大韓本草學會誌 제26권 제2호(2011년 6월)
Kor. J. Herbology 2011 ; 26(2) : 59-66

地骨皮와 牧丹皮 複合劑가 강제수영부하실험에서 CRF, c-Fos와 Tyrosine Hydroxylase에 미치는 영향

심은영, 이태희*

경원대학교 한의과대학 방제학교실

Effects of Mixture of Lycii Radicis Cortex and Moutan Cortex on Corticotropin-Releasing Factor, c-Fos, and Tyrosine Hydroxylase in Forced Swimming Test

Sim, Eun-Yeong, Tae-Hee, Lee

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

ABSTRACT

Objectives : The goal of this study was to investigate the antidepressant effects of Mixture of Lycii Radicis Cortex and Moutan Cortex on the change of HPA-Axis and Catecholamic system.

Methods : We were performed the Forced Swimming Test. The expressions of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) and c-Fos at paraventricular nucleus (PVN), and tyrosine hydroxylase (TH) at ventral tegmental area (VTA) and locus coeruleus (LC) were evaluated by immunohistochemical method.

Results : The duration of immobility in the Forced Swimming Test was significantly decreased in A100, A400($p<0.05 \sim p<0.01$). CRF expressions at PVN was significantly decreased in A400($p<0.05$).No other group showed significant difference in expression of c-Fos at PVN comparing with control group. TH expressions at VTA was significantly decreased in A100 and A400, respectively($p<0.001$). TH expressions at LC was significantly decreased in A100($p<0.01$).

Conclusions : According to the above results, Mixture of Lycii Radicis Cortex and Moutan Cortex has antidepressant effects via the reduction of CRF expression and the Catecholamine System activity.

Key Words : Lycii Radicis Cortex, Moutan Cortex, FST,CRF,c-Fos, PVN, TH, VTA, LC,

서 론

우울증의 주된 진단적 특징은 침체된 기분과 즐거움을 지속할 수 있는 능력의 거의 완전한 결여 상태이다. 침체된 상태는 집중력 장애부터 계속되는 자살 충동에 이르기까지 정신적 증상의 조합들이다. 또한 수면장애와 심한 피곤감은 매우 흔하고 통증 등의 신체증상의 호소 등도 진단에 이용된다. 환자 개개인은 질병의 진행에 따라 변화할 수 있는 여러 다양한 증상들을 호소하며 동반된 다른 질환이 있는 경우가 허다하다[1].

한의학에서 보는 우울증의 원인은 思慮過度나 失意, 悲嘆 등의 정신적인 충격이 臟氣를 쇠약하게 하고 그로 인해 氣血의 순행이 지체되어 鬱症이 생기게 된다[2].

우울증의 주된 진단적 특징은 침체된 기분과 즐거움을 지속할 수 있는 능력의 거의 완전한 결여 상태이다. 침체된 상태는 집중력 장애부터 계속되는 자살 충동에 이르기까지 정신적 증상의 조합들이다. 또한 수면장애와 심한 피곤감은 매우 흔하고 통증 등의 신체증상의 호소 등도 진단에 이용된다. 환자 개개인은 질병의 진행에 따라 변화할 수 있는 여러 다양한 증상들을 호소하며 동반된 다른 질환이 있는 경우가 허다하다[1].

한의학에서 보는 우울증의 원인은 思慮過度나 失意, 悲嘆 등의 정신적인 충격이 臟氣를 쇠약하게 하고 그로 인해 氣血의 순행이 지체되어 鬱症이 생기게 된다[2].

氣鬱증에 대표적인 肝氣鬱結은 肝의 疏泄功能이 不及 혹은

*교신저자 : 이태희. 경원대학교 한의과대학 한의학과, 방제학교실.
· Tel : 031-750-5418. · E-mail : ophm5418@kyungwon.ac.kr.
· 접수 : 2011년 4월 26일 · 수정 : 2011년 6월 8일 · 채택 : 2011년 6월 10일

障碍되어 氣機가 鬱滯不暢한 病理狀態에 이른 것이다. 症狀으로 肝에서 氣滯하여 兩脅이 脹滿하거나 右脅이 疼痛하다. 上部에서는 廮瘤, 梅核氣가 發하고 中部에서는 兩乳脹痛 혹은 結塊가 發하며 下部에서는 少腹疼痛, 牽引睾丸 등이 발할 수 있다. 여자에서는 痛經, 經閉가 나타난다. 脾胃의 納化 및 和降功能에 영향을 미쳐 胸脅脹痛, 脘腹滿悶, 食慾不振 등도 나타난다[3].

肝氣鬱結을 치료하는 처방으로 柴胡抑肝湯이 있는데 조 등[4]은 Tyrosine Hydroxylase(TH)의 발현을 억제하여 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동을 억제하는 효과가 있다고 하였다. 柴胡抑肝湯은 青皮, 柴胡, 赤芍藥, 牧丹皮, 地骨皮, 香附子, 黑山梔子, 蒼朮, 川芎, 神麯, 生地黃, 連翹, 甘草로 구성되며 鬱悶하여 편안하지 못하고 心火가 盛하여 惡風體倦, 寒熱이 마치 瘧과 같아 面赤心煩, 自汗, 經閉한 者를 치료한다[5].

그 중 地骨皮(Lycii Radicis Cortex, *Lycium chinense* Mill.)는 性은 寒 無毒하고 味는 甘하며 淸熱退燒, 凉血, 降血壓의 효능이 있어 肺結核低熱, 肺熱咳嗽, 糖尿病, 高血壓 등에 응용한다[6].

또한 牧丹皮(Moutan Cortex, *Paeonia suffruticosa* Andrews)는 性은 微寒 無毒하고 味는 苦辛하며 淸熱凉血, 活血散瘀의 효능이 있어 夜熱早凉 및 血熱로 인한 瘀血停滯 등 證에 다용한다[7].

地骨皮와 牧丹皮의 선행 연구결과로는 고 등[8]은 地骨皮를 이용한 실험에서 항우울 효과를 보고하였고, 성 등[9]은 牧丹皮를 이용한 실험에서 항우울 효과가 있다고 보고하였다. 柴胡抑肝湯의 구성약재인 地骨皮와 牧丹皮 각각의 약재가 항우울 작용을 나타낸 보고는 있지만, 地骨皮와 牧丹皮 合劑의 우울증 혹은 우울행동에 미치는 영향에 대한 보고가 없어 저자는 이를 확인하기 위해 흰쥐에게 강제수영부하실험을 실시하여 행동변화를 살펴보았다.

만성적인 스트레스는 환경의 상황 및 조건, 그리고 개인의 대처 방법에 따라서 우울증상을 초래할 수 있으며, 이로 인해 Hypothalamo-Pituitary-Adrenaline (HPA) 체계가 실조상태가 되어 병리생리학적인 변화를 초래하게 되고, 결국 흥분장애와 주요 우울증 등의 여러 다양한 질병들을 야기하게 된다[10]. 그래서 면역조직화학법으로 HPA Axis와 관련하여 시상하부의 실방핵, Paraventricular Nucleus(PVN)에서 Corticotropin-Releasing Factor(CRF)와 c-Fos의 발현을 측정하였으며, Catecholamine계에 미치는 영향을 확인하기 위하여 복측피개야, Ventral Tegmental Area(VTA)와 청반, Locus Coeruleus(LC)에서 도파민과 노르에피네프린의 대사에 관여하는 것으로 알려진 Tyrosine Hydroxylase(TH)를 측정하였다. 그 결과 유의성이 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

중량 200 g 내외에 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐(Orient사, 경기도)를 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 낮과 밤 주기는 오전 7시부터 오후 7시까지를 낮으로, 다른 12시간을 밤으로 하여 자동 조절하였다. 그리고 온도는 20~24 ℃, 습도는 60±10 %로 유지하였다.

2) 약 재

연구에 사용한 地骨皮(Lycii Radicis Cortex, LRC)와 牧丹皮(Moutan Cortex, MC)는 HMAX사(제천, 충북)에서 구입하였으며, 추출 전까지 4 ℃ 냉장고에 보관했으며 구입한지 일주일 이내에 추출하였다.

(1) 地骨皮와 牧丹皮 合劑 後 抽出 (Extraction after Mixture)
地骨皮와 牧丹皮를 柴胡抑肝湯[5]에서의 地骨皮와 牧丹皮 양의 비율 2.4g : 3.2 g(3 : 4)의 비율이 되게 합하여 350 g을 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 동결 건조시켜 地骨皮와 牧丹皮 合劑 분말 87 g을 획득하여 24.86 %의 수득율을 보였다.

2. 실 험

1) 실험군

실험은 두 단계로 나누어 실시하였으며, 대조군(Control) 및 地骨皮와 牧丹皮 合劑 後 抽出 100 mg/kg(A100), 地骨皮와 牧丹皮 合劑 後 抽出 400 mg/kg(A400)의 세 그룹으로 나누어 실시하였다. 약재는 강제수영부하실험(Forced Swimming Test) 24시간 전, 5시간 전, 1시간 전에 3회에 걸쳐 경구(p.o.)로 강제 투여하였다.

2) 강제수영부하실험 (Forced Swimming Test)[11]

본 실험에서는 절망행동검사(Behavioral despair test)라고도 하는 표준화된 검사법인 FST를 이용하였다. 이 검사법은 약물개발시의 항우울 효과를 검색하는 기본적인 실험으로 알려져 있다. 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 수분간은 이를 벗어나기 위해 흰쥐가 심한 저항을 보이나, 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어난다. 24시간 후에는 5분간 같은 환경에서 강제수영을 시키고, 여기서 climbing, swimming, immobility 세 가지를 측정한다. 전형적인 immobility란 흰쥐가 얼굴을 포함한 상체의 일부분만 수면위로 드러낸 채 몸의 균형을 유지하기 위하여 약간의 움직임만을 나타낼 뿐 물 위에 떠 있는 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 사람에 의한 오차를 줄이기 위해 비디오카메라로 측정하여 자료를 확보하였다.

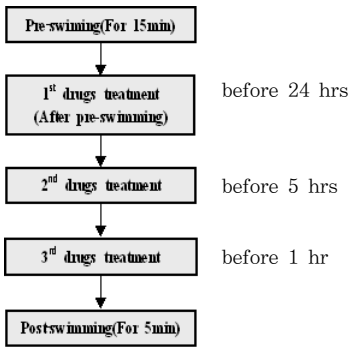

Fig. 1. Experimental scheme of Forced Swimming Test

3) 면역조직화학법 (CRF, c-Fos, TH)[12]

강제수영부하실험이 끝난 쥐를 sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후, 0.9% saline 200 ㎖에 이어 인산용액으로 준비한 4% formalin 용액 1000 ㎖를 심장을 통해 관류하였다. 고정액의 처음 300 ㎖는 2분간, 나머지 700 ㎖는 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 30 ㎛의 크기로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, CRF expression, c-Fos expression, TH expression에 가장 널리 사용되는 Goat anti CRF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Rabbit anti c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Mouse anti-Tyrosine Hydroxylase (Zymed Laboratories, Sanfrancisco, CA)에 담갔다. 일차항체는 0.3% Triton-X100 (PBST)에서 2% normal goat serum과 0.001% keyhole limpet hemocyanin (Sigma, St. Louis, MO, USA)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 PBST에서 200배로 희석한 biotinylated goat anti-mouse serum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)에 반응시켰다.

다시 PBST로 씻은 다음 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Santa Cruz ABC reagent (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)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 투명화 시켜 polymount로 봉입하였다. 뇌 조직의 각 부위는 염색성을 광학 현미경으로 100배 확대 관찰하고 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Watson과 Paxinos의 부도를 참고하였다[13]. 현상된 사진에서 격자(2×2cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은 (평균값±표준오차)로 표시하였고, 각 실험군의 통계학적 분석은 window용 SPSS를 이용하였다. 행동실험 결과 및 면역조직화학법에 대한 통계분석은 one-way ANOVA로 분석하였고, 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, p값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

실험 결과

1. 행동실험

실험 결과는 Fig. 2-3와 같다.

대조군, A100, A400에서 climbing, swimming, 그리고 immobility 등의 행동의 차이를 비교하였을 때, climbing은 대조군에서 61.5±5.4 sec를 나타낸 것과 비교해서 A100은 77.8±7.0 sec, A400은 74.0±10.7 sec를 나타내어 유의성이 없었다 ($F(2,15)=1.140$, $p>0.05$). swimming은 대조군이 237.3±6.3 sec를 나타낸 것과 비교해서 A100은 220.5±6.8 sec, A400은 222.8±11.1 sec를 나타내어 유의성이 없었다 ($F(2,15)=1.194$, $p>0.05$). 부동행동(immobility)는 대조군이 7.8±0.9 sec를 나타낸 것과 비교해서 A100은 1.7±0.7 sec, A400은 3.2±1.4 sec를 나타내어 모두 유의성 있게 감소하였다 ($F(2,15)=9.402$, $p<0.05$).

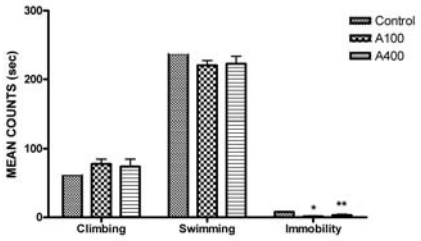

Fig. 2. Effect of Mixture of LRC and MC on Behavior in Forced Swimming Test. Control group was ingested Normal Saline. A100 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (100 mg/kg). A400 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (400 mg/kg). Normal Saline and Mixture of LRC and MC were ingested intragastrically 24 hrs, 5 hrs, and 1 hr before FST. Each column represents the mean±S.E of 6 animals/group.
* : Singnificant difference from the control group ($p<0.05$)
** : Singnificant difference from the control group ($p<0.01$)

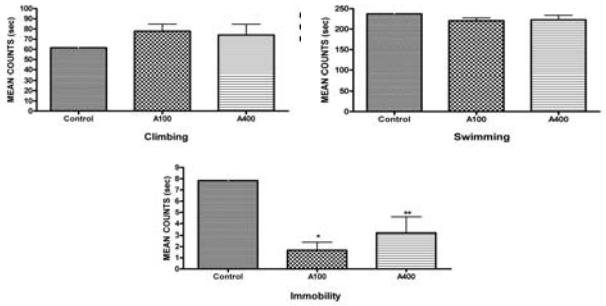

Fig. 3. Effect of Mixture of LRC and MC on Behavior in Forced Swimming Test.
Control group was ingested Normal Saline. A100 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (100 mg/kg). A400 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (400 mg/kg). Normal Saline and Mixture of LRC and MC were ingested intragastrically 24 hrs, 5 hrs, and 1 hr before FST. Each column represents the mean±S.E of 6 animals/group.
* : Singnificant difference from the control group ($p<0.05$)
** : Singnificant difference from the control group ($p<0.01$)

2. 면역조직화학법

1) PVN에서 CRF발현

FST 실시 후, PVN내에서의 CRF 발현은 Fig. 4와 같다. 대조군 5.0±0.9개에 비해 A100은 3.3±0.5개, A400은 2.8±0.5개로 나타나 A400에서 PVN내에서의 CRF의 발현이 유의하게 감소했다 ($F(2,9)=3.242$, $p>0.05$).

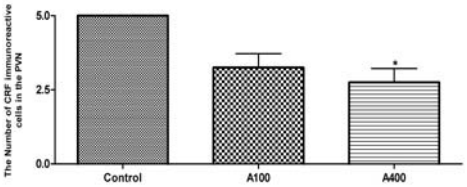

Fig. 4. Expression of CRF-immunoreactive cells in the PVN
Control group was ingested Normal Saline. A100 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (100 mg/kg). A400 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (400 mg/kg). Normal Saline and Mixture of LRC and MC were ingested intragastrically 24 hrs, 5 hrs, and 1 hr before FST. Each column represents the mean±S.E. of 4 animals/group.
* : Singnificant difference from the control group ($p<0.05$)

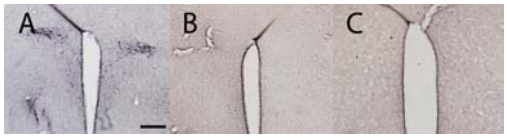

Fig. 5. Photograph of CRF-immunoreactive cells in the PVN (scale bar represents 200 ㎛). A(Control) : Normal Saline ingested group B(A100) : Extraction after Mixture of LRC and MC 100 mg/kg ingested group C(A400) : Extraction after Mixture of LRC and MC 400 mg/kg ingested group

2) PVN에서 c-Fos발현

FST 실시 후, PVN내에서의 c-Fos의 발현은 Fig. 6과 같다.

대조군 37.2±7.0개에 비해 A100은 37.3±4.9개, A400은 31.6±6.4개를 나타내 대조군에 비해서 유의한 차이를 보이지 않았으나, A400에서 약간 감소하는 경향을 보였다 ($F(2,17)=0.298$, $p>0.05$).

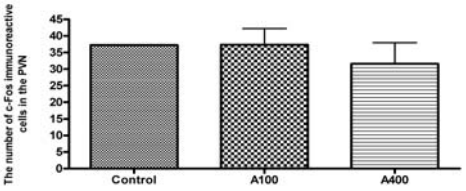

Fig. 6. Expression of c-Fos-immunoreactive cells in the PVN
Control group was ingested Normal Saline (N=5). A100 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (100 mg/kg) (N=6). A400 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (400 mg/kg) (N=9). Normal Saline and Mixture of LRC and MC were ingested intragastrically 24 hrs, 5 hrs, and 1 hr before FST. Each column represents the mean±S.E..

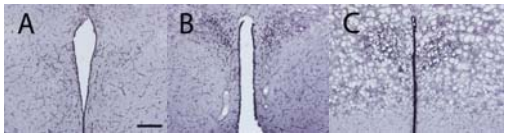

Fig. 7. Photograph of c-Fos-immunoreactive cells in the PVN (scale bar represents 200 ㎛). A(Control) : Normal Saline ingested group B(A100) : Extraction after Mixture of LRC and MC 100 mg/kg ingested group C(A400) : Extraction after Mixture of LRC and MC 400 mg/kg ingested group

3) VTA에서 TH발현

FST 실시 후, VTA에서의 TH 발현은 Fig. 8과 같다. VTA에서는 대조군 27.0±0.9개에 비해 A100은 13.6±1.2개, A400은 18.5±0.7개를 나타내어 A100, A400 모두에서 대조군에 비해 유의하게 감소함을 알 수 있었다($F(2,17)=49.261$, $p<0.001$).

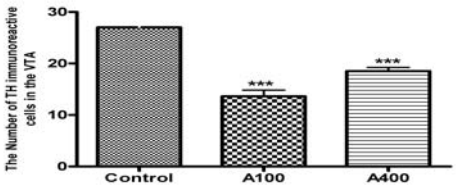

Fig. 8. Expression of TH-immunoreactive cells in the VTA
Control group was ingested Normal Saline (N=7). A100 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (100 mg/kg) (N=7). A400 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (400 mg/kg) (N=6). Normal Saline and Mixture of LRC and MC were ingested intragastrically 24 hrs, 5 hrs, and 1 hr before FST. Each column represents the mean±S.E..
*** : Singnificant difference from the control group ($p<0.001$)

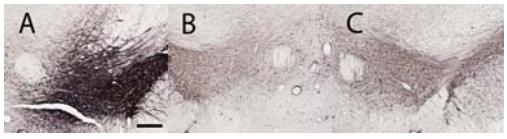

Fig. 9. Photograph of TH-immunoreactive cells in the VTA (scale bar represents 200 ㎛). A(Control) : Normal Saline ingested group B(A100) : Extraction after Mixture of LRC and MC 100 mg/kg ingested group C(A400) : Extraction after Mixture of LRC and MC 400 mg/kg ingested group

4) LC에서 TH발현

FST 실시 후, LC에서의 TH 발현은 Fig. 10과 같다.

LC에서는 대조군 15.3±1.2개에 비해 A100은 11.3±0.6개, A400은 14.6±1.0개를 나타내 A100에서 대조군에 비해 유의하게 감소함을 알 수 있었다 ($F(2,19)=5.557$, $p<0.05$).

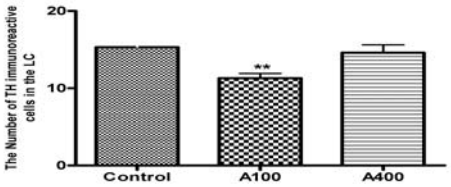

Fig. 10. Expression of TH-immunoreactive cells in the LC
Control group was ingested Normal Saline (N=6). A100 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (100 mg/kg) (N=8). A400 was ingested with Extraction after Mixture of LRC and MC (400 mg/kg) (N=8). Normal Saline and Mixture of LRC and MC were ingested intragastrically 24 hrs, 5 hrs, and 1 hr before FST. Each column represents the mean±S.E..
** : Singnificant difference from the control group ($p<0.01$)

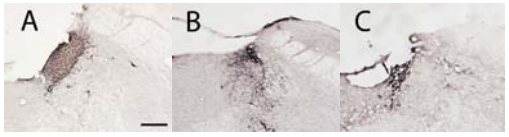

Fig. 11. Photograph of TH-immunoreactive cells in the LC (scale bar represents 200 ㎛). A(Control) : Normal Saline ingested group B(A100) : Extraction after Mixture of LRC and MC 100 mg/kg ingested group C(A400) : Extraction after Mixture of LRC and MC 400 mg/kg ingested group

고 찰

한의학에서는 氣가 정체되어 발산하지 못하는 증상을 총칭하여 鬱症이라 하는데, 鬱은 일반적으로 氣鬱을 가리키며 대표적으로는 肝氣鬱結이 있다. 肝에는 疏泄의 기능이 있고 昇發 舒暢을 좋아하는데 情志不舒나 惱怒로 인해 傷肝 혹은 기타원인으로 氣機의 昇發과 疏泄에 영향을 미쳐 肝氣鬱結의 病症을 야기하게 된다[14].

肝氣鬱結의 症狀은 兩脇脹痛 혹은 刺痛, 乳房脹通, 躁急易怒 혹은 精神抑鬱, 食慾不振, 月經不調로 나타나며[15], 이러한 병증에 주로 사용되는 처방으로는 柴胡抑肝湯이 있는데, 이는 〈醫學入門 婦人玉尺〉[16]에 수록되어 있다.

柴胡抑肝湯에 대한 실험으로는 김 등[17]이 구속 스트레스에 노출된 생쥐에서 상승된 血 中 corticosterone 농도를 감소시키는 유의한 효과를 보고하였으며, 안 등[18]은 柴胡抑肝湯의 항 stress 효과를 보고하였고, 조 등[4]은 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동을 억제하는 효과가 있다고 하였다.

본 실험에서는 肝氣鬱結에서 나타나는 瘀血과 虛熱을 제거함으로 우울행동의 해소에 영향을 줄 수 있으리라는 점에 착안하여 柴胡抑肝湯의 구성 약물 중에서 淸熱凉血, 活血散瘀의 효능을 가진 牧丹皮와 淸虛熱의 효능이 있는 地骨皮의 항우울 효과를 연구하였다.

또한 본 실험에 사용된 각각의 약물에 대한 연구로서 地骨皮에 관하여는 고 등[8]이 地骨皮가 VTA와 LC에서 TH의 발현을 억제시킴으로써 항우울 작용을 가진다는 보고가 있었고, 구 등[19]이 地骨皮가 PVN내에서의 CRF, c-Fos 발현을 모두에서 유의성 있게 감소시켜 항우울 효과가 있다는 보고가 있었으며, 성 등[20]이 地骨皮가 解熱과 血壓降下作用에서 모두 유의성이 있다고 보고하였다. 牧丹皮에 관하여는 성 등[9]이 牧丹皮가 PVN에서 c-Fos와, VTA와 LC에서 TH의 발현을 억제시켜 항우울 효과가 있다는 보고가 있었고, 김 등[21]이 collagen에 의한 關節炎의 진행시 牧丹皮의 투여가 면역 반응을 조절하여 關節炎의 진행을 완화시킨다는 보고가 있었으며, 박 등[22]은 牧丹皮의 성분인 methyl gallate가 활성화된 대식세포로부터 생성되는 염증매개물질을 유의적으로 억제함으로써 抗炎症 효과가 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 흰쥐의 우울행동을 유발하기 위하여 FST를 사용하였는데, FST는 1978년 Porsolt 등[11]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 예측타당도가 인정되어 항우울제의 효과 판정을 위한 방법으로 널리 사용되고 있다.

본 실험의 결과를 보면 FST에서 地骨皮와 牧丹皮 투여군 모두 흰쥐의 부동행동을 유의성 있게 억제하는 것을 관찰할 수 있어 흰쥐의 우울행동을 억제하는 항우울 작용을 가지고 있다고 사료된다. 또한 성 등[9]에서는 牧丹皮의 FST에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보고하였고, 고 등[8]에서는 地骨皮의 FST에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보고하였으며, 본 실험에서는 농도 의존적으로 증가하는 경향이 있어 地骨皮의 FST 결과와 차이가 있었다. 고 등[8] 과 성 등[9]의 FST 결과를 볼 때 牧丹皮가 地骨皮보다 지배적인 효과를 보이는 것으로 사료된다.

스트레스에 대한 적응 반응의 주요한 요소는 교감-아드레날린-노르아드레날린, Sympatho-Adrenergic-Noradrenaline (SAN)체계와 변연계-시상하부-뇌하수체-부신축, Limbic-Hypothalamo-Pituitary-Adrenaline(L-HPA)체계이다[10].

SAN체계에서는 아드네날린의 생합성 및 아드네날린, aderenaline(AR)과 노르아드레날린, noradrenaline(NA)이 분비되며 이는 중추신경계의 청반핵(ucleus locus coeruleus)과 자율신경계의 교감신경계 분절에 의해서 각각 규제된다. L-HPA체계는 HPA및 이와 함께 연관 되어 있는 소뇌 편도체(amygdala)와 해마(hippocampus)와 같은 변연계를 포함한다. SAN체계와 L-HPA체계는 상호적인 촉진작용에 참여하게 되어 한 체계의 활성화는 다른 체계의 활성화를 야기하게 된다[23]. 이와 더불어 스트레스 체계는 분석, 정보검색, 평가 과정, 감정 음조의 설정, 대처 원칙의 평가, 그리고 적절한 적응 반응의 실행 등의 중요 기능을 하게 되는 다른 부위의 뇌 영역을 포함한다[24].

우울증에서는 HPA Axis의 기능이 항진되며 혈중 Cortisol의 농도가 높고 해마에 있는 Cortisol수용체 장애가 발견되기도 한다[25].

본 실험에서는 地骨皮와 牧丹皮 合劑가 FST에서 흰쥐의 우울행동을 억제하는 것이 HPA Axis와 관련 있는지를 확인해 보기 위해 시상하부의 PVN에서 CRF, c-Fos의 발현을 측정하여 보았다.

본 연구에서 CRF와 c-Fos의 발현 물질을 관찰했던 PVN은 CRF를 분비하는 뉴런이 집중되어 있어 우울증에 반응하여 CRF, Vasopressin 그리고 갑상선 자극 호르몬 방출 호르몬, Thyrotropin-Releasing Hormone(TRH)과 같은 우울증과 관련된 물질이 분비되어 우울증 반응 연구에 객관적인 지표가 되고 있다[26]. CRF는 시상하부 및 변연개의 여러 신경핵 등에서 분비되며[27], CRF를 흰쥐의 뇌실 내에 주입한 후 HPA Axis가 항진되었다는 보고[28] 가 있었다.

c-Fos 단백질은 여러 약물이나 스트레스를 포함한 생리적 자극에 의해 발현되므로, 스트레스 및 스트레스와 관련된 우울증 연구에서 자주 관찰되어지는 지표이다[29].

본 실험의 결과 PVN내에서의 CRF의 발현은 고농도로 투여한 A400에서 유의성이 있었고, 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 이는 구 등[19]의 실험에서 地骨皮가 PVN내에서의 CRF 발현을 농도 의존적으로 감소시킨 경향을 보인 것과 일치하나 저농도와 고농도 투여군 모두에서 유의성이 있었던 것과는 차이가 난다. 또 성 등[9]의 실험에서는 牧丹皮의 PVN내에서의 CRF 발현에 대해 저농도와 고농도 투여군 모두에서 유의성이 없는 것과 차이가 나고, 농도 의존적으로 증가된 경향을 보인 것도 차이가 난다. 구 등[18]과 성 등[9]의 결과로 볼 때 PVN내에서의 CRF의 발현은 地骨皮가 牧丹皮보다 지배적인 효과를 보이는 것으로 사료된다.

본 실험의 결과 PVN내에서의 c-Fos 발현은 각 그룹에서 유의성이 없었고, 농도 의존적으로 약간 감소하는 경향을 보였다. 이는 구 등[19]의 실험에서 地骨皮가 PVN내에서의 c-Fos 발현을 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하는 경향을 보인 것에서 경향이 일치한다. 또 성 등[9]의 실험에서는 牧丹皮가 PVN내에서 저농도일 경우 c-Fos의 발현을 억제시

키고 고농도일 경우 증가시키는 경향을 보여 본 실험의 경향과는 차이가 난다. 구 등[18]과 성 등[9]의 결과로 볼 때 地骨皮가 牧丹皮보다 지배적인 효과를 보이는 것으로 사료된다.

우울증 상황에서는 도파민의 수준은 감소하고 상대적으로 도파민 대사에 관여하는 TH의 수준은 증가하는 현상이 보고된 바 있다[30~32].

VTA의 신경세포들도 도파민계 대사에 관여하는데 VTA에서의 TH발현은 우울증에 관여하는 도파민 대사를 조절하는 중요한 요소이다[33,34].

LC는 뇌간에 위치하고 우울증에 행동학적, 생리학적으로 반응하는 세포핵으로서 감정적 질환과 연관된다고 한다[35]. LC는 항우울제 효과를 평가하는데 주로 이용되며 이곳에서의 TH의 조절 정도가 실험에서 흔히 이용된다.

본 실험의 결과 VTA에서의 TH발현은 모두 유의성 있게 감소하였고, 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 이는 고 등[8]이 地骨皮가 VTA와 LC에서 TH의 발현을 억제시킴으로써 항우울 작용을 가진다는 보고와 일치하였으나, 地骨皮에서 용량과 관계없이 억제 효과를 보인 것과는 달리 본 실험에서는 용량이 증가할수록 억제 효과가 감소하는 차이가 있었다.

또한 성 등[9]이 牧丹皮가 VTA에서 TH의 발현을 억제시켜 항우울 효과가 있다는 보고와 일치하였으나, 牧丹皮가 용량과 관계없이 비슷한 감소 효과를 나타내어 본 실험에서 용량이 증가할수록 억제 효과가 감소한 것과는 차이가 있으므로 FST와 PVN에서의 CRF, c-Fos 발현의 결과와는 달리 본 실험에서는 地骨皮와 牧丹皮 어느 한 약물에 지배당하지 않는 것으로 사료된다.

본 실험에서 LC에서의 TH발현은 A100은 크게 감소하였고, A400은 유의성이 없었으며, 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 이는 고 등[8]이 地骨皮가 LC에서 TH의 발현을 억제시킨다는 보고와 본 실험에서 A100의 결과와 일치하고, 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보인 것도 일치한다. 또한 성 등[9]이 牧丹皮가 LC에서 TH의 발현을 억제시킨다는 보고와 본 실험의 A100의 결과는 일치하지만, 牧丹皮가 농도 의존적으로 크게 감소하는 경향을 보여 본 실험의 결과와는 차이가 난다. 고 등[8] 과 성 등[9]의 실험으로 보아 LC에서 TH의 발현은 地骨皮가 牧丹皮보다 지배적인 효과를 보이는 것으로 사료된다.

요약하면, FST결과 牧丹皮가 地骨皮보다 지배적인 효과를 보이며, PVN에서의 CRF와 c-Fos 발현의 결과 地骨皮가 牧丹皮보다 지배적이었으며, VTA에서의 TH발현의 결과 개별 약물의 효과와는 다른 반응을 보였고, LC에서 TH발현의 결과 地骨皮가 牧丹皮보다 지배적인 효과를 보이는 것으로 사료된다.

이상과 같은 실험 결과로 볼 때, 흰쥐의 강제수영부하실험에서 地骨皮와 牧丹皮 合劑 투여군은 PVN의 경우 A400에서 CRF의 발현을 억제하였고, VTA의 경우 모두 TH 발현을 억제하였으며, LC의 경우 A100에서 TH 발현을 억제하여 흰쥐의 우울행동을 억제시키는 항우울 효과가 있다고 생각된다.

결 론

地骨皮와 牧丹皮 투여군(合劑 後 抽出(A100, A400))이 흰쥐의 우울행동에 미치는 효과를 알아보기 위해 FST를 실시하여 행동변화에 미치는 영향을 보고, 면역조직화학법으로 FST가 끝난 흰쥐의 시상하부의 PVN내에서 CRF와 c-Fos의 발현을 측정하고, 면역조직화학법으로 VTA와 LC에서 TH의 발현을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 강제수영부하실험을 실시하고 부동행동이 나타나는 시간을 관찰한 결과, 대조군에 비해 모두 유의하게 감소하였으며 ($p<0.05 \sim p<0.01$), 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다.

2. 강제수영부하실험이 끝난 흰쥐의 시상 하부의 PVN에서 CRF의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 A400에서 유의하게 감소하였으며($p<0.05$), 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다.

3. 강제수영부하실험이 끝난 흰쥐의 시상 하부의 PVN에서 c-Fos의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 유의한 차이는 없었으나, A400에서 감소하는 경향을 보였다.

4. 강제수영부하실험이 끝난 흰쥐의 VTA에서 TH의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 地骨皮와 牧丹皮 合劑 투여군 모두에서 유의하게 감소하였으며 ($p<0.001$), 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다.

5. 강제수영부하실험이 끝난 흰쥐의 LC에서 TH의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 A100에서 유의하게 감소하였다 ($p<0.01$). 그러나 A400은 유의한 차이를 보이지 않았으며, 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다.

본 연구에서는 地骨皮와 牧丹皮를 合劑 後 抽出하여 투여하였는데, PVN에서 CRF의 발현을 감소시키고, VTA와 LC에서 TH의 발현을 감소시킴으로써 우울행동을 억제하는 항우울 효과가 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2011년 경원대학교 연구비 지원의 결과입니다.

참고문헌

1. Mark J. Millan. Multi-target strategies for the improved treatment of depressiveststes : Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application 2005 : 141-143.
2. Huh Joon. Supplemental Interpretation of Donguibo-Gam. Seoul : Namsan-Dang. 2000 : 35.
3. Moon Jun-Jeon et al, Oriental Medicine Pathology. Seoul : Gomoon-Sa, 1990 : 199, 200.
4. Jo Yong-Kook, Lee Tae-Hee. Anti-stress effects

of Sihoueokgantang in the passive avoidance test and the forced swimming test. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 2007 : 15(2) ; 147-160.
5. Shin Jae-Yong. Interpretation on the Bangyakhappyun. Seoul : Research Institute on the Traditional Medicine. 1988 : 321.
6. Su Pei Gen et al. Illustrated Book of Chinese Medicinal Herbs. Vol 1. Hong Kong : The Commercial Press. 1988 : 170.
7. The Concerted Publishing of the Korean National Herbology Professor. Herbology. Seoul : Yeong Lim Sa. 1994 : 193,194.
8. Dong-Kyun Koh, Tae-Hee, Lee. Antistress effects of Lycii Radicis Cortex in the passive avoidance test and the forced swimming test. The Korea Journal of Herbology. 2007 ; 22 : 137-146.
9. Young-Suk Sung, Tae-Hee Lee. Effects of Moutan Cortex on Corticotropin-Releasing Factor, c-Fos and Tyrosine Hydroxylase in Forced Swimming Test. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 2009 ; 17(1) : 129-140.
10. Tafet GE, Bernardini R. Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression. Progress in neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. 2003 ; 27 : 893-903.
11. 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.
12. Garcia G, Tagliaferro P, Ferri A, Evangelista de Duffard AM, Duffard R, Brusco A. Study of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in neonate rats lactationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid. Neurotoxicology. 200 4 ; 25 : 951-7.
13. Paxinos G & Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th Edition. San Diego : Academic Press. 1998 : 26-27, 40-47, 56-62, 80-82, 95-100.
14. Kim Hyun Jae, Hong Won Sik. Encyclopedia on Oriental Medicine. Seoul : Seong Bo Sa. 1988 : 228.
15. The Korean National Liver and Billiary Medicinal Dept. Liver and Billiary Medicine. Seoul : Research Institute on the Oriental Medicine. 1989 : 44.
16. Li Chan. Introduction to the Oriental Medicine. Seoul : Han Seong Sa. 1994 : 409, 534.
17. Kim Hyun-Jun, Lee Tae-Hee. Effects of Shihoieokgan-Tang with Other Herbs and Formulae Pretreatment on the Change of Corticoterone Induced by Immobilization Stress in Mice. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 2002 ; 10(2) : 57-72.
18. Ahn, Su-jin, Lee Tae-Hee. Effect of Chaihushugansan and Chaihuyigantang on the change of Monoamine Contents in the Hypothalamus of Mice induced by the Immobilization Stress. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 2003 ; 11(1) : 99-114.
19. Beom-Mo Koo, Tae-Hee Lee. Effects of Lycii Radicis Cortex in HPA -Axis System on the Forced Swimming Test. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 2010 ; 18(2) : 215-225.
20. Seong Rak Ki, Kim Seong Hoon, Seo Young Bae, Oh Ahn Hyang. Effect of Lycii Radicis Cortex and Lycii Ramulus Cortex on the level of serum glucose, anti-pyresis, blood pressure and the change of hematologic change. Journal of Herbology. 1994 ; 9(1) : 161-171.
21. Kim Dong Hyuk, Song Bong Geun, Kim Hyung Gyun. Effect of Moutan Cortex on the Arthritis induced by Collagen. Journal of Korean Traditional Medicine. 1997 ; 7(2) : 60-69.
22. Yong-Ki Park, Ji-Young Min, Je-Hyun Lee. The Effect of Methyl Gallate Isolated from *Paeonia suffruticosa* on Inflammatory Response in LPS-stimulated RAW264.7 Cells. Korean Journal of Herbology. 2009 ; 24(4) : 181-188.
23. Chrousos GP, Loriaux DL, Gold PW. Mechanisms of physical and emotional stress. Plenum, New York. 1988 : 245.
24. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. JAMA. 1992 ; 267 : 1244-1252.
25. Min Seong Kil. Current Psychiatry. Seoul : Il Jo Gak. 1996 : 14, 201-205, 111.
26. Eduardo E. Benarroch. Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. Clin Auton Res. 2005 ; 15 : 254-63.
27. Olschowka 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.
28. Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, et al. Elevated concentrations of CSF corticotropin -releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. Science. 1984 ; 226 : 1342-4.
29. Doucet JP, Squinto SP, Bazan NG. Fos-jun and the primary genomic response in the nervous system. Mol. Neurobiol. 1990 ; 4 : 27-55.
30. Komori T, Nomura J, Inoue K, Kitayama I. Tyrosine hydroxylase activity in discrete brain

regions of depression model rats. Jpn J Psychiatry Neurol. 1990 ; 44 : 747-54.
31. 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 : 2165-76.
32. Miller WR. Psychological deficit in depression. Psychol. Bull. 1975 ; 82 : 238-60.
33. Cross AR, Neary D. Neuroanatomy. New York : Churchill Living-stone. 1996 : 65-69, 121-2.
34. Danial SM, Amer Karmal, Marten PS, Geert MJ. Modulation of cellular activity and synaptic transmission in the Ventral Tegmental Area. European Journal of Pharmacology 2003 ; 480 : 97-115.
35. Mark A, Smith, M. S., Altemus, M., Michelson, D., Hong, S., Kvetnanskyi, R. & Post, R. Stress and antidepressants differentially regulate neurotrophin 3mRAN expression in the locus coeruleus. Neurobiology. 1995 ; 8788-92.