

少陰人 十二味寬中湯, 吳茱萸附子理中湯이 흰쥐의 腦와 肝組織의 抗酸化 機轉에 미치는 影響

鄭鳳然* · 宋一炳*

A Study on Antioxidative Effects of Sipyimiguanjungtang and Osuyubujayijungtang, Korean Traditional Prescriptions for Soum Constitutes, in Brain and Liver of Rat

Jung Bong-yeon, Song Il-byung

Department of Oriental Medicine, Graduate school, Kyung Hee University, Seoul, Korea

The free radical theory of aging was introduced in 1956 by Denham Harman. This aging theory proposed that normal aging results from random deleterious damage to tissues by free radical and supplying antioxidant lead to decrease oxidative damage, inhibit aging process. In this study, we investigated antioxidative effects of four Korean constitutional prescriptions for 'Soum' constitution - Palmulgunjatang(Y1), Sipyimiguanjungtang(Y2), Osuyubujayijungtang(Y3) and Seungyangyikkibujatang(Y4). Antioxidative activity of this prescriptions was examined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals, superoxide anion radicals, peroxy radical, hydroxyl radical scavenging effects and erythrocyte hemolysis inhibitory effects. Y2 and Y3 were shown to have relatively high antioxidative activity on this methods. In additions, result of the cytoprotective effects of Korean constitutional prescriptions against 2,2'-azobis(amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), a free radical initiator, induced cytotoxicity in human hepatoblastoma cell line was similarly obtained. On the basis of this result, we assayed the antioxidative effects of Y2 and Y3 on experimental oxidative damage, induced in mouse by 100mg/kg AAPH. Male ICR mouse were

* 慶熙大學校 韓醫科大學 四象體質科

given oral administration of 500mg/kg Y2 and Y3 for 4 weeks. Thiobarbuturic acid reactive substance (TBARS) and protein degradation level in liver, plasma and brain as index of oxidative damage were decreased and thiol compound, total antioxidant status in plasma were increased by Y2 administration. But, Y3 injected group was decreased only protein degradation level in brain. Also, glutathione, a potent water-soluble endogenous antioxidant, concentration was increased by Y2 and Y3 administration in liver and brain. However, superoxide dismutase and catalase activity as a major antioxidative enzyme in vivo were not shown change by Y2 and Y3 administration. On the basis of these result, Y2 have an antioxidative effects on both water-soluble fraction and lipid-soluble fraction in cell and tissues. But, Y3 has a lower antioxidative effects on lipid-soluble fraction than Y2 in cell and tissues. These results suggest that Y2 has a antioxidative effects by protect the tissue against oxygen free radical mediated oxidative damage and Y3 has a limited antioxidative effects on water-soluble fraction in vivo. Therefore, we make report that Y2 is more effective prescriptions for anti-aging or therapeutics of diseases.

초 록

少陰人 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯의 抗酸化 效能을 檢證하기 위해, 藥材의 抗酸化力을 測定하였으며, 흰쥐에 投與하여 腦와 肝 組織의 抗酸化力 增強 效果를 實驗한 結果 有意性 있는 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯의 化學的 抗酸化力을 檢證한 結果 비교적 높은 抗酸化 活性을 보여주었다. HepG2 細胞株와 赤血球를 이용한 抗酸化力 檢證에서도 높은 活性을 보여주었으며, 특히 十二味寬中湯은 강한 수용성 抗酸化劑로 알려진 vitamin C와 유사한 結果를 보였다.

實驗用 흰쥐에게 湯劑 抽出物을 4週間 投與한 뒤 體重增加量과 GOT 活性을 測定한 結果 湯劑 非投與群과 有意的 差異를 보이지 않아 湯劑 投與에 의한 毒性은 없는 것으로 思料된다.

活性酸素 發生劑인 2,2'-azobis(amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)로 酸化的 損傷을 誘發한 實驗用 흰쥐에서 十二味寬中湯 投與群은 血漿 總抗酸化力, 血漿 脂質過酸化가 抑制되었으며, 血漿 thiol 그룹의 減少도 抑制되었으나, 吳茱萸附子理中湯 投與群에서는 有意的 差異가 나타나지 않았다.

十二味寬中湯 投與群은 肝 및 腦組織에서 AAPH로 誘導된 酸化的 損傷을 有意적으로 抑制하였으며, 體內 重要 抗酸化 物質인 glutathione을 保護하여 體內 抗酸化 能力을 增進시킨 것으로 思料된다. 吳茱萸附子理中湯 投與群은 制限的인 效果만을 보였다.

十二味寬中湯은 抗酸化 效果가 높은 處方으로 볼 수 있는 바 臨床에서 老化防止에 널리 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

I. 緒 論

韓醫學에서는 人體의 生理的 過程의 하나로 老化 現象을 認識하고 있으며, 先天의인 要因과 後天的인 環境 및 攝生에 따라 差異를 두고 있고, 四象醫學을 創始한 李濟馬는 人間 自身의 生活 調節 能力에 의한 壽命의 自律性を 提示하고 있다¹⁻⁴⁾.

老化現象을 說明하기 위한 여러 學說중 最近 注目을 받고 있는 free radical 說은⁵⁻⁶⁾ 活性酸素 (Reactive Oxygen Species, ROS)에 의해 細胞內 酸化의 損傷이 蓄積되어 여러 가지 退行性 疾患을 誘發하고 生體의 機能을 弱화시킴으로써 老化가 發生한다는 學說로서⁷⁻⁹⁾ 活性酸素의 生成은 正常的인 代謝 過程상에서 사용되는 酸素의 1-5%정도가 不完全하게 還元되어 發生하거나 또는 xanthine oxidase, glucose oxidase와 같은 酸化 酵素의 作用으로도 發生한다¹⁰⁻¹²⁾.

生體는 活性酸素의 破壞的 行動으로부터 細胞를 保護하기 위하여 다양한 防禦體系를 가지고 있다. 그러나 순간적으로 過量의 活性酸素가 發生하거나 慢性的으로 活性酸素가 發生하는 등, 活性酸素와 抗酸化 防禦系間의 均衡이 무너지면 細胞는 損傷을 받게 된다¹³⁻¹⁶⁾.

따라서, 活性酸素의 毒性을 抑制할 수 있는 抗酸化劑(antioxidant)의 補充은 매우 重要한 問題로 最近에 食品 및 醫學 分野에서 活性酸素의 毒性을 抑制시켜줄 수 있는 物質의 發掘과 이의 應用에 많은 關心이 集中되고 있다¹⁷⁻¹⁸⁾.

韓藥材를 利用한 抗酸化 效果에 對한 實驗的 研究로¹⁹⁾ 婁²⁰⁾의 高麗人蔘과 高麗紅蔘, 문²¹⁾ 柴胡, 尹²²⁾의 六味地黃湯, 鄭²³⁾과 尹²⁴⁾의 左歸飲, 右歸飲, 이²⁵⁾의 更年1號丸, 金²⁶⁾의 山查, 崔²⁷⁾의 生薑, 조²⁸⁾의 補肝丸, 안²⁹⁾의 地黃湯과 六味地黃湯, 趙 등³⁰⁾

의 六味地黃元, 延齡固本丹 등에 대한 抗酸化 效果에 關한 研究가 있고, 藥鍼製劑 研究로는 成³¹⁾의 杜沖葉藥鍼, 李³²⁾의 白何首烏藥鍼, 金³³⁾의 胡桃藥鍼, 尹³⁴⁾의 鹿茸藥鍼에 對한 抗酸化 效果에 關한 研究가 있으며, 日本에서는 다양한 抗酸化劑가 開發되어 臨床 實驗을 거쳐 活用되고 있다¹⁷⁻¹⁸⁾.

現在까지 開發된 抗酸化劑는 消化器管에서의 吸收, 組織으로의 分配 등의 問題로 인한 難點을 완전히 克復하지 못하고 있는 實情이고, 體內的 抗酸化 防禦系의 根幹을 이루는 SOD(superoxide dismutase)를 이용하는 방법 역시 經口 服用시 胃腸管에서 破壞되거나 消化管에서 吸收가 難解한 短點이 있다. 따라서, SOD와 類似하게 抗酸化 活性을 가지면서 消化管에서의 吸收가 容易한 SOD 類似物質(SOD-like substance)의 開發이 切實한 實情이다³⁰⁾.

이에 著者는 消化管 吸收에 問題가 없으며 臨床에서 多用되어지고 있고 抗酸化 活性이 期待되는 少陰人 處方을 選別하여, 八物君子湯, 升陽益氣附子湯, 十二味寬中湯, 吳茱萸附子理中湯을 가지고 抗酸化力을 測定하였으며, 흰쥐에 投與하여 腦와 肝 組織의 抗酸化力 增強 效果를 實驗한 결과 有意性 있는 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 藥 材

實驗에 使用한 韓藥材는 市中에서 購入한 후 精選하여 使用하였으며, 處方은 『東醫壽世保元』의 “新定 少陰人病 應用要藥二十四方”에 記載된 八物君子湯(Y1), 十二味寬中湯(Y2), 吳茱萸附子理中湯(Y3),

升陽益氣附子湯(Y4)으로 하였으며 一貼의 處方內容 分讓 받아 사용하였다.
과 分量은 다음과 같다.³⁵⁾

2) 細胞株

본 實驗에 사용한 動物細胞는 Human hepatoblastoma cell line인 HepG2 細胞株(ATCC CRL-10741)를 韓國細胞株銀行으로부터

3) 實驗動物

본 實驗에 사용한 動物은 大韓動物實驗센터로부터 15-20g 정도의 雄性 ICR mouse를 分讓 받아 實驗에 使用하였으며, 飼育用 飼料로 一週日間 適應시킨 후, 實驗에 使用하였다.

The components of Palmulgunjatang(八物君子湯, Y1)

韓藥名	生藥名	學名	用量(g)
人參	RADIX GINSENG	Panax schinseng NESS	8
黃芪	RADIX ASTRAGALI	Astraglus membranaceus BUNGE	4
白朮	RHIZOMA ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE	Atractylodes macrocephala KOIDZ	4
當歸	RADIX ANGELICAE GIGANTIS	Angelica gigas NAKAI	4
川芎	RHIZOMA CNIDII	Cnidium officinale MAKINO	4
白芍藥	RADIX PAEONIAE LACTIFLORAE	Paeonia lactiflora PALL	4
陳皮	PERICARPIUM CITRI NOBILIS	Citrus unshiu MARCOR	4
甘草炙	RADIX GLYCYRRHIZAE	Glycyrrhiza uralensis FISCH	4
大棗	FRUCTUS ZIZYPHI JUJUBAE	Zizyphus jujuba MILL.var. inermis(BUNGE) REHD	6
生薑	RHIZOMA ZINGIBERIS	Zingiber officinale ROSC	6
Total amount			48

The components of Sipyimiguanjungtang (十二味寬中湯, Y2)

韓藥名	生藥名	學名	用量(g)
白何首烏	RADIX CYNANCHI WILFORDII	Cynanchum wilfordii HEMSLEY	4
赤何首烏	RADIX POLYGONI MULTIFLORI	Polygonum multiflorum THUNBERG	4
良薑	RHIZOMA ALPINIAE OFFICINARUM	Alpinia officinarum HANCE	4
乾薑	RHIZOMA ZINGIBERIS SICCATUM	Zingiber officinale ROSC	4
陳皮	PERICARPIUM CITRI NOBILIS	Citrus unshiu MARCOR	4
青皮	PERICARPIUM CITRI NOBILIS VIRIDE	Citrus unshiu MARCOR	4
香附子	RHIZOMA CYPERI	Cyperus rotundus L.	4
益智仁	FRUCTUS ALPINIAE OXYPHYLLAE	Alpinia oxyphylla MIQ	4
厚朴	CORTEX MAGNOLIAE	M. obovata THUNB	2
枳實	FRUCTUS IMMATURUS PONCIRI	Poncirus trifoliata (L.)RAF	2
木香	RADIX SAUSSUREA	Saussurea lappa CLARKE	2
大腹皮	PERICARPIUM ARECAE	Areca catechu L.	2
大棗	FRUCTUS ZIZYPHI JUJUBAE	Zizyphus jujuba MILL.var. inermis(BUNGE) REHD	6
Total amount			46

The components of seungyangyikkibujatang(升陽益氣附子湯, Y4)

韓藥名	生藥名	學名	用量(g)
人參	RADIX GINSENG	Panax schinseng NESS	8
桂枝	RAMULUS CINNAMOMI	Cinnamomum cassia PRESL	8
白芍藥	RADIX PAEONIAE LACTIFLORAE	Paeonia lactiflora PALL	8
黃芪	RADIX ASTRAGALI	Astragalus membranaceus BUNGE	8
白何首烏	RADIX CYNANCHI WILFORDII	Cynanchum wilfordii HEMSLEY	4
官桂	CORTEX CINNAMOMI	Cinnamomum cassia PRESL	4
炙甘草	RADIX GLYCYRRHIZAE	Glycyrrhiza uralensis FISCH	4
附子炮	RADIX ACONITI	Aconitum carmichaeli DEBX	4
當歸	RADIX ANGELICAE GIGANTIS	Angelica gigas NAKAI	4
大棗	FRUCTUS ZIZYPHI JUJUBAE	Zizyphus jujuba MILL.var. inermis(BUNGE) REHD	6
生薑	RHIZOMA ZINGIBERIS	Zingiber officinale ROSC	6
Total amount			64

The components of Osuyubujayijungtang(吳茱萸附子理中湯, Y3)

韓藥名	生藥名	學名	用量(g)
人參	RADIX GINSENG	Panax schinseng NESS	8
白朮	RHIZOMA ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE	Atractylodes macrocephala KOIDZ	8
乾薑炮	RHIZOMA ZINGIBERIS SICCATUM	Zingiber officinale ROSC	8
官桂	CORTEX CINNAMOMI	Cinnamomum cassia PRESL	8
白芍藥	RADIX PAEONIAE LACTIFLORAE	Paeonia lactiflora PALL	4
陳皮	PERICARPIUM CITRI NOBILIS	Citrus unshiu MARCOR	4
甘草炙	RADIX GLYCYRRHIZAE	Glycyrrhiza uralensis FISCH	4
吳茱萸	FRUCTUS EVODIAE	Evodia rutaecarpa(JUSS.) BENTH	4
小茴香	FRUCTUS FOENICULI	Foeniculum vulgare MILL	4
破故紙	SEMEN PSORALEAE	Psoralea corylifolia L.	4
附子炮	RADIX ACONITI	Aconitum carmichaeli DEBX	4
Total amount			60

4) 試藥 및 機器

實驗에 使用한 試藥中 fluoroscamine, thiobarbituric acid, 6,6-dithiodinicotinic acid는 Sigma 社의 製品을 使用하였으며, 2,2'-azobis(aminopropane) dihydrochloride는 Wako Chemical 社의 製品을 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 檢液의 調製

上記 處方內容의 各 5帖 分量을 蒸溜水에 24시간 담가두었다가 30분간 加熱하여 煎湯液을 얻은 다음 다시 120분간 加熱하여 얻은 煎湯液과 함께 濾過紙로 걸러낸 후, rotary evaporator로 減壓 濃縮한 다음 원심분리하여 上澄液을 收去한다. 이 上澄液을 3MM paper로 濾過한 후 凍結 乾燥機를 利用하

여 粉末化시키고 -20℃에서 保管하며 使用하였다. 이 抽出物의 抗酸化 活性 檢索을 위해 각 粉末을 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)에 10mg/ml의 濃度로 溶解하여 利用하였다

2) 細胞株 培養

HepG2 細胞 培養 條件은 5% CO₂, 충분한 濕氣를 준 상태의 incubator에서 5% fetal bovine serum, 100U/ml penicillin 및 100μg/ml streptomycin을 含有한 Dulbecco's modified Eagles Medium(DMEM, Gibco)을 使用하였다.

3) 抗酸化 活性의 測定

가. DPPH radical scavenging activity 測定

DPPH (diphenylpicryl hydrazyl)는 靑안색을 띄는 安定한 free radical 形態로서 存在하며, 抗酸化劑 또는 還元劑에 의해서 電子 또는 水素 原子를 받아들임으로써 diphenylpicryl hydrazine의 形態로 轉換되면서 탈색되는 特性을 가지고 있기 때문에 시료 중의 抗酸化劑의 活性을 測定하는 표적 물질로서 사용된다.³⁶⁾

湯劑 試料를 DPPH solution (0.016% DPPH in EtOH : Na-phosphate buffer (pH 5.6), 1:1, v/v)에 첨가한 후 초기 흡광도를 517nm에서 測定하고, 5분간 실온에서 반응시킨 후 탈색 정도를 測定하여 湯劑 시료의 抗酸化劑 活性을 測定하였다.

나. Superoxide scavenging activity 測定

Pyrogallol은 알칼리 pH에서 自動 酸化하면서 superoxide anion radical (SAR)을 발생하며, 이것이 pyrogallol의 酸化를 더욱 촉진하게 되는데 이 SAR을 消去함으로써 pyrogallol의 自動 酸化를 抑制시키는 能力을 測定하여 SAR scavenging activity를 測定하였다³⁷⁾.

湯劑 試料를 Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 添加하고 여기에 pyrogallol을 添加 한 후 5분 동안 440nm에서 吸光度의 變化를 觀察하였다. SAR scavenging activity는 pyrogallol의 酸化를 50% 抑制하는 湯劑의 濃度(SC50)로 決定하였다.

다. Total antioxidant status 測定

Randox (U.K.) 社의 total antioxidant status 測定用 kit를 使用하여 metmyoglobin과 hydrogen peroxide의 反應으로 形成되는 hydroxyl radical (OH·)에 의해 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonate)가 酸化되는 것을 試料가 抑制하는 정도를 測定하기 위해 spectrophotometer를 利用 하였다.

라. Linoleic acid의 過酸化 防止에 의한 抗酸化力 測定

Linoleic acid sodium salt (3mg/1ml) 50μl에 각 濃도의 試料 20μl 및 10mM AAPH(2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochloride) 30μl를 첨가한 후 37℃에서 30분간 shaking incubation을 行하였다. 그후, 1.2% thiobarbituric acid 100μl와 8.1% SDS 20μl, glacial acetic acid 30 μl를 첨가하고, 85℃에서 30분간 반응시킨 후 생성된 malondialdehydethiobarbituric acid conjugate dye를 540nm에서 흡광도를 測定, 정량하여 첨가된 시료의 peroxy radical 消去 활성을 比較하였다.

4) 動物 細胞 培養에서 湯劑의 抗酸化 效果 測定

가. AAPH 에 의한 細胞毒性에서 湯劑 抽出物의 抗酸化 保護 效果 測定

AAPH로부터 發生하는 peroxy radical에 對한 湯劑의 細胞 保護能을 測定하기 위해 HepG2 細胞

를 2×10^4 cell/well의 濃度로 96-microplate에 接種한 후, 5mM의 AAPH 및 각 濃度의 湯劑를 添加하고 2시간동안 추가 培養하였다. 그 후, 培養 上澄液을 除去하고 3차례 D-PBS로 洗滌한 후, DMEM으로 희석된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution 200 μ l를 添加하고 3시간동안 추가 培養한 뒤, 上澄液을 다시 除去하고 200 μ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 succinate dehydrogenase의 活性으로 生成되는 不溶性의 formazane crystal을 溶解하였고, 이를 540nm에서 吸光度를 測定하여 cell viability를 決定하였다. 測定 結果는 AAPH 무첨가군에 대한 상대적 細胞 生育度(relative cell viability, %control)로 표기하였다.³⁸⁾

나. Red blood cell hemolysis test 및 酵素 活性 測定

實驗用 흰쥐의 심장으로부터 채취한 혈액에서 RBC를 분리하여 사용하였다. 1% RBC 0.7ml에 각 농도의 시료 0.2ml 및 10 mM AAPH를 첨가한 후 37°C에서 2시간동안 震盪 培養한 다음 원심분리하여 上澄液을 540nm에서 吸光度를 測定하여 유출된 hemoglobin 양을 測定한 후, 0.1% RBC 용액으로부터 회수한 RBC를 증류수로 완전 溶血 시킨 후 測定된 값에 대한 상대적인 비율로서 溶血 정도를 결정하였다.³⁹⁾

5) AAPH로 酸化的 損傷을 誘發한 흰쥐 에서 湯劑의 保護 效果 測定

가. 湯劑抽出物의 投與와 AAPH 處理 方法

湯劑抽出物은 PBS에 溶解시킨후 實驗動物의 무게를 測定하여 乾燥 粉末의 무게를 기준으로 500mg/kg body weight의 비율로 매일 오후 1회씩 4주간

경구투여하였다. 對照群은 같은 비율의 PBS를 동일한 방법으로 투여하였다. 각 그룹은 7 마리씩으로 구분하였으며 실험 기간동안 1주일 1회씩 체중을 測定하였다. 실험 기간 滿了後 24시간동안 絶食시킨 후 100mg/kg body weight 의 비율로 AAPH를 腹腔(i.p.)으로 投與하였다. AAPH 투여후 4시간째에 단두하여 頸動脈으로부터 血液을 採取하였으며, 肝과 腦 組織은 즉시 摘出하여 PBS로 2-3회 洗滌後 實驗前까지 -70°C에서 보관하였다. 採取한 血液은 원심분리하여 血漿을 분리한 후 實驗에 사용하였다.

나. 血漿 total antioxidant status (TAS)의 測定

血漿으로부터 total antioxidant status (TAS)의 測定은 Randox (U.K.)사의 血漿 TAS 測定 kit로 행하였으며, 測定된 TAS는 水溶性 vitamin E 類似體인 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchoman-2- carboxylic acid (Trolox)의 相對的인 濃度로서 표기하였다.

다. 血漿 脂質過酸化物 및 thiol group의 測定

血漿 脂質過酸化物價의 測定은 Yagi 등의 방법 40)에 따라 행하였다. 즉, 血漿 50 μ l에 10% phosphotungstic acid 0.5ml과 0.83N H₂SO₄ 4.5ml을 加한 뒤 3,000rpm에서 원심분리하는 세척 과정을 2회 거친 후 침전물 1% thiobarbituric acid:glacial acetic acid:d.H₂O (1:1:3, v/v/v) 5ml과 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.2ml을 첨가하여 100°C에서 1시간동안 반응하였다. 이 반응액에 n-butanol 3ml을 加하여 생성된 dye를 추출한 후 이를 excitation 515nm, emission 553nm에서 형광도를 測定하여 血漿 脂質過酸化값을 決定하였다.

Thiol group의 定量은 組織磨碎液 0.1ml에 0.6 mM 6,6'-dithi-odinitric acid (TNA, in 50

mM Na-phosphate buffer) 2.9ml을 혼합 한 뒤 상온에서 1시간동안 반응시키고, 吸光度를 測定한 뒤 cysteine을 이용한 標準曲線과 비교 定量하였다.⁴¹⁾

라. 肝 및 組織의 生化學的 分析

肝 組織 및 腦 組織의 脂質過酸化物 및 蛋白質 分解度의 分析은 다음과 같이 行하였다.

脂質過酸化物의 測定은 10% 組織 磨碎液 0.1ml 에 5-나) 項과 같은 TBA 反應 試藥 5ml을 添加한 후 95℃에서 1시간동안 反應시킨 후 n-butanol 3 ml을 加하고 원심 분리한 뒤 butanol 층을 取하여 螢光度를 測定하였다⁴⁰⁾.

蛋白質 分解度는 10% 組織磨碎液 0.1ml에 PBS 0.9ml과 20% trichloroacetic acid (TCA) 0.1 ml을 첨가한 후, 12,000rpm에서 원심분리하여 上澄液을 분리하고, 이 上澄液 0.25ml에 HEPES buffer (50mM, pH 9.0) 1.25ml과 fluoroscamine 용액 (0.3% in acetone) 0.5ml을 加한 뒤, 실온에서 15분간 反應시키고 excitation 375nm, emission 425nm에서 螢光度를 測定하여 分析하였다⁴²⁾.

組織에서 glutathione의 測定은 Hissin 등의 方法⁴³⁾에 따라 還元型 glutathione (GSH)와 酸化型 glutathione (GSSG)을 分利하여 測定하였다. 10% 組織 磨碎液에 25% phosphoric acid를 添加한 후 100℃에서 15분간 重湯하고 원심분리하여 上澄液을 분리하였다. 그 후, 이 上澄液에 ethanol:chloroform (2:1, v/v)을 添加하여 원심분리하고 ethanol층을 취하여 試料로서 사용하였다. GSH를 測定하기 위해서 試료에 phosphate buffer (pH 8.0)를 첨가하고 o-phthaldehyde (in methanol) 을 혼합한 후 25℃에서 15분간 反應한 뒤 fluorescence spectrophotometer로 excitation

350nm, emission 420nm에서 螢광도를 測定하여 결정하였다. GSSG의 測定은 試료에 N-ethylmaleimide (NEM)을 첨가하여 30분간 反應시킨 후, glycine-NaOH buffer (pH 12.0)를 첨가하고 o-phthaldehyde를 첨가한 후 25℃에서 反應한 뒤 螢光度를 測定하여 결정하였다.

마. 抗酸化 酵素 活性의 測定

SOD의 活性 測定은 試料 0.1ml을 Tris buffer (pH 8.0) 1.5ml에 添加하고 7.2mM pyrogallol을 첨가하고 初期 吸光度를 440nm에서 測定한 후 25℃에서 5분간 incubation 하고 終了 吸光度를 測定한 뒤 그 吸光度의 差를 이용하여 SOD의 활성을 測定하였다. SOD 활성의 단위는 1분동안 1mg의 단백질이 pyrogallol의 자동酸化를 50% 억제하는 것을 1unit로 정의하였다³⁷⁾.

Catalase의 活性 測定은 Aebi의 방법⁴⁴⁾에 따라 分解된 hydrogen peroxide의 量을 240nm에서 吸光度를 測定하여 定量한 뒤 決定하였다. Catalase의 活性 단위는 1분동안 1mg의 단백질이 1μmol의 hydrogen peroxide를 분해하는 것을 1unit로 정의하였다.

바. 蛋白質 定量

試料에서 蛋白質 定量은 Bradford 法에 따라 行하였다

6) 統計 處理

각 實驗 結果는 平均±標準 偏差의 형태로 圖示 하였다. 각 群間의 有意性 檢證은 student t-test 를 利用하였으며, 통계학적 有意性이 있는 實驗群間에 대해서 圖示하였다.

III. 實驗成績

1. 湯劑의 抗酸化 活性에 미치는 影響

物質의 抗酸化力 測定에는 ESR(electro-spin resonance)를 이용하여 直接的으로 活性 酸素의 發生量을 測定하는 直接的 方法과 活性 酸素에 의해 損傷 받은 物質 또는 그 誘導體를 生化學的 測定法에 의하여 測定하는 間接的 方法으로 區分된다. 本 論文에서 湯劑 抽出物의 抗酸化劑 測定을 위해서는 間接的 抗酸化力 測定方法중 널리 사용되고 있는 電子供與能 測定法, pyrogallol 自動酸化 抑制能, hydroxyl radical 消去能 및 脂質過酸化 抑制能을 이용하여 測定하였으며, 그 결과는 50% 抑制能을 나타내는 SC50(Scavenging concentration at 50%)로 換算하여 Table I.에 나타내었으며, hydroxyl radical 消去能은 水溶性 vitamin E 類似體인 Trolox에 대한 相對的 濃度로서 나타내었다.

實驗에 使用된 DPPH radical은 安정한 free radical 形態로서 짙은 남색을 띄고 있으나, 還元劑

또는 抗酸化劑의 添加로 還元되면서 탈색이 일어나는 것을 이용한 實驗으로 試料의 電子供與能을 檢査하는 方法이다. 이 DPPH radical의 50 %를 還元시키는 試料의 濃度を 測定한 結果 十二味寬中湯, 吳茱萸附子理中湯, 升陽益氣附子湯 順으로 活性을 보였으며, 八物君子湯이 가장 낮은 活性을 보였다. 그러나 대조 물질로 사용한 代表적 水溶性 抗酸化劑인 vitamin C (ascorbic acid)에 비해서는 낮은 活性을 보여주었다.

Pyrogallol은 알칼리 pH에서 자동 酸化되면 황색의 pyrogallic acid로 전환되면서 superoxide anion radical (SAR)을 생성하게 되며, 이렇게 생성된 SAR은 다시 pyrogallol의 酸化를 더욱 촉진시키는 역할을 한다. 따라서, 試料에 의해 SAR을 消去하면 pyrogallol의 자동 酸化를 억제하는 역할을 한다. 시료가 pyrogallol의 자동 酸化를 50% 억제하는 능력을 測定한 결과 DPPH radical을 이용한 電子供與能 結果와 다르게 吳茱萸附子理中湯, 十二味寬中湯, 升陽益氣附子湯의 順으로 높은 活性을 보였으며, 八物君子湯은 낮은 活性을 나타내었다.

Table I. Free Radical Scavenging Concentration(SC50) of Each Korean Constitutional Prescription with Various Free Radical Sources

Korean constitutional prescription	DPPH radical ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Superoxide anion (mg/ml)	Peroxyl radical ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	TAS (nmol Trolox)
Y1	751.90	896.10	285.70	0.64
Y2	377.80	583.70	93.70	1.22
Y3	482.40	540.40	187.50	1.31
Y4	597.00	676.90	233.80	0.52
Vitamin C	116.40	-	143.20	17.4

Y1 : Palmulgungjatang(八物君子湯)

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯)

Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯)

Y4 : seungyangyikkibuiatang (升陽益氣附子湯)

試料의 peroxy radical 消去能의 測定은 水溶液 1에서 일정한 속도로 peroxy radical을 발생하는 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihydrochloride (AAPH)를 이용하여 測定하였다. AAPH에 의해서 발생된 free radical은 불포화 脂肪酸의 불포화 결합 부위를 酸化시켜 지방산 酸化의 이차 산물중 하나인 malondialdehyde (MDA)를 형성하므로, 이를 定量 함으로써 시료의 peroxy radical 消去能을 간접적으로 검색하였다. 그 결과 十二味寬中湯이 가장 높은 peroxy radical 消去能을 보였으며, 吳茱萸附子理中湯, 升陽益氣附子湯, 八物君子湯은 대조물질인 ascorbic acid에 비해 낮은 消去能을 나타내었다.

Total antioxidant status의 測定은 血漿으로부터 測定 가능한 방법을 시료에서 가능하도록 응용하여 사용하였고, Total antioxidant status (TAS)의 活性은 수용성 vitamin E 유사체인 Trolox에 대한 상대적인 농도로서 나타내었다. 그 결과 DPPH radical 消去能등과 유사한 결과를 보여주어 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯이 좋은 효과를 보였다.

試料의 抗酸化力을 測定한 결과 十二味寬中湯, 吳茱萸附子理中湯이 선택된 湯劑 中에서 가장 높은 抗酸化活性을 보였으나 모두 vitamin C에 미치지지는 못하였다. 그러나 實驗에 사용된 방법은 化學的 活性 酸素 消去能을 測定한 것으로 실제 細胞나 實驗動物 또는 인간에게 직접 適用되었을 때의 生物學的 活性을 나타낼 수는 없다 따라서, 物質의 細胞內 吸收 및 排出 速度, 細胞內 巨大 分子 (macromolecule)에 대한 親和性 및 細胞內 酵素의 의한 代謝 등과 같은 生物學的 要因들의 影響을 檢査하기 위하여 이들 선택된 湯劑들을 赤血球 및 HepG2에 적용시켜 抗酸化力을 測定하고자 하였다.

2. AAPH 毒性에 對한 湯劑의 保護 效果

1) Red blood cell에서의 保護 效果

Red blood cell (RBC)은 自體內에 核이 存在하지 않아 새로운 蛋白質을 合成할 수가 없어 酸化의 스트레스를 받게 되었을 때, 酵素의 防禦 體系를 強化시킬 수 없으며, 불포화 脂肪酸의 含量이 높기 때문에 다른 어떤 細胞보다 酸化의 스트레스에 敏感하다³⁹⁾. 또한, 赤血球는 細胞膜에 損傷을 받게 되면, 細胞膜이 崩壞되어 細胞內의 hemoglobin이 流出되는 hemolysis(溶血) 現象을 發生하며, 流出된 hemoglobin의 量을 비교하여 試料의 抗酸化力을 間接的으로 測定할 수 있다.

10mM AAPH가 함유된 RBC 懸濁液에 각 濃度의 試料를 添加한 뒤 對照群에 대한 hemolysis 발생 비율의 50%를 抑制하는 試料의 濃도를 관찰한 결과는 Table II와 같다.

Table II. Inhibitory Effects of Korean Constitutional Prescriptions against AAPH- Induced Red Blood Cell Hemolysis

Drug	Y1	Y2	Y3	Y4	Vitamin C
SC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	859.70	261.48	477.31	526.95	218.43

Y1 : Palmulgungjatang(八物君子湯)

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯)

Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯)

Y4 : seungyangyikkibujatang (升陽益氣附子湯)

藥物的 hemolysis의 50 % 억제 濃度는 DPPH radical 消去能등을 이용한 抗酸化力 測定과 유사한 결과를 나타내었다. 十二味寬中湯이 비교적 좋은 抑制能을 보였으나 化學적 消去能의 測定때와 마찬가지로

지로 對照群인 vitamin C에 비해서는 낮은 活性을 보였으나 Y2의 경우 vitamin C와 유사한 活性을 보여 화학적 抗酸化力의 測定이 생물학적 抗酸化 活性 測定을 대표할 수 없음을 알 수 있었다.

2) 培養 肝 細胞株에 對한 湯劑의 保護效果

가. 湯劑의 cytotoxicity

培養된 動物 細胞에 대한 湯劑의 抗酸化 保護 作用을 관찰하기 위해서 먼저 細胞에 대한 湯劑의 細胞 毒性을 觀察한 結果는 Fig. 1.과 같다. 4개 湯劑 抽出物 모두 1mg/ml 이하의 濃度에서 특별한 細胞 毒性을 나타내지는 않았으며, 1mg/ml 濃度 이상에서 높은 細胞독성을 나타내었기에 細胞 培養 實驗에서 湯劑 抽出物의 濃도는 1mg/ml 이하의 濃度에서 행하였다.

나. AAPH 細胞 毒性에 對한 細胞 保護能

活性 酸素 發生劑인 AAPH는 水溶液上에서 peroxy radical을 발생시키며, 이들은 細胞 構成 成分을 酸化시켜 細胞 機能을 阻害하고 결국에는 細胞를 사멸시킨다.

湯劑의 抗酸化力을 檢證하기 위하여 human hepatoblastoma인 HepG2 細胞를 이러한 AAPH에 노출시킨 후 湯劑의 細胞 保護能을 관찰하였다. DPPH radical 消去能과 같은 抗酸化力의 測定은 free radical에 대한 化學的 消去 作用만을 測定하는 방법이기 때문에, 실제 이들이 細胞의 脂質二重 膜을 통한 細胞質 내로 流入 可能性이나 또는 脂質 膜에서 발생한 脂質過酸化 연쇄 작용을 억제함으로써 나타나는 活性酸素 매개성 AAPH cytotoxicity의 억제 효능을 검사한 결과는 Table III.과 같다. 4개 湯劑중 Y2, Y3가 비교적 低濃度에서도 상대적으로 높은 細胞 보호 活性을 보였다. AAPH와 같은 酸化劑 첨가에 의한 細胞 毒性은 脂質過酸化와 같은

酸化적 損傷을 媒介로 일어난다. 따라서, Y2, Y3가 他 2個 湯劑 抽出物에 비하여 높은 抗酸化力을 바탕으로 細胞 保護能을 나타낸 것으로 思料된다.

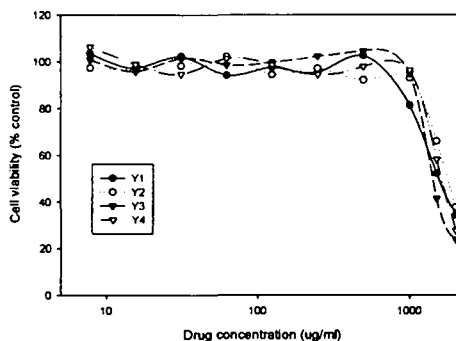


Fig. 1. Cytotoxicity of Korean constitutional prescription.

- Y1 : Palmulgunjatang(八物君子湯)
- Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯)
- Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯)
- Y4 : seungyangyikkibujatang (升陽益氣附子湯)

Table III. Protective Effects of Korean Constitutional Prescriptions against Oxidative Damage Mediated Hepatoblastoma Cell Death

Drug	Y1	Y2	Y3	Y4	Vitamin C
SC50 (μg/ml)	356.71	198.50	233.17	528.72	207.92

- Y1 : Palmulgunjatang(八物君子湯)
- Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯)
- Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯)
- Y4 : seungyangyikkibujatang (升陽益氣附子湯)

3. AAPH로誘發된 酸化的 損傷에 對한 抗酸化 保護 效果

1) 體重 및 血漿 分析

가. 體重 增加量 및 血漿 GOT 活性

實驗用 mouse에 4주간 湯劑를 500mg/kg의 비율로 經口 投與하는 동안 實驗 動物의 體重을 測定하고 實驗 시작 당시의 體重과 비교하여 體重 增加量을 계산한 결과는 Fig. 2.와 같다. 對照群에 비하여 湯劑 投與群의 체중 증가량은 큰 차이가 없었으며, 이는 湯劑 抽出物의 투여에 의한 독성 작용이 없었던 것으로 사료된다. 또한, 肝損傷을 나타내는 임상학적 지표인 血漿 GOT를 測定한 결과는 Fig. 3.과 같으며 역시 對照群과 큰 차이를 나타내지 않아 mouse에게 500mg/kg의 농도로 湯劑의 투여는 毒性을 나타내지 않는 것으로 思料된다.

나. 體內 總抗酸化力에 對한 效果

4주간 湯劑를 투여한 실험 동물에게 AAPH를 투여하여 酸化적 스트레스를 가한 후 血漿에서 總抗酸化力(total antioxidant status, TAS)를 測定한 결과는 Fig. 4.와 같다. 血漿의 상태는 個體의 전체적인 상태를 나타내는 값으로서 AAPH 投與群의 경우 對照群에 비하여 약 48% 정도의 혈장 TAS가 감소되어 AAPH에 의한 酸化的 損傷에 의해 생체내 抗酸化力이 급속도로 낮아짐을 확인할 수 있었다. 반면, Y2 投與群의 경우 對照群에 대하여 각각 23% 정도의 감소만을 보여주었으며, AAPH 단독 投與群에 비하여 약 46% 가량 TAS 값이 증가하는 모습을 보여 생체내에서 抗酸化力을 補強한 것으로 思料된다. 반면에 Y3 投與群은 AAPH 投與群에 비해 유의적 차이를 나타내지 않아 큰 효능을 나타내지 못했던 것으로 사료된다.

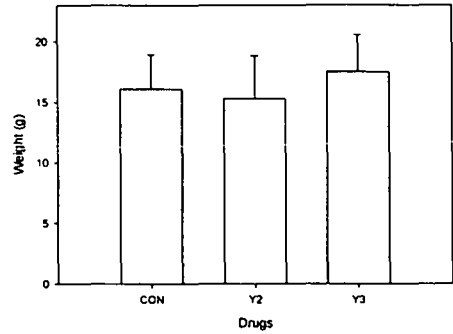


Fig. 2. Gained body weight during experimental period.

CON (Control) : Not treated group

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯) treated group

Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯) treated group

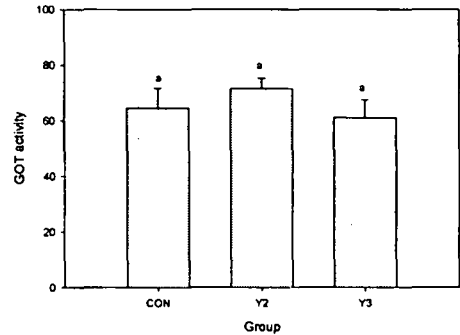


Fig. 3. Plasma glutamic oxaloacetate transaminase activity after Korean constitutional prescriptions injection for 4 weeks.

CON (Control) : Not treated group

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯) treated group

Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯) treated group

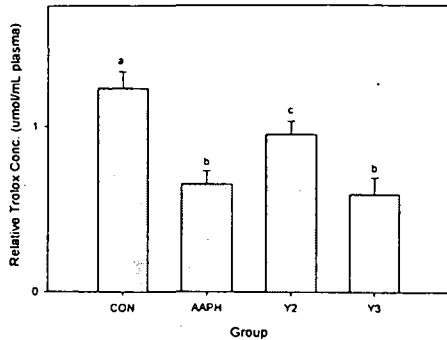


Fig. 4. Total antioxidant status(TAS) in mouse plasma.

CON (Control) : Not treated group

AAPH : 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihydrochloride treated group

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯) treated group

Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯) treated group

Means with same alphabets are not different at $p < 0.05$

다. 血漿 脂質過酸化물에 對한 效果

血漿內的 脂質過酸化물은 組織에서 발생한 脂質過酸化물이 배출된 것으로서 체내의 전체적인 脂質過酸化물을 대표한다고 할 수 있다. 또한, 脂質過酸化물의 2차 산물인 malondialdehyde, 4-hydroxy-Inonenal과 같은 aldehyde 系列의 物質들은 他組織으로 轉移되어 脂質過酸化를 誘導한다고 보고⁴⁵⁾ 되어 있을 뿐만 아니라 發癌 物質로서도 알려져 있어 血漿內 脂質過酸化물의 抑制는 이차적 위험을 감소시킬 수 있다고 할 수 있다. 이러한 血漿 脂質過酸化물을 測定한 결과는 Fig. 5.와 같다.

AAPH 단독 投與群은 對照群에 비하여 유의적 ($p < 0.05$)인 脂質過酸化값의 증가를 보였으며, Y2 投與群은 TAS 결과와 마찬가지로 AAPH로 유도

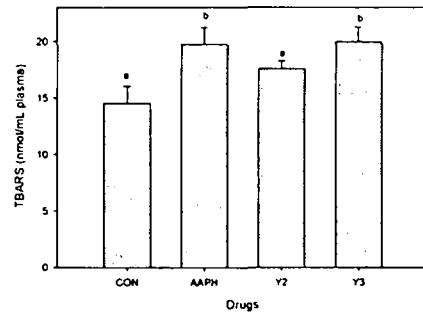


Fig. 5. Inhibitory effects of Korean constitutional prescriptions against AAPH-induced TBARS formation in mouse plasma.

CON (Control) : Not treated group

AAPH : 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihydrochloride treated group

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯) treated group

Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯) treated group

Means with same alphabets are not different at $p < 0.05$

된 脂質過酸化를 유의적으로 경감시키는 결과를 보였다. 그러나 Y3 投與群은 血漿 脂質過酸化에 대해서 保護能이 나타나지 않아 TAS의 결과의 일치하는 결과를 보였다.

라. 血漿 非蛋白質 thiol그룹에 對한 效果

Thiol基는 細胞內 物質의 還元 상태의 유지에 중요한 역할을 하고 있으며, 단백질의 3차구조를 구성하는 중요한 결합이다. 이러한 thiol基는 cysteine과 같은 單獨 遊離 아미노산에서부터 대표적 tripeptide인 glutathione 및 serum albumine과 같은 거대 단백질까지 다양한 분포를 하고 있다. 이 중 단백질에 포함되어 있지 않은 遊離 아미노산이나

저분자 peptide에 포함된 thiol 그룹을 測定한 결과는 Fig. 6.과 같다.

血漿 脂質過酸化 및 總抗酸化力의 결과와 일치하게 AAPH 단독 投與群의 경우 對照群에 비하여 혈장 thiol 그룹은 약 32% 가량 감소하였으며, Y2 投與群은 이러한 감소를 유의적($p<0.05$)으로 억제하였으나 Y3 投與群은 큰 차이를 발견하지 못하였다.

細胞內에서 중요한 非酵素的 抗酸化劑는 glutamate, cysteine, glycine의 3개 아미노산으로 구성된 glutathione이다. Glutathione의 합성과 재생 과정에는 여러 가지 조절인자가 존재하지만 이중 하나는 血漿으로부터 유입되는 cysteine 즉, 非蛋白質性 thiol 그룹이다⁴⁶⁾. 따라서, 血漿內의 thiol 그

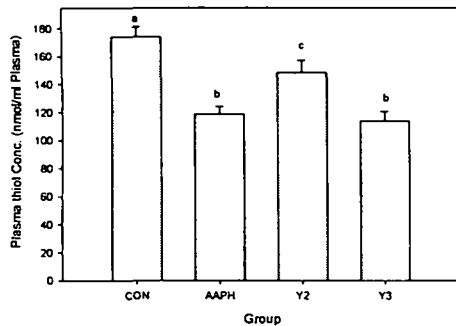


Fig. 6. Non protein thiol group concentration in mouse plasma.

CON (Control) : Not treated group

AAPH : 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihydrochloride treated group

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯) treated group

Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯) treated group

Means with same alphabets are not different at $p<0.05$

룹의 감소는 細胞內의 glutathione의 합성을 감소시키는 영향을 줄 것으로 思料되며, 이에 따라서 細胞內 抗酸化力의 증강에도 악영향을 주리라 思料되며, Y2의 투여로 이러한 thiol 그룹의 보호 작용은 細胞內 抗酸化力 증진에 도움을 주리라 思料된다.

2) 湯劑 投與에 의한 酸化的 損傷 抑制 效果

가. 脂質過酸化

脂質過酸化는 생체내의 酸化的 損傷을 나타내는 가장 중요한 지표로 사용된다. 이러한 脂質過酸化를 腦와 肝 組織에서 測定한 결과는 Fig. 7.과 같다.

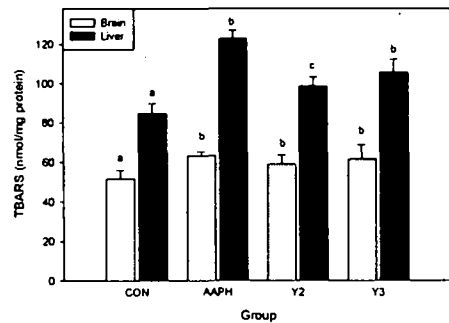


Fig. 7. Inhibitory effects of Korean constitutional prescriptions against AAPH-induced TBARS formation in mouse brain and liver.

CON (Control) : Not treated group

AAPH : 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihydrochloride treated group

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯) treated group

Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯) treated group

Means with same alphabets are significantly not different at $p<0.05$

肝과 腦組織 모두에서 AAPH 投與는 有意的 ($p < 0.05$)인 脂質過酸化 값의 增加를 나타내어 AAPH 投與가 肝 및 腦 組織에서 酸化的 損傷을 정상적으로 誘發함을 알 수 있었다. 湯劑 投與群에 있어서 Y3 投與群은 腦와 肝組織에서 모두 統計的 有意的성을 나타내지 못한 반면에 Y2 投與群은 肝 組織에서 AAPH에 의해서 誘導된 脂質過酸化를 有意的 ($p < 0.05$)으로 抑制하는 效果를 보여 酸化的 손상으로부터 간 조직을 보호하였다. 뇌 조직의 경우 Y2, Y3 投與群 모두 脂質過酸化를 抑制하지 못하였는데, 이는 腦組織이 腦關門(blood-brain barrier, BBB)이라는 透過 保護膜(permeability barrier)을 가지고 있어 水溶性 物質의 透過를 막고 있는 것에 비추어 볼 때, 效果的인 抗酸化 保護作用을 나타낼 수 있는 충분한 量의 湯劑 抽出物이 腦關門을 透過하기 어려웠던 것으로 思料된다.

나. 蛋白質 分解度

酸化的 스트레스에 의해 損傷된 蛋白質은 細胞內의 proteolytic system에 의해서 아미노산이나 低分子 peptide로 分解된다. 이러한 蛋白質 分解度の 測定은 脂質過酸化에 비해 좀더 敏感한 方法으로 알려져 있는데, 그 이유는 脂質過酸化가 初期에 lag phase가 존재하는 반면에 蛋白質 損傷은 이러한 lag phase가 없기 때문에 최근들어 脂質過酸化를 대체하는 方法으로 많이 이용되고 있다⁴²⁾.

AAPH 投與된 動物에서 蛋白質 分解度を 測定한 結果는 Fig. 8.과 같다. AAPH 投與群은 腦와 肝 組織에서 蛋白質 分解度を 有意的($p < 0.05$)으로 增加시켰다. 또한, 肝 組織內에서 Y2, Y3 投與群은 모두 有意的으로 蛋白質 分解度を 輕減시켜 AAPH에 의한 酸化的 損傷을 輕減시키는 것으로 나타났다. 그러나 腦 組織에서는 Y2 投與群만이 抑制 效果를 보였으며 Y3 投與群은 效果를 나타내지 못하

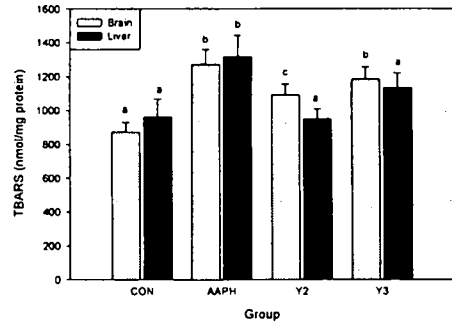


Fig. 8. Inhibitory effects of Korean constitutional prescriptions against AAPH-induced protein degradation in mouse brain and liver.

CON (Control) : Not treated group

AAPH : 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihydrochloride treated group

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯) treated group

Y3 : Osuyubujayjungtang (吳茱萸附子理中湯) treated group

Means with same alphabets are significantly not different at $p < 0.05$

였다. 이는 脂質過酸化에서 Y3가 腦 組織 및 肝 組織에서 抑制 效果를 나타내지 못한 것과는 相反된 結果였다. 본 實驗에서 投與된 湯劑 抽出物은 대부분이 水溶性 分劃으로서 脂溶性인 脂質보다 水溶性인 蛋白質에 대해 높은 保護 效果를 가질수 있었던 것으로 思料된다. 또한, 水溶性 分劃으로서 腦關門의 通過가 어렵지만 肝 細胞의 酸化的 損傷의 輕減은 肝 組織으로부터 합성되는 대표적 水溶性 抗酸化劑인 glutathione의 腦組織으로의 輸送을 增加시킬수 있는 可能性을 높일 수 있어 腦 組織의 保護作用이 觀察될 수 있었던 것으로 思料된다.

3) 湯劑 投與에 의한 體內 抗酸化系의 變化

가. Glutathione의 變化

AAPH를 처리한 흰쥐의 腦와 肝組織에서 還元型 glutathione과 酸化型 glutathione의 含量을 測定한 結果는 Fig. 9. 및 Fig. 10.과 같다.

組織내에서 還元力を 提供할 수 있는 還元型 glutathione (GSH)의 含量은 AAPH 投與에 의하여 腦와 肝 組織에서 각기 60%, 45% 감소하여 組織내의 抗酸化力의 減少가 나타남을 알 수 있었다. 또한 GSH가 酸化되어 나타나는 酸化型 glutathione (GSSG)의 含量은 腦와 肝 組織에서 각기 69%, 11% 증가하여 酸化的 스트레스가 나타

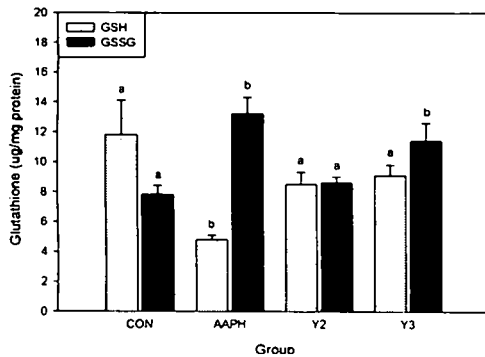


Fig. 9. Protective effects of Korean constitutional prescriptions against AAPH-induced glutathione alteration in mouse brain.

CON (Control) : Not treated group

AAPH : 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihydrochloride treated group

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯) treated group

Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯) treated group

Means with same alphabets are significantly not different at $p < 0.05$

남을 추측할 수 있다. 그러나 Y2, Y3 投與群은 각 AAPH 단독 投與群에 비하여 GSH의 증가, GSSG의 감소가 腦와 肝 組織 모두에서 나타남을 보였다. 즉, 湯劑 抽出物의 投與가 細胞內의 還元力を 保存하고 細胞內 抗酸化력을 增進시키는 結果를 가져온 것으로 思料된다. Glutathione은 肝에서 전체의 90%가 合成되며 glutamylcysteine transpeptidase의 活性에 의해서 glutamylcystein과 glycine으로 分解되어 細胞外로 排出되며 他組織에서 同... 酵素의 作用으로 다시 glutathione으로 再合成되어 吸收되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 湯劑 抽出物의

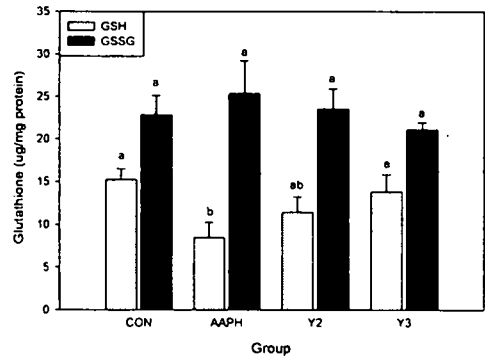


Fig. 10. Protective effects of Korean constitutional prescriptions against AAPH-induced glutathione alteration in mouse liver.

CON (Control) : Not treated group

AAPH : 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihydrochloride treated group

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯) treated group

Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯) treated group

Means with same alphabets are significantly not different at $p < 0.05$

GSH 保護 效果는 肝 組織에서 他組織으로의 GSH 移動을 容易하게 할 것이며, 이것은 湯劑 抽出物 自體가 비록 腦關門을 通過하지 못하더라도 肝 組織내의 GSH를 保存함으로써 腦 組織을 間接적으로 保護할 수 있다는 可能性을 提示한다고 할 수 있다. 따라서, 본 實驗에서 使用된 湯劑 抽出物이 水溶性 分割으로서 腦組織을 直接的으로 保護하기에 어렵다고 보여지나 肝組織을 保護함으로써 間接적으로 腦組織에 保護 效果를 나타낼 수 있다고 思料된다.

Table IV. Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase Activity in Mouse Liver and Brain

Enzyme activity (unit/mg protein)	Brain		Liver	
	SOD	CAT	SOD	CAT
Y2	3.41 ± 0.66	2.84 ± 0.51	3.88 ± 0.35	9.63 ± 1.20
Y3	3.35 ± 0.49	3.21 ± 0.44	3.95 ± 0.33	10.48 ± 0.71
Control	3.14 ± 0.39	3.09 ± 0.4	4.01 ± 0.31	9.59 ± 0.55
AAPH	2.96 ± 0.22	2.77 ± 0.35	3.76 ± 0.40	8.71 ± 1.03

a) Average ± Standard deviation

Y2 : Sipyimiguanjungtang(十二味寬中湯) treated group

Y3 : Osuyubujayijungtang (吳茱萸附子理中湯) treated group

Control : Not treated group

AAPH : 2,2-azobis(2-amidinopropan) dihydrochloride treated group

나. 抗酸化 酵素

湯劑를 投與한 후 酸化의 스트레스를 加했을 때 體內的 重要 抗酸化 酵素인 superoxide dismutase

(SOD)와 catalase (CAT)의 活性을 살펴본 結果는 Table IV.와 같다. AAPH에 의한 SOD 및 CAT의 活性의 變化는 觀察할 수 없었으며, 湯劑 投與에 의한 活性의 有意의 增減 또한 觀察되지 않았다. 그러나 湯劑 投與群이 對照群이나 AAPH投與群에 비하여 統計的 有意性은 없었지만 비교적 높은 活性을 나타내어 미미하나마 抗酸化 防禦 體系에 도움을 줄 수 있을 것으로 思料된다.

IV. 考 察

老化란 生物의 生成과 成長 및 成熟 過程 後 時間의 흐름에 따라 나타나는 形態的, 機能的인 衰退로 死亡에 歸着되는 生理的인 現狀을 말한다. 韓醫學에서는 人間이 天壽를 누리지 못하는 이유는 生活習慣의 不節制함에 있다고 보았다. 따라서 生活習慣을 調節하는 養生方法과 身體를 活性化시키는 導引法, 藥物療法 등을 益壽하는 方法으로 提示하고 있다⁴⁷⁾.

李濟馬 역시 그 觀點을 마음의 攝生과 臟腑代射의 調節을 重視하였고 心身의 相關性을 論하여 病을 극복하여 몸과 마음의 健康을 유지하고 社會적 개체로서의 조화를 오래도록 유지할 수 있는 長壽를 최고의 福德으로 論하고 있으며ⁱ⁾, 人間 自身의 生活 調節 能力에 의해 減壽와 益壽가 可能하다는 壽命의 自律性을 提示하고 있다^{ii) 1-5)}.

人間の 平均壽命은 傳染病의 減少이후 增加하고 있으나 交通事故, 環境汚染, 産業災害등 새로운 要因들이 複雜하게 얽혀 人間の 壽命에 影響을 미치고 있다. 그러나 그런 外的인 要因을 除外하고 보면, 人間の 老化는 以前에 비해 천천히 進行되며 두터운

i) "人生之樂 有五 一曰壽 二曰美心術 三曰好讀書 四曰家產 五曰行世"(「格致藥·五福論」)

ii) "嬌省減壽 懶怠減壽 偏急減壽 貪慾減壽 簡約益壽 勤幹益壽 警戒益壽 聞見益壽"(「格致藥·勤壽論」)

老人層을 形成하게 되었다.⁴⁵⁾ 현재 우리나라의 60세이상 老人 人口는 1975년 總 人口의 5.6%에서 1990년에 7.6%로 增加되었고, 平均壽命도 1970년 63.15세에서 1995년 73.5세로 增加되었다. 세계적으로도 老人의 數는 增加되고 平均壽命도 늘어나고 있다. 老人 人口의 增加는 老化防止와 長壽에 대한 關心을 增加시키고 있으며 삶의 量과 함께 質이 重視되고 있다. 傳染性 疾患으로 死亡하는 比率은 줄어들었지만 現代人들은 惡性腫瘍 成人病 등에 오랜 기간 시달리는 比率이 늘어나고 있으며 精神疾患을 呼訴하는 患者數도 增加趨勢이다.⁴⁷⁾

WHO에서는 健康의 概念을 身體的·精神的·社會的으로 완전히 安寧한 狀態라고 보는데 壽命의 延長에 비해 健康의 滿足度는 그리 높지 못하다고 할 수 있다. 老化의 原因에 대해서는 program theory, error-catastrophe theory, somatic mutation theory, free radical theory, waste product theory, cross-linkage theory, waste&tear theory, tegulatory failure theory, rate of living theory, stress theory 등 여러 學說이 있다.⁵⁻⁶⁾

現代醫學에서 老化에 起因하는 重要한 疾病들 中에서 Alzheimer's disease, 癡呆 등은 현재 free radical이 mitochondrial DNA의 變化를 誘發시켜서 腦나 心臟의 老化를 促進하여 發生되는 것으로 알려져 있다.⁴⁹⁻⁵⁰⁾ Free radical은 人體에 있어서 에너지 代謝 過程中 電子 수송체로 사용되는 필수적인 존재인 酸素로부터 派生되어져 發生하는 活性 酸素(Reactive Oxygen Species, ROS)로서 細胞內의 거대 분자를 변성, 파괴하여 細胞의 항상성을 파괴시켜, 細胞를 死滅시키는 등의 副作用을 나타내고 老化를 促進하며 다양한 疾病을 誘發한다.⁷⁾ 이러한 活性酸素를 防禦하는 높은 抗酸化 活性을 가지면서

消化管에서의 吸收가 쉬운 SOD 類似物質(SOD-like substacne)의 開發이 절실한 실정이며,³⁰⁾ 韓方의 單味劑나 處方을 이용한 抗酸化劑를 개발연구가 요구되어진다. 이에 본 研究에서는 臨床에서 少陰人에 多用되는 表裏病證 處方을 選別하였다.^{3,35)}

少陰人 病證은 크게 腎受熱表熱病과 胃受寒裏寒病으로 大별되는데 腎受熱表熱病은 腎大로 인하여 腎陰이 왕성하며 腎의 腑인 大腸이 升陽 작용을 하지 못하고 鬱滯됨으로 인하여 發生하는데, 이는 크게 鬱狂證과 亡陽證으로 구별되고 모두 上升하지 못한 陽氣를 어떻게 상승시키느냐에 기본 治療방향이 정해지며 陽氣上升을 목표로 升陽益氣法을 사용한다.^{3,35)}

少陰人 表病證 鬱狂證에 사용되는 八物君子湯은 人蔘, 黃芪, 白朮, 白芍藥, 當歸, 川芎, 陳皮, 甘草, 生薑, 大棗로 構成되었으며 少陰人의 여러 病證에 아주 폭넓게 사용되는 處方이며, 亡陽證을 치료하는 升陽益氣附子湯은 人蔘, 桂枝, 白芍藥, 黃芪, 白何首烏, 官桂, 當歸, 甘草, 附子, 生薑, 大棗로 構成되어 陽氣를 補充해 주는데 주안점을 둔 處方이다.^{3,35)}

少陰人 胃受寒裏寒病은 少陰人이 脾小한 特徵을 지니므로 항상 脾陽이 不足하여 陰化되기 쉽고 升陽하는 기운이 부족하여 생긴 陰實之氣의 輕重에 의해 太陰證과 少陰證으로 구별된다. 鬱滯된 陰實之氣를 내려주는 것을 根本으로 하여 太陰證은 溫氣가 寒氣를 밀어내는 것으로 溫氣를 도와주면서 裏陰을 내려주는 溫胃降陰法이고 少陰證은 深部に 영향이 미친 狀態이므로 脾氣를 도와주면서 降陰시키는 健脾降陰法이다.^{3,35)}

裏病證 太陰病을 치료하는 十味寬中湯은 白何首烏, 赤何首烏, 良薑, 乾薑, 陳皮, 青皮, 香附子, 益智仁, 厚朴, 枳實, 木香, 大腹皮로 구성되는 少陰人

의 順氣理氣之劑이며 四肢倦怠, 小便不快, 陽道不興에 사용되는 處方이다.^{3,35)}

裏病證 少陰病을 치료하는 吳茱萸附子理中湯은 人蔘, 白朮, 乾薑, 官桂, 白芍藥, 陳皮, 甘草, 吳茱萸, 小茴香, 破古紙, 附子로 構成된 處方이다.^{3,35)}

抗酸化劑에 대한 研究는 1956년 Harmen에 의해서 活性 酸素가 老化를 進行시킨다는 假說을 發表함으로써 시작되어 1969년 Fridovich가 superoxide dismutase를 發見함으로써 본격화 되었다.⁵¹⁻⁵²⁾ 抗酸化劑에 대한 研究는 初期의 食品 添加物에서부터 始作하여 現在는 각종 疾病에 대한 疾病 治療劑로서의 역할로 領域을 넓히고 있다. 또한, 初期에 活性 酸素種을 직접 消去 할 수 있는 能力을 가진 抗酸化劑(Chain-breaking antioxidant)의 探索에서 현재는 活性 酸素種 생성 자체를 抑制하는 豫防的 抗酸化劑(preventive antioxidant)와 活性 酸素에 의해서 발생한 損傷을 復舊하는 復舊 抗酸化劑(recovery antioxidant)까지 그 領域을 넓히며 활발하게 研究가 이루어지고 있다.²⁸⁾ 이러한 抗酸化劑의 開發은 주로 天然物로부터의 探索이 이루어지고 있으며, 국내에서도 많은 研究機關에서 좀더 효율적인 抗酸化劑의 探索이 많이 이루어지고 있다.

韓醫學에서 使用되는 韓藥材들은 天然으로부터 구해지는 것으로 高等식물이 많이 함유하고 있는 강력한 抗酸化劑 성분인 polyphenol이나 carotenoid를 다량으로 함유하고 있을 것으로 생각된다.

본 논문에서는 상기 4가지 處方에 대한 抗酸化力을 測定하고 이들을 흰쥐에게 投與하였을 때, 腦와 肝 組織의 抗酸化力 增強 效果를 觀察하였다.

抗酸化力의 測定 方法은 free radical의 發生을 直接的으로 測定하는 ESR(electron spin resonance) 등의 直接的 測定 方法과 free radical과 試料의 抗酸化劑間의 競爭의 反應으로 탐침자의 酸化를 抑制

하는 것을 測定하는 間接的인 測定 方法으로 區分된다. 間接的 測定 方法은 다양한 free radical 發生 原 下에서 試料의 抗酸化力을 測定하여 각 free radical에 대한 試料의 親和力을 測定하게 된다. 본 實驗에서는 이렇게 사용되는 間接的인 方法중 DPPH radical에의 電子供與能, pyrogallol 自動酸化에 따른 superoxide anion radical 消去能 및 不飽和 脂肪酸 過酸化 抑制 方法을 利用한 peroxy radical 消去能, hydroxyl radical 消去能을 測定하였다. 이 중 superoxide anion radical 消去能은 生體內에서 發生하는 일차적 活性 酸素로 알려져 있기 때문에 活性 酸素에 의한 毒性을 初期에 抑制할 수 있다는 점에서 매우 重要하다고 할 수 있다.¹²⁾ 또한, 發生한 superoxide anion radical은 SOD의 活性 또는 自然的 不均化 反應(dismutation)에 의해서 hydrogen peroxide로 轉換되며 이는 금속 이온 존재하에서 Fenton 반응을 통하여 hydroxyl radical로 轉換되고, 이것이 生체내에서 주된 손상의 주범으로 알려져 있다.⁵³⁻⁵⁴⁾ 발생된 活性 酸素로 인해서 손상 받은 脂質은 peroxy radical로 轉換되어 脂質膜에서 chain reaction이 發生한다.¹⁶⁾ 따라서, 이러한 活性酸素種에 대한 試料의 消去能을 測定한 結果 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯이 비교적 좋은 活性를 나타내었다. 또한, 赤血球(red blood cell)를 이용한 peroxy radical 消去能에서도 같은 結果를 나타내었으며, Human hepatoblastoma인 HepG2 cell line에서의 結果도 동일한 結果를 나타내었다.

이러한 in vitro 實驗을 바탕으로 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯을 이용하여 in vivo 實驗을 行하였다. 細胞 培養 및 實驗 動物을 이용한 抗酸化力 實驗에서 酸化的 스트레스의 環境 造成은 매우 중요한 일이라고 할 수 있다. 현재까지는 Fenton

reaction을 이용한 hydrogen peroxide나, 脂質過酸化물의 유사물인 t-butylhydroperoxide, cumen hydroperoxide 등이 사용되며, 이외에도 자외선 조사와 같은 방법도 이용된다. 이중 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)는 水溶液上에서 peroxy radical을 발생시키는 Azo系 化合物로서 100-200시간까지 일정한 속도로 peroxy radical을 발생시키기 때문에 안정적으로 지속적인 酸化的 스트레스를 가할 수 있다는 장점으로 peroxy radical의 역학 조사에 많이 이용되고 있다.⁵⁵⁾

AAPH를 4주간 탕제 투여한 흰쥐에 腹腔으로 注入하여 실제 生體內에 酸化的 스트레스를 주었을 때의 湯劑의 效果를 觀察하는 in vivo 實驗을 行하였다. 湯劑만을 4주간 投與했을 때 血清 GOT의 水準은 對照群과 差異를 보여주지 않아 湯劑 自體에 의한 毒性은 없는 것으로 推測된다. AAPH 投與後 血漿의 總抗酸化力(TAS)를 測定한 結果 약 50%정도 減少하여 AAPH에 의해서 體內的 抗酸化 防禦 시스템의 弱화가 일어나고 있다는 것을 알 수 있었다. 湯劑 投與群의 경우 吳茱萸附子理中湯 投與群은 總抗酸化力の 低下를 抑制하지 못했지만 十二味寬中湯 投與群은 總抗酸化力の 減少를 抑制하는 結果를 보였으며, 이는 catechin의 투여로 체내 總抗酸化力이 增強된다는 보고⁵⁶⁾에서와 같이 湯劑 投與로 體內的 總抗酸化力이 增強된 結果로 思料되었다. 이러한 總抗酸化力の 增加는 肝 組織과 腦 組織에서 還元型 glutathione의 增加와 酸化型 glutathione의 減少 등이 반영된 것이라고 推測된다. 이렇게 十二味寬中湯 投與로 強化된 抗酸化力은 體內 酸化的 損傷을 代表하는 血漿 脂質過酸化물의 抑制와 non-protein thiol 그룹 減少의 抑制로 나타났다. 이러한 血漿 抗酸化力の 增加는 十二味寬中湯 投與群의 경우 腦

組織과 肝組織에서 酸化的 損傷을 輕減시키고 體內 重要 抗酸化劑인 glutathione의 還元 狀態 保存에도 중요한 역할을 한 것으로 推測된다. 그러나 血漿 抗酸化力을 增強시키지 못한 吳茱萸附子理中湯 投與群은 비록 AAPH 投與로 發生된 腦 組織의 脂質過酸化를 抑制하지는 못하였고, 蛋白質 分解度에 있어서는 肝과 腦 組織 모두에서 有意的으로 抑制하여 비교적 좋은 抗酸化力을 보인 것으로 思料된다.

본 論文은 少陰人 表裏病證에 活用되는 4가지 處方의 抗酸化力을 檢證한 結果 비교적 높은 抗酸化 效果를 가진 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯으로 實驗 동물을 사용하여 腦와 肝組織에서 抗酸化 效果를 檢證하였다. 그 結果 十二味寬中湯 投與群은 腦와 肝組織 모두에서 有意的인 抗酸化 效果를 나타내어 여러 가지 原因으로 나타나는 體內 酸化的 損傷에 有益한 效果를 가져올 수 있다고 思料된다. 吳茱萸附子理中湯 投與群 역시 肝組織에서 有意的 抗酸化 效果를 보였으나 血漿 및 腦組織에서 抗酸化 效果는 十二味寬中湯에 비하여 떨어졌다.

이상의 實驗 結果로 少陰人 裏病證에 사용되는 十二味寬中湯, 吳茱萸附子理中湯이 表病證에 사용되는 八物君子湯과 升陽益氣附子湯보다 活性酸素에 의한 細胞의 酸化的 損傷을 抑制하는 效果가 높은 것으로 나타났다.

八物君子湯과 升陽益氣附子湯은 虛證을 補하는 目的으로 사용되는 處方이며, 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯은 少陰人 裏病 病證論에서 包括的인 雜病 治療 目的으로 臨床에서 폭넓게 사용되는 處方이다. 본 論文에서 升陽益氣藥보다 調氣, 順氣, 理氣 治療하는 藥인 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯이 抗酸化 活性이 높게 나타난 結果는 臨床에서 이들 處方の 活用度가 높은 것을 고려할 때 抗酸化防止와 老化 豫防에도 그 活用價値를 높일 수 있는 基礎資

料로 活用할 수 있다고 思料된다.

V. 結 論

少陰人 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯의 抗酸化 效能을 檢證하기 위해, 藥材의 抗酸化力을 測定하였으며, 흰쥐에 投與하여 腦와 肝 組織의 抗酸化力 增強 效果를 實驗한 結果 有意性 있는 成績을 얻었기에 報告하는 바이다.

1. 活性酸素種(DPPH radical, superoxide anion radical, peroxy radical, hydroxyl radical)에 대한 試料의 消去能을 測定한 結果 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯은 비교적 높은 抗酸化 活性을 보여주었다.
2. HepG2 細胞株와 赤血球를 이용한 抗酸化力 實驗에서 十二味寬中湯이 강한 水溶性 抗酸化劑로 알려진 vitaminC와 유사한 結果를 보였다.
3. 十二味寬中湯과 吳茱萸附子理中湯의 毒性 實驗에서 檢液을 4週間 投與한 實驗用 흰쥐에게 投與한 結果 毒性反應은 나타나지 않았다.
4. 活性 酸素 發生劑인 2,2'-azobis (amidino-propane) dihydrochloride (AAPH)를 實驗用 흰쥐에게 投與한 實驗에서는 十二味寬中湯이 血漿 總抗酸化力, 血漿 脂質過酸化 및 血漿 thiol 그룹의 減少가 억제되었다.
5. AAPH로 酸化的 損傷을 誘發한 흰쥐에서의 湯劑 保護 效果測定實驗에서 十二味寬中湯은 肝, 腦 組織 및 體內에서 有意性 있는 抗酸化 效果가 있었고, 吳茱萸附子理中湯은 制限的인 效果가 있었다.

VI. 參考文獻

1. 李濟馬 : 格致藥. 咸興, 韓國弘方, 昭和十五年
2. 한주석 외 : 동의수세보원과 제중신편의 양생장 수론에 대한 고찰. 사상의학회지, 3(1) : 141-149, 1991
3. 李濟馬 : 東醫壽世保元. 서울, 杏林出版, 1986
4. 宋一炳 : 알기쉬운 사상의학. 서울, 하나미디어, 1993
5. 이세연, 김달래 : 장수와 사상체질과의 상관성에 관한 연구. 사상의학회지, 10(1) : 295-309, 1998
6. 서순규 : 성인병·노인의학. 서울, 고려의학, 1992
7. 오유진 : 활성산소가 질병의 원인이었다. 서울, 이화문화출판사, 1997
8. Minito, G. Aust, S.D. : Redox cycling of iron and lipid peroxidation. Lipids, 27(3) : 219-226, 1993
9. Bulkey, G.B. : The role of oxygen free radicals in human disease processes. Surgery, 94(3) : 407-411, 1993
10. Pryor, W.A. : Free radicals in biology. New York, Academic Press, 1981
11. Patole, M.S. and A. Ramasarma, T. : Generation of H₂O₂ in brain mitochondria. J. Neurochem. 47(1) : 1-35, 1986
12. Nohl, H., Hegner, D. : Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo. Eur. J. Biochem. 82 : 563-567, 1978
13. Haliwell, B. : Oxidant and human disease: Some new concepts. FASEB J., 1 : 358-364, 1989

14. Halliwell, B and Gutterudgem, J.M.C : Free radicals in biology and medicine. 2nd Ed. Oxford Univ. Press. Oxford, 1989
15. Fridovich, I : Superoxide dismutase. Annu. Rev. Biochem. 44 : 147-159, 1975
16. Mairino, M., Coassin, M. and Roveri, A : Microsomal lipid peroxidation: Effects of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Lipids, 24(8) : 721-726, 1989
17. Halliwell, B. : Free radical and antioxidant : A personal view. Nurt. Review. 52(8) : 253-265, 1994
18. Maxwell, SRJ : Prospects for the use of antioxidant therapies. Drugs, 49(3) : 345-361, 1995
19. 安相源, 李哲浚 : 國內論文(35)에 나타난 抗老化 및 抗酸化의 實驗的 研究에 對한 檢索. 大韓韓醫學會誌, 19(2) : 373-390, 1998
20. 裴基采 : 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
21. 文진영외 : 柴胡가 free radical에 의한 脂質 過酸化物 生成에 미치는 效果. 東國論文自然科學篇, 15 : 361-375, 1996
22. 尹一智 : 六味地黃湯이 老化 RAT의 肝內 過酸化脂質 및 代謝酵素系에 미치는 影響. 大田大學校大學院, 1998
23. 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 酵素系의 活性增加 效果에 대한 研究. 大韓韓醫學會誌, 17(1) : 465-477, 1996
24. 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
25. 이현숙 : 更年1號丸의 抗酸化 活性에 관한 研究. 東國論集, 15 : 343-357, 1996
26. 金貞淑 : 山查 抽出物의 抗酸化 效果에 關하여. 啓明研究論集, 19 : 281-298, 1991
27. 崔榮辰 外 : 生薑 추출物의 抗酸化 效果. 關東論文集, 20 : 93-104, 1992
28. 조한숙외 : 노화과정의 흰쥐에서 보간환이 간장의 대사효소계에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집, 8(1) : 711-726, 1999
29. 安相源, 李哲浚 : 地黃湯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) : 593-623, 1999
30. 한국한의학회연구원보고서 : 노화지연을 위한 한약재의 효능연구. 서울, 한국한의학회연구원, 1998
31. 成日煥 : 抗酸化作用에 對한 杜沖藥藥針의 實驗的 研究. 大田大學校大學院, 1996
32. 李鐘賢 : 白何首烏 藥針의 抗酸化 作用에 關한 實驗的 研究. 大田大學校 大學院, 1997
33. 金永海 外 : 胡桃藥針液의 抗酸化 效果에 對한 研究. 大韓韓醫學會誌, 17(2) : 8-18, 1997
34. 尹哲浩 外 : 흰쥐의 肝 組織에서 鹿茸 藥針製劑의 抗酸化 作用에 關한 研究. 大韓韓醫學會誌, 17(2) : 191-202, 1996
35. 전국한의과대학 사상의학교실 엮음 : 사상의학. 서울, 집문당, 1997

36. Tomohiro, T., Kitatani, F. and Yagi, A. : A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by murine bacteria from fish and shellfish. *Biol. Biotech. Biochem.* 58 : 1780-1782, 1994
37. Marklund, S and Marlund, G : Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *J. Biochem.* 47 : 469-474, 1974
38. Mossaman, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immuno. Method.* 65 : 55-63, 1983
39. Kameda, K., Imai, M. and Senjo, M. : The effect of vitamin E deficiency on some erythrocyte membrane properties. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 31 : 481-490, 1985
40. Yagi, K. : A simple fluoremetric assay for lipid peroxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15 : 212-216, 1976
41. Nishiyama, J., Kuninori, T. : Assay of biological thiols by a combination of high-performance liquid chromatography and postcolumn reaction with 6,6'-dithiodinicotinic acid. *Anal Biochem.* 138(1) : 95-98, 1986
42. Davies, KJA and Goldberg, AL : Protein damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracted of red blood cell. *Biol. Chem.* 262 : 8227-8235, 1987
43. Hissin, PJ and Hilf, R. : A fluorometric methods for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74 : 214-226, 1976
44. Aebi, H. : Catalase In *Methods of enzymatic analysis*. H.U.Vergmeyer, eds. Vol 2. Academic press. New York. 1974
45. Draper, HH, McGirr, LG and Hadley, M. : The metabolism of malondialdehyde. *Lipids* 21 : 4-8, 1986
46. Udupi, V., Rice-Evans, C. : Thiol compounds as protective agents in erythrocyte under oxidative stress. *Free Radical. Res. Commun.* 16 : 315-323, 1992
47. 이정복 : 장수학. 서울, 의성당: 492, 1987
48. 김숙희 외 : 노화. 서울, 민음사, 1995
49. 김정숙 외 : 노화방지를 위한 한약재의 효능연구(1). *한국한의학회연구소논문집*, 1(1) : 401-418, 1995
50. 최진호 : 노화의 메커니즘과 연구방향. *생화학 뉴스, 한국생화학*, 5(3) : 39-53, 1985
51. Harman, D : A theory based on free radicals and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11 : 2980-3003, 1956
52. Fridovich, I. : Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247 : 1-11, 1986
53. Poli, G., Albano, E. and Dianzani, MU : Free radicals from basic science to medicine. *MCBU* : 400-411, 1993

54. Satoh, K, Sakagami, H. : Effects of copper and iron ions on cytotoxicity induced by ascorbate, gallate and caffeate. *Anticancer Res.* 17(3C) : 2181-2184, 1997
55. Niki, E. : Free radical initiators as source of Water- or Lipid-soluble peroxy radicals. In *Oxygen radicals in biological system*, eds, Packer, L. Academic press. 1993
56. Hof, KH, Boer HS and Tijburg, LB : Consumption of green or black tea dose not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 66(5) : 1125-1132, 1997