사상체질의학회지 2008;20(2):85-97
J of Sasang Constitutional Medicine
Vol. 20, No. 2, 2008:85-97
http://www.esasang.com

荊防地黃湯 전탕액이 노화쥐의 신장, 비장, 방광 세포의 항산화능에 미치는 영향

이한얼 · 안택원

대전대학교 한의과대학 사상체질과

Abstract

Anti-Oxidant Effect of Hyeongbangjiwhang-tang Decoction in Kidney, Bladder and Spleen Cell of SD Rats

Lee Han-Eol, Ahn Taek-Won

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

1. Objectives

The purpose of this study is to investigate the anti-aging and anti-oxidant effects of Hyeongbangjiwhang-tang decoction(HGD) in SD rats.

2. Methods

This experiment was used the tissue of kidney, bladder and spleen 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 HG-treated cells.

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

3. Results and Conclusions

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

These results suggest that HGD(Hyeongbangjiwhang-tang) has anti-oxidant effects in aged rats.

Key Words : Hyeongbangjiwhang-tang Decoction, Anti-oxidant Effect, SOD Activity, GSH, MDA, NO

• 접수일 2008년 06월 28일; 승인일 2008년 07월 12일
• 교신저자 : 안택원
충남 천안시 두정동 621번지 대전대천안한방병원 사상체질과
Tel : +82-41-521-7538 Fax : +82-41-521-7377
E-mail : twahn@dju.ac.kr

Ⅰ. 緖 論

우리나라는 65세 이상 노인인구 비율이 2000년에 7.2%에 이르러 '고령화 사회'에 접어들었고, 2018년에는 그 비율이 14.3%가 되어 '고령사회'로, 2026년에는 다시 20.8%가 되어 '초고령사회'에 도달할 것으로 예측되고 있다[1].

노화는 생명체의 성장과 시간 경과에 따라 진행되는 일련의 퇴행성변화를 일으키는 자연적인 변화 과정으로 신체내의 평형이 깨어져 내적·외적 환경에 대한 적응을 어렵게 만드는 신체의 구조와 기능의 점진적인 저하를 유발하여 질병을 증가시키고 궁극적으로 사망을 초래하는 것을 의미한다[2].

노화현상에 대해 최근에는 산소라디칼 등이 대사과정에서 끊임없이 생성되어 이에 의한 손상이 축적됨으로 인하여 나타난다는 소위 "활성산소설"이 많은 관심을 얻고 있다[3,4].

한의학에서는 노화를 生, 長, 壯, 老, 死하는 인류생명의 자연법칙으로 인식하였고 노화의 원인을 나이가 증가함에 따라서 장기간에 걸친 陰陽, 臟腑, 氣血, 經絡, 情志의 변화로 인한 생명의 衰退현상으로 파악하였다[5,6].

東武 李濟馬는 『濟衆新編·五福論』[7]에서 인생의 가장 큰 즐거움은 장수하는 것이라 하였으며, 수명의 장단을 결정짓는 요인은 각 체질에 따른 臟腑大小偏差를 극복하는 체질적 양생임을 강조하였다[8-11].

荊防地黃湯은 少陽人 表證의 身寒 泄瀉 亡陰證과 浮腫의 初結症 그리고 頭腹痛滿 泄瀉 凡虛弱者에 활용되는 처방이며 少陽人 병리 과정에서 陽氣熾盛하여 隔陰으로 발생한 亡陰證과 같은 險證 및 虛弱者에게 쓰는 처방이다[12].

최근의 荊防地黃湯에 관련된 연구는 노화동물의 치매치료 효과에 대한 연구[13]와 간경변 예방에 미치는 영향[14], 폐렴 항균활성물질[15]에 대한 연구가 있었으나 항산화능에 대한 보고는 미흡한 실정이며 더욱이 少陽人의 偏大偏少한 비장, 신장, 방광조직에 미치는 항산화능에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 荊防地黃湯 전탕액(Hyeongbangji-whang-tang decoction, 이하 HGD)이 노화쥐의 신장, 비장, 방광세포의 항산화능에 미치는 영향을 알아보고자 Murphy[16] 등의 연구를 기초 6주령의 Sprague-Dawley(이하 SD) rat을 성장기, 52주령의 SD rat을 노화기, 68주령의 SD rat을 말기노화기로 설정하고, 각 주령 SD rat의 신장과 비장, 방광조직에 아무것도 처리하지 않은 정상세포를 정상군으로, saline을 처리한 세포를 대조군으로, HGD를 처리한 세포를 실험군으로 분류하고 48시간동안 배양시킨 후 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 중앙실험동물(주)에서 공급받아, 6주령은 바로 실험에 사용하였으며, 36주령은 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하며, 실온 (22±2℃)을 유지하여 각각 52주령과 68주령까지 사육하여 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 荊防地黃湯은 D대학교 한방병원에서 구입하여 이용하였다. 荊防地黃湯의 구성[12]은 다음과 같다(Table. 1).

2. 방법

1) 검액의 제조

荊防地黃湯 처방 비율에 따라, 총량 100g에 맞춰 약재를 준비하였다. 1L의 증류수를 가하고 약탕기(웅진약탕기. 한국)를 이용하여 3시간 동안 끓인 다음 여과지로 여과한 후, rotary evaporator에 감압농축을 실시하였다. 감압농축을 실시하여 얻은 분말은 -20℃에서 보관하였다.

Table 1. The Compositions of Hyeongbangjiwhang-tang

Herbs	Scientific name	Amount (g)
熟地黃	*Rehmanniae Radix Preparat*	8
山茱萸	*Corni Fructus*	8
茯 苓	*Poria*	8
澤 瀉	*Alismatis Rhizoma*	8
車前子	*Plantaginis Semen*	4
羌 活	*Notopterygil Rhizoma*	4
獨 活	*Angelicae Pubescentis Radix*	4
荊 芥	*Schizonepetae Herba*	4
防 風	*Ledebouriellae Radix*	4
Total amount		52

2) 실험군 설정

본 실험은 각각 6주령, 52주령, 68주령의 SD rat의 신장, 방광 및 비장 조직으로부터 얻은 실질세포를 이용하여 수행하였다. 아무것도 처리하지 않은 정상세포(not-treated cell)를 정상군으로, saline을 처리한 세포(saline-treated cell)를 대조군으로, 荊防地黃湯 전탕액(HGD)을 처리한 세포(HG-treated cell)를 실험군으로 나누어 분류하였고, 조직으로부터 분리된 세포를 안정화시킨 후, 약물을 6주령의 동물에서 얻은 실질세포는 500㎎/㎖, 52주령의 동물에서 얻은 실질세포는 100㎍/㎖, 68주령의 동물에서 얻은 실질세포는 50㎍/㎖으로 처리하여 48시간동안 배양시켰다.

3) 장기 세포에서의 산화 억제 효과 측정

(1) 세포 분획

Bansal등의 방법[17]을 변형하여, 배양한 세포들을 모아 sonicate를 이용하여 균질화한다. 균질화한 세포는 600×g에서 10분간 원심분리하여 균질화되지 않은 조직 등을 제거한 후 상등액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 얻는다. 이 상등액을 105,000×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 20,000 rpm으로 얻은 sample을 사용하였으며, sample solution을 96well plate의 각 well과 blank 2에 20㎕씩 분주한다. blank 1과 blank 3에 D.W.를 분주한 뒤, WST working solution을 200㎕/well으로 모든 well에 첨가한다. blank 2와 blank 3well에 dilution buffer를 20 ㎕씩 분주하고, enzyme working solution을 각 sample well과 blank 1 에 20 ㎕/well으로 분주한다. 20분 동안 37℃에서 incubating을 실시하고 450 ㎚에서 흡광도를 측정하고 SOD 활성도를 다음의 공식에 의하여 환산하였다.

SOD activity (inhibition rate%) =

$$=\{\frac{[(A_{blank1} - A_{blank3}) - (A_{sample} - A_{blank2})]}{(A_{blank1} - A_{blank3})}\}\times 100$$

(3) Glutathione

Glutathione함량은 GSH assay kit를 이용하여 405 ㎚에서 흡광도를 측정해서 결과를 얻었다.

(4) NO assay

NO함량은 NO assay kit를 이용하여 450 ㎚에서 흡광도를 측정해서 결과를 얻었다.

(5) Lipid peroxidation

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

4) 통계처리

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

Ⅲ. 結 果

1. 세포에서의 산화반응 억제 효과

1) 신장

(1) SOD activity

세포의 주령이 증가함에 따라 SOD 활성이 감소하였다. HGD를 처리한 결과, 6주령에서는 정상군에 비하여, 68주령에서는 정상군 및 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다(Fig. 1).

(2) Glutathione

세포의 주령이 증가함에 따라 GSH 농도가 감소하는 경향을 나타내었다. 52주령 세포에서, 대조군과 실험군에서 정상군에 비하여 GSH 농도가 유의하게 감소하였다. 6주령 세포와 68주령 세포에서는 HGD 처리에 의하여 GSH 농도에 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 2).

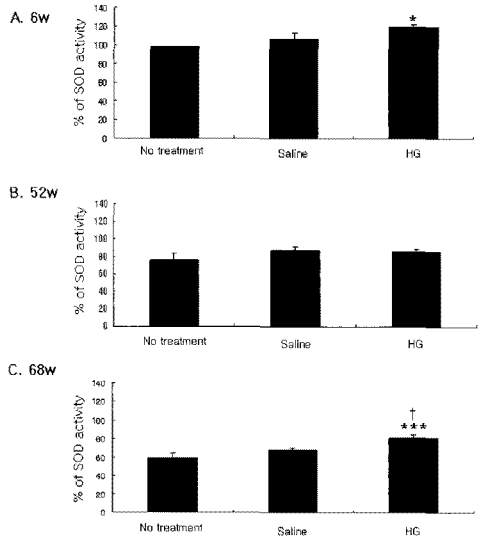

Fig. 1. Effect of HG decoction on SOD activity in kidney cells from old rats.
Kidney cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively and SOD activity was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.
***: $p<0.001$, *: $p<0.05$ compared to normal group by ANOVA test.
†: $p<0.05$ compared to saline group by ANOVA test.

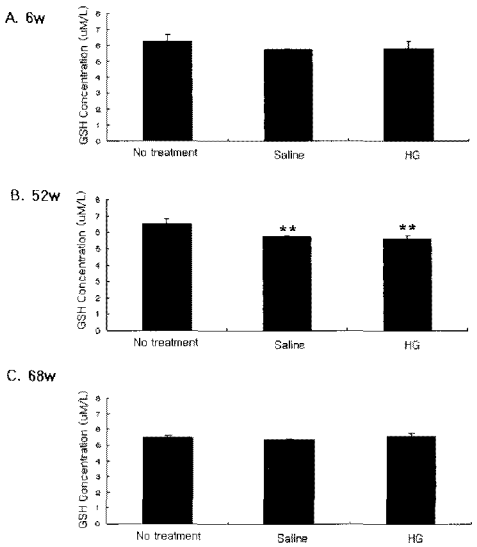

Fig. 2. Effect of HG decoction on GSH level in kidney cells from old rats.
Kidney cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively and GSH level was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.
**: $p<0.01$ compared to normal group by ANOVA test.

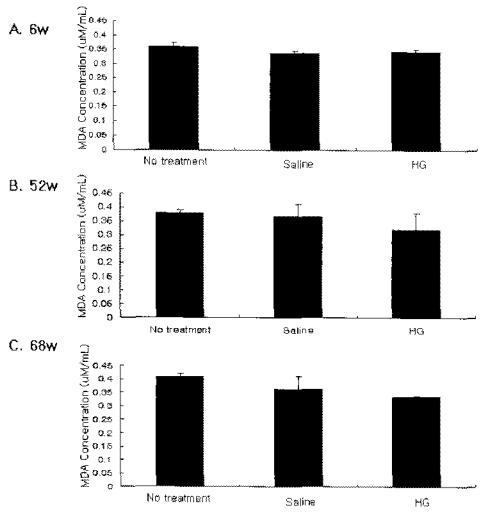

Fig. 3. Effect of HG decoction on MDA level in kidney cells from old rats.
Kidney cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively and MDA level was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.

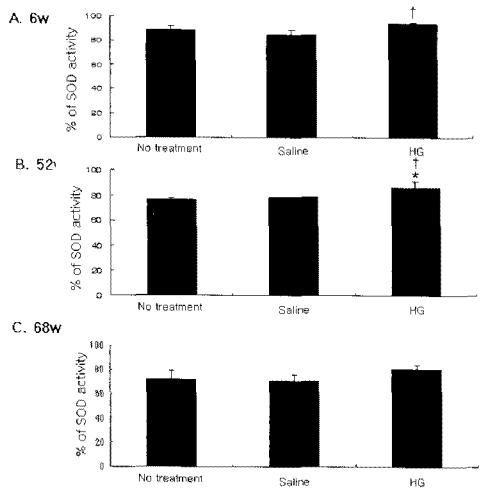

Fig. 5. Effect of HG decoction on SOD activity in urinary bladder cells from old rats.
Cells from urinary bladder of 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively, and SOD activity was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.
*: p<0.05 compared to no treatment group by ANOVA test.
†: p<0.05 compared to saline group by ANOVA test.

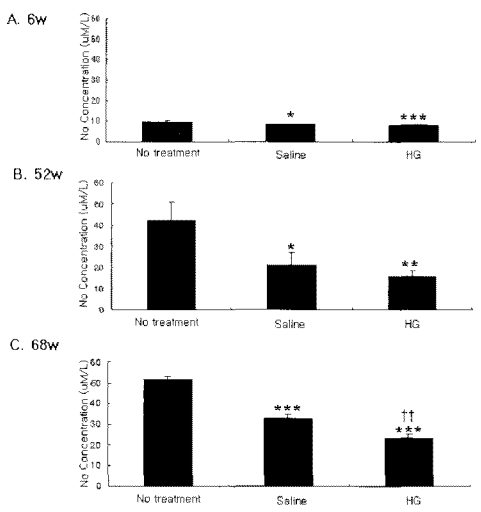

Fig. 4. Effect of HG decoction on NO level in kidney cells from old rats.
Kidney cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively and NO level was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.
***: p<0.001, **: p<0.01, *: p<0.05 compared to normal group by ANOVA test.
††: p<0.01 compared to saline group by ANOVA test.

(3) Lipid peroxidation

세포의 주령이 증가함에 따라 MDA 농도가 증가하는 경향을 나타내었다. 52주령과 68주령 신장 세포에서 HGD 처리에 의해 MDA 농도가 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3).

(4) NO assay

세포의 주령이 증가함에 따라 NO 농도가 현저하게 증가하였다. 반면, HGD 처리에 의해 모든 주령에서 NO 농도가 감소하는 경향을 보였다. 특히 68주령 세포에서는 정상군 및 대조군에 비하여 실험군에서 NO 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

2) 방광

(1) SOD activity

세포의 주령이 증가함에 따라 SOD 활성이

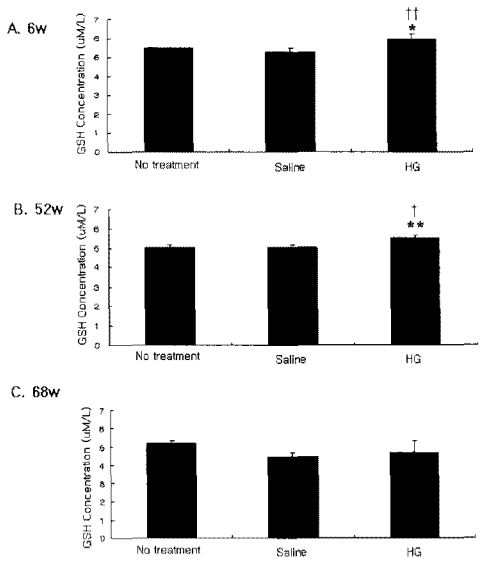

Fig. 6. Effect of HG decoction on GSH level in urinary bladder cells from old rats.
Cells from urinary bladder of 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively, and GSH level was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.
**: p<0.01, *: p<0.05 compared to no treatment group by ANOVA test.
††: p<0.01, †: p<0.05 compared to saline group by ANOVA test.

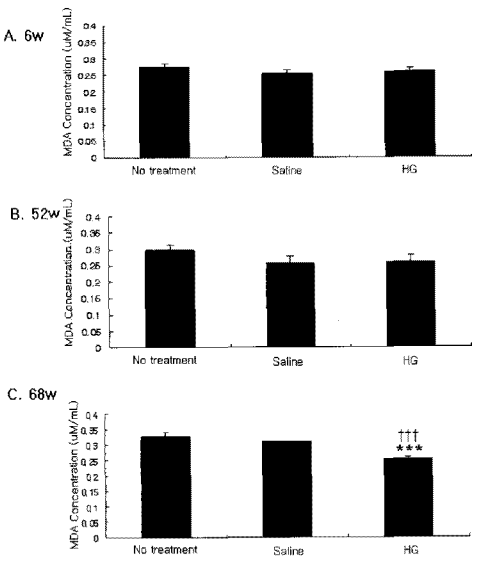

Fig. 7. Effect of HG decoction on MDA level in urinary bladder cells from old rats.
Cells from urinary bladder of 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively, and MDA level was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.
***: p<0.001 compared to no treatment group by ANOVA test.
†††: p<0.001 compared to saline group by ANOVA test.

감소하였다. HGD를 처리한 결과, 6주령 세포에서는 대조군에 비하여, 52주령 세포에서는 정상군과 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다. 68주령 세포에서도 HGD 처리에 의해 SOD activity가 약간 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 5).

(2) Glutathione

6주령 세포와 52주령 세포에서 HGD 처리에 의하여 정상군과 대조군에 비하여 GSH 농도가 유의하게 증가하였다(Fig. 6).

(3) Lipid peroxidation

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

(4) NO assay

세포의 주령이 증가함에 따라 NO 농도가 현저하게 증가하였다. 52주령과 68주령의 실험군에서 대조군에 비하여 NO 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 8).

3) 비장

(1) SOD activity

세포의 주령이 증가함에 따라 SOD 활성이 감소하였다. HGD를 처리한 결과, 6주령에서는 대조군에 비하여, 52주령과 68주령에서는 정상군과 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다(Fig. 9).

(2) Glutathione

세포의 주령이 증가함에 따라 비장 세포내

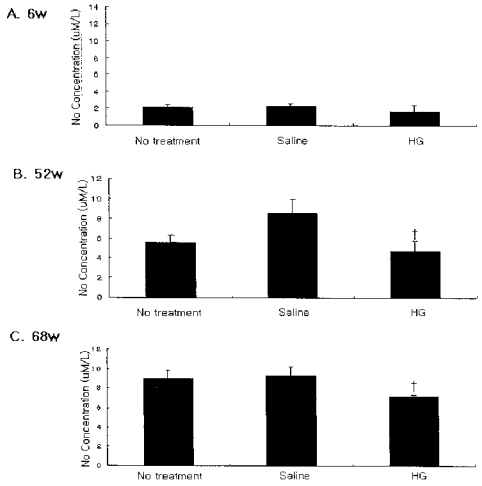

Fig. 8. Effect of HG decoction on NO level in urinary bladder cells from old rats.
Cells from urinary bladder of 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively, and NO level was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.
†: p<0.05 compared to saline group by ANOVA test.

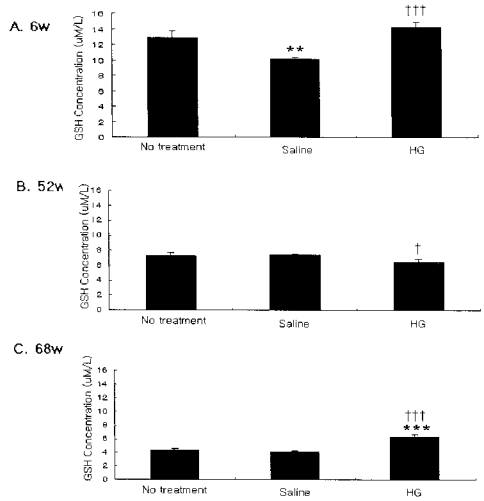

Fig. 10. Effect of HG decoction on GSH level in spleen cells from old rats.
Spleen cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively, and GSH level was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.
***: p<0.001, **: p<0.01 *: p<0.05 compared to no treatment group by ANOVA test.
†††: p<0.001, †: p<0.05 compared to saline group by ANOVA test.

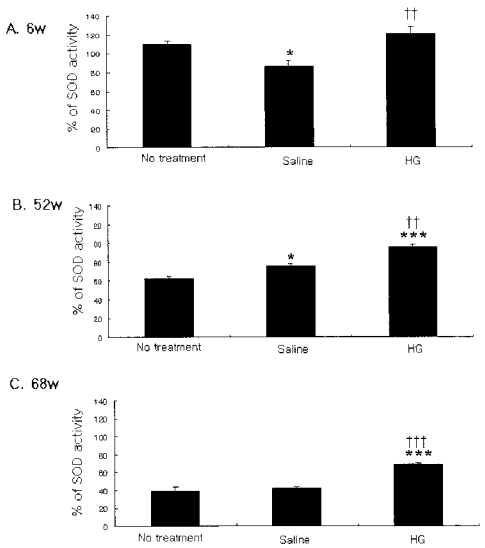

Fig. 9. Effect of HG decoction on SOD activity in spleen cells from old rats.
Spleen cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively, and SOD activity was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.
***: p<0.001, *: p<0.05 compared to no treatment group by ANOVA test.
†††: p<0.001, ††: p<0.01 compared to saline group by ANOVA test.

GSH 농도가 현저히 감소하였다. 6주령에서는 대조군에 비하여, 68주령에서는 정상군 및 대조군에 비하여 실험군에서 GSH 농도가 유의하게 증가하였다(Fig. 10).

(3) Lipid peroxidation

68주령의 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 MDA 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

(4) NO assay

세포의 주령이 증가함에 따라 NO 농도가 현저하게 증가하였다. 68주령의 실험군에서 대조군에 비하여 NO 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 12).

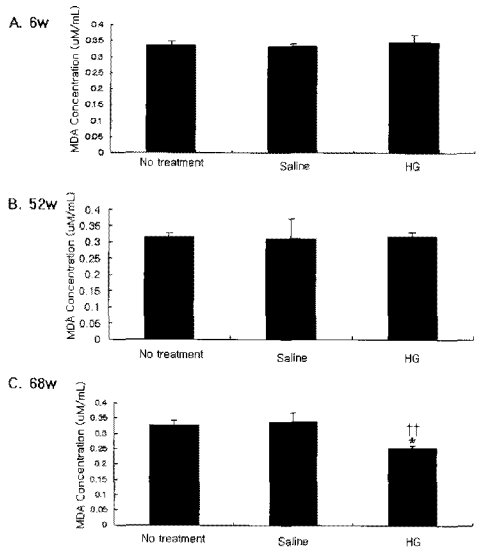

Fig. 11. Effect of HG decoction on MDA level in spleen cells from old rats.
Spleen cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively, and MDA level was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.
*: $p<0.05$ compared to no treatment group by ANOVA test.
††: $p<0.01$ compared to saline group by ANOVA test.

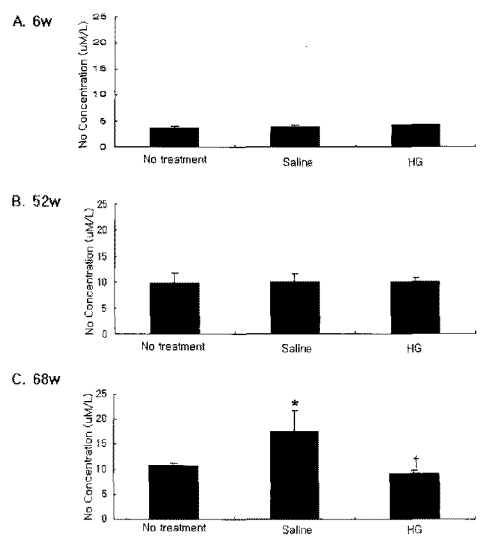

Fig. 12. Effect of HG decoction on NO level in spleen cells from old rats.
Spleen cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500㎍/㎖, 100㎍/㎖, 50㎍/㎖ HG decoction respectively, and NO level was estimated by ELISA. Values represent the means±SD of 3 mice.
*: $p<0.05$ compared to no treatment group by ANOVA test.
†: $p<0.05$ compared to saline group by ANOVA test.

Ⅳ. 考 察

전세계적으로 인간의 평균수명은 증가하고 있는 실정인데 한국은 65세 이상 노인인구 비율이 2007년 7월 1일 기준으로 481만명으로 총인구의 9.9%를 차지하고 있고 2018년에는 그 비율이 14.3%가 되어 '고령사회'에 도달할 것으로 예측되고 있다[1]. 이와 같이 노인인구의 비율이 증가하면서 장수하는 만큼 건강하고 질 높은 삶을 누리는 것에 대한 관심은 증대되고 있으며 노화방지에 대한 의학적 요구가 증대되고 있다[18].

인간은 생물체이기 때문에 출생과 동시에 연령이 증가함에 따라 노화가 시작된다. 일반적으로 노화란, 동물의 발육, 성장, 성숙과 노화의 생물학적 과정에서 형태적 기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저하로 결국 사망에 이르는 보편적인 생리적 현상으로 노화색소의 침착, 소지방구의 축적, 세포실질의 감소, 핵의 위축, 효소의 생성 및 기능저하, 혈구세포의 감소, 혈청성분의 변화, 산소의 활성 및 기능저하 등 신체의 퇴화적 변화가 나타나며, 뇌신경, 내분비 및 각 장부계통의 퇴행성 변화가 나타난다[19].

노화에 관한 학설로는 여러 가지 가설이 제시되고 있는데, 그 종류로는 과오설, 체세포돌연변이설, 전사변경설, 예정설, 프로그램 소멸설, 대사산물 축적설, 소모학설, 교차결합학설, 유해산소설, 면역학설, 미토콘드리아설, 텔로메어학설 등이 있다[20]. 이 중 유해산소설 즉 free radical설은 현재까지 나온 노화 기전설 중 주목받고 있는 학설이며 이에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있다. Free radical설은 노화가 진행되는 동안 산소에서 변환된 free radical에 의해 세포내 산화적 손상이

축적되어 질병과 죽음을 초래한다는 설로, 인체에 흡인된 산소의 일부가 free radical인 reactive oxygen species(ROS)로 변환되어 지질의 과산화반응을 진행시켜 세포막의 파괴, 세포의 노화와 괴사, DNA 손상 등을 유발하여 생체의 기능을 약화시킴으로써 노화를 진행시킨다고 보고되고 있다[21,22].

Free radical은 짝지워지지 않은 전자(unpaired electron)를 가진 원자나 분자를 말하는 것으로, 정상적인 세포대사과정에서 생성되는데 생화학적으로 중요한 것은 산소(O_2^-, H_2O_2, OH^-), 질소(NO), 탄소(CCl_3) 중심의 라디칼이다[23,24]. 특히 산소를 함유하고 있는 free radical을 활성산소라 지칭하며, 이러한 반응산물은 O_2가 H_2O로 되는 환원과정에서 생성되는 중간산물이다. 포유류에서 일어나는 free radical반응은 대부분이 산소대사 과정에서 발생하는 산소 라디칼(O_2^-, H_2O_2, OH^-)에 의한 것으로 알려져 있다[25]. 이들 free radical들은 반응성이 매우 강해서 여러 세포내 거대분자를 변성시킬 수 있는데, 특히 불포화 지방산을 포함한 지질을 쉽게 산화시켜 lipid peroxidation을 초래하여 최종산물인 MDA(malondialdehyde)의 함량이 증가되고 결국 여러 세포막 구조의 기능을 상실케 한다[26].

『素問·陰陽應象大論』[27]에서는 "年五十體重 耳目不聽明矣 年六十陰痿氣大衰 九竅不利...."라 하여 노화에 따른 각 臟器의 機能的, 構造的 변화를 나타냈고, 『靈樞·營衛生會篇』[28]에서는 "老者之氣血衰 其肌肉枯 氣道澁...."이라 하여 기혈변화에 의한 신체적 변화를, 『靈樞·天年篇』[29]에서는 "五十歲 肝氣始衰 肝葉始薄 目始不明.... 六十歲 心氣始衰.... 七十歲 脾氣虛.... 八十歲 肺氣虛.... 九十歲 腎氣焦.... 百歲五臟皆虛 腎氣皆怯...."이라고 하여 五臟의 노화에 대하여 설명하고 있다.

최근 한약제 및 자침을 통한 노화에 대한 연구로는 박 등[30]은 補中益氣湯과 六味地黃湯이 간장내 항산화작용에 미치는 영향에 대하여 연구하였고, 배 등[31]은 鹿茸大補湯의 항산화작용에 대하여 연구하였다. 또 김 등[32]은 호도약침액의 유리기 소거와 항산화 효과에 대한 실험적 연구를 하였고, 이 등[33]은 足三里 전침이 노화에 미치는 영향에 대하여 연구하여 足三里 전침은 활성산소에 대한 내성을 증가시키며, 항산화효소의 감소를 억제하여 혈중에 산화생성물의 증가를 억제시키며 면역력을 증가시키는 효과가 있어 항산화효과가 있다는 연구결과를 발표하였다.

『東醫壽世保元 四象本草卷』[34]에서 "但老年不如壯年 少年不如幼年 少年生植得幼年四分之三 壯年生息得幼年四分之二 老年生息得幼年四分之一 故平人以四十歲爲中年 極壽人以六十歲爲中年" 이라하여 인생의 단계를 幼年, 少年, 壯年, 老年으로 나누어, 老年에는 生息充補之道가 유년기의 4분의 1로 줄기 때문에 노화가 진행되고 生息充補之氣의 보강이 노화방지의 방법임을 설명하였다. 한편, 平人은 40세부터 중년기가 되지만, 極壽人은 64세부터가 중년기라고 하여 장수하려면 중년기 이전의 血氣로써 命脈을 잘 보충하여야 한다고 강조하였다. 또한, 64세의 命脈이 內傷이나 外感에 걸리면 7,80세에 命을 다하나, 養生을 잘하여 神仙의 경지에 이르면 128세까지 장수할 수 있다고 하여 인간의 수명의 한계를 128세까지로 보았다. 또한 『濟衆新編·五福論』[7]에서는 인생의 지극한 즐거움 다섯 가지 중에 첫번째가 장수하는 것이라 하여 장수하면서 건강을 유지하는 것에 대한 중요함을 기술하고 장수를 위해 각 체질별로 다른 養生法을 제시하였다.

사상의학은 사상인의 병을 偏小之臟을 중심으로 설명하므로 사상인의 병증을 해결하는데 있어서 먼저 각 체질의 小한 장부의 기능을 어떻게 유지시키는가 하는 것이 중요한 문제가 된다. 이를 해결하기 위해서는 사상인의 小한 臟의 기능을 중심으로 설정된 保命之主를 도와주는 약물을 사용해야 한다. 사상인 중 少陽人은 脾大腎小하여 신장기능이 약화되어 있으므로 신장기능을 중심으로 설정된 保命之主를 도와주어야 하는데 少陽人의 保命之主인 陰淸之氣를 도와주기 위하여 淸陽시키는 처방을 사용한다[12].

荊防地黃湯은 正傳의 六味地黃湯과 草本卷의 黃柏地黃湯에서 유래된 처방으로 甲午舊本

에는 記載되지 않고 辛丑新本에 처음 등장하는 처방이다. 주로 少陽人 表證의 身寒·泄瀉·亡陰證과 浮腫의 初結症 그리고 頭腹痛·滿泄瀉·凡虛弱者에 활용되는 처방으로 地黃白虎湯보다 降陰의 약력이 10배나 강한 처방으로 기술되어 있다[12].

본 처방은 表病證 처방 중에 유일하게 熟地黃을 사용한 신방으로 고방 六味地黃湯之劑인 熟地黃, 山茱萸, 茯苓, 澤瀉에 陰虛浮腫을 사용하는 車前子가 가미되어 있고 降陰하는 荊芥, 防風, 羌活, 獨活이 사용되어 매우 단순한 약물구성을 이루고 있다. 또한 본 처방은 六味地黃湯劑의 분량을 다시 조정하여 승양시킨 것으로 『辛丑本』에서 처음 시도한 것이며 그 효능에 대한 임상적 경험도 기술하고 있다. 그래서 본 처방은 升陽하는 熟地黃의 분량을 줄이면서 牧丹皮를 제거하고 降陰하는 荊芥, 防風, 羌活, 獨活을 모두 사용하여 降陰에 주안점을 두면서 升陽시키는 처방이다[35].

이와 같이 荊防地黃湯은 주로 陽氣熾盛하여 隔陰으로 발생한 亡陰證과 같은 險證 및 虛弱者에게 쓰이는데[12], 본 처방을 통하여 保命之主인 陰淸之氣를 돕고 偏大偏小한 비장과 신장, 방광의 기능을 회복시키면 건강이 유지되며 노화방지에 효과가 있을 것으로 기대된다.

최근의 荊防地黃湯에 관련된 연구를 보면 노화동물에 대한 치매치료 효과에 대한 연구[13]와 간경변 예방에 미치는 영향[14], 荊防地黃湯 유래의 폐렴 항균활성물질[15]에 대한 연구가 있었으나 荊防地黃湯의 항산화능에 대한 보고는 미흡한 실정이며 더욱이 少陽人의 偏大偏少한 비장, 신장, 방광조직에 미치는 항산화능에 대한 연구는 찾아보기 힘든 실정이다

이에 저자는 荊防地黃湯 전탕액(HGD)이 노화쥐의 신장, 비장, 방광세포의 항산화능에 미치는 영향을 알아보고자 Murphy[16] 등의 연구를 기초 6주령의 SD rat을 성장기, 52주령의 SD rat을 노화기, 68주령의 SD rat을 말기노화기로 설정하고 각 주령에 따라 SD rat의 신장과 비장, 방광조직에 아무것도 처리하지 않은 정상세포를 정상군으로, saline을 처리한 세포를 대조군으로, HGD를 처리한 세포를 실험군으로 삼고 SOD activity, Glutathione 농도, NO 농도, MDA농도를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

6주령, 52주령, 68주령의 SD rat의 신장과 비장, 방광세포에서 정상군, 대조군, 실험군의 각각의 SOD activity, Glutathione 농도, NO 농도, MDA농도를 측정하였다.

SOD는 활성산소 scavenger로서 산소 대사과정에서 가장 먼저 생성되는 산소라디칼을 제거하는 효소[36,37]이고, glutathione은 모든 조직에 분포하여 세포의 유지 및 생존에 필수적인 방어기구를 수행하며, 특히 방사선 장애에 대한 방어, 세포막의 유지, 이물질의 해독 등 생명유지에 중요한 작용을 하고 있으며[38], glutathione peroxidase는 glutathione을 산화시키는 과정에서 hydrogen peroxidase나 lipid peroxidase등을 제거하는 효소이다[39].

NO는 무기저분자 radical로서 매우 불안정하며, 반응성이 강한 물질로서 생체내에서 신경전달기능, 혈액응고 및 혈압조절기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등에서의 역할이 알려지고 있다. NO는 병리적 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등 생체에 유해한 작용을 나타내고, 염증상태에서 혈관 투과성 증대, 부종 등 염증반응을 촉진시키고, cyclooxygenase를 활성화하여 prostaglandin과 같은 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[40].

지질과 산화물의 생성경로는 고도의 불포화지방산으로부터 $O2^-$, OH^-등의 반응성이 강한 자유기가 수소를 탈취함으로서 fatty acid radical을 생성하고, peroxy radical은 다시 인접한 부위에 있는 탄화수소와 연쇄적으로 반응하면서 결국 지방과산화물을 형성한다[41]. 다가불포화지방산은 직접적 또는 간접적으로 과산화과정을 통해 분해되어 결국엔 MDA를 형성한다. 이 물질은 단백질의 제1차 아미노그룹과 격렬하게 반응할 수 있기 때문에 세포막에 결합된 효소의 생성도를 떨어뜨리거나 지방층의 견고성을 증가시킨다[42]. 이러한 불포화지방산과의 반응은 연쇄적으로 일어나 계속적으로 많은 free radical 형성을 유도하므로, 불포화지방산

의 산화는 세포내에서 일어나는 free radical 형성 반응으로 가장 중요하게 생각되어진다. 측정한 결과는 다음과 같다.

6주령, 52주령 및 68주령 rat의 신장 세포를 분리하여 HGD를 처리한 후 SOD activity, GSH 농도, NO 농도 및 MDA 농도를 측정하였다.

HGD를 처리한 결과, 6주령에서는 정상군에 비하여, 68주령에서는 정상군 및 대조군에 비하여 실험군의 SOD activity가 유의하게($p<0.001$) 증가하였다(Fig. 1). HGD이 신장세포의 항산화능에 유의하게 작용함을 알 수 있다.

52주령 세포에서, 대조군과 실험군 모두에서 정상군에 비하여 GSH 농도가 유의하게($p<0.01$) 감소하였다. 6주령 세포와 68주령 세포에서는 HGD 처리에 의하여 GSH 농도에 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 2).

52주령과 68주령 신장 세포에서 HGD 처리에 의해 MDA 농도가 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3).

반면, HGD 처리에 의해 모든 주령에서 NO 농도가 감소하는 경향을 보였다. 특히 68주령 세포에서는 정상군 및 대조군에 비하여 HGD를 처리한 세포에서 NO 농도가 유의하게($p<0.01$) 감소하였다(Fig. 4). HGD는 NO에 모든 연령에서 민감하게 작용하나 특히 노화기 신장세포에서 유의하게 감소한 것으로 보아 노화세포에 대한 항산화능력이 뛰어남을 알 수 있다.

6주령, 52주령 및 68주령 rat의 방광 세포를 분리하여 HGD를 처리한 후 SOD activity, GSH 농도, NO 농도 및 MDA 농도를 측정하였다.

HGD를 처리한 결과, 6주령 세포에서는 대조군에 비하여, 52주령 세포에서는 정상군과 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게($p<0.05$) 증가하였다. 68주령 세포에서도 HGD 처리에 의해 SOD activity가 약간 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 5).

6주령 세포와 52주령 세포에서 HGD 처리에 의하여 정상군과 대조군에 비하여 GSH 농도가 유의하게($p<0.05$) 증가하였다(Fig. 6).

68주령 세포에서는 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 MDA 농도가 유의하게($p<0.001$) 감소하였다(Fig. 7).

52주령과 68주령 세포에서는 HGD 처리 세포(HG)에서 대조군에 비하여 NO 농도가 유의하게($p<0.05$) 감소하였다(Fig. 8).

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 비장 세포를 분리하여 HGD를 처리한 후 SOD activity, GSH 농도, NO 농도 및 MDA 농도를 측정하였다.

HGD를 처리한 결과, 6주령에서는 대조군에 비하여, 52주령과 68주령에서는 정상군과 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게($p<0.001$) 증가하였다(Fig. 9).

6주령에서는 대조군에 비하여, 68주령에서는 정상군 및 대조군에 비하여 실험군에서 GSH 농도가 유의하게($p<0.001$) 증가하였다(Fig. 10).

68주령의 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 MDA 농도가 유의하게($p<0.05$, $p<0.01$) 감소하였다(Fig. 11).

68주령의 실험군에서 대조군에 비하여 NO 농도가 유의하게($p<0.05$) 감소하였다(Fig. 12).

이와 같이 抗酸化力 검사상에서 HGD를 처리한 신장과 비장세포에서에서 정상군 및 대조군에 비하여 특히 노화기의 52주령과 말기노화기의 68주령에서 抗酸化효소인 SOD activity가 유의성 있게 증가하였으며 抗酸化물질인 Glutathine의 농도는 신장, 방광세포의 52주령, 비장의 68주령에서 또한 증가하였다. 반면 산화물질인 NO는 HGD를 처리한 신장, 방광, 비장세포에서 특히 68주령에서 유의성 있는 감소를 보였으며 또 다른 산화물질인 MDA의 농도는 HGD를 처리한 방광, 비장세포의 68주령에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보임으로써 荊防地黃湯의 항산화 효과를 확인할 수 있었다. 또한 본 실험에서 비장, 신장세포를 중심으로 유의한 항산화 효과가 있는 것으로 보아 脾大腎小한 少陽人 노화방지에 응용 가능성이 있을 것으로 생각되며 향후 항산화 작용에 관한 荊防地黃湯의 임상에서의 활용과 그 기전에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

荊防地黃湯 전탕액(HGD)의 항산화능을 알아보고자 6주령, 52주령, 68주령의 SD rat의 신장과 비장, 방광세포의 SOD activity, Glutathione 농도, NO 농도, MDA농도를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 荊防地黃湯은 68주령 백서의 신장세포에서 대조군에 비하여 SOD activity를 유의하게 증가시켰고, NO농도를 유의하게 감소시켰다.

2. 荊防地黃湯은 52주령 백서의 방광세포에서 대조군에 비하여 SOD activity와 GSH농도를 유의하게 증가시켰고, 68주령에서 MDA농도와 NO농도를 유의하게 감소시켰다.

3. 荊防地黃湯은 68주령 백서의 비장세포에서 대조군에 비하여 SOD activity와 GSH농도를 유의하게 증가시켰고, MDA농도와 NO농도를 유의하게 감소시켰다.

VI. 參考文獻

1. 통계청. 통계소식. 2007 고령자 통계, 2007.
2. 배철영, 이영진. 노인의학. 고려의학, 서울, 1996: 21, 25-27.
3. 한복기. 노화특집5 ; 활성산소와 노화현상. 화학세계. 1998;38(8):48-49.
4. Harman D.. Aging, A theory based on free radical radiation chemistry. J Gerontol, 1956;11:298-300.
5. 리정복. 장수학. 의성당, 서울, 1987:11-99, 492-576.
6. 杜鎬京. 동의신계학. 동양의학연구원, 서울, 1993: 1093-1100, 1325-1383.
7. 최병일. 李濟馬 遺作 文獻集. 파란들, 서울, 2002: 326.
8. 이제마. 東醫壽世保元. 행림서원, 서울, 1985: 12-80.
9. 김달래 編譯. 東醫壽世保元四象草藁. 정담, 서울, 1999:41-46.
10. 김선민 외. 東醫壽世保元四象草本卷에서의 양생에 관한 고찰. 사상체질의학회지. 2000; 12(1):101-109.
11. 한주석 외. 동의수세보원과 제중신편의 양생장수론에 대한 고찰. 사상체질의학회지. 1991; 3(1):141-149.
12. 전국 한의과대학 사상의학교실. 개정증보 사상의학. 집문당, 서울, 2004:52-53, 394-395.
13. 박순권, 이홍재, 김현택, 황의완. 한약물의 치매치료에 관한 실험적 연구(調胃升淸湯과 荊防地黃湯의 노화동물에 대한 치매치료 효과연구). 동의신경정신과 학회지. 1998;9(2):19-35.
14. 정성윤, 김승모, 임명현, 이준희, 박재현. 荊防地黃湯이 사염화탄소 장기 투여로 유발된 백서 간경변의 예방에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4):193-210.
15. 정종효 외. 荊防地黃湯 유래의 Klebsiella pneumonia 항균활성물질. 대한본초학회지. 2004;19 (4):127-135.
16. Murphy MP, Rick J Th, Milgram NW, Ivy GO. A simple and rapid test of sensorimotor function in the aged rat. Neurobiology of Learning and Memory. 1995;64:181-186.
17. 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.
18. 대한노인병학회. 노인병학. 의학출판사, 서울, 2002:18-27.
19. 고인석 역. 노화는 왜 일어나는가. 전파과학사, 서울, 1991:143-144.
20. 김재식. 노화의 기전과 예방. 경북대학교 의과대학 임상병리학교실. Immune Network, 2001;1(2):105-106.
21. Harman D.. Free radical theory of ageing. J Gerontol, 1968;23:476-82.
22. 오유진. 활성산소가 질병의 원인이었다. 이화문화출판사, 서울, 1997:57-67.
23. Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato K,, Membrane damage due to lipid oxidation. Am J Clin Nutr, 1991;53:201.

24. Formn H J, Boveris A.. Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. In free radicals in biology. Vol 5, Edited by Pryor WA, New York, Academic Press, 1982:.65-90.
25. Cogen G.. The generation of hydroxyl radicals in biological system. Photobiol, 1978;28:669-675.
26. Kellogg EW 3rd. Fridovich I.. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. J Biol Chem, 1 Oct10 , 1977;252(19):6721-6728.
27. 홍원식 譯. 황제내경소문해석. 고문사, 서울, 1980:37, 41-42.
28. 양유걸 편. 황제내경해석. 성보사, 서울, 1980: 194.
29. 홍원식 譯. 황제내경영추해석. 고문사, 서울, 1982:109, 234-235.
30. 박성민, 임명현, 이준희, 박재현. 보중익기탕과 육미지황탕이 노화촉진생쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4):175-191.
31. 배나영, 안택원. 녹용대보탕이 AAPH로 유발된 산화병태모델 흰 쥐의 항산화 작용에 미치는 영향. 사상체질의학회지. 2007;19(2):155-170.
32. 김철홍, 윤현민, 장경전, 송춘호, 안창범. 호도약침액의 유리기 소거와 항산화 효과에 대한 실험적 연구. 대한침구학회지. 2003;20(4): 209-219.
33. 이준성, 임윤경, 김영일. 족삼리 전침이 흰쥐의 노화에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007; 24(3):145-161.
34. 이제마 著, 박성식 譯. 동의수세보원 사상초본권. 집문당, 파주, 2005:175-176.
35. 한경식, 박성식. 少陽人 약리의 형성과정에 관한 연구. 사상체질의학회지. 2006;18(3):38-48.
36. Borug EL, Foumier D.. Is Lifespan Extension Accompanied by Improved Antioxidant Defences? A Study of Superoxide Dismutase and Catalase in Drosophila Melanogaster Files that Lived in Hypergravity at a Young Age. Biogerontology. 2004; 5(4):261-266.
37. Kubota Y, Takahashi S, Sato H. Significant contamination of superoxide dismutases and catalases with lipopolysaccharide-like substances. Toxicology in vitro. 2004;18(5):711-718.
38. Sakamoto Y, Higashi T. Glutathione. Japan scientific societies. 1989:5.
39. Oztu가 O, Gumuslu S.. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase, coper, zincsuperoxide dismutase and catalase activityes, glutathione and its metabolizing enzymes, and lipid peroxidation in rat erythrocytes with age. Experimental gerontology. 2004;39(2):211-216.
40. 류재하, 장세란, 이소영, 이화진, 한용남. 활성화한 RAW 264,7 세포주에서 인삼 Polyacetylene류의 Nitric Oxide 생성저해. J Gienseng Res. 1998;22(3):181-187.
41. 조영주, 김성동. 고려인삼, 고려홍삼 및 total saponin의 항산화 작용. 동의병리학회지. 1998;12 (1):72-81.
42. 김영곤. 프리라디칼. 여문각, 서울, 1997:455, 564.