

赤芍藥이 강제수영부하시험에서 CRF, c-Fos 와 TH에 미치는 영향

민남기, 이태희*

경원대학교 한의과대학 방제학교실
461-701 경기도 성남시 수정구 복정동 산65

Effects of Paeoniae Radix Rubra on CRF, c-Fos and TH in the Forced Swimming Test

Nam-Ki Min, Tae-Hee Lee*

Formulae Pharmacology Dept, School of Oriental Medicine, Kyungwon University
San 65, Bokjeong-Dong, Soojeong-Gu, Seong-Nam, Kyunggi-Do

ABSTRACT

Objectives : For the purpose of verifying the anti-depressant effect of Paeoniae Radix Rubra(PR), the expression of corticotropin-releasing factor(CRF), c-Fos and tyrosine hydroxylase(TH) was evaluated after performing the Forced Swimming Test(FST).

Methods : Sprague-Dawley rats were ingested PR extract(100mg/kg, 400mg/kg, p.o.) for 3 times prior to FST. And the expression of corticotropin-releasing factor(CRF), c-Fos in the paraventricular nucleus(PVN) and tyrosine hydroxylase(TH) in the locus coeruleus(LC) and ventral tegmental area(VTA) was measured immunohistochemically after FST.

Results : The duration of immobility was significantly decreased in PR 100mg/kg Group and PR 400mg/kg Group, in comparison with the control group (p<0.001). The expression of CRF in the PVN was significantly decreased in PR 400mg/kg Group in comparison of the control group (p<0.05). The expression of c-Fos in the PVN was rather significantly increased in PR 100mg/kg Group in comparison with the control group, while almost no change was demonstrated in PR 400mg/kg Group. The expression of TH was significantly decreased in VTA in comparison with the control group (p<0.05), but the number of expression cells in LC was slightly decreased in case of PR 100mg/kg group while it was increased in case of PR 400mg/kg Group.

Conclusion : Judging from the result of the aforementioned tests, Paeoniae Radix Rubra has decreased immobility. In addition, it has also decreased the expression of CRF and the expression of TH in VTA, while the expression of c-Fos and of TH in LC has no significance. Therefore, it is believed that Paeoniae Radix Rubra has an anti-depressant effect by decreased immobility through the reduced expression of CRF and TH in VTA.

Key words : Paeoniae Radix Rubra, FST, CRF, c-Fos, TH, anti-depression

서론

氣鬱이란 抑壓되고 沈鬱한 精神狀態로 인하여 모든 生理機能이 沈滯되는 현상이다. 發散시킬 수 없는 慾求不滿이나 持續되는 憂愁, 지나친 思慮나 悲嘆 등이 원인이 되는 수가 많다. 喜情이나 怒情은 發揚性이며 爆發의인데 비해 이런 感情들은 抑制的이며 沈滯的인 것이다. 즉 鬱이란 氣가 한 곳에 맺혀 머물러 있으며 흩어지지 못하는 것이며 흔히 七情이 鬱結되어 오는 것이다. 이런 경우에는 기분이 憂鬱하다는 精神的 症狀을 나타나 意慾喪失 興味喪失 沈黙 無氣力 등 生氣가

없음을 알 수 있다¹⁾.

韓醫學의으로는 憂鬱症은 鬱症의 범주로 보고, 氣機가 鬱滯되어 通暢하지 못함으로써 유발되는 病症으로 인식하였다²⁾.

朱丹溪는 “모든 병은 얻은 지 오래되면 鬱이 되고 鬱이 오래되면 蒸熱하여 반드시 火가 생긴다”³⁾라고 하여 鬱症이 오래되면 火의 양상을 나타낸다고 하였고 『東醫寶鑑』에서는 “六慾七情激之 其火隨起 大怒則火起於肝 悲哀則火起於肺”⁴⁾라고 하여 憂鬱症과 관련있는 悲哀에서도 火가 일어난다고 하였다.

鬱症의 治法에 대해서는 初期에는 氣機鬱滯를 해소하기 위해

*교신저자 : 이태희, 경기도 성남시 수정구 복정동 산65 경원대학교 한의과대학 방제학교실.
· Tel : 031-750-5418. · E-mail : ophm5418@kyungwon.ac.kr.
· 접수 : 2010년 11월 9일 · 수정 : 2010년 12월 4일 · 채택 : 2010년 12월 15일

祛痰 順氣해야 하고,鬱이 오래되어 氣血의 耗損을 가져오게 되면 補氣血하여,祛痰 順氣 補氣血의 세 가지 치료법을 사용한다⁵⁾. 順氣를 위주 로 하는 分心氣飲⁶⁾과 補氣血을 위주 로 하는 補血安神湯⁷⁾ 歸脾湯⁸⁾, 補脾溫膽하는 歸脾溫膽湯⁹⁾, 祛痰을 위주 로 하는 遠志石菖蒲散¹⁰⁾ 등이 그 예이다. 그러나 “鬱則氣滯 氣滯久則必火熱 熱鬱則津液耗以不流 昇降之機失度¹¹⁾”에 근거하여 氣滯가 오래되어 鬱火가 되었을 때⁵⁾ 치료하는 淸火 補心 방법을 이용하는 처방은 드물다.

최근 연구에서 淸心蓮子飲¹²⁾과 黃連解毒湯^{5,13)} 淸火補心湯¹⁴⁾ 등이 우울증에 효과가 있다는 실험적 보고가 있다. 또한 조 등¹⁵⁾은 시호소간산과 柴胡抑肝湯에서 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향을 확인한 바 있으며 赤芍藥은 柴胡抑肝湯의 構成 藥物이다.

赤芍藥은 性味가 苦寒하여 주로 肝經 血分에 들어가 血分의 實熱을 淸熱시키고 瘀血留滯를 善散하여 涼血祛瘀의 요약이 된다. 그러므로 一切의 血熱과 血瘀의 證에 모두 응용하여 治療한다¹⁶⁾.

이에 저자는 赤芍藥의 苦寒한 성질과 肝經에 들어가 血分을 淸熱시키는 작용이 鬱火를 풀어 우울증 치료 효과가 있는가를 알아보기 위해 赤芍藥을 白鼠에게 경구투여한 후, 강제수영부하시험(FST, Forced Swimming Test)를 실시하여 행동변화를 살펴보았다. 면역조직화학법으로 HPA axis와 관련하여 시상하부의 실방핵(PVN, Paraventricular Nucleus)에서 스트레스를 받으면 발현이 증가되는 것으로 알려진 CRF(Corticotrophin Releasing Factor), c-Fos의 발현을 측정하였다. 청반(LC, Locus Coeruleus)과 복측피개아(VTA, Ventral Tegmental Area)에서 DA(Dopamine)과 NE(Norepinephrine)의 합성에 관여하는 효소인 TH(Tyrosine Hydroxylase)발현을 측정하였다. 이에 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1.1 실험동물

생후 8주된 중량 약 250g의 Sprague Dawley계 수컷 白鼠 (Orient 사)를 1주간, 실험실 내 사육실 조건에 적응하도록 하면서 동시에 핸들링(handling) 절차를 통해 실험자와 접촉에 익숙해지도록 하였다. 쥐들은 일부 스트레스 절차를 제외하고는 3-4마리씩 사육 상자에서 지내도록 하였다. 사육실의 온도는 20-24℃ 습도는 36-64%로 유지 하였고 사육실 내 환풍기와 공기 정화기를 항상 가동시켰다. 밤과 낮의 주기는 12시간:12시간이 되도록 하되 야행성인 쥐의 습성을 고려하여 주로 실험이 진행되는 낮 시간이 밤 주기에 해당되도록 조정하였다. 시험절차에 따라 예외는 있으나 물과 먹이를 마음대로 먹을 수 있게 공급해 주었다.

1.2 약재

赤芍藥(Paeoniae Radix Rubra)은 毛茛科(프로그램에서 한자가 없음) (미나리아재비과 ; Ranunculaceae)에 속한 다년생 草本인 赤芍藥(Paeonia lactiflora PALL)의 뿌리를 乾燥

한 것을 사용하였다. 赤芍藥 400g에 10배(w/v)량의 3차 증류수를 가하여 100℃에서 4시간 동안 냉각기를 장착한 상태로 달인 후, 거즈로 여과하여, 80℃에서 증탕 농축하여 하루 동안 -80℃에서 냉각시킨 후, -40℃ 온도로 동결건조시켜 분말을 22g 획득하였다(수율 5.5%). 투약 시는 건조된 약제를 분량에 맞게 생리식염수를 첨가하여 용액을 만들었다.

2. 실험

2.1. 실험군

실험은 세 그룹으로 나누어 실시하였으며 Control group (대조군)은 스트레스를 부여하고 생리식염수를 투여하였으며 PR100 group은 스트레스를 부여한 다음 赤芍藥을 100mg/kg p.o. 투여 하였고, PR400 group은 스트레스를 부여한 다음 赤芍藥을 400mg/kg p.o. 투여하였다. 모든 그룹의 동물의 수는 5마리로 배정하였다.

2.2. 강제수영부하시험

높이 50cm, 지름 25cm의 투명한 아크릴원통형 수조에 22℃의 물에 白鼠의 꼬리가 바닥에 닿지 않을 정도의 물 높이에 강제로 빠뜨린 다음 15분간 있게 한다. 처음 수분간은 이를 벗어나기 위해 白鼠가 심한 저항을 보이나, 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어난다.

24시간 후에 5분간 같은 환경에서 강제 수영을 시키고, 기어오르기(climbing), 수영(swimming), 부동(immobility) 세 가지를 측정한다. 기어오르는 가장 격렬한 운동 상태인데, 앞발을 적극적으로 사용하여 아크릴 원통 위로 올라오려고 사지를 다 쓰는 상태이다. 수영은 白鼠가 수면 위를 돌면서 움직이고, 간혹 물밑으로 잠수하기도 하는 상태이다. 부동이란 白鼠가 얼굴을 포함한 상체의 일부분만 수면 위로 드러낸 채, 움직임이 없는 상태이다.

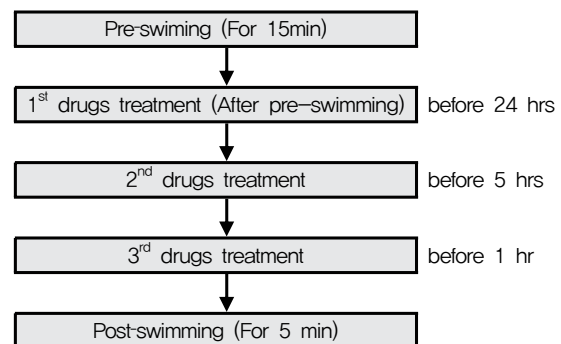


Fig. 1. Experimental scheme of forced swimming test

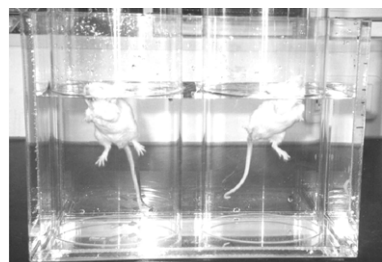


Fig. 2. Each mouse was considered to be immobile when it ceased struggling and remained floating motionless in the water.

2.3. 면역조직화학학적 실험

CRF, c-fos 및 TH발현 실험 과정은 동일하다.

강제수영부하시험이 끝난 쥐를 sodium pentobarbital (80mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 0.9% saline 200ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 100ml를 심장을 통해 관류 하였다. 고정액의 처음 300ml는 2분간, 나머지 700ml는 25분간에 걸쳐 관류 하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 후 고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4℃에서 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 30µm의 두께로 잘랐다. PBS로 몇 차례 씻고, CRF 발현실험에서는 Goat anti-CRF (Santa Cruz Biotechnology)에 담갔고, c-Fos 발현실험에서는 Rabbit anti c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA) 에 담갔다. TH 발현실험에서는 Mouse anti-Tyrosine Hydroxylase (Zymed Laboratories, Inc. San Francisco, CA, USA) 에 담갔다. Primary antibody는 0.3% Triton-X 100(PBST)에서 2% normal donkey serum과 0.001% keyhole limpet hemocyanin(Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)으로 2000배로 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 primary antiserum에서 72시간 배양하였다. 그 후 뇌 조직을 PBST로 씻은 다음, 2시간 동안 실온에서 2% normal donky serum을 함유하는 PBST에서 200배로 희석한 biotinylated goat anti-goat serum (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA)에 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Santa Cruz ABC reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA)에 담가 반응시켰다. PBST로 몇 번 행군 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 부도¹⁷⁾를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자 (2×2cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 counting하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은 평균값±표준오차로 표시하였고, 각 실험군의 통계학적 분석은 window용 SPSS를 이용하였다. 행동 실험결과 및 면역조직 화학법에 대한 통계분석은 one way ANOVA로 분석하였으며, 사후 검정은 LSD를 통해 검증하였으며, P값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

실험결과

1. 강제수영부하시험

FST 결과는 Fig. 3과 같다. Control에서 8.0±1.5sec를 나타낸 것과 비교해서 赤芍藥 100mg/kg그룹(CR100)에서는

3.2±1.5sec, 赤芍藥400mg/kg 그룹(CR400)에서는 3.6±0.9sec를 나타내 부동행동이 유의성있게 감소하였다 (F(2,12)=0.505, p<0.001).

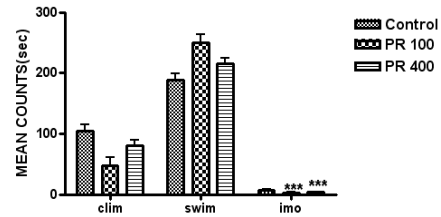


Fig. 3. Effect of Paeoniae Radix Rubra on Behavior in FST Control group was administered saline and FST was performed. PR100 group was administered Paeoniae Radix Rubra(100mg/kg) and FST was performed. PR400 group was administered Paeoniae Radix Rubra(400mg/kg) and FST was performed. Paeoniae Radix Rubra was administered intragastrically 24 hrs, 5hrs, 1 hr prior to FST. Clim:climbing, Swim:swimming, Imo:immobility Each bar represents M±S. D. ***: Significant difference from the control group (***) P(0.001)

2. 면역조직화학법 결과

2.1. PVN에서 CRF 발현

FST 실시 후, PVN에서의 CRF 발현은 Fig. 4, Fig. 5와 같다. 대조군에 비하여, 赤芍藥 100mg/kg 그룹(CR100)과 赤芍藥 400mg/kg그룹(CR400)에서 각각 81.3±12.9%, 54.2±7.6%를 나타내, PVN에서의 CRF의 발현이 감소되었고, 특히 赤芍藥 400mg/kg 그룹(CR400)에서는 유의성있게 감소하였다(p<0.05).

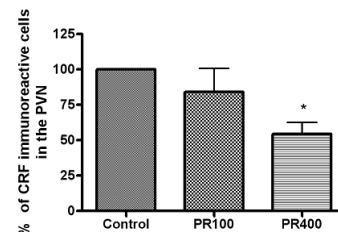


Fig. 4. Expression of CRF-immunoreactive cells in PVN. Control group was administered normal saline and FST was performed. PR100 group was administered Paeoniae Radix Rubra(100mg/kg) and FST was performed. PR400 group was administered Paeoniae Radix Rubra(400mg/kg) and FST was performed. Peoniae Radix Rubra was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST. Each bar represents M±S. D. *: Significant difference from the control group (P<0.05)



Fig. 5. Expression of CRF-immunoreactive cells in PVN (scale bar represents 200µm) Control group was administered normal saline and FST was performed. PR100 group was administered Paeoniae Radix Rubra(100mg/kg) and FST was performed. PR400 group was administered Paeoniae Radix Rubra(400mg/kg) and FST was performed. Peoniae Radix Rubra was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST. Each bar represents M±S. D.

2.2. PVN에서 c-Fos 발현

FST 실시 후, PVN에서의 c-Fos의 발현은 Fig.6, Fig. 7

과 같다. 대조군에 비하여, 赤芍藥 100mg/kg그룹(PR100)은 160.8±39.5%, 赤芍藥 400mg/kg그룹(PR400)은 102.1±2.0%를 나타내, 대조군에 비해 비슷하거나 증가하였다.

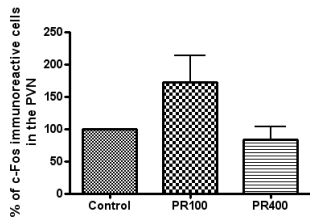


Fig. 6. Expression of c-Fos immunoreactive cells in PVN Control group was administered normal saline and FST was performed. PR100 group was administered Paeoniae Radix Rubra(100mg/kg) and FST was performed. PR400 group was administered Paeoniae Radix Rubra(400mg/kg) and FST was performed. Peoniae Radix Rubra was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST. Each bar represents M±S.D.

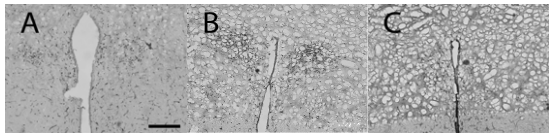


Fig. 7. Expression of c-Fos-immunoreactive cells in PVN (scale bar represents 200µm) Control group was administered normal saline and FST was performed. PR100 group was administered Paeoniae Radix Rubra(100mg/kg) and FST was performed. PR400 group was administered Paeoniae Radix Rubra(400mg/kg) and FST was performed. Peoniae Radix Rubra was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST.

2.3 LC와 VTA에서 TH 발현

1) LC에서의 TH 발현

FST 실시 후, 청반에서의 TH 발현은 Fig. 8, Fig. 9와 같다. 대조군에 비하여, 赤芍藥 100mg/kg투여 그룹은 90.3±17.0%로 감소하였으나 赤芍藥 400mg/kg는 113.3±24.1%로 오히려 증가하여 청반에서의 TH 발현은 유의성이 없음을 알 수 있었다.

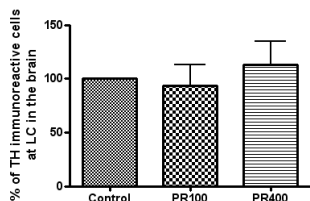


Fig. 8. Effect of Paeoniae Radix Rubra on the expression of TH at LC Control group was administered normal saline and FST was performed. PR100 group was administered Paeoniae Radix Rubra(100mg/kg) and FST was performed. PR400 group was administered Paeoniae Radix Rubra(400mg/kg) and FST was performed. Peoniae Radix Rubra was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST. Each bar represents M±S.D.

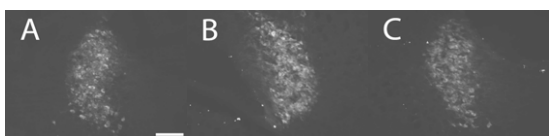


Fig. 9. Expression of TH in LC (scale bar represents 200µm) Control group was administered normal saline and FST was performed. PR100 group was administered Paeoniae Radix Rubra(100mg/kg) and FST was performed. PR400 group was

administered Paeoniae Radix Rubra(400mg/kg) and FST was performed. Peoniae Radix Rubra was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST.

2) VTA에서의 TH 발현

FST 실시 후, VTA에서의 TH 발현은 Fig. 10, Fig. 11과 같다. 대조군에 비하여, 赤芍藥 100mg/kg투여 그룹 68.9±8.0%, 赤芍藥 400mg/kg투여 그룹 70.7±7.9%로 VTA 내, TH 발현은 유의성 있게 감소함을 알 수 있었다 (p<0.05).

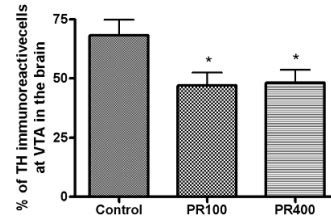


Fig. 10. Effect of Paeoniae Radix Rubra on the expression of TH at VTA.

Control group was administered normal saline and FST was performed. PR100 group was administered Paeoniae Radix Rubra(100mg/kg) and FST was performed. PR400 group was administered Paeoniae Radix Rubra(400mg/kg) and FST was performed. Peoniae Radix Rubra was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST. Each bar represents M±S.D. *: Significant difference from the control group (p<0.05)

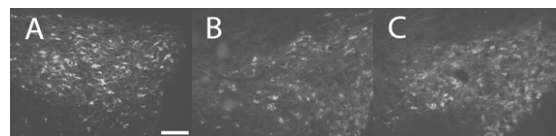


Fig. 11. Expression of TH in VTA (scale bar represents 200µm) Control group was administered normal saline and FST was performed. PR100 group was administered Paeoniae Radix Rubra(100mg/kg) and FST was performed. PR400 group was administered Paeoniae Radix Rubra(400mg/kg) and FST was performed. Peoniae Radix Rubra was administered intragastrically 24 hrs, 5 hrs, 1 hr prior to FST.

고찰

憂鬱證이란 우울 기분, 거의 모든 활동에 있어서의 흥미나 즐거움의 상실, 식욕, 체중, 수면, 정신 운동 활동에서의 변화, 감소된 에너지, 무가치감, 죄책감, 생각하고 집중하고 결정 내리는 데에 대한 어려움, 반복되는 죽음에 대한 생각 또는 자살 생각 또는 자살 계획 및 시도 등의 증상을 포괄하는 정신 장애¹⁸⁾이다.

韓醫學의으로는 우울증은 鬱症의 범주로 보고, 氣機가 鬱滯되어 통창하지 못함으로써 유발되는 병증으로 인식하여 왔다¹⁾. 『內經』¹⁹⁾ 『素問』·〈至真要大論〉에서 “諸氣膈鬱皆屬于肺”라고 鬱을 처음 소개하였고 〈至真要大論〉에 “鬱者結而不舒也”라 하였으며 “鬱者鬱結也, 凡滯而不通者皆謂之鬱”이라 하였다. 광의적으로 鬱은 氣機가 鬱滯되어 發越하지 못함으로써 유발되는 인체에서의 기능적 장애로, 각종 素因으로 말미암아 氣機鬱滯를 발생시키는 것을 위주로는 하는 종류의 병증을 가리키는 것으로 氣鬱, 血鬱, 濕鬱, 痰鬱, 熱鬱, 食鬱 등이, 여기에 해당한다²⁰⁾.

朱丹溪는 『丹溪心法附餘』에서 鬱症을 氣鬱, 濕鬱, 痰鬱,

熱鬱, 血鬱, 食鬱의 六鬱로 분류하였으며 “모든 病은 얻은 지 오래되면 鬱이 되고 鬱이 오래되면 蒸熱하여 반드시 火가 생긴다.”³⁾” 라고 하여 鬱의 病因病機를 설명하였고, 明代의 張景岳은 『景岳全書』에서 怒鬱, 思鬱, 憂鬱등의, 情志之鬱을 언급하면서 이를 心과 관련시켰다²¹⁾.

鬱症의 治法에 대해서는 初期에는 氣機鬱滯를 해소하기 위해 祛痰, 順氣해야 하고, 鬱이 오래되어 氣血의 耗損을 가져 오게 되면 補氣血하여, 祛痰, 順氣, 補氣血의 세 가지 치료법을 사용한다⁵⁾. 실험논문들도 順氣를 위주로 하는 分心氣飲⁶⁾과, 補氣血을 위주로 하는 補血安神湯⁷⁾, 歸脾湯⁸⁾, 補脾溫膽하는 歸脾溫膽湯⁹⁾ 그리고 祛痰을 위주로하는 遠志石菖蒲散¹⁰⁾ 등에 대한 연구에서 항우울효과가 있음을 보고하고 있다. 그러나 “鬱則氣滯, 氣滯久則必火熱. 熱鬱則津液耗以不流, 昇降之機失度.”¹¹⁾” 에 근거하여 氣滯가 오래되어 鬱火가 되었을 때 치료하는 淸火 補心 方法을 이용하는 처방은 드물다. 최근 연구에서 尹¹²⁾ 洪^{5,13)} 趙¹⁴⁾는 각각 淸心蓮子飲과 黃連解毒湯, 淸火補心湯등이 우울증에 효과가 있다는 실험적 보고가 있다.

본 연구에서는 鬱症을 氣鬱이 오래되어 나타나는 鬱火를 赤芍藥의 苦寒한 성질과 주로 肝經 血分에 들어가 血分의 實熱을 淸熱시키고 瘀血留滯를 善散하여 瘀血祛瘀하는 작용이 우울증 치료에 적용될 수 있는지를 알아보고자 하는 것이다.

赤芍藥은 毛茛科(미나리아재비과; *Ranunculaceae*)에 속한 다년생 草本인 赤芍藥 *Paeonia lactiflora* PALL의 뿌리를 乾燥한 것이다. 赤芍藥은 性味가 苦寒하여 주로 肝經 血分에 들어가 血分의 實熱을 淸熱시키고 瘀血留滯를 善散하여 涼血祛瘀의 要藥이 된다. 그러므로 一切의 血熱과 血瘀의 證에 모두 응용하여 治療한다¹⁶⁾.

우울증의 시험 모델로 白鼠의 강제수영부하시험(FST, Forced Swimming Test)을 사용하였다. FST는 1978년 Porsolt 등에 의해 고안된 방법으로, 실험동물이 물이 담긴 실린더 형 용기 속에서 수영을 하다 포기하고 부동자세를 취하는 시간을 측정하여 평가하는 것이다. 실험동물에게 약물을 투여하고 이 부동자세의 시간의 감소를 관찰함으로써 그 약물의 항우울효과를 평가한다²²⁾.

白鼠를 도피 불가능한 수조에 빠뜨리면 처음에는 출구를 찾아 격렬히 수영을 하다가 결국은 코를 수면 위에 내놓기 위한 최소한의 동작 이외에는 특징적인 부동자세를 취함을 관찰하고, 이를 스트레스로 유발된 학습된 무력감 혹은 절망행동으로 보고²³⁾, 우울증의 동물모형이라 제안한 것으로, 실험방법이 간단하고 예측타당도가 인정되어 항우울제의 효과관정을 위한 방법으로 널리 사용되고 있다²⁴⁾. 15분간 물에 빠뜨리는 예비 실험 후 24시간 후 본 실험을 시행하는 것이 일반적이며, 수영을 하다 포기하고 부동자세를 취하는 일종의 좌절 양상을 보이는 시간을 측정하여 평가한다²⁴⁾.

본 실험 결과, 赤芍藥을 투여한 그룹에서 대조군에 비해 부동행동이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 특히, 赤芍藥 100mg/kg투여한 그룹은 대조군에 비해 부동행동이 유의성 있게 줄어드는 것을 관찰할 수 있었으며, 赤芍藥 400mg/kg를 투여한 그룹에서도 대조군에 비해 부동행동이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 FST로 인해 白鼠의 우울행동이 유발되었고, 赤芍藥의 투여가 FST에서 나타나는 白鼠의 우울행동을 억제하는 작용을 하고 있음을 알 수 있다(p<0.001).

시상하부의 실험핵(PVN, Paraventricular Nucleus)은 시

상하부-뇌하수체-부신축(HPA axis)에서 중요한 부위이며 뇌하수체 호르몬 분비, 특히 부신피질호르몬 자극인자 분비에 영향을 미친다²⁵⁾. 정신 스트레스를 많이 받은 경우, PVN은 그에 대하여 뇌하수체 호르몬을 더욱 활성화시키므로, PVN의 활성도가 크면 정신적 스트레스를 많이 받고 있다고 추정할 수 있다.

PVN의 활성도를 측정하는 방법으로는 면역조직화학법을 사용하는데 면역조직화학법은 지표물질을 항체 반응시켜서 나타나는 유사 면역반응성으로 대뇌 여러 부위에서의 발현을 간접적으로 측정하는 것이다²⁶⁾.

또한 최근의 여러 실험적 증거들에 따르면, 우울증에 의해 야기되는 glucocorticoid의 방출은 HPA axis를 통해 조절된다. 시상하부 PVN의 parvocellular 세포가 CRF를 합성 생산하여 뇌하수체로 하여금 ACTH 유리를 촉진시켜 결과적으로 부신피질에서 glucocorticoid를 분비한다. 즉, PVN은 HPA axis의 기시점으로 여러 가지 스트레스 반응에 중추적 기능을 수행하고 있음이 밝혀지고 있다²⁷⁾.

본 실험에서는 赤芍藥이 HPA axis와 관련하여 항우울 효과를 나타내는 것을 확인해 보기 위해 시상하부의 PVN에서 CRF를 측정하여 보았다. CRF는 HPA axis에서 스트레스에 대한 내분비, 자율신경, 행동적, 면역 등의 반응을 매개하는 중요한 역할을 한다.

측정 결과, 대조군에 비하여 赤芍藥 100mg/kg그룹(CR100)과 赤芍藥 400mg/kg그룹(CR400)에서 PVN 내에서의 CRF의 발현이 감소되었다. 특히 赤芍藥 400mg/kg 그룹(CR400)에서는 유의성있게 감소하였다. 이는 여러 선행연구 보고 결과에서 항우울제의 투여가 CRF의 발현을 감소시킨다고 한 것과 일치하는 것으로 赤芍藥의 투여가 시상하부의 PVN에 작용하여 CRF의 발현을 억제시키는 것으로 보이며, 이로써 항우울효과를 나타내는 것으로 생각된다.

c-fos 유전자는 생체의 내부 및 외부의 다양한 자극을 받아서 세포의 성장 분화 발달시키는 역할뿐만 아니라, 세포 표면에 전달된 자극에 반응하여 장기간 계속되는 세포반응을 매개하는 역할을 한다고 알려져 있다. c-fos 유전자의 발현은 면역학적 자극, 출혈, 소음, 구속, 족부 속크자극, 통증과 같은 다양한 스트레스성 자극들에 의해 유도된다고 보고되었다²⁸⁾. c-fos 유전자의 산물인 c-Fos 단백질은 여러 약물이나 스트레스를 포함한 생리적 자극에 발현되어 대뇌 대사활동의 증가와 뇌신경세포활동에 대한 표시자로 우울증 연구에서 자주 관찰되어지는 지표이다²⁹⁾.

선행 연구에서 구속스트레스에 의해 유발된 c-Fos가 스트레스와 관련된 뇌 조직들 PVN, Amygdala, 대뇌피질, Lateral Septum, LC에서 발현된다는 보고가 있다^{12,30)}.

본 실험에서는 FTS에 의해서 스트레스를 받은 白鼠에게 赤芍藥을 투여하여 PVN 내에서의 c-Fos의 발현을 면역조직화학법으로 측정하였다. 측정 결과, 대조군에 비하여 赤芍藥 100mg/kg그룹(PR100)과 赤芍藥 400mg/kg그룹(PR400)에서 대조군에 비해 비슷하거나 오히려 증가하였다.

이 결과는 淸心蓮子飲이 구속스트레스와 절개통증으로 인한 PVN에서 c-Fos발현 증가를 억제하였다는 보고¹²⁾나 c-Fos의 증가가 CMS(cronic mild stress)와 함께 투여된 淸火補心湯에 의해 현저히 억제되었다는 보고¹⁴⁾나 黃連解毒湯에 의해 그 증가가 억제되었다는 보고¹³⁾와 상반되는 결과이

다. 복합치방과 赤芍藥과 비교할 수는 없지만, 赤芍藥이 PVN에서 CRF의 발현을 억제하는 효과는 있으나 c-Fos 발현 증가를 억제하는 효과는 없는 것으로 나타나고 있어 향후 연구가 필요한 부분이라고 생각한다.

도파민(dopamine)은 뇌신경세포의 신경전달물질인 노르에피네프린(norepinephrine)과 에피네프린(epinephrine)의 전구물질로 알려져 있다. 도파민의 합성은 TH에 의하여 L-tyrosine이 L-dopa로 전환되어지며, L-dopa는 AADC(aromatic amino-acid decarboxylase)에 의하여 도파민으로 합성되어지게 된다³¹⁾.

동물이 스트레스 조건에 노출되면 그에 대한 적응반응의 일환으로 도파민 체계가 활성화 되어 도파민의 이용율과 전환율이 증가됨에 따라 도파민의 수준은 감소되고, 상대적으로 도파민의 대사에 관여하는 TH의 수준은 증가하는 현상이 나타난다³²⁾. 따라서 TH는 L-tyrosine, L-dopa, dopamine, norepinephrine, epinephrine으로 진행되는 카테콜아민의 대사의 첫 번째 과정에서 사용되는 효소로^{31,33)}, 도파민계의 대사를 평가하고자 할 때 관찰되어지는 지표중의 하나이다^{34,35)}.

본 실험에서는 도파민의 생성과 관련되어 자주 관찰되는 부위이며 뇌의 여러 영역으로 도파민성 투사를 하는 LC, VTA에서의 TH수준을 면역조직화학법으로 측정하였다. LC는 후뇌 협부 4뇌실 앞에 위치하고 있으며 색소를 띠고 있어 LC라고 불리는데 중뇌, 간뇌, 중뇌, 소뇌, 교뇌, 수뇌 및 척수 등 광범위하게 중추신경계에 분포하는 noradrenaline성 섬유가 LC에서 시작된다. VTA는 중뇌 흑색질의 등쪽 내측에 있으며 VTA라고 불린다. 중뇌는 2개의 기능 단위로 나뉘는데 하나는 운동기능에 영향을 끼치는 흑질-선조로이고 또 하나는 감정에 영향을 미치는 VTA에서 시작하는 중뇌-피질변연로이다. 이처럼 VTA에서 많은 신경세포들이 도파민계 대사에 관여하고 있다³¹⁾.

측정 결과 대조군에 비하여 赤芍藥 100mg/kg 투여 그룹은 감소하였으나 赤芍藥 400mg/kg는 오히려 증가하여 LC 내 TH 발현은 유의성이 없음을 알 수 있었다. 그리고 VTA 내에서는 TH 발현은 대조군에 비하여, 赤芍藥 100mg/kg 투여 그룹과 赤芍藥 400mg/kg 투여 그룹 모두에서 유의성 있게 감소함을 알 수 있었다.

이런 결과는 선행 실험인 강 등³⁶⁾이 구속스트레스 부여 후 VTA와 LC에서 유의하게 TH발현을 증가하였고 맥문동 투여 시에는 VTA에서 TH발현이 유의하게 감소하였다고 보고한 것과 일치하였다. 따라서 赤芍藥은 LC에서는 TH발현에 유의성이 없고 VTA에서만 유의성이 있음을 알 수 있다.

이상과 같은 실험 결과로 볼때 赤芍藥은 FST유발된 우울증에 대한 항우울효과가 있음을 확인하였고 免疫組織化學法으로 측정된 결과 PVN에서 CRF의 발현은 유의성있게 감소시켰으나 c-Fos의 발현은 오히려 증가시켰고, VTA에서 TH 발현은 유의성있게 감소시켰으나, LC에서 TH발현은 유의성이 없었다. 이것은 NE보다는 DA합성을 억제하는 효능으로 생각된다. 따라서 赤芍藥은 PVN에서 CRF와 VTA에서 TH의 발현을 감소시킴으로써 FST에서 부동행동이 감소하고 활동성이 증가되는 것으로 보아 항우울 효과가 있는 것으로 생각된다.

韓醫學的 관점에서 고찰한다면 赤芍藥은 性味가 苦寒하여 주로 肝經 血分에 들어가 血分의 實熱을 淸熱시키고 瘀血留滯를 善散하여 涼血祛瘀하는 효능이 있어 지속적인 스트레스로

인한 鬱火를 해소하고 肝 機能의 鬱滯를 해소시켜주어 만성적 스트레스나 정신적 충격에 의해 발병되는 우울증이 대해 타 약물과 배합하여 예방제 및 치료제로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

결론

赤芍藥이 白鼠의 憂鬱行動에 미치는 효과를 알아보기 위해 FST를 실시하여 행동변화에 미치는 영향을 보고, 免疫組織化學法으로 시상하부의 PVN에서 CRF, c-Fos의 변화를 측정하고 LC, VTA에서 TH발현을 측정하여 유의성 있는 결과를 얻었다.

1. 不動行動이 나타나는 시간을 관찰한 결과, 대조군에 비해 赤芍藥 100mg/kg그룹과 赤芍藥 400mg/kg그룹에서 유의성있게 감소하였다(p<0.001).
2. CRF의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 赤芍藥 400mg/kg그룹에서 CRF의 발현이 유의성있게 감소하였다(p<0.05).
3. c-Fos의 발현을 관찰한 결과, 대조군에 비해 赤芍藥 100mg/kg 그룹에서는 오히려 증가하였고 赤芍藥 400mg/kg그룹에서는 거의 변화가 없었다.
4. LC와 VTA 내에서의 TH 발현을 측정한 결과, 赤芍藥 투여군이 대조군에 비해 VTA에서는 유의성있게 감소하였으나(p<0.05), LC에서는 발현 세포의 수가 赤芍藥 100mg/kg그룹에서는 약간 감소하였고 赤芍藥 400mg/kg 그룹에서는 오히려 증가 하였다.

이상의 결과로 볼때 赤芍藥은 부동행동을 감소시켰으며, PVN에서 CRF의 발현은 감소시키고 VTA에서 TH 발현은 감소시켰으나, PVN에서 c-Fos의 발현과 LC에서 TH발현은 유의성이 없었다. 따라서 赤芍藥은 PVN에서 CRF와 VTA에서 TH의 감소를 통한 항우울 효과가 있는 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 경원대학교 교내 연구비 지원에 의해 연구되었음.

참고문헌

1. 金知赫, 黃義安. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1987:608.
2. 이상용, 서원희. 울증과 우울증의 비교고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1997;6(1):505-514.
3. 朱震亨. 丹溪心法附錄. 서울:大成文化社. 1982:515-527.
4. 許浚. 原本東醫寶鑑. 남산당. 1998:396, 417.
5. 鄭善溶. 黃連解毒湯이 우울증 모형 동물의 우울성향 및

- PVN의 c-Fos 발현에 미치는 효과. 경희대학교 대학원. 2003.
6. 정대규, 지선영. 分心氣飲 투여에 따른 stress 관련 hormone의 함량변화에 관한 실험적 고찰. 동의신경정신과학회지. 1992;3(2):49-63.
 7. 김지혁, 박인, 황의완 : 補血安神湯이 구속스트레스 흰쥐의 체중 및 혈액성분에 미치는 영향. 경희대논문집. 1991;14:431-448.
 8. 이정아. Chronic Mild Stress로 유발된 우울증 모델 白鼠에 대한 歸脾湯의 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 2001;12(1):123-135.
 9. 김종우, 차윤주, 황의완 외 3인. 우울증 모델 흰쥐에 대한 歸脾溫膽湯의 실험적연구. 동의신경정신과학회지. 2001;12(2):53-68.
 10. 황의완, 현경칠. 遠志石菖蒲散이 CMS를 받은 흰쥐의 우울, 학습, 그리고 뇌의 TH 및 c-Fos 발현에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2002.
 11. 葉天士. 臨証指南醫案. 서울:정담. 1998:463-473.
 - 12.尹晶煥. 淸心蓮子飲의 구속 스트레스 및 절개통증에 대한 항스트레스 작용과 진통효과. 경원대학교 대학원. 2006.
 - 13.홍성원. 黃連解毒湯이 憂鬱症 模型動物의 水中迷路學習과 腦의 Tyrosine Hydroxylase 發顯 水準에 미치는 效果. 경희대학교 대학원. 2003.
 14. 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.
 15. 조용국, 이태희. 柴胡肝脾湯이 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향. 대한 한의학 방제학회지. 2007;15(2):147-160.
 16. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 1995:195.
 17. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York:Academic Press. 1986.
 18. Lazarus, R.S. Pattern of adjustment. New York:McGraw Hill. 1976.
 19. 洪元植 編. 精校黃帝內經素問. 서울:동양의학연구원. 1981:277, 282, 288-289, 303-304.
 20. 徐國龍, 陳維華, 張明准. 心-腦-神志病辨證論治. 흑룡강:흑룡강과학기술출판사. 1988:71-72.
 21. 張介賓. 景岳全書. 북경:인민위생출판사. 1997:437-445, 1172-1174, 1190, 1208, 1218, 1219, 1273.
 22. 신경호. 우울증의 실험모델과 항우울제의 선별. 대한정신약물학회지. 2000;11(4):291-303.
 23. Jalfre M, Le Pichon M, Porsolt RD. Depression : a new animal model sensitive to antidepressant treatment. Nature. 1977; 266:730-732.
 24. Baker GB, Bourin M, Colombel MC, David DJ, Hascoet M, 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):443-449.
 25. Price JL, Wiegand Sj. The cell of origin of afferent fibers to the median eminence in the rat. J Comp Neurol. 1980;192:1-9.
 26. 김우선, 방승규. 절망행동모형에 의한 白鼠 대뇌의 Fos 발현의 증가. 신경정신의학. 1995;35(1):1949-1955.
 27. Akil H, Douglas J, Herman JP, Schafer MK-H, Thompson R, Watson SJ, Young EA. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. J Neurosci. 1989;9:3072-3082.
 28. Kanzaki J, Ogawa K, Ogita K, Matsunobu T, Shizuki K. Expression of c-Fos after noise-induced temporary threshold shift in the guinea pig cochlea. Neurosci Lett. 2002;320:73-76.
 29. Bazan NG, Doucet JP, Squinto SP. Fos-jun and the primary genomic response in the nervous system. Mol Neurobiol. 1990;4: 27-55.
 30. Bloom FE, Melia KR, Ryabinin AE, Schroeder R, Wilson MC . Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. J. Neurosci. 1994;14:5929-5938.
 31. 김성준외. 신경성퇴행성 질환 치료를 위한 허부류로부터 tyrosine hydroxylase 유전자, 신경영양인자 발현유도 물질 탐색 및 응용. 조선대학교. 2007;10-11.
 32. Miller WR. Psychological deficit in depression. Psychology Bulletin. 1975;82:238-260.
 33. 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):2165-2176.
 34. Nomura J, Kitayama I, Wang P. Thyrosine hydroxylase gene expression in the Locus coeruleus of depression-model rats and rats exposed to short-and long-term forced walking stress. Life Sci. 1998;62(23):2083-2092.
 35. Fitzgerald LW, Lane S, Nestler EJ, Ortiz J, Terwilliger R . Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. Neuropsychopharmacology. 1996; 14(6):443-452.
 36. 강영건, 이태희. 구속 스트레스로 유발된 기억 손상에 대한 麥門冬의 신경보호 효능. 대한본초학회지. 2006;21(2):63-75.