小烏沈湯加減方의 산화스트레스와 serotonin 대사 과정에 미치는 영향

황지연 · 이상룡 · 정인철*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Effects of So-Ochim-tang-Gagam-bang on Oxidative Stress and Serotonin Metabolism in P815 Cells

Ji-Yeon Hwang, Sang Ryong Lee, In Chul Jung*

Department of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Daejeon University

This experiment was designed to investigate the effects of So-Oochim-tang-Gagam-bang (SOCT-G) on oxidative stress and serotonin metabolism in P815 Mast Cells The effects of SOCT-G on activity of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and Super Oxide Dismutase (SOD) in P815 mast cells were investigated. The effect of SOCT-G on content of serotonin in P815 mast cells was investigated. The effects of SOCT-G on expression of 5-hydroxytryptamine transporter (5-HTT), Tryptophan hydroxylase 1 (TPH-1) mRNA in P815 mast cells were investigated. The SOCT-G increased DPPH radical scavenging activity in P815 mast cells. The SOCT-G increased SOD activity in P815 mast cells. The SOCT-G decreased the intracellular content of serotonin in P815 mast cells. The SOCT-G decreased 5-HTT and TPH-1 mRNA expression in P815 mast cells. This experiment shows that So-Ochm-Tang-Gagam-bang has a significant effect of oxidative stress that help prevent free radical damage. And So-Ochim-Tang-Gagam-bang decreased the intracellular content of serotonin and mRNA expression of 5-HTT and TPH-1. Therefore, further researches are suggested to reveal the anti-depressive effectiveness of So-Ochim-Tang-Gagam-bang.

Key words : So-Ochim-Tang-Gagam-bang, P815, Effect of oxidative stress, Serotonin, Depression

서 론

산화스트레스는 주요우울장애를 포함한 몇몇 신경정신의학적 질병들의 병태 생리적 기전의 원인으로 제시되고 있다. 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 뇌 조직이 다른 조직보다 체내 산소의 20%를 사용하며 산화성 free radical에 손상받기 쉬운 조직이기 때문에 산화스트레스가 신경정신병의 발생 원인이 될 수 있다[1].

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT)은 주요 monoamine 신경전달물질 중의 하나로 melatonin의 전구체이며 혈소판에서 유리되고, 장관점막, 송과체, 중추신경계를 포함한 많은 체내조직 내에 고농도로 존재하며, 위액분비의 억제작용, 평활근 수축작용을 가지고 있다[2,3]. Serotonin은 우울증, 불안증, 정신분열병, 강박장애, 공황장애 등의 정신질환의 병태생리에 관련이 있는 것으로 알려져 있으며[4], serotonin 계의 활성을 조절하는 물질은 정신질환 치료제로 응용될 수 있다. 현재 정신과 영역에서 가장 널리 사용하고 있는 약물이 선택적 serotonin 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)를 비롯한 항우울제이며 이런 약물들의 주된 작용 부위는 serotonin 수송체(serotonin transporter)이다[5].

P815 세포는 F1 hybrid mice의 ascitic tumour에서 유래한 것으로 serotonin을 생합성, 저장 및 분비하며, Tryptophan hydroxylase (TPH) 및 amino acid decarboxylase (AADC)를 발현하고 histamine을 생합성, 저장 및 분비하며, histamine 생합성 효소인 histidine decarboxylase를 발현한다[6].

小烏沈湯은 《太平惠民和劑局方·卷之三》[7] 에 "小烏沈湯 調中快氣, 治心腹刺痛"이라 하였고, 《東醫寶鑑·內景編·氣》[8] 에서

* 교신저자 : 정인철, 대전시 서구 둔산동 대전대학교 둔산한방병원

· E-mail : npjeong@dju.kr, · Tel : 042-470-9129

· 접수 : 2013/05/22 · 수정 : 2013/06/22 · 채택 : 2013/07/03

는 "凡 氣痛 宜 … 小烏沈湯"라 하여 氣로 인한 心腹刺痛에 활용되는 처방이다. 본 연구에서 사용한 小烏沈湯加減方은 스트레스와 우울증 등에서 빈발하는 증세 중 하나인 心胸痛[9]에 활용할 목적으로《東醫寶鑑·內景編》[8] 用藥法에서 제시한 上焦 氣滯에 桔梗, 枳殼를 가한다는 점에 착안하여, 小烏沈湯 처방에서 沈香 대신 木香을 사용하고 桔梗, 枳殼을 가한 것이다.

항산화와 항우울에 관련된 한약물을 이용한 실험적 연구로는 溫膽湯[10], 加味逍遙散[11] 등의 항산화 및 淸火補心湯[12], 加味逍遙散[13], 天王補心丹[14], 四逆散[15], 淸心溫膽湯[16] 등의 항우울에 대한 동물실험 연구와 加味歸脾湯[17], 分心氣飮加味方[18], 加味逍遙散[19]의 항산화 및 serotonin 대사과정에 미치는 영향에 대한 세포실험 연구가 보고된바 있으나, 小烏沈湯에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 小烏沈湯이 우울증 치료에 활용될 수 있으리라 사료되어 이를 실험적으로 규명하고자, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 및 Super Oxide Dismutase (SOD) 활성과 P815 세포내의 serotonin 함량 및 5-hydroxytryptamine transporter (5-HTT), TPH-1 mRNA의 발현을 관찰한바 약간의 지견을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 小烏沈湯加減方의 처방구성은 《太平惠民和劑局方》[1]의 小烏沈湯에서 沈香 대신 木香을 사용하고 桔梗, 枳殼을 2.0 g씩 첨가한 것으로, 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of So-Ochim-Tang-Gagam-bang (SOCT-G)

Herb	Botanical Nomenclature	Quantity(g)
香附子	Cyperi Rhizoma	4.0
烏藥	Linderae Radix	2.0
木香	Aucklandiae Radix	0.5
甘草	Glycyrrhizae Radix	0.5
桔梗	Platycodi Radix	2.0
枳殼	Aurantii Fructus	2.0
Total amount		11.0(g)

2) 시약

Cell culture용 FBS, DMEM, 10 mM HEPES, fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, D-PBS dulbecco's phosphate buffered saline, potassium phosphate dibasic, potassium phosphate monobasic, Trypsin-EDTA는 Gibco-BRL사(USA) 제품을 사용하였고, isopropanol, NaOH, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), 2,2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH), berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride, coralyne hydrochloride, L-tryptophan, 5-hydroxytryptophan, catalase, DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (4H-PT), serotonin (5-HT), 5-hydroxytryptamine transporter (5-HTT), 5-hydroxyindoleacetic acid (HIAA), dithiothreitol는 Sigma사(USA) 제품을 사용하였다. Trizol, Superscript II reverse transcriptase는 Life Technologies사(USA) 제품을, iQ SYBR green supermix는 Bio-Rad Laboratories사(USA) 제품을, ethanol, methalnol은 Samchun Pure Chemical사(Korea), Ez-cytox assay kit는 Itsbio사(Korea) 제품을, SOD assay kit는 Dojindo사(Japan)제품을 사용하였으며, 그 밖의 시약은 특급 및 일급을 사용하였다.

3) 기기

열탕추출기(대웅, Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU 540, Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., USA), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific Co., Korea), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer (Shimazue, Japan), centrifuge (Sigma, USA), deep freezer (Sanyo, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker (Lab Line, USA) 및 ELISA reader (Molecular Devices, USA), C18역상 HPLC columne (Hypersil, USA), HPLC (Shimazu, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

小烏沈湯加減方 처방 33.0 g을 증류수 1,000 ㎖에 넣고 2시간 동안 가열한 후 여과하여 얻은 액체성분을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 약리성분을 추출하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 2.76 g의 분말을 얻었다. 얻어진 분말은 냉동고(-20℃)에 보관하면서 사용 시에는 필요한 농도로 phosphate buffer에 희석하여 0.22 ㎛ 필터를 사용하였다.

2) P815 세포의 배양

P815 세포는 동아대학교 의과대학(해부학 교실)에서 분양받았으며, 배양은 10% fetal calf serum, 100 unit/㎖ penicillin과 100 ㎍/㎖ streptomycin을 포함한 DMEM 배지, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate를 사용하여, cell culture용 dish에서 37℃, 5% CO_2 상에서 배양하였다.

P815 세포(2×10^5 cells/cm^2, 60 mm culture dish)를 배양한 다음, 이 세포에 小烏沈湯加減方을 50 µg, 100 µg 가한 다음 48시간 배양하였다. 배양 후 cell line을 ice cold phosphate buffered saline (PBS)용액으로 harvest하여 원심분리하고 pellet을 얻은 후, pellet은 -70℃ freezer에 보관하면서 serotonin 함량 측정시료로 사용하였다.

3) Ez-cytox를 이용한 세포 생존률 측정

배양한 세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척한 다음 96 multi well에 2×10^4 cells/well의 세포수가 되도록

산정하여 사용하였다. 세포는 FBS가 들어있는 DMEM 배양액에서 小烏沈湯加減方을 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖, 400 ㎍/㎖ 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다.

이후 세포 생존을 Ez-cytox 분석법에 의해서 분석하였다. Ez-cytox 분석법은 배양이 완료된 세포에 50 ㎍/㎖ Ez-cytox를 희석 처리하여 반응시킨 다음 microplate reader로 570 nm에서 측정하였다.

4) DPPH free radical scavenging 활성 측정

시료의 free radical 소거 활성은 stable radical인 DPPH에 대한 환원력을 측정한 것으로, 농축한 시료를 각각 ethanol로 희석하여 IC_{50} 값을 나타낼 수 있는 농도가 포함되도록 小烏沈湯加減方을 10 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖, 400 ㎍/㎖ 농도로 제조하였다. 여기에 2,2′-diphenyl-2-picrylhydrazyl을 methanol에 녹여 0.1 mM DPPH 용액을 제조하였다. 이 DPPH 용액 2 ㎖를 준비한 시료 1 ㎖와 섞은 뒤 30분간 상온의 암소에서 보관하였다. 517 nm에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 다음의 식을 이용하여 각 시료의 농도 별 free radical scavenging activity 곡선을 그린 뒤, 50%의 DPPH free radical scavenging activity (DPPH IC_{50})[20]를 나타내는 값을 구하였다.

Free radical scavenging activity (%) = [1-(시료 첨가구의 흡광도/시료 무첨가구의 흡광도)]×100

5) SOD 활성 측정 실험

96-well plate의 각 well에 小烏沈湯加減方 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖ 농도의 sample solution 20 ㎕를 첨가한 후 reagent solution 200 ㎕를 넣은 후 마지막으로 enzyme working solution을 넣어준 후, 37℃에서 20분간 반응시킨다. ELISA reader를 이용하여 450 mm에서의 흡광도에서 측정 한다. SOD activity (inhibition rate, %)를 계산한다.

6) Serotonin 함량 측정

Serotonin 함량은 HPLC 형광광도계법으로 측정하였다. P815 세포 내부의 serotonin 농도를 분석하기 위하여, 각각 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖ 농도의 小烏沈湯加減方 약물을 처리한 세포의 배지를 제거한 후, 1×PBS pH 7.2의 완충액을 이용하여 세포를 2번 세척하였다. 1×PBS 200 ㎕를 첨가하고 세포를 모아 초음파로 분쇄하고, 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액을 C18 column에 시료용액(150 ㎕)을 trichloroacetic acid (1M, 150 ㎕), HIAA (10μM, 50 ㎕; 내부표준)를 가한 다음 10,000 rpm으로 원심 분리하였다. 상층액을 Millex-GV (0.22 ㎛)로 여과한 후 HPLC에 주입하여 serotonin 함량을 측정하였다.

각각의 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였으며, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하고 Bradford's method[21]를 이용하여 측정하였다.

HPLC Condition: column, TSK-gel ODS 120T (5 ㎛, 0.45×15 cm); a movement, NaOAc buffer (50 mM, pH 3.5)-acetonitrile methanol (90:6:4 v/v); the velocity of a moving fluid, 1 ㎖/min

7) Real-time PCR을 이용한 mRNA 측정

P815세포 pellet에 RNAzolB을 첨가하여 세포를 용해시킨 후 chloroform 200 ㎕를 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 5분 동안 방치시키고, 이를 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 무색의 상층액만을 400 ㎕ 취한 뒤 동량의 isopropanol을 넣고 inverting을 반복하여 섞은 다음 4℃에서 15분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 얻은 pellet (RNA)에 75% ethanol (DEPC treated water) 500 ㎕를 넣어 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하고 ethanol을 완전히 제거한 후에 DEPC water 50 ㎕를 넣어서 RNA를 용해하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 함량을 계산한다. 분리한 RNA에 해당 유전자들의 oligo dT primer와 DEPC water를 넣고 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후 실온에서 3분 동안 방치한 다음 10×buffer, 10 mM dNTP, AMV reverse transcriptase, 50 mM $MgCl_2$ 및 DEPC treated water를 넣고 37℃에서 1시간 동안 반응시켜서 reverse transcriptase (RT) product를 만든다. 만들어진 RT product (template cDNA)를 사용하여 real-time PCR을 사용하여 측정한다.

각 유전자 발현 정도를 real-time PCR을 이용해 측정하였다. 100 ㎍/㎖ 小烏沈湯加減方 sample의 추출된 RNA에 2X SYBR Green Master Mix 25 ㎕와 각각의 유전자들과 10pM forward and reverse primers를 1 ㎕씩 첨가하여 각각 50 ㎕ 반응이 이루어졌으며 95℃에서 10분 후 30초간 40 cycle을 돌린 다음 60℃에서 30초, 72℃에서 30초 동안 반응을 일으켰다. 대조 유전자로 β actin mRNA을 control로 이용하여 target mRNA를 정량하고 유전자 발현을 비교하였다(Table 2).

Table 2. Sequences of primer set used Quantative Real-Time PCR

Primers	Foward	Reverse	Tm(℃)	Product size (bp)
Beta-actin, (β-actin)	TCTGAACCCTAAG GCCAACCGTG	ATGGCATGAGGG AGCGCGTA	60	198
5-hydroxytryptamine transporter (5-HTT)	GGCGTTGCCGCTC TGAATGC	GAGGGACTGAGC TGGACAACCAC	60	484
Tryptophan hydroxylase 1 (TPH-1)	CTGCGACATCAGC CGAGAACAGT	CGGCGTCAAGTTC GGATCCA	60	200

8) 통계 처리

실험결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 분석하였으며 $P<0.05$에서 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. Cell viability

P815 세포주에 小烏沈湯加減方을 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖, 400 ㎍/㎖ 농도로 처리하여 세포 생존을 측정한 결과, 50 ㎍/㎖ 농도에서 108.0 ± 3.67로, 100 ㎍/㎖ 농도에서 100.4 ± 3.70로, 200 ㎍/㎖ 농도에서는 99.9 ± 6.40로, 400 ㎍/㎖ 농도에서는 92.5 ± 2.94로 세포 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

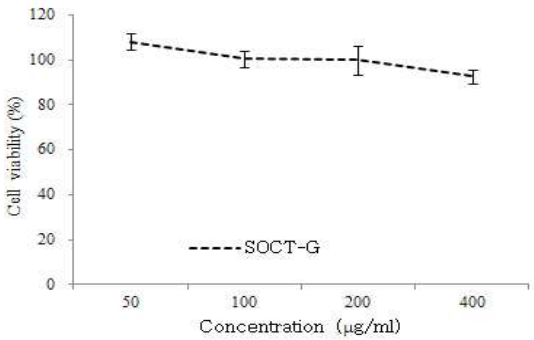

Fig. 1. Cell viability of SOCT-G on P815 cells by EZ-cytox assay. The cell viability was measured by Ez-cytox assay as described in Material and Methods. Date are expressed as % of control (treated with normal saline) and each column represents the mean ± S.E. of three determination.

2. DPPH 소거능

DPPH를 이용한 free radical 소거능을 측정한 결과, 10 μg/㎖ 小烏沈湯加減方군에서 9.0 ± 0.77, 100 μg/㎖군에서 10.7 ± 1.03, 200 μg/㎖군에서 19.9 ± 2.28, 400 μg/㎖군에서 21.4 ± 2.43의 DPPH radical 소거작용을 나타났다(Table 3).

Table 3. Effect of SOCT-G on DPPH radical scavenging activity

Sample	Concentration	Scavenging effect (%)
SOCT-G	10 μg/㎖	9.0 ± 0.77
	100 μg/㎖	10.7 ± 1.03
	200 μg/㎖	19.9 ± 2.28
	400 μg/㎖	21.4 ± 2.43
Ascorbic acid	10 μg/㎖	38.0 ± 6.08
	20 μg/㎖	79.0 ± 6.08
	30 μg/㎖	82.7 ± 3.51
	40 μg/㎖	87.0 ± 4.00
	50 μg/㎖	93.7 ± 4.93
	60 μg/㎖	99.3 ± 1.15

DPPH Scavenging Activity was measured as described in Material and Methods. Each value is mean ± SD (n>3). Positive control: ascorbic acid.

3. SOD 활성

SOD 활성 측정 결과, 50 μg/㎖ 小烏沈湯加減方군에서는 74.0 ± 2.2 U/㎖, 100 μg/㎖군에서는 94.5 ± 7.0 U/㎖로 SOD 활성이 증가하여 50 μg/㎖군, 100 μg/㎖군 모두 유의한 결과를 얻었다(Fig. 2).

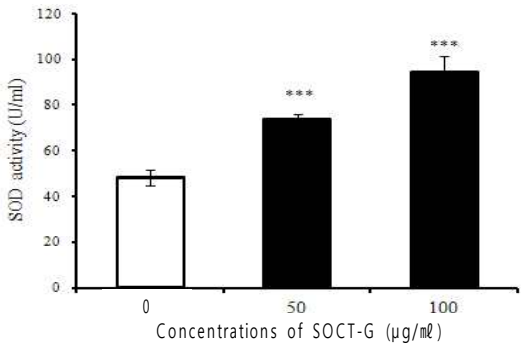

Fig. 2. Effect of SOCT-G on the SOD activity. The effect on SOD was tested with SOCT-G. Date are expressed as SOD activity (U/㎖) and each column represents the mean±SD of two determination. Statistically significant value compared with control by T test (***:P<0.001).

4. Serotonin 함량

P815 세포내의 serotonin 함량 측정 결과, 小烏沈湯加減方을 처리하지 않은 대조군에서 124.4 ± 9.9 ng/㎖ protein (100%) 인 것에 비해 50 μg/㎖ 小烏沈湯加減方군에서 108.7 ± 14.1 ng/㎖ protein (87.4%), 100 μg/㎖군에서 79.1 ± 5.0 ng/㎖ protein (63.6%)으로 100 μg/㎖ 처리군에서 유의미한 감소를 보였다(Fig. 3).

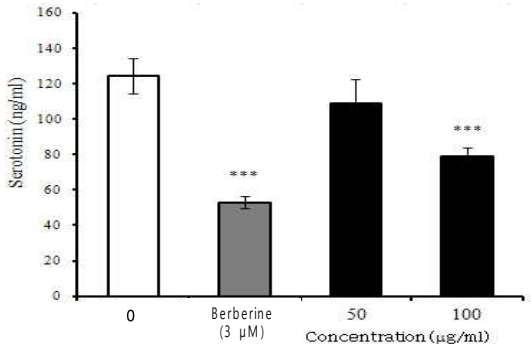

Fig. 3. Effects of SOCT-G on the intracellular serotonin content in P815 cells. P815 cells were cultivated in DMEM medium plus 10% heat inactivated FBS and 100 units/㎖ penicillin and 100 ㎍/㎖ streptomycin at 37.8℃, then SOCT-G or none (control) or berberine (positive control) was added and incubated for 24 hours. P815 cells were harvested and serotonin content was determined by an HPLC method. Significantly different from the control value (***:P<0.001).

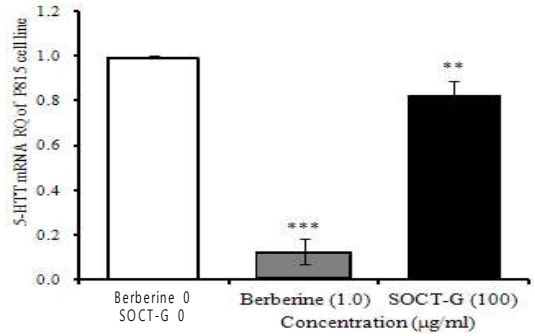

Fig. 4. Effect of SOCT-G on 5-HTT mRNA in P815 cells. The expression levels of 5-HTT mRNA and beta actin were analyzed by real-time RT-PCR. The 5-HTT mRNA expression was normalized to beta actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means ± SEM (**:<0.01, ***:P<0.001). Positive control: berberine.

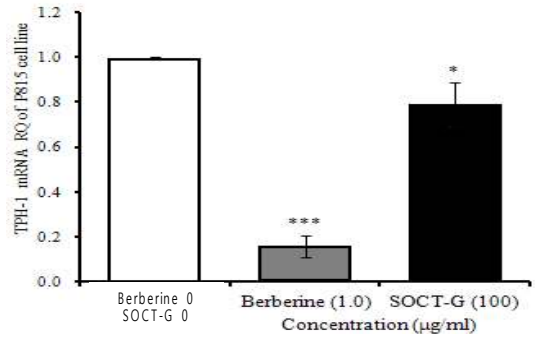

Fig. 5. Effect of SOCT-G on TPH-1 mRNA in P815 cells. The expression levels of TPH-1 mRNA and beta actin were analyzed by real-time RT-PCR. The TPH-1 mRNA expression was normalized to beta actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means ± SEM (*:P<0.05, ***:P<0.001). Positive control: berberine.

5. 5-HTT, TPH-1 mRNA 발현

P815 세포내의 5-HTT, TPH-1 mRNA 발현을 측정한 결과, 小烏沈湯加減方을 처리하지 않은 대조군에서 5-HTT는 0.996 ± 0.005 (100%), TPH-1은 0.996 ± 0.005 (100%)의 mRNA 발현을 보인것에 비해 100 μg/㎖ 小烏沈湯加減方 처리군에서 5-HTT는 0.823 ± 0.067 (82.6%), TPH-1은 0.792 ± 0.097 (79.5%)의 mRNA 발현이 나타나 유의미한 감소를 보였다(Fig. 4, 5).

고 찰

小烏沈湯은 《太平惠民和劑局方·卷之三》 治一切氣[7] 부분에 수록되어 있는 처방으로 "小烏沈湯 調中快氣, 治心腹刺痛"이라 하였고, 《東醫寶鑑·內景編·氣》 氣痛[8] 부분에서는 "凡 氣痛宜 … 小烏沈湯"라 하였다. 또한 《東醫寶鑑·內景編·氣》 用藥法[8] 부분에서 "大槪氣虛四君子湯 氣實小烏沈湯 …"라 하였다.

이처럼 小烏沈湯은 氣實로 인한 心腹刺痛에 활용되는 처방인데, 본 연구에서는 香附子, 烏藥, 沈香, 甘草로 구성된 《太平惠民和劑局方》[7] 小烏沈湯 처방에서 진품을 구하기 어려운 沈香 대신 木香을 사용하고[22] 《東醫寶鑑·內景編·氣》 用藥法[2] 부분의 上焦 氣滯에 桔梗, 枳殼를 가한다는 구문을 참고하여, 桔梗, 枳殼을 가한 小烏沈湯加減方을 사용하였다.

香附子, 烏藥, 木香은 모두 行氣止痛하는 효능이 있는 약물로, 香附子는 味는 辛微甘苦하고 性은 平하며 理氣解鬱, 調經止痛의 효능이 있어 胸脇脘腹脹痛, 消化不良, 胸脘痞悶, 寒疝腹痛, 乳房脹痛, 月經不調, 經閉痛經 등을 치료한다. 烏藥은 味는 辛하고 性은 溫하며 順氣止痛, 散寒溫腎의 효능이 있어 胸悶腹脹, 胃腹脹痛, 寒鬱氣滯, 寒疝腹痛 등을 치료하며, 木香은 味는 辛苦하고 性은 溫하며 行氣止痛, 溫中和胃의 효능이 있어 中寒氣滯, 胸腹脹痛 등을 치료한다[23].

桔梗은 化痰止咳, 利咽開音, 宣暢肺氣의 효능이 있으며, 사포닌 성분이 함유되어 있어 거담작용, 비만억제 작용, 진통 및 항염증 작용이 있는 것이 실험적으로 보고되어 있다. 枳殼은 破氣消積, 化痰散痞의 효능이 있으며 플라보노이드 성분인 hesperidein과 naringin이 주성분으로 심혈류량 증가, 교감신경 흥분, 자궁수축 등의 효과가 있음이 실험적으로 보고되어 있다[24]. 또한 《東醫寶鑑》에서는 桔梗은 온갖 氣를 내리며 목구멍이 아픈 것과 가슴과 옆구리가 아픈 것을 치료한다고 하였고, 枳殼은 氣를 내리며 氣로 인해 찌르는 듯 아프면 사용한다고 하였다[25].

心胸痛은 우울증의 주요증상 중 하나이고[9], 흉통을 가진 환자는 우울 성향이 높다는 사실이 보고되어 있다[26-28]. 心腹痛은 부위적으로 흉통에 해당하여[29] 氣로 인한 心腹刺痛은 비기질성 흉통으로 볼 수 있는데, Cormier[26]에 의하면 흉통을 호소하는 환자 중 심장검사상 이상이 없는 자들은 panic disorder, major depression, two or more simple phobia의 유병율이 높다고 하였고, Serlie[27]에 의하면 비심장성 흉통환자의 경우 우울 성향과 불안 성향이 높다고 보고하였다. 박[28]에 의하면 위식도역류질환과 관련 없는 비심인성(non-cardiac) 흉통 환자를 대상으로 정신과적 평가를 실시한 결과 불안 증상보다는 우울 증상이 더 높은 수치를 보인다고 하였다.

이에 저자는 心腹刺痛을 가지고 있는 우울증 환자에게 小烏沈湯加減方을 활용할 수 있으리라 사료되어, 우울증 발병에 연관이 있는 것으로 알려진 산화 스트레스와 우울증 주요 지표인 serotonin에 대한 小烏沈湯加減方의 효과를 실험적으로 규명하고자, DPPH 및 SOD 활성과 P815 세포내의 serotonin 함량 및 5-HTT, TPH-1 mRNA의 발현을 측정하였다.

Free radical은 체내에서 생성된 높은 반응성을 가진 분자로 세포의 지질, 단백질, 핵산 및 다른 세포 구조를 망가뜨리고 정상적인 대사체계를 교란하여 손상을 입혀 인체의 노화와 질병 발생을 촉진시키는 요인이 된다[30]. 또한 이로 유발되는 산화 스트레스(oxidative stress) 상이 우울증과 같은 신경정신과 질환들의 발현에 연관이 있다는 보고가 있다[31-33].

본 실험에서는 小烏沈湯加減方의 항산화 작용을 알아보고자 DPPH 소거능과 SOD 활성을 측정하였다.

DPPH는 화학적으로 안정화 된 수용성 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. 이 radical은 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며 항산화활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 radical이 소멸되어서 처음의 보라색 빛깔에서 노란색으로 색깔이 변하게 되어 산화활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다[34].

DPPH 소거능 측정 결과, 10 μg/㎖ 小烏沈湯加減方군에서 9.0 ± 0.77, 100 μg/㎖군에서 10.7 ± 1.03, 200 μg/㎖군에서 19.9 ± 2.28, 400 μg/㎖군에서 21.4 ± 2.43의 DPPH radical 소거작용을 나타내, 농도 의존적으로 항산화 작용이 증가하였다(Table 3).

SOD는 주로 세포내 세포질 또는 미토콘드리아 내에 분포하며 대표적인 활성산소 중의 하나인 superoxide anion (O_2-)을 제거하여 생체를 방어하는 물질이다[35]. SOD는 O_2-을 H+와 반응시켜 H_2O_2와 O_2로 만드는 작용을 통해 항산화 작용을 하는데 그 작용의 중요성으로 인해 산화적 스트레스에 대한 지표로서 현재까지 가장 많이 측정되고 있는 물질 중의 하나이다[36].

SOD 활성 측정 실험 결과, 50 μg/㎖ 小烏沈湯加減方군에서는 74.0 ± 2.2 U/㎖, 100 μg/㎖군에서는 94.5 ± 7.0 U/㎖로 농도에 따라 SOD 활성이 증가하였다(Fig. 2).

위의 DPPH 소거능, SOD 활성 측정 실험을 통하여 小烏沈湯加減方이 항산화 작용에 유효한 것으로 판단되며, 우울증뿐 아니라 노화억제 등에 폭 넓게 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

우울증의 병리에는 여러 신경전달물질들과 그것이 작용하는 시냅스 전후 수용체의 조절 이상이 관련이 있다. 이 중에서도 serotonin (5-HT)과 norepinephrine (NE)이 가장 광범위하게 연구되었다[37].

현재의 항우울제는 주로 monoamine의 재흡수 혹은 수용체에 작용하거나 이를 분해하는 효소를 억제하는 약물들이 주종을 이루고 있다. 고전적인 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressant, TCA)는 시냅스전 세포막에 위치한 norepinephrine, serotonin, dopamine 전달체를 차단하고, 단가아민 산화효소 억제제(Monoamine oxidase inhibitors, MAOI)는 norepinephrine, serotonin, dopamine을 분해하는 효소들을 비가역적으로 혹은

가역적으로 억제하여 시냅스내에 이들 monoamine들을 증가시킨다. 그러나 현재 이들 약물들은 그 부작용으로 인하여 우울증의 치료에 2차 혹은 3차로 사용되는 약물로 사용되고 있다[38]. 선택적인 serotonin 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)는 현재 우울증의 치료에 1차 약물로 고려되고 있다. SSRI들은 α1-norepinephrine, histamine 1 (H1) 및 무스칼린 수용체들에 대한 친화력이 없어 이에 대한 부작용이 거의 없고, 단지 serotonin 재흡수에 대해서만 선택적이고 강력하게 차단한다[39]. 최근의 제2세대 항정신병 약물들은 serotonin 수용체의 작용에 근간을 둔 약물들이다. 제2세대 항정신병 약물은 serotonin-dopamine 상호작용에 의한 뇌의 dopamine 활성을 증가시켜 음성증상과 인지증상을 개선시키거나 serotonin 수용체에 대한 직접적인 작용을 통해 항정신병 효과를 나타낸다고 알려져 있다[40].

본 실험에서는 小烏沈湯加減方이 serotonin 대사과정에 미치는 영향을 알아보고자 P815 세포내의 serotonin 함량 및 5-HTT, TPH-1 mRNA의 발현을 측정하였다.

P815 세포는 F1 hybrid mice의 ascitic tumour에서 유래한 것으로 serotonin을 생합성, 저장 및 분비하며, TPH 및 AADC를 발현하고 histamine을 생합성, 저장 및 분비하며, histamine 생합성 효소인 histidine decarboxylase를 발현한다[6].

P815 세포내의 serotonin 함량 측정 결과, 50 μg/㎖ 小烏沈湯加減方군에서 108.7 ± 14.1 ng/㎖ protein (87.4%), 100 μg/㎖ 군에서 79.1 ± 5.0 ng/㎖ protein (63.6%)으로 P815 세포내 serotonin 함량이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3).

Serotonin은 필수 아미노산인 tryptophan의 수산화반응과 탈탄산반응에 의해 tryptophan에서 5-hydroxytryptophan을 경유하여 합성되며 각 단계는 TPH, AADC가 촉매하고 있으며, TPH가 serotonin 생합성 과정의 rate-limiting 효소이다[41]. TPH는 TPH-1과 TPH-2가 존재하는데, TPH-1은 중추신경계 외곽에서 순환하는 serotonin을 만들어내며, TPH-2는 중추신경계 내에서 serotonin을 생산한다[42].

Serotonin 수송단백질(5-hydroxytryptamine transporter, 5-HTT)은 serotonin을 시냅스 전 신경세포로 재흡수하여 신경계의 신경전달을 종결하는 중요한 역할을 담당하고 있다[43,44]. 또한 5-HTT는 삼환계 항우울제(TCA)나 선택적 serotonin 재흡수 억제제(SSRI)가 결합하여 항우울 작용을 나타내는 작용 개시 부위이기도 하다[45].

P815 세포내의 5-HTT, TPH-1 mRNA 발현을 측정한 결과, 100 μg/㎖ 小烏沈湯加減方군에서 5-HTT는 0.823 ± 0.067 (82.6%), TPH-1은 0.792 ± 0.097 (79.5%)로 5-HTT와 TPH-1의 mRNA 발현이 감소하였다(Fig. 4, 5).

그런데, 주요 고려사항은 본 실험에서 양성 대조군으로 사용된 berberine을 처리한 세포의 경우도 P815 세포내 serotonin 함량과 5-HTT, TPH-1의 mRNA 발현이 감소하였다는 점이다. 이[46]에 의하면 berberine이 P815 세포내 serotonin 함량과 TPH-1의 mRNA 발현을 감소시켰다고 보고하여 본 실험 결과와 부합한다. Peng[47]에 의하면 berberine이 동물실험에서 항우울 효과가 있었으며, 전두부와 해마 부위에서 serotonin의 함량을 증가시켰다고 보고하였다.

비슷한 결과를 보인 또 다른 약물로는 ethaverine이 있는데, 김[48]의 연구에서 ethaverine이 P815 세포내 serotonin 함량과 TPH-1의 mRNA 발현을 감소시킨 결과가 보고되었는데, 이[49]의 연구에서는 동물실험에서 ethaverine이 항우울 효과가 있음을 증명하였고, 이[50]의 다른 연구에서는 동물실험에서 ethaverine이 항우울 효과를 보였으나, 뇌에서 serotonin의 변화는 관찰되지 않았다고 보고하였다. 이는 小烏沈湯加減方도 P815 세포 내에서는 serotonin 함량과 5-HTT, TPH-1의 mRNA 발현을 감소시켰으나, 동물실험을 한다면 항우울 효과가 나타날 가능성을 시사하며 그 확인을 위하여 추가실험을 요한다.

다른 가능성으로는 Richardson-Jones[51]의 연구에 의하면 SSRI는 serotonin 생성을 증가시킴으로써 작용하지만 5-HT1A 수용체가 과다한 경우에는 negative feedback을 통해 serotonin 생성이 오히려 감소하며, 항우울제에 치료저항성이 있는 환자의 경우 5-HT1A 수용체를 먼저 감소시킴으로써 효능을 향상시킬 수 있다고 보고하였다. 본 실험에서도 P815 세포내에 5-HT1A 수용체의 양이 과다하여 小烏沈湯加減方을 투여하였지만 negative feedback 기전을 나타냈을 가능성이 있으나, P815 세포내의 5-HT1A 수용체 양에 대한 측정 자료가 없기 때문에 판단할 수 없으며 이에 대해서 향후 더 정밀한 추가실험이 필요하다.

기타 고려사항은 小烏沈湯加減方이 serotonin이 아닌 다른 monoamine의 대사 과정에 관여할 가능성이다. 우울증 및 항우울제들의 작용기전에는 serotonin 신경전달계 이외에도 dopamine[52-54], norepinephrine[55] 등이 관여함이 알려져 있다. 박[13]에 의하면 加味逍遙散이 대뇌피질에서 norepinephrine의 함량을 유의하게 증가시켰으나 serotonin은 유의한 변화가 없었다고 보고하였고, 박[14]에 의하면 天王補心丹이 대뇌피질과 선조체에서 dopamine을 유의하게 증가시켰으나 serotonin은 유의한 변화가 없었다고 보고하였다. 신[15]에 의하면 四逆散이 선조체에서는 serotonin의 유의한 변화 없이 dopamine만 유의하게 증가시켰고, 시상하부에서는 dopamine과 serotonin 모두 유의하게 증가시켰다고 보고하였다.

본 연구에서는 serotonin 신경전달계만 관찰하고 norepinephrine과 dopamine 신경전달계에 대해서는 확인하지 않아, 小烏沈湯加減方이 norepinephrine이나 dopamine 신경전달계에 작용할 가능성이 있으며, 향후 이에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

이상으로 小烏沈湯加減方의 항산화와 serotonin 대사 과정에 미치는 영향을 알아본 결과 小烏沈湯加減方이 우울증 치료에 활용될 가능성이 검토되었다. 저자는 본 연구 결과가 향후 小烏沈湯의 약리작용을 규명하기 위한 보다 정밀한 연구계획을 수립하는데 있어 기초 자료를 제공할 것으로 기대한다.

결 론

小烏沈湯加減方의 항산화 작용을 알아보기 위하여 DPPH의

소거능과 SOD 활성도를 관찰하고, P815세포 내에서 serotonin 대사과정에 미치는 영향을 알아보기 위하여 serotonin 농도, 5-HTT, TPH-1의 mRNA 발현을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

小烏沈湯加減方은 DPPH radical 소거능을 증가시켰다. 小烏沈湯加減方은 SOD 활성도를 증가시켰다. 小烏沈湯加減方은 P815 세포내의 serotonin 농도를 감소시켰다. 小烏沈湯加減方은 P815 세포내의 5-HTT, TPH-1 mRNA 발현을 감소시켰다.

이상의 연구결과로 보아 小烏沈湯加減方은 우울증 치료에 활용도 가치가 있을 것으로 판단되나 심도 있는 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Clarke, D.D., Sokoloff, L., edited by Siegel, G.J., Agranoff B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K., Uhler, M.D. Circulation and energy metabolism of the brain. In Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects. Philadelphia:PA Lippincott-Raven. pp 637-639, 1999.
2. Adham, N., Borden, L.A., Schechte, L.E., Gustafson, E.L., Branchek, T.A. Cell-specific coupling of the cloned human 5-HTlF receptor to multiple signal transduction pathways. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. p 348, 566, 1993.
3. Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharrane, E.J., Saxena, P.R., Humprey, P.P.A. International union of pharmacology c1assification of reports for 5-hydroxytryptamine(serotonin). Pharmacological Reviews. p 46, 157, 1994.
4. Sodhi, M.S., Sanders-Bush, E. Serotonin and brain development. International Review of Neurobiology. 59: 111-174, 2004.
5. Kim, S.J., Seok, J.H., Kim, C.H. Serotonin Transporter and Pharmacotherapy. The Korean journal of psychopharmacology. 17(3):263-272, 2006.
6. Schindler, R., Day, M., Fisher, G.A. Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxytryptamine and histamine in vitro. Cancer Research. 19: 47-51, 1959.
7. Chénshīwén. Tàipíng huì mín hé jì jú fāng. Beijing:People's medical publishing house. p 87, 2007.
8. Huh, J. Donguibogam. Gyeongnam:Donguibogam Publisher. pp 73-76, 79, 2005.
9. The Textbook Compilation Committee of Neuropsychiatry of oriental medical schools in nation. The Neuropsychiatry of Oriental medicine. Seoul. Jipmoon-Dang. pp 256-265, 2007.
10. Jung, I.C., Lee, S.R. The Antioxidant Effects of ONDAMTANG on the Brain Tissue of Mouse. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 8(2):51-62, 1997.
11. Lee, S.H., Lee, J.M., Cho, J.H., Lee, C.H., Jang, J.B., Lee, K.S. Antioxidant and Neuroprotective Effects of Gamisoyo-san. The Journal Of Oriental Gynecology. 23(3):1-13, 2010.
12. Cho, C.H., Shin, H.K., Whang, W.W. Effects of Chengwhabosimtang on depression, anxiety, TH and c-Fos of the brain in the CMS treated rats. Korean journal of oriental medicine. 9(1):157-178, 2003.
13. Park, S.W. Antidepressant Action of Kami-shoyosan. Department of medicine The Graduate School, Inje University. 2003.
14. Park, J.H., Bae, C.W., Jun, H.S., Hong, S.Y., Park, S.D. The Korean journal of oriental medical prescription. The Korean journal of oriental medical prescription. 12(2):77-93, 2004.
15. Shin, H.S., Kweon, Y.M., Park, S.D. Antidepressant effect of Sayuksan and its influence on monoamines of depression model rats. Korean journal of herbology. 19(2):71-82, 2004.
16. Park, J.S., Lee, I., Jung, Y.G., Koo, B.S., Kim, G.W. Experimental Study on the Antidepressant Effect of Cheongsimondam-tang. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 18(1):1-14, 2007.
17. No, D.J., Jung, I.C. Study on Effect to Serotonin Metabolism of Gamiguibi-tang on P815 Cell. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 21(1):1-11, 2010.
18. Lim, J.W., Jung, I.C., Lee, S.R. The Effects of BunSimGiEumGami-Bang(Fenxinqiyinjiam eifang) on Serotonin of P815 cell. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 22(2):147-162, 2011.
19. Sim, T.K., Jung, I.C., Lee, S.R. The Effect of Gamisoyo-san(Jiaweixiaoyaosan) on Serotonin Metabolism. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 22(1):37-51, 2011.
20. Jitendra Yadav Nehete, Vitthal Nivrutti Deshmukh, Vikas Vasant Shewale, Minal Raghunath Narkhede, Vilas Murlidhar Aurangabadkar. In - vitro antioxidant activity of Achyranthes aspera L. Journal of Pharmacy Research. 2(9):1402-1403, 2009.
21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275, 1951.
22. Hwang, D.Y. Jeungmaek bangyakhappyeon. Seoul, Namsan-Dang. p 142, 2000.
23. The Textbook Compilation Committee of Herbalogy of oriental medical schools in nation. Herbalogy. Seoul, Younglim-Sa. pp 395-400, 2007.
24. The Textbook Compilation Committee of Herbalogy. Herbal pharmacology. Seoul, Shinilsangsa. pp 263-268, 610-613,

2005.
25. Huh J. Donguibogam. Gyeongnam, Donguibogam Publisher. p 82, 2131, 2005.
26. Cormer, L.E., Katon, W., Russo, J., Hollifield, M., Hall, M.L., Vitalian, P.P. Chest pain with negative cardiac diagnostic studies. Relationship to psychiatric illness. Journal of Nervous and Mental Disease. 176(6):351-358, 1988.
27. Serlie, A.W., Erdman, R.a., Passchier, J., Trijsburg, R.W., ten Cate, F.J. Psychological aspects of non-cardiac chest pain. Psychotherapy and Psychosomatics. 64(2):62-73, 1995.
28. Park, J.E., Ryu, H.W., Rhee, P.L., Yu, B.H. GERD-unrelated Non-cardiac Chest Pain may be Associated with Depression and Anxiety. Anxiety and Mood. 2(1):28-32, 2006.
29. Cho, H.J., Kim, S.H., Sonh, H.J. Medical consideration the east and west of the chest pain. Journal of the Institute of Oriental Medicine, Daejeon University. 6(2):313-327, 1998.
30. Hwang, E.S., Kim, G.H. Biomarkers of oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. Toxicology. 229(5):1-10, 2007.
31. Andreazza, A.C., Cassini, C., Rosa, A.R., Leite, M.C., de Almeida, L., Nardin, P., Cunha, A.B., Cereser, K.M., Santin, A., Gottfried, C., Salvador, M., Kapczinski, F., Goncalves, C.A. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. Journal of Psychiatric Research. 41(6):523-529, 2007.
32. Andreazza, A.C., Kauer-Sant'anna, M., Frey, B.N., Bond, D.J., Kapczinski, F., Young, L.T., Yatham, L.N. Oxidative stress markers in bipolar disorder: A meta-analysis. Journal of Affective Disorders. 111(2-3):135-144, 2008.
33. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now. Journal of Neurochemistry. 97(6):1634-1658, 2006.
34. Oh, M.S., Kim, D.R., Kang, J.U. Study on Antioxidant Potency of Cuscutae Semen, Psoraleae Fructus, Cnidii Fructus and Epimedii Herba by DPPH Method. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 12(2):101-110, 2005.
35. Dubinina, E.E., Pustygina, A.V. Free radical processes in aging, neurodegenerative diseases and other pathological states. Biomed Khim. 53(4):351-372, 2007.
36. Lyoyd, D. How to avoid oxygen. Science. 286(5438):249, 1999.
37. Kim, H.C. Diagnosis and Assessment of Depression according to Biological Methods. Journal of the Korean Society of Biological Therapies in Psychiatry. 5(1):11-28, 1999.
38. Kennedy, S.H., Lam, R.W., Cohen, N.L., Ravindran, A.V. Clinical guidelines for the treatment of depressive disorders. IV. Medications and other biological treatments. Canadian Journal of Psychiatry. 46(1):38S-58S, 2001.
39. Thase, M.E. Overview of antidepressant therapy. Managed care. 10: 6-9, 2001.
40. Meltzer, H.Y., Li, Z., Kaneda, Y., Ichikawa, J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 27: 1159-1172, 2003.
41. Lovenberg, W., Bourgoin, S., Hery, F., Sjoerdsas, A. Tryptophan hydroxylation; measurement in pineal gland, brain stem and carcinoid tumor. Science. 155: 217-219, 1967.
42. Carkaci-Salli, N., Flanagan, J.M., Martz, M.K., Salli, U., Walther, D.J., Bader, M., Vrana, K.E. Functional domains of human tryptophan hydroxylase 2 (hTPH2). Journal of Biological Chemistry. 281(38):28105-28112, 2006.
43. Amara, S.G., Kuhar, M.J. Neurotransmitter trasporter: Recent progress. Annual Review of Neuroscience. 16: 73-93, 1993.
44. Blakely, R.D., Felice, K., Hartzell, H. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. The Journal of Experimental Biology. 196: 263-281, 1994.
45. Ogilvie, A.D., Battersby, S., Bubb, V.J., Fink, G., Harmar, A.J., Goodwin, G.M., et al. Polymorphism in serotonin trasporter gene associated with susceptibility to major depression. Lancet. 347: 731-733, 1996.
46. Lee, M.K., Kim, E.I., Hur, J.D., Lee, K.S., Ro, J.S. Effects of Protoberberine Compounds on Serotonin Content in P815 Cells. Korean Journal of Pharmacognosy. 32(1):49-54, 2001.
47. Wen-Huang Peng, Kuan-Lin Lo, Yi-Hsuen Lee, Tai-Huang Hung, Ying-Chin Lin. Berberine produces antidepressant-like effects in the forced swim test and in the tail suspension test in mice. Life Science. 81: 933-938, 2007.
48. Kim, E.I., Shin, J.S., Lim, S.C., Park, S.K., Lee, M.K. Inhibitory Effects of Ethaverine on Serotonin Content in Murine Mastocytoma P815 Cells. Yakhak Hoeji. 51(2):83-87, 2007.
49. Lee, S.K., Kim, S.H., Kim, R.U., Yoon, S.H., Kim, Y.G., Kim, G.T., Kim, Y.H. Antidepressant Effects of Ethaverine, a Calcium Channel Antagonist,in Animal Models of Depression. Jorunal of The Korean Neuropsychiatric Association. 39(2):445-455, 2000.
50. Lee, S.K., Kim, S.H., Park, S.W., Yoon, S.H., Kim, S.J., Kim, Y.G., Seo, Y.H., Kim, G.T., Kim, Y.H. Antidepressant Effect of Ethaverine. The Korean journal of psychopharmacology. 12(1):49-63, 2001.
51. Richardson-Jones, J.W., Craige, C.P., Guiard, B.P., Stephen, A., Metzger, K.L., Kung, H.F., Gardier, A.M., Dranovsky, A., David, D.J., Beck, S.G., Hen, R., Leonardo, E.D. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. Neuron. 65(1):40-52, 2010.

52. Sampson, D., Wilner, P., Muscat, R. Reversal of antidepressant action by dopamine antagonists in an animal model of depression. Psychopharmacology(Berl). 104: 491-495, 1991.
53. Roy, A., Karoum, F., Pollack, S. Marked reduction in indexes of dopamine metabolism among patients with depression who attempts suicied. Archives of General Psychiatry. 49: 447-450, 1992.
54. Yoon, S.H., Kim, J.H., Kim, Y.H. Effects of noradrenaline and dopamine system of medicine based improvement of antidepressants on the reduction of model time floating incarceration Rats. Neuro-Psychiatry. 35: 1476-1486, 1996.
55. Vetulani, J., Antkiewicz, M.L., Rokosz, P.A., Pilc, A. Alpha up-beta down adreneric regulation: a possible mechanism of action of antidepressant treatments. Polish Journal of Pharmacology & Pharmacy. 36: 231-248, 1984.