

## 清火補心湯이 憂鬱症 模型動物의 絶望行動, 不安 및 腦의 TH 와 c-Fos 發顯에 미치는 效果

조충훈 · 신현규\* · 황의완  
경희대학교 한의과대학, \* 한국한의학연구원

### Abstract

#### **Effects of Chengwhabosintang on depression, anxiety, TH and c-Fos of the brain in the CMS treated rats.**

Cho Chunghoon, Shin Hyeunkyo\*, Whang Weiwan  
College of Oriental Medicine, Kyung Hee University  
\* Korea Institute of Oriental Medicine

**Objective :** This study was designed to assess the protective effects of Chengwhabosintang on the animal model of depression, chronic mild stress(CMS).

**Method :** Male Sprague-Dawley rats were used for this experiment. The subjects were divided into 3 groups ( 1. CMS-drug: Chengwhabosintang administered during CMS treatment, 2. CMS-vehicle: water administered, 3. normal ). After 4 weeks of CMS treatment, they were executed Forced swimming test(FST) and Elevated plus maze. Tyrosine hydroxylase(TH) in ventral tegmental area(VTA) and c-Fos in paraventricular nucleus(PVN) were measured.

**Result :**

1. In FST, CMS-drug group showed significantly decreased immobility behavior.
2. CMS-drug group showed no significantly lower TH level in VTA than CMS-vehicle group.
3. CMS-drug group showed significantly less c-Fos expressed cell bodies in PVN than CMS-vehicle group.
4. In Elevated plus maze, CMS-drug group showed no significantly anxiety.

**Conclusion :** These results suggest that Chengwhabosintang may have protective antidepressant effects in CMS model rats. And these effects could be explained by the elevated stress-coping behaviors which are related with PVN of hypothalamus and dopaminergic neurons in VTA.

**Key words :** Chengwhabosintang, chronic mild stress, forced swimming test, elevated plus maze, tyrosine hydroxylase, c-Fos.

## I. 序 論

우울증은 임상에서 흔히 대하게 되는 질환으로써 우울 기분, 흥미나 즐거움의 상실, 식욕·체중·수면·정신운동 활동에서의 변화, 감소된 에너지, 무가치감, 죄책감, 반복되는 죽음에 대한 생각 등의 증상을 포괄하는 정신 장애<sup>4,5,6</sup>이다.

鬱證은 『內經』<sup>9</sup>의 『素問·至眞要大論』에서 "諸氣臏鬱 皆屬於肺"라 하여 처음 소개되었으며, 『素問·本病論』에서 "久而化鬱", "日久成鬱", "伏之化鬱"이라 하고 『素問·刺法論』에서 "抑之鬱發"이라 하여 급성적이라기 보다는 만성적인 억압으로 말미암아 형성되는 舒暢, 通暢되지 못하는 상태로 설명되었고, 후대로 갈수록 정신적인 개념의 의미가 커져 明代의 張<sup>41</sup>이 怒鬱, 思鬱, 憂鬱 등의 情志之鬱 이라는 개념을 설정한 후 憂鬱症을 포함하는 의미가 되었다.

우울증을 실험적으로 연구하기 위한 여러 동물모형<sup>73,81,85,88,90,91</sup>이 제시되었는데, 그 중에서 가장 널리 사용되는 것은 Willner<sup>90</sup>등에 의해 제안된 chronic mild stress(CMS)모형이다. 이 모형에서는 여러 가지의 예측 불가능한 경미한 스트레스 자극들을 실험동물에게 만성적으로 가하면 실험동물들은 자당 용액(sucrose)을 정상동물에 비해 적게 섭취하게 되는데, 이는 우울증의 무쾌감증과 유사한 것으로 간주된다.

현재까지 CMS 모델을 이용한 憂鬱症 연구로는 分心氣飲<sup>24,26</sup>에 대한 연구를 비롯하여, 歸脾湯<sup>20,25</sup>, 歸脾溫膽湯<sup>31,33</sup>, 補血安神湯<sup>27,32</sup>, 遠志石菖蒲散<sup>13,34</sup>등에 대한 연구가 있었다. 그러나 遠志石菖蒲散에 대한 연구를 제외하고는 자당섭취량 측정 및 행동실험으로 치료 효과를 연구한 것이었고, 예방적인 측면에서의 연구는 없었다.

이번 실험에 사용된 淸火補心湯은 東洋醫學診療要鑑<sup>2</sup>에 心肝鬱火로 인한 精神衰弱 脫營 失情 등에

효능이 있다고 소개된 처방으로, 東醫寶鑑<sup>8</sup>의 淸心溫膽湯을 기본으로 창방되었다. 淸心溫痰湯은 古今醫鑑<sup>35</sup>에 처음 收錄된 이후 역대 문헌<sup>35,36,42</sup>에서 平肝解鬱, 淸火化痰, 益心血하는 효능이 있는 것으로 기록되어 있다. 따라서 淸火補心湯은 정신적인 억울로 유발된 우울상태를 해소할 수 있을 것으로 사료되었다.

이에 저자는 淸火補心湯의 우울증에 미치는 예방적 효과에 대해 알고자, 우울증 모델 흰쥐에 CMS 처치를 하면서 검약을 투여하고, 체중변화 및 강제수영검사(forced swimming test: FST)를 통해 우울성향을 측정하였고, 고가미로 실험(elevated plus maze: EPM)을 통해 우울증에 흔히 동반되는 불안성향에 대한 효과를 알아보았다. 또, 면역조직화학적 기법을 이용하여, ventral tegmental area (VTA)에서 도파민의 대사에 관여하는 효소인 tyrosine hydroxylase (TH)의 수준과, 시상하부의 paraventricular nucleus (PVN)에서 스트레스를 받으면 발현이 증가되는 것으로 알려진 c-Fos 단백질의 발현을 측정하여 유의미한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實驗

### 1. 動物 및 藥材

#### 1) 動物

Sprague Dawley종의 수컷 흰쥐가 피험동물로 사용되었다. CMS 처치 직전 동물의 체중은 약 260g이었다. 동물은 3~4마리씩 집단 사육하였고 사육실의 실온은 23±2℃로 유지시켰다. 물과 먹이는 충분히 제공하였고 주야 주기는 12시간씩 인위적으로 조절하였다. CMS 처치가 시작되면서 통제동물은

원래의 사육실에 그대로 두었고, 스트레스 처치를 받는 동물들은 크기와 조건이 동일한 다른 사육실로 옮겼다. 이는 CMS 처치에 압박이는 불빛과 소음과 같은 스트레스 자극이 포함되어 있었기 때문이었다.

투여되었다. 이 집단은 약물처치에 대한 통제군으로 사용되었다.

③ 實驗群 : 4주간의 CMS 처치를 받는 동안 淸火補心湯을 투여 받는 집단으로 약물처치에 대한 實驗群으로 사용되었다.

2) 實驗群 設定 및 處置

본 연구에는 각각의 집단별로 13마리씩 모두 3 집단의 동물이 사용되었다.

- ① 正常群 : CMS 처치를 받지 않는 집단으로 CMS 처치에 대한 통제군으로 사용되었다.
- ② 對照群 : CMS 처치를 받지만 약물투여는 받지 않는 집단으로 약물 대신에 vehicle로 물이

3) 藥材

본 실험에서 使用한 藥材는 慶熙大學校 附屬韓方病院에서 購入하여 정선한 약재를 사용하였다. 處方の 內容은 東洋醫學診療要鑑<sup>2)</sup>에 수록된 淸火補心湯의 處方重量을 基準으로 하였으며 處方內容과 한 첩에 해당하는 分量은 Table I과 같다(단, 1錢은 4.0g으로 환산함).

Table 1. Contents of Chengwhabosimtang

Drug Name	Botanical Origin	Dose(g)
香附子 ( <i>Cyperi Rhizoma</i> )	<i>Cyperus rotundus</i>	8.0
川芎 ( <i>Cnidii Rhizoma</i> )	<i>Cnidium officinale</i>	4.0
蒼朮 ( <i>Atractylodis Rhizoma</i> )	<i>Atractylodes japonica</i>	4.0
半夏 ( <i>Pinelliae Rhizoma</i> )	<i>Pinellia ternata</i>	4.0
陳皮 ( <i>Citri Pericarpium</i> )	<i>Citrus nobilis</i>	4.0
黃連 ( <i>Coptidis Rhizoma</i> )	<i>Coptis japonica</i>	4.0
連翹 ( <i>Forsythiae Fructus</i> )	<i>Forsythia koreana</i>	4.0
蓮子肉 ( <i>Nelumbinis Semen</i> )	<i>Nelumbo nucifera</i>	4.0
枳實 ( <i>Aurantii Immaturus Fructus</i> )	<i>Poncirus trifoliata</i>	3.0
竹茹 ( <i>Bambusae Caulis In Taeniam</i> )	<i>Phyllostachys nigra</i>	3.0
山梔子 ( <i>Gardeniae Fructus</i> )	<i>Gardenai jasminoides</i>	3.0
麥門冬 ( <i>Liriopis Tuber</i> )	<i>Liriope graminifolia</i>	3.0
石菖蒲 ( <i>Acorus gramineus Rhizoma</i> )	<i>Acorus gramineus</i>	3.0
遠志 ( <i>Polygalae Radix</i> )	<i>Polyala tenuifolia</i>	3.0
甘草 ( <i>Glycyrrhizae Radix</i> )	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	3.0
生薑 ( <i>Zingiberis Rhizoma</i> )	<i>Zingiber officinale</i>	4.0
大棗 ( <i>Zizyphi inermis Fructus</i> )	<i>Zizyphus jujuba</i>	4.0
Total amount		65.0

## 2. 方法

### 1) 檢液의 調製

실험에 사용된 淸火補心湯은 Table I 에 제시된 처방 약재를 10첩 단위로 전탕 후 냉동건조하여 분말 상태로 만들어 사용하였다. 우선, 약재 1첩당 물(시중에서 판매되는 생수를 이용하였음) 300cc의 비율로 혼합하여 환류냉각 장치에서 3시간 동안 가열 후, 1차 전탕액을 얻는다. 이 전탕액을 다시 회전식 진공 플라스크에 넣고 감압농축시켜 2차 원액을 얻는다. 2차 원액은 다시 냉동건조절차를 거쳐 고체 형태의 추출물로 만들어진다. 이 과정에서 약재 1첩당 약 10g의 추출물이 얻어지게 되며, 추출물은 분쇄기를 이용해 분말상태로 만들어 이용하였다. 실험이 진행되는 동안 분말 상태의 약재는 냉장보관 하였다.

### 2) 檢液의 投與

분말상태의 추출물을 하루 투여량 만큼씩 물에 녹여 현탁액을 만든 후, 경구투여용 주사기를 이용해 실험동물의 위로 바로 주입하였다. 인간의 경우(체중 60kg 기준) 淸火補心湯은 1일 처방량이 2첩이고, 이는 정제된 추출물 20g에 해당된다. 이를 기준으로 실험동물에게 투여할 양을 인간 1일 처방량의 5배로 계산하면 1일 투여량이 1.7g/kg이 된다. 첫 날 검액을 투여하기 전에 동물의 체중을 측정하여 첫 날의 투여량을 결정하였고, 그 후에는 1주일 마다 체중을 측정하여 투여량을 조절하였다. 실제 동물에게 투여된 현탁액의 양은 8 ml/kg이었다. 對照群의 쥐들에

게는 동일한 양의 물을 경구투여 하였다.

### 3) Chronic mild stress 節次

동물에게 가해진 스트레스 자극에는 물 또는 먹이 박탈, 주야 주기의 역전, 과밀집, 사회적 격리, 압박이는 불빛, 소음, 사육 상자 기울이기, 그리고 축축한 깔짚 등이 포함되었다. 이들 다양한 스트레스 자극들을 적절하게 배열하여 1주일 단위의 스트레스 프로토콜을 만들었고(Figure 1), 동물은 언제 어떤 종류의 스트레스가 제시될지 예측할 수 없다. 이렇게 만든 스트레스 프로토콜에 따라 다양한 상황에 동물을 4주간 반복해서 노출시켰다. CMS 처치 기간동안 1주일 간격으로 몸무게를 측정하여 관찰하였고, 이를 기준으로 약물 투여량을 조절하였다.

### 4) Forced swimming test의 裝置 및 節次<sup>51,79)</sup>

투명 아크릴로 제작된 원통형 수조(지름 20cm, 높이가 40cm)가 실험장치로 사용되었다. 이 수조에 25cm 높이로 물(25℃)을 채우고 동물을 넣는다. 실험은 4주의 CMS 처치가 끝난 다음날부터 2일 연속해서 실시되었고, 각 실험집단별로 각각 15마리씩의 동물이 사용되었다. 적응시행인 첫째 날에는 동물을 15분간 물이 담긴 수조에 넣어 어떤 처치도 가하지 않은 채 자유롭게 수영하게 하였다. 15분이 경과하면 동물을 끄집어내어 마른 수건으로 닦은 다음 따뜻한 곳에 두어 몸의 물기가 마르게 하였다. 24시간이 경과한 두 번째 날에는 동일한 수조에 동물을 넣고 5분간 수영하게 하였다.

Figure 1. Chronic Mild Stress Protocol. FD: food deprivation, WD: water deprivation, SS: stroboscope illumination, Tilt: tilt cage (45.), TH: tripled housing, MC: mouse cage, RF: restricted access to food (scattering of ground food), SC: soiled cage (100ml water in bedding), LOF: light off, LON: light on, SI: sucrose intake, EB: empty water bottle, WN: white noise.

time	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5	D-6	D-7		
01:00	WD FD MC (20h)	TH (20h)	WD (15h)	WN(2h)	WD FD (18h)	MC (22h)	SC (18h)	LOF (12h)	WN (2h)
02:00				WN(2h)					WN (3h)
03:00				WN(2h)					WN (1h)
04:00				WN(2h)					WN (1h)
05:00				WN(2h)					WN (1h)
06:00				WN(2h)					WN (1h)
07:00				WN(2h)					WN (1h)
08:00				WN(2h)					WN (1h)
09:00				WN(2h)					WN (1h)
10:00	SI(1h)	SS (7h)	Tilt (7h)	EB (2h)	RF (2h)	SS (9h)	LON (12h)	Tilt (8h)	
11:00				SS (4h)					
12:00				SS (2h)					
13:00				SS (2h)					
14:00				SS (2h)					
15:00				SS (2h)					
16:00				SS (2h)					
17:00				SS (2h)					
18:00				SS (2h)					
19:00	TH (20h)	WD (15h)	WN (3h)	SS (2h)	MC (22h)	SC (18h)	LOF (12h)	WN (3h)	WD FD MC (20h)
20:00				WD FD (18h)					
21:00				WD FD (18h)					
22:00				WD FD (18h)					
23:00				WD FD (18h)					
24:00				WD FD (18h)					

동물이 수영하는 동안 숙련된 실험자가 3초에 한 번씩 동물의 행동을 관찰하여 기록하였다(총 100 회). 기록된 행동은 수영(swimming), 기어오르기(climbing), 그리고 무활동(immobility)이었다. 무활동은 동물이 물에 빠지지 않기 위해서 자세를 유지하는 행동 외에 다른 행동이 나타나지 않는 것이다. 이는 물에 빠진 동물이 물에서 벗어나기 위한 시도를 포기했음을 의미하는 행동(behavioral despair)인 동시에 우울증의 한 행동유형으로 간주되어<sup>75)</sup> 항우울제의 효과를 검증하는 연구에 많이 사용된다. 그러므로 FST에서 동물이 무활동을 많이 보인다는 것은 우울 성향이 높은 것으로, 수영이나 기어오르기와 활동성 유목이 많이 나타나면 우울 성향이 낮은 것으로 해석된다.

#### 5) Elevated plus maze의 裝置 및 節次<sup>84)</sup>

본 실험에 사용된 장치는 검은 아크릴로 제작된 바닥에서 50cm 높이에 설치된 십자형(■) 미로이다. 4개의 통로 가운데 마주보는 2개(길이 50cm, 폭 10cm, 높이 2cm)는 개방되어 있고, 크기가 동일한 다른 2개의 통로는 높이 50cm의 벽으로 둘러싸여 있다. 좁고 어두운 곳을 선호하는 흰쥐의 특성으로 피험동물은 벽이 설치된 폐쇄통로(closed arm) 보다는 벽이 없는 개방통로(open arm)에서 더 많은 불안을 느끼기 때문에 불안이 많은 동물일수록 개방통로에 머무는 시간이 짧다. 미로는 두 개의 백열전구(60W 220V) 조명 하에 설치되고, 미로의 중앙부 천장에 카메라를 설치하여 SmaTracker V 1.3 (SmarTech, USA)를 사용하여 동물의 행동을 기록하고 분석하였다. CMS 처치 종료후 10~12일 사이에 EPM을 실시하였다. 실험이 시작되기 30분전에 동물을 행동 관찰실로 옮겨 실험 상황에 적응시켰다. 그 후 동물을 고가미로의 중앙, 즉 개방통로와 폐쇄통로가 만나는 교차지점에 올려놓았다. 이때 동물이 개방통로

를 향하도록 하였다. 이런 상황에서 사후의 행동 분석을 위해 동물의 행동을 8분 동안 기록하였다. 한 동물에 대한 실험이 종료되면 그 동물이 남긴 냄새를 없애기 위해서 미로를 깨끗이 닦아 내었다. 분석한 행동은 1) 전체 시간에 대한 개방통로에서 머문 시간의 비율, 2) 개방통로에 들어간 횟수, 그리고 3) 전체 통로를 돌아다닌 횟수 등이 포함되었다. 이들 행동유형을 많이 보이는 동물일수록 불안 수준이 낮은 것으로 해석된다.

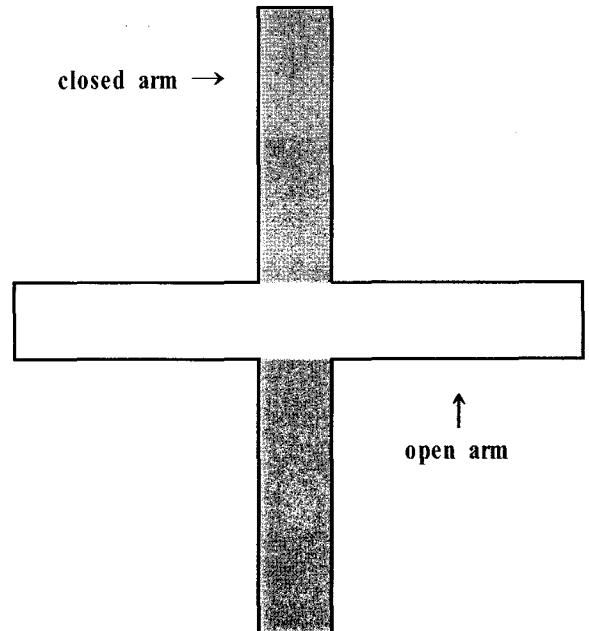


Figure 2. Elevated plus maze apparatus. Dark sides indicate closed arms and bright sides indicate open arms

#### 6) VTA에서 TH 水準의 測定<sup>14,86)</sup>

4주간의 스트레스 및 약물 처치 후 동물을 식염수(100ml)에 이어 10% 포르말린 용액(500ml, 0.2 M phosphate buffer와 혼합)으로 심장을 통해 관류하였다. 500ml의 포르말린 용액중 200ml는 처음 5

분간, 나머지 300 ml는 25분간 주입하면서 고정시켰다. 그 다음 뇌를 적출하여 동일한 고정액에 3시간 동안 고정시켰고, 20%의 sucrose가 함유된 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2)에 넣어 4℃에서 하루 밤 동안 보관하였다가 냉동절편기로 30 $\mu$ m 두께의 뇌절편을 만들었다. 이 절편을 PBS로 3~4회 세척하여 primary anti mouse TH (Diasorin)에 노출시켰다(4℃, 72시간). primary antibody는 0.3% Triton-X100(PBST)에서 2% normal rabbit serum과 0.001% keyhole limpets hemocyanin (Sigma)으로 1000배 희석하여 준비하였다. 그 후 뇌절편을 PBST로 세척하고 2시간 동안 실온에서 2% normal rabbit serum을 함유하는 PBST로 200배 희석한 biotinylated rabbit anti-sheep serum (Vector Laboratories)에 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 다음 뇌절편을 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent (Vector Laboratories)에 담갔다. 그 후 PBS로 3~4회 헹군 다음 뇌절편을 착색제(diaminobenzidine)로 발현시켰다.

염색이 완료된 뇌절편을 현미경하에서 VTA를 중심으로 100 배 확대하여 조직사진을 촬영하였다. 조직사진에서 TH가 가장 많이 발현된 부위를 선택한 후 Scion Image Program을 사용하여 TH 발현 정도를 density로 측정하였다.

buffer saline (PBS, pH 7.2)에 넣어 4℃에서 하루 밤 동안 보관하였다가 냉동절편기로 30 $\mu$ m 두께의 뇌절편을 만들었다. 이 절편을 PBS로 3~4회 세척하여 Fos 발현 연구에 가장 널리 사용되는 primary sheep anti-Fos antibody (Cambridge Research Biochemicals)에 노출시켰다 (4℃, 72시간). primary antibody는 0.3% Triton-X100 (PBST)에서 2% normal rabbit serum과 0.001% keyhole limpets hemocyanin (Sigma)으로 2000배 희석하여 준비하였다. 그 후 뇌절편을 PBST로 세척하고 2시간 동안 실온에서 2% normal rabbit serum을 함유하는 PBST로 200배 희석한 biotinylated rabbit anti-sheep serum (Vector Laboratories)에 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 다음 뇌절편을 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent (Vector Laboratories)에 담갔다. 그 후 PBS로 3~4회 헹군 다음 뇌절편을 착색제(diaminobenzidine)로 발현시켰다.

완성된 뇌절편을 현미경에 올리고 100배 확대하여 조직사진을 촬영하였다. 사진에서 paraventricular nucleus(PVN:실방핵)의 중앙부를 기준으로 2×2cm의 정사각형을 그리고, 그 영역에서 c-Fos가 발현된 cell body의 개수를 세어 발현 정도에 대한 지표로 삼았다.

### 7) PVN에서 c-Fos가 發顯된 細胞體 數의 測定<sup>61,69,72)</sup>

4주간의 스트레스 및 약물 처치 후 동물을 식염수(100 ml)에 이어 10% 포르말린 용액(500 ml, 0.2M phosphate buffer와 혼합)으로 심장을 통해 관류하였다. 500 ml의 포르말린 용액중 200 ml는 처음 5분간, 나머지 300 ml는 25분간 주입하면서 고정시켰다. 그 다음 뇌를 적출하여 동일한 고정액에 3시간 동안 고정시켰고, 20%의 sucrose가 함유된 phosphate

### 8) 統計分析

자료는 집단별 평균(mean)과 표준오차(SEM)로 나타내었다. FST와 EPM에서 측정된 자료는 일원변량분석(one-way ANOVA)과 필요시 Duncan의 방법을 사용하여 개별 비교하였다. 체중변화는 반복측정하의 이원변량분석(two-way ANOVA with repeated measures)으로 처리하였고, 각각의 측정 시기에서 집단간 비교를 위한 단순주효과 분석과 Duncan의 개별 비교를 실시하였다. 면역조직화학 자료의 분석

에도 FST와 EPM과 동일한 방법을 적용하였다. 모든 통계분석에서 통계적 유의성을 판단하는 기준은  $p < .05$ 였다.

### III. 實驗成績

#### 1. Chronic mild stress 處置에 따른 體重 變化

4주간의 CMS 절차를 실시하면서 1주일 간격으로 모든 집단의 동물의 체중을 측정하여 그 결과를 아래의 Table II와 Figure 3에 제시하였다. 표와 그림에서 볼 수 있듯이 CMS 처치만 받은 對照群과 實驗群의 체중은 정상군에 비해 유의미하게 낮았다 [ $F(2, 33)=37.86, p < .01$ ]. 또한 淸火補心湯을 처치한 實驗群의 체중이 week 2에서 통계적으로 유의하게 對照群보다도 낮았으나, 그 이외에는 두 집단간 차

이가 없었다.

#### 2. Forced swimming test 實驗結果

FST에서 관찰한 무활동(immobility), 수영행동(swimming), 그리고 기어오르기(climbing)의 집단별 성적을 Table III과 Figure 4에 제시하였다. 세 집단을 대상으로 변량분석한 결과 무활동 [ $F(2, 36)=9.41, p < .01$ ]과 수영행동 [ $F(2, 36)=8.81, p < .01$ ]에서는 집단간 차이가 통계적으로 유의미하였으나, 기어오르기 [ $F(2, 36)=0.20, p=.35$ ]에서는 집단간에 차이가 없었다.

집단간 차이가 있는 두 가지 행동유형을 Duncan의 방법으로 비교분석해보면 무활동은 다른 두 집단에 비해 對照群에서 더 많이 나타났고( $p < .05$ ), 수영행동에서는 實驗群의 성적이 다른 두 집단에 비해 유의미하게 높았다( $p < .05$ ).

Table 2. Body Weight Changes during 4 Weeks of Chronic Mild Stress Procedure

Group	baseline	week 1	week 2	week 3	week 4
Normal	265.38±3.18	327.31±4.76	373.08±4.99	405.77±8.14	426.54±8.17
CMS-vehicle	264.62±2.86	288.08±4.37	326.15±6.65	338.85±7.10	363.85±8.57
CMS-drug	267.31±2.87	283.08±3.65	311.15±3.45	327.31±4.33	359.23±4.73
Comparisons*	NS	N>Cv=Cd	N>Cv>Cd	N>Cv=Cd	N>Cv=Cd

All values are Mean±SEM (unit: g), n=13

Normal: normal group without CMS

CMS-vehicle: group with CMS administered Water

CMS-drug: group with CMS administered Chengwhabosimtang

NS: not significant, N: Normal, Cv: CMS-vehicle, Cd: CMS-drug

\*:Duncan's method was used in the multiple comparison ( $p < .05$ )



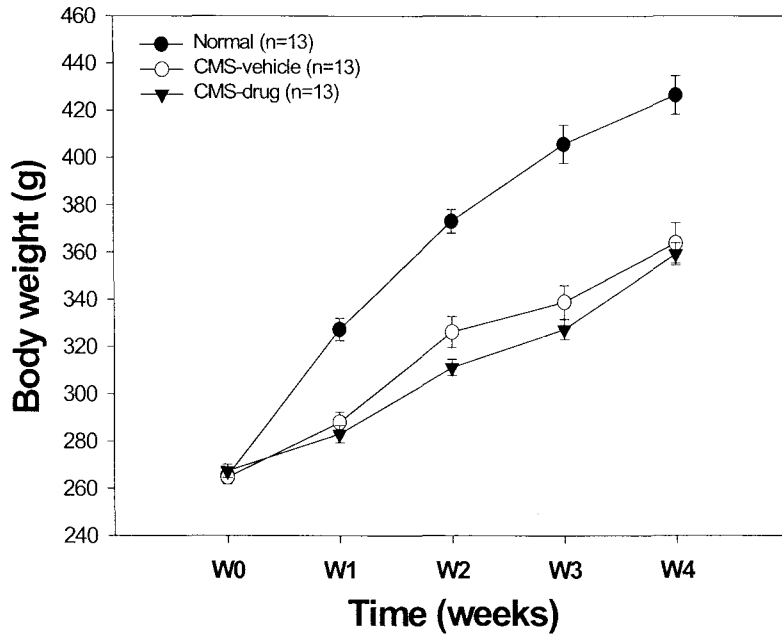


Figure 3. Body weight changes during 4 weeks of CMS. Data are shown as mean  $\pm$  SEM

Table 3. Frequency of Each Behavior Measured in Forced Swimming Test Following CMS

Behavioral types	Normal	CMS-vehicle	CMS-drug	Comparisons*
Immobility	35.69 $\pm$ 1.58	42.08 $\pm$ 1.40	30.15 $\pm$ 2.63	N=Cd<Cv
Swimming	12.85 $\pm$ 1.88	8.46 $\pm$ 1.27	19.08 $\pm$ 2.13	N=Cv<Cd
Climbing	11.31 $\pm$ 1.01	10.23 $\pm$ 1.16	10.00 $\pm$ 1.35	NS

All values are Mean $\pm$ SEM (unit: number), n=13

NS: no significant difference, Cv: CMS-vehicle, Cd: CMS-drug, N: Normal

Normal: normal group without CMS

CMS-vehicle: group with CMS administered Water

CMS-drug: group with CMS administered Chengwhabosintang

\*:Duncan's method was used in the multiple comparison ( $p < .05$ )

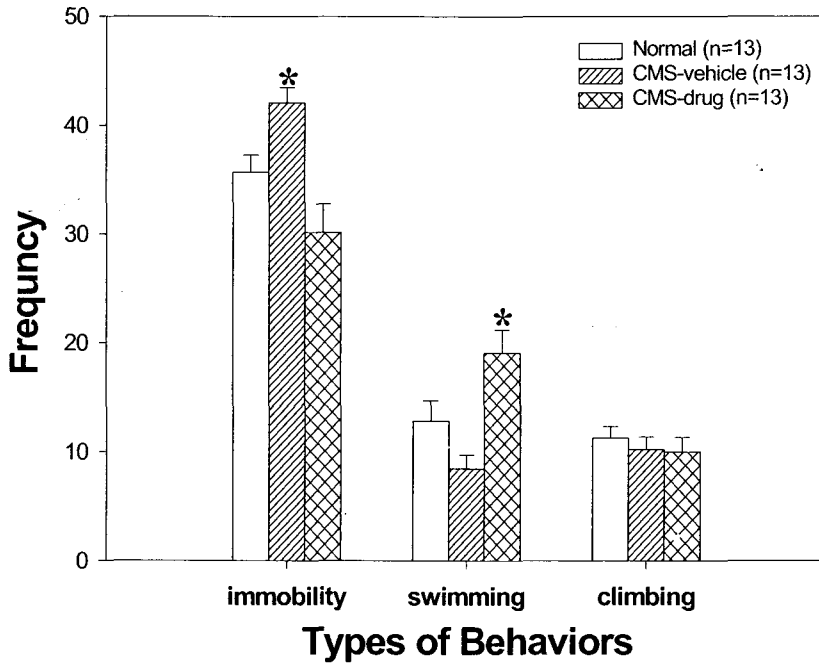


Figure 2. Frequency of behaviors measured in forced swimming test (Mean±SEM). Asterisks indicate that the differences between the marked group and other two groups were significant (Duncan's method,  $p < .05$ ). Normal: normal group without CMS, CMS-vehicle: group with CMS administered Water, CMS-drug: group with CMS administered Chengwhabosimtang

### 3. Elevated plus maze 實驗結果

EPM 실험에서 관찰한 1) 전체 시간에 대한 개방 통로에서 머문 시간의 비율, 2) 개방통로에 들어간 횟수, 그리고 3) 전체 통로를 돌아다닌 횟수의 집단별 성적을 Table IV와 Figure 5에 제시하였다. 세 집단을 대상으로 Duncan의 방법으로 변량분석한

결과 전체 통로 방문 횟수, 개방통로 방문횟수, 그리고 개방통로에 머문 시간 모두 집단간에 통계적으로 유의미한 차이가 나타나지 않았다.

Table 4. Observation of the Anxiety-Related Behavior in Elevated Plus Maze

Behavioral types	Normal	CMS-vehicle	CMS-drug	Comparisons*
Total arms visitation	119.75±5.961 <sup>1)</sup>	112.17±5.00	114.58±6.68	NS
Open arms visitation	19.67±3.97 <sup>1)</sup>	23.42±2.36	26.67±3.28	NS
Duration in open arms	152.00±14.12 <sup>2)</sup>	169.29±8.90	185.78±12.99	NS

All values are Mean±SEM (unit: <sup>1)</sup>time, <sup>2)</sup>sec), n=12

NS: no significant difference

Normal: normal group without CMS

CMS-vehicle: group with CMS administered Water

CMS-drug: group with CMS administered Chengwhabosintang

\*: Duncan's method was used in the multiple comparison (p<.05)

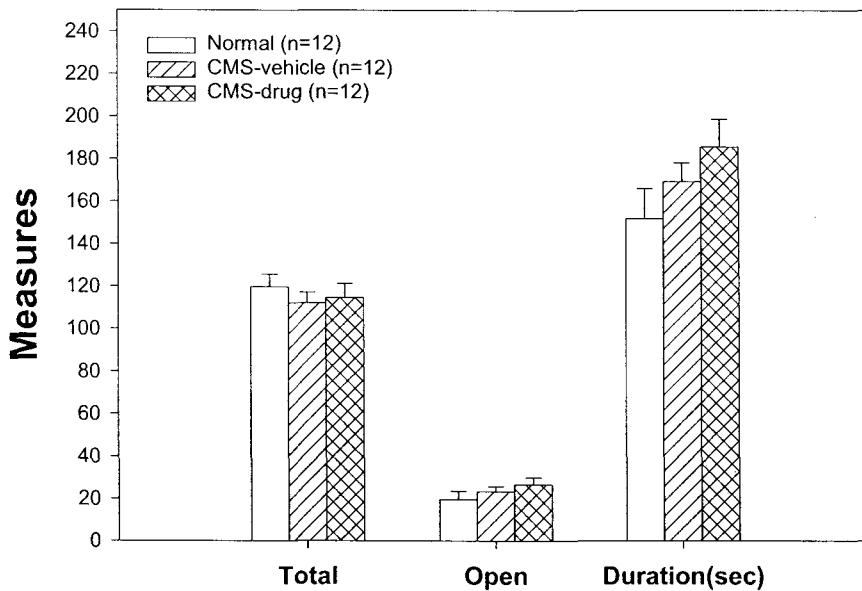


Figure 5. Observation of the Anxiety-related behavior in EPM (Mean±SEM). Normal: normal group without CMS, CMS-vehicle: group with CMS administered Water, CMS-drug: group with CMS administered Chengwhabosintang

#### 4. VTA에서 TH의 水準測定結果

VTA에서 TH 수준을 측정한 결과를 Table V와 Figure 6에 제시하였다. 세 집단을 대상으로 변량분석한 결과 집단간 차이가 통계적으로 유의미하였다

[F(2, 9)=8.045, p<.05]. 집단간 차이가 있으므로 VTA에서의 TH 수준을 Duncan의 중다비교법으로 비교하였다. 그 결과 VTA에서 TH 수준은 정상군에 비해 만성 스트레스에 노출된 對照群과 實驗群에서 높게 나타났다(p<.05).

Table 5. Optical Density of Tyrosine Hydroxylase in VTA Following CMS

	Normal	CMS-vehicle	CMS-drug	Comparisons*
TH	61.89±6.50	93.07±6.39	91.98±5.81	N<Cv=Cd

All values are Mean±SEM

NS: no significant difference, N: Normal, Cv: CMS-vehicle

Cd: CMS-drug

Normal: normal group without CMS

CMS-vehicle: group with CMS administered Water

CMS-drug: group with CMS administered Chengwhabosintang

\*: Duncan's method was used in the multiple comparisons (p<.05)

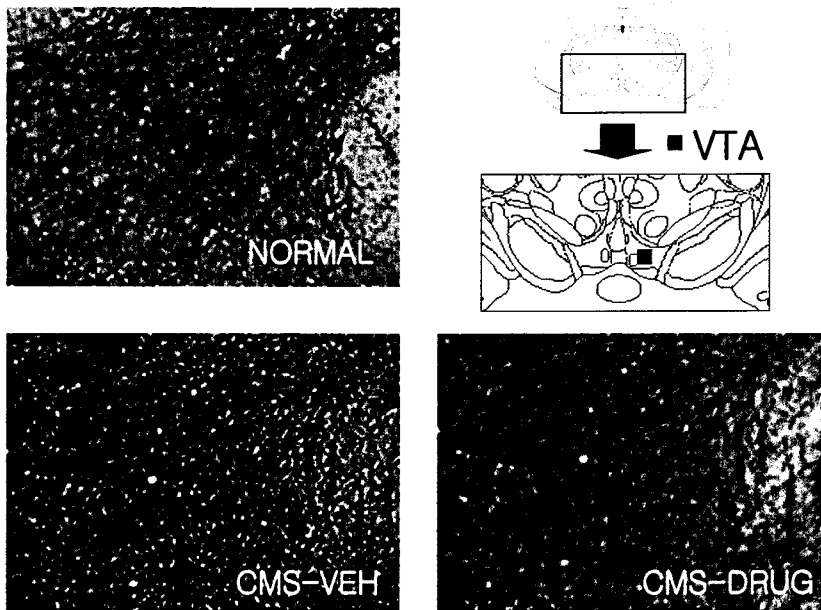


Figure 6. Tyrosine Hydroxylase in VTA following CMS treatment

Normal: normal group without CMS

CMS-VEH: group with CMS administered Water

CMS-DRUG: group with CMS administered Chengwhabosintang

VTA: ventral tegmental area

### 5. PVN에서 c-Fos가 發顯된 細胞體 數의 測定結果

스트레스 처치 후에 PVN에서 c-Fos가 발현된 세포체의 수 측정결과는 Table VI과 Figure 7과 같다.

이 결과들을 변량분석한 결과 집단간 차이가 관찰되었다[F(2, 9)=6.039, p<.05]. 이를 집단별로 비교해보면 對照群 > 實驗群 = 正常群 순으로 분석된다 (Duncan's method, p<.05).

Table 6. c-Fos Expression in PVN Following CMS Treatment

	Normal	CMS-vehicle	CMS-drug
c-Fos	37.75±5.21	63.92±2.69	45.04±7.50
Comparisons*	N=Cd<Cv		

All values are Mean±SEM (unit=cell number)

Normal: normal group without CMS

CMS-vehicle: group with CMS administered Water

CMS-drug: group with CMS administered Chengwhabosimtang

N: Normal, Cv: CMS-vehicle, Cd: CMS-drug

\*:Duncan's method was used in the multiple comparisons (p<.05)

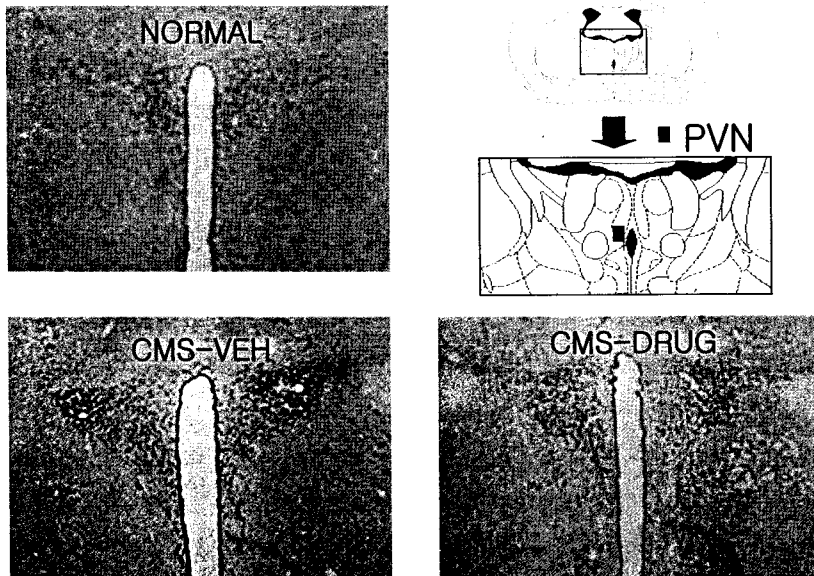


Figure 7. c-Fos expression in PVN following CMS treatment

Normal: normal group without CMS

CMS-VEH: group with CMS administered Water

CMS-DRUG: group with CMS administered Chengwhabosimtang

PVN: paraventricular nucleus

#### IV. 考 察

한의학의 鬱證은 서양의학의 우울증과 같은 단독 병명으로 체계가 이루어지지 않았지만 오늘날 우울증과 유사한 개념이 『內經』<sup>9)</sup>에서부터 언급되었는데, 『素問·至眞要大論』에서는 “諸氣臍鬱 皆屬于肺”라고 鬱을 처음 소개하였고, 『素問·六元正紀大論』에서는 “木鬱達之, 火鬱發之, 土鬱脫之, 金鬱泄之, 水鬱折之”라 하여 鬱證의 治療를 五氣와 결부시켜 나누었으며, 『素問·刺法論』의 “抑止鬱發”과 『素問·本病論』의 “久而化鬱, 日久成鬱, 抑之變鬱, 伏之化鬱” 등은 만성적인 억압으로 말미암아 형성되는 舒暢, 通暢되지 못한 상태를 말하였다. 鬱證에 대한 이러한 개념은 후대로 갈수록 정신적인 의미가 커져 憂鬱症과의 관련성이 깊어지는데, 明代의 張<sup>41)</sup>은 怒鬱, 思鬱, 憂鬱 등의 情志之鬱이라는 개념을 설정하였고, 清代의 葉<sup>38)</sup>은 “悲泣, 乃情懷內起之病, 病生于鬱...”라 하여 情志之鬱로 인한 임상증례를 다룸으로써 鬱證과 정신적인 측면 사이의 관련성을 제시하였다. 최근에 김<sup>1)</sup>은 憂鬱症을 억압되고 침울한 정신 상태로 인하여 모든 생리기능이 침체되는 현상으로 인식하고, 발산시킬 수 없는 욕구불만이나 지속되는 우울, 지나친 사려나 비탄 등이 원인이 되는 수가 많다고 해석하여, 일종의 독립된 병증으로 논술하면서 정서적 원인으로 생긴 협의의 鬱證을 憂鬱症의 한의진단명으로 사용하고 있다.

鬱證의 증상으로는 心下痞滿, 胸悶, 胸痛, 脇痛, 食欲不振, 食不化, 四肢沈重無力, 小便赤澀, 大便秘結, 難澀, 目赤, 耳鳴, 眩暈, 心悸, 心煩 등<sup>19)</sup>이 있는데, 강<sup>11)</sup>은 ICD-10의 우울증 증상 중 우울기분, 흥미와 즐거움의 상실, 집중력과 주의력의 감소, 죄의식이나 쓸모없다는 생각 등을 한의학적 鬱證의 증상과 연관된다 보았다.

鬱證의 원인과 병리에 대하여 中醫內科學<sup>37)</sup>에서는 크게 4가지로 나누어서 접근하고 있는데, 첫째는

悲哀憂愁傷心, 使心氣不足, 心血虧損, 心火亢盛로 인해 각종 心病症候가 나타나며, 둘째는 鬱怒傷肝, 肝失條達, 則氣機鬱滯하는 것이고, 셋째는 氣爲血師, 氣鬱日久, 則血瘀不行, 形成血鬱하는 것이며, 넷째는 思怒傷脾, 或肝鬱傷脾, 使脾失健運, 蘊濕生痰, 痰氣互結, 濕濁不和, 食滯不消로 痰鬱, 食鬱, 濕鬱을 형성하는 것으로, 크게 心 肝 脾 三臟이 관여한다고 보고 있다. 이러한 과정에서 心과 脾는 心生血, 脾統血하여 心脾血虛와 같은 증상을 함께 發하며, 肝과 脾는 木克土하는 관계로 肝氣의 鬱結이 脾胃系의 기능저하를 일으키기 때문에, 鬱證에 있어서 脾胃와 관련된 증상이 중요한 위치를 차지하고 있음을 알 수 있다.

鬱證의 治法에 대하여 이 등<sup>23,28,29)</sup>이 문헌적 고찰을 통해 초기에는 氣機가 鬱滯되므로 이를 해소하기 위한 祛痰 또는 順氣의 방법을 사용하고, 鬱이 오래되어 氣血의 耗損을 가져오게 되면 補氣血하는 방법을 사용한다고 제시한 바와 같이, 祛痰·順氣·補氣血의 세 가지의 치료법이 있다. 기존의 실험들에서도 順氣를 위주로 하는 分心氣飲<sup>24,26)</sup>과 補氣血을 목적으로 하는 補血安神湯<sup>27,32)</sup>, 歸脾湯<sup>20,25)</sup>, 補脾溫膽하는 歸脾溫膽湯<sup>31,33)</sup>, 溫膽湯, 祛痰하는 遠志石菖蒲散 등<sup>13,34)</sup>이 이미 사용된 바가 있으나, “鬱則氣滯, 氣滯久必化熱, 熱鬱則津液耗以不流, 升降之機失度”<sup>38)</sup>를 근거로 하여 氣滯가 오래되어 鬱火가 되었을 때 치료할 수 있는 淸火, 補心하는 방법을 이용한 연구는 없었다.

본 연구에서 사용한 淸火補心湯은 東洋醫學診療要覽<sup>2)</sup>에 나오는 처방으로 東醫寶鑑<sup>3)</sup>의 淸心溫膽湯을 기본으로 창방된 처방이다. 淸心溫膽湯은 古今醫鑑에 처음 收錄된 이후 역대 문헌<sup>35,36,42)</sup>에서 平肝解鬱, 淸火化痰, 益心血하는 효능이 있는 것으로 기록되어 있다. 淸火補心湯은 淸心溫痰湯에 利氣去痰하는 陳皮와 淸熱瀉火燥濕하는 梔子 連翹를 첨가하여 心肝鬱火로 인한 精神衰弱 脫營 失情 등의 효능<sup>2)</sup>이

있어 心肝鬱火로 오는 諸神經症을 다스려서 憂鬱症에 효과가 있다고 사료되었다.

淸火補心湯의 처방구성<sup>7,39,40</sup>에서 香附子는 通行十二經八脈氣分 主一切氣 利三焦 解六鬱 止諸痛하고, 川芎은 血中氣藥으로 助淸陽而開諸鬱 潤肝燥而補肝虛하며, 蒼朮은 補脾 燥濕 升揚 散鬱하고, 半夏는 能走能散 能燥能潤 和胃健脾 補肝潤肺 除濕化痰 發表開鬱 止嘔煩하며, 陳皮는 脾肺氣分之藥으로 調中快膈 導滯消痰하고, 黃連은 入心瀉火 燥濕開鬱 鎮肝涼血하며, 連翹는 入手少陰厥陰氣分而瀉火 兼除氣分濕熱하여 散諸經 血凝氣聚하고, 蓮子肉은 淸心除煩 開胃進食하며, 枳實은 破氣 行氣則痰行하고, 竹茹는 開胃土之鬱 淸肺金之燥 涼血除熱하며, 梔子는 瀉心肺之邪熱 三焦之鬱火而解하고, 麥門冬은 淸心潤肺 強陰益精 瀉熱除煩하며, 石菖蒲는 宣通竅 補心하고, 遠志는 強志益智 補精壯陽 理九竅하며, 香附子는 解鬱開竅하고, 半夏 陳皮 枳實은 利氣去痰하며, 竹茹는 解鬱, 淸熱涼血하고, 川芎은 行氣行血而 開鬱滯하며, 黃連 連翹 竹茹 梔子는 淸熱瀉火燥濕하고, 半夏 遠志 菖蒲는 利竅祛痰하는 등의 효능<sup>43</sup>이 있어, 淸火補心湯은 心肝機能을 조절하여 脫營失情 및 癲癇 憂鬱症에 치료효과<sup>2</sup>가 있다.

憂鬱症의 치료를 위한 항우울제의 개발 과정에서 다양한 우울증 동물 모델들이 시도되어 왔다<sup>49,73,81,85,88,90,91</sup>. 초기에는 주로 강한 강도의 자극을 주는 방법이 선호되었으나, 최근에는 인간의 일상을 더욱 잘 모사할 수 있는 경미한 강도의 반복적인 스트레스를 이용하는 방법<sup>49,52,70,75,78,87</sup>이 선호되고 있다. 그 중에서도 Willner가 제안한 CMS 모델<sup>78,88</sup>이 신뢰도와 타당도를 갖춘 우수한 우울증 동물모델로서 인정받고 있다. CMS 절차에서는 물 먹이 박탈이나, 사육상자에서의 파트너 교체, 소음과 현란한 조명의 제시 등, 여러 가지 예측할 수 없는 다양한 자극들을 계속해서 제공해주게 된다. 이러한 스트레스절차를 수 주간 반복하면, 흰 쥐들은 우울

증의 대표적 증상이라고 할 수 있는 무쾌감증(anhedonia)<sup>44</sup>에 상응하는 증상으로, 자당용액(sucrose solution)의 섭취량에서 상당한 감소를 보이게 된다. 이러한 섭취량의 감소는 아무런 처치를 하지 않을 경우, CMS 절차를 철회하고 난 후에도 수 주간 지속되는 것으로 알려져 있고<sup>21,90</sup>, 다수의 항우울제들은 CMS 처치에 따른 자당섭취량의 감소를 원래 수준으로 회복시켜 주는데 효과가 있는 것으로 밝혀졌다<sup>70</sup>. 이와 같이 일단 스트레스 경험으로 인해 행동적인 결함을 야기시킨 후, 이를 항우울 처방에 의해 다시 회복시키는 類의 우울증 모델실험을 근거로 하여 한약물의 우울증에 대한 효능을 검토한다는 의미에서 實驗 모델로 採擇하였다.

이에 저지는 淸火補心湯의 우울증에 미치는 예방적 효과에 대해 알고자, CMS 과정중에 검액을 투여하고, 체중변화와 FST를 통해 우울성향을 측정하였고, EPM을 통해 우울증에 흔히 동반되는 불안성향에 미치는 효과를 알아보았다. 또한 면역조직화학적 기법을 이용하여, VTA에서 도파민의 대사에 관여하는 효소인 TH의 수준과, 시상하부의 PVN에서 스트레스를 받으면 발현이 증가되는 것으로 알려진 c-Fos 단백질의 발현을 측정하였다.

憂鬱症에 대한 韓藥物 연구로 李<sup>24</sup>와 李<sup>26</sup>는 分心氣飲의 투여가 CMS로 인해 감소된 자당 섭취량을 회복시키고 개방장에서의 행동관찰에서도 활동량의 증가를 가져왔으며 수동적 회피 과제실험에서 차이를 나타냈음을 보고하였고, 趙<sup>31</sup>와 車<sup>33</sup>는 歸脾濇膽湯의 투여가 CMS로 인해 감소된 자당섭취량을 회복시키고 개방장에서의 행동관찰에서도 활동량의 증가를 가져 왔으며 경악반응의 감소를 나타내었다고 보고하였고, 林<sup>27</sup>과 池<sup>32</sup>는 補血安神湯의 투여가 CMS로 인해 감소된 자당섭취량을 회복시키고 개방장실험에도 활동량의 증가를 나타낸다고 보고하였으며, 현<sup>34</sup>은 遠志石菖蒲散의 투여가 CMS로 유발된 우울증 모델흰쥐의 FST에서의 무활동 횟수를 감

소시키고 PVN에서 발현된 c-FOS세포 수를 감소시킨다고 보고하였고, 김<sup>15)</sup>은 古庵心腎丸去朱砂方の 투여가 CMS로 유발된 우울증 모델흰쥐의 VTA에서 TH수준의 증가를 억제시킨다고 보고하였다.

본 실험에서 4주간의 CMS 처치 및 淸火補心湯의 투여가 체중에 미치는 영향에 대하여 각 주마다 측정된 결과 대조군 및 실험군의 체중은 정상군에 비해 유의미하게 낮았다[F(2, 33)=37.86, p<.01]. 이를 각 집단별로 Duncan의 방법으로 주효과를 분석하여 본 결과 淸火補心湯을 처치한 실험군의 체중이 두번째 주에서 통계적으로 유의하게 대조군보다 낮았으나 그 이외에는 두 집단간 차이가 없었다. 이는 CMS 과정중에 물과 음식의 박탈이 포함된 것에 기인된 것으로 사료된다.

일반적으로 CMS 모델을 사용한 실험에서는 우울증에 대한 지표로 자당섭취량이 측정되었는데<sup>68,90)</sup>, 최근에 자당섭취량의 감소가 음식과 물의 박탈로 유발되는 체중의 감소와 관계가 있다는 보고 등<sup>73,80)</sup>으로 논란이 있어서, 본 연구에서도 최근에 제기된 자당섭취량이 가진 문제점<sup>55,63)</sup>을 감안하여 우울증을 평가하기 위한 도구로 FST를 사용하였다. 흰쥐를 도피 불가능한 수조에 빠트리면 처음에는 출구를 찾아 격렬히 수영을 하다가 결국은 코를 수면 위에 내놓기 위한 최소한의 동작 이외에는 특징적인 부동자세를 취함을 관찰하고, 이를 스트레스로 유발된 학습된 무력감 혹은 절망행동(behavioral despair)으로 보고 우울증의 동물모형이라 제안<sup>79)</sup>한 것으로 실험방법이 간단하고 예측타당도(predictive validity)가 인정되어 있어서 항우울제의 효과판정을 위한 방법으로 현재까지 널리 사용되고 있다<sup>16,53,64)</sup>.

본 실험에서 FST를 시행한 후, 세 집단을 대상으로 변량분석한 결과 무활동[F(2, 36)=9.41, p<.01]과 수영행동[F(2, 36)=8.81, p<.01]에서는 집단간 차이가 통계적으로 유의미하였으나, 기어오르기[F(2, 36)=0.20, p=.35]에서는 집단간에 차이가 없었다.

집단간 차이가 있는 두 가지 행동유형을 Duncan의 중다비교법으로 비교해 보면, 우울에 대한 지표로 간주되는 “behavioral despair”, 즉 무활동은 다른 두 집단에 비해 대조군에서 유의하게 많이 나타났고(p<.05), 이와는 반대 의미를 갖는 수영행동은 실험군의 성적이 다른 두 집단에 비해 유의미하게 높았다(p<.05).

이러한 결과는 만성적인 스트레스에 노출된 동물이 FST에서 정상동물에 비해 우울 성향을 더 많이 보여주고, 스트레스를 가하면서 淸火補心湯을 투여하면 스트레스에 의한 우울 성향의 증가가 차단됨을 의미한다. 즉, 무활동과 수영행동 분석결과는 CMS 처치가 동물의 우울 성향을 높인다는 것으로 Cancela 등<sup>16,34,50,51,53)</sup>의 보고와 일치하며 CMS와 함께 투여된 淸火補心湯이 항우울효과를 가지고 있음을 보여주는 것이다.

FST실험에서 對照群의 우울 성향이 증가되는 것이 觀察되었고, 이 우울성향은 4주간의 淸火補心湯의 投與에 의해 防止되었음을 볼 수 있었으나, 이런 스트레스 處置 혹은 藥物 投與의 效果가 동물의 불안과 같은 정서변화를 통해 나타난 二次的인 것일 수도 있으므로, 고와 육 등<sup>12,22)</sup>이 이미 한약물의 효과검증에 이용한 EPM 검사를 통하여 CMS 처치 및 한약물의 투여가 동물의 불안에 관련한 정서상태에 미치는 영향을 검증하였다.

EPM에서 분석한 행동은 1) 전체 시간에 대한 개방통로에서 머문 시간의 비율, 2) 개방통로에 들어간 횟수, 그리고 3) 전체 통로를 돌아다닌 횟수 등이 포함되었다. 이런 행동유형을 많이 보이는 동물일수록 불안 수준이 낮은 것으로 해석된다. 세 집단을 대상으로 변량분석한 결과 전체 통로 방문 횟수, 개방통로 방문횟수, 그리고 개방통로에 머문 시간 모두 집단간에 통계적으로 유의미한 차이가 나타나지 않았다. 이 분석 결과는 만성적인 스트레스 처치가 FST에서 보여주듯 우울을 증가시키지만, 불안에



는 영향을 미치지 않음을 보여준다. 또한 스트레스 처치와 함께 淸火補心湯의 투여도 동물의 불안성향에는 변화를 유발시키지 않음을 보여준다.

동물이 스트레스 조건에 노출되면 그에 대한 적응반응의 일환으로 도파민 체계가 활성화되어 도파민의 이용율(utilization)과 전환율(turnover rate)이 증가됨에 따라 도파민의 수준은 감소되고 상대적으로 도파민 대사에 관여하는 TH의 수준은 증가 하는 현상<sup>6)</sup>이 나타난다. TH는 L-tyrosine, L-dopa, dopamine, norepinephrine, epinephrine으로 진행되는 카테콜아민의 대사의 첫 번째 과정에서 사용되는 효소로<sup>48,58)</sup>, 우울증에서 흔히 제안되고 있는 신경생물학적인 병인 중의 하나인 단가아민의 결핍에 관련되어 있으며<sup>6,45)</sup>, 도파민계 대사를 평가하고자 할 때 관찰되어지는 지표의 하나이다<sup>14,58,76,86)</sup>. 본 실험에서는 기존의 보고들에서 도파민 대사와 관련되어 자주 관찰되고 있는 부위<sup>48,62,74,86)</sup>이며 뇌의 여러 영역으로 DA성 투사<sup>46)</sup>를 하는 VTA에서의 TH 수준을 면역조직화학적 기법을 이용하여 측정하였다.

TH와 관계되는 연구들에서 Wang<sup>86)</sup>은 2주간의 강제보행스트레스를 받은 우울증 모델쥐의 locus coeruleus (LC)에서 TH mRNA의 표현이 증가하였다고 하였으며, Ortiz<sup>74)</sup>는 CMS 처치 후 VAT에서 TH의 면역반응이 증가하였다고 하였고, Serova<sup>82)</sup>는 유전적인 우울증모델 쥐인 FSL의 뇌 흑질에서 TH mRNA 수치는 대조군과 별 차이가 없으나, VTA에서 TH mRNA 수치가 기저수치보다 2배 이상 높으므로 우울증 모델에서는 도파민계가 과항진 되어 있다고 보고하였고, Rots<sup>81)</sup>는 출생 후 모성박탈을 한 흰쥐에서도 TH mRNA의 증가가 관찰되었음을 보고하였다. 특히 Komori<sup>62)</sup>는 단기스트레스 상황에서는 TH 활동성이 증가하고, 憂鬱症 양상의 상황에서는 감소함을 보고하여 스트레스의 종류와 강도, 그리고 개체 반응의 다양성 등에 의해 차이가 나타날 가능성을 제시하였다.

본 실험에서 VTA에서의 TH 수준은 세 집단간에 유의미한 차이가 관찰되었다[F(2, 9)=8.045, p<.05]. 이를 Duncan의 방법으로 비교한 결과 VTA에서의 TH 수준은 정상군에 비해 만성 스트레스에 노출된 대조군 및 실험군에서 유의미하게(p<.05) 높게 나타났다. 대조군과 시험군간의 유의미한 차이는 없었다. 이 결과는 만성 스트레스에 노출되면 VTA의 TH 수준이 현저히 증가되며, 스트레스에 노출되는 동안에 淸火補心湯을 투여하더라도 VTA의 TH 수준의 증가를 억제하지 못함을 의미한다.

원종양유전자(proto-oncogene)의 일종인 c-fos 유전자는 생체의 내부 및 외부의 다양한 자극을 받아서 세포의 성장 분화 발달시키는 역할뿐만 아니라, 세포 표면에 전달된 자극에 반응하여 장기간 계속되는 세포반응을 매개하는 역할을 한다<sup>54,57,59)</sup>고 알려져 있고, c-fos 유전자의 산물인 c-Fos 단백질(c-Fos protein, c-fos)은 여러 약물이나 스트레스를 포함한 생리적 자극에 의해 발현되어<sup>60,65)</sup> 대뇌 대사활동의 증가와 뇌신경세포활성도에 대한 표시자로 스트레스 및 스트레스와 관련된 우울증 연구<sup>18,30,61,69,72,83)</sup>에서 자주 관찰되어지는 지표이다. 본 실험에서는 기존의 연구들<sup>17,47,56)</sup>에서 스트레스와 관련되어 변화가 나타나는 시상하부의 PVN에서 c-Fos 발현을 면역조직화학법으로 측정하여 스트레스와 관련된 반응을 평가하려 하였다.

기존의 c-Fos와 관계된 연구들에서 방<sup>17)</sup>은 절망 행동 모델에서, 조<sup>30)</sup>는 구속스트레스에 의해서, 현<sup>34)</sup>은 CMS에 의해서, 서<sup>18)</sup>는 外關과 曲池 전침자극에 의해서, Beck<sup>47)</sup>은 footshock에 의해서 PVN에서 c-Fos가 증가되었음을 보고하였고, Steciuk<sup>83)</sup>는 회복할 수 없는 스트레스를 주면서 우울상태를 유발했을 때 대조군에 비해 PVN에서 c-Fos 면역반응이 감소되고, 그리고 Kollack-Walker<sup>61)</sup>는 만성적으로 social defeat 처치를 받은 수컷 쥐의 PVN에서 c-Fos의 mRNA 수준이 감소되어 나타난다는 상반된

보고를 하여, 여러 가지 인자들에 의하여 c-Fos 발현에 차이가 나타남을 알 수 있다.

본 실험 결과 PVN에서 c-Fos가 발현된 세포체의 수는 대조군에서 가장 많았고, 실험군, 정상군 순으로 유의미한 차이를 보여 주었다. 이는 CMS 처치에 의해 PVN에서 c-Fos 발현이 증가되는 것으로 해석되어 방<sup>17)</sup>, 조<sup>30)</sup>, 현<sup>34)</sup>등의 견해와 일치하였으며, c-Fos의 증가가 CMS와 함께 투여된 淸火補心湯에 의해 현저하게 억제됨을 의미한다.

결과들을 종합하면 4주간의 CMS 처치는 체중감소 및 우울성향을 유발했으며 淸火補心湯의 투여는 체중감소 억제에는 영향을 미치지 못하였으나 FST 실험결과 우울성향을 현저하게 억제하는 효과가 있고, EPM 실험결과 CMS처치 및 淸火補心湯의 투여가 불안의 정서반응을 유발하지 않았으며, VTA 에서의 TH 발현을 억제하지는 못하였으나 PVN에서 스트레스에 관여하는 c-Fos의 발현을 유의미하게 억제하였다.

한의학적 관점에서 고찰한다면 平肝解鬱, 淸火化痰하는 효능을 가진 淸火補心湯이 일상의 생활에서 받는 스트레스로 인한 간기능의 울체와 심장에서 火의 발현을 해소시켜주어, 만성적 스트레스나 정신적 충격에 의해 발병되어지는 憂鬱症에 대해 예방제 및 치료제로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 結 論

韓醫學 임상에서 정신과 질환에 다양하게 이용되는 淸火補心湯이 CMS로 유도된 우울증 모델 흰쥐의 체중의 변화, Forced Swimming Test, Elevate Plus Maze, VTA에서 tyrosine hydroxylase, PVN에서 c-Fos의 수준을 면역조직화학법으로 측정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CMS 處置過程은 체중증가속도를 현저하게 감소시켰다.
2. 淸火補心湯 實驗群은 FST 실험에서 對照群보다 유의미하게 활동성향이 높게 관찰되어 抗憂鬱效果가 인정되었다.
3. CMS 처치후 EPM 실험의 시행에 따른 불안의 정서반응을 유발하지 않았다.
4. 淸火補心湯 實驗群 및 대조군은 정상군에 비하여 VTA에서 TH 발현이 유의미하게 증가하였다.
5. 淸火補心湯 實驗群은 對照群에 비하여 PVN에서 c-Fos의 발현이 유의미하게 억제되었다.

이러한 결과들은 淸火補心湯이 만성적 스트레스로 인한 우울의 발생을 방지 할 수 있고, 만성적 스트레스 처치에 의한 FST에서의 무활동을 감소시키고, 시상하부의 PVN의 c-Fos발현을 억제함으로써 항우울효과가 있음을 보여 주었다.

## 참 고 문 헌

1. 金相孝 : 東醫神經精神科學, 서울, 杏林出版社, p.152, 1984.
2. 金定濟 : 東洋醫學診療要鑑 下, 서울, 東洋醫學研究院, p.201, 1974.
3. 文濬典, 安圭錫, 崔昇勳 : 東醫病理學, 서울, 高文社, pp.13-27, 1990.
4. 민성길 : 최신정신의학, 서울, 一潮閣, pp.206-219, 586-591, 1998.
5. 이부영譯 : ICD-10(정신 및 행동장애), 서울, 一潮閣, pp.150-155, 1994.
6. 李定均 : 精神醫學, 서울, 一潮閣, pp.212-256, 1996.
7. 李相漸 : 현대한방 약물학, 서울, 書苑堂, pp.15-26,

- 114-120, 1983.
8. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.40-58, 1986.
  9. 洪元植 編 : 精校黃帝內經素問, 서울, 東洋醫學研究院, p. 277, 282, pp. 288-289, 303-304, 1981.
  10. 黃義完, 金知赫 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, pp.38-39, 471-487, 576-582, 608-611, 1987.
  11. 강형원, 장현호, 강인선, 문형철, 황유진, 유영수 : 憂鬱症의 韓方의 理解에 關한 文獻考察, 동의신경정신과학회지, 12(2):1-15, 2001.
  12. 고정인, 이동웅, 하정희 : 기분장애 환자의 스트레스와 정서반응(우울, 불안, 분노반응), 생물치료정신의학, 3(2): 168-174, 1999.
  13. 김광호 : 遠志石菖蒲散이 Chronic Mild Stress 처치 흰쥐의 우울과 학습장애에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 2001.
  14. 김용주, 김지윤, 김동선, 조희중, 배용철, 박매자 : 흰쥐 척수 및 등뿌리신경절에서 Tyrosine Hydroxylase 함유구조물의 분포, 대한해부학회지, 30(2):147-153, 1997.
  15. 김종찬 : 憂鬱症 모델 흰쥐의 水中迷路學習과 VTA의 TH 水準에 對한 古巖腎氣丸去朱砂方의 效能, 慶熙大學校 大學院, 2002.
  16. 박제민, 김종백, 강철중 : 흰쥐의 중추성 Serotonin 고갈이 강제수영 중 부동자세 시간, 불안 및 수동적 회피 학습에 미치는 효과, 신경정신의학, 35(3):699-709, 1996.
  17. 방승규, 김우선 : 절망행동모형에 의한 흰쥐 대뇌의 Fos 발현의 증가, 신경정신의학, 35(1):1949-1955, 1995.
  18. 서영, 김효정, 권영규, 양재하, 김광중 : 고정 스트레스를 가한 백서의 측핵중 Fos-like-immunoreactivity에 미치는 電針의 효과, 동의생리병리학회지, 15(1):105-110, 2001.
  19. 徐元熙, 李相龍 : 鬱症과 憂鬱症의 比較考察, 大田大學校 韓醫學研究所 論文集, 6(1):505-514, 1997.
  20. 成宇鏞 : 우울증유발 흰쥐에 대한 歸脾湯의 항우울효과, 慶熙大學校 大學院, 2002.
  21. 신경호 : 우울증의 실험모델과 항우울제의 선별, 대한정신약물학회지, 11(4):291-303, 2001.
  22. 육창수, 김민선, 황영선, 류중훈 : Elavated plus maze를 이용한 신기환, 보중익기탕 및 사물탕의 항불안효과, 응용약물학회지, 9(2):125-130, 2001.
  23. 李吉才, 姜允皓 : 鬱證에 對한 文獻的 考察 (治法을 中心으로), 東西醫學, 20(1):46-55, 1995.
  24. 李升基 : 憂鬱症誘發 白鼠에 對한 分心氣飲의 抗憂鬱效果, 慶熙大學校 大學院, 2000.
  25. 李貞雅 : Chronic Mild Stress로 誘發된 憂鬱症 모델 흰쥐에 對한 歸脾湯의 實驗的 研究, 동의신경정신과학회지, 12(1):123-135, 2001.
  26. 李姪恩 : Chronic Mild Stress 로 유발된 憂鬱症 모델 흰쥐에 對한 分心氣飲의 實驗的 研究, 慶熙大學校 大學院, 2000.
  27. 林承萬 : Chronic Mild Stress로 유발된 憂鬱症 모델 흰쥐에 對한 補血安神湯의 實驗的 研究, 慶熙大學校 大學院, 2001.
  28. 田炳薰, 鄭遇悅 : 鬱證의 病因·病證分類에 關한 文獻的 考察, 大韓韓醫學會誌, 7(2):219-227, 1986.
  29. 정대규, 서부일, 권순주 : 鬱證에 對한 文獻的 考察 (症治를 中心으로), 濟韓東醫學術院 論文集, 4(1): 500-508, 1993.
  30. 조성일, 이성필, 이창욱, 김우선, 백인호 : Diazepam이 강박 스트레스 흰쥐 뇌의 Fos 발현에 미치는 영향, 신경정신의학, 36(5):927-934, 1997.
  31. 趙忠勳 : 歸脾溫膽湯의 Chronic Mild Stress로 유발된 憂鬱症 모델 흰쥐에 對한 실험적 연구, 대한신심스트레스학회지, 8(1):9-16, 2000.
  32. 池相根 : 憂鬱症誘發 흰쥐에 對한 補血安神湯의 抗憂鬱效果, 慶熙大學校 大學院, 2001.
  33. 車倫周 : 憂鬱症 모델 흰쥐에 對한 歸脾溫膽湯의 實驗的 研究, 慶熙大學校 大學院, 2000.
  34. 현경철 : 遠志石菖蒲散이 CMS를 받은 흰쥐의 우울, 학습, 그리고 뇌의 TH 및 c-Fos 발현에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 2002.
  35. 龔 信 : 古今醫鑑, 臺北, 藝文印書館, p.7110, 1971.
  36. 龔廷賢 : 壽世保元(上), 臺北, 宏業書局有限公司 pp.226- 228, 1985.
  37. 上海中醫學院 : 中醫內科學, 香港:商務印書館, pp.188-193. 1977.
  38. 葉天士 : 臨証指南醫案, 서울, 정담, pp.463-473 1998.

39. 新文豐出版公司編 : 新編中藥大辭典, 臺北, 新文豐出版公司, pp. 1281-1282, 2395-2397, 1981.
40. 吳普 : 神農本草經, 서울, 翰林社, pp.9-11, 19-20, 1976.
41. 張介賓 : 景岳全書, 서울, 정담, pp.385-386, p.692, 1150, 1999.
42. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 杏林書院, pp.97-100, 1975.
43. 朱震亨 : 丹溪心法附餘, 서울, 大星文化社, pp.515-527, 1982.
44. American Psychiatric Association : Diagnostics and statistical manual of mental disorders (4th Edition), Washington DC, American Psychiatric Association, pp. 317-328, 1994.
45. Saito H, Morita A, Miyazaki I, Takagi K : Comparisons of the effects of various stresses on biogenic amines in the central nervous system and animal symptoms. In E. Usdin, R. Kvetnansky, & I.J. Kopin(Eds.), Catecholamines and stress, Oxford : Pergamon.
46. Crossman AR, Neary D : Neuroanatomy, New York, Churchill Livingstone, pp. 65-69, 121-122, 1996.
47. Beck CH, Fibiger HC : Chronic desipramine alters stress-induced behaviors and regional expression of the immediate early gene, c-fos, Pharmacol. Biochem. Behav., 51(2-3):331-338, 1995.
48. 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, 12(6):2165-2176, 1992.
49. Benelli A, Filafarro M, Bertolini A, Genedani S : Influence of 5-adenosyl-L-methionine on chronic mild stress-induced anhedonia in castrated rats, Br. J. Pharmacology, 127:645-654, 1999.
50. Cancela LM, Rossi S, Molina VA : Effect of different restraint schedules on the immobility in the forced swimming test: modulation by an opiate mechanism, Brain Res. Bull., 26:671-675, 1991.
51. Cesana R R, Ciprandi C C, Borsini F F : The effect of BIMT 17, a new potential antidepressant, in the forced swimming test in mice, Behav. Pharmacol, 6(7):688-694,1995.
52. D'aquila P, Brain P, Willner P : Effect of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression, Physio. Behav., 56:861-867, 1994.
53. David DJ, Bourin M, Hascoet M, Colombel MC, Baker GB, Jolliet P : Comparison of antidepressant activity in 4- and 40-week-old male mice in the forced swimming test: involvement of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in old mice, Psychopharmacology, 153(4):443-449, 2001.
54. Doucet JP, Squinto SP, Bazan NG : Fos-jun and the primary genomic response in the nervous system, Mol Neurobiol, 4:27-55, 1990.
55. Forbes NF, Stewart CA, Matthews K, Reid IC : Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression, Physiol. Behav., 60(6):1481- 4,1996.
56. Gusev PA, Alkon DL : Intracellular correlates of spatial memory acquisition in hippocampal slices: long-term disinhibition of cal pyramidal cells, J. Neurophysiol., 86(2):881-899, 2001.
57. Hann MK, Bannon MJ : Stress-induced c-fos expression in the rat locus coeruleus is dependent on neurokinin 1 receptor activation, Neuroscience, 94(4):1183-1188, 1999.
58. Herman JP, Guillonneau D, Dantzer R, Scatton B, Semerdjian-Rouquier L, Le Moal M : Differential effects of inescapable footshocks and of stimuli previously paired with inescapable footshocks on dopamine turnover in cortical and limbic areas of the rat, Life Science, 30(25):2207-2214, 1982.
59. Herrera DG, Robertson HA : Activation of c-fos in the brain, Prog. Neurobiol., 50(2-3):83-107, 1996.
60. Ingvarnsen BK, Laursen H, Olsen UB, Hansen AJ : Possible mechanism of c-fos expression in trigeminal nucleus caudalis following cortical spreading depression, 72(3):407-15, 1997.

61. Kollack-Walker S, Don C, Watson SJ, Akil H : Differential expression of c-fos mRNA within neurocircuits of male hamsters exposed to acute or chronic defeat, *J. Neuroendocrinol.*, 11(7):547-559, 1999.
62. Komori T, Nomura J, Inoue K, Kitayama I : Tyrosine hydroxylase activity in discrete brain regions of depression model rats, *Jpn. J. Psychiatry Neurol.*, 44(4):747-754, 1990.
63. Matthews K, Forbes N, Reid IC : Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress, *Physiol. Behav.*, 57(2):241-248, 1995.
64. Masuda Y, Sugiyama T : The effect of globopentao-sylceramide on a depression model, mouse forced swimming, *Tohoku J. Exp. Med.*, 191(1):47-54, 2000.
65. Michael AP, Wen-Sen L, Gloria SR : Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli, *Brain Res*, 597:41-50, 1992.
66. Miller WR : Psychological deficit in depression, *Psychology Bulletin*, 82:238-260, 1975.
67. Monleon S, D'Aquila P, Parra A, Simon VM, Brain PF, Willner P : Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology*, 117(4):453-457, 1995.
68. Montgomery AM, Suri A : Potentiation of the effects of raclopride on sucrose consumption by the 5-HT2 antagonist ritanserin, *Psychopharmacology*, 123(1):98- 102, 1996.
69. Morin SM, Stotz-Potter EH, DiMicco JA : Injection of muscimol in dorsomedial hypothalamus and stress-induced Fos expression in paraventricular nucleus, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* ,280(5):1276-1284, 2001.
70. Muscat R, Papp M, Willner P : Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline, *Psychopharmacology*, 109(4) :433-438, 1992.
71. Muscat R, Towell A, Willner P : Changes in dopamine autoreceptor sensitivity in an animal model of depression, *Psychopharmacology (Berl)*, 94(4):545-50, 1988.
72. Nakase S, Kitayama I, Soya H, Hamanaka K, Nomura J : Increased expression of magnocellular arginine vasopressin mRNA in paraventricular nucleus of stress-induced depression-model rats, *Life Sci.*, 63(1):23-31, 1998.
73. Nielsen CK, Arnt J, Sanchez C : Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences, *Behav. Brain Res.*, 107(1-2):21-33, 2000.
74. Ortiz J, Fitzgerald LW, Lane S, Terwilliger R, Nestler EJ : Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress, *Neuropsychopharmacology*, 14(6): 443-452, 1996.
75. Papp M, Moryl E, Willner P : Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression, *Eur. J. Pharmacology*, 296:129-136, 1996.
76. Papp M, Muscat R, Willner P : Subsensitivity to rewarding and locomotor stimulant effects of a dopamine agonist following chronic mild stress, *Psychopharmacology*, 110: 152-158, 1993.
77. Papp M, Willner P, Muscat R : An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress, *Psychopharmacology (Berl)* 104(2):255-9, 1991.
78. Porsolt RD : Animal models of depression utility for transgenic research, *Rev. Neurosci.*, 11(1):53-58, 2000.
79. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats : a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*, 47(4):379-91,1978.

80. Reid I, Forbes N, Stewart C, Matthews K : Chronic mild stress and depressive disorder: a useful new model?, *Psychopharmacology*, 134(4): 365-367, 1997.
81. Rots NY, de Jong J, Workel JO, Levine S, Cools AR, De Kloet ER : Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine, *J. Neuroendocrinol.*, 8(7):501-506, 1996.
82. Serova L, Sabban EL, Zangen A, Overstreet DH, Yadid G : Altered gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and stress response in rat genetic model of depression, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 63(1):133-138, 1998.
83. Steciuk M, Kram M, Kramer GL, Petty F : Decrease in stress-induced c-Fos-like immunoreactivity in the lateral septal nucleus of learned helpless rats, *Brain Res*, 822(1-2):256-259, 1999.
84. Varty G, Morgan C, Cohen-Williams M, Coffin V, Carey G. : The gerbil elevated plus-maze I. Behavioral characterization and pharmacological validation, *Neuropsychopharmacology*, 27(3):357, 2002.
85. Vogel G, Hagler M, Hennessey A, Richard C : Dose-dependent decrements in adult male rat sexual behavior after neonatal clorimipramine treatment, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54(3):605-609, 1996.
86. Wang P, Kitayama I, Nomura J : Tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus of depression- model rats and rats exposed to short-and long-term forced walking stress, *Life Sci*, 62(23): 2083-2092, 1998.
87. Willner P : Animal models as simulations of depression, *TiPS*, 12:131-136,1991.
88. Willner P : The validity of animal model of depression, *Psychopharmacology*, 83:1-16, 1984.
89. Willner P : Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation, *Psychopharmacology*, 134(4):319-329, 1997.
90. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R : Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressants, *Psychopharma*, 93:358-364, 1987.
91. Yadid G, Nakash R, Deri I, Tamar G, Kinor N, Gispan I, Zangen A : Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model, *Prog. Neurobiol.*, 62(4):353-378, 2000.