

# 연자육의 항우울 효과 및 프로티옴 분석을 통한 기전 연구

이진우<sup>1</sup> · 홍무창<sup>1</sup> · 신민규<sup>1</sup> · 배현수<sup>1,2\*</sup>

1: 경희대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 퓨리메드(주) 기업부설연구소

## Comparison of Nelumbinis Semen Extract with Hypericum Perforatum and Fluoxetine in Animal Model of Depression

Jin Woo Lee<sup>1</sup>, Moo Chang Hong<sup>1</sup>, Min Kyu Shin<sup>1</sup>, Hyun Su Bae<sup>1,2\*</sup>

1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, KyungHee University, 2: Purimed R&D Institute

Clinical evidence suggests that Nelumbinis Semen extracts have antidepressive properties and may offer an interesting alternative for the treatment of mood disorders. It was the aim of the present study to compare the effects of Nelumbinis Semen extracts with those of fluoxetine and hypericum perforatum extract in the rat forced swimming test (FST) and chronic mild stress (CMS), a model of depression. In the FST, p.o. administration of Nelumbinis Semen extracts (1 mg) induced a statistically significant reduction of immobility. The active behaviors in that test did not reflect decreased general activity because Nelumbinis Semen extracts failed to alter the locomotor activity of rats, measured in the open field test. Moreover Nelumbinis Semen extracts was superior to fluoxetine and hypericum perforatum extract in the incidence of sexual side-effects. These effects of Nelumbinis Semen extracts on the rat behavior is to be ascribed to increased Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver, Mitogen-activated protein kinase 1, Adenylosuccinate synthetase, and Aldehyde dehydrogenase in rat hippocampus.

Key words : Nelumbinis Semen Extract, fluoxetine and hypericum perforatum

### 서론

인간의 정신작용 중 정서활동을 한의학에서는 喜,怒,憂,思, 悲,驚,恐으로 인식하고 이를 七情이라고 한 바, 七情은 평상시에 는 생리 활동의 범위에 있어 병을 일으키지 않지만 장기적인 정 신자극이나 갑작스럽고 과도한 정신적인 상처를 받으면 생리적 으로 조절할 수 없게 되어 인체의 기혈·장부·경락의 기능이 실조되어 발병된다.<sup>1)</sup>

우울증은 한의학에서 鬱證의 개념으로 파악하여, “結하여 퍼지 못하는 것”, “놀리게 되어 鬱을 발하고”, “오래되거나 놀리 고 숨겨져 鬱로 변화된다”고 하였다. 그러므로 鬱證은 氣血이 소 통이 되지 않고 舒暢, 通達되지 못한 상태를 말한다.<sup>2)</sup>

우울증 치료를 위한 항우울제의 개발을 위해 강제유극, 통증 유발 등의 방법을 이용한 다양한 우울증 동물 모델이 개발되었 다.<sup>3)</sup> 이들은 크게 강한 강도의 공포 자극을 주는 방법과 경미한

강도의 예측 불가능한 반복적인 스트레스를 이용하는 방법<sup>4)</sup>으로 나눌수 있다. 이들 중 강제유영검사(Forced swimming test, FST) 와 저강도 스트레스 반복자극(Chronic mild stress, CMS) 모델이 신뢰도와 타당도를 갖춘 우수한 우울증 동물모델로서 한의학의 鬱證과도 가장 합치될 수 있는 모델이라고 생각된다.

우울의 정도를 평가하는 방법으로 CMS 동물 모델의 자당 섭취량이 유효한 지표로 많이 이용되었으나<sup>5)</sup>, 자당섭취량이 CMS 동물의 우울증에 대한 신뢰할만한 지표가 될 수 없다는 견 해가 제기되었다.<sup>6)</sup> 이후 많은 연구자들은 자당 섭취량 이외에 개 방장 행동 검사(Open field test), 교미행동 검사(Sexual behavior test) 등을 우울증에 대한 지표로 삼고 있다.<sup>7)</sup>

최근에는 우울증 동물모델에 대한 분자생물학적인 연구가 활발히 이루어지고 있으나<sup>8)</sup> 최근 발표된 한약재를 이용한 우울 증 개선효과를 입증하려는 논문들을 살펴보면 분자생물학적 연 구결과는 매우 미비하다.<sup>9)</sup>

분자생물학적인 연구방법 중, 프로티옴믹스(Proteomix)기법 을 이용하면 단백질의 발현을 종합적이고 정량적으로 측정할 수 있기 때문에 빠른 시간 내에 특정 단백질의 존재나 그 양을 파악

\* 교신저자 : 배현수, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

· E-mail : hsbae@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0323

· 접수 : 2006/06/21 · 수정 : 2006/07/13 · 채택 : 2006/08/01

할 수 있어 특정 질환에서의 단백질변화 관찰이 가능하며,<sup>10)</sup> 이를 통해 질병의 발현 및 약물 작용 기전을 총괄적으로 이해할 수 있어 유용하게 응용되고 있다.

연자육은 평간澁한 성미를 가진 약재로 心, 脾, 腎經 등에 작용하여 양심안신시킨다. 임상에서 심계 및 불면 등의 우울증상을 개선시키기 위해 사용되며,<sup>11)</sup> 수동회피실험(Passive avoidance test)을 통한 예비실험 결과 역시 유의성있는 효과를 나타내었다.

이에 저자는 연자육의 항우울 효과를 밝히고자, CMS로 유발된 우울증 모델 흰쥐를 이용하여 자당섭취량, 체중 변화, 개방장 행동 검사와 교미행동검사를 시행하여 반복적 자극에 의해 발생된 우울증 치료효과 평가하였으며, 강제유영검사를 통해 강력한 공포자극으로 유발된 우울증에 대한 치료효과를 평가하였다. 또한 연자육의 작용기전과 관련된 대뇌단백질을 밝혀내기 위하여 분자생물학적인 방법인 이차원 전기영동 (two-dimensional electrophoresis (2-DE))을 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 동물 및 약재

#### 1) 동물

실험 시작 시 250-350g 사이인 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 실험동물로 사용한다. 실험집단 동물은 개별사육상자(26×20×13cm)에 한 마리씩 격리 사육하면서 저강도 스트레스 반복자극(Chronic mild stress, CMS)을 가하고, 스트레스를 주지 않는 통제 집단 및 강제유영실험에 사용될 동물은 3마리씩 집단 사육상자(42×26×18cm)에 사육하였다. 사육상자의 바닥에는 위생 처리된 깔짚을 깔아주고, 실험집단의 물, 먹이 박탈시간을 제외하고는 물과 먹이는 충분히 공급해 주었다. 조명을 사용하여 오전 9시부터 12시간을 밤 주기로, 오후 9시부터 12시간을 낮 주기로 조정하였다. 사육실의 온도는 항상 21℃, 습도는 50±5%로 유지하였다.

#### 2) 약재

연자육은 2003년 8월 11일에 포장된 원산지는 중국산을 사용하였다.(신우약품사, Korea)

### 2. 검액의 조제

연자육 500g을 마쇄하여 거름망(1mm, No. 18, 청상상공사, Korea)을 통과 시킨 후 감압된 데시케이터(desiccator)에서 약 48시간 동안 건조하였다. 건조물 150g을 정량하여 에테르 1L(덕산, Korea)를 넣고 약 30분 동안 초음파추출하여 감압여과(Watmann No.2)하고 잔사는 다시 에테르 1L를 넣고 재차 추출하여 상청액을 포집하였다. 80% 메틸알콜(덕산, Korea)을 이용하여 같은방법으로 추출한 후 포집된 상청액을 혼합하였다. 이를 여과하여 감압농축기(EYELA Co. Japan)로 농축한 후 동결건조기(EYELA Co. Japan)로 동결건조하여 개별 약물의 동결건조물을 얻었으며 회수율은 17.4% 였다. 표품은 경희대학교 한의과대학 생리학교실에 보관하였다.

### 3. 연자육의 지표물질 분석 및 다변량 pattern 분석

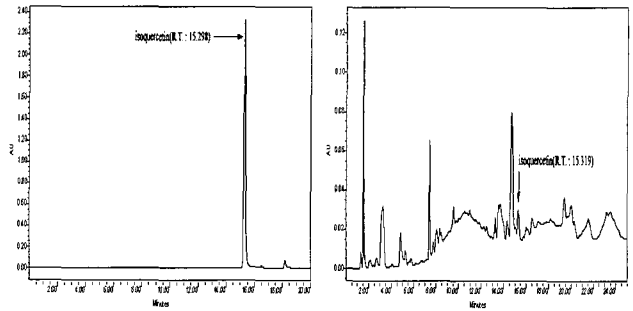
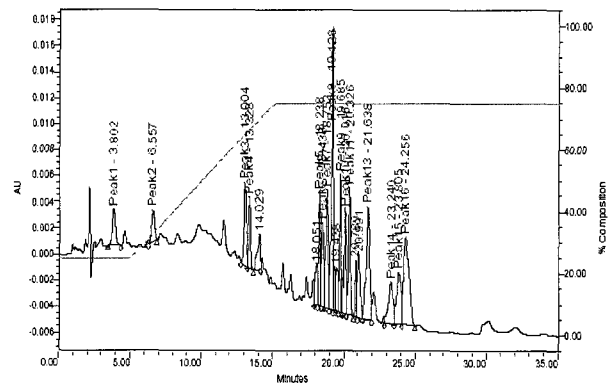


Fig. 1. The ESI-MS spectrum of isoquercetin (left, Fluka) and isoquercetin (right, Fluka) from Nelumbinis Semen extracts.

### A



### B

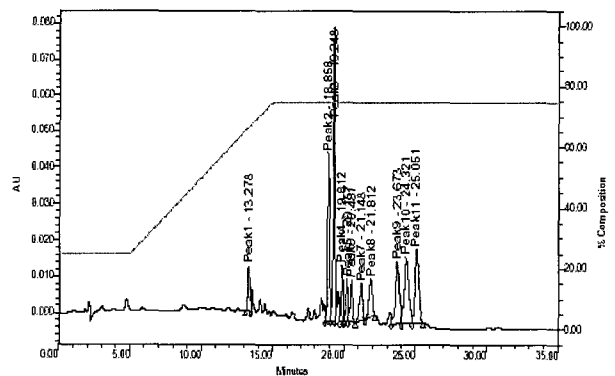


Fig. 2. The pattern of the HPLC chromatogram analyzed at UV 280nm (A, Fluka) and UV 254nm (B, Fluka) for the total alkaloids extracted from Nelumbinis Semen 80% MeOH

### 4. 검액의 투여

연자육추출물은 1mg을 3ml의 증류수에 혼합하여 구강투여하였다. hypericum perforatum(상품명: St. John's wort)는 0.67mg(1점)을 3ml의 증류수에 혼합하여 구강투여하였다. Fluoxetine은 10ml/kg을 복강 주사하였다. 약물의 투여용량은 Altemus 등의 연구<sup>12)</sup>를 참고하였다.

### 5. 강제유영검사 (Forced Swimming Test, FST)

투명 아크릴로 제작된 원통형 수조(지름 20cm, 높이 40cm)가 실험장치로 사용되었다. 이 수조에 25cm 높이로 물(25℃)을

채우고 적응시행인 첫째 날에는 동물을 15분간 빠뜨려서 공포 감 및 절망감을 유발시켰다. 절망감 유발 직후 검역을 투여하고, 24시간 뒤 강제유영검사를 5분 동안 시행하여 쥐의 부동성 (immobility)을 측정하였다. 부동성은 쥐가 오직 물에 떠 있으려고 하는 것 이외에는 다른 움직임이 없는 상태로 정의하였다. 7일 동안 연자육, hypericum perforatum, fluoxetine을 매일 투여 한 후, FST 5분 검사를 실시하여 다시 한 번 쥐의 부동성을 측정하였다.

6. 스트레스 절차와 행동검사

1) 저강도 스트레스 반복자극 (Chronic Mild Stress, CMS)

실험집단과 통제 집단의 쥐들을 먼저 48시간 동안 1% 자당 용액에 노출시켜 단맛에 대해 적응시킨 후 실험집단에 총 8주 동안 CMS 처치를 가하였다. 본 실험에 사용된 스트레스 절차는 Willner<sup>5)</sup>의 것을 참고로 하여 재구성 되었으며, Willner가 도입했던 13종의 스트레스 항목 중 추위와 냄새자극에 대한 노출을 제외한 나머지 11가지 스트레스 항목은 동일하게 적용되도록 하였다. 스트레스 절차는 1) 물박탈, 2) 먹이 박탈 3) 물 및 먹이박탈 4) 물먹이 박탈 후 45g으로 급식제한, 5) 물박탈 후 빈물병 노출, 6) 온종일 조명, 7) 사육상자 45도 기울임, 8) 물 400ml를 주어 사육환경 오염, 9) 간헐적인 85dB 백색잡음 제시, 10) 번쩍이는 Stroboscope조명제시, 11) 3배수 집단 사육 으로 구성된다.

이들 11가지 스트레스는 1주일 단위로 구성되며, 1주일간의 스트레스 스케줄이 Table 1에 요약되어 있다.

Table 1. Weekly Schedule of Chronic Mild Stress Procedures

Day/Time	Mon	Tues	Wed (overday lighting)	Thurs	Fri (overday lighting)	Sat	Sun
am 00:00							
01:00							
02:00							
03:00		soiled cage (15 hours)	water deprivation (16 hours)	grouped housing (17 h)		45°cage tilt (17 hours)	stroboscope lighting (9 hours)
04:00							
05:00	water and food deprivation (20 hours)			water and food deprivation (20 h)			
06:00							
07:00							
08:00							
09:00			empty water bottle		White noise (5 hours)		
10:00							
11:00							
pm 12:00		stroboscope lighting (9 hours)					
13:00			cage tilt (7 hours)				
14:00	sucrose test			restricted access to food(2 h)			
15:00	White noise (3 hours)						
16:00							
17:00					[Behavior Test]		
18:00							
19:00		water deprivation (16 hours)	grouped housing (17 h)				water and food deprivation (20 hours)
20:00	soiled cage (15 hours)				45°cage tilt (17 hours)	stroboscope lighting (9 hours)	
21:00							
22:00							
23:00							

대조군의 흰쥐들은 매주 자당 섭취량 측정 이전 20시간동안 물과 먹이 박탈만 시키고 나머지 기간 동안은 집단 사육상자에서 물과 먹이를 충분히 공급하여 사육하였다.

2) 자당섭취량 및 체중측정

집단 모두에 대해 매주 한차례씩 1% 자당용액 섭취량을 측정하였다. 20시간 동안 물과 먹이를 박탈한 상태에서 1% 자당용액에 1시간 동안 노출시키고, 노출 전과 후의 용기 무게를 기록함으로써 자당용액의 섭취량을 측정하였다. 체중은 매주 1시간 동안의 자당용액 노출이 끝난 후에 측정하였다.

3) 개방장에서의 행동검사

CMS 처치와 각각의 약물 처치에 따른 활동량의 차이를 알아보고자, 9주 동안의 자당용액섭취량 측정 절차가 모두 끝난 후에 개방장(open field)에서의 여러 가지 행동을 관찰하였다. 실험에 이용된 개방장은 75X75X30 cm 규격의 나무로 만든 상자이며, 바닥에는 15cm 간격의 가로 세로선으로 바둑판 모양의 구획이 나뉘어져 있으며, 뚜껑은 관찰이 가능하도록 철망으로 만들어져 있다 (Fig. 3). 개방장의 한쪽 편에는 15X15X15 cm의 작은 상자가 연결되어 있어서, 실험동물이 개방장에 나가기 전 대기하는 출발상자로 이용된다. 출발상자와 개방장 사이는 내리닫이 문을 설치하여, 출발상자 안에 쥐를 넣고 30초 후에 문이 열리게 되며, 문이 열린 후 개방장으로 나갈 때 까지 걸린 시간을 측정하였다. 이 측정치가 출발잠재기가 되며, 문이 열린 때부터 꼬리까지 완전히 출발상자를 벗어나올 때까지의 시간으로 정의하였다. 출발잠재기의 종료와 동시에 개방장에서의 활동이 관찰되기 시작하는데, 개방장에서의 활동은 총 5분 동안 관찰되었고, 그 동안 나타나는 보행 활동(locomotion)과 앞발들고 일어서기(rearing), 몸치장행동(grooming)을 기록하였다. 보행활동은 흰쥐가 5분간 움직인 총 거리를 계산하였다. 일어서기는 총 5분 동안의 개방장 활동 중 뒷발로 서서 탐색행동을 보인 전체 횟수로서 기록되며, 몸치장행동은 앞발로 머리를 쓰다듬거나 입과 손으로 털을 고르는 행동을 전체 5분 동안 얼마나 보였는지에 대한 시간으로 기록하였다.

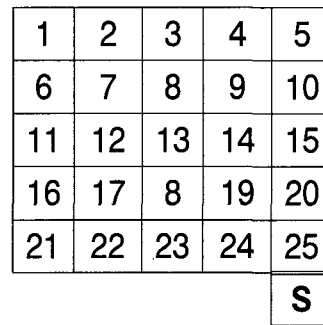


Fig. 3. Draft of open-field (S:start box, there is a door between S and 25 area)

4) 교미행동(sexual behavior)의 측정

검사 장소는 어둡하고 조용한 방에서 실시하였다. 16X16 inch의 투명한 사육상자를 사용하며, 검사 실시 48시간 전에 성숙한 암쥐에 estradiol benzoate 20µg, 5시간 전에 progesterone 1 mg을 투여하여 그 암쥐가 성적 수용성을 갖도록 하였다. 숫쥐를 환경에 익숙해지도록 30분 동안 상자 속에 혼자 놓아둔 뒤 암쥐

를 넣어주고 30분 동안 교미행동을 관찰하였다. 압위의 성적 수용성이 갖추어진 경우, 즉, 발정한 경우, 숫쥐가 올라타도록 허용하고 척추 전만을 보인다. 숫컷의 성행동을 교미시도회수 (mounting number), 교미시도시간 (mounting latency), 삽입회수 (intromission number), 삽입시간 (intromission latency), 사정회수 (ejaculation number), 사정시간 (ejaculation number latency), 회복시간 (refractory period)으로 구분하여 측정하였다.

## 7. 프로티옴 (Proteomics)

### 1) 시료의 적출

강제유영실험이 종료된 후 흰쥐를 에테르 (덕산, Korea)로 마취시켜 희생시키고 신속하게 해마를 적출한 후 -70℃에 보관하였다.

### 2) 시료 용해 및 재수화 (Rehydration)

실험 동물의 뇌에서 추출한 해마조직 40mg을 7M Urea (Amresco Inc. U.S.A.), 2M Thiourea (Amresco Inc. U.S.A.), 100mM DTE (Amresco Inc. U.S.A.), 4% CHAPS (Amresco Inc. U.S.A.), 40mM Tris (Amresco Inc. USA), 0.002% Bromophenol Blue dye (Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 함유한 Sample Buffer 600 $\mu$ l에 넣고, 전체 시료에 1X DNaseI (Roche Diagnostics Corporation, U.S.A), 1X Protease Inhibitor (Protease Inhibitor Cocktail Set I, Calbiochem, Germany)를 첨가하였다. Sonicator (Sonopuls, Germany)로 전체 시료속 해마조직을 세분하였다. Ultrasoner는 10초간 30% Cycle로 20% Power로 맞추어서 수행하였다. 전체 시료를 Ultracentrifuge (Beckman Instruments Inc. U.S.A.)에서 55,000rpm으로 1시간 원심분리시키고 상층액을 조심스럽게 분리하였다.

상층액 5 $\mu$ l에 증류수를 45 $\mu$ l 넣어서 50 $\mu$ l를 만든 후 이 중 5 $\mu$ l, Bio-Rad Protein Assay 시약 (Bio-Rad Laboratories, Inc. U.S.A) 200 $\mu$ l, 증류수 795 $\mu$ l 넣고 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 Spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc. U.S.A.)를 이용하여 595nm에서 측정하고 해마조직 단백질 농도를 2.5 $\mu$ g/ml로 조정하였다. 1.5 $\mu$ g의 정량한 해마조직 단백질을 600 $\mu$ l의 Sample Buffer에 첨가한 시료를 준비하고 Bio-Lyte Ampolite (Bio-Rad Laboratories, Inc. U.S.A) 12 $\mu$ l를 시료에 첨가하였다. 전체 시료를 잘 섞고 원심분리기로 이물질들을 가라 앉히고 상층액만을 분리하였다.

Rehydration Tray (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)에 분리한 상층액 600 $\mu$ l를 넣고, 24 cm의 pH 3-10 Non-linear Immobilized pH Gradient IPG Strip (Bio-Rad Laboratories, Inc. U.S.A.)을 공기방울이 생기지 않게 설치하고 Mineral Oil (Drystrip Cover Fluid, Pharmacia Biotech, Sweden)로 Strip을 덮은 후 24 시간 실온에서 보관하여 재수화시켰다.

### 3) 이차원 전기영동 (two-dimensional electrophoresis (2-DE))

재수화된 IPG Strip은 Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 100V에서 1시간, 300V에서 1시간, 600V에서 1시간 1000V에서 1시간 2000V에서 1시간 3000V에서 22시간 처리하여 등전화 (Isoelectric Focusing : IEF)

시켰다. IEF후에 IPG Strip은 3.6g의 Urea, 2% SDS, 5 M Tris 2 ml, 50% glycerol 4 ml, 25% Acrylamide 1 ml, 200 mM TBP 250  $\mu$ l가 함유된 동질 완충액으로 처리하여 교반기(Twist Shaker TW3, Finepcr, KOREA)에서 1.5 Speed로 20분간 동질화 (Equilibration)시켰다.

Acrylamide (Amresco Inc. Ohio, U.S.A) 200ml, 1.5M Tris-HCl (pH 8.8) 150ml, 증류수 237ml, 10% SDS (Amresco Inc. Ohio, USA) 6ml, 10% APS (Amresco Inc. Ohio, USA) 6ml, 10% TEMED (Amresco Inc. Ohio, USA) 6ml를 혼합하여 Gel Caster (Ettan DALT six Electrophoresis Unit Gel Caster, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 주형하고 16시간 방치하여 6장의 10% Homogeneous Gel (24cm $\times$ 24cm $\times$ 1.5mm)을 제작하였다.

동질화가 끝난 IPG Strip을 완성된 Homogeneous Gel위에 Embedding시키고 0.5% Agarose, 0.001% Bromophenol Blue dye가 함유된 Agarose 완충액 2ml로 IPG Strip을 덮은 후 50mM Glycine, 23.8mM Tris, 0.2% SDS에 증류수 4 l로 맞춘 Cathode Running Buffer를 첨가한 이차전기 영동기 (Ettan DALT six Electrophoresis Unit, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 전기영동을 시행하였다.

### 4) Colloidal Stain (Coomassie G250)

17% Ammonium Sulfate (Amresco Inc. Ohio, U.S.A.), 3% Phosphoric Acid (덕산, Korea), 0.1% Coomassie G-250 (Amresco Inc. Ohio, USA), 34% Methanol(TEDIA Company, Inc. Ohio, U.S.A), 증류수 980ml에 Gel을 넣고 교반기 (Green Sseriker, Sangwoo, KOREA)를 이용하여 30rpm의 회전으로 24 시간 염색하였다. 염색액을 제거하고 증류수를 충분히 첨가하여 35rpm으로 교반기 (상우, KOREA)에서 6시간 방치한 후 증류수를 교체해주는 과정을 3회 반복하여 세척하였다.

### 5) 프로티옴 지도의 비교 분석

염색이 끝난 후 이차원 전기영동 젤을 탈색과정을 거치지 않고 스캐너 (PowerLook 1100, UMAX, Taiwan)를 이용하여 스캐닝한 후 데이터화하였다. ImageMaster 2D (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 사용하여 protein spot을 양적으로 측정하여 각 군의 프로티옴 지도를 얻었다.

### 6) MALDI-MS 분석

ImageMaster 2D (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 이미지 분석을 하여 의미 있게 증가하거나 감소, 없어지거나 새로 생긴 protein spot을 찾아낸 후 젤을 잘라내어 effendorf tube에 옮겼다. 50mM의 Ammonium Bicarbonate (Sigma-Aldrich, U.S.A.)와 Acetonitrile (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 3:2로 혼합한 용액 50 $\mu$ l를 넣어서 섞었다. 20분 실온에서 방치한 후 gel 조각의 염색이 제거된 것을 확인하고 용액을 제거하였다. 탈수하기 위하여 50 $\mu$ l의 Acetonitrile (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 더하고 5분간 실온에서 방치하였다. Acetonitrile (Sigma-Aldrich, U.S.A.)을 제거하고 gel을 말린 후 100-400 ng/ $\mu$ l의 Trypsin (Promega, Madison, U.S.A.)을 넣고 20 $\mu$ l 25mM Ammonium Bicarbonate (Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 넣은 다음 37℃에서 16 시간 펩타이드를 추출해냈다. 펩타이드가 추출된 상층액을

다른 tube 에 옮기고 gel 조각에 50 mM Ammonium Bicarbonate (Sigma-Aldrich, U.S.A.)와 100% Acetonitrile (Sigma-Aldrich, U.S.A.)로 반복하여 α-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid (Sigma-Aldrich, U.S.A.)가 포함된 50% Acetonitrile/0.1% Trifluoroacetic Acid (Sigma-Aldrich, U.S.A.)와 잘 섞어 MALDI 펩타이드를 추출해낸 다음 다른 튜브에 옮겨 놓았던 펩타이드 추출 용액과 합치고 SpeedVac Concentrator (Thermo Savant, Holbrook, U.S.A.)을 이용하여 10 $\mu$ l 정도 남을 때까지 건조 시켰다. 이렇게 추출한 펩타이드는 PerSeptive Biosystems MALDI-TOF Voyager DE-STR Mass Spectrometer (Framingham, U.S.A.)에서 loading 하고 펩타이드 스펙트라를 얻었다. 이를 Peptident (<http://www.expasy.org/tools/peptident.html>) 나 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>) 과 같은 데이터베이스를 검색하여 단백질동정을 시행하였다.

8) 통계분석

모든 통계분석은 SPSS 11.0을 이용하여 시행하였다. 강제유영검사에서 측정된 부동시간은 일원분산분석 및 Dunnett t (2-sided)a 사후검정을 이용하여 분석하였다. CMS 자극 및 약물 투여에 따른 자당섭취량, 체중 변화, 개방장에서의 활동수준, 교미행동은 일원분산분석 및 Dunnett T3 사후검정을 이용하여 분석하였다. 분석결과는 Peptident (<http://www.expasy.org/tools/peptident.html>) 및 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>) 등의 데이터베이스를 검색하여 단백질동정을 시행하였다.

결 과

1. 강제 유영 검사 (Forced Swimming Test , FST)

강제유영검사 결과를 일원변량분석법으로 분석해보면 무활동 시간의 경우 약물의 단기효과를 검증한 1차 평가에 있어 [F(4,80)=3.092, p=0.020]이었으며, 장기효과를 검증한 2차 평가에 있어[F(4, 79)=2.718, p<0.035]로 나타나 집단간에 유의한 차이가 나타났다. 집단간의 차이를 구체적으로 분석하기 위하여 Dunnett t (2-sided)a를 이용한 사후검정 결과 연자육 투여군의 무활동 시간이 대조군에 비해 1차 평가 (Sig. 0.046)와 2차 평가 (Sig. 0.010) 모두 유의성있게 짧았다. (Fig. 4)

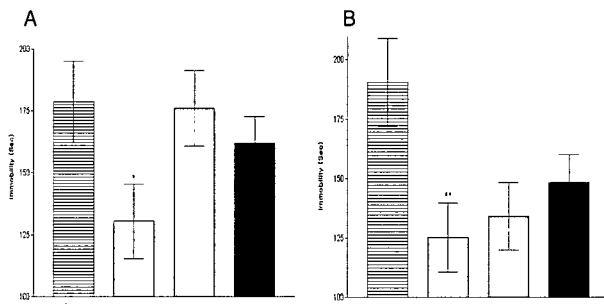


Fig. 4. Immobility time in the forced swimming test. Immobility was measured during the first 5 min of swimming. A. represent the immobility time on the first day. B. show the duration of immobility on the 7th day. Results are expressed as mean±S.E.M. \*, P<0.05 compared to control. \*\*, P<0.01 compared to control

2. 저강도 스트레스 반복자극(Chronic mild stress, CMS) 후 행동 평가

1) 체중의 변화

CMS 처치 및 검액의 투여가 체중에 미치는 영향을 알아보 고자, 실험이 진행된 전체 9주에 대하여 일원변량분석을 실시하였다. 실험 개시시점에는 실험군 및 대조군간에 유의한 체중차이가 발견되지 않았다. [F(4,99)=1.182, P=0.324] CMS 처치 1주째부터 CMS 처치를 받지 않은 군과 받지 않은 군 사이에 유의성있는 차이[F(4,99)=40.060, P<0.001] 가 나타나기 시작하여, 약물 투여 직전인 실험 5주째[F(4,99)=132.295, P=0.324]에 가장 심한 차이를 나타냈다. (Fig. 5, Table 2) CMS 처치군에 있어서는 측정 시점에 따라서 유의성있는 체중차이가 나타나기도 하였으나 음용수 투여군의 체중이 가장 많이 증가하는등 일관된 실험결과가 나타나 지 않았다.

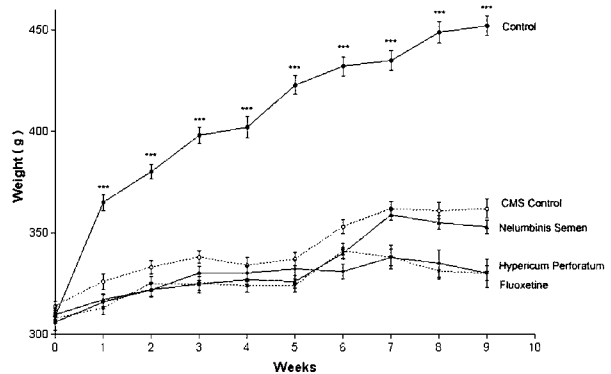


Fig. 5. Comparison of body weight among the four groups. Chronic mild stress caused a significant reduction in weight gain of rats. \*\*\*, P<0.001 compared to CMS control.

Table 2. The Changes of Body Weight

Group	OWK	1WK	2WK	3WK	4WK	5WK	6WK	7WK	8WK	9WK	
Nelumbinis Semen	Mean	309.7	317.0	321.7	325.0	327.0	326.0	340.0	358.8	354.6	352.9
	S.E.M.	2.6	3.1	3.7	4.6	3.2	3.1	2.7	2.8	3.5	3.3
	N	15	15	15	15	15	15	15	12	12	12
Sig.											
Fluoxetine	Mean	306.0	315.7	322.0	329.7	329.7	332.0	331.0	338.0	334.6	328.6
	S.E.M.	3.8	3.5	3.2	3.4	3.7	4.5	3.6	6.0	6.7	6.9
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	14	14
Sig.											
Hypericum Perforatum	Mean	308.0	313.4	325.2	325.4	323.8	324.2	341.4	337.6	330.8	329.8
	S.E.M.	2.7	3.3	3.5	3.4	3.1	3.1	3.9	4.1	3.7	3.7
	N	25	25	25	25	25	25	25	25	25	24
Sig.											
CMS Control	Mean	314.0	326.8	333.5	337.5	333.5	337.0	353.2	362.3	360.5	362.3
	S.E.M.	2.2	3.8	3.2	3.1	3.823	3.3	3.5	3.6	3.9	4.7
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Sig.											
Control	Mean	308.6	364.6	379.6	398.4	402.6	422.8	432.0	434.8	449.4	452.2
	S.E.M.	2.0	3.8	3.7	4.1	5.4	4.7	4.7	4.7	5.3	5.0
	N	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Sig.											

\*\*\*, P<0.001 compared to CMS control.

2) 자당섭취량의 변화

CMS 처치 및 검액의 투여가 자당섭취량에 미치는 영향을

알아보고자, 9주간 매주 한번씩 측정된 자당섭취량을 이원변량 분석하였다. 분석결과, 각 군간의 자당 섭취량의 차이 및 시간에 따른 자당섭취량의 차이 모두 유의한 차이를 나타내지 않았다. (Fig. 6, Table 3) 단위 체중에 대한 자당섭취량의 차이 역시 발견되지 않았다.(Data 생략) 통계적인 유의성은 없었으나 연자육 투여군과 Hypericum Perforatum 투여군에서 대조군에 비해 자당 섭취량이 높게 나타났다.

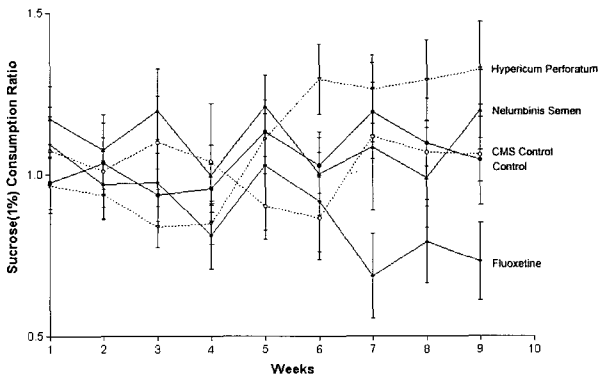


Fig. 6. Intake for 1% sucrose solution measured in rats in a 1h test from 1400h following 20 h of water and food deprivation. The values are means±S.E.M. There was no effect of stress on 1% sucrose intake.

Table 3. Comparison of 1% Sucrose Solution Consumption Measured in Rats.

Group	OWK	1WK	2WK	3WK	4WK	5WK	6WK	7WK	8WK	9WK	
Nelumbinis Semen	Mean	9.05	10.05	9.19	10.11	8.57	10.47	8.73	9.37	8.10	9.93
	S.E.M.	0.71	0.70	0.74	0.80	0.76	0.87	1.29	1.19	1.21	0.93
	N	15	15	15	15	15	15	15	12	12	12
Fluoxetine	Mean	10.97	11.05	10.13	9.27	7.95	9.40	8.77	6.50	7.56	7.23
	S.E.M.	1.06	0.87	0.79	0.65	0.89	0.97	1.06	1.00	1.06	0.95
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	14	14
Hypericum Perforatum	Mean	10.34	9.59	9.24	8.34	8.33	10.96	12.54	12.63	12.60	12.82
	S.E.M.	0.48	0.75	0.60	0.59	0.52	0.65	0.63	0.99	0.85	1.23
	N	25	25	25	25	25	25	25	25	25	24
CMS Control	Mean	10.83	10.38	9.33	10.13	9.19	9.26	8.05	9.61	10.03	9.95
	S.E.M.	0.82	0.58	0.77	0.49	0.52	0.87	0.77	0.86	0.76	0.61
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Control	Mean	11.71	11.46	11.90	10.86	10.85	12.87	11.69	13.22	12.65	12.41
	S.E.M.	0.60	1.14	1.03	1.04	0.79	0.73	1.01	0.71	0.88	1.01
	N	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

Intake for 1% sucrose solution measured in rats in a 1h test from 1400h following 20 h of water and food deprivation. The values are means±S.E.M. There was no effect of stress on 1% sucrose intake.

3) 개방장에서의 활동수준 비교

개방장에서 측정된 4가지 행동 유형, 즉 보행활동, 출발 잠재기, 일어서기, 몸치장행동에 대해 일원변량분석을 실시한 결과, 몸치장행동 [F(4,35)=2.771, p=0.042]에서 유의한 집단간 차이가 발견되었다. 보행활동 [F(4,35)=35, p=0.321], 출발잠재기 [F(4,35)=1.198, p=0.329], 일어서기 [F(4,35)=0.400, p=0.807]에서는 집단간 차이가 나타나지 않았다.

몸치장행동에 있어 집단간의 차이를 구체적으로 분석하기 위하여 Dunnett T3를 이용한 사후검정 결과 fluoxetine 투여군이 CMS control군에 비해 몸치장 행동이 유의성(Sig. 0.005)있게 증가하였으나, Control군에 비해 유의성(Sig. 0.783)있는 차이를 나

타내지는 않았다. (Table 4)

Table 4. Open Field Activity of Rats.

Group		Total distance (cm)	Start latency (Sec)	Rearing	Grooming
Nelumbinis Semen	Mean	10080	10.08	52.38	6.00
	S.E.M.	191	2.44	5.00	1.20
	N	15	15	15	15
Fluoxetine	Mean	10026	12.18	58.12	8.88 *
	S.E.M.	310	4.01	5.49	0.67
	N	15	15	15	15
Hypericum Perforatum	Mean	10646	17.57	59.88	5.88
	S.E.M.	153	5.98	3.33	1.08
	N	25	25	25	25
CMS Control	Mean	10768	10.80	57.75	4.25
	S.E.M.	237	2.95	4.09	0.90
	N	20	20	20	20
Control	Mean	10216	6.55	55.25	6.88
	S.E.M.	506	.70	4.84	1.22
	N	25	25	25	25

\* P<0.05 compared to CMS control.

4) 교미행동(sexual behavior)에 미치는 영향

측정된 8가지 교미행동, 즉 교미시도회수 (mounting number), 교미시도시간 (mounting latency), 삽입회수(intromission number), 삽입시간 (intromission latency), 사정회수 (ejaculation number), 사정시간 (ejaculation number latency), 회복시간 (refractory period)에 대해 일원변량 분석을 실시한 결과 사정회수와 회복시간에서 유의한 집단간의 차이가 발견되었다.

사정회수와 회복시간에 있어 집단간의 차이를 구체적으로 분석하기 위하여 LSD를 이용한 사후검정결과 hypericum perforatum 투여군, fluoxetine 투여군, CMS 대조군 모두 정상군에 비해 유의성있는 사정회수 감소가 발견되었으며, 회복시간에 있어서도 fluoxetine 투여군과 CMS 대조군이 정상군에 비해 유의성있는 회복시간 지연이 관찰되었다. (Fig. 7, Fig. 8, Table 5)

반면, 연자육투여군의 경우 사정회수 및 회복시간에 있어 정상군과 유의성있는 차이를 나타내지 않았다.

Table 5. Sexual Effects of Antidepressant in Rats.

	Nelumbinis Semen	Fluoxetine	Hypericum Perforatum	CMS Control	Control
Mounting Number	19.50 ± 4.61	29.67 ± 4.67	24.63 ± 7.25	20.25 ± 3.64	25.29 ± 4.94
Mounting Latency	1.61 ± 1.12	1.32 ± 0.41	2.26 ± 1.37	2.35 ± 1.59	0.97 ± 0.43
Intromission Number	13.17 ± 3.72	24.50 ± 4.63	15.38 ± 5.18	10.63 ± 3.82	15.43 ± 3.08
Intromission Latency	7.23 ± 4.74	2.18 ± 0.59	12.32 ± 5.18	6.81 ± 2.79	1.31 ± 0.52
Intromission Ratio	13.74 ± 3.81	25.29 ± 4.69	19.55 ± 5.01	11.06 ± 3.90	16.03 ± 3.14
Ejaculation Number	1.83 ± 1.22	0.83 ± 0.40*	1.00 ± 0.42*	0.75 ± 0.49*	3.43 ± 0.92
Ejaculation Latency	21.25 ± 4.01	20.19 ± 4.47	22.96 ± 3.09	26.28 ± 2.09	15.12 ± 2.90
Post Ejaculatory Interval	17.22 ± 5.79	21.94 ± 5.10*	17.32 ± 4.81	23.19 ± 4.46*	7.67 ± 3.79

\* P<0.05 compared to Control.

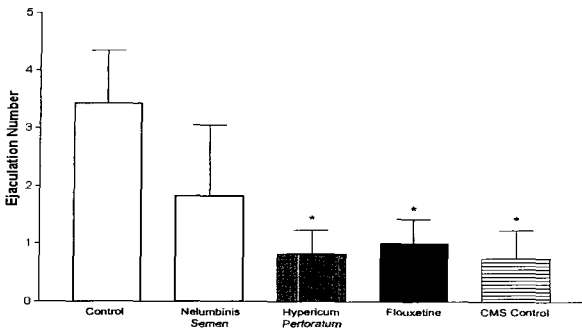


Fig. 7. The number of ejaculation recorded in different groups of rats. The values are expressed as mean±S.E.M. \*, P<0.05 compared to Control.

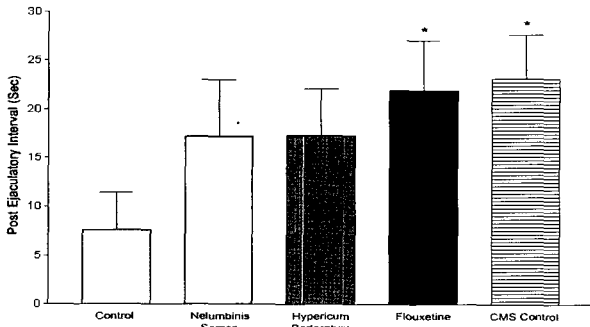


Fig. 8. The postejaculatory interval recorded in different groups of rats. The values are expressed as mean±S.E.M. \*, P<0.05 compared to Control.

3. 프로티오믹스 분석 결과

강제유영실험 종료 후 흰쥐의 뇌에서 적출 한 해마를 이용하여 이차원 전기영동을 시행한후 ImageMaster 2D (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 분석하였다. (Fig. 9-11)

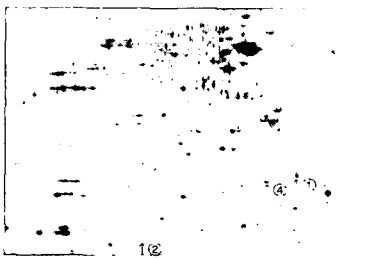


Fig. 9. Two-dimensional gel pattern of proteins from the rat hippocampus of control group.

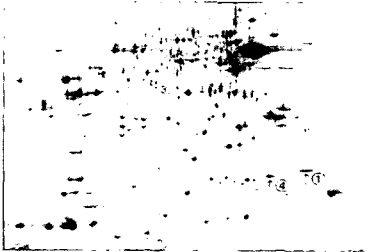


Fig. 10. Two-dimensional gel pattern of proteins from the rat hippocampus of Nelumbinis Semen group.

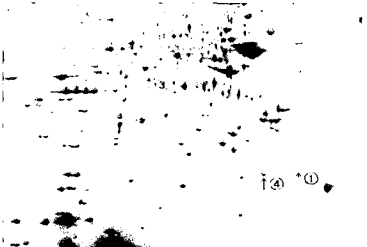


Fig. 11. Two-dimensional gel pattern of proteins from the rat hippocampus of Fluoxetine group.

MOWSE Score가 높으며 Rat에 존재하는 단백질을 분석한 결과 Adenylosuccinate synthetase (Spot 1.), Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver (Spot 2.), Mitogen-activated protein kinase 1 (Spot 3.), Aldehyde dehydrogenase class 1. (Spot 4.) 등 4개 Spot이 대조군에 비해 의미있게 증가 또는 감소하였다.(Fig. 12-15, Table 7, Table 9, Table 11, Table 13) 이들 단백질중 Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver (Spot 2.) , Mitogen-activated protein kinase 1 (Spot 3.)는 연자육 투여군과 fluoxetine 투여군에서 모두 대조군에 비해 증가하였으며, Adenylosuccinate synthetase (Spot 1.), Aldehyde dehydrogenase class 1. (Spot 4.)는 연자육 투여군에서는 대조군에 비해 증가하였으나 fluoxetine 투여군에서는 대조군에 비하여 감소하였다.

Table 6. Proteins Identified in the Rat Hippocampus Spot 1.

Protein Name	MOWSE Score	MW/pl
Adenylosuccinate synthetase, muscle isozyme	1.21E+04	50255/8.6
DNA primase large subunit	6639	58603/8.6
Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4	5907	74328/8.3
T-box transcription factor TBX6	5235	58629/9.1
Poliovirus receptor related protein 1 precursor	5142	57065/6.1

Table 7. Detail Comparison of Candidate Protein in spot 1

	Mean ± S.E.M (normal volume)	Ratio
Nelumbinis Semen	0.2070 ± 0.0632	1.6
Fluoxetine	0.0317 ± 0.0117	0.25
Control	0.1290 ± 0.0403	1

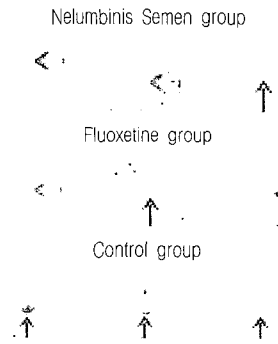


Fig. 12. Detail comparison of Spot 1 in 2-DE gels from rat hippocampus

Table 8. Proteins Identified in the Rat Hippocampus Spot 2.

Protein Name	MOWSE Score	MW/pl
Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver	3.145e+04	12301/9.3
C-Rel proto-oncogene protein	1.044e+04	64961/6.1
Rab11 interacting protein Rip11	4438	69553/9.2
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	3978	87597/8.6
DNA-binding protein RFX2	3947	76534/6.4

Table 9. Detail Comparison of Candidate Protein in spot 2

	Mean ± S.E.M (normal volume)	Ratio
Nelumbinis Semen	0.1660 ± 0.0632	2.21
Fluoxetine	0.1230 ± 0.0253	1.64
Control	0.0750 ± 0.0155	1

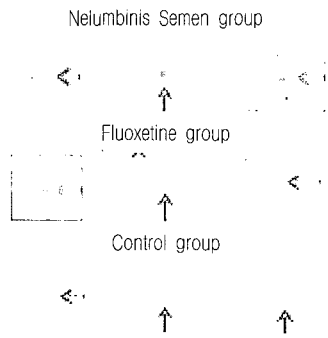


Fig. 13. Detail comparison of Spot 2 in 2-DE gels from rat hippocampus

Table 10. Proteins Identified in the Rat Hippocampus Spot 3.

Protein Name	MOWSE Score	MW/pI
Mitogen-activated protein kinase 1	2.312e+10	41276/6.5
Muskelin	5.463e+06	84835/5.9
Fructose-bisphosphate aldolase C	3.257e+06	39284/6.7
Osmotic stress protein 94	2.384e+06	94383/5.5

Table 11. Detail Comparison of Candidate Protein in spot 3

	Mean ± S.E.M (normal volume)	Ratio
Nelumbinis Semen	0.0880 ± 0.0260	1.78
Fluoxetine	0.0117 ± 0.0472	2.37
Control	0.0493 ± 0.0194	1

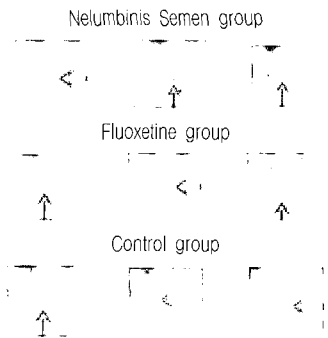


Fig. 14. Detail comparison of Spot 3 in 2-DE gels from rat hippocampus

Table 12. Proteins Identified in the Rat Hippocampus Spot 4.

Protein Name	MOWSE Score	MW/pI
Aldenhyde dehydrogenase 1A1	1046	54450/7.9
DNA-directed RNA polymerases III	253	79855/6.0
Alkaline phosphatase, intestinal 1 precursor	183	58403/5.6
TNF receptor associated factor 5	70.9	64146/7.7

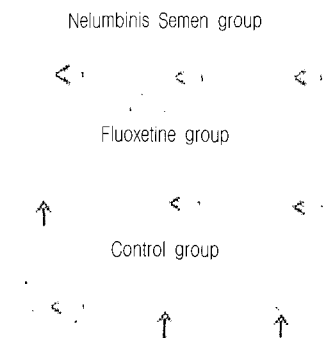


Fig. 15. Detail comparison of Spot 4 in 2-DE gels from rat hippocampus

Table 13. Detail Comparison of Candidate Protein in spot 4

	Mean ± S.E.M (normal volume)	Ratio
Nelumbinis Semen	0.1720 ± 0.0370	1.19
Fluoxetine	0.0317 ± 0.0117	0.63
Control	0.1440 ± 0.0145	1

## 고찰

사회가 복잡해지면 스트레스로 인한 정신적 불안 상태가 증가한다. 스트레스를 감당하지 못하였을 때 여러 가지 부정적인 반응들이 나타나며, 우울 역시 심리적인 반응의 하나로 스트레스에 처한 개인이 심리적인 안정을 지키려는 방어에 실패하게 되면 우울감을 갖게된다.<sup>13)</sup> 이렇듯 우울이란 인간의 감정 중에서 지극히 정상적인 부분으로, 울적하거나 침체된 기분과 같은 정상적인 범주에서부터 구체적인 치료를 요하는 우울증에 이르기까지 연속적인 범주를 갖는다.<sup>13)</sup>

정신장애의 진단 및 통계편람 제4판 (DSM-IV)의 진단기준에 의하면, 우울증은 최소 2주 이상 기분의 저하가 지속되는 것이 주 증상인 경우로, 우울하고 슬픈 느낌과 함께 흥미 감소, 무쾌감증, 집중력 저하, 주의력 및 사고력 저하, 기억력 장애, 인지장애 등의 기분증상과 식욕저하, 불면, 변비, 성욕감퇴 등 다양한 신체증상을 복합적으로 나타내는 질환이다.<sup>14)</sup>

우울증은 평생 유병율이 여자는 10-25%, 남자는 5-12%에 이르는 것으로 알려져 있다. 우울증 환자 중 50-60%가 재발하며, 환자의 15%정도가 자살을 하는 심각한 정신질환이다.<sup>14)</sup>

지금까지 서양의학에서는 우울증을 치료하기 위해 많은 약물들이 개발되어 왔다. 1960년대부터 치료약으로 사용된 MAO 억제제 (MAOI; Monoamine oxidase inhibitors)는 심장병유발이라는 심각한 부작용이 있기 때문에 점차로 그 사용이 감소하고 있고, 삼환계 항우울제 (TCA; Tricyclic antidepressant) 역시 여러 가지 부작용으로 항우울제 시장에서 차지하는 비중이 감소하였다. 임상에서는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(SSRI; Selective serotonin reuptake inhibitor) 약물인 fluoxetine (상품명: Prozac, Seroxat, Zoloft)이 항우울제의 주종을 이루고 있다. 최근 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제 (SNaRI, Serotonin norepinephrine reuptake inhibitor)가 개발되어 사용되고 있으나, 삼환계 항우울제나 선택적 세로토닌 재흡수 차단제는 물론이고 새로 개발된 약제인 세로토닌-노르에피네프린 차단제들은 모두 세로토닌의 재흡수를 담당하는 세로토닌 수송단백질에 작용하여 세로토닌 재흡수를 차단함으로써 항우울작용을 나타내므로 불면, 오심, 초조, 어지러움 등의 급단 증상이 발생할 수 있고, 부작용으로서 세로토닌 활성화와 관련된 위장관련 부작용(오심, 구토, 설사, 복통 등)과 신경과민, 체중증가, 성기능 장애 등이 나타나기도 한다.<sup>15)</sup> 이런 부작용들을 개선하고자 1994년에 NaSSA (Noradrenergic and Specific Serotonergic Antidepressant) 계열의 항우울제가 개발되었으며 성기능 저하 및 불안 초조 등의 부작용이 감소한 반면에 항우울효과가 떨어지는 단점이 있다.<sup>16)</sup>

최근에는 천연물을 이용한 항우울제 개발을 위해 많은 연구가 이루어지고 있다. 이 중 약 2000년 전부터 상처치유 등에 널리



사용되어 온 Hypericum Perforatum이라는 식물에서 추출한 St. John's Wort 약품이 기존 항우울 약물을 대체할수 있는 효과를 가지고 있으면서도 부작용이 적음이 밝혀지면서 환자를 대상으로 한 대규모 Cohorts연구가 이루어지고 있다.<sup>17)</sup>

한의학에서는 인간의 감정인 칠정을 질병을 일으키는 중요한 원인의 하나로 보았다. 內經에서 “우울 공포 슬픔 기쁨 성냄이 모두 사람에게 큰 병을 일으킨다”고 한 이래 갑작스럽고 강렬한 정지의 변화나, 반복되는 정지자극이 오래동안 지속될 경우 인체의 氣를 문란케 하고 臟腑陰陽氣血을 실조케 하여 질병을 발생시킨다.<sup>1)</sup>

서양의학의 우울증과 유사한 한의학적 진단명은 鬱證으로, 鬱이란 억울되고 침울한 정신 상태로 인하여 모든 생리기능이 침체되는 현상으로 발산시킬 수 없는 욕구불만이나 지속되는 憂愁, 지나친 思慮나 悲嘆 등 칠정이 주요한 발병원인이다.<sup>18)</sup>

鬱에 대해서는 內經에서부터 언급이 있었는데, 鬱을 “結하여 퍼지지 못한것”으로 “抑하게 되면 鬱이 생기며” “오래되거나 伏하면 鬱로 변화된다”라고 하여, 鬱證을 氣血이 정상적으로 소통이 되지 않고 舒暢, 通達되지 못한 상태로 과악하였다.<sup>2)</sup> 七情의 이상은 氣의 원활한 운행에 장애를 유발하여 鬱證을 발생시키게 되는데, 內經에서는 怒喜思憂恐 등 情志의 變化로부터 鬱에 이르는 病理에 대해 언급하였고, 喜傷心 怒傷肝 思傷脾 憂傷肺 恐傷腎한다고 하여 감정으로 인해 오장까지 손상이 됨을 설명하였다.<sup>2)</sup>

후세의 醫家들은 대부분 內經을 따르고 있는데, 金元四大家의 하나인 丹溪는 모든 질병의 생성이 氣血의 鬱滯로 말미암는다고 하였으며, 六淫七情 등 내외의 병인으로 熱鬱 痰鬱 血鬱 食鬱 濕鬱 氣鬱 등 六鬱이 나타나며, 六鬱이 임상의 여섯 가지 주요 유형이라고 파악하였다.<sup>19)</sup> 明代의 景岳은 怒鬱, 思鬱, 憂鬱 등 情志의 鬱이 모두 心에서 부터 病이 강조하였으며, 五運과 관련된 木火土金水の 五鬱이 아닌 肝心脾肺腎의 五鬱을 강조하였다.<sup>20)</sup> 清代의 葉天士는 슬퍼우는 것은 감정이 안에서 일어나서 생긴 병이며, 병이 鬱에서 생겼다고 하였으며, 또한 情志가 鬱했을때 나타나는 임상증례를 상세하게 다룸으로써 鬱證과 우울증의 관련성을 확고히 하였다.<sup>21)</sup>

臟腑와 관련하여 心은 七情을 통솔하고 발현시키는 역할을 한다. 心은 神을 藏하고, 血을 生하며, 汗을 主하므로 心이 傷하면 神을 傷하고 血을 生하지 못하여 血이 적어지므로 건망증과, 경계증이 나타나고, 心의 液인 汗이 出하여 盜汗하게 된다. 또 脾는 思를 主하고, 血을 統하며, 肌肉을 主하고, 運化하므로 脾를 傷하면 생각이 원활치 못하고, 營血이 歸經하지 못하므로 불면증이 나타나게 되며, 기육이 마르고, 열이 나며, 사지에 힘이 빠지고, 運化 障礙가 나타나 소화장애가 나타나며 음식섭취량이 감소하게 된다.<sup>22)</sup>

血은 脾氣에 의해 운화되어진 수곡의 정미로부터 생성되며, 脾氣가 實하게 되면 血의 근원이 풍부해져서 心血도 충분해지지만, 脾氣가 虛하여 운화기능이 실조된 경우에는 血의 근원이 부족해지고 심해지면 心血虛를 초래하게 된다. 반면 脾의 운화기능은 心血에 의해 자양을 받고 心陽의 추동에 의지하므로 心神의 영향하에 정상적인 기능이 발휘되어지기 때문에, 만약 心虛할 경

우에는 그 影響이 脾에 과급됨으로써 운화기능의 실조가 발생한다.<sup>22)</sup> 七情 중 공포감정은 腎이 주관하며 그 氣를 怯하게 하므로 腎精이 상승하지 못하고 상하가 교통하지 못하게 되어 氣가 下하게 된다. 恐情은 침정상태로 관찰되며 불이 아래로 떨어지는 것과 같이 심기가 하락하는 모습을 보인다. 행동적인 면에서는 앉으나 서나 불안하며, 혈기가 안으로 응체되며, 안색이 창백해지고, 대소변의 실금증 등이 나타난다.<sup>23)</sup>

恐情에 대하여 동의보감 내경편을 보면, 腎에 志가 있어서 무서움이 생기며, 胃에서도 무서움이 생긴다고 하였다. 족소음경맥이 병들면 잘 무서워하며, 무서움이 풀리지 않으면 精을 상한다. 두려워하고 걱정하며 지나치게 생각하면 腎이 상하며 겨울에 죽는다고 하였다. 또 무서운 일을 당한 것이 풀리지 않으면 精氣를 상하며, 뼈가 시큰거리고 痿厥이 되며 정액이 가끔 저절로 나온다고 하여,<sup>24)</sup> 恐情은 신기능을 저하시키며 성기능을 저하시킴을 강조하고 있다.

鬱證을 변증하면 초기에는 인체가 실하여 기체와 담음, 식적, 어혈 등이 함께 발병하여 대부분이 실증의 양상을 보이나, 시간이 경과하면 心, 脾, 腎이 傷하고 血氣가 손상되어 虛證으로 변하게 된다.<sup>25)</sup>

우울증이 心, 脾, 腎과 관련됨에 기인하여 우울증에 효과적인 것으로 예상 되는 구기자, 산수유, 숙지황, 산약, 연자육을 선정하여, 모리스수중미로(Morris water maze)를 이용 예비실험을 실시한 결과 연자육 투여군이 생존예의 욕구를 나타내는 Struggling time에 있어 유의성있는 증가를 보여 본 연구에 사용하게 되었다. (Data 생략)

연자육은 수련과에 속한 다년생 수생식물인 연꽃 (Nelumbo nucifera Gaertn) 의 성숙된 종자를 건조한 것으로, 성미가 甘澁하고 心脾腎經에 귀경한다. 腎經으로 들어가 益腎 固精시키며, 心經을 들어가 養心 安神시키며 脾經으로 들어가 補脾 止瀉시키는 효과가 있어 심계 정충 등 불안증, 유정 몽정 대하 등 腎精이 손상되어 나타날 수 있는 생식기계 이상, 脾虛로 나타나는 소화기 증상 등 우울증 및 울증과 관련된 증상을 개선시킬수 있는 약재이다.<sup>11)</sup> 대조군으로 사용된 선택적 세로토닌 재흡수 억제제 (SSRI; Selective serotonin reuptake inhibitor) 약물인 fluoxetine은 미국에서 SSRI계통으로 개발된 첫 번째 항우울제로 공인되어 사용되고 있다. 다양한 정신과 질환의 약물치료시 실제 임상에서 널리 사용되고 있는 fluoxetine은 세로토닌의 재흡수를 강력하고 선택적으로 억제함으로써 신경전달물질을 항진시키고, 연접후 수용체의 하향조절을 야기하여 항우울효과를 나타낸다고 알려져 있다.<sup>15)</sup> 2000여년 전부터 상처치유 등에 널리 사용되어 온 Hypericum Perforatum이라는 식물에서 추출한 약물은 St. John's wort라는 상품명으로 미국에서 판매되고 있으며, 우울증 치료제인 imipramine 과 같은 정도의 효과가 있으며, 부작용은 더 적음이 보고되는 등<sup>17)</sup> 최근 가장 활발하게 연구되고 있는 천연물 추출물 중 하나이다.

실험동물을 이용한 우울증 연구를 위해 저강도 스트레스 반복자극Chronic mild stress(CMS), 꼬리메달기(Tail suspension), 강제유영검사 (Forced swimming test, FST) 등을 이용한 다양한

우울증 동물 모델이 개발되었다.<sup>3)</sup> 이들 중 Tail suspension, 강제 수영검사 등은 강제수영, 구급, 메달기 등 강한 강도의 자극을 주어 우울증을 유발시키는 방법이며, 저강도 스트레스 반복자극 등은 경미한 강도의 반복적인 스트레스를 이용하는 방법이다.<sup>4)</sup> 우울증은 전술한 바와 같이 강렬한 정지의 변화, 또는 반복되는 정지자극이 오래동안 지속될 경우 유발될 수 있으므로, 본 연구에서는 강한 강도의 자극을 주는 강제유영검사와 경미한 강도의 반복적인 스트레스를 주는 CMS를 모두 이용하여 연구를 진행하였다. 강제유영검사는 동물을 강제로 물에 빠뜨려 극심한 공포심을 유발시켜 우울을 유발시키는 방법이다. 강제유영검사에서는 수영(swimming), 기어오르기(climbing), 무활동(immobility)의 횟수 및 시간을 측정한다. 이중 무활동 지표가 우울증의 정도를 평가하는데 중요하게 이용된다. 무활동이란 동물이 물에 빠지지 않기 위해서 자세를 유지하는 행동 외에 다른 행동이 나타나지 않는 것으로, 이는 물에 빠진 동물이 물에서 벗어나기 위한 시도를 포기했음을 의미하며 우울증의 한 행동유형으로 간주된다.<sup>26)</sup> 그러므로 강제유영검사에서 동물이 무활동을 많이 보인다는 것은 우울성향이 높은 것으로, 수영이나 기어오르기와 같은 활동성 유영이 많이 나타나면 우울 성향이 낮은 것으로 해석된다.

본 연구에서 연자육 투여군이 2차에 걸친 강제유영실험 결과에 있어 모두 유의성있는 결과를 나타내었다. 연자육을 1일간 투여한 1차실험에 비해 7일간 투여한 2차실험의 유의성이 높게 나온 것은 장기투여시 더 좋은 효과를 낼수 있음을 보여주고 있다. 지속적이고도 경미한 스트레스(Chronic mild stress, CMS)를 이용한 동물 모델은 동물에게 물·먹이 박탈이나, 사육상자에서의 파트너 교체, 소음과 현란한 조명의 제시 등, 여러 가지 예측할 수 없는 다양한 자극들을 계속해서 경미한 스트레스를 장기간 받게하여 우울증에 상응하는 증상을 유발시키는 방법이다.<sup>4)</sup> 흰쥐에 이와 같은 CMS를 가하면 평상시 선호하는 자당 용액에 대한 섭취량과 선호도가 점차로 감소한다는 보고가 있으며, CMS 절차를 철회하고 난 후에도 수주간 지속되는 것으로 알려져 있다. 또한 우울증의 핵심 증상인 흥미나 쾌락의 상실, 즉 무쾌감증(anhedonia)이 유발된다고 알려져 있다.<sup>6)</sup> 여러 연구자들은 CMS 처치 후의 흰쥐는 자당 섭취량의 감소 뿐만 아니라, 암페타민 등 강화자(Reinforcer)와 연합된 장소선호조건화(Place preference conditioning)의 결합, 뇌 자기-자극(brain self-stimulation)에서 강화적 뇌자극의 역치 증가 등 강화 체계의 약화가 나타난다고 하였다.<sup>27)</sup> 또한 CMS 처치는 흰쥐의 활동수준과 체중을 현저하게 줄이고, 공격 행동과 수컷의 성행동을 감소시키며, 수면상태의 변화를 가져오는 등 인간의 우울증과 관련된 여러 증상들을 나타낸다고 보고되었으나,<sup>28)</sup> 현재까지 개발된 많은 항우울제들이 CMS 처치에 따른 자당섭취량의 감소를 원래 수준으로 회복시켜 주는데 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.<sup>5)</sup> 그러나 최근에 자당섭취량이 CMS 동물의 우울증에 대한 신뢰할만한 지표가 될 수 없다는 견해가 등장하였고,<sup>6)</sup> 이로 인해 많은 연구자들이 개방장검사(Open field test)와 교미행동검사(Sexual behavior test)를 또 다른 우울행동 측정지표로 사용하고 있다.<sup>7)</sup>

본 연구에서는 CMS 동물 모델을 이용하여, 지금까지 가장

많이 연구되어 있는 자당섭취량과 체중측정은 물론 대안으로 제시된 개방장검사, 교미행동검사를 모두 우울증 측정지표로 삼았다. 체중측정결과 CMS시행 1주째부터 CMS시행군과 비 시행군 차이에는 매우 유의한 체중증가의 차이가 관찰되었다. CMS시행군의 경우 약물 투여 시점인 5주째까지 거의 체중변화가 나타나지 않고 있다. 이는 적절한 CMS자극이 가해지고 있음을 의미한다. 약물 투여 2주후 즉 CMS시행 7주 이후 연자육 투여군이 fluoxetine 투여군 및 hypericum perforatum 투여군에 비해 유의성있는 체중증가를 보였다. 약물투여 2주후 유의성있는 증가가 시작되어 시간이 경과할수록 증가의 차이가 커지고 있음이 보이며 강제유영실험에서와 같이 연자육의 효능은 장기투여시 더 잘 발휘됨을 보이고 있다. 다만 CMS 대조군과 유의성있는 차이를 보이지 못한 것은 향후 심도 있는 연구가 필요한 부분이다. CMS 모델을 이용한 자당섭취량 측정결과 통계적으로 유의성있는 차이를 나타내지는 않았으나 연자육 및 hypericum perforatum 투여군의 경우 CMS 대조군 및 정상군에 비해 자당섭취량이 높음이 관찰되었다. 연자육의 자당섭취량은 약물투여 시점인 5주 이후 큰 변화를 보이지 않다가 9주째에 크게 상승하는 모습을 보이는 것에 비해, hypericum perforatum 투여군은 투여 직후 자당섭취량의 큰 상승을 보인후 크게 변화하지 않음을 알수 있다. 연자육은 강제유영검사에서와 같이 장기적인 투여에 더 효과적이며 hypericum perforatum은 단기투여에 효과적임을 보여주고 있다. CMS 모델의 자당 섭취량은 종에 따른 편차가 있는 것으로 보고되었으며, 본 연구에 사용된 Sprague-Dawley Rat 은 자당섭취가 증가하거나 감소하는데 비교적 많은 시간이 걸리는 것으로 보고되고 있다.<sup>29)</sup> 또한 흰쥐의 CMS 모델이 주아에 따라 자당섭취량의 감소가 변화를 보인다는 것이 보고 되었다. 이 보고에 의하면 주간에는 대조군에 비해 자당섭취량이 감소하지 않고, 야간에는 자당섭취량이 감소하는 주기성을 보고하였다. 본 연구에서는 오후 2시 즉 주간에 자당섭취량을 측정하였으므로 유의성있는 자당섭취량 감소가 나타나지 않을 수 있음을 나타내는 보고이다. 향후연구에 있어 검토해야할 부분이라고 생각된다.

개방장은 여러 가지 용도로 이용될 수 있는 행동검사도구이다. 보행활동(locomotion), 일어서기(rearing), 몸치장(grooming), 출발잠재기(Start latency) 등이 주로 측정된다.<sup>30)</sup> 보행활동은 동물들이 낯선 넓은 장소에서 얼마나 많이 돌아다녔는가를 알아보기 위해서 측정하는 행동으로 불안 수준이 낮을수록 보행활동을 많이 한다.<sup>3)</sup> 출발잠재기는 동물이 낯선 넓은 장소로 나갈 때까지 소요된 시간을 측정한 것으로 불안수준이 낮을수록 출발잠재기가 짧아진다.<sup>3)</sup> CMS를 처치한 흰쥐는 개방장에서 활동저하 및 탐색활동 감소가 나타나며, 다수의 항우울제는 보행활동을 증가시키고, 앞발 들고 서는 행동을 감소시킨다고 알려져 있다.<sup>7)</sup> 약물의 효과를 입증하기 위해서는 개방장에서의 두 가지 탐색행동에 일관된 방식으로 영향을 미쳐야 인정된다. 그렇지 않을 경우에는 또 다른 가능성에 대해 의심해봐야 한다. 예를 들어 일어서기의 경우 불안의 증가로 인해 나타나지만 운동의 협동반응 이상으로도 오기 때문이다.<sup>31)</sup>

본 연구결과에서는 개방장 검사에서 측정된 모든 항목에 있

어 CMS대조군과 정상군 사이에 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 다른 연구들에서도 CMS 자극후 시행된 개방장검사에서 CMS대조군과 정상군 사이에 유의한 반응이 나타나지 않음을 발표되고 있다.<sup>30)</sup> 다만, 연자육투여군에서 불안의 정도를 나타내는 출발잠자기, 일어서기, 뜯치장의 시간 및 회수가 fluoxetine 투여군에 비해 감소된 결과를 보이여 어느 정도의 항우울 효과를 나타내는 것으로 보이나, 체중 측정의 결과에서와 같이 CMS대조군에 비해 좋은 결과를 보이지 못하고 있음은 앞으로 연구되어야 할 부분이다.

항우울제에 의한 성기능 장애는 우울증이 흔히 장기간의 치료를 요한다는 점에서 우울증 치료에 있어 특수한 문제로 대두되고 있다. Fluoxetine, paroxetine, sertraline 등 항우울제를 투여받는 환자의 3/4에서 한가지 이상의 성적인 부작용을 겪고 있다고 발표되었고, 많은 문헌들이 fluoxetine 등 SSRI계 우울증 치료제의 성적 부작용이 50%에 달하는 것으로 제시하고 있다.<sup>6)</sup>

강제유형검사에서 항우울 효과가 입증된 연자육이 실험동물의 성적 행동에 미치는 영향을 분석한 결과, 성적인 능력을 평가하는 가장 중요한 지표인 사정회수에 있어 fluoxetine 투여군과 hypericum perforatum 투여군이 정상대조군에 비해 현저한 사정회수 감소를 보인데 반해 연자육 투여군에 있어서는 사정회수의 감소가 나타나지 않았다. 또한 사정 후 회복능력을 평가하는 지연시간에 있어서도 fluoxetine 투여군이 정상대조군에 비해 유의성있는 회복능력의 지연을 나타냈는데 반해 연자육 투여군의 경우 대조군에 비해 회복능력 지연이 나타나지 않았다.

현재 우울증 치료제 개발의 추세가 강력한 우울효과 보다는 부작용을 감소시키는 것에 역점을 두고 있음을 감안할때, 이미 성적인 부작용이 알려진 fluoxetine 투여군은 물론 hypericum perforatum 투여군에서도 일정부분 성행위 감소가 나타내는데 반해 연자육의 경우 성적능력 감소가 나타나지 않았다는 점은 향후 연자육을 이용한 우울증 치료제 개발에 있어 중요한 의미를 갖는다.

최근 우울증 연구경향은 행동 실험 연구에만 그치지 않고, 분자생물학적인 방법을 이용하여 우울증 및 작용약물의 기전을 밝히려는 연구가 이루어지고 있다.<sup>8)</sup> 최근 발표된 한약재를 이용한 우울증 연구 논문에 있어서도 분자생물학적인 연구의 필요성을 강조하고 있으나 현재까지의 연구는 미비하다.<sup>9)</sup>

프로티오믹스는 이차원 전기영동 (two-dimensional electrophoresis (2-DE)) 을 이용하여 단백질을 분석하고 이를 여러가지 분석 도구들을 이용하여 단백질을 감정하는 일련의 과정을 거치는데, 전기영동의 결과 얻어진 프로티옴 지도는 matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS) 또는 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 등을 이용하여 분석할 수 있다.<sup>32)</sup>

본 연구에 이용된 이차원 전기영동을 이용한 단백질 분석은 25년 전 O'Farrell에 의해 처음 기술된 방법으로 단백질 혼합물을 등전점 (isoelectric point)과 분자량에 의해 분리하여 단백질을 양적, 질적으로 동시에 분석하는 기술이다. 최근에는 고해상도 이차원 polyacrylamide gel 전기영동 (high resolution 2D-PAGE)

이 단백질의 구성을 분석하는 정형화된 방법으로 사용되고 있으며, 전기영동의 결과를 스캐닝한 후 이미지 분석을 하고 이러한 전기영동의 결과에서 자동적으로 단백질을 규명하는 새로운 방법들이 소개되고 있다.<sup>33)</sup> 이차원 전기영동을 이용한 프로티오믹스의 장점은 미리 특정 단백질의 변화를 가정하여 연구에 임하는 것이 아니라, 질병 발생시 또는 약물투여시 변화되는 모든 단백질을 분석할수 있어 질병의 발병 기전 및 치료 약물의 새로운 표적을 규명하고, 조기 진단의 생화학적 표지자 (biomarker)를 발견하며, 치료의 효과 및 독성을 파악하고, 환자 개개인에 대한 특이한 치료법 개발을 위해 이용되고 있다.<sup>34)</sup> 프로티옴 연구기법을 이용하면 빠른 시간 내에 단백질들의 발현을 종합적이고 정량적으로 측정할 수 있기 때문에 시간과 인력이 현저히 단축되는 장점이 있다.<sup>35)</sup> 질량분석기 (mass spectrometry: MS) 을 이용한 단백질 스폿의 펩타이드 분석은 전하로 단백질을 젤 위에 스폿으로 분리한 다음, 데이터베이스 검색을 통해 단백질을 동정하는 과정을 거친다. 단백질의 용해도를 향상시키는 기술과 immobline pH gradient (IPG) 기법이 발전됨으로 인해 단백질 분리기술이 좋아졌고 재현성 있는 결과를 얻을 수 있게 되었을 뿐만 아니라 여기에 matrix assisted laser desorption ionization/time of flight (MALDI-TOF) 와 electrospray ionization (ESI) MS 를 통한 질량 분석 기술이 접목되어 단백질의 동정이 용이해지게 되었고 이와 더불어 이는 인간의 유전자 서열이 데이터 베이스화 되어 정보사용이 가능해지면서 대량발굴 탐색이 가능하게 되었다.<sup>36)</sup>

기존 연구에 의해 우울증의 발병 및 치료기전에 뇌의 활성화가 관련되어 있는 것이 밝혀졌다. 특히 뇌의 해마(hippocampus) CA3추체세포가 위축되고, 해마의 세로토닌 수용기의 수와 기능이 변화된다고 알려져 있는 등 해마가 우울증의 발병과 치료에 깊은 관련이 있음이 알려졌다.<sup>37)</sup> 항우울제인 fluoxetine 투여시 해마영역에서 신경세포의 활성화와 관련된 c-Fos RNA 발현이 증가하며, 5-HT1A 자가수용체의 기능적인 감소가 관찰되며, brain derived neurotrophic factor (BDNF)와 그 수용체 단백질인 TrkB의 발현이 증가된다는 보고<sup>38)</sup>는 우울증 치료제의 작용기전 역시 해마의 특정 물질의 활성화와 관련됨을 밝히고 있다.

연자육의 항 우울 효과가 나타나는 기전을 밝히기위해 강제유형검사가 끝난 흰쥐의 해마를 적출하여 프로티오믹스를 시행하였다. 이차원 전기영동을 이용한 단백질 발현연구 결과 연자육 투여군에서 대조군에 비해 Adenylosuccinate synthetase, Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver, Mitogen-activated protein kinase 1, Aldehyde dehydrogenase이 증가했음이 밝혀졌다. 이들 중 Adenylosuccinate synthetase, Aldehyde dehydrogenase는 fluoxetine 투여군에서 감소되었는데, 이 두 단백질이 fluoxetine과 차별되는 연자육의 성적 부작용 감소와 관련이 있는 것으로 보인다. Adenylosuccinate synthetase는 적혈구를 제외한 생물의 모든 부분에서 존재하며, AMP의 de novo 생합성 과정 중 IMP와 L-Aspartate가 S-AMP(Adenylosuccinate)를 합성하는 과정에서 촉매로 작용한다. Adenylosuccinate synthetase는 GTP와 Mg<sup>2+</sup>를 이용 Adenylosuccinate가 합성되는

과정을 조절하며, 이외에도 Nucleotide의 유지 기능에 중요한 역할을 담당하고 있다.<sup>39)</sup> 해마에서의 cAMP 감소는 CREB (cAMP-response- element- binding- protein)을 감소시키며 이는 우울증과 연관된다고 알려져 있으며, 우울증 치료제에 의해 CREB가 증가된다고 보고되고 있다.<sup>40)</sup>

한편, estrogen이 adenylosuccinate lyase gene에 영향을 주어 adenylosuccinate lyase에 직접적인 영향을 준다는 보고가 있으며,<sup>41)</sup> fluoxetine과 차별되는 연자육의 성적 부작용 감소 또한 Adenylosuccinate synthetase가 estrogen에 미치는 영향과 관련이 있다고 추측된다. Aldehyde dehydrogenases (ALDH)는 NADP와 함께 광범위한 지방성, 방향성 aldehyde를 산화시키는 것으로 알려진 효소이다. 포유동물에서는 Class-1, Class-2, Class-3, Class-4 등 다양한 형태로 존재한다.<sup>42)</sup> ALDH는 fructose, acetaldehyde, oxalate 등의 대사에 중요한 역할을 하는 효소이며, 반응성 carbonyls와 aldehyde로 인한 독소를 제거하는데 가장 중요한 효소중 하나이다. 중추신경억제제인 reserpine에 의해 monoamine oxidase가 활성화되고 ALDH가 억제되며, ALDH의 감소는 뇌내의 norepinephrine의 분해를 촉진하게 되며, 이 norepinephrine의 감소가 우울증을 유발하게 되며, 항우울제의 투여에 의한 norepinephrine level의 상승이 신경세포 활성을 유도한다는 결과가 발표되었다.<sup>43)</sup> 또한 다운증후군 환자의 뇌에서 ALDH level을 조사한 결과 대조군에 비하여 절반 이하로 감소되어 있음이 확인되었으며, ALDH감소로 인한 aldehyde의 축적이 뇌내 신경신호전달체계의 교란을 일으킴이 발표되었다.<sup>44)</sup> ALDH class 1은 retinal을 retionic acid로 전환시키는 과정에 관련되어 있으며 이는 레티놀이라 불리는 Vit. A의 대사와 긴밀히 연결되어 있다.<sup>45)</sup> 레티놀은 노화와 관련되어 많은 연구가 이루어지고 있는 비타민이며, 연자육 투여군에서의 성적 부작용 감소는 레티놀 대사와 관련이 있는 것으로 보인다. Cytochrome c oxidase는 미토콘드리아의 전자 운송 체인으로서 세포 호흡에 관여하며, ATP 생성 및 미토콘드리아 세포벽으로의 양성자 운반에 관여한다.<sup>46)</sup> 산화대사와 신경 활동은 밀접한 관계를 가지고 있기 때문에 Cytochrome c oxidase는 신경활동을 변화시키는데 필요한 신경 에너지의 민감한 지표로서 여겨진다.<sup>46)</sup> Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver는 가장 중요한 subunit의 하나로 비 근육세포에서 발견되며, 신경활동이나 ATP level과 비례해서 변화한다.<sup>47)</sup> 신경활동이나 ATP의 저하는 시냅스의 신경전달 기능의 저하와 밀접한 연관이 있으며 우울증은 신경 전달 기능의 저하가 특징이므로<sup>48)</sup> 연자육 및 fluoxetine 투여군에 있어서의 항우울 효과는 Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver의 증가에 의한 신경전달기능 향상에 기인한 것으로 보인다. Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK-2)는 Nerve Growth Factor를 활성화시키는 역할을 하는데, 세포 활동의 다양성을 조절하는 역할을 하는 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 Platelet-derived growth factor (PDGF)나 Epidermal growth factor (EGF)와 같은 Growth factor에 반응하여 증폭 조절 세포의 분화를 신호화 하는데 중요하게 작용한다.<sup>49)</sup> 우울증과 깊은 관계가 있다고 알려진 5-Hydroxytryptamine (5-HT)의 자극

은 MAPK의 활동을 증가시킨다.<sup>50)</sup> MAPK는 유전자 발현과 시냅스의 적응력, 리셉터의 기능과 신경 활동에서 중요한 역할을 하며, 우울증 환자에서 5-HT level의 감소에 따른 시냅스 연결의 자극 전달 저하가 나타난다고 알려져 있다.<sup>50)</sup> 연자육 및 fluoxetine 투여에 따른 ERK-2의 증가는 MAPK활동 증가에 따른 신경자극 증가에 기인한 것으로 생각된다.

## 결론

연자육 투여가 강한 공포자극 및 Chronic mild stress (CMS)로 유발된 우울증에 미치는 효과를 알아보기 위해 강제유영실험, 자당섭취량검사, 개방장검사, 교미능력검사를 실시하였으며, 강제유영실험에서 항우울 효과가 확인된 환쥐의 해마를 채취하여 이차원 전기영동으로 프로티옴 분석을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

강한 공포자극을 이용한 강제유영검사에서 연자육 투여 1일째와 7일째 모두 유의성있는 우울행동 개선효과가 나타났다. CMS로 유발된 우울증 동물모델을 이용하여 자당섭취량, 개방장검사를 실시한 결과 연자육 투여군에서 일부 우울증 개선효과가 나타났으나 통계적 유의성은 없었다. 우울증 치료제의 부작용으로 나타나는 성기능 장애를 평가하기 위하여 교미행동을 측정할 결과 대조군으로 사용된 fluoxetine 투여군, hypericum perforatum 투여군에서 정상 대조군에 비해 유의성있는 교미행위 감소가 나타난것에 비해 연자육 투여군에서는 교미행위 감소의 부작용이 나타나지 않았다. 연자육이 우울증에 작용하는 분자생물학적 기전을 알아보기 위해 이차원전기영동법으로 프로티옴 분석을 실시한 결과 Adenylosuccinate synthetase, Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver, Mitogen-activated protein kinase 1, Aldehyde dehydrogenase 등 총 4개의 단백질이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 이들 단백질 중 Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver, Mitogen-activated protein kinase 1은 연자육 투여군과 fluoxetine 투여군에서도 동시에 증가하였으며, Adenylosuccinate synthetase, Aldehyde dehydrogenase는 fluoxetine 투여군에서는 감소하였다.

이상의 결과로 볼때 연자의 투여는 만성적이고 경미한 스트레스에 의해 유발된 우울증보다는 급격한 공포에 의해 유발된 우울증에 효과가 있으며 성기능 저하의 부작용이 나타나지 않음을 알수 있었다. 연자육의 우울증에 대한 효과는 신경전달물질 및 성호르몬의 활성화와 관련되어 있는 단백질의 증감을 통해 발현됨을 알수 있었다.

## 참고문헌

1. 전국 한의과대학 병리학교실. 동의병리학. 서울, 일지사, pp 33, 118-124, 1998.
2. Katz, R.J., Roth, K.A., Carroll, B.J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 5(2):247-251,

- 1981.
3. Skalisz, L.L., Beijamini, V., Joca, S.L., Vital, M.A., Da Cunha, C., Andreatini, R. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression--Parkinson's disease association. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 26(5):879-883, 2002.
  4. Muscat, R., Papp, M., Willner, P. Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline. *Psychopharmacology (Berl)*. 109(4):433-438, 1992.
  5. Forbes, N.F., Stewart, C.A., Matthews, K., Reid, I.C. Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. *Physiol Behav*. 60(6):1481-1484, 1996.
  6. Vega Matuszczyk, J., Larsson, K., Eriksson, E. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sexual motivation in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 60(2):527-532, 1998.
  7. Duncko, R., Kiss, A., Skultetyova, I., Rusnak M, Jezova D. Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in response to chronic mild stress rise in male but not in female rats while tyrosine hydroxylase mRNA levels decrease in both sexes. *Psychoneuroendocrinology*. 26(1):77-89, 2001.
  8. 이승기, 김종우, 황의완, 김현택, 곽소영, 박은혜. 분심기음의 우울증 모델 흰쥐에 대한 실험적 연구. *대한한의학회지* 22(3):129-140, 2001.
  9. Pandey, A., Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 405(6788):837-846, 2000.
  10. 전국한의과대학 본초학교실. *본초학*. 서울, 영림사, p 623, 624, 1992.
  11. De Vry, J., Maurel, S., Schreiber, R., de Beun, R., Jentsch, K.R. Comparison of hypericum extracts with imipramine and fluoxetine in animal models of depression and alcoholism. *Eur Neuropsychopharmacol*. 9(6):461-468, 1999.
  12. 이정균. 3개정판 최신정신의학. 서울, 일조각, p 212, 716, 1994.
  13. Coolidge, F.L., Segal, D.L. Evolution of personality disorder diagnosis in the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. *Clin Psychol Rev*. 18(5):585-599, 1998.
  14. Masand, P.S., Gupta, S. Long-term side effects of newer-generation antidepressants: SSRIS, venlafaxine, nefazodone, bupropion, and mirtazapine. *Ann Clin Psychiatry*. 14(3):175-182, 2002.
  15. Kent, J.M. SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs: new agents for the treatment of depression. *Lancet*. 355(9207):911-918, 2000.
  16. Obach, R.S. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J Pharmacol Exp Ther*. 294(1):88-95, 2000.
  17. 金相孝. *東醫神經精神科學*. 서울, 杏林出版社, pp 72-75, 258-264, 277-284, 1980.
  18. 배병철 譯. *今釋黃帝內經素問*. 서울, 成輔社, pp 635-713.
  19. 朱震亨. *丹溪心法附餘*. 서울, 大成出版社, pp 515-518, 1982.
  20. 張介賓. *景岳全書*. 서울, 정담, p 385, 386, 692, 1999.
  21. 葉天士. *臨證指南醫案*. 서울, 정담, pp 463-473, 1998.
  22. 金完熙, 崔達永. *臟腑辨證論治*. 서울, 成輔社, p 307, 1996.
  23. 大韓東醫生理學會編. *東醫生理學*, 서울, 慶大學校出版局, p 78, 380, 381, 1993.
  24. 東醫寶鑑國譯委員會編. 對譯 *東醫寶鑑*. 서울, 법인문화사, p 182, 183, 1999.
  25. 張伯輿. *中醫內科學*. 北京, 人民衛生出版社, pp 5-7, 238-246, 1988.
  26. David, D.J., Bourin, M., Hascoet, M., Colombel, M.C., Baker, G.B., Jolliet, P. Comparison of antidepressant activity in 4- and 40-week-old male mice in the forced swimming test: involvement of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in old mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 153(4):443-449, 2001.
  27. Moreau, J.L., Jenck, F., Martin, J.R., Mortas, P., Haefely, W.E. Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2(1):43-49, 1992.
  28. Bielajew, C., Konkle, A.T., Merali, Z. The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats: I. Biochemical and physiological analyses. *Behav Brain Res*. 136(2):583-592, 2002.
  29. Marona-Lewicka, D., Nichols, D.E. The Effect of Selective Serotonin Releasing Agents in the Chronic Mild Stress Model of Depression in Rats. *Stress*. 2(2):91-100, 1997.
  30. Harro, J., Haidkind, R., Harro, M., Modiri, A.R., Gillberg, P.G., Pahkla, R., Matto, V., Oreland, L. Chronic mild unpredictable stress after noradrenergic denervation: attenuation of behavioural and biochemical effects of DSP-4 treatment. *Eur Neuropsychopharmacol*. 10(1):5-16, 1999.
  31. Walsh, R.N., Cummins, R.A. The open-field test : a critical review. *Psychological Bulletin*. 83(3):482-504, 1976.
  32. Anderson, N.G., Anderson, N.L. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present, and future. *Electrophoresis* 17, 443-453, 1996.
  33. Klose, J. Large-gel 2D electrophoresis. *Methods Mol Biol* 112, 147-172, 2000.
  34. Pennington, S.R., Wilkins, M.R., Hochstrasser, D.F., Dunn, M.J. Proteome analysis: From protein characterization to biological function. *Trends Cell Biol* 7, 168-173, 1997.
  35. Pandey, A., Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837-846, 2000.
  36. Leimgruber, R.M., Malone, J.P., Radabaugh, M.R., Laporte, M.L., Violand, B.N., Monahan, J.B. Development of improved cell lysis, solubilization and imaging approaches for proteomic analyses. *Proteomics* 2, 135-144, 2002.

37. Saviane, C., Savtchenko, L.P., Raffaelli, G., Voronin, L.L., Cherubini, E. Frequency-dependent shift from paired-pulse facilitation to paired-pulse depression at unitary CA3-CA3 synapses in the rat hippocampus. *J Physiol.* 544(Pt 2):469-476, 2002.
38. Lyons, W.E., Mamounas, L.A., Ricaurte, G.A., Coppola, V., Reid, S.W., Bora, S.H., Wihler, C., Koliatsos, V.E., Tessarollo, L. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(26):15239-15244, 1999.
39. Honzatko, R.B., Fromm, H.J. Structure-function studies of adenylosuccinate synthetase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 370(1):1-8, 1999.
40. Koch, J.M., Kell, S., Hinze-Selch, D., Aldenhoff, J.B. Changes in CREB-phosphorylation during recovery from major depression. *J Psychiatr Res.* 36(6):369-375, 2002.
41. Zhu, Y., Wang, M., Lin, H., Li, Z., Luo, J. Identification of estrogen-responsive genes in chick liver. *Cell Tissue Res.* 305(3):357-363, 2001.
42. Hempel, J., Harper, K., Lindahl, R. Inducible (class 3) aldehyde dehydrogenase from rat hepatocellular carcinoma and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated liver: distant relationship to the class 1 and 2 enzymes from mammalian liver cytosol/mitochondria. *Biochemistry.* 28(3):1160-1167, 1989.
43. Laifenfeld, D., Klein, E., Ben-Shachar, D. Norepinephrine alters the expression of genes involved in neuronal sprouting and differentiation: relevance for major depression and antidepressant mechanisms. *J Neurochem.* 83(5):1054-1064, 2002.
44. Lubec, G., Labudova, O., Cairns, N., Berndt, P., Langen, H., Fountoulakis, M. Reduced aldehyde dehydrogenase levels in the brain of patients with Down syndrome. *J Neural Transm Suppl.* 57, 21-40, 1999.
45. Hsu, L.C., Chang, W.C., Hoffmann, I., Dueter, G. Molecular analysis of two closely related mouse aldehyde dehydrogenase genes: identification of a role for Aldh1, but not Aldh-pb, in the biosynthesis of retinoic acid. *Biochem J.* 339(Pt 2):387-395, 1999.
46. Cooper, C.E. Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? *Trends Biochem Sci.* 27(1):33-39, 2002.
47. Schlerf, A., Droste, M., Winter, M., Kadenbach, B. Characterization of two different genes (cDNA) for cytochrome c oxidase subunit VIa from heart and liver of the rat. *EMBO J.* 7(8):2387-2391, 1988.
48. Wu, J., Takeo, T., Wakui, M., Ellsworth, K., Fisher, R.S. Intracellular energy failure does not underlie hyperthermic spreading depressions in immature rat hippocampal slice. *Brain Res.* 987(2):240-243, 2003.
49. Khan, K.M., Falcone, D.J., Kraemer, R. Nerve growth factor activation of Erk-1 and Erk-2 induces matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 277(3):2353-2359, 2002.
50. Cussac, D., Duqueyroux, D., Newman-Tancredi, A., Millan, M.J. Stimulation by antipsychotic agents of mitogen-activated protein kinase (MAPK) coupled to cloned, human (h)serotonin (5-HT)(1A) receptors. *Psychopharmacology (Berl).* 162(2):168-177, 2002.