동의신경정신과 학회지 제22권 제2호(2011년 6월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2011;22(2):147-162

分心氣飮加味方의 항산화능과 serotonin 대사에 미치는 영향

임재원, 정인철, 이상룡

대전대학교 한의과대학 신경정신과교실

The Effects of *BunSimGiEumGami-Bang(Fenxinqiyinjiameifang)* on Serotonin of P815 cell

Jae-Won Lim, In-Chul Jung, Sang-Ryong Lee

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

Abstract

Objectives :

This experiment was designed to investigate the effect of the BSGE hot water extract on serotonin biosynthesis of depression model.

Methods :

The cytotoxicity of the BSGE hot water extract was analyzed by MTT assay on P815 cell. The antioxidant activity was measured by DPPH free radical-scavenging activity and SOD activity on P815 cell. The quantity of 5-HT and expression of TPH-1, AAADC and MAOa mRNA was measured by of HPLC profle Analysis on P815 cell.

Results :

1. The BSGE hot water extract increased DPPH free radical-scavenging activity and SOD activity on P815 cell.
2. The BSGE hot water extract increased significantly the quantity of 5-HT.
3. The BSGE hot water extract increased the expression of TPH-1 mRNA.

Conclusions :

This experiment shows that the BSGE hot water extract might be effective for the prevention and treatment of depression. Investigation into the clinical use of the BSGE hot water extract for depression is suggested for future research.

Key Words :

Depression, P815 cell, BunSimGiEumGami(BSGE), Serotonin, 5-HT, TPH-1, AAADC, MAOa

투고 : 2011. 05. 09. 수정 : 2011. 06. 08. 채택 : 2011. 06. 13.
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

우울증이란 우울하고 저조된 정신상태가 주축이 되어 일어나는 일련의 정신증상으로 정신과 영역에서 가장 중요한 질병 중의 하나이다. 우울증은 연구방법, 개념의 변화 등에 따라 빈도의 차이가 아주 다양하지만 성인에서 가장 많은 정신장애로서 유병율이 13-20%에 이르고, 여자가 남자보다 약 2배 정도 많다고 알려져 있다[1,2]. 우울증 환자는 정서 증상으로 우울 기분 외에도 수면, 식욕, 체중, 기력 및 성욕 등의 생리 증상, 주의력, 좌절, 내성, 기억, 부정적 왜곡 등의 인지 증상, 동기, 쾌락, 흥미 등의 행동 증상 및 두통, 위통, 근육통 등의 신체 증상을 보일 수 있으며, 이러한 다양한 증상들은 서로 다른 뇌 부위를 통해 조절되는 것으로 보인다[3].

우울증의 약물치료에 있어, 우울증 환자의 2/3에서는 항우울제가 효과적이지만, 우울증 환자의 약 40%에서 항우울제로 관해 상태에 이르지 못하고 재발의 위험이 증가된다. 또한 항우울제의 치료 초기에 반응을 보였던 환자 중 20-30%는 유지치료에 실패하거나 10-20%는 비반응군으로 매우 불량한 예후를 보이기 때문에[4], 이를 보완할 수 있는 새로운 약물의 개발이나 치료효과를 높일 수 있는 병용 투여 약물들의 발견이 임상에서 요구되고 있다[5].

한의학에서는 우울증을 주로 鬱證과 유사한 개념으로 간주하여 치료에 접근하고 있다. 鬱證은 情志不舒로 인하여 氣機가 鬱滯되어 생기는 병으로 情志素因이 鬱證의 중요한 원인이 된다. 鬱證의 주요증상은 心情抑鬱, 情緖不寧, 胸部滿悶, 脇肋脹痛, 或易怒欲哭, 或咽中如有異物梗阻 등이며, 肝氣鬱結, 氣鬱化火, 血行鬱滯, 痰氣鬱結, 心陰虧虛, 心脾兩虛, 肝陰虧虛, 心神惑亂 등의 변증유형으로 분류된다[6].

우울증에 대한 한의학계의 실험연구에서 다수의 단일 약재[7-10]와 복합처방[11-14]이 우울증 동물모델에 대하여 항우울 효과를 나타낸 결과를 보고한 바 있다.

分心氣飮은 『太平惠民和劑局方』[15]에 처음 기술되었는데 憂愁, 思慮, 怒氣로 인하여 神을 傷하였을 때 時候에 구애받지 않고 쓸 수 있으며, 停滯된 氣를 疏通시키고 陰陽을 昇降시키며 三焦를 고르게 조화시키며 脾臟을 和하게 하는 효능이 있어 一切氣不和로 인한 諸證에 응용된다.

分心氣飮에 대한 다양한 선행 연구[12,16-23]가 보고되어 왔으며 길 등[16-19]은 分心氣飮의 스트레스 관련 연구를, 이[12]는 分心氣飮을 시료로 우울증 모델 흰쥐의 행동 및 탐색활동의 변화를 관찰하여 유의한 결과를 보고한 바 있다. 따라서 分心氣飮이 氣鬱型 우울증의 치료와 예방에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

이에 저자는 分心氣飮加味方이 serotonin 대사과정에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 항산화 효능과 P815 세포내의 5-HT 함량 및 TPH-1, AAADC, MAOa mRNA의 활성 변화를 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 分心氣飮加味方(*Fenxinqiyinjiameifang*, BSGE)의 처방구성은 『東醫寶鑑』[24]을 기준으로 하여 分心氣飮에서 香附子를 2.0 g에서 8.0 g으로 增量한 것으로, 약제는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다. 처방 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table Ⅰ).

Table Ⅰ. Prescription of *BunSimGiEumGami-Bang* (*Fenxinqiyinjiameifang*, 이하 BSGE)

Herb Name	Galenical name	Quantity (g)
香附子	*Cyperi Rhizoma*	8.0
紫蘇葉	*Perilla Folium*	4.8
甘草(炙)	*Glycyrrhizae Radix*	2.8
半夏(製)	*Pinelliae Rhizoma*	2.4
枳殼	*Aurantii Fructus Pericarpium*	2.4
靑皮	*Citrii Unshiu Immaturi Pericarpium*	2.0
陳皮	*Citri Pericarpium*	2.0
木通	*Akebiae Caulis*	2.0
大腹皮	*Arecae Pericarpium*	2.0
桑白皮	*Mori Radicis Cortex*	2.0
木香	*Aucklandiae Radix*	4.0
赤茯苓	*Poria*	2.0
檳榔	*Arecae Semen*	2.0
蓬朮	*Zedoariae Rhizoma*	2.0
麥門冬	*Liriopes Radix*	2.0
桔梗	*Platycodi Radix*	4.0
桂枝	*Cinnamomi Ramulus*	2.0
藿香	*Agastachis Herba*	2.0
Total amount		50.4

2) 검액의 조제

分心氣飮加味方 1첩 분량(50.4 g)에 증류수 1,000 ㎖을 가하여 2시간 동안 가열한 후 여과하여 얻은 액체성분을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 약리성분을 추출하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 分心氣飮加味方 열수추출물 6.4 g의 분말을 얻었다. 얻어진 분말은 냉동(-20℃) 보관하면서 사용 시에는 phosphate buffer에 필요한 농도로 희석하여 0.22 ㎛ 필터로 사용하였다.

3) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약 중 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 ㎍/㎖ 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), DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)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, serotonin 및 5-hydroxyindoleacetic acid(HIAA), dithiothreitolDL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin(4H-PT)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 사로 부터 구입하였으며, 그 밖의 시약은 특급 및 HPLC용 등급을 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., 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) 등이다.

2. 실험 방법

1) 세포독성 측정

(1) P815 세포 배양

P815 세포는 동아대학교 의과대학 해부학 교실에서 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% CO2 상에서 배양하였다[25]. P815 세포(2×10^5 cells/㎠, 60㎜ culture dish)를 배양한 다음, 이 세포에 分心氣飮加味方 처방을 10~200 ㎍까지 가한 다음 48시간 동안 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.

(2) HPLC 분석

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)을 통하여 分心氣飮加味方의 수용성 성분을 분석하기 위하여 C18역상 HPLC columne (Hypersil, USA)을 장착한 HPLC(Shimazu, Japan)를 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) MTT 분석

세포독성 측정은 배양한 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척한 다음 96-multiwell에 2×10^4 cells/well의 세포수가 되도록 산정하여 사용하였다. 세포는 FBS가 들어있는 DMEM 배양액에서 각 각 다양한 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후 세포증식을 MTT 분석법에 의해서 분석하였다. MTT 분석법은 배양이 완료된 세포에 50 ㎍/㎖ MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide](Sigma)을 희석 처리하여 반응시킨 다음 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 570 ㎚에서 측정하였다.

2) 항산화능 측정

(1) DPPH Free Radical-Scavenging 활성 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 산화/환원 환경에 따라 색을 띄는 radical로 시료의 radical 제거능력을 측정 할 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 10분간 방치 후에 eppendorf tube에서 96-wells plate의 각 well에 분주하여 O.D 517 ㎜에서 측정 한다.

Free radical scavenging activity(%)

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

(2) SOD 활성 측정

Tetrazolium salt를 이용하여 SOD에 의한 환원으로 수용성의WST-1(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 형성하여 SOD assay를 측정하였다. 96-wells plate의 각 well에 Sample

solution 20 ㎕를 첨가한 후 Reagent solution 200 ㎕를 넣은 후 마지막으로 Enzyme working solution을 넣어준 후, 37℃에서 20분간 반응시킨다. ELISA reader를 이용하여 O.D 450 ㎚에서 측정한다. SOD activity(inhibition rate %)를 계산한다.

3) Serotonin 함량 측정 및 Quantitative Real Time PCR 분석

(1) Serotonin 함량 측정

Serotonin 함량은 HPLC-형광광도계법[26]으로 측정하였다. 세포 내부의 serotonin 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, 원심 분리하여 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(0.22 ㎛)로 여과한 후 HPLC에 주입하여 serotonin 함량을 측정하였다 HPLC 조건은 column, TSK-gel ODS 120 T(5 ㎛, 0.45×15 ㎝); 이동상, NaOAc buffer(50 mM, pH 3.5)-acetonitrile-methanol(90:6:4 v/v); 유속, 1 ㎖/min으로 하였다. 단백질 함량은 각각의 시료 중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였으며, bovine serum albumin을 표준물질로 하고 Bradford's method를 이용하여 측정하였다[27].

(2) 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 mRNA 발현 분석

① RNA 추출

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 상층액만을 400 ㎕ 취한 뒤 동량의 isopropanol을 넣고 inverting을 반복하여 섞은 다음 4℃에서 15분 동안 방치시키고 14,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리(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 계산한다.

② RT-PCR

분리한 RNA에 해당 유전자들의 oligo dT primer와 DEPC water를 넣고 65℃에서 10분 동안 반응시킨 후 실온에서 3분 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.

③ Real Time Quantatative RT-PCR

각 유전자 발현 정도를 Real-Time PCR을 이용해 측정하였다. 각 Sample의 추출된 RNA에 2X SYBR Green Master Mix(Bio-Rad) 25 ㎕와 각각의 유전자들과 10 pM 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. Bata-actin mRNA을 control로 이용하여 target mRNA를 정량하여 유전자 발현을 비교하였다. 각각의 유전자들의 염기 서열은 다음과 같다(Table Ⅱ).

Table Ⅱ. Sequences of Primer Set Used Real-Time Quantative 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(AAAD), dopa decarboxylase(DDC)	AAGCAGTCCCTTCGGATGGCA	GCAGCGTCAATGTGCAGCCA	60	199
monoamine oxidase A (MAOa)	CGGCCAGGAACGGAAATTTGTAG	TGGCAGTCAAAACCGGTGGG	60	200

3. 통계 분석

실험 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다. 실험 집단 간 수치 데이터는 Student t-test를 이용하여 비교분석하였다. $p<0.05$ 수준에서 통계적으로 유의적 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 分心氣飮加味方의 HPLC 분석

C18역상 HPLC를 사용하여 BSGE의 수용성 성분을 분석하였다. 역상 HPLC 분석 결과 앞부분의 수용 성분을 확인하였다(Fig. 1).

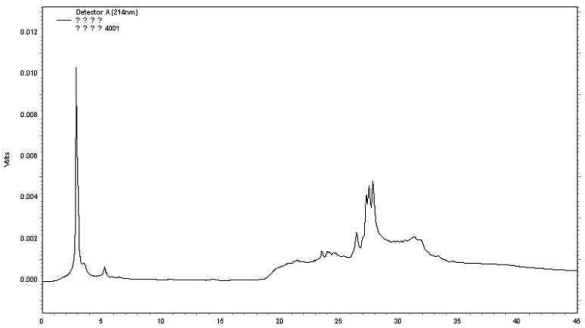


Fig. 1. Analysis of HPLC profile of BSGE.
Water extracts were subjected to C18 column Chromatography on acetonitrile linear gradient(line) over a 30 min period at a flow rate of 1㎖/min. Absorbance was monitored at 214 ㎚.

2. 分心氣飮加味方의 세포독성

MTT assay에 의한 cell viability를 측정한 결과, 分心氣飮加味方 열수추출물은 20 ㎍/㎖에서 102.40 ± 2.40(%), 60 ㎍/㎖에서 100.59 ± 1.95(%), 120 ㎍/㎖에서는 104.67 ± 4.55(%)의 세포 독성을 보여 分心氣飮加味方은 세포 증식에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

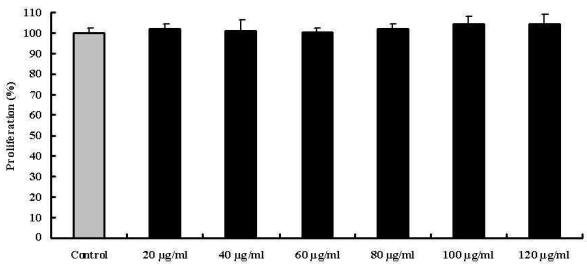


Fig. 2. Additional effects of BSGE on proliferation of P815 cells determined by MTT assay.
The cell proliferation was measured by MTT assay as described in Material and Methods.
Data are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.E. of three determination.
Asterisks indicate a significant difference compared with control group by Student test(*p<0.05).

3. 分心氣飮加味方의 항산화능

1) DPPH Free Radical-Scavenging 활성

대조군으로 사용한 EAE(ethyl ascorbyl ether)에서 농도 의존적인 항산화 작용이 매우 우수하게 나타났다. 分心氣飮加味方 열수추출물 100 ㎍/㎖에서 13.32 ± 2.64(%), 10 ㎍/㎖에서 4.50 ± 1.65(%), 1 ㎍/㎖에서 1.46 ± 0.14(%)의 소거작용

을 나타냈다. 分心氣飮加味方은 1 ㎍/㎖ 이상에서 농도 의존적으로 유의성 있는 항산화능 증가를 보였다(Table Ⅲ).

Table Ⅲ. Effect of BSGE on DPPH Radical-Scavenging Activity

Sample	Concentraion	Scavenging effect(%)
BSGE	100 ㎍/㎖	13.32 ± 2.64*
	10 ㎍/㎖	4.50 ± 1.65*
	1 ㎍/㎖	1.46 ± 0.14*
	0.1 ㎍/㎖	0.54 ±2.54
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).
Statistically significant value compared with control group by Student test(*p<0.05).

2) SOD 활성

分心氣飮加味方 열수추출물 100 ㎍/㎖에서는 13.32 ± 2.64(%), 10 ㎍/㎖는 4.50 ± 1.65(%), 1 ㎍/㎖에서는 1.46 ± 0.14(%)로 100, 10, 1, 0.1 ㎍/㎖의 농도에서 농도 의존적 항산화 작용을 보였고, 100, 10, 1 ㎍/㎖에서 유의한 감소를 보였다(Fig. 3).

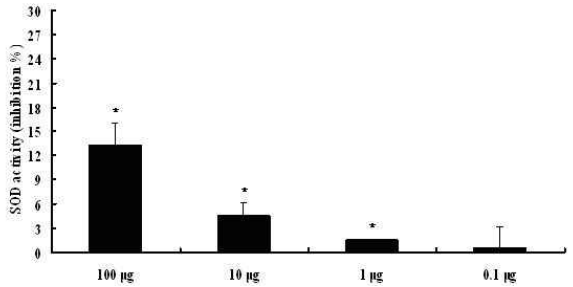


Fig. 3. Effect of BSGE on the Superoxide dismutase (SOD) activity.
The effect on SOD was tested with BSGE.
Data are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.E. of three determination.
Asterisks indicate a significant difference compared with control group by Student test(*p<0.05).

4. 5-HT에 미치는 영향

5-HT는 分心氣飮加味方 열수추출물 20, 40, 60, 80 ㎍/㎖에서 농도 의존적으로 증가하였고, 60 ㎍/㎖와 80 ㎍/㎖의 농도에서는 각각 1.6 ± 0.12 nmol/㎎(104.5%), 1.64 ± 0.15 nmol/㎎(107.1%) 유의성 있는 증가를 보였다(Table Ⅳ).

Table Ⅳ. Effects of BSGE on the Intracellular 5-HT Content in P815 Cells

Compounds	5-HT content (nmol/㎎ protein) (% of control)
Control	1.53 ± 0.23 (100)
BSGE (20 ㎍/㎖)	1.55 ± 0.21 (101)
BSGE (40 ㎍/㎖)	1.57 ± 0.4 (102.6)
BSGE (60 ㎍/㎖)	1.6 ± 0.12 (104.5)*
BSGE (80 ㎍/㎖)	1.64 ± 0.15 (107.1)*

P815 cells were cultivated in DMEM medium plus 10% heat-inactivated FBS and 100 units/㎖ penicillin and 100 Ag/㎖ streptomycin at 37 8C, then BSGE or none(control) were added and incubated for 24 hrs. P815 cells were harvested and serotonin content was determined by an HPLC method.
Statistically significant value compared with control group by Student test(*p<0.05). The results are expressed the mean ± S.E.

5. TPH-1 mRNA 발현에 미치는 영향

TPH-1 mRNA는 分心氣飮加味方 열수추출물 50 ㎍/㎖에서 0.038 ± 0.00069(%), 100 ㎍/㎖에서 0.039 ± 0.0003(%)으로 농도 의존적으로 증가하였으나, 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 4).

6. AAADC mRNA 발현에 미치는 영향

AAADC mRNA는 分心氣飮加味方 열수추출물 50 ㎍/㎖에서 0.0043 ± 0.0012(%), 100 ㎍/㎖에서 0.0039 ± 0.001(%)로 농도 의존적으로 감소되었으나, 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 5).

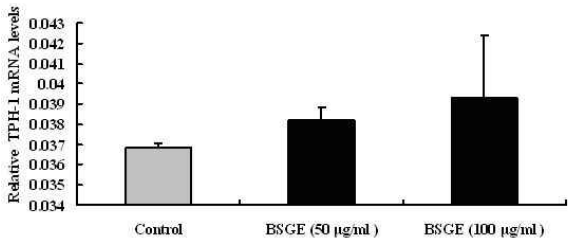


Fig. 4. Effect of BSGE on TPH-1 mRNA in P815 cells.
The expression levels of TPH-1 mRNA and beta-actin were analyzed by real-time RT-PCR. The TPH-1 mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample.
Data are represented as means ± S.E.
Statistically significant value compared with control group by Student test(*p<0.05).

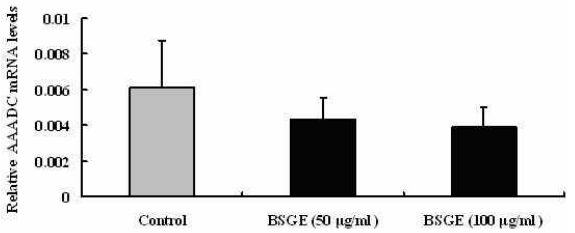


Fig. 5. Effect of BSGE on AAADC mRNA in P815 cells.
The expression levels of AAADC mRNA and beta-actin were analyzed by real-time RT-PCR. The AAADC mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample.
Data are represented as means ± S.E.
Statistically significant value compared with control group by Student test(*p<0.05).

7. MAOa mRNA발현에 미치는 영향

MAOa mRNA는 分心氣飮加味方 열수추출물 50 ㎍/㎖에서 0.0013 ± 0.0006(%), 100 ㎍/㎖에서 0.0017 ± 0.00054(%)로 농도 의존적인 증가를 보였으나, 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 6).

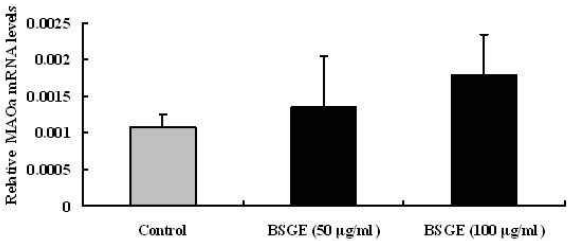


Fig. 6. Effect of BSGE on MAOa mRNA in P815 cells.
The expression levels of MAOa mRNA and beta-actin were analyzed by real-time RT-PCR. The MAOa mRNA expression was normalized to beta-actin mRNA expression in the corresponding sample.
Data are represented as means ± S.E.
Statistically significant value compared with control group by Student test(*p<0.05).

Ⅳ. 고 찰

우울증은 우울하거나 들뜨는 기분의 장애가 주축이 되는 일련의 정신장애를 일컫는 기분장애 중 저조한 기분에 있는 상태를 말하는 것으로 여러 가지 종류의 정신장애 및 신체장애에서 나타나며, 서로 연결성을 가지고 있는 증상들로 이루어지는 증후군이다[28]. 우울증은 여러 가지로 분류되는데 미국정신의학회의 분류인 DSM-Ⅳ[29]에서는 우울증이라는 용어 대신 우울장애로 명칭을 바꾸었으며, 크게 주요우울장애(major depressive disorder)와 기분부전장애(dysthymic disorder)로 구분하였다.

우울증은 현재 가장 흔한 정신과 질환 중의 하나로써 전체 인구의 5-6%가 우울증을 앓고 있으며 10%의 인구가 전 생애에 걸쳐서 한 번은 우울증을 앓는다[30]. 전형적인 우울증의 증상은 우울감, 흥미상실, 체중감소, 수면장애, 죄책감, 정신운동의 지연, 초조, 자살 등이지만, 어떤 환자들은 단지 요통이나 만성피로감을 나타내고, 극단적인 환자들은 피해망상이나 환청을 나타내는 등 그 임상 양상이 매우 다양하다[1,2].

우울증의 원인으로는 생물학적 원인과 사회심리학적 원인으로 크게 대별되는데, 이 중 생물학적 원인에는 유전적 요인, 체질적 요인, 신경생화학적·생리학적 요인 등이 있다. 이 중 가장 잘 알려진 이론이 단가아민학설이다[1,2]. 우울증의 단기아민 가설이란 아미노산의 탈산소에 의해 생기는 것으로 생체아민이라고도 하며, catecholamine과 serotonin으로 분류되는[31] monoamine을 고갈시키는 reserpine과 같은 약물을 우울증 환자에게 투여하면 우울증을 유발한다는 것을 관찰한 뒤 제기된 학설로서, monoamine 특히 norepinephrine이나 serotonin 활성도 감소가 우울증의 발병에 중요한 역할을 한다는 가설이다. 이는 삼환계 항우울제(TCA)나 단가아민 산화효소 억제제(MAOI) 같은 약물들을 투여하면 시냅스에서 monoamine의 농도가 증가된다는 연구들에 의해 지지를 받았다. 이 중 serotonin은 serotonin의 대사산물인 5-HIAA(5-Hydroxyindoleacetic acid)가 우울증 환자의 뇌척수액에서 감소하였다는 보고와 선택적 세로토닌 재흡수차단제가 우울증 치료에 기여한 지대한 영향으로 우울증과 가장 밀접한 monoamine이 되었다[2,32,33]. 최근까지의 우울증의 병태생리와 신경생물학에 관한 연구들은 우울증에서 신경전달물질계의 변화 외에도 신경내분비계, 면역계의 변화 및 해마, 편도, 전전두엽 피질의 구조적인 변화가 초래된다는 사실을 밝혀내었다[34].

현재의 항우울제는 주로 monoamine의 재흡수 혹은 수용체에 작용하거나 이를 분해하는 효소를 억제하는 약물들이 주종을 이루고 있다. 고전적인 삼환계 항우울제 혹은 사환계 항우울제는 시냅스전 세포막에 위치한 노르아드레날린(NA), 세로토닌(5-HT), 도파민(DA) 전달체를 차단하고, 단가아민 산화효소 억제제(MAOI)는 NA, 5-HT, DA을 분해하는 효소들을 비가역적으로 혹은 가역적으로 억제하여 시냅스 내에 이들 monoamine들을 증가시킨다. 그러나 이들 약물들은 그 부작용으로 인하여 우울증의 치료에 2차 혹은 3차로 사용되는 약물로 현재 사용되고 있다[35]. 따라서 선택적인 세로토닌 재흡수 억제제(serotonin-specific reuptake inhibitor, SSRI)는 현재 우울증의 치료에 1차 약물로 고려되고 있다. SSRI들은 α1-NA, histamine 1(H1), 및 muscarinic cholinergic receptor들에 대한 친화력이 없어 이에 대한 부작용이 적고, 단지 5-HT 재흡수에 대해서만 선택적이고 강력하게 차단한다[36]. 최근 많이 사용되는 약물 중에서 serotonin의 재흡수(reuptake)를 차단하는 졸로프트, 팍실, 프로작과 같은 차단제들이 크게 효과적인 것으로 평가받고 있으나 이처럼 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[37]. 또한, 현재의 항우울제들은 임상적 반응이 나타나기까지에는 2주에서 4주 정도의 시간이 필요하며, 약물 순응을 저해하는 부작용을 갖고 있다. 우울증 환자의 2/3에서 항우울제에 효과적 반응을 보이는 반면, 우울증 환자의 약 40%에서 항우울제의 복용에도 불구하고 관해상태에 이르지 못하고 재발의 위험이 증가된다. 더욱이 항우울제의 치료 초기에 반응을 보였던 환자 중에서도 20~30%가 유지치료에 실패하거나 10~20%는 비반응군으로 매우 불량한 예후를 보인다[4]. 따라서 이를 보완할 수 있는 새로운 치료법 및 새로운 약물의 개발이나 치료효과를 높일 수 있는 병용 투여 약물들의 발견이 임상에서 요구되고 있는데[5], 비교적 부작용이 적은 것으로 알려진 천연물 한약은 새로운 접근법으로 여겨지고 있다.

韓醫學에서는 우울증을 주로 鬱證의 범주로

간주하여 치료에 접근하고 있다. 鬱이란 억압되고 침울한 정신 상태로 인하여 모든 생리 기능이 침체되는 현상으로써, 의욕상실, 흥미상실, 침묵, 무기력 등 생기가 없는 현상을 나타낸다. 이러한 증상은 우울증의 전형적인 증상 중 우울한 기분, 흥미와 즐거움의 상실, 집중력과 주의력의 감소와 유사하다고 할 수 있다[38,39]. 鬱證은 情志不舒로 因하여 氣機가 鬱滯되어 생기는 病으로[6], 『內經』[40]의 『素問·至眞要大論』에서 "諸氣膹鬱皆屬於肺"라 하여 처음 소개되었으며, 『素問·本病論』에서 "久而化鬱", "日久成鬱", "伏之化鬱"이라 하고 『素問·刺法論』에서 "抑之鬱發"이라 하여 만성적인 억압으로 말미암아 형성되는 舒暢, 通暢되지 못하는 상태로 설명되었고, 후대로 갈수록 정신적인 개념의 의미가 커져 明代의 張[41]이 怒鬱, 思鬱, 憂鬱 등의 情志之鬱이라는 개념을 설정한 후 우울증을 포함하는 의미가 되었다. 明代의 張[41], 徐[42] 등 많은 醫家들은 감정의 변화로 나타나는 여러 현상인 七情을 鬱證의 주된 발병인자로 보았는데, 情志素因은 鬱證의 중요한 원인이 된다. 鬱證의 주요 증상은 心情抑鬱, 情緖不寧, 胸部滿悶, 脇肋脹痛, 或易怒欲哭, 或咽中如有異物梗阻 등이고, 주요 病理는 憂思鬱怒肝氣鬱結, 憂愁思慮 脾失健運, 情志過極 心失所養으로 구분할 수 있다. 鬱證의 변증유형은 肝氣鬱結, 氣鬱化火, 血行鬱滯, 痰氣鬱結, 心陰虧虛, 心脾兩虛, 肝陰虧虛, 心神惑亂 등이고 理氣開鬱이 鬱證의 治療原則이다[6].

分心氣飮은 "心胸間의 鬱氣를 풀어준다"는 의미이며, 胸膈에 氣가 鬱結하면 水 또한 이를 따라서 정체하게 되므로 이것을 분해하여 水道로 順下하게 하는 효능이 있다고 하였다[43]. 分心氣飮은 宋代 陳 등[15]의 『太平惠民和劑局方』에 처음 기재된 처방으로 "남자와 여자의 一切氣不和를 治한다"고 하였으며 역시 宋代의 楊[44]은 仁齊直指에서 "治憂思鬱怒 諸氣痞滿停滯 通利大小便"라고 하였다. 이후 『東醫寶鑑 內景篇』[24]에서는 "七氣者 喜怒悲思憂驚恐 或以爲寒熱恚怒喜憂愁 皆通也 …… 宜服七氣湯 四七湯 分心氣飮"라 하고, 分心氣飮은 "治七情痞滯 通利大小便 淸而疎快"한다고 하였다. 分心氣飮은 二陳湯料로써 治痰하고, 桔梗 枳殼은 快氣利膈하며 木通 燈心은 利小便하고, 桑白皮 大腹皮는 行水行氣하여 除脹滿하며 桂枝는 溫陽逐寒하고, 麥門冬은 泄心腹結氣 淸虛熱하며, 木香 檳榔 紫蘇葉 香附子 藿香은 理氣 通利大小便하므로 淸而疎快하니 氣鬱太甚 腫滿 兩脇痛 七情痞滯를 治하는 바 胸膈間에 氣가 鬱滯하면 水毒이 따라서 停滯하므로 이를 分離시켜 水道를 通하게 하여 排泄시키는 효능이 있다[45,46]. 본 실험에서는 『東醫寶鑑·內景篇』[24]의 原方에서 香附子를 8g으로, 枳殼과 木香을 각각 4g으로 증량하여 사용하였다. 香附子는 歸經이 肝·脾·三焦經이고, 효능은 疎肝 理氣 解鬱, 調經止痛으로, 神經性胸悶, 慢性胃機能衰弱, 消化不良, 食慾減退, 腹痛 등에 사용하고, 已潰未潰 已痛未痛의 癌腫을 치료하고, 精神鬱結所致의 月經不調, 月經痛, 經閉 등을 치료한다고 하였다[47,48]. 또한 木香은 能升降諸氣 疏肝氣 和脾氣 健脾胃의 효능이 있어 一切氣痛 九種心痛 中氣不省 藿亂 등[47,49]에 사용되었고, 桔梗은 宣肺利咽 祛痰 寬胸利膈 解鬱瀉火의 효능이 있어 咳嗽痰多 胸悶不暢 咳逆 心腹痛 積聚 藿亂 등[49,50]에 사용되어 왔다. 香附子와 桔梗, 木香의 여러 작용 중 疏肝解鬱 理氣寬中하는 작용은 여러 정신과적 치료에 응용할 수 있으며, 특히 우울증에 유효할 것으로 판단되어 본 실험에서는 각각의 약재를 증량하여 사용하였다. 分心氣飮에 대한 선행 실험 연구로, 김[17]이 分心氣飮과 分心氣飮加味方의 抗stress 효과를, 길[16]과 김[18]이 分心氣飮의 스트레스 抑制效果를, 박[20]은 신장기능에 미

치는 효과를, 박 등[21,22]은 혈압강하에 미치는 영향을, 이 등[12,23]이 우울증에 미치는 영향에 대하여 보고한 바 있다. 최근 이[12]는 分心氣飮을 시료로 우울증 모델 흰쥐의 자당섭취량 변화, 개방장에서의 행동변화, 수동적 회피과제에서의 수행 등의 변화를 관찰하여 分心氣飮이 효과적으로 작용함을 보고하였다. 따라서 分心氣飮이 氣鬱型 우울증의 치료와 예방에 활용될 수 있을 것으로 판단할 수 있다.

이에 著者는 分心氣飮加味方의 열수추출물이 우울증을 유발하는 생물학적 원인 중 주요 monoamine 신경전달물질의 일종인 serotonin 생합성 과정에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 分心氣飮加味方 열수추출물을 시료로 배양 P815 세포에서 MTT로 분석한 세포증식, DPPH free radical 소거 작용, superoxide dismutase(SOD) 활성 및 세포내 5-HT, Tryptophan hydroxylase 1(TPH-1), aromatic L-amino acid decarboxylase(AAADC), monoamine oxidase A(MAOa) 등의 함량 및 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 유전자 발현에 미치는 영향을 측정, 관찰하였다.

먼저 C18역상 HPLC[51]를 사용하여 分心氣飮加味方의 수용성 성분을 분석하고 배양 P815 세포에 MTT를 희석 처리한 후 세포독성을 측정하였다. P815 세포는 F1 hybrid mice의 ascitic tumour에서 유래한 것으로 serotonin을 생합성, 저장 및 분비하며, TPH 및 AAADC를 발현하고 histamine을 생합성, 저장 및 분비하며, histamine 생합성 효소인 histidine decarboxylase(EC 4.1.1.22)를 발현[52]하여 본 실험에 적합하다고 사료된다. 본 실험에서는 객관성을 확보하기 위해 각 대사산물의 함량을 HPLC를 통해 分心氣飮加味方 고유의 각 peak pattern을 확인하였다(Fig. 1). MTT 분석법은 세포 내 미토콘드리아 외막의 탈수소효소작용에 의하여 노란색 수용성의 MTT tetrazolium 시약이 자주색의 비수용성의 MTT formazan으로 환원되는 원리를 이용한 것으로 흡광도 측정이 의하여 세포의 생존을 쉽게 분석하는 방법이다[53]. MTT 분석법에 의하여 分心氣飮加味方 열수추출물은 20 ㎍/㎖에서 102.40 ± 2.40(%), 60 ㎍/㎖에서 100.59 ± 1.95(%), 120 ㎍/㎖에서는 104.67 ± 4.55(%) 등의 세포생존율을 보였다(Fig. 2). 이러한 결과로 分心氣飮加味方 열수추출물은 120 ㎍/㎖ 이하의 농도에서 정상세포에 대한 세포독성을 나타내지 않으므로 본 실험에서는 100㎍/㎖ 이하의 分心氣飮加味方 열수추출물의 실험군을 사용하였다.

分心氣飮加味方의 항산화 작용을 알아보기 위하여 DPPH free radical 소거 작용과 SOD 활성을 측정하였다. Free radical이란 하나 또는 여러 개의 홀수 전자를 지닌 분자를 의미하며 생체내의 분자들과 활발히 반응하여 여러 병적 상태를 유발하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 활성산소들의 수와 활성의 증가로 세포손상과 변성이 활발히 일어나는 단계를 산화성 자극이 증가하였다고 하며, 건강상태에서도 기저수준의 산화성 자극이 존재하나 만성질병, 노화, 중독, 손상 등에서는 병적으로 산화성 자극이 증가하여 세포손상과 고사를 유도하는 것으로 알려져 있다. 인체는 이를 예방하기 위해 다양한 항산화 기전을 가지고 있으나 이를 초과하는 산화성 자극의 증가는 필연적으로 질병의 발생과 진행을 가져오게 된다[54]. 본 실험에서는 대조군으로 EAE(ethyl ascorbyl ether)을 사용하여 DPPH free radical 소거능을 측정한 결과 分心氣飮加味方 열수추출물 100 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 1 ㎍/㎖에서 농도 의존적으로 유의성 있는 증가를 보였다(Table Ⅲ). SOD는 Superoxide anion를 과산화수소와 산소 분자로 전환시키는 반응을 촉매하는 중요한 항산화 효소 중의 하나로[55], 分心氣飮加味方 열수추출물

처리 후 SOD를 측정한 결과, 分心氣飮加味方 열수추출물 100, 10, 1 ㎍/㎖에서 농도 의존적으로 유의한 감소를 보였다. 이는 세포가 아닌 分心氣飮加味方 처방 자체가 갖는 전자공여 소거능에 관한 실험으로써 分心氣飮加味方이 항산화 효능을 나타내는 것으로 해석할 수 있다.

Serotonin(5-hydroxytryptamine, 5-HT)은 강장동물에서 척추동물에 이르는 각종 동물, 세균 및 많은 식물에 포함되어 있으며, 혈소판에서 유리되고, 장관점막, 송과체, 중추신경계를 포함한 많은 체내조직 내에 고농도로 존재하고, melatonin의 전구체이며, 위액분비의 억제작용, 평활근 수축작용을 가지고 있다[56,57]. Serotonin은 중추신경계에서 감정 조절, 불안, 알코올 중독, 약물 남용, 폭식, 성적 행동 등의 원인으로 작용되고, 말초 조직에서는 혈관 수축, 장 운동, 지혈, 면역반응 등에 작용한다[58]. Serotonin은 tryptophan에서 5-hydroxytryptophan(5-HTP)을 경유하여 생합성되며 각 단계에는 tryptophan hydroxylase (EC 1.14.16.4; TPH), aromatic L-amino acid decarboxylase(EC 4.1.1.28; AAADC)가 촉매하고 있으며, TPH가 serotonin 생합성 과정의 rate-limiting 효소이다[59]. 따라서 세포 내 Serotonin의 양은 serotonin 합성 속도를 조절하는 TPH의 효소 활성에 의해 결정된다[60]. TPH는 serotonin 합성에서 초기 속도 조절 효소로 세포내 serotonin 합성의 주요 조절자이다. 또한 TPH는 세포 내 serotonin 농도의 조절자이며, 상대적인 serotonin 농도는 신경 전달에서 중요한 요소로 작용한다[61]. TPH는 tryptophan 이외에 L-phenylalanine도 기질로 이용하지만 내재성 보효소인 pteridine의 함량에 따라 활성이 다르게 나타난다[62]. TPH의 활성은 ATP 및 Mg^{2+}에 의한 인산화에 의하여 가역적으로 활성화되며 Ca^{2+}, calmodulin 및 Ca^{2+} calmodulin 의존성 protein kinase가 관여하고 있음이 보고되었다[52]. TPH에는 TPH-1와 TPH-2인 2종의 동질효소가 존재한다. 이들 효소는 서로 다른 유전자에서 만들어지는데, TPH-1은 중앙 신경 시스템(CNS) 외곽에서 순환하는 serotonin을 만들어내며, 뼈 형성에서 간 재생 및 간염에 이르기까지 다양한 생물 공정에 관여한다. 다른 동질 효소인 TPH-2는 CNS 내에서, 특히 뇌간(brainstem) 봉합의 핵(raphe nueclei)에서 세레토닌 생산을 담당한다[62]. 이러한 관점에서 分心氣飮加味方 열수추출물이 P815 세포 내 5-HT의 농도와 TPH-1 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 5-HT는 分心氣飮加味方 열수추출물 20, 40, 60, 80 ㎍/㎖에서 농도 의존적으로 증가하였고 60 ㎍/㎖와 80 ㎍/㎖의 농도에서는 유의성 있는 증가를 보였고(Table Ⅳ), 分心氣飮加味方 열수추출물에 의한 TPH-1 mRNA 발현은 통계적 유의성은 없었으나 농도 의존적인 증가를 보였다(Fig. 4). 이로써 分心氣飮加味方이 5-HT의 농도와 TPH-1 mRNA 발현을 증가시키는 효과가 있음을 실험적으로 확인하였다.

Serotonin은 TPH와 L-아미노산 카르복실기 분해효소(aromatic amino acid decarboxylase ; AAAD)에 의해 단계적으로 합성되어지는데, 먼저, TPH가 L-tryptophan으로부터 5-hydroxy tryptophan(5-HTP)을 합성하고, 이어서 AAADC가 5-HTP로부터 serotonin을 합성한다[63]. 방향족 아미노산 탈탄산효소(AAADC)는 모든 aromatic L-amino acid들을 탈산화하여 tyramine, dopamine 및 serotonin 등을 생성하는 효소로서 동물 체내에서 각종 catecholamine 및 serotonin 같은 신경전달물질들의 생합성에 있어 필수적인 역할을 담당하고 있다[64]. 본 실험에서 P815 세포에 分心氣飮加味方 열수추출물을 처리한 결과 AAADC mRNA는 통계적 유의성이 없는 농도 의존적인 감소를 보였다. 기존 연구[65]에서 실험시간에 따

라서 AAADC 활성이 달라진 것을 보고한 것으로 미루어보아 AAADC의 경시적 변화가 AAADC mRNA의 활성 감소에 영향을 미쳤을 가능성이 있다고 예상할 수 있지만, 이는 단정할 수 없고, 전술한 가설을 뒷받침하기 위해서는 AAADC에 관한 정확한 기전연구가 필요하리라 사료된다.

모노아민산화효소(monoamine oxidase, MAO)는 중추신경계나 말초조직 등 동물조직의 미토콘드리아에 널리 존재하면서 신경전달물질이나 호르몬성 아민 화합물의 대사를 관장하는 효소이다. MAO는 내인성 기질로서 카테콜아민과 인돌알킬아민 또는 그 유도체를 주로 이용하며 기질 특이성에 따라 serotonin, norepinephrine, epinephrine을 산화적으로 탈아민시키는 A형과 벤질아민, 페네틸아민의 산화를 촉매하는 B형의 두가지 형으로 나눌 수 있다[66]. 본 실험에서는 分心氣飮加味方 열수추출물을 처치한 후 MAOa mRNA의 발현을 조사한 결과 증가하였으나 유의성은 없었다.

이상의 연구결과를 총괄해 보면 分心氣飮加味方은 배양 P815 세포에서 항산화 효능을 보였고, 세포내 5-HT와 TPH-1의 함량 및 mRNA의 발현을 활성화시켜 해당 세포에서 serotonin의 함량을 증가시켰다. 따라서 分心氣飮加味方은 우울증에 대한 예방과 치료제로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 향후 分心氣飮加味方의 작용기전에 대한 연구와 임상적 활용에 관한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

分心氣飮加味方의 열수추출물이 P815 세포에서 항산화 효능과 serotonin 함량에 미치는 영향에 대하여 실험적으로 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 分心氣飮加味方 열수추출물은 P815 세포에서 DPPH free radical의 소거 작용을 나타냈고, SOD의 활성을 증가시켰다.
2. 分心氣飮加味方 열수추출물은 P815 세포내 5-HT의 함량을 유의성 있게 증가시켰다.
3. 分心氣飮加味方 열수추출물은 P815 세포에서 TPH-1 mRNA의 발현을 증가시켰다.

이상의 결과로 미루어 보아 分心氣飮加味方은 우울증의 예방과 치료에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 대한신경정신의학회. 신경정신과학. 서울:하나의학사. 1998:361-86.
2. 이형영. 정신의학 각론. 광주:전남대학교 출판부. 1991:61-80.
3. Nestler EJ, Barrot M, Dileone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. Neuron. 2002;34:13-25.
4. Thase ME. The clinical, psychosocial, and pharmacoeconomic ramifications of remission. Am J Manag Care. 2001;7:S377-85.
5. 이상경. 에타베린의 항우울효과. 대한정신약물학회지. 2001;12(1):49-63.
6. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회. 한의신경정신과학. 경기:집문당. 2007:256-65.
7. 홍성유, 박선동. 시호가 우울증 모델 白鼠 의 catecholamine에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4):245-53.
8. 박세진, 김종우, 김현택, 지상은, 김운령, 황의

완. 우울증모델 흰쥐에 대한 竹茹와 St. John's Wort의 항우울효과에 대한 비교 연구. 동의신경정신과학회지. 2004;15(2):53-70.
9. 이진우, 홍무창, 신민규, 배현수. 연자육의 항우울 효과 및 프로티옴 분석을 통한 기전 연구. 동의생리병리학회지. 2006;20(4):830-43.
10. 이덕기, 곽동걸, 박선동. 구기자의 항우울효과 및 indoleamine에 미치는 영향. 대한한의학방제학회지. 2003;11(2):185-96.
11. 김종우, 황의완, 곽소영, 김민정, 박은혜, 이정아. Chronic Mild Stress로 유발된 우울증 모델 흰쥐에 대한 歸脾湯의 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 2001;12(1):123-35.
12. 이승기, 김종우, 황의완, 김현택, 곽소영, 박은혜. 分心氣飮의 우울증 모델 흰쥐에 대한 실험적 연구. 대한한의학회지. 2001;22(3):129-40.
13. 한윤승, 이상택, 심상민, 김근우, 구병수. 壽脾煎 추출물의 항우울 효과에 관한 연구. 동의신경정신과학회지. 2005;16(1):171-83.
14. 이상택, 김근우, 구병수. 三精丸의 항우울 효과에 대한 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 2008;19(3):101-16.
15. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 中國醫學大系9卷. 서울:驪江出版社. 1987:538.
16. 吉宰澔. 分心氣飮의 抗스트레스效果에 關한 實驗的 硏究. 慶熙大學校大學院. 1990.
17. 金基玉. 分心氣飮과 分心氣飮加味方의 抗stress 效果에 對한 實驗的 硏究. 慶熙大學校大學院. 1994.
18. 金知昱. 分心氣飮의 스트레스 抑制效果에 對한 實驗的 硏究. 慶熙大學校大學院. 1989.
19. 지선영, 정대규. 分心氣飮 投與에 따른 Stress 關聯 Hormone의 含量變化에 關한 實驗的考察. 동의신경정신과학회지. 1992;3(2):49-63.
20. 박종훈, 유윤조, 유도곤, 이호섭. 分心氣飮 煎湯液이 白鼠의 腎臟機能 및 血漿 Atrial Natruretic Peptide 濃度에 미치는 影響. 대한동의생리학회지. 1995;10(1):63-72.
21. 朴世光. 分心氣飮이 家兎의 血壓降下에 미치는 影響. 大田大學校 大學院. 1990.
22. 전연이, 박창국, 이소연, 윤현덕, 신오철, 박치상. 分心氣飮이 고혈압 백서와 인간유래 혈관내피세포주(ECV 304)에 미치는 영향에 대한 연구. 대한한방내과학회지. 2005;26(1):182-98.
23. 김종우, 황의완, 김현택, 박순권, 김경욱, 이정륜. 分心氣飮加味方이 흰쥐의 수면장애와 불안에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 2000;11(2):53-62.
24. 許浚. 東醫寶鑑, 서울:법인문화사. 1999:163.
25. Schindler R, Day M, Fisher GA. Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxytryptamine and histamine *in vitro*. Cancer Res. 1959;19:47-51.
26. Yanagisa M, Hasegawa H. and Ichiyama A. Assay of tryptophan hydroxylase vased on rapid separation of the reaction product by high performance liquid chromatography. J Biochem. 1982;92:449, 456.
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. and randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol. Chem. 1951;193:265-75.
28. 황의완, 김지혁. 東醫精神醫學. 서울:현대의학서적사. 1992:471-87, 576-82 608-11.
29. 이근후. 정신장애의 진단 및 통계편람 제4판(DSM-Ⅳ). 서울:하나출판사. 1995:419-433.
30. Bertram G. Katzung, Susan B. Masters, Anthony J. Trevor. Basic & Clinical Pharmacology. San Francisco:McGraw-Hill Companies. 1998:

483-95.
31. 김기석. 뇌. 서울:성원사. 1996:97-122.
32. 남윤영, 전우택. 우울증의 신경생물학적 최신 지견. 생화학 뉴스. 2002;22(2):169-80.
33. 홍사석. 이우주의 약리학 강의 3판. 서울:의학문화사. 1993:211-5.
34. Nemeroff CB. Recent advances in the neurobiology of depression. Psychopharmacol Bull. 2002;36(Sup2):6-23.
35. Kennedy SH, Lam RW, Cohen NL, Ravindran AV. Clinical guidelines forthe treatment of depressive disorders. IV. Medications and other biological treatments. Can J Psychiatry. 2001;46(Sup1):38-58.
36. Thase ME. Overview of antidepressant therapy. Manag Care. 2001;10:6-9.
37. 김용구. 미래의 항우울제: 어떠한 것들이 개발되고 있는가? 생물정신의학. 2004;11(1):14-25.
38. 강형원, 장현호, 강인선, 문형철, 황유진, 유영수. 우울증의 한방적 이해에 관한 문헌고찰. 동의신경정신과학회지. 2001;12(2):1-15.
39. 서원희. 울증과 우울증의 비교고찰. 대전대학교 한의학연구소논문집. 1997;6(1):1-10.
40. 洪元植. 精校黃帝內經素問. 서울:洋醫學硏究院. 1981:277, 282, 288-9, 303-4.
41. 張介賓. 景岳全書. 서울:대성문화사. 1988:413-9.
42. 徐春甫. 古今醫統大全 上. 北京:人民衛生出版社. 1991:936-43.
43. 矢數道明. 漢方後世要方解說. 대구:東洋綜合通信敎育出版部. 1983:169-76.
44. 楊士瀛. 仁齊直指. 中國醫學大系 12卷. 서울:驪江出版社. 1987:131-2.
45. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울:成輔社. 1988:143-4.
46. 尹吉榮. 東醫方劑學. 서울:明寶出版社. 1985:96, 516, 591.
47. 申佶求. 申氏本草學. 서울:壽文社. 1973:16-20, 85-8.
48. 李尙仁. 本草學. 서울:修書院. 1981:401-2.
49. 全國韓醫科大學 本草學敎授 共編著. 本草學. 서울:永林社. 2000:353-6, 460-1.
50. 안덕균. 한국본초도감. 서울:교학사. 1999:462.
51. Hamano T, Mitsuhashi Y, Acki N, Yamamoto S. High-performance liquid chromatographic assy of chondroitin sulphate in food products. Analyst. 1989;114:891.
52. Yamaushi T, Fujisawa H. Most of Ca++-dependent endogenous phosphorylation of rat brain cytosol proteins requires Ca++-dependent regulation protein. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1979;90:28.
53. Kim JE, Kim MS, Kang CM, Kim JI, Shin HK, Choi CW, Seo YS, Ji Y. The use of MTT assay, *in vitro* and *ex vivo*, to predict the adiosensitivity of colorectal cancer. J Korean Soc Ther Radiol Oncol. 2008;26(3):166-72.
54. Masaki H, Sasaki S, Atsumi T. Active-oxygen scavening activity of plant extracts. Chem Pharm Bull. 1995;18(1):162-6.
55. Autor A. Pathology of oxygen. Academic Press. New York. 1982;127:71.
56. Adham N, Boredn LA, Schechte LE, Gustafson EL, Branchek TA. Cell-specific coupling of the cloned human 5-HT1F receptor to multiple signal transduction pathways. Naunyn. Schemied. Arch Pharmacol. 1993;346:566-75.
57. Hoyer D. Clarke DE. Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharrane EJ, Saxena PR, Humprey PPA. Interantional union of pharmacology classification of reports for

5-hydroxytryptamine(serotonin). Pharmacol Rev. 1994;46:157-203.
58. Meltzer CC, Smith G, DeKosky ST, Pollock BG, Mathis CA, Moore RY. Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging. Neuropsychopharmacology. 1998;18: 407-30.
59. Lovenberg W, Bourgoin S, Hery F, Sjoerdsas A. Tryptophan hydroxylation; measurement in pineal gland, brain stem and carcinoid tumor. Science. 1967;155:217-9.
60. 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.
61. Mockus SM, Vrana KE. Advances in the molecular characterization of tryptophan hydroxylase. J Mol Neurosci. 1998;10:163-79.
62. Hamon M, Bourgoin S, Hery F, Simonnet G. Activation of tryptophan hydroxylase by adenosine trphosphate, magnesium and calcium. Mol. Pharmacol. 1978;14:99.
63. Alenina N. Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. PNAS. 2009;106:10332-7.
64. 유시용, 한용남, 한병훈. 천연 페놀성 화합물들의 방향족 아미노산 탈탄산효소 저해작용. 약학회지. 1994;38(6):791-4.
65. 이명구, 김응일, 허재두, 이경순, 노재섭. Protoberine 화합물이 P815 세포중의 serotonin 함량에 미치는 영향. 생약학회지. 2001;32(1): 49-54.
66. Felner AE, Waldmeier PC. Culumative effects of irreversible MAO inhibitors *in vivo*. Biochem Pharmac. 1979;28:995-1002.