

延年益壽不老丹이 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향

길 호 식, 이 송 실, 이 상 재, 김 광 호
경희대학교 한의과대학 예방의학교실, 경희대학교 한의학연구소

Effect of Younnyeniksoobulrodan(延年益壽不老丹) on Antioxidant Capacity in D-galactose induced Aging Rats

Ho-Sik Khil, Song-Shil Lee, Sng-Jae Lee, Kwang-Ho Kim

Dept. of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University. Institute of Oriental Medicine, Kyung-Hee University.

Objectives: Younnyeniksoobulrodan(延年益壽不老丹) composed of Polygonum multiflorum THUNB. and some medical herbs is known as formula of senescence delay effect. The purpose of this study is to investigate the effect of Younnyeniksoobulrodan(延年益壽不老丹) on antioxidant enzyme activity such as Thiobarbituric acid reactive substance(TBARS), Superoxide dismutase(SOD), Catalase(CAT), Glutathione peroxidase (GSH-px) in rat erythrocytes and liver.

Methods: Sprague-Dawley rats divided into 4 groups, Young group(8 weeks old, N-8), Aging group(18 weeks old, N-18), pathologically induced aging group(injected D-galactose 50mg/kg, 1time/day for 6 weeks, CON) and Younnyeniksoobulrodan(延年益壽不老丹) administered group(D-galactose 50mg/kg and Younnyeniksoobulrodan extracts 840.0mg/kg 1time/day for 6 weeks, YIB). Rats were sacrificed and TBARS, SOD, CAT, and GSH-px were measured in rat erythrocytes and liver.

Results: Plasma and liver TBARS concentrations of YIB group were significantly lower than those of control. Red blood cell(RBC) SOD activities of YIB group was increased($F=3.445$, $p=0.033$, ANOVA test), and RBC catalase activities of all experimental group were not significantly different. RBC GSH-px activities of YIB group was increased($F=9.365$, $p=0.0001$, ANOVA test). Liver SOD activities of YIB group was higher than those of control($F=4.967$, $p=0.008$, ANOVA test). Liver catalase activities of all experimental group were not significantly different, and liver GSH-px activity of YIB group was significantly higher than that of control($F=3.846$, $p=0.022$, ANOVA test).

Conclusions: According to the above results, it is considered that Younnyeniksoobulrodan is effective in inhibiting lipid peroxidation and increasing antioxidative enzyme activities in D-galactose induced aging rat.

Key words: Younnyeniksoobulrodan(延年益壽不老丹), Aging, TBARS, SOD, CAT, GSH-px

서론

老化란 연령이 증가함에 따라 발생하는 점진적인 구조적 변화로서 질병이나 사고에 기인하

지 아니하고 궁극적으로는 사망을 초래하는 것이다1). 서양의학에서 파악한 老化的 원인에 대한 가설은 크게 두 가지로 분류할 수 있는데 첫째는, 유전자에 의해 생명체의 老化和 수명이

예정되어 있다는 老化예정설이고 둘째는, 여러 가지 해로운 인자들에 의한 생체 물질의 손상이 축적되어 老化에 이른다는 유해인자 손상설이다4). 유해인자 손상설 중에서 가장 많이 연구되고 있는 것이 Harman에 의해 제안된 老化의 活性酸素說인데 이는 정상적인 代謝과정 중에 부수적으로 발생되기 마련인 여러 가지 活性酸素들에 의해 생체 물질이 酸化의 손상을 받게 되고 이러한 손상들이 축적되어 老化에 이르게 된다는 설이다3),5)-8),53),85).

韓醫學에서는 老化의 원인에 대하여 腎臟毀虛, 脾胃虛衰, 心臟虛衰, 肝臟衰憑, 正氣衰竭 및 陰陽失調와 관계되며, 인체의 老化를 陰陽의 變化, 臟腑의 變化, 經絡의 變化, 精神의 變化, 氣血의 變化로 보고 있다.2),10),29) 그리고 老化를 지연하며 수명을 연장하기 위한 여러 방법들으로써 養生, 導引, 延年益壽 藥物 등의 여러 방법들이 제시되어 있는데29),30),51), 그 중에서 약물을 복용하여 이러한 효과를 얻기 위한 처방으로 瓊玉膏, 延齡固本丹, 斑龍丸 등과 함께 延年益壽不老丹 이 제시되어 있다11). <東醫寶鑑>에 의하면 延年益壽不老丹은 병들지 않게 하며 건강하고 오래 살게 하는 약의 하나로 “精을 잘 생기게 하고 腎을 補한다”라고 기록되어 있어서11) 老化 지연 효과가 있을 것으로 예상되어서 본 실험에 사용하는 약물로 선택하게 되었다.

延年益壽不老丹의 老化 遲延 효과를 실험적으로 알아보기 위하여 抗酸化능에 미치는 영향을 측정하기 위한 실험을 진행하였다. 이미 여러 한약제의 抗酸化 效果에 對한 報告들이 있는데 單味製로서는 高麗人蔘23),25),57), 柴胡26), 薏苡仁, 苦參41), 菟絲子46) 등27),48),57),59),65),76),78) 이 있고, 藥鉞製劑로는 五加皮34), 桂枝35), 覆盆子36) 등37)-40),44)의 抗酸化 效果를 研究한 報告들이 있고, 또한 복합제제로는 醒心散14), 補肺散16), 鹿蔘地黃湯17) 등15),19),22),24),31)-33)

,42)-49),55),56),58),60),61),64),66) 의 抗酸化效果에 對한 報告들이 있었으며, 氣功63),67) 의 抗老化 效果에 대한 報告도 있었다.

본 연구에서는 실험을 위하여 張82)의 방법을 사용하여 D-galactose를 6주간 피하에 투여하여 老化가 촉진된 쥐에게 延年益壽不老丹을 경구투여한 후 肝과 腎臟의 重量變化, 血漿과 肝의 脂質過酸化物, 적혈구의 superoxide dismutase(SOD) 活性, 적혈구의 glutathione peroxide(GSH-px)活性, 적혈구의 catalase 活性, 간의 superoxide dismutase(SOD) 活性, 간의 glutathione peroxide(GSH-px)活性, 간의 catalase 活性를 측정하여 비교한 결과 유의한 결과를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

실험방법

1. 動物 및 材料

(1) 動物

생후 6주와 10주된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 구입하여 實驗 시작 전 2주일간 고품배 합사료(구성성분: 조단백질 21.1%·조지방 3.5%·조섬유 5.0%·조회분 8.0%·칼슘 0.6%·인 0.6%)로 적응시켰다. 적응기간 후 체중이 180±20g(8주령) 400±20g(12주령)인 쥐들을 實驗에 사용하였다. 實驗동물은 한 마리씩 분리하여 stainless steel cage에서 사육하였고, 사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

(2) 材料

본 實驗에서 사용된 약제는 慶熙醫療院 藥劑科에서 엄선한 것을 사용하였으며 처방내용은 東醫寶鑑에 기재된 延年益壽不老丹으로 내용은 다음과 같으며 분량은 한첩 분량으로 환산하여 조절하였다11).

延年益壽不老丹

韓藥名	生藥名	用量
何首烏	POLYGONI MULTIFLORI RADIX	4.0g
白何首烏	CYNANCHI WILFORDII RADIX	4.0g
地骨皮	LYCII RADICIS CORTEX	5.0g
白茯苓	FORIA	5.0g
乾地黃	REHMANNIAE RADIX	3.0g
熟地黃	REHMANNIAE RADIX PREPARAT	3.0g
天門冬	ASPARAGI RADIX	3.0g
麥門冬	LIRIOPIS TUBER	3.0g
人蔘	GINSENG RADIX	3.0g
總量		33.0g

2. 實驗方法

(1) 實驗群 설정

實驗실 환경에서 2주간 적응시킨 SD계 rat를 체중별로 고르게 분포시켜 8주령의 無處置群(N-8 group)과 12주령의 無處置群(N-18 group), D-galactose 투여군(Control group), 延年益壽不老丹 투여군(YIB group)으로 나누어 각 群에 6마리씩 배정하였다.

N-8군은 바로 실험에 사용하였고 N-18군은 어떤 처치도 하지 않고 고형사료와 물만을 6주간 充分히 供給하였다. Control군은 12주령 rat에 D-galactose를 6주간 피하주사하여 老化를 유발하였다. YIB군은 D-galactose를 피하주사함과 동시에 延年益壽不老丹을 경구 투여 하였다.

(2) 老化 誘發

老化촉진유발은 D-galactose를 피하주사하는 방법을 사용하였다. D-galactose (Sigma, USA)를 50mg/kg의 비율로 1회/1일 6주간연속으로 rat 背部에 피하주사 하였다.

(3) 檢液의 준비

延年益壽不老丹 10첩 분량인 330g을

5,000cc의 등근 플라스크에 3,000cc의 증류수와 함께 넣은 다음 냉각기를 부착하고 3시간 동안 煎湯하여 0.2 μ m filter로 여과한 여액을 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 延年益壽不老丹엑기스 61.0g을 얻어 이를 實驗에 필요한 농도로 증류수에 녹여 조정하여 50ml cornical tube(Falcon, USA)에 넣어 2-4 $^{\circ}$ C의 냉장고에 보관하였으며, 사용할 때 water bath에 넣어 gel상태를 완전히 녹여 사용하였다.

(4) 檢液 투여

延年益壽不老丹 추출물은 120.0mg/200g의 비율로 檢液을 증류수로 희석하여 YIB군 흰쥐에 1일 1회 6주간 경구 투여하였다.

(5) 血液과 장기의 채취

實驗기간이 종료된 實驗동물은 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 후 10ml 주사기를 이용하여 심장에서 血液을 채취하였다. 이때 주사기는 血液 응고를 방지하기

위해 3.8% sodium citrate 용액 0.1ml로 내부를 coating하여 사용하였다. 채취된 血液은 응고되는 것을 방지하기 위해 EDTA(Ethylene Diamine Tetra Acetate)가 들어있는 polystyrene 원심분리관에 담아 ice bath에 20분간 방치한 후 원심분리기로 2,800rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 아래층의 red blood cell(RBC)과 혈장을 분리하고, 혈장은 혈장내 脂質過酸化 物 量과 지방 수준을 측정하기 위해 -70°C deep freezer(SANYO, JAPAN)에 보관하였다.

아래층의 RBC는 ice cold saline을 첨가하여 원심분리기로 2,800rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하는 세척과정을 세차례 반복하여 washed RBC를 얻었다. 이 RBC를 cell과 0.9% NaCl 용액의 부피비가 1:1이 되도록 희석하여 50% hematocrit suspension(RBC suspension)을 만든 후 抗酸化酵素의 活性를 측정하기 전까지 -70°C deep freezer에 보관하였다.

血液을 채취한 후 ice bath위에서 즉시 간과 신장을 떼어 ice cold saline에 넣어 세척한 다음 여지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 바로 -70°C deep freezer에 보관하여 過酸化 物 量과 酵素活性 측정에 사용하였다.

(6) 혈장과 간의 Thiobarbituric Acid Reactive Substance 함량

혈장의 Thiobarbituric Acid Reactive Substance(TBARS) 함량은 혈장 20 μ l에 1/12N 황산 4ml와 10% phosphotungstic acid 0.5ml를 넣고 5분간 방치한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고, 침전물은 위의 과정을 다시 한번 반복한다. 이때 얻어진 침전물에 증류수 2ml와 thiobarbituric acid(TBA) reagent 1ml를 가하여 잘 섞은 후 뚜껑을 단단히 막고 95°C water bath에서 1시간동안 incubation시켰다. 여기에 n-butanol 3ml를 가하여 격렬히 섞은 후 3,000rpm에서 15

분간 원심분리하여 얻은 상층액에 있는 TBARS의 양을 1,1,4,4,-tetramethoxypropane을 표준용액으로 하여 luminescence spectrometer (Perkin Elmer, LS50)로 excitation 515nm, emission 553nm에서 정량하였다.

간의 TBARS 함량은 간 1g에 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) 3ml를 가하여 균질화시킨 후 1.5ml씩 duplicate로 취하여 33mM FeSO₄ 용액 50 μ l, 0.33mM butylated hydroxytoluen(BHT) 50 μ l, 33mM L-ascorbic acid 용액 50 μ l를 가하여 잘 섞은 후 37°C에서 30분간 incubation시켰다. 여기에 10% trichloroacetic acid(TCA) 용액 1.5ml를 가하고 12,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 2ml에 1% thiobarbituric acid(TBA) reagent 0.5ml를 가하여 10분간 끓이고 실온에서 냉각시켜 3,000rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상층액을 취하여 spectrophotometer (Spectronic 301, Milton Roy)로 532nm에서 비색정량하였다.

(7) 적혈구와 간의 superoxide dismutase 活性

적혈구의 superoxide dismutase(SOD) 活性은 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 섞어 hemoglobin을 침전시켰다. 여기에 280 μ l의 증류수를 가하여 원심분리기로 20,000 \times g, 4°C에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 SOD 活性을 측정하기 위한 酵素원으로 이용하였다. SOD 活性은 xanthine이 xanthine oxidase에 의해 superoxide를 생성하고, 이 superoxide가 ferricytochrome c(Fe⁺⁺⁺)를 ferrous cytochrome 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℃로 유지시킨 용액 2ml에다 酵素시료 50 μ l를 가하고, 사용 직전에 xanthine oxidase 용액을 제조하여 50 μ l를 첨가시켜 ferricytochrome c의 환원이 방해되는 정도를 550nm(HP 8453, Hewlett Packard)에서 30초 간격으로 3분간 비색정량하였다. 이때 SOD의 분당 活性 정도는 ferricytochrome c의 환원을 50% 방해하는 SOD의 양을 1 unit으로 하여 나타내었고, 1 unit을 흔히 'MaCord and Fridovich unit'라고 한다.

간의 SOD 活性을 측정하기 위해 간 1g을 10ml의 50mM phosphate- 0.25M sucrose- 0.5mM EDTA buffer(pH 7.4)로 균질화시킨 후 10,000 \times g, 4℃에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액 중 3ml는 glutathione peroxidase의 酵素원으로 이용하였고, 5ml는 SOD의 酵素원으로 사용하였다. 즉, 3ml의 상층액은 4℃, 105,000 \times g에서 50분간 원심분리한 후 그 상층액을 -70℃ deep freezer에 냉동보관하여 glutathione peroxidase (GSH-px)의 酵素원으로 사용하였고, 5ml의 상층액은 30초씩 2회 ultrasonication(Heat System- Ultrasonics, Inc., Ultrasonic processor W-385)시키고 다시 2ml를 취해 chloroform과 ethanol의 부피비가 5:3 이 되도록 만든 용액 800 μ l를 가하여 2분간 강하게 혼합한 후 20,000 \times g, 4℃에서 20분간 원심분리시켜 얻은 상층액을 SOD 酵素원으로 하였다. 간의 SOD 活性은 적혈구에서와 동일한 방법으로 측정하였다.

(8) 적혈구와 간의 catalase 活性

적혈구의 catalase 活性은 적혈구 현탁액을

10배의 10mM Tris-1mM EDTA buffer(pH 7.4)로 용혈시킨 후 0.01M phosphate buffer(pH 7.0)로 희석하여 酵素원으로 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 酵素원을 600 μ l 가하여 20℃에서 20분간 shaking 시키면서 반응이 일어나게 한 후 7.8M KOH 300 μ l를 가하여 반응을 종결시키고, 34.2mM Purpald 용액을 600 μ l를 가하여 20℃에서 10분간 shaking시킨 후 65.2mM potassium periodate를 300 μ l를 가하여 발색시켰다. 이를 9,500 \times g에서 10분간 원심분리시켜 spectrophotometer(Spectronic 301, Milton Roy)로 550nm에서 흡광도를 측정한 후 formaldehyde를 표준용액으로 하여 얻은 표준곡선으로부터 活性을 계산하였다.

간의 catalase 活性을 측정하기 위하여 먼저 간 0.2g을 20배의 25mM KH₂PO₄-NaOH buffer(pH 7.0)에 넣고 균질화시키고 이 homogenate를 같은 buffer로 60배 희석한 후 ice bath에서 ultrasonicator(Heat System-Ultrasonics, Inc., Ultrasonic Propessor W-385)로 15초씩 2회 반복하여 sonication한 후 적혈구에서와 같은 방법으로 catalase 活性을 측정하였다.

(9) 적혈구와 간의 glutathione peroxidase 活性

적혈구의 glutathione peroxidase(GSH-px) 活性은 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 酵素원으로 사용하였다.

Glutathione peroxidase의 活性측정은 GSH-px가 환원형 glutathione (GSH)과 H₂O₂

의 반응을 촉진시켜 환원형 GSH를 酸化형 glutathione(GSSG)으로 전환시키고, GSSG는 glutathione reductase의 作用으로 NADPH의 H를 받아 다시 환원형인 GSH로 되는데, 이때 형광을 띠는 NADPH는 H를 떼앗겨 형광을 띠지 않는 酸化형 NADP가 된다는 원리를 이용하였다. Tube에 0.1M phosphate buffer 500 μ l, 10mM GSH 100 μ l, glutathione reductase 100 μ l를 넣고, 酵素원 100 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation시킨 후 1.5mM NADPH 100 μ l를 넣어 다시 3분간 incubation시켰다. 여기에 미리 37 $^{\circ}$ C로 데워진 12mM t-butyl hydroperoxide를 가하여 반응을 개시시킨 후 spectrophotometer로 365nm에서 30초 간격으로 3분간 GSH-px의 活性를 측정하여 unit단위로 나타내었다. 여기에서 1 unit은 1분동안 1.0 μ M의 GSH가 H₂O₂의 作用으로 GSSG로 酸化되는 것을 측매한다.

간의 GSH-px 活性 측정은 간의 SOD 活性 측정시 제조하여 보관한 酵素원을 이용하여 적혈구와 동일한 방법으로 측정하였는데, 간의 경우는 적혈구와 달리 t-butyl hydroperoxide 대신 H₂O₂를 사용하였고, catalase의 作用을 억제하기 위하여 1mM sodium azide를 첨가하였다.

(10) 효소원의 단백질 함량

각 酵素들의 活性측정을 위해 사용된 적혈구와 간의 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 laurylsulfate(SDS)를 포함하는 solution A와 4.0% CuSO₄인 solution B를 100:1(v:v)로 혼합하여 solution C를 만들었다. 酵素원 50 μ l에 solution C 3ml를 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 여기에 동량의 증류수로 희석된 phenol reagent 300 μ l를 넣어 실온에서 45분

간 방치하였다가 파장 660nm에서 spectrophotometer로 비색정량하였다.

3. 통계분석

모든 통계분석은 윈도우용 SPSS(ver. 8.0)를 이용하여 실시하였다. 기술통계학적 분석을 통해 각 집단에서의 측정값을 평균 \pm 표준편차로 요약하였으며, 각 집단간의 유의성은 ANOVA test with multiple comparisons (Duncan's method)으로 분석하였고, 유의수준은 0.05로 하였다.

성 적

1. 간과 신장의 중량변화

實驗에 사용된 쥐의 간중량은 N-8군이 13.86 \pm 0.19g, N-18군이 18.93 \pm 1.06g, Control군이 15.35 \pm 0.37g, YIB군이 18.11 \pm 0.50g으로 나타나 집단 간 간중량의 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 (F=20.593, p=0.0001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 N-18군과 YIB군에서 Control군에 비하여 有意한 증가를 나타내었다. (Table I) 實驗에 사용된 쥐의 신장중량은 N-8군이 2.28 \pm 0.07g, N-18군이 3.47 \pm 0.12g, Control군이 2.70 \pm 0.05g, YIB군이 3.83 \pm 0.05g으로 나타나 집단 간 간중량의 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 (F=89.075, p=0.0001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 N-18군과 YIB군에서 Control군에 비하여 有意한 증가를 나타내었다.

2. 혈장과 간의 脂質過酸化物

혈장 지질의 過酸化 정도를 알아보기 위해 脂

質過酸化 物 함량(Thiobarbituric Acid Reactive Substances: TBARS values)을 측정 한 결과 N-8군이 36.30±2.47 nmol/100ml, N-18군이 39.17±3.25nmol/100ml, Control군이 54.00±3.68nmol/100ml, YIB군이 45.17±2.39nmol/100ml로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 (F=7.141, p=0.001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 有意성을 검정한 결과 N-18군과 YIB군에서 Control군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다. (Table II) 간의 脂質過酸化 物 함량

(Thiobarbituric Acid Reactive Substances: TBARS values)을 측정 한 결과 N-8군이 5.32±0.32 nmol/g, N-18군이 6.75±0.64nmol/g, Control군이 8.98±0.89nmol/g, YIB군이 7.75±0.78nmol/g으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=6.975, p=0.002, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 有意성을 검정한 결과 N-18군은 Control군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으나 YIB군은 유의한 차이가 없었다.

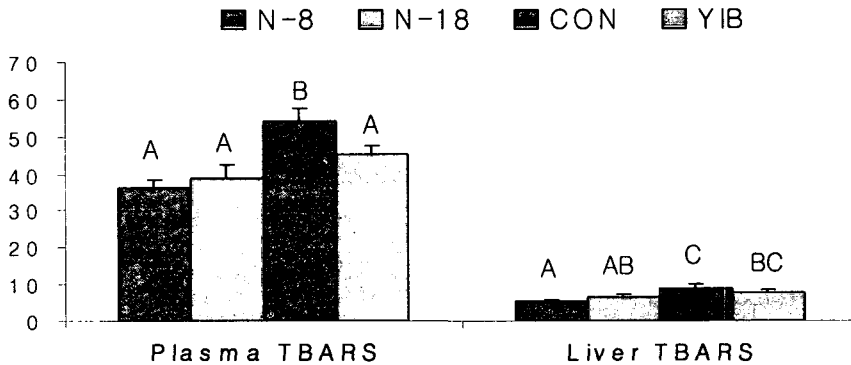


Fig. 1. Plasma and liver TBARS levels

Means and standard error are shown

Calculated by ANOVA test. Different superscripts are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test

N-8: not specially treated in 8 week-old rat. N-18: not specially treated in 18 week-old rat.

Control: D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks. YIB: treated with Younnyeniksoobulrodan(YIB) and D-galactose (50mg/kg/rat) for 6 weeks

3. 적혈구의 superoxide dismutase(SOD) 活性

적혈구에서의 抗酸化 酵素들의 活性을 알아보기 위해 抗酸化 酵素인 superoxide dismutase(SOD)의 活性을 측정 한 결과 N-8군이 23.00±1.60, N-18군이 20.33±1.65,

Control군이 16.00±1.53, YIB군이 21.50±1.41으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=3.445, p=0.033, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 有意성을 검정한 결과 YIB군이 Control군에 비하여 유의

한 증가를 나타내었다.

4. 적혈구의 glutathione peroxidase (GSH-px) 活性

적혈구에서의 抗酸化 酵素들의 活性을 알아보기 위해 抗酸化 酵素인 glutathione peroxidase (GSH-px)의 活性을 측정 한 결과 N-8군이 0.209 ± 0.015 , N-18군이 0.157 ± 0.021 , Control군이 0.108 ± 0.018 , YIB군이 0.238 ± 0.019 로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=9.365$, $p=0.0001$, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's

method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 YIB군이 Control군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.

5. 적혈구의 Catalase 活性

적혈구에서의 抗酸化 酵素들의 活性을 알아보기 위해 抗酸化 酵素인 Catalase의 活性을 측정 한 결과 N-8군이 2942.1 ± 152.7 , N-18군이 2976.8 ± 107.2 , Control군이 2749.2 ± 175.2 , YIB군이 3070.2 ± 201.6 으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 없었다($F=0.776$, $p=0.519$, ANOVA test).

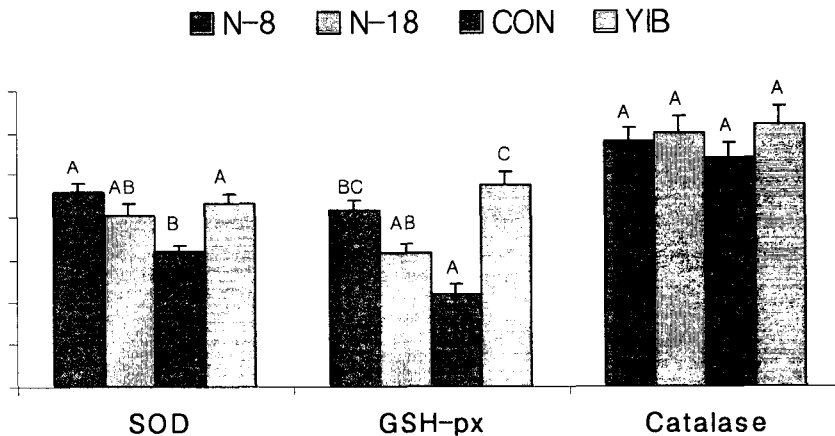


Fig. 2. Erythrocyte antioxidative enzyme activities

Means and standard error are shown

Calculated by ANOVA test. Different superscripts are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test

N-8: not specially treated in 8 week-old rat. N-18: not specially treated in 18 week-old rat. Control: D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks. YIB: treated with Younnyeniksoobulrodan(YIB) and D-galactose (50mg/kg/rat) for 6 weeks

Superoxide dismutase(SOD) activities are expressed as Units per minute per mg protein(1 unit will inhibit the rate of reduced of cytochrome c by 50% in a coupled system with xanthine oxidase at pH 7.8 and 25°C in a 3.0ml reaction volume). Glutathione peroxidase(GSH-px) activities are expressed as unit per mg protein(1 unit will catalyze the oxidation by H_2O_2 of 1.0μmol of reduced glutathione to oxidized glutathione per min at pH 7.0 and 25°C). Catalase activities are expressed as nmole formaldehyde utilized as standard per mg protein.

6. 간의 superoxide dismutase(SOD) 活性

간의 抗酸化 酵素인 superoxide dismutase(SOD)의 活性을 측정 한 결과 N-8군

이 39.52 ± 1.53 , N-18군이 37.83 ± 2.38 , Control군이 39.80 ± 1.86 , YIB군이 48.40 ± 2.53 으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며($F=4.967$,

p=0.008, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意性을 검정한 결과 YIB군이 Control군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.

7. 간의 glutathione peroxidase (GSH-px) 活性

간의 抗酸化 酵素인 glutathione peroxidase (GSH-px)의 活性을 측정한 결과 N-8군이 1.355±0.012, N-18군이 1.264±0.014, Control군이 1.138±0.026, YIB군이 1.404±0.129로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며(F=3.846,

p=0.012, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意性을 검정한 결과 YIB군이 Control군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다.

8. 간의 Catalase 活性

간의 抗酸化 酵素인 Catalase의 活性을 측정한 결과 N-8군이 1840.6±298.3, N-18군이 2002.3±583.3, Control군이 1380.8±27.4, YIB군이 1912.3±498.2로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 없었다(F=0.395, p=0.758, ANOVA test).

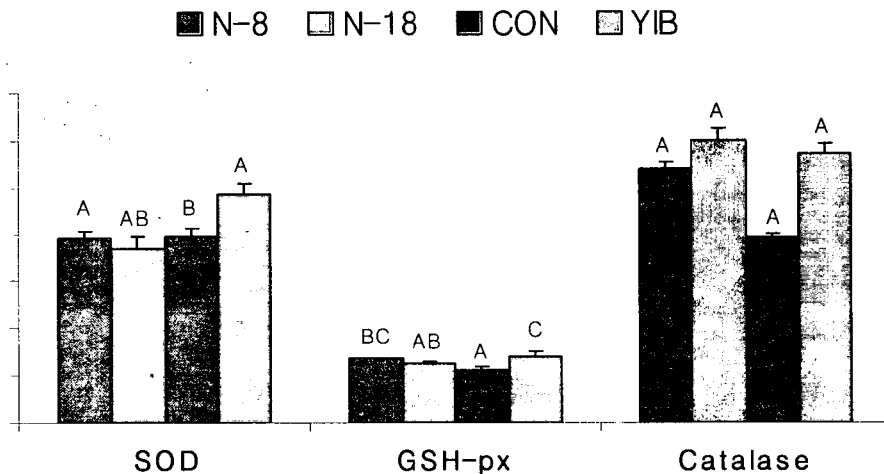


Fig. 3. Liver antioxidative enzyme activities

Means and standard error are shown

Calculated by ANOVA test. Different superscripts are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test

N-8: not specially treated in 8 week-old rat. N-18: not specially treated in 18 week-old rat. Control: D-galactose(50mg/kg/rat) was injected for 6 weeks. YIB: treated with Younnyeniksoobulrodan(YIB) and D-galactose (50mg/kg/rat) for 6 weeks

Superoxide dismutase(SOD) activities are expressed as Units per minute per mg protein(1 unit will inhibit the rate of reduced of cytochrome c by 50% in a coupled system with xanthine oxidase at pH 7.8 and 25°C in a 3.0ml reaction volume). Glutathione peroxidase(GSH-px) activities are expressed as unit per mg protein(1 unit will catalyze the oxidation by H₂O₂ of 1.0μmol of reduced glutathione to oxidized glutathione per min at pH 7.0 and 25°C). Catalase activities are expressed as nmole formaldehyde utilized as standard per mg protein.

고찰

21세기에 사회적 인구구성의 고령화 시대가 다가오면서 의료형태도 단순하게 질병을 예방 치료하는 범위에서 한발 더 발전하여 인간의 육체적 정신적 건강과 더불어 삶의 질적 향상 특히 노인인구의 건강관리, 노인성 질환과 각종 성인병 및 난치병의 예방치료 등 건강증진을 목적으로 하는 새로운 과제에 직면하게 되었다. 현재 한의학에서는 건강증진에 효과적인 전통 방법들이 世人의 주목을 끌기 시작하면서 이에 대한 현대의학적 연구가 활발하게 진행되고 있고, 동서의학적 측면에서 접근하는 실험적 연구도 다양하게 전개되고 있다. 그 일환으로 老花機轉 및 그 防止對策에 관한 신경내분비, 대사 기능, 면역기능, 영양학 및 분자생물학적 측면에 이르기까지 深度 있는 연구들이 진행되어 왔다(3),28),54).

老花는 크게 자연노쇠(生理的 老花)와 각종 질병에 의하여 발생하는 人體組織, 器官 및 臟器 등의 기능감퇴(病理的 老花)로 분류되며, 최근에는 생명체에 대한 深層 연구가 활발히 전개되면서 老花기전에 대한 인식은 더욱 세분화 되어 계획이론(programmed theory, 진화론적 유전요인), 자유기 이론(free radical theory), 오류설(error catastrophe theory, 체단백질 합성의 오류), 체세포 돌연변이설과 유전적 불안정성(DNA의 불안정성) 및 DNA의 변형 등을 통하여 파악되고 있다. 하지만 현재까지 제안된 대부분의 假說들은 그 어느 이론도 생체의 老花과정을 완전히 설명할 수 있는 만족스러운 근거를 제시하지 못하였고, 단지 老花를 어느 특정한 관점에 중점을 두고 解明한 것으로, 이와 같은 가설들은 서로 배타적인 것이 아니라 老花기전을 아직까지 완전히 설명할 수 없는 단계에서는 상호 보완적으로 존재하고, 老花에 대한 이해는 나이에 따르는 신체 장기 및 면역 기능의 변화와 질병 양상, 또한 영양소 대사의

변화, 유전적 요인 등 포괄적인 접근방법에서 이루어져야 한다는 주장이 지배적이다(5)-8).

자유기 이론에서 생체 내에는 자유기를 비롯한 활성산화물질로부터 세포막과 세포 내 물질을 보호하기 위해 抗酸化 system이 존재하는데 catalase, SOD, GSH-px와 같은 抗酸化 효소들에 의한 효소적 방법과 flavonoids를 포함하는 polyphenol류와 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E 등의 작용에 의한 비효소적 방법이 있다.

抗酸化 효소들을 살펴보면, 우선 SOD는 free radicals 생성과정 초기에 생성되어 다른 free radical의 생성 및 lipid peroxidation 과정을 단계적으로 일으키는 superoxide anion radical을 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 만들어 주는 효소이다. 이 H₂O₂의 제거는 catalase와 GSH-px가 담당한다. 조직의 peroxisomes에서 대부분 발견되는 catalase는 SOD로 인해 생성된 H₂O₂를 H₂O로 환원시키는 catalytic activity와 methanol, ethanol, formic acid, phenol과 같은 hydrogen donor의 산화에 관여하는 peroxidic activity를 가진다(83)84). 또한 GSH-px는 생체 내에서 H₂O₂와 환원형 glutathion(GSH)이 산화형 glutathion (GSSG)으로 되면서 물을 생성하게 된다. GSH-px은 이외에도 과산화물(ROOH)과 GSH로부터 GSSG, alcohol(ROH) 및 물을 생성하는 반응을 촉매 함으로써 조직의 과산화적 손상을 방지한다(28),86).

한의학에서는 일찍부터 老花 기전에 대한 인식과 老花 遲延의 방법들을 체계적으로 제시하였다. 한의학은 특히 儒家, 佛家, 道家思想의 영향을 받아 歷代 문헌에 인간의 天壽 및 養生에 관련된 내용을 많이 담고 있는데, 老花에 대한 시각들을 살펴보면 주로 陰陽, 臟腑, 氣血, 經絡, 情志 등의 有機的 관계에서 파악되고 있다(29).

《黃帝內經》에서는 인간의 自然壽命 즉 天壽는 腎氣 또는 腎元과 밀접한 관련이 있으며, 인

체의 生老病死 과정은 곧 腎元의 消長에 起因한 것이고, 腎精이 衰竭되면서 나타나는 腎虛의 병리기전은 老化를 촉진시키고 노인성 질환들이 발생하는 주된 원인이라고 주장하였다¹²⁾. 특히 한의학은 天人合一의 사상에서 출발하여 생명체는 나이가 증가하면서 자연老化가 四時陰陽의 변화에 따라 진행되는 것으로 인식하였는데, <內經知要>에서는 “陰陽交則萬物生 陰陽隔則萬物死”이고 <醫學正傳>에서는 “腎元盛則壽延 腎元衰則壽夭”라고 하여 老衰는 陰陽氣血의 失調 및 臟腑經絡 기능의 衰退 중에서도 腎精의 虧虛(腎虛)가 가장 중요한 요인으로 작용한다고 보고 있다^{12),29),53),80),81)}. 인체에 있어서 생명의 근원은 腎에 존재하므로 腎氣(또는 腎元)와 腎陰(또는 腎精)은 生長壯老死의 과정에 중요한 기능적 물질적 바탕이 되며, 양생학자들은 이러한 이론을 근거로 春生, 夏長, 秋收, 冬藏의 섭생원칙에 따라 腎精을 보존해야만 老化를 지연시켜 장수한다고 강조하였다^{9),29)}.

한의학에서는 老化를 지연하며 수명을 연장하기 위한 여러 방법들로서 養生, 導引 등의 여러 방법들이 제시되어 있는데 ^{11),13),29),30),52)}, 그 중에서 약물을 복용하여 이러한 효과를 얻기 위한 처방의 하나로 延年益壽不老丹이 있다 ¹¹⁾. 延年益壽不老丹은 <東醫寶鑑>에 병들지 않게 하며 건강하고 오래 살게 하는 약의 하나로 瓊玉膏, 延齡固本丹, 斑龍丸 등과 함께 수록되어 있으며 또한 “精을 잘 생기게 하고 腎을 補한다”라고 되어 있다¹¹⁾. 이는 한의학에서 老化의 원인으로 가장 중요시하는 腎虛^{12),54),62),79)-81)}를 補하는 목적으로 이루어진 처방으로 益精補腎의 작용을 통해서 延年益壽케 하는 것이다. 延年益壽不老丹의 주요한 구성 약물 중 하나인 何首烏에 대하여는 약리작용과 함께 抗老化효과에 대한 여러 報告^{18),20),21),50),51),71)-78)}가 있었으며, 그외의 약물로서 人蔘, 熟地黃, 麥門冬, 天門冬 등의 補益하는 성질의 약들로 이루어져서^{50),51)} 延

年益壽不老丹의 抗老化 작용에 적합할 것으로 추측할 수 있었다.

본 연구에서는 延年益壽不老丹의 延年益壽효과 즉 老化방지 효과를 실험적으로 알아보기 위하여 老化유발 쥐를 이용하여 抗酸化능을 측정하였다. 먼저 성장기에 있는 8주령 흰쥐의 抗酸化능과 老化가 진행단계에 있는 18주령 흰쥐의 抗酸化능을 비교하고, 老化촉진은 張82) 등의 방법에 따라 D-Galactose를 피하주사하여 유발하였다. 본 실험에서는 8주령과 18주령의 抗酸化능에는 통계적으로 유의한 차이가 인정되지 않았으며, D-Galactose를 주사한 老化촉진쥐는 8주령과 18주령에 비하여 간과 적혈구의 SOD, GSH-px의 양이 통계적으로 유의한 수준에서 낮게 나타났다.

혈장 지질의 過酸化 정도를 알아보기 위해 脂質過酸化物 함량(Thiobarbituric Acid Reactive Substances: TBARS values)을 측정한 결과는 통계적으로 N-8군과 N-18군 그리고 YIB군은 별 차이가 없었고 Control군에서 다른 군에 비하여 유의한 수준에서 높게 나타났다(F=7.141, p=0.001, ANOVA test). 간의 脂質過酸化物 함량(Thiobarbituric Acid Reactive Substances: TBARS values)을 측정한 결과는 집단 간 차이는 통계적으로 有意한 차이가 있었으며 (F=6.975, p=0.002, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단간 차이의 有意성을 검정한 결과 N-18군은 Control군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으나 YIB군은 감소하는 경향은 있었으나 유의한 차이가 없었다. 혈장과 간 모두에서 8주령과 18주령에서의 脂質過酸化物의 차이는 없었고, Control군에서는 N-8군과 N-18군에 비하여 유의하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 老化가 진행되면서 脂質過酸化物의 생성이 증가한다는 사실을 말해주는 것으로 이해할 수 있고 Control군에 비하여 YIB군에서 낮게 나타나는 것은 延年益壽不老丹의 투여가 老化과정에서 증가하는

脂質過酸化物質의 생성을 억제시키는 작용을 한다는 것을 추측할 수 있다.

적혈구에서의 抗酸化 酵素들의 活性을 알아보기 위해 抗酸化 酵素인 superoxide dismutase(SOD)의 活性을 측정한 결과는 Control군에서 N-8군과 N-18군에 비하여 효소의 양이 낮게 나타났으며 YIB군에서는 Control군에 비하여 유의하게 높게 나타나 N-8군과 N-18군과 같은 수준으로 나타났다 ($F=3.445$, $p=0.033$, ANOVA test). 간의 抗酸化 酵素인 superoxide dismutase(SOD)의 活性을 측정한 결과는 N-8군, N-18군 그리고 Control군 간의 차이는 없었고, YIB군에서 유의한 수준에서 높게 나타났다($F=4.967$, $p=0.008$, ANOVA test).

적혈구에서의 抗酸化 酵素들의 活性을 알아보기 위해 抗酸化 酵素인 glutathione peroxidase (GSH-px)의 活性을 측정한 결과는 YIB군이 Control군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다($F=9.365$, $p=0.0001$, ANOVA test). 간의 抗酸化 酵素인 glutathione peroxidase (GSH-px)의 活性을 측정한 결과는 YIB군이 Control군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다 ($F=3.846$, $p=0.012$, ANOVA test). 이는 延年益壽不老丹의 투여가 적혈구와 간 모두에서 GSH-px의 양을 증가시키는 것을 알 수 있었다.

Catalase의 함량은 적혈구와 간 모두에서 군 간 차이가 인정 되지 않았다.

이상의 결과로 보면, 延年益壽不老丹은 D-galactose의 피하주사로 老化가 촉진된 쥐의 적혈구와 간에서 지질과산화물의 함량을 감소시키고 抗酸化효소인 superoxide dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GSH-px) 活性을 증가시키는 작용을 나타내었다. 따라서 延年益壽不老丹이 일정한 조건에서 抗酸化 효과를 갖고 있다고 볼 수 있으며 향후 다양한 지표를 이용한 보다 심도 있

는 연구가 필요하다고 생각한다.

결론

延年益壽不老丹의 抗酸化능을 알아보기 위하여 8주령의 흰쥐(N-8)와 18주령의 老化과정 흰쥐(N-18) 그리고 D-galactose를 투여하여 老化를 유발시킨 흰쥐(CON)와 D-galactose와 延年益壽不老丹을 동시에 투여한 흰쥐(YIB)에서 혈장과 간의 TBARS 함량과 적혈구와 간의 SOD, catalase, GSH-px의 活性을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈장과 간의 TBARS 수준은 정상흰쥐에서 주령이 늘어남에 따라 증가하는 경향이 있었고 (N-8, N-18), D-galactose를 투여한 흰쥐에서는 YIB군이 CON군에 비하여 유의하게 감소하였다.

2. 적혈구의 SOD활성은 CON군에 비하여 YIB군에서 유의하게 증가하였다.

3. 적혈구의 glutathione peroxidase 活性은 YIB군이 CON군에 비하여 유의하게 증가하였다.

4. 적혈구의 Catalase 活性은 모든 실험군 간에 유의한 차이가 없었다.

5. 간의 SOD활성은 CON군에 비하여 YIB군에서 유의하게 증가하였다.

6. GSH-px활성은 CON군에 비하여 YIB군에서 유의하게 증가하였다.

7. 간의 Catalase 活性은 모든 실험군 간에 유의한 차이가 없었다.

이상의 결과로 延年益壽不老丹은 D-galactose로 유발된 老化촉진 흰쥐에서 抗酸化능 증진 효과가 있었는데 혈장과 간의 과산화지질 함량 저하 및 적혈구와 간의 SOD와 GSH-px 活性 증진효과가 현저하였다.

참고문헌

1. 徐舜圭 : 成人病 老人醫學, 고려의학, pp.10-13, 225-228, 1992.
2. 金光湖 : 豫防韓醫學, 菴苑堂, pp.548, 553-560, 598-608, 2001.
3. 리정복 : 장수학, 의성당, 서울, pp.11-99, 492-576, 1987.
4. 醫學教育練修院 : 老人醫學, 서울大學校出版部, pp.27-35, 1999.
5. 배철영 外 1人 : 老人醫學, 高麗醫學, pp.21, 25-27, 1996.
6. 大韓老人病學會 : 老人病學, 서울, 醫學出版社, p.727, 740, 2000.
7. 최진호 : 老化的 메카니즘과 研究方向, 生化學뉴스, 韓國生化學會, 5(3) pp.39-53, 1985.
8. 오유진 : 活性酸素(有害酸素)가 疾病의 原因이었다, 梨花文化出版社, pp.57-58, 1997.
9. 백상룡 : 老化的에 대한 研究(黃帝內經을 중심으로), 慶熙韓醫大論文集22(1): 107, 1999.
10. 金東榮 : 老年養生의 老衰機轉에 관한 文獻的 考察, 第3醫學 3(2):75-82, 1998.
11. 許浚 : 東醫寶鑑, 여강출판사, p.28, 59, 1994.
12. 洪元植 編著 : 精校黃帝內經素問, 東洋醫學研究院出版部, 서울, p.11, 1981.
13. 洪元植 編著 : 精校黃帝內經靈樞, 東洋醫學研究院出版部, 서울, p.244, 1981.
14. 郭重文, 吳旼錫, 宋泰元 : 老化的過程의 環境에서 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8(1), p.625, 1999.
15. 金仁洙, 高光贊, 吳旼錫, 宋泰元 : 老化的過程의 環境에서 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8(1), p.643, 1999.
16. 소경순, 김광호 : 鹿蓼地黃湯이 抗老衰에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集 18(2):127, 1995.
17. 辛民敎 : 白鼠肝組織에 미치는 赤何首烏와 白何首烏의 效能에 關한 比較 研究, 慶熙大學校 韓醫科大學 박사학위論文, 1984.
18. 이동순, 오민석, 송태원 : 老化的過程의 環境에서 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8(1), pp.689-710, 1999.
19. 이원철 : 赤何首烏가 高Cholesterol食餌에 의하여 誘發된 家兔 冠狀動脈의 粥狀硬化에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌 16(1), 1995.
20. 이종현 : 白何首烏藥鍼의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大韓韓醫學會誌 18(1), 1997.
21. 조한숙, 오민석, 송태원 : 老化的過程의 環境에서 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 8(1), pp.711-726, 1999.
22. 崔鎮浩 : 高麗人蔘의 老化的抑制作用에 關한 研究, 慶熙大學校 大學院, 1982.
23. 박진성 외 2인 : 不老丸을 투여한 環境腦의 抗酸化效果에 關한 研究, 大韓豫防韓醫學會誌5(1) pp.90-102, 2001.
24. 배기채 : 高麗人蔘, 高麗紅蔘 및 total saponin의 抗酸化 作用, 大田大學校 大學院, 1997.
25. 문진영 外 : 柴胡가 Free Radical에 의한 脂質過酸化物 生成에 미치는 效果, 東國論集 자연과학편, 15, pp.361-375, 1996.

27. 김정숙 외 : 老化防止를 위한 韓藥製의 效能 研究, 韓國韓醫學研究所, 1995.
28. 오현명 : 감잎, 녹차의 건분 및 물, 에탄올추출물이 노령쥐의 지방대사와 항산화능에 미치는 영향, 이화여자대학교대학원, 2000.
29. 高綺完 : 老化 및 老人의 病因 病機에 關한 文獻의 研究, 慶熙大學校 韓 醫科大學 碩士學位 論文, 1993.
30. 金恩基 外2人 : 老化防止를 위한 韓醫學의 方法, 韓方成人病學會誌 2(1)p.146, 1996.
31. 손호성 外2人 : 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 8(1),p.659, 1999.
32. 안상원 外1人 : 熟地黃과 六味地黃湯이 老化 過程 흰쥐에서의 抗酸化 機轉에 미치는 影響, 大田大學校 韓醫學研究所論文集 8(1)p.593, 1999.
33. 조한숙 : 老化過程의 흰쥐에서 補肝丸이 肝臟의 代謝酵素系에 미치는 影響, 大田大學校大學院, 1998.
34. 이근동 : 五加皮藥鍼의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1999.
35. 박태균 : 桂枝藥鍼의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1998.
36. 손중수 : 覆盆子藥鍼의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1999.
37. 박현선 : 山茱萸藥鍼의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校 大學院, 1998.
38. 김영해 外 : 胡桃藥鍼의 抗酸化 效果에 對한 研究, 大韓韓學會誌17(2) pp.8-18, 1997.
39. 박겨울 : 淫羊藿藥鍼의 抗酸化作用에 關한 實驗的 研究, 大田大學校大學院, 1998.
40. 윤철호 外 : 흰쥐의 肝組織에서 鹿茸 藥鍼 製劑의 抗酸化 作用에 關한 研究, 大韓韓學會誌17(2) pp.191-202, 1996.
41. 박용기 外 1人 : 薏苡仁과 苦蔘의 抗酸化作用에 關한 研究, 大韓本草學 會誌 15(2) p.57, 2000.
42. 이상룡 外 1人 : 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, 東醫神經精神科學會誌10(1) p.79, 1999.
43. 박용기 外 2人 : 人蔘의 配合에 따른 抗酸化 作用에 關한 研究, 大韓本 草學會誌14(1), p.45, 1999.
44. 김갑성 外1人 : 胡桃藥鍼液의 抗酸化效果에 對한 研究, 大韓鍼灸學會 誌13(2) p.54, 1996.
45. 이태균 外 1人 : 이선소요조영탕의 抗酸化作用에 關한 研究, 大韓韓方婦人科學會誌10(2), p.85, 1997.
46. 김봉수 外 2人 : 兔絲子類의 抗酸化作用에 對한 研究, 大韓本草學會誌 12(1), p.67, 1997.
47. 이상룡 外 1人 : 加味歸脾聰明湯이 老化白鼠의 血液變化 및 血清과 腦 組織이 抗酸化物 活性에 미치는 影響, 9(2) p.53, 1998.
48. 한병훈 外 3人 : 生藥의 抗酸化活性 檢索 研究, 生藥學會誌12(1) p.66, 1981.
49. 허준령 : 十全大補湯의 抗酸化作用에 對한 研究, 大田大學校 大學院, 2001.
50. 全國韓醫科大學本草學教授 : 本草學, 永林社, p.237, 302, 532, 580, 583, 590, 1991.
51. 錢伯文,江克明 : 抗衰老中藥與食物, 上海中醫學院出版社, p.11,13,37, 53,54,97, 1992.
52. 田金洲 : 中醫老年病學, 天津科學技術出版

- 社, pp.28-29, 1994.
53. 余月明 外 : 自由基衰老學說,腎虛與衰老及補腎抗衰老研究, 陝西中醫14(4) pp.187-188, 1993.
54. 江明 : 老年脾腎虛與SOD關係研究, 安徽中醫學院學報18(6) p.21, 1999.
55. 皮明均 外 : 加味溫膽湯對亞急性衰老大鼠大腦皮質超微結構改變的影響,湖南中醫學院學報, Mar.1999 Vol.19 No.1 p.8
56. 張其蘭 : 降脂延衰流膏抗衰老作用的研究, 山東中醫學院,Vol.26 No.5 May, 1999. p.33.
57. 王林江 外1人 : 人蔘對老年大鼠自由基代謝影響的研究,遼寧中醫雜誌,Vol.26 No.5 May,1999. p.238.
58. 黃玉芳 外 3人 : 開心散對4種動物模型SOD,MDA 含量的影響,南京中醫藥大學學報15(2) p.151, 1999.
59. 黃正良 外 8人 : 紅芪多糖抗衰老作用的實驗研究, 中藥學 23(9) p.469, 1999.
60. 張永杰 外 6人 : 藥王五補口服液抗衰老作用的實驗研究, 中藥學24(1) p.32, 1993.
61. 沈小珩 外 6人 : 二仙湯及其拆方對老年大鼠部分抗酸化酶活性及其因表達水平的影響, 中國中西醫結合雜誌15(11) p.672,1995.
62. 林水森 外 1人 : 中醫論衰老機理, 上海中醫藥雜誌12 p.14,1994.
63. 徐定海 外 2人 : 養精益腎功對高血壓病患者的延緩衰老作用, 上海中醫藥雜誌12 p.17, 1994.
64. 黃紅英 : 百年樂延緩衰老作用的研究, 中成藥16(7) p.39, 1994.
65. 孟廣森 : 肉從蓉延緩衰老研究的進展, 中醫雜誌37(8) p.501, 1996.
66. 邱琳 : 參杞安泰抗衰老作用的研究, 中成藥 13(3) p.24, 1991.
67. 劉吉民 : 氣功外氣對老齡大鼠抗酸化酶活性的影響 中成藥13(3), p.363
68. 林朝暉 : 中醫衰老指數與中醫學年齡的初步分析, 中醫雜誌37(8) p.456, 1996.
69. 戴國華 : 深化延緩衰老中西醫結合研究的思路與方法, 安徽中醫學院學報18(6) p.65, 1999.
70. 李建生 : 補腎活血和瀉下及開竅活血方藥對腦缺血再灌注肺損傷老齡大鼠ATP酶和自由基代謝的影響, 中國中醫急症10(6) p.345, 2001.
71. 左莉 : 首烏長春寶口服液延緩衰老的臨床研究, 甘肅中醫學院學報14(4)p.22, 1998.
72. 劉青云 : 首烏丸抗衰老作用的實驗研究, 中成藥13(4) p.28, 1991.
73. 蘇璋 : 何首烏的現代藥理研究概況, 中草藥 28(2) p.119, 1997.
74. 劉成基 : 炮制何首烏對小鼠實驗性肝損傷後肝脂代謝的影響, 中國中藥雜誌17(10) p.595, 1992.
75. 潘洪平 : 何首烏不同炮制品對小白鼠SOD及LPO水平的影響, 中國中藥雜誌18(6) p.344, 1993.
76. 楊朝曄 : 何首烏抗衰老作用研究近況, 時珍國醫國藥10(5) p.390, 1999.
77. 李玉芳 : 何首烏現代研究進展, ?, 19(5) p.37, 1997.
78. 陳曉光 : 何首烏對老年小鼠衰老指標的影響,中草藥22(8) p.357, 1991.
79. 王傳社 : 補腎健脾化痰法延緩衰老機理的實驗研究回顧, 中醫雜誌40(4) p.241, 1999.
80. 朱抗美 : 腎的精氣陰陽理論源流考, 浙江中醫學院學報23(5) p.12, 1999.
81. 林來勝 : 試論延緩早衰從腎虛論治, 陝西中醫20(10) p.456, 1999.
82. 張熙 외 : D-galactose에 의해 유발된 백서 老化 모델의 생화학적 변화, 중국약리와 독성학회지4(4),p.309, 1990.

83. Yoon, Y.H. and Rhee, S.J. : Effects of Korean green tea, oolong tea and bleak tea beverage on the antioxidative detoxification in rat poisoned with cadmium. *Kor. J. Nutr.*, 27, 1007-1017 (1994)
84. Hilton, J. W., Hodson, P.V. and Slinger, S.J. : The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo Gairdneri*). *J. Nutr.*, 110, 2527-2523 (1980)
85. Harman, D. : Free radical theory of aging (the free radical disease), *Age* (7), 1984, pp. 111-131
86. Chow, C.k. : Glucose and dietary vitamin E protection against catalase inactivation in the red cells on rats. *internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 50, 364-371, 1980.