동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 18. No. 1, 2007

수종의 한약재 열수추출물이 멜라토닌 수용체 발현에 미치는 영향

김보라미, 양동호, 김보경
동의대학교 한의과대학 한방신경정신과학 교실

Effects of several herbs on the expression of MT1 and MT2 melatonin receptors in C6 glial cells

Bo-Ra-Mi Kim, Dong-Ho Yang, Bo-Kyung Kim
Dept. of Neuropsychiatry, college of oriental medicine, Dongeui University

Abstract

Objective : This study was to investigate the effects of several herbs on the levels of MT1 and MT2 melatonin receptors

Methods : For this study, we carried out dementia assessment examination of 34 patients with memory disturbance who have come to Cheongju oriental hospital of Daejeon university from April 2005 to February 2006. This study classified the patients as none-dementia(ND), questionable dementia(QD), and dementia(DA) groups and analyzed the result of examination.

Results :

1. The water extracts of Dimocarpus long (WEDL) induced the levels of MT2 melatonin receptor expression in a concentration-dependent manner without altering the levels of MT1 melatonin receptor expression.
2. The treatment with the water extract of Zizyphus vulgaris (WEZV) induced the levels of MT1 melatonin receptor expression and the levels of MT2 melatonin receptor expression was not affected.
3. The levels of MT1 as well as MT2 melatonin receptor expression were markedly up-regulated in the water extract of Fossilia ossis (WEFO) and the water extract of Ostreae caro (WEOC)-treated C6 cells.
4. The combination treatment with WEDL and WEZV induced not only the levels of MT1 melatonin receptor expression but also MT2 melatonin receptor expression, but the synergic effects of the combination treatment with WEFO and WEOC were not detected in C6 cells.

Conclusion : The study provides important new insights into the possible mechanisms on the regulation of melatonin receptor synthesis by WEDL, WEZV, WEFO and WEOC.

key words : insomnia, circadian clock, MT1 and MT2 melatonin receptors, C6 cells, Dimocarpus long (WEDL), Zizyphus vulgaris (WEZV), Fossilia ossis (WEFO), Ostreae caro (WEOC)

투고일 : 2/12 수정일 : 3/12 채택일 : 3/14
교신저자 : 김보경, 부산시 진구 양정2동 산45-1 동의대학교 부속한방병원 한방신경정신과
Tel : 051-850-8809, Fax : 051-867-5162, E-mail : np1234@empal.com

Ⅰ. 서 론

전체 삶의 ⅓을 차지하는 수면은 대뇌가 휴식을 취하는 동안의 주기적이고 가역적인 무의식 상태이며, 연령, 성별, 직업적 요구, 문화적 환경, 생리적 특징, 정신과적 혹은 의학적 상태, 심리활동수준 등에 의해 영향을 받는다. 수면 요구량은 광범위한 개인차가 있지만, 하루 7-8시간의 수면이 낮 동안의 활동에 지장 없이 수면의 이점을 취할 수 있는 적정량으로 추정되고 있다[1,2].

인체는 일주기 각성체계(circadian system)를 통해 체내 생리의 주기성과 외부 환경의 변화를 조화시킴으로써 최적의 건강상태를 유지한다. 그러나 주야교대근무, 장거리 항공 여행 등과 같은 환경의 자극은 일주기 리듬의 교란과 관련된 스트레스를 유발하여, 호르몬 같은 신경전달물질 등의 생리적 요소가 변화되고, 수면 장애와 피로, 식욕부진, 우울 등의 신체적, 정신적 문제가 야기되기도 한다[3,4].

수면의 기전은 melatonin과 관계가 많은데, melatonin은 뇌의 송과체에서 소량 분비되는 호르몬으로 거의 모든 생명체에 존재하고, 저녁 8시경부터 혈중 농도가 증가하기 시작하여 새벽 1시에서 3시 사이에 최고치에 이른 후, 다시 아침까지 점점 감소하여 낮 동안에는 낮은 농도를 유지하는 일중 변동을 보이며, 인간의 생체 리듬 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져, 일주기 리듬을 측정하는 표지자로 사용되고 있다. Melatonin은 성호르몬의 생성을 유도하고, 면역세포의 수를 현저히 증가시켜 방어 기능을 하며, 생체의 항산화제로 작용하여 free radical로부터 세포를 보호하고, 콜레스테롤과 혈압을 낮추어 심장병의 위험을 줄이며, 암세포의 성장을 억제할 뿐만 아니라, 노화 예방, 정신질환의 치료에 효과가 있음이 밝혀지고 있다. 또한 melatonin이 수면을 증가시키고 시차를 완화시킬 수 있다는 효능이 알려져 불면증 환자, 장거리 여행자들이 복용하기도 한다[5-11].

불면은 진단명이라기보다는 여러 가지 원인에 의해서 초래되는 증상으로 癌과 같은 신체질환이나 우울증을 비롯한 정신질환의 증상으로 나타날 수도 있고, 생활패턴에 따라 유발될 수도 있다. 잠을 이루기 힘든 難眠, 깊은 熟眠을 취하지 못하는 淺眠, 수면 시간이 짧은 短眠, 공연히 자주 깨는 頻覺, 꿈을 많이 꾸어 숙면이 되지 못하는 多夢 등이 모두 불면의 여러 형태에 속한다. 불면증은 발병과 경과가 완만해서 갑자기 생명에 위험을 초래할 만한 일은 없다고 할지라도, 유병율이 높고 노동 능력을 포함한 정신적 육체적 부담을 안겨주면서 환자에게 몹시 고통을 초래하는 증후이기 때문에 주목할 필요가 있다[12-14].

韓醫學 文獻에서 不眠은 不寐[15,16], 不睡[15,17], 失眠[16], 不得臥[15,18-20], 不得眠[19], 臥不安[15,21], 不得安寢[21], 目不瞑[22,23], 少寐[24] 등으로 표현되고 있으며, 思結不睡, 榮血不足, 痰涎鬱結, 心腎不交, 心膽虛怯, 胃氣不和 등의 형식으로 변증되어진다[25]. 이에 따라 歸脾湯, 七福飮, 養心湯, 導痰湯, 二陳湯, 溫膽湯, 保和湯 등을 비롯한 다양한 처방이 사용되고 있다. 임상에서 불면처방에 다용되는 약제는 藥性이 養心安神之劑, 重鎭安神之劑, 淸熱之劑 理氣之劑 등으로 다양한데, 龍眼肉, 炒酸棗仁, 龍骨, 牡蠣 등을 그 예로 들 수 있다.

炒酸棗仁은 寧心, 安神, 斂汗의 良藥으로 虛煩失眠과 心悸汗多의 증에 常用하는 要藥이며, 龍眼肉은 安神作用 및 心脾血虛의 證을 治療하는 效果가 있다. 龍骨은 心悸, 失眠, 多夢, 健忘, 癲狂 등의 症에 적용하여 重鎭安神시키는 효능이 있으며, 牡蠣는 陰虛陽亢으로 인한 煩燥不

安과 心悸失眠, 頭暈目眩 등을 治療한다[26].

불면과 관련된 한의학 연구에서 최 등[27]은 不眠症의 病因病理를, 노 등[28]은 原因 및 治方을, 朴 등[29]은 病因病機 및 鍼灸治療를, 李 등[30]은 辨證論治를, 朴 등[31]은 形象醫學的 考察을, 許 등[32]은 分心氣飮加味方으로, 嚴 등[33]은 加味溫膽湯으로, 李 등[34]은 歸脾湯 煎湯液으로 實驗的 硏究를, 桂 등[35]은 不眠에 대한 東西醫學的 考察을, 李 등[36]은 酸棗仁炒 藥鍼을 이용한 臨床 硏究를 한 바가 있었으나 한약물의 melatonin 수용체 발현과 관련된 연구는 접한 바 없었다. 이에 저자는 임상에서 불면증에 빈용되는 龍眼肉, 炒酸棗仁, 龍骨, 牡蠣 각각의 열수추출물과 龍眼肉과 炒酸棗仁, 龍骨과 牡蠣의 열수추출물 복합물이 C6 신경교종세포에서 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시료준비

본 실험에 사용된 龍眼肉(*Dimocarpus long*), 炒酸棗仁(*Zizyphus vulgaris*), 龍骨(*Fossilia ossis*), 牡蠣(*Ostreae caro*)는 동의대학교 한의과대학 방제학 교실에서 제공받아 사용하였다. 龍眼肉과 炒酸棗仁 100 g을 1,000 ml의 3차 증류수에 3시간 이상 끓인 후, 여과지로 필터한 후 3,000 rpm에 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이를 0.45 ㎛의 필터를 이용하여 여과한 후 동결 건조하여 龍眼肉 41 g, 炒酸棗仁 8.1 g의 건조 분말을 얻어 3차 증류수에 100 mg/ml로 용해하여 멸균하였다. 龍骨과 牡蠣는 100 g을 1,000 ml의 3차 증류수에 끓여, 최종 100 ml 만 남긴 것을 3,000 rpm에 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 0.45 ㎛의 필터를 이용하여 여과한 후 멸균하였다.

2. C6 세포의 배양조건

본 실험에 사용한 C6 쥐 신경교종 세포(rat glioma cell)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분주받아 사용하였다. 세포의 배양을 위해 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 DMEM 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였으며, 성장배지의 교환은 매 48시간마다 해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 세포배양용 T-75 plask (Nunc. Denmark)에 옮겨 배양하였다.

3. 약재의 처리

준비된 약재 추출물들은 -20°C에 보관하였으며, 적정량을 실험 전에 녹여 세포배양 배지에 희석하여 실험에 사용하였다. 이를 위하여 C6 세포를 분주한 후 안정화를 위해 24시간 배양하여, 선행연구에 따른 조건에 준하여 龍眼肉과 炒酸棗仁은 1 ~ 5 mg/ml로, 龍骨과 牡蠣는 2 ~ 10%로 배지에 희석하여 24시간 동안 처리하였다.

4. MTT assay를 이용한 세포 성장의 측정

세포배양용 6 well plate에 C6 세포 1×10^5

개/㎖로 희석한 세포액을 2 ㎖/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 약재 추출물들을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Signa Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 ㎎/㎖ 농도가 되게 배지에 희석하여 2 ㎖씩 분주하고 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 2 ㎖씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 분주하여 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 편차를 구하였다.

5. 도립 현미경을 이용한 세포형태의 관찰

세포배양용 6 well plate에 C6 세포를 1×10^5 개/㎖ 정도로 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 약재 추출물들을 희석 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 Kodak 자동카메라용 필름을 이용하여 사진을 촬영하였다.

6. DAPI staining에 의한 액의 형태 관찰

세포배양용 6 well plate에 C6 세포를 1×10^5 개/㎖ 정도로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 약재 추출물들을 성장배지에 희석하여 처리하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 부유시킨 후 PBS를 가하여 세포를 모은 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하였다. 상층액은 버리고 세포만 남긴 다음 formaldehyde solution (Sigma)과 PBS를 1 : 9 비율로 섞은 fixing solution을 500 ㎕ 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분 동안 고정하였다. 다시 1,000 rpm으로 5분간 원심분리를 하고 상층액을 버린 다음 PBS 200 ㎕를 넣어서 충분히 섞은 후, 슬라이드글라스 위에 세포 부유액을 80 ㎕정도 떨어뜨린 다음 900 rpm에서 5분간 cytospin하였다. Cytospin이 끝난 후 PBS로 2 ~ 3회 세척하고 PBS가 마르기 전에 0.2%의 Triton X-100 (Amresco, Solon, Ohio, USA)을 떨어뜨린 후 상온에서 10분간 두었다. 다시 PBS로 2 ~ 3회 세척하고 PBS를 사용하여 2,500 : 1로 희석된 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 슬라이드 글라스 위에 적당량 떨어뜨린 다음 빛을 차단하여 15분간 상온에서 염색시켰다. PBS로 DAPI solution을 충분히 씻어내고 증류수로 재빨리 세척한 다음 100% ethanol을 이용하여 탈수과정을 거친 슬라이드 글라스 위에 mounting solution 처리를 한 다음 형광 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 핵의 형태변화를 관찰한 다음 AxioVision 프로그램을 이용하여 사진을 촬영하였다.

7. RT-PCR을 이용한 mRNA 발현의 분석

정상 및 약재 추출물들이 들어 있는 배지에서 24시간 동안 자란 C6 세포를 PBS로 씻어내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리를 하여 상층액을 버리고 세포만 모았다. 준비된 pellet에 RNAzol B 1 ㎖를 첨가하여 약하게 현탁을 하고 e-tube에 옮겨서 4℃에서 1시간 동안 세포를 용해시켰다. 여기에 chloroform 200 ㎕를 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 5분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 무색의 상

층액 만을 400 ㎕ 취하였다. 동량의 isopropanol을 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 15분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 얻은 pellet (RNA)에 75% ethanol (25% DEPC treated water, Nalgene) 500 ㎕를 넣어 14,000 rpm에서 10분 동안 원심분리(4℃)하고 ethanol을 완전히 건조시켰다. 여기에 DEPC water 50 ㎕를 넣어서 RNA를 용해하여 A260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 함량을 계산하였다. 정량 한 후 각각의 primer (Table 1), DEPC water, RNA 그리고 one-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) PreMix kit (Intron, Korea)를 넣어 PCR 조건(Table 2)에 따라 PCR machine (Eppendorf, Germany)을 이용하여 증폭하였다. PCR 후 얻어진 DNA의 발현 차이를 비교하기 위해 1x TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well에 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution (5x, Quality Biological Inc.)을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하여 Image analyer (Vilber Lourmat, France)를 이용하여 사진 촬영하였다.

Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
MT1	Sence	5'-CAG-TAC-GAC-CCC-CGG-ATC-TA-3'
	Antisence	5'-GGC-AAT-CGT-GTA-CGC-CG-3'
MT2	Sence	5'-ATG-TTC-GCA-GTG-TTT-GTG-GTT-T-3'
	Antisence	5'-ACT-GCA-AGG-CCA-ATA-CAG-TTG-A-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

Table 2. Condition of PCR

Temperature(℃)	Time	No. of cycle
45	30 min	1
94	5 min	1
94	30 sec	
58	30 sec	36
72	30 sec	
72	5 min	1
4	hold	-

Ⅲ. 결 과

1. β-estradiol에 의한 MT1 및 MT2 melatonin 수용체의 발현 증가

몇 가지 종류의 한약재가 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여, C6 세포주가 *in vitro* model로 적정한지의 여부를 먼저 조사하였다. C6 세포에 다양한 농도의 β-estradiol을 다양한 시간 범위 내에서 처리하여 MTT assay에 준하여 세포의 증식에 전혀 영향을 주지 않고 세포독성 또한 나타내지 않는 범위의 시간과 농도를 설정하였다.

Fig. 1은 본 연구에서 설정된 β-estradiol 100 ng/ml 범위 내에서의 MTT assay 결과로서 24시간 동안 처리하였을 경우 β-estradiol이 처리되지 않은 정상 배지에서 배양된 대조군에 비하여 세포증식 억제가 나타나지 않았음을 알 수 있다. 또한 Fig. 2의 결과는 동일 조건에서 β-estradiol 처리에 의한 세포의 형태 변화 및 DAPI 염색을 통한 핵의 모양을 관찰한 결과로서 대조군에 비하여 C6 세포의 전체적인 형태

및 핵의 모양 역시 큰 변화가 없었다. β-estradiol 처리에 따른 세포독성을 나타내지 않는 범위에서 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2 의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. Fig. 3A의 결과는 RT-PCR에 의한 결과이며, 이를 internal control인 house-keeping 유전자인 glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH)에 대한 상대적 발현의 정도를 정량화하여 Fig. 3B에 나타냈다. 결과에서 알 수 있듯이 β-estradiol이 처리되지 않은 대조군에서 MT_1과 MT_2 melatonin 수용체 모두가 어느 정도 발현이 되고 있음을 알 수 있으며, β-estradiol의 처리농도가 증가할수록 두 melatonin 수용체의 발현은 농도 의존적으로 증가되었다. 이상의 결과는 C6 세포는 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현이 어느 정도 이루어지고 있는 세포주이며, 세포독성을 나타내지 않는 범위의 β-estradiol 처리 조건에서 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현이 증가되었기에 melatonin 수용체 발현을 연구하기 위한 적절한 *in vitro* model임을 알 수 있다. 또한 세포독성이 없는 범위에서 전사 수준에서의 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 최고 발현 조건은 50 ng/ml 정도임을 알 수 있다.

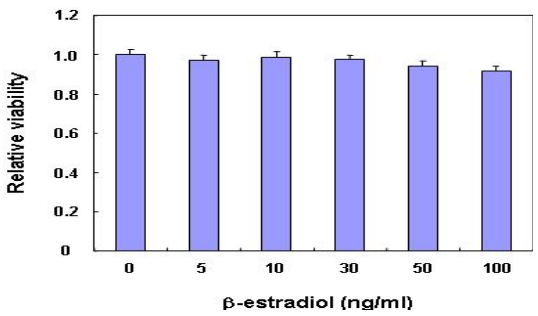


Fig. 1. Effects of β-estradiol on the cell growth of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. The cells were treated with variable concentrations of β-estradiol for 24 hrs. The growth rate was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means ± SD of three independent experiments.

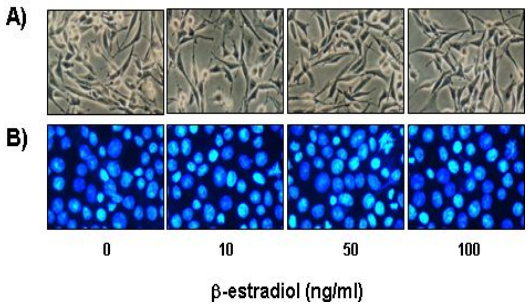


Fig. 2. Effects of β-estradiol on the morphology of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. (A) Cells were treated with variable concentrations of β-estradiol for 24 hrs and cell morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200. (B) After 24 hrs incubation with β-estradiol, the cells were collected and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

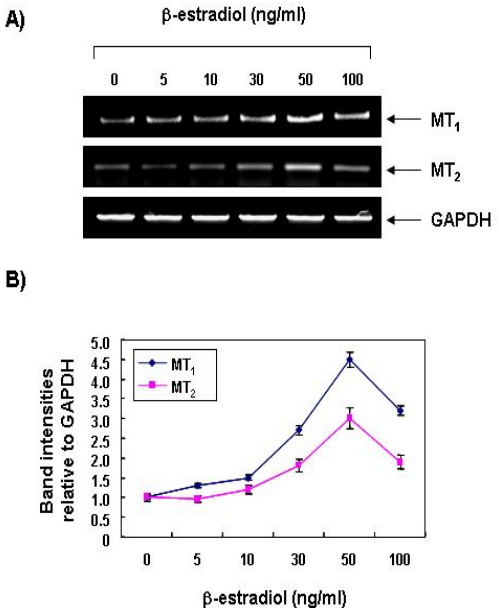


Fig. 3. Induction of MT1 and MT2 melatonin receptor expression by β-estradiol treatment in C6 cells. (A) After 24 hrs incubation with β-estradiol, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with MT1 and MT2 primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene and mRNA levels were normalized against GAPDH (B).

2. MT1 및 MT2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 龍眼肉 열수추출물의 영향

龍眼肉의 열수추출물(water extract of *Dimocarpus long*, WEDL)을 24시간 동안 처리한 후 적정 농도별 세포 독성의 유무를 확인하였다. Fig. 4는 龍眼肉 열수추출물의 1 ~ 5 mg/ml 범위에서 C6 세포의 생존에 큰 영향이 없음을 MTT assay로 확인한 결과이고, 동일 조건에서 전체적인 세포의 형태 및 핵의 변화 여부를 조사한 결과가 Fig. 5에 나타나 있다. 동일 조건에서 龍眼肉 열수추출물의 처리에 따른 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현 변화 여부를 조사한 결과는 Fig. 6에 나타낸 바와 같다. Fig. 6에 나타낸 RT-PCR의 결과에서 龍眼肉 열수추출물은 melatonin 수용체 MT_1의 발현에는 큰 변화를 주지 못하였으나, MT_2의 경우 대조군에 비하여 3 mg/ml 처리군에서 약 1.8배의 발현 증가를 보였다. 그리고 4 및 5 mg/ml 처리군에서는 각각 3.4 및 2.6배 정도의 발현 증가 현상을 나타내어 龍眼肉 열수추출물 처리 농도가 증가할수록 전사 수준에서의 발현이 증가하였으며 특히 4 mg/ml 처리군에서 melatonin 수용체 MT_2의 발현이 가장 높게 나타남을 알 수 있다.

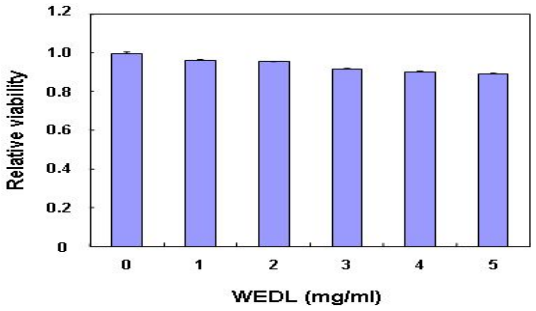


Fig. 4. Effects of the water extract of Dimocarpus long (WEDL) on the cell growth of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. The cells were treated with variable concentrations of WEDL for 24 hrs. The growth rate was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means ± SD of three independent experiments.

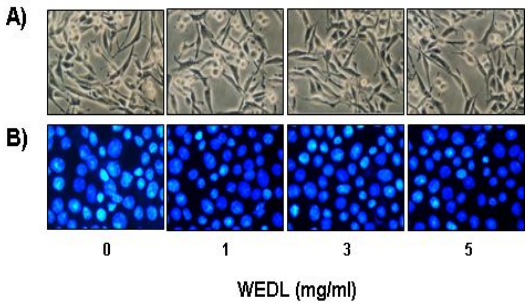


Fig. 5. Effects of WEDL on the morphology of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. (A) Cells were treated with variable concentrations of WEDL for 24 hrs and cell morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200. (B) After 24 hrs incubation with WEDL, the cells were collected and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

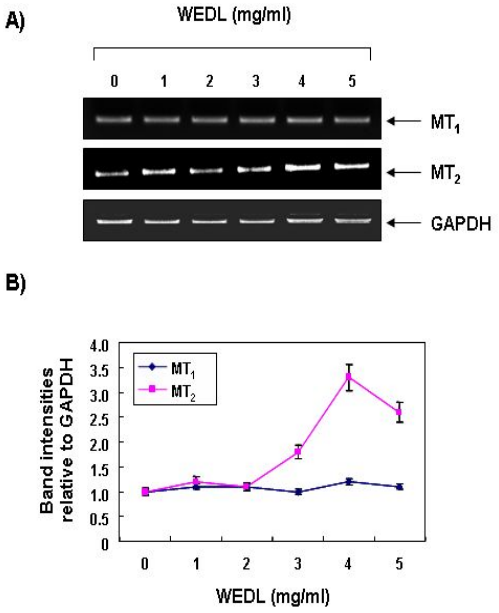


Fig. 6. Induction of MT1 and MT2 melatonin receptor expression by WEDL treatment in C6 cells. (A) After 24 hrs incubation with WEDL, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with MT1 and MT2 primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene and mRNA levels were normalized against GAPDH (B).

3. MT1 및 MT2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 炒酸棗仁 열수추출물의 영향

炒酸棗仁 열수추출물(water extract of *Zizyphus vulgaris*, WEZV)을 C6 세포에 24시간 동안 다양한 농도로 처리하여 세포독성을 나타내지 않는 범위의 조건을 설정한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 炒酸棗仁 역시 龍眼肉 열수추출물과 유사한 조건의 처리 농도 범위에서 C6 세포에 세포독성을 나타내지 않았음을 Fig. 8에 나타낸 세포 형태 변화의 실험 결과에서 확인하였으며, 이를 토대로 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현 변화를 조사하였다. 동일 조건에서 분리된 RNA를 대상으로 RT-PCR 방법에 의하여 얻어진 결과는 Fig. 9에 나타낸 바와 같으며, 炒酸棗仁 열수추출물의 경우는 MT_2의 발현에 유의적인 변화가 없었으며, MT_1의 mRNA 발현이 3 mg/ml 처리군에서 2.7배 정도 증가되었으며, 4 mg/ml 처리군의 경우 약 3.8배 정도로 증가되어 炒酸棗仁 열수추출물 처리 농도가 증가될수록 MT_1 melatonin 수용체 만이 발현이 증가되었음을 알 수 있었다. 또한 炒酸棗仁 열수추출물 5 mg/ml 처리군에서는 2.5배 정도의 발현 증가를 나타내어 4 mg/ml 炒酸棗仁 열수추출물이 MT_1의 발현을 가장 높게 활성화 시켰음을 알 수 있다.

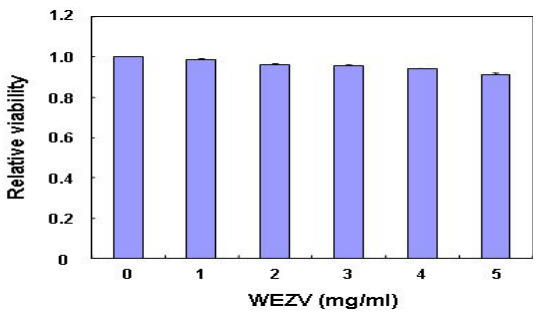


Fig. 7. Effects of the water extract of Zizyphus vulgaris (WEZV) on the cell growth of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. The cells were treated with variable concentrations of WEZV for 24 hrs. The growth rate was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means ± SD of three independent experiments.

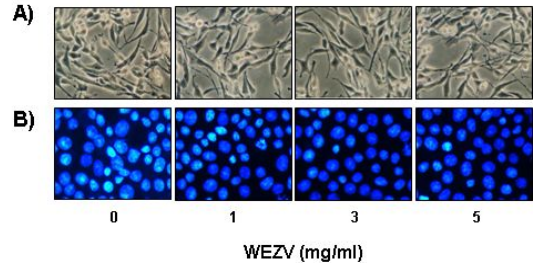


Fig. 8. Effects of WEZV on the morphology of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. (A) Cells were treated with variable concentrations of WEZV for 24 hrs and cell morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200. (B) After 24 hrs incubation with WEZV, the cells were collected and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

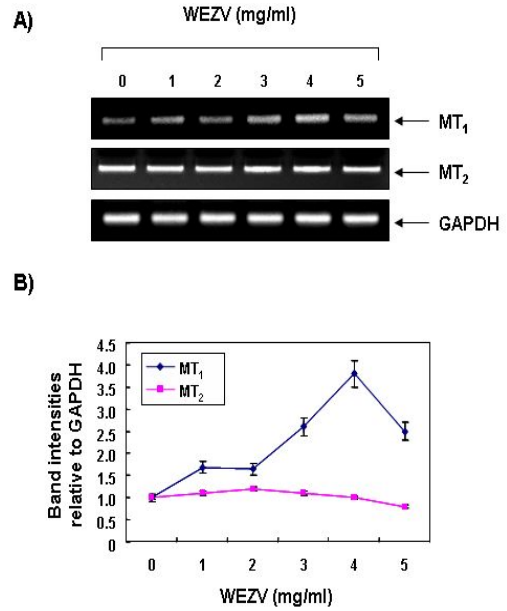


Fig. 9. Induction of MT1 and MT2 melatonin receptor expression by WEZV treatment in C6 cells. (A) After 24 hrs incubation with WEZV, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with MT1 and MT2 primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping

control gene and mRNA levels were normalized against GAPDH (B).

4. MT1 및 MT2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 龍骨 열수추출물의 영향

龍骨 열수추출물(water extract of *Fossilia ossis*, WEFO)을 C6 세포에 24 시간동안 다양한 농도로 MTT assay를 실시하여 C6 세포의 전체적인 모습과 핵 모양 변화를 조사하여 10% 이내의 龍骨 열수추출물 처리 하에서는 세포 독성을 나타내지 않았음을 확인하였다(Fig. 11). Fig. 12에 나타낸 바와 같이 龍骨 열수추출물에 의한 MT_1의 발현은 2% 처리군에서는 대조군에 비하여 큰 변화가 없었으나, 龍骨 열수추출물의 처리 농도가 증가할수록 MT_1의 발현이 크게 증가하여 10% 처리군에서는 약 5.3배 이상 높게 나타났다. 또한 MT_2의 경우도 龍骨 열수추출물의 처리에 따라 mRNA의 발현이 증가되었는데, MT_1과 유사하게 2% 처리군에서는 대조군에 비하여 큰 변화가 없었으나, 8% 처리군에서는 약 5배 이상 발현이 증가되었음을 알 수 있었다. 그리고 10% 龍骨 열수추출물이 처리된 배지에서 배양된 C6 세포의 MT_2 mRNA의 발현은 대조군에 비하여 8.2배 이상 증가하여 조사된 실험 조건하에서 MT_1 및 MT_2의 발현이 龍骨 열수추출물의 처리에 농도 의존적으로 모두 강하게 증가되었음을 알 수 있다

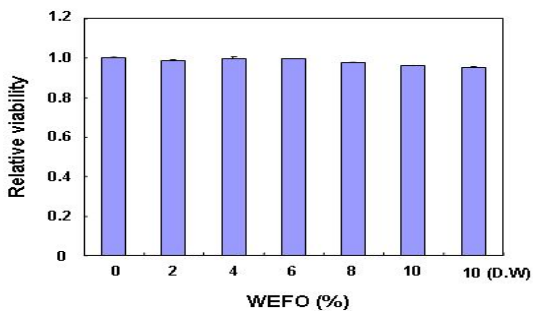


Fig. 10. Effects of the water extract of Fossilia ossis (WEFO) on the cell growth of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. The cells were treated with variable concentrations of WEFO for 24 hrs. The growth rate was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means ± SD of three independent experiments.

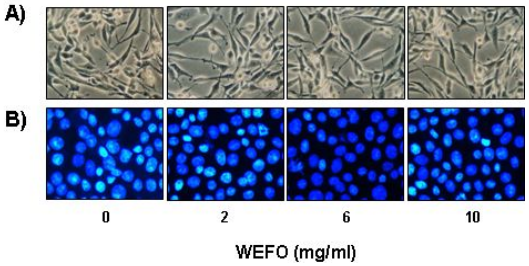


Fig. 11. Effects of the water extract of WEFO on the morphology of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. (A) Cells were treated with variable concentrations of WEFO for 24 hrs and cell morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200. (B) After 24 hrs incubation with WEFO, the cells were collected and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

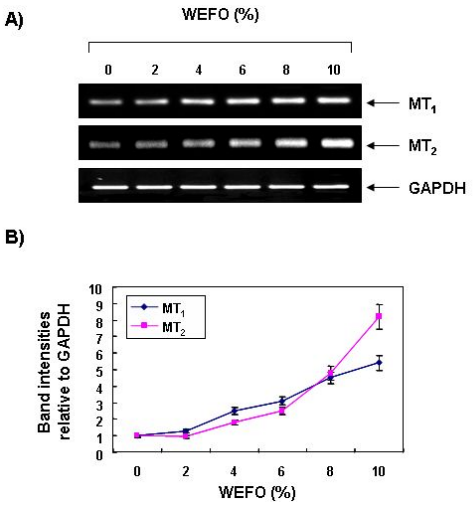


Fig. 12. Induction of MT1 and MT2 melatonin receptor expression by the water extract of WEFO treatment in C6 cells. (A) After 24 hrs incubation with WEFO, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with MT1 and MT2 primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene and mRNA levels were normalized against GAPDH (B).

5. MT1 및 MT2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 牡蠣 열수추출물의 영향

牡蠣 열수추출물(water extract of *Ostreae Caro*, WEOC)이 C6 세포의 형태 변화에 미치는 영향을 조사한 결과 10% 이내의 牡蠣 열수추출물 처리 조건에서 유의적인 세포독성 효과를 관찰할 수는 없었다(Fig. 14). Fig. 15에 나타낸 바와 같이 牡蠣 열수추출물의 처리에 따라 MT_1 melatonin 수용체의 발현은 처리 농도가 높아질수록 점차 증가되었는데, 2% 처리군에서는 유의적인 변화가 나타나지 않았으며, 4% 처리군에서는 약 2.6배, 6% 처리군에서는 약 3.2배, 10% 처리군에서는 3.7배 정도의 발현 증가를 보였다. 그러나 MT_2의 경우는 4% 처리군에서 3.2배 증가된 후 그 이상의 농도 증가군에서는 오히려 감소되는 경향성을 보여주었다.

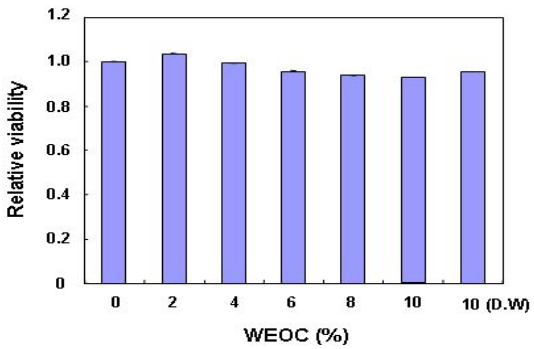


Fig. 13. Effects of the water extract of Ostreae caro (WEOC) on the cell growth of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. The cells were treated with variable concentrations of WEOC for 24 hrs. The growth rate was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means ± SD of three independent experiments.

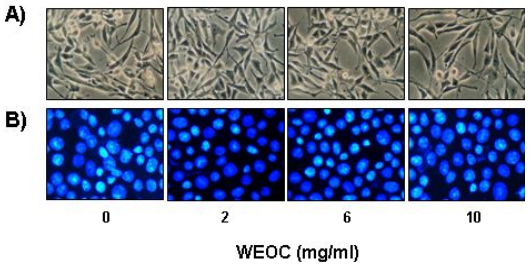


Fig. 14. Effects of the water extract of WEOC on the morphology of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. (A) Cells were treated with variable concentrations of WEOC for 24 hrs and cell morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200. (B) After 24 hrs incubation with WEOC, the cells were collected and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

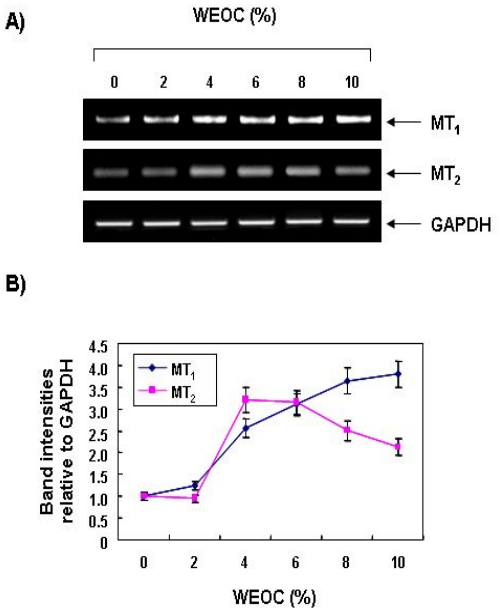


Fig. 15. Induction of MT1 and MT2 melatonin receptor expression by the water extract of WEOC treatment in C6 cells. (A) After 24 hrs incubation with WEOC, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with MT1 and MT2 primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene and mRNA levels were normalized against GAPDH (B).

6. MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 龍眼肉 및 炒酸棗仁 열수추출물의 복합처리 효과

서로 다른 melatonin 수용체의 발현을 활성화시킨 龍眼肉 및 炒酸棗仁 추출물을 복합 처리하였을 경우 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현이 어떻게 변하는지를 조사하기 위하여, 龍眼肉 및 炒酸棗仁 열수추출물을 각각 1 ~ 5 mg/ml 범위에서 동시 처리하고 MTT assay를 통하여 세포증식에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 16에 나타난 결과에서 龍眼肉 및 炒酸棗仁 열수추출물을 각각 복합 처리하여도 C6 세포의 증식에는 아무런 영향을 주지 않았다. 아울러 세포의 형태변화에 미치는 영향의 조사에서도 Fig. 17에 나타낸 바와 같이 정상 배지에서 자란 C6 세포와 龍眼肉 및 炒酸棗仁 열수추출물이 복합 처리된 세포에서 큰 변화를 관찰할 수 없었으며, 핵의 형태 역시 정상적인 모양을 유지하였다. 따라서 龍眼肉과 炒酸棗仁 열수추출물의 단독 처리에 의하여 C6 세포에 세포독성을 나타내지 않는 범위의 처리 농도는 혼합 처리하여도 세포독성은 증가되지 않았다. 동일 조건에서 龍眼肉과 炒酸棗仁 열수추출물 동시 처리가 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현에 미치는 변화를 조사한 결과는 Fig. 18에 나타낸 바와 같다. 먼저 龍眼肉 열수추출물 단독처리에 의하여 큰 변화가 없었던(Fig. 6) MT_1 melatonin 수용체의 경우 龍眼肉과 炒酸棗仁 열수추출물의 복합처리에 의하여 저농도(2 mg/ml) 수준에서 대조군에 비하여 약 3.3배 정도의 높은 발현을 유도하였으나, 이는 炒酸棗仁 열수추출물 단독처리의 MT_1 melatonin 수용체 최고 발현 증가에 해당되는 조건(4 mg/ml)에 비하여 오히려 감소되었다. 그리고 炒酸棗仁 열수추출물 단독 처리에 의하여 발현의 변화가 없었으나(Fig. 9), 龍眼肉 단독 처리에 의하여 발현이 3.3배 이상 증가되었던 MT_2 melatonin 수용체 발현의 경우(Fig. 6), 두 추출물의 복합처리에 의하여 다소 증가되었다. 따라서 龍眼肉 및 炒酸棗仁 열수추출물의 적절한 혼합 조건으로 melatonin 수용체 발현의 조절을 향상 및 MT_1과 MT_2의 동시 발현 유도가 가능함을 보여주었다.

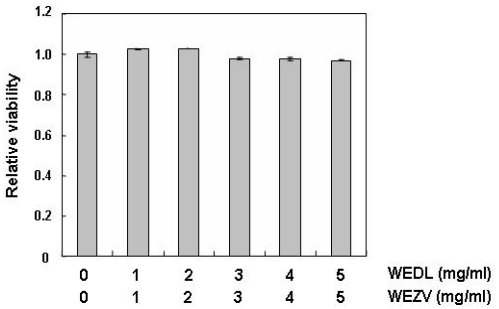


Fig. 16. Effects of the combination treatment of WEDL and WEZV on the cell growth of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. The cells were treated with variable concentrations of WEDL and WEZV for 24 hrs. The growth rate was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means ± SD of three independent experiments.

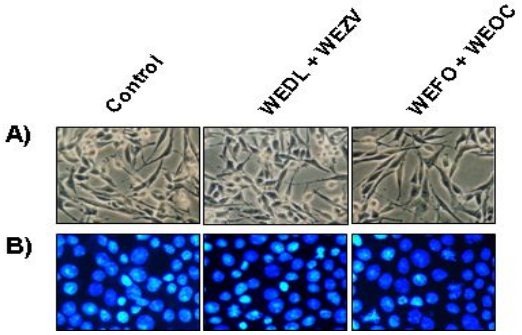


Fig. 17. Effects of the combination treatment of WEDL and WEZV, or WEFO and WEOC on the morphology of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. (A) Cells were treated with variable concentrations of WEDL (5 mg/ml) and WEZV (5 mg/ml), or WEFO (10%) and WEOC (10%) for 24 hrs and cell morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200. (B) After 24 hrs incubation with WEDL (5 mg/ml) and WEZV (5 mg/ml), or WEFO (10%) and WEOC (10%), the cells were collected and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

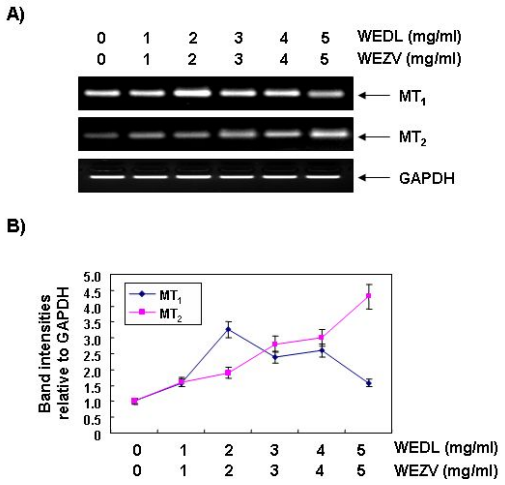


Fig. 18. Effects of the combination treatment of WEDL and WEZV on the levels of MT1 and MT2 melatonin receptor expression in C6 cells. (A) After 24 hrs incubation with the combination treatment of WEDL and WEZV, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with MT1 and MT2 primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene and mRNA levels were normalized against GAPDH (B).

7. MT1 및 MT2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 龍骨 및 牡蠣 열수추출물의 복합처리 효과

Fig. 10~15의 결과에서와 같이 龍骨 및 牡蠣 열수추출물 복합 처리에 의하여 C6 세포에서 세포독성이 없는 농도 범위에서, 두 추출물을 동시에 처리하였을 경우 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 10% 이내에서의 龍骨 및 牡蠣 열수추출물을 동시에 처리하여 세포의 생존에 비치는 영향의 비교를 먼저 조사하였다. Fig. 19에 나타낸 바와 같이 각각 단독 처리하였을 경우 세포독성을 보여주지 않았던 두 추출물을 동시에 처리하였을 경우에 C6 세포의 생존에는 아무런 영향을 미치지 못하였다. 이러한 결과를 C6 세포의 형태변화 여부로 관찰하였을 경우에도 Fig. 16에 나타낸 것처럼 대조군에 비하여 큰 변화가 없었다. 동일 조건에서의 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현 변화를 조사한 결과 Fig. 18에 나타낸 바와 같이 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현이 모두 증가되었다. 그러나 Fig. 12 및 15의 결과에서 알 수 있듯이 龍骨 및 牡蠣 열수추출물은 각각 단독 처리하였을 경우에도 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현이 증가되었으며, 두 추출물을 동시에 처리하였을 경우 龍骨 단독 처리 시 나타난 경우와 매우 유사한 결과를 보여주었다.

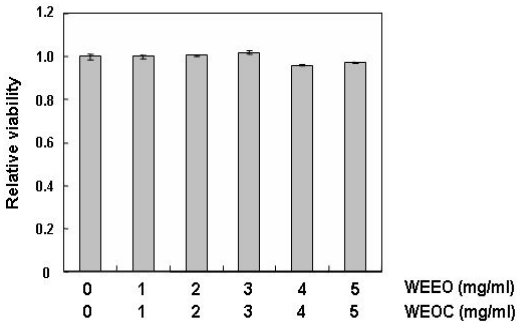


Fig. 19. Effects of the combination treatment of WEFO and WEOC on the cell growth of C6 cells. C6 cells were seeded at 2 X 104/ml in a 6-well plate and incubated for 24 hrs. The cells were treated with variable concentrations of WEFO and WEOC for 24 hrs. The growth rate was measured by the metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means ± SD of three independent experiments.

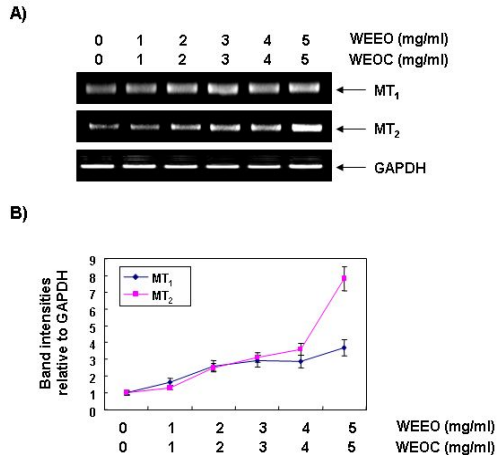


Fig. 20. Effects of the combination treatment of WEFO and WEOC on the levels of MT1 and MT2 melatonin receptor expression in C6 cells. (A) After 24 hrs incubation with the combination treatment of WEFO and WEOC, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with MT1 and MT2 primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene and mRNA levels were normalized against GAPDH (B).

Ⅳ. 고 찰

수면은 대뇌가 휴식을 취하는 동안의 무의식 상태이지만, 외부 자극으로 깨어날 수 있는 주기적이고 가역적이며 조용하고 활동이 줄어든 상태이다. 수면의 정확한 기능은 정의되지 않았지만, 많은 학자들이 적당한 수면은 심신의 안녕과 평화유지에 필수적이며, 뇌의 원상회복을 위해 강제적인 재충전의 기능을 할 것으로 추정하고 있다[1,37]. 수면 중에는 수종의 호르몬이 분비되어 낮 동안의 활동을 위한 생화학적 변화가 일어나고 세포조직에 영양이 공급되며, 스트레스, 불안, 긴장이 조정되고, 매일의 활동에 있어서 집중, 회상 그리고 흥미를 위한 에너지의 재충전이 이루어진다. 단백 합성과 세포 분열이 수면과 휴식 동안 현저히 증가하며, 아미노산 흡수를 촉진하는 성장호르몬이 서파수면 동안에 최고의 분비율을 보인다는 사실로 수면의 재충전 기능을 유추해 볼 수 있을 것이다[38,39].

일반적으로 수면은 rapid eye movement (REM)와 non-rapid eye movement (NREM) 수면으로 구분된다. NREM 수면기는 뇌파 유형에 따라 1 ~ 4단계로 구분되며, 단계가 진행될수록 깊은 수면을 의미한다. REM수면은 각성된 사람에서 나타나는 뇌파와 유사하게 파장이 작고, 빠르게 움직인다. NREM과 REM 수면은 약 90분을 주기로 4 ~ 6회 반복됨으로써 하룻밤 동안의 수면을 이룬다[40-43]. 인간의 수면은 일주기성 요소와 항상성에 의해 결정된다. 일주기 리듬은 약 24시간을 주기로 이루어지는 생체현상으로, 하루 중 일정시간을 수면과 각성이라는 부분으로 이루어지도록 하는 기능이 있다[44-46]. 수면-각성 리듬이 24시간 주기에 일치하도록 영향을 주는 주기성을 가진 환경적 자극을 리듬 일치 요소(Zeitgeber)라고 하는데 직업, 대인관계 같은 사회접촉이나 수면-각성 일과표 등의 사회적 단서는 오랫동안 강력한 리듬 일치 요소로 간주되어 왔으며, 밝은 빛에 매우 의존적인 melatonin 배설 같은 신경 내분비 반응이 제시되면서 밝음-어둠 주기도 다른 동물에서 처럼 인간에서도 역시 리듬일치 요소로 작용한다고 밝혀졌다[47].

불면이란 여러 가지 수면장애 가운데 하나이다. 수면장애는 낮 시간의 피곤을 초래하여 활동을 방해하고, 낮 동안의 졸리움과 명료성 결여는 사회활동과 업무수행에 지장을 줄 수 있으며, 주관적으로 잠이 부족하거나 부적절하다고 느끼는 불면증의 경우에도 삶의 질적 저하가 동반되어 70세 이상의 노인에서는 사망위험의 증가와도 관련이 있다[48]. 불면증은 일반 대중이나 임상의들이 인식하고 있는 것보다 훨씬

더 유병율이 높은데, 미국의 경우 전체 인구의 35%에서 잠자는데 곤란을 느낀다고 호소하고 있으며, 서울 거주 일반성인의 수면양상에 관한 연구에서 전체 대상의 31%가 때때로 잠들기 힘들고 자주 깨거나 너무 일찍 깨어나는 수면곤란을 호소하는 것으로 보고된 바 있다[49,50]. 불면증의 일반적인 치료법으로 수면 환경 치료, 명상이나 근육 이완, 복식 호흡법, 이완 요법, 식이요법, diazepam 등의 수면제를 투여하는 약물 요법 등이 있으며, 최근에는 아로마 요법이나 음악요법, 마사지 등을 통하여 수면을 개선시키기 위한 노력들을 하고 있으며 이에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있다.

약물요법은 수면장애의 대표적인 치료법 중의 하나이며, 약물의 종류도 매우 다양하고, 약물에 따른 효과와 수면에 미치는 영향도 다양하다. benzodiazepine계통의 약은 다른 진정-수면제에 비해 비교적 안전성이 높고, 내성이 빨리 나타나지 않는 점 등으로 불면증 환자의 치료에 폭넓게 사용되어 왔다. 그러나 이러한 약물은 표준 수면구조를 변화시키고, 복용 다음날 수행능력의 감소와 낮 동안 졸리움, 기억력 감퇴 등의 잔여 영향이 있다고 보고 되기도 하였다[51,52]. 대부분의 수면제는 일반적 각성을 감소시키는 진정 효과가 있다. 즉 수면 잠복기를 감소시키거나, 야간의 각성을 감소시킴으로써 전체 수면 시간을 증가시킨다. 그런데 이런 효과는 2 ~ 4주 후에는 효력이 없어지고, 일정 약물 농도에 익숙해진 상태에서 갑작스런 약물의 중단은 더 심한 불면증을 야기시킨다. 처방약제들에 의한 인지기능의 저하, 낮 동안의 각성 변화, 수면구조의 변화, 신체 및 심리적 의존, 약물과의 상호작용, 남용 가능성 등의 부작용이 보고되면서, 가능한 한 비약물 치료가 우선 권장되어 지고 있다[53,54]. 이에 따라 이러한 부작용을 감소시킬 수 있는 여러 연구들이 진행되고 있는데 대체요법으로 한약을 이용한 천연물 신약 개발에 대한 관심이 증가되고 있다.

韓醫學 文獻에서 不眠은 不寐[15,16], 不睡[15,17], 失眠[16], 不得臥[15,18-20], 不得眠[19], 臥不安[15,21], 不得安寢[21], 目不瞑[22,23], 少寐[24] 등으로 표현되고 있다. 黃帝內經에서는 ≪靈樞 • 口問篇≫[22]에 "衛氣晝日行於陽 夜半則行於陰 陰者主夜 夜者主臥...陽氣盡 陰氣盛 則目瞑 陰氣盡而陽氣盛 則寤矣"라 하였고, ≪靈樞 • 大惑論≫[22]에서는 "衛氣不得入於陰 常留於陽 留於陽則陽氣滿 陽氣滿則陽蹻盛 不得入於陰則陰氣虛 故目不瞑矣"라 하여 睡眠의 生理와 不眠의 발생과정에 대하여 언급하였다. 또한 不眠의 原因에 관하여 ≪內經≫[23]에서는 "臟有所傷 肺氣盛 胃不和則臥不安"이라 하였고 "厥氣客于五臟六腑 衛氣獨行 衛其外行於陽 不得入於陰則 目不瞑"이라 하였으며, 水病, 胃不和, 陽明之厥, 太陰之厥, 脾脹 등도 原因이 된다고 하였다. 張[20]은 熱病後의 不眠에 관하여 언급하였고, 巢[55]는 心熱과 膽冷을 원인으로 보았으며, 王[19]은 "陽獨盛陰偏虛"를, ≪太平聖惠方≫[56]에서는 膽虛를 不眠의 原因으로 提示하였다, 龔[57]은 痰涎擾心하여 心氣不足하면 不眠이 發한다 하였고, 陳[58]은 心血少를 原因으로 보고 心腎相交하며 安神할 것을 重視하였다. 이상의 문헌에 나타난 不眠의 원인을 종합해보면 思結不睡, 榮血不足, 痰涎鬱結, 心腎不交, 心膽虛怯, 胃氣不和 등으로 나눌 수 있으며[25], 임상에서 불면에 다용되는 약제는 龍眼肉, 炒酸棗仁, 龍骨, 牡蠣, 梔子, 竹茹 등이 대표적이다.

炒酸棗仁은 갈매나무과에 속한 낙엽관목인 멧대추나무의 성숙한 씨앗을 炒하여 사용하며 氣味가 甘酸性平으로 甘味는 補하고 酸味는 收斂하여 營血을 補하고 安神하며 또한 斂陰하여 止汗시키므로 寧心, 安神, 斂汗의 良藥이 된다. 그러므로 陰血不足으로 心神을 失養하게 되고 虛火가 妄動하여 陰液이 外泄해서 나타나는 虛煩失眠과 心悸汗多의 증에 常用하는 要藥이다.

龍眼肉은 性味가 甘溫質潤하여 心 脾 二經에 들어가 補益하고 營血을 滋養하므로 良好한 安神作用을 가지고 있어 心脾血虛의 證을 治療하는 效果가 있다. 龍骨은 犀類, 牛類, 象類 등의 遺骸가 지층에 매몰되어 骨格, 牙, 齒, 角 등이 석회화된 것을 채취한 것으로, 甘澁質重하여 鎭驚潛陽시키고, 收斂固脫하므로 心悸, 失眠, 多夢, 健忘, 癲狂 등 증에 적용하여 重鎭安神시키는 효능이 있다. 牡蠣는 牡蠣科에 속한 軟體動物인 굴 및 동속 近緣動物의 貝殼을 건조한 것으로, 性寒質重하여 平肝潛陽시키는 효능이 있어 陰虛陽亢으로 인한 煩燥不安과 心悸失眠, 頭暈目眩 및 耳鳴 등 증을 治療한다[26].

Melatonin은 뇌의 송과체에서 분비되는 호르몬으로, 인간의 생체 리듬 생성에 중요한 역할을 하고 있으며, 일주기 리듬을 측정하는 대표적인 표지자로 알려져 있다. melatonin은 생체에서 아주 소량으로 분비되며, 저녁 8시경부터 혈중 농도가 증가하기 시작하여 새벽 1시에서 3시 사이에 최고치에 이른 후, 다시 아침까지 점점 감소하여 낮 동안에는 낮은 농도를 유지하는 일중 변동을 보이고, 거의 모든 생명체에 존재하고 분자구조가 모두 동일하다[5]. 송과체에서의 melatonin 합성은 빛에 의해 조절되며, N-acetylation과 O-methylation을 포함하는 2가지 경로를 통하여 serotonin에 의해 합성되는데, 첫 번째 단계는 enzyme arylalkylamine N-acetyltransferase에 의해 촉진되고, 두 번째 단계는 hydroxyindole-O-methyltransferase에 의해 촉진된다[59]. Melatonin은 melatonin 수용체에 특이적으로 높은 친화성에 의해 매개되며, melatonin 수용체는 3개의 subtype을 가진다. 포유동물과 조류의 뇌에서 MT_1, 포유동물의 망막에서 MT_2, 그리고 양서류의 뇌, 망막, 조류와 어류의 뇌에서 MT_3가 발현된다. MT_2 수용체는 포유동물의 망막에서 빛에 대한 photoreceptor를 담당하며, 반대로 MT_1 수용체는 포유동물의 hypophysial pars tuberalis와 hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN)를 포함하는 뇌에서 seasonal과 circadian의 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다[60-62].

Melatonin은 다양한 기능을 가지고 있는데, 성호르몬의 생성을 유도하고 면역세포의 수를 현저히 증가시켜 방어기능을 하며, 생체의 항산화제로 작용하여 free radical로부터 세포를 보호하며, 콜레스테롤과 혈압을 낮추어 심장병의 위험을 줄이고, 암세포 성장의 억제와 노화예방, 정신질환의 치료에 효과가 있음이 밝혀지고 있다[6-11]. Melatonin은 임상에서 내인성 24시간 리듬축을 교대시키는 명백한 능력에 대해 우선적으로 사용되고 있는데, 초저녁 melatonin의 복용은 내인성 melatonin의 분비를 보다 빨리 일으켜 보다 이른 수면 유도의 경향을 나타낸다. 그러므로 외인성 meltonin의 투여는 jet leg, 지연 수면 증후군, 그리고 주야교대 순번제 일의 적응에 있어 수면-각성 주기를 조정하는 광선 치료의 가능한 대안으로 사용되어지기도 한다[63-65].

Melatonin에 대한 연구는 다양하게 이루어져 왔는데, Ferini-Strambi 등[66]은 건강한 자원자에게 소량의 melatonin과 triazolam을 같이 투여한 결과, 다원수면기록상 유의한 변화는 관찰되지 않았지만, 주관적 수면의 질이 개선되며, 사용량과 관련된 benzodiazepine의 부작용을 회피할 수 있다고 보고하였다. 홍 등[67]은 酸棗仁湯, 酸棗甘麥湯 등의 처방이 serotonin, melatonin의 형성에 효과적으로 작용하였으나 개별약물을 투여하였을 경우 흰쥐의 혈청 내 melatonin양에는 통계학적인 의의가 없었음을, 정 등[68]은 수면 시 전기침구를 사용할 경우 일반침구를 사용할 때에 비해 수면 전반부의 뇨중 melatonin 호르몬양이 작았음을, 김 등[69]은 melatonin 투여가 수면잠복시간과 stage-1 수

면시간에서 유의한 증가를 보였음을, 이 등[70]은 melatonin 경구 투여 시 수면 증진 효과에 대하여 보고하였다. 하지만 아직까지 한약물의 melatonin 수용체 발현과 관련된 연구는 없으므로 임상에서 불면의 처방약에 빈용되는 龍眼肉, 炒酸棗仁, 龍骨 및 牡蠣의 불면 치료효과를 실험적으로 검증하여 보고자, 수면-각성의 일주기 조절과 관련하여 대표적인 표지물질로 알려진 melatonin의 발현 정도를 실험하였다.

최근의 선행연구에 의하면 β-estradiol은 다양한 종류의 세포주에서 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현을 전사 수준에서 증가시킬 수 있었으나[71,72] C6 세포에 관한 연구는 아직 이루어진 바 없었기 때문에, 수종의 한약재가 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 C6 세포주가 *in vitro* model로 적정한지의 여부를 먼저 조사하였다. 이를 위하여 준비된 C6 세포에 다양한 농도의 β-estradiol을 다양한 시간 범위 내에서 처리하여 MTT assay에 준하여 세포의 증식에 전혀 영향을 주지 않고 세포독성 또한 나타내지 않는 범위의 시간과 농도를 설정하였다.

본 연구에 사용된 C6 신경교세포는 쥐의 신경교종에서 유래된 세포(glioma cells)로서 현재 신경계 관련 *in vitro* 실험 모델로서 가장 널리 사용되는 세포주이다. 신경교세포는 뇌의 중추신경계 내 세포의 약 90%를 차지하며, 뉴런과는 달리 신경교세포는 신경자극을 시작하거나 전도에 직접관여하지는 않지만 중추신경계의 작용에 매우 중요한 작용을 한다. 신경교세포 없이는 뉴런이 성장할 수 없고 영양을 공급받을 수 없으며, 효과적으로 시냅스를 이루거나 이용할 수도 없다. 즉 신경교세포는 중추신경계의 결합조직과 같은 기능을 하며 물리적, 대사적으로 조율자 역할을 한다. 이들은 항상 정상적인 뉴런의 기능을 위하여 뉴런을 둘러싸고 있는 특수화된 세포 외 환경을 최적 조건으로 유지하며, 적극적으로 시냅스 기능을 조절하는 중요한 세포 집단이다[73]. 본 연구 결과에서 제시하였듯이 C6 세포는 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현이 어느 정도 이루어지고 있는 세포주이며, 세포독성을 나타내지 않는 범위의 β-estradiol 처리 조건에서 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현이 증가되었기에 melatonin 수용체 발현을 연구하기 위한 적절한 *in vitro* model임을 알 수 있었다. 또한 세포독성이 없는 범위에서 전사 수준에서의 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 최고 발현 조건은 50 ng/ml 정도임을 알 수 있었다(Fig. 3).

본 연구에서 사용된 한약재 중, 龍眼肉 열수추출물(WEDL)의 경우 처리 농도 1 ~ 5 mg/ml 범위에서 C6 세포의 생존에 큰 영향이 없음을 MTT assay와 세포의 형태 및 핵의 변화로 확인하였으며(Fig. 4 및 5), 대조군에 비하여 세포의 생존에 큰 영향을 주지 않는 생존도 90% 이상의 조건에서 두 가지 melatonin 수용체 MT_1, MT_2의 발현을 조사한 결과는 Fig. 6에 나타낸 것처럼 MT_1의 발현에는 큰 변화를 주지 못하였으나, MT_2의 경우 대조군에 비하여 발현 증가를 보여 龍眼肉 열수추출물 처리 농도가 증가할수록 전사 수준에서의 발현이 점차 증가하였으며 특히 4 mg/ml 처리군에서 melatonin 수용체 MT_2의 발현이 가장 높게 나타남을 알 수 있었다. 다음은 龍眼肉 처리 조건과 동일한 방법으로 炒酸棗仁 열수추출물(WEZV)을 준비하여 C6 세포에 세포독성을 나타내지 않는 범위의 처리 조건을 설정한 후 이를 토대로 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현 변화를 조사하였다. 炒酸棗仁 열수추출물의 경우는 龍眼肉 열수추출물과는 달리 MT_2의 발현에 변화가 없었으며, MT_1의 mRNA 발현이 炒酸棗仁 열수추출물 처리 농도가 증가될수록 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 9).

龍骨 열수추출물(WEFO)의 경우에도 C6 세

포에 24 시간동안 다양한 농도로 처리하여 MTT assay 및 세포 형태변화 여부를 조사하였으며, C6 세포의 생존에 전혀 영향을 미치지 않는 조건으로 처리 농도를 10% 이내로 한정시켰다. Fig. 12에서 알 수 있듯이 龍骨 열수추출물에 의한 MT_1의 발현은 2% 처리군에서는 대조군에 비하여 큰 변화가 없었으나, 龍骨 열수추출물의 처리 농도가 증가할수록 MT_1의 발현이 크게 증가하였고, 또한 MT_2의 경우도 龍骨 열수추출물의 처리에 따라 mRNA의 발현이 증가되었는데, MT_1과 유사하게 2% 처리군에서는 대조군에 비하여 큰 변화가 없었으나, 농도가 증가할수록 발현이 증가되어 조사된 실험조건하에서 MT_1 및 MT_2의 발현이 龍骨 열수추출물의 처리에 농도 의존적으로 모두 강하게 증가되었음을 알 수 있었다. 즉 龍骨 열수추출물은 龍眼肉이나 炒酸棗仁 열수추출물과는 달리 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현을 모두 향상시켰음을 알 수 있었다. 牡蠣 열수추출물(WEOC)의 경우에도 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체 발현에 미치는 영향의 조사를 위하여 MTT assay 및 세포의 형태변화에 영향을 미치지 않는 조건을 설정한 결과, 龍骨 열수추출물처럼 10% 이내에서 실험 조건을 설정할 수 있었다(Fig. 13). Fig. 15의 결과에서 알 수 있듯이 牡蠣 열수추출물의 처리에 따라 龍骨 열수추출물의 경우에서처럼 melatonin 수용체 MT_1 의 발현이 처리 농도가 높아질수록 점차 증가되었다.

이상의 결과를 토대로 서로 다른 melatonin 수용체의 발현을 활성화시킨 龍眼肉 및 炒酸棗仁 추출물을 복합 처리하였을 경우 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현이 어떻게 변하는지를 조사하였다. Fig. 16 및 17에 나타낸 결과에서 알 수 있듯이 龍眼肉 및 炒酸棗仁 열수추출물을 동일 양 복합 처리하여도 C6 세포의 증식과 형태적 변화에 큰 영향을 아무런 영향을 주지 않았음을 알 수 있었다. 따라서 동일 조건에서 龍眼肉과 炒酸棗仁 열수추출물 동시 처리에 미치는 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현 변화를 조사한 결과 MT_1 melatonin 수용체의 경우 龍眼肉과 炒酸棗仁 열수추출물의 처리에 의하여 저농도(2 mg/ml) 수준에서 대조군에 비하여 약 3.3배 정도의 높은 발현을 유도하였으나, 이는 炒酸棗仁 열수추출물 단독 처리시 melatonin 수용체 MT_1의 최고 발현에 해당되는 조건(4 mg/ml)에 비하여 오히려 감소되었음을 알 수 있었다. 그리고 炒酸棗仁 열수추출물 단독 처리에 의해서는 발현의 변화가 없었으나(Fig. 9), 龍眼肉 단독 처리에 의하여 발현이 3.3배 이상 증가되었던 melatonin 수용체 MT_2 발현의 경우(Fig. 6), 두 추출물의 복합처리에 의하여 다소 증가되었음을 알 수 있었다. 따라서 龍眼肉 및 炒酸棗仁 열수추출물의 적절한 혼합으로 melatonin 수용체 발현 향상 및 MT_1과 MT_2의 동시 발현 유도가 가능함을 보여주었다. 이는 서로 다른 약물의 복합처리에 의한 相隨 相使작용의 시너지 효과로 추정된다.

다음은 龍骨 및 牡蠣 열수추출물 단독 처리에 의하여 C6 세포에서 세포독성이 없는 농도범위에서 두 추출물을 동시에 처리하였을 경우 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 각각 단독 처리하였을 경우 세포독성을 보여주지 않았던 두 추출물을 동시에 처리하였을 경우에도 龍眼肉과 炒酸棗仁 열수추출물을 동시 처리했을 경우와 유사하게 C6 세포의 증식에는 큰 영향을 미치지 못하였다(Fig. 17 및 19). 동일 조건에서의 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현 변화를 조사한 결과 MT_1 및 MT_2의 발현이 모두 증가되었음을 확인하였다. 그러나 龍骨 및 牡蠣 열수추출물은 각각 단독 처리하였을 경우에도 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현이 증가

되었으며, 두 추출물 각각 절반의 양을 동시에 처리하였을 경우 龍骨 단독 처리 시 나타난 경우와 매우 유사한 결과를 보여주었다. 柴胡加龍骨牡蠣湯이나 桂枝加龍骨牡蠣湯에서처럼 임상에서 龍骨과 牡蠣가 함께 사용되는 경우가 많아 이 두 약물을 복합 처리하였는데, melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2 발현의 시너지 효과는 나타나지 않았으나 적은 양으로 비슷한 정도의 발현이 되어 증강효과가 있었다(Fig. 20). 하지만 이로써 약물의 七情 또는 配伍의 중요성을 확인하는 계기가 되었고, 약물의 조합에서 나타나는 반응에 대한 좀 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

이상의 결과에서 龍眼肉, 炒酸棗仁, 龍骨 및 牡蠣의 열수추출물과 龍眼肉과 炒酸棗仁 열수추출물의 혼합물, 龍骨과 牡蠣의 열수추출물의 혼합물은 melatonin 수용체의 발현을 증가시킴을 알 수 있었고, 복합 처리의 경우에 2종의 수용체 동시 발현 및 증강효과에서 나타난 결과는 적절한 약물 배합의 중요성을 시사하여 준다. 이로 미루어 龍眼肉, 炒酸棗仁, 龍骨, 牡蠣는 melatonin의 활동 증가로 인한 수면을 증가시키는 효과가 있을 것으로 보이며, 龍眼肉과 炒酸棗仁, 龍骨과 牡蠣의 적절한 배합으로 증강 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 적절한 양성대조군을 설정한 추가 연구를 해야 할 것으로 생각된다.

본 연구의 결과에서 관찰된 다양한 한약재에 의한 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현에 관한 결과들은 전사활성 수준에서 관찰된 결과들이다. 한약재 추출물의 처리에 의한 MT_1 및 MT_2의 mRNA의 발현 증가가 가지는 의미의 해석을 위하여 전사활성에 따른 단백질 수준에서 MT_1 및 MT_2의 발현 조절도 증가되는지의 여부에 관한 추가적인 실험이 실시되어져야할 것이다. 또한 한약재의 처리에 의해 조절될 수 있는 melatonin 수용체의 발현 변화가 생체 조건에서 melatonin과 어떤 역학적 관계가 있는지, 또한 이들 수용체의 발현에 관련된 신호전달 수준에서의 분자의학적 기전 해석에 관한 구체적인 실험들도 수행되어야 할 것이다. 그럼에도 불구하고 본 연구는 한약의 효과 검증에 의미 있는 실험이었고 천연물 신약 개발에도 기여할 것으로 생각된다.

V. 결 론

임상에서 불면증에 빈용되는 龍眼肉, 炒酸棗仁, 龍骨 및 牡蠣의 열수추출물과 龍眼肉과 炒酸棗仁, 龍骨과 牡蠣 열수추출물의 혼합물이 C6 신경교세포에서 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 龍眼肉 열수추출물은 melatonin 수용체 MT_1의 발현에는 큰 변화를 주지 못하였으나 MT_2의 경우는 처리 농도가 증가할수록 발현이 증가하였다.

2. 炒酸棗仁 열수추출물은 melatonin 수용체 MT_1의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰으며 MT_2의 발현은 큰 변화가 없었다.

3. 龍骨 열수추출물에 의한 melatonin 수용체 MT_1의 발현은 2% 농도 처리군에서는 대조군에 비하여 큰 변화가 없었으나, 처리 농도가 증가할수록 크게 증가하였고 MT_2 역시 농도 의존적으로 증가되었다.

4. 牡蠣 열수추출물에 melatonin 수용체 MT_1의 발현은 농도의존적으로 증가하였으나,

MT_2의 경우는 4% 처리군에서 3.2배 증가된 후, 그 이상의 농도 증가군에서는 오히려 감소되는 경향성을 보여주었다.

5. 龍眼肉 및 炒酸棗仁 열수추출물을 복합 처리한 후 melatonin 수용체 MT_1의 발현은 저농도(2 mg/ml) 수준에서 대조군에 비하여 약 3.3배 정도의 높은 발현을 유도되었으나, 炒酸棗仁 열수추출물 단독 처리 시의 최고 발현 증가에 해당되는 조건(4 mg/ml)에 비하여 감소되었다. MT_2 발현의 경우, 두 추출물의 복합 처리에 의하여 더욱 증가되었다. 즉, 龍眼肉 및 炒酸棗仁 열수추출물의 혼합으로 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 동시 발현 유도 및 발현 증가가 나타났다.

6. 龍骨과 牡蠣의 열수추출물을 복합 처리하였을 때, melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현이 모두 증가되었으며, 또한 단독 처리 시 최고 발현에 해당하는 조건(10%, 牡蠣는 MT_2의 발현이 4%이상에서 오히려 감소)에 비하여 5%로 감소되었다. 따라서 두 추출물을 동시에 처리하였을 경우 적은 농도로 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현을 유도할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Kozier B and Erb G. Fundamental of nursing concepts & procedure. California:Eddison-Wesley Publishing Company, 1983.
2. Kales A and Kales JD. Sleep Disorders. Recent Findings in the Diagnosis and Treatment of Disturbed Sleep. N. Eng. J. Med. 1974;290:487-9
3. Morrey KM, McLachian JA and Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. J. Immunol. 1994;153:2671-80
4. Folkard S, Hume KI, Minors DS, Waterhouse JM and Watson FL. Independence of the circardian rhythm in alertness from the sleep-wake cycle. Nature 1985;313:678-9
5. Arendt J. Melatonin. Clin. Endocrinol. 1988;29:205-29
6. Frisch H, Parth K, Shobber E and W. Swoboda. Circardian patterns of plasma cortisol 17-hydroxyprogesterone and testosterone in congenital adrenal hyperplasma. Arch. Disease Childhood 1981;56:208-13
7. Lissoni P, Barni S, and Maestroni GJ. Immunotherapy with subcutaneous low-dose interleukin-2 and pineal indole melatonin as a new effective therapy in advanced cancers of the digestive tract. British J. Cancer 1993;67:1404-7
8. Gutteridge JMC. Aging and free radicals. Med. Lab. Sci. 1992;49:313-18
9. Felton G. Body rhythm effects on rotation shift work. Nursing Digest. 1976;4:29-32
10. Ramsey GM. Basic Pathophysiology - modern stress and the disease process. California:Addison - Wesley . 1982.
11. Taub JM. Acute shifts in the sleep-wakefulness cycle . Effects on performance and mood. Psychosoma Med. 1974;36:164-173
12. 양창국. 불면증의 진단과 치료. 釜山精神學

會. 1995:73-93
13. 金相孝. 東醫神經精神科學. 서울:杏林出版. 1989:140
14. 姜允皓. 東醫臨床內科. 서울:書宛堂. 1990:361
15. 李梴. 醫學入門. 서울:南山堂. 1985;3:239-40
16. 林琴. 類證治裁. 臺北:旋風出版社. 1979:257-8
17. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1974:116-7
18. 孫思邈. 備急千金要方. 서울:大星文化社. 1984:535-6, 538
19. 王燾. 外臺秘要. 北京:人民衛生出版社. 1982:91-2, 481-3, 1087, 1088, 1090, 1093-1097, 1099, 1106, 1110, 1111
20. 張仲景. 仲景全書. 서울:大星文化社. 1984:357
21. 張介賓. 類經圖翼. 서울:成輔社 1982:170-1, 174, 187-8, 191-2, 201, 206, 208-9, 222, 233, 262-5, 273, 286-7, 311
22. 楊維傑. 黃帝內經靈樞解釋. 서울:一中社. 1991:127, 252, 266, 271-2, 346-7, 351-2, 450
23. 楊維傑. 黃帝內經素問解釋. 서울:一中社. 1991:256, 290, 488-9, 607
24. 趙佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 1992.
25. 황의완, 김지혁. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1992:671-91, 683-9
26. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 1995
27. 최재홍, 이동원. 不眠症의 病因病理에 관한 문헌고찰. 동의신경정신과학회지. 2001;12
28. 노석균, 정대규. 불면의 원인 및 치방에 관한 문헌적 고찰. 동서의학. 1994;19
29. 朴文祥, 成樂箕. 睡眠障碍의 病因病機 및 鍼灸治療에 관한 文獻的 考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1998;6
30. 李俊茂, 吳世雄. 不眠症의 辨證論治. 대한침구학회지. 1999;16
31. 박태숙, 강경화, 김경철, 이용태. 불면증의 형상의학적 고찰. 동의병리학회지. 2002;16
32. 허용석, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권, 김현주. 分心氣飮加味方이 睡眠障碍와 情緖性에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 2000;11
33. 김완희, 신민규, 홍무창, 엄수훈. 가미온담탕의 투여가 수면 시간에 미치는 영향에 대한 실험적 연구. 東西醫學, 1983;18
34. 이동진, 김상효. 귀비탕전탕액이 수면시간 및 진통작용에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 東西醫學. 1979;4
35. 桂海正, 朴昌國. 不眠에 대한 東西醫學的 考察. 대한한의진단학회지. 1997;1:114-35
36. 이재혁, 백종엽, 정형섭, 박상동. 酸棗仁炒藥鍼의 不眠治療에 대한 臨床硏究. 동의신경정신과학회지. 2000;11:79-86
37. 김신미, 오진주, 송미순. 한국노인의 수면양상과 관련요인에 대한 연구. 간호학논문집. 1997;11:24-38
38. Clark A, Flowers J, Boots L and Shelttar S. Sleep disturbance in mid-life woman. J. Adv. Nursing. 1995;22:562-8
39. 송미순, 김신미, 오진주. 노인 수면연구와 간호. 정신간호학회지. 1995;4:45-64
40. Bowersox SS, Kaitin KI and Dement WC. EEG spindle activity as a function of age. Relationship to sleep continuity. Brain Res. 1985;63:526-39
41. Oswald I. Sleep as a restorative process. Human clues. Prog. Brain Res. 1980:53:279-88
42. Silverstein LD and Levy CM. The stability of the sigma sleep spindle. Electroencephal. Clinical Neurophysiol. 1976;40:666-670

43. Kales A and Kales J. Evaluation, diagnosis and treatment of clinical conditions related to sleep. J. Am. Med. Asso. 1970;213:2229-35
44. Conroy RT and Mills JN. Human Circadian Rhythms. London. J. & A. Churchill. 1970
45. Visscher CA, Bloem GM, Beersma DGM and Daan S. Reduction of human sleep duration after bright light exposure in the morning. Neurosci. Lett. 1987;73:181-6
46. Monk TH. Sleep and circadian rhythms. Exp. Gerontol. 1991;26:233-43
47. Dijk DJ, Beersma DGM, Daan S, and Lewy AJ. Bright morning light advances the human circadian system without affecting NREM sleep homeostasis. A. J Physiol. 1989;256:106-111
48. Ancoli-Israel S, Kripke DF, Mason W and Kaplan OJ. Sleep apnea and Periodic movements in the aging sample. J. Gerontol. 1985;40:419-25
49. Kryger MH, Roth T and Dement WC. Principles and Practice of Sleep Medicine. 2nd Ed. Philadelpia:WB Saunders. 1994.
50. 최소현, 김인, 서광윤. 서울거주 일반 성인의 수면양상에 관한 연구. 신경정신의학 1992;32:289-310
51. Roth T, Roehrs T and Zorick F. Determinants in adverse effects of hypnotics. In. Biological Psychitry. Ed by Shagass C. Amsterdam:Elsevier. 1986
52. Roth T and Roehrs T.: Determinants of residual effects of hypnotics. Accid Anal Prev 17. 1985:291-6
53. Coleman RM. Wide Awake at 3:00 A.M. N.Y.:W.H. Freeman and Company. 1986.
54. 김인, 최윤경, 서광윤. 서울거주 일반인의 수면 위생에 대한 인식과 실행. 신경정신의학. 1997;36:712-21
55. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 臺北:集中書局. 1977:36, 90, 217, 226
56. 宋太宗命選. 太平聖惠方. 서울:翰成社. 1979:78-9
57. 龔廷. 萬病回春. 서울:杏林書院. 1972:234
58. 陳士鐸. 石室秘錄. 서울:杏林書院. 1973:13, 48, 49
59. Axelrod JR and Snyder SH. control of hydroxyindole-O- methyltransferase activity in the rat by environmental lighting. J. Biol. Chem. 1965;240:949-54
60. Duvocovich ML and Takahashi JS. Use of 2-[125 I] iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, salmosalar L. Neuroendocrinology 1992;55:29-37
61. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA and Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain : the Mel(1b) melatonin receptor. Proc Natl Acad Sci. 1995;92:8734-8
62. Weaver DR, Liu C and Reppert SM. Nature's knockout : The Mel(1b) receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. Mol. Endocrinol. 1996;10:1478-87
63. Klein DC. The pineal gland : A model of neuroenclocrine regulation. In : Rejchlin S, Baldessarini RJ, Martin JB, eds. New York Raven:The Hypothalamus 1978;6:303

64. Brown GM. Light, melatonin and the sleep-wake cycle. J Psychiatry Neurosci. 1994;19:345
65. Lewy J, Sack RL and Blood ML. Melatonin marks circadian phase position and resets the endogenous circadian pacemaker in humans. Cil. Found Sym. 1995;183:303
66. Dolberg OT, Hirschmann S and Grunhaus L. Melatonin for the treatment of sleep disturbances in major depressive disorder. Am. J. Psychiatry 1998;155(8):1119
67. 홍영욱, 이태균, 문일수, 김동일. 二仙湯, 甘麥大棗湯, 酸棗仁湯이 serotonin, melatonin의 변화와 白鼠의 행동양태에 미치는 영향에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 1998;12:209-30
68. Hiromi T, 정영옥. 전기요가 야간 수면중 인체의 온열생리반응 및 멜라토닌 호르몬 분비에 미치는 영향. 한국생활환경학회지. 1996;3
69. 김진항, 임인수. 과다운동 후 멜라토닌 투여가 수면 중 뇌파 및 호르몬 변화에 미치는 영향. 운동과학. 2003;12
70. 이재원. melatonin이 주간 수면과 체온에 미치는 영향, 충남대학교대학원. 2000
71. Masana MI, Soares JM Jr and Dubocovich ML. 17β-estradiol modulates hMT1 melatonin receptor function. Neuroendocrinology 2005;81:87-95
72. Soares JM Jr, Masana MI, Ersahin C and Dubocovich ML. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003;306:694-702
73. Oey J. Noradrealine induces morphological alterations in nucleated and enucleated rat C6 glioma cells. Nature 1975;257:317-9