

# 十二味寬中湯의 老化 억제 효과에 대한 實驗的 研究

손덕칭 · 안택원

대전대학교 한의과대학 사상체질과

## Abstract

### Anti-aging Effects of Sipyimigwanjung-tang in Aged Rats

Sun Teh-Cheng, Ahn Taek-Won

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

#### 1. Objectives

The purpose of this study is to prove the anti-aging effects of Sipyimigwanjung-tang.

#### 2. Methods

The SD rats used in this experiment were 6, 18 and 36 weeks old. A part of the 36weeks was grown to 52 and 68 weeks at labarotary. Each age group was again divided into three groups. These 15 groups consisted of 6 rats each. One group was given no treatment, another group was dosed 200  $\mu$ l of normal saline daily, and the last group was dosed 200  $\mu$ l of 1% Sipyimigwanjung-tang(SYG) and saline mixture. At the conclusion of the experiment, the age groups were relabelled accordingly(10w, 22w, 40w, 52w and 68w).

After 4 weeks, the tissue of liver, heart, spleen, lung, kidney and brain was biopsied in order to measure the SOD, GSH, MDA.

#### 3. Results and Conclusions

In liver, the activity of the SOD of 52w-SYG was significantly increased than that of 10w, 22w and 40w-SYG, the level of the GSH of 40w-SYG was significantly increased than that of the normal group, the activity of the catalase of 68w-SYG was significantly increased than that of the normal and control group, the level of the MDA of 52w-SYG and 68w-SYG was significantly decreased than that of the normal and control groups. In heart, the level of the GSH of 22w-SYG was significantly increased than that of the normal and control group. In spleen, the level of the GSH of 52w-SYG was significantly increased than that of the normal and control group. In lung, the level of the GSH of 52w-SYG was significantly increased than that of the normal group and the level of 68w-SYG was significantly increased than that of the normal and control group. In kidney, the level of the GSH of 10w-SYG was significantly increased than that of the normal group. In brain, the level of the GSH of 68w-SYG was significantly increased than that of the normal and control group. The SYG inhibited the histology degeneration of brain tissue.

These results suggest that oral administration of SYG (Sipyimigwanjung-tang) decoction has anti-aging effects in aged rats.

**Key Words** : Sipyimigwanjung-tang, Anti-aging Effect, SOD, GSH.

## I. 緒 論

우리나라는 1960년도에는 65세 이상 노인인구가 전 인구의 2.9%에 불과했으나, 2000년에는 7.2%를 넘어 고령화 시대로 접어들었으며 2018년에는 그 비율이 14.3%가 되어 ‘고령사회’에 도달할 것으로 전망되고 있다<sup>1,2</sup>.

한의학에서는 노화에 대하여 『靈樞·榮衛生會篇』<sup>3</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 氣血의 衰退로 肌肉이 점차 약해지는 것을 노화로 보았고, 노화로 인한 신체변화에 대해서는 『素問·陰陽應象大論』<sup>4</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 신체 기능과 생식능력의 저하가 나타난다고 하였다.

李濟馬(1837-1900)는 『東醫壽世保元』·『廣濟說』<sup>5</sup>에서 “四十九歲至六十四歲曰老”라 하여 50대에 들어 노인의 단계로 접어들었다고 하였으며, 壽命의 長短을 결정짓는 요인은 각 체질에 따른 保命之主의 유지와 知行, 恭敬, 調養, 調病 등을 통한 체질적 양생을 의미한다고 하였다<sup>6,7</sup>.

十二味寬中湯은 赤白何烏寬中湯의 변방으로 脾를 補하고 和하는 藥物과 溫中시키는 藥物로 構成되어 少陰人 裏病의 四體倦怠 小便不快 陽道不興 장차 浮腫으로 진행될 경우에 사용되어<sup>8</sup> 노화에 대한 억제효과가 기대되었다.

이에 저자는 十二味寬中湯의 항산화와 관련된 抗老化 효과를 입증하고자 6주령, 18주령, 36주령, 48주령 및 64주령 백서를 성장기, 성숙기, 초기노화기, 노화기, 말기노화기로 설정하고 4주간 매일 1%의 十二味寬中湯 200 $\mu$ l를 경구투여한 후, 실험이 종료된 10주령, 22주령, 40주령, 52주령 및 68주령 백서의 각 장기조직을 분획한 후 조직 내의 항산화 효소인 SOD(Superoxide Dismutase) 및 catalase 활성도, 항산화 물질인 glutathione의 함량, 자유라디칼인 NO(nitric oxide)의 농도 및 산화적 손상물질인 MDA(malondialdehyde) 변화를 측정하고 결과 유의한 성적을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 研究方法

### 1. 재료

#### 1) 동물

동물은 6주령, 18주령, 36주령의 웅성 SD rat (Sprague-Dawley rat)을 (주)중앙실험동물(경기도, 한국)에서 공급받아, 6주령과 18주령 및 36주령의 일부는 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 36주령의 나머지는 52주령과 68주령이 될 때까지 실험실에서 사육하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 동물은 실험 당일 까지 고휘사료(삼양사료, 한국)와 물을 충분히 공급하고, 실험실은 실온 (22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)을 유지하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용된 十二味寬中湯(SYG)은 D대 학교 한방병원 약제실의 검수를 받아 구입하여 이용하였다(Table 1).

### 2. 실험 방법

#### 1) 실험군 설정

실험동물은 각각 10주령, 22주령, 40주령, 52주령, 68주령의 SD rat으로, 각 주령마다 정상군(normal group), 대조군(saline group), 실험군(SYG group)으로 나누어 모두 15군으로 분류하였고, 각 실험군에는 실험동물을 6마리씩 배정하였다. 각 실험군에 대한 처치는 다음과 같다.

(1) 10주령, 22주령, 40주령, 52주령 및 68주령 정상군(Normal group): 6주령, 18주령, 36주령, 48주령 및 64주령의 정상 SD rat을 4주간 아무 처치하지 않은 군.

(2) 10주령, 22주령, 40주령, 52주령 및 68주령 대조군(Saline group): 6주령, 18주령, 36주령, 48주령 및 64주령의 SD rat에 매일 200  $\mu$ l의 Saline을 4주간 경구투여한 군

Table 1. The Compositions of Sipyimigwanjung-tang(SYG)

Herbs	Scientific name	Amount(g)
白何首烏	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	4
赤何首烏	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	4
良薑	<i>Alpiniae Officinarum Rhizoma</i>	4
乾薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	4
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	4
青皮	<i>Citri Reticulatae Viride Pericarpium</i>	4
香附子	<i>Cyperii Rhizoma</i>	4
益智仁	<i>Alpiniae Oxyphyllae Fructus</i>	4
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>	2
枳實	<i>Aurantii Immaturus Fructus</i>	2
木香	<i>Aucklandiae Radix</i>	2
大腹皮	<i>Arecae Pericarpium</i>	2
大棗	<i>Jujubae Fructus</i>	2
Total amount		42

(3) 10주령, 22주령, 40주령, 52주령 및 68주령 실험군(SYG group): 6주령, 18주령, 36주령, 48주령 및 64주령의 SD rat에 매일 1%의 十二味寬中湯 200  $\mu$ 를 4주간 경구투여한 군.

## 2) 장기내 항산화 효과 측정

### (1) 조직 추출 및 분획

생리 식염수로 관류하여 혈액을 제거한 후 간과 심장, 비장, 폐, 신장, 및 뇌 조직의 일부를 적출하여 여지로 혈액 및 이물질을 제거하고 Bansal 등의 방법<sup>19)</sup>에 의해 조직 1g에 4 배의 150mM의 KCl을 가하여 homogenizer를 이용하여 균질화하였다. 균질화한 조직을 600 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 균질화되지 않은 조직 등을 제거한 후, 상등액을 1000 $\times$ g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하여, 10,000 $\times$ g에서 1시간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 얻었다. 이 상등액을 105,000 $\times$ g에서 1시간 원심분리 하여 cytosolic fraction을 얻었다. 그 침전물에 동일한 양의 0.1 M potassium phosphate buffer를 가하여 현탁시켜 microsomal fraction을 얻었다. microsomal fraction에서 glutathione의 함량과 MDA의 함량을 측정하였고, cytosolic fraction을 이용하

여 SOD 활성도를 측정하였으며, mitochondrial fraction에서 catalase의 활성을 측정하였다.

### (2) SOD activity

간과 심장, 비장, 폐, 신장 및 뇌 조직의 SOD 활성도는 cytosolic fraction을 sample로 하여 SOD assay kit(Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였다. Sample solution을 96 well plate에 각 well과 blank 2에 20  $\mu$ 씩 분주한다. Blank 1과 blank 3에 D.W.를 분주한 뒤, WST working solution을 200  $\mu$ /well으로 모든 well에 첨가한다. Blank 2과 blank 3 well에 dilution buffer를 20  $\mu$ 씩 분주하고, enzyme working solution을 각 sample well과 blank 1에 20  $\mu$ /well으로 분주한다. 20분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 incubating을 실시하고 450nm에서 흡광도를 측정 하고 SOD 활성도를 환산하였다.

### (3) Glutathione assay

간과 심장, 비장, 폐, 신장 및 뇌 조직 내 glutathione 함량은 glutathione assay kit(Dojindo, Japan)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정해서 결과를 얻었다.

(4) Catalase activity

간조직의 catalase 활성은 catalase assay kit(Oxford Biomedical Research, USA)를 이용하여 측정하였으며, 520 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

(5) Lipid peroxidation assay

간조직의 lipid peroxidation 함량은 lipid peroxidation assay kit(Oxford Biomedical Research, USA)을 이용하여 측정하였고 586 nm에서 흡광도를 측정 후 MDA를 계산하였다.

3) Histology 분석

뇌 조직을 취하여 cryotome을 이용하여 절편한 후, hematoxylin and eosin염색을 하고, 200배율로 현미경에서 관찰을 하였으며, 사진 촬영을 실시

하였다.

4) 통계처리

실험 결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, SPSS 통계프로그램(14.0 KO)의 일원분산배치(ANOVA)통계법을 사용하여 유의성을 검증하였다. 각 실험군의 결과값을 비교하여 신뢰도 95%이상 (p<0.05)일 때 유의수준으로 판정하였다.

III. 研究結果

1. 장기에서의 항산화 효과

1) 간

실험동물의 간 조직에서 SOD 활성, GSH 농도,

Table 2. Effect of SYG on Various Antioxidants and Oxidants in Rat Liver

Para meter	Age	Normal	Saline	SYG
SOD activity (%)	10w	91.65±8.85	88.34±6.57	85.61±11.39
	22w	95.59±5.99	102.8±4.58	87.68±2.01
	40w	100.24±9.47	88.01±8.58	84.46±9.68
	52w	105.72±7.49	110.10±12.42	116.82±6.61
	68w	98.19±6.22	92.22±4.70	93.72±1.25
GSH Conc. (umol/ ℓ)	10w	141.89±10.73	133.43±3.11	152.68±0.55
	22w	128.79±6.88	124.31±14.21	150.05±9.73
	40w	102.57±4.24	125.10±4.70	123.66±10.61
	52w	60.10±14.87	34.71±1.92	39.91±4.04
	68w	67.21±11.00	70.72±7.10	80.53±30.05
Catalase activity (%)	10w	164.77±0.08	164.87±0.15	164.81±0.31
	22w	164.81±0.23	164.81±0.35	164.61±0.53
	40w	164.71±0.70	164.40±0.70	164.00±0.96
	52w	165.54±2.62	166.32±1.05	168.36±1.01
	68w	158.53±1.39	145.23±2.62	168.01±3.00
MDA Conc. (umol/ ℓ)	10w	0.37±0.01	0.37±0.01	0.38±0.01
	22w	0.36±0.01	0.39±0.01	0.38±0.01
	40w	0.37±0.01	0.39±0.01	0.38±0.01
	52w	0.90±0.18	0.95±0.11	0.27±0.01
	68w	1.90±0.24	1.63±0.12	0.58±0.09

Rats in the saline group and SYG group were treated with saline and SYG decoction respectively, once a day for 4 weeks. The animals were decapitated 24 hr after the last administration of saline or SYG decoction. Liver was removed and the levels of various oxidants and antioxidants in liver tissue were analysed by ELISA. Values represent mean±SD (n=3)

Normal : normal SD rat

Saline : SD rat treated with saline daily for 4 weeks

SYG : SD rat orally administered with SYG decoction daily for 4 weeks

Table 3. Effect of SYG on SOD Activity and GSH Conc. in Rat Heart

Para meter	Age	Normal	Saline	SYG
SOD activity (%)	10w	97.74±4.92	93.22±4.23	82.35±11.31
	22w	94.38±0.34	77.83±5.61	78.75±5.87
	40w	95.44±9.97	84.08±8.38	85.59±3.72
	52w	113.28±1.60	119.71±4.23	112.93±8.81
	68w	109.79±2.73	104.25±4.98	95.70±9.97
GSH Conc. (umol/ℓ)	10w	158.92±2.64	183.54±6.91	161.86±11.11
	22w	169.23±3.57	165.52±3.51	186.40±0.50
	40w	118.03±30.49	162.59±21.15	143.00±7.73
	52w	52.05±14.05	49.66±12.13	46.32±7.97
	68w	73.56±11.65	52.11±22.77	71.20±16.95

Rats in the saline group and SYG group were treated with saline and SYG decoction respectively, once a day for 4 weeks. The animals were decapitated 24 hr after the last administration of saline or SYG decoction. Rat heart was removed, and SOD and GSH concentration in heart tissue was measured. Values represent mean±SD (n=3).

Normal : normal SD rat

Saline : SD rat treated with saline daily for 4 weeks

SYG : SD rat orally administered with SYG decoction daily for 4 weeks

Table 4. Effect of SYG on SOD Activity and GSH Conc. in Rat Spleen

Para meter	Age	Normal	Saline	SYG
SOD Activity (%)	10w	84.71±8.76	91.73±7.66	93.30±9.11
	22w	107.81±4.03	110.00±4.19	99.42±2.71
	40w	114.05±6.63	103.63±12.33	113.05±4.19
	52w	94.34±9.29	85.37±14.09	118.76±7.34
	68w	82.42±12.91	84.48±1.67	70.04±12.25
GSH Conc. (umol/ℓ)	10w	138.30±32.07	118.55±21.23	114.44±6.59
	22w	117.53±22.14	90.55±16.64	99.99±16.49
	40w	84.13±11.50	77.30±6.91	62.56±5.81
	52w	46.20±0.69	54.97±23.48	88.86±3.21
	68w	63.73±4.85	72.61±3.82	67.44±2.64

Rats in the saline group and SYG group were treated with saline and SYG decoction respectively, once a day for 4 weeks. The animals were decapitated 24 hr after the last administration of saline or SYG decoction. Rat spleen was removed, and SOD and GSH concentration in spleen tissue was measured. Values represent mean ± SD (n=3).

Normal : normal SD rat

Saline : SD rat treated with saline daily for 4 weeks

SYG : SD rat orally administered with SYG decoction daily for 4 weeks

Catalase 활성 및 MDA 농도를 확인하였다(Table 2).

## 2) 심장

실험동물의 심장 조직에서 SOD 활성과 GSH 농도를 확인하였다(Table 3).

## 3) 비장

실험동물의 비장 조직에서 SOD 활성과 GSH 농도를 확인하였다(Table 4).

## 4) 폐

실험동물의 폐 조직에서 SOD 활성과 GSH

Table 5. Effect of SYG on SOD Activity and GSH Conc. in Rat Lung

Para meter	Age	Normal	Saline	SYG
SOD activity (%)	10w	94.22±6.18	107.00±2.82	103.58±3.17
	22w	103.90±6.38	94.05±3.00	97.23±2.17
	40w	106.91±4.72	97.11±8.89	108.14±3.36
	52w	134.24±1.64	110.74±5.58	98.09±9.67
	68w	106.05±6.27	100.17±11.75	101.41±1.27
GSH Conc. (umol/ℓ)	10w	117.46±15.08	89.63±7.23	96.68±3.16
	22w	86.96±23.78	121.81±9.45	112.24±5.19
	40w	68.38±8.02	97.45±13.43	70.39±10.00
	52w	38.53±15.96	125.91±13.71	108.69±23.70
	68w	19.46±2.97	26.29±11.47	63.04±9.14

Rats in the saline group and SYG group were treated with saline and SYG decoction respectively, once a day for 4 weeks. The animals were decapitated 24 hr after the last administration of saline or SYG decoction. Rat lung was removed, and SOD and GSH concentration in lung tissue was measured. Values represent mean ± SD (n=3).

Normal : normal SD rat

Saline : SD rat treated with saline daily for 4 weeks

SYG : SD rat orally administered with SYG decoction daily for 4 weeks.

Table 6. Effect of SYG on SOD Activity and GSH Conc. in Rat Kidney

Para meter	Age	Normal	Saline	SYG
SOD activity (%)	10w	108.14±1.34	105.33±1.76	106.87±2.42
	22w	96.78±0.77	103.74±2.98	102.93±2.54
	40w	101.18±2.83	95.23±4.92	100.89±3.70
	52w	69.75±16.61	95.19±8.27	89.39±19.30
	68w	80.83±8.21	71.89±8.18	83.02±2.85
GSH Conc. (umol/ℓ)	10w	84.52±0.97	102.83±5.20	98.93±2.19
	22w	138.68±5.53	115.79±8.82	122.13±10.10
	40w	91.03±15.65	127.97±15.96	99.64±11.19
	52w	238.52±1.62	135.06±26.55	123.13±57.95
	68w	82.79±29.24	78.16±9.29	65.53±6.47

Rats in the saline group and SYG group were treated with saline and SYG decoction respectively, once a day for 4 weeks. The animals were decapitated 24 hr after the last administration of saline or SYG decoction. Rat kidneys were removed, and SOD and GSH concentration in kidney tissue was measured. Values represent mean ± SD (n=3).

Normal : normal SD rat

Saline : SD rat treated with saline daily for 4 weeks

SYG : SD rat orally administered with SYG decoction daily for 4 weeks

농도를 확인하였다(Table 5).

6) 뇌

실험동물의 뇌 조직에서 SOD 활성과 GSH 농도를 확인하였다(Table 7).

5) 신장

실험동물의 신장 조직에서 SOD 활성과 GSH 농도를 확인하였다(Table 6).

Table 7. Effect of SYG on SOD Activity and GSH Conc. in Rat Brain

Parameter	Age	Normal	Saline	SYG
SOD activity (%)	10w	113.80±0.87	110.82±3.47	116.11±1.62
	22w	127.76±2.51	122.23±3.47	123.05±0.89
	40w	121.15±2.30	115.95±1.22	120.82±2.16
	52w	119.78±17.15	120.84±14.50	112.36±12.84
	68w	112.67±1.37	115.04±2.48	99.26±5.24
GSH Conc. (umol/l)	10w	69.57±7.59	70.01±8.03	67.44±7.38
	22w	94.56±8.90	112.59±13.74	106.07±20.24
	40w	60.80±8.01	69.11±3.31	73.27±3.48
	52w	99.21±15.61	41.61±1.59	64.70±13.11
	68w	26.90±6.22	27.93±4.07	55.32±13.82

Rats in the saline group and SYG group were treated with saline and SYG decoction respectively, once a day for 4 weeks. The animals were decapitated 24 hr after the last administration of saline or SYG decoction. Rat brain was removed, and SOD and GSH concentration in brain tissue was measured. Values represent mean ± SD (n=3).

Normal : normal SD rat

Saline : SD rat treated with saline daily for 4 weeks

SYG : SD rat orally administered with SYG decoction daily for 4 weeks

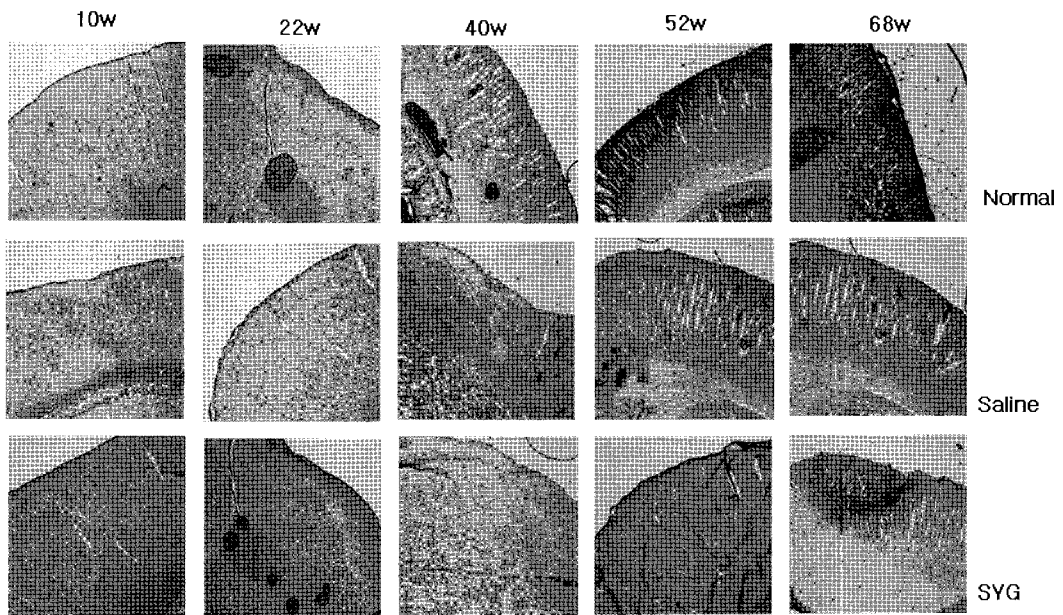


Fig. 1. Effect of SYG on rat brain histology.

Rats in the saline group and SYG group were treated with saline and GHD decoction respectively, once a day for 4 weeks. The animals were decapitated 24 hr after the last administration of saline or SYG decoction. Rat brain was removed and the tissue was stained as described in the experimental methods(optical microscope, ×40).

## 2. 조직학적 분석

실험동물의 뇌 조직을 취하여 H&E 염색을 하였다. 주령이 증가할수록 대뇌피질의 아래쪽 과립

층이 거칠고 성긴 상태를 나타내었다. 실험군에서는 대조군에 비하여 뇌 조직의 상태가 조밀하게 유지되었다(Fig. 1).

#### IV. 考 察

최근 우리나라는 급격한 경제성장과 함께 의료 및 보건기술의 발전으로 국민영양상태가 크게 개선되어 인간의 평균수명이 계속 증가되고 있는 추세이다<sup>9</sup>. UN에 따르면 총 인구에서 65세 이상 고령 인구 비율이 7%를 넘으면 고령화사회(aging society), 14%를 넘으면 고령사회(aged society)로 분리된다. 우리나라는 고령인구 비율이 2000년에 7.2%에 이르러 이미 고령화 사회가 되었고, 2018년에는 그 비율이 14.3%가 되어 ‘고령사회’로, 2026년에는 다시 20.8%가 되어 ‘초고령사회’에 도달할 것으로 예측되고 있다<sup>1</sup>. 고령사회로 접어들면 필연적으로 여러 가지 만성 퇴행성 질환과 난치성 질환자가 급증하므로<sup>9,10</sup> 노화나 이들 질환의 예방과 치료에 대한 대책이 필요하다.

노화는 시간이 경과함에 따라 생체 내 여러 가지 생리적 기능이 저하되는 현상을 말하며 아울러 외부로부터 오는 스트레스를 감당하지 못하게 되는 상태를 의미 한다<sup>11</sup>.

한의학에서는 『素問·上古天真論』<sup>14</sup>에 남녀의 나이를 먹음에 따라 腎氣와 生殖能力의 盛衰에 따라 노화가 진행되고 사람의 외모 및 動態가 바뀌는 것을 설명하였고, 『靈樞·榮衛生會篇』<sup>3</sup>에서는 노화로 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 노화되어 죽는다는 것과 연령이 증가하면서 氣血이 衰하고 任衝脈이 虛해져 퇴행적인 쇠퇴가 일어난다는 노화의 두 가지 측면을 설명한 것이라 할 수 있다. 또한 『素問·上古天真論』<sup>14</sup>에 養生에 따라 至人, 真人, 賢人, 聖人으로 구별하여 生生不息하는 이상향을論하기도 하여 노화를 극복하고 수명을 연장하려는 노력을 보이기도 하였다.

李濟馬는 『東醫壽世保元』<sup>5</sup>에서 “四十九歲至六十四歲曰老”라 하여 50대에 들어 노인의 단계로 접어들었다고 하였으며 『東醫壽世保元四象草藥』·『病變·第二統』<sup>15</sup>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 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 설명하였다.

최근 한의학계에서도 노화에 대한 文獻 研究<sup>16-20</sup> 및 抗酸化 效能에 관한 實驗 研究 보고<sup>21-23</sup>가 있었다. 그 중 노화의 原因으로 가장 중요시되는 腎虛를 보할 목적으로 이루어진 方劑인 六味地黃湯<sup>16</sup>, 瓊玉膏<sup>17,18</sup>, 延年益壽不虎丹<sup>19</sup>, 鹿參地黃湯<sup>20</sup> 등의 抗老化에 대한 연구 보고가 있었으며, 枸杞子<sup>21</sup>, 菟絲子<sup>22</sup>, 覆盆子<sup>23</sup> 등의 抗酸化能에 관한 연구보고가 있었다. 그러나 아직 노화된 백서의 각 장기에 있어서 十二味寬中湯의 항산화 및 항노화에 관한 구체적인 연구는 없는 실정이다.

이에 저자는 十二味寬中湯의 抗老化 효과를 활성산소의 산화능을 억제하는 抗酸化 효과를 통하여 간접적으로 입증하고자 6주령, 18주령, 36주령, 48주령 및 64주령 백서에 4주간 매일 1%의 十二味寬中湯 200 μl를 경구투여한 후, 실험이 종료된 10주령, 22주령, 40주령, 52주령 및 68주령 백서의 각 장기 조직을 분획, 항산화 효소인 SOD 및 catalase 활성도, 항산화 물질인 glutathione의 함량 및 산화적 손상물인 MDA 함량 변화를 측정하였다.

SD rat은 출생 후 약 8주까지는 체중이 급속도로 증가하고 약 16주령까지는 체중 증가 정도가 급속도로 둔화되며 그 이후 32주까지는 미미한 정도의 체중 증가만이 나타난다는 관찰을 토대로 장<sup>24</sup> 등은 평균 7주령까지를 성장기군으로 나누고 28주까지를 성숙기로 분류하여 흰 쥐에서 연령이 골격근의 당대사에 미치는 영향에 대한 연구를 수행하였으며, 박<sup>25</sup> 등의 한약물의 치매치료에 관한 실험적 연구에서도 쥐의 연령이 12개월(약 54주) 이상이 되면서 여러 감각운동 기능이 저하된다는 Murphy<sup>26</sup> 등의 연구를 기초로 이 시기가 SD



rat의 노화기에 해당한다고 판단하였다.

따라서 본 연구에서는 실험용 SD rat을 6주령, 18주령, 36주령, 48주령 및 64주령으로 구분하여 성장기, 성숙기, 초기노화기, 노화기, 말기노화기로 설정하고 연구를 진행하였다.

노화의 발생은 체내 산화적 손상을 일으키는 활성 산소종과 관련되어 있는 것으로 밝혀지고 있는데<sup>12,13</sup> 활성 산소종은 화학물질뿐만 아니라 정상적인 신체대사과정 중에 생성된 한 개 이상의 비공유전자를 가진 불안정한 상태의 이온으로 체내 항산화 체계는 이러한 활성 산소종의 공격으로부터 신체를 보호하기 위한 것으로 라디칼 연쇄 반응을 정지시켜 라디칼의 반응성을 제거한다. 체내 항산화체계와 관련된 주요 효소로는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHpx), catalase (CAT) 등이 있으며 주요 비효소물질로는 glutathione, tocopherols, carotenoids, ascorbic acid 등이 있다<sup>27</sup>.

SOD는 활성산소를 기질로하여 과산화수소와 산소를 만드는 효소이다. 반응성이 큰 활성산소는 일단 SOD에 의해 과산화수소가 된 후 catalase에 의해 물로 되어 무독화된다.

본 실험에서 간 조직 내 SOD 활성도는 정상군 및 대조군에서 주령 증가에 따른 유의성은 없었다. 실험군은 52주령에서는 SOD 활성도가 증가되었다가, 68주령에서는 다시 SOD 활성도가 감소되었다. 十二味寬中湯의 투여에 따른 간장내 SOD 활성도는 통계적으로 유의한 변화를 보이지 않았다.

조직에서 glutathione은 자체적으로 항산화제로 이용되거나 또는 다른 항산화제의 환원 상태 유지에 관여하고 또한 GSHpx와 같은 항산화 효소의 cofactor로 작용하여, 조직내에서 수용성 항산화 방어 체계의 근간을 이루는 중요한 물질이라 할 수 있다<sup>28</sup>.

본 실험에서 항산화 물질인 산화형 GSH 농도는 정상군, 대조군, 실험군 모두 10주령에 비해 52주령에서 농도가 현저히 감소되었다. 十二味寬中湯의 투여에 따른 肝臟 내 GSH 농도는 초기노화상태로 설정한 40주령의 실험군에서 정상군에 비

하여 유의적으로 증가되었다.

과산화수소 및 유기 과산화물을 볼로 무독화시킴으로써 과산화적 손상을 방지하는 catalase 활성도는 정상군 및 대조군 모두 10주령, 22주령 및 40주령에 비해 68주령에서 농도가 현저히 감소되었다. 실험군에서는 주령에 따른 catalase 활성의 변화가 없었다. 十二味寬中湯의 투여에 따른 肝臟 내 catalase 활성은 말기노화기로 설정한 68주령의 실험군에서 정상군 및 대조군에 비하여 유의적으로 증가되었다.

생체내 지질성분 특히 세포 막성분인 불포화지방산이 과산화를 받아 생성된 물질 및 분해이차산물을 과산화지질이라 한다. 불포화지방산의 변형이 일어나면 막의 유동성이 변화되고 막결합효소가 불활성화되어 생체막기능이 소실되고 세포의 구조적, 기능적 장애를 일으켜 신체에 다양한 변화를 초래하게 된다. 간 조직 내 MDA 함량은 정상군, 대조군 및 실험군에서 노화기 이후인 52주령과 68주령에서 MDA 농도가 유의하게 증가되었으나, 실험군은 증가의 정도가 정상군 및 대조군에 비하여 완만하였다. 52주령 및 68주령의 실험군에서는 MDA 농도가 정상군 및 대조군에 비하여 유의적으로 감소되었다.

十二味寬中湯의 프리라디칼 소거효과와 지질 과산화 억제효과를 약제 중 galangin 등<sup>29</sup>의 성분들이 hydroxyl 및 peroxy radical들을 소거하고, Fe이온들을 빼앗아 fenton reaction을 억제하는 것으로 판단되나 향후 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

심장 조직에서는 정상군, 대조군 및 실험군 모두 52주령에서 SOD 활성이 유의적으로 증가되었으나 심장 내 SOD 활성의 유의적인 차이는 없었다. 심장 내 GSH 농도는 정상군, 대조군 및 실험군 모두 주령의 증가에 따라 감소되었다. 22주령의 실험군의 경우 정상군 및 대조군에 비하여 GSH 농도가 유의적으로 증가되었다.

비장의 경우, 정상군에서 초기노화기인 40주령까지 SOD 활성이 증가되었으나 이후 감소되었으며, 실험군에서는 52주령까지 SOD 활성이 증가되었으나 68주령에는 유의적으로 감소되었다.

十二味寬中湯 투여에 따른 비장 내 SOD 활성도 변화는 나타나지 않았다. 정상군, 대조군, 실험군 모두 주령이 증가함에 따라 비장 내 GSH 농도가 감소되었으나, 52주령에서는 실험군에서의 GSH 농도가 정상군 및 대조군에 비하여 유의적으로 증가되었다.

폐 조직 내 SOD 농도는 주령의 증가나 十二味寬中湯의 투여에 따른 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. 폐내 GSH 농도는 정상군의 경우 주령의 증가에 따라 감소되었으며 폐내 GSH 농도는 52주령에서 정상군에 비하여 유의적으로 증가되었고, 68주령에서는 정상군 및 대조군에 비하여 유의적으로 증가되었다.

신장 조직의 주령의 증가에 따른 SOD 활성은 정상군 및 대조군 모두 10주령에 비하여 68주령에서 유의적으로 감소되었으나, 실험군의 경우 주령에 따른 SOD 활성의 유의적인 차이는 없었다. 그러나 22주령의 실험군에서의 SOD 농도는 정상군에 비하여 유의적으로 감소되었다. 정상군의 신장내 GSH 농도는 주령에 따른 기복이 심하였으나, 실험군의 경우 주령 증가에 따른 GSH 농도의 유의적인 차이는 없었다. 10주령의 실험군의 경우 정상군에 비하여 신장 내 glutathione 농도가 유의하게 증가되었으나, 52주령의 실험군에서는 정상군에 비하여 유의하게 감소되었다.

뇌 조직내 SOD 활성은 정상군 및 대조군의 경우 주령의 증가에 따른 유의적인 차이가 없었으나, 실험군의 경우 68주령에서 정상군 및 대조군에 비하여 유의적으로 감소되었다. 十二味寬中湯 투여에 따른 뇌 조직 내 GSH 농도는 68주령에서 정상군 및 대조군보다 유의적으로 증가되었다.

실험 결과 SOD 활성도 및 GSH 농도의 주령에 따른 변화는 각 장기마다 차이가 있었으며, 정상군의 경우 비장 및 신장조직에서 52주령 때 SOD 활성도가 감소되었으나, 실험군은 유의적인 변화가 없었다. SOD의 활성이 변화가 없는것은 十二味寬中湯이 조직에서 free radical 생성의 감소로 인한 세포막의 산화적 손상이 억제되므로서 이들 효소 활성의 최적 조건을 유지시켜 주기 때문인 것으로 사료되어진다. 또한, 十二味寬中湯을 투

여한 백서의 간, 심, 비장, 폐 및 뇌조직의 GSH 농도가 각각 40주령, 22주령, 52주령, 52와 62주령 및 68주령에서 정상군에 비해 유의적으로 증가됨으로써, 十二味寬中湯의 항산화 효과를 확인할 수 있었다.

이와같이 간, 심, 비, 폐, 신, 뇌 등에서 나타난 GSH 활성화로 인해 補脾和胃 溫中시키는 十二味寬中湯이 전신 각 조직의 항산화 물질을 증가시키고, 稟賦한 眞氣의 不足을 補하여 少陰人 노화에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

十二味寬中湯에 이용된 약제들의 노화 관련 항산화 효능에 대한 연구로 조<sup>30</sup>는 적하수오 에탄올 추출물에서 E-2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystibene-2-O-β-D-glucopyranoside, catechin을 분리 동정하여 DPPH free radical 소거활성이 우수함을 보고하였고, Rapta 등<sup>31</sup>은 良薑의 galangin 성분이 low oxidation potential(1.5V)를 갖고 있어 지질과산화억제 효과가 강하다고 보고하였다. 김 등<sup>32</sup>은 CCl<sub>4</sub>-olive oil을 투여하여 간독성을 유발시킨 쥐에서 항부자의 BuOH 및 Water fraction의 유의성있는 지질과산화억제효과를 보고하였다. 또한, 나<sup>33</sup>는 백하수오 성분 중의 하나로 보고되어진 CynandioneA(Biacetophenone)를 사염화탄소로 산화스트레스를 가한 쥐의 간세포에 처리시 지질과 산화물의 형성을 저해함으로써 사염화탄소에 의한 간손상 보호효과와 라디칼 소거능이 보고된 바 있다. 한편, 사염화탄소로 간 독성을 유발한 쥐에 백하수오 추출물과 적하수오 추출물을 각각 투여 시 손상된 간 기능의 회복효과를 볼 수 있었으며 여기서 간 독성 완화 효과는 백하수오가 더 효과적이라고 보고되기도 하였다<sup>34</sup>. 郭<sup>35</sup>은 肝 과 赤血球의 抗酸化 酵素에 대한 實驗에 있어서도 首烏延壽丹 투여군은 적혈구에서의 항산화 효소인 SOD, GSH-px 활성이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었으며, 간에서도 항산화 효소인 SOD, GSH활성이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었다고 보고하였다. 그러므로 首烏延壽丹과 이처방의 君藥인 赤何首烏가 활성산소의 생성과 노화 물질의 축적을 막아 노화억제에 유효한 것으로 추정되어, 노화 예방을 위한 중요한 방법으로 제시

될 수 있음을 확인하였다.

그러나 기존의 실험들이 노화 병태 모델에 있어 같은 환경에서 여러 주령의 실험군에 대하여 전반적인 체중이나 각 장부 조직의 항산화 효소 활성 변화를 관찰한 것이 아니라 특정 장부에 대한 세포수준의 연구였음을 감안하면 다른 실험들과 본 실험에 활용된 약물을 비교하여 약물의 유의성을 판단하기는 어렵다고 사료된다. 또한 본 연구에서 약물의 항산화와 관련된 항노화 효과를 입증하고자 6주령, 18주령, 36주령, 48주령 및 64주령 백서를 성장기, 성숙기, 초기노화기, 노화기 및 말기노화기로 설정하고 실험한 것은 일정부분 가치가 있을 것으로 사료된다.

노화에 따른 실험동물 뇌의 조직학적 구조의 변성과 十二味寬中湯의 뇌세포에 대한 항노화 효과를 알아보기 위하여, 실험동물의 뇌 조직을 취하여 신경세포가 모여 있는 뇌의 회백질 부분을 확인하였다. 주령이 증가할수록 대뇌피질의 아래쪽 과립층이 거칠고 성긴 상태를 나타내었다. 실험군에서는 대조군에 비하여 뇌 조직의 상태가 조밀하게 유지되었다(Fig. 1).

이상과 같이 6주령, 18주령, 36주령, 48주령 및 64주령의 백서를 성장기, 성숙기, 초기노화기, 노화기 및 말기노화기로 설정하여 4주간 매일 1%의 十二味寬中湯 200  $\mu$ 를 경구투여 한 결과 52주령 초기노화 백서의 체중 증가를 지연시켰으며 간, 심장, 비장, 폐, 신장, 뇌조직의 SOD 활성과 GSH 농도 및 간조직의 catalase 활성, MDA 함량을 측정된 결과 간조직의 SOD가 52주령에서 활성화되었고, 간조직의 GSH는 40주령, 심조직의 GSH는 22주령, 비조직의 GSH는 52주령, 폐조직의 GSH는 52 및 68주령, 신조직의 GSH는 10주령, 뇌조직의 GSH는 68주령에서 농도가 증가되었다. 또한 68주령에서 간조직의 catalase 활성을 증가시키고, 52주령 및 68주령에서 지질과산화물인 MDA의 농도를 감소시키는 등 항산화 효과가 있는 것으로 나타났다.

## V. 結 論

十二味寬中湯의 抗老化 및 抗酸化 작용을 실험적으로 살펴보고자 6주령, 18주령, 36주령, 48주령 및 64주령 백서를 성장기, 성숙기, 초기노화기, 노화기 및 말기노화기로 설정하여 4주간 매일 1%의 十二味寬中湯 200  $\mu$ 를 경구투여한 후 체중 증가를 측정하였고, 肝, 心, 脾, 肺, 腎藏과 腦 조직에서 SOD 활성, GSH 농도 및 간조직에서 catalase 활성, MDA의 함량 변화를 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간조직에서 十二味寬中湯은 SOD 활성을 52주령 백서에서 10주령, 22주령 및 40주령에 비해 유의하게 증가시켰고, glutathione 농도를 40주령 백서에서 정상군에 비해 유의하게 증가시켰으며, catalase 활성을 68주령 백서에서 정상군 및 대조군에 비해 유의하게 증가시켰고, MDA 농도를 52주령 및 68주령 백서에서 정상 및 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다.
2. 심장조직에서 十二味寬中湯은 glutathione 농도를 22주령 백서에서 정상군 및 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다.
3. 비장조직에서 十二味寬中湯은 glutathione 농도를 52주령 백서에서 정상군 및 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다.
4. 폐조직에서 十二味寬中湯은 glutathione 농도를 52주령 백서에서는 정상군에 비해 유의하게 증가시켰고, 68주령에서는 정상군 및 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다.
5. 신장조직에서 十二味寬中湯은 glutathione 농도를 10주령 백서에서는 정상군에 비해 유의하게 증가시켰다.
6. 뇌조직에서 十二味寬中湯은 glutathione 농도를 68주령 백서에서 정상군 및 대조군에 비하여 유의하게 증가시켰다.
7. 十二味寬中湯은 주령에 따른 백서 대뇌 과립층의 조직학적 퇴행을 억제시켰다.

IV. 參考文獻

1. 통계청. 통계소식. 2007 고령자 통계, 2007.
2. 김영경. 노인병태생리학. 현문사, 서울, 2007: 10-11.
3. 河北醫學院 校釋. 靈樞經校釋. 人民衛生出版社, 북경, 1982:355.
4. 程士德. 素問注釋匯粹. 人民衛生出版社, 북경, 1987:95.
5. 홍순용. 四象醫學原論. 행림출판, 서울, 1982: 114.
6. 김선민 외. 東醫壽世保元四象草本卷에서의 양생에 관한 고찰. 사상체질의학회지. 2000;12(1):101-109.
7. 유정희 외. 老化和 수명에 관한 사상의학적 양생관에 대한 고찰. 사상체질의학회지. 2002;14(3):7-16.
8. 전국한의과대학 사상의학교실 엮음. 사상의학. 집문당, 서울, 2004: 204-206, 224-235, 390-394.
9. 박준순, 천성수. 사인별 평균수명 손실량 변화에 관한 연구. 대한보건협회 학술지. 2000;26(1):46-58.
10. 공세권, 유호신. 한국인의 노령화에 관한 고찰. 인구문제론집. 1984;25(12):50-59.
11. Donk-Uk Lee. Oxidative stress and age-related changes in microsomal mixed function oxidase activity. Kor J Gerontol. 1991;1(2):187-201.
12. Hayflick L. Theories of biological aging. Exp Gerontol. 1985;20:145-159.
13. Volicer L, Crino PB. Involvement of free radicals in dementia of the alzheimer's type : a hypothesis. Neurobiol Aging. 1990;11:567-571.
14. 임응추. 황제내경장구색인. 일지사, 서울, 1992: 7-9.
15. 김달래 編譯. 東醫壽世保元四象草藥. 경담, 서울, 1999:41-46.
16. 안상원, 이철완. 熟地黃과 六味地黃湯이 노화과정 흰쥐에서의 항산화 기전에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소논문집. 1999;8(1): 593-623.
17. 광병준. 瓊玉膏가 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문. 2004.
18. 김병탁, 김성훈. 瓊玉湯의 항산화작용에 대한 실험적 연구. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1998;7(1):741-748.
19. 길호식. 延年益壽不虎丹이 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. 경희대학교 박사학위논문. 2003.
20. 소경순, 김광호. 녹삼지황탕이 항노화에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1995;18(2):127-159.
21. 윤상주. 백서의 간손상에 의한 구기자의 유리자유기 소거능에 관한 연구. 동국대학교 박사학위논문. 2002.
22. 김봉수 외 2인. 兎絲子의 항산화작용에 대한 연구. 대한본초학회지. 1997;12(1):67-84.
23. 박성준. 覆盆子가 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문. 2004.
24. 장응찬. 흰쥐에서 연령이 골격근의 당대사에 미치는 영향. 영남의대학술지. 2001;18(1):94-100.
25. 박순권. 한약물의 치매치료에 관한 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 1998;9(2):19-35.
26. Murphy MP, Rick J Th, Milgram NW, Ivy GO. A simple and rapid test of sensorimotor function in the aged rat. Neurobiology of Learning and Memory. 1995;64:181-186.
27. Fu S, Gebicki S, Jessup W, Gebicki JM, Dean RT. Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxides. Biochem J. 1995;311(3): 821-827.
28. Sakamoto Y. et al. Glutathione(3rd Ed), Scientific, 1989:5.
29. Hiramoto K, Ojima N, Sake K, Kikugawa K. Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. Biol Pharm Bull. 1996;19:558-563.
30. 趙賢. 천연물로부터 항산화 및 간보호 물질의 분리 및 구조 결정. 원광대학교 약학과 석사학위논문. 2001.
31. Rapta P, Misik V, Stasko A, vrabel I. Redox

- intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study. *Free Radic Biol Med.* 1995;18: 901-908.
32. 김태희, 박지영. 향부자 분획물의 사염화탄소로 유도된 간장해 및 지질과산화에 미치는 영향. *생약학회지.* 1997;28(4):185-191.
  33. 나영인. 백하수오 추출물 투여가 쥐의 체내 지질과산화와 항산화 효소 활성에 미치는 영향. 숙명여자대학교 식품영양학과 석사학위논문. 2001.
  34. 신민교. 백서 간조직에 미치는 적하수오와 백하수오의 효능에 관한 비교 연구. *생약학회지.* 1985;16(2):81-92.
  35. 郭炳薰. 首烏延壽丹이 노화유발 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향, 경희대학교 석사학위논문. 2003.