

반룡환이 D-galactose로 유발된 노화 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향

최영아, 강석봉

대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

An Antioxidative Effects of *Banryong-hwan* on Rats Induced Aging by D-Galactose

Young-Ah Choi, Seok-Bong Kang

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

Objectives : This study was done to examine the antioxidant actions of free radicals caused by *Banryong-hwan* in blood.

Methods : Twelve week-old SD rats were divided into normal group, control group and HTG group. Control and HTG groups were age-induced with D-galactose, and extract of *Banryong-hwan*(BRH) was administered to BRH group for six weeks. After then, blood was taken, and activities of SOD and GSH-px in erythrocytes were measured, as well as TBARS levels and concentrations of total lipid · tryglyceride in plasma.

Results :

1. The activities of SOD and GSH-px in erythrocytes were significantly increased in the BRH group compared with control group.
2. The concentration of total lipid was significantly decreased in the BRH group compared with control group. The values of TBARS and the concentrations of tryglyceride in plasma showed a tendency to decrease but they were not remarkable.

Conclusions : Judging from the above findings, it is suggested that *Banryong-hwan* decrease the activities of free radical, the concentrations of lipid in plasma and generate enzyme which form lipid peroxide.

Key Words: *Banryong-hwan*, D-Galactose, Antioxidative Effects

1. 緒 論

老化는 생명체의 성장과 시간 경과에 따라 진행되는 일련의 퇴행성변화를 일으키는 자연적인 변화 과정으로 발육, 성장, 성숙과 노화의 생물학적 과정에서 형태적, 기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저하로 사망에 귀착되는 보편적인 생리 현상을 말한다^{1,2}.

老化 과정의 기전은 아직 확실하게 밝혀지지 않

았으나, 최근에는 노화와 관련된 퇴행성변화의 설명으로 free radical theory가 주목받고 있다².

산소를 소비하는 모든 생물체는 산소에서 유래된 free radical에 의하여 세포내 산화적 손상이 축적되어 질병과 노화가 초래되며³, free radical 반응은 거의 대부분 유독성 산소대사물($\cdot O_2$, H_2O_2 , $\cdot OH$)에 의한 것으로 알려져 있다⁴. 이들 free radical은 핵산 단백질 지질 등 모든 세포내 거대분자를 변성 내지 파괴시키며, 특히 세포막의 불포화 지방산을 과산화시켜 세포막의 투과성을 변화시킴으로써 세포독성을 유발한다⁵. 생체에는 free radical 반응을 방어하

· 접수 : 2004. 10. 11 · 채택 : 2004. 10. 22
· 교신저자 : 강석봉, 대구광역시 수성구 상동 165
대구한의대학교 한의과대학 신계내과교실
(Tel. 053-770-2102 Fax. 053-770-2055
E-mail : kangsb@dhu.ac.kr)

는 항산화계가 존재하여 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione, glutathione peroxidase, protein bound-SH, nonprotein bound-SH 등에 의하여 지질의 과산화가 억제된다⁶.

한의학에서는 <素問·上古天真論⁷>에서 “女子七歲 腎氣盛…二七而天癸至…七七任脈虛 太衝脈衰少 天癸竭. 丈夫 八歲腎氣實…二八腎氣盛 天癸至…七八 肝氣衰 筋不能動 天癸竭 精少 腎藏衰 形體皆極”라 하였고, <靈樞·天年篇⁸>에서 “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 하여 노화의 과정 중 가장 중요한 것이 腎氣의 虛衰에 달려있다고 하였으며, <醫學正傳⁹>에서는 “腎元盛則壽延 腎元衰則壽夭”라고 하여 장수하는 것이 腎氣의 성쇠여부에 의하여 결정된다고 하였다.

한의학에서 항노화의 개념은 ‘耐老’, ‘延年’, ‘益壽’, ‘不老’, ‘養老’로 표현하고 노화를 예방 또는 지연시키는 방제로 腎精을 補하는 延年益壽藥이 많이 거론되어 왔다¹⁰. 이들 중 <東醫寶鑑·身形編¹¹> 養性延年藥餌의 처방중 하나인 斑龍丸은 <醫學正傳⁹>에 최초로 언급되는 처방으로, <醫方集解¹²>에서는 精髓를 大補하고 心氣를 養하여 心腎相交를 원활하게 해 神魂이 안정되고 筋骨이 壯하게 하여 去病益壽한다고 하였다.

중국 보고에 의하면 老年群의 臟腑別 虛症 檢出率에 대한 조사에서 腎虛의 경우가 83.6%로 가장 높게 나타났는데¹³, 腎虛群에서는 과산화지질 함량이 상승하고¹⁴, SOD활성이 저하되어 있으며¹⁵, 腎을 補하는 五子衍種液¹⁶, 還少丹¹⁷, 清宮長春丹¹⁸ 등의 처방들이 과산화지질의 함량을 저하시키고 SOD활성을 상승시켜 노화를 억제한다고 보고하고 있다.

최근 노화 관련 항산화효능에 대한 실험적 연구로 윤¹⁹은 左歸飲과 右歸飲을, 尹²⁰은 六味地黃湯을, 李²¹는 補脾湯에 대하여 보고한 바 있다.

본 연구에서는 補精髓, 强筋骨하여 延年益壽의 효능¹¹⁻²이 있는 斑龍丸이 노화와 관련된 지질과산화 및 free radical에 대한 항산화작용을 실험적으로 규명하고자 D-galactose를 피하주사하여 노화가 유발된 12주령의 흰쥐에게 斑龍丸 추출물을 투여한

다음 혈장중의 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 함량 및 총지방, 중성지방 농도를 측정하고 적혈구 항산화효소계인 SOD, glutathione peroxidase의 활성도를 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 動物 및 材料

(1) 動物

10주령 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 구입하여 實驗 시작 전 2주일간 고형배합사료(구성성분: 조단백질 21.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 조회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.6%)로 적응시켰다. 적응기간 후 체중이 400±20g(12주령)인 쥐들을 實驗에 사용하였다. 實驗동물은 한 마리씩 분리하여 주야 12시간 교대로 소등과 점등, 실내온도 24±2℃, 습도 40-60%의 조건의 stainless steel cage에서 사육하였고, 사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였다.

(2) 材料

본 實驗에서 사용된 약재는 대구한의대학교 부속 대구한방병원에서 엄선해서 사용하였으며 처방내용은 <東醫寶鑑¹¹>에 기재된 斑龍丸으로 내용과 한 첩의 용량은 다음과 같다.

Composition of *Banyong-hwan*

Herbs of name	Pharmacognosy Name	Dose(g)
鹿角膠	<i>Cervi Cornus Colla</i>	8.0
鹿角霜	<i>Cervi Cornus Degelatinatum</i>	8.0
兔絲子	<i>Cuscutae Semen</i>	8.0
柏子仁	<i>Biotae Semen</i>	8.0
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	8.0
白茯苓	<i>Hoslen Alba</i>	4.0
破故紙	<i>Psoraleae Fructus</i>	4.0
Total		8.0g

2. 實驗方法

(1) 實驗群 區分

實驗室 환경에서 2주간 적응시킨 SD계 rat를 제

중별로 고르게 분포시켜 12주령의 정상군(Normal group)과 대조군(Control group), 실험군(BRH group)으로 나누어 각 군에 6마리씩 배정하였다.

정상군은 어떤 처치도 하지 않고 고형사료와 물만을 6주간 充分히 공급하였고 대조군은 12주령 rat에 D-galactose를 6주간 피하주사하여 老化를 유발하였다. 실험군은 D-galactose를 피하주사 하고 斑龍丸 추출물을 경구 투여 하였다.

(2) 老化 誘發

D-galactose (Sigma, USA)를 50mg/kg의 비율로 1회/1일 6주간 연속으로 rat 背部에 피하주사 하였다.

(3) 檢液의 調劑

斑龍丸 5첩 분량인 240.0g을 5,000cc의 둥근 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 斑龍丸엑기스 63.0g을 얻어 이를 실험에 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 投與

斑龍丸 추출물은 멸균 증류수 200ml에 27g을 녹여 제조한 검액을 1050mg/kg의 비율로 실험군 흰쥐에 1일 1회 6주간 경구 투여하였다.

(5) 혈액의 採取

실험기간이 종료된 실험동물은 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 개복한 후 10ml 주사기를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하였다. 이때 주사기는 혈액 응고를 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 원심분리기로 2,800rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간

원심분리하여 아래층의 red blood cell(RBC)과 혈장을 분리하고, 혈장은 혈장내 脂質過酸化物質 양과 지방 수준을 측정하기 위해 -70 $^{\circ}$ C deep freezer(SANYO, JAPAN)에 보관하였다.

아래층의 RBC는 ice cold saline을 첨가하여 원심분리기로 2,800rpm, 4 $^{\circ}$ 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 항산화효소의 활성을 측정하기 전까지 -70 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관하였다.

(6) 혈장의 thiobarbituric acid reactive substance 함량 측정

혈장의 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 함량은 Yagi²²의 방법을 이용하여 측정하였다. 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 $^{\circ}$ C water bath에서 1시간동안 incubation시켰다. 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) 적혈구의 superoxide dismutase 활성 측정

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 섞어 hemoglobin을 침전시켰다. 여기에 280 μ l의 증류수를 가하여 원심분리기로 20,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 SOD 활성을 측정하기 위한 효소원으로 이용

하였다. SOD 활성은 Flohé 등²³의 방법으로 측정하였다. SOD 활성은 xanthine이 xanthine oxidase에 의해 superoxide를 생성하고, superoxide가 ferricytochrome C(Fe^{+++})을 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 2ml에다 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) 적혈구의 glutathione peroxidase 활성 측정

적혈구의 glutathione peroxidase(GSH-px) 활성은 Flohé의 방법²⁴을 이용하여 측정하였다. 적혈구 현탁액에 10배의 증류수를 가하여 적혈구를 용혈시키고 다시 증류수로 이 hemolysate를 희석한 후 Drabkin용액을 hemolysate와 1:1 비율로 혼합하여 Hb을 cyanomethemoglobin으로 전환시킨 후 효소원으로 사용하였다.

Glutathione peroxidase의 활성측정은 GSH-px가 환원형 glutathione (GSH)과 H_2O_2 의 반응을 촉진시켜 환원형 GSH를 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 incubation시킨 후 1.5mM NADPH 100 μ l를 넣어 다시 3분간 incubation시켰다. 여기에 미리 37°C로 데워진 12mM t-butyl hydroperoxide를 가하여 반응을 개시

시킨 후 spectrophotometer로 365nm에서 30초 간격으로 3분간 GSH-px의 활성을 측정하여 unit단위로 나타내었다. 여기에서 1 unit은 1분동안 1.0 μ M의 GSH가 H_2O_2 의 작용으로 GSSG로 산화되는 것을 측매한다.

(9) 혈장의 총지방, 중성지방 농도 측정

혈장의 총지방 농도는 Frings법²⁶으로 측정하였다. 혈장 100 μ l에 진한 H_2SO_4 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 incubation하여 발색시키고 이를 실온에서 5분간 냉각시킨 후 spectrophotometer (DU530, Beckman)로 파장 540nm에서 비색정량하였다.

3. 통계분석

모든 통계분석은 윈도우용 SPSS(ver. 11.0)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 0.05이하로 하였다.

III. 結 果

1. 혈장의 脂質過酸化 物 함량 변화

혈장 脂質過酸化 物(thiobarbituric acid reactive substances: TBARS) 함량을 측정한 결과, 정상군이 35.40 \pm 1.91 nmol/100ml, 대조군이 45.61 \pm 3.53 nmol/100ml, 실험군이 41.76 \pm 3.33 nmol/100ml로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(F=2.919, p=0.085, ANOVA test)(Table 1).

2. 적혈구의 superoxide dismutase(SOD) 활성 변화

적혈구에서의 抗酸化 효소인 superoxide dismutase (SOD)의 활성을 측정한 결과, 정상군이 18.47 \pm 1.97unit/min/mg protein, 대조군이 11.93 \pm 1.45unit/

min/mg protein, 실험군이 16.91±0.76unit/ min/mg protein으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 있었으며(F=5.296, p=0.018, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 유의성을 검정한 결과 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였고, 실험군이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다(Table 2).

3. 적혈구의 glutathione peroxidase (GSH-px) 활성 변화

적혈구에서의 抗酸化 효소인 glutathione peroxidase (GSH-px)의 활성을 측정한 결과, 정상군이 0.160±0.019unit/min/mg protein, 대조군이 0.094±0.008 unit/min/mg protein, 실험군이 0.126±0.011unit/min/mg protein으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 있었으며(F=5.411, p=0.017,

ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 유의성을 검정한 결과 대조군이 정상군에 비해 유의하게 감소하였고, 실험군이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다(Table 3).

4. 혈장내 총지방, 중성지방 농도 변화

혈장내 총지방의 농도를 측정한 결과, 정상군이 184.00±18.61mg/100ml, 대조군이 320.00±20.33mg/100ml, 실험군이 274.00±22.57mg/100ml으로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 있었으며(F=11.307, p=0.001, ANOVA test), 다중 비교(Duncan's method)를 통하여 각 집단 간 차이의 유의성을 검정한 결과 대조군이 정상군에 비해 유의하게 증가하였고, 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

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

Group	No. of animal	Plasma TBARS (nmol/100mℓ)	Duncan grouping
Normal	6	35.40±1.91 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	45.61±3.53	A
BRH	6	41.76±3.33	A
F-value:		2.919 [*]	

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 12weeks-old rat.

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

BRH: treated with *Banryong-hwan* extracts(1050mg/kg)and D-galactose(50mg/kg/rat) for 6 weeks

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

Group	No. of animal	RBC SOD (unit/min/mg protein)	Duncan grouping
Normal	6	18.47±1.97 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	11.93±1.45	B
BRH	6	19.91±0.76	A
F-value:		5.296 [*]	

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

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℃ in a 3.0mℓ reaction volume).

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

Group	No. of animal	RBC GSH-px (unit/min/mg protein)	Duncan grouping
Normal	6	0.160±0.019 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	0.094±0.008	B
BRH	6	0.126±0.011	AB
F-value:		5.411*	

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

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).

Table 4. Effect of *Banryong-hwan* Extract on the Plasma Total Lipid and Triglyceride Concentration in Rats

Group	No. of animal	Plasma total lipid (mg/100ml)	Duncan grouping	Plasma triglyceride (mg/100ml)	Duncan grouping
Normal	6	184.00±18.61 ¹⁾	A ²⁾	79.00±6.91 ¹⁾	A ²⁾
Control	6	320.00±20.33	B	90.66±7.01	A
BRH	6	274.00±22.57	A	86.66±7.98	A
F-value:		11.307*		0.656*	

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

혈장내 중성지방의 농도를 측정된 결과 정상군이 79.00±6.91mg/100ml, 대조군이 90.66±7.01mg/100ml, 실험군이 86.66±7.98mg/100ml로 나타나 집단 간 차이는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(F=0.656, p=0.533, ANOVA test)(Table 4).

IV. 考 察

노화는 생명체의 성장과 시간 경과에 따라 진행되는 일련의 퇴행성변화를 일으키는 자연적인 변화과정으로 신체내의 평형이 깨어져 내적 외적 환경에 대한 적응을 어렵게 만드는 신체의 구조와 기능의 점진적인 저하를 유발하여 질병을 증가시키고 궁극적으로는 사망을 초래하는 것을 의미한다²⁷.

노화에 대한 기전은 크게 developmently programmed aging²⁸과 damage accumulation aging²⁹⁻³⁰로 나뉘는데, 전자는 성장과정이 그렇듯이 노화

과정도 유전자에 미리 program되어 있다는 이론이며 후자는 free radical theory²⁹⁻³⁰, 체세포 돌연변이설³¹, 폐기부산물 축적설²⁸ 등으로 나누어진다. 그러나 거의 대부분의 이론들이 어느 정도의 설득력은 있지만 생체의 노화과정의 본체는 아직 확실히 밝혀지지 않았으며 최근에는 생체내에서 끊임없이 일어나고 있는 여러 free radical 반응이 노화를 유발한다는 free radical 반응설²⁹⁻³⁰이 주목받고 있다. Free radical theory는 산소를 소비하는 모든 생물체는 산소에서 유래된 free radical에 의하여 세포내 산화적 손상이 축적되어 질병과 노화가 초래한다는 이론³으로 포유류에서 free radical 반응은 거의 대부분 산소대사에 의하여 발생하는 유독성 산소대사물(·O₂, H₂O₂, ·OH)에 의한 것으로 알려져 있다⁴. 생체에는 유독성 산소 대사물에 의한 유해작용을 방어하는 free radical 제거 효소와 비효소계인 항산화물질이 존재하지만 끊임없이 생성되는 free radical의 일부

는 세포기능을 저하시켜 노화과정을 유발할 것으로 추측된다²⁹⁻³⁰.

한의학에서 <素問·上古天真論>⁷에서는 “女子七歲腎氣盛 二七而天癸至…七七任脈虛 太衝脈衰少 天癸竭. 丈夫 八歲腎氣實, 二八腎氣盛 天癸至 …七八肝氣衰 筋不能動 天癸竭 精少 腎藏衰 形體皆極”라 하였고, “天壽過度, 氣脈相通, 而腎氣有餘也”라 하여 연령에 따른 腎氣의 盛衰 변화로 인한 노화과정과 壽命에 대한 설명하고 있으며, <靈樞·天年篇>⁸에서는 “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 하였고, <醫學正傳>⁹에 “腎元盛則壽延 腎元衰則壽夭”라고 하여 노화의 과정중 가장 중요한 것이 腎氣虛衰임과 수명을 연장하는 것이 腎元의 성쇠여부에 의하여 결정된다고 하였다.

이와 같이 한의학에서 노화와 가장 밀접한 장부는 단연코 腎이며 腎精이 인체를 구성하고 인체를 성장하고 발육을 촉진하는 기본물질로 생각해 腎精을 고섭하고 가득하도록 유지하는 것이 인체의 노화를 예방하고 건강을 보장하며 수명을 연장한다고 볼 수 있다.

중국 보고에 의하면 老年群의 臟腑別 虛症 檢出率에 대한 조사에서 腎虛의 경우가 83.6%로 가장 높게 나타났는데¹³, 腎虛群에서는 과산화지질 함량이 상승하고¹⁴, SOD활성이 저하되어 있으며¹⁵, 腎을 補하는 五子衍種液¹⁶, 還少丹¹⁷, 清宮長春丹¹⁸ 등의 처방들이 과산화지질의 함량을 저하시키고, SOD활성을 상승시켜 노화를 억제한다고 보고하고 있다.

한의학에서 항노화의 개념은 ‘耐老’, ‘延年’, ‘益壽’, ‘不老’, ‘養老’로 표현하고 노화를 예방 또는 지연시키는 방제로 精을 보존하여 腎을보호하는 延年益壽藥이 많이 거론되어 왔다¹⁰.

<東醫寶鑑·身形編>¹¹養性延年藥餌의 처방 중 하나인 斑龍丸은 <醫學正傳>⁹에 최초로 언급되는 처방으로 <醫方集解>¹², <方藥合編>³²에 기재되어 있으며 精髓를 大補하고 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. 각각의 약물의 효능을 살펴보면 鹿角膠,

鹿角霜은 大補精髓, 溫補腎陽의 效能이 있고³³, 兎絲子是 益腎固精, 養肝明目, 助脾止瀉. 堅筋骨, 和營衛, 益精髓, 縮小便, 止遺泄하는 효능이^{33,4}있으며, 柏子仁은 滋養肝膽, 養心安神 하는 효능이 있고³³, 熟地黃은 滋陰補血, 益精眞髓 하는 효능이 있으며³³, 白茯苓은 健脾寧心하며 破古紙는 溫腎祖陽, 納氣止瀉하는 효능이 있다^{33,4}.

노화 관련 항산화효능에 대한 실험적 연구에서 윤¹⁹은 左歸飲과 右歸飲이 노화취의 肝 腎 腦 등에서 과산화지질을 감소시키고 free radical 생성 효소인 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase 활성을 억제시키는 효능이 있음을 보고하고, 尹²⁰은 六味地黃湯이 노화 취의 간장내 SOD, catalase 등의 항산화효소의 활성을 증가시킨다고 하였으며, 李²¹는 補脾湯이 노화 취의 脾臟內 과산화지질을 감소시키고 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등의 활성 증가에 대하여 보고한 바 있으며, 申³⁵은 右歸飲과 右歸飲加肉從蓉이 혈중 호르몬 및 SOD활성에 미치는 영향에 대한 보고하였고, 朴³⁶은 補中益氣湯과 六味地黃湯이 노화촉진생취의 간장내 지질과산화는 감소하고 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등 항산화효소의 활성을 증가시킨다고 하였으며, 서³⁷는 五子地黃飲이 적혈구막과 혈청에서 활성산소의 발생을 억제하고 노화물질의 축적을 막아주며, 안³⁸은 六味地黃湯과 熟地黃이 노화백서에서 혈중 및 간내 과산화지질의 함량, hydroxyl radical 감소, 혈중 SOD, 간내 protein bound-SH, nonprotein bound-SH, glutathione, glutathione S-transferase, glutathione reductase 등의 활성을 증가시키는 효과를 보고 한 바 있다.

노화에 따른 활성산소 반응산물의 축적은 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제인 SOD, catalase, glutathione peroxidase, protein bound-SH, nonprotein bound-SH 등의 변화와 관계있으며, 항산화작용을 발현하는 기전은 free radical의 생성을 미리 방지하는 작용과 생성된 라디칼을 포착, 제거하는 작용으로 나누어진다⁶.

이중 SOD는 산소 대사과정에서 가장 먼저 생성

되는 산소라디칼($\cdot O_2$)을 제거시킨다는 점에서 free radical 반응에 대한 방어 기전으로서 그 역할이 매우 크며, catalase, glutathione peroxidase 등은 지질 hydroperoxide(LOOH)나 과산화수소(H_2O_2)를 분해하여 이들로부터 지질 alkoxy radical(LO \cdot)이나 hydroxyl radical($\cdot OH$)과 같은 지질과산화물 생성을 유도하는 활성산소의 생성을 방지하는 효소이다³⁹.

본 연구에서는 斑龍丸이 노화와 관련된 지질과산화 및 free radical에 대한 항산화작용을 규명하고자 12주령의 SD계 rat을 정상군, 대조군, 실험군으로 나누고 대조군과 실험군은 D-galactose 피하주사로 노화를 유발하고 실험군에만 6주 동안 斑龍丸 추출물을 증류수에 녹여 경구 투여한 후 혈장중의 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)함량, 총지방, 중성지방 농도를 측정하고 적혈구의 항산화효소계인 SOD, glutathione peroxidase의 활성을 측정하였다. 脂質過酸化物 함량 (TBARS 함량)은 혈장 지질의 과산화 정도를 알아보기 위해 측정하였다.

생체의 기본 단위인 세포는 지질과 단백질로 구성된 세포막으로 둘러싸여 있는데 자극이 계속되면 불포화지방산을 포함한 지질이 변화하여 free radical이 생성되고 여기에 활성화된 산소가 작용하여 다른 지질성분과 연쇄반응하여 과산화지질이 생성되고 있다³⁹⁻⁴².

실험결과 대조군에서 증가하는 경향은 있었으나 유의성은 나타나지 않았으며, 실험군에서는 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다($p=0.085$).

SOD는 산소 대사과정에서 가장 먼저 생성되는 산소라디칼을 제거하는 효소로 그 역할이 매우 크리라 생각된다⁴³. ($2O_2 + 2H^+ \rightarrow O_2 + 2H_2O_2$). 본 실험에서 SOD의 활성은 대조군에서 유의성 있게 감소하여 양⁴³과 김⁴⁴의 보고와 유사하게 나타났다. 실험군에서는 유의성 있게 증가하여($p=0.018$), SOD가 glutathione peroxidase 등과는 달리 지질과산화 유도 반응을 제거하여 지질과산화를 억제하는 항산화작용을 나타내는 것으로 미루어⁶ 斑龍丸이 free radical을 포착, 제거하는 작용에 우수한 효능을 나타내는

결과로 추측된다. Glutathione peroxidase(GSH-px)는 산화시키는 과정에서 hydrogen peroxide나 lipid peroxide 등을 제거하는 효소이다⁴⁵. glutathione peroxidase 활성은 대조군에서는 유의성 있게 감소하고, 실험군에서는 유의성 있게 증가하였다($p=0.017$). 이는 斑龍丸이 노화촉진흰쥐에서 hydrogen peroxide나 lipid peroxide 등을 제거하는 효소의 활성을 증강시키는 효능이 있음을 의미하는 결과로 생각된다.

혈장의 주요한 지질성분은 중성지방, 콜레스테롤, 콜레스테롤에스터, 인지질, 지방산이다. 지질은 특수단백과 결합하여 이동되는데 주로 脂蛋白 형태로 이동하게된다. 그리고 脂蛋白은 일반적으로 밀도에 따라 chylomicron, 초저밀도지단백(VLDL), 저밀도지단백(LDL), 고밀도지단백(HDL)로 나눈다⁴⁶⁻⁷.

혈장내 총지방농도는 대조군에서 유의하게 증가하였고 실험군은 유의하게 감소하였다($p=0.001$) ($p=0.018$). 중성지방의 경우는 집단 간 유의한 차이가 없었으나 실험군의 경우 중성지방 농도는 감소하였다($p=0.533$). 이는 연령이 증가되면 혈장내 지방 대사의 변화로 인해 중성지방 함량이 증가한다는 보고⁴⁸와 유사하며 斑龍丸 투여군은 혈장내 지질 농도를 감소시키는 효능이 있음을 알 수 있다.

이상의 결과에서 D-galactose로 노화를 유발한 흰쥐에게 斑龍丸 추출물을 투여한 결과 적혈구 항산화효소계 중 활성산소를 제거하는 SOD와 생성억제 효소인 GSH-px 활성이 유의성 증가되었고($p<0.05$), 노화유발로 증가된 혈장내 총지방의 농도가 유의성 있게 감소하였다($p<0.05$). 또 비록 통계적 유의성은 없었으나 과산화지질의 지표인 TBARS 함량 및 중성지방 농도는 감소하는 경향을 나타내었다. 이것으로 보아 斑龍丸의 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 작용은 free radical의 생성을 방지하는 작용과 superoxide 등을 포착하여 제거하는 항산화작용 모두에 유효하게 작용하는 것으로 나타났다.

또한 항산화 물질들 중에서 조사하지 못한 것들, glutathione-s-transferase⁴⁹⁻⁵⁰, glutathione-reductase,

glucose-6-phosphate dehydrogenase와 같은 glutathione 관련 효소 및 protein bound-SH, nonprotein bound-SH, 산소라디칼 제거 효소의 조인자가 되는 Cu, Zn, Mn, Mg, Se 등의 비효소 항산화제^{43,44}들에 대한 검색이 보충되어야 할 것이다.

한의학에서 노화를 예방하고 지연시키는 방제로 腎精을 보존하고 腎을 보호하는 延年益壽藥이 많이 거론되어 왔다. 이들 중 斑龍丸 추출물을 노화가 유발된 12주령의 SD계 rat에게 투여한 후 혈장중의 TBARS 함량 및 총지방, 중성지방 농도와 적혈구의 항산화효소계인 SOD, glutathione peroxidase 활성도를 측정할 결과 노화유발흰쥐의 free radical에 대한 항산화효소의 활성을 증가시키고 혈중 지질농도를 감소시키는 효능이 있음을 알 수 있었다.

향후 이들 약물의 인체내 항산화작용에 대한 연구와 좀 더 넓은 연령군에 대한 투여 및 약물의 투여량, 투여기간에 따른 효능의 차이 등에 관한 연구를 통하여 임상에서 노화관련 질환의 예방과 치료 및 수명 연장의 가능성에 접근할 수 있으리라 기대된다.

V. 結 論

D-galactose로 노화가 유발된 흰쥐에게 斑龍丸 추출물을 투여하고 혈장 TBARS 함량과 적혈구의 SOD, GSH-px, catalase 활성도를 측정하고, 혈장 중의 총지방, 중성지방 농도를 측정할 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈장 지질과산화물(thiobarbituric acid reactive substances)함량은 감소하였으나 유의성은 없었다.
2. 적혈구의 superoxide dismutase(SOD) 활성도는 유의성 있게 증가하였다
3. 적혈구의 glutathione peroxidase(GSH-px) 활성도는 유의성 있게 증가하였다.
4. 혈장내 총지방 농도는 유의성 있게 감소하였고 중성지방 농도는 감소하였으나 유의성은 없었다. 이상의 결과로 보아 斑龍丸은 혈중 지질농도를 감소시켰으며, free radical에 대한 효소의 활성을 증

가시켜 노화와 관련된 free radical의 산화작용을 억제하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

參考文獻

1. Knight JA. The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem.* 2000;35:1-62.
2. Melov S. Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Jun; 908:219-25.
3. Harman D. Free radical theory of aging: history. *EXS.* 1992;62:1-10.
4. Cohen G. The generation of hydroxyl radicals in biologic systems: toxicological aspects. *Photochem Photobiol.* 1978 Oct-Nov;28(4-5): 669-75.
5. Kellogg EW 3d, Fridovich I. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1977 Oct 10;252(19):6721-8.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals transition metals and disease. *Biochem.* 1984;1:219.
7. 洪元植 編. 精校黃帝內經. 서울: 東洋醫學研究院; 1981, pp.19-20, 111, 246, 301.
8. 이귀녕 외. 임상병리과일. 서울: 의학문화사; 1993, pp.138-9, 241, 348.
9. 虞 博. 醫學正傳. 서울: 成輔社; 1986, p.9.
10. 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, pp.2-222.
11. 東醫寶鑑國譯委員會 譯. 對譯東醫寶鑑. 서울: 法人文化社; 1999, p.133, 153.
12. 汪 昂. 國譯醫方集解. 서울: 大星文化社; 1984, pp.66-7.
13. 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.
14. 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.
15. 陳晏珍 外. 腎虛與超氧化物每關係初探. 中醫雜誌. 1989;30(3):42.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 李志海. 中藥抗衰老作用的研究探討. 中草藥. 1986;17(10):37-41.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 李東濬. 老化過程의 흰쥐에서 補裨湯이 脾臟의 代謝酸素系에 미치는 影響. 大田大學校大學院. 1999.
 22. Yagi K. Assay for Blood Plasma or Serum. Methods in Enzymology Academic Press Inc. N Y Vol. 105 1984:328-31.
 23. Flohé L, Becker R, Brigelius R, Lengfelder E and Ötting F. Convenient Assays for Superoxide Dismutase. CRC Handbook of free Radicals and Antioxidants in Biomedicine. 1992:287-93.
 24. Flohé L. Determination of Glutathione Peroxidase. CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidations in Biomedicine. 1992:281-6.
 25. Johnsson LH, Håkan Borg LA. A Spectrophotometric Method for Determination of Catalase Activity in Small Tissue Samples. Analytical Biochemistry. 1988;174:331-36.
 26. Frings CS, Dunn RT. A colorimetric method for determination of total serum lipid based on the sulfuric-phospho-vanillin reaction. Am J Clin Nutr. 1970;53:89.
 27. 배영철, 이영진. 노인의학 1. 서울: 고려의학; 1996, p.21.
 28. Medvedev 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, pp.255-66.
 29. Harman D. The free radical theory of aging: In free radicals in Biology. Vol 5. New York: Academic Press. 1982, pp.255-75.
 30. Heicklen J, Brown E. Increase in life expectancy for mice fed diethylhydroxylamine. J Gerontol. 1987;42(6):674-80.
 31. Szilard L. On the nature if ageing process. Proc Natl Acad Sci. USA. 1959;45:30-45.
 32. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울. 傳統醫學研究所. 1989, pp.56-7.
 33. 全國韓醫科大學 本草學教室. 本草學. 서울: 永林社; 1991, pp.494-5, 546-8, 559, 580-1.
 34. 李時珍. 本草綱目. 北京: 人民衛生出版社; 1982, pp.1235-8.
 35. 申興默 外. 命門動氣의 生理作用에 對한 實驗的 研究-右歸飲과 右歸飲加肉從蓉이 飢餓白鼠 血中 호르몬 및 SOD活性에 미치는 影響. 東醫生理學會誌. 1991;6(1):1-23.
 36. 朴成敏. 補中益氣湯과 六味地黃湯이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. 경산대학교대학원. 2000.
 37. 서경석, 이상룡. 五子地黃飲子가 老化白鼠의 血液 變化와 血清·腦組織의 抗酸化活性에 미치는 影響. 동의신경정신과 학회지. 1999;10(1).
 38. 安相源, 李哲浣. 熟地黃과 六味地黃湯이 老化過程 흰쥐에서의 抗酸化機轉에 미치는 影響. 대전대학교 한의학연구소 논문집 1999;8(1):593-623.
 39. Weisiger RA, Fridovich I. superoxide dismutase: Organelle specificity. J Bio Chem. 1973; 248:3582-92.
 40. 허근, 신억섭, 박종민. 지질과산화 반응과 free

- Radical 생성계 효소활성에 미치는 Testosterone의 영향. 藥學會誌. 1994;38(2):166-73.
41. 張文彭 外. 老年腎虛證血漿過氧化脂質高密度脂蛋白膽固醇及其亞組分水不變化. 中醫雜誌. 1989; 30(2):43-6.
 42. Yagi K. Lipid peroxides and disease Chem. and Phy. of lipid. 1987;45:337.
 43. 양재수. 노화촉진 생쥐에서 산소라디칼 관련 물질의 검색에 관한 연구. 서울대학교대학원. 1989.
 44. 김주섭. 노화촉진 생쥐의 각종 장기에서 산화성 변성과 산소라디칼 제거 효소계의 활성화에 관한 연구. 서울대학교대학원. 1991.
 45. Watabe T, Ishizuka T, Isobe M, Ozawa N. 7-hydroxymethylsulfatester as an active metabolite of 7,12-dimethylbenzanthracene. Science. 1982, p.215, 403.
 47. 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, p.200, 764-71.
 48. 杜鎬京. 臨床腎系學研究. 서울:成輔社; 1995, pp.474-6.
 49. Wilson PD. The histochemistry of aging. Histochem J. 1983;15:393.
 53. Sakamoto Y, Kinoshita S. Glutathion(3rd ED). Scientific. 1989, p.5.
 54. Sevanian A, Muakkash-Kelly SF, Montestraque S. The influence of phospholipase A2 and Glutthion peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxide. Arch. Biochem. Biophys. 1983, p.223, 441.