



Original Article / 원저

防己茯苓湯이 흰쥐에서 LPS로 유도된 우울증에 미치는 효과

박성준, 이태희*

가천대학교 한의과대학 방제학교실

Effect of Banggibongnyeongtang on LPS-induced Depression in rats

Sung jun Park, Tae Hee Lee*

Department of Formulae Pharmacology, College of Korean Medicine,
Gachon University

ABSTRACT

Objective : This study is conducted in order to investigate the effect of Banggibongnyeongtang(BBT) on Lipopolysaccharide (LPS)-induced depression.

Method : LPS 5 μ g was injected to lateral ventricle. Experimental groups were administered BBT intraperitoneally. Depressive behavior was confirmed by weight change, sucrose preference, open field test(OFT), and forced swimming test(FST). The plasma concentration of IL-1 β and TNF- α , Corticotropin-Releasing Factor(CRF), Adrenocorticotropin Hormone(ACTH) and Corticosterone(CORT) were measured by ELISA.

Result : BBT did not change the body weight significantly than LPS group, but on sucrose preference, BBT increased significantly in LPS+BBT400 group compared to LPS group ($P<0.05$). In the OFT, BBT increased spending time in the central zone and decreased grooming number. LPS+BBT400 group increased central zone-spending time, and decreased grooming number than LPS group significantly ($P<0.05$). In the FST, LPS+BBT400 group decreased immobility time than LPS group significantly ($P<0.05$). BBT decreased IL-1 β concentration does-dependently, but only with significant decrease in LPS+BBT400 group than LPS group in plasma ($P<0.05$). But BBT did not decrease TNF- α concentration significantly in plasma. BBT decreased plasma CRF, ACTH, and CORT. And CRH and CORT of LPS+BBT400 group were shown significant decrease comparing with LPS group ($P<0.05$).

Conclusion : It is postulated that the anti-depressant effect of BBT can be validated through inhibition of HPA axis abnormal activity by the anti-inflammatory effect.

© 2019 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Key words : Banggibongnyeongtang, LPS, Antidepressant, Behavior, cytokine, HPA axis

I. 서론

우울증은 기분의 뚜렷한 변화로 나타나며 슬픔이나 초조함 그리고 몇 가지의 정신 생리적인 변화가 수반된다. 특징적인 증상은 수면, 식욕, 혹은 성욕의 장애, 변비, 일이나 친구들과의 관계에서 즐거움 상실, 울음, 자살에 관한 생각들, 그리고 말과 행동이 느려지는 등이다. 이런 증상이 적어도 2주는 지속되어야 하고, 이 증상 때문에 일과 정상적인 가족관계가 방해된다.¹⁾

한의학적으로 우울증은 울증(鬱證)으로 보는 경향이 대부분이다. 울(鬱)의 개념은 억압되고 침울한 정신 상태를 말하며, 이로 인하여 모든 생리기능이 저하되는 현상을 말한다. 표현을 못하고 가뒀는 경우나 지나친 걱정, 슬픔 등이 원인이 되는 경우가 많다²⁾. 최근에 한약이 항 우울제와 비슷하게 monoamine oxidase activity를 감소시켜 항 우울 효과를 낸다는 보고가 있었다³⁾.

우울증의 원인을 설명하는 가설로 최근 염증가설이 나왔는데, 이 가설에 의하면 proinflammatory cytokine의 증가가 indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) 활성을 증가시킴으로써, 신경독성을 유발하는 N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA R)의 작용이 활성화되어서, neuron death가 유발되어 우울증을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 또한 염증 가설을 기반으로 한 우울증에 대한 연구로는 이 등⁵⁾이 시호(柴胡) 추출물로 Lipopolysaccharide(LPS)로 유도한 우울증 동물 모델에서 항 염증 효과를 통해 항우울 효과가 있음을 보고하였으며, 고 등⁶⁾이 감초(甘草)추출물로 LPS로 유도한 우울증 모델에 항 염증효과를 통해 항 우울 효과가 있음을 보고 된 바 있다. 최근 防己茯苓湯(Banggibongnyeongtang, BBT)의 항 염증 효과가 보고 되었으며⁷⁾. 구성약물 중 황기는 Hippocampus에서 신경가소성 단백질 발현을 증가시킨다는 보고가 있었으며⁸⁾, 모든 구성약물들에서 항

염증 효과가 있음이 약리학적으로 밝혀졌다⁹⁾.

이에 저자는 흰쥐에 LPS 주입으로 염증을 유발한 뒤 Forced Swimming Test (FST), Open field test (OFT)를 시행한 뒤, Corticosterone (CORT), Corticotropin-Releasing Factor (CRF), Adrenocorticotropin Hormone (ACTH), Interleukin-1 beta (IL-1 β), Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α)의 농도를 혈장에서 확인하여 防己茯苓湯의 항 우울 효과를 확인한 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 연구방법

1. 실험 재료 및 방법

1) 실험 동물

실험 동물은 숫컷 흰쥐 成體로 Sprague-Dawley 계이고 Samtaco Animal Co. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 모든 실험은 동물이 실험실에 도착한 7일 이후, 환경에 적응시켜 실험에 사용하였다. 이 흰쥐는 각 플라스틱 사육 상자에 5 마리 내로 길렀다. 실험실 온도는 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도는 55 \pm 15%가 유지 되도록 조절하였고, 매일 12시간 동안 인공 햇빛을 쬐어 주었다. 흰쥐에게는 무제한으로 살균된 물과 고형 사료를 실험기간 동안 공급하였다.

2) 약제

Table 1. Herbal Constitution of BBT

Korean (Chinese) name	Pharmaceutical name	Dose (g)
방기(防己)	Stephaniae Tetrandrae Radix	36
황기(黃芪)	Astragali Radix	36
복령(茯苓)	Poria	72
계지(桂枝)	Cinnamomi Ramulus	36
감초(甘草)	Glycyrrhizae Radix	24
Total Amounts		204

*Corresponding author : Tae Hee Lee, Department of Formulae Pharmacology, College of Korean Medicine, Gachon University, 1342, Seongnam-daero, Sujeong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13120, Republic of Korea.

Tel: +82-31-750-5418, Fax: +82-31-750-5416, E-mail: ophm5418@gachon.ac.kr

• Received : March 12, 2019 / Revised : May 13, 2019 / Accepted : May 15, 2019

防己茯苓湯(BBT) 204 g을 가루내어 섞어 정확히 200 g으로 평량한 후, 85% 메탄올을 사용하여 3 회 추출하였으며, 추출물을 감압 농축한 후, 그 추출물을 동결건조시켜 분말 건조하였다. 건조시켜 얻은 양은 25 g으로써, 수율은 12.5%였다.

2. 실험

1) 실험군

실험쥐는 무작위적으로 몸무게에 따라 6마리씩으로 6 그룹으로 나누었다. LPS를 투여하지 않고 약제 대신 생리식염수를 주사한 군(0.9% NaCl, i.p., SAL group, n=6), LPS를 투여하고 매일 14일 동안 생리식염수를 주사한 군(0.9% NaCl, i.p., LPS group, n=6), LPS를 투여하고 매일 14일 동안 100 mg/kg의 防己茯苓湯(BBT)을 주사한 그룹(i.p., LPS+BBT100 group, n=6), LPS를 투여하고 매일 14일 동안 200 mg/kg의 防己茯苓湯(BBT)을 주사한 그룹(i.p., LPS+BBT200 group, n=6), LPS를 투여하고 매일 14일 동안 400 mg/kg의 防己茯苓湯(BBT)을 주사한 그룹(i.p., LPS+BBT400 group, n=6)으로 나누었다. 防己茯苓

湯(BBT)과 식염수는 14일간 복강 내로 주사하였다.

2) LPS 처리

염증에 의한 우울증 동물모델을 만들기 위해서, 쥐에 sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.)로 마취시킨 후 stereotaxic technique를 이용하여 lateral ventricle (AP: -0.2, L: ±0.3, H: -6.2) 위치에 LPS (Escherichia coli; 055:B5, Sigma)를 5 µg을 양쪽으로 주입하였다^{10, 11}. 미세주입은 1 ml gas-tight glass syringe (Hamilton, Reno, NY)에 폴리에틸렌 튜브 (polyethylene tubing)로 연결하여 관류용 펌프(perfusion pump, Pump 22, Harvard Apparatus, South Natick, MA)를 이용하여 2 µl/min 유속으로 주입 후에 5분간 방치한 다음 주사기(syringe)를 제거하였다. 각 손상군에 대한 약물처치는 그 다음날부터 시행하였다. 모의 시술군은 손상 약물 대신 140 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM Na₂HPO₄로 만든 인공뇌척수액 (artificial CSF)을 같은 방식으로 주입하였다. 이 모든 실험과 행동측정 과정은 다음과 같다. (Fig. 1)

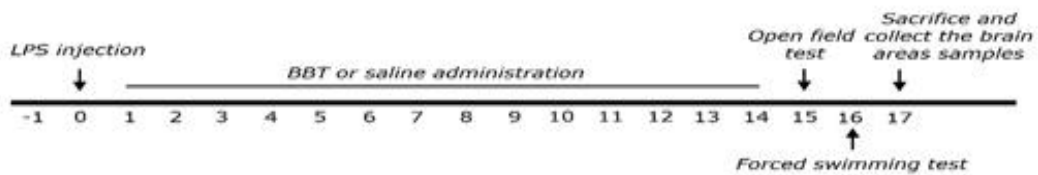


Fig. 1. Experimental schedule for developing lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors, and BBT treatment in rats. Separate groups of rats (n=6 animals per group) were used for all experiments.

3) 체중관찰

Digital mass meter를 이용하여 LPS가 주입되기 시작한 날부터 14일 동안 매일 체중을 관찰하였다.

4) 자당 섭취량 측정

모든 쥐에 대해 매주 한 차례씩 1% 자당 용액 섭취량을 측정하였다. 10시간 물, 먹이를 박탈한 상태에서 1% 자당용액에 1시간 동안 노출시켰으며, 노출 전과 후의 용기 무게를 기록함으로써 자당 용액의 섭취량을 측정하였다. 각 집단의 자당 용액 섭취량은 모두 2주 동안 측정되었다. 본 연구에서 지표로 사용된 자당 선호도(%)는 (자당 섭취량 × 100)/(물 섭취량 + 자당 섭취량)으로 정의되었다¹².

5) OFT

LPS 처치가 활동량에 미치는 영향을 알아보기와, 개방장(Open field)에서의 행동을 관찰하였다. 우선 LPS처치에 들어가지 전 개방장에서의 행동을 관찰하고, 4주간의 약물 투여 후에 행동을 관찰하였다. 실험에 이용된 개방장은 60×60×30 cm 규격의 나무로 만든 상자이며, 바닥에는 15 cm 간격의 가로, 세로선으로 바둑판 모양의 구획이 나뉘어져 있다. 5분 동안의 개방장에서의 행동을 관찰하였고, 보행활동(locomotion)을 비롯한 대표적 행동들을 기록하였다. 보행활동은 바닥의 구획선을 기준으로 5분 동안 전체 개방장을 가로, 세로로 이동한 빈도를 기록한다. 개방장의 활동 중 쥐의 통과 구획이 어느 위치에

해당되느냐에 따라, 센터링(centering)의 점수를 채점하였다. 개방장이 외곽을 이루는 12개 구획에서의 이동은 주변(peripheral) 접근이 되고, 가운데 영역에 해당되는 4개 구획은 중간(central) 접근에 해당된다. 또는 5분 동안 개방장안에서 rearing 횟수, grooming 횟수 및 개방장안에서의 움직임 거리(Activity count)를 함께 측정하였다¹³⁾.

6) FST

강제 수영 부하 실험(FST)은 동물 행동 실험으로 항우울제의 효과를 측정하기 위해 흰쥐에게 자주 사용되는 방법이다. 흰쥐는 강제 수영 부하 실험에서 입수 후 처음 수 분간은 물에서 벗어나기 위해 심한 저항을 보이나, 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어나고, 우울 경향이 있을수록 부동자세를 취하는 시간이 길어지게 된다. 투명한 아크릴 원통형 수조(지름 20 cm × 높이 50 cm)에 25°C 온도의 물을 30cm 높이로 가득 채웠다. 이 깊이는 수조의 바닥에 흰쥐의 꼬리나 뒷발이 닿지 않게 한다. 실험 15일째에 모든 그룹의 쥐들을 물이 채워진 수조에 넣어서 15분간 훈련시켰다. 실험 15일째에 5분간 흰쥐를 강제수영 부하 실험을 시행하였고, 실험 중의 도망가려는 행동(기어오르고 수영하는 동작)과 부동 행동을 측정하였다. 부동 행동 시간은 5 분간의 실험을 통해서 수치화 하였다. 기어오르는 동작은 앞발로 아크릴 원통형 수조 위로 올라오려고 사지를 다 쓰는 상태이고, 수영하는 동작은 흰쥐가 수면 위를 돌면서 움직여 수조의 다른 1/4 부분으로 이동하는 것을 포함하였다. 부동 행동은 도망가려는 반응을 보이지 않은 시간의 정도를 계산하였다(총 실험 시간 - 수영과 기어오르는데 소요된 시간). FST에서의 실험쥐의 행동은 수조 위쪽에 비디오카메라를 이용하여 모두 기록하였다. FST를 시행한 이후의 실험쥐들은 수조에서 꺼내 타올로 물기를 말리고 사육 상자에 다시 넣었다. 수영을 한 수조의 물은 각 실험동물마다 새로 교체하였다¹⁴⁾.

7) CRF, ACTH, CORT, IL-1 β 및 TNF- α 의 측정
실험동물 모두 행동 실험이 끝난 후 같은 날 decapitation 시켰다. 실험방법은 기존의 논문을 참조하였다. 혈액 샘플은 혈장 CORT, CRF, ACTH, IL-1 β 및 TNF- α 수치를 측정하기 위해 채취하였

다. 마취되지 않은 채로 흰쥐를 decapitation 시켰으며, 혈액은 복부 대동맥에서 채취하였다. 수집된 혈액을 4000 g으로 10분 원심분리하고, 혈장은 -20°C에서 채취하여 보관하였다. 농축된 CORT는 rabbit polyclonal CORT antibody (Novus Biologicals, LLC., Littleton, CO, USA), CRT는 rabbit polyclonal CRF antibody (Novus Biologicals), ACTH는 a rabbit polyclonal ACTH antibody (Novus Biologicals), IL-1 β 는 rabbit polyclonal IL-1 β antibody (Abcam, Cambridge, MA, USA), 및 TNF- α 는 rabbit polyclonal TNF- α antibody (Abcam) 프로토콜을 이용하여 competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA)로 측정하였다. 표본은 판에 옮겨져서 한 시간 동안 실온에서 공기에 노출시켜 배양하였다. 표본을 buffers로 몇 번 씻어 내고 발색 시킨 후 450 nm에서 ELISA reader (MutiRead 400; Authos Co., Vienna, Austria)로 optical density를 측정하였다¹⁵⁾.

3. 통계 처리

모든 측정값은 맹검하여 시행되었다. 모든 측정값은 (평균값±표준오차)로 표시하였다. 각 실험군의 통계학적 분석은 windows용 SPSS를 이용하고 사후 Tukey's post-hoc test로 검정하였다. P값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

III. 결과

1. BBT의 몸무게 증가와 자당 섭취량에서의 효과

LPS로 유도된 우울증 동물모델에서 防己茯苓湯을 투여한 후 몸무게(body weight)와 자당 섭취량(sucrose preference)의 변화를 측정하였다.

SAL group의 몸무게는 1일에 205.5 ± 6.5 g, 14일에 308.1 ± 4.3 g으로 129.0 ± 4.0% 증가하였으나, LPS group에서는 1일에 241.2 ± 8.8 g, 14일에 258.6 ± 6.3 g으로 107.5 ± 2.3% 증가하여 8일째부터 SAL group에 비하여 증가량이 유의하게 감소하였다(p<0.001). LPS+BBT 100 group에서 1일에 258.2 ± 8.3 g, 14일에 289.3 ± 7.1 g으로 112.2 ± 1.9% 변화했으며, LPS+BBT 200 group에서 1일에 227.9 ± 4.4 g, 14일에 258.5 ± 1.4 g으로 113.6 ± 1.9%으로 변화하였다. LPS+BBT 400 group에서 1일에 191.2 ± 3.9 g, 14일에 244.1 ± 5.1 g

으로 $109.5 \pm 2.4\%$ 증가하였으나 실험군 모두 LPS group과 유의한 차이가 없었다.

자당 섭취량은 SAL group에서 1일에 $69.1 \pm 0.9\%$, 14일에 $87.6 \pm 3.1\%$ 증가하였으나, LPS group에서는 1일에 $72.8 \pm 8.4\%$, 14일에 $57.8 \pm 3.3\%$ 로 감소하여 14일에 SAL group에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). LPS+BBT 100 group에서

1일에 $70.1 \pm 6.6\%$, 14일에 $73.1 \pm 5.9\%$ 변화했으며, LPS+BBT 200 group에서 1일에 $76.6 \pm 6.6\%$, 14일에 $72.9 \pm 6.1\%$ 으로 변화했다. LPS+BBT 400 group에서 1일에 $69.3 \pm 4.5\%$, 14일에 $82.2 \pm 4.6\%$ 로 증가하여, LPS+BBT400 group 은 LPS group에 비하여 14일에 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). (Fig. 2)

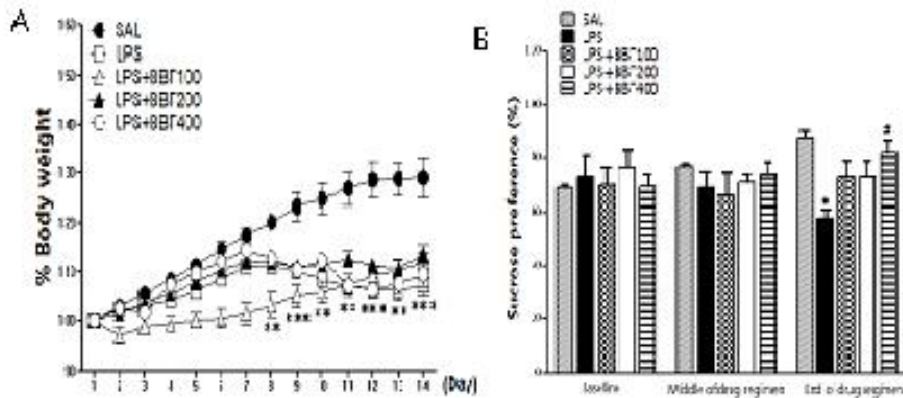


Fig. 2. Effects of BBT on body weight (A) and sucrose intake (B) in rats exposed to LPS. LPS 5 μ g were injected in lateral ventricle. Experimental group were administered i.p.. Body weight counts were significantly lower in LPS-exposed rats versus saline-treated (SAL) group.

SAL group : Saline

LPS group : LPS + saline

LPS+BBT100 group : LPS + BBT (100 mg/kg)

LPS+BBT200 group : LPS + BBT (200 mg/kg)

LPS+BBT400 group : LPS + BBT (400 mg/kg)

*,**,*** : Significant difference compared with the SAL group ($p < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)

: Significant difference compared with the LPS group ($P < 0.05$)

2. BBT의 OFT에서의 효과

LPS로 유도한 우울증 동물모델에서 BBT를 투여한 후 OFT를 시행하여 행동변화를 관찰하였다. 중심 공간(central zone)으로 모인 센터링(centering) 횟수는 SAL group에서 9.50 ± 1.41 회인데 비하여 LPS group에서는 3.00 ± 0.52 회로 SAL group에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.01$). LPS+BBT100 group에서 4.83 ± 0.31 회, LPS+BBT200 group에서 5.67 ± 0.88 회, LPS+BBT400 group에서 7.00 ± 0.68 회로 BBT에서는 증가하는 경향을 보였다.

중심 공간에 머무른 시간 비율의 경우 SAL group에서 $22.56 \pm 3.02\%$ 였고, LPS group에서는 $8.72 \pm 1.53\%$ 로 SAL group에 비하여 유의하게 감소하였

고($p < 0.001$), LPS+BBT100 group에서 $8.17 \pm 0.58\%$, LPS+BBT200 group에서 $13.44 \pm 1.62\%$, LPS+BBT400 group에서 $18.61 \pm 1.67\%$, LPS+BBT400 group은 LPS group에 비해 중심 공간에서 보내는 시간 비율이 유의하게 증가하였다($P < 0.05$, $P < 0.01$).

Rearing 횟수를 측정한 결과 SAL group에서 9.83 ± 0.87 회인데 비해, LPS group에서는 18.50 ± 2.32 회가 측정되어 SAL group에 비하여 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). LPS+BBT100 group에서 16.17 ± 1.66 회, LPS+BBT200 group에서 15.00 ± 1.13 회, LPS+BBT400 group에서 12.00 ± 2.31 회를 기록하여, 유의성 없이 감소하는 경향만 보였다.

Grooming 횟수의 경우 SAL group에서 $3.50 \pm$

0.43 회, LPS group에서는 13.50 ± 1.31 회로 SAL group에 비하여 유의하게 증가하였다($p < 0.01$). LPS+BBT100 group에서 14.00 ± 2.38 회, LPS+BBT200 group에서 12.33 ± 2.29 회, LPS+BBT400 group에서 6.83 ± 0.60 회로 LPS+BBT400 group은 LPS group에 비해 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

총 움직임 거리(Moving distance)의 경우 SAL group에서 987.58 ± 50.01 cm, LPS group에서 935.63 ± 39.19 cm, LPS+BBT100 group에서

1076.95 ± 77.02 cm, LPS+BBT200 group에서 964.20 ± 67.72 cm, LPS+BBT400 group에서 1088.40 ± 86.95 cm로 모두 유의한 차이가 없었다.

주변 공간에서 머무른 시간비율은 SAL group에서 $59.44 \pm 1.11\%$, LPS group에서 $59.44 \pm 1.11\%$, LPS+BBT100 group에서 $58.33 \pm 1.77\%$, LPS+BBT200 group에서 $59.17 \pm 1.49\%$, LPS+BBT400 group에서 $61.50 \pm 1.52\%$ 로 모두 유의한 차이가 없었다. (Fig. 3)

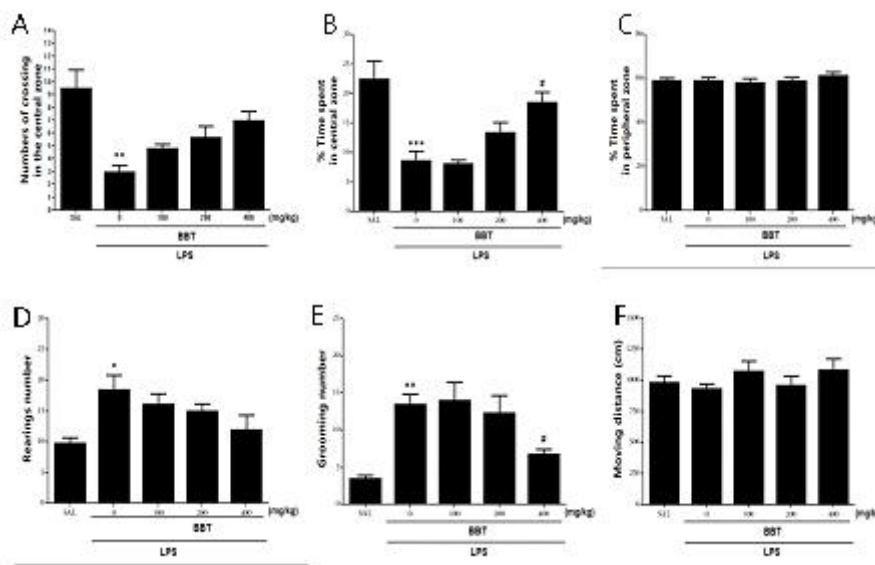


Fig. 3. The Effect of BBT on the Open Field test in the LPS-induced depressive-like behavior. LPS 5 μg was injected to lateral ventricle for 15 days before test. Experimental groups were administered I.p. for 14 consecutive days prior to test. Changes in the number of lines crossed in the central zone, in time spent in the central and peripheral zones, the number of rearing, the number of grooming bouts, and locomotor activity (moving distance).

SAL group : Saline + OFT

LPS group : LPS + saline + OFT

LPS+BBT100 group : LPS + BBT (100 mg/kg) + OFT

LPS+BBT200 group : LPS + BBT (200 mg/kg) + OFT

LPS+BBT400 group : LPS + BBT (400 mg/kg) + OFT

*,** : Significant difference compared with the SAL group ($p < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)

: Significant difference compared with the LPS group ($P < 0.05$)

3. BBT의 FST에서의 효과

LPS로 유도한 우울증 동물모델에서 BBT를 투여한 후 강제 수영 부하 실험을 시행하여 행동변화를 관찰

하였다.

부동행동 시간(Immobility time)은 SAL group에서 22.3 ± 5.1 sec, LPS group에서 50.5 ± 2.1 sec로

SAL group에 비하여 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). LPS+BBT100 group과 LPS+BBT200 group에서 각각 54.7 ± 8.9 sec와 37.5 ± 7.7 sec로 관찰되었고, LPS+BBT400 group에서 24.7 ± 3.5 sec로 LPS+BBT400 group은 LPS group에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.05$).

등반자세 시간(climbing time)은 SAL group에서 66.5 ± 5.3 sec, LPS group에서 34.3 ± 6.7 sec로 SAL group에 비하여 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). LPS+BBT100 group에서 39.3 ± 7.0 sec,

LPS+BBT200 group에서 57.3 ± 5.7 sec였고, LPS+BBT400 group에서 66.0 ± 3.9 sec로 LPS group에 비하여 유의한 차이가 났다($P < 0.05$).

수영자세 시간(swimming time)은 SAL group에서 211.2 ± 3.5 sec, LPS group에서 215.2 ± 6.6 sec, LPS+BBT100 group에서 206.0 ± 10.0 sec, LPS+BBT200 group에서 205.2 ± 5.4 sec, LPS+BBT400 group에서 209.3 ± 3.3 sec로 유의한 차이는 없었다. (Fig. 4)

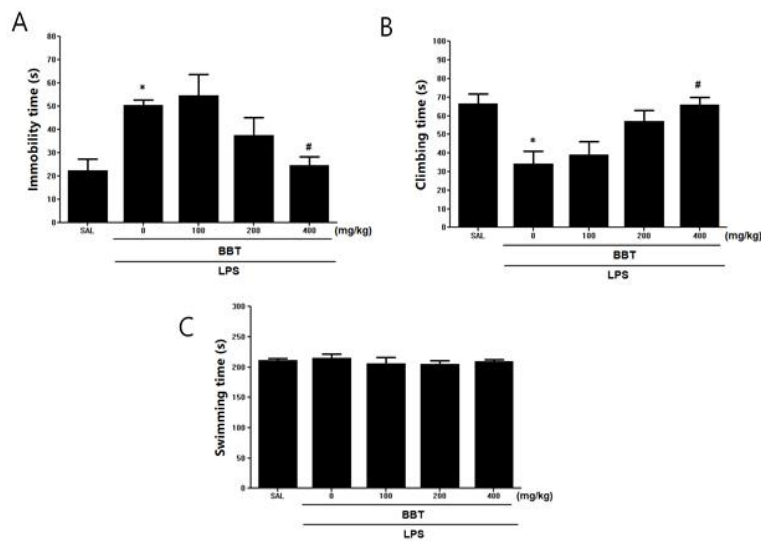


Fig. 4. The Effect of BBT on the Forced Swimming test in the LPS-induced depressive-like behavior. LPS $5\mu\text{g}$ was injected to lateral ventricle for 16 days before the test. Experimental groups were administered I.p. for 14 consecutive days prior to test.

SAL group : Saline + OFT, FST

LPS group : LPS + saline OFT, FST

LPS+BBT100 group : LPS + BBT (100 mg/kg) + OFT, FST

LPS+BBT200 group : LPS + BBT (200 mg/kg) + OFT, FST

LPS+BBT400 group : LPS + BBT (400 mg/kg) + OFT, FST

* : Significant difference compared with the SAL group ($p < 0.05$)

: Significant difference compared with the LPS group ($P < 0.05$)

4. BBT의 혈장에서의 IL-1 β , TNF- α 의 농도 대한 효과

LPS 로 유도한 우울증 모델에 BBT를 투약하여 혈장에서 pro-inflammatory cytokines(IL-1 β , TNF- α)의 농도와 발현을 확인하였다. SAL group에서 IL-1 β 는 84.42 ± 5.68 pg/mg, LPS group에서는 288.23 ± 31.61 pg/mg의 농도가 측정되어 SAL group에

비하여 유의하게 증가하였고($P < 0.05$), LPS+BBT100 group에서 217.93 ± 69.76 pg/mg, LPS+BBT200 group에서 154.12 ± 54.91 pg/mg, LPS+BBT400 group에서 89.45 ± 15.94 pg/mg으로 측정되어 LPS+BBT400 group은 LPS group에 비하여 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

TNF- α 는 SAL group에서 80.05 ± 1.53 pg/mg,

LPS group에서는 307.72 ± 42.99 pg/mg이 측정되어 SAL group에 비하여 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). LPS+BBT100 group에서 142.12 ± 18.01 pg/mg, LPS+BBT200

group에서 168.90 ± 51.92 pg/mg, LPS+BBT400 group에서는 182.23 ± 64.91 pg/mg로 감소하였으나 LPS group에 비해 유의성은 없었다. (Fig. 5)

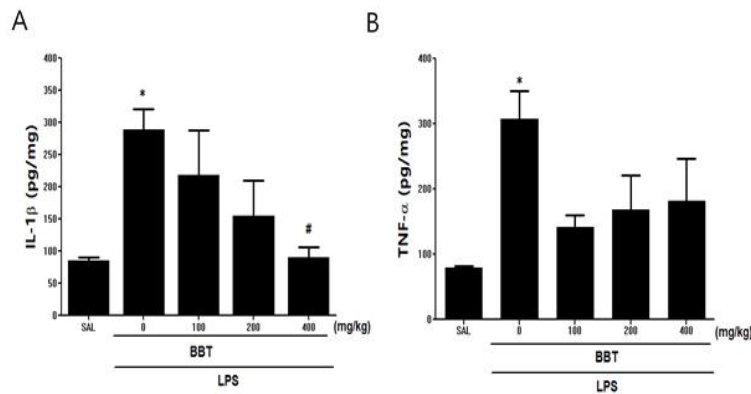


Fig. 5. Effects of BBT on IL-1β(A) protein and TNF-α protein (B) concentrations.

LPS 5μg was injected to lateral ventricle for 15 days before the first behavior test. Experimental groups were administered I.p. for 14 consecutive days prior to the test.

SAL group : Saline + OFT, FST

LPS group : LPS + saline OFT, FST

LPS+BBT100 group : LPS + BBT (100 mg/kg) + OFT, FST

LPS+BBT200 group : LPS + BBT (200 mg/kg) + OFT, FST

LPS+BBT400 group : LPS + BBT (400 mg/kg) + OFT, FST

* : Significant difference compared with the SAL group ($p < 0.05$)

: Significant difference compared with the LPS group ($P < 0.05$)

5. BBT의 혈중 CRH, ACTH, CORT 농도에 대한 효과

CRH 농도는 SAL group에서 31.33 ± 5.36 ng/ml, LPS group에서 120.00 ± 12.70 ng/ml로 측정되어 SAL group에 비하여 유의하게 증가하였다 ($P < 0.01$). LPS+BBT 100 group에서 80.00 ± 19.52 ng/ml, LPS+BBT 200 group에서 78.00 ± 3.51 ng/ml, LPS+BBT400 group에서 65.67 ± 7.45 ng/ml로 측정되어 LPS group에 비하여 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

ACTH 농도는 SAL group에서 42.67 ± 10.97 ng/ml, LPS group에서 103.67 ± 20.10 ng/ml가 측정되어 SAL group에 비하여 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$). LPS+BBT100 group에서 86.33 ± 7.31

ng/ml, LPS+BBT200 group에서 69.33 ± 7.86 ng/ml, LPS+BBT400 group에서 64.33 ± 1.20 ng/ml로 측정되어 LPS group에 비하여 농도 의존적으로 줄어들었으나 통계적 유의성은 없었다.

CORT의 농도는 SAL group에서 40.33 ± 2.91 ng/ml, LPS group에서 121.00 ± 13.58 ng/ml로 측정되어 SAL group에 비하여 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$). LPS+BBT100 group에서 99.00 ± 28.54 ng/ml, LPS+BBT200 group에서 85.67 ± 6.94 ng/ml로 측정되었고, LPS+BBT400 group에서 51.33 ± 6.84 ng/ml로 측정되어 LPS+BBT400 group에서 LPS group에 비하여 유의하게 감소하였다($P < 0.05$). (Fig. 6)

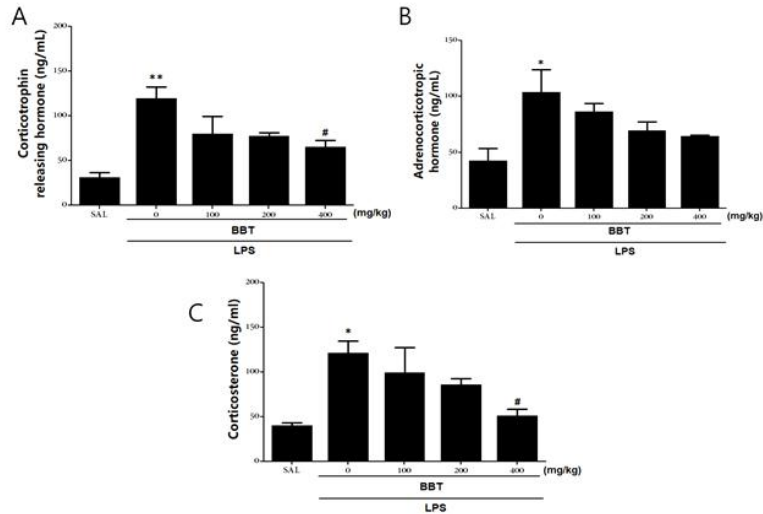


Fig. 6. Effects of BBT on Corticotrophin-Releasing Hormone (CRH)(A), Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH)(B), Corticosterone (CORT)(C) levels in plasma after lipopolysaccharide injection; assessed with an enzyme-like immunosorbent assay (ELISA).

LPS 5 μ g was injected to lateral ventricle for 15 days before the first behavior test. Experimental groups were administered I.p. for 14 consecutive days prior to the test.

SAL group : Saline + OFT, FST

LPS group : LPS + saline OFT, FST

LPS+BBT100 group : LPS + BBT (100 mg/kg) + OFT, FST

LPS+BBT200 group : LPS + BBT (200 mg/kg) + OFT, FST

LPS+BBT400 group : LPS + BBT (400 mg/kg) + OFT, FST

*,** : Significant difference compared with the SAL group ($p < 0.05, P < 0.01$)

: Significant difference compared with the LPS group ($P < 0.05$)

IV. 고찰

우울증은 다 측면으로 나타나는 복합적인 질환으로서 유전적 발달소인과 환경적영향이 복합적으로 작용하여 촉발된다. 우울한 기분 그리고 거의 완전히 그리고 지속적으로 즐거움을 경험하지 못하는 즉 우울감과 쾌감 상실증 한 가지 증상이 주 증상이다. 또한 절망감, 죄책감, 무가치함을 느끼고, 식욕과 체중감소 혹은 식욕과 체중증가, 조바심 혹은 무기력, 질병과 자살에 대한 지속적 생각, 주의력 집중과 결정에 어려움, 불면이나 기면증증 적어도 두 가지 혹은 세 가지 증상을 겪게 된다.¹⁶⁾ 이를 진단하기 위해서는 세계보건기구(WHO)의 기준인 International Classification of Disease, 10th edition(ICM-10)이나 Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders, fourth edition(DSM-IV)를 근거로 한다¹⁷⁾. 지금까지 항 우울제는 기존의 synapse 수준에서 5-HT와

noradrenaline 농도를 증가시키는 것을 목표로 하여¹⁸⁾, Tricyclic Antidepressant (TCA), Monoamine Oxidase Inhibitor (MAOI), Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) 계열의 항 우울제들을 사용하고 있다. 그러나 이런 monoamine 계통에 작용하는 항 우울제를 FDA에서 임상시험 한 후 meta-analysis한 결과를 보면 항 우울제는 위 약군과 비교해 효과가 극히 적고¹⁹⁾, 1세대 TCA류 항 우울제는 심혈관계의 고혈압성 부작용을 야기시킬 수 있고, 2세대 SSRI류의 경우는 치료 효과가 나타나기까지 3~6주 이상의 투약이 필요하다는 단점이 있다¹⁶⁾.

그런데 최근 우울증의 가설로서, Pro-inflammatory cytokine인 IL-1, IL-2 등에 의해 5-HT의 전구물질인 트립토판(tryptophan)을 분해하는IDO의 활성이 증가되어 5-HT이 저하되고, 신경 독성이 있는 NMDA R의 합성이 증가하여 신경 독성이 증가되는 것으로 밝혀졌다⁴⁾. 또한 IL-1 β 와 TNF- α 등의

pro-inflammatory cytokines들에 의해 norepinephrine, dopamine과 함께 CRF 분비가 촉진되며, 교감신경이 활성화되어 염증이 증폭되는데, 이 과정에서 'sickness behavior'가 유발된다. sickness behavior는 주로 감염 상태에서 일어나는 행동의 변화를 말하는데, 무력감, 우울, 불안, 과수면, 식욕저하, 집중력 저하 등의 양상의 행동 변화를 가리킨다²⁰⁾. 우울증 환자의 혈중에 pro-inflammatory cytokines의 농도가 증가되었고, 뇌척수액에서는 PGE2와 같은 염증 매개물질의 농도가 증가된 것으로 보고되었다²¹⁾.

염증반응은 면역계, 내분비계, 신경계가 복잡하게 상호작용하여 cytokine, HPA axis, 신경전달 물질의 변화로 몸의 정상 상태를 되찾는 과정이 포함되어 있다. 그래서 염증반응은 pro-inflammatory cytokines의 증가, HPA axis의 활성화와 glucocorticoid 저항성의 증가, 5-HT, Norepinephrine, Dopamine의 합성과 제거, 신경세포의 사멸과 재생, 신경가소성에 모두 영향을 주어 우울증의 병태생리에 관여할 수 있다²²⁾. 또한 LPS는 염증 연구에서 다루는 실험 모델로서²³⁾ 면역-염증반응과 우울증의 연관성을 통한 항 우울제 개발을 위한 연구가 보고되어있다^{24, 25)}.

실험에 사용된 防己茯苓湯은 『金匱要略』에 나와 있는 처방이다. 처방을 구성하는 약물 중 방기는 mast cell에 작용하여 TNF- α 의 유리, PGE2생성을 억제하여 항 염증 효과가 있다고 보고되었다¹⁰⁾. 그리고 계지에는 5-HT1A 수용체의 결합력을 조절하며, NMDA에 의한 세포 사멸을 억제하는 효과가 있으며⁷⁾, CORT농도, IL-6, IL-1 β , TNF- α 농도를 감소시켜 항 우울효과가 있는 것으로 보고되었다²⁶⁾.

그러므로 항 염증 효과가 있다고 알려진 防己茯苓湯(이하 BBT)을 LPS로 염증을 유도하여 유도한 우울 증상에서 항 우울 효과를 가지는지 확인하기 위해서 흰쥐에 LPS를 투여하여 염증을 유발한 뒤, 자당섭취량, OFT, FST로 행동 변화에 대한 효능을 확인하고 혈중 CRF, ACTH, CORT, IL-1 β , TNF- α 의 농도를 측정하여 항 우울 효능을 확인하였다.

LPS를 lateral ventricle에 주입한 후 14일 뒤 모든 실험군에서 체중이 유의하게 감소하였고($P < 0.001$), LPS group에서 자당 섭취량이 유의하게 감소하여 ($P < 0.05$) 우울증의 증상 중 무쾌락증(anhedonia)이 보였으며, BBT를 투약하였을 때, 자당 섭취량이 용량 의존적으로 증가하였고, 고농도(BBT400)에서 유

의한 차이를 보였다($P < 0.05$). 이를 통하여 BBT가 우울증의 무쾌락증(anhedonia)이 개선되는 것을 확인할 수 있었다.

OFT에서 LPS group에서 central zone을 통과하는 횟수가 감소하였고($P < 0.05$), BBT group에서는 농도 의존적으로 늘어나는 모습을 보였으나 유의하지는 않았다. central zone에서 머무는 시간의 경우 LPS group에서 유의하게 감소하였고($P < .001$), 고농도의 BBT를 투여한 그룹에서 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$). Rearing number의 경우, LPS를 투여한 모든 그룹에서 증가하는 경향을 보였으며, BBT 투약에 농도 의존적으로 감소하는 모습을 보였으나 유의하지는 않았다. Grooming number의 경우, LPS를 투여한 실험군에서 모두 증가하였고, BBT를 투여한 그룹에서 농도 의존적으로 감소하였는데, 특히 고농도(BBT400)에서 유의하게 감소하였다. ($P < 0.05$). OFT는 불안감을 보는 대표적인 행동시험으로, 중심 공간에서 머무는 시간비율의 증가와 Grooming 횟수의 증가를 통하여 불안감의 감소를 확인할 수 있다²⁷⁾. BBT를 투여한 group에서 중심 공간(central zone)에 머무는 시간 비율 및 Grooming 횟수가 유의하게 증가되어 쥐의 불안감이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

또한, FST에서 immobility time이 LPS로 염증을 유발했을 때 증가하였고, BBT를 투여한 후 immobility time이 용량 의존적으로 줄어드는 모습을 보였으며, 특히 고용량(BBT400)에서 유의하게 차이가 났다($P < 0.05$). 또한, Climbing time 역시 LPS를 투여한 후 줄어드는 모습을 보였고 BBT를 투여한 결과로 climbing time이 용량 의존적으로 늘어났으며, 특히 고용량(BBT400)에서 유의하게 차이가 났다($P < 0.05$). Swimming time에서는 큰 차이가 보이지 않았다. OFT와 FST를 통하여 BBT가 염증으로 유발된 우울증의 무력감, 절망감의 증상을 감소시킨 것이 확인되었다.

Cytokines의 경우 우울증의 병태생리와 가장 관련이 높은 두 가지 조절 축, 시상하부-뇌하수체-부신 피질 축(HPA axis)과 카테콜아민/교감신경계축(교감신경계-부신수질 축, SAM axis)과 관련이 있다²⁸⁾. Cytokines은 CRH, ACTH를 자극하여 HPA axis를 활성화시킬 수 있다^{29, 30)}. BBT를 투여한 group에서 IL-1 β 의 농도를 농도 의존적으로 줄이는 효능이 나타났다. 특히 고농도(BBT400)에서 유의하게 차이가

났다($P < 0.05$). 그러나, BBT를 투여한 group에서는 TNF- α 의 농도가 줄어들지 않았다.

우울증에서 HPA axis의 장애가 보고되어 있고³¹⁾, 이것은 염증이 증가하는 것과 관련이 있다. HPA axis의 과 활성화는 고농도의 CORT를 유발시키고, 고농도의 CORT는 phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) 매개 insulin-signaling pathway를 통해 해마 뉴런의 흥분독성을 유도하는데³²⁾, BBT에는 proinflammatory cytokines인 IL-1 β -TNF- α -IL-6 등의 농도를 줄이는 항 염증효과가 있다는 것이 보고되었다⁷⁾.

LPS로 처치했을 때, SAL group과 비교했을 때 CRH, ACTH, CORT의 혈중 농도가 유의하게 증가하였다($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.05$). 이를 통하여 염증상태에서 HPA axis의 활성화 되는 것을 확인할 수 있다. BBT를 투여한 결과 농도 의존적으로 CRH, ACTH, CORT의 농도가 감소되었고, 특히 고농도(BBT400)에서 CRH와 CORT의 농도가 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

이를 통하여 BBT는 항염증 효과를 통하여 pro-inflammatory cytokine을 억제하여 염증으로 인한 HPA-axis의 비정상적 활성을 제어할 수 있다. 그리하여 HPA-axis의 비정상적 활성화로 인한 신경독성을 억제하여 항 우울 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

V. 결론

흰쥐에 LPS를 주입하여 염증을 유발한 뒤, 防己茯苓湯을 투여하여 FST, OFT로 우울 행동변화를 확인한 후, CRF, ACTH, CORT, IL-1 β 및 TNF- α 혈장 농도를 측정된 결과를 통해 LPS로 유발된 염증-우울증 모델에서 防己茯苓湯의 항 우울 효과에 대해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 防己茯苓湯의 체중변화에 대한 효과는, LPS group에 비해 유의한 차이가 없었으나, 자당섭취량은 LPS group에 비하여 LPS+BBT400 group에서 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).
2. 防己茯苓湯의 OFT에서의 효과는, LPS group에 비해 LPS+BBT400 group에서 central zone에서 머무는 시간비율이 유의하게 증가하였고, Grooming 회수는 유의하게 감소하였으며($P < 0.05$), FST에서 LPS group에 비하여 LPS+BBT400 group에서 immobility time이 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

3. 防己茯苓湯은 모든 group에서 혈중 IL-1 β 의 농도를 줄이고, LPS+BBT400 group에서 농도를 유의하게 감소시켰다($P < 0.05$). 혈중 TNF- α 농도는 감소시키지 못하였다.

4. 防己茯苓湯이 혈중 CRH, ACTH, CORT에 대해 나타내는 효과는, 모든 BBT group에서 감소하는 경향이 나타났으나, LPS+BBT400 group에서 CRH와 CORT이 유의하게 감소하였다($P < 0.05$). 이상의 결과에 의하면 LPS로 유발된 염증에 대한 우울증에 대하여, 防己茯苓湯은 항 염증 효과를 통해서 HPA axis의 비정상적 흥분을 억제하여 항 우울 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

References

1. Belmaker RH, Agam G. Major Depressive Disorder. The new england journal of medicine. 2008;358(1):55-68
2. Oh HM, Kim SW, Oh YT, Son Cg, Lee JS. A comparative study on physiopathology of depression by Korean medicine and conventional medicine. Journal of Haehwa Medicine. 2017;26(1):11-18
3. Mao QQ, Ip SP, Xian YF, Hu Z, Che CT. Anti-depressant-like effect of peony:a mini-review, Pharmaceutical Biology. 2012;50:1, 72-77.
4. Jeon SW, Kim YK. Inflammation-induced depression:Its pathophysiology and therapeutic. Journal of Neuroimmunology. 2017;313:92-98
5. Li YH, Kim DH, Lee TH. Effect of Mixture extracted from Bupleuri Radix and Physalidis Herba on the LPS-induced depression in Rats. The Korea journal of herbology. 2015; 30(3):69-76.
6. Ko SY, Kim DH, Lee TH. Effect of Glycyrrhizae Radix Water Extract on the depression induced by LPS in Rats. The Korea journal of herbology. 2014;29(5):9-16
7. Park IS, Yoon IJ, Oh MS. The Effects of Bangkibokryeong-tang on Papain-induced OsteoArthritis C57BL/10 Mouse Blood Glucose and Body Fat in High Fat Diet Induced Obese

- Mice. *J Oriental Rehab Med.* 2013;23(1):25-49
8. Yao H, Gu LJ, Guo JY. Study on effect of astragali radix polysaccharides in improving learning and memory functions in aged rats and its mechanism. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2014; 39(11):2071-2075
 9. Hanbangyangnihakgyojaebyeonchanwiwonhoe. *Hnbangyangnihak.* 4th edition. Seoul:Sinilbukseu. 2015:193-198.
 10. Guo J, Li F, Wu Q, Gong Q, Lu Y, Shi J. Protective effects of icariin on brain dysfunction induced by lipopolysaccharide in rats. *Phytomedicine.* 2010;17(12):950-955
 11. Lim JS, Kim HS, Choi YS, Kwon HM, Shin KS, Joung IS, et al. Neuroprotective effects of berberine in neurodegeneration model rats induced by ibotenic acid. *Animal Cells and Systems.* 2008; 12(4):203-209
 12. Mao QQ, Ip SP, Ko KM, Tsai SH, Che CT. Peony glycosides produce antidepressant-like action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress: Effects on hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain-derived neurotrophic factor. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 2009;33(7):1211-1216
 13. Hsiao YT, Yi PL, Li CL, Chang FC. Effect of cannabidiol on sleep disruption induced by the repeated combination tests consisting of open field and elevated plus-maze in rats. *Neuropharmacology.* 2012;62(1):373-384
 14. Lee B, Shim I, Lee HJ, Yang Y, Hahm DH. Effects of acupuncture on chronic corticosterone-induced depression-like behavior and expression of neuropeptide Y in the rats. *Neuroscience Letters.* 2009;453(3):151-156
 15. Lee BB, Sur BJ, Cho SG, Yeom MJ, Shim IS, Lee HJ, et al. Wogonin Attenuates Hippocampal Neuronal Loss and Cognitive Dysfunction in Trimethyltin-Intoxicated Rats. *Biomolecules & Therapeutics.* 2016;24(3):328-337
 16. Millan MJ. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacology & Therapeutics.* 2006;110 (2):135-370
 17. Lee JE, Kwon YJ, Cho SH. A Review of Clinical Studies with Herbal Medicine for Depression-Based on Randomized Controlled Clinical Trial. *The Journal of Oriental Neuropsychiatry.* 2011; 22(4):31-39
 18. Hindmarch I. Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. *European Psychiatry.* 2002;17(3):294-299
 19. Pigott HE, Leventhal AM, Alter GS, Boren JJ. Efficacy and Effectiveness of Antidepressants: Current Status of Research. *Psychother Psychosom.* 2010;79(5):267-279
 20. Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *TRENDS in Immunology.* 2006; 27(1):24-31
 21. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biological Psychiatry.* 2009;65(9):732-741
 22. Dooley LN, Kuhlman KR, Robles TF, Eisenberger NI, Craske MG, et al. The role of inflammation in core features of depression: Insights from paradigms using exogenously-induced inflammation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2018;94 :219-237
 23. Yagnik RM, Benzeroual KE. Tigecycline prevents LPS-induced release of pro-inflammatory and apoptotic mediators in neuronal cells. *Toxicol In Vitro.* 2013;27(2):686-693
 24. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(1):46-56



25. O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry*. 2009; 14(5):511-522
26. Lee GH, Hyun KY. Control Effect of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis with Cinnamon(Cinnamomum japonicum) Extract. *Asia-pacific Journal of Multimedia Services Convergent with Art, Humanities, and Sociology*. 2015;5(2):49-59
27. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors:a review. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463(1-3):3-33
28. Leonard BE. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. *Eur Psychiatry*. 2005;20 suppl 3:S302-S306
29. Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*. 1987;238(4826):522-524
30. Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F, Besedovsky H. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science*. 1987;238(4826):524-526
31. Pariante CM, Lightman SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*. 2008;31(9):464-468
32. Xia Q, Wang H, Yin H, Yang Z. Excessive corticosterone induces excitotoxicity of hippocampal neurons and sensitivity of potassium channels via insulin-signaling pathway. *Metabolic Brain Disease*. 2018;Oct 4. doi:10.1007