

荊防導赤散이 급성코카인 투여로 인해 유도된 흰쥐의 행동량과 c-Fos 발현에 미치는 영향

서지용 · 최애련 · 구덕모

대구한의대학교 한의학과 사상체질과

Abstract

Effect of Hyeongbangdojeok-san on Acute Cocaine-induced Behavioral Effect and Immediate Early Gene Expression in Rats.

Ji-Yong Seo, Ae-Ryun Choi, Deok-Mo Koo

Dept. of Sasang Constitutional Medicine, college of Oriental Medicine, Deagu Haany Univ.

1. Objectives

The present study was designed to investigate the effect of Soyangin Hyeongbangdojeok-san(HBDJS) on acute cocaine-induced behavior effect and gene expression in the rat brain.

2. Methods

Experimental animals were composed of saline(SAL), cocaine(COC), HBDJS + COC, HBDJS + SAL group. Rats received HBDJS(100, 200 mg/kg, p.o.) 1 h prior to cocaine hydrochloride(20 mg/kg, i.p.) treatment respectively. After cocaine injection, locomotor activity and rearing were measured in a rectangular container equipped with a video camera above the center of the floor for 60 min. In addition, c-Fos expression in the rat brain was detected using immunohistochemistry 2 h after cocaine injection. And the effect of HBDJS on acute cocaine-induced pERK, pElk, pCREB upstream of c-Fos expression was detected using western blotting and immunohistochemistry 15 min after cocaine challenge.

3. Results

The present results show that HBDJS at dose of 200 mg/kg attenuated cocaine-induced both locomotor activity and rearing. Also HBDJS at dose of 200 mg/kg significantly decreased c-Fos expression in the rat brain(nucleus accumbens and striatum). However HBDJS at dose of 200 mg/kg have no effect on cocaine-induced pERK, pCREB, pElk-1 expression. HBDJS is c-Fos expression through ERK-independent pathway.

4. Conclusions.

These results suggest that HBDJS may be effective in suppressing the reinforcing effects of cocaine.

Key Words : Hyeongbangdojeok-san, Cocaine, Locomotor activity, c-Fos, Nucleus accumbens

• 접수일 2010년 08월 13일; 심사일 2010년 08월 13일;
승인일 2010년 08월 27일
• 교신저자 : 구덕모
포항시 남구 대잠동 907-8 대구한의대학교 부속 포항한방병원
사상체질의학과 교실
Tel : +82-54-281-0055 Fax : +82-54-281-7464
E-mail : dolee@dhua.ac.kr

I. 緒 論

급속한 경제성장과 과학문명의 발달에 따라 현대인들의 잇따른 스트레스로 인해 약물남용이 늘고 있으며, 이러한 약물남용은 동서양을 막론하고 전 세계적인 사회문제로 대두되고 있다. 코카인이나 모르핀, 암페타민 등의 향정신성 약물들은 각성과 쾌감을 주는 강력한 중추신경계 흥분제로써 이들 약물을 투여하게 되면 신경 화학적·신경생리학적인 변화가 일어나며, 약물투여를 또 하고 싶은 갈망(craving)이 생겨 정신적 의존성이 생기게 된다. 또한 이 약물의 반복적인 사용은 환상, 망각, 도취감 등 정신적 독성증상이 생기게 된다. 이런 향정신성 약물 중 코카인은 Erythroylon coca라는 식물의 잎으로부터 얻는 alkaloid 성분으로, 간접적인 도파민(Dopamine, DA)수용체 효능제로 작용한다^{1,2}. 코카인은 DA 신경을 자극하는 약물로 이 DA 신경은 복측피개영역(ventral tegmental area, VTA)으로부터 측좌핵(nucleus accumbens, NAC), 선조체(striatum)와 전두엽(prefrontal cortex, PFC)으로 DA 신경을 분사하며, 이를 mesocorticolimbic DA system이라 한다^{3,4}.

급성 코카인 투여로 인해 분비된 DA는 후시냅스의 D1- 과 D2 DA 수용체의 경로를 통하여 초기유전자인 c-Fos의 발현을 유도함이 알려져 있다⁵. 또한 초기 유전자인 c-Fos의 상위 단계에 발현되는 전사인자 중 extracellular signal-regulated kinase(ERK), cAMP response element binding protein(CREB), EIK-1 등이 있는데, 최근 연구들에 의하면 코카인 또는 암페타민 등을 처리하였을 때 측좌핵과 선조체에서 이들 전사조절 인자들의 발현이 증가됨을 알 수 있으며^{6,8}, 이들 인자들의 activation에 의해 c-Fos가 발현된다⁹.

소양인 荊防導赤散은 表陰之氣가 내려오지 못하고 熱邪의 막힘을 받아서 일어나는 脾受寒表寒病證 중 少陽傷風證, 傷寒病 表邪深結之病, 結胸證, 頭痛, 胸膈煩燥證을 치료하는 처방이다¹⁰. 또한 荊防導赤散은 진통 소염 이노효과¹¹와 항 스트레스 효과¹²가 있는 것으로 알려져 있다.

이와 같은 항방도적산의 주치증과 연구 결과는 현대인의 스트레스로 인한 약물남용의 중독 증상들과 유사한 면이 있고, 뇌 활동과 관련된 병증과 스트레스

로 인한 신경정신질환에 효과적이라고 사료되어 본 연구에 착수하게 되었다.

본 연구는 급성 코카인 투여에 의한 보행성 활동량, 상동적 행동량과 뇌의 측좌핵과 선조체에서의 c-Fos 발현에 대한 荊防導赤散의 효과를 확인하고자 한다.

II. 재료 및 方法

1. 재료

1) 동물

실험동물은 (주)효창사이언스로부터 구입한 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐(260-300g)를 사용하였으며, 구입 후 각 cage당 2마리씩 넣어, 7일 동안 실험실 환경(온도: 21±2 °C, 습도: 55-65%, light-dark cycle: 12h)에 적응시켰다. 적응 기간 동안 물과 사료를 자유로이 섭취 하도록 하였으며, 실험 시작 전 실험과정 동안의 스트레스를 최소화하기 위해서 3일 동안 handling하였다.

2) 한약제의 제조

구성약제들은 대원약업사에서 구입하였으며, 처방은 『東醫壽世保元』¹⁰ 『少陽人 病證論』에 기재된 荊防導赤散으로, 물 1500ml, 100°C에서 2시간 동안 끓인 후 여과하여 감압농축기(EYELA Co., Japan)로 농축한 후 동결건조기(EYELA Co. Japan)로 분말 건조하였다. 건조하여 얻은 荊防導赤散 8.7396 g을 얻었다(Table 1).

3) 시약

실험에 필요한 cocaine hydrochloride는 (주)삼승산업에서 구입하였으며, 면역조직화학실험, western blotting에 쓰이는 paraformaldehyde(PFA), bovine serum albumin(BSA), 3,3'-Diaminobenzidine(DAB), 30% Hydrogen peroxide, Sodium azide, Sucrose는 sigma사 제품을 사용하였으며, Permunt(Toluene solution, Fisher scientific), PBS(GIBCO, pH7.2)는 (주)라이프 사이언스를 통해 구입하였다. 또한 anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase, c-Fos, antibody는 Santa cruz사 제품을 구입하여 사용하였다. 또한, phospho-ERK, phospho-EIK-1, phospho-CREB antibody는 Cell signaling사 제품을 구입

Table 1. Composition of Hyeongbangdojeok-san(HBDJS)

Composition of Hyeongbangdojeok-san (HBDJS)		
Herbal Name	Scientific Name	Amount(g)
생지황(生地黃)	<i>Rehmannia glutinosa</i> (GAERTNER)LIBOSCHTZ	12
목통(木通)	<i>Scrophularia buergeriana</i>	8
현삼(玄蔘)	<i>Platycodon graniflorum</i> (JACQ)A.DC.	6
과루인(瓜藨仁)	<i>Anthriscus sylvestris</i> Hoffm.	6
전호(前胡)	<i>Angelica koreana</i> L.	4
강활(羌活)	<i>Aralia contidentialis</i>	4
독활(獨活)	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> var. <i>japonica</i>	4
형개(荊芥)	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schiskin:	4
방풍(防風)	<i>Ledebouriella seseloides</i> (HOFFM.) WOLFF	4
Total		52

하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 행동량 측정

실험동물의 보행성 활동량과 상동적 행동량에 대한 행동학적 변화의 측정은 videotracking을 이용하여 Ethovision program(Noldus Information Technology BV, Wageningen, Netherlands)으로 분석하였다. 행동량은 가로, 세로, 높이가 각각 40 x 40 x 45 cm로 만들어진 검은색의 아크릴 상자 안에 넣어 실험동물의 움직임을 상자 위에 설치된 digital camera를 사용하여 videotracking 방법으로 측정하였다. 실험절차는 실험동물의 몸무게를 측정한 후, 6개의 활동량 측정상자에 개별적으로 넣어 1시간 동안의 적응시간을 거친 다음, 1시간 동안 동물의 안정시의 행동량을 측정하였다. 그 후, 생리식염수 및 HBDJS(100, 200 mg/kg)을 2ml/kg 기준으로 경구투여 하여, 약물이 충분히 몸 안에서 흡수되도록 1시간 동안 둔다. 경구 투여 1시간 후, 코카인(20 mg/kg)를 복강 주사 한 후, 1시간 동안 보행성 활동량과 rearing을 측정하였다. 생리식염수 및 HBDJS가 투여 된지 1시간 후에 코카인을 복강 주사한 것은 코카인 우선 투여 시 실험동물의 handling이 힘들어지기 때문이다.

2) 면역조직화학법

c-Fos 발현을 보기 위해서 실험동물에게 코카인 투여 1시간 전 생리식염수 및 HBDJS(200 mg/kg)을 각각

경구투여 한 후, 코카인 20 mg/kg를 복강 주사하고, 1시간 후에 sodium pentobarbital(80 mg/kg, i.p.)으로 마취 시킨 후, phosphate buffer(0.1 M PBS)로 준비한 4% paraformaldehyde(PFA) 용액 500ml을 심장의 좌심실을 통해 aorta로 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내어 고정액인 4% PFA로 10% sucrose를 만들어 2시간 동안 후고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4°C에서 overnight시켰다. 2-3일 보관 후, 뇌를 급속 냉동 한 후, cryotome(Leica, Biosystems, Nussloch, Germany)으로 -25°C 상태에서 30 um의 크기로 coronal section하여 1X PBS에 30% ethylene glycol, 20% glycerol 첨가한 cryoprotectant solution 넣어 -20°C에 보관하였다. 그 후 실험 진행 시 조직을 PBS로 10분씩 세 번 반복하여 씻고, 1% Triton X-100에 10분 담궈 세포막의 지질을 제거하는 과정을 거친 후, 다시 PBS로 10분씩 세 번 반복하여 씻었다. 3% BSA/PBS용액으로 blocking한 후, c-Fos expression을 보기 위하여 0.1% BSA/PBS에 1차 rabbit anti-Fos antibody(1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 1:2000으로 희석하여 4°C에서 20시간 반응시킨 후, 그 다음날 PBS로 10분씩 3번 반복 씻었다. Endogenous peroxidase를 막기 위해 0.1% H2O2solution에 5분간 둔 후 PBS로 씻었으며, 그 후 실온에서 2시간 동안 biotinylated secondary antibody(1:1000 polyclonal goat anti-rabbit IgG; Santa Cruz)에 반응 시켰으며 PBS로 10분씩 3번 세척 후, 실온에서 1시간 동안 Vectastain Elite ABC Kit(Vector)에 담궈 반응시켰다. PBS로 세척

후, 발색제인 DAB(Diaminobenzidine)로 발색 시켰으며 발색이 끝난 조직은 gelatin coated slide에 얹어서 실온에서 건조시킨 후, 50, 70, 90 100% 에탄올에 담귀 dehydrate시켰다. 그리고 나서 xylene에 넣어 투명화시킨 다음 permount로 봉입하였으며, digital camera(iCAM3000)가 부착된 LABOMED light microscopes(LABO America Inc., Fremont, CA, USA) 현미경을 이용하여 c-Fos protein expression을 관찰하였다.

그리고 c-Fos 상위 단계의 신호전달체계를 규명하기 위하여 HBDJS 200 mg/kg를 경구투여하고 1시간 뒤 코카인을 복강 주사 한 후 15분이 되는 시점에 동물을 마취하여 ERK, EIK-1, CREB인산화 반응에 대한 효과를 보기 위하여 perfusion하였다. Phospho-ERK1/2 (Cell signaling 1:500 dilution), phospho-EIk-1(Cell signaling, 1:2000 dilution), phospho-CREB(Cell signaling, 1:250 dilution)에 대한 발현은 c-Fos 발현 확인과정과 동일한 방법으로 실험하였다.

3) Western blotting

HBDJS 200 mg/kg군의 c-Fos 상위 신호전달체계를 알아보기 위하여 코카인 투여 15시간 후 sodium pentobarbital(80 mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후 빠른 시간 내에 뇌를 적출하여 isopentane(-40°C, Junsei)에 담귀 급속 냉동시킨 후 드라이아이스 위 슬라이드에서 1mm두께로 잘라 선조체(striatum)를 분리해 내었다. 분리해낸 조직은 50 mM Tris(pH 7.5), 150mM NaCl, 1% Triton

X-100, 2mM EDTA, 1mM EGTA와 protein inhibitor가 포함된 lysis buffer를 넣어 분쇄한 후 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 한 후 상층액을 취하였다. 그 후 Bradford assay법으로 단백질을 정량한 후 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(10% acrylamide/0.3% N,N'-methylenebisacrylamideresolvinggel)에 ERK, phospho-ERK을 전기영동 시킨 후 PVDF membrane(Millipore Crop., Bedford, MA, USA)으로 65V에서 1 h 동안 transfer 시킨 후 5% skim milk /TBST에서 1 h 동안 blocking하였다. Blocking후 primary antibody(1:1000 ERK, Santa cruz; 1:1000 phospho-ERK, Santa cruz; 1:1000, GAPDH, Santa cruz)를 4°C에서 24 h 반응시켰으며, 그 후 TBST로 10분씩 3번 세척 후 secondary antibody(1:1000 antirabbit-HRP, Santa cruz)를 상온에서 1 h 동안 반응시킨 후, TBST로 10min씩 3번 세척 후 ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham Biosciences, UK)로 확인하였다.

3. 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계분석은 SPSS 11.0프로그램을 사용하였으며 데이터는 평균값 ± S.E.M으로 표시하였다. 사후 검정은 Tukey test를 통해 검정하였으며, p값이 0.05 이하의 경우 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

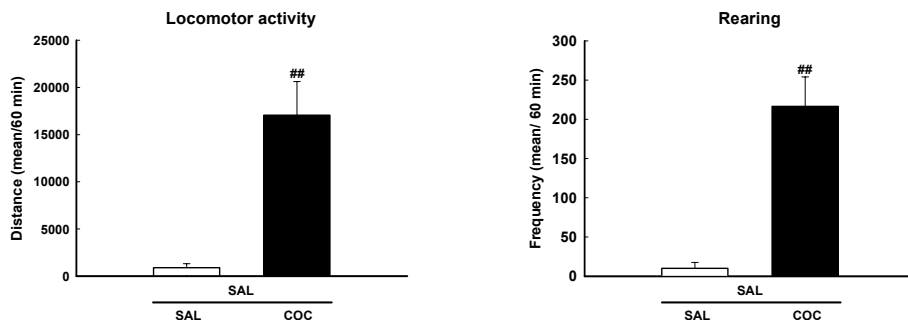


Figure 1. Locomotor activity and rearing responses in Sprague-Dawley rats treated injection of saline(SAL) or cocaine(COC). Results are shown as mean ± S.E.M of the travelled distance (locomotor activity) and frequency(rearing).

SAL treatment group, n=4; COC treatment group, n=8.

##p<0.01 SAL treatment group vs. COC treatment group.

Ⅲ. 結 果

1. 보행성 활동량과 상동적 행동량 차이

본 연구에서 먼저 보행성 활동량 및 상동적 행동량이 코카인에 의해서 증가하는지를 알아보기 위해 생리 식염수를 경구투여하고, 한 시간 뒤 생리식염수 또는 코카인 20 mg/kg를 복강 주사한 후 한 시간 동안의 행동량을 측정하였다. 그 결과 보행성 활동량에서는 정상군(SAL)은 893.69±420.34cm, 대조군(COC)은 17063.81±3555.89cm, 상동적 행동량에서는 정상군은 10.00±7.74, 대조군은 216.36±37.62로 나타났다. 그 결과 코카인에 의해 보행성 활동량과 상동적 행동량이 유의하게 증가됨을 알 수 있었다(Figure. 1).

2. 행동 변화량에 대한 HBDJS의 효과

급성 코카인에 의해 증가한 행동량에 대한 HBDJS의 효과를 알아보기 위하여 생리 식염수 또는 HBDJS(100, 200 mg/kg) 경구투여하고, 한 시간 뒤 생리식염수 또는 코카인 20 mg/kg를 복강 주사한 후 다시 한 시간 동안의 행동량을 측정하였다. 그 결과 보행성 활동량의 결과는 정상군(SAL)은 893.69±420.34cm, 대조군(COC)은 17063.81±3555.89cm, HBDJS 100 mg/kg 투여군은 15593.54±2136.22cm, HBDJS 200 mg/kg 투여군은 6499.16±1536.38cm 움직였으며, HBDJS 200 mg/kg 투여군에서 유의적으로 보행성 활동량이 감소했음을 알 수 있었고, 60분 동안의 움직인 거리를 10분 단위로 확인 한 결과 각 시간대 별로 대조군에 비해 감소됨을 알 수 있었다(Figure. 2-A, B). 그리

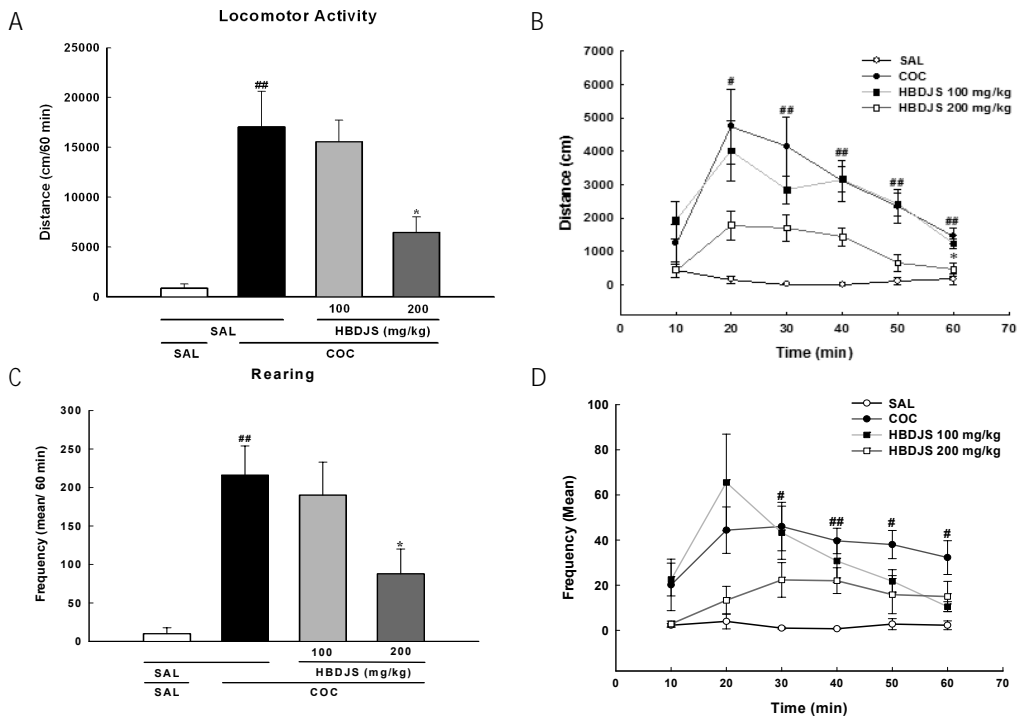


Figure. 2. Effect of HBDJS on locomotor activity and rearing response in Sprague-Dawley rats treated a single saline or cocaine injection.(A, C) Total travelled distance and rearing.(B, D) Time interval in each 10 min. Results are shown as mean±S.E.M of the travelled distance (locomotor activity) and frequency(rearing).

SAL treatment group, n=4; COC treatment group, n=8; HBDJS 100 mg/kg treatment group, n=4; HBDJS 200 mg/kg treatment group, n=6.

##p<0.01 SAL treatment group vs. COC treatment group.

*p<0.05 COC treatment group vs. HBDJS 200 mg/kg treatment group.

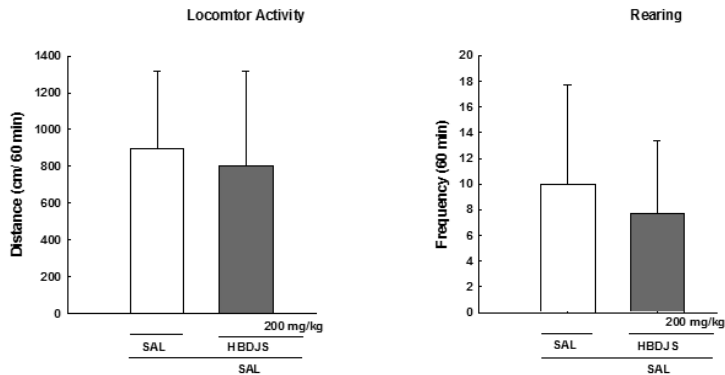


Figure. 3. Effect of HBDJS on locomotor activity and rearing responses in Sparague-Dawley rats treated injection of saline. Results are shown as mean \pm S.E.M of the travelled distance(locomotor activity) and frequency(rearing). SAL treatment group, n=4; HBDJS 200 mg/kg alone treatment group, n=3

고 상동적 행동량의 결과, 정상군은 10.00 ± 7.74 , 대조군은 216.36 ± 37.62 로 나타났는데 반해, HBDJS 100 mg/kg 투여군은 190.25 ± 42.72 , HBDJS 200 mg/kg 투여군은 87.83 ± 32.10 으로 나타났으며, HBDJS 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비해 상동적 행동량이 유의하게 감소하였으며, 10분 단위로 확인 한 결과 각 시간대 별로 대조군에 비해 감소됨을 알 수 있었다(Figure. 2-C, D). 그 결과 HBDJS은 코카인에 의해 유도된 보행성 활동량과 상동적 행동량에 대한 행동적 변화를 유의적으로 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

3. HBDJS 단독 투여시의 행동량

본 연구에서 HBDJS 단독 투여 시 보행성 활동량이나 상동적 행동량에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 알아보기 위하여 생리식염수 또는 약물(200 mg/kg)의 경구투여 한 시간 후, 생리식염수를 복강주사하고 한 시간 동안의 행동량을 측정하였다. 그 결과 보행성 활동량의 경우 정상군(SAL)군은 893.69 ± 420.34 cm, HBDJS 군은 801.49 ± 515.43 cm로 비슷한 양상을 보였다. 상동적 행동량의 경우도 정상군의 경우, 10.00 ± 7.74 , HBDJS 군은 7.67 ± 5.67 로 약간의 차이는 있으나 유의하지는 않았다. 이상의 결과로 보아 HBDJS은 정상상태에서의 행동적 변화에는 영향을 미치지 않은 것으로 확인되었다(Figure. 3).

4. c-Fos 발현에 대한 측좌핵과 선조체에서의 HBDJS의 효과

급성코카인 투여 시 행동적 변화와 함께 유전자의 발현도 변화가 일어나게 된다. 면역조직화학법을 이용하여 측좌핵과 선조체에서의 HBDJS에 의한 c-Fos 발현을 조사하였다. 그 결과 측좌핵과 선조체 모두에서 코카인에 의한 c-Fos 발현이 월등하게 증가한 것을 확인하였으며, HBDJS 200 mg/kg 투여시 코카인에 의해 증가된 c-Fos 발현이 감소한 것을 알 수 있었다(Figure. 4).

5. ERK, Elk-1, CREB 인산화에 대한 HBDJS의 효과

c-Fos 발현을 매개하는 상위 신호전달 전사인자인 ERK, Elk-1, CREB 의 인산화에 HBDJS이 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 western blotting와 면역조직화학법을 이용하여 실험하였다. 그 결과, 측좌핵에서는 pERK, pCREB, pElk-1 모두 정상군(SAL)군에 비해 대조군(COC)에서는 다 증가하였지만, HBDJS투여군은 그 효력을 발휘하지 못하고 대조군과 비슷한 결과를 나타내었다. 선조체에서도 pERK, pCREB, pElk-1 모두 정상군(SAL)군에 비해 대조군(COC)에서는 다 증가하였지만, HBDJS투여군은 그 효력을 발휘하지 못하고 대조군보다 더 활성화된 결과를 나타내었다. 이로 보아 HBDJS은 코카인 투여 후 15분때에

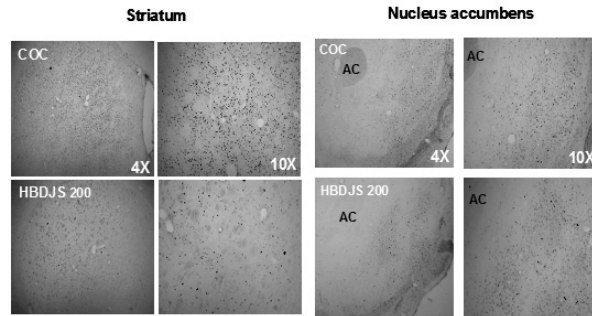


Figure. 4. Effect of HBDJS on acute cocaine-induced c-Fos expression in the nucleus accumbens shell and striatum. Photomicrographs(left:4X, right:10X) of c-Fos immunoreactive nuclei in coronal sections of nucleus accumbens 1.6 mm anterior to bregma after cocaine treatment(20 mg/kg, i.p.)(n=3) or HBDJS (200 mg/kg, p.o.) plus cocaine treatment(n=3).

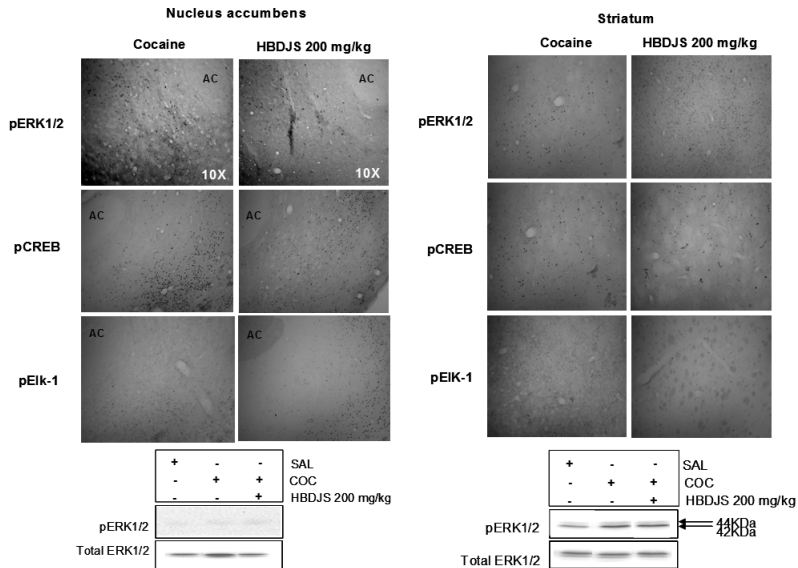


Figure. 5. Effect of HBDJS on acute cocaine induced pERK1/2, pCREB, pElk-1 responses in the nucleus accumbens and striatum. Photomicrographs(10X) of pERK1/2, pCREB, pElk-1 immunoreactive nuclei in coronal sections of nucleus accumbens 1.6 ~1.2 mm anterior to bregma after cocaine treatment (20 mg/kg,, i.p.)(n=3) or HBDJS (200 mg/kg, p.o.) plus cocaine treatment (n=3).

발현되는 pERK, pCREB, pElk-1 발현에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있다(Figure. 5).

IV. 考 察

세계보건기구(WHO)에서는 약물남용을 ‘한 번 사용하기 시작하면 자꾸 사용하고 싶은 충동을 느끼고

(의존성), 사용할 때마다 양을 늘리지 않으면 효과가 없으며(내성), 사용을 중지하면 온 몸에 건디기 힘든 이상을 일으키며(금단증상), 개인에게 한정되지 않고 사회에도 해를 끼치는 물질(사회적 피해)’로 규정하고 있다^{13, 14}. 약물남용으로 인한 약물중독은 정신적인 질환으로 심리현상 중의 하나인 보상(reward)을 담당하는 대뇌 변연계의 기능이 약물에 의하여 비정상적으

로 과 활성화 되고, 이 현상들이 뇌 속에 각인되어 병적인 상태에 이르게 된 것으로 말할 수 있다. 최근의 약물남용은 청소년 여성 약물남용자의 증가로 인해 세계적으로 심각한 정신질환증의 하나로서, 중독성 약물에 대한 치료제의 개발이 시급한 현실이며, 이러한 약물중독의 해결책으로 여러 가지 사회정책 및 치료, 재활을 위한 프로그램이 이루어지고 있지만, 근본적인 치료대책으로서 한계점을 가지고 있다. 중독성 약물중의 하나인 코카인은 DA 신경말단에서 도파민 운반체(DA transport)와 결합해 DA의 reuptake(재흡수)를 막음으로써 축적과 선조체 시냅스 틈새(synaptic cleft)에서의 DA 농도를 증가시킨다^{3, 4}. 증가된 DA에 의해 신경활성이 증가하여 보행성 활동량이나^{15, 16} 상동적인 행동량(rearing)을 증가시키며¹⁷, 6-hydroxydopamine(6-DHDA)로 NAC를 손상시키거나 DA receptor antagonist를 전 처리함으로써 mesolimbic DA system에 의한 motor response에 영향을 줄 수 있다^{18, 19}.

급성 코카인 투여로 인해 분비된 DA은 후시냅스의 D1- 과 D2 DA 수용체의 경로를 통하여 초기유전자인 c-Fos의 발현을 유도함이 알려져 있다⁵. Fos family protein은 AP-1(activator protein-1)부위에 결합하는 AP-1 transcription factor complex형태로의 jun family와 heterodimer를 이루고 있다²⁰. 이들 Fos family protein들은 많은 종류의 중독성 약물들의 급성 투여 후 신속 또는 일시적으로 유도되며, 투여 후 수 시간 이내에 다시 원상태로 되돌아오게 된다²¹. 또한 초기 유전자인 c-Fos의 상위 단계에 발현되는 전사인자 중 extracellular signal-regulated kinase(ERK), cAMP response element binding protein(CREB), EIK-1 등이 있는데, 최근 연구들에 의하면 코카인 또는 암페타민 등을 처리 하였을 때 축적과 선조체에서 이들 전사조절 인자들의 발현이 증가됨을 알 수 있으며^{6, 8}, 이들 인자들의 activation에 의해 c-Fos가 발현된다⁹.

李濟馬는 『東醫壽世保元』²² 『醫源論』에서 ‘古之醫師 不知 心之愛惡所慾 喜怒哀樂 偏着者 爲病而 但知 脾胃水穀 風寒暑濕 觸犯者 爲病故’라 하여 性情的 偏急과 心慾이 病의 原因임을 말하였고, 『臟腑論』에서는 ‘肺肝脾腎之用 正直中和則 津液膏油 充也 偏倚過不及則 津液膏油 燥也’라 하여 性情的 狀態를 正直中和하는 것이

治病의 原理임을 밝히고 있는데, 이와 같이 四象醫學은 心身醫學의 側面을 많이 가지고 있으며 治心 治病의 精神을 바탕으로 두고 있다.

荊防導赤散은 소양인의 腎局陰氣가 熱邪에 둘러싸이고 脾局陰氣는 熱邪에 막혀서 腎局방향으로 下降하지 못하고 등성마루에 凝聚된 病인 脾受寒表寒病 중에 口苦咽乾 胸脇滿 或往來寒熱의 少陽傷風證, 傷寒病 頭痛腦強 寒熱往來 耳聾胸滿의 表邪深結之病, 太陽病으로부터 少陽傷風證으로 轉變한 頭痛, 胸膈煩燥證을 치료하는 대표적인 處方이다. 또한 少陽病證의 심화된 병증인 熱實結胸證, 즉 心下痞硬痛 乾嘔 短氣 水入則吐의 증세가 나타날 때에 荊防導赤散 을 사용하였다²². 荊防導赤散의 처방구성을 살펴보면, 生地 黃 木通 玄蔘 瓜蒌仁 前胡 羌活 獨活 荊芥 防風 등으로 구성되어 있는데, 生地黃은 胸臆間에 鬱滯된 火의 氣運을 瀉하는 데 주력함으로써 胃의 鬱熱이 제거되어 消食進食시키고, 木通은 降心火 清肺熱함으로써 기화작용이 순행하여 血을 化生한다. 前胡와 瓜蒌仁으로 火絳而痰消하여 上部가 막힌 痰滿胸脅中痞症狀을 치료한다. 玄蔘은 清肺金하여 滋陰하게 하며, 羌活과 獨活은 下焦膀胱之邪를 驅逐하며, 荊芥 防風은 胸膈과 頭目的 火를 발산시킨다²²⁻²⁴. 최¹¹는 荊防導赤散의 진통, 소염, 이뇨 효과에 대해 유의한 결과를 얻어 보고하였으며, 이¹²는 荊防導赤散이 스트레스로 인한 우울 등의 증상을 완화시키는 효과가 있음을 보고하였다.

이와 같은 보고와 항방도적산의 주치증은 현대인의 스트레스로 인한 약물남용의 중독증상들과 유사한 면이 있고, 뇌활동과 관련된 병증과 스트레스로 인한 신경정신질환에 효과적이라고 사료되어 본 연구에 착수하게 되었다.

이전 연구들에 의하면, In vivo 미세투석법(microdialysis)를 이용한 실험에서 약물 중독과 관련있는 뇌의 축적과 선조체에서 코카인 또는 methamphetamine 투여로 인한 DA의 농도는 생리식염수 투여군에 비해 현저하게 증가하였다^{3, 25, 26}. 이는 또한 보행성 활동량의 증가를 보임으로써, 생화학적 측면인 DA과 행동학적인 측면인 보행성 활동량과 상동적 행동 중의 하나인 rearing이 상관관계가 있음을 보여주는 실험적인

증거를 제시하였고^{26,28}, 반복적으로 도파민 D1 수용체 효능제인 SKF-38393를 투여한 경우, 보행성 활동량이 증가하였으며²⁹, 도파민의 길항물질인 SCH 23390을 투여한 결과, 코카인에 의한 보행성 활동량과 rearing 모두 줄어들었다^{28, 29}. 본 연구의 결과, 급성 코카인 투여 시 보행성 활동량과 rearing 모두 정상군에 비해 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었다. 그러나 HBDJS과 코카인을 같이 투여한 군에서는 HBDJS 200 mg/kg를 투여한 군에서 보행성 활동량과 rearing이 유의적으로 감소하였다.

또한, 본 연구에서는 코카인 투여로 인한 행동적 변화를 매개하는 신경유전적 기전을 살펴보기 위하여 면역조직화학적 방법을 이용하여 proto-oncoprotein인 c-Fos 단백질의 발현 정도를 통해 신경의 활성도를 측정하였다. 최근의 연구들을 보면 코카인 투여로 인하여 측핵 및 선조체 등의 도파민성 신경세포의 투사부위에서 신경활성의 지표라고 알려진 immediate early gene c-Fos 발현이 증가되었다는 보고가 있으며³⁰, 반복적으로 도파민 D1 수용체 효능제인 SKF-38393를 투여한 경우 신경활성의 지표인 c-Fos의 발현이 증가되었다³¹. 본 실험에서 HBDJS의 경우 측좌핵과 선조체 모두에서 대조군에 비해 확연하게 감소됨을 확인하였다.

HBDJS 200 mg/kg는 locomotor activity, rearing, c-Fos expression 모두에서 효과가 있는 것으로 확인된 것을 바탕으로 c-Fos상위 단계의 signal에는 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 western blotting과 면역조직화학적 방법을 이용하여 ERK, EIK-1, CREB의 인산화 반응을 확인하였다. Mitogen activated protein kinase(MEK)의 downstream인 extracellular signal-regulated kinase(ERK)는 protein serine/threonine kinase로 neuronal plasticity에 중요한 역할을 수행하며³², 세포의 자극과 cell proliferation, differentiation에 대한 특징적인 반응을 나타내며, 이전 연구들에 의하면, 급성 또는 만성 코카인 투여 시 측좌핵과 선조체에서 ERK phosphorylation을 유도한다^{33,35}. 인산화 된 ERK는 결국 핵 내로 이동하여 c-Fos promoter상에서 EIK-1과 CREB의 조절을 통하여 gene expression을 통제하게 되는데 급성 또는 만성 코카인 투여 시 설치류의 측좌핵과 선조체에서 CREB의 인산화가 일어나며³⁶, 이로 인해 c-Fos 발현에도 영향을 미친다.

본 연구결과, 코카인을 투여한 군의 측좌핵과 선조체에서 pERK, pCREB, pEIK-1 모두 인산화가 증가하였으며, 이는 코카인 또는 암페타민에 의해 mesolimbic DA system에서 증가한다는 이전 연구들과 동일한 결과를 나타내었다⁸. 그러나, HBDJS 200 mg/kg를 투여한 군은 ERK, EIK-1, CREB phosphorylation을 차단하지 못하는 것으로 나타났다. 이는 첫째, 약물의 투여경로, 약물의 농도, 약물의 투여기간에 따라 행동학적 변화나 세포 내 분자들의 발현이 달라질 수도 있다. 둘째, HBDJS은 ERK pathway가 아닌 어떤 다른 기전을 통하여 c-Fos 발현에 직접적으로 작용하는 것으로 생각할 수 있다. 여기에는 ERK의 상위단계에는 mitogen activated kinase(MEK)가 있다. 그리고 ERK activation inhibitor인 SL327를 투여한 후 코카인을 처치하였을 때 mice의 선조체에서 ERK phosphorylation이 차단되고, 이는 EIK-1 phosphorylation과 c-Fos expression도 차단한다³⁷. HBDJS은 이 MEK를 activation 시켜 EKR, EIK-1, CREB pathway를 거치지 않고 직접적으로 c-Fos 발현에 영향을 미쳐 HBDJS 200 mg/kg 투여군의 측좌핵과 선조체 모두에서 c-Fos 발현이 감소시켰을 가능성이 있다. 본 연구에서 확인해보지는 않았지만, 코카인에 의한 JNK(c-Jun N-terminal kinase), p38 activation이 직접적으로 c-Fos 발현에 영향을 미치지 않나 생각되어진다. 또한 약물의 투여경로나 투여 농도, 투여기간의 적절치 못한 실험디자인 때문에 c-Fos 발현은 감소시켰지만, EKR, EIK-1, CREB phosphorylation을 차단하지 못했을 가능성도 있다. 이는 차후 지속적인 연구를 통해 밝혀야 할 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과로 볼 때 소양인의 처방 중, HBDJS은 보행성 활동량, 상동적 행동 중 rearing과 신경활성 지표인 c-Fos 발현을 감소시키며, 이는 코카인 중독에 대한 치료제로서의 가능성을 제시한다.

V. 結 論

본 연구에서는 약물중독과 관련하여 흰 쥐에 급성 코카인 투여시 유발되는 보행성 활동량, 상동적 행동량과 중독과 관련된 뇌의 중뇌변연계인 측좌핵과 선조체에서의 c-Fos의 발현에 대한 항방도적산의 효과를 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 보행성 활동량 측정 결과, 대조군(COC)은 정상군(SAL)에 비해 보행성 활동량이 19배 정도 증가하였으며, 형방도적산을 100, 200 mg/kg 를 경구투여한 후, 코카인을 처치한 군에서의 결과 형방도적산 200 mg/kg에서 유의하게 보행성 활동량이 감소하였다.
2. 상동적 행동량의 결과 또한 정상군에 비해 대조군이 21배 정도 증가하였으며, 형방도적산 100, 200 mg/kg를 투여한 군에서는 형방도적산 200 mg/kg투여군에서 대조군에 비해 유의하게 감소되었다.
3. 형방도적산 200 mg/kg를 단독 투여했을 때의 행동량들을 측정된 결과, 단독투여는 보행성 활동량과 상동적 행동량에 별다른 영향을 미치지 않았다.
4. 형방도적산 200 mg/kg를 투여한 후의 측좌핵과 선조체의 초기유전자인 c-Fos의 발현을 확인한 결과 측좌핵과 선조체 모두에서 대조군에 비해 c-Fos의 발현이 감소되었다.
5. c-Fos 상위단계의 전사인자에 대한 효과를 알아보기 위해서 pERK, pCREB, pElk-1 반응을 알아본 결과 측핵과 선조체 두 곳 모두에서 대조군과 비슷하게 발현되었으며, ERK, CREB, Elk-1의 인산화는 차단하지 못하였다.

이들 결과로 보아, 형방도적산은 코카인에 의한 reinforcing effect를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

VI. 參考文獻

1. Koob G.F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. Trends Pharmacol Sci. 1992;13:177-184.
2. Di Chiara. G & A Imperato. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc. Natl Acad Sci USA. 1988;85:5274-5278.
3. Jang EY, Choe ES, Hwang M, Kim SC, Lee JR, Kim SG, et al. Isoliquiritigenin suppresses cocaine-induced extracellular dopamine release in rat brain through GABA(B) receptor. Eur J Pharmacol. 2008;587(1-3):124-128.
4. Steketee JD, Kalivas PW. Sensitization to psychostimulants and stress after injection of pertussis toxin into the A10 dopamine region. J Pharmacol Exp Ther. 1991;259(2):916-924.
5. Nathalie thiriet, Dominique Aunis and Jean zwiller. c-fos and egr-1 immediate-early gene induction by cocaine and cocaethylene in rat brain: a comparative study. Ann NY Acad Sci. 2000;914:46-57.
6. Konradi C, Cole RL, Heckers S, Hyman SE. Amphetamine regulates gene expression in rat striatum via transcription factor CREB. J Neurosci. 1994;14:5623-5634.
7. Vanhoutte P, Barnier JV, Guibert B, Pages C, Besson MJ, Hipskine RA. et al. Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-Fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase dependent pathway in brain slices. Mol Cell Biol. 1999;19:236-246.
8. Adams DH, Hanson GR, Keefe KA. Psychostimulants activate p42/p44 MAPK in dorsal and ventral striatum. Soc Neurosci Abstr. 2001;27:445.
9. Sun WL, Zhou L, Hazim R, Quinones-Jenab V, Jenab S. Effect of acute cocaine on ERK and DARPP-32 phosphorylation pathways in the caudate-putamen of Fisher rats. Brain Research. 2007;1178:12-19.
10. Lee Je-Ma. Donguisusebowon. Seoul:ShinilMunhwasa. 1963:63.(Korean)
11. 최병일. 소양인 형방도적산의 효능에 관한 실험적 연구. 사상체질의학회지. 1990;2(1):167-176.
12. Lee SY, Choi AR, Ha JH, Lee JH, Kim PJ, Goo DM. An Experimental Study on the Anti-stress Effect by Soyangin Hyeongbangdojeok-san and Yanggyeoksanhwatang. J of Sasang Constitut Med. 2008;20(3): 151-163. (Korean)
13. 김대근, 신태용, 엄정열, 은재순. 마약과 약물 남용. 서울:북스힐. 1999:488.
14. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th ed. Washington DC:American Psychiatric press. 1994:1-1156.
15. Weiss F, Hurd YL, Ungerstedt U, Markou A, Plotsky

- PM, Koob GF. Neurochemical correlates of cocaine and ethanol self-administration. *Ann NY Acad Sci.* 1992; 654:220-41.
16. Zapata A, Chefer VI, Ator R, Shippenberg TS, Rocha BA. Behavioural sensitization and enhanced dopamine response in the nucleus accumbens after intravenous cocaine self-administration in mice. *Eur J Neurosci.* 2003;17(3):590-596.
 17. Antoniou K, Kafetzopoulos E, Papadopoulou-Daifoti Z, Hyphantis T, Marselos M. D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998;23(2):189-196.
 18. Roberts DCS, Corcoran ME, Fibiger HC. On the role of ascending catechoaminergic systems in the intravenous self-administration of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997;6(6):615-620.
 19. Kelly PH, Seviour PW, Iverson SD. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens and striatum. *Brain Res.* 1975;95(3):507-522.
 20. Morgan JI, Curran T. Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neurosci.* 1995;18(2):66-67.
 21. Nestler EJ, Barrot M, Self DW. Delta Fos B: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(20):11042-11046.
 22. 전국 한의과대학 사상의학교실. 사상의학. 서울:집문당. 2004:647, 649, 682-684, 692-693, 701-702.
 23. 조황성. 사상의학의 원리와 방제. 서울:집문당. 2005:313-6, 340-352, 349-351, 427-438.
 24. 박인상. 동의사상요결. 서울:소나무. 1992:157, 247-248, 270.
 25. Pontieri FE, Tanda G, DiCiano G. Intravenous cocaine, morphine and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "Core" or the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(26):12304-12308.
 26. Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA. Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1993;32:639-677.
 27. Kuczenski R, Segal DS, Aizenstein ML. Amphetamine, cocaine and fencarnfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles end caudate and accumbens dopamine dynamics. *J Neurosci.* 1991; 11(9):2703-2711,
 28. Ushijima I, Carino MA, Horita A. Involvement of D1 and D2 dopamine systems in the behavioral effects of cocaine in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995;52(4): 737-741.
 29. Parada A, Soares-da-silva P. The dopamine antagonist SCH23390 reverses dizocilpine-induced blockade of cocaine sensitization. *Neuropharmacology.* 2000;39(9): 1645-1652.
 30. Robertson HA, Paul ML, Moratalla R, Cray Biel AM. Expression of the immediate early gene c-Fos in basal ganglia: Induction by dopaminergic drugs. *Can J Neurol. Sci.* 1991;19:380-383.
 31. Freguson SA, Rowe SA, Krupa M, Kennaway DJ. Prenatal exposure of the dopamine agonist SKF-38393 disrupts the timing of the initial response of the suprachiasmatic nucleus to light. *Brain Res.* 2000;858(2): 284-289.
 32. Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 2004;14(3):311-317.
 33. Corbillé AG, Valjent E, Marsicano G, Ledent C, Lutz B, Hervé D, et al. Role of cannabinoid type 1 receptors in locomotor activity and striatal signaling in response to psychostimulants. *The Journal of Neuroscience.* 2007;27(26):6937-6947.
 34. Yoon HS, Kim SW, Park HK, Kim JH. Microinjection of CART peptide 55-102 into the nucleus accumbens blocks both the expression of behavioral sensitization and ERK phosphorylation by cocaine. *Neuropharmacology.* 2007;53:344-351.
 35. Wei-Lun Sun, Luyi Zhou, Ruhai Hazim, Vanya Quinones-Jenab and Shirzad Jenab. Effects of acute cocaine on ERK and DARPP-32 phosphorylation pathways in the caudate-putamen of Fischer rats. *Brain Research.* 2007;1178:12-19.

36. Self DW, Genova LM, Hope BT, Barnhart WJ, Spencer JJ, Nestler EJ. Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the nucleus accumbens in cocaine self-administration and relapse of cocaine-seeking behavior. *J Neurosci*. 1998;18(5):1848-1859.
37. Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *The Journal of Neuroscience*. 2000;20(23):8701 - 8709.