

柴胡가 강제수영부하시험에서 CRF, c-Fos, ACTH와 TH에 미치는 효과

김정훈, 이태희*

경원대학교 한의과대학 방제학교실

Effect of *Bupleuri Radix* on CRF, c-Fos, ACTH and TH in Forced Swimming Test

Jung-Hoon Kim, Tae-Hee Lee*

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

ABSTRACT

Objectives : The goal of this study was to investigate the antidepressive effect of *Bupleuri Radix* (BR).

Methods : The forced swimming test (FST) was performed. Also the expression of corticotropin releasing factor (CRF), c-Fos and tyrosine hydroxylase (TH) was measured immunohistochemically at paraventricular nucleus (PVN) and locus coeruleus (LC). Concentration of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) was measured in plasma by ELISA method.

Results : The immobility in BR400 Group was significantly decreased in comparison with the control group ($p < 0.05$). The expression of CRF has significantly decreased in BR400 Group ($p < 0.01$). BR100 Group and BR400 Group demonstrated an increase tendency in expression of c-Fos. The expression of TH has significantly decreased in BR400 Group (LC: $p < 0.001$, VTA: $p < 0.01$). In the concentration of ACTH, BR100 Group and BR400 Group demonstrated an increase or decrease, more or less, in comparison with the control group but with no significance.

Conclusions : Judging from the result of the aforementioned tests, *Bupleuri Radix* had an effect of controlling motionless behavior in FST. Such effect is deemed to have resulted from *Bupleuri Radix*'s controlling CRF in PVN and also TH in LC and VTA. Therefore, it is believed that *Bupleuri Radix* has an anti-depressant effect of controlling depressive behavior in rats.

Key words : *Bupleuri Radix*, FST, CRF, c-Fos, ACTH, TH, antidepressant

서론

현대를 우울증의 시대라고 할 만큼 이 시대를 살아가는 사람은 누구나 정도의 차이는 있지만 한때 우울증을 경험하는 것이 보편적인 현상이다. 학습된 무기력을 연구한 Seligman은 우울증은 현대생활에서 가장 널리 알려진 심리적 장애라고 보았다. 또한 60년대 이후의 출생자는 그 이전의 부모세대에 비하여 10배 이상의 우울증을

경험할 것이라고 하였다¹⁾.

이러한 우울장애(depressive disorder)는 우울하고 슬픈 기분이 주된 증상의 장애로서 이밖에도 일상 생활에 대한 의욕과 즐거움이 감퇴하고, 체중이 현저하게 감소(때로는 증가)하며, 불면증(때로는 수면과다증)이 나타나고, 거의 매일 안절부절 못하는 행동이나 느린 행동을 보이고, 피로나 활력이 감소되고, 무가치감과 죄책감에 시달리며, 주의집중력과 판단력이 저하되고, 죽음이나 자살

* 교신저자 : 이태희, 경기도 성남시 수정구 복정동 산65 경원대학교 한의과대학 방제학교실
· Tel : 011-792-4656 · E-mail : ophm5418@kyungwon.ac.kr
· 접수 : 2009년 5월 8일 · 수정 : 2009년 6월 21일 · 채택 : 2009년 6월 22일

에 대한 사고가 증가하는 증상이 나타난다²⁾.

현대에 우울증이라고 불리는 증상은 한의학에서 '情' '鬱症'과 유사하다. 한의학에서 '情'은 情志로서 '七情'과 '五志'의 약칭이며, 사람의 정신, 의식, 사유활동을 가리킨다. '七情'이란 喜, 怒, 憂, 思, 悲, 恐, 驚의 일곱가지 감정을 가리키고, '五志'란 七情 가운데 悲, 驚 - 悲는 肺에, 驚은 腎에 포함시킴-을 제외한 다섯 가지, 즉 '心志喜, 肝志怒, 肺志憂, 脾志思, 腎志恐'을 가리킨다. 七情은 대개 인간의 기본적인 감정과 정서를 개괄한 것으로서, 사람이 필요에 따라 객관적인 사물에 대하여 일으키는 반응이다³⁾.

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 憂愁, 思慮나 悲嘆 등이 원인이 되는 수가 많다. 氣鬱이란 氣가 한 곳에 멎혀 머물러 있으면서 흠어지지 못하는 것으로, 대부분 七情이 鬱結되어 온다⁴⁾.

柴胡(*Bupleuri Radix*)는 산형과(繖形科 : Umbelliferae)에 속한 柴胡(*Bupleurum falcatum* L.)의 뿌리를 건조한 것으로, 和解退熱, 疏肝解鬱, 升舉陽氣 등의 효능을 가지고 있어 氣鬱 등의 증상에 사용한다⁵⁾. 그리고 柴胡를 포함하는 대표적인 처방으로 小柴胡湯, 柴胡抑肝湯, 柴胡疎肝散 등인데, 解鬱作用을 통한 정신질환에 빈용되어 온 처방으로 柴胡가 그 주된 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

이러한 柴胡에 관한 논문으로 홍⁶⁾은 대뇌피질, 선조체, 시상하부에서 유의성 있는 catecholamine의 증가와 관련 있음을 밝혔고, 김⁷⁾은 요중 catecholamine 분비량에 대한 조사로 항스트레스성이 있음을 밝혔다.

저자는 柴胡가 우울행동에 미치는 효과를 실험적으로 검증하고자 우울증 동물 모델중 편리하고 신뢰성이 높다고 알려진 강제수영부하시험(FST, forced swimming test)⁸⁾을 사용하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

중량 200g 내외의 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐(Orient사)를 고품사료와 물을 충분히 공급하면서 2주일 간 실험실 환경에 적응 시킨 후, 실험에 사용하였다. 낮과 밤 주기는 오전 7시 부터 오후 7시 까지를 낮으로, 나머지 12시간을 밤으로 하여 자동 조절하였다. 그리고 온도는 20-24℃, 습도는 60±10%로 유지 하였다.

2) 약재

HMAX에서 구입하여 연구에 사용한 한약재는 柴胡

(*Bupleurum falcatum* L.)의 뿌리를 건조한 것을 추출용 시료로 사용하였다. 柴胡는 160 g에 10배(w/v)량의 3차 증류수를 가하여 100℃에서 4시간 동안 냉각기를 장착한 상태로 환류 추출한 다음, 거즈로 여과하여, 80℃에서 증탕 농축하여 하루 동안 80℃에서 냉각시킨 후, 40℃ 온도로 냉각동결건조시켜 43 g의 분말을 획득하였다(수득률 27%). 투약 시에는 건조된 약재를 분량에 맞게 saline을 첨가하여 용액을 만들었다.

2. 실험

1) 실험군

실험은 3단계로 나누어 실시하였다. FST, 면역조직화학법, ELISA법에서 대조군(생리식염수 투여, N=8), BR100(柴胡 100 mg/kg p.o.투여, N=8), BR400(柴胡 400 mg/kg p.o.투여, N=8)의 3그룹으로 나누어 실시하였다.

2) 강제수영부하시험(FST)

본 실험에서는 절망행동검사(behavioral despair test)라고도 하는 표준화된 검사법인 FST를 이용하였다. 이 검사법은 약물개발시의 항우울 효과를 검색하는 기본적인 실험으로 알려져 있다⁸⁾. 이 실험은 두 번에 걸쳐 이루어지는데, 첫 날은 높이 50cm, 지름 30cm의 투명한 아크릴원통형 수조에 22℃의 물에 흰쥐의 꼬리가 바닥에 닿지 않을 정도의 물 높이에 강제로 빠뜨린 다음 15분간 있게 하였다. 처음 수 분간은 이를 벗어나기 위해 흰쥐가 심한 저항을 보이나, 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어난다. 두 번째 날에는 5분간 같은 환경에서 강제 수영을 시키고, 여기서 climbing, swimming, immobility 세 가지를 측정한다. 전형적인 immobility란 흰쥐가 얼굴을 포함한 상체의 일부분만 수면 위로 드러낸 채 모든 것을 포기하고 움직임이 전혀 없는 상태이다. 한편 swimming은 흰쥐가 수면 위를 돌면서 움직이고, 간혹 물밑으로 잠수하기도 하는 상태이다. Climbing은 가장 격렬한 운동 상태인데, 앞발을 적극적으로 사용하여 아크릴 원통 위로 올라오려고 사지를 다 쓰는 상태이다. 실수와 사물에 의한 오차를 줄이기 위해 비디오 카메라로 측정하여 자료를 확보하였다.

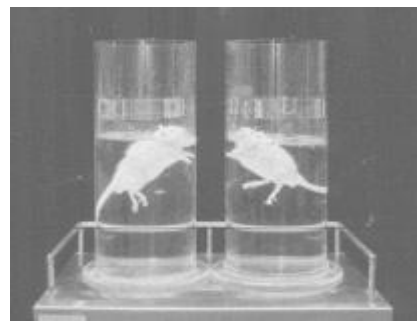


Fig. 1. Equipment of forced swimming test

3) 면역조직화학법⁹⁾

강제수영부하시험이 끝난 쥐를 sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 0.9% saline 200 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 100 ml을 심장을 통해 관류 하였다. 고정액의 처음 300 ml는 2분간, 나머지 700 ml는 25분간에 걸쳐 관류 하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 후 고정 시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4°C에서 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 30 μ m의 두께로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, CRF, c-Fos, TH expression에 가장 널리 사용되는 Goat anti CRF (Santa Cruz Biotechnology), Rabbit anti c Fos (Santa Cruz Biotechnology), Mouse anti-Tyrosine Hydroxylase (Zymed Laboratories)에 담그었다. Primary antibody는 0.3% Triton X100 (PBST)에서 2% normal donkey 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 donkey 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 Biotechnology)에 담그어 반응시켰다. PBST로 몇 번 행군 다음 뇌 조직을 착색제인 diaminobenzidine을 사용하여 발색시켰다. 발색이 끝난 조직은 slide에 올려 2시간 동안 실온에서 건조 시킨 후, xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입하였다. 뇌 조직의 각 부위는 염색성을 광학 현미경으로 100배 확대 관찰하고 사진을 촬영 하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos의 부도를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자(2 \times 2cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting하였다.

4) ELISA법¹⁰⁾

행동실험이 모두 끝난 뒤, 관류 전 심장에서 혈액을 채취한 후, 원심분리 후, 혈장 성분을 모아 -70°C에서 보관한다. 다음날 ELISA 분석 1시간 전 혈액 샘플 및 ELISA kit을 냉장고에서 꺼내, 실온에 둔다. ACTH는 ELISA kit (ACTH(rat), phoenix pharmaceuticals, Inc.)을 구입하여 분석하였다. Standard 농도는 0.04 ng/ml-25 ng/ml로 범위를 정했고, 1 stAb가 코팅되어 있는 96 well에 sample과 standard를 50 ul씩 넣고, biotinyl peptide를 25 ul씩 넣고 2시간 incubation한다. Wash buffer를 이용해 3번 washing 후, SA-HRP를 100 ul를 각 well에 넣어준다. 1시간 후, 3번 washing 하고, 100 ul TMB를 이용해 1시간 동안 발색시킨다. 2N HCl를 이용해 반응을 멈추고, 450 nm에서 ELISA reader를 이용해 OD를 읽는다.

3. 통계처리

모든 측정값은 평균값 \pm 표준오차(Mean \pm S.E.)로 표시하였고, 각 실험군의 통계학적 분석은 Window용 SPSS를 이용하였다. 행동 실험결과 및 면역조직 화학법에 대한 통계분석은 one way ANOVA로 분석하였으며, 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, p 값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

1. 행동실험 결과

Forced Swimming Test (강제수영 부하시험) 결과는 Fig. 2와 같다. Control에서 7.00 \pm 0.58 sec를 나타낸 것과 비교해서 BR100 (柴胡 100 mg/kg그룹)에서는 4.00 \pm 2.25 sec, BR400 (柴胡 400 mg/kg그룹)에서는 2.17 \pm 1.17 sec를 나타내 부동행동이 감소하는 경향을 보였고, BR400 (柴胡 400 mg/kg그룹)에서는 유의성 있는 결과를 나타냈다($F(2,55)=4.278$, $p<0.05$).

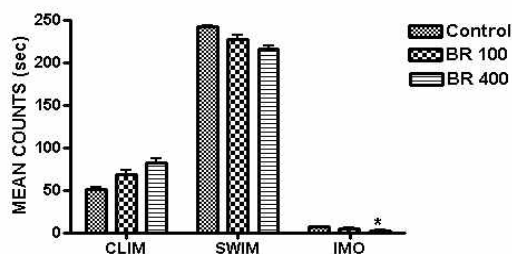


Fig. 2. Effect of *Bupleuri Radix* on Behavior in Forced Swimming Test

Control group was administered normal saline. BR100 group was administered *Bupleuri Radix* (100 mg/kg). BR400 group was administered *Bupleuri Radix* (400 mg/kg). Normal saline and *Bupleuri Radix* was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST. Each column represents the mean \pm S. E. from 8 rats.

* : Significant difference from the Normal group (* : $p<0.05$).

2. 면역조직화학법 결과

1) PVN에서 CRF발현

FST 실시 후, PVN 내에서의 CRF 발현은 Fig. 3, 4와 같다. 대조군과 발현 세포수를 %로 비교해 본 결과, BR100 (柴胡 100 mg/kg그룹)과 BR400 (柴胡 400 mg/kg 그룹)에서 각각 77.76 \pm 19.92%, 39.59 \pm 5.43%를 나타내, PVN 내에서의 CRF의 발현이 감소되었고, 특히 BR400 (柴胡 400 mg/kg그룹)에서는 유의성 있게 감소하였다 ($F(2,14)=7.579$, $p<0.01$).

2) PVN에서 c-Fos발현

FST 실시 후, PVN 내에서의 c-Fos의 발현은 Fig. 5와 같다. 대조군과 발현 세포수를 비교해 본 결과,

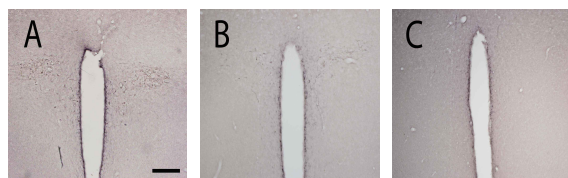


Fig. 3. Photograph of corticotropin-releasing factor-immunoreactive cells in the paraventricular nucleus(scale bar represents 200 μm)

Control group(A) was administered normal saline. BR100 group(B) was administered *Bupleuri Radix* (100 mg/kg). BR400 group(C) was administered *Bupleuri Radix* (400 mg/kg). Normal saline and *Bupleuri Radix* was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST.

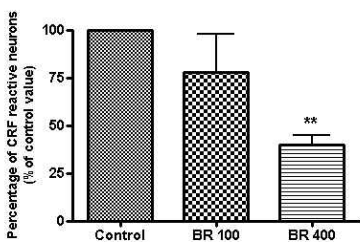


Fig. 4. Expression of corticotropin-releasing factor-immunoreactive cells in paraventricular nucleus

Control group was administered normal saline. BR100 group was administered *Bupleuri Radix* (100 mg/kg). BR400 group was administered *Bupleuri Radix* (400 mg/kg). Normal saline and *Bupleuri Radix* was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST. Each column represents the mean±S. E. from 8 rats.

** : Significant difference from the Normal group (** : $p < 0.01$).

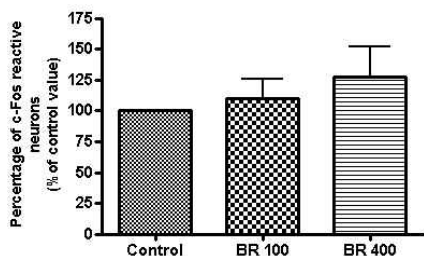


Fig. 5. Expression of c-Fos immunoreactive cells in paraventricular nucleus

Control group was administered normal saline. BR100 group was administered *Bupleuri Radix* (100 mg/kg). BR400 group was administered *Bupleuri Radix* (400 mg/kg). Normal saline and *Bupleuri Radix* was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST. Each column represents the mean±S. E. from 8 rats.

BR100(柴胡 100 mg/kg 그룹)은 110.35±15.27%, BR400(柴胡 400 mg/kg 그룹)은 127.60±24.50%를 나타내, 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타냈다($F(2,20)=0.189, p=0.829$).

3) ACTH

FST 실시 후, 혈장 내에서 ACTH의 농도변화는 Fig. 6과 같다. 대조군과 비교해 본 결과, BR 100(柴胡 100 mg/kg 그룹)은 108.40±27.65%, BR400(柴胡 400 mg/kg 그룹)은 90.32±47.79%를 나타내, 대조군에 비해 증감은 있었으나 유의성은 없었다($F(2,11)=0.657, p=0.541$).

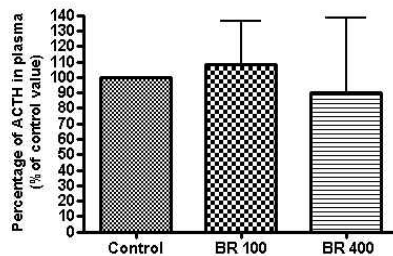


Fig. 6. Concentration of adrenocorticotrophic hormone in plasma

Control group was administered normal saline. BR100 group was administered *Bupleuri Radix* (100 mg/kg). BR400 group was administered *Bupleuri Radix* (400 mg/kg). Normal saline and *Bupleuri Radix* was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST. Each column represents the mean±S. E. from 8 rats.

4) LC, VTA에서 TH발현

FST 실시 후, VTA, LC에서의 TH의 발현은 Fig. 7-10과 같다. VTA에서 대조군과 발현 세포수를 비교해 본 결과, BR100(柴胡 100 mg/kg 그룹)은 90.02±2.42%, BR400(柴胡 400 mg/kg 그룹)은 68.14±6.38%를 나타내었고, LC에서 대조군과 발현 세포수를 비교해 본 결과, BR100(柴胡 100 mg/kg 그룹)은 80.67±11.38%, BR400(柴胡 400 mg/kg 그룹)은 32.69±8.77%를 나타내 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타내었다(LC : $F(2,11)=19.800, p < 0.001$. VTA : $F(2,11)=19.228, p < 0.05$).

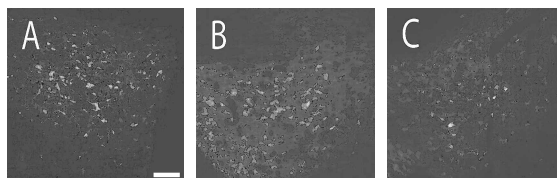


Fig. 7. Photograph of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells in the ventral tegmental area(scale bar represents 200μm)

Control group(A) was administered normal saline. BR100 group(B) was administered *Bupleuri Radix* (100 mg/kg). BR400 group(C) was administered *Bupleuri Radix* (400 mg/kg). Normal saline and *Bupleuri Radix* was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST.

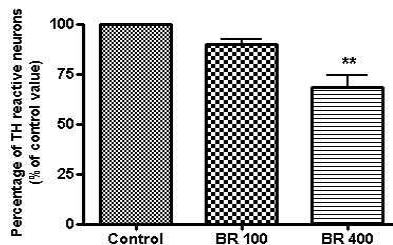


Fig. 8. Expression of tyrosine hydroxylase in ventral tegmental area

Control group was administered normal saline. BR100 group was administered *Bupleuri Radix* (100 mg/kg). BR400 group was administered *Bupleuri Radix* (400 mg/kg). Normal saline and *Bupleuri Radix* was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST. Each column represents the mean±S. E. from 8 rats.

** : Significant difference from the Normal group (** : $p < 0.01$).

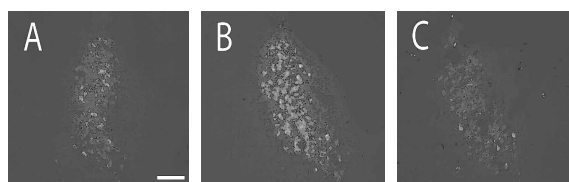


Fig. 9. Photograph of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells in the locus coeruleus (scale bar represents 200 μ m)

Control group(A) was administered normal saline. BR100 group(B) was administered *Bupleuri Radix* (100 mg/kg). BR400 group(C) was administered *Bupleuri Radix* (400 mg/kg). Normal saline and *Bupleuri Radix* was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST.

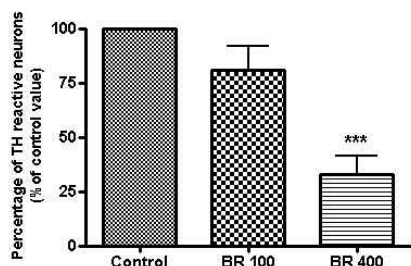


Fig. 10. Expression of tyrosine hydroxylase in locus coeruleus

Control group was administered normal saline. BR100 group was administered *Bupleuri Radix* (100 mg/kg). BR400 group was administered *Bupleuri Radix* (400 mg/kg). Normal saline and *Bupleuri Radix* was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST. Each column represents the mean \pm S. E. from 8 rats.

*** : Significant difference from the Normal group (***) $P < 0.001$

고찰

우울증은 우울과 관련하여 정신운동, 인지기능, 정신생리기능 및 대인관계에 장애가 나타나는 질환으로서, 서양정신의학의 분류인 DSM-IV에 명시된 주요 우울삽화는 다음과 같다. 흥미나 즐거움의 상실이나 우울한 기분이 적어도 2주 동안 진행되는 동시에 동반 증상으로서 '식욕이나 체중의 변화, 불면 또는 과수면, 정신운동의 흥분 또는 지체, 피로감, 무가치감 또는 죄책감, 사고력과 집중력의 감퇴, 반복되는 자살충동' 등의 항목 중에서 최소한 4개의 증상을 경험해야 한다.

현재 서양의학에서는 우울증의 원인을 유전적 요인, 신경학적 요인, 내분비대사 이상, 신경생리학적 이상, 심리 사회적 요인 등이 복합적으로 관계된다고 보고 있으나 정확한 원인은 규명되지 않은 상황이며¹⁰⁾, 따라서 다양한 분류가 존재하고 분류법에 대한 논쟁이 지속되고 있으며 실제 임상에서의 진단 경향은 의사가 속한 사회문화와 의학전통에 따라 우울증의 개념이 다소 다르게 결정되고 있다.

한의학에서 우울증은 鬱症으로 인식되어 왔다. 鬱에 대해 《黃帝內經》에서는 주로 運氣七篇에서 언급하였으며 자연의 기후 변화와 그에 따른 생명현상으로 설명하여 木·火·土·金·水의 五氣之鬱에 대하여 論述하였다.

鬱證의 임상증상은 心情抑鬱, 情緒不定, 脇肋脹痛, 易怒選哭, 失眠, 四肢無力, 二便失調, 不思飲食, 常善太息, 食慾不振 등으로 매우 다양하다. 따라서 鬱證은 “七情의 손상으로 인해 氣機가 鬱滯된 광범위한 증후군”으로 인식되고 있으며, 鬱證의 초기에는 氣滯와 濕痰으로 인한 食積, 熱鬱 등의 實證이 많고, 오래되면 虛證으로 변하여 心脾損傷, 陰虛火旺 등의 양상이 나타나게 된다¹¹⁾.

柴胡는 산형과에 속한 인 柴胡(*Bupleurum falcatum* L.) 또는 그 변종의 뿌리를 건조한 것이다. 藥性이 苦, 微寒하고, 肝膽經에 들어가 和解退熱하여 傷寒少陽證의 寒熱往來, 胸脇苦滿, 口苦, 咽乾, 目眩 등을 치료하고, 疏肝解鬱하여 肝氣鬱結, 胸脇乳房脹痛, 月經不調, 通經 등에 사용하며, 升舉陽氣하는 효능이 뛰어나 氣虛下陷으로 인한 脫肛, 子宮下垂, 短氣 등에 사용한다. 주요 성분은 saponin, seterol, 정유, 지방유, 다당류 등으로 약리학적인 연구에 의하면 해열작용, 진정작용, 진통작용, 진해작용, 항균, 항바이러스작용, 소염작용, 면역증강작용, 간기능보호작용, 항궤양작용, 이노작용 등이 있는 것으로 보고되고 있다¹²⁾. 柴胡의 여러작용 중 疏肝解鬱 등의 효능이 스트레스, 우울증 등의 치료에 응용될 수 있을 것으로 보이며, 실험적으로 검증하고자 하였다.

FST는 흰쥐를 도피 불가능한 수조에 빠트리면 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 예측 타당도가 인정되어 항우울제의 효과관정을 위한 방법으로 현재까지 널리 사용되고 있다. 흰쥐가 강제수영 중 보이는 행동은 이와 같이 활발한 수영, 출구를 찾는 탐색적 행동, 특별한 목적이 없어 보이는 상동증적 행동, 신체균형을 유지하기 위한 행동, 가만히 떠 있는 것 등 다양하다. 따라서 어떤 행동들을 부동자세라 보느냐가 결과 해석에 중요하며, 애매함을 피하기 위해 부동자세 시간이 아니라 활발히 수영한 시간이나 탈출지향적 행동을 한 횟수를 측정할 경우도 있었다¹³⁾.

FST 실험의 결과를 보면 柴胡를 투여한 그룹에서 대조군에 비해 부동행동은 줄어들고, 기어오르기(Climbing)는 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이는 FST로 인해 흰쥐의 우울행동이 유발되었고, 柴胡의 투여가 FST에서 나타나는 흰쥐의 우울행동을 억제하는 작용을 하고 있음을 알 수 있다.

한편 BR400군이 BR100군보다 더 유의성 있는 억제작용을 나타내는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 약물의 투여량에 따라 柴胡의 항우울 효과에 차이가 있음을 보여주는 것이라 할 수 있다. 본 실험에서 투여량에 따라 흰쥐의 부동행동을 억제하는 효과가 좋아진 것은 어느 정도 약물의 농도에 의존하여 효과가 나타난다고 생각된다. 이를 확인하기 위해서는 더 세분화된 후속실험이 필요하

다고 여겨진다.

우울증을 설명하는 가설 중 첫 번째로 가장 잘 알려진 이론이 우울증의 monoamine 가설이다.

두번째 가설로는 HPA (Hypothalamo-pituitary-adrenocortical) axis의 이상이 CRF (corticotropin-releasing factor)의 분비를 증가시키고 이것이 ACTH (adrenocorticotrophic 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 것이다¹⁴).

우울증 episode가 많은 경우 다양한 형태의 스트레스가 있는 상황에서 일어난다는 점은 비록 stress가 우울증을 일으키는 충분조건으로 작용하지는 않을지라도 그것이 우울증 발현에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 이러한 관점에서 우리 몸에서 stress에 대응하는 중요한 요소인 HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal) axis는 우울증 연구에 있어서 오랫동안 관심의 초점이 되어 왔다. Hypothalamus의 PVN에서 분비된 CRF가 ACTH 분비를 증가시키고 그 결과로 adrenal cortex로부터 corticoid가 분비되어 많은 뇌 영역에 그 neuro behavioral 기능을 나타낸다. 이러한 HPA axis는 hippocampus와 amygdala 등의 몇몇 뇌 영역과 조절을 주고 받는 feedback loop으로 circuitry를 형성하고 있다.

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

우울증을 경험하면 PVN에서 뿐만 아니라 청반이나 편도체 중심핵 등의 부위에서 CRF mRNA와 그 생성이 증가되고, 특히 청반과 편도체 중심핵 등의 부위가 우울증으로 인하여 증가된 CRF가 여러 행동적인 변화를 유발하는데 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고 있다¹⁵).

CRF는 시상하부 내에 많이 존재하며 이 호르몬은 우울행동시에 많이 분비되어 위와 대장의 운동에 변화를 초래한다고 알려져 있다¹⁶).

이 peptide 호르몬은 부신피질호르몬과 β -endorphine의 분비를 자극하고, CNS에 작용하는 CRF는 우울증과 관련된 생리학적 및 행동의 변화를 매개하는 주요역할을 한다. Hisano 등의 보고에 의하면 CRF는 시상하부 내외부(intra or extrahypothalamic site)에서 신경내분비와 자율적인 기능에 영향을 미친다. 이 인자는 중추신경계 내에 광범위하게 분포하는데 CRF에 면역반응을 나타내는 부위는 뇌실주위핵(paraventricular nucleus, PVN)에 많이 존재하며 정중용기에 투사한다고 하였고, Hypophysiotropic CRF neuron의 결가지들은 뇌실주위핵 주위와 핵내에 종지한다고 하였다¹⁷).

대조군과 각각의 발현 세포수를 비교해 본 결과, PVN 내에서의 CRF 발현을 억제 시켰다. 이는 여러 선행연구 보고 결과에서 항우울제의 투여가 CRF의 발현을 감소시

킨다는 보고와 일치하는 것으로 柴胡의 투여가 시상하부의 PVN에 작용하여 CRF의 발현을 억제시키는 것으로 보인다. 또한 CRF 발현이 BR400에서 BR100에 비하여 더 잘 억제된 것은 柴胡의 농도에 의존하는 경향을 보이는 것이 아닌가 생각되고, 농도의존성에 대하여는 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

c-fos 단백질은 c-Fos gene의 산물이고, c-Fos gene은 proto-oncogene의 일종이며 immediate early gene (IGE)의 하나로서 세포분열과 세포분화의 역할뿐만 아니라 세포표면에 전달된 자극에 반응하여 장기간 지속되는 세포 반응을 매개하는 역할을 한다고 알려져 있다¹⁸). c-Fos gene의 산물인 c-fos 단백질(c-Fos protein, c-Fos)은 여러 약물이나 스트레스를 포함한 생리적 자극에 의해 발현되므로¹⁸, 스트레스 및 스트레스와 관련된 우울증 연구에서 자주 관찰되는 지표이다²⁰). c-fos 유전자의 발현은 면역학적인 자극, 출혈, 소음, 구속, 족부소크자극, 그리고 통증 등과 같은 다양한 스트레스성 자극들에 의해 유도된다는 것이 보고되었다²¹).

우울증은 세포들의 내적, 외적환경의 변화에 의해 야기되고, 세포가 우울행동에 노출되면 바로 c-Fos를 포함한 초기 유전자들의 발현이 초기 단계에서 신속하게 전사된다. 그러므로 신경세포 활성화를 나타내는 지표인 c-Fos mRNA를 사용해서 우울증을 찾아 낼 수 있다²²). 이전 연구들을 통해 c-Fos는 FST를 포함한 많은 종류의 우울행동 자극에 의해 Hippocampus에서 활성화되고, 우울증과 관련된 뇌 조직들, 즉 Paraventricle Nucleus (PVN), Amygdala, 대뇌피질, Lateral Septum과 Locus Coeruleus (LC) 같은 곳에서 발현된다는 것이 밝혀졌다²³).

선행연구들에서 c-Fos는 뇌손상이나 우울증이 있을 때 뇌 특정부위에서 활성화되어 증가하며, 항우울 약물에 의해 우울증상이 개선되면 c-Fos가 감소된다고 알려져 있다²⁴). 본 실험연구에서도 우울행동자극을 받으면 c-Fos 발현이 증가되는 것으로 알려진 PVN에서 신경세포 활동성에 대한 지표가 되는 c-Fos가 발현된 세포체의 수를 측정하였는데, 대조군과 각각의 발현 세포수를 비교해 본 결과, PVN 내에서의 c-Fos의 발현이 오히려 증가되는 경향을 보였다. 이는 여러 선행연구보고 결과에서 항우울제의 투여가 c-Fos의 발현을 감소시킨다는 보고와 일치하지 않는 것으로 柴胡의 투여가 시상하부의 PVN에 작용하여 c-Fos의 발현을 억제시키지 못하는 것으로 보인다. 이와 같은 결과는 같은 PVN 내에서도 柴胡가 CRF의 발현억제에는 작용하고 c-Fos의 발현억제에는 작용하지 못한다고 생각되고 이러한 이유에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다고 보여진다.

대뇌변연계-시상하부-뇌하수체-부신피질(Limbic-Hypothalamic-Pituitary-Adrenal, LHPA)축 신경내분비계에서 작용하는 음성-되먹임 조절중 부신피질 호르몬(corticosteroid)은 시간의 경과에 따라서 두 가지 기전으로 부신피질 자극호르몬(ACTH)의 분비를 조절한다는

사실이 1970년대와 1980년대의 동물실험들을 통하여 증명되었다²⁶⁾.

주요 우울증에서 cortisol의 과다분비를 동반한 HPA-axis 이상이 일차적으로 시상하부의 CRF의 증가 때문일 것이라는 가설²⁶⁾이 대두된 이래 이와 관련된 연구들이 보고 되어 왔는데, CRF는 시상하부 및 변연계의 여러 신경핵에 존재하고 있고²⁷⁾, 우울증 환자의 뇌척수액내의 CRF가 증가되어 있으며, CRF를 흰쥐의 뇌실내에 주입한 후 HPA-axis가 항진된다는 보고²⁸⁾ 등으로 미루어 볼 때, 항우울제의 작용기전이 이와 연관되어 있을 것이라는 사실을 예상해 볼 수 있겠다.

본 실험으로 대조군과 각각의 발현 세포수를 비교해 본 결과, PVN 내에서의 ACTH의 발현을 억제시키지 못했다.

이는 여러 선행연구 보고 결과에서 항우울제의 투여가 ACTH의 발현을 감소시킨다는 보고와 일치하지 않는 것으로 柴胡의 투여가 시상하부의 PVN에 작용하여 ACTH의 발현을 억제시키지 못하는 것으로 보인다. 이러한 결과는 CRF의 반응과 ACTH의 반응 사이에 시간차가 존재하여 나타나는 결과가 아닌가 하고, 이와 같은 결과가 나타난 이유에 대해서는 시간결과에 따른 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

우울증의 monoamine 가설이란, monoamine을 고갈시키는 reserpine과 같은 약물을 투여하면 우울증을 유발한다는 것을 관찰한 뒤 제기된 학설로서 노르아드레날린, 세로토닌, 도파민 등의 감소가 우울증의 발병에 중요한 역할을 한다는 가설이다²⁹⁾.

도파민과 우울증과의 관계를 설명하는 임상적 증거로서 몇 가지 우울증 유형에 있어서 강력한 도파민계의 개입의 증거가 있고, 파킨슨병과 우울증과의 증상에 있어서의 유사성, 계절성 정동장애의 도파민계 이상 등을 들 수 있다. 생화학적 증거로서 우울증 환자와 자살한 우울증 환자를 대상으로 저하된 도파민 회전율을 시사하는 뇌척수액에서의 homovanillic acid 연구³⁰⁾. 도파민 대사 물질 연구, 약리학적인 증거로서 우울증의 치료에 있어서 도파민계에 영향을 끼치는 항우울제의 효과등이 연구되어져 있고³¹⁾. Sapru 등, Rihmer와 Arato 등은 정신병적 우울증에서 dopamin β -hydroxylase의 활성도가 감소된 것을 관찰하였다.

TH는 L-tyrosine, L-dopa, dopamine, norepinephrine, epinephrine으로 진행되는 카테콜아민의 대사의 첫 번째 과정에서 사용되는 효소로, 우울증에서 흔히 제안되고 있는 신경생물학적인 병인 중의 하나인 단가아민의 결핍에 관련되어, 도파민계 대사를 평가하고자 관찰되어지는 지표의 하나이다.

동물이 우울행동 조건에 노출되면 그에 대한 적응반응의 일환으로 도파민 체계가 활성화 되어 도파민의 이용(utilization)과 전환율(turnover rate)이 증가됨에 따라 도파민의 수준은 감소되고 상대적으로 도파민 대사에 관

여하는 TH의 수준은 증가하는 현상이 나타난다.

이미 언급한 것과 같이 mesolimbic 도파민 system이 기준조절에 핵심적이라는 것은 의심의 여지가 없지만 그것의 기작적인 측면은 아직 잘 연구되어 있지 못하다. 하지만 지난 약 30년간의 다양한 연구는 ventral tegmental area (VTA)로부터 nucleus accumbens (NAc)로의 도파민 신경전달 활성이 정상적인 mesolimbic system의 기능에 매우 중요함을 보여주고 있다³²⁾.

본 실험으로 VTA, LC 대조군과 각각의 발현 세포수를 비교해 본 결과, VTA, LC 내에서의 TH의 발현을 억제시키는 유의성 있는 감소를 나타내었다. 이는 여러 선행연구보고 결과에서 항우울제의 투여가 TH의 발현을 감소시킨다는 보고와 일치하는 것으로 柴胡의 투여가 VTA, LC에 작용하여 TH의 발현을 억제시키는 것으로 보인다. 또한 농도가 높아질수록 항우울 효과가 높아지는 것으로 나타났다.

이상 살펴본 바와 같이 柴胡가 시상하부의 PVN에 작용하여 PVN에서 HPA axis와 관련된 우울 지표물질인 CRF, ACTH의 발현을 억제함으로써 항우울 작용을 나타낸다

한편 우울증은 HPA-axis와 monoamine 계열과 관계가 깊은데, 柴胡는 HPA axis의 CRF에서 억제효과를 나타내었고, VTA와 LC에서 도파민과 노르에피네프린의 합성을 억제하여 TH의 발현이 감소하였다. 결론적으로 시호는 HPA-axis, monoamine 계열 양쪽에 모두 작용하여 항우울 효과를 보이는 것이 아닌가 추론된다.

결론

1. FST를 실시하고 부동행동의 시간을 관찰한 결과, 대조군에 비해 柴胡 투여군에서 부동행동이 감소하는 경향을 보였고, 특히 BR400군에서는 대조군에 비해 부동행동이 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$).
2. 시상하부의 PVN에서 CRF의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 柴胡 투여군에서 CRF의 발현이 감소하는 경향을 보였고, 특히 BR400군에서 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$).
3. 시상하부의 PVN에서 c-Fos의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 BR100군과 BR400군에서 c-Fos의 발현이 증가하는 경향을 나타냈다.
4. VTA, LC에서 TH의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 BR100군과 BR400군에서 TH의 발현이 감소하는 경향을 보였고, 특히 BR400에서 유의성 있게 감소하였다 (LC : $p < 0.001$, VTA : $p < 0.01$).
5. ELISA법으로 혈장에서 ACTH의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 BR100군과 BR400군에서 ACTH의 발현에서 약간의 증감은 있었으나 유의성은 없었다. 이상과 같은 실험결과를 볼때, 柴胡가 FST에서 부동

행동을 억제하는 효과가 나타났다. 그것은 PVN에서 CRF를 억제하고, LC와 VTA에서 TH를 억제하여 나타나는 결과로서 흰쥐의 우울행동을 감소시키는 항우울 효과가 있다고 생각된다.

참고문헌

- 원호택. 이상심리학. 서울 : 범문사. 2000 : 232.
- 원호택, 권석만. 이상심리학 총론. 서울 : 학지사. 2007 : 100-1.
- 조홍건, 노이로제와 화병의 한방치료. 서울:아티전. 1997 : 33.
- 조홍건 편저. 실용한방정신의학. 서울 : 유진문화사. 2002 : 184-90.
- 전국한의과대학 본초학교실 공편저. 본초학. 서울 : 영림사. 1995 : 149.
- 홍성유, 박선동. 시호가 우울증 모델 백서의 카테콜라민에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003 ; 18(4) : 235-53.
- 김도순, 황의완. 시호 백작약의 항stress효과에 대한 실험적 연구. 경희대학교 대학원 1990.
- Arthur H Swiergiel, Yueping Zhou, Adrian J Dunn. Effects of chronic footshock, restraint and corticotropin-releasing factor on freezing, ultrasonic vocalization and forced swim behavior in rats. Behavioral Brain Research. 2007 ; 183 : 178-87
- G. Garcia P, Tagliaferro A, Ferri AM, Evangelista de Duffard, R Duffard, A Brusco. Study of Tyrosine Hydroxylase Immunoreactive Neurons in Neonate Rats Lactationally Exposed to 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid. Neurotoxicology. 2004 ; 25 : 951-7.
- 이정균, 정신의학. 서울 : 일조각. 1996 : 215-31.
- 許沛虎. 中醫腦病學. 北京 : 中國醫藥科技出版社. 1998 : 453-7.
- 김호철. 한약약리학. 서울 : 집문당. 2001 : 94-7.
- Masuda Y, Sugiyama T. The effect of globopentaosylceramide on a depression model, mouse forced swimming. Tohoku J Exp Med. 2000 ; 191(1) : 47-54.
- 권용욱. 청피가 fst에서 나타나는 우울행동에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2008.
- Nestler EJ, McMahon A, Sabban EL, Tallman JF, Duman RS. Chronic antidepressant administration decreases the expression of tyrosine hydroxylase in the rat locus coeruleus. Proc Natl Acad Sci USA. 1990 ; 87 : 7522-6.
- M Nikes M, Schmidt BG, Raybould HE. CRF in the paraventricular nucleus mediate gastric and colonic motor response to restraint stress. Am J Physiol. 1992 ; 262 : G137-G43.
- Hisano S, Fului Y, Chikamori-Aoyama M, Aizawa T, Shibasaki T. Reciprocal synaptic relations between CRF-immunoreactive and TRH-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. Brain Res. 1993 ; 620 : 343-6.
- 방승규, 김우선. 절망행동모형에 의한 흰쥐 대뇌의 fos발현의 증가. 신경정신의학. 1995 ; 35(1) : 1949-55.
- Michael AP, Wen-Sen L, Gloria SR, Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. Brain Res. 1992 ; 597 : 41-50.
- 조성일, 이성필, 이창욱, 김우선, 백인호. Diazepam이 강박 스트레스 흰쥐 뇌의 Fos 발현에 미치는 영향. 신경정신의학. 1997 ; 36(5) : 927-34.
- Shizuki K, Ogawa K, Matsunobu T, Kanzaki J, Ogita K. Expression of c-Fos after noise-induced temporary threshold shift in the guinea pig cochlea. Neurosci Lett. 2002 ; 320 : 73-6.
- Bullitt E. Expression of c-Fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. J Comp Neurol. 1990 ; 296 : 517-30.
- Melia KR, Ryabinin AE, Schroeder R, Bloom FE, Wilson MC. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. J Neurosci. 1994 ; 14 : 5929-38.
- Ikeda J, Nakajima T, Osborne OC, Mies G, Nowak TS Jr. Coexpression of c-fos and hsp70 mRNAs in gerbil brain after ischemia; induction threshold, distribution and time course evaluated by in situ hybridization. Brain Res Mol Brain Res. 1994 ; 26(1-2) : 249-58.
- Jones MT, Brush FR, Neame RLB Characteristics of fast feedback control of corticotropin release by corticosteroids. J Endocrinol 1972 ; 55 : 489-97.
- Goggans FC, Wilson WR, Gold MS, Pottash ALC. Effect of multiple time point sampling on the sensitivity of the dexamethasone suppression test. Am J Psychiatry. 1983 ; 140 : 909-10.
- Oschowka JA, O'Donohue TL, Mueller GP, Jacobowitz DM. Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of CRF-like immunoreactive neurons in the rat brain. Neuroendocrinology 1982 ; 35 : 305-8.
- Nemeroff CB, Widerlv E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT. Elevated concentrations of CSF corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients.

- Science. 1984 ; 226 : 1342-4.
29. 남윤영, 전우택. 우울증의 신경생물학적 최신지견. 생화학뉴스. 2002 ; 22(2) : 169-80.
 30. Roy A, Karoum F, Pollack S. Marked reduction in indexes of dopamine metabolism among patients with depression who attempt suicide. Arch Gen Psychiatry. 1992 ; 49 : 447-50.
 31. Barber J, Tomer R, Sroka H, Myslobodsky MS. Does unilateral dopamine deficit contribute to depression? Psychiatry Res. 1985 ; 15 : 17-24.
 32. Nestler EJ and WA Carlezon Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. Biol Psychiatry. 2006 ; 59(12) : 1151-9.