide dismutase) 活性 測定

적혈구의 SOD 활성은 적혈구 현탁액 200 μ l를 10mM Tris-1mM EDTA buffer(pH 7.4) 1.8ml로 용혈 시킨 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 등¹⁵⁾의 방법으로 측정하였는데, xanthine이 xanthine oxidase에 의해 superoxide를 생성하고, 이 superoxide가 ferricytochrome C(Fe⁺⁺⁺)를 ferrouscytochrome

C(Fe²⁺)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(Fe³⁺)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 GSH-px(glutathione peroxidase) 활성測定

적혈구의 GSH-px 활성은 Flohé¹⁶⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 적혈구 현탁액에 10배의 증류수를 가하여 적혈구를 용혈 시키고 다시 증류수로 이 hemolysate를 희석한 후 Drabkin 용액을 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°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 unit단위로 나타내었다. 여기에서 1 unit은 1분동안 1.0 μ M의 GSH가 H₂O₂의 작용으로 GSSG로 산화되는 것을 측매한다.

9) 赤血球의 catalase 활성測定

적혈구의 catalase 활성은 Johansson법¹⁷⁾에 의해 측정하였다. 적혈구 현탁액을 10배의 10mM Tris-1mM EDTA buffer(pH 7.4)로 용혈 시킨 후 0.01M phosphate buffer(pH 7.0)로 희석하여 효소원으로 사용하였다. 250 mM 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 10분간 shaking시킨 후 65.2mM potassium periodate를 300 μ l를 가하여 발색시켰다. 이를 9,500 rpm에서 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% SDS(sodium dodecyl sulfate)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, 총cholesterol 및 HDL- cholesterol 濃度 測定

혈장의 총지방 농도는 Frings법¹⁸⁾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 $^{\circ}$ 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. 혈장의 총 cholesterol 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. 통계학적 분석을 통해 각 집단에서의 측정값을 평균 \pm 표준편차로 요약하였으며, 각 집단간의 유의성은 ANOVA test with multiple comparisons (Duncan's method)로 분석하였고, 유의수준은 0.05로 하였다.

III. 結 果

1. 血漿의 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance) 含量

TBARS 함량을 측정한 결과 정상군이 35.20 \pm 4.48, 대조군이 47.52 \pm 5.25, 실험군이 39.42 \pm

Table 1. Effect of CGY Extract on the Plasma TBARS Levels in Rats

Group	No. of animal	Plasma TBARS levels (nmol/100ml)	Duncan grouping
Normal	6	35.20 \pm 4.48 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	47.52 \pm 5.25	B
CGY	6	39.42 \pm 4.80	A
F-value:		9.964*	

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

TBARS(thiobarbituric acid reactive substance), Normal : not specially treated in 20 weeks-old rat, Control : D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks, CGY : treated with CGY extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

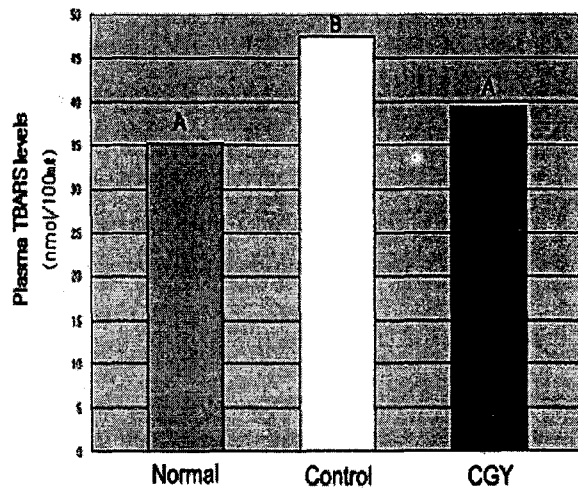


Fig. 1. Effect of CGY extract on the plasma TBARS levels in rats.
(A, B : Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test. $p<0.05$)

4.80 nmol/100m μ 로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=9.964$, $p=0.002$, ANOVA test) 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였고, 실험군이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(Table 1, Fig. 1).

2. 赤血球의 SOD(superoxide dismutase) 活性

항산화효소인 SOD의 활성을 측정한 결과 정상군이 18.71 ± 3.37 , 대조군이 10.99 ± 2.78 , 실험군이 16.81 ± 3.83 unit/min/mg protein으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=8.611$, $p=0.003$, ANOVA test),

Table 2. Effect of CGY Extract on the Erythrocyte Anti-oxidative Enzyme(SOD) Activities in Rats

Group	No. of animal	RBC SOD activities (unit/min/mg protein)	Duncan grouping
Normal	6	18.71 ± 3.37 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	10.99 ± 2.78	B
CGY	6	16.81 ± 3.83	A
F-value:		8.611*	

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

SOD(superoxide dismutase), Normal : not specially treated in 20 weeks-old rat, Control : D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks, CGY : treated with CGY extracts and D-galactose (50mg/kg/rat) for 6 weeks

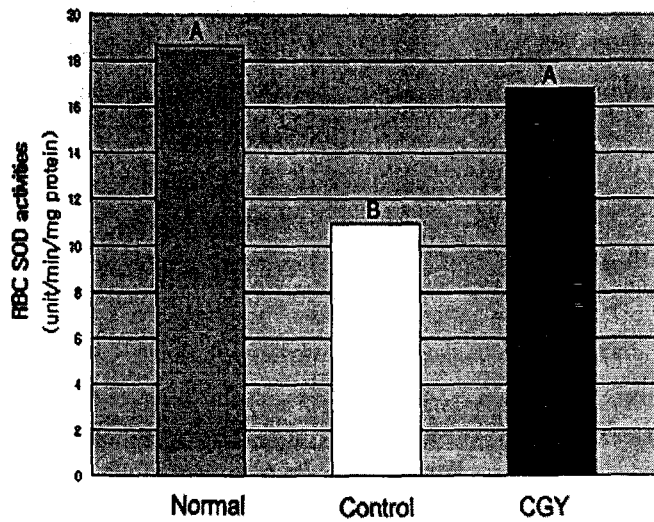


Fig. 2. Effect of CGY extract on the erythrocyte anti-oxidative enzyme(SOD) activities in rats. (A, B : Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test. $p<0.05$)

다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 有意性을 검정한 결과 대조군이 정상군에 비해 有意하게 감소하였고, 실험군이 대조군에 비하여 有意하게 증가하였다(Table 2, Fig. 2).

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

항산화효소인 GSH-px의 활성을 측정한 결과 정상군이 0.158 ± 0.025 , 대조군이 0.084 ± 0.019 , 실험군이 0.131 ± 0.019 unit/mg protein으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한

Table 3. Effect of CGY Extract on the Erythrocyte Anti-oxidative Enzyme(GSH-px) Activities in Rats

Group	No. of animal	RBC GSH-px activities (unit/mg protein)	Duncan grouping
Normal	6	$0.158 \pm 0.025^{1)}$	A ²⁾
Control	6	0.084 ± 0.019	B
CGY	6	0.131 ± 0.019	C
F-value:		18.530*	

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
 GSH-px(glutathione peroxidase), Normal : not specially treated in 20 weeks-old rat, Control : D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks, CGY : treated with CGY extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

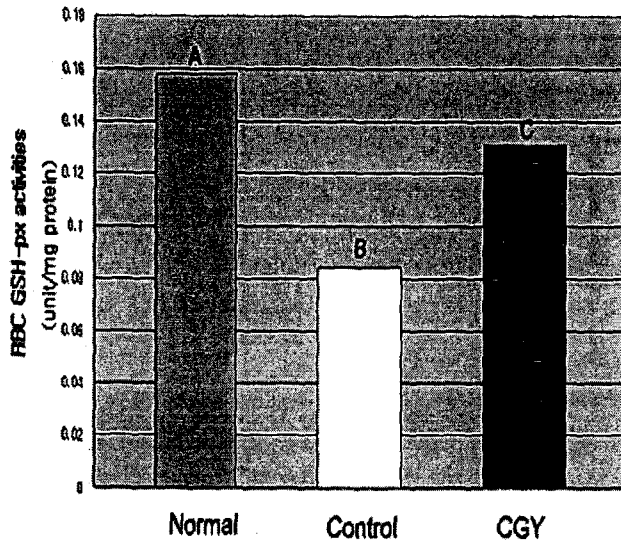


Fig. 3. Effect of CGY extract on the erythrocyte anti-oxidative enzyme (GSH-px) activities in rats. (A, B, C : Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test. $p<0.05$)

차이가 있었으며($F=18.530$, $p=0.000$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意性을 검정한 결과 실험군은 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고, 정상군에 비하여 유의하게 감소하였다(Table 3, Fig. 3).

4. 赤血球의 catalase 活性

항산화효소인 catalase의 활성을 측정된 결과 정상군이 5361.83 ± 252.04 , 대조군이 4657.94 ± 194.65 실험군이 5024.13 ± 258.02 unit/mg protein으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로

Table 4. Effect of CGY Extract on the Erythrocyte Anti-oxidative Enzyme(Catalase) Activities in Rats

Group	No. of animal	RBC catalase activities (unit/mg protein)	Duncan grouping
Normal	6	$5361.83 \pm 252.04^{1)}$	A ²⁾
Control	6	4657.94 ± 194.65	B
CGY	6	5024.13 ± 258.02	C
F-value:		13.279	

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 20 weeks-old rat, Control : D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks, CGY : treated with CGY extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

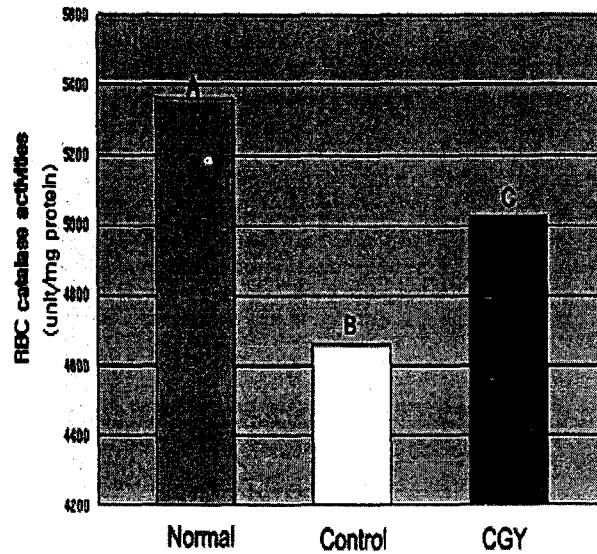


Fig. 4. Effect of CGY extract on the erythrocyte anti-oxidative enzyme (catalase) activities in rats. (A, B, C : Means with the same letter are not significantly different at $\alpha=0.05$ level by Duncan test. $p<0.05$)

有意한 차이가 있었으며($F=13.279$, $p=0.000$, 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 4, Fig. 4).

5. 血漿內 총지방 및 중성지방 濃度

혈장 내 총지방의 농도를 측정한 결과 정상군이 185.78 ± 32.58 , 대조군이 318.97 ± 44.24 , 실험군이 267.50 ± 33.86 mg/100ml로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=19.493$, $p=0.000$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 有意성을 검정한 결과 실험군은 대

조군에 비하여 有意하게 감소하였고, 정상군에 비하여 有意하게 증가하였다(Table 5, Fig. 5).

혈장내 중성지방의 농도를 측정한 결과 정상군이 77.66 ± 8.07 , 대조군이 87.95 ± 8.11 , 실험군이 84.66 ± 7.71 mg/100ml로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 없었으며($F=2.612$, $p=0.106$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 有意성을 검정한 결과 대조군은 정상군에 비하여 有意하게 증가하였고, 실험군은 정상군과 대조군에 대해 각각의 有意성은 없었다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Effect of CGY 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	185.78± 32.58 ¹⁾	A ²⁾	77.66± 8.07 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	318.97± 44.24	B	87.95± 8.11	B
CGY	6	267.50± 33.86	C	84.66± 7.71	AB
F-value:		19.493		2.612	

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 20 weeks-old rat, Control : D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks, CGY : treated with CGY extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

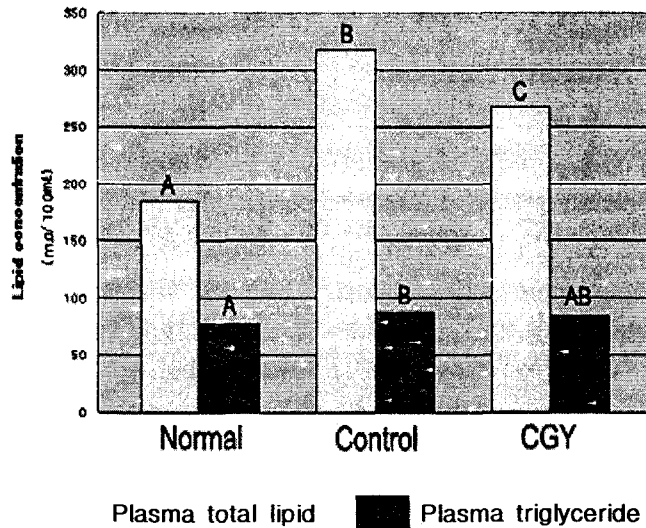


Fig. 5. Effect of CGY extract on the plasma total lipid and triglyceride concentrations in rats.

(A, B, C : Means with the same letter are not significantly different at α=0.05 level by Duncan test. in total lipid p<0.05)

6. 血漿內 총cholesterol 및 HDL-cholesterol 濃度

혈장 내 총cholesterol 농도를 측정한 결과 정상군이 49.86±4.36, 대조군이 63.05±8.30, 실험군이 51.97±8.17 mg/100ml로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며

(F=5.841, p=0.013, ANOVA test) 다중 비교 (Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 대조군이 정상군에 비하여 有意하게 증가하였고, 실험군이 대조군에 비하여 有意하게 감소하였다(Table 6, Fig. 6).

혈장내 HDL-cholesterol 농도를 측정하고 정상군이 27.96±5.67, 대조군이 17.79±3.23, 실험군이 22.30±3.33 mg/100ml로 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=8.705, p=0.003, ANOVA test) 다중 비교 (Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 대조군과 실험군이 정상군에 비해 有意하게 감소하였다(Table 6, Fig. 6).

Table 6. Effect of CGY 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	49.86± 4.36 ¹⁾	A ²⁾	27.96± 5.67 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	63.05± 8.30	B	17.79± 3.23	B
CGY	6	51.97± 8.17	A	22.30± 3.33	B
F-value:		5.841		8.705	

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 20 weeks-old rat, Control : D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks, CGY : treated with CGY extracts and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

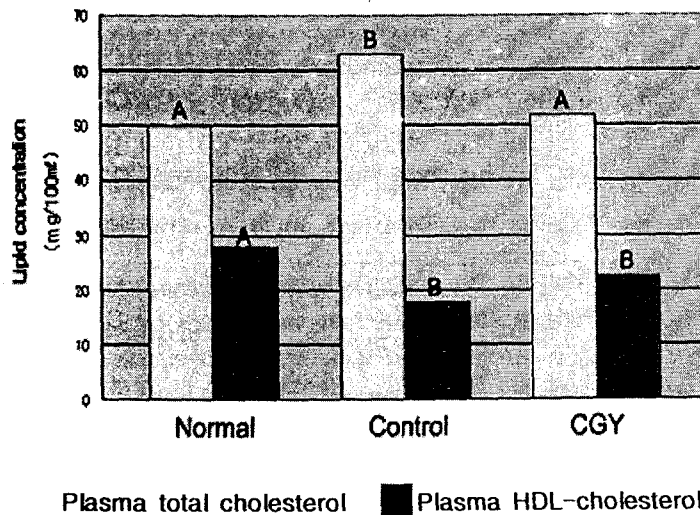


Fig. 6. Effect of CGY extract on the plasma total cholesterol and HDL-cholesterol concentrations in rats. (A, B : Means with the same letter are not significantly different at α=0.05 level by Duncan test in total cholesterol p<0.05)

IV. 考 察

노화란 생명체의 성장과 동시에 시간경과에 따른 연속적인 현상으로 생물학적 과정인 점진적이고 내적인 퇴행성 변화로서, 구조적·기능적 변화가 초래되어 외부환경에 대해 반응하는 예비력과 대응력이 저하되어 형태적·기능적으로 퇴축, 생명력이 감퇴되는 현상을 의미 한다¹⁹⁻²¹⁾.

서양의학에서는 노화의 원인에 대해 생물학적 원인으로 消耗說, 新陳代謝速度說, 生氣說, 衝擊說, 中毒說, 장기의 原發性萎縮說, 細胞學說, 突然變異說, 細胞遺傳學說, 自己免疫說 등을, 생화학적 원인으로 collagen의 노화, 自由遊離基說, 酵素作用障礙說 등을, 형태학적 원인으로 조직재생기능의 노화, 세포수의 변화와 노화, 핵의 변화와 노화, 결합조직의 노화 등을, 생리학적 원인으로 恒常성의 파탄, 적응력의 결함, 반응력의 변화, 장기들의 예비력 감소설 등을 제시하고 있다²⁶⁻³⁰⁾.

이중 自由遊離基說(free radical theory)은 노화가 진행되는 동안 효소에서 유래된 free radical에 의해 세포내 酸化的 손상이 축적되어 질병과 죽음을 초래한다는 설로 인체에 흡입된 효소의 일부가 활성효소인 free radical로 변화되어 脂質의 과산화 반응을 진행시켜 세포막의 파괴, 세포의 노화, 세포의 괴사 그리고 DNA에 대한 세포손상 등을 유발시켜 생체의 기능을 약화시킴으로써 노화가 진행된다는 이론인데, 노화의 정도와 항노화 효과를 측정하는 기준으로 응용되기 쉬워 최근 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 인체 내에는 이러한 활성산소의 독성으로부터 조직을 보호하고 항상성을 유지하려는 예방역할의 항산화계가 존재하는데 superoxide dismutase(SOD), catalase,

glutathione(GSH), glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, protein bound-SH, nonprotein bound-SH, 비타민 E 등이 이에 해당 된다³²⁾.

한의학에서는 《素問·上古天真論》⁶⁾에 “女子……五七陽明脈衰, 面始焦, 髮始墮, 六七三陽脈衰于上, 面皆焦, 髮始白, 七七任脈虛, 太衝脈衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形壞而無子也, 丈夫……五八腎氣衰, 髮墮齒槁, 六八陽氣衰于上, 面焦, 髮鬢頰白, 七八肝氣衰, 筋不能動, 天癸竭, 精少, 腎臟衰, 形體皆極, 八八則齒髮去”라 하였고, 《靈樞·千年篇》³³⁾에 “四十歲……腠理始疏, 榮華頽落, 髮頗斑白……五十歲, 肝氣始衰, 肝葉始簿, 膽汁始滅, 目始不明, 六十歲, 心氣始衰,……八十歲, 肺氣衰, 魄離, 故言善誤, 九十歲 腎氣焦, 四臟經脈空虛, 百歲 五臟皆虛, 神氣皆去”라 하여 연령의 증가에 따른 신체 각 부위의 노화 현상에 대하여 기술하였으며, 양생방법에는 自然適應, 精神調攝, 飲食調理, 起居作息, 藥物保養, 運動收斂 등이 있다.

또한 《素問·上古天真論》⁶⁾에 “天壽過度, 氣脈相通, 而腎氣有餘也”라 하였고, 《醫學正傳》⁸⁾에서는 “腎元盛則壽延, 腎元衰則壽夭”라고 하여 腎氣의 성쇠여부가 수명과 관련 있음을 인식하고 있었다.

그 치료법으로 《抗老益壽方藥》²⁴⁾에서는 補腎方, 健脾補氣方, 養陰方, 補陽氣方을 들고 있으며, 전반적으로 한의학에서 보는 노화의 치료관점은 補腎益元, 補脾腎, 調心補腎, 補氣虛, 補益化痰, 補益扶正 등으로 접근하고 있는 상황이다.

《東醫寶鑑·雜病編》¹³⁾ 虛勞通治藥의 처방중 하나인 千金延壽丹은 《醫學正傳》⁸⁾에 최초로 언급된 처방으로 虛勞의 여러 가지 증상과 일체 허손증을 치료하고 精髓를 大補하

고 心氣를 養하여 心腎相交를 원활하게 해 筋骨이 壯하게 하여 去病益壽하는 효능이 있다.

千金延壽丹에는 補腎益精 補肝腎 滋腎하는 菟絲子, 五味子, 覆盆子, 枸杞子, 柏子仁, 生乾地黃, 熟地黃과 滋陰潤燥 淸肺降火하는 天門冬, 麥門冬, 地骨皮, 補肝腎 强筋骨하는 杜冲, 牛膝, 肉蓯蓉과 더불어 溫中散寒하는 茴香, 川椒, 巴戟 및 健脾補肺 大補元氣하는 山藥, 人蔘, 白茯苓 뿐만 아니라 祛痰利竅 醒神益智하는 石菖蒲, 遠志와 補血和血하는 當歸, 壯元陽 補氣血 益精髓强筋骨하는 鹿茸, 利水滲濕 泄熱하는 澤瀉로 구성되어 있다³⁹⁾.

이에 본 연구에서는 千金延壽丹이 노화와 관련된 지질과산화 및 free radical에 대한 항산화 작용을 규명하고자 14주령의 SD계 흰쥐를 이용하여 D-galactose 피하주사로 노화를 유발함과 동시에 실험군에만 6주 동안 千金延壽丹 추출물을 경구 투여한 후 혈장중의 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) 함량, 총지방, 중성지방, total-cholesterol, HDL-cholesterol 농도를 측정하고 적혈구의 항산화효소계인 SOD, glutathione peroxidase, catalase의 활성을 측정하였으며 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

TBARS(thiobarbituric acid reactive substances) 함량은 혈장 지질의 과산화 정도를 알아보기 위해 측정하였는데 실험결과 대조군에서 유의성 있게 증가하였고, 千金延壽丹 투여군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며(p=0.002), 정상군과 千金延壽丹 투여군 사이에 차이는 없었다.

생체의 기본 단위인 세포는 지질과 단백질로 구성된 세포막으로 둘러싸여 있는데 자국이 계속되면 불포화지방산을 포함한 지질이 변화하여 free radical이 생성되고 여기에 활성화된

산소가 작용하여 다른 지질성분과 연쇄반응하여 과산화지질이 생성되고 있다⁴⁰⁾. 이러한 불포화지방산과의 반응은 연쇄적으로 일어나 계속적으로 많은 free radical 형성을 유도하므로, 불포화지방산의 산화는 세포내에서 일어나는 free radical 형성 반응으로는 가장 중요하게 생각되고 있다. 본 실험결과는 千金延壽丹이 지질과산화물 함량을 감소시키는 효능이 있음을 보여준다.

SOD는 산소 대사과정에서 가장 먼저 생성되는 산소라디칼을 제거하는 효소로 그 역할이 매우 크리라 생각되는데^{41,42)} 본 실험에서 SOD의 활성은 대조군에서 유의성 있게 감소하여 양⁴³⁾ 과 김⁴⁴⁾의 보고와 유사하게 나타났다. 그리고 千金延壽丹 투여군에서도 유의성 있게 증가하여(p=0.003), SOD가 catalase, glutathione peroxidase 등과는 달리 지질과산화 유도반응을 제거하여 지질과산화를 억제하는 항산화작용을 나타내어⁴⁵⁾ 千金延壽丹이 free radical을 포착, 제거하는 작용에 우수한 효능을 나타내는 결과로 추측된다.

GSH-px(glutathione peroxidase)는 산화시키는 과정에서 hydrogen peroxide나 lipid peroxide 등을 제거하는 효소로⁴⁶⁾ 대조군에서는 정상군에 비해 유의성 있게 감소하였고, 千金延壽丹 투여군에서는 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(p=0.000). 이는 千金延壽丹이 노화유발 흰쥐에서 hydrogen peroxide나 lipid peroxide 등을 제거하는 효소의 활성을 증강시키는 효능이 있음을 의미하는 결과로 추측된다.

Catalase는 세포내에서 과산화수소를 제거하는 효소로 ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) 특히 간장과 적혈구에 많이 분포하는데 항산화효소인 Catalase의 활성을 측정한 결과 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였고 千金延壽丹

투여군이 대조군에 비해 유의하게 증가하여 항산화 작용이 있음을 보여주었다.

혈장내 총지방농도는 千金延壽丹 투여군이 대조군과 정상군에 대하여 각각 유의성있게 감소 및 증가하였다.

HDL-cholesterol은 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였으나 千金延壽丹 투여군과 대조군간의 유의한 차이는 없었고(p=0.003), 중성지방은 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다. 이를 통하여 千金延壽丹 투여군은 혈장내 지질농도를 감소시키는 효능이 있음을 알 수 있다.

以上の結果로 千金延壽丹이 노화유발 흰쥐의 항산화효능에 미치는 작용은 free radical의 생성을 방지하는 작용과 superoxide 등을 포착하여 제거하는 항산화작용의 효능이 있음을 알 수 있었으므로, 향후 이들 약물의 인체내 항산화작용에 대한 연구와 다양한 방법의 실험을 통하여 임상에서 노화관련 질환의 예방과 치료 및 수명 연장의 가능성에 접근할 수 있으리라 기대된다.

1. 혈장 지질과산화물(thiobarbituric acid reactive substances)함량은 유의성있게 감소하였다.
2. 적혈구의 superoxide dismutase(SOD)활성도는 유의성 있게 증가하였다
3. 적혈구의 glutathione peroxidase(GSH-px) 활성도는 유의성 있게 증가하였다.
4. 적혈구의 catalase 활성도는 유의성 있게 증가하였다.
5. 혈장내 총지방 농도는 유의성 있게 감소하였고, 중성지방 농도는 감소하였으나 유의성은 없었다.
6. 혈장내 total-cholesterol 농도는 유의성 있게 감소하였고, HDL-cholesterol농도는 유의성이 없었다.

以上の結果로 보아 千金延壽丹은 혈중 지질농도를 감소시켰으며, free radical에 대한 효소의 활성을 증가시켜 노화와 관련된 free radical의 산화작용을 억제하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

V. 結 論

항산화효능을 알아보기 위해 흰쥐에게 D-galactose로 노화를 유발시키면서 6주간 千金延壽丹 추출물을 함께 투여한 후 혈장 TBARS 함량과 적혈구의 SOD, GSH-px, catalase 활성도를 측정하고, 혈장 중의 총지방, 중성지방, total-cholesterol, HDL-cholesterol 농도를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

參 考 文 獻

1. 배영철, 이영진. 노인의학 1. 서울:고려의학. 1996:21.
2. Medvdev ZA. Ageing at the molecular level and some speculations concerning maintaining the functioning of systems for replication of specific macromolecules. In Biological Aspects of aging. New York. Columbia University press. 1962:255-66.

3. Harman D. The free radical theory of aging: In free radicals in Biology. Vol 5. New York: Academic Press. 1982: 255-75.
4. Heicklen J, Brown E. Increase in life expectancy for mice fed diethylhydroxylamine. J Gerontol. 1987;42(6):674-80.
5. Szilard L. On the nature if ageing process. Proc Natl Axad Sci. USA. 1959;45:30-45.
6. 洪元植 編. 精校黃帝內經. 서울:東洋醫學研究院. 1981:19-20,111,246,301.
7. 南京中醫學院醫經教研組 黃帝內經靈樞譯釋, 上海:上海科學技術出版社. 1986:337.
8. 虞博. 醫學正傳. 서울:成輔社. 1986:9, 159.
9. 沈連生 主編. 神農本草經中藥彩色圖譜: 中國中醫藥出版社. 1996:2-222.
10. 윤철호. 左歸飲과 右歸飲이 노화 Rat의 過酸化 脂質 生成 및 活性酸素 生成 系 酵素活性에 미치는 影響. 東國大學 校大學院. 1994.
11. 尹一智. 六味地黃湯이 老化 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.
12. 李東濬. 老化過程의 環境에서 補裨湯이 脾臟의 代謝酵素系에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 1999.
13. 東醫寶鑑國譯委員會 譯. 對譯東醫寶鑑. 서울:法人文化社. 1999:186.
14. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. Methods Enzymol. 1984;105: 328-31.
15. Flohé L. Becker R. Brigelius R. Lengfelder E. Ötting F. Convenient assays for superoxide dismutase. CRC handbook of free radicals and anti-oxidants in biomedicine. 1992:287-93.
16. Flohé L. Determination of glutathione peroxidase. CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. 1992:281-6.
17. Johansson LH. Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. Analytical Biochemistry. 1988;174(1):331-6.
18. 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.
19. 張錫泰. 피부과학. 서울:여문각. 1994: 23-5.
20. 디팍 초프라. 사람은 늙지 않는다. 서울:정신세계사. 1994:21-2,102-3.
21. 徐舜圭. 성인병·노인병학. 서울:고려의학. 1992:9-18,28-30,33-5,73-7,107,251-4, 277-80,343-4,402,475-7,505-6.
22. 杜鎬京. 東醫腎系學. 서울:동양의학연구원. 1993:1325-83.
23. 이정복. 장수학. 서울:과학백과사전출판사. 1987:11-99,492-576.
24. 李聰甫. 傳統老年醫學. 湖南:湖南科學技術出版社. 1988:212-5.
25. 金光湖. 東양예방의학. 서울:경희대한의대 예방의학교실. 1995:139-46,240-4.
26. 林乾良. 養生壽老集. 上海:上海科學技術出版社. 1982:26-7,110-25,132-43.
27. 金永坤 外. 프리라디칼. 서울:여문각.

- 1997:455,564.
28. 李吉相. 세계장수촌 탐방. 서울:대광문화사. 1978:200-48.
 29. Cutler, R. G., Antioxidant aging and longevity. *Free Radicals in Biology* (ed.Pryor, W.), Academic Press, Vol. 6, 1984:371-424.
 30. Feher J. Csomos G. and Vereckei A., The free radical theory of aging, *Free Radicals Reactions in Medicine*, Springer-Verlag, Berlin, 1987:57-9.
 31. 오유진. 활성산소가 질병의 원인이었다. 서울:이화문화출판사. 1997:57-67.
 32. 蘇敬順 外. 鹿蓼地黃湯이 抗老衰에 미치는 영향. 서울:경희대학교논문집. 1995:127-48.
 33. 南京中醫學院醫經教研組 黃帝內經靈樞譯釋, 上海:上海科學技術出版社. 1986:337.
 34. 張文彭 外. 清宮長春丹對老年腎虛證血漿過氧化脂質,高密度蛋白,膽固醇水平影響的研究. 中醫雜誌. 1989;30(3):34.
 35. 梁曉春 外. 腎虛,衰老與自由基的關係以及補腎藥對自由基的影響. 中西醫結合雜誌. 1990;10(8):511-2.
 36. 陳晏珍 外. 腎虛與超氧化物每關係初探. 中醫雜誌. 1989;30(3):42.
 37. 王學美 外. 五子衍宗液延緩衰老的臨床觀察. 中國中西醫結合雜誌. 1992;12(1):23-5.
 38. 杜辛外. 環少丹膠囊抗衰老急治療腎陽虛臨床觀察. 中國中西醫結合雜誌. 1992;12(1):20-2.
 39. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 1995:190,237,302, 305,339,344,427,494,496,523,531,537,545,549,550,556,568,578,580,588,589,596,622,630.
 40. 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.
 41. 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.
 42. 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.
 43. 양재수. 노화촉진 생쥐에서 산소라디칼 관련 물질의 검색에 관한 연구. 서울대학교대학원. 1989.
 44. 김주섭. 노화촉진 생쥐의 각종 장기에서 산화성 변성과 산소라디칼 제거효소계의 활성에 관한 연구. 서울대학교대학원. 1991.
 45. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals transition metals and disease. *Biochem*. 1984; 1:219.
 46. Watabe T, Ishizuka T, Isobe M, Ozawa N. 7-hydroxymethylsulfatester as an active metabolite of 7,12-dimethylbenzanthracene. *Science*. 1982: 215,337,403.