

歸脾湯加減方이 구속 Stress 유발 白鼠에 미치는 영향

권혁란, 김기현, 장규태, 김장현

동국대학교 한의과대학 소아과학교실

The effects of *Quibitanggagam*(QBT) on the stress due to restraint method in rat.

Kwon Hyuk Ran, Kim Ki Hyun, Chang Gyu Tae, Kim Jang Hyun
Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Objectives : This study was aimed to find out the anti-stress and protective-memory effect of *Quibitanggagam*(QBT) on stress of rats

Methods : This experimental study was conducted with elevated plus maze test, passive avoidance test, morris water maze test, and consequently density of AchE reactivity in the CA1 of hippocampus to research the learning and memory of rats affected by restraint stress.

Results : Passive avoidance test revealed that time latency of retention test for QBT+Stress group significantly decreased on 2, 3rd day. Morris water maze revealed that acquisitive ability of QBT+Stress group significantly improved on 2, 3rd day and retentive ability of QBT+Stress group was significantly improved on 7th day. Elevated plus maze test revealed that latency in open arm of QBT+Stress group significantly decreased and locomotor activity(number of entered arm) of QBT+Stress group was significantly increased. The values of density of AchE stained nuclei in the CA1 of hippocampus QBT+Stress group was significantly increased compared with SAL+Stress group.

Conclusion : According to the above results, it is concluded that QBT will be useful as a remedy against stress disease and improving memory.

Key word : *Quibitanggagam*(QBT), stress, learning and memory, AchE

I. 緒 論

Stress란 생체에 가해진 각종 유해 자극에 대한 생체반응과 그에 따른 방어반응의 총화라 할 수 있으며, 이 때 가해지는 자극은 외부에서 가해지는 물리적, 화학적, 생물학적 자극인 외적 자극과 체내에서 가해지는 육체적, 정신적 자극인 내적 자극으로 분류될 수 있다^{1,2)}.

Stress에 대한 생체반응은 환경조건의 변화에 대한 생리적 안정을 유지하기 위하여 주로 내분비계와 자율신경계를 통한 변화가 일어나며, 반응이 지속적일 경우 조절계의 기능장애로 비특이적인 반응을 보이게 된다³⁾.

성인뿐만 아니라 소아에게 있어 stress는 疲勞, 食慾低下 등의 신체적 장애뿐만 아니라 忿怒, 無快感, 自己憐憫, 憂鬱症 등의 情緒的 症狀과 否定的 自己評價, 無望感, 集中困難, 學習能力 低下 등의 認知的 症狀의 심각한 精神的 障礙를 유발할 수 있다⁴⁾.

강제적인 구속은 육체적, 정서적 stress를 동시에 유발하여 시상하부를 통한 교감신경-부신계가 과잉 반응함으로써 부신수질의 epinephrine과 norepinephrine을 혈액 속으로 분비시켜 동맥압이 증가되고, 심박동수와 심근의 수축력 및 심박출량이 증가하며 신장, 장관, 피부혈관을 수축시키고, 근육혈관을 확장시키며 혈당치를 증가시킴으로서 인체가 긴장에 대처한다는 연구결과는 이미 보고된 바 있다⁵⁻⁹⁾.

歸脾湯은 宋代 嚴用和¹⁰⁾가 처음 創方하고, 明代 薛己¹¹⁾가 當歸와 遠志를 첨가하여 완성된 것으로 『東醫寶鑑』¹²⁾에서도 이를 따르고 있으며, 補氣養血과 安神行氣의 약물로 조합되어 益氣補血 健脾養心하는 효능으로 心脾

虛損證인 心神不寧, 氣血虧虛, 脾不統血의 證候에 응용되고 있고, 憂思로 勞傷心脾하여 나타나는 健忘, 怔忡, 驚悸, 遺精, 不眠, 發熱, 盜汗, 思慮過度, 嗜眠, 食慾不振, 大便不調, 月經不順 등의 諸神經症에 적용되는 處方¹³⁾이다.

歸脾湯에 관한 實驗的 研究로 李¹⁴⁾는 歸脾湯加熟地黃이 생쥐의 수면시간 연장, 진정, 진통에 효과가 있음을 보고하였고, 오¹⁵⁾는 흰쥐에서 단속적인 전기자극 및 침수자극으로 유발된 驚, 恐情에 대해 유의성있는 억제효과가 있음을 보고하였으며, 김¹⁶⁾은 歸脾湯, 加味溫膽湯, 歸脾溫膽湯의 항 stress 비교연구에서 백서의 혈청중 norepinephrine, epinephrine의 유의한 감소효과를 보고하였고, 류¹⁷⁾와 이¹⁸⁾는 guinea pig에 열 및 유영 stress를 유발시키고 歸脾湯 투여 후 뇌 norepinephrine, epinephrine, dopamine, serotonin 함량의 유의한 감소와 체중증가, 장기 중량의 감소, 혈장 중 catecholamine, 혈청 중 total cholesterol, free cholesterol, triglyceride, cortisol의 감소를 보고하였으며, 李¹⁹⁾와 成²⁰⁾는 CMS 모델에 대해 歸脾湯이 자당섭취량을 증가시키고 학습능력을 회복시켰음을 보고하였다.

이에 저자는 stress로 유발된 학습 및 기억장애에 歸脾湯加減方의 효과를 관찰하기 위하여 白鼠에 신체구속을 통한 stress로 불안, 학습 및 기억장애를 유발시킨 후 Passive Avoidance Test(PAT), Morris Water Maze (MWM) Test, Elevated Plus Maze(EPM) Test의 행동검사를 통한 행동학적 변화를 관찰하고, 면역조직화학적 방법으로 학습 및 기억에 관련된 부위인 hippocampus부위에서 Acetylcholinesterase(AchE)의 활성변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料

1) 動物

생후 8주된 200-250g의 Sprague-Dawley계 수컷 白鼠((주)삼육, 한국)를, 일주일 동안 실험실 내 사육실 조건에 적응하도록 하면서, 동시에 핸들링(handling) 절차를 통해 실험자와의 접촉에 익숙해지도록 하였다. 쥐들은 일부 stress 절차를 제외하고는 항상 1마리씩 개별 사육상자(26×20×13cm)에서 지내도록 하였다. 사육실의 온도는 21±2℃, 습도는 40~50%로 유지하였고, 사육실 내 환풍기와 공기정화기를

항시 가동시켰다. 밤과 낮의 주기는 12시간:12시간이 되도록 하되, 야행성인 쥐의 습성을 고려하여, 주로 실험이 진행되는 낮 시간이 밤주기에 해당되도록 조정하였다. 실험절차에 따라 예외는 있으나, 그 외의 경우에는 물과 먹이를 마음대로 먹을 수 있게 공급해 주었다.

2) 藥材

藥材는 東國大學校 附屬韓方病院에서 購入하여 사용하였다. 歸脾湯加減方은 《東醫寶鑑》¹²⁾에 수재된 歸脾湯에 白茯苓, 生地黃, 白芍藥, 陳皮, 半夏, 麥門冬, 葛根, 山楂肉, 釣鉤藤, 天麻를 加減하였으며, 1첩의 처방내용과 구성은 Table 1과 같다.

Table 1 Contents of Quibitanggagam(QBT)

韓藥名	Herbal name	amount(g)
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	8
龍眼肉	<i>Longanae Arillus</i>	8
白茯苓	<i>Poria</i>	8
生地黃	<i>Rehmanniae radix Preperat</i>	8
黃耆	<i>Astragali Radix</i>	8
當歸	<i>Angelicae sinensis Radix</i>	8
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	8
酸棗仁(炒)	<i>Zizyphi Spinosae Semen(baked)</i>	8
陳皮	<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i>	4
半夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4
白茯苓	<i>Poria</i>	4
遠志	<i>Polygalae Radix</i>	4
麥門冬	<i>Liriope Tuber</i>	4
葛根	<i>Puerariae Radix</i>	4
山楂肉	<i>Crataegi Fructus</i>	4
釣鉤藤	<i>Uncariae Ramulus Uncus</i>	4
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	2
天麻	<i>Gastrodiae Rhizoma</i>	2
木香	<i>Aucklandiae Radix</i>	2
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2
Total		104

2. 方法

1) 檢液 調製

경구투여용 검액은 상기한 처방 약제를 10첩 단위로 전탕 후 냉동건조하여 분말 상태로 만들어 사용하였다. HPLC를 이용하여 순도를 측정된 약제 104g을 취하여 물로 가열 추출한 후 흡입 여과한 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축하여 점조성의 추출물(수율 13%)을 얻어 실험에 사용하였다. 우선, 약제 1첩당 물(시중 판매용 생수) 300cc의 비율로 혼합하여 환류냉각장치에서 3시간 동안 가열 후, 1차 전탕액을 얻었다. 이 전탕액을 다시 회전식 진공 플라스크에 넣고 감압농축시켜 2차 원액을 얻은 후 다시 냉동건조절차를 거쳐 고체 형태의 추출물로 만들어졌다. 이 과정에서 약제 1첩당 13.665g의 추출물이 얻어지게 되며, 추출물은 분쇄기를 이용해 분말상태로 만들어 이용하였다. 실험이 진행되는 동안 분말 상태의 약제는 냉장보관하였다.

2) 檢液 投與

실험동물을 아무 처치도 하지 않은 정상군(Normal, n=10), 스트레스 유발 후 생리식염수를 투여한 대조군(SAL+Stress, n=11) 및 검액을 투여한 실험군(QBT+Stress, n=10)으로 나누는 후, 멸균한 rat용 철제 경구주입기(직경 1.5×70mm, 명진사, 서울)를 사용하여 제조된 각각의 검액 400mg/kg을 3주간 매일 오전 11시경 경구 투여하였다.

3) 實驗 節次

3주 동안 stress를 가한 후 4주째부터 1주일 동안 동일한 stress를 가하면서 Passive Avoidance Test(PAT)를 실시하였고, 그 다음 PAT가 끝난 후 1주일동안 동일한 stress를

가하면서 Morris Water Maze(MWM) Test를 실시하였으며, 그 다음날 Elevated Plus Maze (EPM) Test를 실시하였다. 모든 행동검사가 끝난 후에 백서의 뇌조직을 적출하여 적당한 처리를 거쳐 광학현미경으로 관찰하여 hippocampus 부위에 발현되는 Acetylcholinesterase (AChE)의 신경세포내 밀도를 측정하였다.

4) Stress 誘發

대조군과 歸脾湯加減方 투여군의 白鼠는 검사기간 동안 매일 오전 8시 30분 경 동물실에서 실험실로 옮겨 오전 9시부터 2시간씩 3주 동안 stress를 유발하였다. Stress 유발방법은 비닐구속, 팔다리구속 그리고 구속상자를 이용한 구속 등이 있지만 기존 실험에서 가장 효과적인 방법인 비닐을 이용한 구속방법을 이용하였다²¹⁾. 구속비닐은 삼각뿔 모양이며 실험용 쥐의 머리가 삼각뿔 방향으로 향하게 하여 투입시킨 후 꼬리만 밖으로 나오게 한 뒤 테이프를 고정시켰으며 삼각뿔 쪽 비닐은 호흡이 가능할 정도만 개봉하였다. 3주의 stress에 노출한 후 각 2주 동안 행동검사를 실시하면서 동일한 stress를 가하였다.

5) 體重 測定

신체변화를 관찰하기 위하여 모든 군에서 실험시작전 1번과 실험기간 5주 동안 매주 한 차례씩 모두 6회의 체중 측정을 하였다.

6) 학습 및 기억검사

(1) PAT²²⁾의 장치와 절차

실험장치는 전기충격발생기와 회피상자로 구성되어 있다. 회피상자는 검은 아크릴로 만들어진 어두운 상자(30×30×30cm)이고, 바닥에는 알미늄 막대가 일정한 간격으로 깔려 있어서 이를 통해 동물의 발바닥에 전기충격을 가

할 수 있다. 상자의 전면 바깥벽에는 한 마리의 동물을 가까스로 올려놓을 수 있는 크기 (5×15cm)의 난간이 설치되어 있으며, 난간 위쪽 45cm 지점에는 할로겐 전구(AC12V-50W)가 설치되어 있다. 난간과 회피상자 사이에는 작은 문(5×5cm)이 장치되어 있고, 동물에게 전기충격을 가하는 장치는 scrambler shock generator (Coulbourn, USA)를 사용하였다.

실험절차는 먼저 상자 바깥에 설치되어 있는 난간에 동물을 머리가 바깥을 향하게 올려놓는 동시에 상자로 통하는 문을 연 후, 문이 열리자마자 난간 위 45cm 지점에 설치된 조명 장치를 통해 50W의 불빛을 동물에게 비추었다. 장치는 바닥에서 60cm 되는 곳에 설치되어 있어서 난간 위의 동물은 혐오 상황에 노출되게 되고, 동물이 밝은 곳을 피해 어두운 상자로 들어가는 회피반응을 보일 때 동물이 상자로 들어가면 10초간의 간격을 두면서 3회 시행을 반복시키고, 3번째 시행에서는 동물이 어두운 상자로 들어가는 순간 상자의 바닥에 깔려있는 알미늄 격자를 통해 전기충격(0.4mA, 5초)이 가해졌다. 동물의 사지가 모두 상자 안으로 들어가는 경우에만 반응을 한 것으로 간주하고 이것으로 훈련시행을 종료하였다. 24시간이 지난 다음날 동일한 절차를 사용하여 기억 검사시행(retention test)을 실시하였다. 검사시행에서는 동물이 상자로 들어가면 전기충격이 가해지지 않고 바로 시행이 종료되었다. 훈련시행과 검사시행 모두에서 동물이 혐오 상황인 난간에서 어두운 상자로 들어갈 때 소요된 반응잠재기(response latency)가 훈련 또는 기억성적으로 측정되었다. 동물이 싫어하는 밝은 곳에서 어두운 곳으로 들어갔을 때 전기충격을 경험한 기억을 잘 형성하면 기억 검사시행에서는 어두운 곳으로 들어가지 않고 밝은 곳에서 오래 머물게 되므로 반응잠재기가 바로

기억성적으로 간주되었다.

(2) MWM Test²³⁾의 장치와 절차

실험장치는 원형의 수조와 도피대로 구성되었다. 수조의 재질은 합성수지이고 직경 160cm, 높이 50cm이다. 도피대의 높이는 20cm이고 직경 16cm인 투명 아크릴로 만들어져 있으며, 동물이 이 도피대를 찾아서 올라가면 물 밖으로 나갈 수 있게 하였다. 수조에는 22cm 높이로 물을 채우고 탈지분유를 풀어 혼탁하게 하여 도피대가 보이지 않게 만들었으며 수온은 25℃를 유지하도록 하였다. 수조 위 천정 300cm에는 비디오카메라를 설치하고 전 실험과정을 비디오 촬영하여 행동 분석에 사용하였고 실험기간 동안 수조 주변에는 공간단서와 조명 장치를 일정하게 유지시켰다.

실험절차는 수조의 북동(NE)쪽에 고정시키고 실험동물을 매일 동서남북의 임의방향에서 수조에 투입시켜 수조를 우연히 찾을 때까지 3분간의 시간을 부여하였다. 첫 시행에서 도피대를 찾을 경우 도피대 위에서 30초간 머물도록 하고 만약 도피대를 찾지 못할 경우 인위적으로 도피대 위에 올려놓은 후 30초간 머물도록 하여 수조주변의 공간단서를 학습할 수 있는 기회를 부여하였다. 실험은 매일 4회씩 6일간의 학습시행과 7일째 기억시행을 하여 동물이 도피대를 찾는 시간을 측정하였다.

6) 불안검사: Elevated Plus Maze Test^{24,25)}의 장치와 절차

실험장치는 검정색 아크릴로 제작된 십자가 모양의 틀을 만든 후 두 통로에는 벽을 세우고 다른 통로에는 열려있게 하였다. 통로는 지상에서 60cm 떨어진 위치에 조정하여 사용하였다. 동물을 미로의 중앙에 가볍게 올려놓고 열린 통로로 머리를 밖으로 향하게 한 다음 미로

를 자유롭게 탐색하도록 하였다. Stress를 받은 실험동물은 불안 반응이 증가하여 닫힌 통로에 머문 시간과 출입횟수가 증가하는 반응을 보이는데 5분간 관찰하여 출입횟수와 머문 시간을 관찰하였다. 출입횟수는 활동량지표로, 머문 시간은 불안반응의 척도로 사용되었다. 歸脾湯加減方을 투여한 후 stress에 의한 불안 반응과 활동량의 효과를 검토하였다.

7) Acetylcholinesterase(AchE)^{26,27)} 염색 및 측정

모든 행동검사가 끝나면, 실험동물을 sodium pentobarbital(80mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후, 0.9% saline 200ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액(fixative) 800ml를 심장을 통해 관류하였다. 처음 고정액 200ml은 2분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 800ml은 25분간에 걸쳐 천천히 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 동안 후고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4℃에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌 조직을 PBS에 3회 정도 세척한 후 0.1M sodium hydrogen phosphate buffer($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH6.0) 325ml에 acetylcholine iodide 250mg을 녹인 용액에 0.1M sodium citrate 25ml, 30 mM copper sulfate 50ml, 5mM potassium ferricyanide 50ml, 증류수 50ml을 넣어 혼합한 후 수초간 기다리면 옅은 녹색을 나타내는데 이때 뇌 조직을 넣고 실온에서 1~2시간 동안 배양하였다. 모든 처리를 거친 뇌 조직을 광학현미경으로 관찰하였다. 200×200 μm 크기의 microscope 4각 격자(rectangle grid)를 사용하여 100배로 확대하여 hippocampus에서 AchE의 신경세포내 밀도를 Scion image program(Scion Corp. MD, USA)을 이용하여

측정하였다.

8) 統計處理

各 群의 統計處理는 Window용 SPSS version 10.0를 이용한 分散分析法에 의해 分散比를 통하여 各 群 사이의 평균치 차이에 대한 有意성을 檢定한 후, $\alpha=0.05$ 水準에서 LSD檢定法에 의해 事後個別比較하였다

Ⅲ. 成 績

1. 體重變化

Stress 유발 후 실험 제 3, 4 및 5주에서 체중은 정상군에서는 각각 $267.00 \pm 1.53\text{g}$, $323.00 \pm 2.60\text{g}$ 및 $356.00 \pm 3.06\text{g}$ 이었으며, 대조군은 각각 $240.91 \pm 2.11\text{g}$, $279.09 \pm 2.85\text{g}$ 및 $309.09 \pm 2.85\text{g}$ 으로 유의성있는($p < 0.01$) 감소를 나타냈으며, 歸脾湯加減方 투여군은 각각 $255.00 \pm 4.77\text{g}$, $301.00 \pm 8.09\text{g}$ 및 $330.00 \pm 8.56\text{g}$ 으로 대조군에 비해 유의성있는($p < 0.01$) 증가를 나타내었다. (Table 2)

2. Passive Avoidance Test

어두운 상자로 들어가는 데 소요되는 시간 즉 난간에 머문 시간은 실험 제 3 일에서 정상군은 $84.80 \pm 2.98 \text{ sec}$ 였으며, 대조군은 $69.27 \pm 2.71 \text{ sec}$ 로 감소한데 비하여 歸脾湯加減方 투여군은 $83.30 \pm 3.14 \text{ sec}$ 로 유의성있는($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. (Table 3).

Table 2. The Changes of Body Weight During the Experiment

	Normal		SAL+Stress		QBT+Stress	
	Mean	S.E.M	Mean	S.E.M	Mean	S.E.M
Pretest	220.00	0.00	220.00	0.00	220.00	0.00
Week 1	251.00	1.00	230.00	2.70	238.00	4.16
Week 2	257.00	2.60	233.64	2.03	247.00	4.23
Week 3	267.00	1.53	240.91**	2.11	255.00##	4.77
Week 4	323.00	2.60	279.09**	2.85	301.00##	8.09
Week 5	356.00	3.06	309.09**	2.85	330.00##	8.56

Significant difference from Normal (**, p<0.01) and from SAL+Stress group(##, p<0.01). Each value represents the mean±S.E.M.

Normal : Saline administered group

SAL+Stress : Saline administered group after restraint stress for 2hr

QBT+Stress : QBT administered group after restraint stress for 2hr

Table 3. Latency of pre and retention test on PAT

	Normal		SAL+Stress		QBT+Stress	
	Mean	S.E.M	Mean	S.E.M	Mean	S.E.M
Pretest	29.00	6.10	21.00	4.26	28.20	7.30
Retention 1	90.00	0.00	90.00	0.00	81.60	8.40
Retention 2	90.00	0.00	77.00	5.62	87.30	1.80
Retention 3	84.80	2.98	69.27**	2.71	83.30#	3.14

Significant difference from Normal (**, p<0.01) and from SAL+Stress group(#, p<0.05). Each value represents the mean±S.E.M.

Normal : Saline administered group

SAL+Stress : Saline administered group after restraint stress for 2hr

QBT+Stress : QBT administered group after restraint stress for 2hr

3. Morris Water Maze Test

6일간의 학습시행중 도피대를 찾는데 소요되는 시간이 정상군의 경우 제 2일부터 현저히 단축되는 경향을 나타내었고, 대조군은 제 4일에 단축되기 시작하였다. 실험 제 2, 3일에서 정상군은 각각 89.70±14.8 sec, 67.38±14.83 sec 였으며 대조군은 각각 136.89±6.49 sec, 130.43

±10.79 sec로 정상군에 비해 유의성있는(p<0.05, p<0.01) 증가를 나타내었으나 歸脾湯加減方 투여군에서는 각각 73.33±11.38 sec, 63.18±4.29 sec로 대조군에 비해 유의성있는(p<0.01) 감소를 나타내었다. (Table 4) 제 7일의 기억검사는 도피대가 치워진 위치에 머문 시간을 1분내의 백분율로 환산하였는데, 정상군은 27.70±1.34 sec였으며, 대조군은 13.39±

Table 4. The Changes of Latency Time during 6 Days on MWM Test

	Normal		SAL+Stress		QBT+Stress	
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.
Day 1st	138.23	6.86	165.72*	4.80	146.43	13.95
Day 2nd	89.70	14.80	136.89*	6.40	73.33##	11.38
Day 3rd	67.38	14.83	130.43**	10.79	63.18##	4.29
Day 4th	52.13	12.03	78.86	14.38	65.40	18.10
Day 5th	38.38	10.93	67.23	13.93	42.48	5.12
Day 6th	25.73	7.62	51.09	13.17	40.17	7.19
Retention (Day 7th)	27.70	1.34	13.39**	1.54	20.08##	0.78

Significant difference from Normal (*, p<0.05, **, p<0.01) and from SAL+stress group(##, p<0.01). Each value represents the mean±S.E.M.

Normal : Saline administered group

SAL+Stress : Saline administered group after restraint stress for 2hr

QBT+Stress : QBT administered group after restraint stress for 2hr

1.54 sec로 감소한데 비하여 歸脾湯加減方 투여군은 20.08±0.78 sec로 유의성있는(p<0.01) 증가를 나타내었다. (Table 4)

4. Elevated Plus Maze Test

1) EPM 不安反應測定

불안반응에 대한 효과를 평가하기 위하여 EPM Test를 실시하였다. 5분간 장치 안에 든 후 열린 통로와 닫힌 통로에 각각 들어간 회수

와 열린 통로에 머문 시간을 측정하였다. 열린 통로에 머문 시간은 정상군은 184.12±8.10 sec, 대조군은 70.00±4.12 sec로 나타났으나 歸脾湯加減方 투여군은 145.34±13.84 sec로 대조군에 비하여 유의성있는(p<0.01) 증가를 나타내었다. (Table 5). 닫힌 통로에 머문 시간은 정상군은 90.40±8.50 sec, 대조군은 208.60±7.70 sec로 나타났으나 歸脾湯加減方 투여군은 138.90±14.70 sec로 대조군에 비하여 유의성있는(p<0.01) 감소를 나타내었다. (Table 5)

Table 5. Elevated Plus Maze Test

	Normal		SAL+Stress		QBT+Stress	
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.
EPM Open arm	184.12	8.10	70.00**	4.12	145.34##	13.84
EPM Close arm	90.4	8.50	208.6**	7.70	138.9##	14.70

Significant difference from Normal (**, p<0.01) and from SAL+Stress group(##, p<0.01). Each value represents the mean±S.E.M.

Normal : Saline administered group

SAL+Stress : Saline administered group after restraint stress for 2hr

QBT+Stress : QBT administered group after restraint stress for 2hr

2) EPM 活動量測定

각 통로에 들어간 횟수를 측정한 결과 정상군은 97.60±2.22 회였고, 대조군은 77.09±3.14 회로 활동량이 감소한데 비하여 歸脾湯加減方 투여군은 85.20±1.88 회로 유의성있는(p<0.01) 증가를 나타내었다. (Table 6, Fig. 6).

은 정상군 16.15±0.42 %에 비해 대조군은 8.68 ±0.37 %로 현저히 감소했으며, 歸脾湯加減方 투여군은 12.80±0.59 %로 대조군에 비하여 AchE 발현이 증가되어 이들 집단간에 유의성 있는(p<0.01) 차이를 나타냈다. 이에 집단별 사후검정 결과, 歸脾湯加減方 투여군의 AchE 발현이 대조군에 비해 유의성있는(p<0.01) 증가를 나타내었다. (Table 7, Fig. 1).

5. AchE 발현에 미치는 효과

Hippocampus의 CA1 부위에서 AchE 발현

Table 6. Locomotor Activity on EPM Test

	Normal		SAL+Stress		QBT+Stress	
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.
Number of entered arm	97.60	2.22	77.09**	3.14	85.20#	1.88

Significant difference from Normal (**, p<0.01) and from SAL+stress group(#, p<0.05). Each value represents the mean±S.E.M.

Normal : Saline administered group

SAL+Stress : Saline administered group after restraint stress for 2hr

QBT+Stress : QBT administered group after restraint stress for 2hr

Table 7. The Density of AchE Reactivity in the CA1 of Hippocampus

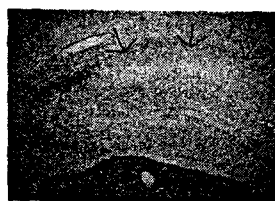
	Normal		SAL+Stress		QBT+Stress	
	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.	Mean	S.E.M.
AchE	16.15	0.42	8.68**	0.37	12.80##	0.59

Significant difference from Normal (**, p<0.01) and from SAL+Stress group(##, p<0.01). Each value represents the mean±S.E.M.

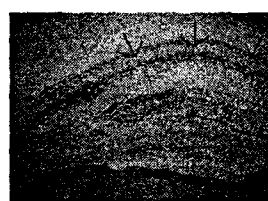
Normal : Saline administered group

SAL+Stress : Saline administered group after restraint stress for 2hr

QBT+Stress : QBT administered group after restraint stress for 2hr



(SAL+Stress)



(QBT+Stress)

Fig. 8 AchE-reactivity in the Hippocampus
Arrow: CA1 of the Hippocampus

IV. 考 察

Stress에 대한 생리, 병리적 반응은 다른 모든 반응의 양상처럼 정지된 체계에서 유도되는 것이 아니라 계속적인 활동상의 변화에서 나타나며, 이러한 변화는 stress 반응이 體外에서 가해진 각종 有害作用에 의해 體內에 생긴 傷害와 防衛反應의 總和라 할 수 있다²⁸⁾.

韓醫學에서는 인간의 생활양식과 생존의 지속을 자연에 대한 적응으로 인식하고 있으며 정신과 육체도 유기적 관계로 인식하여 상호간의 협조와 통일을 중요시하고 있다^{1,2,29,30)}. 이러한 관점에서 볼 때 stress는 內因으로서의 七情, 外因으로서의 六淫과 기타 飲食, 痰飲, 瘀血 등의 不內外因을 포괄하는 病理的 概念³¹⁾으로 볼 수 있으며^{32,33)}, 특히 精神的 측면에서는 神이나 七情의 범주에 해당한다^{30,34)}. 『素問·刺法論』에서 “抑之鬱發”, 『素問·本病論』에서는 “久而化鬱”, “日久成鬱”, “抑之變鬱”, “伏之化鬱”이라하여 stress를 만성적인 억압으로 인하여 舒暢, 通暢이 되지 못하는 상태로 설명하고 있다³⁵⁾. 이런 개념은 후대로 갈수록 精神的인 개념의 의미가 커져 明代의 張介賓³⁶⁾은 “怒鬱”, “思鬱”, “憂鬱” 등의 “情志之鬱”이라는 개념을 설정하여 stress를 “鬱證”의 범주에 귀결시켰다.

Stress로 인한 신체내부 기능의 변화는 氣의 변화로 표현하며 이러한 氣의 不調나 循環障礙가 疾病의 원인이 된다²⁾. 따라서 감정의 변화나 寒熱의 차이 등이 stress 인자로 작용하여 나타나는 신체반응, 특히 자율신경계의 긴장과 이완에서 오는 여러 증상 및 호흡작용과 穀氣로부터 얻는 생명활동의 여러 증상을 모두 氣의 病證으로 볼 수 있다. 精神的 또는 寒熱 등에서 받는 자극에 의한 증상인 七氣,

九氣, 氣鬱, 中氣, 氣痛, 氣逆 등¹²⁾은 stress 증상이라고 할 수 있으며, 이에 따른 치료방법은 stress 치료에 유효하리라 여겨진다.

유기체가 살아가면서 접하게 되는 환경적인 stress를 통제한다는 것은 불가능한 일이므로 stress에 대한 반응으로 나타나는 우울 증상의 기전을 이해하는 것은 매우 중요한 일이다. 여러가지 만성 stress 모델 중 강제적인 구속은 육체적, 정서적 stress를 동시에 유발하여 시상하부를 통한 교감신경-부신계가 과잉 반응함으로써 부신수질의 epinephrine과 norepinephrine을 혈액속으로 분비시켜 동맥압이 증가되고, 심박동수와 심근의 수축력 및 심박출량을 증가시키며 신장, 장관, 피부혈관을 수축시키고, 근육혈관을 확장시키며 혈당치를 증가시킴으로서 인체가 긴장에 대처한다는 연구결과는 이미 보고된 바 있다⁵⁻⁹⁾. 이러한 stress 경험은 白鼠의 활동량을 저하시키고, 호르몬 수준을 변화시키며, 또한 불안반응을 증가시키며 학습과 기억장애를 유발시킨다²⁰⁾.

소아 stress에 대한 관심은 1950년대에 나타나기 시작하여 1980년 DSM-III에서 처음 공식적으로 받아 들여졌다³⁷⁾. 이후 대부분의 정신건강 관련 연구들은 소아의 경험과 교육이 인격형성과 정신건강에 매우 중요하다는 것을 보여준다^{38,39)}.

소아는 인격구조가 미숙하고 자아가 완전히 형성되지 않아서 소아기 stress 증상을 하나의 발달 현상으로 오인하여 독립적 질환으로 인식하지 못하는 경우가 많다. 소아의 stress 증상은 성인에서 흔히 보는 정동적인 반응은 드물고 대개 신체증상이나 행동증상으로 나타난다⁴⁰⁾. 신체증상으로는 복통, 구토, 두통, 신경성 빈뇨, 기관지천식, 과호흡증 등을 들 수 있고, 행동증상으로는 수행능력의 저하, 식이장애(신경성 식욕부진, 식욕과항진), 수면장애(악몽, 야

경증), 타인기피, 등교거부, 과잉행동 등이 있다. 또한 소아의 특유한 정신적 질환으로는 분노발작, 틱장애, 자폐증, 야뇨증, 주의력결핍, 언어발달장애, 학습장애, 지능저하 등이 있다⁴¹⁾. 또한 유아기의 심각한 stress는 퇴행성 행동이나 인격발달의 미숙을 초래할 수 있다고 하였다^{42,43)}.

소아는 心身이 불안정한 상태로 肉體的으로는 臟腑嬌嫩 形氣未充하고 精神的으로는 神氣怯弱 易受驚恐하여^{44,45)} 주위로부터 영향을 받기 쉬워서 사소한 자극에도 곧 반응하므로^{46,47)} 소아의 stress 치료는 신중한 접근이 필요하다.

지금까지 韓藥物的 항stress 효과에 대하여 金⁴⁸⁾이 六味地黃湯, 四物湯, 四君子湯으로 金⁴⁹⁾이 天王補心丹加減方으로, 李⁵⁰⁾가 補血安神湯으로, 길⁵¹⁾은 分心氣飲으로, 이⁵²⁾는 香附子八物湯으로 조⁵³⁾는 歸脾溫膽湯으로, 洪⁵⁴⁾은 黃連解毒湯으로 실험보고한 바 있다.

歸脾湯은 嚴用和의 『濟生方』¹⁰⁾에 최초로 수록되어 있으며, 이후에 薛己가 當歸 遠志를 가하였으며, “引血歸脾”의 의미로 명명되었다. 임상에서는 薛己의 歸脾湯¹¹⁾이 흔히 사용되며 그 구성은 白朮 白茯苓 黃芪 龍眼肉 酸棗仁 人蔘 木香 甘草 當歸 遠志로 이루어져 있고 『東醫寶鑑』¹²⁾에서도 이를 따라서 기술되고 있다. 그 효능이 益氣補血 健脾養心하여 心脾를 補養하므로 역대 임상에서는 心脾의 虛損으로 인한 질환의 치료에 많이 활용되어 왔다. 그 主治 및 運用범위는 역대 醫家들의 풍부한 임상경험을 거쳐서 확충되어 왔는데, 宋代 嚴用和가 『濟生方』에서 처음으로 創方할 당시에는 思慮過度 勞傷心脾로 인한 健忘 怔忡의 證을 위주로 치료하였으나, 元代 危亦林的 『世醫得效方』⁵⁵⁾에 이르러서 脾不統血로 인한 吐血 下血 等證으로 적응증이

확대되었고, 明代 薛己의 『內科摘要』에 와서는 더욱 넓어져 驚悸 盜汗 嗜臥少食 月經不調 赤白帶下 等證에도 활용되었다. 역대 醫家들이 歸脾湯을 활용한 主治 病證은 크게 心神不寧, 氣血虧虛, 脾不統血의 세가지로 귀납된다⁵⁶⁾.

歸脾湯에 관한 實驗的 研究로는 李¹⁴⁾는 歸脾湯加熟地黃이 생쥐의 thiopental sodium에 의한 진정작용에 미치는 영향을 연구하기 위한 실험에서 thiopental sodium에 의한 수면 시간 연장과 crimbling test에 의한 진정작용 및 acetic acid법에 의한 진통효과가 유의성이 있음을 보고하였고, 오¹⁵⁾는 흰쥐에게 단속적인 전기자극 및 침술자극을 가한후 채취한 24시간 뇨 중 norepinephrine과 epinephrine 분비량의 유의성 있는 감소를 보고하여 驚, 恐情에 대한 歸脾湯의 억제효과가 있음을 보고하였으며, 김¹⁶⁾은 歸脾湯, 加味溫膽湯, 歸脾溫膽湯의 항 stress 비교연구에서 백서의 혈청중 norepinephrine, epinephrine의 유의한 감소효과를 보고하였고, 류¹⁷⁾와 이¹⁸⁾는 guinea pig에 열 및 유영 stress를 유발시키고 歸脾湯투여 후 뇌 norepinephrine, epinephrine, dopamine, serotonin 함량의 유의한 감소와 체중증가, 장기 중량의 감소, 혈장 중 catecholamine, 혈청 중 total cholesterol, free cholesterol, triglyceride, cortisol의 감소를 보고하였으며, 李¹⁹⁾와 成²⁰⁾는 CMS 모델에 대해 歸脾湯이 자당섭취량을 증가시키고 학습능력을 회복시켰음을 보고하였다.

본 연구에 사용된 歸脾湯加減方은 『東醫寶鑑』¹²⁾의 歸脾湯에서 健脾寧心하는 白茯苓, 養血柔肝 補肝腎하는 白芍藥, 消食積하는 山楂肉, 養血養陰하는 生地黃과 麥門冬, 燥濕化痰하는 陳皮와 半夏, 升陽解肌하는 葛根, 平肝熄風하는 鈞鈞藤과 天麻를 加하

고 白朮, 龍眼肉, 黃耆, 當歸, 酸棗仁(炒), 甘草를 增量하고 人蔘을 減量하여 脾常不足, 肝常有餘, 腎常虛한 小兒의 生理, 病理的 特徵에 맞게 조절하여 활용하고 있는 處方이다.

本 實驗에서는 歸脾湯加減方이 stress로 유발된 학습 및 기억장애에 미치는 효과를 알아보기 위하여 白鼠에 신체구속을 통한 자연스러운 stress로 불안, 학습 및 기억장애를 유발시킨 후 PAT, MWM Test, EPM Test의 행동학적 변화를 관찰하였고, 면역조직화학적 방법으로 학습 및 기억에 관련된 부위인 hippocampus에서 AchE의 활성변화를 관찰하였다.

실험기간중 신체변화를 관찰하기 위하여 실험시작전 1번과 실험기간 5주 동안 체중을 측정하였다. stress 유발 후 실험 3, 4 및 5주에서 정상군에 비해 대조군은 유의성있는($p < 0.01$) 감소를 나타냈으며, 歸脾湯加減方 투여군은 대조군에 비해 유의성있는($p < 0.01$) 증가를 나타내었다. 그러나 stress가 체중의 변화에 미치는 영향에 대해서는 보고들 간에 차이를 보이고 있으므로 앞으로 지속적인 연구가 필요할 것이다.

학습 및 기억에 미치는 효과를 평가하기 위하여 먼저 PAT를 실시하였는데, 주로 사용되는 step through test를 이용하여 빛으로 유발된 공포자극에 노출된 후 행동의 변화에 전기충격에 의한 통증반응을 훈련시켜서 학습과 기억의 양상을 관찰하는 방법으로 이는 특히 해마와 대뇌 콜린성 신경회로가 동물의 공간적 지도화(mapping)에 관여하다는 근거⁵⁷⁾와 강한 불빛이 내려찍는 장소를 피하기 위해 어두운 터널의 위치를 학습해야 하는 미로과제에서 나이 많은 쥐의 수행이 유난히 저하된다는 사실⁵⁸⁾에 근거한다. 2회의 훈련시행 후 전기충격을 준 뒤 3일간 기억검사를 시행하여 난간에서 어두운 상자로 들어가는 데 소요되는 시간을 측

정하였다. 정상군은 3일간의 검사기간 중 제 2, 3일에 난간에 머문 시간의 감소를 나타내었고, 대조군은 1일에 비해 제 2, 3일에는 현저히 감소를 나타냈으며, 歸脾湯加減方 투여군은 대조군에 비해 난간에 머문 시간이 유의성있는($p < 0.05$) 증가를 나타내었다. 이어서 MWM Test를 실시하였는데, 이는 動物의 空間學習과 記憶을 檢査하기 위해 使用하는 기구로 空間 情報 以外의 端緒들을 統制하기 쉬운 長點이 있다. 이는 주로 長期記憶 能力을 測定하는 課題로서 動物의 周邊에 있는 端緒들을 使用하여 記憶하는 能力, 즉 空間關聯記憶을 測定하는 것⁵⁹⁾으로 인체에서는 外部에서 일어나는 事實들에 대한 情報를 習得하여 記憶하고 그 事實들의 時空間的 位置를 根據로 行動하는 能力에 該當한다. stress 유발 후 매일 4회씩 6일간의 학습시행 후 제 7일에 기억검사를 시행하여 도피대 위치에 머문 시간을 측정하였다. 6일간의 학습시행중 도피대를 찾는데 소요되는 시간이 정상군은 제 2일부터 현저히 단축되는 경향이 나타났고, 대조군은 제 4일에 단축되기 시작하였다. 歸脾湯加減方 투여군은 제 2, 3일에 대조군에 비해 유의성있는($p < 0.01$) 감소를 나타내었다. 제 7일의 기억검사는 도피대가 치워진 위치에 머문 시간을 1분내의 백분율로 환산하였는데, 대조군은 정상군에 비해 감소한데 비하여, 歸脾湯加減方 투여군은 대조군보다 유의성있는($p < 0.01$) 증가를 나타내었다. 이는 歸脾湯加減方이 stress로 인한 학습과 기억장애에 대한 회복작용을 가지고 있음을 나타낸다.

불안반응에 대한 효과를 평가하기 위하여 EPM Test를 실시하였는데, 이는 불안과 연관된 행동을 확인하는 방법으로 널리 이용되고 있는 시험방법으로 rat와 mouse에서 검정된 모델이다. 항불안작용을 관찰하기 위해서 통로

에 진입한 전체횟수에 대한 열린 통로에 진입한 횟수의 비율 및 열린 통로에 머문 시간으로 평가된다. 열린 통로에 대한 기피정도의 감소는 열린 통로에서 머문 시간의 연장 및 열린 통로로의 진입횟수의 증가로 표출되며, 이는 닫힌 통로의 진입횟수 및 머문 시간의 감소로 표현된다. 5분간 장치 안에 둔 후 열린 통로와 닫힌 통로에 각각 들어간 횟수와 열린 통로에 머문 시간을 측정하였다. 열린 통로에 머문 시간은 대조군에 비해 정상군이 많았으며 歸脾湯加減方 투여군에서는 열린 통로에 머문 시간이 증가되어 대조군에 비해 유의성있는 ($p<0.01$) 감소를 나타내었다. 닫힌 통로에 머문 시간은 대조군에 비해 정상군이 적었으며 歸脾湯加減方 투여군에서는 닫힌 통로에 머문 시간이 감소되어 대조군에 비해 유의성있는 ($p<0.01$) 감소를 나타내었다. 각 통로에 들어간 횟수를 측정한 결과 정상군에 비해, 대조군이 통로로 들어간 횟수가 현저히 줄어들어 활동량의 감소를 나타냈으며, 歸脾湯加減方 투여군에서는 대조군에 비해 유의성있는($p<0.01$) 증가를 나타내었다. 이는 歸脾湯加減方이 항불안작용을 가지고 있음을 나타낸다.

항stress에 대한 효과를 확인하기 위하여 행동검사를 마친 실험동물을 마취시킨 후 약물을 통하여 고정시킨 후에 腦組織을 꺼내어 hippocampus CA1부위의 AchE 신경세포의 밀도를 측정하였다. hippocampus의 CA1 부위에서 AchE 발현은 정상군에 비해 대조군에서 현저히 감소했으며, 歸脾湯加減方 투여군은 대조군에 비해 AchE 발현이 유의성있게($p<0.01$) 증가되었다. 이는 歸脾湯加減方이 stress로 유발된 뇌조직 특히 hippocampus의 기능저하에 대한 보호효과를 가지고 있음을 나타낸다.

以上の 結果로 보아 歸脾湯加減方이 stress로 유발된 白鼠에서 학습 및 기억시험,

불안시험에 있어 유효하게 작용하는 것으로 보아 stress로 유발되어 나타나는 不安, 學習 및 記憶障礙에 임상적으로 활용할 가치가 있는 것으로 생각되고, 이는 stress와 관련된 질환에 사용할 수 있는 기초적 자료가 될 것이며, 향후 객관적이고 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 結 論

歸脾湯加減方の stress로 인한 학습 및 기억장애에 미치는 효과를 연구하기 위하여 신체구속을 통한 stress로 불안, 학습 및 기억장애를 유발시킨 후 PAT, MWM Test, EPM Test의 행동학적 변화를 관찰하고, 행동관찰 결과 유의성이 있는 경우 면역조직화학적 방법으로 학습 및 기억에 관련된 부위인 hippocampus부위에서 AchE의 활성변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 체중 변화에서는 stress 유발 후 3주째부터 체중이 감소되었으며, 歸脾湯加減方 투여군에서는 대조군에 비해 감소된 체중이 유의성있게 회복되었다.
2. 학습 및 기억에 미치는 효과를 평가하기 위한 PAT에서는 대조군이 1일에 비하여 2, 3일에는 현저히 감소를 보였으며, 歸脾湯加減方 투여군은 대조군에 비해 난간에 머문 시간이 유의성있게 증가되었다.
3. 학습 및 기억에 미치는 효과를 평가하기 위한 MWM Test에서는 6일간의 학습시행중 도피대를 찾는 데 소요되는 시간이 歸脾湯加減方 투여군은 2일째에 정상군

과 비슷한 시간으로 단축되었고, 3일째에 정상군과 유사한 경향을 보였다. 7일째의 기억검사에서 歸脾湯加減方 투여군은 대조군보다 유의성있게 증가되었다.

4. 불안반응에 대한 효과를 평가하기 위한 EPM Test에서는 歸脾湯加減方 투여군에서는 대조군에 비해 열린 통로에 머문 시간이 증가되어 불안 반응이 유의성있게 감소되었고, 각 통로에 들어간 수도 유의성있게 증가되었다.
5. 항stress에 대한 효과를 확인하기 위한 hippocampus의 CA1 부위에서의 AchE 활성변화는 歸脾湯加減方 투여군이 대조군에 비해 유의성있게 증가되었다.

參考文獻

1. 金鐘佑. Stress의 한의학적 이해. 동의신경정신과학회지. 1993;4(1):19-26.
2. 文流模. Stress에 관한 문헌적 고찰. 동의신경정신과학회지. 1991;2(1):38-50.
3. Selye H. The alarm reaction. *Canad. Med. Ass. J.*, 1936;34:706-13.
4. Kevin D. Stack. *Childhood Depression*. Guilford Press. 1990:11-45, 109-12.
5. Adams David, B. et al. Cardiovascular changes during naturally elicited fighting behavior in the cat. *Am. J. Physiol.* 1969;216(5):1226.
6. Eliasson, S. et al. Activation of sympathetic vasodilator nerves to the skeletal muscles in the cat by hypothalamic stimulation. *Acta. Physiol. Scand.* 1951;23:331-51.
7. Feigl, E. et al. Renal vasoconstriction and the defence reaction. *Acta. Physiol. Scand.* 1964;62:429.
8. Gobbold, A. et al. Blood flow, capillary filtration coefficients and regional blood volume responses in the intestine of the cat during stimulation of the hypothalamic 'defence' area. *Acta. Physiol. Scand.* 1964;61:467.
9. Rosen, A. Augmented cardiac contraction, heart acceleration and skeletal muscle vasodilatation produced by hypothalamic stimulation in cats. *Acta. Physiol. Scand.* 1961;52:291.
10. 嚴用和. 重訂嚴氏濟生方. 北京. 인민위생출판사. 1980:115-7.
11. 薛己. 內科摘要. 江蘇. 江蘇科學技術出版社. 1985:41-2.
12. 許浚. 東醫寶鑑. 內景篇. 서울. 대성문화사. 1992:56, 173.
13. 신재용. 방약합편해설. 서울. 정보사. 2000: 60.
14. 이동건, 이봉교. 귀비탕가속지황이 생쥐의 수면시간 진정 및 진통작용에 미치는 영향. *동서의학*. 1987;12(2):5-16.
15. 오상훈, 김지혁, 황의완. 귀비탕의 오지상승위치효과에 관한 실험적 연구. *경희한의대논문집*. 1989;12:433-51.
16. 김형철, 정대규. 歸脾湯, 加味溫膽湯 및 歸脾溫膽湯의 항Stress 효능 비교연구. *동의신경정신과학회지*. 1993;4(1):99-119.
17. 류재규, 황의완. 歸脾湯과 Ascorbic Acid 열 및 유영 Stress Guinea Pig의 뇌 Catecholaminegkafid에 미치는 영향.

- 동의신경정신과학회지. 1995;6(1):41-9.
18. 이화신, 황의완. 열Stress 및 유영Stress에 대한 歸脾湯과 Ascorbic Acid의 항Stress 효능 비교연구. 동의신경정신과학회지. 1995;6(1):19-39.
 19. 李貞雅. Chronic Mild Stress로 誘發된 憂鬱症 모델 흰쥐에 대한 歸脾湯의 實驗的 研究. 慶熙大學校 大學院. 2001.
 20. 成宇鏞. 憂鬱症誘發 흰쥐에 대한 歸脾湯의 抗憂鬱效果. 慶熙大學校 大學院. 2002.
 21. McEwen BS, Magarinos AM. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum Psychopharmacol.* 2001;16(S1):S7-S19.
 22. King RA, Glasser RL. Duration of electroconvulsive shock-induced retrograde amnesia in rat. *Physiol Behav.* 1970;5:335-9.
 23. Pitsikas N, Algeri S. Effect of oxiracetam on scopolamine-induced amnesia in the rat in a spatial learning task. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992;43:949-51.
 24. Lister, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in mouse. *Psychopharmacology(Berl)* 1987;92:180-5.
 25. Dawson, G. R. and Tricklebank, M. D. Use of the elevated plus maze in search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol. Sci.* 1995;16:33-6.
 26. M.G. Giovannini, F. Casamenti, L. Bartolini, G. pepeu. The brain cholinergic system as a target of cognition enhancers. *Behavioural Brain Research.* 1997;83:1-5.
 27. Akio Itoh, Atsumi Nitta, Mitsuhiko Hirose, Takaaki Hasegawa, Toshitaka Nabeshima. Effects of metrifonate on impairment of learning and dysfunction of cholinergic neural system in basal forebrain-lesioned rats. *Behavior brain research.* 1997;83:165-7.
 28. 宮城音彌. 스트레스. 東京. 講談社. 5th Ed. 1986:174-84.
 29. 김완희, 김광중. 한의학의 형성과 체계. 대구. 중문출판사. 1991:78-84, 183-200, 210, 225-7.
 30. 김종우, 황의완. stress에 대한 한의학적 이해. *대한stress학회지.* 1993;1(1):119-125.
 31. 陳言. 三因方(卷2). 臺北. 臺聯國風出版社. 1985:6-7.
 32. 최승훈. 동의병리학. 서울. 고문사. 1990:318-9.
 33. 김기욱. stress와 氣病에 관한 고찰. 경희대학교대학원. 1991.
 34. 조홍건. stress와 노이로제의 한방요법. 서울. 문학예술사. 1987:13.
 35. 홍원식. 정교황제내경소문. 서울. 동양의학연구원. 1985:18-20, 34, 36, 44, 46, 51, 68-9, 79, 92, 127, 131, 172, 277, 282, 288-9, 303.
 36. 張介賓. 景岳全書. 서울. 대성문화사. 1988:413-9.
 37. 미국 정신의학회. 정신장애의 진단 및 통계 편람(제3판 개정판). APA. 1987:25.
 38. Brumback, R. A., Dietz-Schmidt, S. G., & Weinberg, W. A. Depression in children referred to an educational diagnostic center. *Diagnosis and*

- treatment and analysis of criteria and literature review. *Diseases of the Nervous System*. 1977;38:529-35.
39. Kendall, P. C., Stark, K. D., & Adam, T. Cognitive deficit or cognitive distortion in childhood depression. *Journal of Abnormal Child Psychology*. 1990;18:255-70.
 40. 정규만. 동의소아과학. 서울. 행림출판. 1985:99-104, 651.
 41. 황의완, 김지혁. 동의정신과학. 현대의학 서적사. 1999:53-6, 87-94.
 42. Formann MA, Kerschbaum WE, & Hetznecker JM. *Nelson Textbook of Pediatrics*(13th Ed). Philadelphia. WB Saunder Co. 1987:35-7.
 43. 홍창의. 소아과학. 서울. 대한교과서주식회사. 제7판. 2001:63.
 44. 이종우. 소아심신증에 관한 문헌적 고찰. *대한한방소아과학회지*. 1992;6(1):55-64.
 45. 江育仁, 張奇文. *實用中醫兒科學*. 상해. 상해과학기술출판사. 1996:44-53.
 46. Gray M, Hayman LL. Assessing stress in children research and clinical implications. *J. Pediatric Nursing*. 1987;2(5):316-26.
 47. 김주연, 김정순. 학령기 아동의 stress, stress 대처행동, 건강문제간의 관계. *대한심신stress학회지*. 1999;7(1):13-22.
 48. 金度淳. 六味地黃湯, 四物湯, 四君子湯의 抗stress 효과에 관한 실험적 비교 연구. 경희대학교 대학원. 1995.
 49. 金知赫. 天王補心丹加減方の 抗stress 효과에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1998.
 50. 李雄錫. 補血安神湯의 抗stress 효과에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1998.
 51. 길재호. 分心氣飲의 抗stress효과에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1990.
 52. 이승기, 김종우, 황의완. 香附子八物湯이 拘束stress 원위의 抗stress와 免疫反應에 미치는 영향. 서울. 동의신경정신과학회지. 1997;8(1):81-93.
 53. 조진영, 황의완. 歸脾溫膽湯이 원위의 抗stress와 免疫反應에 미치는 영향. 서울. 동의신경정신과학회지. 1995;6(1):1-17.
 54. 洪性媛. 黃連解毒湯이 憂鬱症 模型動物의 水中迷路學習과 腦의 Tyrosine Hydroxylase 發顯 水準에 미치는 效果. 慶熙大學校 大學院. 2003.
 55. 危亦林. *世醫得效方*. 北京. 中國中醫藥出版社. 1996:115.
 56. 劉玉茂 主編. *中醫十大名方-歸脾湯*. 北京. 中國中醫藥出版社. 1997:2-3.
 57. O'Keefe J & Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. London. Oxford University Press. 1978:15-25.
 58. Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comparative and Physiological Psychology*. 1979;93(1):74-104.
 59. Beatty WW, Shavalia DA. Rat spatial memory. *USA. Animal Learning and behavior* 1980;8(4):550-2.