

## 활동성 기반 식욕부진 마우스의 뇌 조직을 이용한 감초건강탕의 치료 기전 연구

김도현<sup>1</sup>, 이승인<sup>2\*</sup>

1. 조선대학교 의과대학 생리학 교실 연구원
2. 동신대학교 한의과대학 방제학교실 부교수

### Study on the therapeutic mechanism of licorice and dried ginger decoction using brain tissue of activity based anorexia mice

Do-Hyun Kim<sup>1</sup>, Soong-In Lee<sup>2\*</sup>

1. Department of Physiology, College of Medicine, Chosun University, Gwangju, Korea
2. Department of Herbal formula science, College of Korean Medicine, Dongshin University, Naju, Korea

**Purpose:** In a prior study, we found that giving licorice and dried ginger decoction (LGD) to mice with activity-based anorexia (ABA) enhanced their behavior by increasing their activity during mealtime and improving their survival rate. This study aims to uncover the detailed mechanism of LGD in treating ABA by examining changes in the central nervous system, systemic blood, hippocampus, and intestinal microbiomes.

**Methods:** The radical scavenging abilities of LGD were assessed using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). Murine hippocampal HT22 cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and LGD, and cell survival rates were analyzed to confirm cell protection efficacy. ABA was induced in mice through food restriction and provision of a wheel, followed by oral administration of LGD. Changes in neurotransmitters, neurotrophins, and molecules involved in neural activity in the brain, hippocampus, and blood serum were analyzed using western blot and quantitative analysis tools. Intestinal microbiome diversity was assessed using Ezbiocloud, MTP, and LefSe.

**Results:** LGD demonstrated concentration-dependent DPPH and ABTS radical scavenging abilities and protective effects against oxidative stress in HT22 cells. In ABA mice, LGD increased dopamine levels in brain tissue and blood and

**\*Corresponding Author:**  
Soong-In Lee, PhD. Associate Professor, Department of Herbal Formula Science, College of Korean Medicine, Dong-Shin University, 120-9 Dongshindaegil, Naju, Jeonnam, 58245, South Korea.  
Tel 82-61-330-3529  
Fax 82-61-330-3519  
E-mail barunhani@hanmail.net

Received 2024/11/25  
Revised 2024/12/27  
Accepted 2024/12/31

elevated brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the hippocampus. ABA reduced intestinal microbiome diversity, but LGD restored this diversity, particularly increasing Akkermansia, Prevotella, and Muribaculum strains. Conclusion: LGD improved dopamine and BDNF levels and restored intestinal microbial balance in mice with ABA.

**Keywords:** Activity based anorexia, anorexia nervosa, licorice and dried ginger decoction, Gamchogeongang-Tang, dopamine, BDNF, microbiome

## 1. 서론

최근 『傷寒論』에 대한 임상 연구들에 의하면 환자의 다양한 병증은 환자의 특정한 행동, 감정 등에 기인하는 것으로 분석되는 경향이 나타나고 있다<sup>1,2)</sup>. 실제 임상에서 환자가 호소하는 증상들의 원인은 진단에 의해 확인된 질병이며, 질병에 대한 관점은 시대를 거쳐 변천하고 있다<sup>3,4)</sup>. 『傷寒論』은 저술시기와 저자의 실체에 대한 다양한 논란이 있으나<sup>5,6)</sup> 현대와는 매우 거리가 있는 의학적 관점에서 기술된 저작임은 부인할 수 없다. 따라서 감초건강탕(Licorice and dried ginger decoction, Gancao-ganjiang-tang, LGD)의 임상적 응용 목표로 제시된 ‘傷寒’, ‘自汗出’, ‘咽中乾躁, 吐逆’의 의미가 무엇인지에 대해서 해결되지 않는 의문을 가질 수 밖에 없다.

활동성 기반 식욕부진(activity based anorexia, ABA) 모델은 신경성 식욕부진 연구에 최적화된 모델이며, 하루 4~8 시간으로 식이 공급 시간을 제한하면서 자유롭게 달릴 수 있는 쳇바퀴를 공급하면, 동물들은 비정상적으로 과도한 활동성, 식사량 감소, 빠른 체중 감소, 체온 저하, 성선-호르몬축의 변화를 유발한다<sup>7,8)</sup>. 이와 같은 증후상의 유사성으로 인하여 ABA는 신경성 식욕부진(anorexia nervosa, AN) 연구를 위해 가장 활발하게 연구되는 실험연구 주제이다. 우리는 선행 연구<sup>9)</sup>에서 LGD가 ABA 마우스의 과도한 체중감소를 억제함으로써 생존율을 개선시켰으며, 전체 뇌조직의 dopamine 분비량을 증가시켰고, 음식이 공급되는 시간(09:30~15:30)의 쳇바퀴 운동량을 증가시켰다고 보고하였다. 따라서 감

초건강탕의 치료 지침으로 제시되어 있는 ‘傷寒’, ‘自汗出’, ‘咽中乾躁, 吐逆’이 상당한 연관성이 있다고 판단하였다. 그러나 아직 이러한 식사 행동과 수면 주기의 변화를 유도하는 기전에 대해서는 신경 세포와 뇌 조직 수준의 연구가 부족하다.

감초는 항산화, 항미생물, 항진균, 항염증, 종양증식 억제 등 효능에 대한 체계적인 문헌 고찰이 진행되었고<sup>1)</sup>, 강제수영검사와 꼬리현수검사에서 부동 행동을 감소시키며<sup>2)</sup>, lipopolysaccharide 유발 신경염증을 완화한다<sup>3)</sup>. 건강의 6-shogaol과 6-gingerol은 5-hydroxytryptamine 3(5-HT3) 수용체에 비경쟁적 길항제로 작용하며<sup>4)</sup>, 건강 추출물은 알츠하이머 동물 모델을 개선하는 것으로 보고되었다. 따라서 감초건강탕은 ABA로 인한 말초의 다양한 병증을 해소하면서, 중추의 문제에도 상당한 잠재력을 확보하고 있다.

한편 장내 미생물은 최근 식이장애에 원인 가운데 하나로 인식되며<sup>10)</sup>, 장내 미생물 불균형과 섭식장애의 병태생리의 관계는 최근 각광 받고 있다<sup>11-13)</sup>. 따라서 LGD의 ABA 개선 효과는 장내 미생물 조절 상태를 통해서도 확인할 필요가 있다.

우리는 이번 연구에서 먼저 LGD의 항산화 효능과 마우스 해마 HT22 세포주의 산화적 스트레스에 대한 보호 효능을 평가하였다. 그리고 ABA를 유발한 마우스에서 그룹별 체중 차이가 나타나기 시작하는 4일차에 마우스를 희생하였다. ABA 마우스의 중추에서 나타나는 변화를 확인하기 위해 전체 뇌조직과 해마에서 식사 및 과도한 활동성과 관련된 단백질의 발현 양을 분석하였다. 또한, 혈중 신경전달물질의 농도와 장내 미생물의 변화를 확인하였다.

**Table 1.** Comparison of the original formulation of the *Shanghanlun* and the dosage used in the experiment

	<i>Shanghanlun</i>	Experiment
Herbal materials	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma 12 g	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma 100 g
	Zingiberis Rhizoma 6 g	Zingiberis Rhizoma 50 g
Extraction	Hot water extraction, boil in 600cc of water until reduced to 300cc	Hot water extraction, put in 1.5 L of water, cool at 4°C for 10 hours, then boiled at 100°C for 150 minutes and extract under cooling reflux
Dosage	Oral administration	Oral administration
Concentration	Take in two divided doses. -> (based on 60kg adult) 300 mg/kg/day	190 and 380 mg/kg/day for each mouse group

## II. 재료 및 방법

### 1. 감초건강탕 열수추출물 제작(Table 1.)

실험에 사용한 감초건강탕 열수추출물(Licorice and dried Ginger Decoction, LGD)은 Omniherb (Daegu, Republic of Korea, 감초:HA1700030304, 건강:HB1800060001)에서 구입한 감초 100g과 건강 50g을 혼합하여 열수 추출하여 사용하였으며, 추출 수율을 높이기 위하여 정제수 1.5L에 10시간 동안 4°C로 냉침하여 사용하였다. 냉침액 전체를 냉각 환류 장치에서 열수추출하고, 상온에서 여과(6 µm, No. 1, Advantec MFS Inc., Dublin, USA)하여 농축기(N-1000, EYELA, New York, USA)를 사용하여 농축 이후 동결건조기(FD8512, Ilshin Lab Co., Ltd., Daejeon, Republic of Korea)를 사용하여 -80°C에서 육안상 습기가 충분히 제거될 때까지 건조시켰다. 최종 수율은 16.0%였으며 건조된 분말형태의 LGD는 -20°C에서 냉동 보관하였다. LGD 분말은 매 실험 조건에 따라 희석되어 냉장하였고, 투여 조건에 따라 적절한 온도로 조절되었다.

### 2. 감초건강탕 항산화 활성 측정방법

#### 1) DPPH radical 소거능

감초건강탕 추출물의 항산화 활성도를 측정하기 위하여 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl, Sigma-aldrich, Saint Louis, USA)를 이용하여 radical 소거 활성을 측정하였다. Methanol에 희석한 다양한 농도의 추출물 50 µl에 DPPH 용액 150 µl를 혼합하여 암실, 상온 조건에서 15분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 ascorbic

acid(Sigma-aldrich, Saint Louis, USA)을 1 mg/ml의 농도로 사용하였다.

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} =$$

$$\frac{\text{무첨가군의 흡광도} - \text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \times 100$$

#### 2) ABTS radical 소거능

감초건강탕 파우더를 다양한 농도로 희석하여 실험을 진행하였다. 96 well plate에 sample 100 µl와 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), Sigma-aldrich, Saint Louis, USA) 100 µl를 혼합하여 암실, 상온 조건에서 5시간 반응 후 ELISA reader(A51119600C, Thermo scientific, Waltham, USA)를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 ascorbic acid (Sigma-aldrich, Saint Louis, USA)을 1 mg/ml의 농도로 사용하였다. 소거능을 평가하기 위한 계산식은 아래와 같다.

$$\text{ABTS radical 소거능(\%)} =$$

$$\frac{1 - \text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \times 100$$

#### 3) 해마 세포 배양과 세포생존율 측정

Mouse 해마 세포인 HT22 세포는 10% FBS를 포함한 DMEM 배지에 1%농도의 penicillin과 streptomycin을 첨가하여 37.5°C에서 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터(MCO-170AIC, PHCbi scientific, Kadoma shi, Japan)에서 배양하였다. 다양한 농도의 LGD(0~

0.1 mg/ml)와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0~0.4 μM) 처리에 의한 세포 생존율을 변화는 EZ-Cytox(EZ-500, DoGenBio, Seoul, Korea)를 이용하여 세포 배지 내 formazan을 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA reader(A51119600C, Thermo scientific, Waltham, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량적으로 평가하였다.

4) 해마 세포 산화적 스트레스

HT22 세포는 96-well plate에 8×10<sup>3</sup> cells/100 μl/well의 수로 24시간 배양하여 안정화 상태를 확인한 후 FBS-free 배지로 100 μl씩 교체하였다. 1시간 안정 후 배지에 LGD를 다양한 농도로 처리하였다. 시료 처리 30분 뒤 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 500 μM 농도로 처리 후 24시간 뒤에 MTS 시약을 배지 100 μl에 20 μl씩 처리하고 CO<sub>2</sub> incubator에서 2~3시간 정도 배양 후 ELISA reader(A51119600C, Thermo scientific, Waltham, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다.

3. ABA 실험 절차

6주령의 암컷 Balb/CAnNcrI 마우스를 분양하여 사용하였다. 분양된 마우스는 7일간 1케이지에 5~6개체를 사육하면서, 자유롭게 사료와 물을 섭취할 수 있는 환경에서 적응시켰다. 사육장의 명암주기는 각각 12시간, 온-습도는 24℃ ± 2℃ 내외, 습도 40~60%를 유지하였다. 7일간의 적응이 끝난 후 마우스는 케이지 별로 1마리씩 사육하여 3일간 적응시켰다. 사육용 케이지의 크기는 14×17×30 cm(height×width×length)이며, 바닥에서 사료와 물까지의 거리는 4 cm이므로 신체적인 상태가 건강하지 않더라도 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있는 높이이다. 이후 무선활동기록장치(Wireless low-profile run

시간으로 동물활동성 기록시스템(Med associates inc, Wheel Manager, Fairfax, USA)에 의하여 기록되었다. 동시에 하루 2회 존데(oral zonde)를 이용하여 물을 30 μl 투여함으로써 실험자의 조작과 무선활동기록장치에 적응시켰다.

이 모든 적응 과정이 완료되면 케이지 내의 깔짚과 사료를 제거한 다음 18시간의 단식을 시작함으로써 ABA를 유발하였다. 18시간 단식 이후 쳃바퀴 활동량과 체중변화를 확인하고, 그룹별 체중과 체중감소율, 하루 사료섭취량을 동일하게 그룹을 분류하였다. 이후 매일 09:30~15:30에 사료를 공급하여, 사료섭취량, 체중, 그리고 쳃바퀴를 이용하여 운동량을 확인하였다. 생존율은 식이 제한 전 체중에 비하여 25% 이상 체중이 감소된 개체를 '배제'함으로써 생존율을 계산하였다. 식이제한 4일차에 모든 마우스는 희생하여, 뇌조직, 혈장, 분변을 채취하였다. 이상 모든 절차는 NIH 가이드라인을 준수하였으며, 동신대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 ABA 마우스의 전체 뇌조직과 장내 미생물을 분석하기 위한 실험(No. DSU2021-01-01)과 ABA 마우스의 해마 조직과 혈청 내 신경전달물질을 분석하기 위한 실험(DSU2023-04-02)을 수행하였다.

4. ELISA를 이용한 혈장 내 신경전달물질 정량 분석

ABA 마우스를 희생시킨 후, 복부대동맥에서 동맥혈을 수집하였다. 혈액은 4℃에서 24시간 응고, 분리가 이루어지도록 방치하고, 원심분리기(5424R, eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 5,000 rpm으로 15분간 혈청을 분리하여 -80℃에서 보관되었다. ELISA assay를 진행하는 동안 sample은 ice에 올려 사용하였다. 필요한 개수만큼 플레이트 well을 추가하고 standard와 sample을 각각 100

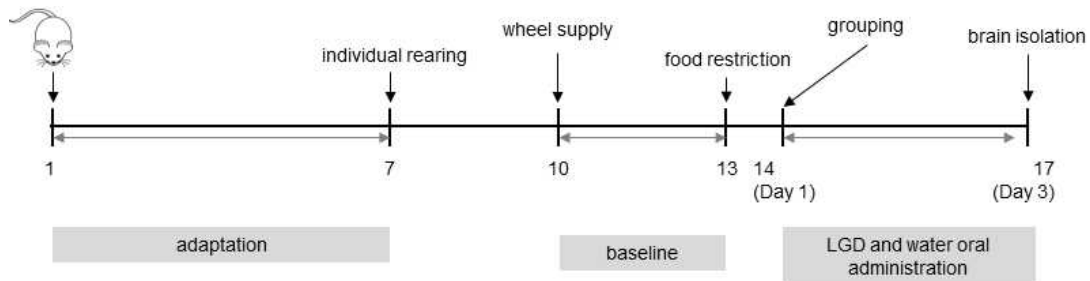


Figure 1. The procedures of activity-based anorexia mouse model. Running wheels, MED associates inc, Fairfax, USA) 이 함께 비치되었으며, 쳃바퀴의 활동량 정보는 실

μl 씩 분주하였다. 이후 키트에 포함되어있는 Conjugate를 50 μl씩 첨가한 이후 37℃에서 1시간 동안

배양하였다. 배양 이후 플레이트에 남아있는 용액을 가볍게 티슈에 털어내고 Washing solution을 이용하여 5회 세척을 진행하고 플레이트를 뒤집어 well 속의 액체가 모두 제거되도록 10분간 방치하였다. 이어서 blank control well을 포함한 각 well에 Substrate A 와 Substrate B를 각각 50  $\mu$ l씩 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C의 암실 조건에서 20분간 반응시켰다. 충분히 반응이 진행된 후 stop solution을 50  $\mu$ l씩 첨가한 후 ELISA reader(A51119600C, thermo scientific, waltham, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

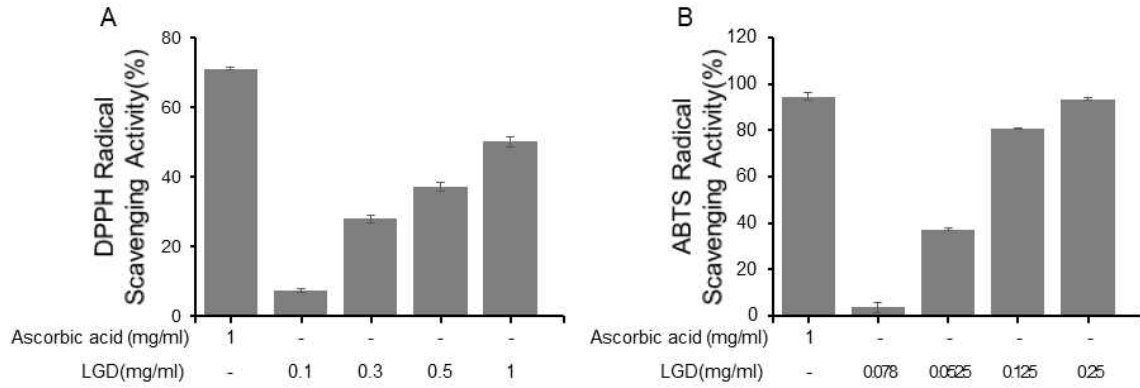
### 5. Western blot을 이용한 전체 뇌조직과 해마 조직 내 신경 관련 물질 분석

ABA 마우스를 희생시킨 후, 전체 뇌조직의 우측 절반, 또는 해마를 분리하여 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 마우스 해마는 실험 전날 Lysis buffer(Protein Extraction Solution; 17081; iNtRON, Seongnam, Korea)에 담가 -20 $^{\circ}$ C에서 24시간 보관하였다. 이후 sample은 피펫을 이용하여 균질화 하였다(n=3 mice per group). 균질화가 끝난 마우스 해마조직은 원심 분리기(5424R, eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 6,000 rpm에서 10분간 분리시켰다. 이후 상층액만 분리하여 실험 전까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 이후 단백질 정량 키트(BCA protein Assay Kit; 23227; Thermo scientific, Waltham, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 5 $\times$ SDS PAGE Loading buffer(BS002, BIOSOLUTION, Seoul, Korea)를 각 sample에 첨가한 후 sample을 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 가열 후 원심분리기를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 5,000 rpm으로 30초간 원심분리 하였다. 정량된 단백질은 12% polyacrylamide gel에서 전기영동장치 electrophoresis(Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 100V에서 90분간 분리하였다. 분리된 단백질은 Trans-Blot Turbo Transfer System(Bio-Rad, Hercules, USA)을 사용하여 4 $^{\circ}$ C에서 100V의 전기로 filter membrane(Pall life sciences, New York, USA)으로 옮겼다. Transfer가 끝난 membrane은 TBST를 이용하여 10분씩 3번 세척한 후 트레이 크기(5 $\times$ 7 cm)로 잘라 사용하였다. Filter membrane은 TBST에 녹인 3% Skim Milk(1257917; Becton Dickinson, New Jersey, USA)용액을 사용하여 상온에서 2시간 동안 blocking 하였다. Blocking이 끝난 filter membrane은 3% Skim Milk에

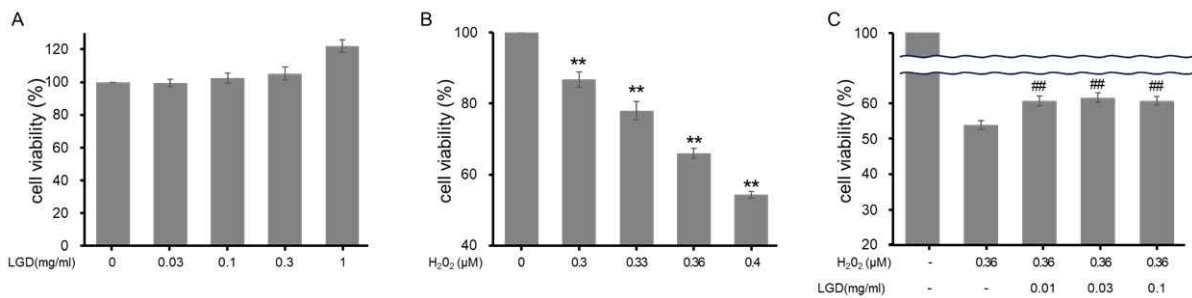
녹인 1차 항체 p-cFos(1:1000; 5348; Cell Signaling Technology, Danvers, USA), p-CREB(1:1000; 9198; Cell Signaling Technology, Danvers, USA), p-ERK(1:1000; 4370; Cell Signaling Technology, Danvers, USA), Dopamin(ab8888 31822; Invitrogen, Carlsbad, USA), Serotonin(1:1000; 13690; Cell Signaling Technology, Danvers, USA), BDNF(1:1000; 478108; Cell Signaling Technology, Danvers, USA)를 각각 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 반응시켰다. 이후 TBST 세척 후 2차 항체(goat anti-rabbit, 1:50000; 31822; Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하여 1시간 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 filter membrane 5분간 5번의 washing 과정을 거친 이후 화학발광키트(West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate; 34580; Thermo scientific, Waltham, USA)를 사용하여 이미징시스템(Amersham imager 600; GE healthcare, Chicago, USA)으로 촬영하였다.

### 6. 장내 미생물 분석

DNA 분리 및 amplicon library을 위해 희생 전에 mouse의 대변을 수집하였다. Total genomic DNA 추출은 PureLink<sup>TM</sup> Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하였다. 각 샘플은 16S rRNA gene의 V3-V4 region이 PCR을 통해 증폭되었다. 라이브러리 제작은 Miseq 기기를 통해 250 base pair의 길이만큼 시퀀싱하였으며, 위 과정은 LabGenomics(Seongnam, Republic of Korea)에서 진행하였다. Miseq 분석을 끝난 후에 나온 Fastq 파일은 Chunlab에서 개발한 Ezbiocloud의 MTP(microbiome taxonomic profiling)에 업로드하여 Ezbiocloud 데이터베이스(<https://www.ezbiocloud.net/>)를 이용하여 merging paired-end reads, filtering low-quality reads, detecting chimeras, identified to species-level의 과정을 수행하였다. 또한 미생물 군집의 다양성을 확인하기 위해 MTP를 이용하여 alpha와 beta diversity(Principal coordinate analysis, PCoA)를 분석하였다. Alpha diversity는 rarefaction curve를 사용하였고, beta diversity 분석에는 Bray-Curtis 지표를 통해 주요한 미생물 군집의 패턴을 확인하였다. 그룹 간 유의미한 미생물 속(genus)의 변화는 LefSe([<http://kmediacs.com>](http://</a></p>
</div>
<div data-bbox=)



**Figure 2.** Antioxidative potential of LGD (A) DPPH and (B)ABTS radical scavenging activity. All results are expressed as mean ± SEM.



**Figure 3.** Licorice and dried ginger decoction (LGD) protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury in HT22 cells. (A) Effect of LGD on cell viability (B) Cytotoxicity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on HT22 cells. (C). Protective effect of LGD on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell deaths. The results were expressed as mean ± SEM. \*\*, P < 0.01, vs control group; ##, P < 0.01, vs. only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated group.

hutzenhower.org/galaxy/)를 활용하여 유의성을 분석하였다.

### 7. 통계분석 방법

데이터는 평균 ± SE로 표현하였으며, 모든 실험 데이터는 Tukey's HSD post-hoc test 또는 Student's test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다. 모든 통계 검정의 결과는 양방향이며 P 값이 0.05 미만이면 유의한 것으로 결정되었다.

## III. 결과

### 1. LGD의 항산화 효능

#### 1) LGD의 DPPH 라디칼 소거능

감초건강탕 추출물과 대조군의 DPPH 라디칼 소거능은 Figure 2A와 같다. LGD를 메탄올에 4가지 용량(0.1, 0.3, 0.5, 1 mg/ml)로 희석하여 DPPH 라디칼 소거능 실험을 진행하였다. 상온 조건에서 15분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정된 결과 각각 7.21 ± 0.4

1%, 27.90 ± 1.00%, 37.12 ± 1.37%, 50.06 ± 1.42%의 소거능을 나타냈다. DPPH 라디칼 소거능은 양성대조군인 ascorbic acid를 1 mg/ml 농도로 처리하였을 때와 비교하여 LGD 0.1 mg/ml의 농도에서 대폭 감소하였으며 이후 용량 의존적으로 증가하였다(Figure 2A).

#### 2) LGD의 ABTS 라디칼 소거능

LGD와 대조군의 ABTS 라디칼 소거능은 Figure 2B와 같다. ABTS 라디칼 소거능은 인체 내에서 생성되는 라디칼을 대체하여 간접적으로 항산화능을 측정할 수 있는 시험법으로 LGD의 라디칼 소거능을 측정된 결과 0.078 mg/ml에서 3.51 ± 1.80%, 0.0625 mg/ml에서 37.17 ± 1.66%, 0.125 mg/ml에서 80.69 ± 0.39, 0.25에서 93.43 ± 0.18%의 라디칼 소거능을 보였다. LGD의 용량이 증가함에 따라 ABTS 라디칼 소거활성이 증가하였으며 최고 농도인 0.25 mg/ml에서 93.43 ± 0.18%의 값으로 가장 높은 값을 보여주었으며 이는 대조군으로 사용한 ascorbic acid를 1 mg/ml으로 처리하였을 때의 소거능인 94.58 ± 0.16%에 근사한 값을 나

타냈다(Figure 2B).

## 2. LGD의 해마 세포 보호 효능

HT22 cell은 마우스 해마 세포주이며  $H_2O_2$ 로 유발한 산화적 스트레스에 대한 LGD의 보호 효능을 확인하기 위한 실험을 실시하였다. LGD는 0.03~1.0 mg/ml를 처리한 HT22의 세포생존율을 확인한 결과, 해당 농도 범위에서 세포독성이 나타나지 않았다(Figure 3A).  $H_2O_2$ 를 0~0.4  $\mu M$  농도로 HT22 세포에 처리하고 세포생존율을 확인한 결과, 유의한 세포독성이 나타났으며(Figure 3B), 우리는  $H_2O_2$  0.36  $\mu M$  농도를 처리하여 산화적 스트레스를 유발한 상태에서 LGD의 보호 효능을 확인하였다. HT22 해마 세포의 생존율을 분석한 결과, 0.36  $\mu M$   $H_2O_2$ 를 처리한 HT22는  $65.9 \pm 2.8\%$ 의 세포생존율이 나타났으나, LGD를 0, 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml를 처리한 결과 각각의 세포생존율은  $54.0 \pm 1.2$ ,  $60.8 \pm 1.4$ ,  $61.8 \pm 1.3$ ,  $60.9 \pm 1.2\%$ 로 유의한 보호 효능을 나타냈다.

## 3. LGD가 ABA 마우스의 전체 뇌 조직의 신경 관련 물질 발현에 미치는 영향

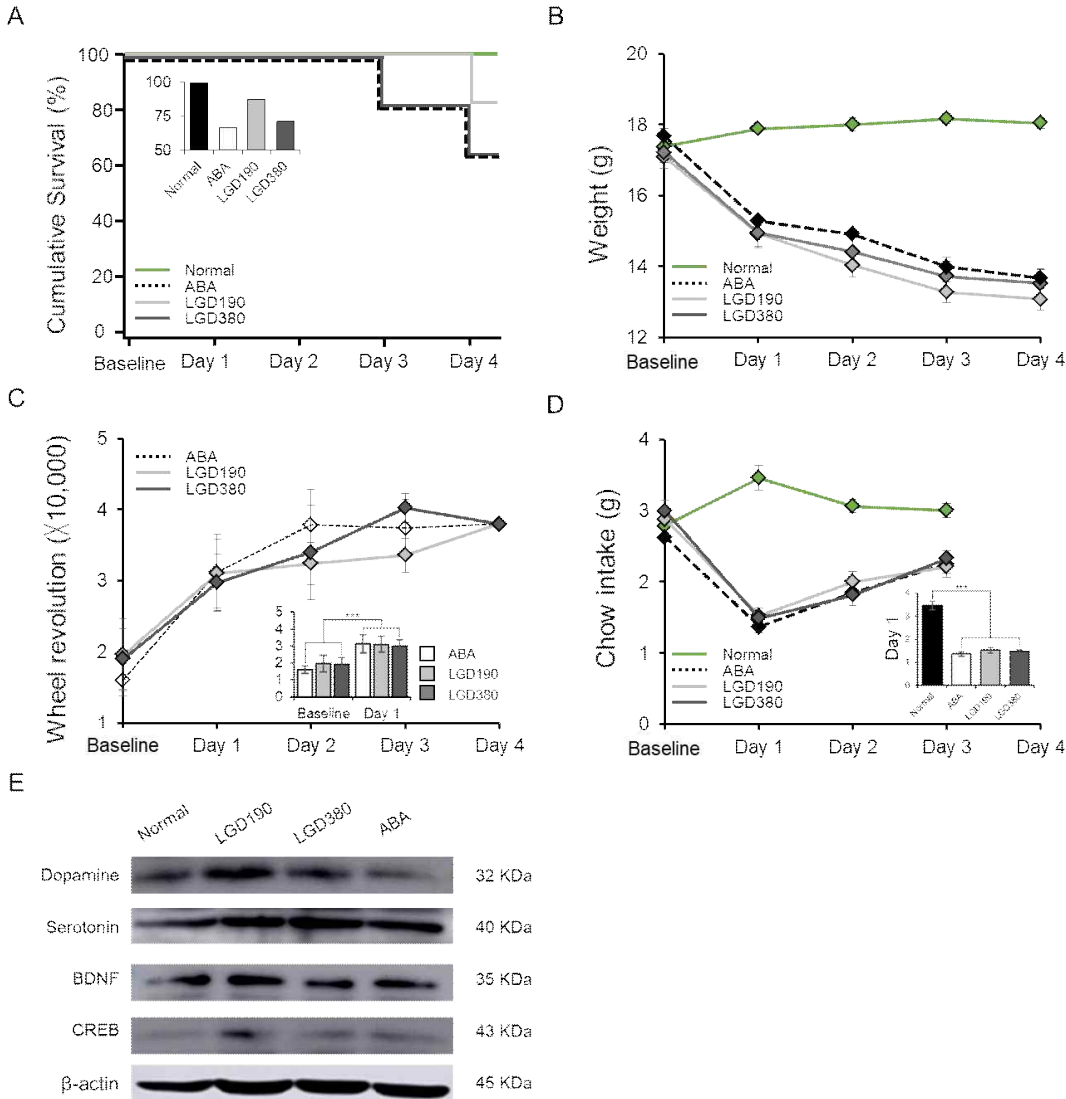
전체 뇌조직에서 dopamine, serotonin, BDNF, CREB 발현양을 분석하기 위해 ABA 실험을 진행하였다. ABA 4일차에 그룹별 생존율은 Normal 그룹 100%(6/6 개체), ABA 그룹 66.7%(4/6 개체), LGD190 그룹 87.5%(7/8 개체), LGD380 그룹 71.4%(5/7 개체)로 그룹별 차이가 나타나기 시작하였다(Figure 4A). 체중은 baseline에 비하여 ABA 1일차에 급격하게 감소하였고, ABA 4일차에는 Normal 그룹 13.6g(103.7%), ABA 그룹 13.1g(76.5%), LGD190 그룹 13.5g(78.5%), LGD380 그룹 13.7g(77.3%)였다(Figure 4B). 쳃바퀴 활동량은 ABA 1일차에 급격하게 상승하였고, ABA를 유발한 전체 그룹은 Baseline과 비교하여 ABA 1일차에 활동량이 유의( $P=0.0012$ )하게 증가하였다(Figure 4C). 사료섭취량은 ABA 1일차에 급격하게 감소하였으며, Normal 그룹 3.5 g/day(124.1%), ABA 그룹 1.4 g/day(52.1%), LGD190 그룹 1.5g/day(52.9%), LGD380 그룹 1.5 g/day(49.6%)였다. Day 1의 사료 섭취량은 ABA를 유발하지 않은 Normal 그룹과 ABA를 유발한 그룹간에 유의한 차이( $P<0.0001$ )를 보였다(Figure 4D). 이와 같이 ABA 1일차에 ABA 유발한 세 그룹의 마우스들은 체중이

유의하게 감소하였고, 쳃바퀴 활동량이 유의하게 증가하였으며, 사료섭취량이 유의하게 감소하였다(Figure 4B, 4C, 4D). 따라서 과도한 활동성과 그로 인한 식욕부진이 확실하게 형성되었으며, LGD를 투여한 그룹은 4일차에 보다 나은 생존율과 체중이 확인되었다.

ABA 4일차에 전체 뇌조직에서 신경전달물질의 발현양을 분석한 결과는 다음과 같다. Dopamine은 ABA 마우스가 Normal 마우스에 비해 발현양이 감소하였으나, LGD를 투여한 마우스에서는 반대로 dopamine 발현양이 증가하였다. Serotonin은 ABA 그룹에서 발현양이 증가하였고, LGD를 투여한 마우스에서 더욱 증가하였다. 신경영양물질과 관련된 신호전달 경로를 분석한 결과, BDNF와 CREB은 모두 ABA 그룹에서 발현이 증가하였고, LGD190 그룹의 마우스는 발현양이 더욱 증가하였다(Figure 4E).

## 4. LGD가 ABA 마우스 해마의 신경 관련 물질 발현에 미치는 영향

ABA 마우스의 해마에서 BDNF, p-CREB, CREB, p-cFos 발현양을 분석하기 위해 실험을 재차 진행하였다. ABA 4일차에 그룹별 생존율은 Normal 그룹 100%(11/11 개체), ABA 그룹 77.8%(7/9 개체), LGD190 그룹 100%(10/10 개체)로 그룹별 차이가 나타나기 시작하였다(Figure 5A). 체중은 Baseline에 비하여 ABA 1일차에 급격하게 감소하였고, ABA 4일차에는 Normal 그룹 17.9g(105.7%), ABA 그룹 13.5g(78.7%), LGD190 그룹 14.1g(82.3%)였다(Figure 5B). 쳃바퀴 활동량은 ABA 1일차에 급격하게 상승하였으며, ABA를 유발한 전체 그룹은 Baseline과 비교하여 ABA 1일차의 활동량이 유의( $P<0.001$ )하게 증가하였다(Figure 5C). 사료섭취량은 ABA 1일차에 급격하게 감소하였으며, Normal 그룹 2.3 g/day(99.7%), ABA 그룹 1.2 g/day(53.6%), LGD190 그룹 1.4 g/day(58.2%)였다. ABA 1일차의 섭취량은 ABA를 유발하지 않은 Normal 그룹과 ABA를 유발한 두 그룹 간에 유의한 차이( $P<0.0001$ )를 보였다(Figure 5D). 이와 같이 ABA 마우스들은 1일차에 체중이 유의하게 감소하였고, 쳃바퀴 활동량이 유의하게 증가하였으며, 사료섭취량이 유의하게 감소하였다(Figure 5B, 5C, 5D). 따라서 과도한 활동성과 그로 인한 식욕부진이 확실하게 형성되었으며, LGD를 투여한 그룹은 4일차에 보다 나은 생존율과 체중이 확인되었다.



**Figure 4.** Analysis of neurotransmitters and neurotrophins in activity based anorexia (ABA) mouse brain tissue on day 4. (A) Survival rate (%); Mice weighing less than 75% of body weight in each group were eliminated. (B) Body weight change (C) Wheel revolutions (D) Chow intake (E) Dopamine, serotonin, BDNF and CREB expressions in whole brain of ABA mouse. LGD190 and LGD380, licorice and dried ginger decoction 190 and 380 mg/kg/day, oral administration. All results are expressed as mean ± SEM. \*\*\*, P < 0.001.

ABA 4일차에 해마에서 신경영양물질과 신경활성에 관여하는 분자들의 발현양을 분석한 결과는 다음과 같다. BDNF는 Normal 그룹과 ABA 그룹보다 LGD 그룹이 발현양이 높았다. p-CREB와 CREB는 ABA를 유발시킨 그룹에서 Normal 그룹보다 낮은 발현양을 보여주었고, LGD를 그룹에서는 ABA그룹에 비하여 발현양이 증가하였다. p-cFos는 ABA를 유발한 그룹에서 Normal 그룹보다 발현양이 감소하였다. BDNF와 p-CREB, CREB 모두 ABA 그룹보다 LGD190 그룹에서 발현양이 증가하였다.

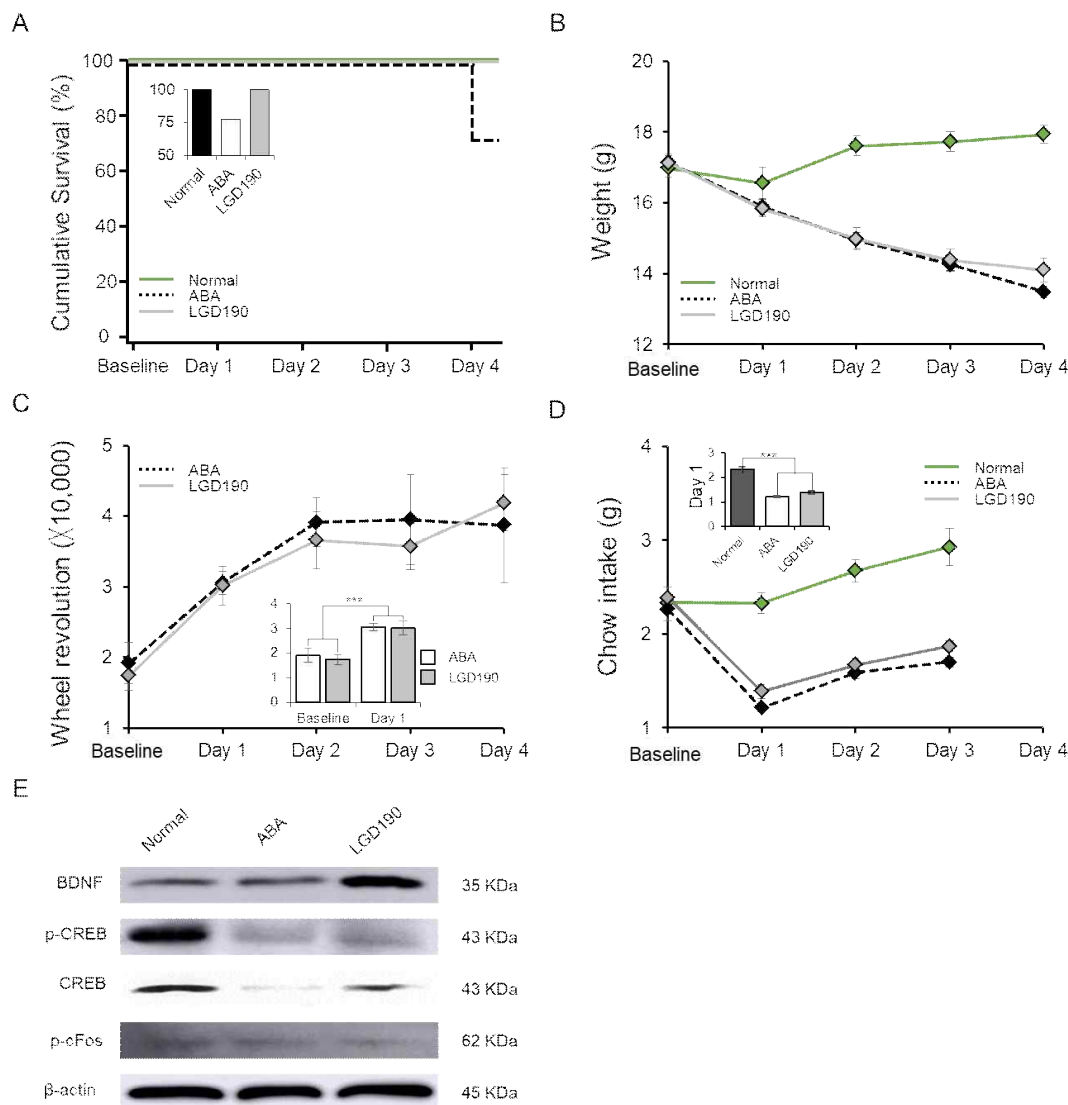
### 5. LGD가 ABA 마우스의 혈청 신경전달물질 농도에 미치는 영향

LGD를 처리한 ABA 마우스에서 말초 신경전달물질의 변화를 확인하였다. Dopamine 농도를 분석한 결과, ABA 그룹(43.36 ± 4.29 ng/ml)은 Normal 그룹(176.62 ± 55.23 ng/ml)에 비해 유의하게 감소하였으며, LGD190 그룹(332.07 ± 85.74 ng/ml)은 ABA 그룹에 비해 유의하게 상승하였다(Figure 6A). Acetylcholine은 ABA 그룹(1.96 ± 0.28 ng/ml)이 Normal 그룹(5.2 ± 0.4 ng/ml)과 비교하여 유의하게 감소하였으며, LGD190 그룹(2.4 ± 0.4

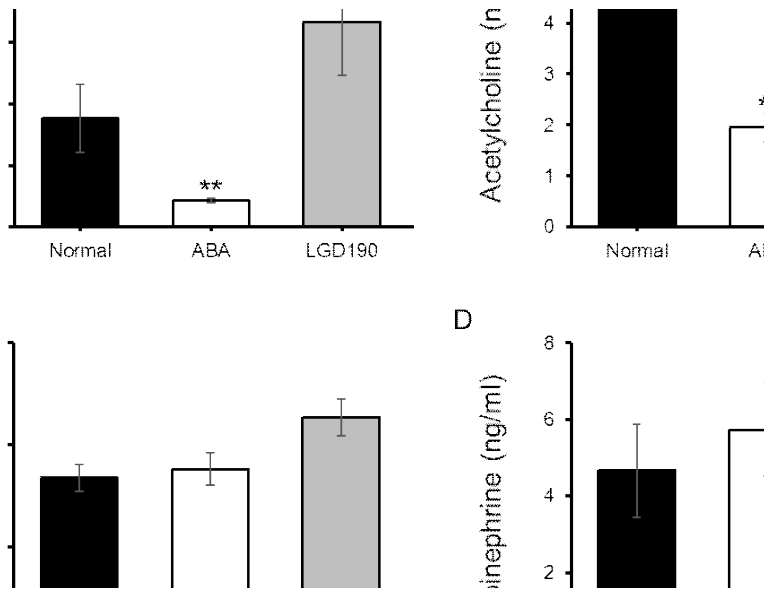


ng/ml)에서 ABA 그룹과 유의한 차이가 나타나지 않았다(Figure 6B). Serotonin은 ABA 그룹( $175.9 \pm 15.6$  ng/ml)과 Normal 그룹( $167.5 \pm 13.3$  ng/ml)이 유의한 차이가 없었으나, LGD190 그룹( $226.8 \pm 18.01$  ng/ml)에서는 상승하는 경향이 나타났다(Figure 6C). Epinephrine은 ABA 그룹( $5.7 \pm 1.2$  ng/ml)에서 Normal 그룹( $4.7 \pm 1.2$  ng/ml)에 비

해 유의하지 않으나 상승하는 경향이 나타났으며, LGD190 그룹( $6.3 \pm 1.7$  ng/ml)에서 더욱 상승하는 경향이 나타났다(Figure 6D). 따라서 ABA 마우스에서 LGD는 말초 순환에서 dopamine 농도를 유의하게 상승시키는 것이 가장 주요한 신경전달물질의 변화로 확인되었다.



**Figure 5.** Analysis of neurotrophins and proteins related with neuronal activation in hippocampus with activity based anorexia (ABA) on day 4. LGD190, licorice and dried ginger decoction, 190 mg/kg/day, oral administration (A) Survival rate (%); Mice weighing less than 75% of body weight in each group were eliminated. (B) Body weight change (C) Wheel revolutions (D) Chow intake. (E) BDNF, CREB, c-Fos expressions in hippocampus of ABA mouse. All results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*\*\*,  $P < 0.001$ .



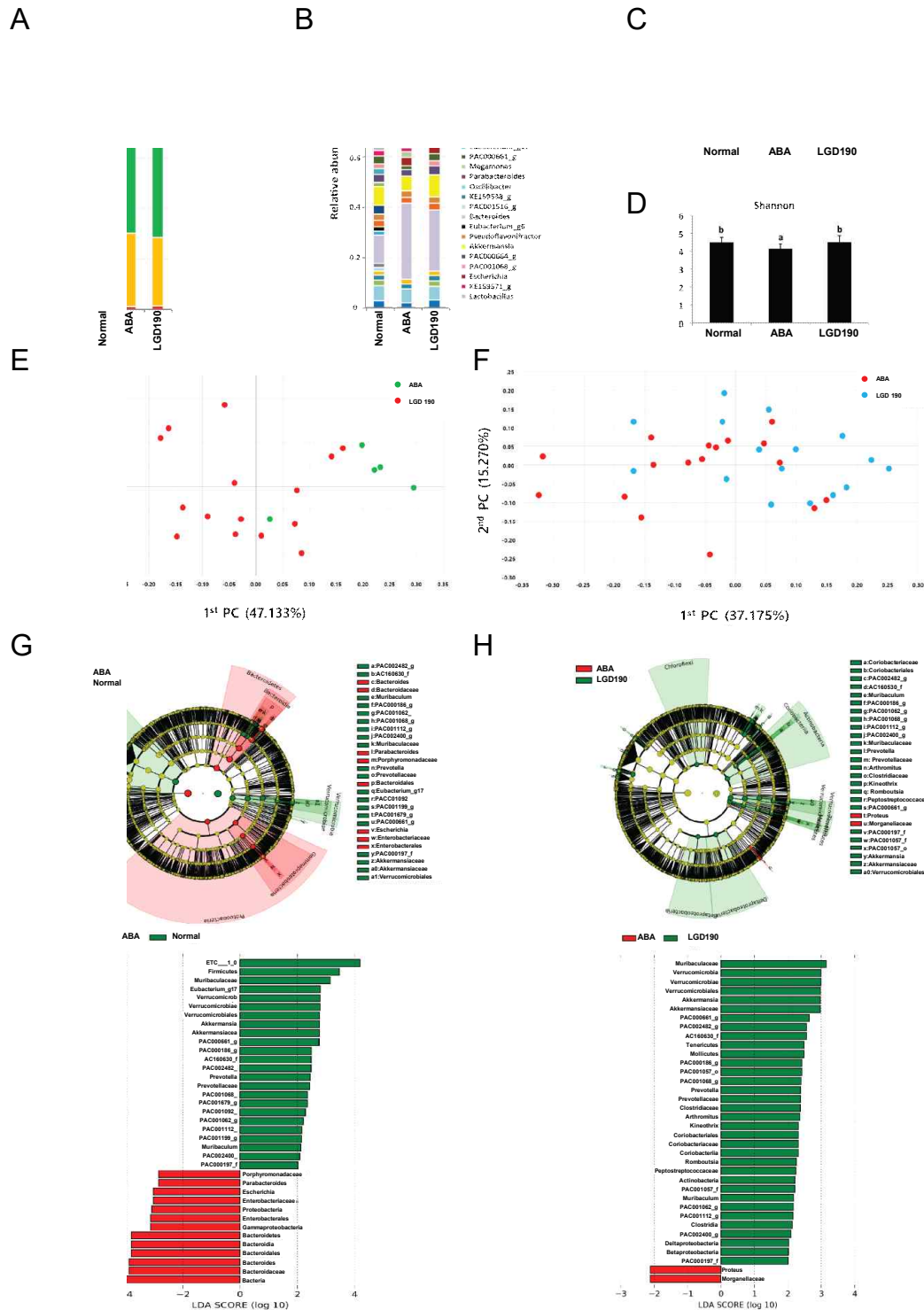
**Figure 6.** Serum neurotransmitter change in the ABA mice. (A) Serum dopamine concentration (B) Serum acetylcholine concentration (C) Serum serotonin concentration (D) Serum epinephrine concentration Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was recorded as \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ).

### 6. LGD가 ABA 마우스의 장내 미생물에 미치는 영향

장내 미생물 조성물의 문(phylum) 수준에서 ABA 그룹은 Normal 그룹에 비해 *Bacteroidetes ratio*는 증가시켰으나 *Firmicutes*는 감소시켰다. 또한 Normal 그룹에서 작은 비율이었던 *Tenericutes*는 ABA 그룹에서는 확인되지 않았으며, LGD190 그룹에서 다시 검출되었다(Figure 7A). 속(genus) 수준에서는 Normal 그룹에서 상대적으로 다양한 미생물이 ABA 그룹에서는 검출되지 않거나 매우 적은 비율로 감소하였다(Figure 7B). 이는 alpha-diversity의 풍부도 및 다양도 지수(Figure 7C, 7D)에서도 관찰되었으며, PCoA의 경우 Normal 그룹과 ABA 그룹의 마우스는 두 그룹 간의 분리 패턴을 보였다(Figure 7E). 하지만 ABA와 LGD190 그룹의 마우스에서 P

CoA는 두 그룹간의 차이가 없었다(Figure 7F).

상대적인 미생물의 풍부도 조사를 위해 Normal 그룹과 ABA 그룹, ABA 그룹과 LGD190 그룹의 장내 미생물 무리의 차이를 확인할 수 있는 중요한 bacterial biomarkers 조사를 위해 LEfSe 방법을 사용하였다(Figure 7G, 7H). Normal 그룹에서는 *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Prevotella*, *Muribaculum*이 비교적 많이 검출되었으나, ABA 그룹은 *Parabacteroides*, *Escherichia*, *Bacteroides*이 풍부하게 검출되었다(Figure 7G). 이러한 결과는 장내 미생물 무리가 ABA 유도에 의해 변화되었음을 시사하며, 반면 ABA 그룹에서 감소된 *Akkermansia*, *Prevotella*, *Muribaculum* 등 여러 속의 비율은 LGD190 그룹에서 더 높았다(Figure 7H), 이러한 결과는 LGD가 ABA에 의해 유도된 장내 미생물 변화를 회복시킬 수 있음을 시사한다.



**Figure 7.** Differences in the gut microbiome composition between activity-based anorexia (ABA)-induced and Licorice and dried ginger decoction (LGD)-treated groups at the level of (A) phylum and (B) genus. Alpha-diversity assessed by (C) richness (Chao1) and (D) diversity (Shannon). PCoA plots were generated to elucidate major patterns of variation in the fecal microbial community using Bray-Curtis distance between (E) CON and ABA and (F) ABA and LGD190. (G) and (H) panels show LefSe and cladogram representing the unique bacterial signatures identified between CON and ABA and ABA and LGD, respectively.

#### IV. 고찰

국내에서 감초건강탕은 수면장애 등에 대한 증례 보고가 있었으며<sup>5)</sup>, 『金匱要略』과 『東醫寶鑑』에서는 폐질환에 사용한다고 기록되어 있다. 우리는 신경성 식욕부진의 연구모델로 활용되는 ABA 모델을 사용하여 감초건강탕이 식사에 관련된 활동을 조절할 수 있음을 확인하였다. 이는 기존의 임상적 활용 사례들과 비교할 때, 응용 분야의 차이가 있으므로 환자에게 응용하기 위해서는 ABA에 대해 보다 깊은 이해가 필요하며, 더욱 상세한 감초건강탕의 치료 기전 연구를 통해서 약물의 효능에 대한 확신을 얻을 수 있다.

ABA와 같은 음식 제한은 마우스의 주야 활동 주기(circadian rhythm)를 무너뜨리며<sup>14)</sup>, 이는 대사와 내분비, 인지기능의 문제를 초래하여, 건강을 악화시켜 치명적인 상황을 초래한다<sup>15)</sup>. 하루 6시간 이내의 시간을 정하여 음식을 제한하는 경우 마우스는 수일 이내에 음식 공급 시간을 예측하지만, 음식의 섭취량은 뚜렷하게 감소하게 된다<sup>16)</sup>. 따라서 이러한 열악한 여건에 적응하는 것은 생존에 중요한 관건이 된다.

이번 연구에서 우리는 먼저 LGD의 항산화 효능과 마우스 해마 HT22 세포주의 산화적 스트레스에 대한 보호 효능을 평가하였다. 그리고 ABA 마우스에서 그룹별 체중 차이가 나타나기 시작하는 4일차에 마우스를 희생하였다. ABA 마우스의 중추에서 나타나는 변화를 확인하기 위해 전체 뇌조직과 해마에서 식사 및 과도한 활동성과 관련된 단백질의 발현양을 분석하였다. 또한, 혈중 신경전달물질의 농도와 장내 미생물의 변화를 확인하였다.

중증의 신경성 식욕부진 환자가 혈장 glutathione<sup>17)</sup>과 그 전구체인 cystine<sup>18)</sup>이 극도로 낮다는 점을 볼 때, 산화적 스트레스 요인이 신경성 식욕부진 환자의 관리에서 중요하다는 점을 알 수 있다. ABA 모델에서도 전신과 중추에서 산화적 스트레스 상태가 확인되었으며, 그로 인해 대뇌피질의 미토콘드리아 분열이 유도되었다<sup>19)</sup>. 이번 연구에서는 LGD의 처리 농도에 따라서 DPPH 라디칼과 ABTS 라디칼의 소거능이 높아졌으며(Figure 2), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 해마 세포 손상에 대해서도 유의한 보호효능을 나타냈다(Figure 3). 따라서 LGD는 ABA에서 항산화 효능을 통한 행동의 변화를 나타낼 수 있다.

식사에 대한 동기와 보상의 강화에 기여하는 dopamine의 중뇌변연계 경로는 식욕부진에서 중요한 조절 기작 중 하나이다<sup>20)</sup>. 실제 dopamine을 합성하지 못하는 마우스는 활동성이 낮아지면서, 식욕이나 갈증도 생기지 않는다<sup>21)</sup>. 또한 수면과 각성 주기에 관여하는 도파민의 증가는 ABA에서 생존을 개선하는 전략이 될 수 있다<sup>8)</sup>. ABA 마우스 전체 뇌조직의 신경전달물질의 발현양을 분석한 결과, ABA 그룹에서 dopamine이 뚜렷하게 감소하였으며, LGD를 투여한 그룹에서 모두 발현양이 증가하였다(Figure 4E).

한편 serotonin은 신경성 식욕부진 환자의 강박, 불안, 우울, 공포 등 감정과 관련이 있다. Fluoxetine을 포함한 SSRI(selective serotonin reuptake inhibitors, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제)가 신경성 식욕부진 환자의 저체중과 주요 증상의 개선에 도움이 된다는 보고는 아직 부족하지만, 재발 예방과 정신적 증후 개선에 도움이 될 수 있다<sup>22)23)</sup>. 이 실험에서 LGD190 그룹은 ABA 그룹에 비해 serotonin 발현양이 상승하였다(Figure 4E). 이러한 현상이 직접적으로 ABA 마우스의 저체중 증상이나 식사 행동을 개선을 했다고 단언할 수는 없으나, 식욕부진 환자에게는 정서적으로 긍정적인 역할을 기대할 수 있는 변화이다.

또한, BDNF는 뇌조직 전체에서 가장 풍부한 신경영양 물질이며, 신경정신과 질환의 중요한 표지자이며, 신경가소성, 음식의 섭취와 열량 소비의 균형 조절, 스트레스 대응, 보상 등에 관여하므로, 식욕부진에서도 매우 중요한 분자이다. 그러나 BDNF가 이형으로 조작된 마우스는 과도한 식욕항진, 체중증가가 나타나지만<sup>24)</sup>, 신경성 식욕부진 환자에게는 BDNF가 심각하게 감소되며<sup>25)</sup>, 체중이 회복되면 혈중 BDNF가 다시 회복되거나 약간 상승<sup>26)</sup>하는 등 아직 BDNF와 신경성 식욕부진 환자, ABA 마우스의 관계 아직 명확하지 않다. 유사한 계열의 마우스인 Balb/cJ를 이용한 한 ABA 연구에서 식이제한, 칫바퀴 공급, 식이제한과 함께 칫바퀴를 공급(ABA)한 세 가지 조건에서 ventral tegmental area와 해마의 BDNF mRNA 발현이 상승하였는데<sup>27)</sup>, 본 연구에서도 Balb/c AnNcrI 마우스의 전체 뇌조직과 해마의 BDNF 발현양이 약간 상승하는 경향이 나타났으며, LGD190 그룹에서는 더욱 상승하였다(Figure 4E, 5E). 이는 체중이 회복된 신경성 식욕부진 환자의 BDNF 변화 양상<sup>26)</sup>과 유사하며, LGD 그룹의 체중 유지에

BDNF가 관여하고 있음을 시사한다.

CREB mRNA와 단백질은 해마에 풍부하게 존재하며, CREB $\alpha$  유전자가 결핍된 마우스는 낮은 활성을 나타낸다<sup>28</sup>. ABA에서 CREB 발현양의 변화는 체계적으로 보고되지 않았으나, ABA의 과도한 활동성에 의해 CREB 발현이 증가할 것으로 예측할 수 있다. 이번 연구에서도 ABA 그룹의 전체 뇌조직 CREB은 약간 상승하였으나(Figure 4E), 해마에서 p-CREB은 뚜렷하게 감소하였다(Figure 5E). LGD190 그룹은 전체 뇌조직의 CREB과 해마의 p-CREB 발현이 상승하는 경향이 나타났다(Figure 4E, 5E). 이번 연구에서 우리는 식사가 공급된 시간에 마우스를 희생하였고, 생존을 위해서 활동량이 상승해야 하는 시간에 마우스의 뇌를 적출하였기 때문에 이러한 경향성이 나타난 것으로 사료된다.

한편 혈중 신경전달 물질 분석에서 ABA 그룹은 dopamine과 acetylcholine이 유의하게 감소하였으며, 특히 LGD190 그룹의 dopamine은 ABA 그룹보다 유의하게 상승하였다(Figure 6A). Dopamine은 중추에서는 학습, 보상, 동기 강화 등에 기여하며<sup>27</sup>, 중뇌의 운동기능 조절에 기여하며, 말초에서는 교감신경계에 작용하는 물질이면서 동시에 noradrenaline의 전구물질로서 주로 심박수 증가와 혈압 상승 등 효과를 나타낸다<sup>28</sup>. 선행 ABA 연구에서 혈중 dopamine은 실험 방법에 따라 서로 반대 방향의 양적 변화들이 보고 되었다<sup>29</sup>. 그러나 본 실험에서는 초기 실험실 적응기에 수면 시간에 해당하는 오전 09:30~15:30에만 식사가 공급되는 방식의 식이제한을 진행하였으므로, 생존을 위해서는 해당 시간에 활동성이 증가하는 방식에서의 활동 주기의 변화(circadian rhythm shift)가 필요하다. 따라서 이러한 상황에 중추에서 dopamine이 증가하는 것은 생존을 위한 전략적 변화 중 하나이다<sup>9</sup>. 또한 선행 연구에서 ABA의 증상으로 보고 되어 있는 심전도 QT 연장과 QRS 연장<sup>30</sup> 등 심장의 병리적 변화에 대해서 LGD 그룹의 혈중 dopamine의 상승은 강심 작용을 유도하므로 긍정적인 변화로 해석할 수 있다.

장내 미생물의 구성과 다양성은 식습관이나 영양 상태의 영향을 받으며<sup>31</sup>, 역으로 장내 미생물은 영양실조에 영향을 미친다<sup>32</sup>고 상호간의 관계가 보고되었다. 이러한 변화는 AN(anorexia nervosa)을 포함하여 기능성 위장 장애, 불안, 우울증의 발생과 진행에도 관여할 수 있다<sup>10</sup>. 이러한 측면에서 AN 환

자들과 ABA 동물의 장내 미생물 군집의 변화가 다양하게 보고되어 있다<sup>33-35</sup>. 본 연구에서는 ABA 유발 후 미생물의 다양성이 낮아졌다(Figure 7C, 7D). 장내 미생물 불균형은 장벽의 손상을 초래하여, 장 내용물이 잠재적인 염증 반응을 유발하게 되는데, 이는 사람의 장 질환에서도 종종 관찰된다<sup>36</sup>. 또 다른 ABA 마우스는 대장 조직의 투과성이 증가하였다고 보고되었으며, 이러한 장 장벽 기능 장애가 AN 환자에게서도 발생할 수 있음을 시사한다<sup>37,38</sup>.

다양한 연구들이 한약에 의한 장내 미생물의 체계적인 변화를 보고하였으며, 생약 추출물에 포함된 많은 화합물들은 소화되지 않은 채로 장내에 도달하며, 특정 미생물의 성장을 자극하거나 억제한다<sup>39</sup>. 본 연구에서 LGD 군은 ABA 군에서 낮아진 장내 미생물의 다양성을 회복하였다(Figure 7C, 7D). 또한 LGD는 ABA 군에서 감소된 *Akkermansia*, *Prevotella*, *Muribaculum*을 증가시켰다(Figure 7G, 7H). 이 중에서 *Akkermansia muciniphila*는 아직 ABA에 의한 장내 미생물 변화의 정확한 특징에 대한 결론을 내리기는 어렵지만, 장벽의 복원을 통해 대사성 독소에 의한 염증을 악화시키는 것으로 보고되었다<sup>40</sup>. 단, AN 환자에서 증가하거나 감소하는 미생물의 종류, 그리고 세균의 다양성에 대한 연구 결과는 연구마다 다르게 보고 되고 있다<sup>10</sup>. 또한 현재 연구 결과는 ABA 유발 마우스에서 LGD가 미생물 무리를 조절함으로써 치료 효과를 발휘할 수 있음을 시사하고 있으나, 장내 미생물의 변화가 LGD에 의해 직접적으로 발생한 것인지 아니면 LGD가 ABA에 미치는 치료 효과를 통해 간접적으로 발생한 것인지는 확인하기 힘들다. 앞으로 장내 미생물 무리에 대한 영향이 LGD에 의해 직접적으로 발생한다는 것을 판단하기 위해서는 ABA를 유도하지 않은 LGD를 투여한 대조군의 장내 변화를 관찰하는 추가 연구가 필요하다.

본 연구를 통해 우리는 감초건강탕이 항산화 효능을 통해 해마 세포를 보호할 수 있음을 확인하였다. 또한 감초건강탕은 ABA 마우스에서 전체 뇌조직의 dopamine 발현을 상승시키고, 해마에서 BDNF 발현을 상승시켰다. 이러한 기전을 통해 ABA 마우스의 행동 변화가 나타났을 것으로 추정할 수 있다. 또한 감초건강탕이 혈중 dopamine을 상승시킴으로써 강심 작용을 통해 ABA의 치명적인 증상에 대한 긍정적인 변화를 유도한 것으로 보인다. 또한 ABA

마우스에서 나타나는 장내 미생물의 불균형을 조절 하였음을 확인하였다. 앞으로 성분 약리학적인 연구와 임상적인 접근을 통해, 상세한 작용 기전을 규명할 필요가 있고 신경성 식욕부진에 대한 임상적인 효용성을 확인하는 연구가 필요하다.

### V. 결론

다양한 농도의 감초건강탕 열수추출물을 해마 세 포주와 ABA 마우스에 처리한 본 연구를 통해서 다음과 같은 결론을 도출할 수 있었다.

- 1. 감초건강탕은 ABA 마우스에서 전체 뇌조직의 dopamine 발현을 상승시키고, 해마에서 BDNF 발현을 상승시켰다.
- 1. 감초건강탕은 ABA 마우스에서 혈중 dopamine을 상승시켰다.
- 1. 감초건강탕은 ABA 마우스의 장내 미생물의 다양성을 증가시키면서, ABA에 의한 불균형을 균형 상태로 조절하였다.

### References

1. Javad SR, Cristina Q, Jesús HB, Lisandra HB, Rajandeep K, Dorota K, Yadav U, Ahmet B, Balakyz Y, Celale K, Beraat Ö, Surjit S, Krishnendu A, Farukh S, Natália CM, Manoj K, Ahmad FAR, Usman S, Ramla MK, Shabnum S, Hafiz ARS. Glycyrrhiza Genus: Enlightening Phytochemical Components for Pharmacological and Health-Promoting Abilities. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:7571132. doi: 10.1155/2021/7571132
2. Ko SY, Kim DH, Lee TH. Effect of glycyrrhizae Radix water extract on the depression induced by LPS in rats. *Kor. j. herb.* 2014;29:9-16.
3. Cho MJ, Kim JH, Park CH, Lee AY, Shin YS, Lee JH, et al. Comparison of the effect of three licorice varieties on cognitive improvement via an amelioration of neuroinflammation in lipopolysaccharide-induced mice. *Nutr Res Pract.* 2018; 12:191-198. doi: 10.4162/nrp.2018.12.3.191
4. in Z, Lee G, Kim S, Park CS, Park YS, Jin YH. Ginger and its pungent constituents non-competitively inhibit serotonin currents on visceral afferent neurons. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 201

- 4;18:149-153. 10.4196/kjpp.2014.18.2.149
5. Park SY, Lee SJ. Two Case Reports of different chief complaints combined with Sleep Disorder treated by Gamchogungang-tang based on Shannhanlun Provisions. *J of KMediACS.* 2019;11(1):113-123.
6. American psychiatric association. DSM-5. Arlington, American psychiatric publishing. 2013 : 171-173.
7. Klenotich SJ, Dulawa SC. The activity-based anorexia mouse model. *Psychiatric disorders.* Totowa : Humana press. 2012 : 377-393.
8. Schalla MA, Stengel A. Activity based anorexia as an animal model for anorexia nervosa : a systematic review. *Front Nutr.* 2019 ; 6 : 69.
9. Kim DH, Kim JS, Kim J, Jeong JK, Son HS, Park SE, Jo J, Ryu SM, Kim ES, Lee SJ, Lee SI. Therapeutic Effects of Licorice and Dried Ginger Decoction on Activity-Based Anorexia in BALB/c AnNCrl Mice. *Front Pharmacol* 2020 ; 11 : 594706.
10. Breton J, Déchelotte P, Ribet D. Intestinal microbiota and anorexia nervosa. *Clinical Nutrition Experimental.* 2019 ; 28 : 11-21.
11. Fetissov SO, Sinno MH, Coëffier M, Bole-Feysot C, Ducrotté P, Höckfelt T, Déchelotte P. Autoantibodies against appetite-regulating peptide hormones and neuropeptides : putative modulation by gut microflora. *Nutrition.* 2008 ; 24(4) : 348-359.
12. Fetissov SO, Sinno MH, Coquerel Q, Do Rego J C, Coëffier M, Gilbert D, Höckfelt T, Déchelotte P. Emerging role of autoantibodies against appetite-regulating neuropeptides in eating disorders. *Nutrition,* 2008 ; 24(9) : 854-859.
13. Queipo-Ortuño MI, Seoane LM, Murri M, Pardo M, Gomez-Zumaquero JM, Cardona F, Casanueva F, Tinahones FJ. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PloS one.* 2013 ; 8(5) : e65465.
14. Kobayashi K, Takahashi K. Prolonged food deprivation abolishes the circadian adrenocortical rhythm, but not the endogenous rhythm in rats. *Neuroendocrinol.* 1979 ; 29 : 207-214.
15. Kenneth PW, Christopher AL, Monique KL. Circadian and wakefulness-sleep modulation of cognition in humans. *Front. Mol. Neurosci.* 2012 ;

- 5 : 50.
16. Valter DL, Satchidananda P. Fasting, circadian rhythms, and timerestricted feeding in healthy lifespan. *Cell Metab.* 2016 ; 23 : 1048-1059.
  17. Zenger F, Russmann S, Junker E, Wuthrich C, Bui MH, Lauterburg BH. Decreased glutathione in patients with anorexia nervosa. Risk factor for toxic liver injury? *European Journal of Clinical Nutrition.* 2004 ; 58(2) : 238-43.
  18. Moyano D, Vilaseca MA, Artuch R, Lambruschini N. Plasma amino acids in anorexia nervosa. *European Journal of Clinical Nutrition.* 1998 ; 52(9) : 684-9.
  19. Hurley MM, Murlanova K, Macias LK, Sabir AI, O'Brien SC, Bhasin H, Tamashiro KL, Pletnikov MV, Moran TH. Activity-based anorexia disrupts systemic oxidative state and induces cortical mitochondrial fission in adolescent female rats. *International Journal of Eating Disorders.* 2021 ; 54(4) : 639-645.
  20. Palmiter RD. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci.* 2007 ; 30 : 375-381.
  21. Zhou QY, Palmiter RD. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell.* 1995 ; 83(7) : 1197-209.
  22. Marvanova M, Gramith K. Role of antidepressants in the treatment of adults with anorexia nervosa. *Ment Health Clin.* 2018 ; 8(3) : 127-137.
  23. Kim SS. Role of fluoxetine in anorexia nervosa. *Ann. Pharmacother.* 2003 ; 37(6) : 890-2.
  24. Chan JP, Unger TJ, Byrnes J, Rios M. Examination of behavioral deficits triggered by targeting Bdnf in fetal or postnatal brains of mice. *Neuroscience.* 2006 ; 142(1) : 49-58.
  25. Brandys MK, Kas MJ, van Elburg AA, Campbell IC, Adan RA. A meta-analysis of circulating BDNF concentrations in anorexia nervosa. *World J Biol Psychiatry.* 2011 ; 12 : 444-54.
  26. Ehrlich S, Salbach-Andrae H, Eckart S, Merle J V, Burghardt R, Pfeiffer E, Franke L, Uebelhack R, Lehmkuhl U, Hellweg R. Serum brain-derived neurotrophic factor and peripheral indicators of the serotonin system in underweight and weight-recovered adolescent girls and women with anorexia nervosa. *J Psychiatry Neurosci.* 2009 ; 34 : 323-329.
  27. Ho EV, Klenotich SJ, McMurray MS, Dulawa SC. Activity-based anorexia alters the expression of BDNF transcripts in the mesocorticolimbic reward circuit. *PLoS ONE.* 2016 ; 11(11) : e0166756.
  28. Neumann J, Hofmann B, Dhein S, Gergs U. Role of Dopamine in the Heart in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023 ; 24(5) : 5042.
  29. Kontis D, Theochari E. Dopamine in anorexia nervosa: a systematic review. *Behav. Pharmacol.* 2012 ; 23(5-6) : 496-515.
  30. Skowron K, Kurnik-Łucka M, Jurczyk M, Aleksandrovych V, Stach P, Dadański E, Kuśnierz-Cabala B, Jasiński K, Węglarz WP, Mazur P, Podlasz P, Wąsowicz K, Gil K. Is the activity-based anorexia model a reliable method of presenting peripheral clinical features of anorexia nervosa? *Nutrients.* 2021 ; 13(8) : 2876.
  31. Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature.* 2016. 535(7610) : 56-64.
  32. Million M, Diallo A, Raoult D. Gut microbiota and malnutrition. *Microbial pathogenesis.* 2017 ; 106 : 127-138.
  33. Kleiman SC, Watson HJ, Bulik-Sullivan EC, Huh EY, Tarantino LM, Bulik CM, Carroll IM. The intestinal microbiota in acute anorexia nervosa and during re-nourishment: relationship to depression, anxiety, and eating disorder psychopathology. *Psychosomatic medicine.* 2015 ; 77(9) : 969-981.