

모려분을 이용한 한의학적 항스트레스성 기능보조제 개발

이용태* · 최병태¹ · 최영현² · 강경화

동의대학교 한의과대학 생리학교실 · 한의학연구소, 1: 해부학교실, 2: 생화학교실

Development of Health Assistances for Anti Stress used with *Ostreae Concha*

Yong Tae Lee*, Byung Tae Choi¹, Yung Hyun Choi², Kyung Hwa Kang

Department of Physiology · Research Institute of Oriental Medicine,

1: Department of Anatomy, 2: Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Ostreae concha is natural products of sea that has good function for anti-stress. WE observed the effect of *Ostreae concha*, Yukkwooltang and yukwool-tang add *Ostreae concha* for catecholamine, GOT, GPT, LDH and TG after immobilization stress, *Ostreae concha* depressed the stress response. In immunohistochemical analysis, The area of white pulp of the spleen decreased in the control groups as compared with control ones. At same time, more severe histological changes of spleen such as the decreased diameter of periarterial lymphoid sheath and splenic node were demonstrated in the rats challenged with emotional stress. But these changes were slightly recovered in rats pretreated with Sample I, Sample II and Sample III. Immunohistochemical analysis showed that the expression of the inflammation-related protein tended to increase. But a decline of these expression, especially TNF- α by pretreated with Sample I, were observed in the red pulp of spleen of the experimental rats. These results suggest that *ostreae concha* may act as a therapeutic agent for stress disease through a regulation of stress-related hormones.

Key words : *Ostreae concha*, Yukkwooltang, immobilization stress, catecholamine, TNF- α

서 론

모려는 굴조개 껍질로 <신농본초경>에 수록된 이래 <본초강목>에서 "陰液을 수렴하고 陽을 키우며 汗을 멈추게 하고 精을 수렴하며 痰(痰)을 제거하고 단단한 덩어리를 부드럽게 한다. 경간, 현기증, 자한, 도한, 유정, 배뇨가 곤란하면서 소변 색이 뿌연 증상, 붓루, 대하, 나력, 癰癤 등을 치료한다."고 되어 있으며, <동의보감>에서 "기울로 인한 간병 협통에 사용한다"고 하여 신체의 체액 조절과 정신적 스트레스에 효능이 있음이 알려진 해양유래 한약재이다^{14,20}.

스트레스란 생체의 균형을 깨뜨리는 내, 외적 원인에 의해 일어나는 유기체 내의 변화를 말하며, 스트레스의 종류와 방법이 다를지라도 생체는 이에 대항하여 여러 가지 반응을 일으키게 되는데, 그 반응으로 내분비계, catecholamine계 그리고 면역계의 변화가 일어난다¹⁻³.

스트레스 반응에 hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis가 중요한 역할을 하며, 이는 뇌의 ACTH 유리 증가와 이로 인한 부신의 증대 및 glucocorticoid 분비 증가 그리고 catecholamine 분비 및 교감신경흥분 등이 유발된다는 것은 주지의 사실이다^{4,6}.

그러나 최근 들어 스트레스 반응이 부하된 스트레스 인자의 종류에 따라 HPA axis의 활성화를 조절하는 limbic structure의 중요성이 점차 부각되고 있으니 즉 생존에 위협이 되는 전신적 스트레스인자에는 HPA axis가 반응하며, 감정적 스트레스와 같은 순차적 스트레스인자에는 limbic structure가 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고 있다^{7,9}.

한의학에서 스트레스와 관련된 견해는, 정신신체적 스트레스의 원인을 철정과 철기로 보며, 또한 외기의 변화가 맥관 및 자율신경의 긴장과 이완을 유발하여 나타나는 생체 반응을 기의 변화로 파악하여 철기, 구기, 기울, 기억, 기통 등으로 나타내므로 이는 스트레스 현상이라고 할 수 있다¹⁰고 하여, 모든 질병의 원인이 모두 스트레스가 될 수 있으니, 내적 질병의 원인인 음식, 거처, 음양, 화로와 외적 질병의 원인인 구기, 육음 및 내, 외적 원인에 속하지 않는 외상, 피로 등으로 기 순환이 되지 않으며 이를 시작으로 기울을 형성하고 점차 신체의 불균형을 초래하여

* 교신저자 : 이용태, 부산시 진구 양정 2동 산 45-1, 동의대학교 한의과대학

· E-mail : ytleee@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8635

· 접수 : 2006/09/28 · 수정 : 2006/10/19 · 채택 : 2006/11/13

심각한 질병을 유발한다고 하였다¹¹⁻¹⁴).

한편 이러한 칠정 또는 칠기는 인체에 전신적인 스트레스를 유발하거나, 감정적 스트레스를 유발하여 기의 승강, 변화를 저해하는 율병을 유발하고 이는 나아가 간의 정상 생리를 방해하여 간기울결을 초래한다고 하였다¹⁵⁻¹⁹).

이러한 율병에 사용하는 대표적인 처방이 육울탕으로, 육울탕은 <고금의감>, <단계심법> 및 <의학입문> 등에 수록되어 있고, 처방 구성은 조금씩 다르지만 “開諸鬱火 通治六鬱”하는 효능이 있으며 <동의보감>에 수록된 처방은 <고금의감> 처방에 생강 3쪽이 추가된 것이다²⁰⁻²²).

이에 실험적으로 스트레스 부여 방법은 다양하지만, 전신적 스트레스 뿐만 아니라, 감정적 스트레스 반응이 가장 잘 발현되는 구속스트레스^{17,19,23-25}를 흰쥐에 부여하고, 모려, 육울탕 그리고 육울탕 가 모려를 각각 경구 투여한 후, 혈중 catecholamine함량, Aspartate aminotransferase(AST; GOT), Alanine aminotransferase (ALT; GPT), Lactate Dehydrogenase (LDH) 활성도, Triglyceride (TG) 함량, 비장에 미치는 병리조직화학적 관찰 및 염증관련 단백질에 대한 면역조직화학적 변화를 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험 동물은 체중 130 g 내외의 Sprague Dawley계 암컷 흰쥐(대한실험동물센터, 한국)를 구입하여 고형사료(삼양 배합사료 실험동물용, 삼양유지사료, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경(온도: 20±2 °C, 습도: 40~60 %, 명암: 12 시간 light/dark cycle) 하에서 2 주 적응 후 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 약재는 시중에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였으며, 육울탕 처방은 《東醫寶鑑》에 수재된 내용에 따라 조제하였으며, 1 첩의 처방내용과 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of yukwool-tang, yukwool-tang add ostreae concha

韓藥名	生藥名	重 量(g)
항부자	CYPERI RHIZOMA	7.5
창출	ATRACTYLODIS RHIZOMA	6.0
천궁	LIGUSTICI RHIZOMA	6.0
진피	CITRI RETICULATAE PERICARPIMUM	4.0
생강	ZINGIBERIS RHIZOMA	3.0
반하(제)	PINELLIAE RHIZOMA	2.0
적복령	PORIA	2.8
치자	GARDENIAE FRUCTUS	2.8
사인	AMOMI FRUCTUS	2.0
감초	GLYCYRRHIZAE RADIX	2.0
모려	OSTREAE CONCHA	4.0
總重量		42.1

3) 기구 및 시약

본 실험에는 생화학 분석기(COBAS MIRA, Roche, Germany), Gamma Counter(1470-Wizard Gamma Counter, Willac, Finland), 원심분리기 (IEC Centra-8R centrifuge

international EQUIPMENT COMPANY Extraction apparatus 3 unit×500 ml, USA), 감압농축기(Rotaparor REIII BÜCHI Switzerland)등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

상기 처방의 10 첩 분량을 세절하여 증류수 1700 cc로 round flask에서 2 시간 30 분 가열 추출하고 rotary evaporator 로 500 cc되게 감압 농축하여 냉장 보관하였고, 투여 전에 따뜻하게 데워서 사용하였다.

2) 구속 스트레스 부여 및 검액 투여 방법

흰쥐 8 마리를 1 군으로 하여 아무 처치하지 않은 정상군 (Normal), 나무로 만든 구속상자(5×20×5 cm)에 넣어 1일 12시간 썩(오후 9시~다음날 오전 9시) 7일 간 구속시키면서 검액을 경구 투여한 실험군(Sample), 7일간 구속시키면서 생리식염수를 경구 투여한 대조군(Control)으로 하였다. 검액은 1일 1회 오전 11시에 사람 1 일 복용량의 3 배 농도로 흰쥐 체중에 비례(0.1 ml/kg)하여 경구투여하였으며, 구속된 12시간 동안은 절식시켰다. 검액은 구속 시작과 함께 투여하였다. sample 군은 모려군 (ostreae concha, Sample I), 육울탕군(yukwool-tang, Sample II), 육울탕+모려군(yukwool-tang add ostreae concha, Sample III)으로 나누었다.

3) 채혈 및 혈청분리

구속 7일째 동물을 가볍게 ether 마취시킨 후 심장 천자하여 혈액을 채취하였으며 원심분리기 (IEC Centra-8R centrifuge international EQUIPMENT COMPANY Extraction apparatus 3 unit×500 ml, USA)로 2014 g로 25 분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후, 그 혈청을 실험에 사용하였다.

4) 혈청검사

(1) 혈청 중 Catecholamine 함량의 측정

혈청 중 Catecholamine 함량의 측정은 자동분석기기 1470-Wizard gamma Counter를 통해 이중항체법(Double Antibody Method)을 통해서 측정하는데 sample 또는 standard 중의 Catecholamine이 항원으로 Anti-Catecholamine과 결합하기 위해 I125-labeled Catecholamine과 서로 결합하는데 I125-labeled Catecholamine 과 Anti-Catecholamine과 결합한 부위에 2차 항체가 결합하게 되어 bound form 과 free form이 완전히 분리되어 bound form만 측정하게 된다.

(2) 혈청 중 Aspartate aminotransferase(AST; GOT) 활성도 측정

혈청 중 AST측정은 자동 분석기기 (COBAS MIRA, Roche, Germany)로 Reitman-Frankel법을 통하여 발생하는 적갈색의 흡광도 측정하고 표준혈청에 있어서도 같은 방법으로 반응시켜 작성한 검량선으로 부터 검체 중의 AST를 측정하였다.

(3) 혈청 중 Alanine aminotransferase (ALT; GPT) 활성도 측정

혈청 중 ALT측정은 자동 분석기기 (COBAS MIRA, Roche, Germany)로 Reitman-Frankel법을 통하여 발생하는 적갈색의 흡광도 측정하고 표준혈청에 있어서도 같은 방법으로 반응시켜 작성한 검량선으로 부터 검체 중의 ALT를 측정하였다.

(4) 혈청 중 Lactate Dehydrogenase (LDH) 활성도 측정

혈청 중 LDH 측정은 자동 분석기기 (COBAS MIRA, Roche, Germany)로 LDH가 젓산을 산화, 피루빈산을 생성하고, 조효소인 NAD는 NADH로 환원되면서, 340nm에서의 흡광도가 증가하는데 이 흡광도 변화속도를 측정하는 것에 의하여 LDH의 활성치를 구하고 표준혈청에 있어서도 같은 방법으로 반응시켜 작성한 검량선으로 부터 검체 중의 LDH 농도를 측정하였다.

(5) 혈청 중 Triglyceride (TG) 함량 측정

혈청 중 Triglyceride 측정은 자동 분석기기 (COBAS MIRA, Roche, Germany)로 유리 Glycerol 소거법 (GPO with Glycerol blank)을 통하여 반응물의 탁도를 광학적으로 측정하고 표준혈청에 있어서도 같은 방법으로 반응시켜 작성한 검량선으로 부터 검체 중의 Triglyceride 농도를 측정하였다.

5) 절편제작 및 조직병리학적 관찰

비장을 절취하여 4% paraformaldehyde에 4℃ 12시간 고정하여 6 μm 절편을 제작하였다. 조직병리학적 관찰을 위하여 hematoxylin-eosin 및 periodic acid Schiff's (PAS)염색을 실시하였다. 비장내 백색수질에 대한 형태학적 계측은 동맥주위임파초 (periarterial lymphatic sheath, PALS)와 비장소절(splenic node, SN)로 구별하여 현미경하에서 micrometer로 잰 직경을 측정하였다.

6) 면역조직화학적 관찰

면역조직화학적 관찰을 위해 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에서 95℃ 5분간 처리하였고, 이를 3% methanolic hydrogen peroxide 에 30분간 실온에서 처리하였다. PBS로 세척한 후 goat normal serum (Vector Lab., PK-6101)으로 실온에서 30분간 처리하였으며, tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β, cyclooxygenase (COX)-1, COX-2, nuclear factor (NF)-κ Bp65, inhibitory (I)-κBα 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc)를 200:1로 희석하여 4℃ 습실에 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Lab., PK-6101)를 실온에서 30분 동안 반응 시켰으며 PBS로 세척 후 ABC kit (Vector Lab., PK-6101)에 실온에서 60분간 반응시켰다. DAB substrate kit (Vector Lab., SK-4100)로 실온에서 5분간 발색시켰으며 상기 실험 방법 중 일차 항체대신 10% BSA/PBS를 처리하고 동일한 과정으로 염색한 것을 대조군으로 삼았다.

7) 통계 분석

성적은 평균치±표준오차로 나타내었으며, 평균치간의 유의성은 Student's T-test를 이용하여 검정하였고 p값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 判定하였다.

결 과

1. 혈청 중 Epinephrine 함량에 미치는 영향

혈청 중 Epinephrine의 함량은 Normal에서 209.80±7.70(pg/ml)이었으며, Control은 686.33±17.92(pg/ml)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.001) 증가를 보였으며 Sample I에서는 311.89±29.10 (pg/ml)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었고

Sample II에서는 480.71±36.62(pg/ml)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었으며 Sample III에서는 183.49±22.13 (pg/ml)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었다 (Table 2).

Table 2. Effect of ostreae concha, yukwool-tang, yukwool-tang add ostreae concha on the Serum Epinephrine Level after Immobilization Stress in Rats (M±S.E.)

Group	No	Epinephrine(pg/ml)
Normal	6	209.80±7.70
Control	6	686.33±17.92 ^{###}
Sample I	6	311.89±29.10 ^{***}
Sample II	6	480.71±36.62 ^{***}
Sample III	6	183.49±22.13 ^{***}

M±S.E. : Mean ± Standard Error. # : Significantly different from Normal group(### p<0.001). * : Significantly different from Control group(*** p<0.001). Normal : No treated group. Control : Administration of Normal Saline. Sample I : Administration of ostreae concha. Sample II : Administration of yukwool-tang. Sample III : Administration of yukwool-tang add ostreae concha

2. 혈청 중 Norepinephrine 함량에 미치는 영향

혈청 중 Norepinephrine의 함량은 Normal에서 1534.11±156.32 (pg/ml)이었으며, Control은 3177.96±89.72(pg/ml)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.001) 증가를 보였으며 Sample I에서는 1217.78±73.92(pg/ml)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었고 Sample II에서는 1932.42±153.24(pg/ml)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었으며 Sample III에서는 1383.80±69.83(pg/ml)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of ostreae concha, yukwool-tang, yukwool-tang add ostreae concha on the Serum Norepinephrine Level after Immobilization Stress in Rats (M±S.E.)

Group	No	Norepinephrine(pg/ml)
Normal	6	1534.11±156.32
Control	6	3177.96±89.72 ^{###}
Sample I	6	1217.78±73.92 ^{***}
Sample II	6	1932.42±153.24 ^{***}
Sample III	6	1383.80±69.83 ^{***}

: Significantly different from Normal group (### p<0.001). * : Significantly different from Control group (*** p<0.001). Abbreviations listed in Table 2.

3. 혈청 중 Dopamine 함량에 미치는 영향

혈청 중 Dopamine의 함량은 Normal에서 114.12±13.23(pg/ml)이었으며, Control은 207.92±32.80(pg/ml)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.05) 증가를 보였으며 Sample I에서는 60.59±15.13 (pg/ml)로 Control에 비하여 유의한(p<0.005) 감소를 나타내었고 Sample II에서는 367.63±81.50(pg/ml)로 Control에 비하여 증가하였으나 유의성은 나타내지 않았으며 Sample III에서는 39.84±16.83(pg/ml)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었다(Table 4).

4. 혈청 중 Aspartate aminotransferase(AST; GOT) 함량에 미치는 영향

혈청 중 Aspartate aminotransferase의 함량은 Normal에서 107.17±2.15(U/l)이었으며, Control은 112.50±2.58(U/l)로

Normal에 비하여 유의한(p<0.05) 증가를 보였으며 Sample I에서는 115.50±2.83(U/I)로 Control에 비하여 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았으며 Sample II에서는 120.67±2.68(U/I)로 Control에 비하여 유의한(p<0.05) 증가를 하였으며 Sample III에서는 114.17±2.87(U/I)로 Control에 비하여 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 5).

Table 4. Effect of ostreae concha, yukwool-tang, yukwool-tang add ostreae concha on the Serum Dopamine Level after Immobilization Stress in Rats (M±S.E.)

Group	No	Dopamine(pg/ml)
Normal	6	114.12±13.23
Control	6	207.92±32.80 [#]
Sample I	6	60.59±15.13 ^{**}
Sample II	6	367.63±81.50
Sample III	6	39.84±16.83 ^{***}

: Significantly different from Normal group (# p<0.05). * : Significantly different from Control group (** p<0.005, *** p<0.001). Abbreviations listed in Table 2.

Table 5. Effect of ostreae concha, yukwool-tang, yukwool-tang add ostreae concha on the Serum GOT Level after Immobilization Stress in Rats (M±S.E.)

Group	No	GOT(U/I)
Normal	6	103.17±2.15
Control	6	112.50±2.53 [#]
Sample I	6	115.50±2.83
Sample II	6	120.67±2.68 [*]
Sample III	6	114.17±2.87

: Significantly different from Normal group (# p<0.05). * : Significantly different from Control group (* p<0.05). Abbreviations listed in Table 2.

5. 혈청 중 Alanine aminotransferase (ALT; GPT) 함량에 미치는 영향

혈청 중 Alanine aminotransferase의 함량은 Normal에서 32.50±0.89(U/I)이었으며, Control은 48.67±1.94(U/I)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.001) 증가를 보였으며 Sample I에서는 27.17±0.54(U/I)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었고 Sample II에서는 36.33±0.88(U/I)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었으며 Sample III에서는 33.50±0.34(U/I)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Effect of ostreae concha, yukwool-tang, yukwool-tang add ostreae concha on the Serum GPT Level after Immobilization Stress in Rats (M±S.E.)

Group	No	GPT (U/I)
Normal	6	32.50±0.89
Control	6	48.67±1.94 ^{***}
Sample I	6	27.17±0.54 ^{***}
Sample II	6	36.33±0.88 ^{***}
Sample III	6	33.50±0.34 ^{***}

: Significantly different from Normal group (### p<0.001). * : Significantly different from Control group (*** p<0.001). Abbreviations listed in Table 2.

6. 혈청 중 Triglyceride (TG) 함량에 미치는 영향

혈청 중 Triglyceride의 함량은 Normal에서 50.42±1.06 (mg/dl)이었으며, Control은 82.83±3.98(mg/dl)로 Normal에 비

하여 유의한(p<0.001) 증가를 보였으며 Sample I에서는 52.70±1.55(mg/dl)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었고 Sample II에서는 50.03±3.82(mg/dl)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었으며 Sample III에서는 47.93±2.98(mg/dl)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었다(Table 7).

Table 7. Effect of ostreae concha, yukwool-tang, yukwool-tang add ostreae concha on the Serum Triglyceride Level after Immobilization Stress in Rats (M±S.E.)

Group	No	Triglyceride(mg/dl)
Normal	6	50.42±1.06
Control	6	82.83±3.98 ^{***}
Sample I	6	52.70±1.55 ^{***}
Sample II	6	50.03±3.82 ^{***}
Sample III	6	47.93±2.98 ^{***}

: Significantly different from Normal group (### p<0.001). * : Significantly different from Control group (*** p<0.001). Abbreviations listed in Table 2.

7. 혈청 중 Lactate Dehydrogenase (LDH) 함량에 미치는 영향
 혈청 중 Lactate Dehydrogenase의 함량은 Normal에서 829.50±32.87(U/I)이었으며, Control은 999.50±38.60(U/I)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.05) 증가를 보였으며 Sample I에서는 883.00±56.92(U/I)로 Control에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았으며 Sample II에서는 730.50±61.55(U/I)로 Control에 비하여 유의한(p<0.005) 감소를 하였으며 Sample III에서는 726.50±39.88(U/I)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 하였다(Table 8).

Table 8. Effect of ostreae concha, yukwool-tang, yukwool-tang add ostreae concha on the Serum LDH Level after Immobilization Stress in Rats (M±S.E.)

Group	No	LDH (U/I)
Normal	6	829.50±32.87
Control	6	999.50±38.60 [#]
Sample I	6	883.00±56.92
Sample II	6	730.50±61.55 ^{**}
Sample III	6	726.50±39.88 ^{***}

: Significantly different from Normal group (# p<0.05). * : Significantly different from Control group (** p<0.005, *** p<0.001). Abbreviations listed in Table 2.

8. 비장의 조직병리학적 소견

전형적인 비장의 조직학적 소견을 보이는 Normal에 비해 Control에서는 적색수질에 비해 백색수질의 분포가 줄어들었다. 또한 적색수질에서 혈액 총량과 더불어 PAS 양성 반응을 보이는 세포가 다수 관찰되었다. 백색수질 중 동맥주위임파초와 비장소절에 대한 형태학적 계측 결과는 Fig. 1에 보는 바와 같다. 비장 동맥주위임파초의 평균 직경이 Normal, Control, Sample I, Sample II, Sample III가 각 47.4±2.3 μm, 37.6±1.9 μm, 38.0±1.0 μm, 39.0±1.4 μm, 38.6±1.7 μm이며 비장소절 직경은 24.2±1.4 μm, 18.6±1.2 μm, 19.4±0.6 μm, 18.8±0.9 μm, 20.6±0.5 μm이었다. Control의 동맥주위임파초와 비장소절 직경은 Normal에 비해 현저한 감소를 보였으나 Sample I, Sample II, Sample III에서 대조군에 다소 증가하였으나 현저한 변화는 없었다.

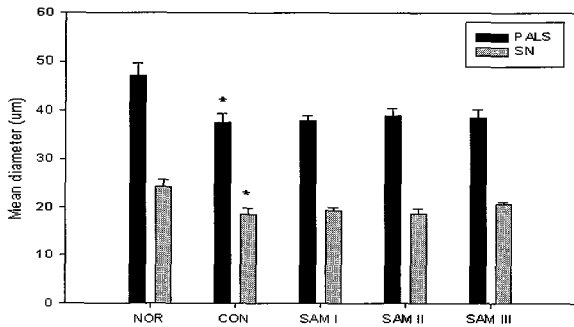


Fig. 1. Comparisons of means of periaarterial lymphatic sheath (PALS) AND splenic node (SN) diameter. The restraint stress induced a decreased mean diameter of PALS and NS compared with normal. * P<0.05 when compared with normal. All bars indicate means±SE of 5 rats. Abbreviations listed in Table 2.

9. 비장의 면역조직학적 소견

Table 9. Immunoreactive reaction of inflammation-related proteins in the spleen of restraint rat

Stain	Regions	Normal	Control	Sample I	Sample II	Sample III
PAS	RP	±++	+++	++	++++	++
	PALS	-	-	-	-	-
	SN	-	-	-	-	-
TNK-α	RP	±	++	+	++	+
	PALS	-	-	-	-	-
	SN	-	-	-	-	-
IL-1β	RP	+	++++	++	++	++
	PALS	±	+++	+++	++	+
	SN	±	±	±	±	±
COX-1	RP	+++	+++	+++	+++	+++
	PALS	-	-	-	-	-
	SN	-	-	-	-	-
COX-2	RP	±	++	+	+	+
	PALS	-	-	-	-	-
	SN	-	-	-	-	-
I-κBα	RP	++	++	++	++	++
	PALS	++	++	++	+++	++
	SN	+++	++	++	++	++
NF-κBp65	RP	+	++	+	+	+
	PALS	-	-	-	-	-
	SN	-	-	-	-	-

0-+++ indicate the relative intensity of the reaction : +++, intense; ++, moderate; +, weak; 0, absent. Abbreviations: RP, red pulp; PALS, periaarterial lymphatic sheath; SN, splenic node; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; COX, cyclooxygenases; I, inhibitory; NF, nuclear factor. Other abbreviations listed in Table 2.

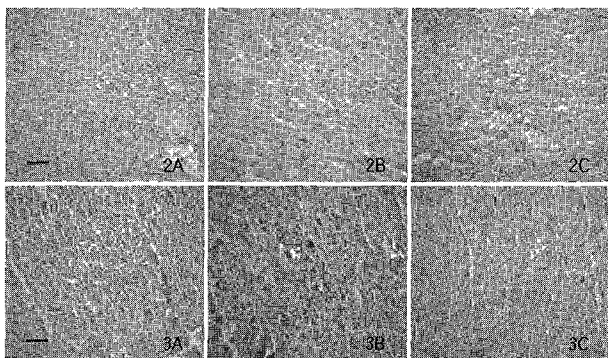


Fig. 2 and 3. TNF-α (Fig. 2) and IL-1β (Fig. 3) immunoreaction of the spleen in the normal (A), restraint stressed control (B) and sample III group (C). Numerous cells with intensive immunoreaction of both TNF-α and IL-1β (arrows) were mainly observed in the red pulp of the spleen of restrained rats, but fewer cells were detected in yukwool-tang with ostreae concha-treated rat, bar=200 µm.

Control 비장의 적수에서 PAS양성 반응세포의 증가와 더불어 염증관련 단백질에 대한 면역반응도 증가하였다. COX-1 및 I-κBα를 제외한 모든 면역반응이 증가하였으며 특히 IL-1β의 면역반응이 가장 현저하였다. 이에 비해 Sample I, Sample II, Sample III를 투여 하였을 때 대체로 면역반응이 감소하였으며 TNK-α에서는 Sample II에 비해 Sample I을 처리하였을 때 더 감소하였다. Control의 IL-1β는 동맥주위임파초에서 증가하나 Sample I 및 Sample II에 의해 감소하였으며 I-κBα는 Control에서 감소하나 Sample I과 Sample II처리에도 변화를 보여 주지 않았다.

고찰

모려는 굴조개 껍질로 <신농본초경>에 수록된 이래 <본초강목>에서 "陰液을 수렴하고 陽을 키우며 痰을 멈추게 하고 精을 수렴하며 痰(痰)을 제거하고 단단한 덩어리를 부드럽게 한다. 경간, 현기증, 자한, 도한, 유정, 배뇨가 곤란하면서 소변 색이 뿌연 증상, 붓루, 대하, 나력, 癭瘤 등을 치료한다."고 되어 있으며, <동의보감>에서 "기울로 인한 간병 협통에 사용한다"고 하여 신체의 체액 조절과 정신적 스트레스에 효능이 있음이 알려진 해양유래 한약재이다^{14,20}.

육울탕은 명대 이²²의 <의학입문>에서 주¹⁵의 월국환에 신곡을 제거하고 진피, 반하, 적복령, 사인, 감초를 가하여 모든 울증을 치료하기 위하여 입방된 처방으로, <단계심법>의 육울탕이 최초의 처방으로 알려졌으나, 이는 기울, 습울, 담울, 열울, 혈울, 식울 각각의 처방을 총칭하는 명칭으로 사용된 것이며, <동의보감>에 수록된 처방은 <고금의감> 처방에 생강 3쪽이 추가된 것이다^{20,22}.

스트레스의 요인은 한냉, 서열, 외상, 감염, 소음 등의 물리적 인자와, 약물, 기아, 과식, 비타민 부족 등의 생화학적 인자, 정신적 자극 및 과로 등의 내부적 요인으로 대별되며²⁶, 이때 생체는 면역 현상과 같은 특이적인 방어기구 외에 자극을 방어하는 비특이적방어기구가 존재하여, 외부 환경의 변화에도 불구하고 내적 환경을 항상 일정하게 유지하려는 자율신경계-부신수질계의 항상성 유지 기구가 있다. 이러한 생체의 방어반응이 일어나는 것을 general adaptation syndrome이라고 하며, 경고반응기, 저항기 및 피로기로 구분된다^{27,28}.

스트레스는 histamine, corticosterone 및 catecholamine과 같은 생체 호르몬 함량을 증가시켜 면역기능을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 특히 정신적 스트레스는 phagocytosis의 감소 등을 유발하여 박테리아나 바이러스에 의한 질병 유발물이 커지게 되며, 암세포의 증식도 촉진되는 것으로 알려졌다^{29,31}.

한의학에서 정신신체적 스트레스의 원인을 철정과 철기로 보며, 또한 외기의 변화가 맥관 및 자율신경의 긴장과 이완을 유발하여 나타나는 생체 반응을 기의 변화로 파악하여 철기, 구기, 기울, 기역, 기통 등으로 나타나므로 이는 스트레스 현상이라고 할 수 있다¹⁰고 하여, 모든 질병의 원인이 모두 스트레스가 될 수 있으나, 내적 질병의 원인인 음식, 거처, 음양, 회로와 외적 질병의 원인인 구기, 육음 및 내, 외적 원인에 속하지 않는 외상, 피로 등으로 기 순환이 되지 않으며 이를 시작으로 기울을 형성하고

점차 신체의 불균형을 초래하여 심각한 질병이 유발된다¹¹⁻¹⁴.

또한 철정 또는 철기는 인체에 전신적인 스트레스를 유발하거나, 감정적 스트레스를 유발하여 기의 승강, 변화를 저해하는 율병을 유발하고 이는 나아가 간의 정상 생리를 방해하여 간기 율결을 초래한다고 하였다¹⁵⁻¹⁹.

한편 실험적 스트레스 부여 방법은 주로 구속스트레스, 통증 자극, 저혈압 출혈, 한냉 노출, 광주기 등의 방법이 있으나³², 본 실험에서는 면역 관련 유전자의 변화가 발견되며, 정서적 스트레스의 대표적 방법인 구속스트레스를 이용하였으며³³⁻³⁵, 쥐의 활동이 야행성임을 감안하여 7일간 야간에 12시간씩 구속하고, 모려, 육울탕 그리고 육울탕 가 모려를 각각 경구 투여한 후, 스트레스 반응의 주요 인자인 catecholamine과 지질 대사와 관련된 GOT, GPT, TG 및 LDH 함량의 변화를 살펴보았다.

혈청 중 epinephrine의 함량은 Normal에서 209.80±7.70(pg/ml)이었으며, Control은 686.33±17.92(pg/ml)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.001) 증가를 보였으며 Sample I, Sample II 및 Sample III에서 각각 311.89±29.10(pg/ml), 480.71±36.62(pg/ml), 183.49±22.13(pg/ml)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었으며 Sample III가 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다(Table 2).

혈청 중 norepinephrine의 함량은 Normal에서 1534.11±156.32(pg/ml)이었으며, Control은 3177.96±89.72(pg/ml)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.001) 증가를 보였으며 Sample I, Sample II, Sample III에서 각각 1217.78±73.92(pg/ml), 1932.42±153.24(pg/ml), 1383.80±69.83(pg/ml)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었으며 Sample I이 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다(Table 3).

혈청 중 dopamine의 함량은 Normal에서 114.12±13.23(pg/ml)이었으며, Control은 207.92±32.80(pg/ml)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.05) 증가를 보였으며 Sample I, Sample III에서 각각 60.59±15.13(pg/ml), 39.84±16.83(pg/ml)로 Control에 비하여 유의한(p<0.005, p<0.001) 감소를 나타내었으며 Sample III가 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다(Table 4).

이상의 결과에서 스트레스 반응의 주요 지표로 삼는 norepinephrine, dopamine 함량의 변화에 모려의 성분이 함유된 Sample I과 Sample III에서 그 효과가 나타난 것으로 보아 모려가 항스트레스 효과에 유효한 것으로 생각되고, 육울탕은 주로 epinephrine의 함량 변화에 작용하여 물질대사를 자극하며, 모려도 유사한 효과가 있음을 알 수 있었다.

한편 지질대사와 관련하여 살펴보면 혈청 중 GOT 함량은 Normal에서 107.17±2.15(U/l)이었으며, Control은 112.50±2.58(U/l)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.05) 증가를 보였으며 Sample II에서 120.67±2.68(U/l)로 Control에 비하여 유의한(p<0.05) 증가를 하였다(Table 5).

혈청 중 GPT 함량은 Normal에서 32.50±0.89(U/l)이었으며, Control은 48.67±1.94(U/l)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.001) 증가를 보였으며 Sample I, Sample II, Sample III에서 각각 27.17±0.54(U/l), 36.33±0.88(U/l), 33.50±0.34(U/l)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었으며 Sample I이 가장

효과가 좋은 것으로 나타났다(Table 6).

혈청 중 TG 함량은 Normal에서 50.42±1.06(mg/dl)이었으며, Control은 82.83±3.98(mg/dl)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.001) 증가를 보였으며 Sample I, Sample II, Sample III에서 각각 52.70±1.55(mg/dl), 50.03±3.82(mg/dl), 47.93±2.98(mg/dl)로 Control에 비하여 유의한(p<0.001) 감소를 나타내었으며, Sample III가 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다(Table 7).

혈청 중 LDH 함량은 Normal에서 829.50±32.87(U/l)이었으며, Control은 999.50±38.60(U/l)로 Normal에 비하여 유의한(p<0.05) 증가를 보였으며 Sample II, Sample III에서 각각 730.50±61.55(U/l), 726.50±39.88(U/l)로 Control에 비하여 유의한(p<0.005, p<0.001) 감소를 나타내었으며 Sample III가 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다(Table 8).

구속 스트레스에 의한 비장내 형태학적 변화에 대한 연구를 보면 비장내 혈구형성물질과 림프구의 수 감소에 의해 비장 크기의 감소하며³⁶, 동맥주위림프초에서 소림프구의 감소와 더불어 파괴된 세포수가 증가하였다³⁷. 또한 스트레스에 의해 비장내 단핵비장세포가 감소하였다³⁸. 염증반응은 필수적인 숙주방어체계로 lipopolysaccharide, tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1과 같은 사이토카인, H₂O₂ (hydrogen peroxide), 고산소/저산소 (hyperoxia/hypoxia) 등 여러 화학요법 약물 등의 광범위한 외부 및 내부 자극에 의해 유도된다³⁹.

본 연구의 결과에서 Control의 동맥주위림프초와 비장소절 직경은 Normal에 비해 현저한 감소를 보였으나 Sample I, Sample II, Sample III에서 대조군에 다소 증가하였다. 또한 Control 비장의 적색수질에서 PAS양성 반응세포의 증가와 더불어 염증관련 단백질에 대한 면역반응도 증가하였으며 COX-1 및 I-κBα를 제외한 모든 면역반응이 증가하였으며 특히 IL-1β의 면역반응이 가장 현저하였으나 Sample I, Sample II, Sample III 처리에서는 Normal과 유사한 반응을 보였으며 특히 TNF-α는 Sample I을 처리했을 때 현저하였다.

이상의 결과를 볼 때 지질 대사에서의 변화도 모려의 성분이 함유된 Sample I과 Sample III에서 주로 그 효과가 나타난 것으로 보아 모려가 항스트레스에 효능이 있음을 알 수 있었다. 한편 실험 전반적인 경향을 볼 때 모려와 육울탕이 혼합된 처방 (Sample III)에서 항스트레스와 지질대사의 조절이 우수하게 나타났다. 이는 모려를 이용한 건강기능 보조제의 발굴에 필요한 복합 처방(육울탕)의 선정에 예상된 목적을 달성한 것으로, 본 연구의 목표를 달성함과 아울러 향후 기대 효과 목표 달성도 예상된다.

결론

모려분을 이용한 한의학적 항스트레스성 기능보조제 개발을 위하여 면역 관련 유전자의 변화가 발견되며, 정서적 스트레스의 대표적 방법인 구속스트레스방법으로, 7일간 야간에 12시간씩 구속하고, 모려, 육울탕 그리고 육울탕 가 모려를 각각 경구 투여한 후, 스트레스 반응의 주요 인자인 catecholamine과 지질 대사와 관련된 GOT, GPT, TG 및 LDH 함량의 변화를 살펴보았다.

스트레스 반응의 주요 지표로 삼는 norepineprine, dopamine 함량의 변화에 모려의 성분이 함유된 Sample I과 Sample III에서 그 효과가 나타난 것으로 보아 모려가 항스트레스 효과에 유효한 것으로 생각되고, 육울탕은 주로 epineprine의 함량 변화에 작용하여 물질대사를 자극하며, 모려도 유사한 효과가 있음을 알 수 있었다. 한편 지질 대사에서의 변화도 모려의 성분이 함유된 Sample I과 Sample III에서 주로 그 효과가 나타난 것으로 보아 모려가 항스트레스에 효능이 있음을 알 수 있었다.

비장에 대한 병리조직학적 소견을 보면 Normal에 비해 Control에서는 적색수질에 비해 백색수질의 분포가 줄어들었고, 동맥주위임파초와 비장소절 직경이 현저히 감소하였으나 Sample I, Sample II, Sample III 처리군에서 Control에 비해 증가하였다. 염증관련 단백질 반응을 보면 Normal에 비해 Control의 적색수질에서 면역반응이 증가하였으며 특히 IL-1 β 의 면역반응이 가장 현저하였다. Sample I, Sample II, Sample III을 투여하였을 때 면역반응이 감소하며 TNK- α 의 반응은 특히 Sample I을 처리하였을 때 현저하였다.

실험 전반적인 경향을 볼 때 모려와 육울탕이 혼합된 처방 (Sample III)에서 항스트레스와 지질대사의 조절이 우수하게 나타났다. 이는 모려를 이용한 건강기능 보조제의 발굴에 필요한 복합 처방의 선정(육울탕)에 예상된 목적을 달성한 것으로, 본 연구의 목표를 달성함과 아울러 향후 기대 효과 목표 달성도 예상된다.

감사의 글

이 논문은 부산테크노파크 공모과제로 지원되는 연구비(과제번호 2005QB015)로 조성되었습니다.

참고문헌

1. Selye, H. The stress of life, Toronto, Longmans Green and Co., pp 1-50, 1958.
2. 백인호. Stress에 따른 생물학적 반응. 한양대학교 정신건강연구, 10: 51-64, 1991.
3. 안수진. 구속스트레스로 유발된 생쥐 시상하부내 단가아민의 변화에 대한 시호소간산과 시호역간탕의 효능. 경원대학교 대학원, 석사학위논문, 2002.
4. 이동진, 김지혁, 황의완. 보혈안신탕 가미보혈안신탕의 항스트레스 효과에 관한 실험적 연구. 동의신경정신과학회지 4(1):77-97, 1993.
5. Oliver, G., Schaefer, E.A. The physiological effects of the extracts of the suprarenal capsules. J. Physiol. 18: 230, 1985.
6. Irwin, J.K. Catecholamine, adrenal hormones and stress. Hospital Practice, pp 49-55, 1976.
7. Senba, E., Ueyama, T. Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. Neurosci Res., 29: 183-207, 1997.
8. Herman, J.P., Cullinan, W.E. Neurocircuitry of stress:

central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Trends Neurosci., 20: 78-84, 1997.

9. Moon, H.J., Shin, K.H., Lim, E.M. Influence of Gammakdaejo-Tang on brain Fos-like immunoreactivity in response to immobilization stress in ovariectomized rats. J. Orien. Obs & Gyn, 15(2):25-40, 2002.
10. 김상호. 동의신경정신과학. 행림출판사, 서울, pp 259-260, 277-278, 1980.
11. 김점수. 청뇌탕이 구속스트레스 생쥐의 뇌부위별 Catecholamine 함량에 미치는 영향. 경희대학교 대학원, 1993.
12. 조광훈, 정대규. 귀비탕과 이신교제단이 구속스트레스 생쥐의 뇌부위별 Monoamines 함량에 미치는 영향. 경산, 동의한의학 학술대회 초록집, 5: 46-61, 2001.
13. 권순주, 정대규, 김연섭. 소음인 소합환원이 스트레스 생쥐의 뇌 Serotonin 함량에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 9(2):87-95, 1998.
14. 허준. 동의보감. 서울, 법민문화사, p 162, 721, 889, 1999.
15. 주진형. 단계심법. 산동, 산동과학기술출판사, pp 16-18, 1985.
16. 서춘보. 고급의통대전. 북경, 인민위생출판사, pp 936-942, 1991.
17. 공민준. 시호소간산이 구속스트레스 흰쥐의 위계양 및 혈중 catecholamine 함량에 미치는 영향. 동의대학교대학원, 1997.
18. 박찬국. 병인병기학. 서울, 전통의학연구소, p 187, 1978.
19. 이미연. 가미소요산이 구속스트레스 흰쥐에 미치는 영향. 동의대학교 대학원, 1998.
20. 이시진. 본초강독.
21. 공신. 고급의감. 남창, 강서과학기술출판사, p 99, 1990.
22. 이천. 원본편주의학입문. 서울, 대성문화사, p 358, 563, 564, 1989.
23. 조영도. 육울탕이 구속스트레스 흰쥐의 위계양 및 혈중 catecholamine 함량에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 1992.
24. 김영원. 보혈안신탕이 구속스트레스 흰쥐의 위계양 및 혈중 catecholamine 함량에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 1991.
25. 강현근. 자음건비탕이 구속스트레스 흰쥐의 위계양 및 혈중 catecholamine 함량에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 1992.
26. 황선미, 정대규. 용안육과 백복신이 구속스트레스 생쥐의 뇌 부위별 serotonin 함량에 미치는 영향. 경산대학교대학원, 2002.
27. Kopin, I.J. Catecholamines, adrenal hormones, and stress, In Neuroendocrinology. Sinauer Association Inc., p 159, 1980.
28. Guillemin, R.G. Beta-lipotropin and endorphin, Implications of current knowledge, In Neuroendocrinology. Sinauer Association Inc., p 67, 1980.
29. Eun, J.S., Song, J.M. Effects of kwibi-tang on serum levels of hormone and the non-specific immune response after immobilization stress in Mice. Korean J. Oriental Physio. and Patho. 18(1):172-178, 2004.
30. Teshima, H., Sogawa, H., Kihara, H., Nakagawa, T. Influence of stress on the maturity of T-cells. Life Sciences 49(21):1571-1581, 1991.
31. Lee, T.Y., Han, M.S., Oh, C.H., Eun, J.S. Effects of Kwibi-tang

- on the specific immune response after immobilization stress in C57BL/6 Mice. Korean J. Oriental Physio. and Patho. 17(5):1208-1216, 2003.
32. Pacak, K., Palkovits, M. Stressor specificity of central disorders. Endocrine Rev. 22: 502-548, 2001.
33. Reyes, T.M., Walker, J.R., DeCino, C., Hogenesch, J.B., Sawchenko, P.E. Categorically distinct acute stressor elicit dissimilar transcriptional profiles in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. J. Neurosci., 23: 5607-5616, 2003.
34. Sawchenko, P.E., Li, H.Y., Ericsson, A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic response to stress: a tale of two paradigms. Prog. Brain Res., 122: 61-78, 2000.
35. Lee, H.C., Yeom, M.J., Kim, G.H., Choi, K.D., Lee, S.H., Shim, I.S., Lee, H.J., Hahm, D.H. Gene expression analyses in hypothalami of immobilization-stressed and BoshimgeonTang-treated Mice using cDNA microarray. Korean J. Oriental Physio. and Patho. 17(6):1393-1403, 2003.
36. Durnova, G.N., Kaplanskii, A.S. Changes in the structure of the lymphoid organs of rats during prolonged hypokinesia. Arkh. Anat. Gistol. Embriol. 85: 17-21, 1983.
37. Bakhmet, A.A. Lymphoid structure of the spleen in rats exposed to acute emotional stress. Morfologiya, 125: 55-58, 2004.
38. Millan, S., Gonzalez-Quijano, M.I., Giordano, M., Soto, L., Martin, A.I., Lopez-Calderon, A. Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions. Life Sci. 59: 1431-1442, 1996.
39. Baldwin, A.S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu. Rev. Immunol. 14: 649-681, 1996.