

우울증 유발 생쥐에서 溫膽湯加烏藥의 항우울 효과

이은희 · 정인철*

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Anti-Depressive Effects of OnDam-Tang with Addition of *Linderae Radix* (ODT-L) after Chronic Immobilization Stress in C57BL/6 Mice

Eun Hee Lee, In Chul Jung*

Department of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Daejeon University

The purpose of this study was to examine the anti-depressive effects of OnDam-Tang with addition of *Linderae Radix* (ODT-L) on the animal model of depression induced by chronic immobilization stress. Depression model was made by chronic immobilization stress for 2 hours for 21 days. And we performed forced swimming test, analysis of the neurotransmitter and immunohistochemical staining, measured expression levels of serotonin in the brain. ODT-L has decreased immobilization time in forced swimming test. ODT-L has increased amount of melatonin in the brain. ODT-L has increased expression levels of serotonin in the brain. ODT-L prevented damage in the hippocampal region. ODT-L has reduced the expression level of CRF receptors in hippocampus region. These results suggest that ODT-L may have anti-depressive effects on depression.

Key words : OnDam-Tang with addition of *Linderae Radix* (ODT-L), Immobilization stress, Anti-depressive effect, Depression, Serotonin

서 론

우울증은 우울한 기분, 흥미의 감소, 식욕 및 체중 변화, 불면 또는 과수면, 무가치감 등의 증상들로 이루어진 일련의 증후군으로, 반복되는 재발 삽화가 특징적인 질환이다¹⁾.

평생유병률이 약 10% 정도로 매우 흔한 질환일 뿐 만 아니라, 높은 재발률이 특징으로 2년 후 재발률이 25-40%이고 점차 재발률이 증가해서 5년 후에는 60%, 10년 후에는 75%, 15년 후에는 87%에 이른다고 알려져 있다²⁾. 이러한 높은 재발률은 우울증으로 인해 발생하는 막대한 규모의 사회경제적 비용손실의 원인이 된다³⁾. 이러한 우울증은 국내에서도 점차 증가 추세로 보건복지부에서 발표한 2011년 정신질환실태 역학조사에 따르면 국내 우울증의 평생유병률은 전체 6.7%(남 4.3%, 여 9.1%)로 2001년에 비해 1.5배 이상 증가하였으며 남녀 모두에서 증가추세로

* To whom correspondence should be addressed at : In Chul Jung,

Department of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon, Korea

· E-mail : npjeong@dju.kr, · Tel : 042-280-2600

· Received : 2014/05/29 · Revised : 2014/06/30 · Accepted : 2014/08/12

나타났다⁴⁾.

우울증의 원인은 유전적 요인, 생물학적 요인, 심리사회적 요인들이 복합적으로 작용할 것으로 추정되며, 신체질환이나 약물에 의해서도 발생할 수 있다⁵⁾. 모노아민 가설은 monoamine 특히 norepinephrine 이나 serotonin 활성화도 감소가 우울증의 발병에 중요한 역할을 한다는 가설로, 우울증의 발생과 관련된 가설 중 가장 잘 알려진 이론이다⁶⁾.

한의학에서는 우울증을 鬱證의 개념으로 간주하여 접근하고 있다. 鬱證은 氣機가 鬱滯되어 생기는 병으로 주로 情志不舒가 그 원인이 되며⁷⁾, 心情抑鬱, 情緒不寧, 胸部滿悶, 脇肋脹痛, 或易怒欲哭, 或咽中如有異物梗阻 등의 증상을 보이며, 肝鬱脾虛, 肝鬱氣滯, 痰迷心竅, 心脾陽虛, 脾腎兩虛 등의 변증으로 분류하여 진단 및 치료가 이루어진다⁸⁾.

한편 溫膽湯은 唐代 《千金要方》⁹⁾에 처음 수록되어 “治大病後 虛煩 不得眠, 此膽寒故也, 宜服溫膽湯方”이라 하여 虛煩, 不得眠 등의 증상을 치료한다고 기술되어 있는데, 氣鬱로 인해 心脾經에 痰涎이 阻滯되고, 이로 인해 心膽이 虛怯하여 발생하는 驚悸, 不得眠 등을 치료하는 처방으로⁹⁾, 心膽虛怯, 觸事易驚, 夢寐不祥 등의 증상에 사용되고 있다¹⁰⁾.

溫膽湯과 관련된 연구로는 수면시간연장에 관한 효과¹¹⁾, 중추신경 억제작용에 관한 연구¹²⁾, 스트레스성 뇌신경전달물질 변화에 미치는 영향 등의 실험적 연구¹³⁾, 심박수 변이도(Heart rate variability)를 이용한 자율신경실조증 환자의 치험례¹⁴⁾, 심혈관 질환에 대한 연구¹⁵⁾, 항산화와 serotonin 대사에 관한 연구¹⁶⁾ 등이 있었으나 동물 모델을 통한 항우울효과에 대한 연구는 미진한 편이다.

烏藥은 溫, 辛, 無毒한 性味로 脾, 肺, 腎, 膀胱에 歸經하며 烏藥順氣散, 開結舒經湯 등의 처방에서 쓰이며, 氣鬱, 七情六鬱 등에 활용되는 藥材이다¹⁷⁾.

이에 저자는 溫膽湯에 順氣開鬱하는 효능을 가진 烏藥¹⁷⁾을 가한 溫膽湯加烏藥의 항우울 효과를 알아보기 위해 강제수영 검사(forced swimming test), 신경전달물질 분석, 뇌 내 serotonin 양 측정, 뇌조직손상 분석, 뇌 면역조직화학염색 분석 등을 시행하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 溫膽湯加烏藥(OnDam-Tang with addition of *Linderae radix*, ODT-L)은 《東醫寶鑑·夢》¹⁰⁾의 溫膽湯에 烏藥을 4.0 g 가미한 것으로, 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of OnDamT-tang with addition of *Linderae Radix* (ODT-L)

Herb	Botanical Nomenclature	Quantity(g)
半夏	<i>Rhizoma Pinelliae</i>	8.0
陳皮	<i>Pericarpium Citri Reticulatae</i>	8.0
白茯苓	<i>Poria</i>	8.0
枳實	<i>Fructus Aurantii Immaturus</i>	8.0
青竹茹	<i>Folium Phyllostachydis Henonis</i>	4.0
生薑	<i>Rhizoma Zingiberis Recens</i>	4.0
大棗	<i>Fructus Jujubae</i>	2.0
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2.0
烏藥	<i>Linderae Radix</i>	4.0
Total amount		48.0(g)

2) 시약

본 실험에 사용된 분석용 시약은 formaldehyde, dopamine, serotonin, melatonin, epinephrine, norepinephrine, fluoxetine, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), sucrose, spermine, spermidine, HEPES, MgCl₂, KCl, DTT, PMSE, protease inhibitor, phosphatase inhibitor, NP-40는 Sigma사(St Louis, MO, U.S.A.) 제품을 사용하였으며, HPLC grade:MeOH, HPLC grade:CHCl₃, HPLC grade:Water, HPLC grade:CH₃CN등은 Merck사(Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였고, Serotonin ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kit는 Enzo life Sciences사(NY, U.S.A.) 제품을, Fluorescein goat anti-rabbit IgG-conjugated secondary Ab(1:4000, Amersham, U.S.A.)와

ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.), Rabbit anti-mouse CRF, anti-mouse CRF-1 mAb는 Santa-Cruz사(California, U.S.A.) 제품을, LSAB kit는 DAKO 사(Glostrup, Denmark) 제품을 사용하였으며, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

3) 기기

열탕추출기(대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치(Rotary vacuum evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), CO₂ 배양기(Forma scientific Co., U.S.A.), 원심분리기(한일과학, Korea), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), spectrophotometer (Shimadzu, Japan), Bio-freezer (Sanyo, Japan), ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.), HPLC (Waters Co. Milford, MA, U.S.A.), DAD detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), degasser (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), Luna C18 column (Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.), Axio Scope. A1 (Zeiss, Germany) 등을 사용하였다.

4) 동물

수컷 6주령의 20~22 g C57bl/6 생쥐(대한바이오링크, 대한민국)를 공급받아 실험 당일까지 고품사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2℃, 습도 55±15%, 12 시간의 light-dark cycle 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였고, 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인(승인번호 DJUAR2012-016)을 받았다.

2. 방법

1) 검역의 조제

溫膽湯加烏藥 2첩 분량(96 g)에 증류수 2,000 ml를 가하여 3 시간 동안 가열한 후 여과하여 얻은 액체성분을 감압 증류 장치(rotary vacuum evaporator)에서 감압 농축하여 추출하였다. 농축된 용액을 동결 건조기(freeze dryer)로 동결 건조하여 10.2 g의 분말을 얻었다(수율 10.6%). 얻어진 분말은 냉동고(-84℃)에 보관하면서 사용하였다.

2) 실험군 및 약물 투여방법

실험군은 C57bl/6 생쥐 10마리를 한 그룹으로 하여 5군으로 다음과 같이 나누었다.

(1) 정상군(C57bl/6-WT) : 구속 스트레스(immobilization stress) 없이 사육, 증류수 경구투여.

(2) 대조군 (CIS-NS) : 21일간 2시간씩 별도로 제작한 conical tube에서 구속시키고, 구속스트레스를 가하기 2시간 전에 증류수 경구투여.

(3) 양성대조군 (CIS-FLU) : 대조군과 동일하게 구속스트레스를 가하고, 구속 2시간 전에 fluoxetine 100 mg/kg 경구 투여

(4) 실험군 (CIS-ODT-L 204 mg/kg) : 대조군과 동일하게 구속 스트레스를 가하고, 구속 2시간 전에 溫膽湯加烏藥을 204 mg/kg 경구 투여.

(5) 실험군 (CIS-ODT-L 612 mg/kg) : 대조군과 동일하게 구속

스트레스를 가하고, 구속 2시간 전에 溫膽湯加烏藥을 612 mg/kg 경구 투여.

3) Immobilization stress에 의한 우울증 유발 생쥐 모델¹⁸⁾

수컷 C57bl/6 생쥐를 뒷면, 옆면, 마개에 여러개의 구멍이 나있는 50 ml conical tube (FALCON, BD)를 제작하여 구속 스트레스 우울증 생쥐모델 제작에 사용하였고, 하루 2 시간씩 21 일 동안 장기 구속 스트레스(chronic immobilization stress)에 노출된 마우스의 우울증 모델을 만들었다.

4) 강제수영 검사 및 부동시간 측정^{19,20)}

강제수영 검사는 윗면이 개방된 원통모양의 아크릴실린더 (지름 20 cm, 높이 40 cm)에 깨끗한 수돗물(수온 25±2℃)을 실린더 바닥에서부터 15 cm까지 부은 후, 우울증 생쥐 모델을 15분 동안 강제로 수영시키고, 물에서 건져 올려 마른 수건으로 닦고 사육상자로 돌려보냈다(pretest session). 24시간 후에 동물을 동일한 장비에 5분 동안 빠뜨렸다(test session). 검사시행 전제를 캠코더 등의 기록 장치를 이용하여 기록하고, 기록된 영상을 통하여 test session(5분) 동안 다음의 동물의 행동을 나타내는 시간을 측정하였다. 또는 5초에 한 번씩 sampling 하는 방식으로 3종류의 동물 행동의 시간(time)과 빈도(frequency)를 측정하였다. 강제수영 검사는 동물이 발버둥치지 않고 물위에 떠 있는 행동으로 수면 밖으로 머리를 내놓는 데 필요한 움직임 이외에 아무 움직임이 없는 상태인 부동성의 증가를 절망행동의 지표로 삼았다(immobility behavior). 그리고 실린더 주위를 수평 방향으로 움직이는 행동으로 Immobility behavior 보다도 더 적극적으로 움직이는 행동(swimming behavior)과 벽을 향해 앞발을 물 밖으로 차올리는 다소 격렬하게 움직이는 행동(climbing behavior)으로 구분하였다. 검사 회기(test session)동안 각 행동을 측정하거나 혹은 검사 전 회기(pretest session) 15분 중 마지막 5분과 검사회기 5분의 측정치를 비교하였다(Fig. 1).

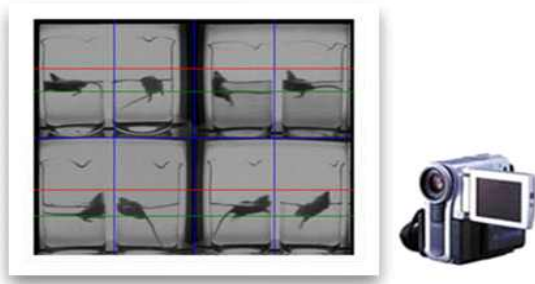


Fig. 1. Forced swimming test

5) 뇌 안의 신경전달 물질 분석

생쥐의 뇌를 적출하여 호모제나이저(homogenizer)로 균질화한 후 5 ml 메탄올(Methanol, Merck)을 가하여 6시간 이상 shaking water bath(비전과화)에서 배양한 후 3M filter로 모두 거른 다음 0.2 ml로 가압 농축한다. 농축된 메탄올 추출액을 HPLC 분석을 통하여 serotonin, melatonin의 함량을 분석하였다.

6) HPLC를 이용한 표준성분 및 신경전달 물질 분석

뇌 메탄올 추출물 분석을 위한 HPLC는 Agilent 1200 series

로서 autosampler, column oven, binary pump, DAD detector, degasser를 사용하였으며, software는 Agilent사의 Chemstation software (Agilent Technologies, Avondale, CA, U.S.A.)를 사용하였다. HPLC 조건으로 컬럼 오븐의 온도는 25℃, 분석파장은 220 nm, 유속은 0.3 ml/min를 사용하였고, 컬럼은 Luna C18 column (250 mm x 4.6 mm, particle size 5 μm)를 사용하였다. 이동상은 A 용매로 100% 3차 증류수(0.1% TFA 함유)와 B 용매 100% 아세토니트릴로 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였으며 용매계는 용매기울기 용리로서 다음과 같다(Table 2). 표준성분 시료는 Serotonin과 Melatonin을 사용하였고, 뇌 메탄올 추출물에서 성분분석을 하였다.

Table 2. Solvent gradient condition for HPLC-DAD

Final time (min)	Flow rate (ml/min)	A	B
0	0.3	85	15
10	0.3	80	20
30	0.3	65	35
35	0.3	65	35
40	0.3	85	15

A: Water with 0.1% formic acid, B : Acetonitrile with 0.1% formic acid, HPLC-DAD : High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection.

7) 생쥐 뇌 균질액에서 serotonin양 측정

생쥐의 뇌를 적출하여 -20℃에서 얼린 후 해마부분에 200~500 μl의 extraction buffer (0.3 M sucrose, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.2mM PMSF, 0.1% protease inhibitor, 0.1% phosphatase inhibitor, 0.5% NP 40)를 넣어 호모제나이저(homogenizer)로 균질화한 후 최종 부피가 0.2 ml이 되도록 extraction buffer를 가해 잘 혼합한 뒤 2시간 동안 4℃에서 lysis시켰다. 여기에 반응이 끝나면 시료를 1.5 ml tube에 담아 3분씩 5번 동안 vortex하고 4℃, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상등액(100 μl)을 취하였다. Serotonin ELISA kit (ADI-900-175, Enzo life Sciences)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 각 well을 wash buffer로 세척하고 Assay diluent를 100 μl 씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상등액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상등액을 100 μl 씩 넣었다. 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μl 씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 200 μl 씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. stop solution을 각 well에 50 μl 씩 넣고 Microplate spectrophotometer에서 흡광도 405 nm로 측정하였다.

8) 조직염색(brain H&E staining)

적출한 생쥐의 뇌를 4% paraformaldehyde 용액에서 12시간 고정후 15% sucrose 용액에서 침강시까지 담근 후 급속냉동에 의하여 조직을 동결하였다. 동결뇌조직을 Cryostat (Reichert-Jung Co. 2800)를 이용하여 절편을 제조하여 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하고 광학현미경상에서 관찰

하였다.

9) 면역조직화학염색(immunohistochemical staining)

분리된 생쥐의 뇌를 Zamboni's fluid (4% paraformaldehyde, 1.5% saturated picric acid, 0.1M PB)용액으로 관류 고정한 후 4시간 후 고정하였다. 이를 30% sucrose에 조직이 포화될 때 까지 4°C 보관 뒤 OCT compound로 조직을 붙여 CO₂ gas 로 급속 동결하여 Cryostat로 30 μm 두께로 free floating brain sections 하였다. 준비한 조직은 항체에 따라 서로 다른 10% Serum (S-5000, VECTOR)으로 1시간 동안 실온에서 전처리 한 후 일차항체를 처리하였다. 일차항체는 사용 부위에 따라 Rabbit anti-CRF (T-4037, Peninsula Lab., diluted 1:10,000), anti CRF-R1 (sc-1757, SANTA CRUZ, diluted 1:1,000)를 사용하였다. 일차항체는 4°C에서 48시간 Obital-shaker에서 반응시킨 후 PBS와 1% triton X-100을 함유한 PBS로 15분 씩 번갈아 세 차례 씻어낸 후 이차항체를 처리하였다. 이차항체는 Fluorescein goat anti-rabbit IgG (F-2765, Molecular probe, diluted 1:200)로 4°C에서 2시간 동안 Obital-shaker에서 반응시킨 후 PBS와 1% triton X-100을 함유한 PBS로 15분 씩 번갈아 네 차례 씻어낸 후 슬라이드에 조직을 6장씩 붙였다. Mounting은 형광 전용액 (H-1000, VECTOR)을 사용하였다. 형광현미경은 AXIO scope(CARL ZEISS)를 사용하였으며, program은 Meta Morph (ver.6.1r6)로 분석하였다.

10) 통계처리

모든 측정치는 평균±표준편차를 구하였고, 계측치들은 실험의 성격을 감안하여 비모수 검증을 사용하였는데, 전체군간 비교를 위하여 Kruskal-Wallis 검증을, 대조군과 실험군 간의 양군 비교를 위하여 Mann-Whitney 검증을 사용하였다. 통계처리를 위한 프로그램은 SPSS for Windows (version 10.0)가 이용되었고 p<0.05에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 강제수영 검사에서 부동시간에 대한 효과

溫膽湯加烏藥의 투여가 만성구속 스트레스 생쥐 모델에서의 강제수영 검사에서 부동시간에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군 122.0±17.1 sec, 대조군 176.5±19.6 sec, fluoxetine 투여군 165.8±22.7 sec, 溫膽湯加烏藥 204 mg/kg 투여군 158.3±6.6 sec, 溫膽湯加烏藥 612 mg/kg 투여군 149.8±10.6 sec로 측정되었다. 정상군에 비하여 대조군이 강제수영 검사에서 부동시간이 증가하였고, 溫膽湯加烏藥 204 mg/kg 투여군(p<0.01)과 612 mg/kg 투여군(p<0.05)은 대조군에 비하여 유의성 있게 부동시간이 감소하였다 (Fig. 2).

2. HPLC를 이용한 신경전달 물질 성분 분석에서의 효과

뇌 메탄올 추출액에서 정상 C57bl/6 생쥐에서의 serotonin 과 melatonin이 우울증 생쥐 대조군에서 감소하였고, Fluoxetine 투여군, 溫膽湯加烏藥 투여군(204 mg/kg, 612 mg/kg)은 대조군에 비하여 melatonin이 증가하였다(Fig. 3).

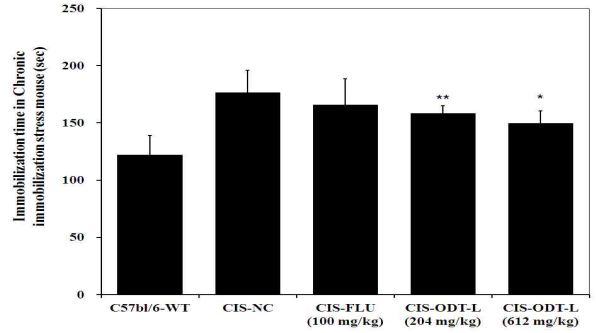


Fig. 2. Effects of OnDam-Tang with addition of *Linderae Radix* (ODT-L), and all of its contents, fluoxetine on the mouse forced swim test. The immobilization time (sec) was measured for the first 5 min after each animal was placed in the water. C57bl/6-WT : Normal group untreated immobilization stress, CIS-NC : Control group treated immobilization stress, CIS-FLU : Positive control group treated fluoxetine before immobilization stress, CIS-ODT-L : Experimental group treated ODT-L before immobilization stress. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 as compared with the control group.

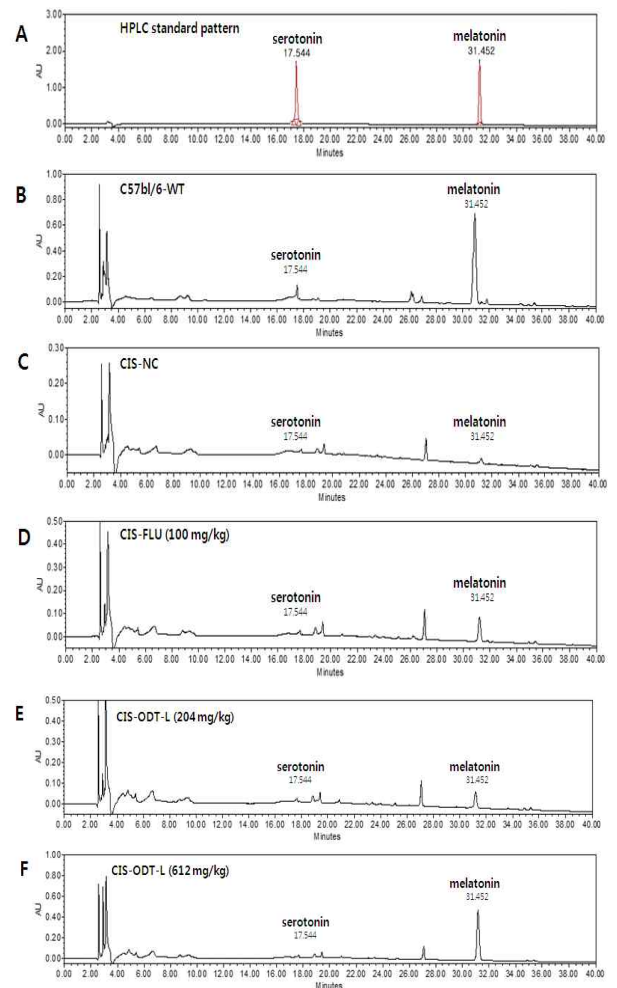


Fig. 3. HPLC chromatograms of standard mixture and extract of OnDam-Tang with addition of *Linderae Radix* (ODT-L). Chromatograms of serotonin & melatonin standard (A), C57bl/6 normal group (B), CIS-NC group (C), CIS-FLU (100 mg/kg) group (D), CIS-ODT-L (204 mg/kg) group (E), and CIS-ODT-L (612 mg/kg) group (F) are recorded at 220 nm. HPLC : High-Performance Liquid Chromatography, C57bl/6-WT : Normal group, CIS-NC : Control group, CIS-FLU : Positive control group treated fluoxetine, CIS-ODT-L : Experimental group treated ODT-L.

3. 생쥐 뇌 혼탁액에서 serotonin양 측정에 미치는 효과

溫膽湯加烏藥의 투여가 만성구속 스트레스 생쥐 모델에서의 뇌 혼탁액에서 serotonin 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군 66.9±9.17 ng/ml, 대조군 38.8±9.17 ng/ml, Fluoxetine 투여군 81.4±7.40 ng/ml, 溫膽湯加烏藥 204 mg/kg 투여군 69.1±10.50 ng/ml, 溫膽湯加烏藥 612 mg/kg 투여군 85.8±17.46 ng/ml로 측정되었다. 정상군에 비하여 대조군의 serotonin 생성량이 감소하였고, 溫膽湯加烏藥 204 mg/kg 투여군(p<0.05)과 612 mg/kg 투여군(p<0.05)은 대조군에 비하여 serotonin 생성량이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 4).

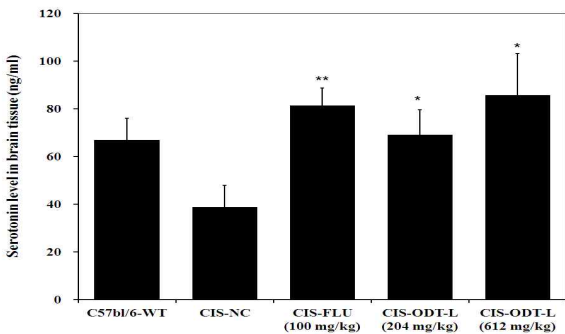


Fig. 4. Effects of OnDam-Tang with addition of *Linderae Radix* (ODT-L) on Serotonin production in brain. Brain extract samples were obtained by centrifugation and stored at -20°C until use. Total Serotonin levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Enzo life Sciences). C57bl/6-WT : Normal group, CIS-NC : Control group, CIS-FLU : Positive control group treated fluoxetine, CIS-ODT-L : Experimental group treated ODT-L.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 as compared with the control group.

kg)은 CA1, CA3, neurons 그리고 DG 등이 유지되고 있음을 볼 수 있었다(Fig. 5).

5. 우울증 생쥐모델 뇌조직의 CRF 수용체에 대한 효과

해마부위(hipocampus area)에서 corticotropin releasing factor (CRF) 수용체의 발현량을 면역조직화학염색으로 관찰한 결과, Fluoxetine 투여군과 溫膽湯加烏藥 204 mg/kg, 612 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 CRF 수용체 발현량이 감소되었다 (Fig. 6).

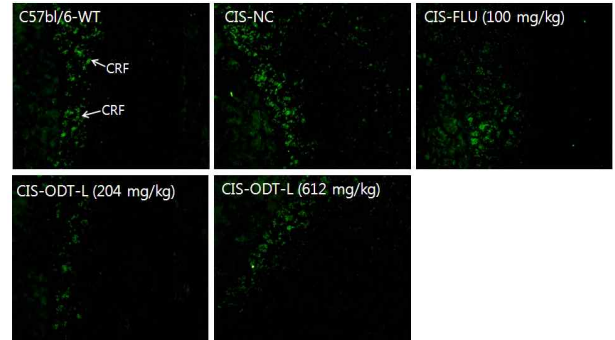


Fig. 6. Immunohistochemistry analysis of CRF receptor tissue in the hippocampus of CIS-mice. Immunohistochemical staining for CRF protein was performed on brain tissue sections. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at contrast fluorescence-microscope (Nikon, X200). C57bl/6-WT : Normal group, CIS-NC : Control group, CIS-FLU : Positive control group treated fluoxetine, CIS-ODT-L : Experimental group treated ODT-L, CRF : Corticotropin Releasing Factor.

고찰

본 실험에 사용한 溫膽湯加烏藥은 心膽虛怯, 觸事易驚, 夢寐不祥, 虛煩不得睡에 사용하는 《東醫寶鑑·夢》¹⁰⁾의 溫膽湯에 烏藥을 加味한 처방이다. 烏藥은 順氣開鬱하는 효과가 있어 烏藥順氣散, 開結舒經湯 등의 처방에 쓰이며 氣鬱, 七情六鬱 등의 병증에 활용되는 藥材이다¹⁷⁾. 《東醫寶鑑》에서의 溫膽湯 및 加減의 처방은 이외에도 痰火, 膽虛怯, 氣鬱로 인한 驚悸怔忡, 思結不食 등에 다양하게 쓰인다⁹⁾. 溫膽湯은 정신적 스트레스로 인해 나타나는 神經性 症狀에 쓰는 代表 處方으로²¹⁾, 설¹⁶⁾ 등은 P815세포를 이용한 실험연구를 통해 溫膽湯加味方이 항우울효과가 있을 가능성을 제시한 바 있다.

한편 우울증은 우울한 기분, 활동에서의 흥미와 즐거움의 감소, 불면 혹은 과수면 등의 다양한 증상들로 이루어진 기분장애이다¹⁾. 우울증은 높은 재발율이 특징이며, 우울증의 증가추세와 더불어 늘어나는 사회경제적인 손실비용 및 자살율은 오늘날의 심각한 사회문제이다^{2,3)}.

우울증의 발생원인은 심리적, 사회적, 생물학적 원인 등 다양한 원인에 의해 발생하는 것으로 여겨진다¹⁾. 우울증의 원인을 설명하는 이론 중 대표적인 이론 중 하나가 모노아민 가설이다⁹⁾. 모노아민 가설은 monoamine 중에서도 특히 serotonin의 활성도가 감소하면 우울증이 발생한다는 가설이다. serotonin은 인체의 수면-각성 주기, 감정, 공격성, 불안, 감각운동 반응성

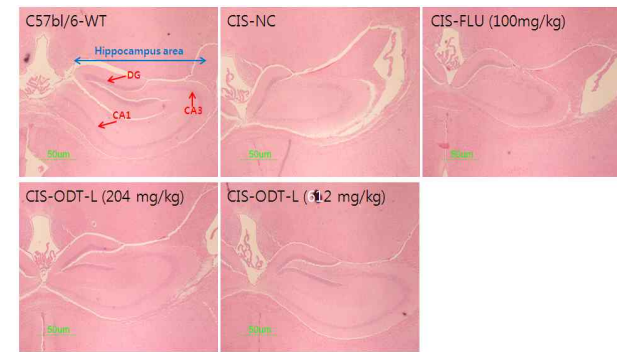


Fig. 5. Histological analysis of hippocampal lesions and neural loss of CIS-mice Brain. C57bl/6 mice were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin&eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk (red arrow) at bright microscope (Nikon, X40). DG : Dentate gyrus, CA1 : Cornu Ammonis 1, CA3 : Cornu Ammonis 3, C57bl/6-WT : Normal group, CIS-NC : Control group, CIS-FLU : Positive control group treated fluoxetine, CIS-ODT-L : Experimental group treated ODT-L.

4. 우울증 생쥐모델 뇌조직 보호 효과

대조군에서는 만성 구속 스트레스로 인해 해마부위의 조직 손상으로 stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cell, pyramidal cell layer(CA1, CA3), neurons 그리고 dentate gyrus(DG) 등이 정상군에 비하여 사라졌으나, Fluoxetine 투여군과 溫膽湯加烏藥 투여군(204 mg/kg, 612 mg/

(sensorimotor reactivity) 및 학습 등의 행동 기능과 자율신경 조절에 광범위한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다²¹.

우울증의 치료에 쓰이는 항우울제는 작용기전에 따라 선택적 세로토닌 재흡수 차단제(Selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI), 삼환계 항우울제(Tricyclic and tetracyclic antidepressants, TCA), 단가아민 산화효소 억제제(Monoamine oxidase inhibitors, MAOI) 등으로 분류 할 수 있다. 이 중 SSRI는 TCA나 MAOI에 비해 안정성이 높고 부작용이 적은 편이기에 우울증 치료에 많이 쓰이며, fluoxetine, paroxetine 등이 이에 속한다²³.

한편, 스트레스는 생체의 다양한 반응을 유발하는데, 생물학적 반응과 가장 많이 관련되는 시스템은 시상하부-뇌하수체-부신(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 축의 변화로, 이 축은 다양한 신경전달 물질 및 신경호르몬과 밀접한 상호작용을 통해 조절된다²⁴. 우울증 환자의 경우 HPA 축 과활성으로 인해 시상하부에서 CRF가 과다 분비된다고 알려져 있다²⁵. CRF는 스트레스에 대한 신경 내분비 조절과 자율신경계 행동반응을 조절하는 펩타이드이며, 현재 우울증의 표지로 이용되는 물질 중 하나이다²⁵.

이에 저자는 구속 스트레스를 받은 우울증 생쥐를 모델로 하여 강제 수영검사를 통한 행동학적 실험과 serotonin 및 CRF 등에 대한 생화학적 분석을 통해 溫膽湯에 烏藥을 가한 溫膽湯加烏藥의 항우울 효과를 알아보았다.

구속 스트레스 모델은 우울 장애와 연관된 행동학적, 생물학적 연구를 위해 생쥐에게 물리적 스트레스와 정신적 스트레스를 가하는 방법이다¹⁸. 장기간의 구속 스트레스는 HPA Axis를 활성화시켜 카테콜아민과 스트레스 호르몬인 글루코코르티코이드를 분비시키고²⁶, 체중 감소 및 내장장기의 무게 변화를 일으키며²⁷, 절망행동, 불안행동의 증가²⁸, 등의 행동학적, 생물학적 변화 등의 여러 변화를 일으킨다고 알려져 있다¹⁸.

강제수영 검사는 항우울 작용을 평가하는 모델로, 항우울제의 선별에 많이 사용되고 있는 방법이다. 실험동물이 물이 담긴 수조에서 수영을 하다 포기하고 부동자세를 나타내는 시간을 측정하여 평가하는 것으로, 부동시간 감소에 대한 평가가 실험동물의 항우울 효과를 살펴보는 지표가 된다^{19,20}.

강제 수영검사 결과, Fluoxetine 투여군은 대조군과 부동시간에 있어서 유의한 차이를 보이지 않은 반면, 溫膽湯加烏藥 투여군은 대조군과 비교하여 부동시간이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2).

다음으로 HPLC를 이용하여 생쥐의 뇌내 신경전달 물질 분석을 시행하였다. 그 결과, serotonin과 melatonin이 감소한 대조군에 비해, 양성대조군인 Fluoxetine 투여군은 melatonin이 증가하였고, 溫膽湯加烏藥 204 mg/kg 투여군과 612 mg/kg 투여군에서 melatonin이 증가하였다(Fig. 3).

뇌 혼탁액에서 serotonin양을 측정된 결과, Fluoxetine 투여군과 溫膽湯加烏藥 204 mg/kg 투여군, 612 mg/kg 투여군 모두에서 대조군에 비해 serotonin 생성량이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 4).

한편, 해마는 스트레스 관련 호르몬인 코티졸에 의해 손상받

기 쉬운 것으로 알려져 있는데²⁹, 우울증에서는 장기적인 스트레스로 인한 코티졸이 과다 분비 되고 그에 따라 해마의 위축이 생기는 것으로 알려져 있다³⁰. 특히 재발성 우울증, 조기 발병된 우울증 등에서는 비교적 일관되게 해마 용적의 감소 소견이 보고되었다³¹.

해마의 형태는 두 개 얇은 뉴런 층들이 서로 겹쳐진 모양으로, 한 층은 치상회(dentate gyrus, DG)이고, 다른 층은 암몬각(Ammon's horn)이라고 한다. 암몬각의 4개 부위 중 중요한 2개의 부위는 CA3와 CA1 부위이며, 이 부위는 최근의 기억(recent memory)에 관련되어 있다³².

뇌조직을 관찰한 결과, 대조군에서 해마부위의 조직손상이 관찰 되었고, Fluoxetine 투여군과 溫膽湯加烏藥 204 mg/kg 투여군, 612 mg/kg 투여군에서 pyramidal cell layer (CA1, CA3), neurons, dentate gyrus 등이 유지된 것을 볼 수 있었다(Fig. 5).

다음으로 면역생화학적 방법을 이용하여 생쥐 시상하부 실방핵(paraventricular nucleus, PVN)에서 CRF 수용체의 양을 측정하였다.

Fluoxetine 투여군과 溫膽湯加烏藥 204 mg/kg 투여군, 612 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 CRF 수용체의 발현량이 감소되었다(Fig. 6).

溫膽湯加烏藥을 이용한 이상의 실험 결과를 종합하여 보면 강제수영 검사에서 부동성이 감소하였고, HPLC를 이용한 신경전달물질 분석 결과 melatonin 양이 증가하였으며, 뇌 혼탁액 serotonin 측정 결과 뇌 내 serotonin 생성량이 증가하였고, 해마부위의 조직 손상과 시상하부 실방핵의 CRF 수용체 발현량이 감소하였다. 따라서 溫膽湯加烏藥은 항우울제로서의 가능성이 있다고 사료된다.

향후 溫膽湯加烏藥의 항우울효과에 대한 기전연구, 임상 연구 등의 추가적인 연구가 필요하리라 사료되며, 이를 통해 새로운 항우울 한약제제가 개발되리라 기대하는 바이다.

결론

溫膽湯加烏藥의 항우울 효과를 알아보기 위하여 우울증 생쥐 모델을 이용하여 강제수영 검사, 신경전달물질 분석, 뇌내 serotonin 양 측정, 뇌조직손상 분석, 뇌 면역화학조직염색 분석 등을 시행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

강제수영 검사에서 부동시간이 유의하게 감소하였다.

HPLC를 통한 신경전달물질 분석에서 melatonin 양이 증가하였다.

뇌 혼탁액에서 뇌내 serotonin 발현량이 유의하게 증가하였다.

해마부위의 조직손상을 방지하였다.

해마부위의 CRF 수용체 발현량이 감소하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (HI13C0493)

References

1. The Textbook Compilation Committee of Neuropsychiatry of Oriental Schools in Nation. The Neuropsychiatry of Oriental Medicine. Seoul, Jipmoon-Dang, pp 472-475, 477-478, 2007.
2. Keller, M.B., Bolland, R.J. Implications of failing to achieve successful long-term maintenance treatment of recurrent unipolar major depression. *Biological Psychiatry* 44: 348-360, 1998.
3. Greenberg, P.E., Kessler, R., Birnbaum, H.G., Leong, S.A., Lowe, S.W., Berglund, P.A. The economic burden of depression in the United States: How did it change between 1990 and 2000. *J Clin Psychiatry* 64: 1465-1475, 2003.
4. Ministry for Health, Welfare and Family Affairs. The Epidemiological Survey of Mental Disorders in Korea, 2011.
5. Choi, E.M., Koo, S.J. Possibility of regulation by food in depression and mood disorders. *Food science and industry*, 34(4):53-69, 2001.
6. Lee, S.H., Kim, B.Y., Kee, J.I., Kwon, S.J., Chung, D.K. A case of Mixed anxiety and depressive disorder. *Journal of oriental neuropsychiatry* 14(2):127-134, 2003.
7. Kang, H.W., Jang, H.H., Kang, I.S., Moon, H.C., Hwang, Y.J., Lyu, Y.S. A Study on The Oriental-medical Understanding of Depression. *Journal of oriental neuropsychiatry*, 12(2):1-15, 2011.
8. Som, S.M. *Bigeub cheon geum yo bang*. Seoul, Daeseong munhwasa, p 217, 1984.
9. Seo, S.H., Jung, I.C., Lee, S.R. The Literature Study of Ondamtng, Guibitang, Soyosan & Their Gagambang Recording in Dong-Eui-Bo-Gam. *Journal of institute of oriental medicine, Daejeon univ.* 14(1):129-140, 2005.
10. Heo, J. *Dong ui bo gam*. Seoul, Beob-in munhwasa, p 238, 303, 428, 2005.
11. Eom, S.H. Experimental Study on the Effect of the Administration of Gamiondamtang on the Sleep Time. Master's Thesis of Graduate School of Kyunghee University, 1983.
12. Kim, C.D. Studies on Central Nervous Depressive Action of Ondam Tang Aqueous Extracts. *Korean J Pharmacogn* 12(1):66, 1981.
13. Kang, T.L. Effect of Gami-Ondamtang(GO) on brain neuronal transmitters in immobilized rats. *Korean journal of oriental preventive medical society* 5(2):114-121, 2001.
14. Kim, D.P., Choi, Y.S., Park, Y.H., Keum, D.H. A Case Report by Heart Rate Variability on the Patient with Dysfunction of Autonomic Nervous System. *Journal of oriental rehabilitation medicine* 14(3):173-185, 2004.
15. Lim, J.M., Moon, B.S., Kim, S.G. Effects of Ondamtang Water Extract on the Heart Function. *The Journal of Traditional Korean Medicine* 3: 99-113, 1993.
16. Seol, S.H., Lee, S.R., Jung, I.C. The Effects of OnDam-tang-Kami-bang (ODK) in Antioxidant and Serotonin Metabolism Testing on P815 Cell. *Journal of oriental neuropsychiatry* 24(2):189-200, 2013.
17. Ju, Y.S. *Ungok Herbology*. Jeonju, Woosuk Press, p 827, 2013.
18. Voorhees, J.L., Tarr, A.J., Wohleb, E.S., Godbout, J.P., Mo, X., Sheridan, J.F., Eubank, T.D., Marsh, C.B. Prolonged Restraint Stress Increases IL-6, Reduces IL-10, and Causes Persistent Depressive-Like Behavior That Is Reversed by Recombinant IL-10. *PLoS ONE* 8(3):1-11, 2013.
19. Rodrigues, A.L., da Silva, G.L., Mateussi, A.S., Fernandes, E.S., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., Santos, A.R. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life sciences* 70(12):1347-1358, 2002.
20. Cryan, J.F., McGrath, C., Leonard, B.E., Norman, T.R. Combining Pindolol and Paroxetine in an Animal Model of Chronic Antidepressant Action. Can Early Onset of Action Be Detected? *Eur J Pharmacol* 352: 23-28, 1998.
21. Kang, S.S. *Baleun Bangjehag*. Seoul, Daeseong munhwasa, p 128, 1996.
22. Lucki, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44: 151-162, 1998.
23. Lee, H.S. *Clinical Neuropsychopharmacology*. Seoul, MLcommunication, 2009.
24. Koob, G.F. Corticotropin-releasing factor, Norepinephrine, and stress. *Biol Psychiatry* 46: 1167-1180, 1999.
25. Arborelius, L., Owens, M.J., Plotsky, P.M., Nemeroff, C.B. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrin* 160: 1-12, 1999.
26. Lee, K.W., Kang, S.K., Chun, Y.H., Hong, J.P. The Effect of Repeated Restraint Stress on Clusterin Change of the Rat Salivary Glands. *The Journal of Korean Academy of Oral Medicine* 37(2):81-91, 2012.
27. Ro, S.K. The Effect of Binding Stressed White Rats by Chijashitang and Chijashitang+Bambusea Caulis. Dept of Neuropsychiatry Graduate School Kyungsan University pp 1-36, 1995.
28. Yun, H.Y. *Bupleurum Falcatum Prevents Depression Andanxiety-Like Behaviors in the Rats Exposed to Repeated Restraint Stress*. Graduate School of Oriental Medicine KyungHee University pp 1-41, 2012.

29. Woon, F.L., Sood, S., Hedges, D.W. Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: a meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34: 1181-1188, 2010.
30. Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M. Neurobiology of depression. *Neuron* 34: 13-25, 2002.
31. McKinnon, M.C., Yucel, K., Nazarov, A., MacQueen, G.M.. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci* 34: 41-54, 2009.
32. Lee, I.A., Yoganarasimha, D., Rao, G., Knierim, J.J. Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 and CA3. *Nature* 430(6998):456-459, 2004.