

# 少陽人 荊防敗毒散 전탕액이 노화쥐의 신장과 비장 세포의 항산화능에 미치는 영향

민경훈 · 안택원

대전대학교 한의과대학 사상체질과

## Abstract

### Anti-Oxidative Effect of Soyangin Hyeongbangpaedok-san Decoction in Kidney and Spleen Cells of Aged Rats

Gyeong-hoon Min, Taek-won Ahn

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, college of Korean Medicine, Daejeon Univ

#### 1. Objectives

The purpose of this study is to find out the Anti-Oxidative effects of Soyangin Hyeongbangpaedok-san(HBP) in kidney and spleen cells of aged rats.

#### 2. Methods

Aged rats used in this experiment were 6, 52, 68 weeks old. Each age group was divided into three groups again. One group was given no treatment, another group was dosed normal saline and the other group was dosed HBP decoction. The antioxidant effects of HBP decoction were measured by the levels of SOD, GSH, MDA and NO.

#### 3. Results and Conclusions

- 1) The activity of SOD was significantly increased in kidney cells of 68w-HBP group. Deterioration of the activity of SOD in kidney cells was significantly suppressed according to increasing in age of the week.
- 2) The level of NO was significantly decreased in kidney cells of 68w-HBP group. Deterioration of The level of NO in kidney cells was significantly suppressed according to increasing in age of the week.
- 3) The activity of SOD was increased in spleen cells of 52w and 68w-HBP group.
- 4) The level of GSH was significantly increased in spleen cells of 68w-HBP group.

**Key Words:** Soyangin Hyeongbangpaedok-san decoction(HBP), Anti-Oxidative effect, SOD activity, GSH, MDA, NO

## I. 緒 論

우리나라 노인인구 구조는 1960년대에는 65세 이상 인구가 약 72만 6천명으로 총 인구의 약 2.9%를 차지하였는데 1990년대에는 약 2백 19만명으로 증가하였고, 2020년에는 노령인구가 689만명(총인구의 13.2%)에 도달할 것으로 보인다. 이와 같은 노인인구의 급속한 증가로 우리나라는 노령화 사회로 접어들고 있다.

넓은 의미에서의 노화(aging)라 불리는 현상은 생명체가 태어나서 죽기까지의 시간경과, 즉 연령증가에 따라 수반되는 생체구조 및 기능의 변화로 정의할 수 있고, 좁은 의미에서의 노화(senescence)는 성숙기 이후에 세포 기관 또는 개체에 나타나는 진행적인 생체변화를 의미한다.<sup>1</sup>

노화를 초래하는 기전이나 과정을 명확히 규명하는 것은 아직까지 없으나, 최근 가장 주목받고 있는 학설은 Harman에 의해 제기된 활성산소설이며 이것은 정상 대사과정 중에 생성될 수 있는 여러 활성산소들에 의하여 지질의 산화, 단백질의 변성 등의 산화적 손상이 축적되어 노화에 이르게 된다는 설이다.<sup>1,3,6</sup>

한의학에서는 노화에 대하여 선천적인 稟賦不足 또는 후천적인 攝生失調에 의한 음양의 부조화, 장부기능의 실조, 기혈 및 腎氣衰弱, 形神衰弱 등을 원인으로 보고 있다.<sup>7</sup>

四象醫學의 창시자인 東武公은 『東醫壽世保元四象草本卷』<sup>8</sup>에서 四象人의 건강을 유지하고 壽命의 長短을 결정하는 偏小之臟의 기운의 정도를 命脈實數라 정의하고, 偏小之臟의 剩削에 따라 命脈의 長短이 결정된다고 하였다.<sup>9</sup>

소양인 형방패독산은 『東醫壽世保元』<sup>10</sup> 「少陽人 脾受寒表寒病論」에 기재되어 있는 처방으로 羌活 獨活 柴胡 前胡 荊芥 防風 地骨皮 赤茯苓 生地 黃 車前子로 구성되어 있다. 소양인의 少陽傷風證 및 背癰 腦疽 脣腫 纏喉風 陽毒發斑 流注丹毒 黃疸 등의 表證이 있을 때 활용되는 처방으로 東武公은 三神山不死藥이라 높이 평가하였으며, 表證에 裏熱을 맑게 하고 表陰을 내려서 담음을 스스로 흠어지게 하고 結胸을 예방할 수 있다<sup>10,11</sup>고 하였으니 형방패독산은 소양인의 保命之主인 陰清之氣를

도와 臟腑大小偏差를 조절하여 노화예방 효과를 기대할 수 있다.

최근 형방패독산에 대한 연구로는 형방패독산의 진통, 해열, 항경련 및 진정 작용에 관한 실험적 연구<sup>12</sup>와 항염증 작용을 밝히기 위한 실험적 연구<sup>13</sup>, 형방패독산과 독활지황탕이 Wistar rat의 노화에 미치는 영향에 관한 연구<sup>14</sup> 등이 있었으나 형방패독산이 소양인의 신장과 비장 세포의 항산화능에 미치는 영향에 관한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 소양인 형방패독산 전탕액(Hyeong-bangpaedok-san decoction, 이하 HBP)이 노화주의 신장과 비장 세포의 항산화능에 미치는 영향을 파악하고자 6주령, 52주령, 68주령의 Sprague-Dawley rat(이하 SD rat)의 신장과 비장 조직으로부터 얻은 실질세포에 HBP를 처리한 후 SOD activity, Glutathione 농도, NO 농도, MDA 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 실험 동물(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) 약제

본 실험에 사용된 형방패독산은 대전대학교 한방병원의 약제 공급처인 혜화약업사에서 구입하여 이용하였다. 형방패독산의 구성<sup>15</sup>은 다음과 같다 (Table. 1)

형방패독산의 처치 비율에 맞춰, 약제 300 g을 준비하였다. 3 L의 증류수를 가하고 약탕기(웅진약탕기. 한국)를 이용하여 3시간 동안 끓인 다음 여과지로 여과한 후, rotary evaporator에 감압농축을 실시하였다. 감압농축을 실시하여 얻은 분말은 -20℃에서 사용하기 전까지 보관하였다. 형방패독산에서 얻은 수물은

Table 1. The Compositions of Hyeongbangaedok-san(HBP)

| Herbs        | Botanical name       | Amount (g) |
|--------------|----------------------|------------|
| 羌活           | Notopterygii Rhizoma | 4.0        |
| 獨活           | Araliae Radix        | 4.0        |
| 柴胡*          | Bupleuri Radix       | 4.0        |
| 前胡           | Peucedani Radix      | 4.0        |
| 荆芥           | Schizonepetae Herba  | 4.0        |
| 防風           | Ledebouriellae Radix | 4.0        |
| 地骨皮*         | Lycii radidis cortex | 4.0        |
| 赤茯苓*         | Poria                | 4.0        |
| 生地黃          | Rehmanniae Radix     | 4.0        |
| 車前子*         | Plantaginis Semen    | 4.0        |
| Total amount |                      | 40.0       |

\* : imports from China. The others are Korean herbs.

44.12 g(14.71%) 이었다.

2. 방법

1) 실험군 설정

본 실험은 각각 6주령, 52주령, 68주령의 SD rat의 신장 조직과 비장 조직으로부터 얻은 실질세포를 이용하여 수행하였다. 아무것도 처리하지 않은 정상세포(no-treated cell)를 정상군, saline을 처리한 세포(saline-treated cell)를 대조군, HBP를 처리한 세포(HBP-treated cell)를 실험군으로 나누어 분류하였고, 조직으로부터 분리된 세포를 안정화시킨 후, 약물을 6주령의 동물에서 얻은 실질세포는 500 µg/ml, 52주령의 동물에서 얻은 실질세포는 500 µg/ml, 68주령의 동물에서 얻은 실질세포는 25 µg/ml로 처리하여 48시간동안 배양시켰다.

2) 장기 조직에서의 세포 분리 및 세포 배양

(1) 신장

Rat을 Ethyl ether를 이용하여 마취 시킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS (Ca2+, Mg2+ free)를 투여하며 복부쪽 혈관을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출시켜준다. 신장 조직을 rat으로부터 적출하여, 차가운 media (RPMI1640 + 10% FBS +Abs)에 보관한다. Dish에서 신장 조직을 잘게 잘라주고, 15 ml tube에 collagenase type IV(300U/ml-1)와 10 ml PBS를 넣고 잘게 잘린 신장 조직을 넣어 37°C에서 1시간 동안 shaking 한다.

Shaking이 끝난 뒤, 100 µm strainer에 배양액을 걸러주고, 5-10 ml 정도 media를 더 분주하여 통과 시키고, 50 µm strainer에 배양액을 걸러준다. 걸러진 배양액은 centrifuge 300 g(= 1200 rpm)에서 5분간 원심분리한다. 침전된 cell pellet은 lysis buffer를 이용하여 적혈구를 파쇄하고, PBS로 세척한 뒤, 신장 실질 세포의 개수를 확인한 후, complete media를 이용하여 배양한다.

(2) 비장

Rat을 Ethyl ether를 이용하여 마취 시킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS(Ca2+, Mg2+ free)를 투여하며 복부쪽 혈관을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출시켜준다. 비장 조직을 rat으로부터 적출하여, 차갑게 준비한 RPMI 1640 media에 보관한다. 비장 조직을 으개어 준비한 뒤, RPMI1640 media를 넣고 세포를 모아준다. 모아진 cell들은 원심 분리기를 사용하여 침전시키고, 침전된 cell pellet은 complete media (RPMI1640 + 5% FBS + antibiotics)를 이용하여 2회 세척한다. 세척이 끝난 cell pellet은 lysis buffer를 이용하여 적혈구를 파쇄하고, 원심분리하여 비장 조직의 실질 세포를 분리한다. 분리된 세포는 complete media를 이용하여 배양한다.

3) 세포에서의 산화 억제 효과 측정

(1) 세포 분획

Bansal등의 방법<sup>16</sup>을 변형하여, 배양한 세포들을 모아 sonicate를 이용하여 균질화한다. 균질화한 세포

는 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 kit(Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였다. 세포분획으로 얻은 sample중에서 20000 rpm으로 얻은 sample을 사용하였으며, sample solution을 96well plate의 각 well과 blank 2에 20  $\mu$ l씩 분주한다. blank 1과 blank 3에 D.W.를 분주한 뒤, WST working solution을 200  $\mu$ l/well으로 모든 well에 첨가한다. blank 2와 blank 3 well에 dilution buffer를 20  $\mu$ l씩 분주하고, enzyme working solution을 각 sample well과 blank 1에 20  $\mu$ l/well으로 분주한다. 20분 동안 37°C에서 incubating을 실시하고 450 nm에서 흡광도를 측정 하고 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(GSH) concentration

신장과 비장 조직 내 glutathione함량은 kit(Dojindo, Japan)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정해서 결과를 얻었다. 신장과 비장 조직의 분획으로 얻은 sample중에서 12000 rpm으로 얻은 sample을 사용하였다. 우선, coenzyme working solution은 buffer solution 7 ml/vial 에 녹여 준 뒤, 96well plate에 140  $\mu$ l/well으로 coenzyme working solution을 분주한다. 다음으로 enzyme working solution은 buffer solution과 enzyme solution을 200:1의 비율로 mix 하여 96well plate에 enzyme working solution을 20  $\mu$ l/well으로 분주하고, pre-incubation 을 실시하기 위해, 37°C에서 5분간 incubation을 실시한다. 5분 뒤, GSH standard와 각각의 장기에서 얻은 분획 sample을 20  $\mu$ l/well으로 분주하고 36°C에서 10분간 incubation을 실시한다. 10분 뒤, substrate working sol-

ution을 20  $\mu$ l/well으로 분주한다. 이때, substrate working solution은 buffer solution 1 ml/vial으로 녹여 준비해 준다. Substrate working solution을 첨가하고, 다시 10분간 incubation을 실시한다. 405 nm에서 흡광도를 측정하고 GSH의 농도의 값으로 환산해 준다.

#### (4) Lipid peroxidation(MDA)

Lipid peroxidation assay kit(Oxford Biomedical Research, USA)을 이용하여 측정하였고 586 nm에서 흡광도를 측정한 후 MDA를 계산하였다. 신장과 비장 조직의 분획으로 얻은 sample중에서 20000 rpm으로 얻은 sample을 사용하였다. 분획으로 얻은 sample은 각각의 E-tube에 200  $\mu$ l씩 분주한다. 우선, R1 solution을 멸균증류수를 이용해 dilution을 R1: DW = 1: 3으로 실시하며, R1의 dilution은 사용하기 직전에 만들어 사용한다. dilution R1을 각 tube에 650  $\mu$ l/vial 분주한 뒤, sample을 짧게 vortex를 실시한다. 다음으로는, 37% HCL 150  $\mu$ l/vial으로 분주하고, vortex를 실시한다. 그 후에, 35°C에서 60 min incubation을 실시하였다. 원심분리기를 15000 g (약 12240 rpm)으로 이용하여, 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액은 96well plate에 200  $\mu$ l/well으로 옮겨 준다. 586 nm에서 흡광도를 측정한 뒤, MDA 농도의 값으로 환산해 준다.

#### (5) NO assay

신장과 비장 조직 내 NO 함량은 kit(Oxford, USA)을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정해서 결과를 얻었다. 신장과 비장 조직의 분획으로 얻은 sample중에서 12000 rpm으로 얻은 sample을 하였다. 우선, NaNO<sub>2</sub> standard solution을 buffer solution 9 ml/vial에 녹여 준비한다. 분획으로 얻은 sample과 standard solution을 96well plate에 80  $\mu$ l/well으로 분주하고, buffer solution을 20  $\mu$ l/well으로 분주한다. 그리고 DAN solution(fluorescence reagent)를 10  $\mu$ l/well으로 첨가한 뒤, 36°C에서 15분간 incubation을 실시한다. 그 후, NaOH solution을 10  $\mu$ l/well으로 분주하고, fluorescence microplate reader으로 450 nm에서 흡광도를 측정 하고 NO 농도의 값으로 환산해 준다.

#### 4) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. SPSS 통계프로그램(14.0 KO)의 일원배치 분산

Table 2. Effect of HBP Decoction on the Levels of Various Oxidants and Antioxidants in Rat Kidney Cells.

| Parameter           | Age | *No treatment | †Saline     | ‡HBP        |
|---------------------|-----|---------------|-------------|-------------|
| SOD activity (%)    | 6w  | 100.11±5.33   | 104.53±7.33 | 105.85±1.47 |
|                     | 52w | 76.28±5.39    | 86.63±4.60  | 88.14±5.11  |
|                     | 68w | 58.19±5.88    | 69.80±3.08  | 77.62±1.87  |
| GSH Conc. (umol/ℓ)  | 6w  | 6.27±0.38     | 5.71±0.08   | 6.19±0.75   |
|                     | 52w | 6.54±0.28     | 5.77±0.05   | 5.85±0.08   |
|                     | 68w | 5.49±0.13     | 5.33±0.05   | 5.59±0.27   |
| NO Conc. (umol/ℓ)   | 6w  | 9.89±0.82     | 8.35±0.23   | 9.34±0.54   |
|                     | 52w | 42.18±8.42    | 21.18±5.82  | 25.21±5.79  |
|                     | 68w | 51.88±1.58    | 32.58±2.43  | 26.01±0.60  |
| MDA Conc. (umol/ml) | 6w  | 0.36±0.02     | 0.34±0.01   | 0.40±0.06   |
|                     | 52w | 0.38±0.01     | 0.37±0.05   | 0.45±0.07   |
|                     | 68w | 0.41±0.02     | 0.36±0.05   | 0.37±0.03   |

Kidney cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μg/ml, 500 μg/ml, 25μg/ml HBP decoction respectively, and SOD activity, GSH, NO and MDA levels were estimated by ELISA. Values represent the means ± SD of 3 mice.

\*No treatment : normal kidney cells of SD rat.

†Saline : kidney cells of SD rat treated with saline for 48 hours.

‡HBP : kidney cells of SD rat treated with HBP decoction for 48 hours.

분석(one way ANOVA)을 사용하여 유의성을 검증하였으며, 각 실험군을 비교하여 신뢰도 95% (p<0.05) 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

GSH 농도가 유의하게 감소하는 경향을 나타내었다. 52주령에 대조군 및 실험군에서 정상군에 비하여 GSH 농도가 유의하게 감소하였다.

### III. 結 果

#### 1. 신장 세포에서의 산화반응 억제 효과

6주령, 52주령 및 68주령 rat의 신장 세포를 분리하여 HBP를 처리한 후 SOD activity, GSH 농도, NO 농도 및 MDA 농도를 측정하였다. (Table 2)

##### 1) SOD activity

주령이 증가함에 따라 SOD 활성이 유의하게 감소하였다. 주령의 증가에 따른 SOD 활성감소율은 정상군에 비하여 실험군에서 유의하게 낮았다.

68주령에서 정상군 및 대조군에 비하여 실험군에서 SOD 활성이 유의하게 증가하였다. HBP 처리에 의한 SOD 활성 증가율은 68주령에서 6주령 및 52주령에 비하여 유의하게 높았다.

##### 2) Glutathione(GSH) concentration

세포의 주령이 증가함에 따라 정상군과 대조군에서

#### 3) Lipid peroxidation(MDA)

정상군에서는 주령이 증가함에 따라 MDA 농도가 증가하였다. 실험군에서는 68주에서 52주에 비하여 MDA 농도가 오히려 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. 주령의 증가에 따른 MDA 증가율이 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 낮게 나타났으나 유의성은 없었다.

모든 주령에서 HBP 처리에 따른 유의성 있는 MDA 농도 변화가 나타나지 않았다.

#### 4) NO assay

세포의 주령이 증가함에 따라 NO 농도가 현저하게 증가하였다. 주령의 증가에 따른 NO 농도의 증가율은 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.

68주령 세포에서 정상군 및 대조군에 비하여 실험군에서 NO 농도가 유의하게 감소하였다. HBP 처리에 의한 NO 감소율은 68주령 및 52주령에서 6주령에 비하여 유의하게 높았다.

Table 3. Effect of HBP Decoction on the Levels of Various Oxidants and Antioxidants in Rat Spleen Cells.

| Parameter           | Age | *No treatment | †Saline    | ‡HBP        |
|---------------------|-----|---------------|------------|-------------|
| SOD activity (%)    | 6w  | 95.58±25.47   | 86.20±5.62 | 111.91±0.92 |
|                     | 52w | 62.37±3.96    | 75.36±5.94 | 95.42±1.70  |
|                     | 68w | 39.79±4.04    | 41.76±2.11 | 56.46±6.99  |
| GSH Conc. (umol/ℓ)  | 6w  | 12.92±0.89    | 10.11±0.28 | 13.18±1.05  |
|                     | 52w | 7.30±0.42     | 7.46±0.10  | 6.33±0.08   |
|                     | 68w | 4.38±0.15     | 4.16±0.10  | 5.85±0.24   |
| NO Conc. (umol/ℓ)   | 6w  | 3.62±0.31     | 3.82±0.30  | 3.62±0.23   |
|                     | 52w | 9.94±1.87     | 9.99±1.64  | 10.74±0.60  |
|                     | 68w | 10.59±0.57    | 17.50±4.11 | 13.22±0.98  |
| MDA Conc. (umol/ml) | 6w  | 0.34±0.01     | 0.33±0.01  | 0.32±0.06   |
|                     | 52w | 0.31±0.02     | 0.31±0.06  | 0.34±0.06   |
|                     | 68w | 0.33±0.02     | 0.34±0.03  | 0.36±0.04   |

Spleen cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μg/ml, 500 μg/ml, 25μg/ml HBP decoction respectively, and SOD activity, GSH, NO and MDA levels were estimated by ELISA. Values represent the means ± SD of 3 mice.

\*No treatment : normal spleen cells of SD rat.

†Saline : spleen cells of SD rat treated with saline for 48 hours.

‡HBP : spleen cells of SD rat treated with HBP decoction for 48 hours.

## 2. 비장 세포에서의 산화반응 억제 효과

6주령, 52주령 및 68주령 rat의 비장 세포를 분리하여 HBP를 처리한 후 SOD activity, GSH 농도, NO 농도 및 MDA 농도를 측정하였다. (Table 3)

### 1) SOD activity

세포의 주령이 증가함에 따라 SOD 활성이 유의하게 감소하였다. 주령의 증가에 따른 SOD 활성의 감소율은 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.

52주령과 68주령에서 실험군이 정상군 및 대조군에 비하여 SOD 활성이 유의하게 높았다. HBP 처리에 의한 SOD 활성 증가는 52주령에서 가장 높게 나타났다.

### 2) Glutathione(GSH) concentration

세포의 주령이 증가함에 따라 GSH 농도가 유의하게 감소하였다. 주령의 증가에 따른 GSH 감소율은 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.

6주령과 68주령에서 HBP 처리에 의해 GSH 농도가 유의하게 증가하였다. HBP 처리에 의한 GSH 증가율은 68주령에서 6주령 및 52주령에 비하여 유의하게

높았다.

### 3) Lipid peroxidation(MDA)

세포의 주령 증가에 따라 MDA 농도에 유의한 변화를 보이지 않았고, HBP 처리에 따른 MDA 농도의 유의한 변화도 나타나지 않았다.

### 4) NO assay

세포 주령이 증가함에 따라 모든 군에서 NO 농도가 증가하였으나 HBP 처리에 의한 NO 농도의 감소는 나타나지 않았다.

## IV. 考 察

노화란 생명체의 성장과 시간 경과에 따라 진행되는 퇴행성 변화로서, 신체내의 평형이 파괴되어 환경에 대한 적응을 어렵게 만들고 신체의 구조와 기능의 퇴축으로 질병을 증가시킴으로써 궁극적으로는 사망을 초래하는 보편적인 생리현상을 말한다<sup>17</sup>.

노화를 초래하는 기전이나 과정을 명확히 규명한 것은 아직까지 없으며, 노화를 일으키는 원인이나 확실한 수백 가지에 이르고 있다. 그 중 주요한 몇 가지를

살펴보면, 신체와 각각의 세포들이 濫用과 誤用에 의해 손상 받게 된다는 마모이론(wear and tear theory), DNA 내에 노화 프로그램이 암호화되어 있다는 유전자 조절이론(genetic control theory), 대사과정에서 생긴 free radical에 의해 노화가 발생한다는 자유유리기이론(free radical theory), DNA 합성시 착오가 발생하게 되며 수선과정의 불완전함에 의해 생성되는 비정상 단백질에 의해 노화가 촉진된다는 착오와 수선이론(errors and repairs theory), lipofuscin과 같은 세포 내 노폐물의 축적에 의해 노화가 발생한다는 노폐물 축적이론(waste accumulation theory) 등이 노화 연구의 주류를 이루고 있다<sup>18,19</sup>.

그 중 1955년 Dr. Denham Harman에 의해 제기된 free radical theory는 최근 가장 주목받고 있는 학설로서 free radical은 유리전자(free electron)를 가진 분자구조를 의미한다<sup>6,20,21</sup>. 방사선, 약물, 오존 등 환경적 요인에 의해 생성이 촉진될 수 있으며, 생체 내에서 불포화 지방산, 단백질, DNA 등 고분자 물질과 반응할 수 있는데, free radical이 세포막에 분포하고 있는 불포화 지방산과 작용하여 과산화 과정이 일어나면 지질과산화물(lipid peroxide)을 만들어 내고 연쇄반응이 진행된다면 최종산물인 MDA(malondialdehyde)를 형성한다<sup>22</sup>. 물론 생체 내에는 산화 반응을 억제하기 위한 항산화 기전이 존재하며 대표적인 항산화효소로는 SOD, catalase, glutathione peroxidase 등이 있다<sup>21</sup>.

한의학에서는 노화에 대하여 선천적인 稟賦不足 또는 후천적인 攝生失調에 의한 음양의 부조화, 장부기능의 실조, 기혈 및 腎氣衰弱, 形神衰弱 등을 원인<sup>7</sup>으로 보고 있는데, 『靈樞』·『營衛生會篇』<sup>23</sup>에서 “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 기혈의 쇠약이 장부의 약화를 유발한다고 하였고, 『靈樞』·『天年篇』<sup>24</sup>에서 “五十歲 肝氣始衰…九十歲 腎氣焦 四臟經脈空虛 百歲 五臟皆虛 腎氣皆去 形骸獨居而終矣”라 하여 노화의 과정이 장부기능의 실조에 달려있음을 밝히고 있다. 『素問』·『陰陽應象大論』<sup>25</sup>에는 “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 陰氣의 虧損이 일련의 노화증상을 유발한다고 하였다.

東武公은 『東醫壽世保元四象草本卷』<sup>8</sup> 「病變·第二統」에서 “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 사상인의 건강을 유지하고 壽命의 長短을 결정하는 偏小之臟의 기운의 정도를 命脈實數라 정의하고, 偏小之臟의 剩削에 따라 命脈의 長短이 결정된다고 하였다<sup>9</sup>. 또한 命脈은 酒色財權·內傷外觸에 의해 손상 받을 수 있으나 64세 전에는 자연회복의 개념으로 生息充補之道<sup>26</sup>가 있다고 하여 生息充補之道의 보전이 항상 성 유지 및 노화방지의 관건이 됨을 설명하였고 生息充補之力이 잘 유지되기 위하여 자율적인 知行調節을 통한 治心을 강조하였다. 체질적 知行의 구체적 방법으로 태음인은 戒貪欲하고 寬其衣하며, 소음인은 戒喜好하고 直其謀하며, 태양인은 戒嗔怒하고 閑其行하며, 소양인은 戒勇敢하고 安其所 하여 養肺, 養脾, 養肝, 養腎하는 생활자세를 제시하였고, 喜怒哀樂의 과도함을 경계할 것을 당부하였다<sup>27</sup>.

四象醫學的인 항노화의 개념은 臟腑大小偏差를 조절하는 保命之主로 無病의 상태를 유지하는 것을 말하며, 소양인의 경우 偏小之臟인 腎臟의 기능저하와 腎精의 枯渴을 막아야 하므로 소양인의 保命之主인 陰清之氣를 도와주어야 한다. 表病은 脾大로 인해 鬱滯된 表陰을 내려주는 목적으로 表陰降氣의 치법을 사용하고, 裏病은 腎小에서 기인한 火熱을 해결하기 위해 裏陽上升의 치법을 사용하게 된다<sup>15</sup>.

소양인 行방패독산은 『攝生衆妙方』에 수록되어 있는 行방패독산<sup>28</sup>을 소양인에 맞게 변화시킨 것이다. 본 처방은 소양인이 惡寒發熱, 脈浮緊, 頭痛, 身痛, 不汗出하고 胸煩하는 증상에 특효가 있고<sup>10</sup> 背癱·腦疽·脣腫·纏喉風·陽毒發斑·流注丹毒·黃疸 등의 表證이 있을 때 활용되는 처방이다<sup>10,11</sup>.

본 실험은 行방패독산 전탕액(HBP)이 노화쥐의 신장과 비장 세포의 항산화능에 미치는 영향을 파악하고자 장<sup>29</sup>, 박<sup>30</sup>, Murphy 등<sup>31</sup>의 연구를 기초로 6주령, 52주령, 68주령의 SD rat을 각각 성장기, 노화기, 말기 노화기로 설정하고 신장과 비장 조직으로부터 얻은

실질세포를 이용하여 실험을 수행하였다. 아무것도 처리하지 않은 정상세포(no-treated cell)를 정상군, saline을 처리한 세포(saline-treated cell)를 대조군, HBP를 처리한 세포(HBP-treated cell)를 실험군으로 하여 SOD activity, Glutathione 농도, NO 농도, MDA 농도를 측정하였다.

SOD는 활성산소를 기질로 하여 과산화수소와 산소를 만드는 항산화효소이다<sup>32</sup>. 인체 내에서 강한 독성으로 작용하는 활성산소(O<sub>2</sub>-)는 SOD에 의해 과산화수소가 된 후 catalase에 의해 물로 되어 무독화되므로, SOD는 free radical 반응에 대한 주요 방어기전으로서의 역할이 크다고 할 수 있다<sup>33</sup>.

Glutathione(GSH)은 체내에서 생성되는 강력한 항산화물질로서 glycine, glutamate, cysteine으로 구성된 단백질의 일종이다<sup>34</sup>. 대표적인 역할은 세포내 환원제로서 이물질성 화합물의 탈독성화 반응을 촉진시키며 활성산소와 free radical의 항산화제를 위한 반응을 촉매시킨다<sup>35</sup>.

NO는 호중구, 대식세포 등에서 생성되는 활성산소로, 반응성이 크고 반감기가 짧은 것이 특징이다. NO는 다른 활성산소들과 반응할 수 있다는 점에서 문제를 일으킬 수 있는데, 특히 O<sub>2</sub>-와 반응하여 ONOO-를 생성함으로써 세포내 독성을 유발할 수 있다<sup>35</sup>.

MDA(malondialdehyde)는 불포화지방산이 직접적 또는 간접적인 과산화 과정을 거치면서 분해되어 생성되는 물질이다. 이 물질은 단백질의 제1차 아미노그룹과 격렬하게 반응할 수 있기 때문에 세포막에 결합된 효소의 생성도를 떨어뜨리거나 지방층의 견고성을 증가시키고 연쇄적인 free radical 생성을 유도한다<sup>35</sup>.

HBP의 항산화능 실험에 앞서 6주령, 52주령 및 68주령 흰쥐의 간 실질세포를 이용하여 HBP의 세포독성을 측정하였다. 6주령, 52주령 및 68주령 세포 모두 전탕액의 농도가 증가할수록 세포생존률이 감소하였다. 따라서 각 주령에서의 세포생존률을 고려하여 6주령 세포에는 500 µg/ml, 52주령 세포에는 500 µg/ml, 68주령 세포에는 25 µg/ml의 HBP를 처리한 후 SOD activity, GSH 농도, MDA 농도 및 NO 농도를 측정하였다. (Table 2,3)

HBP를 여러 가지 농도로 희석하여 DPPH 소거능을 측정한 결과 모든 농도에서 DPPH 활성이 유의하

게 감소하였다. 따라서 HBP에 항산화물질이 포함되어 있을 가능성이 높음을 알 수 있었다.

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 신장과 비장 세포를 분리하여 HBP를 처리한 후 SOD activity, GSH 농도, MDA 농도 및 NO 농도를 측정된 결과, 신장과 비장세포 모두 노화주의 주령의 증가에 따라 SOD activity, GSH 농도는 유의하게 감소하였고, NO 농도는 유의하게 증가하는 경향을 보였으나, MDA 농도는 통계적으로 유의성이 있는 변화가 관찰되지 않았다.

HBP를 처리한 68주령의 신장 세포에서 SOD activity가 유의하게 증가하였고, HBP를 처리한 52주령과 68주령의 비장 세포에서 SOD activity가 유의하게 증가하였다. 따라서 HBP가 신장과 비장 세포의 항산화작용에 유의한 영향을 주는 것으로 생각된다.

GSH 농도는 52주령의 신장 세포에서 유의하게 감소하였으나 6주령과 68주령에서는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았고, 6주령과 68주령의 비장 세포에서 HBP 처리에 의해 GSH 농도가 유의하게 증가하였다.

MDA 농도는 신장과 비장 세포 모두 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다.

NO 농도는 HBP를 처리한 68주의 신장 세포에서 유의하게 감소하였고, 비장 세포에서는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 HBP가 신장 세포내 독성물질의 제거에 유의한 작용을 한다고 볼 수 있다. 또한 HBP는 비장 세포의 SOD activity와 GSH 농도를 향상시켜 산화 스트레스에 대한 생체 방어능을 강화시키고 비장의 손상을 억제하여 항산화 효과를 발휘하는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 요약해보면 SOD activity는 68주령의 신장 세포, 52주령과 68주령의 비장 세포에서 유의성있게 증가하였고, GSH 농도는 6주령과 68주령의 비장 세포에서 유의성있게 증가하였다. 불포화지방산의 과산화 결과물인 MDA 농도는 68주령의 신장 세포에서 감소하였으나 유의성은 없었고, 강력한 산화물질인 NO 농도는 68주령의 신장 세포에서 유의성있는 감소를 보였다.

따라서 형방패독산은 비장의 항산화력을 높여주고 신장의 산화적 손상을 억제하는 유효한 작용이 있는 것으로 나타나므로 소양인의 노화예방에 응용이 가능할 것으로 생각되며 향후 다양한 지표를 이용한 연구



가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

형방패독산 전탕액(HBP)을 6주령, 52주령 및 68주령 흰쥐의 신장과 비장 세포에 처리한 후 SOD activity, Glutathione 농도, NO 농도, MDA농도를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 68주령의 신장 세포에서 SOD 활성이 유의하게 증가하였으며, 주령의 증가에 따른 신장 세포내 SOD 활성 저하가 유의하게 억제되었다.
2. 68주령의 신장 세포에서 NO 농도가 유의하게 감소하였으며, 주령의 증가에 따른 신장 세포내 NO 농도 증가가 유의하게 억제되었다.
3. 52주령과 68주령의 비장 세포에서 SOD 활성이 유의하게 증가하였다.
4. 68주령의 비장 세포에서 GSH 농도가 유의하게 증가하였다.

이상의 결과로 보아 형방패독산 전탕액은 신장과 비장에서 항산화작용을 촉진하고 노화를 예방하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

VI. 參考文獻

1. 구병삼. 노화방지의학. 서울:칼빈서적. 2003:22-23.
2. Yoo HJ. Aging and Endocrine System. J of Korean Society of Endocrinology. 1993;8(1):1-2.(Korean)
3. 大韓老人病學會. 老人病學. 서울:醫學出版社. 2000:727, 740.
4. 오유진. 활성산소가 질병의 원인이었다. 서울:이화문화출판사. 1997:57-58.
5. 余月明. 自由基衰老學說 腎虛與衰老及補腎抗衰老研究. 陝西中醫. 1993;14(4):187-188.
6. Harman, D. Free radical theory of aging(the free radical disease). Raven Pr. 1984;7:111-131.
7. Back SR. The Study on Aging. J of the Korean Society of Oriental Medical Classics. 1999;12(2):175-183. (Korean)
8. 李濟馬. 김달래 編譯. 東醫壽世保元四象草藁. 서울:정담. 1999:41-46.

9. Jeong YJ, Lee SK, Lee EJ, Koh BH, Song IB. A study of preservation of health in the DongyiBogam and Dongyi Soose Bowon Sasang Chobongyun. J of The Society of Sasang Constitutional Medicine. 2002;14(2): 25-34.(Korean)
10. 李濟馬. 東醫壽世保元. 서울:여강출판사. 2003:153-157, 181, 202.
11. 李乙浩, 洪淳用. 四象醫學原論. 서울:행림출판사. 1983:36, 234-242, 295-299, 304-380.
12. Kim DS, Hong SY. An Experimental Study on some Effects of Soyagin-HyeongBangPaedok-San. J of Sasang Constitutional Med. 1989;1(1):171-181. (Korean)
13. Koh JE, Kim J, Kim H, Kim CJ, Lee CY. Effects of Lesser Yang Person-Hyungbangpaedok-san on Lipopolysaccharide-induced Expression of cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase in Mouse BV2 Microglial Cells. J Oriental Physiology & Pathology. 2007;21(4):961-966. (Korean)
14. Lee SY, Ahn TW. Effects of Hyungbangpaedok-san and Dokhwajihwang-tang that Get Weight, Hematology, Biochemistry Change by Wistar Rat's Aging. J of Sasang Constitutional Med. 2005;17(3):91-102. (Korean)
15. 전국 한의과대학 사상의학교실. 개정중보 사상의학. 서울:집문당. 2004:52-53, 394-395.
16. 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.
17. 후지모토 다이사부로 고인석 譯. 노화는 왜 일어나는가. 서울:전파과학사. 1991:143-144.
18. 김숙희, 김화영. 老化. 서울:민음사. 1995:13-15, 77-106, 253-299.
19. James D.P, Richard St.P. 노화와 건강. 서울:대한미디어. 1995:27-39.
20. Marian V, Dieter L, Jan M, Mark T.D. C, Milan M, Joshua T. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.

- 2007;39(1):44-46.
21. 한복기. 활성산소와 노화현상. 서울:화학세계. 1998;38(8):48-51.
  22. 가와시마 세이이치로 수명의 비밀을 벗기는 5가지 열쇠. 서울:중앙일보미디어 인터내셔널. 2003:98-100.
  23. 河北醫學院 校釋. 靈樞經校釋. 北京:人民衛生出版社. 1982:355.
  24. 南京中醫學院醫經教研組. 黃帝內經靈樞譯釋. 上海:上海科學技術出版社. 1986:337.
  25. 程士德. 素問註釋匯粹. 서울:일중사. 1987:95.
  26. Jeong YJ, Lee SK, Lee EJ, Koh BH, Song IB. A study of preservation of health in the DongyiBogam and Dongyi Soose Bowon Sasang Chobongyun. J of Sasang Constitutional Med. 2002;14(2):30-31.(Korean)
  27. Kim SM, Song IB. A Study of preservation of health in the Dongyi Soose Bowon Sasang Chobonguen. J of Sasang Constitutional Med. 2000;12(1):106-107. (Korean)
  28. 김상찬. 방제학. 서울:영림사. 1999:98.
  29. Jang EC, Youn WK, Lee SK. Effect of Age on Glucose Metabolism of Skeletal Muscle in Rats. Yeungnam University journal of medicine. 2001;18(1):94- 100. (Korean)
  30. Park SG, Lee HJ, Kim HT, Hwang UW. An experimental study of drial medicine on cure for dementia. J of Oriental Neuropsychiatry. 1998;9(2): 19-35. (Korean)
  31. Murphy MP, Rick JT, 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.
  32. Lyoyd. D. How to avoid oxygen. Science. 1999:249, 286.
  33. 김영곤. 향산화제. 서울:여문각. 2004:6-8, 38, 154.
  34. Sakamoto Y. Glutathione. 3rd ed. Scientific. 1989:5.
  35. Ameczua LL, Palmer RMJ, De Souza BM, Moncada S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. Br J Pharmacol. 1989;97:1119-1124.