

靑皮가 강제수영부하에 따른 우울행동에 미치는 영향

권용욱, 이태희*

경원대학교 한의과대학 방제학교실

Antidepressant Effects of Citri Reticulatae Viride Pericarpium in the Forced Swimming Test

Yong-Uk Kwon, Tae-Hee Lee*

Dept. of Formulae Pharmacology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

ABSTRACT

Objectives : Investigation of the antidepressant effects of Citri Reticulatae Viride Pericarpium(CR)

Methods : In order to investigate the antidepressant effects of Citri Reticulatae Viride Pericarpium(CR), we performed the forced swimming test. Also the expression of CRF, HSP70 and c-fos was measured with immunohistochemical method at PVN.

Results : 1. The duration of immobility in the forced swimming test was significantly decreased in the CR 100mg/kg, 400mg/kg groups.

2. In the Control group, CRF expression was significantly increased in the PVN. Also, these CRF increase were significantly reduced in the CR 100mg/kg and 400mg/kg treated group.

3. HSP70 expression was significantly decreased at PVN in the CR 100mg/kg and 400mg/kg treated group.

4. C-fos expression was significantly decreased at PVN in the CR 100mg/kg and 400mg/kg treated group.

Conclusions : According to the results, it can be considered that Citri Reticulatae Viride Pericarpium has antidepressant effect.

Key words : Citri Reticulatae Viride Pericarpium, FST, CRF, HSP70, c-fos, PVN.

서론

다양한 정신질환들 중에서 주요우울증 및 조울증 등을 포함하는 기분장애는 세계적으로 한 해에 약 10%가 인종에 관계없이 앓고 있는 현대 인간사회에서 가장 흔한 정신질환 중 하나이다. 이러한 기분장

애는 그 병증에 있어서 공통적으로 지속적인 우울감, 죄책감, 불안감, 자살충동과 시도 등의 우울증후군을 보여 일반적으로 우울증으로 통칭되곤 한다.

이러한 우울증은 정서적으로 우울하고 슬픈 느낌 이외에도 감정적, 신체적으로 여러 장애를 동반할 수 있는 위험한 정신과 질병이며, 임상적으로 활동증상,

* 교신저자 : 이태희, 경기도 성남시 수정구 복정동 산65 경원대학교 한의과대학 방제학교실

· Tel : 031-750-5418 · E-mail : ophm5418@kyungwon.ac.kr

· 접수 : 2008년 11월 7일 · 수정 : 2008년 12월 17일 · 채택 : 2008년 12월 22일

인지증상, 충동장애 조절, 행동증상과 즐거움의 상실, 피로감과 신체 증상 등 다양한 증상들의 조합으로 이루어진 증후군이다.

한의학에서는 정체되어 발산하지 못하는 증상을 총칭하여 鬱症이라 하는데, 鬱은 일반적으로 氣鬱을 가리킨다. 氣鬱이란 억압되고 침울한 마음으로 인하여 모든 생리기능이 침체되는 현상을 말한다. 이는 발산시킬 수 없는 욕구불만이나 지속되는 우수, 지나친 思慮나 悲嘆 등이 원인이 되는 수가 많다. 氣鬱이란 氣가 한 곳에 맺혀 머물러 있으면서 흩어지지 못하는 것으로, 대부분 七情이 鬱結되어 온다.

이런 氣鬱症은 기분이 항상 우울하고 사람을 싫어하는 정신적 증상을 나타내게 되므로 본인의 호소가 없더라도 겉에서 보기에 의욕 상실, 흥미 상실, 침묵, 무기력 등 생기가 없음을 알 수 있게 된다.

한약재의 항우울효과에 대한 실험적 연구로는 이¹⁾는 오수유 에탄올 추출물이 yohimbine 투여 후 생쥐의 사망률을 감소시켰음을 보고하였고, 김 등²⁾은 인삼, 향부자 추출물의 경구투여가 항우울 효과 및 항경련효과, 수면연장효과가 있음을 보고하였으며, 홍 등³⁾은 시호가 우울증 유도 백서의 뇌 부위별 카테콜라민을 측정하여 대뇌피질, 선조체, 시상하부에서 모두 유의하게 증가하였음을 보고하였고, 고 등⁴⁾은 지골피가 흰쥐의 복측피개야와 청반에서 TH(tyrosine hydroxylase)를 감소시켜 항우울 효과를 나타냄을 보고하였다.

靑皮(*Citri Reticulatae Viride Pericarpium*)는 芸香科에 속한 常綠小喬木인 귤나무(柑橘, *Citrus reticulata* Blanco)의 未成熟 果皮로, 通血脈, 疏肝破氣, 消積化滯하는 효능을 가지고 있어 氣滯로 인한 증상들에 사용된다. 氣滯는 대부분 일상생활에서 발생하는 스트레스 등으로 氣機의 흐름이 阻滯된 것을 말하는데, 만약 이 氣滯가 血行을 不暢케 하면 瘀血이나 痰飲 등이 발생됨으로써 다양한 증상들이 나타나게 된다. 이러한 靑皮에 대한 기존의 실험연구 보고로는 虛血性 腦損傷, 肝損傷, 면역세포에 미치는 영향 등에 대한 보고가 있었으며, 조 등⁵⁾은 靑皮가 세로토닌 재흡수를 억제하여 억제시킴으로써 항우울작용을 가지고 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 흰쥐의 우울행동을 유발하기 위하여 강제수영부하실험(FST, Forced Swimming Test)을 사용하였다. FST는 1978년 Porsolt 등에 의해 고안된 방법으로, 실험동물이 물이 담긴 실린더형 용기에서 수영을 하다 포기하고 부동자세를 취하는 것을 일종의 스트레스로 유발된 학습된 무력감 혹은 절망

행동으로 보고 이러한 부동자세를 나타내는 시간을 측정하여 평가하는 것이다. 대개 실험동물에게 약물을 투여하고 이 부동자세의 시간의 감소를 관찰함으로써 그 약물의 항우울효과를 살펴보는 지표로 많이 쓰인다.

우울증의 원인에 대해서는 여러 가지 가설이 있다. 모노아민 가설은 뇌의 노르아드레날린 혹은 세로토닌의 부족이 우울증의 증상들을 유발하는 원인이 된다는 가설이다. 또다른 가설로는 HPA(Hypothalamo-pituitary-adrenocortical) axis의 이상이 CRF(corticotropin-releasing factor)의 분비를 증가시키고 이것이 ACTH(adrenocorticotropin hormone), 코티솔의 분비를 자극한다는 것이다. 세 번째 가설로는 마크로파지 이론이 있는데 이는 사이토카인, IL-1(interleukine-1), INF- α (interferon- α)의 이상분비로 인해 CRF, ACTH, prolactin, cortisol의 이상분비가 나타나게 되고 이로 인해 우울증의 증후군이 발생하게 된다는 것이다.

이에 저자는 靑皮가 FST에서 흰쥐의 우울행동에 미치는 효과를 알아보기 위해 흰쥐에게 FST를 실시하여 행동변화를 살펴보고, 면역조직화학법으로 HPA axis와 관련하여 시상하부의 실방핵(PVN, paraventricular nucleus)에서 CRF, HSP70(heat shock protein 70), c-fos의 발현을 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

중량 200g 내외의 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐(Orient사)를 고품사료와 물을 충분히 공급하면서 2주일간 실험실 환경에 적응 시킨 후, 실험에 사용하였다. 낮과 밤 주기는 오전 7시부터 오후 7시까지를 낮으로, 다른 12시간을 밤으로 하여 자동 조절하였다. 온도는 20-24°C, 습도는 36-64%로 유지하였다.

2) 제약

연구에 사용한 한약재는 芸香科(Rutaceae)에 속한 常綠小喬木인 귤나무(柑橘, *Citrus reticulata* Blanco)의 未成熟 果皮 혹은 幼果를 건조한 것을 추출용 시료로 사용하였다. 靑皮는 300g에 10배(w/v)량의 3차 증류수를 가하여 100°C에서 4시간 동안 냉각기를 장착한 상태로 환류 추출한 다음, 거즈로 여과하여, 80°C

에서 중탕 농축하여 하루 동안 80℃에서 냉각시킨 후, 40℃ 온도로 냉각동결건조시켜 분말로 靑皮 60g을 획득하였다. 투약시는 건조된 약제를 분량에 맞게 saline을 첨가하여 용액을 만들었다.

2. 실험

1) 실험군

실험은 두 단계로 나누어 실시하였다. 먼저 FST에서는 Control(생리식염수 투여, N=8), CR100(靑皮 100mg/kg p.o.투여, N=8), CR400(靑皮 400mg/kg p.o.투여, N=8)의 3그룹으로 나누어 실시하였고, 면역조직화학법에서는 Normal(N=8), Control(생리식염수 투여, N=8), CR100(靑皮 100mg/kg p.o.투여, N=8), CR400(靑皮 400mg/kg p.o.투여, N=8)의 4그룹으로 나누어 실시하였다.

2) 강제수영부하실험

본 실험에서는 절망행동검사(behavioral despair test)라고도 하는 표준화된 검사법인 FST를 이용하였다. 이 검사법은 약물개발시의 항우울효과를 검색하는 기본적인 실험으로 알려져 있다. 이 실험은 두 번에 걸쳐 이루어지는데, 첫 번째 날은 높이 50cm, 지름 30cm의 투명한 아크릴원통형 수조에 22℃의 물에 랫트의 꼬리가 바닥에 닿지 않을 정도의 물 높이에 강제로 빠뜨린 다음 15분간 있게 하였다. 처음 수분간은 이를 벗어나기 위해 랫트가 심한 저항을 보이거나, 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어난다. 두 번째 날, 즉 24시간 후에는 5분간 같은

환경에서 강제 수영을 시키고, 여기서 climbing, swimming, immobility 세 가지를 측정한다. 전형적인 immobility 랫트가 얼굴을 포함한 상체의 일부분만 수면 위로 드러낸 채 몸의 균형을 유지하기 위하여 약간의 움직임만을 나타낼 뿐 물 위에 떠 있는 상태이다. 한편 swimming은 랫트가 수면 위를 돌면서 움직이고, 간혹 물밑으로 잠수하기도 하는 상태이다. climbing은 가장 격렬한 운동 상태인데, 앞발을 적극적으로 사용하여 아크릴 원통 위로 오르려고 사지를 다 쓰는 상태이다. 실수와 사람에게 의한 오차를 줄이기 위해 비디오카메라로 측정하여 자료를 확보하였다.

3) 면역조직화학법

(1) CRF

강제수영 부하실험이 끝난 쥐를 sodium pentobarbital (80mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 0.9% saline 200ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 100ml을 심장을 통해 관류하였다. 고정액의 처음 300ml는 2분간, 나머지 700ml는 25분간에 걸쳐 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 후 고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4℃에서 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 30µm의 두께로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, CRF expression에 가장 널리 사용되는 Goat anti CRF (santa cruz biotechnology)에 담갔다. Primary antibody는 0.3% Triton X100(PBST)에서 2% normal donky serum과 0.001% kehole limpit hemocyanin (sigma)으로 2,000배로 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 primary antiserum에서 72시간 배양하였다. 그 후 뇌 조직을 PBST로 씻은 다음, 2시간 동안 실온에서 2% normal donky serum을 함유하는 PBST에서 200배로 희석한 biotinylates goat anti goat serum(Santa Cruz Biotechnology)에 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Santa Cruz ABC reagent (Santa Cruz)에 담가 반응시켰다. PBST로 몇 번 헹군 다음 뇌 조직을 착색제인 diaminobenzidine을 사용하여 발색시켰다. 발색이 끝난 조직은 slide에 올려 2시간 동안 실온에서 건조 시킨 후, xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입하였다. 뇌조직의 각 부위는 염색성을 광학현미경으로 100배 확대 관찰하고 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos의 부도를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자(2×2cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성의 정도를

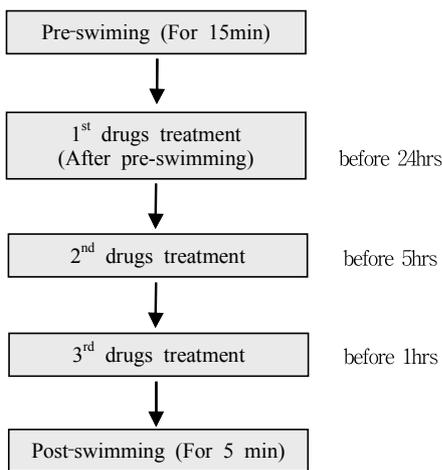


Fig. 1. Experimental scheme of forced swimming test

counting 하였다.

(2) HSP70

강제수영 부하시험이 끝난 쥐를 sodium pentobarbital (80mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 0.9% saline 200ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 100ml를 심장을 통해 관류하였다. 고정액의 처음 300ml은 2분간, 나머지 700ml은 25분간에 걸쳐 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 후 고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)에 넣어 4°C에서 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 30 μ m의 크기로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, HSP70 expression에 가장 널리 사용되는 Mouse anti HSP70 (Zymed Laboratories, Sanfrancisco, CA)에 담갔다. primary antibody는 0.3% Triton X100 (PBST)에서 2% normal goat serum과 0.001% kehole limpit hemocyanin (sigma)으로 2,000배로 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 primary antiserum에서 72시간 배양하였다. 그 후 뇌 조직을 PBST로 씻은 다음, 2시간 동안 실온에서 2% normal goat serum을 함유하는 PBST에서 200배로 희석한 biotinylates goat anti mouse serum (Santa Cruz Biotechnology.)에 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Santa Cruz ABC reagent (Santa Cruz)에 담가 반응시켰다. PBST로 몇 번 헹군 다음 뇌 조직을 착색제인 diaminobenzidine을 사용하여 발색시켰다. 발색이 끝난 조직은 slide에 올려 2시간 동안 실온에서 건조시킨 후, xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입하였다. 뇌 조직의 각 부위는 염색성을 광학현미경으로 100배 확대 관찰하고 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos의 부도를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자 (2 \times 2cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting 하였다.

(3) c-fos

강제수영 부하시험이 끝난 쥐를 sodium pentobarbital (80mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 0.9% saline 200ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 100ml를 심장을 통해 관류하였다. 고정액의 처음 300ml은 2분간, 나머지 700ml은 25분간에 걸쳐 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 후 고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)에 넣어 4°C에서 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 30 μ m의 크기

로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, c-fos expression에 가장 널리 사용되는 Rabbit anti c-fos (santa cruz biotechnology)에 담갔다. primary antibody는 0.3% Triton X100(PBST)에서 2% normal goat serum과 0.001% kehole limpit hemocyanin (sigma)으로 2,000배 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 primary antiserum에서 72시간 배양하였다. 그 후 뇌 조직을 PBST로 씻은 다음, 2시간 동안 실온에서 2% normal goat serum을 함유하는 PBST에서 200배로 희석한 biotinylates goat anti rabbit serum(Santa Cruz Biotechnology.)에 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Santa Cruz ABC reagent (Santa Cruz)에 담가 반응시켰다. PBST로 몇 번 헹군 다음 뇌 조직을 착색제인 diaminobenzidine을 사용하여 발색시켰다. 발색이 끝난 조직은 slide에 올려 2시간 동안 실온에서 건조시킨 후, xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입하였다. 뇌 조직의 각 부위는 염색성을 광학현미경으로 100배 확대 관찰하고 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos의 부도를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자 (2 \times 2cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting 하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은(평균값 \pm 표준오차)로 표시하였고, 각 실험군의 통계학적 분석은 window용 SPSS를 이용하였다. 행동 실험결과 및 면역조직 화학법에 대한 통계분석은 one way ANOVA로 분석하였으며, 사후검정은 LSD를 통해 검증하였으며, P값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

1. 강제수영부하실험

FST 결과는 Fig. 2, 3과 같다. Control에서 10.4 \pm 1.3 sec를 나타낸 것과 비교해서 靑皮 100mg/kg그룹(CR100)에서는 3.0 \pm 0.8sec, 靑皮400mg/kg그룹(CR400)에서는 6.7 \pm 1.8sec를 나타내 부동행동이 유의성있게 감소하였다.

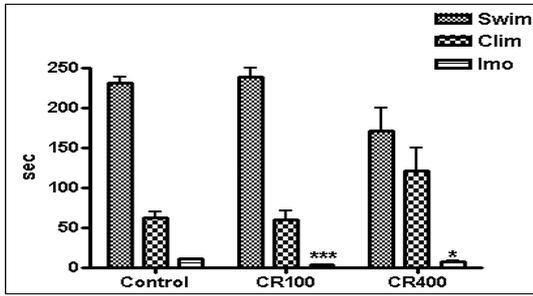


Fig. 2. Effect of Citri Reticulatae Viride Pericarpium in the forced swimming test

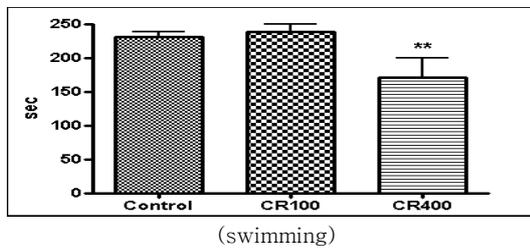
Control : Saline.

CR100 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium(100mg/kg).

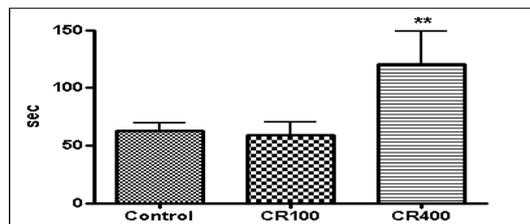
CR400 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium(400mg/kg).

*, ***, Significant difference from the control group.

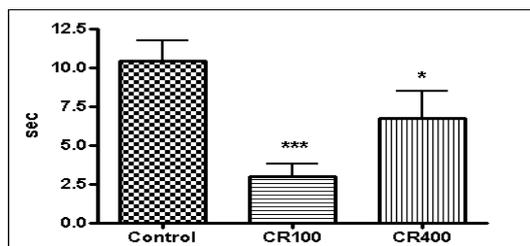
* P < 0.05, *** P < 0.001.



(swimming)



(climbing)



(immobility)

Fig. 3. Effect of Citri Reticulatae Viride Pericarpium in the forced swimming test

Control : Saline.

CR100 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium(100mg/kg).

CR400 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium(400mg/kg).

*, **, ***, Significant difference from the control group.

*: P < 0.05, **: P < 0.01. ***: P < 0.001.

2. 면역조직화학법 결과

1) 실방핵(PVN, paraventricular nucleus)에서 CRF 발현

FST 실시 후, PVN 내에서의 CRF 발현은 Fig. 4, 5 와 같다. 대조군을 100으로 보고 각각의 발현 세포수를 %로 비교해 본 결과, 靑皮 100mg/kg그룹(CR100)과 靑皮 400mg/kg그룹(CR400)에서 각각 80.76±7.5%, 53.84±8.2%를 나타내, PVN 내에서의 CRF의 발현이 감소되었고, 특히 靑皮 400mg/kg 그룹(CR400)에서는 유의성 있게 감소하였다(F(3,35) = 11.319, p < 0.001).

Fig. 4. Expression of CRF-immunoreactive cells in the PVN (paraventricular nucleus)

Normal : No treatment.

Control : Saline and the forced swimming test.

CR100 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium(100mg/kg) and the forced swimming test.

CR400 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium(400mg/kg) and the forced swimming test.

: Significant difference from the Normal group (### P < 0.001).

** : Significant difference from the control group (** P < 0.01).

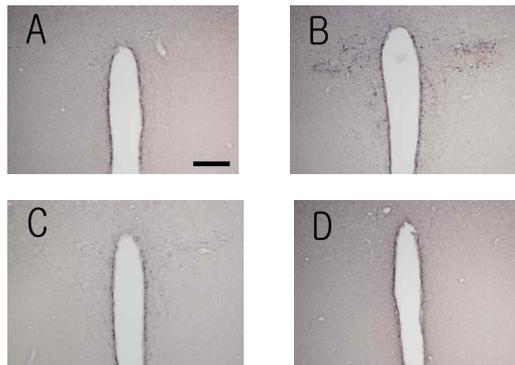


Fig. 5. Expression of CRF-immunoreactive cells in the PVN

scale bar represents 200µm.

A: Normal, B: Control, C: CR100, D: CR400.

2) 실방핵(PVN, paraventricular nucleus)에서 HSP70 발현

FST 실시 후, PVN 내에서의 HSP70의 발현은 Fig. 6, 7과 같다. 대조군을 100으로 보고 각각의 발현 세포수를 %로 비교해 본 결과, 靑皮 100mg/kg 그룹(CR100)에서는 73.64±13.97%, 靑皮 400mg/kg 그룹(CR400)에서는 50.38±7.14%를 나타내, 靑皮 400mg/kg 그룹(CR400)에서 유의성있게 감소하였음을 알 수 있다(F(3,23)=4.840, p < 0.05).

Fig. 6. Expression of HSP70-immunoreactive cells in the PVN

Normal : No treatment.
 Control : Saline and the forced swimming test.
 CR100 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium(100mg/kg) and the forced swimming test.
 CR400 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium(400mg/kg) and the forced swimming test.
 ## : Significant difference from the normal group (## P < 0.01).
 ** : Significant difference from the control group (** P < 0.01).

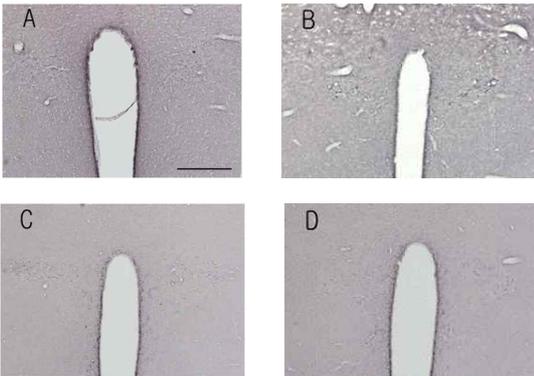


Fig. 7. Expression of HSP70-immunoreactive cells in the PVN

scale bar represents 200µm.
 A: Normal, B: Control, C: CR100, D: CR400.

3) 실방핵(PVN, paraventricular nucleus)에서 c-fos 발현

FST 실시 후, PVN 내에서의 c-fos의 발현은 Fig. 8, 9와 같다. 대조군을 100으로 보고 각각의 발현 세

포수를 %로 비교해 본 결과, 靑皮 100mg/kg 그룹(CR100)은 73.64±13.97%, 靑皮 400mg/kg 그룹(CR400)은 50.38±7.14%를 나타내, 대조군에 비해 유의성있는 감소를 나타내었다(F(3,26)=8.585, p<0.01).

Fig. 8. Expression of c-fos-immunoreactive cells in the PVN

Normal : No treatment.
 Control : Saline and the forced swimming test.
 CR100 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium(100mg/kg) and the forced swimming test.
 CR400 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium(400mg/kg) and the forced swimming test.
 ## : Significant difference from the normal group (## P < 0.01).
 *** : Significant difference from the control group (** P < 0.001).

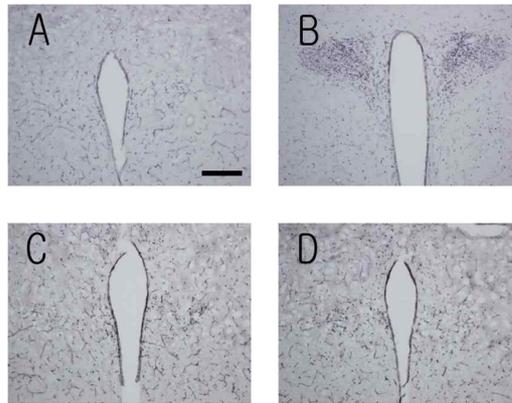


Fig. 9. Expression of c-fos-immunoreactive cells in the PVN

scale bar represents 200µm.
 A: Normal, B: Control, C: CR100, D: CR400.

고찰

한의학에서 정체되어 발산하지 못하는 증상을 총칭하여 鬱症이라 하는데, 鬱은 일반적으로 氣鬱을 가리킨다. 氣鬱이란 억압되고 침울한 마음으로 인하여 모든 생리기능이 침체되는 현상을 말한다. 이는 발산시킬 수 없는 욕구불만이나 지속되는 憂愁, 지나친 思慮나 悲嘆 등이 원인이 되는 수가 많다. 氣鬱이란

氣가 한 곳에 맺혀 머물러 있으면서 흩어지지 못하는 것으로, 대부분 七情이鬱結되어 온다. 이에 대해 《黃帝內經·素問·六元正紀大論》⁶⁾에 “木鬱達之, 火鬱發之, 土鬱奪之, 金鬱泄之, 水鬱折之”라 하였고, 《黃帝內經·素問·至真要大論》⁶⁾에서는 “鬱者 結而不舒也”라 하였다.

이러한 氣鬱症의 원인은 思慮過度나 失意, 悲嘆 등 정신적인 충격이 臟氣를 쇠약하게 하고, 그로 인해 氣血의 順行이 지체되거나 濕熱, 食痰 등이 정체되어 흡수, 배설이 원활치 못한 데서 鬱症이 생기게 된다. 또한 정신적인 요인 중에서도 특히 자기의 뜻을 펴지 못할 때, 즉 욕구불만이 쌓일 때 鬱症이 오는 경우가 많으므로 평소 소심한 사람이나 내성적인 사람에게 흔히 나타난다고 하겠다.

鬱症은 情志不舒와 七情所傷뿐만 아니라 內外六淫, 飲食內傷, 勞傷 등을 포괄하는 氣機阻滯의 病變을 조성하는데 그중 특히 情志所傷이 後代로 가면서 점차 중요한 원인으로 강조되었다. 이에 대해 朱⁷⁾는 “氣之初病 其端甚微, 或因七情, 或感六氣, 或因飲食, 以致津液不行, 清濁相干, 自氣成積, 自積成痰, 氣爲之鬱, 或痞或痛. 鬱者 結聚而不得發越也, 當升者不得升, 當降者不得降, 當變化者不得變化也. 此爲傳化失常 六鬱之病 見矣”라 하여 氣의 升降傳化 작용이 失常하면 六鬱이 생긴다고 하고 鬱症을 氣鬱, 濕鬱, 痰鬱, 熱鬱, 血鬱, 食鬱의 六鬱로 나누어 인식하였다. 張⁸⁾은 “凡五氣之鬱, 則諸病皆有此因病而鬱也. 至若情志之鬱, 則總由乎心, 此因鬱而病也”, “若憂鬱病者, 則全屬大虛, 本無邪實”이라 하여 氣鬱로 인한 鬱症의 病機를 설명하였고 이를 怒鬱, 思鬱, 憂鬱로 나누어 보았다. 葉⁹⁾은 情志不舒로 인한 七情鬱의 증상을 辨證하였고, “鬱則氣聚 聚則似有形而實無質”이라 하여 氣鬱로 인해 생기는 병의 성질을 기능적 병리상태로 파악하였으며 趙¹⁰⁾는 鬱症을 肝氣鬱結, 氣鬱化火, 痰氣鬱結의 實證과 久鬱傷神, 陰虛火旺의 虛證으로 나누어 각각의 다양한 증상을 열거하였다.

또한 서 등¹¹⁾은 鬱症은 인체생리과정 중에 일어나는 기능적인 장애 및 병리적인 산물을 말하는 것이고, 憂鬱症은 정신적인 면에 있어서의 情緒의 병리현상을 말하는 것으로 그 개념이 서로 완전히 일치하지는 않지만 憂鬱症을 신경증적인 憂鬱과 정신병적인 憂鬱로 분류했을 때, 鬱症과 신경증적인 憂鬱은 情志所傷과 생활, 환경적 스트레스 인자 등의 원인에서 증상이 나타나는 점에서 서로 유사하다고 하여 憂鬱症이 鬱症의 범위에 포함될 수 있고, 鬱症에 대한 치료방법을 憂鬱症의 치료에 적용할 수 있음을 보였다.

靑皮(*Citri Reticulatae Viride Pericarpium*)는 芸香科(Rutaceae)에 속한 常綠小喬木인 귤나무(柑橘, *Citrus reticulata* Blanco)의 未成熟 果皮 혹은 幼果를 건조한 것으로, 그 氣味는 苦辛微溫하고 肝, 膽經으로 들어가 疏肝破氣, 散結消痰, 散積化滯하는 효능이 있어 肝氣鬱結, 氣滯로 인한 증상들에 사용된다.

본 연구에서는 흰쥐의 우울행동을 유발하기 위하여 FST를 사용하였는데, FST는 1978년 Porsolt 등에 의해 고안된 방법으로 절망행동모델이라고도 불린다. 흰쥐를 도피 불가능한 수조에 빠뜨리면 처음에는 출구를 찾아 격렬히 수영을 하다가 결국은 코를 수면 위에 내놓기 위한 최소한의 동작 이외에는 특징적인 부동자세를 취함을 관찰하고, 이를 스트레스로 유발된 학습된 무력감 혹은 절망행동으로 보고 우울증의 동물모형이라 제안한 것으로, 실험방법이 간단하고 예측타당도가 인정되어 항우울제의 효과관정을 위한 방법으로 널리 사용되고 있다. 15분간 물에 빠뜨리는 예비 실험 후 24시간 후 본 실험을 시행하였는데, 수영을 하다 포기하고 부동자세를 취하여 좌절 양상을 보이는 시간을 측정하여 평가한다.

한의학에서 FST에 의한 항우울효과에 관한 연구로 신 등¹²⁾은 FST를 통해 유발된 우울증 쥐에게 四逆散을 투여한 결과, 부동시간이 줄고 뇌내 Monoamine검사에서 항우울 효과가 있는 것을 확인한바 있으며, 홍 등¹³⁾은 시호 추출물의 경구투여가 카테콜아민에 변화를 주어 쥐의 우울증 유발을 억제할 수 있는 것을 확인하였고, 조 등¹⁴⁾은 柴胡抑肝湯이 스트레스를 가한 흰쥐의 부동행동이 감소되었음을 확인하였으며, 고 등⁴⁾은 지골피가 스트레스에 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향을 보고하였다.

본 실험의 결과를 보면 靑皮를 투여한 그룹에서 대조군에 비해 부동행동이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 특히 靑皮 100mg/kg투여한 그룹은 3.0±0.8sec로 대조군의 10.4±1.3sec에 비해 부동행동이 유의성있게 줄어드는 것을 관찰할 수 있었으며, 靑皮 400mg/kg를 투여한 그룹에서도 6.7±1.8sec로 대조군에 비해 부동행동이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 FST로 인해 흰쥐의 우울행동이 유발되었고, 靑皮의 투여가 FST에서 나타나는 흰쥐의 우울행동을 억제하는 작용을 하고 있음을 알 수 있다.

한편 청피 100mg/kg그룹이 청피 400mg/kg그룹보다 더 유의성있는 억제작용을 나타낸 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 약물의 투여량 변화에 따라 청피의 항우울효과가 관련이 있음을 보여주는 것이라 할 수 있는데, 본 실험에서 적은 양을 투여했을 때 흰쥐의

부동행동을 더욱 억제하는 것으로 나타난 것은 조직 차원에서의 변화가 나타나는 시간과 행동차원에서의 변화가 나타나는 시간 사이에 간극이 있어 이러한 결과를 나타내는 것이 아닌가 추측된다. 즉 저용량의 약물 흡수가 고용량의 경우보다 더 빠르게 진행되어 행동상의 변화 또한 더 빨리 나타나게 하는 것으로 생각된다. 이를 확인하기 위해 용량을 더욱 세분화한 후속실험이 필요하리라 여겨진다.

우울증삽화의 발생이 대개의 경우 다양한 형태의 스트레스가 있는 정황에서 일어난다는 점은 비록 스트레스가 우울증을 일으키는 충분조건은 아니라 할지라도 그것이 우울증 발현에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 이러한 관점에서 우리 몸에서 스트레스에 대응하는 중요한 요소인 HPA axis는 우울증 연구에 있어서 오랫동안 관심의 초점이 되어왔다.

일반적으로 스트레스 현상은 HPA axis의 과도한 활동 및 그로 인한 glucocorticoid의 증가와 관련된다. 정신적 스트레스는 대뇌피질을 통해 인식되어 변연계를 통해 시상하부로 전달되고, 신체적 스트레스는 뇌간을 통해 역시 시상하부로 전달되는 것으로 알려져 있다. 스트레스가 계속되면 시상하부의 PVN에서 CRF를 방출하고 이는 뇌하수체 전엽으로 이동하여 ACTH가 분비되도록 유도하며 이 ACTH는 혈액순환을 통해 부신으로 이동하고 부신피질에서 작용하여 corticosteroid 합성을 유발하며 따라서 혈장 내 glucocorticoid의 농도를 높인다. 이렇게 해서 glucocorticoid의 농도가 높아지게 되면 신경세포들을 죽이는 등 건강을 해치는 작용을 하게 되며 생리적, 정신적 이상을 유발할 수 있다. 예를 들면 스트레스의 부적당한 조절은 대장염, 천식, 고혈압과 같은 전신적인 질병과 우울증 등의 정서장애, 알츠하이머 같은 퇴행성신경질환 등의 병인이 된다는 보고¹⁵⁾가 있으며, 또한 이러한 HPA axis의 과다한 활성화는 약 50%의 우울증 환자로부터 관찰되고 항우울제의 지속적인 투여가 이러한 현상을 완화한다는 보고가 있다.

최근의 여러 실험적 증거들에 따르면, 스트레스에 의해 야기되는 glucocorticoid의 방출은 HPA axis를 통해 조절된다. 시상하부 PVN의 parvocellular 세포가 CRF를 합성생산하여 뇌하수체로 하여금 ACTH 유리를 촉진시켜 결과적으로 부신피질에서 glucocorticoid를 분비한다. 즉 PVN은 HPA axis의 기시점으로 여러 가지 스트레스 반응에 중추적 기능을 수행하고 있음이 밝혀지고 있다.

본 실험에서는 靑皮가 FST에서 흰쥐의 우울행동을 억제하는 것이 HPA axis와 관련하여 항우울 효

과를 나타내는 것이 아닌가 하는 추론을 확인해보기 위해 시상하부의 PVN에서 CRF를 측정하여 보았다.

CRF는 HPA axis에서 스트레스의 영향을 증대하고 스트레스에 대한 내분비, 자율신경, 행동적, 면역 등의 반응을 매개하는 중요한 역할을 한다.

스트레스를 경험하면 PVN에서 뿐만 아니라 청반이나 편도체 중심핵 등의 부위에서 CRF mRNA와 그 생성이 증가되고, 특히 청반과 편도체 중심핵 등의 부위가 스트레스로 인하여 증가된 CRF가 여러 행동적인 변화를 유발하는데 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고 있다. 또한 CRF의 수용체인 CRF1과 CRF2가 불안과 관련되는 것으로 보고¹⁶⁾되고 있다. 우울증 환자를 검시한 연구에서 이들의 PVN에 CRF mRNA가 증가되어 있었고 척수액내 CRF 및 소변내 cortisol이 증가되었다는 보고¹⁷⁾가 있었다. 또한 우울증 환자에게 항우울제를 투여하거나 전기경련치료를 실시하면 척수액 내의 CRF 함량이 정상으로 돌아오는 것으로 보고되고 있으며, 항우울제의 투여가 glucocorticoid 수용체의 세포질내에서 핵내로의 이동과 전사 등을 증가시킨다는 보고¹⁸⁾도 있다.

또한 Campbell 등¹⁹⁾은 뇌내에 CRF를 주입, 관찰한 보고를 통해 HPA axis가 CRF에 민감히 반응함을 보여주었으며, CRF1 receptor antagonist의 투여가 스트레스에 대한 HPA axis의 조절과 관계없이 우울, 분노 행동을 감소시킨다고 보고하였다. Imaki 등²⁰⁾은 CRF antagonist를 직접 주입하고 구속스트레스 후 PVN에서의 면역조직화학적 변화를 관찰한 실험보고를 통해 CRF가 스트레스 중 PVN의 neuron들을 활성화시킴으로써 스트레스반응에 중요한 역할을 한다고 하였다. 박 등²¹⁾은 흰쥐의 PVN에서 BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor)와 CRF의 발현을 봄으로써 quetiapine의 항우울효과를 확인하였으며, quetiapine의 투여가 CRF의 발현을 감소시킴으로써 항우울효과를 나타낸다고 보고²²⁾하였다.

중추의 CRF 시스템 과항진은 기분장애와 연관된다. CRF는 CRF1 receptor와 높은 친화성을 가지는데, CRF 시스템의 흥분은 CRF의 증가된 농도에 의해서 CRF1 receptor가 활성화되는 것에서 유발된다고 여겨진다. CRF1 receptor는 대뇌신피질, 편도체, 뇌간 핵 등에 분포하며, CRF1 receptor를 녹아웃시킨 생쥐를 관찰한 실험에서 분노(鬱火)와 유사한 행동이 줄었다는 보고²³⁾가 있었고, CRF1 receptor의 활성을 막는 oligodioxynucleotides를 주입하였을 때 분노(울화)행동을 나타낼 때의 CRF 발현을 억제시킨다는 보고²⁴⁾가 있었다. 잠복기와 치료시의 실험에서

CRF1 receptor antagonist가 항우울제와 같은 작용을 나타낸다는 보고²⁵⁾도 있다.

본 실험의 결과 대조군을 100으로 보고 각각의 발현 세포수를 %로 비교해 본 결과, 靑皮 100mg/kg 그룹과 靑皮 400mg/kg 그룹에서 각각 $80.76 \pm 7.5\%$, $53.84 \pm 8.2\%$ 를 나타내, PVN 내에서의 CRF의 발현을 억제시켰다. 이는 여러 선행연구보고 결과에서 항우울제의 투여가 CRF의 발현을 감소시킨다고 한 것과 일치하는 것으로 靑皮的 투여가 시상하부의 PVN에 작용하여 CRF의 발현을 억제시키는 것으로 보이며, 특히 CRF1 receptor antagonist와 유사한 역할을 함으로써 항우울효과를 나타내는 것으로 생각된다.

면역조직화학적 연구에서 HSP는 HSP10, HSP27, HSP60, HSP70 및 HSP90 등과 ubiquitin 등이 존재하며 이는 그 분자량에 의해 명칭이 붙여진 것이다. 특히 HSP70은 태아 발달 초기 단계에서 중추신경계에 대한 고온, 허혈, 외상, 경련 같은 자극에 의해 비교적 높게 발현되고 단백질의 folding과 unfolding, 단백질의 세포내 이동, 면역글로블린과의 결합, 항원 전달, 자가면역기전예의 관여 등 인체 내에서 중요한 기능을 하는 것으로 보고되고 있다.

HSP합성은 물리적, 화학적 손상에 의해 자극되며 열, 화학물질, 혈액 및 포도당 결핍, 감염 등에 의한 세포의 손상으로부터 세포를 보호하고 회복시키는 스트레스 반응에 있어 중요한 역할을 담당한다. 여러 종류의 HSP 중 HSP70은 온도변화에 가장 민감하게 반응하며, 세포가 온도 상승의 조건에 처했을 때 수분 이내에 세포 내에서 합성되며, 세포에 스트레스가 주어졌을 때 세포를 보호하고, 과도한 외부 자극 등의 부적절한 조건하에서 세포의 생존력을 증가시켜주는 물질이다. 또한 HSP는 복합물을 구성할 때 분자적 표식자 기능을 하는 ATP-binding proteins의 하나인데, 예를 들면 GC(Glucocorticoid)가 GR (Glucocorticoid Receptor)과 결합할 때 protein folding을 돕는 역할을 한다. HSP70은 단백질 결합을 촉매하거나 GR을 친화력이 높은 결합상태로 변화시킴으로써 GR heterocomplex를 적합하게 구성하는 데에 필수적이다.

주요우울증 환자들의 말초혈관 단핵혈구에서 HSP70 mRNA의 결핍이 있었다는 보고²⁶⁾가 있었고, HSP가 우울증에서 나타나는 면역기능 저하와 관련되며 염증반응체계를 활성화시키며²⁷⁾, HSP가 ACTH나 카테콜라민 같은 스트레스 매개물들에 의해 유도되므로 스트레스 반응의 척도가 될 수 있고, 주요우울증, 스트레스로 유발되는 질병들의 병태생리를 해명하기 위해 HSP와 그 mRNA의 추적을 제안한 보고도 있었다²⁸⁾. 또한 Pae 등²⁹⁾

은 항우울제들이 HSP의 유전적 발현에 영향을 미침으로써 항우울 작용을 나타낸다고 보고하였다.

본 실험에서는 우울상태와 관련하여 시상하부의 PVN에서 HSP70 발현의 변화를 살펴보았는데, 대조군을 100으로 보고 각각의 발현 세포수를 %로 비교해 본 결과, 靑皮 100mg/kg 그룹에서는 $73.64 \pm 13.97\%$ 로 그 발현이 감소함을 보였고, 靑皮 400mg/kg 그룹(CR400)에서는 $50.38 \pm 7.14\%$ 를 나타내 유의성 있게 감소하였음을 알 수 있었다.

이는 靑皮가 HSP70의 발현을 억제시킴으로써 항우울 작용을 가지고 있음을 보여주는 것이다. 이에 대해 한 선행연구³⁰⁾에서 HSP70 발현의 변화가 GR과 연관되어 HPA axis에서 GC의 negative feedback에 영향을 준다고 한 가설과 관련하여 靑皮的 HSP70 발현억제기전을 추측해볼 수 있겠다. 반면에 HSP70 mRNA의 발현이 GR mRNA의 발현과 관련이 없고 PVN에서 HSP70 발현 수준이 높더라도 GR의 기능에 대해 제한적으로 작용하지 않으며 다른 steroid receptor와 관련이 있다는 보고³¹⁾도 있어, HSP70의 역할과 관련한 靑皮的 작용기전에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

c-fos 단백질은 c-fos gene의 산물이고, c-fos gene은 proto-oncogene의 일종이며 IEG(Immediate Early Gene)의 하나로서 세포분열과 세포분화의 역할뿐만 아니라 세포표면에 전달된 자극에 반응하여 장기간 지속되는 세포 반응을 매개하는 역할을 한다고 알려져 있다. c-fos 단백질은 여러 약물이나 스트레스를 포함한 생리적 자극에 의해 발현되므로, 스트레스 및 스트레스와 관련된 우울증 연구에서 자주 관찰되는 지표이다.

스트레스는 세포들의 내적, 외적환경의 변화에 의해 야기되고, 세포가 스트레스에 노출되면 바로 c-fos를 포함한 초기 유전자들의 발현이 초기 단계에서 신속하게 전사된다. 그러므로 신경세포 활성화를 나타내는 지표인 c-fos mRNA를 사용해서 스트레스를 찾아낼 수 있다. 이전 연구들을 통해 구속스트레스에 의해 유발된 c-fos가 스트레스와 관련된 뇌 조직들, 즉 PVN, 편도체, 대뇌피질, 청반같은 곳에서 발현된다는 것이 밝혀졌다. 또 c-fos는 구속스트레스를 포함한 많은 종류의 스트레스 자극에 의해 해마에서 활성화되는데 endotoxin과 cytokines의 투여와 같은 전신성 스트레스와 통증과 같은 진행성 스트레스 모두 시상하부의 PVN에서 c-fos 발현을 증가시킨다는 보고³²⁾가 있었다.

선행연구들에서 c-fos는 뇌손상이나 스트레스가 있을 때 뇌 특정부위에서 활성화되어 증가하며, 항우

울 약물에 의해 우울증상이 개선되면 c-fos가 감소된다고 알려져 있다. 본 실험연구에서도 스트레스를 받으면 fos 발현이 증가되는 것으로 알려진 PVN에서 신경세포 활동성에 대한 지표가 되는 c-fos가 발현된 세포체의 수를 측정하였는데, 대조군을 100으로 보고 각각의 발현 세포수를 %로 비교해 본 결과, 靑皮 100mg/kg그룹은 $73.64 \pm 13.97\%$, 靑皮 400mg/kg그룹은 $50.38 \pm 7.14\%$ 를 나타내 대조군에 비해 유의성있는 감소를 나타내었다. 이는 靑皮的 투여가 PVN에 작용하여 c-Fos의 발현을 억제한 결과로 볼 수 있다.

Imaki 등³³⁾은 구속스트레스에 의한 실험에서 c-fos의 발현이 CRF의 발현을 유도한다고 보고하였고, Tan 등³⁴⁾은 구속스트레스가 c-fos와 ACTH의 발현, 면역반응은 유발하였으나 corticosterone의 분비에는 영향을 주지 않았다는 보고를 하였으며, Imaki 등³⁵⁾은 CRF antagonist를 직접 주입하고 관찰한 실험에서 스트레스 후 PVN에서의 c-fos 발현을 감소시켰다는 보고를 하였다. 이로 보아 靑皮가 FST로 유발된 흰쥐의 우울상태에서 시상하부의 PVN에서 c-fos의 발현을 억제함으로써 항우울 작용을 나타냄을 알 수 있다.

이상 살펴본 바와 같이 靑皮가 시상하부의 PVN에 작용하여 PVN에서 HPA axis와 관련된 스트레스물질인 CRF, HSP70, c-fos의 발현을 억제함으로써 항우울작용을 나타내는데, 특히 CRF antagonist와 같은 작용을 함으로써 이러한 항우울작용을 나타내는 것이 아닌가 생각된다.

한편 HSP70이나 c-fos의 발현은 CRF뿐만 아니라 세로토닌, 도파민 계열의 작용과도 연관이 되는데, 이에 대해 opioid 투여 중단을 통해 PVN에서 TH와 c-fos 발현을 관찰한 보고³⁶⁾가 있었고, Laorden 등³⁷⁾은 opioid receptor agonist를 주입한 후 PVN에서 TH와 c-fos의 발현을 관찰한 결과를 보고하였고, Ceccatelli 등³⁸⁾은 구속스트레스와 콜히친의 icv 투여가 PVN뿐만 아니라 뇌간의 카테콜라민 신경세포들에서도 c-fos의 발현을 유발한다고 보고하였다.

따라서 靑皮的 항우울 작용의 기전을 살피기 위해 CRF antagonist와 비교하고, 세로토닌, 도파민, 카테콜라민 계에 미치는 영향에 대한 추가연구가 필요하다고 생각된다.

결론

靑皮가 흰쥐의 우울행동에 미치는 효과를 알아보기 위해 FST를 실시하여 행동변화에 미치는 영향을 보고,

면역조직화학법으로 시상하부의 PVN에서 CRF, HSP70, c-fos의 변화를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. FST를 실시하고 부동행동이 나타나는 시간을 관찰한 결과, 대조군에 비해 靑皮 100mg/kg그룹과 靑皮 400mg/kg그룹에서 유의성있게 감소하였다.
2. 면역조직화학법으로 시상하부의 PVN에서 CRF의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 靑皮 400mg/kg그룹에서 CRF의 발현이 유의성있게 감소하였다.
3. 면역조직화학법으로 시상하부의 PVN에서 HSP70의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 靑皮 400mg/kg 그룹에서 HSP70의 발현이 유의성있게 감소하였다.
4. 면역조직화학법으로 시상하부의 PVN에서 c-fos의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 靑皮 100mg/kg 그룹과 靑皮 400mg/kg그룹에서 c-fos의 발현이 유의성있게 감소하였다.

이상과 같은 실험결과를 볼 때, 靑皮가 FST에서 시상하부의 PVN에 작용함으로써 흰쥐의 우울행동을 억제시키는 항우울효과가 있다고 생각된다.

참고문헌

1. 이태희. 오수유 분획물의 항우울증 효과에 대한 연구. 대한본초학회지. 1998 ; 13(1) : 139-45.
2. 김인재, 이동원. 인삼과 향부자의 항우울효과에 관한 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 2004 ; 15(1) : 101-19.
3. 홍성유, 박선동. 시호가 우울증 모델 백서의 카테콜라민에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003 ; 18(4) : 235-53.
4. 고동균, 이태희. 지골피가 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007 ; 22 : 137-46.
5. 조현미, 이태희, 손건호, 정진섭, 서홍원, 송등근, 김영희. 배양된 흰쥐 뇌간 신경세포에서 5-hydroxytryptamine 흡수에 대한 각종 전통 생약 추출물의 억제효과. 생약학회지, 1995 ; 26(4) : 349-54.
6. 王氷. 黃帝內經素問. 서울 : 대성출판사. 1990 : 306, 720.
7. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울 : 대성문화사. 1982 : 515-27.
8. 張介賓. 景岳全書. 서울 : 정담. 1999 : 385-6, 692, 1150.
9. 葉天士. 臨證指南醫案. 서울 : 정담. 1998 : 463-73.

10. 趙尙華, 張子琳醫療經驗選輯. 太原 : 山西人民出版社. 1986 : 88-91.
11. 서원희, 이상용. 鬱症과 憂鬱症의 比較考察. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1997 ; 6(1) : 505-14.
12. 신화석, 권영모, 박선동. 四逆散의 抗憂鬱效果 및 腦內 monoamine에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2004 ; 19(2) : 71-82.
13. 홍성유, 박선동. 柴胡가 우울증 모델 백서의 catecholamine에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003 ; 18(4) : 245-53.
14. 조용국, 이태희. 시호역간탕이 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향. 대한한의학방제학회지. 2007 ; 15(2) : 147-60.
15. Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Trends Neurosci. 1997 ; 20(2) : 78-84.
16. Owens MJ, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders. laboratory and clinical studies. Ciba Found Symp. 1993 ; 172 : 296-308.
17. Nemeroff CB, Bissette G, Akil H, Fink M. Neuropeptide concentrations in the cerebrospinal fluid of depressed patients treated with electroconvulsive therapy Corticotropin-releasing factor, beta-endorphin and somatostatin. Br J Psychiatry. 1991 ; 158 : 59-63.
18. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. J Neurosci. 1995 ; 15 : 7539-47.
19. Campbell BM, Morrison JL, Walker EL, Merchant KM. Differential regulation of behavioral, genomic and neuroendocrine responses by CRF infusions in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2004 ; 77(3) : 447-55.
20. Imaki T, Shibasaki T, Wang XQ, Demura H. Intracerebroventricular Administration of Corticotropin-Releasing Factor Antagonist Attenuates c-fos mRNA Expression in the Paraventricular Nucleus after Stress. Neuroendocrinology. 1995 ; 61 : 445-52.
21. 박성우, 이선경, 김영경, 이선정, 주명진, 이정구, 김영훈. 백서의 뇌에서 Quetiapine이 구속스트레스로 인한 BDNF와 CRF 발현에 미치는 영향. 대한정신약물학회지. 2006 ; 17(3) : 291-301.
22. Park SW, Lee SK, Kim JM, Kang HC, Yoon JS, Kim YH. Quetiapine regulates the stress-induced increase in corticotropin-releasing factor mRNA expression in the rat hypothalamus. Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry. 2007 ; 31(2) : 357-60.
23. Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. Nat Genet. 1998 ; 19 : 162-6.
24. Heinrichs SC, Lapsansky J, Lovenberg TW, De Souza EB, Chalmers DT. Corticotropin-releasing factor CRF1, but not CRF2, receptors mediate anxiogenic-like behavior. Regul Pept. 1997 ; 23(71) : 15-21.
25. Deak T, Nguyen KT, Ehrlich AL, Watkins LR, Spencer RL, Maier SF, Licinio J, Wong ML, Chrousos GP, Webster E, Gold PW. The impact of the nonpeptide corticotropin-releasing hormone antagonist antalarmin on behavioral and endocrine responses to stress. Endocrinology. 1999 ; 140 : 79-86.
26. Shimizu S, Nomura K, Ujihara M. An additional exon of stress-inducible heat shock protein 70 gene (HSP70-1). Biochem Biophys Res Commun. 1999 ; 257 : 193-8.
27. Sluzewska A, Rybakowski J, Bosmans E, Sobieska M, Berghmans R, Maes M. Indicators of immune activation in major depression. Psychiatry Res. 1996 ; 64 : 161-67.
28. Takimoto T, Nakamura K, Ueno H, Matsuda M, Fukunishi I, Ameno K, Iwahashi K. Major depression and heat shock protein 70-1 gene. Clinica Chimica Acta. 2003 ; 332(1-2) : 133-37.
29. Pae CH, Mandelli L, Serretti A, Patkar AA, Kim JJ, Lee CU, Lee SJ, Lee C, Ronchi D, Paik IH. Heat-shock protein-70 genes and response to antidepressants in major depression. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2007 ; 31(5) : 1006-11.

30. Pratt WB. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 1993 ; 268 : 21455-58.
31. Andrews MH, Matthews SG. Regulation of glucocorticoid receptor mRNA and heat shock protein 70 mRNA in the developing sheep brain. *Brain Research.* 2000 ; 878(1-2) : 174-82.
32. Helmreich DL, Cullinan WE, Watson SJ. The effect of adrenalectomy on stress-induced c-fos mRNA expression in the rat brain. *Brain Res.* 1996 ; 706 : 137-44.
33. Imaki T, Shibasaki T, Hotta M, Demura H. Early induction of c-fos precedes increased expression of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress. *Endocrinology.* 1992 ; 131 : 240-46.
34. Tan Z, Nagata S. PVN c-fos expression, HPA axis response and immune cell distribution during restraint stress. *Journal of UOEH.* 2002 ; 24(2) : 131-49.
35. Imaki T, Shibasaki T, Wang XQ, Demura H. Intracerebroventricular Administration of Corticotropin-Releasing Factor Antagonist Attenuates c-fos mRNA Expression in the Paraventricular Nucleus after Stress. *Neuroendocrinology.* 1995 ; 61 : 445-52.
36. Benavides M, Laorden ML, García-Borrón JC, Milanés MV. Regulation of tyrosine hydroxylase levels and activity and Fos expression during opioid withdrawal in the hypothalamic PVN and medulla oblongata catecholaminergic cell groups innervating the PVN. *Eur J Neurosci.* 2003 ; 17(1) : 103-12.
37. Laorden ML, Castells MT, Milanés MV. Effects of U-50, 488H and U-50, 488H withdrawal on c-fos expression in the rat paraventricular nucleus Correlation with c-fos in brainstem catecholaminergic neurons. *British Journal of Pharmacology.* 2003 ; 138 : 1544-52.
38. Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, Hokfelt T. Expression of c-Fos Immunoreactivity in Transmitter-Characterized Neurons after Stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989 ; 86 : 9569-73.