

## 血府逐瘀湯이 스트레스에 미치는 영향

최유경, 박종형, 전찬용, 김동우, 황귀서<sup>1)</sup>

경원대학교 한의과대학 내과학 교실,  
경원대학교 한의과 대학 예방의학 교실<sup>1)</sup>

### Effects of *Hyeolbuchukyeo-tang* on Stress

You-kyung Choi, Chong-hyeong Park, Chan-yong Jun, Dong-woo Kim,  
Gui-seo Hwang<sup>1)</sup>

Dep. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-won University,  
Dep. of preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung-won University<sup>1)</sup>

**Backgrounds :** Two stress pathways, the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the sympathetic nervous system, regulate immune system responses through release of corticosteroids, norepinephrine and epinephrine, respectively. These neuromediators act on immune cells via specific receptors on their surface to modulate the production of key regulatory cytokines.

**Objectives :** To evaluate the preventive effects of oriental medicine *Hyeolbuchukyeo-tang* (HC) on stress.

**Methods :** Mice were divided into three groups: normal group, control group under immobilization stress and HC group which received *Hyeolbuchukyeo-tang* (HC) under immobilization stress. Following sacrifice, their splenocytes were isolated and splenocyte surface markers were determined. The brains were removed and mRNA determined. In vivo, we separated RNA from cultured macrophages (RAW264.7).

**Results :** In our study, immune functions were decreased in stress due mainly to changes of various neuromediators, cytokines and macrophage activities, and the treatment of HC increased those expressions.

**Conclusions :** In summary, the present study documents the anti-stress effects of HC through stress-immune regulation.

**Key Words:** Stress, immune, neuromediator, cytokine, macrophage, *Hyeolbuchukyeo-tang*

## 緒 論

· 접수 : 2005년 6월 9일 · 논문심사 : 2005년 7월 20일  
· 채택 : 2005년 8월 14일  
· 교신저자 : 박종형, 서울시 송파구 송파동 경원대부속 서울  
한방병원  
(Tel: 02-425-3456 Fax: 02-425-3560  
E-mail: pancoss@freechal.com)

신체와 정신에 해로운 영향을 미치는 인자나 자극을 스트레스(stressor)라 하고, 이 때의 긴장상태를 스트레스라고 한다<sup>1)</sup>. 스트레스로 인한 인체의 반응은 중추신경계, 시상하부, 변연계 및 기타 표적기관으로부터 시작되는데, 자율신경계 반응, 내분비계 반

응, 면역계 반응 등을 통하여 복합적인 신체 증상으로 발현된다<sup>2)</sup>. 스트레스 상황에서는 시상하부-뇌하수체-부신 축(HPA axis)과 교감신경계의 작용으로 norepinephrine, epinephrine, serotonin, ACTH, cortisol, acetylcholine, GABA, substance P, TRH 등 여러 신경전달물질 방출에 변화가 생기며 이러한 변화는 면역기전에 중요한 역할을 하고 일부는 면역세포의 활성화에 직접적으로도 영향을 미친다<sup>3,5)</sup>. 이 과정에서 면역세포 상호간의 신호전달 물질인 다양한 cytokine이 결정적인 역할을 하고 있다. Cytokine은 면역세포들에 의해 만들어져서 여러 가지 면역세포의 활성화 (activation), 성장 (growth), 분화 (differentiation) 등에 영향을 미치는 동시에, 뇌의 신경전달물질에도 영향을 미쳐 시상하부-뇌하수체-부신 축(HPA axis)에 중요한 역할을 하고 serotonin 대사에도 관여하고 있음이 밝혀지고 있다<sup>6,7)</sup>. 따라서 스트레스 상태에서 면역세포 각각의 활성화 및 여러 면역세포들의 직접, 간접적인 상호작용을 조절하는 것은 매우 중요한 일이 될 것이며 cytokine의 분비를 조절하는 것 역시 중요하게 여겨지고 있다. 이에, 스트레스에 의한 면역계의 변화에 미치는 영향과 정확히 작용기전을 규명하기 위한 수많은 연구들이 시도되어 왔으며, 현재 스트레스에 의해 변화되는 면역조절물질 및 그 대사과정에 대한 다양한 연구 보고들이 있다<sup>6-14)</sup>.

血府逐瘀湯은清代王清任의『醫林改錯』에 수록되어 있는 처방으로活血去瘀와行氣止痛의 효능이 있어<sup>15)</sup>, 임상에서瘀血內阻와血瘀氣滯로 인한 각종 심혈관계 질환에 활용되어 왔으며, 실험실 연구를 통해서혈전생성과동맥경화증의 발생 과정 중 일정 부분을 억제한다는 것이 입증되고 있다<sup>16-18)</sup>. 임상에서는 스트레스로 인해肝鬱不舒,氣機阻滯한 증상이 발현되는 경우에血府逐瘀湯을 사용하여行氣活血시킴으로써氣機를소통시켜치료에응용해왔다.

본 연구에서는血府逐瘀湯의抗스트레스 효과를 실험적으로 확인하기 위해 마우스를 구속시켜 스트레스를加하여 나타나는비장세포의 변화 및LPS로 자극한 대식세포에서의 cytokine의 활성을 측정하였

으며, 뇌 내 신경전달물질의 농도를 조절하는 효소인 tyrosine hydroxylase, dopa decarboxylase, monoamine oxidase의 유전자 발현을 측정하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 藥物 구성 및 추출

실험에 사용된 藥物은 暎園大學校 附屬韓方病院에서 구입하여精選한 藥物을 사용하였다. 血府逐瘀湯(이하 HC)135g을 약탕기에 넣고 2,000ml의 증류수를 넣어 3시간동안 가열하여 물 추출액을 얻었다. 이를 membrane filter(2 $\mu$ m, Millipore)로 감압여과한 후 진공 증발시켜 농축시킨 다음, 동결 건조기에서 완전히 건조하여 33.8g의 고형물을 얻어 사용할 때까지 냉동 보관하였다. 투여 시에는 증류수에 녹여 사용하였다.

#### 2) 실험동물 및 사육조건

본 실험에서 사용한 ICR 마우스(이하 마우스)는 대한실험동물센터에서 분양받아 2주 이상 실험 사육장 환경에 적응시킨 후 각 실험군당 8마리씩 사용하였다. 사육장은 인공조명설비에 의하여 조명시간을 오전 7시부터 오후 7시까지 12시간으로 조절하였으며, 실내온도는 22℃ 내외, 습도는 60% 내외로 유지하였다. 사료는 고형사료를 사용하였으며, 그 조성은 단백질 21%, 지방 3.5%, 셀룰로오스 5.0%, 무기질 8.0% 등이다. 급수는 일반 상수도를 사용하였고, 사료와 급수는 제한하지 않았다(실험동물 공급사에서 사육).

### 2. 방법

#### 1) 동물 실험

##### (1) 스트레스 유발 및 약물투여

실험동물 공급사(바이오링크)로부터 20~22g의 마우스(ICR, male)를 공급받아 3일간 적응시켰다. 공급사에서의 사육조건과 동일하게 자동 점등기를 이용해 12시간 점등하고 12시간 소등했다. 사료는 마우스용 사료(삼양사)를 사용하였고, 식수는 상수도를

사용하였으며, 그 양을 제한하지 않았다. 동물실내 온도는  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는 60%로 유지하였고, 여과된 공기를 환류시켰다. 마우스 8마리를 한 군으로 하여 정상군(Normal group), 구속군(Control group), 검액투여군(HC group)으로 분리하였다. 정상군과 구속군에는 식염수를 5ml/kg씩, 검액투여군에는 두 군으로 나누어 약물을 각각 100mg/5ml/kg, 300mg/5ml/kg씩 2주간 매일 투여하였다. 투여 12일째부터 매일 12시간씩, 구속군과 검액투여군을 아크릴로 제조한 구속상자( $2 \times 2 \times 12\text{cm}$ )에 넣고 절식시켰다. 구속직전 식염수와 검액을 각각 투여하였고, 정상군도 같은 시간동안 절식시켰다. 3일간 같은 방식으로 구속을 반복하였고, 4일째 sacrifice하여 장기를 적출하였다.

## (2) Splenocyte 분리 및 면역세포에 대한 영향

실험동물의 복부를 70% ethanol로 세척한 후 무균적으로 비장을 적출하여 배지가 담겨있는 35mm 멸균 petri dish에 담았다. Clean bench 내에서 비장을 가위로 잘게 자른 후, homogenizer와 teplon pestle를 이용하여 비장세포를 유리시켰다. 200 mesh stainless steel sieve를 통과시켜 조직을 제거하고 200×g에서 6분간 원심분리하여 3회 세척한 후 pellet을 현탁시킨 다음, pellet 1ml 당 1.5ml의 2차 증류수를 넣어 18초 동안 용혈시켰다. 다시 배지를 가하고 원심분리하여 3회 세척한 다음 PBS buffer에  $1 \times 10^6$  cell/ml가 되도록 재현탁한 후, 비복상에 보관하였다. 이 현탁액에 10 $\mu\text{l}$ 의 FITC conjugated rat anti mouse CD45 항체 희석액(10 $\mu\text{l}$  FITC + 90 $\mu\text{l}$  FACS staining media)을 가하였다. 냉장상태에서 1시간동안 반응시킨 후, 4,000rpm으로 3분간 원심분리하여 침전을 얻었다. 이 침전을 다시 100 $\mu\text{l}$ 의 FACS fixing solution에 재현탁시킨 후 FACS를 이용하여 세포의 분포를 측정하였다.

## 2) 대식세포를 이용한 in vitro 연구

### (1) 세포주 및 시약

마우스의 대식세포 암세포주인 RAW264.7은 American Type Culture Collection (Rockville, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS),

penicillin-streptomycin은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. TRIzol reagent는 Invitrogen에서 구입하였고 PCR primer는 Cosmo genetics (Korea)에서 합성하였다.

### (2) 세포 배양

RAW264.7 세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. FBS는 잔존하는 보체성분을 불활성화시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation ( $56^\circ\text{C}$  water bath에서 30분간 가열)하여 사용하였으며 배지는 0.2 $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과 후 사용하였다. RAW264.7 세포는 부착해서 자라며 5ml 배지를 넣은 T-25 culture flask에서 배양하였다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1ml를 가하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4ml를 넣고 원심분리 (1000rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다.

### (3) RNA 분리

배양하고 있는 RAW264.7 세포에 1ml TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리한다. 분리한 RNA에 100 $\mu\text{l}$  phenol과 100 $\mu\text{l}$  chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심 분리하는 과정을 2번 반복함으로써 상층액을 분리한다. 0.5ml isopropyl alcohol을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시킨다. RNase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고  $-70^\circ\text{C}$ 에서 저장한다.

### (4) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

oligo(dT) 12-18 (Promega, USA), reaction buffer (50mM Tris-HCl, 75mM KCl, 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 10mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP (Biotools, Spain)과 200 unit M-MLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성한다. PCR은 total volume 15 $\mu\text{l}$ 에 10 × PCR buffer, 0.2mM dNTPs, 2pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에

cDNA와 1.25unit의 Taq polymerase (Biotools, Spain) 을 넣어 PCR을 시행한다. PCR 조건은 94℃ 4분, 30cycles의 [94℃ (30초), 59℃ (30초), 72℃ (45초)], 72℃ 10분이었다 (Perkin Elmer, USA). 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한다. 전기영동 결과 나온 band의 강도는 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1 (Media Cybernetics, USA)을 이용하여 구했으며 GAPDH는 Control로 사용하였다.

### 3) 뇌세포 유전자 발현 측정

#### (1) RNA 분리

RNA를 분리하기 위하여 스트레스를 가한 마우스에서 뇌를 적출한 다음, homogenizer를 이용하여 균질화한 다음, 750×g에서 10분간 원심 분리하고 ice cold PBS로 2회 씻었다. 침전된 조직에 lysis buffer를 가하여 용해시킨 다음, 12,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상층을 취하였다. 다시 1M sucrose가 함유된 Tris buffer 위에 loading한 다음, 36,000rpm에서 160분간 원심분리 하였다. Polysome pellet을 취하여 SDS buffer에 녹인 후, 37℃에서 30분간 incubation 시켰다. Sod. Acetate buffer를 가한 다음, phenol/CsK13 용액으로 추출하였다. NaCl을 0.2M이 되도록 가한 다음, EtOH를 가한 후 -20℃에서 12시간 보관하였다. 침전물을 75% EtOH로 2회 washing한 다음 건조 시켰다. 유전자 발현에 필요한 RNA양을 대조군과 시험군에서 mRNA양이 같게 조정한다. 전기영동으로 확인하여 사용하였다.

#### (2) cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA액 (13 $\mu$ g RNA 함유) 에 oligo dT 1 $\mu$ l을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 70℃에서 5분간 incubation하였다. primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 다음, cyscript buffer, 0.1M DTT, dUTP nucleotide, dUTP cydye-labelled nucleotide, cyscript reverse transcriptase를 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이후, 42℃에서 90분간 incubation한 후, 얼음 상에 방치하였다. 여기에 2.5M NaOH을 가한 후 37℃에서 15분간 incubation하였으며, 2M HEPES buffer를 가하여 중화시켰다.

#### (3) cDNA의 정제

조제된 cDNA 액을 GFX column상에 loading한 다음, capture buffer와 washing soln을 사용하여 elution 시켰다. Cy3-, Cy5- labelled cDNA 양을 각각 60 $\mu$ l 만큼 elution하였다.

#### (4) 유전자 발현의 확인 및 정량

각각의 Cy3-, Cy5- labelled cDNA를 speed vacuum container에 3시간 동안 건조한 다음, nuclease free water에 녹였다. 95℃에서 가열한 다음, 곧바로 얼음 상에 30초 이상 방치하였다. 여기에 hybridization buffer와 100% formamide를 가한 후 조심스럽게 섞었다. 혼합된 액을 microarray slide와 cover slip 사이에 loading하였다. cDNA가 loading된 microarray slide를 hybridization chamber에 넣고 42℃에서 18시간 동안 incubation하였다. microarray slide를 SDS가 함유된 55℃로 가온된 SSC (saline, SDS, citrate) buffer에 넣어 55℃에서 10분간 2회 washing하였다. 다시 희석한 SSC buffer로 상온에서 10분간 washing한 다음, 1,000rpm에서 2분간 원심 분리하였다. 데시케이터에 1시간 방치하여 건조한 다음, scanner에 넣고 발현된 mRNA양을 측정하였다. 실험은 3회 실시하였다.

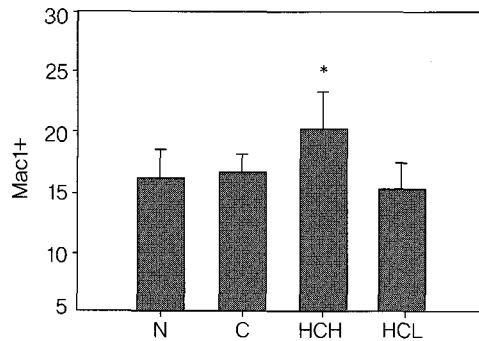
### 3. 통계처리

각 결과에 대한 유의성 검증은 Student's *t*-test를 이용하였다.

## 結 果

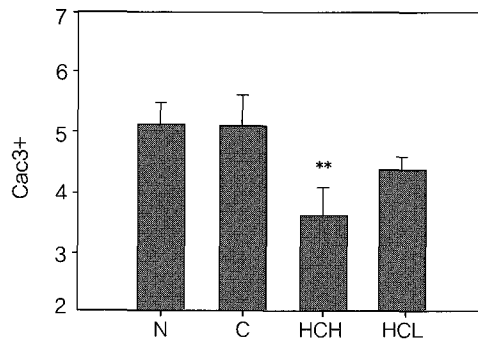
### 1. Splenocyte Mac 1+ 분포율에 미치는 영향

스트레스를 가한 후 마우스를 희생시키고 적출한 비장에서 면역에 관련되는 세포들의 분포 상태를 표면 항원을 이용하여 측정하였다. 실험결과, 대식세포의 표면항원인 Mac 1+의 발현율은 정상군(N)에서 16.25 ± 2.22 % 이었으며, 스트레스를 가한 대조군(C)에서는 16.22 ± 1.71 %로 변화를 나타내지 않았다. 그러나 대조군에 비하여 HC 고용량투여군(HCH)에서는 20.50 ± 2.64 %를 나타내어 유의적인 증가를 나타내었으며, 저용량투여군(HCL)은 15.25



**Fig. 1.** Effect of HC on Mac 1+ Surface Marker of Splenocyte

N: Normal group  
 C: Stress group  
 HCH: Stress + HC (300mg/kg, p.o.)  
 HCL: Stress + HC (100mg/kg, p.o.) \*:  $p < 0.05$  vs C



**Fig. 2.** Effect of HC on Mac 3+ Surface Marker of Splenocyte

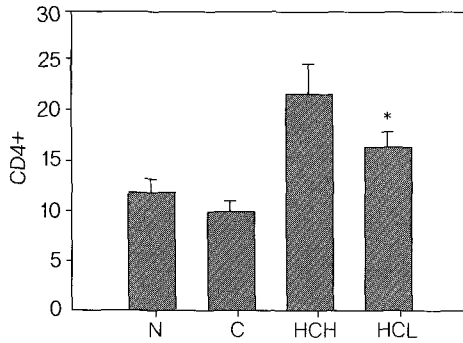
N: Normal group  
 C: Stress group  
 HCH: Stress + HC (300mg/kg, p.o.)  
 HCL: Stress + HC (100mg/kg, p.o.) \*\*:  $p < 0.01$  vs C

± 2.06 %로 유의적인 변화를 나타내지 못했다(Fig. 1).

2. Splenocyte Mac 3+ 분포율에 미치는 영향  
 활성화된 대식세포의 표면항원인 Mac 3+의 발현율은 정상군(N)에서  $5.12 \pm 0.37$  % 이었으며, 스트레스를 가한 대조군(C)에서는  $5.10 \pm 0.52$  %로 변화를 나타내지 않았다. 그러나 대조군에 비하여 HC 고용량투여군(HCH)에서는  $3.60 \pm 0.47$  %를 나타내어

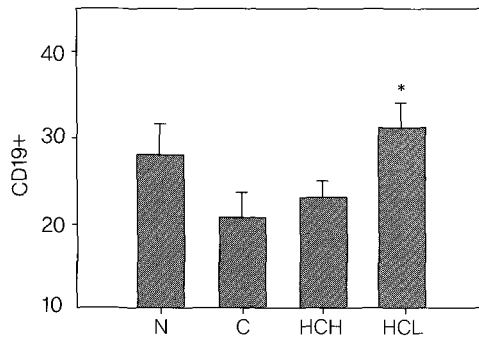
유의적인 감소를 나타내었으며, 저용량투여군(HCL)은  $4.37 \pm 0.22$  %로 약간 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2).

3. Splenocyte CD 4+ 분포율에 미치는 영향  
 Helper T Cell의 표면항원인 CD 4+의 발현율은 정상군(N)에서  $11.67 \pm 1.52$  % 이었으며, 스트레스를 가한 대조군에서는  $10.01 \pm 1.01$  %로 약간 감소하는



**Fig. 3.** Effect of HC on CD 4+ Surface Marker of Splenocyte

N: normal group                      C: Stress group  
 HCH: Stress + HC (300mg/kg, p.o.)  
 HCL: Stress + HC (100mg/kg, p.o.)  
 \*:  $p < 0.05$  vs C



**Fig. 4.** Effect of HC on CD 19+ Surface Marker of Splenocyte

N: Normal group  
 C: Stress group  
 HCH: Stress + HC (300mg/kg, p.o.)  
 HCL: Stress + HC (100mg/kg, p.o.)  
 \*:  $p < 0.05$  vs C

경향을 보였다. 그러나 대조군에 비하여 HC 고용량 투여군(HCH)에서는  $21.67 \pm 3.05$  %를 나타내었으며, 저용량투여군(HCL)은  $16.33 \pm 1.52$  %로 모두 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 3).

않았다. 대조군에 비하여 HC 고용량투여군(HCH)에서는  $8.37 \pm 0.31$  %를 나타내었으나, 저용량투여군(HCL)은  $11.63 \pm 1.03$  %로 유의적인 증가를 나타내었다.

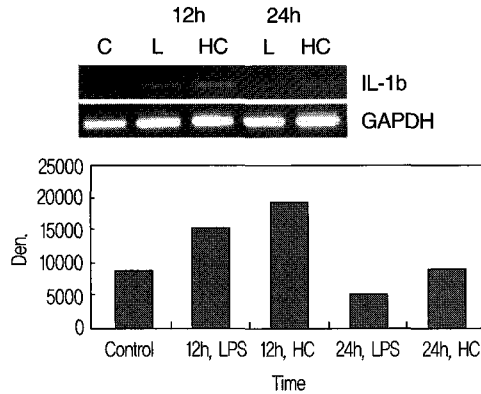
4. Splenocyte CD 8+ 발현에 미치는 영향

Cytotoxic T Cell의 표면항원인 CD 8+의 발현율은 정상군에서  $8.27 \pm 0.35$  %이었으며, 스트레스를 가한 대조군에서는  $7.96 \pm 0.40$  %로 변화를 나타내지

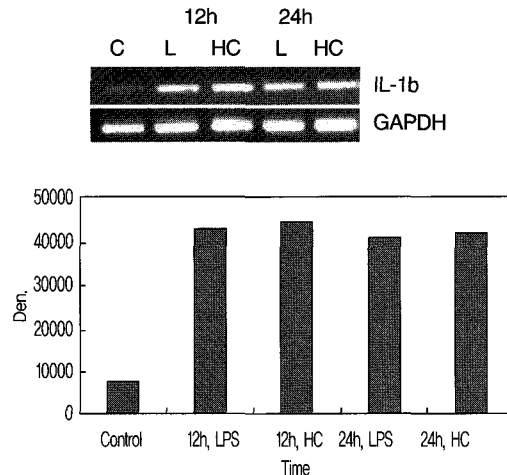
5. Splenocyte CD 19+ 발현에 미치는 영향

B Cell의 표면항원인 CD 19+의 발현율은 정상군에서  $28.02 \pm 3.60$  %이었으며, 스트레스를 가한 대조군에서는  $20.67 \pm 3.05$  %로 유의적인 감소를 나

(1) 25 cycle



(2) 30 cycle



**Fig. 5.** Effect of HC on IL-1 $\beta$  Expression in Macrophage Cells.

RT-PCR assay of IL-1 $\beta$  mRNA in macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of HC (12, 24hrs). Expression of mRNA for GAPDH was also detected as a positive control.

L: LPS

타내었다. 그러나 대조군에 비하여 HC 고용량투여군(HCH)에서는  $23.03 \pm 2.04$  %를 나타내어 약간 증가하는 경향을 나타내었으며, 저용량투여군(HCL)은  $31.00 \pm 3.04$  %로 유의적인 증가를 나타내었다 (Fig. 4).

6. 대식세포의 IL-1 $\beta$  발현에 미치는 영향

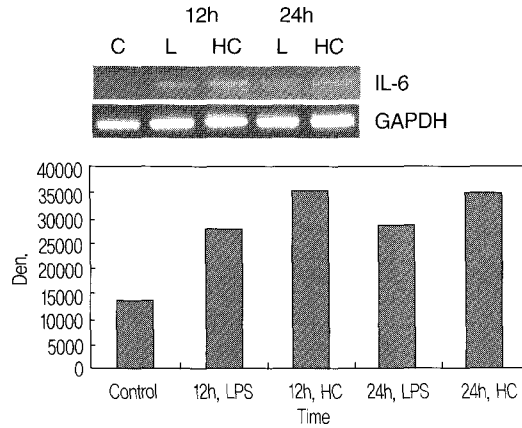
IL-1은 proinflammatory cytokine으로, 많은 염증 유전자의 발현을 활성화시키는 것으로 알려졌다. HC

는 LPS로 자극된 macrophage에서 IL-1 $\beta$ 의 유전자 발현을 12시간, 24시간 배양한 경우에 모두 증가시켰다. 그러나 30cycle의 PCR에서는 LPS 처리한 경우와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5).

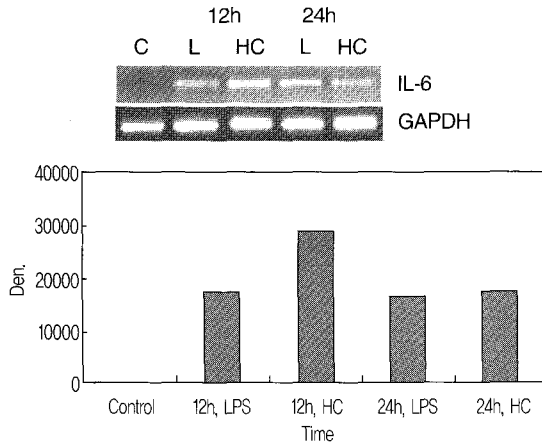
7. 대식세포 IL-6 발현에 미치는 영향

HC는 LPS로 자극된 macrophage에서의 12시간 처리했을 경우 IL-6의 유전자 발현을 증가시켰으며, HC를 24시간 처리했을 경우에도 IL-6의 유전자 발

(1) 25 cycle



(2) 30 cycle



**Fig. 6.** Effect of HC on IL-6 Expression in Macrophage Cells.

RT-PCR assay of IL-6 mRNA in macrophage cells cultured in DMEM, supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, in the presence of HC (12, 24hrs). LPS is a cytokine inducer. Expression of mRNA for GAPDH was also detected as a positive control.

L: LPS

현이 증가 되었다(Fig. 6).

주지 못하는 것으로 나타났다.

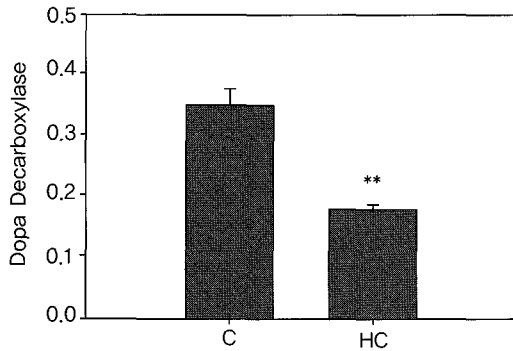
8. 대식세포 IL-10 발현에 미치는 영향

IL-10은 염증반응에서 증가되는 여러 염증 cytokine인 TNF- $\alpha$ , GM-CSF와 염증 효소인 iNOS의 합성을 억제하는 것으로 알려졌다. HC는 LPS로 자극된 macrophage에서 12시간 배양했을 경우, IL-10의 발현을 약간 증가시키는 경향을 보였다. 그러나 24시간 48시간 배양했을 경우에는 별다른 영향을

9. 대식세포 TGF- $\beta$  발현에 미치는 영향

TGF- $\beta$ 는 항염증작용을 하는 cytokine으로 T cell에서 분비되는 IL-4의 작용을 억제하는 것으로 알려졌다. HC는 LPS로 자극된 macrophage에서 12시간, 24시간 배양했을 때 TGF- $\beta$  유전자 발현을 약간 증가시키는 경향을 나타내었다.

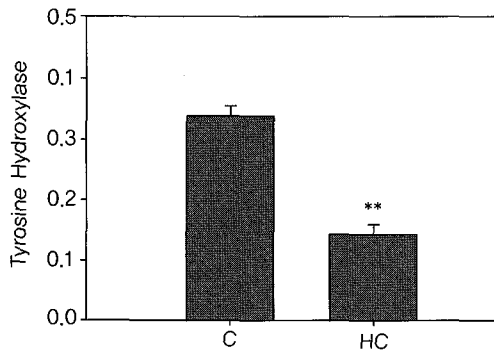




**Fig. 7.** Effect of HC on expression of dopa decarboxylase gene in brain.

Gene expression was represented as a fluorescence of Cy3/5 incorporated into mRNA (n=3).

C: Control HC: HC 300mg/kg. p.o. \*\*:  $p < 0.01$  vs C



**Fig. 8.** Effect of HCE on expression of tyrosine hydroxylase gene in brain.

Gene expression was represented as a fluorescence of Cy3/5 incorporated into mRNA (n=3).

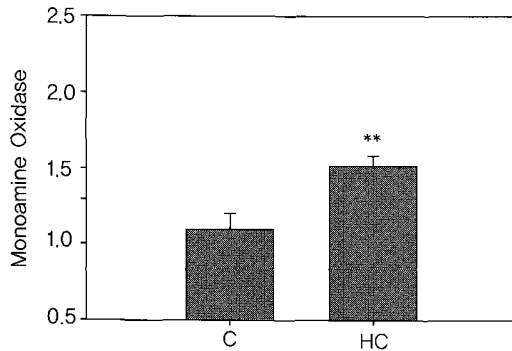
C: Control HC: HC 300mg/kg. p.o. \*\*:  $p < 0.01$  vs C

#### 10. Dopa decarboxylase 유전자 발현에 미치는 영향

뇌조직에서 dopa decarboxylase 유전자 발현은 microarray 상에서 발생하는 fluorescence량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군의 유전자 양은 약 0.35이었으며, HC를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 약 0.18로 HC는 dopa decarboxylase 유전자 발현을 유의하게 억제하였다(Fig. 7).

#### 11. Tyrosine hydroxylase 유전자 발현에 미치는 영향

뇌조직에서 tyrosine hydroxylase 유전자 발현은 microarray 상에서 발생하는 fluorescence량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군의 유전자 양은 약 0.348이었으며, HC를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 약 0.168로 HC는 tyrosine hydroxylase 유전자 발현을 유의하게 억제하였다(Fig. 8).



**Fig. 9.** Effect of HCE on Expression of Monoamine Oxidase Gene in Brain. Gene expression was represented as a fluorescence of Cy3/5 incorporated into mRNA (n=3). C: Control HC: HC 300 mg/kg. P.O. \*\*:  $p < 0.01$  vs C

## 12. Monoamine oxidase 유전자 발현에 미치는 영향

뇌조직에서 monoamine oxidase 유전자 발현은 microarray 상에서 발생하는 fluorescence량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, 대조군의 유전자 양은 약 1.217이었으며, HC를 첨가하여 배양한 군에서 얻은 유전자의 양은 약 1.585로 HC는 monoamine oxidase 유전자 발현을 유의하게 증가시켰다(Fig. 9).

## 考 察

스트레스는 생체 외에서 생체에 가해진 각종 유해 작용인 신체적, 심리적 압박상태를 총칭하는 것으로, 과도한 자극은 생체의 적응기전을 파탄시켜 체내 항상성의 불균형 상태를 야기할 수 있다. 사회가 복잡해지고 다양해지면서 현대인들은 다양한 스트레스에 노출되어 있는데, 환경 변화에 대한 적응의 실패, 이로부터 오는 미래에 대한 두려움과 불안감 등의 정신적 요인 뿐 아니라 생활환경의 악화, 화학적 물질에 의한 환경오염 등이 모두 신체적, 정신적 건강을 위협하는 주요한 환경요인이 되고 있다. 이러한 스트레스 결과, 심장질환이나 두통, allergy 등과 같은 신체적 문제와 불면, 불안, 환각, 망상 등의 정신장애가 유발될 수 있다<sup>12</sup>. 뇌는 스트레스를 인식

하고 적응에 필요한 신체적 변화를 유발시키는 기관이다. 따라서 스트레스로 인한 뇌의 기능적, 구조적 변화와 신체적인 반응에 대한 연구는 스트레스의 병리와 예방책을 연구하는데 있어서 가장 핵심적인 분야이다<sup>3,19-21</sup>. 사람의 경우 뇌에 대한 침습적 연구가 제한적이기 때문에 실험동물을 이용한 연구가 일반적으로 이루어지고 있으며 실험동물을 장기간 자유롭게 움직일 수 없도록 구속시키는 방법이 스트레스의 실험동물모델로 널리 이용되고 있다<sup>10,14,19-21</sup>). 그런데 실험동물에서는 스트레스에 의한 정서적 변화나 지능적 변화를 측정하는 데 한계가 있으므로, 스트레스로 인한 뇌 내 신경전달물질 및 그 대사체의 변화를 스트레스 측정지표로 삼아왔다<sup>4,5,10-3)</sup>. 나아가 정신과 뇌와 신체의 복잡한 연계성을 규명하기 위한 연구가 진행되면서 스트레스로 인한 자율신경계 반응, 내분비계 반응, 면역계 반응에 대한 연구 보고들이 발표되고 있어<sup>8,9)</sup> 내분비선의 변화나 면역력의 변화를 평가하는 것 역시 스트레스 연구의 중요한 지표가 되고 있다.

여러 연구들을 통해 스트레스에 의해 뇌와 뇌의 각 부위에서 epinephrine을 포함하는 catecholamine계 열 신경전달물질의 농도가 현저히 증가됨이 보고되었으며<sup>3-5)</sup> 이로 인해 자율신경계가 관장하는 vasoconstriction, gland secretion 등도 영향을 받아 내분

비계와 면역계에 다양한 반응이 나타난다는 것이 밝혀졌다. 이는 시상하부-뇌하수체-부신 축(HPA axis)의 작용과 유관한 것으로 알려져 있으며 이 과정에서 cytokine의 역할이 중요하게 다루지고 있다<sup>6,9,22,4)</sup>. 한편, 스트레스 상태에서 민감하게 그 농도가 변화하는 norepinephrine, epinephrine과 같은 신경전달 물질들은 면역세포들의 활성화에 직접적으로도 영향을 미친다<sup>5,25,26)</sup>. 이렇게 스트레스는 다양한 방면으로 면역기능에 관여하게 되는데, 예전에는 스트레스가 면역기능을 약화시킨다고만 여겨져 왔으나 최근 연구에서 단기스트레스에서는 스트레스에 대한 방어 반응으로 면역력이 오히려 상승하며 장기적인 스트레스에서 결국 면역력이 약화된다는 것이 실험적으로 밝혀지고 있다<sup>26,27)</sup>. 스트레스와 면역의 관계를 규명하면서 중요하게 다루어지는 것이 다양한 cytokine이다. Cytokine들은 면역세포들에 의하여 만들어지며, 여러 면역세포의 활성화(activation), 성장(growth), 분화(differentiation) 등에 영향을 미칠 수 있어서 자연면역과 획득면역반응에 관여할 뿐 아니라 면역세포의 성숙과정에서도 중요한 작용을 나타내는 면역조절물질이다. 최근 밝혀지고 있는 바에 의하면 cytokine은 HPA system을 활성화시키고 중추신경계에 작용하여 serotonin대사에도 관여하고 있어 단순한 면역계 반응 뿐 아니라 스트레스와 관련된 면역반응에서 그 중요성이 더욱 확대되고 있다<sup>6,7)</sup>.

血府逐瘀湯은 王清任의 『醫林改錯』에 처음 수록된 처방으로 活血去瘀, 行氣止痛시키는 효능이 있어서 胸中の瘀血이 氣機를 阻礙하고 肝鬱氣滯의 瘀血症을 겸한 증상을 치료하는데 광범위하게 사용되어 온 處方이다. 活血行瘀시키는 桃紅四物湯, 疎肝理氣시키는 四逆散, 開胸行氣하는 桔梗과 瘀血을 祛하여 下行시키는 牛膝로 구성되어 一切의 氣滯血瘀症을 通治한다<sup>15)</sup>. 따라서 血滯증, 瘀血증상 뿐 아니라 스트레스나 감정의 抑鬱로 인하여 肝鬱氣滯되어 氣滯, 血滯가 생기면서 나타나는 여러 신체적, 정신적 증상들을 개선하는 목적으로도 사용되어왔다. 이에 스트레스로 인하여 나타날 수 있는 자율신경계, 내분비계, 면역계의 이상반응에서 血府逐瘀湯

이 실험적으로도 일정부분 역할을 할 것이 기대되었다.

본 연구에서는 血府逐瘀湯(HC)을 투여한 실험동물에 구속스트레스를 가한 후 희생시켜 적출한 비장내의 면역관련 세포의 표면항원이 어떻게 변화하는지를 측정하여 스트레스 상태에서 면역에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 실험 결과, 스트레스는 macrophage의 표면항원인 Mac 1+의 분포율에 거의 영향을 미치지 않았다. 그러나 스트레스를 가하고 HC를 고용량 투여한 마우스의 비장 세포에서 Mac 1+ 분포율은 유의적인 증가를 나타내었다. 이는 HC 투여로 macrophage의 숫자가 증가하였음을 의미한다(Fig. 1). 또한, 활성화된 macrophage의 표면 항원인 Mac 3+의 분포는 스트레스를 가한 대조군에서 변화를 나타내지 않았으나 HC를 투약한 경우에는 Mac 3+의 표면 항원을 나타내는 세포 숫자가 감소하였는데 특히 고용량 HC의 경우 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 2). T helper cell에 특이적인 표면 marker인 CD 4+의 분포율은 스트레스에서 약간 감소하는 경향을 보였으나 HC를 투여한 경우 저용량과 고용량 모두에서 CD 4+의 발현율이 유의적으로 증가했다(Fig. 3). T killer cell에 특이적인 표면 marker인 CD 8+의 분포율은 스트레스상태에서 큰 변화를 나타내지 않았다. 고용량 HC를 투약한 경우에는 유의성이 없었으나 저용량 HC 투여한 경우는 CD 8+의 분포율이 유의적으로 증가하였다. B cell 기능을 나타내는 표면 marker인 CD 19+는 스트레스 상황에서 유의적인 감소를 나타내었으나 고용량 HC투여군에서 약간 증가하는 경향을 보였고 저용량의 경우에는 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig 4). 이는 스트레스 상황에서 HC투여로 인해 면역세포의 활성이 증가되었음을 시사한다.

또한, macrophage 세포에 HC를 투여하고 특정 cytokine의 유전자발현을 측정한 실험 결과 IL-1 $\beta$  유전자 발현은 25cycle에서 12시간, 24시간 배양한 경우 모두 유의성 있는 증가를 보였다. 그러나 30cycle에서는 HC투여군이 cytokine 유도물질인 LPS로만 처리한 것과 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig.

5). IL-1은 proinflammatory cytokine으로 많은 염증 유전자의 발현을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 적은 양에서는 CD4 T cell과 B cell을 활성화하며, 염증세포를 자극할 수 있으나 IL-1이 과량 만들어지면 호르몬으로 작용하여 발열, 급성기반응(acute phases response)등이 나타난다. 또한 IL-1은 norepinephrin 분비를 증가시켜 HPA system을 활성화시키고 serotonin의 대사를 증대시킨다는 것이 밝혀지고 있다<sup>6,7,29</sup>. IL-6 역시 proinflammatory cytokine으로 B cell에 작용하여 B cell의 성장을 촉진하고, T cell이나 thymocytes에 co-stimulator로 작용하는 것으로 알려져 있으며 HPA system에 IL-1과 유사한 작용을 한다<sup>6,7</sup>. IL-6은 12시간, 24시간 HC투여했을 때 유전자 발현이 증가되었다(Fig. 6). IL-10은 antiinflammatory cytokine으로 염증반응에서 증가되는 여러 염증 cytokine인 TNF- $\alpha$ , GM-CSF와 염증 효소인 iNOS의 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다. HC는 LPS로 자극된 macrophage에서 12시간 배양했을 경우, IL-10의 발현을 약간 증가시키는 경향을 보였다. 그러나 24시간 배양했을 경우에는 별다른 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. TGF- $\beta$ 는 그 기능이 다양하여 많은 cell type에 작용하여 그들을 활성화시키기도 하고 억제시키기도 하는데 주로 steroid 호르몬에 의해 조절된다. TGF- $\beta$ 는 다른 사이토카인의 작용을 방해하기도 하고 새로운 혈관의 생성에 관여하기도 하며 (angiogenesis), 특히 T cell에서 분비되는 IL-4의 작용을 억제하는 것으로 알려졌다. HC는 LPS로 자극된 macrophage에서 12시간, 24시간 배양했을 때 TGF- $\beta$  유전자 발현을 약간 증가시키는 경향을 나타내었다. 이러한 결과들은 HC가 면역세포 뿐 아니라 면역의 중개물질에도 일정부분 관여함을 보여주며 앞으로 염증 반응을 비롯하여 다른 세포의 분화나 세포독성반응의 중개에 있어 HC가 어떤 형태로 기여를 할 수 있는지 좀 더 세부적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

스트레스를 가한 동물의 뇌 내 serotonin 과 catecholamine의 농도변화를 측정하는 실험들이 행해지면서 norepinephrine이나 epinephrine의 농도가

상승함이 보고되고 있다. Shimizu 등은 Wistar 쥐에 장단기간의 구속스트레스를 가한 결과 뇌 내 대부분의 영역에서 norepinephrine을 상승하였다고 보고하였다<sup>30</sup>. 본 연구에서는 HC를 가한 뇌세포에서 norepinephrine이나 epinephrine의 생합성에 관여하는 효소인 dopa decarboxylase, tyrosine hydroxylase 유전자 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 뇌조직에서 dopa decarboxylase와 tyrosine hydroxylase 유전자 발현은 유전자에 함유된 fluorescence량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, HC는 dopa decarboxylase 및 tyrosine hydroxylase의 유전자 발현을 유의있게 억제하였다(Fig. 7, Fig. 8). 따라서, HC는 스트레스상태에서 뇌에서 증가되는 epinephrine 및 norepinephrine의 합성을 억제할 수 있을 것으로 판단되며, 이는 합성에 관여하는 효소의 유전자 발현을 억제하여 나타나는 것으로 판단된다. 한편, norepinephrine이나 epinephrine의 분해를 통하여 신경에서의 농도를 결정하는 효소인 monoamine oxidase (MAO)의 유전자 발현을 측정하였다. 역시 유전자에 함유된 fluorescence량을 측정하여 결정하였다. 실험결과, HC는 MAO 유전자 발현을 유의하게 증가시켰다(Fig. 9). 이는 구속 스트레스에서 증가할 수 있는 norepinephrine이나 epinephrine의 분해를 촉진하여 농도를 저하시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 구속 스트레스로 splenocyte에서의 표면 항원의 발현을 조사하여 면역에 관련된 세포들의 동태를 예측하고자 하였다. 실험결과, HC는 면역세포 활성을 높여주어 장기간의 스트레스로 인한 면역력 저하를 억제할 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 대식세포의 cytokine발현에 미치는 영향을 측정하여 HC가 대식세포의 cytokine발현을 증가시킨다는 결과를 얻었으며 이는 스트레스-면역반응의 중개물질의 발현에 관여하여 면역력을 높여줄 수 있음을 보여준다. 뇌세포에서 norepinephrine이나 epinephrine의 생합성에 관여하는 효소의 유전자 발현과 분해에 관여하는 효소인 MAO의 유전자 발현을 각각 측정하여 HC가 norepinephrine이나 epinephrine의 농도를 저하시킬 수 있다고 판단되었

으며 이는 스트레스 상황에서 HPA system에 결정적인 작용을 하고 면역세포활성에도 직접적인 영향을 미치는 norepinephrine과 epinephrine의 농도를 조절함으로써 HC가 스트레스상태에서의 면역기능에 긍정적인 역할을 할 수 있음을 시사한다. 따라서 血府逐瘀湯은 스트레스로 인해 발생하는 면역기능의 변화와 뇌 내 신경전달물질 변화를 조절하여 항 스트레스 효과를 가질 것으로 사료된다.

### 結 論

구속성 스트레스에 대한 血府逐瘀湯의 효과를 측정하기 위하여 splenocyte의 표면항원에 미치는 영향, 대식세포의 cytokine 발현에 미치는 영향, 뇌세포에서의 유전자 발현에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HC는 스트레스를 가한 마우스의 spleen에서 분리한 세포의 표면 항원인 Mac 1+, CD 4+, CD 8+, CD 19+을 증가시켰으나, Mac 3+은 감소시켰다.

2. HC는 macrophage cytokine 인 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  등의 유전자 발현을 증가시켰다.

3. HC는 뇌세포에서 tyrosine hydroxylase 및 dopa decarboxylase의 유전자 발현을 감소시켰으며, MAO의 유전자 발현은 증가시켰다.

이상의 연구결과, 血府逐瘀湯은 실험적 스트레스로 인한 면역세포와 면역 매개물질의 기능변화 및 뇌 내 신경전달물질 함량의 변화를 조절하여 항 스트레스 효과를 가질 것으로 판단되었다.

### 參 考 文 獻

- 1) 이병윤. 정신의학사전. 서울: 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. Lakartidningen. 1997;632:635-8.
- 3) Huether, G. The central adaptation syndrome:

psychosocial stress as a trigger for adaptive modifications of brain structure and brain function. Prog Neurobiol. 1996;48(6):569-612.

- 4) Palkovits M, Patthy A, Elekes I. Distribution and stress-induced increase of glutamate and aspartate levels in discrete brain nuclei of rats. Brain Res. 1986;373:252-7.
- 5) Glavin GB. Stress and brain noradrenaline. Neurosci Biobehav Rev. 1985;9(2):233-43.
- 6) Dunn AJ, Wang J, Ando T. Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. Adv Exp Med Biol. 1999;461:117-27.
- 7) Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. J Neuroimmunol. 2003 Dec;145 (1-2):154.
- 8) Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. Lancet Oncol. 2004 Oct;5(10):617-25.
- 9) Miller AH. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. Psychiatr Clin North Am. 1998 Jun;21(2):443-63.
- 10) Lobanova NN, Panusheva N, Belova TI. Changes in the catecholamine content of brain structures in rats subjected to immobilization stress. Biull Eksp Biol Med. 1986;102(11):526-7
- 11) Dunn AJ. Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after footshock stress. Life Sci. 1988;42 (19):1847-53.
- 12) Geiger JD and Glavin GB. Adenosine receptor activation in brain reduces stress-induced ulcer formation. Eur J Pharmacol. 1985;115(2-3):185-190.
- 13) Persico AM, Schindler CW, O' Hara BF, Brannock MT, Uhl GR. Brain transcription factor

- expression: effects of acute and chronic amphetamine and injection stress. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993;20(1-2):91-100.
- 14) Ali-Khizhazi A, Madoian MV, Sytnikova KA, 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.* 1998;2:13-8.
  - 15) 광주중의학원. 방제학. 서울:영림사. 1994:248-51.
  - 16) 김영선, 박종형, 한양희, 전찬용, 김동우, 박세기, 이청정혜, 고승희, 고재철, 최유경. 血府逐瘀湯이 혈전생성관여인자에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2000;21(5):819-27.
  - 17) 최승훈. 血府逐瘀湯이 혈전등과 피하혈중에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1987;8(2):84-5
  - 18) 최유경, 고재철, 백은기, 홍의실, 한지완, 박세기, 김동우, 전찬용, 한양희, 박종형. 혈부축어탕이 대식세포 oxLDL 생성에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2002;23(3):406-14.
  - 19) Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J.* 1996;10(13):1532-8.
  - 20) Vernigora AN, 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.* 1994;40(1):54-6.
  - 21) Kofman O, Levin U, Alpert C. Lithium attenuates hypokinesia induced by immobilization stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1995;19(6):1081-90.
  - 22) Borges R. The rat adrenal gland in the study of the control of catecholamine secretion. *Semin Cell Dev Biol.* 1997 Apr;8(2):113-20.
  - 23) Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003 Feb 28;463(1-3):235-72.
  - 24) Francis MG, Barnawell EB. The influence of the nervous system upon adrenal gland weight and assayable pituitary MSH. *Neuroendocrinology.* 1978;27(5-6):228-38.
  - 25) Roy B, Rai U. Dual mode of catecholamine action on splenic macrophage phagocytosis in wall lizard, *Hemidactylus flaviviridis*. *Gen Comp Endocrinol.* 2004 Apr;136(2):180-91.
  - 26) Azuma Y, Ohura K. Immunological modulation by lidocaine-epinephrine and prilocaine-felypressin on the functions related to natural immunity in neutrophils and macrophages. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2004 Mar;4(1):29-36.
  - 27) Deak T, Nguyen KT, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF. Acute stress may facilitate recovery from a subcutaneous bacterial challenge. *Neuroimmunomodulation.* 1999 Sep-Oct;6(5):344-54.
  - 28) Campisi J, Leem TH, Fleshner M. Acute stress decreases inflammation at the site of infection. A role for nitric oxide. *Physiol Behav.* 2002 Nov;77(2-3):291-9.
  - 29) Neveu PJ, Merlot E. Cytokine stress responses depend on lateralization in mice. *Stress.* 2003 Mar;6(1):5-9.
  - 30) Shimizu T, Tanaka M, Yokoo H, Gondoh Y, Mizoguchi K, Matsuguchi N, Tsuda A. Differential changes in rat brain noradrenaline turnover produced by continuous and intermittent restraint stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994;49(4):905-9.