

補血安神湯이 SK-N-SH cell line의 brain-derived neurotrophic factor 발현에 미치는 영향

백 현 · 장규태* · 김장현

동국대학교 한의과대학 소아과학교실

Experimental Study on the Effects of *Bohyulanshin-tang* on brain-derived neurotrophic factor expression in SK-N-SH cell line

Hyun Baek, Gyu Tae Chang*, Jang Hyun Kim

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study was performed to investigate the effect of *Bohyulanshin-tang* on brain-derived neurotrophic factor(BDNF) expression in SK-N-SH (immortalized human neuroblastoma) cell line. MTT-based cytotoxicity assay revealed that cells of 0.1 mg/ml group and 1 mg/ml group significantly increased compared with Control group. Western blotting and RT-PCR analysis showed that *Bohyulanshin-tang* significantly increased BDNF mRNA expression of 0.1 mg/ml group and 1 mg/ml group compared with Control group. Another analysis revealed that *Bohyulanshin-tang* significantly increased BDNF expression of 0.1 mg/ml group and 1 mg/ml group compared with Control group. These results showed that cell-protective abilities and cell-proliferating effects of *Bohyulanshin-tang* approached that of Fluoxetine.

Key words : *Bohyulanshin-tang*, BDNF, stress

서 론

오늘날 小兒은 과거와는 다른 양상을 띤 세계 속에서 부모, 교사, 동료, 사회의 요구와 기대 안에서 많은 stress를 받고 있다¹⁾. 小兒은 특히 身體가 柔弱하고 心膽이 虛해서 신경이 예민해지고 사소한 刺戟에 쉽게 놀라며 心動悸, 健忘, 不眠, 夜啼, 夢遊症, 多動症, Tic, 夜尿症 등의 精神神經系 疾患을 誘發하기 쉽다²⁾.

stress가 慢性化되거나 短期間의 과도한 stress는 自律神經系를 攪亂시키고 人體 內分泌 防禦機能을 무너뜨리면서 全身의 病態를 招來하게 되는데, 무엇보다 stress와 가장 관련이 깊은 부분은 腦와 心臟이라 할 수 있다³⁾. 최근의 stress에 관한 분자생물학적인 실험들은 뇌에서 발현되는 신경영양성 인자(neurotrophic factor)에 대해 주목하고 있는데, brain-derived neurotrophic factor(이하 BDNF)는 최근 10여년간 stress와 정서적 장애(affective disorders)에 관련되어 연구되고 있는 추세이다⁴⁾.

stress는 뇌조직중 특히 해마(hippocampus)의 신경세포의 위축과 괴사를 유발하며, BDNF를 mRNA 수준에서 감소시킨다⁵⁾. 이런 점에서 약물 투여로 인한 BDNF의 증가는 stress로 인한 손상으로부터 신경세포를 보호하는 것을 의미하는 것이다⁶⁾. 補血安神湯은 補血, 安神, 清熱, 止痛하는 효능이 있어 七情傷과 stress로 인한 질환에 널리 사용되는 처방으로 이에 관한 연구로는 金 등⁷⁾이 구속stress 흰쥐의 뇌 및 혈중 catecholamine에 미치는 영향을, 朴⁸⁾이 구속 stress 흰쥐의 체중 및 혈액 성분에 미치는 영향을, 金⁹⁾이 소음 stress를 받은 흰쥐와 집토끼의 뇌중 catecholamine 함량에 미치는 영향을, 李¹⁰⁾가 구속, 전기자극 및 침수 stress를 받은 흰쥐의 뇌중 epinephrine 및 dopamine의 양적 변화와 위조직의 변화에 미치는 영향을, 李¹¹⁾가 전기쇼크에 의한 갈등 stress를 받은 흰쥐의 체중 변화, 물 섭취량 및 위궤양 등에 미치는 영향을, 金¹²⁾이 補血安神湯 투여가 운동선수에 유발된 stress반응에 미치는 영향을, 黃¹³⁾이 우울증유발 흰쥐의 항우울효과에 대하여 보고한 바 있다.

이에 저자는 補血安神湯이 SK-N-SH(immortalized human neuroblastoma, Korean cell line bank, Korea) cell line의 BDNF

* 교신저자 : 장규태, 경북 경주시 용강동 357 동국대 경주한방병원 소아과
· E-mail : gtchang@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-1260
· 접수 : 2004/11/18 · 수정 : 2004/12/20 · 채택 : 2005/01/21

의 발현에 미치는 영향을 MTT-based cytotoxicity assay와 Western blotting, Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 실험을 통하여 분석한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

藥材는 동국대학교 부속한방병원에서 購入하여 使用하였으며, 補血安神湯의 處方은 동국대학교 한방병원처방집¹⁴⁾에 의거하였으며, 1첩의 처방내용과 구성은 Table 1과 같다.

Table 1. Contents of *Bohyulanshin-tang*

韓藥名	生藥名	分量(g)
山藥(炒)	<i>Dioscoreae Rhizoma(baked)</i>	8
當歸身	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	8
龍眼肉(煮熟)	<i>Longanae Arillus(steamed)</i>	6
蘿蔔子(炒)	<i>Raphani Semen(baked)</i>	6
白芍藥(酒炒)	<i>Paeoniae Radix Alba(baked with alcohol)</i>	6
乾地黃(酒炒)	<i>Rehmanniae Radix(baked with alcohol)</i>	4
麥門冬(去心)	<i>Ophiopogon Tuberosus(removed center)</i>	4
白茯苓	<i>Poria</i>	4
酸棗仁(炒)	<i>Zizyphi Spinosae Semen(baked)</i>	4
神曲(炒)	<i>Massa Medicata Fermentata(baked)</i>	4
麥芽(炒)	<i>Hordeum Fructus Germinatus(baked)</i>	4
遠志(炙)	<i>Polygalae Radix(baked)</i>	3
川芎(去油)	<i>Cnidii Rhizoma(without oil)</i>	3
黃芩(酒炒)	<i>Scutellariae Radix(baked with alcohol)</i>	3
五味子(酒炒)	<i>Schizandrae Fructus(baked with alcohol)</i>	3
甘草(炒)	<i>Glycyrrhizae Radix(baked)</i>	2
黃砂仁	<i>Amomi Fructus</i>	2
甘菊	<i>Chrysanthemi Flos</i>	1
Total amount		75

2) 시료의 준비

試料는 10첩 분량을 70% 에탄올을 3ℓ로 추출한 湯煎液 1,250 ml를 농축, 동결건조하여 준비하였고, phosphate buffered saline(이하 PBS, pH 7.2)에 필요한 농도로 시료를 녹여 0.22 μm syringe filter로 여과, 무균상태로 제조하여 사용하였다. 고농도에서 시료가 PBS에 완전히 용해되지 않을 경우 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma, USA)에 녹여서 DMSO의 최종농도가 0.1% 이하가 되도록 맞춘 후 무균조작으로 제조하였다.

2. 방법

1) 세포배양

100 mm culture dish(SPL, Korea)에 SK-N-SH(immortalized human neuroblastoma) cell line을 2×10^6 cells/10ml이 되도록 접종한 후 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(이하 DMEM, JBI, Korea)에 10% fetal bovine serum(이하 FBS, Gibco BRL, USA) 및 1% antibiotic-antimycotic(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 units/ml streptomycin sulfate, 25 μg/ml amphotericin B, Gibco BRL, USA)이 포함된 DMEM 배지를 이

용하여 배양하였다. 이때 사용한 FBS는 사용하기 전 55 ℃에서 1시간 heat-inactivation 시켜 사용하였다. 또한 일정한 습도와 온도가 유지되는 37 ℃ 배양기에서 O₂(95%)/CO₂(5%)의 혼합기체를 계속 공급하면서 세포를 배양하였다. 배지는 10 ml 씩 2일에 한번 교체해 주었고 주 2-3 회 계대배양하였다.

2) MTT-based cytotoxicity assay

처리한 시료의 농도에 따른 세포증식 및 독성을 검사하기 위하여 96-well plate(SPL, Korea)에 SK-N-SH cell을 2×10^4 cells/100 μl/well의 농도로 접종하였다. 24시간 배양 후에 補血安神湯 추출물을 각각 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml가 최종 농도가 되도록 처리하고 PBS를 처리한 세포군을 대조군으로 하였다. 6시간 혹은 12시간 동안 37 ℃, 5% CO₂의 조건으로 배양한 후 MTT용액을 50 μl 가한 뒤 알루미늄 호일로 덮어 빛을 차단한 채 4시간 배양하였다. 500xg에서 5분간 centrifuge하여 상층액을 제거하고 dimethylsulfoxide(DMSO) 100 μl를 첨가하여 침전물을 용해시킨 다음 ELISA로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Protein extraction

100 mm culture dish(SPL, Korea)에 SK-N-SH(immortalized human neuroblastoma) cell line을 2×10^6 cells/10ml이 되도록 접종한 후, 24시간 후 補血安神湯의 최종농도가 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml이 되도록 처리하고, 24시간 동안 37 ℃, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척한 다음, 300 μl의 protein lysis buffer(Intron, Korea)를 가하여 30분간 가끔 흔들면서 얼음 위에 두고 1 ml pipette을 이용하여 수차례에 걸쳐 lysate를 올렸다 내렸다를 반복하여 뽀뽀하지 않을 때까지 시행하여 genomic DNA가 모두 shearing되었다고 보이면 이 용액을 미세원침관으로 옮기고 4℃, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새 미세원침관으로 옮겨서 Bio-Rad Protein Assay Kit(Bio-Rad, USA)을 이용하여 단백질질을 정량한 후 Western blotting에 이용하였다.

4) Western blotting

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(이하 SDS-PAGE)를 준비하여 separating gel(H₂O 1.9 ml, 30% acrylamide mix 1.7 ml, 1.0 M Tris(pH 8.8) 1.3 ml, 10% SDS 0.05 ml, 10% ammonium persulfate 0.05 ml, TEMED 0.002 ml)을 SDS-PAGE에 먼저 넣고 나서, 약 40분에서 1시간 정도 지나 이것이 굳어지면 stacking gel(H₂O 2.1 ml, 30% acrylamide mix 0.5 ml, 1.0 M Tris(pH 6.8) 0.38 ml, 10% SDS 0.03 ml, 10% ammonium persulfate 0.03 ml, TEMED 0.002 ml)을 separating gel 위에 넣었다. 전기영동할 검체는 5× SDS-PAGE loading buffer(Bio-Rad, USA)와 혼합한 후 100 ℃에서 5분간 가열한 다음 얼음 속에서 5분간 식힌 후 gel에 걸었다. 검체는 50 μg을 gel에 거는데 이때 분자량 표준체(biotinylated molecular weight standard, Bio-Rad, USA)를 검체와 동시에 gel에 걸었다. 전기영동은 1× running buffer (25 mM Tris, 250 mM glycine pH 8.3, 0.1% SDS)로 처음에는 100 V정도로 시작하여 bromophenol blue가 separating gel 속으로 들어갈 때까지 계속하였고, 다음

200 V정도로 증가시켜 2-3시간 정도 bromophenol blue가 separating gel의 끝까지 갈 때까지 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝나면 전기영동 장치로부터 유리판을 분리한 후 paper towel 위에 놓고 유리판을 gel로부터 분리한 후 gel의 왼쪽 위 모서리에 표식을 남겨 방향을 알 수 있게 하였다. 흡착지(nitrocellulose, pore size 0.45 μ m, Bio-Rad, USA)를 transfer buffer(25 mM Tris-Cl, pH 8.3, 1.4% glycine, 20% methanol) 속에 5분간 담가 적신 다음, gel 위에 덮고 양측에 흡수지를 각각 한 장씩 대고 전기이동 장치 속에 넣었다. 미리 냉장실에 보관하여 차게 해 둔 transfer buffer에 붓고 250 mA로 1시간 정도 단백을 이동시켰다. Transfer가 끝난 후 흡착지를 분리해 내어 5 % skim milk가 들어있는 TBS-T(10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) 용액 속에 담가 적신 다음 실온에서 1시간 동안 안구형 진탕기(orbital shaker)위에 놓고 천천히 흔들어 주어 membrane에 단백질이 결합하지 않은 부분을 blocking시켰다. Blocking을 위해 사용된 완충용액을 제거하고 5 % skim milk가 들어있는 TBS-T 용액에 1차 항체인 BDNF(1:1,000, Santa Cruz, USA)를 희석시킨 다음 여기에 membrane을 담가 4 °C에서 overnight하여 1차 항체와 반응시켰다. 다음날 1차 항체를 제거하고 TBS-T용액으로 15분간 3회 세척하였다. 5 % skim milk가 들어있는 TBS-T용액에 2차 항체 goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase(Santa Cruz, USA)를 희석시켜 상온에서 1시간 정도 반응시킨후, 2차 항체를 제거하고 TBS-T로 15분간 3회 세척하였다. 흡착지를 ECL detection solution(Amersham pharmacia, USA)에 1분간 담가 위의 방법으로 흔들면서 실온에 방치하고, 충분한 정도로 발색된 상태로 암실에서 X-ray film에 현상하였다.

5) Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

100 mm culture dish(SPL, Korea)에 SK-N-SH(immortalized human neuroblastoma) cell line을 2 \times 10⁶ cells/10ml이 되도록 접종한 후 24시간 후 補血安神湯의 최종농도가 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml이 되도록 처리하고 24시간 동안 37 °C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척한 다음 TriZol reagent(Life Technologies, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 모든 reverse transcription(RT) reaction에서는 2 ug RNA를 주형으로 하여 40 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(Life Technologies, USA)를 이용하여 실시하였다. RT 혼합물은 37 °C에서 60분 간 반응 후 97 °C에서 10분 간 가열하고, Polymerase chain reaction(PCR)은 5 U/ μ l Taq polymerase와 total cDNA의 1/20을 사용하여 실시하였다. PCR product는 1.7 % agarose gel을 이용하여 전기영동 후, ethidium bromide로 염색하여 관찰하였다. BDNF의 양은 sample의 housekeeping gene인 GAPDH로 표준화하였으며, 각 gene의 특정화된 기시번호(the primer sequences)와 크기 및 PCR condition은 Table 2와 같다.

6) 통계처리

各 群의 統計處理는 Window용 SPSS(ver. 11.0)를 이용하여 실시하였다. 각 집단에서의 측정값은 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 各群間의 평균차이에 대한 有意性은 ANOVA test로 檢

定하고 Duncan 방법에 의해 사후 검정하였다. P값이 0.05이하일 때 유의성 있는 것으로 판정하였다.

Table 2. The primer sequences and polymerase chain reaction conditions

Gene	Sequence of primers	Cycles & annealing temperature	Fragment size(bp)
BDNF	5'-CCTCCTCTTCTCTTCTGCTG-3' 5'-AATTCTCTTTTGTATCCAT-3'	35 cycles 55 °C	369
GAPDH	5'-TCCCTCAAGATTGTGAGCAA-3' 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'	25 cycles 58 °C	309

실험성적

1. MTT-based cytotoxicity assay

6시간 배양실험결과는 0.1 mg/ml 실험군에서 108.5 \pm 1.6 % (P<0.05), 1 mg/ml 실험군에서 242.6 \pm 1.1 % (P<0.001)의 세포 증식을 보였으며, 12시간 배양실험결과는 0.1 mg/ml 실험군에서 121.9 \pm 0.8 % (P<0.001), 1 mg/ml 실험군에서는 241.5 \pm 5.7 % (P<0.001)로 각각 유의한 결과를 나타내었다. 0.01 mg/ml 실험군과 0.001 mg/ml 실험군에서는 6시간과 12시간 배양실험군 모두 유의성이 없었다(Table 3, 4).

Table 3. Effect of *Bohyulanshin-tang*(BHAST) on SK-N-SH proliferation (6 hrs)

Group	Control	BHAST (mg/ml)			
		0.001	0.01	0.1	1
mean \pm S.E.M.(%)	100.0 \pm 0.1	98.4 \pm 0.5	105.4 \pm 10.2	108.5 \pm 1.6*	242.6 \pm 1.1***

Control: SK-N-SH treated with PBS for 6 hrs, BHAST 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml; SK-N-SH treated with *Bohyulanshin-tang*(1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml) for 6 hrs. Data represents Mean \pm S.E.M., Significantly different from control group(*, P<0.05, ***, P<0.001)

Table 4. Effect of *Bohyulanshin-tang* on SK-N-SH proliferation(12 hrs)

Group	Control	BHAST (mg/ml)			
		0.001	0.01	0.1	1
mean \pm S.E.M.(%)	100.0 \pm 0.6	91.9 \pm 0.9	95.4 \pm 9.8	121.9 \pm 0.8***	241.5 \pm 5.7***

Control: SK-N-SH treated with PBS for 12 hrs, BHAST 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml; SK-N-SH treated with *Bohyulanshin-tang*(1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml) for 12 hrs. Data represents Mean \pm S.E.M., Significantly different from control group***, P<0.001

2. BDNF mRNA expression

0.01 mg/ml 실험군에서는 1.11 \pm 0.09 % 로 대조군 0.99 \pm 0.02 % 에 비하여 다소 증가된 결과를 보였으나 유의성은 없었다. 0.1 mg/ml 실험군에서는 1.22 \pm 0.01 % (P<0.05), 1 mg/ml 실험군에서는 1.31 \pm 0.05 % (P<0.05)로 補血安神湯의 유의미한 세포 보호효과가 관찰되었다(Table 5, Fig. 1).

Table 5. Effect of *Bohyulanshin-tang* on BDNF mRNA expression of SK-N-SH (24 hrs)

Group	Control	BHAST (mg/ml)		
		0.01	0.1	1
mean \pm S.E.M.(%)	0.99 \pm 0.02	1.11 \pm 0.09	1.22 \pm 0.01*	1.31 \pm 0.05*

Control: SK-N-SH treated with PBS for 24 hrs, BHAST 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml; SK-N-SH treated with *Bohyulanshin-tang*(1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml) for 24 hrs. Data represents Mean \pm S.E.M., Significantly different from control group(*, P<0.05)

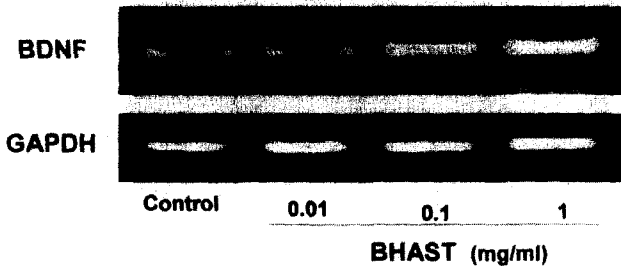


Fig. 1. The effect of Bohyulanshin-tang on the BDNF mRNA expression in SK-N-SH cells(24 hrs) Control: SK-N-SH treated with PBS for 24 hrs, BHAST 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml; SK-N-SH treated with Bohyulanshin-tang(1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml) for 24 hrs

3. BDNF expression

0.1 mg/ml 실험군에서 $1.50 \pm 0.01 \%$ ($P < 0.05$), 1 mg/ml 투여군에서는 $1.63 \pm 0.12 \%$ ($P < 0.05$)로 유의미한 세포 보호효과가 관찰되었다(Table 6). 임상적으로 항stress 효과가 있는 Fluoxetine 10-7 mM 실험군에서는 $1.60 \pm 0.07 \%$ ($P < 0.01$)로 補血安神湯 1 mg/ml 투여군이 Fluoxetine 실험군과 유사한 결과를 나타내었다. Fluoxetine 실험군과 보혈안신탕 실험군 간의 비교결과 통계적인 차이는 없었다.

Table 6. Effect of Bohyulanshin-tang on BDNF expression of SK-N-SH (24 hrs)

Group	Control	Fluoxetine 10 ⁻⁷ mM	BHAST (mg/ml)		
			0.01	0.1	1
mean ± S.E.M.(%)	1.13±0.20	1.60±0.07**	1.35±0.14	1.50±0.01*	1.63±0.12**

Control: SK-N-SH treated with PBS for 24 hrs, BHAST 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml; SK-N-SH treated with Bohyulanshin-tang(1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml) for 24 hrs, Data represents Mean ± S.E.M., Significantly different from control group†, P<0.05, **, P<0.001

고찰

stress란 인간 발달의 한 과정으로, 인간의 탄생에서 시작하여 성장과정을 거치는 동안 무수한 stress 상황들이 존재한다. 오늘의 재촉받는 사회 환경과 가족의 지지 부족은 小兒로 하여금 과거보다 더 많은 stress를 경험하게 한다. 小兒에게 stress는 실제로 정신적, 신체적 외상을 산출해 냄으로써 가정과 학교에서 어려움에 빠지게 한다¹⁵⁾. stress란 생체에 가해지는 各種의 有害刺戟에 대한 생체의 反應과 그에 따른 防禦反應의 總和라 할 수 있는데, 이 때 가해지는 刺戟을 stressor라 하며 이 stressor는 外部에서 가해지는 物理的, 化學的, 生物學的 刺戟인 外的 刺戟과 體內에서 가해지는 肉體的, 精神的 刺戟인 內的 刺戟으로 분류될 수 있다¹⁶⁾. 人間은 對人關係나 社會環境의 일정한 變化에 따라 情緒的 stress를 받게되면 즉각 身體內部的 生理的 反應을 惹起하여 各種 臟器에는 일정한 機能的 變動이 自律的으로 일어나게 된다¹⁷⁾. stress에 대한 生·病理的 反應은 다른 모든 反應의 樣相처럼 정지된 체계에서 유도되는 것이 아니라 지속적인 활동상의 변화에서 나타나며, 이러한 변화는 stress 반응이 體外에서 가해진 각종 有害作用에 의해 體內에 생긴 傷害와 防禦反應의 總和라 할 수 있다¹⁸⁾. 이러한 人體의 恒常性維持(homeostasis)는 《內經·素問·通評虛實論》¹⁹⁾에 “邪氣盛即實 精氣奪即虛”라 언급

된 正氣와 邪氣의 두가지 측면으로 요약되는 질병 발생원리와 부합된다. 즉, 體質의 虛弱과 臟腑組織의 機能減退, 抗病能力低下를 正氣가 虛하다하여 우선 疾病發生의 根據가 되고, 發病因子로 外因의 六淫外感과 內因의 七情內傷, 그리고 飲食所傷 勞逸過度, 蟲獸所傷 등의 不內外因으로 구분되는 邪氣가 疾病發生의 條件이 된다. 따라서 하나의 整體로서의 人體가 正氣不足으로 病邪에 저항할 수 없거나, 病邪가 人體에 侵襲한 力量이 正氣를 넘어설 때 疾病이 發生되는 것이다²⁰⁾. Selye²¹⁾는 이러한 신체의 균형의 깨뜨리는 내부 및 외부의 원인에 의하여 일어나는 有機體의 變化를 stress라 하여 의학에 그 개념을 처음으로 도입하였다.

《內經》¹⁹⁾에서 인간의 생존은 자연에 대한 적응이며, 精神과 肉體는 有機的 關係로 相互間의 協助와 統一이라 하여 天人相應의 觀點을 重要視하였다. 또한 六氣를 外在的 刺戟要因으로, 七情을 內在的 刺戟要因으로, 이 刺戟들에 대한 身體의 反應을 氣의 變化로 認識하였으며, 이들 刺戟要因은 身體에 氣鬱, 氣火 등의 病的 要因을 提供하여 病態의 變化가 惹起된다고 하였다. 이러한 변화들은 하나의 stress 현상이라고 할 수 있으며 stressor는 人體에서 五臟의 虛實, 血虛, 精損, 氣虛, 氣逆, 氣의 循環障礙, 痰涎, 火 등의 病理的인 요인을 생성한다²²⁾.

이러한 관점에서 《三因方》에서 개괄한 外氣의 變化인 六淫, 情緒의 變化인 七情, 기타 瘀血, 痰飲, 食積 등의 病理因子들이 모두 stress 誘發要因이 될 수 있다²³⁾. 이를 精神活動과 情動反應의 變動에 한정하면 神이나 七情의 범주에 해당된다²⁴⁾. 특히 小兒는 心과 身이 不安定한 狀態로서 肉體의으로는 臟腑嬌嫩 形氣未充하고 精神의으로는 神氣怯弱 易受驚恐하여 주위로부터 영향을 받기 쉬워서 사소한 자극에도 곧 반응하므로²⁵⁾ 이러한 小兒의 生理的 特性을 전제로 이해해야 한다. 또한 《內經》에서는 心身一體와 精神優位의 韓方精神醫學의 基本을 闡明하여 基本臟器인 五臟과 精神을 결부시켜 心身의 機能을 모두 하나의 生命活動으로 認識하였다¹⁹⁾. 精神의 過勞, 즉 七情傷은 五臟의 生理機能에 直接的으로 損傷을 주거나, 臟腑氣機에 영향을 미쳐 氣機의 運行을 紊亂하게 함으로 疾病을 招來한다고 認識하였다²⁶⁾. 이러한 見解는 근래 西洋醫學에서 擡頭된 心身醫學의 原理와 相通하는 것이라 할 수 있다.

인간은 대인관계나 사회환경의 일정한 변화에 따라 情緒的 stress를 받게되면 生理的 變動이 자율적으로 일어나며, stress가 慢性化되거나 短期間의 과도한 stress는 自律神經系를 攪亂시키고 人體 內分泌 防禦機能을 무너뜨리면서 循環器 疾患을 비롯한 消化器 疾患, 感染性 疾患, 免疫性 疾患, 內分泌 疾患, 皮膚疾患, 泌尿器 疾患, 呼吸器 疾患 및 筋膜痛症候群 등의 全身的 病態를 招來하고 器質的 變動까지 유발할 수 있는데, 무엇보다 stress와 가장 관련이 깊은 부분은 腦와 心臟이다³⁾. 이에 stress에 관한 최근의 분자생물학적인 실험들은 腦에서 발현되는 신경영양성 인자(neurotrophic factor)에 관해 주목하고 있으며, 신경영양성 인자 중에서 최근 10여년간 stress와 정서적 장애(affective disorders)에 관련되어 연구되고 있는 주제는 BDNF이다⁴⁾. 신경영양성 인자는 성장인자로서 신경계의 발달 및 유지를 위한 필수적 조절인자다. 특히 이들 물질은 신경의 생존, 축삭성장, 시냅

스 가소성 등의 조절자 역할을 담당하는 물질로, 뇌졸중이나 척수손상 동물모델 실험을 통해 이들 물질이 신경의 손상을 방지하고 축삭의 성장을 유도하며 최종적으로 기능적 회복을 돕는 역할을 담당하는 것으로 확인되었다. 최근의 연구결과 이들 물질들이 운동학습이나 신체활동 등을 통해 활동 의존적으로 중추신경계 내에서 그 발현이 증가되는 것이 확인되었으며, 신경계 질환의 보상적 의미뿐 아니라 질환의 진행을 방지하는 역할이 밝혀져 임상적 적용을 위한 다양한 연구가 진행 중이다. 이들 신경영양성 인자는 nerve growth factor(NGF), brain-derived neurotrophic factor(BDNF), Neurotrophin-3(NT-3), Neurotrophin-4/5(NT-4/5), Neurotrophin-6(NT-6)가 확인되었으며, 이들 성장인자중에서 가장 최초로 확인된 물질은 NGF이다²⁷⁾.

BDNF는 두 번째 신경영양성 인자로 발견된 성장인자로 돼지 추출물 연구를 통해 확인되었으며, 12.3 KDa의 분자량과 120 개의 아미노산 단백질로 구성된 물질이다²⁸⁾. BDNF mRNA와 그 단백질은 NGF의 발현부위보다 광범위한 부위에서 확인되며 특히 해마에서 풍부하게 발현되는데, 이러한 발현양상은 신경형성에 의해 조절되는 것으로 보고되었다²⁹⁾. BDNF는 Neurotrophin 4/5(NT-4/5)와 구조적으로 연관되어 있으며, 이들은 세포질 내 tyrosine kinase domain을 활성화하여 신경성장작용을 나타낸다. 이러한 신경성장인자들은 중추 및 말초 신경계 신경세포의 발달과 유지에 필수적인 역할을 하며, 발생동안의 枯死(apoptosis)를 억제하고 신경세포의 성장을 촉진하는 역할을 한다³⁰⁾.

한편 반복적으로 stress에 노출되거나 우울증에 이환된 환자의 경우 뇌내 해마(hippocampus)의 용적 감소와 더불어 해마 신경세포의 위축과 과사를 유발하며, BDNF를 mRNA 수준에서 감소시킨다⁹⁾. 李³¹⁾는 실험적으로 stress가 뇌내 해마조직의 신경영양성 인자와 신경세포의 생성에 미치는 효과를 알아보기 위해 Chronic Mild Stress(이하 CMS)모델의 흰쥐를 이용한 실험에서 CMS에 노출된 흰쥐의 BDNF mRNA가 해마의 CA1, CA3, pyramidal cell layer에서 유의한 감소를 보이는 것으로 보고하였다. 따라서 약물을 이용한 BDNF의 증가는 stress로 인한 손상으로부터 신경세포를 보호하는 것을 암시하는 것이다⁹⁾.

본 연구에 사용된 補血安神湯은 金³²⁾에 의해 創劑된 방제로 임상에서 血虛로 인한 諸神經症에 자주 활용되며, 실험적으로 항stress 및 항우울효과가 있는 것으로 보고된 바 있다. 補血安神湯의 약물은 山藥(炒), 當歸(身), 龍眼肉, 蘿菴子, 白芍藥(酒炒), 乾地黃(酒炒), 麥門冬(去心), 白茯苓, 酸棗仁(炒), 神曲(炒), 麥芽(炒), 遠志, 川芎(去油), 黃芩(酒炒), 五味子, 甘草, 貢砂仁, 甘菊으로 구성되어 血虛로 인한 諸神經症을 다스릴 목적으로 立方되어, 脈細數하면서 不眠, 怔忡, 空腹腹痛, 頭痛, 眼昏, 大便秘, 舌赤裂, 舌乾 또는 剝離되거나 淡紅色 등의 血虛證이 뚜렷하며 食不進, 心下痞, 頻尿 등의 증상을 동반하는 神經症에 쓰인다¹⁴⁾. 따라서 補血安神湯은 일체 血虛에 活血 補血 調經 등의 효과가 있는 四物湯³³⁾을 기본으로 하고 있음을 알 수 있는데, 當歸, 白芍藥, 乾地黃은 補陰養血藥이고, 白朮, 甘草, 白茯苓은 補氣助陽藥이며, 山藥, 龍眼肉, 麥門冬, 五味子, 酸棗仁은 收斂精氣藥이며, 川芎은 溫和血分藥으로 이들은 益氣, 養血, 健脾, 助陽의 효능으로 正氣를 補하

는 작용이 있고, 麥芽와 神麩은 通氣行滯하고, 蘿菴子は 消積溫痰하고, 砂仁은 溫運中氣하여 消化를 돕고, 甘菊은 發散風熱하고, 遠志는 溫化寒痰하고, 黃芩은 清熱燥濕하는 작용이 있어 이들은 消導, 祛風, 清熱의 효능으로 邪氣를 막는 작용을 한다³⁴⁾. 결국 補血安神湯은 扶正祛邪의 원칙에 입각하여 正氣와 邪氣의 상호작용에서 인체를 지키는 예방적 의미를 지닌 처방으로 血虛로 인한 諸心因性 질환 및 stress성 질환에 광범위하게 응용된 처방임을 알 수 있다^{14,32)}.

補血安神湯에 대한 실험적 연구로는 金 등⁷⁾은 구속stress 흰쥐의 뇌 및 혈중 catecholamine에 미치는 영향을, 朴⁸⁾은 구속stress 흰쥐의 체중 및 혈액 성분에 미치는 영향을, 金⁹⁾은 소음stress를 받은 흰쥐와 집토끼의 뇨중 catecholamine 함량에 미치는 영향을, 李¹⁰⁾는 구속, 전기자극 및 침수 stress를 받은 흰쥐의 뇨중 epinephrine 및 dopamine의 양적 변화와 위조직의 변화에 미치는 영향을, 李¹¹⁾는 전기쇼크에 의한 갈등 stress를 받은 흰쥐의 체중 변화, 물 섭취량 및 위궤양 등에 미치는 영향을, 金¹²⁾은 補血安神湯 투여가 운동선수에 유발된 stress반응에 미치는 영향을 보고하였으며 黃¹³⁾은 우울증유발 흰쥐의 항우울효과에 대하여 보고한 바 있다. 다양한 종류의 stress에 대하여 補血安神湯은 항stress 효과를 나타내었기에 분자생물학적 측면에서도 유효할 것으로 생각되어 본 연구에서는 補血安神湯이 SK-N-SH cell line의 BDNF의 발현에 미치는 영향을 MTT-based cytotoxicity assay와 Western blotting, Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) 실험을 통하여 알아보려 하였다.

우선 補血安神湯으로 처리한 시료의 농도에 따른 세포증식 및 독성을 검사하기 위한 MTT-based cytotoxicity assay 실험을 하였다. MTT-based cytotoxicity assay는 세포배양에서 생존하는 세포의 수를 측정하는 방법으로 살아있는 세포의 mitochondrial succinic dehydrogenase가 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma, USA)를 푸른색의 formazan으로 환원되는 작용을 이용한 것으로 흡광도(OD)의 값은 살아있는 세포의 수를 반영한다. 그 결과, 6시간 배양실험군에서는 대조군과 비교하여 補血安神湯 0.1 mg/ml 실험군에서 108.5 ± 1.6 % (P<0.05), 1 mg/ml 실험군에서 242.6 ± 1.1 % (P<0.001)의 세포증식을 보였으며, 12시간 배양실험군에서는 補血安神湯 0.1 mg/ml 실험군에서 121.9 ± 0.8 % (P<0.001), 1 mg/ml 실험군에서는 241.5 ± 5.7 % (P<0.001)로 세포증식을 나타내어 각각 통계적으로 유의한 결과를 보였다. 그러나 補血安神湯 0.01 mg/ml 실험군과 0.001 mg/ml 실험군에서는 6시간과 12시간 배양실험군 모두 유의성이 나타나지 않았다.

다음으로는 처리된 배지의 BDNF mRNA expression과 BDNF expression을 보기 위하여 Protein extraction 후 Western blotting과 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) 실험을 하였다. 이에 사용된 補血安神湯의 최종농도는 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml이었다. 補血安神湯 0.001 mg/ml 처리군은 MTT-based cytotoxicity assay 결과상 세포증식 효과가 보이지 않아 제외하였다. BDNF expression 실험에서는 補血安神湯의 실험결과를 보다 객관화하기 위하여 Fluoxetine 10-7

mM(SK-N-SH treated with Fluoxetine 10⁻⁷ mM) 실험군을 또 다른 실험대조군으로 사용하였다. Fluoxetine은 BDNF와 trkB proteins의 발현을 증가시키는 것으로 밝혀져 있으며, 임상적으로는 小兒憂鬱症, 小兒期 不安障礙 등의 小兒期 精神疾患(childhood mental illnesses)의 치료에 사용되고 있는 약물이다^{29,30}.

BDNF mRNA expression 결과 補血安神湯 0.01 mg/ml 실험군에서는 1.11 ± 0.09 % 로 대조군(0.99 ± 0.02 %)에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었다. 그러나 0.1 mg/ml 실험군에서 1.22 ± 0.01 % (P<0.05), 1 mg/ml 실험군에서 1.31 ± 0.05 % (P<0.05)로 補血安神湯의 유의한 세포 보호효과가 관찰되었다. BDNF expression 결과에서는 대조군이 1.13 ± 0.20 % 인데 비하여 補血安神湯 0.01 mg/ml 실험군에서는 1.35 ± 0.14 % 로 유의성은 없었으나, 0.1 mg/ml 실험군에서 1.50 ± 0.01 % (P<0.05), 1 mg/ml 실험군에서는 1.63 ± 0.12 % (P<0.01)로 補血安神湯의 유의미한 세포 보호효과가 관찰되었다. 임상적으로 항stress 효과가 있는 Fluoxetine 10⁻⁷ mM 실험군에서는 1.60 ± 0.07 % (P<0.01)로 補血安神湯 1 mg/ml 투여군이 Fluoxetine 실험군과 유사한 결과를 나타내었다. Fluoxetine 실험군과 보혈안신탕 실험군 간의 비교결과 통계적인 차이는 없었다.

BDNF mRNA는 중추신경계 내에서 광범위하게 나타나는데 해마의 CA3와 dentate gyrus(DG)에서 가장 많이 발현되며 그 외에 전두엽과 측두엽등에서도 나타난다³⁵. BDNF는 신경세포의 생존과 세포생성에 관여하는 중요한 성장인자로 신경세포의 생존에서 BDNF는 시냅스의 활성화와 시냅스 전후의 역할에 필수적인 요소로 작용한다³⁶. 신경세포의 활동은 신경영양성 인자의 합성과 방출, 그리고 신경세포간의 이동을 통해 가능하며³⁷, BDNF는 신경세포간의 자극전달 통로와 신경세포에서의 전기적 자극 및 시냅스 효과에 빠른 변화를 유발하며 이러한 변화는 신경세포가 장기간에 걸쳐 형성되고 생존하는 데에 기초가 된다³⁸.

위의 실험결과에서 補血安神湯은 BDNF mRNA expression 과 BDNF expression 모두 증진시키는 효과가 있었으며 현재 임상활용중인 Fluoxetine의 효과에 근접하는 결과를 보였다. 현재 보고된 바에 의하면 stress는 해마에서 BDNF mRNA level을 저하시키며 이것은 신경세포의 시냅스 기능의 저하를 초래한다. 따라서 장기간의 항stress 약물 치료로 증가된 BDNF 발현은 시냅스 전후에서 신경세포의 시냅스 기능을 활성화하는데 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨진다⁶⁹. 그러므로 본 연구의 실험결과로 볼 때 stress로 인한 신경세포 손상에 대하여 補血安神湯이 시냅스 사이의 기능 활성화를 통해 신경세포의 형성과 생존에 도움을 주는 세포보호효과를 지니는 것을 사료된다.

결 론

補血安神湯이 SK-N-SH (immortalized human neuroblastoma) cell line의 BDNF의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT-based cytotoxicity assay와 Western blotting, Reverse Transcriptase -Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) 실험을 시행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 補血安神湯의 세포증식

및 독성을 검사하기 위한 MTT-based cytotoxicity assay에서 6시간 배양실험결과는 0.1 mg/ml 실험군에서 108.5 ± 1.6 % (P<0.05), 1 mg/ml 실험군에서 242.6 ± 1.1 % (P<0.001)의 세포 증식을 보였으며, 12시간 배양실험결과는 0.1 mg/ml 실험군에서 121.9 ± 0.8 % (P<0.001), 1 mg/ml 실험군에서는 241.5 ± 5.7 % (P<0.001)로 각각 유의한 결과를 보였다. BDNF mRNA expression 결과, 0.1 mg/ml 실험군에서는 1.22 ± 0.01 % (P<0.05), 1 mg/ml 실험군에서는 1.31 ± 0.05 % (P<0.05)로 補血安神湯의 유의미한 세포 보호효과가 관찰되었다. BDNF expression 결과, 0.1 mg/ml 실험군에서 1.50 ± 0.01 % (P<0.05), 1 mg/ml 투여군에서는 1.63 ± 0.12 % (P<0.05)로 유의미한 세포 보호효과가 관찰되었다. 임상적으로 항stress 효과가 있는 Fluoxetine 10⁻⁷ mM 실험군이 1.60 ± 0.07 % (P<0.01)의 결과를 나타낸 것과 비교할 때 補血安神湯이 Fluoxetine에 근접하는 세포보호효과가 있음을 알 수 있다. Fluoxetine 실험군과 보혈안신탕 실험군 간의 비교결과 통계적인 차이는 없었다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 논문게재비 지원으로 이루어졌음.

참고문헌

1. 우희정. 학령기 아동의 스트레스에 대한 이론적 고찰, 한국 가정교과교육학회지 8(2):43-51, 1996.
2. Annette Spence. 청소년 스트레스와 정신건강, 학지사, pp .31-49, 1998.
3. 대한심심스트레스학회. 스트레스 과학의 이해, 서울, 신광출판사, pp.11-19, 149-158, 270-284, 1997.
4. J Licinio & M-L Wong. Molecular Psychiatry 7:519. 2002.
5. Ueyama, T., Kawai, Y., Nemoto, K., Sekimoto, M. Tone, S. and Senba, E. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophin and their receptors in the rat brain, Neurosci. Res. 28:103-110, 1997.
6. Nibuya, M., Morinobu, S. and Duman, R.S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatment, J. Neurosci., 15:7539-7547, 1995.
7. 金知昱. 補血安神湯이 拘束스트레스 흰쥐의 腦部位別 Catecholamines含量에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1993.
8. 朴仁. 補血安神湯이 拘束스트레스 흰쥐의 體重 및 血液成分에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1991.
9. 金永洙. 補血安神湯의 騒音 Stress에 對한 實驗的 考察, 慶熙大學校 大學院, 1986.
10. 李東鎮. 補血安神湯, 加味補血安神湯의 抗 Stress效果에 關한 實驗的 研究, 慶熙大學校 大學院, 1987.
11. 李雄錫. 補血安神湯의 抗 스트레스 效果에 關한 實驗的 研究, 慶熙大學校 大學院, 1991.

12. 金鍾佑. 補血安神湯 投與가 運動選手에 誘發된 스트레스反應에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1996.
13. 池相根. 憂鬱症誘發 흰쥐에 대한 補血安神湯의 抗憂鬱效果, 慶熙大學校 大學院, 2001.
14. 東國大學校 醫療院. 韓方病院處方集, 東國大學校 醫療院 韓方病院, p.103, 2000.
15. Brenner, A. helping children cope with stress. Massachusetts, Lexington Books, 1984.
16. 金鐘佑. Stress의 韓醫學的 理解, 東醫神經精神科學會誌 4(1):19-26, 1993.
17. 송고식 외. Stressor에 따른 신체생리반응에 대한 동의학적으로 고찰, 대한한의학회지 18(2):103-104, 1987.
18. 宮城音彌. ストレス, 東京 講談社 5th Ed, p174-184, 1986.
19. 洪元植. 精校皇帝內經素問, 서울, 동양의학연구원출판부, pp. 18-20, 34, 36, 44, 46, 51, 68-69, 79, 92, 107-109, 127, 131, 172, 1985.
20. 大韓東醫生理學會. 東醫生理學, 서울, 慶熙大學校出版局, p. 21, 1983.
21. Selye H. The alarm reaction, Canad. Med. Ass. J. 34: 706-713, 1936.
22. 黃義完 외. 東醫精神科學, 現代醫學書籍社, pp.53-56, 87-94, 99-109, 617-619, 624, 651-657, 727-751, 783, 786-787, 1987.
23. 최승훈. 東醫病理學, 서울, 고분사, pp.318-319, 1990.
24. 이상룡 외. 情動 Stressor(七情)가 오장기능에 미치는 영향, 동의학신경정신과학회지, 1:49-60, 1990.
25. 김주연 외. 학령기 아동의 스트레스, 스트레스 대처행동, 건강문제간의 관계, 대한신심스트레스학회지 7(1):13-22, 1999.
26. 김종우 외. 한의학에서 본 정신구조, 대한스트레스학회지 2(1):63-71, 1994.
27. 김석현, 남기원. 신경영양성 인자와 역할, 대한물리치료학회지 11(2):131-137, 1999.
28. Leibrock J, Lottspeich F, Hohn M. Molecular cloning and expression of brain derived neurotrophic factor. Nature 341:149-152, 1989.
29. Thoenen H, Zafra F, Hengeler B et al. The synthesis of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal and cortical neurons is regulated by specific transmitter systems. Ann. NY Acad. Sci. 640:86-89, 1991.
30. Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors, Curr Opin Cell Biol 7:148-155, 1995.
31. 李錦珠. Chronic Mild Stress가 흰쥐 뇌내 해마조직의 BDNF, bFGF, NR1 mRNA 발현과 신경세포의 생성에 미치는 영향, 인하대학교 대학원, 2001.
32. 金相孝. 東醫精神科學, 서울, 杏林出版社, pp.258-264, 277-279, 358, 360-361, 1980.
33. 康舜洙, 盧昇鉉, 李尙仁. 方劑學, 서울, 癸丑文化社, pp. 115-118, 1984.
34. 李尙仁. 本草學, 서울, 修書院, pp.58-60, 101-110, 112-115, 121-122, 171-175, 197-198, 208-209, 244-246, 281-284, 347-349, 358-359, 381-383, 393-394, 399-401, 407-409, 505-507, 1975.
35. Hofer M, Pagliusi S, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. EMBO J 9: 2459-2464, 1990.
36. Shaywitz A, Greenberg M. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signal. Annu Rev Biochem 68:821-861, 1999.
37. Kohara K, Kitamura A, Morishita M, Tsumoto T. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. Science 291:2419-2423, 2001.
38. Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. Nat Rev Neurosci. 2:24-32, 2001.