

LPS로 유발된 우울증에 대한甘草의 효과

고성렬^{1#}, 김도훈², 이태희^{1*}

1 : 가천대학교 한의과대학 방제학교실, 2 : 가천대학교 한의과대학 원전외사학교실

Effect of Glycyrrhizae Radix Water Extract on the depression induced by LPS in Rats

Ko Sung-Youl^{1#}, Do-Hoon, Kim, Kim², Tae-Hee, Lee^{1*}

1 : Department of Formulae Pharmacology, School of Oriental Medicine, Gachon University

2 : Department of Oriental Medical Classics & History, Gachon University

ABSTRACT

Objectives : Investigation of the antidepressant effect of Glycyrrhizae Radix (GR) through the anti-inflammatory effect.

Methods : Depression in rats was induced by LPS (i.p,3days). The rats were treated with GR100 mg/kg (GR 100) or GR400 mg/kg (GR 400). The depressive immobility was examined with Tail Suspension Test(TST) and Forced Swimming Test(FST). The expression of nuclear factor- κ B(NF- κ B), I κ B was measured with western blotting. The concentration of corticosterone, cytokine in plasma was measured with ELISA. The expression of c-Fos in the paraventricular nucleus(PVN) and tyrosine hydroxylase(TH) in the locus coeruleus(LC) were measured with immunostaining method.

Results : In the TST, GR400 group significantly decreased immobility time compared with the LPS group. In the FST, GR100, GR400 group significantly decreased immobility time comparing with the LPS group. c-Fos expression in GR100 and GR400 group was decreased comparing with the lipopolysaccharide(LPS) group. The I κ B expression of GR100 and GR400 group was increased comparing with the LPS group. The level of corticosterone of GR100 group was decreased comparing with the LPS group. The concentration of cytokine of GR100 and GR400 group was decreased comparing with the LPS group. TH expression in the LC was increased in LPS group, but in GR100 and GR400 group was not shown significant decrease.

Conclusion : According to this results obtained, GR has antidepressant effects by the anti inflammatory action through the suppression of HPA axis activity, not through the action against the catecholaminergic system.

Key words : Glycyrrhizae Radix(GR), LPS, HPA axis, anti-inflammation, anti-depressant effect.

서론

우울증은 사람의 精神, 意識, 사유 등의 활동에서 개인의 능력과 의욕을 저하시키며, 不眠症, 疲勞感 등의 증상을 나타내고 비관적인 생각을 갖게 한다^{1,2)}. 우울증은 유전적인 요인, 스트레스, 심각한 질환, 술이나 약물 남용 등 여러 가지 생물학적, 심리적, 사회적 요인이 복합적으로 작용한다.

우울증의 원인에 대해서는 뇌의 noradrenaline 혹은 serotonin의 부족이 우울증의 증상들을 유발하는 원인이 된

다는 학설³⁾, HPA axis의 이상이 CRF의 분비를 증가시켜 ACTH, cortisol의 분비를 자극한다는 학설⁴⁾, Macrophage에서 cytokine, IL-1, INF- α 의 이상 분비로 인해 CRF, ACTH, prolactin, cortisol의 이상분비를 유발하여 발생하게 된다는 학설 등이 있다⁵⁾. 이에 맞춰 항우울제는 초기 monoamine 가설을 기반으로 1950년대 imipramine, clomipramine, amitriptyline 등과 같은 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressant, TCA)부터 시작해서 1980년대에는 선택적 작용 기전을 가지면서 안전성 및 내약성이 개선된

*Corresponding author : Tae-Hee, Lee, Department of Formulae Pharmacology, School of Oriental Medicine, Gachon University
· Tel : +82-31-750-5514 · E-mail : ophm5418@gachon.ac.kr

#First author : Ko Sung-Youl, Department of Formulae Pharmacology, School of Oriental Medicine, Gachon University

· Tel : +82-31-750-5514 · E-mail : jihooko@hanmail.net

· Received : 9 May 2014 · Revised : 5 September 2014 · Accepted : 11 September 2014

선택적 serotonin 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)가 개발되었고, 1990년대 중반 이후에는 특정 수용체 들에만 작용하는 다중기전을 가진 약물들이 개발되어 임상에 사용되고 있으며⁶⁾, 또한 우울증 환자들에서 흔히 나타나는 높은 glucocorticoid 농도를 억제하기 위해 glucocorticoid 수용체 길항제, cortisol 합성 억제제 등이 사용될 수 있으며, 그 외 HPA axis와 관련된 항우울제의 개발 연구가 진행되고 있다⁷⁾.

또한 최근에는 우울증과 염증이 sickness behavior와 증상 면에서 많은 부분을 공유하고 있고, 우울증 환자에서 염증 촉진 cytokine과 C-reactive Protein (CRP) 등 염증성 단백질의 증가가 흔히 관찰되는 면에서 착안하여 면역-염증 반응이 우울증의 발병에 기여하거나, 우울증의 회복을 방해하는 역할을 하고 있을 가능성이 제기되었다⁸⁾.

한의학에서는 정체되어 발산하지 못하는 증상을 총칭하여 鬱症이라 하는데, 鬱은 일반적으로 氣鬱을 가리킨다. 氣鬱이란 억압되고 침울한 마음으로 인하여 모든 생리기능이 침체되는 현상을 말한다. 이는 발산시킬 수 없는 욕구불만이나 지속되는 우수, 지나친 思慮나 悲嘆 등이 원인이 되는 수가 많다. 氣鬱이란 氣가 한 곳에 맺혀 머물러 있으면서 흩어지지 못하는 것으로, 대부분 七情이 鬱結되어 온다.

甘草(Glycyrrhizae Radix, GR)는 콩과(豆科 Leguminosae)의 다년생 초본인 甘草(Leguminosae)의 根莖으로, 神農本草經에 甘草의 性味는 甘, 平 無毒하고, 五臟六腑의 寒熱과 邪氣를 치료하고, 筋骨을 강화하며, 解毒 한다고 기재된 이후⁹⁾, 補脾益氣, 潤肺止咳, 緩急止痛, 清熱解毒하는 효능을 가진 약물로 널리 사용하고 있다¹⁰⁾. 甘草에 대한 연구로서 권¹¹⁾ 등은 甘草의 항산화 활성 및 항염 활성을 확인하였고, 이¹²⁾ 등은 甘草의 항염증 활성을 확인 하였으며, 이¹³⁾는 甘草가 항골관절염에 효능이 있음을 확인하였다. 김¹⁴⁾은 甘草로부터 감염에 대한 항균작용이 있음을 확인하였고, 박¹⁵⁾ 등은 FST에서 甘草의 항우울효능이 있음을 보고하였다.

이에 저자는 甘草의 항염, 항우울작용이 LPS로 유발된 염증과 그에 따른 우울증에 대한 치료제로서의 가능성을 확인하기 위해, 흰쥐에 LPS 주입으로 염증을 유발한 뒤, Tail Suspension Test(꼬리 현수법, TST)와 Forced Swimming Test(강제 수영 부하 실험, FST)로 우울상태를 확인하고, Paraventricular Nucleus(실방핵, PVN)에서 c-Fos, PVN에서 NF-κB, IκB를, 혈중 corticosterone, cytokine 그리고 LC에서 TH를 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 한약재의 구입과 동정

한약재는 HMAX사(충북, 제천)에서 구입하였으며 가천대학교 한의과대학 방재학 교실에서 동정하였다.

2) 실험동물

실험에 사용된 동물은 체중 220~250 g의 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐(7주령, 샘타코, 경기도, 한국)로 일주일

간 사육실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육 실 온도는 22 ± 2 °C, 습도는 55~60%로 유지하였고, 사육실 내 환풍기와 공기정화기를 항시 가동시켰다. light-dark cycle이 12 시간 단위로 조절되게 한 후, 흰쥐용 고형사료와 물을 제한 없이 공급 하였다.

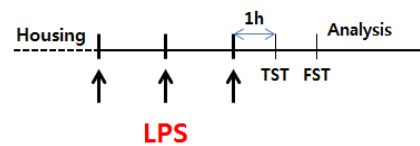
2. 방법

1) 한약재의 추출

甘草 300 g분량에 10배(w/v)량의 3차 증류수를 가하여 약 물을 추출하기 24시간 전에 추출약물의 10배의 물에 약재를 담가 전 추출을 하였다. 100°C에서 4시간 동안 냉각기를 장착한 상태로 환류 추출한 다음, 거즈로 여과하여, 6시간 동안 80°C에서 중탕 농축기(LCA-110, EYELA, JAPAN)을 이용하여 24시간 -80°C에서 6시간 냉각시킨 후, 동결건조기(FDU-2200, EYELA, JAPAN)를 이용하여 -40°C에서 30분간 동결 건조시켰다. 甘草 추출 분말 30 g(수율:10%)을 획득 하였다. 투약 시는 건조된 약재를 분량에 맞게 saline에 첨가하여 용액을 만들었다.

2) 실험동물 group

실험동물은 5 group으로 무작위 배정을 하였다. 실험동물의 group은 Normal group: 아무 처치를 하지 않은 group, Control group: saline 투여+행동검사 (TST, FST), LPS group: LPS 투여+행동검사 (TST, FST), GR100 group: LPS 투여+GR 100mg/kg 투여+행동검사 (TST, FST), GR400 group: LPS 투여+GR400 mg/kg 투여+행동검사 (TST, FST)로 나누었다. 우울행동을 유발하기 위해 LPS (lipopolysaccharide from salmonella typhosa; Sigma, USA)를 사용하였으며, 10 mg/kg로 saline에 녹여 복강 내로 3일 동안 투여하였다. GR은 강제수영 부하실험 전 3일 동안 100 mg/kg, 400 mg/kg(10 ml/kg)을 saline에 녹여 경구 투여 하였다(Fig. 1).



Rat	SD-rat, 7weeks, male	
Model	Semi-chronic model, LPS treated, 10mg/kg, 3days	
Groups	Normal	No treatment
	Control	Saline+TST, FST
	LPS	LPS treated 3 day
	GR 100	LPS treated 3 day + GR 100mg/kg
	GR 400	LPS treated 3 day + GR 400mg/kg

Fig. 1. Experimental Procedure.

3) 우울행동 검사

TST는 FST와 유사한 원리를 사용하는 절차로, 동물의 꼬리를 막대 등에 고정시켜 거꾸로 매달아 놓고 부동자세(immobility)의 양상을 측정한다. 6분간 비디오카메라로 행동을 녹화하며, 4분간의 행동을 분석한다. 선택한 약물이 항우

울 효과가 있다면, 대조군과 비교하여 부동자세의 감소가 나타나게 된다.

또한 FST에 사용된 방법은 Detke 등에 의해 고안된 방법을 이용하였다. 동물은 직경 25 cm, 높이 50 cm의 투명한 아크릴 원통에 30 cm의 높이로 수온 23 °C의 물을 채운 뒤에 예비실험(pre-swim)으로 15분간 동물을 물에 빠뜨리고 24시간 뒤에 5분간 본 실험(post-swim)을 실행하였다. 예비 실험 동안에는 동물의 행동을 분석하지 않지만, 5분간의 본 실험에서는 동물의 행동을 3가지, 부동자세(immobility), 수영자세(swimming) 등반자세(climbing)로 구분하여 각각의 시간을 측정하였다. 선택한 약물이 항우울 효과가 있다면 대조군과 비교하여 부동자세의 감소가 나타나게 된다.

4) Immunohistochemistry

행동 실험이 끝난 직후 실험동물을 sodium pentobarbital (엔토발, 한림제약, 50 mg/kg, I, p.)로 마취시키고 saline 100 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formaline 용액 (fixative) 900 ml로 심장을 통해 관류하였다. 처음 고정액 200 ml은 5분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 700 ml은 25분간 걸쳐 천천히 관류하였다. 그 다음 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2~3시간 동안 고정 시키고 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)에 넣어 하루 동안 포매하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후, 뇌 조직을 몇 차례 PBS에 0.3% Triton X-100첨가한 PBST에서 씻고 primary sheep polyclonal c-fos antibody (Santacruz, CA, USA), primary mouse monoclonal TH antibody (Santacruz, CA, USA)를 1차 항체로 사용하였다. 1차 항체는 PBST에 goat serum 또는 horse serum (PK 4001, PK 4005, Vector Laboratories, USA)과 500배 희석하여 준비한 후 4 °C에서 72시간 동안 지속적으로 흔들어 배양하였다. 그 후 뇌 조직을 PBST로 씻은 다음 2시간 동안 실온에서 goat serum 또는 horse serum을 함유하는 PBST에서 200배 희석한 biotinylated anti-sheep 또는 biotinylated anti-mouse (PK 4001, PK 4005, Vector)에 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent (Vector)에 담구어 반응시켰다. PBST로 세척한 뒤 뇌 조직을 nikel chloride로 강화시키고 착색제인 diaminobenzidine을 사용하여 발색시켰다. 발색이 끝난 뇌 조직은 슬라이드에 부착한 뒤 2시간 동안 실온에서 건조시켰으며, xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입한 후 광학 현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Paxinos와 Watson (Paxinos and Watson, 1986)의 뇌 도감¹⁹⁾을 참고하였으며, 100배로 현상된 사진에서 격자 (2×2 cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 계산하였다.

5) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

행동 실험이 끝난 직후 실험동물을 sodium pentobarbital (엔토발, 한림제약, 50 mg/kg, i.p.)로 마취시키고, 혈액을 채취하여 혈액 내 corticosterone과 cytokine 변화를 측정하기 위해 ELISA kit (R&D system, CA, USA)를 이용하여 분석한다. 96 well에 해당 antibody가 coating 되어 있는

kit에 serum을 50 ul씩 넣고, 50 ul의 diluent를 넣고 2시간 동안 실온에서 incubation 한다. 2시간 후 wash buffer를 이용하여 5회 세척하고, 100ul의 conjugate를 넣고, 2시간동안 실온에서 incubation한다. 2시간 후에 washing buffer를 이용하여 5회 washing을 하고, 100 ul의 substrate solution을 넣고, 30분 동안 incubation한다. 그 후 100 ul의 stop solution을 넣고 ELISA reader (Bio-Rad 680, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 optical density를 측정한다.

6) Western blotting

젤은 폴리아크릴아마이드(polyacrylamide) 젤에 SDS를 넣은 것을 사용하였다. Polyacrylamide, SDS, Ammonium persulfate, TEMED 를 틀에 넣어 굳혀서 젤을 만들었다. 굳히는데 30분 정도 기다렸다. 단백질은 5분간 90도에서 변성시켰다. 단백질 전기영동장치에 loading buffer를 채웠다. (2 X SDS gel loading buffer 100 mM Tris ph 6.8 200 mM DTT 4% SDS 0.2% bromophenol blue 20% glycerol). 단백질은 5분간 90도에서 denaturation시켰다. 단백질을 loading 하기 전 well을 씻고, 단백질을 loading하였다. 혼합단백질을 SDS-PAGE에 전기영동하였다(100mA). 전기영동이 끝난 후 젤을 Transfer buffer에 넣었다. 단백질 Transfer는 단백질을 나일론 막으로 옮기는 작업을 하였다. Millipore immobilon tranfer membrane을 젤 크기에 맞추어 자랐다. 나일론 membrane을 순수한 메탄올에 적셨다. 몇 분 후, paper 2장, membrane, gel, paper 2장의 순서로 겹쳐 놓았다. (단백질이 아래쪽으로 이동할 것을 가정하였을 때) 판위에 Transfer buffer를 적셨다. 100V에서 90분간 Transfer하였다. blockingTBS로 membrane을 15분간 2회 washing 후 1% BSA-TBST에 1~2시간 혹은 5% non fat dry milk에 30분간 담가두었다. 1차 항체반응PBST로 15분간 2회 washing 후 primary antibody를 1~2시간 처리하였다. 1차 항체는 단백질에 직접 붙을 수 있게 디자인 된 것을 이용하였다. 1.5시간 정도 반응시켰다. 2차 항체는 눈으로 확인하기 위해 사용하였다. 2시간 정도 반응시켰다. TBST로 15분간 2회 washing 후 horseradish peroxidase가 부착된 secondary antibody를 1시간 처리하고 washing하였다. membrane에 solution을 1~2분 처리 후 X-ray film에 감광하였다.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 자료는 SPSS version 21 (IBM cop. New York, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다. 측정치는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, 그룹 간 비교를 위하여 one-way analysis of variance (ANOVA) Turkey post-hoc test를 실시하였고 p값이 0.05 미만인 것을 유의하다고 판정하였다.

결 과

1.甘草의 TST에서의 효과

LPS 10 mg/kg을 3일 동안 처치한 LPS group에서 saline

을 투여 한 control group에 비해 immobility 시간이 증가하였고(F3,28=15.244, $P<0.001$), GR 400에서 LPS group에 비해 immobility 시간이 유의하게 감소하였다($p<0.05$)(그림 2).

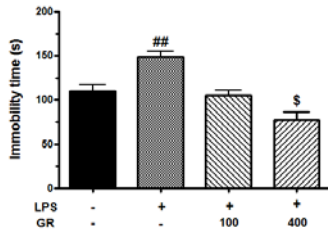


Fig. 2. The Effect of GR on the LPS-induced depressive-like behavior in TST.

LPS 10 mg/kg was injected i.p. for 3 days before test. GR groups were administered intragastrically for three consecutive days prior to test. After LPS and GR treatment, the immobility of rats was measured on TST. Control group was administered saline. LPS group was injected with LPS. GR 100 group was administered GR 100 mg/kg. GR 400 was administered GR 400mg/kg.

: Significant difference compared with the Control group ($\alpha<0.01$)
\$: Significant difference compared with the LPS group ($P<0.05$)

2.甘草의 FST에서의 효과

LPS 10 mg/kg을 3일 동안 처치한 후 saline을 투여 한 control group과 immobility 시간을 비교 하였을 때 증가 (F3,28=6.795, $P<0.01$)하였고, GR 100과 GR 400에서 LPS 처리 군에 비해 감소되는 것이 확인되었다($p<0.05$). 또한 climbing 시간에서도 saline 투여한 control group에 비해 LPS 투여군에서 감소하였으며(F3,28=5.028, $P<0.01$), GR 100 group에서는 LPS 투여군에 비해 오히려 더 감소하였으나 GR 400에서는 saline group보다 더 증가하였다 ($p<0.05$)(그림 3).

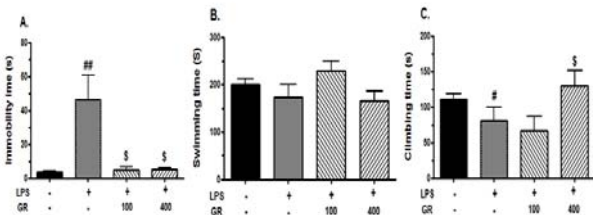


Fig. 3. The Effect of GR on the LPS-induced depressive-like behavior in FST.

LPS 10 mg/kg was injected i.p. for 3 days before test. GR groups were administered intragastrically for three consecutive days prior to test.

After LPS and GR treatment, the immobility of rats was measured on FST. Control group was administered saline. LPS group was LPS injected. GR 100 group was administered GR 100 mg/kg. GR 400 was administered GR 400 mg/kg.

#, ## : Significant difference compared with the Control group ($P<0.05$, $P<0.01$)
\$: Significant difference compared with the LPS group($P<0.05$)

3.甘草의 PVN내에서 c-fos 발현에 대한 효과

LPS로 유발된 우울증 동물모델에서甘草를 투여 후 PVN에서의 c-fos 발현의 변화를 측정 한 결과 아무 처치도 하지 않은 normal group에 비해 control group과 LPS group에서

c-fos의 발현이 증가됨을 관찰하였으며 이는 GR100과 GR400 group에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(그림 4).

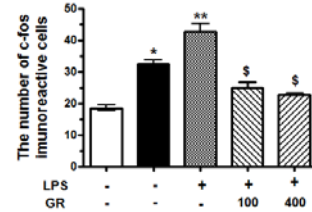


Fig. 4. The Effect of GR on c-fos expression in the PVN of LPS-induced depressive rats.

LPS 10 mg/kg was injected i.p. for 3 days before test. GR groups were administered intragastrically for three consecutive days prior to test.

After TST and FST, rats were sacrificed and perfused with saline(100 ml) and 4% formaline solution(900 ml). c-fos immunoreactive cells were counted. Normal group(a) was no treatment group. Control(b) and LPS group(c) were injected with LPS. GR 100 group(d) was administered GR 100 mg/kg. GR 400 group(e) was administered GR 400 mg/kg. Scale bar represents 100 μ m. Sections were cut coronally at 30 μ m and the original magnification was 100x.

*, ** : Significant difference compared with the Normal group($\alpha<0.05$, $\alpha<0.01$)
\$: Significant difference compared with the LPS group($\alpha<0.05$)

4.甘草의 PVN 내에서 NF- κ B와 I κ B에 발현에 대한 효과

LPS로 유발된 우울증 동물모델에서甘草를 투여 후 PVN에서 NF- κ B, I κ B 변화 측정 한 결과 아무처치 하지 않은 Normal group에 비해 control group (행동실험만 진행)과 LPS group (LPS 투여+행동실험)에서 증가함을 관찰 하였고 GR100, GR400 group에서 LPS group에 비해 P-NF- κ B/NF- κ B ratio 발현에는 변화가 없고, I κ B는 발현의 증가를 보였지만 유의성은 없었다(그림 5).

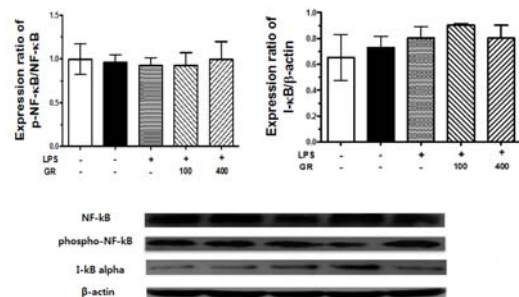


Fig. 5. The Effect of GR on NF- κ B, I κ B expression in the PVN of LPS-induced depressive rats.

LPS 10mg/kg was injected i.p. for 3 days before test. GR groups were administered intragastrically for three consecutive days prior to test. Expression of NF- κ B, NF- κ B-p and I- κ B was measured by western blotting in PVN of LPS-induced depressive rats.

Normal group was no treatment group. Control and LPS group were injected with LPS. GR 100 group was administered GR 100 mg/kg. GR 400 was administered GR 400mg/kg.

5.甘草의 혈액 내 corticosterone에 대한 효과

LPS로 유발된 우울증 동물모델에서甘草를 투여 후 plasma corticosterone 농도의 변화 측정된 결과 아무 처치 하지 않은 Normal group에 비해 control group(행동실험만 진행)과 LPS group (LPS 투여 + 행동실험)의 plasma corticosterone 농도가 증가함을 관찰하였으며 (F4,26=6.596 P<0.01). GR100 group에서 LPS group에 비해 plasma corticosterone 농도가 감소하였으며(P<0.05). GR400 group에서는 LPS group에 비해 plasma corticosterone 농도가 감소하였으나, 유의성은 확인되지 않았다(그림 6).

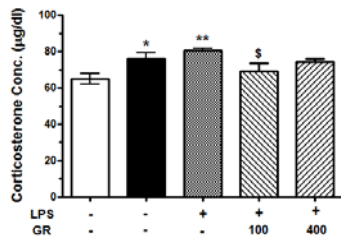


Fig. 6. The Effect of GR on plasma corticosterone concentration of LPS-induced depressive rats. LPS 10 mg/kg was injected i.p. for 3 days before test, GR groups were administered intragastrically for three consecutive days prior to test. After TST and FST, rats were sacrificed and blood was collected. Plasma corticosterone was measured by ESISA. Normal group was no treatment group, Control and LPS group were injected with LPS. GR 100 group was administered GR 100 mg/kg. GR 400 was administered GR 400 mg/kg.

*, ** : Significant difference compared with the Normal group (P<0.05, P<0.01)
\$: Significant difference compared with the LPS group (P<0.05)

6.甘草의 혈액 내 cytokine에 대한 효과

LPS 10 mg/kg을 3일 동안 처치한 LPS group에서 saline을 투여 한 control group과 비교 하였을 때, 혈액 내 IL-1β, IL-10, 그리고 IL-4가 유의하게 증가하였으며(F4,27=14,292, P<0.001 for IL-1β; F4,27=0.5 P=0.736 for IL-6; F4,27=9,521, P<0.001 for IL-10; F4, 27=10,234, P<0.001 for IL-4), GR400 group에서 LPS group에 비해 IL-1β, IL-10, 그리고 IL-4가 유의하게 감소하였다(그림 7).

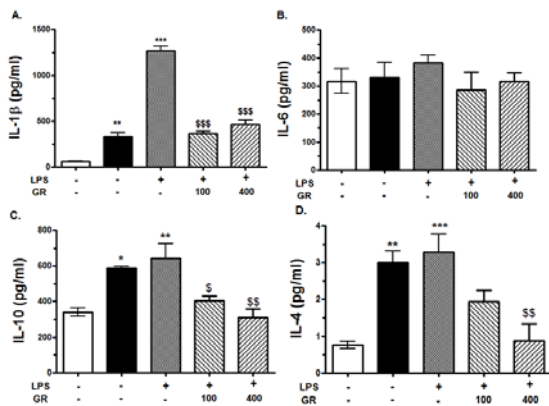


Fig. 7. The Effect of Glycyrrhizae Radix on plasma cytokine concentration of LPS-induced depressive rats. LPS 10 mg/kg was injected i.p. for 3 days before test, GR groups were administered intragastrically for three consecutive days prior to test

Normal group was no treatment group. Control and LPS group were injected with LPS. GR 100 group was administered GR 100 mg/kg. GR 400 was administered GR 400 mg/kg.

*, **, *** : Significant difference compared with the Normal group (P<0.05, P<0.01, P<0.001)
\$, \$\$, \$\$\$: Significant difference compared with the LPS group (P<0.05, P<0.01, P<0.001)

7.甘草의 LC내에서 TH 발현에 대한 효과

LPS로 유발된 우울증 동물모델에서甘草를 투여 후 LC에서의 TH 발현의 변화 측정된 결과 아무 처치 하지 않은 Normal group에 비해 control group (행동실험만 진행)과 LPS group (LPS 투여+행동실험)에서 TH 발현이 증가함을 관찰 하였으나, GR100 group, GR400 group에서의 유의한 감소를 관찰하지는 못하였다(그림. 8).

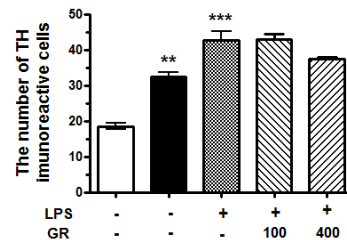


Fig. 8. The Effect of GR on TH expression in the PVN of LPS-induced depressive rats. LPS 10 mg/kg was injected i.p. for 3 days before test. GR groups were administered intragastrically for three consecutive days prior to test. After TST and FST, rats were sacrificed and perfused with saline(100ml) and 4% formaline solution(900ml). TH immunoreactive cells were counted. Scale bar represents 100 µm. Sections were cut coronally at 30 µm and the original magnification was 100x.

Normal group(a) was no treatment group. Control(b) and LPS group(c) were injected with LPS. GR 100 group(d) was administered GR 100 mg/kg. GR 400 group(e) was administered GR 400 mg/kg. **, *** : Significant difference compared with the Normal group (P<0.01, P<0.001)

고찰

항우울제의 개발과 연관된 우울증의 원인설은 크게 세 가지로 볼 수 있다.

첫째, monoamine 가설은 뇌의 noradrenaline 혹은 serotonin의 부족이 우울증의 증상을 유발하는 원인이 된다는 학설³⁾로, 이 가설을 기반으로 Tricyclic Antidepressant (TCA), Monoamine Oxidase Inhibitor(MAOI), Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) 계열의 항우울제들이 널리 개발되어 사용되었다.

둘째, HPA axis의 이상이 CRF의 분비를 증가시켜 ACTH, cortisol의 분비를 자극한다는 학설⁴⁾로 stress에 대한 적응반응으로 glucocorticoid의 농도가 높아지게 되면 신경세포들을 죽이는 등 건강을 해치는 작용을 하게 되며 생리적, 정신적 이상을 유발할 수 있다. 이를 기반으로 한 항우울제에 대해서는 glucocorticoid 수용체 길항제(예 : mifepristone), cortisol 합

성 억제제(예 : metyrapone, aminoglutethimide, ketoconazole 등)이 사용될 수 있으며, 그 외 HPA axis와 관련된 항 우울제의 개발 연구가 진행되고 있다⁷⁾.

셋째, Macrophage 가설⁵⁾이 있으며, 우울증과 염증이 sickness behavior와 증상 면에서 많은 부분을 공유하고 있고, 우울증 환자에서 염증촉진 cytokine과 C-reactive Protein(CRP) 등 염증성 단백질의 증가가 흔히 관찰되는 면에서 착안하여 면역-염증 반응이 우울증의 발병에 기여하거나, 우울증의 회복을 방해하는 역할을 하고 있을 가능성이 제기되고 있다^{8,16)}. 특히, 염증은 면역계, 내분비계, 신경계가 복합적으로 개입된 일종의 allostatic load로서 cytokine, HPA axis, 신경전달물질의 변화를 초래한다. 즉 염증촉진 cytokine의 증가, HPA axis의 활성화와 glucocorticoid 저항성의 증가, serotonin, 노르에피네프린, 도파민의 합성과 제거, 신경세포의 사멸과 재생, 신경가소성에 모두 영향을 주어 우울증의 병태생리에 관여한다¹⁷⁾.

甘草의 효능에 대해 陳存仁¹⁸⁾은甘草가 "抗염증·抗알레르기 작용에 의해 氣管平滑筋의 痙攣을 완화하고 炎症을 일으킨 점막을 덮어 자극을 감소하여 염증을 止咳化痰한다"고 하였다. 또한 앞서 말한 바와 같이甘草에 항염, 항우울 효능이 있음을 확인한 실험적 연구 발표들이 있었다¹¹⁻¹⁵⁾.

이에 본 연구에서는甘草의 항염 항우울 효능에 대해 우울증의 주요 원인설들과의 연관성을 확인하기 위해 시상하부의 PVN에서 c-fos발현, PVN에서 NF- κ B와 I κ B발현, 혈액의 Corticosterone농도, cytokine발현과 LC에서의 TH의 발현을 측정하여 보았다.

Lipopolysaccharide(LPS)는 염증반응을 유발하는 인자로 다양한 cytokine을 생성시키므로 염증을 연구하는 경우 빈용하는 실험모델로 확립되어 있으며¹⁹⁾, 최근에는 면역-염증반응과 우울증의 연관성을 통한 항우울제 개발을 위한 연구들에서 LPS induced depression model을 이용한 연구발표가 있었다^{20,21)}. 이에 본 실험에서는 LPS를 주입하여 염증을 유발하고甘草를 투여한 후 TST, FST의 실험 결과를 살펴보았는데, LPS 주입군에서 나타난 cytokine과 immobility 시간의 유의성있는 급격한 증가는 LPS의 주입으로 염증이 발생하고 이와 함께 흰쥐가 우울상태에 빠졌음을 볼 수 있다. 또한甘草투여군에서의 실험결과를 보면 TST의 경우 GR400 group에서, FST의 경우는 GR100 group과 GR400 group에서 immobility 시간이 유의하게 감소하는 것을 볼 수 있었는데, 이는甘草가 LPS의 주입으로 인해 유발된 염증과 우울상태에 대해 항우울효능이 있음을 보여주는 것이다.

c-fos 단백질은 많은 종류의 stress 자극에 의해 해마에서 활성화되며, 선행연구들에서 뇌손상이나 stress가 있을 때 뇌 특정부위에서 활성화되어 증가하며, 항우울 약물에 의해 우울 증상이 개선되면 c-fos가 감소된다는 보고가 있었다²²⁾. 본 연구에서 시상하부의 PVN에서 c-fos가 발현된 세포체의 수를 측정한 결과, GR100, GR400 group에서의 유의성 있는 감소를 확인하였는데, 이것으로 보아甘草의 항우울효능이 PVN에서 c-fos 발현을 억제하는 작용을 통해 나타난다는 것을 알 수 있다.

Glucocorticoid는 HPA axis의 부신피질에서 분비되는 호르몬으로²³⁾, 주요한 stress 지표이며, 염증과 stress는 HPA axis를 활성화시켜 glucocorticoid를 방출하여 혈중 농도를 증

가시킨다. 본 연구의 실험결과 특히 GR100 group에서 혈액 내 plasma corticosterone 농도가 유의하게 감소함이 확인되었는데, 이는甘草가 LPS로 염증을 유발한 흰 쥐에서 HPA axis에 작용하여 항우울작용을 나타내는 것임을 보여준다.

염증과 관련하여 cytokine은 면역세포에서 분비되는 펩타이드로서²⁴⁾, cytokine의 증가는 염증이 유발되었음을 보여준다. 이러한 cytokine이 우울증에 영향을 주는 기전은 생성된 트립토판이 뇌로 들어가서 IDO 효소가 PAMPs에 의해 활성화되어 트립토판이 부족하여 serotonin의 합성이 줄어 우울증이 생기는 것으로 설명된다^{25,26)}. 만약 스트레스 등의 결과로 cytokine이 과다 분비되고 이로 인해 우울 증상이 발생된다면, 항우울제는 말초 혹은 뇌의 cytokine 생산과 작용을 억제하는 역할을 할 것이다. 또한 항우울제가 면역세포에서 cytokine 분비를 억제하거나 혹은 cytokine 수용체를 길항하여 우울 증상을 호전시킨다는 보고들^{27,28)}이 있다. 본 실험에서 혈액 내 cytokine의 발현세포수를 비교한 결과 GR400 group에서 IL-1 β , IL-4, IL-10의 농도를 유의하게 감소시키는 것이 확인되었는데, 이로 보아甘草가 이들 cytokine을 억제시키는 항염 효능을 가지고 있음을 알 수 있으며, 또한 염증-면역반응과 연관된 우울증에서甘草의 항우울 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

NF- κ B와 I- κ B는 염증반응과 발생과정에서 중요한 transcription factor로서, LPS 자극에 의해 I- κ B가 인산화되어 NF- κ B와 분리된 후 핵 내로 이동해서 유전자의 발현을 촉진함으로써, cytokine의 생성을 증가시킨다^{29,30)}. 본 연구의 실험결과를 보면 LPS group에 비해 GR100, GR400 group에서의 P-NF- κ B/NF- κ B ratio 발현에는 변화가 없고, I- κ B는 발현의 증가를 보였지만 유의성은 없었다. 이를 통해 NF- κ B와 I- κ B에 대한甘草의 항우울효능은 I- κ B의 발현을 증가시키므로써 NF- κ B의 활성을 억제시켜 c-fos의 과다발현을 억제하는 한편, 세포질에서 NF- κ B가 핵 내로 이동하는 것을 차단하고, HPA axis에 작용하여 glucocorticoid 농도를 감소시키며, 핵 내에서 유전자의 활동이 억제되는 방향으로 전환되게 해서 cytokine의 합성을 억제시키는 것으로 생각된다^{31,32)}.

LC는 NE가 합성되는 부위로서, 특히 우울증 상황에서는 도파민 수준은 감소하고 상대적으로 도파민 대사에 관여하는 TH 수준은 증가한다³³⁾. 이에 본 실험에서 LC에서 염증과 stress에 의해 NE가 합성되는 지표로 TH의 발현을 확인해보았으나, LC에서 TH를 측정함에 LPS group에서는 증가하여 염증이 유발된 것을 확인할 수 있었으나, GR100 group, GR400 group에서의 유의한 감소를 확인하지 못하였다. 이는甘草의 항우울 작용이 monoamine합성과 관련된 SAN체계 쪽으로 작용하는 것은 아닌 것으로 보인다.

이상에서 살펴본 바와 같이甘草는 PVN에서 c-fos의 발현을 억제하고, I- κ B의 발현을 증가시켰으며, HPA axis의 말단부위인 부신피질에 작용하여 혈액 내 corticosterone 농도를 감소시키고, cytokine의 농도를 감소시키는 작용을 통해 항염증 작용을 나타내고 있으며, 이를 통한 항우울 작용으로 TST와 FST에서 부동 행동이 감소시키는 것으로 나타났다. 그리고 LC에서 TH 발현에 대한 효과는 확인되지 않았다. 그러므로甘草의 항우울 효과는 catecholamine system에 대해서 작용하는 것이 아니라 HPA axis에 작용하여 나타나며,

또한 항염증 작용과 함께 항우울 효능을 발휘하는 것으로 보인다.

결론

흰쥐에 LPS로 염증을 유발한 뒤,甘草 100 mg/kg, 400 mg/kg을 투여하여 우울행동의 변화를 확인하고 corticosterone, cytokine, NF- κ B, I κ B, c-fos, TH 등의 발현을 측정된 결과, 이를 통해 LPS로 유발된 염증-우울증 모델에서甘草의 항염 및 항우울 효과에 대해 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1.甘草의 TST에서의 효과는 GR400 group에서 LPS group에 비해 부동행동 시간의 유의한 감소를 확인하였다.
- 2.甘草의 FST에서의 효과는 GR100, GR400 group에서 LPS group에 비해 부동행동의 유의한 감소를 확인하였다.
- 3.甘草의 PVN 내에서 c-fos에 대한 효과는 GR100 group, GR400 group에서 유의한 감소를 확인하였다.
- 4.甘草의 PVN 내 NF- κ B, I κ B에 대한 효과는 GR100, GR400 group에서 LPS group에 비해 P-NF- κ B/NF- κ B ratio 발현에는 변화가 없고, I κ B는 발현의 증가를 보였지만 유의성은 없었다.
- 5.甘草의 혈액 내 corticosterone에 대한 효과는 GR100에서 LPS group에 비해 농도의 유의한 감소가 확인되었다.
- 6.甘草의 혈액 내 cytokine에 대한 효과는 GR100, GR400 group은 LPS group에 비해 IL-1 β , IL-4, IL-10가 유의하게 감소되는 변화를 확인하였다.
- 7.甘草의 LC내에서 TH 발현에 대한 효과는 LPS group에서는 증가하였지만, GR100, GR400 group에서 유의한 감소를 확인하지는 못하였다.

따라서甘草의 항우울 효과는 HPA axis 억제 작용을 통한 항염증 효과에 의해 항우울 효과를 나타내고 있는 것으로 사료되며, catecholamine system에 대한 효과는 없는 것으로 사료된다.

References

1. Sapolsky RM1, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 2000 ; 21(1) : 55-89.
2. Millan MJ. Multi-target strategies for the improved

- treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol Ther.* 2006 ; 110(2) : 135-370.
3. Baldessarini RJ. The basis for amine hypotheses in affective disorder, A critical evaluation. *Arch Gen Psychiatry.* 1975 ; 32(9) : 1087-93.
 4. Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science.* 1987 ; 238(4826) : 522-4.
 5. Smith RS. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses.* 1991 ; 35(4) : 298-306.
 6. Lee MS. Antidepressants and Related Drug Interactions. *Koeran J Biol Psychiatry.* 2000 ; 7(1) : 21-33.
 7. Ko YH, Kim SH. The Characteristics and Treatments of Major Depressive Disorder with Psychotic Features. *Korean J. Pyschopharmacol.* 2005 ; 16(5) : 341-50.
 8. Song HR, Woo YS, Bahk WM. Depression as an Inflammatory Disease. *Korean J Psychopharmacol.* 2013 ; 24(1) : 5-10.
 9. Woong DS, Shin Nong Bon Cho Gyung. Taiwan : Joong Hwa Seo Gwh. 1983 : 12-3.
 10. Ahn JH, Joong Yah Hak. Beijing : In Min Wi Seng. 1991 : 751-8.
 11. Kwon SO, Choi SM, Kim MH, Lee BB, Park MW, Lee YJ, Park HJ, Hahm DH. Antidepressant Effect of the Subchronic Administration of the Methanolic Extract of Wild-ginseng and Cultivated-ginseng in Mice Tail Suspension Test. *J Korean Acupuncture Moxibustion Med Soc.* 2009 ; 26(4) : 99-106.
 12. Hwang JM. Inhibitory effect of(E)-1-(3,4-dihydroxystyryl)-3-(4-hydroxyphenetyl) urea compound on LPS-induced inflammatory responses in RAW 264,7 cells. Junbuk University. 2010.
 13. Lee JM. Effects of Jakyakkamchobuja-tang on Papain-induced Osteoarthritis in Mice. Daejeon University. 2012.
 14. Kim YJ. Effect of wild ginseng pharmacopuncture on immune system in an LPS-induced acute inflammatory rat model. SangJi University. 2010.
 15. Park HJ, Shim HS, Shim IS, Lee TH. Neural Mechanisms Underlying Antidepressant-Like Effects of Glycyrrhizae Radix in Rats. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2010 ; 24(6) : 1053-8.
 16. Dantzer R, O'Connor JC, Lawson MA, Kelley KW. Inflammation-associated depression: From serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology.* 2011 ; 36(3) : 426-36.
 17. Herman JP, Schafer MK-H, Young EA, Thompson R, Douglas J, Akil H, Watson SJ. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neurosci.* 1989 ; 9(9) : 3072-82.

18. Jin JI, Joong Guk Yak Hak Dae Jeon, Taiwan : Song Ak, 1990 : 256–9.
19. Yagnik RM, Benzeroual KE. Tigecycline prevents LPS-induced release of pro-inflammatory and apoptotic mediators in neuronal cells. *Toxicol In Vitro*. 2013 ; 27(2) : 686–93
20. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008 ; 9(1) : 46–56.
21. O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry*. 2009 ; 14(5) : 511–22.
22. 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.
23. Vazquez DM. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*. 1998 ; 23(7) : 663–700.
24. Kim YK. The role of cytokines in depression and their therapeutic implication. *Korean J Psychopharmacol*. 2000 ; 11(4) : 304–12.
25. Sakash JB, Byrne GI, Lichtman A, Libby P. Cytokines induce indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human atheroma-associated cells: implications for persistent *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2002 ; 70(7) : 3959–61.
26. Guillemin GJ, Kerr SJ, Pemberton LA, Smith DG, Smythe GA, Armati PJ, Brew BJ. IFN- β 1b induces kynurenine pathway metabolism in human macrophages: potential implications for multiple sclerosis treatment. *J Interferon Cytokine Res*. 2001 ; 21(12) : 1097–101.
27. Neveu JP, Castanon N. Is there evidence for an effect of antidepressant drugs on the immune function? In: Dantzer R, Wollman EE, Yirmiya R, editors. *Cytokines, stress, and depression*. New York : Plenum, 1999 : 267–82.
28. Xia Z, DePierre JW, Nassberger L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 β and TNF- α release in human blood monocytes and IL-2 and interferon- β in T cells. *Immunopharmacology*. 1996 ; 34(1) : 27–37.
29. Jacob MD, Harrison SC. Structure of an I κ B/NF- κ B complex. *Cell*. 1998 ; 95(6) : 749–58.
30. Kim DS. A novel mechanism for constitutive NF- κ B activation: I- κ B α depletion by transglutaminase 2 and mu-calpain occurs in parallel with the ubiquitin-proteasome pathway. Sungkyunwan University. 2011.
31. Robert Ader. *Psychoneuroimmunology*. Burlington : Elsevier. 2007 : 50–4, 66–71, 281–318.
32. Fujioka S, Niu J, Schmidt C, Scwabas GM, Peng B, Uwagawa T, Li Z, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. NF- κ B and AP-1 Connection: Mechanism of NF- κ B-Dependent Regulation of AP-1 Activity. *Mol Cell Biol*. 2004 ; 24(17) : 7806–19.
33. McDevitt RA, Szot P, Baratta MV, Bland ST, White SS, Maier SF, Neumaier JF. Stress-induced activity in the locus coeruleus is not sensitive to stressor controllability. *Brain Res*. 2009 ; 1285 : 109–18.