동의신경정신과 학회지 제22권 제1호(2011년 3월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2011;22(1):37-51

加味逍遙散의 항산화 효과와 serotonin 대사과정에 미치는 영향

심태경, 정인철, 이상룡

대전대학교 한의과대학 신경정신과학교실

The Effect of *Gamisoyo-san*(*Jiaweixiaoyaosan*) on Serotonin Metabolism

Tae-Kyoung Sim, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee

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

Abstract

Objectives :
This experiment was designed to investigate the effect of *Gamisoyo-san*(*Jiaweixiaoyaosan, SYS*) on serotonin activity of P815 Mast Cell.

Methods :
The effects of SYS on activation of TPH-1 mRNA and AAADC mRNA in P815 mast cell were investigated.
The effect of SYS on content of serotonin in P815 mast cell was investigated.
The effects of SYS on activation of DPPH and SOD in P815 mast cell were investigated.

Results :
1. The SYS increased the activation of SOD and DPPH in P815 mast cell.
2. The SYS decreased the manifestation TPH-1 mRNA in P815 mast cell.
3. The SYS decreased the manifestation AAADC mRNA in P815 mast cell.

Conclusions :
This experiment shows that *Gamisoyo-san* might not be effective for treating depression in terms of biogenic amine theory. However, *Gamisoyo-san* showed significant anti-oxidative effect and it can not yet be ruled out for treating depression. Therefore, pathogenesis of depression and clinical research of *Gamisoyo-san* is suggested for future research.

Key Words :
P815, *Gamisoyo-san*, Depression, Anti-oxidative effect

투고 : 2011. 2. 14. 수정 : 2011. 3. 5. 채택 : 2011. 3. 8.
교신저자 : 이상룡, 대전시 동구 용운동 96-3번지 대전대학교 한의과대학
Tel) 043-229-3726, E-mail) 7575np@dju.kr
이 논문은 2010년 2월 대전대학교 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 석사학위 논문임

Ⅰ. 서 론

우울증의 발생기전과 우울증의 작용기전을 완벽하게 설명하는 이론은 아직 없으나 현재까지 중추신경계의 시냅스 내에 모노아민계 신경전달물질인 세로토닌(serotonin), 노르에피네프린(norepinephrin), 도파민(dopamine) 등이 부족하게 되면 우울증이 유발됨을 중시하는 단가아민 가설이 가장 잘 알려져 있다[1]. 또한 유리기(free-radical)로 유발되는 산화 스트레스(oxidative stress) 현상이 우울증과 같은 신경정신과질환들의 발현에 연관이 있다는 보고가 있다[2-6].

韓醫學的으로는 憂鬱症은 鬱症에 屬한다[7]. 鬱症은 『黃帝內經』에 처음 기술되어 있으며, 明代에 이르러서는 張[8,9]이 怒鬱, 思鬱, 優鬱 등의 情志之鬱의 개념을 설정하여 情緖的인 개념을 강조하였으며, 原因은 肝氣鬱結, 氣鬱化火, 痰氣鬱結의 實證과 久鬱傷神, 陰虛火旺의 虛症으로 크게 나눌 수 있다[10].

逍遙散은 宋代 陣등이 選한 『太平愚民和劑局方』에 최초로 記載된 處方으로 情志不暢으로 인한 肝鬱血虛, 脾實建運한 諸般症狀에 疏肝解鬱, 建脾養血作用을 하는 代表處方으로 憂鬱症, 更年期障碍에 주로 사용된다[11,12]. 加味逍遙散은 『東醫寶鑑·婦人門』에 記載된 것으로 逍遙散에서 柴胡, 薄荷를 去하고 知母, 地骨皮, 生地黃, 梔子, 黃柏, 桔梗을 加하여 血虛로 煩熱이 나며 潮熱이 있고 식은땀이 나며, 가래가 끓으면서 기침하는 것이 虛勞症같은 것을 치료한다[13].

또한 加味逍遙散은 逍遙散에 淸熱效能이 증가되어 있어, 肝火上炎으로 인한 제반증상, 특히 憂鬱症 및 更年期障碍에 있어 疏肝, 解鬱, 淸熱을 목적으로 임상에서 사용되는 처방이다[14].

그간 한의학 분야에서는 加味逍遙散에 대한 최근의 많은 연구가 있었으나 주로 증례 연구[15,16]와 항스트레스 효과[17,18]에 관한 연구가 대부분이었으며, 특히 우울증의 아민가설이나 유리기와 관련된 실험적 연구는 아직까지 접하지 못하였다.

P815세포는 F1 hybrid mice의 ascitic tumour에서 유래한 것으로 세로토닌을 생합성, 저장 및 분비하며, TPH 및 AAADC를 발현하고 histamine을 생합성, 저장 및 분비하며, histamine 생합성 효소인 histidine decarboxylase를 발현한다[19].

이에 저자는 임상에서 加味逍遙散이 肝火上炎으로 인한 우울증에 널리 활용되고 있는 점을 감안하여, P815세포의 세로토닌에 대해 미치는 영향을 알아보고자 배양된 P815세포를 이용해서 항산화 효능과 P815 세포 내의 세로토닌 함량 및 TPH 활성 및 AAADC 활성 변화 등을 연구하여 약간의 지견을 얻었기에 報告하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약재

본 실험에 사용한 加味逍遙散 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 처방 1첩(貼)의 내용과 분량은 Table Ⅰ과 같다.

Table Ⅰ. Prescription of *Gamisoyo-san*(*Jiaweixiaoyaosan*, 이하 SYS)

Herb Name	Pharmacognostic nomenclatures	Amount(g)
白芍藥	*Paeonia japonica*	4.0
白 朮	*Atractylodes macrocephala Koidzumi*	4.0
知 母	*Anemarrhena asphodeloides*	4.0
地骨皮	*Lycium chinense Miller*	4.0
當 歸	*Angelica gigas*	4.0
白茯苓	*Poria cocos Wolf*	3.2
麥門冬	*Liriope platyphylla Wang et Tang*	3.2
生地黃	*Rehmannia glutinosa*	3.2
梔 子	*Gardenia jasminoides for.*	2.0
黃 栢	*rutaceae*	2.0
甘 草	*Glycyrrhizae radix*	1.2
桔 梗	*Platycodon grandiflorum A*	1.2
香附子	*Cyperus rotundus*	4.0
	Total amount	40.0

2) 시약 및 기기

FBS(Gibco-BRL, U.S.A), DMEM(Gibco-BRL, U.S.A), 10 ㎜ HEPES, 2 ㎜ L-glutamine, 1 ㎜ sodium pyruvate, 100 U/㎖ penicillin, 100 ㎍/㎖ streptomycin, 50 μM 2-mercaptoethanol, D-PBS dulbecco's phosphate buffered saline(Gibco-BRL, U.S.A), POTASSIUM PHOSPHATE DIBASIC, POTASSIUM PHOSPHATE MONOBASIC, Trypsin -EDTA(Gibco-BRL, U.S.A.), Isopropanol, 3-(4.5-dimethylthiazol-2yl)-2.5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), NaOH, Dimethyl Sulfoxide(DMSO), DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)(Sigma, U.S.A), Trizol(Life Technologies, Gaithersburg), Superscript II reverse transcriptase(Life Technologies, Gaithersburg), IQ SYBR green supermix(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), 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)(Sigma, U.S.A), 세포배양용 fetal calf serum 및 penicillin/streptomycin, DMEM배지(Gibco, U.S.A), SOD assay kit(Dojindo, Japan), EAE(ethyl ascorbyl ether)(Cosmol. Korea)를 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 연구에 사용된 기기는 열탕추출기(대웅, Korea), Rotary vaccum evaporator(Büchi B-480, Switzerland), Freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), CO2 incubator(Forma scientific Co., U.S.A), 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, U.S.A), Deep-freezer(Sanyo, Japan), Thermocycler system (MWG Biotech., Germany), Ice-maker(Vision scientific Co., Korea), Homogenizer(OMNI, U.S.A), Plate shaker(Lab-Line, U.S.A) 및 ELISA reader(Molecular Devices, U.S.A), C18역상 HPLC columne(Hypersil, U.S.A), HPLC(Shimazu, Japan)등의 기기를 사용하였다.

2. 방 법

1) 검액

加味逍遙散 40 g에 증류수 1,000 ㎖을 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하고, 이를 Rotary evaporator로 농축하였다. 이를 다시 Freeze dryer를 이용하여 동결건조한 후, 8.7 g을 얻어 냉동(-20℃) 보관하면서 사용 시에는 필요한 농도로 phosphate buffer에 희석하여 0.22 ㎛ 필터로 여과하여 사용하였다.

2) 약물의 High Performance Liquid Chromatography(HPLC) 분석

加味逍遙散의 수용성 성분을 분석하기 위하여 C18역상 HPLC columne을 장착한 HPLC를 사용하였다. 전체 분석시간은 30분으로 이동상의 구성은 초기 5분 동안 H_2O를 흘려주었고, 이후 20분 동안은 acetonitrile gradient를 하여 acetonitrile을 100%까지 올렸으며, 그 상태를 5분간 지속하였다. 214 ㎚에서의 흡광도를 측정하여 시료의 양을 확인하였다.

3) P815세포의 배양

P815세포는 부산 대학교 의과대학(해부학 교실)에서 분양 받았으며, 배양은 10% fetal calf serum, 100 unit/㎖ penicillin과 100 ㎍/㎖ streptomycin을 포함한 DMEM 배지, 10 ㎜ HEPES, 2 ㎜

L-glutamine, 1 ㎜ sodium pyruvate를 사용하여, cell culture용 dish에서 37℃, 5% CO_2 상에서 배양하였다.

P815세포(2 × 105cells/㎠, 60 ㎜ culture dish)를 배양한 다음, 이 세포에 加味逍遙散 처방을 10-200 ㎍ 까지 가한 다음 48시간 배양하였다. 배양 후 cell line을 ice-cold phosphate buffered saline(PBS)용액으로 harvest하여 원심분리하고 pellet을 얻은 후, pellet은 -70℃ et은 -er에 보관하면서 serotonin 함량 측정시료로 사용하였다.

4) MTT를 이용한 세포증식 측정

배양한 세포를 PBS로 3회 세척한 다음 96-multiwell에 2 × 104 cells/well의 세포수가 되도록 산정하여 사용하였다. 세포는 FBS가 들어있는 DMEM 배양액에서 각 각 다양한 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다.

이후 세포증식을 MTT분석법에 의해서 분석하였다. MTT 분석법은 배양이 완료된 세포에 50 ㎍/㎖ MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)을 희석 처리하여 반응시킨 다음 Microplate reader로 570 ㎚에서 측정하였다.

5) DPPH Free Radical-Scavenging 활성 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 산화/환원 환경에 따라 색을 띄는 라디칼로 시료의 라디칼 제거능력을 측정 할 수 있다. 시료의 free radical 소거 활성은 stable radical인 DPPH에 대한 환원력을 측정한 것으로, 시료를 Phosphate buffer에 녹여 100 ㎕에 200 ㎜ DPPH 900 ㎕를 shaking 한 후에 상온에서 10분간 방치 후에 Eppendorf tube에서 96-웰 플레이트의 각 웰에 분주하여 O.D 517 ㎜에서 측정 한다.(Blank : phosphate buffer, Control : phosphate buffer + DPPH)

Free radical scavenging activity(%) =

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

6) SOD 활성 측정 실험

96-웰 플레이트의 각 웰에 sample solution 20 ㎕를 첨가한 후 reagent solution 200 ㎕를 넣은 후 마지막으로 enzyme working solution을 넣어준 후, 37도에서 20분간 반응시켰다. ELISA reader를 이용하여 O.D 450 ㎚에서 측정하여 SOD activity(inhibition rate %)를 계산하였다.

7) Serotonin 함량 측정

serotonin 함량은 HPLC-형광광도계법으로 측정하였다. 세포 내부의 세로토닌 농도를 분석하기 위하여, 약물을 처리한 세포의 배지를 제거한 후, 1 × PBS pH 7.2의 완충액을 이용하여 세포를 2번 세척하였다. 1 × PBS 200 ㎕를 첨가하고 세포를 모아 초음파로 분쇄하고, 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 상층액을 C18 column에 시료용액(150 ㎕)을 trichloroacetic acid(1 M, 150 ㎕), HIAA(10 ㎛M, 50 ㎕ 내부표준)를 가한 다음 10,000 rpm으로 원심 분리하였다. 상층액을 Millex-GV (0.2원심㎛)로 여과한 후 HPLC에 주입하여 serotonin 함량을 측정하였다.

단백질함량은 각각의 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였으며, bovine serum albumin을 표준물질로 하고 Bradford's method를 이용하여 측정하였다.

HPLC 조건: column, TSK-gel ODS 120T(5 ㎛, 0.45 × 15㎝); 이동상, NaOAc buffer(50 ㎜, pH 3.5)-acetonitrile-methanol(90:6:4 v/v); 유속, 1 ㎖/min

8) 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 mRNA 측정

P815세포 pellet에 RNAzolB을 첨가하여 세포를 용해시킨 후 chloroform 200 ㎕를 넣고 inverting을 반복하여 고르게 섞은 다음 4℃에서 5분 동안 방치시키고, 이를 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 무색의 상층액 만을 400 ㎕ 취한 뒤 동량의 isopropanol을 넣고 inverting을 반복하여 섞은 다음 4℃에서 15분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하여 얻은 pellet(RNA)에 75% ethanol(DEPC treated water) 500 ㎕를 넣어 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리(4℃)하고 ethanol을 완전히 제거한 후에 DEPC water 50 ㎕를 넣어서 RNA를 용해하여 A260 ㎚에서 흡광도를 측정하여 RNA 함량을 계산하였다. 분리한 RNA에 해당 유전자들의 oligo dT primer와 DEPC water를 넣고 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후 실온에서 3분 동안 방치한 다음 10 x buffer, 10 ㎜ dNTP, AMV Reverse transcriptase, 50 ㎜ ㎎ Cl2 및 DEPC treated water를 넣고 37℃에서 1시간 동안 반응시켜서 reverse transcriptase(RT) product를 만들었다. 만들어진 RT product(template cDNA)를 사용하여 Real-Time PCR(Bio Rad)를 사용하여 측정하였다.

각 유전자 발현 정도를 Real-Time PCR을 이용해 측정하였다. 각각의 유전자들의 염기 서열은 Table Ⅱ과 같다. 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 10분 후 30초간 40 cycle을 돌린 다음 60℃에서 30초 72℃에서 30초 동안 반응을 일으켰다. 대조 유전자인 β-actin으로 사용하였다. Beta-actin mRNA을 control로 이용하여 타겟 mRNA를 정량하여 유전자 발현을 비교하였다.

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

9) 통계 처리

실험결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 분석하였으며 $P<0.05$ 이하에서 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 성 적

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석

C18역상 HPLC를 사용하여 加味逍遙散의 수용성 성분을 분석하였다. 역상 HPLC 분석 결과 앞부분의 수용 성분을 확인하였다(Fig. 1).

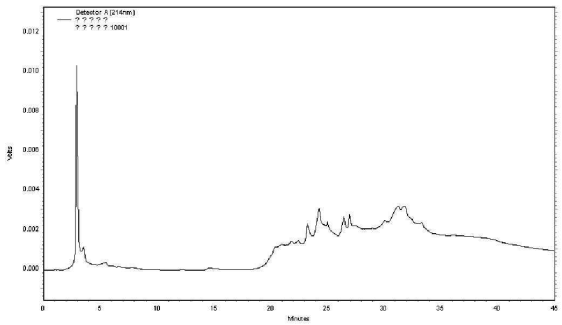


Fig. 1. Analysis of HPLC profile of *Gamisoyo-san*.
Water extracts were subjected to C18 column Chromatography on acetonitrile linear gradient (line) over a 30 min period at a flow rate of 1 ml /min. Absorbance was monitored at 214 nm.

2. MTT assay에 의한 cell viability 측정

P815 세포를 加味逍遙散을 함유한 배지에서 2일 동안 배양한 후 세포 증식를 각각 측정하였다.

加味逍遙散을 첨가 배양한 세포 대조군과 차이는 加味逍遙散 20 ㎍/㎖에서 101.46 ± 1.88로 加味逍遙散 60 ㎍/㎖에서 101.21 ± 4.37로 加味逍遙散 120 ㎍/㎖에서는 100.59 ± 1.95로 나타나 유의성이 없었다(Fig. 2).

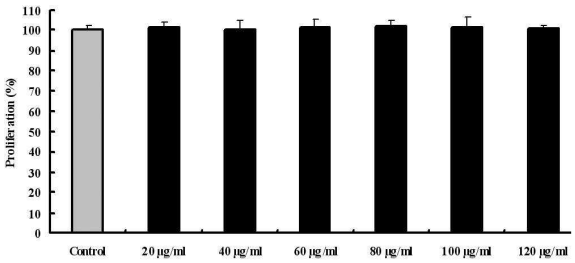


Fig. 2. Additional Effects of *Gamisoyo-san* on Proliferation of P815 Cells Determined by MTT assay.
The cell proliferation was measured by MTT assay as described in Material and Methods. Date are expressed as % of control(treated with normal saline) and each column represents the mean ± S.E. of three determination.
Statistically significant value compared with control by T test(*P<0.05).

3. DPPH 소거능 측정

DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응으로 加味逍遙散의 항산화 작용을 측정한 결과, 100 ㎍/㎖ 일 때, 17.18 ± 1.65의 DPPH radical 소거작용을 나타났고, 10 ㎍/㎖ 일 때는 6.49 ± 2.59의 DPPH radical 소거작용을 나타내 농도에 따라 유의성 있게 증가하였다(Table Ⅲ).

Table Ⅲ. Effect of *Gamisoyo-san* on DPPH radical -scavenging activity

Sample	Concentraion	Scavenging effect (%)
Gamisoyo-san	100 ㎍/㎖	17.18 ± 1.65*
	10 ㎍/㎖	6.49 ± 2.59*
	1 ㎍/㎖	5.51 ± 4.48
	0.1 ㎍/㎖	0.33 ± 6.15
EAE (ethyl ascorbyl ether)	1000 ㎜	83.58 ± 0.20*
	500 ㎜	82.53 ± 0.14*
	250 ㎜	76.13 ± 0.29*
	120 ㎜	74.54 ± 0.58*
	60 ㎜	71.76 ± 0.20*

Each value is mean ± SD (n>3)
Statistically significant value compared with control(EAE) by T test(*P<0.05).

4. SOD 활성 측정

SOD 활성을 측정한 결과, 100 ㎍/㎖에서는 17.18 ± 1.65 %, 10 ㎍/㎖는 6.49 ± 2.59 %, 1 ㎍/㎖에서는 5.51 ± 4.48 %, 로 나타나 농도에 따라 유의성 있게 증가하였다(Fig. 3).

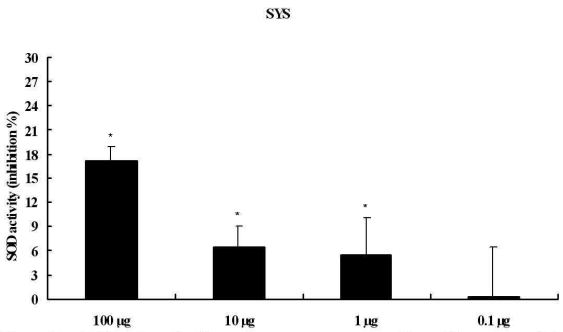


Fig. 3. Effect of *Gamisoyo-san* on the Superoxide dismutase(SOD) activity.
The effect on SOD was tested with *Gamisoyo-san*, date are expressed as % of control and each column represents the mean±S.E. of three determination.
Statistically significant value compared with control by T test(*P<0.05).

5. 세포내 serotonin에 미치는 영향

加味逍遙散이 세포 내부의 세로토닌 농도에 미치는 영향을 분석하기 위하여, HPLC-형광광도계법으로 측정한 결과, 각각 1.57 ± 0.16 nmol/mg (20 μg/ml 加味逍遙散), 1.55 ± 0.12 nmol/mg (40 μg/ml 加味逍遙散), 1.58 ± 0.17 nmol/mg (60 μg/ml 加味逍遙散), 1.58 ± 0.15 nmol/mg (80 μg/ml 加味逍遙散)로 나타나 대조군의 1.53 ± 0.23 nmol/mg에 비하여 함량이 다소 증가했지만 통계적으로 유의하지 않았다(Table Ⅳ).

Table Ⅳ. Effects of *Gamisoyo-san* on the Intracellular Serotonin Content in P815 Cells

Compounds	Serotonin content (nmol/mg protein) (% of control)
Control	1.53 ± 0.23 (100)
SYS (20 μg/ml)	1.57 ± 0.16 (102.6)
SYS (40 μg/ml)	1.55 ± 0.12 (101.3)
SYS (60 μg/ml)	1.58 ± 0.17 (103.2)
SYS (80 μg/ml)	1.58 ± 0.15 (103.2)

P815 cells were cultivated in DMEM medium plus 10% heat-inactivated FBS and 100 units/ ml penicillin and 100 Ag/ml streptomycin at 37 8C, then *Gamisoyo-san* 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 (Student's t-test).

6. TPH-1 유전자 발현에 미치는 영향

加味逍遙散이 TPH-1 mRNA발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 加味逍遙散을 함유한 배지에서 2일간 배양한 후 TPH-1 mRNA를 측정하였다. 加味逍遙散에 의한 TPH-1 mRNA 발현은 각각 0.035 ± 0.0009(50 μg/㎖ 加味逍遙散)과 0.033 ± 0.0009(100 μg/㎖ 加味逍遙散)으로 나타나 유의성이 없었다(Fig. 4).

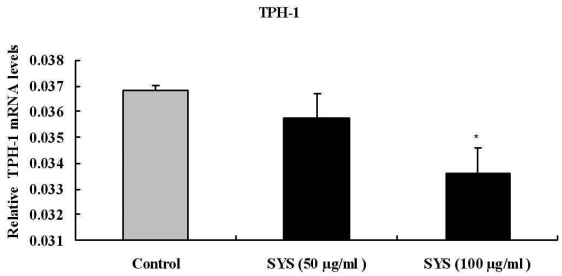


Fig. 4. Effect of *Gamisoyo-san* on TPH-1 mRNA in P815 cells.
The expression levels of TPH-1 mRNA and beta-actin were analyzed by real-time RT-PCR. The TPH-1 mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means ±SEM.
Statistically significant value compared with control (beta-actin mRNA) by T test(*P<0.05).

7. AAADC 유전자 발현에 미치는 영향

加味逍遙散이 AAADC mRNA발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 加味逍遙散을 함유한 배지에서 2일간 배양한 후 AAADC mRNA를 측정하였다. 加味逍遙散에 의한 AAADC mRNA 발현은 각각 0.0017 ± 0.0008(50 μg/㎖ 加味逍遙散)과 0.0021 ± 0.0009(100 μg/㎖ 加味逍遙散)로 나타나 유의성이 없었다(Fig. 5).

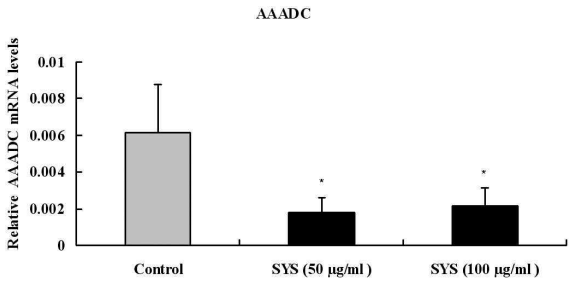


Fig. 5. Effect of *Gamisoyo-san* on AAADC mRNA in P815 cells.
The expression levels of AAADC mRNA and beta-actin were analyzed by real-time RT-PCR. The AAADC mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means ± SEM.
Statistically significant value compared with control (beta-actin mRNA) by T test(*P<0.05).

8. MAOa 유전자 발현에 미치는 영향

加味逍遙散이 MAOa mRNA발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 加味逍遙散을 함유한 배지에서 2일간 배양한 후 MAOa mRNA를 측정하였다. 加味逍遙散에 의한 MAOa mRNA 발현은 각각 0.0008 ± 0.0001(50 ㎍/㎖ 加味逍遙散)과 0.0009 ± 0.0004(100 ㎍/㎖ 加味逍遙散)로 나타나 유의성이 없었다(Fig. 6).

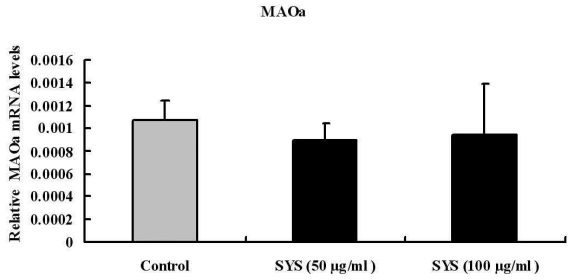


Fig. 6. Effect of *Gamisoyo-san* on MAOa mRNA in P815 Cells.
The expression levels of MAOamRNA and beta-actin were analyzed by real-time RT-PCR. The MAOa mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample. Values are means ± SEM.
Statistically significant value compared with control (beta-actin mRNA) by T test(*P<0.05).

Ⅳ. 고 찰

우울증의 발생기전과 우울증의 작용기전을 완벽하게 설명하는 이론은 아직 없다. 그러나 일반적으로는 중추신경계의 시냅스(synapse)내에 모노아민(monoamine)계 신경전달물질(neurotransmitter)인 세로토닌(serotonin), 노르에피네프린(norepinephrin), 도파민(dopamine) 등이 부족하게 되면 우울증이 유발됨을 중시하는 단가아민 가설이 가장 잘 알려져 있다[1].

우울증의 단가아민 가설이란 monoamine을 고갈시키는 reserpine과 같은 약물을 우울증 환자에게 투여하면 우울증을 유발한다는 것을 관찰한 뒤 제기된 학설로 단가아민, 특히 노르에피네프린이나 세로토닌 활성도 감소가 우울증의 발병에 중요한 역할을 한다는 가설이다. 서양의학에서 우울증의 약물요법으로 주로 이용되는 삼환계 항우울제와 monoamine 산화효소억제제의 약리기전을 보면, 삼환계 항우울제는 monoamine의 재흡수를 억제하여 시냅스의 monoamine치를 상승시키고, monoamine의 분해를 억제하는 monoamine 산화억제제(MAOI)는 monoamine 분해효소를 억제하여 시냅스의 monoamine치를 상승시키는 것으로 알려져 우울증의 단가아민가설은 지지를 받게 되었다. 이중 세로토닌은 세로토닌의 대사산물인 5-HIAA(5-Hydroxyindoleacetic acid)가 우울증 환자의 뇌척수액에서 감소하였다는 보고와 선택적 세로토닌 재흡수차단제가 우울증 치료에 기여한 지대한 영향으로 우울증과 가장 밀접한 단가아민이 되었다[20].

세로토닌은 혈관수축 물질로서 bovine serum에서 분리한 indoleamine와 위장점막에서 분리한 자궁수축 물질인 enteramine과 동일한 물질로 5-hydroxytryptamine(5-HT)으로 동정된 것이다. 히스타민과 같이 동식물계에 널리 분포되어 있으며 위장관과 혈소판에 다량 집중되어 있고 뇌와 망막에서도 발견된다. 포유동물에서 5-HT는 전체의 90%가 장점막의 entero-chromaffin cell에 있으며 8%는 혈소판에, 1-2%는 중추신경계에 함유되어 합성된다[21].

위장관의 세로토닌은 주로 장크롬친화성세포에서 합성, 저장되며 이외에 비만세포, 장벽의 일부 벽내신경원 그리고 일부 장 내분비세포 등도 세로토닌을 포함하고 있다. 장크롬친화성세포는 위장관 전체의 점막상피에 분포하고 있으며 내강쪽에 산재하기도 하지만 주로 점막층의 기저부에 위치하고 있다. 부위별로는 위에서는 체

부 그리고 소장에서는 근위부 특히 십이지장에 다수가 존재한다고 보고되어 있다[22].

세로토닌은 여러 평활근 및 신경들을 자극 혹은 억제시키며 특히 순환계, 호흡기계 및 위장관계에 다양한 반응을 일으킨다. 골격근 혈관을 제외한 혈관 평활근에 대해서 수축작용을 나타내고, 위장관에서는 점막에 있는 지각 수용체를 자극하여 아세틸콜린에 대한 평활근의 감수성을 증가시켜 위장관 기능을 조절한다[23].

세로토닌은 중추신경계에서 감정 조절, 불안, 알코올 중독, 약물 남용, 폭식, 성적 행동 등의 원인으로 작용되고, 말초 조직에서는 혈관 수축, 장 운동, 지혈, 면역 반응 등에 작용한다[24].

세포 내 세로토닌 양은 세로토닌 합성 속도를 조절하는 트립토판 하이드록실레이즈(tryptophan hydroxylase; TPH)의 효소 활성에 의해 결정되어진다[25].

세로토닌은 TPH와 L-아미노산 카르복실기 분해효소(aromatic amino acid decarboxylase ; AAADC)에 의해 단계적으로 합성되어지는데, 먼저, TPH가 L-트립토판으로부터 5-hydroxy tryptophan (5-HTP)을 합성하고, 이어서 AAADC가 5-HTP로부터 세로토닌을 합성한다[26].

세로토닌은 신호 물질로 트립토판 아미노산에서 합성된다. 이 과정은 TPH에 의해 시작되며, 2 종의 동질효소(TPH1과 TPH2)가 존재한다. 이들 효소는 서로 다른 유전자에서 만들어지는데, TPH1는 중앙 신경 시스템(CNS) 외곽에서 순환하는 세로토닌을 만들어내며, 뼈 형성에서 간 재생 및 간염에 이르기까지 다양한 생물 공정에 관여한다. 다른 동질 효소인 TPH2 효소는 CNS 내에서, 특히 뇌간(brainstem)의 봉합의 핵(raphe nueclei)에서 세레토닌 생산을 담당한다[26].

P815 세포는 F1 hybrid mice의 ascitic tumour에서 유래한 것으로 serotonin을 생합성, 저장 및 분비하며, TPH 및 AADC를 발현하고 histamine을 생합성, 저장 및 분비하며, histamine 생합성 효소인 histidine decarboxylase(EC 4.1.1.22)를 발현한다[19].

항우울제는 신경전달물질의 농도를 높여주는 메카니즘에 따라 크게 삼환계 항우울제(TCA; tricyclic antidepressants), 모노아민 옥시다제 억제제(MAOI; monoamine oxidase inhibitors), 또는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(SSRI; selective serotonin reuptake inhibitors) 등이 많이 사용되고 있다[1].

개발된지 비교적 오래된 페넬진(phenelzine) 등과 같은 모노아민 옥시다제 억제제는 심장병유발이라는 심각한 부작용이 있기 때문에 최근에는 잘 쓰이고 있지 않으며, 이미프라민 등과 같은 삼환계 항우울제 역시 항콜린성 부작용 및 진정작용, 심혈관계에 대한 부작용이 상당한 문제점으로 남아 있다. 따라서, 최근에는 이와 같은 부작용이 적은 우울증 치료제로서 선택적 세로토닌(5-HT) 재흡수 저해제(selective serotonin reuptake inhibitor: 이하, 'SSRI'라 약칭함)를 이용한 우울증 치료제의 개발에 촛점이 되고 있으며, 그 대표적인 약제로서 플루옥세틴(fluoxetine, 제품명 푸로작), 파로세틴(paroxetine, 제품명 세로자트), 세르트랄린(sertraline, 제품명 졸로푸트) 등이 개발되어 임상적으로 그 효능을 널리 인정받고 있다[1].

최근에는 서양에서도 천연약제 추출물의 약효를 인정하고 연구하는 추세에 있으며, 우울증과 관련해서는 주로 St. John's wort라 불리는 하이페리쿰 퍼포라툼(Hypericum perforatum) 추출물을 이용한 연구가 진행되고 있다[1].

하이페리쿰 퍼포라툼에는 중추신경계(CNS)에 직접 또는 간접적으로 작용하는, 구조적으로 차이가 있는 많은 수의 화합물들이 포함되어 있다. 즉 하

이페리쿰 퍼포라툼은 실제 하이페리신(hypericin), 하이퍼포린(hyperforin) 등과 같은 활성화합물들 및 이량체 플라본들(dimeric flavones)이 포함되어 있으며, 이들은 동물 및 인간에 있어서 항우울작용 및 불안해소작용을 갖는 것으로 알려져 있다[27,28].

그 작용기전을 살펴보면, 하이페리신은 하이페리쿰 퍼포라툼 추출물 중에 함유된 이량체의 프로시아니딘(dimeric procyanidines)의 존재하에서 항우울 작용이 입증되었고, 하이퍼포린(hyperforin)은 마우스의 시상하부(hypothalamus)와 해마(hippocampus)에서의 5-HT(serotonin) 농도를 상승시키는 것으로 보고되어 하이퍼포린(hyperforin)의 항우울 효과는 세로토닌 시스템과 관련되는 것으로 추정된다. 그러나, 우울증 환자들 중에는 기존의 항우울제로 치료가 되지 않는 환자가 약 20%나 존재하고 SSRI 등 최근 개발된 항우울제들의 부작용도 기존 항우울제에 비해 상대적으로 덜하지만 여전히 무시할 수 없는 수준이다[27,28].

또한 최근 많이 사용되는 약물중에서 세로토닌의 재흡수(Reuptake)를 차단하는 졸로프트, 팍실, 프로작과 같은 차단제들이 크게 효과적인 것으로 평가받고 있으나 이처럼 세로토닌 불균형에 의한 질환을 치유하는데 있어서 정상적인 수준의 세로토닌을 생산하는 근본적인 치유방법은 전무하고 세로토닌의 재흡수를 차단하는 방법등과 같은 일시적인 치유방법만 현재 이용되고 있는 실정이다[29].

韓醫學에서의 鬱症은 서양의학의 우울증과 대비할 수 있는 용어로서, 이를 "心身一如", "形神一體"의 一元論的 관점으로 보았는데, 초기에는 氣機가 疏通되지 못해 생기는 諸病症이라는 다소 포괄적인 의미였으나 차츰 정신적인 증상의 개념으로 귀결되었다[30].

鬱症에 대한 최초의 언급은 『素問』과 『靈樞』에서 있었는데 『靈樞·本神』에서 "秋憂者, 氣閉塞而不行"이라 하였고, 『素問·至眞要大論』에서 "諸氣臢鬱 皆屬于肺"라고 하였으니 鬱이란 氣를 主하는 肺臟과 關聯이 있다고 보았고, 또한 『靈樞·本神』에서 "脾秋憂而不解卽傷意"라고 하여 憂가 脾臟과도 筵官이 있어서 憂로 인해 脾氣가 鬱結되면 運化機能이 失調한다고 설명하였다. 『素問·五運行大論』, 『素問·氣交變大論』, 『素問·五常政大論』등에서는 기후변화에 의한 鬱의 發病에 대하여 설명하고 있으며, 『素問·本病論』에서는 "久而化鬱", "日久成鬱", "抑之變鬱", "伏之化鬱"이라 하여 氣機가 오래도록 疏通되지 않아서 발생하는 것이 鬱症임을 설명하였고, 『素問·擧痛論』에서는 "思卽心有所存, 神有所歸, 正氣留而不行, 固氣結矣"라고 하여 思는 神明之心에서 出하며 思의 太過로 氣機가 鬱結되면 心, 脾의 氣가 不暢하게 되는데, 心氣가 鬱結하여 心身이 失傷하거나, 오래되면 火熱하여 心脾가 鬱熱한다고 하였다[8,31,32]. 元代의 朱는 鬱의 病因을 實鬱, 濕鬱, 痰鬱, 血鬱, 熱鬱, 食鬱의 六鬱로 설명하였고, 또한 '모든 病은 얻은지 오래되면 鬱이 되고 鬱이 오래되면 蒸熱하여 반드시 火가 생긴다'고 하여 鬱의 病機에 대하여 언급하였으며[33], 明代의 王은 "鬱者燥淫爲病之別稱", "濟氣沸鬱皆屬於肺", "沸鬱屬熱"이라 하여 모든 鬱이 火로 轉化한다는 病機를 설명하였다[34]. 張은 怒鬱, 思鬱, 憂鬱등의 情志至鬱을 言及하면서 憂鬱症의 개념과 心과 關聯됨을 설명하였고[9], 淸代의 葉은 "悲泣, 乃情壞內起之病, 病生于鬱..."이라 하여 슬퍼하고 우는 것은 感情이 안에서 일어나서 생긴 病이고, 病이 鬱에서 생긴 것이라고 하여 情志至鬱로 인한 임상증례를 다루어 鬱症이 精神的인 側面과 關聯 있음을 提示하였다[35].

鬱症의 治法에 대하여 許는 初期에는 情志所

傷과 肝氣鬱結 혹은 痰氣交阻에 의해 나타나며, 대부분 實證에 屬하므로 所肝理氣를 우선으로 하고, 痰氣鬱結의 경우에는 化痰理氣, 寬胸利膈을 해야 하는데, 이를 失治할 경우에는 化火傷陰, 氣血受耗하여 心, 肺, 腎, 脾 등의 臟腑에 影響을 미치므로 神明失養, 心身陰虛, 心脾兩虛 등의 虛症으로 발전한다고 하여 養心安神, 滋養心腎, 補益心脾 등으로 다스려야 한다고 하였으며[36], 王은 肝鬱痰結, 肝鬱氣滯, 氣滯血虛, 肝腎陰虛, 肝鬱脾虛로 辨證하여 각각 所肝解鬱 理氣暢中, 疏肝解鬱 淸肝瀉火, 活血化瘀 理氣解鬱, 行氣開鬱 化痰散結, 滋陰養血 補心安神으로 치료해야 한다고 하였다[37]. 李는 順氣를 우선으로 하고 開提를 다음으로 하며 降火, 化痰, 消積을 兼해야 한다고 했고[38], 徐는 順氣를 우선으로 하여 鬱結된 기운을 풀어주고 降火, 化痰, 消食 등의 방법을 사용 할 수 있다고 하였다[7]. 따라서 鬱症의 治法으로는 "鬱久而化火"의 관점에서 보면 順氣, 去痰, 補氣血, 淸熱瀉火의 4가지로 대별할 수 있다[39].

逍遙散은 宋代 陣등이 選한 『太平愚民和劑局方』에 최초로 記載된 處方으로 情志不暢으로 인한 肝鬱血虛, 脾實建運한 諸般症狀에 疏肝解鬱, 建脾養血作用을 하는 代表處方이다[11,12].

加味逍遙散은 『東醫寶鑑·婦人門』에 記載된 것으로 逍遙散에서 柴胡, 薄荷를 去하고 知母, 地骨皮, 生地黃, 梔子, 黃柏, 桔梗을 加하여 血虛로 煩熱이 나며 潮熱이 있고 식은땀이 나며, 가래가 끓으면서 기침하는 것이 虛勞症같은 것을 치료하며 본 실험에서 쓰인 處方에는 香附子가 加해져 있다[13].

方中 當歸는 補血和血, 調經止痛하며, 芍藥과 配合하여 養血柔肝, 滋養强壯作用으로 氣血을 調和하여 全身을 營養, 滋潤하며 내분비기능을 개선한다. 白朮, 茯苓, 甘草는 益氣建脾作用으로 소화흡수를 촉진하여 脾能化生氣血로 養肝하며 甘草는 芍藥과 配合하여 鎭痛, 鎭痙作用으로 腸管의 痙攣을 緩解한다. 또한 淸熱瀉火, 養血解毒作用을 하는 梔子, 滋陰降火하는 知母, 淸熱凉血, 養陰生津하는 生地黃, 淸熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱하는 黃柏을 加味하여 淸熱과 補陰效能이 增加된 것으로 자율신경계 흥분을 가라앉혀서 陰虛火旺한 증을 緩解하는데 사용된다. 또한 理氣解鬱하는 香附子를 加하여 氣鬱로 인한 諸般症狀에도 應用할 수 있는 處方이다[12,40,41].

이에 저자는 加味逍遙散이 P815세포의 세로토닌에 대해 미치는 영향을 통해 간접적으로 우울증에 대한 효과를 가늠해보고자 했다. 배양된 P815세포를 이용해서 항산화 효능과 P815세포 내의 serotonin 함량 및 TPH, AAADC, MAOa의 활성 변화 등을 연구하여 약간의 지견을 얻었다.

본 실험에서 P815 세포를 加味逍遙散을 함유한 배지에서 2일 동안 배양한 후 세포 증식를 각각 측정한 결과, 加味逍遙散을 첨가 배양한 세포 대조군과 차이는 加味逍遙散 20 ㎍/㎖에서 101.46 ± 1.88로 加味逍遙散 60 ㎍/㎖에서 101.21 ± 4.37로 加味逍遙散 120 ㎍/㎖에서는 100.59 ± 1.95로 세포 증식에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

유리기(free-radical)는 짝 없는 전자로 구성된 강한 반응력의 분자다. 인체의 노화와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져있다[42,43]. O_2^-(superoxide radical), ROO*(peroxyl radical), OH*(hydroxyl radical), NO*(nitric oxide), H_2O_2(hydrogen peroxide), HOCl(hypochlorous acid) 등을 ROS(reactive oxygen species라 칭한다[44,45]. 이러한 ROS의 과잉생성이 산화 스트레스(oxidative stress) 현상을 유발하고 주요우울장애를 비롯하여 알츠하이머병, 파킨슨병, 정신분열병, 양극성장애와 같은 신

경정신과질환과 연관된다는 연구들이 최근 발표되고 있다[2-6].

DPPH는 그자체가 매우 안정한 free radical로서 517 ㎚에서 특징적인 광흡수성을 나타내는 보라색 화합물이다. 이 radical은 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며 특히 여러 가지 항산화 기작중 proton-radical scavenger에 의해 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다[46].

본 실험에서 DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응으로 加味逍遙散의 항산화 작용을 측정한 결과, 100 ㎍/㎖ 일 때, 17.18 ± 1.65의 DPPH radical 소거작용을 나타났고, 10 ㎍/㎖ 일 때는 6.49 ± 2.59의 DPPH radical 소거작용을 나타내 농도에 따라 유의성 있게 항산화능이 증가하였다(Table Ⅰ).

SOD는 주로 세포내 세포질 또는 미토콘드리아 내에 분포하며 대표적인 활성산소중의 하나인 superoxide anion을 제거하여 생체를 방어하는 물질이다[43]. SOD는 superoxide anion(O_2^-)을 수소원자(H^+)와 반응시켜 과산화수소(H_2O_2)와 산소분자(O_2)로 만드는 작용을 통해 항산화 작용을 하는데 그 작용의 중요성으로 인해 산화적 스트레스에 대한 지표로서 현재까지 가장 많이 측정되고 있는 물질중의 하나이다[47].

본 실험에서 SOD 활성 측정결과, 100 ㎍/㎖에서는 17.18 ± 1.65%, 10 ㎍/㎖는 6.49 ± 2.59%, 1 ㎍/㎖에서는 5.51 ± 4.48%로 효능을 나타냈으며 농도 의존적으로 효능을 갖는 것으로 확인되어 加味逍遙散은 농도에 따라 유의성 있게 항산화능이 증가하였다(Fig. 3).

이처럼 SOD와 DPPH의 활성도가 증가함은 加味逍遙散이 인체 내의 항산화 능력을 증가시킬 수 있음을 제시한다.

세로토닌은 뇌세포에서 자연적으로 생성되는 아미노산인 트립토판(tryptophan)에서 두 단계를 거쳐 만들어진다. 트립토판은 TPH에 의해 5-HTP (5-Hydroxytryptophan)라 부르는 중간산물로 변환되고, 이어서 AAADC가 5-Hydroxytryptophan decarboxylase에 의해서 세로토닌(5-HT)으로 변환된다[48].

加味逍遙散이 세포내 serotonin 함량에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 P815 배양 세포에 加味逍遙散을 처리한 후 HPLC-형광광도계법으로 측정한 결과, 각각 1.57 ± 0.16 nmol/mg(20 ㎍/ml 加味逍遙散), 1.55 ± 0.12 nmol/mg(40 ㎍/ml 加味逍遙散), 1.58 ± 0.17 nmol/mg(60 ㎍/ml 加味逍遙散), 1.58 ± 0.15 nmol/mg(80 ㎍/ml 加味逍遙散)로 나타나 대조군의 1.53 ± 0.23 nmol/mg에 비하여 함량이 다소 증가했지만 통계적으로 유의하지 않았다(Table Ⅳ).

加味逍遙散에 의한 TPH-1 mRNA 발현은 각각 0.035 ± 0.0009(5 ㎍/㎖ 加味逍遙散)과 0.033 ± 0.0009 (100 ㎍/㎖ 加味逍遙散)으로 대조군에 비해 감소하였다. 특히 100 ㎍/㎖ 농도에서는 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4).

加味逍遙散에 의한 AAADC mRNA 발현은 각각 0.0017 ± 0.0008 (50 ㎍/㎖ 加味逍遙散)과 0.0021 ± 0.0009 (100 ㎍/㎖ 加味逍遙散)으로 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 5).

이처럼 TPH-1와 AAADC mRNA 발현에서 실험군이 대조군에 비해 감소한 것으로 보아 加味逍遙散의 작용이 비만세포의 세로토닌을 억제하는 경향이 있는 것을 확인할 수 있었다.

Monoamine계 신경전달물질은 신경생물학 및 신경정신적 기능에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이들을 분해하는 효소인 monoamine oxide(MAO)는 주로 미토콘드리아 막에 결합되어 있고 아미노산 서열이 다른 MAOa와 MAOb의 두가지 형태로 존재한다. 사람에 있어서 MAOa

는 주로 noradrenaline과 5-HT를 대사시키는 반면 MAOb는 dopamine을 산화시킨다[49].

加味逍遙散에 의한 MAOa mRNA 발현은 각각 0.0008 ± 0.0001(50 ㎍/㎖ 加味逍遙散)과 0.0009 ± 0.0004(100 ㎍/㎖ 加味逍遙散)으로 나타나 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었다.(Fig. 6). 이는 加味逍遙散의 작용이 MAOa mRNA 발현에 영향을 주지 않는 것으로 볼 수 있다.

이상의 실험결과를 종합하면 加味逍遙散은 항산화 효능은 있으나 P815세포내의 TPH, AAADC 활성을 억제하는 경향을 보여 세로토닌 분비에 긍정적인 영향을 주지 못하는 것으로 판단된다. 따라서 세로토닌 활성을 목적으로 하는 우울증 치료에 유효하지 않은 것으로 판단된다. 하지만 위 실험에서는 우울증의 단가아민 가설만을 기준으로 삼았으므로 우울증 자체에 대한 유효성을 평가하기에는 무리가 있다. 유리기(free-radical)로 인한 산화 스트레스의 관점에서 본다면 분명 유의한 효과를 기대해볼만 하다. 향후 우울증의 병인론에 대한 지속적 연구와 임상적 응용이 필요하다고 사료된다.

V. 결 론

加味逍遙散이 P815세포의 세로토닌에 대해 미치는 영향을 실험적으로 고찰하기 위하여 배양된 P815세포를 이용해서 항산화 효능과 P815세포 내의 TPH, AAADC, monoamine oxidase A의 활성 변화 등을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SOD와 DPPH의 활성도는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다.
2. TPH-1 mRNA 발현은 100 ㎍/㎖ 실험군에서 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다.
3. AAADC mRNA 발현은 모든 실험군에서 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다.

이상의 실험결과를 종합하면 加味逍遙散은 항산화 효능은 있으나 P815세포내의 TPH, AAADC 활성을 억제하는 경향을 보여 세로토닌 분비에 긍정적인 영향을 주지 못하는 것으로 판단된다. 따라서 세로토닌 활성을 목적으로 하는 우울증 치료에 유효하지 않은 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Hassinen IE, Vuorinen KH. Neuropharmacology. Cochrane Database Syst Rev. 1999;21(2):247-57.
2. Andreazza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida L, Nardin P, Cunha AB, Cereser KM, Santin A, Gottfried C, Salvador M, Kapczinski F, Goncalves CA. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. J Psychiatry Res. 2007;41(6):523-9.
3. Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, Yatham LN. Oxidative stress markers in bipolar disorder: A meta-analysis. J Affect Disord. 2008;111(2-3):135-44.
4. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now. J Neurochem. 2006;97(6):1634-58.
5. Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, Belmonte-de-Abreu PS, Berk M, Kapczinski F. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric

acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2008;32(7):1677-81.
6. Maes M, Christophe A, Delange J, Neels H, Scharpe S, Meltzer HY. Lowered omega 3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesterol esters of depressed patients. Psychiatry Res. 1999;85(3):275-91.
7. 서원희, 이상룡. 鬱症과 憂鬱症의 比較考察. 大田大學校 韓醫學硏究所 論文集. 1997;6(1):505-14.
8. 홍원식 編. 情校黃帝內經素問. 서울:동양의학연구원. 1995:277, 282, 303, 288-9.
9. 張介賓. 景岳全書. 서울:정담. 1999:692, 1150, 385-6.
10. 송필정, 정대규. 鬱症에 대한 文獻的 考察. 동의신경정신과 학회지. 1995;6(1):107-13.
11. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 北京:人民衛生出版社. 1985:308.
12. 박동갑. 최신한방처방해설. 대구:동양종합통신교육원출판부. 1986:103-4.
13. 허준. 동의보감. 서울:법인문화사. 1999:1644.
14. 薛己. 校註婦人良方. 臺北:文光圖書有限公司. 1981:17-8.
15. 고은상, 강병철, 성경화, 송일헌, 김의철, 권도익, 박경훈, 정성민, 박준하. 스트레스에 의한 여성 鬱症 환자의 加味逍遙散 치험 3례. 대한한방내과학회지. 2004;25(3):615-24.
16. 박형선, 서원희, 문익렬, 김정근, 배경연, 허윤경. 기질성 우울장애가 혼재된 우울증 환자 1례. 동의신경정신과학회지. 2003;14(2):199-206.
17. 김인정, 배종국. 加味逍遙散이 스트레스로 인한 흰쥐의 유즙과다분비에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1993;6(1):1-13.
18. 김점수. 加味逍遙散의 항스트레스효과에 대한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1989.
19. Schindler R, Day M, Fisher GA. Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxytryptamine and histamine in vitro. Cancer Res. 1959;19(1):47-51.
20. 대한신경정신의학회. 신경정신과학. 서울:하나의학사. 1998:361-86.
21. Peter J Delves. Encyclopedia of immunology second edition. academic press. 1998:2164-7.
22. Gershon MD, Tamir H. Release of endogenous 5-hydroxytryptamine from resting and stimulated enteric neurons. Neuroscience. 1981;6(11):2277-86.
23. 이귀녕, 이종순. 임상병리파일. 서울:의학문화사. 1993:526-7.
24. Meltzer CC, Smith G, DeKosky ST, Pollock BG, Mathis CA, Moore RY, Kupfer DJ, Reynolds CF 3rd. Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease:the emerging role of functional imaging. Neuropsychopharmacology. 1998;18(6):407-30.
25. 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. Brain Res Mol Brain Res. 1994;24(1-4):145-52.
26. Alenina N, Kikic D, Todiras M, Mosienko V, Qadri F, Plehm R, Boye P, Vilianovitch L, Sohr R, Tennet K, Hornagl H, Bader M. Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin.

PNAS. 2009;106(25):10332-7.
27. Regensburg, Germany, V Butterwecke et.al. 4th,5th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research. 1997:11.
28. J Pharm. Pharmacopsychiatry. Pharmacol. 2001;53(5):583-600.
29. 김용구. 미래의 항우울제 : 어떠한 것들이 개발되고 있는가. 생물정신의학. 2004;11(1):14-25.
30. 김완희 외. 동의생리학. 서울:대한동의생리학회. 1993:389-99.
31. 홍원식 編. 情校黃帝內經靈樞. 서울:동양의학연구원. 1995:99-100.
32. 김성훈. 동의병리학. 대전:한림원. 1994:41-2.
33. 朱丹溪. 丹溪心法附與. 서울:대성문화사. 1982:515-27.
34. 王肯當. 證治準繩. 서울:성보사. 1982:100-3.
35. 葉天士. 臨証指南醫案. 서울:정담. 1998:463-73.
36. 許沛虎. 中醫腦病學. 北京:中國醫藥科技出版社. 1998:453-9.
37. 王彦恒. 實用中醫精神病學. 北京:人民衛生出版社. 2000:72-89.
38. 李用傑. 證治菓補. 臺北:旋風出版社. 1976:107-13.
39. 홍성완, 김종우, 김은주, 김현주, 김현택, 황의완. 黃連解毒湯이 憂鬱症 摸型動物의 水中迷路學習과 뇌의 Tyrosine Hydroxylase 發顯 水準에 미치는 效果. 동의신경정신과학회지. 2003;14(1):27-44.
40. 이상인. 天眞處方解說. 서울:성보사. 1987:239-43.
41. 전국 한의과 대학 본초학교수 공편저. 本草學. 서울:영림사. 2000:161, 167, 182, 190, 237, 302, 354, 460, 536, 540, 578, 581, 588.
42. Arutiunian AV, Kozina LS. Mechanisms of free radical oxidation and its role in aging. Adv Gerontol. 2009;22(1):104-16.
43. Dubinina EE, Pustygina AV. Free radical processes in aging, neurodegenerative diseases and other pathological states. Biomed Khim. 2007;53(4):351-72.
44. Drõge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002;82(1):47-95.
45. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.
46. 오명숙, 김도림, 강지웅. DPPH방법을 통한 兎絲子, 補骨脂, 淫羊藿의 항산화 활성에 대한 연구. 대한한의학방제학회지. 2005;12(2):101-10.
47. Lyoyd D. How to avoid oxygen. Sience. 1999;286(5438):249.
48. 서유현. 신경전달물질. 서울:민음사. 1992:219-44.
49. Singer TP, Ramsay RR. Monoamine oxidase; Old friends hold many surprises. FASEB J. 1995;9(8):605-10.