

甘草 엑기스가 Immobilization Stress 負荷후 血中 Corticosterone 및 Histamine 含量變化에 미치는 영향

殷 載 淳·吳 贊 鎬·韓 宗 鉉*

全州又石大學 藥學科, 圓光大學校 韓醫科大學*

Effects of Glycyrrhizae Radix on Serum Corticosterone and Blood Histamine Content by Immobilization Stress in Mice

Jae Soon Eun, Chan Ho Oh and Jong Hyun Han*

Department of Pharmacy, Jeon ju Woosuk University, Jeon ju 565-800 and

*College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iri 570-180, Korea

Abstract—This study was carried out to investigate the effect of Glycyrrhizae Radix on serum corticosterone and blood histamine content by immobilization stress in mice. Corticosterone secretion and blood histamine level was significantly increased in mice by subjecting the animals to immobilization stress 1 hr. after intraperitoneal injection of Glycyrrhizae Radix extract (150 mg/kg) and glycyrrhizic acid (15 mg/kg). Whereas, administration of cortisol (7.5 μ g/kg) provoked a decrease in corticosterone secretion and histamine levels. These results suggested that glycyrrhizic acid was effective on corticosterone release provoked by immobilization stress and this release was mediated in part by histamine.

Keywords—Glycyrrhizae Radix • serum corticosterone • blood histamine • cortisol • immobilization stress

H. Selye¹⁾는 생체에 면역현상과 같은 특이적인 방어기구의에 高·低溫, 外傷, 感染, 精神的壓迫等 刺激의 종류에 관계없이 일정한 반응형식으로서 작용하는 非特異的防禦機構(stress 반응)가 있음을 提示하였으며, W.B. Cannon²⁾은 생체가 외부환경의 변화에도 불구하고 內的環境은 항상 일정하게 유지된다는 homeostasis(恒常性)의 개념을 주장했는데 이러한 恒常性を 維持시키는데는 自律神經—副腎髓質系의 作動성을 갖는 catecholamine이 分泌됨과 동시에 corticoid가 general tissue hormone임을 의미한다.³⁾ 이러한 생체의 일련의 防禦反應이 일어날 때의 증상을 Selye는 general adaptation syndrome이라 命名했는데, 이는 3단계가 있어 警告反應期, 抵抗期

및 疲勞期로 구분된다. 외부에서 stress가 加해질 때 경고반응기에 있어서 체액의 화학변화와 신경계의 자극에 의해 腦의 視床下部가 자극되어 교감신경의 활동과 副腎髓質호르몬의 분비가 있고 腦下垂體로 부터 ACTH가 분비되며, 이 ACTH는 副腎皮質에서 glucocorticoid를 분비시켜 糖新生, 抗炎症作用 등의 대사변화를 일으켜 신체의 stress에 대한 抵抗力을 증강시켜 순응하게 된다.⁴⁾ corticoid의 分泌意義에 관하여 많은 연구⁵⁾가 진행되고 있으나, 실제로 末梢에 가해진 stress의 자극이 어떻게 해서 腦에 전달되어지는 가는 정확히 알려져 있지 않다. 현재까지 알려진 stress時 first mediator로서 작용하는 것으로는 histamine,⁶⁾ vassopresin,⁷⁾ catecholamine⁸⁾

serotonin,⁹⁾ CRF¹⁰⁾ 및 ACTH¹¹⁾ 등이 있지만, 모두 腦에서의 neurotransmitter로서의 관련성 뿐이고 末梢의 자극을 전달하는 mediator에 대하여는 극히 연구가 미약한 실정이다.

따라서 本 研究는 韓方에서 가장 흔하게 사용되고 있는 甘草에 steroid성 抗炎症작용이 있다는 사실¹²⁾에 입각하여 stress에 대한 저항성 증강 효과를 검토하기 위해 immobilization stress를 부하하고, 감초엑스, glycyrrhizic acid 및 cortisol을 투여한 후 血液中 corticosterone 및 histamine량의 변동에 대하여 실험한 결과 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

實 驗

實驗材料 및 檢液의 調製

本 實驗에 사용된 甘草(Glycyrrhizae Radix)는 시중 진재상에서 上品을 구입하여 사용하였으며, 감초 100 g을 細切하여 500 ml의 증류수를 가하고 5시간씩 3회 반복하여 가열 추출한 액을 여과포로 여과한 다음, 원심분리기로 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취해 감압농축한 뒤, 40° vacuum desiccator에서 건조시켜 분말 21 g(21%)을 얻어 0.9% 생리식염수에 녹여 檢液으로 사용하였다.

實驗動物

實驗動物은 체중 20~25 g의 ICR系 雄性 mouse를 한국화학연구소에서 구입하여 常溫조건하에서 1주간 적응시킨 후, 實驗에 사용하였다.

試藥 및 機器

Phospho cellulose powder(Junsei Co.), corticosterone, histamine·HCl(Sigma Co.) 및 cortisol(DPC)을 사용하였고 기타시약은 특급시약을 사용하였다. 사용機器로는 Fluorescence spectrophotometer(Hitachi 650-40s)를 사용하였다.

實驗方法

藥物投與 및 stress 負荷

甘草엑스, glycyrrhizic acid 및 cortisol의 투여는 stress 負荷 1時間前에 mouse에 복강으로 주사하였으며, stress는 immobilization stress¹³⁾로 30分 동안 행하였다.

血中corticosterone 含量測定

血清中 corticosterone 含量은 Zenker와 Bernstein 方法¹⁴⁾에 준해 측정하였다. 즉 혈청 0.3 ml에 재증류수 0.7 ml를 넣어 혼합하고, chloroform 10 ml로 진탕하여 corticosterone을 추출한 다음, 2,500 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 분리 제거한 후, 0.1N-NaOH용액 1 ml를 가하고 진탕하여, 2회 이상 세척한다. 원심분리하여 상층액을 제거하고 세척한 chloroform층 9 ml를 취하여 3 ml의 형광시약(H₂SO₄ : 50% C₂H₅OH = 2.4 : 1)을 가하고 진탕한 뒤, 2,500 rpm에서 5분간 원심분리를 하고 chloroform층을 제거하고 잔류액을 2시간 동안 방치하여 fluorescence spectrophotometer로 측정하였다(여기 파장 470 nm, 형광파장 520 nm). 檢量線은 표준 corticosterone을 99% EtOH에 용해시켜 standard solution으로 사용하였다.

血液中 histamine 含量測定

0.4N-HClO₄로 제단백한 全血 sample을 phospho-cellulose column을 이용하여 histamine을 borate buffer로 용출시킨 후, 용출액 3 ml를 orthophthal aldehyde로 형광시켜 fluorescence spectrophotometer로 여기파장 350 nm, 형광파장 444 nm에서 측정하였으며¹⁵⁾, 통계처리는 student t-test를 이용하였다.

實 驗 結 果

Immobilization stress에 의한 血中 corticosterone 및 histamine 含量變化에 미치는 감초엑스의 영향

감초엑스 투여 1시간 후, immobilization stress군과 대조군(non-stress)에 있어서 serum중 corticosterone의 함량변화는 감초엑스를 투여하지 않았을 때, non-stress時 254±25 ng/ml이고 stress 부하時 290±18 ng/ml이었으며, 감초엑스 50 mg/kg 투여시에는 338±54 ng/ml에서 485±62.7 ng/ml로 유의성있게 증가하였고(p<0.05), 150 mg/kg 투여시에 385±79 ng/ml에서 703±65 ng/ml로 약 2배 정도 유의성있게 증가하였다(p<0.01). 300 mg/kg 투여시에는 366±57 ng/ml에서 446±83 ng/ml로 증가하는 경향이었으며, 600 mg/kg 투여시에 420±34 ng/ml에서 533±

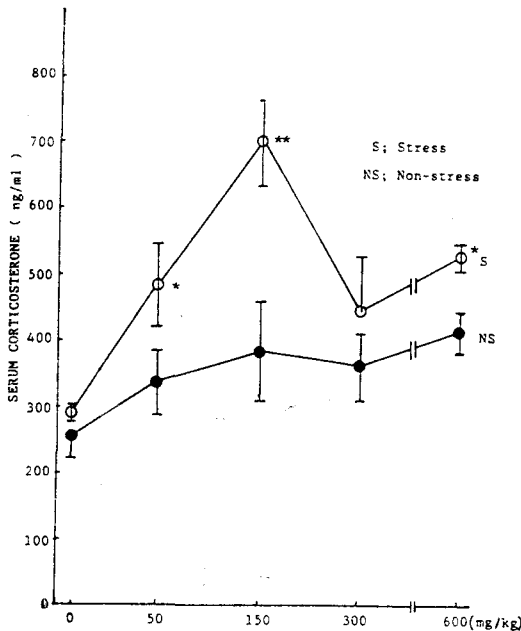


Fig. 1. Effect of Glycyrrhizae Radix Ex. on serum corticosterone levels induced by immobilization stress in mice. Immobilization stress was imposed on mice for 30 min. Drugs were administered i.p. 1 hr. before immobilization stress. Each bar represents the means±S.E. of 6 mice. Significantly different from the non-stress group; (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

21 ng/ml로 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가하였다 (Fig. 1).

또한 血中 histamine 含量은 감초엑스를 투여하지 않았을 때는 non-stress時 50 ± 3.6 ng/ml에서 stress부하時 61 ± 5 ng/ml로, 감초엑스 50 mg/kg을 투여하였을 때는 72 ± 3.3 ng/ml에서 95 ± 17 ng/ml로 증가하였으며, 150 mg/kg 투여시에는 78 ± 12 ng/ml에서 89 ± 7 ng/ml로 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가하였다. 300 mg/kg 투여시에는 79 ± 11 ng/ml에서 101 ± 17 ng/ml로 증가하였으며, 600mg/kg 투여시에는 92 ± 7 ng/ml에서 128 ± 12 ng/ml로 유의성 ($p < 0.05$) 있게 증가하였다 (Fig. 2).

Immobilization stress에 의한 血中 corticosterone 및 histamine 含量變化에 미치는 glycyrrhizic acid의 영향

감초엑스의 성분인 glycyrrhizic acid를 투여

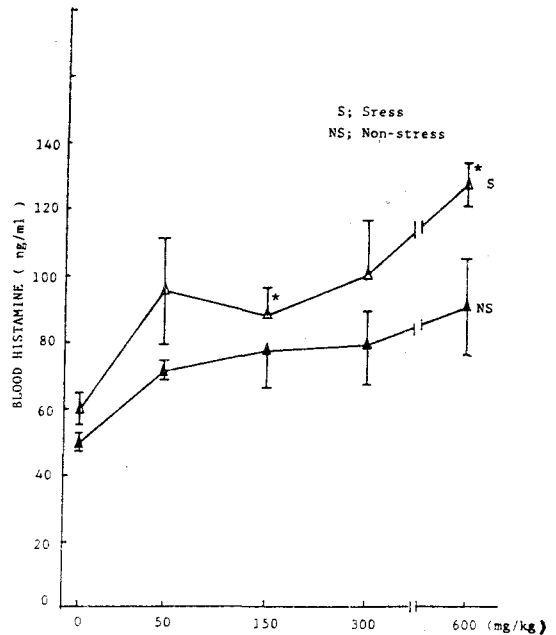


Fig. 2. Effect of Glycyrrhizae Radix Ex. on blood histamine contents induced by immobilization stress in mice. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 1. Significantly different from the non-stress group (* $p < 0.05$).

하지 않았을 때, non-stress時의 혈중 corticosterone 含量은 254 ± 25 ng/ml에서 stress 부하時 290 ± 18 ng/ml로 증가하였으며, glycyrrhizic acid 15 mg/kg 투여시에는 407 ± 21 ng/ml에서 556 ± 44 ng/ml로 유의성 ($p < 0.01$) 있게 증가하였다. 30 및 60 mg/kg 투여시에는 non-stress時 339 ± 34 및 355 ± 64 ng/ml에서 stress 부하時 360 ± 14 및 451 ± 39 ng/ml로 증가하는 경향이 있었다 (Fig. 3).

이때 全血中 histamine의 含量은 non-stress時 50 ± 3.6 , 87 ± 7 , 101 ± 18 및 92 ± 16 ng/ml에서 stress 부하時 61 ± 5 , 180 ± 10 , 152 ± 9 및 138 ± 7 ng/ml로 유의성 ($p < 0.01$) 있게 증가하였으며, 특히 15 mg/kg을 투여한 군에서 가장 높게 증가하였다 (Fig. 4).

Immobilization stress에 의한 血中 corticosterone 및 histamine 含量變化에 미치는 cortisol의 영향

cortisol 7.5 mg/kg을 투여하고 non-stress時

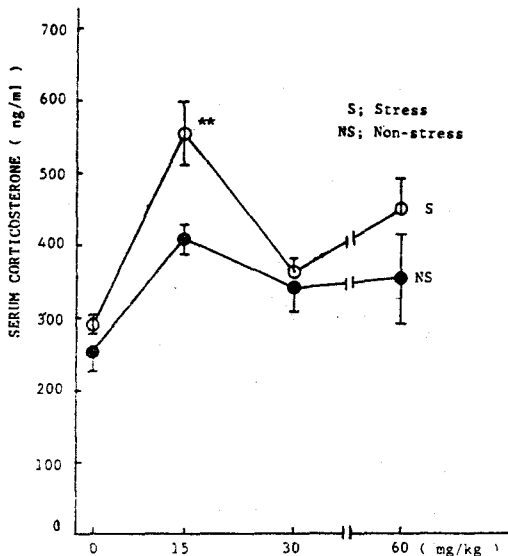


Fig. 3. Effect of Glycyrrhizinic acid on serum corticosterone levels induced by immobilization stress in mice.

Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 1.

Significantly different from the nonstress group (** $p < 0.01$).

corticosterone의 量은 대조군 254 ± 25 ng/ml인데 비해 cortisol 투여군은 539 ± 95 ng/ml로 증가하였으며, stress 時에도 290 ± 18 ng/ml에서 410 ± 49 ng/ml로 증가하였으나, stress를 부하하였을 때 corticosterone 含量은 non-stress 時에 비해 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$).

Histamine 含量도 non-stress 時 대조군 40 ± 3.6 ng/ml인데 비해 cortisol 투여군은 137 ± 17 ng/ml로, stress 부하 時에는 61 ± 5 ng/ml에서 116 ± 14 ng/ml로 증가하였으나, stress 부하 時 non-stress 時 보다 histamine 含量이 감소하는 경향이 있었다(Fig. 5).

考 察

生體에 외부로부터 非特異的 자극이 가해지면 그 種類에 관계없이 恒常性을 유지시키기 위한 일정한 防禦反應이 일어난다 동시에 glucocorticoid는 그 反應의 성립에 중요한 역할을 하고 있는데, 이러한 glucocorticoid의 分泌意義에 관해서는 Ingle 등¹⁷⁾이 corticoid 호르몬이 없으면

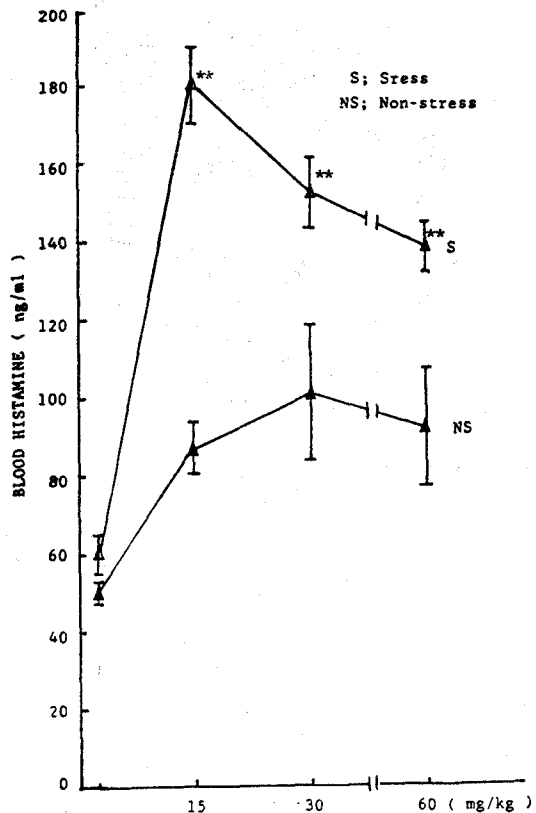


Fig. 4. Effect of Glycyrrhizinic acid on blood histamine contents induced by immobilization stress in mice.

Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 1.

Significantly different from the non-stress group (** $p < 0.01$).

細胞의 正常活動에 많은 障害가 일어나며 Nakano 등¹⁸⁾도 부신적출 rat에 stress를 負荷하면 正常의 rat에 비해 死亡率이 매우 높아지는데, 이때 glucocorticoid를 前처리하면 이를 방지할 수 있다고 보고하였다. 한편 Beaven 등¹⁹⁾은 cold stress 時 血中 histamine 含量이 증가한다고 하였으며, Campos 등²⁰⁾은 electric shock stress 時 rat 腦中의 histamine 含量이 증가한다고 보고하였으며, Nakano 등²¹⁾은 stress 負荷 時 glucocorticoid의 분비에 histamine이 직접적인 mediator로서 관여한다고 하였다.

본 實驗에서는 甘草의 stress에 대한 방어기전을 살펴 보고자 甘草엑스 및 그 상당량에 해당하

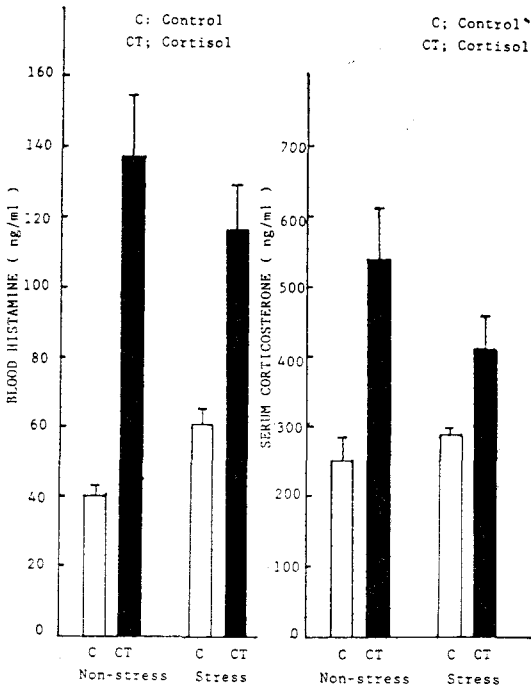


Fig. 5. Effect of cortisol (7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) on serum corticosterone and blood histamine levels induced by immobilization stress in mice. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 1. Significantly different from the non-stress group (* $p < 0.05$).

는甘草의成分인 glycyrrhizinic acid 및 cortisol을 투여한 후, immobilization stress를 負荷하고 non stress群과 血中 corticosterone 및 histamine의 含量을 비교한 결과, stress時 corticosterone 및 histamine의 量이 상승되었다. 이는 生體防禦기전에 關係하는 glucocorticoid 分泌능력을 향상시키는 것이며, 이때 mediator로서 histamine이 關係하고 있다는 것을 시사한다. Cortisol 투여時 non stress時 보다 stress時 血中 corticosterone 및 histamine의 含量이 감소하는 경향을 나타낸 點은 구체적인 검토가 더 進行되어야 하나, feed back 작용에 의한 것이라 豫측된다. 또한 甘草 엑스 150 mg/kg 투여時와 그에 상응하는 glycyrrhizinic acid 15 mg/kg 투여時 corticosterone 및 histamine 含量이 가장 높게 증가했다는 사실도 과량 투여에 의한 feed back 작용에 의한 것이라 料되나, 이에 대한 연구는 더 進行되어야 할

것이다.

結 論

甘草엑스, glycyrrhizinic acid 및 cortisol을 投與하고 immobilization stress를 負荷한 後 血中 corticosterone 및 histamine 含量의 變動을 측정한 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 甘草엑스 50, 150, 300 및 600 mg/kg 투여 후 immobilization stress 負荷時, non-stress時에 비해 血中 corticosterone 및 histamine 含量이 증가하는 경향이었으며, 甘草엑스 150 mg/kg을 投與하였을 때 가장 높게 증가하였다.

2. Glycyrrhizinic acid 15, 30 및 60 mg/kg을 投與한 後 immobilization stress 負荷時, non-stress時에 비해 血中 corticosterone 및 histamine 含量이 증가하였으며, 15 mg/kg을 投與하였을 때 가장 높게 증가하였다.

3. Cortisol 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 投與後 immobilization stress 負荷時 non stress時에 비해 血中 corticosterone 및 histamine 含量이 감소되는 경향이였다.

이상의 實驗結果 甘草엑스의 stress에 대한 방어기전에 있어서 glucocorticoid 分泌能力을 升시키는 것은 甘草成分인 glycyrrhizinic acid에 의한 것이라 料되며, cortisol에 의해서 감소되는 경향이 나타나는 것은 negative feed back 기작이라 推定되나 좀 더 구체적인 연구가 行되어야 할 것이다.

〈1989년 1월 12일 접수 : 2월 28일 수리〉

文 獻

- Selye, H.: The Story of the Adaptation Syndrome, Acta. (1952).
- Cannon, W.B.: Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. 2nd Ed. Appleton.
- Hartman, F.A., Brownell, K.A. and Lockwood, J.E.: *Am. J. Physiol.* 101, 50 (1932).
- Ramey, E.R. and Goldstein, M.S.: *Physiol. Rev.* 37, 155 (1957).
- Sayers, G. and Sayers, M.A.: *Ann. N.Y. Acad.*

- Sci.* 50, 522 (1949).
6. Bugajski, J. and Gadek, A.: *Neuroendocrinology* 36, 424 (1983).
 7. Mormede, P.: *Nature* (London) 302, 345 (1983).
 8. Rivier, C. and Vale, W.: *Nature* (London) 305 325 (1983).
 9. Fuller, R.W. and Sonddy, H.D.: *Neuroendocrinology* 31, 96 (1980).
 10. Nakane, T., Audhya, T., Kanie, N. and Hollander, C.S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1247 (1985).
 11. Kaneko, M., Kaneko, K., Shinsako, J. and Dallman, M.F.: *Endocrinology* 109, 70 (1981).
 12. Hong-Yen Hsu: *Oriental materia medica*, Long Beach; CA, Oriental Healing Arts Institute, (1986).
 13. Suzuki, S. and Nakano, K.: *Am. J. Physiol.* 248, E26 (1985).
 14. Zenker, N. and Bernstein, D.E.: *J. Biol. Chem.* 231, 695 (1958).
 15. Endo, Y.: In *methods in Enzymology*, 94, 45. Academic Press (1983).
 16. Abraham, G.E., Buster, J.E. and Teller, R.C.: *Analytical Letters* 5, 757 (1972).
 17. Ingle, D.J.: *J. Endocrinology* 8, 13 (1952).
 18. Nakano, K., Suzuki, S., Oh, C. and Yamashita, K.: *Acta Endocrinol.* 112, 122 (1986).
 19. Beaven, M.A.: *New Engl. J. Med.* 294, 30 (1976a).
 20. Campos, H.A. and Jurpe, J.: *Experientia* 26, 746 (1970).
 21. Nakano, K., Suzuki, S. and Oh, C.: *Brain Behavior and Immunity* 1, 159 (1987).