

六味地黃湯의 항산화작용에 관한 연구

문성식 · 김병수 · 강정수*

대전대학교 한의과대학 생리학교실

Study on antioxidant action of Yukmijihwang-tang

Seong Sik Moon, Byoung Soo Kim, Jung Soo Kang*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

In order to examine the antioxidant actions of YMJHT, the study was done through measurement of parameters such as LPO(lipidperoxidation), GSH(glutathione), SOD(superoxidation dismutase), catalase, GOT, GPT, ALP, the results were obtained as follows: For the weight changes, in the testis the group given YMJHT showed significant increase compared to the control group. In the left cerebrum, the group given YMJHT showed significant increase compared to the control group on the activities of SOD, catalase. In the right cerebrum, the group given YMJHT showed significant decrease on the content of LPO and showed significant increase on the activity of catalase. In the cerebellum, the group given YMJHT showed significant decrease on the content of LPO and showed significant increase on the activities of SOD, catalase. In the liver, the group given YMJHT showed significant decrease on the content of GSH and showed significant increase on the activity of SOD. In the kidney, the group given YMJHT showed significant decrease on the contents of GSH, GSH and showed significant increase on the activities of SOD, catalase. In the testis, the group given YMJHT showed significant decrease on the contents of LPO, GSH and showed significant increase on the activity of SOD. From above results, the antioxidant action of YMJHT is effective. And it is expected to be necessary to the study of the mechanism in the antioxidant of YMJHT.

Key words : Yukmijihwang-tang(六味地黃湯), LPO(lipidperoxidation), GSH(glutathione), SOD(superoxidation dismutase), catalase, GOT, GPT, ALP

서론

노화란 생명체의 성장과 동시에 진행되는 일련의 반응으로서 생명체의 발육, 성장, 성숙과 쇠퇴의 생물학적 과정에서 형태적 기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저하로 사망에 귀착되는 보편적인 생리현상을 말한다^{1,2}. 노화의 원인설로는 생물학적, 생화학적, 생리학적 및 형태학적 원인설 등³⁻⁶이 있는데, 이 중 생화학적 원인설의 하나인 free radical theory가 유력시되고 있다. Free radical theory란 대사과정에서 발생하는 superoxide anion(O²⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂) 및 hydroxy radical(OH) 등의 자유유리기가 체내에 축적되어 노화 및 만성 퇴행성 질병의 원인이 된다^{3,7-8}고 보는 것으로, 자유遊離基가 축적되는 것을 방지하기 위하여 정상세포는 O²⁻를 분해하는 superoxide dismutase(SOD)와 H₂O₂을 분해하는 catalase와 같은 효소들을 가지고 있다⁹⁻¹⁰는 이

론이다. 한의학에서는 『素問·上古天眞論』¹¹에서는 “女子七歲, 腎氣盛... 五七, 陽明脈衰, 面始焦, 髮始墮... 七七, 任脈虛, 太衝脈衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形壞而無子也... 丈夫八歲, 腎氣實... 五八, 腎氣衰, 髮墮齒槁... 八八, 則齒髮去, 腎者主水, 受五藏六府之精而藏之”, “天壽過度, 氣脈相通, 而腎氣有餘也”라 하였고, 『靈樞·天年篇』¹¹에 “五十歲, 肝氣始衰, 肝葉始薄, 膽汁始減, 目視不明... 九十歲, 腎氣焦, 四藏經脈空虛, 百歲五臟皆虛 神氣皆怯”이라 하여 腎氣虛衰가 노화와 관련이 있다고 하였다.

六味地黃湯은 腎氣虛乏으로 인한 腎怯失音, 腦開不合, 神不足, 目中白睛多 등에 應用되는 方劑¹⁶로, 이에 대한 抗酸化 연구로는 尹 등¹²⁻¹⁴은 六味地黃湯을 기본방으로 하는 左歸陰과 右歸陰이 過酸化脂質의 生成을 抑制하고 活性酸素 분해계 酵素活性을 增加시킴을, 尹¹⁵은 六味地黃湯이 노화현위의 肝內 過酸化脂質 및 代謝酵素系에 긍정적인 영향을 미침을 보고하였으나, 各臟器에서의 抗산화 작용에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

이에 저자는 六味地黃湯이 各臟器에 대한 抗산화 작용을 실험적으로 입증하고자, 연령이 20개월 된 自然 老化白鼠에 六味

* 교신저자 : 강정수, 대전시 중구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
· E-mail : omdkjs@dju.ac.kr, Tel : 042-280-2617
· 접수 : 2003/02/05 · 수정 : 2003/03/07 · 채택 : 2003/03/31

地黃湯檢液을 투여하고, 左腦, 右腦, 小腦, 肝臟, 腎臟, 脾臟, 睪丸의 중량과 이들 臟器의 過酸化脂質(LPO), glutathione(GSH) 함량, catalase, SOD 活性度 및 GOT, GPT, ALP의 活性度を 測定한 결과 유의성있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 연령이 20개월 된 Sprague-Dawley계(SD) 웅성 백서를 사용하였으며, 실험 당일까지 고형사료(조단백질 22.1%이하, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%, 인 0.4%이상, 삼양사 배합 사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 22±2 °C, 상대 습도 50±10%, 조명 시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 六味地黃湯 처방은 『小兒藥證直訣』¹⁶⁾에 의거하였으며, 약재는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입, 정선하여 사용하였고, 처방 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Compositions of Yukmijhwang-tang Extracts

韓藥名	生藥名	量(g)
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	16
山藥	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	8
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	8
白茯苓	<i>Poria Cocos</i>	4
牡丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	4
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	4
Total Amount		44

3) 시약 및 기기

실험에 사용된 시약은 2-thiobarbituric acid(TBA), trichloroacetic acid(TCA), 5, 5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), hydrogen peroxide(H₂O₂), ethylene-diaminetetraacetic acid(EDTA), chloroform, hematoxylin, potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄), potassium phosphate dibasic(K₂HPO₄) 등은 Sigma社(Sigma Chem. Co., U.S.A.), ferric sulfate (FeSO₄), batanol, sulfosalicylic acid는 Junsei社(Junsei Chem. Co., Japan)로부터 구입하였으며, glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate-pyruvate transaminase(GPT), alkaline phosphatase (ALP) 측정 kit은 Hitachi社(Hitachi Co., Japan)로부터, ethanol은 Merck社(Merck Chem. Co., Germany)로부터 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 Round flask, Rotary vacuum evaporator(Buchi 461, Germany), Centrifuge(GS-6R, Beckman Co., U.S.A.), Spectrophotometer(Shimadzu, Japan), Autoclave(Hirayama, Japan), Micro pipet(Gilson, U.S.A), Water bath(Vision, Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 제조 및 투여

六味地黃湯(이하 YMJHT이라 한다) 8첩을 증류수 2,000ml에 3시간 가열 추출하고, 침전물을 3회 濾別(3M filter paper)한 후, 3,000ml round flask에 넣고 여과액을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. Round flask에 농축된 용액을 -70°C deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24 시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 28.5g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다. YMJHT 투여군은 농축된 YMJHT을 3주일간 매일 119mg/kg의 농도로 경구 투여하였다.

2) 酵素原의 제조

실험 동물을 ether로 痲醉시킨 후 腹部正中線을 따라 절개하고 腹部大動脈을 통하여 채혈한 후, 각 臟器를 적출하여 생리식염수로 혈액 및 기타 이물질 제거하였다. 조직 1g당 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 조직분쇄기로 磨碎하였다. 이 磨碎液을 600×g에서 10분간 원심분리하여 核 및 未磨碎 부분을 제거한 상등액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 이 상등액 105,000×g에서 1시간 초원심분리하여 cytosolic fraction을 얻고, 12,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 얻었다. 痲醉液으로 지질과산화 및 glutathione의 함량을 측정하였으며, cytosolic fraction은 superoxide dismutase 활성 측정의 효소원으로, mitochondrial fraction은 catalase의 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 따로 규정이 없는 한 4°C 이하에서 행하였다.

3) 過酸化脂質(LPO) 함량 측정(TBA 측정)

조직 1g당 4배량의 potassium phosphate buffer를 가해 磨碎하고 이 磨碎液 200µl에 蒸溜水 1.3ml, 20% TCA에 1mM 농도로 녹인 FeSO₄ 용액 500µl를 넣고 5초 동안 vortex mixer로 혼합하였다. 0.8% TBA 용액 1ml을 test tube에 가하고, clean dry marble(유리구슬)를 올려놓은 후, 20분간 water bath에서 끓였다. 그리고 찬물에 담가 식힌 후, butanol 5ml를 첨가하여 완전히 섞어 준 다음 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 실험에 사용하였다. 532nm에서 吸光度를 측정하였으며, 조직 단위 g당 過酸化脂質의 농도는 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$\text{吸光度} \times \text{factor} = \text{nmoles/g of tissue} \quad \text{Factor} : 32.051$$

4) Glutathione(GSH)의 함량 측정

조직 1g당 4배량의 potassium phosphate buffer를 가해 마쇄한 용액 200µl에 증류수 0.3ml, 4% sulfosalicylic acid 용액 500µl를 넣고 섞어 준 후, 3,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액 300µl에 0.1mM DTNB 발색시약 2.7ml를 넣고 실온에서 20분간 방치한 후 412nm에서 흡광도를 측정하였으며, 조직 단위 g당 GSH의 농도는 아래의 식에 의해 產出하였다.

$$\text{吸光度} \times \text{factor} = \mu\text{moles/g of tissue} \quad \text{Factor} : 9.75$$

5) Catalase 활성도 측정

Mitochondrial fraction에 0.1M potassium phosphate

buffer (pH 7.4) 2~3ml를 넣고 얼렸다 녹였다 하는 과정을 3회 반복하여 막단백질인 catalase를 유리시켰다. 기질은 50mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 10.5mM H₂O₂를 넣어 조제하였다. 반응은 25℃에서 5분간 예비 반응시킨 기질에 mitochondria 분획 20μl를 넣어 섞어 준 후 240nm에서 0초와 30초의 흡광도를 측정하였으며, catalase 활성도는 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Unit : nmole H}_2\text{O}_2 \text{ decreased/mg protein/min}$$

$$= \text{吸光度} \times \text{factor/사용한 酵素量에 해당하는 protein量}$$

$$\text{Factor : } 24.390 \text{ nmole/cc} \times \text{time(min)} \times \text{total volume(ml)}$$

6) Superoxide dismutase(SOD)의 활성도 측정

Cytosolic fraction에 ethanol : chloroform(5:3)용액을 0.4배량 첨가하여 섞어 준 후, 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 실험에 이용하였다. 상층액 10μl를 0.1mM EDTA가 첨가된 50mM potassium phosphate buffer 2.93ml에 가한 후, 실온에서 15분간 반응시켰다. 그런 다음 50mM hematoxylin 60μl를 첨가한 후, 560nm에서 0분, 4분의 흡광도를 측정하였으며, SOD 활성도는 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Unit(50\% inhibition of autoxidation of hematoxylin)}$$

$$= \text{Control unit} \div \text{test OD/mg protein}$$

$$\text{Control unit : (control 4분 OD - control 0분 OD)/2}$$

$$\text{Test OD : sample 4분 OD - sample 0분 OD}$$

7) Glutamate-oxaloacetate transaminase(GOT) 활성도 측정

血清 10μl에 GOT 효소액(malate dehydrogenase, nicotinamide adenine nucleotide) 300μl를 넣고, 37℃에서 3분간 반응시킨 후, GOT 기질액(L-aspartate, 2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol buffer) 90μl를 첨가하여 37℃, 48~216초 동안 반응시켜 415nm와 340nm의 흡광도를 측정하였다.

8) Glutamate-pyruvate transaminase(GPT) 활성도 측정

血清 10μl에 GPT 효소제(lactate dehydrogenase, nicotinamide adenine nucleotide) 300μl를 넣고, 37℃에서 3분간 반응시킨 후, GPT 기질액(L-alanine, 2-amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol buffer) 90μl를 첨가하여 37℃, 48~216초 동안 반응시켜 415nm와 340nm의 흡광도를 측정하였다.

9) Alkaline phosphatase(ALP) 활성도 측정

血清 4μl에 ALP 완충액(Magnesium chloride, 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer) 300μl를 넣고, 37℃에서 3분간 반응시킨 후, ALP 기질제(p-Nitrophenyl phosphate) 70μl를 첨가하여 37℃, 48~264초 동안 반응시켜 505nm와 415nm의 흡광도를 측정하였다.

결 과

1. 各 臟器의 증량

各 臟器의 증량은 체중에 대한 비율로 표시하였는데, 辜丸에서는 대조군이 0.0072±0.0002(%)인데 비하여, YMJHT 투여군에서 0.0101±0.0006(%)로 나타나 유의성(p<0.01)있는 증가를 보였고, 다른 臟器에서는 YMJHT를 장기적으로 투여한 군에서 증가되었으나 유의성은 없었다(Table 2).

Table 2. Effect of YMJHT on the Weight of Organs

Group	% of body weight	
	Control	YMJHT
Left cerebrum	0.0012±0.0003	0.0018±0.0004
Right cerebrum	0.0013±0.0007	0.0020±0.0004
Cerebellum	0.0011±0.0003	0.0017±0.0004
Liver	0.025±0.0028	0.027±0.0007
Kidney	0.0068±0.0011	0.0074±0.0008
Spleen	0.0019±0.0002	0.0028±0.0004
Testis	0.0072±0.0002	0.0101±0.0006**

Body weight of control : 388.0±21.3(g). Body weight of YMJHT treated group : 372.5±3.94(g). * : Statistically significant as compared with data of control(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

2. 腦에서의 항산화 효과

1) 左腦에서의 항산화 효과

左腦에서 LPO 함량은 대조군과 YMJHT 투여군에서 각각 13.93±0.75, 12.05±0.71(nmoles/g tissue)로, GSH 함량은 각각 0.93±0.09, 0.94±0.08(μmoles/g tissue)로, SOD 활성도는 29.4±2.6, 56.9±7.2(unit/mg protein/min)로, catalase 활성도는 188.2±15.6, 421.2±44.7(μmoles/mg protein/min)로 나타나, SOD, catalase 활성도에서 YMJHT 투여군이 대조군에 비하여 유의성(p<0.05, p<0.01)있는 결과가 나타났다(Table 3).

Table 3. Effect of YMJHT on the Content of LPO, GSH and Activity of SOD and Catalase in Left Cerebrum

	Unit	Control	YMJHT
LPO	nmoles/g tissue	13.93±0.75	12.05±0.71
GSH	μmoles/g tissue	0.93±0.09	0.94±0.08
SOD	unit/mg protein/min	29.4±2.6	43.76±3.8
Catalase	μmoles/mg protein/min	188.2±15.6	421.2±44.7 [~]

Control : None treated group. YMJHT : YMJHT treated group. * : Statistically significant value compared with control data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

2) 右腦에서의 항산화 효과

右腦에서 LPO 함량은 대조군과 YMJHT 투여군에서 각각 10.02±0.21, 8.66±0.14(nmoles/g tissue)로 유의성(p<0.01)있는 감소를 나타내었고, GSH 함량은 각각 0.88±0.11, 0.87±0.10(μmoles/g tissue)로, SOD 활성도는 54.5±6.2, 61.5±4.3(unit/mg protein/min)으로 대조군과 큰 차이가 나지 않았으며, catalase 활성도는 133.6±83.5, 347.8±34.1(μmoles/mg protein /min)으로 대조군에 비하여 유의성(p<0.001)있는 결과가 나타났다(Table 4).

Table 4. Effect of YMJHT on the Content of LPO, GSH and Activity of SOD and Catalase in Right Cerebrum

	Unit	Control	YMJHT
LPO	nmoles/g tissue	10.02±0.21	8.66±0.14 [~]
GSH	μmoles/g tissue	0.88±0.11	0.87±0.10
SOD	unit/mg protein/min	54.5±6.2	61.5±4.3
Catalase	μmoles/mg protein/min	133.6±83.3	347.8±34.1 [~]

Control : None treated group. YMJHT : YMJHT treated group. * : Statistically significant value compared with control data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

3) 小腦에서의 항산화 효과

小腦에서 LPO 함량은 대조군과 YMJHT 투여군에서 각각 7.31±0.01, 6.36±0.07(nmoles/g tissue)로 유의성(p<0.001)있는 감소를 나타내었고, GSH 함량은 각각 0.61±0.09, 0.55±0.03 (μmoles/g tissue)로 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았으며, SOD 활성도는 44.6±7.6, 69.6±2.7(unit/mg protein/min)로, catalase 활성도는 70.1±3.4, 165.4±5.4(μmoles/mg protein/min)로 대조군에 비하여 유의성(p<0.05, p<0.001)있게 증가하였다(Table 5).

Table 5. Effect of YMJHT on the Content of LPO, GSH and Activity of SOD and Catalase in Cerebellum

	Unit	Control	YMJHT
LPO	nmoles/g tissue	7.31±0.01	6.36±0.07 ^{***}
GSH	μmoles/g tissue	0.61±0.09	0.55±0.03
SOD	unit/mg protein/min	44.6±7.6	69.6±2.7 [*]
Catalase	μmoles/mg protein/min	70.1±3.4	165.4±5.4 ^{***}

Control : None treated group, YMJHT : YMJHT treated group. * : Statically significant value compared with control data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

3. 肝臟에서의 항산화 효과

肝臟에서 LPO 함량은 대조군과 YMJHT 투여군에서 각각 2.21±0.13, 2.03±0.17(nmoles/g tissue)로, catalase 활성도는 151.0±17.3, 156.3±9.3(μmoles/mg protein /min)로 유의성있는 결과가 나타나지 않았고, GSH 함량은 각각 5.24±0.19, 4.24±0.31(μmoles/g tissue)로 유의성(p<0.05)있는 감소를, SOD 활성도는 119.8±14.1, 290.7±18.1(unit/mg protein/min)로 유의성(p<0.001) 있는 증가를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Effect of YMJHT on the Content of LPO, GSH and Activity of SOD and Catalase in Liver

	Unit	Control	YMJHT
LPO	nmoles/g tissue	2.21±0.13	2.03±0.17
GSH	μmoles/g tissue	5.24±0.19	4.24±0.31 [*]
SOD	unit/mg protein/min	119.8±14.1	290.7±18.1 ^{***}
Catalase	μmoles/mg protein/min	151.0±17.3	156.3±9.3

Control : None treated group, YMJHT : YMJHT treated group. * : Statically significant value compared with control data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

4. 腎臟에서의 항산화 효과

Table 7. Effect of YMJHT on the Content of LPO, GSH and Activity of SOD and Catalase in Kidney

	Unit	Control	YMJHT
LPO	nmoles/g tissue	3.92±0.22	1.92±0.15 ^{**}
GSH	μmoles/g tissue	2.43±0.12	1.75±0.13 ^{**}
SOD	unit/mg protein/min	53.0±11.2	150.4±9.5 ^{***}
Catalase	μmoles/mg protein/min	37.5±1.5	70.8±4.9 ^{***}

Control : None treated group, YMJHT : YMJHT treated group. * : Statically significant value compared with control data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

腎臟에서 LPO 함량은 대조군과 YMJHT 투여군에서 각각

3.92±0.22, 1.92±0.15(nmoles/g tissue)로, GSH 함량은 각각 2.43±0.12, 1.75±0.13(μmoles/g tissue)로 나타나 유의성(p<0.01, p<0.01)있는 감소를 나타내었고, SOD 활성도는 53.0±11.2, 150.4±9.5(unit/mg protein/min)로, catalase 활성도는 151.0±17.3, 70.8±4.9(μmoles/mg protein /min)로 유의성(p<0.01, p<0.001)있는 증가를 나타내었다(Table 7).

5. 脾臟에서의 항산화 효과

脾臟에서 LPO 함량은 대조군과 YMJHT 투여군에서 각각 4.43±0.16, 4.45±0.12 (nmoles/g tissue)로, GSH 함량은 각각 1.21±0.20, 1.00±0.23(μmoles/g tissue)로, SOD 활성도는 31.5±5.8, 32.9±2.6(unit/mg protein/min)로, catalase 활성도는 17.9±6.2, 23.9±5.7(μmoles/mg protein /min)로 나타나 유의성있는 결과가 나타나지 않았다(Table 8).

Table 8. Effect of YMJHT on the Content of LPO, GSH and Activity of SOD and Catalase in Spleen

	Unit	Control	YMJHT
LPO	nmoles/g tissue	4.43±0.16	4.45±0.12
GSH	μmoles/g tissue	1.21±0.20	1.00±0.23
SOD	unit/mg protein/min	31.5±5.8	32.9±2.6
Catalase	μmoles/mg protein/min	17.9±6.2	23.9±5.7

Control : None treated group, YMJHT : YMJHT treated group

6. 辜丸에서의 항산화 효과

辜丸에서 LPO 함량은 對照群과 YMJHT 투여군에서 각각 2.23±0.21, 1.78±0.07(nmoles/g tissue)로, GSH 함량은 각각 3.33±0.16, 2.82±0.14(μmoles/g tissue)로 나타나 유의성(p<0.05, p<0.05)있는 감소를 나타내었고, SOD는 255.9±13.1, 878.7±20.7 (unit/mg protein/min)로 유의성(p<0.001)있는 증가를 나타낸 반면, catalase는 26.1±4.9, 41.9±6.7(μmoles/mg protein /min)로 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 9).

Table 9. Effect of YMJHT on the Content of LPO, GSH and Activity of SOD and Catalase in Testis

	Unit	Control	YMJHT
LPO	nmoles/g tissue	2.23±0.21	1.78±0.07
GSH	μmoles/g tissue	3.33±0.16	2.82±0.14 [*]
SOD	unit/mg protein/min	255.9±13.1	878.7±20.7 ^{***}
Catalase	μmoles/mg protein/min	26.1±4.9	50.0±7.5

Control : None treated group, YMJHT : YMJHT treated group. * : Statically significant value compared with control data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

7. 血清酵素들의 활성도 변화

血清중에 존재하는 관련 효소들의 활성도 변화에서, GOT는 대조군이 335±39(IU/L)인데 비하여 YMJHT 투여군이 175±21 (IU/L), GPT는 대조군이 63±5(IU/L)인데 비하여 YMJHT 투여군이 43±3(IU/L)로 유의성(p<0.05, p<0.05)있는 감소를 나타내었고, ALP는 대조군이 584±61(IU/L)인데 비하여 YMJHT 투여군 439±

82(IU/L)로 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 10).

Table 10. Effect of YMJHT on GOT, GPT and ALP Activities in Serum

Test Group	Serum enzymes		
	GOT(IU/L)	GPT(IU/L)	ALP(IU/L)
Control	335±39	63±5	584±61
YMJHT	175±21*	43±3*	439±82

Control : None treated group, YMJHT : YMJHT treated group, * : Statically significant value compared with control data by T test(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

고찰

노화란 인체의 노년기에 나타나는 노인성 변화로 발육, 성장, 성숙과 노화의 생물학적 과정에서 형태적·기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저하로 사망에 귀착되는 보편적인 생리현상³⁾을 말하며, 노화현상으로는 두발, 피부 등의 외관상 변화와 신체 및 장기중량 감소 등의 형태적 변화와 지적, 인격적 기능 저하, 심리적 변화 등이 나타나는 것이 일반적인 특징이다^{4,5)}.

西洋醫學에서 보는 노화의 원인에 대해서 생물학적 원인설로 消耗說, 新陳代謝速度說, 內分泌說, 生氣說, 衝擊說, 中毒說, 臟器의 原發性萎縮說, 세포화설, 突然變異說, 細胞遺傳學說, 자기면역설 등이 있고, 생화학적 원인설로는 DNA설, 화학반응설, collagen의 노화설, free Radical설, 酵素作用障礙說 등이 있으며, 형태학적 원인설로는 組織再生機能의 노화, 세포수의 변화와 노화, 핵의 변화와 노화, 결합조직의 노화 등이 있으며, 생리학적 원인으로는 항상성의 파탄, 적응력의 결함, 반응력의 변화, 臟器들의 예비력 감소설 등^{4-6,24-29)}이 있는데, 최근에는 Harman에 의해 제창된 free radical에 의한 연쇄적인 유해반응의 결과로 노화 과정이 진행된다는 학설이 유력한 것으로 보고되고 있다^{7,24,28)}. Free radical은 인체의 radiation에 의한 노출이나 内部酵素反應에 의하여 생성되는데, 蛋白質의 -SH기와 반응하여 효소의 활성을 잃게 되거나 假橋結合의 촉진, DNA, RNA, 효소 및 membrane에 損傷을 일으켜 세포괴사를 유발한다²⁹⁾. 즉, free radical theory는 代謝過程에서 發生하는 superoxide anion(O²⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂) 및 hydroxy radical(OH) 등의 free radical이 세포나 결합조직에 작용하여 해로운 물질을 생성하게 되고 이것이 축적된 결과가 노화와 만성 퇴행성 질병의 근본적인 원인이라고 보는 것으로, free radical이 축적되는 것을 방지하기 위하여 정상세포는 O²⁻를 분해하는 SOD, H₂O₂을 분해하는 catalase같은 효소들을 가지게 된다^{5,31)}.

한의학에서는 『素問·上古天真論』¹¹⁾에 “女子七歲 腎氣盛……七七 任脈虛 太衝脈衰少 天癸竭 地道不通 故形壞而無子也. 丈夫八歲 腎氣實……八八 則齒髮去 腎者主水 受五臟六府之精而藏之”, “天壽過度 氣脈相通 而腎氣有餘也”라 하였고, 虞는 “腎元盛則壽延, 腎元衰則壽夭”라 하여 腎臟의 성쇠가 노화와 수명에 깊은 관련이 있음을 언급하였다. 『素問·陰陽應象大論』³²⁾에 “年四十, 而陰氣自半也, 起居衰矣. 年五十, 體重, 耳目不聰明矣, 年六十, 陰痿, 氣大衰, 九竅不利, 下虛上實, 涕泣俱出矣”라 하였

고, 『靈樞·天年篇』³³⁾에 “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, 神氣皆去”라 하여 가령에 따른 각 器管의 구조적, 기능적 변화를 언급하였다. 임상에서 노쇠로 인하여 나타나는 耳目不聽, 心失神則健忘, 飲食無味, 腰痠, 陰虧 증상과 各種運動器 장애 등이 주로 腎과 상생관계에 있는 肝의 기능 저하에 의해 유발되므로 肝, 腎의 기능이 노화와 밀접한 관련이 있는 것으로 사려된다.

六味地黃湯은 張仲景³⁴⁾의 『金匱要略』方劑中 八味丸에서 肉桂와 附子를 거하고 六味地黃丸의 분량을 1/20로 줄인 것으로 錢乙¹⁶⁾의 『小兒藥證直訣』에 최초로 수록된 이후 腎氣虛乏으로 인한 諸證百病을 치료하는 방제^{16,36-42)}로 治諸虛損, 腎水不足, 補腎水, 能生精, 補精滋陰, 補真陰, 補益腎陰 및 滋補肝腎 等の 效能²⁶⁻⁴³⁾이 있어, 形體瘦弱, 四肢無力, 腎虛惡寒, 發熱咳嗽, 盜汗自汗, 頭眩目眩, 耳鳴耳聾, 牙齒痛, 腰痛, 腰膝痠軟, 消渴淋瀝, 遺精夢泄, 精液不足, 短尿, 夜尿, 小便頻數, 月經不順 및 食慾不振 等^{36-39,43,25-27)}의 증상에 대응되는 처방이다. 六味地黃湯을 구성하는 재료의 약성과 主治症을 살펴보면, 熟地黃은 氣味가 甘微苦微溫하며 補血, 滋腎水, 益陰한다²⁶⁻⁶⁴⁾. 山藥은 氣味가 甘澁溫하며 補氣虛損補虛扶弱, 補中益氣力, 虛勞羸瘦, 健脾胃, 充五臟한다. 山茱萸는 氣味가 酸溫이며 補肝腎, 滋陰養血, 補腎氣, 滋精氣, 固氣, 溫中, 溫肝, 強陰益精, 安五臟한다. 牡丹皮는 氣味가 辛苦微寒하며 理血消瘀血, 涼血熱, 清伏火한다. 茯苓은 氣味가 甘淡平하며 和中益氣, 滲水行痰한다. 澤瀉는 氣味가 甘鹹寒하며 滲濕利水, 補虛損, 滲濕熱한다²⁶⁻⁴⁰⁾. 六味地黃湯에 대한 실험적 연구로는 李²⁵⁾가 六味地黃湯이 成長發育의 촉진, 腦機能의 활성화, 세포면역기능증가 등의 효능이 있다고 보고하였고, 安¹³⁾은 急性腎不全에, 宋 等³⁵⁻⁴¹⁾은 血糖降下에, 吳⁴⁴⁾는 抗疲勞에 각각 효능이 있다고 보고하였으며, 尹 等¹²⁻¹⁵⁾은 六味地黃湯을 기본방으로 하는 左歸陰과 右歸陰이 過酸化脂質의 생성을 억제하고 활성산소 분해계 효소활성을 증가시켜 항산화 효과가 있음을 보고하였으나, 各 臟器에서의 항산화 작용에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 이에 六味地黃湯의 臟器別 抗酸化 작용을 실험적으로 입증하고자, 연령이 20개월 된 노화백서에 六味地黃湯을 투여하고, 左腦, 右腦, 小腦, 肝, 腎, 脾, 睪丸의 중량변화와 이들 臟器에서의 LPO 함량, GSH 함량, catalase와 SOD 활성度, GOT, GPT, ALP의 활성도를 측정하였다.

본 실험에서 腦, 肝臟, 脾臟, 腎臟, 睪丸 등을 選擇하게 된 것은 이들 臟器가 노화와 관련이 있기 때문이다. 腦神經系統는 腦室의 확대, 腦회전의 萎縮, 神經細胞數의 감소, 腦質量의 감소, 動脈內膜의 細胞增殖과 肥厚와 內膜下層과 內彈力膜의 섬유화와 退行性變成 등의 腦血管의 老化, 老化色素(lipofuscin) 함량의 증가, alzheimer型 原纖維變化, 老人斑, 顆粒空砲變成, 神經축삭의 萎縮, 세포내 붕입체의 형성 등 沈着物의 형성이 나타난다⁵⁻⁶⁾. 肝臟은 인체내 대사를 總括하는 臟器로 모든 生理物質을 합성 또는 분해하여 에너지를 供給해 주고 貯藏하며, 外因性 및 內因性 毒物物質을 산화, 還元, 메틸화, 아세틸화 또는 포함시켜 解毒하는 기능을 갖고 있다. 근래에 와서 各種 stress 및 화학물질에 의한 肝損傷은 사회적으로 지대한 관심의 대상이 되고 있는데, 이

러한 화학물질에 의한 肝損傷의 기전은 일반적으로 생체 조직세포의 생체막 구성성분인 多價不飽和脂肪酸의 過酸化가 그 한가지 원인^{20,21)}으로 지적되고 있다. 腎臟은 구조적인 면에서 남녀 공히 30대 이후로 腎臟의 무게는 줄어들기 시작하여 80대에 이르면 9~43%의 감소가 있다고 하며, 기능적인 면에서 腎機能은 30대 이후부터 연령이 증가함에 따라 저하되는 것²²⁾으로 알려져 있다. 또한 睪丸의 기능은 출생후 3개월 동안 상승한 채로 유지하다가 6개월에서 1년이 되면 낮은 수준으로 떨어진다. 그리고 나서 사춘기가 시작할 때 남자 어린이에서 상승하기 시작해서 約 17세에 이르러 성인 수준에 도달한다. 평균 血漿値는 成人期부터 중년 말까지 다소 一定하게 유지되고 그 후 수십년동안 천천히 감소한다. 감소된 테스토스테론 치의 원인은 睪丸의 라이디히 세포수의 감소 때문인 것 같다. 또한 老年에는 세정관 기능이 저하되고 정자생산이 감소²³⁾하기 때문이다.

본 실험에서 腦, 肝臟, 脾臟, 腎臟, 睪丸의 중량에 대하여 비교 결과, 이들 臟器에서 重量의 증가는 있었으나 유의성은 없었으며, 睪丸에서만 대조군에 비해 YMJHT 투여군이 유의성(p<0.01)있게 증가하였는데 이는 六味地黃湯이 노화 白鼠의 대사 기능을 활성화시켜 중량 증가를 가져온 것으로 사려된다(Table 2). LPO는 체내의 不飽和脂肪酸이 free radical의 작용에 의해 변화된 脂質 過酸化物로서 血液中の LPO의 함량은 체내의 脂質 過酸化物의 代謝狀況을 反映하는 것³⁸⁾으로, 이에 대하여 張^{37,38)} 등은 건강한 사람의 血漿內的 LPO 함량이 나이가 증가함에 따라 높아진다고 하였다. 본 실험에서 LPO 함량은 대조군에 비하여 YMJHT 투여군이 右腦(p<0.01), 小腦(p<0.001), 腎臟(p<0.01), 睪丸(p<0.05)에서 有意性있는 감소를 나타내었다(Table 4-5,7,9). 이러한 脂質 過酸化의 감소는 투여된 六味地黃湯이 체내 抗氧化系의 酵素活性를 증가시키는 역할을 했거나 그 외의 다른 기전에 의해 脂質의 過산화 반응을 감소시킨 것으로 사려된다. SOD는 인체 내에 過산화반응 방어기구 중의 하나이며, 생체에서 xanthine oxidase, aldehyde oxidase 등의 효소반응의 결과로 생성되어진 superoxide anion radical을 H₂O₂로 쉽게 전환시키는 것으로 活性酸素를 除去하는 작용을 가지고 있다³⁹⁾. 각 장기의 SOD 활성도를 측정된 결과, 대조군에 비하여 YMJHT 투여군이 左腦(p<0.05), 小腦(p<0.05), 肝臟(p<0.001), 腎臟(p<0.01), 睪丸(p<0.001)에서 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 3,5-7,9). 이는 六味地黃湯에 鹿茸, 人蔘을 가한 삼용지황탕이 SOD 活性를 상승시켜 뇌조직의 노화를 억제한다는 金³⁰⁾의 報告와 類似한 것이며, 六味地黃湯이 腦, 肝臟, 腎臟, 睪丸의 SOD 활성화시켜 H₂O와 O₂로 분해함으로써 過산화물의 생성을 억제시킨 바라고 추측되어진다. Catalase는 동식물 조직 중에 널리 분포하고 있으며 인체에는 赤血球, 肝, 腎臟 등에 풍부하며 대개 preoxisomes 內에 存在하는 것으로 알려져 있으며³³⁾, 생체내 호흡의 유해산물인 過산화수소를 빨리 제거하기 위한 효소로 암환자의 간에서 catalase 활성이 정상인에 비해 감소한다. 본 실험에는 각 臟器의 catalase 활성도를 측정된 결과, 대조군에 비해 YMJHT 투여군이 左·右·小腦(p<0.001), 腎臟(p<0.001)에서 유의성있는 증가를 보였다(Table 3-5,7). 이는 六味地黃湯이 腦, 腎臟의 기능을 강화하여

“腎怯失音, 腦開不合, 神不足, 目中白睛多”¹⁶⁾에 쓰인다는 『小兒藥證直訣』의 方解와 부합하는 것이다. GSH는 호흡에 있어서 酸素의 傳達體로 작용하는데, 酸化型 GSH는 vitamin E와 더불어 不飽和脂肪酸의 過산화를 방지하며, 缺乏症狀도 vitamin E 결핍증상과 매우 흡사하여 肝의 壞死, 筋肉弱화, 溶血, 心筋弱化症 등이 있다³³⁾. 각 臟器에서 GSH 함량을 측정된 결과, 대조군에 비하여 YMJHT 투여군이 肝臟(p<0.05), 腎臟(p<0.01), 睪丸(p<0.05)에서 유의성있는 감소를 보였다(Table 6-7,9). 이는 정상적인 노화과정을 보이는 마우스에 定志丸¹⁹⁾을 투여하여 GSH 함량이 감소한 것과 일치하는 결과이나, 當歸藥鍼液¹⁷⁾, 胡桃藥鍼液¹⁸⁾ 投與時에 GSH 함량이 증가하는 것과는 상반되는 결과로서 이에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 사려된다. 血清內에 존재하는 GOT, GPT, ALP 효소들의 활성도를 측정된 결과, 對照群에 비하여 YMJHT 투여군에서 GOT, GPT, ALP 모두 감소를 보였으나, GOT, GPT에서만 유의성(p<0.05)이 인정되었다(Table 10). 이는 定志丸¹⁹⁾의 실험 결과와 유사한 것으로 YMJHT이 肝臟과 腎臟에 작용을 하여 血清 內에 효소들에 일정한 영향을 미친 것으로 보인다.

이상의 결과를 총괄해보면, 六味地黃湯은 腦, 肝臟, 腎臟 및 睪丸에서, 특히 腦와 睪丸에서 유의성있는 항산화효과를 나타내었다. 이는 六味地黃湯이 腦, 腎臟의 기능을 강화하여 “腎怯失音, 腦開不合, 神不足, 目中白睛多”¹⁶⁾에 쓰인다는 한의학 이론과 부합하는 것이며, 향후 이들 臟器에 대한 組織學的, 解剖學的 變化를 살펴보아야 할 것이며, 이러한 효과를 나타내는 정확한 기전에 대한 연구를 지속해야 할 것으로 사려된다.

결론

左腦, 右腦, 小腦, 肝臟, 腎臟, 脾臟, 睪丸에서 六味地黃湯의 抗氧化作用을 실험적으로 입증하고자, 자연 老化白鼠에 六味地黃湯檢液을 투여하고, 이들 臟器의 중량, LPO, GSH 함량과 SOD, catalase 활성도와 혈청내 효소인 GOT, GPT, ALP 활성도를 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

중량은 睪丸에서 YMJHT 투여군이 유의성있게 증가하였다. 左腦에서는 YMJHT 투여군에서 SOD와 catalase 활성도가 유의성있게 증가하였고, 右腦에서는 YMJHT 투여군에서 LPO 함량이 유의성있게 감소를, catalase 활성도가 유의성있게 증가하였으며, 小腦에서는 YMJHT 투여군에서 LPO 함량이 유의성있게 감소를, SOD와 catalase 활성도가 유의성있게 증가하였다. 肝臟에서는 YMJHT 투여군에서 GSH 함량이 유의성있게 감소를, SOD 활성도가 유의성있게 증가하였다. 腎臟에서는 YMJHT 투여군에서 LPO와 GSH 함량이 유의성있게 감소를, SOD와 catalase 활성도가 유의성있게 증가하였다. 脾臟에서는 YMJHT 투여군에서 GSH 含量이 감소를, LPO 含量과 SOD와 catalase 활성도는 증가하였으나 모두 유의성은 없었다. 睪丸에서는 YMJHT 투여군에서 LPO 함량, GSH 함량은 유의성있게 감소를, SOD 활성도는 유의성있게 증가하였다. 혈청내 GOT, GPT 활성도는 YMJHT 투여군에서 유의성있게 감소하였다.

이상의 결과로 보아 六味地黃湯은 항산화작용이 있으며, 앞으로 抗酸化作用의 기전에 관한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 최진호, 老化的 메카니즘과 研究方向, 生化學뉴스, 韓國生化學會, 5(3):39-53, 1985
2. 沈吉浩, 老化的 概念과 豫防, 成文出版社, pp. 15-17, 1987.
3. 徐舜圭, 成人病 · 老人病學, 서울, 高麗醫學, pp.9-18,28-30,33-35, 73-77, 107, 225-228, 251-254, 277-280, 343-344, 402, 475-477, 505-506, 1992.
4. 杜鎬京, 東醫腎系學, 서울, 東洋醫學研究員, pp.1325-1383, 1993.
5. 리정복, 長壽學, 서울, 醫聖堂, pp. 11-99, 492-576, 1987.
6. 李吉相, 世界 長壽村 探訪, 서울, 大光文化社, pp.199-203, 234-235, 241-242, 248, 1978.
7. 김숙희 · 김화영, 老化, 서울, 민음사, pp.77-85,94, 1991.
8. Barry, H, Oxidants and human disease, Some new concept. FASEB.J. 1:358-364, 1987.
9. Reiter RJ, Oxidative processes and antioxidative defence mechanism in the aging brain. FASEB J. 9:526-533, 1995.
10. Halliwell B, gutteridge JMC and Cross CE, Free radicals, antioxidants, and human diseases, Where are we now? J Lab Clin Med. 119:598-620, 1992.
11. 洪元植 編, 精校黃帝內經, 서울, 東洋醫學研究院, pp.19-20, 111,246,301, 1981.
12. 尹哲浩, 左歸飲과 右歸飲이 老化 Rat의 肝 過酸化脂質 生成 및 活性酵素生成系 酵素活性에 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌, 16(1):62-70, 1995.
13. 安世永, 五苓散 및 六味地黃湯이 Gentamicin Sulfate로 誘發된 白鼠의 急性腎不全에 미치는 影響, 慶熙大學校 論文集, 17(1):145-165, 1994.
14. 鄭智天, 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性酵素類의 消去作用과 抗酸化 酵素系의 活性增加效果에 對한 研究, 大韓韓醫學會誌, 17(1):21-36, 1996.
15. 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, 대전, 大田大學校大學院, 1988.
16. 錢乙, 小兒藥證直訣 江蘇, 江蘇科學技術出版社, p.47-48, 1983.
17. 安峻徹 外, 當歸藥鍼液의 抗酸化 效能에 관한 研究(II), 대한 침구학회지, 14(1):383-396, 1997.
18. 金永海 외, 桃葉鍼液의 抗酸化效果에 對한 研究, 대한침구학회지, 13(2):54-66, 1996.
19. 河在原, 定志丸이 老化에 미치는 影響, 대전대학교대학원, 1996.
20. Curtis, M. T., Gilfor, D and Farber, J. L., lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. Arch. Biochem. Biophys. p.235,644, 1984.
21. Cirotti, A.W., Thomas, J.P., and Jordan, J.E.: Lipid photooxidation in erythrocyte ghosts: sensitization of membranes toward ascorbate and superoxide-induced peroxidation and lysis. Arch. Biochem. Biophys. p.236,238, 1985.
22. 대한노인병학회, 노인병학, 서울, 의학출판사, p.727,740, 2000.
23. 해리슨 내과학 편찬위원회 편, HARRISON'S 내과학, 서울, 정담, p.2180,2184, 1997.
24. 李獻平 外, 四大懷藥延緩衰老作用의 研究, 서울, 中西醫結合雜誌, 11(8):486-487, 1991.
25. 李進容, 六味地黃丸의 小兒疾患治療에 對한 文獻의 考察, 大韓韓方小兒科學會誌, 4(1):51-64, 1990.
26. 李尙仁 外, 韓藥臨床應用, 서울, 成輔社, p.124,172,175,429,356, 395, 1982.
27. 尹吉榮, 東醫臨床方劑學, 서울, 明寶出版社, pp.185-186,319-320, 1985.
28. Cutler, R.G, Antioxidant, aging and longevity. Free Radicals in Biology(ed. Pryor, W.), Academic Press, 6:371-424, 1984.
29. Feher, J., Csomos, G and Vereckei, A, The free radical theory of aging Free Radicals Reactions in Medicine, Springer-Verlag, Berlin, pp.57-59, 1987.
30. 金保岡, 蓼茸地黃湯이 腦組織의 酸化作用에 미치는 影響, 대전대학교대학원, p.22, 1998.
31. 金永坤 · 金永杓, 프리라디칼, 서울, 麗文閣, pp. 31-35, 98-101, 259-260, 278-286, 396-400, 425-426, 564-568, 1997.
32. 南京中醫學院醫經教研組, 黃帝內經素問譯解, 上海, 上海科學技術出版社, pp.4-5,337, 1983.
33. 이귀영 外, 임상병리과일, 서울, 의학문화사, p.138,139,241,348, 1993.
34. 張仲景, 仲景全書, 서울, 大星文化社, pp.156-157,396,438, 1984.
35. 宋孝貞, 六味地黃湯加山藥이 Alloxan糖尿 白鼠의 血糖 및 血清變化에 미치는 影響, 慶熙醫學, 8(4):388-398, 1992.
36. 許浚, 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.147,449, 1987.
37. 허근 외, 脂質過酸化 反應과 Free Radical 生成系 酵素活性에 미치는 Testosterone의 影響, 藥學會誌, 38(2):166-173, 1994.
38. 張文彭 外, 老年腎虛證血漿過氧化脂質, 高密度脂蛋白, 膽固醇及基亞組分水平變化, 中醫雜誌, 30(2):43-46, 1989.
39. 中國中西醫結合雜誌編集委員會, 中國中西醫結合雜誌, 서울, 一中社, 13(4):14, 17-18, 1993.
40. 李尙仁, 本草學, 서울, 修書院, p.106,107,114,115,282,286, 1981.
41. 宋泰元, 熟地黃의 修治差異에 따른 六味地黃湯 煎湯液이 糖尿性 高脂血症에 미치는 影響, 韓方再活醫學會誌, 7(1):29-40, 1997.
42. 黃度淵, 方藥合編, 서울, 南山堂, p.175,199,211,241,166-167,244-245, 1990.
43. 張介賓, 景岳全書,台北, 台聯國風出版社, p.1073, 1980.
44. 吳皎錫, 雙和湯, 八物湯, 六味地黃湯 및 補中益氣湯 煎湯液의 抗疲勞 效果에 對한 比較研究, 大田大學校大學院, 1991.