

梔子が 강제수영부하시험에서 Corticotropin-Releasing Factor, c-fos와 Tyrosine Hydroxylase에 미치는 영향

박찬혁, 이태희
경원대학교 한의과대학 방제학교실

ABSTRACT

Effects of Gardeniae Fructus on Corticotropin-Releasing Factor, c-fos and Tyrosine Hydroxylase in Forced Swimming Test

Chan-Hyuck Park, Tae-Hee Lee
Dept. of Formulae Pharmacology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

Objectives : The goal of this study was to investigate the effect of Gardeniae Fructus (GF) as antidepressant in the forced swimming test(FST) model rats.

Methods : The expressions of corticotropin-releasing factor(CRF), tyrosine hydroxylase (TH) and c-fos were measured by immunohistochemical method at paraventricular nucleus(PVN), locus coeruleus (LC) and ventral tegmental area(VTA).

Results : The duration of immobility in FST was significantly decreased in the GF 100mg/kg groups ($p < 0.05$). CRF expression was significantly decreased at PVN in the GF 100 mg/kg and 400mg/kg treated group in comparison with the control group, respectively ($p < 0.01$). c-fos expression was decreased at PVN in the GF 100 mg/kg treated group with no significance. TH expression was significantly decreased in the GF 100 mg/kg and 400mg/kg treated group in comparison with the control group, at LC and VTA

-
- 교신저자 : 이태희
 - 경기도 성남시 수정구 복정동 산65번지 경원대학교 한의과대학 방제학교실
 - Tel : 011-792-4656 E-mail : ophm5418@kyungwon.ac.kr
 - 접수 : 2009/ 05/ 08 1차 수정 : 2009/ 06/ 05 2차 수정 : 2009/ 06/ 11 채택 : 2009/ 06/ 13

respectively ($p < 0.001$).

Conclusion : According to the results, it can be considered that *Gardeniae Fructus* has antidepressant effect by showing the reduction of immobility in FST through the reduction of CRF, TH expression.

Key word : *Gardeniae Fructus*, Forced Swimming Test, Corticotropin-Releasing Factor, c-fos, Tyrosine Hydroxylase, Anti-depression

I. 서론

현대사회에 만연한 과도한 스트레스로 인한 개인이 심리적 안정 유지에 실패하게 되면 공포와 불안 반응 및 상실과 관련된 우울증이 유발되며¹⁾, 특히 개인의 생활 스트레스는 우울증의 발생과 직접 관련이 있다²⁾.

서양의학에서 우울증에 해당하는 한의학적 개념은 “鬱證”에 속하며³⁾ 이는 情志不舒 氣機鬱滯로 인해 心, 肝, 脾 三藏에 이상이 생긴 결과로 氣血이 失調하여 발생하는 질병을 말한다.⁴⁾ 『素問·至眞要大論』⁵⁾에서 “諸氣鬱滯 皆屬於肺”라 한 이래 鬱證의 개념은 후대로 갈수록 정신적 측면이 중시되어 『景岳全書』⁶⁾에서는 “怒鬱”, “思鬱”, “憂鬱” 등의 “情志之鬱”을 언급하였고 『臨證指南醫案』⁷⁾에서는 情志로 인해 발생된 鬱의 증례를 통해 鬱證의 정신적 병리를 서술한 바 있다. 아울러 鬱證은 “久而火鬱”, “日久成鬱”, “抑之變鬱”, “伏之化鬱”⁵⁾이라는 표현에서와 같이 급성이 아닌 만성적 억압으로 형성되는 舒暢, 通暢되지 못한 상태를 의미한다. 梔子(*Gardeniae Fructus*)는 茜草科(Rubiaceae)에 속한 常綠灌木인 梔子나무(*Gardenia jasminoides* for. *grandiflora* MAKINO) 또는 同屬植物의 成熟한 과실을 건조한 것으로, 淸熱 瀉火 涼血하는 효능을 가지고 있어 熱이 胸膈에 纏結하여 된 心煩 懊惱, 燥鬱不寧 등의 증상에 요약이 된다⁸⁾.

이에 저자는 梔子が 강제수영부하시험(FST, forced swimming test)에서 흰쥐의 우울행동에 미치는 효과를 알아보기 위해 흰쥐에게 FST를 실시하여 행동변화를 살펴보고, 면역조직화학법으로 시상하부의 실방핵(PVN, paraventricular nucleus)에서 CRF(corticotropin-releasing factor), c-fos의 발현과 청반(LC, locus coeruleus), 복측피개야(VTA, ventral tegmental area)에서 tyrosine hydroxylase (TH)을 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

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

2) 약재

연구에 사용한 한약재는 茜草科(Rubiaceae)에 속한 常綠灌木인 梔子나무(*Gardenia jasminoides* for. *grandiflora* MAKINO) 또는 同屬植物의 成熟

한 과실을 건조한 것을 추출용 시료로 사용하였다. 梔子は 400g에 10배 (w/v)량의 3차 증류수를 가하여 100℃에서 4시간 동안 냉각기를 장착한 상태로 환류 추출한 다음 거즈로 여과하였다. 그 다음 80℃에서 중탕 농축하여 하루 동안 -80℃에서 냉각시킨 후, 40℃ 온도로 냉각동결건조시켜 54g 분말을 획득하였다. 투약시에는 건조된 약재를 분량에 맞게 saline을 첨가하여 용액으로 만들었다.

2. 실험

1) 실험군

실험은 두 단계로 나누어 실시하였다. 먼저 FST에서는 대조군(생리식염수 투여, N=8), GF100(梔子 100mg/kg p.o.투여, N=8), GF400(梔子 400mg/kg p.o.투여, N=8)의 3그룹으로 나누어 실시하였고, 면역조직화학법에서는 대조군(생리식염수 투여, N=8), GF100(梔子 100mg/kg p.o.투여, N=8), GF400(梔子 400mg/kg p.o.투여, N=8)의 3그룹으로 나누어 실시하였다.

2) 강제수영부하시험

본 실험에서는 절망행동검사(behavioral despair test)라고도 하는 표준화된 검사법인 FST를 이용하였다. 이 검사법은 약물개발시의 항우울 효과를 검색하는 기본적인 실험으로 알려져 있다. 이 실험은 두 번에 걸쳐 이루어 지는데, 첫 날은 높이 50cm, 지름 30cm의 투명한 아크릴원통형 수조에 22℃의 물에 흰쥐의 꼬리가 바닥에 닿지 않을 정도의 물 높이에 강제로 빠뜨린 다음 15분간 있게 하였다(Fig. 1). 처음 수분간은 이를 벗어나기 위해 흰쥐가 심한 저항을 보이나, 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어난다. 약물은 preswimming 직후에 1회, postswimming test 전 5시간에 2회, 1시간에 3회 투여하였다(Fig. 2). 둘째 날, 5분간 같은 환경에서 강제 수영을 시키고, 여기서 climbing, swimming, immobility 세가지를 측정하였다. 전형적인 immobility란 흰쥐가 얼굴을 포함한 상체의 일부뿐만 수면 위로 드러낸 채 몸

의 균형을 유지하기 위하여 약간의 움직임만을 나타낼 뿐 물 위에 떠 있는 상태이다. 한편, swimming은 흰쥐가 수면 위를 돌면서 움직이고, 간혹 물밑으로 잠수하기도 하는 상태이다. climbing은 가장 격렬한 운동 상태인데, 앞발을 적극적으로 사용하여 아크릴 원통 위로 올라 오려고 사지를 다 쓰는 상태이다. 실수와 사물에 의한 오차를 줄이기 위해 비디오 카메라로 측정하여 자료를 확보하였다.

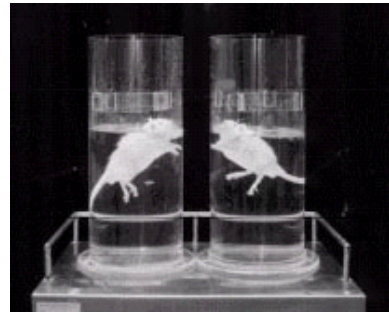


Fig. 1. Equipment of forced swimming test (FST).

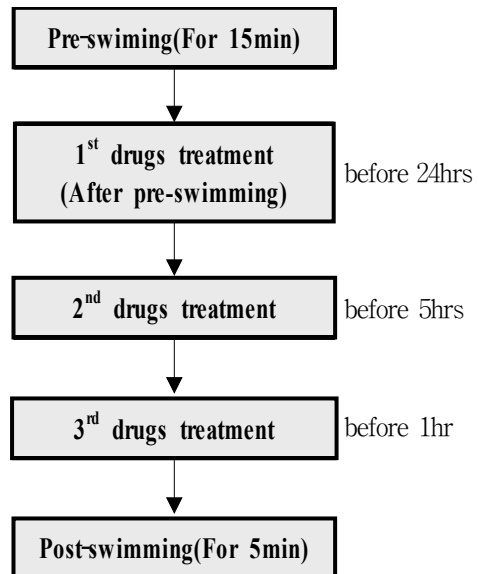


Fig. 2. Experimental scheme of forced swimming test (FST).

3) 면역조직화학법(CRF, c-fos, TH)

강제수영 부하시험이 끝난 쥐를 sodium pentobarbital (80mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 0.9% saline 200ml 에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 100ml을 심장을 통해 관류 하였다. 고정액의 처음 300ml은 2분간, 나머지 700ml은 25분간에 걸쳐 관류 하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 후 고정 시키고, 20% sucrose 가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4°C에서 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 30 μ m의 두께로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, CRF expression에 가장 널리 사용되는 Goat anti-CRF(Santa Cruz Biotechnology), Rabbit anti c-fos (Santa Cruz Biotechnology), Mouse anti-Tyrosine Hydroxylase(Zymed Laboratories)에 담구었다. Primary antibody는 0.3% Triton X100 (PBST)에서 2% normal donky serum과 0.001% kehole limpit hemocyanin (Sigma)으로 200배로 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 primary antiserum 에서 72시간 배양하였다. 그 후 뇌 조직을 PBST 로 씻은 다음, 2시간 동안 실온에서 2% normal donky serum을 함유하는 PBST에서 200배로 희석 한 biotynlates goat anti-goat serum(Santa Cruz Biotechnology)에 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Santa Cruz ABC reagent (Santa Cruz Biotechnology)에 담구 어 반응시켰다. PBST로 몇 번 행군 다음 뇌 조직 을 착색제인 diaminobenzidine을 사용하여 발색시켰다. 발색이 끝난 조직은 slide에 올려 2시간 동안 실온에서 건조 시킨 후, xylene으로 투명화 시켜 polymount로 봉입하였다. 뇌 조직의 각 부위는 염색성을 광학 현미경으로 100배 확대 관찰하고 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos의 부도⁹⁾를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자(2×2cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은 (평균값±표준오차)로 표시하였고, 각 실험군의 통계학적 분석은 window용 SPSS 를 이용하였다. 행동 실험결과 및 면역조직 화학 법에 대한 통계분석은 one way ANOVA로 분석하였으 며, 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, P값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

III. 실험 결과

1. 강제수영부하시험

FST 결과는 Fig. 3, Fig. 4와 같다. 부동행동에서는 대조군에서 4.5±0.65sec를 나타낸것과 비교해서, 梔子 100 mg/kg 그룹(GF100)에서는 2.5±0.62sec 를 나타내서 유의성있게 감소하였다(F(2,15)=1.050 , p<0.05).

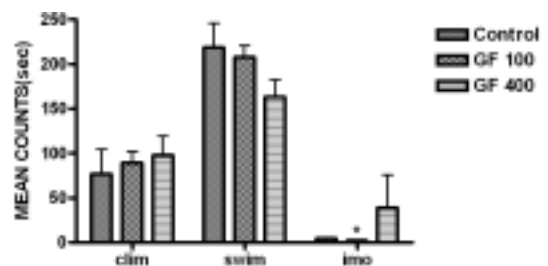


Fig. 3. Effect of Gardeniae Fructus on Behavior in Forced Swimming Test.

Control group was administered normal saline. And GF100 and GF400 groups were administered Gardeniae Fructus (100 mg/kg) and Gardeniae Fructus (400 mg/kg). Normal saline and Gardeniae Fructus were administered intragastrically 24hrs, 5hrs and 1hr prior to FST. Each column represents the mean ± S.E. from 8 rats.

*: Significant difference from the control group (*p<0.05)

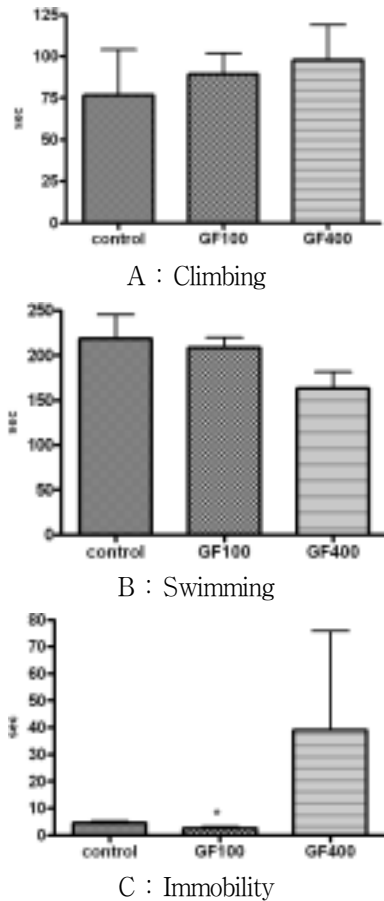


Fig. 4. Effect of Gardeniae Fructus on Behavior in Forced Swimming Test.

Control group was administered normal saline. And GF100 and GF400 groups were administered Gardeniae Fructus (100 mg/kg) and Gardeniae Fructus (400 mg/kg). Normal saline and Gardeniae Fructus were administered intragastrically 24hrs, 5hrs and 1hr prior to FST. Each column represents the mean ± S.E. from 8 rats.

*: Significant difference from the control group (*p<0.05)

2. 면역조직화학법 결과

1) PVN에서 CRF발현

FST 실시 후, PVN 내에서의 CRF 발현은 Fig. 5, Fig. 6과 같다. 세포의 발현을 비교할 때, 대조군에 비하여 梔子 100 mg/kg 그룹(GF100)은

51.8±5.60%이고, 梔子 400 mg/kg 그룹 (GF400)에서 69.0±22.05%로서 PVN내에서의 CRF의 발현이 모두 유의성있게 감소되었다(F(2,11)=1.486, p<0.01).

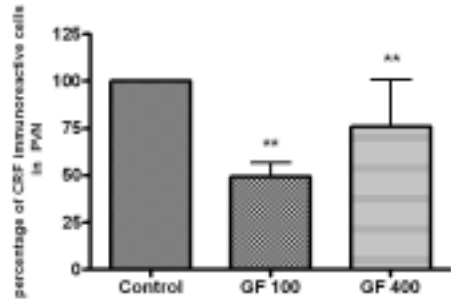


Fig. 5. Expression of CRF-immunoreactive cells in PVN.

Control group was administered normal saline. And GF100 and GF400 groups were administered Gardeniae Fructus (100 mg/kg) and Gardeniae Fructus (400 mg/kg). Normal saline and Gardeniae Fructus were administered intragastrically 24hrs, 5hrs and 1hr prior to FST. Each column represents the mean ± S.E. from 8 rats.

** : Significant difference from the control group(** P<0.01)

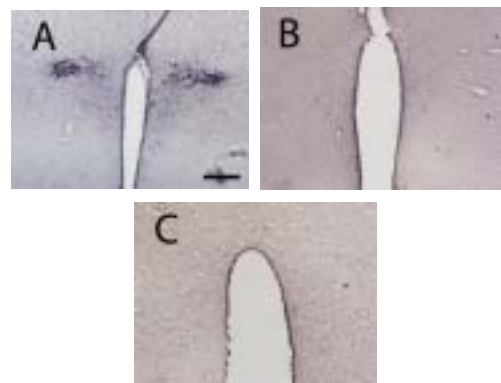


Fig. 6. Photograph of CRF-immunoreactive cells in PVN (scale bar represents 200µm).

Control group(A) was administered normal saline. And GF100(B) and GF400(C) groups were administered Gardeniae Fructus (100 mg/kg) and Gardeniae Fructus (400 mg/kg). Normal saline and Gardeniae Fructus were administered intragastrically 24hrs, 5hrs and 1hr prior to FST.

2) PVN에서 c-fos 발현

FST 실시 후, PVN 내에서의 c-fos의 발현은 Fig. 7, Fig. 8과 같다. 세포의 발현을 비교할 때, 대조군에 비하여 梔子 100mg/kg 그룹(GF100)에서는 $75.8 \pm 11.26\%$ 를 나타내어 대조군에 비해 감소하였다.

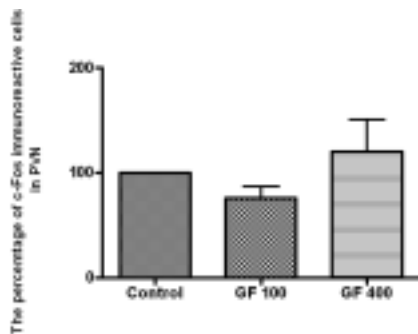


Fig. 7. Expression of c-fos immunoreactive cells in PVN.

Control group was administered normal saline. And GF100 and GF400 groups were administered Gardeniae Fructus (100 mg/kg) and Gardeniae Fructus (400 mg/kg). Normal saline and Gardeniae Fructus were administered intragastrically 24hrs, 5hrs and 1hr prior to FST. Each column represents the mean \pm S.E. from 8 rats.

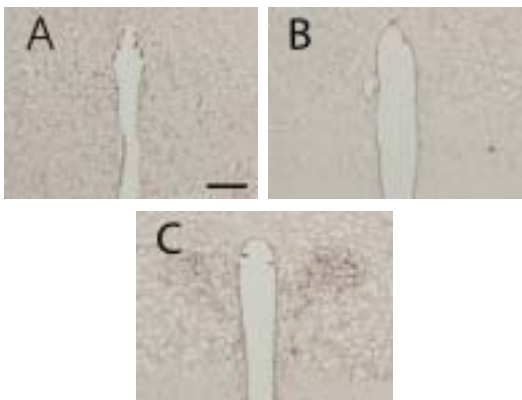


Fig. 8. Photograph of c-fos immunoreactive cells in PVN (scale bar represents $200\mu\text{m}$).

Control group(A) was administered normal saline. And

GF100(B) and GF400(C) groups were administered Gardeniae Fructus (100 mg/kg) and Gardeniae Fructus (400 mg/kg). Normal saline and Gardeniae Fructus were administered intragastrically 24hrs, 5hrs and 1hr prior to FST.

3) LC에서 TH발현

FST 실시 후, LC에서의 TH의 발현은 Fig. 9, Fig. 10과 같다. 세포의 발현을 비교할 때, 대조군에 비하여 梔子 100 mg/kg 그룹(GF100)에서는 $51.8 \pm 8.64\%$ 를 나타내었고, 梔子 400 mg/kg 그룹(CR400)에서는 $47.7 \pm 3.10\%$ 를 나타내어 모두 대조군에 비해 유의성있게 감소하였음을 알 수 있다 ($F(2,25)=24.265$, $p<0.001$).

4) VTA에서 TH 발현

FST 실시 후, VTA에서의 TH의 발현은 Fig. 11, Fig. 12와 같다. 세포의 발현을 비교할 때, 대조군에 비하여 梔子 100 mg/kg 그룹(GF100)에서는 $43.2 \pm 3.77\%$ 를 나타내었고, 梔子 400 mg/kg 그룹(CR400)에서는 $39.5 \pm 4.01\%$ 를 나타내어 모두 대조군에 비해 유의성있게 감소하였음을 알 수 있다 ($F(2,21)=34.987$, $p<0.001$).

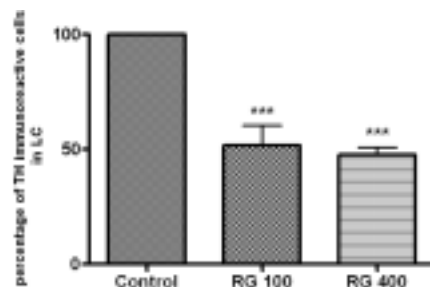


Fig. 9. Expression of TH-immunoreactive cells in LC.

Effect of Gardeniae Fructus on Behavior in Forced Swimming Test. Control group was administered normal saline. And GF100 and GF400 groups were administered Gardeniae Fructus (100 mg/kg) and Gardeniae Fructus (400 mg/kg). Normal saline and Gardeniae Fructus were administered intragastrically 24hrs, 5hrs and 1hr prior to FST. Each column represents the mean \pm S.E. from 8 rats.

*** : Significant difference from the control group(***) $P<0.001$

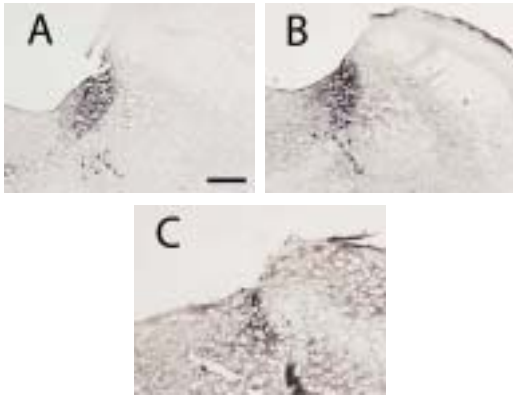


Fig. 10. Photograph of TH-immunoreactive cells in LC(scale bar represents 200 μ m).

Control group(A) was administered normal saline. And GF100(B) and GF400(C) groups were administered Gardeniae Fructus (100 mg/kg) and Gardeniae Fructus (400 mg/kg). Normal saline and Gardeniae Fructus were administered intragastrically 24hrs, 5hrs and 1hr prior to FST.

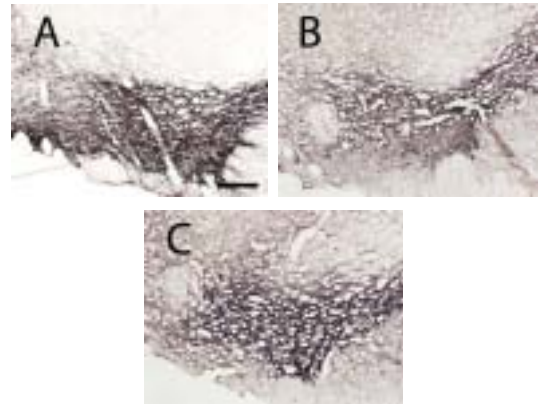


Fig. 12. Photograph of TH-immunoreactive cells in VTA (scale bar represents 200 μ m).

Control group(A) was administered normal saline. And GF100(B) and GF400(C) groups were administered Gardeniae Fructus (100 mg/kg) and Gardeniae Fructus (400 mg/kg). Normal saline and Gardeniae Fructus were administered intragastrically 24hrs, 5hrs and 1hr prior to FST.

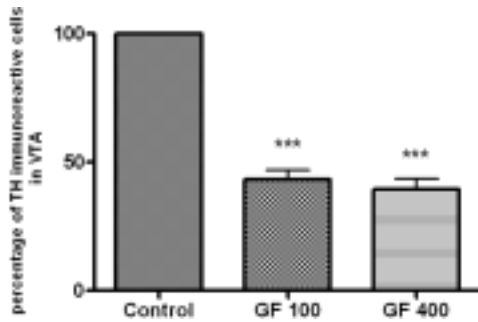


Fig. 11. Expression of TH-immunoreactive cells in VTA.

Control group was administered normal saline. And GF100 and GF400 groups were administered Gardeniae Fructus (100 mg/kg) and Gardeniae Fructus (400 mg/kg). Normal saline and Gardeniae Fructus were administered intragastrically 24hrs, 5hrs and 1hr prior to FST. Each column represents the mean \pm S.E. from 8 rats.

*** : Significant difference from the control group (***) P<0.001)

IV. 고 찰

우울증(depression)은 우울과 관련하여 정신운동, 인지기능, 정신생리기능 및 대인관계에서 장애가 나타나는 질환으로서¹⁰⁾ 흥미나 즐거움의 상실, 우울한 기분, 식욕이나 체중의 변화, 불면 또는 과수면, 정신운동의 흥분 또는 지체, 피로감, 무가치감 또는 죄책감, 사고력과 집중력의 감퇴, 반복되는 자살충동 등을 나타내는 포괄적인 정신장애이다¹¹⁾.

우울증은 유전, 생물학적 요인, 심리사회적 요인 등이 복합적으로 작용하여 발병을 유발한다고 보여지며, 신체질환이나 약물에 의해서 유발될 수도 있다¹⁰⁾.

우울증을 한의학적인 개념으로 살펴보면 鬱證에 속하고 정신적 증상과 신체적 증상이 함께 나타나고 있으며¹²⁾, 그 개념이 초기에는 氣機가 소통되지 못해 생기는 諸病症으로 제시되어 다소 포괄적인 의미였으나 明 清代 이후로는 정신적인 개념으

로 귀결되고 있다^{5,6,7}. 鬱에 대해 『黃帝內經·素問』⁵에서는 『至眞要大論』에서 “諸氣臞鬱 皆屬於肺”라 하였고 『六元正紀大論』에서는 “木鬱達之, 火鬱發之, 土鬱奪之, 金鬱泄之, 水鬱折之”라 하여 각 臟腑의 不和에 따른 치료법을 제시하였으며 『刺法論』에서는 “抑之鬱發”, 『本病論』에서는 “久而化鬱”, “日久成鬱”, “抑之變鬱”, “伏之化鬱” 등으로 기재되어 있다.

이와 같이 鬱證은 급성이 아닌 만성적 억압으로 형성되는 舒暢, 通暢되지 못한 상태라고 할 수 있으며, 張⁶이 서술한 “怒鬱”, “思鬱”, “憂鬱” 등의 “情志之鬱”이라는 개념에서 나타나는 바와 같이 우울증과 깊은 연관이 있음을 알 수 있다. 鬱證은 情志不舒와 氣機鬱滯로 인해 心, 肝, 脾 三臟에 이상이 생긴 결과 氣血이 失調하여 발생한 것으로서⁴, 朱¹³는 그 원인과 증상에 따라 氣鬱 血鬱 痰鬱 熱鬱 濕鬱 食鬱의 六鬱로 분류하기도 했다.

鬱證의 임상증상은 心情抑鬱, 情緒不定, 脇肋脹痛, 易怒善飢, 失眠, 四肢無力, 二便失調, 不思飲食¹⁴, 常善太息¹⁵, 食慾不振¹⁶ 등으로 매우 다양하다. 따라서 “七情의 손상으로 인해 氣機가 鬱滯된 광범위한 증후군”으로 인식되고 있으며¹⁷ 그 원인에 따라 肝氣鬱結型, 氣鬱化火型, 憂鬱傷神型, 心脾兩虛型, 陰虛火旺型, 氣結痰阻型으로 분류된다¹⁸. 또한 鬱證의 초기에는 氣滯와 濕痰으로 인한 食積, 熱鬱 등이 많고 오래되면 虛症으로 변하여 心脾損傷, 陰虛火動 등의 양상이 나타나게 된다⁴.

梔子(Gardeniae fructus)는 茜草科(Rubiaceae)에 속한 常綠灌木인 梔子나무(*Gardenia jasminoides* for. *grandiflora* MAKINO) 또는 동속식물의 成熟한 과실을 건조한 것으로, 淸熱 瀉火 涼血하는 효능을 가지고 있어 熱이 胸膈에 纏結하여 된 心煩 懊惱, 燥鬱不寧 등의 증상에 요약이 된다⁸.

이번 실험에서 사용한 강제수영부하시험(Forced Swimming Test)은 동물의 행동을 부동행동(Immobility), 수영행동(Swimming), 그리고 기어오르기(Climbing)으로 나눠서 집단별 성적을 측정

한다. 부동행동이란 동물이 물에 빠지지 않기 위해 유지하는 자세 외에 다른 행동이 나타나지 않은 것이다. 이는 물에 빠진 동물이 물에서 벗어나기 위한 시도를 포기했음을 의미하는 절망행동(behavioral despair)¹⁹인 동시에 우울증의 한 유형으로 간주되어 항우울제의 효과를 검증하는데 많이 사용된다. 그러므로 FST에서 동물이 부동행동을 많이 보인다는 것은 우울 성향이 높은 것으로 해석되며, 수영이나 기어오르기 같은 행동이 많이 나타나면 우울 성향이 낮은 것으로 해석된다²⁰.

본 실험결과 梔子 100mg/kg 그룹과 400mg/kg 그룹 모두에서 대조군에 비해 기어오르기 시간이 증가하였으며, 부동행동에서는 梔子 100mg/kg 그룹에서 유의성 있게 감소하였다. 이는 梔子 추출액이 강제수영부하시험에 의한 절망행동 발현을 억제하는 것을 의미한다.

스트레스로 유발된 우울증 동물모델의 연구 동향으로서 우울증과 관련된 뇌의 조직과 부위를 밝히는 연구들이 진행되고 있다. 그 중에서 뇌조직에 발현되는 유전자를 면역조직화학적(immunohistochemical)으로 측정하는 방법이 있으며 대표적으로 연구되는 것이 CRF와 c-fos 이다²¹. 본 실험에서도 CRF와 c-fos를 측정해 보았는데 먼저 CRF는 스트레스에 대한 내분비, 자율신경, 행동적, 면역 등의 반응을 매개하는 중요한 역할을 한다²².

CRF는 시상하부에서 발견된 호르몬으로서²³ 양의 시상하부 조직으로부터 추출하였다²². Hisano²⁴ 등의 보고에 의하면 CRF는 시상하부 내외부(intra or extrahypothalamic site)에서 신경내분비와 자율적인 기능에 영향을 미친다²⁵. 이 인자는 중추신경계내에 광범위하게 분포하는데 CRF에 면역 반응을 나타내는 부위는 뇌실주위핵(PVN, Paraventricular Nucleus)에 많이 존재하며 정중용기에 투사한다고 하였고, hypophysiotropic CRF neuron의 결가지들은 뇌실주위핵 주위와 핵내에 종지한다고 하였다²⁴. PVN은 기능적으로 다양한 신경내분비 활성을 통합하는 연결망을 통하여 서

로 기능적으로 연결이 되어있으며, 이러한 연결은 투사하는 신경원과 감각섬유들이 이 peptide에 면역반응을 보이기 때문에 뇌줄기(brain stem)의 자율신경 중심과 PVN 사이의 신경적 연결을 의미한다²⁴⁾. 스트레스를 받게 되면 뇌실주위핵에서 CRF mRNA수준의 증가하고 편도핵의 CRF neuron을 활성화한다²⁶⁾.

본 실험의 결과, 梔子 100mg/kg 그룹과 梔子 400mg/kg 그룹에서 PVN 내에서의 CRF의 발현을 억제시켰다. 이는 梔子の 투여가 시상하부의 PVN에 작용하여 CRF의 발현을 억제시키는 것으로 보인다.

Proto-oncogene의 일종인 c-fos는 immediate early gene(IEG)의 하나로서 세포분열과 세포분화의 역할 및 세포반응의 매개 역할을 한다²⁷⁾. c-fos gene 산물인 c-fos 단백질(c-fos protein, c-fos)은 뇌손상²⁸⁾이나 스트레스²¹⁾가 있을 때 뇌 특정부위에서 활성화되어 증가하며, 항우울 약물에 의해 우울증상이 개선되면 c-fos가 감소된다고 알려져 있다²⁹⁾.

본 실험연구에서는 PVN에서 c-fos 가 발현된 세포체의 수를 측정하였는데, 梔子 100mg/kg 그룹은 대조군에 비해 감소를 나타내었다. 이는 梔子の 투여가 PVN에 작용하여 c-fos의 발현을 억제한 결과로 볼 수 있다. 다만 梔子 100mg/kg 그룹에서는 유의성은 없지만 오히려 c-fos 발현이 증가한 것으로 나타나 향후 치자의 적정 농도에 따른 항우울 작용과의 상관관계에 대한 추가 실험이 요구된다고 할수 있겠다.

후뇌 협부, 4뇌실 앞에 위치하는 청반(LC, Locus Ceruleus)은 색소를 띄고있어 청색반점등으로 불리는데, 중뇌, 간뇌, 중뇌, 소뇌, 교뇌, 수뇌 및 척수등 광범위하게 중추신경계에 분포하는 noradrenaline성 섬유가 LC에서 유래한다^{30,31,32)}.

중뇌 흑색질의 등쪽내측에서는 많은 세포들이 염색성을 보이며, 복측피개야(VTA, Ventral Tegmental Area)로 불린다³³⁾. 중뇌 dopamine system은 2개의

기능 단위로 나뉘는데 하나는 운동기능에 영향을 끼치는 흑질에서 시작하는 흑질-선조로이고, 또 하나는 감정에 영향을 미치는 복측피개야에서 시작하는 중뇌-피질변연로이다. 이처럼 VTA에서 많은 신경세포들이 도파민계 대사에 관여하고 있다^{34,35)}

스트레스와 tyrosine hydroxylase간의 관련된 연구에서 趙³⁶⁾는 스트레스 처치후 VTA에서의 tyrosine hydroxylase 발현이 유의하게 증가하는 것을 확인하였고, 姜 등³⁷⁾은 스트레스 부여후 VTA와 LC에서 유의하게 tyrosine hydroxylase 발현이 증가한다고 보고하였다. 이렇듯 LC와 VTA에서의 tyrosine hydroxylase 발현은 아민성 신경전달물질의 변화양상을 확인할 수 있는 유용한 지표의 하나로서 여러 실험에서 유용하게 사용되고 있다³⁸⁾.

본 실험에서도 관련 실험과 마찬가지로 강제수영부하시험 후 LC와 VTA에서 tyrosine hydroxylase 발현이 증가하였으며, 梔子 100mg/kg 그룹과 梔子 400 mg/kg 그룹에서 모두 유의한 tyrosine hydroxylase 발현 감소를 확인할 수 있었다.

이상과 같은 실험결과로 볼 때 梔子は 시상하부의 PVN에 작용함으로써 CRF와 c-fos의 발현을 감소시키며, 도파민계 대사에 관여하여 VTA에서의 TH의 발현을 억제시키며, 또한 Norepinephrine 대사에 관여하여 LC에서의 TH의 발현을 감소시킴으로써, FST에서 흰쥐의 부동행동을 억제시키는 항우울 효과가 있는 것으로 생각된다. 이는 梔子の 淸熱 瀉火 涼血의 효능이 우울증의 치료에 효과를 발휘한다고 볼수 있다.

V. 결 론

梔子が 흰쥐의 우울행동에 미치는 효과를 알아보기 위해 FST를 실시하여 행동변화에 미치는 영향을 보고, 면역조직화학법으로 시상하부의 PVN에서 CRF, c-fos, 그리고 LC, VTA에서 TH의 변화를 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에

이에 보고합니다.

1. FST를 실시하고 부동행동이 나타나는 시간을 관찰한 결과, 대조군에 비해 梔子 100mg/kg 그룹에서 유의성있게 감소하였다($p < 0.05$).
2. CRF의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 梔子 100mg/kg 그룹과 梔子 400mg/kg 그룹에서 모두 CRF의 발현이 유의성있게 감소하였다 ($p < 0.01$).
3. c-fos의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 梔子 100mg/kg 그룹에서 c-fos의 발현이 감소하였으나 유의성은 없었다.
4. LC에서 TH의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 梔子 100mg/kg 그룹과 梔子 400mg/kg 그룹에서 모두 TH의 발현이 유의성있게 감소하였다($p < 0.001$).
5. VTA에서 TH의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 梔子 100mg/kg 그룹과 梔子 400mg/kg 그룹에서 모두 TH의 발현이 유의성있게 감소하였다($p < 0.001$).

이상과 같은 실험결과를 볼 때, 梔子가 시상하부의 PVN에서 CRF, LC와 VTA에서 TH의 발현을 감소시킴으로써 FST에서의 흰쥐의 부동행동을 억제시키는 항우울 효과가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 박찬무, 서경란, 이민규. 정신질환자들의 역기능적 태도, 스트레스 대처방식 및 우울증상 간의 관계. *정신신체의학*. 1997;5(1):37-43.
2. 최영민, 이정호, 이기철. 지각된 스트레스와 스트레스 대처방식이 직장인의 우울과 불안에 미치는 영향. *신경정신의학*. 1996;35(6):1376-85.
3. 김상효. *동의신경정신과학*. 서울:행림출판사. 1984:152.
4. 許市虎. *中國腦病學*. 북경:中國醫藥科技出版社. 1998:453-7.
5. 홍원식. 精校黃帝內經素問. 서울:동양의학연구원. 1981:16, 24, 277, 282, 285, 287, 288, 303.
6. 張介賓. 景岳全書. 서울:대성문화사. 1988:413-9.
7. 葉天士. 臨證指南醫案. 서울:정담. 1998:463-73.
8. 전국한의과대학 본초학교실 편. *본초학*. 서울:영림사. 1991:167-8.
9. Paxinos G, Watson C, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York:Academic Press. 1986.
10. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. 2005:257-77.
11. American Psychiatric Association. *Diagnotics and statistical manual of mental disorders (4th edition)*. Washington DC. American Psychiatric Association. 1994:317-28.
12. 서원희, 이상룡. 울증과 우울증의 비교고찰. *대전대학교 한의학연구소 논문집*. 1997;6(1):505-14.
13. 朱震亨. 丹溪醫集. 北京:人民衛生出版社. 1993:344-5.
14. 황의완, 김지혁. *동의정신의학*. 서울:현대의학서적사. 1992:99-109, 608-11.
15. 匡調元. *中國傳統精神病理學*. 上海:上海科學普及出版社. 1995:150-1.
16. 呂光榮. *中國腦病證治*. 北京:科學技術文獻出版社. 1991:72-81.
17. 유희영. *동의정신과학*. 서울:남산당. 1994:58-62.
18. 上海中醫學院 編. *中醫內科學*. 香港:商務印書館. 1983:188-93.
19. Porsolt RD. Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev Neurosci*. 2000;11(1):53-8.
20. 박제민, 김종백, 강철중. 흰쥐의 중추성 Serotonin 고갈이 강제수영 중 부동자세 시간, 불안 및 수동적 회피 학습에 미치는 효과. *신경정신의학*. 1996;35(3):699-709.
21. Beck CH, Fibiger HC. Chronic desipramine alters stress-induced behaviors and regional expression

- of the immediate early gene, c-fos. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1995;5(2-3):331-8.
22. Vale W, Spiess J, Rivier C. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and β -endorphin. *Science*. 1981;213:1394-7.
 23. Safran M, Schally AV. The release of corticoprotein by anterior pituitary tissue in vitro. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1955;33:408-15.
 24. Hisano S, Fukui Y, Chikamori-Aoyama M, Aizawa T, Shibasaki T. Reciprocal synaptic relations between CRF-immunoreactive and TRH-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res.* 1993;620:343-6.
 25. Dunn AJ, Berridge CW. Physiological and behavioral responses to corticotrophin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress response?. *Brain Res. Rev.* 1990;15:71-100.
 26. Kalin NH, Takahashi LK, Chen FL. Restraint stress increases corticotrophin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus. *Brain Res.* 1994;656:182-6.
 27. Doucet JP, Squinto SP, Bazan NG. Fos-jun and the primary genomic response in the nervous system. *Mol Neurobiol.* 1990;4:27-55.
 28. Dragunow M, Robertson HA, Robertson GS. Amygdala kindling and c-fos protein. *Exp Neurol.* 1988;102:261-3.
 29. Hahn MK, Bannon MJ. Stress-induced c-fos expression in the rat locus coeruleus is dependent on neurokinin 1 receptor activation. *Neuroscience.* 1999;94(4):1183-8.
 30. 배춘상, 백서용, 조희중, 차중익, 천병훈 . 신경해부학. 서울:고문사. 1998:102-208.
 31. Mokha SS, Mcmillan JA, Iggo A. Descending control of spinal nociceptive transmission. Actions produced on spinal multireceptive neurones from the nuclei locus coeruleus(LC) and raphe magnus(NRM). *Exp. Brain. Res.* 1985;58:213-6.
 32. Nakazato, T. Locus coeruleus neurons projecting to the forebrain and the spinal cord in the cat. *Neuroscience* 1987;23:529-38.
 33. Crossman AR, Neary D. *Neuroanatomy*. New York:Churchill Livingstone 1996:65-69, 121-2.
 34. Daniel SM, Amer Karmal, Marten PS, Geert MJ. Modulation of cellular activity and synaptic transmission in the ventral tegmental area. *European Journal of Pharmacology* 2003 ;480:97-115.
 35. Ortiz J, Fitzgerald LW, Lane S, Terwilliger R, Nestler EJ. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. *Neuropsychopharmacology*, 1996 ;14(6):443-52.
 36. 조충훈. 淸火補心湯이 憂鬱症 模型動物의 絶望行動, 不安 및 腦의 TH와 c-fos 發顯에 미치는 效果. *동의신경정신과학지.* 2003;14(2):61-78.
 37. 강영건, 이태희. 구속 스트레스로 유발된 기억 손상에 대한 麥門冬의 신경보호 효능. *대한본초학회지.* 2006;21(2):63-75.
 38. 고동균, 이태희. 지골피가 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향, *대한본초학회지.* 2007;22:137-46.