동의신경정신과 학회지 제21권 제2호(2010년 06월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(2):61-73

봉독이 우울증 모델 흰쥐에게 미치는 영향

이진희, 김근우, 구병수

동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실

Experimental Study on the Anti-depressive Effect of Bee Venom Injection

Jin-Hee Lee, Geun-Woo Kim, Byung-Soo Koo

Dept. of Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Dong-Guk University

Abstract

Objectives :
The purpose of this study was to assess anti-depressive effects of Bee Venom(BV) on an Animal Model of Depression induced immobility stress.

Methods :
There was 2 pre-experiments MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and Western blot test and 3 main experiments : forced swimming test, tail suspension test and Y-maze task.
Male rats were used for main experiment. The subject was divided into 4 groups(1. control group injected only saline, without immobility stress 2. Negative group injected saline after 2 hours immobility stress 3. Positive group injected Amitriptyline after 2 hours immobility stress 4. BV group injected Bee Venom after 2 hours immobility stress). Each group consisted of 6 rats. Forced swimming test, tail suspension test, Y-maze task were used to evaluate anti-depressive effect of Bee Venom.

Results :
In MTT assay, as the density of BV increased, the existence rate of primary neuronal cell increased. In Western blot test, the density of CREB and AKT was increasing as time went by. In forced swimming test, BV group showed immobility decreased more than Normal group and Positive group. In tail suspension test, Normal group and Positive group showed immobility decreased more than BV group. In Y-maze task, BV group showed immobility decreased more than Normal group, but Positive group showed immobility decreased more than BV group.

Conclusions :
These results suggest that Bee Venom may have anti-depressive effect on depression.

Key Words :
Bee Venom, Depression, Immobility stress, Tail suspension, Y-maze task

투고 : 2010. 5. 10. 수정 : 2010. 6. 1. 채택 : 2010. 6. 2.
교신저자 : 구병수, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 일산한방병원 신경정신과
Tel) 031-961-9140, Fax) 031-961-9009, E-mail) koobs@dongguk.ac.kr
이 논문은 2008년 2월 동국대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학 전공 석사학위 논문임.

Ⅰ. 서 론

우울증이란 가장 흔한 정신 장애 중 하나로 사람이 살아가면서 일상의 삶에 대하여 흥미를 느끼지 못하고 절망하는 즉, 사는 맛을 알지 못하게 되는 병이다. 여러 보고에 의하면 주요 우울 장애의 평생 유병율은 약 15%로 상당히 높고, 발병 연령이 빨라지거나 발병률도 증가되는 경향이 있다고 한다[1].

우울증의 원인은 현재까지 명확하게 밝혀져 있지는 않으며, 유전, 생물학적 요인, 심리사회적 요인 들이 복합적으로 작용하여 발병한다고 알려져 있을 뿐이며, 신체 질환이나 약물에 의해서도 발생할 수 있다. 그 중 생물학적 요인으로는 catecholamines과 그 관련물질, indoleamines와 그 관련물질, 기타 신경물질과 같은 생체 아민에 의한 영향, 부신피질호르몬이나 갑상선 호르몬, 성장호르몬과 같은 신경내분비학적인 요인이 있으며, 이로 인해 우울증이 발생할 수 있다. 이러한 요인에 바탕을 둔 많은 가설과 연구가 이루어지고 있다[2].

韓醫學에서는 우울증이라는 명칭을 사용하지는 않지만, 鬱證, 氣鬱, 癲症, 脫營失精, 虛勞, 不眠, 嗜眠, 不思食등과 관련이 깊다. 憂는 근심으로 인하여 마음이 답답하고 울적한 상태로 의기소침한 것을 말하는데, 『靈樞』의 〈口問篇〉 에는 "悲哀愁憂則心動", "憂思則心系急"[3]이라 하여 心과 관련이 연관된다고 보았다. 鬱證은 情志不舒, 七情所傷, 外感 및 飮食內傷으로 인하여 발생하는 병으로 여겨, 서양의학의 신경쇠약이나 갱년기 장애, 우울증, 정신병적 장애와 유사하다고 인식하고 있으며, 《丹溪心法附餘》에 "鬱者 結聚而不得發越也"로서, 鬱은 氣機가 鬱滯되어 發越하지 못함으로써 유발되는 인체에서의 기능적 장애를 말하는 것으로 생각되고 있다[4].

봉독요법은 꿀벌의 鍼刺戟과 봉독의 生化學的 特異物質이 인체에 미치는 藥理作用을 이용한 治療方法이다. 이는 약 2000년 전부터 民間療法의 하나로 關節炎, 痛風 등의 諸疾患에 응용되어 왔으며 韓醫學에 있어 鍼灸學의 한 분야로 인식되고 있으며[5], 봉독의 주요 성분은 약 40가지 정도로 peptide, enzymes, physiologically active amines, carbohydrates, Lipids, amino acids 등으로 나누어 볼 수 있다[5,6]. 이 중 중요한 역할을 하는 Peptide로는 melittin, apamin, adolapin 그리고 Mast Cell Degranulating Peptide(MCD peptide)를 들 수 있는데[6], melittin은 용해작용, 효소작용, 통증 유발 작용, 항균작용, 방사능 저항 작용 등이 있으며[7], apamin은 중추성 신경독성 펩티드로 melittin과 함께 cortisone 분비를 증가시켜 소염효과를 나타내고, 시상하부에 serotonin 증가를 유도하는 약리 작용이 있다[8].

봉독의 치료 작용은 전신적, 국소적 작용과 經穴作用으로 나누어 생각해 볼 수 있는데, 全身作用은 봉독이 신체의 면역계에 변화를 초래하고 시상하부- 뇌하수체- 부신피질 축에 작용하여 수일간 혈중 부신피질 호르몬 양을 증가, 유지시키는 작용 등을 질병에 이용하는 것[9,10]이고, 국소작용은 근골격계 질환의 경우에 봉독이 그 투여 부위에 일으키는 국소적 효과로 항염증, 진통 효과이다. 경혈 작용은 봉독 자극 부위를 침구학 이론에 따라 선택한 경혈의 자극에 의한 생화학적 효과와 봉독 자체의 효과가 상승작용이 일어나는 것을 말한다[9].

이러한 봉독의 효과에 대한 연구 경향은 봉독의 항염 효능 관련, 진통 효능 관련, 면역 관련, 봉독 요법의 안정성관련 논문들이 발표되고 있는데, 항염·진통 관련 논문의 경우 초기의 효능 입증 연구에서 기전 연구 쪽으로 경향이 바뀌어

가고 있으며, 면역 관련 논문의 경우 초기의 면역 증진 효능 등의 연구에서 항암 관련 연구로 바뀌어 가고 있다[11].

봉독의 전신 작용이 시상하부-뇌하수체-부신피질 축에 작용하며, 봉독 주사 시 뇌간의 세로토닌(serotonin; 이하 5-HT)의 분비에 부분적으로 영향을 주는데[12], 이는 봉독이 병태 생리학적으로 우울증과 가장 관련이 높은 시상하부-뇌하수체- 부신피질 축과 카테콜아민/교감신경계의 활성[12]에 영향을 미친다고 볼 수 있다. 또한, 봉독의 주요 성분인 melittin과 apamin의 약리 작용을 고려해볼 때 봉독이 우울증에 효과가 있을 것이라고 생각된다.

이에 봉독이 우울증 개선에 효과가 있는지를 확인하기 위하여 선행실험으로 실험동물모델을 통해 일차 신경교세포(primary neuronal cell:PNC)를 분리, 배양하여 봉독에 의한 일차 신경교세포의 증식 활성에 대한 효과를 측정하였다. 그 후에 실험동물모델을 대상으로 강제수영시험, 꼬리현수법, Y- maze task 를 실시하여 봉독의 우울증에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고한다.

Ⅱ. 실 험

1. 재료

1) 실험동물

실험동물은 오리엔트바이오(주)에서 구입한 외관상 건강한 ICR계 웅성 mouse로 6주령(20~26g)을 사용하였으며, 온도 22±1℃, 습도 55±1%, 12시간 light-dark cycle의 통제된 사육실(동국대 일산병원 동물실)에서 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 반입 후 7일 동안 적응 사육시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 실험시약

선행실험으로 봉독에 대한 일차신경교세포의 활성도에 대한 검사를 하기 위해 10% Fetal Bocine Serum(FBS;Invitrogen, USA)이 함유된 DMEM/F12를 사용하여 일차신경교세포를 배양하며, MTT assay 에서는 뇌 손상을 유발시키는 amyloid beta 1-42과 봉독을 사용하여 일차신경교세포를 배양시키는 데 사용하였으며, MTT용액과 dimethysulfoxide (DMSO; Sigma)를 용해제로 사용하였다. Western blot 분석법에서는 모든 세포 용해질의 표본 완충제는 62.5mmol/l Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol 1을 사용하고, 염색약으로 Ponceau-S가 사용되었고, Tris-buffered Saline(TBS-T), 5% 탈지분유액을 세척과 blocking에 각각 사용되었다.

본 실험에서는 봉독(Bee venom; 이하 BV)이 0.6mg/kg과 Amitriptyline (Sigma) 1mg/kg이 사용되었다.

2. 방법

1) 선행 실험

(1) 일차 신경교세포 (primary neuronal cell) 분리 및 배양

신경교세포의 배양은 Liu의 방법에 따라, 태어난 지 2일 이내의 흰쥐의 대뇌를 사용하였다. 간단히 하면, meninges와 blood vessels을 제거한 후, 뇌조직은 분쇄하여 세포를 분리한 후 150 ㎠ flask에 5×107의 세포를 넣고 일주일간 37℃, 5% CO2 incubator에서 10% Fetal Bovine Serum (FBS; Invitrogen, USA)이 함유된 DMEM/F12를 사용하여 배양하였다. 그 다음 일주일이 지나 세포가 자란 후에 사용하였다.

(2) 세포 활성도 측정 (MTT assay)

MTT (tetrazlium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) assay는 Sladowski의 방법13)을 따라 행하였다. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 tetrazolium을 청자색을 띄는 비수용성의 formazan으로 환원시키는 세포의 능력을 이용하는 검사법이다. formazan의 흡광도는 580nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 세포가 살아있고 대사가 왕성한 세포의 산화 환원력을 반영한다.

MTT assay는 우선 12 well plate에 primary neuronal cell를 12시간 배양한 후 FBS를 첨가하지 않은 serum-free medium, DMEM/F12로 교환하여 16시간 동안 안정화시키고, 여러 농도의 amyloid beta 1-42 또는 bee venom을 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 그리고 MTT 용액 (2mg/ml)을 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethysulfoxide (DMSO; Sigma)로 용해시켜 580nm의 파장에서 microplate reader(Molecular divices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

세포 생존율 (Cell viability, %)은 다음과 같이 정의를 하였다. 정상군의 값을 control로 하고 이때의 O.D. 값을 세포의 생존도가 100%라고 정의하고, 나머지 군의 측정한 O.D. 값을 상대치로 환산을 하면 다음과 같다.

Cell viability = (실험군 값/ 정상군 값) × 100

(3) Western blot 분석법

봉독에 의한 일차 신경교세포의 증식 활성에 대한 효과를 측정하기 위해 0.1ug/ml농도의 봉독을 처리하고 이 세포들로부터 10min, 30min, 1h, 2h의 각 시간대별로 단백질을 추출하여 신경세포의 생존에 관여하는 것으로 잘 알려진 CREB 단백질에 대한 western blot을 시행하였다.

모든 세포 용해질들은 표본 완충제(62.5 mmol/l Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol) 내에 boiling cell에 의해 만들어졌다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid (BCA, Pierce)법을 사용하였다. 정량된 단백질 시료 50 ug는 4-12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel (Invitrogen) 전기 영동법(SDS-PAGE)으로 분리되었고, nitrocellulose paper(Amersham)로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막을 Ponceau-S로 염색하여 단백질이 완전하게 옮겨졌음을 확인하고 0.1 % Tween 20을 포함하는 Tris-buffered saline (TBS-T) 로 씻은 후 5% 탈지분유 액으로 30분 이상 blocking 하였다. 각 단백질은 항체와 함께 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 막을 TBS-T에서 10분씩 3회 세척한 후, blot을 2차 항체와 함께 1시간 반응시켰다. 2차 항체 반응 뒤 막을 씻고 enhanced chemiluminiscence system (ECL, Pierce)으로 원하는 단백질을 가시화 하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 image 장비 (LAS-3000, Fuji)를 이용하였다.

2) 본 실험

(1) 실험군 구성

실험군은 1주일간 적응 사육시킨 후 무게별로 균등하게 6마리씩 4 group으로 나누고, 각 group별로 다음과 같이 처치하였다.

① Control group : Immobility stress 유발없이 saline만 투여.

② Negative group : 2시간 동안 immobility stress 유발 후, saline 투여.

③ Positive group : 2시간동안 immobility stress 유발 후, 항우울 효과의 표준 약물로 알려진 Amitriptyline을 복강 투여.

④ BV group : 2시간동안 immobility stress 유발 후, BV를 복강 투여.

(2) 강제수영법에 의한 항우울 효과 측정

강제수영법(Forced swimming test)에 의한 항우울 활성은 Porsolt등의 방법[14]에 의해 측정하였다. 먼저 실험동물을 훈련시키는 예비실험을 실시하였는데, 25±1℃의 물을 10cm 수위로 채운 유리원통 (직경 15cm, 높이 25cm) 속에 mouse를 1마리씩 넣어 15분간 수영시켰다. 수영하는 쥐를 관찰하면서 최초로 정지상태 (immobility)에 도달하는 시간을 기록하여 매일 쥐에게 같은 방법으로 수영연습을 3일간 반복하였다. 최초의 정지시간이 대체로 일정한 쥐를 선택하여 2시간 동안 immobility stress를 유발하고, 약물을 복강 주사한 후 30분후 6분간 강제 수영을 시켰다. 최초 2분간을 제외하고, 나머지 4분 동안의 immobility를 측정하였다.

(3) 꼬리현수법에 의한 항우울 효과 측정

꼬리현수법(Tail Suspension test)에 의한 항우울 활성의 측정은 Steru등의 방법[15]으로 실시하였다. 꼬리가 매달린 쥐는 처음에는 활동적으로 움직이다가 stress로 우울해지면 가만히 있는 부동자세를 보이며 이러한 움직임을 교대로 나타내는데 항우울 약물을 투여하면 부동자세를 보이는 시간을 감소시키므로 이 시간을 측정하여 우울증 억제활성을 확인한다. 2시간동안 immobility stress를 유발하고, 약물을 복강 주사한 후 30분후 6분간 꼬리현수법을 실시하고 immobility를 측정하였다.

(4) Y-maze task

단기 행동 기억 정도를 측정하는 Y-maze test를 이용하여, 약물에 의한 mouse의 행동성을 측정하였다. Y자형 미로 측정 장치는 3개의 통로(arm)를 뻗어 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며 각 가지는 길이 25cm, 높이 14cm, 폭 5cm이고 동일한 각도로 위치한다. Y자형 미로의 한 통로의 끝에 실험동물의 머리 부분이 향하도록 하고 7분 동안 자유롭게 통로를 돌아다니도록 한다.

동물의 움직임을 기록하고 동물의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것(arm entry)으로 보고 총 통과 횟수를 측정하여 약물에 의해 동물의 활동성에 어떠한 변화가 있는지 확인한다.

3. 통계처리

모든 측정값은 평균값±표준오차(mean±S.E.M)로 표시하였고, 각 실험군과의 통계학적 분석은 Window 용 SPSS를 이용하였다. 각 군간 측정치의 비교는 일원분산분석을 시행하였으며, 사후검증은 Tukey test, Scheffe test, Duncan test를 통해 검증하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 신뢰구간 $p<0.05$에서 의미를 부여하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 세포 활성도 측정(MTT assay) 결과

12 well plate에 일차 신경교세포(primary neuronal cell)을 12시간 배양한 후 FBS를 첨가하지 않은 serum-free mediun, DMEM/F12로 교환하여 16시간 동안 안정화시키고, 여러 농도의 BV로 세포 활성도를 측정한 결과, BV의 농도가 높은 것이 낮은 것보다 세포의 생존도가 높음을 알 수 있다(Fig. 1).

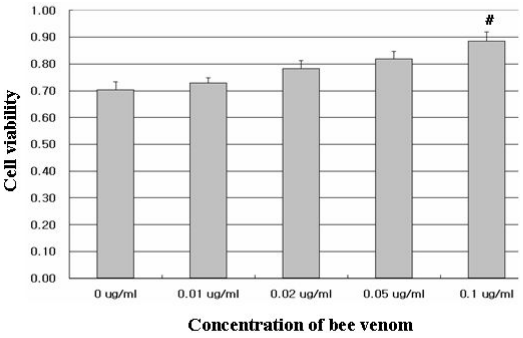


Fig. 1. The effect of bee venom on proliferation of primary neuronal cell.
The number of primary neuronal cell was examined 2 day after BV treatment using MTT assay. The error bars indicate S.E. (n=3).
# p<0.005 compared with 0 ug/ml.

2. Western blot 검사 결과

BV에 의한 일차신경교세포의 증식 활성에 대한 효과를 측정하기 위해 0.1㎍/ml 농도의 BV를 처리하고 이 세포들로부터 10분, 30분, 1시간, 2시간의 각 시간대 별도 단백질을 추출하여 신경 세포의 생존에 관여하는 것으로 잘 알려진 CREB 단백질에 대한 western blot 검사를 시행한 결과, 대조군과 비교하여 BV를 투여한 군이 시간이 지남에 따라 CREB의 밀도가 높아지는 것을 보아 일차신경교세포의 증식이 활성화됨을 알 수 있다. 세포 생존 및 분화에 중요한 역할을 하는 Akt 단백질에 대한 western blot검사 결과 BV를 투여한 군을 대조군과 비교했을 때, 일차신경교세포의 증식이 활성화됨을 알 수 있다(Fig. 2, Fig. 3).

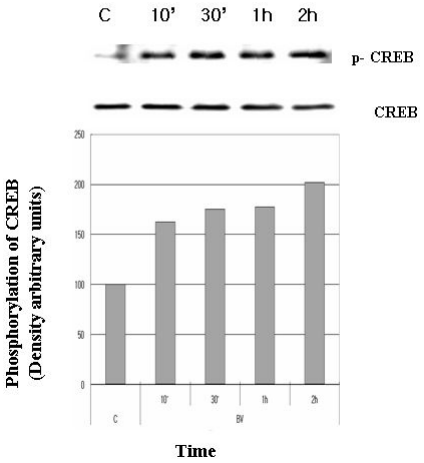


Fig. 2. BV induces phosphorylation of CREB in primary neuronal cell.
Primary neuronal cells were treated with 0.1 ug/ml BV for 10, 30, 60, and 120 min.
C : non-treated primary neuronal cell

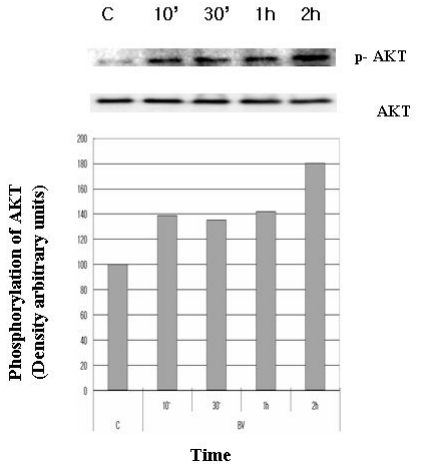


Fig. 3. BV induces phosphorylation of AKT in primary neuronal cell.
Primary neuronal cells were treated with 0.1 ug/ml BV for 10, 30, 60, and 120 min.
C : non-treated primary neuronal cell

3. 강제수영법(Forced Swimming test)에 대한 효과

6분 동안 측정된 최초 정시상태(immobility)는 복강에 봉독을 투여한 群이 대조군보다 감소하

였으며, 항우울 약물인 Amitriptyline 을 투여한 Positive 群보다 더 감소한 결과가 나타났다 (Table Ⅰ, Fig. 4).

Table Ⅰ. The Antidepressant Effects of the BV by Forced Swimming Test

Immobility time(s)	Mean± Std Error of Mean
Control	207.7 ± 3.2
Negative	225.5 ± 1.6[a]
Positive	210.8 ± 5.9
BV	205.4 ± 4.4[b]

The immobility time was measured during a 6-min experimental session.
[a]p<0.05 compared with control.
[b]p<0.05 compared with negative

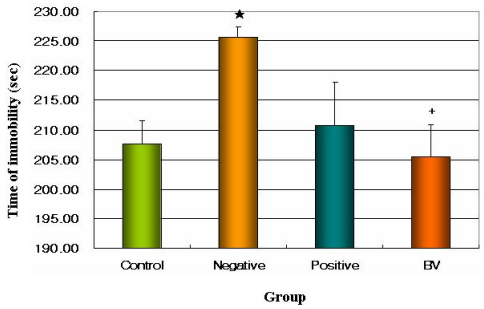


Fig. 4. The antidepressant effects of BV by Forced swimming test
Each value is the mean with S.E. (n=6)
★ p<0.05 compared with control
+ p<0.05 compared with negative

4. 꼬리현수법(Tail Suspension Test)에 대한 효과

약물을 복강 주사한 30분 후에 6분간 꼬리현수법을 실시하여 측정된 최초 정지 상태(immobility)는 봉독을 투여한 群이 saline을 투여한 Negative 군보다는 감소되어 나타났으나, 대조군이나 항우울 약물인 Amitriptyline 을 투여한 Positive 群보다 더 증가된 결과를 보였다(Table Ⅱ, Fig. 5).

Table Ⅱ. The antidepressant effects of the BV by Tail suspension Test

mmobility time(s)	Mean± Std Error of Mean
Control	40.9 ± 4.5
Negative	71.9 ± 5.7[a]
Positive	38.6 ± 5.5
BV	48.9 ± 4.0[b]

The immobility time was measured during a 6-min experimental session.
[a]p<0.005 compared with control.
[b]p<0.05 compared with negative

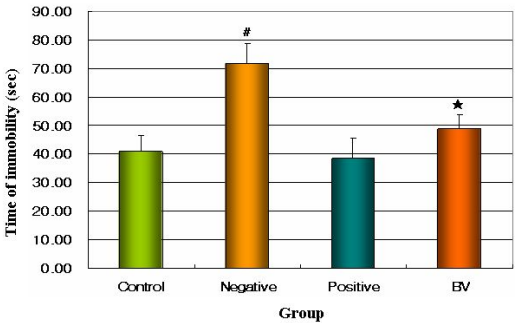


Fig. 5. The antidepressant effects of BV by Tail suspension test
Each value is the mean with S.E. (n=6)
# p<0.005 compared with control
★ p<0.05 compared with negative

5. Y-maze task 에 대한 효과

7분간 Y-maze task를 실시하여 arm entry 의 횟수를 측정하여 mouse의 행동성을 측정해본 결과, 대조군에 비해 Negative, Positive 및 BV 群 모두 유의한 차이가 나타나지 않음을 확인했다(Negative; p=0.753, Positive; p=0.545, BV; p=0.966). 또한, 봉독을 투여한 군과 Negative 군 간에도 유의한 차이가 없음을 확인하였다 (p=0.476). 봉독의 투여가 운동성에는 영향을 주지 않는다는 것을 확인함으로써, Forced swimming test 나 Tail suspension test를 통해 확인한 봉독의 항우울 효과가 봉독에 의한 운동성 변화와는 상관이 없다는 것을 확인할 수 있다(Table Ⅲ, Fig. 6).

Table Ⅲ. The locomotor activity effects of the BV by Y-maze Test

Arm Entries (횟수)	Mean± Std Error of Mean
Control	31.6 ± 1.4
Negative	33.7 ± 1.8
Positive	28.4 ± 0.9
BV	30.6 ± 1.7

The total entries was measured during a 7-min experimental session.

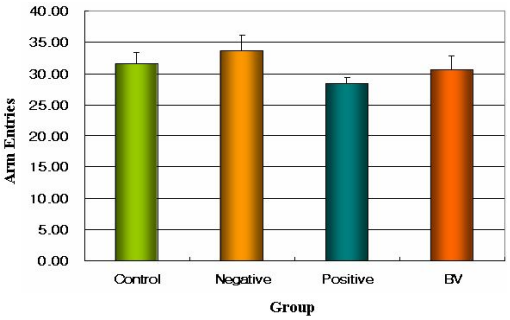


Fig. 6. The locomotor activity effects of the BV by Y-maze test
The total entries was measured during a 7-min experimental session.
Each value is the mean with S.E. (n=6)

Ⅳ. 고 찰

우울증은 우울하거나 자극받기 쉬운 기분 또는 흥미나 관심의 감소 중 하나의 증상이 있고, 체중감소나 증가, 불면 또는 과수면, 정신 운동 지연이나 혼란, 피곤이나 의욕감소, 가치 없다고 느끼거나 지나친 죄책감, 집중력 감소와 우유부단, 죽음에 대한 사고나 자살사건 자살기도 중 4가지 이상의 증상이 있는 경우인데, 2주 이상 이러한 증상이 지속될 때 憂鬱症이라고 진단한다. 인구의 15%이 인생의 어느 시점에서 주요 우울삽화를 경험하고, 모든 외래 환자의 6~8%에서 우울증 진단 기준을 만족시킨다[16]. 따라서 대부분의 우울증 환자들은 우울증으로 인해서 직장생활이나 학업의 어려움 등 사회적 기능을 상실하게 된다[17].

이러한 우울증을 유발시키는 원인으로 유전, 생물학적 요인, 심리사회적 요인들이 복합적으로 작용하여 발병한다고 알려져 있으며, 신체 질환이나 약물에 의해서도 발생할 수 있다[2].

이 중 생물학적 요인을 통해 우울증의 원인을 살펴보면, 초기에는 단가아민 고갈가설(monoamine depletion hypothesis)이 유력하였는데, 이는 우울증이 단가아민 신경전달물질들 가령 도파민, 5-HT, 노르아드레날린의 효용성의 저하, 특히 시냅스에서 5-HT과 노르에피네프린(norepinephrine; 이하 NE)이 고갈되어 나타난다는 가설이다[12,18]. 실로 5-HT는 감정이나 식욕, 수면 등의 행동을 통제하는 대표적인 중추 신경계 물질로서 기분장애등의 정신 병태 생리에서 중요한 역할을 한다고 보고되어져 왔다[19]. 그러나 이 가설은 시냅스에서 5-HT 혹은 NE 고갈시키는 파라다임을 통해 그 관련성이 더욱 복잡하다는 것이 밝혀졌다[12].

이 외에도 사이토카인 계 역시 병태생리학적으로 우울증에 영향을 주는데, 이와 같은 사이토카인의 역할은 사이토카인의 특별한 기능에 의한 것이 아니라 그들의 수용체가 청반핵, 해마, 전두엽 피질 그리고 시상하부 등의 중치신경계 구조물에 위치하고 있기 때문이다. 사이토카인은 시상하부-뇌하수체-부신피질 축과 카테콜아민/교감신경계 성과 관련이 있는데, 사이토카인들은 hypothalamic corticotropin- releasing hormone (CRH), pituitary adreno-corticotropic hormone (ACTH), adrenal steroidogenesis를 자극하여 시상하부-뇌하수체-부신피질 축을 활성화 시킬 뿐만 아니라, 5-HT의 전구물질인 trytophan에서 kynurenine으로 대사시키는 indoleamine-2,3-dioxygenase(IDO)를 활성화시켜 뇌에서 5-HT

합성을 결핍시키므로 우울증을 유발한다[12].

한의학적으로 볼 때 憂鬱症은 鬱證, 氣鬱, 癲症, 脫營失精, 虛勞, 不眠, 嗜眠, 不思食 등과 관련이 깊으며 이에 근거하여 치료에 접근하고 있다. <東醫寶鑑 內景篇 神門>[20]에서 憂에 대해 "靈樞曰, 愁憂不解則傷意, 意爲脾神也. 又曰 愁憂者 氣閉塞而不行.盖憂則隔塞否閉, 氣脈斷絶而上下不通也."라 하였다. 鬱證은 情志不舒로 인하여 氣機가 울체되어 생기는 病으로, 鬱이란 억압되고 침울한 정신상태로 인하여 모든 생리기능이 침체되는 현상으로 의욕상실, 흥미상실, 침묵, 무기력 등 생기가 없는 것을 의미한다. 『東醫寶鑑 內景篇 氣門』[20]에 "入門曰 鬱者 病結不散者"라 하였으며, 『素問·刺法論』[21]에서 "抑之鬱發", 『素問·本病論』에서 "久而火鬱", "日久成鬱", "抑之變鬱", "伏之化鬱" 이라 하여 氣機가 오래도록 소통되지 않아 발생하는 것을 鬱證임을 설명하였으며, 心情抑鬱, 情緖不寧, 胸部滿悶, 脇肋脹痛, 或易怒慾哭, 或咽中如有異物梗阻 등이 주요증상으로 보았다[2,22,23].

우울증의 치료방법은 다양한 데, 최근 연구 동향을 살펴보면, 김[22]은 중의문헌에 있는 우울증에 관련된 침구 치료에 대한 논문을 발표하였고, 홍[23]은 시호가 우울증 모델 백서의 catecholamine에 미치는 영향에 대해 연구하여 유의성 있는 결론을 얻었고, 한[4]은 加減蘇合香元를 마우스에게 향기흡입 및 경구 투여를 통해 항우울증을 억제하는지에 대해, 백[24]은 감맥대조탕이 신체부동 스트레스 백서에 미치는 영향에 대해서, 이[25]는 삼정환의 항우울 효과에 대한 실험 연구 등이 이루어지고 있다.

서양의학에서는 우울증의 치료에 크게 약물치료, 인지치료, 대인관계치료, 행동치료, 가족치료, 물리치료 등의 정신치료를 시행하는데, 경미한 우울증은 정신치료만으로도 치료가능하나, 중등도 이상의 심한 우울증은 항우울제를 사용한 약물치료를 필요로 한다. 우울증 치료에 사용하는 약물로는 삼환계 항우울제, 유사 삼환계 항우울제, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제, 단가아민 산화효소 억제제, 기타 L-tryptophan, flupenthixol, nefazodone 등의 항우울제 등이 있다[26].

蜂毒은 꿀벌의 毒囊에 들어 있는 약 40여 가지의 유효 성분으로 구성된 물질로, BC 2000년경의 이집트 파피루스 문서에 봉침이나 죽은 벌 자체를 아픈 곳에 직접 문질러 치료한다는 기록이 있는 정도로 오래된 치료법이다. 한의학의 역사 기록에도 이미 2000여 년 전부터 매우 정교한 방법으로 봉독을 채취하고 가공하여 치료에 응용한 기록이 있다. 매장년도가 기원전 168년인 중국 장사 마왕퇴 3호 한묘에서는 1973년에 帛書, 竹簡 혹은 木簡 형태의 의서가 총 15종 출토되었는데, 그 중 『養生方』과 『雜療方』에 봉독 용법이 각각 1례씩 2례가 소개되어 있다[7].

蜂毒의 性味는 苦, 辛, 平, 有毒하고 祛風除濕, 止疼痛, 解痙平喘, 消腫降壓하는 효능이 있어 鎭痛, 消炎, 鎭痙, 抗癌, 免疫增强, 循環促進, 抗菌, 放射能抵抗性作用을 나타내며[27,28], 蜂毒의 성분은 약 40가지 정도로 크게 polypeptides, enzymes, physiologially acitive amines, non peptide components로 구성되어 있다. 이 중 polypeptides는 건조중량의 약 50%를 구성하고 있으며, 주요 성분으로 melittin, apamin, MCD-peptide 등이 있다[8].

Melittin은 26개의 amino acid로 구성된 활성 peptide로 용혈작용과 효소작용을 하는데, 효소작용에서는 우울증과 관련하여 생각할 수 있는 뇌하수체와 부신피질체계를 자극하여 catecholamine과 cortisone 분비를 촉진시킨다[29].

Catecholamine에는 norepinephrine, epinephrine, dopamine이 있으며, norepinephrine은 교감 신경

충동 전달체의 역할을 하며 감정, 주의, 각성상태와 관계한다. dopamine은 세로토닌과 norepinephrine과 같이 우울증에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되고 있다[30].

Apamin은 척수에 흥분성 폴리시냅스 경로를 더욱 효과 있도록 유도하는데, apamin에 의해 매개된 norepinephrine과 dopamine의 증가는 apamin의 약리학적 효과 즉 운동신경 흥분, 전기 작용의 탈동시반응, 혈압증가 등에 관련된 듯하다. serotonin도 이 효과에 관련된 듯 하며 apamin 주입 후 시상하부 부위에 serotonin이 3배 정도 증가된다. apamin의 영향 아래 증가된 부위에 serotonin의 감소는 뇌구조에 향신경성 약물의 선택적인 효과에 기인한 것으로 여겨진다[29].

또한 미량이긴 하지만, non peptide components는 histamine, dopamine, noradrenaline 등으로 구성되어 있으며, 이러한 성분들로 구성된 봉독의 약리 작용을 살펴보면 독성작용, 소염·진통작용, 알러젠 작용, 통증 유발 작용, 세포용해, 신경 독성 작용, 면역 조절 작용, 순환촉진 작용, 항균작용, 방사능 저항성 작용 등이 있으며, 이 중 소염 진통 작용에는 부신피질 자극 효과와 대항 자극 효과, 유해 산소 억제 작용이 있다[8].

학회지에 실려진 봉독 관련 논문들의 경향을 살펴보면, 실험논문과 임상논문, 고찰에 관련된 논문 순으로 발표되고 있다. 실험 논문의 경우 봉독의 성분 분석, 봉독의 안정성 실험, 봉독의 항체 생성 실험, 봉독의 효능 실험이 주를 이루었으며, 봉독의 효능 실험의 경우 항염, 소염, 진통, 해열, 활혈, 항경련, 면역관련 작용에 관한 실험이 이루어지고 있다. 임상 논문의 경우 질병치료, 봉독의 부작용, 안전성에 관련된 논문이 기재되었는데, 질병 치료 관련 논문의 내용을 살펴보면, 요추 추간판 탈출증, 진행성 근위축증, 중풍 편마비 환자의 견관절 동통, Cervical Disk Protrusion, 류마토이드 관절염, 슬관절염 환자 등 에 대한 임상적 연구가 있었다. 고찰 논문의 경우 봉침요법의 개설과 생화학적, 약리학적 고찰, 봉독 요법의 임상활용에 대한 전반적인 소개 등의 논문들이 있었다[31].

많은 논문들이 봉독의 다양한 효능 등에 대해 발표를 했지만, 봉독의 주요 성분인 melittin과 apamin이 우울증의 병태 생리의 중요한 두 축인 시상하부-뇌하수체-부신피질 축과 카테콜아민/교감신경계에 영향을 미친다는 것을 감안해 우울증과 같이 기분 장애에 이용한 예는 없었다.

이에 저자는 봉독이 우울증의 치료에 적용될 수 있을지를 연구하기 위해 봉독이 일차 신경교세포에 미치는 영향을 선행 실험을 하였다. 실험결과, MTT assay에서 봉독의 농도가 높음에 따라 일차 신경교세포의 세포 활성도가 증가됨을 확인할 수 있었으며, Western blot 분석법에서도 봉독을 투여하지 않은 대조군에 비해 봉독을 넣은 군은 10분, 30분 ,1시간, 2시간의 시간이 지남에 따라 신경 세포의 생존에 관여하는 것으로 잘 알려진 CREB 단백질의 농도가 증가됨을 알 수 있었다. CREB 단백질은 신경세포의 가소성을 조절하여 신경세포의 성장에 관여한다[32]. 해마에 있는 CREB 단백질은 항 우울제와 매우 유사한 행동 반응을 나타내며, 설치류에서 CREB 단백질의 증가는 항 우울제와 같은 반응을 보인다. 따라서 이러한 CREB 단백질의 농도 증가는 봉독의 항 우울 효과가 있음을 알 수 있다[33,34,35,36]. Akt 단백질은 신경세포의 분화와 밀접한 관련이 있는데, 한번 활성화된 Akt 단백질은 세포괴사에 대항해서 세포들을 보호하며, 뇌하수체에 있는 활성화된 PKB/Akt는 저산소 스트레스와 NO 독성에 대항하여 신경을 보호한다[37]. 또한 Akt는 정확한 기전이 밝혀지지는 않았지만

CREB를 활성화시킨다[28,36]. 따라서 BV를 투여한 군에서 시간이 경과함에 따라 Akt가 증가하는 것은 BV가 항우울 효과가 있음을 반영해주는 것이다.

이러한 봉독이 일차 신경교세포에 미치는 유의성 있는 결과를 바탕으로, 봉독을 우울증에 사용할 수 있는지에 대해 알아보기 위해 본 연구를 하게 되었다. 이를 위해 실험동물을 대조군, 스트레스를 준 후 봉독·항 우울제·saline 을 투여한 군으로 나누어 강제수영법, 꼬리현수법, Y-maze task를 이용하여 실험하였다.

강제수영법은 생쥐나 백서에게 강제수영을 시켰을 때 희망의 소실과 기분의 저조로 인하여 특징적인 부동자세를 취하게 되는데, 이를 절망적인 행동으로 간주하고, 이 시간을 측정하여 우울증상의 지표로 삼는 것이다. 모든 동물 모형에서와 마찬가지로 강제수영법에서도 증상의 지표가 되는 행동은 반드시 약물의 처치에 의해 행동의 개선이 있어야 하는데, 이 강제수영법은 항우울제의 적합성 여부를 검사하는 방법으로 가장 많이 활용되며, 현재까지 보고된 우울증 연구의 동물 모형 중 가장 편리하고 신뢰성이 있는 모형으로 알려져 있다[30,38]. 이러한 강제수영법 검사에서 BV 群이 대조군이나 항우울제를 투여한 Positive群에 비해 유의 있는 결과가 나왔다.

꼬리현수법에서는 부동 상태 발현 시간이 BV 群이 Negative 群에 비해 낮게 나타났으나 대조군이나 Positive 群에 비해 높게 나왔다.

우울증에 흔히 학습과 기억 장애가 수반되는데[38], Y-maze task에서 7 분동안 arm entry 의 횟수를 측정하여 mouse의 행동성을 측정해본 결과, 대조군에 비해 Negative, Positive 및 BV 群 모두 유의한 차이가 나타나지 않음을 확인했다. 또한 봉독을 투여한 군과 Negative 군 간에도 유의한 차이가 없었다. 이는 봉독의 투여가 운동성에는 영향을 주지 않는다는 것으로써, Forced swimming test 나 Tail suspension test 를 통해 확인한 봉독의 항 우울 효과가 봉독에 의한 운동성 변화와는 상관이 없다는 것을 확인할 수 있었다.

봉독이 일차 신경교세포의 활성과 증식에 미치는 유의성 있는 결과를 바탕으로, 강제수영법과 Y-maze task 에서는 유의한 결과를 얻었다. 그러나 이러한 결과만으로 봉독의 항 우울 효과를 확증할 수 없다. 봉독을 기분 장애에 적용하려면, 봉독의 항 우울 효과를 더욱 정확히 평가해야하며 그러기 위해서는 더 다양한 실험의 개발이 필요할 것으로 여겨지며, 또한 그 항 우울의 기전을 규명하는 연구 또한 정밀하고 구체적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

우울증에 대한 봉독의 효과를 검증하기 위하여 白鼠를 대상으로 MTT assay 와 Western blot분석법을 통해 얻어진 일차 신경교세포와 봉독에 대한 결과와, 항우울 활성을 측정하는 강제수영법과 꼬리현수법, 단기 행동 기억 정도를 측정하는 Y-maze task를 실시하여 봉독의 효과에 대한 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay에서 진한 농도의 봉독을 사용하여 배양한 경우가 그렇지 못한 경우에 비해 일차 신경교세포의 생존도가 높았다.
2. Western blot 분석법 결과 봉독을 투여하지 않은 대조군에 비해 투여했을 경우시간이 경과함에 따라 신경세포의 생존에 관여하는 것으로 알려진 CREB 단백질과 Akt 단백질의

농도가 증가하는 결과를 통해 일차 신경교세포의 증식이 활성화됨을 알 수 있었다.

3. 강제수영법 결과 부동 상태 발현시간 저하 효과가 BV 군에서 대조군이나 항우울제를 투여한 Positive군에 비해 유의하게 나타났다.
4. 꼬리현수법 결과 부동 상태 발현시간은 BV 군이 Negative 群에 비해서 낮게 나타났다.
5. Y-maze task를 실시한 결과, BV 군이 Negative 群에 비해서는 별 차이가 없었으며, 이는 봉독이 白鼠의 운동성에 영향을 미치지 않았다는 것을 알 수 있다. 즉, Forced swimming test 나 Tail suspension test를 통해 확인한 봉독의 항 우울 효과가 봉독에 의한 운동성 변화와는 상관이 없다는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 연구 결과, 봉독의 항 우울 효과를 더욱 자세히 평가하기 위하여 다양한 실험 모델의 개발이 필요할 것으로 여겨지며, 또한 그 항 우울 기전을 규명하는 연구가 이루어져야 할 것이라고 생각된다.

참고문헌

1. 대한신경정신의학회. 신경정신과학. 서울:하나의학사. 1998:361-86.
2. 대한한방신경정신과학회편. 한방신경정신의학. 경기:집문당. 2005:254-6, 482-6.
3. 이경우 역. 編注譯解 황제내경 영추. 서울:여강출판사. 2000:211-6.
4. 한윤승. 加減蘇合香元 향기흡입 및 경구투여가 마우스의 우울증 억제효과에 미치는 연구. 동국대학교대학원. 2006.
5. 강준. 봉약침액과 Melittin이 RAW 264.7 세포의 NO, iNOS 및 MAPK에 미치는 영향. 2003. 경원대학교대학원.
6. 권기록, 고형균. 봉약침요법의 면역반응에 관한 임상적 연구. 대한침구학회지. 2000;17(1):169-74.
7. 고형균, 권기록, 인창식. 봉독약침용법. 서울:경희대학교출판국. 2003:1-5, 105-62, 214.
8. 신용승. 도해임상봉약침요법. 서울:의성당. 2004:39-40, 44, 53-4.
9. 이진선, 권기록, 최호영. HPLC를 이용한 봉약침의 주요 성분에 관한 연구. 대한침구학회지. 2000;17(4):120-9.
10. 김혜남. 봉독 약침 자극이 뇌간 신경 세포와 serotonin 성 신경 세포의 활성 변화에 미치는 영향. 대한 침구학회지. 2000;17(2):119-38.
11. 박장우. 봉독의 연구 경향에 대한 분석. 대전대학교대학원. 2006.
12. 김용구. 주요우울증에 사이토카인- 세로토닌 상호작용에 의한 신경병성 가설, 대한신경정신의학회지. 2004;43(4):386-92..
13. Sladowski. D, Steer SL, Clothier RH, Balls M. An improved MTT assay. J. Immunol. Methods. 1993;157:203-7.
14. Porslot RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression : a new animail model sensitive to antidepressant treatments. Nature. 1997;226(5604):730-2.
15. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tailsuspension test: A new method for screening antidepressant in mice. Psychopharmacology. 1985;85(3):367-70.
16. E. Braunwald. 해리슨 내과학. 서울:정담. 2003:2627-30.
17. 이광헌. 우울증 약물 치료의 최신 경향. 동국논집. 2000;19:274.

18. 김용구. 우울증에서 cytokines의 역할과 치료적 연관성. 대한정신약물학회지. 2000;11(4):304-11.
19. 이민수, 한창수, 김용구. 우울 장애의 세로토닌 전달체 유전자 다형성. 생물치료정신의학. 2002;8(1):88-95.
20. 허준. 동의보감. 경남:동의보감출판사. 2005:77, 91.
21. 이경우 역. 編注譯解 황제내경 소문 5권. 서울:여강출판사. 2000:279-88, 330-5.
22. 김여진, 박동석, 이윤호. 우울증의 침구치료에 관한 중의문헌의 고찰. 대한침구학회지. 2005;22(1):223-4.
23. 홍성유, 박선동. 柴胡가 우울증 모델 白鼠의 catecholamine에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4):245-53.
24. 백현. 甘麥大棗湯이 신체부동 스트레스 白鼠에 미치는 영향. 2006. 동국대학교 대학원.
25. 이상택. 三精丸의 항우울 효과에 대한 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 2008;101-15.
26. K. McKenzie. 우울증. 서울:아카데미아. 2005:9, 81-114.
27. 최정식, 박장우, 오민석. 봉독요법의 항염증기전 연구에 관한 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2006;15(10):142-5.
28. 이주연, 김인자, 최방섭, 김근우, 구병수. 봉독이 Glioma Cell 에 미치는 효과. 동의신경정신과학회지. 2008;19(3):117-27.
29. 권도희, 이재동, 최도영. 약침용 봉독성분 중 Apamin, Melittin, Phospholipase A2의 항암작용. 대한침구학회지. 2001;18(1):129-45.
30. 김용구. 우울증의 새로운 신경생물학. 생물정신의학. 2001;8(1):3-4.
31. 이홍석, 이재동, 고형균. 최근 10년간 국내의 봉독 관련 연구에 대한 고찰. 대한 침구 학회지. 2003;20(3):154-65.
32. 남윤영, 전우택. 우울증의 신경생물학적인 최신지견. 한국생화학분자생물학회. 2002;22(2):169-77.
33. William A. Carlezon. The many faces of CREB. Trends in Neurosciences. 2005;28(8):436-43.
34. Julie A. Blendy. The Role of CREB in Depression and Antidepressant Treatment. Society of Biological Psychiatry. 2006;1144-50.
35. Eero Castren: Neurotrophic effects of antidepressant drugs. Current Opinion in Pharmacology. 2004;4:58-64.
36. Joseph Peltier. PI3K/Akt and CREB Regulate Adult Neural Hippocampal Progenitor Proliferation and Diffrentiation. Developmental Neurobiology. 2007:1348-56.
37. Lars P, van der Heide. Insulin signaling in the central nervous system Learing to survive. Progress in Neurobiology. 2006;79:205-21.
38. 윤성환, 김재홍, 김영훈. 백서 강제수영모델의 부동시간 단축에 미치는 항우울제의 개선효과에 대한 도파민 및 노르아드레날린계 약물의 영향. 신경정신의학. 1996;35(6):1476-86.
39. 조선영, 이기철, 이정호, 김현택. 선택적 세로토닌 재흡수 차단제인 fluoxetine이 우울증을 야기시킨 쥐의 수동적 회피 학습에 미치는 영향. 한국심리학회지. 1996;8(1):49-60.