

흰쥐의 腎에서 過酸化脂質 生成 및 Oxygen Free radical 生成系 酵素 活性에 미치는 左歸飲과 右歸飲의 影響

東國大學校 韓醫科大學 內科學教室

尹哲浩 · 鄭智天 · 申億燮

I. 緒 論

脂質과 蛋白質로 構成된 細胞膜에⁷⁾ free radical이 作用하면 不飽和脂肪酸을 過酸化시켜 細胞膜의 透過性을 變化시키고 이로 因해 細胞膜의 破壞를 招來하여 細胞毒性을 誘發시키는 것으로 알려져 있다.^{22,25,51)} 最近 많은 研究 報告들에 依하면 free radical에 依한 過酸化脂質의 生成은 成人病의 發病過程과 疾病의 進行 및 老化現象과 密接한 關係가 있다고 報告되고 있다.^{7,8,30,45,51)}

脂質의 過酸化 反應은 xanthine oxidase⁴³⁾와 aldehyde oxidase³⁹⁾ 같은 酵素들에 依해서 生成되는 superoxide anion radical이나 hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$)³⁸⁾ 등의 活性 酸素에 依해서 促進되며, 또한 이러한 活性 酸素들을 分解시키는 酵素인 superoxide dismutase(SOD)^{25,50)}, catalase³⁴⁾ 및 glutathione peroxidase⁴⁷⁾ 등에 依해서 抑制되어진다.

東醫學에서 이에 對한 研究는 腎虛를 中心으로 이루어지고 있는데, 老年群의 臟腑別 虛症 檢出率 調査에서 腎虛의 境遇가 83.6%로 가장 높게 나타났으며³¹⁾, 腎虛群에서 過酸化脂質 含量이 上昇하고²⁴⁾ SOD 活性이 低下되어 있었다³³⁾. 또한, 腎을 補하는 五子衍宗液²⁶⁾, 還少丹¹⁸⁾, 淸宮長春丹³²⁾ 등의 處方들이 過酸化脂質의 含量을 低下시키고 SOD 活性을 上昇시켜 老化를 抑制한다고 報告되고 있다.

左歸飲과 右歸飲은 腎陰과 腎陽을 補하는 代表的인 處方으로 主로 抗老衰 作用을 가진 藥物로 構成되어 있어^{13,17)} 抗酸化 效能을 究明하고자 하였다. 以前 研究에서 著者들은 左歸飲과 右歸飲이 實驗 動物의 肝과 腦 組織에서 脂質의 過酸化 反應을 抑制하는 效果가 있음을 確認하였다.^{5,6)} 따라서, 本 研究에서는 腎臟에서 過酸化脂質의 含量 및 oxygen free radical 生成系 酵素 活性을 檢討하였던 바 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

(1) 藥材

이 實驗에 使用한 藥材는 東國大學校 附屬 韓方病院에서 購入한 後 精選하여 使用하였으며, 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

1) 左歸飲

熟地黃	Rehmanniae Radix	12 g
山藥	Dioscoreae Rhizoma	8 g
枸杞子	Lycii Fructus	8 g
山茱萸	Corni Fructus	8 g
白茯苓	Hoelen Alba	4 g
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	4 g
Total amount		44 g

2) 右歸飲

熟地黃	Rehmanniae Radix	12 g
山藥炒	Dioscoreae Rhizoma	8 g
枸杞子	Lycii Fructus	8 g
杜冲鹽製	Eucommiae Cortex	8 g
山茱萸	Corni Fructus	4 g
肉桂	Cinnamomi loureirii Cortex	4 g
附子炮	Aconiti Tuber	4 g
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	4 g
Total amount		52 g

(2) 實驗動物

實驗動物은 外觀上 健康한 400g 內外의 老
化된 雄性 Sprague-Dawley系 rat을 實驗前
16時間 동안 물만 주고 絶食시켜 使用하였다.

(3) 試藥 및 機器

Bovine serum albumin(BSA), β -nicotina-
mide adenine dinucleotide(β -NAD), xanthine
sodium salt, thiobarbituric acid(TBA), N-
methylnicotinamide(NMN), malondialdehyde
(MDA), sodium dodesyl sulfate(SDS), xanthine
oxidase는 Sigma社의 製品을 使用하였으며 그
外 實驗에 使用한 모든 試藥들은 市中에서 購

入한 特級 내지는 一級品을 使用하였다.

實驗에 使用한 機器는 refrigerated centrifuge
(Hanil supra 22K), ultracentrifuge(Dupont Sorval
OTD 65B), spectrophotometer (Shimadzu ²⁰²¹)
等이었다.

2. 實驗方法

(1) 左歸飲 및 右歸飲의 抽出物 製造

左歸飲 및 右歸飲 3貼 分量에 各各 500ml의
methanol을 加한 다음 60℃에서 24時間 間隔
으로 3回 反復 抽出하여 濾過한 後, 濾液을 減
壓濃縮器로 濃縮하여 methanol extract 左歸飲
26g 및 右歸飲 28.6g을 얻었다. (Scheme 1.)

試料는 1% CMC(carboxymethyl cellulose)
溶液에 懸濁시킨 左歸飲 및 右歸飲 抽出物을
實驗動物의 體重 kg當 200mg의 用量으로 1日
1回 15日間 esophagus needle을 使用해 經口
投與하였으며, 對照群은 같은 方法으로 1%
CMC溶液만 經口投與하였다.

Jwagyuyeuem or Woogyuyeuem

extracted with hot
methanol, then filtered

Methanol Solution

evaporated

Methanol Extract

Scheme 1. Extraction of Jwagyuyeuem or
Woogyuyeuem with Methanol

(2) 酵素源의 調製

動物은 ether로 痲醉시킨 다음 腹部正中線을
따라 開腹하여, 腹部 大動脈에서 採血한 後 生

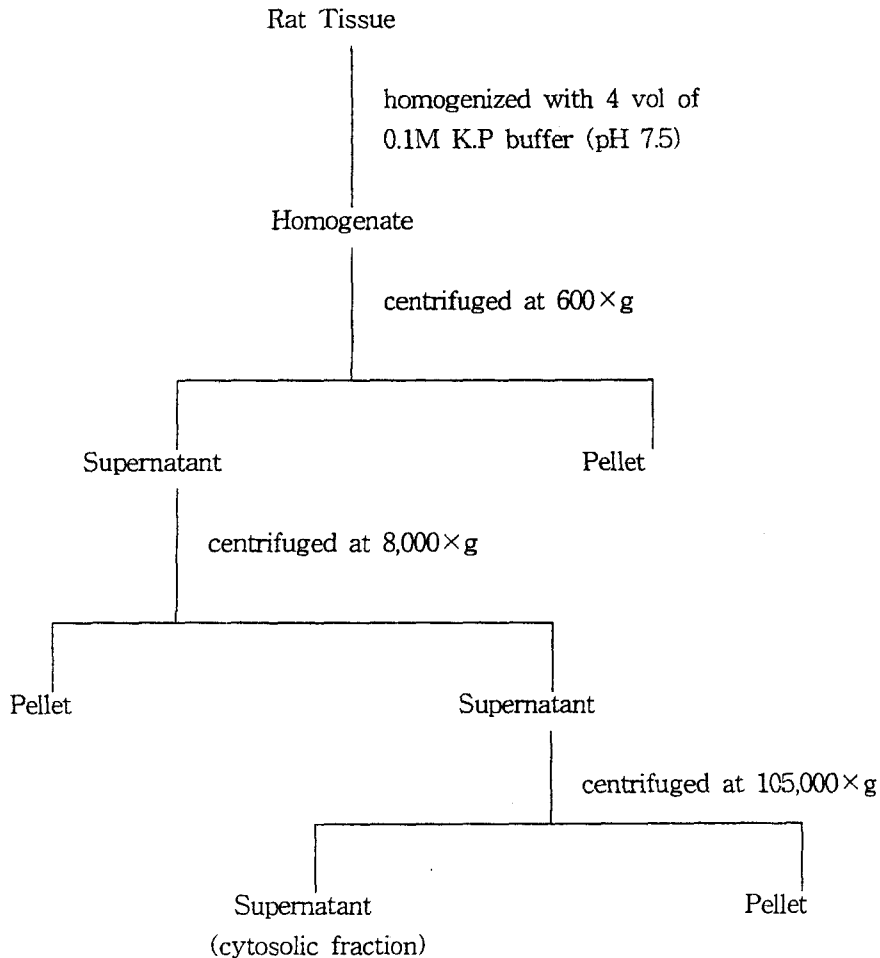
理食鹽水로 貫流시킨 腎臟을 摘出하여 食鹽水
로 깨끗이 씻고 濾紙로 남아있는 血液 및 生
理食鹽水를 除去한 後 組織 1g當 4倍量의
0.1M potassium phosphata buffer(pH 7.5, 以
下 K.P buffer로 略함)를 加하여 氷冷下에서
glass teflon homogenizer로 磨碎하여 均質液
을 만들었다. 이 磨碎均質液을 脂質의 過酸化
反應 測定 試料로 使用하였다. 調製된 磨碎均
質液을 600×g에서 10分間 遠心分離하여 核
및 未磨碎部分을 除去하고 8000×g에서 다시
20分間 遠心分離하여 上澄液을 얻었다. 이 上

澄液을 105,000×g에서 1時間 동안 超遠心分離하
여 cytosol分劃을 얻고 이 分劃을 aldehyde
oxidase 및 xanthine oxidase活性 測定 酵素源
으로 使用하였다. 以上의 모든 操作은 0-4℃
에서 行하였다. (Scheme 2.)

(3) 酵素活性의 測定

1) Aldehyde oxidase 活性測定

Aldehyde oxidase 活性測定은 Rajagopalan
等53)의 方法에 依해 0.1M K.P.buffer (pH
7.5) 一定量에 基質인 N-methylnicotinamide



Scheme 2. Preparation of enzyme source

1.5mM과 酵素液을 添加해 37°C에서 20分間 反應시킨 다음 20% trichloroacetic acid(TCA)를 加해 反應을 終了시켰다. 反應 終了後 生成된 pyridone을 波長 300nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 酵素의 活性도를 算定하였다. 酵素의 活性도는 1分當 1mg의 蛋白質이 生成시킨 pyridone의 量을 nmole로 나타내었다.

2) Xanthine oxidase 活性 및 型轉換率 測定
Xanthine oxidase (type O) 活性 測定은 Stirpe 等⁵⁵⁾의 方法에 準해 0.1M K.P.buffer (pH 7.5) 一定量에 基質인 xanthine 60 μM 및 酵素源을 添加하여 37°C에서 5分間 反應시킨 다음, 20% TCA를 加하여 制蛋白시키고 遠心 分離하였다. 이때 生成되어진 uric acid를 波長 292nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 酵素의 活性도를 算定하였다. 한편, xanthine dehydrogenase (type D)의 活性은 type O의 活性 測定 反應液에 coenzyme인 NAD⁺ 100mM을 添加해 同一하게 反應시킨 다음, 測定하여 나온 活性度(total type : type D+O)에서 type O의 活性을 減한 값으로 算定하였다. 酵素의 活性도는 1分當 1mg의 蛋白質이 生成시킨 uric acid 量을 nmole로 나타내었다.

한편, xanthine oxidase의 型轉換比 算出은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine oxidase 反應에서 얻어진 酵素의 活性도를 利用하여 xanthine dehydrogenase (type D)에서 xanthine oxidase (type O)로의 型轉換 比率을 O/(O+D)의 比로 算出하였다.

(4) 過酸化脂質 含量 測定

過酸化脂質 含量 測定은 Ohkawa 等⁵²⁾의 方法에 準해 磨碎均質液 一定量에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 溶液을 加해 95°C에서 1時間동안 反應시키고 室溫으로 冷却한 다음, 生成된 紅色의 TBA reactive substance를 n-Butanol : Pyridine (15:1) 混液

으로 移行시켜 波長 532nm에서 吸光度의 變化를 測定하여 定量하였다. 한편, in vitro 實驗에서는 Haber-Weiss反應⁵¹⁾을 除外시킨 實驗條件과 Haber-Weiss反應을 利用하여 300 μM의 Fe²⁺와 xanthine-xanthine oxidase system을 添加시킨 實驗條件에서 脂質의 過酸化反應을 測定하였다. 過酸化脂質의 含量은 組織 1g當 malondialdehyde (MDA)의 量을 nmole로 나타내었다.

(5) 蛋白質의 定量

蛋白質의 定量은 Lowry 等⁴⁸⁾의 方法에 準해 bovine serum albumin을 標準品으로 하여 定量하였다. 한편, 實驗 結果의 有意性 檢定은 Student's t-test를 利用하여 相互比較하여 觀察하였다.

Ⅲ. 實驗 成績

1. 試驗管內에서 腎 過酸化脂質의 含量 變化

試驗管內에서 腎 過酸化脂質의 含量 變化를 觀察하였을 때 對照值가 10.48 nmoles이었고, 試驗管內에 各各의 添加量을 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1.0 mg/ml로 增加시킴에 따라 左歸飲 methanol 抽出物을 添加하였을 경우 各各 9.12 nmoles, 7.90 nmoles, 6.30 nmoles 및 5.97 nmoles로 減少하여 對照值에 比하여 0.5 mg/ml와 1.0 mg/ml에서 p<0.01의 有意性 있는 減少를 나타내었으며, 右歸飲 抽出物을 添加하였을 때는 各各 9.38 nmoles, 8.60 nmoles, 7.54 nmoles 및 6.74 nmoles로 減少하여 對照值에 比하여 0.5 mg/ml와 1.0 mg/ml에서 p<0.05의 有意性 있는 減少가 나타났다. (Fig. 1)

p<0.1, 1.0 mg/ml에서 p<0.01의 有意性 있는 減少를 나타내었다. (Fig. 2.)

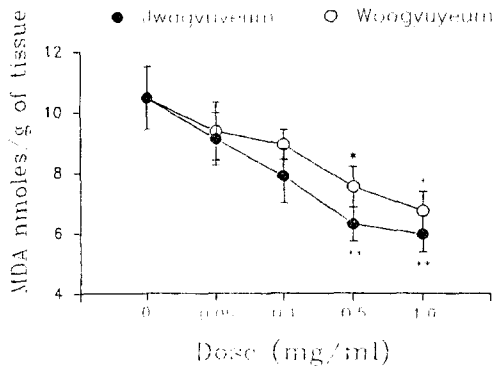


Fig. 1. Effects of the MeOH extracts of Jwag-yuyeuim and Woogyuyeuim on the Renal lipid peroxidation in vitro.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 3 separate experiments.

Significantly different from control. (*:p<0.05, **:p<0.01)

2. 試驗管内에서 Fe+2에 依해 誘導된 腎 過酸化脂質의 含量 變化

Haber-Weiss反應을 利用하여 試驗管内에 Fe+2 300 μ M을 添加시켜 誘導된 腎 過酸化脂質의 含量 變化는 對照值가 32.04 nmoles이었고, 添加量을 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1.0 mg/ml로 增加시킴에 따라 左歸飲 抽出物의 경우는 各各 29.67 nmoles, 21.58 nmoles 및 17.11 nmoles로 減少하여 對照值에 比하여 0.5 mg/ml에서 p<0.01, 1.0 mg/ml에서 p<0.001의 有意性 있는 減少가 나타났으며, 右歸飲 抽出物 添加時는 各各 32.21 nmoles, 29.92 nmoles, 24.49 nmoles 및 20.22 nmoles로 減少하여 對照值에 比하여 0.5 mg/ml에서

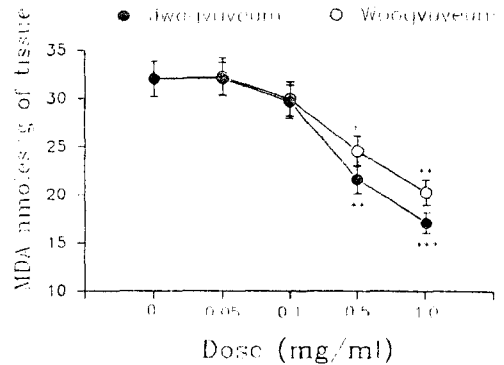


Fig. 2. Effects of the MeOH extracts of Jwag-yuyeuim and Woogyuyeuim on the Fe+2-induced Renal lipid peroxidation in vitro.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 3 separate experiments.

Significantly different from control. (*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001)

3. Rat에서의 腎 過酸化脂質의 含量 變化

試驗管内 實驗에서 左歸飲 및 右歸飲이 脂質의 過酸化 反應을 顯著하게 抑制시킴을 確認할 수 있었다. 따라서 이러한 左歸飲 및 右歸飲이 生體內에서도 類似하게 作用하는 지를 確認하기 爲하여 實驗 動物에 各各의 抽出物을 投與하여 生體內에서의 過酸化脂質의 含量 變化를 觀察하였다. Rat의 體重 1kg當 左歸飲과 右歸飲의 methanol 抽出物 200mg을 15日

間 投與한 다음, 腎臟에서의 過酸化脂質 含量을 測定한 結果 對照群의 10.35nmoles에 比하여 左歸飲은 6.30nmoles, 右歸飲은 7.94nmoles로 나타나 모두 過酸化脂質의 生成을 抑制시켰지만 左歸飲에서만 $p < 0.05$ 의 有意性 있는 減少가 觀察되었다. (Fig. 3.)

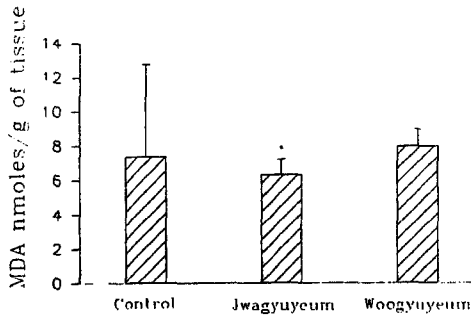


Fig. 3. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeum and Woogyuyeum on the content of Renal lipid peroxides in rat.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Rats were received the MeOH extracts of Jwagyuyeum or Woogyuyeum (200mg/kg, p.o.) for 15 days. Values are mean \pm S.E. for 5 animals.

Significantly different from control. (*: $p < 0.05$)

4. Rat의 腎 xanthine oxidase 活性 變化

左歸飲과 右歸飲의 methanol 抽出物 200 mg/kg을 15日間 各各 投與하였을 때, 腎臟의 xanthine oxidase 活性 變化는, Type O (oxidase)의 경우 對照群이 0.24 nmoles인 反

面 左歸飲 投與群은 0.15 nmoles로 減少하여 $p < 0.05$ 의 有意性이 認定되었으며, 右歸飲 投與群의 경우 0.19 nmoles로 減少하였으나 有意性은 認定되지 않았다. Type D+O (oxidase + dehydrogenase)의 경우 對照群이 0.81 nmoles, 左歸飲 投與群은 0.79 nmoles, 右歸飲 投與群은 0.81 nmoles로 나타나 別다른 變化를 觀察할 수 없었다. (Fig. 4.)

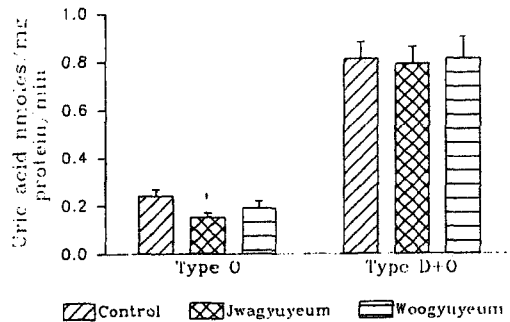


Fig. 4. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeum and Woogyuyeum on the Renal xanthine oxidase activity in rats.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Rats were received the MeOH extracts of Jwagyuyeum or Woogyuyeum (200mg/kg, p.o.) for 15 days. Values are mean \pm S.E. for 5 animals.

Significantly different from control. (*: $p < 0.05$)

Type O : xanthine oxidase

Type D+O : xanthine oxidase + xanthine dehydrogenase.

5. Rat의 腎 xanthine oxidase 型轉換 變化

Rat의 體重 1kg當 左歸飲과 右歸飲의 methanol 抽出物 200mg을 15日間 投與한 後 腎臟에서의 xanthine oxidase 型轉換 變化를 觀察 하였을 때, 對照群이 29.6%인 反面 左歸飲 投與群은 18.9%로 $p<0.05$ 의 有意性 있는 減少를 나타내었으며, 右歸飲 投與群의 경우 23.5%로 減少되었으나 有意性은 認定되지 않았다. (Fig. 5.)

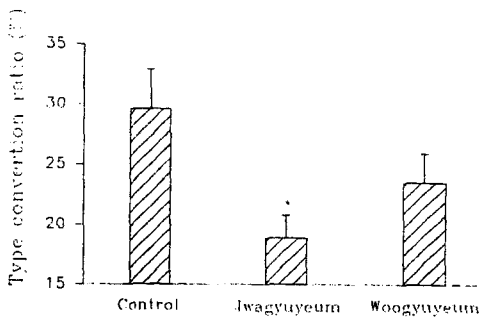


Fig. 5. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu on the type conversion of Renal xanthine oxidase in rats.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Rats were received the MeOH extracts of Jwagyuyeu or Woogyuyeu (200mg/kg, p.o.) for 15 days. Values are mean \pm S.E. for 5 animals.

Significantly different from control. (*: $p<0.05$)

6. Rat의 腎 aldehyde oxidase 活性 變化

Rat에 左歸飲과 右歸飲의 methanol 抽出物 200mg/kg을 15日間 各各 投與한 後, 腎臟에서의 aldehyde oxidase 活性은 對照群이 0.48 nmoles인 反面, 左歸飲 投與群은 0.29 nmoles로 減少하여 對照群에 比하여 $p<0.01$ 의 有意性 있는 減少를 나타내었고, 右歸飲 投與群의 경우 0.37 nmoles로 나타나 $p<0.01$ 의 有意性 있는 減少를 나타내었다.(Fig. 6.)

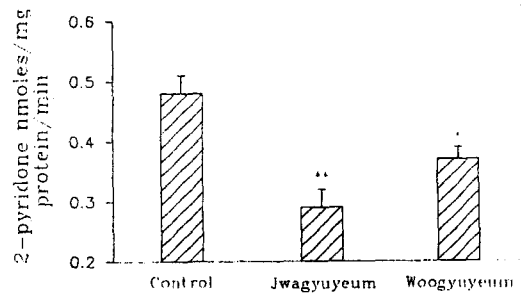


Fig. 6. Effects of the MeOH extracts of Jwagyuyeu and Woogyuyeu on the Renal aldehyde oxidase activity in rats.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Rats were received the MeOH extracts of Jwagyuyeu or Woogyuyeu (200mg/kg, p.o.) for 15 days. Values are mean \pm S.E. for 5 animals.

Significantly different from control. (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$)

IV. 考 察

Harman⁴⁵⁾에 依하면 生體가 外部로 부터 放射線 또는 紫外線을 받거나 重金屬 및 有機溶劑의 吸入, 抗生劑 等 合成藥品의 濫用, 過度한 肉體的, 精神的 스트레스 等を 받게 되면 生體內에서 生化學的 酸化 反應이 促進되고 이와 並行하여 free radical의 生成이 增加하게 되는데 이러한 free radical類에 依하여 細胞나 組織이 損傷을 받게 되거나 過酸化脂質의 生成이 誘導되기 때문에 老化를 促進한다고 報告하고 있다.

生體의 基本 單位인 細胞는 脂質과 蛋白質로 構成된 細胞膜으로 둘러 싸여 있는데⁷⁾ 刺戟이 繼續되면 不飽和脂肪酸을 包含한 脂質이 變化하여 free radical이 生成되고 여기에 活性化된 酸素가 作用하여 peroxy radical이 生成되어 다른 脂質成分과 連鎖反應하여 過酸化脂質이 生成되고 있다.^{7,13,22,25,26)}

過酸化脂質 生成의 原因이 되는 活性 酸素類들은 分子 狀態의 酸素(O₂)가 生體內 酸化還元 反應의 電子受容體로 利用되므로서 持續的으로 還元되어 가는 過程 中에 生成되는 不完全한 酸素의 還元形態로 superoxide anion, hydrogen peroxide(H₂O₂) 및 hydroxyl radical(·OH) 等³⁸⁾이 있으며, 이들 中 hydroxyl radical이 가장 強力한 活性을 지니는 것으로 알려져 있다.^{36,41,54)} 生體內에서 活性酸素는 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase⁴⁹⁾ 및 microsomal mixed function oxidase⁴²⁾ 및 catecholamines⁴⁰⁾의 自動 酸化에 依해서도 生成된다.

Xanthine oxidase는 生體內에 널리 分布되어 있으며 活性酸素 生成의 生化學的 酸化反應을 觸媒하는 重要한 酵素로 알려져 있다.⁴¹⁾ 正常 過程에서 이 酵素는 電子 受容體로 NAD⁺를 利用하는 xanthine dehydrogenase (type D) 形態로 存在하나 病態 生理 條件이 附與될 때에는 酸素를 電子 受容體로 利用하

여 活性 酸素를 生成시키는 xanthine oxidase (type O) 形態로 轉換된다는 事實이 밝혀지고 있다.^{37,55,56)}

Aldehyde oxidase는 細胞質 分割에 存在하는 molybden含有 flavoprotein酵素로서 pyridoxal 等の 外因性 物質과 內因性 物質을 代謝시키는 反應을 觸媒하는 基質 非特異性 酸化酵素이다.³⁹⁾ 이 酵素가 觸媒하는 酸化反應이 進行되는 過程에 分子狀態의 酸素에 基質의 電子를 傳達하는 生化學的 反應으로 superoxide anion을 生成하는 機能을 遂行하게 된다.³⁵⁾

東醫學에서는 老化와 密接한 關係에 있는 脂質의 過酸化 反應을 腎虛와 關聯시켜 理解하고 있는데^{13,18,21,24,25)}, 素問·上古天眞論⁹⁾에 '天壽過度,氣脈常通,而腎氣有餘也', 虞¹⁴⁾는 '腎元盛則壽延,腎元衰則壽夭'라고 長壽하는 것이 腎氣의 盛衰與否에 依하여 決定된다고 하였다.

生長發育,老衰와 密接한 關係가 있는 腎의 作用은 腎陰과 腎陽의 兩 方面으로 概括되는데 腎陰은 一身의 陰液의 根本으로서 濡潤, 滋養作用을 하며, 腎陽은 人體 陽氣의 根本이자 先天의 眞火로서 溫煦, 氣化作用을 하여 腎陰과 더불어 發育과 生殖을 促進하며¹²⁾ 病理現象이 招來時 治療를 爲하여 左歸飲과 右歸飲 等の 處方이 活用된다.^{11,15)}

右歸飲은 張¹⁶⁾이 八味地黃湯에서 清熱의 牡丹皮,澤瀉,茯苓을 去하고 補腎益精의 枸杞子,杜仲을 加하고 再次 補中益氣의 炙甘草를 加하여 補而不瀉하고 溫補腎陽의 效能을 增強시킨 益火之原의 方劑로서 腎陽虛가 比較的 重한 경우에 活用된다. 左歸飲 또한, 張¹⁶⁾이 六味地黃湯에서 涼性의 牡丹皮와 泄腎經之火하는 澤瀉를 去하고 滋補肝腎하는 枸杞子와 益氣健脾하는 炙甘草를 加하여 補而不瀉하고 補益腎陰의 效能을 增強시킨 純補壯水之劑로 腎陰虛가 比較的 重한 경우에 使用된다.^{10,11,12,15)}

構成 藥物에 對한 實驗 研究에 依하면 熟地黃^{19,21,30)}, 山茱萸^{19,21,30)}, 枸杞子^{21,28)}, 杜仲²¹⁾, 肉桂^{18,29)} 等の 藥物이 過酸化脂質의 生成을 抑制

시키고, 枸杞子^{23,28)}, 山藥³⁰⁾, 熟地黃³⁰⁾ 등의 藥物은 SOD의 活性을 增加시켰으며, 枸杞子^{20,27)}, 杜仲²⁰⁾, 肉桂²⁰⁾ 등은 實驗動物의 壽命을 延長시키는 效果가 있음이 밝혀졌다.

左歸飲과 右歸飲은 腎陰과 腎陽을 補하는 代表的인 處方으로 主로 抗老衰 作用을 가진 藥物로 構成되어 있으므로^{13,17)} 脂質의 過酸化反應에 一定한 作用을 할 것으로 여겨지나 老化和 關聯된 實驗研究로는 申⁴⁾의 右歸飲과 右歸飲加肉蓯蓉이 SOD 活性을 增加시켰다는 報告가 있을 뿐이다.

이에 著者는 腎陰과 腎陽을 補하는 左歸飲, 右歸飲이 腎臟에서의 過酸化脂質 生成과 oxygen free radical 生成系 酵素 活性에 미치는 影響에 關하여 檢討해 보았다.

生體膜 損傷의 程度를 나타내는 過酸化脂質의 含量⁴⁶⁾은 試驗管内 實驗에서 左歸飲 및 右歸飲 抽出物에 用量 依存的으로 抑制되었으며 또한, Haber-Weiss反應⁵¹⁾을 利用하여 人爲的으로 過酸化脂質의 生成을 促進시킨 實驗條件에서도 左歸飲, 右歸飲 投與群 모두에서 過酸化脂質의 生成을 有意性있게 抑制시켰다.

試驗管内 實驗에서 觀察된 이런 現狀이 生體內에서는 어떤 樣相으로 나타나는지를 檢討하기 爲하여 各各의 抽出物을 實驗動物에 經口 投與하였을 때, 左歸飲, 右歸飲 投與群 모두 過酸化脂質의 含量이 減少되었으나 左歸飲 投與群에서만 有意性이 認定되었다.

Oxygen free radical의 代表的인 生成系 酵素인 xanthine oxidase 活性과 型轉換率에 對한 實驗에서는 左歸飲 投與群에서만 有意性이 認定되어 type O의 경우 37.5%의 酵素 活性 抑制를, 型轉換은 36.1% 抑制시킨 것으로 나타났다. 이러한 結果는 xanthine dehydrogenase (type D)로부터 xanthine oxidase(type O)로 型轉換이 이루어져야만 活性酸素의 生成에 參與할 수 있으며^{37,55)} 病態 生理條件이 附與될 때 型轉換이 急進的으로 促進되며⁴⁴⁾ 實驗動物의 나이에 따라 xanthine oxidase 活性 및 型

轉換이 增加된다는 報告^{3,8)}로 미루어 볼 때 老화를 抑制시키는 것과 關聯성이 強할 것으로 여겨진다.

Aldehyde oxidase의 活性에 對한 實驗에서는 左歸飲과 右歸飲 投與群은 各各約 40%, 23%의 有意性 있는 酵素 活性 抑制를 보였다.

以上の 實驗 結果들을 綜合하면 左歸飲과 右歸飲은 腎臟에서 oxygen free radical의 生成系 酵素인 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase의 活性을 抑制시킴으로서 活性 酸素의 生成이 沮害되어 活性 酸素에 依해 誘導되는 脂質의 過酸化反應을 抑制시킨 것으로 생각되어진다. 그리고, 活性 酸素 分解系 酵素 活性에 미치는 影響 등에 對한 研究가 必要할 것으로 여겨진다.

V. 結 論

左歸飲과 右歸飲이 老化和 關聯된 parameter에 미치는 影響을 알아보기 爲한 一環으로 腎臟에서의 過酸化脂質 含量 變化和 xanthine oxidase 活性 및 型轉換率, aldehyde oxidase의 活性 變化를 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 試驗管内에서 過酸化脂質 含量은 左歸飲과 右歸飲 抽出物 添加에 依해 濃度 依存的으로 有意性 있게 減少하였다. Fe+2로 脂質의 過酸化反應을 誘導한 後 過酸化脂質 含量도 左歸飲과 右歸飲 添加群 모두에서 濃度 依存的으로 有意性 있게 減少하였다.
2. 生體內에서 過酸化脂質 含量 變化는 左歸飲, 右歸飲 投與群 모두에서 減少하였으나 左歸飲 投與群에서만 有意性이 認定되었다.
3. 生體內에서 xanthine oxidase 活性度는 type O에서는 左歸飲, 右歸飲 投與群 모두 減少

하였으며 左歸飲 投與群에서 有意성이 있었고, type D+O에서는 別 變化가 없었다. 또한, 左歸飲과 右歸飲 投與群 모두에서 xanthine oxidase의 型轉換率을 抑制하는 것으로 나타났으나 左歸飲 投與群에서만 有意성이 있었다.

4. 生體內에서 aldehyde oxidase의 活性도는 左歸飲, 右歸飲 모두에서 有意性 있게 減少하였다.

以上の 結果로 보아 左歸飲과 右歸飲은 腎臟에서 oxygen free radical 生成系 酵素인 xanthine oxidase의 活性 및 型轉換率과 aldehyde oxidase의 活性를 抑制시켜 活性 酸素類의 生成을 阻害하므로써 過酸化脂質의 生成을 抑制시킨 것으로 여겨진다.

參考 文獻

- 1) 金完熙, 崔達永 : 臟腑辨證論治, 成輔社, pp. 282-284, 1985.
- 2) 杜鎬京 : 東醫腎系學(上), 東洋醫學研究院, pp.10-11, 1993.
- 3) 金永文 : Xanthine oxidase 型轉換에 관한 研究, 嶺南大學校 大學院 博士學位論文, 1993.
- 4) 申興默, 金吉萱 : 命門動氣의 生理作用에 對한 實驗的 研究-右歸飲과 右歸飲加肉蓯蓉이 飢餓 白鼠 血中 호르몬 및 SOD 活性에 미치는 影響, 東醫生理學會誌, 6(1):1-23, 1991.
- 5) 尹哲浩, 鄭智天 : 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 肝 過酸化脂質 生成 및 活性酸素 生成系 酵素 活性에 미치는 影響, 大韓 韓方內科學會誌, 16(1):62-80, 1995.
- 6) 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 酵素 活性에 미치는 影響, 大韓 韓醫學會誌, 16(2): 348-364, 1995.
- 7) 최진호 : 노화의 메카니즘과 연구방향, 생화학뉴스, 한국생화학회, 5(3):39-53, 1985.
- 8) 허근, 신억섭, 박종민 : 지질과산화 반응과 Free Radical 생성계 효소활성에 미치는 Testosterone의 영향, 약학회지, 38(2):166-173,1994.
- 9) 南京中醫學院醫經教研組 : 黃帝內經素問譯釋, 上海科學技術出版社, pp.4-5, 1983.
- 10) 方文賢 : 中醫名方臨證秘用, 中國中醫藥出版社, pp.242,246, 1993.
- 11) 楊蘊祥 : 古今名方, 河南科學技術出版社, pp. 132-133, 1983.
- 12) 連建偉 : 歷代名方精編, 浙江科學技術出版社, pp.271-273,284-287, 1987.
- 13) 王其飛 外 : 中醫長壽學, 遼寧科學技術出版社, pp.50,53,54, 1989.

- 14) 虞 搏 : 醫學正傳, 成輔社,p.9, 1986.
- 15) 于世良 : 中醫名方精釋, 中醫古籍出版社, pp. 139,145-146, 1993.
- 16) 張介賓 : 景岳全書(下), 大成文化社, pp. 416-417, 1988.
- 17) 田金洲 外 : 中醫老年病學, 天津科學技術出版社, pp.17,60, 1994.
- 18) 杜 辛 外 : 還少丹膠囊抗衰老及治療腎陽虛臨床觀察, 中國中西醫結合雜誌, 12(1):20-22, 1992.
- 19) 馬瑞琿 : 中藥的抗衰延年作用, 浙江中醫學院學報, 15(6):49-51, 1991.
- 20) 莫新民 外 : 抗衰延壽方對家蠅壽命的影響, 中草藥, 24(7):358-359, 1993.
- 21) 舒守琴 外 : 27種中藥及SOD對體外大白鼠腦均漿過氧化脂質生成的影響, 山東中醫學院學報, 15(3):70-72, 1991.
- 22) 孫承琳 外 : 人蔘對培養神經細胞自由基損傷的保護作用, 北京中醫學院學報, 16(4):62-67, 1993.
- 23) 曾一飛 外 : 補腎抗衰口服液抗自由基損傷的實驗研究, 四川中醫, 10:12-14, 1992.
- 24) 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, 10(8):511-512, 1990.
- 25) 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):187-188, 1993.
- 26) 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, 12(1):23-25, 1992.
- 27) 劉小英 : 枸杞的抗衰藥理研究與臨床應用概述, 四川中醫, 7:18-19, 1993.
- 28) 李 爲 外 : 口服枸杞子對老年人血中超氧化物歧化酶,血紅蛋白和過氧化脂質含量的動態觀察, 中草藥, 22(6):251,268, 1991.
- 29) 李春生 : 中國傳統延緩衰老藥物的現代研究概述, 中醫雜誌, 29(1):59-62, 1988.
- 30) 李獻平 外 : 四大懷藥延緩衰老作用的研究, 中西醫結合雜誌, 11(8):486-487, 1991.
- 31) 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平變化,中醫雜誌, 30(2):43-46, 1989.
- 32) 張文彭 外 : 清宮長春丹對老年腎虛證血漿過氧化脂質,高密度脂蛋白,膽固醇水平影響的研究, 中醫雜誌, 30(3):34, 1989.
- 33) 陳晏珍 外 : 腎虛與超氧化物歧化酶關係初探, 中醫雜誌, 30(4):42, 1989.
- 34) Aebi,H. : Catalase erythrocytaire.in : Exposes Annuels de Biochimie Medicale, 29 ieme serie, Masson & Cie(eds), Paris, pp.139-164 (1969)
- 35) Badwey,J.A., Robinson,J.M., Karnovsky, M.J. and Karnovsky,M.L. : Superoxide production by an unusual aldehyde oxidase in guinea pig granulocytes. Characterization and cytochemical localization, J.Biol.Chem., 256(7):3479-3486 (1981)
- 36) Barry,H : Oxidants and human disease : Some new concepts. FASEB.J., 1:358-364 (1987)
- 37) Battelli,M.G. : Enzymatic conversion of rat liver xanthine oxidase from dehydrogenase to xanthine. FEBS Letters. 113:47-51 (1980)
- 38) Battelli,N.G., Lorenzoni,E. and Stirpe,F. : Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O(oxidase) : Purification and interconversion and some properties. Biochem.J., 131:191-198 (1973)
- 39) Bell,R.R., Blanchard,C.A. and Haskell,B.E. : Metabolism of vitamine B6 in the 1-strain mouse. Arch.Biochem.Biophys. 147:602 (1971)
- 40) Bodanes,R.S. and Chan,P.C. : Singlet oxygen as a mediator in hematoporphyrin-catalyzed photooxidation of NADPH to NADP+ in deuterium oxide.

- J.Biol.Chem., 252:8554-8560 (1977)
- 41) David,R. : Mechanistic toxicology: A radicalperspective. J.Pharm. pharmacol., 41:505-511 (1989)
- 42) Freemann,B.A. and Crapo,J.D.: Biology of disease: Free radicals and tissue injury. Lab.Invest., 47:412-426 (1982)
- 43) Fridovich,I. and McCord,J.M. : Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). J.Biol. Chem., 244:6049-6055 (1969)
- 44) Granger,D.N., Rutili,G. and McCord,J.M. : Role of superoxide radicals in intestinal ischemia. Gastroenterol., 81:22 (1981)
- 45) Harman,D : Free radical theory of aging ; Role of free radicals in the organization and evolution of life, aging and disease processes. Free Radicals, Aging and Degenerative Disease (ed. Johnson, J.E. et al.), Alan R.Liss.Inc., New York, pp.3-49 (1986)
- 46) Huff,S.D. and Chaykin,S. : Kinetics of testosterone action, in vivo, on liver N-methylnicotinamide oxidase activity in mice. Endocrinology, 83:1259 (1968)
- 47) Little,C. and O'Brien,P.J. : An intracellular GSH-peroxidase with lipid peroxide substrate. Biochem. Biophys. Res.Comm., 31:145-150 (1968)
- 48) Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. and Randall,R.J. : Protein measurement with folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-275 (1951)
- 49) Massey,V., Strickland,S., Mayhew,S.G., Howell,L.G. and Engel,P.C. : The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoprotein with molecular oxygen. Biochem. Biophys.Res.Comm., 36:891-897 (1969)
- 50) McCord,J.M.: Free radical and inflammation : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. Science, 185:529-531 (1974)
- 51) Milan L., Jozef R., Vilian K., Peter P. and Ladislav V.: Free Radicals in Chemistry and Biology, CRC Press, pp. 29-31,283-284 (1989)
- 52) Ohkawa,H., Ohishi,N. and Yaki,K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem., 95:351-358 (1979)
- 53) Rajagopalan,K.V., Fridovich,I. and Handler, P. : Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. J.Biol.Chem., 237: 922-928 (1962)
- 54) Simon,R.H., Scogging,C.M. and Patterson, D. : Hydrogen peroxide cause the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. J.Biol.Chem., 266:7181-7186 (1981)
- 55) Stirpe,F. and Della Corte,E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase : conversion in virto of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). J.Biol.Chem., 244:3855-3863 (1969)
- 56) Tubaro,E., Banci,F., Lotti,B. and Croce,C. : Xanthine oxidase activation in animal liver during infections processes. Arzneimittel Forsch.,(Drug Res.), 26:2185 (1976)

ABSTRACT

Effects of Jwagyuyeum and Woogyuyeum on Free Radical Generating Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Rat's Kidney

Yoon Cheol-Ho · Jeong Ji-Cheon * · Shin Uk-Seob **

* Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk Univ.

** Dept. of Pharmacy, Dongguk Medical Center

Jwagyuyeum and Woogyuyeum, being known to reinforce Kidney-yin and -yang, were tested for the effects of on free radical generating enzyme and lipid peroxidation in rat's kidney. In vitro, levels of lipid peroxide in tissues of brain were proportionally decreased to concentration of extracts prepared from Jwagyuyeum and Woogyuyeum. They were much more decreased, when lipid peroxidation was induced with ferrous iron (Fe²⁺). In vivo, after both herbs were administered to the rat, levels of lipid peroxide in kidney were decreased only in Jwagyuyeum.

The enzyme activities and the ratio of type conversion of xanthine oxidase were decreased only in Jwagyuyeum. But, We can't see special changes in Woogyuyeum. The enzyme activities of aldehyde oxidase was lowered in both herbs, especially Jwagyuyeum was much more done.

These results suggest that Jwagyuyeum and Woogyuyeum decrease the activities of free radical generating enzymes such as xanthine oxidase and aldehyde oxidase which form lipid peroxide.