ORIGINAL ARTICLE

pISSN 1226-6396, eISSN 2234-4942
J of Oriental Neuropsychiatry 2014;25(2):191-202
http://dx.doi.org/10.7231/jon.2014.25.2.191

JON Journal of Oriental Neuropsychiatry

# 우울증 생쥐 모델에서 半夏厚朴湯加味의 항우울 효과

김국기, 이상룡, 정인철

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

# The Anti-Depressive Effects of BanHaHuBakTang-kami (BHHBT) after Chronic Immobilization Stress in C57BL/6 Mice

**Kook-Ki Kim, Sang-Ryong Lee, In-Chul Jung**

Department of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Daejeon University

**Received:** May 9, 2014
**Revised:** June 16, 2014
**Accepted:** June 16, 2014

**Correspondence to**
In-Chul Jung
Department of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon, Korea.
Tel: +82-42-280-2600
Fax: +82-42-280-2881
E-mail: npjeong@dju.kr

**Acknowledgement**
This is a master's dissertation of the Department of Oriental Neuropsychiatry Medicine of the Graduate School of Daejeon University on February 2014.

**Objectives:** The purpose of this study was to examine the anti-depressive effects of BanHaHuBakTang-kami (BHHBT) on an animal model of depression induced by chronic immobility stress.

**Methods:** Mice were treated daily with immobilization stress for 2 hours over a period of 21 days. To examine the effect of BHHBT, we performed behavioral, biochemical and histological analysis to measure immobility time (FST), brain neurotransmitter concentration (HPLC, ELISA), hippocampal damage (H&E staining) and CRF-R1 expression (immunohistochemistry).

**Results:** BHHBT has reduced the immobility time of immobilization stress exposed mice in the forced swimming test. BHHBT has increased the amount of serotonin in the brain. BHHBT has increased the expression level of serotonin in the brain. BHHBT 540 mg/kg were sufficient to prevent tissue damage in the hippocampus region. BHHBT has reduced the expression level of CRF receptors in the hippocampus region.

**Conclusions:** These results suggest that BHHBT may have anti-depressive effects on mice treated with immobilization stress by reducing immobility, increasing brain serotonin concentration and reducing CRF-R1 expression in the hippocampus region.

**Key Words:** BanHaHuBakTang-kami (BHHBT), Immobilization stress, Anti-depressive effect, Depression, Serotonin.

Copyright © 2014 by The Korean Society of Oriental Neuropsychiatry. All rights reserved.
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

# I. 서론

우울한 기분, 활동에서의 흥미와 즐거움의 감소 등과 같은 다양한 정신적, 신체적 증상들이 나타나는 우울증은 가장 흔한 정신장애 중 하나로 평생 유병률이 여자의 경우 10~25%, 남자의 경우 5~12% 정도[1]로 매우 높다. 우울증의 유병률은 점차 증가되는 추세로 2001년 4.6%이던 국내 유병률이 2006년 6.2%, 2011년 7.5%로 증가하였다. 또한 우울증환자의 10~15%에서 자살 시도가 있는 것으로 조사되었다[2]. 이는 매우 심각한 사회적 문제를 야기하고 있으며, 2011년 통계청 자료에 따르면 2010년 국내 자살사망률은 인구 10만 명 당 31.2명으로, 경제협력개발기구(Organization for Economic Cooperation and Development) 회원 국가 중 자살률 1위를 기록하고 있다[3].

우울증의 원인으로는 생물학적 요인이 상당히 작용한다고 알려져 있으나[4], 아직 그 원인이 명확히 밝혀지지 않았다. 그러나 지금까지 연구된 바에 의하면, 뇌 속의 모노아민, 그 중 특히 serotonin과 노르아드레날린 양이 감소하면 우울증이 발생한다는 '모노아민 가설'이 지지를 받아오고 있다[5]. 양극성 환자에서 우울상태일 때 norepinephrine과 dopamine의 농도와 활성이 상대적으로 더 낮았으며 우울증에서는 혈중, 소변 및 뇌척수액에서 serotonin 결핍이 발견된 바 있다[6,7].

이러한 우울증은 한방적으로 울증(鬱證), 전증(癲證)의 범주에서 견주어 볼 수 있는데, 울증은 신경증적 우울증과, 전증은 정신병적 우울증과 유사하다[8]. 금원시대(金元時代) 이전에는 기울(氣鬱)의 의미가 외사(外邪)를 포함한 광의(廣義)의 울증이었으나 명대(明代)부터 울증을 독립된 병증으로 서술하면서 정서적 원인으로 생긴 협의(俠義)의 울증으로 바뀌었다[9]. 우울증의 증상 중 피로감, 기력저하는 허로(虛勞)의 범주에, 수면장애는 불면(不眠)이나 기면(嗜眠), 식욕감퇴는 불사식(不思食)과 유사하다[8].

한편 반하후박탕(半夏厚朴湯)은 정지불창(情志不暢)에 의한 담기울결증(痰氣鬱結證)을 치료하는 처방[10]으로, ≪금궤요략(金匱要略)≫[11]에 처음 수록되었으며 "부인인중여유자련 반하후박탕주지(婦人咽中如有炙臠 半夏厚朴湯主之)"라 하여 부인의 매핵기 등과 같은 증상을 치료한다고 하였다. 이후 ≪천금방(千金方)≫[12], ≪동의보감(東醫寶鑑)≫[13], ≪방약합편(方藥合編)≫[14] 등 많은 고서에서 등장하며, 흉만(胸滿), 심하견(心下堅), 토지불출(吐之不出), 탄지불하(呑之不下) 등의 증상을 치료한다고 알려져있다.

반하후박탕과 관련된 기존의 연구를 살펴보면 연하 반사장애 개선[15], 하부식도괄약근의 이완작용[16], 항불안[17], 항우울[18-20] 효과 등이 보고 된 바 있다.

이에 저자는 반하후박탕에 행기관중(行氣寬中)하는 효능을 가진 지각(枳殼)과 선폐거담(宣肺祛痰)하는 효능을 가진 길경(桔梗)[21]을 가(加)한 반하후박탕가미(半夏厚朴湯加味)를 이용하여 강제수영 검사(forced swimming test), 신경전달물질 분석, 뇌 내 serotonin 양 측정, 뇌조직손상 분석, 뇌 면역조직화학염색 분석 등을 시행하여 약간의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

# II. 연구대상 및 방법

## 1. 재료

### 1) 약재

본 실험에 사용한 반하후박탕가미(BanHaHuBak-Tang-kami, BHHBT)는 ≪의종금감(醫宗金鑑)≫[22] 의 반하후박탕에 길경, 지각을 4.0 g 가미한 것으로, 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

### 2) 시약

본 실험에 사용된 분석용 시약은 formaldehyde, dopamine, serotonin, melatonin, epinephrine, norepinephrine, fluoxetine, dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), sucrose, spermine, spermidine, HEPES,

**Table 1.** Prescription of BanHaHuBak-Tang-kami

| Herb | Botanical nomenclature | Quantity (g) |
|---|---|---|
| 半夏 | Pinellia ternata | 12.0 |
| 白茯苓 | Poria cocos | 10.0 |
| 生薑 | Zingiber officinale | 8.0 |
| 厚朴 | Magnolia officinalis | 6.0 |
| 蘇葉 | Perilla frutescens | 4.0 |
| 桔梗 | Platycodon grandiflorum | 4.0 |
| 枳殼 | Citrus aurantum | 4.0 |
| Total amount | | 48.0 (g) |

MgCl2, KCl, DTT, PMSF, protease inhibitor, phosphatase inhibitor, NP-40는 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였으며, HPLC grade:MeOH, HPLC grade:CHCl3, HPLC grade:Water, HPLC grade:CH3CN등은 Merck사(Germany)제품을 사용하였고, Serotonin ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kit는 Enzo life Sciences사(U.S.A.) 제품을, Fluorescein goat anti-rabbit IgG-conjugated secondary Ab(1:4000, Amersham, U.S.A.)와 ECL-Hybond film (Amersham, U.S.A.), Rabbit anti-mouse CRF, anti-mouse CRF-1 mAb는 Santa-Cruz사(California, U.S.A.) 제품을, LSAB kit는 DAKO 사(Glostrup, Denmark) 제품을 사용하였으며, 그 외 시약들은 특급 및 일급을 사용하였다.

### 3) 기기

열탕추출기(대웅, DWT-1800T, Korea), 감압 증류장치(Rotary vacuum evaporator, BUCHI B-480, Switzerland), 동결 건조기(freeze dryer, EYELA FDU-540, Japan), $CO_2$ 배양기(Forma scientific Co., U.S.A.), 원심분리기(한일과학, Korea), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), spectrophotometer (Shimazue, Japan), Bio-freezer (Sanyo, Japan), ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.), HPLC (Waters Co. Milford, MA, U.S.A.), DAD detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), degasser (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), Luna C18 column (Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.), Axio Scope. A1 (Zeiss, Germany) 등을 사용하였다.

### 4) 동물

수컷 6주령의 20~22 g C57bl/6 생쥐(대한바이오링크, 대한민국)를 공급받아 실험 당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 온도 22±2°C, 습도 55±15%, 12시간의 light-dark cycle 환경에서 1주간 적응시킨 후 실험에 사용하였고, 동물실험의 윤리적, 과학적 타당성 검토 및 효율적인 관리를 위하여 대전대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인(승인번호 DJUARB2012-016)을 받았다.

## 2. 방법

### 1) 검액의 조제

반하후박탕가미 86 g에 증류수 2,000 ml을 가하여 열탕추출기에서 3시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류 장치에서 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 반하후박탕가미 9 g을 냉동 보관(−84°C)하면서 생쥐 (25 g)에 180 mg/kg과 540 mg/kg 경구투여시 각각 증류수에 22.5 mg/ml과 67.5 mg/ml로 검액을 조제하여 0.2 ml씩 경구투여하였다.

### 2) 실험군 및 약물 투여방법

실험군은 C57bl/6 생쥐 10마리를 한 그룹으로 하여 5군으로 다음과 같이 나누었다.

(1) 정상군(C57bl/6-WT)

구속 스트레스(immobilization stress) 없이 사육, 증류수 경구투여.

(2) 대조군(CIS-NS)

21일간 2시간씩 별도로 제작한 conical tube에서 구속시키고, 구속스트레스를 가하기 2시간 전에 증류수 경구투여.

(3) 양성대조군(CIS-FLU)

대조군과 동일하게 구속스트레스를 가하고, 구속 2시간 전에 fluoxetine 100 mg/kg 경구 투여

(4) 실험군(CIS-BHHBT 180 mg/kg)

대조군과 동일하게 구속스트레스를 가하고, 구속 2시간 전에 반하후박탕가미를 180 mg/kg 경구 투여.

(5) 실험군(CIS-BHHBT 540 mg/kg)

대조군과 동일하게 구속스트레스를 가하고, 구속 2시간 전에 반하후박탕가미를 540 mg/kg 경구 투여.

### 3) Immobilization stress에 의한 우울증 유발 생쥐 모델

수컷 C57bl/6 생쥐를 윗면, 옆면, 마개에 여러개의 구멍이 나있는 50 ml conical tube (FALCON, BD)를 제작하여 구속 스트레스 우울증 생쥐모델 제작에 사용하였고, 하루 2시간씩 21일 동안 장기 구속 스트레스(chronic immobilization stress)에 노출된 마우스의 우울증 모델을 만들었다.

#### 4) 강제수영 검사 및 부동시간 측정

강제수영 검사는 윗면이 개방된 원통모양의 아크릴실린더(지름 20 cm, 높이 40 cm)에 깨끗한 수돗물(수온 25±2°C)을 실린더 바닥에서부터 15 cm까지 부은 후, 우울증 생쥐 모델을 15분 동안 강제로 수영시키고, 물에서 건져 올려 마른 수건으로 닦고 사육상자로 돌려보냈다(pretest session). 24시간 후에 동물을 동일한 장비에 5분 동안 빠뜨렸다(test session). 검사시행 전체를 캠코더 등의 기록 장치를 이용하여 기록하고, 기록된 영상을 통하여 test session (5분) 동안 다음의 동물의 행동이 나타나는 시간을 측정하였다. 또는 5초에 한 번씩 sampling 하는 방식으로 3종류의 동물 행동의 시간(time)과 빈도(frequency)를 측정하였다. 강제수영 검사는 동물이 발버둥치지 않고 물위에 떠 있는 행동으로 수면 밖으로 머리를 내놓는 데 필요한 움직임 이외에 아무 움직임이 없는 상태인 부동성의 증가를 절망행동의 지표로 삼았다(immobility behavior). 그리고 실린더 주위를 수평 방향으로 움직이는 행동으로 Immobility behavior 보다도 더 적극적으로 움직이는 행동(swimming behavior)과 벽을 향해 앞발을 물 밖으로 차올리는 다소 격렬하게 움직이는 행동(climbing behavior)으로 구분하였다. 검사 회기(test session)동안 각 행동을 측정하거나 혹은 검사 전 회기(pretest session) 15분 중 마지막 5분과 검사회기 5분의 측정치를 비교하였다.

#### 5) HPLC를 이용한 표준성분 및 뇌 안의 신경전달 물질 분석

생쥐의 뇌를 적출하여 호모겐나이즈(homogenizer)로 균질화한 후 5 ml 메탄올(Methanol, Merck)을 가하여 6시간 이상 shaking water bath (비전과학)에서 배양한 후 3M filter로 모두 거른 다음 0.2 ml로 가압 농축한다. 농축된 메탄올 추출액을 HPLC 분석을 통하여 serotonin, melatonin의 함량을 분석하였다.

뇌 메탄올 추출물 분석을 위한 HPLC는 Agilent 1200 series로서 autosampler, column oven, binary pump, DAD detector, degasser를 사용하였으며, software는 Agilent사의 Chemstation software (Agilent Technologies, Avondale, CA, U.S.A.)를 사용하였다. HPLC 조건으로 컬럼 오븐의 온도는 25°C, 분석파장은 220 nm, 유속은 0.3 ml/min를 사용하였고, 컬럼은 Luna C18 column (250×4.6 mm, particle size 5 μm)를 사용하였다. 이동상은 A 용매로 100% 3차 증류수(0.1% TFA 함유)와 B 용매 100% 아세토니트릴로 각각 0.1% 포름산을 첨가하여 사용하였으며 용매계는 다음과 같다(Table 2). 표준성분 시료는 Serotonin과 Melatonin을 사용하였고, 뇌 메탄올 추출물에서 성분분석을 하였다.

**Table 2.** Solvent Gradient Condition for HPLC-DAD

| Final time (min) | Flow rate (ml/min) | A | B |
|---|---|---|---|
| 0 | 0.3 | 85 | 15 |
| 10 | 0.3 | 80 | 20 |
| 30 | 0.3 | 65 | 35 |
| 35 | 0.3 | 65 | 35 |
| 40 | 0.3 | 85 | 15 |

A: Water with 0.1% formic acid, B: Acetonitrile with 0.1% formic acid. HPLC-DAD: High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection.

#### 6) 생쥐 뇌 균질액에서 serotonin양 측정

생쥐의 뇌를 적출하여 −20°C에서 얼린 후 해마부분에 200~500 μl의 extraction buffer (0.3 M sucrose, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 0.1% protease inhibitor, 0.1% phosphatase inhibitor, 0.5% NP 40)를 넣어 호모겐나이즈(homogenizer)로 균질화한 후 최종 부피가 0.2 ml이 되도록 extraction buffer를 가해 잘 혼합한 뒤 2시간 동안 4°C에서 lysis시켰다. 여기에 반응이 끝나면 시료를 1.5 ml tube에 담아 3분씩 5번 동안 vortex하고 4°C, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상등액(100 μl)을 취하였다. Serotonin ELISA kit (ADI-900-175, Enzo life Sciences)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 각 well을 wash buffer로 세척하고 Assay diluent를 100 μl씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상층액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상층액을 100 μl씩 넣었다. 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μl 씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 200 μl 씩 넣고 30분 동안 어

두운 곳에서 실온으로 배양하였다. stop solution을 각 well에 50 μl 씩 넣고 Microplate spectrophotometer에서 흡광도 405 nm로 측정하였다.

### 7) 조직염색(brain H&E staining)

적출한 생쥐의 뇌를 4% paraformaldehyde 용액에서 12시간 고정후 15% sucrose 용액에서 침강시까지 담근 후 급속냉동에 의하여 조직을 동결하였다. 동결뇌조직을 Cryostate (Reichert-Jung Co. 2800)를 이용하여 절편을 제조하여 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하고 광학현미경상에서 관찰하였다.

### 8) 면역조직화학염색(immunohistochemical staining)

분리된 생쥐의 뇌를 Zamboni's fluid (4% paraformaldehyde, 1.5% saturated picric acid, 0.1M PB)용액으로 관류 고정한 후 4시간 후 고정하였다. 이를 30% sucrose에 조직이 포화될 때 까지 4°C 보관 뒤 OCT compound로 조직을 붙여 $CO_2$ gas로 급속 동결하여 Cryostate로 30 μm 두께로 free floating brain sections 하였다. 준비한 조직은 항체에 따라 서로 다른 10% Serum (S-5000, VECTOR)으로 1시간 동안 실온에서 전처리 한 후 일차항체를 처리하였다. 일차항체는 사용 부위에 따라 Rabbit anti-CRF (T-4037, Peninsula Lab., diluted 1:10,000), anti-CRF-R1 (sc-1757, SANTA CRUZ, diluted 1:1,000)를 사용하였다. 일차항체는 4°C에서 48시간 Obital-shaker에서 반응시킨 후 PBS와 1% triton X-100을 함유한 PBS로 15분 씩 번갈아 세 차례 씻어낸 후 이차항체를 처리하였다. 이차항체는 Fluorescein goat anti-rabbit IgG (F-2765, Molecular probe, diluted 1:200)로 4°C에서 2시간 동안 Obital-shaker에서 반응시킨 후 PBS와 1% triton X-100을 함유한 PBS로 15분 씩 번갈아 네 차례 씻어낸 후 슬라이드에 조직을 6장씩 붙였다. Mounting은 형광 전용액(H-1000, VECTOR)을 사용하였다. 형광현미경은 AXIO scope(CARL ZEIZZ)를 사용하였으며, program은 Meta Morph (ver. 6.1r6)로 분석하였다.

### 9) 통계처리

모든 측정치는 평균±표준편차를 구하였고, 계측치들은 실험의 성격을 감안하여 비모수 검증을 사용하였는데, 전체 군간 비교를 위하여 Kruskal-Wallis 검증을, 대조군과 실험군 간의 양군 비교를 위하여 Mann-Whitney 검증을 사용하였다. 통계처리를 위한 프로그램은 SPSS for Windows (version 10.0)가 이용되었고 $p<0.05$에서 유의성을 검정하였다.

## III. 결과

### 1. 강제수영 검사에서 부동시간에 대한 효과

반하후박탕가미의 투여가 만성구속 스트레스 생쥐 모델에서의 강제수영 검사에서 부동시간에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상군 122.0±17.1 sec, 대조군 176.5±19.6 sec, fluoxetine 투여군 165.8±22.7 sec, 반하후박탕가미 180 mg/kg 투여군 126.8±6.3 sec, 반하후박탕가미 540 mg/kg 투여군 116.5±19.6 sec로 측정되었다. 정상군과 비교하여 대조군에서 강제수영 검사 상 부동시간이 증가하였고, 반하후박탕가미 180 mg/kg 투여군($p<0.001$)과 540 mg/kg 투여군($p<0.01$)은 대조군에 비하여 부동시간이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1).

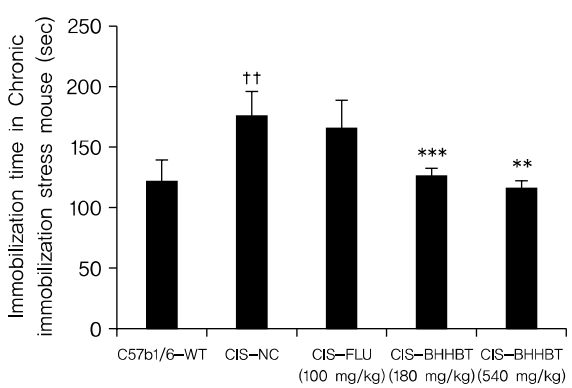


**Fig. 1.** Effects of BanHaHuBakTang-kami (BHHBT), and all of its contents, and fluoxetine on the mouse forced swim test. The immobilization time (sec) was measured for the first 5 min after each animal was placed in the water.
C57bl/6-WT: Normal group untreated immobilization stress, CIS-NC: Control group treated immobilization stress, CIS-FLU: Positive control group treated fluoxetine before immobilization stress, CIS-BHHBT: Experimental group treated BanHaHuBakTank-kami before immobilization stress. *:$p<0.05$, **:$p<0.01$, ***:$p<0.001$ as compared with the control group, †:$p<0.05$, ††:$p<0.01$ as compared with the normal group.

## 2. HPLC를 이용한 신경전달 물질 성분 분석에서의 효과

뇌 메탄올 추출액에서 정상 C57bl/6 생쥐(Fig. 2B)에서의 serotonin과 melatonin이 우울증 생쥐 대조군에서 감소하였고(Fig. 2C), Fluoxetine 투여군은 대조군에 비하여 melatonin이 증가하였고(Fig. 2D), 반하후박탕가미 180 mg/kg, 540 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 serotonin이 증가하였다(Fig. 2E, F).

## 3. 생쥐 뇌 균질액에서 serotonin양 측정에 미치는 효과

반하후박탕가미의 장기투여가 만성구속 스트레스 생쥐 모델에서의 뇌 균질액에서 serotonin 생성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군 66.9±9.17 ng/ml, 대조군 38.8±9.17 ng/ml, Fluoxetine 투여군 81.4±7.40 ng/ml, 반하후박탕가미 180 mg/kg 투여군 53.4±2.52 ng/ml, 반하후박탕가미 540 mg/kg 투여군 98.2±7.69 ng/ml로 측정되었다. 정상군에 비하여 대조군의 serotonin 생성량이 감소하였고, 반하후박탕가미 540 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 serotonin 생성량이 유의성 있게 증가($p<0.001$) 하였다. 반하후박탕가미 180 mg/kg 투여군은 대조군과 비교해 serotonin 생성량이 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 3).

## 4. 우울증 생쥐모델 뇌조직 보호 효과

대조군에서는 만성 구속 스트레스로 인해 해마부위의 조직손상으로 stratum radiatum, oligodendrocytes-like cells, astrocytes-like cell, pyramidal cell layer (CA1,

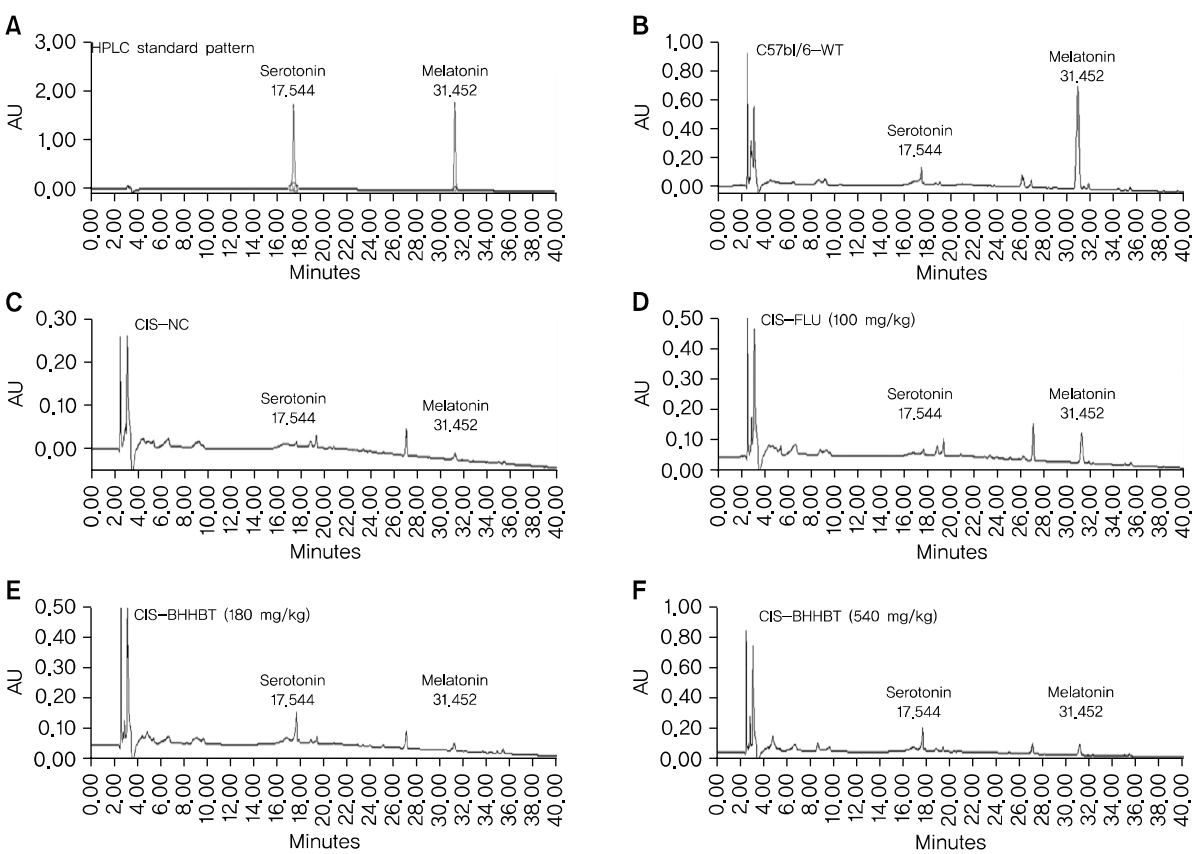


**Fig. 2.** HPLC chromatograms of standard mixture and extract of BanHaHuBakTang-kami. Chromatograms of serotonin & melatonin standard (A), C57bl/6 normal group (B), CIS-NC group (C), CIS-FLU (100 mg/kg) group (D), CIS-BHHBT (180 mg/kg) group (E), and CIS- BHHBT (540 mg/kg) group (F) are recorded at 220 nm.
HPLC: High-Performance Liquid Chromatography, C57bl/6-WT: Normal group, CIS-NC: Control group, CIS-FLU: Positive control group treated fluoxetine, CIS-BHHBT: Experimental group treated BanHaHuBakTank-kami.

CA3), neurons 그리고 dentate gyrus (DG) 등이 정상군에 비하여 사라졌으나, Fluoxetine 투여군과 반하후박탕가미 540 mg/kg 투여군은 CA1, CA3, neurons 그리고 DG 등이 유지되고 있음을 볼 수 있었다(Fig. 4).

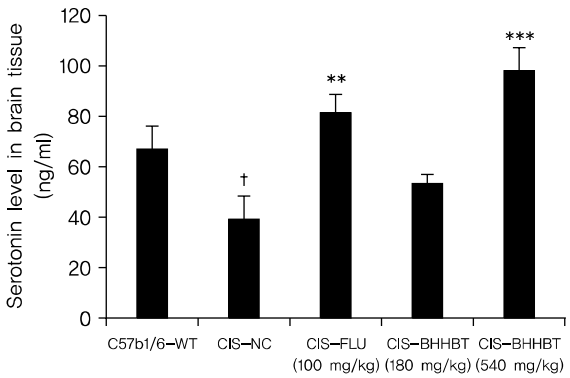


**Fig. 3.** Effects of BanHaHuBakTang-kami (BHHBT) on Serotonin production in brain. Brain extract samples were obtained by centrifugation and stored at -20°C until use. Total Serotonin levels were measured by a sandwich ELISA using an ELISA kit (Enzo life Sciences).
C57bl/6-WT: Normal group untreated immobilization stress, CIS-NC: Control group treated immobilization stress, CIS-FLU: Positive control group treated fluoxetine before immobilization stress, CIS-BHHBT: Experimental group treated BanHaHuBakTank-kami before immobilization stress. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ as compared with the control group, †: $p<0.05$, ††: $p<0.01$ as compared with the normal group.

### 5. 우울증 생쥐모델 뇌조직의 CRF 수용체에 대한 효과

해마부위(hipocampus area)에서 corticotropin releasing factor (CRF) 수용체의 발현량을 면역조직화학염색으로 관찰한 결과, Fluoxetine 투여군과 반하후박탕가미 180 mg/kg, 540 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 CRF 수용체의 발현량이 감소되었다(Fig. 5).

## IV. 고찰

우울증은 우울한 기분, 흥미와 즐거움의 감소, 식욕 변화, 체중 변화, 불면 혹은 과수면 등의 증상들로 이루어진 기분장애이다[1].

우울증은 2011년 국내 유병률이 7.5%에 이르는 흔한 정신장애 중 하나이며[23], 우울증과 관련이 깊은 자살 역시 OECD 회원국 중 우리나라의 자살률이 1위를 기록할 정도로 심각한 사회문제로 대두되었다[3]. 이러한 우울증은 점차 증가추세에 있어 우울증의 치료는 중요한 사회문제라고 할 수 있다.

한의학적인 관점에서 우울증은 울증, 전증의 개념으로 다

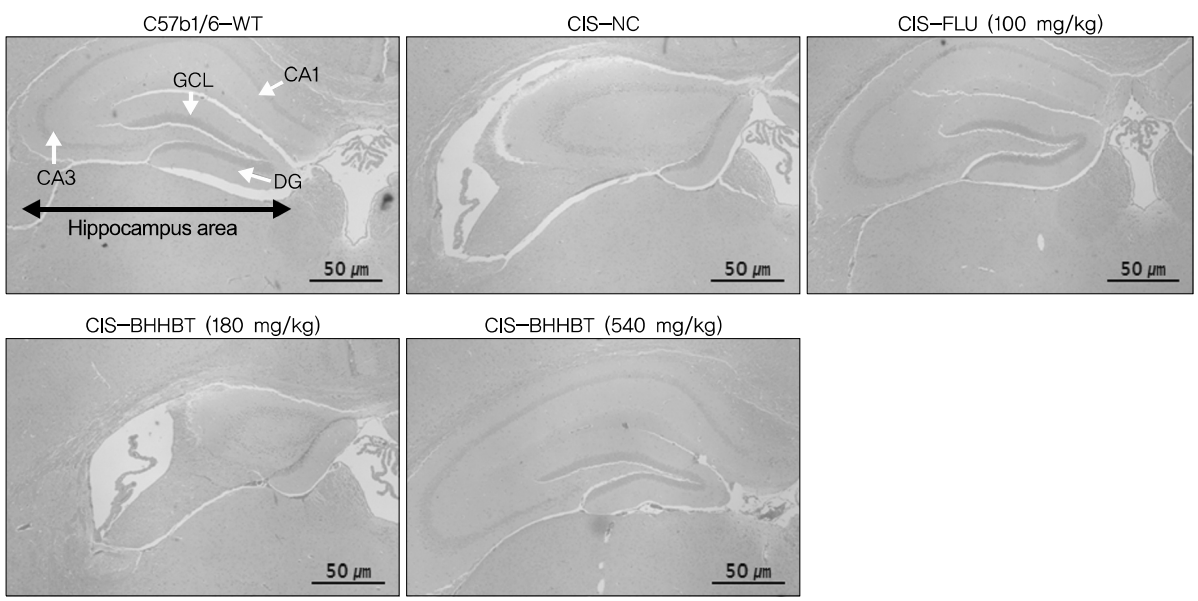


**Fig. 4.** Histological analysis of hippocampal lesions and neural loss of CIS-mice Brain. C57bl/6 mice were sacrificed, brain was fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with hematoxylin&eosin. The panels are representative photomicrographs of each of these risk (arrow) at bright microscope (Nikon, ×40).
C57bl/6-WT: Normal group, CIS-NC: Control group, CIS-FLU: Positive control group treated fluoxetine, CIS-BHHBT: Experimental group treated BanHaHuBakTank-kami, DG: Dentate gyrus, GCL: Granule Cell Layer, CA1: Cornu Ammonis 1, CA3: Cornu Ammonis 3.

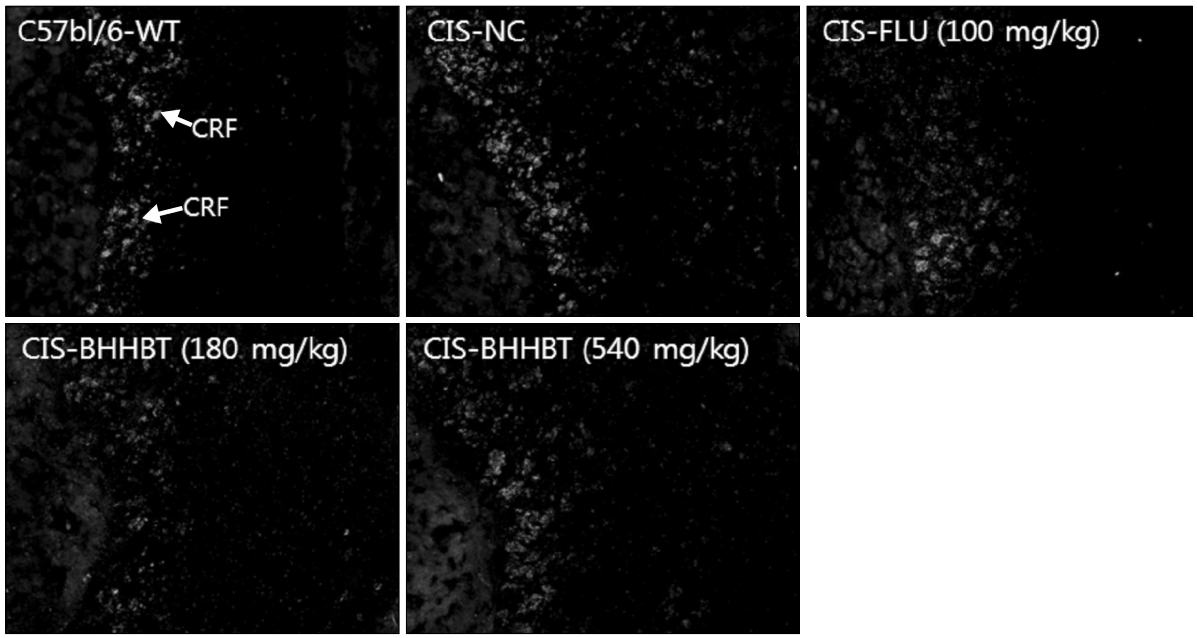


**Fig. 5.** Immunohistochemistry analysis of CRF protein tissue in the hippocampus of CIS-mice. Immunohistochemical staining for CRF protein was performed on brain tissue sections. The panels are representative photomicrographs of each of these risk at contrast fluorescence-microscope (Nikon, ×200).
C57bl/6-WT: Normal group, CIS-NC: Control group, CIS-FLU: Positive control group treated fluoxetine, CIS-BHHBT: Experimental group treated BanHaHuBakTank-kami, CRF: Corticotropin Releasing Factor.

루어지는데, 우울증 중에서도 신경증적 우울증은 울증과 유사하다[8]. 금원시대 이전의 울증은 외사를 포함한 포괄적인 의미였으나, 차츰 정신적인 증상의 개념으로 귀결되었고, 요즘에는 우울증의 한의 진단명으로 사용되고 있다[9]. 진단 및 치료에 있어서는 간울비허(肝鬱脾虛), 간울기체(肝鬱氣滯), 담미심규(痰迷心竅), 심비양허(心脾兩虛), 비신양허(脾腎兩虛) 등으로 나누어 변증시치(辨證施治)하고 있다[24].

반하후박탕은 ≪금궤요략≫에 부인의 매핵기(梅核氣) 등과 같은 증상을 치료한다고 수록된 이후 칠정(七情)에 의한 기울(氣鬱), 기역(氣逆) 등에 많이 활용되고 있는 처방이다. 또한 길경은 선폐거담(宣肺祛痰), 이인배농(利咽排膿) 등의 효능이 있고[21], 이외에도 이기소통(理氣疏通) 등(等)의 다양한 작용을 하며 내상칠정(內傷七情)으로 인한 두목혼침(頭目昏沈), 기상천급(氣上喘急)에도 사용된 바 있다[25]. 지각은 배오(配伍)되는 약물(藥物)과 처방(處方)에 따라 관통행체(貫通行滯), 이기개울(理氣開鬱), 거풍지통(祛風止痛) 등의 효능을 보인다[26].

반하후박탕과 관련된 연구 중에서도 항우울 효과와 관련된 연구를 살펴보면 Luo[18] 등은 동물실험을 통해 tail suspension test와 forced swimming test를 실시한 결과 반하후박탕의 90% 에탄올 추출액의 항우울 효과를 보고한 바 있고, Guo[19] 등은 우울증 동물모델에 반하후박탕에서 추출한 다당류를 투여한 결과 serotonin과 dopamine이 증가되어 항우울효과가 있음을 보고하였다. 또한 Zhang[20] 등은 만성스트레스 모델 rat에 반하후박탕 추출액을 투여하여 cerebral cortex, hippocampus, striatum corpora에서 c-fos의 합성이 유의하게 감소하였음을 보고한 바 있다.

이에 저자는 반하후박탕에 행기관중하는 지각과 선폐거담하는 길경[21]을 가한 반하후박탕가미가 항우울 효과가 있을 것이라는 판단 하에 구속 스트레스로 유발된 우울증 생쥐 모델의 행동학적, 생화학적 실험을 실시하였다.

실험에 사용한 구속 스트레스 모델은 인간의 우울증과 연관된 행동학적, 생물학적 연구를 위하여 생쥐에게 물리적, 정신적 스트레스를 동시에 가하는 방법이다. 장기간 스트레스에 노출된 쥐는 우울증 환자에게 관찰되는 행동 및 내분비계 활동 등이 유발되기 때문에, 사람의 정서장애에 대한 유용한 모델로 여겨진다[27].

강제 수영검사(Forced-Swimming Test, FST)는 우울을

평가하기 위한 행동학적 실험으로, 생쥐가 수영을 하지 않을 때나 움직임 없이 물 위에 떠 있기만 할 때의 부동시간을 측정하는데, 이것이 우울의 지표가 된다[28].

강제수영 검사 결과, Fluoxetine 투여군은 대조군과 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았고, 반하후박탕가미 투여군(180 mg/kg, 540 mg/kg)은 대조군과 비교하여 부동시간이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1).

다음으로 HPLC를 이용하여 생쥐의 뇌 내 신경전달 물질 분석을 시행하였다. 그 결과, serotonin과 melatonin이 감소한 대조군에 비해, 양성대조군인 Fluoxetine 투여군은 melatonin이 증가를 나타내었고, 반하후박탕가미 투여군은 180 mg/kg, 540 mg/kg 모두에서 serotonin이 증가하였다(Fig. 2).

Melatonin은 주로 뇌의 송과체(pineal gland)에서 만들어지는 물질로, 내인성 조절기전에 따라 합성과 분비의 주기적인 변화를 보이며, 이러한 변화를 통해 다양한 생리적 기능에 관여한다[29,30]. 여러 연구를 통해, 야간에 melatonin의 농도가 낮으면 우울증 및 기분부전이 발생한다고 알려져 있다[31-33].

뇌 균질액에서 serotonin양을 측정한 결과, 대조군에 비해 Fluoxetine 투여군과 반하후박탕가미를 540 mg/kg 투여한 실험군은 대조군에서 serotonin 생성량이 유의성 있는 증가를 보였다. 반하후박탕가미 180 mg/kg 투여군 역시 serotonin 생성량이 증가 하였으나 통계학적으로 유의하지 않았다(Fig. 3).

Serotonin (5-hydroxy tryptamine)은 신경세포, 혈소판, 비만세포 등에 존재하며, 뇌에 존재하는 serotonin은 전체 양의 약 1~2%이고, 대뇌 피질-변연계 경로(corticolimbic circuits)의 대부분의 영역에 다수의 serotonin 신경원 및 수용체가 존재한다[34]. Serotonin은 혈관-뇌 장벽을 통과할 수 없고, 그렇기 때문에 대뇌에 존재하는 serotonin은 뇌신경세포에서 합성된 것이다. Serotonin의 이용률 저하는 우울증, 불안장애, 자살 등과 관련이 있는 것으로 알려져 왔다[35].

한편, 해마는 단기 기억을 장기 기억으로의 전환하는 것과 관련된 뇌 영역으로, 스트레스에 민감하며 스트레스와 관련된 호르몬인 코티졸에 의해 손상받기 쉬운 것으로 알려져 있다[36]. 우울증에 대한 신경생물학적 기반은 아직 뚜렷이 알려지지 않고 있으나 신경회로적 비정상성의 가능성이 제시되었으며, 한 연구에 따르면 우울증 환자의 경우 전두엽 피질영역이나 해마부위의 부피와 아교세포 수치 감소가 보고된 바 있다[37]. 일부 연구에서는 정상인과 우울증 환자의 해마용적에 차이가 관찰되지 않기도 하였지만, 다수의 연구에서 우울증 환자의 해마 용적 감소를 보고하였고[38], 특히 재발성 우울증과 조기 발병된 우울증 등에서는 해마의 용적이 비교적 일관되게 감소하였음을 보고하였다[39].

해마는 2개 얇은 뉴런 층들이 서로 겹쳐진 형태를 갖고 있다. 한 층은 치상회(dentate gyrus, DG)이고, 다른 층은 암몬각(Ammon's horn)이라고 한다. 암몬각의 CA3와 CA1 부위는 최근의 기억(recent memory)에 관련되어 있고, 학습과 기억은 시냅스에서 일어날 수 있는데, 해마에서의 시냅스 가소성을 연구하는 데 유용하게 이용되고 있다[40].

뇌조직을 관찰한 결과, 대조군에서 해마부위의 조직손상이 관찰 되었고, 양성대조군인 Fluoxetine 투여군과 반하후박탕가미 540 mg/kg 투여군에서 pyramidal cell layer (CA1, CA3), neurons, dentate gyrus등이 회복된 것을 볼 수 있었다(Fig. 4).

다음으로 면역조직화학 염색을 이용하여 생쥐 시상하부 실방핵(paraventricular nucleus, PVN)에서 CRF 수용체의 양을 측정하였다.

CRF는 스트레스에 대한 신경 내분비계를 조절하고, 자율신경계의 행동반응을 조절하는 펩타이드로, 스트레스로 인해 시상하부-뇌하수체-부신(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) 축이 과활성하게 되면 시상하부의 실방핵에서 분비되는 CRF mRNA 발현이 증가된다고 알려져 있다[41]. 우울증에 대한 신경생리학적 기전을 이해하기 위하여 특정 신경조직상의 생체물질의 반응성에 대한 근거를 확보하기 위한 연구들이 이루어 졌고, 이를 통해서 serotonin이나 CRF 및 그들의 수용체를 비롯하여 옥시토신이 신경전달물질로서 해마, 편도체 및 시상하부 조직에서의 생성수준의 변화가 우울증의 반응성 조절과 연관성이 있음이 보고되었다[42]. 특히 시상하부의 PVN에서 분비되는 CRF는 뇌조직에 존재하는 수용체 type 1에 대한 길항제 처리에 의하여 우울증 증세를 감소시킬 수 있음이 보고된 바 있다[43].

본 실험에서 Fluoxetine 투여군과 반하후박탕가미 투여군(180 mg/kg, 540 mg/kg)은 대조군에 비하여 CRF 수용체의 발현량이 감소되었다(Fig. 5).

이상의 내용을 종합하여 보면 반하후박탕가미는 강제수

영 검사에서 부동성을 감소시키고, HPLC를 이용한 신경전달물질 분석과 뇌 균질액 serotonin측정 결과 뇌 내 serotonin생성량을 증가시켰으며, 540 mg/kg 투여군의 경우 해마부위의 뇌 조직손상을 방지하였고, 시상하부 실방핵의 CRF 수용체 발현량을 감소시켰다. 따라서 반하후박탕가미는 항우울제로서의 가능성이 있다고 사료된다. 향후 반하후박탕가미의 항우울효과에 대한 기전 연구, 임상 연구 등의 추가적인 연구가 필요하리라 사료되며, 이를 통해 새로운 항우울 한약제제의 개발을 기대하는 바이다.

## V. 결론

반하후박탕가미의 항우울 효과를 알아보기 위하여 강제수영 검사, 신경전달물질 분석, 뇌 내 serotonin 양 측정, 뇌조직손상 분석, 뇌 면역조직화학염색 분석 등을 시행한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 구속 스트레스에 의한 부동시간이 증가된 생쥐의 부동시간을 반하후박탕가미가 감소시켰다

2. 반하후박탕가미는 HPLC를 통한 신경전달물질 분석상 serotonin 양을 증가 시켰다.

3. 반하후박탕가미는 뇌내 serotonin 발현량을 유의하게 증가 시켰다.

4. 반하후박탕가미 540 mg/kg는 해마부위의 손상을 방지하였다.

5. 반하후박탕가미는 해마부위의 CRF 수용체 발현량을 감소시켰다.

## REFERENCES


1. The Textbook Compliation Committee of Neuropshychiatry of Oriental Schools in Nation. The Neuropsychiatry of Oriental Medicine. Seoul: Jipmoon-Dang. 2007;256-65, 295, 472, 474-8.
2. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). JAMA. 2003;289:3095-105.
3. Statistics korea. The cause of death statistics. Statistics korea. 2010.
4. Kendler KS, Gardner CO, Neale MC, Prescott CA. Genetic risk factors for major depression in men and women: similar or different heritabilities and same or partly distinct genes?. Psychol Med. 2001;31:605-16.
5. Choi EM, Koo SJ. Possibility of regulation by food in depression and mood disorders. Food science and industry. 2001;34(4):53-69.
6. Min SG. Modern Psychiatry, 5th Edition. Seoul:Ilchokak. 2006;52-67, 274-97, 323-58, 743-56.
7. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience: Exploring the Brain, 3rd Edition. Seoul: Biomedibook. 2009.
8. Kang HW, Jang HH, Kang IS, Moon HC, Hwang YJ, Lyu YS. A Study on The Oriental-medical Understanding of Depression. Journal of oriental neuropsychiatry. 2011; 12(2):1-15.
9. Hwang WW, Kim JH. Dong ui jeong sin ui hag. Seoul: Hyundai uihag seojeogsa. 1987:505-29, 607-11.
10. Lee SI. Oriental Prescriptionology. Seoul: Younglim Press. 1999:382.
11. Zhang ZJ. Chin Kuei Yao Lueh. Seoul. Daesung Press. 1993;66.
12. Park SS, Yeom TH. Hyeondae hanbang gangjwa. Geumgang Publisher. 1963:118.
13. Heo J. Dong ui bo gam. Namsungdang. 1966:30.
14. Yuk CS. Hyeondae bangyakhappyeon. Gyechuk munhwasa. 1976:200.
15. Naito T, Itoh H, Takeyama M. Effect of Hange-koboku-to (Banxia-houpo-tang) on an plasma and saliva. Biol Pharm Bull. 2003;26(11):1609-13.
16. Lee BK, Cho TS. Experimental Studies on Pharmacological Action of the Banhahubagtang, A Combined Preparation of Oriental Medicine. Kor J Pharmacogn. 1987; 18(1):14-25.
17. Kuribara H, Kishi E, Hattori N, Okada M, Maruyama Y. The anxiolytic effect of two oriental herbal drugs in Japan attributed to honokiol from magnolia bark. J Pharm Pharmacol. 2000;52(11):1425-9.
18. Luo L. Nong Wang J, Kong LD, Jiang QG, Tan RX. Antidepressant effect of Banxia Houpu decoction, a traditional Chinese medicinal empirical formula. J Ethnopharmacol. 2000;73(1-2):277-81.
19. Guo Y, Kong L, Wang Y, Huang Z. Antidepressant evaluation of polysaccharides from a Chinese herbal medicine Banxia-houpu decoction. Phytother Res. 2004;18(3): 204-7.
20. Weiyun Z, Jianmei L, Jixiao Z, Zhenqiu S, Yong W, Lingdong K. Chinese medicine Banxia-houpu decoction regulates c-fos expression in the brain regions in chronic mild stress model in rats. phytother Res. 2004;18(3): 200-3.
21. Ju YS. Ungok Herbology. Jeonju:Woosuk Press. 2013: 819, 826-8. Korean.
22. Oh G. Uijong-geumgam. Korea medical book publisher. 1963.
23. Ministry for Health, Welfare and Family Affairs. The Epidemiological Survey of Mental Disorders in Korea.

2011. Available from:URL:http://www.mw.go.kr/front_new/jb/sjb030301vw.jsp?PAR_MENU_ID=03&MENU_ID=031604&CONT_SEQ=274852&page=1
24. Korea Institute of Oriental Medicine. Standardization and Unification of the Terms and Conditions Used for Diagnosis in Oriental Medicine (III). J Korean Oriental Med. 1997;3(1):41-65.
25. Lee TH, Lee SJ, Huh J, Shin DG, Lee JC, Shin YS, Yun YG. Study on the Applications of prescriptions including Platycodi Radix as a main component in Dongeuibogam. The Korean journal of oriental medical prescription. 2010;18(1):23-42.
26. Ryu SH, Lim YH, Ryou SY, Yun YG. A study on Applications of prescriptions including Fructus Ponciri Seu Aurantii as a main component in Dongeuibogam. The Korean journal of oriental medical prescription. 2008;16(1):15-27.
27. Willner P. The validity of animal models of depression. Psychopharmacology. 1984;83(1):1-16.
28. Rodrigues AL, da Silva GL, Mateussi AS, Fernandes ES, Miguel OG, Yunes RA, Calixto JB, Santos AR. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of Siphocampylus verticillatus. Life sciences. 2002;70(12):1347-58.
29. Korf, H. W., Schomerus, C. and Stehle, J. H. The pineal organ, its hormone melatonin and the photoneuroendocrine system. Adv Anat Embryol Cell Biol. 1998;146: 1-100.
30. Ganguly, S., Coon, S. L. and Klein, D. C. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. Cell Tissue Res. 2002; 309:127-37.
31. Brown, G. M. Melatonin in psychiatric and sleep disorders: therapeutic implication. CNS Drugs. 1995;3: 209-26.
32. Partonen, T. Extrapineal melatonin and exogenous serotonin in seasonal affective disorder. Med Hypotheses. 1998;51:441-2.
33. Wetterberg, L. Melatonin and affective disorders. Ciba Found Symp. 1985;117:235-65.
34. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. Annu Rev Med. 2009;60:355-66.
35. Wrase J, Reimold M, Puls I, Kienast T, Heinz A. Serotonergic dysfunction: brain imaging and behavioral correlates. Cogn Affect Behav Neurosci. 2006;6:53-61.
36. Woon FL, Sood S, Hedges DW. Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: a meta-analysis. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2010;34:1181-8.
37. Lucas G, Rymar VV, Du J, Mnie-Filali O, Bisgaard C, Manta S, Lambas-Senas L, Wiborg O, Haddjeri N, Piñeyro G, Sadikot AF, Debonnel G. Serotonin(4) (5-HT(4)) receptor agonists are putative antidepressants with a rapid onset of action. Neuron. 2007;55(5):712-25.
38. Lorenzetti V, Allen NB, Fornito A, Yüel M. Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies. J Affect Disord. 20091; 17:1-17.
39. McKinnon MC, Yucel K, Nazarov A, MacQueen GM. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. J Psychiatry Neurosci. 2009;34:41-54.
40. Lee IA, Yoganarasimha D, Rao G, Knierim JJ. Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 and CA3. Nature. 2004; 430(6998):456-9.
41. Aubry JM, Pozzoli G, Vale WW. Chronic treatment with the antidepressant amitriptyline decrease CRF-R1 receptor mRNA levels in the rat amygdala. Neurosci Lett. 1999; 266:197-200.
42. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. Nature. 2008;455(7215):894-902.
43. Zobel AW, Nickel T, Künzel HE, Ackl N, Sonntag A, Ising M, Holsboer F. Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. J Psychiatr Res. 2000;34(3):171-81.