



Original Article / 원저

구속 스트레스로 인한 동물모델의 행동학적 변화와 간 손상

양예진^{1,†}, 유영주^{1,†}, 김민정¹, 손재동¹, 오탈우^{2,*}, 박광일^{1,*}

¹경상국립대학교 수의과대학,
²한국한의학연구원 한의기술응용센터

Analysis of Restraint Stress-induced Behavioral Alteration and Liver Injury in Mice

Ye Jin Yang^{1,†}, Young Zoo You^{1,†}, Min Jung Kim¹, Jae Dong Son¹, Tae Woo Oh^{2,*},
Kwang Il Park^{1,*}

¹ Departments of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

² Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Background : Recent studies have shown that stress fundamentally influences the functional modulation of organ and stress-related disease causes high morbidity and mortality rates.

Objective : The present research investigated the effect of restraint stress on psychological and physiological responses.

Results : Body weight and food intake were changed in stress group. Body weight has continuously decreased, and food intake has been slightly altered. As a result of measuring each tissue's weight, the liver and kidney's weight loss was greater than that of other organs. The lipid profile of stressed animals showed significant increases in cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein (LDL), and high-density lipoprotein (HDL) levels compared to control. As hepatic marker enzymes, serum glutamic pyruvic transaminase (GPT; alanine aminotransferase), glutamic oxalacetic transaminase (GOT; aspartate aminotransferase), and lactic dehydrogenase (LDH) were increased in the stress group. However, levels of serum cortisol and corticosterone did not affect. Results of the behavioral tests show that the stress group has increased activity, sluggish movements, and anxiety in the central part compared with the control group through the open field test. In the forced swim test, the stress group models had a longer duration of slowing movement, and its rate also increased. Also, in immunoblotting, stress increased the inflammatory factors Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and activated the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway.

© 2024 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusions : We observed that mouse model were affected behavioral response and liver injury when exposed to restraint stress, indicating the importance of the restraint stress in the development of psychological and physiological processes.

Key words : Restraint-stress, Behavioral change, Inflammation, Liver injury

I. 서론

스트레스의 요인(stressor)은 물리적, 화학적, 정신적, 사회적 요인과 더불어 신체의 심혈관계 및 대사장애를 유발시키는 요인인 저혈당, 출혈, 과도한 운동 등으로 인해 여러 스트레스가 혼합된 상태로 나타난다¹. 스트레스는 신체의 여러 부분에 영향을 미쳐 두통, 복통, 속쓰림, 피로, 과식 등의 다양한 생리적 변화를 가져온다^{2,3}. 최근, 현대 사회가 발전함에 따라 일상 업무와 생활에서 받는 과도한 압박감과 스트레스로 인한 간 손상 발생률이 급격히 증가하고 있다⁴.

한의학에서는 간은 혈액과 체액의 흐름, 비기의 상승 및 위기의 하강, 정서 활동의 조절 및 사정을 촉진하는 역할을 하며, 자유로운 기의 흐름을 관장하는 것으로 알려져 있다. 즉, 신체를 활성화하고 추진하며 따뜻하게 하는 것으로 여겨지는 기(에너지)는 간의 조절에 달려있기에⁵, 간은 스트레스의 표적기관이다⁶. 스트레스 자극을 받은 간은 기의 흐름이 정체된다. 간의 기가 정체되면 간의 글루코스 신생합성 및 글리코겐 저장을 포함하는 에너지 생산 과정에서 스트레스로 인한 당질 코르티코이드의 증가와 자유 라디칼 생성 촉진으로, 결국 간의 염증 및 손상이 유발된다⁷. 이전 연구에서는 급성 스트레스에 따른 세포내 간 효소, ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase)의 혈장/혈청 수치 상승 외에도 산화 스트레스, 염증 및 간세포 세포 apoptosis marker의 증가는 간 손상과 일치한다고 보고하였다⁸.

간 기 흐름의 정체는 정신적 부조화의 결과를 가져오게 되는데^{9,10}, 반복적인 스트레스로 인한 간

기의 정체는 우울증의 발병에 기여한다¹¹. 과도한 스트레스로 코르티코스테론 및 코티솔과 모노아민의 불균형으로 시상하부-뇌하수체-부신(HPA) 축의 교란은 우울증 발병의 주요원인이다¹². 우울증은 기분, 신체적, 인지적 증상의 장애를 포함한다. 우울증의 증상으로 식욕부진이나 과식, 신체적 불편함과 같은 신체적 장애, 기억력 상실과 같은 인지장애, 우울한 기분과 과민성을 포함한 기분장애, 감소된 자아 정체감에 대한 부정적인 생각 등으로 나타난다⁹. 더불어 우울감과 의욕의 저하를 주요 증상으로 다양한 인지 및 정신 신체적 증상을 일으켜 일상생활에 기능의 저하를 가져오는 질환이며, 불행히도 현대사회가 고도화되어 감에 따라 현대인의 우울증세는 과도한 스트레스로 인하여 비약적으로 증가하고 있는 추세이다¹. 앞서 언급한 대사 관련 질환 중 하나인 비알콜성 지방 간 질환과 우울증은 복부비만, 당뇨병, 만성 전신 염증 등 여러 위험인자를 공유하고 있다¹³. 그러므로 만성 간 질환에서 우울증이 심해질수록 자가간호 이행 정도가 낮아지고, 일상생활수행능력이 저하된다. 이는 합병증 발생을 높이게 되는 원인이 된다. 그러므로 간 기를 원활하게 만드는 것이 우울증이나 불안증 치료에 있어 중요한 핵심이다¹⁴. 본 연구에서는 스트레스로 인한 간 염증 및 손상 정도를 확인하고, 간 기의 흐름이 정서에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 동물모델

실험동물은 6주령 수컷 ICR 마우스(26-32g)를

†These authors contributed equally to this work

*Corresponding author: Tae Woo Oh, Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Cheomdan-ro 70, Dong-gu, Daegu, 41062, Republic of Korea.

E-mail : taewoo2080@kiom.re.kr

*Corresponding author: Kwang Il Park, Departments of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52828, Republic of Korea.

Tel : +82-55-772-2342, Fax : +82-55-772-2349, E-mail : kipark@gnu.ac.kr

•Received : August 7, 2024 / Revised : August 16, 2024 / Accepted : August 20, 2024

샘타코 주식회사 (Osan, Korea) 에서 구입하여 사용하였다. 동물은 실험 당일까지 고품사료(Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 물을 제한없이 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 실험동물은 자유식이 하면서 온도 20-23°C, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle이 유지된 환경에서 7일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 연구의 동물 실험에 관한 모든 사항은 한국 한의학 연구원 (KIOM; Daegu, Korea)의 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)에서 승인 번호 D-16-015로 승인되었으며, KIOM의 IACUC 지침을 준수하여 수행되었다.

2. 동물 실험 설계

실험동물을 공급받은 뒤 1주일동안 새로운 실험실 환경에 적응하도록 하였다. 적응 기간을 거친 후 한 그룹 당 5마리씩 무작위로 선정하여 2개의 실험

그룹으로 분류하였다. 정상군 (Stress-)은 ICR 마우스에 아무런 처리하지 않았고, 실험군 (Stress+)은 C57BL/6J 마우스를 6시간 동안 구속 스트레스를 부여하였다 (Table 1). 구속 스트레스는 50 mL의 실험용 튜브 (Conical tube, SPL life science)의 끝에 환기를 위한 구멍을 뚫고 실험동물을 한 마리 씩 넣어 움직임을 제한하는 방식으로 부여하였다. stress-군을 제외한 모든 실험동물은 오전 9시부터 오후 3시까지 하루 6 시간씩 7일동안 연속으로 같은 시간에 구속 스트레스를 부여하였다. 실험기간동안 실험동물에게서 부작용은 나타나지 않았다. 실험동물의 체중과 음식 섭취량은 구속 스트레스에 노출되기 직전에 측정되었으며, 구속 스트레스에 노출된 후 그들의 케이지에 다시 돌려 보냈다. 실험 종료 당일 마취 후, 복대 정맥에서 혈액을 채취하여 보관하였으며, 실험동물의 간 조직은 적출하여 -80 °C에 보관하였다.

Table 1. Treatments group and control group (n=5)

Group	
Stress-	Control group
Stress+	Restraint-induced stress during 6 hours

3. 혈청 생화학적 검사

실험동물의 복대정맥으로부터 1 mL 이상의 혈액을 채혈하여 얻은 후 원심분리기를 사용하여 4 °C에서 10 분간 12000rpm으로 혈청을 분리하였다. 혈청 중 간 손상 마커인 glutamic pyruvic transaminase (GPT; alanine aminotransferase), glutamic oxalacetic transaminase (GOT; aspartate aminotransferase)는 ELISA kit를 사용하여 분석하였다. 그리고 lactate dehydrogenase (LDH)는 Analysis kits(Point Scientific Inc., Canton, MI, USA)와 Automated blood chemistry analyzer (Photometer 5010, Robert Riele GmbH & Co KG, Berlin, Germany)를 사용하여 분석 하였다. 또한 enzyme-linked immunosorbent assay (R&D System, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 스트레스 지표로서 혈청 내 cortisol과 corticosterone 수치를 측정하였다.

4. 오픈 필드 테스트 (Open Field Test, OFT)

가로, 세로, 높이가 각각 30cm × 30cm × 30cm인

정사각형 모양의 상자 틀에 어두운 조명을 중앙으로 배치하여 그림자가 생기지 않도록 위치한 뒤 Video tracking system (SMART V3.0)을 활용하여 행동 측정을 하였다. 실험을 시작함과 동시에 상자의 중앙에 실험동물을 내려놓은 다음, 실험동물이 이동한 거리를 30 분 동안 기록하였고, 상자 틀 안의 영역을 임의로 나누어 실험동물의 움직임의 정도 및 각 영역에서 머문 정도 (중앙 영역에서 총 거리, 소요 시간 및 소요 거리)를 측정하였다.

5. 강제수영검사 (Forced Swim Test, FST)

강제수영검사를 통해 스트레스에 따른 행동변화를 확인하기 위해 먼저, 원형 실린더 (직경 20cm × 깊이 40cm)에 온도 25±1 °C 물을 채웠다. 모든 실험동물이 FST실험을 실시하기 전 물 속에서15분 동안 예비수영을 통해 물에 적응하도록 하였다. 24시간 후, FST실험 직전, 테스트 세션으로 실험동물을 동일한 원형 실린더에5분 동안 두어 강제수영을 실시하였다. 실험동물의 행동은 5분 동안 Video tracking system (SMART

V3.0)을 사용하여 5초마다 한 번씩 촬영하였다. 이후 5분 동안 수영 동작 혹은 기어오르는 동작없이 단순히 떠있는 동작이나 고개를 드는 것과 같은 최소한의 동작만을 취한 부동자세 (immobility), 미세한 움직임 (low act)과 격렬한 움직임 (high act)을 취한 시간과 빈도를 측정하였다.

6. Immunohistochemical (IHC) staining

냉동 보관된 마우스의 분리된 간 조직의 일부를 10% paraformaldehyde(Sigma Aldrich, MO, USA)에 고정시킨 후 파라핀에 매립하고, 냉동 절편기인 microtome (Thermo fisher scientific, Germany)으로 4 μ m의 얇은 두께로 조직을 절단하여 조직 표본을 제작하였다. 그리고 에탄올을 농도별로 설정하여 수화과정을 수행하였다. 그리고 면역조직화학(IHC) 염색은 F4/80 다중 클론 항체(Polyclonal antibodies, 1:50; Santa Cruz, USA)를 사용하여 염색하였다. 면역조직학적 변화는 광학 현미경으로 관찰하였다.

7. Western blot

마우스의 분리된 간 조직을 radioimmunoprecipitation assay(RIPA) buffer를 넣고 tissue grinder (BioSpec Product, Oklahoma, USA)로 분쇄하였다. 이후 12,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액을 취해 용해물(lysate)를 얻은 후 BCA assay 를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 10% SDS-polyacrylamide gel에 동일한 양의 단백질 20 μ g을 로딩하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 수행하였다. 그리고 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 옮겨 준 뒤, 0.1% tween 20이 포함된 tris-buffered saline(TBS) 용액을 이용하여 만든 5% skimmed milk

로 4 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 blocking하였다. 그 후 각각의 1차 antibody를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시킨 후 tris buffered saline with tween 20 (TBS-T)로 7분마다 4회 세척하였다. 그 다음 각각의 1차 antibody에 상응하는 2차 antibody를 사용하여 상온에서 2시간 반응시킨 후, TBS-T로 7분마다 4회 세척하였다. 최종 측정 은 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액에 노출시킨 후 단백질을 검출하였다.

8. 통계처리

모든 실험 결과는 mean \pm standard error of the mean (SEM) 또는 Standard deviation (SD) 으로 표시되었다. 통계 처리는 GraphPad Prism프로그램을 이용하였고, One-way analysis of variance(ANOVA) 또는 Two-way ANOVA로 통계적 유의성을 검정하였다. 그리고 p의 값이 0.05미만일 때 통계적 유의성을 가진다고 판정하였다.

III. 결과

1. 구속 스트레스로 인한 체중 및 섭취 변화

구속 스트레스를 부유한 기간 동안 스트레스를 부유하기 전 체중과 먹이 섭취량을 측정하였다. 실험동물을 7일 동안 구속 스트레스에 노출시키는 동안 Stress-그룹과 stress+그룹의 체중 변화는 구속 스트레스 1일에는 변화를 보이지 않았지만, 2일부터 stress+ 그룹의 체중은 stress- 그룹의 체중과 비교하여 유의적으로 감소됨을 확인하였다. (Figure. 1A) 그리고 실험동물의 먹이 섭취량을 측정한 결과, 실험이 진행되는 4일 동안 stress+ 그룹의 섭취량이 감소하였다가, 다시 증가하여 stress- 그룹과 비슷하거나 증가됨을 보였고, 이후 다시 감소하였다 (Figure. 1B).

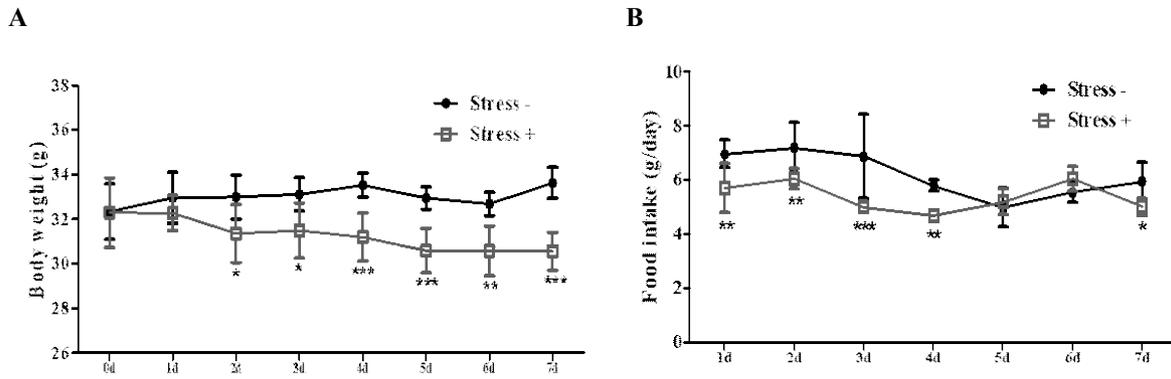


Figure 1. Changes in body weight and food intake in restraint-induced stress model. (A) Changes in body weight in the restraint-induced stress model. (B) Changes in food intake in the restraint-induced stress model. Data were analyzed for statistical significance using analysis of variance, followed by Two-way ANOVA test used GraphPad Prism. Differences were considered statistically significant as follows, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the stress- group.

2. 구속 스트레스로 인한 조직 무게 변화

구속 스트레스로 인해 stress+ 그룹의 간, 신장, 뇌 조직의 무게가 감소하였고, 비장의 무게는 증가하였다.

실험동물의 전체 체중 중 간, 신장, 비장의 조직이 차지하는 비율은 감소하였지만, 뇌 조직이 차지하는 비율은 증가하였다 (Table 2).

Table 2. Effects of restraint stress on tissue weights

Tissue weight	Treatment	
	Stress -	Stress +
Liver weight (g)	1.87 ± 0.14	1.59 ± 0.08**
Liver weight (% body weight)	5.56 ± 0.45	5.20 ± 0.32
Kidney weight(g)	0.53 ± 0.04	0.45 ± 0.04*
Kidney weight (% body weight)	1.59 ± 0.14	1.48 ± 0.15
Spleen weight(g)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.06
Spleen weight (% body weight)	0.33 ± 0.04	0.31 ± 0.03
Brain weight(g)	0.48 ± 0.02	0.46 ± 0.02
Brain weight (% body weight)	1.44 ± 0.04	1.51 ± 0.11

The results presented are mean ± SD. Data were analyzed for statistical significance using analysis of variance, followed by Two-way ANOVA test used GraphPad Prism. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus the stress- group.

3. 구속 스트레스로 인한 혈청 내 혈액 변화
구속 스트레스로 인한 간 손상 정도를 알기 위해 혈청 내 변화를 측정한 결과, stress+ 그룹에서 혈중

Lactate Dehydrogenase (LDH)가 현저하게 증가한 것을 확인하였다.

Table 3. Effects of restraint stress blood parameter

Blood parameter	Treatment	
	Stress -	Stress +
AST (IU/L)	250.0 ± 22.4	368.2 ± 15.1
ALT (IU/L)	120.0 ± 9.4	154.5 ± 8.8
ALP (IU/L)	390.0 ± 12.7	320.5 ± 28.0
ALB (g/dL)	18.5 ± 0.6	18.4 ± 0.5
TC (mg/dL)	625.0 ± 45.4	668.2 ± 27.2
LDL (mg/dL)	58.0 ± 4.6	72.5 ± 3.1
HDL (mg/dL)	547.0 ± 45.9	560.0 ± 19.5
TG (mg/dL)	555.0 ± 39.8	640.9 ± 41.5
CREA (mg/dL)	2.5 ± 0.0	2.5 ± 0.0
UREA (mg/dL)	124.5 ± 5.0	100.2 ± 5.6
TP (g/dL)	27.0 ± 0.5	26.1 ± 0.6
LDH (IU/L)	4305.0 ± 547.6	6129.5 ± 397.9***

The results presented are mean ± S.E. Data were analyzed for statistical significance using analysis of variance, followed by Two-way ANOVA test used GraphPad Prism. Differences were considered statistically significant as follows, ***p < 0.001 versus the stress- group.

4. 구속 스트레스로 인한 간 손상
구속 스트레스로 유도된 간 손상에 대한 영향을 알아보기 위해 혈청 내 GPT 및 GOT 수치를

측정하였다. Stress+그룹과 Stress-그룹을 비교하였을 때, 혈청 내 GPT 및 GOT 수치가 증가하였다 (Figure. 2A and 2B).

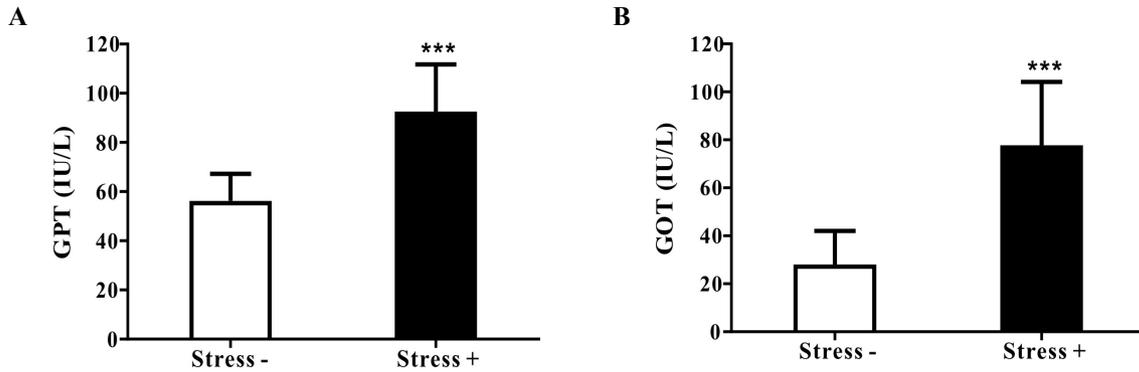


Figure 2. Effects of restraint-induced stress hepatic damage in mice. (A) Effects of restraint stress on serum GPT level. (B) Effects of restraint stress on serum GOT level. The results represent the mean \pm SEM values of each mouse in the same group, *** $p < 0.001$ versus the stress- group. Karman Unit * 0.48 = IU/L.

5. 구속 스트레스로 인한 cortisol 및 corticosterone 수치
 구속 스트레스의 생리학적 영향을 평가하기 위해
 혈청 cortisol과 corticosterone의 수치를 측정하였다.
 구속 스트레스 유도로 인해 혈청 내 cortisol과

corticosterone 농도를 측정한 결과, 혈청 내 cortisol과
 corticosterone 모두 stress-그룹과 비교하였을 때,
 유의성 있는 감소를 나타내지 않았다 (Figure. 3A and 3B).

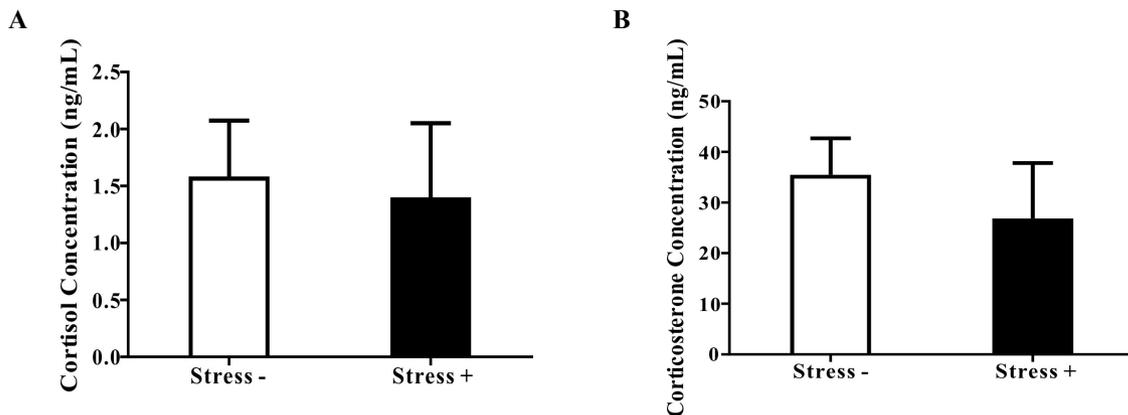


Figure 3. Cortisol and corticosterone levels in sera collected from restraint-induced stress models. (A) Level of cortisol in blood serum (B) Level of corticosterone in blood serum. Data were analyzed for statistical significance using analysis of variance, followed by One-way ANOVA test used GraphPad Prism, not significant versus the stress- group.

6. 구속 스트레스로 인한 행동 변화
 구속 스트레스가 행동 변화에 미치는 영향을 확인하기

위해 오픈 필드 테스트 (OFT)와 강제수영검사 (FST)를
 수행하였다. 먼저, 오픈 필드 테스트를 실시하여

움직임의 정도와 머문 영역을 측정한 결과, stress- 그룹에 비해 stress+ 그룹에서 한 영역에서 머문 정도가 현저하게 감소하였고, 움직임은 눈에 띄게 느려진 것을 확인하였다. 이 뿐만 아니라 평균적으로 상자 틀의 중앙 영역에서 오랫동안 머물렀고, stress- 그룹에 비해 가장자리영역에서의 머문 시간이 현저히 감소하였다. (Figure. 4A and 4B) 다음은 강제수영검사를 실시하여

물 속에서 움직임의 지속률과 시간을 측정한 결과, 움직임이 없는 상태의 부동자세를 취한 시간과 비율이 감소함을 보였지만, stress- 그룹과 stress+ 그룹 간의 유의성은 보이지 않았다. 그리고 느린 행동의 지속률과 시간은 측정한 결과, stress+ 그룹에서 약간의 증가함을 보였지만 이 또한 두 그룹 간의 유의성 있는 변화는 보이지 않았다 (Figure 4C and 4D).

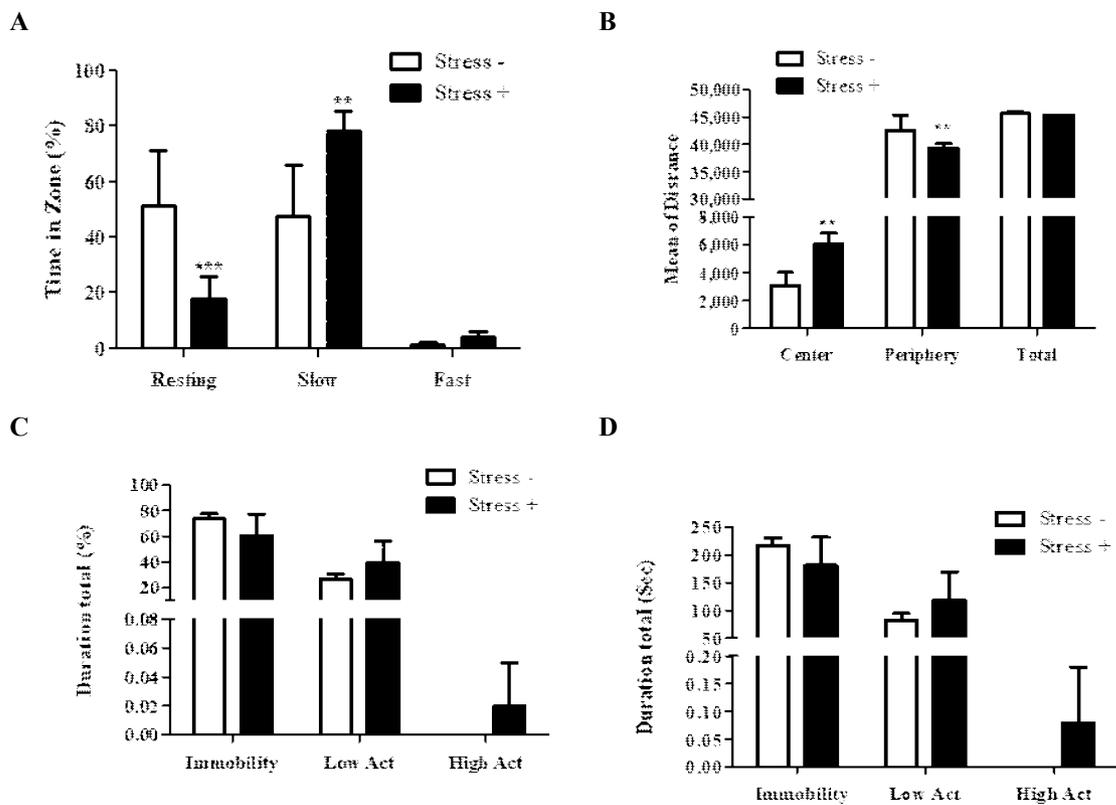


Figure 4. Neurobehavioral changes observed in the open field test (OFT) in restraint-induced stress models. (A) Mice spent less time in the center and periphery of the open field, while also displaying movement in all zones. (B) Distance traveled by mice in the center and periphery of the open field. Forced swim test (FST) in the restraint-induced stress models. (C) Immobility duration in the FST. (D) Total duration of movement during 5 min (s). Data were analyzed for statistical significance using analysis of variance, followed by Two-way ANOVA test used GraphPad Prism. Differences were considered statistically significant as follows, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus the stress- group, $n = 5$ mice per group.

7. 구속 스트레스가 유도된 동물 모델에서의 간 손상 및 염증 반응

구속 스트레스를 부여하였을 때 실험 동물의 간에서 macrophage infiltration에 미치는 영향을 확인하기

위해 간 조직에 IHC를 실시하였다. 광학 현미경을 이용하여 관찰한 결과, stress+ 그룹에서 염증성 세포인 macrophage의 infiltration이 증가한 것을 확인하였다 (Figure 5).

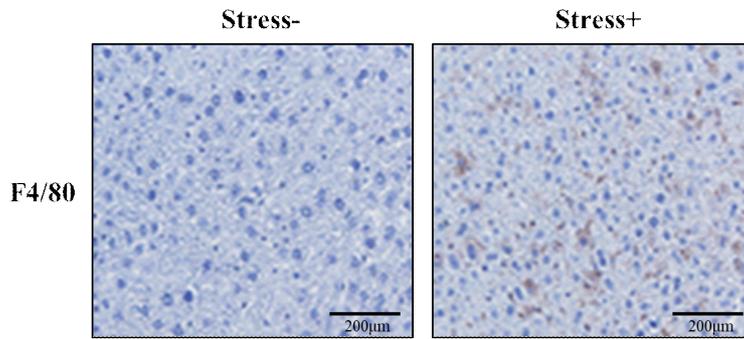


Figure 5. Effects of restraint-induced stress hepatic damage in mice. Immunohistochemistry change (200 × magnification, scale bar : 200 µm)

8. 구속 스트레스가 유도된 MAPK 신호 경로

스트레스가 간에 미치는 영향을 확인하기 위해 단백질 발현량을 측정하였다. 그 결과, 염증 지표인 Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)가 stress+ 그룹에서 stress- 그룹에 비해 증가하였다. 또한, 염증경로인

mitogen-activated protein kinase (MAPK) 관련 단백질인 phosphorylation of ERK (p-ERK) 및 phosphorylation of JNK (p-JNK)의 발현량이 증가하였다 (Figure 6). 이것을 통해 스트레스는 MAPK 경로를 통해 간에 염증반응을 유발한 것을 확인하였다.

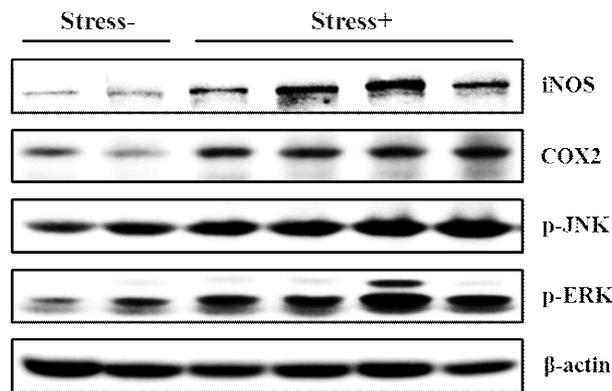


Figure 6. Effects of inflammation-related protein expression. iNOS, COX-2, p-JNK and p-ERK in restraint-induced stress models were measured by Western blot in the liver tissue. Expression of iNOS, COX-2 were increased in stress+ group compare to stress- group. And the phosphorylation of JNK and phosphorylation of ERK were related MAPK signaling increased in stress+ group.

IV. 고찰

스트레스의 실험동물 모델로서 실험동물을 장기간 자유롭게 움직일 수 없도록 구속시키는 방법이 널리 이용되고 있다^{15,16}. 본 연구에서는 수컷 ICR 마우스를 이용하여 스트레스모델을 제작하고, 혈액분석 및 간 손상의 영역에서 면역화학염색을 통해 간 손상 정도를 확인하고, MAPK 경로를 통한 관련 단백질 발현 변화량을 확인하였다. 또한, 구속 스트레스로 인한 간 기 정체로 인한 우울 및 불안과 같은 정서적 변화가 행동양상에 미치는 영향을 확인하기 위해 OFT와 SWT를 진행하였다. 스트레스는 간 기 정체와 밀접한 관련이 있다^{5,17}. 간 기 정체는 기가 몸 전체로 원활하게 흐르지 못하는 것을 의미하며, 혈액을 마르게 하는 열 또는 기의 고갈에 따른 감정적 원인에서 비롯된다. 또한, 시간이 지남에 따라 지속될 때 기의 정체로 인해 혈액의 응축, 건조 및 열의 흐름 억제와 기와 양의 공허함은 움직임의 부족함을 초래한다^{4,18}. 마우스에 구속 스트레스를 반복하여 노출시킨 결과, 실험동물의 체중 감소가 뚜렷하게 나타나는 것으로 보아, 반복되는 구속 스트레스가 체중 감소와 더불어 신체발달에 나쁜 영향을 초래하는 결과로 보여진다 (Figure 1). 그리고 GPT와 GOT는 간 손상 마커로서⁶, 간세포성 질환 및 간염과 같은 질환의 유무를 확인할 수 있다. GOT의 경우 간, 신장, 뇌 등과 같이 다양한 곳에 존재하고, GPT의 경우, 주로 간에 존재한다¹⁹. stress+그룹에서 GPT 및 GOT의 수치와 실험동물의 전체 몸무게 중 뇌 조직 무게의 비율이 증가한 것으로 스트레스는 체중감소와 각각의 장기의 손상을 초래한다는 점을 알 수 있다 (Figure 2 and Table 2). 또한, 스트레스에 노출된 마우스의 간에서 간 염증성 마커인 F4/80가 증가된 것을 통해 스트레스가 간에 직접적인 영향을 미치는 것을 확인하였다^{20,21} (Figure 5).

스트레스 장애는 주요 우울증 유발의 근본적인으로, HPA 축 활성화 및 고코르티솔 혈중은 스트레스 호르몬, CRH 및 ACTH 분비 증가를 의미한다²². 그러므로 cortisol은 스트레스 바이오마커 물질로, 급성 스트레스시 증가한다. 하지만 본 연구의 스트레스 호르몬인 cortisol과 corticosterone의 유의미한 증가는 미미하였다 (Figure 3). 7일 이상의 장 기간동안 구속 스트레스를 유도한 만성모델에서는 간 스트레스 지표인 cortisol과 corticosterone의 유의미한 변화가 있을

것으로 예상된다²³ (Figure 4). 또한, Stress+ 그룹에서 간 세포 손상의 지표인 LDH가 현저하게 증가하고 TP가 감소된 것으로 생리적 기능장애가 유발된 것을 확인하였다 (Table 3). 그리고 Stress+ 그룹에서 HDL이 상승했지만 TC, LDL, TG 수치는 증가하는 이상지질혈을 보였다. 그리고 CREA의 수치는 변화가 없고, UREA는 stress+ 그룹에서 감소된 것으로 보아 신장 기능의 문제가 아닌 간기능 감소로 요소 급성에 문제가 있는 것으로 보인다 (Table 3). 본 연구의 행동 관련 실험 결과, 호르몬 농도의 변화는 미미하였지만 (Figure 4), 우울증 상태와 비슷한 행동 양상이 확인되었다^{5,14}.

반복적인 스트레스는 면역 체계를 과도하게 활성화하여 염증과 항 염증 사이의 불균형을 초래한다. 특히, 스트레스로 인해 초래된 우울증의 생물행동적 메커니즘은 질병을 가속화할 수 있다²⁴. 활성화된 스트레스 경로는 염증을 시작하거나 악화시킬 수 있으며, 세포사멸에 의한 간 세포 사멸 및 간 손상을 초래한다. 조직 대식세포는 신체의 모든 조직에 존재하는 이질적인 세포 집단으로, 항상성을 유지하고 해로운 자극에 대한 반응으로 면역 활성화를 유발한다²⁵. F4/80은 마우스의 대식세포를 표적으로 하는 단일클론 항체로써, 마우스 대식세포의 고유한 마커로 확립되었다^{25,26}. MAPK 경로는 우울증과 관련된 가장 중요한 신경 전달 물질인 세로토닌 막 수송체의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다²². MAPK 패밀리는 세포 외 수용체 kinase (ERK), c-Jun N-말단 kinase/스트레스 활성화 단백질 kinase (JNK/SAPK) 및 p38 MAP kinase로 구성된다²⁷. MAPK 신호 전달 경로는 전 염증성 매개체의 발현에 중요한 것으로 알려져 있는데, 주로 염증 및 세포 사멸과 같은 세포 스트레스의 매개체 역할을 한다^{28,29}. 구속 스트레스로 인한 산화스트레스는 간 손상을 유발하는데³⁰, 과도한 ROS의 증가는 MAPK 신호 경로와 여러 염증성 사이토카인을 활성화시킨다²⁷. 본 연구결과에서 급성 혹은 만성 염증에서 증가하는 F4/80 macrophage가 조직에서 증가하였고, MAPK 신호전달을 통해 염증 인자들이 증가한 것을 확인하였다 (Figure 5 and 6). 이것은 스트레스로 인한 간 기 흐름이 원활하지 못해 열이 머물게 되고 그것으로 인해 염증반응이 유발되었다는 것을 의미한다³¹⁻³³. 그러므로 간 기의 순환을 촉진하는 것은 질병 완화를 위한 염증 반응



억제와 관련이 있다^{34,35}. 많은 연구를 통해 다양한 약초들의 간 기 순환 효능이 입증되었다. Bupleurum Chinense DC 는 면역조절을 통해 항균 및 항바이러스 사이토카인의 분비를 조절하여 염증 증상 및 질병을 조절하며, 혈액 및 체액의 순환 개선하였다. 그리고 Cyperi Rhizoma, Chaihu-Shugan-San는 감정 불안 및 간 기 정체를 개선한다고 보고되었으³⁴⁻³⁶, Citrus folium는 향종양 및 간 기 정체로 인한 우울증을 완화한다고 보고되었다³⁷. 불안감 해소 및 간 기 순환 효능을 가진 새로운 약초들의 발견은 간 질환과 그에 따른 합병증을 예방 및 개선하는데 중요한 전략이 될 수 있다.

본 연구는 스트레스가 우울증과 같은 행동 변화를 유발하고 간 기 정체와 같은 간 기능에 영향을 미치는 것을 확인했다. 이러한 결과를 통해 간 기 정체는 부정적인 감정에 의해 악화되는 전신의 만성 통증, 불행함, 두통, 불면증, 심계항진, 식욕 부진, 하복부 통증, 식욕부진, 창백한 안색, 촉박한 맥박 등의 다양한 질환의 전조증상을 야기한다. 본 연구 결과를 통해 스트레스로 인해 발생하는 간 기 정체를 해결하기 위해 간 기 순환이 중요성이 요구된다. 간을 조화시키고, 감정을 부드럽게 하고, 간혈 및 비장을 강화하는 것과 같은 간 기 순환을 원활히 하는 새로운 치료법은 다양한 질환의 예방 및 증상 완화를 촉진할 수 있음을 시사한다.

V. 결론

결론적으로 반복적인 스트레스는 마우스의 간 기 정체를 유발하여, 간 염증 및 손상을 가져왔고, 이것으로 인한 불안장애 및 우울감으로 인한 행동 양상의 변화를 확인하였다. 즉, 간 기의 흐름은 정서적 변화를 야기시키는 것으로 사료되므로, 원활한 간 기 흐름은 정서적 변화 및 관련 대사 질환을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

This research was funded by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) and supported by the Ministry of Education (NRF-2022R111A3053818), Republic of Korea.

References

1. Park, H.J.; Shim, H.S.; Park, S.; Shim, I. Antidepressant effect and neural mechanism of *Acer tegmentosum* in repeated stress-induced ovariectomized female rats. *Animal Cells and Systems (Seoul)* 2020; 24: 205.
2. Woo, H.; Hong, C.J.; Jung, S.; Choe, S.; Yu, S.W. Chronic restraint stress induces hippocampal memory deficits by impairing insulin signaling. *Molecular Brain* 2018; 11: 37.
3. Park, S.H.; Jang, S.; Lee, S.W.; Park, S.D.; Sung, Y.-Y.; Kim, H.K. *Akebia quinata* Decaisne aqueous extract acts as a novel anti-fatigue agent in mice exposed to chronic restraint stress. *Journal of Ethnopharmacology* 2018; 222: 270.
4. Li, X.J.; Qiu, W.Q.; Da, X.L.; Hou, Y.J.; Ma, Q.Y.; Wang, T.Y.; Zhou, X.M.; Song, M.; Bian, Q.L.; Chen, J.X. A combination of depression and liver Qi stagnation and spleen deficiency syndrome using a rat model. *The Anatomical Record (Hoboken)* 2020; 303: 2154.
5. Liu, M.F.; Jiang, Y.; Wang, X.M.; Liu, Q.S.; Wu, H. The Role of Rumination and Stressful Life Events in the Relationship between the Qi Stagnation Constitution and Depression in Women: A Moderated Mediation Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017; 2017.
6. Aziz, N.M.; Ragy, M.M.; Ahmed, S.M. Somatostatin analogue, Octreotide, improves restraint stress-induced liver injury by ameliorating oxidative stress, inflammatory response, and activation of hepatic stellate cells. *Cell Stress Chaperones* 2018; 23: 1237.
7. Wang, H.; Zhao, Y.; Zhang, Y.; Yang, T.; Zhao, S.; Sun, N.; Tan, H.; Zhang, H.; Wang, C.; Fan, H. Effect of Chlorogenic Acid via Upregulating Resolvin D1 Inhibiting the NF- κ B Pathway on Chronic Restraint Stress-Induced Liver Inflammation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2022; 70:

- 10532.
8. Spiers, J.G.; Steiger, N.; Khadka, A.; Juliani, J.; Hill, A.F.; Lavidis, N.A.; Anderson, S.T.; Cortina Chen, H.J. Repeated acute stress modulates hepatic inflammation and markers of macrophage polarisation in the rat. *Biochimie* 2021; 180: 30.
 9. Zhuang, W.; Liu, S.L.; Xi, S.Y.; Feng, Y.N.; Wang, K.; Abduwali, T.; Liu, P.; Zhou, X.J.; Zhang, L.; Dong, X.Z. Traditional Chinese medicine decoctions and Chinese patent medicines for the treatment of depression: Efficacies and mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology* 2023; 307: 116272.
 10. Hempen, C.-H.; Fischer, T. XV - Tonifying herbs. In *A Materia Medica for Chinese Medicine*, Hempen, C.-H., Fischer, T., Eds.; Churchill Livingstone: Edinburgh, 2009; pp. 695.
 11. Choi, J.E.; Park, D.M.; Chun, E.; Choi, J.J.; Seo, J.H.; Kim, S.; Son, J.; Do, M.; Kim, S.Y.; Park, Y.C.; et al. Control of stress-induced depressive disorders by So-ochim-tang-gamibang, a Korean herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2017; 196: 141.
 12. Wang, H.; Bin, W.; Pan, M.B.; Jiang, S.T.; Wang, Y.C.; Zhu, Y.; Zhang, Q.C.; Dong, Y.F. Disorders in the gut and liver are involved in depression contagion between isosexual post-stroke depression mice and the healthy cohabitators. *Behavioural Brain Research* 2023; 439: 114246.
 13. Gu, Y.; Zhang, W.; Hu, Y.; Chen, Y.; Shi, J. Association between nonalcoholic fatty liver disease and depression: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Journal of Affective Disorders* 2022; 301: 8.
 14. Zhang, J.; Liu, Y.; Xu, Y. Soothing liver-qi stagnation method for cancer-related depression: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2020; 99: e22797.
 15. Yang, X.; Han, Z.P.; Zhang, S.S.; Zhu, P.X.; Hao, C.; Fan, T.T.; Yang, Y.; Li, L.; Shi, Y.F.; Wei, L.X. Chronic restraint stress decreases the repair potential from mesenchymal stem cells on liver injury by inhibiting TGF-beta1 generation. *Cell Death & Disease* 2014; 5: e1308.
 16. Bao, L.; Yao, X.S.; Yau, C.C.; Tsi, D.; Chia, C.S.; Nagai, H.; Kurihara, H. Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract on restraint stress-induced liver damage in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56: 7803.
 17. Sun, K.B.; Sun, R. [Study on construction of rat model of acute pancreatitis with syndrome of liver depression and Qi stagnation]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2020; 45: 5732.
 18. Huang, X.; Xu, L.; Li, Y.; Song, M.; Zhan, D. Clinical study on the efficacy of self-designed elimination soup in the accumulation of qi stagnation and blood stasis based on transient elasticity of liver and spleen. *Minerva Medica* 2024; 115: 100.
 19. Chen, W.; Wang, W.; Zhou, L.; Zhou, J.; He, L.; Li, J.; Xu, X.; Wang, J.; Wang, L. Elevated AST/ALT ratio is associated with all-cause mortality and cancer incident. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2022; 36: e24356.
 20. Cao, K.; Shen, C.; Yuan, Y.; Bai, S.; Yang, L.; Guo, L.; Zhang, R.; Shi, Y. SiNiSan Ameliorates the Depression-Like Behavior of Rats That Experienced Maternal Separation Through 5-HT1A Receptor/CREB/BDNF Pathway. *Front Psychiatry* 2019; 10: 160.
 21. Cheng, F.; Ma, C.; Wang, X.; Zhai, C.; Wang, G.; Xu, X.; Mu, J.; Li, C.; Wang, Z.; Zhang, X.; et al. Effect of traditional Chinese medicine formula Sinisan on chronic restraint stress-induced nonalcoholic fatty liver disease: a rat study. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17: 203.
 22. Liu, Y.Z.; Wang, Y.X.; Jiang, C.L. Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases. *Frontiers in Human Neuroscience* 2017; 11.
 23. Sun, Y.; Zhang, C.; Qu, S.; Zhu, B. Efficacy of



- the Integration of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine in Coronary Heart Disease Comorbid with Anxiety and Depression: A Meta-Analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2022; 2022: 9586456.
24. Bortolato, B.; Hyphantis, T.N.; Valpione, S.; Perini, G.; Maes, M.; Morris, G.; Kubera, M.; Köhler, C.A.; Fernandes, B.S.; Stubbs, B.; et al. Depression in cancer: The many biobehavioral pathways driving tumor progression. *Cancer Treatment Reviews* 2017; 52: 58.
 25. Dos Anjos Cassado, A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. *Results and Problems in Cell Differentiation* 2017; 62: 161.
 26. Austyn, J.M.; Gordon, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European Journal of Immunology* 1981; 11: 805.
 27. Liu, C.M.; Sun, Y.Z.; Sun, J.M.; Ma, J.Q.; Cheng, C. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF-kappaB pathway. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820: 1693.
 28. Meller, E.; Shen, C.; Nikolao, T.A.; Jensen, C.; Tsimberg, Y.; Chen, J.; Gruen, R.J. Region-specific effects of acute and repeated restraint stress on the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases. *Brain Research* 2003; 979: 57.
 29. Lee, C.; Bak, J.; Yoon, S.; Moon, J.O. Protective Effect of Oligonol on Dimethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis in Rats via the JNK/NF- κ B and PI3K/Akt/Nrf2 Signaling Pathways. *Antioxidants* 2021; 10.
 30. Kim, S.H.; Oh, D.S.; Oh, J.Y.; Son, T.G.; Yuk, D.Y.; Jung, Y.S. Silymarin Prevents Restraint Stress-Induced Acute Liver Injury by Ameliorating Oxidative Stress and Reducing Inflammatory Response. *Molecules* 2016; 21: 443.
 31. Zhang, Y.M.; Ren, H.Y.; Zhao, X.L.; Li, J.; Li, J.Y.; Wu, F.S.; Su, H.; Tang, W.F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Da-Cheng-Qi decoction in the liver of rats with severe acute pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology* 2017; 23: 1367.
 32. Robinson, M.W.; Harmon, C.; O'Farrelly, C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cellular & Molecular Immunology* 2016; 13: 267.
 33. Wang, J.; Wu, X. Traditional Chinese Medicine Jiuwei Zhenxin Granules in Treating Depression: An Overview. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2020; 16: 2237.
 34. Lu, J.R.; Li, W.B.; Gao, T.H.; Wang, S.P.; Fu, C.M.; Wang, S. The association study of chemical compositions and their pharmacological effects of Cyperi Rhizoma (Xiangfu), a potential traditional Chinese medicine for treating depression. *Journal of Ethnopharmacology* 2022; 287.
 35. Law, B.Y.; Mo, J.F.; Wong, V.K. Autophagic effects of Chaihu (dried roots of Bupleurum Chinense DC or Bupleurum scorzoneraefolium WILD). *Chinese medicine* 2014; 9: 21.
 36. He, Z.H.; Fan, R.; Zhang, C.H.; Tang, T.; Liu, X.; Luo, J.K.; Cui, H.J.; Wang, Y.; Lu, R.H.; Gan, P.P. Chaihu-Shugan-San Reinforces CYP3A4 Expression via Pregnane X Receptor in Depressive Treatment of Liver-Qi Stagnation Syndrome. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019; 2019.
 37. Wu, Y.; Cheng, C.S.; Li, Q.; Chen, J.X.; Lv, L.L.; Xu, J.Y.; Zhang, K.Y.; Zheng, L. The Application of in Breast Cancer and the Mechanism of Its Main Component Nobiletin: A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2021; 2021.