

동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 13. No. 2, 2002

古庵心腎丸去朱砂方이 憂鬱症 模型 흰쥐의 憂鬱 성향 및 PVN의 c-Fos 發顯에 미치는 效果

이재혁, 김종우*, 황의완*, 김현택**

세명대학교 한의과대학 신경정신과, 경희대학교 한의과대학 신경정신과, 고려대학교 심리학과**

The Effects of Koamsimsinwhan(without Cinnabarite) on Depression in Chronic Mild Stress(CMS)-treated Rats

Jaehyok Lee, Jongwoo Kim*, Weiwan Whang*, Hyuntaek Kim**

Dept. of Neuropsychiatry, Semyung University, Dept. of Neuropsychiatry, Kyung Hee University*
Dept. of Psychology, Korea University**

This study was performed to evaluate the effects of Koamsimsinwhan (without Cinnabarite) on depression in CMS-treated rats. Rats of trial groups were exposed to chronic mild unpredictable stress for 4 weeks. These CMS-treated rats were stratified into Koamsimsinwhan(without Cinnabarite) group and vehicle(non-drug) group. And there were control rats excluding both CMS and Koamsimsinwhan(without Cinnabarite). Forced swimming test, general activity test and immunohistochemical test(measuring the level of manifestation of c-Fos in PVN) were executed to evaluate the effects of Koamsimsinwhan(without Cinnabarite) on depression after 4 weeks of CMS treatment.

The results were as follows

1. In FST, depression was induced from CMS treatment and was suppressed with Koamsimsinwhan(without Cinnabarite).
2. The increased activity of nerve cell in PVN, which refers to stress, was induced from CMS treatment and normalized with Koamsimsinwhan (without Cinnabarite).

I. 結 論

우울증은 우울과 관련하여 정신운동, 인지기능, 정신생리기능 및 대인관계에서 장애가 나타나는 질환

으로서¹⁾ 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 정신장애이다²⁾.

· 교신저자 : 이재혁, 충청북도 충주시 봉방동 836 세명대학교 충주한방병원 한방신경정신과 (Tel. 043-841-1726, E-mail: yuean69@hanmail.net)

서양의학의 우울증에 해당하는 한의학적 개념은

“鬱證”에 속하며³⁾ 이는 情志不舒 氣機鬱滯로 인해 心, 肝, 脾 三臟에 이상이 생긴 결과로 氣血이 失調하여 발생하는 질병을 말한다⁴⁾. 아울러 鬱證은 “久而化鬱”, “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.

서양의학에서도 이와 같은 만성적 스트레스로 인한 우울증 연구를 위해서 인간의 일상생활을 모사한 경미한 강도의 반복적 스트레스를 연구하는 추세이며^{6,7,8)}, 그 중에서 CMS(Chronic Mild Stress) 모델은 Willner⁹⁾에 의해 개발된 것으로서 충분한 신뢰도와 타당성을 갖춘 우수한 우울증 동물 모델로서 주목받고 있다.

이러한 CMS 유발 우울증에 대한 한의학적 연구로서 조¹⁰⁾는 歸脾溫膽湯을, 이¹¹⁾는 分心氣飲을, 지¹²⁾는 補血安神湯을 투여하여 항우울 효과를 규명한 바 있다. 그러나 김¹³⁾의 遠志石菖蒲散을 이용한 연구를 제외하면 대부분 CMS의 기본 연구인 자당 섭취량 측정과 행동실험이었으며 다른 검사를 통한 검증이나 신체적 반응에 대한 연구는 미비한 실정이었다.

본 실험에 사용된 古庵心腎丸은 【丹溪心法附錄】¹⁸⁾에 처음으로 기재된 처방으로서 勞損으로 心腎이 虛하고 有熱하여 나타나는 驚悸 怔忡 遺精 盜汗 등의 증상에 사용하는 처방이다. 이 처방에 대한 차¹⁹⁾의 연구와 이 처방의 기본방이라 할 수 있는 六味地黃湯²⁰⁾에 대한 김²¹⁾과 조²²⁾의 연구를 통해 항스트레스 효과가 입증되었으므로 스트레스에 의해 유발되는 우울증에도 유효할 것으로 사료되었다.

따라서 이번 실험에서는 CMS로 유발된 우울 상태를 강제수영검사(FST)^{14,15,16)}로써 검증하였다. 또한 스트레스에 특징적으로 반응하는 paraventricular nucleus(PVN) 부위¹⁷⁾에서 신경세포 활동성에 대한 지표가 되는 c-Fos 단백질의 발현도를 측정하였다.

또한 CMS를 이용한 기존의 한의학적 연구들에서는 우울증 치료에 있어서 CMS 처치 후에 한약물을 투여하여 치료 효과를 입증한 데 반해, 이번 실험에서는 CMS 처치와 동시에 한약물을 투여하여 우울증의 예방 효과를 검증하고자 하였다.

이에 저자는 古庵心腎丸去朱砂方을 이용하여, CMS로 유발된 우울증 모델 흰쥐에 대해 강제수영 검사와 면역조직화학적 절차를 실시하여 우울증의 예방 효과에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 動物 및 藥材

1) 動物

대한실험동물센터에서 공급되는 Sprague-Dawley 종 흰쥐 수컷을 피험동물로 사용하였다. 일주일 동안 실험실 내 사육실 조건에 적응하도록 하면서, 동시에 핸들링(handling) 절차를 통해 실험자와의 접촉에 익숙해지도록 하였다. 흰쥐들은 3-4마리씩 집단 사육하였고, CMS 처치 직전 동물의 체중은 200g이었다. 사육실의 온도는 23±2℃, 습도는 40~50%로 유지하였으며, 사육실에서는 환풍기와 공기정화기를 항상 가동시켰다. CMS 처치가 시작되면서 통제동물은 원래의 사육실에 그대로 두었고, 스트레스 처치를 받는 동물들은 크기와 조건이 동일한 다른 사육실로 옮겼다. 이는 CMS 처치에 압박이는 불빛과 소음과 같은 스트레스 자극이 포함되어 있었기 때문이다. 밤과 낮의 주기는 12시간:12시간이 되도록 하되, 야행성인 흰쥐의 습성을 고려하여, 주로 실험이 진행되는 낮 시간이 밤주기에 해당되도록 조정하였다. CMS 절차에 따라 박탈 스케줄이 포함되기도 하였지만, 그 외의 경우에는 물과 먹이를 마음대로 먹을 수 있게 공급해 주었다.

2) 藥材

이 실험에서 사용된 약제는 경희의료원 한방병원 제약실을 통해 구입하여 정선한 것을 사용하였다. 처방은 東醫寶鑑²³⁾에 收載된 내용에 준하였으며, 朱砂는 元方에서 爲衣하게 되어있으나 이번 실험에서는 사용하지 않았다. 또한, 본 처방은 丸劑로 되어 있으나 임상에서 1/20을 한 첩으로 하는 관례에 따라 복용량을 산정하였다. (단, 1錢은 4.0g으로 환산함)

Table 1. Contents of Koamsimsinwhan without Cinnabarite

韓藥名	生藥名	分量
熟地黄	Rehmanniae Radix Preparat	6g
生乾地黄	Rehmanniae Radix	6g
山藥	Dioscoreae Rhizoma	6g
白茯苓	Poria	6g
當歸	Angelicae Gigantis Radix	3g
澤瀉	Alismatis Rhizoma	3g
黃柏(鹽酒炒)	Phellodendri Cortex	3g
山茱萸	Corni Fructus	2g
枸杞子	Lycii Fructus	2g
龜板(酥灸)	Testudinis Plastrum	2g
牛膝	Achyranthis Bidentatae Radix	2g
黃連	Coptidis Rhizoma	2g
牡丹皮	Moutan Cortex	2g
鹿茸(酥灸)	Cervi Pantotrichum Cornu	2g
生甘草	Glycyrrhizae Radix	1g
Total amount		48g

2. 方法

1) 檢液의 調製

실험에 사용된 古庵心腎丸去朱砂方은 Table I. 에 제시된 처방 약재를 10첩 단위로 전탕 후 냉동 건조하여 분말 상태로 만들어 사용하였다. 우선, 약재 1첩당 물(시중에서 판매되는 생수를 이용하였음) 300cc의 비율로 혼합하여 환류냉각 장치에서 3 시간 동안 가열 후, 1차 전탕액을 얻는다. 이 전탕액을 다시 회전식 진공 플라스크에 넣고 감압농축시켜 2차 원액을 얻는다. 2차 원액은 다시 냉동 건조 절차를 거쳐 고체 형태의 추출물로 만들어진다. 이 과정에서 약재 1첩 당 6g의 추출물이 얻어지게 되며, 추출물은 분쇄기를 이용해 분말상태로 만들어 이용하였다. 실험이 진행되는 동안 분말 상태의 약재는 냉장보관 하였다.

2) 檢液의 投與

분말상태의 추출물을 하루 투여량 만큼씩 물에 녹여 현탁액을 만든 후, 경구투여용 주사기를 이용해 실험동물에게 매일 한 차례 씩 경구투여하였다. 인간의 경우(체중 60 kg 기준) 古庵心腎丸去朱砂方은 1일 처방량이 2첩이고, 이는 정제된 추출물 12 g에 해당된다. 이를 기준으로 실험동물에게 투여할 양을 인간 1일 처방량의 5배로 계산하면 1일 투여량이 1.0 g/kg이 된다. 첫 날 검액을 투여하기 전에 동물의 체중을 측정하여 첫 날의 투여량을 결정하였고, 그 후에는 5일 마다 체중을 측정하여 투여량을 조절하였다. 실제 동물에게 투여된 현탁액의 양은 8 ml/kg이었다. CMS-vehicle 집단의 쥐들에게는 동일한 양의 생수를 경구투여 하였다. 모든 동물에 있어서 검액 혹은 물의 투여는 매일 동일한 시각에 이루어지도록 하였다.

3) CMS 節次

본 실험에서, 실험동물들은 3개의 집단으로 나누어 사용되었다.

① Normal 집단(N=17) : CMS 처치를 받지 않는 집단이며, CMS 처치에 대한 통제군으로 사용되었다.

② CMS-vehicle 집단(N=17) : CMS 처치를 받

지만 약물 대신에 vehicle(생수)을 투여하였으며, 약물처치에 대한 통제군으로 사용되었다.

③ CMS-drug 집단(N=17) : 4주간의 CMS 처치를 받는 동안 古庵心腎丸去朱砂方을 투여 받는 집단이며, 약물처치에 대한 실험군으로 사용되었다.

이상과 같이 3개 집단을 구분한 후, CMS 스케줄을 도입하였다. CMS 절차에 속한 34마리의 흰쥐들이 경험하는 스트레스에는 물 또는 먹이 박탈, 주야 주기의 역전, 과밀집, 사회적 격리, 깜박이는 불빛, 소음, 사육상자 기울이기, 그리고 축축한 깔짚 등이 포함되었다. 이들 다양한 스트레스 자극들을 적절하게 배열하여 1주일 단위의 스트레스 프로토콜(Fig. 1.)을 만들었기 때문에 동물은 언제 어떤 종류의 스트레스가 제시될지 예측할 수 없다. CMS 처치를 받는 34마리의 흰쥐들은 스트레스 프로토콜에 따라 4주간 다양한 상황에 반복 노출시켰다. 반면, CMS 처치를 받지 않는 17마리의 흰쥐들은 전과 다른없는 사육 조건에서 지내도록 하였고, 가능한 한 스트레스 자극을 최소화시킨 조건에서 생활하도록 배려하였다. 본 실험에 사용된 CMS 절차는 Willner⁹⁾의 것을 참고로 하여 재구성되었으며, Willner가 도입했던 13종의 스트레스 항목 중 추위와 냄새자극에 대한 노출을 제외한 나머지 11가지 스트레스 항목은 동일하게 적용되도록 하였다. 이들 11가지 스트레스는 1주일 단위로 구성되며, 1주일 간의 스트레스 스케줄이 Fig. 1.에 요약되어 있다.

Fig. 1. Chronic Mild Stress Protocol

time	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5	D-6	D-7								
01:00	WD FD ISO 24h	WN 2h	WD 16h	LOF	TH 20h	ISO 21h	SC 17h	WN 2h	ISO 14h						
02:00										WN 2h					
03:00															
04:00										WN 2h					
05:00															
06:00										WN 1h					
07:00															
08:00															
09:00															
10:00		SS 4h	EB 2h	LON	WD FD 20h	ISO 21h	SC 17h	WN 1h	ISO 14h						
11:00															
12:00															
13:00															
14:00															
15:00		SS 2h	Tilt 7h												
16:00											RF 2h	SS 9h	Tilt 8h	SS 4h	ISO 14h
17:00															
18:00															
19:00		SS 3h	WD 16h	TH 17h	WD FD 20h	ISO	SC 17h	WN 3h	ISO 14h						
20:00															
21:00	WN 3h														
22:00															
23:00			LOF												
24:00	WN 2h														

EB : empty water bottle, FD : food deprivation, ISO : isolation, LOF : light off, LON : light on, RF : restricted access to food (scattering of ground food), SC : soiled cage (100 ml water in bedding), SS : stroboscope illumination, Tilt : tilt cage (45°), TH : tripled housing, WD : water deprivation.

4) 강제수영 검사 (forced swimming test, FST)
CMS 절차가 끝난 각 그룹의 쥐 17마리를 A군(N=12)과 B군(N=5)으로 나눈다. A군은 강제수영 검사에 사용하고, B군은 면역조직화학절차에 사용하게 된다. CMS 절차가 끝난 다음날 각 그룹의 A군(N=12)을 대상으로 강제수영검사를 실시하였다.

강제수영검사의 장치와 절차는 다음과 같다. 투명 아크릴로 제작된 원통형 수조(지름 20cm, 높이 40cm)를 실험장치로 사용하였다. 이 수조에 25cm 높이로 물(25°C)을 채우고 동물을 넣는다. 실험은 2일간 연속해서 실시하며 적응시행인 첫째 날에는 동물을 15분간 물이 담긴 수조에 넣어 어떤 처치도 가하지 않은 채 자유롭게 수영하게 하였다. 15분이 경과하면 동물을 수조 밖으로 꺼내서 마른 수건으로 닦은 후 따뜻한 곳에서 몸의 물기가 마르게 하였다. 적응시행 후 24시간이 경과한 두 번째 날에는 동일한 수조에 동물을 넣고 5분간 수영하게 하였다. 동물이 수영하는 동안 숙련된 실험자가 3초에 한번씩 동물의 행동을 관찰하여 기록하였다(총 100회). 동물의 행동은 수영(swimming), 기어오르기(climbing), 그리고 무활동(immobility)으로 나누어 기록하게 되며 각각의 행동 빈도를 계산하여 우울증의 평가에 사용하였다.

5) 면역조직화학적 절차 (PVN에서의 c-Fos 발현)

CMS 절차가 끝난 각 그룹의 쥐 17마리 가운데 B군(N=5)은 면역조직화학절차에 사용한다. 면역조직화학절차는 CMS 절차가 끝난 다음날 실시한다.

4주간의 스트레스 및 약물 처치 후 동물을 식염수(100 ml)에 이어 10% 포르말린 용액(500 ml, 0.2 M phosphate buffer와 혼합)으로 심장을 통해 관류하였다. 500 ml의 포르말린 용액중 200 ml는 처음 5분간, 나머지 300 ml는 25분간 주입하면서 고정시켰다. 그 다음 뇌를 적출하여 동일한 고정액에 3시간 동안 고정시켰고, 20%의 sucrose가 함유된 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2)에 넣어 4°C에서 하루 밤 동안 보관하였다가 냉동절편기로 30 μ m 두께의 뇌절편을 만들

었다. 이 절편을 PBS로 3-4회 세척하여 Fos 발현 연구에 가장 널리 사용되는 primary sheep anti-Fos antibody (Cambridge Research Biochemicals)에 노출시켰다 (4°C, 72시간). primary antibody는 0.3% Triton-X100(PBST)에서 2% normal rabbit serum과 0.001% keyhole limpets hemocyanin (Sigma)으로 2000배 희석하여 준비하였다. 그 후 뇌절편을 PBST로 세척하고 2시간 동안 실온에서 2% normal rabbit serum을 함유하는 PBST로 200배 희석한 biotinylated rabbit anti-sheep serum (Vector Laboratories)에 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 다음 뇌절편을 실온에서 2시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent (Vector Laboratories)에 담갔다. 그 후 PBS로 3-4회 행군 다음 뇌절편을 착색제(diaminobenzidine)로 발현시켰다.

완성된 뇌절편을 현미경에 올리고 50배 확대하여 조직사진을 촬영하였다. 사진에서 paraventricular nucleus(PVN)의 중앙부를 기준으로 2×2 cm의 정사각형을 그리고, 그곳에서 c-Fos가 발현된 cell body의 개수를 세어 발현 정도에 대한 지표로 삼았다.

6) 資料分析

실험에서 얻어진 모든 자료는 윈도우용 SPSS(버전 8.0)를 이용해 통계분석하였다. 자료는 집단별 평균과 표준오차(SEM)로 나타내었다. FST 및 면역조직학적 자료는 모두 일원변량분석(one-way ANOVA)으로 분석하였고, 필요시 Duncan의 방법을 사용하여 개별 비교하였다. 결과의 통계적 유의성 여부는 최소한 95% 신뢰구간(p<0.05)에서 판단 되도록 하였다.

III. 成績

1. 강제수영 검사 (FST) 결과

동물의 우울 경향성을 알아보기 위해서 실시한 FST에서 관찰한 무활동(immobility), 수영행동(swimming), 그리고 기어오르기(climbing)의 집

단별 성적을 기록하였다. 세 집단을 대상으로 변량분석한 결과 무활동[F(2, 33)=7.25, p<.01]과 수영행동[F(2, 33)=7.44, p<.01]에서는 집단간 차이가 통계적으로 유의미하였으나, 기어오르기[F(2, 33)=0.49, p=.62]에서는 집단간에 차이가 없었다.

집단간 차이가 있는 두 가지 행동유형을 Duncan의 중다비교법으로 비교하였다. 우울에 대

한 지표로 간주되는 “behavioral despair”, 즉 무활동은 다른 두 집단에 비해 CMS-vehicle 집단에서 더 많이 나타났고(p<.05), 이와는 반대 의미를 갖는 수영행동에서는 CMS-vehicle 집단의 성적이 다른 두 집단에 비해 유의미하게 낮았다(p<.05). (Table II, Fig. 2.)

Table II. Frequency of Behavior in FST following CMS

(unit : No. of times)

Behavioral types	Normal (n=12)	CMS-vehicle (n=12)	CMS-drug (n=12)	comparisons
Immobility	53.92±4.13	70.67±3.12	58.50±2.06	N=Cd<Cv
Swimming	28.42±3.95	12.67±1.68	21.33±2.59	N=Cd>Cv
Climbing	17.67±2.41	16.67±3.36	20.17±1.64	NS

All values are Mean±SEM.

NS : not significant

N : Normal

Cv : CMS-vehicle

Cd : CMS-drug

Duncan's method was used in the multiple comparisons (p<.05).

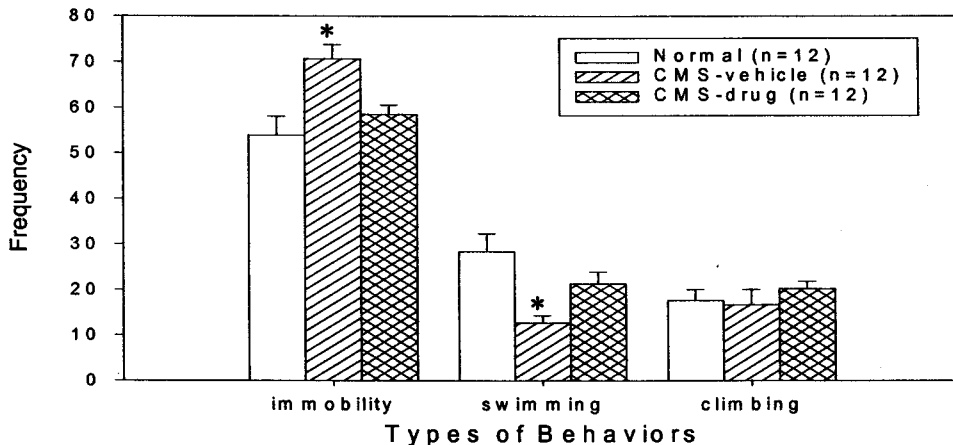


Fig. 2. Frequency of behaviors measured in forced swimming test (Mean±SEM).

Asterisks indicate that the differences between the marked group and other two groups were significant (Duncan's method, p<.05).

2. 면역조직화학적 변화 (PVN에서의 c-Fos 발현도 비교)

스트레스 처치 후에 PVN에서 c-Fos가 발현된 세포체의 수를 측정하였다. c-Fos가 발현된 세포

체의 수를 변량분석한 결과 집단간 차이가 관찰되었다[F(2, 12)=263.00, p<.01]. 이를 집단별로 비교해보면 Normal = CMS-drug < CMS-vehicle 집단의 순으로 분석된다(Duncan's method, p<.05). (Table III, Fig. 3.)

Table III. c-Fos Expression in PVN Following CMS Treatment

(unit : count)

	Normal(n=5)	CMS-vehicle(n=5)	CMS-drug(n=5)
c-Fos	40.60±4.07	299.00±5.78	42.40±14.22
comparisons		N=Cd<Cv	

All values are Mean±SEM.

NS: not significant

N: Normal

Cv: CMS-vehicle

Cd: CMS-drug.

Duncan's method was used in the multiple comparisons (p<.05).

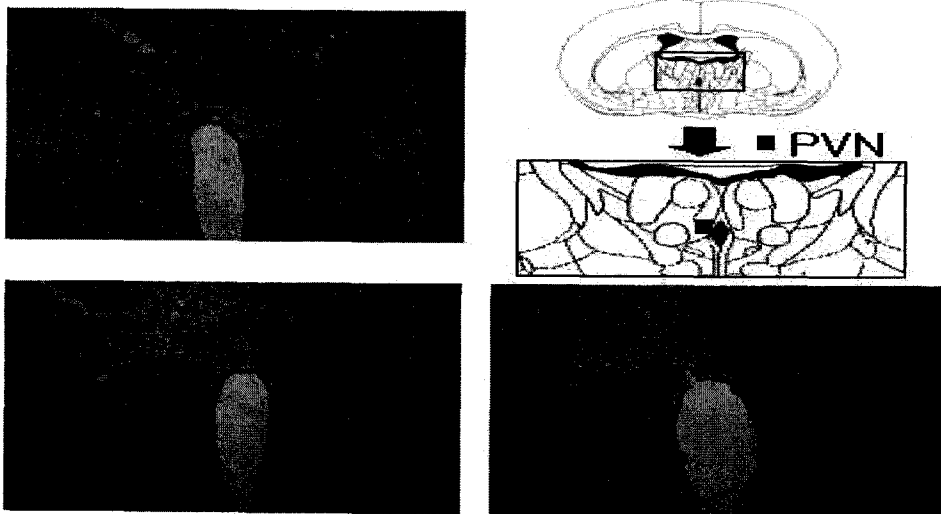


Fig. 3. c-Fos expression in PVN following CMS treatment.

IV. 考 察

우울증을 한의학적 개념으로 살펴보면 鬱證에 속하고 정신적 증상과 신체적 증상이 함께 나타나고 있으며, 그 개념이 초기에는 氣機가 疏通되지 못해 생기는 諸病症으로 제시되어 다소 포괄적인 의미였으나 明清代 이후로는 정신적인 개념으로 귀결되고 있다^{24,25}. 鬱에 대해 【黃帝內經·素問】⁵⁾에서는 【至眞要大論】에서 “諸氣臏鬱 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”, 【本病論篇】에서는 “久而化鬱”, “日久成鬱”, “抑之變鬱”, “伏之化鬱” 등으로 기재되어 있다. 이상과 같이 鬱證은 급성이 아닌 만성적 억압으로 형성되는 舒暢, 通暢되지 못한 상태라고 할 수 있으며, 張²⁵⁾이 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 발생하는 것으로서⁴⁾, 朱²⁶⁾는 그 原因과 症狀에 따라 氣鬱 血鬱 痰鬱 熱鬱 濕鬱 食鬱의 六鬱로 분류하기도 하였다.

鬱證의 임상증상은 心情抑鬱, 情緒不定, 脇肋脹痛, 易怒選哭, 失眠, 四肢無力, 二便失調, 不思飲食²⁷⁾, 常善太息²⁸⁾, 食慾不振²⁹⁾ 등으로 매우 다양하다. 따라서 “七情의 손상으로 인해 氣機가 鬱滯된 광범위한 증후군”으로 인식되고 있으며³⁰⁾ 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 분류된다³¹⁾. 또한 鬱證의 초기에는 氣滯와 濕痰으로 인한 食積, 熱鬱 등의 實證이 많고, 오래 되면 虛證으로 변하여 心脾損傷, 陰虛火旺 등의 양상이 나타나게 된다⁴⁾.

이와 같이 鬱證에 대한 한의학적 연구는 辨證과 治療 위주로 발전해 왔으며, 서양의학에서는 우울증을 치료하기 위한 연구의 일환으로서 다양한 우울증 동물 모델들을 개발해 왔다^{9,16,32)}. 이번 실험에 사용된 CMS 절차에서는 물·먹이 박탈이나 사육상자에서의 파트너 교체, 소음과 환란한 조명의 제

시 등 여러 가지 예측할 수 없는 다양한 자극들을 계속해서 제공해 주게 된다. 이러한 스트레스 절차를 수주간 반복하면 흰쥐들은 우울증의 대표적 증상이라고 할 수 있는 무쾌감증(anhedonia)에 상응하는 증상으로서 자당용액(sucrose solution)의 섭취량에서 상당한 감소를 보이게 된다³³⁾. 이러한 섭취량의 감소는 아무런 처치를 하지 않을 경우, CMS 절차를 철회하고 난 후에도 수주간 지속되는 것으로 알려져 있다^{9,34)}. 다수의 항우울제들은 CMS 처치에 따른 자당섭취량의 감소를 원래 수준으로 회복시켜 주는데 효과가 있는 것으로 밝혀졌다^{6,33)}. 따라서 CMS 모델은 여러 종류의 만성 스트레스를 경험시켜서 우울증을 유발한 후 다양한 약물 처치를 통해 항우울 작용을 평가할 수 있다는 점에서 매우 유용하다고 할 수 있다.

이번 연구에 사용된 古庵心腎丸은 【丹溪心法附餘】¹⁸⁾에 처음으로記載된 處方으로서 勞損으로 心腎이 虛하고 有熱하여 나타나는 驚悸 怔忡 遺精 盜汗 耳鳴 腰痛 脚萎를 治療하며 久服하면 黑鬚 髮 令人有子한다고 하였으며 心惡熱, 腎惡燥임에도 불구하고 君火와 相火가 奮亂하여 不寧한 證에 補精 益血 清熱 潤燥하면서 心腎을 兼治한다고 하였다. 古庵心腎丸의 처방은 熟地黃, 生乾地黃, 山藥, 白茯苓, 當歸, 澤瀉, 黃柏, 山茱萸, 枸杞子, 龜板, 牛膝, 黃連, 牡丹皮, 鹿茸, 甘草 등으로 이루어져 있으며²³⁾ 元方에서는 朱砂를 爲衣하게 되어있으나 이번 실험에서는 사용하지 않았다. 이와 같은 처방 구성은 기본방인 六味地黃湯에서 白茯苓을 白茯苓神으로 바꾸고, 當歸, 生乾地黃, 黃柏, 黃連을 加하여 清熱 補心 효능이 더해짐으로써 腎과 心を 동시에 치료하며, 枸杞子, 龜板, 鹿茸 등을 加하여 補陰 및 補陽 효능이 추가된 것이다.

본 처방에 대한 연구로서는 차¹⁹⁾의 古庵心腎丸去朱砂方の 항스트레스효과에 대한 연구가 있었으며, 관련 처방으로서 조²²⁾는 六味地黃湯의 항스트레스 효과를, 김²¹⁾은 六味地黃湯, 四物湯, 四君子湯의 항스트레스 효과를 비교연구한 바 있다. 그러나 CMS를 이용하여 古庵心腎丸去朱砂方の 항스트레스 및 항우울 작용을 검증한 경우는 없었다.

한편, CMS 모형을 사용한 많은 연구들에서 우울증에 대한 지표로 자당섭취량이 측정되어 왔다.

그러나 최근에 자당섭취량이 CMS 동물의 우울증에 대한 신뢰할 만한 지표가 될 수 없다는 견해^{35,36)}가 등장하였고, 일부 연구자들은 자당섭취량 대신에 동물을 물에 넣어 수영을 하게 하는 강제수영 검사(forced swimming test, FST)를 행동검사로 사용하고 있다^{14,15,16)}. 본 연구에서도 최근에 제기된 자당섭취량이 가진 문제점을 감안하여 CMS로 유발된 우울증을 평가하기 위한 도구로 FST를 사용하였다.

이번 FST 실험에서는 동물의 행동을 무활동(immobility), 수영행동(swimming), 그리고 기어오르기(climbing)로 나누어 집단별 성적을 측정하였다. 무활동이란 동물이 물에 빠지지 않기 위하여 자세를 유지하는 행동 외에 다른 행동이 나타나지 않는 것이다. 이는 물에 빠진 동물이 물에서 벗어나기 위한 시도를 포기했음을 의미하는 행동("behavioral despair")인 동시에 우울증의 한 행동 유형으로 간주되어³⁷⁾ 항우울제의 효과를 검증하는 연구에 많이 사용된다. 그러므로 FST에서 동물이 무활동을 많이 보인다는 것은 우울 성향이 높은 것으로 해석되며, 수영이나 기어오르기와 같은 활동성 유목이 많이 나타나면 우울 성향이 낮은 것으로 해석된다.

이번 실험에서 무활동은 다른 두 집단에 비해 CMS-vehicle 집단에서 더 많이 나타났고, 이와는 반대 의미를 갖는 수영행동에서는 CMS-vehicle 집단의 성적은 다른 두 집단에 비해 유의미하게 낮았다(Table II). 이와 같은 분석 결과는 만성적인 스트레스에 노출된 동물이 정상동물에 비해 우울 성향을 더 많이 나타내며, 스트레스를 가하면서 古庵心腎丸去朱砂方을 투여하면 스트레스에 의해 높아지는 우울 성향이 정상화됨을 보여준다. 이는 CMS 처치가 동물의 우울 성향을 높인다는 것과 CMS 처치와 함께 투여된 古庵心腎丸去朱砂方이 항우울효과를 가지고 있음을 보여준다.

스트레스로 유발된 우울증 동물 모델의 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 c-fos이다³⁸⁾. proto-oncogene의 일종인 c-fos

는 immediate early gene(IEG)의 하나로서 세포분열과 세포분화의 역할 및 세포반응의 매개 역할을 한다³⁹⁾. c-fos gene의 산물인 c-fos 단백질(c-fos protein, c-Fos)은 뇌손상⁴⁰⁾이나 스트레스³⁸⁾가 있을 때 뇌 특정 부위에서 활성화되어 증가하며, 항우울 약물에 의해 우울증상이 개선되면 c-Fos가 감소된다고 알려져 있다⁴¹⁾.

이번 연구에서도 CMS 유발 우울증에 대해서 정신적 변화 외에 스트레스와 관련된 신체적 변화를 알아보기 위해 스트레스를 받으면 Fos 발현이 증가되는 것으로 알려진 PVN(paraventricular nucleus)¹⁷⁾에서 신경세포 활동성에 대한 지표가 되는 c-Fos 단백질이 발현된 세포체의 수를 측정하였다. c-Fos의 측정은 면역조직화학적 연구방법으로서 지표물질에 대해 항체반응을 시켜서 나타나는 유사 면역반응성을 측정하는 방법이다⁴²⁾. 이번 실험에서 c-Fos가 발현된 세포체의 수를 분석한 결과 집단간 차이가 관찰되었으며, 이를 비교해 보면 Normal = CMS-drug < CMS-vehicle 집단의 순서로 나타났다(Table III). 이 결과는 CMS와 古庵心腎丸去朱砂方을 함께 처치한 집단과 정상군에 있어서 c-Fos가 발현된 정도의 차이가 없으나, 아무런 처치 없이 CMS만 받은 대상은 다른 집단에 비해 c-Fos의 발현이 유의하게 증가했음을 나타낸다. 이는 CMS 처치에 의해 증가된 PVN의 c-Fos 발현이, CMS와 함께 투여된 古庵心腎丸去朱砂方에 의해 정상 수준으로 억제되었음을 의미한다. 이와 같은 연구 결과는 古庵心腎丸去朱砂方이 만성 스트레스로 인해 유발되는 뇌 조직의 변화를 예방할 수 있음을 증명하는 것이며, 古庵心腎丸去朱砂方이 스트레스에 대한 심리적 우울 성향과 더불어 신체적 이상 변화도 함께 예방할 수 있음을 시사한다.

이상의 실험 결과로 보아 CMS로 유발되는 우울증에 古庵心腎丸去朱砂方이 효과적으로 작용함을 알 수 있다. 즉 古庵心腎丸去朱砂方의 투여는 우울증 모델 흰쥐에게 유발되는 우울 상태를 예방하는 효과를 보였으며, 면역조직화학적 검사에서도 PVN에서의 c-Fos 발현을 억제하는 효과가 입증되었다.

V. 結 論

한의학 임상에서 널리 이용되고 있는 古庵心腎丸去朱砂方の 효과를 알아보기 위해, CMS로 유도된 우울증 모델 흰쥐를 사용하여 강제수영 검사(FST)와 면역조직화학적 검사(PVN에서의 c-Fos 발현도 측정)를 시행하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. FST 및 CMS 실험 결과, 古庵心腎丸去朱砂方の 투여는 CMS로 유발된 우울 성향을 억제한다.

2. PVN에서 측정된 c-Fos 발현 수준은 古庵心腎丸去朱砂方の 투여 집단에서 유의미하게 낮았다. 이는 CMS 처치가 스트레스와 관련성이 있는 뇌영역인 PVN에 있는 신경세포의 활동을 증가시킨 것으로 보이고, 이런 증가가 古庵心腎丸去朱砂方 투여에 의해 정상화되었음을 의미한다.

參 考 文 獻

1. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. 1999:257-77.
2. N American Psychiatric Association. Diagnostics and statistical manual of mental disorders (4th Edition). Washington DC: American Psychiatric Association. 1994: 317-28.
3. 金相孝. 東醫神經精神科學. 서울:杏林出版社. 1984:152.
4. 許沛虎. 中醫腦病學. 北京:中國醫藥科技出版社. 1998:453-7.
5. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院. 1981:16, 124, 277, 282, 285, 287, 288, 303.
6. 이기철, 조선영, 이정호, 김현택. Fluoxetine과 Choline의 병합투여가 경도의 만성적 스트레스 처리한 백서의 수동적 회피학습에 미치는 영향. 신경정신의학. 1998;37(2):371-80.
7. Papp M, Willner P, Muscat R. Behavioral sensitization to dopamine agonist is associated with reversal of stress-induced anhedonia. Psychopharmacology. 1993;110(1-2):159-64.
8. Willner P. The validity of animal model of depression. Psychopharmacology. 1984;83:1-16.
9. Willner P. The anatomy of melancholy (The catecholamine hypothesis of depression revisited). Reviews in Neuroscience. 1987;1:77-99.
10. 조충훈. 歸脾溫膽湯의 Chronic Mild Stress로 유발된 憂鬱症 모델 흰쥐에 대한 實驗的研究. 대한신심스트레스학회지. 2000;8(1):9-16.
11. 이승기. 分心氣飲의 憂鬱症 모델 흰쥐에 對한 實驗的研究. 慶熙大學校 大醫院. 2000.
12. 지상은. 憂鬱症誘發 흰쥐에 대한 補血安神湯의 抗憂鬱效果. 대한신심스트레스학회지. 2000;9(1):15-32.
13. 김광호. 遠志石菖蒲散이 Chronic Mild Stress

- 처치 원리의 憂鬱과 學習障礙에 미치는 영향. 慶熙大學校 大學院. 2001.
14. Cesana R, Ciprandi C, Borsini F. The effect of BIMT 17 a new potential antidepressant in the forced swimming test in mice. *Behav Pharmacol.* 1995;6(7):688-94.
15. David DJ, Bourin M, Hascoet M, Colombel MC, Baker GB, Jolliet P. Comparison of antidepressant activity in 4- and 40-week-old male mice in the forced swimming test (involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in old mice). *Psychopharmacology(Berl)*. 2001;153(4):443-9.
16. Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology(Berl)*. 2000;149(1):41-4.
17. Morin SM, Stotz-Potter EH, DiMicco JA. Injection of muscimol in dorsomedial hypothalamus and stress-induced Fos expression in paraventricular nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280(5):1276-84.
18. 方 廣. 丹溪心法附餘(下). 서울:大成文化社. 1993:515-516, 700-701.
19. 차의숙. 古庵心腎丸去朱砂方の 抗Stress效果에 對한 實驗的 考察. 慶熙大學校 大學院. 1986.
20. 錢乙. 小兒藥證直訣. 江蘇:江蘇科學技術出版社. 1985:5-6.
21. 김도순. 六味地黃湯, 四物湯, 四君子湯의 抗 stress效果에 關한 比較研究. 慶熙大學校 大學院. 1995.
22. 조윤숙. 六味地黃湯의 抗스트레스 效果에 對한 研究. 慶熙大學校 大學院. 1988.
23. 許浚. 東醫寶鑑(제2권). 서울:大成文化社. 1999 :222-3.
24. 葉天士. 臨證指南醫案. 서울:정담. 1998:463-73.
25. 張介賓. 景岳全書. 서울:大星文化社. 1988:413-9.
26. 朱震亨. 丹溪醫集. 北京:人民衛生出版社. 1993 :344-5.
27. 황의완, 김지혁. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사. 1992:99-109, 608-611, 626.
28. 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.
29. 呂光榮, 劉楚玉. 中醫腦病證治. 北京:科學技術文獻出版社. 1991:72-81.
30. 柳熙英. 東醫精神科學. 서울:南山堂. 1994: 58-62.
31. 上海中醫學院 編. 中醫內科學. 香港:商務印書館. 1983:188-93.
32. Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat. implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 1981;5(2):247-51.
33. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression. *Psychopharmacology.* 1997;134 (4):319-29.
34. Muscat R, Papp M, Willner P. Reversal of stress induced anhedonia by the atypical antidepressants (fluoxetine and maprotiline). *Psychopharmacology.* 1992;109:433-8.
35. Forbes NF, Stewart CA, Matthews K, Reid IC. Chronic mild stress and sucrose consumption (validity as a model of depression). *Physiol Behav.* 1996;60(6): 1481-4.
36. Matthews K, Forbes N, Reid IC. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. *Physiol Behav.* 1995;57(2):241-8.
37. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats (a new model sensitive to antidepressant treatments). *Eur J Pharmacol.* 1978;47(4):379-91.
38. 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;51(2-3):331-8.
39. Ducet JP, Squinto SP, Bazan NG. fos-jun and the primary genomic response in the nervous system. *Mol Neurobiol*. 1990;4:27-55.
 40. Dragunow M, Robertson HA, Robertson GS. Amygdala kindling and c-Fos protein. *Expl Neurol*. 1988;102:261-3.
 41. 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.
 42. Morgan JI, Cohen D, Hempstead J, Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*. 1987;237:192-7.