동의신경정신과 학회지 제22권 제1호(2011년 3월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2011;22(1):53-67

大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯이 구속스트레스 부하 ICR-mouse의 스트레스 환경에서의 회복능력에 미치는 영향

이효경, 김향이[1], 박현제[1], 서주희, 류영수, 강형원

원광대학교 한의과대학 한방신경정신과 교실
원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과[1]

The effect of *Da-Huang*, *Huang-Lian* and *Dahuanghuanglianxiexin-tang*(DHXT) on ability to recover from the stressful conditions in immobilization stressed ICR-mice

Hyo-Gyung Lee, Hyang-Yi Kim[1], Hyun-Je Park[1], Joo-Hee Seo, Yeoung-Su Lyu, Hyung-Won Kang

Dept. of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Won-Kwang University
Dept. of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Won-Kwang University[1]

Abstract

Objectives :

Dahuanghuanglianxiexin-tang(DHXT) has been prescribed for patients with anxiety disorder and has been believed to treat Haw-Byung. The present study was carried out to investigate whether *Da-Huang*, *Huang-Lian* and DHXT have beneficial effects on ability to recover from the stressful conditions.

Methods :

The mice were divided into normal group, control group, positive control group and experimental groups. The experimental groups were divided into *Da-Huang*, *Hwan-gryun* and DHXT group. In the positive control group, imiprimine at 500μg/g/day of dose were applied to mice and in the experimental groups, *Da-Huang*, *Huang-Lian* and DHXT at 50μg/g/day of dose were applied to mice. After 1 hour, the mice in the rest of groups except normal group were exposed to immobilization stress. Their body weights, phagocytosis, nitric oxide in macrophage, iNOS in hippocampus, serum levels of corticosterone and adrenocorticotropic-hormone(ACTH) were observed.

Results :

Da-Huang, *Huang-Lian* and DHXT didn't increase the body weights of immobilization stressed mice but they improved phagocytosis in immobilization stressed mice. Also they worked on reducing the amount of nitric oxide in macrophages in immobilization stressed mice. Although *Da-Huang*, *Huang-Lian* and DHXT didn't affect the serum level of ACTH in immobilization stressed mice, they reduced the serum level of corticosterone in immobilization stressd mice.

Conclusions :

The present study suggests that *Da-Huang*, *Huang-Lian* and DHXT have beneficial effects on ability to recover from the stressful conditions.

Key Words :

Da-Huang, *Huang-Lian*, *Dahuanghuanglianxiexin-tang*(DHXT), *S*tress, Corticosterone, Adrenocorticotropic-hormone(ACTH)

투고 : 2011. 2. 14. 수정 : 2011. 3. 5. 채택 : 2011. 3. 8.
교신저자 : 강형원, 전북 익산시 신룡동 344-2 원광대학교 한의과대학 신경정신과교실
Tel) 031-390-2762. E-mail) dskhw@wonkwang.ac.kr
이 논문은 2011년 2월 원광대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 박사학위 논문임

Ⅰ. 서 론

스트레스란 신체에 가해진 각종의 유해인자(stressor)에 대해 체내에 생긴 상해와 그것을 방어하기 위한 반응을 말하는 것으로[1], 이 stressor를 韓醫學에서는 感情이나 外氣의 변화로, 七氣, 九氣, 氣鬱, 氣逆 등의 氣의 변화를 인체의 반응으로 인식하였다[2]. stressor로 인해 인체내부의 균형 상태가 깨지면, 인체는 이를 항원으로 인식하고 특이하게 반응하여 이에 대한 항체를 만들고, 이를 배제하여 항상성(homeostasis)을 유지하려는 면역반응을 일으키게 되는데[3], 이는 인체 내외에 존재하는 각종 유해인자인 邪氣와 질병에 대한 방어능력이자 생명활동의 원동력인 正氣가 抗爭하며 消長進退하는 과정을 통해 질병이 발생하는 것으로 보는 韓醫學적 개념과 유사하다[4].

스트레스의 first mediator로 histamine, vasopressin, catecholamine, serotonin, corticosteroid, corticotropin releasing hormone(CRH) 및 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 등이 작용한다는 것은 이미 널리 알려져 있다[5,6]. 최근에는 스트레스가 corticosteroid를 증가시켜 면역억제작용을 나타낼 뿐 아니라 lymphocyte 및 macrophage의 활성에도 영향을 주어 면역계를 변화시키는 것으로 밝혀졌고[7], 과도한 스트레스는 뇌의 hippocampus와 amygdala에도 영향을 주는 것으로 밝혀졌다[8].

大黃黃連瀉心湯은 《傷寒論》[9]에 "心下痞, 按之濡, 其脈關上浮者, 大黃黃連瀉心湯主之."라 하여 처음 수록된 이래, 熱盛壅塞으로 인한 氣上逆의 제반 神經病등에 응용되어 왔으며[10-12], 각 구성약물에 대해 《藥徵》[13]에서 大黃은 "主治通利結毒也. 故能治胸滿. 腹滿. 腹痛. 及便閉. 小便不利. 旁治發黃. 瘀血. 腫膿."이라 하고, 黃連은 "主治心中煩悸也. 旁治心下痞. 吐下. 腹中痛."이라 하였다.

최근 古方에 대한 관심이 높아지면서 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 大黃이 항스트레스[14]와 항산화 및 신경세포 보호 효능[15]이 있다고 하였고, 黃連은 염증스트레스로 인한 corticosterone 함량에 영향을 미치며[16], NO와 TNF-α의 생성 억제 및 iNOS 유전자 발현 억제를 통한 면역능 회복 효과[17]가 있는 것으로 보고되었다. 또한 大黃黃連瀉心湯이 胸痞, 不眠, 便秘를 동반한 뇌경색 환자[18]와 暴怒로 인해 衄血, 潮熱을 동반한 眩暈症 환자에서 유효하다는 치험례[19]가 발표되었다.

이를 토대로 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯이 스트레스에 의한 心煩, 心悸, 眩暈, 不眠證 등의 신경정신증상을 개선하여, 스트레스 치료약물로써 유의미하다고 판단 할 수 있으나, 이에 대해 실험동물모델을 이용한 연구가 아직 부족한 실정이다.

이에 저자는 다른 스트레스 유발법에 비해 직접적인 통증을 유발하지 않아 사람에서의 정신적 스트레스와 유사한 대표적 정서적 스트레스 모델인 구속스트레스[20]를 부여한 mouse에, 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯과 Tricyclic Antidepressants (TCAs)의 항스트레스제제인 imipramine을 각각 투여한 후, 체중, 대식세포의 phagocytosis와 nitric oxide(NO)함량, 대뇌 해마체에서의 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 발현, 혈청 내 ACTH 함량과 corticosterone 함량 변화를 관찰하여 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯의 항스트레스 효과에 대한 의미 있는 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시약 및 기기

실험에 사용된 시약은 인산완충액(PBS LB20), LPS(L4391), Griess시액(G4410)은 Sigma Co.제품을, Rabbit anti-mouse iNOS IgG(ab15323), HRP-conjugated anti-mouse rabbit IgG(ab6721)는 Abcam, RPMI-1640(LM011)는 WelGENE Inc., FBS(090450)는 WISENT Icn., γ-IFN(IF005)는 Millipore, Tween 20(0777)는 Amresco, DAB발색액(DAB substrate kit; DAB057)은 Zytomed, ACTH ELISA kit(AC018T)는 Calbiotech 제품을 사용하였고, 기타 시약은 모두 특급 및 일반시약을 사용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 CO_2incubator(VS-9108 MS, Vision Scientific Co.), Vibratome(HA752, Campden instruments), ELISA reader(VersaMax, Molecular Devices) 등을 사용하였다.

2) 실험약재

본 실험에 사용한 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯에 사용된 약재는 옴니허브(주)에서 최상품으로 인정된 약재를 엄선하여 사용하였고, 대조약재로 사용된 imipramine은 환인제약㈜에서 정제 형태로 구입하여 상온에 보관하였다.

3) 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 ICR계 mouse 수컷 5 주령, 120수를 나라바이오텍에서 구입하여 스테인레스제망 사육상자에 상자 당 5수씩 넣고, 온도 23 ± 3℃, 상대습도 55 ± 15 %, 환기횟수 10~20회/hr (전외기 공조방식), 광원은 형광등조명 12hr/day (08:00 점등~20:00 소등), 조도 150~300 Lux하에, 급수는 미세여과기를 이용하여 멸균한 물을 물병을 이용하여 자유 섭취시켰고, 사료는 피드랩에서 생산한 멸균된 일반 사료(FORMULA-M07)를 자유섭취 시켰고, 공급원에서 제공한 자료를 참조한 결과 시험에 영향을 주는 오염물질은 없었다. 시험을 실시할 동물실에서 2주간 순화하면서 일반증상을 관찰하였다.

2. 연구방법

1) 검액 조제

大黃 100g, 黃連 100g, 大黃黃連瀉心湯 120g을 취하여, 다음과 같은 제조공정을 걸쳐 大黃, 黃連, 大黃黃連瀉心湯 건조엑스를 획득하여, 사용전 상온에 보관하였다

(1) 大黃 100g, 黃連 100g, 大黃黃連瀉心湯 120g (大黃80g, 黃連40g)을 각각 추출기에 넣고

(2) 大黃 100g, 黃連 100g에 정제수 각각 1L, 大黃黃連瀉心湯 120g에 정제수 1.2L를 넣고

(3) 95~100℃에서 大黃 40분, 黃連 2시간 30분, 大黃黃連瀉心湯은 黃連을 넣고 1시간 50분 달인 후에 大黃을 넣고 40분을 더 달여서 총 2시간 30분 가온추출한 후

(4) 25㎛필터를 사용하여 여과하고 여액을 농축기를 이용하여 50-60℃에서 감압 농축한다.

(5) 한약 잔류물에 ②~④ 과정을 1회 반복하여 농축액을 각각 합한다.

(6) 합한 농축액을 건조기에 넣고 60℃이하에서 건조한다.

(7) 건조물을 분쇄기를 이용하여 분말화하여, 건조엑스 大黃 24.1806g, 黃連 25.3099g, 大黃黃連瀉心湯 22.7573g을 얻는다.(수득률 大黃 약 24.2%, 黃連 약 25.3%, 大黃黃連瀉心湯 약 18.3%)

2) 시험군의 구성

5수의 mouse를 한 group으로 하여, 정상군(NOR군), 대조군(CON군), 양성대조군(PC군), 실험군으로 나누었고, 실험군은 大黃 투여군(DH군), 黃連 투여군(HR군), 大黃黃連瀉心湯 투여군

(DHXT군)으로 나누어, 총 6개의 group을 구성하였다(Table Ⅰ).

Table Ⅰ. Organization of the experimental groups

Groups	Number of mice
Normal group (NOR group) Non-treatment, Non-stress	5
Control group (CON group) Non-treatment, stress	5
Positive Control group (PC group) imipramine, stress	5
Da-Huang treated group (DH group) *Da-Huang*, stress	5
Huang-Lian treated group (HR group) *Huang-Lian*, stress	5
DHXT treated group (DHXT group) DHXT, stress	5

3) 檢液 投與 및 구속스트레스 賦與

NOR군, CON군에는 아무것도 투여하지 않고, PC군에는 이미프라민을 증류수 100mg/ml로 희석하여 mouse 체중 1g당 500㎍을 투여하고, DH군, HR군, DHXT군에는 각각 大黃, 黃連, 大黃連瀉心湯을 10mg/ml로 희석하여 체중 1g당 50㎍을 주사용수로 녹여 매일 동일한 시간대에 경구투여 하였고, 檢液 투여 1시간 후에 mouse를 플라스틱 원통형 cage(직경2cm, 높이 10cm)에 넣어 구속스트레스를 주었으며, cage 밑에 구멍을 내어 호흡을 유지시켰고, 검사항목에 따른 검액 투여 횟수 및 기간과, 구속 횟수 및 시간은 다음과 같다.

(1) 체중, 대식세포의 대식작용 및 NO함량과 뇌 해마체의 iNOS 발현양 실험

6개군의 30마리의 마우스에 각각에 해당하는 검액을 투여하고, 검액 투여 한 시간 후부터 2시간 동안 구속스트레스를 가한 후 안정화시키는 방법으로, 총 5일간 매일 동일시간대에 검액을 투여하고 한 시간 후에 2시간씩 구속 직후 복강 대식 세포와 대뇌를 적출한다.

(2) 혈청 내 ACTH와 Corticosterone 함량 실험

NOR군, CON군, PC군, HR군, DH군, DHXT군의 총 30마리의 마우스에 각각에 해당하는 검액을 투여하고, 검액 투여 1시간 후부터 15분 동안 구속스트레스를 가한 후 안정화시켜서 채혈한다. 이와 같은 시간에 다른 6개 군의 총 30마리의 마우스에 각각에 해당하는 검액을 투여하고, 검액 투여 1시간 후부터 60분 동안 구속스트레스를 가한 후 안정화시켜서 채혈하고, 역시 이와 같은 시간에 같은 방법으로 또 다른 6개 군 총 30마리 마우스에 검액을 투여하고, 한 시간 후부터 180분 동안 구속스트레스를 가한 후 안정화시켜 채혈한다.

4) 관찰 및 검사항목

(1) 체중

매일 검액 투여 직전 체중을 전자저울로 측정하고, 5일째 검액 투여 전까지 체중을 측정하여 4일간 구속스트레스로 인한 체중변화량을 계산하였다.

(2) 대식세포의 대식작용

5일 동안 구속스트레스를 가한 직후 mouse를 이산화탄소 마취한 후, 마우스의 복부의 외피를 절개하고, 주사기(10cc, 18Gauge)를 이용하여 10ml의 인산완충액(PBS LB204, Sigma)을 복강 내로 주사하였다. 1분가량 복부를 마사지 하여 복강 내의 대식세포가 잘 혼합될 수 있도록 한 후 다시 10cc 주사기를 이용하여 대식세포 인산완충액 혼탁액을 추출하였다. RPMI-1640(LM011, WelGENE) 10% FBS (090450, WISENT Icn.) 배양액으로 2회 세척 후 배양접시에서 도포하여 배양기(5% CO_2, 37℃)에 2시간 동안 배양하여 바닥에 붙지 않은 부유세포를 제거하고, 붙어있는 세포를 모아 HBSS(LB003, WelGENE) 10% FBS에 $2x10^6$cells/ml

이 되도록 세포를 부유시킨다. 37℃ 항온수조에서 30분 동안 안정화 시킨 후 고열 사멸 시킨 효모세포를 $40x10^6$cells/ml이 되도록 세포 혼탁액에 넣어준다. 모든 그룹의 대식세포를 동일하게 처리 후 60분간 항온수조 내에서 반응시킨 후 효모세포 수를 혈구계산기로 측정하여 대식작용능을 측정한다.

(3) 대식세포내의 NO 함량

대식세포의 대식작용검사와 동일하게 부유세포를 제거한 대식세포를 24 well 배양접시의 2개에 $2x10^6$개의 세포를 넣어주고, 그 중 1개의 well에는 LPS(L4391, Sigma) 1㎍/ml와 γ-IFN (IF005, Millipore) 25 units/ml를 첨가하여 24시간 배양하였다. 배양액 100㎕와 Griess(G4410, Sigma) 시액 100㎕를 혼합하여 96 well plate에 넣고 37℃에서 10분간 방치한 후 570nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 LPS와 γ-IFN로 NO를 활성화시킨 그룹과 그렇지 않은 그룹의 함량을 분석하여, LPS와 γ-IFN 처리 후 증가한 대식세포내의 NO양을 측정하였다.

(4) 대뇌 해마체 내의 iNOS 발현량

구속스트레스를 가한 직후 마우스의 대뇌를 적출하여 면역조직화학법을 수행하기 위하여 4% paraformaldehyde로 대뇌를 고정하여 PBS로 세척 후 vibratome(HA752, Campden instruments)을 이용하여 50㎛의 절편을 만들어 사용하였다. 조직은 5% BSA와 5% FBA를 넣은 인산완충액으로 비 특이적 결합을 차단하였고, Rabbit anti-mouse iNOS IgG (ab15323, abcam)항체로 iNOS에 특이적 결합을 시킨 후 인산완충액 0.02% Tween 20(0777, Amresco)의 세척액으로 세척 후 mouse anti rabbit IgG conjugated HPR(ab6721, abcam) 항체로 2차 항체결합을 시켰다. 세척 후 DAB(DAB substrate kit; DAB057, Zytomed) 발색액을 이용하여 10분간 발색시킨 후 세척하여 각 조직의 발색정도에 따라 iNOS의 발현여부를 파악하였다.

(5) ACTH 함량

구속스트레스를 가한 직후, Entobar (pentobarbital)을 이용하여 마취 후 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 iced EDTA 시험관에 담아 -70℃에서 보관하며 사용 전까지 안정화 시켰다가 냉장원심분리기를 사용하여 혈청을 분리하고, 유리튜브에 분주하여 즉시 얼렸다가 검사를 위해 녹일 때에도 ice bath에서 녹여 항시 4℃이하에서 비치한다. ACTH 측정은 혈청 100ul를 ACTH ELISA kit(AC018T, Calbiotech)를 이용하여 혈액내의 ACTH양을 측정하였다. 결과 값은 ELISA reader (VERSAMAX, Molecular Devices)를 이용하여 판독하였다.

(6) Corticosterone 함량

ACTH 측정시험에서와 같은 방법으로 채취한 혈액을 원심 분리하여 혈청만을 모은 후에 수거한 혈청 0.3ml을 0.7ml의 증류수와 혼합하여 준비한다. Chloroform 10ml를 넣고 15초간 진탕한 후 2500rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액 제거한다. 1ml의 0.1N NaOH로 세척한 후 원심분리 하여 상층액을 제거하고, Chloroform 9ml에 형광시액(황산:50%에탄올 = 2.4:1)을 3ml 넣고 15초간 진탕하여 원심분리 후 Chloroform층을 제거한 형광시액층을 2시간 동안 발색시켜 470-520nm 파장으로 정량하였다.

3. 통계학적 분석

각 측정치는 SPSS프로그램을 이용하여 평균±표준편차를 구하였고, 얻은 자료에 대한 표본간

의 비교는 Student's t-test를 사용하여 군 간의 차이를 검정하였고, 통계적 유의수준은 5%미만으로 하였다.

Ⅲ. 성 적

1. 체중

5일간 매일 약물 투여 전에 마우스의 체중을 측정하여(Table Ⅱ), 4일 동안 구속스트레스로 인한 체중변화량을 계산한 결과, NOR군은 체중이 0.346±0.139g 증가하였고, CON군은 3.028±0.475g 감소하여 구속스트레스로 인한 유의성 있는 체중감소가 나타났고($p<0.01$), PC군은 2.158±1.302g 감소하였고, DH군, HR군, DHXT군은 각각 3.164±0.589g, 2.500±0.392g, 4.044±0.412g 감소하여, PC군, DH군, HR군은 CON군에 비해 유의성 있는 체중증가가 나타나지 않았으며, DHXT군에서는 CON군에 비해 오히려 유의성 있는 체중감소가 나타났다($p<0.01$). 또한, PC군에 비해 DH군, HR군은 유의성이 없었고, 오히려 DHXT군은 PC군에 비해 유의성 있는 체중감소를 나타냈다($p<0.05$) (Fig. 1).

Table Ⅱ. Individual data of the body weights of mice before administering drugs for five days (g)

Group	1day	2days	3days	4days	5days
NOR	35.218±0.4423	35.17±0.4021	35.224±0.6211	35.022±0.9014	35.444±0.75
CON	35.2241±1.2788	33.786±0.9528	33.094±0.8557	32.592±0.9833	32.196±0.8436
PC	33.922±2.555	32.828±2.2077	31.918±1.9363	31.728±0.8855	31.764±1.4609
DH	34.574±0.4486	33.012±0.6788	31.926±0.4559	31.728±1.5168	31.41±0.7181
HR	34.28±1.8976	32.974±1.313	32.298±1.5102	31.88±1.5168	31.78±1.5273
DHXT	35.472±0.7311	33.896±0.9855	32.336±0.9561	31.308±1.1632	31.428±0.9493

All data represent the means±standard deviation of 5 mice.

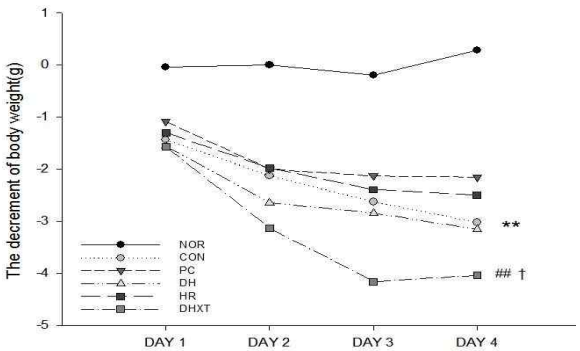


Fig. 1. Administration of DH, HR and DHXT didn't increase the body weights of immobilization stressed mice.
Mice in NOR group were not treated with drug and not exposed to immobilization stress. Mice in CON group were not treated with drug and exposed to immobilization stress. Mice in PC, DH, HR and DHXT group were treated with drug and exposed to immobilization stress. The weight was measured before administering drugs. Imipraimine, DH, HR and DHXT were administered once a day for 5 days. And after 1 hour, the mice were exposed to immobilization stress for 2 hours. Dots of the Day 1 mean the difference of the weights between the first day and the second day. Each group contained 5 mice. All dots represent the means±standard deviation of 5 mice.
** denote the significant difference from NOR group at $p<0.01$. ## denote the significant differences from CON group at $p<0.01$. † denote the significant differences from PC group at $p<0.05$.

2. 대식세포의 대식작용

5일간 구속스트레스를 가한 후, NOR군의 대식작용능은 62.5±6.4550%, CON군은 15.0±10.8012%로 구속스트레스로 인해 유의성 있는 대식작용 감소가 나타났고($p<0.01$), PC군은 52.5±5.4006%,

DH군, HR군, DHXT군은 각각 42.5±6.1237%, 50.0±7.3598%, 47.5±9.3541%로, PC군, DH군, HR군, DHXT군은 모두 CON군에 비해 유의미하게 대식작용이 증가하였다($p<0.05$, $p<0.01$). 또한 PC군에 비해 DH군, HR군, DHXT군이 대식작용이 약간 감소하였으나 유의성은 없어서, PC군과 DH군, HR군, DHXT군 사이에는 유의미한 차이가 없었다(Fig. 2).

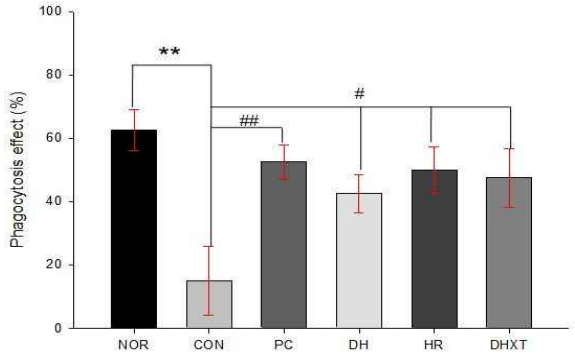


Fig. 2. Administration of DH, HR and DHXT improved phagocytosis of the mice in immobilization stress.

Mice in NOR group were not treated with drug and not exposed to immobilization stress. Mice in CON group were not treated with drug and exposed to immobilization stress. Mice in PC, DH, HR and DHXT group were treated with drug and exposed to immobilization stress. After immobilization stress 2 hours a day for 5 days, the peritoneal macrophages, which were separated from the mice, were mixed with the dead yeast cells. And then the number of the dead yeast cells were measured with hemocytometer. Each group contained 4 mice. All bars represent the means±standard deviation of 4 mice.
** denote the significant difference from NOR group at $p<0.01$. # and ## denote the significant differences from CON group at $p<0.05$ and $p<0.01$.

3. 대식세포의 NO함량

LPS와 γ-IFN로 활성화된 대식세포 내의 NO 증가량은 NOR군에서 17.9505±1.4485, CON군에서 13.0253±0.6105로 구속스트레스로 인해 활성화된 대식세포내의 NO 함량은 유의미하게 감소하였고($p<0.01$), PC군은 7.3788±0.165, DH군, HR군, DHXT군은 각각 5.7735±0.3760, 5.3438±0.2836, 7.2913±0.3007로 CON군에 비해 PC군, DH군, HR군, DHXT군은 모두 NO함량이 유의미하게 감소하였다($p<0.01$). 또한, PC군에 비해 HR군, DH군의 NO함량은 유의미하게 감소하였고($p<0.01$), DHXT군은 감소하였으나 유의성은 없어서, PC군과 DHXT군 사이에는 유의미한 차이는 없었다(Fig. 3).

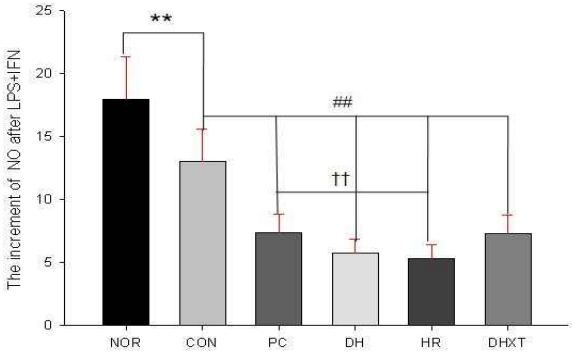


Fig. 3. Administration of DH, HR and DHXT reduced the amount of NO in macrophages of the mice in immobilization stress.

Mice in NOR group were not treated with drug and not exposed to immobilization stress. Mice in CON group were not treated with drug and exposed to immobilization stress. Mice in PC, DH, HR and DHXT group were treated with drug and exposed to immobilization stress. After immobilization stress 2 hours a day for 5 days, the peritoneal macrophages were separated from the mice. The well plates of $2x10^6$ macrophage with LPS + γ-IFN and without LPS + γ-IFN were cultured for 24 hours. The increment of NO after LPS + γ-IFN was checked. Each group contained 4 mice. All bars represent the means±standard deviation of 4 mice.
** denote the significant difference from NOR group at $p<0.01$. ## denote the significant differences from CON group at $p<0.01$. †† denote the significant differences from PC group at $p<0.01$.

4. 대뇌 해마체 내 iNOS 발현량

NOR군에서는 거의 발색이 보이지 않았고, CON군에서는 강한 발색을 보여 구속스트레스로 인해 대뇌 해마체 내 iNOS의 발현양이 증가하였

고, PC군, DH군, HR군, DHXT군에서는 모두 CON군보다 약한 발색을 보였으며, 특히 HR군은 현저히 옅은 발색을 보였다(Fig. 4).

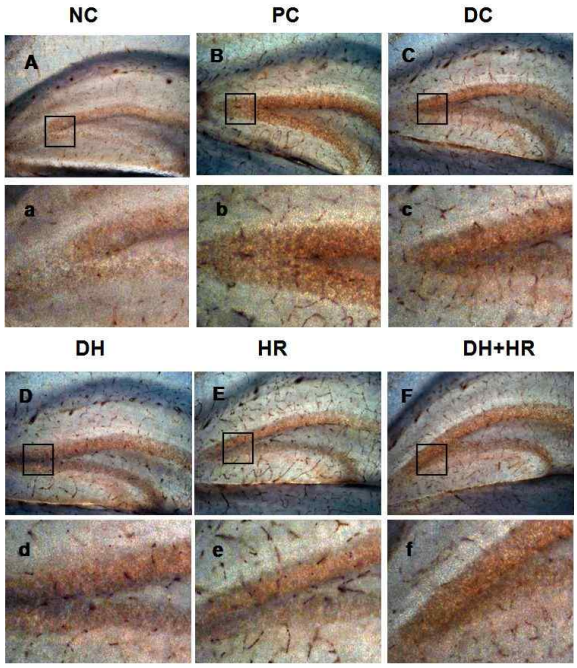


Fig. 4. Administration of DH, HR and DHXT reduced the expression of iNOS in the hippocampus of immobilization stressed mice.

Mice in NOR group were not treated with drug and not exposed to immobilization stress. Mice in CON group were not treated with drug and exposed to immobilization stress. Mice in PC, DH, HR and DHXT group were treated with drug and exposed to immobilization stress. After immobilization stress 2 hours a day for 5 days, the cerebrum was removed. Immunohistochemistry was done with rabbit anti-mouse iNOS and IgG mouse anti rabbit IgG conjugated HPR. Potomicrographs show both general parts of hippocampus(A-F) and localized parts of hippocampus(a-f).

5. ACTH 함량

각 시간대별 ACTH의 함량을 측정한 결과(Table Ⅲ), 모든 시간대에서 ACTH 함량은 NOR군보다 CON군에서 현저하게 감소하여 구속스트레스로 인해 ACTH 함량이 감소하였고, CON군과 각 약물과의 비교에서는 15분대에서는 PC군, DH군, HR군, DHXT군이 CON군보다 증가하였으나 많은 차이를 보이지 않았고, 60분대에서는 DH군, DHXT군, HR군, PC군 순서로 CON군보다 증가하였고, 180분대에서는 PC군, DH군, HR군, DHXT군이 CON군보다 오히려 약간 감소하여, 어떤 약물도 시간과 관계없이 스트레스로 인한 ACTH의 감소를 억제하지는 못했다(Fig. 5).

Table Ⅲ. Individual data of the amount of ACTH according to the time course of immobilization stress (ng/ml)

Groups	NOR	CON	PC	DH	HR	DHXT
15mins	99.5960	23.5650	29.8710	25.2860	25.0810	25.8100
60mins	62.2090	16.4360	21.9150	36.3530	23.3100	29.1320
180mins	65.2500	19.8040	15.0090	15.6120	12.7630	12.6420

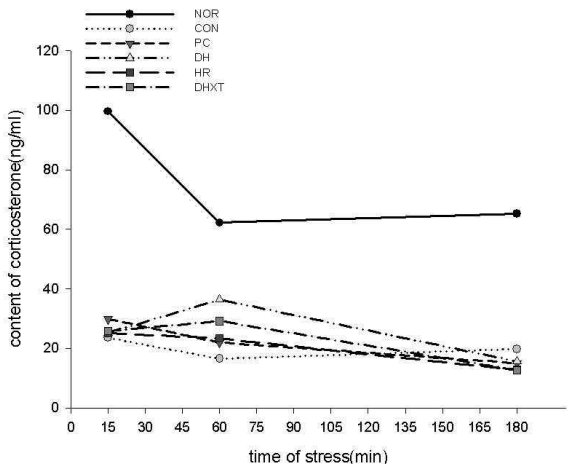


Fig. 5. Administration of DH, HR and DHXT didn't increase the amount of ACTH in immobilization stressed mice.

Mice in NOR group were not treated with drug and not exposed to immobilization stress. Mice in CON group were not treated with drug and exposed to immobilization stress. Mice in PC, DH, HR and DHXT group were treated with drug and exposed to immobilization stress. The mice were put in immobilization stress for each 15 minutes, 60 minutes and 180 minutes. The amount of serum ACTH was determined with spectro fluoroment and measured by ACTH ELISA kit.

6. Corticosterone 함량

각 시간대별 corticosterone의 함량을 측정한 결과(Table Ⅳ), CON군은 NOR군에 비해 모든 시간대에서 유의미하게 corticosteron 함량이 증가하였고($p<0.05$,$p<0.01$), 모든 시간대에서 PC군, DH군, HR군, DHXT군은 CON군에 비해 유의미하게 corticosteron 함량이 감소하였다($p<0.05$, $p<0.01$). 또한, PC군에 비해 15분대에서는 HR군이 유의미하게 증가하였고($p<0.05$), DHXT군, DH군은 유의성이 없어서 PC군과 유사한 효과를 나타냈고, 60분대에서는 DH군, HR군이 유의미하게 감소하였고($p<0.01$), DHXT군은 유의성이 없어 PC군과 유사한 효과를 나타냈으며, 180분대에서는 PC군에 비해 DHXT군, DH군, HR군 모두 유의성이 없어서, 모두 PC군과 유사한 효과를 나타냈다(Fig. 6).

Table Ⅳ. Individual data of the amount of corticosterone according to the time of immobilization stress

(ng/ml)

Group	NOR	CON	PC	DH	HR	DHXT
15mins	93.4158±11.4919	182.3562±15.1157*	119.428±16.184$^{\#\#}$	134.1778±5.1785$^{\#}$	141.9574±13.8580$^{\#\dagger}$	131.0656±16.7298$^{\#\#}$
60mins	114.5686±7.3215	224.1366±23.0966**	159.2752±4.0809$^{\#\#}$	136.4132±5.2543$^{\#\#\dagger\dagger}$	136.4602±7.9961$^{\#\#\dagger\dagger}$	159.1364±5.7595$^{\#\#}$
180mins	122.5366±5.3992	241.6218±20.3330**	154.3762±1.6837$^{\#\#}$	160.9524±9.9257$^{\#\#}$	157.4146±6.7702$^{\#\#}$	150.4514±11.7832$^{\#\#}$

All data represent the means±standard deviation of 5 mice.
* and ** denote the significant difference from NOR group at $p<0.05$ and $p<0.01$. # and ## denote the significant differences from CON group at $p<0.05$ and $p<0.01$. † and †† denote the significant differences from PC group at $p<0.05$ and $p<0.01$.

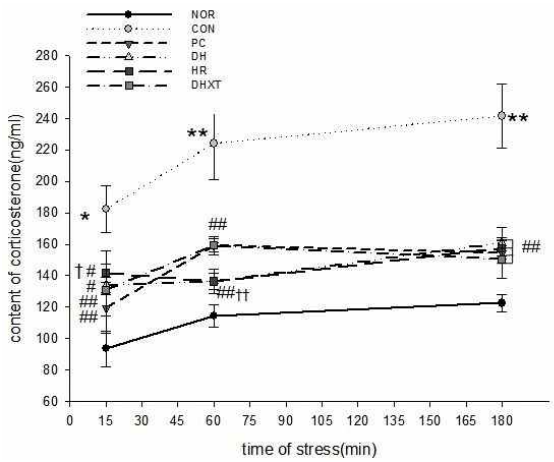


Fig. 6. Administration of DH, HR and DHXT reduced the amount of corticosterone in immobilization stressed mice.

Mice in NOR group were not treated with drug and not exposed to immobilization stress. Mice in CON group were not treated with drug and exposed to immobilization stress. Mice in PC, DH, HR and DHXT group were treated with drug and exposed to immobilization stress. The mice were put in immobilization stress for each 15 minutes, 60 minutes and 180 minutes. The amount of serum corticosterone was determined with spectrofluoroment. Each group contained 5 mice. All dots represent the means±standard deviation of 5 mice.
** denote the significant difference from NOR group at $p<0.01$. # and ## denote the significant differences from CON group at $p<0.05$ and $p<0.01$. † and †† denote the significant differences from PC group at $p<0.05$ and $p<0.01$.

Ⅳ. 고 찰

Hans Selye는 스트레스에 대해 인체에 가해진 어떤 외부자극에 대한 신체의 비 특이적인 반응이라고 정의하고, 스트레스 반응을 유발시키는 환경적 자극을 stressor라 하였다[21]. Walter Bradford Cannon은 생체내부의 균형 혹은 평형상태가 깨지면 생체는 평형상태를 다시 유지하기 위한 활동을 하게 되며, 이 때 균형이 이루어질 때까지 자신의 에너지를 사용하는 활동과정을 항상성

(homeostasis)이라 부르는데, 항상성을 파괴하는 상태를 스트레스의 위험수준이라고 정의하였다[22]. 이러한 스트레스의 원인이 되는 stressor에는 寒冷, 暑熱, 電氣쇼크 등의 물리적 인자와 음식물 섭취 과잉, 약물, 감염 등에 의한 생물화학적 인자인 외부적 인자와, 대인관계, 사회활동 등의 곤란에 의한 정신적 인자 그리고 전근, 심야의 공부 등의 내부적 인자가 있다[23].

스트레스 반응은 크게 교감신경-부신수질계(sympathetic-adrenalmedullary system)와 시상하부-뇌하수체-부신피질계(hypothalamic-pituitary-adrenalcortical system)로 나눌 수 있고, 교감신경-부신수질계에서는 스트레스를 지각하면 뇌간에서 흥분성 활동을 생성시켜 표적장기에 있는 아드레날린성 신경말단부에서 norepinephrine을 방출시키고, 부신수질에서는 norepinephrine, dopamine, epinephrine등의 catecholamine을 분비한다. 시상하부-뇌하수체-부신피질계에서는 대뇌피질과 변연계에서 스트레스를 자각하면 시상하부를 자극하여 CRH를 분비케 하고 CRH는 다시 뇌하수체에서 ACTH를 방출시키고, ACTH는 부신피질에서 cortisol, androgen, aldosterone 등의 corticosteroid를 방출시켜 내외의 상황에 대처하도록 돕는다[5,6].

이때 분비된 스트레스 호르몬에 의해 면역계에도 변화가 일어나는데, 스트레스에 의해 분비된 corticosteroid는 T세포의 기능, 대식세포 및 nature killer세포의 활동을 억제시켜서 면역 억제작용을 일으키고[24], catecholamine은 lymphocyte에서 발견된 catecholamine 수용체를 자극하여 세포의 반응을 감소시켜 면역기능을 억제시키는 등 면역계에도 다양한 변화를 가져 온다[25].

韓醫學에서 스트레스는 感情이나 外氣의 변화를 하나의 刺戟因子로, 이로 인한 인체의 반응을 七氣, 九氣, 氣鬱, 氣逆 등의 氣의 변화로 인식하였다[2]. 스트레스 인자에 대해서는《靈樞·口問篇》[26]에서 "夫百病之始生也, 皆生於風雨寒暑, 陰陽喜怒, 飮食居處, 大驚卒恐 卽 氣血分離"라 하여 氣候 靜動 飮食 起居 등을 제시하였고, 宋代의 陳言은《三因方》[27]에서 六淫邪氣에 의한 것은 外因, 七情에 의한 것은 內因, 飮食 房室 跌撲金刀에 의한 것은 不內外因이라고 하여 세 가지로 나누어 제시하였는데, 이러한 요인들은 모두 질병 발생의 조건이 된다는 점에서 한의학의 內因, 外因, 不內外因은 서양의학의 스트레스 인자와 부합된다고 볼 수 있다[28].

또한 질병의 발생에 대해,《靈樞·百病始生篇》[26]에서는 "風雨寒熱, 不得虛, 邪不能獨傷人"라 하여 외부의 병인이 있어도 신체가 허하지 않으면 병을 일으킬 수 없다 하였고,《素問·刺法論》[29]에서 "正氣存內 邪不可干"이라 하여 질병의 발생과정 중 생체의 저항력을 중시하였다. 즉, 인체의 기능 활동과 질병에 대한 방어, 투쟁 및 회복능력을 가리키는 생명활동의 원동력을 正氣, 인체에 가해지는 각종 유해한 발병인자를 邪氣라 하여, 질병의 발생과 변화를 일정한 조건하에서의 正邪抗爭의 표현으로 보고 있으며, 이는 서양의학에서 면역의 개념과 유사하다[30].

그동안 다양한 한약의 항스트레스 효능에 대한 실험적 연구가 이루어져 왔는데, 溫膽湯 계열[31,32]의 淸膽祛痰劑, 逍遙散 계열[33,34]의 疏肝解鬱劑 등 후세방에 대한 연구가 주를 이루었으며, 大黃黃蓮瀉心湯과 같은 최근 활발한 임상적 운용이 이루어지고 있는 상한방의 항스트레스 효능에 관한 연구는 부족하다.

大黃黃蓮瀉心湯은《傷寒論》[9]에서 "心下痞 按之濡, 其脈關上浮者, 大黃黃蓮瀉心湯主之"라 한 이래,《方極》[35]에서 "治心煩 心下痞 按之濡者."라 하여, 임상에서 心煩, 心悸 등 증을 다스리는 것으로 활용되어 왔다. 大黃黃蓮瀉心湯은 大黃과 黃連 두 가지 藥物로 구성된 처방으로, 大黃은

攻積導滯 瀉火凉血 行瘀通經하여, 苦寒으로 泄熱하고 强한 攻下작용으로 腸胃中의 積滯를 蕩滌하고, 주로 實熱에 屬한 壅滯證候인 熱結便秘, 高熱神昏 등을 다스리며, 黃連은 淸熱除濕 淸心除煩 瀉火解毒하여, 心火亢盛 煩躁不眠, 熱病으로 인한 心熱神煩 神昏譫語 등 증을 다스린다[36].

최근 불안장애를 비롯한 신경정신질환이 증가하면서, 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯에 대한 연구 및 임상응용이 활발히 이루어지고 있는데, 大黃黃連瀉心湯에 대해 노 등[19]은 顔色赤 心下痞者, 精神鬱塞하고 沈默하며, 心悸亢進한 者의 發狂, 癇疾, 小兒驚氣, 健忘症, 腦充血 등에 應用한다고 하였고, 노 등[37]은 心中煩悸 腹滿便閉 或心悸, 胸滿, 小便不利 하며, 心下痞, 下腹結毒이 있으며, 忌熱, 面赤, 上熱이 있고, 신경이 예민하며 속쓰림, 不眠증상이 있는 경우에 응용한다고 하였다. 大黃, 黃連 개별 약재에 대해서는, 백 등[14]은 大黃의 해마에서 스트레스 시 증가하는 c-fos 및 c-jun 유전자 발현 감소에 대해 보고하였고, 명 등[15]은 大黃의 H_2O_2와 nitric oxide 손상에 대한 세포 생존률과 뇌 해마부위의 뇌허혈 손상에 의한 신경세포 보호효능에 대해 보고하여 면역능 회복효과에 대한 근거를 제시하였으며, 조 등[16]은 黃連의 염증스트레스가 유발된 흰쥐에서 corticosterone 함량과 직장온도 변화를 관찰하여 항스트레스 효과를 보고하였고, 정 등[17]은 黃連의 쥐 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 NO와 TNF-α의 생성 억제 및 iNOS 유전자 발현 억제를 통해 면역능 회복효과에 대해 보고하였다.

현재까지 연구된 결과를 토대로 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯을 이용한 항스트레스 실험이 유의미하다고 판단되어, 이들의 스트레스 환경으로부터 회복능에 대한 효과를 규명하기 위해서, 구속스트레스 부하 ICR-mouse를 이용하여 체중변화, 대식세포의 대식작용능력변화, 대식세포의 NO함량 변화, 혈청 내 ACTH, corticosterone 함량변화, 대뇌 해마체에서의 iNOS 발현양을 측정하여 본 연구를 진행하였다.

본 연구에 적용한 구속스트레스는 정신병리학적 연구를 위한 동물모델 제작에 가장 널리 사용되는 스트레스 유발법이자 대표적 정서적 스트레스 모델로, 다른 스트레스 유발법에 비해 직접적인 통증을 유발하지 않기 때문에 사람에서의 정신적 스트레스와 좀 더 유사하며, 장기간 실험 시 실험동물을 관리하는데 있어 유리하다[20]. 이에, 본 실험에서는 정서질환에 사용되는 Tricyclic Antidepressants(TCAs)의 대표적 항스트레스제제인 imipramine을 양성대조군으로 하여 비교함으로써, 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯의 정서적 항스트레스제제로서의 가능성을 살펴보았다.

실험결과, 구속스트레스로 인한 유의성 있는 체중감소가 나타났고($p<0.01$), PC군, DH군, HR군은 CON군에 비해 유의성 있는 체중증가가 나타나지 않았으며, DHXT군에서는 CON군에 비해 오히려 유의성 있는 체중감소가 나타났고 ($p<0.01$), DHXT군은 PC군에 비해서도 유의성 있는 체중감소가 나타났다($p<0.05$)(Fig. 1). 이는 구속스트레스로 인해 신진대사가 전반적으로 증가하여 체중이 감소된 것으로, 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯의 투여가 imipramine의 투여와 더불어 스트레스에 의한 체중 감소에는 영향을 주지 못한 것으로 보인다. 그러나 이 등[38]의 연구에서 반복 구속스트레스 초기에 항스트레스 약물투여군의 체중이 감소하다가 구속 3일째부터 체중이 회복되기 시작하여 7일째에 정상쥐에 비해 유의성 있는 회복을 보인 것처럼, 좀 더 정확한 결과를 위해서는 구속기간을 늘여 감소된 체중이 CON군에 비해 얼마나 짧은 시간 안에 회

복되는지에 대한 연구와 스트레스가 없는 일반적 상황에서 실험약물의 단독투여가 체중감소에 미치는 영향에 대한 연구가 보충되어야 할 것으로 사료된다.

구속 스트레스를 후 대식세포의 대식작용능을 측정한 결과, 구속스트레스로 인해 유의미하게 대식작용능이 감소하였고($p<0.01$), PC군, DH군, HR군, DHXT군 모두 CON군에 비해 유의미하게 대식작용이 증가하였으며($p<0.05$, $p<0.01$), PC군과는 유사한 대식작용을 나타냈다(Fig. 2). 이는 大黃, 黃連, 大黃黃連瀉心湯이 스트레스에 의해 저하된 대식작용을 회복시켜, 대식세포가 관여하는 비 특이적 면역반응을 증가시킬 수 있음을 의미한다.

대식세포에 LPS와 γ-IFN 첨가 전후 NO함량의 차이를 검사한 결과 구속스트레스로 인해 대식세포내의 NO 함량은 유의미하게 감소하였고($p<0.01$), CON군에 비해 PC군, DH군, HR군, DHXT군 모두 NO함량이 유의미하게 감소하였다($p<0.01$). 또한, PC군에 비해 HR군, DH군의 NO함량은 유의미하게 감소하였고($p<0.01$), PC군과 DHXT군 사이에는 유의미한 차이는 없었다(Fig. 3). 이는 스트레스 상황에서 大黃, 黃連, 大黃黃連瀉心湯이 항상성 조절을 위해 대식세포를 활성화시켜 스트레스 상황에서 회복되도록 하는 것으로 볼 수 있다.

또한, 구속스트레스를 가한 후, 뇌 해마체의 iNOS의 발현양이 증가하였고, PC군, DH군, HR군, DHXT군에서는 모두 CON군보다 약한 발색을 보였으며, 특히 HR군은 현저히 옅은 발색을 보였다(Fig. 3). 이는 DH, HR, DHXT가 스트레스에 의해 뇌 해마체에서 발현되는 iNOS를 억제시켜 과도한 NO생성을 억제하여 면역능을 회복시킬 수 있음을 의미한다[39].

구속스트레스를 가한 직후, 혈액 내의 ACTH양을 측정한 결과, 15분, 60분, 180분에 모두 구속스트레스로 인해 ACTH함량이 감소하였으며, 15분에는 CON군과 PC군, DH군, HR군, DHXT군이 모두 유사한 값을 나타내었고, 60분에서는 CON군에 비해 PC군, DH군, HR군, DHXT군의 ACTH함량이 증가하였으며, 특히 DH군에서 뚜렷이 증가하였다. 180분에는 CON군보다 PC군, DH군, HR군, DHXT군이 오히려 약간 증가하여, DH군, HR군, DHXT군 모두 시간대와 상관없이 전반적으로 ACTH 감소를 억제하지는 못하였다(Fig. 5).

또한, 모든 시간대에서 구속스트레스로 인해 corticosterone함량이 유의미하게 증가하였고($p<0.05$, $p<0.01$), PC군, DH군, HR군, DHXT군 모두 CON군에 비해 유의미하게 corticosterone값이 유의미하게 감소하였으며($p<0.05$, $p<0.01$), PC군에 비해 15분에는 HR군이 유의미하게 증가하였고($p<0.05$), 60분에서는 DH군, HR군이 유의미하게 감소하였고($p<0.01$), 180분에는 DHXT군, DH군, HR군 모두 유의성이 없었다(Fig. 6).

이는 스트레스에 의한 corticosterone함량 증가를 DH, HR, DHXT가 모두 유의미하게 억제하여, 大黃, 黃連, 大黃黃連瀉心湯이 스트레스환경에서 회복시키는 능력이 있고, 이들이 스트레스반응에서 직접 ACTH를 줄이도록 작용하기보다는 스트레스에 의한 corticosterone의 함량 증가의 영향을 받으며 변화를 보이는 것으로 사료되나, DH, HR, DHXT이 스트레스 반응에서 어느 부위에 관여하는지에 대해 알아보기 위해서는 보다 많은 연구가 필요하겠다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 大黃, 黃連, 大黃黃連瀉心湯이 구속스트레스 마우스에서 혈청 내 corticosterone의 감소에 영향을 줄 뿐 아니라 복강 내 대식세포의 탐식작용을 향상시키고, 대식세포 내의 NO함량과 해마체에서의 iNOS 발

현양을 감소시키며, imipramine과 유사한 효과를 나타내어, 항스트레스 제제로서의 가능성을 밝혀주었다. 이에 앞으로는 체계적으로 스트레스 반응에 대한 구체적인 작용부위와 기타 다른 스트레스 처방과의 비교를 통해 최적의 유효처방을 탐색해 나갈 수 있을 것으로 기대된다.

Ⅴ. 결 론

大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯의 스트레스 상황에서의 회복능을 규명하기 위하여 mouse에 각각 약물을 투여하고, 구속스트레스를 부여한 후, 체중변화, 혈청 내 ACTH와 corticosterone 함량변화, 복강 내 대식세포의 탐식작용과 NO 함량의 변화 그리고 대뇌 해마체에서의 iNOS 발현 여부를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯은 체중변화에 영향을 주지 못하였다.
2. 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯은 대식세포의 대식작용을 유의미하게 증가시켰다.
3. 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯은 대식세포내의 NO의 함량을 유의미하게 감소시켰다.
4. 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯은 대뇌 해마체에서의 iNOS 발현을 감소시켰다.
5. 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯은 혈청 내 ACTH 함량에 영향을 주지 못하였다.
6. 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心은 혈청 내 corticosterone 함량을 유의미하게 감소시켰다.

이상의 실험결과 大黃, 黃連 및 大黃黃連瀉心湯은 구속스트레스에 의해 증가하는 corticosterone 함량을 억제하고, 감소되는 면역능을 회복시켜 스트레스 환경으로부터 회복시키는 작용이 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 성호경, 김기환. 생리학(제6판). 서울:의학문화사. 1997:655.
2. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회. 증보판 한의신경정신과학. 파주:집문당. 2010:104, 198.
3. Lauralee Sherwood 著, 강영숙 외 譯. 생리학(제5판). 서울:라이프사이언스. 2005:16.
4. 宋鷩永. 中醫病因病機學. 북경:인민위생출판사. 1987:64-6.
5. Lundberg U. Methods and applications of stress research. Technol Health Care. 1995;3(1):3-9.
6. Wong YN, Cassano WJ Jr, D'mello AP. Acute-stress-induced facilitation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Neuroendocrinology. 2000;71(6):354-65.
7. Blalock JE, Smith EM. A complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine system. Fed Proc. 1985;44(1pt1):108-11.
8. Figueiredo HF, Dolgas CM, Helmer JP. Stress activation of cortex and hippocampus is modulated by sex and stage of estrus. Endocrinol. 2002;143(7):2534-40.
9. 전국한의과대학 상한론교재 편찬위원회 편. 傷寒論精解. 서울:일중사. 2003:326.
10. 채인식 著. 傷寒論譯詮(附 臨床應用). 서울:고문사. 2000:355-8.
11. 廓子光, 馮顯遜. 傷寒論湯證新編. 상해:과학기술출판사. 1983:102.

12. 미즈노 슈이치. 최신 임상 한방의학 2권. 서울:신흥메드싸이언스. 2009:704-5.
13. 이정환, 정창현. 藥徵. 서울:청홍출판사. 2007: 139, 169-72.
14. 백진원, 김주원, 정승현, 신길조, 이원철. 大黃이 뇌허혈 유발 노령 흰쥐의 해마 c-fos 및 c-jun 발현에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2004;25(3):473-81.
15. 명성하, 김연섭. 大黃의 항산화와 신경세포손상 보호효능에 대한 연구. 동의생리병리학회지. 2005;19(3):647-55.
16. 조은호, 이태희. LPS에 의해 유발된 염증 스트레스에 대한 黃連과 附子의 효과. 대한본초학회지. 2006;21(2):77-85.
17. 정효원, 박용기. 黃連의 쥐 대식세포로부터 LPS에 의해 유도되는 nitric oxide 및 TNF-α의 생성억제효과. 대한본초학회지. 2006; 21(2):165-73.
18. 최성환, 김진미, 장문원, 문승희, 조현경, 설인찬. 胸痞, 不眠, 便秘를 동반한 뇌경색 환자의 大黃黃連瀉心湯 치험례. 대한한의학정보학회지. 2009;93-9.
19. 노의준, 강한은. 古方類聚. 서울:도서출판고방. 2009:467.
20. Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. Prog Brain Res. 2000;122:61-78.
21. Selye H. The stress of life. Toronto:Longmans Green and Co. 1958:1-50.
22. Cannon WB. The wisdom of the body. Newyork:Norton&Company Inc. 1963:19-40.
23. 민병일 譯. 스트레스와 면역. 동경:電波科學社. 1994:23, 56-60, 73-82.
24. 김금순. 스트레스상황이 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구. 대한심신스트레스학회지. 1993;1(1):35-54.
25. Bishopric NH, Cohen HJ, Letkowitz RJ. Beta adrenergic receptors in lymphocyte subpopulations. J. Allergy and Clinical Immunology. 1980;65(1):29-33.
26. 李慶雨. 編注譯解 黃帝內經靈樞. 서울:여강출판사. 2000;(2):197, (3):223.
27. 陳無擇. 三因方. 서울:한성사. 1997:9.
28. 金種佑, 黃義完. Stress에 관한 한의학적 이해. 심신스트레스학회지. 1993;1(1):120.
29. 李慶雨. 編注譯解 黃帝內經素問 5. 서울:여강출판사. 1994:311, 421.
30. 祁松任, 陳濤. 中醫學與免疫學研究. 中西醫結合雜誌. 1984;4(6):381-4.
31. 강탁림. 加味溫膽湯이 스트레스성 뇌신경전달물질 변화에 미치는 영향. 대한예방의학회지. 2001;5(2):114-21.
32. 조진영, 황의완. 歸脾溫膽湯이 흰쥐의 항스트레스와 면역반응에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1995;6(1):1-17.
33. 이정호, 정대규. 逍遙散과 淸肝逍遙散이 스트레스 생쥐의 뇌부위별 Monamines 함량에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1998;9(2): 1-18.
34. 황귀서, 이기선, 박종형. 丹梔逍遙散이 구속스트레스를 가한 흰쥐의 뇌내 catecholamine 함량변화에 미치는 영향. 환경독성보건학회지. 1998;13(2):55-149.
35. 吉益東洞 著 , 吳秀三, 富士川游 編. 동동전집・방극편. 서울:교정의서국. 2006:364.
36. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 2000:402-4, 785-7.
37. 노영범, 노의준. 圖解類聚方. 서울:도서출판고방. 2010:276.

38. 이한창, 염미정, 김건호, 최강덕, 이승희, 심인섭, 이혜정, 함대현. 구속스트레스를 가한 rat의 hypothalamus에서의 유전자 발현 및 補心建脾湯의 항스트스효과에 관한 cDNA microarray 분석. 대한생리병리학회지. 2003; 17(6):1393-403.

39. Gemil Tumer, Hakki Murat Bilgin, Basra Deniz Obay, Huda Diken, Ezelv Tasdemir, Abdurrahman Sermet. Effect of ghrelin administration on phagocytic activity in acute cold-restraint stress exposed rats. Regulatory Peotides. 2007;138:113-7.