

자하거 약침이 만성 신체 스트레스 모델 백서의 행동, 체중, 수면 호르몬, 염증 사이토카인, 항산화 효소의 변화에 미치는 영향

하지원, 이유미*, 나창수*, 사공종원[†], 김보경[‡]

동의대학교 한의과대학원 한방신경정신과, 동신대학교 한의과대학 경혈학교실*, 동의대학교 부속한방병원 한방신경정신과[†], 부산대학교 한의학전문대학원 한방신경정신과[‡]

Effects of *Hominis Placenta* Pharmacopuncture in a Chronic Physical Stress Rat Model on Changes in Behavior, Weight, Sleep-Related Hormones, Inflammatory Cytokines, and Anti-Oxidant Enzymes

Ji-Won Ha, Yu-Mi Lee*, Chang-Su Na*, Jong-Won Sakong[†], Bo-Kyung Kim[‡]

Department of Oriental Neuropsychiatry, Graduate School of Korean Medicine, Dong-Eui University, *Department of Acupoint & Meridian, College of Korean Medicine, Dongshin University, [†]Department of Oriental Neuropsychiatry, Dong-Eui University Korean Medical Hospital, [‡]Department of Oriental Neuropsychiatry, School of Korean Medicine, Pusan National University

Received: December 1, 2019

Revised: December 18, 2019

Accepted: December 19, 2019

Correspondence to

Bo-Kyung Kim
Department of Oriental
Neuropsychiatry, Pusan National
University Korean Medical Hospital,
20 Geumoh-ro, Mulgeum-eup,
Yongsan, Korea.
Tel: +82-55-360-5965
Fax: +82-55-360-5890
E-mail: npjolie@hanmail.net

Acknowledgement

This manuscript is a revision of the first author's doctor's dissertation for Dong-Eui University in 2019. This study was supported by the Traditional Korean Medicine R&D program funded by the Ministry of Health & Welfare through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI) (HB16C0074).

Objectives: This study was designed to examine the effect of *Hominis Placenta* Pharmacopuncture on the change in behavior, sleep-related hormones, inflammatory cytokines, anti-oxidants, weight, blood, and serum on rats given chronic physical stress.

Methods: Wistar rats older than age 10 weeks were used in this experiment. They were divided into six groups. The normal group was not given stress. The control group was given only chronic physical stress and no treatment. The positive control group was given chronic physical stress and treated with zolpidem. Three *Hominis Placenta* Pharmacopuncture (HPP) groups were given chronic physical stress, then treated with different concentrations of HPP; HPP-0.5x (0.5 times diluted), HPP-1x (undiluted) and HPP-2x (2 times condensed). The changes of values of Nestlet Shredding results, weight, Melatonin, Gamma-aminobutylic Acid (GABA), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Super-oxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), AST, ALT, BUN, Creatinine, and leukocytes were observed during the experiment.

Results: The changes in chronic physical stress of the rat model were as follow. The Nestlet Shredding result increased in the control group compared to the normal group ($p < 0.05$), and decreased in the HPP-1x and HPP-2x compared to the control group ($p < 0.05$). The amount of weight gain showed increasing tendency in the HPP-2x compared to the control group since the second week. The GABA increased ($p < 0.05$) and Melatonin also showed certain increasing tendency in the HPP-1x and HPP-2x compared to the control group. The TNF- α and IL-6 increased in the control group compared to the normal group ($p < 0.01$), and decreased in all the HPPs compared to the control group ($p < 0.05$). The SOD level decreased in the control group compared to the normal group ($p < 0.01$), and increased in all the HPPs compared to the control group ($p < 0.05$). GPx, AST, ALT, Bun, Creatinine and leukocytes showed no noticeable difference among all groups.

Conclusions: *Hominis Placenta* Pharmacopuncture was effective in increasing weight, GABA, Melatonin, SOD, and decreasing Nestlet Shredding and inflammatory cytokines, suggesting that it consequently facilitates in relieving physical stress.

Key Words: *Hominis Placenta*, Pharmacopuncture treatment, Chronic stress, Antioxidants, Melatonin, Cytokines.

I. 서론

불면증은 Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5 (DSM-5)¹⁾ 진단 기준에 의하면 잠들기 어려움, 수면 유지의 어려움, 아침에 너무 일찍 깨서 다시 잠들기 어려움 등의 증상이 주 3회 이상, 3달 이상 지속되는 것으로 정의된다. 이로 인해 심각한 심리적 불편감, 낮 동안의 피로나 졸림 또는 인지장애, 부정적인 기분, 행동장애 등을 초래해 사회적, 직업적 기능에 불편을 느끼게 된다²⁾. 불면증은 성인의 12%에서 나타나는 흔한 증상이며, 1차 진료 기관을 찾는 환자 중 20%가 수면이상을 호소한다³⁾.

불면의 주요 원인 중 하나인 스트레스는 수면의 질을 나쁘게 하고 수면시간을 단축시키며⁴⁻⁷⁾, 수면 부족 자체가 다시 피로 수준을 높여 스트레스 반응을 일으키는 악순환으로 이어진다⁸⁾.

스트레스란 외부의 사건이나 자극에 대한 유기체의 적응 반응으로, 항상성을 유지하기 위해 신체의 특정 기전들에 압박이 가해져서 생기는 결과인데, 심리적으로는 직면한 문제를 해결하지 못할 때 생기는 불안 또는 불쾌한 긴장 상태 등과도 관련된다⁹⁾. 한의학적 관점에서 스트레스는 七情傷(심리적 원인의 손상) 또는 六氣(외부 환경)의 변화로 볼 수 있으며 이들은 인체 내부에서 氣血과 陰陽의 불균형을 일으켜 각종 질병의 시초가 되는데, 氣機失調로 인해 발생할 수 있는 氣鬱, 氣逆 등과도 관련이 있다¹⁰⁾.

자하거 약침의 수면장애에 치료 효과와 관련된 선행 연구로는, 자하거 약침 시술 후 총수면 시간의 유의한 증가¹¹⁾와 수면장애 점수의 유의한 감소¹²⁾, 장기 수면제 복용 환자에서 수면제 중단 후의 치험례¹³⁾ 등이 있다.

본 연구에서는 자하거 약침의 만성 허리와 소모 상태에 대한 개선 효과가 만성 신체 스트레스로 유발된 스트레스 행동을 감소시키고, 스트레스에 반응한 체중 감소를 줄이며, 불균형해진 수면 관련 호르몬, 염증성 사이토카인, 항산화 효소 등을 정상화하여, 결과적으로 불면증을 개선하는 효과를 가져올 것이라는 가설을 세웠다. 이를 확인하기 위해 백서(白鼠)에 만성 신체 스트레스 모델을 적용한 실험을 설계하고 백서의 Nestlet Shredding, 체중의 증가량, 수면 관련 호르몬, 염증성 사이토카인, 항산화 효소, 혈액과 혈청 등의 변화를 측정해 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 연구대상 및 방법

1. 동물

실험동물은 동신대학교 실험동물위원회 승인(2019-02-02)을 받은 10주령 이상의 Wistar Hannover계의 수컷 백서(체중 300 g 이상)를 사용하였고, 일정한 온도와 습도가 유지되는 사육장(실내 온도 24±1°C, 습도 60±5%) 내에 두고 실험을 진행했다. 실험이 진행되는 동안 고품 사료(샘타코, 한국)와 물은 제공해 자유롭게 섭취하도록 했다.

2. CPS (Chronic Physical Stress) 절차

실험군들의 분리는 CPS (chronic physical stress)를 유발하지 않은 정상군(Nor, Normal group), CPS를 유발한 후 아무 처치도 하지 않은 대조군(Con, Control group), CPS를 유발한 후 졸피뎀을 구강 투여한 양성 대조군(PC, Positive Control group), CPS를 유발한 후 각각 0.5×(1/2 희석, 50 μl), 1×(원액, 50 μl), 2×(2배량, 100 μl)의 자하거 약침 치료를 한 HPP군(*Hominis Placenta* Pharmacopuncture group)으로 분류했다. 각 군에 백서는 5마리씩 배정했다.

실험 시작 전 실험실 환경에 3일간 적응을 시킨 후, 정상군을 제외한 대조군과 실험군들에서 3주 동안 CPS를 유발하였는데, 첫 1주 동안은 스트레스만 주었고, 이후의 2주 동안은 스트레스를 주면서 양성 대조군에는 졸피뎀을, 자하거 실험군에는 약침 시술을 시행하였다. 3주의 기간이 종료된 후 각 실험군들의 관찰 지표가 측정되었다. 실험 기간 동안 온도, 습도, 등의 사육환경은 일정하게 유지했고 물과 사료는 자유롭게 공급되었다.

CPS의 유발은 스트레스 유발 스케줄에 따라 불규칙적으로 유발하여 백서에 있어 자극에 대한 습관화가 일어나지 않도록 했으며, 그 내용은 불규칙하게 일주기 리듬 바꾸기, 낮 동안 조명 제거, 온도변화(찬바람, 따뜻한 바람), 트레드밀 위 달리기, 물이 채워진 케이지에 넣어두기, 고 밀집 유발, 기울이기, 흔들기이다(Table 1).

3. Nestlet Shredding

실험동물을 케이지당 1마리씩 Nestlet 용도로 사용될 오아시스(3 g)와 함께 넣고 3시간 동안 방치했다. 3시간 후 실험동물이 굶아 먹고 남은 오아시스의 무게를 mg 단위로 측

Table 1. Time Table for the CPS Rat Model

	Sun	Mon	Tue	Wed	Thu	Fri	Sat.
01:00 ~09:00	CRC	CRC Cool	NCR	NCR	NCR Hot	NCR	NCR
10:00 ~18:00	Lights off at day	TVS	FT	Water cage	TVS	TH	Lights off at day
19:00 ~24:00	CRC	Hot NCR	NCR	NCR	Cool NCR	NCR	CRC

CRC: Circadian Rhythm Changes, Light off at day: Remove lighting during day-time, TVS: Temperature variation stress (hot, cool), NCR: Normal Circadian Rhythm, FT: Forced Treadmill, Water cage: Put in cage filled with water, TH (Tight Husbandry): Forcing concentrated formation.

정해 같은 양을 구했다.

4. 체중

체중은 전자저울 ((주)카스, 중국)을 이용해 측정하였으며 매주 2회 측정했다.

5. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Test for Melatonin, GABA, TNF- α and IL-6

1) Melatonin

실험이 끝난 후 뇌 조직(100 mg)을 적출하고, 여기에 1× PBS 1 ml을 넣고 precellys 24 (Bertin technologies, France)에서 균질화한 후, 4°C, 7,300 rpm에서 5분간 원심 분리(Centrifuge 5415 R : Eppendorf, Germany)해 상층액을 분리했다. 분리한 상층액 샘플은 측정 전까지 냉동 보관했다.

Rat Melatonin Elisa Kit (Biomatik, USA)를 사용해 Melatonin을 측정했다. Melatonin이 코팅된 마이크로 플레이트에 쥐의 Melatonin standard 조직 샘플 50 μ l을 넣고, HRP-conjugate를 50 μ l를 첨가한 다음, antibody 50 μ l를 넣고 플레이트 커버로 tapping한 후에 1분간 섞고 37°C에 60분간 incubation 했다. 이를 Wash buffer 400 μ l로 3회 세척한 다음, Substrate A 50 μ l와 Substrate B 50 μ l를 첨가한 후, 플레이트 커버로 tapping하고 1분간 섞은 후 37°C에 15분간 incubation (dark 상태)했다. 이 플레이트에 Stop solution 50 μ l를 넣어 발색 반응을 중지시킨 다음 마이크로 플레이트 리더(EZ Read 400, Biochrom, USA)로 450 nm에서 OD (Optical density)를 측정했다. standard curve를 만들어 sample의 Melatonin을 assay했다.

2) GABA (Gamma-aminobutylic Acid)

실험이 끝난 후 뇌 조직(50 mg)을 적출하고 lysis buffer 1 ml을 넣은 다음, precellys 24 (Bertin technologies, France)에서 균질화했다. 이를 4°C, 10,400 rpm에서 5분 동안 원심분리(Centrifuge 5415 R : Eppendorf, Germany)해 상층액을 분리하고, 분리한 상층액 샘플을 측정 전까지 냉동 보관했다.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For GABA (Biomatik, USA)를 사용해 GABA를 측정했다. GABA가 코팅된 마이크로 플레이트에 GABA standard 조직 샘플 50 μ l를 넣은 후 1× Detection Reagent A 50 μ l를 곧바로 넣고, 플레이트 커버로 tapping (cloudy 상태 확인)한 후에 1분간 섞고 37°C에 60분간 incubation 했다. 이 마이크로 플레이트를 Wash buffer 400 μ l로 3회 세척 후 1× Detection Reagent B 100 μ l를 넣고 플레이트 커버로 tapping하고 1분간 섞은 후 37°C에 30분간 incubation 했다. incubation한 플레이트를 Wash buffer 400 μ l로 5회 세척한 다음, Substrate Solution 90 μ l를 넣고 플레이트 커버로 tapping한 후에 1분간 섞고 37°C에 10분간 incubation (dark 상태)했다. 이 플레이트에 Stop solution 50 μ l를 넣어 발색 반응을 중지시킨 후, 마이크로 플레이트 리더(EZ Read 400, Biochrom, US)로 450 nm에서 OD를 측정했다. standard curve를 만들어 샘플의 GABA를 assay했다.

3) TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha)

Rat TNF- α (Invitrogen, USA)를 사용해 TNF- α 를 측정했다. Rat TNF- α 가 코팅된 마이크로 플레이트에 쥐의 TNF- α standard 혈청, control 100 μ l를 첨가하고 플레이트 커버로 tapping하고 1분간 섞은 후에 실온에서 2시간 동안 방치했다. 이를 1× Washing solution 400 μ l로 4회 세척한 다음, Rat TNF- α Biotin Conjugate 100 μ l를 첨가하고, 플레이트 커버로 덮은 후에 실온에서 1시간 동안 방치했다. 이후 1× Washing solution 400 μ l로 4회 세척한 다음, 1× Streptavidin-HRP Working solution 100 μ l를 첨가하고, 플레이트 커버를 덮은 후 실온에서 30분 동안 방치했다. 다시 1× Washing solution 400 μ l로 4회 세척한 다음, Stabilized Chromogen 100 μ l를 첨가하고, 플레

이트 커버를 덮은 후 실온(dark 상태)에서 30분 동안 방치했다. 이 플레이트에 Stop solution 100 μ l를 넣어 발색 반응을 중지시킨 후 마이크로플레이트 리더(EZ Read 400, Biochrom, USA)로 450 nm에서 OD를 측정하고, standard curve를 만들어 샘플의 TNF- α 양을 assay했다.

4) IL-6 (Interleukin-6)

Rat IL-6 (Biomatik, USA)를 사용해 IL-6를 측정했다. 마이크로 플레이트의 각 well에 IL-6 standard sample 100 μ l를 첨가하고 플레이트 커버로 tapping하고 1분간 섞은 후, 37°C에서 2시간 동안 방치했다. 모든 well의 내용물을 제거한 후, 세척하지 않은 채로 Biotin-antibody (1 \times) 100 μ l를 첨가하고, 플레이트 커버로 덮은 후 37°C에서 1시간 동안 방치했다. 이를 Washing solution 400 μ l로 3회 세척한 다음 HPR-avidin (1 \times) 100 μ l를 첨가하고, 플레이트 커버로 덮은 후에 37°C에서 1시간 동안 방치했다. 다시 Washing solution 400 μ l로 5회 세척한 다음, TMB Substrate solution 90 μ l를 첨가하고 플레이트 커버로 덮은 후에 37°C (dark 상태)에서 30분 동안 방치했다. 이 플레이트에 Stop solution 50 μ l를 넣어 발색 반응을 중지시킨 후에 마이크로 플레이트 리더(EZ Read 400, Biochrom, US)로 450 nm에서 OD를 측정했다.

6. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) for SOD and GPx

1) Total RNA 분리

백서의 뇌 조직을 적출해서 관상 절단해 곧바로 액체 질소에 급속 냉동시키고 분석할 때까지 -70°C에서 보관했다.

Total RNA의 분리는 다음과 같은 방법으로 했다. 뇌 조직(200 mg)에 800 μ l Trizol Reagent (Lifetechnologies, USA)를 넣고 precellys 24 (Bertin technologies, France)에서 균질화한 후, 균질액에 200 μ l의 chloroform (Sigma, USA)을 첨가하고 15초 동안 흔들어서 잘 혼합했다. 이를 실온 상태에서 5분간 방치한 후, 세포의 유전물을 제거하기 위해 4°C, 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리(Centrifuge 5415 R : Eppendorf, Germany)했다. 원심분리로 얻은 상층액에 500 μ l의 isopropanol (sigma, USA)을 첨가하고 실온상에서 5분 동안 방치했다. 여기에서 RNA pellet을 얻기

위해, 4°C, 14,000 rpm에서 8분간 원심분리하고, 원심분리로 생긴 pellet에 냉장 보관된 70% ethanol과 DEPC를 넣고 4°C, 7,500 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후, pellet만 남기고 모두 제거했다. 실온에서 5분 동안 방치해 남은 에탄올을 건조시킨 다음에 DEPC-treated water에 녹이고 spectrophotometer (Biophotometer : Eppendorf, Germany)에서 OD 260 값을 읽어 RNA의 순도와 농도를 정량했다.

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

분리한 total RNA 5 μ g과 Oligo (dT), DEPC-treated water 2.5 μ l를 RT premix (Bioneer, Korea)에 넣어 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)를 이용해 cDNA 50 μ l를 합성하고, 이를 PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭을 위한 template로 사용했다. 이때 internal control로는 하우스키팅 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (sense primer: 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3', antisense primer: 5'-CCTGCTTTTACCACCTCCTT-3')를 사용했다. Reverse transcription temperature cycle은, 먼저 42°C에서 1시간 동안 cDNA를 합성하고, 94°C에서 5분 동안 변성한 후에 4°C에서 5분 동안 냉각하는 단계를 거쳤다. 그런 다음 PCR (polymerase chain reaction)을 얻기 위해서 cDNA, sense primer 10 pg (picogram), anti-sense primer 10 pg, DEPC-treated water를 PCR premix (Bioneer, Korea)에 넣은 후, Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)를 이용해 증폭시켰다.

PCR temperature cycle을 얻기 위해 다음과 같은 순서로 진행했다.

먼저 cDNA를 증폭하기 위해 95°C에서 300초 동안 pre-denaturation시키고, 94°C에서 40초 동안 melting하고, 56°C에서 40초 동안 annealing한 후, 72°C에서 90초 동안 extension하였다. 이 과정을 30회 반복한 후 마지막 싸이클의 extension 단계에서 72°C에서 600초 동안 extension했다. 그런 다음 GPx 유전자는 primer (sense primer: 5'-CTCTCCGCGGTGGCACAGT-3', antisense primer: 5'-CCACCACCGGGTCGGACTAC-3')를 이용하고, Cu-Zn SOD 유전자는 primer (sense primer: 5'-GCAGAAGGC

AAGCGGTGAAC-3', antisense primer: 5'-TAGCAGGA CAGCAGATGAGT-3')를 이용해서 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)에서 증폭시켰다. 이렇게 증폭된 SOD, GPx의 DNA를 Greenview nucleic acid gel stain (IO Rodeo, 1:10,000)을 포함한 1.5%의 agarose gel 상에 두고, 0.5× TBE buffer (80 mM Tris-HCL, 80 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3)를 이용해 100 V에서 30분간 전기 영동시켜서 관찰했다.

촬영에는 Image Station (Samsung, Korea)을 이용했으며, 측정에는 Alphaease FC StandAlone Software (Alpha Innotech, USA)를 이용했다.

7. 혈액 및 혈청학적 검사

채혈로 얻은 혈액 중에서 약 100 μl를 EDTA-bottle에 넣고 곧바로 Multispecies Hematology Analyser (950, Hemavet, USA)에 넣어 백혈구를 측정했다. 남은 혈액은 VS-6000CFI (Vision, Korea)를 이용해 3,000 rpm으로 20분간 원심분리해 혈청을 분리했다. AST, ALT, Bun, Creatinine 항목은 Dri-chem 4000 I (Fujifilm corp. Japan)를 활용하여 측정했다.

8. 통계분석

모든 측정값은 Excel program (Microsoft Excel 2016,

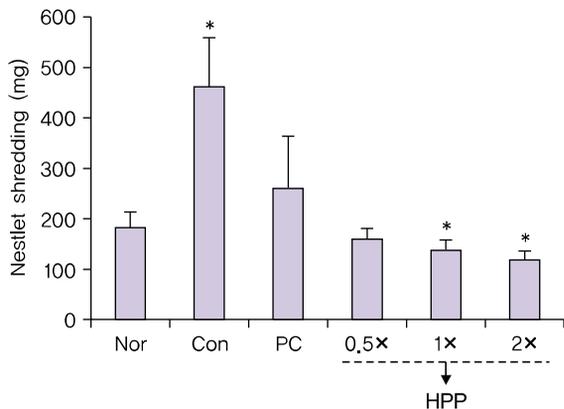


Fig. 1. Effect of *Hominis Placenta* Pharmacopuncture on Nestlet Shredding in rats subjected to CPS. Values are expressed as Mean±SE. *p<0.05 compared with normal group, *p<0.05 compared with control group. Normal: no CPS, no treatment, Control: CPS, no treatment, PC: CPS, treated with Zolpidem, HPP: CPS, treated with *Hominis Placenta* Pharmacopuncture at GB20 • GB21 • CV4 (0.5×: 50% *Hominis Placenta* Pharmacopuncture, 1×: 100% *Hominis Placenta* Pharmacopuncture, 2×: twice the amount of the 100% *Hominis Placenta* Pharmacopuncture).

USA)을 이용해 평균치와 표준 오차값(mean±standard error)으로 표시했다. 실험군들의 통계분석은 SPSS 21 ver. for windows를 사용하였고, 비모수적인 방법으로 Mann-Whitney U test를 시행했다. 유의성 검정은 각 실험군과 대조군을 비교해 p<0.05 수준에서 해석했다.

III. 결과

1. Nestlet Shredding 행동 변화에 미치는 영향

정상군에 비해 대조군은 유의한 증가를 나타내었고(p<0.05), 대조군에 비해 HPP-1×군, HPP-2×군에서 유의한 감소를 나타냈다(p<0.05) (Fig. 1).

2. 체중 변화에 미치는 영향

1주 차에 정상군에 비교해 대조군을 비롯한 모든 실험군에서 체중 증가량이 적은 경향을 나타냈으며, 2주 차와 3주 차엔 HPP-2×군과 양성 대조군에서 대조군에 비해 체중 증가량이 많은 경향을 나타냈다(Fig. 2, Table 2).

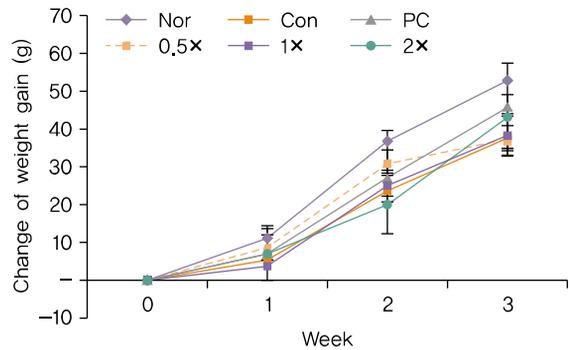


Fig. 2. Changes of weight in rats subjected to CPS. The groups are referred to in Fig. 1. Values are expressed as Mean±SE.

Table 2. Changes of Weight after *Hominis Placenta* Pharmacopuncture Treatment in Rats subjected to CPS

Group*	0 week (g)	1 week (g)	2 wks (g)	3 wks (g)
Nor	0.00±0.00	11.20±2.78	37.00±5.42	53.00±7.48
Con	0.00±0.00	5.25±2.29	23.75±4.11	37.75±5.98
PC	0.00±0.00	7.00±2.35	27.25±7.79	46.00±10.89
0.5×	0.00±0.00	8.25±5.09	31.00±6.68	37.00±9.25
1×	0.00±0.00	3.75±7.09	25.50±8.53	38.5±11.03
2×	0.00±0.00	6.88±12.03	20.25±11.93	43.25±10.23

*The groups are referred to in Fig. 1. Values are expressed as Mean±SE.

3. 수면 관련 호르몬 변화에 미치는 영향.

1) Melatonin

정상군에 비해 대조군은 감소의 경향을 나타내었고, 대조군에 비해 HPP-2×군에서 증가의 경향을 나타냈다(Fig. 3).

2) GABA (Gamma-aminobutylic Acid)

정상군에 비해 대조군은 감소의 경향을 나타내었고, 대조군에 비해 HPP-2×군에서 유의한 증가를 나타냈다($p < 0.05$) (Fig. 4).

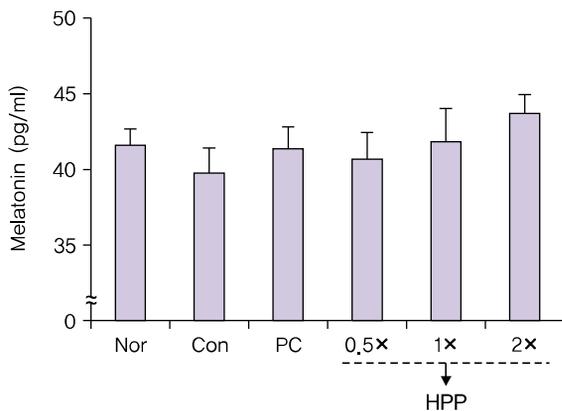


Fig. 3. Effect of *Hominis Placenta* Pharmacopuncture on the secretion of Melatonin in rats subjected to CPS. The groups are referred to in Fig. 1. Values are expressed as Mean±SE.

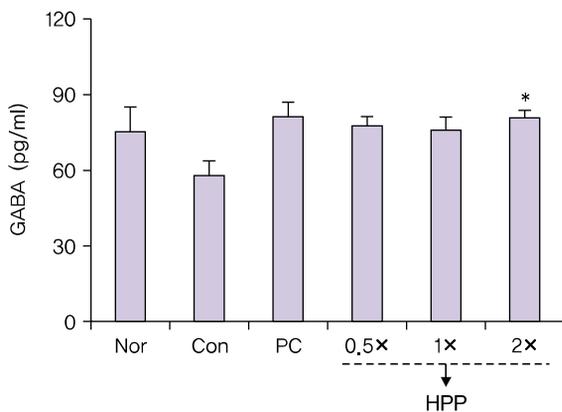


Fig. 4. Effect of *Hominis Placenta* Pharmacopuncture on the secretion of GABA (Gamma-aminobutylic Acid) in rats subjected to CPS. The groups are referred to in Fig. 1. Values are expressed as Mean±SE. * $p < 0.05$ compared with control group.

4. 염증성 cytokine 변화에 미치는 영향

1) TNF- α (Tumor necrosis factor- α)

정상군에 비해 대조군은 유의한 증가를 나타내었고($p < 0.01$), 대조군에 비해 실험군 모두 유의한 감소를 나타냈다 ($p < 0.05$) (Fig. 5).

2) IL-6 (Interleukin-6)

정상군에 비해 대조군은 유의한 증가를 나타내었고($p < 0.01$), 대조군에 비해 실험군 모두 유의한 감소를 나타냈다 ($p < 0.05$) (Fig. 6).

5. 항산화 인자에 미치는 영향

1) SOD (Superoxide dismutase)

정상군에 비해 대조군은 유의한 감소를 나타내었고($p < 0.01$), 대조군에 비해 실험군 모두 유의한 증가를 나타냈다 ($p < 0.05$) (Fig. 7).

2) GPx (glutathione peroxidase)

실험군 간 유의한 차이가 없었다(Fig. 8).

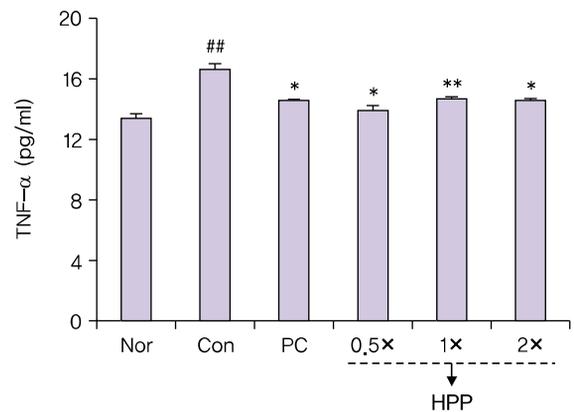


Fig. 5. Effect of *Hominis Placenta* Pharmacopuncture on TNF- α values in rats subjected to CPS. The groups are referred to in Fig. 1. Values are expressed as Mean±SE. ## $p < 0.01$ compared with normal group, * $p < 0.05$ compared with control group, ** $p < 0.01$ compared with control group.

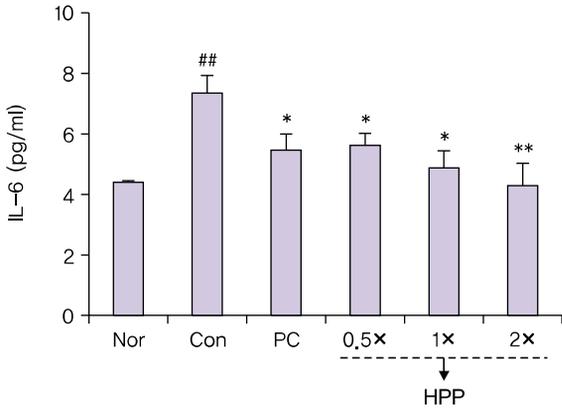


Fig. 6. Effect of *Hominis Placenta* Pharmacopuncture on IL-6 values in rats subjected to CPS. The groups are referred to in Fig. 1. Values are expressed as Mean±SE. ^{##}p < 0.01 compared with normal group, ^{*}p < 0.05 compared with control group, ^{**}p < 0.01 compared with control group.

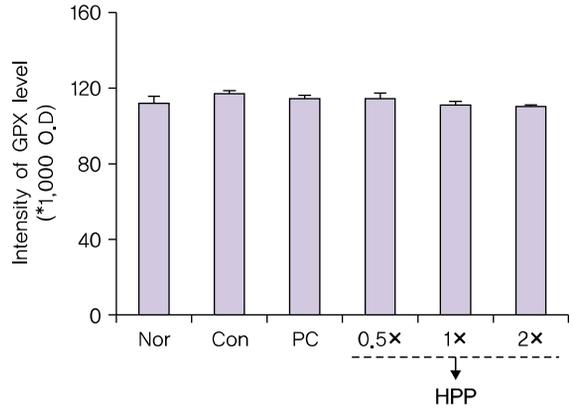


Fig. 8. Effect of *Hominis Placenta* Pharmacopuncture on the intensity of GPX level in rats subjected to CPS. The groups are referred to in Fig. 1. Values are expressed as Mean±SE.

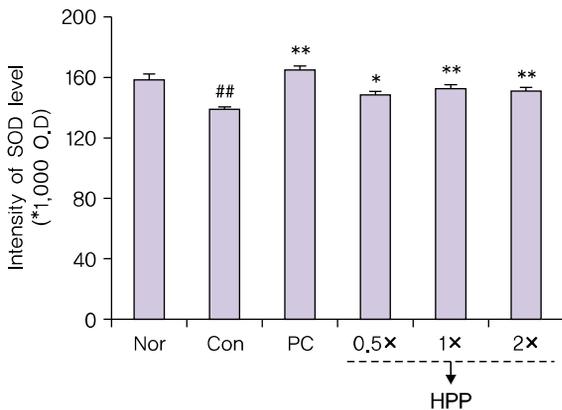


Fig. 7. Effect of *Hominis Placenta* Pharmacopuncture on the intensity of SOD level in rats subjected to CPS. The groups are referred to in Fig. 1. Values are expressed as Mean±SE. ^{##}p < 0.01 compared with normal group, ^{*}p < 0.05 compared with control group, ^{**}p < 0.01 compared with control group.

Table 3. Changes on AST, ALT, Bun and Creatinine Values after HPP Treatment in Rats subjected to CPS

Group*	AST (U/L)	ALT (U/L)	Bun (dl/L)	Creatinine (dl/L)
Nor	121.8±1.4	57.3±7.3	18.6±0.5	0.35±0.02
Con	151.5±6.7 [#]	59.0±5.9	19.4±0.8	0.38±0.02
PC	125.3±6.7	51.0±6.3	15.3±0.5	0.33±0.02
0.5x	171.8±17.3	56.5±0.8	16.0±0.9	0.38±0.02
1x	173.3±25.9	71.3±19.8	20.0±0.6	0.53±0.02
2x	136.5±13.4	41.0±2.5	21.2±1.1	0.48±0.06

*The groups are referred to in Fig. 1. Values are expressed as Mean±SE. [#]p < 0.05 compared with normal group.

IV. 고찰

불면증을 유발하는 원인은 여러 가지가 있는데, 관절염, 천식, 임신, 고혈압 등의 신체 질환과 하지불안증후군, 수면 무호흡증 등의 수면 관련 질환, 공황장애, 불안장애, 우울증 등의 정신 질환, 밤낮이 바뀐 수면 패턴이나 잘못된 수면위생 등 행동적 요인, 약물 또는 신체나 심리 스트레스 등이 그 원인이 되며, 또한 불면증으로 인한 수면 부족을 보상하기 위해 낮잠을 자거나 침대에 누워 오랜 시간을 보내는 등 잘못된 습관이 불면을 만성화시키기도 한다¹⁴⁾.

저자는 스트레스로 유발된 수면장애에 대한 자하거 약침의 효과를 알아보기 위해 6개의 실험군을 나누어 실험을 진행했다. 먼저 정상군에는 아무 스트레스도 가하지 않았고, 대조군에는 스트레스를 가한 후 아무 처치도 하지 않았으며, 양성 대조군에는 스트레스를 유발한 후 수면제인 졸피뎀을 투여했고, HPP에는 스트레스를 유발한 후 자하거 약침을

6. 혈청 및 혈액학적 변화에 미치는 영향

1) AST, ALT, BUN, and Creatinine

실험군 간 유의한 차이는 없었다(Table 3, Fig. 9).

2) Leukocytes

실험군간 유의한 차이는 없었다(Fig. 10, Table 4).

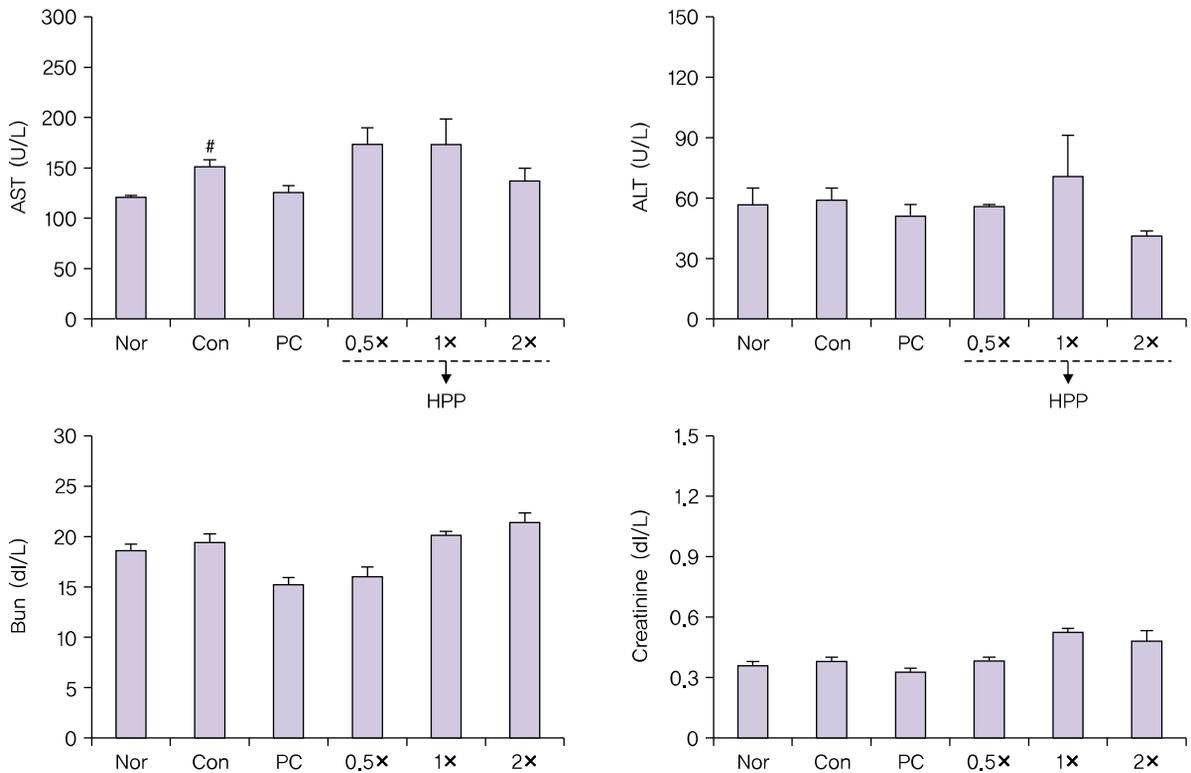


Fig. 9. Effect of HPP on AST, ALT, Bun and Creatinine values in rats subjected to CPS. The groups are referred to in Fig. 1. Values are expressed as Mean ± SE. #P < 0.05 compared with normal group.

각 0.5배 희석액, 1배 원액, 2배 증액량 나누어 투여했다.

본 연구에서는 Alline C. 등의 불안장애와 스트레스의 동물 모델¹⁵⁾을 사용하여 백서에게 만성 신체 스트레스를 주었는데, 스트레스의 내용은 불규칙하게 일주기 리듬 바꾸기, 낮 동안 조명 제거, 온도변화(찬바람, 따뜻한 바람), 트레드밀 위 달리기, 물이 채워진 케이지에 넣어두기, 고 밀집 유발, 케이지 기울이기, 케이지 흔들기이다. 이러한 스트레스를 유발한 후, 이에 대한 자하거 약침의 영향을 알아보기 위해서 백서의 행동학적 관찰(Nestlet Shredding), 체중 증가량, 뇌내 수면 관련 호르몬, 염증성 사이토카인, 항산화 효소, 혈청 및 혈액학적 변화 등을 관찰하였다.

실험동물이 스트레스를 느끼면 Nestlet Shredding 행동을 지속해 Nestlet를 갉는 양이 증가한다. 본 연구에서 스트레스만 가한 대조군에서 정상군에 비해 Nestlet Shredding이 유의하게 증가했고(p < 0.05), 스트레스 유발 후 HPP-1x군, HPP-2x군에서는 대조군에 비해 유의하게 감소한 것으로 보아(p < 0.05) 자하거 약침이 스트레스로 인한 행동 증상의 완화 효과를 나타낸 것으로 보였다.

체중 변화에서 스트레스만 가하고 처치를 하지 않은 1주차에는 모든 실험군에서 정상군에 비해 체중이 적게 증가했고, 2주차와 3주차엔 HPP-2x군과 양성대조군에서 대조군에 비해 많은 체중 증가량을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

정상적으로 성장하는 백서에서는 꾸준한 체중 증가가 관찰될 것으로 예상되는데, 대조군에서는 체중 증가량이 줄어들어, 스트레스 상황에서는 신체 성장이 정상적으로 이루어지지 못한다는 것을 알 수 있었다. 실험 3주차에는 대조군에 비해 모든 실험군에서 체중 증가량이 늘었는데, HPP-0.5x군과 HPP-1x군에서는 체중의 증가량이 대조군과 비슷한 정도로 적었으나, HPP-2x군에서는 다른 HPP군들에 비해서 정상군에 보다 가깝게 체중 증가량이 늘어났다. 이를 볼 때, 신체 스트레스를 극복하고 정상 성장하는데 자하거 약침이 영향을 미치는 것으로 추정할 수 있으며, 특히 신체 스트레스 회복을 위해서는 일정 용량 이상의 자하거 약침 투여가 필요할 것으로 보여, 약침 투여량과 효과의 상관관계에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

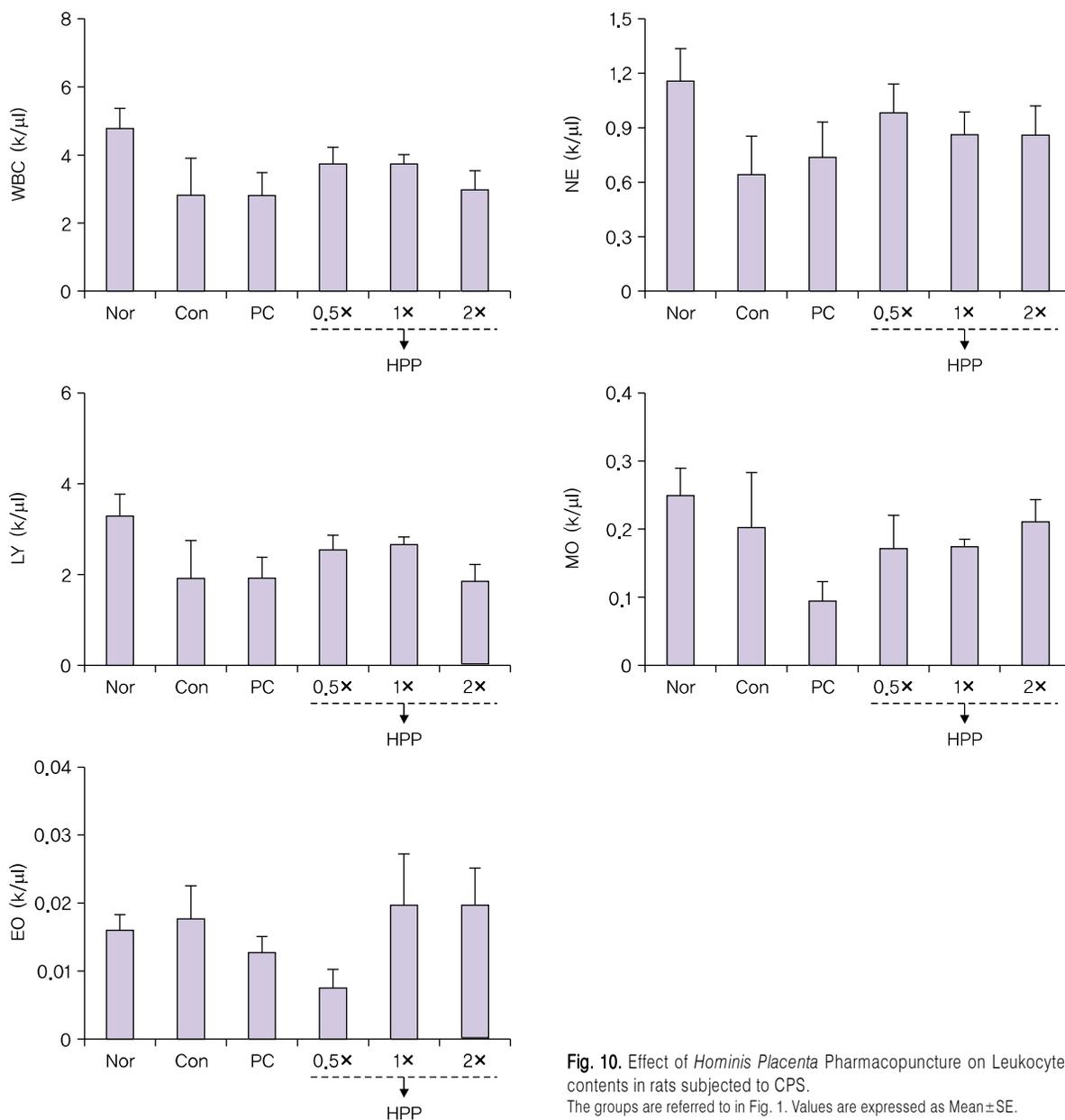


Fig. 10. Effect of *Hominis Placenta* Pharmacopuncture on Leukocytes contents in rats subjected to CPS. The groups are referred to in Fig. 1. Values are expressed as Mean±SE.

Table 4. Changes on the Leukocytes Contents after *Hominis Placenta* Pharmacopuncture Treatment in Rats subjected to CPS

Group	WBC (k/ μ l)	NE (k/ μ l)	LY (k/ μ l)	MO (k/ μ l)	EO (k/ μ l)
Nor	4.74±0.59	1.16±0.18	3.33±0.46	0.25±0.04	0.02±0.002
Con	2.81±1.07	0.65±0.19	1.93±0.80	0.21±0.08	0.02±0.005
PC	2.78±0.68	0.73±0.19	1.93±0.48	0.10±0.03	0.01±0.003
0.5x	3.71±0.52	0.98±0.15	2.54±0.37	0.17±0.05	0.01±0.003
1x	3.75±0.28	0.86±0.13	2.69±0.18	0.18±0.01	0.02±0.007
2x	2.96±0.55	0.86±0.16	1.86±0.36	0.21±0.03	0.02±0.005

수면에는 관여하는 여러 호르몬 중 멜라토닌은 세로토닌으로부터 형성되고 에피네프린에 의해 조절되며 인체에 있어 수면을 유도해¹⁶⁾, 인체의 일주기 리듬의 조절에 관여한다^{3,17,18)}. 본 실험에서 멜라토닌은 정상군에 비해 대조군에서 감소의 경향을 나타내었다. 이는 만성 경증 스트레스를 유발한 흰쥐실험에서 멜라토닌 함량이 감소 경향을 나타낸 연구 결과¹⁹⁾와, 동일하게 만성 경증 스트레스를 준 백서 실험에서 멜라토닌이 유의하게 감소한 결과²⁰⁾와 일치하여, 스트레스가 멜라토닌을 감소시킴을 보여준다.

그리고 대조군에 비해 HPP-2×군에서 멜라토닌 증가의 경향이 나타났는데, 이를 통해 일정 농도 이상의 자하거 약침을 투여하면 스트레스로 감소된 멜라토닌을 증가시켜 수면 리듬 정상화에 도움을 주어서 불면 장애의 치료에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 추정할 수 있다.

GABA는 중추신경계의 억제성 신경전달 물질로, 흥분 또는 스트레스가 뇌에 전달될 때 그 자극을 줄여주는 기능을 하며 몸을 편안하게 하는 신경안정 효과가 있다. GABA의 양이 증가하면 정서적인 안정 효과와 스트레스 해소, 기억력 증진 효과가 나타난다⁸⁾.

GABA 함량은 정상군에 비해 대조군에서 감소하였는데, 이는 흰쥐에게 반복적 부동화 스트레스를 가했을 때 GABA가 유의하게 감소한 연구 결과^{21,22)}와 만성 경증 스트레스를 유발한 흰쥐에서 GABA 함량이 유의하게 감소한 결과^{19,23)}와도 일치한다.

HPP-2×군에서는 대조군에 비해 GABA가 유의하게 증가했는데($p < 0.05$), 수면과 GABA의 연관성과 관련한 선행 연구에서, GABA 복합물을 섭취한 여성의 PSQI (Pittsburgh Sleep Quality Index) 지수가 유의하게 감소했고²⁴⁾, GABA를 코팅한 쌀을 공급한 쥐의 멜라토닌과 세로토닌이 유의하게 증가한 연구결과가 있었다²⁵⁾. 그리고 스트레스와 GABA의 연관성과 관련한 연구에서는, 만성 스트레스를 유발한 흰쥐에서 GABA 함량이 정상군에 비해 유의하게 낮아진 결과가 있었다¹⁹⁾. 이것을 볼 때, 자하거 약침은 GABA를 증가시키므로 결과적으로 수면 장애와 스트레스를 완화하는 효능을 가질 것으로 추측해 볼 수 있다.

TNF- α 와 IL-6는 대표적인 염증성 사이토카인인데, 염증은 다양한 위험이나 해로운 조건으로부터 신체의 항상성을 지키기 위한 필수적인 반응으로²⁶⁾, 염증성 물질이 체내에 축적되면 피로를 느끼게 된다²⁷⁾.

TNF- α 는 염증반응 시 생성되어 염증세포를 활성화하고 세포 내의 산화 스트레스를 증가시켜 조골세포의 골 형성 기능을 떨어뜨리고 골수기질세포의 세포자멸사를 촉진한다²⁸⁾. 수면 생리에서 TNF- α 는 Ventrolateral preoptic nucleus (복외측 시각전핵)와 청반핵에서 non REM 수면을 유발하며, 전신상하부에 TNF 수용성 수용체를 투여하면 자연 발생적 수면이 감소한다²⁶⁾. 또한 TNF- α 는 PER genes의 발현을 억제함으로써 일주기 시계의 정해진 리듬을 방해하고 밤 시간 동안 휴지기(세포가 기능적으로는 활동하고 있으나, 핵분열이나 세포분열을 하고 있지 않은 시기)를 연장시키는데, 이로 인해 자가면역 질환과 피로가 초래된다. 그리고 TNF- α 는 Aa-nat 유전자의 전사를 억제하는데, 이 유전자의 생성물이 멜라토닌 합성에 있어서 열쇠가 되는 효소이다. 따라서 염증성 질환 등으로 인해 TNF- α 가 축적되면 단기간 동안 야간 멜라토닌 surge를 방해하여 수면장애를 초래할 수 있다²⁹⁾.

IL-6는 염증성 사이토카인 중 하나로 체내 지방 조직, 특히 내장 지방에서 발현이 높으며, 격렬한 운동 후에 증가하는 것으로 보고되며, IL-6가 과잉 생산되면 여러 가지 면역 이상과 염증성 질환, 림프계 종양이 발현되는 것으로 알려져 있다³⁰⁾.

본 실험에서 TNF- α 와 IL-6 수치는 대조군에서 정상군에 비해 유의하게 증가하였는데($p < 0.01$), 선행 연구에서 Chronic Mild Stress를 가한 흰쥐에서 정상군에 비해 TNF- α 가 유의하게 증가했고²⁰⁾, 인체를 대상으로 신장성 운동으로 골격근 손상을 유발한 후 안정시에 비해 TNF- α 가 유의하게 증가했고³¹⁾, 마우스를 대상으로 고강도 저항성 운동을 실시했을 때 TNF- α 와 IL-6가 유의하게 증가했으며³⁰⁾ 탈진 운동 후 타액의 IL-6 농도가 안정시에 비해 유의하게 증가되는³²⁾ 등, 신체 스트레스가 TNF- α 와 IL-6를 증가시킨다는 본 연구결과와 일치했다.

양성 대조군과 HPP-0.5×군, HPP-1×군, HPP-2×군 모두에서 TNF- α 와 IL-6가 대조군에 비해 유의하게 감소했다($p < 0.05$). 따라서 자하거 약침이 체내 염증성 물질인 TNF- α 와 IL-6를 감소시켜 신체가 느끼는 피로도를 줄이고, 자연 발생적 수면을 감소시키고 일주기 리듬을 방해하는 역기능을 가진^{26,29)} TNF를 감소시켜 수면장애의 완화 효과를 가질 것으로 사료된다.

SOD와 GPx는 항산화 물질로, 세포의 노화는 세포의 산

화와 관련이 있다고 알려져 있다³³⁾. 산소를 이용하는 생물은 정상적인 대사 과정 중에도 지속해서 활성 산소를 생성하는데, 활성 산소는 독성을 가진 산소로, 다양한 기전을 통해서 세포 손상 또는 파괴와 산화 스트레스를 유발하고, DNA 손상이나 단백질 변성, 그리고 암과 노화, 심장 질환, 염증 등 질병을 일으킨다. SOD나 GPx와 같은 항산화 효소들은 이러한 활성 산소를 불활성화하는 역할을 한다³⁴⁾. SOD는 세포 기질과 미토콘드리아에 존재하며 활성 산소가 일반 분자 산소 또는 과산화수소로 분열되는 데 촉매 작용을 하는 효소이다. 산소 대사의 부산물로 생성되는 과산화물은 그대로 두면 많은 종류의 세포 손상을 일으키므로 SOD는 세포에서 중요한 항산화 방어 물질로 작용한다^{35,36)}. SOD로 인해 생성된 과산화수소는 세포질과 미토콘드리아에 존재하는 GPx에 의해 물로 전환되어 무독화된다³⁴⁾. GPx (glutathione peroxidase)는 지질 하이드로 과산화물을 상응하는 하이드록시산(알콜산)으로 환원시키고 유리 과산화수소를 물로 환원시켜 무독화시키는 체내 항산화 효소로, 활성 산소와 반응성 산소 화합물의 생성을 방지하고 손상된 조직을 회복시키는 기능을 한다¹¹⁾. GPx는 세포질과 미토콘드리아 기질에 많이 분포되어 있으며, 포유동물에서는 catalase보다 강력한 항산화 작용을 한다³⁷⁾. 인체가 강도 높은 운동을 하거나 신체적으로 스트레스를 받게 되면 산소의 섭취가 급증하고 이에 따른 산소 공급이 평소의 10~15배에 달하게 되면 일부에서 활성 산소가 만들어져 면역, 내분비, 근육계에 악영향을 끼친다. 인체는 이런 활성 산소로 인한 산화 스트레스에 대항하기 위한 항산화 방어 체계를 가지고 있으며 안정 시에는 인체에서 발생하는 산화 스트레스를 충분히 이겨낼 수 있으나 심한 운동에 의해서는 이런 평형을 잃으면서 세포 손상이 일어날 수 있다³²⁾.

본 연구에서 SOD 함량에 있어서 대조군은 유의하게 감소를 나타내었고($p < 0.01$), 대조군에 비해 실험군 모두에서 유의한 증가를 나타냈는데($p < 0.05$), 이는 선행 연구에서 백서에 자하거 약침을 투여한 결과 SOD가 유의하게 증가한 것³⁸⁾과 일치한다.

GPx는 각 군간 유의한 차이가 나타나지 않았는데, 백서에 자하거 약침을 시술한 후 항산화 효과를 확인하기 위한 실험에서 GPx 수치에서 유의한 차이가 없었던³⁸⁾ 것과 일치한다. 실험군과 대조군 간에 유의한 차이가 없었던 것과 관련해서는, 선행 연구에서 산화 스트레스를 준 세포 실험에서

GPx 활성이 뚜렷하게 증가했고³⁹⁾ 유산소 운동 처치를 한 후 GPx 활성의 변화를 관찰한 결과 유의한 변화가 없었던 결과⁴⁰⁾와 일치한다.

GPx 농도에서는 유의한 변화를 보이지 않았으나, 자하거 약침 투여로 SOD가 뚜렷하게 증가했으므로, 자하거 약침이 SOD와 관련한 항산화 효과를 가지고 있을 것으로 추정할 수 있다.

혈청 생화학적 변화에 미치는 영향에서 AST, ALT, Bun, 크레아티닌 모두 실험군 간에 유의한 차이는 없었다. 혈액학적 변화에 미치는 영향에서도 염증과 관련해 살펴본 백혈구 함량 변화에서 실험군 간에 유의한 차이는 없었다. 혈청과 혈액검사에서 유의한 차이가 없었음을 보았을 때 자하거 약침이 혈액에 대해 안전성을 가진다고 볼 수 있다.

백서를 대상으로 한 본 연구의 한계점은 먼저 백서의 중량이 적어 더 많은 양의 자하거 약침을 투약했을 때 일어나는 변화를 보지 못했다는 것이다. 실제로 체중변화와 같은 경우, 0.5배 실험군과 1배 실험군에서는 저조하였으나, 2배 실험군이 되었을 때 증가 경향이 나타나 보다 정상군에 근접하기 시작하였으므로, 3배 이상 용량을 투여시 통계적으로 유의한 범위의 증가가 나타날 지도 모른다. 그러나 이를 위해서는 보다 개체 체중량이 큰 실험동물을 대상으로 실험을 진행해야 할 것이라는 한계가 있다. 또한, 실험군에 비교할 위약 투여군이 설정되지 않았다는 한계가 있다. 자하거 약침 투여 자체의 침구 치료 효과를 배제하기 위해 증류수를 동일량 투여한 실험군을 설정했어야 하는데 그렇게 하지 못했으므로 나타난 효과가 순수하게 자하거 약침의 효과인지 약침을 찌를 때 생기는 자침효과인지에 대한 명확한 구분을 지을 수 없었다는 한계가 있었다. 동물실험에서는 실험동물의 몸무게가 적어 한정된 용량의 자하거 약침밖에 사용하지 못했는데, 향후의 연구방향에 있어서 임상에서 실제 환자를 대상으로 용량을 증량하여 실험을 진행한다면, 본 실험에서 유의성이 나타나지 않았던 항목들에 있어서도 유의한 증가나 감소가 나타날 것으로 추측해 볼 수 있으므로 임상 시험을 진행함이 의미 있을 것으로 보인다. 또 동물실험에서는 주관적인 스트레스 정도나 피로감의 호소를 알 수 없다는 단점이 있었는데 임상에서 시험을 진행하게 될 시에는 피실험자가 느끼는 스트레스의 완화 정도를 점수로 매겨볼 수 있으므로 더욱 자세한 연구 결과를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

V. 결론

자하거 약침의 스트레스와 불면에 대한 치료 효과와 그 기전을 확인하기 위해서, 저자는 백서에 만성 신체 스트레스 모델을 적용한 실험을 설계하고, 자하거 약침 실험군(HPP)과 정상군, 대조군, 양성 대조군(졸피뎀 투여군)의 Nestlet Shredding 행동 지표, 체중 증가량, 수면 관련 호르몬, 염증성 사이토카인, 항산화 효소, 혈액과 혈청 등의 지표들을 비교 관찰한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. Nestlet Shredding 테스트에서 정상군에 비해 대조군에서 유의한 증가를 나타내었고($p < 0.05$), 대조군에 비해 HPP-1×군, HPP-2×군에서 유의하게 감소했다($p < 0.05$).

2. 체중의 변화를 관찰한 결과, 1주 차에 체중 증가량의 감소 경향을 나타냈으나, 2주 차와 3주 차에는 대조군에 비해 양성 대조군과 HPP-2×군에서 체중 증가량이 많아지는 경향을 보였다.

3. 수면 관련 호르몬을 측정된 결과, 멜라토닌 함량은 대조군에 비교하여 HPP-2×군에서 증가하는 경향을 나타내었고, GABA 함량은 대조군에 비해 HPP-2×군에서 유의하게 증가했다($p < 0.05$).

4. 염증성 사이토카인을 측정된 결과, TNF- α 함량과 IL-6 함량은 정상군에 비해 대조군에서 유의한 증가가 나타났고($p < 0.01$), 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의하게 감소했다($p < 0.05$).

5. 항산화 효소를 측정된 결과, SOD 함량은 정상군에 비해 대조군에서 유의한 감소가 나타났고($p < 0.01$), 대조군에 비해 모든 실험군에서 유의하게 증가하였고($p < 0.05$), GPx 함량은 각 군 간에 유의한 차이가 없었다.

6. AST, ALT, BUN, CRE, Leukocytes 함량 변화에서 각 군 간에 유의한 차이는 없었다.

이상과 같이, 자하거 약침이 Nestlet Shredding 행동 지표를 감소시키고 체중 증가량을 회복시키고, 염증성 사이토카인을 감소시키고 항산화 효소인 SOD를 증가시키므로 스트레스를 완화하는 효과가 있을 것으로 볼 수 있고, 또한 수면 관련 호르몬인 멜라토닌과 GABA를 증가시키므로 불면 장애의 치료에 효과가 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- David A. Kalmbach, PhD, Vivek Pillai, PhD, J. Todd Arnedt, PhD, Christopher L. Drake, PhD. DSM-5 Insomnia and Short Sleep: Comorbidity Landscape and Racial Disparities. *Sleep*, 2016;39(12):2101-11.
- Su-Yeon Seo. Cognitive—Behavioral Therapy for Insomnia. (Seoul : Sigma Press. 2017) p.4-5.
- Seog Ju Kim. Pharmacotherapy of Insomnia. *J. Korean Med. Assoc.* 2009;52(7):719-26.
- Cheol-Bum Park, Sung-Keun Wang. The Effects of Melatonin on Sleep. *J. Korean Society of Biological Therapies in Psychiatry.* 1999;5(2):145-53.
- Bok Nam Seo, Inja Kim. Differences of Stress, Sleep Quality and Metabolic Syndrome by Prolonged Fatigue in Early Adulthood. *Korean J. Adult Nursing.* 2019;31(2): 202-10.
- Hyun-Choul Cho, Suk-Hee Kim, Jong-Shik Kim. Effects of Vitamin Mixed Supplement on Anti-oxidant Related Gene Expressions after Aerobic exercise. *J. Spor. and Leisure Studies.* 2010;41:975-85.
- Hee-Jung Kim, Dong-Hyun Kim. Effect of Different Exercise Intensity on Blood Melatonin Density in Sleep Disorder Rats. *J. Korean Soc. Phys. Med.* 2014;9(1):45-53.
- Seung-Seop Kim, Sung-Ho Oh, Myoung-Hoon Jeong, Seok-Cheol Cho, Moo-Chang Kook, Seok-Ho Lee, et al. Sleep-Inductive Effect of GABA on the Fermentation of Mono Sodium Glutamate(MSG). *Korean J. Food Sci. Technol.* 2010;42(2):142-6.
- 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.
- Eun Hye Jang, Ah Young Kim, Han Young Yu. Relationships of Psychological Factors to Stress and Heart Rate Variability as Stress Responses Induced by Cognitive Stressors. *Sci. Emot. Sensib.* 2018;21(1):71-82.
- Hyoung-seon Yoon, Jang-hyuk Moon, Kyoung-suk Jeong, Jung-hoon Lee, Jong-yeob Baek, Ho-jin Ahn. A Study on the Effects of the *Hominis Placenta*-induced Injection on Insomnia Patient. *J. Korean Acupuncture & Moxibustion Society.* 2004;21(3):99-105.
- Hyoun-min Yoon, Chae-woo Lee, Hong-ki Kim. The Effects of the *Hominis Placenta* Herbal acupuncture on Sleep patten disturbance. *J. Korean Institute of Pharmacopuncture.* 2005;8(1):5-11.
- Hyun-Ho Jang, In-Sun Doo, Dae-Yong Lee, Seung-Hoon Lee, Sang-Jun Min, Tae-Hoon Kim, et al. The Case of Regulation of Insomnia with Jahageo Herbal Acupuncture. *J. Oriental Neuropsychiatry.* 2003;14(1):155-60.
- Su-Sik Kim. Cause of Insomnia. *J. Christian Counseling and Missions.* 2009;63:55-68.
- A. C. Campos, M. V. Fogaca, D. C. Aguiar, F. S. Guimaraes.

- Animal Models of Anxiety Disorders and Stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2013;35:S101-S111.
16. J.H. Kim, I.S. Lim The Effects of Overlap Exercise on the Changes of EEG, Blood Growth Hormone, and Melatonin Concentration During Sleep. *Exercise Science*. 2003;12(2): 297-306.
 17. Eun-Kyung Kim. The Effect of Antioxidants Vitamin Supplementation on Activities of GPx and Muscle Fatigue. *Korea Sports Research*. 2005;16(5):841-52.
 18. Hee-Jung Kim, Dong-Hyun Kim. Effect of Different exercise Intensity on Blood Melatonin Density in Sleep Disorder Rats. *J. Korean Soc. Phys. Med*. 2014;9(1):45-53.
 19. Chang-won Choi, Young-su Lee, Young-ho Moon, Kyeong-ok Kim. The Effects Liquid Stick Packs of Dongshingihyeol-yangsubang on Stress and Sleep-Related Substance of Rats Induced by Chronic Mild Stress. *J. Oriental Neuropsychiatry*. 2017;28(3):231-48.
 20. Ha-na Kim, Kyeong-ok Kim. The Effects of Yunjogyosintang on Stress and Sleep-related Substance of Rats Induced by Chronic Mild Stress. *J. Oriental Neuropsychiatry*. 2017;28(1):25-38.
 21. Chang-Soo Kim, Jong-Bum Lee, Hyun-Mo Sung, Hyun-Seok See, Jing-Seung Kim, Jin-Seung Kim, M.D. The Effects of Repeated Stress on the GABAergic Neurotransmission in Rats. *J. Korean Neuropsychiatry*. 191-8.
 22. Heon-Gu Kang, Byung-Jo Kang, Jeong-Hee Ha. Effects of Repeated Immobilization Stress on the Modulation of Neuroactive Steroids at the GABAergic Neurotransmission. *J. Korean Society of Biological Therapies in Psychiatry*. 1999;5(2):89-97.
 23. Young-gil Song, Kyeong-ok Kim. Effect of Resina Dendropanacis Morbiferus on Stress and Sleep Hormone in Chronic Mild Stress-Induced Rats. *J. Oriental Neuropsychiatry*. 2017;28(3):287-302.
 24. Jeong Kee Kim, Seong Hwan Lim, Wan Gi Kim, Changhui Cho, Jaehyouon Ha, Dae Bang Seo. Beneficial Effect of Collagen-Peptide Mixture with GABA on Improvement Skin and Sleep Quality. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*. 2018; 44(3):277-84.
 25. Ok Ju Kim, Jeong Kwang Lee, Young Min Woo, Seung Tae Choi, Mi Yeon Park, Andre Kim et al. Sleep-Induction Effects of GABA Coated Rice from Fermentation of Mono Sodium Glutamate. *Appl. Chem. Eng*. 2013;24(6):605-10.
 26. Leen Kim. Stress, Sleep Physiology, and Related Insomnia Disorders. *J. Korean Med Assoc*. 2010;53(8):707-16.
 27. Suk Jun Lee and Jinkwan Kim. Inflammation and Insufficient or Disordered Sleep. *Korean J. Clin. Lab. Sci*. 2015; 47(3):97-104.
 28. Jung-Min Koh, Chang Hyun Byun, Hee Sook Lee, Young-Sun Lee, Ghi Su Kim. α -Lipoic Acid Inhibits TNF- α -Induced Apoptosis in Human Bone Marrow Stromal Cells by Reduction of oxidative Stress. *J. Bone Metabolism*. 2004;11(2):111-20.
 29. Mustafa Gokhan Ertosun, Gamze Kocak, Osman Nidai Ozes. The regulation of circadian clock by tumor necrosis factor alpha. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2019; 46:10-6.
 30. Eun-Ju Choi, Sung-Cheol Lee, Ae-Kyung Chang. Effects of Tower Climbing Resistance Exercise on Leptin, TNF- α , IL-6 Gene Expression of Colon in Mice. *The Korean J. Sports Science*. 2016;25(3):1245-55.
 31. Seung-Goo Ra, Tae-Geun Ha, Byung-Ju Kim, Chung-Su Yoon, Dae-Ryoung Park. Effects of Cryotherapy on Blood Pro-inflammatory Cytokines and ED1+ Macrophage Expression Following Eccentric Exercise. *Korean J. Sports Science*. 2015;24(4):1215-29.
 32. Tae-Beom Seo, Dae Sung Rho, So Yoon Lee, Kwang Kyu Lee. The Effect of Consecutive Exercise to Exhaustion on the Alteration of Salivary Stress and Immunity Hormone. *J. the Korean Society of Living Environmental System*. 2017;24(5):597-607.
 33. Min-Hee Kim, Sung-Wook Hong. Effect of Short Term Vitamin Supplementation on MDA, SOD, GPx in Ballet. *J. the Korean Society of Dance Science*. 2012;26:161-71.
 34. An Keun Kim, Ji Hyun Kim. Alterations of Antioxidant Enzymes in Response to Oxidative Stress and Antioxidants. *J. Applied Pharmacology*. 2001;9:249-57.
 35. Yong-Kyun Jeon. Effects of Resistance Training in the Morning and Evening of Middle-aged Women on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes. *Korean J. Sports Science*. 2015;24(3):1523-32.
 36. Nak-Hun Song. The Influence of Elastic Band exercise of Persons with Spinal Cord Injuries on the Concentration of Lipoperoxide(MDA) and Anti-oxidant Enzyme(SOD and GPx). *Korean J. Sports Science*. 2013;22(2):921-32.
 37. Hye-Yeon Yeo, Hye-Youn Lee, Ji-Yeon Lee, Sang-Mo Kang. Status Analysis on Fatigue Levels and Substances After a Meridian Massage. *J. Kor. Soc. Cosm*. 2013;19(5):842-9.
 38. Joonmoo Lee. Effects of Homnini Hominis Placenta Pharmacopuncture on the Blood Picture and Antioxidative Activity in Rats. *J. Meridian & Acupoint*. 2009;26(2):53-60.
 39. Se-won Lim, Leen Kim. Stress and Sleep. *Korean J. Stress Research*. 2004;12(4):1-8.
 40. Soon-ye Lee, Cheol-Woong Lee, Jin-Woo Kim, Jin-hyung Cho. A Case Report of the Postpartum Depression with Hominis Placenta Herbal Acupuncture Therapy. *J. Oriental Obstetrics & Gynecology*. 2006;19(2):282-94.