

청피가 FST에서 TH와 ACTH변화에 미치는 영향

박수현, 이태희*

경원대학교 한의과대학 방제학교실

Effects of Citri Reticulatae Viride Pericarpium on the Changes of Tyrosine Hydroxylase and ACTH in the Forced Swimming Test

Soo-Hyun Park, Tae-Hee Lee*

Dept. of Formulae Pharmacology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University

ABSTRACT

Objectives : The investigation of the antidepressant effects of Citri Reticulatae Viride Pericarpium (CR)

Methods : we performed the forced swimming test. Also the expression of Tyrosine Hydroxylase (TH) was measured with immunohistochemical method at the Ventral Tegmental area (VTA), Locus coeruleus (LC). The Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) level was measured in plasma.

Results:

1. The duration of immobility in the forced swimming test was significantly decreased in the CR 100 mg/kg, CR 400 mg/kg groups, comparing with the control group ($p < 0.05$, $p < 0.001$).
2. TH expressions in the VTA, LC were significantly reduced in the CR 100mg/kg and CR 400mg/kg treated group, comparing with the control group ($p < 0.05$, $p < 0.001$).
3. ACTH expression in plasma was significantly reduced in the CR 100 mg/kg treated group, comparing with the control group ($p < 0.05$).

Conclusions : According to the above results, it can be considered that Citri Reticulatae Viride Pericarpium has antidepressant effect through the reduction of TH expression at VTA, LC and ACTH level in plasma.

Key words : Citri Reticulatae Viride Pericarpium, FST, VTA, LC, TH, ACTH, antidepression

서론

우울증이란 가장 흔한 정신장애 중 하나로 사람이 살아가면서 일상의 삶에 대하여 흥미를 느끼지 못하고 절망하는 병이다. 여러 보고에 의하면 주요 우울

장애의 평생 유병률은 약 15%로 상당히 높고, 발병연령이 빨라지거나 발병률도 증가되는 경향이 있다고 한다¹⁾.

우울증의 원인과 현상을 살펴보면 몇 가지 경향성이 있고, 공격심 내재화 이론, 행동이론, 인지이론, 학

* 교신저자 : 이태희, 경기도 성남시 수정구 복정동 산 65 경원대학교 한의과대학 방제학교실
· Tel : 011-792-4656 · E-mail : ophm5418@kyungwon.ac.kr
· 접수 : 2009년 2월 19일 · 수정 : 2009년 3월 16일 · 채택 : 2009년 3월 20일

습된 무기력이론, 생활스트레스이론, 생물학적 이론 등으로 설명되고 있다²⁾. 적당한 대상으로 향하지 못하는 공격본능의 내재화, 적합하지 않은 강화로 인한 불만족, 인지오류, 강화자에 대한 통제력 결여, 사별과 같은 사건으로 인한 생활스트레스 증가, 시상하부-뇌하수체-부신피질 축의 활동증가와 코르티솔의 과다분비, 인터페론, T세포, B세포 활성변화 등이 우울증 행동에 영향을 주는 것으로 생각되는데, 이러한 변화는 동물실험 모델에서도 유사하게 관찰된다.

이러한 우울증은 정서적으로 우울하고 슬픈 느낌 이외에도 감정적, 신체적으로 여러 장애를 동반할 수 있는 위험한 정신과 질병이며³⁾, 임상적으로 활동증상, 인지증상, 충동장애 조절, 행동증상과 즐거움의 상실, 피로감과 신체 증상 등 다양한 증상들의 조합으로 이루어진 증후군이다⁴⁾.

한의학에서는 정체되어 발산하지 못하는 증상을 충칭하여 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^{5,6)}.

우울증과 유사한 정서반응이 유도된 실험동물에서 역시 우울증환자와 유사하게 기억력이 감퇴되는 인지결함을 볼 수 있는데, 이러한 동물모델의 인지능력, 기억능력, 불안반응의 정도를 확인하는 행동 실험 방법으로는 수동 회피 실험⁷⁾, 수중 미로 실험⁸⁾, 상승 십자형 미로 실험⁹⁾, 방사형 미로 실험¹⁰⁾, 개방장 활동 실험¹¹⁾, 강제 수영 부하 실험¹²⁾ 등이 사용되고 있고, acetylcholinesterase¹³⁾, tyrosine hydroxylase¹⁴⁾, norepinephrine¹⁵⁾ 등의 monoamine이나 corticosterone 등이 신경생화학적 지표로서 신경호르몬을 측정하는데 이용되고 있다.

靑皮(Citri Reticulatae Viride Pericarpium)는 芸香科(Rutaceae)에 속한 常綠小喬木인 귤나무(柑橘, Citrus reticulata Blanco)의 未成熟 果皮로, 微溫無毒 하고 苦辛하며 肝膽經에 歸經하여, 疏肝破氣, 散結消痰 하여 胸脇胃脘疼痛, 疝氣, 食積, 乳腫, 乳核, 久瘡癰塊를 治하는 效能을 가지고 있어 氣滯로 인한 증상들에 사용된다¹⁶⁾. 氣滯는 대부분 일상생활에서 발생하는 스트레스 등으로 氣機의 흐름이 阻滯된 것을 말하는데, 만약 이 氣滯가 血行을 不暢케 하면 瘀血이나 痰飲 등

이 발생되고 무엇보다도 氣鬱이 발생하여 다양한 증상을 포함한 鬱症이 나타나게 된다. 靑皮에 대한 기존의 실험연구 보고로는 뇌혈류역학¹⁷⁾, 면역세포에 미치는 영향¹⁸⁾ 등에 대한 보고가 있었으며, 권¹⁹⁾은 강제 수영 부하 실험 후 CRF, TH, HSP, c-Fos를 측정하여 청피의 항우울작용에 대해 보고하였다. 이에 저자는 흰쥐에게 강제 수영 부하 실험을 실시하여 행동변화를 살펴보고, 면역조직화학법으로 복측피개야(VTA, Ventral tegmental area)와 청반(LC, Locus coeruleus)에서 도파민의 대사에 관여하는 것으로 알려진 TH (Tyrosine Hydroxylase)를 측정하고, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)법으로 Plasma에서 ACTH (Adrenocorticotrophic Hormone)를 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

중량 200 g 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 7시까지를 낮으로, 다른 12시간을 밤으로 하여 자동 조절하였다. 그리고 온도는 20-24°C, 습도는 36-64%로 유지하였다.

2) 약제

연구에 사용한 한약제는 芸香科(Rutaceae)에 속한 常綠小喬木인 귤나무(柑橘, Citrus reticulata Blanco)의 건조한 未成熟 果皮를 추출용 시료로 사용하였다. 靑皮는 7첩 분량에 10배(w/v)량의 3차 증류수를 가하여 100°C에서 4시간 동안 냉각기를 장착한 상태로 환류 추출한 다음, 거즈로 여과하여, 80°C에서 중탕 농축하여 하루 동안 80°C에서 냉각시킨 후, 40°C 온도로 냉각동결건조시켜 분말을 60 g 획득하여 20%의 획득률을 보였다. 투약시는 건조된 약재를 분량에 맞게 saline을 첨가하여 용액을 만들었고 preswimming 후에 1회, postswimming 전 5시간, 1시간 전에 각각 1회씩 총 3회 복용시켰다.

2. 실험

1) 실험군

실험은 4그룹으로 나누어 실시하였다.

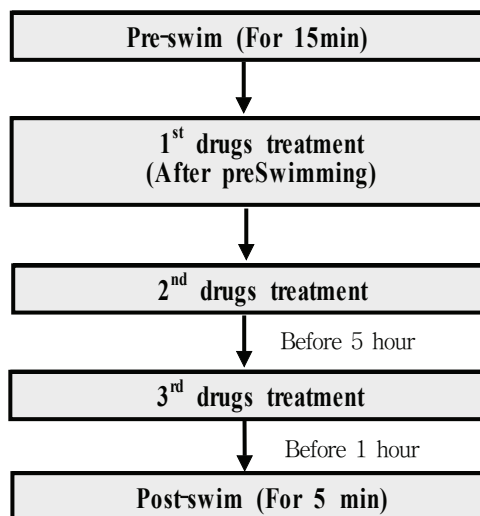
Control : 생리식염수 투여 N=8

靑皮 100 : 靑皮(100 mg/kg) p.o.투여 N=8

靑皮 400 : 靑皮(100 mg/kg) p.o.투여 N=8

2) 행동실험 방법 및 절차

Forced swimming test (강제 수영 부하 시험)는 본 실험에서는 절망행동검사(behavioral despair test)라고도 하는 표준화된 검사법인 FST를 이용하였다. 이 검사법은 약물개발시의 항 우울 효과를 검색하는 기본적인 실험으로 알려져 있다. 이 실험은 두 번에 걸쳐 이루어지는데, 첫 번째 날은 높이 50 cm, 지름 30 cm의 투명한 아크릴원통형 수조에 22℃의 물을 랫트의 꼬리가 바닥에 닿지 않을 정도의 높이까지 채우고 랫트를 강제로 빠뜨린 다음 15분간 있게 하였다. 처음 수분간은 이를 벗어나기 위해 랫트가 심한 저항을 보이거나, 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어난다. 두 번째 날, 즉 24시간 후에는 5분간 같은 환경에서 강제 수영을 시키고, 여기서 Climbing, Swimming, Immobility 세 가지를 측정한다. 전형적인 Immobility란 랫트가 얼굴을 포함한 상체의 일부분만 수면 위로 드러낸 채 몸의 균형을 유지하기 위하여 약간의 움직임만을 나타낼 뿐 물 위에 떠 있는 상태이다. 한편 Swimming은 랫트가 수면 위를 돌면서 움직이고, 간혹 물 밑으로 잠수하기도 하는 상태이다. Climbing은 가장 격렬한 운동 상태인데, 앞



Scheme 1. Experimental scheme of forced swimming test

발을 적극적으로 사용하여 아크릴 원통 위로 올라 오려고 사지를 다 쓰는 상태이다. 실수와 사람에 의한 오차를 줄이기 위해 비디오 카메라로 측정하여 자료를 확보하였다.

3) TH(Tyrosine Hydroxylase) Immunohistochemistry (면역조직 화학법)²⁰⁾

강제 수영 부하 시험이 끝난 쥐를 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 관류하였다. 고정액의 처음 300 ml은 2분간, 나머지 700 ml은 25분간에 걸쳐 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 후 고정 시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4℃에서 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 3 μm의 크기로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, TH expression에 가장 널리 사용되는 Mouse anti Tyrosine Hydroxylase (Zymed Laboratories, Sanfrancisco, CA)에 담그었다. primary antibody는 0.3% Triton X100 (PBST)에서 2% normal goat serum과 0.001% kehole limpit hemocyanin (sigma)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 biotinylates goat anti mouse serum (Santa Cruz Biotechnology)에 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Santa Cruz ABC reagent (Santa Cruz)에 담그어 반응시켰다. PBST로 몇 번 헹군 다음 뇌 조직을 착색제인 diaminobenzidine을 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 부도를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자(2×2 cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting하였다.

4) ELISA²¹⁾

실험이 모두 끝난 뒤, 관류전 심장에서 혈액을 채

취한 후, 원심분리하여 혈장 성분을 모아 -70℃에서 보관한다. 다음날 ELISA 분석 1시간 전 혈액 샘플 및 ELISA kit을 냉장고에서 꺼내, 실온에 놔 둔다. ACTH는 ELISA kit (ACTH(rat), phoenix pharmaceuticals, Inc.)을 구입하여 분석하였다. Standard 농도는 0.04 ng/ml-25 ng/ml로 범위를 정했고, 1stAb가 코팅되어 있는 96 well에 sample과 standard를 50 ul씩 넣고, biotinyl peptide를 25 ul씩 넣고 2시간 incubation한다. Wash buffer를 이용해 3번 washing후, SA-HRP를 100 ul를 각 well에 넣어준다. 1시간 후, 3번 washing 하고, 100 ul TMB를 이용해 1시간 동안 발색시킨다. 2 N HCl을 이용해 반응을 멈추고, 450 nm에서 ELISA reader를 이용해 O.D.를 읽는다.

3. 통계처리

모든 측정값은(평균값±표준오차)로 표시하였고, 각 실험군의 통계학적 분석은 Window용 SPSS를 이용하였다. 행동 실험결과 및 면역조직 화학법에 대한 통계분석은 one way ANOVA로 분석하였으며, 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였다.

결 과

1. 행동실험 결과

강제수영 부하시험 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 靑皮를 투여한 그룹에서, control군에 비해 현저하게 부동행동이 줄어들어 드는 것을 알 수 있다. 특히 靑皮 100 mg/kg을 투여한 그룹은 3.0±0.8 sec이고 400 mg/kg을 투여한 그룹은 6.7±1.8 sec으로서 control군 10.4±

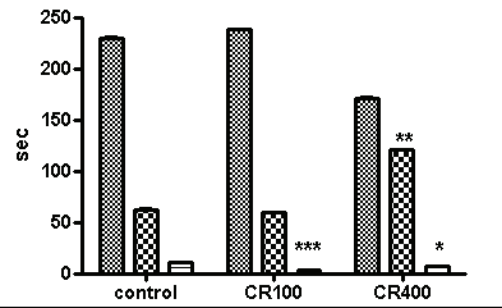


Fig. 1. Effect of Citri Reticulatae Viride Pericarpium in the forced swimming test

Control : Saline administrated group.
 CR 100 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (100 mg/kg) administrated group.
 CR 400 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (400 mg/kg) administrated group.
 CR was administered intragttically 2 hrs, 5hrs, 1hr prior to FST.
 *, **, *** : Significant difference from the control group (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)

1.3 sec에 비해 부동 행동이 유의성있게 현저히 줄어들어 드는 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$, $p < 0.001$).

2. 면역조직화학법 결과

1) VTA와 LC에서 TH발현

강제 수영 부하 시험 후, VTA와 LC 내에서의 TH 발현은 Fig. 3-6과 같다. 대조군을 100으로 보고 각각의 별현세포수를 %로 비교해 본 결과, VTA에서는 靑皮 100 mg/kg 그룹은 78.95±1.2 %를 나타냈고, 靑皮 400 mg/kg 그룹은 58.9±1.7 %를 나타냈으며, LC에서는 靑皮 100 mg/kg 그룹이 94.0±5.5 %를 나타냈고, 靑皮 400 mg/kg 그룹은 89.20±3.5 %를 나타내 두 그룹 모두 VTA에서 대조군에 비해 TH의 발현이 유의성 있게 저하되었음을 볼 수 있었다($p < 0.05$, $p < 0.001$).

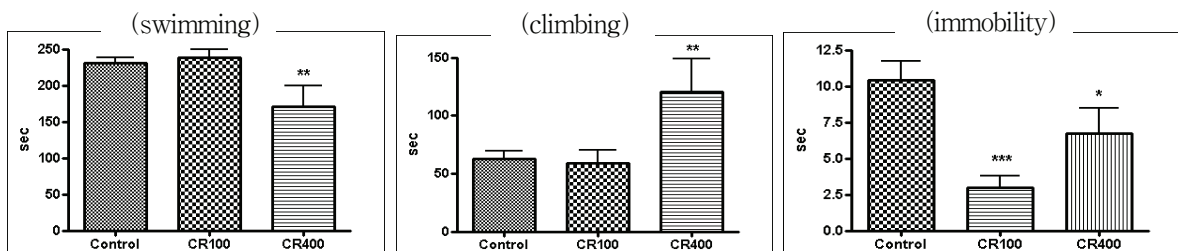


Fig. 2. Effect of Citri Reticulatae Viride Pericarpium in the forced swimming test

Control : Saline administrated group.
 CR 100 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (100 mg/kg) administrated group.
 CR 400 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (400 mg/kg) administrated group.
 CR was administered intragttically 2 hrs, 5 hrs, 1hr prior to FST.
 *, **, ***: Significant difference from the control group (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$)

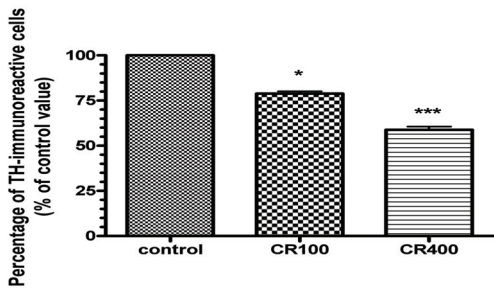


Fig. 3. Expression of TH-immunoreactive cells in the VTA
 Control : Saline administrated group.
 CR 100 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (100 mg/kg) administrated group.
 CR 400 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (400 mg/kg) administrated group.
 CR was administered intragttically 2hrs, 5hrs, 1hr prior to FST.
 *, *** : Significant difference from the control group
 (* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$)

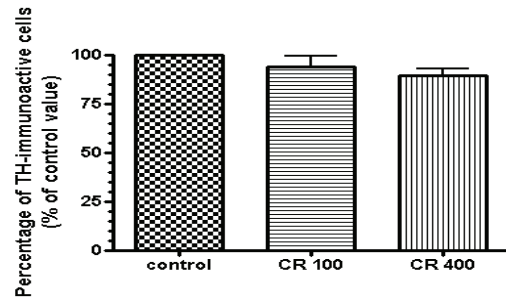


Fig. 4. Expression of TH-immunoreactive cells in the LC
 Control : Saline administrated group.
 CR 100 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (100 mg/kg) administrated group.
 CR 400 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (400 mg/kg) administrated group.
 CR was administered intragttically 2 hrs, 5 hrs, 1hr prior to FST.

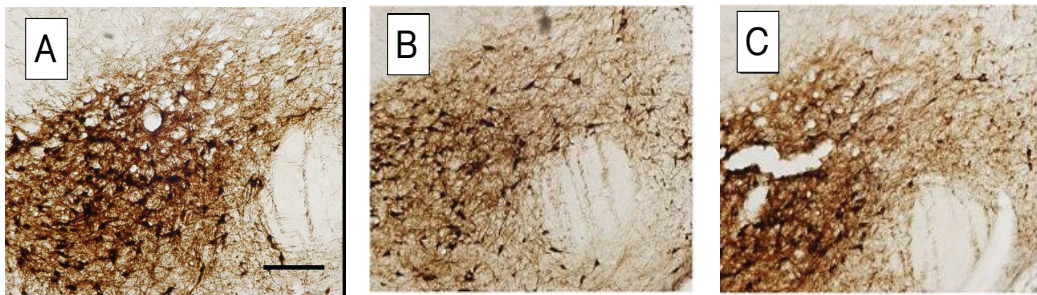


Fig. 5. Expression of TH-immunoreactive cells in the VTA (scale bar represents 200 μm)
 A : Control : Saline administrated group.
 B : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (100 mg/kg) administrated group.
 C : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (400 mg/kg) administrated group.
 Citri Reticulatae Viride PericarpiumR was administered intragttically 2 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST.

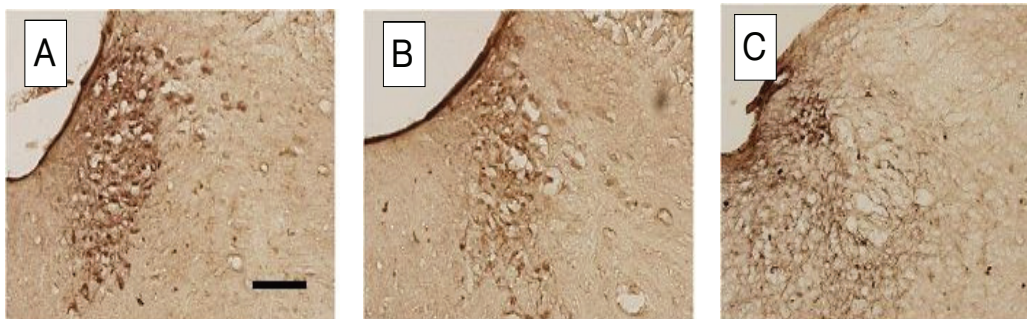


Fig. 6. Expression of TH-immunoreactive cells in the LC (scale bar represents 200 μm)
 A : Control : Saline administrated group.
 B : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (100 mg/kg) administrated group.
 C : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (400 mg/kg) administrated group.
 CR was administered intragttically 2 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST.

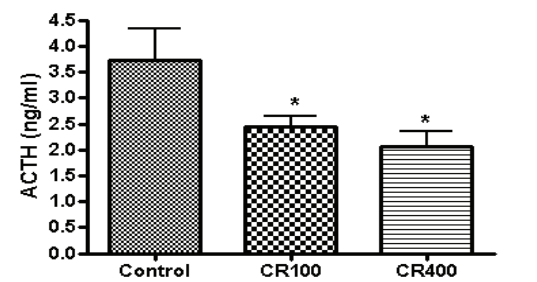


Fig. 7. Expression of ACTH in the Plasma

Control : Saline administrated group

CR 100 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (100 mg/kg) administrated group

CR 400 : Citri Reticulatae Viride Pericarpium (400 mg/kg) administrated group.

CR was administered intragttically 2hrs, 5hrs, 1hr prior to FST.

* : Significant difference from the control group (* $p < 0.05$).

2) ACTH

강제 수영 부하 시험 후, 혈장 내에서의 ACTH 발현은 Fig. 7과 같다. 대조군에서는 3.72 ± 0.62 ng/ml를 나타냈고, 靑皮 100 mg/kg 그룹은 2.44 ± 0.21 ng/ml를 나타냈으며, 靑皮 400 mg/kg 그룹은 2.06 ± 0.29 ng/ml를 나타내 두 그룹 모두 대조군에 비해 ACTH의 발현이 유의성 있게 저하되었음을 볼 수 있었다($p < 0.05$).

고찰

한의학에서는 우울증을 주로 울증과 유사한 개념으로 간주하여 치료에 접근하고 있다. 울증이란 억울되고 침울한 정신 상태로 인해 모든 생리기능이 침체되는 현상으로 발산시킬 수 없는 욕구불만이나 지속되는 우수, 지나친 사려나 비탄이 원인인 경우가 많고, 기가 한 곳에 맺혀 머물러 있으며 흠어지지 못하는 것으로서 흔히 칠정이 울결되어 오는 것인데^{22,23}, 한의학에서는 이러한 울증을 기울과 혈허의 범주로 나누어 변증시치하고 있다²⁴.

이러한 氣鬱症의 원인은 思慮過度나 失意, 悲嘆 등 정신적인 충격이 臟氣를 쇠약하게 하고, 그로 인해 氣血의 順行이 지체되거나 濕熱, 食痰 등이 정체되어 흡수, 배설이 원활치 못한 데서 鬱症이 생기게 된다. 또한 정신적인 요인 중에서도 특히 자기의 뜻을 펴지 못할 때, 즉 욕구불만이 쌓일 때 鬱症이 오는 경우가 많으므로 평소 소심한 사람이나 내성적인 사람에게 흔히 나타난다고 하겠다.

鬱症은 情志不舒와 七情所傷 뿐만 아니라 內外六

淫, 飲食內傷, 勞傷 등을 포괄하는 氣機阻滯의 病變을 조성하는데 그중 특히 情志所傷이 後代로 가면서 점차 중요한 원인으로 강조되었다. 이에 대해 朱²⁵는 氣의 升降傳化 작용이 失常하면 六鬱이 생긴다고 하고 鬱症을 氣鬱, 濕鬱, 痰鬱, 熱鬱, 血鬱, 食鬱의 六鬱로 나누어 인식하였고, 張²⁶은 氣鬱로 인한 鬱症의 病機를 설명하면서 이를 怒鬱, 思鬱, 憂鬱로 나누어 보았다. 葉²⁷은 情志不舒로 인한 七情鬱의 증상을 辨證하였고, “鬱則氣聚 聚則似有形而實無質”이라 하여 氣鬱로 인해 생기는 병의 성질을 기능적 병리상태로 파악하였으며 趙²⁸는 鬱症을 肝氣鬱結, 氣鬱化火, 痰氣鬱結의 實證과 久鬱傷神, 陰虛火旺의 虛症으로 나누어 각각의 다양한 증상을 열거하였다. 서 등²⁹은 鬱症은 인체생리과정 중에 일어나는 기능적인 장애 및 병리적인 산물을 말하는 것으로 정신적인 면에 있어서 情緒의 병리현상을 말하는 憂鬱症과 그 개념이 서로 완전히 일치하지는 않지만 鬱症과 신경증적인 憂鬱症은 情志所傷과 생활, 환경적 스트레스 인자 등의 원인에서 증상이 나타나는 점에서 서로 유사하다고 하였다. 그래서 憂鬱症이 鬱症의 범위에 포함될 수 있고, 鬱症에 대한 치료방법을 憂鬱症의 치료에 적용할 수 있음을 설명하였다.

靑皮(Citri Reticulatae Viride Pericarpium)는 芸香科(Rutaceae)에 속한 常綠小喬木인 귤나무(柑橘, Citrus reticulata Blanco)의 未成熟 果皮 혹은 幼果를 건조한 것¹⁶으로, 그 氣味는 苦辛微溫하고 肝, 膽經으로 들어가 疏肝破氣, 散結消痰, 散積化滯하는 효능이 있어 肝氣鬱結, 氣滯로 인한 증상들에 사용된다.

본 연구에서는 흰쥐의 우울행동을 유발하기 위하여 FST(Forced Swimming Test, 강제 수영 부하 실험)를 사용하였다. FST는 1978년 Porsolt 등³⁰에 의해 고안된 방법으로, 실험동물이 물이 담긴 실린더형 용기에서 수영을 하다 포기하고 부동자세를 취하는 것을 일종의 스트레스로 유발된 학습된 무력감 혹은 절망행동으로 보고 이러한 부동자세를 나타내는 시간을 측정하여 평가하는 것이다. 대개 실험동물에게 약물을 투여하고 이 부동자세의 시간의 감소를 관찰함으로써 그 약물의 항우울효과를 살펴보는 지표로 많이 쓰인다¹⁹.

항우울제를 전처치한 강제 수영 흰쥐에서 부동자세의 발현이 식염수 대조군과 비교해 줄어드는 것이 확인되었고, 세로토닌 흡수 억제제에 의해 부동자세 발현이 감소하는 것이 확인되었다³¹. 권³²은 강제 수영에 의한 행동절망과 Dopamine계통과 Monoamine

의 연관관계가 있음을 보고하였다. 강제 수영에 의한 스트레스반응은 HPA축을 통해 코르티코스테론 분비가 과항진되어 나타나는 병태모델로 생각된다.

본 실험의 결과를 보면 靑皮를 투여한 그룹에서 대조군에 비해 현저하게 부동행동이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 특히 靑皮 100 mg/kg 투여한 그룹은 3.0 ± 0.8 sec로 대조군의 10.4 ± 1.3 sec에 비해 부동 행동이 현저하게 줄어드는 것을 관찰할 수 있었으며, 靑皮 400 mg/kg를 투여한 그룹에서도 6.7 ± 1.8 sec로 대조군에 비해 부동행동이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 FST로 인해 흰쥐의 우울행동이 유발되었고, 靑皮의 투여가 FST에서 나타나는 흰쥐의 우울행동을 억제하는 작용을 하고 있음을 알 수 있다.

중추신경계에서 쾌감 및 의욕 신경회로를 포괄적으로 조절하는 신경전달물질인 도파민을 주요 매개체로 그 기능이 발휘되는 mesolimbic system은 정상적인 기분 조절의 기작과 우울증후군을 이해하는데 상대적으로 간과되어왔던 잠재적인 실마리를 많이 가지고 있다. 우울증 환자들의 cerebro spinal fluid에서 도파민의 대사물질의 농도가 감소한다는 점³³⁾, 도파민을 생성하는 신경세포의 사멸에 의해 '저 도파민 증후군'의 한 형태로 나타나는 '파킨슨씨병'환자에서 우울증이 더욱 자주 발현한다는 점³⁴⁾ 등은 사람에서 도파민과 mesolimbic system의 기능 저하가 우울증후군 발현에 일정 부분 관여하고 있음을 임상수준에서 보여준다.

Tyrosine hydroxylase는 도파민계 대사를 평가하고자 할 때, 관찰하는 지표 중 하나이다. 스트레스 조건에서는 도파민체계가 활성화 되어 도파민의 이용률과 전환율이 증가되어 도파민의 수준은 감소되고 상대적으로 도파민 대사에 관여하는 tyrosine hydroxylase의 수준은 증가하는 현상이 나타난다³⁵⁾.

중뇌 흑색질의 등쪽 내측에서는 많은 세포들이 염색성을 보이며, 복측피개야(Ventral tegmental area, VTA)로 불린다³⁶⁾. 중뇌 dopamine system은 2개의 기능 단위로 나뉘는데 하나는 운동기능에 영향을 끼치는 흑질에서 시작하는 흑질-선조로이고, 또 하나는 감정에 영향을 미치는 복측피개야에서 시작하는 중뇌-피질변연로이다. 이처럼 복측피개야에서 많은 신경세포들이 도파민계 대사에 관여하고 있다^{37,38)}.

지난 다양한 연구들은 복측피개야로부터 nucleus accumbens(NAc)로의 도파민 신경전달 활성이 정상적인 mesolimbic system의 기능에 매우 중요함을 보여주는데, 예를 들어 실험동물에서 스트레스 등의 우

울증과 밀접한 관계를 가지는 감정적 자극에 대하여 복측피개야의 도파민 활성이 강하게 반응한다. 또한 viral vector를 이용하거나 genetic modification을 통해 복측피개야의 도파민 시스템을 변형하였을 때 우울증과 유사한 행동양식의 발현을 볼 수 있다. 이것은 항우울제의 장기 투여에 의하여 복측피개야-NAc의 도파민 활성의 변화가 일어난다는 보고들과 일맥상통한다고 볼 수 있다³⁹⁾.

후뇌 협부, 4뇌실 앞에 위치하는 청반(LC, Locus Coeruleus)은 색소를 띠고 있어 청반, 청색반점 등으로 불리는데, 중뇌, 간뇌, 중뇌, 소뇌, 교뇌, 수뇌 및 척수 등 광범위하게 중추신경계에 분포하는 noradrenaline 성 섬유가 이 청반에서 유래한다⁴⁰⁾.

Zhu⁴¹⁾ 등은 주요 우울증에서 LC의 TH 수준이 증가한다고 보고하였고, 조⁴²⁾는 CMS 처치후 VTA에서의 TH 발현이 유의하게 증가하는 것을 확인하였고, 김⁴³⁾은 4주간의 CMS 처치가 VTA의 TH 발현을 증가시키고, 古庵心腎丸去朱砂方이 VTA에서의 TH 발현을 감소시킨다고 하여 본 실험과 일치하는 결과를 보였다.

본 실험에서는 복측피개야와 청반에서 TH를 측정하였는데 대조군이 복측피개야에서 9.5 ± 0.4 , 청반에서 8.3 ± 0.8 이 나온 것에 비해 靑皮 100 mg/kg 그룹은 각각 7.5 ± 0.4 , 7.8 ± 0.3 을 나타냈고, 靑皮 400 mg/kg 그룹은 각각 5.6 ± 0.4 , 7.4 ± 0.4 를 나타냈으며 이를 대조군을 100으로 보고 %로 비교해 본 결과, VTA에서는 靑皮 100 mg/kg 그룹은 $78.95 \pm 1.2\%$ 를 나타냈고, 靑皮 400 mg/kg 그룹은 $94.0 \pm 5.5\%$ 를 나타냈으며, LC에서는 靑皮 100 mg/kg 그룹이 $58.9 \pm 1.7\%$ 를 나타냈고, 靑皮 400 mg/kg 그룹은 $89.20 \pm 3.5\%$ 를 나타내 대조군에 비해 TH의 발현이 저하되었음을 볼 수 있었다.

인체는 정신적 또는 신체적 스트레스에 직면하게 되면, 스트레스를 감소시키거나 제거하기 위한 대응반응(기제)이라 일컫는 체계적인 일련의 생리적 반응을 일으킨다. 대뇌 수준에서 지각되어 변연계에 각성을 일으킨 스트레스는 시상하부에 전달되어 신경계를 통한 시상하부-자율신경계-부신수질 축 및 내분비계를 통한 시상하부-뇌하수체전엽-부신피질 축(HPA axis)을 활성화시킨다. 자율신경계의 교감신경계 활성화는 위기대응반응인 투쟁-도피반응(fight and flight)을 가능케 하며, 아울러 신경호분 전달에 의하여 부신수질이 활성화됨에 따라 epinephrine 및 norephrine이 방출되어 혈류를 통해 신체를 순환하여 뇌하수체 전엽을 자극함으로써 ACTH (adrenocorticotrophic hormone)의 방출을 가속시킨다. 시상하부에서 방출된 CRF (corticotropin-

releasing factor)에 의하여 활성화된 뇌하수체 전엽은 ACTH를 방출하고 이는 혈류를 통해 부신피질에 도달하여 세포막에 있는 adenylyl cyclase의 활성화-cyclic AMP의 생성-Cholesterol을 이용한 부신피질 호르몬 합성의 속도제한 효소(rate-limiting enzyme)인 desmolase 활성화 등 일련의 작용을 통해 부신피질 zona fasciculata 및 zona reticularis 영역에서 부신피질 호르몬의 합성과 분비가 촉진되게 된다.

분비된 혈장 부신피질 호르몬은 다시 ①시상하부로 부터의 CRF형성을 억제하고, ②뇌하수체 전엽에서 ACTH형성을 감소시키는 전형적인 음성 되먹이 회로(negative feedback loop)에 의해 조절된다.

본 실험에서는 혈장 내의 ACTH를 측정함으로써 그 반응을 살펴보았는데, 대조군에서는 3.72 ± 0.62 ng/ml를 나타냈고, 靑皮 100mg/kg 그룹은 2.44 ± 0.21 ng/ml를 나타냈으며, 靑皮 400mg/kg 그룹은 2.06 ± 0.29 ng/ml를 나타내 두 그룹 모두 대조군에 비해 ACTH의 발현이 유의성 있게 저하되었음을 볼 수 있었다.

이상과 같은 실험 결과로 볼때 靑皮는 강제 수영 부하 실험으로 유발된 우울증 반응에 대한 항우울 효과가 있음을 확인하였고, 도파민계 대사에 관여하여 복측피개야와 청반에서의 tyrosine hydroxylase 발현을 억제시키는 것과 관련이 있다고 생각된다.

결론

靑皮가 흰쥐의 우울행동에 미치는 효과를 알아보기 위해 강제 수영 부하 실험을 실시하여 행동변화에 미치는 영향을 보고, 면역조직화학법으로 복측피개야와 청반에서 도파민의 대사에 관여하는 것으로 알려진 TH를 측정하고 혈장 내에서 ACTH를 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 이에 보고합니다.

1. 강제 수영 부하 실험을 실시하고 부동행동이 나타나는 시간을 관찰한 결과, 대조군에 비해 靑皮 100 mg/kg 그룹과 靑皮 400 mg/kg 그룹에서 유의성 있게 감소하였다.
2. 강제 수영 부하 실험이 끝난 흰쥐의 복측피개야와 청반 내에서의 TH 발현을 측정한 결과, 靑皮 100mg/kg, 400mg/kg 투여군은 대조군에 비해 복측피개야 내 TH 발현 세포의 수가 유의성 있게 감소하였다.
3. 강제 수영 부하 실험이 끝난 흰쥐의 혈장 내에서의

ACTH 발현을 측정한 결과, 靑皮 100 mg/kg, 400 mg/kg 투여군은 대조군에 비해 혈장 내 ACTH 발현 세포의 수가 유의성 있게 감소하였다.

이상과 같은 실험결과를 볼 때, 靑皮가 강제 수영 부하 실험에서 복측피개야와 청반에서 TH의 발현을 억제함으로써 흰쥐의 우울행동을 억제시키는 항우울 효과가 있다고 생각된다.

참고문헌

1. 대한신경정신의학회. 신경정신과학. 서울 : 하나의 학사. 1998 : 361-86.
2. 김정엽. 우울의 발생요인 및 면역기능과의 관계에 대한 연구. 경기전문대학 논문집 1994 ; 22 : 33-42.
3. 민성길. 최신정신의학. 서울 : 일조각. 1998 ; 199-219.
4. Halas RE, Yudofsky SC, Talbot JA. Psychopharmacology and electroconvulsive therapy, in Textbook of psychiatry. 3rd ed. The American psychiatric press. 1999 : 479-565.
5. 황의완, 김지혁 편저. 동의정신의학. 현대의학서적사. 1987 : 608-11.
6. 조흥건 외 편저. 실용한방정신의학. 유진문화사. 2002 : 184-90.
7. Car H, Wisniewska RJ, Wisniewski K. 2R, 4R-APDC influence on hypoxia-induced impairment of learning and memory processes in passive avoidance test. Pol J Pharmacol. 2004 ; 56(5) : 527-37.
8. Hickey RW, Akino M, Strausbaugh S, De Courtmn, Myers GM. Use of the Morris water maze and acoustic stradle chamber to evaluate neurologic injury after asphyximal arrest in rats. Pediatrics Res. 1996 ; 39(1) : 77-84.
9. Dawson GR, Tricklebank MD. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. Trends Pharmacol. 1995 ; 16(2) : 33-6.
10. Bolhuis JJ, Bijlsma S, Ansmink P. Exponential decay of spatial memory of rats in a radial maze. Behavioural and Neural biology. 1986 ; 46 : 115-22.

11. Zacharko RM, Anisman H. Stressor-induced anhedonia and the mesocorticolimbic system. *Neurosci Biobehav Rev.* 1991 ; 15 : 391-405.
12. 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-HT1A and 5-HT1b receptors in old mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2001 ; 153(4) : 443-9.
13. 강영건, 이태희. 구속 스트레스로 유발된 기억 손상에 대한 麥門冬의 신경보호 효능. *대한본초학회지.* 2006 ; 21(2) : 63-75.
14. 고동균, 이태희. 지골피가 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 2007 ; 22 : 137-46.
15. 신화석, 권영모, 박선동. 四逆散의 抗憂鬱效果 및 腦內 monoamine에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 2004 ; 19(2) : 71-82.
16. 전국한외과대학 본초학교수 공편저. *본초학.* 서울 : 영림사. 1998 : 349-50.
17. 이금수, 정현우, 이원석. 靑皮가 腦血流力學에 미치는 실험적 연구. *동의생리병리학회지.* 2002 ; 16(1) : 104-10.
18. 정현우, 오찬호, 은재순. 靑皮가 마우스의 免疫細胞에 미치는 影響. *대한동의병리학회지.* 1998 ; 12(2) : 55-62.
19. 권용욱. 靑皮가 FST에서 나타나는 우울행동에 미치는 영향. *경원대학교 대학원.* 2008.
20. G Garcia, P Tagliaferro, A Ferri, AM Evangelista de Duffard, R Duffard, A Brusco. Study of Tyrosine Hydroxylase Immunoreactive Neurons in Neonate Rats Lactationally Exposed to 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Neurotoxicology.* 2004 ; 25 : 951-7.
21. Silja Bellingrath, Brigitte M Kudielka. Effort-reward-imbalance and overcommitment are associated with hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis responses to acute psychosocial stress in healthy working schoolteachers. *Psychoneuroendocrinology.* 2008 ; 33 : 1335-43.
22. 김상효. *동의신경정신과학.* 서울 : 행림출판사. 1980 : 72-5, 258-64, 277-84.
23. 왕현명. *중의내과변증학.* 북경 : 인민위생출판사. 1984 : 460-7, 470-85.
24. 여광영. *중위뇌병증치.* 북경 : 과학기술문헌출판사. 1991 : 72-81.
25. 朱震亨. *丹溪心法附餘.* 서울 : 대성문화사. 1982 : 515-27.
26. 張介賓. *景岳全書.* 서울 : 정담. 1999 : 385-6, 692, 1150.
27. 葉天士. *臨證指南醫案.* 서울 : 정담. 1998 : 463-73.
28. 趙尙華. *張子琳醫療經驗選輯.*太原 : 山西人民出版社. 1986 : 88-91.
29. 서원희, 이상용. 鬱症과 憂鬱症의 比較考察. *대전대학교 한의학연구소 논문집.* 1997 ; 6(1) : 505-14.
30. 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.
31. 신경호. 우울증의 실험모델과 항우울제의 선별. *대한정신약물학회지.* 2000 ; 11(4) : 291-303.
32. 권영재. 강제 수영에 의한 행동절망에 있어서 중추성 Monoamines계의 역할에 관한 연구. *부산대학교 대학원.* 1990.
33. Bowden C. Reduced dopamine turnover in the basal ganglia of depression suicides. *Brain Res.* 1997 ; 769(1) : 135-40.
34. Burn DJ. Depression in parkinson's disease. *European Journal of Neurology.* 2002 ; 9(3) : 44-54.
35. Beitner-Johnson D, Guitart X, Nestler EJ. Neurofilament proteins and the mesolimbic dopamine system : common regulation by chronic morphine and chronic cocaine in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci.* 1992 ; 12(6) : 2165-76.
36. Crossman AR, Neary D. *Neuroanatomy.* New York : Churchill Livingstone. 1996 : 65-9, 121-2.
37. Daniel SM, Amer Karmal, Marten PS, Geert MJ. Modulation of cellular activity and synaptic transmission in the ventral tegmental area. *European Journal of Pharmacology.* 2003 ; 480 : 97-115.
38. Ortiz J, Fitzgerald LW, Lane S, Terwilliger R, Nestler EJ. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. *Neuropsychopharmacology.* 1996 ; 14(6) : 443-52.

39. Nestler EJ, Carelzon Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*. 2006 ; 59(12) : 1151-9.
40. 배춘상, 백서용, 조희중, 차중익, 천병훈. *신경해부학*. 서울 ; 고문사. 1998 : 102-208.
41. Meng-Yang Zhu, Violetta Klimek, Ginny E Dilley, John W Haycock, Craig Stockmeier, James C Overholser, Herbert Y Meltzer, Gregory A Ordway. Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression *Biological Psychiatry*. November 1999 ; Vol 46, Issue 9, 1 : 1275-86.
42. 조충훈. 淸火補心湯이 憂鬱症 模型動物의 絶望行動, 不安 및 腦의 TH와 c-Fos 發顯에 미치는 效果. 경희대학교 대학원. 2003.
43. 김종찬. 憂鬱症 모델 흰쥐의 水中迷路學習과 VTA의 TH 水準에 對한 古庵心賢丸去朱砂防의 效果. 경희대학교 대학원. 2002.