

Original Article

## 숙지황 추출물의 항염증 작용을 통한 항우울 효과

김응선<sup>1</sup>, 정명수<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, <sup>2</sup>원광대학교 한의과대학 예방의학교실 & 원광대학교 전통의학연구소

### The Anti-depressive Effect of Rehmanniae Radix Preparata via Anti-inflammatory Activity

Eung Sun Kim<sup>1</sup>, Myongssoo Chong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Third Medicine, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

<sup>2</sup>Dept. of Preventive Medicine, College of Korean Medicine & Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

**Objectives:** Rehmanniae Radix Preparata (RRP) has been used as a traditional remedy to treat gynecology and endocrine diseases. Recently, studies on antioxidant and anti-inflammatory effects of RRP have been reported, so it was judged that RRP extracts would have an anti-depressive effect.

**Methods:** We investigated the anti-neuroinflammatory and anti-depressive effect of RRP on lipopolysaccharide (LPS)-induced depression and LPS-stimulated BV2 microglia. RRP inhibited the LPS-stimulated excessive release of nitrite in the BV2 cells. RRP also significantly inhibited the inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)-alpha, interleukin (IL)-1beta and IL-6 in LPS-stimulated BV2 microglial cells.

**Results:** RRP significantly suppressed the LPS-induced mitogen-activated protein kinase (MAPKs) and nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activation. In addition, administration of RRP not only inhibited the immobility time in the forced swimming test (FST) but also increased the total travel distance in the open field test (OFT). Also, RRP inhibited the elevation of TNF-alpha, IL-1beta, and IL-6 in brain of LPS-injected mice.

**Conclusions:** Considering the overall results, our study showed that RRP exhibited the anti-neuroinflammatory and anti-depressive activities via deactivation of MAPKs and NF- $\kappa$ B.

**Key Words** : Rehmanniae Radix Preparata (RRP), Anti-neuroinflammatory effect, Anti-depressive effect, inflammatory cytokine, Microglia cell

## 서론

우울증은 의욕 저하와 우울감을 주요 증상으로 하여 다양한 인지 및 정신 신체적 증상을 일으키는 질환을 말한다<sup>1)</sup>. 대표적인 예로 수면 장애, 식욕 저하, 성욕 장애, 변비, 즐거움 상실(anhedonia), 울음, 자

살에 관한 생각들 등이 있다<sup>1)</sup>. 이런 증상이 2주 이상 지속되고, 이 증상으로 인해 일과 정상적인 생활에 방해가 된다면 주요 우울 장애(Major depressive disorder, MDD)로 판정받을 수 있다<sup>2)</sup>. 주요 우울 장애는 WHO 질병 통계에서 가장 높은 위험성을 가진 질병으로, 전세계에서 15-25%의 발병률을 보인다<sup>3)</sup>.

• Received : 11 February 2022

• Revised : 21 February 2022

• Accepted : 22 February 2022

• Correspondence to : 정명수

전북 익산시 익산대로 460 원광대학교 한의과대학 예방의학교실

Tel : +82-63-850-6912, Fax : +82-63-852-5594 E-mail : neurokid@wku.ac.kr

우울증의 주요 원인으로는 유전적, 환경적 요인도 있지만, 산업화, 도시화에 따른 사회적 영향이 크기 때문에 최근 우울증 환자수도 크게 증가하고 있다<sup>4)</sup>.

항우울제는 초기 모노아민 가설을 기반으로 imipramine, clomipramine 등의 삼환계 항우울제를 사용했으나, 효과나 안정성 측면에서 만족스럽지 못했다<sup>5,6)</sup>. 그 이후 noradrenaline 혹은 serotonin의 부족이 우울증을 유발한다는 가설<sup>7)</sup>, cortisol의 분비를 자극하여 우울증을 유발한다는 가설<sup>8)</sup> 등이 보고되어, 선택적 serotonin 재흡수 억제제와 cortisol 합성 억제제 등이 개발되어 상용되고 있다<sup>9)</sup>. 그러나 현재 상용되고 있는 항우울제는 졸음, 진정, 항콜린 효과, 몸무게 증가, 분노 등의 부작용이 다수 보고되고 있어<sup>10)</sup> 새로운 치료약 및 우울증 병인 연구가 필요하다.

최근에는 염증이 우울증과 관련이 깊을 것이라는 가설이 주목을 받고 있다<sup>11)</sup>. 뇌 염증으로 인한 뇌 손상에 의해 나타나는 증상과 우울증 주요 증상이 많은 부분이 비슷하고, 우울증 환자에서 염증성 cytokine과 대식세포 같은 염증성 세포의 증가가 관찰되는 점에서 염증 반응이 우울증의 발병에 기여한다는 것이다<sup>12)</sup>.

한의학에서는 정체되고 發散하지 못하는 증상을 鬱證이라 하는데, 鬱은 일반적으로 氣鬱을 가리키며, 氣鬱이란 억지로 구속되고 우울한 마음으로 인하여 인체 기능이 침체되는 현상을 말한다<sup>13)</sup>. 氣鬱이란 氣가 한 곳에 뭉쳐 있으면서 흩어지지 못하는 것으로, 대부분 七情으로 인하여 발생한다<sup>14)</sup>. 따라서 기존의 우울증 한약치료에서도 기존의 항우울제와 비슷하게 모노아민 활성을 증가시켜 항우울 효과를 내는데 초점을 두었다<sup>15)</sup>. 하지만 최근 연구 이슈에 맞게 한약을 이용한 우울증 치료에도 변화가 필요하며, 따라서 항염증 효과를 가지고 있는 한약 소재를 이용하여 우울증 치료 연구에 응용해 볼 필요가 있다고 판단이 들었다.

또한 한의학에서 우울증은 심리적 원인이 동반된 영혼의 질병이라고 생각한다<sup>14)</sup>. 따라서 正氣와 精血을 저장하며 생성시키고 영혼이 머무는 골수를 강화

해 면역 생성과 함께 정신에 안정을 취할 수 있는 처방을 사용한다<sup>14)</sup>. 이에 저자는 正氣와 精血을 보충할 수 있는 熟地黃(Rehmanniae Radix Preparata, RRP)을 이용하여 항우울증 효과가 있는지 연구를 진행하였다. 지황은 玄蓼科에 속하는 다년생초로서 뿌리를 채취하여 根葉과 잔뿌리를 제거하고 세척한 것을 生地黃(Rehmanniae Radix Crudus)이라 하고 生地黃을 陽乾한 것을 乾地黃(Rehmanniae Radix), 황주 등으로 九蒸九暴한 것을 熟地黃(Rehmanniae Radix Preparata)이라고 하며, 치료 목적에 맞게 사용하고 있다<sup>16)</sup>. 특히 熟地黃은 補血, 滋陰의 효능이 있어 血虛, 心悸怔忡, 失眠, 崩漏, 月經不調, 腎陰不足으로 인한 骨蒸潮熱, 盜汗, 耳鳴, 遺精, 消渴 등에 적용된다<sup>17)</sup>. 熟地黃의 藥性和 효능이 生地黃 및 乾地黃과 구별되는 것은 그 제조과정에서 함유 성분의 함량이 변화되기 때문이다. 熟地黃의 제조과정에서 蒸熟과정이 반복됨에 따라 乾地黃의 stachyose 등의 농도가 감소되며 배당체들은 분해되거나 그 함량이 낮아지는 데 비해 熟地黃은 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde(5-HMF)의 생성이 증가한다<sup>18,19)</sup>. 최근 熟地黃을 이용한 항산화, 항염 작용에 대한 연구가 보고가 되고 있으며<sup>20)</sup>, 熟地黃의 주요 성분인 5-HMF도 항염효과가 탁월한 것으로 보고되어 있어<sup>21)</sup>, 熟地黃 추출물이 항우울 효과가 있을 것으로 판단되었다.

이에 저자는 熟地黃 추출물이 염증성 우울 모델에 대한 유효한 효과가 있는지 확인하기 위해, BV2 microglia cell과 마우스 모델에서 Lipopolysaccharide (LPS)로 염증을 유발하여, 염증성 반응과 쥐 우울 행동 등을 조사하였고, 유의성 있는 결과를 얻었으므로 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

세포 배양용 시약인 Fetal bovine serum(FBS), 항

생제, RPMI 1640 Media 등은 Gibco(Grand Island, USA)에서 구입하였다. Anti-phospho p38 antibody, anti-phospho ERK1/2 antibody, anti-phospho JNK antibody는 Cell Signaling(MA, USA)에서 구입하였고, anti-p38 antibody, anti-JNK antibody, anti-ERK antibody, anti- $\beta$ -actin antibody, anti-I $\kappa$ -B $\alpha$  antibody는 Santa Cruz(CA, USA)에서 구입하였다.

## 2) 연구용 마우스

C57BL/6 마우스(15~20 g, 8 weeks, male)는 오리엔트 바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하였으며, 일주일 동안 실험실 환경에서 적응시킨 후 실험을 시행하였다. 모든 실험은 원광대학교에서 정해놓은 동물관리규정을 준수하며 진행하였다(WKU 21-66).

## 3) 熟地黃 추출물 제조

본 연구에 사용한 熟地黃은 광명당 제약(Ulsan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 熟地黃은 乾地黃을 세척하여 黃酒를 고루 섞어 저온 저압 방식으로 九蒸九曝의 전통방식으로 가공하여 지표물질인 5-HMF 1.0% 이상 함유된 제품을 사용하였다. 熟地黃 100 g을 물 1 L에 넣어 약탕기(Daewoong, Korea)에 2 시간 30 분 전탕한 후 여과하여 -80℃에서 동결 건조하였다. 동결 건조한 후 나온 분말가루는 13.2 g으로 수율은 13.2%였고, 분말가루를 3차 증류수에 희석·여과한 후 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 세포배양

한국세포주은행(KCLB; Seoul, Korea)에서 mouse의 microglia인 BV2 세포를 분양받았다. 세포배양은 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI 1640 media에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에 시행하였다.

### 2) BV2 세포에서 熟地黃의 세포 독성 측정

세포 독성은 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 formazan 생성물로 변하는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) 시약을 활용하여 측정하였다. 세포는 배지에서  $2 \times 10^5$  cells/mL로 현탁 후, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mg/mL의 각각의 농도로 熟地黃을 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 MTT 용액을 well에 첨가한 후 30분 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 이후 유기용매를 첨가하여 formazan을 녹이고, 그 액의 흡광도를 540 nm에서 Spectrophotometer(Molecular devices, MD, USA)를 이용하여 측정했다.

### 3) 아질산염(Nitrite)농도 측정

Griess reagent를 활용하여 측정하였다. 세포는 배지에서  $2 \times 10^5$  cells/mL로 현탁하였고, 0.1, 0.2, 0.5 mg/mL의 각각의 농도로 熟地黃, 10  $\mu$ M fluoxetine (FXT)을 처리하였다. LPS(1  $\mu$ g/mL)첨가 후 24시간 동안 배양하였다. 세포 상층액에 100  $\mu$ L의 griess reagent를 첨가한 후, spectrophotometer(Molecular devices, MD, USA)를 사용해 540 nm에서 혼합물의 흡광도를 측정하였다.

### 4) RNA 분리 및 Quantitative RT-PCR

Easy Blue(Intron, USA)시약을 통해 Total RNA를 뇌와 세포로부터 추출하였다. Easy Blue 용액을 1 mL를 넣어 뇌 혹은 세포를 용해시켰다. 여기에 chloroform 100  $\mu$ L를 첨가한 뒤, 15,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 supernant를 harvest하였다. 그 후 isopropanol을 동량 섞은 후 15,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 supernant는 버리고, pellet을 80% ethanol로 3 회 세척한 후 건조시켰다. 마지막으로 pellet에 DEPC treated water를 15  $\mu$ L씩 넣어 정량하였다. cDNA는 1  $\mu$ g RNA와 cDNA synthesis kit(Toyobo, Japan)를 이용해서 합성하였다.

합성된 cDNA, PCR master mix (Toyobo, Japan), primer를 넣고 92℃에서 30 초, 60℃에서 45 초, 7

2℃에서 30 초를 35 cycle로 반응시켰다. 정량 증합 효소반응에 쓰인 forward(f)와 reverse(r) primer는 코스모진텍(Daejeon, Korea)에서 합성한 것을 사용하였다. 사용한 primer는 Table 1과 같다.

Table 1. The Primer of IL-1β, IL-6, TNF-α, GAPDH

Gene	Primer
IL-1β	5'-CCT CGT GCT GTC GGA CCC AT-3' (forward)
	5'-CAG GCT TGT GCT CTG CTT GTG A-3' (reverse)
IL-6	5'-CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3' (forward)
	5'-CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC-3' (reverse)
TNF-α	5'-GTG GAA CTG GCA GAA GAG GC-3' (forward)
	5'-AGA CAG AAG AGC GTG GTG GC-3' (reverse)
GAPDH	5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3' (forward)
	5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3' (reverse)

### 5) Western blot analysis

5 x 10<sup>6</sup> cells/dish로 세포를 배양하고 12 시간 starvation시켰다. 이후 熟地黃을 전처리 하고 LPS로 30분 자극하였다. 이후 cold PBS로 2회 세척 후 세포를 획득하였다. 획득한 세포를 원심분리(5,000 rpm, 5 min)하여 그 상층액을 버리고 cell pellet을 획득하였다. RIPA lysis buffer를 넣어 단백질을 용해시켜 15,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 pellet를 가라앉힌 후 단백질을 정량하였다. 단백질에 5X샘플링 버퍼를 같이 넣어 섞은 후, 샘플을 10% SDS-PAGE에 electrophoresis 한 후 membrane에 옮기고 skim milk로 blocking 하였다. 단백질의 발현은 ECL detection 용액(Amersham, UK)으로 확인하였다.

### 6) LPS로 유도한 우울증 모델

LPS로 유도한 우울증 모델은 기존의 논문<sup>22)</sup>을 참고하여, mouse에 0.5 mg/kg LPS를 복강 주사로 유발하였다. 실험실 환경에서 적응시킨 mouse는 정상군, LPS 처리한 대조군과 熟地黃 투여 농도에 따라 0.1 g/kg 투여군, 0.2 g/kg 투여군, FXT 20 mg/kg의

3가지 실험군으로 설정하였다. FXT는 우울증 및 뇌 염증 반응 억제 양성 대조군으로 사용하였다. 대조군과 실험군을 실험 횟수별로 각각 6 마리로 나누어 총 3 회, 군별 18 마리씩 진행하였다. 실험군에게는 熟地黃을 1주일간 하루에 한 번 경구 투여하였으며, FXT는 1주일간 하루에 한 번 복강 투여하였다. 마지막 熟地黃 및 FXT 투여 후 1시간 뒤에 LPS를 주사하였고, 24시간 후 윤리 규정을 준수하여 FST 및 OFT를 시행하거나 희생시켰다.

### 7) Forced swimming test (FST)

FST에 사용된 방법은 Detke 등<sup>23)</sup>에 의해 제안된 방법을 이용하였다. 동물은 투명한 아크릴 원통에 물을 채운 뒤에 예비실험으로 15분간 동물을 물에 빠뜨려 24시간 뒤에 5분간 본 실험을 실행하였다. 본 실험에서는 동물의 부동자세(immobility) 시간을 측정하였다. FST를 시행한 이후의 마우스는 수조에서 꺼내 물기를 말리고 cage에 다시 넣었다. 실험에 사용된 물은 각 실험을 시작할 때마다 새로 교체하였다.

### 8) Open field test (OFT)

LPS 투여로 인한 우울증이 활동량에 미치는 영향을 알아보고자, Open field에서 행동을 관찰하였다. 실험에 이용된 Open field는 60 × 60 × 30 cm 규격의 나무로 만든 상자이며, 바닥에는 15 cm 간격의 가로, 세로선으로 바둑판 모양의 구획이 나뉘어져 있다. 5분 동안 Open field에서의 행동을 관찰하였고, 보행활동 등을 기록하였다. 보행활동은 개방장안에서의 움직인 거리를 함께 측정하였다<sup>24)</sup>.

### 9) 통계처리

실험은 최소 3회 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean±S.D.로 나타내고, 실험 데이터는 one way ANOVA로 분석하였다. 분석한 데이터가 p < 0.05 일 경우 유의한 것으로 판단하였다. 이상의 통계는 SPSS (V 12.0)를 사용하여 처리하였다.

## 결 과

### 1. BV2 세포에서 熟地黃의 유효 농도 설정

BV2 세포에서 熟地黃이 세포독성에 영향을 주는 지 확인하기 위하여 MTT를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 세포독성이 없는 熟地黃의 농도를 조사하기 위해, BV2 세포에 熟地黃을 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mg/mL으로 24시간동안 처리하였다. 熟地黃을 처리하지 않은 대조군과 熟地黃을 0.1 mg/mL 농도에서 0.5 mg/mL 농도까지 처리한 실험군 사이의 세포 생존에는 유의성 있는 차이가 없었다. 그러나 熟地黃을 1 mg/mL 이상일 경우, 유의미한 세포 사멸이 관찰되었다(Fig. 1). 이러한 결과를 기반으로 BV2 세포에서 熟地黃의 실험농도를 0.1, 0.2, 0.5 mg/mL로 설정하였다.

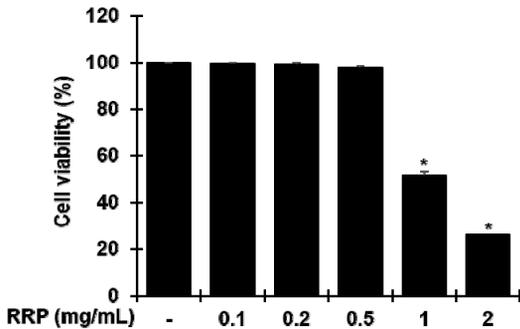


Fig. 1. Effect of RRP on cell viability in BV2 cells. Cells were treated with saline or the RRP (0.1, 0.2, 0.5, 1, and 2 mg/mL) for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay, as described in Methods. Data are the mean  $\pm$  S.D.(n = 3). \* $p$  < 0.05 versus the saline. RRP: Rehmanniae Radix Preparata.

### 2. LPS로 자극된 BV2 세포에서 熟地黃의 Nitrite 생성 억제 효과

BV2 세포에서 熟地黃이 nitrite의 생성을 억제하는 효과가 있는지 조사하기 위해, BV2 세포에 熟地黃을 각각 0.1, 0.2, 0.5 mg/mL로 처리한 다음 LPS로 자극하였다. 양성대조군으로 현재 항우울제로 사용되고 있는 fluoxetine(FXT)을 10  $\mu$ M로 같이 처리하였다.

LPS로 자극되어 활성화된 nitrite의 증가는 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다. LPS 자극으로 인한 nitrite의 증가는 熟地黃 처리에 의해 농도의존적으로 감소함을 확인하였으며, 특히 0.5 mg/mL 투여군의 경우 양성대조군인 FXT보다 우수한 억제 효과를 보여주었다(Fig. 2).

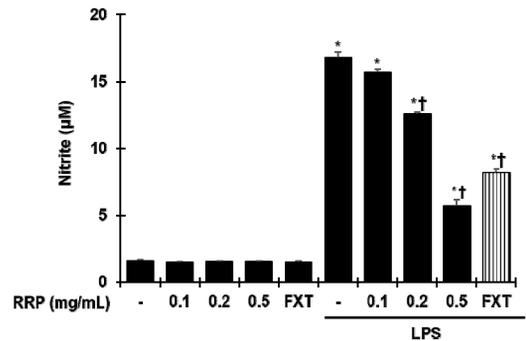


Fig. 2. Effect of RRP on LPS-induced nitrite production in BV2 cells.

BV2 cells were incubated with saline, RRP(0.1, 0.2, and 0.5 mg/mL) or FXT(Fluoxetine 10  $\mu$ M), and then stimulated with 1  $\mu$ g/mL of LPS for 24 h. The concentrations of nitrite were determined by Griess reagent, as described in methods. Data are the mean  $\pm$  S.D.(n = 3). \* $p$  < 0.05 versus the saline, † $p$  < 0.05 versus LPS. RRP: Rehmanniae Radix Preparata, FXT: Fluoxetine.

### 3. LPS로 자극된 BV2 세포에서 熟地黃의 염증성 cytokine 억제 효과

BV2 세포에서 熟地黃의 항염증 효과를 조사하기 위하여, BV2 세포에 熟地黃을 처리한 다음 LPS로 자극하여 염증성 cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) mRNA 발현을 qPCR을 통해 확인하였다. 그 결과 BV2 세포에서 LPS에 의해 증가한 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 발현이 熟地黃의 처리에 의해 모두 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 3).

### 4. LPS로 자극된 BV2 세포에서 熟地黃의 염증 억제 기전 연구

熟地黃이 mitogen-activated protein kinases(MAPKs; ERK, JNK, p38)와 I $\kappa$ -B $\alpha$  신호전달 경로의 발현에

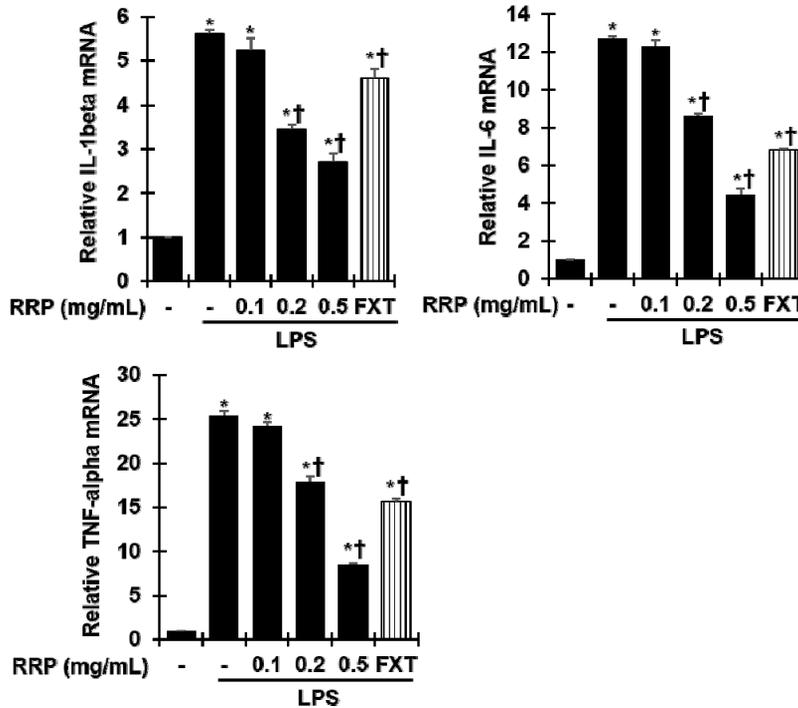


Fig. 3. Effect of RRP on inflammatory cytokine expression in LPS-stimulated BV2 cells.

Cells were pre-treated with saline or RRP(0.1, 0.2, and 0.5 mg/mL) or FXT(Fluoxetine 10 μM) for 1 h and then stimulated with 1 μg/mL of LPS for 24 h. The mRNA expression level of IL-1β, IL-6, TNF-α were measured by qPCR. Data are the mean ± S.D.(n = 3). \*p < 0.05 versus saline, †p < 0.05 versus LPS. RRP: Rehmanniae Radix Preparata, FXT: Fluoxetine.

어떠한 영향을 주는지 조사하기 위해, MAPKs의 인산화와 Iκ-Bα를 western blot을 통해 확인하였다. 그 결과, LPS로 자극된 미세아교세포에서 ERK, JNK, p38의 인산화는 증가되었고, 그 증가는 熟地黃에 의해 감소하였다. BV2 세포에서 Iκ-Bα는 LPS에 의하여 감소하였음을 확인할 수 있었고, 熟地黃 처리로 인하여 다시 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

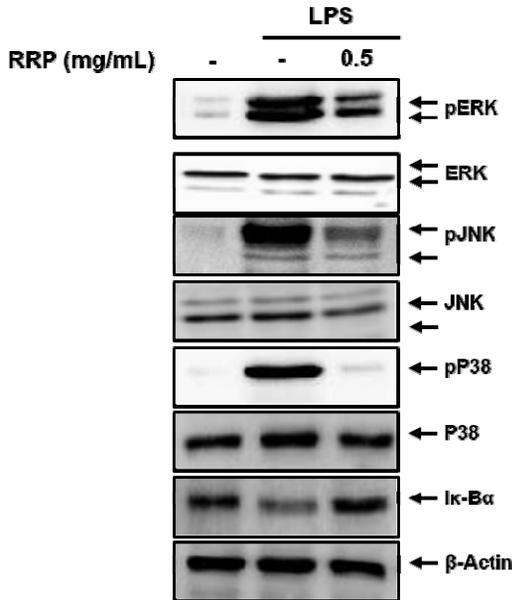
### 5. LPS로 자극된 마우스 우울증 모델에서 熟地黃의 FST에서의 효과

LPS로 유도한 마우스 우울증 모델에서 熟地黃을 투여한 후 강제 수영 부하 실험(Forced swimming test, FST)을 시행하여 행동 변화를 관찰하였다. LPS를 처리한 후 saline을 투여한 control group에서는

우울증상으로 인하여 immobility 시간이 크게 증가하였다. 하지만 熟地黃 투여에 의해 immobility 시간이 감소했음을 관찰할 수 있다. 熟地黃은 양성대조군인 FXT와 거의 비슷한 수준으로 감소 효과를 보여주었다(Fig. 5).

### 6. LPS로 자극된 마우스 우울증 모델에서 熟地黃의 OFT에서의 효과

LPS로 유도한 마우스 우울증 모델에서 熟地黃을 투여한 후 Open field test(OFT)를 시행하여 행동 변화를 관찰하였다. LPS를 처리한 후 saline을 투여한 control group에서는 우울 증상으로 인하여 이동 거리가 유의성 있게 감소하였다. 하지만 熟地黃 투여에 의해 이동 거리가 증가했음을 관찰할 수 있다. 熟地

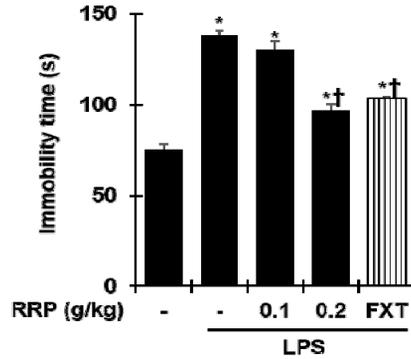


**Fig. 4.** Effect of RRP on the activation of MAPKs and the degradation of Iκ-Bα in LPS-stimulated BV2 cells. Cells were treated with the saline or RRP(0.5 mg/mL) for 1 h, and then stimulated with 1 μg/mL of LPS for 30 min. The protein expressions were measured by western blot. The experiment was repeated three times, and similar results were obtained. RRP: Rehmanniae Radix Preparata, FXT: Fluoxetine.

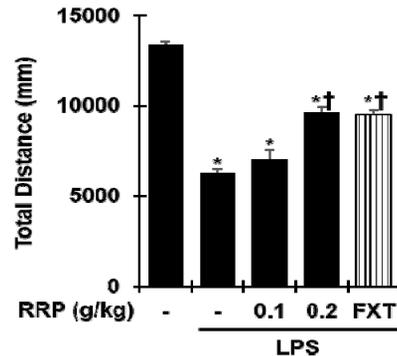
黃은 양성대조군인 FXT와 거의 비슷한 수준으로 증가 효과를 보여주었다(Fig. 6).

### 7. LPS로 자극된 마우스 우울증 모델에서 熟地黃의 염증성 cytokine 억제 효과

마우스 우울증 모델의 뇌 조직에서 熟地黃의 염증성 cytokine 억제에 대하여 조사하기 위해, 熟地黃을 1주간 마우스에 투여한 후 LPS로 우울증을 유도하였다. 24시간 후 마우스의 뇌 조직을 얻어서, 염증성 cytokine을 qPCR로 분석하였다. LPS 자극 그룹의 뇌조직에서 IL-1β, IL-6, TNF-α와 같은 cytokine은 정상그룹에 비하여 상당히 증가한 양상을 보였고 熟地黃을 처리한 그룹에서는 LPS 자극 우울증 그룹에 비해 농도 의존적으로 염증성 cytokine 생성이 유의하게 감소함을 확인하였다. 熟地黃은 양성대조군인



**Fig. 5.** Effect of RRP on Force swimming test (FST) in the LPS-induced depressive-like behavior. Data are the mean ± S.D.(n = 3). \**p* < 0.05 versus saline, †*p* < 0.05 versus LPS. RRP: Rehmanniae Radix Preparata, FXT: Fluoxetine.



**Fig. 6.** Effect of RRP on Open field test (OFT) in the LPS-induced depressive-like behavior. Data are the mean ± S.D.(n = 3). \**p* < 0.05 versus saline, †*p* < 0.05 versus LPS. RRP: Rehmanniae Radix Preparata, FXT: Fluoxetine.

FXT보다 더 우수한 억제효과를 보여주었다(Fig. 7).

### 고찰

우울증에 대한 병리학적 규명이 완전히 이루어지지 않았지만, 일반적으로 세로토닌, 노르아드레날린, 도파민 등의 모노아민이 부족한 상황이 우울증을 유발한다고 생각되고 있다<sup>26)</sup>. 그 외에도 gammaaminobutyric acid (GABA)활성 감소, glutamate system 과활성,

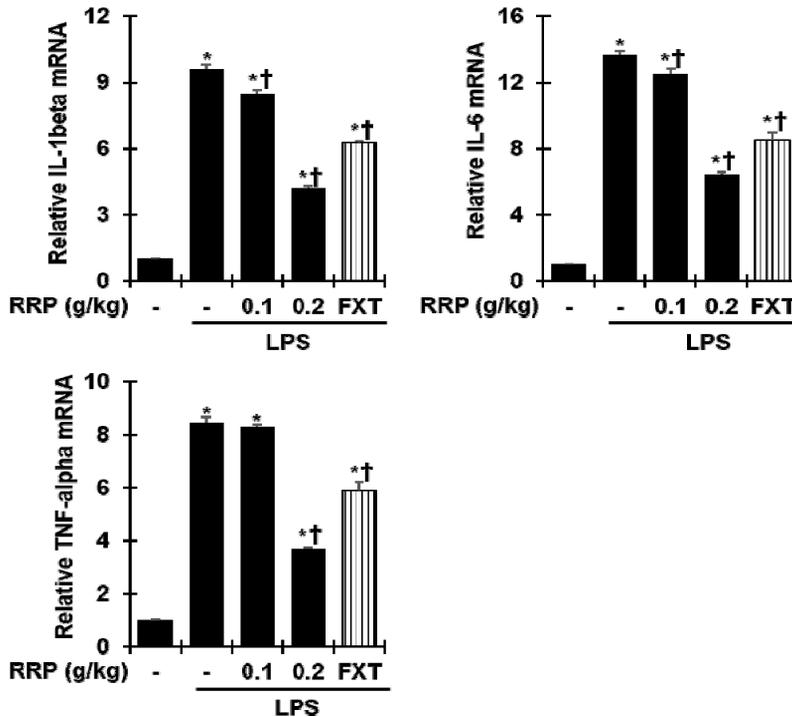


Fig. 7. Effect of RRP on inflammatory cytokines in the LPS-induced depressive-like model.

The mRNA expression level of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  were measured by qPCR. Data are the mean  $\pm$  S.D.(n = 3). \* $p$  < 0.05 versus saline, † $p$  < 0.05 versus LPS. RRP: Rehmanniae Radix Preparata, FXT: Fluoxetine.

미세아교세포에 의한 신경 염증(neuro-inflammation)이 원인으로 지목되고 있다<sup>27,28</sup>). 이 연구에서는 신경 염증(neuro-inflammation) 기반 우울증 모델을 이용하였다. 신경 염증은 cytokine, 신경전달물질, HPA axis의 변화를 통해 야기되는 면역계, 신경계, 내분비계가 개입된 종합적 생체 반응이다<sup>12</sup>). Tryptophan은 뇌로 수송되어 serotonin 등으로 생성되고, 이 과정에서 glutamatergic neurotransmission을 야기하며, 이를 통해 분해된 tryptophan은 세로토닌성 신경전달물질을 감소시켜 우울증상에 영향을 준다<sup>11</sup>). 또한 면역-염증 반응이 우울증 회복 과정을 방해하는 역할을 하고 있을 가능성도 보고되고 있다<sup>29</sup>). PAMP에 반응하는 미세아교세포의 대표적인 ligand로서 그람음성 박테리아인 Lipopolysaccharide(LPS)가 알려져 있

다. LPS는 다양한 cytokine을 생성시키고, 염증을 유발하기 때문에 빈용 실험모델로 확립되어 있으며<sup>22</sup>, 뇌 염증 반응 및 행동 연구에서도 우울증과 아주 유사하게 나타난다<sup>29</sup>). 이에 본 연구에서는 BV2 microglia 세포에서 LPS로 자극하여 발생한 염증 반응과 마우스에 LPS를 투여하여 발생하는 우울증 모델에서 숙지황의 효과를 관찰하였다.

한의학에서는 우울증이라는 용어를 사용하지 않지만, 우울증과 유사한 개념을 鬱證, 氣鬱, 脫營失精, 氣虛로 표현하였다. 鬱證의 원인은 情志不舒와 七情所傷 그리고 外感和 飲食內傷으로 볼 수 있으며 그 중 특히 情志所傷이 중요한 원인으로 요약된다<sup>14</sup>). 우울증 치료에 빈용되는 한약에 대한 문헌 연구에 따르면<sup>30</sup>, 시호, 울금, 석창포, 천궁, 향부자, 백작약, 반하, 복령

등이 가장 많이 사용되는 약으로서, 기와 혈의鬱滯를 제거할 수 있는 약이 주를 이루었다. 하지만 현대 사회는 과로로 인한 虛損으로 인한 우울증의 빈도가 늘어나고 있으므로, 正氣와 精血을 보충하면서, 우울 증상을 개선할 새로운 한약소재의 연구가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 精血을 보충할 수 있는 소재로 熟地黃을 선정하여 연구를 진행하였다.

熟地黃은 玄蓼科에 속한 多年生 草本인 地黃 또는 중국의 懷慶地黃의 뿌리에 해당되는데, 生地黃은 地黃의 신선한 塊根이며 熟地黃은 이 塊根에 黃酒를 뿌려 九蒸九曝한 약재로, 甘微溫無毒하며 補血滋陰補精益髓의 효과가 있다. 地黃은 <神農本草經>에 “乾地黃, 味甘寒, 主折跌, 傷中, 逐血痺, 填骨髓, 長肌肉, 除寒熱積聚, 除痺, 生者尤良, 久服輕身不老, 一名地髓, 生川澤”이라 하여 生地黃과 乾地黃으로 나누어 기재되어 있고<sup>31)</sup>, <本草圖經>에서 “二月, 八月, 採根, 蒸三二日, 令爛暴乾, 謂之熟地黃, 陰乾者, 謂之生地黃”이라 기록되어 熟地黃, 生地黃, 乾地黃으로 분류하였다<sup>32)</sup>. 熟地黃은 甘微溫無毒하여 補血滋陰補精益髓의 효능이 있어 肝腎陰虛와 血虛로 인한 腰膝酸軟, 盜汗遺精, 骨蒸潮熱, 內熱消渴, 血虛萎黃, 眩暈, 鬚髮早白 등의 치료에 응용되고 있다<sup>17)</sup>. 생지황 및 건지황은  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, fatty acids, catalpol, glucose 등의 성분을 함유하며, 숙지황은 stachyose, mannotriose, raffinose 등의 당류와 catalpol 등이 소량으로 함유되어 있다고 보고되어 있다<sup>33,34)</sup>. 주로 숙지황은 혈압 강하, 당뇨 등 대사성 질환 및 뼈, 부인과 질환에 효과가 있는 것으로 보고되어 있으나, 항산화, 면역 등에 대한 효과도 다수 보고 되고 있다<sup>35-37)</sup>. 이에 본 저자는 항산화 효과가 탁월한 숙지황을 이용하면, LPS로 유도한 신경 염증으로 인한 우울증 모델에서 항 우울 효과가 있을 것으로 예상되었고, LPS를 이용한 세포 및 동물 모델에서 관련 지표를 조사하였으며, 항 우울 효과를 확인하였다. 숙지황 추출물은 현재 가장 활발히 쓰이는 우울증 치료제인 fluoxetine (FXT)과의 비교 실험에서도 효과가 비슷하거나 더

좋은 효과를 보여주었다.

손상 및 감염 부위에서 외부 물질의 존재는 대식세포가 염증 반응을 시작하도록 야기한다. 대식세포는 외부 이물질을 인식하고 파괴하는 기능을 수행하는 세포로 골수에서 만들어져서 혈액에서 순환되며, 다양한 조직에서 활성화되는데, 뇌, 척수 등에서 활성화되어 존재하는 대식세포가 미세아교세포(microglia cell)이다<sup>38)</sup>. 대식세포가 LPS와 같은 박테리아를 인식하게 되면, MAPK와 NF- $\kappa$ B 경로를 통해 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 등 다양한 염증성 cytokine의 생성을 유도한다. 그 결과 염증 반응 매개체인 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 등이 발현되며 이 과정으로 nitrite, 프로스타글란딘 등이 분비되어 국소 염증을 일으킨다<sup>39)</sup>. 정상적인 과정의 염증 반응은 인체 방어 기전으로 작용하나, 미세아교세포와 같은 대식세포가 과도하게 활성화되거나 장시간 염증이 일어날 경우 신경퇴행성 질환, 우울증 등의 질병으로 이어질 수 있다<sup>38,39)</sup>. 따라서 미세아교세포의 과한 활성을 억제하는 것을 통해 신경 세포 기능의 손상이나 사멸을 막아 우울증 등의 뇌 신경성 질환을 방지할 수 있다. 본 연구에서는 LPS로 자극한 세포군에서 염증성 cytokine 발현 정도가 상승하였고, 熟地黃을 처리한 경우 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 mRNA의 발현이 농도의 존적으로 감소한 것을 확인하였다. 이것은 熟地黃이 LPS로 자극된 BV2 세포에서 염증 반응의 매개 물질인 cytokine을 억제하여 염증 반응을 억제하는 것을 보여준다. 또한 熟地黃은 MAPKs 인산화를 억제하고 I $\kappa$ -B $\alpha$ 의 degradation을 감소시키는 등 염증성 신호전달경로를 억제하는 효능이 탁월했다.

뇌 염증이 발생하면, 이 과정에서 ‘우울 관련 행동 변화’가 나타난다. ‘우울 관련 행동 변화’는 무력감, 불안, 식욕저하, 집중력 저하 등의 행동 변화를 가리킨다. 이러한 변화를 측정하는 가장 대표적인 행동 측정법이 forced swimming test (FST), open field test (OFT)이다. FST의 경우 LPS로 우울증을 유발했을 때 무력감 등으로 인하여 immobility time이 크

게 증가하게 된다<sup>23</sup>). OFT의 경우 우울, 불안 등으로 인하여 움직임 및 활동량이 크게 감소하게 되어 이동 거리가 감소하게 된다<sup>24</sup>). 따라서 FST와 OFT를 통하여 염증으로 유발된 우울증의 무력감, 우울증 등의 증상과 개선 정도를 확인할 수 있다. 본 연구에서도 마찬가지로 LPS group에서 FST의 immobility time은 유의하게 증가하였고, OFT의 distance는 감소하였다 (Fig. 5, 6). 하지만, 숙지황 추출물을 투여함에 따라서 FST의 immobility time은 감소하였고, OFT의 distance는 증가하였다. 이는 숙지황 추출물이 우울증으로 인한 행동 변화 개선에 도움을 줄 수 있음을 보여준다. 또한 행동 개선 효과와 유사하게 숙지황 추출물 투여가 뇌 염증 및 손상에 따른 염증성 cytokine 분비도 억제함(Fig. 7)에 따라 뇌 염증 및 우울 행동 개선 모두에 유효한 것으로 보인다.

이상의 실험 결과를 종합해 보면 미세아교세포 염증 모델과 LPS로 유도된 우울증 모델에서 숙지황은 미세아교세포의 염증 반응을 억제하고, 우울증 억제 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

## 결론

LPS로 자극된 미세아교세포 염증 모델 및 LPS로 유도된 마우스 우울증 모델에서 熟地黃의 뇌염증 억제 효과와 항 우울 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS 자극에 의해 활성화된 미세아교세포 염증 모델에서 熟地黃 처리는 염증성 cytokine의 생성을 억제하였으며, nitrite같은 염증물질의 분비를 감소시켰다.
2. LPS 자극에 의해 활성화된 미세아교세포에 熟地黃 처리는 JNK, ERK, p38 인산화를 억제하였고, Ik-B $\alpha$ 의 분해를 감소시켰다.
3. LPS로 유도된 마우스 우울증 모델에서 熟地黃 경구투여는 FST 및 OFT에서 우울 행동 개선효과를

보였다.

4. LPS로 유도된 마우스 우울증 모델에서 熟地黃 경구투여는 뇌의 염증성 cytokine의 생성을 억제하였다.

이상의 결과로 보아 熟地黃은 LPS로 자극된 미세아교세포 염증과 마우스 우울증 모델에서 항염증 효과를 통하여 우울증 개선에 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 따라서, 熟地黃은 추후에 임상적으로 우울증 관련 질환을 예방 및 치료하는 효과적인 후보 한약 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. WHO. Pharmacological treatment of mental disorders in primary health care (Geneva: World Health Organization) 2009.
2. Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., & Merikangas, K. R. (2003). The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA*, 289, 3095-3105.
3. Greenberg, P. E., Kessler, R. C., Birnbaum, H. G., Leong, S. A., Lowe, S. W., & Berglund, P. A. (2003). The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000? *J Clin Psychiatry*, 64, 1465-1475.
4. Hidaka, B. H. (2012). Depression as a disease of modernity: explanations for increasing prevalence. *J Affect Disord*, 140, 205-214.
5. Tiemeier, H. (2003). Biological risk factors for late life depression. *Eur J Epidemiol*, 18, 745-750.
6. Torres, G. E., Gainetdinov, R. R., & Caron, M. G. (2003). Plasma membrane monoamine

- transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci*, 4, 13-25.
7. Baldessarini, R. J. (1975). The basis for amine hypotheses in affective disorder, A critical evaluation. *Arch Gen Psychiatry*, 32(9), 1087-1093.
  8. Sapolsky, R., Rivier, C., Yamamoto, G., Plotsky, P., & Vale, W. (1987). Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*, 238(4826), 522-524.
  9. Lee, M. S. (2000). Antidepressants and related drug interactions. *Koeran J Biol Psychiatry*. 7(1), 21-33.
  10. Sarko, J. (2000). Antidepressants, old and new. A review of their adverse effects and toxicity in overdose. *Emerg Med Clin North Am*, 18, 637-654.
  11. Maes, M. (1995). Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 19(1), 11-38.
  12. Song, H. R., Woo, Y. S., & Bahk, W. M. (2013). Depression as an inflammatory disease. *Korean J Psychopharmacol*, 24(1), 5-10.
  13. Oh, H. M., Kim, S. W., Oh, Y. T., Son, C. G., & Lee, J. S. (2017). A comparative study on pathophysiology of depression by Korean medicine and conventional medicine. *Journal of Haehwa Medicine*, 26(1), 11-18.
  14. Kim, E.S. (2011). A study on the concept of Ul(鬱) in medical history- Focused on the theory submitted by Zhang-Zihe(張子和). *J Oriental Medical Classics*, 24(1), 73-84.
  15. Mao, Q. Q., Ip, S. P., Xian, Y. F., Hu, Z., & Che, C. T. (2012). Anti-depressant-like effect of peony: a minireview. *Pharmaceutical Biology*, 50, 72-77.
  16. Yoon, J. P. (2011). Evaluation of the remedy for neuronal diseases from *Rehmannia glutinosa* Liboschitz and elucidation of their underlying mechanisms. MS Thesis. Daegu Haany University, Daegu, Korea.
  17. Kim, J. K. & Cho, B. K. (1995). *Oriental traditional medicine primaries book*. Seoul: Younglim.
  18. Liu, Z. Y. (1984). Comparison of monosaccharide contents between the raw and prepared roots of *Rehmannia*. *Zhong Yao Tong Bao*, 9, 17-18.
  19. Ni, M., Bian, B., & Wang, H. (1992). Constituents of the dry roots of *Rehmannia glutinosa* Libosch. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 17, 297-298.
  20. Min, A. Y., Son, A.Y., Kim, H. J., Shin, S. K., & Kim, M. R. (2015). Quality characteristics and antioxidant activities of noodles added with *Rehmanniae Radix Preparata* powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 44(3), 386-392.
  21. Kong, F., Lee, B. H., & Wei, K. (2019). 5-Hydroxymethylfurfural mitigates lipopolysaccharide-stimulated inflammation via suppression of MAPK, NF- $\kappa$ B and mTOR activation in RAW 264.7 cells. *Molecules*, 24(2), 275.
  22. Custódio CS, Mello BSF, Cordeiro RC, de Araújo FYR, Chaves JH, Vasconcelos SMM, et al. Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice. *Eur J Pharmacol*. 2013; 713: 31-38.
  23. Detke, M. J., Rickels, M., & Lucki, I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming

- test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology*, 121(1), 66-72.
24. Hsiao, Y. T., Yi, P. L., Li, C. L., & Chang, F. C. (2012). Effect of cannabidiol on sleep disruption induced by the repeated combination tests consisting of open field and elevated plus-maze in rats. *Neuropharmacology*, 62(1), 373-384.
25. Mao, Q. Q., Ip, S. P., Ko, K. M., Tsai, S. H., & Che, C. T. (2009). Peony glycosides produce antidepressant-like action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress: Effects on hypothalamic- pituitary adrenal function and brain-derived neurotrophic factor. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(7), 1211-1216.
26. Stetler, C. & Miller, G. E. (2011). Depression and hypothalamic-pituitary adrenal activation: a quantitative summary of four decades of research. *Psychosom Med*, 73, 114-126.
27. Schiepers, O. J., Wichers, M. C., & Maes, M. (2005). Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29, 201-217.
28. Maletic, V., Robinson, M., Oakes, T., Iyengar, S., Ball, S. G., & Russell, J. (2007). Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Int J Clin Pract*, 61, 2030-2040.
29. Dantzer, R., O'Connor, J. C., Lawson, M. A., & Kelley, K. W. (2011). Inflammation-associated depression: From serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology*, 36(3), 426-436.
30. Lee, J. E., Kwon, Y. J., & Cho, S. H. (2011). A review of clinical studies with herbal medicine for depression - based on randomized controlled clinical trial. *J of Oriental Neuropsychiatry*, 22(4), 31-40.
31. Son, S. H. & Son, P. I. (1985). *Shinnongboncho -Gyeong*. Taipei: Oju Publisher.
32. San, S. (1994). *Bonchdogyong*. Hefei: Anhui Science and Technology Publisher.
33. Park, S.J., Park, H.S., & Yoo, S. O. (1998). Effects of supplementation of *Rehmannia Radix* on performance and physiological status in broiler chicks. *Korean J Poul Sci*, 25, 195-202.
34. Tomoda, M., Miyamoto, H., & Shimizu, N. (1994). Structural features and anti-complementary activity of rehmnan SA, a polysaccharide from the root of *Rehmannia glutinosa*. *Chem Pharm Bull*, 42, 1666-1668.
35. You, B. R., Kim, H. R., Kim, H. J., Lee, J. Y., Lee, S. Y., Song, M. R., et al. (2011). Catalpol content and antioxidant activities in various cultivars of *Rehmannia glutinosa*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 40, 481-485.
36. Oh, H. L., You, B. R., Kim, H. J., Lee, J. Y., Kim, N. Y., Song, J.E., et al. (2011). Quality characteristics and antioxidant activities of *Rhmanniae Radix* paste. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 40, 1518-1524.
37. Cho, S. I. (2005). Effects of the *Rehmanniae Radix* Preparat on Ovariectomized Rats. *Kor J Herbol*, 20(4), 61-67.
38. Thao, D., Roger, M., Susan, V., & Carl W. (2008). *Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology*. Seoul: Shinilbooks.
39. Abbas, A. K., Lichtman, A.H., & Pillai, S. (2008). *Cellular and Molecular Immunology*, 6/E. Seoul: Epublic.

## ORCID

김응선 <https://orcid.org/0000-0002-1028-2596>

정명수 <https://orcid.org/0000-0002-8140-9566>