

[報 文]

단치소요산이 구속 스트레스를 가한 흰쥐의 뇌내 catecholamine 함량변화에 미치는 영향

황 귀 서 · 이 기 선 · 박 종 형

경원대학교 한의학과

Effect of Danchisoyosan on Catecholamine Level in Rat Brain Applied to Immobilization Stress

Kwi-seo Hwang, Ki-seon Lee and Jong-Hyeong Park

College of Oriental Medicine, Kyung-won University

ABSTRACT

To elucidate the preventive effect of Danchisoyosan (DS) on stress, we investigated the physiological change of rats which were applied immobilization stress. For immobilization stress, rats were placed in restrainer for 12 hours a day for 3 days. During application of stress, body weight of rats was measured. After sacrifice, 8 organs were taken for measurement of organ weight. Brain was sectioned into 4 parts that are Frontal Cortex, Corpus Striatum, Hypothalamus and Hippocampus. Each part was homogenated and its catecholamine and serotonin contents were measured with HPLC. In our study, stress mainly induced increase of concentration of neurotransmitters in brain without other significant physical change of rats. DS inhibited stress induced changes of neurotransmitter content in brain.

서 론

스트레스란 생체에게 적응을 강요하는 신체적, 심리적 압박상태를 총칭하는 것으로, 과도하여 생체의 적응이 어려울 경우 심장질환이나 두통, allergy 등과 같은 신체적 문제를 야기하거나 불면, 불안, 환각 망상 등의 정신장애를 유발할 수 있다.¹⁾ 현대인에게 주거, 대인관계, 업무 등에서 기인하는 스트레스는 신체적, 정신적 건강을 위협하는 주요한 환경요인이 되고 있다.²⁾ 뇌는 스트레스를 인식하고 적응에 필요한 신체적 변화를 유발시키는 기관으로

스트레스로 인한 뇌의 기능적, 구조적 변화와 신체적인 반응에 대한 연구는 스트레스의 병리와 예방책을 연구하는데 있어서 가장 핵심적인 분야이다.³⁾ 사람의 경우 뇌에 대한 침습적 연구가 제한적이기 때문에 실험동물을 이용한 연구가 일반적으로 이루어지고 있다. 실험동물에서 스트레스에 의한 정서적 변화나 지능적 변화를 측정하는 데는 한계가 있으므로, 스트레스로 인한 뇌내 신경전달물질의 변화가 일반적인 측정 지표가 되고 있다.^{4) 5)} 스트레스의 실험동물모델로서 실험동물을 장기간 자유롭게 움직일 수 없도록 구속시키는 방법이 널리 이용되고 있다.⁶⁾ 구속스트레스에 의해 뇌와 뇌의 각 부위에서 cate-

cholamine 등 신경전달물질의 농도가 변화됨이 보고되었고, 뇌의 지질과 단백질에 과산화가 유발됨이 보고된 바 있다.⁷⁾

단치소요산(丹道遙散)은 청간소요산(淸肝逍遙散) 등과 함께 한방에서 스트레스나 우울증세 등을 개선하기 위해 처방되어 왔다.^{8)~9)} 단치소요산의 항스트레스효과를 실험적으로 알아보기 위하여 흰쥐에 구속스트레스를 가하여 체중, 여러 장기의 무게, 뇌의 과산화지질생성, 뇌내 신경전달물질의 농도변화에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 검액의 조제

단치소요산(DS) 150 g을 약탕기에 넣고 2,000 ml의 증류수를 넣어 3시간동안 가열하여 물 추출액을 얻었다. 이를 membrane filter (2 μ m, Millipore)로 감압여과한 후 진공증발시켜 농축시킨 다음, 동결건조기에서 완전히 건조하여 28.09 g의 고형물을 얻었다. 이 고형물을 투여를 위해 0.5% CMC에 녹여 냉장보관하였다.

2. 구속 스트레스 부여방법과 검액의 투여

실험동물 공급사(대한실험동물)로부터 200~220 g의 흰쥐(SD, male)를 공급받아 3일간 적응시켰다. 자동점등기를 이용해 12시간 점등하고 12시간 소등했다. 사료는 mouse용 사료(삼양사)를 사용하였고, 식수는 상수를 사용하였으며, 그 양을 제한하지 않았다. 동물실내 온도는 20°C, 습도는 60%로 유지하였고, 여과된 공기를 환류시켰다. 흰쥐 8마리를 한 군으로 하여 정상군(Normal group), 구속군(Control group), 검액투여군(DS-treated group)으로 분리하였다. 정상군과 구속군에는 식염수를 5 ml/kg씩, 검액투여군에는 약물을 500 mg/5 ml/kg씩 2주간 매일 투여하였다. 투여 12일째부터 매일 12시간씩, 구속군과 검액투여군을 아크릴로 제조한 구속상자(5×5×20 cm)에 넣고 절식시켰다. 구속직전 식염수와 검액을 각각 투여하였고, 정상군도 같은 시간동안 절식시켰다. 3일간 같은 방식으로 구속을 반복하였고, 4일째 sacrifice하여 뇌와 장기를 적출하였다.

3. 체중측정

투여시작일에 체중을 측정하고, 투여 5일 후 체중을 측정하였다. 구속직전과 구속후에는 매일 체중을 측정하였다.

4. 뇌 및 장기적출

구속스트레스 부여 후 실험동물을 단두하여 즉시 뇌를 적출하여 액화질소탱크(-170°C)에 보관하였다. 단두한 후 즉시 heart, liver, pancreas, spleen, kidney, adrenal gland, thymus, testis를 적출하여 무게를 측정한 후 냉동보관하였다. 모든 장기는 이후 -90°C의 초저온냉동고로 옮겨 실험전까지 보관하였다.

5. 뇌의 부위별 분리

적출한 뇌를 전방에서 1 cm 두께의 관상절편으로 만든 다음, rat brain anatomy map을 참고로 하여, 대뇌피질(frontal cortex), 선조체(corpus striatum), 시상하부(hypothalamus), 해마조직(hippocampus)으로 분리하였다.

6. Brain homogenate의 catecholamines과 5-HT의 정량

분리한 뇌조직을 Perchloric acid 용액 600 μ l (0.17 M perchloric acid 510 μ l+2 μ M Dihydro Benzylamine (DHBA) 90 μ l)에 넣어 microhomogenizer (GlassCol. Corning)로 homogenation 시켜 4°C에서 10분간 방치한 후 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이를 millipore filter (0.2 μ m)로 여과하여 HPLC 주입용 시료로 사용하였다. Catecholamine과 5-HT의 정량은 DHBA에 의한 internal standard 방법을 사용하였다. Catecholamine의 retention time과 양을 결정하기 위하여 norepinephrine, epinephrine, dopamine, serotonin는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 각각 1 ng/10 μ l씩 가하여 표준액의 chromatogram을 작성하였다. HPLC의 분리조건은 Table 1과 같다.

7. Brain homogenate의 lipid peroxidation 측정

Tissue slice를 무게를 측정하여 5배(w/v)의 cold Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)을 가하여 Polytron homogenizer를 이용하여 homogenation 시켰다. homogenate에 0.25 mM

Table 1. Analytical condition for Catecholamine concentration in rat brain homogenate

Item	Condition
Pump	1-5000 psi
Detector	ECD
Column	Novapak C18 (30 cm × 4.6mm i.d., 10 μm)
Intergrator	automatic-digitalized
Temperature controller	4°C
Autoinjector	90 well
Mobile phase	0.003M perchloric acid : Acetonitrile (99 : 1)
Flow rate	1 ml/min
Sample volume	10 μl

의 FeCl₃를 가하여 37°C에서 1시간동안 incubation 시키고, trichloroacetic acid를 가하여 단백질을 침전시켰다. 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 얻어 thiobarbituric acid (0.67% in M HCl solution)를 가하여 100°C에서 20분간 반응시킨 후, 이 반응에서 생성되는 MDA (malonyl dialdehyde)의 양을 550 nm에서 흡광도를 측정하여 과산화지질 생성의 지표로 삼았다.

8. 통계

실험군과 대조군의 경과를 Student's t-test하여 p값이 0.05보다 낮을 때 유의성있게 차이가 있다고 판단하였다.

결 과

1. 체중변화와 장기무게의 변화

실험기간중 각 실험군의 체중의 변화는 Fig. 1과

같다. 실험기간중 체중이 50~60 g 증가하였으며, DS투여에 의한 체중의 변화는 관찰되지 않았다. 구속스트레스를 가하면서 체중이 감소하기 시작하였다. DS 투여군은 체중이 투여 10일이 지나면서 정상군에 비해 낮아졌으며, DS 투여가 스트레스에 의한 체중의 감소에는 영향을 주지 못하였다.

실험동물을 단두한 직후 각 장기를 적출하여 무게를 측정된 결과는 Table 2와 같다. 적출한 8가지의 장기 중 testes를 제외한 모든 장기의 무게가 스트레스를 부여한 실험군에서 유의적으로 감소하였다. 그러나, 장기무게의 감소는 체중감소와 비례하였으

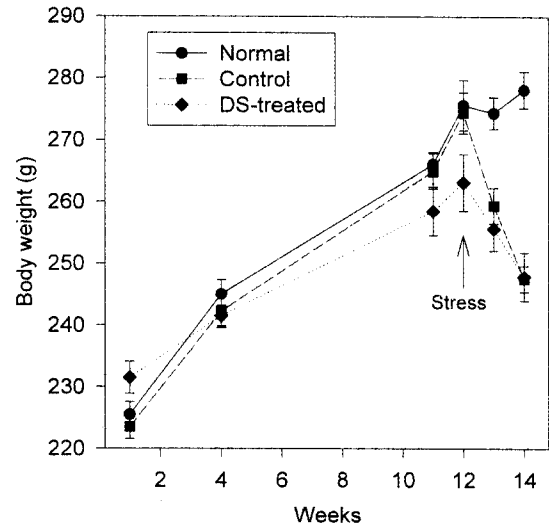


Fig. 1. Effects of DS on change of body weights during experiments. All dots represents the means±standard deviation (SD) of 8 rats.

Table 2. Organ weight/body weight of liver, spleen, kidney and adrenal gland (g/g × 10³)

	liver	spleen	kidney	adrenal gland
Normal	31.8 ± 0.59	2.48 ± 0.11	3.39 ± 0.07	0.12 ± 0.01
Control	32.6 ± 1.18	2.32 ± 0.10	3.41 ± 0.05	0.12 ± 0.02
DS-treated	32.0 ± 0.64	2.70 ± 0.22	3.53 ± 0.09	0.13 ± 0.02
	testes	pancreas	thymus	heart
Normal	5.80 ± 0.26*	3.76 ± 0.28	2.03 ± 0.06*	3.82 ± 0.12
Control	6.68 ± 0.26	3.49 ± 0.26	1.81 ± 0.07	3.80 ± 0.03
DS-treated	6.99 ± 0.30	3.76 ± 0.13	2.10 ± 0.19*	4.22 ± 0.19

Data are the means±standard error of 8 rats
 * = p<0.05 vs Control (Student's t-test)

며, 특정장기의 위축은 관찰되지 않았다. 다만, testes와 thymus에서 장기무게/체중의 비가 증가하였다. DS를 투여한 실험군에서는 정상군과 유사한 장기무게/체중 비율을 보였다. 구속 스트레스로 인해 신진대사가 전반적으로 증가하여 체중이 감소하지만 특정장기가 손상되지는 않는 것으로 사료된다.

2. Brain homogenate의 lipid peroxidation

적출한 뇌의 일부를 homogenation하여 과산화지질 생성 정도를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 스트레스를 가한 실험군에서 과산화지질 생성이 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. DS 투여군은 정상군과 좀더 유사한 경향을 보였다. 구속 스트레스가 뇌에 가한 물리적인 자극은 미미한 것으로 사료된다.

3. 뇌의 부위별 catecholamines과 5-HT 함량의 변화

대뇌 피질에서의 스트레스에 의한 신경전달물질의 변화와 이에 미치는 영향은 Table 3과 같다. Catecholamines과 5-HT가 스트레스에 의해 모두 증가하는 경향을 보였고, norepinephrine (NE), dopamine (DA), serotonin (5-HT)에서는 유의적으로 증가하였다. DS는 스트레스에 의한 신경전달물질의

대뇌피질내 증가를 억제하였다. 선조체 (Corpus Striatum)에서는 스트레스에 의해 NE와 5-HT만이 유의적으로 증가하였다. DS는 NE의 증가는 유의적으로 억제하였으나, 5-HT의 증가를 억제하는 정도는 미미하였다 (Table 4).

시상하부 (hypothalamus)는 스트레스에 의해 신

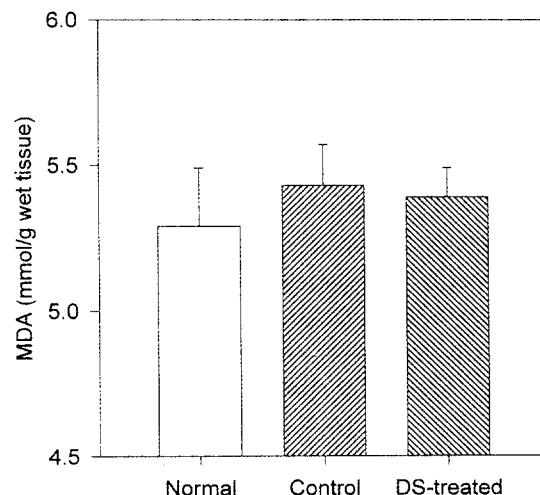


Fig. 2. Effect of DS on lipid peroxidation of stressed rat brain. All bars are the means \pm standard error (SE) of 8 rats

Table 3. Effect of DS on catecholamines and serotonin contents in Frontal Cortex of immobilization stressed rats (ng/g wet tissue)

	NE	E	DA	5-HT
Normal	273.3 \pm 30.9*	233.0 \pm 19.5	777.0 \pm 103.3*	213.5 \pm 23.7*
Control	341.5 \pm 35.5	289.4 \pm 78.0	2188.8 \pm 549.1	344.3 \pm 38.6
DS-treated	301.0 \pm 26.3	230.1 \pm 40.0	1434.8 \pm 335.5*	254.0 \pm 43.1*

Data are the means \pm standard error of 8 rats

* = $p < 0.05$ vs Control (Student's t-test)

Table 4. Effect of DS on catecholamines and serotonin contents in Corpus Striatum of immobilization stressed rats (ng/g wet tissue)

	NE	E	DA	5-HT
Normal	260.4 \pm 51.0*	211.7 \pm 23.31	674.8 \pm 59.5	305.1 \pm 76.0*
Control	593.1 \pm 30.1	236.5 \pm 35.9	688.7 \pm 77.1	866.3 \pm 68.9
DS-treated	320.1 \pm 45.5*	204.5 \pm 14.5	677.7 \pm 80.5	770.3 \pm 67.9

Data are the means \pm standard error of 8 rats

* = $p < 0.05$ vs Control (Student's t-test)

Table 5. Effect of DS on catecholamines and serotonin contents in Hypothalamus of immobilization stressed rats (ng/g wet tissue)

	NE	E	DA	5-HT
Normal	520.3±26.8*	85.7±36.0*	571.0±210.4*	699.1±95.9*
Control	566.3±17.5	247.5±37.5	1272.5±294.7	967.7±89.7
DS-treated	483.5±36.4*	258.6±46.3	1915.8±383.3*	494.6±73.6*

Data are the means±standard error of 8 rats
 * = p<0.05 vs Control (Student's t-test)

Table 6. Effect of DS on catecholamines and serotonin contents in Hippocampus of immobilization stressed rats (ng/g wet tissue)

	NE	E	DA	5-HT
Normal	511.1±61.5	102.0±16.6*	333.8±31.9*	195.2±26.6*
Control	547.0±109.2	180.5±39.3	492.3±22.9	441.1±40.4
DS-treated	336.7±69.8*	186.0±30.6	273.5±49.3*	210.0±32.2*

Data are the means±standard error of 8 rats
 * = p<0.05 vs Control (Student's t-test)

경전달물질이 모두 유의적으로 증가하였고, DS는 NE와 DA, 5-HT의 농도가 증가하는 것을 유의적으로 억제하였다 (Table 5). 해마 (hippocampus)에서는 스트레스가 E, DA, 5-HT의 농도를 유의적으로 증가시켰으며, DS는 DA와 5-HT의 농도의 증가를 유의적으로 억제하였다 (Table 6).

고 찰

실험동물에 구속스트레스를 가하였을 때 뇌내의 catecholamines의 변화에 영향을 주었다. 전반적으로 catecholamine과 serotonin의 뇌내 농도가 증가하였으나, 적출부위에 따라 차이가 있어 전두대뇌피질과 시상하부에서는 dopamine이 가장 현저히 증가하였고, 선조체에서는 dopamine양의 변화보다 serotonin의 증가가 두드러졌다 (Table 3-6). De Souza 등은 유사한 연구를 통해 구속 스트레스가 대뇌피질과 시상하부에서 serotonin과 그 유도체, 그리고 dopamine의 농도를 증가시킨다고 보고한 바 있다.¹⁰⁾ 같은 보고에서 구속스트레스를 짧은 시간내에 반복해서 가할 때 serotonin, dopamine의 증가가 더욱 커졌다. Norepinephrine의 농도는 De Souza의 보고에서는 감하는 것으로 관찰되었으나, Nomura 등의 보고에서는 Wistar 쥐에서 변화가 없다고 관찰되었다.¹¹⁾ Shimizu 등은 Wistar 쥐에

장단기간의 구속스트레스를 가한 결과 뇌내 대부분의 영역에서 norepinephrine을 상승하였다고 보고하였다.¹²⁾ 따라서, 구속스트레스가 뇌에 미치는 영향과 약물의 작용을 평가할 때, dopamine과 serotonin 함량에 미치는 영향을 관찰하는 것이 신뢰성 있는 방법이라고 사료된다.

실험동물에 물리적으로 스트레스를 유발하기 위하여 여러 가지 방법이 이용되고 있다. 전기적 자극을 가하거나, 저온에서 방치하거나 열판, 주사 등을 사용하여 통증을 유발하는 방법 등이 사용되어 왔다.¹³⁻¹⁵⁾ 구속스트레스 유발법은 기타의 방법에 비해 직접적인 통증을 유발하지 않기 때문에 사람에서의 정신적 스트레스와 좀 더 유사하며, 장기간 실험시 실험동물을 관리하는데 있어 유리하다. Weiminger의 방법과 같은 가혹한 구속조건에서는 쥐에서 뇌조직의 과산화지질 생성이나 간에서의 과산화지질 생성, 위체양의 생성과 같은 말초적 변화들이 유발될 수 있다.¹⁶⁻¹⁹⁾ 본 실험에서는 뇌조직의 과산화지질 생성정도를 관찰한 결과 조직의 물리적 변화는 일어나지 않았다. 다만, 스트레스로 인한 체중의 감소와 뇌내 신경전달물질의 함량변화만이 유의적인 차이가 있었다. 이는 구속조건의 차이에서 기인하는 것이라 여겨지며, 사람의 경우 스트레스에 노출되었을 때 신체의 말초적 변화보다 두통, 불안과 같은 심리적 장애가 우선하는 만큼 항스트레스성 약물의

약효를 평가하는데는 보다 적합한 실험모델이라고 여겨진다.

한방에서 단치소요산은 간울혈허(肝鬱血虛)로 인하여 양협(兩脇)이 작통(作痛)하고 두통(頭痛), 목현(目眩), 구조인건(口燥咽乾), 신피식소(神疲食少) 등이 일어날 때 처방된다. 현대의학적 개념으로는 스트레스에 의한 우울과 불안, 두통 등 신경장애나 현기증과 식욕감소 등 정서장애에 의한 부차적 증세를 개선하는 목적으로 사용될 수 있다.¹⁹⁾ 본 연구에서는 동물모델에서 단치소요산의 약효를 실험적으로 검증하였다. 단치소요산은 스트레스로 인해 뇌내 신경전달물질의 농도가 변화하는 것을 억제하였다. 사람에게서 나타나는 스트레스성 신경질환은 요인이 다양하고 뇌의 작용과 기능이 실험동물에 비해 훨씬 복잡하여 적합한 실험모델을 설정하는 것이 어렵다.²⁰⁾ 그러나, 항우울제나 알코올과 같이 정신신경계에 작용하는 물질들이 구속스트레스를 가한 실험동물모델에서 그 작용이 평가될 수 있음이 보고되었다.²⁰⁾⁻²³⁾ 본 연구의 결과, 단치소요산은 스트레스가 유발하는 뇌내 신경물질 함량의 변화를 조절하여 항스트레스 효과를 가질 것으로 사료된다.

결 론

단치소요산의 추출액을 투약한 흰쥐의 구속스트레스에 대한 반응을 관찰하였다. 구속스트레스는 뇌조직이나 특정장기를 손상시키지는 않았고, 체중을 감소시켰고, 뇌내 dopamine, serotonin 등 신경전달물질들의 함량에 변동을 일으켰다. 단치소요산은 구속스트레스로 인한 체중감소는 억제하지는 못했으나, 뇌내 각 부위에서 신경전달물질의 농도가 상승하는 것을 억제하였다.

본 연구는 한방에서 사용되고 있는 항스트레스 처방이 실험적으로 약효가 증명될 수 있음을 보여주었으며, 단치소요산과 같은 한의학적 처방으로 부터 항스트레스 작용을 가진 물질을 얻어낼 수 있다는 가능성을 보여주었다.

참 고 문 헌

1. 이병운 : 정신의학사전, 일조각, 1990
2. Orth Gom K, Moser V, Blom M, Wamala SP and Schenck Gustafsson K : Survey of stress in women. Heart disease in Stockholm women is caused by both family- and work-related stress, *Lakarlitidningen*, **632**, 635-638(1997)
3. Huether, G : The central adaptation syndrome: psychosocial stress as a trigger for adaptive modifications of brain structure and brain function, *Prog Neurobiol*, **48**:6, 569-612(1996)
4. Palkovits, M, Patthy A and Elekes I : Distribution and stress-induced increase of glutamate and aspartate levels in discrete brain nuclei of rats, *Brain Res*, **373**, 252-257(1986)
5. Glavin GB : Stress and brain noradrenaline, *Neurosci Biobehav Rev*, **9**:2, 233-243(1985)
6. Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A and Ames BN : Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats, *FASEB J*, **10**:13, 1532-1538(1996)
7. Lobanova NN, Panusheva N and Belova TI : Changes in the catecholamine content of brain structures in rats subjected to immobilization stress, *Biull Eksp Biol Med*, **102**:11, 526-527(1986)
8. 김성호, 이상용 : 정간소간산의 항스트레스 효과에 대한 실험적 연구, 동의신경정신과 학회지, **6**, 61-70(1995)
9. 광주중의학원 : 방제학, 영림사, 1990
10. De Souza EB and Van Loon GR : Brain serotonin and catecholamine responses to repeated stress in rats, *Brain Res*, **367**:1-2, 77-86(1986)
11. Nomura M and Okamura K : Catecholamine content changes in brain regions of spontaneously hypertensive rats under immobilization stress, *J Neurochem*, **52**:3, 933-937(1989)
12. Shimizu T, Tanaka M, Yokoo H, Gondoh Y, Mizoguchi K, Matsuguchi N and Tsuda A : Differential changes in rat brain noradrenaline turnover produced by continuous and intermittent restraint stress, *Pharmacol Biochem Behav*, **49**:4, 905-909(1994)
13. Dunn AJ : Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after footshock stress, *Life Sci*, **42**:19, 1847-1853(1988)
14. Geiger JD and Glavin GB : Adenosine receptor activation in brain reduces stress-induced ulcer formation, *Eur J Pharmacol*, **115**:2-3, 185-

- 190(1985)
15. Persico AM, Schindler CW, O'Hara BF, Brannock MT and Uhl GR: Brain transcription factor expression: effects of acute and chronic amphetamine and injection stress, *Brain Res Mol Brain Res*, **20**:1-2, 91-100(1993)
 16. Lui J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A and Ames BN: Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats, *FASEB J*, 10-13, 1532-1538(1996)
 17. Kovacheva Ivanova S, Bakalova R and Ribavov SR: Immobilization stress enhances lipid peroxidation in the rat lungs, *Gen Physiol Biophys*, **13**:6, 469-482(1994)
 18. Geiger JD and Glavin GB: Adenosine receptor activation in brain reduces stress-induced ulcer formation, *Eur J Pharmacol*, **115**:2-3, 185-190(1985)
 19. ali-Khizhazi A, Madoian MV, Sytnikova KA and Lipkan GN: Immobilization stress as a model of ulcerative lesions of the digestive tract and as an object for studying pharmacological and physical actions on the living organism, *Lik Sprava*, **2**, 13-18(1998)
 20. 김찬형, 김지웅 : 공격성의 신경생물학, 대한정신약물학회지, **9**, 3-18(1998)
 21. Zhang X, Kindel GH, Wülfert E and Hanin I : Effects of immobilization stress on hippocampal monoamine release: modification by mivazerol, a new alpha 2-adrenoceptor agonist, *Neuropharmacology*, **34**:12, 1661-1672(1995)
 22. Vernigora AN and Gengin MT: The effect of ethanol on the activity of soluble and membrane-bound carboxypeptidase H in areas of the rat brain during immobilization stress, *Vopr Med Khim*, **40**:1, 54-56(1994)
 23. Kofman O, Levin U and Alpert C: Lithium attenuates hypokinesia induced by immobilization stress in rats, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **19**:6, 1081-1090(1995)