

감맥대조탕 복합추출물의 만성스트레스 유발 생쥐의 항우울 작용에 관한 실험연구

이유찬, 김보경

동의대학교 한의과대학원 한방신경정신과학교실

Experimental Study on the Anti-Depressant Effects of Gammakdaejo-tang Complex Extracts in Rats Induced with Chronic Mild Stress

Yu-Chan Lee, Bo-Kyung Kim

Department of Oriental Neuropsychiatry, Graduate School of Oriental Medicine in Dong-eui University

Received: March 14, 2018
Revised: March 18, 2018
Accepted: March 21, 2018

Correspondence to

Bo-Kyung Kim
Department of Oriental
Neuropsychiatry, Graduate School of
Oriental Medicine in Dong-eui
University, 62 Yangjung-ro,
Busanjin-gu, Busan Korea.
Tel: +82-51-850-8809
Fax: +82-51-867-5162
E-mail: npjolie@deu.ac.kr

Acknowledgement

This manuscript is a revision of the
first author's master's dissertation for
Dong-Eui University in 2018.

Objectives: To experimentally assess the anti-depressant effects of Gammakdaejo-tang Complex Extracts (GMDJ-Tang) in rats.

Methods: Twenty Wistar Hannover (160~170 g) stressed rats were treated with different concentrations of GMDJ-Tang extracts i.e., 0, 62.5 mg/kg, 125 mg/kg, and 250 mg/kg. Chronic mild stress was induced by food deprivation, empty bottles, forced swimming, flickered light, tilt cages, shaking cages, high density breeding, water deprivation, and by soaking the litter cover according to fixed schedule. Blood and brain tissue samples were collected for biochemical analysis. Tests included serotonin and ELISA assays.

Results: GMDJ-tang increased the weight of treated rats as well as levels of serotonin, BDNF and TrkB; however, the differences were not significant. In contrast, the extracts significantly decreased blood glucose in stressed rats. GMDJ-tang extracts did not significantly impact Serum AST, ALT, leukocytes, erythrocytes and thrombocytes when comparing treatment groups to control rats. Likewise, hemoglobin, hematocrit and PLT increased in treatment groups following treatment with GMDJ-tang, but this change was without significance.

Conclusions: These results suggest that GMDJ-tang can alleviate chronic mild stress in rats, possibly through anti-depressant activity.

Key Words: Gammakdaejo-tang, Chronic mild stress, Anti-depressant effects, Serotonin, TrkB, BDNF.

I. 서론

감맥대조탕(甘麥大棗湯)은 『금궤요략(金匱要略)』에서 “부인장조(婦人臟躁), 희비상욕곡(喜悲傷欲哭), 상여신령소작(象如神靈所作), 삭흡신(數欠伸), 감맥대조탕주지(甘麥大棗湯主之)”¹⁾라고 최초로 수록 이후 양심안신(養心安神)시킬 목적으로 사용되어 왔으며, 임상에서는 주로 히스테리, 신경쇠약, 노이로제, 불면증, 야제증(夜啼症), 전간(癲癇), 우울증, 부인장조증(婦人臟躁症) 등의 정신장애에 활용되어 왔다^{2,3)}.

우울증, 주요우울장애 진단 기준은 최소 2주간 지속되는 정동, 인지, 성장 기능의 명백한 변화를 수반하는 삽화와 삽화 사이 관해 상태를 특징으로 한다⁴⁾.

중추신경계 신경전달물질 중 하나인 serotonin의 함량 부족 또는 결핍은 우울증을 유발시킬 수 있는데⁵⁾, 감맥대조탕이 serotonin을 증가시킨다는 보고가 있었다⁶⁾. 백⁷⁾은 감맥대조탕이 우울 및 불안검사와 학습 및 기억검사에 있어 유효하게 작용하고, 혈청 스트레스 호르몬인 corticosterone의 분비가 억제되는 항우울화 효과가 있음을 보고하였다. 이 외에도 감맥대조탕이 뇌혈류량과 평균 혈압 및 심근 수축력을 증가시킨다는 보고와 갱년기 우울증의 스트레스 반응을 둔화시킨다는 보고 및 항우울 효과가 있다는 보고가 있었다^{6,8-10)}.

우울증은 학습 및 기억력 저하를 흔히 동반하기도 하는데¹¹⁾, 인지기능과 관련한 선행 연구들은 해마 BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)가 신경세포 생존 및 퇴행의 예방, 학습과 기억 과정 중 시냅스 기능과 신경가소성을 조절한다는 사실을 지지하고 있다^{12,13)}. BDNF는 세포 표면 티로신수용체 TrkB (Tyrosine receptor kinase B)와 결합 후 다수 세포내 신호 전달체계를 개시하고¹⁴⁾, TrkB와 BDNF의 결합은 CREB (cAMP response element binding protein) 발현을 촉진하고¹⁵⁾, 해마에서의 BDNF와 CREB 발현의 감소는 인지기능 장애와 밀접한 상관관계가 있다고 보고하고 있다¹⁶⁾.

이에 저자는 기존 연구를 바탕으로 하여, 감맥대조탕의 항우울 작용에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 생쥐에 먹이박탈, 물 제한, 주야 빛 역조절, 소음, 케이지 경사도 조절 혹은 흔들기, 젖은 깔짚, 강제 수영과 운동 등으로 장기간 스트레스를 가하면서 감맥대조탕을 투여하여, 유발된 만성 스트레스에 대한 Serotonin 혈중 함량, BDNF, TrkB 함량,

혈액학적 변화 및 증체량의 변화와 혈당의 수준에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 연구대상 및 방법

1. 재료

1) 동물

체중이 약 160~170 g의 Wistar Hannover계의 수컷 생쥐를 항온항습 사육장(실내온도 24±1°C, 습도 60±5%)에서 실험실 환경에 3일 이상 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 실험기간 동안 고형사료(동아원, 한국)와 물은 스트레스 유발시간을 제외하고, 자유롭게 섭취하도록 충분히 하였다.

2) 약물

일본한방제약회사(Tsumura)에서 나온 감맥대조탕 복합추출물(1 stick=약 2.5 g) 파우더 62.5 mg/kg, 125 mg/kg, 250 mg/kg 세 가지 농도로 5 ml/kg의 류류수에 녹여 투여하였다(Table 1).

2. 실험 방법

1) Chronic Mild Stress (이하 CMS) 유발

본 연구를 위하여 Table 2와 같은 만성 스트레스(CMS) 모델을 사용하였다. 실험기간은 정상군을 제외한 CMS 유발군은 21일간 먹이박탈(Food Deprivation, FD), 빈 물병 제시(Empty Bottle, EB), 강제 운동(Forced Treadmill, FT), 소음(Noise bursts, NB), 주야 주기 역전(Lights on at night, LON, Lights off at day, LOF), 강제 수영(Force Swimming, FS), 빛 깜빡(The Flashing light, FL), 케이지 기울이기(Tilt), 케이지 흔들기(Shaking), 고밀도 사육(Tight Husbandry,

Table 1. Contents of Gammakdaejo-tang (GMDJ-tang)

Chinese herbal name	Scientific name	Component (g)
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	1.67
浮小麥	Tritici Immatri Semen	6.67
大棗	Jujubae Fructus	2.0
Tsumura 1 stick 2.5 g	GMDJ-tang	1.0833 g
	Lactose hydrate	1.4042 g
	Magnesium stearic acid	0.0125 g

Table 2. Time Table for Induced by Chronic Stress Model in Rat

Time	Fri	Sat	Sun	Mon	Tue	Wed	Thu
01:00	FD, EB	LON	FL	Tilt	TH, WD	FL	Tilt
02:00	(9 h)	(9 h)	(9 h)	(9 h)	(9 h)	(9 h)	(9 h)
03:00							
04:00							
05:00							
06:00							
07:00							
08:00							
09:00							
10:00							
11:00	FT	FS	LOF	Shaking	FT	SC	Shaking
12:00	(2 h)	(2 h)	(2 h)	(2 h)	(2 h)	(2 h)	(2 h)
13:00							
14:00							
15:00	NB	WD	LOF	FD	NB	FS	LOF
16:00	(4 h)	(4 h)	(4 h)	(4 h)	(4 h)	(4 h)	(4 h)
17:00							
18:00							
19:00	LON	FL	Tilt	TH, WD	FL	Tilt	FD, EB
20:00	(6 h)	(6 h)	(6 h)	(6 h)	(6 h)	(6 h)	(6 h)
21:00							
22:00							
23:00							
24:00							

*FD: Food deprivation, EB: Empty bottles, FT: Forced Treadmill, NB: Noise bursts, LON: Lights on at night, FS: Force Swimming, FL: The Flashing light, LOF: Lights off at day, Tilt, Shaking, TH: Tight Husbandry, WD: Water deprivation, SC: Straw litter clammy.

TH), 물 박탈(Water deprivation, WD), 젖은 깔짚(Straw litter clammy, SC) 등 매일 스트레스 유발표에 의하여 노출시켰으며, 이 기간 동안 먹은 사료량 및 물량을 확인하였으며, 체중은 5일 간격으로 측정하였고, 스트레스 유발 시간 이외에는 일반적인 사육환경을 유지하였다(Table 2).

2) 실험군 분리

각 군들의 분리는 특별 처치 없이 관찰한 정상군(Normal), CMS을 유발하고 처치를 하지 않은 대조군(Control), CMS 유발 후 감맥대조탕 62.5 mg (62.5 mg/kg), 150 mg (125 mg/kg), 250 mg (250 mg/kg) 투여군으로 분류하였으며, 군 당 개체 수는 5마리로 하였다.

3) 약물 투여

약물의 구강투여는 zonda를 사용하여 CMS 유발 1일째부터 하루 한 번 씩 14일간 총 14회 시행되었다. 1회 투여량 5 ml/kg을 주입하였다.

Table 3. Scheme. GMDJ-tang Administered Experimental Protocol for CMS-induced Stress Model

1 week adaptation		3 week CMS		Sacrifice	
	5일전	0일	5일	10일	15일
		↑	(weight estimation)		↑
					Blood sampling Brain extraction
			(→ Administration)		
			GMDJ-tang 62.5 mg/kg		
			GMDJ-tang 125 mg/kg		
			GMDJ-tang 250 mg/kg		

CMS: Chronic Mild Stress.

4) 체중

생쥐의 체중은 전자저울(주카스, 중국)을 이용하여, 실험 기간 동안 스트레스 유발 5일 전(-5일), 유발시작(0일), 약물 투여 5일째, 10일째, 15일째에 각각 측정하였다(Table 3).

5) 혈당 측정

혈당 측정은 총 2회 즉, CMS 유발 전과 실험 종료 후 꼬리 채혈을 하여 얻어진 혈액을 ACCU-CHEK Active Strip (Roche, Germany)에 혈액방울을 묻혀 ACCU-CHEK Active (Roche, Germany)로 시행하였다.

6) 혈액 및 혈청학적 검사

꼬리 채혈로 얻어진 혈액 중 약 100 μ l를 EDTA-bottle에 넣은 후 Multispecies Hematology Analyser (950, Hemavet, USA)에 주입하여 Leukocytes, Erythrocytes, WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT를 측정하였다. 남은 혈액은 VS 6000CFI (Vision, Korea)에서 3,000 rpm으로 20분간 시행 후 혈청을 분리하였고, 혈청 AST (u/l)와 ALT (u/l)를 Dri-chem 4000 I (Fujifilm corp. Japan)으로 측정하였다.

7) ELISA에 의한 Serotonin 측정

Serotonin은 Serotonin Elisa Kit (abcam, UK)를 사용하여 측정하였다. Serotonin이 coating된 microplate에 Serotonin standard 100 μ l, serum 100 μ l를 넣고 Alkaline phosphate conjugate 50 μ l를 첨가하고, Serotonin antibody 50 μ l를 넣은 후 plate cover로 tapping한 후에 1분간 mixing하고 실온에서 2시간 동안 500 rpm으로 shaking

시켰다. Wash buffer 200 μ l로 3회 washing 후 pNpp substrate solution 200 μ l를 첨가하고 plate cover를 덮고 실온에서 1시간 동안 incubation 하였다. Stop solution 50 μ l를 plate에 넣고 발색 반응을 중지시킨 후 microplate spectrophotometer (Benchmark plus, Biorad, USA)로 405 nm에서 OD (Optical density)를 측정하였다. Standard curve를 만들어 sample의 Serotonin를 assay하였다.

8) ReverseTranscription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

(1) Total RNA 분리

적출된 뇌를 coronal section하여 신속히 액체 질소에 급속 냉동시키고 분석할 때까지 -70°C 에서 보관하였다. Total RNA의 분리는 뇌 조직(200 mg)에 800 μ l Trizol Reagent (Lifetechnologies, USA)를 넣고 precllys 24 (Bertin technologies, France)에서 균질화하고, 균질액에 200 μ l의 chloroform (Sigma, USA)을 가하여 15초 동안 흔들어서 잘 혼합한 후, 실온 상태에서 5분 방치하고 난 다음 세포 유잔물을 제거하기 위하여 4°C , 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리(Centrifuge 5415 R; Eppendorf, Germany) 하였다. 원심분리로 얻어진 상층액에 500 μ l의 iso-propanol (sigma, USA)을 첨가하여 실온상태에서 5분 동안 방치한 후 RNA pellet을 얻기 위하여 4°C , 14,000 rpm에서 8분간 원심분리하고, 원심분리로 생긴 pellet에 냉장 보관된 70% ethanol과 함께 DEPC를 넣고 4°C , 7,500 rpm에서 5분간 원심분리 후 pellet만 남기고 모두 제거하고, 남은 ethanol은 실온에서 5분간 방치시켜 건조시킨 다음 DEPC-treated water에 녹여 spectrophotometer (Bio-photometer: Eppendorf, Germany)에서 OD260 값을 읽어 RNA의 순도 및 농도를 정량하였다.

(2) ReverseTranscription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

분리된 total RNA 5 μ g과 2.5 μ l Oligo (dT), DEPC-treated water를 RT premix (Bioneer, Korea)에 넣어 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)를 이용하여 50 μ l cDNA를 합성하여 PCR 증폭을 위한 template로 사용하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (sense primer:

5'-ACTCCATCACCATCTTCCAG-3', antisense primer: 5'-CCTGCTTTCACCACCTCCTTG-3')를 internal control로 사용하였다. Reverse transcription temperature cycle은 42°C 에서 1시간 동안 cDNA synthesis, 94°C 에서 5분 동안 denature 그리고 4°C 에서 5분 동안 cooling시키는 단계를 거쳤다. Polymerase chain reaction은 cDNA, 10 pg sense primer, 10 pg antisense primer, DEPC-treated water를 PCR premix (Bioneer, Korea)에 넣은 후 Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany)를 이용하여 증폭시킨다. PCR temperature cycle은 cDNA의 증폭을 위하여 95°C 에서 30초 동안 pre-denaturation, 94°C 에서 40초 동안 melting, 55°C 에서 40초 동안 annealing, 72°C 에서 90초 동안 extension하는 과정을 34회 반복 수행하고 마지막 cycle에서 72°C 에서 600초 동안 extension 단계를 거친다. BDNF 유전자증폭은 primer (sense primer: 5'-CAGGGGCATAGACAAAAG-3', antisense primer: 5'-CTTCCCCTTTTAATGGTC-3'), TrkB 유전자증폭은 primer (sense primer: 5'-GATCTTCACCTACGGCAAGC-3', antisense primer: 5'-TCGCCAAGTCTGAAGGAGT-3')로 시행하였다. 이렇게 증폭된 BDNF, TrkB의 DNA를 Greenview nucleic acid gel stain (IO Rodeo, 1:10,000)를 포함한 1.5% agarose gel상에서 0.5x TBE buffer (80 mM Tris-HCL, 80 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3)로 100 V에서 전기 영동시켜 관찰한 후 Image Station (Samsung, Korea)을 이용하여 촬영하였으며, Alphaease FC StandAlone Software (Alpha Innotech, USA)를 이용하여 측정하였다.

3. 통계처리

모든 측정값은 Excel statistic program (Microsoft, USA)을 이용하여 평균치와 표준오차(mean \pm standard error)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 SPSS 21.0 ver. for windows를 사용하여 비모수적 방법으로 Mann-Whitney U test를 시행하였다. 각 실험군은 대조군에 비하여 $\alpha=0.05$ 수준($p<0.05$)과 $\alpha=0.01$ 수준($p<0.01$)에서 유의성을 검정하였다.

III. 결과

1. Serotonin 함량에 미치는 영향

감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 Serotonin 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 8.08 ± 0.96 pg/ml, 대조군은 6.95 ± 0.44 pg/ml를 나타내어 정상군에 비하여 대조군은 감소의 경향을 보였고, GMDJ-tang 62.5 mg군은 7.63 ± 0.58 pg/ml, GMDJ-tang 125 mg군은 8.86 ± 0.50 pg/ml, GMDJ-tang 250 mg군은 8.18 ± 0.83 pg/ml을 나타내어 대조군에 비하여 GMDJ-tang 실험군에서는 Serotonine 함량이 정상군과 비슷하게 나타났으며, GMDJ-tang 125 mg군이 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 1).

2. BDNF 활성에 미치는 영향

감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 BDNF 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 121.8 ± 3.9 OD value, 대조군은 88.9 ± 8.4 OD value를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 감소를 나타내었고, GMDJ-tang 62.5 mg군은 112.3 ± 3.2 OD value, GMDJ-tang 125 mg군은 117.9 ± 3.1 OD value를 나타내 대조군에 비하여 유의한 감소억제가 나타났으며, GMDJ-tang 250 mg군은 106.0 ± 7.4 OD value의 감소억제하였으나 유의성은 없었다(Fig. 2).

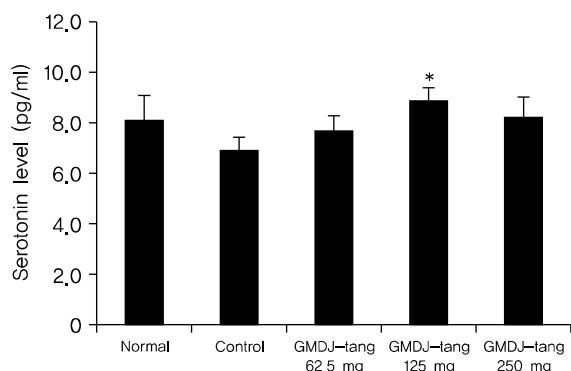


Fig. 1. Effect of GMDJ-tang administration on the Serotonin level in CMS rats.

Values are expressed Mean±SE. Normal, normal group; Control, CMS and no treatment; GMDJ-tang 62.5 mg, CMS and administration of GMDJ-tang 62.5 mg; GMDJ-tang 125 mg, CMS and administration of GMDJ-tang 125 mg; GMDJ-tang 250 mg, CMS and administration of GMDJ-tang 250 mg.

*p < 0.05, compared with control.

3. TrkB 활성에 미치는 영향

감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 TrkB 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 124.4 ± 5.5 OD value, 대조군은 85.1 ± 4.5 OD value를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 감소를 나타내었고, 대조군에 비하여 GMDJ-tang 62.5 mg군은 102.2 ± 6.0 OD value, GMDJ-tang 125 mg군은 104.0 ± 6.0 OD value, GMDJ-tang 250 mg군은 92.9 ± 3.3 OD value을 나타내어 감소 억제 효과를

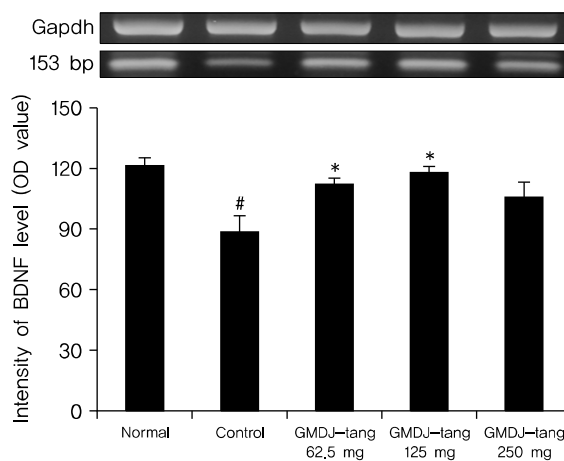


Fig. 2. Effect of GMDJ-tang administration on the BDNF activity in CMS rats.

Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1.

#p < 0.05, compared with normal; *p < 0.05, compared with control.

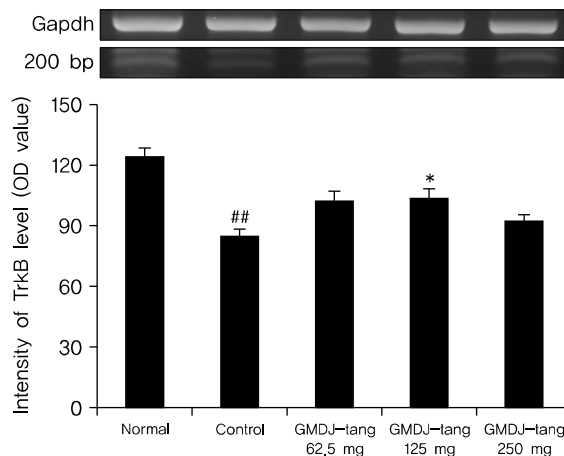


Fig. 3. Effect of GMDJ-tang administration on the TrkB activity in CMS rats.

Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1.

##p < 0.01, compared with normal; *p < 0.05, compared with control.

보였다. GMDJ-tang 125 mg군은 대조군보다 유의성 있는 상승이 나타났다(Fig. 3).

4. 증체량 변화에 미치는 영향

감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 증체량 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 실험이 진행되는 20일 동안 정상군은 지속적으로 체중의 증가를 나타냈다. 정상군에 비하여 대조군은 CMS 5일째에 감소의 경향을 보였고, CMS 10일째에 유의한 감소를 보였고, CMS 15일에 감소의 경향도 나타났다. 대조군에 비하여 실험군은 5일째에 증가의 경향을 보였고, 10일째에 실험군 모두 유의한 증가를 나타내었고, 15일째에 증가의 경향을 나타내었다(Fig. 4).

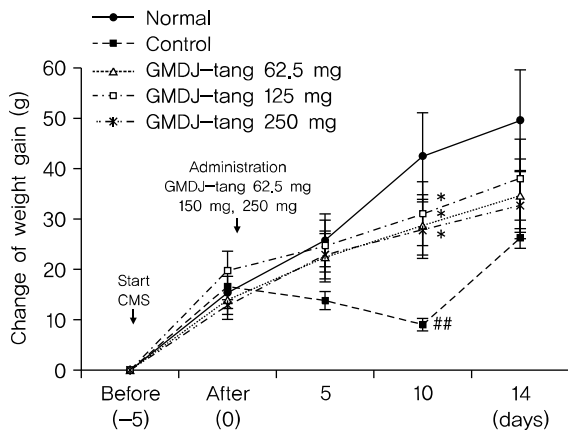


Fig. 4. Effect of GMDJ-tang administration on the weight gain in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. ##p<0.01, compared with normal; *p<0.05, compared with control.

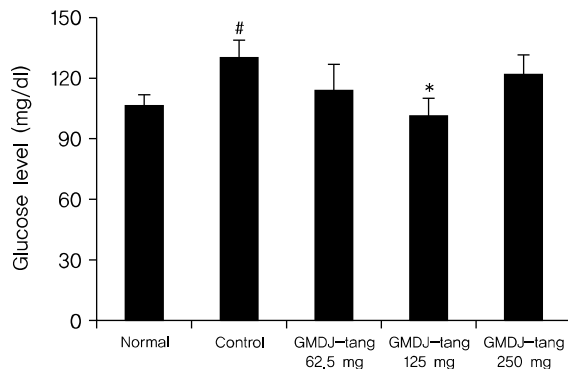


Fig. 5. Effect of GMDJ-tang administration on the glucose level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. #p<0.05, compared with normal; *p<0.05, compared with control.

5. 혈당(Glucose) 함량에 미치는 영향

감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 혈중 glucose 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 106.4±5.6 g/dl, 대조군은 130.1±8.1 g/dl를 나타내어 정상군에 비하여 대조군이 유의한 증가를 나타내었다. GMDJ-tang 62.5 mg군은 113.8±12.7 g/dl, GMDJ-tang 125 mg군은 101.4±8.6 g/dl, GMDJ-tang 250 mg군은 121.6±9.9 g/dl를 나타내어 대조군과 비교하여 감소하였으며, GMDJ-tang 125 mg군이 유의성 있게 감소 결과를 나타내었다(Fig. 5).

6. 혈청 transaminase 함량에 미치는 영향

1) AST 함량

감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 혈청 AST

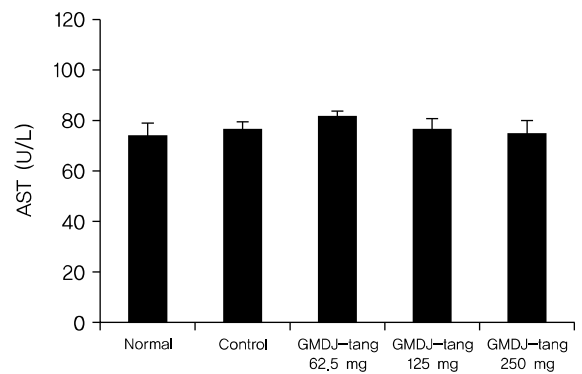


Fig. 6. Effect of GMDJ-tang administration on the AST level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1.

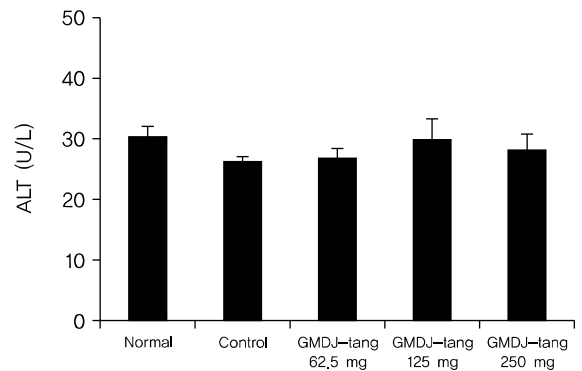


Fig. 7. Effect of GMDJ-tang administration on the ALT level in CMS rats. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1.

함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 73.6±4.8 U/L, 대조군은 76.4±2.8 U/L로 나타났고, GMDJ-tang 62.5 mg군은 81.6±1.9 U/L, GMDJ-tang 125 mg군은 76.4±3.9 U/L, GMDJ-tang 250 mg군은 74.4±5.7 U/L를 나타내어 정상군, 대조군, 실험군에서 유의성은 있는 차이는 나타나지 않았다(Fig. 6).

2) ALT 함량

감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 혈청 ALT

함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군은 30.4±1.6 U/L, 대조군은 26.4±0.6 U/L를 나타내어 정상군에 비하여 대조군은 감소의 경향을 나타내었고, GMDJ-tang 62.5 mg군은 27.0±1.4 U/L, GMDJ-tang 125 mg군은 29.8±3.5 U/L, GMDJ-tang 250 mg군은 28.2±2.7 U/L를 나타내어 정상군, 대조군, 각 실험군에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 7).

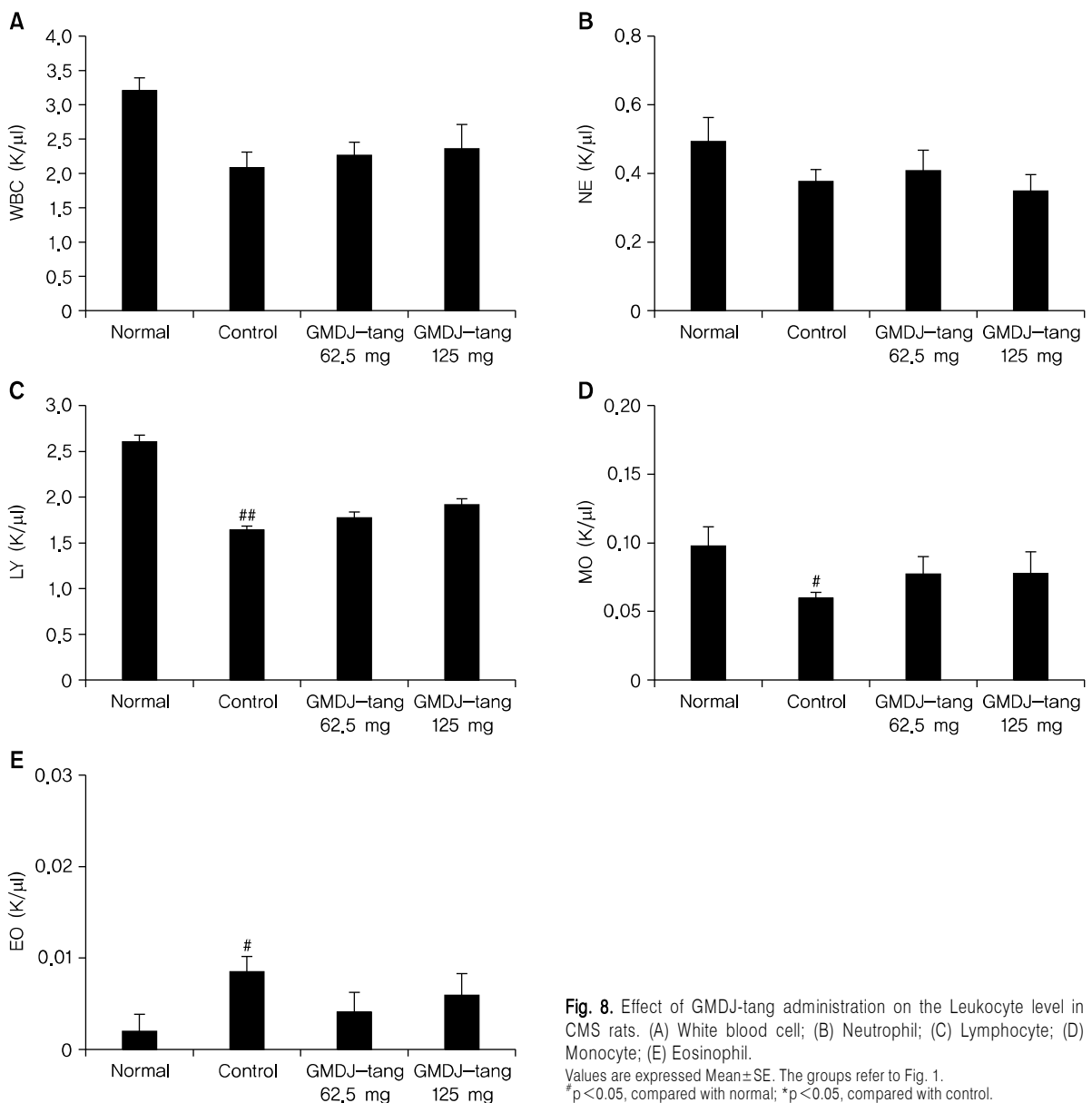


Fig. 8. Effect of GMDJ-tang administration on the Leukocyte level in CMS rats. (A) White blood cell; (B) Neutrophil; (C) Lymphocyte; (D) Monocyte; (E) Eosinophil. Values are expressed Mean±SE. The groups refer to Fig. 1. [#]p<0.05, compared with normal; ^{*}p<0.05, compared with control.

7. 혈구세포 변화에 미치는 영향

1) Leukocyte 변화

감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 Leukocyte 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, White Blood Cell, Neutrophil에서 정상군, 대조군, 실험군에서 유의한 변화가 나타나지 않았고, Lymphocyte, Monocyte는 대조군에서 유의성 있고 감소, 실험군은 감소억제하였고, Eosinophil은 대조군에서 유의성있게 상승되었지만, 실험군은 상승억제가 나타났지만, 유의성은 없었다(Fig. 8).

2) Erythrocyte 및 thrombocyte 변화

감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 Erythrocyte 및 Thrombocyte 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, Red Blood Cell은 정상군, 대조군, 실험군에서 유의성있는

차이가 없었고, Hemoglobin, Hematocrit, PLT은 정상군에 비하여 대조군에서 유의성있는 감소를 보였고, Hemoglobin은 실험군에서 유의성 있는 증가, PLT는 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 9).

IV. 고찰

우울증은 사회가 복잡해지고 다양한 스트레스가 혼합되어 누구나 경험할 수 있는 흔한 정신질환 중에 하나이다. DSM-5의 주요 우울증 진단 기준은 적어도 2주 동안 하루의 대부분 그리고 거의 매일 지속되는 우울한 기분 또는 모든 활동에 있어서 흥미나 즐거움의 상실이 필수적이며, 부가 증상으로 체중감소나 증가, 식욕감소나 증가, 불면이나 과도한 수면, 정신 운동성 초조나 지체, 피로, 사고력이나 집중력의 감소 또는 자살 등 이중 최소 4가지 이상의 증상을 경험한 경우로 정의한다⁴⁾.

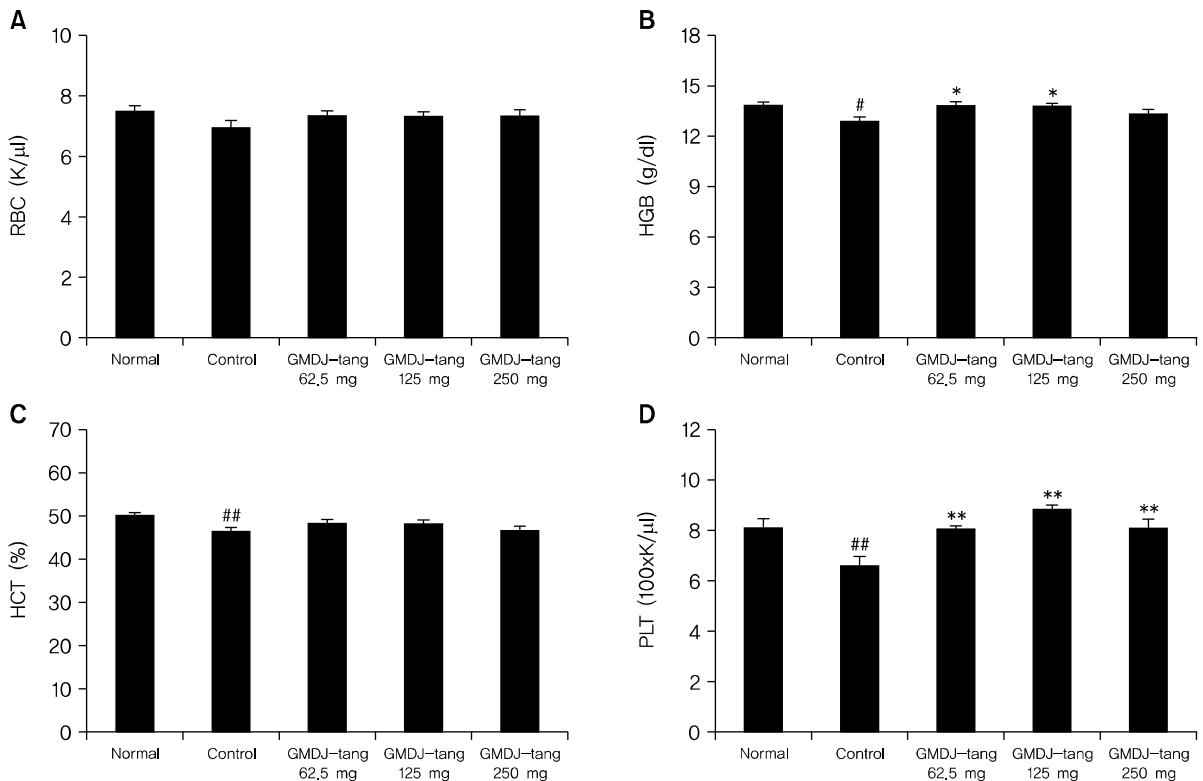


Fig. 9. Effect of GMDJ-tang administration on the Erythrocyte and Thrombocyte level in CMS rats. (A) Red blood cell; (B) Hemoglobin; (C) Hematocrit; (D) Platelet.

Values are expressed Mean \pm SE. The groups refer to Fig. 1.

^{##}p<0.01, compared with normal; ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, compared with control.

우울증과 유사한 한의학 개념은 울증(鬱證)으로 이는 초기에 기기(氣機)가 울체(鬱滯)되어 통창(通暢)하지 못하여 발생하는 병증이다. 최근 우울증을 억압과 침울한 정신 상태로 전반적 생리기능이 침체되는 현상이나, 이를 수 없는 욕구에 대한 불만족, 지속되는 우울, 지나친 사려 등이 원인이 되는 수가 많다고 한 바 한의학에서의 울증(鬱症)과 가깝다고 이해된다¹⁷⁾.

감맥대조탕은 『금궤요략(金匱要略)』에 “부인장조(婦人臟躁), 희비상욕곡(喜悲傷欲哭), 상여신령소작(象如神靈所作), 삭흡신(數欠伸), 감맥대조탕주지(甘麥大棗湯主之)”¹⁾ 최초로 수록된 이후 양심안신(養心安神) 화중완급(和中緩急) 시키기 위해 사용되었다¹⁸⁾. 임상에서는 신경의 흥분이 심한 것을 진정시키고 또한 여러 경련 증상을 완화시킬 때 사용하며, 히스테리, 신경쇠약, 불면, 정신병, 자궁경련, 경련성 기침, 하품을 자주하는 증상 등에 응용하고 있다³⁾.

감맥대조탕의 구성약물 중 감초는 화중완급(和中緩急), 윤편(潤肺) 효능이 있어 복통변당(腹痛便溏), 심계(心悸) 등에는 생용(生用)으로, 소화성 궤양, 용저창양(癰疽瘡瘍) 등에는 구용(灸用)으로 활용되며, 임상에서는 완복(腕腹)이나 사지런급작통(四肢攣急作痛) 등에 사용될 뿐 아니라 경락을 소통 시키는 약물로도 지칭된다. 감초의 약리작용을 보면 항염증작용, 항궤양 및 해경작용(解痙作用), 콜레스테롤 저하작용, 이뇨작용 등이 있어 위궤양, 십이지장궤양, 근경련 등에 활용한다^{19,20)}. 부소맥은 익기제열(益氣除熱)하는 효능으로 골증노열(骨蒸勞熱) 및 자한도한(自汗盜汗)에 활용하고²¹⁾, 양심안신(養心安神) 작용으로 허번(虛煩) 및 히스테리 등에도 활용한다⁷⁾. 대조는 익기생진(益氣生津)시키면서 영위(營衛)를 조화시키기 때문에 감초와 상합하여 익기생진(益氣生津), 보비생혈(補脾生血), 양심안신(養心安神)하는 효과상승으로 심계정충(心悸怔忡), 부인장조증(婦人臟躁症)에 활용한다²¹⁾.

감맥대조탕에 대한 실험적 연구로는 정⁹⁾이 생쥐를 이용한 실험에서 감맥대조탕이 국소 뇌혈류량의 증가와 평균혈압과 심근수축력을 증가시키는 효과가 있음을 보고하였고, 문¹⁰⁾이 난소를 절제한 생쥐에서 감맥대조탕 투여가 갱년기 우울증의 스트레스 반응을 둔화시키고 불안반응을 억제할 수 있다고 보고한 바 있으며, 홍⁶⁾이 여성의 불안 및 우울, 불면증에서 감맥대조탕이 Melatonin과 Serotonin 분비와 관련한 작용을 보고하였으며, 백⁷⁾은 감맥대조탕이 우울

및 불안검사와 학습 및 기억검사에 있어 유효하게 작용하고, 혈청 스트레스 호르몬인 corticosterone의 분비가 억제되는 항우울화 효과가 있음을 보고하였다.

스트레스는 적응을 요구하는 여러 유해인자로 인해 체내에 생긴 손상과 내외적 자극을 방어하기 위한 체내 반응이 합해진 것으로, 생체 불균형을 일으키는 내외부의 원인에 의해서 일어나는 유기체내의 변화를 의미한다²¹⁾. 이에 착안하여 이번 연구에서 적응을 요구하는 환경의 다양한 변화, 즉 주야 광선 역조절, 소음, 환경, 먹이, 노동 등의 조작적 조건을 가하여 만성 스트레스를 유발하기로 하였다.

저자는 감맥대조탕이 만성스트레스 유발 생쥐의 항우울 작용에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3주간 생쥐에게 먹이 박탈, 빈 물병제시, 강제운동, 소음, 주야 주기 역전, 강제수영, 빛 깜빡임, 케이지 기울이기와 흔들기, 고밀도 사육, 물 박탈, 젖은 깔짚 등과 같은 스트레스를 가함과 동시에 감맥대조탕을 투여하면서 먹은 량 및 물량을 확인하였다. 감맥대조탕 성분별 용량은 방제학 교과서(감초 9 g, 부소맥 18 g, 대조 6 g), 임상응용 한방처방해설(감초 5 g, 부소맥 20 g, 대조 6 g)으로^{3,19)} 용량이 책마다 다르고, 부소맥에 대한 의견이 일치되지 않은 부분이 있었다. 또한 복용의 간편성과 용량 제조의 정확성을 위하여 일본한방제약회사(Tsumura)에서 나온 복합 추출물을 이용하여 실험하였다 (Table 1).

우울증과 관련하여 신경전달물질인 Serotonin 함량을 측정하고, PCR기법을 활용하여 학습 및 기억과 관련된 BDNF와 TrkB 활성화에 미치는 영향을 관찰하였으며, 스트레스 상황과 관련한 혈중 glucose 농도를 측정하였고, 생쥐의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 뒤 혈구 성분변화를 관찰하고, 생쥐의 증체량 변화를 측정하였다. 그리고 감맥대조탕의 생쥐에 대한 항우울효과에 미치는 효과뿐만 아니라, 감맥대조탕의 용량에 따른 효능 정도에 대하여 실험적으로 살펴보고자 하였다.

실험결과 감맥대조탕이 생쥐의 Serotonin 함량에 미치는 영향에 대하여 대조군의 경우 6.95±0.44 pg/ml로 정상군에 비하여 감소의 경향을 보였고, 실험군의 경우 대조군에 비하여 감맥대조탕 125 mg군이 유의한 증가를 나타내었으며, 정상군과는 함량 변화가 크지 않아 유의한 결과를 보였다. 우울증의 경우 중추신경계의 신경전달물질 중 하나인 Serotonin의 양이 부족하게 되면 유발되는데, 항우울제의

대부분은 시냅스에 있는 Serotonine의 농도를 높이는 약리 작용을 가지고 있다⁵⁾. 이에 감맥대조탕 125 mg군에서의 Serotonine의 유의성 있는 증가를 통해 감맥대조탕이 만성 스트레스로 인한 항우울에 효과적으로 작용함을 알 수 있다.

우울증은 학습 및 기억력 저하를 흔히 동반한다¹¹⁾. 많은 연구들에서 해마의 BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)가 신경세포 생존과 퇴행의 예방, 학습 및 기억 과정 중 시냅스 기능과 신경가소성을 조절한다는 사실을 지지하고 있다^{12,13)}. BDNF 단백질은 중추신경계의 신경세포체, 축삭 돌기, 수상돌기 안에 광범위하게 분포되어 있는데²²⁾, 국소적으로 발현된 BDNF는 시냅스 전달 및 시냅스 생성을 조절하며²³⁾, 세포 표면의 TrkB (Tyrosine receptor kinase B)와 결합하여 다양한 세포내 신호전달체계를 개시한다⁹⁾. BDNF와 TrkB결합은 CREB (cAMP response element binding protein)의 발현을 촉진하는데¹⁰⁾, 해마에서의 BDNF와 CREB 발현의 감소와 인지기능 장애와의 사이에 밀접한 상관관계가 있음을 선행 연구들이 제시하고 있다⁶⁾.

본 실험연구에서는 생쥐의 뇌를 적출하여 Total RNA를 분리한 후 PCR기법을 활용하여 BDNF와 TrkB 활성화에 끼친 효과 관찰 결과, BDNF는 대조군에 비하여 GMDJ-tang 62.5 mg군, GMDJ-tang 125 mg군이 유의한 증가를 나타내었고, TrkB의 경우 대조군에 비하여 GMDJ-tang 125 mg군이 유의한 증가를 보였고, 정상군과 비교하여 큰 차이가 없어 감맥대조탕의 학습 및 인지기능과 관련한 BDNF 및 TrkB 활성화에 효과가 유의미하다.

생쥐의 체중을 스트레스 시작 5일전, 스트레스 시작일, 스트레스 5일, 10일, 15일에 측정된 결과, 정상군에 비하여 대조군의 체중은 감소하는 경향을 보인 반면에, 대조군에 비하여 실험군은 5일째에 체중이 증가하는 경향을 보였고, 10일째에 실험군 모두 유의한 증가를 나타내었고, 15일째 증가의 경향을 나타내었다.

지속적 스트레스는 코티졸을 분비시키고, 코티졸은 간에 작용하여 간에 저장되어 있는 글리코젠을 혈중으로 보내는 작용을 하여 결과적으로 혈당을 상승시킨다²⁴⁾. 생쥐의 혈액 내 glucose 함량에 감맥대조탕 투여가 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 GMDJ-tang 125 mg 군이 유의한 감소를 보여 감맥대조탕이 스트레스로 인한 혈당 조절에 효과가 관찰되었다.

생쥐의 혈청 AST 및 ALT 함량에 대한 감맥대조탕의 영향

을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 각 실험군은 유의한 변화를 일으키지 않았다.

혈액 검사에서 Leukocyte 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, Monocyte, Eosinophil의 경우 대조군에 비하여 실험군의 경우 정상군과 비교하였을 때, 감소경향이 크게 나타나지 않았다. 그리고 Hemoglobin, PLT의 경우 대조군에 비하여 실험군에서 증가하는 경향을 보였으나, 정상군에 비해서는 유의성은 나타나지 않았다. 스트레스로 인해 혈구세포가 영향을 받게 되는데, 감맥대조탕 투여 실험군의 경우 정상군과 비교하였을 때 혈구세포에 큰 영향을 미치지 않는다고 볼 수 있다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 감맥대조탕이 만성스트레스를 유발한 생쥐에서 중추신경계 신경전달물질인 Serotonine의 분비가 증가하고, 학습 및 기억과 관계된 BDNF 및 TrkB 활성화에서 유의한 증가를 보였으며, 증체량의 변화에 있어서 유의미한 증가를 보였다. 그리고 스트레스를 받으면 증가하는 혈중 glucose 함량이 감소하고, 혈청 및 혈액 검사에서 감맥대조탕이 위대한 영향을 끼치지 않는다는 것을 알 수 있다.

이번 연구는 먹이, 환경적 스트레스 인자로 인해 발생한 우울에 대하여 감맥대조탕의 효과를 확인하기 위해 시행되어, 스트레스 상황에 발생하는 여러 신체생리적 지표로 우울증에 대항하는 감맥대조탕의 효과를 확인할 수 있었다. 그러나 우울증은 불면증, 쾌감 감소, 의욕 저하 등의 정신생리적 측면을 동반하는 질환이므로 향후 이에 관한 객관적이고 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각 된다.

V. 결론

감맥대조탕 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 혈청 Serotonin, BDNF, TrkB, 혈중 glucose 함량, 증체량 변화 및 혈액혈구세포 변화에 미치는 영향을 관찰한 바, 다음의 결론을 얻었다.

1. 감맥대조탕이 CMS 유발 생쥐의 Serotonin 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, GMDJ-tang은 대조군의 감소에 비하여 정상군 수준으로 감소 억제되었으며, GMDJ-tang 125 mg군이 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었다.

2. 감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 BDNF 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조

군이 유의한 감소를 나타내었고, GMDJ-tang은 감소억제 효과가 나타났으며, 62.5 mg군, 125 mg군은 유의한 감소 억제 효과가 나타났다.

3. 감맥대조탕이 CMS 유발 생쥐의 TrkB 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 유의한 감소를 나타내었고, 대조군에 비하여 GMDJ-tang은 감소 억제 효과를 보였으며, 125 mg군은 대조군보다 유의성 있는 상승이 나타났다.

4. 감맥대조탕의 CMS 유발 생쥐의 증체량 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군이 지속적으로 체중 증가한 반면, 대조군은 CMS 5일째에 감소, 10일째에 유의한 감소, 15일에 감소되었다. 대조군에 비하여 실험군은 CMS 5일째에 증가, 10일째에 실험군 모두 유의한 증가, 15일째에 증가의 경향을 나타내었다.

5. 감맥대조탕의 CMS 유발 생쥐의 혈중 glucose 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군에 비하여 대조군이 유의한 증가를 나타내었다. 대조군에 비교하여 GMDJ-tang은 감소효과가 나타났으며, 125 mg군은 유의성 있는 감소를 보였다

6. 감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 혈청 AST, ALT 함량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상군, 대조군, 각 실험군에서 유의성은 있는 차이는 나타나지 않았다.

7. 감맥대조탕의 용량별 투여가 CMS 유발 생쥐의 Leukocyte, Erythrocyte 및 Thrombocyte 변화에 미치는 영향을 관찰한 결과, White Blood Cell, Red Blood Cell, Neutrophil에서 정상군, 대조군, 실험군에서 유의한 변화가 나타나지 않았고, Lymphocyte, Monocyte는 대조군에서 유의성 있고 감소, 실험군은 감소억제하였고, Eosinophil은 대조군에서 유의성 있게 상승되었고, 실험군은 상승억제가 나타났다. Hemoglobin, Hematocrit, PLT은 대조군에서 유의성 있는 감소를 보였고, 대조군에 비하여 Hemoglobin, PLT는 실험군에서 유의성 있는 증가를 보였다.

REFERENCES

- Zhang ZG. Jinkuiyaolue. Beijing:People's medical publishing house. 1989:597.
- Heo J. Dongeui bogam. Namsandang. 1998:996.
- Yakazu T. Korean medical prescription's explanation of clinical application. Yibang publishing company. 2008:13.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders fifth edition. Seoul:Hakjisa. 2016:163-197.
- Jun SA. Synthesis and biological evaluation of novel serotonin modulators as antidepressants. Ewha womans university the graduate school department of chemistry. 2007:141-2.
- Hong YY, Lee TK, Moon IS, Kim DI. A study on melatonin, serotonin secretion change and behavior in the rats treated with Yiseontang, Gammakdae jotang, and Sanjogam-maktang. The journal of oriental obstetrics and gynecology. 1999;12(1):209-30.
- Baek H, Kim JH. The effects of Gammaekdaejo-tang (Ganmaidazao-tang) on rats subjected to stress by immobilization. Journal of Korean oriental medicine. 2007;28(3):183-96.
- Cheng SE, Xu BF, Jiang GH, Xia YH. Zhongyaoxinf. Beijing science technology publishing house. 1994:391-2.
- Jeong HW, Min BI, Rho YH. Experimental effects of Gammaekdaejo-tang and its constituent herbs on the regional cerebral blood flow and cardiovascular system. Korean journal of oriental physiology & pathology. 2001;15(4):590-4.
- Moon HJ, Im EM, Shin KH. Influence of Gammakdaejo-Tang on brain Fos-like immunoreactivity in response to immobilization stress in ovariectomized rats. The journal of oriental obstetrics and gynecology. 2002;15(2):25-40.
- Cho SY, Lee GC, Lee JH, Kim HT. Effects of fluoxetine on the retention of passive avoidance conditioning in an animal model of depression. Korean journal of cognitive and biological psychology. 1996;8(1):49-60.
- Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. Life sci. 2002;70(7):735-44.
- Yamasaki Y, Shigeno T, Furukawa Y, Furukawa S. Reduction in brain-derived neurotrophic factor protein level in the hippocampal CA1 dendritic field precedes the delayed neuronal damage in the rat brain. J neurosci Res. 1998;53(3):318-29.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell. 2000; 103(2):211-25.
- Leung MC, Yip KK, Ho YS, Siu FK, Li WC, Garner B. Mechanisms underlying the effect of acupuncture on cognitive improvement : a systematic review of animal studies. J neuroimmune pharmacol. 2014;9(4):492-507.
- Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Deng Q, Wu H, Bao W, Wang D, Yao P, Huang F, Liu L. Memory impairment in cognitively impaired aged rats associated with decreased hippocampal CREB phosphorylation : reversal by procyanidins extracted from the lotus seedpod. J gerontol a biol sci med sci. 2010;65(9):933-40.
- Hwang UW, Kim JH. Dongeui psychiatry. Hyundai medical publishing company. 1992:576-7.

18. School of Korean medicine, class of oriental medical prescription. Oriental medical prescription. Youngrimsa. 2012:332.
19. School of Korean medicine, class of herbology. Herbology. Youngrimsa. 1999. 540-3, 608-9.
20. Wang YS. Zhongyaoyaoliyuyingyong. People's medical publishing house. 1983:264-77.
21. Hwang UW. Psychosomatic disease. Haenglim publishing company. 1985:18-24, 36-44.
22. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. J biol chem. 2001;276(16):1260-6.
23. Tongiorgi E. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. Neurosci res. 2008;61(4):335-46.
24. The Korean society of biosociobehavioral science. Understanding the science of stress. Shingwang publishing company. 1997:117.