동의신경정신과 학회지 제21권 제2호(2010년 06월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(2):103-123

天王補心丹, 溫膽湯, 歸脾湯이 멜라토닌 수용체 발현에 미치는 영향

조윤송, 김보경

동의대학교 한의과 대학원 한방신경정신과학교실

Effects of *Tianwangbuxin-dan*, *Wendan-tang*, *Guipi-tang* on the expression of MT_1 and MT_2 melatonin receptors in C6 glial cells

Yun-Song Cho, Bo-Kyung Kim

Dept. of Neuropsychiatry, Undergraduate school of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Abstract

Objectives :
This study was to investigate the effect of several herbal prescriptions such as *Tianwangbuxindan qu zhusha*, *Tianwangbuxindan*, *Wendantang*, *Guipitang* on the level of MT_1 and MT_2 melatonin receptors in C6 glial cells.

Methods :
For this study, we exposed of C6 cells to several herbal prescriptions resulted in non-cytotoxic in various dose as measured by MTT assay, trypan blue count, morphology change and DAPI stain.

Results :
Tianwangbuxindan qu zhush and *Tianwangbuxindan* induced the levels of MT_1 melatonin receptor expression in a dose-dependent manner without altering the level of MT_2 melatonin receptor expression. However, the treatment with *Wendantang*, *Guipitang* don't effect of MT_1 and MT_2 melatonin receptor expression.

Conclusions :
This results suggest that *Tianwangbuxindan* can be a promising the regulation of melatonin receptor synthesis, and further studies will be needed to clarify the mechanism.

Key words :
Tianwangbuxin-dan qu zhusha, *Tianwangbuxin-dan*, *Wendan-tang*, *Guipi-tang*, MT_1 and MT_2 melatonin receptors

투고 : 2010. 5. 14. 수정 : 2010. 6. 2. 채택 : 2010. 6. 3
교신저자 : 김보경, 부산시 진구 양정2동 산25-1 동의대학교 부속한방병원 한방신경정신과
Tel) 051-850-8809, Fax) 051-867-5162, E-mail) npjolie@deu.ac.kr
이 논문은 2010년 2월 동의대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 석사학위 논문임.

Ⅰ. 서 론

수면은 인간 생활의 약 1/3 이상을 차지하며, 휴식과 안정의 기회를 제공하여 신체적, 정신적 피로 회복에 도움을 주고, 일상생활을 유지시키는 기본적인 삶의 부분이다[1]. 인체는 일주기 각성체계를 통해 체내 생리의 주기성과 외부환경의 변화를 조화시킴으로써 최적의 건강상태를 유지하지만, 주야교대근무, 장거리 여행 등과 같은 환경의 자극은 일주기 리듬의 교란과 관련된 스트레스를 유발하여, melatonin 같은 신경전달물질 등의 생리적 요소가 변화되고, 수면장애와 피로, 식욕부진, 우울 등의 신체적·정신적 문제가 야기되기도 한다[2,3].

Melatonin은 송과선에서 생성·분비되는 호르몬으로, 송과선은 頭部의 피부를 통과하여 들어오는 빛을 받아들일 수 있어서 광주기를 통해 생식활동의 일주성, 연주성 등 생체 리듬에 관여하는 호르몬을 형성한다. melatonin은 생체시계의 역할을 하는 송과선에 의해 오후 10시에서 새벽 4시 사이에 가장 많이 분비되어 수면을 유도하고 휴식을 취하게 되고, 수면 상태에서 melatonin은 스트레스의 원인인 코티코스테론의 면역 억제효과를 상쇄시킨다[4-10].

『靈樞·營衛生會篇』에서는 수면의 기전에 대해서 "脈中을 行하는 營氣와 脈外를 行하는 衛氣가 하루에 전신을 50回씩 순환하는 데 衛氣는 陰分을 25回 行하고 陽分을 25回 行하여 晝夜로 나누어지며 衛氣가 陽分에 이르면 일어나게 되고, 陰分에 이르면 잠을 자게 된다."고 하였다. 그리고 『靈樞·口問』에서도 역시 衛氣가 낮에는 陽分을 行하고 夜半에는 陰分을 行하는데, 陽氣가 다하고 陰氣가 盛하면 目瞑하여 잠을 자고, 陰氣가 다하고 陽氣가 盛하면 깨어난다고 하였다[11].

한의학에서 不眠은 不寐[12,13], 不睡[12,14], 失眠[13], 不得臥[12,15-17], 不得眠[16], 臥不安[12,18], 不得安寢[18], 目不瞑[15], 少寐[19] 등으로 표현되고 있으며, 思結不睡, 榮血不足, 心腎不交, 心膽虛怯, 痰涎鬱結, 胃中不和로 원인을 분류하여, 변증에 따라 歸脾湯, 補血安神湯, 天王補心丹, 酸棗仁湯, 溫膽湯, 去痰淸神湯, 香砂養胃湯, 分心氣飮 등 다양한 처방을 사용한다[20].

天王補心丹은 동물실험을 통한 약리 작용으로 중추신경억제, 혈관확장, 혈압강하, 이뇨작용이 보고되었고[21], 항스트레스 효과[22]와 항우울 효과[23]에 유의한 것으로 보고되었다. 天王補心丹의 구성 약물 중 朱砂는 硫化水銀(HgS)을 함유한 鑛石으로, 鎭心·安神·定驚의 主藥이 되지만, 有毒하여 修治를 반드시 필요로 한다[24]. 溫膽湯은 mouse의 체위 보행상태 등 일반 행동에 있어 중추억제작용을 나타냈으며, mouse의 수면지속시간을 연장시켰다고 보고되었다[25]. 또, 이 등[26]은 歸脾湯加熟地黃이 생쥐의 thiopental sodium에 의한 수면시간 연장에 관한 효과가 있는 것을 보고하였고, 오 등[27]은 歸脾湯이 斷續的인 電氣刺戟 및 浸水刺戟으로 유발된 驚, 恐情에 대해 유의성 있는 억제 효과가 있는 것을 보고하였다. 최근, 김 등[28]은 불면의 처방약에 빈용되는 한약재인 龍眼肉, 炒酸棗仁, 龍骨 및 牡蠣의 불면 치료 효과를 일주기 리듬을 측정하는 대표적인 표지자로 알려진 melatonin의 수용체 발현과 관련하여 실험적으로 검증하였다.

이에, 저자는 임상에서 불면에 다용되는 天王補心丹 去 朱砂, 天王補心丹, 溫膽湯, 歸脾湯의 불면에 미치는 효과를 실험적으로 검증하여 보고자, 각각 처방의 열수추출물을 C6 신경교종세포에 처리하여 melatonin 수용체 MT_1 및 MT_2의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은

지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 시료준비

본 실험에 사용된 天王補心丹 去 朱砂, 天王補心丹, 溫膽湯, 歸脾湯은 부산 해운대구 소재의 'ㅎ'한의원에서 제공받아 사용하였다(Table 1). 天王補心丹 去 朱砂, 天王補心丹, 溫膽湯, 歸脾湯 각각의 분량을 2000 ml의 3차 증류수를 이용하여 3시간 이상 끓인 후, 여과지로 필터한 후에 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하여, 다시 이를 0.45 μm의 필터를 이용하여 여과한 후 동결 건조하여 수율을 조사하였다(Table 2). 건조산물을 3차 증류수에 200 mg/ml로 용해하여 고압증기멸균으로 멸균하여 사용하였다.

2. C6 세포의 배양조건

본 실험에서 사용한 C6 쥐 신경교종세포(rat glioma cell)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 사용하였다. 세포의 배양을 위해 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)과 1% penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 DMEM 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 사용하였다. 세포는 37℃, 5% CO_2 조건하에서 배양하였으며, 성장배지의 교환은 매 48시간 마다 해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 T-75 plask (Nunc, Denmark)에 계대배양 하였다.

3. 약재의 처리

준비된 약재 추출 용해물은 -20℃에 보관하였으며, 필요시에 녹여서 성장배지에 희석하여 실험에 사용하였다. 실험을 위하여 C6 세포를 분주한 후 24시간 동안 안정화하여, 선행 연구[28]에 따른 조건에 준하여 天王補心丹 去 朱砂, 天王補心丹은 0.1 ~ 0.5 mg/ml로, 歸脾湯과 溫膽湯은 1 ~ 5 mg/ml로 배지에 희석하여 24시간 동안 처리하였다.

4. MTT assay를 이용한 세포 생존율의 측정

세포배양용 6 well plate에 C6 세포를 1×10^5 cell/ml로 희석한 세포액을 2 ml/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 약재 열수추출물을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 2 ml씩 분주하고 3시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 2 ml씩 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 오차를 구하였다.

5. Trypan blue counting을 통한 세포 성장도의 조사

세포배양용 6 well plate에 C6 세포를 1×10^5 cell/ml로 희석한 세포액을 2 ml/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 약재 열수추출

물을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 phosphate-buffered saline (PBS)를 각 well당 적정량 첨가하여 세포를 모은 후 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액만 제거하고 세포만 남긴 다음 다시 PBS를 첨가하여 잘 섞은 후 세포 부유액과 0.5% trypan blue (Gibco BRL)를 동량 섞어 2분간 처리하였다. 이를 hemocytometer로 옮긴 후 위상차 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 푸른색으로 염색된 세포를 죽은 세포로 추정하고 염색되지 않은 살아있는 세포의 수를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 구하였다.

6. 위상차 현미경을 이용한 세포형태의 관찰

세포배양용 6 well plate에 C6 세포를 1×10^5 cell/ml로 희석한 세포액을 2 ml/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후 약재 열수추출물을 배지에 희석하여 처리하여 배양한 후, 위상차 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 axiovision 프로그램을 이용하여 사진을 촬영하였다.

7. DAPI 염색을 통한 핵 형태 관찰

세포배양용 6 well plate에 C6 세포를 1×10^5 cell/ml로 희석한 세포액을 2 ml/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 약재 열수추출물을 배지에 희석하여 처리하여 배양한 후, 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 phosphate-buffered saline (PBS)를 각 well당 적정량 첨가하여 세포를 모은 후 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액만 제거하고 세포만 남긴 다음 formaldehyde solution (Sigma)과 PBS를 1 : 9 비율로 섞은 fixing solution을 500 μl 첨가하여 충분히 섞은 후, 상온에서 10분간 고정하였다. 다시 2000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 고정액을 제거한 후 PBS 200 μl를 넣어 충분히 섞은 후, 슬라이드 글라스 위에 세포 부유액을 적당량 떨어뜨린 다음 1000 rpm에서 5분간 cytospin 하였다. Cytospin이 끝난 후에 PBS로 2 ~ 3회 세척하고 PBS가 마르기전에 0.2%의 Triton X-100 (Ameresco, Solon, Ohio, USA)을 떨어뜨린 후 상온에서 10분간 두었다가, 다시 PBS로 2 ~ 3회 세척하고 2,500 : 1로 희석된 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) 용액을 슬라이드 글라스 위에 적당량 떨어뜨린 다음 차광하여 15분간 상온에서 염색시켰다. PBS로 DAPI solution을 충분히 씻어내고 증류수로 재빨리 세척한 다음 100% 에탄올을 이용하여 탈수 과정을 거친 다음 슬라이드 글라스 위에 mounting solution을 처리하여 고정한 다음 형광현미경(Carl zeiss)을 이용하여 400배의 배율로 핵의 형태를 관찰한 다음 axiovision 프로그램을 이용하여 사진을 촬영하였다.

8. RT-PCR을 이용한 RNA 발현의 분석

세포배양용 6 well plate에 C6 세포를 1×10^5 cell/ml로 희석한 세포액을 2 ml/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 약재 열수추출물을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 0.05% trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 phosphate-buffered saline (PBS)를 각 well당 적

정량 첨가하여 세포를 모은 후 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액만 제거하고 세포만 남긴 다음 RNAzol B 1ml를 첨가하여 약하게 현탁하여 4℃에서 1시간 동안 용해 시켰다. 여기에 chloroform 200 μl를 넣고 전도 교반하여 고르게 섞은 다음 4℃에 5분간 방치시킨 후 14,000 rpm에서 15분간 원심분리(4℃)하여 무색 상층액만을 500 μl 취하였다. 동량의 isopropanol을 넣고 전도 교반하여 고르게 섞은 다음 4℃에 15분간 방치시킨 후 14,000 rpm에서 15분간 원심분리(4℃)하여 얻은 pellet(RNA)에 75% 에탄올(25% DEPC water, nalgene) 500 μl를 넣고 14,000 rpm에서 10분간 원심분리(4℃)하고 에탄올을 완전 건조시켰다. 여기에 DEPC water 적정량을 넣어서 RNA를 용해하여 A260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 1시를 계산하였다. 정량한 후 각각의 primer(Table 3), DEPC water, RNA 그리고 one-step reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) PreMix kit (Intron, Korea)를 넣어 PCR 조건에 따라 PCR machine (Eppendorf, Germany)을 이용하여 증폭하였다. PCR 산물을 통한 mRNA의 발현량 차이를 비교하기 위하여 1x TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 PCR산물과 DNA gel loading solution (5x, Quality Biological, Inc.)을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하여 Image analyer (Viber Lourmat, France)를 이용하여 사진 촬영하였다.

Table Ⅰ. Composition of Herbal Prescriptions

Herbal Prescription	Herb name	Botanical name	Dose(g)
天王補心丹去朱砂 *Tianwangbuxindan qu zhusha*, 이하 'TBqZ'	生乾地黃	Rehmanniae Radix Crudus	64
	黃連	Coptidis Rhizoma	32
	石菖蒲	Acori Gramineri Rhizoma	16
	人蔘	Ginseng Radix Alba	8
	當歸	Angelicae Gigantis Radix	8
	五味子	Schisandrae Fructu	8
	天門冬	Asparagi Tuber	8
	麥門冬	Liriopis Tuber	8
	柏子仁	Thujae Semen	8
	酸棗仁	Zizyphi Semen	8
	玄蔘	Scrophulariae Radix	8
	白茯神	Hoelen Cum Radix	8
	丹蔘	Salviae Miltiorrhizae Radix	8
	桔梗	Platycodi Radix	8
	遠志	Polygalae Radix	8
天王補心丹 *Tianwangbuxindan*, 이하 'TB'	天王補心丹去朱砂		208
	朱砂	Cinnabaris	4
溫膽湯 *Wendantang*, 이하 'WD'	半夏	Pinelliae Tuber	32
	陳皮	Citri Unshii Pericarpium	32
	白茯苓	Hoelen	32
	枳實	Ponciri Fructus	32
	靑竹茹	Bambusae Caulis In Taeniam	16
	甘草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	8
	生薑	Zingiberis Rhizoma Crudus	40
	大棗	Zizyphi Fructus	8개

歸脾湯 *Guipitang*, 이하 'GP'	當歸	Angelicae Gigantis Radix	16
	龍眼肉	Longanae Arillus	16
	酸棗仁	Zizyphi Semen	16
	遠志	Polygalae Radix	16
	人蔘	Ginseng Radix Alba	16
	黃芪	Astragali Radix	16
	白朮	Atractylodis Rhizoma Alba	16
	茯神	Hoelen Cum Radix	16
	木香	Aucklandiae Radix	8
	甘草	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma	4.8
	生薑	Zingiberis Rhizoma Crudus	40
	大棗	Zizyphi Fructus	8개

Table Ⅱ. Yield of Prescriptions

Herbal Prescription	Dose(g)	Yield rate
TBqZ	208	45.5g(21.9%)
TB	212	47.75g(22.5%)
WD	226	38g(16.8%)
GP	196	40g(20.4%)

Table Ⅲ. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
MT_1	Sence	5'-CAG-TAC-GAC-CCC-CGG-ATC-TA-3'
	Antisence	5'-GGC-AAT-CGT-GTA-CGC-CG-3'
MT_2	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'

Ⅲ. 결 과

1. 天王補心丹 去 朱砂 열수추출물이 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 영향

1) 농도에 따른 cell viability 확인

天王補心丹 去 朱砂의 열수추출물을 24시간 동안 처리 한 후 적정농도별 세포 독성의 유무를 확인하였다. Fig. 1과 2는 열수추출물의 0.1 ~ 0.5 mg/ml 범위에서 C6 세포의 생존에 큰 영향이 없음을 MTT assay와 trypan blue와 counting로 확인한 결과이고, Fig. 3과 4는 동일한 조건에서 세포의 형태와 세포핵의 모양 변화를 microscope로 관찰 촬영한 결과 주의할만한 변화가 나타나지 않았다.

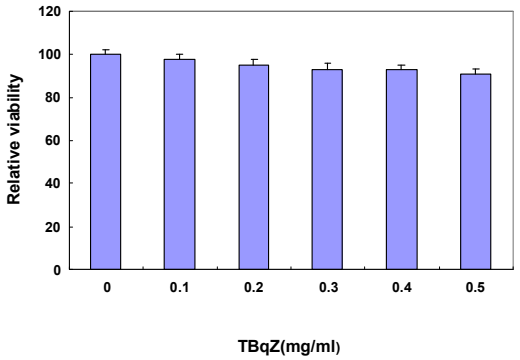


Fig. 1. Effect of *Tianwangbuxindan qe Zhusha* (TBqZ) on the cell viability of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of TBqZ for 24hrs. The viability was measured by metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means SD of three independent experiments.

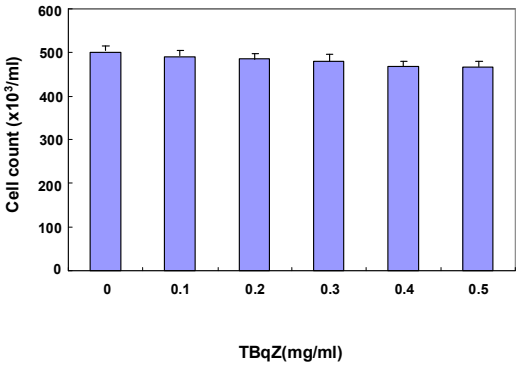


Fig. 2. Effect of TBqZ on the cell growth of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of TBqZ for 24hrs. The growth was measured by trypan blue count. The data shown are means SD of three independent experiments.

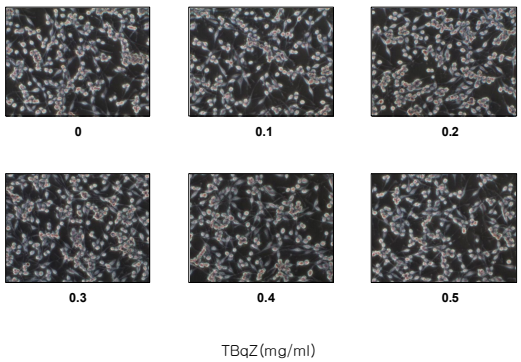


Fig. 3. Effect of TBqZ on the morphology of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of TBqZ for 24hrs and morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200.

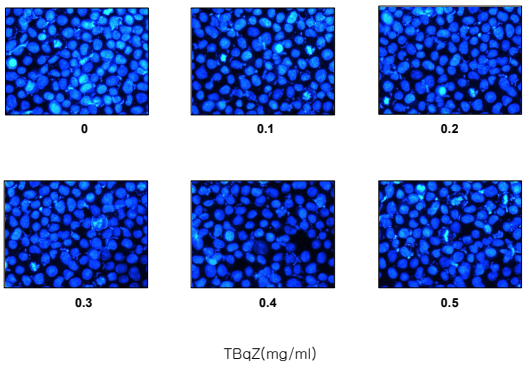


Fig. 4. Effect of TBqZ on the nuclear morphology of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of TBqZ for 24hrs. The cells were collected and then stained with DAPI solution. After 15 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

2) MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체 발현

이와 같은 조건에서 天王補心丹 去 朱砂 열수추출물의 처리에 따른 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현 변화 여부를 조사한 결과는 Fig. 5에 나타낸 바와 같다. Fig. 5에 나타난 RT-PCR의 결과에서 天王補心丹 去 朱砂 열수추출물은 MT_2의 발현 변화에는 큰 영향을 미치지 못하였지만, MT_1의 경우에는 대조군에 비하여 0.3 mg/ml 처리군에서 2.5배의 발현 증가를 보였다. 그리고 0.4 및 0.5 mg/ml 처리군에서는 4.2배 및 3.5배 정도의 발현 증가 현상을 나타내어 天王補心丹 去 朱砂 열수추출물의 처리농도가 증가할수록 melatonin 수용체의 전사 수준에서의 발현이 증가하였으며 특히 0.4 mg/ml 처리군에서 melatonin 수용체 MT_1의 발현이 가장 높게 나타남을 알 수 있다.

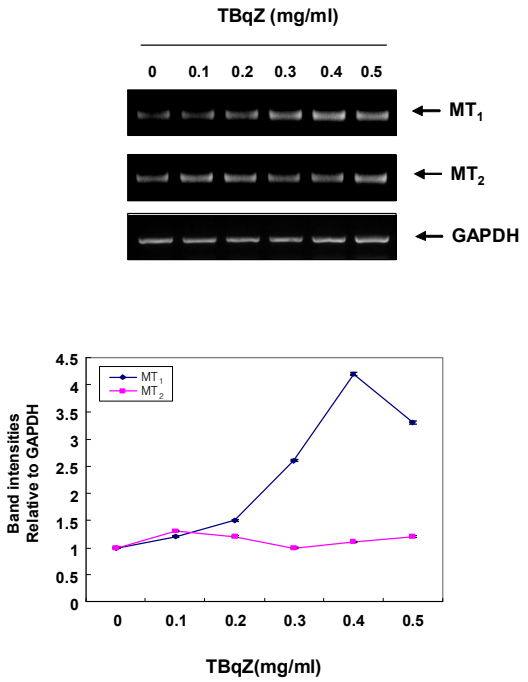


Fig. 5. Effect of MT_1 and MT_2 melatonin receptor expression by TBqZ treatment in C6 cells.
(A) After 24hrs incubation with TBqZ, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with MT_1 and MT_2 melatonin receptor primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene and mRNA level were normalized against GAPDH (B). Measured band intensities compare MT_1, MT_2 with GAPDH.

2. 天王補心丹 열수추출물이 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 영향

1) 농도에 따른 cell viability 확인

天王補心丹 역시도 天王補心丹 去 朱砂와 마찬가지로 열수추출물의 농도가 0.1 ~ 0.5 mg/ml 범위에서 C6 세포의 생존에 큰 영향이 없음을 MTT assay와 trypan blue counting로 통해서 확인하였으며(Fig. 6, 7), Fig. 8과 9는 동일한 조건에서 세포의 형태와 세포핵의 모양 변화를 microscope로 관찰 촬영한 결과 주의할 만한 변화가 나타나지 않았다.

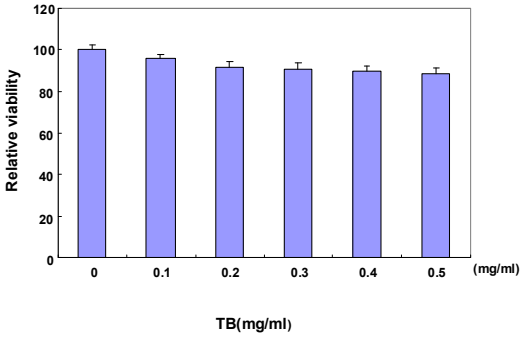


Fig. 6. Effect of *Tianwangbuxindan* (TB) on the cell viability of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of TB for 24hrs. The viability was measured by metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means SD of three independent experiments.

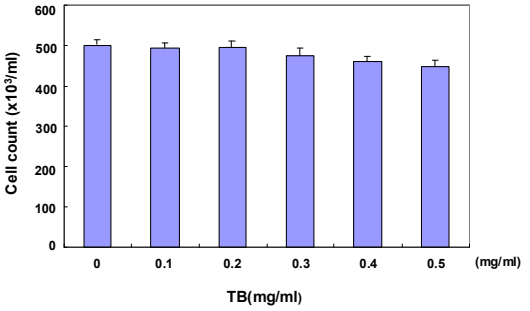


Fig. 7. Effect of TB on the cell growth of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of TB for 24hrs. The growth was measured by trypan blue count. The data shown are means SD of three independent experiments.

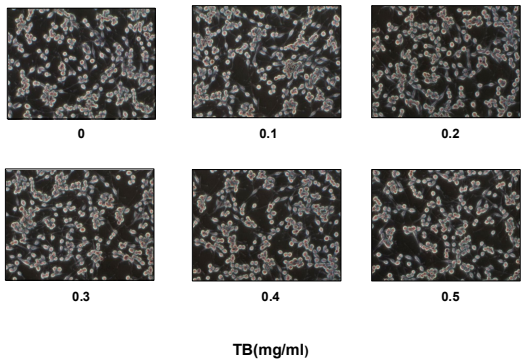


Fig. 8. Effect of TB on the morphology of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of TB for 24hrs and morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200.

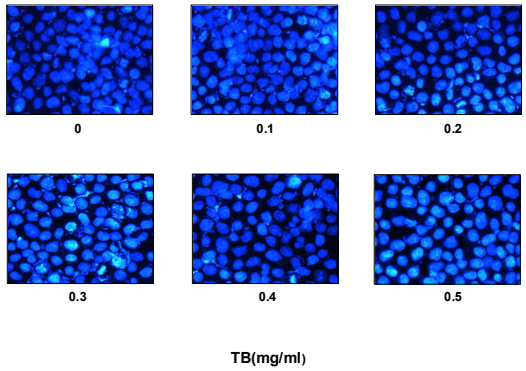


Fig. 9. Effect of TB on the nuclear morphology of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of TB for 24hrs. The cells were collected and then stained with DAPI solution. After 15 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

2) MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체 발현

이와 같은 조건에서 天王補心丹 열수추출물의 처리에 따른 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현 변화 여부를 조사한 결과는 Fig. 10에 나타낸 바와 같다. Fig. 10에 나타난 RT-PCR의 결과에서 天王補心丹 열수추출물도 天王補心丹 去 朱砂 열수추출물과 같이 MT_2의 발현 변화에는 큰 영향을 미치지 못하였지만, MT_1의 경우에는 대조군에 비하여 0.3 mg/ml 처리군에서 2.2배의 발현 증가를 보였다. 그리고 0.4 및 0.5 mg/ml 처리군에서는 4.6배 및 3.4배 정도의 발현 증가 현상을 나타내어 天王補心丹 열수추출물 처리 농도가 증가할수록 天王補心丹 去 朱砂와 마찬가지로 melatonin 수용체의 전사 수준에서의 발현이 증가 하였으며 특히 0.4 mg/ml 처리군에서 melatonin 수용체 MT_1의 발현이 가장 높게 나타남을 알 수 있다.

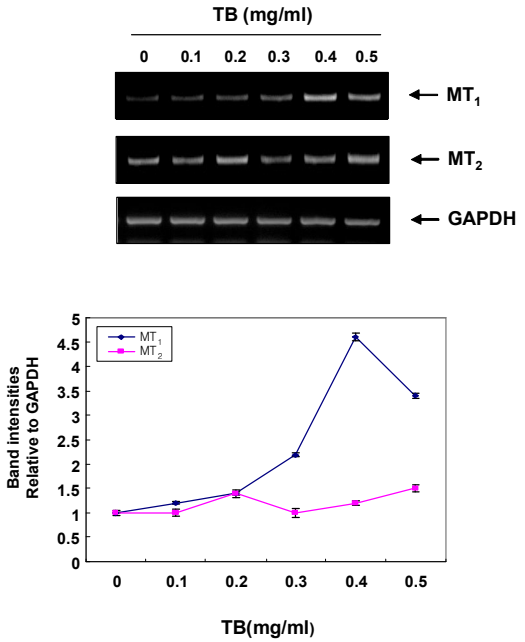


Fig. 10. Effect of MT_1 and MT_2 melatonin receptor expression by TB treatment in C6 cells.
(A) After 24hrs incubation with TB, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with MT_1 and MT_2 melatonin receptor primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene and mRNA level were normalized against GAPDH (B). Measured band intensities compare MT_1, MT_2 with GAPDH.

3. 溫膽湯 열수추출물이 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 영향

1) 농도에 따른 cell viability 확인

溫膽湯 열수추출물을 C6 세포에 24시간 동안 다양한 농도로 처리하여 세포독성이나 성장에 영향을 미치지 않는 농도 범위에서 조건을 설정하였다(Fig. 11, 12). 天王補心丹에 비해 약 10배 정도 농도에서도 溫膽湯은 세포독성이나 성장에 영향을 미치지 않았으며, 이 조건에 역시나 세포 형태나 핵의 형태에도 큰 변화가 없었다(Fig. 13, 14).

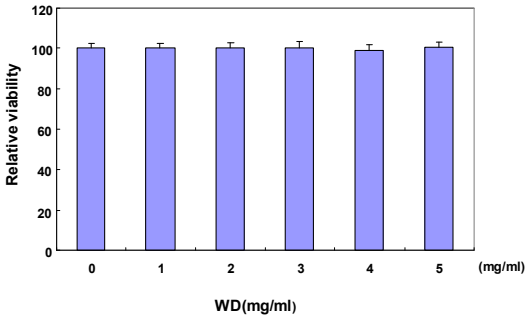


Fig. 11. Effect of *Wendantang*(WD) on the cell viability of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of WD for 24hrs. The viability was measured by metabolic -bye-based MTT assay. The data shown are means SD of three independent experiments.

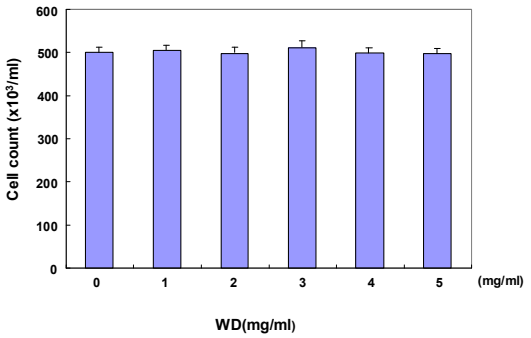


Fig. 12. Effect of WD on the cell growth of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of WD for 24hrs. The growth was measured by trypan blue count. The data shown are means SD of three independent experiments.

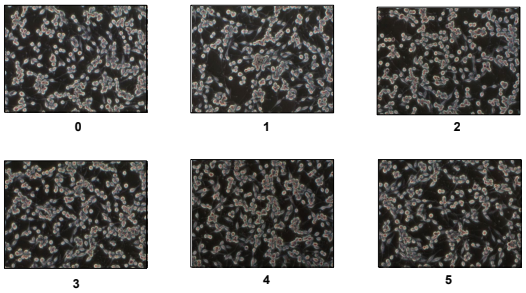


Fig. 13. Effect of WD on the morphology of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of WD for 24hrs and morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200.

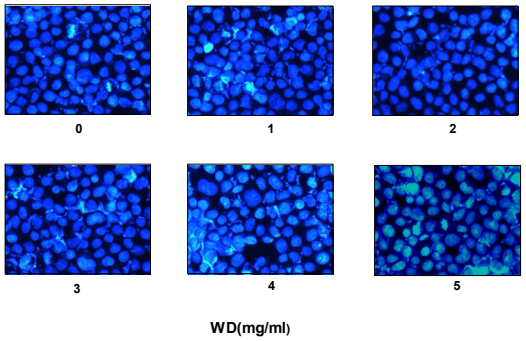


Fig. 14. Effect of WD on the nuclear morphology of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of WD for 24hrs. The cells were collected and then stained with DAPI solution. After 15 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

2) MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체 발현

이를 토대로 세포의 melatonin receptor 수용

체 MT_1과 MT_2의 발현 변화를 조사하였다. 동일한 조건에서 분리된 RNA를 대상으로 RT-PCR 방법에 의하여 얻어진 결과는 Fig. 15에 나타낸 바와 같이 溫膽湯 열수추출물을 처리 하더라도 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현에는 크게 영향을 미치지 못하였다.

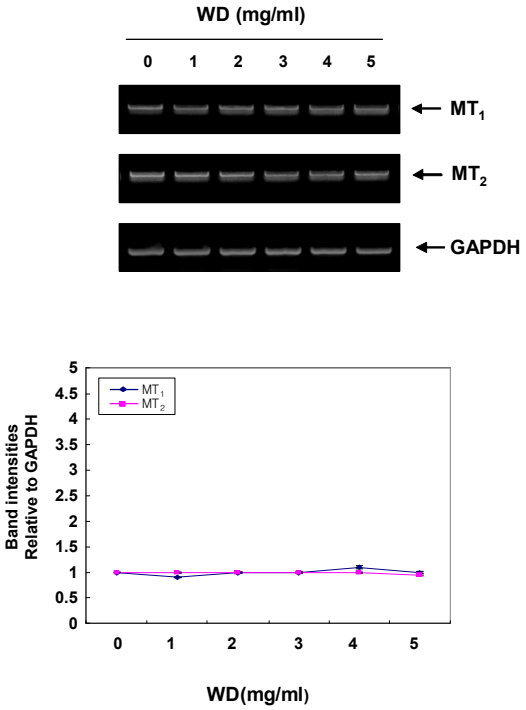


Fig. 15. Effect of MT_1 and MT_2 melatonin receptor expression by WD treatment in C6 cells.
(A) After 24hrs incubation with WD, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with MT_1 and MT_2 melatonin receptor primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene and mRNA level were normalized against GAPDH (B). Measured band intensities compare MT_1, MT_2 with GAPDH.

4. 歸脾湯 열수추출물이 MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체의 발현에 미치는 영향

1) 농도에 따른 cell viability 확인

歸脾湯 열수추출물이 C6 세포에서 세포독성이나 세포성장에 영향을 미치지 않는 조건을 조사한 결과 溫膽湯과 거의 유사한 1~ 5 mg/ml에서 세포독성이나 세포성장에 거의 영향을 미치지 않았으며, 세포 형태 변화나 핵의 형태 변화 역시 관찰되지 않았다(Fig. 16-19).

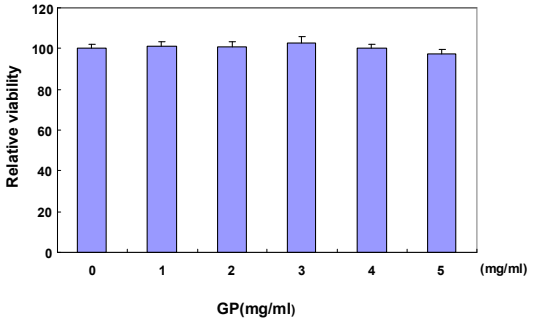


Fig. 16. Effect of *Guipitang* (GP) on the cell viability of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of GP for 24hrs. The viability was measured by metabolic-bye-based MTT assay. The data shown are means SD of three independent experiments.

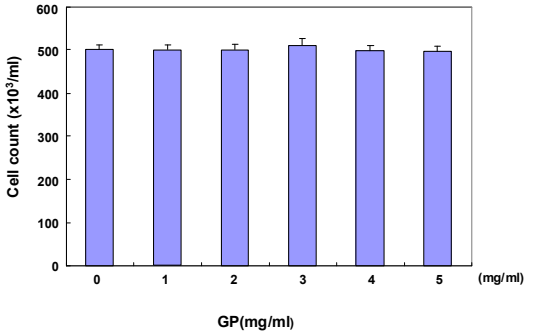


Fig. 17. Effect of GP on the cell growth of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of GP for 24hrs. The growth was measured by trypan blue count. The data shown are means SD of three independent experiments.

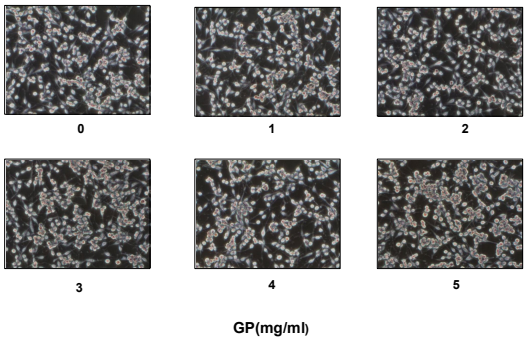


Fig. 18. Effect of GP on the morphology of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of GP for 24hrs and morphology was visualized by inverted microscopy. Magnification, X200.

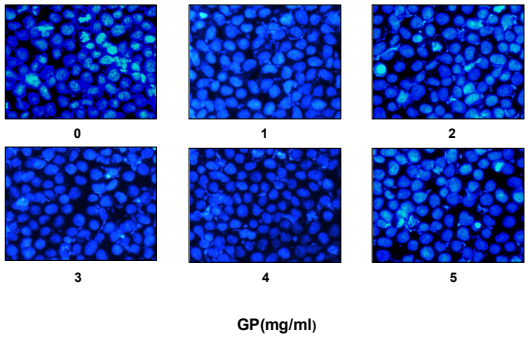


Fig. 19. Effect of GP on the nuclear morphology of C6 cells.
C6 cells were seeded at 2 x 10^5 /ml in a 6 well plate and incubated for 24hrs. The cells were treated with variable concentrations of GP for 24hrs. The cells were collected and then stained with DAPI solution. After 15 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400.

2) MT_1 및 MT_2 melatonin 수용체 발현

Fig. 20에 나타낸 바와 같이 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현 변화를 조사하였다. C6 세포에 歸脾湯 열수추출물을 처리하더라도 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현 변화에는 크게 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

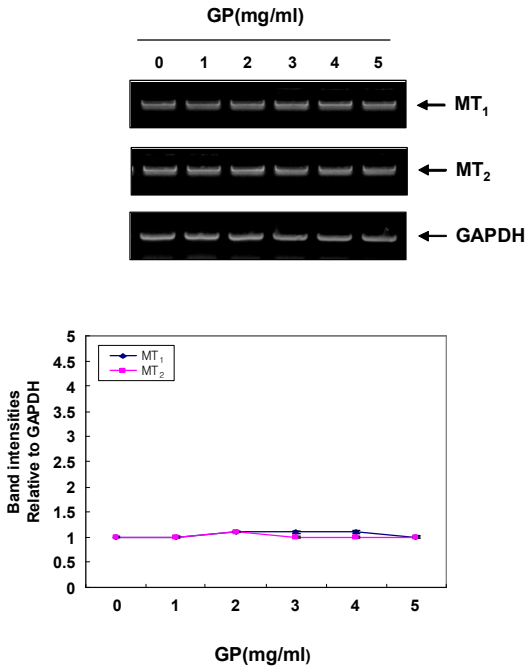


Fig. 20. Effect of MT_1 and MT_2 melatonin receptor expression by GP treatment in C6 cells.
(A) After 24hrs incubation with GP, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with MT_1 and MT_2 melatonin receptor primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as a house-keeping control gene and mRNA level were normalized against GAPDH (B). Measured band intensities compare MT_1, MT_2 with GAPDH.

Ⅳ. 고 찰

불면증은 가장 흔한 수면 장애 중 하나로, 수면의 시작이나 유지가 어려워 충분한 수면을 취하지 못하거나 충분한 양의 수면을 취한 후에도 원기 회복이 안 되는 상태이다[29].

睡眠에 대해 韓醫學 文獻을 살펴보면, 『黃帝內經』 『靈樞・口問篇』[15]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』[15]에는 "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 수면의 生理와 不眠의 발생과정에 대하여 언급하였다. 즉, 수면을 陰과 陽의 변화에 따라 발생한다고 보고 있다. 인체는 衛氣가 주간에는 陽分을 순행하므로 目張而寤하고, 야간에는 陰分을 순행하므로 目瞑而寐한다. 또한 耳目口鼻는 외부에 있어 陽에 속하고 臟腑는 내부에 있어 陰에 속한다고 할 수 있는데, 衛氣가 주간에는 陽分, 즉 신체의 외부를 주행하므로 耳目口鼻는 陽氣를 받아 覺寤하게 되는 것이고, 야간에는 陰分, 즉 신체의 내부를 주행하므로 耳目口鼻가 陽氣를 받지 못해 睡寐하게 된다. 이와 같이 韓醫學에서는 수면을 陰陽消長의 과정으로 해석하고 있는데, 즉 營衛氣血의 순행이 같지 않음으로 해서 寤寐가 교대로 나타나는 생리적 과정이라고 보고 있다[20].

또 不眠은 不寐[12,13], 不睡[12,14], 失眠[13], 不得臥[12,15-17], 不得眠[16], 臥不安[12,18], 不得安寢[18], 目不瞑[15], 少寐[19] 등으로 표현되고 있다. 不眠의 原因에 관하여 『黃帝內經』[15]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 원인이 된다고 하였다. 張[17]은 熱病後의 不眠에 관하여 언급하였고, 巢[30]는 心熱과 膽冷을 원인으로 보았으며, 王[16]은 "陽獨盛陰偏虛"를, 『太平聖惠方』[31]에서는 膽虛를 不眠의 원인으로 제시하였다. 龔[32]은 痰涎擾心하여 心氣不足하면 不眠이 發한다 하였고, 陳[33]은 心血少를 原因으로 보고 心腎相交하며 安神할 것을 중시하였다.

이상의 문헌에 나타난 不眠의 원인을 종합해 보면 心腎不交, 心膽虛怯, 思結不睡, 榮血不足, 痰涎鬱結, 胃氣不和등으로 나누어 변증되어진다[34].

心腎不交는 장기간 영양부족이 지속되거나 오랜 병, 여성호르몬의 부족, 지나친 성교로 腎水不足 血虛로 인해 心火가 허황된 陰虛內熱의 경우의 정신이 안정되지 않아 불면이 생긴다. 怔忡·潮熱(午後發熱)·盜汗·耳鳴·口乾·大便秘·頻尿·遺精·早漏 등이 나타나며, 天王補心丹, 酸棗仁湯, 加味逍遙散, 三一腎氣丸 二神交濟丹 등을 사용한다. 心膽虛怯은 몹시 겁이 많거나 크게 놀란 후에 心膽이 약해져 발생하는 경우의 가슴이 심하게 뛰고 매사에 잘 놀라며 평소에도 무서움이 많아 혼자 있기를 싫어하거나 胸悶·驚悸·多夢·頻覺이 특징인데 溫膽湯을 가미하여 다용한다. 思結不睡는 생각을 과하게 하여 脾臟과 心臟이 손상되어 血을 소모시킨 경우로, 건강한 사람보다는 부인의 산후나 오랫동안 병을 앓은 환자, 노인 등에게서 많이 나타난다. 이때는 偏多妄思·胸悶·體倦懶怠·易疲勞·不知味하고, 꿈이 많고 자주 깨며 가슴이 두근거리고 잘 잊어버린다. 주로 내성적인 사람에게 많으며 歸脾湯, 壽脾煎, 香附子八物湯 등을 사용한다. 營血不足은 怔忡·眩暈·頭重·心下痞 등 營虛證을 구비하여 입맛이 없고 쉽게 피로한데, 補血安神湯, 七福飮, 養心湯 등을 사용한다. 痰涎鬱結은 痰火로 인해 不眠하게 되면서 驚悸·怔忡·頭眩·惡心 或嘔逆·梅核氣하는데 祛痰淸神湯, 淸心導痰湯, 十味溫膽湯 등을 사용한다. 胃中不和는 음식을 잘 조절해 먹지 않아 소화불량이 되어 명치끝이 답답하고 괴로워 편히 눕지 못하고 잠을 이루지 못하는 경우로, 香砂養胃湯, 平陳健脾湯, 分心氣飮 등을 사용한다[20].

그 외에 한의학에서의 불면 치료법으로는 陰交, 浮郄, 神門 등을 자침하는 鍼灸 요법과, 수면환경을 조절하는 환경 요법, 향기 요법, 耳鍼 요법, 氣功 요법, 식이 요법 등이 있다[20].

이에 저자는 불면에 사용되는 상기의 여러 처

방 중에서 임상에서 활용도가 높은 天王補心丹, 溫膽湯, 歸脾湯의 세 처방을 동의보감에서 선택하여 살펴보았다.

『東醫寶鑑』에 따르면 "天王補心丹 寧心保神令人不忘除怔忡定驚悸養育心神生乾地黃酒洗四兩黃連酒炒二兩石菖蒲一兩人參當歸酒洗五味子天門冬麥門冬栢子仁酸棗仁炒玄參白茯神丹參桔梗遠志各五錢右爲末蜜丸梧子大朱砂爲衣臨臥以燈心竹葉煎湯呑下三五十丸<回春>"이라 하였다. 즉, 天王補心丹은 心을 편안하게 하고 神을 보전하여 잊어버리지 않게 하며 怔忡과 驚悸를 없애고 心神을 기르는 方으로, 生乾地黃(술로 씻은 것) 4냥, 黃連(술에 축여 볶은 것) 2냥, 石菖蒲 1냥, 人蔘 當歸(술로 씻은 것) 五味子・天門冬・麥門冬・柏子仁・酸棗仁(볶은 것)・玄蔘・白茯神・丹蔘・桔梗・遠志 각 5돈을 가루 내어 꿀로 반죽하여 오자대로 환을 만들고 朱砂로 겉을 입혀 만든다[35]. 天王補心丹은 동물실험을 통한 약리 작용으로 중추신경억제, 혈관확장, 혈압강하, 이뇨작용이 보고되었고[21], 항스트레스 효과[22]와 항우울 효과[23]에 유의한 것으로 보고되었다.

溫膽湯은 "溫膽湯 治心膽虛怯觸事易驚夢寐不祥虛煩不得睡半夏陳皮白茯苓枳實各二錢靑竹茹一錢甘草五分右剉作一貼薑五片棗二枚水煎服<醫鑑>驚悸怔忡失志不寐皆是痰涎沃心宜理痰氣此藥主之<醫鑑>"이라 하여 心膽이 虛하여 일을 할 때 쉽게 놀라고 꿈자리가 사나우며 虛煩으로 잠들지 못하는 것을 溫膽湯이 치료한다고 하였다. 半夏・陳皮・白茯苓・枳實 각 2돈, 靑竹茹 1돈, 甘草 5푼을 썰어 1첩으로 하여 生薑 5쪽, 大棗 2개와 함께 물에 달여 먹는다. 驚悸・怔忡이나 정신이 나가거나 잠들지 못하는 것은 모두 痰涎이 心으로 흘러들었기 때문이므로 痰氣를 다스리는 이 약을 주로 쓴다[35]. 김 등[25]은 溫膽湯 수성엑기스가 mouse의 체위 보행상태 등 일반 행동에 있어 중추억제작용을 나타냈으며, mouse의 수면지속시간을 연장시켰다고 보고하였다.

또, "歸脾湯 治憂思勞傷心脾健忘怔忡當歸龍眼肉酸棗仁炒遠志製人參黃芪白朮茯神各一錢木香五分甘草三分右剉作一貼薑五片棗二枚水煎服<入門>"이라 하여 歸脾湯은 근심과 생각으로 心脾를 상하여 健忘과 怔忡이 있는 것을 치료한다고 하였다. 當歸・龍眼肉・酸棗仁・遠志・人蔘・黃芪・白朮・茯神 각 1돈, 木香 5푼, 甘草 3푼을 썰어 1첩으로 하여 生薑 5쪽, 大棗 2개와 함께 물에 달여 먹는다[35]. 이 등[26]은 歸脾湯加熟地黃이 생쥐의 thiopental sodium에 의한 수면시간 연장에 관한 효과가 있는 것을 보고하였고, 오 등[27]은 歸脾湯이 斷續的인 電氣刺戟 및 浸水刺戟으로 유발된 驚, 恐情에 대해 유의성 있는 억제 효과가 있는 것을 보고하였다.

朱砂는 硫化物類의 鑛物인 辰砂族에 속한 辰砂의 鑛石으로 硫化水銀(HgS)를 함유한 것으로 採取하여 精選한다. 性은 微寒有毒하고 味는 甘하여 心經으로 歸經한다. 質이 重하여 鎭怯하고, 寒性은 淸熱시켜 心經에 들어가 心經의 邪熱을 鎭降시켜 邪熱을 제거하므로 心身이 안정되어 鎭心, 安神, 定驚의 主藥이 되며, 心火가 亢盛하여 나타나는 心神不安과 驚悸失眠 및 癲狂 등 증에 응용하여 치료한다. 朱砂에 龍骨 茯苓 등을 配伍하며 心氣를 養하고, 當歸 丹蔘 등과 配伍하면 心血을 養하고, 黃連 生地黃과 配伍하면 心火를 淸한다[24]. 세 처방 중 天王補心丹에 들어가는 朱砂는 硫化水銀을 함유한 鑛石으로 有毒하여 修治를 반드시 하여야 하는데, 修治가 어렵고 사용에 신중을 기해야 하므로 일반적으로 제약회사[36]에서는 朱砂를 빼고 天王補心丹을 만든다. 따라서 朱砂를 뺀 天王補心丹이 어떤 차이를 가지는지 알아보기 위해 天王補心丹 去 朱砂의 처방을 추가하였다.

서의학에서 수면이란 모든 생물들이 휴식과 주기성을 가지고 있고, 수면은 그 휴식기에 해당하며, 수면동안에 활동의 원동력을 회복하는 것이라 하였다. 수면의 정확한 기능은 정의되지 않았지만, 많은 학자들이 적당한 수면은 심신의 안녕과 평화 유지에 필수적이며, 뇌의 원상회복을 위해 강제적인 재충전의 기능을 할 것으로 추정하고 있다[37,38].

1979년에 Webb이 수면의 기능에 대한 기존 이론을 회복이론, 보호이론, 본능이론, 에너지 보존이론, 부동이론 등의 다섯 가지 범주로 정리하였고, 수면을 유지하는 데는 일주기(circadian rhythms)와 항상성(homeostasis)이라 불리는 수면 유발 욕구가 작용된다고 하였다[39]. 그 중 일주기에 대해서 살펴보면, 뇌의 박동조절기 같은 기전이 일상의 수면과 각성을 조절한다. 생후 첫 1개월 동안 만들어지는 생물학적 시계로 알려진 내부시계는 체온, 혈압, 호르몬 분비(melatonin, 코티솔 등), 소화효소 분비, 소변 형성, 수면과 각성의 시각 등 여러 생리 기전의 상승과 하강을 관장한다. 일주기는 대부분 자연조절이 되지만 자연시계로 불리는 외적 요인인 빛, 시간 자극, melatonin 등에 반응하며, 항상성 측면에서는 마지막 수면 후 경과된 시간과 누적된 수면빚 등이 수면시간에 영향을 준다[40].

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 일중변동을 보이고, 거의 모든 생명체에 존재하고 분자 구조가 모두 동일하다[4]. 송과체에서 melatonin 합성은 빛에 의해 조절되며, N-acetylation과 O-methylation을 포함하는 2가지 경로를 통하여 serotonin에 의해 합성된다[41]. Melatonin은 melatonin 수용체에 특이적으로 높은 친화성에 의해 매개되며, melatonin 수용체는 세 가지의 subtype을 가진다. 포유동물과 조류에 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[42-44].

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 치료효과가 있음이 밝혀지고 있다[5-10]. Melatonin은 임상에서 내인성 24시간 리듬축을 교대시키는 명백한 능력에 대해 우선적으로 사용되고 있는데, 초저녁 melatonin의 복용은 내인성 melatonin의 분비를 보다 빨리 일으켜 보다 이른 수면유도의 경향을 나타낸다. 그러므로 외인성 melatonin의 투여는 시차적응, 지연수면 증후군 그리고 주야교대근무에 일의 적응에 있어 수면-각성 주기를 조정하는 광선치료의 대안으로 사용되어지기도 한다[45-47]. Melatonin에 대한 연구는 다양하게 이루어져 왔는데, Ferini-stambi 등[48]은 건강한 자원자에게 소량의 melatonin과 triazolam을 같이 투여한 결과, 다원수면 기록상 유의한 변화는 관찰되지 않았지만 주관적 수면의 질이 개선되며, 사용량과 관련된 benzodiazepine

의 부작용을 회피할 수 있다고 보고하였다.

불면증은 모든 연령층에서 발생하는데, 특히 여자와 노인에게서 더 흔하며 70세 이상의 사망 위험의 증가와도 관련이 있다고 한다[49]. 우리나라에서는 약 5%가 만성불면증을 가지고 있고 약 20% 이상이 불면증을 경험한다. 단기 불면증은 수일에서 수 주 동안 잠을 못 자는 것을 말하며, 대개 흥분이나 스트레스가 원인으로 작용한다. 만성불면증은 한 달 이상 지속되는 불면증을 의미하며 한국인 전체의 약 15 ~ 20%가 만성불면증으로 알려져 있다[50,51]. 불면증은 대개 피로감 증가, 무력감, 주의 집중력 감소 등을 동반하고, 삶의 질을 심각하게 낮추며 치명적인 건강문제나 사고발생의 위험을 높이므로 신중한 진단과 원인에 대한 적절한 치료를 제공해 주어야 할 것이다[29].

불면증의 치료법으로 수면환경치료, 명상이나 근육 이완, 복식 호흡법, 이완요법, 식이요법, diazepan 등의 수면제를 투여하는 약물 요법이 있으며, 최근에는 아로마 요법이나 음악요법, 마사지 등을 통하여 수면을 개선시키기 위한 노력을 하고 있으며 이에 대한 연구 또한 활발하게 진행되고 있다[53,54]. 치료적 접근에서는 약물치료가 우선되는데, 현재 처방되는 양약 수면제는 barbiturates와 중추신경 억제제, benzodiazepine계 수면제, 항우울제, chloralhydrate. ethchlorvynol, Methaqualone, zolpidem과 zopiclone 등으로[52], 약물에 따른 효과와 수면에 미치는 영향이 다양하다. benzodiazepine 계통의 약은 다른 진정-수면제에 비해 비교적 안전성이 높고, 내성이 빨리 나타나지 않는 점 등으로 불면증 환자의 치료에 폭 넓게 사용되어 왔다. 그러나 이러한 약물은 약물의 반감기에 따라 너무 빨리 각성이 되거나 표준 수면구조를 변화시키고, 복용 다음날 작업수행능력의 감소와 낮 동안 졸림, 기억력 감퇴 등의 잔여 영향이 있다고 보고되었다[53,54]. 대부분의 수면제는 일반적 각성을 감소시키는 진정효과가 있다. 즉 수면 잠복기를 감소시키거나, 야간의 각성을 감소시킴으로써 전체 수면시간을 증가시킨다. 그런데 이런 효과는 2 ~ 4주 후에는 효력이 없어지고, 일정 약물 농도에 익숙해진 상태에서 갑작스런 약물의 중단은 더 심한 불면증을 야기한다. 처방약제들에 의한 인지기능의 저하, 낮 동안의 각성변화, 수면구조의 변화, 신체 및 심리적 의존, 약물과의 상호작용, 남용 가능성 등의 부작용이 보고되면서[55,56], 이러한 부작용을 감소시킬 수 있는 여러 가지 연구들이 진행되고 있는데 대체요법으로 한약을 이용한 천연물신약 개발에 대한 관심이 증가되고 있다.

최근 김 등[28]은 불면의 처방약에 빈용되는 한약재인 龍眼肉, 炒酸棗仁, 龍骨 및 牡蠣의 불면 치료효과를 melatonin 수용체 발현과 관련하여 실험적으로 검증하였다. 이에 저자는 임상에서 불면에 다용하는 처방인 天王補心丹, 구성 약물 중 주의가 필요한 주사를 제외한 天王補心丹 去朱砂, 溫膽湯, 歸脾湯의 불면 치료 효과를 실험적으로 검증하여 보고자, 수면-각성의 일주기 조절과 관련하여 대표적인 표지물질로 알려진 melatonin 수용체의 발현 정도를 실험하였다.

최근의 선행 연구에 의해 β-estradiol은 다양한 종류의 세포주에서 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현을 전사 수준에서 증가시킬 수 있다는 것이 보고되었으며[57,58], 본 실험에서 사용된 C6 세포주에서 역시도 β-estradiol에 의해 세포독성을 가지지 않는 범위에서 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현을 전사 수준 증가시킨다는 *in vitro* model[28]이 이미 보고되었다.

본 실험에서 사용된 한약 중, 天王補心丹 去朱砂의 경우 처리 농도 0.1 ~ 0.5 mg/ml 범위

에서 C6 세포의 생존에 큰 영향을 미치지 않는 것을 MTT assay, trypan blue conut와 세포형태 및 핵 형태의 관찰 확인하였으며(Fig. 1~4), 이에 따라 세포 생존에 거의 영향을 미치지 않는 세포 생존도 90% 이상의 조건에서 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현을 조사한 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 MT_2의 발현에는 큰 변화를 주지 못하였으나, MT_1의 발현이 天王補心丹去朱砂 처리 농도가 증가함에 따라 증가하는 것을 확인 하였으며, 0.4 mg/ml 처리군에서 melatonin 수용체 MT_1의 발현이 가장 높게 나타남을 알 수 있었다.

다음으로 天王補心丹 역시도 天王補心丹去朱砂와 마찬가지 농도 0.1 ~ 0.5 mg/ml 범위에서 C6세포의 생존에 큰 영향을 미치지 않는 것 확인하였으며(Fig. 6~9), 이에 따라 세포 생존도 90% 이상의 조건에서 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현을 조사한 결과, 天王補心丹去朱砂와 유사하게 MT_2의 발현에는 큰 변화를 주지 못하였으나, MT_1발현이 天王補心丹 처리 농도가 증가함에 따라 증가하는 것을 확인하였으며, 0.4 mg/ml 처리군에서 melatonin 수용체 MT_1의 발현이 가장 높게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 10). 이로 미루어 天王補心丹에서 朱砂는 melatonin 수용체 발현에는 크게 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

溫膽湯의 경우에도 C6 세포에서 24시간 조건에서 다양한 농도를 처리하여 MTT assay, trypan blue count와 세포형태 및 핵 형태의 변화를 조사하였으며, C6 세포의 생존도에 전혀 영향을 미치지 않는 조건으로 天王補心丹去朱砂와 天王補心丹에 비해 약 10배 정도 높은 1 ~ 5 mg/ml 농도를 확정하였다(Fig. 11~14). 하지만 Fig. 15에서 보는 바와 같이 溫膽湯처리에 따라 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현에는 크게 영향을 미치지 못하였다.

歸脾湯 역시도 C6 세포의 생존도에 전혀 영향을 미치지 않는 조건을 MTT assay, trypan blue count와 세포형태 및 핵 형태의 변화를 통해 농도를 설정한 결과, 溫膽湯과 마찬가지로 1 ~ 5 mg/ml 농도를 확정하였다(Fig. 16~19). 그러나 歸脾湯도 溫膽湯과 마찬가지로 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현에는 크게 영향을 미치지 못하였다(Fig. 20). 김 등[28]의 보고에서 보면, 龍眼肉은 melatonin 수용체 MT_2의 발현을 증가시켰고 酸棗仁은 MT_1의 발현을 증가시켰으나, 두 약물이 들어가 있는 歸脾湯은 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2에 큰 변화를 주지 못했다. 이는 약물의 七情 또는 配伍의 중요성을 되새기는 계기가 되어, 하나의 약재가 가지는 성질이나 효능이 전체 처방에서 그대로 발현되지는 않는 점으로 歸脾湯의 실험 결과의 이유를 추정해볼 수 있었다. 또한, Melatonin은 빛에 매우 의존적인 일주기와 관련된 대표적 표지 물질이지만, 수면에는 melatonin 외의 다른 호르몬과 수면시간 등 여러 기전이 작용한다. 그렇다면 임상에서 불면에 다용하는 溫膽湯과 歸脾湯은 melatonin의 활동과는 다른 기전으로 수면에 영향을 주리라 짐작되며, 이에 대한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

이상의 결과에서 天王補心丹去朱砂, 天王補心丹은 melatonin 수용체 MT_1의 발현을 증가시키는 것을 알 수 있었으나, 歸脾湯, 溫膽湯은 melatonin 수용체에 별다른 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다. 실험 오류의 가능성을 고려하여 각 세 번씩 반복 실험을 했으나, 결과는 같았다. 이로 미루어 天王補心丹去朱砂, 天王補心丹은 melatonin의 활동 증가로 인한 수면 유도에 효과가 있을 것으로 보이며, 주사의 유무에 따른 melatonin 수용체 발현의 유의성이 나

타나지 않은 것은, 주사가 수용체발현에 주요 관련 인자가 아닐 것으로 생각된다.

또, 본 연구의 결과에서 관찰된 다양한 한약처방에 의한 melatonin 수용체의 발현에 관한 결과는 전사수준에서 관찰된 결과들이다. 한약처방 열수추출물의 처리에 의한 melatonin 수용체의 mRNA의 발현 증가가 가지는 의미의 해석을 위하여 전사활성에 따른 단백질 수준의 melatonin 수용체의 발현에 영향을 미치는지에 대한 추가적인 실험이 실시되어져야 할 것이다.

Ⅴ. 결 론

임상에서 불면증에 빈용되는 天王補心丹 去 朱砂, 天王補心丹, 溫膽湯, 歸脾湯의 열수추출물이 C6 신경교세포에서 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 天王補心丹 去 朱砂 열수추출물은 melatonin 수용체 MT_2의 발현에는 큰 변화를 주지 못하였으나, MT_1의 경우는 처리 농도가 증가할수록 발현이 증가하였으며 0.4mg/ml 처리군에서 melatonin 수용체 MT_1의 발현이 가장 높게 나타났다.
2. 天王補心丹 열수추출물은 melatonin 수용체 MT_2의 발현에는 큰 변화를 주지 못하였으나, MT_1의 경우는 농도 의존적으로 증가하였다. 그러나 天王補心丹 去 朱砂 열수추출물과의 차이에서는 유의성을 찾을 수 없었다.
3. 溫膽湯 열수추출물은 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현에 크게 영향을 미치지 못하였다.
4. 歸脾湯 열수추출물은 melatonin 수용체 MT_1과 MT_2의 발현에 크게 영향을 미치지 못하였다.

참고문헌

1. 양진향, 김시자, 황미순. 성인환자의 입원전·후 수면양상과 수면장애요인. 仁濟論叢. 2005; 20(1):62-646.
2. Morrey KM, Mclachian JA and Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. J. Immunol. 1994;153: 2671-80.
3. Folkard S, Hume KI, Minors DS, Waterhouse JM and Watson FL. Independence of circardian rhythm in alertness from the sleep-wake cycle. Nature. 1985;313:678-9.
4. Arendt J. Melatonin. Clin Endocrinol. 1988; 29:205-29.
5. Frisch H, Parth K, Shobber E and W. Swoboda. Circardian patterns of plasma cortisol 17-hydroxyprogesterone and testosterone in congenital adrenal hyperplasma. Arch. Disea Childhood. 1981;56:208-13.
6. 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 digestive tract. British J. Cancer. 1993;67: 1404-07.
7. Gutteridge JMC. Aging and free radicals. Med. Lab. Sci. 1992;49:313-8.
8. Felton G. Body rhythm effects on rotation

shift work. Nursing Digest. 1976;4:29-32.
9. Ramsey GM. Basic Pathophysiology - modern stress and the disease process. California: Addison - Wesley. 1982.
10. Taub JM. Aute shifts in the sleep-wakefulness cycle ; Effects on performance and mood. Psychosoma Med. 1974;36:164-73.
11. 김인구, 김중한. 黃帝內經에 나타난 불면의 원인에 관한 考察. 大韓韓醫 學原典學會誌. 2005;13(1):57-66.
12. 李梴. 醫學入門. 서울:南山堂. 1985:3권 239-40.
13. 林琴. 類證治裁. 臺北:旋風出版社. 1979:257-8.
14. 許浚.東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1974:116-7.
15. 楊維傑. 黃帝內經靈樞解釋. 서울:一中社. 1991: 127, 252, 256, 266, 271-72, 290, 346-7, 351-2, 450, 488-9, 607.
16. 王燾. 外臺秘要. 北京:人民衛生出版社. 1982: 91-2, 481-3, 1087, 1088, 1090, 1093-7, 1099, 1106, 1110, 1111.
17. 張仲景. 仲景全書. 서울:大星文化社. 1984:357.
18. 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.
19. 趙佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 1992.
20. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학. 집문당. 2005:242-6, 630-41.
21. 김남재, 공수윤, 장순욱. 天王補心丹이 중추신경계 및 순환기계에 미치는 영향. 생약학회지. 1988;19(3):208-15.
22. 김지혁. 天王補心丹 加減方의 抗스트레스 效果에 關한 實驗的 硏究. 慶熙學會. 1988;4(4): 453-66.
23. 박종흠. 天王補心丹의 항우울효과 및 monoamine 대사에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2004.
24. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 本草學. 서울:영림사. 2000:489-90.
25. 김창덕, 서성훈, 김수억. 溫膽湯 수성엑기스의 中樞抑制作用에 관한 硏究. 경희약대논문집. 1981;9:53-8.
26. 이동건, 이봉교. 歸脾湯加熟地黃이 생쥐의 睡眠時間 鎭靜 및 鎭痛作用에 미치는 影響. 동서의학. 1987;12(2):5-16.
27. 오상훈. 歸脾湯의 五志相勝爲治效果에 關한 實驗的 硏究. 高凰論集. 1988;3:235-60.
28. 김보라미. 수종의 한약재 열수추출물이 멜라토닌 수용체 발현에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2007;18(1):15-36.
29. 송윤미. 불면증의 치료. 가정의학회지. 2001; 22(8):1163-72.
30. 巢元方. 巢氏諸病源候論, 臺北:集中書局. 1977: 36, 90, 217, 226.
31. 宋太宗命選. 太平聖惠方. 서울:翰成社. 1979:78, 79.
32. 龔廷. 萬病回春. 서울:杏林書院. 1972:234.
33. 陳士鐸. 石室秘錄. 서울:杏林書院. 1973:13, 48, 49.
34. 황의완, 김지혁. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1992:671-91, 683-9.
35. 許浚. 東醫寶鑑. 경남 하동:동의보감출판사. 2005:99, 116, 155.
36. 일심제약 일심만옥단, 한풍제약 순심, (주)제일한방 금왕심단.
37. Kozier B and Erb G. Fundamental of nursing concepts & procedure. California:Eddison-Wesley Publishing Company. 1983.
38. 김신미, 오진주, 송미순. 한국노인의 수면양상과 관련요인에 대한 연구. 간호학논문집. 1997;11:24-38.
39. Webb, W. B. Theories of sleep functions and someclinical implications In ; The Funtion

of Sleep. edited by R. Drucker-Colin, M, Shkurovich and M.B. N.Y:Sterman Academic Press. 1979:19-35.
40. Lawrence J. Epstein, M.D. 박용한・신윤경 釋. 수면건강과 수면장애. 조윤커뮤니케이션. 2008:31-38, 40.
41. Axelrod JR and Snyder SH. control of hydroxyindole-O-methyltransferse activity in the rat by environmental lighting. J. Biol. Chem. 1965;240:949-54.
42. Duvocovich ML and Takahashi JS. Use of 20-[125 I] iodomelatonin bindindg sites in the brain of the Atlantic salmon. salmosalar L. Neuroendocrinology. 1992;55:29-37.
43. 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.
44. 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.
45. Klein DC. The pineal gland ; A model of neuroenclocrine regulation In ; Rejchlin S, Baldessarini RJ, Martin JB, eds. The Hypothalamus. New york Raven. 1978;6:303.
46. Brown GM. Light, melatonin and the sleep -wake cycle. J Psychiatry Neurosci. 1994;19: 345.
47. Lewy J, Sack RL and Blood ML. Melatonin marks circadian phase position and resets the endogenous circadian pacemaker in humans. Cli. Found Sym. 1995;183:303.
48. Dolberg OT, Hirschmann S and Grunhaus L. melatonin for the treatment of sleep disturbances in major despressive disorder. Am. J. Psychiatry. 1988;155(8):1119.
49. Ancoli-Israel S, Kripke DF, Mason W and Kaplan OJ. Sleep apnea and Periodic movement in the aging sample. J. Gerontol. 1985;40:419-25.
50. Kryger MH, Roth T and Dement WC. Principles and Practice of Sleep Medicine. 2nd Ed, WB Saunders. Philadelpia. 1994.
51. 최소현, 김인, 서광윤. 서울거주 일반성인의 수면 양상에 관한 연구. 신경정신의학. 1992; 32:289-310.
52. 양창국, M.D. 불면증의 약물치료. 생물치료정신의학. 1997;3(2):103-17.
53. Roth T, Roehrs T and Zorick F. Determinants in adverse effects of hypnotics In ; Biological Psychitry. Ed by Shagass C. Amsterdam: Elsevier. 1986.
54. Roth T, Roehrs T. Determinants of residual effects of hypnotics. Accid Anal Prev. 1985; 17:291-6.
55. Coleman RM. Wide Awake at 3:00 A.M. W.H. Freeman and Company. N.Y. 1986.
56. 김인, 최윤경, 서광윤. 서울거주 일반인의 수면 위생에 대한 인식과 실행. 신경정신의학. 1997;36:712-21.
57. Masana MI, Soares JM Jr and Dubocovich ML. 17β-estradial modulates hMT1 melatonin receptor function. Neuroendocrinology. 2005; 81:87-95.
58. Soares JM Jr, Masana MI, Ersahin C and Dubocovich ML. Functional melatonin recepter

in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. J. pharmacol. Exp. Ther., 2003;306: 694-702.