

피로형 미병에 대한 당귀보혈탕의 효과

박선행¹⁾ · 성윤영¹⁾ · 장 설¹⁾ · 이시우¹⁾ · 김홍준^{2)*} · 김호경^{1)*}

¹⁾ 한국한의학연구원, ²⁾ 우석대학교 한의학과

Effect of Dang Gui Bo Hyul-tang on fatigue types of Mibyeong

Sun Haeng Park¹⁾, Yoon-Young Sung¹⁾, Seol Jang¹⁾, Siwoo Lee¹⁾,
Hong Jun Kim^{2)*} & Ho Kyoung Kim^{1)*}

¹⁾ Mibyeong Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu,
Daejeon, 305-811, Republic of Korea

²⁾ College of Korean Medical, Woosuk University61, Seonneomeo 3-gil, Wansan-gu, Jeonju-si,
Jeollabuk-do, 54986, Republic of Korea

Abstract

Objectives : Mibyeong is a korea medicine have original concept of the disease. However, no previous report has effect of mibyeong herbal medicine in fatigue types of mibyeong. This study investigated the question of whether Dang Gui Bo Hyul-tang(DGBHT) of effect on fatigue types of Mibyeong.

Methods : C57BL/6 mice were randomaly divided into three group (n=10). The mice were then group (1) Nocontrol, (2) Restraunt stress(veh), (3) Dang Gui Bo Hyul-tang 200mg/kg. The administered Dang Gui Bo Hyul-tang 200mg/kg or distilled water (orally) 1 hr prior to daily exposure to repeated restraint stress (2 h) for 15 days. The performed behavior test (*Mechanical hyperalgesia test*, *Open-field test*, *Forced swimming test*, *Sucrose preference test* and immunostaining and biochemical measured in serum.

Results : Stress fatigue induced mices significantly increased lethargic, hyperalgesia through behavior test (*Mechanical hyperalgesia test* (decrease 43%), *Open-field test* (4,809 ± 226.13 cm vs. 3121 ± 226.64 cm), *Forced swimming test* (11.45 ± 3.96 vs. 79.10 ± 8.12 sec), *Sucrose preference test* (decrease 58%)). In addition, chronic fatigue model evidently increased corticosterone level (122.54 ± 18.88 vs. 186.94 ± 18.26 ng/ml), AST level (46.22 ± 3.23 vs. 31.40 ± 3.86 U/L), ALT level (38.78 ± 5.72 vs. 17.60 ± 1.30), liver necrosis, lateral ventricle size. These alterations were significantly ameliorated by DGBHT. DGBHT significantly attend the elevated serum concentrations of corticosterone (155.90 ± 6.29 ng/ml), AST (31.40 ± 3.86 U/L), ALT (17.60 ± 1.30 U/L). Moreover, DGBHT improved lethargic, hyperalgesia when compared the stress fatigue (*Mechanical hyperalgesia test* (improve 28%), *Open-field test* (4,038 ± 615.81 cm), *Forced swimming test* (7.56 ± 1.88 sec), *Sucrose preference test* (increase 21%))

Conclusions : Theses result suggest that DGBHT have improved lethargic, hyperalgesia and fatigue-associated hormone and liver protective on stress fatigue model. It will be necessary to research to present evidences

• 접수 : 2016년 11월 16일 • 수정접수 : 2016년 12월 2일 • 채택 : 2016년 12월 16일

*교신저자 : Dr. Ho Kyoung Kim, 대전시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 미병연구단
전화 : +82-42-868-9502, 팩스 : +82-42-868-9294, 전자우편 : hkkim@kiom.re.kr
Dr. Hong Jun Kim, 전라북도 전주시 완산구 어은로 46 우석대학교 한의과대학 방제학교실
전화 : +82-63-290-9028, 팩스 : +82-63-291-1240, 전자우편 : kimboncho@woosuk.ac.kr

on benefits and effects of Korean medical treatment for Mibyeong through clinical researches based on benefits and effects of those animal models.

Key words : Mibyeong, Dang Gui Bo Hyul-tang, stress, Pain, Fatigue

I. 서론

미병(未病)은 황제내경(黃帝內經), 사기조신대론(四氣調神大論) 등에 “미병을 다스린다(治未病)”의 표현으로 언급되어 이미 병든 상태를 다스린다기보다는 병들기 전에 먼저 다스린다는 현대의 예방의학적 의미가 내포되어 있는 개념이다.¹⁴⁾

미병에 대한 연구는 동양의 중국, 일본, 한국을 중심으로 진행되고 있다. 중국은 미병의 개념으로 건강한 상태부터 질병 후 회복까지로 보고 있으며 건강과 질병 사이의 상태인 아건강(亞健康)이라 하여 치미병 센터를 운영하고 있으며¹⁻²⁾ 일본은 동양의학의 자각증상과 서양의학의 검사수치를 기준으로 하여 미병(Mibyou)을 Sub-health condition의 개념으로 생각하여 노화와 연관된 질환 등을 예방하는 것을 목적으로 하고 있으며 미병시스템학회를 중심으로 미병에 대한 연구를 진행하고 있다.^{3,5)}

한국의 미병연구는 미병 개념 및 미병의 변증유형을 정리하고 해당 변증유형과 동의보감에 있는 관련 변증과 비교하는 연구를 하였고⁴⁾ 미병의 분류 및 평가기준을 제시하고자 다양한 임상데이터를 확보하여 바이오마커에 대한 연구를 진행하고 있다.

3국 중 가장 많은 연구가 진행된 중국은 임상연구뿐만 아니라 다양한 동물실험 모델을 이용한 실험이 이루어지고 있다.⁸⁻¹¹⁾ 이러한 동물실험모델의 상당수가 만성피로모델을 활용한 미병동물실험이 이루어지는데 이는 미병의 호소증상의 대표적인 증상이 피로이기 때문이다.⁸⁻⁹⁾ 하지만 국내 연구의 대부분은 임상연구를 위한 근거확보 쪽에 치우쳐 있고 미병을 다스리기 위한 약물이나 치료방법의 효능을 검증하기 위한 방법이 이루어지지 못하고 있다.

이에 본 연구팀은 미병의 증상 가운데 사람들이 가장 많이 호소하는 피로 증상을 개선시킬 수 있는 처방으로 당귀보혈탕(Danguiboehyul-tang)을 선정하고 이의 효

과를 검증하고자 하였다. 검증 방법으로는 중국의 실험동물 모델과 실험방법으로 제시한 것을 종합하여 동물 실험방법을 설계하여 당귀보혈탕의 효과를 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 7 주령의 수컷 C57BL/6 마우스(♂) 중앙동물실험, 서울)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물의 사육 온도는 $23.2 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$ 내외 명암 주기 12시간(오전 8시) 주기로 일정하게 유지된 사육실에서 한 케이지 당 5마리씩 넣어 사육하였다. 모든 실험동물은 실험 시작 7일 전부터 이러한 방식으로 다루어졌다. 동물실험은 미국 NIH(National Institute of Health)의 실험동물취급지침인 Guide for the care and Use of Laboratory Animals의 규정에 따랐으며 한국한의학연구원(KIOM) 실험동물윤리위원회의 승인(Kiom 15-099)과 통제 하에서 이루어졌다.

동물 실험 군은 총 3개의 군으로 (1) 정상군(n=10) (2) 스트레스 유발군(대조군, n=10) (3) 당귀보혈탕 200 mg/kg 투여군(n=10) 으로 나누어졌다. 당귀보혈탕은 매일 오전 10:00시 2주간 경구투여하였으며 정상군, 약물투여 없이 스트레스만 주는 대조군은 동일한 용량에 생리식염수를 경구투여 하였다.

2) 약재

본 실험에서 사용된 약재는 (주)옴니허브(대구, 한국)로부터 구입하여 사용하였으며, 우석대학교 한의학과 방제학 교실의 확인을 거쳐 사용하였고 표본은 연구원에 보관되어 있다(Table 1).

Table 1. Composition of Dang Gui Bo Hyul-tang

Scientific name	Herb name	Amount (g)
<i>Angelica acutiloba</i>	日當歸	40
<i>Astragalus membranaceus</i>	黃芪	200

3) 분석시약 및 기기

HPLC 분석을 위한 acetonitrile과 water는 HPLC 용 특급용매로, trifluoroacetic acid(TFA)는 분석용 등급의 용매로 각각 J.T. Baker(USA)와 (주)대정화금에서 구입하였다. Caylcosin-7-O-β-D-glucopyranoside, ononin, calycosine, 8-methoxypsoralen 및 formononetin 표준품들은 케이오씨바이오텍으로부터 구입하여 사용하였다. HPLC 분석은 Waters 2695 및 996 photodiode array detector에 의하여 수행하였다.

2. 방법

1) 추출물의 제조

당귀보혈탕 약재(일당귀 40g, 황기 200g) 240g (Table 1)을 경서 무압력 순환식 추출기(TOWER KS-220)에 물 1.2L를 넣고 180분 추출한 뒤, 여과지(Whatman No.2)로 여과한 후 감압농축기(N-1200A, EYELA, CO. LTD, Japan)를 이용하여 농축 후 동결 건조기(PF-10/ALPHA 1-2LD, Germany)를 이용하여 건조추출물 27.5 g을 얻었다.

2) HPLC 분석

당귀보혈탕을 20 mg/ml로 80% 메탄올에 용해한 후, PVDF syringe filter를 사용하여 여과한 후 HPLC 분석에 사용하였다. Optima pak C18 column(5 um, 4.6 mm x 250 mm)을 사용하여 수행되었으며, 칼럼의 온도는 40℃로 유지하였고, 검출은 PDA detector를 사용하였다. 이동상은 acetonitrile (A) 및 0.1% TFA 함유 water (B)를 이용한 gradient system으로 table 2과 같이 최적화 하였고, 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 20 ul로 하였다.

당귀보혈탕 중 지표성분 caylcosin-7-O-β-D-glucopyranoside, ononin, calycosine, formononetin

및 8-methoxypsoralen의 함량분석을 위해 이들 표준품들은 12.5, 25, 50, 100, 200 ug/ml의 농도로 제조하고, 당귀보혈탕의 농도는 20 mg/ml로 하여 HPLC 분석을 시행한 후 표준품의 양과 peak area 사이의 상관관계를 도출하여 검량선을 작성하여 계산하였다 (Table 2).

Table 2. The solvent elution condition for HPLC analysis of Dang Gui Bo Hyul-tang

Time (min)	Acetonitrile (A)	0.1% TFA (B)
	10	90
10	10	90
50	50	50
52	100	0
62	100	0
65	10	90
75	10	90

3) 마우스 구속 스트레스 유발

구속 스트레스를 유발하기 위해 각 실험동물들의 호흡을 위해 앞쪽에 작은 구멍을 뚫어 놓은 안지름 30 mm * 길이 100 mm 의 아크릴 원통형 구속 장치에 매일 오전 11시부터 오후 14시까지 3 시간, 15 일 동안 구속 장치에 가두었다.¹²⁻¹³⁾ 스트레스 노출이 종료된 후 실험동물은 원래의 사육장으로 복귀 시키고 일반적인 사육환경을 유지하였다.

4) 구속 스트레스를 일으킨 마우스에서 몸무게 변화 측정

실험기간 중 실험동물의 몸무게 변화 관찰을 위하여 주 1 회 전자저울로 체중을 측정하였다.

5) 구속 스트레스로 인한 행동테스트 변화 관찰

실험기간 중 실험동물의 행동변화를 관찰하기 위하여 주 1 회 각각의 행동테스트를 실시하였다.

(1) Open-field test

실험동물이 새로운 공간에 노출된 경우 나타나는 탐색행동을 측정하였다. 본 실험은 30 x 30 x 30 cm의 검은 아크릴 상자로 된 open field 장치에 실험동물을

30분간 노출 시킨 후 30 분 동안 총 이동 거리, 중앙에서 머문 비율을 측정하였다. 본 연구에 사용된 open field 장치는 중앙부 천장에 설치된 카메라와 자동 추적 장치(Ethnovision XT9[®], Noldus, Wageningen, Netherlands)를 이용하여 분석하였다.

(2) Forced swimming test

강제수영검사는 탈출할 수 없는 수조에서 나타나는 무력의 정도를 검사하는 도구로서 주로 항우울의 효과를 측정하기 위한 실험이다. 높이 27.5 cm x 직경 18 cm 되는 원통형 수조에 온도 25 °C의 물을 25 cm가 되게 채운 후 실험동물을 한 마리 씩 수조에 넣고 총 4 분 중 최초 1분은 적응시간으로 측정하지 않고, 마지막 3 분 동안의 실험동물의 패턴별로 운동시간을 측정하였다. Swimming은 활동적으로 수영을 하고 있는 경우, immobility은 최소한의 움직임만 보이며 세발 움직이지 않거나 뒷발 중 하나를 이용하여 부여하는 경우로 정의하였다.

(3) Sucrose preference test

실험동물의 1% 자당용액 섭취량 변화를 통하여 우울 증 감정반응 검사 중 하나인 자극에 대한 무쾌감 반응을 지표로 측정하였다. 검사 15시간 전 절수, 절식을 시켰으며, 검사당일 1% 자당용액과 물은 1 시간 동안 자유롭게 섭취하도록 하여 모두 같은 조건을 동일하게 적용하여 총 자당 소모량을 측정하였다.

(4) Mechanical hyperalgesia test

실험동물의 기계적 동통의 역치를 평가하는 실험으로 실험동물을 금속철망 위쪽에 위치한 검은 플라스틱 상자 안에 넣은 뒤, 환경변화 적응을 위해 5 분 동안 적응 시켰다. 동물이 적응된 후 Von Frey filament가 부착된 자극기(Ugo-Basile 37450 and Ugo-Basile 37450-275, Comerio, Italy)를 이용하여 철망 사이로 필라멘트를 발바닥에 가해주면서 발의 회피반응 여부를 조사하였다.

6) 혈액채취 및 측정

모든 실험동물을 처사하기 15 시간 전 절식 시킨 후, 대동맥에서 혈액을 각 500~1000 µl씩 채취하고 blood collection tube(BD 365967, NJ, USA) 넣은 뒤 상온

에서 1 시간 방치 후 4 °C, 13,000 rpm, 10 분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였으며, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)는 자동 생화학분석기(Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였으며, Corecosterone은 ELISA Kit(Demeditec, Kiel-wellsee, Germany)를 이용하여 측정하였다.

7) Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색

실험동물을 마취시킨 후 뇌·간 조직을 적출하여 여러 차례 PBS로 세척하여 혈액과 이물질을 제거 한 뒤 10 % 포르말린에 24 시간 고정하였다. 파라핀 조직 절편을 제작한 뒤 4 µm 의 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켰다. 그 후, hematoxylin으로 핵 염색을 한 후 eosin을 이용하여 세포질을 염색하였다. 이후 슬라이드를 봉입하여 광학현미경(Olympus optical Co., Tokyo, Japan)을 통해 사진 촬영을 하였다.

8) 통계처리

통계분석은 SigmaPlot software version 12.5, 2015(Systat Software Inc. San Jose, USA)프로그램을 사용하였다. 실험군별의 차이의 유의성 검증은 One-way ANOVA 와 student's t-test 사용하였고, 모든 통계적 유의성은 p값이 0.05 미만일 때 인정하였다.

III. 결 과

1. 당귀보혈탕 지표성분 분석

HPLC-PDA를 이용하여 당귀유래 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside, ononin, calycosine, formononetin 및 황기유래 8-methoxypsoralen에 대한 동시분석조건을 설정하여 함량을 분석하였다. 검량선의 상관관계(r^2)는 0.99 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다. 분석결과 calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside, ononin, calycosine, formononetin 및 8-methoxypsoralen의 피크는 각각 24.5, 32.2, 35.6, 44.7, 및 41.0 min에서 나타났으며 함량은 각각 0.48, 0.18, 0.11, 0.04 및 0.01 mg/g으로 나타났었다(Fig.1).

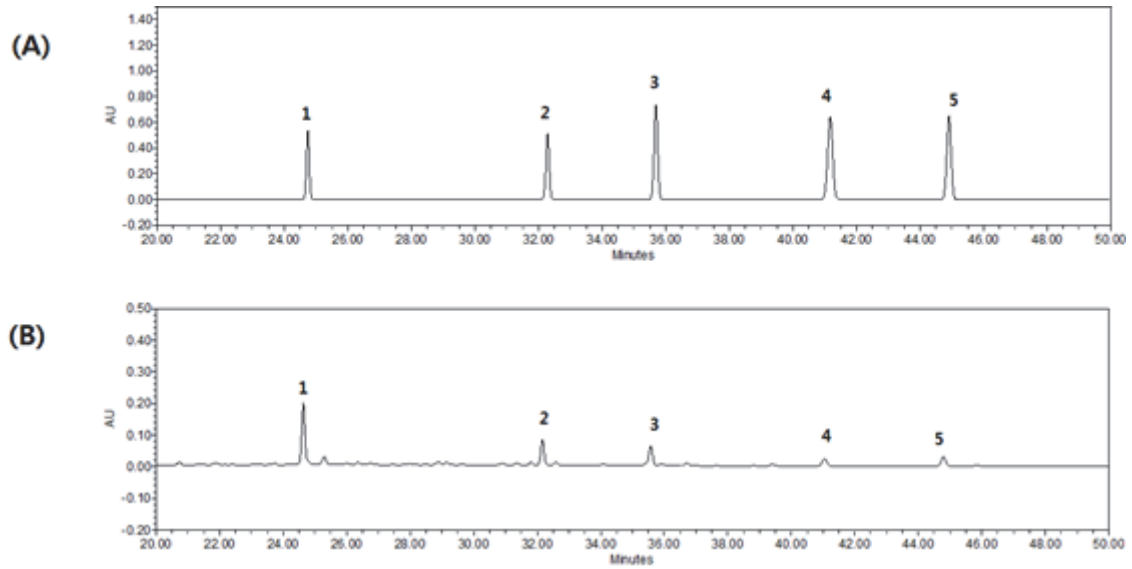


Figure 1. HPLC chromatograms of five standards mixture (A) at 250 nm and Dang Gui Bo Hyul-tang. Caylcosin-7-O-β-D-glucopyranoside (1), ononin (2), calycosine (3), 8-methoxypsoralen (4), and formononetin (5) were appeared at the retention time of approximately at 24.5, 32.2, 35.6, 41.0, and 44.7 min, respectively.

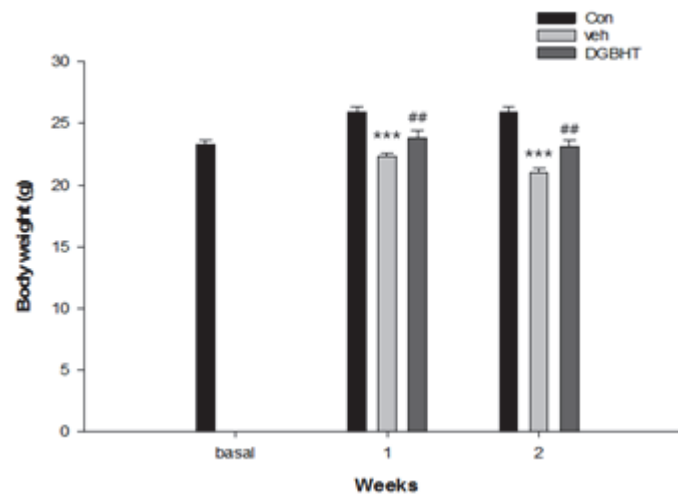


Figure 2. Effects of Dang Gui Bo Hyul-tang on Bodyweight in fatigue-induced mice.

Mice (7 weeks old) were restraint stree for 3 h after adiministered with DGBHT. (A) Body weight was measured every week for 2 weeks. Values are mean \pm SEM. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. Cont; $###p < 0.001$ vs. veh. Con, Control; veh, vehicle (Restrirent stress); DGBHT, Dang Gui Bo Hyul-tang.

2. 피로가 유발된 쥐에서 몸무게 변화

실험 초기 체중은 23.3 g 이었으나, 구속 스트레스 진행 2 주 후, 실험군들의 체중은 정상군에 비해 약 20 % 감소하였다. 그러나 당귀보혈탕 투여군의 체중은 투여가 진행됨에 따라 정상군과 비교하였을 때 체중이 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

3. 피로가 유발된 쥐에서 행동변화 관찰 및 당귀보혈탕의 효과

1) Open-field test

Lcomotor activity는 실험동물의 활동성을 측정하는 장치로 약물이 동물의 활동성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하는 실험방법이다. 실험 전날, 최초 노출 되

었을 때 총 이동거리는 $6,861 \pm 669.62$ cm였으며, 1주차 때, 정상군에 비해 실험군의 활동성이 유의성 있게 감소하고 있음을 확인하였다($5,924 \pm 468.43$ cm vs. $4,714 \pm 152.31$ cm). 그러나 당귀보혈탕 투여군의 총 이동거리는 5914 ± 617.21 cm로 활동성의 증가를 나타내었다. 2주차에도 동일하게 실험군의 활동성이 정상군에 비해 감소되었음을 확인하였으며($4,809 \pm 226.13$ cm vs. 3121 ± 226.64 cm), 그에 비해 당귀보혈탕 투여군은 활동성이 증가되는 것으로 관찰되었다($4,038 \pm 615.81$ cm). 또한, field의 중앙 지점을 지나간 횟수도 유의성 있게 증가하였다(Fig 3-A, B).

2) *Forced swimming test*

강제수영에서 실험동물의 행동이 소실되는 학습된 무력(learned helplessness)의 시간을 측정된 결과, 정상군에 비해 대조군의 부동 상태 시간은 68초 더 오래 지속되었으나(11.45 ± 3.96 초 vs. 79.10 ± 8.12 초), 약물투여군에서는 정상군보다 부동상태 시간이 더 짧은 것을 확인할 수 있었다(7.56 ± 1.88 초). 정상군에 비해 구속스트레스의 경험은 행동소실 시간이 증가되

었다는 것을 알 수 있었으나, 특히, 당귀보혈탕 투여군은 부동상태의 정도가 정상군보다 더 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig 3-C).

3) *Sucrose preference test*

무쾌감 반응에 대한 확인 지표인 Sucrose preference 실험에서 각 그룹별 sucrose 선호도는 정상군과 비교해보았을 때 대조군은 약 58% 감소되었으며, 당귀보혈탕 투여군은 정상군과 비슷하게 선호도가 나타났다. 따라서, 당귀보혈탕 투여군은 대조군에 비해 sucrose 선호도에 대한 회복율이 높은 것을 관찰할 수 있었다(Fig 3-D).

4) *Mechanical hyperalgesia test*

구속 스트레스 후 발생하는 기계적 과민통 반응을 발회피역치를 측정하여 관찰하였다. 발회피역치는 구속스트레스를 일으킨 1주차부터 정상군에 비하여 감소하였고, 이러한 감소는 2주차 실험에서도 더 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 그에 비해, 당귀보혈탕 투여군

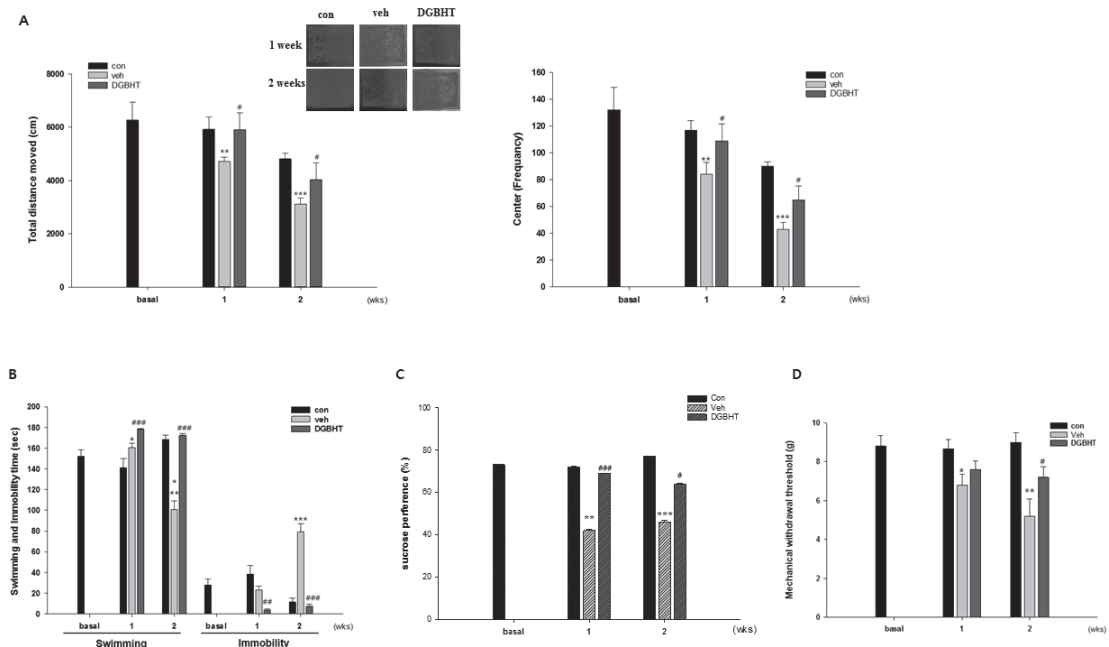


Figure 3. Effect of Dang Gui Bo Hyul-tang on behavior test in fatigue-induced mice.

Behavior test performed once a week. (A)(B) *Open-field test*, (C) *Forced swimming test*, (D) *Sucrose preference test*, (E) *Mechanical hyperalgesia test* Values are mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Cont; ### $p < 0.001$ vs. veh, Con, Control; veh, vehicle (Restrirent stress); DGBHT, Dang Gui Bo Hyul-tang.

은 대조군과 비교했을 때 발회피역치 감소 양상에서 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-E).

4. 피로가 유발된 쥐에서 혈청 중 Corticosterone 및 간 기능 변화

스트레스 관련 호르몬으로 알려진 Corticosterone 와 간 기능 관련 인자인 AST, ALT의 완화효과를 알아보기 위해 구속스트레스 실험 진행 후 실험동물의 혈청을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 정상군과 비교하여 대조군의 Corticosterone, ALT, AST의 함량은 유의적인 증가를 보였고 대조군에 비해 당귀보혈탕 투여군의 혈청 Corticosterone, ALT, AST의 함량은 유의적으로 감소하였다. 게다가, 당귀보혈탕의 투여군은 대조군이 비해 Glucose 함량도 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Table. 3).

5. H&E 염색을 통한 당귀보혈탕의 효과

간 조직의 면역조직화학 염색 판독 결과를 보면 구속스트레스에 노출된 대조군의 간에서 피막 밑 괴사와 염증, 간실질 내 광범위한 괴사, single necrosis, 또한 일부 표면에 화농성 염증과 세균집락이 관찰되었다. 그에 비해, 당귀보혈탕 투여군은 정상군과 별 차이가 없었으며 일부에서 간혹 간 손상 병변의 정도가 미약하게 관찰되는 것으로 보아 당귀보혈탕은 스트레스로 인한 간 손상에 대한 간 보호효과가 있음을 알 수 있다 (Fig. 4-A). 뇌 조직의 면역조직화학 염색 판독 결과, 뇌의 앞쪽 절편에서 측 뇌실 평균크기가 대조군에서 뇌실 크기가 가장 크게 나타났으나 당귀보혈탕 투여군에서는 뇌실크기가 정상군과 비슷하였다(Fig. 4-B).

Table 3. Effect of Dang Gui Bo Hyul-tang on biochemical parameters in the serum of fatigue-induced mice.

	Coritcosterone (ng/mL)	Glucose (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	BUN (mg/dL)
Con	122.54±18.88	237.33±20.45	29.67±0.77	23.60±4.31	23.92±1.32
Veh	186.94±18.26*	280.60±19.81	46.22±3.23***	38.78±5.72*	19.70±0.35
DGBHT	155.90±6.29#	84.17±22.31###	31.40±3.86##	17.60±1.30###	22.50±1.76

Values are mean ± SEM.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. Con; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. veh.

Con, Control; veh, vehicle (Restraint stress); DGBHT, Dang Gui Bo Hyul-tang.

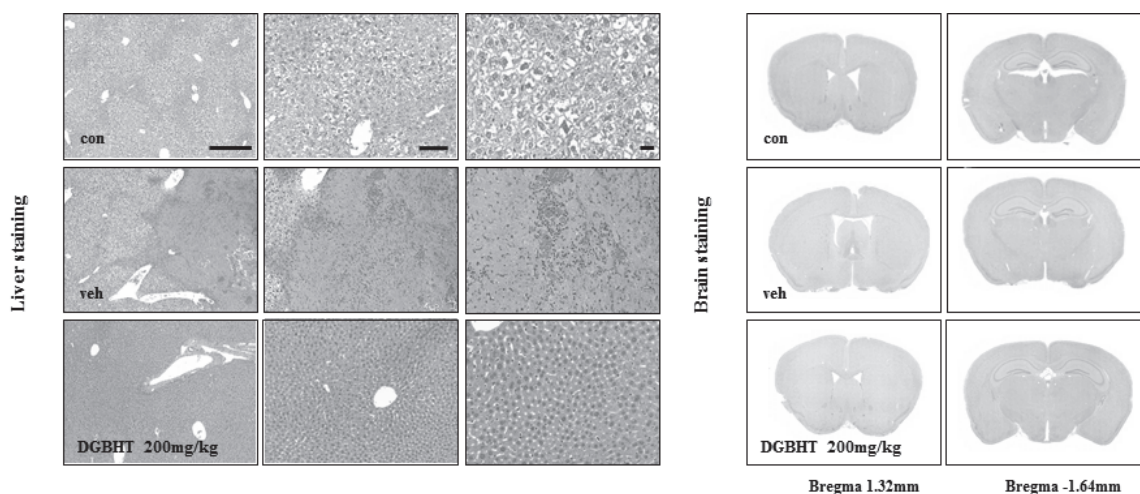


Figure 4. Effect of Dang Gui Bo Hyul-tang on necrosis of liver and brain in restraint stress mice. H&E stained sections of (A) liver and (B) brain. All magnifications: (liver) 50x, 100x, 200x (brain) 10x. Con, Control; veh, vehicle (Restraint stress); DGBHT, Dang Gui Bo Hyul-tang.

IV. 고찰

미병(未病)은 한의학적으로는 황제내경(黃帝內經)에서 그 개념적 언급을 하였을 정도로 보편화된 개념으로 이미 병든 상태를 다스린다고 보다는 병들기 전에 먼저 다스린다는 현대의 예방의학적 의미가 내포되어 있는 개념이다.¹⁴⁾

고령화 사회로 접어들면서 예방적인 의료의 개념이 점차 증가될 것으로 보이며 이런 측면에서 미병의학적 접근은 중요하다고 할 수 있다.

서양의학적 측면에서 미병은 MUS(Medically Unexplained Symptoms)로 의학적으로 설명되지 않는 증상들의 의미로 불리고 있고 미병은 건강과 질병의 사이에 상태를 의미한다.⁵⁾ 서양의학에서는 아직까지 적극적인 치료의 범주로 미병을 분류하고 있지 않고 있지만 한의학에서는 미병 또한 질병의 상태로 인식하고 현대의학적으로 질병이 확인되지 않은 시기인 미병기에도 적극적 치료를 시작한다는 측면에서 한의학의 미병사상은 진정한 예방의학이라고 할 수 있다.⁶⁾

국내에서 미병의 개념은 건강의 범위를 넘어서 질병으로 진행되려는 초기 단계로 환자의 자각증상이 없거나 있다 하더라도 무시할만한 증상이 나타나는 단계로 정의*하고 있으며 관련 연구는 아직까지 많이 이루어지지 못하고 진단적 접근이나 개념적 접근의 근거나 기반을 마련하고 있는 실정이다. 미병은 한의학적으로는 건강하지 못한 병적인 개념으로 치료적 접근을 요하고 이러한 치료적인 수단으로 보편적으로 생각할 수 있는 것이 약물적 치료방법이라 할 수 있다. 하지만 약물적 치료방법은 현재는 의학적 치료수단의 범주보다는 건강기능성식품과 같은 보조적인 수단에서 더 많이 사용되어지고 있다고 보여진다. 또한 미병의 범주는 한의학 전반에 다 분류될 수 있기 때문에 이를 치료하는 약물도 하나로 단순 증후에 대한 치료 약물로 특정짓기는 어렵다. 때문에 미병 약물은 질병을 예방하고 관리하는 약물로 한의학적 개체특성에 기반을 두고 특징적으로 발생하는 증후에 대하여 개체 특이적으로 관리해주는 약물이라고 할 수 있을 것이다.

일본에서 미병(Mibyyou)은 증상발현 전 질병(Pre-symptomatic diseases)으로 정의 내리고 있으며 복합

적인 기전을 가지고 있는 다양한 질병에 대해 초기에 발견하여 여러 효능을 가지고 있는 한약을 이용하여 질환을 예방하는 것이 매우 중요하다고 하였다.¹⁵⁻¹⁶⁾ 일본에서 미병의 병인을 대체로 어혈(瘀血)로 인식하고 고혈압, 동맥경화, 심장병, 뇌졸중, 간장병, 당뇨병 등에서 어혈상태를 볼 수 있다고 하였다.⁶⁾ 일본에서 많은 질병과 노화는 산화스트레스와 연관이 되어있고, 특히 뇌의 산화스트레스는 미병과 연관이 있다고 보고하였으며³⁾ 미병을 예방하기 위한 항 스트레스 작용이 있는 인삼의 효과에 대해 발표를 하였다.¹⁶⁾

중의학에서는 미병(未病) 혹은 아건강(亞健康)에 대한 변증유형 방식의 분류안¹⁷⁾이 만들어져 있고 이에 대한 다양한 연구가 시행되어지고 있으며 특히, 피로를 주증상으로 하는 미병군에 대한 다양한 연구가 많이 이루어져 있다.

미병의 증상으로 신체적 증상인 피로, 통증, 수면장애, 소화이상과 정서적 증상인 분노, 불안, 우울을 제시하고 있으며 미병 증상 중에서 피로 증상을 호소하는 사람이 전체에 65.8%로 가장 많으며, 그 다음은 통증(33.5%), 소화이상(27.0%) 이외에는 수면장애, 우울, 분노, 불안감을 호소하였다.⁷⁾

미병의 대표적 표현증상인 피로는 가장 큰 원인으로 과로로 인한 기혈진액(氣血津液), 음양(陰陽), 장부(臟腑)의 손상을 들 수 있으며 한의학적 변증으로는 허증(虛證) 또는 허로(虛勞)의 범주에서 쉽게 찾아 볼 수 있는 개념으로 현대적 병명인 만성피로증후군이 피로형 미병에 가장 근접한 형태라고 볼 수 있다.⁸⁻⁹⁾

피로형 미병을 다스리는 처방으로는 문헌적 검색을 통하여 기혈을 다스리는 기본처방인 당귀보혈탕을 선정하였다. 당귀보혈탕은 허증으로 인한 피로나 수면이상의 대표적인 처방인 귀비탕(歸脾湯)¹⁸⁻¹⁹⁾의 원류가 되는 처방이다.

당귀보혈탕은 이동원(李東垣)의 『내외상변혹론(內外傷辨惑論)』에서 처음 수록된 처방으로 당귀와 황기가 1 : 5 (Table 1)의 비율로 구성되어 있는 보기보혈(補氣補血)의 기본방으로 용혈성빈혈²⁰⁾, 재생불량성빈혈²¹⁾, 근육피로²²⁾, 골다공증²³⁾ 등에 효과가 있다고 보고되어있던 본 연구에서는 기존에 제시한 몇몇 미병 동물실험 모델 중 피로를 유발시키는 방법인 강제수영부하시험(Forced swimming test, FST)을 활용한 몇 가지 평가방법을

* 전국 한의과대학 예방의학교실 편저, 양생학(한방예방의학) 제3판, 서울, 계축문화사, 2012; 10.

이용하여 미병에 대한 당귀보혈탕의 효능을 검증하였다.

속박에 의한 스트레스와 피로를 유발시켜 강제수영 검사(Forced swimming test)와 개방장소 탐색활동도 측정(Open Field test)을 통해 피로, 스트레스에 의한 무력, 우울감, 자발적 행동변화를 분석한 결과, 당귀보혈탕 투여군의 체중은 투여가 진행됨에 따라 정상군과 비교하였을 때 체중이 회복되고(Fig. 2) 당귀보혈탕 투여군은 활동성이 증가되며 field의 중앙 지점을 지나간 횡수도 유의성 있게 증가하였다(Fig. 3-A). 강제수영에서 실험동물의 행동이 소실되는 학습된 무력의 시간을 측정한 결과 당귀보혈탕 투여군은 부동상태의 정도가 정상군보다 더 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-B). 구속 스트레스 후 발생하는 기계적 과민통 반응을 발회피역치를 측정하여 당귀보혈탕 투여군은 대조군과 비교했을 때 발회피역치 감소 양상에서 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-D).

또한 당귀보혈탕 투여군의 혈액, 뇌, 간, 근육조직 등에서의 각각의 피로, 스트레스와 기능 관련 biomarker 인 혈청 Corticosterone 과 ALT, AST가 유의적으로 감소하였고, Glucose 함량도 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Table 3).

간의 면역조직화학적 관찰 결과, 당귀보혈탕 투여군은 스트레스로 인한 간 손상에 대한 간 보호효과가 있었고(Fig. 4-A), 뇌조직의 결과에 의하면 대조군에서 뇌실 크기가 크게 나타났으나 당귀보혈탕 투여군은 뇌실크기가 정상군과 비슷함을 관찰하였다(Fig. 4-B).

이와 같이 구속 스트레스가 유발된 쥐에서 행동변화를 관찰한 결과 당귀보혈탕 투여군은 대조군과 비교하여 유의한 스트레스성 항피로효과가 있어 당귀보혈탕은 피로뿐만 아니라 스트레스나 통증 등의 미병 주요 증상에 대해 유의한 효과가 있는 처방임을 알 수 있었다.

V. 결론

피로형 동물모델에서 당귀보혈탕의 효과를 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 강제수영검사(Forced swimming test)와 개방장소 탐색활동도 측정(Open Field test)을 통해 피로, 스트레스에 의한 무력, 우울감, 자발적 행동변화를 분석한 결과, 당귀보혈탕 투여군의 체중은 투여가

진행됨에 따라 정상군과 비교하였을 때 체중이 회복되고 활동성이 증가하였으며 우울과 관련된 학습무력시간은 감소되었다.

2. 대조군에 비해 당귀보혈탕 투여군의 피로나 스트레스와 관련된 biomarker인 혈청 Corticosterone 과 ALT, AST가 유의적으로 감소하였고, Glucose 함량도 감소되었다.

3. 대조군에 비해 당귀보혈탕 투여군의 간조직과 뇌조직의 스트레스 유발 후 회복이 유의하게 관찰되었다.

미병의 영역은 한의계가 가지고 있는 독창적인 질병의 개념이지만 아직 많은 연구가 되어 있지 못하다. 본 실험은 미병의 주증상인 피로를 중심으로 한 미병의 예방과 치료에 사용할 수 있는 약물에 대해 검증한 연구로 이러한 동물 모델에서의 효능효과를 근거로 향후 미병에 대한 한의학적 치료방법의 evidence를 제시하는 연구가 후속적으로 이어지기를 기대해 본다.

Acknowledgements

This research was supported by the research program of the Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM), South Korea (K16092).

Conflicts of interest: None.

참고문헌

1. Lee SJ, Li SS, Kim DH. A study on the trends of Meebyung research. J Korean Medical Classics. 2010;23(5):23-34.
2. Kim SH, Joo JC, Hwang DU, Lee SW. A report on traditional Chinese medicine (TCM) constitution theory and Chinese health administration center. J of Sasang Constitutional Medicine. 2010;22(3):59-66.
3. Konishi T. Brain oxidative stress as basic target of antioxidant traditional oriental medicines. Neurochem Res. 2009;34(4):711-716.

4. Lee JC, Kim SH, Lee YS, Jang ES, Lee SW. Overview of relations between concepts of sub-health(Mibyung) and Korean medicine patterns. *Journal of Society of Preventive Korean Medicine*. 2012;16(2):31-39.
5. Kim JW, Kim KC, Lee YT, Lee IS, Kim KK, Chi GY. Study on diagnosis by facial shapes and signs as a disease-prediction data for a construction of the ante-disease pattern diagno-therapeutic system - focusing on gall-bladder's versus bladder's body and masculine versus feminine shape -. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2009;23(3):540-547.
6. Takechi M[武市昌士]. Modern nourishing life medicine of Mibyeong · sub-health [未病 · 半健康(心配性)の現代養生医学]. Kim YS, Park YB translator. *East-west medicine of Mibyeong*. Seoul:Koonja Publisher. 2008.
7. Lee EY, Park KH, Yoo JH, Lee SW. A study on pattern of changes of Mibyeong recognition, prevalence and its management plan in Korean public : national survey. *Journal of Society of Preventive Korean Medicine*. 2016; 20(1):1-10.
8. Feng YH, Yang YT, Wang KF. Construction and evaluation of spleen-deficiency type sub-health state of chronic fatigue rat model. *Journal of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine*. 2015;16(3):21-23.
9. Li YP, Huang SH, Jin W. Construction of a sub-health fatigue rat model. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*. 2012;16(7): 1225-1228.
10. Ma ZF, Jiang RX, Zhang LT, Wang P. Effect of compound stimulus on the fatigue resistance of sub-healthy rat models and SOD and MDA in serum. *Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*. 2011; 32(8):54-55.
11. Liu YY, Cheng JR, Yu KQ, Tan W, Ouyang MZ, Chen SJ, et al. Construction of fatigue-type sub-health mouse model. *Guangdong Medical Journal*. 2012;33(1):21-24.
12. Harrington ME. Neurobiological studies of fatigue. *Prog Neurobiol*. 2012; 99(2):93-105.
13. Jeong JJ, Lee DH, Kang SS. Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. *Endocrinol Metab*. 2013;28(4):288-296.
14. Min JH, Baik YS, Jang WC, Jeong CH. A study on the theory of Chimbyeong(治未病). *J Korean Medical Classics*. 2010;23(1):257-277.
15. Yamamoto S, Tsumura N, Nakaguchi T, Namiki T, Kasahara Y, Ogawa-Ochiai K, et al. Principal component vector rotation of the tongue color spectrum to predict "Mibyou" (disease-oriented state). *Int J Comput Assist Radiol Surg*. 2011;6(2):209-215.
16. Miyata T. Pharmacological basis of traditional medicines and health supplements as curatives. *J Pharmacol Sci*. 2007;103(2):127-131.
17. Zhang ZQ. On Improvement of classification of Chinese medicine about 《sub-health Chinese medical clinical guideline》[关于《亚健康中医临床指南》中医分类补充之拙见]. *Chin J of Clinical Rational Drug Use*. 2012;5(6):143-144.
18. He QH[何清湖]. *Ya Jian Kang Linchuang Zhinan*[亚健康临床指南]. Beijing:China Chinese Medicine Publisher[中国中医药出版社]. 2009.
19. Sun SG, Jing J, Sun R. Analysis on composition principles of prescriptions for insomnia disease by traditional Chinese medicine inheritance support system. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*. 2015;21(9):208-211.
20. Kim, YI. The effect of dose-change of constituent medicines in Danggwibohyeoltang on hemolytic anemia. *Herbal formula science*. 1996;4(1):53-74.
21. Yang X, Huang CG, Du SY, Yang SP, Zhang X, Liu JY, et al. Effect of Danggui Buxue Tang on immune-mediated aplastic anemia bone marrow proliferation mice. *Phytomedicine*.

- 2014;21(5):640–646.
22. Lee DE, Kim YK. The effects of Danggui-bohyultang and Ssangbohwan the muscle recovery in rats. *J Korean Med*. 1996;17(1):361–373.
23. Gong AG, Li N, Lau KM, Lee PS, Yan L, Xu

ML, et al, Calycosin orchestrates the functions of Danggui Buxue Tang, a Chinese herbal decoction composing of Astragali Radix and Angelica Sinensis Radix: An evaluation by using calycosin-knock out herbal extract. *J Ethnopharmacol* 2015;168:150–157.