

# Chronic Mild Stress 유발 흰쥐에서 潤燥交心湯이 스트레스 및 수면 관련 호르몬에 미치는 영향

김하나, 김경옥

동신대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실

## The Effects of Yunjogyosim-tang on Stress and Sleep-related Substance of Rats Induced by Chronic Mild Stress

Ha-na Kim, Kyeong-ok Kim

Department of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dongshin University

**Received:** February 27, 2017

**Revised:** March 11, 2017

**Accepted:** March 28, 2017

**Objectives:** The study aims were to evaluate the Anti-stress and Sleep-inductive effects of Yunjogyosim-tang (YJGS) in rats induced by Chronic Mild Stress (CMS).

**Methods:** 25 healthy Rats were randomly divided into 5 groups; Normal, CMS (Control), YJGS 50, YJGS 100, and YJGS 200. All rats except the normal group were exposed to random stress conditions like water deprivation, empty bottles, forced runs on the treadmill, etc. according to the timetable of CSM for 3 weeks. After a week starting the experiment, Rats in YJGS 50, YJGS 100, and YJGS 200 groups were fed orally once a day for 2 weeks. Blood samples were taken afterward from each rat for analysis of Complete blood count, AST, ALT, and glucose levels. Corticosterone, serotonin, and melatonin were measured by ELISA kit. BDNF and TNF- $\alpha$  were measured by RT-PCT.

**Results:** 1. Corticosterone levels were lower in YJGS 50, and YJGS 200 groups compared to the control group. 2. Serotonin levels were lower in the YJGS 100 and YJGS 200 groups compared to the control group. 3. Melatonin levels were higher in the YJGS 50 group compared to the control group. 4. Activity levels were higher in the BDNF, and YJGS 50 groups compared to the control group. 5. In the Activity of TNF- $\alpha$ , YJGS 50 group showed a significant decrease compared to the control group. 6. In the Glucose content, YJGS 50, YJGS 100, and YJGS 200 groups showed a significant decrease compared to the control group. 7. When analyzing leukocytes, monocytes were found to be increased in YJGS 100 and YJGS 200 groups compared to the control group. 8. When analyzing red blood cells, more changes occurred to erythrocytes and thrombocytes in the YJGS 50 and YJGS 200 groups than in the control group. Hemoglobin was significantly increased in the YJGS 100 group and platelet levels were significantly increased in all experimental groups compared with the control group.

**Conclusions:** These results suggest that Yunjogyosim-tang has anti-stress and sleep-inductive effects on rats induced by CMS.

**Key Words:** Yunjogyosim-tang, Chronic Mild Stress (CMS), Stress, Insomnia, Corticosterone, Serotonin, Melatonin, Animal model.

### Correspondence to

Kyeong-ok Kim  
Department of Korean  
Neuropsychiatry, Dongshin University  
Hospital at Suncheon, 331 Isu-ro,  
Suncheon, Korea.  
Tel: +82-61-729-7199  
Fax: +82-61-725-1717  
E-mail: [avecinkok@hanmail.net](mailto:avecinkok@hanmail.net)

## I. 서론

현대사회에서 스트레스(Stress)라는 단어는 일상생활에서 가장 빈번하게 사용되는 전문 용어 중 하나이다<sup>1)</sup>. 스트레스는 인체에 가해지는 다양한 자극이나 변화에 대해 적절하게 대처하지 못하여 발생하는 부정적 상태로 각종 심리증상과 신체증상, 행동증상 등을 초래한다<sup>2)</sup>. 반복적이고 만성적인 스트레스는 중추신경계에 작용하여 걱정, 우울, 불안, 초조, 긴장 등 심리적으로 불안정한 상태를 야기하고 수면장애, 기분장애 및 각종 심리학적 장애를 유발하는데<sup>3,4)</sup>, 특히 수면장애 가운데 가장 흔한 질환인 불면증은 스트레스와 직접적인 관련이 있을 것으로 추정된다<sup>1)</sup>.

한의학적 관점에서 스트레스 인자는 정신적인 자극(七情傷) 또는 외부 환경(六氣)의 변화로 볼 수 있으며 이들은 인체 내부에서 기혈양양의 불균형을 야기하여 각종 질병을 일으키는 기초가 되는데 기기실조(氣機失調)로 인해 발생할 수 있는 기울(氣鬱), 기역(氣逆) 등과 관계가 있다. 이러한 증후들은 수면장애와도 관련이 있는데 정신적인 스트레스(七情傷)는 심(心), 비(脾) 두 개의 장부를 주로 상하게 하여 영혈(營血)의 불족을 초래하고 이로 인해 인체의 음양기혈의 균형이 깨져 장부가 손상되어 부면이 발생하게 되는 것이다<sup>5,6)</sup>.

본 연구에서 사용된 윤조교심탕(潤燥交心湯)은 《변증기문(辨證奇聞)·불매문(不寐門)》<sup>7)</sup>에 수록된 처방으로 심신불교(心腎不交)하고 간기태조(肝氣太燥)하여 생기는 불면을 치료하는데 오래도록 근심걱정을 한 후에 피곤하지만 잠을 자지 못하는 증상에 활용한다.

기존의 만성 스트레스에 대한 실험적 연구로는 Chronic Mild Stress로 유발된 우울증 모델 흰쥐에 대한 귀비탕의 실험적 연구<sup>8)</sup>, 가미산조인탕의 항스트레스 효과<sup>9)</sup>, 사물탕가

향부자의 항우울 효과<sup>10)</sup>, 하엽추출물의 항우울 효과<sup>11)</sup>, 삼음교, 족삼리의 백복령 약침이 CSM 유발 흰쥐에 대한 항스트레스효과<sup>12)</sup>를 보고한 바가 있었고, 수면장애와 관련된 실험적 연구로는 천왕보심단, 온담탕, 귀비탕, 수종의 한약재 열추출물이 멜라토닌 수용체 발현에 미치는 영향<sup>13,14)</sup>, 분심기음가미방이 흰쥐의 수면장애와 불안, 정서성에 미치는 영향<sup>15,16)</sup> 등이 있었으나 만성 스트레스 모델에 대해 스트레스 및 수면 관련 호르몬에 미치는 영향을 함께 보고한 연구는 없었다.

이에 저자는 윤조교심탕의 경구투여가 만성 스트레스 모델 흰쥐의 스트레스 및 수면 관련 호르몬에 미치는 영향을 알아보고자 혈액 및 혈청학적 지표, 스트레스, 수면과 관련된 지표인 Corticosterone, Serotonin, Melatonin, PCR기법을 활용한 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 지표 등을 측정 및 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 실험 동물

체중이 약 160~170 g의 Wistar Hannover계의 웅성의 백서를 항온항습 환경의 사육장(실내온도 24±1°C, 습도 60±5%)내에서 고행사료(동아원, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 3일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험기간 동안에도 물과 고행사료를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

Table 1. Prescription of Yunjogyosim-tang

韓藥名	Herbal name	Scientific name	Weight (g)
芍藥	Paeoniae Radix Alba	Paeonia Lactiflora Pall.	20
當歸	Angelicae Gigantis Radix	Angelica gigas Nakai	20
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparata	Rehmannia glutinosa	20
玄參	Scrophulariae Radix	Scrophularia buergeriana Miq.	6
柴胡	Bupleuri Radix	Bupleurum falcatum Linne	4
菖蒲	Acori Gramineae Rhizoma	Acorus gramineus Solander	4
Total amount			74

## 2) 실험 약물(표 내용 추가)

본 실험에 사용된 윤조교심탕(Yunjogyosim-tang; YJGS-tang)의 구성 약재는 동신대학교 부속 순천한방병원에서 구입·엄선하여 사용하였다. YJGS-tang (740 g=10첩)을 동결건조 시켜 65 g 파우더를 얻었으며, 구성 약재의 처방 내용은 Table 1과 같다. YJGS-tang 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg의 농도로 5 ml/kg의 증류수에 녹여 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) Chronic Mild Stress (CMS) 유발 방법

본 연구를 위하여 Table 2과 같은 만성 스트레스 모델(CMS)을 사용하였다. 실험기간은 정상군을 제외한 CMS 유발군은 21일간 먹이박탈(FD), 빈 물병 제시(EB), 강제 운동(FT), 소음(NB), 주야 주기 역전(LON, LOF), 강제 수영(FS), 빛 깜빡(FL), 케이지 기울이기(Tilt), 케이지 흔들기(Shaking), 고밀도 사육(TH), 물 박탈(WD), 젖은 깔짚(SC) 등 매일 스트

레스 유발표(Table 2)에 의하여 노출시켰으며, 이 기간 동안 먹은 사료량 및 물량을 확인하였으며, 주 3회 몸무게를 확인하였으며, 일반적인 사육환경을 유지하였다.

### 2) 군 분리

실험군들의 분리는 처치를 하지 않은 정상군(Normal), CMS를 유발시킨 후 처치를 하지 않은 대조군(Control), CMS를 유발시킨 후 윤조교심탕 구강투여 I군(50 mg/kg; YJGS 50), CMS를 유발시킨 후 윤조교심탕 구강투여 II군(100 mg/kg; YJGS 100), CMS를 유발시킨 후 윤조교심탕 구강투여 III군(200 mg/kg; YJGS 200)으로 분류하였고, 각 군당 5마리씩 배정하였다.

### 3) 약물 투여

약물의 구강투여는 zonda를 사용하여 CMS 유발 후 7 일째부터 시작하였으며, 1일에 각 1회씩 총 14회에 걸쳐 시행되었다. 1회 투여량 5 ml/kg을 주입하였다.

**Table 2.** Time Table for Induced by Chronic Stress Model in Rat

Time	Fri	Sat	Sun	Mon	Tue	Wed	Thu
01:00	FD, EB (9 h)	LON (9 h)	FL (9 h)	Tilt (9 h)	TH, WD (9 h)	FL (9h)	Tilt (9 h)
02:00							
03:00							
04:00							
05:00							
06:00							
07:00							
08:00							
09:00							
10:00							
11:00	FT (2 h)	FS (2 h)	LOF (2 h)	Shaking (2 h)	FT (2 h)	SC (2 h)	Shaking (2 h)
12:00							
13:00							
14:00							
15:00	NB (4 h)	WD (4 h)	LOF (4 h)	FD (4 h)	NB (4 h)	FS (4 h)	LOF (4 h)
16:00							
17:00							
18:00							
19:00	LON (6 h)	FL (6 h)	Tilt (6 h)	TH, WD (6 h)	FL (6 h)	Tilt (6 h)	FD, EB (6 h)
20:00							
21:00							
22:00							
23:00							
24:00							

FD: Water deprivation, EB: Empty bottles, FT: Forced Treadmill, NB: Noise bursts, LON: Lights on at night, FS: Force Swimming, FL: The Flashing light, LOF: Lights off at day, Tilt, Shaking, TH: Tight Husbandry, WD: Water deprivation, SC: Straw litter clammy.

#### 4) 체중 및 사료효율

체중은 전자저울(주)카스, 중국)을 이용하여 흰쥐의 무게를 실험기간 동안 매주 3회 측정하였다. 섭취량은 1마리당 1일 섭취 평균량을 구하였다. 사료효율은 기간 중 체중증가량(g)÷기간 중 사료섭취량(g)×100을 이용하여 계산하였다.

#### 5) 혈액 및 혈청학적 검사

채혈에 의하여 얻어진 혈액 중 약 100  $\mu$ l를 EDTA-bottle에 넣은 후 곧바로 Multispecies Hematology Analyser (950, Hemavet, USA)에 주입하여 WBC, RBC, HGB, PLT를 측정하였다. 나머지 혈액은 VS 6000CFI (Vision, Korea)에서 3,000 rpm으로 20분간 시행하여 혈청을 분리하였으며, 혈청 분석으로는 AST (u/l)와 ALT (u/l)를 Dri-chem 4000i (Fujifilm corp. Japan)으로 측정하였다.

#### 6) 혈당 측정

혈당 측정은 CSM 유발 전, 유발 후 1주, 유발 후 2주, 유발 후 3주로 총 4회 꼬리채혈을 하여 얻어진 혈액은 ACCU-CHEK Active Strip (Roche, Germany)에 혈액방울을 묻혀 ACCU-CHEK Active (Roche, Germany)에 꽂아 혈당측정을 하였다.

#### 7) ELISA에 의한 Corticosterone 측정

Corticosterone은 Corticosterone Elisa Kit (abcam, UK)를 사용하여 측정하였다. Corticosterone이 coating된 microplate에 Corticosterone standard 25  $\mu$ l, serum 25  $\mu$ l를 넣고 1X Biotinylated Corticosterone 25  $\mu$ l를 첨가하고 platecover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 실온에서 2시간 동안 incubation시켰다. Wash buffer 200  $\mu$ l로 5회 washing 후 1X SP Conjugate 50  $\mu$ l를 첨가하고 plate cover를 덮고 실온에서 30분 동안 incubation 하였다. Wash buffer 200  $\mu$ l로 5회 washing 후 Chromogen Substrate 50  $\mu$ l를 첨가하고 bubble을 제거한 후 plate cover를 덮고 실온에서 20분 동안 incubation 하였다. Stop solution 50  $\mu$ l를 plate에 넣고 발색반응을 중지시킨 후 microplate spectrophotometer (Benchmark plus, Biorad, USA)로 450 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였다. Standard curve를 만들어 sample의 Corticosterone

를 assay하였다.

#### 8) ELISA에 의한 Serotonin 측정

Serotonin은 Serotonin Elisa Kit (abcam, UK)를 사용하여 측정하였다. Serotonin이 coating된 microplate에 Serotonin standard 100  $\mu$ l, serum 100  $\mu$ l를 넣고 Alkaline phosphate conjugate 50  $\mu$ l를 첨가하고, Serotonin antibody 50  $\mu$ l를 넣은 후 platecover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 실온에서 2시간 동안 500 rpm으로 shaking시켰다. Wash buffer 200  $\mu$ l로 3회 washing 후 pNpp substrate solution 200  $\mu$ l를 첨가하고 plate cover를 덮고 실온에서 1시간 동안 incubation하였다. Stop solution 50  $\mu$ l를 plate에 넣고 발색반응을 중지시킨 후 microplate spectrophotometer (Benchmark plus, Biorad, USA)로 405 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였다. Standard curve를 만들어 sample의 Serotonin를 assay하였다.

#### 9) ELISA에 의한 Melatonin 측정

실험이 끝난 후 적절한 뇌 조직(100 mg)에 1X PBS 1 ml을 넣고 precellys 24 (Bertin technologies, France)에서 균질화하고 4°C, 7,300 rpm에서 5분 동안 원심분리 (Centrifuge 5415 R: Eppendorf, Germany)하여 상층액을 분리한다. 분리한 상층액 sample은 측정하기 전까지 냉동보관한다.

Melatonin 측정은 Rat Melatonin Elisa Kit (Biomatik, USA)를 사용하여 측정하였다. Melatonin이 coating된 microplate에 Rat Melatonin Standard, 조직 sample 50  $\mu$ l를 넣고, HRP-conjugate를 50  $\mu$ l를 첨가하고 Antibody 50  $\mu$ l를 넣고 platecover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 37°C에 60분간 incubation시켰다. Wash buffer 400  $\mu$ l로 3회 washing후 Substrate A 50  $\mu$ l를 넣고, Substrate B 50  $\mu$ l를 첨가한 다음 platecover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 37°C에 15분간 incubation (dark 상태) 하였다. Stop solution 50  $\mu$ l를 plate에 넣고 발색반응을 중지시킨 후 microplate spectrophotometer (Benchmark plus, Biorad, USA)로 450 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였다. Standard curve를 만들어 sample의 Melatonin을 assay하였다.

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

### (1) Total RNA 분리

적출된 뇌를 coronal section하여 신속히 액체 질소에 급속 냉동시키고 분석할 때까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

Total RNA의 분리는 뇌 조직(300 mg)에 800  $\mu\text{l}$  Trizol Reagent (Lifetechnologies, U.S.A.)를 넣고 precllys 24 (Bertin technologies, France)에서 균질화하고, 균질액에 200  $\mu\text{l}$ 의 chloroform (Sigma, U.S.A.)을 가하여 15초 동안 흔들여 잘 혼합한 후, 실온상태에서 5분 방치하고 난 다음 세포 유잔물을 제거하기 위하여  $4^{\circ}\text{C}$ , 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리(Centrifuge 5415 R: Eppendorf, Germany)하였다. 원심분리로 얻어진 상층액에 500  $\mu\text{l}$ 의 iso-propanol (sigma, USA)을 첨가하여 실온상태에서 5분 동안 방치한 후 RNA pellet을 얻기 위하여  $4^{\circ}\text{C}$ , 14,000 rpm에서 8분간 원심분리하고, 원심분리로 생긴 pellet에 냉장 보관된 70% ethanol과 함께 DEPC를 넣고  $4^{\circ}\text{C}$ , 7,500 rpm에서 5분간 원심분리 후 pellet만 남기고 모두 제거하고, 남은 ethanol은 실온에서 5분간 방치시켜 건조시킨 다음 DEPC-treated water에 녹여 spectrophotometer (Bio-photometer: Eppendorf, Germany)에서 OD260 값을 읽어 RNA의 순도 및 농도를 정량하였다.

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

분리된 total RNA 5  $\mu\text{g}$ 과 2.5  $\mu\text{l}$  Oligo (dT), DEPC-treated water를 RT premix (Bioneer, Korea)에 넣어 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)를 이용하여 50  $\mu\text{l}$  cDNA를 합성하여 PCR 증폭을 위한 template로 사용하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (sense primer: 5'-ACTCCATCACCATCTTCCAG-3', antisense primer: 5'-CCTGCTTTCACCACCTCCTTG-3')를 internal control로 사용하였다. Reverse transcription temperature cycle은  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 cDNA synthesis,  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 denature 그리고  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 cooling시키는 단계를 거쳤다. Polymerase chain reaction은 cDNA, 10 pg sense primer, 10 pg antisense primer, DEPC-treated water를 PCR premix (Bioneer, Korea)에 넣은 후

Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)를 이용하여 증폭시킨다. PCR temperature cycle은 cDNA의 증폭을 위하여  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 300초 동안 pre-denaturation,  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 40초 동안 melting,  $55^{\circ}\text{C}$ 에서 40초 동안 annealing,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 90초 동안 extension하는 과정을 34회 반복 수행하고 마지막 cycle에서  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 600초 동안 extension 단계를 거친다. BDNF 유전자증폭은 primer (sense primer: 5'-CAGGGGCATAGACAAAAG-3', antisense primer: 5'-CTTCCCTTT TAATGGTC-3'), TNF- $\alpha$  유전자증폭은 primer (sense primer: 5'-ATGAG CACAGAAAGCATGATC-3', antisense primer: 5'-TACAGGCTTGTCA CTCGAAT-3')로 시행하였다.

이렇게 증폭된 BDNF, TNF- $\alpha$ 의 DNA를 Greenview nucleic acid gel stain (IO Rodeo, 1:10,000)를 포함한 1.5% agarose gel상에서 0.5x TBE buffer (80 mM Tris-HCL, 80 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3)로 100 V에서 전기 영동시켜 관찰한 후 Image Station (Samsung, Korea)을 이용하여 촬영하였으며, Alphaease FC StandAlone Software (Alpha Innotech, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

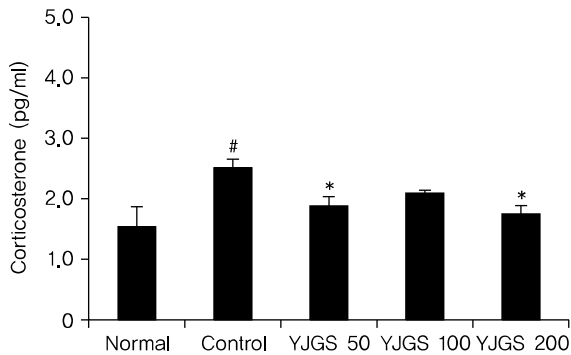
## 3. 통계처리

모든 측정값은 Excel statistic program (Microsoft, USA)을 이용하여 평균치와 표준오차(mean  $\pm$  standard error)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 SPSS 21.0 ver. for windows를 사용하여 비모수적 방법으로 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 각 실험군은 대조군에 비하여  $\alpha=0.05$  수준( $p<0.05$ )과  $\alpha=0.01$  수준( $p<0.01$ )에서 유의성을 검정하였다.

## III. 실험 결과

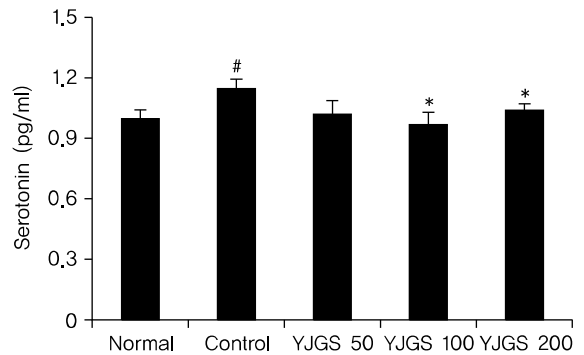
### 1. Corticosterone 함량에 미치는 영향

CMS 유발 흰쥐의 Corticosterone 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은  $1.56 \pm 0.31$  pg/ml, 대조군은  $2.53 \pm 0.13$  pg/ml를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 증가를 나타내었고, YJGS 50군은  $1.89 \pm 0.15$  pg/ml, YJGS 100군은  $2.11 \pm 0.03$  pg/ml, YJGS 200군은  $1.76 \pm 0.12$  pg/ml를 나타내어 대조군에 비하여 YJGS 50군과 YJGS 200군이 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Effect of Yunjogyosim-tang administration on the Noradrenalin level in CMS rats.

Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). Normal, normal group; Control, CMS and no treatment; YJGS-tang 50 mg, CMS and administration of Yunjogyosin-tang 50 mg; YJGS-tang 100 mg, CMS and administration of Yunjogyosin-tang 100 mg; YJGS-tang 200 mg, CMS and administration of D Yunjogyosin-tang 200 mg. #p<0.05, compared with normal; \*p<0.05, compared with control.



**Fig. 2.** Effect of Yunjogyosim-tang administration on the Serotonin level in CMS rats.

Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1. #p<0.05, compared with normal; \*p<0.05, compared with control.

## 2. Serotonin 함량에 미치는 영향

CMS 유발에 흰쥐의 Serotonin 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은  $1.00 \pm 0.04$  pg/ml, 대조군은  $1.15 \pm 0.04$  pg/ml를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 증가를 나타내었고, YJGS 50군은  $1.02 \pm 0.07$  pg/ml, YJGS 100군은  $0.97 \pm 0.06$  pg/ml, YJGS 200군은  $1.04 \pm 0.03$  pg/ml를 나타내어 대조군에 비하여 YJGS 100군과 YJGS 200군이 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 2).

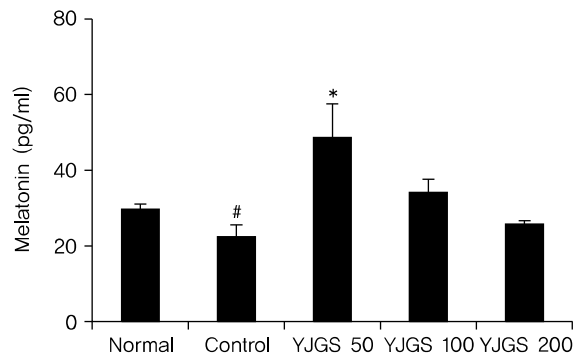
## 3. Melatonin 함량에 미치는 영향

CMS 유발에 흰쥐의 Melatonin 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은  $29.8 \pm 1.3$  pg/ml, 대조군은  $22.7 \pm 2.8$  pg/ml를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 감소를 나타내었고, YJGS 50군은  $48.8 \pm 8.8$  pg/ml, YJGS 100은  $34.1 \pm 3.6$  pg/ml, YJGS 200군은  $25.7 \pm 0.8$  pg/ml를 나타내어 대조군에 비하여 YJGS 50군이 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 3).

## 4. PCR 기법을 활용한 BDNF, TNF- $\alpha$ 에 미치는 영향

### 1) BDNF 활성화에 미치는 영향

CMS 유발 흰쥐의 BDNF 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은  $136.6 \pm 3.1$  OD value, 대조군은  $125.8 \pm$



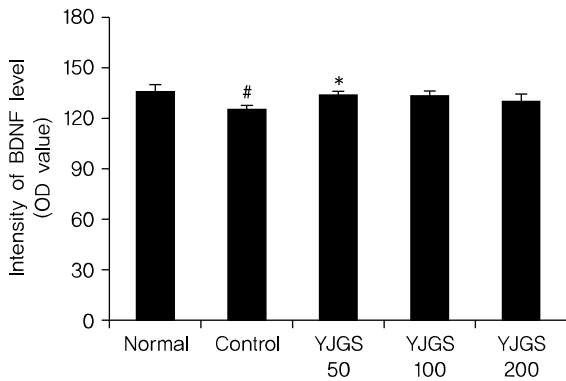
**Fig. 3.** Effect of Yunjogyosim-tang administration on the Melatonin level in CMS rats.

Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1. #p<0.05, compared with normal; \*p<0.05, compared with control.

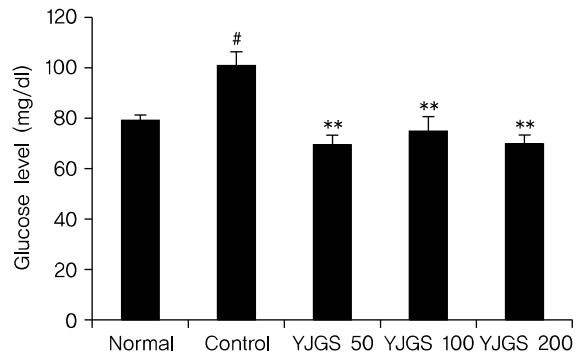
2.1 OD value를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 감소를 나타내었고, YJGS 50군은  $133.8 \pm 2.2$  OD value, YJGS 100군은  $133.4 \pm 3.0$  OD value, YJGS 200군은  $130.3 \pm 4.0$  OD value를 나타내어 대조군에 비하여 YJGS 50군은 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 4).

### 2) TNF- $\alpha$ 활성화에 미치는 영향

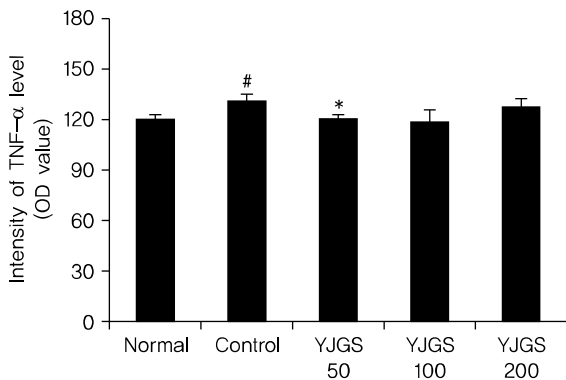
CMS 유발 흰쥐의 TNF- $\alpha$  활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은  $120.2 \pm 2.6$  OD value, 대조군은  $131.2 \pm 3.7$  OD value를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 증가를 나타내었고, YJGS 50군은  $120.7 \pm 2.1$  OD value, YJGS 100군은  $118.5 \pm 7.1$  OD value, YJGS 200군은  $127.5 \pm 5.1$  OD value를 나타내어 대조군에 비하여 YJGS 50군은 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 5).



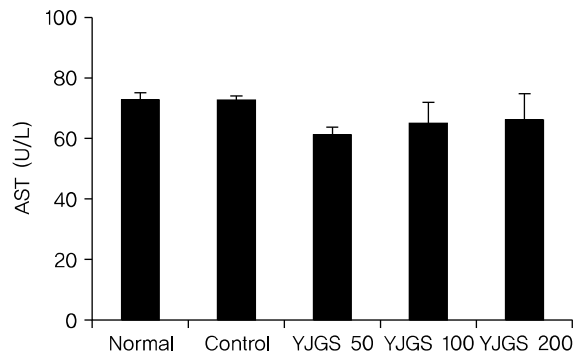
**Fig. 4.** Effect of Yunjogyosim-tang administration on the BDNF level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1. <sup>#</sup>p<0.05, compared with normal; <sup>\*</sup>p<0.05, compared with control.



**Fig. 6.** Effect of Yunjogyosim-tang administration on the glucose level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1. <sup>\*</sup>p<0.05, compared with normal; <sup>\*\*</sup>p<0.01, compared with control.



**Fig. 5.** Effect of Yunjogyosim-tang administration on the TNF-α level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1. <sup>#</sup>p<0.05, compared with normal; <sup>\*</sup>p<0.05, compared with control.



**Fig. 7.** Effect of Yunjogyosim-tang administration on the AST level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1.

## 5. 혈당 및 혈청 transaminase 함량에 미치는 영향

### 1) Glucose 함량에 미치는 영향

CMS 유발 흰쥐의 glucose 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 78.8±2.4 mg/dl, 대조군은 100.7±5.5 mg/dl를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 증가를 나타내었고, YJGS 50군은 69.5±4.0 mg/dl, YJGS 100군은 74.7±5.7 mg/dl, YJGS 200군은 69.7±3.6 mg/dl를 나타내어 대조군에 비하여 YJGS 50군, YJGS 100군과 YJGS 200군 모두 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 6).

### 2) AST 함량에 미치는 영향

CMS 유발 흰쥐의 AST 함량에 미치는 영향을 관찰한 결

과, 정상군은 73.0±2.1 U/L, 대조군은 72.7±1.7 U/L를 나타내어 정상군과 대조군은 비슷한 수준을 나타내었고, YJGS 50군은 61.5±2.4 U/L, YJGS 100군은 65.3±6.8 U/L, YJGS 200군은 66.6±8.5 U/L를 나타내어 대조군에 비하여 각 실험군은 유의한 차이가 없었다(Fig. 7).

### 3) ALT 함량에 미치는 영향

CMS 유발 흰쥐의 ALT 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 27.3±5.7 U/L, 대조군은 24.3±1.0 U/L를 나타내어 정상군과 대조군은 비슷한 수준을 나타내었고, YJGS 50군은 20.8±2.2 U/L, YJGS 100군은 20.5±1.6 U/L, YJGS 200군은 19.4±3.1 U/L를 나타내어 대조군에 비하여 각 실험군은 유의한 차이가 없었다(Fig. 8).

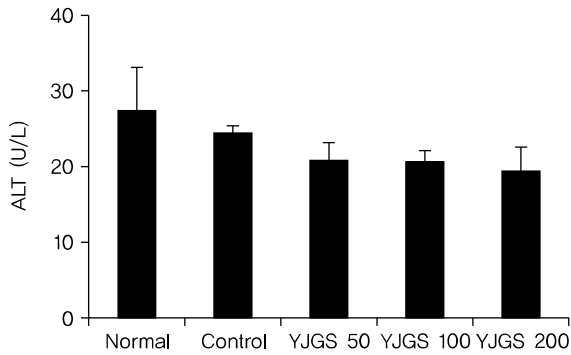


Fig. 8. Effect of Yunjogyosim-tang administration on the ALT level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1.

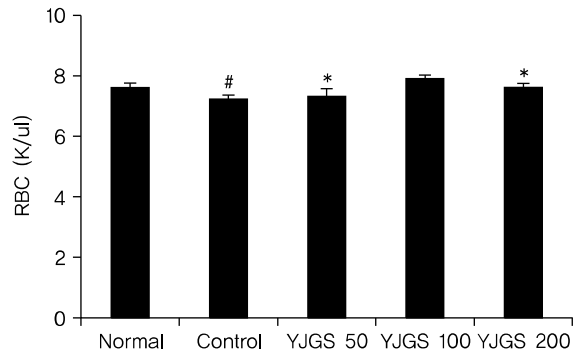


Fig. 10. Effect of Yunjogyosim-tang administration on the RBC in CMS rats. Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1. \*p<0.05, compared with normal; \*p<0.05, compared with control.

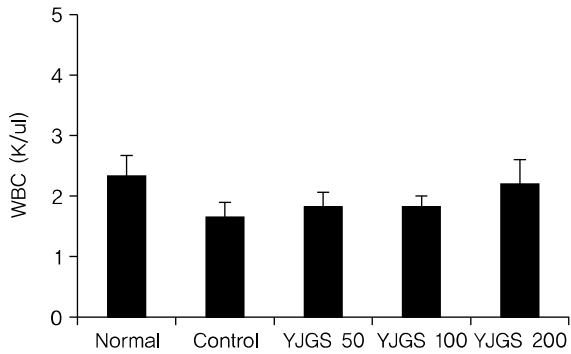


Fig. 9. Effect of Yunjogyosim-tang administration on the WBC in CMS rats. Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1. \*p<0.05, compared with control.

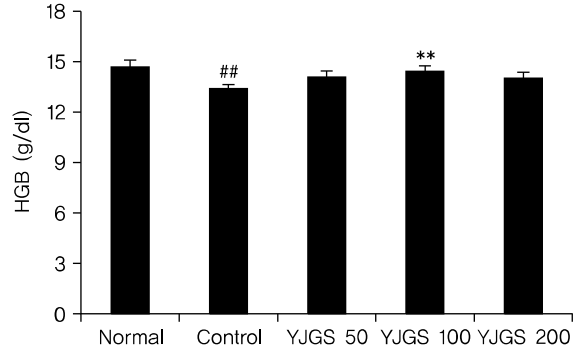


Fig. 11. Effect of Yunjogyosim-tang administration on the Hemoglobin level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1. \*\*p<0.01, compared with normal; \*\*p<0.01, compared with control.

## 6. Leukocyte 변화에 미치는 영향

CMS 유발 흰쥐의 Leukocyte 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 각 실험군은 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 9).

## 7. Erythrocyte 및 thrombocyte 변화에 미치는 영향

CMS 유발 흰쥐의 Erythrocyte 및 Thrombocyte 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, Red blood cell의 경우 대조군에 비하여 YJGS 50군과 YJGS 200군이 유의한 증가를 나타내었고(Fig. 10), Hemoglobin의 경우 대조군에 비하여 YJGS 100군이 유의한 증가를 나타내었고(Fig. 11), Platelet의 경우 대조군에 비하여 YJGS 50군, YJGS 100군과 YJGS 200군 모두 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 12).

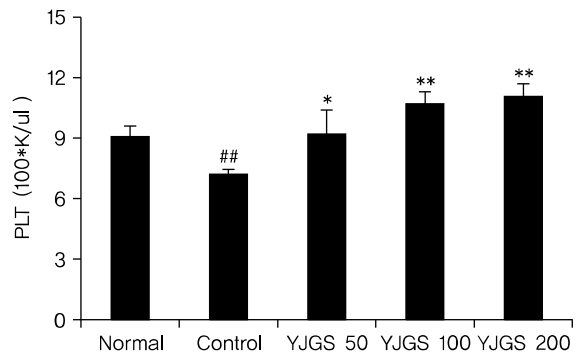


Fig. 12. Effect of Yunjogyosim-tang administration on the Platelet level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1. \*\*p<0.01, compared with normal; \*p<0.05, \*\*p<0.01, compared with control.

## 8. Weight gain에 미치는 영향

CMS 유발 흰쥐의 weight gain에 미치는 영향을 관찰한



**Table 3.** Change of Yunjogyosim-tang Administration on the Weight Gain in CMS Rats

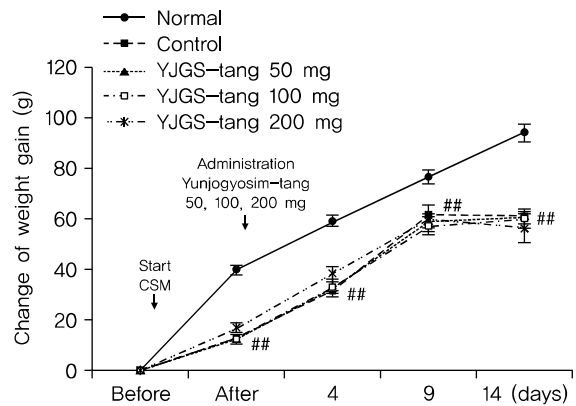
Group		Before	Administration			
			0	4	9	14
Normal	Mean	0.0	39.7	59.0	76.5	94.0
	SE	0.0	1.6	2.0	2.7	3.5
Control	Mean	0.0	12.5*	31.2*	61.0*	60.7*
	SE	0.0	1.2	0.8	1.2	1.6
YJGS-tang 50 mg	Mean	0.0	12.4*	32.6*	58.8*	60.4*
	SE	0.0	1.0	1.5	2.6	2.3
YJGS-tang 100 mg	Mean	0.0	12.2*	32.4*	57.0*	60.0*
	SE	0.0	1.8	3.2	3.7	3.9
YJGS-tang 200 mg	Mean	0.0	16.5*	37.8*	60.0*	56.0*
	SE	0.0	1.5	3.0	5.1	5.9

The groups refer to Fig. 1. n=5 per each Group. \*p<0.05, compared with normal.

결과, 정상군에 비하여 대조군은 유발 후부터 14일까지 유의한 감소를 나타내었고, 대조군에 비하여 각 실험군 모두 실험기간 동안 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table 3, Fig. 13).

#### IV. 고찰

스트레스는 인체에 가해지는 다양한 자극이나 변화에 대해 원활하게 대처하지 못하여 발생하는 인체의 부적응 상태로 각종 심리증상과 신체증상, 행동증상 등을 초래하는 것을 말한다<sup>2)</sup>. 스트레스에 의한 생리적 반응은 자율신경계 및 시상하부-뇌하수체-부신 축(Hypothalamus-Pituitary-Adrenal gland; HPA axis)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있는데, 스트레스 자극이 주어지면 대뇌피질에서 위험성에 대해 파악하고, 망상활성계(Reticular Activating System)를 통해 변연계(Limbic System)와 시상(Thalamus)으로 이동하여 내분비계와 자율신경계를 활성화시킨다<sup>3,17)</sup>. 내분비계가 활성화 될 때 시상하부는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자(Corticotropin Releasing Factor; CRF)를 분비하여 뇌하수체 전엽을 자극해 부신피질 자극 호르몬(Adrenocorticotrophic Hormone; ACTH)을 방출하고 방출된 ACTH는 부신피질을 자극하여 대표적인 스트레스 지표 물질인 Corticosterone을 방출하게 한다<sup>18)</sup>. 방출된 Corticosterone은 몸의 기관과 중추신경계, 자율신경계통, 내분비계통, 면역계통에 영향을 미치게 되고 신체의 조절 기능을 약화시켜 복합적인 신체증상을 유발하여 가법계는 두통, 피로감, 면역기능 저하, 신경성 질환 등을 발생시키고, 심하면 당뇨병, 고혈



**Fig. 13.** Effect of Yunjogyosim-tang administration on the Weight gain in CMS rats. Values are expressed Mean±SE (n=5 per each Group). The groups refer to Fig. 1. ##p<0.01, compared with normal.

압, 심장질환, 암 등의 난치성 질환으로 발생하게 된다<sup>19-21)</sup>.

특히 정신건강의 측면에서 볼 때 반복적이고 만성적인 스트레스는 중추신경계에 작용하여 여러 신경전달물질 및 호르몬 분비의 변화를 유발하여 걱정, 우울, 불안, 초조, 긴장 등 심리적으로 불안정한 상태를 야기하고 수면장애, 우울증 등의 기분장애 및 조현병 등 각종 정신과적 질환을 발생시킨다<sup>3,4)</sup>.

불면증은 수면장애 가운데 가장 흔한 질환으로 수면의 어려움을 호소하는 증상으로 정의되는데 현대인의 3명 중 1명이 한 해 동안 불면을 경험하고 6명 중 1명이 심각한 불면을 경험하며 12명 중 1명이 만성적인 불면을 경험한다고 보고될 정도로 매우 높은 유병률을 보인다<sup>5)</sup>. 불면증의 원인으로는 심리적 요인, 환경적 요인 등 매우 다양하나, 현

대 사회에서는 복합 요인이 작용하여 발생하는 원인 불명의 불면증이 많은데 이는 스트레스와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다<sup>1)</sup>.

한의학에서는 스트레스 인자에 대해 정신적인 자극(질정상) 또는 외부 환경(육기)의 변화가 자극인자로 작용하여 인체가 반응함으로써 나타나는 현상으로 인식하였는데<sup>22)</sup>, 이는 《영추(靈樞)·구문편(口問篇)》<sup>23)</sup>에서 기후, 정동(情動), 음식, 기저 등을 제시한 것과 《삼인방(三因方)》<sup>24)</sup>의 내인(內因), 외인(外因), 불내외인(不內外因)을 통해 알 수 있다. 이 중 심리적 스트레스와 관련된 부분은 七情에 의한 것으로 《소문(素問)·거통론(舉痛論)》<sup>25)</sup>에서는 노(怒)하면 기상(氣上)하고 희(喜)하면 기완(氣緩)하고 비(悲)하면 기소(氣消)하고 공(恐)하면 기하(氣下)하고 경(驚)하면 기란(氣亂)하고 사(思)하면 기결(氣結)한다고 하여, 감정의 변화가 기의 기능을 실조시킴으로써 다양한 질병을 일으킬 수 있다고 하였다<sup>5)</sup>.

수면에 대해서는 한의학에서 양기와 음기의 상관관계로 설명하고 있는데 《영추(靈樞)·대혹편(大惑論)》<sup>26)</sup>에서는 양기가 신체의 음분으로 들어가면 눈을 감고 수면을 취하게 되지만, 양기가 밤이 되어 음분으로 들어가지 못하고 양분에 머물게 되면 부면이 된다고 하였다. 불면을 일으키는 원인은 다양한데, 감정의 급격한 변화나 지속적인 스트레스가 주된 요인으로 병리기전을 살펴보면 다음과 같다. 첫 번째는 정지부수 간기울결 울구이화화 사화우동심신 신불득안 이치부매(情志不遂 肝氣鬱結 鬱久而化火 邪火扰动心神 神不得安而致不寐) 하고, 두 번째는 심담허겁 혹 폭수경해 신혼부안 선경이공이치야부능매(心膽虛怯 或 暴受驚駭 神魂不安 善驚易恐而致夜不能寐) 하며, 세 번째는 사려노권태과 손상심신 심상척심혈암모 신부수사(思慮勞倦太過 損傷心神 心傷則心血暗耗 神不守舍) 한다<sup>27)</sup>. 즉, 정신적인 스트레스로 인해 기가 울체되어 순행이 순조롭지 못하면 음양기혈의 균형이 깨지고 장부를 손상시켜 불면이 발생하게 된다.

윤조교심탕은 《변증기문·불매문》<sup>7)</sup>에 기재된 처방으로 “인유우수지후 중일곤권 지야이쌍목부폐 육구일폐목이 부능자 인이위심신지부교야 수지시간지태조호(人有憂愁之後 終日困倦 至夜而雙目不閉 欲求一閉目而不能者 人以爲心腎之不交也 誰知是肝氣之太燥乎). 부우수지인 미유부기 울자야(夫憂愁之人 未有不氣鬱者也). 기울기구 칙간기부서 간기부서 칙간혈필모 간혈기모 칙몽중지혈 상하능운어심

이하필취흡어신수(氣鬱既久 則肝氣不舒 肝氣不舒 則肝血必耗 肝血既耗 則木中之血 上下能潤於心 而下必取於腎水). … 치지법 필수보간혈지조 이익지보신지고 자연수기이양목 이간기이교심야. 방용윤조교심탕(治之法 必須補肝血之燥 而益之補腎之枯 自然水可以養木 而肝可以交心也. 方用潤燥交心湯.)”이라 하여 오래도록 근심걱정을 한 후에 피곤하지만 잠을 자지 못하는 증상에 활용하는데, 이는 사려과다로 인해 심신불교하고 간기태조하여 생기는 것으로 간혈의 조를 보하고 신고(腎枯)를 막으면 신수(腎水)가 양목(養木)하여 간과 심이 교류하여 불면을 치료한다고 하였다. 윤조교심탕을 구성하는 약물은 백작약, 당귀, 숙지황, 현삼, 시호, 석창포로 약재 각각의 효능을 살펴보면 백작약은 고산미한(苦酸微寒)하여 양혈유간(養血柔肝), 완중지통(緩中止痛), 렴음수한(斂陰收汗)하고, 당귀는 감신온(甘辛溫)하여 보혈화혈(補血和血), 조경지통(調經止痛), 윤조활장(潤燥滑腸)하며, 숙지황은 감미온(甘微溫)하여 자음보혈(滋陰補血), 익정진수(益精填髓)하는데 이 세 약물은 모두 보혈약으로 생혈(生血)을 자양(滋養)하고 심간이경(心肝二經)의 기능을 조절하여 조혈(造血)한다. 현삼은 청열양혈약으로 감고함한(甘苦鹹寒)하여 양혈자음(養血滋陰), 사화해독(瀉火解毒)하고, 시호는 발산풍열약으로 고미한(苦微寒)하여 화해표리(和解表裏), 소간(疏肝), 승양(升陽)하며, 석창포는 개규약으로 신고온(辛苦溫)하여 화담개규(化痰開竅), 화습행기(化濕行氣), 거풍이비(祛風利痺), 소종지통(消腫止痛)하는 효과가 있다<sup>28)</sup>. 따라서 진사택(陳士鐸)은 이 처방이 “백작약, 당귀로 자간하고, 숙지황으로 신수를 보하여 간혈의 생을 도우며, 현삼으로 심중의 염증을 풀고, 시호, 창포로 간의 울체를 풀어주어 간기가 심과 서로 교류하게 하여 불면면을 치료한다(차방용 작약당귀이자기간 칙간기자평의(此方用芍藥當歸以滋其肝 則肝氣自平矣) 우득숙지이보신수 칙수족이제간 이간지혈의왕(又得熟知以補腎水 則水足以濟肝 而肝之血益旺) 우득현삼 이해심중지염 이우득보수지제(又得玄蓼以解心中之炎 而又得補水之劑) 투지시호창포 해간중지울 인제약이직입어심궁 칙간간지기 자연부교이교의(投止柴胡菖蒲 解肝中之鬱 引諸藥而直入於心宮 則腎肝之氣 自然不交而交矣).”고 하였다<sup>7)</sup>.

기존의 한의학 실험 연구들에서의 스트레스 모델은 구속 스트레스, 소음스트레스, 전기쇼크 등 신체적 스트레스를 가하거나 심리적 스트레스를 유발시켜 단일 약재 혹은 복합 방제의 투여에 따른 혈액 분석, 뇌 조직 내 물질의 함량 변화

측정, 뇌세포 유전자 분석 등을 통하여 항스트레스 효과를 보고한 연구가 많았다<sup>29)</sup>.

본 연구에서 활용한 Chronic Mild Stress (CMS) 유발 흰쥐는 Wilner에 의해 고안된 것으로 여러 종류의 약물을 통해 다양한 실험 및 관측이 가능하다는 점에서 주목받는 실험 방법이다. 초기 동물실험에서는 강한 자극을 주는 방법이 선호되었으나 최근에는 인간의 생활 스트레스를 본 뜬 경미한 강도의 반복적인 스트레스를 이용하는 방법이 선호되고 있다. 실험동물에 가해진 스트레스는 먹이박탈, 빈 물병 제시, 강제 운동, 소음, 주야 주기 역전, 강제 수영, 빛 깜빡임, 케이지 기울이기, 케이지 흔들기, 고밀도 사육, 물 박탈, 젖은 깔짚 등이 포함되며 매일 스트레스 유발표에 의하여 예측할 수 없는 자극들을 제공하여 습관화가 일어나지 않도록 하였다<sup>30,31)</sup>.

기존의 만성 스트레스에 대한 실험적 연구로는 Chronic Mild Stress로 유발된 우울증 모델 흰쥐에 귀비탕을 경구 투여하여 항우울효과를 보고한 연구<sup>8)</sup>와 가미산조인탕의 항스트레스 효과<sup>9)</sup>, 사물탕가향부자, 하엽추출물의 항우울 효과<sup>10,11)</sup>, 삼음교, 족삼리의 백복령 약침이 CSM 유발 흰쥐에 미치는 항스트레스효과<sup>12)</sup>를 보고한 연구가 있었고, 수면장애에 관한 실험적 연구로 천왕보심단, 온담탕, 귀비탕이 멜라토닌 수용체 발현에 미치는 영향<sup>13)</sup>, 수종의 한약재 열수추출물이 멜라토닌 수용체 발현에 미치는 영향<sup>14)</sup>, 분심기음가미방이 흰쥐의 수면장애와 불안, 정서성에 미치는 영향<sup>15,16)</sup> 등에 관한 연구가 있었으나 만성 스트레스 모델에 대해 한약제제의 투여가 스트레스 및 수면 관련 호르몬에 미치는 영향을 함께 보고한 연구는 없었다.

이에 본 저자는 정신적 스트레스로 인한 불면에 효과적인 윤조교심탕의 경구투여가 만성 스트레스 모델 흰쥐의 스트레스 및 수면 관련 호르몬에 유의미한 영향을 미칠 것으로 추정하여 혈액 및 혈청학적 지표, 스트레스, 수면과 관련된 지표인 Corticosterone, Serotonin, Melatonin, PCR기법을 활용한 BDNF, TNF- $\alpha$  지표의 변화를 측정, 관찰하였다.

부신 피질계 호르몬 중 하나인 Corticosterone은 스트레스 자극에 의해 분비량이 증가되는 데, 주로 혈청 중의 Corticosterone의 분비가 증가되는 것으로 알려져 있다<sup>32)</sup>.

본 실험에서 Corticosterone의 함량은 정상군의 경우  $1.56 \pm 0.31$  pg/ml인데 비해 대조군에서는  $2.53 \pm 0.13$  pg/ml를 나타내어 대조군이 유의한 증가를 나타내었고, 실

험군에서는 YJGS 50군에서  $1.89 \pm 0.15$  pg/ml, YJGS 200군에서  $1.76 \pm 0.12$  pg/ml로 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 1). 이는 윤조교심탕이 지속적인 스트레스 자극으로 인해 증가된 Corticosterone의 함량을 감소시킴으로써 항스트레스 효과를 보인다고 생각되며, 농도에 따른 효과는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Serotonin은 Melatonin의 전구체로 중뇌, 뇌교, 연수에 있는 봉선핵에 주로 분포하는 신경전달물질이다. 신경정신과적 치료의 측면에서 항불안, 항스트레스, 항우울, 항불면 등의 효과에 대한 연구가 많이 진행되고 있는 물질로 주된 작용은 수면에 대한 저항을 감소시켜 수면을 유도하고 식욕을 감소시키며 분비량이 증가 시 뇌의 활동을 자극하여 각성효과를 나타냄으로써 인지능력 및 집중력을 높이는 작용을 하나 분비량 감소 시 침정상태를 유발하며 우울증, 불안장애 등의 원인이 된다고 알려져 있다<sup>33,34)</sup>.

본 실험에서 Serotonin의 함량은 정상군의 경우  $1.00 \pm 0.04$  pg/ml, 대조군은  $1.15 \pm 0.04$  pg/ml로 정상군에 비해 대조군이 유의한 증가를 나타내었고, 실험군에서는 YJGS 100군에서  $0.97 \pm 0.06$  pg/ml, YJGS 200군에서  $1.04 \pm 0.03$  pg/ml로 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 2).

Melatonin은 수면과 관련된 대표적인 호르몬으로 송과선에서 생성, 분비되는데 멜라토닌합성효소(NAT)의 활성이 망막으로부터의 광(Light) 정보에 의해 저해되어 어두울 때 높아지고 밝을 때 낮아지는 변동을 보여 저녁 8시경부터 혈중 농도가 증가하여 새벽 1~3시 사이에 최고치에 이른 후 아침까지 점점 감소하여 낮 동안에는 낮은 농도를 유지하게 된다. 따라서 광주기를 감지하여 생식활동의 일주성, 연주성 등 생체리듬 생성에 중요한 역할을 하게 된다. 또한 Melatonin은 거의 모든 생명체에 존재하며 분자구조가 거의 동일하다고 알려져 있다<sup>35,36)</sup>.

본 실험에서 Melatonin의 함량은 정상군에서  $29.8 \pm 1.3$  pg/ml, 대조군에서  $22.7 \pm 2.8$  pg/ml로 대조군이 유의한 감소를 나타내었고, 실험군에서는 YJGS 50군에서  $48.8 \pm 8.8$  pg/ml로 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 3).

이를 종합해 볼 때, 윤조교심탕이 스트레스에 의해 증가된 Serotonin 함량을 감소시키고 감소된 Melatonin 함량을 증가시켜 수면 유도에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

또한 본 연구에서는 PCR 기법을 활용하여 BDNF와

TNF- $\alpha$ 를 관찰하였는데 BDNF는 신경영양인자 중에 하나로 신경세포의 생존과 분화에 관여하고, 중추신경계 및 말초신경에서의 신경 재생에 관여한다고 알려져 있으며<sup>37)</sup>, TNF- $\alpha$ 는 초기단계의 염증반응을 매개하는 역할을 하고, 염증반응, 면역반응 등 인체의 방어기전에 관여하는 대표적인 사이토카인으로 TNF- $\alpha$ 의 증가는 비정상적인 염증반응을 일으킨다고 알려져 있다<sup>38)</sup>.

윤조교심탕이 BDNF 활성에 미치는 영향을 관찰하였을 때 정상군은 136.6 $\pm$ 3.1 OD value, 대조군은 125.8 $\pm$ 2.1 OD value로 대조군이 유의한 감소를 나타내었고, 실험군에서는 YJGS 50군이 133.8 $\pm$ 2.2 OD value로 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 4). TNF- $\alpha$ 의 활성에 대한 영향은 정상군 120.2 $\pm$ 2.6 OD value, 대조군 131.2 $\pm$ 3.7 OD value로 대조군이 유의한 증가를 나타내었고, 실험군에서는 YJGS 50군이 120.7 $\pm$ 2.1 OD value로 대조군에 비해 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 5). 이는 潤燥交心湯이 BDNF 활성을 증가시키고, TNF- $\alpha$ 의 과도한 활성을 억제하여 만성 스트레스 자극으로 인해 발생하는 신경 손상 및 비정상적인 염증반응을 통제하여 항스트레스 효과를 나타낸다고 생각된다.

혈액학적 검사를 통한 각종 지표와 체중 변화의 결과는 다음과 같다.

Glucose 함량은 정상군에 비해 대조군이 유의하게 증가하였고, 실험군에서는 세 군 모두 대조군에 비하여 모두 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 6). 스트레스 자극 상황에서는 Corticosterone의 영향으로 인해 혈당이 증가되는데 윤조교심탕이 혈당 강하에 유의한 효과가 있는 것으로 생각되며 만성적인 스트레스로 인해 유발되는 성인병의 예방에도 좋은 효과가 있을 것으로 기대 된다.

한약제제의 안전성 확인을 위해 AST와 ALT 함량을 확인하였는데, 정상군과 대조군, 실험군에서 모두 유의한 차이가 없었고(Fig. 7), Leukocyte에서도 정상군과 대조군, 실험군에서 모두 유의한 차이가 없었다(Fig. 8). Erythrocyte와 Thrombocyte의 변화를 관찰하였을 때 Red Blood cell의 경우 대조군에 비해 YJGS 50, 200군이 유의한 증가를 나타내었고, Hemoglobin의 경우 대조군에 비하여 YJGS 100군이 유의한 증가를 나타내었으며, Platelet의 경우 대조군에 비해 세 군의 실험군 모두 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 10). 이는 보혈약 위주로 구성된 처방의 특성으로 인한 조혈

작용 강화로 각종 혈구 지표의 증가가 나타난 것으로 보인다.

윤조교심탕이 체중 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상군에 비하여 대조군은 유발 후부터 14일째까지 유의한 감소를 나타내었고, 실험군은 대조군에 비해 세 군 모두 유의한 차이를 나타내지 않은 것으로 보아(Table 3, Fig. 13), 윤조교심탕의 투여가 스트레스로 인한 체중 감소를 회복시키는 데에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과로 종합해 볼 때, 윤조교심탕의 경구 투여는 CMS 유발 흰쥐에 있어서 항스트레스 및 항불면 효과가 있는 것으로 사료된다. 다만 경구 투여 농도를 다르게 한 실험군들에서는 유의미하게 일정한 차이를 보이지 않아 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

## V. 결론

윤조교심탕의 용량별 경구 투여가 CMS 유발에 대하여 Corticosterone, Serotonin, Melatonin, BDNF, TNF- $\alpha$  및 혈액학적 변화에 미치는 영향을 관찰한 바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Corticosterone 함량에서 대조군에 비하여 YJGS 50군과 YJGS 200군이 유의한 감소를 나타내었다.
2. Serotonin 함량에서 대조군에 비하여 YJGS 100군과 YJGS 200군이 유의한 감소를 나타내었다.
3. Melatonin 함량에서 대조군에 비하여 YJGS 50군은 유의한 증가를 나타내었다.
4. BDNF 활성에서 대조군에 비하여 YJGS 50군은 유의한 증가를 나타내었다.
5. TNF- $\alpha$  활성에서 대조군에 비하여 YJGS 50군은 유의한 감소를 나타내었다.
6. 혈액 내 Glucose 함량에서 대조군에 비하여 YJGS 50군, YJGS 100군과 YJGS 200군 모두 유의한 감소를 나타내었다.
7. Leukocyte의 변화에서 각 실험군은 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았고, Erythrocyte 및 Thrombocyte에서 대조군에 비하여 Red blood cell의 경우 YJGS 50군과 YJGS 200군이 유의한 증가를 나타내었고, Hemoglobin의 경우 YJGS 100군이 유의한 증가를 나타내었으며, Platelet의 경우 YJGS 50군, YJGS 100군과 YJGS 200군 모두 유의한 증가를 나타내었다.

이상에서 볼 때 윤조교심탕은 스트레스 관련 호르몬을 감소시키며, 수면관련 호르몬을 증가시키는 효과가 있다고 판단되며, 보혈작용이 수면에 미치는 영향 및 기전에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

## REFERENCES

1. Park JJ, Lim LC, Seol IC. The consideration about the insomnia patient which sees as HRV. Daejeon University Korean medicine laboratory collection of dissertations. 2004;13(1):39-45.
2. Koh HJ. Stress management in primary care. The Journal of the Korean Academy of Family Medicine. 2000;21(2):125-36.
3. Lee GH. Modern Clinical Psychiatry. Seoul. Hanam. 1985;42, 148, 381, 498-501.
4. Brown, G.W. and J.L.T. Birley. Crisis and life changes and the onset of schizophrenia. Journal of Health and Human Behavior. 1968;9:203-14.
5. The textbook Compilation Committee of Neuropsychiatry of oriental medical schools in nation. The Neuropsychiatry of Oriental Medicine. Seoul. Jipmoondang. 2011:197-202, 252-5, 531-9.
6. Na CS and others. Korean medicine Home. Seoul. Eusungdang. 2004:463-4.
7. Noh YG. New Edit Byeongjeugimoon. Daejeon. Jumin publisher. 2005:311-2.
8. Lee JA, Kim JW, Hwang WW, Kwak SY, Kim MJ, Park EH. The effects of Quibitang on an Animal Model of Depression induced by Chronic Mild Stress. Journal of Oriental neuropsychiatry. 2001;12(1):123-35.
9. Kwon HJ, Kim KS, Kang SK, Park PS, Lim JM, Cho YS, Choi YH, Park SY. Antistress effect of Gagamsanzointang on rat chronic stress model. The Korea Journal of Herbology. 2012;27(6):29-35.
10. Jeong JH, Choi CM, Seo YJ, Cho HB, Kim SB. The Anti-depressive Effect of Samul-tanggahyangbuja on Chronic Mild Stress in Overiectomized Rats. Journal of Korean Obstet Gynecol. 2013;26(4):30-7.
11. Kang MG, Kim YH, Im AR, Nam BS, Chae SW, Lee MY. Antidepressant-like effects of *Nelumbo buciifera* leaves extract in chronic mild stress model. The Korea Journal of Herbology. 2014;29(2):7-13.
12. Kim SW, Kim JH, Cho MR, Shin JC. The Effect of Poria Cocos Pharmacopuncture at SP6(Sameumgyo) and ST36(Joksamni) on Chronic Stress Model(CSM) Rats. The Acupuncture. 2015;32(2):187-95.
13. Cho YS, Kim BK. Effects of Tianwangbuxin-dan, Wendan-tang, Guipi-tang on the expression of MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> melatonin receptors in C6 glial cells. Journal of Oriental neuropsychiatry. 2010;21(2):103-23.
14. Kim BRM, Yang DH, Kim BK. Effects of several herbs on the expression of MT1 and MT2 melatonin receptors in C6 glial cells. Journal of Oriental neuropsychiatry. 2007;18(1):15-36.
15. Kim KW, Kim JW, Whang WW, Kim HT, Park SK, Lee JR. The effects of punsimgieumgamibang on insomnia and Anxiety in Rat. Journal of Oriental neuropsychiatry. 2000;11(2):53-62.
16. Hu YS, Kim JW, Whang WW, Kim HT, Park SK, Kim HJ. The effect of punsimgieumgamibang on sleep disorder and emotionality in animals. Journal of Oriental neuropsychiatry. 2000;11(2):43-52.
17. Min HG. Clinical endocrinology. Seoul. Koryeo Medicine. 1999;5, 31, 450.
18. Choi WK, Lee KS, Joung HY, Lee YC, Sohn JH, Lee BH, Pyun KH, Shim IS. Low frequency noise induces stress responses in the rat. The Journal of Emotion and Sensibility. 2007;10(3):411-8.
19. Lss Sy, Choi JH, Jeong HS, Kim YK, Choi SI. Piperis Nigri fructus extract Ameliorates psychological stress in mice. Daejeon University Korean medicine laboratory collection of dissertations. 2013;21(2):95-104.
20. Selye H. Forty years of stress research. Principal remaining problems and misconceptions. Canada. Journal of Medical Association. 1976;115:53-6.
21. Stone EA. Stress and catecholamines. In A. J. Friedhoff (ed.). Catecholamines and Behavior. Plenum Press. New York. 1975;2:31-72.
22. Kwon BH, Lee SR. Effect of Samulanshintang on Rats stressed by Immobilization. Journal of Oriental neuropsychiatry. 1994;5(1):86.
23. Hong WS. Jeonggyo(精校) Hwangjenaehyeongyoungchu(黃帝內經靈樞). Seoul. Oriental Medicine Institution Press. 1985:158-9, 286.
24. Jineon(陳言). Jinmutaeksaminbang(陳無擇三因方) Second volume. Taipei. Daeryeongukpung(臺聯國風) Publisher. 1978:6.
25. Lee KW translation. Yeokhaebyeonjoo(譯解編注) Hwangjenaehyeongyoungsomun(黃帝內經素問). Seoul. Yeokang publisher. 2001:153-230, 339-432, 553-76.
26. Yang BC translation. Keumseok(今釋) Hwangjenaehyeongyoungchu(黃帝內經靈樞). Seoul. Hyundai Medical Publisher. 1987:513, 620.
27. Zhang PY. Chinese Internal Medicine. Beijing. Renminweishengchubanshe. 1996:218-22.
28. Editing commission of Herbology. Herbology. Seoul. Younglimsa. 2004:186-8, 233-4, 562-3, 628-35.
29. Choi GA, Cho SI, Kim KS, Choi CW, Wei TS, Yang SJ, Park SY, Kim KO. Effect of Banhahoobak-tang (Banxiahouputang) Extract(BHTe) on Psychological Stress. Journal of Oriental neuropsychiatry. 2015;26(2):117-30.
30. Willner P. The validity of animal models of depression. Psychopharmacology. 1984;83(1):1-16.
31. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild

- stress model of Depression : a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*. 1997;134(4):319-29.
32. Korean neuropsychiatric association. *Neuropsychology*. Seoul. Hana mpc. 1998:465-9.
  33. Koob GF. Corticotropin-releasing factor, Norepinephrine, and stress. Elsevier. 1999;1167-80.
  34. Leventhal AG, Wang YC, Pu ML, Zhou YF, Ma Y. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science*. 2003;300:812-5.
  35. Lee JY. The Influence of Acute Cerebral Infarction on the Circadian Rhythm of Melatonin Secretion . *Journal of the Korean Neurological Association*. 2001;19(4):359-63.
  36. Arendt J. Melatonin. *Clinical Endocrinology*. 1988;29: 205-29.
  37. Utley DS, Lewin SL, Cheng ET, Verity AN, Sierra D, Terris DJ. Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. *Archives of otolaryngology-head & neck surgery*. 1996;122(4):407-13.
  38. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:397-440.