

## 柴胡와 酸漿 복합제가 LPS로 유도된 우울증에 미치는 효과

이원행<sup>1#</sup>, 김도훈<sup>2</sup>, 이태희<sup>3\*</sup>

- 1 : 경기도 고양시 일산동구 장항동 890-3 화접몽 한의원,  
2 : 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 가천대학교 한의과대학 원전외사학 교실,  
3 : 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 가천대학교 한의과대학 방제학교실

### Effect of Mixture extracted from Bupleuri Radix and Physalidis Herba on the LPS-induced depression in Rats.

Lee Won-Haeng<sup>1#</sup>, Kim Do-Hoon<sup>2</sup>, Lee Tae Hee<sup>3\*</sup>

- 1 : Jang Hang Dong 890-3, Il Sandong-Gu, Goyang-City, Kyunggi-Do. Hwa Jeop Mong HAN Clinic,  
2 : Seong-Nam De Ro 1342, Soojeong-Gu, Seongnam-City, Kyunggi-Do. Dept. of Oriental Medical Classics and History, Gachon University,  
3 : Seong-Nam De Ro 1342, Soojeong-Gu, Seongnam-City, Kyunggi-Do. Dept. of Formulae Pharmacology, Gachon University.

### ABSTRACT

**Objectives** : The effect of mixture extracted from Bupleuri Radix and Physalidis Herba(BR+RH) on the LPS-induced Depression in rats was investigated.

**Methods** : Rats were administered intragastrically BR+PH after injectio of LPS to induce deprssion. Immobility was examined using Tail Suspension Test(TST), Forced Swimming Test(FST). The level of plasma corticosterone was measured by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) method. The expressions of c-Fos, Corticotropin Releasing Factor(CRF), NADPH-d in the Paraventricular nucleus(PVN) and TH in the Locus coeruleus(LC) were measured by immunohistochemical method.

**Results** : In the effect of BR + PH on TST, immobility was significantly decreased comparing with the LPS group. In FST, immobility was shown decrease tendency in the BR+PH group. The expression of c-Fos in the PVN was significantly decreased at BR + PH400 group, comparing with the LPS group. The expression of CRF in PVN was shown dto have the decrease tendency in the BR+PH group, comparing with the LPS group. The expression of NADPH-d in PVN was not significantly decreased at BR+PH groups, comparing with the LPS group. The expression of TH in the LC was shown to have the decrease tendency at BR + RH groups, but not significantly, comparing with the LPS group.

**Conclusions** : Anti-depressant effect of mixture after extracted from Bupleuri Radix and Physalidis Herba was through the anti-inflammatory effect via inhibition of HPA axis. NO and catecholamine system is not involved.

**Key words** : Bupleuri Radix, Physalidis Herba, LPS, anti-depressant, HPA axis

## 서론

지금까지 우울증은 모노아민(monoamine) 가설에 기초하

여 설명되었고 이에 따라 TCA(tricyclic antidepressants), MAOI(monoamine oxidase inhibitor), SSRI(Selective Serotonin Reuptake Inhibitors) 등의 항우울제가 개발되어

\*Corresponding author : Lee Tae Hee, Dept. of Formulae Pharmacology, Gachon University  
· Tel : +82-10-3792-4656 · E-mail : ophm5418@gachon.ac.kr

#First author : Lee Won-Haeng, Hwa Jeop Mong HAN Clinic, Jang Hang Dong 890-3, Il Sandong-Gu, Goyang-City, Kyunggi-Do

· Tel : +82-31-902-0221 · E-mail : dryinyang@naver.com

· Received : 27 February 2015 · Revised : 05 April 2015 · Accepted : 20 May 2015

우울증 치료에 이용되어 왔다. 하지만 최근에는 정신신경면역학(psychoneuroimmunology)적 관점에서, 그 기저에 염증반응이 작용하는 복잡한 발생과정을 가진 뇌질환으로서 우울증을 이해하는 염증 가설을 제시하고 있다<sup>1)</sup>.

柴胡(Bupleuri Radix, BR)는 「神農本草經」에 “主心腹去腸胃中結氣, 飲食積聚, 寒熱邪氣, 推陳致新”라고 한 이후<sup>2)</sup>, 和解表裏·疏肝·升陽의 효능으로 感冒發熱, 寒熱往來, 胸脇脹痛, 月經不調, 子宮下垂, 脫肛 등의 치료에 사용된다<sup>3)</sup>. 柴胡의 물 추출물은 항염효과가 있으며<sup>4)</sup>, 주성분은 triterpenoidal saponins이고<sup>5)</sup>, 이 중 saikosaponin은 항염증 및 해열, 체액/세포면역기능 강화, 간 손상에 대한 보호 효과가 있는 것으로 보고되었다<sup>6,7)</sup>. 항우울 기능에 대하여 홍<sup>8)</sup>, 김<sup>9)</sup>, 조<sup>10)</sup> 등의 HPA axis와 catecholamine system에 관한 여러 선행 연구들이 있다.

酸漿(燈籠, Physalidis Herba, PH)은 「神農本草經」에 “主熱煩滿, 定志益氣, 利水道”라고 한 이후<sup>11)</sup>, 清熱解毒 利咽喉 通利二便의 효능으로 咽喉腫痛 肺熱咳嗽 黃疸 痢疾 水腫 小便淋瀝 大便不通 濕疹 丹毒 등의 치료에 사용되고 있다<sup>12)</sup>. 권<sup>13)</sup>,甄清 등<sup>14)</sup>의 실험적 연구에서는 항염효과가 있다고 보고되었다.

이에 이 논문에서는 염증가설에 근거하여<sup>1)</sup> 疏肝解鬱의 효능이 있는 肝氣鬱結의 要藥으로<sup>15)</sup> 항염, 항우울 효능이 이미 밝혀져 있는 柴胡와, 항염효과를 가지지만 항우울효과는 언급되지 않는 酸漿을 배합하여 Lipopolysaccharide(LPS)로 유발된 염증성 우울모델에 어떤 효과가 있는지 조사해 보고자 하였다. 그리하여 흰쥐에 柴胡와 酸漿 복합제를 투여하고, LPS를 주입하여 꼬리 현수법(Tail Suspension Test, TST)과 강제 수영 부하 실험(Forced Swimming Test, FST)을 실시하여 부동행동 시간을 측정하였다. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)법을 이용하여 plasma corticosterone의 농도를 측정하고 면역조직화학법(Immunohistochemistry)을 사용하여 실방핵(Paraventricular Nucleus, PVN)에서 c-Fos, Corticotropin Releasing Factor(CRF), NADPH-d, 그리고 청반핵(Locus coeruleus, LC)에서 TH의 발현을 측정하였다. 이를 통하여 유의성 있는 결과를 얻었으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 한약재의 준비

한약재는 HMAX 제약사(충북, 제천)에서 구입하였다.

#### 2) 실험동물

체중 220~250 g 의 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐(샘타코, 경기도, 한국)를 사육실 환경에 일주일 동안 적응시킨 후 사용하였다. 온도는 22 ± 2 °C, 습도는 55~60%로 사육실 환경을 유지하였고, 사육실 내 환풍기와 공기정화기를 지속적으로 가동시켰다. 12시간 단위로 light-dark cycle이 조절되게 한 후, 제한 없이 물과 흰쥐용 고형사료를 공급하였다. 모든 동물의 관리 및 실험은 가천대학교 한의과대학의 IACUC

(Institutional Animal Care and Use Committee)에 따라 진행을 하였다.

## 2. 실험

### 1) 한약재의 추출

柴胡와 酸漿 각 300 g을 10배(w/v)량의 3차 증류수에 24 시간 담가 전 추출을 하였다. 이후 냉각기를 장착한 상태에서 100 °C에서 4시간 동안 환류 추출한 이후, 거즈로 여과하여 80 °C에서 증탕 농축하였다. 24시간동안 -80 °C에서 냉각시킨 후, -40 °C 온도로 냉각 동결건조하여 柴胡와 酸漿의 추출 분말을 각 30 g을 얻었고 수득률은 10%였다. 건조된 분말을 밀봉하여 냉동고에 보관한 후, 투약 시에는 분량에 맞게 건조된 약재를 saline에 첨가하여 용액을 만들었다.

### 2) 실험동물 그룹

실험동물은 5 그룹으로 무작위 배정을 하였다. 실험동물의 그룹은 다음과 같다.

(A) normal 그룹 (n=5): 아무 처치를 하지 않은 그룹; (B) control 그룹 (n=5): saline 투여+행동검사 (TST, FST); (C) LPS 그룹 (n=5): LPS 투여 + 행동검사; (D) BR + PH100 그룹 (n=5): BR + PH 100 mg/kg 투여 + LPS 투여 + 행동검사; (E) BR + PH400 그룹 (n=5): BR + PH 400 mg/kg 투여 + LPS 투여 + 행동검사를 실시하였다.

우울행동을 유발하기 위하여 LPS (lipopolysaccharide from salmonella typhosa; Sigma, USA)를 사용하였으며, 10 mg/kg로 saline에 녹여 복강 내로 투여하였으며, 柴胡(BR)와 酸漿(PH) 추출물은 각 100 mg/kg, 400 mg/kg (10 ml/kg)로 saline에 녹여 LPS 투여 30분 전에 경구 투여 하였다.

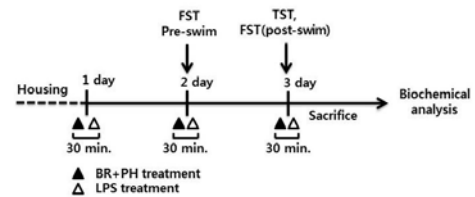


Fig. 1. Experimental Procedure for LPS treatment

### 3) 우울행동 검사 (TST, FST)

TST는 FST의 상동모델 범주에 속한다. 흰쥐의 꼬리를 잡고 거꾸로 막대 등에 고정시키면 흰쥐는 처음에는 나무대다가 얼마 후 활동을 멈추게 된다. 이 때 보이는 부동행동(immobility)의 양상을 측정하였다. 6분간 비디오카메라로 행동을 녹화하며, 4분간의 행동을 분석하였다<sup>16)</sup>.

본 연구에서는 Detke<sup>17)</sup> 등에 의해 고안된 FST 시험 방법을 이용하였다. 지름 25 cm, 높이 50 cm의 투명한 아크릴 원통 안에 23 °C의 물을 30cm의 높이로 채우고 예비실험 (pre-swim)으로 흰쥐를 15분간 물에 빠뜨리고 나서, 24시간 뒤에 5분동안 본 실험 (post-swim)을 시행하였다. 예비실험 동안에는 흰쥐의 행동을 분석하지 않지만 5분 동안의 본 실험에서는 흰쥐의 행동을 부동행동 (immobility), 수영자세 (swimming), 그리고 등반 자세 (climbing)로 나누어 각각의 시간을 측정하였다.

4) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

우울행동 검사 실험이 끝난 직후 흰쥐를 sodium pentobarbital (엔토발, 한림제약, 50 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후, 혈액을 채취하고, 혈액 내 corticosterone의 변화를 ELISA kit (R&D system, CA, USA)를 이용하여 측정, 분석하였다. 96well에 corticosterone 항체가 코팅되어 있는 키트에 혈청을 50  $\mu$ l 씩 넣고, 50  $\mu$ l의 희석액을 넣고 2시간 동안 실온에서 배양하였다. 2시간 후 wash buffer를 이용하여 5회 세척한 후, 100  $\mu$ l의 conjugate를 넣고 나서 실온에서 2시간동안 배양한다. 2시간 후 washing buffer를 이용, 5회 세척을 한 후 100  $\mu$ l의 substrate solution을 넣고, 30분간 배양하였다. 배양을 마치고 100  $\mu$ l의 stop solution을 넣은 후 ELISA reader (Bio-Rad 680, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 optical density를 측정하였다.

5) Immunohistochemistry

우울행동 검사 실험이 끝난 직후 흰쥐를 sodium pentobarbital (엔토발, 한림제약, 50 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후, saline 100 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formaline 용액 (fixative) 900 ml로 심장을 통해 관류하였다. 이 때 고정액 200 ml은 처음 5분간 빠른 유속으로 관류하였으며, 나머지 700 ml은 25분 동안 천천히 관류하였다. 그 후 뇌를 꺼내 동일 고정액으로 2~3시간 동안 고정시킨 후 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)에 넣어 24시간 동안 포매하였다. 그 후 뇌를 급속 냉동하고, PBS에 0.3% Triton X-100 첨가한 PBST에서 뇌 조직을 몇 차례 세척하였다. 1차 항체는 primary sheep polyclonal c-Fos antibody (Santacruz, CA, USA), primary goat polyclonal CRF antibody (Santacruz, CA, USA), primary mouse monoclonal TH antibody (Santacruz, CA, USA)를 사용하였으며, ABC Kit (Vector Laboratories, USA; sleep ABC Kit for c-fos, PK4006; goat kit for CRF, PK6100; mouse ABC KIT for TH, PK6103)를 사용하였다. 1차 항체는 PBST에 goat serum, rabbit serum, horse serum과 500배 희석하여 준비하고, 4  $^{\circ}$ C에서 지속적으로 72시간 동안 흔들며 배양하였다. 그 후 PBST로 뇌 조직을 세척한 다음, goat serum 혹은 horse serum을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated anti-sheep, biotinylated anti-goat, biotinylated anti-mouse 에 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음, 실온에서 2시간 동안 뇌 조직을 Vectastain Elite ABC reagent (Vector, USA)에 담가 반응시켰다. PBST로 세척한 뒤 뇌 조직을 nickel chloride로 강화시키고 diaminobenzidine을 사용하여 발색시켰다. 발색이 종료된 뇌 조직을 슬라이드에 부착한 뒤 실온에서 2시간 동안 건조하였으며, xylene으로 투명화하고 polymount로 봉입하였다. 그 후 광학현미경으로 관찰하여 사진을 촬영하였다. Paxinos와 Watson (Paxinos and Watson, 1986)의 뇌 도감에서 뇌의 각 부위의 위치와 명칭을 참고하였다. 격자 (2x2cm)를 이용하여 200배로 현상된 사진에서, 동일한 지역에 일정한 영역에서 반응되어 나타난 염색성의 정도를 계산하였다.

6) Histochemistry

절편 된 뇌 조직을 PBS에 0.3% Triton X-100 첨가한 PBST로 몇 차례 세척하였다. 1mg의  $\beta$ -Nicotineamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form ( $\beta$ -NADPH; Sigma, USA)와 1mg의 Nitro Blue Tetrazolium을 1ml의 PBST에 넣어 잘 섞은 후 37 $^{\circ}$ C incubator에서 흔들며 배양하여 발색하였다. 발색이 종료된 뇌 조직을 슬라이드에 부착한 뒤 실온에서 2시간동안 건조하였으며, xylene으로 투명화하고 polymount로 봉입하였다. 그 후 광학현미경으로 관찰하여 사진을 촬영하였다. Paxinos와 Watson (Paxinos and Watson, 1986)의 뇌 도감에서 뇌의 각 부위의 위치와 명칭을 참고하였다. 격자 (2x2cm)를 이용하여 200배로 현상된 사진에서, 동일한 지역에 일정한 영역에서 반응되어 나타난 염색성의 정도를 계산하였다.

7) 통계처리

SPSS version 21 (IBM cop, New York, USA) 통계프로그램을 이용, 본 실험에서 얻은 자료를 처리하였다. 측정치는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였고, 그룹 간 비교를 위한 one-way analysis of variance (ANOVA) Turkey post-hoc test를 시행하였다. 통계적 유의수준은  $P < 0.05$ 로 설정하였다.

결 과

1. 柴胡 + 酸漿 복합제(BR + PH)의 TST에서의 효과

LPS로 유발된 우울증 동물모델에서 BR + PH를 투여한 후 TST에서 부동행동 시간(immobility time)을 측정한 결과 ( $F_{3,19}=6.346, P < 0.01$ ), control 그룹 ( $88.0 \pm 6.6$ ), LPS 그룹 ( $120.4 \pm 2.5$ ), BR+PH100 그룹 ( $89.0 \pm 6.1$ ), BR + PH400 그룹 ( $95.6 \pm 5.8$ )으로 나타났다. LPS 그룹에 비해 BR + PH100 그룹 및 BR+PH400 그룹 모두 부동시간의 유의한 감소를 관찰할 수 있었다( $P < 0.05$ )(Fig. 2).

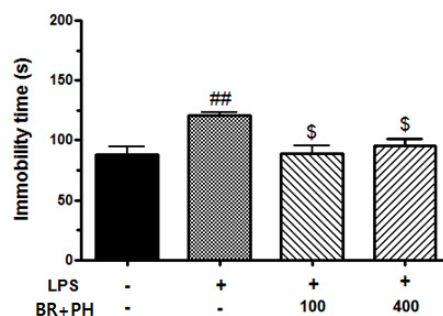


Fig. 2. The Effect of BR+PH on the LPS-induced depressive-like behavior in TST. Control group was administered saline(p.o. and i.p.). LPS group was injected LPS 10 mg/kg(i.p.) for 3 days before TST, FST. BR + PH100 group was administered BR + PH 100 mg/kg(p.o.) 30 min. before LPS injection. BR + PH400 group was administered BR + PH 400 mg/kg(p.o.) 30 min. before LPS injection. After LPS and BR + PH treatment, the immobility time of rats was measured on TST. n=5 rats/group. Data represent mean  $\pm$  SD. #: Significant difference compared with the Control group ( $p < 0.01$ ) \$: Significant difference compared with the LPS group ( $P < 0.05$ )

### 2. 柴胡 + 酸漿 복합제(BR + PH)의 FST에서의 효과

LPS로 유발된 우울증 동물모델에서 BR + PH를 투여한 후 FST에서의 행동을 측정된 결과, 부동행동 시간(immobility time)은 (F3,19=24,248,  $P < 0.001$ ) control 그룹 ( $5.0 \pm 0.5$ ), LPS 그룹 ( $23.4 \pm 2.3$ ), BR + PH100 그룹 ( $19.6 \pm 1.3$ ), BR + PH400 그룹 ( $21.4 \pm 1.5$ ) ; 수영자세 시간(swimming time)은 (F3,19=0,473,  $P=0.705$ ) control 그룹 ( $214.8 \pm 15.7$ ), LPS 그룹 ( $230.2 \pm 7.5$ ), BR + PH100 그룹 ( $213.0 \pm 4.2$ ), BR + PH400 그룹 ( $192.2 \pm 11.7$ ); 등반자세 시간(climbing time)은 (F3,19=1,726,  $P=0.202$ ) control 그룹 ( $66.2 \pm 9.3$ ), LPS 그룹 ( $46.4 \pm 6.18$ ), BR + PH100 그룹 ( $63.4 \pm 4.6$ ), BR + PH400 그룹 ( $58.4 \pm 1.4$ )으로 나타났다. BR + PH100 그룹 및 BR + PH400 그룹 모두에서 LPS 그룹과 비교시 부동행동 시간이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3).

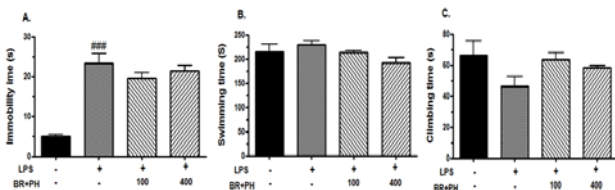


Fig. 3. The Effect of BR+PH on the LPS-induced depressive-like behavior in FST.

Control group was administered saline(p.o. and i.p.). LPS group was injected LPS 10 mg/kg(i.p.) for 3 days before TST, FST. BR + PH100 group was administered BR + PH 100 mg/kg 30 min, before LPS injection. BR + PH400 group was administered BR + PH 400 mg/kg(p.o.) 30 min, before LPS injection. After LPS and BR + PH treatment, the immobility, swimming and climbing time of rats was measured on FST. n=5 rats/group. Data represent mean  $\pm$  SD.

###: Significant difference compared with the control group ( $P < 0.001$ ).

### 3. 柴胡 + 酸漿 복합제(BR + PH)의 PVN내에서 c-Fos 발현에 대한 효과

LPS로 유발된 우울증 동물모델에서 BR+PH를 투여 후 PVN에서 c-Fos 발현의 변화를 측정된 결과 normal 그룹 ( $18.5 \pm 0.8$ ), control 그룹 ( $28.5 \pm 1.3$ ), LPS 그룹 ( $32.6 \pm 2.6$ ), BR+PH100 그룹 ( $28.8 \pm 1.9$ ), BR+PH400 그룹 ( $22.6 \pm 0.6$ )을 각각 나타내었다. normal 그룹에 비해 control 그룹( $P < 0.05$ ), LPS 그룹( $P < 0.01$ ) 모두 c-Fos의 발현이 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 이어서 BR + PH100 그룹, BR + PH400 그룹에서 모두 c-Fos의 발현이 감소하였으며, 특히 BR + PH400 그룹에서는 유의한 발현 감소가 관찰되었다( $P < 0.05$ )(Fig. 4).

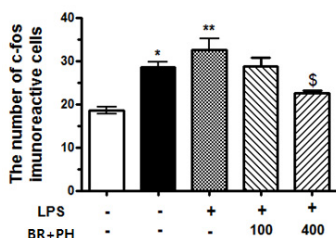


Fig. 4. The Effect of BR+PH on c-Fos expression in the PVN of LPS-induced depressive rats.

(A)Normal group:no treatment group, (B)Control group was administered saline(p.o. and i.p.). (C)LPS group was injected LPS 10 mg/kg (i.p.) for 3 days before TST, FST. (D)BR+PH100 group was administered BR+PH 100 mg/kg (p.o.) 30 min, before LPS injection. (E)BR+PH400 group was administered BR+PH 400 mg/kg(p.o.) 30 min, before LPS injection. After TST and FST, rats were sacrificed and perfused with saline (100 ml) and 4% formaline solution (900 ml). c-Fos immunoreactive cells were counted. Sections were cut coronally at 30  $\mu$ m and the original magnification was 200x. Scale bar was 200  $\mu$ m. n=5 rats/group. Data represent mean  $\pm$  SD.

\*: Significant difference compared with the normal group( $P < 0.05$ ).

\*\* : Significant difference compared with the normal group( $P < 0.01$ ).

\$: Significant difference compared with the LPS group( $P < 0.05$ ).

### 4. 柴胡+酸漿 복합제(BR + PH)의 PVN내에서 CRF 발현에 대한 효과

LPS로 유발된 우울증 동물모델에서 BR+PH를 투여한 후 PVN에서의 CRF 발현의 변화를 측정된 결과는 다음과 같다. 각 그룹별 PVN에서의 CRF 발현 세포의 수는 normal 그룹 ( $6.5 \pm 1.8$ ), control 그룹 ( $15.3 \pm 2.25$ ), LPS 그룹 ( $25.1 \pm 3.5$ ), BR + PH100 그룹 ( $20.3 \pm 0.9$ ), BR + PH400 그룹 ( $18.5 \pm 1.5$ )을 각각 나타내었다. normal 그룹에 비해 control 그룹, LPS 그룹 모두 CRF의 발현이 증가하였으며, control 그룹보다 LPS 그룹에서 CRF의 발현이 증가하였다( $P < 0.05$ ). BR + PH 그룹들에서는 LPS 그룹에 비해 CRF의 발현이 감소되는 경향성을 볼 수 있다(Fig. 5).

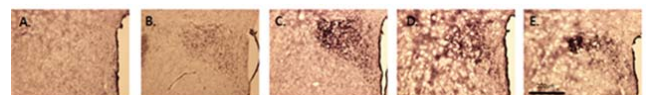
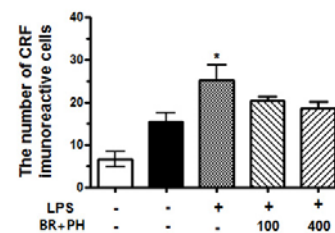


Fig. 5. The Effect of BR+PH on CRF expression in the PVN of LPS-induced depressive rats.

(A)Normal group:no treatment group, (B)Control group was administered saline(i.p. and p.o.). (C)LPS group was injected LPS 10 mg/kg(i.p.) for 3 days before TST, FST. (D)BR + PH100 group was administered BR + PH 100 mg/kg(p.o.) 30 min, before LPS injection. (E)BR + PH400 group was administered BR + PH 400 mg/kg(p.o.) 30 min, before LPS injection. After TST and FST, rats were sacrificed and perfused with saline (100 ml) and 4% formaline solution (900 ml). CRF immunoreactive cells were counted. Sections were cut coronally at 30  $\mu$ m and the original magnification was 200x. Scale bar was 200  $\mu$ m. n=5 rats/group. Data represent mean  $\pm$  SD.

\*: Significant difference compared with the normal group( $P < 0.05$ ).

### 5. 柴胡 + 酸漿 복합제(BR + PH)의 plasma corticosterone에 대한 효과

LPS로 유발된 우울증 동물모델에서 BR + PH를 투여 후 plasma corticosterone 농도의 변화를 측정한 결과 ( $F_{4,24}=5.358$   $P < 0.01$ ) 각 그룹별 plasma corticosterone 농도는 normal 그룹 ( $65.90 \pm 3.3$ ), 대조군 ( $75.3 \pm 3.2$ ), LPS 그룹 ( $79.5 \pm 1.4$ ), BR+PH100 그룹 ( $75.5 \pm 0.9$ ), BR+PH400 그룹 ( $69.1 \pm 4.5$ )으로 측정 되었다. LPS그룹이 normal 그룹에 비해 농도가 유의하게 증가한 것을 확인하였으며( $P < 0.05$ ), BR + PH 그룹들의 경우 농도가 감소하는 경향을 보였고, BR + PH400 그룹에서는 유의할 만큼 감소한 것이 확인되었다( $P < 0.05$ )(Fig. 6).

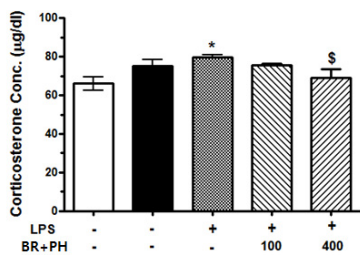


Fig. 6. The Effect of BR+PH on plasma corticosterone concentration of LPS-induced depressive rats.

Normal group: no treatment group. Control group was administered saline(i.p. and p.o.). LPS group was injected LPS 10 mg/kg(i.p.) for 3 days before TST, FST. BR+PH100 group was administered BR+PH 100 mg/kg(p.o.) 30 min. before LPS injection. BR+PH400 group was administered BR+PH 400 mg/kg(p.o.) 30 min. before LPS injection. After TST and FST, rats were blood sampled for ELISA. n=5 rats/group. Data represent mean ± SD.

\*: Significant difference compared with the normal group( $P < 0.05$ ).  
 §: Significant difference compared with the LPS group( $P < 0.05$ ).

### 6. 柴胡+酸漿 복합제(BR + PH)의 PVN내에서 NADPH-d 발현에 대한 효과

LPS로 유발된 우울증 동물모델에서 BR+PH를 투여한 후 PVN에서의 NADPH-d 발현의 변화를 측정한 결과, 각 그룹별 PVN에서의 NADPH-d 발현 세포의 수는 normal 그룹 ( $12.7 \pm 1.1$ ), control 그룹 ( $24.7 \pm 3.5$ ), LPS 그룹 ( $30.3 \pm 2.1$ ), BR+PH100 그룹 ( $29.7 \pm 3.1$ ), BR + PH400 그룹 ( $28.8 \pm 0.6$ )을 각각 나타내었다. normal 그룹에 비해 control 그룹, LPS 그룹 모두 NADPH-d 발현이 증가함을 관찰하였다( $P < 0.01$ ). BR + PH 그룹의 경우 발현 감소의 경향성 및 유의성을 관찰하지 못하였다(Fig. 7).

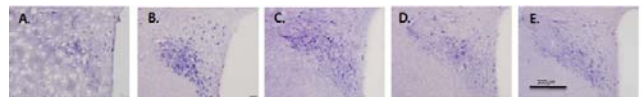
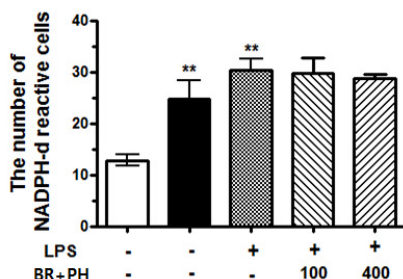


Fig. 7. The Effect of BR+PH on NADPH-d expression in the PVN of LPS-induced depressive rats.

(A)Normal group: no treatment group. (B)Control group was administered saline(i.p. and p.o.). (C)LPS group was injected LPS 10 mg/kg(i.p.) for 3 days before TST, FST. (D)BR+PH100 group was administered BR+PH 100 mg/kg(p.o.) 30 min. before LPS injection. (E)BR+PH400 group was administered BR+PH 400 mg/kg(p.o.) 30 min. before LPS injection. After TST and FST, rats were sacrificed and perfused with saline (100 ml) and 4% formaline solution (900 ml). NADPH-d immunoreactive cells were counted. Sections were cut coronally at 30 µm and the original magnification was 200x. Scale bar was 200 µm. n=5 rats/group. Data represent mean ± SD.

\*: Significant difference compared with the normal group( $P < 0.01$ ).

### 7. 柴胡 + 酸漿 복합제(BR + PH)의 LC내에서 TH 발현에 대한 효과

LPS로 유발된 우울증 동물모델에서 BR+PH를 투여한 후 LC에서의 TH 발현의 변화를 측정한 결과 각 그룹별 LC에서의 TH 발현 세포의 수는 normal 그룹 ( $8.6 \pm 0.8$ ), control 그룹 ( $18.5 \pm 1.3$ ), LPS 그룹 ( $22.5 \pm 22.6$ ), BR + PH100 그룹 ( $19.8 \pm 1.6$ ), BR + PH400 그룹 ( $218.3 \pm 1.6$ )을 각각 나타내었다. normal 그룹에 비해 control 그룹( $P < 0.01$ ), LPS 그룹( $P < 0.001$ ) 모두 발현이 증가함을 관찰하였다. 하지만 BR+PH 그룹들의 경우 감소 경향성은 보였으나 유의한 결과를 관찰하지는 못하였다(Fig. 8).

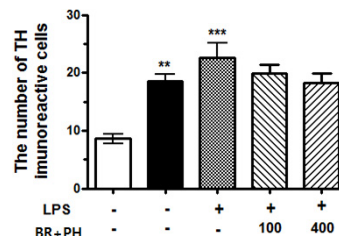


Fig. 8. The Effect of BR+PH on TH expression in the LC of LPS-induced depressive rats.

(A)Normal group: no treatment group. (B)Control group was administered saline (i.p. and p.o.). (C)LPS group was injected LPS 10 mg/kg (i.p.) for 3 days before TST, FST. (D)BR+PH100 group was administered BR+PH 100 mg/kg(p.o.) 30 min. before LPS injection. (E)BR+PH400 group was administered BR+PH 400 mg/kg(p.o.) 30 min. before LPS injection. After TST and FST, rats were sacrificed and perfused with saline (100 ml) and 4% formaline solution (900 ml). TH immunoreactive cells were counted. Sections were cut coronally at 30 µm and the original magnification was 200x. Scale bar was 200 µm. n=5 rats/group. Data represent mean ± SD.

\*\* : Significant difference compared with the normal group( $P < 0.01$ ).  
 \*\*\* : Significant difference compared with the normal group( $P < 0.001$ ).

## 고찰

한의학에서 우울증의 증상은 鬱證, 癡證, 脫營失精, 虛勞,

不眠, 嗜眠, 不思食 등과 유사한 면이 있으며, 정신병적 우울증은 癡證과 유사하다<sup>18)</sup>. 우울증의 한의학적 변증은 肝氣鬱結, 心脾兩虛, 痰氣鬱結, 氣虛痰結, 氣鬱化火, 肝陰虧虛, 憂鬱傷神, 陰虛火旺의 11가지 유형으로 분류 가능하다<sup>19)</sup>.

인체는 스트레스를 극복하기 위하여 HPA axis와 교감신경계 활성화 등의 생리적 변화를 통한 적응과정을 겪는데, 우울증은 적응 실패가 일어난 결과로서 설명된다. 최근 우울증의 원인이 염증이라는 가설이 제기 되고 있는 바, 우울증과 염증 상태에서 나타나는 아픔반응(sickness behavior)의 증상은 비슷한 부분이 많다<sup>20)</sup>. 염증은 cytokine, HPA axis, 신경전달물질의 변화를 야기하는 면역계, 내분비계, 신경계가 복합적으로 개입된 allostatic load이다<sup>1)</sup>. Cytokine은 병원체 관련 분자 패턴(PAMPs)과도 연관이 되어 있는데, 식품 단백질로부터 유래된 tryptophan은 뇌로 수송되어 serotonin 혹은 5-hydroxytryptophan으로 합성되고, 이 과정은 PAMPs에 대한 대응으로 상향 조절되어 kynurenine / quinolinic acid 경로를 통해 글루탐산성 신경전달물질(glutamatergic neurotransmission)을 변동시키며 이를 통해 분해된 tryptophan은 세로토닌성 신경전달물질(serotonergic neurotransmission)을 감소시켜 우울증에 영향을 주게 된다<sup>21)</sup>. 또한 우울증의 발병에 면역-염증 반응이 영향을 주거나 우울증에서의 회복을 방해하는 역할을 하고 있을 가능성도 제기되고 있다<sup>22)</sup>.

柴胡(Bupleuri Radix, BR)에 대하여 홍<sup>8)</sup>은 柴胡가 대뇌피질, 선조체, 시상하부에서 catecholamine을 증가시킨다는 것을 보고하였고, 김<sup>9)</sup>은 柴胡에 HPA axis와 catecholamine system 양쪽에 작용하는 항우울 효과가 있음을 보고하였다. 조<sup>10)</sup>는 柴胡와 地骨皮 合劑가 HPA axis에 작용하지 않고 catecholamine system에만 작용한다는 결과를 보고하였다.

酸漿(燈籠, Physalidis Herba, PH)에 대하여 권<sup>13)</sup>은 酸漿의 전초가 농도 의존적으로 항염효과를 가지고 있는 것에 대하여 보고하였다. 민간에서는 전초를 해열제, 이노제, 진해제, 황달 치료제 등으로 사용하여 왔는데<sup>13)</sup>, 특히 해열, 황달 등에 대한 항염 효과에서 酸漿은 柴胡의 쓰임과 유사한 면이 있다.

이 연구는 우울증에 대한 염증가설에 입각하여 설계되었다. 항염, 항우울 효능에 대하여 이미 밝혀져 있는 柴胡와 본초학적으로 柴胡와 유사한 증상에 대한 항염효과를 가지지만 항우울효과는 언급되지 않는 酸漿을 배합하였을 때, LPS 염증으로 유도된 우울증상에서 어떠한 항우울효과를 가지는지 알아보고자 하였다. 이를 위해 흰쥐에 LPS 주입으로 염증을 유발한 뒤, TST, FST로 우울상태를 확인하고 plasma corticosterone 농도를 측정하고, PVN에서 c-Fos, CRF와 NADPH-d, LC에서 TH의 발현 정도를 측정하였다.

LPS는 염증에 대한 연구에 빈용하는 실험모델로 확립되어 있으며<sup>23)</sup>, LPS induced depression model을 이용한 면역-염증반응과 우울증의 연관성을 통한 항우울제 개발을 위한 연구가 있었다<sup>24,25)</sup>. 이에 본 실험에서는 LPS를 주입하여 염증을 유발하고 柴胡+酸漿 복합제를 투여한 후 LPS 그룹에서 공통적으로 부동행동 시간(immobility time)이 증가하여 우울상태가 유발됨을 알 수 있었으며, BR + PH 그룹에서의 실험결과 TST의 경우 BR + PH100 그룹 및 BR + PH400 그룹 모두 LPS 그룹에 비해 부동시간의 유의한 감소를 관찰할 수 있었고( $P < 0.05$ ), FST에서는 LPS 그룹과 비교시 부동행동 시간이 감소하는 경향을 보였다. TST와 FST는 항우울제의

활성을 검사하는데 사용하는 상동모델의 범주로서 두 검사의 부동자세 모델은 관련이 있을 것으로 생각되는데<sup>26)</sup>, 위 실험결과 柴胡+酸漿 복합제의 TST, FST에서 부동행동 시간은 모두 감소하였으나, 그 정도 차이에 대해서는 동일한 결과가 나오지 않았다. 김<sup>9)</sup>의 柴胡 단일 실험 및 조<sup>10)</sup>의 항우울활성이 확인되어 있는 地骨皮와 柴胡의 合劑에 대한 실험에서는 둘 다 모두 FST에서 유의성 있는 결과가 도출되었던 것을 볼 때, 본 실험은 LPS 인해 유도된 우울상태라는 것이 선행 연구와 차이가 있을 수 있다고 생각된다.

c-Fos 단백질은 조기유전자(immediate early gene)의 하나로서 약물이나 스트레스를 포함한 생리적 자극 등 여러 인자에 의해 빠르게 일시적으로 발현되어 신경계내에서 단기 자극이 장기간의 구조적 변화로 이어지도록 하는 핵내 조절자 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 면역조직화학법에 의한 c-Fos 단백질 유도의 관찰은 자극에 의해 활성화된 신경원의 추적에 이용 가능하다<sup>27)</sup>. 선행연구들에서, 뇌손상이나 stress가 있을 때 뇌의 특정부위에서 활성화되어 발현이 증가하며, 항우울 약물에 의해 우울증상이 개선되면 c-Fos의 발현이 감소된다는 보고가 있었다<sup>28)</sup>. 본 연구에서 시상하부의 PVN에서 c-Fos가 발현된 세포체의 수를 측정한 결과 normal 그룹에 비해 control 그룹( $P < 0.05$ ), LPS 그룹( $P < 0.01$ ) 모두 c-Fos의 발현이 증가한 것을 관찰할 수 있었으며, 이어서 BR + PH100 그룹, BR + PH400 그룹에서 모두 c-Fos의 발현이 감소한 것을 확인하였다. LPS가 주입되지 않은 normal 그룹과 control 그룹에서 c-Fos 발현 차이가 발생한 이유는, 선행한 TST, FST가 control 그룹에 stress를 주었기 때문으로 생각된다<sup>16)</sup>. 또한 BR + PH400 그룹에서 BR + PH100 그룹보다 더 유의성 있게 c-Fos의 발현이 감소한 것을 확인하였다( $P < 0.05$ ). 이것으로 보아 柴胡+酸漿 복합제의 항우울 효능은 PVN에서 c-Fos의 발현을 농도 의존적으로 억제하는 작용을 통해 나타난다는 것을 알 수 있다.

Corticotropin Releasing Factor(CRF)는 시상하부(hypothalamus), 청반핵(locus coeruleus), 배측봉선핵(dorsal raphe nucleus)을 비롯한 뇌간(brain stem)에 수용체가 분포함으로써 내분비계뿐 아니라 교감신경과 세로토닌계를 모두 조절한다<sup>1)</sup>. HPA axis의 활성화에 중요한 역할을 하며 corticosterone의 분비를 증가시킨다. 항우울제의 투여는 CRF의 발현을 감소시킨다<sup>8)</sup>. 본 연구에서 PVN에서의 CRF 발현을 측정한 실험 결과 normal 그룹에 비해 control 그룹, LPS 그룹 모두 CRF의 발현이 증가하였으며, control 그룹보다 LPS 그룹에서 CRF의 발현이 증가하였다( $P < 0.05$ ). BR+PH 그룹들에서는 LPS 그룹에 비해 CRF의 발현이 감소되는 경향성을 볼 수 있다.

glucocorticoid는 HPA axis의 부신피질에서 분비되는 호르몬으로<sup>29)</sup>, 스트레스는 HPA axis를 활성화시켜 glucocorticoid를 방출하여 혈중 농도를 증가시킨다. 실험 결과 LPS그룹이 normal 그룹에 비해 plasma corticosterone 농도가 유의하게 증가한 것을 확인하였으며( $P < 0.05$ ), 이는 LPS로 염증을 유발시켜 HPA axis가 활성화된 것으로 볼 수 있다. BR+PH 그룹들의 경우 plasma corticosterone 농도가 감소하는 경향을 보였고, BR + PH400 그룹에서는 유의할 만큼 감소함이 확인되었다( $P < 0.05$ ).

Nitric oxide(NO)는 중추신경계에서 신경계 시냅스 가소성

(synaptic plasticity)에 관여하거나 장기 상승 작용(long-term potentiation)이나 우울 등 기억과 연관된 신경생리학적 현상에 관여하며 뇌 혈류량의 국소적 조절 및 주위의 시냅스들로부터 신경전달물질의 분비를 촉진하는 역할을 수행한다. 하지만 그 작용시간이 매우 짧기 때문에 그 검출은 해당 조직에서 간접적으로 NOS, nitrite, nitrate의 검출을 통해 이루어질 수 밖에 없다. PVN내에서 NADPH-d 발현에 대한 조직화학법은 NOS를 검출하는 방법으로서<sup>30)</sup>, 본 실험은 柴胡+酸漿 복합제가 시상하부의 PVN에서 NO에 영향을 주는지 알기 위하여 실시하였다. 그 결과 normal 그룹에 비해 control 그룹, LPS 그룹 모두 NADPH-d 발현이 증가함을 관찰하였다 ( $P < 0.01$ ). LPS 그룹의 발현도가 더 큰 것을 통해 LPS에 의한 염증과 우울현상은 NO를 활성화시킨다는 것을 알 수 있다. 하지만 BR + PH 그룹의 경우 유의한 감소를 관찰하지는 못하였다. 이는 柴胡 + 酸漿 복합제의 항우울효과는 NO와는 관계 없이 이루어짐을 의미하는 것으로 생각된다.

TH는 L-tyrosine, L-dopa, dopamine, norepinephrine, epinephrine으로 진행되는 catecholamine 대사의 첫 번째 과정에서 사용되는 효소로 모노아민 가설의 dopamine계 대사의 평가를 위한 지표의 하나이다. LC에서 NE가 합성되며 중추신경계에 광범위하게 분포하는 noradrenaline성 섬유가 이곳에서 시작된다<sup>31)</sup>. 동물이 우울행동 조건에 노출되면 적응 반응의 일환으로 dopamine 체계가 활성화되어 dopamine의 이용률과 전환률이 증가됨에 따라 dopamine의 수준은 감소되고 상대적으로 dopamine의 대사에 관여하는 TH의 수준은 증가하는 현상이 나타난다<sup>10,32)</sup>. 따라서 LC에서 TH의 발현을 측정하여 catecholamine system의 활성을 확인할 수 있다<sup>31)</sup>. 실험 결과 normal 그룹에 비해 control 그룹( $P < 0.01$ ), LPS 그룹( $P < 0.001$ ) 모두 LC에서 TH 발현이 증가함을 관찰하였다. 하지만 BR+PH 그룹들의 경우 경향성은 보였으나 유의한 감소를 관찰하지는 못하였다. 이는 柴胡+酸漿 복합제의 항우울효과는 모노아민 가설의 catecholamine system에는 큰 효과를 가지지 못하는 것으로 보인다.

이상의 실험에서 살펴본 바와 같이 LPS는 우울효과를 일으키며, 이로 인해 유도된 우울현상에 대해 투여된 柴胡 + 酸漿 복합제는 시상하부의 PVN에서 c-Fos의 발현을 용량 의존적으로 유의하게 억제하고, CRF의 발현을 억제하는 경향을 나타냈으며 HPA axis의 말단부위인 부신피질에 작용하여 용량 의존적으로 plasma corticosterone 농도를 유의하게 감소시켰다. 즉, HPA axis의 억제 작용을 통해 TST에서 부동시간을 유의하게 감소시켰으며 FST에서는 부동시간의 감소 경향을 나타내어 항우울효과를 나타냈다.

하지만 PVN에서 NADPH-d의 발현에는 효과를 나타내지 못하였고 LC에서 TH의 발현에 대한 효과는 경향성은 보였으나 유의한 효과가 나타나지 않았다. 따라서 柴胡와 酸漿의 복합물 추출물의 효과는 주로 염증과 스트레스에 직접적으로 대응하는 HPA axis에 작용하여 나타나며, NO에서는 작용하지 않고 catecholamine system에 대하여는 작용이 저하되는 것으로 보인다. 이는 선행 연구인 김<sup>9)</sup>의 柴胡가 HPA axis와 catecholamine system 둘 다에 영향을 미친다는 보고와, 조<sup>10)</sup>의 地骨皮와 柴胡의 合劑 후 추출물은 HPA axis에는 효과가 없고 catecholamine system 중 noradrenaline system에만 영향을 발휘한다는 보고와는 차이가 있다. 본 연구와 두

선행 연구는 LPS 처리의 유무라는 차이점이 있다. 하지만 선행 연구와 본 연구에서 나타난 결과를 종합하여 볼 때, 柴胡가 우울증에 작용하는 system이 배합된 약물에 따라 차이가 있다는 점을 보여준다고 생각된다.

## 결론

흰쥐에 柴胡와 酸漿 복합제를 투여하고, LPS를 주입하여 염증을 유발한 뒤, 우울행동의 변화를 확인하고 plasma corticosterone의 농도, 그리고 c-Fos, CRF, NADPH-d, TH의 발현을 측정된 결과 이를 통해 LPS로 유발된 염증-우울증 모델에서 柴胡와 酸漿 복합제의 항우울 효과에 대해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TST에서의 효과는, 모든 BR + PH 그룹에서 LPS 그룹에 비해 부동행동 시간이 유의하게 감소하였다.
2. FST에서의 효과는, BR + PH 그룹에서 LPS 그룹에 비해 부동행동 시간이 감소하는 경향을 보였다.
3. PVN 내의 c-Fos에 대해 나타내는 효과는, BR + PH400 그룹에서 LPS 그룹에 비해 농도 의존적으로 유의하게 발현이 감소하였다.
4. PVN 내에서 CRF에 대해 나타내는 효과는, BR + PH 그룹에서 LPS 그룹에 비해 발현이 감소하는 경향을 나타내었다.
5. 혈중 corticosterone에 대해 나타내는 효과는, BR + PH400 그룹에서 LPS 그룹에 비해 농도가 유의하게 감소하였다.
6. PVN내의 NADPH-d에 대해 나타내는 효과는, BR + PH100 그룹, BR + PH400 그룹에서 모두 유의한 변화가 없었다.
7. LC내의 TH에 대해 나타내는 효과는, BR + PH100 그룹, BR + PH400 그룹에서 모두 LPS그룹에 대해 발현이 감소하는 경향성은 보였으나, 유의한 변화는 없었다.

따라서 柴胡와 酸漿 복합제는 HPA axis 억제 작용을 통한 항염증 효과에 의하여 항우울 효과를 나타내고 있는 것으로 생각되며, NO 및 catecholamine system에 대한 효과는 유의하지 않은 것으로 사료된다.

## References

1. Song HR, Woo YS, Bahk WM. Depression as an Inflammatory Disease. Korean J Psychopharm. 2013 ; 24 : 5-10.
2. Zou S, Lim JS translation. BenJingShuZheng. 1st ed. Seoul : Dae-Sung medical publisher. 2001 : 63-9.

3. Nationwide Oriental Medicine Herbology Professor, Herbology, 2nd ed, Seoul : YeongRimSa, 2011 : 186-8.
4. Choi SW, Kang H, Shim BS, Kim SH, Choi SH, Ahn KS. Effect of Bupleuri Radix on Inflammatory Cytokine Secretion to HMC and Mouse Immune Cells, *Kor J Orient Physiol Pathol*, 2009 ; 23(1) : 150-7.
5. Ji OP. Pharmacognosy, 2nd ed, Seoul : SungKyunKwan Publishing Department, 2012 : 354.
6. Pharmacognosy Textbook Publishing Committee, Pharmacognosy, 2nd ed, Gyeonggi-do : DongMyeongSa, 2013 : 164-8.
7. Oriental Medicine Pharmacognosy Textbook Publishing Committee, Oriental Medicine Pharmacognosy, 3rd ed, Seoul : Shin-Il books, 2010 : 188-90.
8. Hong SY, Park SD. The effect of Bupleurum falcatum L. on the catecholamines of depression rat model, *Kor J Herbol*, 2003 ; 18(4) : 245-53.
9. Kim JH, Lee TH. Effect of Bupleuri Radix on CRF, c-Fos, ACTH and TH in Forced Swimming Test, *Kor J Herbol*, 2009 ; 24(2) : 29-37.
10. Cho EH, Lee TH. Effect of Mixture of Bupleuri Radix and Lycii Radix Cortex on the Change of HPA-Axis and Catecholamine System in the Forced Swimming Test, *Korean J Orient Med Pre*, 2011 ; 19(1) : 161-74.
11. Gu GQ. YuTongMeng edit. ShenNongBenCaoJing, 1st ed, Harbin : Harbin publisher, 2007 : 125-6.
12. State TCM administration <<ZhongHuaBenCao>> Editorial board, ZhongHuaBenCao, 7th ed, Shanghai : Shanghai technology publisher, 1996 : 286-90.
13. Kwon SR. Comparative Study on The Anti-Inflammatory Effect of Aerial part, Calyx, and Fruit of Physalis Alkekengi var. francheti, [dissertation], Seoul : Kyung Hee University, 2011 : 78.
14. ZhenQing, LiJing, LiYong, WangChunYong, LiJuan. The antibacterial activity of Physalidis Herba extract ethanol extract, *Chin J Med Study*, 2004 ; 2(3) : 31.
15. Lee JE, Kwon YJ, Cho SH. A Review of Clinical Studies with Herbal Medicine for Depression - Based on Randomized Controlled Clinical Trial -, *Kor J Orient Neuropsychiatry*, 2011 ; 22(4) : 31-9.
16. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioral drspair in rats : A new model sensitive to antidepressant treatments, *Eur J Pharmacol*, 1978 ; 47(4) : 379-91.
17. Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants, *Psychopharmacology (Berl)*, 1995 ; 121(1) : 66-72.
18. Kang HW, Jang HH, Kang IS, Moon HC, Hwang YJ, Lyu YS. A Study on The Oriental-medical Understanding of Depression, *J Orient Neuropsychiatry*, 2001 ; 12(2) : 2-11.
19. Lee EH, Choi WC, Jung IC. Preliminary Study to Develop the Instrument on Pattern Identifications for Depression, *J Orient Neuropsychiatry*, 2013 ; 24(4) : 435-50.
20. Herman JP, Schafer MK-H, Young EA, Thompson R, Douglas J, Akil H, Watson SJ. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, *J Neurosci* 1989 ; 9 : 3072-82.
21. Robert Ader. Psychoneuroimmunology, 4th ed, San Diego : Elsevier, 2007 : 281-318.
22. Dantzer R, O'Connor JC, Lawson MA, Kelley KW. Inflammation-associated depression: From serotonin to kynurenine, *Psychoneuroendocrinology*, 2011 ; 36(3) : 426-36.
23. Yagnik RM, Benzeroual KE. Tigecycline prevents LPS-induced release of pro-inflammatory and apoptotic mediators in neuronal cells, *Toxicol In Vitro*, 2013 ; 27(2) : 686-93.
24. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain, *Nat Rev Neurosci* 2008 ; 9(1) : 46-56.
25. O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice, *Mol Psychiatry*, 2009 ; 14(5) : 511-22.
26. Jung YI. Experimental Models of Depression, *Kor J Bio Psychiatry*, 1999 ; 6(2) : 161-9.
27. Jung HJ, Park CM, Chung DS, Ahn MJ, Byun HJ. The Inhibition of stress-induced c-Fos expression by superior cervical ganglion block in rat brain, *Korean J Anesthesiol*, 1997 ; 33(6) : 1029-36.
28. Hahn MK, Bannon MJ. Stress-induced c-Fos expression in the rat locus coeruleus is dependent on neurokinin 1 receptor activation, *Neurosci*, 1999 ; 94(4) : 1183-8.
29. Vazquez DM. Stress and the Developing Limbic-Hypothalamic-Adrenal axis, *Psychoneuroendocrinology*, 1998 ; 23(7) : 663-700.
30. Jung KH, Roh JD, Kim EH, Lee EY. Effect of low frequency electroacupuncture on NADPH-d positive neurons in the brain cortex of rat with adjuvant induced rheumatoid arthritis, *J Korean Acu Mox Soc*, 2008 ; 25(3) : 1-9.
31. Min NK, Lee TH. Effect of Paeoniae Radix Rubra on CRF, c-Fos and TH in the Forced Swimming Test, *Kor J Herbol*, 2010 ; 25(4) : 61-7.
32. McDevitt RA, Szot P, Baratta MV, Bland ST, White SS, Maier SF, Neumaier JF. Stress-induced activity in the locus coeruleus is not sensitive to stressor controllability Original Research Article, *Brain Res*, 2009 ; 1285 : 109-18.