동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 20. No. 3, 2009

半夏 추출물이 생쥐의 사회·심리적 스트레스에 미치는 영향

김수연, 임세현*, 조수인†, 최창원, 김경옥

동신대학교 한의과대학, 고려대학교 간호대학*, 부산대학교 한의학전문대학원†

Effects of Pinelliae Rhizoma Extract on Sociopsychological Stress

Su-Youn Kim, Se-Hyun Lim*, Su-In Cho†, Chang-Won Choi, Kyeong-Ok Kim

College of Oriental Medicine, Dong-Shin University
College of Nursing, Korea University*
School of Oriental Medicine, Pu-San National University†

Abstract

Objectives :
The effects of Pinelliae Rhizoma extract(PRe) were tested for the anti-stress action.

Methods :
PRe was fed to ICR male mice(20±2g) orally with the dose of 100 mg/kg/day for five days. Mice were exposed to sociopsychological stress by restraining and seeing foot shock stressed mice for one hour for five days.

Results :
PRe administration had the effect of decreasing serum level of lipid peroxidation. The elevated plus-maze test is designed to detect the effect of anxiolytic drugs,and PRe administration group showed a significant increase of latency time. From Microarray, common features between mind-stimulus related genes and body-stimulus related genes were not so abundant When PRe was administered, there were some changes in distributions of mind-stimulus related genes but the distributions were not recovered to normal status.

Conclusions :
These results suggest that PRe can effectively rid the sociopsychological stress and stress concrened diseases.

투고일 : 8/10 수정일 : 8/25 채택일 : 9/4
교신저자 : 김경옥, 전라남도 나주시 대호동 동신대학교 한의과대학 신경정신과학교실
Tel : 061-729-7166, Fax : 061-725-1717, E-mail : lab3402@hanmail.net
이 논문은 2007년 2월 동신대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 박사학위 논문임

Key Words :
Pinelliae Rhizoma Extract(PRe), Stress, Corticosterone, Noradrenaline, Anti-anxiety Agents, Microarray Analysis

Ⅰ. 서 론

스트레스란 자극이나 변화에 대한 인체의 적응이 원활하게 일어나지 못한 부적응의 상태로 교감신경계가 과 활성화되어 급성 혹은 만성적으로 불쾌한 신체적, 심리적, 행동적 문제를 초래하는 것을 말 한다[1]. 만성적 스트레스는 자율신경계와 내분비계에 영향을 끼쳐 심해지면 두통, 과민성 대장증후군 등이 발생하고 신체 조절 기능이 약화되어 위궤양・당뇨병・고혈압・심장병・간경화・암 등 많은 질병의 발생과 밀접한 관계가 있는 것으로 밝혀져[2,3] 치료 및 해결책이 시급한 상황이다.

한의학에서는 감정이나 외기의 변화에 대한 생체의 반응을 氣의 변화로 설명하였는데, 七情의 偏乘 및 寒熱이 氣機乘降에 영향을 미쳐서 곧 질병을 일으킬 수 있음을 말하였다[4]. 또한, 모든 질병의 기초가 氣의 변화에서 유래하며, 氣滯로 말미암아 발생한 痰飮은 氣를 좇아 인체 내외를 流行하므로 이르지 않는 곳이 없어, 神明을 蒙蔽시켜 頭暈目眩, 精神不振이 나타나고 心神을 被蒙시키면 神昏譫妄, 癲, 狂, 癎 등의 병증을 유발한다[5].

스트레스는 현대인들에게 가장 중요한 병인 중에 하나로 항 스트레스 작용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데 임[6]은 酸棗仁 추출물의 항 스트레스 효과에 유의한 결과를 보고하였고, 원[7]은 蓮根의 사회・심리적 스트레스에 대한 효능을, 최[8]는 胡椒의 사회・심리적 스트레스에 대한 효능을, 김[9]은 擷草根의 사회・심리적 스트레스에 대한 효능을 연구 보고하였으나, 半夏의 항 스트레스 효과에 관한 실험은 찾아보기 어려웠다. 이에 저자는 祛痰之劑의 대표적 약물인 半夏에 대해 실험하였다. 化痰止嘔, 燥濕降逆, 消痞散結 등의 효능이 있는 半夏는 痰多喘咳, 痰飮眩悸, 痰厥頭痛, 嘔吐反胃, 胸脘痞悶, 梅核氣 등을 치료하는 것으로 알려져 있다[10].

실험을 위해 고안된 사회・심리적 스트레스 부하 장치에서 일정 시간 동안 스트레스를 야기 시킨 생쥐에게 半夏 추출물을 경구 투여한 후 스트레스와 관련 있는 지표 및 microarray 분석법을 이용하여 사회・심리적 스트레스가 뇌 조직에 미치는 영향을 정량적으로 측정하여 의미 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 동물

동물은 체중 20±2 g의 ICR 계 수컷 생쥐를 대한실험동물(대한실험동물, 한국)에서 구입하여 본 대학 동물 사육실에서 고형사료(삼양사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 2 주일 이상 실험실 환경(22℃, 12 시간 간격 조명)에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 半夏는 동신대학교 부속 순천 한방 병원에서 사용하고 있는 제품을 구입하여 엄선한 것을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 半夏 추출물의 조제

半夏 50 g을 증류수 1500 ml와 함께 전기 약탕기(DWP-1800T, 대웅, 한국)로 100℃에서 2 시간 전탕한 후 추출액을 부직포를 이용하여 찌꺼기를 제거한 후 동결 건조기(SFDSM06, 삼원, 한국)를 이용하여 6.6 g의 건조 추출물을 얻었다. 이를 냉동실에 신선하게 보관하였다가 실험 직전에 필요한 농도로 증류수에 녹여 시료로 사용하였다.

2) 실험동물의 분류 및 약물 투여

실험동물은 신체적 스트레스군, 정상군, 대조군 및 실험군의 4 개 그룹으로 나누었다. 신체적 스트레스군은 하루 1 시간의 전기적 충격을 부하하였고, 정상군은 아무 처치도 안하였으며, 대조군은 신체적 스트레스군을 옆에서 지켜보는 것으로써 사회·심리적 스트레스를 부하하면서 증류수를 투여하였고, 실험군은 사회·심리적 스트레스를 부하하면서 半夏 추출물을 100 mg/kg로 투여하였다. 투여 시기와 방법은 각각 1일 1 회 5 일간 스트레스 부하 30 분 전에 경구 투여하였다.

3) 스트레스 부하 장치 및 실험

스트레스 부하 실험은 Ogawa 등[11]이 개발한 것을 Shibasaki 등[12]이 보완하여 개발한 사회·심리적 스트레스 부하 장치를 사용하였다. 동물 실험을 통해서도 사람의 일상적인 사회·심리적 스트레스를 대신할 수 있도록 고안·제작된 communication box를 사용하여 ICR 계 생쥐를 실험동물로 하여 사회·심리적 스트레스 상태를 유발한 다음 半夏 추출물을 실험군에 투여하여 스트레스의 해소에 어느 정도 영향을 미치는가를 평가하였다.

사회·심리적 스트레스 부하 장치는 Fig. 1과 같이 크기가 64×64×40 cm^3로서 16 개의 작은 방(16×16 cm^2)으로 되어 있고, 그 중에서 어둡게 표시된 8개의 방바닥에 1.3 cm 간격으로 직경 0.5 cm 굵기의 동선을 깔고 foot shock으로 전기적 충격을 부하할 수 있도록 전기 장치에 연결되도록 설계되어 있다. 이들 16 개의 방 사이에는 투명한 플라스틱으로 설치하여 foot shock에 의한 전기적 충격을 방지할 수 있도록 설치했다. 전기적 foot shock은 2.0 mA의 전류를 10 초 동안 진행되며 120 초 간격으로 다시 foot shock이 부하되도록 제작되었다. 매일 오전 10 시부터 신체적 스트레스군에 1 시간의 foot shock이 부하되었다.

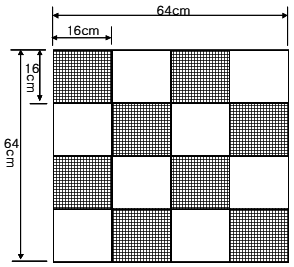


Fig. 1. Scheme of the communication box.
Foot shock mice were placed individually in the eight shaded areas(foot shock compartments). Sociopsychological mice were placed in the eight solid areas(nonfoot shock compartment). Foot shocks were delivered in shaded areas.

4) 스트레스 해소 효과 측정

(1) 혈청 중 코티코스테론 함량 측정

생쥐를 ether로 가볍게 마취시키고 3 ml 용량의 일회용 주사기(삼우, 한국)로 혈액을 복부 대정맥으로부터 1.0 ml 취하여 실온에 30 분 방치한 후 냉장원심분리기(VS6000CFN, Vision, 한국)로 1300×g로 20 분간 원심 분리시켜 상층의 혈청을 얻었다. 혈청 중 코티코스테론 함량은 Zenker와 Bernstein 방법[13]에 준해 측정하였다. 즉 혈청 0.3 ml에 증류수 0.7 ml를 넣어 혼합하고, chloroform 10 ml로 진탕하여 코티코스테론을 추출한 다음 800×g에서 5 분간 원심분리하고 상층액을 분리 제거한 후, 0.1N-NaOH 용액 1 ml을 가하고 진탕하여 2 회 이상 세척한다. 원심 분리하여 상층액을 제거하고 세척한 chloroform 층 9 ml를 취하여 3 ml의 형광시약(H_2SO_4 : 50% C_2H_5OH = 2.4 : 1)을 가하고 진탕한 뒤, 800×g에서 5 분간 원심분리하고 chloroform 층을 제거하고 잔류액을 2 시간 동안 실온에 방치한 다음 형광광도계를 사용하여 excitation 470 nm, emission 520 nm에서 측정하였다. 검량선은 표준 코티코스테론을 99% 에탄올에 용해시켜 표준 용액으로 사용하였다.

(2) 뇌 조직 내 노르아드레날린 함량 측정

뇌세포에서 노르아드레날린의 분비는 Kohno의 방법[14]에 따라 측정하였다. 뇌 조직 중 dorsal cortex 쪽을 분리하여 0.1% sodium metabisulfite ($Na_2S_2O_5$)을 포함한 0.2 N sulfuric acid(H_2SO_4) 4 ml로 저온에서 마쇄한 다음, 8000×g로 5 분간 원심 분리한다. 상층액을 2 ml 취한 다음, 0.1% $Na_2S_2O_5$와 0.05% EDTA를 포함한 0.4 N PCA 3 ml을 첨가한다. 다시 8000×g에서 10 분간 원심분리한 후 상층액은 캡 튜브에 옮긴 후 실험하기 전까지 -45℃의 냉동고에 저장한다. 노르아드레날린의 분비량 측정을 위한 파이렉스 칼럼(pyrex column : 직경 6 mm, 높이 25 cm)은 유리솜(glass wool)으로 막고 정확히 6 cm의 높이에서 pH 7.5-8.0로 활성화된 알루미나(alumina)로 채운다. 노르아드레날린은 0.05 N PCA 2 ml로써 칼럼을 통해 추출한다. 추출한 후 요오드(iodine) 시약 2 ml을 첨가하여 형광화합물로 전환시킨다. 노르아드레날린의 형광물질은 형광광도계를 사용하여 excitation 380 nm, emission 495 nm에서 측정하였다. 노르아드레날린 표준물질은 100 /ml 농도로 준비하여 표준 검량선에 의거, 노르아드레날린의 분비량(ng/g brain)을 정량하였다.

(3) 혈청 내 지질 과산화물 함량 측정

혈청 내 지질 과산화물 함량은 Uchiyama와 Mihara의 방법[15]에 준하여 측정하였다.

(4) 항 불안 효과 측정

半夏 추출물을 실험동물에 100 mg/kg/day 용량으로 5일 동안 경구 투여한 후 elevated plus-maze(Fig. 2)를 이용하여 항 불안 효과를 측정하였다. 최종 약물 투여는 실험 시작 1 시간 전에 투여가 종료되도록 하였다. 대조군은 증류수를 경구투여 하였으며 각 군은 10 마리 내외로 하였다.

약물 투여가 종료된 후 항 불안 효과의 측정은 합판으로 제작된 elevated plus-maze를 이용하였다. 이 장치는 바닥에서 50 cm 높이에 설치된 십자형 미로로서, 길이 50 cm 폭 10 cm의 4개의 통로 가운데 마주보는 2 개는 개방되어 있고, 크기가 동일한 다른 2 개의 통로는 높이 40 cm의 벽으로 둘러싸여 있다. 중심 platform은 가로 10 cm

및 세로 10 cm로 하였다.

실험을 시작할 때 생쥐는 maze의 open arm에 머리를 밖으로 향하게 놓은 다음 maze를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 행동은 5 분간 관찰하였으며, 생쥐가 open arm과 closed arm에 머문 시간, 각 arm의 출입 횟수 및 총 이동거리 등을 측정하였다.

5) 통계 처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SAS(The SAS System for Windows, ver. 6.12, SAS Institute, U.S.A.)를 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준오차(mean±S.E.)로 나타내었으며, 실험군 간 평균의 차이를 검정할 때에는 student's *t*-test로 검정하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

6) Microarray 분석

(1) RNA 분리 정제 및 Microarray 실험 조건

뇌 조직은 적출 후 곧바로 액체 질소에 넣어 얼린 뒤 -70℃에서 보관하였다. 뇌조직의 total RNA는 Qiagen 키트를 사용하여 분리하였으며, 분리된 RNA의 quality는 아가로스 젤 전기영동상의 28S/18S RNA의 존재유무 및 비율을 이용하여 측정하여 연구의 진행에 적절함을 확인 후 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 microarray는 Agilent사에서 제조한 Mouse 4_Plex chip으로 약 45,000 oligo-nucleotide가 부착되어 있다. Probe 준비와 hybridization은 3DNA array detection system(Genisphere, PA)을 이용하였다. 10ug의 분리된 RNA를 이용하여 cy3 또는 cy5 형광 물질이 부착된 cDNA로 변환 시킨 뒤 chip과 hybridization 시켰다. 공통 reference로 사용할 정상 mouse 뇌로부터 얻은 RNA는 cy3 UTP를 이용하였으며, 각 실험군으로부터 얻은 RNA는 cy5-UTP를 이용하여 형광 부착 하였다. 각 실험군의 microarray 실험 조건은 Table Ⅰ과 같다. Hybridization이 종료되면, 세척 후 GenePix 4000B(Axon Instruments, Union City, CA) 레이저 스캐너를 이용하여 스캔 image를 얻은 뒤, GenePix Pro 3.0 software(Axon Instruments, Union City, CA)를 통해 chip의 결과를 수치화 하였다.

Table Ⅰ. Design of Microarray Experiments

Groups	Cy3	Cy5
Foot Shock	Normal	Foot Shock
Control	Normal	Control
Sample	Normal	Sample

RNA from normal tissue was used as common reference which was labelled using Cy3-dUTP probe. Each RNA from samples was labelled using Cy5-dUTP according to manufacturer's instructions(3DNA array detection system: Genisphere, PA, USA)

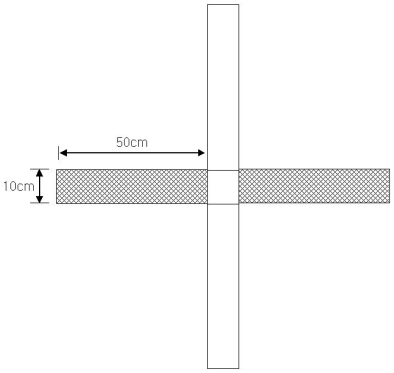


Fig. 2. A bird's eye view of elevated plus-maze.
Solid area consisted of two opposite open arms, and shaded area crossed with two enclosed arms with 40 cm high walls. The arms were connected with a central square(10×10 cm^2) to give the apparatus a plus sign appearance.

(2) Microarray 수치 분석

Microarray의 실험적 오차를 최소화하기 위하여 수치화된 RNA의 발현 비율을 변환시키는 표준화 작업을 수행하였다. 사용한 표준화 작업 방법은 Lowess 회귀 분석 방법으로 전체 RNA 발현 비율을 균일하게 유지하였다. 이후의 모든 분석은 표준화된 수치를 이용하여 수행하였다. 신호가 미약한 bad spot을 제거하기 위하여 모든 신호의 강도는 배경의 신호보다 최소 1.4배 이상인 spot 만을 사용하였다. 유전자의 패턴분석은 순차적 클러스트링 기법을 이용하였으며 Cluster와 Treeview(M.B. Eisen, http://rana.lbl.gov) 프로그램을 사용하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 혈청 중 코티코스테론 함량

신체적 스트레스군에서의 경우 646.3±18.4 ng/ml 이고, 정상군에서의 수치가 164.3±16.3 ng/ml 인데 비해 대조군에서는 387.5±52.1 ng/ml 으로 유의하게 증가하였으며, 이에 비해 실험군에서는 304.33±24.04 ng/ml로 나타나 대조군에 비하여 실험군에서 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 3).

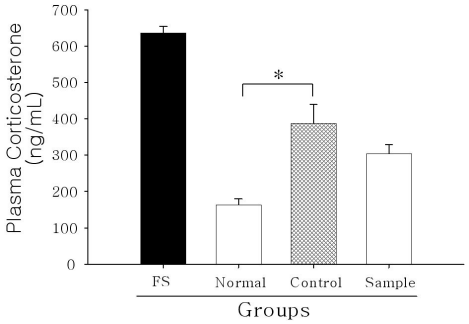


Fig. 3. Effect of Pinelliae Rhizoma extract(PRe) on corticosterone level of ICR-mice for 5 days.
FS, foot shock stress group. Normal, normal group. Control, sociopsychological stress group. Sample, sociopsychological stress group, and were administered PRe containing 100 mg/kg/day. * : significantly different when compared($p<0.05$).

2. 뇌 조직 내 노르아드레날린의 함량

신체적 스트레스군, 정상군, 대조군 및 실험군에서의 수치는 각각 75.2±8.3 ug/g brain, 206.3±13.6 ug/g brain, 130.7±9.6 ug/g brain 및 173.3±5.8 ug/g brain으로 나타나 정상군에 비해 대조군에서의 수치가 유의하게 감소하였으며, 半夏 추출물을 투여한 실험군에서는 노르아드레날린 분비량이 대조군에 비해 다시 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

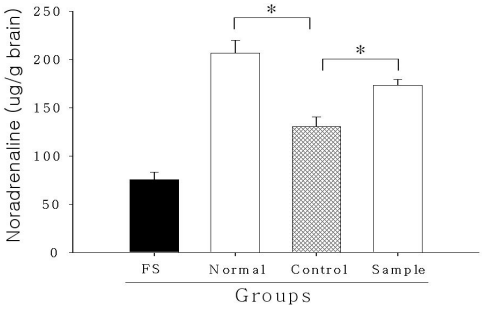


Fig. 4. Effect of PRe on noradrenaline level in brain dorsal cortex area of ICR-mice for 5 days.
FS, foot shock stress group. Normal, normal group. Control, sociopsychological stress group. Sample, sociopsychological stress group, and were administered PRe containing 100 mg/kg/day. * : significantly different when compared($p<0.05$).

3. 혈청 내 지질 과산화물 함량

신체적 스트레스군, 정상군, 대조군 및 실험군에서 각각 3.95±0.11 pmole MDA/mg protein, 3.17±0.16 pmole MDA/mg protein, 3.73±0.12 pmole MDA/mg protein 및 3.42±0.11 pmole MDA/mg protein으로 나타나 대조군의 경우 정상군에 비해 유의한 증가를 보였다. 그러나 실험군에서는 대조군과의 유의한 차이가 나타나지 않았으며 다만 감소의 경향을 보였다(Fig. 5).

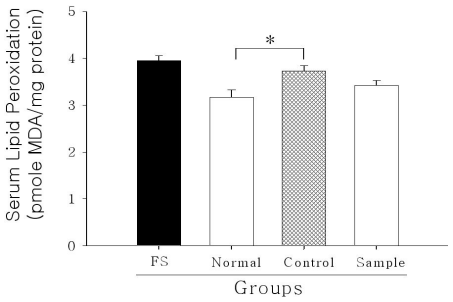


Fig. 5. Effect of PRe on lipid peroxidation in the serum of ICR-mice for 5 days.

FS, foot shock stress group. Normal, normal group. Control, sociopsychological stress group. Sample, sociopsychological stress group, and were administered PRe containing 100 mg/kg/day. * : significantly different when compared($p<0.05$).

4. 항 불안 효과

Elevated plus-maze를 이용한 반하 추출물의 항 불안 효과를 관찰한 결과 open arm에서 머무는 시간이 신체적 스트레스군, 정상군, 대조군 및 실험군에서 각각 71.7±4.5 초, 132.7±7.4 초, 59.7±7.1 초 및 101.7±5.6 초로 나타나 대조군의 경우 정상군에 비해 유의한 감소를 보였으며, 실험군에서는 다시 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 6).

Elevated plus-maze를 이용하여 open arm과 closed arm 사이의 이동 횟수를 5 분 동안 측정한 결과 신체적 스트레스군, 정상군, 대조군 및 실험군에서 각각 12.0±0.9 회, 8.8±0.8 회, 11.2±1.1 회 및 11.0±1.1 회로 나타나 각 군 간의 차이가 없었다(Fig. 7).

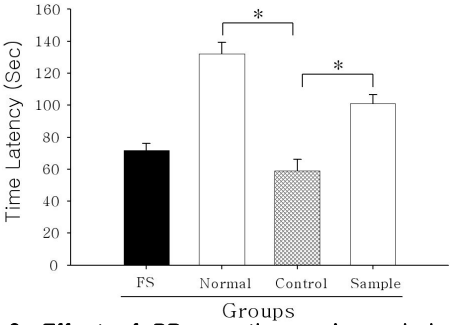


Fig. 6. Effect of PRe on the sociopsychological stress on the time spent in open arms of the elevated plus-maze test in mouse.

Values represent mean±S.E. of eight mice per group. FS, foot shock stress group. Normal, normal group. Control, sociopsychological stress group. Sample, sociopsychological stress group, and were administered PRe containing 100 mg/kg/day. * : significantly different when compared($p<0.05$).

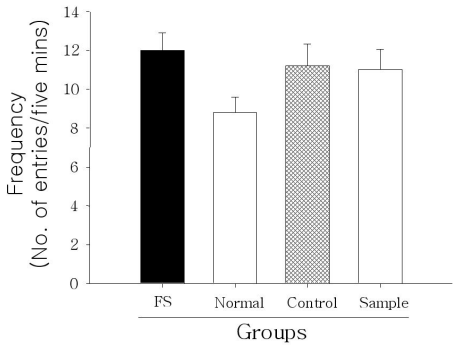


Fig. 7. Effect of PRe on the sociopsychological stress on the number of arm entries into the closed arms of the elevated plus-maze test in mouse.

Values represent mean±S.E. of eight mice per group. FS, foot shock stress group. Normal, normal group. Control, sociopsychological stress group. Sample, sociopsychological stress group, and were administered PRe containing 100 mg/kg/day.

5. Microarray 결과

1) Microarray 분석 후 얻어진 원본 image

Spot의 색을 통해 실험군 3개 모두 Cy3와 Cy5의 비율이 거의 비슷하다는 사실을 알 수 있다. 이는 실험군에서의 RNA 발현이 정상군과 비교했을 때 큰 차이가 없다는 것을 의미한다(Fig. 8). 이후의 분석에서 데이터를 표준화하여 사용하였으며, 구체적 방법은 본문에 나타내지 않았다.

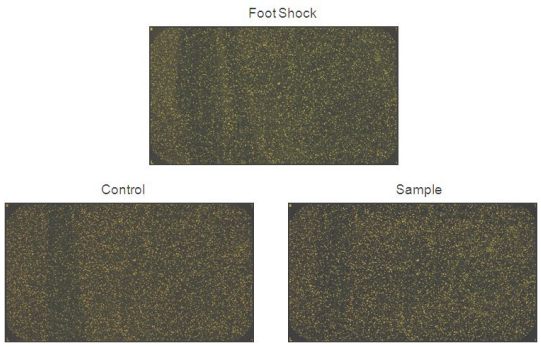


Fig. 8. Raw images of microarrays.
Each microarray was hybridized with labelled samples consisting of common reference(Cy3) and each experimental sample(Cy5). After hybridization, microarray slide was scanned using laser scanner(GenePix 4000B: Axon Instruments, CA, USA).

2) 유전자 발현패턴 분석

유사도가 높은 유전자 군끼리 서로 뭉치도록 하는 순차적 클러스터링 기법을 이용하였다. 적색은 발현이 증가된 유전자를, 청색은 발현이 감소된 유전자를 나타내며, 그 색의 강도는 발현비율과 비례한다. 3개의 실험군의 유전자 발현 패턴이 유사 하다는 것을 확인 할 수 있다(Fig. 9).

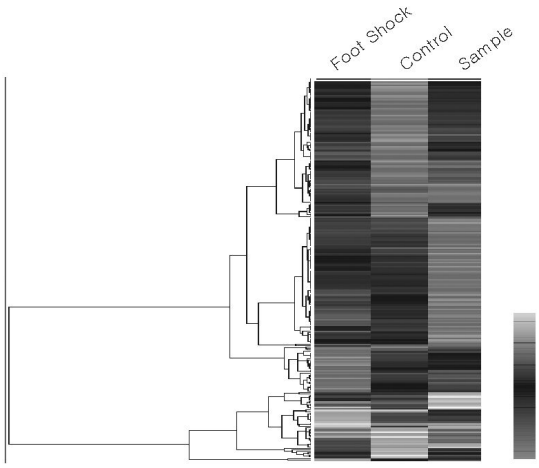


Fig. 9. Clustering analysis of expressional profiling.
Normalized data were hierarchically clustered on ratio of gene expression. Columns represent each experimental group and rows represents genes. Red color means up-regulated genes and greed color means down-regulated genes over reference genes. Scale bar shows relationship between color and ratio.

3) 변화된 유전자의 수와 종류

신체적 스트레스군에서 17개의 유전자가 정상군에 비해 절반이하의 발현도를 나타내었다. 대조군에서 발현이 감소한 유전자의 수는 22개로 약간 증가하였으나 큰 차이를 보이지는 않았다. 실험군에서의 발현이 감소된 유전자의 수는 19개로 이전과 마찬가지로 유의한 차이를 보이지 않았다. 발현이 2배 이상 증가된 유전자를 기준으로 보면, 신체적 스트레스군에서 32개의 유전자가 발현이 증가하였다. 대조군에서 발현이 증가된 유전자의 수는 89개로 크게 증가하였으며, 실험군에서는 107개로 더욱 증가하였다. 개별 유전자의 종류를 비교하여 보면, 신체적 스트레스군에서 발현이 감소된 유전자 17개 중에서 대조군에서는 4개만이 여전히 발현이 감소되어 있고, 실험군에서도 4개만이 발현이 감소되어 있었다. 신체적 스트레스군에서 발현이 증가한 유전자 32개의 경우, 대조군과 실험군에서 전부 혹은 대부분의 유전자 발현이 정상으로 회복되었다(Table Ⅱ).

Table Ⅱ. Number of Under or Over Expressed Genes

	Foot Shock	Control	Sample
Decrease	17	22	19
Increase	32	89	107
Decrease	17	4	4
Increase	32	0	1

The number of under expressed genes(below 0.5 fold ratio) or over expressed genes (over 2 fold ratio) were measured in each experimental condition (upper panel). Lower panel shows the change of numbers of under or over expressed in control group according to experimental conditions.

Ⅳ. 고 찰

스트레스는 개인으로 하여금 적응에의 요구를 강요하는 신체적 또는 심리적인 압박상태로, 과도하고 지속적인 경우에는 개인의 잠재적 능력을 소모시켜 기능 장애를 유발하게 되며[16], 이를 Hans Selye는 신체가 어떤 요구에 대하여 일으키는 신체의 불특정의 반응이라 정의하였으며, 불특정이라는 용어는 상이한 스트레스를 주는 자극들에 의해서 일어날 수 있는 동일한 형태의 반응들을 의미하는 것으로 사용하였다[17]. 스트레스 초기에는 경고 반응이 나타나는데 두통, 미열, 피로, 식욕부진, 무력감, 근육통 등의 증상과 심신의 저항력이 감소되고, 이 단계에서 스트레스가 해소되지 못하면 저항단계에 이르게 되어 뇌하수체에서 부신피질 자극호르몬과 부신에서 부신피질 호르몬이 분비되어 스트레스 반응을 완화하게 된다. 이 상태에서 스트레스가 주어지면 피로기에 이르는데 이때에는 뇌하수체나 부신에서의 호르몬 분비가 충분히 이루어지지 못하여 초기의 증상들이 다시 나타나게 되며 정신적 불균형으로 인한 불면증, 불안, 적개심, 억제된 분노 등을 초래하기도 한다[17-19].

한의학은 스트레스 인자에 대해 『靈樞·口問編』[20]에서는 氣候, 情動, 飮食, 起居 등으로, 『三因方』[21]에서는 內因, 外因, 不內外因으로 보았으며, 특히 『素問·擧痛論』[22]에 怒하면 氣上하고, 喜하면 氣緩하며, 悲하면 氣消하고, 恐하면 氣下하며, 驚하면 氣亂하고, 思하면 氣結한다고 하여 七情의 偏勝이 氣機乘降에 영향을 미쳐서 곧 질병을 일으킬 수 있음을 말하였다.

이런 현상에 대하여 김[23]은 정신작용 및 外氣의 변화 등이 맥관 및 내장지배신경인 자율신경의 긴장과 이완이라는 현상을 가져와 五臟의 虛實, 血虛, 精損, 氣虛, 氣의 순환장애, 痰涎, 火 등의 병적인 요인을 만든다고 하였다.

痰飮은 肺, 脾, 腎 및 三焦의 氣化기능의 실조로 인해 水飮의 凝聚로 말미암아 형성되는데, 이러한 痰飮은 氣를 좇아 인체 내외를 流行하므로 이르지 않는 곳이 없고 經脈에 流注하여 經脈氣血의 운행을 阻滯하며 또한 臟腑氣機의 升降失常을 유발한다. 痰飮은 頭目眩暈, 惡心, 嘔吐, 心悸氣短 등의 증상을 포괄하며, 神明을 蒙蔽시켜 頭痛, 精神不振이 나타나고 心神을 被蒙시키면 神昏譫妄, 癲, 狂, 癎 등의 병증을 유발한다[5].

임상적으로 半夏는 祛痰의 목적으로 梅核氣 및 두통, 현훈 등의 다양한 신경성 질환에 많이 응용되고 있어 실험에 사용하였는데, 半夏(Pinelliae Rhizoma)는 천남성과(天南星科: Araceae)에 속한 다년생초본인 끼무릇(*Pinellia ternata (Thunb.) Breitenbach)*의 코르크층을 제거한 덩이줄기를 7월 및 8월경에 채취하여 외피를 벗기고 건조한 것으로, 性은 溫하고 味는 辛하며 脾, 胃, 肺로 歸經하고, 化痰止嘔, 燥濕降逆, 消痞散結 등의 효능이 있어 痰多喘咳, 痰飮眩悸, 風痰眩暈, 痰厥頭痛, 嘔吐反胃, 胸脘痞悶, 梅核氣 등을 치료하는 것으로 알려져 있다[10]. 半夏의 효능에 관한 실험적 연구로써 장[24] 등이 비만유도 白鼠의 체중, 부고환 지방조직, 혈액 및 유전자 변화에 관한 유의한 결과를 보고하였고, 김[25] 등이 T3로 유발한 임신오저 白鼠에서 薑半夏와 淸半夏의 혈청 중 gastrin의 유의한 감소와 K^+의 유의한 증가를 보고하였다. 또 홍[26] 등이 半夏 약침액의 기관지 분비물억제작용으로 천식치료에 유의한 결

과를 보고하였으나, 半夏의 사회·심리적 스트레스에 관한 실험연구는 아직 접하지 못하였다. 따라서 본 연구에서는 半夏를 재료로 하여 그 추출물의 투여가 스트레스의 해소에도 효과적으로 작용하는지 확인하기 위하여 스트레스와 관련된 몇 가지 지표 및 스트레스로 인한 생체의 변조를 개선할 수 있는지를 살펴보았다.

부신 피질계 스테로이드 호르몬인 코티코스테로이드는 세 가지 종류로서 코티졸, 코티코스테론, 알도스테론이 있는데, 이 중 코티코스테론은 스트레스 자극에 의하여 분비량이 증가된다[27]. 실험에서 신체적 스트레스군은 수치가 크게 증가하였고, 대조군은 정상군보다 증가하였으며, 실험군은 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지는 않았다(Fig. 3).

사람이 스트레스를 받으면 신경 전달 물질이나 일부 호르몬의 분비에 이상을 가져오는 것으로 알려져 있으며[28], 특히 노르아드레날린이란 호르몬이 대뇌 dorsal cortex, hypothalamus 등에서 분비가 억제되는 것으로 보고되고 있다[29]. 또한 시행방법에 있어 실험개체에 shock을 주면서 이를 실험 개체가 피할 수 없도록 조작된 uncontrollable군에서는 대뇌 노르아드레날린의 수준이 감소되게 되며, 이는 노르아드레날린의 이용과 요구가 합성을 능가하기 때문인 것으로 설명되고 있다[30]. 노르아드레날린의 분비량에 미치는 半夏 추출물의 영향을 분석한 결과 대조군의 노르아드레날린 분비량에 비해 실험군에서 유의하게 증가하여 半夏의 항 stress 효과 가능성을 보여주었다(Fig. 4).

활성 산소의 공격에 의한 지질과산화 반응으로 생성되는 과산화 지질의 생성은 강한 세포 독성을 나타내기 때문에 이의 혈액 중 함량은 성인병의 重症度 뿐만 아니라 노화 과정에 관여한다는 사실이 밝혀져 있으므로[31], 혈청 내 지질 과산화물의 생성을 억제할 수 있다면 질병의 예방과 치료에 효과적일 것으로 추정할 수 있다. 半夏 추출물 투여가 혈청 내 지질 과산화물 생성량에 영향을 미치는가를 조사하였는데, 대조군과 실험군과의 차이가 유의하지 않았으며 다만 감소의 경향을 보였다(Fig. 5).

Elevated plus-maze test는 항 불안효과가 있는 약제를 개발하기 위해 고안된 장치이다. 쥐는 본능적으로 밝은 곳에서 두려움을 느끼므로 open arm에서 머무르는 시간이 길수록 불안에 대한 내성이 있다고 할 수 있다. 본 실험에서는 실험군에서 대조군에 비해 유의한 증가를 보여 항 불안효과에 대한 가능성도 보여주었다(Fig. 6).

인간 유전자의 분석이 최근 마무리됨으로써 탄생하게 된 Microarray기술을 이용한 대량의 유전자분석법은 종양을 비롯한 수많은 질환에서 유전자 발현의 변화를 찾아내는데 큰 기여를 하고 있는데[32], 현재까지는 주로 약물에 대한 신경세포를 이용한 뇌신경학적 연구가 많이 이루어졌으나[33-34] 본 실험에서는 정신적 자극이 뇌신경세포에 미치는 영향을 정량적으로 측정해보았으며 의미있는 결과를 얻었다.

Microarray로 본 검사결과 신체적 스트레스 또는 사회·심리적 스트레스를 주었을 경우 둘 다 모두 발현이 증가 또는 감소된 유전자의 수가 매우 적게 추출되었다. 전체 분석 유전자를 기준으로 보면 약 0.1%에 해당하는 수치이며, 이는 신체적 혹은 사회·심리적 스트레스 유발이 뇌세포의 전체 유전자 발현에는 거의 영향을 미치지 않았다는 것을 의미한다. 유전자의 발현 패턴을 본 결과, 각각의 실험군에서 유전자의 발현정도

가 유사함을 확인 할 수 있었고, 특히 발현이 증가한 유전자의 수가 발현이 감소한 유전자의 수보다 많음을 확인할 수 있다. 이런 결과는 Table Ⅱ의 유전자 수의 분포와 일치하는 것으로써, 각 실험군에서 유전자 발현의 비대칭성이 형성 되어 있다는 것을 의미한다. 이런 발현도의 비대칭성은 각 실험군에서 일어나는 유전자의 발현조절이 어떤 특정한 패턴을 통해 이루어지고 있다는 것으로 추정되는데, 차후 이 부분에 대한 자세한 연구가 진행되어야 할 것이다. 개별 유전자 수의 분포를 보면, 신체적 스트레스에 의해 발현이 감소한 유전자의 수는, 대조군 및 실험군에서도 거의 비슷한 개수의 유전자에서 발현이 감소되어 있다. 반면 신체적 스트레스에 의해 발현이 증가된 유전자 수는 대조군에서 약 3 배가량 그 수가 증가하였으며, 실험군에서 더욱 증가하는 결과를 확인할 수 있다. 이는 신체적 스트레스와 사회·심리적 스트레스가 뇌의 유전자 발현에 미치는 영향이 서로 차이가 있음을 보여주며 각각이 독립적인 형태로 작용 할 수도 있음을 의미한다. 대조군과 실험군을 비교해 볼 때는 유의한 유전자 수의 변화를 얻을 수 없었다. 개별 유전자의 종류를 추적한 결과에서도 비슷한 결론을 얻을 수 있다. 신체적 스트레스에 의해 발현이 증가 혹은 감소된 유전자들은 대조군과 실험군에서는 대부분 정상수준으로 회복되어 있음을 확인 할 수 있다. 즉 사회·심리적 스트레스와 관련된 유전자와 신체적 스트레스에 관련된 유전자 사이에는 공통점이 크지 않다는 결론을 내릴 수 있으며, 약물 처리 시 사회·심리적 스트레스과 관련된 유전자들의 분포에 변화가 있지만 정상수준으로 회복시키는 수준은 아닌 것으로 판단된다.

이상의 결과들을 종합하여 보면 사회·심리적 스트레스가 부하된 5일 동안 半夏 추출물을 함께 투여하면 그 결과로 스트레스를 효과적으로 해소할 수 있다는 것을 알 수 있으며 아울러 스트레스로 인해 발생하는 여러 병리적인 지표들의 증가도 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. Microarray 상에서는 신체적 스트레스에 관련된 유전자와 정신적 스트레스와 관련된 유전자 사이에 공통점이 크지 않다는 것을 알 수 있었으며 앞으로 半夏의 이러한 작용에 어떠한 기전들이 관여하는지 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

半夏 추출물이 사회·심리적 스트레스에 미치는 영향을 확인하기 위하여 사회·심리적 스트레스를 부하하면서 半夏 추출물을 100 mg/kg로 5 일간 투여한 후 스트레스 및 이로 인한 병리적 지표들을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 半夏 추출물 투여로 혈청 중 코티코스테론이 유의하지 않지만 감소의 경향을 보였다.

2. 半夏 추출물 투여로 뇌의 dorsal cortex 부분의 노르아드레날린 함량은 유의하게 증가하였다.

3. 半夏 추출물 투여로 혈청 내 지질 과산화물의 함량은 유의하지 않지만 감소의 경향을 보였다.

4. 半夏 추출물 투여로 elevated plus-maze에서 open arm에 머무는 시간이 실험군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 그러나 open arm과 close-arm과의 이동횟수에는 유의한 변화가 없었다.

5. Microarray 상 사회·심리적 스트레스에 관련된 유전자와 신체적 스트레스에 관련된 유전자 사이에는 공통점이 크지 않다는 결론을 내릴 수 있었으며, 半夏 추출물 투여시 사회·심리적 스트레스와 관련된 유전자들의 분포에 변화가 있지만 정상수준으로 회복시키는 수준은 아닌 것으로 판단되었다.

이상의 내용으로 미루어 半夏 추출물이 스트레스를 효과적으로 해소시킬 뿐만 아니라 스트레스로 인한 생체의 각종 질병발생 억제에도 작용함을 알 수 있어 불안, 긴장, 불면, 두통 등의 스트레스 관련 질환에 치료 약물로 개발 가능할 것으로 생각되며, 추후 더 체계적인 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 고희정. 일차진료에서 스트레스 관리 전략. 대한가정의학회지. 2000;21(2):125-36.
2. Selye H. Forty years of stress research. Principal remaining problems and misconceptions. Can Med Assoc J. 1976 ;115:53-6.
3. Stone EA. Stress and catecholamines. In A. J. Friedhoff (ed.), Cathecholamines and Behavior. Plenum Press. New York. 1975;2:31-72.
4. 文濬典, 安圭錫, 崔昇勳. 東醫病理學. 서울: 高文社. 1990:23-2, 78-9.
5. 채우석. 한의학개론. 서울:대성문화사. 1997 :219.
6. 임동석. 酸棗仁 추출물의 항 스트레스 효과. 동신대학교한의과대학원석사. 2003.
7. 원호영. Effects of Nodus Nelumbinis Rhizomatis Extract on Sociopsychological stress in Mice. 동신대학교한의과대학원 석사. 2004.
8. 최재홍. Effects of Piperis Nigri Fructus Extract on Sociopsychological stress in Mice. 동신대학교한의과대학원박사. 2005.
9. 김은정. Effects of Valerianae Radix Extract on Sociopsychological stress in Mice. 동신대학교한의과대학원박사. 2005.
10. 韓醫科大學 本草學 編纂委員會. 서울:永林社. 2004:487-8.
11. Ogawa N, Kuwahara K. Psychophysiology of emmotion-communication of emotion. Jpn J Psychosom Med. 1996;6:352-7.
12. Shibasaki T, Imaki T, Hotta M, Ling N and Demura H. Psychological stress increases arousal through brain corticotropin -releasing hormone without significant increase in adrenocorticotropin and catecholamine serection. Brain Res. 1993 ;618:71-5.
13. Zenker N, Bernstein DE. J. Biol. Chem. 1958;231:69.
14. Kohno Y, Matsuo K, Tanaka M, Furukawa T and Nagasaki N. Simultaneous determination of noradrenaline and 3-methoxy-4hydroxy -phenylethylene-glycol

sulfatein discrete brain regions of the rat, Anal Biochem. 1979;97:352-8.
15. Uchiyama M and Mihara M. Determination of malonaldehyde precusor in tissue by thiobarbituric acid test., Anal. Biochem. 1987;86:271-8.
16. 이병태. 정신의학사전. 서울:일조각. 1990:272.
17. 홍대식 역. 심리학개론. 서울:박영사. 1992 :603-4, 606, 608.
18. 이수원. 심리학. 서울:정민사. 2002:274-5.
19. Kolb & Brodie 著. 이근후 譯. 최신임상 정신의학. 서울:하나의학사. 1985:498-500.
20. 洪元植. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學 硏究院 出版部. 1985:158-9, 286.
21. 陳言. 陳無擇三因方 2卷. 臺北:臺聯國風出 版社. 1978:6.
22. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學 硏究院 出版部. 1985:14, 101, 146, 217.
23. 김상효. 동의신경정신과학. 서울:행림출판 사. 1980:258-64, 277-9, 360-1.
24. 신현대, 장병수, 이종수, 정석희, 김성수. 半夏가 비만유도 백서의 체중, 지방조직, 혈액 및 유전자 변화에 미치는 영향. 한 방재활의학회지. 1999;9(1):103-28.
25. 김규섭, 강효신. 生半夏, 薑半夏 및 淸半 夏가 T3로 유발된 백서의 임신오저에 미치는 영향. 제한동의학술원논문집. 1997 ;2(1):83-99.
26. 홍재화, 서정철, 임성철, 정태영, 한상원. 半夏 약침액이 사람 기관지 상피세포의 TARC 분비에 미치는 영향. 대한침구학 회지. 2005;22(1):155-64.
27. 대한신경정신의학회. 신경정신과학. 서울: 하나醫學社. 1998:465-9.
28. Selye H. The alarm reaction. Can Med Assoc J. 1936;34:706-11.
29. Maria K, Elizabeth J, Matti AL, Michalils M and Maris M. Noradrenalline, Dopamine, Serotonin:Different effects of Psychological stress on Brain Biogenic Amines in Mice and Rats. Pharmacological Research. 2000;40(3):341-6.
30. 양병환, 백기청, 김정희, 백인호, 강병조, 김광수, 한창환, 원호택, 임기영. 스트레 스연구. 서울:하나의학사. 1999:87-8.
31. Yagi K. Lipid peroxides and human disease. Chemistry and Physics of Lipids. 1987;45:337-51.
32. Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO and Davis RW. Parallel human genome analysis. Microarray-baxed expression monitoring of 1000 genes. Proc Natl Acad Sci USA. 1996 ;93(20):10614-9.
33. Raza SM, Fuller GN, Rhee CH, Huang S, Hess K, Zhang W and Sawaya R. Identification of necrosis-associated genes in glioblastoma by cDNA microarray analysis. Clin Cancer Res. 2004;10:212-21.
34. Damodaran TV, Greenfield ST, Patel AG, Dressman HK, Lin SK and Abou-Donia MB. Toxicogenomic studies of the rat brain at an early time point following acute sarin exposure. Neurochem Res. 2006;31(3):367-81.