

목향과 향부자 추출물이 흰쥐의 만성 스트레스에 미치는 실험적 효과

최찬헌 · 홍준영 · 정현우*

동신대학교 한의과대학

Experimental Effects of Aucklandiae Radix and Cyperi Rhizoma Extract on Chronic Stress in Rats

Chan Hun Choi, Jun Yeong Hong, Hyun Woo Jeong*

College of Korean Medicine, Dongshin University

This study aimed to investigate the anti-stress function of Aucklandiae Radix (AR) and Cyperi Rhizoma (CR). The essential oils used in the experiment were extracted from AR and CR using Steam Distillation Extraction and Super critical CO₂ extraction. To observe the effects of sample administration, we measured feed intake, leukocytes, red blood cells, hemoglobin, platelets, serum serotonin content, immobility time, climbing time, and swimming time in mice subjected to chronic restraint stress as behavioral changes. The average body weight of all experimental groups increased than the average body weight of the control group. The immobility and climbing times of experimental groups A and B administered with supercritical extraction samples were shorter than those of the other experimental groups and the control group, and the swimming time was longer. The serotonin content in the blood of all experimental groups decreased compared to the normal group, and the serotonin content of the control group was increased. The authors suggest that Korean herbal medicines AR and CR may be utilized as anti-stress flavoring agents based on the above results.

keywords : Aucklandiae Radix, Cyperi Rhizoma, chronic restraint stress, Steam Distillation Extraction, Super critical CO₂ extraction, flavoring

서 론

현대 사회를 살아가는 사람들은 급격한 사회변동과 복잡한 관계 속에서 적응하기 위해 다양한 스트레스에 노출되어 있다¹⁾. 최근 스트레스와 관련된 여러 질환들이 증가하면서 스트레스로 인한 만성 질환의 이환 등에 의한 직·간접적 사회경제적 비용이 상승하고 있다²⁾.

심신상관적 건강관을 강조하는 한의학에서는 이러한 스트레스를 중요한 병인 중 하나로 내인의 분류에 속하는 칠정상(七情傷)이라 칭하고 있고³⁾, 칠정상은 감정의 과극이 기기의 실조 그리고 신체증상까지 이어지는 패턴을 따르며 이러한 결과로 기(氣)차원의 손상이 일어난다고 파악한다⁴⁾.

정신적인 질환에 관련된 심리적인 병은 기의 울체인鬱證에 포함한다고 했으며, 이는 현대의학의 정신질환에 속하는 것으로⁵⁾, 심인적 stressor를 七情으로 설명하였고, 그에 따른 증후는 七氣, 九氣, 氣鬱 등으로 나타난다 하여 울체된 기를 해소하는 처방을 주로 사용하였다⁶⁾.

아로마테라피라고 불리는 향기요법은 천연식물의 향을 이용하여 부작용이 거의 없고, 함유된 특정 성분으로 자연치료 개념에 입각하여 스트레스를 조절하는 데 큰 도움을 준다고 연구되어지고 있다⁷⁾. 이에 따라 스트레스로 인한 불안, 초조, 우울 및 집중력 장애 환자가 다발하고 있는 시점에서 한약재의 향을 이용한 아로마테라피의 연구가 유망하리라 생각된다.

이에 본 저자들은 국화과(菊花科: Compositae)에 속한 다년생 초목인 목향⁸⁾과 사초과(莎草科: Cyperaceae)에 속한 다년생 초본인 Cyperus rotundus L.의 근경인 향부자⁸⁾의 강한 理氣解鬱 작용이 항스트레스 효능^{8,9)}과 연관 있을 것으로 판단하고 이를 기반으로 산업화를 진행하고자 본 연구를 기획하였다. 이와 연관된 기존의 연구들을 살펴보면 류 등¹⁰⁾은 목향이 흰 쥐 대뇌피질 신경세포를 통해 신경세포 보호작용을 보고하였고 김 등¹¹⁾은 목향이 serotonin에 의하여 매개되고 있는 중추신경 전달체계 일부를 억제하여 중추기능에 길항효과가 있음을 보고하였다. 또한, 엄¹²⁾ 등은 HRV (Heart rate variability)와 EEG (electroencephalography)

측정을 통해 향부자의 스트레스 이완 효과를 보고하였고, 김 등¹³⁾은 뇌내 serotonin 변화량을 중심으로 향부자의 항 우울 작용을 관찰하였다. 이들 연구들은 각각 흰쥐 신경세포 배양¹⁰⁾을 통하거나, 적출된 회질의 조직에서¹¹⁾ 그리고 뇌내 5-HIAA 와 in vitro 상으로 monoamine oxidase로 serotonin을 측정¹³⁾하는 방식으로 연구가 진행되었으며, 이들을 보완하여 목향과 향부자를 이용해 항스트레스 효과가 있는 향료를 개발하고자 본 연구를 진행하였다. 또한, 추출 방식에 따른 효과를 관찰하기 위하여 수증기 증류 추출기(Steam Distillation Extraction)을 이용한 추출방식과 초임계 추출기(Super critical CO₂ extraction)을 이용한 추출법을 구분하여 시행하였다. 그리고 이들 시료에 대한 독성 여부를 일차적으로 확인한 후, 구속 스트레스를 가한 병태 흰쥐에게 나타나는 외관상 변화로 체중과 식이량, 혈액 상의 WBC, RBC, hemoglobin, platelet 및 serotonin 함량, 행동장애 변화로 부동 시간, 오르기 시간 및 수영 시간을 관찰하여, 이에 대한 소기의 성과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료 및 실험 준비

1) 시료

(1) 약재

시료로 사용한 목향과 향부자는 한약재 유통 업체인 (주)온니버스를 통해 구입한 것으로 이 중 목향은 중국산이고, 향부자는 국산을 사용하였다.

(2) 열수 추출

목향 (Aucklandiae Radix, AR) 100g과 향부자 (Cyperi Rhizoma, CR) 100g을 약탕기에 넣고 1,200 mL의 증류수를 넣은 다음 열수 추출하였다. 열수 추출의 온도는 105°C 설정하여 2시간 동안 추출하였으며, 각 배합비율 별 100g을 열수 추출하여 동결건조 분말을 각각 목향 열수 추출물 AR Extract (ARE)을 34.12g, 향부자 열수 추출물 CR Extract (CRE)을 4.7g, 목향 및 향부자 혼합추출물 ARCR Extract (ARCRE)을 19.27g을 수득했다.

Hyun Woo Jeong, College of Korean Medicine, Dongshin University, 67, Dongshindaegil, Naju-si, Jeollanam-do, Republic of Korea

E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr · Tel : +82-61-330-3524

Received : 2021/12/30 · Revised : 2022/04/07 · Accepted : 2022/04/20

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2022.04.36.2.54

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

(3) 정유 추출

수증기 증류 추출방식과 초임계 추출방식으로 구분하였다. 목향 (AR) 정유는 80°C에서 6시간 수증기 증류 추출한 오일 (AR Steam distillation extracted Oil, ARSDO)의 압력 400bar, 온도 60도, 120 min 조건의 초임계 추출 오일 (AR Super critical CO2 extracted Oil ARSCO)을 사용하였고, 향부자 (CR) 정유는 80°C에서 6시간 수증기 증류 추출한 오일 (CRSDO)와 압력 400bar, 온도 60도, 120 min 조건의 초임계 추출 오일 (CRSCO)를 사용하였다.

2) 동물

(1) 사육조건

사용된 동물은 (주)샘타코에서 7주령 수컷 balb/c 계통의 생쥐 (23 g 내외) 6수와 7주령 SD계 흰쥐 (200 g 내외) 48수를 구입한 후 식품의약품안전처에서 고시한 동물실험시설 규정에 적합한 사육 시설에서 7일간 적응시켰다. 적응시키는 과정에서는 충분한 사료와 물을 공급하였고, 명암주기 (12시간), 실내온도 (24±2°C) 그리고 습도 (55±5%)를 일정하게 유지시켰다.

(2) 실험동물위원회 승인

본 실험을 진행하기 위하여 동물실험계획서의 승인을 얻었다 (동신대학교 동물실험윤리위원회 승인번호 2017-09-03).

(3) 구속 스트레스 모델 유발

구속 스트레스 모델을 유발하기 위하여 스트레스 유발군에 속하는 실험동물들은 1주일에 3회, 3주간 총 9회 구속 스트레스를 가하였다. 구속 스트레스를 유발은 아래 사진과 같이 호흡 확보를 위한 작은 구멍이 있는 안지름 6 cm, 길이 20 cm의 원통형 구속 장치에 가둔 다음 1시간 동안 방치하였다 (Fig. 1).



Fig. 1. Chronic restraint stress model rats

(4) 실험군 및 향기 흡입

각 실험군은 8마리 흰쥐를 한 그룹으로 하고, 시료를 흡입시키는 그룹은 오일을 생리식염수에 1% 농도로 희석한 후 nebulizer를 이용하여 1주일에 3회 (30분/회), 3주간 총 9회를 아래 사진과 같이 흡입시켰다. 1회당 10 ml씩 30분간 흡입박스 (아크릴제, 30 cm × 45 cm)에 넣고 분무하였다. 대조군은 오일 대신 생리식염수를 분무하였다 (Fig. 2).



Fig. 2. Oil inhaled suction device

2. 효능 검색 방법

1) 면역세포 독성 검색

정상 생쥐의 흉선 및 비장 세포 분리는 Wysocki¹⁴⁾ 및 Mizel¹⁵⁾ 등의 방법에 의하여 실시하였다. 분리한 흉선 세포 및 비장세포의 부유액을 RPMI 1640 배지로 희석한 후 96 well plate에 5.0×10⁵ cells/well 농도로 injection한 후 흉선 세포에 Con A 10 µg/ml, 비장 세포에 LPS 10 µg/ml와 시료를 농도별 (0, 62.5, 125, 250,

500, 1000 µg/ml)로 첨가한 후 37°C의 CO₂ 배양기에서 48 시간 배양한다. 이 후 Ez-cytox 15 µl를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 배양하고, 각각의 well 흡광도는 Microplate Reader로 450 nm에서 측정하였다.

2) 구속스트레스 병태모델에 미치는 효능 검색

(1) 강제수영법 (Forced swimming test, FST)

본 실험은 Porsolt 등¹⁶⁾의 강제수영검사법을 수정하여 실시하였고, 실험에 사용한 원형 실린더 (깊이 50 cm × 직경 20 cm, 물의 온도 25±2°C, 물의 양 20 cm) 및 행동분석에 필요한 환경은 아래 그림과 같았다 (Fig. 3).

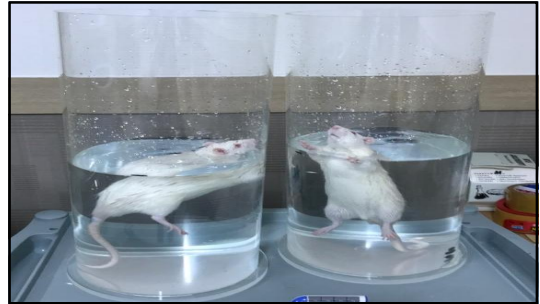


Fig. 3. Forced swimming test experimental design

구속 스트레스 과정과 시료의 투여 그리고 강제수영법의 실험 진행 과정을 도식으로 나타내면 다음과 같다 (Fig 4).

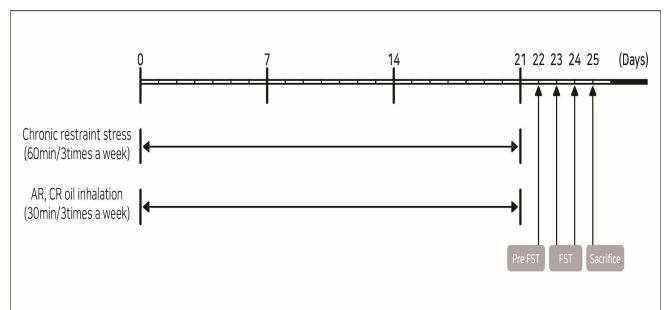


Fig. 4. The diagram of experiment. FST: Forced swimming test

(2) 체중 및 식이량 (사료 섭취량) 관찰

실험동물의 체중은 실험개시 당일 체중을 측정된 후 주 3회씩 3주간 총 9회에 걸쳐 측정하였고, 사료 섭취량은 스트레스에 노출된 날로부터 주 3회씩 3주간 총 9회에 걸쳐 측정하였다. 총 섭취량을 측정된 다음 개체 수로 나누어 개체별 평균 섭취량으로 계산하였다.

(3) 혈액 성상의 변화 관찰

실험이 끝난 후 동물을 희생하여 심장채혈을 실시한 다음 혈액을 EDTA-bottle에 담아 혈구자동분석기 (Hemavet950, U.S.A.)에서 WBC, RBC, Hb, PLT를 측정하였다.

(4) 행동적 지표 변화 관찰

실험동물은 FST 실시 1일 전 약 15분 정도 예비수영 (Pre FST)을 시켜 물에 적응토록 한 후 당일 실험 직전 6분간 강제수영을 실시하였다. 이후 5분간 실험동물의 행동을 VTS (Video tracking system)로 촬영하여 부동 시간, 수영 시간, 오르기 시간을 측정하였다. 부동 시간은 수영동작이나 기어오르기 동작을 멈추고 수면에 떠서 가만히 있는 동작 또는 고개를 드는 동작을 부동자세로 측정하였다.

(5) 혈액 중 Serotonin 함량 변화 관찰

Acylation plate에 standard, serum을 100 µl를 첨가한 후 Acylation buffer 25 µl를 넣고 실온에서 30분 incubation 시켰다. Serotonin이 coating된 microplate에 acyle화된 standard 100 µl, serum 100 µl를 넣고, serotonin Antiserum 100 µl를 첨가한 후 2-8°C 에서 18시간 incubation 시켰다. Wash buffer 300 µl로 3회 washing 후 Enzyme conjugate 100 µl를 첨가하고 plate cover를 덮은 다음 실온에서 30분간 incubation 하였다. Wash buffer 300 µl로 3회 washing 후 substrate solution 100 µl를 첨가한 다음 plate cover를 덮고 dark 상태로 실온에 20분간 incubation 하였다. Stop solution 100µl를 plate에 넣고 발색 반응을 중지시킨 후 ELISA reader (Biorad, USA) 기기를 사용하여 450 nm에서 Optical density를 측정하였다.

3. 통계처리

실험을 통해 수집된 수치의 통계 분석은 SigmaPlot 11.1 (www.systat.com)를 활용하였고, 각 실험군간의 비교는 one-way ANOVA 기법으로 처리하였다. 사후검정은 Tukey 방법을 사용하였고, p-value가 0.05 미만인 경우에만 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

1. 면역세포의 세포독성 결과

1) Thymocytes에 대한 세포독성

목향 추출물 (ARE)과 향부자 추출물 (CRE) 그리고 목향과 향부자를 혼합한 추출물 (ARCRE)이 생쥐의 thymocytes에 미치는 독성을 확인하고자 농도별 (0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml)로 처리한 후 증식율을 확인한 결과 (Fig. 5), 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

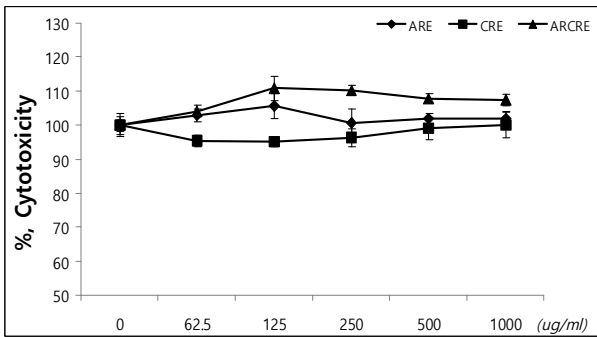


Fig. 5. Cytotoxicity of ARE and CRE in thymocytes. ARE was Aucklandiae Radix Extracts, CRE was Cyperi Rhizoma Extracts and ARCRE was Aucklandiae Radix and Cyperi Rhizoma Extracts. After attaching thymocytes to 96 well plate, each extracts was treated according to concentration. After 48 hrs incubation, the proliferation rate were measured using Microplate Reader 450 nm. Results are expressed as the mean and standard deviation.

2) Splenocytes에 대한 세포독성

목향 추출물 (ARE)과 향부자 추출물 (CRE) 그리고 목향과 향부자를 혼합한 추출물 (ARCRE)이 생쥐의 splenocytes에 미치는 독성을 확인하고자 농도별 (0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml)로 처리한 후 증식율을 확인한 결과 (Fig. 6), ARE를 소량 처리하였을 때 비장 세포의 증식율은 유의성 (p<0.05)있게 증가하였고, CRE와 ARCRE를 처리하였을 때는 비장세포의 증식율이 증가하였지만 유의성은 인정되지 않았다.

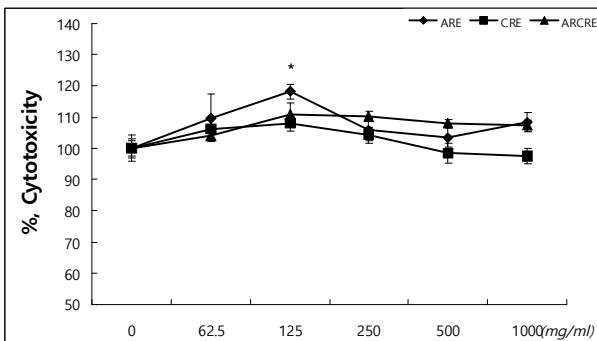


Fig. 6. Cytotoxicity of ARE and CRE in splenocytes. After attaching splenocytes to 96 well plate, each extracts was treated according to concentration. After 48 hrs incubation, The proliferation rate were measured using Microplate Reader 450 nm. Results are expressed as the mean and standard deviation. * : Statistically, significance compared with non-treated group(0 mg/ml)(*; p<0.05) (n=8)

2. 병태모델에 미치는 효능검색 결과

1) 체중의 변화

수증기 추출법과 초임계 추출법을 사용해 추출한 목향 오일 (ARSDO, ARSCO)과 향부자 오일 (CRSDO, CRSCO) 향이 구속 스트레스를 가한 병태 흰쥐의 실험기간 중에 변화되는 체중을 관찰하였다 (Fig. 7). 실험 개시일부터 4주간 평균 체중을 측정된 모든 실험군에서 체중이 증가하는 것을 확인하였다. 실험군 A와 실험군 B의 체중 증가폭이 다른 실험군보다 증가하였고, 정상군의 체중과 유사하게 나타났다.

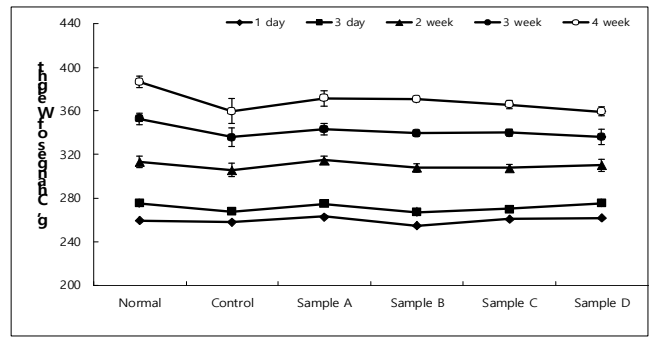


Fig. 7. Weight change in the restraining stress model inhaled AR and CR oil flavor. Normal group without chronic restraint stress were sprayed saline, Control groups induced by chronic restraint stress were sprayed saline instead of oil. Under restraint stress, Sample A, B, C and D group were inhaled ARSCO (1%), CRSCO (1%), ARSDO (1%) and CRSDO (1%). Results are expressed as the mean and standard deviation.

2) 식이량의 변화

평균 식이량을 관찰하기 위하여 사료 섭취량을 1주, 2주, 3주, 4주 동안 관찰한 다음 개체 대비 평균 사료 섭취량을 계산한 결과 (Fig. 8), 실험 개시일부터 4주간 평균 식이량은 관찰한 결과 각 실험군별 평균 식이량에서의 유의한 차이는 보이지 않았다.

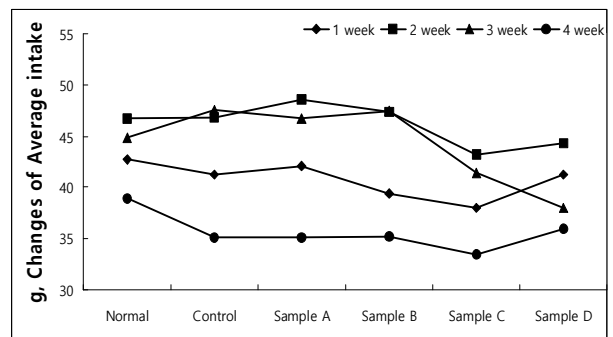


Fig. 8. The change in the average food intake of the restraining stress model inhaled by AR and CR oil flavor. Results are expressed as the mean and standard deviation. Other descriptions are the same as in Fig. 7.

3) 혈액 성상의 변화

실험군들의 혈액 성상 변화 (WBC, RBC, Hemoglobin, platelet)를 관찰한 결과(Fig. 9, 10), WBC에 있어 실험군 A와 B는 대조군에 비해 모두 유의성 (p<0.01) 있게 증가하였고, RBC에서 실험군 B에서 대조군에 비해 유의성 (p<0.05) 있게 증가하였다. Platelet (PLT)에서는 모든 실험군이 대조군의 PLT보다 증가하였고, 특히 실험군 D에서 대조군보다 유의성 (p<0.05) 있게 증가를 보였다.

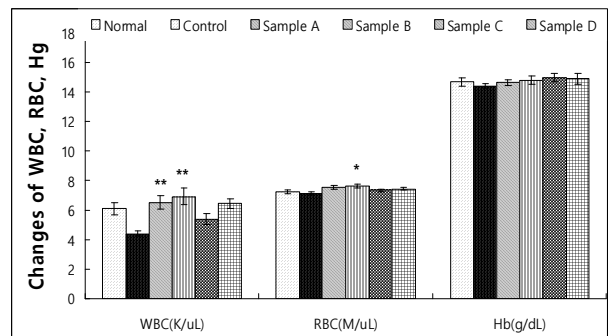


Fig. 9. Changes in serum WBC, RBC and Hemoglobin of the restraining stress model inhaled by AR and CR oil flavor. Results are expressed as the mean and standard deviation. Other legends are the same as in Fig. 7. * : Statistically, significance compared with Control group(*; p<0.05, ** ; p<0.01) (n=8)

4) 행동분석 지표 관찰

구속 스트레스를 가한 병태 흰쥐의 행동 변화를 관찰하기 위하여 강제수영시험 (Force swimming test, FST) 결과를 분석한 결과 (Fig. 11), 대조군의 평균 부동 시간이 정상군보다 길어졌고, 실험군에서는 대조군보다 짧아지는 경향을 나타내었다. 초임계 추출 오일 향을 흡입한 실험군 A, B가 수증기 추출 오일 향을 흡입한 실험군 C, D보다는 부동 시간이 짧아지는 경향이 보였지만 유의성은 발견하기 어려웠다. 평균 오르기 시간은 실험군 A, B의 평균 오르기 시간이 대조군보다 짧아지는 경향을 나타내었으며, 수영 시간은 모

든 실험군에서 대조군보다 길어지는 경향을 나타내었으나, 오르기 시간과 수영 시간 역시 실험군 간의 특이성은 발견하기 어려웠다.

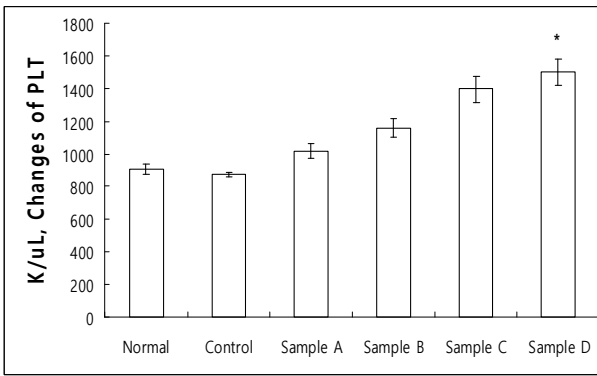


Fig. 10. Changes in serum Platelet of the restraining stress model inhaled by AR and CR oil flavor. Results are expressed as the mean and standard deviation. Other legends are the same as in Fig. 7. * : Statistically, significance compared with Control group(*; p<0.05) (n=8)

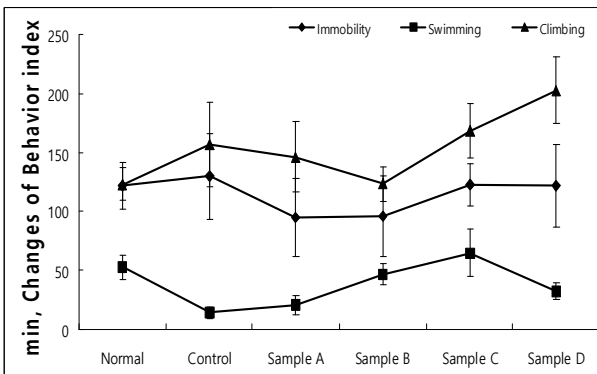


Fig. 11. Behavioral Changes in Forced Swimming Tests of the restraining stress model inhaled by AR and CR oil flavor. Results are expressed as the mean and standard deviation. Other legends are the same as in Fig. 7.

5) 혈액 중 Serotonin 함량 변화

구속 스트레스를 가한 병태 흰쥐의 혈액 내 serotonin 함량을 측정한 결과 (Fig. 12), 실험군 모두에서 대조군의 serotonin 함량보다 증가하였고 또한 초임계 추출 오일 향을 흡입한 실험군 A와 B의 serotonin 함량이 수증기 추출 오일 향을 흡입한 실험군 C와 D의 serotonin 함량보다 증가하는 경향이 보였지만, 통계적으로 유의하지는 않았다.

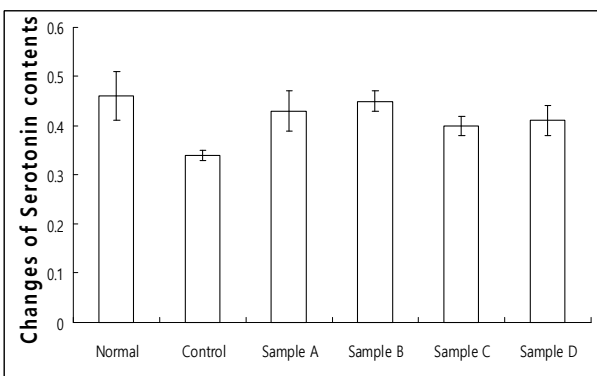


Fig. 12. Variation of Serotonin contents in serum of the restraining stress model inhaled by AR and CR oil flavor. Results are expressed as the mean and standard deviation. Other legends are the same as in Fig. 7.

고찰

한의학에서는 오래전부터 쯤이 몸과 정신에 영향을 미친다는 것을 인지하고 다양한 방법을 통하여 쯤을 치료에 적극적으로 응용해 왔고¹⁷⁾, 근래에 들어서는 다양한 방식으로 식물에서 추출한 방향성 정유로 질병을 예방 및 치료하는 방법을 개발해 왔다^{7,18)}. 국화과에 속한 다년생 초본인 운목향의 根인 木香 (Aucklandiae Radix, AR)과 방동사니과에 속한 다년생초본인 향부자의 根莖인 香附子 (Cyperi Rhizoma, CR)는 대표적인 理氣藥⁸⁾로서 스트레스 질환에 상응하는 諸氣鬱滯, 七情, 痰飲 등의 병증에 활용되었다^{9,19)}. 목향을 항스트레스 효과와 연관시켜 실험적으로 규명하기 위

한 연구로는 류 등¹⁰⁾은 목향이 SD계 배양된 흰쥐의 대뇌신경세포에 미치는 영향을 관찰해서 신경세포 보호작용이 있음을 보고하였고, 김 등¹¹⁾은 목향이 serotonin에 의하여 매개되고 있는 중추신경 전달체계 일부를 억제함으로써 항우울작용에 대해 보고하였다. 다만 이들 실험은 흰쥐 유래 세포주를 이용하였고, 흰쥐의 회장을 적출하여 serotonin 함량을 측정 한 실험이었다.

향부자에 있어서는 엄 등¹²⁾은 향부자 정유흡입의 스트레스 이완효과를 연구한 것으로 본 실험의 성격과 유사하지만 이 실험은 사람을 대상으로 EEG와 HRV 측정을 통해 교감신경과 부교감신경의 활성을 관찰한 실험이었다. 또한 김 등¹³⁾은 향부자가 항우울작용, 항경련효과, 수면연장 효과가 있음을 보고하였으나, 생쥐의 뇌 조직을 추출하여 5-HIAA 와 in vitro상으로 monoamine oxidase 로 serotonin을 측정 한 실험이었고, 정유의 흡입이 아닌 구강 투여의 방식이었다.

이에 저자들은 한의학적으로 항스트레스 물질로서의 효능이 기대되는 목향, 향부자에 대해 현재까지 연구되어온 기존의 연구들을 보완하여 항스트레스 효과가 있는 한방 향료로 개발하고자 초보적인 연구를 시작하였다. 이후에 진행될 한의약 산업으로의 확장 가능성을 타진하고자 항스트레스 효능을 관찰 지표 외에 목향과 향부자의 독성 여부를 실험적으로 확인하는 실험과 체중과 식이량, 혈액 성분 변화로 WBC, RBC, hemoglobin, platelet 검사를 시행하였다. 또한 본 연구에서는 일반적으로 사용되는 수증기 추출법이 회수율이 낮고, 식물이 가지고 있는 고유의 향취가 열에 의해 변화되는 문제점이 있다고 판단하여 이를 개선하기 위해 이산화탄소를 용매로 이용한 초임계 추출법을 도입해 비교하였다²⁰⁾. 이를 위해 정상군과 대조군 외에 실험군을 4개로 구분하여 Sample A는 목향 초임계 추출물 그룹으로, Sample B는 향부자 초임계 추출물 그룹으로, Sample C는 목향 수증기 추출물 그룹 Sample D는 향부자 수증기 추출물을 흡입한 그룹으로 실험군은 설정하여 진행하였다. 이들의 결과를 살펴보면, 추출한 목향과 향부자가 thymocytes 및 splenocytes에 독성을 보이지 않았으며 (Fig. 5,6), 향후 스트레스 치료에 도움이 될 수 있는 제품으로 개발됨에 있어 필요한 안전성에 대한 초보적인 결과를 확보한 것으로 판단하였다.

실험군 간 체중 증가 폭을 확인한 결과 대조군의 증가 폭이 실험군보다 감소된 것으로 나타났고, 실험군 간에서는 초임계 추출물을 흡입한 실험군 A와 B의 체중 증가 폭이 수증기 추출물을 흡입한 다른 실험군보다 증가하여 정상군의 체중과 유사하게 나타났다(Fig. 7). 이는 스트레스로 인해 체중의 증가 폭이 감소한 대조군보다 목향이나 향부자 추출물 특히, 수증기 추출물보다는 초임계 추출물을 흡입할 경우 항스트레스 작용이 더 강한 것으로 생각되었다. 평균 식이량의 경우는 일반적으로 시간이 지날수록 증가하였으나 4주째는 실험군들의 평균 식이량 모두 감소하였다(Fig. 8). 각 실험군간 식이량 섭취도 특이한 변화를 나타내지 않았고, 평균 식이량이 감소하더라도 모든 실험군에서 체중이 증가하여 체중과 식이량과의 상관성은 특별히 없는 것으로 생각되었다.

혈액 성상의 경우, 실험군들의 WBC와 RBC가 대조군보다 유의하게 반응하였는데 특히 향부자의 초임계 추출물을 흡입한 실험군이 대조군보다 유의성 (p<0.01, p<0.05) 있게 증가하였고, 다른 실험군보다도 유의한 반응을 보였으며, PLT의 경우도 향부자를 수증기 추출법으로 추출한 추출물을 흡입한 실험군이 대조군에 비해 유의성 (p<0.05) 있게 증가하였다(Fig. 9, 10). 이와 같은 결과는 목향 및 향부자의 추출물이 구속 스트레스로 유발된 생체 내 변화를 회복시키는 것으로 판단되며, 특히 수증기 추출물보다는 초임계 추출물에서 그 효과가 더욱 우수한 것으로 생각되었다.

수증기 추출법과 초임계 추출법을 사용해 추출한 목향과 향부자 추출물이 구속 스트레스를 가한 병태 흰쥐에 미치는 행동 변화를 강제수영시험 (Force swimming test, FST)을 통해 관찰한 결과 대조군의 평균 부동 시간이 정상군보다 길어졌고, 실험군에서는 대조군보다 짧아지는 경향을 나타내었으며, 또한 초임계 추출물을 흡입한 실험군 A와 B가 수증기 추출물을 흡입한 실험군보다는 부동 시간이 짧아졌다. 평균 오르기 시간과 수영 시간은 서로 반비례하는데 대조군의 평균 오르기 시간이 정상군보다 길었고, 수영 시간은 짧아졌다. 실험군 A와 B의 평균 오르기 시간은 이와 반대로 대조군보다 짧아지면서 수영 시간은 대조군보다 길어졌다(Fig. 11).

일반적으로 우울장애가 있으면 실험동물의 움직임이 없는 부동 시간이 길어지기 때문에 이와 같은 결과는 구속 스트레스로 인한 우울한 행동적 반응들이 개선된 것으로 생각되고, 수영 시간과 오르기 시간의 변화가 서로 반비례하기 때문에 실험군의 이러한 결과들을 볼 때 이 역시 개선의 효과가 있는 것으로 판단되었다. 또한 추출방법에 따른 효율성을 볼 때, 초임계 추출물이 수증기 추출물보다 효과가 우수한 것으로 관찰되었다.

구속 스트레스를 가한 병태 흰쥐의 혈액 내 serotonin 함량을 관찰한 결과, 실험군 모두에서 정상군보다 감소한 대조군의 serotonin 함량을 증가시켰다(Fig. 12). 이는 스트레스를 받거나 불안 혹은 우울 감정이 발생할 때 serotonin 함량이 감소하게 하는 결과와 일치하고, 추출물을 흡입한 실험군들이 모두 대조군의 serotonin 함량을 증가시켜 항스트레스에 도움이 될 것으로 보이며, 추출방법에 있어서는 초임계 추출이 수증기 추출보다 유효할 것으로 생각되었다. 다만, serotonin 지표가 대조군에 비해서 증가되는 경향성이 있었으나 통계적 유의성은 나타나지 않았는데 이는 김 등¹³⁾의 연구에서 향부자의 향우울작용이 serotonin과 용량의존적인 경향을 보였으나 통계적인 유의성이 보이지 못했던 결과와 유사하였다. 이러한 결과에 대해서는 뇌조직 전체를 적출하여 농도를 관찰하거나¹³⁾ 본 연구와 같이 혈장 내 serotonin을 측정하는 것보다는 뇌 내의 봉선핵(Raphe nuclei)과 같이 serotonin 생산과 연관된 구역을 적출해서 측정²⁰⁾하였다면 유의성이 분명하게 나타나지 않았을까 생각한다.

결 론

목향과 향부자를 항스트레스 효과가 있는 한방 향료로 개발하고자 약재에 대한 독성을 확인하고, 구속 스트레스를 가한 병태 흰쥐의 체중, 평균 식이량, WBC, RBC, hemoglobin, platelet 및 serotonin 함량과 행동장애 변화로 나타나는 부동 시간, 오르기 시간 및 수영 시간 관찰을 시행하였다. 이들의 결과를 종합하면, 목향과 향부자 추출물에서 세포독성은 나타나지 않았고 구속 스트레스를 가한 병태 흰쥐의 체중, 혈액상의 WBC, RBC, PLT 및 serotonin 함량을 변화시켰다. 행동적인 반응에 있어서도 부동 시간이나 수영 시간들을 감소시켜 우울이나 불안으로 인한 행동장애를 개선시키는 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 초임계 추출법으로 추출한 추출물을 흡입했을 때 더욱 개선된 결과를 나타냈다. 이에 본 저자들은 목향과 향부자를 항스트레스 한방 향료로 개발하는데 있어, 초임계 추출방식의 목향과 향부자 정유가 항스트레스 향료 자원으로써 활용 가능성이 높다고 판단하였다.

References

1. Kim YN. The study on effect of anti-stress managed by aroma essence oil therapy through oldfactory, Graduate School of alternative medicine Kyong University, 2011.
2. Korea Centers for Disease Control. Development of the Stress Questionnaire for KNHANES(the Korea National Health and Nutrition Examination Survey), 2010.
3. Park HM, Lee KN, Hwang GI, Shin YC, Go SG, Lee HW et al. The New Etiologic Classification System of Korean Medicine, Korean Journal of Oriental Preventive Medical Society. 2013;17(2):47-68.
4. Yoon EK. Emotional factors in the mechanism of Chiljeongsang(七情傷), Department of Oriental Medicine, Graduate School; Kyung Hee University, 2011.
5. Yoon YH, Yun CY. A Study on Judangye's Theory of

- Sasang(four harms) -with a Focus on Gyeokchiyeoron and Geumgweguhyeon. J. Korean Medical Classics. 2014;27(3):123-40
6. Lyu YS. A psychiatric study on the stais symptorm complex(鬱證), The Journal of Wonkwang Oriental Medicine. 1995;5(1):122-40.
7. Son KC, Song JE, Um SJ, Paek KY, Oh HK, Lee JS, et al. Effect of Absorption of Essential Oils on the Changes of Arousal and Antistress, HORTICULTURE ENVIRONMENT and BIOTECHNOLOGY. 2001;42(5):614-20.
8. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine Schools. Herbology. Seoul: Youngrimsa;2011. p. 395-7.
9. Lee MS, Lee JH, Yoon TK, Lee JC, Lee BK. Study on the "Moschus substitute for Aquilariae Resinatum Lignum or Aucklandiae Radix"of Gongjin-Dan In The Classic Literature. Herbal Formula Science. 2015;23(2):235-43.
10. Ryu DK, Jeong SH, Shin GC, Lee WC, Moon IS. The Effect of Aucklandiae Radix Moschus(木香.麝香)'s for Delayed Neuronal Death in Hypoxia, The Journal of Korean Oriental Internal Medicine, 2003;24(2):348-357.
11. Kim KW, Shin KS, Cho KH, Kim YS, Bae HS. Antagonistic Effects of Saussureae Radix and Xanthii Fructus on Serotonin-Mediated Central Actions, The Journal of Kyung Hee University Medical Center. 1992;8(4):377-87.
12. Uhm JT, Bae SY, Park KS, Kim KS. A Study on Effects of Cyperus rotundus L. Essential Oil Inhalation on Stress Relaxation with HRV, EEG, Daejeon University Institute of Oriental Medicine. 2014;22(2):81-92.
13. Kim IJ, Lee DW. Experimental Study on the Antidepressant Effect of Ginseng Radix Alba and Cyperi Rhizoma, The Korean Society of Oriental Neuropsychiatry. 2004;15(1):101-19.
14. Wysocki LJ, Sato VL. Planning for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. 1978;75(6):2844-8.
15. Mizel SB, Rosenstreich DL. Regulation of lymphocyte-activating factor (LAF) production and secretion in P388D1 cells: identification of high molecular weight precursors of LAF. J. Immunol. Methods. 1979;122(6):2173-9.
16. Porsolt RD, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. European J. of Pharmacology. 1978; 47:379-91.
17. Uhm JT, Kim KS, Kang JS, Kim BS. The Study on Classification of Aromatic Herbs in Oriental Medicine for Aromatherapy. Daejeon University Institute of Oriental Medicine. 2011;20(1):39-50.
18. Lee SH. Aromatherapy, Seoul, Honghijea;1995. pp.25-49.
19. Hu J, Lee JH, Yun YG. Study on the Applications of Prescriptions including Rhizoma Cyperi as a Main Component in Dongeuibogam, The Koeran Journal Of Orienta Medicall Prescription. 2011; 19(2):161-78.
20. Kim HT. Effects of Treadmill Exercise on Serotonin and Tph-Positive Cells in Raphe Nuclei and Depressive Behaviors in Aged Rat, The Korean Journal of Sport. 2017;15(2):563-70.