

老化過程의 흰쥐에서 補肝丸이 肝臟의 代謝酵素系에 미치는 影響

趙漢淑 · 吳旼錫 · 宋泰元*

Abstract

Effects of Boganhwan Decoction on the Liver Lipid Peroxide Content and Metabolic Enzyme System

Cho Han-sook, Oh Min-suk, Song Tae-won
Dept. of Oriental Medicine
Graduate School, Tae-jeon University

Aging in the life form occurs due to a gradual progression of the body growth and degeneration. Morphological and functional changes in the body decreases the adaptation and prevention capacity leading into the decline of a life force. Various studies have been released to examine the anti-aging effects of herbal prescriptions. This experiment has chosen Boganhwan which is used for the deficiency of the liver function and studied the anti-aging factors by examining the biotransformation enzymes.

The following results were obtained in this study:

1. Hepatic lipid peroxide activity was significantly suppressed in the experimental group treated with Boganhwan for 2 weeks at the dosage of 350mg/kg, while other dosage groups did not present much changes.

2. Insignificant changes were shown for the cytochrome P-450 level, aminopyrine demethylase, and aniline hydroxylase (AH) activities. Cytochrome P-450 do not appears to be a part of the detoxification scheme.

3. Boganhwan decoction treated group showed most significant increase of superoxide dismutase (SOD), catalase, superoxide, and glutathione activities at the concentration of 350mg/kg and 500mg/kg.

4. Glutathione S-transferase and glutathione made most significant increase at the decoction concentration of 350mg/kg and 500mg/kg compared to the control group.

5. Hepatic glutathione concentration, protein bound-SH, and nonprotein bound-SH made most significant increase at the decoction concentration of 350mg/kg and 500mg/kg compared to the control group.

From the above results, Boganhwan decoction played an important role in eliminating foreign substances in the body excluding cytochrome P-450 enzyme system. Thus, Boganhwan decoction can provide substantial aid in preventing and treating senile related illnesses.

* 大田大學校 韓醫科大學 再活醫學教室

I. 緒 論

老化란 生命體의 成長과 同時에 時間經過에 따른 連續的인 現象으로 生物學的 過程인 漸進的이고 內的인 退行性變化로서, 構造的, 機能的 變化가 招來되어 外部環境에 대해 反應하는 豫備力과 適應力이 低下되어 形態的 機能的으로 退縮, 生命力이 減退되는 現象을 意味한다¹⁻³⁾.

韓醫學에서는 “年五十已上爲老”^{4,5)}라 하여 老衰의 原因을 陰陽의 不調和, 形身衰弱, 氣血 및 腎氣衰弱 등으로 說明하고 있으며, 老化現象에 의한 變化로는 頭髮, 皮膚 等の 外觀上 變化와 身體 臟器重量減少 等の 形態的 變化 및 知的, 人格的 機能低下, 心理的 變化 等이 나타나는 것이 一般의 特徵^{3,6-8)}이라 할 수 있는데 이는《靈樞·天年篇》^{4,5)}에서 “五十歲, 肝氣始衰....., 六十歲, 心氣始衰....., 七十歲, 脾氣虛....., 八十歲, 肺氣衰....., 九十歲, 腎氣焦....., 百歲, 五臟皆虛, 腎氣皆去, 形骸獨居而終矣.”라 하여 年齡의 增加에 따른 身體 各部位의 老化現象 및 各 臟腑와의 關聯性에 대해 상세히 說明하고 있으며 특히 肝臟의 變化로부터 老化가 始作됨을 알 수 있으나 《素問·上古天真論》⁹⁾에서는 “天壽過度, 氣脈常通, 而腎氣有餘也”라 하여 腎氣의 盛衰與否가 壽命과 關聯있음을 說明하고 있다.

老化에 對한 韓醫學에서의 實驗的 研究로는 蘇¹⁰⁾는 鹿蔘地黃湯, 尹¹¹⁻¹³⁾ 등은 左歸飲과 右歸飲이 抗老化效果가 있음을 報告하고 있는데, 이들 處方들은 모두 腎虛로 인한 諸 疾患에 使用되는 六味地黃湯을 基本方으로 하였다.

최근 競爭社會가 普遍化되면서 스트레스에 대한 關心이 크게 高操되어 萬病의 根源으로도 認識되고 있는 現實 속에서 肝臟의 重要性이 擡頭되고 있다.

이에 肝臟과 老化와의 相關性을 實驗的으로 檢索하고자 許¹⁴⁾의 《東醫寶鑑》에서 肝虛症에 使用되는 補肝丸의 生理活性을 檢索하고자 8個月齡의 흰쥐를 使用하여 生體 內에서의 biotransformation enzyme들의 活性 變動을 觀察한 結果 有意性 있

는 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 試藥 및 器具

試藥중 sodium dodecyl sulfate, thiobarbituric acid, malondialdehyde, EDTA, trichloroacetic acid, ninhydrin, cysteine, glycerol, sodium cholate, Triton N-101, sodium dithionite, aminopyrine HCl, NADPH, semicarbazide, Tris. HCl, aniline HCl, glutathione, 1-chloro 2,4-dinitrobenzene, cyanide, cytochrome C, 5,5'-dithiobis -2-nitrobenzoic acid, bovine serum albumin은 Sigma사 製品, sulfamic acid, HgCl₂ sulfanilamide, N-1-naphthylethylenediamine, xanthine sodium, hydroxylamine HCl, xanthine oxidase, sulfanilamide, naphthylethylenediamine은 Aldrich社로부터 購入하였으며, 그 외 試藥은 特級 또는 一級試藥을 使用하였다.

實驗에 使用한 機器로는 Spectrophotometer(Shimadzu UV-240), High centrifuge(Hanil, HMR-1610V), Ultra centrifuge(Hitachi, 695-7), Light microscopy(Olympus BH-2 with C-35-AD2), Cold Lab. Chamber(Korean Manhattan, KMC-8512) 등을 使用하였다.

2) 藥材

本 實驗에 使用한 藥劑는 大田大學校 附屬 韓方病院에서 購入하여 嚴選한 것으로 使用하였으며, 處方은 《東醫寶鑑》¹⁴⁾에 收載된 補肝丸으로 한 貼의 處方 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of BOGANHWAN(BGW)

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Remaanniae Radix	10
當歸	Angelicae gigantis Radix	10
白芍藥	Paeoniae Radix	10
川芎	Cnidii Rhizoma	10
防風	Sileris Radix	10
羌活	Angelicae Koreanae Radix	10
Total amount		60

3) 動物

實驗動物로는 韓國實驗 動物開發로부터 分讓 받은 雄性 Sprague-Dawley系 2個月(180±10g) 및 8個月齡 흰쥐(550±10g)를 1週日동안 適應시킨 후 一定한 條件(溫度: 20±2°C, 濕度: 50%, 明暗: 12시 肝 light/dark cycle)에서 飼育한 후 使用하였다. 實驗 始作前 24時間 동안 물만 주고 絶食하였다. 이때 酵素活性의 日中 變動을 考慮하여 實驗動物를 一定時間(午前 10:00-12:00)내에 處置하였다.

2. 方法

1) 檢液의 調製

上記處方의 600g分量을 水洗하여 蒸溜수로 8時間씩 3回 加熱 濃縮하고 吸引 濾過한 濾液을 rotary evaporator로 減壓 濃縮하여 粗粘土 抽出物을 冷凍乾燥 하여 粉末 154.8g을 얻어 本 實驗에 必要로 하는 濃度로 生理食鹽水에 稀釋하여 使用하였다.

2) 檢液의 投與

檢液의 經口投與는 흰쥐 8마리를 6群으로 나누어 週齡 8週의 正常 흰쥐를 正常群(Normal), 週齡 32週의 老化 흰쥐를 對照群(Control), 老化 흰쥐를 4分類하여 補肝丸 煎湯液 投與群(BGW 100, 250, 350, 500 mg/kg)으로 區別하였다.

補肝丸의 抽出物의 投與 用量 및 期間을 設定하기 위한 豫備 實驗으로 用量別(100, 250, 350, 500 mg/kg)로 1週에서 4週間 投與하고서 老化 흰쥐의 肝 脂質過酸化의 含量變化를 觀察한 結果 350 mg/kg을 2週間 投與한 경우 脂質過酸化의 含量增加가 抑制되었으며, 그 以上 및 以下의 濃度 및 期間에서는 過酸化脂質의 含量이 類似하였다 (Table 1). 이 結果를 토대로 하여 이후의 實驗에

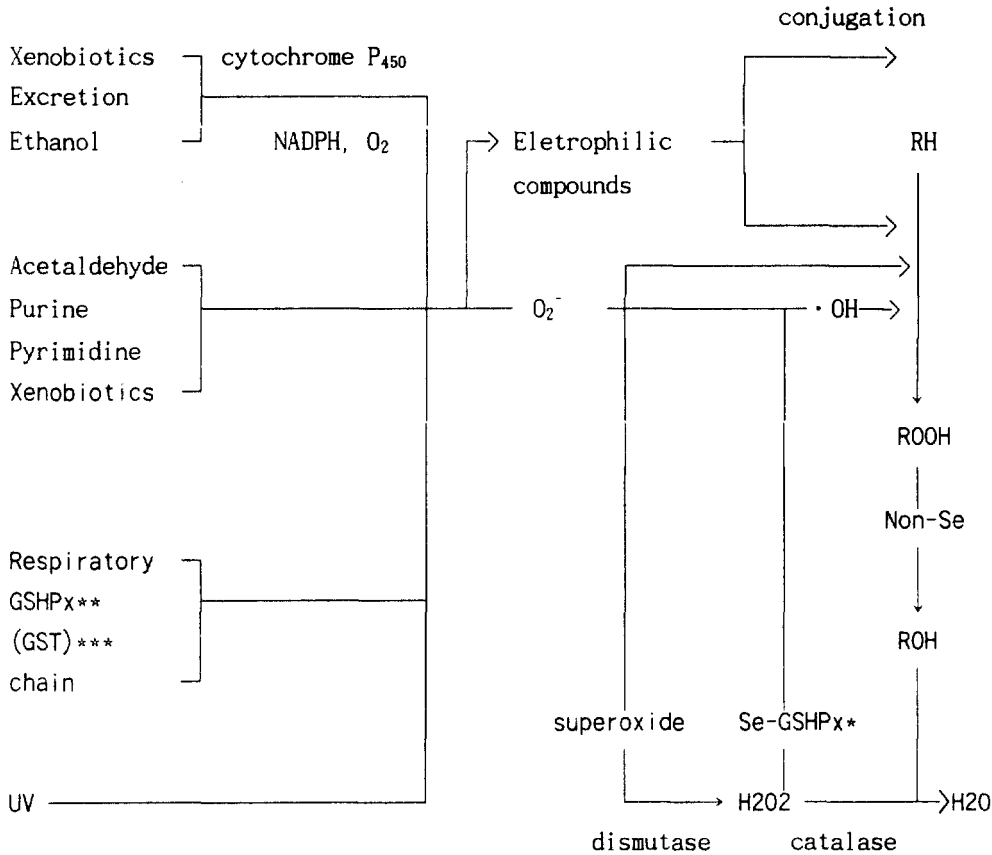
서는 補肝丸 抽出物을 100, 250, 350, 500 mg/kg 씩 2週間 投與하였다.

3) 酵素源의 調製

實驗動物을 CO₂ gas로 麻酔시킨 후 腹部 正中線을 따라 切開하고 腹部大動脈에서 血液을 採取하였다. 이 血液을 3000 rpm에서 10分間 遠心分離하여 生化學的檢査에 使用하였으며, 肝臟은 生理食鹽水로 灌流하여 血液을 除去한 肝을 摘出하여 여지로 血液 및 其他 異物質을 除去하고 摘出하여 여지로 血液 및 其他 附着物質을 除去하고 평량한 다음 組織 1g當 4倍量의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 glass teflon homogenizer로 磨碎 하였다. 이 磨碎液을 600Xg에서 10分間 遠心分離하여 核 및 미마쇄 부분을 除去한 상등액을 10,000Xg에서 20分間 遠心分離하였다. 이 상등액을 105,000 Xg에서 1時間 超遠心分離하여 cytosolic fraction으로, 그 沈澱物에 同한 量에 0.1M potassium phosphate buffer를 가하여 懸탁 시킨 액을 microsomal fraction으로 하였다. 磨碎液은 glutathione의 含量을 測定하였으며, Cytosolic fraction은 superoxide dismutase, glutathione S-transferase, glutathione reductase 및 v-glutamacystein synthetase 活性의 酵素源으로, microsomal fraction은 cytochrome P-450, aminopyrine N-demethylase 및 anilline hydroxylase 活性 測定에 使用하였다. 한편 mitochondria 分割은 catalase의 活性 測定의 酵素源으로 使用하였다. 以上の 모든 조작은 따로 규정이 없는 한 4°C이하에서 행 하였다(Scheme I, II).

4) 肝組織중 過酸化脂質의 含量 測定

Ohkawa 等의 方法¹⁵⁾에 準하여 肝 組織 1g당 9 배량의 生理食鹽水를 가해 磨碎하고 이 磨碎液에 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer(pH 3.5)및 發色의 目的으로 0.8% thiobarbituric acid를 가한후 95°C에서 1時間 동안 反應시킨 후 室溫에서 冷覺시켜 n-BuOH : Pyridine (15:1)을 添加하여 15分間 遠心分離 시킨 후 紅色의 n-BuOH : pyridine層을 취하여 波長 532nm에서 그 吸光度를 測定하여 標準曲線에서



* : Selenum - dependent glutathione peroxidase
⁸⁸ : Selenum - independent glutathione peroxidase
⁸⁸⁸ : Glutathione S-transferase

Scheme I. The generation of free radicals and detoxification pathways

그 함량을 肝 組織 1g當 malondialdehyde nmole 로 標示하였다

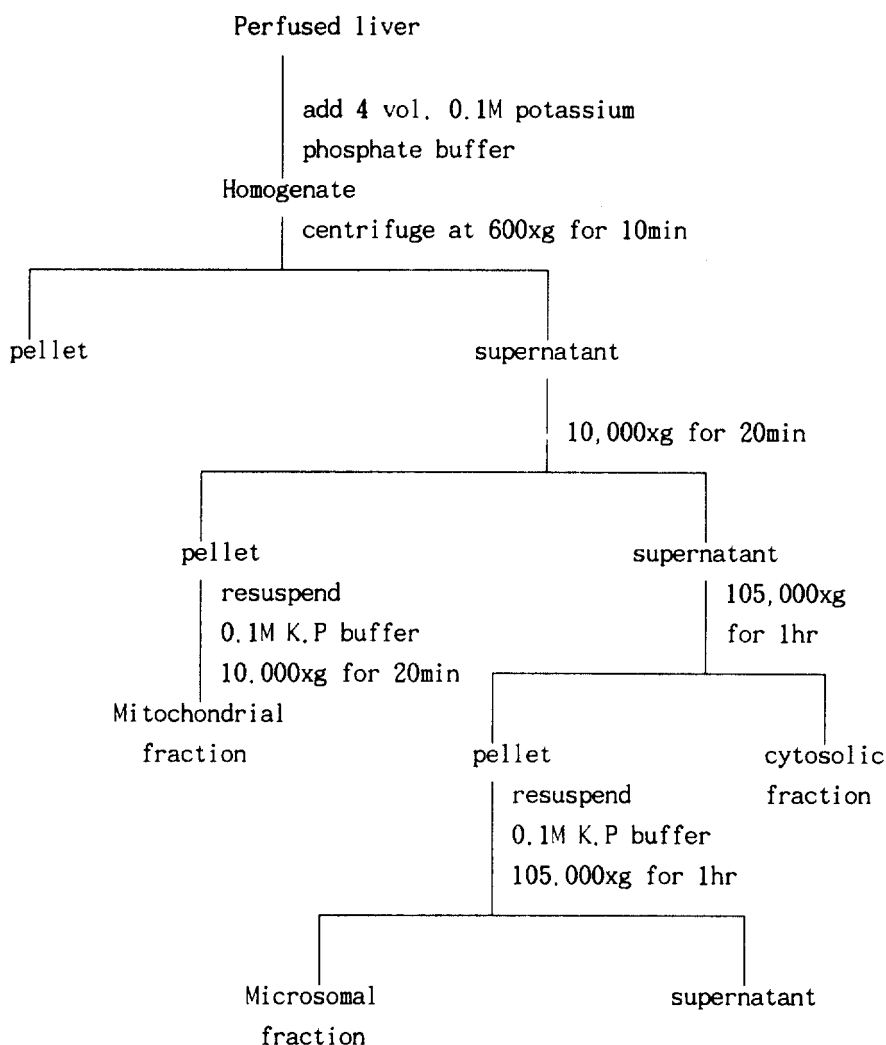
5) 肝組織중 glutathione의 定量

Ellamn의 方法¹⁶⁾을 약간 變更하여 10% 肝組織 1 ml에 1mM EDTA가 含有된 5% trichloroacetic acid를 가하여 遠心分離한 후 상등액 0.5 ml를 취하여 0.5 ml ninhydrin 試藥을 가한 후 10分間 加熱하여 冷水에 冷覺하고서 560nm에서 吸光度를 測定하였다. 이곳에서 non-protein-SH에서 cysteine을 제한값을 glutathione의 양으로하였다.

6) 酵素活性의 測定

(1) Cytochrome P-450의 測定

Omura와 Sato등의 方法¹⁷⁾에 準해 試驗管에 1 mM EDTA, 20% glycerol, 0.5% sodium cholate 및 0.4% Triton N-101이 含有된 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)에 microsomal suspension(1 mg protein/ml)을 添加한 후 sodium dithionite를 넣고 混合한다. 다음 CO gas를 1分間 bubbling시킨다. Bubbling이 끝난 후 波長 400-500nm에서 吸光度를 測定하고



Scheme II. Preparation of mitochondrial, microsomal and cytosolic fractions

450-490nm에서 吸光度의 差異를 cytochrome P-450 CO complex에 의한 吸光量 吸光計數 $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 을 利用하여 算定하였다.

(2) Aminopyrine demethylase의 活性 測定

Nash등의 方法¹⁸⁾을 약간 變更하여 反應液 2ml 중 $0.1 \text{ M Na}^+/\text{K}^+$ phosphate buffer(pH 7.5)에 2 mM aminopyrine, 1 HCl , 0.5 mM NADPH, 10 mM MgCl_2 , 150 mM KCl, 1 mM semicarbazide 및 酵素液($30\text{-}400 \mu\text{g}$ 의 蛋白質)을 가해 이 反應液을 37°C

에서 30分間 反應시킨 다음 15% ZnSO_4 와 飽和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 를 가하여 反應을 終了 시키고 5分間 放置後 10分間 遠心分離하여 여기서 얻은 상징액 5ml에 發色의 目的으로 Nash reagent를 添加하고 60°C 에서 30分間 反應시킨 후 다시 遠心分離하여 상징액을 취하여 波長 415 nm 에서 그 吸光度를 測定하고 標準曲線에 準하여 活性도를 算定 하였다.

(3) Aniline hydroxylase의 活性 測定

Bidlack등의 方法¹⁹⁾에 準하여 反應液 2ml중

10mM MgCl₂와 150mM KCl이 함유된 50mM Tris. HCl 완충액(pH 7.4)에 基質인 1mM aniline HCl, 0.5mM NADPH 및 酵素액(300-400μg의 단백질)을 가하여 이 액을 37°C에서 20분간 反應시킨 다음 反應을 종료시킬 目的으로 20% trichloroacetic acid를 가한 후 10分間 遠心分離하여 상등액에 發色の 目的으로 10% Na₂CO₃와 0.2N-NaOH(2% phenol 含有)를 넣고 37°C에서 30분간 反應시킨 후 波長 640nm에서 그 吸光度를 읽고 標準曲線에서 活性도를 算定하였다.

(4) Glutathione S-transferase의 活性 測定

Habig 등의 方法²⁰⁾에 準하여 反應液 3.5 ml에 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.5)에 1mM glutathione, 1mM 1-chloro 2,4-dinitrobenzene 및 0.1 ml 酵素液을 가하여 25°C에서 2分間 反應시킨 후 이때 生成되는 thioether를 340nm에서 吸光度의 變化를 읽고 吸光計數 9.6 mM⁻¹cm⁻¹을 利用하여 酵素의 活性도를 算定하였다.

(5) Superoxide 生成能 測定

Superoxide 遊離基의 生成은 superoxide dismutase를 抑制할 수 있는 ferricytochrome C의 還元되는 速度를 測定하였다. 즉, 0.1mM EDTA를 含有한 phosphate buffer(pH 7.8) 420μl에 cyanide의 濃도가 50 μM이 되도록 20mM cyanide 溶液을 가한 후 37°C에서 10分間 保溫하였다. 이 溶液에 postnuclear fraction 300μl와 0.1mM cytochrome C 50μl를 넣어 spectrophotometer로 cuvette를 37°C로 維持시키면서 550nm에서 測定하였다. 이때 cytochrome C의 量은 分子吸光計數 19,500M⁻¹cm⁻¹로 計算하였다.

(6) Total-SH의 測定

0.2M tris buffer(pH 8.2) 1ml, 0.01M DTNB (5,5'- dithiobis - 2 - nitrobenzoic acid) 0.1ml, methanol 4ml를 취한 후 여기에 homogenate 0.1 ml를 취하여 24°C, 15分間 放置하였다. 이것을 4000rpm, 30分間, 遠心分離한 후 상등액을 412nm에서 吸光度를 測定하였다.

(7) Nonprotein bound-SH의 測定

Saville法²¹⁾에 의해서 測定했으며 homogenate에

동량의 10% trichloroacetic acid 溶液을 가하여 遠心分離한 상등액을 sample로 하였다. Sample 0.1 ml에 0.01M NaNO₂ 1vol.과 0.2N H₂SO₄ 9vol.을 混合調劑하여 0.5ml를 가한 다음에 5分間 放置시켰다. 0.5% sulfamic acid ammonium 水溶液 0.2 ml를 가하여 强하게 混合한 후 1% HgCl₂ 1vol과 3.4% sulfanilamide/0.4N HCl 9vol 混合을 1ml 가 하였다. 그리고 0.1% N-1-naphthylethylenediamine/0.4N HCl 溶液 1ml 가하고 5분 후 540nm에서 吸光度를 測定하였다. 標準溶液으로서 125nM glutathione 溶液을 使用하였다.

(8) Catalase 活性 測定

50mM phosphate buffer(pH 7.0) 1.5ml에 酵素源 100μl를 가하고 30mM H₂O₂ 溶液의 3배 稀釋液을 1ml 가하여 240nm에서 吸光度 變化를 2分間 觀察하여 測定하였다.

(9) Superoxide dismutase 活性的 測定

7.5mM xanthine 50μl와 10mM hydroxylamine hydrochloride 50μl에 濃度別 稀釋 試料 0.5ml, blank로써 65mM P.B.(pH 7.8) 0.5ml를 취해 37°C에서 10分間 preincubation시켰다. 0.42unit/ml의 xanthine oxidase를 0.2ml 가한 후 20分間 incubation시키고 sulfanilamide 溶液 1ml와 naphthylethylenediamine 1ml를 가하여 室溫에서 20分間 放置後 540nm에서 吸光度를 測定하여 總 SOD活성을 求한 뒤 4mM KCN을 0.2ml 넣고 測定한 Mn-SOD값을 제하여 Cu, Zn-SOD 값을 구 하였다.

(10) Glutathione peroxidase의 活性 測定

Paglia와 valentine의 方法²²⁾에 準하여 0.75mM hydrogen peroxide, 6mM NADPH 및 40mM glutathione이 含有된 0.1M Tris buffer(pH 7.2)중에서 酵素液을 가하여 波長 340nm에서 吸光度를 測定하고 標準檢量線에 準하여 活性도를 算定하였다. 酵素 活性的 單位는 1분당 1mg protein이 生成하는 NADP의 量을 nmole로 標示하였다.

7) 蛋白質 定量 및 統計處理

蛋白質의 含量은 Lowry 등의 方法²³⁾에 準하여 bovine serum albumin(Sigma Fr. V)을 標

準品으로 하여 測定하였으며, 本 實驗에서 얻어진 結果는 平均值 ± 標準偏差로 標示하였고, 統計的 有意性 檢證은 Duncan, s multiple range test를 利用하였다.

III. 實驗結果

1. 肝組織 中 過酸化脂質의 含量變化

補肝丸의 抽出物의 投與 用量 및 期間을 設定하기 위한 豫備 實驗으로 用量별(100, 250, 350, 500 mg/kg)로 1週에서 4週間 投與하고서 老化 肝臟의 肝 過酸化脂質의 含量變化를 觀察한 結果 350 mg/kg을 2週間 投與한 경우 過酸化脂質의 含量 增加가 抑制되었으며, 그 以上 및 以下의 濃度 및 期間에서는 過酸化脂質의 含量이 類似하였다. 이 結果를 토대로 하여 以後의 實驗에서는 補肝丸 抽出物을 100, 250, 350, 500 mg/kg 씩 2週間 投與하였다(Table 1).

2. 肝代謝酵素系에 미치는 影響

1) Cytochrome P-450의 含量變化

補肝丸 煎湯液이 老化 肝臟의 肝 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴 본 結果 cytochrome P450의 含量變化에 있어 對照群이 1.02 ± 0.081인데 비해 實驗群 모두 對照群 水準으로 別 다른 變化가 없었다(Table 2).

Table 2. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic microsomal cytochrome P450 activity in eight month rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	
	nmole/mg protein	% of Normal
Normal	0.78 ± 0.043 ^a	
Control	1.02 ± 0.081 ^b	
BGW 100	0.98 ± 0.065 ^b	
BGW 250	0.97 ± 0.049 ^b	
BGW 350	1.16 ± 0.085 ^b	
BGW 500	0.99 ± 0.079 ^b	

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for two weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

2) Aminopyrine N-demethylase 活性變化

補肝丸 煎湯液이 老化 肝臟의 肝 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴 본 結果 Aminopyrine N-demethylase 活性變化에 있어 對照群이 4.78 ± 0.36인데 비해 實驗群 모두 對照群 水準으로 別 다른 變化가 없었다(Table 3).

Table 1. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic lipid peroxide content in eight month rats

Dose Group(mg/kg)	Content(MDA nmole/g of tissue)				
	0	1	2	3	4(week)
Normal	17.8±4.27 ^a				
Control	34.7±8.36 ^b				
BGW 100		38.9±9.37 ^b	36.2±7.86 ^b	33.8±4.96 ^{b,c}	30.9±6.36 ^{b,c}
BGW 250		33.6±5.26 ^b	34.2±4.49 ^b	30.6±5.38 ^c	29.7±5.49 ^c
BGW 350		30.4±6.39 ^{b,c}	24.7±3.27 ^d	23.9±3.69 ^d	21.7±3.46 ^d
BGW 500		37.2±7.36 ^b	26.9±5.31 ^d	25.4±5.36 ^d	20.9±4.37 ^e

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for one to four weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 3. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic aminopyrine N-demethylase activity in eight month rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	
	HCHO nmole/mg protein/min	% of Normal
Normal	2.97 ± 0.27 ^a	
Control	4.78 ± 0.36 ^b	
BGW 100	4.67 ± 0.56 ^b	
BGW 250	4.97 ± 0.49 ^b	
BGW 350	4.71 ± 0.48 ^b	
BGW 500	4.59 ± 0.57 ^b	

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for two weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

3) Aniline hydroxylase 活性變化

補肝丸 煎湯液이 老化 흰쥐의 肝 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴 본 結果 Aniline hydroxylase 活性變化에 있어 對照群이 1.56 ± 0.09인데 비해 實驗群 모두 對照群 水準으로 별 다른 變化가 없었다(Table 4).

Table 4. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic aniline hydroxylase activity in eight month rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	
	p-aminophenol nmole/mg protein/min	% of Normal
Normal	0.78 ± 0.04 ^a	
Control	1.56 ± 0.09 ^b	
BGW 100	1.39 ± 0.11 ^b	
BGW 250	1.63 ± 0.08 ^b	
BGW 350	1.57 ± 0.12 ^b	
BGW 500	1.48 ± 0.07 ^b	

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for two weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

4) Glutathine 濃度變化

補肝丸 煎湯液이 老化 흰쥐의 肝 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴 본 結果 glutathine 濃度變化에 있어 對照群이 3.47 ± 0.76인데 비해 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 各各 4.17 ± 0.46,로 有意性 있게 增加하였다(Table 5).

Table 5. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic glutathione concentration in eight month rats

Dose Group (mg/kg)	Concentration	
	μ mole/mg protein	% of Normal
Normal	5.69 ± 0.83 ^a	
Control	3.47 ± 0.76 ^b	
BGW 100	3.09 ± 0.61 ^b	
BGW 250	2.97 ± 0.53 ^b	
BGW 350	4.17 ± 0.46 ^c	
BGW 500	4.58 ± 0.54 ^c	

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for two weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

5) Total-SH 濃度變化

補肝丸 煎湯液이 老化 흰쥐의 肝 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴 본 結果 Total-SH 濃度變化에 있어 對照群이 13.12 ± 0.783데 비해 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 各各 17.32 ± 0.61, 16.96 ± 0.49로 有意性 있게 增加하였다 (Table 6).

Table 6. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic total-SH concentration in eight month rats

Dose Group (mg/kg)	Concentration	
	μ mole/g of tissue	% of Normal
Normal	19.05 \pm 0.34 ^a	
Control	13.12 \pm 0.83 ^b	
BGW 100	12.94 \pm 0.60 ^b	
BGW 250	13.02 \pm 0.51 ^b	
BGW 350	17.32 \pm 0.61 ^{c,a}	
BGW 500	16.96 \pm 0.49 ^c	

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for two weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean \pm S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

6) Nonprotein bound-SH 濃度變化

補肝丸 煎湯液이 老化 흰쥐의 肝 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴 본 結果 Nonprotein bound-SH 濃度變化에 있어 對照群이 2.75 \pm 0.08인데 비해 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 各各 3.54 \pm 0.13, 3.48 \pm 0.04로 有意性 있게 增加하였다(Table 7).

Table 7. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic nonprotein bound-SH concentration in eight month rats

Dose Group (mg/kg)	Concentration	
	μ mole/mg protein	% of Normal
Normal	3.95 \pm 0.06 ^a	
Control	2.75 \pm 0.08 ^b	
BGW 100	2.56 \pm 0.10 ^b	
BGW 250	3.12 \pm 0.09 ^{b,c}	
BGW 350	3.54 \pm 0.13 ^d	
BGW 500	3.48 \pm 0.04 ^d	

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for two weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean \pm S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

7) Glutathione S-transferase活性變化

補肝丸 煎湯液이 老化 흰쥐의 肝 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴 본 結果 Glutathione

S-transferase 濃度變化에 있어 對照群이 102.8 \pm 38.3인데 비해 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 各各 159.8 \pm 33.9, 160.2 \pm 28.7로 有意性 있게 增加하였다(Table 8).

Table 8. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic glutathione S-transferase activity in eight month rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	
	μ nmole/mg protein/min	% of Normal
Normal	190.3 \pm 43.1 ^a	
Control	102.8 \pm 38.3 ^b	
BGW 100	120.9 \pm 26.6 ^b	
BGW 250	138.7 \pm 35.4 ^b	
BGW 350	159.8 \pm 33.9 ^c	
BGW 500	160.2 \pm 28.7 ^c	

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for two weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean \pm S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

^a: 1,2-dinitro-4-nitrobenzene

8) Superoxide 濃度變化

補肝丸 煎湯液이 老化 흰쥐의 肝 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴 본 結果 superoxide 濃度變化에 있어 對照群이 8.46 \pm 0.22인데 비해 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 各各 3.12 \pm 0.15, 3.20 \pm 0.43으로 有意性 있게 減少하였다(Table 9).

Table 9. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic superoxide generation in eight month rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	% of Normal
	nM/mg protein	
Normal	3.78 ± 0.12 ^a	
Control	8.46 ± 0.22 ^b	
BGW 100	7.98 ± 0.36 ^b	
BGW 250	6.29 ± 0.59 ^{b,c}	
BGW 350	3.12 ± 0.15 ^d	
BGW 500	3.20 ± 0.43 ^{d,a}	

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for two weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

9) Superoxide dismutase 活性變化

補肝丸 煎湯液이 老化 흰쥐의 肝 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴 본 結果 superoxide dismutase 活性變化에 있어 對照群이 10.56 ± 0.24인데 비해 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 各各 14.53 ± 0.33, 13.98 ± 0.41로 有意性 있게 增加하였다(Table 10).

Table 10. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic superoxide dismutase activity in eight month rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	% of Normal
	unit*/mg protein/min	
Normal	16.98 ± 0.38 ^a	
Control	10.56 ± 0.24 ^b	
BGW 100	9.87 ± 0.19 ^b	
BGW 250	11.02 ± 0.21 ^{b,c}	
BGW 350	14.53 ± 0.33 ^d	
BGW 500	13.98 ± 0.41 ^d	

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for two weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

*unit : 1 unit of superoxide dismutase activity was defined as the which inhibited the reduction of alkaline DMSO-mediated cytochrome C by 50%

10) Catalase 活性變化

補肝丸 煎湯液이 老化 흰쥐의 肝 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴 본 結果 catalase 活性變化에 있어 對照群이 2.45 ± 0.41인데 비해 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 各各 3.98 ± 0.33, 4.32 ± 0.31로 有意性 있게 增加하였다(Table 11).

Table 11. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic catalase activity in eight month rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	% of Normal
	* μ mole/mg protein/min	
Normal	5.78 ± 0.27 ^a	
Control	2.45 ± 0.41 ^b	
BGW 100	2.56 ± 0.25 ^b	
BGW 250	2.97 ± 0.19 ^{b,c}	
BGW 350	3.98 ± 0.33 ^d	
BGW 500	4.32 ± 0.31 ^d	

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for two weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

* : hydrogen peroxide decreased

11) Glutathione peroxidase 活性變化

補肝丸 煎湯液이 老化 흰쥐의 肝 代謝酵素系에 미치는 影響을 살펴 본 結果 Glutathione peroxidase 活性變化에 있어 對照群이 150.9 ± 19.8인데 비해 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 各各 200.1 ± 23.4, 210.9 ± 14.7로 有意性 있게 增加하였다(Table 12).

Table 12. Effect of water extract from Boganhwan(BGW) on hepatic glutathione peroxidase activity in eight month rats

Dose Group (mg/kg)	Activity	
	nmole/mg protein	% of Normal
Normal	253.2 ± 20.8 ^a	
Control	150.9 ± 19.8 ^b	
BGW 100	169.3 ± 12.6 ^b	
BGW 250	158.2 ± 15.2 ^b	
BGW 350	200.1 ± 23.4 ^c	
BGW 500	210.9 ± 14.7 ^{c,a}	

Rats were orally administered water extract from Boganhwan(0, 100, 250, 350, 500mg/kg) daily for two weeks. The animals were decapitated 24hr after administration of last treatment of extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.D.(n=8). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

^a: oxidized NADPH

IV. 考 察

人體는 出生, 成長, 成熟, 老化의 過程으로 이어지게 되는데⁶⁾, 이중 老化는 人類의 주된 關心事로 이에 대한 研究가 持續的으로 進行되어 왔으나 現在까지 提案된 여러 理論들은 서로 關聯이 있으며 한가지 理論만으로는 老化機轉을 완전히 說明하는 것은 未洽한 點이 있다.^{7,24,25)}

지금까지 나와 있는 여러 理論들을 살펴보면, 老化는 遺傳的으로 豫定된 대로 進行되는 受動的인 過程이라 보는 計劃理論(programmed theory), 生體內 正常代謝 過程에서 생긴 free radical이 生分子(biomolecule)와 反應하여 細胞에 損傷을 준다는 自由라디칼理論(free radical theory), 情報傳達 過程의 誤謬로 因하여 잘못 만들어진 體蛋白質이 蓄積된 結果라고 說明하는 誤謬說(error catastrophe theory), DNA에 突然變異가 일어나면 體細胞 機能에 異狀을 가져오게 되고 이러한 變化가 蓄積되어 細胞는 죽게 된다고 생각하는 體細胞 突然變異說(somatic mutation theory), DNA가 合成된 後 變形中 가장 중요한 過程인 시토신의 메틸화 過程에서 細胞의 分化와 老化가 일어난다고

하는 DNA變形說등이 現在研究의 主從을 이루고 있으며^{7,25-31)}, 이 중 活性酸素와 關聯된 學說이 最近 注目을 받고 있는데, 이는 正常的인 細胞內 代謝過程에서 生産되는 遊離基(free radical)들이 漸進的으로 細胞內에 蓄積되면서 細胞內 酵素, 細胞膜, 蛋白質, 脂肪, DNA를 損傷시킨다는 것으로 이것이 老化의 原因이 된다는 學說이다.^{25,31,32)}

韓醫學에서는 老衰의 原因을 陰陽의 不調和, 形身衰弱, 氣血 및 腎氣衰弱등으로 說明⁶⁾하고 있으며 특히 <靈樞·千年篇>^{4,5)}에 “四十歲……腠理始疏, 榮華頽落, 髮頗斑白……五十歲, 肝氣始衰, 肝葉始薄, 膽汁始減, 目始不明, 六十歲, 心氣始衰,……九十歲, 腎氣焦, 四臟經脈空虛, 白髮, 五臟皆虛, 神氣皆去”라 하여 年齡의 增加에 따른 身體 各部位의 老化現象 및 장기의 쇠약에 對하여 技術하였으며, <素問·上古天真論>⁹⁾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, 髮鬢頽去, 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 하였다.

또한 <素問·上古天真論>⁹⁾에 “天壽過度, 氣脈常通, 而腎氣有餘也”라 하였고, 虞³³⁾는 “腎元盛則壽延, 腎元衰則壽夭”라고 하여 腎氣의 盛衰與否가 壽命과 關聯있음을 認識하고 있었다.

그 治療法으로 抗老益壽方藥에서는 補腎方, 健脾補氣方, 養陰方, 補陽氣方³⁵⁾을 들고있으며, 全般的으로 韓醫學에서 보는 老化의 治療觀點은 補腎益元³⁴⁾, 補脾腎^{24,35)}, 調心補腎, 補氣虛, 補益化癆³³⁾, 補益扶正^{24,35)} 등으로 接近하고 있으며 養生方法으로는 <黃帝內經>⁹⁾에서 自然適應, 精神調攝, 飲食調理, 起居作息, 藥物保養, 運動收斂等이 있고, 傳統醫學에서는 順應自然, 精神調攝, 飲食調理, 體育鍛鍊, 起居調理, 抗老化藥物等³⁵⁾으로 說明하고 있다.

이와 같이 老化의 주된 觀點은 주로 補腎, 補陰에 偏重되어 있음을 있었다. 그러나 最近 社會의 發達과 더불어 感情과 外氣의 變化에 대한 生體反應에 대한 關心이 高操되고 있는 가운데 스트레

스學說이 注目받고 있으며 이와 密接하게 關聯있는 臟腑는 肝臟이며 이에 대해 새로운 接近方式으로 研究하는 實情이다.

肝臟은 一種의 外分泌腺으로서 人體內 代謝를 總括하는 臟器로 모든 生理物質을 生合性 또는 分解하여 에너지를 供給해주고 貯藏하며, 또한 外因性 및 內因性 毒性物質을 酸化, 還元, 메칠화, 아세틸화 또는 抱合시켜 解毒시켜 주는 機能을 갖고 있다³⁶⁾. 近來에 와서 人體는 stress와 老化등에 의하여 肝에서의 物質代謝가 至大한 關心의 對象이 되고 있다³⁷⁾. 이러한 過程에서의 肝 物質代謝의 기전^{34,38-45)}은 一般的으로 生體 組織細胞의 損傷은 生體膜 構成分인 多價不飽和脂肪酸의 過酸化가 그 한가지 原因으로 指摘되고 있는데, 脂質의 過酸化는 生化學的인 要因 즉, free radical의 生成系로 알려져 있는 cytosolic xanthine oxidase, aldehyde oxidase, microsomal mixed function oxidase, mitochondrial respiratory chain 및 catecholamine類와 thiol類, hemoprotein등의 自動酸化에 의해 生成된 free radical인 活性酸素 및 親電子性 物質들의 攻撃으로 惹起되어지며, 이와 같은 物質들은 여러 가지 毒性作用 뿐 만 아니라 食菌作用에도 關與하고 있어 兩面性を 지니고 있다. 그러나 生體는 free radical들의 毒性을 除去시켜 주는 解毒機構의 存在로 여러 가지 毒性作用에 의한 組織損傷으로부터 保護받고 있으며, free radical 生成系와 解毒系 사이의 不均衡 때문에 毒性作用이 誘發된다고 한다.

따라서 許¹⁴⁾의 《東醫寶鑑》에서 肝虛症의 代表인 處方으로 記載된 補肝丸을 利用하여 肝臟과 老化와의 相關성을 實驗實的으로 檢索하고자 하였다.

補肝丸의 構成藥物의 效能^{46,47)}을 살펴보면 當歸, 白芍藥, 川芎, 熟地黃 등의 四物湯에다 補血養肝, 調血行滯의 效力을 빠르게 하기 위해 羌活, 防風을 加한 補血劑의 藥物로 주로 構成되어 있다.

이에 典型的으로 肝臟에 作用하는 補肝丸을 活用하여 肝臟의 生理活性를 檢索하고자 8個月齡의 흰쥐를 使用하여 生체내에서의 biotransformation enzyme들의 活性 變動을 觀察하고자

흰쥐 8마리를 6群으로 나누어 週齡 8週의 正常 흰쥐를 正常群(Normal), 週齡 32週의 老化 흰쥐를 對照群(Control), 老化 흰쥐를 4分類하여 補肝丸 煎湯液 投與群(BGW 100, 250, 350, 500 mg/kg)으로 區分하여 抗老化測定指標중의 하나인 代謝機能 중 肝組織의 過酸化脂質 含量 및 代謝酵素系의 影響 등을 檢討하였다.

過酸化脂質은 自動酸化反應에 의한 多價 不飽和 脂肪酸에 酸素가 附加된 生成物의 總稱으로 生體內 酸化反應에서 重要な 것은 B酸化和 過酸化(自動酸化)인데, B酸化는 生體內에서 없어서는 안되는 것으로 에너지(ATP)生産에 關與하는 反應이며, 過酸化는 高度로 不飽和된 脂肪酸의 二重結合에 炭化水素에서 水素를 빼내어 free radical이나 活性酸素가 생기는 反應이다⁴⁸⁾. 過酸化脂質의 生成은 病態生理現象이나 組織의 損傷程度를 나타내는 指標로, 細胞膜의 透過性を 亢進시킬 뿐 만 아니라 全般的인 細胞毒性을 招來하여 細胞機能을 低下하며 壞死에 關係하여 老化現狀이나 이에 따른 여러 가지 疾患의 病理現狀을 誘發하여 發癌過程에도 關與할 것으로 생각되고 있다. 그러나 生體內에서는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, vitamin E 등에 의한 過酸化反應 防禦機構가 있기 때문에 通常은 過酸化脂質이 大量으로 蓄積되지는 않으나 年齡增加에 따른 血管壁의 退行性病變이나 肝疾患, 糖尿病등에서는 過酸化脂質이 增加한다고 報告⁴⁸⁾되어 있다.

이에 補肝丸의 추출물의 投與 用量 및 期間에 따른 老化 흰쥐의 肝 過酸化脂質의 含量變化를 觀察한 結果 350 mg/kg을 2週間 投與한 경우 過酸化脂質의 含量 增加가 抑制되었으며, 그 以上 및 以下의 濃度 및 期間에서는 過酸化脂質의 含量이 類似하였다(Table 1). 이는 補肝丸 煎湯液 投與로 인하여 肝內 過酸化脂質이 效果의으로 줄어들고 있음을 보여주는 것으로 補肝丸 煎湯液이 肝內 細胞毒性除去에 有效함을 알 수 있었다.

一般的으로 肝은 生體에서 生成되는 各種 産物들 및 生體內外로부터 들어오는 異物質중 正常的인 炭素, 窒素代謝를 거치지 못하거나 또는 一般的인 經路를 통하여 體外排出이 못되어 體內에 蓄

積되므로 非正常的인 生理活性을 나타내어 生體에 毒性을 일으키는 有毒한 産物들을 水溶性形態로 바꾸어 體外로 주로 小便을 통하여 排出하도록 하는 役割을 擔當하고 있다³⁴⁾. 이 解毒作用이 주로 이루어지는 기전은 두 가지로 첫째는 cytochrome P-450계를 利用한 異物質處理方案이 그것이며 둘째는 肝組織의 固有機能 중의 하나로 bilirubin代謝가 그것이다. 生體內로 들어온 異物質은 大部分 脂溶性이므로 生體膜을 透過하기도 쉽고, 體液에서 lipoprotein에 의해 쉽게 運搬될 수 있는 特性을 가지고 있는데 肝은 脂溶性의 異物質을 가능한 水溶性이 높은 形態의 化學物로 迅速하게 바꾸어 尿中이나 膽汁중으로 排泄하기 쉽게 만들어 解毒作用을 이루는 것이다^{34,49,50)}. 이와 같은 異物質은 細胞內에서 比較的 基質 特異性이 약한 酵素關係에 의해 代謝될 때 大概 두 가지 段階를 거치게 된다^{34,51)}. 異物質代謝의 1段階反應은 肝細胞內 內血室網에 存在하는 複合酵素系에 의하여 複合酸化作用에 의해 일어난다. 이때 주로 cytochrome P-450의 酸化酵素系에 의하여 進行되지만 amino酸化系로도 代謝되고 肝細胞內 microsome分割이 아닌 mitochondria 또는 다른 酸化酵素系에 의해서도 代謝된다. 그 외 化合物을 利用한 非酵素的으로 또는 酵素系를 利用한 還元反應과 加水分解反應, epoxide 水化作用 등도 일어난다. 1段階反應에서 주로 關與하는 cytochrome P-450은 藥物이 結合하는 形態 및 存在 組織에 따라 다른 spectrum을 나타내는 type I 과 type II로 나누어진다^{34,52)}. type I 系의 藥物을 代謝하는 酵素는 aminopyrine. HCl을 基質로 하여 formaldehyde를 生成하는 aminopyrine demethylase(AD)이며, type II 系의 藥物을 代謝하는 酵素는 aniline. HCl을 基質로 하여 P-aminopyrine을 生成하는 aniline hydroxylase(AH)이다. 이와 같은 過程을 거쳐 1段階反應에서는 異物質의 水溶性을 높이고 2段階過程을 위한 基質로 變換시키는 反應이 일어난다. 2段階反應은 더욱 水溶性을 높임으로 體外로의 排出를 容易하게 할 수 있는 形態의 化合物로 轉換하는 抱合過程을 이룬다. 異物質 또는 異物質중

제1段階 反應을 거친 代謝産物로서 hydroxyl, amino, carboxyl, epoxide, halogen 등의 機能基를 갖는 物質들은 抱合反應으로 代表되는 生合性的 過程을 거침으로써 보다 水溶性이 높아지고, 脂溶性이 減少되며, 보다 毒性이 약해지고, 體外로 排出하기 容易한 化合物로 轉換되고 있다. 이러한 抱合過程은 異物質 또는 그 代謝産物이 體內에서 生成되어 있는 糖質, polypeptide 또는 sulfure化合物의 誘導體들과 抱合을 이루며, 一般적으로 energy를 消耗하여 高에너지 中間體를 媒介體로 이루어진다. 여기에는 glycoside抱合, sulfate抱合, methyltransferase抱合, glutathione S-transferase 反應, acylation反應 등이 있다^{34,51)}.

老化 硯界의 肝에서 cytochrome P-450含量, aminopyrine demethylase(AD), aniline hydroxylase(AH)의 活性을 測定해 본 結果 對照群에 비해 別다른 變化가 없었다(Table 2, 3, 4). 이는 補肝丸 煎湯液은 cytochrome P-450계를 利用한 解毒作用過程에는 關與하지 않는 것으로 思料되었다.

또한 glucuronic acid나 sulfate를 抱合시킴으로서 毒性을 減少시키고, 脂溶性物質을 水溶性物質로 轉換시켜 體外排出를 促進시키는 2段階의 媒介酵素인 superoxide dismutase(SOD)와 catalase^{34,49,53,54)}, superoxide, glutathion peroxidase의 活性을 살펴 본 結果 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 對照群에 비해 有意性이 있게 增加하였다(Table 9, 10, 11, 12).

以外的 다른 解毒系에 關與하는 glutathion S-transferase의 活性⁵⁵⁾과 glutathion S-transferase의 活性에 必然적으로 要求되는 glutathiondml 含量⁵⁶⁾을 살펴본 結果 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 對照群에 비해 有意性이 있게 增加하였다(Table 5, 8).

한편 補肝丸 煎湯液이 老化過程의 다른 기전에 의하여 肝毒性을 輕減시키는 기전이 있는가를 觀察할 目的으로 肝臟의 glutathion濃度, 蛋白 結合 SH, 非蛋白 結合 SH 등을 觀察하였던 바 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 對照群에 비해 有意性이 있게 增加하였다(Table 5, 6, 7).

以上の實驗結果를 綜合하여 볼 때 補肝丸 煎湯液은 肝 解毒系 1段階反應의 cytochrome P-450 酵素系를 除外한 다른 肝 酵素系에 두루 關與하여 生體內로 들어온 異物質의 體外排出을 促進하는데 有效함을 알 수 있어 向後 補肝湯 煎湯液은 老化和 關聯된 疾病의 豫防과 治療에 도움을 줄 것으로 思料되며 이에 대한 研究가 더욱 必要하리라 본다.

V. 結 論

老化過程의 轉機에서 補肝丸이 肝臟의 代謝酵素系에 미치는 影響을 觀察한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 肝 過酸化脂質의 含量變化에 있어서는 350 mg/kg을 2週間 投與한 경우 過酸化脂質의 含量增加가 抑制되었으며, 그 以上 및 以下の 濃度 및 期間에서는 過酸化脂質의 含量이 類似하였다.

2. cytochrome P-450含量, aninopyrine demethylase(AD), aniline hydroxylase(AH)의 活性變化을 測定해 본 結果 對照群에 비해 別다른 變化가 없는 것으로 나타나 補肝丸 煎湯液은 cytochrome P-450계를 利用한 解毒作用過程에는 關與하지 않는 것으로 思料되었다.

3. superoxide dismutase(SOD)와 catalase, superoxide, glutathion peroxidase의 活性變化을 살펴 본 結果 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 對照群에 비해 有意性이 있게 增加하였다.

4. glutathion S-transferase과 glutathion S-transferase의 活性에 必然的으로 要求되는 glutathion의 含量變化를 살펴본 結果 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 對照群에 비해 有意性이 있게 增加하였다

5. 肝臟의 glutathion濃度, 蛋白 結合 SH, 非蛋白 結合 SH 등을 觀察하였던 바 補肝丸 煎湯液 350, 500 mg/kg 投與群에서 對照群에 비해 有意性이 있게 增加하였다.

以上の實驗結果를 綜合하여 볼 때 補肝丸 煎

湯液은 肝 解毒系 1段階反應의 cytochrome P-450 酵素系를 除外한 다른 肝 酵素系에 두루 關與하여 生體內로 들어온 異物質의 體外排出을 促進하는데 有效함을 알 수 있었다.

이에 補肝湯 煎湯液은 老化和 關聯된 疾病의 豫防과 治療에 도움을 줄 수 있을 것으로 思料된다.

參考文獻

1. 張錫泰 : 皮膚과학, 서울, 역문각, 1994, pp.23-25.
2. 디팍 초프라 : 사람은 늙지않는다, 서울, 정신 세계사, 1994, pp.21-22, 102-103.
3. 徐舜圭 : 成人病·老人病學, 서울, 高麗醫學, 1992, pp.9-18, 28-30, 33-35, 73-77, 107, 251-254, 277-280, 343-344, 402, 475-477, 505-506.
4. 楊維傑 編: 黃帝內經靈樞譯解, 成輔社, 서울, p.196, 397, 415, 1980.
5. 任應秋 編: 黃帝內經章句索引, 一社, 서울, p.22, 325, 410, 418, 1992.
6. 朴鎬京: 東醫腎系學, 東洋醫學研究院, 서울, pp.1093-1100, 1991.
7. 리정복 : 長壽學, 서울, 醫聖堂, 1987, pp.11-99, 492-576.
8. Gaitonide, M.K. : A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. Biochem. J., 1967, p.104, 627.
9. 南京中醫學院醫經教研組 : 黃帝內經素問譯釋, 上海, 上海科學技術出版社, 1983, pp.4-5.
10. 蘇敬順 外: 鹿蓼地黃湯이 抗老化에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 18(2) : 127-148, 1995.
11. 尹哲浩 : 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 肝 過酸化脂質 生成 및 活性酵素 生成係 酵素活性에 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌, 16(1) : 62-79, 1995.
12. 尹哲浩 外: 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 腦 過酸化脂質 生成 및 活性酵素 生成係 酵素活性에 미치는 影響, 大韓韓醫學會誌, 16(2) : 348-364,

- 1995.
13. 鄭智天 : 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性酸素類의 消去作用과 抗酸化 酵素係의 活性增加 效果에 對한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(1) : 21-36, 1996.
14. 허준 : 동의보감, 서울, 대성문화사, 내경편 p.337, 1981.
15. Ohkawa, H., Ohishi, n. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem., 1979, p.95, pp.351-358.
16. G. I. Ellman. Tissue sulfhydryl group, Arch. Biochem. B. O. physis. 30. 1959. 2409.
17. F. Omura and R. Sato, Th carbon monoxide binding pigments of liver microsomes. In : Evidence for its hemoprotein nature, J. Biol. Chem., 239, 2370, 1964.
18. T. Nash, The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hentisch reaction, J. Biol. Chem., 55, 416, 1953.
19. W. R. Bidlack and G. L. Lowery, Multiple drug metabolism : p-mitroanisoole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. Biochem. pharmacol., 31, 311, 1982.
20. W. H. Habig, M. J. Pabist and W. B. Jakoby, Glutathione S-transferase : The first enzymatic step in mercapture acid formation, J. Biol. Chem., 249, 7130, 1974.
21. M.Somogyi, Enzymology, in : Clinical laboratory methods. 9th Ed. The C. V. Mosby Co., 588, 1982.
22. E. D. Paglia and W. N. Valentine, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathion peroxidase, J. Lab. Clin. Med., 70, 158, 1967.
23. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Rendall, Protein measurement with folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
24. 金光湖: 東醫豫防醫學, 慶熙大學校韓醫科大學豫防醫學教室, 서울, pp.57-60, 139-146, 240-244, 1995.25
25. 김숙희 외 : 老化, 서울, 민음사, pp.77-80, 83, 94, 1995.
26. James D. Porterfield 외: 老化와 건강, 대한 미디어, 서울, pp.27-39, 1995.
27. 후지모토 다이사부로: 老化는 왜 일어나는가, 전과과학사, 서울, pp.31-55, 1987.
28. 도이 히루후미: 老化 DNA의 음모, 대광서림, 서울, pp.117-134, 1992.
29. 과학·백과사전출판사: 자연치료건강학, 일월서각, 서울, pp.465-468, 1990.
30. 윤방부: 임상가정의학, 수문사, 서울, pp.130-131, 1991.
31. 오유진: 活性酸素가 질병의 원인이었다. 이화문화출판사, 서울, pp.57-67, 1997.
32. 이영돈: 생로병사의 비밀, KBS문화사업단, 서울, pp.224-247, 1997.
33. 虞搏 : 醫學正傳, 서울, 成輔社, 1986, p9.
34. 全國韓醫科大學肝系內科學教授共著 : 肝系內科學, 社團法人東洋醫學研究院, pp.182-184, 1989.
35. 李聰甫 : 傳統老年醫學, 湖南, 湖南科學技術出版社, 1988, pp.212-215.
36. 서울대학교 의과대학편 : 내분비학, 서울, 서울대학교출판부, pp. 227-229, 1986.
37. 金相孝 : 東醫 神經精神科學, 서울, 杏林出版社, pp.157-186, 1980.
38. T. Croci and G. M. Willams Activities of several phase and phase xeniotics biotransformation enzyme in cultured hepatocytes from male and female rats, Biochem. Pharmacol., 34, 3029, 1985.
39. C. Beauchamp, I. Fridovich, A Mechanism for the production of ethylene from methional : The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase J. Biol Chem, 24, 4641, 1970.
40. R. H. Simonm, C. M. Scoggin and D. Patterson, Hydrogen peroxide cause the fetal injury to human fibroblasts exposed tooxygen radicals, J. Biol, Chem, 266, 7181, 1981.

41. B. Schoutsen and J. W. De Jong, Age-dependent increase in xanthine oxidoreductase differs in various heart cell type. *Circ. Res.*, 61, 604, 1987.
42. K. Periannan and L. Z. Jay, Characterization of free generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 264, 9880, 1989.
43. B. Halliwell, Biochemical mechanism accounting for the toxic action of oxygen on living organism. The key role of superoxide dismutase, *Cell, Biol, Int. Rep.*, 2, 1, 1979.
44. M. D. Susan and L. F. Darry, Normobaric oxygen toxicity of the lung, *New. Engl. j. J. Med* 303, 76, 1980.
45. B. A. Freeman and J. Crapo, Biology of disease : Free radical and tissue injury, *Lab. Invest.*, 47, 412, 1982.
46. 尹吉永 : 東醫臨床方劑學, 서울, 明寶出版社, 1985, pp.185-186, 319-320.
47. 上海中醫學院 : 中草藥學, 上海, 商務印書館, 1983, p.227, 229, 522, 561, 589.
48. 이귀영: 임상병리과일, 의학문화사, 서울, pp.138-139, 348-349, 1990.
49. J. R. Gillette, A perspective on the chemically reactive metabolism. II. Alteration in kinetics of covalent binding, *Biochem. Pharmacol.*, 23, 2928, 610, 1986.
50. S. R. Howell, G. A. Hazelton and C. D. Klassen, Depletion of hepatic UDP-glucuronic acid by drugs that are glucuronidated, *J. Pharmacol. EXP. Yher.*, 236, 610, 1986.
51. P. A. Routledge and D.G. Shand Presystemic drug elimination, *Annu. Res. Pharmacol, Toxicol.*, 19, 447, 1979.
52. J. B. Schenkman, H. Remmer and R. W. Estabrook, Spectral, Studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome, *Mol. Pharmacol.*, 3, 113, 1967.
53. J. R. Dawson and J. W. Bridge, Guinea pig intestinal sulfotransferase : An investigation using the cytosol fraction, *Biochem Pharmacol.*, 30, 2409, 1981.
54. L. A. Reike, M. J. Meyer and K.A. Notley, Diminished rates of glucuronidation and sulfation in perfused rat liver after chronic ethanol administration, *Biochem. Pharmacol.*, 35, 439, 1986.
55. W. B. Jakoby. The glutathione S-transferase. : A group of multifunctional detoxication proteins, *Adv. Enzymal.*, 46, 383, 1978.
56. J. T. Ahokas, F. A. Nichollas, P. J. Ravenscroft and B. T. Emmerson, Inhibition of purified rat liver glutathione S-transferase isozymes by diuretic drugs, *Biochem. Pharmacol.*, 34, 2157, 1985.