

# 半夏가 스트레스로 인한 생쥐의 뇌조직 유전자변화에 미치는 영향 연구

정중효, 조수인\*, 송영길, 김하나, 김경옥

동신대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실, 부산대학교 한의학전문대학원\*

## Genome Wide Expression Analysis of the Effect of *Pinelliae Rhizoma* Extract on Psychological Stress

Jong-hyo Jeong, Su-in Cho\*, Young-gil Song, Ha-na Kim, Kyeong-ok Kim

Department of Korean Medicine, Graduate School of Dong-Shin University, \*School of Korean Medicine, Pu-san National University

**Received:** February 27, 2015

**Revised:** March 13, 2015

**Accepted:** March 19, 2015

**Objectives:** *Pinelliae Rhizoma* has traditionally been used as an anti-depressant in oriental medicine. This study is to investigate the effect of *Pinelliae Rhizoma* extract (PRE) on psychological stress in genome wide expression of mice.

**Methods:** After giving physical stress to mice, PRE was orally administered with 100 mg/kg/day for five days. After extracting whole brain tissue from the mice, their genome changes were observed by microarray analysis method. The genome changes were analyzed by IMAGENE 4.0, TREEVIEW, FatiGo algorithms, BOND database, cytoscape program, etc.

**Results:** 1. PRE administered group were remained at normal level; 60% of increase was shown in expressed genes by physical stress, and 65% of decrease was shown in expressed genes by psychological stress. 2. Genes with increased expression in control group that remained at a normal state in PRE administered group were involved with the gene of a cellular metabolic process on biological process, protein binding on molecular function, and cell part on cell composition. The pathway was found to be cytokin-cytokin receptor interaction. 3. Genes with decreased expression in control group that remained at a normal state in PRE administered group were involved with the gene of a cellular metabolic process on biological detail and coupled ATPases activity on molecular function. This gene related pathway was Ubiquitin mediated proteolysis etc. 4. Core node genes analyzed by protein interaction network were Vinculin, Cell division cycle 42 homolog (*S. cerevisiae*) etc. They played an important role in maintaining cytoskeleton and controlling cell cycle.

**Conclusions:** Several genes were up-regulated and down-regulated in response to psychological stress. The expression of most of the genes that were altered in response to psychological stress was restored to normal levels in PRE treated mice. When the interaction network information was analyzed, the recovery of the core node genes in PRE treated mice indicates that this final set of genes may be the effective target of PRE.

**Correspondence to**

Kyeong-ok Kim  
Department of Korean  
Neuropsychiatry, Dong-shin  
University Hospital at Suncheon, 331,  
Isu-ro, Suncheon, Korea.  
Tel: +82-61-729-7199  
Fax: +82-61-725-1717  
E-mail: avecinok@hanmail.net

**Key Words:** *Pinelliae Rhizoma* Extract (PRE), Psychological Stress, Microarray.

## I. 서론

생물학적 의미로서의 스트레스란, 자극이나 변화에 대한 인체의 부적응의 상태로 교감신경계가 과활성화 되어 급성 혹은 만성적으로 신체적 또는 심리적, 행동적 문제를 초래하는 것을 말하며<sup>1)</sup>, 지속적인 스트레스는 자율신경계통과 내분비 계통에 영향을 끼쳐 두통, 과민성 대장증후군, 위궤양, 당뇨병, 고혈압 뿐만 아니라 심장병, 간 경화증, 암 등 많은 질병의 발생과 밀접한 관계가 있는 것으로 밝혀져 있다<sup>2,3)</sup>.

한방신경정신과에서 종종 볼 수 있는 우울, 불안 등의 질환들은 현대를 살아가는 사람들에게 있어서는 스트레스로부터 야기되어진 것으로 보고되고 있으며<sup>4)</sup>, 이러한 스트레스는 특정한 상황에 대하여 자신이 위협받는다라고 받아들임으로서 야기되는 두려움, 긴장감, 우려, 근심 등의 부정적 감정으로 이해된다<sup>1)</sup>.

한의학에서는 스트레스를 감정이나 외기의 변화가 하나의 자극인자로 작용하는 것에 대한 반응으로서 나타나는 현상으로 인식하고 있다<sup>5)</sup>. 이들은 내부에서 기의 변조를 야기하고 질병을 일으키는 기초가 되고, 신체에 대하여 병적 요인을 제공하여 제반 질환을 야기시키는 것으로<sup>6,7)</sup> 모두 칠정(七情)의 변화에 의해 나타날 수 있는 기허, 기울, 기역 등과 관계가 있는 것으로 이해하고 있다<sup>8,9)</sup>.

한의학에서는 스트레스를 기의 변화로 인식하고 한약제 투여에 따른 항스트레스 효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 신체적 스트레스에 대해 보혈안신탕<sup>10,11)</sup>, 자음건비탕<sup>12)</sup>, 분심기음<sup>13)</sup>, 십전대보탕<sup>14)</sup> 등의 복합 방제의 투여로부터 산조인<sup>15)</sup>과 같은 단일 약제의 투여로 인한 효과에 대한 연구 보고와 사회·심리적 스트레스에 대한 힐초근<sup>16)</sup>, 호초<sup>17)</sup>, 원지<sup>18)</sup>, 석창포<sup>19)</sup>, 반하<sup>20)</sup> 등 단일 약제와 반하후박탕<sup>21)</sup>의 복합 방제 투여에 대한 연구 보고 등으로 많으나, 스트레스로 인한 뇌세포의 유전자 변화에 대한 연구는 미비한 실정이다.

연구 재료로 사용된 반하(半夏)는 거담지제(祛痰之劑)의 대표적 약물로 화담지구(化痰止嘔), 조습강역(燥濕降逆), 소비산결(消痞散結) 등의 효능으로 매핵기(梅核氣)와 흉완비민(胸腕痞悶) 등을 치료하여<sup>22)</sup> 스트레스에도 사용될 수 있는 약물이다.

본 연구에서는 마이크로어레이 분석법을 활용한 반하의

사회·심리적 스트레스에 대한 효능 평가<sup>20)</sup>에 관한 연구 방법에 준하여 스트레스를 실험 동물에 유발한 다음 적출한 뇌조직을 재료로 IMAGENE 4.0 (Bio-discovery, Marina del Rey, CA), TREEVIEW (M.B. Eisen, <http://rabam.lbl.gov>), FatiGo algorithms (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>), BOND 데이터베이스(<http://bond.unleashedinformatics.com>) 및 cytoscape program 등을 이용하여 유전자 변화 등을 분석하여 유전자의 종류와 작용 경로에 대한 의미있는 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 동물 및 약재

체중  $20 \pm 2$  g의 ICR 계 수컷 생쥐를 대한실험동물(대한실험동물, 한국)에서 구입하여 본 대학 동물사육실에서 고형사료(삼양사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 2주일 이상 실험실 환경(22°C, 12 시간 간격 조명)에 적응시킨 후 사용하였으며, 약제인 반하는 동신대학교 부속 순천 한방병원에서 사용하고 있는 제품을 구입하여 엄선한 것을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 반하 추출물의 조제

반하 50 g을 증류수 1,500 ml와 함께 전기 약탕기(DWP-1800T, 대웅, 한국)로 100°C에서 2시간 전탕한 후 추출액을 부직포를 이용하여 찌꺼기를 제거한 후 동결 건조기(SFDSM06, 삼원, 한국)를 이용하여 6.6 g의 건조 추출물을 얻었다. 이를 냉동실에 신선하게 보관하였다가 실험 직전에 필요한 농도로 증류수에 녹여 시료로 사용하였다.

#### 2) 실험동물의 분류 및 약물 투여

실험동물은 신체적 스트레스군, 정상군, 대조군 및 실험군의 4개 그룹으로 나누었다. 신체적 스트레스군은 하루 1시간의 전기적 충격을 부하하였고, 정상군은 스트레스 부하장치에 노출되었으나 신체적 심리적 스트레스에 노출되지 않고 아무 처치도 안하였으며, 대조군은 신체적 스트레스군을 옆에서 지켜보는 것으로써 사회·심리적 스트레스를 부하하면서 증류수를 투여하였고, 실험군은 사회·심리적 스트

레스를 부하하면서 반하 추출물을 100 mg/kg로 투여하였다. 투여 시기와 방법은 각각 1일 1회 5일간 스트레스 부하 30분 전에 경구 투여하였다.

### 3) 스트레스 부하 장치 및 실험

스트레스 부하 실험은 Ogawa 등<sup>23)</sup>이 개발한 것을 Shibasaki 등<sup>24)</sup>이 보완하여 개발한 사회·심리적 스트레스 부하 장치를 사용하였다. 동물 실험을 통해서도 사람의 일상적인 사회·심리적 스트레스를 대신할 수 있도록 고안·제작된 communication box를 사용하여 ICR 계 생쥐를 실험동물로 하여 사회·심리적 스트레스 상태를 유발한 다음 반하 추출물을 실험군에 투여하여 스트레스의 해소에 어느 정도 영향을 미치는가를 평가하였다.

사회·심리적 스트레스 부하 장치는 Fig. 1과 같이 크기가 64×64×40 cm<sup>3</sup>로서 16개의 작은 방(16×16 cm<sup>2</sup>)으로 되어 있고, 그 중에서 어둡게 표시된 8개의 방바닥에 1.3 cm 간격으로 직경 0.5 cm 굵기의 동선을 깔고 foot shock으로 전기적 충격을 부하할 수 있도록 전기 장치에 연결되도록 설계되어 있다. 이들 16개의 방 사이에는 투명한 플라스틱으로 설치하여 foot shock에 의한 전기적 충격을 방지할

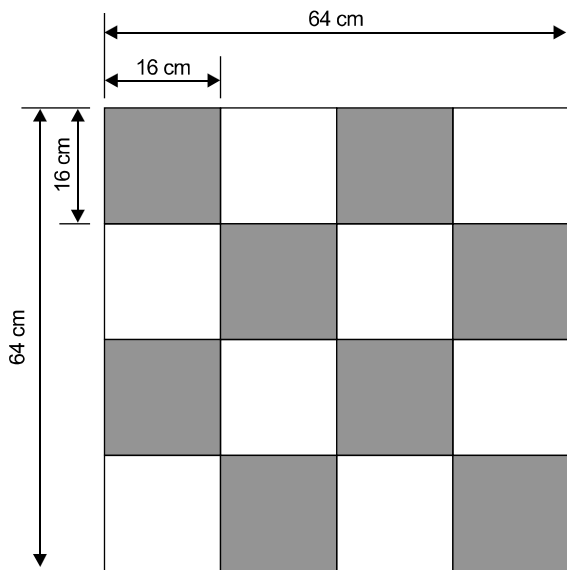


Fig. 1. Scheme of the communication box. Foot shock mice were placed individually in the eight shaded areas (foot shock compartments). Sociopsychological mice were placed in the eight solid areas (non-foot shock compartment). Foot shocks were delivered in shaded areas.

수 있도록 설치했다. 전기적 foot shock은 2.0 mA의 전류를 10초 동안 진행되며 120초 간격으로 다시 foot shock이 부하되도록 제작되었다. 매일 오전 10시부터 신체적 스트레스군에 1시간의 foot shock을 5일간 부하하였다.

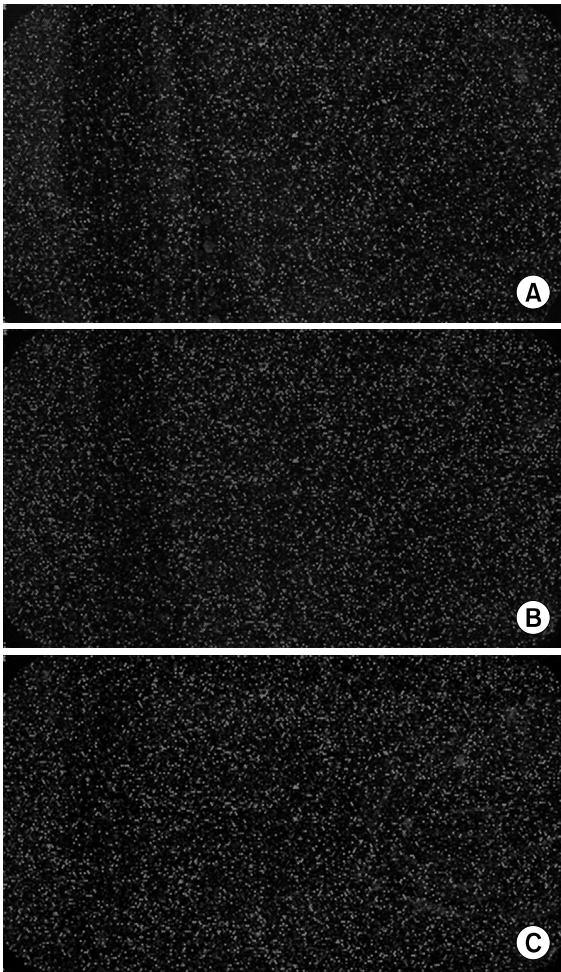
### 4) Microarray 데이터 분석

ICR 마우스의 전뇌를 이용하여 반하의 사회·심리적 스트레스에 대한 효능 평가<sup>20)</sup>를 수행한 이전 연구자로부터 제공받은 Microarray 원본 이미지파일에서 IMAGEGENE 4.0 (Bio-discovery, Marina del Rey, CA)을 사용하여 1차 데이터를 얻은 후 lowess method (Zahurak M, 2007)를 사용하여 표준화하였다. 모든 칩상의 spot에서, 각 채널의 형광 강도가 배경의 형광 강도보다 1.4배 더 큰 경우에 한해 제대로 측정된 것으로 판단하여 선별하였고, 시료에서 제대로 측정되지 않은 것은 제외시켰다. 발현 비율은 CLUSTER를 이용하여 순차적 클러스터링한 후 TREEVIEW (M.B. Eisen, <http://rabam.lbl.gov>)<sup>25)</sup>를 이용하여 시각화하였다. 유전자 기능분석은 FatiGo algorithms ([Http://babelomics.bioinfo.cipf.es](http://babelomics.bioinfo.cipf.es))를 이용하여 수행하였다. 클래스간 비교분석을 통해 얻어진 결과는 False Discovery Rate (FDR) 값이 0.05 이하일 때 의미있는 것으로 판단하였다. 단백질 결합은 BOND 데이터베이스(<http://bond.unleashedinformatics.com>)에서 얻어진 단백질 데이터베이스로 cytoscape program을 이용하여 분석하였다.

## III. 실험 결과

### 1. Microarray 이미지 및 유전자 발현 프로파일

Microarray 분석을 통한 이미지는 Fig. 2과 같으며, 이를 바탕으로 발현 변화를 보이는 유전자를 선택하여 클러스터링 하였다(Fig. 3). 대부분의 유전자들은 스트레스군과 실험군에서도 유사한 발현 패턴을 보였으나 일부의 유전자는 서로 다른 발현 패턴을 나타냈다. 이러한 유전자 발현 패턴을 크게 2가지의 군으로 분류 하였다(Fig. 3). 즉, (A) 스트레스 대조군에서 발현이 증가하였으나 실험군에서 변하지 않은 유전자, (B) 대조군에서 발현이 감소하였으나 실험군에서는 변하지 않은 유전자로 분류하였다. 전체 유전자 발현 프로파일에서 각 패턴의 위치는 Fig. 3에 표시되어 있다.



**Fig. 2.** Raw image of microarray. A total sequence set of ~45,000 oligo-nucleotides were printed onto glass microscope slides. The probe preparation and hybridization were performed using 3DNA array detection system with 20  $\mu$ g of total RNA from physical foot shock (A) and psychosocial (B as control, C as sample) stress. Normal brain tissue was used as reference RNA for all samples.

Fig. 4은 스트레스 대조군에서 발현이 일괄적으로 증가 혹은 감소된 유전자들이 실험군에서는 어떠한 양상을 보였는지를 나타낸다. 신체적 스트레스와 심리적 스트레스에 의한 유전자 발현이 각기 다른 양상을 보였는데(Fig. 4A) 이는 각각의 스트레스에 따라 변화하는 유전자가 다름을 의미한다. 따라서 본 연구에서는 두 스트레스 대조군에서 동일한 발현 양상을 보인 유전자들을 구분하여 분석하여 보았다(Fig. 4B, C). 그 결과 40개의 유전자들이 스트레스 대조군에서 모두 발현이 증가하였으며, 이 중 60%에 해당하는 24개의 유전자가 반하 추출물 투여로 정상 수준을 유지하였으며, 66개의 유전자가 스트레스 대조군에서 모두 발현이 감

소하였는데, 이 중 65%에 해당하는 43개의 유전자가 역시 반하 추출물 투여에 의해 정상 수준을 유지하였다.

## 2. 발현의 증가가 억제된 유전자들의 생물학적 과정, 분자기능 및 세포 구성요소 구분에 따른 분포

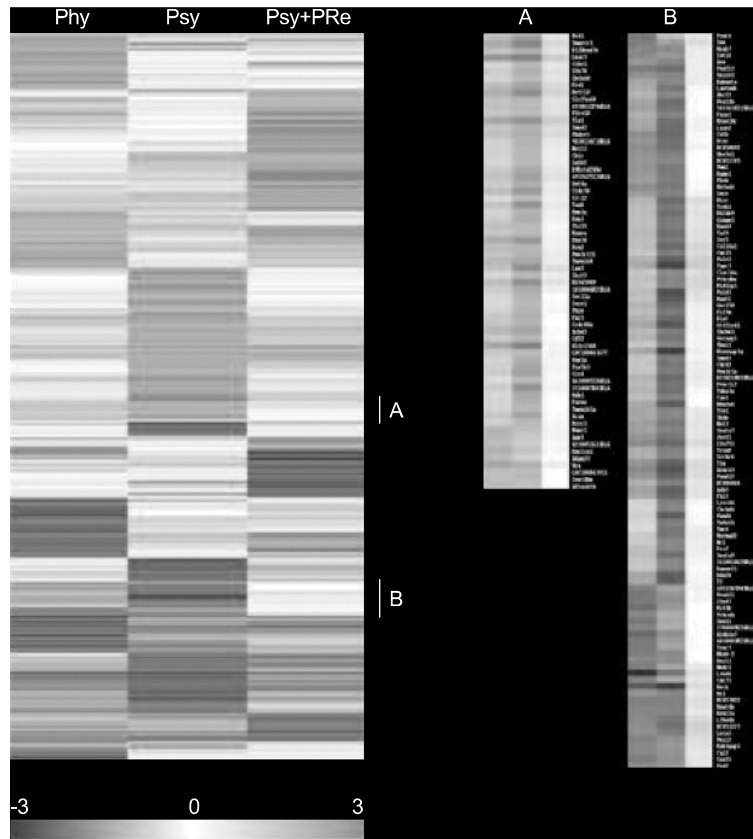
심리적 스트레스군에서는 발현이 증가하였으나 심리적 스트레스와 함께 반하 추출물을 투여한 실험군에서는 발현이 정상 상태를 유지한 경우에서의 유전자 기능분포를 생물학적 과정, 분자기능 및 세포 구성요소로 나누어 분석하였다. 생물학적 과정항목에서는 cellular metabolic process, primary metabolic process 및 macromolecule metabolic process 등과 관련한 유전자가 많았다(Table 1A). 분자기능항목에서는 protein binding, ion binding 및 nucleic acid binding 등과 관련한 유전자가 많았다(Table 1B). 세포 구성요소 관련 분석에서는 cell part, membrane-bound organelle 및 organelle part에 관련한 유전자가 많았다(Table 1C).

## 3. 발현의 감소가 억제된 유전자들의 pathway 분석

심리적 스트레스 대조군에서 발현이 감소하였으나 반하 추출물 투여에 의해 정상수준으로 발현이 복귀된 유전자들이 관련되어 있는 pathway를 분석한 결과, cytokine-cytokine receptor interaction 및 neuroactive ligand-receptor interaction 항목 등이 있음을 확인하였다(Table 2). Fig. 5는 pathway의 자세한 경로와 관련 유전자를 나타낸 모식도이며, 붉은 색으로 표시된 부분에 해당하는 유전자에 반하 추출물이 작용했음을 나타낸다.

## 4. 발현의 감소가 억제된 유전자들의 생물학적 과정, 분자기능 항목에 따른 분포

심리적 스트레스군에서는 발현이 감소하였으나 심리적 스트레스와 함께 반하 추출물을 투여한 실험군에서는 발현이 정상 상태를 유지한 경우에서의 유전자 기능분포를 생물학적 과정, 분자기능으로 나누어 분석하였다. 생물학적 과정항목에서는 cellular metabolic process, primary metabolic process 및 macromolecule metabolic process 등과 관련한 유전자가 많았다 (Table 3A). 분자기능항목에서는 coupled ATPase activity, MAP kinase activity 및 MAP



**Fig. 3.** Expressional profile of microarray. The normalized ratios were hierarchically clustered by using CLUSTER and then visualized using TREEVIEW program. Red, green, and black color represents up-regulation, down-regulation, and no change of gene expression, respectively. The color intensity correlates with expression level of the gene. Genes increased in control and not-changed in experiment were clustered in (A). Genes decreased in control and not-changed in experiment were clustered in (B).

kinase phosphatase activity 등과 관련한 유전자가 많았다 (Table 3B).

### 5. 발현의 감소가 억제된 유전자들의 pathway 분석

심리적 스트레스 대조군에서 발현이 감소하였으나 반하 추출물 투여에 의해 정상수준으로 발현이 복구된 유전자들이 관련되어 있는 pathway를 분석한 결과, Ubiquitin mediated proteolysis (mmu04120) 및 MAP kinase signaling pathway 등이 있음을 확인하였다(Table 4). Fig. 6은 pathway의 자세한 경로와 관련 유전자를 나타낸 모식도이다.

### 6. 유전자 발현 변화에 따른 단백질 상호 작용 분석

심리적 스트레스에 의해 변화하는 유전자들의 상호작용

을 분석하기 위해 단백질 상호 작용 네트워크로 분석한 결과 약 1,336종의 유전자들의 발현이 증가되었고, 1,053종의 유전자들의 발현이 감소되었다(Table 5). Fig. 7에서 노란색을 띠는 부분은 심리적 스트레스에 의해 변화되는 유전자 중 상호작용에서 중심 역할을 하는 유전자에 해당된다.

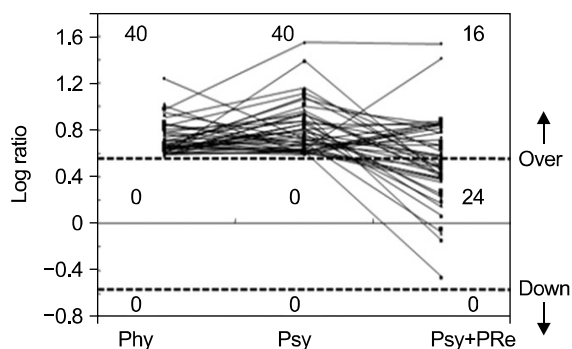
## IV. 고찰

스트레스란 외부의 위협에 대한 인체의 반응, 자아위협에 대한 반응, 환경적 요구와 유기체의 반응능력간의 불균형, 그리고 자원의 위협이나 손실 등을 야기시킬 수 있는 위험 인자로 설명되어지며, 외부로부터의 위협이 반응능력의 수준을 넘어서거나 혹은 일정하게 유지하고 있는 각 개인들의 자원에 위협을 가하게 됨으로써 발생하게 되는 심리적이면서 또한 상황적 맥락에 의해 영향을 받는 인간의 갈등상

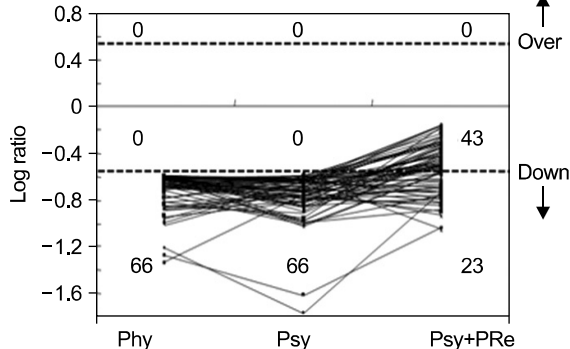
A

	Psychological stress		
	Over	Down	No change
Physical			
Over	40	1	312
Down	3	66	304
No change	405	307	

B



C



**Fig. 4.** The relationship between physical and psychological stress on gene expression. (A) The number of genes altered by physical or psychological stress are depicted. The threshold for up- and down-regulation was set at 1.5 fold (0.5849 of the logarithm of base 2). (B) The effect of PRe was determined based on the expression level of genes that were up-regulated in response to both physical and psychological stress. The figures represent the number of up-regulated, normally-expressed and down-regulated genes according to each treatment condition. The dotted line indicates the baseline of up- or down-regulation. (C) The effect of PRe was determined based on the expression level of genes that were down-regulated in response to both physical and psychological stress. Phy; physical stress, Psy; psychological stress.

**Table 1A.** Functional Annotation of Genes Related in Biological Process. The Horizontal Bar Represents the Percentage of Specific Functional Category in Biological Process, The List was Arrayed in Decreasing Percentage of Functional Category

GO biological process at level 3				
Term	Genes	N of genes	Percentage	
Cellular metabolic process (GO: 0044237)	Rtx4.Phks2.Map3k3.Mlt3.Rars.lkzf2...	150	51.37	
Primary metabolic process (GO: 0044238)	Rtx4.Phks2.Map3k3.Mlt3.Rars.lkzf2...	145	49.66	
Macromolecule metabolic process (GO: 0043170)	Trp53bp1.Nsbp1.Carrk2b.Fanca.Tbcel.Z...	128	43.84	
Cell communication (GO: 0007154)	Ctfr468.Dffa.Cxci10.Rasgef1b.Ctfr13...	99	33.9	
Regulation of biological process (GO: 0050789)	Myh10.Csf3.Epas1.4932441K18Rik.Zfp5...	98	33.56	
Cellular component organization and biogenesis (GO: 0016043)	Ppp4c.Sirt2.Edar.Rffi.Bci3.Myh14.Sy...	63	21.58	
Multicellular organismal development (GO: 0007275)	Hoxb8.Pax4.Mapk1.Ccr4.Bart12.Satb2...	62	21.23	
Anatomical structure development (GO: 0048856)	Gpr88.Vegfb.Rein.Fgtr4.Sirt2.Mxt12.E...	57	19.25	
Cellular developmental process (GO: 0048869)	Vegfb.Rein.Fgtr4.Sirt2.Aff4.FasSd1...	52	17.81	
Establishment of localization (GO: 0051234)	Atp5g3.Scn7a.Rab5b.Sic4a8.Grm2.9830...	52	17.81	
Neurological process (GO: 0050877)	Otfr539.Bbs4.Grm2.Rpgr.Cin5.Otfr938...	41	14.04	
Cell cycle (GO: 0007049)	Camk2b.Fancs.Mtbp1.Rif1.Cvcl1...	24	8.22	
Response to stress (GO: 0006950)	220018M11Rik.Grm7.Myh10.Epas1.Mlh3...	23	7.88	
Biosynthetic process (GO: 0009058)	Bci3.Aldh112.Gtpbp1.Pbx1.Mc1r.Cyid...	20	6.85	
Cell adhesion (GO: 0007155)	Robo2.Gp1ba.Vci.Cxadr.Spon1.Dic1.Al...	19	6.51	
Protein localization (GO: 0008104)	Rab5b.S830134C10Rik.Srix12.Edzr.Rffl...	15	5.14	
Catabolic process (GO: 0009056)	Aldh112.Mdh1.Mrmp1a.6530401N04Rik.Mc...	15	5.14	
Cell proliferation (GO: 0008283)	Tlx1.Vegfb.Tbx18.Rin1.Ctf2.Pbx1.Fan...	14	4.79	

**Table 1B.** Functional Annotation of Genes Related in Molecular Function. The Horizontal Bar Represents the Percentage of Specific Functional Category in Molecular Function, The List was Arrayed in Decreasing Percentage of Functional Category

GO molecular function at level 3			
Term	Genes	N□ of genes	Percentage
Protein binding (GO: 0005515)	Smc2.Fhi5.Piaur.Ccr4.Cxd10.Tlx1.Sp...	141	45.05
Ion binding (GO: 0043167)	Eoe2.Phi20.Rars.Arhref12.Mmp1a.Rrm2...	68	21.73
Nucleic acid binding (GO: 003676)	Smg8.Ikzf2.Rccr3.Zfp111.Rfx4.Msi2.N...	67	21.41
Receptor activity (GO: 0004872)	Synj2bp.Trim42.Olfr958.Olfr1217.Olf...	64	20.45
Nucleotide binding (GO: 0000166)	Pip5k3.Chd1.Rac2.Sfrs9.Hac3.Rick1.D...	50	15.97
Hydrolase activity (GO: 0016787)	Myh10.Pde1c.Gnb5.Smpd3.Sirt2.Ppp4c...	45	14.38
Transferase activity (GO: 0016740)	2610029101RikMap3k3.Mapk1.Ugt1a6s...	39	12.46
Oxidoreductase activity (GO: 0016491)	Rrm2.Hgd.F8.Hso3.Rpgr.Picd3.Msrb3.M...	19	6.07
Lipid binding (GO: 0008289)	Hs1bp3.Acbd3.Srtx12.Otos.Cpm.Atp5g3...	11	3.51
Ligase activity (GO: 0016874)	Ube2q2.Gluid1.Mccc1.Rflf.Ube2h.Ccro...	10	3.19
GTPase regulator activity (GO: 0030695)	Arhref12.Rpgr.Rasgef1b.Gnb5.Dlc1.Ra...	8	2.56
Ion transporter activity (GO: 0015075)	Pidrej.Trfm45.Hyon1.Rpgr.Grm7.Atp5g...	8	2.26
Transcriptional activator activity (GO: 0016563)	Trp53bp.Elf2.Epas1.Mk12.Nsbp1.Fhi5...	7	2.24
Chromatin binding (GO: 0003682)	Mlh3.Smarca4.Nsbp1.Smarcc1.Chd1.Nsd...	6	1.92
Carbohydrate binding (GO: 0030246)	Vegfb.Gaint14.Ncl9.Kira9.Dgo2.Masp...	6	1.92
Channel or pore class transporter activity (GO: 0015267)	Hyon1.Nup153.Grm7.Konmb2.Pidrej.Nup...	6	1.92
Helicase activity (GO: 0004386)	Smarca4.Eroo6l.Wrn.Chd1.Dhx38	5	1.60
Small protein conjugating enzyme activity (GO: 0008639)	Ube2q2.Ube2h.Heow1.Ube2r2.Cblc	5	1.60

**Table 1C.** Functional Annotation of Genes Related in Cellular Component. The Horizontal Bar Represents the Percentage of Specific Functional Category in Cellular Component, The List was Arrayed in Decreasing Percentage of Functional Category

GO cellular component at level 3			
Term	Genes	N□ of genes	Percentage
Cell part (GO: 0044464)	Soml2.Adam1a.1810008K21Rik.Zfp715.S...	289	95.7
Membrane-bound organelle (GO: 0043227)	Acbd3.Ugt8a.Chd1.Dfs.Mgmt.Sic25a40...	128	42.38
Organelle part (GO: 044422)	Pbx1.Lhx8.Trp53bp1.Atp5g3.Krtap8-1...	58	19.21
Extracellular region part (GO: 00044421)	Rgr.Plod3.Tmem8.Trem1.Crif1.Apos5.E...	46	15.23
Non-membrane-bound organelle (GO: 0043228)	Chd1.Tekt4.Hist1h1d.Gan.Bbs4.Add2.B...	41	13.58
Vesicle (GO: 0031982)	Sv2s.Rab5b.Snap23.Tmed2.Eoe2.Rflf.P...	7	2.32
Receptor complex (GO: 0043235)	Il6ra.Sdobp.Cd79a	3	0.99
Synapse part (GO: 0044456)	Gabbr1.Grm2.Grm7	3	0.99
Neuromuscular junction (GO: 0031594)	Myh10	1	0.33
Unlocalized protein complex (GO: 0005941)	Phka2	1	0.33
Immunoglobulin complex (GO: 00019814)	Cd79a	1	0.33
Virion part (GO: 00044423)	Nlrp9c	1	0.33

태를 표현해주는 개념으로 정의된다<sup>26</sup>). 생물학적 스트레스란 자극이나 변화에 대한 인체의 부적응 상태로 교감신경이 과활성되어 급성 또는 만성적으로 신체적, 심리적 또는 행동적 문제를 야기하게 되는 것을 말한다<sup>1</sup>).

스트레스가 누적되면 심리적으로 예민해져 걱정과 불안, 초조, 긴장 등으로 인한 신경쇠약과 우울, 의욕 상실 등의 증상이 나타나고 심한 경우에는 자살에 이르기도 하며, 만성적 스트레스는 생리적으로 자율신경계와 내분비계에 영향을 미쳐 두통, 과민성대장증후군, 위궤양, 당뇨병, 고혈압,

심장병, 간경화증, 암 등 많은 질병의 발생과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>26-28</sup>). 행동적인 측면에서도 스트레스를 과도하게 느끼게 되면 대인관계에서 말씨가 거칠어지고 공격적인 행동을 취하게 되는 등 여러 병적인 현상들이 나타나게 된다<sup>29</sup>).

각종 스트레스는 동물의 신경과 호르몬 분비를 자극하여 심장을 비롯한 각종 장기에 형태학적 및 기능적 변화를 일으킨다는 것은 잘 알려진 사실이며<sup>30-36</sup>), 신체적 활동을 제한하는 부동스트레스도 심장근육의 부분적인 출혈과, 미세

**Table 2.** Pathway Analysis of Restored Genes from up-regulation by Psychological Stress. Pathway Analysis between Class A Genes in Animals Treated with PRe. Involvement of These Genes on Different Pathway was Analyzed (A). The Horizontal Bar Represents the Percentage of Genes on each Pathway. The List was Arrayed in Decreasing Percentage of Pathway Involvement. Sample Pathways (B and C) were Showed in Detail in which the Class A Genes were Colored in Red. The Represented Pathways were Obtained from KEGG

KEGG			
Term	Genes	N of genes	Percentage
Cytokine-cytokine receptor interaction (mmu04060)	Caf3.Amh.Cxci10	3	10.71
Neuroactive ligand-receptor interaction (mmu04080)	Oprm1.Mafe.P2ry10	3	10.71
Mmu04120	Ube2r2.Ube2h	2	7.14
Olfactory transduction (mmu04740)	Pde1c.Camk2b	2	7.14
Mmu01030	Rpn1.Mgat5	2	7.14
Mmu00980	Cyp3a44.Ugtfa6a	2	7.14
Natural killer cell mediated cytotoxicity (mmu045650)	Klca9.Cd244	2	7.14
Melanogenesis (mmu04916)	Camk2b.Mc1r	2	7.14
N-Glycan biosynthesis (mmu00510)	Mgat5.Rpn1	2	7.14
Calcium signaling pathway (mmu04020)	Pde1c.Camk2b	2	7.14
Wnt signaling pathway (mmu04310)	Cond2.Camk2b	2	7.14
Jak-STAT signaling pathway (mmu04630)	Cond2.Csf3	2	7.14
Oxidative phosphorylation (mmu00190)	Atp5g3	1	3.57
Ribosome (mmu03010)	BC003885	1	3.57
MTOR signaling pathway (mmu04150)	4921505C17Rik	1	3.57
Purine metabolism (mmu00230)	Pde1c	1	3.57
Focal adhesion (mmu04510)	Cond2	1	3.57

괴사를 일으키는 등 실험동물에게 치명적인 영향을 미칠 뿐만 아니라<sup>37)</sup>, 심방근육세포, 사립체능선의 파괴, 근육원섬유의 용해, 분비과립의 분포 변화와 심방근육세포의 세포자멸사를 일으키는것으로 밝혀지는 등<sup>38)</sup>, 다양한 스트레스가 신체의 생리적 기능에 장애를 초래한다는 연구 결과들이 다수 보고되어 있다. 또, 실험적으로 저산소증을 유발할 경우 심장근육세포의 근육세포질세망과 근육형질막이 부분적으로 파괴되며, 세포막의 투과성을 세포뼈대단백질인 vinculin과  $\alpha$ -actinin이 감소하는 것을 조직화학적 방법으로 밝힌 보고<sup>39)</sup>와 같이 스트레스에 의한 세포의 미세구조 변화에 대한 연구와 더불어 세포막투과성의 변화에 관한 연구도 진행되고 있다.

하지만 보건의료 분야에서의 대다수 연구들은 정신적 장애 보다 신체적 장애에 비중을 두어 상대적으로 많은 진전을 보여 왔기 때문에 정신건강이나 심리학적 증상에 대한 현황 조사가 미흡한 상태이며<sup>26)</sup> 한의계에서도 임상에서 다양한 환자를 접할 수 있기는 하지만 상태를 개선시키는 것으로 알려진 처방들의 자세한 기전은 아직 연구되지 못하고 있다.

서양의학 및 심리학과 한의학은 배경철학이나 기본이론, 질병관, 치료법 등 많은 부분에서 큰 차이가 있으며, 스트레

스란 단어는 서양에서 사용되어진 용어이므로 오랜 기간 동안 임상의학으로 발전해온 한의학에서 스트레스와 정확히 대비되는 단어는 찾기 어렵다. 다만 자연계의 변화가 직접적 혹은 간접적으로 인체의 생리와 병리에 상응하는 변화를 일으킨다는 의미의 천인상응론(天人相應論), 생명체의 각 부분의 활동은 언제나 개체 전체로서의 관계와 상관된다고 전제하는 정체개념(整體概念) 등이 스트레스를 한의학적으로 이해하는 전제에 해당된다고 볼 수 있다<sup>40,41)</sup>.

한의학에서는 정신적 스트레스는 칠정소상(七情所傷)에 의한 기울과 기체반응(氣滯反應)과 연관하여, 생리적 스트레스는 육음사로 인한 외감이나 외상에 의한 인체반응과 연관하여 인식하였다<sup>42)</sup>.

『내경(內經)』을 비롯한 역대 문헌에서 정신적 스트레스와 관련한 부분을 찾아보면 칠정상이 오장의 허실 혈허 정손 기허 기의 순행장애 담연의 조성 등의 병적인 요인을 만들며 육체적인 과로나 음식부절, 과음과식 등도 또한 결과적으로 정신작용에까지 영향을 미친다고 보았다. 또한 감정의 변화에 대한 생체의 반응을 기의 변화로 설명할 수 있는데, 『소문·기통론(素問·舉痛論)』<sup>43)</sup>에 노하면 기상하고, 희하면 기완하며, 비하면 기소하고, 공하면 기하하고, 경하면 기란하며 사하면 기결한다고 하여, 칠정의 편승이 기



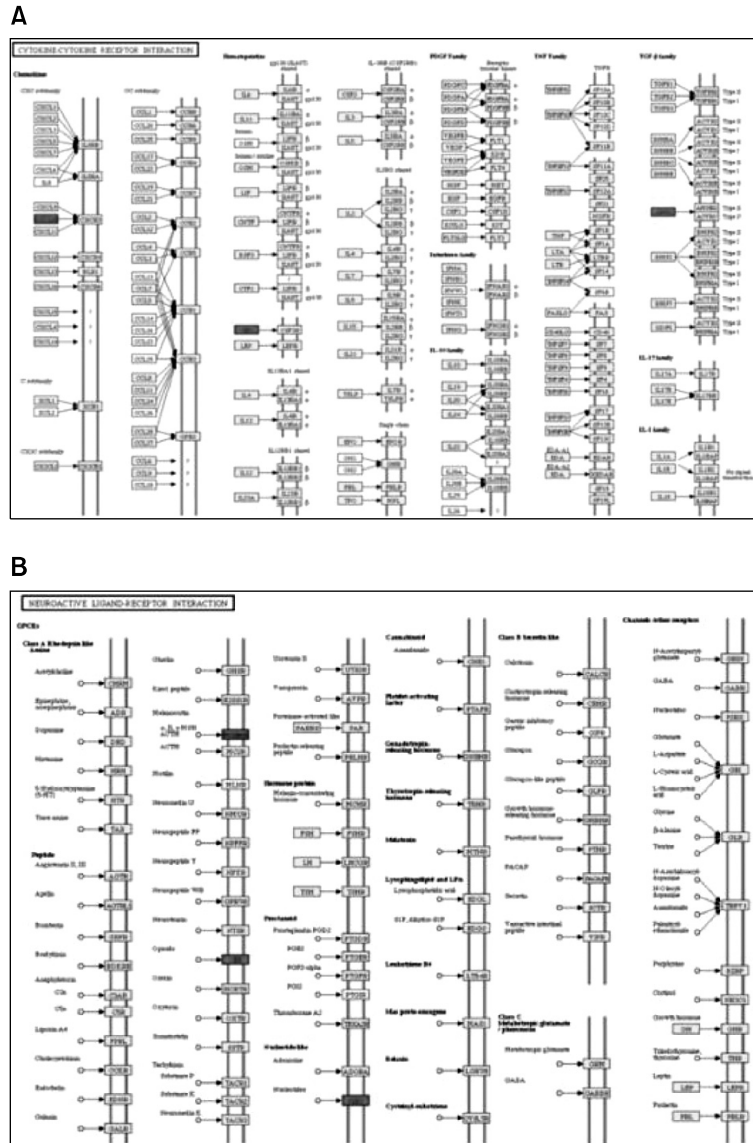


Fig. 5. (A) Regulation of Cytokine-cytokine receptor interaction. (B) Regulation of Neuroactive ligand-receptor interaction.

승강에 영향을 미쳐서 곧 질병을 일으킬 수 있음을 말하였다. 이를 역대 문헌에서는 칠기(또는 구기) 기을 중기 기통 기억 등으로 서술하였고<sup>8,9,44</sup>, 한의학에서는 이들에 의한 신체반응을 기의 변화로 인식하고 있다.

또, 생리적 스트레스와 유관한 부분을 찾아보면 『영추·구문편(靈樞·口問篇)』<sup>43</sup>에서 “부백병지시생야, 개생어풍우한랭, 음양희노, 음식기거, 대경졸공칙 기혈분리(夫百病之始生也, 皆生於風雨寒冷, 陰陽喜怒, 飲食起居, 大驚卒恐則氣血分離)”라 하여 스트레스 인자로 기후, 정동, 음식, 기거

등을 제시하였고, 송대의 진(陳)은 『삼인방(三因方)』<sup>45</sup>에서 질병발생의 인자로서 육음사기의 침습을 외인과 음식노권, 질부금도(跌仆金刀) 및 충수(蟲獸)에 상한 것 등을 불내외인 등으로 인식하고 있음을 알 수 있다.

따라서 한의학에서는 감정이나 외기의 변화가 하나의 자극인으로 작용하는 것을 스트레스라 인식하였고, 칠정상에 의해 발생하는 기의 변조를 사회·심리적 스트레스라고 인식하였다. 또, 이러한 자극요인들이 신체에 정기와 사기의 상호관계에 영향을 미치게 되고 그 결과 병적 요인이 발생

**Table 3A.** Functional Annotation of Genes Related in Biological Process. The Horizontal Bar Represents the Percentage of Specific Functional Category in Biological Process, The List was Arrayed in Decreasing Percentage of Functional Category

GO biological process at level 3				
Term	Genes	N□ of genes	Percentage	
Cellular metabolic process (GO: 0044237)	Pmm1.Rsh12s.Atp5f1.Posk2.OTTMUSG000...	157	64.08	
Primary metabolic process (GO: 0044238)	Pmm1.Rsh12s.Atp5f1.Posk2.OTTMUSG000...	156	63.67	
Macromolecule metabolic process (GO: 0043170)	Adam17.Ppib.Uch14.Dist.Zip319.TafSb....	134	54.69	
Regulation of biological process (GO: 0050789)	Ppap2s.Zip189.Lsm4.Taf9.Aes.Jazf1.Z...	90	36.73	
Establishment of localization (GO: 0051234)	Abd2.Chm.Sic39a8.Konc3.Kif5a.Myo5s...	58	23.67	
Cell communication (GO: 0007154)	Trp83.Gpr158.Rab5a.Rasgef1b.V1rk1.A....	57	23.27	
Cellular component organization and biogenesis (GO: 0016043)	Pop4.Smyd3.Scfd2.Chd3.Tbpl1.Sertad1...	57	23.27	
Multicellular organismal development (GO: 007275)	Lhx2.Fos.Rapgef1.Smpd3.Reck.Neb.Pin...	40	16.33	
Anatomical structure development (GO: 0048856)	Tmie.Hoxb5.Tbpl1.Sertad1.Rptgas3.Cb...	39	15.92	
Biosynthetic process (GO: 0009058)	Lss.Fdft1.Tbpl1.Pemt.Rpl4.Rps28.Eif...	30	12.24	
Cellular developmental process (GO: 0048869)	Nc13.Snrpd2.Nudt2.Hoxb5.Cul5.Lpin1...	27	11.02	
Protein localization (GO: 0008104)	Ints7.Pex7.Rab34.Scfd2.Stx1a.Ipo11...	14	5.71	
Cell cycle (GO: 0007049)	Mdm2.Fos.Smpd3.Reck.Cks2.Rbm7.Spin2...	14	5.71	
Neurological process (GO: 0050877)	Kif5a.Myo5a.Olfr1276.Olfr890.Olfr70...	14	5.71	
Regulation of biological quality (GO:0065008)	Slo40a.Cckdr.Pin.Pkhd1.Ugt8s.Myo5a...	11	4.49	
Catabolic process (GO: 0009056)	Uch14.Dlst.Mdm2.Smg5.Smpd3.Neb.Adam...	10	4.08	
Response to stress (GO: 0006950)	Hspa12a.Dusp10.A770011L01Rik.Nme5.P...	10	4.08	
Cell proliferation (GO: 0008283)	Vip.Cul5.Sertad1.Pthr1.Fanci.Mdm2.C...	10	4.08	

**Table 3B.** Functional Annotation of Genes Related in Molecular Function. The Horizontal Bar Represents the Percentage of Specific Functional Category in Molecular Function, The List was Arrayed in Decreasing Percentage of Functional Category

GO molecular function at level 9				
Term	Genes	N□ of genes	Percentage	
ATPase activity, coupled (GO: 0042623)	Atp8v1e1.Atp511.Abcf2.Rshi2sCdh3.D...	7	43.75	
MAP kinase activity (GO: 0004707)	Mspk6.Mapk9	2	12.5	
MAP kinase phosphatase activity (GO: 0017017)	Dusp10	1	6.25	
Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase activity (GO: 0004149)	Dist	1	6.25	
Protein phosphatase type 2C activity (GO: 0015071)	Dusp10	1	6.25	
Cholecystokinin receptor activity (GO: 0004951)	Cokbr	1	6.25	
Protein phosphatase type 2A activity (GO: 0000158)	Dusp10	1	6.25	
Bis (5'-nucleosyl)-tetraphosphatase (asymmetrical) activity (GO: 0004081)	Nudt2	1	6.25	
CTD phosphatase activity (GO: 0008420)	Dusp10	1	6.25	
Ribonuclease P activity (GO: 0004526)	Pop4	1	6.25	
Neuropeptide Y receptor activity (GO: 0004983)	Cokbr	1	6.25	
Protein phosphatase type 1 activity (GO: 0000163)	Dusp10	1	6.25	
Histone-lysine N-methyltransferase activity (GO: 0018024)	Smyd3	1	6.25	
Rab escort protein activity (GO: 00005084)	Chm	1	6.25	
Phosphoinositide phospholipase C activity (GO: 0004435)	Cokbr	1	6.25	
Bis (5'-nucleosyl)-tetraphosphatase (symmetrical) activity (GO: 0008803)	Nudt2	1	6.25	

하여 제반질환이 발생한다고 보았다<sup>46)</sup>.

이처럼 외부로부터의 반복적인 자극으로 인해 생명 조절계에 이상이든지, 기의 변화에 의한 것이든지 결과적으로 스트레스로 인한 질병 발생 측면에서는 서양의학과 한의학 모두 유사한 기록을 보이고 있다. 또한 스트레스 자극과 반응에 관한 보고들에 관한 연구들도 확인할 수 있는데, 자극

으로서는 내인, 외인, 불내외인을 말하였고, 스트레스에 대한 인체의 반응은 정기와 사기의 상호작용으로 설명하고 있다<sup>45,47,48)</sup>.

한의학계에서의 스트레스 관리법은 많은데, 대체적 내용을 정리하면 자연에의순응, 정신 수양, 정서의 조절, 기공요법, 체질에 맞는 생활, 음식과 성생활의조절, 한방정신요법,

**Table 4.** Pathway Analysis of Restored Genes from Down-regulation by Psychological Stress

KEGG				
Term	Genes	N of genes	Percentage	
Mmu04120	Mdm2.Herc3.Cu15.Ube3b	4	13.33	
MAPK signaling pathway (mmu04010)	Mapk9.Fgf11.Dusp10.Mras	4	13.33	
Ribosome (mmu03010)	Rpl7a.Rps28.Rp14	3	10.00	
Neuroactive ligand-receptor interaction (mmu04080)	Ltb4r2.Pthr1.Cokbr	3	10.00	
Purine metabolism (mmu00230)	Polo3.Nme5	2	6.67	
Focal adhesion (mmu04510)	Rapgef1.Mapk9	2	6.67	
Pyrimidine metabolism (mmu00240)	Nme5.Pcid3	2	6.67	
Glycerolipid metabolism (mmu00561)	Ach5.Ppap2a	2	6.67	
Glycerophospholipid metabolism (mmu00564)	Pemt.Ppap2a	2	6.67	
Melanoma (mmu05218)	Fgf11.Mdm2	2	6.67	
Regulation of actin cytoskeleton (mmu04810)	Fgf11.Mras	2	6.67	
Insulin signaling pathway (mmu04910)	Rapgef1.Mapk8	2	6.67	
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (mmu05030)	Rab5a.Sw4	2	6.67	
Calcium signaling pathway (mmu04020)	Ltb4r2.Cdkbr	2	6.67	
Terpenoid biosynthesis (mmu00900)	Fdft1	1	3.33	
Fc epsilon RI signaling pathway (mmu04664)	Mapk9	1	3.33	
Adipocytokine signaling pathway (mmu04920)	Mapk9	1	3.33	
Oxidative phosphorylation (mmu00190)	Atp5f1	1	3.33	
Biosynthesis of steroids (mmu00100)	Fdft1	1	3.33	

약물치료 등으로 귀결되며<sup>40)</sup>, 이러한 관리법들의 효용성에 관한 구체적인 연구는 많이 부족한 실정이다.

스트레스를 기의 변화로 인식하고 한의학적인 관점에서 항스트레스 효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 신체적 스트레스에 대해 복합 방제인 보혈안신탕<sup>10,11)</sup>, 자음견비탕<sup>12)</sup>을 투여하여 노나 혈중의 catecholamine 함량측정이나 분심기음<sup>13)</sup>, 집선대보탕<sup>14)</sup>을 투여하여 혈청 cortisol 함량을 지표로 한 것들에서 효과가 있다는 보고와 단일 약재인 산조인<sup>15)</sup>을 투여하여 혈청 중 corticosterone 함량이나 뇌 조직 내 noradrenaline 등의 함량을 측정 한 보고가 있으나, 사회·심리적 스트레스에 대한 보고는 힐초근<sup>16)</sup>, 호초<sup>17)</sup>, 원지<sup>18)</sup>, 석창포<sup>19)</sup>, 반하<sup>20)</sup> 등의 단일 약재와 반하후박탕<sup>21)</sup>의 복합 방제 투여에 따른 혈청 중 코티코스테론의 함량, 뇌조직내 노르아드레날린의 함량, 혈청 내 지질 과산화물 함량과 항불안 효과에 대한 연구 보고가 있다.

이전 연구자 김의 연구 결과<sup>20)</sup>, 반하 추출물 투여로 인해 뇌의 dorsal cortex 부분의 노르아드레날린 함량은 유의하게 증가하였고, elevated plus-maze에서 open arm에 머무는 시간이 실험군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하는 등 반하 추출물이 스트레스를 효과적으로 해소시킬 뿐만 아니라 스트레스로 인한 생체의 각종 질병발생 억제에도 작용할 수 있는 가능성을 보고하였으며, microarray를 이용하여 초

보적인 해석을 하였으므로, 본 연구에서는 microarray 결과를 입수 한 후 진보된 분석법을 이용하여 변화된 유전자들의 프로파일을 분석함으로써 미약하게나마 반하 추출물이 스트레스 해소에 관여한 근거를 찾고자 하였다.

연구에 사용된 재료인 반하(Pinelliae Rhizoma)는 천남성과(천남성과: Araceae)에 속한 다년생초본인 끼무릇(Pinellia ternata (Thunb.) Breitenbach)의 코르크층을 제거한 덩이줄기로, 성은 온하고 미는 신하며 비·위·폐로 귀경하고, 화담지구·조습강역·소비산결 등의 효능이 있어 담담천해·담음현훈·풍담현훈·담결두통·구토반위·홍완비민·매핵기증 등을 치료하며<sup>22)</sup>, 임상적으로는 거담의 목적으로 매핵기 및 두통, 현훈 등의 다양한 신경성 질환에 많이 응용되고 있다. 이 중 매핵기나 홍완비민 등의 증상이 스트레스로 인한 증상과 유사하여 항스트레스 효과에 관한 실험에 사용되고 있다.

반하에 관한 연구들로는 비민<sup>49)</sup>, 임신 중 입덧<sup>50)</sup>, 천식<sup>51)</sup> 등 에 관한 연구들이 있었을 뿐, 심리적 스트레스에 관한 실험연구는 아직 미흡하였다.

김의 연구 결과<sup>20)</sup> 중 반하 추출물 투여로 인해 사회·심리적 스트레스와 관련된 유전자들의 분포에 변화가 있지만 정상수준으로 회복시키는 수준은 아닌 것으로 판단하였으나 구체적인 유전자들의 경로 등에 관한 연구까지는 진행되

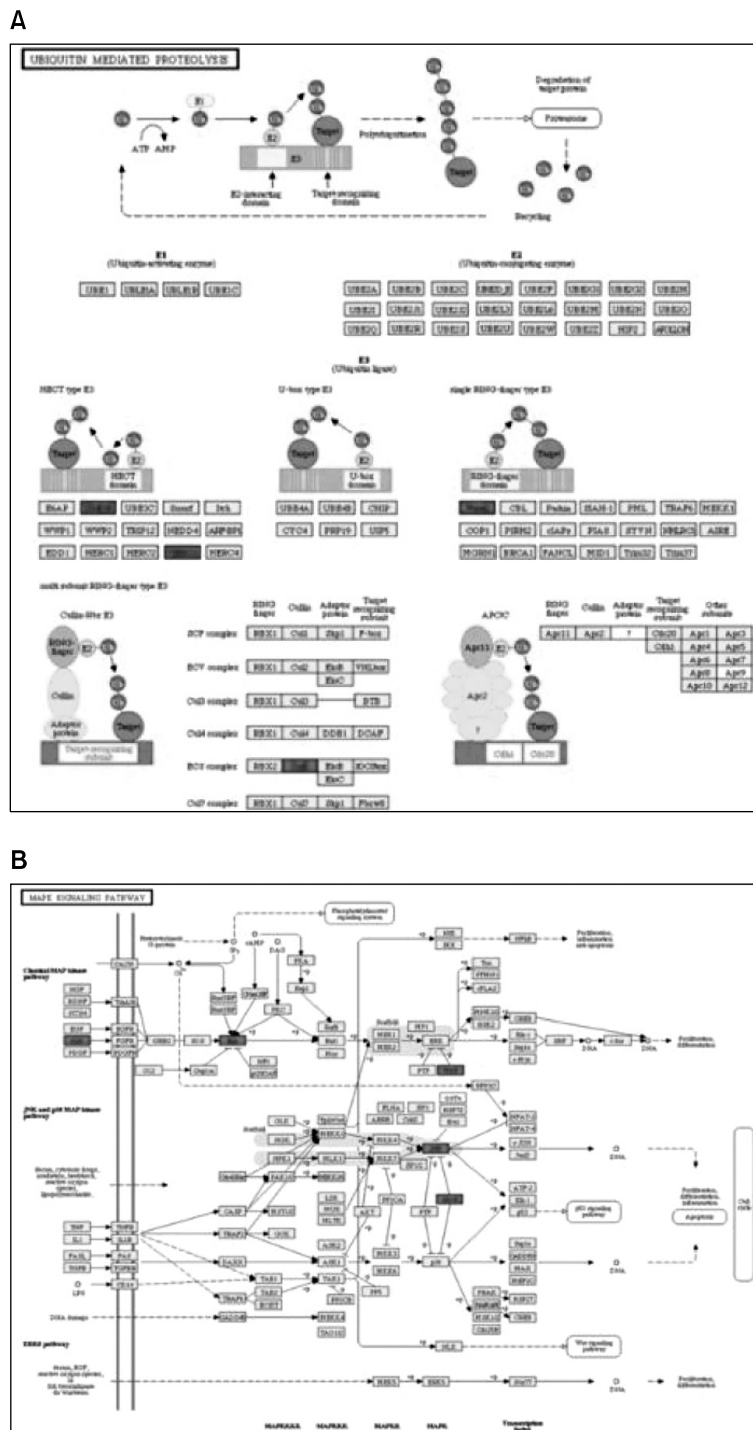
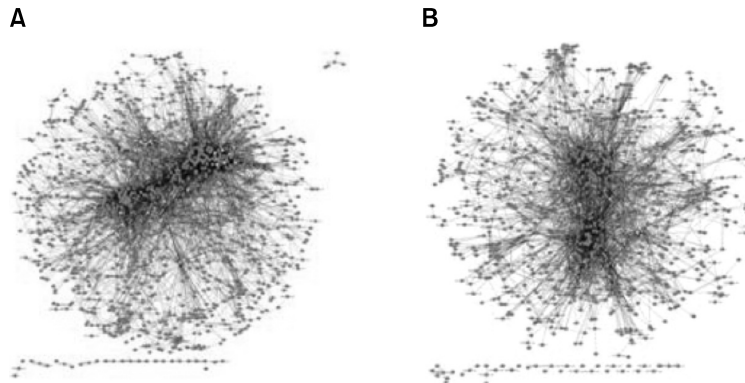


Fig. 6. Regulation of Ubiquitin mediated proteolysis. Pathway analysis between Class A genes in animals treated with PRE. Involvement of these genes on different pathway was analyzed (A). The horizontal bar represents the percentage of genes on each pathway. The list was arrayed in decreasing percentage of pathway involvement. (B) Regulation of MAP kinase signaling pathway.

**Table 5.** Top 10 Core Node Genes Altered by Psychological Stress. Genes were Ordered according to the Number of Interaction Edges. The Expression Level of each Gene Following Treatment with PRe is also Shown

Over by psychological stress				
Unigene	Symbol	Name	Edge number	Status after PRe
Mm.279361	VCL	Vinculin	87	Normal
Mm.196581	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	54	Normal
Mm.6536	FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	51	Normal
Mm.27592	NCOA6	Nuclear receptor coactivator 6	49	Increased
Mm.286593	SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	41	Normal
Mm.439744	RARA	Retinoic acid receptor, alpha	40	Normal
Mm.7906	PIN1	Protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1	32	Normal
Mm.245715	SNAP23	Synaptosomal-associated protein 23	30	Normal
Mm.2314	PRKCD	Protein kinase C, delta	27	Increased
Mm.85410	SMARCC1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1	21	Normal
Down by psychological stress				
Unigene	Symbol	Name	Edge number	Status after PRe
Mm.1022	CDC42	Cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)	60	Normal
Mm.21495	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	47	Decreased
Mm.246513	FOS	FBJ osteosarcoma oncogene	40	Normal
Mm.6225	STX1A	Syntaxin 1A (brain)	40	Normal
Mm.239865	HSPA4	Heat shock protein 4	28	Normal
Mm.22670	MDM2	Transformed mouse 3T3 cell double minute 2	28	Normal
Mm.6799	FHL2	Four and a half LIM domains 2	23	Normal
Mm.27591	PSMD6	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6	22	Normal
Mm.154378	NCL	Nucleolin	20	Normal
Mm.249645	JAK3	Janus kinase 3	20	Normal



**Fig. 7.** Protein interaction network of genes. The network of total protein interactions was measured using cytoscape program. The database was obtained in BOND database (<http://bond.unleashedinformatics.com>). A shows the first neighborhood nodes of genes that were up-regulated in response to psychological stress and B, down-regulated genes. Yellow nodes indicate core node genes that were altered by psychological stress.

지 않았으므로 본 연구에서는 유전자 프로파일 중심으로 관찰하였다.

변화가 확인된 유전자들을 선택하여 클러스터링 한 결과 (Fig. 3), 대부분의 유전자들은 스트레스군과 실험군에서도 유사한 발현 패턴을 보였는데, 이러한 결과는 스트레스에 의한 유전자의 변화는 크지 않다는 것을 보여주는 결과이다

로 이후에는 卍夏 추출물 투여에 의해 변화가 관찰된 일부 유전자들을 대상으로 발현 패턴을 크게 2가지의 군으로 분류 하였다. 하나는 스트레스 대조군에서 발현이 증가하였으나 실험군에서 변하지 않은 유전자, 또 다른 하나는 대조군에서 발현이 감소하였으나 실험군에서는 변하지 않은 유전자로 분류하여 전체 유전자 발현 프로파일에서 각 패턴의

위치는 Fig. 3에서 A 및 B로 표시하였다. 즉 스트레스로 인해 발현이 변화되었으나 반하 추출물을 투여하였을 경우에는 변화가 없었던 유전자들의 구획을 표시한 것이다.

본 연구의 주제는 심리적 스트레스로 제한하였으나 연구 방법에서 신체적 스트레스를 부하한 대조군을 관찰하는 것으로 심리적 스트레스를 유발하였으므로 스트레스 대조군에서 일괄적으로 변화가 관찰된 유전자를 분류하였으며 심리적 스트레스가 부하된 실험군에서 어느 정도 유전자 발현 변화를 억제할 것인지를 관찰하였는데(Fig. 4), 스트레스 대조군에서 발현이 증가된 40개의 유전자 중 60%에 해당하는 24개의 유전자가 반하 추출물 투여로 정상 수준을 유지하였으며, 스트레스 대조군에서 발현이 감소된 66개의 유전자 중 65%에 해당하는 43개의 유전자에서 반하 추출물 투여로 정상 수준을 유지하는 결과를 보였다(Fig. 4B, C). 이러한 결과는 스트레스의 종류가 신체적이건 심리적이건 동일한 유전자에 변화를 가져올 수 있으며 이러한 유전자의 변화 중 상당수에 대해 반하 추출물이 효과적으로 작용하였음을 보여주는 것으로 김의 연구 결과<sup>12)</sup>에서 제시하지 못한 구체적인 유전자의 회복 기능을 확인한 결과로 생각된다.

이후의 연구 결과들은 심리적 스트레스에 의해 발현이 변화되었으나 半夏 추출물 투여에 의해 정상 수준을 유지한 유전자들이 주로 관여하는 기능에 관한 관찰 결과이다 (Tables 1-4). 심리적 스트레스 대조군에 의해 발현이 증가되었으나 실험군에서 발현의 증가가 억제된 유전자들의 경우 생물학적 과정항목에서는 cellular metabolic process, primary metabolic process 및 macromolecule metabolic process 등과 관련한 유전자가, 분자기능항목에서는 protein binding, ion binding 및 nucleic acid binding 등과 관련한 유전자가, 세포 구성요소 관련 분석에서는 cell part, membrane-bound organelle 및 organelle part에 관련한 유전자가 많았는데, 이러한 유전자들의 작용 기전을 분석한 결과 cytokine-cytokine receptor interaction 및 neuroactive ligand-receptor interaction 항목 등이 있었다. 또한 심리적 스트레스 대조군에서는 발현이 감소하였으나 실험군에서 발현이 정상 상태를 유지한 경우에서의 유전자 기능분포는 생물학적 과정 항목에서는 cellular metabolic process, primary metabolic process 및 macromolecule metabolic process 등과 관련한 유전자가, 분자 기능항목에서는 coupled ATPase activity, MAP kinase

activity 및 MAP kinase phosphatase activity 등과 관련한 유전자가 많았다. 이러한 유전자들이 pathway를 분석한 결과, Ubiquitin mediated proteolysis (mmu04120) 및 MAP kinase signaling pathway 등이 있음이 확인되었다. 따라서 본 연구를 통해 심리적 스트레스에 의한 유전자의 변화 중 半夏 추출물이 어떠한 과정에 작용하는지와 구체적 작용 기전 및 위치를 확인할 수 있었다.

이상의 분석 결과만으로는 발현 변화가 억제된 유전자들의 상호 작용과 중요도에 관한 정보를 확인할 수 없으므로 이를 분석하기 위해 단백질 상호 작용 네트워크로 분석하였으며, 그 결과 약 1,336종의 유전자 발현의 증가와 1,053종의 유전자 발현의 감소를 확인하였으며(Fig. 7), 이를 바탕으로 핵심 역할을 하는 유전자 각 10종을 선별하여 보았다 (Table 5). 이 중 심리적 스트레스 대조군에서 증가하였다가 실험군에서 증가가 억제된 대표적 유전자인 vinculin은 포유류의 세포에서 세포막의 골격을 유지하는데 관여하며 역시 유사한 작용을 하는  $\alpha$ -catenin과 서열이 20~30% 정도가 일치하는 것으로 알려져 있다<sup>52)</sup>. 심리적 스트레스 대조군에서 감소하였다가 실험군에서 감소가 억제된 대표적 유전자인 Cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)은 세포 주기의 조절에 관여하는 유전자로 세포의 형태·이동·이물질의 흡수·세포 주기의 진행 등 다양한 세포 기능들을 조절하는 신호전달의 경로를 조절하는 단백질들을 암호화하는 역할을 한다<sup>53)</sup>.

위의 결과로는 반하 추출물 투여가 뇌조직에서의 유전자에 어떠한 영향을 미치는지 정확하게 확인할 수는 없지만 심리적 스트레스에 의해 세포의 골격 유지와 세포 주기의 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 유전자들에 변화가 관찰되며, 반하 추출물 투여가 이러한 변화를 억제함으로써 스트레스로 인한 여러 증상을 개선할 수 있는 것으로 추정된다.

## V. 결론

반하 추출물이 심리적 스트레스에 의한 유전자 변화를 관찰하기 위하여 심리적 스트레스를 부하하면서 반하 추출물을 100 mg/kg로 5일간 투여한 후 뇌조직을 적출한 후 microarray 분석법을 이용하여 관찰한 유전자 변화를 IMAGE 4.0, TREEVIEW, FatiGo algorithms, BOND 데이터베이스 및 cytoscape program 등을 이용하여 분석한

결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 신체적 스트레스군와 사회·심리적 스트레스군 모두에서 발현이 증가한 유전자 중의 60%와, 발현이 감소한 유전자 중 65%의 유전자가 반하 추출물 투여에 의해 정상 수준을 유지하였다.

2. 대조군에서는 발현이 증가하였으나 반하 추출물을 투여한 실험군에서 발현이 정상 상태를 유지한 경우, 생물학적 과정 항목에서는 cellular metabolic process 등이, 분자 기능 항목에서는 protein binding 등이, 세포 구성요소 항목에서는 cell part 등에 관련한 유전자가 많이 속해 있었으며, 이러한 유전자가 관여한 pathway에는 cytokine-cytokine receptor interaction 등이 있었다.

3. 대조군에서는 발현이 감소하였으나 반하 추출물을 투여한 실험군에서 발현이 정상 상태를 유지한 경우, 생물학적 과정항목에서는 cellular metabolic process 등이, 분자 기능항목에서는 coupled ATPase activity 등에 관련한 유전자가 많이 속해 있었으며, 이러한 유전자가 관여한 pathway에는 Ubiquitin mediated proteolysis 등이 있었다.

4. 단백질 상호 작용 네트워크로 분석한 중심 유전자들에는 Vinculin 및 Cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae) 등이 있었으며 이러한 유전자들은 세포의 골격 유지와 세포 주기의 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 유전자에 속한다.

이상의 내용으로 미루어 반하 추출물이 스트레스를 해소하는 과정에서 관여하는 구체적인 신호 전달 경로와 유전자들을 확인할 수 있었다.

## REFERENCES

- Koh HJ. Stress management strategies in Primary medical care. *Journal of Korean Academy of Family medicine*. 2000;21(2):125-36.
- Selye H. Forty years of stress research. Principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J*. 1976;115:53-6.
- Stone, E. A. Stress and catecholamines. In A. J. Friedhoff (ed.), *Catecholamines and Behavior*. Plenum Press. New York. 1975;2:31-72.
- Kang KT, Lee MK. Kyeongsang National University. Relations of stress coping style to depression and anxiety. *Korean psychological Association. collection of dissertations*. 2005. 402-3.
- Kwon BH, Lee SY. collection of dissertations. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 1994;5(1):86.
- Moon JJ, Ahn KS, Choi SH. *Oriental Pathology*. Seoul. Komunsa. 1990:23-4,78-9.
- Kim JW, Hwang WW. Stress in Oriental Medicine. *Korean Journal of Stress Research*. 1993;1(1):120-1.
- Hwang WW. *Psychosomatic disease*. Seoul. Hanglim Publisher. 1985:18-24, 36-44.
- Hwang WW, Kim JH. *Oriental Psychiatry*. Seoul. Hyundai Medical Publisher. 1987:99-109.
- Kim YS. Experimental study on the Anti-stress effect of Bohyulanshin-tang on the noise stress. Graduate School of Kyunghee University. Doctoral Dissertation. 1986.
- Lee DJ. Experimental study on the Anti-stress effect of Bohyulanshin-tang, Kami Bohyulanshin-tang. Graduate School of Kyunghee University. Doctoral Dissertation. 1987.
- Kang HK. Effect of Jaeumgunbitang on the gastric ulcer and plasma catecholamines contents of rats in immobilization stress. Graduate School of Kyunghee University. Doctoral Dissertation. 1992.
- Ji SY. Effect of Jaeumgunbitang on the gastric ulcer and plasma catecholamines contents of rats in immobilization stress. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 1992; 3(2):49-63.
- Hwang CY. Effects of Sibjeondaebotang Adding Cervi Pantotrichum Cornu on the Immune Responses in Mice. Graduate School of Wonkwang University. Doctoral Dissertation. 1989.
- Im DS. The Antistress Effects of Semen Ziziphi Spinosae Extract. Graduate School of Dongshin University. Dissertation of Master's degree. 2003.
- Kim EJ. Effects of Valerianae Radix Extract on Sociopsychological Stress in Mice. Graduate School of Dongshin University. Doctoral Dissertation. 2005.
- Choi JH. Effects of Piperis Nigri Fructus Extract on Sociopsychological Stress in Mice. Graduate School of Dongshin University. Doctoral Dissertation. 2005.
- Kim KH, Jeong HW, Lee DW, Kim JS, Kim YK, Cho SI. Effects of Radix Polygalae Extract on Sociopsychological Stress. *Korean Journal of Herbology*. 2003;18(1):99-108.
- Cho SI, Kim HW, Jeong YS. Effects of Radix Polygalae Extract on Sociopsychological Stress. *Korean Journal of Herbology*. 2004;19(4):99-108.
- Kim SY. Effects of Pinelliae Rhizoma Extract on Sociopsychological Stress. Graduate School of Dongshin University. Doctoral Dissertation. 2007.
- Won HY. Effects of Banhabubak-Tang extract on sociopsychological stress. Graduate School of Dongshin University. Doctoral Dissertation. 2007.
- Editing commission of Herbology. *Herbology*. Seoul. Younglimsa. 2004:487-8.
- Ogawa N, Kuwahara K. Psychophysiology of emotion-communication of emotion. *Jpn J Psychosom Med*.

- 1996;6:352-7.
24. Shibasaki T, Imaki T, Hotta M, Ling N, Demura H. Psychological stress increases arousal through brain corticotropin-releasing hormone without significant increase in adrenocorticotropin and catecholamine secretion. *Brain Res.* 1993;618:71-5.
  25. Pavliek A, Hrda S, Flegr J. Free-Tree-freeware program of construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biol (Praha)*. 1999;45(3):97-9.
  26. Park YE, Lee DH. A Study on Socio-Psychological Stresses affected with Health Status. 1999;16(1):61-82.
  27. Seyle H. *The Stress of Life*. 2nd edition, NY. Mcgraw-Hill Inc. 1976.
  28. Brenner. The Stressful Price of Prosperity, *Science News*, 1987, March 18, 16.
  29. Luthans F, *Organizational Behavior*, 4th, Mograw-Hill, 1985. 130.
  30. Hoffstein S, Gennaro DE, Fox AC, Hirsch J, Streuli F, Weissmann G : Colloidal lanthanum as a marker for impaired plasma membrane permeability in ischemic dog myocardium, *Am J Pathol* 79:207-18, 1975.
  31. Ruberman W, Weinblatt E, Goldberg JD, Chaudhary BS : Psychosocial influences on mortality after myocardial infarction, *N Engl J med* 311:552-9, 1984.
  32. Harper LS, Williams K, Lochner A : Lanthanum proving of cell membrane permeability in the rat heart: Pathological Versus artefactual alterations, *J Electr Microsc Tech* 14: 357-66, 1990.
  33. Schmiedl A, Bach F, Rehrenbach H, Schnabel PA, Richter J : Cellular distribution patterns of lanthanum and morphometry of rat hearts exposed to different degrees of ischemic stress, *Anat Rec* 243:496-508, 1995.
  34. Soldani P, Pellegrini A, Gesi M, Leni P, Cristofani R, Paparelli A : SEM/TEM investigation of rat cardiac sub-cellular alterations induced by changing duration of noise stress, *Anat Rec* 248:521-32, 1997.
  35. Gesi M, Riva A, Soldani P, Fornai F, natale G, Lenzi P, Pellegrini A, Paparelli A : Central and peripheral benzodiazepine ligands prevent mitochondrial damage induced by noise exposure in the rat myocardium : An ultra-structural study, *Anat Rec* 255:334-41, 1999.
  36. Kim HT, Kim H, Song CH, Han EH, Lee MS. Changes of Ultrastructure and Atrial Specific Granules of Atrial Myocytes in Dehydrated and Rehydrated Rats. *Journal of Korean association of Anatomists*. 2001;34:567-78.
  37. Toth T : The role of catecholamines in lethal immobilization stress, *Acta Physiol Hung* 75:95-9, 1990.
  38. Lee MS, Song CH, Kim HT, Han EH, Lee KS, Kim WC, Shin HY. The Effects of Immobilization Stress on the Ultrastructure of Rat Atrial Myocytes. *Journal of Korean association of Physical anthropologist*. 2002;15:1-13.
  39. Ganote CE, Heide RSV : Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury : A conventional and high-voltage electron-microscopic and immunofluorescence study, *AM J Pathol* 129:327-44, 1987.
  40. Lee SG. A Study of Stress Management in Oriental Medicine. *Korean Journal of Stress Research*. 2002; 10(2):31-9.
  41. Hwang WW. *Psychosomatic disease*. Seoul. Hanglim Publisher. 1985:33-50.
  42. Ahn SW. Understanding the Conception of Stress regard in the Oriental Medicine. *Collection of dissertations of Korea institute of Oriental medicine*. 1997;3(1):126.
  43. Hong WS. Jeonggyo Hwangjenaehyeongyoungchu. Seoul. Oriental Medicine Institution Press. 1985:158-9, 286.
  44. Kim SH. *Oriental Neuropsychiatry*. Seoul. Hanglim Publisher. 1978:152-4, 258-64, 277-84.
  45. Jineon. *Jinmutaeksaminbang Second volume*. Taipei. Daeryeongukpung Publisher. 1978:6.
  46. Sa YG. *Chinese Internal Medicine*. Sichuan. Sichuan scientific-technique Publisher. 1985:141-2.
  47. Kim JW, Kim JH, Hwang WW. Stress in Oriental Medicine. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 1993;4(1):19-26.
  48. Jineon. *Jinmutaekilbyeongjeungbangron*. Seoul. Iljungs. 1992:19.
  49. Shin HD, Jang BS, Lee JS, Jeong SH, Kim SS. Effects of Pinellia Tuber Extract on the change of the weight, tissue in epididymal fat, blood and mRNA in visceral fat of obesity rats induced by high fat diet. *Journal of Oriental Rehabilitation Medicine*. 1999;9(1):103-28.
  50. Kim KS, Kang HS. Studies on the Effects of Seang-Banha, Kang-Banha and Chung-Banha on the Hypermesis Gravidarum. Graduate School of Daegu University. Dissertation of Master's degree. 1997.
  51. Hong JH, Seo JC, Im SC, Jeong TY, Han SW. Effect of Pinelliae Rhizoma Herbal Acupuncture on the Release of Thymus and Activation-Regulated Chemokine (TARC) in Human Bronchial Epithelial Cell. *Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2005;22(1):155-64.
  52. Entrez Gene: VCL vinculin, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez? Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7414](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7414).
  53. Entrez Gene : CDC42 cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa).