

補肺元湯이 노화쥐의 간장과 폐장 세포의 항노화 및 항산화능에 미치는 영향

배정규 · 안택원

대전대학교 한의과대학 사상체질과

Abstract

Anti-aging and Anti-Oxidant Effect of Bopyewon-tang in Liver and Lung Cell of SD Rats

Bae Jung-kyu, Ahn Taek-won

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

1. Objective

The purpose of this study is to investigate the anti-aging and anti-oxidant effects of Bopyewon-tang(BPW) in Liver and Lung cell.

2. Methods

This experiment was used the tissue of liver and lung 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 BPW-treated cells.

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

3. Results and Conclusion

1. The activity of SOD in liver of in 52 w-BPW group, 68 w-BPW group, and in lung of 68 w-BPW were significantly increased in comparison with those of the normal groups.
2. The levels of NO in liver of in 68 w-BPW group was significantly decreased in comparison with those of the normal groups.
3. The levels of MDA in lung of in 68 w-BPW group was significantly decreased in comparison with those of the normal groups.

Key Words : Bopyewon-tang, Anti-aging Effect, Anti-oxidant Effect, SOD Activity, NO, MDA

I. 서론

老化는 생명체의 성장과 동시에 나이가 들어 감에 따라 나타나는 퇴행적 현상으로 생체조절 기능, 대사능력의 저하 등 기능적 유연성이 떨어지는 현상이다¹. 한의학에서는 《『素問』·「上古天真論」》²에 사람이 늙어 가며 생식능력이 없어지고 그에 따라 나타나는 외형의 변화를 설명하였으며 또한 사상의학의 창시자인 이세마는 《東醫壽世保元》³에서 “四十九歲至六十四歲曰老”라 하여 50대에 들어 노인의 단계로 접어든다고 생각하였다.

현재까지 노화의 원인에 관하여 확실히 밝혀진 바는 없으나 크게 세 가지 가설로 설명할 수 있다⁴. 첫째는 내적 인자인 유전자에 의해 생명체의 노화와 수명이 예정되어 있다는 노화 예정설(genetic programme theories of aging)이고, 둘째는 여러 가지 해로운 인자들에 의한 생체물질의 손상이 축적되어 노화에 이른다는 유해인자 손상설(theories of aging related to primary damage)이다. 마지막으로 위의 두 가설을 통합하여 하나의 가설로 발전시킨 노화의 통합 모델(unifying model of the programmed and stochastic theories of aging)이다⁵. 그 중 유해인자 손상설(Theories of aging related to primary damage)은 노화가 계획된 과정이라기보다는 생체에서 반복해서 일어나는 정보 전달 과정 및 단백질 합성 과정에서 오류가 발생하고, 그 오류가 축적되어 노화가 발생한다는 것이다⁶.

유해인자 손상설 중 대표적인 학설인 free radical 이론은 인체의 대사과정 중에 발생하는 활성산소에 의한 인체 조직 및 세포의 손상이 개체의 손상을 유발하여 老化에 이르게 된다고 하므로 이 이론에 따르면 항산화 작용이 老化의 방지에 결정적인 영향을 미칠 수 있는 것이다⁷.

補肺元湯은 生脈散을 기본으로 한 처방으로 麥門冬으로 補肺和肺하고 五味子로 健肺直肺하여 太陰人の 保命之主인 呼散之氣를 유지시키고 보전시키며 桔梗으로 壯肺而有外揚之勢 하여 太

陰人の 정기이자 保命之主인 呼散之氣를 확충하여⁸ 太陰人の 肺를 보하고 呼散之氣를 보충한다. 따라서 補肺元湯은 太陰人에 있어 폐장의 기운이 削하여 발생할 수 있는 여러 질병의 치료와 노화에 저항하는 효과가 기대된다.

기존에 補肺元湯에 대한 연구는 많지 않고 五味子の 항산화 효과에 대한 김⁹ 등의 연구와 장¹⁰ 등의 연구가 있으며 麥門冬의 항산화 효과에 대한 연구로는 최¹¹ 등의 연구 등이 있으나 桔梗에 대한 연구는 찾아 볼 수 없고 더욱이 補肺元湯의 항산화 효과 혹은 항노화 효과에 대한 연구 역시 찾아 볼 수 없었다.

이에 저자는 太陰人の 偏小 偏大之臟인 肺와 肝의 항산화 활성도에 대하여 補肺元湯이 미치는 영향을 알아보려고 6주령과 52주령 68주령 Sprague-Dawley rat(SD rat)의 간세포와 폐세포를 배양하여 Superoxide Dismutase(SOD) 활성도와 Glutathione(GSH) 함량, Malondialdehyde(Lipid peroxidation, 이하 MDA)의 함량과 Nitric Oxide(NO)의 함량을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

동물은 6주령과 36주령의 웅성 Sprague-Dawley rat(SD rat)을 중앙 실험동물(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 補肺元湯(BPW)은 D대학교 한방병원에서 구입하여 정성하여 사용하였다. 補肺元湯의 구성은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Compositions of Bopyewon-tang

Herbs	Scientific name	Amount (g)
麥門冬	Liriois Tuber	12
桔 梗	Platycodi Radix	8
五味子	Schizandrae Fructus	4
Total		24

2. 방법

1) 검액의 제조

補肺元湯 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 °C에서 보관하였다.

2) 세포 독성 측정

(1) 간 실질세포 분리

본 실험모델과 동일한 6주령, 52주령과 68주령의 수컷 SD rat의 간 조직을 사용하였다. Rat을 Ethyl ether를 이용하여 마취 시킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하며 복부쪽 혈관을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출시켜준다. 조직을 잘게 잘라서 RPMI 1640 media (with 10% FBS, antibiotics)와 collagenase type IV (300u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation 한다. 이때 20분에 한 번씩 흔들어 줌으로써 간세포 분리가 잘 되도록 한다. 간 조직을 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 사용하여 mesh에서 갈아준다. 이렇게 얻어진 시료에서 RBC를 제거하고 세척하여 획득한 세포를 실험에 사용하였다.

(2) MTT assay 방법을 이용한 농도별 약물 세포 독성 측정

분리한 간세포는 RPMI 1640 media에 10 %의 FBS와 antibiotic를 첨가하고 24시간동안 세포배양을 실시하여 활성을 안정화시킨다. 96 well plate

에 세포를 1×10⁵ cells/well으로 분주하고, 각 약물은 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1mg/ml, 500µg/ml, 100 µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 농도로 희석한 補肺元湯을 첨가하여 48시간동안 세포 배양을 실시한다. 48시간 후에, MTT solution(5mg/ml, Cat No. 135038, Sigma, USA)을 각 well에 20µl씩 분주하고 5시간 동안 37 °C에서 incubation 한다. 5시간 후, 각 well에 있는 medium을 100 µl씩 버리고, solubilizing solution을 100 µl씩 분주한 뒤 pipetting을 강하게 하여 well에 dark blue crystals가 침전하는 정도를 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 optical densities를 확인한다.

3) DPPH 소거능 측정

1,1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl(DPPH, Sigma, USA) 80mg을 에탄올 50ml과 멸균 증류수를 50ml에 첨가하여 녹여 준다. 이를 96 well에 180µl씩 분주하고, 각 약물은 5mg/ml, 2.5mg/ml, 1mg/ml, 500 µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 농도로 희석하여 첨가하고, 30분 동안 실온에서 방치한다. 그 후에 517nm로 O.D.(Optical Density)값을 측정하고, activity로 환산한다.

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

4) 실험군 설정

본 실험은 각각 6주령, 52주령, 68주령의 SD rat의 간 조직과 폐 조직으로부터 얻은 실질세포를 이용하여 수행하였다. 실험군은, 아무것도 처리하지 않은 정상군(not-treated cell), saline을 처리한 대조군(saline-treated cell), 補肺元湯 전탕액을 처리한 실험군(BPW-treated cell)으로 나누어 분류하였고, 조직으로부터 분리된 세포를 안정화시킨 후, 약물을 6주령의 동물에서 얻은 실질세포는 500 µg/ml, 52주령의 동물에서 얻은 실질세포는 100 µg/ml, 68주령의 동물에서 얻은 실질세포는 25µg/ml으로 처리하여 48시간동안 배양시켰다.

5) 장기 조직에서의 세포 분리 및 배양

(1) 간

Rat을 Ethyl ether를 이용하여 마취 시킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하며 복부쪽 혈관을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출 시켜준다. 간 조직을 rat으로부터 적출하여, 차갑게 준비한 RPMI 1640 media에 보관한다. 100mm dish에서 간을 잘게 잘라 준비한 뒤, RPMI 1640 media와 collagenase type IV (300 u/ml)를 넣고 실온에서 90분간 incubation을 한다. 이때 20분에 한번씩 흔들어 줌으로써 간세포가 분리가 잘 되도록 한다. 간 조직을 complete media (RPMI1640 + 5% FBS + antibiotics)를 사용하여 mesh에서 갈아준다. 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 간 실질 세포를 분리한다. 분리된 세포는 complete media을 이용하여 배양한다.

(2) 폐

Rat을 Ethyl ether를 이용하여 마취 시킨 후, 대동맥 혈관에 HBSS(Ca²⁺, Mg²⁺ free)를 투여하며 복부쪽 혈관을 절단시켜 동물의 혈액을 모두 배출 시켜준다. 폐 조직을 rat으로부터 적출하여, 차갑게 준비한 complete media(RPMI1640 + 5% FBS + antibiotics)에 보관한다. 100 mm dish에서 폐를 잘게 잘라 준비한 뒤, 15ml tube에 collagenase digestion solution(300 Uml⁻¹ collagenase type II + 10ml PBS ml + 150µl DNase I of a 10 mg/ml⁻¹ stock solution)을 10 ml 넣고 잘게 잘린 폐 조직을 넣고, 37°C water bath에서 1시간 동안 shaking 한다. Shaking을 마친 다음, 40µm strainer 에 배양액을 걸러주고, 5-10ml 정도 complete media를 더 분주하여 통과 시킨다. 모아진 배양액은 원심분리를 300 g에서 5분 동안 실시한다. 침전된 cell pellet은 lysis buffer를 이용하여 적혈구를 파쇄하고, 원심분리를 300g에서 5분 동안 실시하여 폐 실질 세포를 분리한다. 분리된 세포는 complete

media을 이용하여 배양 한다.

6) 세포에서의 항산화능 측정

(1) 세포 분획

Bansal¹²등의 방법을 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 GSH의 함량과 MDA의 함량을 측정하고, cytosolic fraction을 이용하여 SOD 활성도와 NO 함량을 측정하였다.

(2) SOD activity

SOD 활성도는 SOD assay kit를 이용하여 측정하였다. 세포 분획으로 얻은 sample중에서 20000 rpm으로 얻은 sample을 사용하였으며, sample solution을 96 well plate의 각 well과 blank 2에 20 µl씩 분주한다. Blank 1과 blank 3에 D.W.를 분주한 뒤, WST working solution을 200µl/well으로 모든 well에 첨가한다. blank 2와 blank 3 well에 dilution buffer를 20µl씩 분주하고, enzyme working solution을 각 sample well과 blank 1 에 20µl/well으로 분주한다. 20분 동안 37°C에서 incubating을 실시하고 450nm에서 흡광도를 측정 하고 SOD 활성도를 다음의 공식에 의하여 환산하였다.

SOD activity (inhibition rate %)

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

(3) Glutathione(GSH)

간과 폐 조직 내 GSH함량은 kit를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정해서 결과를 얻었다.

(4) Lipid peroxidation(MDA)

Lipid peroxidation assay kit를 이용하여 측정하였

고 586nm에서 흡광도를 측정한 후 MDA를 계산하였다.

(5) NO assay

간과 폐 조직 내 NO함량은 kit를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정해서 결과를 얻었다.

7) 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. 성적

1. 세포 독성

6주령, 52주령 및 68주령 흰쥐의 간 실질세포를 이용하여 補肺元湯 전탕액의 세포독성을 측정

하였다. 측정 결과, 6주령, 52주령 및 68주령 세포 모두 補肺元湯 전탕액의 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 세포생존률이 감소하였다. 각 주령에서의 세포생존률을 고려하여, 6주령 세포에는 500 µg/ml, 52주령 세포에는 100 µg/ml, 68주령 세포에는 10 µg/ml의 補肺元湯 전탕액을 선택하여 각 세포의 항산화능을 측정에 사용하였다.

2. DPPH 소거능 측정

補肺元湯 전탕액을 여러 가지 농도로 희석하여 DPPH 소거능을 측정한 결과, 모든 농도에서 control에 비하여 DPPH 활성이 유의하게 감소하였다.

3. 간 세포에서의 항산화능

(1) SOD activity

세포의 주령이 증가함에 따라 SOD 활성이 감소하였다. 補肺元湯 전탕액을 처리한 결과, 6주

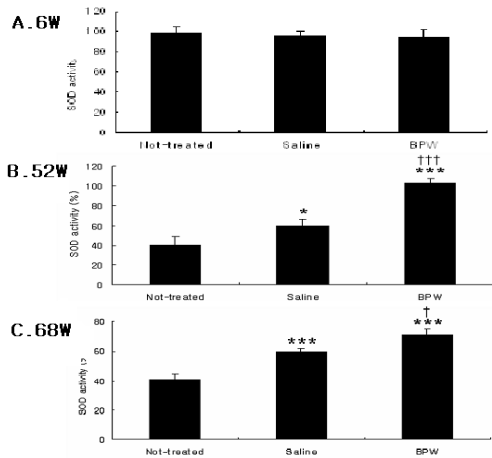


Fig. 1 Effect of BPW Decoction on SOD Activity in Liver Cells from Old Rats.

Liver cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml BPW 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<0.001 compared to saline group by ANOVA test.

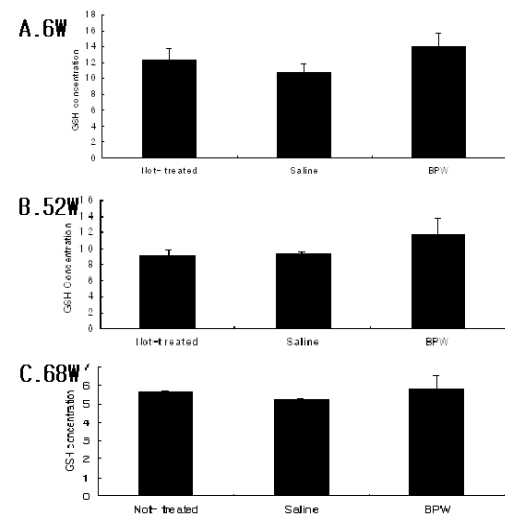


Fig. 2 Effect of BPW Decoction on GSH Level in Liver Cells from Old Rats.

Liver cells from 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml BPW decoction respectively and GSH level was estimated by ELISA. Values represent the means ± SD of 3 mice.

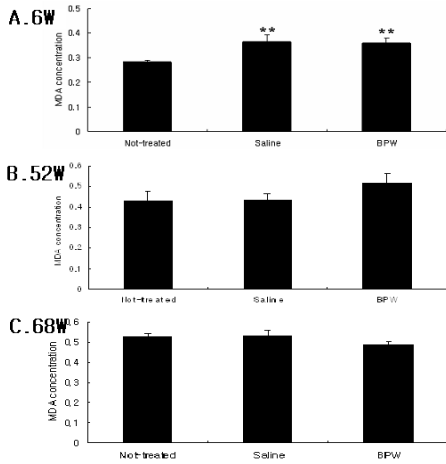


Fig. 3 Effect of BPW Decoction on MDA Level in Liver Cells from Old Rats.

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

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

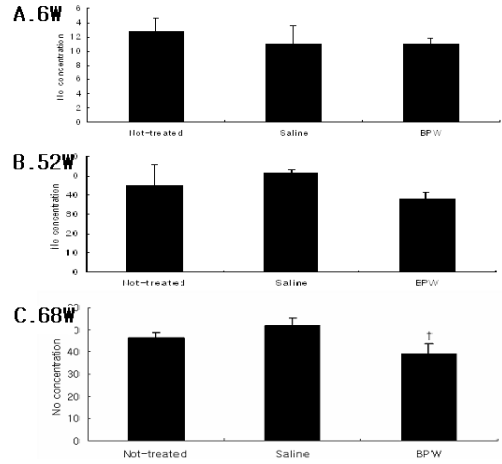


Fig. 4 Effect of BPW Decoction on NO Level in Liver Cells from Old Rats.

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

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

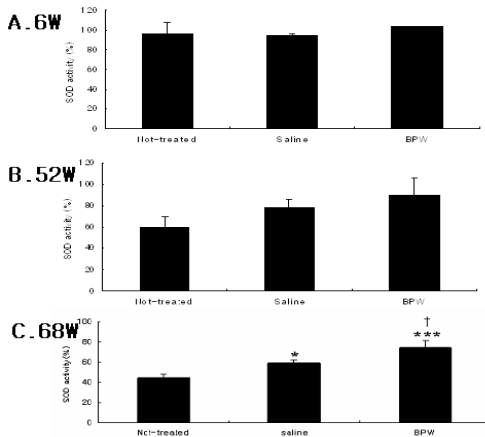


Fig. 5 Effect of BPW Decoction on SOD Activity in Lung Cells of Old Rats.

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

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

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

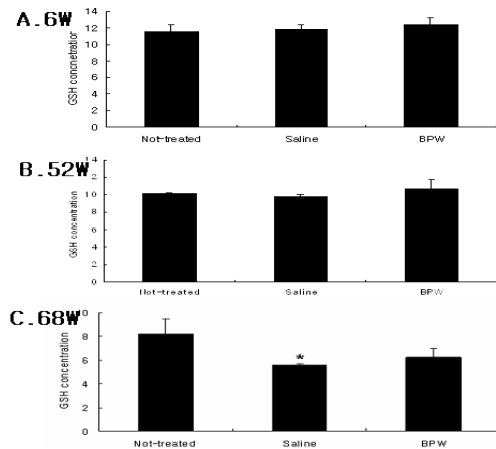


Fig. 6 Effect of BPW Decoction on GSH Level in Lung Cells of Old Rats.

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

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

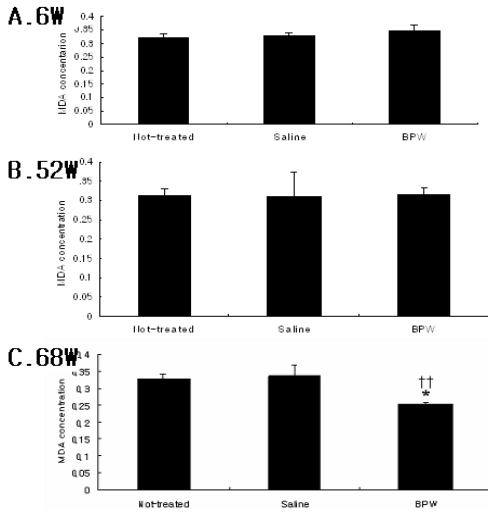


Fig. 7 Effect of BPW Decoction on MDA Level in Lung Cells of Old Rats.

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

*: $p < 0.05$ compared to normal group by ANOVA test.
 $\dagger \dagger$: $p < 0.01$ compared to saline group by ANOVA test.

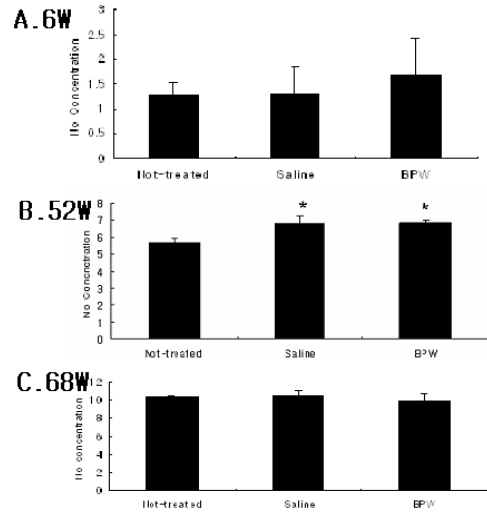


Fig. 8 Effect of BPW Decoction on NO Level in Lung Cells of Old Rats.

Lung cells of 6w, 52w, 68w old rats were treated with 500 μ g/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml BPW decoction respectively, and NO level was estimated by ELISA. Values represent the means \pm SD of 3 mice.

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

령 세포에서는 정상군 및 대조군에 비하여 유의한 변화가 없었으나, 52주령 및 68주령 세포에서는 정상군 및 대조군에 비하여 SOD activity가 유의하게 증가하였다(Fig. 1).

(2) GSH

세포의 주령이 증가함에 따라 GSH 농도가 감소하였다. 6주령과 52주령 세포에서 補肺元湯 전탕액 처리에 의하여 대조군에 비하여 GSH 농도가 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 2).

(3) MDA

6주령과 52주령의 간세포에서 補肺元湯 전탕액 처리에 의해 MDA 농도가 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 3).

(4) NO assay

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

4. 폐 세포에서의 항산화능

(1) SOD activity

세포의 주령이 증가함에 따라 SOD 활성이 감소하였다. 補肺元湯 전탕액을 처리한 결과, 6주령 세포에서는 유의한 변화가 나타나지 않았고, 52주령 세포에서는 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 68주령 세포에서 SOD activity가 유의하게 증가하였다(Fig. 5).

(2) GSH

6주령 세포와 52주령 세포에서 補肺元湯 전탕액 처리에 의해 GSH 농도에 유의한 변화가 나타나지 않았다. 68주령 세포에서 補肺元湯 전탕액 처리에 의해 GSH 농도가 감소하는 경향을 나타냈으나, 통계적 유의성은 없었다(Fig. 6).

(3) MDA

6주령 세포와 52주령 세포에서 補肺元湯 전탕액 처리에 의해 MDA 농도에 유의한 변화가 나

타나지 않았다. 68주령 세포의 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 MDA 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

(4) NO assay

세포의 주령이 증가함에 따라 NO 농도가 현저하게 증가하였다. 52주령의 실험군과 대조군에서 정상군에 비하여 NO 농도가 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

IV. 고찰

현대과학 및 의학의 발달로 인간의 평균수명이 증가하면서 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 있다¹³.

인간의 수명이 연장되기는 하였지만 이러한 수명의 연장은 위생의 개선과 생활환경의 변화로 이루어진 결과이며 전적으로 노화의 방지 혹은 예방에 의한 결과라고 보기는 힘들다. 서구의 학적 관점으로도 생물학적 기능이 스트레스나 기타 요인에 치명적인 영향을 받는 것이 사실이나 노인의 기능 소실을 유발하는 결정적 요인은 질병자체라고 생각하고 있다. 따라서 건강한 노인은 같은 연령대의 다른 사람보다 활동적인 생활이 가능하며 현시대의 65세의 노인들은 과거 조상들 보다 훨씬 건강한 상태에 있다¹⁴.

Free radical 이론은 인체의 대사과정 중에 발생하는 활성산소에 의한 인체 조직 및 세포의 손상이 개체의 손상을 유발하여老化에 이르게 된다는 것으로⁸ 이에 따르면 활성산소가 지질과 단백질로 구성된 세포막에 작용하여 불포화지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질과산화이 유발되고, 최종산물인 MDA의 함량을 증가시켜 산화적 손상을 유발한다. 이러한 세포의 산화적 손상이 생리적 기능을 저하시키므로 동맥경화, 간질환 및 각종 암 등의 질병을 초래하여 결국老化와 유전적 장애의 요인이 되는 것으로 알려져 있다^{15,16}.

老化에 따라 생체에는 노폐물과 같은 물질들이 쌓이게 되어 각종 질환과 세포의老化가 촉진되는데, 그 중 산화물질인 활성산소 (O_2 , OH-), 산화질소 (NO), 과산화수소 (H_2O_2) 등의 혈액 내 농도가 올라가게 된다. 이러한 산화물질을 효과적으로 제거하기 위해서는 항산화물질(SOD, catalase, GSH)이 증가되어 인체의 항산화력이 증진되어야 한다¹⁷.

韓醫學에서는老化에 대해 『素問』·「上古天真論」²에 남녀의 나이를 먹음에 따라 腎氣와 生殖能力的의 盛衰에 따라老化가 진행되고 사람의 외모 및 動態가 바뀌는 것을 설명하였고, 『靈樞』·「榮衛生會篇」¹⁸에서는老化로 인하여 氣血의 衰退로 肌肉이 점차 약해진다고 하였다. 이는 사람이 성장하면서 절로 腎氣가 盛하고 天癸가 至하였다가, 늙으면서 腎氣가 衰하고 天癸가 竭하여 누구나 일정 나이가 되면老化되어 죽는다는 것과 연령이 증가하면서 氣血이 衰하고 任衝脈이 虛해져 퇴행적인 쇠퇴가 일어난다는老化의 두 가지 측면을 설명한 것이라 할 수 있다. 또한 『素問』·「上古天真論」²에 養生에 따라 至人, 真人, 賢人, 聖인으로 구별하여 生生不息하는 이상향을 論하기도 하여老化를 극복하고 수명을 연장하려는 노력을 보이기도 하였다.

老化에 대하여 李濟馬는 인간의老化를 이해하고 극복하여 수명을 연장시키는 방법에 대하여 보다 구체적으로 기술하였다. 『東醫壽世保元』³에서 “四十九歲至六十四歲曰老”라 하여 50대에 들어 노인의 단계로 접어든다고 하였으며 『東醫壽世保元四象草本卷』¹⁹ 「病變·第二統」에서 命脈의 長短이 偏小之臟의 剩削에 따라 결정된다고 하였다. 또한 생명을 유지하는 偏小之臟의 기운의 정도를 命脈實數라 정의하고 이 命脈實數가 반 이하가 되면 죽는다고 하여 질병과 건강의 상태뿐 아니라 수명까지도 命脈實數에 따라 달라질 수 있다고 설명하였다²⁰.

이처럼 四象醫學的인 壽命과 老化의 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^{21,22}.

이와 같은 기존 한의학의 養生이나 체질학의 命脈實數 등의 개념을 통해 예정된 老化에 대항하고 질병이나 손상에 의해 촉발되는 老化를 예방하려는 과거의 시도들이 있었음을 알 수 있다.

현재 한의학 계에는 김²³ 등이나 박²⁴ 등의 연구와 같은 노화와 관련된 여러 연구들이 시행되고 있다. 또한 본 실험과 같이 노화 관련 항산화 효능에 대한 연구로 윤²⁵은 좌귀음과 우귀음이 肝, 腎 등에서 과산화지질을 감소시키고 free radical 활성을 억제하는 효능이 있음을 보고하였고, 이²⁶는 귀비탕이 노화 쥐의 脾臟 내 SOD 및 glutathione의 활성을 증가시킴을 보고하였으며 복합처방 이외 단미제에 대한 연구로는 鹿茸²⁷, 五味子²⁸, 紅花²⁹, 熟地黃³⁰ 등의 항산화에 대한 연구를 통해 각각 유의한 결과들을 발표하였다.

太陰人の 노화는 偏小之臟인 肺의 呼散之氣의 강약, 즉 命脈實數에 따라 결정된다고 할 수 있다. 따라서 太陰人の 정기이자 保命之主인 呼散之氣를 확충하여⁸ 太陰人の 肺를 보하는 補肺元湯은 太陰人에 있어 폐장의 기운이 削하여 발생할 수 있는 여러 질병의 치료와 노화에 저항하는 효과를 기대할 수 있다.

이에 저자는 補肺元湯의 태음인에 대한 항산화 효과를 활성산소의 산화능을 억제하는 항산화 효과를 통하여 간접적으로 입증하고자 본 연구를 시행하였다.

인체의 抗酸化力에 관여하는 요소는 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 체내 항산화 효소계와 비효소 항산화 물질이다^{31,32}. 항산화 효소계에는 구리, 아연, 망간으로부터 생성되는 SOD효소가 대표적이고, 철을 조효소로 하여 구성된 CAT (Catalase)와 셀레늄을 조효소로 하는 GPX (Glutathion Peroxidase)가 있다^{31,32}. 비효소 항산화 물질은 체내에서 만들어 지는 것과 체외에서 공급받아야 할 것으로 나뉜다. 체내 항산화 물질로는 금속결합 단백질인 albumin, ferritin, transferrin 과 glutathione(GSH), uric acid, bilirubin, 멜라토닌

등이 있다^{31,32}.

본 실험에서는 분획한 간, 폐의 세포로부터 항산화 효과를 측정하기 위하여, 항산화 효소인 SOD 활성도와 항산화 물질인 GSH 농도를 측정하였다.

SOD는 주로 세포내 세포질 또는 미토콘드리아 내에 분포하며 대표적인 활성산소종의 하나인 superoxide anion을 제거하여 생체를 방어하는 물질이다³³. SOD는 superoxide anion(O₂⁻)을 수소원자(H+)와 반응시켜 과산화수소(H₂O₂)와 산소분자(O₂)로 만드는 작용을 통해 항산화 작용을 하는데 그 작용의 중요성으로 인해 산화적 스트레스에 대한 지표로서 현재까지 가장 많이 측정되고 있는 물질중의 하나이다³³.

간세포에서 SOD 활성도는 주령이 증가함에 따라 감소하였으며 補肺元湯 투여에 의한 SOD 활성도의 변화는 6주령에서는 유의한 변화가 없었으나 52주와 68주 모두에서 대조군 및 실험군이 정상군에 비하여 통계적으로 유의하게 SOD 활성도가 증가하였고 대조군보다 실험군이 유의하게 증가하였다.

폐세포에서의 SOD 활성도 역시 주령이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며 補肺元湯 투여에 의한 SOD 활성도의 변화는 52주령과 68주령에서 실험군이 대조군이나 정상군에 비하여 높은 SOD 활성을 보였다. 특히 68주령에서는 정상군보다 대조군 및 실험군의 SOD 활성도가 유의하게 증가하였으며 실험군에서 대조군보다 유의하게 증가하였다.

GSH는 비타민 E와 더불어 H₂O₂를 제거하고 과산화지질을 분해하여 해독하는 역할을 하며 불포화지방산의 과산화를 방지하는 작용을 하는 체내 항산화력 증진에 중요한 항산화물질이다³⁴. GSH는 모든 조직에 분포하는 세포 내 환원제로서 세포 내 수송과 저장, 세포 산화환원의 균형조절, DNA합성, 면역기능 및 세포증식에서 매우 중요한 물질로 이물질 화합물의 탈독성을 위한 반응을 촉진하며 free radical의 항산화를 위한 반응을 촉매한다³⁵.

간세포에서 GSH 함량은 주령이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며 특히 68주령에서 급격

히 감소하였다. 補肺元湯 투여에 따른 GSH 함량 변화는 정상군에 비하여 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

폐세포에서 GSH 함량은 주령이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며 補肺元湯 투여에 따른 GSH 함량은 유의한 변화를 보이지 않았다.

MDA 및 NO는 활성산소로 인하여 발생하는 최종산물과 중간대사 산물로^{36,37} NO(Nitric oxide)는 병리적 혈관확장, 세포독성, 세포손상 등 생체에 유해한 작용을 나타내고, 염증상태에서 혈관 투과성, 부종 등 염증반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있으며³⁸, 무기저분자 radical로서 매우 불안정하고 반응성이 강한 물질로서 생체내에서 신경전달기능, 혈액응고 및 혈압조절기능, 암세포에 대항하는 면역기능 등에서의 역할이 알려지고 있다. 또한 NO는 cyclooxygenase를 활성화하여 prostaglandin과 같은 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로도 알려져 있다³⁹.

간세포에서의 NO 함량은 주령이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보여 52주령에서 급증하였고 68주령과는 큰 차이가 없었다. 補肺元湯 투여에 따른 NO의 함량 변화는 모든 군에서 정상군에 비하여 감소하는 경향을 보였으며 68주령에서는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.

폐세포에서의 NO 함량은 주령이 증가함에 따라 지속적으로 증가하는 경향을 보였다. 補肺元湯 투여에 따른 함량 변화는 52주령에서 대조군과 실험군이 정상군에 비하여 유의하게 증가하였으나 실험군과 대조군에서의 유의한 차이는 나타나지 않았으며 68주령에서도 정상군 대조군에 비하여 감소하였으나 유의한 변화가 없었다.

MDA는 다가불포화지방산이 직접적 또는 간접적으로 과산화과정을 통해 분해된 결과로 형성된다⁴⁰. 이 물질은 단백질의 제1차 아미노그룹과 격렬하게 반응할 수 있기 때문에 세포막에 결합된 효소의 생성도를 떨어뜨리거나 지방층의 단단한 견고성을 증가시킨다⁴¹. 이러한 불포화지방산과의 반응은 연쇄적으로 일어나 계속적으로 많은 free radical 형성을 유도하므로, 불포화지방산의 산화는 세포내에서 일어나는 free radical 형

성 반응으로 가장 중요하게 생각되어 진다. 본 실험에서의 MDA 측정 결과는 다음과 같다.

간세포에서 MDA 함량의 변화는 주령에 따라 증가하는 경향을 보였으며 補肺元湯 투여에 따른 52주 및 68주령의 통계적 유의성은 보이지 않았다.

폐세포에서 MDA 함량의 변화는 주령에 따라 큰 차이는 보이지 않았으며 補肺元湯 투여에 따른 변화는 특히 68주령에서 대조군 및 실험군에 비해 유의하게 감소하였다.

이상의 결과 補肺元湯은 노화주의 간세포와 폐세포에서 SOD 활성도를 증가시키고 간에서 활성산소의 대사 중간 산물인 NO의 함량을 감소시키며 폐세포에서 활성산소로 인한 최종 산물인 MDA의 함량을 감소시켰다. SOD 활성의 증가는 대사과정 중에 발생한 O₂의 제거에 있어 훨씬 적극적으로 반응하여 초기에 산화스트레스를 방지하고 산화적 손상을 방지할 수 있음을 의미한다. SOD는 실제 세포에서 산화적 손상의 주체가 되는 OH⁻ 생성의 필수조건이 되는 O₂의 생성을 초기에 억제함으로써 세포의 손상을 막고 기능의 저하를 방지한다³⁵. 따라서 補肺元湯이 간세포 및 폐세포에서의 SOD 활성도를 증가시키는 간세포 및 폐세포의 산화적 손상을 예방하고 간 및 폐기능의 저하를 방지함을 의미한다.

간세포는 인체의 산화적 스트레스에 가장 많이 노출되는 장기 중 하나로 간조직은 감염과정과 약제 및 기초대사작용에 의하여 oxidant stress에 지속적으로 노출되며 지질대사에도 관여하여 산화과정에 있어서 타 장기보다 관여하는 바가 크다. 또한 활성산소와 과산화지질이 상대적으로 많이 생성되고 모이는 곳으로 간에서의 항산화능이 체내 항산화력에 미치는 영향이 매우 크다고 할 수 있다³⁶. 이러한 간세포에서 SOD의 활성도가 증가함은 인체 내의 항산화 능력이 증가하는 것으로 볼 수 있다.

MDA의 함량 감소는 활성 산소로 인한 대사산물이 감소하였음을 의미하며 MDA로 인해 발생할 수 있는 산화적 손상이 방지될 수 있음을 의미하는 것이다. 補肺元湯을 투여함으로써 폐세포의 SOD 활성도가 증가되고 그로 인하여 MDA의 함

량이 감소하였다는 것은 폐세포의 항산화능이 증가하여 활성산소로 인한 손상과 기능 저하의 영향을 덜 받는다는 것을 의미한다.

따라서 補肺元湯을 투여함으로써 간세포 및 폐세포의 항산화능을 증강시키고 인체의 산화적 손상을 예방하여 항노화의 효과를 기대할 수 있음을 알 수 있다.

이상과 같이 6주령, 52주령, 68주령의 SD rat에서 간세포와 폐세포에 補肺元湯 전탕액을 처리하고 SOD활성도, GSH, MDA, NO 함량을 측정된 결과 補肺元湯은 간세포에서 주령이 증가함에 따라 감소되는 SOD 활성도의 감소를 억제하였고 폐세포에서도 역시 주령의 증가에 따라 급격히 감소하는 SOD 활성도의 감소를 억제하는 효과를 보였으며 폐에서 활성산소의 최종산물인 MDA 함량을 감소시켜 활성산소로 인한 조직의 손상을 방어하는 효과를 나타내었다. 이와 같이 補肺元湯은 太陰人の 偏小之臟인 폐를 보호하고 呼散之氣를 강화시켜 간의 燥熱을 방지하는 효과와 더불어 간세포 및 폐세포에서 산화적 손상을 방지하여 노화를 예방하는 항산화 및 항노화에 유의한 효과가 있는 것으로 나타나 앞으로 임상에서의 활용과 함께 기전에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

補肺元湯의 抗老化 및 항산화 작용을 실험적으로 입증하고자 6주령, 52주령, 68주령 백서의 간 및 폐 세포를 48시간 동안 배양하며 補肺元湯 전탕액을 투여하여 SOD 활성도, GSH 함량, MDA 함량과 NO 함량을 측정된 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 補肺元湯은 52주령 및 68주령 SD rat의 간세포에서 SOD 활성도를 유의하게 증가시켰다.
2. 補肺元湯은 68주령 SD rat의 폐세포에서 SOD 활성도를 유의하게 증가시켰다.
3. 補肺元湯은 68주령 SD rat의 간세포에서 NO 함량을 유의하게 감소시켰다.

4. 補肺元湯은 68주령 SD rat의 폐세포에서 MDA 함량을 유의하게 감소시켰다.

VI. 참고문헌

1. 구정완. 운동과 건강15:노화와 운동(1), 산업보건, 2006; 219:43-46.
2. 임응추. 황제내경장구색인. 일증사, 서울, 1992.
3. 李濟馬. 四象醫學原論. 행림출판, 서울, 1992.
4. Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Hug JI. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress, Age. 1997;20:127-140.
5. Hassinen IE, Vuorinen KH, Ylitalo K, Ala-Rami A. Role of cellular energetics in ischemia-reperfusion and ischemic preconditioning of myocardium, Mol Cell Biochem. 1998;184:393-400.
6. Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP. : The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction, Ann N Y Acad Sci. 2001;928:327-335.
7. 최병기 외. 활성산소와 질환, 신일상사, 서울, 2004.
8. 송일병 외. 개정증보 사상의학. 집문당, 서울, 2005.
9. 김현구, 나경민, 예수향, 한호석. 오미자 추출물의 항산화 효과. 한국식생활문화학회지. 2004;19(5):484-490.
10. 장은희, 표영희, 안명수. 오미자 추출물의 항산화 효과. 한국식품조리과학회지. 1996;12(3): 372-376.
11. 퇴영성, 권영모, 박종흠, 박선동. 인삼고분환과 그 구성약물군의 항산화 효과. 대한본초학회지. 2003;18(3):41-50.
12. 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.
13. 통계청. 통계소식, 2007 고령자 통계, 2007.

14. Mark H. BEERS. 머크 매뉴얼. 제17판. 한우리, 서울, 2002.
15. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J. 1990;4:2587-2597.
16. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis, J. Free Radic. Biol. Med. 1990;8:583-599.
17. Halliwell B. Free radical, antioxidant and human disease. Lancet. 1994;344:721-724.
18. 河北醫學院 校釋. 靈樞經校釋. 人民衛生出版社, 북경, 1982:355.
19. 김달래 編譯. 東醫壽世保元四象草藁. 정담, 서울, 1999.
20. 정용재. 동의보감과 동의수세보원사상초본권에 나타난 양생관에 대한 고찰. 사상체질의학회지. 2002;14(2):25-34.
21. 김선민 외. 東醫壽世保元四象草本卷에서의 양생에 관한 고찰. 사상체질의학회지. 2000; 12(1):101-109.
22. 유정희 외. 老化和 수명에 관한 사상의학적 양생관에 대한 고찰. 사상체질의학회지. 2002;14(3):7-16.
23. 김인수, 고광찬, 오민석, 송태원. 노화과정의 흰쥐에서 보페산이 폐의 대사효소계에 미치는 영향. 대전대학교 논문집. 1999;8(1):643- 657.
24. 박성민, 임명현, 이준희, 박재현. 보중익기탕과 육미지황탕이 노화촉진쥐(SAM)의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4),175-191.
25. 鄭智天. 左歸飲과 右歸飲에 의한 活性酸素類의 消去作用과 抗酸化 酵素系의 活性증가效果에 대한 研究. 大韓韓醫學學會誌. 1996;17 (1):465-477.
26. 이동준. 노화과정의 흰쥐에서 보비탕이 비장의 대사효소계에 미치는 영향. 대전대학교한 의학연구소 논문집. 1999;15:689-710.
27. 안봉진, 이진태, 김상찬. 한약재를 가미한 녹용 추출물의 생리활성에 관한 연구. 방제학회지. 2001;9(1):335-354.
28. 장은희, 표영희, 안명수. 오미자 추출물의 항산화 효과. 한국조리과학회지. 1996;12(3):372- 376.
29. 유진숙, 송윤경, 임형호. 홍화 추출물의 항산화 효과에 대한 연구. 대한한의학회지. 2007; 28(1):137-147.
30. 안상원, 이철완. 숙지황과 육미지황탕이 노화 과정 흰쥐에서의 항산화 기전에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1999;8(1): 593-623.
31. 김영곤. 抗酸化劑 Antioxidant. 여문각, 서울, 2004.
32. 니와 유끼에. 활성산소가 죽음을 부른다. 글이랑, 서울, 1995.
33. Lyoyd. D. How to avoid oxygen. Sience. 1999; 249,286.
34. Sakamoto Y. et al. Glutathione(3rd Ed). Scientific. 1989;5.
35. 이귀녕, 권오현. 임상병리과일. 의학문화사, 서울, 2003.
36. 홍진영. 생쥐에서 연령의 증가에 따른 항산화 효소의 발현에 관한 연구. 한남대학교 논문집. 2003.
37. 유신환. 한국노년의 건강. 소화, 서울, 2001: 28-34.
38. 이종무, 이병렬. 택사 약침의 항산화효과에 관한 실험적 연구. 대한침구학회지. 2003;20 (1):159-176.
39. 류재하, 장세란, 이소영, 이화진, 한용남. 활성화한 RAW 264.7 세포주에서 인삼 Polyacetylene 류의 Nitric Oxide 생성저해. J Gienseng Res. 1998;22(3):181-187.
40. 조영주, 김성동. 고려인삼, 고려홍삼 및 total saponin의 항산화 작용. 동의병리학회지. 1998; 12(1):72-81.
41. 김영곤 외. 프리라디칼. 여문각, 서울, 1997.