

동물모델에서 柴胡加龍骨牡蠣湯의 수면유도 및 항불안 효과

임준식# · 임강현 · 김태연*

세명대학교 한의과대학

Sleep-promoting and Anti-anxiety Effects of Shihogayonggolmoryo-tang in Mice

Junsik Lim#, Kanghyun Leem, Taeyeon Kim*

College of Korean Medicine, Semyung University

Shihogayonggolmoryo-tang (ST) is a Korean medical herb cocktail which has been used to treat anxiety induced insomnia. In this study, we will examine sleep-promoting and anti-anxiety effects of ST, and investigate its mechanism. ICR mice were divided into three groups for the first examination : control group (n=11), ST50 group (50 mg/kg, po, n=11), ST200 group (200 mg/kg, po, n=11). Sleep-promoting effect was confirmed by measuring the sleeping duration time and sleeping onset time after thiopental sodium treatment (50 mg/kg, ip). ICR mice were divided into five groups for the second examination : control group (n=11), ST200 group (200 mg/kg, po, n=11), ST200+Flumazenil group (ST 200 mg/kg, po, flumazenil 0.3 mg/kg, ip, n=11), diazepam group (1 mg/kg, ip, n=11), diazepam+flumazenil group (diazepam 1 mg/kg, ip, Flumazenil 0.3 mg/kg, ip, n=11). Anxiety behavior and sleep-promoting effect was confirmed by open field test and measuring the sleeping duration time and sleeping onset time. Expression levels of c-fos in tuberomammillary nucleus (TMN) and ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) were analyzed by immunohistochemistry. ST treated group showed significantly decreased anxiety behavior and enhanced sleeping duration time and sleeping onset time concentration dependently. The expression of c-fos was significantly upregulated in VLPO as sleep-inducing center and TMN as downregulated in arousal center by ST treatment. In addition, all effects of ST were reversed by flumazenil. Our results suggest that ST has sleep-promoting and anti-anxiety effects through regulating arousal center (TMN) and sleep-inducing center (VLPO).

keywords : Shihogayonggolmoryo-tang, Sleep disorder, Sleep latency, Sleep onset, Thiopental sodium

서 론

불면증은 수면을 시작하기 어렵거나 수면 후에 양질의 수면을 유지하기 힘들어 피로와 집중력 저하로 삶의 질에 심각한 영향을 주는 일반적인 질환으로 정의된다¹⁾. 정상적인 수면은 건강한 삶에 필수적인 요소이나, 최근 현대인들은 업무과다, 스트레스 등 다양한 원인에 의해 성인의 약 30%가 어떠한 형태로든 불면증을 경험하고, 10% 이상이 수면장애를 호소하고 있다^{2,3)}. 불면증의 가장 흔한 원인은 갑작스런 환경적 요인이다. 만성 불면증의 경우 감정부전장애, 주요우울장애, 불안장애, 등 정신질환에 의한 경우가 가장 흔하다⁴⁾.

Zolpidem 등 non-benzodiazepine 계열 약물이 불면증에 첫 번째로 처방되는 약물이다. GABA receptors에 효능제로 작용하여 치료 효과를 나타내는 benzodiazepines 계열 약물이 다음으로 처

방된다. 그러나 위 약물들은 다양한 부작용을 가지고 있다⁵⁻⁷⁾. Benzodiazepines는 약물 의존성과 남용이 문제가 되어 불면증치료에 단기기간 사용된다⁸⁾. Zolpidem 계열 약물은 입면에 효과적이거나 양질의 수면을 유지하는 것에는 효과가 적다. 게다가 오랜기간 복용할 경우 benzodiazepines와 유사한 부작용이 나타난다⁹⁾. 그러므로 부작용이 적으며 입면과 양질의 수면유지에 모두 효과적인 약물을 개발해야 한다.

柴胡加龍骨牡蠣湯(Sihogayonggolmoryeo-tang, ST)은 傷寒論에 최초 수록된 처방으로, 少陽病을 치료하는 주요 방제인 小柴胡湯加減方이다. 傷寒論에서는 “傷寒八九日, 下之, 胸滿煩驚, 小便不利, 譫語, 一身盡重, 不可轉側者, 柴胡加龍骨牡蠣湯主之”라 하여, 邪氣가 彌滿하여 병이 表證과 裏證을 겸하고 虛證과 實證이 함께 나타나는 경우에 少陽樞機의 和解를 위주로 하고 아울러 通陽瀉實하고 逐痰鎮驚하는 효능을 발휘한다고 하였다¹⁰⁾.

* Corresponding author

Tae Yeon Kim, College of Korean Medicine, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, 27136, Korea

E-mail : violet805@hanmail.net ·Tel : +82-43-649-1339

Received : 2020/11/11 ·Revised : 2020/12/23 ·Accepted : 2021/01/22

© 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.2021.02.35.1.8

Available online at https://kmpath.jams.or.kr & http://jppkm.org

제 1저자의 세명대학교 한의과대학 석사학위 논문임

ST에 관련한 국내 연구를 살펴보면 지질이상¹¹⁾, 외상 후 스트레스 장애¹²⁾, 고혈압¹³⁾에 대한 효과를 확인한 실험논문이 각각 1편씩, 신경증¹⁴⁾, 진전¹⁵⁾, 대퇴신경 지각이상증¹⁶⁾, 전신성다한증¹⁷⁾, 화병¹⁸⁾, 갱년기증후군¹⁹⁾, 신경정신과 질환²⁰⁾ 치료에 관한 임상논문이 각각 1편씩 보고되어 있으나 불면증과 관계된 in vivo 실험 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서 ST 추출물의 항불안효과와 수면유도 효과를 확인하였으며, 이 과정에서 ST가 중추신경계에 미치는 약리작용을 검증하였다. 그리고 ST의 항불안효과와 수면유도 효과 기전이 GABA 성 신경을 통해 작용하는지 확인하기 위해 GABA 수용체 길항제인 flumazenil을 이용하여 실험을 수행했다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 7주령 ICR 수컷 마우스로 (♂)나 라바이오텍(서울, 한국)에서 구입하였다. 실험쥐들은 12시간 명암주기, 온도 22 ± 2°C, 습도 50 ± 5%로 조절되는 사육실에서 일주일간 적응시킨 후 각 실험군 당 11마리씩 그룹화하여 본 실험을 진행하였다. 사육기간 동안 사료와 물은 자연스럽게 먹을 수 있도록 충분히 공급하였다. 실험은 국제동물복지법에 근거한 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(승인번호 : smecae 18-05-01).

2. 시료 및 추출물

ST 5첩(315 g, Table 1)은 세명대학교 부속 한방병원에서 구매하여 시료를 세척하고 3000 ml의 증류수를 넣은 뒤 3시간 동안 끓여 유효성분을 추출하였다. 추출액은 원심분리기를 사용하여 침전물을 제거하고, 회전농축기를 사용하여 200 ml가 되도록 감압 농축한 뒤, -70°C 냉동고에서 동결시켰다. 이후 동결건조기를 사용하여 7일간 건조과정을 거쳐 최종적으로 22.8 g(yield : 7.2 %)의 분말을 얻었다. 획득한 시료는 -20°C에서 보관하였다가 실험 시작 전 생리식염수에 녹여 사용하였다. 투여량은 한약 연구 시 통상적으로 사용되는 용량인 50mg/kg/day와 200 mg/kg/day로 설정하여, 3일간 1일 1회 경구투여하였으며, 대조군은 같은 용량의 생리식염수를 경구투여하였다^{21,22)}. 행동평가 30분 전 ST를 1회 추가로 경구투여하였으며, 양성대조군으로 diazepam(명인제약, 한국, 1 mg/kg)을 복강주사하였다. 약리학적 기전연구를 위한 GABA 수용체에 대한 길항제인 flumazenil(명문제약, 한국, 0.3 mg/kg)을 각각 약물처리 5분 전에 복강주사하였다.

3. 보행성활동 분석

실험동물의 활동을 정량화하기 위해 시료 처치 30분 뒤 5분간 보행성 활동을 open field test를 이용하여 측정했다. 본 연구에서는 검은색 아크릴 상자(48 cm x 48 cm x 40 cm)에서 실험동물의 움직임을 비디오로 촬영하여 분석소프트웨어(Image J, NIH, USA)를 이용하여 보행성 활동량을 측정하였다. 내부를 가상의 선으로 16칸 등분한 뒤 가운데 4칸을 센터존으로 설정하였다. 처음으

로 센터존에 들어갈 때까지의 시간(sec), 센터존에 머무른 시간(sec), 센터존과 전체 이동거리의 비율(%)을 분석하여 항불안효과를 측정 평가하였다.

Table 1. Composition of Sihogayonggolmoryeo-tang

Korean name (Chinese name)	Pharmacognostic name	Weight (g)
Shi Ho (Chai Hu)	Bupleuri Radix	60.0
Ban Ha (Ban Xia)	Pinelliae Rhisoma	45.0
Dae Hwang (Da Huang)	Rhei Rhizpma	30.0
Hwang Geum (Huang Qin)	Scutellariae Radix	22.5
Yong Gol (Long Gu)	Ostreae Concha	22.5
Mo Ryeo (Mu Li)	Fossilia Osis Mastodi	22.5
Gye Ji (Gui Zhi)	Cinnamomi Ramulus	22.5
Bok Ryoung (Fu Ling)	Poria	22.5
Seng Gang (Sehng Jiang)	Zingiberis Rhizoma Recens	22.5
In Sam (Gin Seng)	Ginseng Radix Alba	22.5
Dae Chu (Da Zao)	Jujubae Fructus	22.5
Total amount		315.0

4. 수면 시간 측정

생쥐는 낮에 자고 밤에 활동하는 전형적인 야행성 동물로, 낮에 실험을 시작할 경우 생리적인 수면주기에 포함되어 정확한 결과를 얻을 수 없다. 낮에는 내인성 수면유발 인자들이 충족되어 있는 상태로 체외에서 추가로 수면 유발물질을 주입하여도 그 효과가 제대로 작용하지 않는다²³⁾. 따라서 모든 실험은 쥐가 각성상태로 활동이 가능한 일몰 이후 시간, 오후 7시 이후에 시행하였다.

실험동물에게 시료 처치 30분 뒤 thiopental sodium (JW중외제약, 한국, 50 mg/kg) (마약류 취급자(학술연구자) 승인번호 : 대전청 제398호)을 복강주사하여 유도한 수면유도 실험에서 기존 논문에서 사용된 실험방법에 따라 정좌반사(Righting reflex)가 소실되는 시점과 회복되는 시점을 기준으로 수면 유도시간과 수면 지속시간을 측정하였다²³⁾.

5. 면역화학염색법

수면실험 종료 후 실험동물을 thiopental sodium 과량투여로 신속하게 마취시킨 후, 심장관류법(transcardiac perfusion method)을 이용하여 고정하였다. 관류액(0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2)은 peristaltic pump를 통해 심장에 관류하여 혈관 내부의 혈액을 제거한 후, 4°C로 냉각시킨 고정액(4% paraformaldehyde, PFA, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2)을 심장에 재주입하여 조직을 고정시켰다. 관류 고정이 끝난 후 뇌를 신속하게 적출한 다음 뇌를 4% PFA 고정액으로 4°C에서 2-4시간 담가서 후고정을 시행하였고, 30% sucrose에 보관하여 완전히 침투된 다음 동결절편기(HM440E, Zeiss Co, Germany)를 이용하여 뇌조직에서 ventrolateral preoptic nucleus (VLPO)과 tuberomammillary nucleus (TMN) 부위 조직을 40 µm 두께로 확보한 후 면역조직화학염색을 시행하였다^{24,25)}. 24시간 동안 4°C에서 c-fos 1차 항체 rabbit polyclonal anti-c-fos IgG (1 : 1k, Santa Cruz, USA)를 반응시켰다. 다음 날 2차 항체 및 avidin and biotinylated peroxidase complex는 ABC kit (Vector Laboratories, USA)를 이용하여

3,3'-diaminobenzidine (DAB, Merck, Germany)으로 해당 항체의 발색을 유도하였다. 건조 후 에탄올 및 xylene을 거쳐 Permount (Merck, Germany)로 봉입하였다. 광학 현미경(BX60, Olympus Co, Japan)을 이용하여 VLPO와 TMN 조직 부위의 사진을 찍은 후 염색된 c-fos positive cell의 개수를 2명의 실험자가 측정하였다.

6. 통계 처리

데이터는 평균 \pm S.E.M.으로 표시하였다. 통계처리는 GraphPad Prism (Ver 6, USA)을 이용하였고, 각 군간 비교는 ANOVA test와 Fisher's LSD post hoc test로 통계분석하였다. 통계적 유의성 한계는 $p < 0.05$ 수준으로 정하였다.

결 과

1. ST의 입면 시간 및 수면 시간에 대한 효과

실험동물에게 thiopental sodium을 투여한 후 입면까지 걸리는 시간이 짧을수록, 수면 시간이 길수록 수면 유도 효과가 크다. ST에 의한 입면 시간 및 수면 시간에 대한 효과를 측정할 데이터는 다음과 같다.

입면 시간을 확인한 결과, ST를 50 mg/kg의 농도로 투여한 시험군인 ST(50)의 입면 시간은 188.4 ± 28.7 초, ST를 200 mg/kg의 농도로 투여한 시험군인 ST(200)의 입면 시간은 140.4 ± 17.2 초로, 대조군의 입면 시간인 245.8 ± 25.10 초와 비교하여 시험군의 입면 시간은 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 1-a).

수면 시간을 확인한 결과, ST(50)의 수면 시간은 1223.7 ± 380.4 초, ST(200)의 수면 시간은 1652.3 ± 281.0 초로, 대조군의 수면 시간인 654.8 ± 142.5 초와 비교하여 시험군의 수면 시간은 농도의존적으로 증가하였다(Fig. 1-b).

두 시험군 중, 대조군과 비교하여 입면 시간 감소 및 수면 시간 증가에 통계적 유의성($p < 0.05$, Fig. 1-a, b)을 보인 ST(200)으로 이후 실험을 진행하였다.

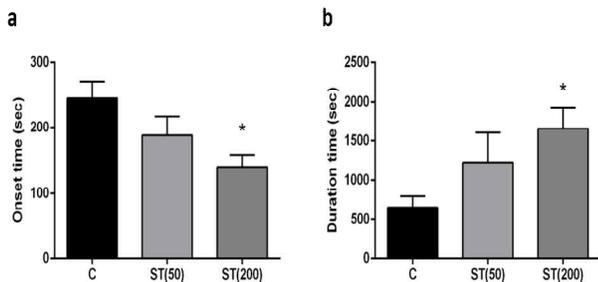


Fig. 1. Effects of ST on the sleep duration time induced by thiopental sodium (50 mg/kg, i.p.). C: control group, ST(50): ST administered group (50 mg/kg), ST(200): ST administered group (200 mg/kg). *: statistical difference compared with control group ($p < 0.05$). Numbers in parentheses are dosages administered (mg/kg).

2. GABA 수용체 길항제의 ST의 수면 및 항불안 작용에 대한 영향

ST 투여군의 보행성 활동량을 측정하기 위해 open field test

를 실시하였다. 센터존으로 처음 들어가는데 걸린 시간이 짧을수록, 센터존 안에 머무른 시간이 길수록, 전체 움직인 거리 중 센터존 안에서 움직인 거리의 비율이 클수록 항불안효과가 크다. ST에 의한 위 지표들을 측정할 데이터는 다음과 같다.

센터존으로 처음 들어가는데 걸린 시간을 확인한 결과, ST(200)의 시간은 29.1 ± 5.0 초로, 대조군이 센터존으로 처음 들어가는데 걸린 시간인 34.5 ± 2.9 초와 비교하여 한약 시험군에서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2-a). 그리고 GABA 수용체 길항제인 flumazenil을 ST와 함께 처치한 ST(200)+F의 시간은 26.69 ± 6.5 초로 ST(200)과 비교해 약간 감소하였으나 유의미한 차이를 보이지 않았다.

센터존 안에 머무는 시간을 확인한 결과, ST(200)의 시간은 22.9 ± 4.2 초로, 대조군이 센터존 안에 머무른 시간인 14.5 ± 1.3 초와 비교하여 한약 시험군에서 통계적으로 유의하게 증가했다($p < 0.05$, Fig. 2-b). 또한 flumazenil을 ST와 함께 처치한 ST(200)+F의 시간은 18.5 ± 3.8 초로 ST(200)과 비교하여 센터존 안에 머무른 시간이 감소하는 경향을 나타내었다.

전체 움직인 거리 중 센터존 안에서 움직인 거리의 비율을 확인한 결과, ST(200)의 비율은 7.3 ± 0.8 %로, 대조군의 비율인 5.6 ± 0.4 %와 비교하여 한약 시험군에서 항불안효과가 통계적으로 유의하게 증가했다($p < 0.05$, Fig. 2-c). 그러나 ST(200)+F의 시간은 7.256 ± 1.0 초로 ST(200)의 효과를 감소시키지 않았다.

ST의 수면 유도 효과와 이에 대한 flumazenil의 억제 효과를 GABA 수용체 효능제인 diazepam과 비교하기 위해 diazepam 투여군과 각 약물에 flumazenil을 함께 투여한 시험군을 추가하여 실험을 진행하였다.

입면 시간을 확인한 결과, ST(200)의 입면 시간은 172.4 ± 32.7 초, diazepam을 투여한 시험군인 D의 입면 시간은 158.3 ± 29.4 초로, 대조군의 입면 시간인 295.4 ± 42.8 초와 비교하여 두 시험군의 입면시간은 통계적으로 유의하게 감소하였다. ST(200)+F의 입면 시간은 216.7 ± 21.3 초, flumazenil을 diazepam과 함께 처치한 시험군인 D+F의 입면 시간은 318.4 ± 42.5 초로 각 약물 시험군에 비해 증가하는 경향을 보였으나, ST(200)+F과 ST(200)간의 통계적으로 유의미한 차이는 관찰되지 않았다($p < 0.05$, Fig. 2-e).

수면 시간을 확인한 결과, ST(200)의 수면 시간은 2175.8 ± 335.6 초, D의 수면 시간은 2957.6 ± 750.5 초로, 대조군의 입면 시간인 795.3 ± 180.1 초와 비교하여 두 시험군의 수면시간은 통계적으로 유의하게 증가하였다. ST(200)+F의 수면 시간은 779.1 ± 169.5 초, D+F의 수면 시간은 971.5 ± 348.7 초로, 각 약물 시험군에 비해 증가하는 통계적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 2-f).

3. 柴胡加龍骨牡蠣湯의 TMN과 VLPO의 c-fos 발현 세포에 대한 효과

TMN이 활성화되면 수면을 억제하기 때문에 TMN의 c-fos 발현량이 적을수록 수면 유도 효과가 크다. VLPO는 활성화되면 수면이 유도되기 때문에 VLPO의 c-fos 발현량이 많을수록 수면 유도

효과가 크다.

각성 중추인 TMN에서 c-fos 발현 세포수를 확인한 결과, ST(200)의 c-fos 발현 세포수는 9.2 ± 1.7 개, D의 c-fos 발현 세포수는 6.7 ± 0.8 개로, 대조군의 c-fos 발현 세포수 24.1 ± 4.7 개와 비교하여 두 시험군의 c-fos 발현 세포수가 통계적으로 유의하게 감소하였다. ST(200)+F의 c-fos 발현 세포수는 20.5 ± 2.9 개, D+F의 c-fos 발현 세포수는 23.4 ± 3.1 개로 각 약물 시험군의 c-fos 발현 세포수와 비교하여 통계적으로 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$, Fig. 3).

수면 중추인 VLPO에서 c-fos 발현 세포수를 확인한 결과, ST(200)의 c-fos 발현 세포수는 10.6 ± 2.5 개, D의 c-fos 발현 세포수는 11.8 ± 2.1 개로, 대조군의 c-fos 발현 세포수 5.4 ± 0.7 개와 비교하여 두 시험군의 c-fos 발현 세포수가 통계적으로 유의하게 증가하였다. ST(200)+F의 c-fos 발현 세포수는 3.2 ± 1.0 개, D+F의 c-fos 발현 세포수는 3.8 ± 0.5 개로 각 약물 시험군의 c-fos 발현 세포수와 비교하여 통계적으로 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$, Fig. 4).

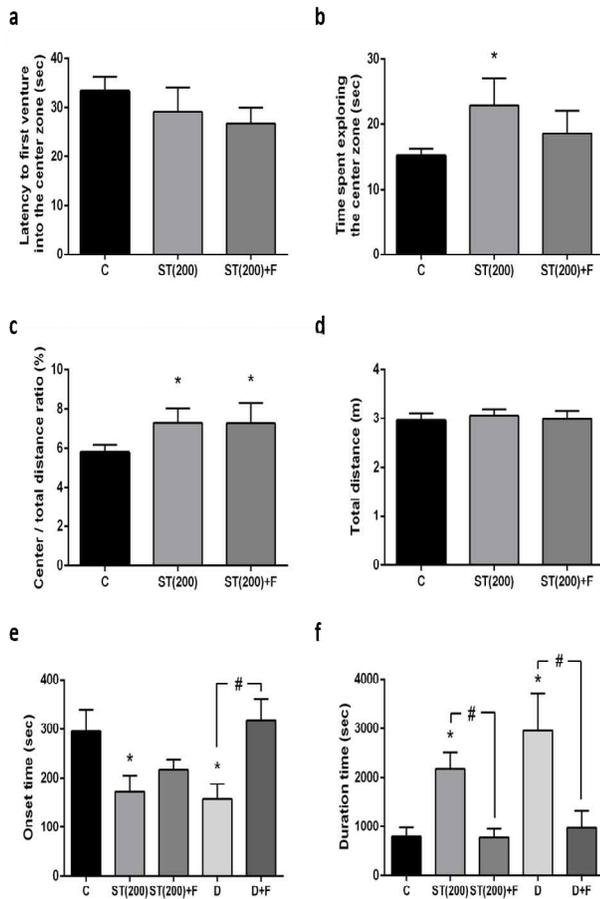


Fig. 2. Effects of ST on the locomotor activity analysed by open field test. Effects of ST on the sleep duration time and onset time induced by thiopental sodium (50 mg/kg, i.p.). C: control group, ST(200): ST administered group (200 mg/kg), ST(200)+F: flumazenil (0.3 mg/kg, i.p.) treated group with ST(200), D: diazepam (1 mg/kg, i.p.) treated positive control group, D+F: flumazenil (0.3 mg/kg, i.p.) treated group with diazepam. *: statistical difference compared with control group ($p < 0.05$).

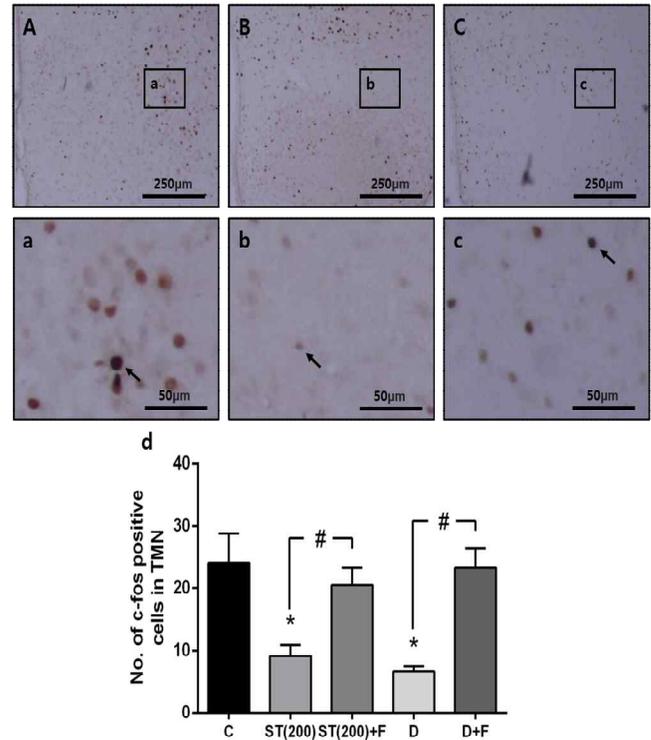


Fig. 3. C-fos immunohistochemistry in the tuberomammillary nucleus (TMN). Control group; (A,a), ST(200) group; (B,b), ST(200)+F group (C,c). *: statistical difference compared with control group ($p < 0.05$). #: statistical difference compared with each paired group ($p < 0.05$).

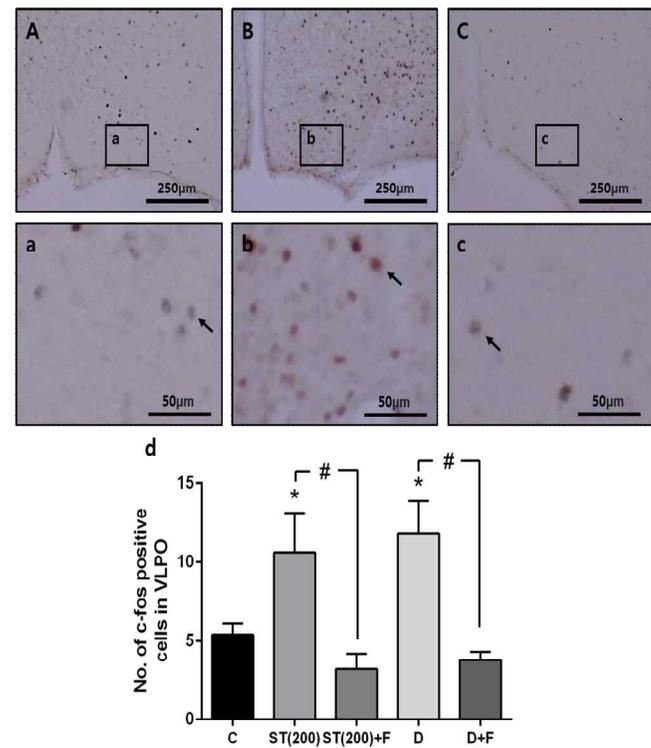


Fig. 4. C-fos immunohistochemistry in the ventrolateral preoptic nucleus (VLPO). Control group; (A,a), ST(200) group; (B,b), ST(200)+F group (C,c). *: statistical difference compared with control group ($p < 0.05$). #: statistical difference compared with each paired group ($p < 0.05$).

고찰

柴胡加龍骨牡蠣湯(Sihogayonggolmoryeo-tang, ST)은 임상에서는 신경정신과 질환에 다용하는 처방으로 不眠·頭痛·嘔吐 등의 증상을 위주로 하는 신경증, 전간, 갱년기증후군 등을 치료하는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 처방 구성을 살펴보면, 柴胡는 樞機之劑로서 解表退熱·疏肝解鬱하고, 黃芩은 清肅하여 實火熱를 瀉하므로써 함께 疏通鎮靜 작용을 발휘하며, 半夏는 燥濕化痰·降逆止嘔·消痞散結하여 痰火擾心으로 초래된 不安症을 치료하고, 龍骨은 重鎮安神, 牡蠣는 益陰潛陽, 茯苓은 寧心安神의 효능을 지니므로 함께 心神搖亂을 진정시켜 不眠·心悸亢進 등의 정신 증상을 치료한다. 桂枝는 調和營衛의 효능으로 上衝을 치료하며, 大黃은 瀉熱和胃하여 譫語를 그치게 하고 生薑·大棗는 調和諸藥한다²⁶⁾.

본 연구에서 ST 투여로 인한 수면 유발작용을 관찰하기 위해 thiopental sodium으로 유도한 수면 시간과 수면에 도달하는 시간을 측정하였다. ST 투여 시 입면 시간과 수면 시간을 농도의존적으로 유의하게 향상시켰다. 이에 ST가 수면을 유도하는 효과가 있다고 생각된다. 이에 그 효과 기전을 알아보기 위해 GABA 수용체 길항제인 flumazenil을 이용하여 동일 실험을 반복하였다. 양성대조군으로는 diazepam을 사용하였다. diazepam은 benzodiazepines 계열의 약물로 GABA type A 수용체를 조절하는 양성 알로스테릭 조절제이다. diazepam은 GABA 수용체 기능을 향상시켜 신경세포 흥분을 억제하는 것으로 알려져 있다²⁷⁾. diazepam 투여군은 수면에 도달하는 시간을 통계적으로 유의하게 줄였고, 또한 수면 유지시간을 통계적으로 유의하게 늘렸다. 이는 기존의 보고와 일치하는 내용이다. 그리고 flumazenil 투여로 인해 diazepam의 효능이 완벽히 차단되는 것을 알 수 있었다. 이와 유사하게 ST 투여로 유발된 수면에 도달하는 시간과 수면 유지시간에 대한 효과를 차단하는 경향을 나타내었는데, 특히 수면 유지시간의 경우에는 통계적으로 유의하게 효과를 차단하였다. 수면 유도하는 기전은 다양하지만, 대표적인 기전은 GABA 수용체의 활성화와 히스타민 수용체의 억제다²⁸⁾. 이를 통해 생각해보면, ST의 수면 시간 연장에 대한 효과는 GABA 수용체 활성화로 인한 기전의 영향력이 크다고 생각된다. 반면 ST의 수면 유도 효과는 diazepam과는 달리 GABA 수용체 활성화와 히스타민 수용체의 억제가 동시에 작용하기 때문에 flumazenil이 ST의 수면 유도 효과를 완벽히 차단하지 못했다고 추론할 수 있다.

추가적으로 항불안효과를 관찰하기 위해 open field test를 수행하였다. 센터존에 처음 들어가는 시간은 짧을수록, 센터존에 머문 시간 및 전체 이동거리에 대한 센터존 이동거리의 비율은 클수록 각각 항불안효과가 있는 것으로 생각된다. ST 투여군에서 센터존에 머문 시간과 전체 움직인 거리 중 센터존에서 움직인 거리의 비율이 통계적으로 유의하게 증가되었고, GABA 수용체 길항제인 flumazenil과 ST를 동시에 투여한 실험군에서는 센터존에 머무른 시간이 ST 투여군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 두 군간의 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 그리고 다른 지표들에서는 flumazenil로 인한 ST 효능 차단이 보인다고 인정할 수 없었다. 이 결과만 보자면, ST의 항불안효과가 GABA 수용체의 flumazenil

이 억제하는 부위로 작용하지 않거나 혹은 일부분만 작용할 것으로 생각된다.

수면을 유도하는 기전은 복잡한데, 이후 수면유도 및 각성을 담당하고 있는 부위의 신경세포 활성도를 c-fos 면역조직화학염색을 통하여 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다. ST가 수면을 조절하는 뇌 중추에 미치는 영향을 알기 위해 수면을 유도하는 신경세포가 밀집한 복외측 시삭전 영역(ventrolateral preoptic area, VLPO)과 각성을 유도하는 신경세포가 밀집한 부위인 시상하부의 조면유두체핵(tuberomammillary nucleus, TMN)의 c-fos 양성세포 개수를 관찰하였다. VLPO의 신경세포는 GABA를 분비하여 각성 신경세포를 억제한다고 알려져 있으며, TMN의 히스타민성 신경세포(histamine-releasing neurons)는 대뇌피질과 연결되어 있기 때문에 직접적으로 피질의 활동성을 증가시켜 각성 효과를 나타낸다²⁸⁾. ST 투여 시 수면 유도 중추(VLPO)의 c-fos 양성세포 수가 통계적으로 유의하게 증가하였고, 각성 중추(TMN)의 c-fos 양성 세포 수를 통계적으로 유의하게 감소시켰다. Flumazenil과 ST를 동시에 투여한 실험군에서 ST의 효과가 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 양성대조군인 diazepam 투여군의 경향과 유사하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

ST가 항불안작용과 thiopental sodium으로 유발한 수면에 대해 수면 시간 연장과 입면 시간 단축 효과가 있는 것을 확인할 수 있었고, 그 기전은 GABA 수용체를 통한 뇌 내 VLPO 부위 신경세포 흥분과 TMN 부위 신경세포의 억제인 것을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 thiopental sodium을 사용하여 유도한 수면 시간을 측정하였기 때문에 생체 주기에 따른 자연적인 수면 시간에 대한 직접적 효과를 밝히지는 못했다. 또한 수면 시간을 측정할 때 수면 뇌파 및 근전도 측정을 하는 것이 더욱 정확한 방법이나 본 실험에서는 정좌반사만을 이용해 수면 시간을 측정했다는 한계가 있다. 이번 연구는 전통적으로 不眠·心悸亢進 치료를 위해 사용되는 ST의 효능에 대한 실험적 근거자료가 될 것으로 생각된다. 추후 세포 내 신호전달 등의 후속 연구가 추가되고, 임상 연구와 분자적 연구를 진행하여 더 구체적인 효능 기전 및 효과에 대해 밝힐 필요성이 있다고 사료된다.

결론

본 연구에서 수면과 불안에 대한 ST의 효과 및 기전을 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

ST는 open feild test에서 센터존에서 머무른 시간을 통계적으로 유의하게 증가시켰다.

ST는 thiopental sodium으로 유발한 수면에 들어가까지 걸리는 시간인 입면 시간과 수면 유지시간을 통계적으로 유의하게 감소시켰다.

ST는 수면 유도 중추(VLPO)의 c-fos 면역조직화학염색 양성 세포수를 통계적으로 유의하게 증가시키고, 각성 중추(TMN)의 c-fos 면역조직화학염색 양성 세포수를 통계적으로 유의하게 감소시켰다.

결론적으로 ST는 항불안효과를 가지며, thiopental sodium으로

로 유발한 수면에 대해 입면 시간을 단축하고, 수면 시간을 증진하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 그 기전은 뇌 안의 수면 유도 중추(VLPO)를 자극하고, 각성 중추(TMN)는 억제하는 작용이라는 것을 확인할 수 있었다. 또한 그 효과가 GABA 수용체 차단제로 감약되는 것으로 보아 ST의 기전이 GABA 수용체와 연관이 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구결과는 ST을 불안증과 이로 인한 불면증 치료에 사용할 수 있는 과학적 근거자료로 임상에서 활용이 가능할 것으로 생각된다.

References

- Zisapel N. Drugs for insomnia. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2012;17:299-317.
- Kim L, Choi YK, Suh KY. The Knowledge and Practice of Sleep Hygiene in Residents of Seoul. *J Korean Neuropsychiatr Assoc*. 1997;36:712.
- Zeitler JM, Dijk DJ, Kronauer R, Brown E, Czeisler C. Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression. *J Physiol*. 2000;526:695-702.
- Yang CK. Pharmacological Treatment of Insomnia. *J Korean Society of Biological therapies in Psychiatry*. 4, 1998;p. 106.
- Greenblatt DJ and Roth T. Zolpidem for insomnia. *Expert Opin Pharmacother*. 2012;13:879-93.
- Besnard S, Massé F, Verdaguer M, Cappelin B, Meurice JC, and Gestreau C. Time- and dose-related effects of three 5-HT receptor ligands on the genioglossus activity in anesthetized and conscious rats. *Sleep Breath*. 2007;11:275-84.
- Haefely W. Benzodiazepine interactions with GABA receptors. *Neuroscience Letters*. 1984;47:201-6.
- Morin AK. Strategies for treating chronic insomnia. *Am J Manag Care*. 2006;12:S230-45.
- Zammit G. Comparative tolerability of newer agents for insomnia. *Drug Saf* 2009;32:735-48.
- Moon JJ, An GS, Kim JB, Park WS, Park JH, Kim DH et al. Precise Interpretation of 'Treatise on Cold Damage Diseases'. *Yongin:Hanuimunhwasa*. 2017;p. 239-40.
- Kim SO. The Effect of Shiho Ka Yongol MoryoTang on the Contents of Total Cholesterol, Triglyceride and Phospholipid in the Serum of Rabbit. *Kyunghee College of Pharmacy collection of dissertations*. 1978;6(1):17-22.
- Kim HY, Lee TH. Effect of Sihogayonggolmoryeotang on SPS-induced PTSD in Rats. *Herbal formula science*. 2019;27(2):121-36.
- Song U, Kim SH. The Effects of Kakamsihokayonggolmoryeotang on the Hyperlipidemia. *The Journals of the Korean Oriental Medical Society*. 1993;26:332-47.
- Lee SJ. The operation of Shihogayonggolmoryo-tang on the nervous disease. *The Journals of the Korean Oriental Medical Society*. 1976;13(1):86-8.
- Seo SH, Yim HJ, Jung IC, Lee SR. The Clinical study on 1 case of Patient with Tremor by Bok-Jin. *Institute of Oriental Medinine Daejeon University collection of dissertations*. 2007;16(1):69-79.
- Lee JH, Lee JS, Chung SH. A Clinical Report about Meralgia paresthtica Treated with Sihogayonggolmoryo-tang. *The Journals of Oriental Rehab Med*. 2002;12(3):157-67.
- Lee BY, Lee HJ, Kim JW, Choi HY, Kim YJ, Cho SY, Park SU, Ko CN, Park JM. The Efficacy of Shihogayonggolmoryo-tang in Combating Excessive Sweating in Heart Disease Syndrome, Called 心病 in Korean Medicine. *J. Int. Korean Med*. 2016;37(4):601-8.
- Choi WC, Park DM, Kang WC, Lee SR, Jung IC. Interim Report about The Effect of Sihogayonggolmoryeo-tang on the Anxiety of Hwa-byung. *J of Oriental Neuropsychiatry* 2012;23(4):133-52.
- Lee YH. 5 Cases Report of Climacteric Symptoms with Shihogayonggolmoryo-tang. *The journal of oriental obstetrics & gynecology*. 2013;26(1):121-34.
- Kim KS, Kim WC, Kim KO. A Study about trends of using Shihogayong-golm-oryo-tang granule Shihogayonggolmoryo-tang, Herbal extracts, non-prescription medicine, prescription medicine. *The Korean journal of oriental medical prescription*. 2013;20(1):159-66.
- Oh DR, Kim Y, Jo A, Im S, Kim CE, Jung MA, Shin J, Kang H, Choi EJ, Kim J, Choi C. Antidepressant-like and Hypnotic Effects of the Herbal Extract Combination of Stauntonia hexaphylla and Vaccinium bracteatum Fruit in Mice. *J Physiol & Pathol Korean Med*. 2020;34(2):88-96.
- Kim HR, Kwon YK, Choi BK, Jung HJ, Baek DG. Effect of Mixture of Atractylodes macrocephala and Amomum villosum Extracts on Body Weight and Lipid Metabolism in High Fat Diet-Induced Obesity Model. *J Physiol & Pathol Korean Med*. 2020;34(2):75-80.
- Jeong HY, Kwon YJ, Park IJ, Kwon JT, Han BH, Lee SP. Effects of the Sanjoin on the Rat Brain. *Korean Journal of Biological Psychiatry*. 1997;4(1):54-9.
- Hua R, Yu S, Liu M and Li H. A PCR-Based Method for RNA Probes and Applications in Neuroscience. *Front. Neurosci*. 2018;12:266.

25. Koprdoва R, Osacka J, Mach M and Kiss A. Acute Impact of Selected Pyridoindole Derivatives on Fos Expression in Different Structures of the Rat Brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2018;38:171-80.
26. Shin YI, Kim SH. *GuksiShanghanlun*. Seoul:Jumin Publisher. 2006:133-6.
27. Lobo IA, Harris RA. GABAA receptors and alcohol. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008;90(1):90-4.
28. Malenka RC, Nestler EJ, Hyman SE. "Chapter 6: Widely Projecting Systems: Monoamines, Acetylcholine, and Orexin". In Sydor A, Brown RY (eds.). *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*. 2nd ed. New York:McGraw-Hill Medical. 2009: 175-6.