

四物安神湯이 스트레스에 미치는 영향

林錫麟*

Abstract

Effect of Samulanshintang(SA) on Stressed Rats

Lim Seok-rhin

College of Oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon, Korea

To determine the preventive effect of Samulanshintang (SA) on stress, we investigated the physiological change of rats which were applied immobilization stress. For immobilization stress, rats were placed in restrainer for 12 hours a day for 3 days. During application of stress, body weight of rats was measured. After sacrifice, 4 organs were taken for measurement of organ weight. Brain was homogenated and its catecholamine and serotonin contents were measured with HPLC. In our study, stress mainly induced increase of concentration of neurotransmitters in brain without other significant physical change of rats. SA inhibited stress induced changes of neurotransmitter content in brain.

I. 서론

사회가 점점 복잡해지고 다양화되어 감에 따라 이에 적응하는 과정에서 현대인은 많은 심리적, 정신적 부담을 가지게 된다. 이러한 신체적 정신적 압박감을 스트레스라고 표현하고 있는데, 현대 산업사회에서는 그 직업과 종사하는 작업의 종류만큼이나 다양한 형태의 스트레스가 건강을 위협하고 있다. 적당한 스트레스는 생활의 활력을 준다고 알려져 있지만, 극심한 환경적 스트레스는 생물체의 항상성을 유지하기 위한 반작용으로 비특이적 유해 작용을 유발하기도 한다. 지속적인 스트레스는 심장질환이나 두통, allergy 등과 같은 신체적 문제를 야기하거나 불면, 불안, 환각, 망상 등의 정신장애를 유발할 수 있다고 보고되고 있다(1,2).

뇌는 스트레스를 인식하고 적응에 필요한 신체적 변화를 유발시키는 기관으로 스트레스로 인한 뇌의 기능적, 구조적 변화와 신체적인 반응에 대한 연구는 스트레스의 병리와 예방책을 연구하는데 있어서 가장 핵심적인 분야이다(3). 따라서, 많은 연구자들이 동물을 이용하여 다양한 스트레스를 가하고 이에 대한 생리적 반응을 연구하고 있으며, 약물을 이용한 예방법에 대한 연구도 진행하고 있다(21-23). Oliver 등은 stress에 의해 교감신경 흥분작용이 유발되며 이는 부신 수질 추출물을 투여한 경우와 동일한 작용이라는 사실을 기초로 catecholamine이 stress와 상관성이 있을 것이라고 발표하였다. 움직임을 제한한 구속성 스트레스는 대뇌중에 norepinephrine, epinephrine, dopamine 등의 함량이 증가한다는 보고가 있으며(4-7), 이는 움주와 같은 신경전달을 늦추는 약물에 의해서는 감소될 수 있다는 보고가 있다(21, 22). 또한 구속성 스트레스에 의해 부신 수질 및 피질에서

* 大田大學校 韓醫科大學

cortisol, epinephrine, norepinephrine 등의 분비가 촉진되고 지질대사에도 영향을 미칠 수 있다고 알려져 있다(8). 이러한 스트레스 반응은 한냉 스트레스, 소음 스트레스, 전기적 스트레스 등 다양한 자극에 의해서도 거의 유사하게 나타난다고 보고되고 있다(13, 14).

사물안신탕(四物安神湯)은 대전대학교 한방병원에서 신경과민, 심계항진, 불안초조, 불면 등의 증상을 개선하기 위해 처방되어 왔다. 본 연구에서는 사물안신탕의 항스트레스 효과를 실험적으로 알아보기 위하여 흰쥐에 구속스트레스를 가하고 체중에 미치는 영향, 뇌내 신경전달물질인 catecholamine 함량 변화에 미치는 영향을 측정하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

동물은 체중 200-220g의 흰쥐(SD.male)를 대한 실험동물(삼양사료co.)로부터 분양받아 물을 충분히 공급하고 Specific pathogen free(SPF)시설에서 12시간의 명암주기와 22±2℃, 습도60%로 유지 3일간 적응시켜 실험에 사용하였다.

2) 약재

실험에 사용한 약재는 대전대학교 부속 한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고 처방의 내용과 용량은 다음과 같다.

Table I. 四物安神湯(SA)의 處方構成

藥材	生藥名	用量(g)
當歸	Angelicae gigantis Radix	4
白芍藥	Paeoniae Radix	4
生地黃	Rehmanniae Radix	4
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparata	4
人參	Ginseng Radix	4
白朮	Atractylis Rhizoma alba	4
白茯神	Hoelen cum Radix	4
酸棗仁(炒)	Zizyphi Semen	4
黃蓮(炒)	Coptidis Rhizoma	4
梔子(炒)	Gardeniae Fructus	4
竹茹	Bambusae silicea Concretie	4
大棗	Zizyphi inermis Fructus	8
米(炒)	Oryzae Semen	20
烏梅	Mume Fructus	2
Total amount		74

2. 방법

1) 검액 제조

사물안신탕(SA) 74g을 약탕기에 넣고 2,000 ml의 증류수를 넣어 3시간동안 가열하여 물 추출액을 얻었다. 이를 membrane filter(2 μm, Millipore)로 감압여과한 후 진공증발시켜 농축시킨 다음, 동결건조기에서 완전히 건조하여 약 21 g의 고형물을 얻었다. 이 고형물을 투여를 위해 0.5 % CMC에 녹여 냉장보관하였다.

2) 스트레스 부여와 검액 투여

흰쥐 8 마리를 한 군으로 하여 정상군(Normal group), 구속군(Control group), 검액투여군(SA-treated group)으로 분리하였다. 정상군과 구속군에는 식염수를 5 ml/kg씩, 검액투여군에는 약물을 800 mg/5 ml/kg씩 2주간 매일 투여하였다. 투여 12 일째부터 매일 12 시간씩, 구속군과 검액투여군을 아크릴로 제조한 구속상자(5×5×20 cm)에 넣고 절식시켰다. 구속직전 식염수와 검액을 각각 투여하였고, 정상군도 같은 시간동안 절식시켰다. 3일간 같은 방식으로 구속을 반복하였고, 4 일째 sacrifice하여 뇌와 장기를 적출하였다.

3) 체중 측정

투여 시작일에 체중을 측정하고, 투여 5 일후 체중을 측정하였다. 구속직전과 구속후에는 매일 체중을 측정하였다.

4) 뇌 및 장기적출

구속스트레스 부여 후 실험동물을 단두하여 즉시 뇌를 적출하여 액화질소탱크(-170 ℃)에 보관하였다. 단두한 후 즉시 heart, liver, spleen, kidney를 적출하여 무게를 측정한 후 냉동보관하였다. 모든 장기는 이후 -90 ℃의 초저온냉동고로 옮겨 실험전까지 보관하였다.

5) Brain homogenate의 catecholamines과 5-HT의 정량

분리한 뇌조직을 Perchloric acid 용액 (0.17 M perchloric acid + 2 μM Dihydro Benzylamine (DHBA))에 넣어 microhomogenizer (GlassCol. Corning)로 homogenation 시켜 4 ℃에서 10 분간 방치한 후 4 ℃에서 10,000 rpm으

로 10 분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이를 millipore filter (0.2 μ m)로 여과하여 HPLC 주입용 시료로 사용하였다. Catecholamine과 5-HT의 정량은 DHBA에 의한 internal standard 방법을 사용하였다. Catecholamine의 retention time과 양을 결정하기 위하여 norepinephrine, epinephrine, dopamine, serotonin은 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하여 각각 1 ng/10 μ l씩 가하여 표준액의 chromatogram을 작성하였다. HPLC의 분리조건은 table II 와 같다.

Table II. Analytical Condition for Catecholamine Concentration in Rat Brain Homogenate

Item	Condition
Pump	1-5000 psi
Detector	ECD
Column	Novapak C18(30cm×4.6 mm i.d, 10 μ m)
Intergrator	automatic-digitalized
Temperature controller	4 $^{\circ}$ C
Autoinjector	90 well
Mobile phase	0.003M perchloric acid:Acetonitrile(99:1)
Flow rate	1 ml/min
Sample volume	10 μ l

6) 통계처리

실험군과 대조군의 경과를 Student's t-test하여 p값이 0.05보다 낮을 때 유의성있게 차이가 있다고 판단하였다.

III. 실험성적

1. 장기무게의 변화

정상군의 경우 실험기간중 체중이 50-60 g 증가하였으며, SA를 전처리한 군에서도 체중의 변화는 관찰되지 않았다. 구속스트레스를 가하면 체중이 급격히 감소하기 시작하였다. SA 투여군은 체중이 투여 10일이 지나면서 정상군에 비해 낮아졌으며, SA를 투여한 경우에도 스트레스에 의한 체중 감소 경향에는 영향

을 미치지 못하였다.

실험동물을 단두한 직후 각 장기를 적출하여 무게를 측정한 결과는 Table III과 같다. 적출한 4가지의 장기의 무게는 스트레스를 부여한 실험군에서 유의적으로 감소하였다. 그러나 장기무게의 감소는 체중감소와 거의 비례하였으며, 특정 장기의 위축은 관찰되지 않았다. 다만 liver의 장기무게/체중의 비가 증가하여 체중감소가 더 심했음을 알 수 있었다. SA를 투여한 실험군에서는 정상군과 유사한 장기무게/체중 비율을 보였다. 구속 스트레스는 전반적인 신진대사를 교란하여 체중이 감소하지만 특정장기가 손상될 정도는 아닌 것으로 판단된다.

2. 뇌의 catecholamines과 5-HT 변화

대뇌에서의 스트레스에 의한 신경전달물질의 변화를 알아보기 위하여 brain homogenate를 추출하여 여과한 다음 HPLC를 행하였다. Norepinephrine의 함량은 정상군은 약 247.5 ng/g tissue 이었다. 스트레스를 가한 경우 약 40%의 증가를 보였으며, SA를 투여한 경우 스트레스에 의해 증가된 함량을 약 45% 정도 억제하였다(Table IV). Epinephrine의 경우도 정상군에서 약 105.2 ng/g tissue이었으나, 스트레스를 가한 경우 약 78% 정도의 증가를 가져왔으며 SA를 투여한 랫드의 뇌에서는 증가된 epinephrine 함량이 약 35% 정도 감소하는 것으로 나타났다(Table V). 이러한 경향은 dopamine 및 serotonin에서도 나타났으며, SA 투여에 의해 억제되는 경향을 보였다(Table VI, Table VII)

Table III. Organ Weight/body Weight of Liver, Spleen, Kidney and Adrenal Gland. (g/g \times 10³)

	liver	spleen	kidney	heart
Normal	34.9 \pm 0.59	2.63 \pm 0.11	4.36 \pm 0.07	3.93 \pm 0.13
Control	35.8 \pm 1.18	2.54 \pm 0.10	4.40 \pm 0.05	3.89 \pm 0.09
SA-treated	35.1 \pm 0.64	2.84 \pm 0.22	4.51 \pm 0.09	4.04 \pm 0.18

Data are the means \pm standard error of 6 rats

* = p<0.05 vs Control (Student's t-test)

Table IV. Effect of SA on the Brain Norepinephrine Contents of Rats in Immobilized Stress.

Group	No of animal	NE (ng/g tissue)	% of increase	p value
Normal	6	247.5 ± 37.9*		<0.05
Control	6	354.1 ± 45.7	43.3	
SA-treated	6	307.8 ± 34.5	24.3	

Data are the means ± standard error of 6 rats

* = p<0.05 vs Control (Student's t-test)

Table V. Effect of SA on the Brain Epinephrine Contents of Rats in Immobilized Stress.

Group	No of animal	epinephrine (ng/g tissue)	% of increase	p value
Normal	6	105.2 ± 18.7*		<0.05
Control	6	187.6 ± 41.8	78.0	
SA-treated	6	153.4 ± 38.1	45.7	

Data are the means ± standard error of 6 rats

* = p<0.05 vs Control (Student's t-test)

Table VI. Effect of SA on the Brain Dopamine Contents of Rats in Immobilized Stress.

Group	No of animal	dopamine (ng/g tissue)	% of increase	p value
Normal	6	163.2 ± 23.7*		<0.05
Control	6	257.4 ± 25.3	57.6	
SA-treated	6	221.7 ± 36.9	35.6	

Data are the means ± standard error of 6 rats

* = p<0.05 vs Control (Student's t-test)

Table VII. Effect of SA on the Brain Serotonin Contents of Rats in Immobilized Stress.

Group	No of animal	serotonin (ng/g tissue)	% of increase	p value
Normal	6	337.4 ± 80.4*		<0.05
Control	6	771.3 ± 106.7	128.0	
SA-treated	6	618.5 ± 117.6	83.4	

Data are the means ± standard error of 6 rats

* = p<0.05 vs Control (Student's t-test)

IV. 고찰

현대인은 다양한 스트레스에 노출되어 있다. 사회가 복잡해지고 다양해지면서 환경 변화에 대한 적응 실패로부터 미래에 대한 두려움, 불확실성 등의 정신적 요인뿐 아니라 육체노동의 강도, 생활 환경의 악화, 화학적 물질에 의한 환경오염 등 생물체에 자극을 줄 수 있는 수많은 스트레스 요인들이 있다. 스트레스는 중추신경계, 시상하부, 변연계 및 기타 표적기관으로부터 시작되며, 시상하부는 자율신경계 반응, 호르몬 또는 내분비계 반응, 면역계 반응등을 통하여 신체에 영향을 미친다. 시상하부에는 2가지 경로가 있는데, 그 하나는 교감신경에 작용하여 부신수질을 경유하여 epinephrine을 방출하는 경로이며, 다른 하나는 뇌하수체 전엽에서 ACTH 분비를 증가시키고 부신 피질에서 cortisol의 분비를 증가시키는 경로이다. Epinephrine을 포함하는 catecholamine 계열 화학 물질은 스트레스에 의해 현저히 증가하며, 자율신경계가 관장하는 vasoconstriction, gland secretion 등에 영향을 준다. 또한, 대사과정에 관련된 호르몬 분비를 촉진 시킴으로서 발열반응을 유발하고 지방질 대사를 촉진한다. 강한 스트레스를 받는 경우, 피하 지방의 고갈을 가져올 수 있으며 지방 대사 변화에 따라 고지혈증 등의 증상을 일으킬 수 있다고 보고되고 있다(7, 8).

스트레스의 정확한 기전과 신경계에서의 관련 신경전달물질을 규명하기 위한 노력은 많은 연구자들에 의해 시도되어 왔다. 현재 많은 연구결과에 의해 스트레스에 의해 변화되는 신경전달물질 및 그 대사과정이 어느정도 밝혀져 있으며, Norepinephrine, epinephrine, ACTH, acetylcholine, GABA, substance P, TRH와 그 대사체들이 스트레스와 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서 사용한 실험 모델인 구속성 스트레스의 경우, 대뇌중에 norepinephrine, epinephrine, dopamine 등의 함량을 증가시킨다는 보고가 있으며, 이는 음주와 같은 신경전달을 늦추는 약물에 의해서는 감소될 수 있다는 보고가 있다(22). 또한, 구속성 스

트레스에 의해 부신 수질 및 피질에서 cortisol, epinephrine, norepinephrine 등의 분비가 촉진되고 지질대사에도 영향을 미칠 수 있다고 알려져 있다(8, 12). 이러한 스트레스 반응은 한냉 스트레스, 소음 스트레스, 전기적 스트레스 등 다양한 자극에 의해서도 거의 유사하게 나타난다고 보고되고 있다(13, 14).

사물안신탕은 대전대학교 한방병원에서 신경과민, 심계항진, 불안초조, 불면 등의 증상 등을 개선하기 위해 처방되어 왔다. 본 처방의 구성은 사물탕을 기본으로 하고 있어 보혈, 진정, 진통 등의 효능이 있을 것으로 보이며, 심인성 환자의 증상을 개선시키는 것으로 보아 항스트레스 효과가 있을 것으로 판단되어 실험을 시행하였다.

실험 결과, norepinephrine의 함량은 정상군은 약 247.5 ng/g tissue이었으며, 스트레스를 가한 경우 약 43%의 증가를 나타냈다. 사물안신탕을 투여한 경우 스트레스에 의해 증가된 norepinephrine 함량을 약 45% 정도 억제하여 스트레스에 효과적임을 알 수 있었다(Table IV). 대뇌의 epinephrine 함량은 정상군에서 약 105.2 ng/g tissue이었으나, 스트레스를 가한 경우 약 78% 정도의 증가를 보였다. 스트레스를 가하고 사물안신탕을 투여한 랫드의 뇌에서는 스트레스만 가해서 증가된 뇌내 epinephrine 함량을 약 35% 정도 감소시키는 것으로 나타났다(Table V). 이러한 경향은 dopamine 및 serotonin에서도 나타났으며, SA 투여에 의해 억제되는 경향을 보였다(Table VI, Table VII)

현대의학적 개념으로는 스트레스에 의한 우울과 불안, 두통 등 신경장애나 현기증과 식욕감소 등 정서장애에 의한 부차적 증세를 개선하는 목적으로 사용될 수 있다. 사람에게서 나타나는 스트레스성 신경질환은 요인이 다양하고 뇌의 작용과 기능이 실험동물에 비해 훨씬 복잡하여 적합한 실험 모델을 설정하는 것이 어렵다(20). 그러나 항우울제나 알코올과 같이 정신신경계에 작용하는 물질들이 구속스트레스를 가한 실험동물모델에서 그 작용이 평가될 수 있음이 보고되었다(20-23). 본 연구결과, 실험동물 모델에서 사물안신탕이 스트

레스에 관련된 뇌내 신경전달물질의 함량 변화를 효과적으로 억제하였으며, 이 것은 사물안신탕이 스트레스를 완화시키는 처방으로 응용될 수 있는 실험적 근거를 제공하게 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 이병윤 : 정신의학사전, 일조각, 1990
2. Orth Gom K, Moser V, Blom M, Wamala SP and Schenck Gustafsson K : Survey of stress in women. Heart disease in Stockholm women is caused by both family and work related stress, *Lakartidningen*, 632, 635-638 (1997)
3. Huether, G : The central adaptation syndrome: psychosocial stress as a trigger for adaptive modifications of brain structure and brain function, *Prog Neurobiol*, 48:6, 569-612 (1996)
4. Palkovits, M, Patthy A and Elekes I : Distribution and stress-induced increase of glutamate and aspartate levels in discrete brain nuclei of rats. *Brain Res*, 373, 252-257(1986)
5. Glavin GB : Stress and brain noradrenaline. *Neurosci Biobehav Rev*, 9:2, 233-243 (1985)
6. Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A and Ames BN : Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats, *FASEB J*, 10:13, 1532-1538 (1996)
7. Lobanova NN, Panusheva N and Belova TI : Changes in the catecholamine content of brain structures in rats subjected to immobilization stress, *Biull Eksp Biol Med*, 102:11, 526-527 (1986)
8. 김성호, 이상용 : 정간소간산의 항스트레스 효과에 대한 실험적 연구, *동의신경정신과학회지*, 6, 61-70 (1995)

9. 광주중의학원 : 방제학, 영림사, 1990
10. De Souza EB and Van Loon GR : Brain serotonin and catecholamine responses to repeated stress in rats, *Brain Res*, 367:1-2, 77-86 (1986)
11. Nomura M and Okamura K : Catecholamine content changes in brain regions of spontaneously hypertensive rats under immobilization stress, *J Neurochem*, 52:3, 933-937 (1989)
12. Shimizu T, Tanaka M, Yokoo H, Gondoh Y, Mizoguchi K, Matsuguchi N and Tsuda A : Differential changes in rat brain noradrenaline turnover produced by continuous and intermittent restraint stress. *Pharmacol Biochem Behav*, 49:4, 905-909 (1994)
13. Dunn AJ : Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after footshock stress, *Life Sci*, 42:19, 1847-1853 (1988)
14. Geiger JD and Glavin GB : Adenosine receptor activation in brain reduces stress-induced ulcer formation, *Eur J Pharmacol*, 115:2-3, 185-190 (1985)
15. Persico AM, Schindler CW, O'Hara BF, Brannock MT and Uhl GR : Brain transcription factor expression: effects of acute and chronic amphetamine and injection stress, *Brain Res Mol Brain Res*, 20:1-2, 91-100 (1993)
16. Lui J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A and Ames BN : Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats, *FASEB J*, 10-13, 1532-1538 (1996)
17. Kovacheva Ivanova S, Bakalova R and Ribavov SR : Immobilization stress enhances lipid peroxidation in the rat lungs. *Gen Physiol Biophys*, 13:6, 469-482 (1994)
18. Geiger JD and Glavin GB : Adenosine receptor activation in brain reduces stress-induced ulcer formation, *Eur J Pharmacol*, 115:2-3, 185-190 (1985)
19. ali-Khizhazi A, Madoian MV, Sytnikova KA and Lipkan GN : Immobilization stress as a model of ulcerative lesions of the digestive tract and as an object for studying pharmacological and physical actions on the living organism, *Lik Sprava*, 2, 13-18 (1998)
20. 김찬형, 김지용 : 공격성의 신경생물학, 대한정신약물학회지, 9, 3-18 (1998)
21. Zhang X, Kindel GH, Wörfert E and Hanin I : Effects of immobilization stress on hippocampal monoamine release: modification by mivazerol, a new alpha 2-adrenoceptor agonist. *Neuropharmacology*, 34:12, 1661-1672 (1995)
22. Vernigora AN and Gengin MT : The effect of ethanol on the activity of soluble and membrane-bound carboxypeptidase H in areas of the rat brain during immobilization stress, *Vopr Med Khim*, 40:1, 54-56 (1994)
23. Kofman O, Levin U and Alpert C : Lithium attenuates hypokinesia induced by immobilization stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 19:6, 1081-1090 (1995)