

荊防敗毒散과 獨活地黃湯이 Wistar rat의 老化에 미치는 影響

이수영 · 안택원

대전대학교 한의과대학 사상체질의학교실

Abstract

Effects of Hyeongbangpaedok-san and Dokhwajihwang-tang that Get Weight, Hematology, Biochemistry Change by Wistar Rat's Aging

Lee Soo-Young, Ahn Taek-Won

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

1. Objectives

The purpose of this study is to find out effects of Hyeongbangpaedok-san(HBPDS) and Dokhwajihwang(DHJH) against decline of physical function as aging.

2. Methods

Administrating HBPDS and DHJH to 40-week-old Wistar rat for 10 weeks so, I researched weight change, weight change of internal organs, and hematological and serological changes.

3. Results & Conclusions

1. Both examining groups, which were taken HBPDS and DHJH, got more weight than control group. But that was regardless.
2. Both examining groups got more weight on internal organs than control group. But that was regardless, too.
3. Both examining groups decreased in amount of MDA in serum, as contrasted with control group. But it was regardless.
4. Both examining groups improved on hematological condition. WBC, RBC, Hgb, monocytes and eosinophil rates were decreasing and HCT and PLT were increasing. Especially monocytes($p<0.001$) and eosinophil($p<0.05$) rate of DHJH taken group was decreased remarkably.
- 5-1. Both examining groups show decline in each item of functional examination of liver, such as ALT, AST, T-bilirubin, T-protein, ALB, A/G, T-chol, TG, etc. HBPDS taken group showed meaningful decline in Albumin($p<0.01$) and A/G($p<0.01$) and DHJH taken group showed meaningful decline in T-bilirubin($p<0.01$).
- 5-2. Both examining groups showed decline in items of functional examination of kidneys. Specially HBPDS taken group showed meaningful decline in CRN rate($p<0.05$) and DHJH taken group showed meaningful decline in BUN rate($p<0.05$).

As those results, HBPDS and DHJH are effective against decline of physical function as aging.

Key Words : Sasang Constitutional Medicine, Hyeongbangpaedok-san and Dokhwajihwang, Aging

I. 緒 論

우리나라는 2000년에 노인의 인구가 7%를 초과하는 고령화 사회로 진입하였으며, 평균수명도 계속 증가하고 있어 노화로 인한 다양한 문제가 발생하여 이에 대한 관심이 고조되고 있다^{1,3}.

노화란 생명체의 성장과 동시에 시간경과에 따른 연속적인 현상으로 생물학적 과정인 漸進的이고 내적인 퇴행성 변화로 구조적, 기능적 변화가 초래되어 외부환경에 대해 반응하는 豫備力과 適應力이 저하되어 형태적, 기능적으로 퇴축되어 생명력이 減退되는 현상을 의미 한다⁴.

• 접수일 2005년 1월 10일; 승인일 2005년 4월 1일
• 교신저자 : 이수영
충북 청주시 흥덕구 복대1동 2579 대성 B/D 2층
정준한의원
Tel : +82-43-232-7533
E-mail : lysiom@hotmail.com

이런 노화에 대해 한의학에서는 『靈樞 榮衛生會篇』⁵에서 “老者之氣血衰 其肌肉枯 氣道澁 榮衛不行”이라 하여 氣血의 衰退로 肌肉이 점차 약해지는 것으로 보았으며, 『東醫壽世保元』⁶에서 “四十九歲至六十四歲曰老”라하여 50대에 들어 노인의 단계로 접어들어 가며 『東醫壽世保元四象草本卷』⁷에서는 ‘六十四歲命脈在神仙度數者壽一百二十八’라 하여 有限한 수명에 대해 설명하였다.

四象醫學의 창시자 東武公은 『濟衆新編 五福論』⁸에서 인생의 지극한 즐거움을 다섯 가지로 보았는데 첫째는 장수하는 것이라 하여 건강하게 장수하는 것에 대한 중요함을 기술하고 장수를 위해 각 체질별로 다른 양생법을 제시하였다⁹⁻¹¹.

荊防敗毒散은 少陽人 少陽傷風證으로 나타나는 頭痛, 寒熱往來, 돌발적인 嘔吐 등에 활용되며 少陽人 表寒證에 대표적인 처방으로 쓰이고 獨活地黃湯은 少陽人의 裏熱病症으로 나타나는 食滯痞滿과 中風, 嘔吐에 주로 사용하였으며 少陽人 裏熱證에 대표적인 처방이다¹²⁻¹⁵.

최근의 연구로는 少陽人 荊防敗毒散의 효능에 관한 실험적 연구 실험적 연구¹⁶, 少陽人, 少陰人 처방과 약재가 脂肪細胞의 증식·분화억제에 미치는 영향¹⁷, 獨活地黃湯의 위장관 및 중추신경에 미치는 효능에 관한 실험적 연구¹⁸가 보고 되었으나 少陽人의 表寒證의 대표적인 처방인 荊防敗毒散과 裏熱病 처방인 獨活地黃湯의 항노화 효과에 대해 비교한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 荊防敗毒散과 獨活地黃湯의 항노화 효과를 살펴보기 위하여 노화모델인 Wistar rat에 실험을 하여 최종적인 체중, 장기중량, 혈액학적 분석, MDA측정, 그리고 혈청생화학적 변화를 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

하였다.

② 기기

본 실험에 사용된 기기는 熱湯抽出器 (대웅, Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), centrifuge (Sigma, U.S.A), deep-freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific Co., Korea) 등을 사용하였다.

2) 동물

實驗動物은 雄性 40주령의 wistar rat는 Japan SLC사에서 공급받아 實驗當日까지 固形飼料 (항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 供給하고 室溫 22±2℃를 계속 維持하면서 2週日間 實驗室環境에 適應시킨 後 實驗에 使用하였다. 일반 사료와 고지방 사료의 kg당 조성의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 1).

3) 약물

실험에 사용된 荊防敗毒散 (HyeongBangPaeDokSan, HBPDS)과 獨活地黃湯 (Dokhwajihwang, DHJH)은 『東醫壽世保元』⁶의 처방 내용을 근거로 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다 (Table 2, 3).

4) 荊防敗毒散과 獨活地黃湯 추출물 분리

荊防敗毒散과 獨活地黃湯은 3첩에 각각 증류수 1,300 ml를 가하여 열탕 추출기에서 3시간 추출하여

II. 實 驗

1. 재료

1) 시약 및 기기

① 시약

본 실험에 사용된 시약은 sodium dodesyl sulfate, acetic acid, 그리고 thiobarbituric acid (Sigma, USA)를 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용

Table 1. The Components of Normal Diet

조단백질	22.1%
조지방	8.0%
조섬유	5.0%
조회분	8.0%
칼슘	0.6%
인	0.4%

Table 2. The Compositions of HBPDS

韓藥名	生藥名	用量(g)
羌活	<i>Notopterygii Rhizoma</i>	4.0
獨活	<i>Araliae Radix</i>	4.0
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4.0
前胡	<i>Peucedani Radix</i>	4.0
荊芥	<i>Scaberrapetae Herba</i>	4.0
防風	<i>Ledebouriiellae Radix</i>	4.0
地骨皮	<i>Lycii radidis cortex</i>	4.0
赤茯苓	<i>Poria</i>	4.0
生地黃	<i>Rebmanniae Radix</i>	4.0
車前子	<i>Plantaginis Semen</i>	4.0
Total amount		40.0

얻은 추출액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치 (Rotary evaporator, BUCHI B-480, Switzerland)로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기 (Freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan)를 이용하여 완전 건조한 荊防敗毒散과 獨活地黃湯 추출물을 냉동 (-84℃) 보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

얻어진 荊防敗毒散과 獨活地黃湯 추출물을 각각 580mg/kg과 490mg/kg의 농도로 증류수에 희석하여 각각 동물에 1회에 1 ml씩 용량으로 경구투여하였다.

2) 검액의 투여

Wistar rat는 5수를 실험군으로 하여 荊防敗毒散 투여군과 獨活地黃湯 투여군 그리고 대조군으로 분리하여 자유식으로 사료를 공급하여 사용하였다. 검액 투여는 1주일에 3일 (월, 수, 금)을 오전 10시에서 11시 사이에 10주간 경구 투여하였다.

3) 체중 측정

체중측정은 50주령이 되었을 때 측정하였으며 0.1g 단위까지 측정하였다. 단, 10주령, 30주령의 정상 wistar rat의 평균체중은 일본 SLC社에서 제공한 wistar 계통자료를 참조하였다.

4) 장기중량 측정

장기중량은 최종적으로 50주령이 되었을 때 해

Table 3. The Compositions of DHJH

韓藥名	生藥名	用量(g)
熟地黃	<i>Rebmanniae Radix</i>	16.0
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	8.0
茯苓	<i>Poria</i>	6.0
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	6.0
牡丹皮	<i>Moutan Radicis Cortex</i>	4.0
防風	<i>Ledebouriiellae Radix</i>	4.0
獨活	<i>Araliae Radix</i>	4.0
Total amount		48.0

부하여 비장, 심장, 간, 폐, 신장을 측정하였으며, 10주령, 30주령의 정상 wistar rat 장기의 평균중량은 일본 SLC社에서 제공한 wistar 계통자료를 참조하였다. 측정기기는 Top leading electric balance (Sartorius)를 사용하여 절대 장기 중량을 측정하였다.

5) 지질과산화도 측정(MDA측정)

TBA측정은 Suematsu 등의 방법¹⁹⁾에 따라 clean test tube에 wistar rat 혈청 200 μl를 넣고, 8.1% Sodium dodesyl sulfate(SDS) solution 225 μl를 가하고 5sec.동안 vortex mixer로 mixing한다. 20% acetic acid 1.5 ml을 가하고 그리고 75 μl 증류수를 넣고 5sec. 동안 vortex mixer로 mixing한다. 1.2% Thiobarbituric acid solu.을 각각의 1 ml씩 tube에 더하고, clean dry marble로 감싼 후, 30분간 water bath에서 끓인다. 그리고 실온에서 30분간 cooling한 후에 3000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 실험에 사용하였고, 532nm에서 흡광도를 측정하였다

6) 혈액학 및 혈청생화학 분석

채혈 16시간 전에 절식시킨 후 심장 천자법으로 채혈하였으며 혈액검사를 위하여 채혈된 용기는 EDTA-2K가 처리된 병(CBC bottle, 녹십자)을 사용하여 응고를 방지하여 즉시 coulter S-189으로 측정하였다. 혈청생화학 분석은 채혈한 후 2시간 동안 실온에 방치한 후 3000rpm에서 20분간 원심분리하고 분리된 혈청은 deep freezer (-80℃)에 보관한 후 Clinalyzer (JCA-VX1000)을 이용하여 측정하였다

7) 통계처리

실험 결과는 unpaired student's T-test를 사용하여 통계처리 하였으며 P<0.05, P<0.01 및 P<0.001 수

준에서 유의성을 검정하였다.

Ⅲ. 成 績

1. 체중에 미치는 영향

Wistar rat의 노화에 따른 생체 변화를 알아보기 위하여 노화된 40주령의 wistar에 대조군에는 증류수를 투여하고 실험군에는 荊防敗毒散 580mg/kg을, 그리고 獨活地黃湯 490mg/kg을 주 3회 경구투여하고 10주 후 최종 체중을 측정한 결과 대조군은 559±20.6g, 荊防敗毒散 투여군은 587±18.6g, 獨活地黃湯은 576±22.1g이었다 (Fig.1).

2. 장기 중량에 미치는 영향

노화된 40주령의 wistar에 荊防敗毒散과 獨活地黃湯을 10주간 투여하여 심장, 비장, 간, 폐의 중량을 관찰한 결과, 10주령, 30주령, 50주령 대조군에서 일정한 증가가 측정되었고, 荊防敗毒散과 獨活地黃湯 투여군은 대조군에 비하여 심장, 비장, 간, 폐 모두에서 증가가 관찰되었다(Fig.2, Fig.3).

3. 지질과산화도 (MDA)에 미치는 영향

노화에 따른 생체 내 산화물질의 양을 측정하기

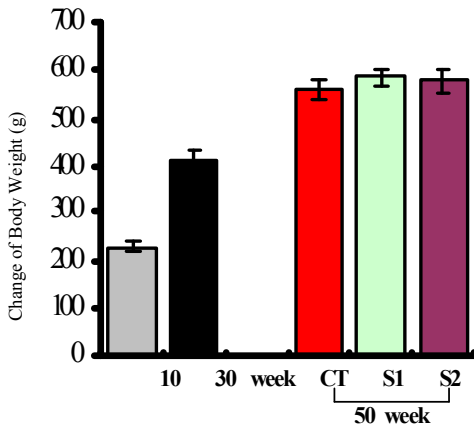


Fig.1. Changes of Wistar rat Body weight with aging. A 10 to 50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, *p.o*) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, *p.o*) for 10 weeks (three times per week). Final body weight measured to top leading electric balance. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

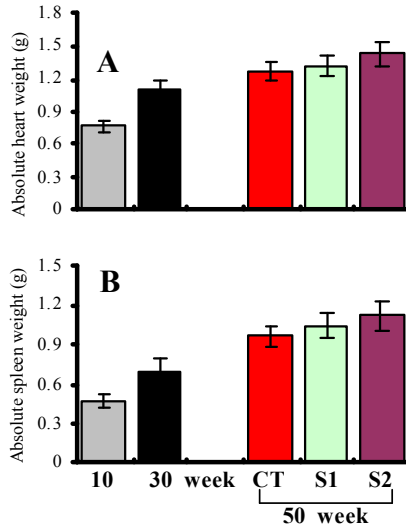


Fig.2. Change of Wistar rat Absolute heart and spleen weight with aging. A 10 to 50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, *p.o*) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, *p.o*) for 10 weeks (three times per week). Final Absolute heart (A) and spleen (B) weight measured to top leading electric balance. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

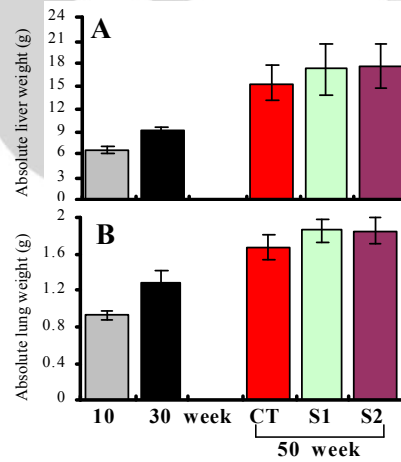


Fig.3. Change of Wistar rat Absolute liver and lung weight with aging. A 10 to 50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, *p.o*) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, *p.o*) for 10 weeks (three times per week). Final Absolute liver (A) and lung (B) weight measured to top leading electric balance. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

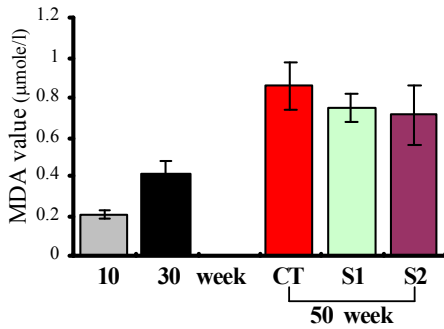


Fig.4. Effect of HBPDS and DHJH on the Malondialdehyde value in the serum with wistar rat aging. A 10 to 50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, *p.o*) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, *p.o*) for 10 weeks (three times per week). MDA value were MDA-TBA activity measured by spectrophotometry. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

위하여 TBA를 이용하여 MDA를 측정 한 결과 10주령에서는 0.21±0.02(μmol/l)이었고, 30주령에서는 0.42±0.06(μmol/l)이었다. 50주령에서 대조군은 0.86±0.12(μmol/l)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 0.75±0.07(μmol/l), 獨活地黃湯 투여군은 0.71±0.15(μmol/l)로 대조군에 비하여 감소를 나타내었으나 유의성은 없었다(Fig.4).

4. 혈액학적인 변화에 미치는 영향

40주령의 Wister rat에 10주간 荊防敗毒散과 獨活地黃湯을 투여한 후 관찰한 혈액학적인 변화는 다음과 같다.

WBC는 50주령 대조군에서 13.0±2.25(x10³/μl)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 10.1±1.77(x10³/μl), 獨活地黃湯 투여군은 11.6±2.23(x10³/μl)으로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5A).

RBC는 50주령 대조군에서 9.40±0.55(x10⁶/μl)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 8.74±0.24(x10⁶/μl), 獨活地黃湯 투여군은 8.94±0.58(x10⁶/μl)로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5B).

Hgb은 주령에 따라 증가하다가 50주령 대조군에서 17.0±1.00(g/dl)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 15.9±0.10(g/dl), 獨活地黃湯 투여군은 16.0±0.90(g/dl)으로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은

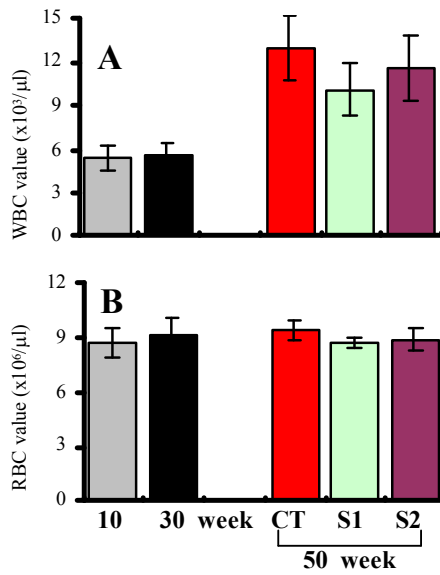


Fig.5. Change of WBC and RBC value with wistar rat aging. A 10 to 50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, *p.o*) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, *p.o*) for 10 weeks (three times per week). Final WBC value (A) and RBC value (B) measured to Coulter counter.

없었다(Fig. 6A).

Hct는 30주령에서 감소하여 50주령 대조군에서 42.9±2.3(%)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 45.1±0.5(%)이었고 獨活地黃湯 투여군은 46.5±2.7(%)로 대조군에 비하여 개선되어 나타내었다(Fig. 6B).

PLT는 노화에 따라 감소하지만 약물투여에 대하여서는 차이가 보이질 않았다.

Monocytes는 주령의 증가에 따라 증가하여 50주령 대조군은 5.90±0.40(%)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 4.65±1.62(%)이었으나 獨活地黃湯 투여군은 2.49±1.27(%)로 현저한 감소를 나타내었다(*p*<0.01)(Fig. 7A).

Eosinophil은 주령에 증가에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 3.55±0.73(%)이었고 荊防敗毒散 투여군도 약간 감소된 2.61±0.51(%)이었으나 獨活地黃湯 투여군은 1.86±0.42(%)로 유의성 있는 감소를 나타내었다(*p*<0.05)(Fig. 7B).

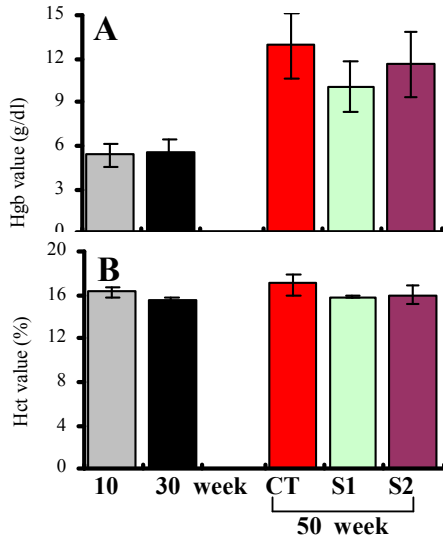


Fig. 6. Change of Hgb and Hct value with wistar rat aging
 A 10 to50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, *p.o*) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, *p.o*) for 10 weeks (three times per week). Final Hgb value (A) and Hct value (B) measured to Coulter counter. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

5. 혈청생화학적인 변화에 미치는 영향

Wistar rat 의 혈청생화학적인 변화를 알아보기 위해 ALT, AST, Glucose, BUN, CRN, T-bili., T-chol., TG, TP, ALB, A/G, P를 측정하였다

ALT는 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군은 53.3±3.0(U/L) 이었고, 荊防敗毒散 투여군은 46.3±6.9 (U/L), 獨活地黃湯 투여군은 49.3±3.8(U/L)로 다소 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 8A).

AST는 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군은 244±22(U/L)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 197±19.6 (U/L), 獨活地黃湯 투여군은 185±17(U/L)로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다 (*p*<0.05)(Fig. 8B).

Glucose 는 노화에 따라 감소하였으나 荊防敗毒散과 獨活地黃湯의 투여군에서 변화가 관찰되지는 않았다(Fig. 9A).

BUN은 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 23.9±1.79(mg/ dl) 이었고 荊防敗毒散 투여군은

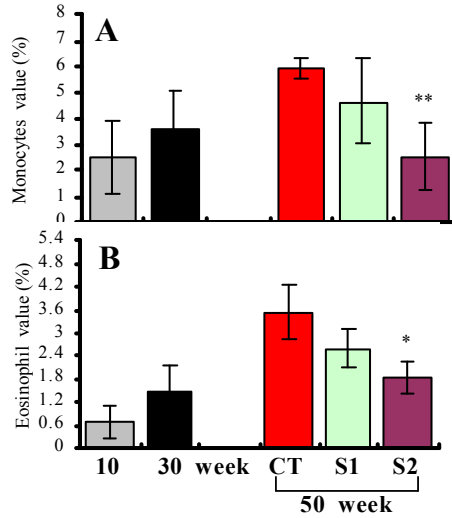


Fig.7. Change of monocytes and eosinophil value with wistar rat aging
 A 10 to50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, *p.o*) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, *p.o*) for 10 weeks (three times per week). Final monocytes value (A) and eosinophil value (B) measured to Coulter counter. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

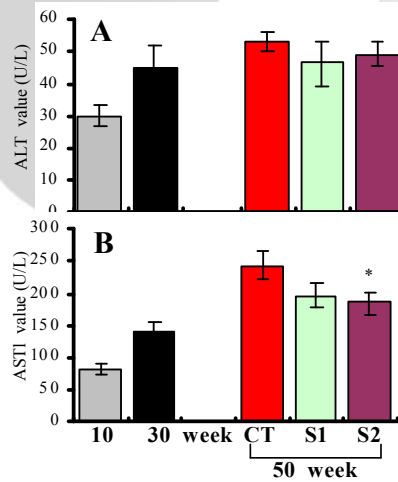


Fig.8. Change of ALT and AST value with wistar rat aging
 A 10 to50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, *p.o*) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, *p.o*) for 10 weeks (three times per week). Final ALT value (A) and AST value (B) measured to Coulter counter. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

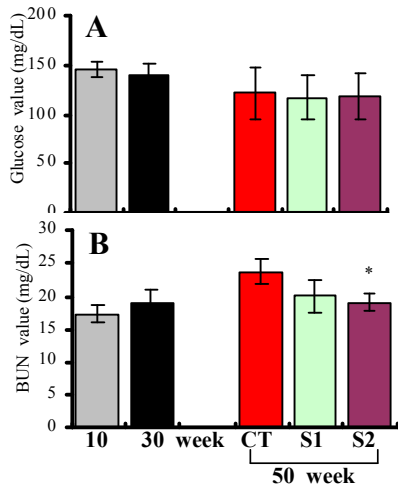


Fig.9. Change of Glucose and BUN value with wistar rat aging
 A 10 to50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, *p.o*) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, *p.o*) for 10 weeks (three times per week). Final Glucose value (A) and BUN value (B) measured to Coulter counter. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

20.1±2.5(mg/dl), 獨活地黃湯 투여군은 19.1±1.23 (mg/dl) 으로 獨活地黃湯 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(*p*<0.05)(Fig. 9B).

CRN은 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 0.62±0.04(mg/dl) 이었고 荊防地黃湯 투여군에서 0.53±0.03(mg/dl) 으로 荊防地黃湯 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(*p*<0.05)(Fig. 10A).

T-bili.은 50주령 대조군에서 0.78±0.12(mg/dl) 이었고 荊防敗毒散 투여군은 0.46±0.07(mg/dl)로 유의성 있는 감소를 나타내었으며 (*p*<0.05), 獨活地黃湯 투여군은 0.44±0.05(mg/dl)로 대조군에 비하여 현저한 감소를 나타내었다 (*p*<0.01)(Fig. 10B).

T-chol.과 TG는 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 각각 83.7±13.0(mg/dl)와 114.7±7.1(mg/dl)로 나타났고 荊防敗毒散의 투여군은 61.4±9.0(mg/dl)와 87.1±16.2(mg/dl), 獨活地黃湯 투여군은 71.2±11.0(mg/dl)와 81.6±11.6으로 나타나 獨活地黃湯 투여군이 대조군에 비하여 TG에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(*p*<0.05) (Table 10, Fig. 11).

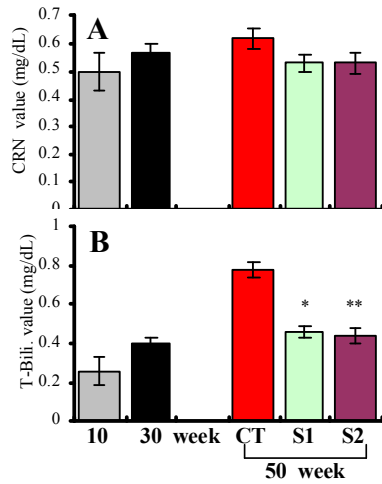


Fig.10. Change of creatinine and total-Bilirubin value with wistar rat aging
 A 10 to50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, *p.o*) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, *p.o*) for 10 weeks (three times per week). Final creatinine value (A) and total-bilirubin value (B) measured to Coulter counter. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

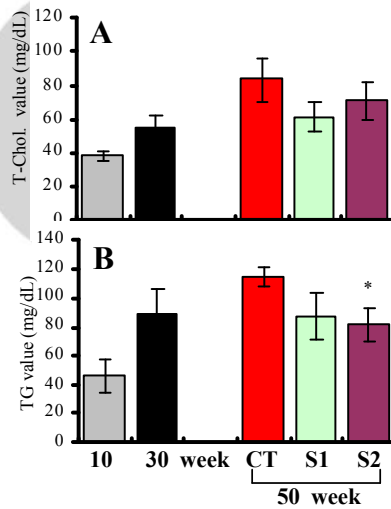


Fig.11. Change of total cholesterol and triglyceride value with wistar rat aging
 A 10 to50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, *p.o*) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, *p.o*) for 10 weeks (three times per week). Final creatinine value (A) and total-bilirubin value (B) measured to Coulter counter. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

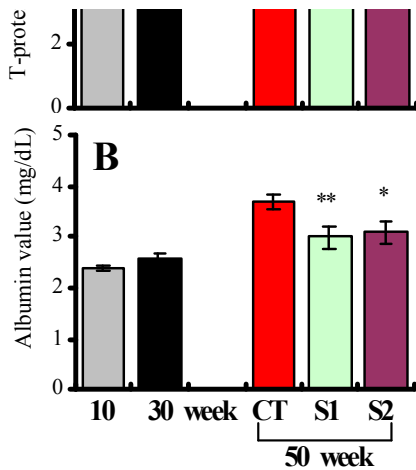


Fig 12. Change of total protein and albumin value with wistar rat aging

A 10 to 50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, p.o) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, p.o) for 10 weeks (three times per week). Final Total protein value (A) and albumin value (B) measured to Coulter counter. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

TP은 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 6.4±0.3(mg/dl)이었고 荆防敗毒散 투여군은 5.6±0.3(mg/dl)으로 유의성 있는 감소를 나타내었고 (p<0.05), 獨活地黃湯 투여군은 5.3±0.4(mg/dl)로 감소를 나타내었지만 유의성은 없었다 (Fig. 12A).

ALB는 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 3.69±0.16(mg/dl)이었으나 荆防敗毒散 투여군은 3.0±0.22(mg/dl)로 현저한 감소를 나타내었고 (p<0.01), 獨活地黃湯 투여군은 3.1±0.20(mg/dl)로 유의성 있는 감소를 나타내었다(p<0.05)(Fig. 12B). A/G도 50주령 대조군에서 가장 높게 관찰되었으나 荆防敗毒散 투여군은 현저한 감소를 나타내었고 (p<0.01), 獨活地黃湯 투여군은 유의성 있는 감소를 나타내었다 (p<0.05)(Fig. 13A).

P는 50주령 대조군에서 7.9±0.96(mg/dl)이었고 荆防敗毒散 투여군은 6.12±0.81(mg/dl), 獨活地黃湯 투여군은 6.49±1.21(mg/dl)로 감소를 나타내었지만 유의성은 없었다 (Fig. 13B).

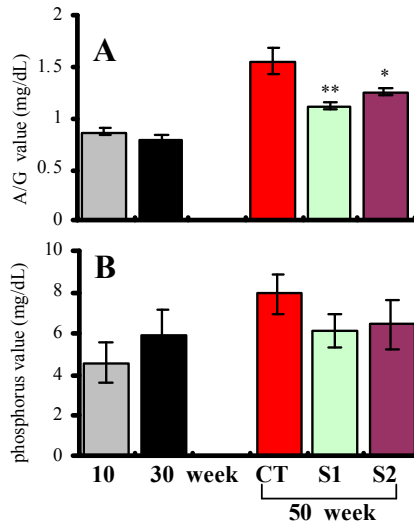


Fig.13. Change of A/G and Phosphorus value with wistar rat aging

A 10 to 50-wk-old conventional Wistar rat with aging. A 40-wk-old Wistar rat followed by the administration of S1 (HBPDS, 580 mg/kg, p.o) and S2 (DHJH, 490 mg/kg, p.o) for 10 weeks (three times per week). Final A/G value (A) and phosphorus value (B) measured to Coulter counter. Statistically significant value compared with control mice group data by T test (*p<0.05, **p<0.01).

IV. 考 察

20세기 이후 인간의 평균수명은 선진국을 중심으로 계속 증가하고 있다. 평균 수명이 계속 증가하는 것은 유아 사망률의 감소 외에 노인의 사망 원인이 상당수 감소되었기 때문이라고 보아야 할 것이다. 예방의학의 발달로 환경이 청결해지고, 의식주생활에도 많은 변화가 일어나 인간의 건강상태가 나날이 양호하여지면서 노화의 속도가 점점 늦춰져 결국 노인의 사망원인이 줄어들고 따라서 수명이 연장된 것이라 보여 진다²⁰.

노화란 연령의 증가함에 따라 발생하는 점진적인 구조적 변화로서 질병이나 사고에 기인하지 아니하고 궁극적으로 사망을 초래하는 것으로 인체가 老衰하는 전반 과정을 말하기도 하고 또 그 과정의 결과를 가리키기도 하는데 이러한 노화현상은 일종의 생리현상이다²¹.

이러한 노화의 명백한 징후로 주름, 늘어진 피부,

회색머리카락 등과 신장이 점진적으로 감소되는 것 등이 있는데³ 연령의 증가에 따라 체내에서는 水分量, 體重, 臟器의 重量, 세포수, 적혈구수 등이 감소하고 색소가 침착되며 염색체가 파열한다. 그러나 백혈구수, 지방량 등은 증가 한다⁴.

노화에 대한 정의도 여러 가지로 해석되어 단순히 나이가 많아지는 것을 노화라 하기도 하고, 나이가 많아지면서 나타나는 신체기능 감소상태를 노화라 하기도 하며, 어떤 학자는 노화를 수정 단계에서부터 시작되는 성장 발달의 마지막 단계로 해석하기도 한다. 그러나 일반적인 공통점은 노화는 나이가 증가함에 따라 나타나는 개체에게 해로운 단계로 해석되며 이것은 결국 사망으로 연결된다고 보는 견해가 타당할 것이다²².

이런 해로운 단계가 시작하는 시간을 늦추거나 아니면 애초에 그 단계까지 가지 않도록 방지하여 사람이 정해진 최대수명을 건강하게 누릴 수 있는 방법을 찾는 것이 항노화 연구의 목적일 것이다²³.

노화에 대해 한의학에서는 『靈樞 榮衛生會篇』⁵에서 “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 것으로 보았으며, 『東醫壽世保元』⁶에서 “四十九歲至六十四歲曰老”라 하여 50대에 들어 노인의 단계로 접어들었다고 하였으며, 노화의 원인에 대해서는 臟腑機能 失調와 精氣神의 작용 약화 그리고 陰陽失調가 중요한 작용을 일으킨다고 하였다⁴.

四象醫學의 창시자 東武公은 『濟衆新編·五福論』⁸에서 인생의 지극한 즐거움을 다섯 가지로 보았는데 첫째는 장수하는 것이라 하였으며, 『東醫壽世保元四象本草』⁷에서 ‘六十四歲命脈在神仙度數者壽一百二十八’라 하여 有限한 수명에 대해 설명하였다. 또 『東醫壽世保元·廣濟論』⁶에서는 인생의 단계를 16세로 구분 하여 保命의 방법이 달라짐을 설명하며 酒色財權도 體質에 따라 偏小之臟에 영향을 주어 壽命에 영향을 준다고 하였다^{9,10}.

이처럼 四象醫學的인 壽命과 노화의 개념은 인생과정에서 命脈과 本常之氣 및 生息充補之力の 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^{10,11}.

少陽人의 노화는 偏小之臟인 腎臟의 機能低下와 腎精의 고갈로 인한 裏熱病證으로 촉진될 수 있으며 이런 병리적인 단계에서 表裏를 막론하고 陰清之氣를 保命之氣로 調節해야 한다¹².

荊防敗毒散은 醫鑑의 荊防地黃湯을 기본으로 『東醫壽世保元四象草本卷』에는 敗毒散이라 하였다². 본 처방은 少陽人 少陽傷風證을 치료하며, 頭痛과 寒熱往來등의 太陽病證과 少陽病證 그리고 갑작스럽게 나타나는 嘔吐 등에 활용되었다^{12,15}.

獨活地黃湯은 醫學正傳의 六味地黃湯에서 기원하여 『東醫壽世保元四象草本卷』의 瓜蒌仁地黃湯과 獨活防風湯에서 유래된 처방으로 『東醫壽世保元·辛丑本』의 新定方에 처음 등장하였다¹². 본 처방은 少陽人의 裏熱病證에 주로 사용하였으며 食滯痞滿과 中風, 嘔吐에도 先用하였다^{12,15}.

少陽人의 裏病證인 陰虛午熱로 인한 病證에 사용되는 獨活地黃湯은 熟地黃, 山茱萸, 茯苓, 澤瀉, 牡丹皮, 防風, 獨活 등의 藥物로 構成되어 있는 處方이다^{6,12}. 獨活地黃湯을 構成하는 各藥物의 主效能을 보면 熟地黃은 補腎和腎하고, 山茱萸는 健腎直腎며, 茯苓은 固腎立腎, 澤瀉는 壯腎而外揚之勢하고, 防風, 獨活은 解腎之表邪 한다.

내용을 분석해 보면 少陽人의 脆弱한 臟腑인 腎精을 補, 和하는 약물에 防風, 獨活로 胸膈의 熱과 膀胱의 津液을 補하여 少陽人 保命之主인 陰清之氣를 유지하여 疾病 상태를 개선하고 偏急된 臟腑 기능을 조절하는 藥物로 構成된 處方이다.

최근의 연구로는 少陽人 荊防敗毒散의 효능에 관한 실험적 연구 실험적 연구¹⁶, 少陽人 少陰人 처방과 약제가 脂肪細胞의 증식·분화억제에 미치는 영향¹⁷, 獨活地黃湯의 위장관 및 중추신경에 미치는 효능에 관한 실험적 연구¹⁸ 등이 보고되었으며 熟地黃과 六味地黃湯이 노화과정 환경에서의 항산화 기전에 미치는 영향²⁴에 대해 보고하였다. 그러나 少陽人의 表寒證의 대표적인 처방인 荊防敗毒散과 裏熱病 처방인 獨活地黃湯의 항노화 효과에 대해 비교한 실험적 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 荊防敗毒散과 獨活地黃湯의 항노

화 효과를 살펴보기 위하여 노화모델인 Wistar rat에 실험을 하여 최종적인 체중, 장기중량, 혈액학적 분석, MDA 측정 그리고 혈청생화학적 변화를 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Wistar rat의 노화에 따른 생체 변화를 알아보기 위하여 40주령의 wistar rat에 대조군에는 증류수를, 실험군에는 荊防敗毒散 580mg/kg을 그리고 獨活地黃湯 490mg/kg을 주 3회 경구투여하고 10주 후 최종 체중을 측정한 결과 10주령에서는 229 ± 7.7 (g)이었고, 30주령에서는 411 ± 17.7 (g)으로 측정되었다. 50주령의 대조군은 559 ± 20.6 (g)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 587 ± 18.6 (g)이었고 獨活地黃湯 투여군은 576 ± 22.1 (g)으로 대조군에 비하여 28(g)과 17(g)이 증가하였다(Fig.1).

Wistar rat의 노화에 따른 장기 중량의 변화를 알아보기 노화된 40주령의 wistar에 荊防敗毒散과 獨活地黃湯을 10주간 투여하여 노화에 따른 장기중량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 10주령, 30주령, 50주령 대조군에서 비장, 심장, 간, 폐의 일정한 증가가 측정되었고, 노화된 40주령에 荊防敗毒散과 獨活地黃湯을 투여한 wistar rat는 대조군에 비하여 비장, 심장, 간, 폐 등 모두에서 10% 전후의 증가가 관찰되었다(Fig.2, Fig.3).

이는 체중의 증가와 더불어 노화 과정에서도 荊防地黃湯과 獨活地黃湯이 생체작용의 활성화를 촉진할 것으로 사료된다.

노화에 따른 생체 내 산화물질의 양을 측정하기 위하여 TBA를 이용하여 MDA를 측정한 결과 10주령에서는 0.21 ± 0.02 ($\mu\text{mol/l}$)이었고, 30주령에서는 0.42 ± 0.06 ($\mu\text{mol/l}$)이었다 50주령으로 노화된 대조군은 0.86 ± 0.12 ($\mu\text{mol/l}$)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 0.75 ± 0.07 ($\mu\text{mol/l}$)이었고 獨活地黃湯은 0.71 ± 0.15 ($\mu\text{mol/l}$)로 대조군에 비하여 12.7%와 17.4%의 감소를 나타내었으나 유의성은 없었다(Fig.4).

노화에 따른 wistar rat의 혈액학적인 변화는 주령에 따라 WBC, RBC, Hgb, monocytes, eosinophil 등은 증가하였고, Hct, PLT 등은 주령에 따라 감소하는 경향을 보였다.

WBC는 30주령에서 급격히 2배 이상 증가하여 50주령 대조군에서 13.0 ± 2.25 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)이었고, 荊防

敗毒散 투여군은 10.1 ± 1.77 ($\times 10^3/\mu\text{l}$), 獨活地黃湯 투여군은 11.6 ± 2.23 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)으로 대조군에 비하여 22.3%와 10.8% 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5A).

RBC는 50주령 대조군에서 9.40 ± 0.55 ($\times 10^6/\mu\text{l}$)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 8.74 ± 0.24 ($\times 10^6/\mu\text{l}$), 獨活地黃湯 투여군은 8.94 ± 0.58 ($\times 10^6/\mu\text{l}$)로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5B).

Hgb은 주령에 따라 증가하다가 50주령 대조군에서 17.0 ± 1.00 (g/dl)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 15.9 ± 0.10 (g/dl), 獨活地黃湯 투여군은 16.0 ± 0.90 (g/dl)으로 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6A).

Hct는 30주령에서 감소하여 50주령 대조군에서 42.9 ± 2.3 (%)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 45.1 ± 0.5 (%)이었고 獨活地黃湯 투여군은 46.5 ± 2.7 (%)로 대조군에 비하여 개선되어 나타내었다(Fig. 6B).

PLT는 노화에 따라 감소하지만 약물투여에 대하여서는 차이가 보이질 않았다.

Monocyte는 주령의 증가에 따라 증가하여 50주령 대조군은 5.90 ± 0.40 (%)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 4.65 ± 1.62 (%)이었으나 獨活地黃湯 투여군은 2.49 ± 1.27 (%)로 현저한 감소를 나타내었다($p < 0.01$)(Fig. 7A).

Eosinophil은 주령에 증가에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 3.55 ± 0.73 (%)이었고 荊防敗毒散 투여군도 약간 감소된 2.61 ± 0.51 (%)이었으나 獨活地黃湯 투여군은 1.86 ± 0.42 (%)로 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.05$)(Fig. 7B).

Wistar rat의 혈청생화학적인 변화를 알아보기 위해 ALT, AST, Glucose, BUN, CRN, T-bili., T-chol., TG, TP, ALB, A/G, P를 측정한 결과 노화에 따른 wistar rat의 혈청학적인 변화는 10, 30, 50주령에 따라 ALT, AST, BUN, CRN, T-bili., T-chol., TG, TP, ALB, A/G, P 등은 계속 증가하여 50주령에서 가장 높게 측정되었다. 반면 glucose는 주령에 따라 감소하는 경향을 보였다.

노화에 따른 간기능 수치는 증가되는 경향으로 지방간 그리고 간질환과 관련이 높다. 특히 간기능 검사는 ALT, AST, T-bili., TP, ALB, A/G 등을 측정한다²⁵.

ALT는 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군은 53.3 ± 3.0 (U/L)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 46.3 ± 6.9 (U/L), 獨活地黃湯 투여군은 49.3 ± 3.8 (U/L)로 다소 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 8A).

AST는 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군은 244 ± 22 (U/L)이었고, 荊防敗毒散 투여군은 197 ± 19.6 (U/L), 獨活地黃湯 투여군은 185 ± 17 (U/L)로 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.05$)(Fig. 8B).

T-bili.은 50주령 대조군에서 0.78 ± 0.12 (mg/dl) 이었고 荊防敗毒散 투여군은 0.46 ± 0.07 (mg/dl)로 유의성 있는 감소를 나타내었으며($p < 0.05$), 獨活地黃湯 투여군은 0.44 ± 0.05 (mg/dl)로 대조군에 비하여 현저한 감소를 나타내었다($p < 0.01$)(Fig. 10B).

TP는 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 6.4 ± 0.3 (mg/dl)이었고 荊防敗毒散 투여군은 5.6 ± 0.3 (mg/dl)으로 유의성 있는 감소를 나타내었고($p < 0.05$), 獨活地黃湯 투여군은 5.3 ± 0.4 (mg/dl)로 감소를 나타내었지만 유의성은 없었다(Fig. 12A).

ALB는 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 3.69 ± 0.16 (mg/dl)이었으나 荊防敗毒散 투여군은 3.0 ± 0.22 (mg/dl)로 현저한 감소를 나타내었고($p < 0.01$), 獨活地黃湯 투여군은 3.1 ± 0.20 (mg/dl)으로 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.05$)(Fig. 12B).

A/G(알부민/글로부린)에서도 50주령 대조군에서 가장 높게 관찰되었고, 荊防敗毒散의 투여로 대조군에 비하여 각각 28.2% ($p < 0.01$)와 獨活地黃湯 투여로 19.2% ($p < 0.05$)의 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 13A).

이상의 결과로 보아는 荊防敗毒散과 獨活地黃湯의 투여로 노화된 wistar rat의 간기능 개선이 이루어진 것으로 사료된다.

T-chol.과 TG는 당질대사와 전해질의 조절, 생식기능의 조절 등 생체에서 중요한 기능을 하는 것으로 알려졌지만 그 혈중 농도가 기준치를 초과하면 고지혈증 등을 유발하게 되는 것으로 알려져 있다.

T-chol.과 TG는 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 각각 83.7 ± 13.0 (mg/dl)와 114.7 ± 7.1 (mg/dl)로 나타났고 荊防敗毒散의 투여군은 61.4 ± 9.0 (mg/

dl)와 87.1 ± 16.2 (mg/dl), 獨活地黃湯 투여군은 71.2 ± 11.0 (mg/dl)와 81.6 ± 11.6 으로 나타나 獨活地黃湯 투여군이 대조군에 비하여 TG에서 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.05$)(Fig. 11).

Glucose는 노화에 따라 감소하였으나 荊防敗毒散과 獨活地黃湯의 투여군에서 변화가 관찰되지는 않았다(Fig. 9A).

신장기능의 지표로 이용되는 BUN은²⁵ 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 23.9 ± 1.79 (mg/dl)이었고 荊防敗毒散 투여군은 20.1 ± 2.5 (mg/dl), 獨活地黃湯 투여군은 19.1 ± 1.23 (mg/dl)으로 獨活地黃湯 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.05$)(Fig. 9B).

BUN과 더불어 신기능의 지표인 CRN은²⁵ 주령에 따라 증가하여 50주령 대조군에서 0.62 ± 0.04 (mg/dl)이었고 荊防地黃湯 투여군에서 0.53 ± 0.03 (mg/dl), 荊防地黃湯 투여군은 0.53 ± 0.04 (mg/dl)으로 荊防地黃湯 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타내었다($p < 0.05$)(Fig. 10A).

이상의 결과로 볼 때 少陽人 荊防敗毒散과 獨活地黃湯은 노화에 따른 신체기능 저하를 억제하는 유효한 작용이 있는 것으로 보아 향후 지속적인 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

40주령의 Wistar rat를 이용하여 10주간 荊防敗毒散과 獨活地黃湯을 투여한 후 체중, 장기 중량의 변화, 혈액학적, 혈청생화학적 변화에 대한 연구결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 荊防敗毒散과 獨活地黃湯의 투여군은 대조군에 비하여 체중의 증가가 관찰되었으나 유의성은 없었다.
2. 荊防敗毒散과 獨活地黃湯의 투여군은 대조군에 비하여 장기 중량의 증가도 관찰되었으나 유의성은 없었다.
3. 荊防敗毒散과 獨活地黃湯의 투여군은 대조군에 비하여 혈청중 MDA 함량의 감소를 나타내었다.
4. 荊防敗毒散과 獨活地黃湯의 투여군은 대조군에 비하여 혈액학적인 개선이 관찰되었다. WBC,

RBC, Hgb, monocytes, eosinophil의 수치는 감소하였고, HCT, PLT의 수치는 증가하였다. 특히 獨活地黃湯 투여군의 monocytes($p<0.01$), eosinophil($p<0.05$) 수치는 유의성 있는 감소를 나타내었다.

5-1. 荊防敗毒散과 獨活地黃湯의 투여군은 대조군에 비하여 ALT, AST, T-bilirubin, T-protein, ALB, A/G, T-cho, TG 등 간기능 검사의 각 항목에서 감소를 나타내었다. 荊防敗毒散은 Albumin($p<0.01$), A/G ($p<0.01$)에서, 獨活地黃湯은 T-bilirubin($p<0.01$)에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.

5-2. 荊防敗毒散과 獨活地黃湯의 투여군은 대조군에 비하여 BUN, CRN 등 신기능검사의 각 항목에서 감소를 나타내었다. 특히 荊防敗毒散은 CRN($p<0.05$) 수치가, 獨活地黃湯은 BUN($p<0.05$) 수치가 유의성 있는 감소를 나타내었다.

이러한 결과로 荊防敗毒散과 獨活地黃湯은 항노화 효과가 있는 것으로 사료되며 향후 지속적인 연구가 요망된다.

VI. 參 考 文 獻

- 대한노인병학회. 노인병학. 의학출판사, 서울, 2002:18-27.
- 김숙희, 김화영. 노화. 민음사, 서울, 1995:77-106.
- 김광호. 예방한의학. 서원당, 서울, 2002:405-480.
- 이 화. 노인의학에 관한 연구. 대전대학교 대학원 박사학위논문, 2001.
- 郭靄春. 黃帝內經靈樞校注語. 일증사, 서울, 1992:177.
- 이제마. 東醫壽世保元. 행림서원, 서울, 1985:12, 80.
- 김달래. 篇譯. 東醫壽世保元四象草藁. 정담, 서울, 1999:42-45.
- 최명일 校閱. 李濟馬 遺作 文獻集 파란들, 서울, 2002:326.
- 유정희. 노화와 수명에 관한 사상의학적 양생관에 대한 고찰. 사상체질의학회지. 2002;14(3): 7-16.
- 김선민, 송일병. 東醫壽世保元四象草本卷에서의 양생에 관한 고찰. 사상체질의학회지. 2000;12(1):101-109.
- 한주석, 고병희, 송일병. 동의수세보원과 제중신편의 양생 장수론에 대한 고찰. 사상체질의학회지. 1991;3(1):141-149.
- 진국한의과대학. 改訂增補 四象醫學 집문당, 서울, 2004:390-394.
- 윤길영. 四象體質醫學論. 명보출판사, 서울, 1989:357-359.
- 元德必. 東醫四象新編. 우문사, 서울, 1929:102-126.
- 박석연. 東醫四象大典. 의도한국사, 서울, 1977:277-280.
- 김달래. 少陽人 荊防敗毒散의 효능에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문, 1988.
- 문성환. 少陽人, 少陰人 처방과 약제가 脂肪細胞의 증식·분화억제에 미치는 영향. 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1998.
- 진현철. 獨活地黃湯의 위장관 및 중추신경에 미치는 효능에 관한 실험적 연구. 상지대학교 대학원 석사학위논문, 1997.
- Suematsu T., Kamada T., Abe H., Kikuchi S., and Yagi K.. Serum lipoperoxide levels in patients suffering from liver disease. Clin. Chin. Acta. 1977;79:267~770.
- Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. Free. Rad. Biol. Med. 1996;21: 651-68.
- 김동석. 공중보건학. 수문사, 서울, 1997:379.
- Harman D. Free radical theory of aging: nutritional implications. Age. 1978;1:143-50.
- Freeman BA. Biological sites and mechanism of free radical production. In : Armstrong D, Sohal R, Culter RG, Slater T ed. Free radicals in molecular biology, aging and disease. New York, Raven Press, 1984:43-52.
- 安相源. 熟地黃과 六味地黃湯이 노화과정 흰쥐에서의 항산화 기전에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1999;8(1):1-27.
- 의학교육연수원. 임상진단학. 서울대학교 출판부, 서울, 1992:333.