동의신경정신과 학회지 제21권 제1호(2010년 03월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(1):1-11

加味歸脾湯이 P815 세포의 serotonin 대사 과정에 미치는 영향

노동진, 정인철

대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

Study on Effect to Serotonin Metabolism of *Gamiguibi-tang* on P815 Cell

Dong-Jin No, In-Chul Jung

Dept. of Oriental Neuropsychiatry College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Abstract

Objectives :
This study was perfomed to investigate the antioxidant activity and serotonin activity of *Gami-guibi-tang* on P815 Mast Cell.

Methods :
The effects of *Gami-guibi-tang* on activation of TPH-1 mRNA and AAADC mRNA in P815 mast cell were investigated.
The effect of *Gami-guibi-tang* on content of serotonin in P815 mast cell was investigated.
The effects of *Gami-guibi-tang* on activation of DPPH radical scavenging and SOD in P815 mast cell were investigated.

Results :
1. The *Gami-guibi-tang* increased SOD activity and DPPH radical scavenging activity.
2. The *Gami-guibi-tang* increased the intracellular concentration of serotonin in 60 ㎍/㎖, 80 ㎍/㎖ experiment group.
3. The *Gami-guibi-tang* increased menaingful the manifestation TPH mRNA.
4. The manifestation of AAADC and MAO mRNA have not made menaingful changes on *Gami-guibi-tang*.

Conclusions :
This experiment shows that *Gami-guibi-tang* had significant anti-oxidative effect. And *Gami-guibi-tang* increased the intracellular concentration of serotonin. Therefore, *Gami-guibi-tang* can be used by the medication of major depression disorder. But Study on mechanism of increased serotonin and clinical research of *Gami-guibi-tang* is suggested for future research.

Key Words :
Gamiguibi-Tang(*Jiaweiguipitang*), Depression, Antioxidant activity, Serotonin

투고 : 2010. 2. 6. 수정 : 2010. 3. 18. 채택 : 2010. 3. 20.
교신저자 : 정인철, 대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학
Tel) 042-470-9129, E-mail) npjeong@dju.kr
이 논문은 2010년 2월 대전대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 석사학위 논문임

Ⅰ. 서 론

우울증이란 우울한 기분(슬픈 기분), 흥미나 즐거움의 상실 등을 주요 증상으로 하며, 식욕의 감소 혹은 증가, 수면의 증가 혹은 감소, 정신 운동 초조 혹은 지체, 피곤, 무가치감 혹은 부적절감, 인지기능장애, 자살과 죽음에 대한 반복적인 사고 등을 부수 증상으로 하는 일련의 증후군이다[1]. 이러한 우울증에서는 생체아민 중 norepinephrine과 serotonin이 우울증에 가장 중요한 물질로 알려져 있으며, 특히 최근 비전형적 항우울제인 fluoxetine 등 selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) 등이 항우울작용을 나타냄으로써 serotonin이 우울증에서 가장 중요한 요인으로 부각되고 있다[2].

또한 우울증에서는 정상보다 체내의 free radical 생성이 증가되어 있는 것으로 보고되고 있는데, free radical은 인체가 외계의 물리화학적 자극이나 정신적 스트레스를 받게 되면 생성되며 인체 내에서 산화 반응을 일으켜 세포 및 장기에 손상을 가해 각종 성인병의 발생 및 노화의 원인과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다[3].

우울증은 한의학에서 鬱證의 범주에 속하는데[4], 鬱證은 情志不舒로 인하여 氣機가 鬱滯되어 생기는 병으로, 心情抑鬱, 情緖不寧, 胸部滿悶, 脅肋脹痛, 或易怒欲哭, 或咽中如有異物梗阻 등이 주요증상이다. 鬱證은 肝氣鬱結, 氣鬱化火, 血行濕滯, 痰氣鬱結, 心陰虧虛, 心脾兩虛, 肝陰虧虛, 心神惑亂으로 辨證하는데, 이중 憂愁思慮가 오래되어 心脾를 손상시켜 氣血의 生化가 부족해져 발생한 心脾兩虛型 鬱證에서는 歸脾湯을 대표적인 治療方으로 사용한다[5].

歸脾湯은 嚴用和[6]가 처음 創方하였고 薛己[7]가 當歸와 遠志를 첨가하여 완성한 方으로, 思慮傷脾, 心脾兩虛하여 일어나는 健忘, 怔忡, 嗜臥, 小食, 盜汗, 肢體作痛, 不寐, 吐血, 下血 등에 주로 활용되었는데, 최근에는 제반 심인성질환 및 스트레스성 질환에 널리 활용되고 있다[8].

歸脾湯의 실험적 연구들이 지속적으로 이루어져 왔는데, 문 등[8]은 실험 동물의 뇨 중 catecholamine 양을 측정하여 歸脾湯의 항스트레스 효과를 보고하였으며, 임 등[9]은 加味歸脾湯에 유의성 있는 면역조절기능이 있음을 밝혔다. 이 외에 박 등[10]의 항피로효능에 관한 연구가 있으며, 박 등[11]은 歸脾湯과 구성약물들의 free radical에 의한 지질과산화물 생성 억제 여부와 acetaminophen으로 유도된 산화적 간 손상 방어효과를 관찰하여 보고하였다. 그러나 우울증의 중요한 신경전달물질인 serotonin에 관한 歸脾湯의 연구는 아직 이루어지지 않았다.

이에 저자는 歸脾湯 처방을 이용하여 P815 세포 내의 serotonin 함량과 TPH 활성 및 AAADC 활성 변화를 통해 serotonin 대사 과정에 미치는 영향과 항산화 효능을 실험적으로 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 加味歸脾湯(*Gamiguibi-tang, GBT*)의 처방구성은 『東醫寶鑑』[12]의 歸脾湯을 기준으로 하여 合歡皮를 8.0 g 첨가한 것으로, 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table Ⅰ).

Table Ⅰ. Prescription of GBT

Herb	Scientific name	Quantity(g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
龍眼肉	Longanae Arillus	4
酸棗仁(炒)	Zizyphi Spinosae Semen	4
遠志(製)	Polygalae Radix	4
人蔘	Ginseng Radix	4
黃芪	Astragali Radix	4
白朮	Atractylodis Macrocephalac Rhizma	4
茯神	Poria Cocos	4
木香	Aucklandiac Radix	2
甘草	Glycyrrhizae Radix	1.2
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	5
大棗	Jujubae Fructus	2
合歡皮	Albizzia julibrissin	8
	Total amount	50.2(g)

2) 시약

Cell culture는 FBS(Gibco-BRL, Grand Island, NY), DMEM(Gibco-BRL, Grand Island, NY), 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/㎖ penicillin, 100 μg/㎖ streptomycin, 50 μM 2-mercaptoethanol, D-PBS dulbecco's phosphate buffered saline(GIBCO BRL Life Technology, Grand Island, NY, USA), POTASSIUM PHOSPHATE DIBASIC, POTASSIUM PHOSPHATE MONOBASIC, Trypsin-EDTA (GIBCO BRL), isopropanol, 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), NaOH, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)은 Sigma(USA) 제품을 사용하였고, Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD), Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, Gaithersburg, MD), iQ SYBR green supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다. Berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride, coralyne hydrochloride, L-tryptophan, 5-hydroxytryptophan, catalase, DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (4H-PT), serotonin, dithiothreitol 및 5-hydroxyindoleacetic acid(HIAA)는 sigma사(St. Lpuis. MO, USA)로부터, 세포배양용 fetal calf serum 및 penicillin/streptomycin, DMEM 배지는 Gibco사(Grand Islad, NY, USA)로부터 구입하였다. SOD assay kit(Dojindo. Japan)제품을 사용하였고, EAE(ethyl ascorbyl ether)은 Cosmol 사로부터 구입하였으며, 그 밖의 시약은 특급 및 HPLC용 등급을 사용하였다.

3) 기기

열탕추출기(대웅, Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU 540, Japan), CO2 incubator(Forma scientific Co., USA), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), water bath(Vision scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer(Shimazue, Japan), centrifuge (Sigma, USA), deep freezer(Sanyo, Japan), thermocycler system(MWG Biotech., Germany), ice maker (Vision scientific Co., Korea), homogenizer (OMNI, USA), plate shaker(Lab Line, USA) 및 ELISA reader(Molecular Devices, USA), C18역상 HPLC columne (Hypersil, USA), HPLC(Shimazu, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

加味歸脾湯 처방 50.2 g을 증류수 1,000 ㎖에 넣고 2시간 동안 가열한 후 여과하여 얻은 액체 성분을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 약리성분을 추출하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 9.8 g의 분말을 얻었다. 얻어진 분말은 냉동고(-20℃)에 보관하면서 사용 시에는 필요한 농도로 phosphate buffer

에 희석하여 0.22 ㎛ 필터 사용하였다.

2) 약물의 high performance liquid chromatography(HPLC) 분석

加味歸脾湯의 수용성 성분을 분석하기 위하여 C_{18}역상 HPLC columne (Hypersil, USA)을 장착한 HPLC(Shimazu, Japan)를 사용하였다. 전체 분석시간은 30 분으로 이동상의 구성은 초기 5 분 동안 H_2O를 흘려주었고, 이후 20 분 동안은 acetonitrile gradient를 하여 acetonitrile을 100% 까지 올렸으며, 그 상태를 5 분간 지속하였다. 214 ㎚에서의 흡광도를 측정하여 시료의 양을 확인하였다.

3) P815 세포의 배양

P815 세포는 동아대학교 의과대학(해부학 교실)에서 분양 받았으며, 배양은 10% fetal calf serum, 100 unit/㎖ penicillin과 100 ㎍/㎖ streptomycin을 포함한 DMEM 배지(Gibco-BRL, Grand Island, NY), 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate를 사용하여, cell culture용 dish에서 37℃, 5% CO_2 상에서 배양하였다.

P815 세포(2×10^5 cells/cm^2, 60 mm culture dish)를 배양한 다음, 이 세포에 加味歸脾湯 처방을 10~200 ㎍ 까지 가한 다음 48시간 배양하였다. 배양 후 cell line을 ice cold phosphate buffered saoine(PBS)용액으로 harvest하여 원심분리하고 pellet을 얻은 후, pellet은 -70℃ freezer에 보관하면서 serotonin 함량 측정시료로 사용하였다.

4) MTT를 이용한 세포 생존 측정

배양한 세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척한 다음 96 multi well에 2×10^4 cells/well의 세포수가 되도록 산정하여 사용하였다. 세포는 FBS가 들어있는 DMEM 배양액에서 각 각 다양한 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다.

이후 세포 생존을 MTT분석법에 의해서 분석하였다. MTT 분석법은 배양이 완료된 세포에 50 ㎍/㎖ MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma)을 희석처리하여 반응시킨 다음 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 측정하였다.

5) DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical scavenging 활성 측정

DPPH는 산화/환원 환경에 따라 색을 띄는 라디칼로 시료의 라디칼 제거능력을 측정할 수 있다. 시료의 free radical 소거 활성은 stable radical인 DPPH에 대한 환원력을 측정한 것으로, 시료를 phosphate buffer에 녹여 100 ㎕에 200 mM DPPH 900 ㎕를 shaking 한 후에 상온에서 10 분간 방치 후에 eppendorf tube에서 96-well plate의 각 well에 분주하여 O.D 517 mm에서 측정한다. 실험은 대표적인 항산화 물질인 EAE를 양성대조군으로 사용했으며, 농도별로 측정하여 실험군과 비교하였다. (Blank: phosphate buffer, Control: phosphate buffer + DPPH)

Free radical scavenging activity(%) =

[1-(Absorbance of test compound / Absorbance of control)] X 100.

6) SOD 활성 측정 실험

96-well plate의 각 well에 sample solution 20 ㎕를 첨가한 후 reagent solution 200 ㎕를 넣은 후 마지막으로 enzyme working solution을 넣어준 후, 37℃에서 20 분 간 반응시킨다. ELISA

reader를 이용하여 O.D 450 mm에서 측정 한다. SOD activity(inhibition rate,%)를 계산한다.

7) serotonin 함량 측정

serotonin 함량은 HPLC 형광광도계법으로 측정하였다. 세포 내부의 serotonin 농도를 분석하기 위하여, 약물을 처리한 세포의 배지를 제거한 후, 1×PBS pH 7.2의 완충액을 이용하여 세포를 2 번 세척하였다. 1×PBS 200 ㎕를 첨가하고 세포를 모아 초음파로 분쇄하고, 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 상층액을 C_{18} column에 시료용액(150 ㎕)을 trichloroacetic acid(1M, 150 ㎕), HIAA(10μM, 50 ㎕; 내부표준)를 가한 다음 10,000 rpm으로 원심 분리하였다. 상층액을 Millex-GV (0.22 ㎛)로 여과한 후 HPLC에 주입하여 serotonin 함량을 측정하였다.

각각의 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였으며, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하고 Bradford's method를 이용하여 측정하였다[13].

8) 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 mRNA 측정

P815세포 pellet에 RNAzol[B]을 첨가하여 세포를 용해시킨 후 chloroform 200 ㎕를 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 5 분 동안 방치시키고, 이를 14,000 rpm에서 15 분 동안 원심분리(4℃)하여 무색의 상층액 만을 400 ㎕ 취한 뒤 동량의 isopropanol을 넣고 inverting을 반복하여 섞은 다음 4℃에서 15 분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15 분 동안 원심분리(4℃)하여 얻은 pellet(RNA)에 75% ethanol(DEPC treated water) 500 ㎕를 넣어 15,000 rpm에서 15 분 동안 원심분리(4℃)하고 ethanol을 완전히 제거한 후에 DEPC water 50 ㎕를 넣어서 RNA를 용해하여 A260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 함량을 계산한다. 분리한 RNA에 해당 유전자들의 oligo dT primer와 DEPC water를 넣고 65℃에서 10 분 동안 반응시킨 후 실온에서 3 분 동안 방치한 다음 10 × buffer, 10 mM dNTP, AMV reverse transcriptase, 50 mM $MgCl_2$ 및 DEPC treated water를 넣고 37℃에서 1시간 동안 반응시켜서 reverse transcriptase(RT) product를 만든다. 만들어진 RT product (template cDNA)를 사용하여 real-time PCR(Bio Rad)를 사용하여 측정한다.

각 유전자 발현 정도를 real-time PCR을 이용해 측정하였다. 각 Sample의 추출된 RNA에 2X SYBR Green Master Mix (Bio Rad) 25 ㎕와 각각의 유전자들과 10pM forward and reverse primers를 1 ㎕씩 첨가하여 각각 50 ㎕ 반응이 이루어졌으며 95℃에서 10 분 후 30 초간 40 cycle을 돌린 다음 60℃에서 30 초, 72℃에서 30 초 동안 반응을 일으켰다. 대조 유전자로 β actin mRNA을 control로 이용하여 target mRNA를 정량하고 유전자 발현을 비교하였다(Table Ⅱ).

Table Ⅱ. Sequences of Primer Set Used Quantative Real-Time PCR

Primers	Foward	Reverse	Tm(℃)	Product size (bp)
Beta actin,(β actin)	TCTGAACCCTAAGGCCAACCGTG	ATGGCATGAGGGAGCGCGTA	60	198
Tryptophan hydroxylase 1(TPH 1)	CTGCGACATCAGCCGAGAACAGT	CGGCGTCAAGTTCGGATCCA	60	200
aromatic L amino acid decarboxylase, dopa decarboxylase (AAAD,DDC)	AAGCAGTCCCTTCGGATGGCA	GCAGCGTCAATGTGCAGCCA	60	199
monoamine oxidase A (MAOa)	CGGCCAGGAACGGAAATTTGTAG	TGGCAGTCAAAACCGGTGGG	60	200
monoamine oxidase B (MAOb)	TGGGCCAACCCAGAATCGTATCT	TTGGCCCATCTCATCCATTG	60	199

9) 통계 처리

실험결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 분석하였으며 P<0.05에서 유의한 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 성 적

1. HPLC 분석

C18역상 HPLC를 사용하여 加味歸脾湯의 수용성 성분을 분석하였다. 역상 HPLC 분석 결과 앞부분의 수용 성분을 확인하였다(Fig. 1).

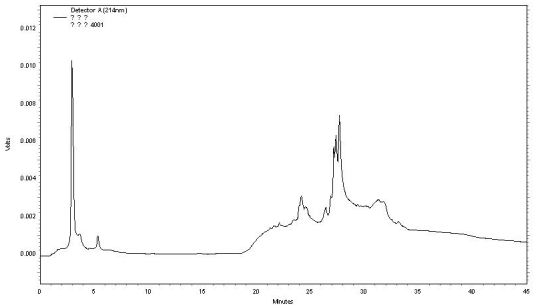


Fig. 1. Analysis of HPLC profile of *GBT*.
Water extracts were subjected to C18 column Chromatography on acetonitrile linear gradient (line) over a 30 min period at a flow rate of 1 ㎖/min. Absorbance was monitored at 214 nm.

2. MTT assay에 의한 cell viability 측정

P815 세포주에 加味歸脾湯을 각 농도로 처리하여 세포 생존을 측정한 결과 加味歸脾湯 20 ㎍/㎖에서 101.3 ± 2.55로, 60 ㎍/㎖에서 100.63 ± 3.24로, 120 ㎍/㎖에서는 101 ± 2.36로 세포 생존에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다 (Fig. 2).

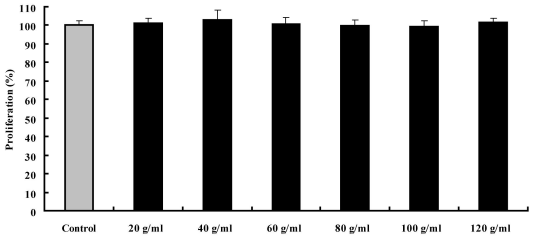


Fig. 2. Additional effects of *GBT* on proliferation of P815 cells determined by MTT assay.
The cell proliferation was measured by MTT assay as described in Material and Methods. Date are expressed as% of control and each column represents the mean ± S.E. of three determination. Asterisks indicate a significant difference compared with control group.

3. DPPH 소거능 측정

DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응으로 加味歸脾湯의 항산화 작용을 측정한 결과, 100 ㎍/㎖ 일 때 11.16 ± 0.51, 10 ㎍/㎖ 일 때는 5.87 ± 3.59의 DPPH radical 소거작용을 나타났다 (Table Ⅲ).

Table Ⅲ. Effect of GBT on DPPH Radical Scavenging Activity

Sample	Concentraion	Scavenging effect (%)
Guibi Tang(GBT)	100 ㎍/ml	11.16 ± 0.51*
	10 ㎍/ml	5.87 ± 3.59*
	1 ㎍/ml	0.48 ± 1.15
	0.1 ㎍/ml	0.41 ± 3.51
EAE(ethyl ascorbyl ether)	1000 mM	83.58 ± 0.20*
	500 mM	82.53 ± 0.14*
	250 mM	76.13 ± 0.29*
	120 mM	74.54 ± 0.58*
	60 mM	71.76 ± 0.20*

Each value is mean ± SD (n>3). *p<0.05

4. SOD 활성 측정

SOD 활성 측정 결과, 加味歸脾湯은 100 ㎍/㎖에서는 11.16 ± 0. 51%, 10 ㎍/㎖는 5.87 ± 1.59%, 1 ㎍/㎖에서는 0.48 ± 1.15%, 0.1 ㎍/㎖에서는 0.41 ± 2.14%로 SOD 활성이 증가하였다.

이 중 10 μg/㎖, 100 μg/㎖에서 유의한 성적을 얻었다(Fig. 3).

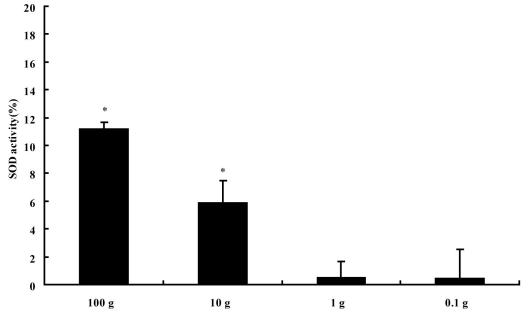


Fig. 3. Effect of *GBT* on the SOD activity.
The effect on SOD was tested with GBT, Date are expressed as% of control and each column represents the mean±SD of three determination. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, *p < 0.05.

5. Serotonin 함량에 미치는 영향

세포 내부의 serotonin 농도를 분석한 결과 대조군 1.53 ± 0.23 nmol/mg protein에 비하여 加味歸脾湯 60 μg/㎖에서 1.67 ± 0.12 nmol/mg protein (109.1%), 80 μg/㎖에서 1.82 ± 0.15 nmol/mg protein (118.9%)로 유의하게 상승하였다(Table Ⅳ).

Table Ⅳ. Effects of *GBT* on the Intracellular Serotonin Content in P815 Cells

Compounds	Serotonin content (nmol/mg protein) (% of control)
Control	1.53 ± 0.23 (100)
GBT (20 μg/㎖)	1.55 ± 0.14 (101)
GBT (40 μg/㎖)	1.61 ± 0.11 (105.8)
GBT (60 μg/㎖)	1.67 ± 0.12 (109.1)*
GBT (80 μg/㎖)	1.82 ± 0.15 (118.9)*

P815 cells were cultivated in DMEM medium plus 10% heat inactivated FBS and 100 units/㎖ penicillin and 100 Ag/㎖ streptomycin at 37.8C, then GBT or none (control) were added and incubated for 24 hours. P815 cells were harvested and serotonin content was determined by an HPLC method. Significantly different from the control value: *p < 0.05.

6. TPH-1 유전자 발현에 미치는 영향

加味歸脾湯에 의한 TPH-1 mRNA 발현은 50 μg/㎖에서 0.044 ± 0.003, 100 μg/㎖에서 0.046 ± 0.0042로 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

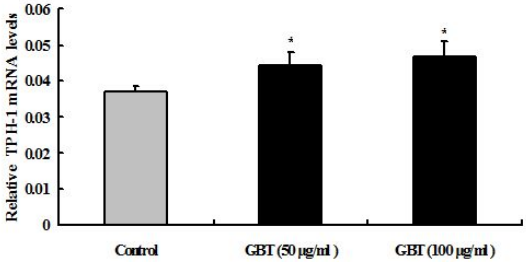


Fig. 4. Effect of *GBT* on TPH-1 mRNA in P815 cells.
The expression levels of TPH-1 mRNA and beta actin were analyzed by real-time RT-PCR. The TPH-1 mRNA expression was normalized to beta actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means ± SEM. *P < 0.05.

7. AAADC 유전자 발현에 미치는 영향

加味歸脾湯에 의한 AAADC mRNA 발현은 加味歸脾湯 50 μg/㎖에서 0.0063 ± 0.0013, 100 μg/㎖에서 0.0067 ± 0.0015로 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

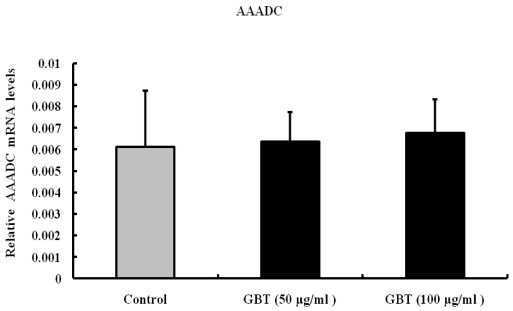


Fig. 5. Effect of *GBT* on AAADC mRNA in P815 cells.
The expression levels of AAADC mRNA and beta actin were analyzed by real-time RT-PCR. The AAADC mRNA expression was normalized to beta actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means ± SEM.

8. MAOa 유전자 발현에 미치는 영향

加味歸脾湯이 MAOa mRNA발현에 미치는 영향을 측정한 결과, 加味歸脾湯 50 ㎍/㎖에서 0.0013 ± 0.0003, 100 ㎍/㎖에서 0.0016 ± 0.00057로 MAOa mRNA를 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

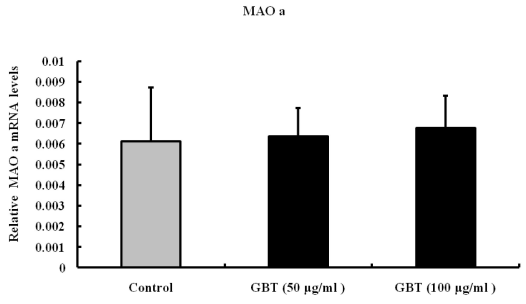


Fig. 6. Effect of *GBT* on MAOa mRNA in P815 cells.
The expression levels of MAOa mRNA and beta actin were analyzed by real-time RT-PCR. The MAOa mRNA expression was normalized to beta actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means ± SEM.

Ⅳ. 고 찰

주요우울증(major depression)은 기분장애 중에서 가장 많이 볼 수 있는 형태이며, 그 유병률이 범세계적으로 약 5%에 이른다. 성별로는 여성이 남성보다 대략 2배 정도 많이 발생되고, 평균 발생연령은 30세에서 40세 사이에서 시작되며, 치료를 받지 않은 경우의 자연적인 경과는 6개월에서 2년 정도로 추산된다. 한 장기적인 추적 조사에서는 회복된 사람의 대략 50% 정도에서 재발을 하였다. 따라서 우울증은 재발이 잦은 만성적 질환으로 간주된다[14].

우울증은 다양한 증상을 나타내는 증후군인데 우울증 환자는 정서 증상으로 우울 기분 외에도 생리 증상(수면, 식욕, 체중, 기력 및 성욕), 인지 증상(주의력, 좌절, 내성, 기억, 부정적 왜곡), 충동 증상(자살, 타살), 행동 증상(동기, 쾌락, 흥미) 및 신체 증상(두통, 위통, 근육통)을 보일 수 있다. 이러한 다양한 증상들은 서로 다른 뇌 부위를 통해 조절되는 것으로 보인다[15].

우울증과 일차적인 연관이 있는 신경전달물질인 serotonin은 중추신경계에서 감정 조절, 불안, 알코올 중독, 약물 남용, 폭식, 성적 행동 등의 원인으로 작용되고, 말초 조직에서는 혈관 수축, 장운동, 지혈, 면역 반응 등에 작용한다[16].

Serotonin은 tryptophan에서 5-hydroxytryptophan을 경유하여 합성되며 각 단계에는 tryptophan hydroxylase(TPH), aromatic L-amino acid decarboxylase(AAADC)가 촉매하고 있으며, TPH가 serotonin 생합성 과정의 rate-limiting 효소이다[17]. 즉 세포 내 serotonin 양은 serotonin 합성 속도를 조절하는 TPH의 효소 활성에 의해 결정된다[18].

한편 free radical은 체내에서 생성된 높은 반응성을 가진 분자로 세포의 지질, 단백질, 핵산 및 다른 세포 구조를 망가뜨리고 정상적인 대사 체계를 교란하여 손상을 입혀 인체의 노화와 질병 발생을 촉진시키는 요인이 된다고 한다[19].

주요우울증에 대한 효과적인 치료로는 약물치료 외에도 정신치료, 인지행동치료, 대인관계치료가 있다. 그러나 주우울증에서 정신치료의 효과에 대한 객관적인 평가가 어렵기 때문에 약물치료가 가장 실제적인 선택일 수 있다[20].

그러나 현재의 항우울제 치료는 serotonin 불균형에 의한 질환을 치유하는데 있어서 정상적인 수준의 serotonin을 생산하는 근본적인 치유 방법은 전무하고 serotonin의 재흡수를 차단하는 방법 등과 같은 일시적인 치유 방법만 현재 이용되고 있는 실정이다[21].

우울증은 한의학에서는 鬱證의 범주에 속한다. 鬱證의 의미는 광의와 협의로 구분할 수 있는데, 광의적으로는 생리기능이 원활하게 소통되지 못하고 침체되어 이로 인해 장애나 병증을 초래하게 되는 상태를 말하며, 협의적으로는 七情不舒로 인한 七情鬱證을 의미한다[22].

鬱證은 肝氣鬱結, 氣鬱化火, 血行濕滯, 痰氣鬱結, 心陰虧虛, 心脾兩虛, 肝陰虧虛, 心神惑亂으로 변증하는데, 각각의 대표방은 柴胡疏肝湯, 丹梔逍遙散, 血府逐瘀湯, 半夏厚朴湯, 天王補心丹, 歸脾湯, 杞菊地黃湯, 甘麥大棗湯이 있다[8].

鬱證의 유형 중 多思善疑, 心悸膽怯, 失眠, 健忘 등의 증상을 호소하는 心脾兩虛型인 경우에는 歸脾湯을 주로 응용하는데, 歸脾湯의 구성약물 중 人蔘, 黃芪, 白朮, 甘草, 大棗 등은 補脾益氣하고 當歸, 龍眼肉, 茯神, 遠志 등은 養心血安神하여 전체적으로 養心安神, 補氣益血의 효능이 있다고 할 수 있다[23]. 본 실험에서는 歸脾湯 처방에 合歡皮를 가하였는데, 추가된 合歡皮는 藥性이 甘平하고 解鬱安神하는 효능이 있으며 최근 연구에는 진정작용 및 항경련작용도 보고되었다[24].

이에 저자는 加味歸脾湯을 우울증에 응용할 수 있을지를 확인하기 위하여 TPH를 비교적 많이 발현하는 P815세포를 이용하여 serotonin의 대사 과정에 미치는 영향과 항산화 능력을 측정하였다.

MTT 분석은 살아 있는 세포가 미토콘드리아의 탈수소효소를 이용하여 황색의 MTT를 환원시켜서 분광광도법으로 측정이 가능한 자색의 formazan 결정을 형성하는 특성을 이용하는 방법으로 세포 독성여부를 측정하는 분석법이다[25]. 본 실험에서는 P815 세포주에 加味歸脾湯을 농도별로 처리하여 세포 생존에 미치는 영향을 조사한 것으로 P815 세포를 加味歸脾湯을 처리한 배지에서 2일 동안 배양한 후 세포 생존을 각각 측정하였다. 加味歸脾湯을 처리하지 않은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않아 비교적 안전한 약물임을 확인할 수 있었다.

DPPH와 Superoxide는 우리 몸에서 생성되는 반응성이 강한 free radical로, 이를 매개로 加味歸脾湯의 항산화 능력을 측정하였다. DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응으로 加味歸脾湯의 항산화 작용을 측정한 결과, 加味歸脾湯은 농도에 의존적인 항산화 작용을 보였는데 100 ㎍/㎖ 일 때, 11.16 ± 0.51%의 DPPH radical 소거작용을 나타났고, 10 ㎍/㎖ 일 때는 5.87 ± 3.59%의 DPPH radical 소거작용을 나타냈다. 또한 SOD의 활성 측정 실험 결과, 加味歸脾湯 10, 100 ㎍/㎖의 농도에서 유의한 항산화 작용을 보였는데, 100 ㎍/㎖에서는 11.16 ± 0. 51%, 10 ㎍/㎖는 5.87 ± 1.59%의 성적을 나타냈다. 위의 결과에 의거하여 加味歸脾湯은 우수한 항산화 능력을 가진 것으로 보이며, 향후 우울증 뿐 아니라 free radical의 산화 작용에 의해 발생되는 각종 성인병, 노인병 등에 폭 넓게 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

加味歸脾湯이 serotonin 합성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 세포 내부의 serotonin 농도를 분석한 결과 대조군 1.53 ± 0.23 nmol/mg protein에 비하여 加味歸脾湯 60 ㎍/㎖에서 1.67 ± 0.12 nmol/mg protein (109.1%), 加味歸脾湯 80 ㎍/㎖에서 1.82 ± 0.15 nmol/mg protein (118.9%)로 유의하게 상승하여 加味歸脾湯이 우울증 치료에 효과적인 약물이 될 수 있음을 보였다.

TPH와 AAADC는 serotonin 대사 과정의 중요한 인자이다. serotonin은 TPH와 AAADC에 의해 단계적으로 합성되는데, 먼저, TPH가 L-tryptophan으로부터 5-hydroxytryptophan(5-HTP)을 합성하고, 이어서 AAADC가 5-HTP로부터

serotonin을 합성한다.

serotonin의 합성 속도를 조절하는 TPH의 mRNA는 加味歸脾湯 50 ㎍/㎖에서 0.044 ± 0.003로 加味歸脾湯 100 ㎍/㎖에서 0.046 ± 0.0042로 유의하게 증가 시켰다. 따라서 TPH의 유전자 발현 증가로 인해 세포내 serotonin의 농도가 증가하였으리라 유추할 수 있다.

또 다른 serotonin 합성 촉매인 AAADC의 mRNA 발현은 加味歸脾湯 50 ㎍/㎖에서 0.0063 ± 0.0013, 加味歸脾湯 100 ㎍/㎖에서 0.0067 ± 0.0015로 변화하였다. 반면 serotonin을 산화시키는 MAO의 유전자 발현에서는 加味歸脾湯 50 ㎍/㎖에서 0.0013 ± 0.0003, 加味歸脾湯 100 ㎍/㎖에서 0.0016 ± 0.00057로 변화하였다. 그러나 각각의 변화는 대조군에 비해 유의한 차이를 보여주지 못하였다.

이상을 종합하면 加味歸脾湯은 비교적 우수한 항산화 능력을 가졌으며, 세포내 serotonin의 농도와 serotonin의 rate-limiting 효소인 TPH의 유전자 발현을 유의하게 증가시키므로, 이들을 목표로 한 우울증의 치료에 효과적인 처방이 될 것으로 생각된다. 그러나 향후 serotonin 농도를 증가시키는 기전에 대한 추가적인 연구와 임상적 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

加味歸脾湯의 항산화 효능과 P815세포 내의 serotonin 농도, TPH, AAADC, MAOa의 mRNA 활성 변화를 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味歸脾湯은 DPPH radical 소거 능력과 SOD 활성도는 유의성 있게 증가하였다.
2. 加味歸脾湯은 60 ㎍/㎖, 80 ㎍/㎖ 실험군에서 serotonin 농도를 유의하게 증가하였다.
3. 加味歸脾湯은 TPH mRNA 발현을 유의하게 증가하였다.
4. AAADC, MAOa mRNA 발현에서는 모든 加味歸脾湯 실험군에서 유의한 변화를 보이지 않았다.

참고문헌

1. American psychiatric association. DSM-Ⅳ-TR text rivision: Diagnostic and statistical manual for mental disorders, 4th ed. Washington DC: American psychiatric press. 2000.
2. 민성길. 제5판. 최신정신의학. 서울:일조각. 2008 :274-99.
3. Piotr G, Janusz S, Małgorzata B, Antoni F, Elżbieta G. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment. Pharmacological reports. 2009;61 :436-47.
4. 이상용, 서원희. 鬱證과 우울증의 비교고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1997;6(1):505-14.
5. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회. 한의신경정신과학. 경기도:집문당. 2007:256-65.
6. 嚴用和. 濟生方. 北京:人民衛生出版社. 1980:117.
7. 薛己. 內科摘要. 江蘇:江蘇科學技術出版社. 1985 :41-2.
8. 문충모, 황의완. 歸脾湯의 항 Stress 효과에 대한 실험적 고찰. 경희의학. 1986;2(3):388-96.
9. 임동욱, 유동열. 加味歸脾湯이 면역조절작용에

미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1999;12(2):253-80.
10. 박동원, 박재우, 김진성, 류봉하, 류기원. 歸脾湯의 항피로효능에 관한 연구. 한방성인병학회지. 2000;6:162-73.
11. 박선동, 박현준, 주왕석. 歸脾湯 및 그 구성 약물군이 항산화효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001;16:11-27.
12. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:여강출판사. 2001:125.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;193:265-75.
14. Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, et al. Cross national epidemiology of major depression and bipolar disorder. JAMA. 1996;276:293-9.
15. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. Neuron. 2002;34:13-25.
16. Meltzer CC, Smith G, DeKosky ST, Pollock BG, Mathis CA, Moore RY, et al. Serotonin in aging, late life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging. Neuropsychopharmacology. 1998;18:407-30.
17. Lovenberg W, Bourgoin S, Hery F and Sjoerdsas A. Tryptophan hydroxylation; measurement in pineal gland, brain stem and carcinoid tumor. Science. 1967;155:217-9.
18. Huh SO, Park DH, Cho JY, Joh TH, Son JH. A 6.1 kb 5′ upstream region of the mouse tryptophan hydroxylase gene directs expression of E. coli lacZ to major serotonergic brain regions and pineal gland in transgenic mice. Mol. Brain Res. 1994;24:145-52.
19. Hwang ES, Kim GH. Biomarkers of oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. Toxicology. 2007;229(5):1-10.
20. Kupfer DJ, Frank E. The interaction of drug and psychotherapy in the long term treatment of depression. J. Affect Disord. 2001;62:131-7.
21. 김용구. 미래의 항우을제:어떠한 것들이 개발되고 있는가? 생물정신의학. 2004;11(1):14-25.
22. 유영수. 鬱證의 정신의학적 고찰. 원광한의학. 1995;5(1):125-40.
23. 江克明. 簡明方劑辭典. 中國:上海科學技術出版社. 1989:298.
24. Yu DH, Qiao SY, Zhao YM. Advances in study on bark of Albizzia julibrissin. Institute of Pharmacology and Toxicology. 2004;29(7):619-24.
25. 조창규, 이순곤, 이권해. MTT 분석법을 이용한 점액성 난소암세포주 RMUG sublines의 Cis-platinum 감수성에 관한 연구. 순천향대학논문집. 1993;16(4):1169-76.