

靑皮와 地骨皮 複合劑가 강제수영부하실험에서 CRF, c-Fos와 TH의 변화에 미치는 영향

박수현, 이태희*

경원대학교 한의과대학 방제학교실
461-701, 경기도 성남시 수정구 복정동 산65

Effects of Mixture of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex on the Change of HPA-Axis and Catecholamic System in the Forced Swimming Test

Soo-Hyun Park, Tae-Hee Lee *

Formulae Pharmacology Dept, School of Oriental Medical School,
Kyungwon University

ABSTRACT

Objectives : In this study the antidepressant effects of mixture of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex on the change of HPA-Axis and Catecholamic system was investigated

Methods : The forced swimming test(FST) was performed. The expression of corticotropin-releasing factor(CRF), c-Fos in the paraventricular nucleus(PVN), and tyrosine hydroxylase(TH) in the ventral tegmental area(VTA) and locus coeruleus(LC) was measured with immunohistochemical method and the concentration of serum adrenocorticotropic hormone(ACTH) was measured with ELISA method. And the experimental groups were divided into the extraction after mixing(A) and mixture after extraction(B). The effects of both group were compared.

Results : The duration of immobility in the forced swimming test was significantly decreased in the A400 group($P < 0.01$). The expression of CRF in PVN were significantly reduced in the A100, A400, B100, B400 groups($P < 0.001$), but the expression of c-fos in PVN weren't reduced in all groups. And the concentration of ACTH in Plasma were significantly reduced in the A 100 group($P < 0.01$). The expression of TH in LC were significantly reduced in the A 400, B 100 and B400 groups($P < 0.05 \sim P < 0.01$).

Conclusion : Mixture of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex has antidepressant effects. But the difference between mixing and extracting methods was not shown.

Key words : Mixture of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex, FST, HPA Axis system, Catecholaminergic system, antidepressant.

*교신저자 : 이태희, 경기도 성남시 수정구 복정동 산65 경원대학교 한의과대학 방제학교실
· E-mail : ophm5418@kyungwon.ac.kr · Tel : 031-750-5418
· 접수 : 2010년 5월 10일 · 수정 : 2010년 6월 4일 · 채택 : 2010년 6월 22일

서론

憂鬱症이란 가장 흔한 정신장애 중 하나로 사람이 살아가면서 日常의 삶에 대하여 흥미를 느끼지 못하고 절망하는 병이다. 여러 보고에 의하면 주요 우울장애의 평생 유병률은 약 15%로 상당히 높고, 발병연령이 빨라지거나 발병률도 증가되는 경향이 있다고 한다¹⁾.

주요 우울증(Major depression)은 유전적, 환경적, 발달적 인자가 복잡하게 관련되어 야기되는 심각하고 유행성이 높은 질환으로, 특징적인 증상은 우울한 기분으로 거의 완전히 또는 지속적으로 쾌감을 경험할 능력이 사라지는 것이다.

그리고 우울한 상태는 다른 필수적인 심리적 증상들, 즉 주의력 결핍, 자꾸 자살하려는 생각 등 과, 또한 수면의 리듬이 깨어지고 심한 피로감을 호소하는 것이 특징이다²⁾.

우울증 episode가 많은 경우 다양한 형태의 스트레스가 있는 정황에서 일어난다는 점은 비록 stress가 우울증을 일으키는 충분조건으로 작용하지는 않을지라도 그것이 우울증 발현에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.³⁻⁵⁾ 이러한 관점에서 우리 몸에서 stress에 대응하는 중요한 요소인 HPA Axis system과 Catecholaminergic system은 우울증 연구에 있어서 오랫동안 관심의 초점이 되어 왔다^{6,25)}.

한의학에서는 氣가 정체되어 발산하지 못하는 증상을 총칭하여 鬱症이라 하는데, 鬱은 일반적으로 氣鬱을 가리키며 이것은 억압되고 침울한 마음으로 인하여 모든 생리기능이 침체되는 현상으로서 肝氣鬱結이 대표적인 것이다. 이는 발산시킬 수 없는 욕구불만이나 지속되는 우수, 지나친 思慮나 悲嘆 등이 원인이 되는 수가 많다⁷⁾. 肝氣鬱結이란 정신적 긴장과 정서의 과도한 변화로 肝의 疏泄작용이 실조되고 氣血이 鬱滯되어 나타나는 병리적 현상으로서, 현대의학적 의미로는 스트레스에 의해 뇌하수체와 부신피질에서 호르몬의 분비가 촉진되어 혈압상승, 맥박증가, 체온상승 등의 자율신경계의 실조현상으로서 나타내는 것이라 할 수 있다⁸⁻¹⁰⁾.

조 등¹¹⁾은 이러한 병증에 주로 사용되는 柴胡抑肝湯이 TH(Tyrosine Hydroxylase)의 발현을 억제한다고 하였는데 柴胡抑肝湯은 柴胡, 赤芍藥, 牡丹皮, 靑皮, 地骨皮, 香附子, 梔子, 蒼朮, 神麩, 川芎, 連翹, 生地黃, 甘草로 구성되어 있다.

그 중 靑皮(*Citri Reticulatae*)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로, 通血脈, 疏肝破氣, 消積化滯하는 효능을 가지고 있어 氣滯로

인한 증상들에 사용되어 왔다¹²⁾. 地骨皮는 茄科(가지과: Solanaceae)식물인 枸杞子나무(枸杞) *Lycium chinense* Mill. 또는 寧夏枸杞 *L. barbarum* L.의 근피로서, 淸熱涼血, 退虛熱의 효능을 가지고 있어 骨蒸潮熱의 대표적인 약으로 임상에서 널리 사용되어 왔다¹³⁾.

이와 같은 靑皮와 地骨皮의 항우울 효과에 대한 보고로 권 등¹⁴⁾은 靑皮가 PVN에서 CRF와 c-fos의 발현을 억제함으로써 항우울 작용을 나타낸다고 하였고, 고 등¹⁵⁾은 地骨皮를 이용한 실험에서 항우울 작용을 보고하였으며, 박 등¹⁶⁾은 靑皮가 TH와 ACTH의 억제를 통해 항우울 작용이 있음을 보고하였다.

이에 저자는 柴胡抑肝湯의 구성약재인 靑皮와 地骨皮¹⁷⁾각각의 약재가 항우울작용을 나타낸것을 보고 방제는 여러 약재의 합제이므로 靑皮와 地骨皮 합제(합제후 추출과 추출후 합제)가 우울증 혹은 우울행동에 미치는 영향을 확인하기 위해 흰쥐에게 강제수영 부하실험을 실시하여 행동변화를 살펴보았다. 또 면역조직화학법으로 HPA Axis와 관련하여 시상하부의 실방핵(PVN, Para-Ventricular Nucleus)에서 CRF와 c-fos의 발현을 측정하였으며, ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 법으로 serum에서 ACTH(Adrenocorticotrophic Hormone)농도를 측정하였다. Catecholamine계에 미치는 영향을 확인하기 위하여 복측피개야(VTA, Ventral Tegmental Area)와 청반(LC, Locus Coeruleus)에서 도파민과 노르에피네프린의 대사에 관여하는 것으로 알려진 TH(Tyrosine Hydroxylase)를 측정하였다. 그 결과 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

중량 200g 내외에 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐(Orient사)를 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 2주일 간 실험실 환경에 적응 시킨 후, 실험에 사용하였다. 낮과 밤 주기는 오전 7시부터 오후 7시 까지 낮으로, 다른 12시간을 밤으로 하여 자동 조절하였다. 그리고, 온도는 20 ~ 24 °C, 습도는 60 ± 10%로 유지하였다.

2) 한약재

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인 靑皮(Citri Peticulatae Viride Pericarpium)와 地骨皮(Lycii Radicis Cortex)를 HMAX사(제천, 충북)에서 구입하였다. 합제후 추출을 A라 하고, 추출후 합제를 B라고 하였다. 또한 柴胡抑肝湯에서의 1錢은 4g으로 환산하였다.

(1)靑皮와 地骨皮 합제후 추출(A)

靑皮와 地骨皮를 柴胡抑肝湯에서의 靑皮와 地骨皮 양의 비율(4g:2.4g)대로¹⁷⁾ 1:0.6의 비율이 되게 합하여 400g을 10배(w/v)량의 3차 증류수를 가하여 Round Flask에 넣고 냉각기를 부착한 다음 100℃에서 4시간 가열한 후, 거즈로 여과하여, 80℃에서 중탕 농축하여 하루 동안 -80℃에서 냉각시킨 후 -40℃로 동결건조시켜 60g(15%)의 靑皮와 地骨皮 합제의 분말을 획득하였다.

(2)靑皮와 地骨皮 추출 후 합제(B)

靑皮는 400g, 地骨皮는 400g을 10배(w/v)량의 3차 증류수를 가하여 100℃에서 4시간 동안 냉각기를 장착한 상태로 환류 추출한 다음, 거즈로 여과하여 80℃에서 중탕 농축하여 하루동안 -80℃에서 냉각시킨 후 -40℃로 동결건조시켜 분말로 靑皮는 66g(16.5%), 地骨皮는 19.65g(4.9%)의 분말을 획득하였다. 합제는 柴胡抑肝湯에서의 靑皮와 地骨皮 양의 비율(4g:2.4g)대로¹⁷⁾ 1:0.6의 비율이 되게 합했다.

투약시는 건조된 약재를 분량에 맞게 saline을 첨가하여 용액을 만들었다.

2. 실험 방법

1) 실험군

실험은 두 단계로 나누어 실시하였으며 대조군 및 A100 (靑皮와 地骨皮 합제 후 추출 100 mg/kg), A400 (靑皮와 地骨皮 합제 후 추출 400 mg/kg), B100 (靑皮와 地骨皮 추출 후 합제 100 mg/kg), B400 (靑皮와 地骨皮 추출 후 합제 400 mg/kg)의 다섯 그룹으로 나누어 실시하였으며 강제수영부하실험(Fored Swimming Test) 24시간 전, 5시간 전, 1시간 전에 3회에 걸쳐 구강(p.o.)으로 강제 투여하였다.

2) 강제수영부하실험

본 실험에서는 절망행동검사(Behavioral despair test)라고도 하는 표준화된 검사법인 FST를 이용하였다¹⁸⁾. 이 검사법은 약물개발시의 항 우울 효과를 검색하는 기본적인 실험으로 알려져 있다. 이 실험은 두 번에 걸쳐 이루어지는데, 첫 번째 날은 높이 50 cm,

지름 20cm의 투명한 아크릴원통형 수조에 30cm높이로 22℃의 물을 채워, 흰쥐의 꼬리가 바닥에 닿지 않을 정도의 물 높이에 강제로 빠뜨린 다음 15분간 있게 하였다. 처음 수분간은 이를 벗어나기 위해 흰쥐가 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 immobility란 흰쥐가 얼굴을 포함한 상체의 일부분만 수면 위로 드러낸 채 몸의 균형을 유지하기 위하여 약간의 움직임만을 나타낼 뿐 물 위에 떠 있는 상태이다. 한편, swimming은 흰쥐가 수면 위를 돌면서 움직이고, 간혹 물 밑으로 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 비디오카메라로 측정하여 자료를 확보하였다.

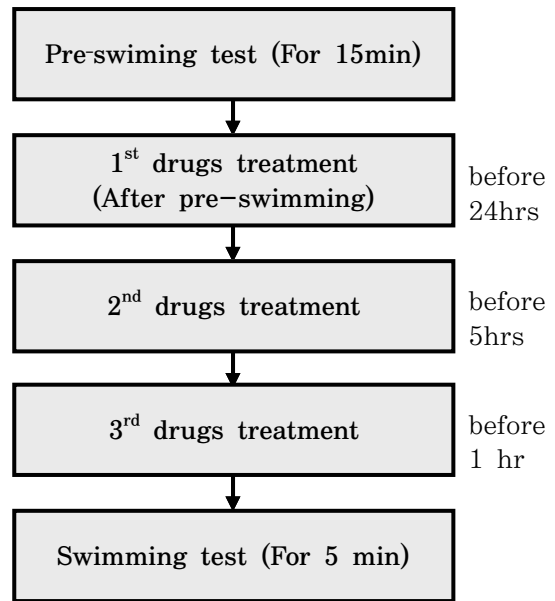


Fig. 1. Experimental Scheme of the Forced Swimming Test

3) 면역조직화학법

(1) CRF 발현 측정

강제수영 부하시험이 끝난 흰쥐를 sodium pentobarbital(80mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 0.9% saline 200 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 100 ml을 심장을 통해 관류하였다. 고정액의 처음 300 ml은 2분간, 나머지 700 ml은 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℃에서 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 30 μm 의 두께로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, CRF expression에 가장 널리 사용되는 Goat anti-CRF(santa cruz biotechnology)에 담구었다. Primary antibody는 0.3% Triton-X100(PBST)에서 2% normal donky serum과 0.001% kehole limpit hemocyanin (sigma)으로 2000배로 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 Vectastain ABC reagent (Vectastain)에 담구어 반응시켰다. PBST로 몇 번 행군 다음 뇌 조직을 착색제인 diaminobenzidine을 사용하여 발색시켰다. 발색이 끝난 조직은 slide에 올려 2시간 동안 실온에서 건조 시킨 후, xylene으로 투명화 시켜 polymount로 봉입하였다. 뇌 조직의 각 부위는 염색성을 광학 현미경으로 100배 확대 관찰하고 사진을 촬영 하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos의 부도¹⁹⁾를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자 (2×2 cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting하였다²⁰⁾.

(2) c-fos 발현 측정

강제수영 부하시험이 끝난 흰쥐를 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 ml은 2분간, 나머지 700 ml은 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℃에서 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 3 μm 의 크기로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, c-fos expression에 가장 널리 사용되는 Rabbit anti c-fos(santa cruz biotechnology)에 담구었다. Primary antibody는 0.3% Triton-X100(PBST)에서 2% normal goat serum과 0.001% kehole limpit hemocyanin (sigma)으로 2000배로 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 Primary antiserum에서 72시간 배양하였다. 그 후 뇌 조직을 PBST로 씻은 다음, 2시간 동안 실온에서 2% normal goat serum을 함유하는 PBST에

서 200배로 희석한 biotinylates goat anti-rabbitserum(Santa Cruz Biotechnology.)에 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Vectastain ABC reagent (Vectastain)에 담구어 반응시켰다. PBST로 몇 번 행군 다음 뇌 조직을 착색제인 diaminobenzidine을 사용하여 발색시켰다. 발색이 끝난 조직은 slide에 올려 2시간 동안 실온에서 건조 시킨 후, xylene으로 투명화 시켜 polymount로 봉입하였다. 뇌 조직의 각 부위는 염색성을 광학 현미경으로 100배 확대 관찰하고 사진을 촬영 하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos의 부도¹⁹⁾를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자 (2×2 cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting하였다²¹⁾.

(3) TH(Tyrosine Hydroxylase)발현 측정

강제수영 부하시험이 끝난 흰쥐를 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 ml은 2분간, 나머지 700 ml은 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℃에서 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 3 μm 의 크기로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, TH expression에 가장 널리 사용되는 Mouse anti-Tyrosine Hydroxylase (Zymed Laboratories, Sanfrancisco, CA)에 담구었다. primary antibody는 0.3% Triton-X100(PBST)에서 2% normal goat serum과 0.001% kehole limpit hemocyanin (sigma)으로 2000배로 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 primary antiserum에서 72시간 배양하였다. 10% BSA buffer에 10%mouse FITC 2nd antibody를 실온에서 2시간 배양한 후, 형광 mountant를 이용하여 봉입하였다. 뇌 조직의 각 부위는 염색성을 형광 현미경으로 100배 확대 관찰하고 사진을 촬영 하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos의 부도¹⁸⁾를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자 (2×2 cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting하였다²¹⁾.

4) ELISA법을 통한 혈청 ACTH측정

행동 실험이 모두 끝난 뒤, 관류 전 심장에서 혈액을 채취한 후, 원심분리 후, 혈청 성분을 모아 -70

℃에서 보관한다. 다음날, ELISA 분석 1시간 전 혈액 샘플 및 ELISA kit을 냉장고에서 꺼내, 실온에 놔둔다. ACTH는 ELISA kit (ACTH(rat), phoenix pharmaceuticals, Inc.)을 구입하여 분석하였다. Standard농도는 0.04 ng/ml - 25 ng/ml로 범위를 정했고, 1stAb가 코팅되어 있는 96well에 sample과 standard를 50 ul씩 넣고, biotinyl peptide를 25 ul씩 넣고 2시간 incubation한다. Wash buffer를 이용해 3번 washing후, SA-HRP를 100 ul를 각 well에 넣어준다. 1시간 후, 3번 washing 하고, 100 ul TMB를 이용해 1시간 동안 발색시킨다. 2N HCl을 이용해 반응을 멈추고, 450 nm에서 ELISA reader를 이용해 O.D.를 읽는다¹⁶⁾.

5) 통계처리

모든 측정값은(평균값±표준오차)로 표시하였고, 각 실험군의 통계학적 분석은 window용 SPSS 15.0를 이용하였다. 행동 실험결과 및 면역조직 화학법에 대한 통계분석은 one-way ANOVA로 분석하였으며, 집단간 차이 분석을 위해 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, P값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

실험 결과

1. 강제수영부하실험

FST 결과는 Fig 2-3. 과 같다. Control에서 부동행동이 10.4 ± 1.3 sec를 나타낸 것과 비교해서 A100에서는 9.8 ± 1.4 sec, A400에서는 4.5 ± 0.7 sec를 나타내 B100에서는 6.3 ± 1.4 sec, B400에서는 7.7 ± 2.3 sec로 나타나 A400에서 부동행동이 유의성 있게 감소하였다(F(4, 40)=2,562, P<0.01).

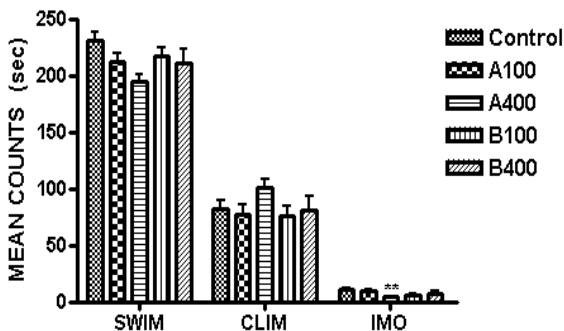


Fig. 2. Effect of Mixture of Citri Reticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex in the Forced Swimming Test Saline and Mixture of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex was ingested intragastrically 24hrs, 5hrs, 1hr before the FST. Behaviors of the rodents were tested in the FST.

Values are presented as mean ± S.E. of 8 animals / group.

Control group was ingested with normal saline. A100 was ingested with extracts after mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). A400 was ingested with extracts after Mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg). B100 was ingested with mixture after extraction of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). B400 was ingested with mixture after extraction of Citri Reticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex(400 mg/kg) and the FST.

** : Significant difference compared with the control group (** P<0.01)

2. 면역조직화학법 결과

2.1. 실방핵(PVN) 에서 CRF 발현

FST 실시 후, PVN 내에서의 CRF 발현은 Fig 4-5. 와 같다. Control을 100으로 보고 %로 계산해 본 결과, A100에서는 66.2 ± 7.6%, A400에서는 66.2 ± 6.1%, B100에서는 56.9 ± 6.2%, B400에서는 53.8 ± 7.7%로 나타나 모든 실험군에서 PVN 내에서의 CRF의 발현이 유의성 있게 감소되었음을 알 수 있었다(F(5,52)=9,354, P<0.001).

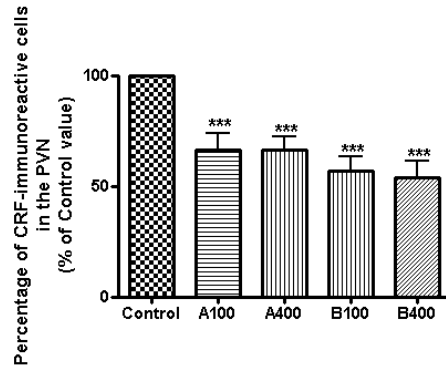


Fig. 3. Expression of CRF-immunoreactive cells in the PVN Saline and Mixture of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex were ingested intragastrically at 24hrs, 5hrs, 1hr before the FST.

Expression of CRF was measured after the FST Values are presented as mean ± S.E. of 8 animals / group.

Control group was ingested with normal saline. A100 was ingested with extracts after mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). A400 was ingested with extracts after Mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg). B100 was ingested with mixture after extraction of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). B400 was ingested with mixture after extraction of Citri Reticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex(400 mg/kg) and the FST.

*** : Significant difference compared with the control group (***) P<0.001)

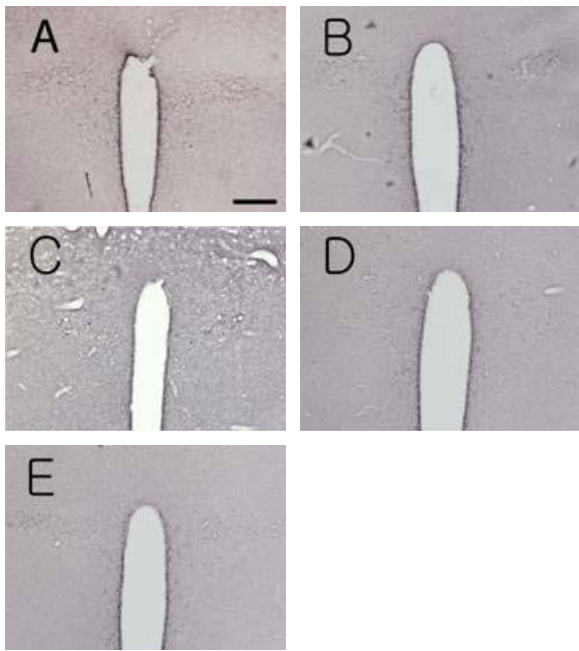


Fig. 4. Photograph of CRF-immunoreactive cells in the PVN (scale bar represents 200 μ m) Control group(A) was ingested with normal saline. A100(B) was ingested with extracts after mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). A400(C) was ingested with extracts after Mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg). B100(D) was ingested with mixture after extraction of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). B400(E) was ingested with mixture after extraction of Citri Reticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex(400 mg/kg) and the FST.

2.2. 실방핵(PVN) 에서 c-fos 발현

FST 실시 후, PVN 내에서의 c-fos 발현은 Fig 6-7 . 과 같다. Control을 100으로 보고 %로 계산 해본 결과, A100에서는 104.1 \pm 9.9%, A400에서는 109.6 \pm 15.4%, B100에서는 93.3 \pm 5.7%, B400에서는 89.2 \pm 7.3%로 나타나 유의성있는 변화를 볼 수 없었다 (F(5,41)=3.767).

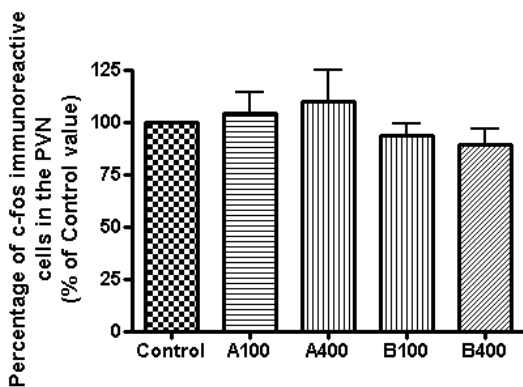


Fig. 5. Expression of c-fos-immunoreactive cells in the PVN Saline and Mixture of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex were administered intragastrically at 24hrs, 5hrs, 1hr before the FST.

Expression of c-fos was measured after the FST Values are presented as mean \pm S.E. of 8 animals / group. Control group was ingested with normal saline. A100 was ingested with extracts after mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). A400 was ingested with extracts after Mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg). B100 was ingested with mixture after extraction of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). B400 was ingested with mixture after extraction of Citri Reticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex(400 mg/kg) and the FST.

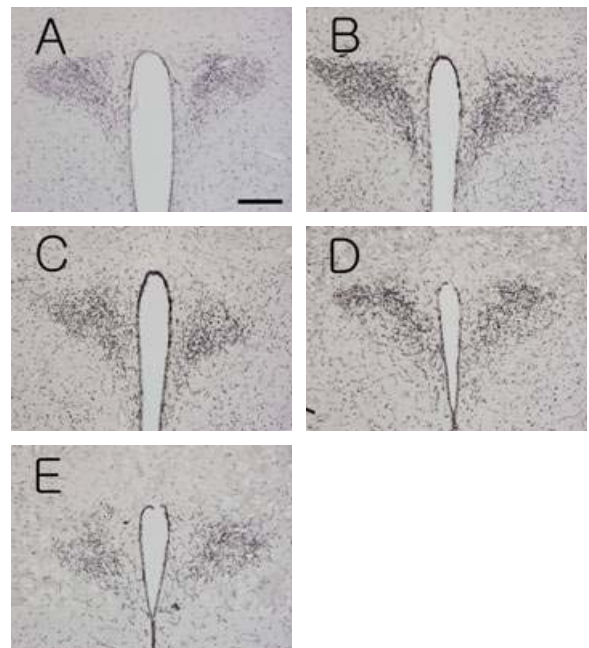


Fig 6. Photograph of c-fos-immunoreactive cells in the PVN (scale bar represents 200 μ m)

Control group(A) was ingested with normal saline. A100(B) was ingested with extracts after mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). A400(C) was ingested with extracts after Mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg). B100(D) was ingested with mixture after extraction of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). B400(E) was ingested with mixture after extraction of Citri Reticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex(400 mg/kg) and the FST.

2.3. 혈청(Serum)에서 ACTH(Adrenocorticotrophic Hormone) 농도

FST 실시 후, serum 내에서의 ACTH 발현은 Fig 8. 과 같다. Control을 100으로 보고 %로 계산 해본 결과, A100에서는 19.6 \pm 8.9%, A400에서는 118.5 \pm 15.9%, B100에서는 82.8 \pm 3.2%, B400에서는 121.2 \pm 12.9%로 나타나 A100에서 유의성 있게 감소하였다(F(9,29)=9.192, P<0.01).

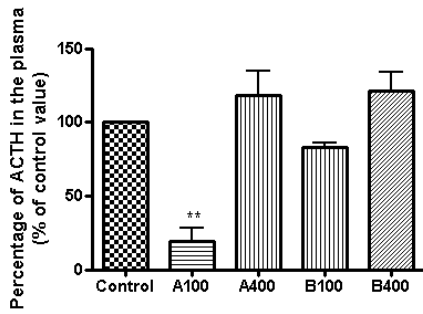


Fig. 7. ACTH concentration in Serum Saline and Mixture of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex were administered intragastrically at 24hrs, 5hrs, 1hr before the FST. Concentration of ACTH was measured by ELISA method after the FST Values are presented as mean \pm S.E. of 8 animals / group. Control group was ingested with normal saline, A100 was ingested with extracts after mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). A400 was ingested with extracts after Mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg). B100 was ingested with mixture after extraction of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). B400 was ingested with mixture after extraction of Citri Reticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex(400 mg/kg) and the FST. ** : Significant difference compared with the control group (** P<0.01)

2.4. 복측피개야(VTA)와 청반(LC)에서 TH 발현

FST 실시 후, VTA와 LC 내에서의 TH 발현은 Fig 9-12, 와 같다. VTA에서는 Control을 100으로 보고 %로 계산한 결과, A100에서는 113.1 \pm 29%, A400에서는 112.8 \pm 10%, B100에서는 121.1 \pm 3.6%, B 400에서는 130.7 \pm 18.1%를 나타내 오히려 증가하는 모습을 나타냈으며, LC에서는 A100에서는 101.5 \pm 10.3%, A400에서는 58.8 \pm 10.2%, B100에서는 34.6 \pm 0.7%, B400에서는 68.4 \pm 6.6%를 나타냄으로써 TH의 발현이 유의성 있음을 알 수 있었다 (VTA : F(5,25)=0.889, LC : F(5,13)=2.698, P<0.05~P<0.01).

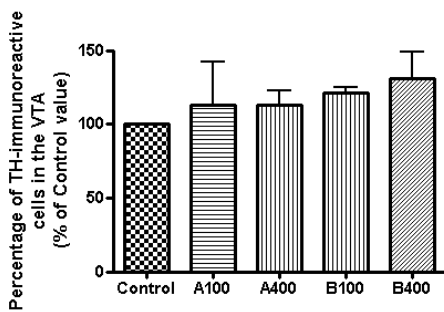


Fig. 8. Expression of TH-immunoreactive cells in the VTA Expression of TH in VTA was measured after the FST Saline and Mixture of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex were administered intragastrically at 24hrs, 5hrs, 1hr before the FST. Values are presented as mean \pm S.E. of 8 animals / group. Control group was ingested with normal saline, A100 was ingested with extracts after mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). A400 was ingested with extracts after Mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg).

B100 was ingested with mixture after extraction of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). B400 was ingested with mixture after extraction of Citri Reticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex(400 mg/kg) and the FST.

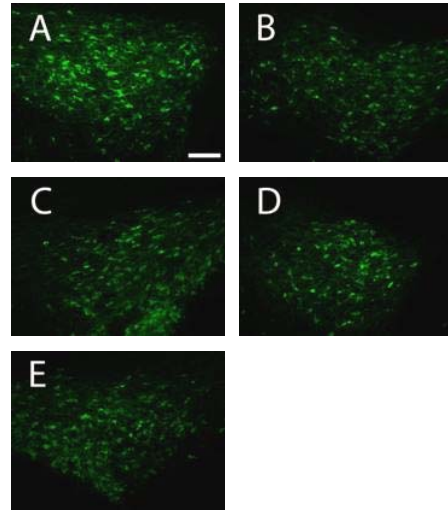


Fig. 9. Photograph of TH-immunoreactive cells in the VTA (scale bar represents 200 μ m) Control group(A) was ingested with normal saline, A100(B) was ingested with extracts after mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). A400(C) was ingested with extracts after Mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg). B100(D) was ingested with mixture after extraction of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). B400(E) was ingested with mixture after extraction of Citri Reticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex(400 mg/kg) and the FST.

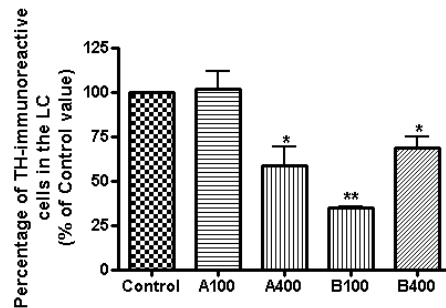


Fig. 10. Expression of TH-immunoreactive cells in the LC The Expression of TH in the LC was measured after the FST Saline and Mixture of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex were administered intragastrically at 24hrs, 5hrs, 1hr before the FST. Values are presented as mean \pm S.E. of 8 animals / group. Control group was ingested with normal saline, A100 was ingested with extracts after mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). A400 was ingested with extracts after Mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg). B100 was ingested with mixture after extraction of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). B400 was ingested with mixture after extraction of Citri Reticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex(400 mg/kg) and the FST. *, ** : Significant difference compared with the control group (* P<0.05 , ** P<0.01)

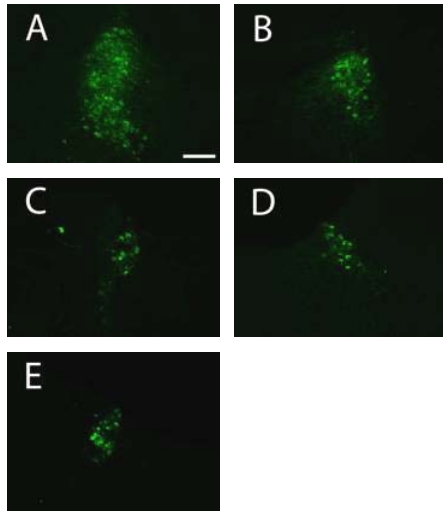


Fig. 11. Photograph of TH-immunoreactive cells in the LC (scale bar represents 200 μ m)
 Control group(A) was ingested with normal saline. A100(B) was ingested with extracts after mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). A400(C) was ingested with extracts after Mixing Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg). B100(D) was ingested with mixture after extraction of Citri Peticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg). B400(E) was ingested with mixture after extraction of Citri Reticulatae Viride Pericarpium and Lycii Radicis Cortex(400 mg/kg) and the FST.

고찰

肝氣鬱結이란 정신적 긴장과 정서의 과도한 변화로 肝의 疏泄작용이 실조되고 氣血이 鬱滯되어 나타나는 병리적 현상으로서, 현대의학적 의미로는 스트레스에 의해 뇌하수체와 부신피질 호르몬의 분비가 촉진되어 혈압상승, 맥박증가, 체온상승 등의 자율신경계의 실조현상을 나타내는 것이라 할 수 있다⁸⁻¹⁰. 이러한 肝氣鬱結이 오래되면 氣鬱化火, 肝火上炎이 되고 肝火로 인해 陰血이 손상되면 肝陰不足證을 유발하게 된다. 또한 肝氣鬱結이 衝任二脈에 영향을 미치면 經痛, 經閉, 월경중 乳房脹痛, 乳房腫塊 및 月經不調 등의 증상이 나타난다²³. 이러한 병증에 주로 사용되는 처방으로 柴胡抑肝湯이 있는데, 이는 <醫學入門 婦人玉尺>²⁴에 수록된 것으로 鬱悶不舒, 心火煩熾, 惡風體倦, 似寒似熱, 面赤心煩, 自汗 등의 증을 치료할 목적으로 立方되었으며, 후대에 와서는 清肝解鬱 작용을 주로 하여 肝氣鬱結로 인한 妊娠虛勞, 骨蒸潮熱 뿐 아니라 스트레스에 의한 獨身女經閉에 주로 활용되는 처방이다.

본 실험에서는 스트레스와 우울 상황에서 肝氣鬱結을 풀어주고 허열을 제거해줌으로써 우울행동과 스트

레스반응의 해소에 영향을 줄 수 있지않을까 하는데 착안하여 柴胡抑肝湯의 약물구성중 肝氣鬱結을 풀어주는 효능의 靑皮와 清虛熱의 효능이 있는 地骨皮의 조합이 흰쥐의 우울행동에 미치는 효과를 확인해 보았으며 구성약물의 추출방식에 따른 효능차이(합제후 추출(A), 추출후 합제(B))를 함께 보았다.

본 연구에서는 흰쥐의 우울행동을 유발하기 위하여 FST를 사용하였는데, FST는 1978년 Porsolt 등¹⁸)에 의해 고안된 방법으로 절망행동모델이라고 불린다. 흰쥐를 도피 불가능한 수조에 빠트리면 처음에는 출구를 찾아 격렬히 수영을 하다가 결국은 코를 수면 위로 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 널리 사용되고 있다.

본 실험의 결과를 보면 FST에서 靑皮와 地骨皮 합제(A100, A400, B100, B400)를 투여했을 때 A400 에서 흰 쥐의 부동행동을 유의성 있게 억제하는 것을 관찰할수 있어(P<0.01) 靑皮와 地骨皮 합제가 흰쥐의 우울행동을 억제하는 항우울 작용을 가지고 있다고 생각된다.

스트레스에 대한 적응반응은 크게 두 가지 과정을 거쳐 신체에 작용한다. 하나는 the sympatho-adrenergic-noradrenergic system(SAN)이고 다른 하나는 the limbic-hypothalamo-pituitary-adrenal system(L-HPA)이다²⁵.

SAN system은 생합성을 동반하고 아드레날린과 노르아드레날린의 분비를 수반하며 주로 자율신경계의 교감신경계 영역과 중추신경계의 the nucleus coeruleus(NLC) 영역을 조절하여 스트레스반응을 나타내며, L-HPA system은 amygdala, 해마 등과 같은 HPA Axis와 연관된 limbic 구조물들에 작용을 하여 스트레스 반응을 나타내는 것이다²⁶. 또한 SAN, L-HPA system은 강력한 상호작용을 통해 서로 연관된다. 이러한 스트레스 시스템은 정보의 분석, 복구, 평가 과정에 중요한 기능을 하는 뇌의 다른 부위들과도 연관되고 감정적인 조절, 적합한 반응 등과 관련된 뇌의 부위와도 연관된다²⁷.

일반적으로 우울증 현상은 HPA Axis의 과도한 활동 및 그로 인한 glucocorticoid의 증가와 관련된다²⁸. 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 혈청내 glucocorticoid의 농도를 높인다²⁵⁾. 이렇게 해서 glucocorticoid의 농도가 높아지게 되면 신경세포들을 죽이는 등 건강을 해치는 작용을 하게 되며 스트레스의 부적당한 조절은 대장염, 천식, 고혈압과 같은 전신적인 질병과 우울증 등의 정서장애, 알츠하이머 같은 퇴행성신경질환 등의 병인이 된다는 보고²⁹⁾가 있다.

본 실험에서는 靑皮와 地骨皮 합제가 FST에서 흰 쥐의 우울행동을 억제하는 것이 HPA Axis와 Catecholamine 계와 관련 있는지를 확인해보기 위해 시상하부의 PVN에서 CRF, c-fos의 발현과 혈청 내 ACTH를 측정하여 보았다.

CRF는 HPA Axis에서 스트레스의 영향을 증대하고 스트레스에 대한 내분비, 자율신경, 행동적, 면역 등의 반응을 매개하는 중요한 역할을 한다³⁰⁾. 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 있다³¹⁾.

본 실험의 결과, PVN 내에서의 CRF의 발현은 합제후 추출(A)와 추출후 합제(B) 양쪽에서 모두 유의성 있게 감소되었음을 알 수 있었는데 이는 여러 선행연구보고 결과에서 항우울제의 투여가 CRF의 발현을 감소시킨다고 한 것³⁾과 일치하는 것으로 靑皮와 地骨皮 합제의 투여가 시상하부의 PVN에 작용하여 CRF의 발현을 억제시킴으로써 항우울효과를 나타내는 것으로 생각된다.

c-Fos 단백질은 여러 약물이거나 스트레스를 포함한 생리적 자극에 의해 발현되므로, 스트레스 및 스트레스와 관련된 우울증 연구에서 자주 관찰되어지는 지표이다³²⁾. 우울증은 세포들의 내적, 외적환경의 변화에 의해 야기되고, 세포가 우울행동에 노출되면 바로 c-fos를 포함한 초기 유전자들의 발현이 첫 단계에서 신속하게 전사된다³³⁾. 그러므로 신경세포 활성화를 나타내는 지표인 c-fos mRNA를 사용해서 우울증을 찾아 낼 수 있다³⁴⁾. 이전 연구들을 통해 c-fos는 FST를 포함한 많은 종류의 우울행동 자극에 의해 해마에서 활성화되고, 우울증과 관련된 뇌 조직들 즉, PVN, Amygdala, 대뇌피질, Lateral Septum과 LC 같은 곳에서 발현된다는 것이 밝혀졌다³⁵⁾.

본 실험 결과에서는 靑皮와 地骨皮 합제(A100, A400, B100, B400)가 c-fos에서는 뚜렷한 효과를

보이지 못한 것으로 나타났는데, 이는 靑皮만을 투여했을 때 c-fos를 감소시켰다는 선행보고¹⁴⁾와 비교해 볼 때, 靑皮와 地骨皮 합제의 투여가 靑皮 단독으로 투여한 경우와는 차이가 있는 것으로 나타났다.

한편, 혈청 내 ACTH를 측정한 결과에서는 A100 그룹에서는 유의성 있는 감소를 나타내었다. B100 그룹에서는 약간 감소하는 경향을 보였고 A400, B400에서는 대조군보다 오히려 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 CRF를 억제하는 것으로 나타난 본 실험 결과 및 靑皮의 투여가 혈청 내 ACTH의 발현을 억제시켰다고 한 박 등¹⁶⁾의 선행보고와는 차이가 있는 것으로, CRF 발현 후 ACTH의 분비에 미치는 과정에서 고용량의 靑皮와 地骨皮 합제의 투여가 두 과정 사이에 어떤 영향을 미치는 것이 아닌지 추정해 볼 수 있는데, 이와 같은 결과가 나타난 이유에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Catecholamine계에 속하는 TH는 도파민계 대사를 평가하고자 할 때, 관찰하는 지표 중 하나로, 스트레스 조건에서는 도파민체계가 활성화 되어 도파민의 이용율과 전환율이 증가되어 도파민의 수준은 감소되고 상대적으로 도파민 대사에 관여하는 TH의 수준은 증가하는 현상이 나타난다³⁶⁾. 우울증 환자들의 cerebro spinal fluid에서 도파민의 대사물질의 농도가 감소한다는 점³⁷⁾, 도파민을 생성하는 신경세포의 사멸에 의해 '저 도파민 증후군'의 한 형태로 나타나는 '파킨슨씨병' 환자에서 우울증이 더욱 자주 발현한다는 점³⁸⁾ 등은 사람에서 도파민과 mesolimbic system의 기능 저하가 우울증후군 발현에 일정 부분 관여하고 있음을 임상에서 보여준다.

본 실험 결과를 살펴보면, VTA에서는 모든 실험 조에서 TH가 오히려 증가하는 모습을 나타내 효과가 없었으며 LC에서는 TH의 발현이 유의성 있게 억제되고 이는 Zhu³⁹⁾ 등이 주요우울증에서 LC에서 TH의 유의성있는 발현의 감소를 언급한 보고와 합치된다. 이로 보아 靑皮와 地骨皮 합제(합제후 추출(A), 추출후 합제(B))의 항우울 작용이 LC/NE system에 작용하여 나타나는 것으로 추정해 볼 수 있다. 여기서 LC/NE system은 LC와 medulla, pons의 다른 noradrenergic 세포군들을 말하는 것으로 HPA Axis와 함께 스트레스에 대해 적응하기 위한 스트레스 시스템을 말한다⁴⁰⁾.

이상의 결과에서 보듯이 FST에서 靑皮와 地骨皮 합제를 투여했을 때 A400에서 흰 쥐의 부동행동이 유의성 있게 감소되어 靑皮와 地骨皮 합제가 흰 쥐의 우울행동을 억제하는 항우울 작용을 가지고 있다고 생각되며 합제후 추출(A)에서는 고 등¹⁵⁾의 地骨皮

실험에서 400mg/kg 이 유의성이 있는것과 같이 나왔으며, 추출후 합제(B)에서 저용량인 B100은 권 등¹⁴⁾의 靑皮 실험결과와 같음을 알수 있어 A는 地骨皮와, B는 靑皮와 같은 경향의 효능을 보이고 있다.

PVN 내에서의 CRF의 발현은 A 와 B 모든 그룹에서 고루 유의성있게 감소되었음을 알 수 있는데 이는 권 등¹⁴⁾이 靑皮 400mg/kg에서 유의성이 있게 나온것과 차이가 있어 A 와 B 각 100 의 저용량에서 유의성있게 나온것이 地骨皮의 영향이 아닌지 추정해 볼 수 있다.

c-Fos의 발현에서는 A 와 B 양쪽 에서 효과가 없었으나 권 등¹⁴⁾의 靑皮 실험에서는 100mg/kg 과 400mg/kg 에서 유의성이 있게 나와 이번 실험과 차이가 있음을 알수 있었다.

ACTH의 농도 변화에서는 A100 에서만 유의성 있는 변화가 나타나고 B100 에서는 감소하는 변화를 보였지만 유의성은 없었고, 나머지 그룹에서는 대조군보다 오히려 증가하였다. 이는 박 등¹⁶⁾이 靑皮 100mg/kg와 400mg/kg에서 유의성 있게 감소한 결과와는 반대로 나타났다.

VTA와 LC에서 TH의 발현은 VTA에서는 A 와 B 모두 효과가 없는 반면 LC에서는 A400, B100, B400 에서 효과가 나타나 고 등¹⁵⁾ 과, 박 등¹⁶⁾이 靑皮와 地骨皮 각각의 약제로 실험했을 때 VTA와 LC 모두에서 TH의 발현을 억제시킨다는 기존의 실험과 차이가 있는 것으로 나타났다.

이상의 결과에서 靑皮와 地骨皮의 개별약물의 효능과 합제후의 효능이 차이가 있는 것은 地骨皮와 靑皮의 상호작용에서 생긴 결과로 보이며 이에 대한 연구는 추후 더 진행할 필요가 있다고 사료된다.

이로 보아 靑皮와 地骨皮 합제(합제후 추출(A), 추출후 합제(B))가 나타내는 항우울 작용이 PVN에서 CRF의 발현을 억제해서 ACTH의 농도가 감소하게 되고 LC에서 TH의 발현을 억제하여 나타내는 것으로 생각되어지며 이와 함께 추출방식에 따른 효능의 차이점은 명확하게 구분하기 어려웠다.

결론

靑皮와 地骨皮 합제(합제 후 추출(A100, A400), 추출 후 합제(B100, B400))가 흰쥐의 우울행동에 미치는 효과를 알아보기 위해 FST를 실시하여 행동변화에 미치는 영향을 보고, 면역조직화학법으로 FST가 끝난 흰쥐의 시상하부의 PVN에서 CRF와 c-fos 의 발현을 측정하고 serum에서 ACTH의 농도를 측정하였으며, 면역조직화학법으로 VTA와 LC에서 TH를

측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 강제 수영 부하 실험을 실시하고 부동행동이 나타나는 시간을 관찰한 결과, 대조군에 비해 靑皮와 地骨皮 합제 투여군(A100, A400, B100, B400) 모두에서 감소하였으며, 특히 A400 에서 유의성 있게 감소하였다(A400(P<0.01)).
2. HPA Axis에 대한 靑皮와 地骨皮의 합제가 미치는 영향은 시상하부의 PVN에서 靑皮와 地骨皮 합제 투여군 A와 B 모두에서 CRF가 유의성 있게 감소하였고(P<0.001), c-fos의 발현은 A와 B 모두에서 유의성 없었으며, 혈청 ACTH 농도는 A100 에서만 유의성 있게 감소되었다(P<0.01) .
3. Catecholamine 계에 속하는 TH 발현은 VTA에서는 A와 B 모두에서 유의성 없었으며, LC에서는 A400, B100, B400 에서 유의성 있게 감소하였다(A400(P<0.05), B100(P<0.01), B400(P<0.05)).

이상과 같은 실험결과를 볼 때, 靑皮와 地骨皮 합제가 FST에서 부동행동을 감소시키고 시상하부의 PVN에서 CRF의 발현을 억제시켰으며 청반에서 TH의 발현을 감소시켜 흰쥐의 우울행동을 억제시키는 항우울효과가 있음을 시사하는 것이다. 하지만 추출방식에 따른 효능, 즉 합제후 추출(A)와 추출후 합제(B)의 차이점은 명확하게 구분하기 어려웠다.

감사의 글

본 연구는 경원대 연구비 지원에 의한 결과입니다.

참고문헌

1. 대한신경정신의학회. 신경정신과학. 서울:하나의학사. 1998:361-386.
2. Millan MJ. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. Pharmacology & Therapeutics. 2006; 110:135-370.
3. Sapolsky, R.M, L.M, Romero, and A.U. Munck. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative

- actions. *Endocr Rev*, 2000;21(1):55-89.
4. Korte, S.M, et al. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005;29(1): 33-38.
 5. de Kloet, E.R. M. Joels, and F. Holsboer. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 2005;6(6): 463-475.
 6. 이세봄, 곽용도, 안홍을, 박상기. 우울증과 항우울제의 분자신경생물학. *Molecular and Cellular Biology News*, 2007;19(4):30.
 7. 조홍건 편저. 실용한방정신의학. 서울:유진문화사. 2002:184-190.
 8. Oliver, G. and Schaefer, E.A.. The physiological effects of the extracts of the suprarenal capsules, *J. Physiol*, 18, 1985; 230-238.
 9. 전국한외과대학간계내과학교실. 간계내과학. 서울: 동양의학연구원. 1989: 30-38, 44-51.
 10. 대전대학교한외과대학병리학교실. 동의병리학. 서울. 1991:8-9.
 11. 조용국, 이태희. 시호억간탕이 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향. *대한한의학 방제학회지*, 2007;15(2):147-160.
 12. 신길구. 신씨본초학. 서울:고문사. 1987: 497-498.
 13. 전국한외과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울:영림사. 1994:237-238.
 14. 권용욱, 이태희. 청피가 강제수영부하에 따른 우울행동에 미치는 영향. *대한본초학회지*, 2008; 23(4):59-70.
 15. 고동균, 이태희. 지골피가 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향. *대한본초학회지*, 2007;22:137-146.
 16. 박수현, 이태희. 청피가 FST에서 TH와 ACTH변화에 미치는 영향. *대한본초학회지*, 2009: 24(1):141-150.
 17. 신재용 편저. 방약합편 해설. 서울:성보사. 1988:321.
 18. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in rats : A new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*, 1978;47(4): 379-391.
 19. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, New York, 1986.
 20. Arthur H Swiergiel, Yueping Zhou, Adrian J Dunn. Effects of chronic footshock, restraint and corticotropinreleasing factor on freezing, ultrasonic vocalization and forced swim behavior in rats. *Behavioral Brain Research*, 2007;183:178-187.
 21. Malgorzata Lehner, Ewa Taracha, Anna Skorzevska, Danuta Turzynska. Expression of c-fos and CRF in the brains of rats differing in the strength of a fear response. *Behavioral Brain Research*, 2008;188:154-167.
 22. G. Garcia P., Tagliaferro A., Ferri A.M., 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;25:951-957.
 23. 송병기. 한방부인과학. 서울:행림출판. 1986:182-193.
 24. 이천. 의학입문. 서울:한성사. 1994:409, 534.
 25. Tafet GE, Bernardini R. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2003;27:893-903.
 26. Chrousos GP, Loriaux DL, Gold PW. Mechanisms of physical and emotional stress. *Plenum*, New York, 1988:245.
 27. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. *JAMA*, 1992;267:1244-1252.
 28. Vazquez DM. Stress and the Developing Limbic-Hypothalamic-Adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*, 1998;23(7):663-700.
 29. Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*, 1997; 20(2):78-84.
 30. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*, 2002 ;53:865-871.

31. 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; 87:7522–7526.
32. Doucet JP, Squinto SP, Bazan NG. Fos-jun and the primary genomic response in the nervous system. *Mol Neurobiol*. 1990; 4:27–55.
33. Muchimapura S, Fulford AJ, Mason R, Marsden CA. Isolation rearing in the rat disrupts the hippocampal response to stress. *Neuroscience* 2002; 112:697–705.
34. Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol*. 1990; 296:517–530.
35. 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;14:5929–5938.
36. Beitner-Johnson D, Guitart X, Nestler EJ. Neurofilament proteins and the mesolimbic dopamine system : common regulation by chronic morphine and chronic cocaine in the rat ventral tegmental area. *J. Neurosci*. 1992; 12(6): 2165–2176.
37. Bowden C. Reduced dopamine turnover in the basal ganglia of depression suicides. *Brain Res*. 1997;769(1):135–140.
38. Burn DJ. Depression in parkinson's disease. *European Journal of Neurology*. 2002;9(3):44–54.
39. Meng-Yang Zhu, Violetta Klimek, Ginny E. Dilley, John W. Haycock, Craig Stockmeier, James C. Overholser, Herbert Y. Meltzer, Gregory A. Ordway. Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression. *Biological Psychiatry*. 1999 ; 46(9):1275–1286.
40. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic Research*. 2002;53:865–871.