

# 東新氣血養睡方 액상 스틱 파우치가 Chronic Mild Stress 유발 흰쥐의 스트레스 및 수면 관련 호르몬에 미치는 영향

최창원, 이영수, 문영호, 김경옥\*

동신대학교 한의과대학 내과학교실, 한방신경정신과학교실\*

## The Effects Liquid Stick Packs of Dongshingihyeolyangsubang on Stress and Sleep-Related Substance of Rats Induced by Chronic Mild Stress

Chang-won Choi, Young-su Lee, Young-ho Moon, Kyeong-ok Kim\*

Departments of Internal Medicine, \*Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dongshin University

**Received:** September 1, 2017  
**Revised:** September 14, 2017  
**Accepted:** September 16, 2017

**Objectives:** This study evaluates anti-stress and sleep-inductive effects of Dongshingihyeolyangsubang (DSGYSB) on rats induced by chronic mild stress (CMS).

**Methods:** Twenty-five healthy rats were randomly divided into five groups: normal, CMS (Control), DSGYSB50, DSGYSB100, and DSGYSB200. All rats except the normal group were exposed to unpredictable stress conditions such as water deprivation, empty bottles, and forced treadmill. A week after starting the experiment, rats in DSGYSB50, DSGYSB100, and DSGYSB200 groups were fed orally with water once a day for two weeks. Then blood samples were taken from the rats for analysis of complete blood count, AST, ALT, and glucose. Noradrenaline, corticosterone, serotonin, GABA and melatonin were measured by ELISA kit. BDNF, CREB, TrkB and TNF- $\alpha$  were measured by RT-PCT.

**Results:** In Noradrenaline contents, the DSGYSB200 group revealed significant decrease compared to the control group. In corticosterone contents, the DSGYSB200 group revealed significant decrease compared to the control group. In serotonin contents, the DSGYSB200 group revealed significant increase compared to the control group. In GABA contents, the DSGYSB50, DSGYSB100, and DSGYSB200 groups revealed significant increase compared to the control group. In the activity of BDNF, the DSGYSB50, DSGYSB100 and DSGYSB200 groups revealed significant increase compared to the control group. In the activity of CREB, the DSGYSB100 and DSGYSB200 groups revealed a significant decrease compared to the control group. In the activity of TrkB, the DSGYSB100 and DSGYSB200 groups revealed significant decrease compared to the control group. In the activity of TNF- $\alpha$ , DSGYSB100 and DSGYSB200 groups revealed significant decrease compared to the control group. In glucose contents, the DSGYSB100 and DSGYSB200 groups revealed significant decrease compared to the control group. In the leukocyte changes, white blood cells, neutrophil, lymphocytes, and monocyte significantly increased in the DSGYSB100 and DSGYSB200 groups than the control group. In the erythrocyte changes, hemoglobin significantly increased in the DSGYSB200 group than the control group.

**Conclusions:** Results suggest that Dongshingihyeolyangsubang has anti-stress and sleep-inductive effects on rats induced by CMS.

### Correspondence to

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

### Acknowledgement

This research was supported by the  
Dongshin University research grants.

**Key Words:** Dongshingihyeolyangsubang, Chronic mild stress, CMS, Stress hormone, Insomnia, Animal model.

## I. 서론

수면은 신체적·정신적 성장과 안정 및 두뇌의 발달에 기초적인 생리적 현상으로 인간이 정상적인 활동을 영위하는데 필수적인 요소이다<sup>1)</sup>. 이러한 수면이 시작이나 유지가 어려워 충분한 수면을 취하지 못하거나 불충분한 수면으로 피로감, 무력감 및 주의 집중력 감소 등이 동반하는 것을 수면장애라고 한다<sup>2)</sup>. 이러한 수면장애는 크게 4가지의 범주가 있는데, 그 중 하나가 스트레스나 입원과 같은 환경적 변화로 생길 수 있다고 한다<sup>1)</sup>.

스트레스(Stress)라는 단어는 현대사회의 일상생활에서 가장 빈번하게 사용되는 전문 용어 중 하나이다<sup>3)</sup>. 스트레스는 인체에 가해지는 다양한 자극이나 변화에 대해 적절하게 대처하지 못하여 발생하는 부적응 상태로 각종 심리증상과 신체증상, 행동증상 등을 초래한다<sup>4)</sup>. 반복적이고 만성적인 스트레스는 중추신경계에 작용하여 걱정, 우울, 불안, 초조, 긴장 등 심리적으로 불안정한 상태를 야기하고 수면장애, 기분장애 및 각종 심리학적 장애를 유발하는데<sup>5,6)</sup>, 특히 수면장애 가운데 가장 흔한 질환인 불면증은 스트레스와 직접적인 관련이 있을 것으로 추정 된다<sup>3)</sup>.

한의학적 관점에서 스트레스 인자는 정신적인 자극(七情傷) 또는 외부 환경(六氣)의 변화로 볼 수 있으며 이들은 인체 내부에서 기혈음양(氣血陰陽)의 불균형을 야기하여 각종 질병을 일으키는 기초가 되는데 기기실조(氣機失調)로 인해 발생할 수 있는 기울(氣鬱), 기역(氣逆) 등과 관계가 있다. 이러한 증후들은 수면장애와도 관련이 있는데 정신적인 스트레스로 인한 불면은 변증론치(辨證論治)의 관점에서 사결불수(思結不睡), 심담허겁(心膽虛怯)이라고 하며 사려과다로 인해 장부가 손상되어 발생하는 것이다<sup>7,8)</sup>.

본 연구에서 사용된 동신기혈양수방은 《변증기문(辨證奇聞)》<sup>9)</sup>의 <불매문(不寐門)>에 수록된 윤조교심탕(潤燥交心湯)에 수증가감(隨證加減)한 것으로 저자의 임상에서 심신불교(心腎不交)하고 간기태조(肝氣太燥)하여 생기는 불면과, 막연한 불안이나 생각이 많아 쉽게 잠을 이루지 못하는 경우와 오래도록 근심걱정을 한 후에 피곤하지만 잠을 이루지 못하는 경우 등 다양하게 활용하고 있는 처방이다.

수면장애와 관련된 실험적 연구로는 천양보심단, 운담탕, 귀비탕, 수종의 한약재 열수추출물이 멜라토닌 수용체 발현에 미치는 영향<sup>10,11)</sup>, 분심기혈가미방이 흰쥐의 수면장애와

불안, 정서성에 미치는 영향<sup>12,13)</sup> 등이 있고, 기존의 불면증 치료에 대한 임상보고는 산조인탕의 불면치료에 대한 임상 연구<sup>14,15)</sup>와 삼황사심탕<sup>16)</sup>, 육군자탕가미방<sup>17)</sup>의 임상레포트가 있다. 만성 스트레스에 대한 실험적 연구로는 Chronic Mild Stress로 유발된 우울증 모델 흰쥐에 대한 귀비탕의 실험적 연구<sup>18)</sup>, 가미산조인탕의 항스트레스 효과<sup>19)</sup>, 사물탕 기향부자<sup>20)</sup>과 하엽추출물<sup>21)</sup>의 항우울 효과, 삼음교, 족삼리의 백복령 약침이 CSM 유발 흰쥐에 미치는 영향<sup>22)</sup>을 보고한 바가 있다. 또한 황칠<sup>23)</sup>과 윤조교심탕<sup>24)</sup>을 이용한 만성 스트레스 모델에서의 스트레스 및 수면 관련 호르몬에 미치는 영향을 보고한 연구가 있으나, 액상 파우치 형태의 한약의 스트레스 및 수면관련 호르몬에 미치는 영향을 연구한 보고는 없었다.

이에 저자는 액상 스틱 파우치 형태의 동신기혈양수방 경구투여가 만성 스트레스 모델 흰쥐의 스트레스 및 수면 관련 호르몬에 미치는 영향을 알아보고자 혈액 및 혈청학적 지표, 스트레스, 수면과 관련된 지표인 Noradrenalin, Corticosterone, Serotonin, Melatonin, GABA와, PCR기법을 활용한 BDNF, CREB, TrkB, TNF- $\alpha$  지표 등을 측정 및 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 동물

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

#### 2) 약물

동신기혈양수방은 Table 1과 같은 약재로 구성되어 있으며, 현재 동신대학교 부속순천한방병원에서는 액상형의 파우치가 사용중인데, 동신기혈양수방 액상형 스틱 파우치는 함소아제약에 제조 한 것을 사용하였다.

실험에는 동신기혈양수방 액상형 스틱 파우치(순천한방

**Table 1.** Prescription of Dongshingihyeolyangsoo-Bang (DSGYSB)

韓藥名	Herbal Name	Scientific Name	Weight (g)
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	<i>Paeonia Lactiflora</i> Pall.	10
酸棗仁 (炒)	Zizyphi Spinosae Semen	<i>Zizyphus spinosa</i> Hu.	10
熟地黃	Rehmanniae Radix Preparata	<i>Rehmannia glutinosa</i>	10
當歸	Angelicae Gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i> Nakai	8
龍眼肉	Longan Arillus	<i>Dimocarpus logan</i>	4
砂仁	Amomi Fructus	<i>Amomum Xanthoides</i> Wallich	4
玄蔘	Scrophulariae Radix	<i>Scrophularia buergeriana</i> Miq.	3
柴胡	Bupleuri Radix	<i>Bupleurum falcatum</i> Linne	3
菖蒲	Acori Graminei Rhizoma	<i>Acorus gramineus</i> Solander	2
黃芩	Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	2
Total Amount			56

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

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

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

병원, 액상형파우치 1개=10 g) 10개를 동결건조 시켜 50.5 g 파우더를 얻었다. 동신기혈양수방 파우더(Dongshin-GihyeolYangsoo-Bang, DSGYSB)를 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg 세 가지 농도로 5 ml/kg의 증류수에 녹여 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) CMS (Chronic Mild Stress) 유발

본 연구를 위하여 Table 2과 같은 만성 스트레스(CMS) 모델을 사용하였다. 실험기간은 정상군을 제외한 CMS 유발군은 21일간 먹이박탈(FD), 빈 물병 제시(EB), 강제 운동(FT), 소음(NB), 주야 주기 역전(LON, LOF), 강제 수영(FS),

빛 깜빡(FL), 케이지 기울이기(Tilt), 케이지 흔들기(Shaking), 고밀도 사육(TH), 물 박탈(WD), 젖은 깔짚(SC) 등 매일 스트레스 유발표에 의하여 노출시켰으며, 이 기간 동안 먹은 사료량 및 물량을 확인하였으며, 주 3회 몸무게를 확인하였으며, 일반적인 사육환경을 유지하였다.

## 2) 군 분리

실험군들의 분리는 처치를 하지 않은 정상군(Normal), CMS을 유발시킨 후 처치를 하지 않은 대조군(Control), CMS을 유발시킨 후 동신기혈양수방 구강투여 I군(50 mg/kg, DSGYSB 50 mg), CMS을 유발시킨 후 동신기혈양수방 구강투여 II군(100 mg/kg, DSGYSB 100 mg), CMS을 유발시킨 후 동신기혈양수방 구강투여 III군(200 mg/kg, DSGYSB 200 mg)으로 분류하였다.

## 3) 약물 투여

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

## 4) 체중 및 사료효율

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

## 5) 혈액 및 혈청학적 검사

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

## 6) 혈당 측정

혈당 측정은 CMS 유발 전, 유발 후 1주, 유발 후 2주, 유발 후 3주로 총 4회 꼬리채혈을 하여 얻어진 혈액은 ACCU-CHEK Active Strip (Roche, Germany)에 혈액 방

울을 묻혀 ACCU-CHEK Active (Roche, Germany)에 꽂아 혈당 측정을 하였다.

## 7) ELISA에 의한 Noradrenaline (NA) 측정

Norepinephrine 측정은 Rat Noradrenaline Elisa Kit (Cusabio, China)를 사용하여 측정하였다. Rat Noradrenaline이 coating된 microplate에 Rat Noradrenaline standard, serum 50  $\mu$ l를 넣고, Antibody (1X) 50  $\mu$ l를 첨가해 platecover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 37°C에 40분간 incubation 시켰다. Wash buffer 400  $\mu$ l로 3회 washing 후 HRP-conjugate (1X) 100  $\mu$ l를 첨가하고 plate cover를 덮고 37°C에 30분간 incubation 하였다. Wash buffer 400  $\mu$ l로 5회 washing 후 TMB Substrate 90  $\mu$ l를 첨가하고 platecover를 덮고 dark 상태로 37°C에 20분간 incubation 하였다. Stop solution 50  $\mu$ l를 plate에 넣고 발색반응을 중지시킨 후 microplate spectrophotometer (Benchmark plus, Biorad, USA)로 450 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였다. Standard curve를 만들어 sample의 Noradrenaline를 assay하였다.

## 8) ELISA에 의한 Corticosterone 측정

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

## 9) ELISA에 의한 Serotonin 측정

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

## 10) ELISA에 의한 Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) 측정

실험이 끝난 후 적출한 뇌 조직(50 mg)에 lysis buffer 1 ml을 넣고 precellys 24 (Bertin technologies, France)에서 균질화하고 4°C, 10,400 rpm에서 5분 동안 원심분리 (Centrifuge 5415 R: Eppendorf, Germany)하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액 sample은 측정하기 전까지 냉동보관 하였다. GABA 측정은 Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For GABA (Biomatik, USA)을 사용하여 측정하였다. GABA가 coating된 microplate에 gABA Standard, 조직 sample 50  $\mu$ l를 넣은 후 1X Detection Reagent A 50  $\mu$ l를 바로 넣고 platecover로 tapping (cloudy 상태 확인)한 후에 1분간 mixing하고 37°C에 60분간 incubation 하였다. Wash buffer 400  $\mu$ l로 3회 washing후 1X Detection Reagent B 100  $\mu$ l를 넣고 platecover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 37°C에 30분간 incubation 시켰다. Wash buffer 400  $\mu$ l로 5회 washing후 Substrate Solution 90  $\mu$ l를 넣고 platecover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 37°C에 10분간 incubation (dark 상태) 시켰다. Stop solution 50  $\mu$ l를 plate에 넣고 발색반응을 중지시킨 후 microplate spectrophotometer (Benchmark plus, Biorad, USA)로 450 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였다. Standard curve를 만들어 sample

의 gABA을 assay하였다.

## 11) ELISA에 의한 Melatonin (MT) 측정

실험이 끝난 후 적출한 뇌 조직(100 mg)에 1X PBS 1 ml을 넣고 precellys 24 (Bertin technologies, France)에서 균질화하고 4°C, 7,300 rpm에서 5분 동안 원심분리 (Centrifuge 5415 R: Eppendorf, Germany)하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액 sample은 측정하기 전까지 냉동보관하였다. Melatonin 측정은 Rat Melatonin Elisa Kit (Biomatik, USA)를 사용하여 측정하였다. Melatonin이 coating된 microplate에 Rat Melatonin Standard, 조직 sample 50  $\mu$ l를 넣고, HRP-conjugate를 50  $\mu$ l를 첨가하고 Antibody 50  $\mu$ l를 넣고 platecover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 37°C에 60분간 incubation 시켰다. Wash buffer 400  $\mu$ l로 3회 washing후 Substrate A 50  $\mu$ l를 넣고, Substrate B 50  $\mu$ l를 첨가한 다음 platecover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 37°C에 15분간 incubation (dark 상태) 하였다. Stop solution 50  $\mu$ l를 plate에 넣고 발색반응을 중지시킨 후 microplate spectrophotometer (Benchmark plus, Biorad, USA)로 450 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였다. Standard curve를 만들어 sample의 Melatonin을 assay하였다.

## 12) Immunohistochemistry: Brain derived neurotrophic factor (BDNF)

모든 실험이 끝난 직후 흰쥐를 80% O<sub>2</sub> 가스에 5% isoflurane (Hana Pharm, Korea)을 이용하여 흡입마취 유도를 한 후, 0.9% saline 200 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 5% formalin 용액(fixative) 200 ml로 심장을 통해 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 10% formalin 용액으로 고정시키고, 30% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)에 넣어 4°C에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직은 Cryotome (Shandon, Japan)을 이용하여 30  $\mu$ m의 두께로 잘랐다. 뇌 조직은 초기에 0.1 M PBS에 3회 정도 세척하였고, 2% 토끼 혈청으로 30분 blocking한 후, 각각 BDNF antibody (1:400, Novusbio, USA)를 사용하였다. 1차 항체는 0.1 M PBS에 0.1% sodium azide (Sigma, USA) buffer로 400배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 1차 항혈청에 4°C에서 72

시간동안 배양하였다. 그 후 3번 이상 조직을 0.1 M PBS로 세척한 다음 biotinylated universal Secondary Antibody (Quick Kit: Vector Laboratories, USA)를 예 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 0.1 M PBS로 3번 세척한 다음, 뇌 조직은 37°C에서 30분 동안 Streptavidin peroxidase preformed complex (Quick Kit: Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 담구었다. 0.1 M PBS로 3번 세척한 다음 조직을 착색제로서 diaminobenzidine (DAB: Vector Laboratories, USA)을 사용하여 발현시키고, 0.1 M PBS로 발색을 정지시켰다. 염색이 끝난 조직은 광학현미경(Nikon, Japan)을 사용하여 40배로 확대하여 관찰하였고, 신경세포의 밀도를 Scion image program (Scion Corp. MD, USA)을 이용하여 측정하였다.

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

#### (1) Total RNA 분리

적출된 뇌를 coronal section하여 신속히 액체 질소에 급속 냉동시키고 분석할 때까지 -70°C에서 보관하였다. Total RNA의 분리는 뇌 조직(300 mg)에 800 ul Trizol Reagent (Lifetechnologies, USA)를 넣고 precellys 24 (Bertin technologies, France)에서 균질화하고, 균질액에 200  $\mu$ l의 chloroform (Sigma, USA)을 가하여 15초 동안 흔들여 잘 혼합한 후, 실온상태에서 5분 방치하고 난 다음 세포 유잔물을 제거하기 위하여 4°C, 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리(Centrifuge 5415 R: Eppendorf, Germany) 하였다. 원심분리로 얻어진 상층액에 500  $\mu$ l의 isopropanol (sigma, USA)을 첨가하여 실온상태에서 5분 동안 방치한 후 RNA pellet을 얻기 위하여 4°C, 14,000 rpm에서 8분간 원심분리하고, 원심분리로 생긴 pellet에 냉장 보관된 70% ethanol과 함께 DEPC를 넣고 4°C, 7,500 rpm에서 5분간 원심분리 후 pellet만 남기고 모두 제거하고, 남은 ethanol은 실온에서 5분간 방치시켜 건조시킨 다음 DEPC-treated water에 녹여 spectrophotometer (Biophotometer: Eppendorf, Germany)에서 OD260 값을 읽어 RNA의 순도 및 농도를 정량하였다.

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

분리된 total RNA 5  $\mu$ g과 2.5  $\mu$ l Oligo (dT), DEPC-

treated water를 RT premix (Bioneer, Korea)에 넣어 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)를 이용하여 50  $\mu$ l cDNA를 합성하여 PCR 증폭을 위한 template로 사용하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (sense primer: 5'-ACTCCATCACCATCTTCCAG-3', antisense primer: 5'-CCTGCTTTCACCACCTCCTTG-3')를 internal control로 사용하였다. Reverse transcription temperature cycle은 42°C에서 1시간 동안 cDNA synthesis, 94°C에서 5분 동안 denature 그리고 4°C에서 5분 동안 cooling시키는 단계를 거쳤다. Polymerase chain reaction은 cDNA, 10 pg sense primer, 10 pg antisense primer, DEPC-treated water를 PCR premix (Bioneer, Korea)에 넣은 후 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)를 이용하여 증폭시킨다. PCR temperature cycle은 cDNA의 증폭을 위하여 95°C에서 300초 동안 pre-denaturation, 94°C에서 40초 동안 melting, 55°C에서 40초 동안 annealing, 72°C에서 90초 동안 extension하는 과정을 34회 반복 수행하고 마지막 cycle에서 72°C에서 600초 동안 extension 단계를 거친다. BDNF 유전자증폭은 primer (senseprimer: 5'-CAGGG GCATAGACAAAAG-3', antisense primer: 5'-CTTCCCC TTTAATGGTC-3'), CREB 유전자증폭은 primer (senseprimer: 5'-TACCCAGGGAGGAGCAATAC-3', antisense primer: 5'-GAGGCAGCTTGAACAACAAC-3'), TNF- $\alpha$  유전자증폭은 primer (senseprimer: 5'-ATGAGCACAGAAAGC ATGATC-3', antisense primer: 5'-TACAGGCTTGTCCT CGAAT-3'), TrkB 유전자증폭은 primer (senseprimer: 5'-GATCTTCACCTACGGCAAGC-3', antisense primer: 5'-TCGCCAAGTTCTGAAGGAGT-3')로 시행하였다. 이렇게 증폭된 BDNF, CREB, TNF- $\alpha$ , TrkB의 DNA를 Greenview nucleic acid gel stain (IO Rodeo, 1:10,000)를 포함한 1.5% agarose gel상에서 0.5x TBE buffer (80 mM Tris-HCL, 80 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3)로 100 V에서 전기 영동시켜 관찰한 후 Image Station (Samsung, Korea)을 이용하여 촬영하였으며, Alphaease FC StandAlone Software (Alpha Innotech, USA)를 이용하여 측정하였다.

### 3. 통계처리

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

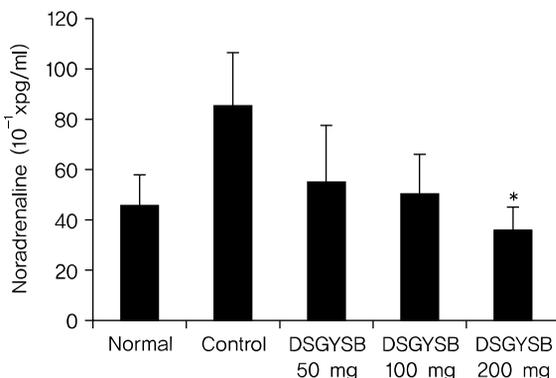
## III. 결과

### 1. Noradrenalin 함량에 미치는 영향

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 Noradrenalin 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은  $45.4\pm 12.4 \times 10^{-1}$  pg/ml, 대조군은  $85.2\pm 21.5 \times 10^{-1}$  pg/ml을 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 높았고, DSGYSB 50 mg군은  $54.8\pm 22.6 \times 10^{-1}$  pg/ml, DSGYSB 100 mg군은  $50.2\pm 15.6 \times 10^{-1}$  pg/ml, DSGYSB 200 mg군은  $35.4\pm 9.7 \times 10^{-1}$  pg/ml을 나타내어 대조군에 비하여 DSGYSB 200 mg군이 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 1).

### 2. Corticosterone 함량에 미치는 영향

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의



**Fig. 1.** Effect of DSGYSB administration on the Noradrenalin level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. Every group Normal, normal group; Control, CMS and no treatment; DSGYSB 50 mg, CMS and administration of DSGYSB 50 mg; DSGYSB 100 mg, CMS and administration of DSGYSB 100 mg; DSGYSB 200 mg, CMS and administration of DSGYSB 200 mg. \* $p<0.05$ , compared with control.

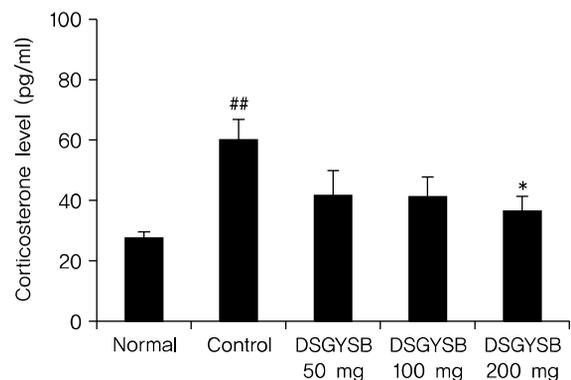
Corticosterone 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은  $27.9\pm 1.9$  pg/ml, 대조군은  $60.5\pm 6.3$  pg/ml를 나타내어 정상군에 비하여 대조군은 유의하게 증가하였고, DSGYSB 50 mg군은  $41.9\pm 7.9$  pg/ml, DSGYSB 100 mg군은  $41.1\pm 6.5$  pg/ml, DSGYSB 200 mg군은  $36.5\pm 4.9$  pg/ml을 나타내어 대조군에 비하여 DSGYSB 200 mg군이 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

### 3. Serotonin 함량에 미치는 영향

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 Serotonin 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은  $3.61\pm 0.32$  pg/ml, 대조군은  $2.88\pm 0.27$  pg/ml를 나타내어 정상군에 비하여 대조군은 감소하였고, DSGYSB 50 mg군은  $3.55\pm 0.60$  pg/ml, DSGYSB 100 mg군은  $3.64\pm 0.20$  pg/ml, DSGYSB 200 mg군은  $3.97\pm 0.47$  pg/ml을 나타내어 대조군에 비하여 DSGYSB 200 mg군이 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

### 4. GABA 함량에 미치는 영향

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 GABA 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은  $62.4\pm 9.7$  pg/ml, 대조군은  $35.0\pm 7.3$  pg/ml를 나타내어 정상군에 비하여 대조군은 유의하게 감소하였고, DSGYSB 50 mg군은  $52.0\pm 1.9$  pg/ml, DSGYSB 100 mg군은  $65.3\pm 10.0$  pg/ml, DSGYSB 200 mg군은  $61.3\pm 5.4$  pg/ml을 나타내어 대조군에 비하여 DSGYSB 50 mg군, DSGYSB 100 mg군,



**Fig. 2.** Effect of DSGYSB administration on the Corticosterone level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. ## $p<0.01$ , compared with normal; \* $p<0.05$ , compared with control.

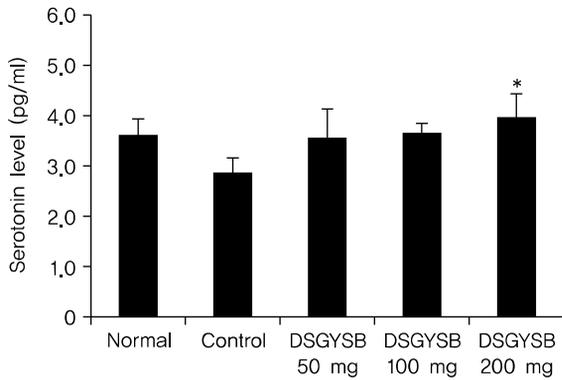


Fig. 3. Effect of DSGYSB administration on the Serotonin level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. ##p<0.01, compared with normal; \*p<0.05, compared with control.

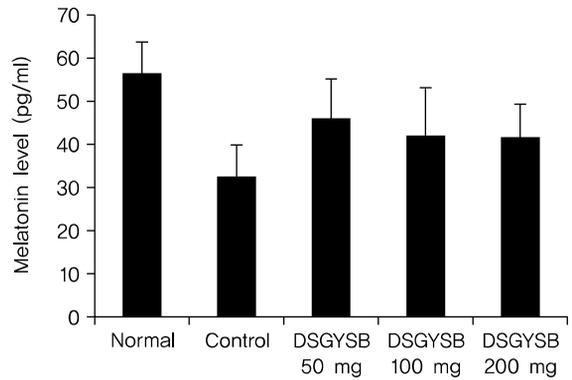


Fig. 5. Effect of DSGYSB administration on the Melatonin level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1.

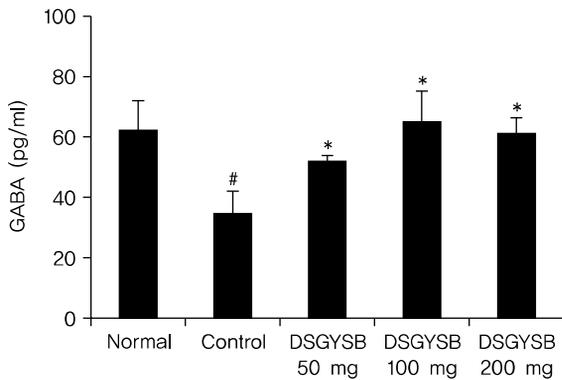


Fig. 4. Effect of DSGYSB administration on the GABA level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. #p<0.05, compared with normal; \*p<0.05, compared with control.

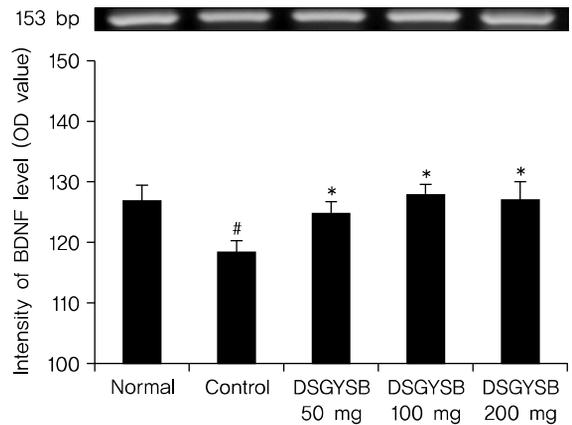


Fig. 6. Effect of DSGYSB administration on the BDNF activity in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. #p<0.05, compared with normal; \*p<0.05, compared with control.

DSGYSB 200 mg군이 모두 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

### 5. Melatonin 함량에 미치는 영향

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 Melatonin 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 56.5±7.3 pg/ml, 대조군은 32.1±7.6 pg/ml를 나타내어 정상군에 비하여 대조군은 감소하였고, DSGYSB 50 mg군은 46.1±9.4 pg/ml, DSGYSB 100 mg군은 42.1±11.2 pg/ml, DSGYSB 200 mg군은 41.4±7.9 pg/ml을 나타내어 대조군에 비하여 각 실험군은 증가하였으나 유의한 차이는 나타내지 않았다(Fig. 5).

### 6. PCR 기법 활용 BDNF, CREB, TrkB, TNF-α에 미치는 영향

#### 1) BDBF 활성화에 미치는 영향

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 BDNF 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 127.0±2.6 OD value, 대조군은 118.5±1.8 OD value를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의하게 감소하였고, DSGYSB 50 mg군은 124.8±1.9 OD value, DSGYSB 100 mg군은 127.9±1.9 OD value, DSGYSB 200 mg군은 127.0±3.0 OD value을 나타내어 대조군에 비하여 DSGYSB 50 mg군, DSGYSB 100 mg군, DSGYSB 200 mg군이 모두 유의하게 증가하였다(Fig. 6).

## 2) CREB 활성화에 미치는 영향

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 CREB 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 129.3±4.0 OD value, 대조군은 117.0±3.4 OD value를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의하게 감소하였고, DSGYSB 50 mg군은 129.8±5.6 OD value, DSGYSB 100 mg군은 131.0±4.3 OD value, DSGYSB 200 mg군은 135.5±5.0 OD value을 나타내어 대조군에 비하여 DSGYSB 100 mg 군과 DSGYSB 200 mg군이 유의하게 증가하였다(Fig. 7).

## 3) TrkB 활성화에 미치는 영향

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 TrkB 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 118.7±2.1 OD value, 대조군은 82.0±1.3 OD value를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의하게 감소하였고, DSGYSB 50 mg군은 75.4±5.5 OD value, DSGYSB 100 mg군은 93.1±2.8 OD value, DSGYSB 200 mg군은 102.1±1.4 OD value을 나타내어 대조군에 비하여 DSGYSB 100 mg 군과 DSGYSB 200 mg군이 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

## 4) TNF-α 활성화에 미치는 영향

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 TNF-α 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 108.1±2.3 OD value, 대조군은 126.6±2.4 OD value를 나타내어

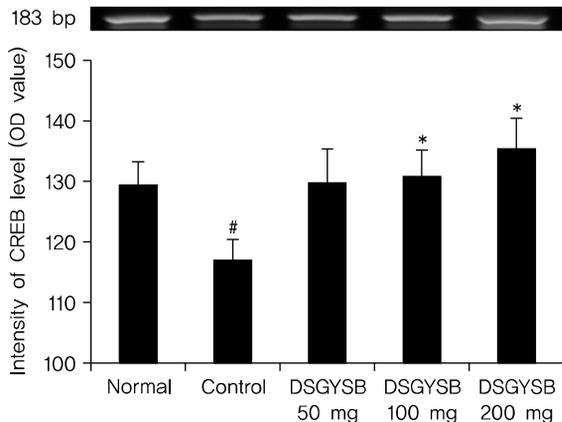


Fig. 7. Effect of DSGYSB administration on the CREB activity in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. #p<0.05, compared with normal; \*p<0.05, compared with control.

정상군에 비하여 대조군이 유의하게 증가하였고, DSGYSB 50 mg군은 121.4±5.1 OD value, DSGYSB 100 mg군은 109.1±8.1 OD value, DSGYSB 200 mg군은 109.9±3.1 OD value을 나타내어 대조군에 비하여 DSGYSB 100 mg 군과 DSGYSB 200 mg군이 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

## 7. 혈당 및 혈청 transaminase 함량에 미치는 영향

### 1) Glucose 함량

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 glucose 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 120.3±

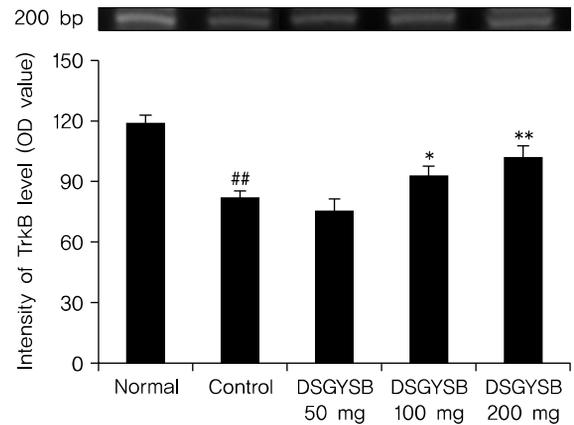


Fig. 8. Effect of DSGYSB administration on the TrkB activity in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. ##p<0.01, compared with normal; \*p<0.05, \*\*p<0.01, compared with control.

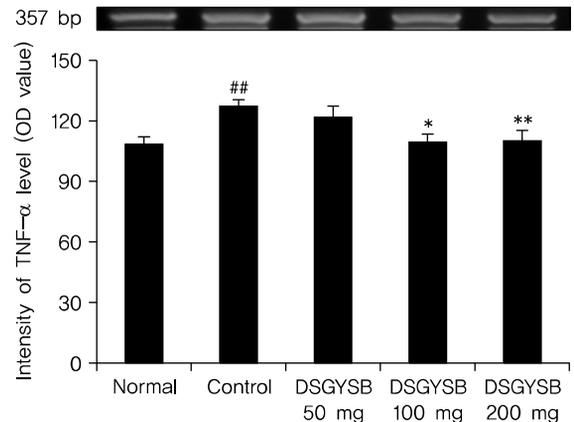


Fig. 9. Effect of DSGYSB administration on the TNF-α activity in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. ##p<0.01, compared with normal; \*p<0.05, \*\*p<0.01, compared with control.

6.1 g/dl, 대조군은 147.2±9.4 g/dl를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의하게 증가하였고, DSGYSB 50 mg군은 126.5±3.3 g/dl, DSGYSB 100 mg군은 113.6±4.9 g/dl, DSGYSB 200 mg군은 110.2±4.6 g/dl를 나타내어 대조군에 비하여 DSGYSB 100 mg군과 DSGYSB 200 mg군 모두 유의하게 감소하였다(Fig. 10).

2) AST 함량

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 AST 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 76.2±2.2 U/L, 대조군은 90.8±7.2 U/L를 나타내어 정상군에 비하여 대조군은 증가하였으나, DSGYSB 50 mg군은 89.7±7.4 U/L, DSGYSB 100 mg군은 81.0±2.8 U/L, DSGYSB 200 mg군은 75.8±7.0 U/L를 나타내어 대조군에 비하여 각 실험군은 유의한 차이가 없었다(Fig. 11).

3) ALT 함량

동신기혈양수방의 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 ALT 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 26.0±0.7 U/L, 대조군은 29.5±2.7 U/L를 나타내어 정상군에 비하여 대조군은 증가하였으나, DSGYSB 50 mg군은 25.2±1.3 U/L, DSGYSB 100 mg군은 24.8±3.9 U/L, DSGYSB 200 mg군은 25.0±1.1 U/L를 나타내어 대조군에 비하여 각 실험군은 유의한 차이가 없었다(Fig. 12).

8. Leukocyte 변화에 미치는 영향

동신기혈양수방가미 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 Leukocyte 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, White blood cell, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte의 경우 대조군에 비하여 DSGYSB 200 mg군이 유의하게 증가하였다(Fig. 13).

9. Erythrocyte 및 thrombocyte 변화에 미치는 영향

동신기혈양수방 용량별 투여가 CMS 유발 흰쥐의 Erythrocyte 및 Thrombocyte 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, Red blood cell과 Hematocrit, Eosinophil, Platelet의 경우 대조군에 비하여 각 실험군은 유의한 차이를 보이지

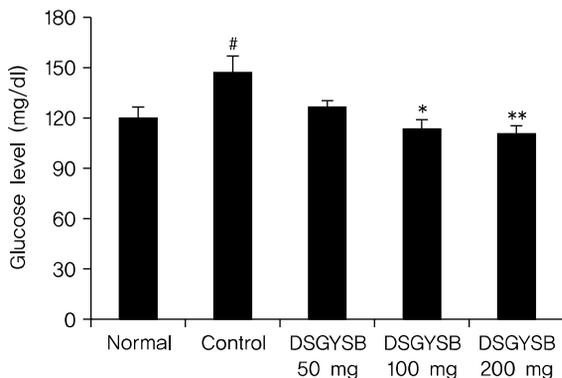


Fig. 10. Effect of DSGYSB administration on the glucose level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. #p<0.05, compared with normal; \*p<0.05, \*\*p<0.01, compared with control.

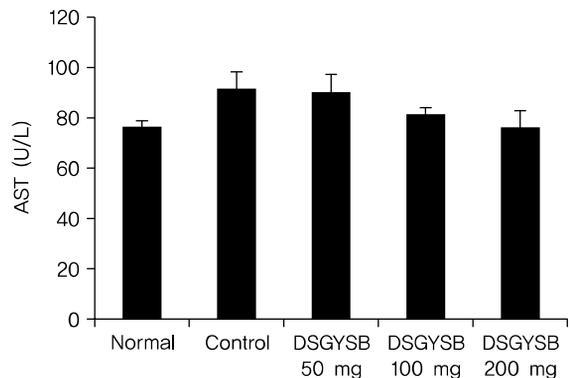


Fig. 11. Effect of DSGYSB administration on the AST level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1.

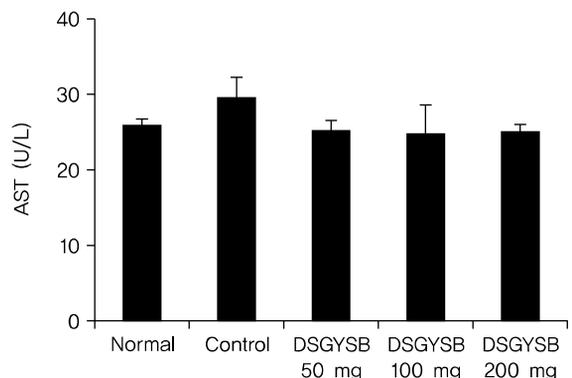
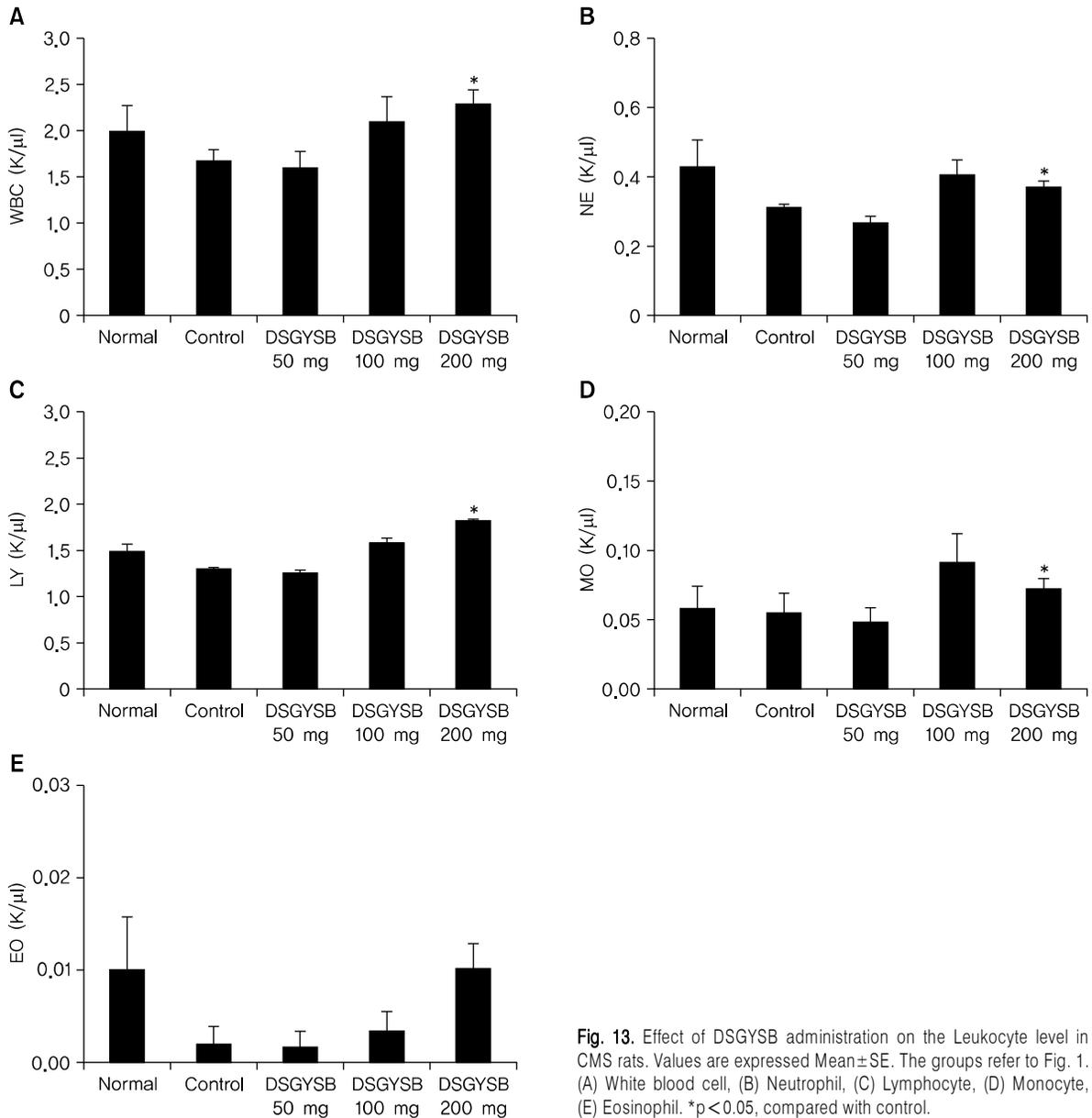


Fig. 12. Effect of DSGYSB administration on the ALT level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1.



**Fig. 13.** Effect of DSGYSB administration on the Leukocyte level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. (A) White blood cell, (B) Neutrophil, (C) Lymphocyte, (D) Monocyte, (E) Eosinophil. \*p<0.05, compared with control.

않았으며, Hemoglobin의 경우 대조군에 비하여 DSGYSB 200 mg군이 유의하게 증가하였다(Fig. 14).

#### IV. 고찰

충분한 양의 수면은 건강을 유지하는데 필수적인 요소로 개인의 안녕과 삶의 질에 긍정적인 영향을 미치는데, 여러 가지 형태의 방해로 인해 충분한 수면을 취하지 못하면 에너지와 활력을 잃게 되어 신체적, 정신적, 행동적 장애가 발

생하게 되며, 집중력과 판단력이 저하되며 불안정해지고 일상생활에 적극적으로 참여하기 어려워진다<sup>25)</sup>. 대한수면연구학회(Korean Sleep Research Society, 2009)의 수면 정보에 의하면 우리나라의 경우 20% 이상이 불면증을 겪고 있고 그중 1/4 정도는 만성 불면증을 경험하고 있다고 한다<sup>26)</sup>.

불면증은 수면장애 가운데 가장 흔한 질환으로 수면의 어려움을 호소하는 증상으로 정의되는데 현대인의 3명 중 1명이 한 해 동안 불면을 경험하고 6명 중 1명이 심각한 불면을 경험하며 12명 중 1명이 만성적인 불면을 경험한다

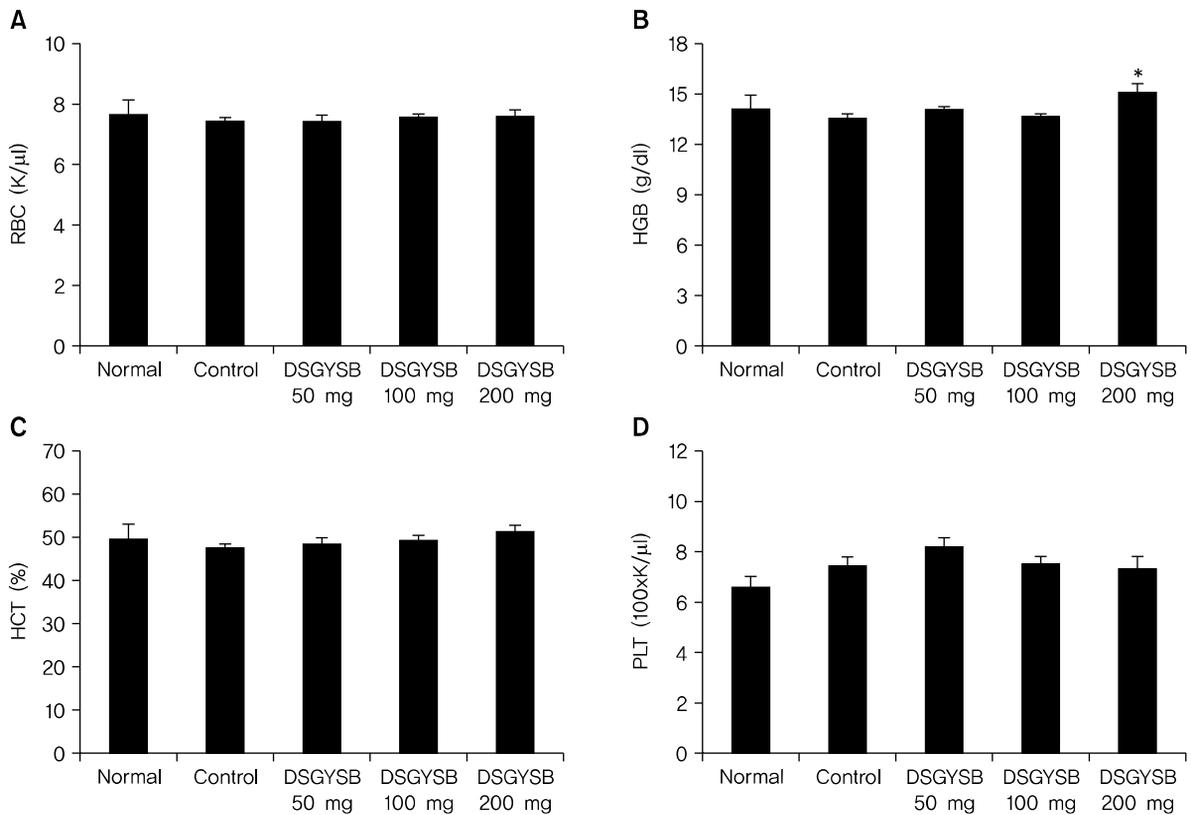


Fig. 14. Effect of DSGYSB administration on the Erythrocyte and Thrombocyte level in CMS rats. Values are expressed Mean $\pm$ SE. The groups refer to Fig. 1. (A) Red blood cell, (B) Hemoglobin, (C) Hematocrit, (D) Platelet. \* $p < 0.05$ , compared with control.

고 보고될 정도로 매우 높은 유병률을 보인다<sup>7)</sup>. 불면증의 원인으로는 심리적 요인, 환경적 요인 등 매우 다양하나, 현대 사회에서는 복합 요인이 작용하여 발생하는 원인 불명의 불면증이 많은데 이는 스트레스와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다<sup>1,3)</sup>.

스트레스는 인체에 가해지는 다양한 자극이나 변화에 대해 원활하게 대처하지 못하여 발생하는 인체의 부적응 상태로 각종 심리증상과 신체증상, 행동증상 등을 초래하는 것을 말한다<sup>4)</sup>. 이러한 스트레스에 대해 자율신경계와 시상하부-뇌하수체-부신 축(Hypothalamus-Pituitary-Adrenal gland; HPA axis)에 의해 생리적 반응이 조절되는 것으로 알려져 있는데, 스트레스 자극이 주어지면 대뇌피질에서 위협성에 대해 파악하고, 망상활성계(Reticular Activating System)를 통해 변연계(Limbic System)와 시상(Thalamus)으로 이동하여 내분비계와 자율신경계를 활성화시킨다<sup>5,27)</sup>. 내분비계가 활성화 될 때 시상하부는 부신피질 자극 호르몬 방출 인자(Corticotropin Releasing Factor; CRF)를 분비하여 뇌

하수체 전엽을 자극해 부신피질 자극 호르몬(Adrenocorticotrophic Hormone; ACTH)을 방출하고 방출된 ACTH는 부신피질을 자극하여 대표적인 스트레스 지표 물질인 Corticosterone을 방출하게 한다<sup>28)</sup>. 방출된 Corticosterone은 몸의 기관과 중추신경계, 자율신경계, 내분비계, 면역계에 영향을 미치게 되고 신체의 조절 기능을 약화시켜 복합적인 신체증상을 유발하여 가볍게는 두통, 피로감, 면역기능 저하, 신경성 질환 등을 발생시키고, 심하면 당뇨병, 고혈압, 심장질환, 암 등의 난치성 질환으로 발생하게 된다<sup>29-31)</sup>.

특히 정신건강의 측면에서 볼 때 반복적이고 만성적인 스트레스는 중추신경계에 작용하여 여러 신경전달물질 및 호르몬 분비의 변화를 유발하여 걱정, 우울, 불안, 초조, 긴장 등 심리적으로 불안정한 상태를 야기하고 수면장애, 우울증 등의 기분장애 및 조현병 등 각종 정신과적 질환을 발생시킨다<sup>5,6)</sup>.

한의학에서는 스트레스 인자에 대해 정신적인 자극(칠정상) 또는 외부 환경(육기)의 변화가 자극인자로 작용하여 인

체가 반응함으로써 나타나는 현상으로 인식하였는데<sup>32)</sup>, 이는 《영추(靈樞)·구문편(口問篇)》<sup>33)</sup>에서 기후, 정동(情動), 음식, 기거 등을 제시한 것과 《삼인방(三因方)》<sup>34)</sup>의 내인(內因), 외인(外因), 불내외인(不內外因)을 통해 알 수 있다. 이 중 심리적 스트레스와 관련된 부분은 七情에 의한 것으로 《소문(素問)·거통론(舉痛論)》<sup>35)</sup>에서는 노(怒)하면 기상(氣上)하고 희(喜)하면 기완(氣緩)하고 비(悲)하면 기소(氣消)하고 공(恐)하면 기하(氣下)하고 경(驚)하면 기란(氣亂)하고 사(思)하면 기결(氣結)한다고 하여, 감정의 변화가 기의 기능을 실조시킴으로써 다양한 질병을 일으킬 수 있다고 하였다<sup>7)</sup>.

수면에 대해서는 한의학에서 양기와 음기의 상관관계로 설명하고 있는데 《영추(靈樞)·대혹편(大惑論)》<sup>36)</sup>에서는 양기가 신체의 음분으로 들어가면 눈을 감고 수면을 취하게 되지만, 양기가 밤이 되어 음분으로 들어가지 못하고 양분에 머물게 되면 불면이 된다고 하였다. 불면을 일으키는 원인은 다양한데, 감정의 급격한 변화나 지속적인 스트레스가 주된 요인으로 병리기전을 살펴보면 다음과 같다. 첫 번째는 정지부수 간기울결 울구이화화 사화우동심신 신부득안 이치불매(情志不遂 肝氣鬱結 鬱久而化火 邪火擾動心神 神不得安而致不寐) 하고, 두 번째는 심담허겁 혹 폭수경해 신 혼불안 선경이공이치아부능매(心膽虛怯 或 暴受驚駭 神魂不安 善驚易恐而致夜不能寐) 하며, 세 번째는 사려노권태과 손상심신 심상즉심혈암모 신불수사(思慮勞倦太過 損傷心神 心傷則心血暗耗 神不守舍) 한다<sup>37)</sup>. 즉, 정신적인 스트레스로 인해 기가 울체되어 순행이 순조롭지 못하면 음양기혈의 균형이 깨지고 장부를 손상시켜 불면이 발생하게 된다.

동신기혈양수방은 《변증기문·불매문》<sup>9)</sup>에 기재된 윤조교심탕의 가감처방으로 오래도록 근심걱정을 한 후에 피곤하지만 잠을 자지 못하는 증상에 활용하는 윤조교심탕에 산조인(초)과 용안육, 사인, 황금을 가한 처방이다. 저자는 동신기혈양수방이 사려과다로 인해 심신불교하고 간기태조하여 생기는 간혈(肝血)의 조(燥)를 보하고, 신고(腎枯)를 막으며 신수(腎水)가 양목(養木)하여 간과 심이 교류시키는 것에 산조인과 용안육의 조합으로 음혈이 부족해 생기는 심번불면(心煩不眠)과 소양경의 열을 내리는 작용을 더해 불면을 치료할 수 여겨 임상에서 활용하였다. 동신기혈양수방을 구성하는 약물은 백작약, 산조인(초), 숙지황, 당귀, 용안육, 사인, 현삼, 시호, 석창포, 황금으로 약재 각각의 효능을 살

펴보면 백작약은 고산미한(苦酸微寒)하여 양혈유간(養血柔肝), 완중지통(緩中止痛), 림음수한(斂陰收汗)하고, 산조인(초)은 미감산(味甘酸)하여 허번불면(虛煩不眠), 경계다몽(驚悸多夢)하고, 숙지황은 감미온(甘微溫)하여 자음보혈(滋陰補血), 익정진수(益精填髓)하고, 당귀는 감신온(甘辛溫)하여 보혈화혈(補血和血), 조경지통(調經止痛), 윤조활장(潤燥滑腸)하는데 세 가지의 보혈약 조합이 생혈(生血)을 자양(滋養)하고 심간이경(心肝二經)의 기능을 조절하여 조혈(造血)하는 것에 산조인(초)의 영혈을 보하여 안신(安神)하는 작용을 덧붙였다. 여기에 미감(味甘)하고 보익심비(補益心脾), 양혈안신(養血安神)하는 용안육을 추가하였다. 현삼은 청열량혈약으로 감고함한(甘苦鹹寒)하여 양혈자음(養血滋陰), 사화해독(瀉火解毒)하고, 시호는 발산풍열약으로 고미한(苦微寒)하여 화해표리(和解表裏), 소간(疏肝), 승양(升陽)하며, 석창포는 개규약으로 신고온(辛苦溫)하여 화담개규(化痰開竅), 화습행기(化濕行氣), 거풍이비(祛風利痺), 소종지통(消腫止痛)하는 효과가 있다. 또한 미고(味苦)하고 사실회(瀉實火)하는 황금을 시호와 어울려 소양경의 열을 청(淸)하게 하는 작용을 덧붙여 심리적인 갈등으로 인해 생긴 열을 제거하여 수면을 유도하거나 유지하는데 도움이 되도록 하였다<sup>38)</sup>.

기존의 한의학 실험 연구들에서의 스트레스 모델은 구속 스트레스, 소음스트레스, 전기쇼크 등 신체적 스트레스를 가하거나 심리적 스트레스를 유발시켜 단일 약재 혹은 복합방제의 투여에 따른 혈액 분석, 뇌 조직 내 물질의 함량 변화 측정, 뇌세포 유전자 분석 등을 통하여 항스트레스 효과를 보고한 연구가 많았다<sup>39)</sup>.

본 연구에서 활용한 Chronic Mild Stress (CMS) 유발 흰쥐는 Wilner에 의해 고안된 것으로 여러 종류의 약물을 통해 다양한 실험 및 관측이 가능하다는 점에서 의미가 있는 실험 방법이다. 초기 동물실험에서는 강한 자극을 주는 방법이 선호되었으나 최근에는 인간의 생활 스트레스를 본뜬 경미한 강도의 반복적인 스트레스를 이용하는 방법이 선호되고 있다. 실험동물에 가해진 스트레스는 먹이박탈, 빈물병 제시, 강제 운동, 소음, 주야 주기 역전, 강제 수영, 빛 깜빡임, 케이지 기울이기, 케이지 흔들기, 고밀도 사육, 물 박탈, 젖은 깔집 등이 포함되며 매일 스트레스 유발표에 의하여 예측할 수 없는 자극들을 제공하여 습관화가 일어나지 않도록 하였다<sup>40,41)</sup>.

기존의 수면장애와 관련된 실험적 연구로는 천왕보심단,

온담탕, 귀비탕, 수종의 한약재 열수추출물이 멜라토닌 수용체 발현에 미치는 영향<sup>10,11</sup>, 분심기음가미방이 흰쥐의 수면 장애와 불안, 정서성에 미치는 영향<sup>12,13</sup> 등이 있고, 기존의 불면증 치료에 대한 임상보고는 산조인탕의 불면치료에 대한 임상연구<sup>14,15</sup>와 삼황사십탕<sup>16</sup>, 육군자탕가미방<sup>17</sup>의 임상 증례보고가 있다. 만성 스트레스에 대한 실험적 연구로는 Chronic Mild Stress로 유발된 우울증 모델 흰쥐에 대한 귀비탕의 실험적 연구<sup>18</sup>, 가미산조인탕의 항스트레스 효과<sup>19</sup>, 사물탕가향부자<sup>20</sup>과 하엽추출물<sup>21</sup>의 항우울 효과, 삼음교, 족삼리의 백복령 약침이 CSM 유발 흰쥐에 미치는 영향<sup>22</sup>을 보고한 바가 있다. 또한 황칠<sup>23</sup>과 윤조교심탕<sup>24</sup>을 이용한 만성 스트레스 모델에서의 스트레스 및 수면 관련 호르몬에 미치는 영향을 보고한 연구가 있었으나, 액상 파우치 형태의 한약의 스트레스 및 수면관련 호르몬에 미치는 영향을 연구한 보고는 없었다.

이에 저자는 임상에서 정신적 스트레스로 인한 불면에 효과를 보이는 동신기혈양수방을 액상 스틱 파우치 형태로 변용시켜 이를 경구하는 것이 만성 스트레스 모델 흰쥐의 스트레스 및 수면 관련 호르몬에 유의미한 영향을 미칠 것으로 추정하여 혈액 및 혈청학적 지표, 스트레스, 수면과 관련된 지표인 Noradrenalin, Corticosterone, Serotonin, GABA, Melatonin, PCR기법을 활용한 BDNF, CREB, TrkB, TNF- $\alpha$  지표의 변화를 측정, 관찰하였다.

Noradrenalin은 부신(副腎)으로부터 혈액으로 방출되는 스트레스와 관련된 호르몬 중 하나이며, 주의와 충동성과 관련있는 인간의 뇌 부분에 영향을 미친다.

본 실험에서 Noradrenalin의 함량은 정상군의 경우  $45.4 \pm 12.4 \times 10^{-1} \text{ pg/ml}$ , 대조군은  $85.2 \pm 21.5 \times 10^{-1} \text{ pg/ml}$ 을 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 높았고, 실험군에서는 DSGYSB 200 mg군에서  $35.4 \pm 9.7 \times 10^{-1} \text{ pg/ml}$ 로 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었으며, 오히려 정상군보다 낮아지는 결과를 보였다(Fig. 1).

부신 피질계 호르몬 중 하나인 Corticosterone은 스트레스 자극에 의해 분비량이 증가되는 데, 주로 혈청 중의 Corticosterone의 분비가 증가되는 것으로 알려져 있는데<sup>42</sup>, 본 실험에서 Corticosterone의 함량은 정상군의 경우  $27.9 \pm 1.9 \text{ pg/ml}$ , 대조군은  $60.5 \pm 6.3 \text{ pg/ml}$ 를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 높았고, 모든 실험군에서 감소를 보였으며, 특히 DSGYSB 200 mg군은  $36.5 \pm 4.9 \text{ pg/ml}$ 로 대조

군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 2).

이를 종합해 볼 때, 고용량의 동신기혈양수방이 지속적인 스트레스로 인해 높아진 Noradrenalin와 Corticosterone의 함량을 감소시킴으로서 항스트레스 효과를 보인다고 생각된다.

Serotonin은 Melatonin의 전구체로 중뇌, 뇌교, 연수에 있는 봉선핵에 주로 분포하는 신경전달물질이다. 신경정신과적 치료의 측면에서 항불안, 항스트레스, 항우울, 항불면 등의 효과에 대한 연구가 많이 진행되고 있는 물질로 주된 작용은 수면에 대한 저항을 감소시켜 수면을 유도하고 식욕을 감소시키며 분비량이 증가 시 뇌의 활동을 자극하여 각성효과를 나타냄으로써 인지능력 및 집중력을 높이는 작용을 하나 분비량 감소 시 침정상태를 유발하며 우울증, 불안 장애 등의 원인이 된다고 알려져 있다<sup>43,44</sup>.

본 실험에서 Serotonin의 함량은 정상군의 경우  $3.61 \pm 0.32 \text{ pg/ml}$ , 대조군은  $2.88 \pm 0.27 \text{ pg/ml}$ 를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 낮았고, 모든 실험군에서 대조군보다 증가를 보였으나 DSGYSB 200 mg군에서만  $3.97 \pm 0.47 \text{ pg/ml}$ 으로 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 3).

Gamma-aminobutyric acid (GABA)는 포유류의 중추신경계에서 신경흥분을 조정하는 역할을 맡고 있는 억제성 신경전달물질로<sup>45</sup>, 항스트레스와 수면과 관련있다고 생각된다.

본 실험에서 GABA의 함량은 정상군의 경우  $62.4 \pm 9.7 \text{ pg/ml}$ , 대조군은  $35.0 \pm 7.3 \text{ pg/ml}$ 를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 통계학적으로 유의하게 낮았고, 실험군에서는 DSGYSB 50 mg군은  $52.0 \pm 1.9 \text{ pg/ml}$ , DSGYSB 100 mg군은  $65.3 \pm 10.0 \text{ pg/ml}$ , DSGYSB 200 mg군은  $61.3 \pm 5.4 \text{ pg/ml}$ 을 나타내어 모든 실험군이 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 4).

Melatonin은 수면과 관련된 대표적인 호르몬으로 송과선에서 생성, 분비되는데 멜라토닌합성효소(NAT)의 활성이 망막으로부터의 광(Light) 정보에 의해 저해되어 어두울 때 높아지고 밝을 때 낮아지는 변동을 보이며, 광주기를 감지하여 생식활동의 일주성, 연주성 등 생체리듬 생성에 중요한 역할을 하게 된다<sup>46,47</sup>.

본 실험에서 Melatonin의 함량은 정상군의 경우  $56.5 \pm 7.3 \text{ pg/ml}$ , 대조군은  $32.1 \pm 7.6 \text{ pg/ml}$ 를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 낮았고, 실험군에서는 DSGYSB 50 mg

군은  $46.1 \pm 9.4$  pg/ml, DSGYSB 100 mg군은  $42.1 \pm 11.2$  pg/ml, DSGYSB 200 mg군은  $41.4 \pm 7.9$  pg/ml을 나타내어 모든 실험군에서 대조군에 비해 증가였으나 유의한 차이는 나타내지 않았다(Fig. 5).

이상에서 serotonin과 GABA, Melatonin의 농도가 정상군에 비해 대조군은 모두 감소된 상태였고, 실험군에서는 정상군과 거의 같은 수준을 유지하고 있음을 알 수 있다. 스트레스로 인한 경우 Serotonin과 GABA의 함량은 높아지게 되는데, 이 경우는 정상군보다 더 높게 나타나야 하겠지만, 거의 같은 수준을 유지하고 있다는 점에서 증가된 Serotonin과 GABA를 어느 정도 낮춘 것으로 생각되며, Melatonin과 고려해 보았을 때 동시기혈양수방은 항스트레스와 수면유지의 효과를 나타낸다고 볼 수 있다.

또한 본 연구에서는 PCR 기법을 활용하여 BDNF, CREB, TrkB 및 TNF- $\alpha$ 를 관찰하였는데 BDNF는 신경영양인자 중에 하나로 신경세포의 생존과 분화에 관여하고, 중추신경계 및 말초신경에서의 신경 재생에 관여한다고 알려져 있고<sup>48)</sup>. cAMP response element-binding protein (CREB)은 우울증과 관련된 전사인자 중 하나로 상위신호전달분자인 Extracellular signal regulated kinase에 의해 조절되어 BDNF 유전자 발현에 주요한 역할을 하며, Tropomyosin receptor kinase B (TrkB)는 BDNF의 수용체로 알려져 있고<sup>49-52)</sup>, 시냅스 전후에서 TrkB 수용체와의 작용을 통해 BDNF에 의한 신경세포생성이 조절된다. 또, TNF- $\alpha$ 는 초기단계의 염증반응을 매개하는 역할을 하고, 염증반응, 면역반응 등 인체의 방어기전에 관여하는 대표적인 사이토카인으로 TNF- $\alpha$ 의 증가는 비정상적인 염증반응을 일으킨다고 알려져 있다<sup>53)</sup>.

동시기혈양수방이 BDNF의 활성에 미치는 영향을 관찰하였을 때, 정상군은  $127.0 \pm 2.6$  OD value, 대조군은  $118.5 \pm 1.8$  OD value를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 감소를 나타내었고, 실험군에서는 DSGYSB 50 mg군은  $124.8 \pm 1.9$  OD value, DSGYSB 100 mg군은  $127.9 \pm 1.9$  OD value, DSGYSB 200 mg군은  $127.0 \pm 3.0$  OD value을 나타내어 모든 실험군이 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 6). CREB의 활성에 미치는 영향을 관찰하였을 때, 정상군은  $129.3 \pm 4.0$  OD value, 대조군은  $117.0 \pm 3.4$  OD value를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 감소를 나타내었고, 실험군에서는 DSGYSB 100 mg군은  $131.0 \pm 4.3$  OD value, DSGYSB 200 mg군은  $135.5 \pm 5.0$

OD value을 나타내어 대조군에 비하여 두 군이 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 7). 또한 TrkB의 활성에 미치는 영향을 관찰하였을 때, 정상군은  $118.7 \pm 2.1$  OD value, 대조군은  $82.0 \pm 1.3$  OD value를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 감소를 나타내었고, 실험군에서는 DSGYSB 100 mg군은  $93.1 \pm 2.8$  OD value, DSGYSB 200 mg군은  $102.1 \pm 1.4$  OD value을 나타내어 대조군에 비하여 두 군이 유의한 증가를 나타내었고(Fig. 8), TNF- $\alpha$ 의 활성에 미치는 영향을 관찰하였을 때, 정상군은  $108.1 \pm 2.3$  OD value, 대조군은  $126.6 \pm 2.4$  OD value를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 증가를 나타내었고, 실험군에서는 DSGYSB 100 mg군은  $109.1 \pm 8.1$  OD value, DSGYSB 200 mg군은  $109.9 \pm 3.1$  OD value을 나타내어 대조군에 비하여 두 군이 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 9).

이상에서 볼 때, 동시기혈양수방이 BDNF, CREB, TrkB의 활성을 증가시키고, TNF- $\alpha$ 의 과도한 활성을 억제하여 지속적인 스트레스 자극으로 인한 신경 손상 및 비정상적인 염증반응을 통제하는 항스트레스 효과를 나타낸다고 생각된다.

혈액학적 검사를 통한 각종 지표의 변화에 대한 결과는 다음과 같다.

본 실험에서 동시기혈양수방을 투여하였을 때 Glucose의 함량은 정상군의 경우  $120.3 \pm 6.1$  g/dl, 대조군은  $147.2 \pm 9.4$  g/dl를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 증가를 나타내었고, 실험군에서는 DSGYSB 100 mg군은  $113.6 \pm 4.9$  g/dl, DSGYSB 200 mg군은  $110.2 \pm 4.6$  g/dl를 나타내어 대조군에 비하여 두 군 모두 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 10).

스트레스 상황에서는 Noradrenalin과 Corticosterone의 영향으로 인해 혈당이 증가되는데, 실험군의 혈당이 감소된 것으로 볼 때, 동시기혈양수방은 스트레스로 인한 혈당 강화효과가 있다고 생각된다.

동시기혈양수방의 안정성을 위해 AST와 ALT의 함량을 확인하였는데, 정상군과 대조군, 모든 실험군에서 유의한 차이가 없어(Fig. 11, 12), 안정성을 확보하였다고 생각된다.

Erythrocyte와 Thrombocyte의 변화를 관찰한 결과 Hemoglobin의 경우 대조군에 비하여 DSGYSB 200 mg군이 유의한 증가를 나타내었고(Fig. 14), Leukocyte의 경우 대조군에 비해 DSGYSB 200 mg군에서 White blood cell,

Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte이 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 13). 이 결과는 동신기혈양수방이 보혈작용과 면역력 증강 효과를 나타내는 것으로 항스트레스 효과가 있다고 생각할 수 있다. 이는 윤조교심탕의 불면효과<sup>24)</sup>에 면역력 증강효과를 더한 것으로 볼 수 있다.

이상의 연구 결과로 볼 때, 액상 스틱 파우치 형태의 동신기혈양수방의 경구 투여는 CMS 유발 흰쥐에 있어 스트레스 및 수면관련 호르몬에 영향을 미치며, 특히 DSGYSB 200 mg군에서 양호한 결과를 보이고 있다. 이것은 동신기혈양수방이 스트레스 관련 호르몬을 감소시키며, 수면관련 호르몬을 증가시키는 효과가 있다고 판단된다. 또한 실험결과가 임상활용에서의 효과와 유사하게 나타났으며, 불면증 외 항스트레스 효과를 보이고 있어 향후 임상에 적용한다면 스트레스로 인한 불면증 환자에게 좋은 결과가 있을 것으로 생각된다. 또한 보혈작용이 수면에 미치는 영향 및 기전에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

## V. 결론

동신기혈양수방 용량별 투여가 CMS 유발에 대하여 Noradrenalin, Corticosterone, Serotonin, GABA, BDNF, CREB, TrkB, TNF- $\alpha$  및 혈액학적 변화에 미치는 영향을 관찰한 바, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Noradrenalin 함량은 DSGYSB 200 mg군이 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다.
2. Corticosterone 함량에서 대조군에 비하여 DSGYSB 200 mg군이 유의하게 감소하였다.
3. Serotonin 함량에서 대조군에 비하여 DSGYSB 200 mg군이 유의하게 증가하였다.
4. GABA 함량은 DSGYSB 50 mg군, DSGYSB 100 mg군, DSGYSB 200 mg군 모두 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다.
5. BDNF 활성은 DSGYSB 50 mg군, DSGYSB 100 mg군, DSGYSB 200 mg군 모두 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다.
6. CREB 활성은 DSGYSB 100 mg군과 DSGYSB 200 mg군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.
7. TrkB 활성은 DSGYSB 100 mg군과 DSGYSB 200 mg군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.

8. TNF- $\alpha$  활성은 DSGYSB 100 mg군과 DSGYSB 200 mg군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.

9. 혈액내 Glucose 함량은 DSGYSB 100 mg군과 DSGYSB 200 mg군 모두 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.

10. Leukocyte 변화에서 White blood cell, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte의 경우 DSGYSB 200 mg군이 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다.

11. Erythrocyte 변화에서는 Hemoglobin의 함량이 DSGYSB 200 mg군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다.

## REFERENCES

1. Min SG. Modern psychiatry. Seoul: Ilchokak. 2004:434-50.
2. Song YM. Management of Insomnia. Family Physician : Journal of the Korean Academy of Family Medicine. 2001;22:1163-72.
3. Park JJ, Lim LC, Seol IC. The consideration about the insomnia patient which sees as HRV. Daejeon University Korean medicine laboratory collection of dissertations. 2004;13(1):39-45.
4. Koh HJ. Stress management in primary care. The Journal of the Korean Academy of Family Medicine. 2000; 21(2):125-36.
5. Lee GH. Modern Clinical Psychiatry. Seoul. Hanamc. 1985:42, 148, 381, 498-501.
6. Brown, G.W. and J.L.T. Birley. Crisis and life changes and the onset of schizophrenia. Journal of Health and Human Behavior. 1968;9:203-14.
7. The textbook Compilation Committee of Neuropsychiatry of oriental medical schools in nation. The Neuropsychiatry of Oriental Medicine. Seoul. Jipmoondang. 2011: 197-202, 252-5, 531-9.
8. Na CS and others. Korean medicine Home family. Seoul. Eusungdang. 2004:463-4.
9. Noh YG. New Edit Byeongjeugimoon. Daejeon. Jumin publisher. 2005:311-2.
10. Cho YS, Kim BK. Effects of Tianwangbuxin-dan, Wendantang, Guipi-tang on the expression of MT1 and MT2 melatonin receptors in C6 glial cells. Journal of Oriental neuropsychiatry. 2010;21(2):103-23.
11. Kim BRM, Yang DH, Kim BK. Effects of several herbs on the expression of MT1 and MT2 melatonin receptors in C6 glial cells. Journal of Oriental neuropsychiatry. 2007; 18(1):15-36.
12. Kim KW, Kim JW, Whang WW, Kim HT, Park SK, Lee JR. The effects of pungsimgieumgamibang on insomnia and Anxiety in Rat. Journal of Oriental neuropsychiatry. 2000;

- 11(2):53-62.
13. Hu YS, Kim JW, Whang WW, Kim HT, Park SK, Kim HJ. The effect of punsimgieumgamibang on sleep disorder and emotionality in animals. *Journal of Oriental neuropsychiatry*. 2000;11(2):43-52.
  14. Hong HW. A Clinical Study of Sanjoin-Tang on Insomnia Patients. Dept of Oriental Medicine Graduate School Dong-Eui University. 2005.
  15. Hong HW, Lee SD, Gam CW, Park DI. Clinical Study of Sanjoin-Tang on Insomnia Patients with Cerebrovascular Accident. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 2004;18:1927-32.
  16. Seok SH, Kim JH, Kin GW, Koo BS. A Case of Insomnia Incurable by Neuropsychiatric Medication Alone but Made Possible with Sam-Hwang-Sa-Sim-Tang. *Journal of Oriental Neuropsychiatry*. 2006;17:117-29.
  17. Kim SH, Lee JI, Gu JH, Chung DK. Three Case Report of Modified Yukgunja-tang Main Treatment Effect on Improvement of Insomnia Caused by Wibulhwa. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 2010;24:892-7.
  18. Lee JA, Kim JW, Hwang WW, Kwak SY, Kim MJ, Park EH. The effects of Quibitang on an Animal Model of Depression induced by Chronic Mild Stress. *Journal of Oriental neuropsychiatry*. 2001;12(1):123-35.
  19. Kwon HJ, Kim KS, Kang SK, Park PS, Lim JM, Cho YS, Choi YH, Park SY. Antistress effect of Gagamsanzointang on rat chronic stress model. *The Korea Journal of Herbology*. 2012;27(6):29-35.
  20. Jeong JH, Choi CM, Seo YJ, Cho HB, Kim SB. The Anti-depressive Effect of Samul-tanggahyangbuja on Chronic Mild Stress in Overiectomized Rats. *Journal of Korean Obstet Gynecol*. 2013;26(4):30-7.
  21. Kang MG, Kim YH, Im AR, Nam BS, Chae SW, Lee MY. Antidepressant-like effects of *Nelumbo buciifera* leaves extract in chronic mild stress model. *The Korea Journal of Herbology*. 2014;29(2):7-13.
  22. Kim SW, Kim JH, Cho MR, Shin JC. The Effect of Poria Cocos Pharmacopuncture at SP6(Sameumgyo) and ST36(Joksamni) on Chronic Stress Model(CSM) Rats. *The Acupuncture*. 2015;32(2):187-95.
  23. Song YG. Effect of Resina Dendropanacis morbiferus on Stress and Sleep Hormone in Chronic Mild Stress-Induced Rats. Graduate School of Dongshin University. Doctoral Dissertation. 2016.
  24. Kim HN, Kim KO. The Effects of Yunjogyosim-tang on Stress and Sleep-related Substance of Rats induced by Chronic Mild Stress. *Journal of Oriental neuropsychiatry*. 2017;28(1):25-38.
  25. Fuller J, Schaller-Ayers J. Health Assessment: A Nursing Approach. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000.
  26. Okun ML, Kravitz HM, Sowers MF, Moul DJ, Hall M. Psychometric Evaluation of the Insomnia Systptom Questionnaire: A Self-report Measure to Identify Chronic Insomnia. *Journal of Clinical Sleep Medicine*. 2000;5:41-50.
  27. Min HG. Clinacal endocrinology. Seoul. Koryeo Medicine. 1999;5, 31, 450.
  28. Choi WK, Lee KS, Joung HY, Lee YC, Sohn JH, Lee BH, Pyun KH, Shim IS. Low frequency noise induces stress responses in the rat. *The Journal of Emotion and sensibility*. 2007;10(3):411-8.
  29. Lss Sy, Choi JH, Jeong HS, Kim YK, Choi SI. Piperis Nigrifructus extract Ameliorates psychological stress in mice. Daejeon University Korean medicine laboratory collection of dissertations . 2013;21(2):95-104.
  30. Selye H. Forty years of stress research. Principal remaining problems and misconceptions. Canada. *Journal of Medical Association*. 1976;115:53-6.
  31. Stone EA. Stress and catecholamines. In A. J. Friedhoff(ed.). *Cathecholamines and Behavior*. Plenum Press. New York. 1975;2:31-72.
  32. Kwon BH, Lee SR. Effect of Samulanshintang on Rats stressed by Immobilization. *Journal of Oriental neuropsychiatry*. 1994;5(1):86.
  33. Hong WS. Jeonggyo(精校) Hwangjenaehyeongyoungchu(黃帝內經靈樞). Seoul. Oriental Medicine Institution Press. 1985:158-9, 286.
  34. Jineon(陳言). Jinmutaeksaminbang(陳無擇三因方) Second volume. Taipei. Daeryeongukpung(臺聯國風) Publisher. 1978:6.
  35. Lee KW translation. Yeokhaebyeonjoo(譯解編注) Hwangjenaehyeongyoungsomun(黃帝內經素問). Seoul. Yeokang publisher. 2001:153-230, 339- 432, 553-76.
  36. Yang BC translation. Keumseok(今釋) Hwangjenaehyeongyoungchu(黃帝內經靈樞). Seoul. Hyundai Medical Publisher. 1987:513, 620.
  37. Zhang PY. Chinese Internal Medicine. Beijing. Renminweishengchubanshe. 1996:218-22.
  38. Editing commission of Herbology. *Herbology*. Seoul. Younglimsa. 2004:186-8, 216-8, 233-4, 336-8, 530-2, 562-3, 628-35, 640-1.
  39. Choi GA, Cho SI, Kim KS, Choi CW, Wei TS, Yang SJ, Park SY, Kim KO. Effect of Banhahoobak-tang (Banxiahoupotang) Extract(BHTe) on Psychological Stress. *Journal of Oriental neuropsychiatry*. 2015;26(2):117-30.
  40. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*. 1984;83(1):1-16.
  41. Wilner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of Depression : a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*. 1997;134(4):319-29.
  42. Korean neuropsychiatric association. *Neuropsychology*. Seoul. Hana mpc. 1998:465-9.
  43. Koob GF. Corticotropin-releasing factor, Norepinephrine, and stress. Elsevier. 1999;1167-80.
  44. Leventhal AG, Wang YC, Pu ML, Zhou YF, Ma Y. GABA and its agonists improved visual cortical function in sen-

- escent monkeys. *Science*. 2003;300:812-5.
45. Mody I, Dekoninck Y, Otis TS, Soltesz I. Bringing the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends. Neurosci*. 1994;17: 517-525.
  46. Lee JY. The Influence of Acute Cerebral Infarction on the Circadian Rhythm of Melatonin Secretion . *Journal of the Korean Neurological Association*. 2001;19(4):359-63.
  47. Arendt J. Melatonin. *Clinical Endocrinology*. 1988;29: 205-29.
  48. Uitley DS, Lewin SL, Cheng ET, Verity AN, Sierra D, Terris DJ. Brain-derived neurotrophic factor and collagen tubulization enhance functional recovery after peripheral nerve transection and repair. *Archives of otolaryngology-head & neck surgery*. 1996;122(4):407-13.
  49. Silhol, M., Bonnichon, V., Rage, F., Tapia-Arancibia, L.. Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience*. 2005;132(1):613-24.
  50. Rex, C. S., Lauterborn J. C., Lin, C. Y., Kramar, E. A., Rogers, G. A. et al. Restoration of long-term potentiation in middle-aged hippocampus after induction of brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurophysiol*. 2006;96(1): 677-85.
  51. Tapia-Arancibia, L., Aliaga, E., Silhol, M., Arancibia, S..New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res. Rev.* 2008;59(1): 201-20.
  52. Vanguilder, H. D., Farley, J. A., Yan, H., Van Krik, C. A., Mitschelen, M. et al. Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiol. Dis.* 2011;43(1):201-12.
  53. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:397-440.