

香砂養胃湯 전탕액이 노화쥐의 비장, 췌장, 위장 세포의 항산화능에 미치는 영향

최병철 · 안택원

대전대학교 한의과대학 사상체질과

Abstract

Anti-Oxidant Effect of Hyangsayangyi-tang Decoction in Stomach, Spleen and Pancreas Cell of SD Rats

Choi Byoung-Chol, Ahn Taek-Won

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon Univ.

1. Objectives

The purpose of this study was to observe the anti-oxidant effects of Hyangsayangyi-tang(HY) in SD rats.

2. Methods

This experiment was used the tissue of stomach, spleen and pancreas cells of 6, 52 and 68 weeks old SD rats. Each age group was again divided into three groups. One group, as normal group, was not-treated cells, another group, as control group, was saline-treated cells, and the last group, as experimental group, was HY-treated cells.

After culture for 48 hours, each groups measured the level of SOD, GSH, MDA and NO in the tissue of stomach, spleen and pancreas cells.

3. Results and Conclusions

The activity of SOD were significantly increased in spleen cell of 52, 68 w-HY group, pancreas cell of 68 w-HY group and in stomach cell of 52, 68 w-HY group compared with those of the normal and the control groups. The level of GSH were significantly increased in spleen cell of 52, 68w-HY group and in pancreas cell of 68w-HY group compared with those of the normal and the control groups. The level of MDA were significantly decreased in pancreas cell of 68 w-HY group compared with those of the normal and the control groups. The level of NO were significantly decreased in spleen cell of 68 w-HY group, pancreas cell of 52, 68w-HGD groups compared with those of the control groups.

According to results, HY showed anti-oxidant effect.

Investigation into the clinical use of the HY is suggested for future research.

Key Words : Hyangsayangyi-tang, Anti-oxidant Effect, SOD, GSH, MDA, NO

I. 緒 論

UN의 보고서에 의하면 2000년에는 65세 이상의 인구가 4억명 이상으로 추정되고 있으며, 선진국에서는 2005년 인구의 17%이상을 차지할 것으로 예상하고 있다¹.

노화란 연령이 증가함에 따라 발생하는 점진적인 구조적 변화로서 질병이나 사고에 기인하지 아니하고 궁극적으로 사망을 초래하는 것이다².

한의학에서는 老化에 대하여 명확하게 정의 내리지는 않았지만³, 『靈樞 榮衛生會篇』⁴에서 “老者之氣血衰 其肌肉枯 氣道澁 五臟之氣相搏 其營氣衰少而衛氣內伐”이라 하여 氣血의 衰退로 肌肉이 점차 약해지는 것을 老化로 보았고, 老化로 인한 신체변화에 대해서는 『素問·陰陽應象大論』⁵에는 “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”라 하여 신체 기능과 생식능력의 저하가 나타난다고 하였다.

李濟馬는 『東醫壽世保元』·『廣濟說』⁶에서 “四十九歲至六十四歲曰老”라 하여 50대에 들어 노인의 단계로 접어든다고 하였으며, 壽命의 長短을 결정짓는 요인은 각 체질에 따른 臟腑大小偏差를 극복하는 保命之主로 無病상태를 유지하며 心慾과 知行, 恭敬과 怠慢, 調養과 病變, 調病 등을 통한 체질적 양생을 의미한다고 하였다^{7,8}.

최근 노화와 관련이 있는 것으로 알려진 자유유리기설(free radical theory)은 산소를 소비하는 모든 생물체는 산소에서 유래된 free radical에 의하여 세포내 산화적 손상이 축적되어 질병과 죽음이 초래된다는 설로, 현재 free radical의 독성으로부터 조직을 보호하고 항상성을 유지하는 항산화계에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다^{9,10}.

한약을 이용한 최근 항산화관련 실험적 연구들은 약침제제와 단미제 및 복합처방을 이용하여 시행되고 있는데 이¹¹, 김¹², 임¹³ 등은 각각 澤瀉, 胡桃, 赤何首烏 약침의 항산화 효과에 대하여 연구하였고, 이¹⁴는 전침을 통하여 항산화 효과를 연구하였다. 또한 정¹⁵, 김¹⁶, 조¹⁷ 등은 각

각 薄荷, 石斛, 黃芩의 항산화 효과에 대하여 연구하였으며, 박¹⁸ 등은 補中益氣湯과 六味地黃湯의 항산화 작용에 대하여 연구하였다.

香砂養胃湯은 소화기계의 치료를 위해 예부터 널리 사용되어져 왔으며 특히 식욕부진, 흉통, 위염, 위하수, 위무력등에 응용되어 왔다¹⁹⁻²¹. 『東醫壽世保元』에서의 香砂養胃湯은 新方 香砂養胃湯으로 半夏를 사용하는 二陳湯 계통이기 때문에 平胃散 계통의 古方 香砂養胃湯보다는 二陳湯 계통의 香砂六君子湯으로 보는 것이 타당하나 理中湯 계통인 人蔘, 白朮, 乾薑, 甘草등도 사용하였다²². 이 처방은 少陰人 太陰病의 병리기전에 활용하기 위한 處方으로 少陰人 素病인 脾胃病에 食物塞滯함과 더불어 脾胃의 기운을 돕고 補脾和脾하고 健脾直脾하는 효과를 기대할 수 있다^{23,24}.

이에 저자는 少陰人의 偏小臟腑인 비장과 그 黨이라 할수 있는 위장과 韃장의 기능을 돕는 香砂養胃湯의 항산화와 관련된 항노화 효과를 입증하기 위하여 6주령, 52주령, 68주령의 SD rat(Sprague-Dawley rat)의 비장과 韃장, 위장 조직에 무처리 세포를 정상군으로, saline을 처리한 세포를 대조군으로, 香砂養胃湯 전탕액을 처리한 세포를 실험군으로 삼고 SOD(Superoxide Dismutase) activity, Glutathione 농도, NO(nitric oxide) 농도, MDA(malondialdehyde)농도를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 동물

동물은 6주령과 36주령의 웅성 SD rat을 중앙 실험동물(주)에서 공급받아, 6주령은 바로 실험에 사용하였으며, 36주령은 실험 당일까지 고형 사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하며 실온(22±2℃)을 유지하여, 각각 52주령과 68주령까지 사육하여 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 香砂養胃湯(HY)은 D대학교 한방병원에서 구입하여 이용하였다(Table 1).

2. 방법

1) 세포 독성 측정

(1) 간 실질세포 분리

본 실험모델과 동일한 6주령과 52주령의 수컷 SD rat의 간 조직을 사용하였다. Rat을 Ethyl ether를 이용하여 마취 시킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하며 복부쪽 혈관을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출시켜준다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media(with 10% FBS, antibiotics)와 collagenase typeIV(300 u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation 한다. 이때 20분에 한 번씩 흔들어 줌으로써 간세포가 분리가 잘 되도록 한다. 간 조직을 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 사용하여 mesh에서 갈아준다. 이렇게 얻어진 시료에서 RBC를 제거하고 세척하여 획득한 세포를 실험에 사용하였다.

(2) MTT assay 방법을 이용한 농도별 약물 독성 측정

분리한 간세포는 RPMI 1640 media에 10%의 FBS와 antibiotic를 첨가하고 24시간동안 세포배양을 실시하여 활성을 안정화시킨다. 96 well plate에 세포를 1×10⁵ cells/well으로 분주하고, 각 약물은 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1mg/ml, 500μg/ml, 100μg/ml, 50μg/ml, 10μg/ml의 농도로 희석한 香砂養胃湯을 첨가하여 48시간동안 세포 배양을 실시한다. 48시간 후에, MTT solution(5mg/ml, Cat No. 135038, Sigma, USA)을 각 well에 20μl씩 분주하고 5시간 동안 37℃에서 incubation 한다. 5시간 후, 각 well에 있는 medium을 100μl씩 버리고, solubilizing solution을 100μl씩 분주한 뒤 pipetting을 강하게 하여 well에 dark blue crystals가 침전하는 정도를 ELISA reader를 이용하여 570nm에서 optical densities를 확인한다.

3) DPPH 소거능 측정

1, 1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl(DPPH, Sigma, USA) 80mg을 에탄올 50ml과 멸균 증류수를 50ml에 첨가하여 녹여 준다. 이를 96well에 180μl씩 분주

Table 1. Prescription of *Hyangsangyangi-tang* (HY)

Herbs	Scientific name	Amount(g)
人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4
白 朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	4
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	4
炙甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4
香附子	<i>Cyperii Rhizoma</i>	4
陳 皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4
乾 薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4
山查肉	<i>Crataegii Fructus</i>	4
砂 仁	<i>Amomi Fructus</i>	4
白荳蔻	<i>Alpiniae Katsumadai Semen</i>	4
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	4
大 棗	<i>Jujubae Fructus</i>	4
Total amount		52

하고, 각 약물은 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1mg/ml, 500 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml의 농도로 희석하여 첨가하고, 30분 동안 실온에서 방치한다. 그 후에 517nm로 O.D.값을 측정하고, activity로 환산한다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{(\text{대조군 O.D.} - \text{sample O.D.})}{\text{대조군 O.D.}} \times 100$$

4) 실험군 설정

본 실험은 각각 6주령, 52주령, 68주령의 SD rat의 비장, 췌장 및 위장 조직으로부터 얻은 실질세포를 이용하여 수행하였다. 실험군은, 아무것도 처리하지 않은 세포(not-treated cell)를 정상군으로, saline을 처리한 세포(saline-treated cell)를 대조군으로, 그리고 香砂養胃湯 전탕액을 처리한 세포(HY-treated cell)를 실험군으로 나누어 분류하였고, 조직으로부터 분리된 세포를 안정화시킨 후, 약물을 6주령의 동물에서 얻은 실질세포는 500 μ g/ml, 52주령의 동물에서 얻은 실질세포는 100 μ g/ml, 68주령의 동물에서 얻은 실질세포는 10 μ g/ml로 처리하여 48시간동안 배양하였다.

5) 세포에서의 산화 억제 효과 측정

(1) 세포 분획

Bansal등의 방법²⁵을 변형하여, 배양한 세포들을 모아 sonicate를 이용하여 균질화한다. 균질화한 세포는 600 \times g에서 10분간 원심분리하여 균질화되지 않은 조직 등을 제거한 후 상등액을 10,000 \times g에서 20분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 얻는다. 이 상등액을 105,000 \times g에서 1시간 원심분리하여 cytosolic fraction을 얻는다. 그 침전물에 동일한 양의 0.1M potassium phosphate buffer를 가하여 현탁시켜 microsomal fraction을 얻는다. microsomal fraction에서 glutathione의 함량과 MDA의 함량을 측정하고, cytosolic fraction을 이용하여 SOD 활성도와 NO 함량을 측정하였다.

(2) SOD activity

SOD 활성도는 SOD assay kit를 이용하여 측정하였다. 세포분획으로 얻은 sample중에서 20000rpm으로 얻은 sample을 사용하였으며, sample solution

을 96 well plate의 각 well과 blank 2에 20 μ 씩 분주한다. Blank 1과 blank 3에 D.W.를 분주한 뒤, WST working solution을 200 μ /well으로 모든 well에 첨가한다. blank 2와 blank 3well에 dilution buffer를 20 μ 씩 분주하고, enzyme working solution을 각 sample well과 blank 1에 20 μ /well으로 분주한다. 20분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 incubating을 실시하고 450nm에서 흡광도를 측정 하고 SOD 활성도를 다음의 공식에 의하여 환산하였다.

$$\text{SOD activity (inhibition rate\%)} = \left\{ \frac{[(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})]}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \right\} \times 100$$

(3) Glutathione

Glutathione함량은 kit를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정해서 결과를 얻었다.

(4) NO assay

NO함량은 kit를 이용하여 450 에서 흡광도를 측정해서 결과를 얻었다.

(5) Lipid peroxidation

Lipid peroxidation assay kit를 이용하여 측정하였고 586 에서 흡광도를 측정한 후 MDA를 계산하였다.

6) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. SPSS 통계프로그램(14.0 KO)의 일원배치 분산분석(one way ANOVA)을 사용하여 유의성을 검정하였으며, 각 실험군을 비교하여 신뢰도 95% 이상(p<0.05)일 때 유의수준으로 판정하였다.

III. 結 果

1. 세포 독성

6주령, 52주령 및 68주령 흰쥐의 간 실질세포를 이용하여 香砂養胃湯 전탕액의 세포독성을 측정하였다. 측정 결과, 6주령, 52주령 및 68주

령 세포 모두 香砂養胃湯 전탕액의 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 세포생존률이 감소하였다. 각 주령에서의 세포생존률을 고려하여, 6주령 세포에는 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 52주령 세포에는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 68주령 세포에는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 香砂養胃湯 전탕액을 선택하여 각 세포의 항산화능을 측정에 사용하였다.

2. DPPH 소거능 측정

香砂養胃湯 전탕액을 여러 가지 농도로 희석하여 DPPH 소거능을 측정한 결과, 모든 농도에서 control에 비하여 DPPH 활성이 유의하게 감소하였다.

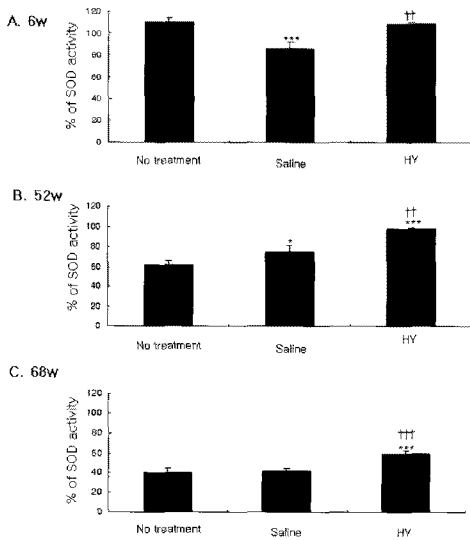


Fig. 1. Effect of HY decoction on SOD activity in spleen cells from old rats.

Spleen cells from 6 w, 52 w, 68 w old rats were treated with 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HY decoction respectively and SOD activity was estimated by ELISA. Values represent the means \pm SD of 3 mice.

***: $p < 0.001$, *: $p < 0.05$ compared to normal group by ANOVA test.

†††: $p < 0.001$, ††: $p < 0.01$ compared to saline group by ANOVA test.

3. 세포에서의 산화반응 억제 효과

1) 비장

(1) SOD activity

세포의 주령이 증가함에 따라 SOD 활성이 감소하였다. 香砂養胃湯 전탕액을 처리한 결과, 6주령 세포에서는 대조군에 비하여, 52주령 및 68주령 세포에서는 정상군 및 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다(Fig. 1).

(2) Glutathione

세포의 주령이 증가함에 따라 GSH 농도가 감소하였다. 52주령과 68주령 세포에서는 香砂養胃湯 전탕액 처리에 의하여 대조군과 정상군에 비하여 GSH 농도가 유의하게 증가하였다(Fig. 2).

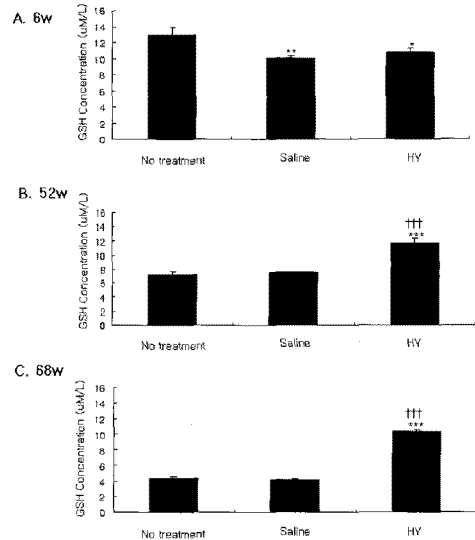


Fig. 2. Effect of HY decoction on GSH level in spleen cells from old rats.

Spleen cells from 6 w, 52 w, 68 w old rats were treated with 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HY decoction respectively and GSH level was estimated by ELISA. Values represent the means \pm SD of 3 mice.

***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ compared to normal group by ANOVA test.

†††: $p < 0.001$, compared to saline group by ANOVA test.

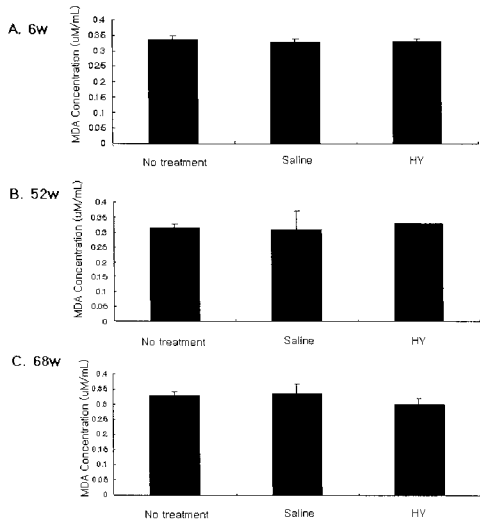


Fig. 3. Effect of HY decoction on MDA level in spleen cells from old rats.

Spleen cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml HY decoction respectively and MDA level was estimated by ELISA. Values represent the means \pm SD of 3 mice.

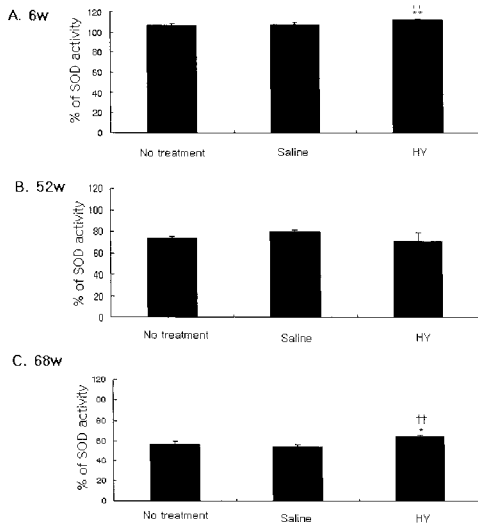


Fig. 5. Effect of HY decoction on SOD activity in pancreatic islet cells of old rats.

Pancreatic islet cells of 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μ g/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml HY decoction respectively, and SOD activity was estimated by ELISA. Values represent the means \pm SD of 3 mice.

**: p<0.01, *: p<0.05 compared to no treatment group by ANOVA test.

††: p<0.01 compared to saline group by ANOVA test.

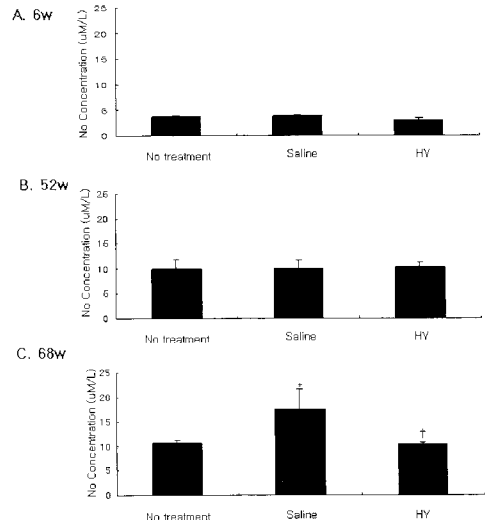


Fig. 4. Effect of HY decoction on NO level in spleen cells from old rats.

Spleen cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml HY decoction respectively and NO level was estimated by ELISA. Values represent the means \pm SD of 3 mice.

***: p<0.001, **: p<0.01, *: p<0.05 compared to normal group by ANOVA test.

††: p<0.01 compared to saline group by ANOVA test.

(3) Lipid peroxidation

68주령 비장세포에서 香砂養胃湯 전탕액 처리에 의해 MDA 농도가 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3).

(4) NO assay

세포의 주령이 증가함에 따라 NO 농도가 현저하게 증가하였다. 68주령 세포에서 대조군에 비하여 실험군에서 NO 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

2) 췌장

(1) SOD activity

세포의 주령이 증가함에 따라 SOD 활성이 감소하였다. 香砂養胃湯 전탕액을 처리한 결과, 6주령 세포에서는 정상군과 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다. 68주령 세포에서도 SOD activity가 유의하게 증가하였다 (Fig. 5).

(2) Glutathione

6주령 세포와 52주령 세포에서 香砂養胃湯 전탕액 처리에 의하여 정상군과 대조군에 비하여 GSH 농도가 유의하게 증가하였다. 68주령 세포에서 香砂養胃湯 전탕액 처리에 의해 GSH 농도가 증가하였으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 6).

(3) Lipid peroxidation

세포의 주령이 증가함에 따라 MDA 농도가 증가하는 경향을 나타내었다. 6주령 세포에서 실험군에서 대조군에 비하여 MDA 농도가 유의하게 감소하였다. 68주령 세포에서 실험군에서 정상군에 비하여 MDA 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

(4) NO assay

세포의 주령이 증가함에 따라 NO 농도가 현저하게 증가하였다. 52주령과 68주령의 실험군

에서 대조군에 비하여 NO 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 8).

3) 위장

(1) SOD activity

세포의 주령이 증가함에 따라 SOD 활성이 감소하였다. 香砂養胃湯 전탕액을 처리한 결과, 모든 주령에서 정상군 및 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다(Fig. 9).

(2) Glutathione

52주령과 68주령에서 정상군 및 대조군에 비하여 실험군에서 GSH 농도가 유의하게 증가하였다(Fig. 10).

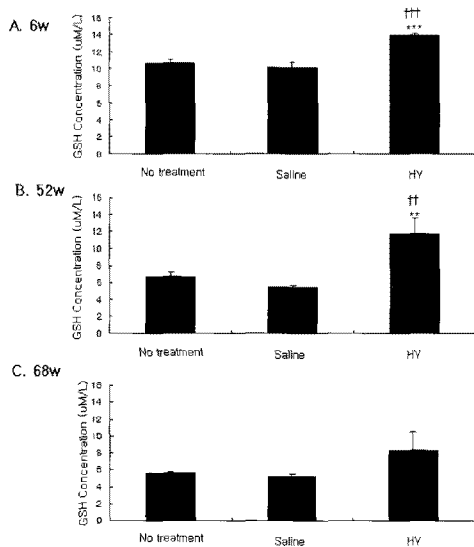


Fig. 6. Effect of HY decoction on GSH level in pancreatic islet cells of old rats.

Pancreatic islet cells of 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μ g/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml HY decoction respectively, and GSH level was estimated by ELISA. Values represent the means \pm SD of 3 mice.

***: p<0.001, **: p<0.01 compared to no treatment group by ANOVA test.

†††: p<0.001, ††: p<0.01 compared to saline group by ANOVA test.

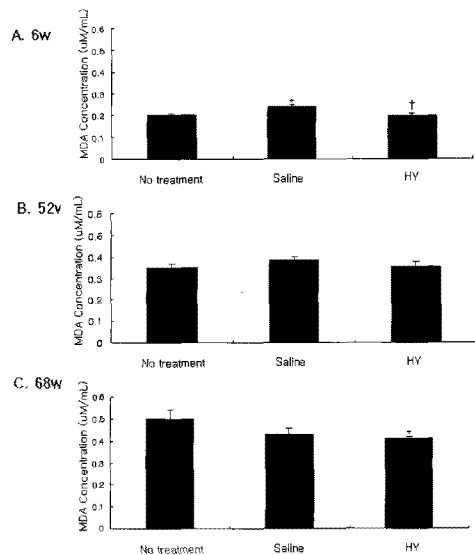


Fig. 7. Effect of HY decoction on MDA level in pancreatic islet cells of old rats.

Pancreatic islet cells of 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μ g/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml HY decoction respectively, and MDA level was estimated by ELISA. Values represent the means \pm SD of 3 mice.

*: p<0.05 compared to no treatment group by ANOVA test.
†: p<0.05 compared to saline group by ANOVA test.

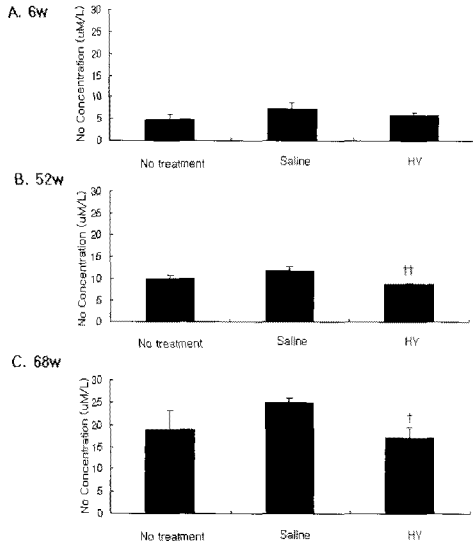


Fig. 8. Effect of HY decoction on NO level in pancreatic islet cells of old rats. Pancreatic islet cells of 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500µg/ml, 100µg/ml, 10µg/ml HY decoction respectively, and NO level was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice. ††: p<0.05, †: p<0.05 compared to saline group by ANOVA test.

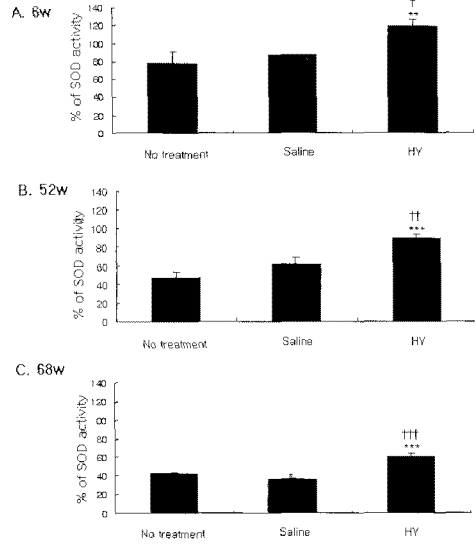


Fig. 9. Effect of HY decoction on SOD activity in stomach cells from old rats. Stomach cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500µg/ml, 100µg/ml, 10µg/ml HY decoction respectively, and SOD activity was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice. ***: p<0.001, **: p<0.05 compared to no treatment group by ANOVA test. †††: p<0.001, ††: p<0.01, †: p<0.05 compared to saline group by ANOVA test.

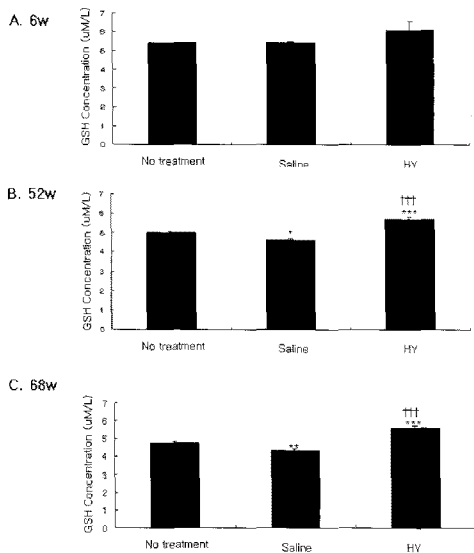


Fig. 10. Effect of HY decoction on GSH level in stomach cells from old rats.

(3) Lipid peroxidation

52주령과 68주령 세포에서 HY처리에 의하여 MDA 농도가 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 11).

(4) NO assay

세포의 주령이 증가함에 따라 NO 농도가 현저하게 증가하였다. 모든 주령에서 HY의 처리에 의하여 NO 농도에 유의한 변화는 나타나지 않았다(Fig. 12).

Stomach cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500µg/ml, 100µg/ml, 10µg/ml HY decoction respectively, and GSH level was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.

***: p<0.001, **: p<0.01 *: p<0.05 compared to no treatment group by ANOVA test. †††: p<0.001 compared to saline group by ANOVA test.

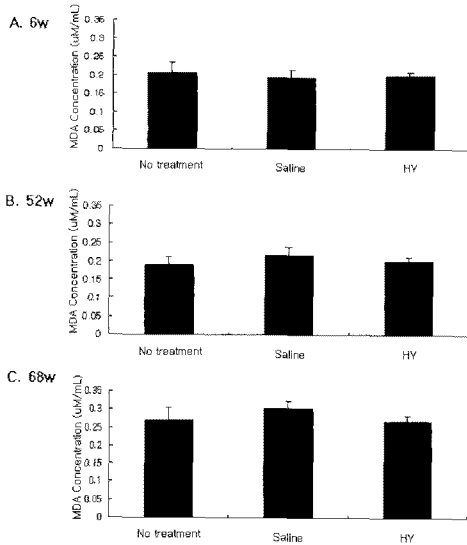


Fig. 11. Effect of HY decoction on MDA level in stomach cells from old rats. Stomach cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μ g/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml HY decoction respectively, and MDA level was estimated by ELISA. Values represent the means \pm SD of 3 mice.

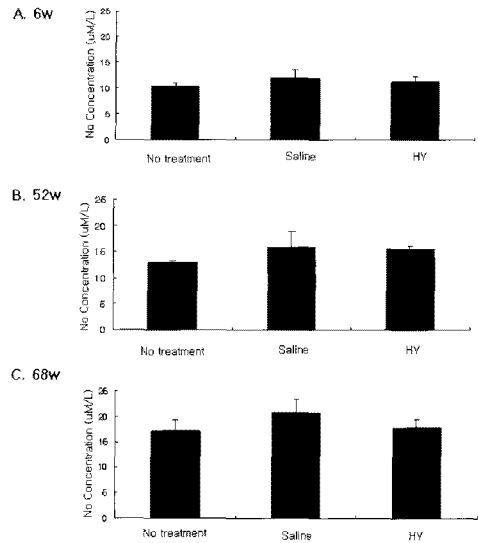


Fig. 12. Effect of HY decoction on NO level in stomach cells from old rats. Stomach cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml HY decoction respectively, and NO level was estimated by ELISA. Values represent the means \pm SD of 3 mice.

IV. 考 察

인체는 산화 촉진물질(pro-oxidants)과 산화 억제물질(antioxidants)들이 균형을 이루고 있다²⁶. 신체 활동이 정상일 때에는 이런 활성산소를 제거하는 기능이 효과적으로 작용하고 있으나, 균형이 깨져 산화촉진쪽으로 기울게 되면 세포에 해로운 영향을 끼치게 되는데, 이러한 유해한 작용을 산화적 스트레스(oxidative stress)라고 한다²⁷.

산화 스트레스는 체내의 활성산소(reactive oxygen)를 발생시켜 인체 여러 조직과 기관에 상해를 주는 것으로 알려져 있다. 하지만 인체는 이 유리기를 제거하는 항산화 효소가 있어 산화스트레스로부터 인체를 보호한다²⁸.

자유유리기설은 산소를 소비하는 모든 생물체는 산소에서 유래된 free radical에 의하여 질병과 죽음이 초래된다는 설로, 인체의 노화나 여러 종류의 성인병은 자유유리기설과 연관이 있는 것으

로 보고되고 있으며, 현재 항산화계에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다^{9,10,12,13}.

Free radical이란 분자 혹은 원자 최외각 전자궤도에 부대전자를 가진 불안정한 화합물을 말하는데, 생체내에서 문제가 되는 것은 대사과정에서 부수적으로 생기는 활성산소로 superoxide(O₂), 과산화수소(H₂O₂), hydroxy radical(OH⁻) 등이 해당되며 이들은 세포내 지질 및 cytosol에서 생성되고 macrophage, 백혈구에서도 생성된다²⁹. 이렇게 인체에 흡입된 산소의 일부가 대사과정에서 불완전 환원되어 자유유리기인 활성산소(active oxygen)로 변환되고, 활성산소가 세포막을 형성하는 주성분인 지질의 과산화 반응을 일으켜 세포막의 파괴, 세포의 노화와 괴사등을 진행시켜서, 각종 암, 노화촉진, 스트레스, 성호르몬이나 면역물질(cytokine)의 활성도 감소 등을 유발한다는 보고가 있으며, 질병의 90%가 활성산소에 의해 발생된다고 한다^{30,31}.

활성산소 발생의 억제와 생성된 활성산소를 제거하는 기전을 가진 항산화제는 SOD, catalase,

glutathione peroxidase, protein bound-SH, nonprotein-SH 등이 있으며³², 또한 세포의 산화방지 효과를 가지는 화합물은 free radical의 형성을 억제 혹은 직접 제거하거나, 세포의 항산화기전을 강화시키는 작용을 할 수 있다³². 그러므로 radical scavengers와 항산화제는 산소를 매개로 하는 질환에 대한 예방책이 될 수 있다³².

韓醫學에서 老化에 대한 정확한 정의를 내리지는 않았지만, 『素問·上古天真論』³³에 남녀의 나이를 먹음에 따라 腎氣와 生殖能力의 盛衰에 따라 老化가 진행되고 사람의 외모 및 動態가 바뀌는 것을 설명하였고, 『靈樞·榮衛生會篇』⁴에서는 “老者之氣血衰 其肌肉枯 氣道澁 五臟之氣相搏 其營氣衰少而 衛氣內伐”이라 하여 老化로 인하여 氣血의 衰退로 肌肉이 점차 약해진다고 하였다. 이는 사람이 성장하면서 절로 腎氣가 盛하고 天癸가 至하였다가 늙으면서 腎氣가 衰하고 天癸가 竭하여 누구나 일정 나이가 되면 老化되어 죽는다는 것과 연령이 증가하면서 氣血이 衰하고 任衝脈이 虛해져 퇴행적인 쇠퇴가 일어난다는 老化의 두 가지 측면을 설명한 것이라 할 수 있다. 또한 『素問·上古天真論』³³에 養生에 따라 至人, 真人, 賢人, 聖人으로 구별하여 生生不息하는 이상향을 論하기도 하여 老化를 극복하고 수명을 연장하려는 노력을 보이기도 하였다.

老化에 대하여 체질의학의 효시인 李濟馬는 인간의 老化를 이해하고 극복하여 수명을 연장시키는 방법에 대하여 보다 구체적으로 기술하였다. 『東醫壽世保元』⁶에서 “四十九歲至六十四歲曰老”라 하여 50대에 들어 노인의 단계로 접어든다고 하였으며 『東醫壽世保元四象草本卷』·‘病變·第二統’³⁴에서 “太陽人財權酒色 凡百內傷外觸皆損肝 故太陽人以肝臟剩削爲命脈長短…”라 하여 命脈의 長短이 偏小之臟의 剩削에 따라 결정된다고 하였다. 또한 “太陽人 肝臟十分圖全而與肺相敵者 極完境人也, 一半虧缺而與肺讓倍者 極壞境人也 過此則死, 以此推之 太陽人肝臟部一半爲命脈實數 他臟倣此”라 하여 생명을 유지하는 偏小之臟의 기운의 정도를 命脈實數라 정

의하고 이 命脈實數가 만 이하가 되면 죽는다고 하여 질병과 건강의 상태뿐 아니라 수명까지도 命脈實數에 따라 달라질 수 있다고 설명하였다고 생각할 수 있으며 이러한 命脈實數를 결정짓는 요인으로 ‘存其心 養其性 修其身 立其命’하는 治心 正신을 강조하고 있다³.

이처럼 四象醫學의인 壽命과 老化의 개념은 인 생과정에서 命脈과 本常之氣 및 生息充補之力의 변화를 의미하며 壽命의 長短을 결정짓는 요인은 각 체질에 따른 臟腑大小偏差를 극복하는 保命之主로 無病상태를 유지하며 心慾과 知行, 恭敬과 怠慢, 調養과 病變, 調病 등을 통한 체질적 양생을 의미한다^{7,8}.

少陰人은 腎大脾小하기 때문에 腎陰이 왕성하고 脾陽이 부족하여 腎에는 鬱結이 생기기 쉽고, 脾에는 陽氣不足이 나타나기 쉬운 체질적 특징을 가지고 있다²⁴.

香砂養胃湯은 人蔘, 白朮, 白芍藥, 炙甘草, 半夏, 香附子, 陳皮, 乾薑, 山查肉, 砂仁, 白豆蔻, 生薑, 大棗로 구성되어 있다²⁴. 砂仁은 모든 氣不利를 다스리는 기능으로 心腹痛이나 水穀難消의 증을 개선할 수 있으며 脾胃를 溫緩케 하여 寒冷性의 泄痢나 霍亂 등의 증상을 해소하기도 한다²⁴. 山查는 健脾開陽의 작용으로 食滯와 宿滯를 헤쳐 풀고 結氣를 疏通하며 痰塊나 血塊등 쌓여 멎친 각종의 덩어리를 풀어낸다²⁴. 白朮은 健脾降胃의 효능이 있으며 乾薑, 砂仁, 白豆蔻는 溫裏緩胃의 작용을 한다. 陳皮, 白豆蔻, 生薑은 下氣 기능을 가지고 있으며 香附子는 開鬱行氣 작용을 한다. 半夏는 痰鬱解消 작용이 있으며 山查는 積結解消 그리고 乾薑, 芍藥은 溫經止痛작용을 한다²⁴.

人蔘, 白朮, 白芍藥, 炙甘草, 乾薑은 陽緩之氣를 도와줄수 있는 理中湯類에 속하며 半夏, 陳皮는 食物塞滯를 도와주는 二陳湯類에 속한다²².

그러므로 香砂養胃湯은 二陳湯과 理中湯이 합쳐진 것으로 少陰人 太陰病의 병리기전인 胃氣虛弱, 食物塞滯를 치료하여 少陰人 素病인 脾胃病에 활용하는 主藥이 된다²².

SOD는 주로 세포내 세포질 또는 미토콘드리아 내에 분포하며 대표적인 활성산소중의 하나인 su-

peroxide anion을 제거하여 생체를 방어하는 물질이다³⁵. SOD는 superoxide anion(O_2^-)을 수소원자(H^+)와 반응시켜 과산화수소(H_2O_2)와 산소분자(O_2)로 만드는 작용을 통해 항산화 작용을 하는데 그 작용의 중요성으로 인해 산화적 스트레스에 대한 지표로서 현재까지 가장 많이 측정되고 있는 물질 중의 하나이다³⁶.

비장에서 香砂養胃湯 전탕액을 처리한 결과, 6주령 세포에서는 대조군에 비하여, 52주령 및 68주령 세포에서는 정상군 및 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다(Fig. 1).

췌장에서 香砂養胃湯 전탕액을 처리한 결과, 6주령 세포에서는 정상군과 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다. 68주령 세포에서도 香砂養胃湯 전탕액 처리에 의해 정상군과 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다(Fig. 5).

위장에서 香砂養胃湯 전탕액을 처리한 결과, 모든 주령에서 정상군 및 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다(Fig. 9).

따라서 비장, 췌장, 위에서의 SOD activity가 유의하게 증가하는 것으로 보아 香砂養胃湯이 세포독성에 대한 1차 방어라인인 SOD활성을 증가시킴으로써 항산화작용을 하는 것으로 생각된다.

Glutathione peroxidase는 Se가 주원소로 되어 있으며 free radical을 H_2O 로 변환시켜 생성된 활성 산소를 체외로 배설시키는 해독계 효소이며 항산화물질인 산화형 GSH는 비타민 E와 더불어 불포화지방산의 과산화를 방지하는 작용을 하여 체내 항산화력 증진에 중요한 항산화물질이다³⁷.

Glutathione은 모든 조직에 분포하는 세포내 환원제로서 세포내 수송과 저장, 세포 산화환원의 균형조절, DNA합성, 면역기능 및 세포증식에서 매우 중요한 물질로 이물질 화합물의 탈독성을 위한 반응을 촉진하며 free radical의 항산화를 위한 반응을 촉매한다³⁵.

비장에서는 세포의 주령이 증가함에 따라 GSH 농도가 감소하였다. 52주령과 68주령 세포에서는 香砂養胃湯 전탕액 처리에 의하여 대조군과 정상군에 비하여 GSH 농도가 유의하게 증가하였다(Fig. 2).

췌장에서는 6주령 세포와 52주령 세포에서 香砂養胃湯 전탕액 처리에 의하여 정상군과 대조군에 비하여 GSH 농도가 유의하게 증가하였다. 68주령 세포에서 香砂養胃湯 전탕액 처리에 의해 GSH 농도가 증가하였으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 6).

위장에서는 52주령과 68주령에서 정상군 및 대조군에 비하여 GSH 농도가 유의하게 증가하였다(Fig. 10).

따라서 香砂養胃湯은 비장과 위장에서의 glutathione을 활성화시켜 독성물질에 대한 생체 방어능력을 향상시키는 항산화효과가 있는 것으로 보인다.

MDA(malondialdehyde)는 다불포화지방산이 직접적 또는 간접적인 과산화 과정을 거치면서 분해되어 생성되는 물질이다³⁵. 또한 막의 지질 과산화는 세포기능의 변화 즉, 막투과성의 감소, 세포질로의 이온교환감소, 독성대사물질의 생성, 세포내 glutathione의 대사 변화를 유발한다³⁸.

Free radical은 지질 과산화와 같은 화학적 연쇄반응을 거쳐 조직에 대해 손상을 유발할 수 있으며, 운동 중 증가된 산소섭취는 미토콘드리아의 산화적 인산화와 뒤이은 O_2^- 생성을 증가시켜 지질 과산화와 조직손상을 유발한다³⁹.

또한 유기체의 세포막에 있는 다불포화 인지질이 산소분자상태에서 free radical의 공격을 받게 되면 연쇄반응이 일어나 지방산과, 탄화수소가스 및 지질 과산화물의 형성을 초래한다. MDA는 단백질과 효소의 교차결합을 유발하는 독성화합물이며, 생리학적 기능을 저하시킬 수 있다⁴⁰.

비장에서는 68주령 비장세포에서 香砂養胃湯 전탕액 처리에 의해 MDA 농도가 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3).

췌장에서는 세포의 주령이 증가함에 따라 MDA 농도가 증가하는 경향을 나타내었다. 6주령 세포에서 실험군에서 대조군에 비하여 MDA 농도가 유의하게 감소하였다. 68주령 세포에서 실험군에서 정상군에 비하여 MDA 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

위장에서는 52주령과 68주령 세포에서 HY처리에 의하여 MDA 농도가 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 11).

따라서 香砂養胃湯이 지질과산화의 최종산물인 MDA의 생성을 억제시키고 지질과산화에 의한 생체 변성을 방어하는 기능이 있음을 유추할 수 있으나 이에 관한 보다 많은 연구가 이뤄져야 할 것으로 생각된다.

NO(Nitric oxide)는 병리적 혈관확장, 세포독성, 세포손상 등 생체에 유해한 작용을 나타내고, 염증상태에서 혈관 투과성, 부종 등 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있다¹¹.

비장에서는 세포의 주령이 증가함에 따라 NO 농도가 현저하게 증가하였다. 68주령 세포에서는 대조군에 비하여 실험군에서 NO 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

췌장에서는 세포의 주령이 증가함에 따라 NO 농도가 현저하게 증가하였다. 52주령과 68주령의 실험군에서 대조군에 비하여 NO 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 20).

위장에서는 세포의 주령이 증가함에 따라 NO 농도가 현저하게 증가하였다. 모든 주령에서 실험군에서 NO 농도에 유의한 변화는 나타나지 않았다(Fig. 12).

따라서 香砂養胃湯이 비장과 췌장에서 유해한 자극에 대하여 억제작용을 하리라 생각된다.

이상의 결과로 보아 香砂養胃湯은 산화적 스트레스에 대한 생체 방어능을 향상시키고 비장, 췌장, 위장의 손상을 억제하여 항산화 효과를 발휘하는 것으로 사료된다. 아울러 少陰人의 偏小之臟인 비장의 기능을 회복시키고 항산화능을 증대시켜 少陰人의 노화예방에 응용 가능성이 있을 것으로 사료되며 향후 임상적 활용 및 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 結 論

香砂養胃湯의 항산화와 관련된 항노화 효과를 입증하기 위하여 SD rat의 비장과 췌장, 위장조직을 대상으로 SOD activity, Glutathione 농도, NO 농도, MDA농도를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 香砂養胃湯은 52, 68주령 백서의 비장세포에서 정상군 및 대조군에 비하여 SOD activity와 GSH농도를 유의하게 증가시켰고, 68주령에서 NO농도를 유의하게 감소시켰다.

2. 香砂養胃湯은 68주령 백서의 췌장세포에서 정상군 및 대조군에 비하여 SOD activity를, 52주령에서 GSH농도를 유의하게 증가시켰고, 68주령에서 MDA농도를, 52, 68주령에서 NO농도를 유의하게 감소시켰다.

3. 香砂養胃湯은 52, 68주령 백서의 위장세포에서 정상군 및 대조군에 비하여 SOD activity를 유의하게 증가시켰다.

VI. 參 考 文 獻

1. 최선화. 사회문제와 사회복지. 양서원, 서울, 2006: 419.
2. 김동석. 공중보건학. 수문사, 서울, 1997:379.
3. 정용재. 동의보감과 동의수세보원사상초본권에 나타난 양생관에 대한 고찰. 사상체질의학회지. 2002;14(2):25-34.
4. 河北醫學院 校釋. 靈樞經校釋. 人民衛生出版社, 북경, 1982:355.
5. 程士德. 素問注釋匯粹. 人民衛生出版社, 일중사 영인, 북경, 1987:95
6. 李濟馬. 四象醫學原論. 행림출판, 서울, 1992: 114.
7. 김선민. 東醫壽世保元四象草本卷에서의 양생에 관한 고찰. 사상체질의학회지. 2000;12(1): 101-109.
8. 유정희. 老化와 수명에 관한 사상의학적 양생관에 대한 고찰, 사상체질의학회지. 2002;14(3): 7-16.
9. Harman D.. The free radical theory of aging. New York, Acedemic Press, 1982;5:255-275.
10. 양미경. 노화촉진생쥐(SAM)에서 간조직의 SOD 활성에 대해 paraquat가 미치는 영향. 한국미용학회지. 2005;11(3):191-6.
11. 이종무, 이병렬. 택사 약침의 항산화효과에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 2003;20(1):

- 159-76.
12. 김영해, 김삼성. 호도 약침액의 항산화 효과에 대한 연구. 대한한의학회지. 17(2):9-20, 1996.
 13. 임락철. 적하수오 약침의 AAPH처리된 흰쥐에 대한 항산화작용, 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2000;8(2):361-74.
 14. 이준성, 임윤경, 김영일. 족삼리 전침이 흰쥐의 노화에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007;24(3):156.
 15. 정광희, 성낙술, 이영종. 박하의 항산화 효능에 대한 연구(1). 대한본초학회지. 2005;20(4):103-12.
 16. 김영균, 양기호, 조수인. 석곡의 항산화효과. 대한본초학회지. 2005;20(3):53-60.
 17. 조수인, 오원우. 황금의 항산화효과. 대한본초학회지. 2005;20(3):67-74
 18. 박성민, 임명현, 이준희. 보중익기탕과 육미지황탕이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4):175-91.
 19. 許浚. 東醫寶鑑. 南山堂, 서울, 1976:643.
 20. 具本泓. 消化器疾患의 韓方臨床. 杏林書院, 서울, 1987.
 21. 陸昌洙. 現代方藥合編, 癸丑文化社, 서울, 1977:333.
 22. 한경석, 박성식. 少陰人 약리의 형성과정 관한 연구. 사상체질의학회지. 2006;18(2):15-24.
 23. 송일병 외. 사상의학. 집문당, 서울, 2004:343, 366.
 24. 이정찬. 신사상의학론Ⅱ. 목과도, 서울, 2001:79-83.
 25. Bansal VS, Hattori H, Orihel D, Kanfer JN. Distribution of selected phospholipid modifying enzymes in rat brain microsomal subfractions prepared by density gradient zonal rotor centrifugation. Neurochem Res. 1985;10(4):439-451.
 26. 김주영. 흡연 여고생의 지질과산화물 및 항산화 관련효소 활성도와 무기질 영양상태 평가. 서울여자대학교 석사학위 논문. 1998.
 27. Sies H. Oxidative stress, Oxidants and antioxidants Academic press, HB Jovanovich publishers, 1991.
 28. Ji L.L.. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. Medicine and science in sports and exercise. 1993;25(2):225-231.
 29. Oyanagui.Y. SOD and active oxigen modulator. Nihon gakukan, Tokyo, 1989:17-36.
 30. 오유진. 활성산소가 질병의 원인이었다. 이화문화출판사, 서울, 1997:57-67.
 31. 이강평. 최대운동시 활성산소에 의한 잠재적 악영향 및 항산화제 투여효과. 한국체육학회지. 1993;36(1):243-255.
 32. Amers BN, Gold LS, Willet WC. The causes and prevention od cancer. Procd Natl Acad sci. 1995;92:5258-65.
 33. 임응추. 황제내경장구색인. 일증사, 서울, 1992:7-9.
 34. 김달래 編譯. 東醫壽世保元四象草藥. 정담, 서울, 1999:41-46.
 35. 이귀녕, 권오현. 임상병리파일. 의학문화사, 서울, 2003:125, 180, 182, 345, 367, 399, 498, 955, 334-335, 373-374.
 36. Lyoyd. D. How to avoid oxygen. Sience, 1999:249, 286.
 37. Sakamoto Y. et al.. Glutathione(3rd Ed). Scientific, 1989:5.
 38. Warren, J.A, Jenkins, R.R. Elevated muscle vitamin E does not attenuate eccentric exercise-induced muscle injury. J. appl. Physiol. 1992;72:2168-2175.
 39. Maxwell, S.R.J., Jakeman. P. Changes in plasma antioxidant status during eccentric exercise and the effect of vitamin supplementation. Free. Rad. Res. Commun. 1993;19:191-201.
 40. Davies, K.J.A., Packer. Free radical and tissue damage produced by exercise, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1982;107:1198-1205.