

원 지

## 延齡固本丹 및 八味地黃湯이 Rat의 피부섬유아세포, 사구체 메산지움세포 및 혈관내피세포의 老化 遲延에 미치는 影響

박영준, 안영민, 안세영, 두호경  
경희대학교 한의과대학 신계내과학교실

### Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on the Population Doubling Number and the Population Time in Rat Fibroblasts, Heart-Endothelial Cells, Mesangial Cells

Young-Joon Park, Young-Min Ahn, Se-Young Ahn, Ho-Kyung Doo

Dept. of 6th Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University Seoul, Korea

**Objectives :** This paper is to investigate what effects *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* have on postponing senility in rat fibroblasts, heart-endothelial cells, mesangial cells.

**Methods :**

1. In vitro *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* controlled the growth of fibroblasts, heart-endothelial cells, mesangial cells, extended the PDT of them.

2. After feeding rats the drugs for 2 months, the fibroblasts, heart-endothelial cells, mesangial cells were cultured.

**Results :** 1) In fibroblasts the PDN was increased and the PDT was decreased at passage-1, 2 by *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang*( $p<0.05$ ).

2) In heart-endothelial cells the PDN was increased and the PDT was decreased at passage 8 by *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang*( $p<0.05$ ).

3) In mesangial cells the PDN was increased and the PDT was decreased at passage 4 by *Yeonryunggobondan*, the PDN was increased at passage 4 by *Palmijihwangtang*( $p<0.05$ ).

**Conclusions :** It is concluded that both *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* maybe be conductive to protect and delay the senescence of rat fibroblasts, heart-endothelial cells, mesangial cells.

**Key Words:** *Yeonryunggobondan*, *Palmijihwangtang*, Fibroblasts, Heart-Endothelial Cells, Mesangial Cells

## 서론

· 접수 : 2003년 7월 23일 · 논문심사 : 2003년 7월 27일  
· 채택 : 2003년 8월 18일  
· 교신저자 : 안영민, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희의료원  
한방병원 신계내과 (Tel: 02-958-9155, E-mail:  
omdan@hanmail.net)

최근 우리나라에서도 老齡 인구의 구성비가 급격한 증가추세를 보이고 있는데, 약 20년 후에는 노인 인구가 전체의 20% 정도를 점유할 것으로 예측되고 있어서 이에 따른 사회적, 의학적 대처방안이 절실히

요구되고 있다. 고령사회에서의 의학적 목표는 삶의 질을 높이면서 평균수명을 증가시키는 것이라고 할 수 있는 바, 無病長壽라는 인간의 원초적 욕구를 달성하기 위해 전 세계적으로 노화와 관련된 각종 연구가 활발히 진행되고 있다.

현재까지 보고된 노화의 원인에 대한 가설은 매우 많지만, 크게는 유전자에 의해 생명체의 노화와 수명이 예정되어 있다는 노화예정설(genetic programming theories of aging)과 여러 유해인자들에 의한 생체물질의 손상이 축적되어 노화에 이끈다는 유해인자 손상설(theories of aging related to primary damage)의 2가지로 대별된다. 1961년 Hayflick 등이 사람의 정상 이배체 섬유모세포가 *in vitro*에서 유한 횟수만 분열 증식할 수 있다는 것을 밝힌 이후, 노화는 세포의 분열 능력과 밀접한 관계가 있을 것이라는 주장이 더욱 설득력있게 받아들여지고 있다.

東洋醫學에서는 老化를 生體 衰退의 變化로 認識하고 있으며, 整體觀에 依據한 有機的 聯關下에 陰陽, 臟腑, 氣血, 經絡 및 精神의 變化 등으로 多樣하게 考察하고 있다. 老化의 原因에 대해서는 크게 先天稟賦不足과 後天 攝生失調로 나눌 수 있는데, 특히 東醫寶鑑에서는 '老因血衰'라 하여 精血의 虧虛를 老化의 가장 큰 원인으로 지목하여, 延年益壽의 한 방법으로 延齡固本丹 등과 같은 補精血의 效能이 있는 方劑를 복용할 것을 제시하였다.

이에 저자는 東洋醫學에서 抗老化의 效能이 있다고 인식되어 온 延齡固本丹과 八味地黃湯을 실험약제로 선정한 뒤, 실험동물의 피부 섬유아세포, 심장 혈관내피세포 및 사구체 메산지움세포의 세포분열 횟수와 시간을 지표로 설정하여 이들 方劑가 老化遲延에 미치는 영향을 검토한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 實驗動物 및 材料

#### 1) 動物

3-4週齡의 體重 150-200g 정도의 Sprague-Dawley 실험

白鼠를 자웅구별없이 고형사료(삼양유지사료 「주」 실험동물용)와 물을 충분히 공급하면서 2주일간 실험실 환경(24±2℃)에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다.

#### 2) 材料

본 실험에 사용한 약제는 경희의료원 한방병원 약제부에서 구입·정선하여 사용하였으며, 처방은 東醫寶鑑에 기재된 八味地黃湯과 延齡固本丹으로 1첩의 처방내용과 분량은 다음과 같다.

가. 八味地黃湯

나. 延齡固本丹

표-1. 팔미지황탕 구성 및 용량

藥物名	生藥名	重量(g)
熟地黃	Rehmanniae Radix	16
山藥	Dioscoreae Radix	8
山茱萸	Corni Fructus	8
白茯苓	Hoelen	6
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis	6
澤瀉	Alismatis Rhizoma	6
肉桂	Cassiae Cortex	2
附子	Aconiti Tuber	2
Total amount		54

표-2. 연령고본단 구성 및 용량

韓藥名	生藥名	分量(g)
絲子	Cuscutae Semen	25
肉蓯蓉	Cistanches Herba	25
天門冬	Asparagi Radix	12
麥門冬	Liriopsis Tuber	12
生地黃	Rehmanniae Radix	12
熟地黃	Rehmanniae Radix	12
山藥	Dioscoreae Radix	12
牛膝	Achyranthis Radix	12
杜沖	Eucommiae Cortex	12
巴戟	Morindae Radix	12
枸杞子	Lycii Fructus	12
山茱萸	Corni Fructus	12
白茯苓	Hoelen	12
五味子	Schizandrae Fructus	12
人蔘	Ginseng Radix	12
木香	Saussureae Radix	12
栝子仁	Biotae Semen	12
覆盆子	Rubi Fructus	9
車前子	Plantaginis Semen	9
地骨皮	Lycii Cortex Radicis	9
川椒	Zanthoxyli Fructus	6
石菖蒲	Acori Graminei Rhizoma	6
遠志	Polygalae Radix	6
澤瀉	Alismatis Rhizoma	6
Total amount		281

## 2. 方法

### 1) 檢液의 調製 및 投與

八味地黃湯은 처방내용의 30배 분량을, 延齡固本丹은 처방내용의 10배분량을, 경희의료원 한방병원 약제부의 액기스 추출방식에 의거하여 추출한 결과 八味地黃湯 乾燥 extract 390g과 延齡固本丹 乾燥 extract 550g을 얻었다.

조정제된 각각의 처방을, 다시 八味地黃湯은 ml 당 0.22g을, 延齡固本丹은 ml 당 0.31g을 증류수에 용해하여 실험동물 체중 100g 당 1ml씩 주 5회 2개월간 경구 투여하였으며, 2개월의 투약기간이 끝난 뒤에는 1개월간 자유급식 하에 사육하였다.

### 2) 細胞의 培養

#### (1) 皮膚 纖維芽細胞의 培養

실험동물의 복부에 thioglycolic acid 연고를 도포하여 털을 제거하고, 70% ethanol 및 10% iodine 용액으로 피부를 세척한 다음 피부 전층을 제거하였다.

제거한 피부는 여과 멸균된 70% ethanol 용액에 30초간 담귀 2차 소독하고 생리식염수로 세척한 후 1mm<sup>2</sup>크기의 절편으로 만들었다. 이 피부 절편을 세포배양용 접시에 부착시키고 우태아혈청(Fetal Bovine Serum; 이하 FBS로 약함)이 10%되게 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(이하 DMEM으로 약함)을 각 세포배양용 접시에 분주하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포가 90%정도 단층을 형성하면 0.05% Trysin-0.53mM EDTA 용액으로 처리하여 세포를 유리시켰고, 유리된 세포를 수확하여 2차 계대배양하였다.

#### (2) 心臟 血管內皮細胞의 培養

실험동물을 ether로 마취시킨 후 흉곽을 절개하여 심장을 적출한 뒤, 심장 중앙부에서 2등분하여 심장 내면을 노출시켜 Phosphate-Buffered Saline(이하 PBS로 약함)용액으로 세척하였다. 이 심장조직을 50ml 시험관에 넣고 여기에 2mg/ml의 collagenase(Sigma, Type 1A)용액 10ml를 첨가하여 37℃에서 20분간 처리하였다. collagenase처리에 의해 심장 내벽으로부터 유리된 혈관내피세포를 새 시험관에 옮겨 2차례 PBS 용액으로 세척한 다음 DMEM 기초 배양액에 FBS

10%, endothelial cell growth factor(이하 ECGF) 10ng/ml, insulin 10 $\mu$ g/ml, hydrocortisone 0.4 $\mu$ g/ml, ethanolamine 10<sup>-4</sup>M, phosphoethanolamine 10<sup>-4</sup>M, cholera toxin 0.1 $\mu$ g/ml, T<sub>3</sub> 20pM, adenine 0.18mM, transferrin 5 $\mu$ g/ml의 농도로 첨가된 배양액(이하 내피세포 완전배양액으로 약함)으로 부유시킨 후, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 세포가 90%의 단층을 형성하면 계대배양하였다.

#### (3) 絲毬體 메산지움細胞의 培養

실험동물의 복부를 절개하여 양 신장을 적출한 뒤, 신장의 피질을 벗겨내고 속의 사구체를 취하여 구경 200 $\mu$ m, 150 $\mu$ m 및 75 $\mu$ m의 체에 통과시켜서 75 $\mu$ m위에 모아진 것을 수확하였다. 수확된 사구체에 2mg/ml의 collagenase용액을 첨가하여 37℃ 배양기에서 20분간 처리한 후 PBS 용액으로 세척하였다. 이들 사구체를 DMEM 기초배양액에 FBS 15%, insulin 10 $\mu$ g/ml이 첨가된 배양액(이하 메산지움세포 완전 배양액)에 부유시켜 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하되, 세포가 90% 단층을 형성하면 계대배양하였다.

#### 3) 試驗管 內 細胞 壽命의 測定

각각의 세포가 시험관내에서의 배양체계가 수립되면 분열을 정지할 때까지 연속 계대배양하였다. 계대배양은 세포의 종류에 관계없이 배양용기 cm<sup>2</sup>면적당 10<sup>4</sup>세포를 파종하여 90% 단층을 형성하였을 때 수확하여 그 수를 계산하였다. 세포수의 계산은 세포부유액을 혈구계산판(hemocytometer)에 도말하여 현미경 하에서 측정하였다.

각 계대배양시 細胞倍加回數(population doubling number; PDN) 및 細胞倍加時間(population doubling time; PDT)은 다음의 공식에 의하여 산정하였다.

##### (1) 細胞倍加回數

$$\text{population doubling number} = (\log Y - \log X) / \log 2$$

log Y; 배양이 끝나고 수확된 세포의 수

log X; 배양 시작시 파종된 세포의 수

##### (2) 細胞倍加時間

$$\text{population doubling time(hr)} = \text{population doubling number} / t(\text{time, hr})$$

## 3. 統計處理

모든 성적은 평균±표준편차로 나타내었고, 대조군과 실험군(延齡固本丹, 八味地黃湯)간의 차이는 Student's *t*-test로 분석하여  $p<0.05$  이면 통계학적으로 유의한 것으로 하였다.

또한 八味地黃湯과 延齡固本丹의 유의성 차이인 변수간의 통계학적 유의성 검정은 PC program SAS ver.6.12를 이용하여 ANOVA와 최소 유의차(least significant difference, LSD)에 의한 다중비교방법(multiple comparison test)을 사용하였다.

## 결 과

1. *in vitro*에서 皮膚 纖維芽細胞, 心臟 血管內皮細胞 및 絲毯體 메산지움細胞의 細胞倍加回數와 細胞倍加時間에 미치는 影響

### 1) 皮膚 纖維芽細胞에서의 影響

Passage-4의 기간 중 시험관에 0.5%의 延齡固本丹과 八味地黃湯을 투여하고 白鼠의 皮膚 纖維芽細胞를 培養하여 대조군과 실험군의 세포배가회수(PDN)와 세포배가시간(PDT)을 비교 관찰하였다.

대조군에서는 PDN이  $2.85 \pm 0.16$ 배, PDT가  $60.0 \pm 1.12$ hr이었으나, 延齡固本丹 투여군에서는 PDN은  $1.32 \pm 0.19$ 배로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고( $p<0.05$ ), PDT는  $128.6 \pm 19.3$ hr로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다( $p<0.05$ ).

八味地黃湯 투여군에서는 PDN은  $2.01 \pm 0.38$ 배로 대조군에 비해 감소하였지만 유의성이 없었으며, 세포수(CN)는  $1.04 \pm 0.28 (\times 10^4)$ 로 대조군  $1.82 \pm 0.22 (\times 10^5)$ 에 비해 유의성이 있게 분열세포수 감소가 나타났고( $p<0.05$ ), PDT는  $84.9 \pm 16.4$ hr로 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타냈지만 유의성이 없었다(Table I, Fig. 1).

한편 세포의 성장에 있어서는 대조군에 비하여 延齡固本丹 투여군은 46.32%, 八味地黃湯 투여군은 70.53%의 수준으로 성장 억제, 즉 노화 지연 효과를 나타내었다(Table IV).

### 2) 心臟 血管內皮細胞에서의 影響

Passage-4의 기간 중 시험관에 0.5%의 延齡固本丹

과 八味地黃湯을 투여하고 白鼠의 心臟 血管內皮細胞를 培養하여 대조군과 실험군의 PDN과 PDT를 비교 관찰하였다.

대조군에서는 PDN이  $3.92 \pm 0.12$ 배, PDT가  $55.0 \pm 1.70$ hr이었으나, 延齡固本丹 투여군에서는 PDN은  $3.54 \pm 0.04$ 배로 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성이 없었고, PDT는  $60.9 \pm 0.84$ hr로 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으나 유의성이 없었다.

八味地黃湯 투여군에서는 PDN은  $3.61 \pm 0.12$ 로 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의하진 않았고, PDT는  $59.8 \pm 2.10$ hr로 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타냈지만 유의하진 않았다(Table II, Fig. 1).

한편 세포의 성장에 있어서는 대조군에 비하여 延齡固本丹 투여군은 90.31%, 八味地黃湯 투여군은 92.09%의 수준으로 성장 억제, 즉 노화 지연 효과를 나타내었다(Table IV).

### 3) 絲毯體 메산지움細胞에서의 影響

Passage-5의 기간 중 시험관에 0.5%의 延齡固本丹과 八味地黃湯을 투여하고 白鼠의 絲毯體 메산지움細胞를 培養하여 대조군과 실험군의 PDN과 PDT를 비교 관찰하였다.

대조군에서는 PDN이  $2.48 \pm 0.26$ 배, PDT가  $68.2 \pm 7.70$ hr이었으나, 延齡固本丹 투여군에서는 PDN은  $2.61 \pm 0.20$ 배로 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성이 없었고, PDT는  $78.0 \pm 7.60$ hr로 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으나 유의성이 없었다.

八味地黃湯 투여군에서는 PDN은  $2.14 \pm 0.28$ 배로 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성이 없었고, PDT는  $79.2 \pm 10.40$ hr로 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타냈지만 유의성이 없었다.(Table III, Fig. 1)

한편 세포의 성장에 있어서는 대조군에 비하여 延齡固本丹 투여군은 87.10%, 八味地黃湯 투여군은 86.29%의 수준으로 성장 억제, 즉 노화 지연 효과를 나타내었다(Table IV).

2. 皮膚 纖維芽細胞의 細胞倍加回數와 細胞倍加時間에 미치는 影響

1) 細胞倍加回數에 미치는 影響

延齡固本丹을 2개월간 경구 투여한 실험군과 동량

**Table 1.** The Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on the Population Doubling Number and Population Doubling Time in Rat Fibroblast at in vitro

Group	CN (단위: ×10 <sup>6</sup> )	PDN (단위: 배)	PDT (단위: 시간)
Control	1.82±0.22	2.85±0.16	60.0±1.21
<i>Yeonryunggobondan</i>	0.63±0.08*	1.32±0.19*	128.6±19.3*
<i>Palmijihwangtang</i>	1.04±0.28*	2.01±0.38	84.9±16.4

\* : p<0.05 significant difference compared with control

CN : Cell Number

PDN : Population Doubling Number

PDT : Population Doubling Time

**Table 2.** The Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on the Population Doubling Number and Population Doubling Time in Rat Heart-endothelial Cells at in vitro

Group	CN (단위: ×10 <sup>6</sup> )	PDN (단위: 배)	PDT (단위: 시간)
Control	1.53±0.13	3.92±0.12	55.0±1.70
<i>Yeonryunggobondan</i>	1.17±0.04	3.54±0.04	60.9±0.84
<i>Palmijihwangtang</i>	1.23±0.11	3.61±0.12	59.8±2.10

CN : Cell Number

PDN : Population Doubling Number

PDT : Population Doubling Time

**Table 3.** The Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on the Population Doubling Number and Population Doubling Time in Rat Mesangial Cells at in vitro

Group	CN (단위: ×10 <sup>6</sup> )	PDN (단위: 배)	PDT (단위: 시간)
Control	1.13±0.21	2.48±0.26	68.2±7.70
<i>Yeonryunggobondan</i>	0.91±0.12	2.16±0.20	78.0±7.60
<i>Palmijihwangtang</i>	0.90±0.18	2.14±0.28	79.2±10.4

CN : Cell Number

PDN : Population Doubling Number

PDT : Population Doubling Time

**Table 4.** The effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on the Growth of Fibroblast, Heart-Endothelial Cell and Mesangial Cell at in vitro

	Control	<i>Yeonryunggobondan</i>	<i>Palmijihwangtang</i>
Fibroblast	100	46.32	70.53
Endothelial cell	100	90.31	92.09
Mesangial cell	100	87.10	86.29

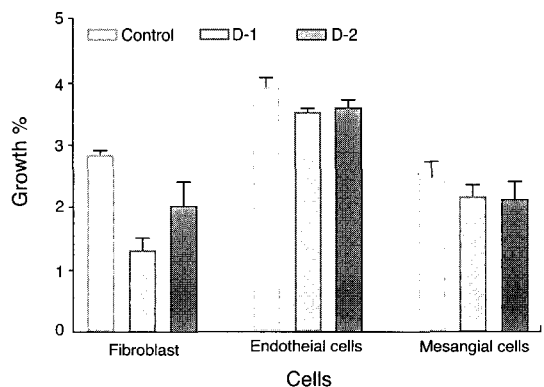
unit: %

의 생리식염수를 투여한 대조군의 피부 섬유아세포를 계대배양하여 PDN을 비교 관찰한 결과, Passage-1에서는 대조군의 PDN이 3.82±0.18배이었으나 延齡固本丹 투여군은 4.45±0.13배로 유의성 있게 증가하였고(p<0.05), Passage-2에서도 대조군의 경우 2.91±0.03배이었으나 延齡固本丹 투여군은 3.13±0.06배로 유의성 있게 증가하였다(p<0.05). 그러나 Passage-3, 4, 5, 6, 7에서는 延齡固本丹 투여군이 대조군에 비하여 오히려 감소하였다.

八味地黃湯을 2개월간 경구 투여한 실험군과 동량의 생리식염수를 투여한 대조군의 피부 섬유아세포를 계대배양하여 PDN을 비교 관찰한 결과, Passage-1에서는 八味地黃湯 투여군이 4.34±0.22배로 대조군에 비해 유의하게 증가하였고(p<0.05), Passage-2에서도 八味地黃湯 투여군은 3.27±0.10배로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며(p<0.05), Passage-7에서도 八味地黃湯 투여군은 1.71±0.17배로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(p<0.05). 그러나 Passage-3, 4, 5, 6, 7에서는 延齡固本丹 투여군처럼 현저하진 않았지만 대조군의 PDN에 비하여 오히려 감소하였다 (Table V, Fig. 2).

2) 細胞倍加時間에 미치는 影響

延齡固本丹을 2개월간 경구 투여한 실험군과 동량



**Fig. 1.** Effects of each Drug on the Growth of Fibroblast, Heart-Endothelial Cell and Mesangial Cell at in Vitro

D-1: *Yeonryunggobondan*, D-2: *Palmijihwangtang* Effects of each Drug on the Growth of Fibroblast, Heart-Endothelial Cell and Mesangial Cell at in Vitro

D-1: *Yeonryunggobondan*, D-2: *Palmijihwangtang*

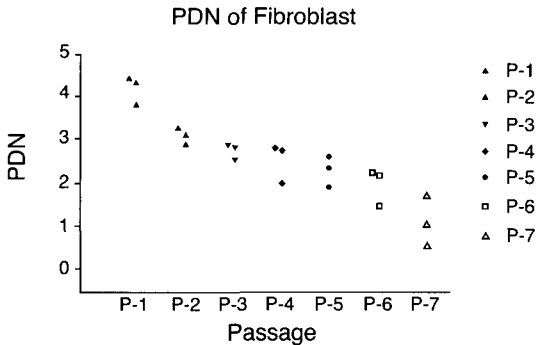


Fig. 2. The Effects of *Yeonryunggobondan*, *Palmijihwangtang* on Population Doubling NumberN in the Fibroblast

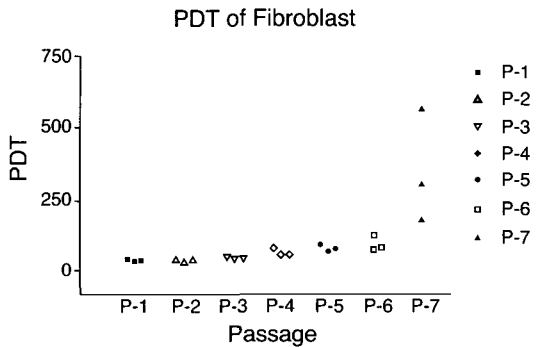


Fig. 3. The Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on Population Doubling Timer in the Fibroblast

Table 5. The Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on Population Doubling Number in the Fibroblast

	Control	<i>Yeonryunggobondan</i>	<i>Palmijihwangtang</i>
Passage No.1 9/18-9/24	3.82±0.17	4.45±0.13*	4.34±0.22*
Passage No.2 9/24-9/30	2.91±0.03	3.13±0.06*	3.27±0.10*
Passage No.3 9/30-10/5	2.83±0.42	2.51±0.39	2.78±0.12
Passage No.4 10/5-10/12	2.78±0.08	2.00±0.04*	2.76±0.15
Passage No.5 10/12-10/19	2.58±0.22	1.86±0.07*	2.31±0.05
Passage No.6 10/19-10/26	2.21±0.16	1.41±0.28*	2.14±0.07
Passage No.7 10/26-11/8	1.04±0.10	0.57±0.14*	1.71±0.17*

\* :  $p < 0.05$  significant difference compared with control, unit: 배  
 \*\* : Multiple comparison test(Means with the same letter are not significantly different at the 0.05 level).

Table 6. The Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on Population Doubling Time in the Fibroblast

	Control	<i>Yeonryunggobondan</i>	<i>Palmijihwangtang</i>
Passage No.1 9/18-9/24	37.6±1.72	32.3±1.01*	33.1±1.74*
Passage No.2 9/24-9/30	41.3±0.70	40.7±2.62	36.6±1.20*
Passage No.3 9/30-10/5	43.0±6.76	48.6±7.6	43.1±1.92
Passage No.4 10/5-10/12	60.3±1.74	83.7±1.90*	60.9±3.42
Passage No.5 10/12-10/19	65.2±5.50	90.09±3.95*	72.5±1.70
Passage No.6 10/19-10/26	76.1±5.7	122.3±27.0*	78.4±2.57
Passage No.7 10/26-11/8	301.9±31.1	565.5±148.0*	182.9±17.2*

\* :  $p < 0.05$  significant difference compared with control, unit: time

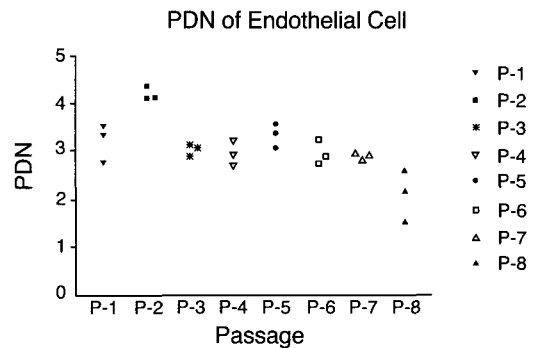


Fig. 4. The Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on Population Doubling Number in the Heart-Endothelial Cells

의 생리식염수를 투여한 대조군의 피부 섬유아세포를 계대배양하여 PDT를 비교 관찰한 결과, Passage-1에서는 대조군의 경우 37.6±1.72hr이었으나 延齡固本丹 투여군에서는 32.3±1.01hr로 유의하게 감소하였고( $p < 0.05$ ), Passage-2에서는 대조군이 41.3±0.7hr이었으나 延齡固本丹 투여군은 40.7±2.62hr로 유의성 없이 감소하였다. 그러나 Passage-3, 4, 5, 6, 7에서는 延齡固本丹 투여군의 PDT가 대조군에 비하여 오히려 현저히 증가하였다.

八味地黄湯을 2개월간 경구 투여한 실험군과 동량

**Table 7.** The Effects of *Yeonryungobondan* and *Palmijihwangtang* on Population Doubling Number in the Heart-Endothelial Cells

	Control	<i>Yeonryungobondan</i>	<i>Palmijihwangtang</i>
Passage No.1 9/9-9/14	3.37±0.15	3.53±0.09 B	2.75±0.17' A
Passage No.2 9/14-9/21	4.09±0.12	4.38±0.14 A	4.13±0.37 A
Passage No.3 9/21-9/27	3.11±0.07	2.93±0.05' A	3.08±0.42 A
Passage No.4 9/27-10/4	3.22±0.14	2.65±0.12' A	2.90±0.14' A
Passage No.5 10/4-10/13	3.52±0.12	3.06±0.32 A	3.36±0.08 A
Passage No.6 10/13-10/22	3.23±0.18	2.88±0.12 A	2.74±0.32 A
Passage No.7 10/22-10/31	2.96±0.13	2.94±0.24 A	2.85±0.20 A
Passage No.8 10/31-11/8	1.54±0.31	2.18±0.20' A	2.61±0.26' A

\* :  $p < 0.05$  significant difference compared with control, \*\* : Multiple comparison test (Means with the same letter are not significantly different at the 0.05 level). 단위: 배

의 생리식염수를 투여한 대조군의 피부 섬유아세포를 계대배양하여 비교 관찰한 결과, Passage-1에서는 八味地黃湯 투여군은  $33.1 \pm 1.74$ hr로 대조군에 비해 유의하게 감소하였고( $p < 0.05$ ), Passage-2에서도 八味地黃湯 투여군은  $33.1 \pm 1.74$ hr로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며( $p < 0.05$ ), Passage-7에서도 대조군은  $301.9 \pm 31.1$ hr이었으나 八味地黃湯 투여군은  $182.9 \pm 17.2$ hr로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 Passage-3, 4, 5, 6, 7에서는 八味地黃湯 투여군과 대조군이 큰 차이가 없었다(Table VI, Fig. 3).

### 3. 心臟 血管內皮細胞의 細胞倍加回數와 細胞倍加時間에 미치는 影響

#### 1) 細胞倍加回數에 미치는 影響

延齡固本丹을 2개월간 경구 투여한 실험군과 동량의 생리식염수를 투여한 대조군의 心臟 血管內皮細胞를 계대배양하여 PDN을 비교 관찰한 결과, Passage-1에서는 대조군은  $3.37 \pm 0.15$ 배이었으나 延齡固本丹 투여군은  $3.53 \pm 0.09$ 배로 증가하는 경향을 보였고, Passage-2에서도 대조군은  $4.09 \pm 0.12$ 배이었으나 延齡固本丹 투여군은  $4.38 \pm 0.14$ 배로 증가하는

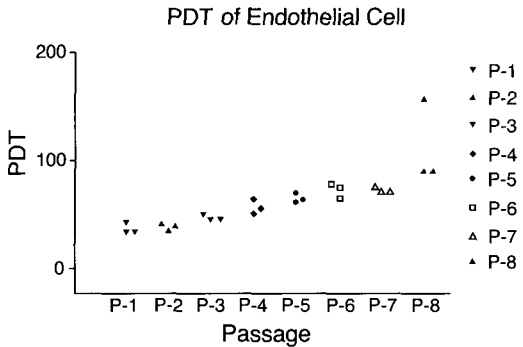
경향을 보였으며, Passage-8에서는 대조군은  $1.54 \pm 0.31$ 배이었으나 延齡固本丹 투여군은  $2.18 \pm 0.20$ 배로 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 Passage-3, 4, 5, 6, 7에서는 延齡固本丹 투여군과 대조군이 큰 차이가 없었다.

八味地黃湯을 2개월간 경구 투여한 실험군과 동량의 생리식염수를 투여한 대조군의 피부 섬유아세포를 계대배양하여 비교 관찰한 결과, Passage-1에서는 八味地黃湯 투여군이  $2.75 \pm 0.17$ 배로 대조군에 비해 오히려 유의성 있게 감소하였으나, Passage-2에서는 팔미지황탕 투여군이  $4.13 \pm 0.37$ 배로 증가하는 경향을 보였으며, Passage-8에서는 八味地黃湯 투여군이  $2.61 \pm 0.26$ 배로 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 八味地黃湯 투여군 역시 Passage-2, 3, 4, 5, 6, 7에서는 延齡固本丹 투여군처럼 대조군과 큰 차이가 나지 않았다(Table VII, Fig. 4).

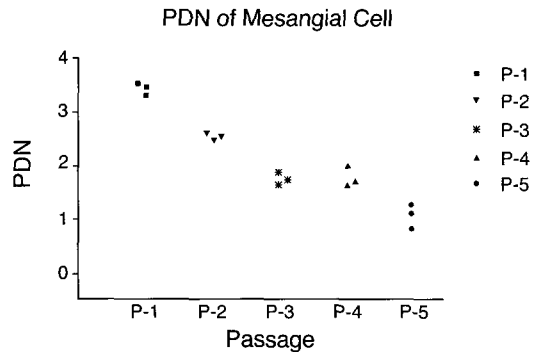
#### 2) 細胞倍加時間에 미치는 影響

延齡固本丹을 2개월간 경구 투여한 실험군과 동량의 생리식염수를 투여한 대조군의 심장 혈관내피세포를 계대배양하여 PDT를 비교 관찰한 결과, Passage-1에서는 대조군은  $35.6 \pm 1.60$ hr이었으나 延齡固本丹 투여군은  $34.09 \pm 0.90$ hr로 감소하는 경향을 나타냈고, Passage-2에서도 대조군은  $41.0 \pm 1.20$ hr이었으나 延齡固本丹 투여군은  $38.3 \pm 1.20$ hr로 감소하는 경향을 나타냈으며, Passage-8에서는 대조군은  $157.9 \pm 31.4$ hr이었으나 延齡固本丹 투여군은  $110.5 \pm 10.4$ hr로 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 Passage-4, 5에서는 延齡固本丹 투여군이 대조군에 비해 오히려 유의성 있게 증가하였고, Passage-3, 6, 7에서는 대조군과 큰 차이가 나지 않았다.

八味地黃湯을 투여한 경우, Passage-1에서는 八味地黃湯 투여군에서  $43.6 \pm 2.75$ hr로 나타나 대조군에 비해 오히려 유의성 있게 증가하였으나 Passage-8에서는 八味地黃湯 투여군이  $92.1 \pm 8.90$ hr로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 그러나 Passage-2, 3, 4, 5, 6, 7에서는 대조군과 비교하여 차이가 없거나 증가하는 경향을 나타내었다(Table VIII, Fig. 5).



**Fig. 5.** The Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on Population Doubling Time in the Heart-Endothelial Cells



**Fig. 6.** The Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on Population Doubling Number in the Mesangial Cells

**Table 8.** The Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on Population Doubling Time in the Heart-Endothelial Cells

	Control	<i>Yeonryunggobondan</i>	<i>Palmijihwangtang</i>
Passage No.1 9/9-9/14	35.6±1.60	34.09±0.90	43.6±2.75*
Passage No.2 9/14-9/21	41.0±1.20	38.3±1.20	40.8±3.9
Passage No.3 9/21-9/27	46.2±1.05	49.6±0.46*	47.2±6.60
Passage No.4 9/27-10/4	52.2±2.2	65.1±0.00*	58.0±2.82*
Passage No.5 10/4-10/13	61.3±2.15	71.0±7.40	64.1±1.50
Passage No.6 10/13-10/22	67.0±3.80	74.9±3.30	79.6±10.0
Passage No.7 10/22-10/31	73.0±3.50	73.3±6.30	76.0±5.43
Passage No.8 10/31-11/8	157.6±31.4	110.5±10.4*	92.1±8.90*

\* :  $p < 0.05$  significant difference compared with control, unit: hr, \*\* : Multiple comparison test (Means with the same letter are not significantly different at the 0.05 level).

**Table 9.** The Effects of *Yeonryunggobondan* and *Palmijihwangtang* on Population Doubling Number in the Mesangial Cells

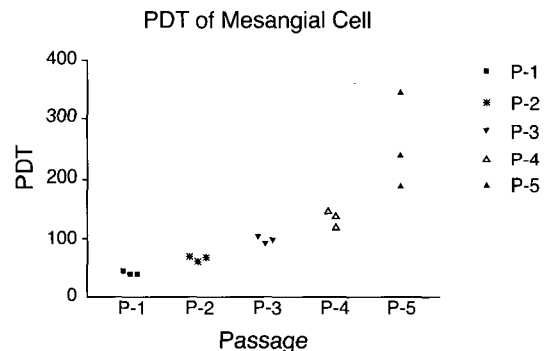
	Control	<i>Yeonryunggobondan</i>	<i>Palmijihwangtang</i>
Passage No.1 9/25-10/1	3.50±0.34	3.30±0.24	3.46±0.08
Passage No.2 10/-10/7	2.56±0.21	2.47±0.20	2.60±0.15
Passage No.3 10/7-10/15	1.76±0.20	1.87±0.29	1.66±0.14
Passage No.4 10/15-10/25	1.65±0.13	2.02±0.16*	1.72±0.17
Passage No.5 10/25-11/4	1.12±0.23	1.26±0.41	0.86±0.36

\* :  $p < 0.05$  significant difference compared with control, 단위: 배

4. 絲球體 메산지움細胞의 細胞倍加回數와 細胞倍加時間에 미치는 影響

1) 細胞倍加回數에 미치는 影響

延齡固本丹을 2개월간 경구 투여한 후 동량의 생리식염수를 투여한 대조군과의 絲球體 메산지움細胞 배가회수를 비교 관찰한 결과, Passage-1, 2, 3에서는 대조군과 延齡固本丹 투여군이 차이가 나지 않았으나 Passage-4에서는 대조군은  $1.65 \pm 0.13$ 배이었으나



**Fig. 7.** The Effects of *Yeonryunggobondan*, *Palmijihwangtang* on Population Doubling Time in the Mesangial cells

延齡固本丹 투여군은  $2.02 \pm 0.16$ 배로 유의성 있게 증



**Table 10.** The Effects of *Yeonryunggobondan*, *Palmijihwangtang* on Population Doubling Time in the Mesangial cells

	Control	<i>Yeonryunggobondan</i>	<i>Palmijihwangtang</i>
Passage No.1 9/25-10/1	41.3±4.0	43.6±3.08	41.5±0.96
Passage No.2 10/-/10/7	65.9±5.8	68.3±5.7	64.7±3.76
Passage No.3 10/7-10/15	96.2±10.9	91.3±15.4	101.6±8.5
Passage No.4 10/15-10/25	145.8±12.1	118.9±10.3*	139.8±13.7
Passage No.5 10/25-11/4	243.0±52.8	190.6±26.6	345.8±144

\* :  $p < 0.05$  significant difference compared with control, unit: time

가하였고( $p < 0.05$ ), Passage-5에서도 대조군은  $1.12 \pm 0.23$ 배이였으나 延齡固本丹 투여군에서는  $1.26 \pm 0.41$ 로 증가하는 경향을 나타내었다.

八味地黃湯을 2개월간 경구 투여한 실험군과 동량의 생리식염수를 투여한 대조군의 絲毳體 메산지움세포를 계대배양하여 PDN을 비교 관찰한 결과, Passage-4에서는 八味地黃湯 투여군이  $1.72 \pm 0.17$ 배로 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으나 Passage-1, 3, 4, 5에서는 대조군과 비교하여 별 차이가 없었다(Table IX, Fig. 6).

### 2) 細胞倍加時間에 미치는 影響

延齡固本丹을 2개월간 경구 투여한 실험군과 동량의 생리식염수를 투여한 대조군의 사구체 메산지움세포를 계대배양하여 PDT를 비교 관찰한 결과, Passage-1, 2, 3에서는 延齡固本丹 투여군과 대조군이 별 차이가 없었으나 Passage-4에서는 대조군은  $145.8 \pm 12.1$ hr이였으나 延齡固本丹 투여군은  $118.9 \pm 10.3$ hr로 유의성 있게 감소하였고( $p < 0.05$ ), Passage-5에서도 대조군은  $243.0 \pm 52.8$ hr이였으나 延齡固本丹 투여군은  $190.6 \pm 26.6$ hr로 감소하는 경향을 나타냈다.

八味地黃湯을 투여한 투여한 경우와 생리식염수를 투여한 경우를 비교하면, Passage-1, 2, 3에서는 八味地黃湯 투여군이 대조군과 별 차이가 없었으나 Passage-4에서는 八味地黃湯 투여군이  $139.8 \pm 13.7$ hr로 감소하는 경향을 보였으며, Passage-5에서는 八味地黃湯 투여군이 오히려 증가하였다(Table X, Fig 7).

## 고찰

지금까지 보고된 노화 기전에 관한 이론들은 무수히 많지만, 크게는 유전자에 의해 생명체의 노화와 수명이 예정되어 있다는 노화예정설(genetic programming theories of aging)과 여러 유해인자들에 의한 생체물질의 손상이 축적되어 노화에 이른다는 유해인자 손상설(theories of aging related to primary damage)로 나눌 수 있다.

노화예정설은 세포가 일정 壽命을 다할 경우 老化 遺傳자가 發現된다는 학설로서, 老化에 관여하는 遺傳子들은 1, 4, 6, 7, 9, 11, 18, 그리고 X 등이며 단일경로가 아닌 여러 경로에 의하여 노화가 진행된다고 알려지고 있다<sup>8)</sup>. 가령 배양 중에 있는 정상적인 세포는 노화하는 반면 腫瘍 세포는 종종 죽지 않고 무한히 성장하는 특성이 있는 바, Karen<sup>9)</sup>이 자궁내막의 악성종양세포에 동일 사람의 정상세포를 심어주면 노화가 진행된다고 보고한 바와 같이 遺傳子는 細胞의 老化를 決定하는 證據로 인식되고 있다.

반면 유해인자 손상설은 1956년 Harman이 활성산소에 대해 보고한 후 현재 Free Radical 이론이 활발하게 연구되고 있는데, Free Radical은 에너지 대사 과정 중의 산물로서 이것이 분자에 독성으로 작용하여 세포의 활성을 감퇴시키고 결국 세포를 사망시켜 염증을 발생함으로써 노화를 유발시킨다. 아울러 Free Radical은 염색체의 돌연변이와 교원질의 교차결합과 관련이 있다고 보고된다<sup>10,11)</sup>.

한편 정상적인 免疫機能은 加齡에 따라 감소한다고 알려져 있으며, 나이에 따른 胸線의 변화를 그 대표적 근거로 인정하고 있다<sup>12)</sup>. 특히 免疫系의 老化는 老年期の 疾病과 感染에 대한 개인의 抵抗力에 지대한 영향을 미치는데, 이것은 身體의 機能과 老化의 중요한 면을 잘 설명해 준다.

젊은 사람에게서 얻은 피부 섬유아세포는 나이 많은 사람의 섬유아세포보다 세포복제율이 높으며 세포분열횟수가 많다. Hayflick은 인체의 정상피부에서 얻은 섬유아세포가 실험실에서 배양하면 대체로 1일 1회 정도의 속도로 細胞數가 倍加(population doubling

; PD)되면서 증식하는데, 어느 정도 PD가 일어난 후에는 증식속도가 점차 떨어지다가 증식이 완전히 멈추게 되며, 이처럼 세포가 증식을 멈추는 단계를 세포 노화(replicative senescence)라 하였다<sup>13)</sup>.

계대배양은 일정한 세포를 실험용 접시에 넣고 세포가 지속적으로 분열되어 실험용 접시의 90%까지 증식하면 그 세포의 수를 확인한 후 연속적으로 배양용 접시를 옮겨 배양을 진행시키는 것이다. 처음 실험용 접시에 배양시켜 90%까지 증식이 이루어진 최초의 상태가 Passage-1인 바, Passage의 번호가 낮을수록 젊은 세대인 반면 번호가 높을수록 늙은 세대라고 할 수 있다.

따라서 延齡固本丹과 八味地黃湯이 in vitro의 세포 수준에서뿐만 아니라 생체내 장기의 노화를 실질적으로 지연시켰다면 이들 方劑를 투여받은 白鼠에서 채취한 세포들을 배양할 경우 대조군에 비하여 보다 젊은 상태의 세포임을 확인할 수 있어야 한다. 즉 延齡固本丹 투여군과 八味地黃湯 투여군은 대조군에 비하여 PDN은 증가하는 반면 PDT는 감소해야 노화 지연의 효과가 있다고 할 수 있다.

실험 결과, 피부 섬유아세포의 경우에는 延齡固本丹과 八味地黃湯 투여군 모두 PDN은 대조군에 비해 Passage-1, 2에서 유의하게 증가하였고, PDT는 대조군에 비해 역시 Passage-1, 2에서 유의하게 감소하였다. 이는 延齡固本丹과 八味地黃湯을 복용한 白鼠의 피부 세포가 東醫方劑를 복용하지 않은 白鼠에 비해 보다 젊은 상태를 유지하고 있었음을 의미한다고 할 수 있다.

심장 혈관내피세포의 경우에는 延齡固本丹과 八味地黃湯 투여군 모두 세포배양 시 가장 늙은 세대라 할 수 있는 Passage-8에서 PDN은 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, PDT는 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 이는 延齡固本丹과 八味地黃湯을 복용한 白鼠의 심장 세포가 東醫方劑를 복용하지 않은 白鼠에 비해 보다 장기간 동안 그 기능을 유지할 수 있게 되었기 때문으로 사려된다.

사구체 메산지움세포의 경우에는 延齡固本丹 투여군은 PDN은 대조군에 비해 Passage-4에서 유의하게

증가하였고, PDT는 대조군에 비해 역시 Passase-4에서 유의하게 감소하였다. 반면 八味地黃湯 투여군은 PDN은 대조군에 비해 Passase-4에서 유의하게 증가하였으나 PDT는 대조군과 큰 차이가 없었다.

이상의 실험결과를 종합하면, 동양의학에서 抗老化的의 효능이 있다고 인식되어 온 延齡固本丹과 八味地黃湯은 실험동물의 피부 섬유아세포, 심장 혈관내피세포, 사구체 메산지움세포의 細胞倍加回數와 細胞倍加時間에 영향을 주어 노화를 지연시키는 효과가 있는 것으로 사려된다. 따라서 향후에는 실제 환자들을 대상으로 한 임상실험이 필요할 것으로 생각되며, 아울러 더욱 다양한 종류의 세포들을 대상으로 한 동물실험 및 보다 많은 종류의 東醫方劑를 대상으로 抗老化的의 효능을 검증하는 연구가 필요할 것으로 사려된다.

## 결론

延齡固本丹과 八味地黃湯이 白鼠의 피부 섬유아세포, 심장 혈관내피세포, 사구체 메산지움세포의 노화 지연에 미치는 영향을 알아보기 위하여 細胞倍加回數와 細胞倍加時間을 지표로 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. in vitro에서는 延齡固本丹과 八味地黃湯 투여군 모두 白鼠의 피부 섬유아세포, 심장 혈관내피세포, 사구체 메산지움세포의 성장을 억제하고 細胞倍加時間을 연장시켰다.
2. 延齡固本丹과 八味地黃湯을 실험동물에 2개월간 경구 투여한 후, 피부 섬유아세포, 심장 혈관내피세포, 사구체 메산지움세포를 채취하여 계대배양을 진행시키며 細胞倍加回數와 細胞倍加時間을 관찰한 결과,
  - 1). 피부 섬유아세포의 경우에는 延齡固本丹과 八味地黃湯 투여군 모두 계대배양의 가장 초기인 Passage-1, 2에서 細胞倍加回數를 증가시키고 細胞倍加時間을 감소시켰다.
  - 2). 심장 혈관내피세포의 경우에는 延齡固本丹과 八味地黃湯 투여군 모두 계대배양의 가장 말기

인 Passase-8에서 細胞倍加回數를 증가시키고 細胞倍加時間을 감소시켰다.

- 3). 사구체 메산지움세포의 경우에는 延齡固本丹 투여군은 계대배양의 후기에 속하는 Passase-4에서 細胞倍加回數를 증가시키고 細胞倍加時間을 감소시켰고, 八味地黃湯 투여군은 Passase-4에서 細胞倍加回數를 증가시켰다.

따라서 延齡固本丹과 八味地黃湯은 실험동물의 피부 섬유아세포, 심장 혈관내피세포, 사구체 메산지움세포의 細胞倍加回數와 細胞倍加時間에 영향을 주어 노화를 지연시키는 효능이 있는 것으로 사려된다.

### 참고문헌

1. Sugawara, O. M., Oshimura, M., Koi, M., Annab, L., and Barrett, J. C. Induction of cellular senescence in immortalized cells by human chromosome L. *Science* (Washington DC). 1990;247:707-10.
2. Yamada, H., Wake, N., Fujimoto, S., Barrett, J. C., and Oshimura, M. Multiple chromosomes carrying tumor suppressor activity for a uterine endometrial carcinoma cell line identified by microcell-mediated chromosome transfer. *Oncogene*. 1990;5:1141-7.
3. Hensler, P. J., Annab, L. A., Barrett, J. C., and Pereira-Smith, O. M. A gene involved in the control of cellular senescence localized to human chromosome 1q. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14:2291-7.
4. Ning, Y., Weber, J. L., Killary, A. M., Ledbetter, D. H., Smith, J. R., and Pereira-Smith, O. M. Genetic analysis of indefinite division in human cells: evidence for a cell senescence-related gene(s) on human chromosome 4. *Proc. Natl. Sci USA*. 1991;8:5635-9.
5. Sandhu, A. K., Hubbard, K., Kaur, G. P., Jha, K. K., Ozer, H. L., and Athwal, R. S. Senescence of immortal human fibroblasts by the introduction of normal human chromosome 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994;91:5498-502.
6. Ogata, T., Ayusawa, D., Namba, M., Takahashi, E., Oshimura, M., and Oishi, M. Chromosome 7 suppresses indefinite division of nontumorigenic immortalized human fibroblast cell lines KMST-6 and SUSM-1. *Mol. Cell. Biol.* 13:6036-43.
7. Koi, M., Johnson, L. A., Kalikin, L. M., Little, P. F. R., Nakamura, Y., and Feinberg, A. P. Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11. *Science* (Washington DC). 1993;260:361-4.
8. Klein, C. B., Conway, K. Wang, X. W., Bhamra, R. K., Lin, X., Cohen, M. D., Annab, L. Barrett, J. C., and Costa, M. Senescence of nickel-transformed cells by a mammalian X chromosome: possible epigenetic control. *Science* (Washington DC). 1991;251:796-9.
9. Masahiro Sasaki, Tsuyoshi Honda, Hideto Yamada, Norio Wake, J. Carl Barrett, and Mitsuo Oshimura. Evidence for Multiple Pathways to Cellular Senescence. *cancer research*. 1994;54:6090-3.
10. 의학교육연수원. 노인의학. 서울: 서울대학교출판부. 1997:26.
11. 조동국 외. 노화지연을 위한 한약재의 효능연구. 서울: 한국한의학연구원. 1998:9-10.
12. 조주연. 노인의학개론. 서울: 순천향대학교 교육매체 제작센터. 1998:76-7.
13. 황은성. 노화현상은 비가역적인가. 대한의사협회지. 2001;44:813-4.