

補心健脾湯 투여가 Stress 유발 Mouse의 Hypothalamus 유전자 발현에 미치는 영향

이승희 · 장규태 · 김장현*

동국대학교 한의과대학 소아과교실

Effects of *Boshimgeonbi-tang* on Gene Expression in Hypothalamus of Immobilization-stressed Mouse

Seoung Hee Lee, Gyu Tae Chang, Jang Hyun Kim*

Department of Pediatrics, College of Oriental Medicine, Dongguk University

The genetic effects of restraint stress challenge on HPA axis and the therapeutic effect of *Boshimgeonbi-tang* on the stress were studied with cDNA microarray analyses, RT-PCR on hypothalamus using an immobilization-stress mice as an animal model. Male CD-1 mice were restrained in a tightly fitted and ventilated vinyl holder for 2hrs once a day, and this challenge was repeated for seven consecutive days. In the change of body weight it showed that the *Boshimgeonbi-tang* is effected recovery on weight loss caused by the immobilization-stress. Seven days later, total RNA was extracted from the organs of the mouse, body-labeled with CyDye™ fluorescence dyes and then hybridized to cDNA microarray chip. Scanning and analyzing the array slides were carried out using GenePix 4000 series scanner and GenePix Pro™ analyzing program, respectively. The expression profiles of 109 genes out of 6000 genes on the chip were significantly modulated in hypothalamus by the immobilization stress. Energy metabolism-, lipid metabolism-, apoptosis-, stress protein, transcriptional factor, and signal transduction-related genes were transcriptionally activated whereas DNA repair-, protein biosynthesis-, and structure integrity-related genes were down-regulated in hypothalamus. The 58 genes were up-regulated by the mRNA expression folds of 1.5 to 7.9. and the 51 genes were down-regulated by 1.5 - 5.5 fold. The 11 genes among them were selected to confirm the expression profiles by RT-PCR. The mRNA expression levels of *Tnfrsf1a* (apoptosis), *Calm2* (cell cycle), *Bag3* (apoptosis), *Ogg1*(DNA repair), *Aatk* (apoptosis), *Dffa* (apoptosis), *Fkbp5* (protein folding) were restored to the normal one by the treatment of *Boshimgeonbi-tang*:

Key words : *Boshimgeonbi-tang*, cDNA microarray, RT-PCR

서 론

Stress란 체외로부터 가해지는 각종 유해작용 인자 및 이 인자가 생체에 작용하여 발생하는 장애와 이를 극복하기 위한 방위반응 혹은 적응반응이라는 두가지 요소가 포함된 것이며, 유해작용인자에는 물리, 화학, 생물학적, 육체적, 정신적인 인자가 있고, 생체의 방위반응은 생체의 내부 환경의 항상성 유지를 위하여 노력하는 생체의 작용을 말하는 것이다¹⁾. 한의학에서는 인체의 내외적 자극요인에 의하여 발생하는 생체의 반응을 기의 변

화로 인식하여 七氣, 九氣, 氣鬱, 氣逆등으로 나누고, 이를 stress 현상으로 규정하였다²⁻⁴⁾. 최근에는 stress에 의한 유전자발현 변화 연구가 보고되고 있는데 크게 인체의 stress 신호전달 및 반응의 축인 hypothalamus-pituitary -adrenal gland (HPA) axis의 hypothalamus 나 stress 호르몬에 의한 신경세포 손상이 가장 많이 일어나는 hippocampus부위를 주요 대상으로 하여 이루어지고 있다⁵⁻¹⁰⁾.

補心健脾湯¹¹⁾은 正傳加味二陳湯¹²⁾과 加味溫膽湯¹³⁾을 합방하여 酸棗仁, 厚朴, 藿香, 木香을 加하고 人蔘, 柴胡, 麥門冬, 桔梗을 減한 處方으로써, 本方은 怔忡, 心煩, 不安, 焦燥, 不眠, 胃脘痞悶疼痛, 嘔雜등의 心膽火 및 脾胃不和와 연관된 精神身體障礙에 이용할 수 있다. 소아는 특히 心膽이 虛하여 사소한 자극에 쉽게 놀라게 되어, 식욕이나 수면 같은 신체의 생리기능에 변화를 일으

* 교신저자 : 김장현, 성남시 분당구 수내동 87-2, 동국대학교분당한방병원

· E-mail : kjh@dongguk.ac.kr, · Tel : 031-710-3724

· 접수 : 2005/07/14 · 수정 : 2005/12/05 · 채택 : 2005/12/14

키는 心身障碍가 多發한다. 이에 補心健脾湯은 소아의 신경성 식욕 부진 및 소화장애, 과민성 대장증후군등에 광범위하게 응용할 수 있는 처방이며, 현대인의 stress성 질환에도 효과적이라 할 수 있다.

補心健脾湯에 관한 연구로서는 金¹⁴⁾의 補心健脾湯과 正傳 加味二陳湯의 摘出臟器, 抗潰瘍, 胃液, gastrin 分泌, 腸管輸送能 및 鎮痛, 鎮痙작용에 대한 比較 研究와 申¹⁵⁾의 補心健脾湯의 抗 스트레스 效果에 관한 實驗的 研究등이 있었으나 이는 모두 행동실험, 胃의 조직검사, 胃液분비검사로서 유전자 발현패턴에 관한 연구는 없었다.

이에 저자는 stress 모델의 하나인 구속 stress mouse 모델을 이용하여 생체 stress 반응의 중심축의 하나인 뇌의 hypothalamus에서의 유전자 발현 변화를 cDNA microarray chip을 이용하여 분석하고, stress 완화에 효과적 한약제제로 알려진 補心健脾湯의 효능을 유전자 분석 기법을 통해 분자생물학적 측면에서 객관적으로 접근하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

이계교배(outbreed)된 체중 29±2g의 4주령 수컷 ICR계 mouse(바이오제노믹스, 韓國)을 실험에 사용하였다. 동물은 일정한 온도(23±1℃)와 규칙적인 조명(12시간 명/암)이 자동적으로 조절되는 동물실에서 사육되었고, 사료(삼양사료, 韓國)와 음수가 자유롭게 공급되었으며, 약 일주일 정도의 적응기간을 거친 후, 본 실험에 사용되었다.

2) 약재

藥材는 東國大學校 附屬 韓方病院에서 구입하여 사용하였으며, 補心健脾湯의 처방은 方證新編¹¹⁾에 의거하여 1첩의 처방내용과 구성은 Table 1과 같다.

Table 1. Contents of Boshimgeonbi-tang

韓藥名	生藥名	用量(g)
香附子	<i>Cyperi Rhizoma</i>	9
酸棗仁(炒)	<i>Zizyphi Semen</i>	8
山查肉	<i>Crataegi Semen</i>	6
麥芽(炒)	<i>Hordei Fructus</i>	6
陳皮	<i>Aurantii nobilis Pericarpium</i>	5
半夏	<i>Pinelliae Rizima</i>	4
竹茹	<i>Phyllostachys</i>	4
枳實	<i>Ponciri Fructus</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
蒼朮	<i>Atractylis Rhizoma</i>	4
白茯苓	<i>Hoelon Alba</i>	4
白朮	<i>Atractylis Rhizoma</i>	3
厚朴	<i>Magnoliae Cortex</i>	3
藿香	<i>Agastachis Herba</i>	3
貢砂仁	<i>Amomi Semen</i>	3
神曲(炒)	<i>Massa Medicata Fermentata</i>	3
甘草(炙)	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3
青木香	<i>Helenii Radix</i>	2
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	6
計		84

3) 검액의 제조

5,000ml 용량의 볼 플라스크에 藥材 840g을 증류수 3ℓ에 30분가량 침지시킨 후 Multiple Roast Mantle (MS-EAM-JM, TOPS Co., USA) 약탕기에서 1.5시간을 끓인 후 거즈로 걸러서 추출액만 플라스크에 모은다. 檢液을 플라스크에 담고 감압농축기(R-124A, Buchi Ltd., Switzland)를 이용하여 감압농축 한다. 농축된 檢液을 식힌 후 Deep freezer(upright type #725, Forma Scientific Co., USA)에서 밤새 방치하여 충분히 얼린 후, 72시간 동안 완전히 동결건조(Telstar Lioalfa-6, Spain)시켰다.

2. 방법

1) 실험군의 분류 및 처치

實驗群은 정상군(Normal, n=5), 구속 stress(immobilization stress; IMO stress)를 형성한 대조군(Control, n=5) 그리고 구속 stress를 형성한 후 檢液 투여한 실험군(Sample, n=5)으로 각각 분류하였다. 구속 stress는 Rodent restraint cone (Stoelting Co., IL, USA)을 구입하여 실험동물 몸에 맞도록 재단하여 사용하였으며 오전의 일정시간에 2시간씩, 일주일 동안 가하였다(Fig. 1). 약물투여는 檢液(400mg/kg)을 구속 stress를 가하고 30분 후에 투여하였으며, 정상군과 대조군의 경우에는 동량의 saline을 투여하였다.



Fig. 1. IMO stress with rodent restraint cone

2) 체중측정

mouse의 체중은 개체의 크기에 맞는 용기에 넣은 후, 전자저울(OHAUS, USA)을 사용하여 측정하였다.

3) 뇌적출

구속 stress 마지막 날에 plastic holder에서 풀어주자마자 경추 탈골시킨 후, decapitation을 하고 필요한 뇌부위를 적출하여 부위별로 PBS (phosphate buffered saline)에 담가 냉장 보관하였다.

4) total RNA의 정제

뇌의 hypothalamus 부위를 적출하여 RNA 보존액인 RNA later™ 용액에 담근 후, 약 100mg의 각 뇌 부위로 부터 total RNA를 분리하였다. total RNA는 TRIzol™ (GIBCO BRL Co., MD, USA)을 사용하여 protocol에 따라 분리 정제하였으며 추출

후에는 분광분석기로 260nm에서 정량한 후 -80℃에서 보관하였다. 실험의 정확도를 높이기 위해 한 종류 실험군에서 추출된 total RNA는 서로 혼합한 후, 일정량을 사용하였다.

5) cDNA microarray 분석

(1) probe 준비

각 sample의 RNA는 50µg씩 사용되었고, 각각 Cy3(red fluorescence, 대조군)와 Cy5(green fluorescence, 정상군) 형광표지된 nucleotide 존재하에서 total RNA를 template로 역전사반응을 일으켜 형광표지가 되도록 cDNA를 제작한 후 3M NaOH로 template로 사용된 RNA를 제거하였다. 1M Tris와 1M HCl을 첨가하여 반응액을 중화시킨 후 Micro Bio-spin column(BD bioscience Co.)을 이용하여 남아있는 free fluorescence dye인 Cy3와 Cy5를 제거함으로써 9.6µl의 형광표지 cDNA probe를 최종적으로 만들었다.

(2) Microarray hybridization

준비된 probe는 polyA(4mg/ml in TE) 0.5µl, yeast tRNA(4mg/ml) 0.5µl, human Cot1 DNA(1mg/ml) 5µl, 10% SDS 0.4µl, 20X SSC 4µl와 혼합한 후, 99℃에서 5분, 실온에서 5분 반응시킨 후 12,000rpm 으로 2분 동안 spin down 시켜 상층액을 취하였다. 상층액은 약 6천개의 mouse 유전자가 배열된 TwinChip™ Mouse-6.0K (Digital-Genomics Co., Korea) microarray에 16시간 동안 hybridization 되도록 배양되었고, 수차례 세척하여 비특이적 결합과 수분을 완전히 제거하였다.

(3) Scanning and Data analysis

cDNA chip의 scanning은 GenePix 4000B microarray Scanner (Axon Instruments Co. CA, USA)를 사용하여 수행하였고, array slide의 분석을 위해 동 회사의 GenePix Pro™ 4.0 분석 program을 사용하였다.

6) 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

1µg의 total RNA를 65℃에서 15분 동안 denaturation시킨 후, 200U moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO BRL, MD, USA)을 이용하여 최종 부피가 25µl인 반응 혼합액에서 역전사 반응을 수행하여 cDNA mixture를 얻었다. cDNA는 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 0.4mM의 각 primer와 0.5U Taq polymerase (TaKaRa Co., Shiga, Japan)을 포함한 20µl의 반응 혼합액에서 PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Waltham, MA, USA)를 사용하여 증폭되었다. 각각의 primer는 Genbank에 기록된 염기서열을 토대로 적당한 부위를 선택하여 제작하였으며 각각의 염기서열은 아래와 같다.

- PCR 분석 조건

Denaturation temperature: 95℃, 30초; Annealing temperature: 60-65℃, 30초; Polymerization temperature: 72℃, 30초.)

(1) GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

forward 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3'
reverse 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG-3'

(2) Tnfrsf1a (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a, 327bp)

forward 5'-ACCGTGACAATCCCCTGTAA-3'
reverse 5'-TCCAGCCITTCCTCTTTGA-3'

(3) Calm2 (calmodulin 2, 301bp)

forward 5'-GGGACAATAACAACAAAGGAGC-3'
reverse 5'-TCATCTCATCAACCTTTCATCTG-3'

(4) Itgb1 (Integrin beta 1, 345bp)

forward 5'-TTGGATTCTCCAGAAGGTGG-3'
reverse 5'-TGTGCCCACTGCTGACTTAG-3'

(5) Ogg1 (8-oxoguanine DNA glycosylase 1)

forward 5'-ACTCGTCCATTCTGCTCTCG-3'
reverse 5'-CAATCACTACTCCAACGCCA-3'

(6) Bag3 (Bcl2-associated athanogene 3, 353bp)

forward 5'-AAGTCACCTCCTCTGCTGA-3'
reverse 5'-TCAGGGTCTACGGAATCCAG-3'

(7) Hspe1 (Heat shock protein 1, 309bp)

forward 5'-TGGCTGGACAAGCTTTTAGG-3'
reverse 5'-TGCCCTCATATTCTGGGAGA-3'

(8) Dffa (DNA fragmentation factor, alpha subunit, 385bp)

forward 5'-CCAAGAGTCCTTTGAGGCAG-3'
reverse 5'-CTCCGAAGCCATCTCTCTG-3'

(9) Aatk (apoptosis-associated tyrosine kinase, 344bp)

forward 5'-TAGACTGGGGTGTGGCTACC-3'
reverse 5'-TGCTACTAGCCCAGGGAGAA-3'

(10) Vcam1 (Vascular cell adhesion molecule 1, 389bp)

forward 5'-CCCAAGGATCCAGAGATTCA-3'
reverse 5'-GTCATGTGCACAGCACCACC-3'

(11) Fkbp5 (FK506 binding protein 5, 365bp)

forward 5'-GAAGACCACGACATTCGGA-3'
reverse 5'-AACCAGCTGAGGCCTTTGGA-3'

(12) Calm3 (calmodulin 3, 316bp)

forward 5'-AAGCCTTCTCCCTCTTCGAC-3'
reverse 5'-TCATCTGTACGCTTCTCCCC-3'

7) 통계처리

각 집단에서의 측정값은 평균±표준편차로 나타내었으며, 각 군간의 평균치에 대한 유의성은 SPSS 프로그램 (ver. 8.0)을 사용하여 ANOVA test로 검정하였고, p값이 0.01이하인 경우에 유의한 차이가 있는 것으로 인정하였다.

실험성적

1. 체중의 변화

실험 제 1일날에는 정상군의 체중은 증가했으나, 실험군과 대조군의 체중은 각각 감소했다. 실험 제 2일부터 7일까지는 대조군이 정상군에 비해 유의성(P<0.01) 있게 체중 감소가 있었으며, 실험 제 4일부터 7일까지는 실험군이 대조군에 비하여 유의성(P<0.01) 있게 체중 회복이 증가되었다(Table 2).

Table 2. The Change of Body Weight

	The change of body weight(%)						
	1day	2day	3day	4day	5day	6day	7day
Normal	1.5±0.6 ^{a)}	4.0±2.5	7.5±3.7	9.6±4.6	12.4±6.0	14.3±5.1	16.7±3.7
Control	-6.1±1.7	-11.2±2.0*	-10.1±3.1*	-12.4±2.5*	-9.5±2.1*	-13.0±3.3*	-12.9±2.6*
Sample	-4.5±2.3	-7.4±1.3	-7.4±1.0	-4.5±1.4**	-4.0±1.4**	-1.3±1.4**	6.9±2.1**

a) mean±S.E. Data is express as mean±S.E. Normal: Mouse with no IMO stress, Control: IMO stress mouse for 7days with saline administration Sample: IMO stress mouse for 7days with *Boshimgeonbi-tang* *: p<0.01 compared to Normal, **: p<0.01 compared to Control

2. cDNA microarray 분석

빨간색을 띠는 spot은 정상적으로 발현되지 않거나 그 발현이 미약한 유전자가 IMO stress에 의해 그 발현이 크게 증가되는 패턴을 의미하며 녹색 spot은 반대의 경우로 정상적으로 발현이 상당히 되어 있으나 IMO stress에 의해 발현이 억제되는 유전자를 의미한다. 노란색 spot의 경우에는 정상군과 대조군 모두에서 발현이 비슷한 정도로 이루어지는 것을 의미하는데 모든 경우에 있어 spot 색깔의 강도는 유전자 발현의 양을 나타낸다(Fig. 2).

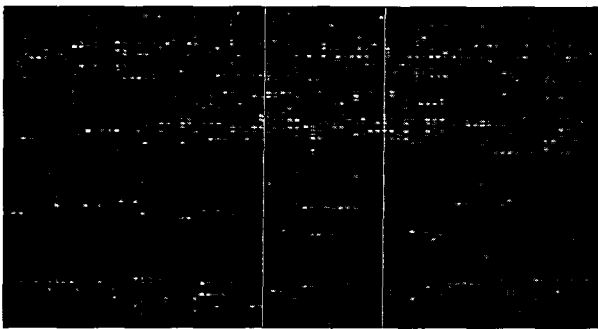


Fig. 2. Gene expression analysis in hypothalamus of IMO stress mouse using cDNA microarray.

실험결과 6천개의 유전자 가운데 총 109개의 유전자가 유의성 있게 그 발현이 변화된 것으로 나타났으며 그 기준은 발현이 증가한 경우는 정상 군의 발현에 비해 50%이상 (1.5배 증가) 증가된 spot들을, 감소한 경우는 정상군의 발현량에 대해 75% (1.5배 감소) 이하로 감소된 spot들을 선택하였다. 유전자 발현의 정량적 측정 결과를 가지고 GenePix ProTManalyzing program을 이용하여 분석한 결과, 각각의 기능이 다양한 총 58개의 유전자가 1.5배에서 부터 7.9배에 이르기까지 그 발현이 증가하였으며 51개의 유전자가 1.5배에서 5.5배까지 감소된 것으로 나타났다 (Table 3).

3. 역전사 증합효소 연쇄반응(RT-PCR)에 의한 분석

cDNA microarray chip을 이용하여 나타난 109여개 유전자의 발현수준 변화결과를 한번 더 확인하기 위해 일반적으로 기능이 알려져 있는 11개의 유전자(*Tnfrsf1a*, *Calm2*, *Calm3*, *Bag3*, *Hspe1*, *Fkbp5*, *Itgb1*, *Aatk*, *Dffa*, *Vcam1*, *Ogg1*)를 선택하여 각각의 primer를 제작한 후, mRNA 발현 수준을 정확히 분석하기 위해 RT-PCR을 수행하였다(Fig. 3).

Table 3. The Change of Gene Expression Quantity in Hypothalamus of IMO Stress Mouse

ORF	Fold	Gene	ORF	Fold	Gene	ORF	Fold	Gene
AI414898	7.9↑	Scamp2	AW211960	1.7↑	Tnfrsf1a	AI503846	2.0↓	Rpl10
AI845324	4.0↑	Prkar1a	AI325498	1.7↑	Csnk1a1	AI846864	2.0↓	Lapim4a
AI451115	3.7↑	Tcof1	AI854196	1.7↑	Bdnf	AI505105	2.0↓	Ogg1
AI747086	3.6↑	Rps26	AI850379	1.7↑	Mark3	AI835204	2.0↓	Mprs17
AI842597	3.2↑	Tcf4	AI132336	1.7↑	Bag3	AI846884	2.0↓	Timm8b
AI450766	3.2↑	Solt	AI846646	1.7↑	Exi2	AI848981	2.0↓	Six8
AI480711	2.7↑	Atp9a	AI256517	1.6↑	Mttp	AI325940	2.0↓	Vbp1
AI413515	2.6↑	Tapbp	AW321876	1.5↑	Pola1	AI480832	1.9↓	Galns
AI505029	2.5↑	Capn10	AI850723	1.5↑	Calm2	AI607343	1.9↓	Sntb1
AI854716	2.5↑	Atp2a2	AI324671	1.5↑	Rpl30	AI173264	1.9↓	Rps28
AI836130	2.5↑	Akap12	AW212337	1.5↑	Hs6st1	AI849738	1.9↓	Jph3
AI464573	2.4↑	Atp5o	AI327085	1.5↑	Hspe1	AI835204	1.9↓	Mprs17
AI839583	2.3↑	Dffa	AI504369	1.5↑	Calm3	AI324227	1.8↓	Ywhag
AI837050	2.3↑	Aatk	AI528687	1.5↑	Itgb1	AI853721	1.8↓	Wiap
AI841577	2.2↑	Hspa9	AI850037	1.5↑	Ppp2r5c	AI847271	1.8↓	Ntan1
AI841591	2.2↑	Minpp1	AI327297	1.5↑	Tbp	AI842939	1.8↓	Tph
AI836381	2.2↑	Act1	AI596985	1.5↑	Preb	AI849117	1.8↓	Rpl10
AI848248	2.1↑	ApoE	AW322613	1.5↑	Cd164	AI843948	1.8↓	Psma3
AI462808	2.0↑	Ccnd2	AI464240	1.5↑	Misn1	AI841584	1.8↓	Ube2e3
AI465521	2.0↑	Snx1	AI851705	1.5↑	Ppp2r1a	AW412515	1.7↓	Rpl3
AI850738	2.0↑	Fbxw7	AI385718	1.5↑	Psmb8	AI661702	1.7↓	Ddx20
AI836396	2.0↑	Ptpn	AI482525	5.5↓	Chaf1a	AI842057	1.7↓	Ecap29
AW413483	2.0↑	Sh3bp2	AI604830	4.5↓	Gpr56	AI844807	1.7↓	Mrol27
AI666563	2.0↑	Sf3b1	AI506208	4.0↓	Sf100a10	AI839962	1.7↓	Mor2
AI482261	2.0↑	Sreb1	AI482475	3.5↓	Lst1	AI462730	1.6↓	Eed
AI643694	2.0↑	Cyr61	AI854799	3.0↓	Rplp1	AI324691	1.6↓	Rps3
AI838216	2.0↑	Motps1	AI482502	3.0↓	G0s2	AI849826	1.6↓	Six6
AI841815	2.0↑	Cpsf2	AI854799	3.0↓	Rplp1	AI847083	1.6↓	Pop1cb
AW413990	2.0↑	Fkbp5	AI324768	3.0↓	Krt116	AI467605	1.5↓	Ddt
AI840277	1.9↑	Vcp	AI504950	2.7↓	Abcc3	AI481879	1.5↓	Vcam1
AI503608	1.8↑	Igf1	AI325486	2.4↓	Epb4.9	AI504287	1.5↓	Pigo
AI132520	1.8↑	Drg1	AI846627	2.4↓	Adam8	AI503059	1.5↓	Bop
AI849859	1.8↑	Fhl1	AI848283	2.3↓	Pphn	AI847301	1.5↓	Rpl7a
AW214553	1.8↑	Akt1	AW227563	2.2↓	Parn	AI838492	1.5↓	Nov
AI848067	1.8↑	Cryab	AI843531	2.2↓	Crcp	AI847860	1.5↓	Sphk2
AI840074	1.8↑	G3bp2-pen	AI848940	2.2↓	Hspa8			
AI503761	1.7↑	Trai4	AI845872	2.1↓	Stk19			

ORF: open reading frame

cDNA microarray 결과와 동일하게 *Tnfrsf1a*, *Calm2*, *Bag3*, *Aatk*, *Dffa*, *Fkbp5*의 유전자의 발현은 증가되었고, *Ogg1*과 *Vcam1* 유전자의 발현은 감소되었으나, *Calm3*, *Hspe1*, *Itgb1* 유전자의 발현은 정상군의 발현량과 거의 유사하였다. 한편 실험군의 hypothalamus의 mRNA에 대한 RT-PCR결과에서는 *Tnfrsf1a*, *Calm2*, *Bag3*, *Aatk*, *Dffa*, *Fkbp5* 유전자에서 IMO stress로 증가되었던 유전자 발현이 정상수준 혹은 그 이상으로 회복되는 결과를 보였으며, IMO stress로 발현수준이 감소되었던 유전자중에서는 *Ogg1*

유전자 발현만이 정상수준으로 회복되었다(Table 4, Fig. 4).

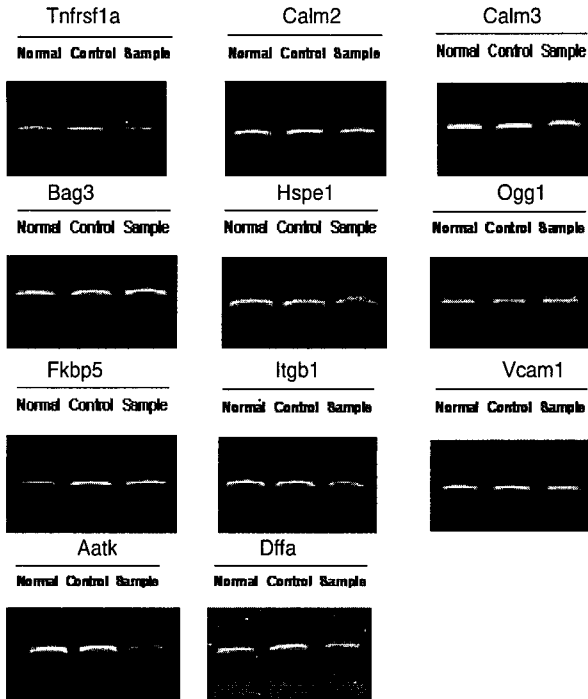


Fig. 3. Main gene connected with IMO stress using RT-PCR. Normal: Mouse with no IMO stress. Control: IMO stress mouse for 7days with saline administration. Sample: IMO stress mouse for 7days with *Boshimgeonbi-tang*

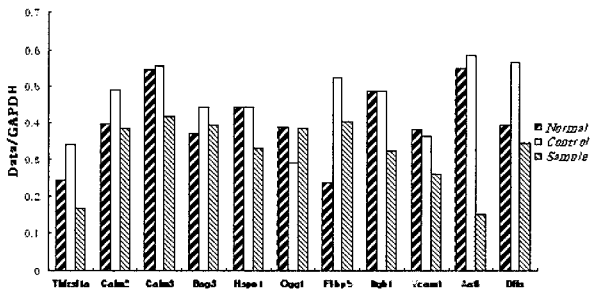


Fig. 4. Quantitative analysis of mRNA expression about main gene connected with IMO stress. Normal: Mouse with no IMO stress. Control: IMO stress mouse for 7days with saline administration. Sample: IMO stress mouse for 7days with *Boshimgeonbi-tang*.

Table 4. Quantitative Analysis of mRNA Expression about Main Gene Connected with IMO Stress

Gene	Data/GAPDH		
	Normal	Control	Sample
Tnfrsf1a	0.244378	0.339203	0.166779
Calm2	0.394931	0.489147	0.382645
Calm3	0.542879	0.549751	0.415543
Bag3	0.370667	0.443701	0.393666
Hspe1	0.443401	0.444761	0.330817
Ogg1	0.387223	0.290426	0.383786
Fkbp5	0.239033	0.521091	0.40419
Itgb1	0.485196	0.486555	0.323707
Vcam1	0.380392	0.364665	0.260468
Aatk	0.546073	0.582726	0.15331
Dffa	0.391226	0.562345	0.344666

모든 정량화는 house keeping gene인 GAPDH의 band intensity에 대해 normalized된 수치로 표현되었다(Fig. 5).

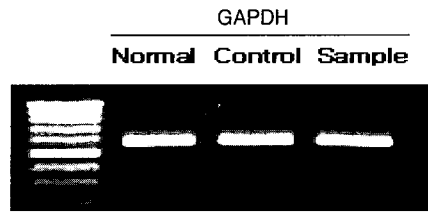


Fig. 5. House-keeping gene GAPDH using RT-PCR. Normal: Mouse with no IMO stress Control: IMO stress mouse for 7days with saline administration Sample: IMO stress mouse for 7days with *Boshimgeonbi-tang*.

고찰

Stress가 의학적 용어로 사용되기 시작한 것은 1940년 Seyle¹⁶⁾에 의해 “stress는 어떤 요구에 대한 보편적 반응”이라고 처음 소개된 이후, 많은 학자들¹⁷⁻¹⁹⁾이 이에 대해 연구를 해왔으나, 각각 관점이 다르고 저자에 따라 혹은 상황에 따라 다르게 사용되고 있다²⁰⁾.

Stress를 개체에 부담을 주는 외적 사건이나 자극으로 보는 가하면, stress인자에 대한 개체의 반응으로 보기도 하고, 또 개체와 환경간의 상호작용에 의해서 개체가 위협받는 상태로 일컬기도 한다²¹⁾.

이러한 stress를 유발하는 인자를 stressor라 하며 이는 크게 네 가지로 구분되는데 첫째, 열, 냉기, 소음, 진동 등의 물리적 인자 (physical stressor)과 모든 종류의 독성물질을 포함하는 화학적 인자 (chemical stressor), 둘째, 정서적인 부분을 자극함으로써 불안, 걱정, 공포, 좌절 등을 일으키게 하는 정신적 인자 (psychological stressor), 셋째, 해고, 별거, 파도림 등으로 표현되는 사회적 인자 (social stressor) 그리고 넷째, 저혈당, 출혈, 과도한 운동 등으로 인해 인체의 심혈관계 또는 대사 장애를 유발시키는 인자 등이 있다²²⁾. 일반적인 스트레스는 상기 네 종류의 스트레스가 혼합된 상태로 나타나며 실험용 동물에 이용되는 구속 스트레스(immobilization stress), 통증자극(painful stimulus)등의 방법도 여러 종류의 스트레스가 혼합된 상태로 나타나게 된다²²⁾.

한의학에서는 感情이나 外氣의 변화에 대한 생체의 반응을 氣의 변화로 인식하여 이를 stress 현상의 하나라고 설명하였다²⁻⁴⁾. [素問 舉痛論]²³⁾에 怒하면 氣上하고, 喜하면 氣緩하며, 悲하면 氣消하고, 恐하면 氣下하며, 驚하면 氣亂하고, 思하면 氣結한다고 하여, 七情의 偏勝이 氣機升降에 영향을 미쳐서 곧 疾病을 일으킬 수 있음을 말하였고, 또 寒하면 氣收하고, 熱하면 氣泄한다고 하여, 外氣의 變化에 氣의 움직임을 설명하였다.

한의학의 생명관에서는 人與天地相應이라 하여 인간은 자연계의 일부분으로서 불가분의 관계로 상호조화를 하여야만 생명활동의 유지가 가능하다고 보았으며 또한, 인간의 정신과 육체 역시 유기적 관계로 인식하여 상호간의 협조와 통일을 중시하여 七情과 五臟을 연결시켜 이해하고 있다. 이에 관하여 [素問 陰陽應象大論]²³⁾에 “喜傷心, 怒傷肝, 思傷脾, 悲傷肺, 恐傷腎”과 [素問

疏五過論²³⁾에 “暴樂暴苦, 始樂後苦 皆傷精氣”, “暴怒傷陰, 暴喜傷陽”이라 하여 精神과 五臟活動 관계를 설명하면서, 七情의 偏勝이 五臟의 기능을 훼손시킬 수 있음을 시사하고 있다. [醫源論]²⁴⁾에서는 七情의 偏差에 의하여 病因이 되는 것임을 지적하였다. 즉 七情은 정신활동의 한 표현방식이며, 다른 사물, 다른 환경의 영향에 의해 사람의 情志를 시시각각으로 활동 변화시키는 것이지만, 정상적 상황에서는 그 변화가 절도가 있으면 무해하지만, 균형이 깨졌을 경우에는 하나의 스트레스로 작용한다.

인간은 대인관계나 사회환경의 일정한 변화에 따라 정서적 stress를 받게 되면 즉각 신체내부의 생리적 반응을 야기하여 각종 臟器에는 일정한 기능적 변동이 자율적으로 일어나게 된다. 이러한 stress는 자율신경계를 분란시키고 인체 내분비 방어기능을 무너뜨리면서 순환기 질환을 비롯한 소화기 질환, 감염성 질환, 면역성 질환, 내분비 질환, 피부질환, 비뇨기 질환, 호흡기 질환 및 근막통증 증후군등의 전신적 병태를 초래하기도 한다^{3,25,26)}.

소아는 특히 心膽이 虛하여 사소한 자극에 쉽게 놀라게 되어 健忘, 不眠, 夢遊症, Tic, 夜尿症, 自閉症, 忿怒發作, 學習障礙, 注意力缺乏, 言語發達障礙, 知能低下등의 精神神經系 疾患이 誘發되기 쉽다^{3,27)}. 또한 소아는 성장과정에서 학교생활, 가족, 친구관계등의 여러 가지 요인으로 인하여 stress를 받으며 이로 인해 腹痛, 嘔吐, 頭痛, 神經性 頻尿, 氣管支 喘息, 神經性 食慾不振, 多動症, 他人忌避, 遺糞症, 아토피성 피부염등의 신체증상이나 행동증상으로 나타나기도 한다^{3,28-30)}. 이러한 유아기의 심각한 stress로 인하여 퇴행성 행동이나 인격발달의 미숙을 초래하기도 한다^{3,28,29,31,32)}.

補心健脾湯¹¹⁾은 正傳加味二陳湯¹²⁾과 加味溫膽湯¹³⁾을 合方하여 酸棗仁, 厚朴, 藿香, 木香을 加하고 人蔘, 柴胡, 麥門冬, 桔梗을 減한 處方으로써, 本方은 怔忡, 心煩, 不安, 焦燥, 不眠, 胃脘痞悶疼痛, 嘈雜 등의 心膽火 및 脾胃不和와 연관된 精神身體障礙에 이용할 수 있으며, 임상상 소화불량, 급만성 위염, 소화성 궤양 등의 위질환, 불안, 불면 등의 정신신경계 질환에 응용될 수 있다. 이에 補心健脾湯은 소아의 신경성 식욕부진 및 소화장애, 과민성 대장증후군등에 광범위하게 응용할 수 있는 처방이다.

補心健脾湯에 관한 연구로서는 金¹⁴⁾의 補心健脾湯과 正傳加味二陳湯의 摘出臟器, 抗潰瘍, 胃液, gastrin 分泌, 腸管輸送能 및 鎮痛, 鎮痙작용에 대한 比較 研究와 申¹⁵⁾의 補心健脾湯의 抗스트레스 效果에 관한 實驗의 研究등이 있었으나 이는 모두 행동실험, 胃의 조직검사, 胃液分泌檢査로써 유전자 발현패턴에 관한 연구는 없었다.

각종 stress에 의한 유전자 발현 연구는 현재까지 활발히 이루어지지 않았으나 다양한 외부자극에 대해 수분 이내에 반응함으로써 뇌 신경세포의 바이오 마커로 사용될 수 있는, 초기 발현 유전자 (immediate early genes, IEGs)의 일종인 fos 와 jun과 같은 전사조절인자 (transcription factor)의 발현을 mRNA 또는 단백질 수준에서 분석하는 연구들이 1980년대 후반들어 시작되어 크게는 인체의 stress 신호전달 및 반응의 축인 hypothalamus-pituitary-adrenal gland (HPA) axis의 hypothalamus나 stress 호르몬에 의한 신경세포 손상이 가장 많이 일어나는 hippocampus부위를 주요 대상으로 하여 이루어지고 있다⁵⁻¹⁰⁾.

급성 immobilization stress에 의해 heat shock proteins (HSPs)인 HSP27, crystallin- α B 등의 mRNA 발현이 증가되거나^{8,33)}, 신경세포의 생존에 필요한 BDNF, NT-3 (neurotrophin-3), NGF (nerve growth factor) 등과 같은 neurotrophin류의 발현이 뇌의 hypothalamus 나 hippocampus에서 감소 혹은 일부 증가된다는 보고들^{7,9,10)}이 최근에 이루어졌으며, cyclooxygenase-2 (COX-2), antioxidant enzyme, cell adhesion molecule, tryptophan hydroxylase (TPH), IL-1 (interleukine-1), KGF-1 (keratinocyte growth factor-1)³⁴⁻³⁸⁾등과 같이 통증, 노화, 암, 신경 전달, 상처치료등에 핵심적으로 관여하는 유전자들도 급속 stress에 의해 그 발현이 증감된다는 결과가 보고 되었으나, 모두 단편적인 개개의 유전자 발현에 대한 연구에 그친 상황이며 관련 전체 유전자 발현 패턴이나 발현된 유전자 상호간의 관련성에 대한 종합적인 연구는 보고된 바 없다.

이에 저자는 stress모델의 하나인 구속(immobilization) stress mouse 모델을 이용하여 생체 stress 반응의 중심축의 하나인 뇌의 hypothalamus에서의 유전자 발현 변화를 cDNA microarray chip을 이용하여 분석하고 stress 완화 효과적 한약 제제로 알려진 補心健脾湯에 대한 RT-PCR 분석을 하였다.

stress를 심하게 받는 동물일수록 체중이 현저하게 감소한다는 것은 이미 실험을 통하여 증명된 바³⁹⁾있으며, 본 실험에서도 실험 제 2일부터 7일까지는 대조군이 정상군에 비해 유의성(P<0.01) 있게 체중 감소가 있었으며, 실험 제 4일부터 7일까지는 실험군이 대조군에 비하여 유의성(P<0.01) 있게 체중 회복이 증가되었다.

IMO stress에 의해 그 발현이 변화되는 유전자들을 종합적으로 분석하기 위해 6천여개의 mouse 주요 유전자가 집적되어 있는 cDNA microarray chip을 사용하여 정상군과 대조군의 hypothalamus에서 뽑은 RNA를 이용하여 각각 Cy3 (red fluorescence, 대조군)와 Cy5 (green fluorescence, 정상군)으로 표지한 후 역전사반응을 일으켜 형광표시가 되도록 cDNA를 제작한 후 chip에 hybridize시킴으로써 그 발현이 증가한 (up-regulation) 유전자와 감소한 (down-regulation) 유전자를 찾아내었다. 유전자 발현의 정량적 측정 결과를 가지고 GenePix ProTManalyzing program을 이용하여 분석한 결과, 각각의 기능이 다양한 총 58개의 유전자가 1.5배에서부터 7.9배에 이르기까지 그 발현이 증가하였으며, 51개의 유전자가 1.5배에서 5.5배까지 감소된 것으로 나타났다.

대체로 Energy metabolism-, Lipid metabolism-, Apoptosis-, Signal transduction, stress protein, 그리고 transcriptional factor에 관련된 유전자들의 mRNA 발현이 증가되었고, 반면에 DNA repair-, Protein biosynthesis-, 그리고 structure integrity에 관련된 유전자들의 mRNA 발현이 감소된 것으로 나타났다. IMO stress와 관련하여 발현량이 증가된 유전자들 중에는 apoptosis와 관련된 Dffa, Aatk, Traf4, Tnfrsf1a, Bag3 등이 있으며 결국 IMO stress에 의해 apoptosis를 유발시키는 인자들의 발현이 증가한 것으로 여겨진다. Energy 및 지방 대사와 관련해서는 Atp9a, Atp2a2, Atp5o, Apoe, Srebf1, Vcp, Mbtps1, Mttp 등의 발현이 증가했으며 이는 stress response의 하나로 stress상황을 벗어나기 위해 축적된 영양분으로부터 에너지를 생산, 비축하는 생체

방어 현상으로 풀이된다. 이외에 세포신호전달(signal transduction) 기능의 유전자인 Prkar1a, Akap12, Fbxw7, Sh3bp2, G3bp2-pen, Ppp2r1a, Ppp2r5c, Ccnd2, Drg1, Mark3, Csnk1a1 등의 발현이 증가했으며, 각종 stress에 대한 방어기능을 수행하는 것으로 알려진 stress protein류로서 Hspa9, CryaB, Fkbp5, Tapbp, Hspe1 등이 증가되었고 그 밖에 각종 유전자 발현을 조절하는 transcriptional factor류로서 Tcf4, Tbp, Preb 유전자의 발현이 현저히 증가되었다.

한편, IMO stress에 의해 그 발현이 감소된 유전자로는 DNA repair에 관련된 유전자로 Chaf1a, Ogg1 등의 발현이 현저히 감소하였으며 Protein biosynthesis에 관련해서는 Rpl1, Rpl10, Mprs17, Rps28, Tph, Rpl3, Rps3, Rpl7a 등의 발현이 크게 감소되었고, 세포의 structure integrity에 관여하는 Krt1-16, Adam8, Jph3 유전자들의 발현이 감소된 것으로 나타났다. IMO stress에 따라 DNA 유전자의 외부 손상에 대한 방어기전을 수행하는 기능으로 chromatin을 구성하는 histone-DNA binding에 관여하는 chromatin assembly factor 1 (Chaf1a)와 생체 내 활성 산소 (Reactive Oxygen Species)의 공격에 의해 쉽게 변형된 8-oxoguanine base를 DNA strand에서 제거하는 효소인 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (Ogg1) 등의 발현수준이 약화됨으로써 스트레스에 의해 생체 유전자의 방어 체계는 손상되는 것으로 추정된다.

cDNA microarray chip을 이용한 분석은 가치성이 큰 대신 많은 오류 요인을 가지고 있다. cDNA microarray chip 제작상의 오류, 실험절차에서의 오류, 이미지 분석의 오류 외에도 각 실험 개체가 가지고 있는 유전적 다양성으로 인한 유전자 발현의 차이점등이 실험 결과 해석에 오류를 가져올 수 있는데, 이를 해결하기 위해서는 cDNA microarray로 얻어진 결과를 다른 실험 방법을 통하여 재검증하는 방식이다⁴⁰⁾. 실험결과와 재검증이란 예를 들어 cDNA microarray 실험으로 얻어진 결과 중에서 본인이 흥미있는 유전자를 선택하여 RT-PCR 등의 방법으로 다시 확인하는 것이다⁴⁰⁾. 이런 방식은 자칫하면 cDNA microarray 실험은 소용없다는 인식을 낳을 수 있으나, 어떤 유전자의 발현을 조사할 것인지 그 대상을 압축하여 제공한다는 점에서 실제 매우 powerful 한 것이다⁴⁰⁾. 질병의 진단에 있어 세포의 형태학적 소견이 중요한 근거이나, 실제 세포의 형태학적 소견변화에 앞서 이를 결정짓는 유전자 발현의 변화가 선행된다. 따라서 cDNA microarray를 이용하여 유전자 발현을 대규모로 검증할 경우 질환의 발생에 선행되어 나타나는 특정 유전자의 발현변화등을 찾을 수 있다. 또한 cDNA microarray 실험결과를 통하여 특정 유전자 발현경로가 임상적으로 중요한 의미를 지니고 있는 것으로 판단될 경우, 이를 target으로 하는 새로운 약물의 개발이나 평가가 이루어질 수 있다⁴⁰⁾.

본 연구에서도 cDNA microarray 분석에 의해 검증된 IMO stress로 인하여 그 발현수준이 변화된 유전자에 대해 stress 치료 효과가 있는 補心健脾湯의 영향을 유전자학적으로 분석하기 위해 실험군에 대해 동일 유전자에 대한 RT-PCR을 병행하였다.

cDNA microarray 분석 결과, IMO stress에 의해 뇌의

hypothalamus에서 그 발현이 증가되는 것으로 나타나고 일반적으로 그 기능이 알려진 Tnfrsf1a, Calm2, Calm3, Bag3, Hspe1, Fkbp5, Itgb1, Aatk, Dffa 등 9개의 유전자와 그 발현이 감소되는 것으로 나타난 유전자 중에 Vcam1와 Ogg1에 대한 RT-PCR을 병행하였다. cDNA microarray 결과와 동일하게 Tnfrsf1a, Calm2, Bag3, Aatk, Dffa, Fkbp5의 유전자의 발현은 증가되었고, Ogg1과 Vcam1 유전자의 발현은 감소되었으나, Calm3, Hspe1, Itgb1 유전자의 발현은 정상군의 발현량과 거의 유사하였다. 한편 실험군의 hypothalamus의 RNA에 대한 RT-PCR결과에서는 Tnfrsf1a, Calm2, Bag3, Aatk, Dffa, Fkbp5 유전자에서 IMO stress로 증가되었던 유전자 발현이 정상수준 혹은 그 이상으로 회복되는 결과를 보였으며 IMO stress로 발현수준이 감소되었던 유전자 중에서는 Ogg1 유전자 발현만이 정상수준으로 회복되었다.

각 유전자의 기능을 보면 Tnfrsf1a는 apoptosis기능, Calm2는 calcium ion binding하는 cell cycle기능, Bag3는 apoptosis기능, Aatk는 apoptosis 기능, Dffa는 apoptosis기능, Fkbp5는 protein folding을 하며, Calm3는 calcium ion binding하는 cell cycle, Hspe1는 stress protein에 속하고 Itgb1은 cell adhesion 기능을 하고, Ogg1는 DNA repair기능, Vcam1은 cell adhesion기능을 한다.

2002년에 발표된 미국 NIH의 Galon 그룹의 연구⁴¹⁾에 의하면 인간의 peripheral blood mononuclear cell을 대상으로 in vitro에서 stress 호르몬인 glucocorticoid를 가한 후, microarray 분석 결과 chemokine, cytokine, complement family member 들을 비롯한 innate immune/inflammation 관련 유전자들이 대체로 up-regulation된 반면 adaptive immune/cell adhesion 관련 유전자들이 감소된다는 연구결과를 발표한 바 있다. 사용된 microarray 유전자 chip과 대상 세포조직이 다르기 때문에 정확히 비교되지는 않지만 stress에 의해 apoptosis관련, 또는 세포 energy대사 관련 유전자들의 발현이 증가되는 반면, 세포구조 유지에 위한 단백질 합성 및 관련 유전자들의 발현이 억제된다는 공통된 패턴을 보였다.

생체는 stress가 가해지면 유해인자에 의해 장애가 발생할 뿐만 아니라 이를 극복하기 위한 방위반응을 보이는데 위의 실험을 통해서 IMO stress가 가해질 경우 장애로 인해 apoptosis 유전자 발현이 증가되고, 세포구조유지를 위한 단백질 합성관련 유전자, 혈관신생과 연관된 cell adhesion 유전자들의 발현이 IMO stress에 의해 억제되고, 이를 극복하기 위한 방위반응으로 스트레스를 받을 때 생체내의 여러 단백질들의 생성이 변질되어 functional하지 않은 형태로 생성되는 예가 많은데, 이때 변질되어 생기는 단백질이 정상적인 구조로 잘 생성되도록 도와주는 기능을 하는 stress protein 기능 유전자 발현이 증가한다고 볼 수 있다.

본 실험을 통해 IMO stress가 생체에 가해졌을 때, 그 발현 양상이 변화되는 유전자들이 분석되었으며 특히 Energy metabolism-, Lipid metabolism-, Apoptosis-, Signal transduction, stress protein, 그리고 transcriptional factor에 관련된 유전자들의 mRNA 발현이 증가되었고, 반면에 DNA repair-, Protein biosynthesis-, 그리고 structure integrity에 관련된 유전자들의 mRNA 발현이 감소된 것으로 나타났다. 補心健脾湯투여가

stress 유발 mouse의 hypothalamus 유전자 발현에 미치는 영향에 대한 RT-PCR결과에서는 Tnfrsf1a, Calm2, Bag3, Aatk, Dffa, Fkbp5, Ogg1 유전자 발현이 정상수준으로 회복되었다. 이는 잠재적으로 IMO stress에 대한 생체 작용기전을 규명하는데 유전적 자료를 제공할 수 있고, 또한 stress 예방 및 치료제 개발을 위한 유전자 수준의 drug target을 제공함이 드러났으며, 더 나아가 본 실험을 통해 그 변화가 확인된 유전자들의 profile을 이용하여 補心健脾湯과 같은 한방 치료제제의 치료효과를 객관적으로 검증할 수 있는 약리효능 검증용 functional DNA chip 및 분석 체계를 개발하는데 활용될 수 있으리라 사료된다.

결 론

補心健脾湯투여가 Stress 유발 Mouse의 Hypothalamus 유전자 발현에 미치는 영향을 cDNA microarray, RT-PCR를 통하여 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

실험 제 1일은 정상군의 체중은 증가했으나 실험군과 대조군은 체중이 감소했으며 실험 제 2일부터 7일까지는 대조군이 정상군에 비해 유의성 있게 체중 감소가 있었으며, 실험 제 4일부터 7일까지는 실험군이 대조군에 비하여 유의성 있게 체중이 회복되었다. cDNA microarray chip을 사용하여 나타난 IMO stress를 가진 대조군의 유전자 발현에 있어서 각각의 Energy metabolism-, lipid metabolism-, apoptosis-, signal transduction, stress protein, 그리고 transcriptional factor에 관련된 총 58개의 유전자가 1.5배에서부터 7.9배에 이르기 까지 그 발현이 증가하였으며, 반면 DNA repair-, protein biosynthesis-, and structure integrity 관련된 51개의 유전자는 1.5배에서 5.5배까지 감소된 것으로 나타났다. cDNA microarray chip을 이용하여 나타난 유전자의 발현수준 변화결과를 한번 더 확인하기 위해 다시 11개의 유전자를 선택하여 RT-PCR을 수행한 결과 Tnfrsf1a (apoptosis), Calm2 (cell cycle), Bag3 (apoptosis), Aatk (apoptosis), Dffa (apoptosis), Fkbp5 (protein folding)의 유전자들이 IMO stress에 의해 그 발현이 증가되었으나, Calm3(cell cycle), Hspe1(stress protein), Itgb1(cell adhesion)의 유전자는 정상군의 발현량과 유사하였고, Ogg1(DNA repair)과 Vcam1(cell adhesion) 유전자가 그 발현이 감소되었다. 실험군의 hypothalamus의 mRNA에 대한 RT-PCR결과에서는 Tnfrsf1a (apoptosis), Calm2 (cell cycle), Bag3 (apoptosis), Aatk (apoptosis), Dffa (apoptosis), Fkbp5 (protein folding), Ogg1(DNA repair) 유전자만이 정상수준으로 회복되는 결과를 보였다.

참고 문헌

1. 徐舞圭. 成人病, 老人病學, 서울, 고려의학, p 6, 1992.
2. 김상호. 동의신경정신과학, 서울, 행림출판사, p 140, 146, 394, 1980.
3. 黃義完. 心身症, 서울, 행림출판사 p 33, 43, 48, 1985.
4. 김기석. 腦, 서울, 성원사 pp 108-121, 149-153, 1989.

5. Senba, E. and Ueyama, T. Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci. Res.*, 29:183-207, 1997.
6. Reyes, T.M., Walker, J.R., DeCino, C., Hogenesch, J.B. and Sawchenko, P.E. Categorically distinct acute stressors elicit dissimilar transcriptional profiles in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neurosci.* 23:5607-5616, 2003.
7. Smith, M.A., Makino, S., Kvetnansky, R. and Post, R.M. Stress and glucocorticoids affect the expression of the brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J. Neurosci.*, 15:1768-1777, 1995.
8. Yun, S.J., Hahm, D.H. and Lee, E.H. Immobilization stress induces the expression of alphaB-crystallin in rat hippocampus: implications of glial activation in stress-mediated hippocampal degeneration. *Neurosci. Lett.*, 324:45-48, 2002.
9. Rage, F., Givalois, L., Marmigere, F., Tapia-Arancibia, L., Arancibia, S. Immobilization stress rapidly modulates BDNF mRNA expression in the hypothalamus of adult male rats. *Neurosci.* 112:309-318, 2002.
10. Schaaf, M.J., de Jong, J., de Kloet, E.R. and Vreugdenhil, E. Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone, *Brain Res.* 813:112-120, 1998.
11. 宋炳基. 方證新編, 서울, 東南出版社, pp 595-596, 1983.
12. 虞 搏. 醫學正傳, 서울, 성보사, p 69, 1986.
13. 許 俊. 東醫寶鑑, 서울, 남산당, p 188, 1986.
14. 金珍成. 補心健脾湯과 正傳加味二陳湯의 摘出臟器, 亢瀆瘍, 胃液, gastrin 分泌, 腸管輸送能 및 鎮痛, 鎮痙작용에 대한 比較 研究: 대한한방내과학회지 21(1):87-99, 2000.
15. 申容澈. 補心健脾湯의 抗스트레스 效果에 관한 實驗의 研究, 경희대학교 대학원 박사학위논문, 1991.
16. 이종목. 직무스트레스의 원인 결과 및 대책, 서울, 星苑社, pp 19-20, 1989.
17. 文洗模. stress에 관한 동서의학적 고찰, 대전대학교논문집, 4(2):301-305, 1987.
18. 이민규. 스트레스 그 원인과 대책, 서울, 중앙적성출판사, p 56, 1988.
19. Cox, T. Strsss, Hong Kong, The macmillian press, pp 58-62, 1978.
20. 황애란. 생리학, 서울, 고려의학, pp 9-10, 1986.
21. 郭東日. 神經精神科學, 서울, 하나의학사, pp 415, 445-446, 449, 1997.
22. Pacak, K. and Palkovits, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders, *Endocrine Rev.* 22:502-548, 2001.
23. 洪元植. 精校黃帝內經, 서울, 傳統文化研究會, pp 234-241, 514, 1992.
24. 李濟馬. 東醫壽世保元, 서울, 杏林출판사, p 27, 1970.
25. 문충모. Stress에 관한 문헌적 고찰, 동의신경정신과학회지

- 2(1):38-50, 1991.
26. 대한심신스트레스학회 편. 스트레스 과학의 이해, 서울, 신광출판사, pp 11-19, 149-158, 270-284, 1997.
 27. 黃義完. 東醫精神科學, 서울, 현대의학서적사, pp 53-56, 87-94, 99-109, 617, 619, 624, 651-657, 727, 751, 783, 786-787, 1987.
 28. 丁奎萬. 東醫小兒科學, 서울,杏林出版社, pp 99-104, 1985.
 29. 筒井末春. 心身醫學入門, 東京, 南出堂, pp 240-246, 1987.
 30. 金祺峰, 金璋顯. 소아 stress에 관한 문헌적 고찰, 大韓韓方小兒科學會誌 16(1):106-117, 2002.
 31. Werkman, S.L. Psychiatry disorder of Adolescent, American Handbook of Psychiatry(2nd Ed), New York, Basic Book Inc, pp 223-248, 1974.
 32. Forman, M.A., Kerschbaum, W.E., Hetznecker, J.M. Nelson textbook of Pediatrics(13th Ed), Philadelphia, WB Saunders Co, pp 35-37, 1987.
 33. Vamvakopoulos, N.C., Fukuhara, K., Patchev, V. and Chrousos, G.P. Effect of single and repeated immobilization stress on the heat shock protein 70/90 system of the rat: glucocorticoid-independent, reversible of Hsp90 in the liver and spleen. Neuroendocrinol., 57:1057-1065, 1993.
 34. Chamas, F. and Sabban, E.L. Role of the 5' untranslated region in the tissue-specific regulation of rat tryptophan hydroxylase gene expression by stress., J. Neurochem., 82:645-654, 2002.
 35. Mercado, A.M., Quan, N., Padgett, D.A., Sheridan, J.F. and Marucha, P.T. Restraint stress alters the expression of interleukine-1 and keratinocyte growth factor at the wound site: an in situ hybridization, J. Neuroimmunol., 129:74-83, 2002.
 36. Oishi, K. and Machida, K. Different effects of immobilization stress on the mRNA expression of antioxidant enzymes in rat peripheral organs. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 62:115-121, 2002.
 37. Venero, C., Tilling, T., Hermans-Borgmeyer, I., Schmidt, R., Schachner, M. and Sandi, C. Chronic stress induces opposite changes in the mRNA expression of the cell adhesion molecules NCAM and L1., Neurosci., 115:1211-1219, 2002.
 38. Ueyama, T., Saika, M. and Senba, E. Distinct gene expression in the stomach following stress and alcohol exposure, Kaibogaku Zasshi, 76:435-441, 2001.
 39. 金祺峰. 分心氣飲加減方이 母性分離 Stress 白鼠에 미치는 影響, 동의생리병리학회지, 19(5):1303-1310, 2005.
 40. 김진혁. cDNA microarray, 천식 및 알레르기 21(3):473-475, 2001.
 41. Galon, J., Franchimont, D., Hiroi, N., Frey, G., Boettner, A., Eehart-Bornstein M., O'shea J.J., Chrousos G.P., and Bornstein S.R. Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. FASEB J. 16:61-71, 2002.