

升陽益氣湯 전탕액이 노화쥐의 비장, 췌장, 위장 세포의 항산화능에 미치는 영향

이주용 · 안택원

대전대학교 한의과대학 사상체질과

Abstract

Anti-Oxidative Effect of Seungyangikki-tang Decoction in Spleen, Pancreas and Stomach Cells of SD Rats

Joo-Yong Lee, Taek-Won Ahn

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, College of Daejeon University

1. Objectives

The purpose of this study is to investigate the anti-aging and anti-oxidative effects of Seungyangikki-tang decoction(SY) in spleen, pancreas and stomach cells of Sprague-Dawley(SD) rats.

2. Methods

This experiment was used by the tissue of spleen, pancreas and stomach cells of 6, 52 and 68 weeks old SD rats. We divided each group by three. One group as normal group was non-treated cells, another group as control group was saline-treated cells, and the other group as experimental group was SY 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

SOD activity was significantly increased in spleen cell of 6, 68w-SY group, pancreas cell of 52,68w-SY group and in stomach cell of 52w-SY group compared with those of the control groups. GSH concentration was significantly increased in spleen cell of 6,68w-SY group and in pancreas cell of 6w-SY group compared with those of the control groups. MDA concentration was significantly decreased in spleen cell of 68w-SY group and in stomach cell of 68w-SY group compared with those of the control groups. NO concentration was significantly decreased in spleen cell of 68w-SY group, stomach cell of 68w-SY group compared with those of the control groups.

Key Words : Seungyangikki-tang decoction (Shengyangyigi-tang), Anti-oxidative effect, SOD, GSH, MDA, NO

I. 緒 論

노화란 나이가 들면서 세포와 조직에 해로운 변화들이 발생하고 이것이 축적되어 질병과 사망의 발생 위험을 높이는 점진적인 변화를 말한다. 노화의 진행 속도와 수명은 인종, 개인차, 유전적 차이로 차이가 나게 되어 있으며 환경적 요인에 의하여 영향을 받는다.

李濟馬는 『東醫壽世保元』 「廣濟說」에서 “四十九歲至六十四歲曰老”라 하여 49세 이상을 노년으로 규정하고 노화가 오는 것으로 정의하고 있다². 李濟馬는 命脈實數을 평가하여 예상 수명을 측정할 수 있다고 하였으며, 命脈은 손상받을 수 있으나 ‘生息充補之道’에 의하여 회복될 수 있고, 調養과 적절한 服藥을 통하여 命脈이 회복되면 정해진 수명보다 오래 살 수 있다고 하였다³.

노화의 원인에 대하여 여러 가지 가설이 있으나 최근에는 활성산소의 산화 과정에서 세포의 손상, 변이가 발생하여 이로 인하여 노화가 발생한다는 ‘활성산소설’이 많은 관심을 얻고 있다. ‘활성산소설’은 1954년 Harman⁴에 의하여 제안된 후 많은 연구를 통하여 이론이 증명되었으며 현재는 활성산소가 노화에 직, 간접적으로 관여하고 있다는 것이 정설로 자리잡게 되었다⁵.

升陽益氣湯은 少陰人 太陽病 亡陽初證과 胃家實, 鬱狂未證을 치료하는 처방이다⁶. 升陽益氣湯에 대한 연구로는 陽虛證에 미치는 영향⁷, 면역조절작용⁸에 대한 연구가 있었으나 升陽益氣湯의 항산화능에 대한 연구 보고는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 升陽益氣湯 전탕액(Seungyangikkirang decoction, 이하 SY)이 노화쥐의 비장, 췌장, 위장 세포의 항산화능에 미치는 영향을 알아보하고자 6주령의 SD(Sprague-Dawley) rat을 성장기, 52주령의 SD rat을 노화기, 68주령의 SD rat을 말기노화기로 설정하였다. 각 쥐의 실질세포에서 SOD(Super-Oxide Dismutase) activity, Glutathione concentration, NO(Nitric Oxide) concentration, MDA(Malondialdehyde) concentration를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 동물

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

2) 약재

본 실험에 사용된 升陽益氣湯(SY)은 D대학교 한방병원에서 구입하여 이용하였다. 해화약업사에서 공급되는 한약재를 사용하였으며 사용 한약재는 모두 식품의약품안전청 한약 규격에 맞는 약재를 사용하였다. 人蔘, 白芍藥, 黃芪, 白何首烏, 當歸, 生薑, 大棗는 국산을 사용하였으며 桂枝, 肉桂, 甘草는 중국산을 사용하였다. 升陽益氣湯의 구성⁶은 다음과 같다. (Table. 1)

2. 방법

1) 실험군 설정

본 실험은 각각 6주령, 52주령, 68주령의 SD rat 3마리의 비장, 위장, 췌장 조직으로부터 얻은 실질세포를 이용하여 수행하였다. 각 주령 SD rat의 비장, 췌장, 위장세포에 아무것도 처리하지 않은 정상세포(no-treated cell)를 정상군으로, saline을 처리한 세포(saline-treated cell)를 대조군으로, 승양익기탕 전탕액을 처리한 세포(SY-treated cell)를 실험군으로 분류하고 48시간 동안 배양시킨 후, 조직으로부터 분리된 세포를 안정화시킨 후, 6주령의 SD rat에서 얻은 실질세포는 500 µg/ml, 52주령의 SD rat에서 얻은 실질세포는 50 µg/ml, 68주령의 SD rat에서 얻은 실질세포는 50 µg/ml의 농도로 약물을 처리하여 48시간 동안 배양시켰다.

2) 장기 세포에서의 산화 억제 효과 측정

(1) 세포 분획

배양한 세포들을 모아 sonicate를 이용하여 균질화

Table 1. The Compositions of Seungyangikki-tang

Herbs	Botanical name	Amount (g)
人蔘	Ginseng Radix Alba	8
桂枝	Corni Fructus	8
白芍藥	Paeoniae Radix	8
黃芪	Astragali Radix	8
白何首烏	Cynanchi Wilfordii Radix	4
肉桂	Cinnamomi Cortex Spissus	4
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	4
生薑	Zingiberis Rhizoma	4
大棗	Zizyphi Fructus	4
Total amount		56

하였다. 균질화한 세포는 600×g에서 10분간 원심분리하여 균질화되지 않은 조직 등을 제거한 후 상등액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 얻었다. 이 상등액을 105,000×g에서 1시간 원심분리하여 cytosolic fraction을 얻었다. 그 침전물에 동일한 양의 0.1 M potassium phosphate buffer를 가하여 현탁시켜 microsomal fraction을 얻었다. Microsomal fraction에서 glutathione의 함량과 MDA의 함량을 측정하고, cytosolic fraction을 이용하여 SOD activity와 NO 함량을 측정하였다.

(2) SOD activity

SOD activity는 SOD assay kit를 이용하여 측정하였다. 세포분획으로 얻은 sample solution을 96well plate의 각 well과 blank 2에 20 μ l씩 분주하였다. Blank 1과 blank 3에 D.W.를 분주한 뒤, WST working solution을 200 μ l/well으로 모든 well에 첨가하였다. Blank 2와 blank 3 well에 dilution buffer를 20 μ l씩 분주하고, enzyme working solution을 각 sample well과 blank 1에 20 μ l/well으로 분주하였다. 20분 동안 37℃에서 incubation을 실시하고 450 nm에서 흡광도를 측정하고 SOD activity를 다음의 공식에 의하여 환산하였다.

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

(3) Glutathione concentration

Glutathione concentration은 kit를 이용하여 결과를

얻었다. 세포분획으로 얻은 sample을 7 ml/vial에 녹여 coenzyme working solution을 준비하여, 96well plate에 140 μ l/well으로 분주하였다. Buffer solution과 enzyme solution을 200:1 비율로 혼합하여 희석한 enzyme working solution은 plate에 20 μ l/well으로 분주하였다. Pre-incubation을 36℃에서 5분간 실시한 후, glutathione standard와 sample을 20 μ l/well으로 분주하였다. 20분간 36℃에서 incubation을 실시한 뒤, buffer solution 1 ml/vial으로 녹인 substrate working solution을 20 μ l/well씩 분주하였다. 10분간 36℃에서 incubation을 실시한 뒤, 405 nm에서 흡광도를 측정하고, GSH concentration level로 환산하였다.

(4) NO concentration

NO concentration은 kit를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정해서 결과를 얻었다. 비장, 췌장 및 위장 세포의 분획으로 얻은 NaNO₂ standard solution을 buffer solution 9 ml/vial에 녹여 준비하였다. 분획으로 얻은 sample과 standard solution을 96well plate에 80 μ l/well로 분주하고, buffer solution을 20 μ l/well로 분주하였다. 그리고 DAN solution(fluorescence reagent)를 10 μ l/well으로 첨가한 뒤, 36℃에서 15분간 incubation을 실시하였다. 그 후, NaOH solution을 10 μ l/well로 분주하고, fluorescence microplate reader으로 450 nm에서 흡광도를 측정하고 NO concentration으로 환산하였다.

(5) Lipid peroxidation concentration

Lipid peroxidation assay kit를 이용하여 측정하였고

586 nm에서 흡광도를 측정 한 후 MDA를 계산하였다. 비장, 췌장 및 위장 세포의 분획으로 얻은 sample을 각각의 E-tube에 200 μ l씩 분주하였다. 우선, R1 solution을 멸균증류수를 이용해 dilution을 R1: D.W. = 1: 3으로 실시하며, R1의 dilution은 사용하기 직전에 만들어 사용하였다. Dilution R1을 각 tube에 650 μ l/vial 분주한 뒤, sample을 짧게 vortex를 실시하였다. 다음, 37% HCL 150 μ l/vial로 분주하고, vortex를 실시하였다. 그 후에, 35°C에서 60분간 incubation하였다. 원심분리기를 15000 g (약 12240 rpm)으로 하여, 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액은 96well plate에 200 μ l/well으로 옮겨 주었다. 586 nm에서 흡광도를 측정 한 뒤, MDA concentration의 값으로 환산하였다.

(6) SOD, GSH, NO, MDA의 increasing rate, decreasing rate 주령의 증가에 따른 SOD 및 GSH의 decreasing rate, NO 및 MDA의 increasing rate와 升陽益氣湯 전탕액 처리에 따른 SOD 및 GSH의 increasing rate, NO 및 MDA의 increasing rate는 아래와 같은 방법으로 구하였다.

주령의 증가에 따른 SOD 및 GSH의 decreasing rate

$$\text{decreasing rate (\%)} = \frac{6\text{주령 평균} - 68\text{주령 평균}}{6\text{주령 평균}} \times 100$$

주령의 증가에 따른 NO 및 MDA의 increasing rate

$$\text{increasing rate (\%)} = \frac{68\text{주령 평균} - 6\text{주령 평균}}{6\text{주령 평균}} \times 100$$

약물 처치에 따른 SOD 및 GSH의 increasing rate

$$\text{increasing rate (\%)} = \frac{\text{SY군 평균} - \text{no treatment군 평균}}{\text{no treatment군 평균}} \times 100$$

약물 처치에 따른 NO 및 MDA의 increasing rate

$$\text{decreasing rate (\%)} = \frac{\text{no treatment군 평균} - \text{SY군 평균}}{\text{no treatment군 평균}} \times 100$$

(7) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. SPSS 통계프로그램(14.0 KO)의 일원배치 분산분석(one way ANOVA)을 사용하여 유의성을 검증하였으며, 각 실험군을 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 結果

1. 세포에서의 산화반응 억제 효과

1) 비장

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 비장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 SOD activity, GSH concentration, NO concentration 및 MDA concentration을 측정하였다. (Table 2)

(1) SOD activity

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 비장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 SOD activity를 측정하였다. 세포의 주령이 증가함에 따라 SOD activity가 유의하게 감소하였다. 정상군에 비하여 실험군에서 주령의 증가에 따른 SOD activity 감소율이 낮게 나타났으나 유의성은 없었다.

升陽益氣湯 전탕액을 처리한 결과, 6주령에서는 대조군에 비하여, 68주령에서는 정상군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다. 주령의 증가에 따라 升陽益氣湯 전탕액 처리에 의한 SOD activity 증가율이 높았으나 유의성은 없었다.

(2) Glutathione concentration

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 비장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 GSH concentration을 측정하였다. 세포의 주령이 증가함에 따라 GSH concentration이 유의하게 감소하였다. 특히 6주령과 68주령의 실험군에서 대조군에 비하여 GSH concentration이 유의하게 증가하였다. 52주령 세포에서는 실험군의 GSH concentration에 유의한 변화가 나타나지 않았다.

(3) Lipid peroxidation concentration

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 비장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 MDA concentration을 측정하였다. 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 세포는 68주령에서 6주 및 52주령에 비하여 MDA concentration이 유의하게 감소하였다. 특히 68주령 비장 세포에서 升陽益氣湯 전탕액 처리에 의해 MDA concentration이 유의하게 감소하였다.

(4) NO concentration

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 비장 세포를 분리

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

Parameter	Age	No treatment	Saline	SY
SOD activity (%)	6w	109.83±3.83	86.27±5.89**	114.35±1.44 ^{††}
	52w	62.37±3.96 ^{‡‡‡}	75.36±5.94	80.49±9.93 ^{‡‡}
	68w	39.79±4.04 ^{‡‡‡,§§}	41.76±2.11 ^{‡‡‡,§§}	55.71±8.32 ^{*‡‡‡,§}
GSH Conc. (umol/l)	6w	12.92±0.89	10.11±0.28*	15.08±1.15 ^{††}
	52w	7.30±0.42 ^{‡‡‡}	7.46±0.01 ^{‡‡‡}	7.00±0.40 ^{‡‡‡}
	68w	4.38±0.15 ^{‡‡‡,§§}	4.16±0.10 ^{*‡‡‡,§§§}	5.30±0.49 ^{*‡‡‡}
NO Conc. (umol/l)	6w	3.62±0.31	3.82±0.30	3.08±0.68
	52w	9.94±1.87 ^{††}	9.99±1.64	7.75±0.85 ^{††}
	68w	10.59±0.57 ^{††}	17.50±4.11 ^{*‡‡,§}	9.10±0.57 ^{‡‡‡}
MDA Conc. (umol/ml)	6w	0.34±0.01	0.31±0.02	0.33±0.02
	52w	0.33±0.01	0.31±0.01	0.34±0.02
	68w	0.35±0.02	0.32±0.02	0.25±0.01 ^{*‡‡,‡‡,§§}

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

No treatment : SD rat with no treatment

Saline : SD rat treated with saline

SY : SD rat treated with SY decoction

** : 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.

‡ ‡ ‡ : p<0.001, ‡ ‡ : p<0.01, compared to 6w group by ANOVA test.

§ § § : p<0.001, § § : p<0.01, § : p<0.05 compared to 52w group by ANOVA test.

하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 NO concentration을 측정하였다. 세포의 주령이 증가함에 따라 NO concentration이 유의하게 증가하였다. 측정 결과 68주령에서 대조군에 비하여 실험군에서 NO concentration이 유의하게 감소하였다.

2) 췌장

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 췌장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 SOD activity, GSH concentration, NO concentration 및 MDA concentration을 측정하였다. (Table 3)

(1) SOD activity

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 췌장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 SOD activity를 측정하였다. 세포의 주령이 증가함에 따라 SOD activity가 유의하게 감소하였다. 주령 증가에 따른 SOD activity 감소율은 실험군에서 정상군에 비하여 유의하게 낮았다. 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 결과, 52주령

세포에서는 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다. 68주령 세포에서는 정상군에 비하여 실험군의 SOD activity가 유의하게 증가하였다. 실험군의 SOD activity 증가율은 68주령에서 6주령 및 52주령에 비하여 유의하게 증가하였다.

(2) Glutathione concentration

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 췌장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 GSH concentration을 측정하였다. 세포의 주령이 증가함에 따라 GSH concentration이 유의하게 감소하였다. 특히 6주령 세포에서 실험군은 정상군 및 대조군에 비하여 GSH concentration이 유의하게 증가하였다.

(3) Lipid peroxidation concentration

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 췌장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 MDA concentration을 측정하였다. 세포의 주령이 증가함에 따라 MDA concentration이 유의하게 증가하였으며, 升陽益氣湯 전탕액 처리에 의한 MDA concentration의 감

Table 3. The Effect of SY Decoction on the Levels of Various Oxidants and Antioxidants in Rat Islet Cells

Parameter	Age	No treatment	Saline	SY
SOD activity (%)	6w	97.63±0.48	105.48±7.69	102.49±2.47
	52w	74.07±1.85 [‡]	80.16±1.62 ^{**‡}	85.71±2.76 ^{**‡,‡‡}
	68w	58.19±5.88 ^{‡‡§}	68.21±2.09 ^{‡‡‡}	77.40±5.81 ^{**‡‡}
GSH Conc. (umol/ℓ)	6w	10.61±0.42	10.15±0.63	16.04±0.77 ^{***,‡‡‡}
	52w	6.76±0.48 ^{‡‡‡}	5.50±0.12 ^{**‡‡‡}	5.55±0.10 ^{**‡‡‡}
	68w	5.54±0.11 ^{‡‡‡,§}	5.16±0.29 ^{‡‡‡}	5.29±0.35 ^{‡‡‡}
NO Conc. (umol/ℓ)	6w	4.82±1.21	7.15±1.51	7.06±0.52
	52w	10.04±0.71	11.78±1.06 ^{‡‡}	15.66±2.92 ^{‡‡}
	68w	19.05±4.20 ^{‡‡,§}	25.16±0.93 ^{‡‡‡,§§§}	23.47±1.92 ^{‡‡‡,§}
MDA Conc. (umol/ml)	6w	0.20±0.01	0.24±0.01	0.24±0.01
	52w	0.35±0.02 ^{‡‡}	0.39±0.02 ^{‡‡‡}	0.39±0.02 ^{‡‡‡}
	68w	0.50±0.04 ^{‡‡‡,§§}	0.43±0.03 ^{‡‡‡}	0.64±0.02 ^{**‡‡,‡‡‡,§§§}

Islet cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μg ml, 50 μg ml, 50 μg ml SY decoction respectively, and SOD activity, GSH, NO and MDA levels were estimated by ELISA. Values represent the means ± SD of 3 mice.

No treatment : SD rat with no treatment

Saline : SD rat treated with saline

SY : SD rat treated with SY decoction

***: p<0.001, **: p<0.01, *: 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.

‡ ‡ ‡ : p<0.01, ‡ ‡ : p<0.01, ‡ : p<0.05 compared to 6w group by ANOVA test.

§§§: p<0.001, §§: p<0.01, §: p<0.05 compared to 52w group by ANOVA test.

소는 나타나지 않았다.

(4) NO concentration

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 췌장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 NO concentration을 측정하였다. 세포의 주령이 증가함에 따라 NO concentration이 유의하게 증가하였다. 주령의 증가에 따른 NO concentration 증가는 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.

3) 위장

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 위장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 SOD activity, GSH concentration, NO concentration 및 MDA concentration을 측정하였다. (Table 4)

(1) SOD activity

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 위장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 SOD activity를

측정하였다. 분석 결과 52주령에서는 6주령에 비하여 SOD activity가 감소하였다. 68주령에서는 52주령에 비하여 약간 증가하였으나 6주령에 비하면 감소한 경향을 나타내었다. 주령의 증가에 따른 SOD activity 감소율은 실험군에서 정상군 및 대조군에 비해 낮았으나 유의성은 없었다. 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 결과, 52주령에서 무처리 세포에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다.

(2) Glutathione concentration

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 위장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 GSH concentration을 측정하였다. 세포의 주령이 증가함에 따라 GSH concentration은 감소하는 경향을 나타내었다. 약물처리에 의한 GSH concentration의 변화는 나타나지 않았다.

(3) Lipid peroxidation concentration

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 위장세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 MDA concen

Table 4. The Effect of SY Decoction on the Levels of Various Oxidants and Antioxidants in Rat Stomach Cells

Parameter	Age	No treatment	Saline	SY
SOD activity (%)	6w	88.64±3.44	84.24±4.41	92.15±2.38
	52w	47.44±5.79 ^{***}	61.24±7.64 ^{**}	72.67±5.67 ^{**}
	68w	72.57±6.57 ^{‡§§}	70.55±5.24	81.04±3.17 [‡]
GSH Conc. (umol/l)	6w	5.42±0.04	5.44±0.04	5.46±0.47
	52w	4.99±0.07 ^{***}	4.62±0.08 ^{***}	5.09±0.32
	68w	4.77±0.06 ^{***§§}	4.38±0.06 ^{***§§}	4.47±0.36
NO Conc. (umol/l)	6w	10.44±0.52	11.88±1.76	9.64±0.65
	52w	12.83±0.48	15.86±3.06	11.18±4.23
	68w	17.06±2.18 ^{***§§}	20.84±2.59 [‡]	13.17±2.83 [‡]
MDA Conc. (umol/ml)	6w	0.21±0.03	0.19±0.02	0.24±0.01
	52w	0.19±0.02	0.22±0.02	0.25±0.02
	68w	0.27±0.04 [§]	0.30±0.02 ^{***§§}	0.23±0.04 [*]

Stomach cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μg ml, 50 μg ml, 50 μg ml SY decoction respectively, and SOD activity, GSH, NO and MDA levels were estimated by ELISA. Values represent the means \pm SD of 3 mice.

No treatment : SD rat with no treatment

Saline : SD rat treated with saline

SY : SD rat treated with SY decoction

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

‡ : $p < 0.05$ compared to saline group by ANOVA test.

*** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$, † : $p < 0.05$ compared to 6w group by ANOVA test.

§§ : $p < 0.01$, § : $p < 0.05$ compared to 52w group by ANOVA test.

tration을 측정하였다. 정상군과 대조군에서는 주령의 증가에 따라 MDA concentration이 유의하게 증가하였으나, 실험군에서는 주령의 증가에 따른 MDA concentration의 변화가 나타나지 않았다. 주령의 증가에 따른 MDA concentration 증가율은 실험군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 특히 68주령의 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 MDA concentration이 유의하게 감소하였다.

(4) NO concentration

6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 위장 세포를 분리하여 升陽益氣湯 전탕액을 처리한 후 NO concentration을 측정하였다. 정상군과 대조군에서는 세포의 주령이 증가함에 따라 NO concentration이 유의하게 증가하였으며, 실험군에서는 주령의 증가에 따라 NO concentration이 약간 증가하였으나 유의성은 없었다. 주령의 증가에 따른 NO concentration의 증가는 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다. 68주령의 실험군에서 대조군에 비하

여 NO concentration이 유의하게 감소하였다. 升陽益氣湯 전탕액 처리에 의한 NO concentration 감소율은 6주령 및 52주령에 비하여 68주령에서 높게 나타났으나 유의성은 없었다.

IV. 考 察

고령화는 21세기 인류가 직면한 가장 중요한 문제 중의 하나이다. UN은 65세 이상 고령인구가 전체 인구의 7%를 넘어서게 되면 ‘고령화 사회’, 고령인구가 전체 인구의 14%이상에 달하면 ‘고령 사회’, 20%가 넘게 되면 ‘초고령 사회’가 된다고 규정하고 있다⁹. 2008년 7월 1일 기준 대한민국 총인구 중 65세 이상 인구가 차지하는 비율은 10.3%로 우리나라는 2000년에 이미 ‘고령화 사회’에 진입하였으며, 향후 10년 후(2018년)에는 ‘고령사회’에, 2026년에는 ‘초(超)고령 사회’에 도달할 것으로 전망된다¹⁰. 이에 따라 우리 사회도 고령화 사회로 진행하면서 어떻게 노화를 맞

이할 것이며 성공적으로 노화를 맞이할 것인가에 대한 관심이 점차 늘어가고 있다.

李濟馬는 『東醫壽世保元四象草本卷』에서 “六十四歲命脈在神仙度數者壽一百二十八”이라 하여 사람의 최대 수명을 128세로 규정하였으며, 『濟衆新編』 「五福論」에서는 “一曰壽, 二曰美心術, 三曰好讀書, 四曰家產, 五曰行世.”라 하여 장수를 五福중의 으뜸으로 뽑았다¹². 이제마는 『東醫壽世保元四象草本卷』에서 偏小之臟의 剩削에 따라 命脈의 길고 짧음이 결정되며 64세에 존재하는 命脈을 따져 수명을 알 수 있다고 하였다¹¹.

노화는 나이가 증가함에 따라 생식력의 감퇴와 사망률의 증가가 동반되는 진행성의 기능상실로 정의될 수 있다¹³. 생물학적 노화의 기전은 여러 가지가 있으나 크게 분자이론, 세포이론, 계통이론, 진화론으로 구분할 수 있으며, 그 중 세포이론에 속하는 활성산소설은 최근 노화에 대한 생물학적 연구의 중심이 되는 이론이다¹³. 1956년 Harman⁴에 의하여 발상된 후 활성산소와 노화에 대한 많은 연구들이 발표되었으며, 이를 통하여 활성산소가 노화에 관여한다는 여러 가지 증거들이 발견되었다¹⁴.

활성산소설은 노화 과정에서 발생하는 활성 산소로 인하여 세포 내부의 손상이 축적되어 질병과 세포사망을 유발한다는 이론이다. 활성산소는 분자 파편이나, 하나 또는 홀수 개의 전자를 가진 원자를 가리킨다. 분자나 원자는 전자를 잃으면 불안정해지기 때문에, 전자를 다시 획득해 안정된 원래 상태로 되돌아가려는 경향이 있다. 활성산소는 전자를 다시 얻기 위해 다른 분자를 공격해 변형시켜 활성산소가 생성되면 분자들은 서로의 전자를 빼앗기 위해 연쇄 반응을 일으킨다. 이러한 과정에서 전자가 한 분자에서 다른 분자로 이동하는 것을 산화라고 한다¹⁵.

升陽益氣湯은 黃芪桂枝湯의 君臣藥(桂枝, 黃芪, 芍藥)에 人蔘 2錢을 추가하여 主藥으로 삼고, 佐使藥(白何首烏, 當歸, 炙甘草)에 官桂 1錢을 추가하여 附藥으로 삼은 처방이다. 少陰人 太陽病 亡陽初證과 胃家實, 鬱狂末證을 치료한다⁶. 補中益氣湯과 비슷하나 人蔘, 黃芪의 함량이 補中益氣湯보다 적으며 대신에 桂枝湯의 주된 약재인 桂枝와 芍藥이 추가되어 人蔘, 黃芪의 부족한 藥량을

보충한다. 人蔘, 黃芪, 白何首烏, 肉桂는 少陰人의 陽暖之氣를 강화시키며 升陽益氣시키는 약제로 볼 수 있다. 이로 볼 때 升陽益氣湯은 補中益氣湯의 陽氣를 補益하는 효능을 가지면서 有汗을 治하는 桂枝湯의 약제를 더하여 少陰人 亡陽證의 升陽시키는 처방으로 볼 수 있다¹⁶.

이번 실험에서는 6주령, 52주령 및 68주령 SD rat의 비장과 위장, 췌장 세포에서 정상군, 대조군, 실험군의 각각의 SOD activity, Glutathione concentration, NO concentration 및 MDA concentration을 측정하였다.

SOD는 활성산소의 산화과정에서 생성되는 superoxide anion radical을 제거하며 가장 유해한 활성산소 대사산물인 hydroxy radical의 생성을 방지하는 대표적인 효소이다¹⁷. 생체 내에서 발생한 활성산소들은 SOD에 의하여 H₂O₂와 O₂로 변환되며 이렇게 변환된 H₂O₂는 catalase에 의하여 H₂O와 O₂로 변환되어 독성이 사라지게 된다¹⁸.

GSH는 hydroxyl radical, lipid peroxy radical, peroxynitrite, H₂O₂등의 활성산소와 체내 산화물을 제거하는 작용이 있다. GSH는 활성산소 제거 과정에서 GSSG로 산화되었다가 GSH로 다시 환원되며 이 과정에서 활성산소가 제거된다. Glutathione peroxidase는 GSH가 H₂O₂와 lipid peroxidase를 산화시키는 과정에 작용하여 GSH의 작용을 촉진시킨다¹⁹.

Lipid peroxidation은 활성산소의 산화 과정에서 고도의 불포화지방산이 수소를 탈취당하면서 이를 보상하기 위하여 일어나는 타 전하와의 연쇄적인 반응을 통하여 생성된다. Lipid peroxidation은 노화를 촉진하며, 동맥경화, 백내장, 류마티스 관절염, 신경퇴행성 장애 등과 연관이 있다²⁰. 인체 내 lipid peroxidation을 측정하는 표준적 방법은 없으나 지질과산화 과정은 여러 단계를 거치므로 중간 대사물을 측정하여 lipid peroxidation의 농도를 측정한다²¹. 그 중 이차 과산화물인 MDA측정이 가장 쉬우며 널리 사용되는 방법이다.

NO는 체내 어디에나 존재하는 세포 내 전달 물질이다. NO는 혈액 순환, 혈액 응고, 혈전 생성, 신경 활성 등을 조절하는 작용을 한다. 또한 비특이적 면역 반응에 관여하며 병원체나 중양 세포를 제거하는 작용에도 관여한다. 그러나 NO가 superoxide 활성산소와 반응하게 되면 peroxynitrite(ONOO-)라는 superoxide보

다 더 강력한 산화 물질이 합성된다. 일반적으로 항산화 효소가 체내에 많이 존재하여 superoxide가 제거되면 NO는 체내에서 유지할 수 있지만 항산화 효소가 부족하거나 superoxide 농도가 높아지면 NO는 세포사멸, 종양 발생, 동맥경화 등에 작용한다는 보고가 있는 peroxynitrite로 합성되어 노화를 촉진시킨다²².

升陽益氣湯 전탕액을 노화주의 비장 세포에 처리한 결과, 실험군은 6주령에서는 대조군에 비하여, 68주령에서는 정상군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다. 주령의 증가에 따라 升陽益氣湯 전탕액 처리에 의한 SOD activity 증가율이 높았으나 유의성은 없었다.

비장 세포의 주령이 증가함에 따라 GSH concentration이 유의하게 감소하였다. 6주령과 68주령의 실험군은 대조군에 비하여 GSH concentration이 유의하게 증가하였다. 52주령 비장 세포에서 실험군은 정상군 및 대조군에 비하여 GSH concentration의 유의한 변화가 나타나지 않았다.

升陽益氣湯 전탕액을 처리한 비장 세포는 68주령에서 6주 및 52주령에 비하여 MDA concentration이 유의하게 감소하였다.

비장 세포의 주령이 증가함에 따라 NO concentration이 유의하게 증가하였으나, 68주령에서 대조군에 비하여 실험군의 NO concentration이 유의하게 감소하였다.

췌장 세포에서의 주령 증가에 따른 SOD activity 감소율은 실험군이 정상군에 비하여 유의하게 낮았다. 52주령 세포에서는 정상군 및 대조군에 비하여 실험군의 SOD activity가 유의하게 증가하였다. 68주령 세포에서는 정상군에 비하여 실험군의 SOD activity가 유의하게 증가하였다. 升陽益氣湯 처리에 의한 SOD activity 증가율은 68주령에서 6주령 및 52주령에 비하여 유의하게 증가하였다.

6주령 췌장 세포에서 실험군은 정상군 및 대조군에 비하여 GSH concentration이 유의하게 증가하였다.

췌장 세포의 주령이 증가함에 따라 췌장 세포의 MDA concentration이 유의하게 증가하였으며, 升陽益氣湯 전탕액 처리에 의한 MDA concentration의 감소는 나타나지 않았다.

췌장 세포의 주령이 증가함에 따라 췌장 세포의

NO concentration이 유의하게 증가하였다. 주령의 증가에 따른 NO concentration 증가율은 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다. 升陽益氣湯 전탕액 처리에 의한 NO concentration의 유의한 감소는 나타나지 않았다.

升陽益氣湯 전탕액을 위장 세포에 처리한 결과, 52주령에서는 6주령에 비하여 SOD activity가 감소하였다. 68주령에서는 52주령에 비하여 약간 증가하였으나 6주령에 비하면 감소한 경향을 나타내었다. 주령의 증가에 따른 SOD activity 감소율은 실험군에서 정상군 및 대조군에 비해 낮았으나 유의성은 없었다. 실험군은 52주령에서 정상군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다.

위장 세포의 주령이 증가함에 따라 GSH concentration은 감소하는 경향을 나타내었다. 약물처리에 의한 GSH concentration의 변화는 나타나지 않았다.

정상군과 대조군의 위장 세포에서는 주령의 증가에 따라 MDA concentration이 유의하게 증가하였으나, 실험군에서는 주령의 증가에 따른 MDA concentration의 변화가 나타나지 않았다. 주령의 증가에 따른 MDA concentration 증가율은 실험군이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 68주령의 실험군은 정상군에 비하여 MDA concentration이 유의하게 감소하였다.

위장 세포의 주령이 증가함에 따라 NO concentration이 증가하였다. 주령의 증가에 따른 NO concentration의 증가율은 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 낮았다. 68주령의 실험군에서 대조군에 비하여 NO concentration이 유의하게 감소하였다. 升陽益氣湯 전탕액 처리에 의한 NO concentration 감소율은 6주령 및 52주령에 비하여 68주령에서 높게 나타났다.

升陽益氣湯 전탕액을 처리한 결과 비장 세포의 6, 68주령, 췌장 세포의 52, 68주령, 위장 세포의 52주령 세포에서 실험군은 정상군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였고, Glutathione concentration은 비장 세포의 6주령과 68주령, 췌장 세포의 6주령에서 유의한 증가를 보였다. MDA concentration은 68주령의 비장, 위장 세포에서 유의한 감소를 보였으며, NO concentration은 68주령의 비장, 위장 세포에서 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다.

위의 결과를 토대로 분석해 본 결과 升陽益氣湯

은 노화기 또는 말기 노화기 쥐의 비장, 췌장, 위장 세포에 유의한 항산화 효과가 있다는 결론을 내릴 수 있었다. 특히 말기 노화기의 비장 세포에 대한 항산화 효과가 뛰어났으며 췌장 세포에 대한 항산화 효과는 상대적으로 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 노화기의 비장, 췌장 및 위장 세포에 升陽益氣湯을 처리하여 SOD activity가 모두 유의하게 증가한 것으로 보아 升陽益氣湯은 SOD activity에 특히 유의하게 작용한다고 볼 수 있었다.

비장은 인체의 면역 기능과 밀접한 관련이 있는 기관이다. 유 등⁸의 연구에서 升陽益氣湯은 비장 세포의 γ -IFN 및 IL-2의 양을 증가시키며 T helper cell의 양을 증가시켰다. 노화쥐의 비장 세포의 항산화능이 유의하게 증가한 것은 升陽益氣湯 복용으로 비장 세포의 면역 기능이 향상되면서 항산화능이 향상된 것으로 추론할 수 있다.

升陽益氣湯의 구성약물에 대한 기존 연구에서 각 약재 추출물에 의한 항산화 효과가 입증되었다. 하지만 기존의 실험들은 노화 병태 모델에서 같은 환경에서 여러 주령의 실험군에 대하여 각 장부 조직의 항산화 효소 활성 변화를 관찰한 것이 아니라 특정 장부에 대한 세포수준의 연구였으며, 임상에서 흔히 쓰이는 전탕액이 아닌 약재 한 가지의 추출물을 사용한 결과 도출로 실제 약물이 혼합되어 사용되었을 때의 항산화 효소 활성 변화에 대하여는 예측할 수 없다고 사료된다.

소음인 처방이 항산화능에 미치는 영향에 대한 연구로는 香砂養胃湯²³, 吳茱萸附子理中湯²⁴, 十二味寬中湯^{24,25}에 대한 연구가 있다. 각 처방들은 항산화능 및 노화 방지에 유의한 효과가 있었으나 모두 소음인 胃受寒裏寒病에 관련된 처방이며 소음인 腎受熱表熱病 처방이 비장, 췌장, 위장 세포에 미치는 항산화능에 관한 연구는 아직 접하지 못하였다.

따라서 본 연구에서 升陽益氣湯 전탕액의 항산화 효과를 입증하기 위하여 6주령, 52주령, 68주령 SD rat을 성장기, 노화기, 말기노화기로 설정하고 실험한 것은 일정부분 가치가 있을 것으로 사료된다.

升陽益氣湯은 비장, 췌장, 위장의 항산화 활성을 강화하며 산화물질을 감소시켜 항산화능 강화 및 노화 방지에 유의한 효과가 있는 것으로 사료된다. 특히

노화기의 비장 세포에 유의한 효과가 있었으며, SOD activity을 유의하게 강화시키는 효과가 있는 것으로 나타났다. 추후의 연구에서는 升陽益氣湯의 면역 기능 향상 효과와 항산화능과의 관련성에 대한 보다 체계적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

升陽益氣湯 전탕액의 항산화능을 알아보고자 6주령, 52주령, 68주령의 SD rat의 비장, 췌장 그리고 위장 세포의 SOD activity, Glutathione concentration, NO concentration, MDA concentration을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SOD activity는 SY를 처리한 비장세포의 6, 68주령, 췌장세포의 52, 68주령, 위장세포의 52주령에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다.
2. GSH concentration은 SY를 처리한 비장세포의 6, 68주령, 췌장세포의 6주령에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다.
3. MDA concentration은 SY를 처리한 비장세포의 68주령, 위장세포의 68주령에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.
4. NO concentration은 SY를 처리한 비장세포의 68주령, 위장세포의 68주령에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.

VI. 參 考 文 獻

1. Harman D. The Free Radical Theory of Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2003;5(5):557-561.
2. 이제마. 東醫壽世保元. 서울:여강출판사. 2003:266.
3. Han JS, Koh BH, Song IB. A Study of Preservation of Health in the 『Dongyi Soose Bowon』 and 『Chejung Sinpyeon』. *J Sasang Constitut Med*. 1991;3(1):141-149. (Korean)
4. Harman D. Aging, A theory based on free radical radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11:298-300.
5. 손장락. 활성산소와 항산화제. 서울:(주)바이오메디컬. 2004:29.
6. 전국 한의과대학 사상의학교실. 개정증보 사상의

- 학. 서울:집문당. 2004:362.
7. Kim JS. The experimental study of Palmoolgoonjarang and Seungyangikki-tang of Soyum-in on yang insufficient syndrome induced by hydrocortisone acetate. *J Korean Oriental Med.* 1988;9(1):42-61. (Korean)
 8. Ryu CR, Song JM. Immunoregulatory action of Soeumin Seungyangikki-rang. *J Sasang Constitut Med.* 2001;13(3):102-113. (Korean)
 9. U Nations. The Sex and Age Distribution of the World Populations. The 1996 Revision. New York:United Nations, 1997.
 10. 통계청. 2008 고령자 통계. 서울:통계청. 2008:2.
 11. 이제마. 東醫壽世保元四象草本卷. 파주:집문당. 2005:171,176,186.
 12. 최병일. 李濟馬 遺作 文獻集東. 서울:과린들. 2002:326.
 13. Cheon JS. The concept of aging. *J Korean Soc Biol Ther Psychiatry.* 2007;13(2):129-137. (Korean)
 14. Gustavo Barja. Free radicals and aging, *Trends in Neurosciences,* 27(10):595-600, 2004.
 15. 서유현. 노화의 과학. 서울:사이언스북스. 2006: 58-59.
 16. Joo JC, Kim KY. A Study on the Diseases and Pharmacy of the Soeumin's Sinsooyl-Pyoyul-Byung theory. *J Sasang Constitut Med.* 1997;9(2):67-94. (Korean)
 17. I Fridovich. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry.* 1995; 94:97-112.
 18. Gary N. Landis, John Tower. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development.* 2005;126(3):365-379.
 19. Guoyao Wu, Yun-Zhong Fang, Sheng Yang, Joanne R. Lupton and Nancy D. Turner. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health, *Journal of Nutrition.* 2004;134:489-492.
 20. Etsuo Nikia, Yasukazu Yoshidaa, Yoshiro Saitoa and Noriko Noguch. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2005;338(1): 668-676.
 21. RE Little, BC Gladen. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reproductive Toxicology.* 1999;13(5):347-352.
 22. Pál Pacher, Joseph S. Beckman, Lucas Liaudet. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews.* 2007;87:315-424.
 23. Choi BC, Ahn TW. Anti-Oxidant Effect of Hyang-sayangyi-tang Decoction in Stomach, Spleen and Pancreas cell of SD Rats. *J Sasang Constitut Med.* 2008;20 (2):72-84. (Korean)
 24. Jung BY, Song IB. A Study on Antioxidative Effects of Sipyimiguanjung-tang and Osuyubujayijung-tang, Korean Traditional Prescriptions for Soeum constituents, in Brain and Liver of Rat. *J Sasang Constitut Med.* 1999;11(2):227-250. (Korean)
 25. Sun TC, Ahn TW. Anri-aging Effects of Sipyimigwanjung-tang in Aged Rats. *J Sasang Constitut Med.* 2008;20(2):98-110. (Korean)