

만성스트레스 모델에서 하엽추출물의 항우울 효과

강민구^{1#}, 김영화¹, 임아랑¹, 남병수², 채성욱¹, 이미영^{1*}

1 : 한국한의학연구원 한의신약개발그룹, 2 : 한국한의학연구원 인프라운영팀

Antidepressant-like effects of *Nelumbo nucifera* leaves extract in chronic mild stress model

Min Gu Kang^{1#}, Young Hwa Kim¹, A Rang Im¹, Byung Soo Nam², Sung wook Chae¹, Mi Young Lee^{1*}

1 : KM-Based Herbal Drug Development Group, Korea Institute of Oriental Medicine

2 : Infrastructure Management Team, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : Chronic mild stress (CMS) model is currently recognized as a better animal model of depression. The purpose of this study was to investigate the antidepressant-like effects of the *Nelumbo nucifera* leave extract using CMS model.

Methods : The antidepressant-like effects of *Nelumbo nucifera* leaves extract was determined by using animal models of depression. Male ICR mice were divided into four groups: saline-treated normal, without CMS; saline-treated stress control; CMS+ Imipramine(20mg/kg); CMS+*Nelumbo nucifera* leaves extract(200mg/kg). All mice except the normal group exposed an unpredicted sequence of chronic mild stressors for 5 weeks. The behavior of mice were detected by sucrose preference test, forced swim test and tail suspension test. Then concentration of corticosterone in serum was detected by enzyme immunoassay.

Results : *Nelumbo nucifera* leaves extract administration by daily gavage from the 3rd week exhibited an antidepressant-like effect on CMS-induced depression in mice. *Nelumbo nucifera* leaves extract administration at dose of 200 mg/kg significantly increased the sucrose consumption, and decreased the immobility durations in forced swim test and tail suspension test. Furthermore the corticosterone level decreased than control group.

Conclusions : Chronic mild stress can affect mouse behavior and corticosterone level and cause depression. The present experiments not only further confirm the antidepressant-like effects of *Nelumbo nucifera* leaves extract in the sucrose preference test, forced swimming test and tail suspension test, but also the improving effects of *Nelumbo nucifera* leaves extract on the depression-like symptoms in the CMS model. *Nelumbo nucifera* leaves extract has the antagonism on CMS and produce antidepressive effects.

Key words : Antidepressant, *Nelumbo nucifera*, Chronic mild stress, Forced swimming test, Tail suspension test, Sucrose preference test

서론

전 세계적으로 인구의 17-20%정도가 경험하는 우울증은 사회, 경제적으로 심각한 영향을 미치고 있는 정서장애이다¹⁾. 세계보건기구 WHO는 우울증이 주요 사망 및 장애 원인 중 4번째 중증 질환으로 분류하였고, 2020년에는 모든 연령에서 나타날 수 있는 미래질환 1위로 예측하였다²⁾.

우울증의 발생 원인은 환경적, 신체적, 심리적 변화 등과 같은 여러 원인들이 복합적으로 어우러져 어린아이부터 노인 까지 다양한 연령층에서 발생되고 있으며, 이러한 원인들 중 현대사회에서 가장 큰 비중을 차지하고 있는 원인은 스트레스라 볼 수 있다. 만성적인 스트레스는 우울증을 유발하는 가장 위험 인자로서, 지속적인 스트레스가 계속적으로 반복될시 뇌의 신경발달이 저하되고 쾌감상실, 과민성, 집중력 저하, 식

*교신저자 : 이미영. 대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한의신약개발그룹
· Tel : 042-868-9504 · E-mail : mylee@kiom.re.kr
#제1저자 : 강민구. 대전광역시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한의신약개발그룹
· Tel : 042-868-9672 · E-mail : eytro86@kiom.re.kr
· 접수 : 2014년 2월 12일 · 수정 : 2014년 3월 19일 · 채택 : 2014년 3월 20일

욕부진, 수면장애 등의 상태가 나타나는 우울증 증상이 유발된다³⁻⁶⁾.

특히 우울증이 유발된 사람은 자살이란 극단적 선택뿐만 아니라, 관상동맥질환, 제2형 당뇨병과 같은 성인성 질환을 유발시킬 수 있는 연관성 및 만성적인 내과 질환의 예후를 더욱 나쁘게 할 수 있는 원인으로도 알려져 있다⁷⁾.

현재 사용되고 있는 우울증 치료제는 삼환성 항우울제(tricyclic antidepressants, TCA), 모노아민 산화효소 억제제(monoamine oxidase inhibitor, MAOI), 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI), 노르아드레날린 재흡수 억제제(noradrenergic reuptake inhibitor, NARI) 그리고 세로토닌-노르아드레날린 재흡수 억제제(Serotonin and noradrenergic reuptake inhibitor, SNRIs) 등의 약물들이 많이 사용되고 있지만⁸⁻¹²⁾, 아직까지 우울증 유발에 대한 정확한 경로는 명확히 밝혀지지 않아, 부작용을 최소화 하면서 재발 가능성이 적은 치료제에 대한 요구는 계속적으로 증가되고 있는 실정이다¹³⁾.

현재 대부분 우울증 실험에 이용되는 동물모델은 스트레스와 연관되어져 있으며, 장기간 스트레스에 노출된 쥐는 우울증 환자에서 볼 수 있는 신경 내분비 활동과 행동 등이 유발되며, 장기적인 스트레스를 받은 쥐는 인간의 정서 장애에 대한 유용한 동물 모델로 여겨지고 있다¹⁴⁾.

현재 대부분의 항우울제의 작용기전을 이해하는데 정상적인 실험동물에 투여하는 것보다는 스트레스와 같이 변화된 상황에서 항우울제를 투여하여 효과를 관찰하는 것이 보다 임상 상황에 근접한 것으로 생각되어 지고 있으며¹⁵⁾, Chronic mild stress (CMS) 동물모델 통한 우울증 개선 관련 연구가 많이 이루어지고 있다.

CMS 모델은 인간이 일상에서 받는 스트레스로 인한 우울증 증상을 가장 잘 묘사할 수 있는 동물모델로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. 이러한 우울증 동물모델에서 우울증이 유발하기 위해 사용되는 다양한 스트레스는 뇌 기능에 다양한 변화를 일으킬 수 있는데, 예를 들어 조건화된 공포 스트레스나 지속적인 심리사회적 스트레스 또는 구금 스트레스는 여러 뇌 영역에서 시냅스 가소성을 변화시키는 것으로 알려져 있다^{20,21)}.

이 실험방법의 특징은 실험동물이 예측할 수 없는 경미한 스트레스를 반복적으로 부여함으로써 습관화가 나타나지 않도록 한다는 것이며, 우울증의 주요 증상인 무쾌감증(anhedonia)과 비슷한 증상이 나타난다는 것이다.

CMS 실험에서 나타나는 실험동물의 무쾌감증은 음식이라는 보상에 대한 반응성이나 민감도가 저하되는 것으로 추정되고 있다^{16,17)}. 이처럼 CMS 절차를 적용한 동물은 전형적으로 심한 물리적, 정신적 스트레스를 받게 되고, 이는 신경세포의 정상적인 세포생리에 변화를 가져오게 될 것이며 시냅스 가소성의 변화를 반영하는 장기상승작용(longterm potentiation; LTP)를 방해할 가능성이 높은 것으로 사료된다²²⁾.

荷葉은 수련과(Nymphaeaceae)의 여러해살이 수생식물인 연(*Nelumbo nucifera Gaertner*)의 잎으로 한의학에서는 해열, 해독작용에 사용하였고, 여름에 설사를 그치게 하고 두통과 어지럼증을 해소시키며 토혈, 코피, 대변출혈, 자궁출혈, 산후어혈로 인한 어지럼증을 치료하는데 사용되었다²³⁾. 그 외에도 荷葉은 피부노화 방지, 항산화, 지질저하, 항비만, 포도당 자극 인슐린 분비촉진 효과 등의 생리활성 효과 또한 보고

되어 있다²⁴⁻²⁷⁾.

본 연구에서는 만성 스트레스로 인해 발생하는 우울증의 해결 방안을 모색하고자 Chronic mild stress 방법으로 우울증 증상을 유발시킨 동물모델에서, 두통완화 효과 및 항산화 효과를 가진 荷葉 추출물의 항우울 효과를 검증하고자, 자당 선호도(Sucrose preference test, SPT)변화, 강제수영법(Forced swim test, FST), 꼬리매달기(Tail suspension test, TST) 등의 우울증적 증상 개선 유무를 확인 할 수 있는 행동실험 및 스트레스 관련 호르몬인 corticosteron 함량 변화 통하여 荷葉 추출물의 항우울 효과에 대한 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

실험동물로 사용된 8주령 수컷 ICR 마우스는 (주) 샘타코 바이오 코리아(경기도, 한국)에서 공급 받아 사용하였다. 실험동물은 Specific Pathogen Free(SPF) 시설인 한국한의학연구원 실험동물연구센터에서 7일간 적응 시킨 후 스트레스를 주지 않는 정상군, 스트레스만 주는 대조군, 스트레스와 시판 항우울제를 투여하는 양성대조군, 스트레스와 추출물을 투여하는 실험군으로, 각 군당 10마리씩 총 4군으로 구분하여 실험을 진행하였다. 실험방법은 한국한의학연구원 윤리위원회의 심의(승인번호: 13-079)을 거쳤으며, 실험동물 사육 및 유지 는 한국한의학연구원 실험동물연구센터의 동물 관리 및 사용 규정에 입각하여 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$ 내외 명암주기 12시간 주기로 일정하게 유지된 사육실에서 Individually Ventilated Cage (IVC)에 5마리씩 넣어 사육하였다.

2) 약재

본 실험에서 사용된 荷葉은 (주)광명당제약(울산, 한국)으로부터 구입하여 진행하였으며, 표본은 연구원에 보관되어 있다(표본번호 : KIOM012909).

2. 실험방법

1) 추출물 제조

荷葉 추말 200g에 10배량의 3차 증류수를 가하여 2시간 동안 환류추출(100°C) 하고 전액을 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후 잔류물에 동량의 물을 첨가하여 2차 추출하였다. 1, 2차 추출액을 감압농축(Buchi Rotavapor R-114 system) 한 후, 동결건조(일신랩 Freeze Dryer FD5508A, Korea)를 통하여 荷葉 물 추출물 건조분말을 제조하였다. 제조된 건조분말은 균일한 품질을 위한 균질화 작업 후 바코드를 부착하여 냉장보관(4°C 이하) 하면서 실험에 사용하였다. 본 논문에서는 실험에 사용된 荷葉 추출물을 'NLE' 란 약자로 표기하였다.

2) 몸무게 측정 및 경구 투여

실험동물의 몸무게 측정은 5주간 매주 측정 하였으며, 경

구 투여에 사용한 NLE와 양성대조군인 Imipramine은 생리 식염수에 200 mg/kg과 20 mg/kg의 용량으로 녹여 매일 오전 09:00에 3주간 경구투여 하였다. 약물 투여 없이 스트레스만 주는 대조군은 동일한 용량에 생리식염수를 경구투여 하였다. 양성대조군인 Imipramine은 시그마 알드리치 코리아(St. Louis Mo)의 제품을 사용하였다.

3) Chronic mild stress (CMS) 방법

Chronic mild stress 모델은 1984년 Willner에 의해 제안된 실험 모델로 본 실험에서는 Willner의 실험방법을 일부 수정하여 실시하였다¹⁴⁾. 실험동물에 가해진 스트레스는 물 또는 먹이 박탈, 물 박탈 후 빈 물병 제시, 먹이 박탈 후 먹이 제한, 주간·야간 주기의 역전, 고밀집 사육, 사육 상자 기울이기 (45°), 깔집 제거, 축축한 깔집 등이 포함되어 있다 (Table 1). CMS는 총 5주 동안 진행하였으며, 정상군을 제외한 모든 실험군에 처음 2주간은 CMS만을 적용하였고, 그 후 3주간은 CMS 및 약물 투여를 병행 하였다(Fig. 1). 실험동물은 언제 어떤 종류의 스트레스가 제시될지 예측 할 수 없었다. 정상군은 스트레스가 적용되는 집단과 접촉을 피하도록 다른 사육실에서 사육 하였고, 자당 선호도 검사 전날 먹이, 물 박탈 이외에는 물과 먹이를 자유롭게 공급 하였다.

Table 1. Chronic mild stress regime.

Day	Week				
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
Sunday	WFD(24hr)	WFD(24hr)	WFD(24hr)	WFD(24hr)	WFD(24hr)
Monday	SC (9hr)	CT (24hr)	SC (24hr)	CT (24hr)	SC (24hr)
	OI (12hr)	RAF (3hr)	EWB (3hr)	RAF (3hr)	EWB (3hr)
Tuesday	CH (24hr)	OI (12hr)	OI (12hr)	O,I (12hr)	OI (12hr)
	CT (16hr)	CH (24hr)	WC (24hr)	WC (24hr)	CH (24hr)
Wednesday	WC (24hr)	CT(16hr)	FD (16hr)	WD (16hr)	CT(16hr)
	WC (24hr)	WC (24hr)	SC (24hr)	CH (24hr)	WC (24hr)
Thursday	SC (24hr)	WD (16hr)	RAF (3hr)	CT(16hr)	FD (16hr)
	FST(5min)	CH (24hr)	CH (24hr)	S,C (24hr)	SC (24hr)
Friday	CT (24hr)	CT (9hr)	CT (9hr)	FST(5min)	RAF (3hr)
	CH (24hr)	SC (24hr)	CT (24hr)	CT (24hr)	OI (12hr)
Saturday	WC (9hr)	FD (16hr)	FST (5min)	CH (24hr)	CT (24hr)
	WC (9hr)	WC (9hr)	WC (9hr)	WC (9hr)	WC (9hr)

WFD, Water/Food Deprivation; WD, Water Deprivation; WC, Wet Cage ; EWB, Empty Water bottle; FD, Food Deprivation; CH, Crowded Housing; CT, Cage Tilt; SC, Solid Cage; RAF, Restricted Access to Food; OI, Overnight Illumination; FST, Forced Swim Test.

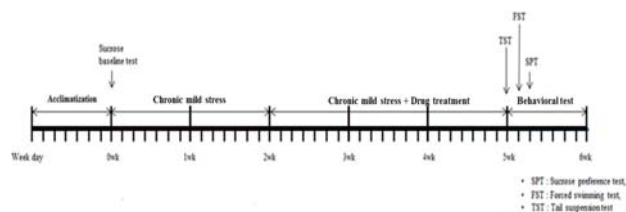


Fig. 1. The outline of design for chronic mild stress and behavior test.

4) 자당용액 섭취 검사 (Sucrose preference test, SPT)

CMS를 진행 후 실험동물의 1% 자당용액 섭취량 변화를 통하여 우울증 유발 관련 행동 변화 증가극에 대한 무쾌감 반응을 확인 지표로 결정하였다^{16,17)}. 자당용액 섭취량 변화 확인 전 실험동물을 1% 자당용액에 적응시키기 위해하여 검사 48시간 전 물통에 자당용액 넣어 섭취 할 수 있게 하였다. 검사 24시간 전에는 절수, 절식을 시켰으며, 검사 당일 3시간 동안의 자당용액 섭취량 변화를 물병 무게의 변화를 통하여 확인하였다. 측정은 스트레스 전 (0 week)와 CMS 5주 후(5 week) 총 2번 측정하였다.

5) 강제수영실험(Forced swimming test, FST)

NLE의 항우울 효과를 측정하기 위해 Porsolt 등의 방법을 이용하였다²⁸⁾. 높이 40cm 직경 20 cm되는 수조에 온도 25 ± 1°C의 물을 30 cm가 되게 채운 후 실험용 쥐를 한 마리씩 수조에 넣고 총 6분 중 최초 2분은 적응시간으로 측정하지 않고, 마지막 4분 동안의 실험동물 부동상태(immobility) 시간을 측정하였다. 부동상태는 머리만을 물 위로 드러내기 위한 최소한의 움직임만 하면서 똑바로 서서 움직이지 않고 떠 있는 경우를 부동상태로 정의하였다.

6) 꼬리매달기 (Tail suspension test, TST)

꼬리매달기 실험은 Steru 등의 방법을 이용하였다²⁹⁾. 실험용 쥐 꼬리 끝 1cm 정도에 고정 장치를 장착 후 지면에서 50cm 떨어진 위치에 매달고, 총 6분 동안의 측정 중 최초 2분은 적응시간으로 측정하지 않고 마지막 4분 동안의 실험동물 상태 중 부동상태(immobility) 시간을 측정하였으며, 부동상태는 매달려있는 상태에서 아무런 움직임 없이 완전히 멈춰있는 상태를 부동상태로 간주하였다.

7) 혈액 채취 및 Corticosterone의 측정

혈액 채취는 모든 실험동물을 처사 전 18시간 이상 절식시킨 후, 심장에서 혈액을 각각 1mL씩 채취하였으며, heparin이 코팅되어 있는 blood collection vacutainer tube (BD, NJ, USA)에 넣어 잘 섞어준 후 상온에서 2시간을 방치하였다. 그 후 4°C, 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액 (plasma)을 분리, 실험 전까지 냉동보관(-20°C)하였다. Corticosterone 농도는 일반적으로 사용하는 EIA kit (Corticosterone EIA kit, Oxford Biomedical Research, USA)를 이용하여 측정하였다.

8) 통계처리

결과 값의 표기는 ‘평균±표준편차’ 로 표시하였으며, 실험군별 차이의 유의성 검증은 일원변량분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 통계적 유의성은 p<0.05인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 몸무게 변화

NLE의 CMS모델에서의 체중 변화에 대한 효과를 확인해본 결과, 초기 체중은 정상군 32.1±0.8g, 대조군 32.5 ±

0.7g, NLE 투여군 32.9 ± 0.8g, Imipramine 투여군 31.9 ± 1.0g으로 모든 군의 체중은 유사하게 나타났다. 그러나 CMS 진행 2주차부터 CMS가 진행된 실험군들의 체중은 정상군에 비해 약 3g 이상씩 급격하게 감소하기 시작했다. 반면 CMS 3주차부터 NLE와 Imipramine를 투여한 군의 체중은 투여가 진행됨에 따라 정상군과 비교하였을 때 체중이 점차 회복 되는 것을 확인 할 수 있었으나, NLE 투여군의 체중 회복은 Imipramine 투여군 보다는 낮았다(Table 2).

Table 2. The effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract on the body weight of mice

	Group			
	Normal	Control	NLE	Imipramine
0 week	32,1±0,8	32,5±0,7	32,9±0,8	31,9±1,0
1 week	33,3±1,2	31,9±0,9	32,0±0,8	31,8±0,9
2 week	33,9±0,9	29,5±1,2	30,1±1,3	30,4±1,2
3 week	34,7±0,8	29,1±1,5	30,8±0,9	31,5±1,1
4 week	35,0±1,5	28,8±0,8	31,2±0,7	32,8±0,7
5 week	35,5±0,9	28,3±0,7	32,1±1,0	33,5±0,8

2. 자당선호도 변화

우울증 유발 증상 중 하나인 무쾌감 반응에 대한 확인 지표인 자당 선호도 확인은 CMS 진행 전(0 week)에서는 각 그룹별 자당 선호도의 변화는 크게 나타내지 않았다. 5주 동안의 CMS 진행 후 각 그룹별 자당 선호도는 정상군과 비교해 보았을 때 대조군 24.0%, NLE 투여군 11.3%, Imipramine 투여군 3.4%의 자당 선호율이 감소하였다(Fig. 2). 반면에 양성대조군인 Imipramine 투여군 보다는 NLE 투여군의 자당선호도에 대한 회복율은 낮았지만, 스트레스만 받은 대조군에 비해 NLE 투여군의 자당 선호율은 12.6% 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

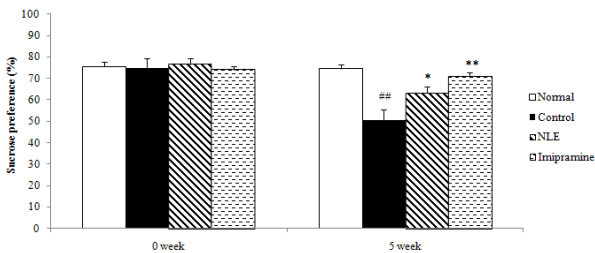


Fig. 2. Sucrose consumption of mice. The sucrose preference test was carried out before stress (0 week) and 5 weeks after stress (5 week). All values given are the mean±S.D. ##P<0.01, as compared with the normal group. *P<0.05, **P<0.01 as compared with the control group.

3. 강제수영에서의 부동상태 시간 변화

강제수영에서의 우울적 행동의 척도인 부동상태의 시간 변화를 각 군별로 확인해본 결과, 정상군에 비해 대조군의 부동상태 시간은 115초 이상 더 오래 지속되었다. 반면 NLE와 Imipramine 투여군의 부동상태 시간은 정상군에 비해 증가하였지만 스트레스만 받은 대조군과 비교하였을 때 각각 61

초(p=0.02), 83초(p=0.002) 감소하였다. 하지만 NLE 투여군의 부동상태 시간은 Imipramine 투여군 보다 22초 더 길게 나타났다(Fig. 3).

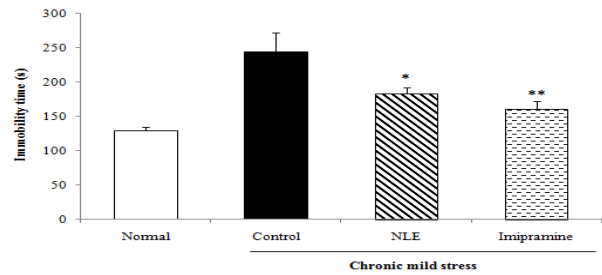


Fig. 3. Effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract on the immobility duration of mice in the forced swimming test. All values are expressed as mean±S.D. Immobility duration was measured for the last 4 min of the forced swimming test. *P<0.05, **P<0.01 as compared with the control group.

4. 꼬리매달기에서의 부동상태 시간 변화

NLE 투여 후 꼬리매달기에서의 부동상태 시간 변화를 확인해본 결과(Fig. 4), 정상군에 비해 스트레스만 받은 대조군의 부동상태 시간은 84초 이상 더 오래 지속되었다. 반면 NLE와 Imipramine 투여군의 부동상태 시간은 정상군에 비해서는 증가하였지만, 스트레스만 받은 대조군과 비교하였을 때 각각 27초(p=0.04), 78초(p=0.0002) 감소하였다. 하지만 NLE 투여군의 부동상태 시간은 Imipramine 투여군 보다는 51초 더 길게 나타났다.

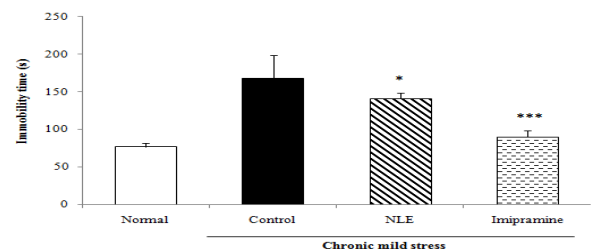


Fig. 4. Effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract on the immobility duration of mice in the tail suspension test. All values are expressed as mean±S.D. Immobility duration was measured for the last 4 min of the tail suspension test. *P<0.05, ***P<0.001 as compared with the control group.

5. Corticosterone 함량 변화

스트레스 관련 호르몬인 Corticosterone의 함량 변화는 5주간의 CMS 진행 후 실험동물의 혈장을 이용하여 측정하였다(Fig. 5). 정상군 (27.0 ng/mL)과 비교하였을 때 CMS 진행 군들의 corticosterone 함량은 대조군 51.5 ng/mL, NLE 투여군 38.1 ng/mL, Imipramine 투여군 32.1 ng/mL으로 스트레스로 인해 증가하였다. 반면, 스트레스만 받은 대조군과 비교하였을 때 NLE 투여군의 corticosterone 함량은 13.4 ng/mL 감소하였으나 Imipramine 투여군 보다 corticosterone 감소량의 변화는 적었다.

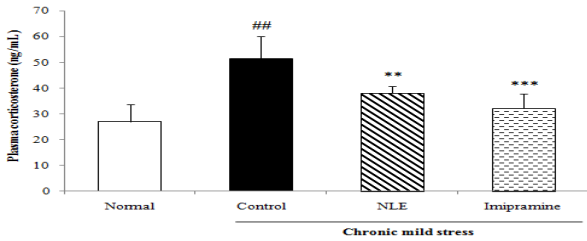


Fig. 5. Corticosterone level of Stress-associated hormone. The levels of corticosterone in plasma was determined by enzyme linked immunoadsorbent assay. Data are means±S.D. ##P<0.01, as compared with the normal group. **P<0.01, ***P<0.001 as compared with the control group.

고찰

본 연구에 이용된 CMS방법을 통한 실험동물의 우울증 상태 유발 및 NLE의 항우울 효과에 대한 검증은 자당섭취량 변화, 강제수영, 꼬리매달기와 같은 행동실험 및 스트레스 호르몬인 corticosterone의 변화를 이용하여 확인 하였다.

먼저 CMS 방법을 통하여 실험동물의 상태가 우울증으로 유도되었는지 확인하기 위해 체중과 자당 선호도 변화를 확인 하였다. CMS와 같은 방법으로 지속적인 스트레스에 노출 된 동물은 스트레스를 받지 않은 동물에 비하여 체중 및 자당 선호율이 감소하며 이를 지표로 실험동물의 우울증 유발 유무를 확인 할 수 있다^{16,17}. 또한 CMS로 인해 우울증이 유발된 실험동물의 자당섭취량 감소는 CMS처치 기간 이후에도 몇 주 간 지속되는 것으로 알려져 있다¹⁶.

본 실험에 이용된 실험동물들의 체중 감소와 자당섭취량 감소 결과를 토대로 CMS 방법을 통한 우울증 유발이 제대로 유도됐음을 확인 할 수 있었다.

NLE의 항우울 효과를 확인하기 위해 CMS로 우울증이 유발된 동물모델에게 3주간 NLE 200 mg/kg의 농도로 투여 후 자당섭취량 변화 및 강제수영(FST), 꼬리매달기(TST) 행동 실험을 진행하였다. 그 결과 NLE을 투여한 군에서의 우울증 유발 유무의 육안적 지표인 자당 선호도의 회복율은 스트레스만 받은 대조군 보다는 증가한 것을 확인하였다. 또한 행동제한적인 공간에서 우울증이 유발된 실험동물의 부동적 상태의 시간의 증가를 통하여 절망과 정신적 우울감 상태를 확인하는 실험으로 알려져 있는^{28,29} FST와 TST의 행동실험 결과를 보면 부동자세의 지속 시간이 스트레스만 받은 대조군에 비해 NLE을 투여한 군에서 상당히 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 이 결과들을 종합해 볼 때 NLE는 양성대조군인 Imipramine 보다는 항우울 효과는 낮지만, 우울증 행동 개선 효과가 있음을 확인 할 수 있었다.

또 CMS와 같이 우울증 증상을 유발 할 수 있는 스트레스 과정들은 높은 수준의 코르티코스테론(Corticosterone)을 방출 시킬 수 있다는 연구 결과가 알려져 있다³⁰⁻³³. 스트레스에 의한 코르티코스테론의 증가는 해마에 신경세포 손상 및 해마 신경세포의 고유한 속성에 영향을 미쳐 해마 신경세포의 흥분성을 감소시키며 이는 해마 LTP의 손상을 가져 온다 보고되어 있다^{34,35}. 3주간 NLE을 투여한 군은 스트레스만 받은 대조군에 비해 코르티코스테론의 상승률이 낮았으며, NLE

을 투여를 통하여 스트레스 완화 및 그로인한 뇌의 산화적 손상 보호효과도 예측해 볼 수 있었다.

위 결과들을 종합해 볼 때 CMS모델을 통한 항우울 효과 검증 실험은 항우울제제 개발 효능 평가 실험에 유용하다고 사료되며, NLE은 양성대조군인 Imipramine보다는 항우울 효과가 뛰어나진 않았지만 우울증 행동 개선 및 스트레스 호르몬의 분비를 저하시킬 수 있는 항우울 효과가 있음을 확인 하였다. 또한 스트레스로 인해 발생 될 수 있는 뇌 손상에 대한 보호 효과 가능성을 예측해 볼 수 있었으며, 차후 뇌신경 보호 효과에 대한 효능 검증 및 항우울 효과를 나타내는 물질에 대한 구조 분석이 필요 할 것으로 사료된다.

결론

Chronic mild stress 모델을 이용한 荷葉 추출물(NLE)의 항우울 효과를 확인하기 위해 진행된 이번 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CMS로 인해 우울증이 유발된 동물모델에서 특징적으로 나타나는 체중 및 자당섭취량 감소는 3주 동안의 NLE (200mg/kg)을 투여함으로써 증가하는 것을 확인하였다.
2. 항우울 효과 확인을 위한 행동실험인 강제수영(FST), 꼬리매달기(TST)에서 스트레스만 받은 대조군과 비교하였을 때 포기상태를 나타내는 부동자세 시간이 감소하는 것을 확인하였다.
3. NLE을 투여한 군과 스트레스만 받은 대조군을 비교 하였을 때 스트레스 호르몬인 코르티코스테론(corticosterone) 수치가 낮아지는 것을 확인하였다.

이상의 결과로 보아 荷葉 추출물(NLE)은 항우울 효과 및 스트레스 완화 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 주요사업 ‘한의 생체에너지 대사 기반 노화조절 연구(K13101)’의 지원을 받아 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

Referenses

1. Kessler RC, McGonagle KA, Zhao S, Nelson CB, Hughes M, Eshleman S. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. Arch Gen Psychiatry. 1994 ; 51 : 8-19.
2. Kim JH, Kim SY, Lee SY, Jang CG. Antidepressant-like effects of Albizzia julibrissin in mice: involvement of the 5-HT1A receptor system. Pharmacol Biochem

- Behav. 2007 ; 87 : 41–7.
3. Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 ; 98(22) : 12796–801.
 4. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*. 1997 ; 17(7) : 2492–8.
 5. Garcia R. Stress, metaplasticity, and antidepressants. *Curr Mol Med*. 2002 ; 2(7) : 629–38.
 6. Tanapat P, Galea LA, Gould E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci*. 1998 ; 16(3–4) : 235–9.
 7. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of Depression. *Neuron*. 2002 ; 34(1) : 13–25.
 8. Anderson, IM. SSRIs versus tricyclic antidepressants in depressed inpatients: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *Depress Anxiety*. 1998 ; 7(1) : 11–7.
 9. Anderson, I.M. Meta-analytical studies on new antidepressants. *Br Med Bull*. 2001 ; 57 : 161–78.
 10. Bouvier N, Trenque T, Millart H. Development of antidepressant drugs. Experience and prospects. *Presse Med*. 2003 ; 32(11) : 519–22.
 11. Mandrioli R, Mercolini L, Saracino MA, Raggi MA. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs): therapeutic drug monitoring and pharmacological interactions. *Curr Med Chem*. 2012 ; 19(12) : 1846–63.
 12. Steffens DC, Krishnan KR, Helms MJ. Are SSRIs better than TCAs? Comparison of SSRIs and TCAs: a meta-analysis. *Depress Anxiety*. 1997 ; 6(1) : 10–8.
 13. Sarko J. Antidepressants, old and new. A review of their adverse effects and toxicity in overdose. *Emerg Med Clin North Am*. 2000 ; 18(4) : 637–54.
 14. Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*. 1984 ; 83(1) : 1–16.
 15. Shin KH. Animal models of depression and screening of antidepressants. *Kor J Psychopharmacol*. 2000 ; 11(4) : 291–303.
 16. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987 ; 93(3) : 358–64.
 17. Luo DD, An SC, Zhang X. Involvement of hippocampal serotonin and neuropeptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress. *Brain Res Bull*. 2008 ; 77(1) : 8–12.
 18. An L, Zhang YZ, Yu NJ, Liu XM, Zhao N, Yuan L, Li YF. Role for serotonin in the antidepressant-like effects of a flavonoid extract of Xiaobuxin-Tang. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008 ; 89(4) : 572–80.
 19. Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 1981 ; 5(2) : 247–51.
 20. Gracia R, Vouimba RM, Jaffard R. Contextual conditioned fear blocks the induction but not the maintenance of lateral septal LTP in behaving mice. *J Neurophysiol*. 1997 ; 78(1) : 76–81.
 21. Pavlides C, Nivon LG, McEwen BS. Effect of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus*. 2002 ; 12(2) : 245–57.
 22. Kessal K, Deschaux O, Chessel A, Xu L, Moreau JL, Garcai R. Fluoxeti reverses stress-induced fimbria-prefrontal long-term potentiation facilitation. *Neuroreport*. 2006 ; 17(3) : 319–22.
 23. Ahn DG. Illustrated Book of Korean Medical Herbs. 7th ed, Seoul : Kyohaksa, 1998 : 684.
 24. Yang WM, Kim HM, Chang MS, Kim WN, Kim SW, Choi DG, Lee HC, Kim YK, Park SK. Effects of ethanol extract of *Nelumbo nucifera* leaves on Anti-oxidation and Type I procollagen expression in CCD-986sk cell. *Kor J Orient Med prescription*. 2006 ; 14(2) : 67–75.
 25. Kim SB, Rho SB, Rhyu DY, Kim DW. Effect of *Nelumbo nucifera* leaves on hyperlipidemic and atherosclerotic bio F1B hamster. *Kor J Pharmacogn*. 2005 ; 36(3) : 229–34.
 26. Liu S, Li D, Huang B, Chen Y, Lu X, Wang Y. Inhibition of pancreatic lipase, α -glucosidase, α -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves. *J Ethnopharmacol*. 2013 ; 149(1) : 263–9.
 27. Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol*. 2006 ; 106(2) : 238–44.
 28. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977 ; 266 (5604) : 730–2.
 29. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985 ; 85(3) : 367–70.

30. Park SK, Kim TI, Lee WK, Park HK, Hong TJ. Combination of green tea extract and L-theanine alleviates electric foot shock induced stress by modulating neurotransmitters in mice. *Yakhak Hoeji*, 2009 ; 53(5) : 241-9.
31. Kim JJ, Lee HJ, Han JS, Packard MG. Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning. *J Neurosci*, 2001 ; 21(14) : 5222-8.
32. Konkle AT, Baker SL, Kentner AC, Barbagallo LS, Merali Z, Bielajew C. Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: sex and strain compared. *Brain Res*, 2003 ; 992(2) : 227-38.
33. Yang CH, Huang CC, Hsu KS. Behavioral stress modifies hippocampal synaptic plasticity through corticosterone-induced sustained extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurosci*, 2004 ; 24(49) : 11029-34.
34. Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res*, 1992 ; 588(2) : 341-5.
35. Kim JJ, Foy MR & Thompson RF. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through NMDA receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996 ; 93(10) : 4750-3.