

地骨皮가 강제수영부하실험에서 HPA-Axis System에 미치는 영향

구범모, 이태희
경원대학교 한의과대학 방제학교실

ABSTRACT

Effects of Lycii Radicis Cortex in HPA-Axis System on the Forced Swimming Test

Beom-Mo Koo, Tae-Hee Lee
Dept. of Formulae Pharmacology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

In order to investigate the antidepressant effects of Lycii Radicis Cortex on the change of HPA-Axis system, the forced swimming test was performed. The expressions of CRF and c-Fos in the PVN were measured with immunohistochemical method and the concentration of ACTH in Serum was evaluated with ELISA method. And the results obtained were as follows.

Results :

1. The duration of immobility in the forced swimming test was significantly decreased in the LRC100 group and the LRC400 group($P < 0.001$).
2. The expressions of CRF and c-Fos were significantly reduced in the LRC100 group and the LRC400 group($P < 0.001$). And the concentration of ACTH in Serum were significantly reduced in

-
- 교신저자 : 이태희
 - 경기도 성남시 수정구 복정동 산65 경원대학교 한의과대학 방제학교실
 - Tel : 031-750-5418 Fax : 031-750-5416
 - 접수 : 2010/ 10/ 29 수정 : 2010/ 11/ 20 채택 : 2010/ 12/ 01

the LRC 100 group($P<0.05$).

According to the results above mentioned, it can be considered that Lycii Radicis Cortex has antidepressant effects.

Key word : Lycii Radicis Cortex, FST, CRF, c-Fos, ACTH, HPA-Axis, antidepressant

1. 서론

우울증은 가장 흔한 정신 질환 가운데 하나로 살아가면서 일상적인 삶에 대하여 흥미를 느끼지 못하고 절망하는 병이다¹⁾. 어떤 순간에든, 인구의 약 5~6%가 우울하고, 인구의 약 10%가 일생 동안에 우울증에 걸린다고 추정되고 있다. 우울증은 여러 특징을 가지며, 다양한 방법으로 분류되는 이질적인 질환이다. 반응성(이차성) 우울증은 슬픔, 질병 등의 실제적 자극에 반응하여 발생하며, 모든 우울증의 60% 이상을 차지한다. 내인성 우울증은 통상적인 스트레스에 잘 대처하지 못하는 것으로 유발된 생활 사건이 우울증의 정도에 적절하지 않으며, 자율적이며, 어떤 연령에서도 발생할 수 있고, 생물학적으로 결정되는, 가족력이 있는 형태이다. 조울증과 연관된 우울증은 조증 삽화가 특징적이며 순환성을 갖는다²⁾.

Stress와 stress에 대한 개인의 민감도가 서로 연결이 되고 기분장애를 일으키며, HPA-Axis와 CRF 신호가 조절이 안될때 기분장애와 연결된다³⁾. 우울 상태가 발생하면 시상하부는 부신피질자극 호르몬 방출인자(Corticotropin Releasing Factor:CRF)를 통해 뇌하수체 전엽에서 ACTH(Adrenocorticotropic Hormone)를 방출하도록 촉진한다. ACTH가 방출되면 이것에 자극을 받아 부신은 코티졸(cortisol),

에피네프린(epinephrine), 노에피네프린(norepinephrine) 같은 호르몬을 분비한다. 코티졸은 간에서 이루어지는 포도당 생성 속도를 증가시켜 신체에 에너지를 더 많이 공급해 주지만, 코티졸의 과도한 분비는 임파구세포의 수와 효율성을 감소시키기 때문에 면역억제의 효과를 가져오게 되고, 질병에 대한 취약성도 증가된다⁴⁾.

한의학에서 鬱證은 침울하고 억압된 마음으로 모든 생리기능이 침체되는 현상으로 氣가 정체되어 발산할 수 없는 상태를 지칭할 수 있다. 대표적으로 肝氣鬱結을 들 수 있는데 이는 발산시킬 수 없는 욕구불만이나 지속되는 경우, 지나친 思慮나 슬픔 등이 원인이 되는 수가 많다⁵⁾. 柴胡抑肝湯은 鬱證을 치료하는 주요 처방이 되는데, 구성 약물 중 柴胡, 靑皮, 牡丹皮, 地骨皮, 梔子是 鎮靜작용과 淸虛熱하는 작용으로 鬱火로 인한 熱을 淸熱시키는 효과를 갖는다⁶⁾.

地骨皮는 茄科(가지과:Solanaceae)식물인 枸杞子나무(枸杞) *Lycium chinense* Mill. 또는 寧夏枸杞 *L. barbarum* L.의 근피로서, 淸熱涼血, 退虛熱의 효능을 가지고 있어 陰虛潮熱, 骨蒸盜汗, 肺熱咳嗽, 內熱消渴 등의 효능이 있어 임상적으로 널리 사용되는 약재이다. 주로 虛熱을 제거하는 효능이 좋고, 解熱, 降壓시키는 효과가 있다⁷⁾.

이에 저자는 柴胡抑肝湯의 구성약재인 地骨皮가 우울행동에 미치는 영향을 확인하기 위해 흰쥐에

게 강제수영부하실험⁸⁾을 실시하여 행동변화를 측정 한 다음, 면역조직화학법으로 HPA-Axis System과 관련하여 시상하부의 실방핵(PVN, Para-Ventricular Nucleus)에서 CRF와 c-Fos의 발현을 측정하였으며, ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 법으로 serum에서 ACTH(Adrenocorticotropic Hormone) 농도를 측정하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

중량 200g 내외에 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐 (Orient사)를 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 2주일 간 실험실 환경에 적응 시킨 후, 실험에 사용하였다. 낮과 밤 주기는 오전 7시부터 오후 7시 까지를 낮으로, 다른 12시간을 밤으로 하여 자동 조절하였다. 그리고, 온도는 20~24℃, 습도는 60±10%로 유지하였으며, 동물실험에 대한 가이드 라인을 준수하였다.

2) 한약재

연구에 사용한 한약재는 茄科(Solanaceae)에 속한 枸杞(Lycium chinense Mill.)의 근피를 건조한 것인 地骨皮(Lycii Radicis Cortex)를 HMAX사(제천, 충북)에서 구입하였다.

(1) 시료의 제조

地骨皮를 400g을 10배(w/v)량의 3차 증류수를 가하여 Round Flask에 넣고 냉각기를 부착한 다음 100℃에서 4시간 가열한 후, 거즈로 여과하여, 80℃에서 중탕 농축하여 하루 동안 -80℃에서 냉각시킨 후 -40℃로 동결건조 시켜 地骨皮 분말 19.65g을 획득하여 4.91%의 수득율을 나타내었다. 투약시는 건조된 약재를 분량에 맞게 생리식염수(10ml)를 첨가하여 사용하였다. 약물은 강제수영시험 부하 전 24시간, 5시간, 1시간으로 3회에 걸쳐 구강으로 투여하였다.

2. 실험 방법

1) 실험군

실험은 3그룹으로 나누어 실시하였다.

1. 대조군 : FST. 생리식염수 투여.
2. LRC100 : FST. 地骨皮(100 mg/kg) 투여.
3. LRC400 : FST. 地骨皮(400 mg/kg) 투여.

2) 강제수영부하실험

본 실험에서는 절망행동검사(Behavioral despair test)라고도 하는 표준화된 검사법인 강제수영부하 실험(FST, Forced Swimming Test)을 이용하였다. 이 검사법은 약물개발시의 항 우울 효과를 검색하는 기본적인 실험중 하나로, 두 번에 걸쳐 이루어진다. 첫 번째 날은 높이 50 cm, 지름 20cm의 투명한 아크릴원통형 수조에 30cm높이로 22℃의 물을 채워, 흰쥐의 꼬리가 바닥에 닿지 않을 정도의 물 높이에 강제로 빠뜨린 다음 15분간 있게 하는 예비수영 과정을 갖는다. 처음 수분간은 이를 벗어나기 위해 흰쥐가 심한 저항을 보이나, 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어난다. 24시간 후 두 번째 날에는 5분간 같은 환경에서 강제 수영을 시키고, 여기서 헤엄치기(swimming), 기어오르기(climbing), 부동행동(immobility)의 세 가지를 측정한다. 전형적인 immobility란 흰쥐가 얼굴을 포함한 상체의 일부분만 수면 위로 드러낸 채 몸의 균형을 유지하기 위하여 약간의 움직임만을 나타낼 뿐 물 위에 떠 있는 상태를 말한다. 한편, swimming은 흰쥐가 수면 위를 돌면서 움직이고, 간혹 물밑으로 잠수하기도 하는 상태이다. climbing은 가장 격렬한 운동 상태인데, 앞발을 적극적으로 사용하여 아크릴 원통 위로 올라오려고 사지를 다 사용하는 상태이다. 실험 측정에서의 실수와 사람에 의한 오차를 줄이기 위해 비디오카메라로 촬영하여 자료를 확보하였다⁹⁾.

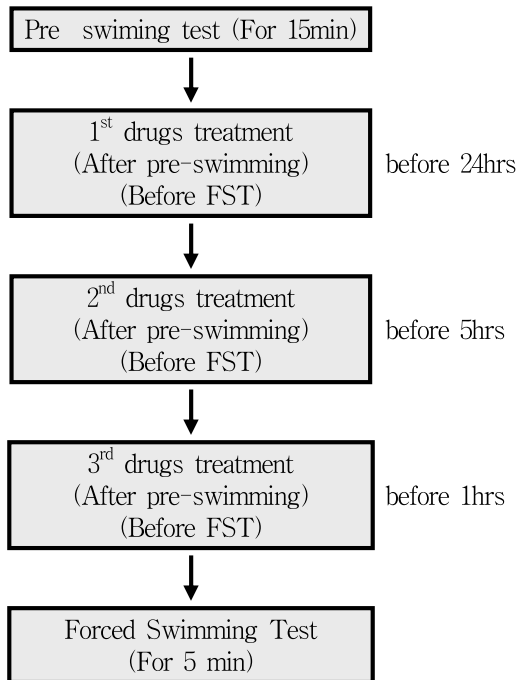


Fig. 1. Experimental Scheme of the Forced Swimming Test

3) 면역조직화학법

(1) CRF(Corticotropin Releasing Factor) 발현 측정

강제수영 부하시험이 끝난 흰쥐를 sodium pentobarbital(80mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 0.9% saline 200 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 100 ml을 심장을 통해 관류 하였다. 고정액의 처음 300 ml은 2분간, 나머지 700 ml은 25분간에 걸쳐 관류 하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 후 고정 시키고, 20% sucrose가 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, Delaware Avenue, CA, U.S.A.)에 담구었다. Primary antibody는 0.3% Triton X100(PBST)

에서 2% normal donkey serum과 0.001% keyhole limpet hemocyanin (Sigma, St.Louis, MO, U.S.A.)으로 200배로 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 primary antiserum에서 72시간 배양하였다. 그 후 뇌 조직을 PBST로 씻은 다음, 2시간 동안 실온에서 2% normal donkey serum을 함유하는 PBST에서 200배로 희석한 biotinylated goat anti goat serum(Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, U.S.A.)에 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Vectastain ABC reagent (Vectastain, Burlingame, CA, U.S.A.)에 담구어 반응시켰다. PBST로 몇 번 행군 다음 뇌 조직을 착색제인 diaminobenzidine(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)을 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 부도¹⁰⁾를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자 (2×2 cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting하였다¹¹⁾.

(2) c-Fos 발현 측정

강제수영 부하시험이 끝난 흰쥐를 sodium pentobarbital(80 mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 0.9% saline 200 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 100 ml을 심장을 통해 관류 하였다. 고정액의 처음 300 ml은 2분간, 나머지 700 ml은 25분간에 걸쳐 관류 하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 후 고정 시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4°C에서 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 3 μ m의 크기로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, c-fos expression에 가장 널리 사용되는 Rabbit anti c-fos(Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, U.S.A.)에

담구였다. Primary antibody는 0.3% Triton-X100 (PBST)에서 2% normal goat serum과 0.001% keyhole limpet hemocyanin (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)으로 2000배로 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 Primary antiserum에서 72시간 배양하였다. 그 후 뇌 조직을 PBST로 씻은 다음, 2시간 동안 실온에서 2% normal goat serum을 함유하는 PBST에서 200배로 희석한 biotinylated goat anti-rabbitserum (Santa Cruz Biotechnology, Delaware Avenue, CA, U.S.A.)에 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Vectastain ABC reagent (Vectastain, Burlingame, CA, U.S.A.)에 담구어 반응시켰다. PBST로 몇 번 행군 다음 뇌 조직을 착색제인 diaminobenzidine(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)을 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 촬영 하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Franklin과 Paxinos의 부도¹⁰⁾를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자(2×2 cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting하였다¹¹⁾.

4) ELISA법을 통한 ACTH(Adrenocorticotropic Hormone)측정

행동 실험이 모두 끝난 뒤, 관류 전 심장에서 혈액을 채취한 후, 원심분리 후, 혈청 성분을 모아 -70 °C에서 보관한다. 다음날, ELISA 분석 1시간 전 혈액 샘플 및 ELISA kit을 냉장고에서 꺼내, 실온에 놔둔다. ACTH는 ELISA kit (ACTH(rat), Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA, U.S.A.)을 구입하여 분석하였다. Standard농도는 0.04 ug/dl-25 ug/dl로 범위를 정했고, 1stAntibody가 코팅되어 있는 96well에 sample과 standard를 50ul씩 넣고, biotinyl peptide를 25ul씩 넣고 2시간 incubation한다. Wash buffer를 이용해 3번 washing

후, SA-HRP(Streptavidin-Horseradish Peroxidase)를 100ul를 각 well에 넣어준다. 1시간 후, 3번 washing 하고, 100ul TMB를 이용해 1시간 동안 발색시킨다. 2N HCl을 이용해 반응을 멈추고, 450 nm에서 ELISA reader를 이용해 O.D.를 읽는다²⁰⁾.

5) 통계처리

모든 측정값은(평균값±표준편차)로 표시하였고, 각 실험군의 통계학적 분석은 window용 SPSS 15.0를 이용하였다. 행동 실험결과 및 면역조직 화학법에 대한 통계분석은 One-way ANOVA로 분석하였으며, 집단간 차이 분석을 위해 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, P값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

III. 실험 결과

1. 강제수영부하실험

FST 결과는 Fig. 2와 같다. Control에서 부동행동이 10.40±1.34 sec를 나타낸 것과 비교해서 LRC100에서는 4.57±1.39 sec, LRC400에서는 2.28±1.06 sec를 나타내 지골피 투여군에서 부동행동이 유의성 있게 농도 의존적으로 감소하였다(F(2,22)=11,102, P<0.001).

2. 면역조직화학법 결과

1) 실방핵(PVN)에서 CRF 발현 측정 결과

FST 실시 후, PVN 내에서의 CRF를 발현한 세포수는 Fig. 3-4 와 같다. 실험 결과를 보면 Control의 6.50±0.50에 비하여 LRC100에서는 4.28±0.56, LRC400에서는 3.42±0.29로 나타나 지골피 투여군에서 PVN 내에서의 CRF의 발현이 유의성 있게 농도 의존적으로 감소되었음을 알 수 있었다(F(3,33)=12.610, P<0.001).

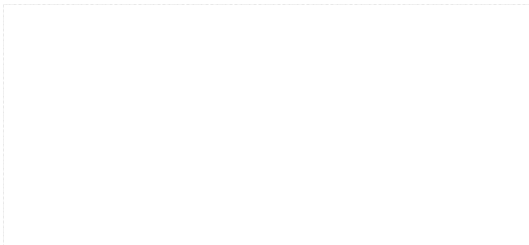


Fig. 2. Effect of Lycii Radicis Cortex in Forced Swimming Test

Saline and Lycii Radicis Cortex was administered intragastrically 24hrs, 5hrs, 1hr before FST. Behaviors of the rodents were tested in FST. Values are presented as Mean±S.D. of 8 animals / group. Control : FST and Saline
 LRC100 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg)
 LRC400 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg)
 * : Significant difference compared with control group (*: P<0.05)
 ** : Significant difference compared with control group (**: P<0.01)

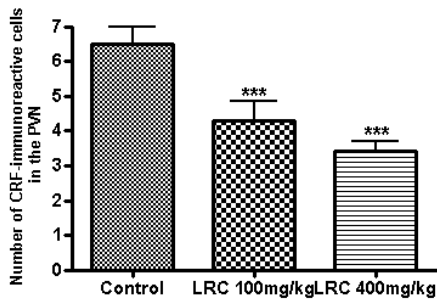


Fig. 3. Expression of CRF-immunoreactive cells in PVN

Saline and Lycii Radicis Cortex were administered intragastrically at 24hrs, 5hrs, 1hr before FST. Expression of CRF was measured after FST. Values are presented as Mean±S.D. of 8 animals / group. Control : FST and Saline
 LRC100 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg)
 LRC400 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg)
 *** : p<0.001 vs. control group, respectively

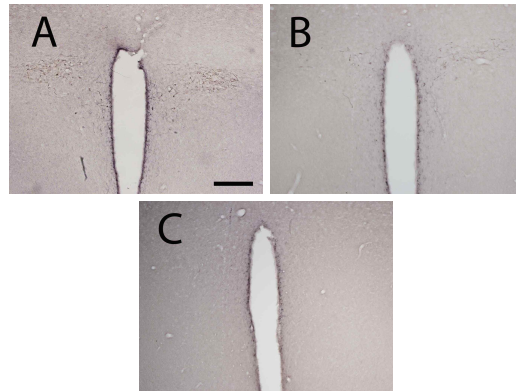


Fig. 4. Photograph of CRF-immunoreactive cells in PVN (scale bar represents 200 μm)

Saline and Lycii Radicis Cortex were administered intragastrically at 24hrs, 5hrs, 1hr before FST. Expression of CRF was measured after FST
 A : control : FST and Saline
 B : LRC100 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg)
 C : LRC400 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg)

2) 실방핵(PVN) 에서 c-Fos 발현 측정 결과

FST 실시 후, PVN 내에서의 c-Fos 발현 세포 수는 Fig. 5-6과 같다. 실험 결과를 보면 Control의 10.42±1.2 에 비하여 LRC100에서는 6.00±0.62, LRC400에서는 3.57±0.57로 나타나 지골피 투여군에서 유의성있게 농도 의존적으로 감소되었다(F(2,18)=17.03,p<0.001).

2. ELISA법을 통한 ACTH 발현 측정 결과

1) 혈청에서 ACTH 측정 결과

FST 실시 후, serum 내에서의 ACTH 발현은 Fig. 7과 같다. 실험 결과를 보면 Control의 3.72±0.615에 비하여 LRC100에서는 0.96±0.45, LRC400에서는 3.25±0.05로 나타나 LRC100에서 유의성 있게 감소하였고, LRC400에서는 약간의 감소가 있었다 (F(3,8)=9.758, p<0.05).

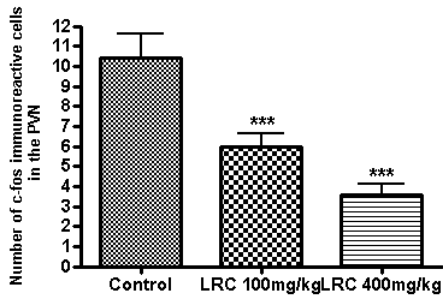


Fig. 5. Expression of c-Fos-immunoreactive cells in PVN

Saline and Lycii Radicis Cortex were administered intragastrically at 24hrs, 5hrs, 1hr before FST. Expression of c-fos was measured after FST. Values are presented as Mean±S.D. of 8 animals / group.
 Control : FST and Saline
 LRC100 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg)
 LRC400 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg)

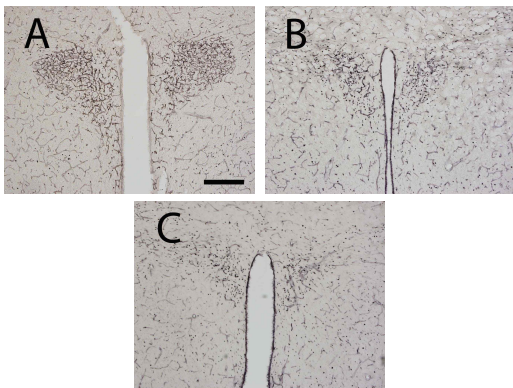


Fig. 6. Photograph of c-Fos-immunoreactive cells in PVN (scale bar represents 200 μm)

Saline and Lycii Radicis Cortex were administered intragastrically at 24hrs, 5hrs, 1hr before FST. Expression of c-fos was measured after FST
 A : Control : FST and Saline
 B : LRC100 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg)
 C : LRC400 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg)

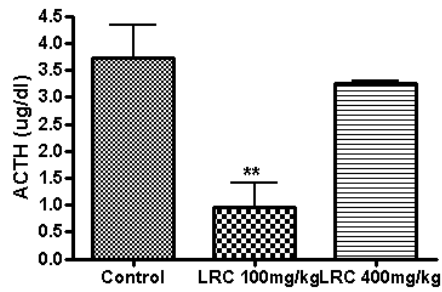


Fig. 7. ACTH concentration in Serum

Saline and Lycii Radicis Cortex were administered intragastrically at 24hrs, 5hrs, 1hr before FST. Concentration of ACTH was measured by ELISA method after FST. Values are presented as Mean ± S.D. of 8 animals / group.
 Control : FST and Saline
 LRC100 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (100 mg/kg)
 LRC400 : FST and Decoction of Lycii Radicis Cortex (400 mg/kg)
 ** : Significant difference compared with control group (** P<0.01)

IV. 고찰

우울증은 유전적, 발달적, 환경적 요소들의 상호작용을 통해 유발되는 심각한데 또한 매우 일상적인 장애이다. 슬픔 등 우울한 기분이 특징적이며, 집중력 저하, 수면장애, 심한 피로감 등이 나타나며, 신체적인 불편함이나 통증과도 연관된다. 기분의 조절에는 뇌의 다양한 메카니즘이 연관되어 있고 우울 상태의 조절에는 매우 선택적인 약물들이 적용된다. 일생동안 주요우울증에 이환될 위험성은 10~15%정도로 높으며, 우울증은 생산성을 감소시켜서 사회, 경제적 부담이 되고, 지속적인 의학적 치료가 필요하며, 자살로 이어질 수도 있고, 다른 심각한 장애로 이어질 수도 있는 취약성을 가지고 있다¹²⁾.

우울증에 대한 치료는 약물치료, 정신치료, 사회치료, 행동치료 등을 들 수 있으나 약물치료가 주가 되는 경우가 많다¹³⁾. 그러나 경한 우울증에

서 약물 치료의 효능이 충분히 입증되지 못하였고, 세로토닌과 노에피네프린에 주로 작용한다고 알려져 있기는 하지만 다양한 약물치료의 작용기전은 아직도 완전히 알려지지 않은 상태이다²⁾. 최근까지 발매된 우울증 치료제는 주로 SSRI에 집중되었으나 이 약들은 본질적으로 증상의 개선에 초점을 두고 있어 구체적인 치료효과는 기대하기 어려운 점이 있으며 항우울 치료제는 성기능 장애, 불면증, 전신피로 등 여러 부작용을 가지고 있어¹⁴⁾ 항우울제에 대한 많은 연구가 더 필요한 상황이며 한약제제로 우울증 치료에 대한 연구도 더욱 필요한 상태라 할 수 있다.

한의학에서 鬱證은 침울하고 억압된 마음으로 모든 생리기능이 침체되는 현상으로 氣가 정체되어 발산할 수 없는 상태를 지칭할 수 있다. 대표적으로 肝氣鬱結을 들 수 있는데 이는 발산시킬 수 없는 욕구불만이나 지속되는 경우, 지나친 思慮나 슬픔 등이 원인이 되는 수가 많다⁵⁾. 이러한 鬱證을 해소할 수 있는 처방으로 柴胡抑肝湯을 사용할 수 있으며⁶⁾ 柴胡抑肝湯에 대한 그간의 연구로는 박 등¹⁵⁾이 柴胡抑肝湯의 항 stress 효능을 연구한 결과가 있고, 김 등¹⁶⁾이 柴胡抑肝湯 등 약물의 전 처치가 스트레스로 유발된 생쥐의 Corticosterone 변화에 미치는 영향을 연구하였으며, 조 등¹⁷⁾이 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향을 연구하였다.

地骨皮는 柴胡抑肝湯의 구성 약물 중 하나이며 주로 淸虛熱하는 작용을 통하여 柴胡抑肝湯에서 항우울, 항스트레스 작용을 하는 역할을 한다고 할 수 있다^{6,26)}. 地骨皮의 항우울이나 스트레스 억제 작용에 관한 연구로는 고 등²⁷⁾이 地骨皮의 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향을 연구하여 기억증진과 항우울 효과가 있음을 보고한 내용이 있으며, 김²⁸⁾의 地骨皮와 베타인의 항우울제적인 효과의 연구가 있었으며, 박²⁹⁾ 등의 청피와 지골피 합제가 갖는 항우울효과에 대한 연구가 있었다.

地骨皮는 茄科(가지과: Solanaceae) 식물인 枸杞子나무(枸杞) *Lycium chinense* Mill. 또는 寧夏枸杞 *L. barbarum* L.의 근피로서, 淸熱涼血, 退虛熱의 효능을 가지고 있어 陰虛潮熱, 骨蒸盜汗, 肺熱咳嗽, 內熱消渴 등의 효능이 있어 임상적으로 널리 사용되는 약재이다⁷⁾. <神農本草經>에는 “主五內邪氣, 熱中消渴, 周痺, 久服堅筋骨, 輕身不老” 라고 기재되어있고¹⁸⁾, <名醫別錄>에는 “主治風濕, 下胸脇氣, 客熱頭痛, 補內傷, 大勞, 呼吸, 堅筋骨, 強陰, 利大小腸, 久服耐寒暑”라고 기재되어 있으며¹⁹⁾ 주로 虛熱을 제거하는 효능이 좋고, 解熱, 降壓시키는 효과가 있으며, 骨蒸潮熱의 대표적인 약이다⁷⁾. 地骨皮가 갖고있는 여러 가지 효능에 대한 실험적 연구로는 고지혈증²⁰⁾, 고혈당²¹⁾, 해열²²⁾, 고혈압²³⁾, 진통²⁴⁾, 손상된 간기능회복²⁵⁾ 등에 효과가 있는 것이 연구, 보고된 바가 있다.

우울상태에서는 HPA-Axis System이 관여하는데 우울상태로 증가된 CRF는 전구물질인 POMC를 합성하고 뇌하수체전엽에서 ACTH로 분해를 촉진하여 유발시키는 반응체계가 있으며, 또한 증가된 CRF는 Early gene으로서 c-fos 생성물이 c-Fos 단백질을 증가시키는 작용을 하게 되는 것이다³⁰⁾.

우울 장애에는 Neurotransmitter, peptide, cytokine 등이 작용하게 된다³¹⁾. Stress는 평행상태를 동요시키는 것으로 정의되며 내분비와 자율신경계의 반응을 일으킨다. Stress 반응을 하는 동안 CRF는 HPA-Axis를 뇌하수체 전엽에 있는 CRFR1(CRF 수용체1)을 활성화시켜 ATCH를 분비하도록 자극한다. ACTH는 혈액내로 들어가서 부신피질에 있는 MCI receptor에 작용하여 glucocorticoid를 합성 분비케 한다. 뚜렷한 부정피먹임 기전(negative feedback system)은 시상하부에서 더 이상 CRF가 분비되지 않도록 한다. Stress는 central CRF 분비를 자극하고 전통적인 fight and flight 반응을 나타내도록 자율신경계를 흥분시켜서 노에피네프린, 에피네프린을 혈액내로 분비시킨다³⁾.

본 연구에서는 흰쥐의 우울행동을 유발하기 위

한 방법으로 FST를 사용하였다. FST는 실험방법이 비교적 간단하고 예측타당도가 인정되기 때문에 항우울제의 효과관정을 위한 방법으로 널리 사용되고 있으며 절망행동모델이라고도 한다. 흰쥐를 도피가 불가능한 수조에 빠트리고 관찰했을 때 특징적인 부동자세를 취하는 것이 나타나게 되는데, 이런 행동 상태를 스트레스로 유발된 무력감 혹은 절망행동으로 보고 우울증의 동물모형으로 제안된 것이다⁸⁻⁹⁾.

본 실험의 FST 결과를 살펴보면 LRC100, LRC400 모두에서 Control에 비하여 地骨皮 투여후 흰쥐의 부동행동 시간이 감소된 것을 볼 수 있다. 따라서 地骨皮 투여가 흰 쥐의 부동행동을 유의성 있게 억제하는 것을 관찰할 수 있어 地骨皮가 흰쥐의 우울행동을 억제하는 것으로 판단된다

CRF는 Stress 반응의 key stimulator 가 되며 PVN, Amygdala, cortex, brainstem 등에서 발견되며, CRFR1, CRFR2의 두 가지 receptor가 알려져 있다³⁾. 뇌하수체의 부신피질 자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH, corticotropin)과 베타-엔돌핀(β -endorphin)의 분비를 자극하는 시상하부 호르몬으로 정서, 통증, 혈압변화에 의하여 조절된다²⁾.

c-Fos 단백질은 우울 상태로 인한 자극이 있을 때 PVN에서 신경흥분의 증거로서 초기에 발견된다. 여러 약물이나 스트레스를 포함한 생리적 자극에 의하여 발견되므로, 우울증 연구에서 자주 관찰되는 지표이며, 대부분의 연구에서 CRF를 주입했을 때 c-Fos 단백질이 발견되는 것을 볼 수 있었다³¹⁾. 최근에 in vitro에서 AtT-20 corticotroph tumor cell에서 CRF로 자극했을 때 Immediate Early c-fos gene이 빠르고 일시적으로 유도된다는 연구 결과가 나왔고, CRF가 AtT-20 corticotroph tumor cell에서 c-Fos 의존적 활성화를 통해서 POMC gene transcription이 POMC gene의 first axon에서 일어난다는 보고도 있다³⁰⁾.

ACTH의 전구물질인 POMC(proopiomelanocortin)는 뇌, 뇌실주위 시상, 뇌하수체, 위장관, 생식기계

에서 합성되며 POMC는 뇌하수체전엽에서 ACTH, 베타-엔돌핀, 베타-리포프로틴, 멜라닌세포로 분해된다. ACTH는 전신순환으로 가서 글루코코르티코이드, 알도스테론, 안드로젠을 합성하고 분비한다. 또한 CRF에 의해 조절되며, 노에피네프린, 에피네프린, arginine vasopressin, 옥시토신, 안지오텐신II에 의해서도 조절된다³³⁾.

PVN 내에서의 CRF 발현 실험에서는 LRC100, LRC400 모두에서 유의성있게 농도 의존적으로 감소되었음을 볼 수 있었는데, LRC100보다 LRC400에서 더 큰 감소를 보여 地骨皮 투여 용량에 따라 CRF 발현이 감소되는 것을 볼 수 있었다.

c-Fos의 발현에서는 LRC100과 LRC400 양쪽에서 모두 효과를 보였으며 LRC100보다 LRC400에서 더 큰 감소를 보여 地骨皮 투여 용량에 따라 c-Fos 발현이 감소됨을 볼 수 있었다.

혈청 ACTH의 농도 변화에서는 LRC100에서 만 유의성 있는 감소가 나타나고 LRC400에서는 감소하는 변화를 보였지만 감소 정도가 크지 않았다. 이는 CRF감소가 용량에 따라 더 커졌던 이번 실험 결과와 달리 LRC400에서는 ACTH 감소량이 오히려 더 적었다는 점은 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

이상과 같은 실험을 통해서 地骨皮의 항우울 작용에 대하여 알아보았다. 본 실험에서는 地骨皮 투여가 우울상태에서의 반응체계인 HPA-Axis System에 미치는 영향을 확인하기 위하여 강제수영부하 실험을 하고, PVN에서의 CRF 발현과 C-Fos 단백질 발현, Serum 내 ACTH 농도를 측정하여 地骨皮의 항우울 효과를 확인한 것이다. 실험 결과를 보면 地骨皮 투여가 강제수영부하실험에서 부동행동을 감소시키는 작용을 보였고, 이에 따라 PVN에서 CRF의 발현을 억제시킴으로써 C-Fos 생성과 ACTH 분비를 감소시켜 HPA-Axis System의 중추부위를 억제시킴으로써 우울행동을 억제시키는 항우울 효과가 있는 것으로 사료된다.

V. 결 론

地骨皮 투여가 흰쥐의 우울행동에 미치는 효과를 알아보기 위해 FST를 실시하여 행동변화에 미치는 영향을 보고, 면역조직화학법으로 FST가 끝난 흰쥐의 시상하부의 PVN에서 CRF와 c-Fos의 발현을 측정하고 serum에서 ACTH의 농도를 측정하여 HPA-Axis System에 대한 효능을 확인한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 강제 수영 부하 실험을 실시하고 부동행동이 나타나는 시간을 관찰한 결과, 대조군에 비해 地骨皮 투여군(LRC100, LRC400) 모두에서 의미있는 감소를 보였다($P<0.001$),
2. HPA Axis에 대한 地骨皮 투여가 미치는 영향은 시상하부의 PVN에서 地骨皮 투여군 LRC100과 LRC400 모두에서 CRF와 c-Fos의 발현이 의미있는 감소를 보였고($P<0.001$), 혈청 ACTH 농도는 LRC100에서만 유의성있게 감소되었고($P<0.05$), LRC400에서는 약간의 감소가 있었다.

이상과 같은 실험결과를 볼 때, 地骨皮 투여가 FST에서 부동행동을 감소시키고 시상하부의 PVN에서 CRF의 발현을 억제시킴으로써 C-Fos 생성과 ACTH 분비를 감소시켜 HPA-Axis System의 중추부위를 억제시킴으로써 우울행동을 억제시키는 항우울 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 경원대학교 교내 연구비 지원에 의해 연구되었음.

참고문헌

1. 대한신경정신의학회. 신경정신과학. 서울:하나
2. Bertram G. Katzung. 의과대학 교수편. Katzung's 임상약리학. 7판. 도서출판 한우리. 1998:546-60.
3. Tracy L. Bale. Sensitivity to stress: Dysregulation of CRF pathways and disease development. Hormones and Behavior. 2005;38:1-10.
4. 이인혜. 현대인의 정신건강. 大旺社. 2005:69-75.
5. 조홍건 편저. 실용한방정신의학. 서울:유진문화사. 2002:184-90.
6. 강순수. 바른방제학. 서울:대성문화사. 1996:413-4.
7. 전국한의학대학본초학교수 공편저. 본초학. 개정4판. 서울:영림사. 1998:237-8.
8. Dawson, GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. Trends Pharmacol. 1995;16(2):33-6.
9. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in rats : A new model sensitive to antidepressant treatments. European Journal of Pharmacology. 1978;47(4):379-91.
10. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press. New York. 1986.
11. Arthur H Swiergiel, Yueping Zhou, Adrian J Dunn. Effects of chronic footshock, restraint and corticotropinreleasing factor on freezing, ultrasonic vocalization and forced swim behavior in rats. Behavioal Brain Research. 2007;183 :178-87.
12. Mark J. Millan. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. Pharmacology & Therapeutics. 2006;110:135-370.
13. 전국의과대학교수 역. Current Medical Diagnosis & Treatment. 37판. 도서출판 한우리. 1999: 1135-45.
14. 가톨릭대학교. 만성스트레스의 행동학적 및 생

- 물학적 기전 연구를 통한 스트레스 조절인자 개발. 2008.
15. 박미순, 정진홍, 유동열. 시호역간탕의 항 stress 효능에 대한 연구. 대한한방부인과학회지. 2000; 13(1):220-63.
 16. 김현준, 이태희. 柴胡抑肝湯 등 藥物의 前處置가 拘束 스트레스로 유발된 생쥐의 血中 Corticosterone 變化에 미치는 影響. 대한한의 학방제학회지. 2002;10(2):57-72.
 17. 조용국, 이태희. 柴胡抑肝湯이 스트레스로 인 한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향. 2007; 15(2):147-60.
 18. 孫星衍輯. 神農本草經. 台北:文光圖書有限公司. 1979:93.
 19. 陶弘景集·尙志鈞輯校. 名醫別錄. 北京:人民衛 生出版社. 1986:44.
 20. 조현상. 흰쥐의 고지혈증과 고혈압에 대한 枸 杞子和 地骨皮의 효능 연구. 경희대학교 대학 원. 2006.
 21. 손예건. 枸杞子, 枸杞葉, 地骨皮가 高血壓, 고 지혈증 및 고혈당에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1993.
 22. 성낙기, 김성훈, 서영배, 오안향. 地骨皮와 枸 杞便皮가 血糖, 解熱, 血壓, 血液學的 變化에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1994;9(1):161-71.
 23. 이화준. 豨簽地骨皮湯 약침제제가 高血壓 및 高脂血症에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1994.
 24. 이장재. 地骨皮 Hexane 藥鉞이 鎮痛 및 血糖 變化에 미치는 影響. 대전대학교 대학원. 1996.
 25. 曹永周, 金聖勳. 地骨皮 EA分劃의 CCl₄ 損傷 肝에 대한 保護作用. 동의병리학회지 1997; 11(2):63-71.
 26. 李尙仁, 安德均, 李民教, 盧昇鉉, 李暎鍾, 金先 熙 譯. 韓藥임상응용. 전통의학연구소. 1998 :111-2.
 27. 고동균, 이태희. 地骨皮가 스트레스로 인한 기 억저하와 우울행동에 미치는 영향. 대한본초학 회지. 2007;22(2):137-46.
 28. 김수정. 우울증 동물 모델에서 地骨皮와 베타 인의 항우울제적인 효과. 경희대학교 동서의학 대학원. 2005.
 29. 박수현, 이태희. 청피와 지골피 합제가 강제수 영부하실험에서 HPA-Axis와 Catecholamine계 변화에 미치는 영향. 경원대학교 대학원. 2010.
 30. Dominic J. Autelitano. Stress-Induced Stimulation of Pituitary POMC Gene Expression is Associated with Activation of Transcription Factor AP-1 in hypothalamus and Pituitary. Brain Ressearch Bulletin. 1998;45(1):75-82.
 31. Hymie anisman, Zul Merali, Shawn hayley. Neurotransmitter, peptide and Cytokine porcesses in relation to depressive disorder: Comorbidity between depression and neurodegenerative disorder. 2008;85:1-74.
 32. Lixin Wang, Sylvain Cardin, Vicente Martinez, Yvette Tache. Intracerebroventricular CRF inhibits cold restraint-induced c-fos expression in the dorsal motor nucleus of the vagus and gastric erosions in rats. Brain Research. 1996;736:44-53.
 33. 김금순. 스트레스반응의 생 행동적 접근. 간호 학의 지평. 2005;2(1):61-75.