



Original Article / 원저

黃連解毒湯과 乾薑附子湯의 Cold Stress로 유발된
생쥐의 血中 호르몬 농도변화에 대한 비교연구
한상용¹ · 강한주³ · 최은식² · 이기남⁴ · 이태희⁵ · 김윤경^{2,6*}

¹원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과 · ²원광대학교 약학대학
한약학과 방제학교실 · ³원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과 ·
⁴원광대학교 한의과대학 한의예과 · ⁵가천대학교 한의과대학 방제학교실 ·
⁶원광한약연구소

Comparative Study of *Hwangnyeonhaedok-tang* and
Geongangbuja-tang on the Plasma Hormones Level in Mice
Exposed to Cold Stress

Sang-Yong Han¹ · Han-Ju Kang³ · Eun-Sik Choi² ·
Ki-Nam Lee⁴ · Tae-Hee Lee⁵ · Yun-Kyung Kim^{2,6*}

¹ Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental
Medicine, Wonkwang University
² Department of Herbal Medicine, College of Pharmaceutics, Wonkwang University ·
³ Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine ·
⁴ Department of Pre-Herb Medicine, College of Korean medicine, Wonkwang
University · ⁵ Department of Formulae Pharmacology, College of Oriental medicine,
Gachon University · ⁶ Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang
University



ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to evaluate the efficacy of Hwangnyeonhaedok-tang (HH) and Geongangbuja-tang (GB) on the plasma hormone level in mice exposed to cold stress. HH and GB are the representative prescriptions of cold and hot property, respectively.

Methods : We established cold condition by confining ICR mice to a 4°C cage for 24 hours, ICR mice were given a HH (100, 300, 1000 mg/kg) or GB (100, 300, 1000 mg/kg) extract orally twice a day for three consecutive days. From the second day, they were given cold stress (4°C) for twenty four hours. To measure the plasma corticosterone, insulin, thyroxine, epinephrine and norepinephrine levels of mice, their blood samples were collected from cardiac puncture, immediately centrifuged at 4°C. The protein level of HSP70 and JNK was examined using western blot analysis in cortex and hypothalamus.

Results : Oral administration of GB more significantly reduced plasma corticosterone level raised by cold stress than HH. *Gardeniae Fructus* (CJ), the constituent of HH, significantly increased the thyroxine level. Western blot analysis showed that cold stress-induced Heat shock protein 70 (HSP70) expression was increased by HH and GB, HH decreased JNK expression and GB increased JNK expression dose-dependently in hypothalamus. *Scutellariae Radix* (HG), *Zingiberis Rhizoma* (GG) and *Aconiti Tuber* (BJ) decreased HSP70 in hypothalamus and GG, BJ decreased HSP70 in cortex as well.

Conclusions : These results suggest Geongangbuja-tang (GB) is more effective for ameliorating the stress response caused by cold stress.

Keyword : Cold stress, Hwangnyeonhaedok-tang, Geongangbuja-tang, Corticosterone, Insulin, Epinephrine, Norepinephrine, Hypothalamus, Heat shock protein 70.

I. 서 론

기온변화에 의한 cold stress는 일정한 체온을 유지해야 하는 인체에 적지 않은 스트레스로 작용한다. 인체는 체온 항상성을 유지하며 체내에서 열을 생산하는 화학적 조절기능과 외부로 체열을 방출하는 이학적 조절 기능을 가지고 있어 외부의 기후조건에 따라 적절히 균형을 이룸으로써 일정한 체온을 유지하고자 한다¹⁾.

《素問: 至真要大論》²⁾에서는 “清者溫之, 寒者熱之” 하였는데, 韓醫學에서 말하는 寒證이란 機體의 陽氣가 不足하거나 혹은 寒邪를 感受하여 表現되는 症候로 그 치료법은 病位와 病情에 따라 약간의 차이가 있으나 溫熱藥인 小茴香 吳茱萸 乾薑 肉桂 附子 類를 쓴다³⁾ 고 하였다.

한편 韓藥材의 寒熱溫涼은 陰陽에 입각한 韓藥材의 분류체계로 인체에 미치는 약리활성도를 네 가지로 표현한 것으로 溫熱은 陽的인 성질, 寒涼은 陰的인 성질을 나타내는 것이다. 일반적으로 熱藥과 寒藥은 작용이 비교적 강하고 溫藥과 涼藥은 작용이 완만하다⁴⁾.

이번 연구에 사용한 처방은 대표적인 溫熱한 처방이며 藥味가 적은 乾薑附子湯과 대표적인 寒涼한 처방이며 藥味가 적은 黃連解毒湯이다. 乾薑附子湯은 《傷寒論》⁵⁾에 나온 처방으로 약재구성이 乾薑, 附子로 모두 辛熱한 氣味를 가진 약물로 寒邪가 왕성하여 발생한 寒證에 回陽救逆시키고 溫中逐寒하는 대표적인 처방이다. 黃連解毒湯은 出典은 《外臺秘要》⁶⁾이고, 약재구성이 黃連, 黃芩, 黃白, 梔子이며 모두 苦寒한 氣味를 가진 약물로 消炎작용을 갖고 있으며, 三焦의 實熱에 의하여 일어나는 炎症과 充血을 수반하는 諸症을 治하는 대표적인 처방이다⁷⁾⁻⁹⁾.

韓醫學에서 寒熱개념은 중요한데 寒熱溫涼의 四氣로 藥性を 표현하기도 하였으며, 風寒暑濕燥火의 六氣의 病因으로도 사용되었고, 表裏寒熱虛實陰陽의 八剛辨證으로 診斷의 한 분류로써도 사용되었다. 본 연구

*교신저자 : Y. Kim, Department of Herbal Medicine, College of Pharmacy, Wonkwang University 460 Iksan-daero, Iksan, Jeonbuk, 570-749, Korea
· Tel / Fax : 82-63-850-6803
· Email : hestia@wku.ac.kr

· 접수 2013/10/30 · 수정 2013/11/25 · 채택 2013/11/30

는 이렇게 중요한 韓醫學의 寒熱개념이 현대적으로 어떤 의미를 가지는지 실험적으로 검증해보고자 하였다.

기존의 寒熱에 관한 실험 연구들을 살펴보면 쥐를 이용해서 寒熱 藥性的 藥材를 경구 투여하여 체온의 변화를 비교 관찰 해보거나¹⁰⁾, 춥거나 더운 환경을 준 후 쥐에게 寒熱 韓藥方劑를 경구 투여하여 체온의 변화를 살펴거나 血中 corticosterone의 농도변화를 살펴보는 방법을 사용하였다¹¹⁾¹²⁾. 이번 연구에서는 한 자극을 준 후 체온 조절에 관여하는 호르몬들과 체온조절 중추인 뇌에서의 신호전달 유전자를 분석하여 寒熱處方에 대한 현대적 해석을 해보고자 하였다.

이에 저자는 24시간 4℃ cold stress 환경에 처한 쥐에게 黃連解毒湯과 乾薑附子湯을 경구 투여하여 血中 호르몬 농도 변화와 뇌에서의 신호전달 유전자 분석에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 시약

본 연구에서 사용된 antibody는 Heat-shock protein 70 (Santa Cruz Biotechnology, USA), JNK (Santa Cruz Biotechnology, USA), GAPDH (Enzo Life Sciences, USA)를 사용하였으며, 다양한 호르몬 분석은 Corticosterone EIA Kit (Enzo Life Sciences, USA), Insulin ELISA kit (Alpco Diagnostics, USA), Bi-CAT ELISA kit (Alpco Diagnostics, USA), Thyroxine kit (CUSABIO Biotech, China)를 사용하였다. 기타 사용된 모든 시

약은 분석 등급으로 Sigma (Sigma Aldrich, Korea) 와 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

2) 한약재

실험에서 사용한 黃連解毒湯과 乾薑附子湯에 포함된 약재들은 경북 안동시 옴니허브에서 구입하였으며, 黃連解毒湯은 《外臺秘要》, 乾薑附子湯은 《傷寒論》에 수록된 1濟의 기본 구성 배합에 따라 아래의 Table. 1과 같이 제조하여 한풍제약에 의뢰하여 추출 후 최종 파우더 형태로 받아 사용하였다. 黃連解毒湯의 수율은 17.25%, 乾薑附子湯은 13.8%로 이들을 구성하는 단미제는 Table. 1을 참고한다. 본 연구에 사용된 한약재인 黃連解毒湯은 “HH”, 乾薑附子湯은 “GB”, 黃蓮은 “HN”, 黃芩은 “HG”, 黃柏은 “HB”, 梔子是 “CJ”, 乾薑은 “GG”, 附子是 “BJ”라 명명하였다. 실험 전까지 -20° C에 보관을 하였으며, 사용 전 3차 증류수에 추출 시료를 넣어 완전히 용해시킨 후 사용하였다.

3) 실험동물

본 실험에서 사용되는 실험동물은 6주령된 웅성 ICR mice (Orient Bio, Korea)를 제공받아 온도 24.5±2℃, 습도 50±5%로 조절되는 동물실에서 물과 식이를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였고 조명은 12시간 주기로 낮과 밤이 구분되도록 조정하여 일주일 동안 적응기를 거쳤으며 하나의 cage에 생쥐 5마리씩 사육하였다. 모든 동물실험은 원광 대학교의 실험동물 관리와 사용 지침의 규정 WKU12-11에 따라 수행하였다 (Table. 2, 3).

Table 1 Composition and Amount of HH and GB

Prescription name	Composition	Scientific Name	Amount (g)	Yield (%)	
Hwangnyeonhaedok-tang (HH)	黃蓮	Coptidis Rhizoma	90	11.42	17.25
	黃芩	Scutellariae Radix	60	32.77	
	黃柏	Phellodendri Cortex	60	12.13	
	梔子	Gardeniae Fructus	90	19.44	
Geogangbujatang (GB)	乾薑	Zingiberis Rhizoma	150	10.45	13.8
	附子	Aconiti Tuber	150	21.10	



Table 2 Experiment Design of Mice for the Study of Herbal Combinations

Experiments groups (N=5)	Treatment (P.O)
Normal group	Normal control
Control group	Negative control (Cold stress only)
Hwangnyeonhaedok-tang100 (HH100)	HH 100mg/kg with cold stress
Hwangnyeonhaedok-tang300 (HH300)	HH 300mg/kg with cold stress
Hwangnyeonhaedok-tang1000 (HH1000)	HH 1000mg/kg with cold stress
Geongangbuja-tang100 (GB100)	GB 100mg/kg with cold stress
Geongangbuja-tang300 (GB300)	GB 300mg/kg with cold stress
Geongangbuja-tang1000 (GB1000)	GB 1000mg/kg with cold stress

* P.O: per os

Table 3 Experiment Design of Mice for the Study of Single Herb

Experiments groups (N=5)	Treatment (P.O)
Normal group	Normal control
Control group	Negative control (Cold stress only)
Hwangnyeon (HN) 90	HN 90mg/kg with cold stress
Hwangbaek (HB) 60	HB 60mg/kg with cold stress
Hwanggeum (HG) 60	HG 60mg/kg with cold stress
Chija (CJ) 90	CJ 90mg/kg with cold stress
Geongang (GG) 150	GG 150mg/kg with cold stress
Buja (BJ) 150	BJ 150mg/kg with cold stress

* P.O: per os

2. 실험방법

1) 동물실험

본 실험을 수행하기 전 cold stress에 대한 조건을 확립하기 위하여 다양한 온도설정, 물 섭취의 여부, 자극에 노출되는 시간을 고려하여 cold stress를 주었으며 모든 온도 반응은 Chamber (JEIOTECH, Korea)를 이용하여 이루어졌다.

Cold stress로 인한 반영여부를 위해 쥐의 표면체온을 가변적이므로 이를 대신하여 인체 내부 온도를 가장 잘 반영하는 직장온도를 Thermalert TH-5 (Physitemp, USA)로 직장의 온도를 측정하여 cold stress에 대한 조건을 확립하는데 사용하였으며, 각 그룹별 개체수는 5마리로 하였다. Chamber에 쥐를 넣고 일정시간 노출을 시킨 후 실온에 꺼내어 직장온도를 측정하여 온도변

화를 확인하였으며, cold stress 후 시간대별로 심장에서 혈액을 취한 후 원심분리를 통하여 plasma를 얻었으며, 얻어진 plasma는 사용 전까지 -70℃에서 보관하였으며, 뇌에서 얻어진 hypothalamus와 cortex조직은 액체질소에 급속냉동하여 사용 전까지 액체질소에 보관하였다.

2) ELISA

분석 1시간 전 plasma와 ELISA kit를 실온에서 녹인 후 ELISA법에 의해 plasma내의 corticosterone, insulin, thyroxine, epinephrine, norepinephrine의 양을 측정하였다.

3) Western blot analysis

3-1. Protein Extraction

Western blot을 수행하기 위하여 hypothalamus와 cortex를 혈액이나 잔류물질을 제거하기 위하여 1×PBS로 세척한 후 1×PBS을 조직 volume의 3배를 넣고 homogenizer로 균질화하였다. 3000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 남아있는 잔류물을 pipette을 이용하여 제거하였다. Radio-Immuno-Precipitation Assay lysis Buffer (RIPA lysis Buffer, 1% Nonidet P-40, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.15M NaCl, 0.01M Sodium phosphate pH7.2, 2mM EDTA)로 세포를 용해시킨 후 Ultrasonic Processor VC-130PB (Sonic & Materials, USA)로 분쇄 후 12000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 취하여 -70℃에 보관하였다.

3-2. 전기영동 및 Western blot

각 시료를 Bradford 방법에 따라 정량하고 SDS-PAGE에 전기영동하여 단백질을 분리한 다음 transfer Buffer를 이용해 PVDF-membrane에 분리된 단백질을 전사시켰다. 비 특이반응을 제거하기 위해서 5% 비지방 skim milk가 함유된 T-TBS (blocking buffer)로 실온에서 1시간 동안 충분히 흔들면서 방치하였다. 반응이 끝난 후 blocking buffer에 1:1000으로 희석된 1차 항체를 넣고 4°C에서 반응시켰다. 반응 후 T-TBS로 7분 간격으로 3번 세척하고 blocking buffer에 1:5000으로 희석한 2차 항체를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응을 시켰다. T-TBS로 10분 간격으로 3번 세척한 후 ECL kit를 사용하여 발색을 시켜 단백질의 발현정도를 확인하였다.

4) 통계 분석

결과는 평균값 ± 표준편차로 표현하였다. 통계 분석은 Student's t-test와 One-way ANOVA를 이용하였으며 유의성은 0.05에서 검증하였다.

III. 결 과

1. Cold stress에 대한 조건 확립

Cold stress에 대한 조건으로는 4°C-1시간 자극, 4°C-24시간 자극, -15°C-30분 자극으로 수행하였으며, 7주령된 웅성 ICR mice를 사용하여 cold stress를 주지 않은 normal group과 cold stress 자극 후 실온으로 옮겨 시간 (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30분)에 따른 직장온도를 측정하였다.

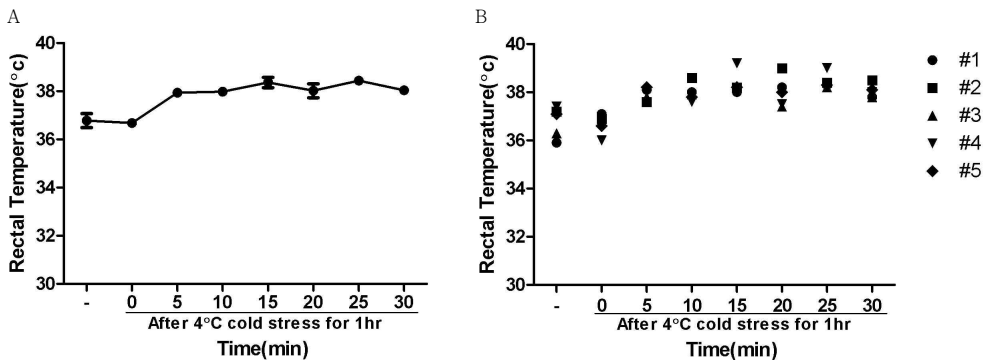


Figure 1. The change of Rectal temperature according to time-course after 4°C cold stress for 1 hour. Normal group(-) was not given cold stress.

A) Mean rectal temperature B) Rectal temperature of individual mouse. Error bars indicate SDs; N=5

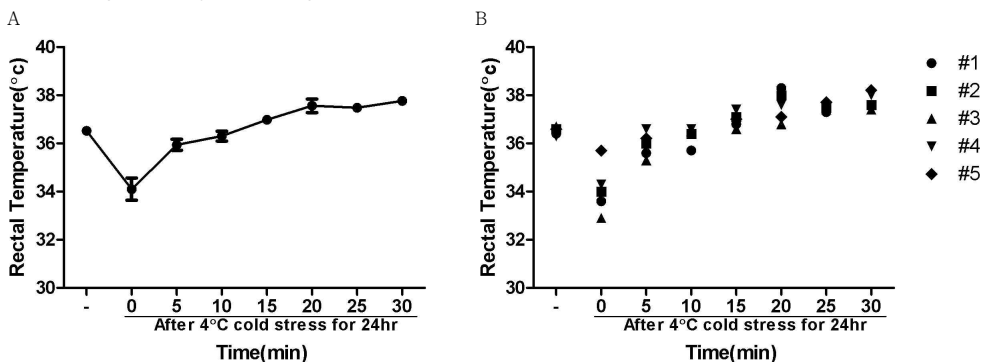


Figure 2. The change of Rectal temperature according to time-course after 4°C cold stress for 24 hour. Normal group(-) was not given cold stress.

A) Mean rectal temperature B) Rectal temperature of individual mouse. Error bars indicate SDs; N=5

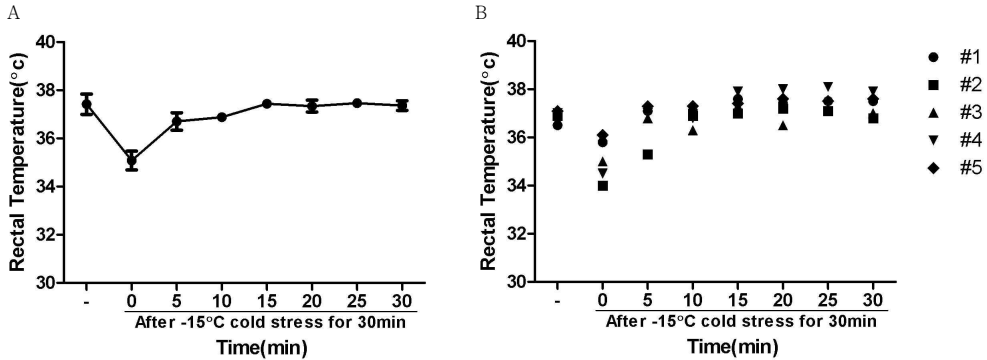


Figure 3. The change of Rectal temperature according to time-course after -15°C cold stress for 30 minute. Normal group(-) was not given cold stress.

A) Mean rectal temperature B) Rectal temperature of individual mouse. Error bars indicate SDs; N=5

4°C-1시간 stress에서는 자극을 주지 않는 normal group의 직장 온도는 36.78°C였고 자극을 준 후 0분에서의 직장 온도는 36.68°C로 자극에 대한 변화가 없었으며 (Fig. 1), 4°C-24시간 stress에서는 normal group의 직장 온도는 36.5°C였고 자극을 준 후 0분에서의 직장 온도는 34.1°C로 cold stress 후 2.4°C로 온도가 떨어짐을 확인하였다 (Fig. 2). -15°C-30분 stress에서는 normal group의 직장 온도는 37.4°C로 확인되었으며, 자극을 준 후 0분에서의 직장 온도는 35.0°C로 2.32°C 온도가 떨어짐을 확인하였다 (Fig. 3).

그러나 -15°C-30분의 경우 너무 낮은 온도의 노출로 인해 오한이나 콧물증상이 육안으로 관찰되어 스트레스 자극이 아닌 cold stress가 하나의 질환으로 나타나는 가능성을 보여 본 실험에서는 제외되었다. Cold stress의 조건은 4°C에서 24시간 동안 노출시키는 것으로 결정하여 본 실험을 수행하였다.

2. Cold stress로 인한 plasma corticosterone의 변화

4°C에서 24시간 동안 cold stress를 자극한 후 쥐의 血中 corticosterone의 영향을 확인하기 위하여 시간에 따른 corticosterone양을 측정하였다. 자극을 주지 않은 normal 그룹과 비교하였을 때 자극을 준 후 0분에서는 6.4배, 5분에서는 5.4배, 10분에서는 2.8배 corticosterone의 양이 증가하였으며 0분과 5분에서 유의성 있는 결과를 확인하였다. 0분 이후에는 감소하는 경향을 보이며 자극 후 30분이 되면서 정상적으로 회복되는 것을 확인하였다 (Fig. 4).

3. 黃連解毒湯 및 구성약물, 乾薑附子湯 및 구성약물에 의한 血中 지표 측정

寒熱을 陰陽으로서 藥性を 대표하는 성질로 간주하여 寒性處方과 熱性處方으로서 黃連解毒湯과 乾薑附子湯을 처방하여 cold stress에 미치는 효능을 확인하기 위하여 Fig. 5의 과정을 걸쳐 실험하였으며, plasma 내의 corticosterone의 변화를 확인한 바 cold stress를 준 후 5분이 지난 후 심장에서 혈액을 채취하여 plasma를 분리해 내어 corticosterone, insulin, thyroxine, epinephrine, norepinephrine의 수치변화를 확인하였다.

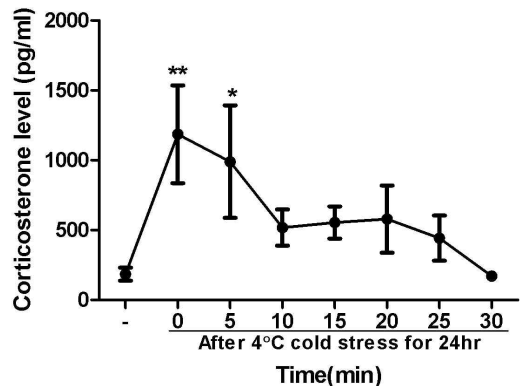


Figure 4. The change of corticosterone level in plasma according to time-course after 4°C cold stress for 24 hour. Normal group(-) was not given cold stress.

indicates significance for the difference between normal and control group (p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). Error bars indicate SDs; N=5.

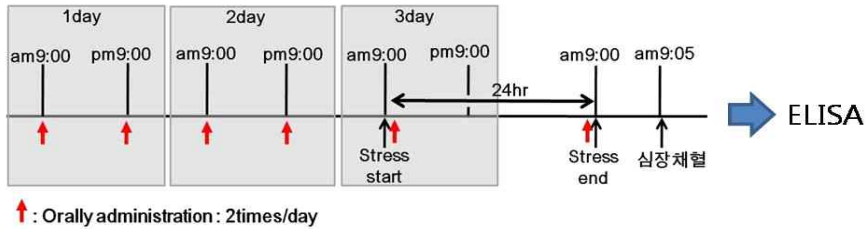


Figure 5. Execution process of experiment.

1000 Corticosterone에 대해서 乾薑附子湯과 黃連解毒湯은 모두 농도 의존적으로 저하시키는 효능이 있었으나 1000 mg/kg 乾薑附子湯 투여군만이 유의성 있게 정상수준으로 회복하였다 (Fig. 6A). Cold stress를 주지 않은 그룹과 cold stress에만 노출시킨 그룹간의 insulin 수치는 변화가 없었으나 두 處方의 300 mg/kg/day와 1000 mg/kg/day 농도에서 저하시키는 효능을 확인할 수 있었다. 특히, 1000 mg/kg/day의 농도로 乾薑附子湯을 처리한 그룹은 유의성 있게 저하시켰다 (Fig. 6B). Thyroxine의 경우 두 處方 모두 300 mg/kg/day에서 증가하다가 1000 mg/kg/day에서는 저하시키는 효능을 확인하였다 (Fig. 6C).

Cold stress로 혈중 epinephrine과 norepinephrine은 증가되었으며, 두 處方 투여시 黃連解毒湯의 경우 300 mg/kg/day의 농도에서 감소하였다가 1000 mg/kg/day의 농도에서 증가됨을 확인하였으며, 乾薑附子湯 투여시 300 mg/kg/day와 1000 mg/kg/day의 농도에서 정상수준으로 회복하였다 (Fig. 6D, 6E).

또한 黃連解毒湯과 乾薑附子湯의 구성약물들의 효능을 확인하고자 각각의 약물을 투여하여 血中 corticosterone, insulin, thyroxine, epinephrine, norepinephrine의 수치변화를 확인하였다. Corticosterone의 경우 黃連解毒湯의 구성약물인 黃芩에서 유의성 있게 증가했으며, insulin과 norepinephrine의 변화에는 영향을 미치지 않았다. 감소된 thyroxine은 단미 투여시 증가함을 보였으며 특히 梔子 투여시 유의성 있게 증가됨을 확인하였다 (Fig. 7C). 이를 바탕으로 cold stress에 대해 乾薑附子湯이 corticosterone 증가를 저하시켜 효과적인 스트레스반응을 완화하는 효과를 나타냈고, 단미약제에서는 梔子が 유의성 있게 thyroxine을 증가시키는 효과를 보였다. 乾薑附子湯은 epinephrine 수치도 농도 의존적으로 저하시키는 경향을 보였다.

4. Hypothalamus와 Cortex에서 黃連解毒湯 및 구성약물, 乾薑附子湯 및 구성약물에 의한 단백질 변화

黃連解毒湯 및 구성약물, 乾薑附子湯 및 구성약물에 의한 血中 지표 측정의 결과를 바탕으로 hypothalamus와 cortex조직에서의 신호전달 체계에 있어 미치는 영향을 확인하기 위하여 western blot analysis를 통하여 protein level의 변화를 확인하였다.

Hypothalamus에서의 단백질 발현 결과 黃連解毒湯과 乾薑附子湯을 투여한 군에서 HSP70 (heat shock protein 70) 발현이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며 黃連解毒湯 300, 1000 mg/kg/day와 乾薑附子湯 1000 mg/kg/day에서 유의성 있게 확인되었다. JNK의 경우 黃連解毒湯은 농도 의존적으로 감소함을 乾薑附子湯은 증가하는 경향이 있음을 볼 수 있었다.

Cortex에서의 단백질 발현 결과 黃連解毒湯 투여시 HSP70의 발현은 농도 의존적으로 증가함을 보이면서 100 mg/kg/day에서 유의성이 있었지만 乾薑附子湯에서는 농도 의존적 경향이나 유의성 있는 결과는 얻지 못하였다. JNK의 경우 乾薑附子湯 300 mg/kg/day, 1000 mg/kg/day은 유의성 있는 변화가 있었음을 확인하였다.

黃連解毒湯과 乾薑附子湯의 구성약물인 각각의 단미제제의 결과 hypothalamus에서의 HSP70 발현은 cold stress로 유의성 있게 감소하였으며, 黃連解毒湯의 구성약물인 黃芩에서 더 감소됨을 확인하였으며 乾薑附子湯의 구성약물인 乾薑과 附子에서 유의성 있게 감소되었다. Cortex에서는 HSP70 발현은 黃連解毒湯의 구성약물인 梔子에서 유의성 있었으며, 乾薑附子湯의 구성약물인 乾薑과 附子에서 유의성 있는 결과가 확인되었다. JNK의 경우 黃芩과 乾薑에서 유의성 있는 결과를 확인하였다.

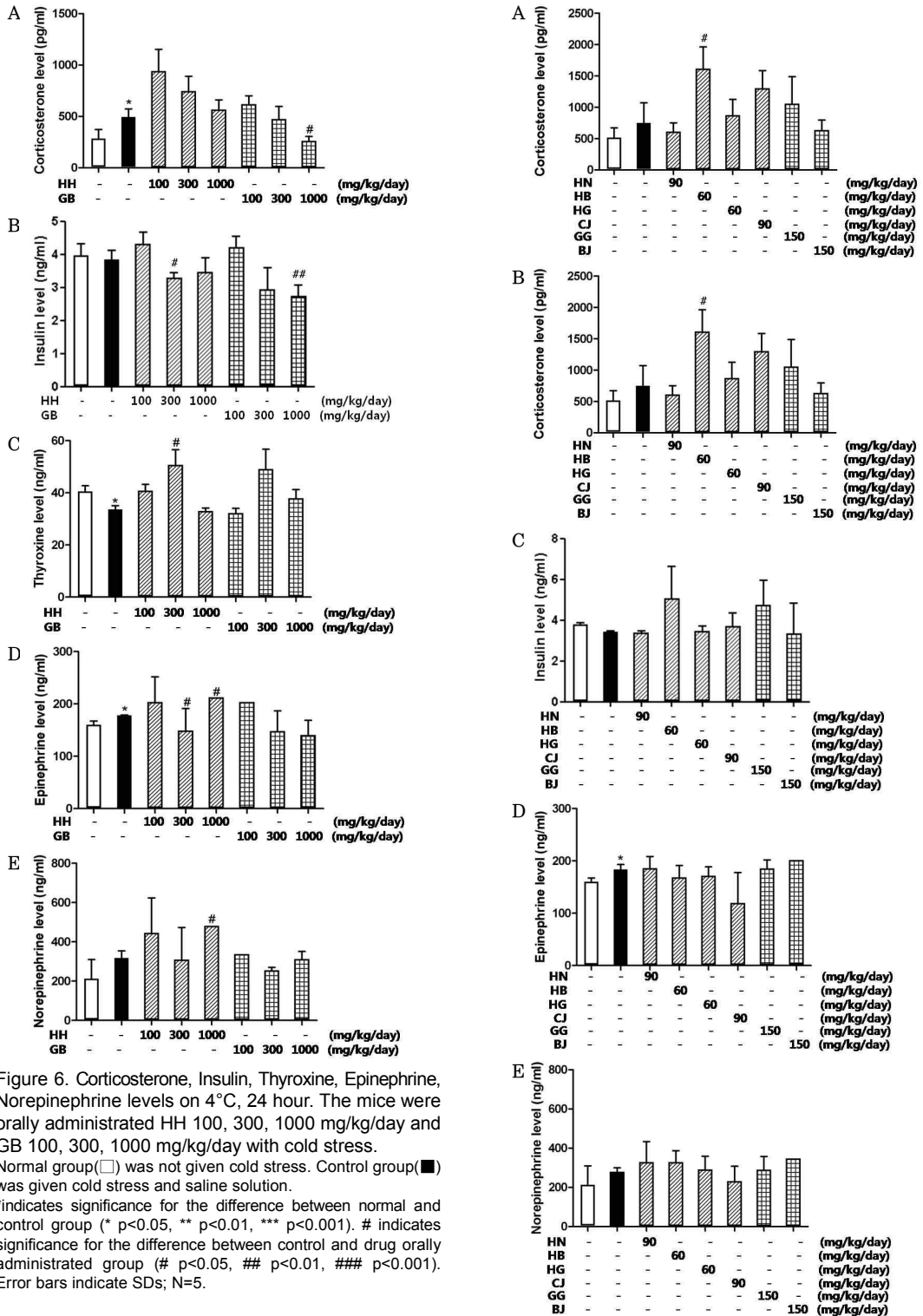


Figure 6. Corticosterone, Insulin, Thyroxine, Epinephrine, Norepinephrine levels on 4°C, 24 hour. The mice were orally administrated HH 100, 300, 1000 mg/kg/day and GB 100, 300, 1000 mg/kg/day with cold stress. Normal group(□) was not given cold stress. Control group(■) was given cold stress and saline solution. *indicates significance for the difference between normal and control group (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). # indicates significance for the difference between control and drug orally administrated group (# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001). Error bars indicate SDs; N=5.

Figure 7. Corticosterone, Insulin, Thyroxine, Epinephrine, Norepinephrine levels on 4°C, 24 hour. The mice were orally administrated HN 90 mg/kg/day, HB 60 mg/kg/day, HG 60 mg/kg/day, CJ 90 mg/kg/day, GG 150 mg/kg/day and BJ 150 mg/kg/day with cold stress.

Normal group(□) was not given cold stress. Control group(■) was given cold stress and saline solution

* indicates significance for the difference between normal and control group (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

indicates significance for the difference between control and drug orally administrated group (# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001).

Error bars indicate SDs; N=5.

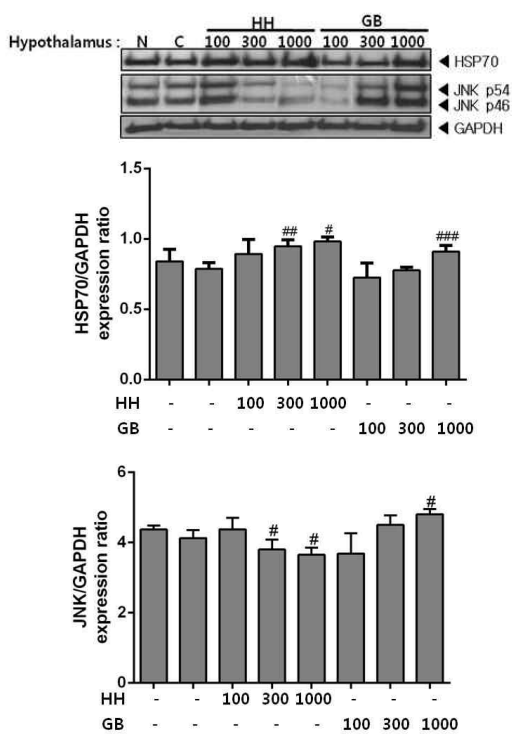


Figure 8. Effect of HH and GB treatment on protein expression in hypothalamus.

(A) Level of protein expression in hypothalamus by western analysis.

(B) Quantitative analysis by Image J Program. Normal group (first lane) was not given cold stress. Control group (second lane) was given cold stress and saline solution.

indicates significance for the difference between control and stress group (# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001). Error bars indicate SDs; N=4.

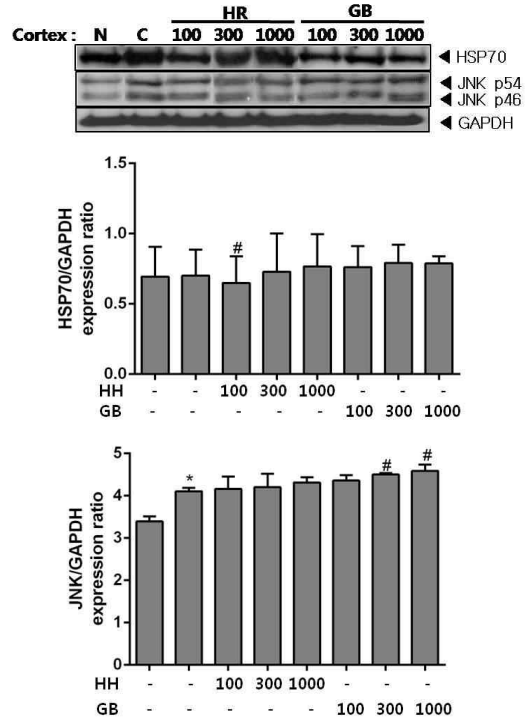


Figure 9. Effect of HH and GB treatment on protein expression in cortex.

(A) Level of protein expression in cortex by western analysis.

(B) Quantitative analysis by Image J Program. Normal group (first lane) was not given cold stress. Control group (second lane) was given cold stress and saline solution.

* indicates significance for the difference between normal and control group (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). # indicates significance for the difference between control and stress group (# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001). Error bars indicate SDs; N=4.

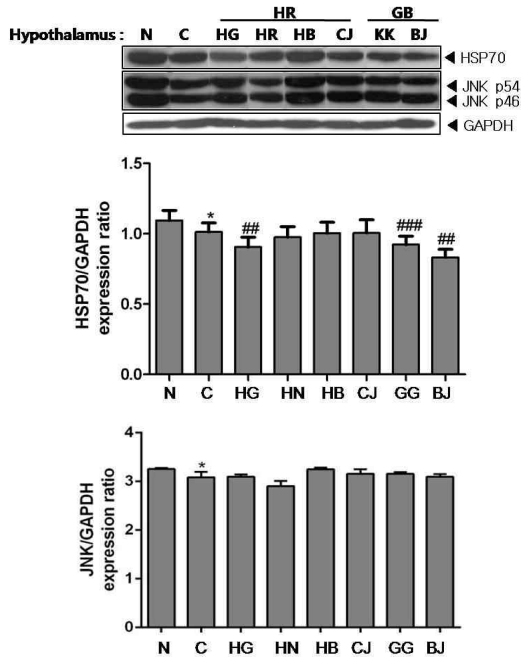


Figure 10. Effect of single herbs treatment on protein expression in hypothalamus.

(A) Level of protein expression in hypothalamus by western analysis.

(B) Quantitative analysis by Image J Program.

* indicates significance for the difference between normal and control group (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

indicates significance for the difference between control and stress group (# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001). Error bars indicate SDs; N=4.

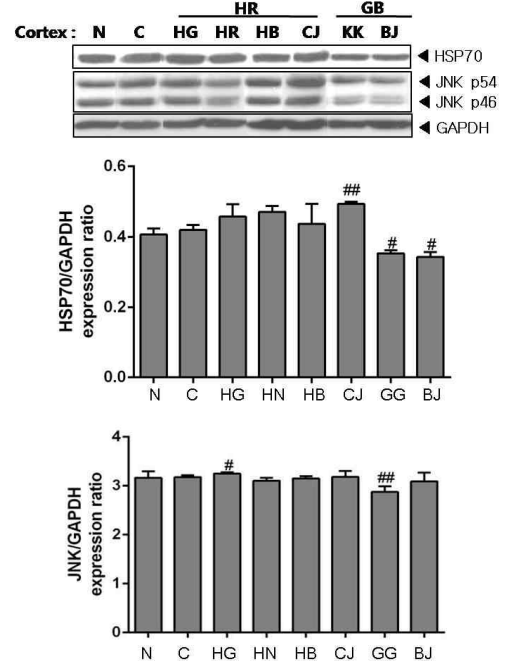


Figure 11. Effect of single herbs treatment on protein expression in cortex.

(A) Level of protein expression in cortex by western analysis.

(B) Quantitative analysis by Image J Program.

* indicates significance for the difference between normal and control group (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

indicates significance for the difference between control and stress group (# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001). Error bars indicate SDs; N=4.

IV. 고찰

韓醫學에서 寒熱은 질병의 성질을 大別하는 두 綱領으로 寒熱을 辨證하는 것은 실제로 陰陽의 盛衰를 辨別하는 것이다. 病症을 크게 寒證과 熱證으로 大別할 때 寒證은 機體의 陽氣가 不足하거나 혹은 寒邪를 感受하여 表現되는 症候이며 熱證은 機體의 陽氣가 偏盛하거나 혹은 熱邪를 感受하여 나타나는 症候이다. 寒證과 熱證에도 病位와 病情에 따라 治療에 차이가 있으나 일반적으로 寒證에 대해서는 氣味가 辛溫한 藥물을 사용하여 代사를 行진시키며 熱證에서는 苦寒한 藥물을 사용하여 代사를 억제하는 方法으로 治療한다¹³⁾¹⁴⁾.

인체에서는 외부온도변화에 맞춰서 일정한 체온을 유지할 수 있도록 조절을 하는데, 추울 때는 포도당의 분해를 통한 혈당 상승으로 체온을 상승시키는데 이에 관여하는 호르몬은 glucocorticoid와 epinephrine 이고, 포도당을 분해 촉진하는 호르몬이 thyroxine이다. 또한 간뇌의 자율신경인 교감신경이 관여하여 피부를 수축시키는 입모근이 수축하고, 피부 모세혈관을 수축시켜 피부로 열이 빠져 나가는 것을 방지하여 체온을 상승시킨다¹⁵⁾.

따라서 본 연구에서는 mouse에서 cold stress에 대한 glucocorticoid와 epinephrine, norepinephrine, thyroxine을 혈중지표로 삼아 寒證에 대표적으로 쓰는 乾薑附子湯과 熱證에 대표적으로 쓰는 黃連解毒湯의 효능차이를 보고자 하였다.

그 중 corticosterone은 mouse에서 검출되는 glucocorticoid로 catecholamine에 비해 반감기가 길고 검출을 위한 정맥천자와 같은 자극에 대한 반응의 정도가 예민하지 않아 stress 호르몬 지표가 많이 사용되는 동물 실험에서는 더욱 유용하게 쓰이고 있어 주된 지표로 삼았다¹⁶⁾⁻²⁰⁾.

한편 血中 corticosterone은 하루 24시간 주기적인 변화를 가진다는 것이 잘 알려져 있으므로²¹⁾ mouse의 circadian rhythm을 고려하여 하루 24시간 주기 중 오전 6시 30분부터 오전 10시 30분 사이가 낮은 시간이므로 오전 9시를 기준 시간으로 정하여 혈액을 채취하여 본 실험을 수행하였다.

Cold stress에 노출된 쥐의 血中 호르몬의 농도변화에서 corticosterone과 epinephrine은 유의성있게 상승하였고 thyroxine은 유의성 있게 하강하였다. 黃連解毒湯과 乾薑附子湯의 효능의 차이를 이 혈중 호르몬 농도변화를 통해서 관찰해보았다.

Corticosterone에 대해서 乾薑附子湯과 黃連解毒湯은 모두 농도 의존적으로 저하시키는 효능이 있었으나 乾薑附子湯만이 1000 mg/kg/day에서 유의성 있게 정상수준으로 회복하여서 두 처방을 비교하였을 때 건강부자탕이 cold stress에서 더 효과적인 것인 것을 알 수 있었다.

Thyroxine의 경우 cold stress로 감소하였는데, 두 처방 모두 300 mg/kg/day에서는 회복시켰다가 1000 mg/kg/day에서는 다시 감소되는 경향을 보였는데 이것은 1000 mg/kg/day가 적정 용량을 넘어선 것으로 생각된다.

Epinephrine의 경우 cold stress로 증가되는데 黃連解毒湯에서 300 mg/kg/day시에 회복하다가 1000 mg/kg/day에서는 다시 올라가는 것은 thyroxine과 같이 약 용량이 과하기 때문으로 생각된다.

또한 黃連解毒湯과 乾薑附子湯의 구성약물들의 효능을 확인하고자 효과가 좋았던 黃連解毒湯과 乾薑附子湯의 300 mg/kg/day의 단미 약제 구성 비율을 계산하여 같은 양을 투여해서 혈중지표를 확인하였다.

Corticosterone의 경우 처방과 같이 저하효과를 보이는 약제는 없었으며 黃連解毒湯의 구성약물인 黃柏에서는 반대로 유의성 있게 증가하였다. 단미에서는 보이지 않는, 단미의 조합에서 생길 처방만의 효과로

볼 수 있다. 黃連解毒湯의 구성약물인 梔子は thyroxine에서 유의성 있게 증가시켰다.

cold stress에 대한 혈중지표 변화를 관찰한 결과 乾薑附子湯이 1000 mg/kg/day에서 corticosterone 수치를 유의성 있게 저하시켜 黃連解毒湯보다 cold stress를 완화하는 효과가 좋았고, 단미 약제에서는 梔子が thyroxine과 epinephrine을 회복시켜서 cold stress에 특이적 효능을 갖는 것으로 사료된다.

한편 cold stress으로 인한 뇌에서의 신호전달 유전자 발현을 확인하기 위해 hypothalamus와 cortex 조직을 떼어 western blot analysis을 수행하였다. Hypothalamus는 pituitary gland와 함께 Limbic System을 구성하며, 음식섭취, 식음, 수면, 각성, 평형을 조절하며, 체온조절중추이다. 또한 전기적, 화학적 자극을 통하여 우리 몸에서 가장 중요한 호르몬 생성기관인 pituitary gland를 조절한다. hypothalamus에서 pituitary gland를 조절하여 adrenal gland를 자극하여 인체의 호르몬 대사를 조절한다. 이를 시상하부-뇌하수체-부신축(HPA axis: Hypothalamic - Pituitary - Adrenal Axis)이라고 하며, 스트레스에 반응하는 뇌의 신경내분비계의 주요 구성요소이다²²⁾.

본 연구의 주요지표인 corticosterone에 대한 glucocorticoid receptor signalling에서 corticosterone은 glucocorticoid receptor와 결합하여 세포내로 여러 이동 경로를 통해 작용하는데 HSP70, JNK은 그 경로 중에 결합되는 단백질들로 스트레스와 염증작용에 반응한다²³⁾.

HSP70은 열, 중금속, 독소, 허혈 등 변성단백질을 생산하는 여러 스트레스에 대한 반응으로 합성되며, HSP family에는 그 분자량에 의해 명칭이 붙여진 HSP10, HSP27, HSP60, HSP70 및 HSP90과 ubiquitin 등이 존재한다²⁴⁾²⁵⁾. JNK (jun N-terminal Kinase)는 세포소멸에 관여하는 물질로 ERK (extra-signal response kinase) 및 p38 kinase 로 이루어져 있는 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway에 포함되어 있다고 알려져 있다. MAP kinase 신호전달계는 세포가 외부의 환경변화에 따른 자극들을 인지하여 그 정보를 세포질 및 세포핵 내부로 전달하는 과정에 관여하는 대표적인 신호전달계로 특히 세포의 성장, 발생, 분화, 사멸 등의 조절기전에 관여한다고 알려



져 있다²⁶⁾²⁷⁾.

따라서 HSP70, JNK의 단백질 발현을 스트레스 지표로 삼아 hypothalamus와 cortex에서의 변화를 살펴 보았다.

Hypothalamus에서의 단백질 발현 결과 黃連解毒湯과 乾薑附子湯 투여시 HSP70 발현이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며 黃連解毒湯 300, 1000 mg/kg/day와 乾薑附子湯 1000 mg/kg/day에서 유의성이 있었다. 그러나 같은 농도에서 JNK의 경우 유의성 있게 黃連解毒湯은 농도 의존적으로 감소함을, 반대로 乾薑附子湯은 농도 의존적으로 증가함을 볼 수 있었다.

Cortex에서의 단백질 발현 결과 黃連解毒湯 투여시 HSP70의 발현은 100 mg/kg/day에서 유의성 있게 저하되었지만 乾薑附子湯에서는 유의성 있는 결과는 얻지 못하였다. 그러나 JNK의 경우 hypothalamus의 결과와 일관되게 cortex에서도 乾薑附子湯 300 mg/kg/day, 1000 mg/kg/day은 유의성 있게 증가하였다.

다음으로 黃連解毒湯과 乾薑附子湯 각각의 구성약물들을 실험한 결과 hypothalamus에서의 HSP70 발현은 cold stress로 유의성 있게 감소하는데, 이는 黃連解毒湯 구성약물인 黃芩에서 더 감소됨을 확인하였으며 乾薑附子湯의 구성약물인 乾薑과 附子에서도 유의성 있게 감소되었다.

乾薑과 附子は cortex에서도 HSP70 발현을 유의성 있게 낮추었으나 반대로 黃連解毒湯의 구성약물인 梔子は 유의하게 증가시켰다. JNK의 경우 cortex에서 乾薑이 처방의 효과와 반대로 유의성 있게 저하시킨 것이 특이적이었다.

이상 뇌에서의 단백질 발현 결과 HSP70에서 건강 부자탕의 구성약물인 乾薑과 附子 단미에서는 hypothalamus 와 cortex 양쪽 다 유의성 있게 낮추었지만 처방에서 농도 의존적으로 상승한 것은 단미의 효능만으로 처방의 효능을 설명할 수가 없다는 것을 보여준다.

Corticosterone과 HSP70에 대해서는 黃連解毒湯과 乾薑附子湯이 정도의 차이는 있지만 같은 방향의 효과를 보였음에도 불구하고, JNK의 경우 黃連解毒湯은 농도 의존적으로 감소시키고, 乾薑附子湯은 농도 의존적으로 증가시켜 정반대의 양상을 보였다. 따

라서 cold stress에 대한 인체의 반응을 완화시키는 것은 두 처방이 같으나 그 기전에 있어서 寒熱處方은 서로 다른 pathway을 통해 작용하는 것으로 생각되며 이에 대한 추후연구가 필요하다.

본 연구는 乾薑附子湯이 cold stress에 대해 더 적합하다고 볼 수 있는 연구결과로 寒熱연구의 기초자료가 될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

韓藥의 藥性を 설명하는 寒熱을 현대적으로 해석하고 정리하기 위해 생쥐를 4℃, 24시간 cold stress에 노출하고 대표적인 寒涼藥과 溫熱藥인 黃連解毒湯과 乾薑附子湯을 투여하여 血中 호르몬 농도변화를 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Cold stress에서 乾薑附子湯이 corticosterone 수치를 유의성 있게 저하시켜 黃連解毒湯보다 효과적인 스트레스 완화효과를 나타내었다.
2. Cold stress에서 단미약재 중 梔子が 유의성 있게 thyroxine을 증가시켰고, 黃柏이 유의성 있게 corticosterone을 증가시켰다.
3. Cold stress로 hypothalamus에서의 HSP70의 수치는 黃連解毒湯과 乾薑附子湯 모두 농도 의존적으로 증가하였으며, JNK의 경우 黃連解毒湯은 농도 의존적으로 감소, 乾薑附子湯은 농도 의존적으로 증가시키는 정반대의 양상을 보였다. 乾薑附子湯은 JNK 발현도 농도 의존적으로 증가시켰다.
4. 각 처방의 구성약물 중 乾薑, 附子は hypothalamus에서의 HSP70 수치를 유의성 있게 감소시켰으나 각 단미의 효과로 처방의 효과를 설명할 수는 없었다.

이상과 같은 실험 결과로 볼 때 cold stress에 대하여는 乾薑附子湯이 黃連解毒湯보다 血中 corticosterone 증가를 저하시켜 스트레스 완화 효과가 있다고 보

며, 작용기전에 있어서 黃連解毒湯과 乾薑附子湯이 JNK 발현에서 정반대의 양상을 보여 추후 보다 깊은 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 한의이론과학화사업의 지원을 받아 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Kim WH, Kim GJ, Formation and System of Korea Oriental Medicine, Seoul:Doseo publishing company, 1990:183-192.
2. Yang UG, Hwangjenaegyongsomunseokae, Seoul:Seongbosa, 2009:305-6.
3. Yun GY, Donguimsangbangjehak, Seoul:Myeongbo publishing company, 1994:728.
4. Nam BH, Lee MY, Kim CS, Lee HG, A Modern Approach to The Natures of Drugs (1) - Relation to The Rectal Temperature -, Biomolecules & Therapeutics, 1997;5(1):8-11.
5. Chae IS, Sanghallonseokjeon, Seoul:Gomunsa, 1991: 334-5.
6. Wang S, Oedaebiyo, Seoul:Seongbosa, 1975:70.
7. Im JS, Bongyeongsojeung, Seoul:Atijeon, 1999:102-108, 276-281, 318-322.
8. Lee JH, Doseolhanbangjillyoyobang, Seoul:Uibang publishing company, 2007:743.
9. Professors of Herbology, College of Oriental Medicine, Bonchohak, Seoul:Yeongnimsa, 2011:531-3.
10. Lee HG, Lee MY, Lee JH, A study on KIMI-Theory (I) - The relationship between 'KI' and changes in body temperature -, Journal of the Korea Institute of Oriental Medicine, 1995;1(1):419-31.
11. Nam YJ, Lee TH, Effects of Taste and Quality of Drugs on the Plasma Corticosterone Level in Mice exposed to Heat and Cold Stress, J Korean Oriental Med, 2002;10(1):157-67.
12. Kang YG, Lee TH, Yookmijihwang-Tang on the Plasma Corticosterone level in Mice exposed to Heat, Cold and Immobilization Stress, J Korean Oriental Med, 2002;10(2):99-112.
13. Im TK, Chinese medicine studies, Hunan:Hunan Science and Technology publishing company, 1985: 44-83, 158-168.
14. Kim JJ, Dongyanguihak Jillyoyogam, Institute of Oriental Medicine, 1983:106-10.
15. The Korean society of Pathologists, Pathology (5th), Seoul:Gomunsa, 2005:937-9.
16. Hwang UW, Kim JH, An Experimental Study on the Anti-Stress Effect by Mokhyangsoongisan, J Korean Oriental Med, 1993;26:168-79.
17. Kim DH, Min SG, SON BG, Lee SG, Song DG, E ffects of Ginseng Saponin on the Stress-Induced Plasma Corticosterone Levels in Mice, J Korean Neuropsychiatr Assoc, 2002;41(3):389-98.
18. Kim SH, Lee SY, Lee SR, The Experimental Studies on the Anti-Stress Effeces of Chungkansoyosan, J Oriental Neuropsychiatry, 1995;6(1):61-70.
19. GO KB, Stress and Psychosomatic medicine (2nd), Seoul:Iljogak, 2010:3-21, 47-70.
20. Gwon YY, Lee TH, Effect of Each Constituent-Herb of Sagoonja-Tang on the Change of Corticosterone Level induced by Cold Stress in Mice, The Korean J. of Oriental Medical Prescription, 2003;11(2):83-94.
21. Simon C, Biddie, Becky L, Conway-Campbell and Stafford L, Lightman, Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease, Rheumatology, 2012;51(3):403-412.
22. Hadley ME, Levine JE, Endocrinology (6th), Upper Saddle River, NJ:Pearson Prentice Hall, 2007: 111-33.
23. Barnes PJ, Corticosteroid effects on cell signaling, J European respiratory, 2006;27(2):413-26.
24. Kim YS, Effect of Puerariae Radix on HSP70 Expression in Ischemic Damaged Rats, Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology, 2004;18(1):167-71.
25. Mayer MP, Bukau B, Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism, Cell Mol Life



- Sci, 2005;62(6):670-84.
26. Shim JY, Cho JY, Lee NO, Kim GH. The Effect of Bee Venom on COX-2, P38, ERK and JNK in RAW 264.7 Cells. *Journal of Korean Institute of Pharmacopuncture*. 2003;6(2):77-90.
 27. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):537-49.
 28. Salgado-Delgado, R., A. Tapia Osorio, et al. Disruption of circadian rhythms: a crucial factor in the etiology of depression. *Depress Res Treat*. 2011;839743.
 29. Baccan, G. C., R. Sesti-Costa, et al. Effects of cold stress, corticosterone and catecholamines on phagocytosis in mice: differences between resting and activated macrophages. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(6):379-85.
 30. Filipović, D, Zlatković J, Pavićević I, Mandić L, Demajoet M. Chronic isolation stress compromises JNK/c-Jun signaling in rat brain. *J Neural Transm*. 2012;119(11): 1275-84.
 31. Kakihana, R. and J. A. Moore. Circadian rhythm of corticosterone in mice: the effect of chronic consumption of alcohol. *Psychopharmacologia*. 2012; 46(3):301-305.
 32. Kaneko, T. and K. Kibayashi. Mild hypothermia facilitates the expression of cold-inducible RNA-binding protein and heat shock protein 70.1 in mouse brain. *Brain Res*. 2012;1466:128-36.
 33. Maruyama, T., S. Kusakari, et al. Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP alpha in the brain. *J Neurochem*. 2012;121(6):891-902.
 34. Roudkenar MH, Halabian R, Roushandeh AM, Nourani MR, Masroori N, Ebrahimi M, Nikogoftar M, Rouhbakhsh M, Bahmani P, Najafabadi AJ, Shokrgozar MA. Lipocalin 2 regulation by thermal stresses: protective role of Lcn2/NGAL against cold and heat stresses. *Exp Cell Res*. 2009;315(18):3140-51.