

# Elevated Plus-Maze를 이용한 현삼의 항불안 효과 : GABA 신경계와의 관련성 연구

최윤희 · 정지욱<sup>1\*</sup>

원광디지털대학교 한방건강학과, 1: 대구한의대학교 한약재약리학과

## Anxiolytic-like Effects of *Scrophularia buergeriana* Miquel Using the Elevated Plus-Maze in Mice : Involvement of GABAergic Nervous System

Yun Hee Choi, Ji Wook Jung<sup>1\*</sup>

*Department of Oriental Health Science, Wonkwang Digital University,  
1: Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Haany University*

The present study was performed to investigate the putative anxiolytic-like effects of the aqueous extract of the roots of *Scrophularia buergeriana* (SB-W) using elevated plus-maze (EPM) and hole-board apparatus in mice. SB-W was orally administered at doses of 50, 100, 200 or 400 mg/kg to ICR mice, 1 h before the behavioral evaluation. Control group were administered with an equal volume of saline, and positive control group with buspirone (2 mg/kg, i.p.). The administration of SB-W significantly increased the percentage of time spent in open arms and entries into the open arms of the EPM compared with saline-treated control group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, those anxiolytic-like activities of SB-W were antagonized by flumazenil (a GABA<sub>A</sub> antagonist, 10 mg/kg), but not by WAY-100635 (a 5-HT<sub>1A</sub> antagonist, 0.3 mg/kg). Moreover, there were no changes in the locomotor activity and myorelaxant effects in any group compared with saline-treated control group. In the hole-board test, the administration of SB-W (200 and 400 mg/kg) significantly increased the number of head-dipping compared with saline-treated control group ( $P < 0.05$ ). Therefore, these findings suggest that *Scrophularia buergeriana* promotes the anxiolytic-like activity mediated by GABAergic nervous system in mice.

Key words : Anxiety, *Scrophularia buergeriana*, Elevated plus-maze, WAY 100635, Flumazenil

### 서 론

고도의 경제성장이 이루어놓은 풍요로운 물질문명과 정신문화 생활의 불균형은 많은 정신적 스트레스와 불안 등을 초래하여 정신질환의 병태생리 조건을 형성하였으며, 실제로 높은 경제성장이 이루어진 사회에서 보다 많은 정신질환이 발병한다는 사실은 역학적인 조사에서 증명된 사실이다. 불안(anxiety)은 확실하지는 않지만 어떤 위험이 닥칠 것이라는 생각 때문에 가슴이 두근거려 어찌할 바를 모르는 심리적 상태이며, 주요 증상은 가

슴의 울렁거림, 호흡곤란, 식은땀 등의 자율신경계와 관련된 증상이다<sup>1)</sup>. 이는 익숙하지 않은 환경에 적응하기 위한 가장 기본적인 반응이며 정상인도 위험이나 고통이 예견되거나 예기치 않은 현상에 직면하게 되면 불안을 경험하기도 한다. 불안 및 우울, 이에 따른 불면증 등은 현대인의 정신병 중 많은 부분을 차지하고 있고, 실제로 많은 사람들이 고통 받고 있다<sup>2,3)</sup>.

1960년대 초에 Roche 연구소는 새로운 불안 치료제로 benzodiazepine 계열 신경안정제인 diazepam을 소개하였다. 그 후 benzodiazepine류는 barbiturate류 약물을 대체하면서 선진국에서 10%를 상회하는 인구에게 처방되고 있을 정도로 세계적으로 가장 많이 사용되고 있는 항불안제가 되었다. 그러나 benzodiazepine류는 이상적인 항불안제로 사용하기에는 진정작

\* 교신저자 : 정지욱, 경산시 유곡동 290, 대구한의대학교 한약재약리학과

· E-mail : jwjung@dhu.ac.kr, · Tel : 053-819-1337

· 접수 : 2010/06/08 · 수정 : 2010/06/15 · 채택 : 2010/06/15

용, 기억력 장애, 알코올독성의 증가뿐만 아니라 장기투여에 따른 남용과 의존성을 유발할 수 있는 한계점을 지니고 있다<sup>3)</sup>. 최근 들어 불안을 치료하는 약물에 대한 연구는 주로 오래된 약물에 대한 재평가 및 적응증 확대뿐만 아니라 새로운 약물의 개발, 특히 5-hydroxytryptamine(5-HT) 재흡수 억제제 등의 개발에 관심이 모아지고 있다<sup>4,5)</sup>. 현재 빈용 되고 있는 약물로는 benzodiazepine 계 약물, buspirone, hydroxyzine, zolpidem 등이 있으나 임상적으로 항불안 효과뿐만 아니라 진정, 금단현상의 유발 등의 부작용 때문에 사용에 신중을 기해야 하는 단점이 있다<sup>6)</sup>.

한방에서도 불안 및 신경과민에 관한 약리학적 연구가 많이 보고되어 있는데, 대표적인 약물로는 valerian과 kava가 있다<sup>7,8)</sup>. 이들 약물은 모두 GABA 신경계에 작용하여 항불안 작용이 있음을 나타내고 있다. 이외에도 특히 산조인(*Zyziphus jujuba* var. *spinosa*)은 저용량에서는 항불안 효과를 나타내며, 고용량에서는 진정작용을 가진다고 알려져 있다<sup>9,10)</sup>. 또한 Jung 등은 elevated plus-maze를 이용하여 천마(*Gastrodia elata* Blume.)의 항불안 효과를 확인하였으며 4-hydroxybenzyl alcohol과 4-hydroxybenzaldehyde가 주요성분임을 보고하였다<sup>11)</sup>. 이외에도 Kimura 등은 인삼의 주요성분인 ginsenosides가 GABA 수용체와 결합한다고 발표하였는데, ginsenoside Re 및 Rf는 [3H]flunitrazepam의 결합력을 증가시키고, Rc는 [3H]baclofen의 affinity를 Bmax의 변화 없이 증가시킨다고 보고하였다<sup>12)</sup>. 이와 같은 결과는 인삼이 GABA와 상호작용을 예상하는 여러 행동약리 실험 결과에 중요한 작용기전의 단서를 제공하고 있다.

현삼(*Scrophularia buergeriana* Miquel)은 현삼과(Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 초본인 현삼의 뿌리를 건조한 것으로 중국, 일본 및 한국에서 전통적으로 해열, 진통작용이 있다고 알려져 있다. 한의학에서 현삼은 청열양음(淸熱養陰), 해독산결(解毒散結)의 효능이 있어 음허증(陰虛證)과 열독증(熱毒證)에 사용되어 왔으며<sup>13)</sup> 서양의학에서는 발열, 부종, 변비, 인후염 및 신경염을 치료한다고 알려져 있다<sup>14)</sup>. 또한 현삼에서 iridoid glycoside, phenylpropanoid, terpenoid 및 flavonoid 성분들이 보고되어 있으며<sup>15,16)</sup> Kim 등은 scopolamine으로 유도한 건망증 모델에서 phenylpropanoid 계열의 buergeriside A1, E-p-methoxycinnamic acid 및 e-isoferulic acid가 기억력 개선이 있음을 확인하였다<sup>17)</sup>. 이외에도 malondialdehyde에 의한 세포독성을 현삼의 phenylpropanoid 계열의 물질이 억제하여 간보호 효과가 있음을 확인하였다<sup>18)</sup>. 그러나 현삼의 항불안 효과에 대해서는 아직까지 알려져 있지 않으며, 이에 본 연구에서는 현삼의 물 추출물이 신경계질환 중에서 불안증에 미치는 효과를 elevated plus-maze, hole-board test, open field test 등 동물행동 실험을 통하여 관찰하였고, 이러한 효과가 어떤 기전을 통하여 작용하는지를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 추출물 제조

#### 1) 실험동물

실험동물은 수컷의 ICR mouse(SPF/VAF Crj/Bgi: CD-1) 5주령을 주식회사 오리엔트(경기도, 한국)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 대구한의대 동물실에서 7일간 적응 시킨 후 대조군(Control Group), buspirone을 투여한 양성대조군(Positive control Group) 및 현삼 추출물을 투여한 군(SB-W Group)으로 구분하여 사용하였다. 실험동물은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 10\%$  내외, 명암주기 12시간 주기로 일정하게 유지된 사육실에서 다섯 마리씩 polycarbonate mice cage에 수용하여 사육하였으며 적응 기간 동안 사료와 물을 제한 없이 공급 받았다. 실험동물의 처치 및 유지는 실험동물 관리 원칙(NIH publication No. 85-23, revised 1985)과 대구한의대학교의 동물의 관리 및 사용 규정에 입각하여 진행하였다.

#### 2) 재료

본 연구에 사용된 현삼은 경동시장에서 구입하였고, 본 대학의 대구한의대학교의 김용한 교수로부터 감정을 받아 본 연구실의 표본실에 보관하고 있다(No. DHUHMP0904). 실험에 사용할 시료를 제조하기 위하여 원생약의 10배의 증류수를 가하여 환류냉각장치에서  $80 - 100^\circ\text{C}$ 로 2시간 추출하였다. 추출이 완료 후, 추출액을 Whatman(No. 1) filter paper로 여과하고, 여액을 일정 부피가 될 때까지 감압 농축한 후 동결건조(Eyela, model FDU-2000, Japan)하여 실험에 사용하였다(수득율: 15.3%). 본 추출물을 SB-W라 명명하였다. Buspirone hydrochloride, WAY-1000635, Tween 80(Polyethylene glycol sorbitan monooleate), sodium chloride, flumazenil은 시그마 알드리치(St. Louis, Mo)의 제품을 사용하였으며, diazepam은 대원제약의 제품을 사용하였다. 기타 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최상급을 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 약물처리

SB-W는 생리식염수에 녹여 50, 100, 200 및 400 mg/kg 용량으로 실험 시작 1 시간 전에 경구 투여하였고, 대조군은 SB-W 투여군과 동일 부피의 생리식염수를 경구 투여하였다. 양성대조군에는 생리식염수에 녹인 buspirone(2 mg/kg)을 실험 30분 전에 복강 투여하였다. 길항실험에 사용한 WAY-100635(0.3 mg/kg)은 생리식염수에, flumazenil(10 mg/kg)은 10% Tween 80 수용액에 녹여 실험 30분 전에 복강 투여하였다. Horizontal wire test에서 대조약물로 사용한 diazepam은 5 mg/kg의 용량으로 생리식염수에 녹여 복강 투여하였다.

#### 2) Elevated plus-maze(EPM)

##### (1) EPM을 이용한 SB-W의 항불안 작용 확인

항불안 효과는 음성 ICR mice를 이용하여 elevated plus-maze에서 측정하였다. 양성대조군으로는 buspirone(2 mg/kg)을 실험 30분 전에 복강 투여하였고, SB-W는 50, 100, 200 및 400 mg/kg 용량으로 경구 투여하였다. 약물 투여는 실험 시작 1 시간 전에 투여가 종료되도록 하였으며 대조군은 생리식염수를 경구 투여하였다. 각 군은 8 - 10마리로 하였다.

항불안 효과의 측정에 사용된 elevated plus-maze는 검정색

의 아크릴로 제작되었으며, 바닥에서 50 cm 높이에 설치된 십자형(+) 미로로서, 4개의 통로 가운데 마주보는 2개(길이 30 cm, 폭 5 cm)는 개방되어 있고, 크기가 동일한 다른 2개의 통로는 높이 20 cm의 벽으로 구성되어 있다. 중심 platform은 가로 5 cm 및 세로 5 cm로 하였고, maze의 중앙부 천장에 비디오카메라를 설치하여 동물의 행동을 기록하였으며 광도는 20 lux로 조정하였다. 실험을 시작할 때 마우스는 maze의 open arm에 머리를 밖으로 향하게 놓은 다음 maze를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 행동은 5분 간 관찰하였으며, 마우스가 open arm과 closed arm에 머문 시간, 각 arm의 출입 횟수 및 총 이동거리 등을 EthoVision program(Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands)으로 각각 측정하여 항불안 효과를 측정하였다<sup>19,20</sup>. 각 arm의 출입 횟수는 open arm 이나 closed arm의 교차점을 기준으로 할 때 어느 쪽으로나 네 발이 완전하게 진입되었을 때를 1회로 하고 open arm과 closed arm에 대하여 각각 측정한다. 각 arm에 머문 시간의 측정은 각 arm에 진입된 후 머물러 있던 시간의 총 합을 측정하였다. 각 실험이 끝난 후에는 전 실험동물의 흔적을 70 % EtOH로 세척하여 다음 실험에 영향을 주지 않도록 하였다.

#### (2) WAY-100635와 flumazenil의 길항작용

현삼의 항불안 효과의 작용 기전을 관찰하기 위해 5-HT<sub>1A</sub> 수용체의 antagonist인 WAY-100635와 GABA<sub>A</sub> 수용체의 antagonist인 flumazenil을 사용하여 elevated plus-maze에서 측정하였다. SB-W는 200 mg/kg 용량으로 경구 투여하였으며 실험 시작 30분 전에 각각 WAY-100635(0.3 mg/kg, i.p.) 또는 flumazenil(10 mg/kg, i.p.)을 병용 투여하였다. 대조군은 생리식염수를 동일 부피로 경구 투여하였다. 각 군은 8-10마리로 하였다.

#### 3) Hole-board Test

Hole-board test는 항불안 작용을 측정하는 장치로 elevated plus-maze와 함께 널리 사용되는 방법 중의 하나이다<sup>21</sup>. 항불안 효과의 측정을 위해 hole-board 측정 장치를 사용하였으며 본 장치는 회색 아크릴수지 재질의 판넬로 제작되었고, 16개의 구멍(diameter: 3 cm, depth: 2.2 cm)이 판넬에 설치되어 있다(40 x 40 cm, 2.2 cm, Ugo Basile, Italy). 약물 투여 종료 1 시간 후 이 장치 중앙에 동물을 올려놓고 5분 동안 head-dipping 횟수를 측정하였다. SB-W는 50, 100, 200 및 400 mg/kg 용량으로 실험 1시간 전에 경구 투여하였으며 각 군은 8 - 10마리로 하였다.

#### 4) Locomotor activity 측정

Locomotor activity는 실험동물의 활동성을 측정하는 장치로 약물의 항불안 작용이 동물의 활동성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하는 실험방법이다. Locomotor activity는 자가 제조된 open field test용 box를 이용하여 측정하였다<sup>22</sup>. Open field test용 box는 가로 41.5 cm, 세로 41.5 cm, 높이 43 cm가 되도록 제조하고, 하나의 box에서 한 마리씩 측정하였다. SB-W는 50, 100, 200 및 400 mg/kg 용량으로 경구 투여하였으며 약물 투여는 실험 시작 1시간 전에 종료되도록 하였다. 대조군으로 생리식염수를 동일 부피로 경구 투여하였다.

#### 5) Horizontal wire test

Horizontal wire test는 실험동물의 근육이완 상태를 확인하는 실험방법이다. 일반적으로 항불안 약물들은 졸음, 근육이완 등의 부작용을 야기하므로 SB-W가 이러한 부작용이 발생하는지를 horizontal wire test를 통해 확인하였다. Horizontal wire test는 양쪽에 기둥을 설치하고 바닥으로부터 30 cm의 높이로 하여 직경 1 mm, 길이 40 cm의 wire를 수평으로 설치하여 측정하였다. 먼저 마우스의 앞발이 wire를 쥐게 한 다음, 꼬리를 아래쪽으로 향하여 놓은 후 한 쪽 뒷발이 wire를 쥐거나, 앞발이 10초 이상 wire에 매달려 있으면 통과로 인정하였다<sup>23</sup>. SB-W는 50, 100, 200 및 400 mg/kg 용량으로 경구 투여하였으며 약물 투여는 실험 시작 1시간 전에 종료되도록 하였다. 대조군으로 생리식염수를 동일 부피로 경구 투여하였으며, 대조약물인 diazepam은 실험 30분 전에 복강 투여되었다. 실험용으로 5분 간격으로 2번의 wire test를 실시하여 그 평균값을 이용하였다.

#### 3. 통계처리

모든 실험 결과는 one way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 통계처리 하였고, 유의성이 인정될 경우 Student-Newman-Keuls Method를 이용하여  $P < 0.05$  수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

## 결 과

#### 1. Elevated Plus-maze에서 SB-W의 항불안 효과 및 작용 기전

##### 1) Open arm에서 머문 시간 및 출입한 횟수

Elevated plus-maze를 이용한 SB-W의 항불안 효과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서 알 수 있는 바와 같이, 200 및 400 mg/kg 용량의 SB-W 투여군에서 open arm에 머무는 시간의 백분율이 대조군의 비율과 비교하여 용량 의존적으로 유의성 있게 증가됨이 관찰되었다(각각  $41.3 \pm 1.7\%$ ,  $37.1 \pm 3.8\%$  versus  $27.7 \pm 3.1\%$ ,  $P < 0.05$ ). 양성대조군인 buspirone 투여군에서는  $43.4 \pm 2.15\%$ 로 대조군보다 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다( $P < 0.05$ ). 또한 open arm에 출입한 횟수의 백분율에서 200 및 400 mg/kg 용량의 SB-W 투여군의 비율이 대조군의 비율과 비교하여 용량 의존적으로 유의성 있게 증가하였음을 관찰할 수 있었다(각각  $50.2 \pm 2.7\%$ ,  $46.3 \pm 2.7\%$  versus  $34.8 \pm 3.2\%$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 1). 양성대조군인 buspirone 투여군에서는  $51.7 \pm 2.4\%$ 로 대조군의 비율보다 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다( $P < 0.05$ ).

##### 2) WAY-100635 및 flumazenil의 길항작용

Fig. 2에서 알 수 있는 바와 같이 open arm에 머무는 시간의 백분율이 대조군에서  $29.0 \pm 2.7\%$ 였으며, open arm에 출입한 횟수의 백분율은  $39.5 \pm 1.8\%$ 로 나타났다. Flumazenil 또는 WAY-100635 투여군에서의 open arm에 머무는 시간의 백분율은 각각  $30.0 \pm 2.5\%$ ,  $31.6 \pm 3.2\%$ 로 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화가 없었다. 또한 flumazenil 또는 WAY-100635 투여군에서의 open arm에 출입한 횟수의 백분율은 각각  $40.3 \pm 1.9\%$ ,  $41.1 \pm 2.5\%$ 로 나타났으며, open arm에 머무는 시간의 백분율과 마찬가지로 대조군과 비교하여 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.

그러나 SB-W와 WAY-100635의 병용 투여군의 open arm에 머무는 시간의 백분율 및 open arm에 출입한 횟수의 백분율은 각각  $49.4 \pm 3.7\%$ ,  $54.3 \pm 1.5\%$ 로 SB-W 투여군과 비교하여 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았으나, SB-W와 flumazenil의 병용 투여군의 open arm에 머무는 시간의 백분율 및 open arm에 출입한 횟수의 백분율은 각각  $29.6 \pm 3.0\%$ ,  $40.1 \pm 2.8\%$ 로 SB-W 투여군과 비교하여 유의성 있게 감소되었음을 확인할 수 있었다( $P < 0.05$ , Fig. 2). 이 결과를 통해서, SB-W의 항불안 작용이 GABA complex의 benzodiazepine 수용체의 antagonist인 flumazenil 의해 완전히 차단되어지는 것으로 보아 SB-W가 GABA 신경계를 경유하여 항불안 작용을 나타냄을 확인할 수 있었다.

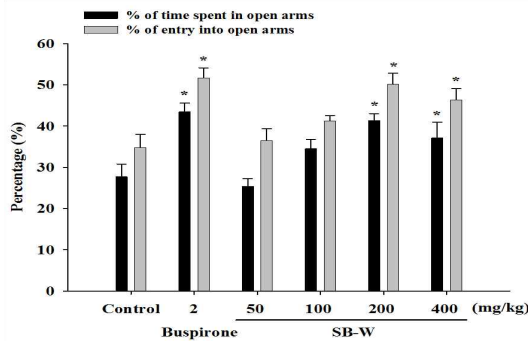


Fig. 1. Effect of a single treatment of the aqueous extract of *Scrophularia buergeriana* (SB-W) on the percentage of the time spent in open arms and the number of entries into open arms of the elevated plus-maze over a 5 min test period in the mice. Each bar represents mean  $\pm$  S.E.M. of 8-10 mice. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (\* $P < 0.05$  as compared with saline-treated control group).

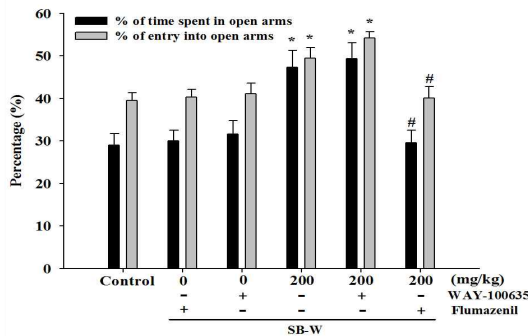


Fig. 2. Anxiolytic-like effects of the aqueous extract of *Scrophularia buergeriana* (SB-W) were blocked by flumazenil but not by WAY-100635. The data is expressed as the mean (S.E.M.) of the percentage of the time spent in and the number of entries into the open arms of the elevated plus-maze, 1 h after the oral administration of SB-W (200 mg/kg), SB-W (200 mg/kg) + WAY-100635 (0.3 mg/kg) or flumazenil (10 mg/kg) (30 min prior testing, i.p.), or saline; N = 8-10 mice per group. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (\* $P < 0.05$  versus saline-treated control, # $P < 0.05$  as compared with the SB-W-treated group).

## 2. Hole-board test에서 SB-W의 항불안 효과

Hole-board test를 이용한 SB-W의 항불안 효과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 알 수 있는 바와 같이, 200 및 400 mg/kg 용량의 SB-W 투여군에서 head-dipping 횟수가 대조군에 비하여

용량 의존적으로 유의성 있게 증가됨이 관찰되었다(각각  $88.1 \pm 2.9$ ,  $84.3 \pm 3.0$  versus  $71.9 \pm 3.2$ ,  $P < 0.05$ ).

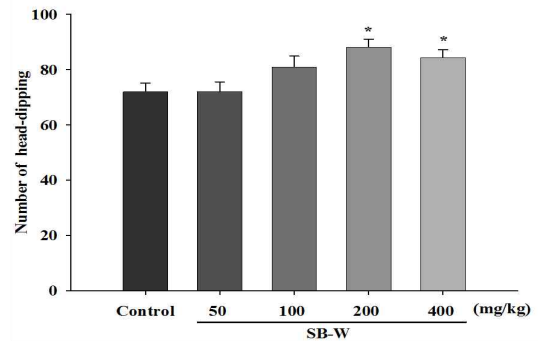


Fig. 3. Effects of the aqueous extract of *Scrophularia buergeriana* (SB-W) on the changes in head-dipping behaviors in mice tested on the hole-board. Mice were administered SB-W (50, 100, 200 or 400 mg/kg, p.o). Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 8-10 mice. P values for group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (\* $P < 0.05$  versus saline-treated control).

## 3. Locomotor activity test

SB-W의 투여가 자발운동력에 미치는 영향을 확인하기 위하여 open field test를 실시하였다. 대조군 및 SB-W(50, 100, 200 and 400 mg/kg) 투여군의 총 이동거리 및 rearing 횟수를 측정 한 결과, 유의성 있는 차이를 관찰할 수 없었다(Table 1).

Table 1. Effects of the aqueous extract of *Scrophularia buergeriana* (SB-W) on exploratory behavior of mice in the open field test.

Drugs	Dose (mg/kg)	Locomotor activity (cm)	Rearing Frequency (No.)
Control		2143.10 $\pm$ 129.58	47.70 $\pm$ 5.63
SB-W	50	2223.56 $\pm$ 79.33	51.57 $\pm$ 4.25
	100	2079.21 $\pm$ 76.96	50.43 $\pm$ 4.17
	200	2003.32 $\pm$ 57.68	55.14 $\pm$ 4.87
	400	2055.79 $\pm$ 58.76	46.11 $\pm$ 2.75

Exploratory behaviors of mice in the open field test were observed for 5 min 1h after being treated each drug or control. Each data represents the mean  $\pm$  SEM from 8 - 10 mice.

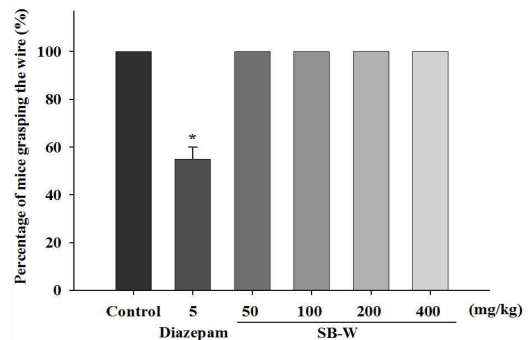


Fig. 4. Effects of the aqueous extract of *Scrophularia buergeriana* (SB-W) on horizontal wire test. Performance of mice in the horizontal wire test 1h after oral administration of control, diazepam (5 mg/kg), or SB-W. Data represent percentage of mice grasping the wire after administration of SB-W. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 8-10 mice. P values for group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (\* $P < 0.05$  versus saline-treated control).

## 4. Horizontal wire test

SB-W이 일반적인 항불안 약물들이 가지는 근육이완의 부작용을 나타내는지 확인하기 위하여 horizontal wire test를 실시하였다. Fig. 4에서 알 수 있듯이 대조 약물인 diazepam 5 mg/kg 투여군에서 실험동물이 wire에 매달리는 행동이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하고 있음을 확인하였다( $P < 0.05$ ). 그러나 SB-W 투여군에서는 대조군에 비교하여 어떠한 유의성 있는 변화를 관찰 할 수 없었다(Fig. 4). 이러한 결과로 통하여 SB-W는 benzodiazepine계 항불안 약물들의 투여에 의해 발생하는 근육이완의 부작용이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다.

## 고 찰

불안에 대한 현상의 효능을 확인한 결과, elevated plus-maze를 이용한 본 연구에서 SB-W의 200 mg/kg 및 400 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 open arm에서 머무른 시간에 대한 백분율이 증가하였으며, 또한 open arm으로의 출입횟수에 대한 백분율도 증가하였다. Hole-board test에서도 SB-W의 200 mg/kg 및 400 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 head-dipping의 횟수가 유의성 있게 증가하였다. locomotor activity의 활동성 실험에서는 총 이동거리의 변화가 없었으며, 또한 horizontal wire test에서도 대조군과 약물투여군 사이에 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 SB-W가 근육이완 및 행동과다의 부작용이 없으면서 항불안 작용을 가지고 있음을 의미하는 것이라고 할 수 있다.

지난 십 수 년 동안 의학 및 기타 생명 과학 여러 분야의 급속한 발전으로 불안의 본질을 분자 수준에서 이해할 수 있게 되었음에도 불구하고 불안의 발병율과 유병율은 지속적으로 증가하고 있으며, 뚜렷한 메커니즘이 규명되지 못하고 있으며, 정복할 수 있는 획기적인 치료법 또한 개발을 못하고 있는 실정이다. 현재 빈용 되고 있는 항불안 약물로는 benzodiazepine계 약물, 또는 buspirone, hydroxyzine, zolpidem 등이 있으며 대표적인 항우울 치료제에는 TCAs, MAO inhibitors, SSRIs, 5-HT<sub>2</sub> blockers, mirtazapine, venlafaxine 등이 사용되어 왔으나 장기간 사용 시, 그 부작용뿐만 아니라 내성 및 의존성 발현 등의 문제점이 발생되어 사용이 제한되어 있어서 보다 안전한 천연약물 개발의 중요성이 절실하다고 할 수 있다<sup>24-33</sup>. 또한 한방에서도 사용되고 있는 안신약물들에 대해서도 아직까지 약물들의 작용기전에 대해 여전히 불분명한 상태이어서 아직 사용에는 논란의 여지가 많은 상태이므로 이러한 한약재의 작용 메커니즘을 밝히는 것이 시급하다고 할 수 있다. 불안을 비롯한 뇌질환은 여러 가지 요소들이 작용하는 복합적인 질병이므로 예방제 탐색 및 치료제 연구에서도 이러한 다단계 과정을 제대로 반영할 수 있는 신뢰성 있는 실험모델과 생체지표의 사용이 고려되어야 한다. 최근 연구에 따르면 불안과 관련하여 생물학적 또는 연구가 진행되어 가바 신경계, 세로토닌 신경계, 노르아드레날린 신경계 및 neuropeptide 계 등 각종 신경전달물질과의 관계에 초점이 맞추어져 왔으며 이러한 정신병 등의 신경 화학적 지식은 새로운 치료약물의 개발에 커다란 도움을 주고 있으나, 지금까지 개

발된 많은 치료 약물들은 그 부작용 등으로 인해 사용에 제한을 받고 있다<sup>34,35</sup>.

불안에 대한 모델에는 geller-type이나 vogel-type의 anticonflict tests, hole-board test, social interaction test, elevated plus-maze 등이 있는데 이 중 elevated plus-maze는 흔히 불안 완화제나 불안 유도약물의 효과를 입증할 때 쓰이는 모델로, 좁고 어두운 곳을 선호하는 흰쥐의 특성을 이용한 것이다<sup>36</sup>. 벽이 설치된 closed arm 보다는 벽이 없는 open arm에서 더 많은 불안을 느끼기 때문에 불안이 많은 동물일수록 open arm에 머무는 시간이 짧다. 항불안 약물의 검색은 open arm에서 머문 시간의 연장 및 open arm으로의 진입횟수의 증가로서 평가되는데 이는 closed arm의 진입 회수 및 머문 시간의 감소로 표현된다. 따라서 본 연구에서 elevated plus-maze를 이용한 불안 실험동물 모델에서 SB-W 투여의 경우 항불안 효과와 일치한다고 할 수 있다. 또한 본 실험에서는 SB-W의 투여에 의해 locomotor activity가 변화되었는지 확인하기 위해 총 이동거리를 측정된 결과 SB-W의 모든 용량에서 대조군과 비교 시 차이를 보이지 않았다. 결론적으로 SB-W는 locomotor activity 및 근육이완 작용의 변화 없이 항불안 작용을 갖는 것이라고 할 수 있다.

최근 항불안제인 benzodiazepine계 약물의 작용기전은 억제적 신경전달물질인  $\gamma$ -amino butyric acid(GABA)의 강화라고 알려져 있다<sup>37</sup>. GABA는 포유류 뇌에서 중요한 억제성 신경전달물질로 시냅스 후 GABA<sub>A</sub> 수용체의 복합체에서 chloride 이온의 시냅스 후 세포(postsynaptic cell)내로의 투과력을 증가시킴으로써 큰 과분극을 일으켜 시냅스전달의 억제를 일으킨다. 중추신경계의 모든 부위에서 벤조디아제핀류는 GABA에 의한 chloride ion의 투과력을 강화하여 간접적으로 GABA 신경전달을 촉진하는 것으로 알려져 있다<sup>38</sup>. Liao 등은 baicalein과 baicalin의 항불안작용이 GABA<sub>A</sub> 수용체의 antagonist인 flumazenil에 의해 억제된다고 보고하고 있다<sup>39</sup>. Fig. 2에서 알 수 있듯이 5-HT<sub>1A</sub>의 antagonist인 WAY-100635와 SB-W추출물의 병용 투여에서 WAY-100635가 SB-W의 항불안 효과에 길항작용이 전혀 없었지만, GABA<sub>A</sub>의 antagonist인 flumazenil과 SB-W추출물의 병용 투여에서는 flumazenil이 SB-W의 항불안 효과에 길항작용을 하고 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 SB-W가 GABA<sub>A</sub>신경계를 경유하여 항불안 작용을 나타내며, 5-HT<sub>1A</sub>신경계와는 관련이 없다는 사실을 뒷받침하고 있는 것이다. 본 실험에 양성 대조군으로 사용한 buspirone은 benzodiazepine과는 달리 5-HT<sub>1A</sub>의 agonist로 작용하여 세로토닌으로 인해 유발되는 신경의 흥분을 차단하여 진정효과를 유발시켜 항불안 작용을 가진다고 보고되어 있다<sup>40</sup>. 그러나 본 연구에서 사용한 diazepam 5 mg/kg 투여에 의해 open arm에 머문 시간 및 open arm 출입횟수의 비율이 증가됨을 관찰할 수 있었지만 총 이동거리가 약 46 % 정도 감소하여 과량 복용으로 과다한 진정효과가 발현된다는 사실을 확인할 수 있었다(data not shown). 그러나 SB-W 투여에서 총 이동거리 측정 및 horizontal wire test에서 알 수 있듯이 비록 SB-W의 항불안 작용이 GABA 신경계와 관련이 있다고 생각되어지지만 benzodiazepine 계 약물과는 달리 근육이완이나 과다한 진정효

과가 나타나지 않음을 확인할 수 있다.

한약재 중 청열약으로 분류되고 있는 다양한 생약에는 다량의 flavonoid가 함유되어 있다는 사실은 이미 널리 알려져 있다. 대표적인 생약으로 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)을 들 수 있는데, Xu 등은 황금에서 flavonoid 성분인 baicalin이 우수한 항불안 효과가 있음을 확인하였고<sup>41)</sup>, Jung 등은 elevated plus-maze를 이용한 항불안 실험에서 황금의 물 추출물이 뛰어난 항불안 활성을 가지고 있음을 증명하였으며, 이것은 황금이 가지고 있는 flavonoid가 GABA<sub>A</sub> partial agonist로 작용하기 때문이라고 보고한 바 있다<sup>42)</sup>. 또한 천연 flavonoid 뿐만 아니라 합성되어진 flavonoid 역시 항불안 활성을 가지고 있다고 알려져 있다<sup>43)</sup>. 현삼에는 다양한 flavonoid를 함유하고 있는데, 비록 본 실험실에서 그 성분들의 효능을 확인한 것은 아니지만, 현삼이 가지는 항불안 효능은 현삼의 flavonoid성분에 의한 것이라 사료된다.

결론적으로, 본 연구의 결과에서 현삼의 물 추출물은 locomotor activity 및 근육이완이나 진정 등의 부작용이 없으면서 항불안 작용을 가지는 천연물이라고 생각되며, 신경 안정 효과를 갖는 건강기능식품 또는 의약품으로서 개발 가능성이 충분한 천연물질임을 시사하고 있다.

## 결 론

현삼의 물 추출물의 항불안 효능을 탐색하기 위하여 elevated plus-maze, hole-board test, horizontal wire test 및 open field test와 같은 동물 행동실험을 통하여 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Elevated plus-maze를 이용한 본 연구에서 SB-W의 200 mg/kg 및 400 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 open arm에서 머무른 시간의 백분율이 증가하였고, open arm으로의 출입 백분율 또한 증가하였다. Elevated plus-maze를 이용한 길항실험에서 benzodiazepine 수용체의 antagonist인 flumazenil에 의해 SB-W의 200 mg/kg의 항불안효능이 차단되는 것이 관찰되었다. Hole-board test를 이용한 항불안 효과를 확인한 결과 SB-W의 200 mg/kg 및 400 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 head-dipping의 횟수가 유의성 있게 증가하였다. Open field test를 이용한 locomotor activity 측정에서도 SB-W의 모든 용량에서 총 이동거리와 rearing 횟수의 변화가 없었으며, 또한 horizontal wire test에서도 대조군과 약물투여군 사이에 차이를 나타내지 않았다.

결론적으로, 본 연구의 결과에서 현삼의 물 추출물이 elevated plus-maze, hole-board test, horizontal wire test 및 open field test를 통하여 locomotor activity 및 근육이완이나 진정 등의 부작용이 없으면서 우수한 항불안 작용을 가지는 천연물이라고 생각되어지며 이러한 작용이 특히 GABA 신경계와 관련이 있음을 시사하고 있다. 향후 현삼의 항불안 작용의 평가를 위하여 다양한 실험모델의 개발이 필요할 것으로 생각되며 또한 이러한 작용에 대한 기전 연구가 더욱 상세히 진행되어야 할

필요성이 있다고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역혁신센터사업(대구한의대학교 한방생명자원연구센터)의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Sandford, J.J., Argyropoulos, S.V., Nutt, D.J. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. *Pharmacol. Ther.* 88: 197-212, 2000.
- Argyropoulos, S.V., Sandford, J.J., Nutt, D.J. The psychobiology of anxiolytic drug. Part 2: Pharmacological treatment of anxiety. *Pharmacol. Ther.* 88: 213-227, 2000.
- Kunovac, J.L., Stahl, S.M. Future directions in anxiolytic pharmacotherapy. *Psychiatr Clin North Am.* 18: 895-909, 1995.
- Leo, R.J. Movement disorders associated with the serotonin selective reuptake inhibitors. *Clin Psychiatry.* 57(10):449-454, 1996.
- Lucki, I. Serotonin receptor specificity in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry.* 57 Suppl 6: 5-10, 1996.
- Hoffman, E.J., Mathew, S.J. Anxiety disorders: a comprehensive review of pharmacotherapies. *Mt Sinai J Med.* 75(3):248-262, 2008.
- Ernst, E. Herbal remedies for anxiety - a systematic review of controlled clinical trials. *Phytomedicine.* 13(3):205-208, 2006.
- Saeed, S.A., Bloch, R.M., Antonacci, D.J. Herbal and dietary supplements for treatment of anxiety disorders. *Am Fam Physician.* 76(4):549-556, 2007.
- Peng, W.H., Hsieh, M.T., Lee, Y.S., Lin, Y.C., Liao, J. Anxiolytic effect of seed of *Zyziphus jujuba* in mouse of anxiety. *J. Ethnopharmacol.* 72(3):435-441, 2000.
- Wu, S.X., Zhang, J.X., Xu, T.L., Li, F., Zhao, S.Y., Lan, M.Y. Effects of seeds, leaves and fruits of *Ziziphus spinosa* and jujuboside A on central nervous system function. *China journal of Chinese Materia Medica.* 18: 685-687, 703-704, 1993.
- Jung, J.W., Yoon, B.H., Oh, H.R., Ahn, J.H., Kim, S.Y., Park, S.Y., Ryu, J.H. Anxiolytic-like effects of *Gastrodia elata* and its phenolic constituents in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 261-265, 2006.
- Kimura, T., Saunders, P.A., Kim, H.S., Rhee, H.M., Oh, K.W., Ho, I.K. Interactions of ginsenosides with ligand-bindings of GABA(A) and GABA(B) receptors. *Gen*

- Pharmacol. 25(1):193-199, 1994.
13. 전국한의약대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 영림사, pp 588-589, 2004.
  14. Xu Li and Wang Wei. Chinese Materia Medica. St. Albans: Donica Publishing. pp 130-131, 2002.
  15. Calis, I., Gross, G.A., Winkler, T., Sticher, O. Isolation and Structure Elucidation of Two Highly Acylated Iridoid Diglycosides from *Scrophularia scopolii*. *Planta Med.* 54(2):168-170, 1988.
  16. Li, Y.M., Jiang, S.H., Gao, W.Y., Zhu, D.Y. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. *Phytochemistry.* 54(8):923-925, 2000.
  17. Kim, S.R., Kang, S.Y., Lee, K.Y., Kim, S.H., Markelonis, G.J., Oh, T.H., Kim, Y.C. Anti-amnestic activity of E-p-methoxycinnamic acid from *Scrophularia buergeriana*. *Brain Res Cogn Brain Res.* 17(2):454-461, 2003.
  18. Lee, E.J., Kim, S.R., Kim, J., Kim, Y.C. Hepatoprotective phenylpropanoids from *Scrophularia buergeriana* roots against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity: action mechanism and structure-activity relationship. *Planta Med.* 68(5):407-411, 2002.
  19. Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci Methods.* 14: 149-167, 1985.
  20. Bonetti, E.P., Pieri, L., Cumin, R., Schaffner, R., Pieri, M., Gamzu, E.R., Muller, R.K.M., Haefely, W. Benzodiazepine antagonist Ro 15-1788: neurological and behavioral effects. *Psychopharmacology (Berl).* 78: 8-18, 1982.
  21. Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 350: 21-29, 1998.
  22. Overstreet, D.H., Pucilowski, O., Rezvani, A.H., Janowsky, D.S. Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. *Psychopharmacology(Berl).* 121(1):27-37, 1995.
  23. Hattesoehl, M., Feistel, B., Sievers, H., Lehnfeld, R., Hegger, M., Winterhoff, H. Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. *Phytomedicine.* 15(1-2):2-15, 2008.
  24. Kent, J.M., Mathew, S.J. and Gorman, J.M. Molecular Targets in the Treatment of Anxiety. *Society of Biological Psychiatry.* 52: 1008-1030, 2002.
  25. Uhlenhuth, E.H. Buspirone: a clinical review of a new, non-benzodiazepine anxiolytic. *J Clin Psychiatry.* 43(12):109-116, 1982.
  26. Gladney, M., Stanley, R.T., Hendricks, S.E. Anxiolytic activity of chloral hydrate and hydroxyzine. *Pediatr Dent.* 16(3):183-189, 1994.
  27. Chouinard, G., Lefko-Singh, K., Teboul, E. Metabolism of anxiolytics and hypnotics: benzodiazepines, buspirone, zopiclone, and zolpidem. *Cell Mol Neurobiol.* 19(4):533-552, 1999.
  28. Boyce, P., Judd, F. The place for the tricyclic antidepressants in the treatment of depression. *Aust N Z J Psychiatry.* 33(3):323-327, 1999.
  29. Bymaster, F.P., McNamara, R.K., Tran, P.V. New approaches to developing antidepressants by enhancing monoaminergic neurotransmission. *Expert Opin Investig Drugs.* 12(4):531-543, 2003.
  30. Segrave, R., Nathan, P.J. Pindolol augmentation of selective serotonin reuptake inhibitors: accounting for the variability of results of placebo-controlled double-blind studies in patients with major depression. *Hum Psychopharmacol.* 20(3):163-174, 2005.
  31. Cowen, P.J. A role for 5-HT in the action of antidepressant drugs. *Pharmacol Ther.* 46(1):43-51, 1990.
  32. Anttila, S.A., Leinonen, E.V. A review of the pharmacological and clinical profile of mirtazapine. *CNS Drug Rev.* 7(3):249-264, 2001.
  33. 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.
  34. Sheehan, D.V., Sheehan, K.H. Current approaches to the pharmacologic treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull.* 40(1):98-109, 2007.
  35. Pollack, M.H. Comorbid anxiety and depression. *J Clin Psychiatry.* 66(8):22-29, 2005.
  36. Imaizumi, M., Onodera, K. Animal models of 'anxiety'. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 115(1):5-12, 2000.
  37. Kent, J.M., Mathew, S.J. and Gorman, J.M. Molecular Targets in the Treatment of Anxiety. *Society of Biological Psychiatry.* 52: 1008-1030, 2002.
  38. 한국약학대학 협의회 약물학분과회. 약물학. 서울, 신일상사, p 237, 1998.
  39. Liao, J.F., Hung, W.Y. and Chen, C.F. Anxiolytic-like effects of baicalein and bacalin in the Vogel conflict test in mice. *European Journal of Pharmacology.* 464: 141-146, 2003.
  40. Harvey, R.A., Champe, M.J., Mycek, M.J. *Lippincott's Illustrated Reviews Pharmacology*, 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins. pp 89-93, 119-126, 2000.
  41. Xu, Z., Wang, F., Tsang, S.Y., Ho, K.H., Zheng, H., Yuen,

- C.T., Chow, C.Y., Xue, H. Anxiolytic-Like Effect of baicalin and its additivity with other anxiolytics. *Planta Med.* 72(2):189-192, 2006.
42. Jung, J.W., Ahn, N.Y., Park, S.H., Oh, J.K., Oh, H.R., Lee, B.K., Om, A.S., Kime, B.S., Kim, D.H., Ryu, J.H. The Anxiolytic-like Effects of *Scutellaria baicalensis* Using Elevated Plus-Maze in Rats. *Kor J Pharmacol.* 35(1):22-27, 2004.
43. Salgueiro, J.B., Ardenghi, P., Dias, M., Ferreira, M.B., Izquierdo, I., Medina, J.H. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 58(4):887-891, 1997.