

백년초 에탄올 추출물이 net handling stress를 유도한 제브라피쉬에 미치는 영향

오원보^{1#}, 오준영¹, 김동현², 정지욱³, 이승현^{1*}

1 : 제주대학교 해양과학대학 해양생명과학과, 2 : 동아대학교 건강과학대학 의약생명공학과
3 : 대구한의대학교 한방산업대학 한약재약리학과

Effect of the ethanolic extract of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit on net handling stress in zebrafish

Won-bo Oh^{1#}, Jun-Young Oh¹, Dong-Hyun Kim², Ji-Wook Jung³, Seung-heon Lee^{1*}

1 : Department of Marine Life Sciences, School of Marine Biomedical Sciences, College of Ocean Sciences, Jeju National University, Korea
2 : Department of Medicinal Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University,
3 : Department of Herbal Medicinal Pharmacology, College of Herbal Bio-industry, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : In this study, the anti-stress effects of ethanolic extract of *Opuntia ficus-indica* (OF70E) were investigated.

Methods : To determine the effects of OF70E on physical stress, changes in whole-body cortisol level or behavior were monitored in zebrafish. After treatment with 0.9% saline or OF70E for 6 min, all fish underwent net handling stress (NHS), which induced physical stress. And then, we conducted open field test (OFT) or sacrificed fish for collecting body fluid from whole-body. We used the cortisol enzyme-linked immunoassay kit to measure the amount of cortisol in each zebrafish sample.

Results : In result, compared with normal group which were not treated by NHS, whole-body cortisol levels were significantly increased in stressed-control group. Compared with control group, pretreatment with OF70E at concentrations of 25, 50 and 100 mg/L for 6min significantly inhibited the increase of whole-body cortisol levels induced by NHS($p<0.05$). To anti-stress effects of OF70E on behavior, we conducted OFT after the induction of NHS following pretreatment of OF70E. As results of OFT, compared with unstressed-normal group, distance moved was significantly decreased by induction of NHS in stressed-control group ($p<0.05$). OF70E-pretreatment blocked decreases of distance moved increased by NHS ($p<0.05$). And meandering movement, immobility and turn angle were significantly increased by NHS in stressed-control group compared with unstressed-normal group ($p<0.05$). OF70E-pretreatment prevented the increases of meandering movement immobility and turn angle by NHS ($p<0.05$).

Conclusions : In conclusion these results suggest that OF70E-pretreatment may prevent stress responses.

Key words : Net handling stress, Zebrafish, *Opuntia ficus-indica*, Whole-body cortisol, Open field test

서론

스트레스는 모든 병의 근원으로 인체의 부조화 및 순환장애 등을 유발하여 다양한 질병의 원인으로 작용한다¹⁾. 인체가

*Corresponding author : Seungheon Lee, Department of Marine Life Sciences, School of Marine Biomedical Sciences, College of Ocean Sciences, Jeju National University, Korea

· Tel : +82-64-754-3476 · FAX : +82-64-756-3493 · E-mail : slee76@jejunu.ac.kr

#First author : Wonbo Oh, Department of Marine Life Sciences, School of Marine Biomedical Sciences, College of Ocean Sciences, Jeju National University, Korea

· Tel : +82-64-754-3476 · E-mail : wonbo0907@jejunu.ac.kr

· Received : 17 December 2014 · Revised : 28 January 2015 · Accepted : 02 February 2015

스트레스를 받게 되면 자신을 보호하기 위하여 시상하부-뇌하수체-부신계(Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis, HPA axis) 및 부신수질 및 교감신경계의 항진으로 에피네프린(epinephrine) 및 노르에피네프린(norepinephrine)의 분비를 증가시키며 시상하부에서 코티코트로핀 분비인자(corticotropin releasing hormone, CRH) 분비 증가, 뇌하수체 전엽에서 부신피질자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 분비 증가, 부신수질에서 코티졸(cortisol), 알도스테론(aldosterone) 등의 분비를 증가시켜 스트레스 반응을 나타낸다²⁾. 스트레스 반응에는 혈압상승, 심박동수 증가, 행동변화, 위장관으로부터 골격근으로의 혈액 이동 등의 단기적인 작용과 비장무계의 감소나 백혈구수 감소의 면역 억제 등과 같은 장기적 작용이 있다. 스트레스의 정도가 강하고 오랫동안 지속되거나 우리 인체의 스트레스 반응 시스템에 결함이 있으면 질병으로 발전할 가능성이 있다³⁾.

최근 유전학, 생물학, 행동약리학적 연구 등에서 제브라피쉬(*Danio rerio*)가 널리 사용되고 있는데 제브라피쉬는 실험동물로써 다루기 쉽고, 가격이 저렴하며, 세대 기간이 약 3 개월로 짧은 장점을 가지고 있다⁴⁾. 현재까지 알려진 바에 따르면 제브라피쉬의 주요 유전자는 사람이나 마우스와 genomic structure가 유사하며, 아미노산 배열에서는 90% 정도로 높은 상동성을 보이는 특징을 가지고 있다^{5,6)}. 또한 제브라피쉬의 스트레스 관련 내분비계는 포유류의 시상하부-뇌하수체-부신 축과 유사하게 시상하부-뇌하수체-간신샘 축의 신호에 따라 cortisol을 분비한다⁷⁾. 즉, 감각계에서 보내진 스트레스 신호가 시상하부를 자극하게 되면 시상하부는 CRH를 분비하게 되고, 이렇게 분비된 CRH의 작용에 의해 뇌하수체에서 혈류로 ACTH를 분비한다. 혈류 중의 ACTH는 제브라피쉬의 간신샘에 도달하여 cortisol의 분비를 유도한다⁸⁾. 정상 농도의 cortisol은 에너지 공급 및 면역력 향상 등의 이로운 효과를 가지고 있지만⁹⁾, 고농도의 cortisol 분비가 지속되었을 경우, 우울감과 삶에 대한 흥미 및 의욕을 상실하고 상당히 위축되는 행동장애, 공황장애를 일으키는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾.

Zebrafish에게 스트레스를 유도 방법에는 over-crowding, social isolation, tank change, restraint stress, predator stress, chasing, alarm pheromone, heat and cold stress 등 다양한 방법이 존재한다¹¹⁾. 그 중 Ramsay 등¹²⁾의 방법인 net handling stress (NHS)는 다른 스트레스 유도 방법과 비교하여 스트레스 유도 시간이 짧고 유도 방법이 간단하며, 유도 후 행동 및 내분비에서 스트레스에 의한 변화가 예비 실험과정에서 뚜렷하게 나타나기 때문에 본 연구의 스트레스 유도 방법으로 사용하였다.

백년초는 손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica*)의 열매이며, 손바닥 선인장은 매년 4-5월경에 꽃이 피고 11-12월경에 자주색 열매를 맺는다. 주로 우리나라 남부 지방인 제주도, 거제도, 남해안 등지에서 재배되고 있다. 분류학적으로 부채 선인장과에 속하며 부채과 선인장류로 *Opuntia* 속으로 구분된다¹³⁾. 손바닥 선인장은 짙은 녹색에 가시가 많은 손바닥 모양의 잎을 가지고 있으며 그 열매인 백년초는 서양배 모양으로 내부에 씨가 많고 점질성 물질과 감수를 다량 함유하고 있다¹⁴⁾. 뿐만 아니라 손바닥 선인장에는 항산화작용 및 항암효과가 있는 페놀계 성분과 플라보노이드가 약 5% 정도 함유되어 있고 자양강장제 기능을 하는 여러 무기질과 아미노산

이 함유되어 있으며 백년초로부터 분리된 pectin 성분은 콜레스테롤 수치를 낮추며 당노를 억제하고 그로 인한 합병증을 예방하는 효능이 있어 의약품으로도 활용가치가 높은 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 그러나 현재까지 백년초의 스트레스 억제효과에 대해서는 전혀 연구된 바가 없다

최근 현대인들은 많은 스트레스에 노출되어 우울증 및 공황장애 같은 질병을 초래한다. 따라서, 스트레스의 내분비계 호르몬의 기전을 밝혀 새로운 약물 및 치료방법의 개발에 필요한 이론적인 배경을 제공하는 연구가 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서는 비교적 자원이 풍부하면서도 그 식물 화학적 성분 및 생리활성에 대한 연구가 미비한 백년초를 선택하여 제브라피쉬를 대상으로 스트레스 억제 효과를 행동약리학적 연구방법과 whole-body cortisol의 농도 측정을 실시하였으며 이 결과를 통해 백년초 추출물의 스트레스 억제의 고찰을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 추출물의 제조

본 실험에 사용한 백년초는 2013년 5월 농업기술원(제주시, 대한민국)에서 구입하였으며 정확히 감정한 후 실험에 사용하였고, 그 기준 표본은 제주대학교 해양과학대학 수산약리학 실험실에 보관하였다(JJUHMP-13-05). 잘 건조된 백년초를 분쇄하여 증류수로 2회 세척한 후, 원생약의 10배의 70% EtOH 수용액을 가하고 60 °C로 중탕 가열하여 2회 추출하였다. 추출액을 Whatman (No.1) 여과지로 감압여과하고, 그 여과액을 rotary evaporator로 감압농축하였다. 감압농축을 통해 얻은 점조상의 추출물을 동결 건조기(FDU-1200, EYELA, Japan)에서 건조하여 얻어진 분말을 실험에 사용하였으며 이 추출물을 OF70E라 명명하였다(수득률 79.18%).

2) 실험 동물

본 실험에는 월드피쉬족관(제주시, 대한민국)에서 wild-type의 5-6 월령의 성체 제브라피쉬를 구입하였으며, 구입한 제브라피쉬는 수온 26±1 °C에서 14시간:10시간(낮:밤) 주기로 사육되었고 사료로 TetraMin(Tetra, Germany)를 하루에 두 번 공급받았으며 1달 간 실험실 환경에 적응한 후 사용되었다¹⁶⁾. 실험동물의 취급은 실험동물윤리위원회 동물실험 취급 규정에 따라 사육하고 실험하였다.

2. 방법

1) 스트레스 유도 및 약물 투여

스트레스 유도를 위해 Ramsay 등의 방법인 net handling stress(NHS)를 이용하였다¹⁷⁾. NHS는 제브라피쉬를 뜰채를 이용하여 공기 중에 3분 동안 노출시키고 다시 3분 동안 물 속에 휴식시킨 후, 다시 3분 동안 공기 중에 노출시켜 스트레스를 유도하는 방법이다¹⁷⁾. 약물처리를 위하여 OF70E를 0.9% 생리식염수 500 ml에 25-100 mg/L의 농도로 용해시켜 NHS 유도 전 6분 간 약욕시켰다. 또한 아래와 같이 실험

동물을 무작위로 분류하였다.

- ① 정상군(Untreated normal group): 6분 동안 0.9% 생리식염수에 약욕 후 NHS를 유도하지 않은 군
- ② 대조군(Net handling stress-control): 6분 동안 0.9% 생리식염수에 약욕 후 NHS를 유도한 군
- ③ 약물 처리군(Net handling stress+OF70E): 6분 동안 백년초 25-100 mg/L 약욕 후 NHS를 유도한 군

2) Open field test (OFT)

OF70E 처리와 NHS 유도가 행동 변화 및 자발 운동량에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Cachat 등 실험과 동일한 open field test를 실시하였다¹⁸⁾. OFT는 자가 제조된 수조에서 한 마리씩 진행하였다. 실험 수조는 지름 21 cm, 높이 24 cm의 원통형 모양의 백색 plastic cylinder로 제조되었다. 약물 처리를 마친 실험동물에게 NHS를 유도한 후 사육 환경과 동일한 수조의 물을 10cm 채워진 수조 중앙에 위치시킨 후, 원통형 상단에 설치된 camera로 행동을 6분 간 기록하였다. 이후 기록된 영상을 Ethovision program (Noldus, Wageningen, The Netherlands)을 이용해서 분석하였고, meandering movement 및 회전각, 부동시간, 총 이동거리를 측정하였다.

3) Whole-body cortisol 측정

Barcellos 등의 방법을 이용하여 whole-body cortisol를 측정하였다¹⁹⁾. 6분 동안 0.9% 생리식염수나 OF70E에 약욕시킨 제브라피쉬에게 즉시 NHS를 가한 후, 체액을 얻기 위해 150 mg/L 농도의 tricaine (Sigma-Aldrich, MO)로 처리하여 안락사를 유도하였다. 안락사 유도 후 제브라피쉬에서 물기를 제거한 뒤 액체 질소에 급속 냉동시키고 준비해놓은 cryo tube에 1 x Phosphate buffer saline (PBS) 2ml 넣고 물고기를 분쇄하였다. 분쇄한 혼합물에 5 ml diethyl ether(Sigma-Aldrich, MO)를 넣은 후 1분 간 vortexing을 하였다. 이후 3000g에서 10분 동안 원심분리(Hanil, Korea) 후 액체 질소에 30초간 급속냉동시킨 후 상층액을 test tube에 옮겨 담았다. 이 후 진공 원심 농축기(CVE-2000, EYELA, Japan)를 이용하여 ether을 증발시켰다. Ether를 증발시킨 test tube에 1 ml의 0.5M PBS를 넣고 1.7 ml tube에 옮긴 후 cortisol 측정 시까지 -20℃에서 보관하였다. Cortisol 농도는 cortisol assay kit(R&D system, USA)를 이용하여 측정하였다. ELISA plate를 분석하기 위해서 microplate reader (Molecular Device, USA)로 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 이렇게 얻은 흡광도 값은 4-parameter sigmoid minus curve를 기초하여 cortisol 농도값으로 환산되었다. Whole-body cortisol level은 각 어체 무게에 대한 농도의 비로 표현되었다¹⁹⁾.

3. 통계처리

모든 실험 결과의 값은 mean ± S.E.M.으로 표현하였으며, 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Student-Newman-Keuls test를 이용하여 각 실험군 평균치 간의 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 약물 검색

제주도 자생식물의 스트레스 억제 효과를 확인하기 위하여 제브라피쉬에 각각의 식물 추출물 용액에 약욕 처리 후 NHS 유도에 의한 whole-body cortisol 농도 변화를 관찰하였다. NHS 유도를 하지 않은 정상군의 whole-body cortisol 농도는 2.9 ± 0.7 ng/g으로 측정되었고, NHS 유도 후 약물을 투여하지 않은 대조군의 whole-body cortisol 농도는 5.2 ± 0.4 ng/g으로 유의성 있게 증가하였다. 약물 검색에 사용된 여러 식물추출물 처리군 중 백년초 추출물 처리군에서 2.0 ± 0.3 ng/g으로 가장 낮은 whole-body cortisol level이 측정되었다(Fig. 1).

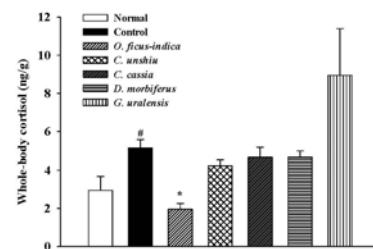


Fig. 1. Effects of ethanolic extracts (*Opuntia ficus-indica*, *Citrus unshiu*, *Cinnamomum cassia*, *Dendropanax moribiferus*, *Glycyrrhiza uralensis*) on level of whole-body cortisol in zebrafish. Each bar represents mean ± S.E.M. of 4 animals. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($^*P < 0.05$ vs control, $^{\#}P < 0.05$ vs normal).

2. 백년초 추출물의 OFT에서의 효과

NHS 유도가 행동변화 및 자발운동량의 미치는 영향과 OF70E의 스트레스 억제 효과를 관찰하기 위하여 OFT를 실시하였다.

1) Meandering movement

OFT에서의 6분 간 측정된 총 meandering movement는 정상군에서 352.6 ± 101.6 deg/s이었으나 대조군에서 939.7 ± 344.9 deg/s로써 NHS 유도에 의해 약 65%정도 증가하였다($p < 0.05$). 흥미롭게도 OF70E 25 mg/L에서는 223.2 ± 18.1 deg/s($p < 0.05$), OF70E 50 mg/L에서는 369.3 ± 113.6 deg/s($p < 0.05$), OF70E 100 mg/L에서는 190.7 ± 28.1 deg/s($p < 0.05$)로 대조군과 비교하여 모든 농도의 OF70E 처리군에서 통계적으로 유의성 있게 감소하였으며 NHS 유도에 의한 meandering movement의 증가가 관찰되었다(Fig. 2A).

2) 회전각

회전각은 정상군에서 21.3 ± 2.2 deg/s이었으나 대조군은 34.9 ± 4.8 deg/s로서 약 38% 정도 증가하였으나 ($p < 0.05$), OF70E 25 mg/L에서는 20.0 ± 1.2 deg/s($p < 0.05$), OF70E 50 mg/L에서는 23.1 ± 1.6 deg/s($p < 0.05$), OF70E 100 mg/L에서는 18.0 ± 1.6 deg/s($p < 0.05$)로 대조군과 비교하여 모든 농도의 OF70E 처리군에서 유의성 있는 감소가 관찰

되었다(Fig 2B).

3) 부동시간

OFT에서의 6분 간 측정된 총 부동시간은 정상군에서 31.1 ± 9.2 초였으나 대조군은 72.1 ± 19.3 초로서 약 56% 정도 증가하였으나($p < 0.05$), OF70E 25 mg/L은 22.9 ± 2.1 초($p < 0.05$), OF70E 50 mg/L은 30.8 ± 8.2 초($p < 0.05$), OF70E 100 mg/L은 16.8 ± 2.5 초($p < 0.05$)로 대조군과 비교하여 모든 농도의 OF70E 처리군에서 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Fig 2C).

4) 총 이동거리

OFT에서의 6분 간 측정된 총 이동거리는 정상군에서 2983.9 ± 294 cm이었으나 대조군은 2004.3 ± 179.6 cm로 약 48% 정도 감소하였으나($p < 0.05$), OF70E 25 mg/L에서는 2372.6 ± 83.4 cm($p < 0.05$), OF70E 50 mg/L에서는 2432.8 ± 163.3 cm($p < 0.05$), OF70E 100 mg/L은 2567.0 ± 89.2 cm($p < 0.05$)로 대조군과 비교하여 50과 100 mg/L의 OF70E 처리군에서 유의성 있는 증가가 관찰되었다(Fig 2D).

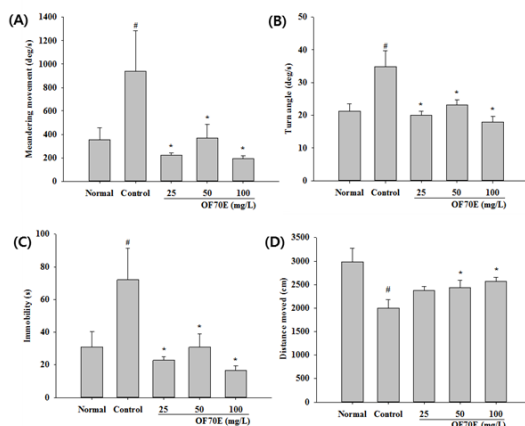


Fig. 2. Effects of ethanolic extract of *Opuntia ficus-indica* (OF70E; 50, 100 or 200 mg/L) on (A) meandering movement, (B) turn angle, (C) not moving and (D) distance moved on the open field test in zebrafish. Each bar represents mean \pm S.E.M. of 10–12 animals. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test ($P < 0.05$ vs control, $^{\#}P < 0.05$ vs normal).

3. 백년초 추출물의 Whole-body cortisol에서의 효과

Whole-body cortisol 농도는 정상군 3.7 ± 0.6 ng/g에 비해 대조군에서는 NHS 유도에 의해 7.2 ± 0.8 ng/g으로 약 2배 이상 증가하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). OF70E 처리군에서의 whole-body cortisol의 변화를 측정된 결과, 25, 50, 100 mg/L 농도별로 각각의 그룹에서 4.1 ± 0.3 ng/g, 3.6 ± 0.8 ng/g, 3.9 ± 0.8 ng/g로 대조군에 비교하여 통계적으로 유의성 있는 감소가 나타났으며, 양성대조군으로 사용한 theanine 처리군에서는 4.3 ± 0.9 ng/g로 약 물투여군과 동등 정도의 결과가 나타나 NHS 유도에 의한 whole-body cortisol 수준의 증가가 억제되는 것으로 관찰

되었다($p < 0.05$, Fig. 3). 이를 통하여 OF70E를 투여가 whole-body cortisol의 증가를 차단하는데 영향을 줌을 확인하였다.

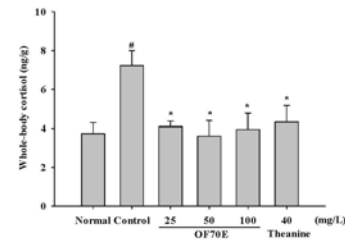


Fig. 3. Effects of ethanolic extract of *Opuntia ficus-indica* (OF70E; 50, 100 or 200 mg/L) on level of whole-body cortisol in zebrafish. Each bar represents mean \pm S.E.M. of 4 animals. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test ($^{\#}P < 0.05$ vs control, $^*P < 0.05$ vs normal).

고찰

스트레스란 생물체가 외부에서 유해한 작용을 받을 때, 신체를 보호하고자 나타나는 일체의 반응이라 할 수 있다. 포유류에서 유해한 작용을 받았을 때 HPA 축으로 이루어진 내분비계에서 cortisol이 분비되는데, 체내의 말초신경계로부터 받은 신호에 의해 시상하부를 자극하여 CRH의 분비를 유도하며 CRH는 ACTH의 분비를 자극하고 분비된 ACTH는 부신을 자극하여 cortisol의 분비를 촉진한다. 인간과 유사한 유전자를 갖는 제브라피쉬는 HPI 축을 통하여 cortisol이 분비되며 제브라피쉬의 내분비 작용은 포유류의 cortisol 관련 내분비 기관의 작용과 유사함을 알 수 있다⁷⁾.

과도한 스트레스가 지속되었을 때 스트레스 호르몬은 중추신경계 및 호르몬계에 영향을 주어 행동에 변화를 주거나 면역기능을 저하시킨다. 설치류를 이용한 연구에서 과도한 스트레스가 장기간 지속되었을 때 CRH의 증가와 함께 체중 감소가 일어난다는 보고가 있으며^{21,22)}, 또한 Ramsay 등의 보고에 따르면 제브라피쉬를 이용한 OFT에서 스트레스를 받지 않은 정상군에 비해 스트레스를 받은 대조군은 새로운 환경에 노출 되었을 때 노출이 극대화되는 중심영역에서 활동 비율이 적은 불안 행동 양상을 보인다고 보고된 바 있다^{21–23)}. 뿐만 아니라 제브라피쉬의 경우, 외부 스트레스로 인하여 불안이 유도되며, 이에 따른 행동으로는 새로운 환경에 적응을 위해 아무런 움직임 없거나 바닥으로 기운 없이 가라앉아 부동 상태를 유지하기도 하고 과흥분 상태가 되어 머리를 바닥으로 향하는 비이상적인 유영을 하거나 갑작스럽게 빠른 움직임을 보이다가 물 밖으로 튀어나오는 행동을 보인다고 보고되고 있다^{24,25)}.

또한 제브라피쉬가 스트레스를 받게 되면 직선형의 정상적인 유영을 적게 하고 좌우로 몸을 흔드는 비정상적인 유영을 많이 하게 된다²⁶⁾. 이런 비정상적인 유영을 meandering movement이라고 정의하며 스트레스나 불안 등의 비정상적인 심리상태에 대한 척도로 사용한다. 본 연구에서는 시간 당 유영 방향의 변화를 통하여 meandering movement을 측정된 결과, 정상군에 비하여 NHS를 유도한 대조군에서 meandering movement이 유의성 있게 증가하였고 OF70E를 투여하였을

때 비이상적인 유영이 감소함을 확인하였다. 이는 NHS로 유도된 스트레스로 인한 불안상태를 OF70E가 억제하였을 것으로 사료된다.

제브라피쉬는 스트레스 받았을 때 위에서 언급한 meandering movement 외에 일정한 직선유영이 아닌 몸을 제자리에서 빠르게 좌우로 회전하는 유영을 보인다²⁶⁾. 이에 본 연구에서는 유영을 분석하여 회전각을 측정하여 회전 유영상태를 관찰한 결과, NHS를 유도하지 않은 정상군에 비해 NHS를 유도한 대조군에서 회전각이 증가하였고, NHS 유도에 의해 증가된 회전각이 OF70E 처리에 의해 정상수준과 비슷한 수준으로 증가가 억제되었음을 확인하였다. 이는 NHS로 유도된 스트레스로 인한 불안상태를 OF70E가 억제하였을 것으로 사료된다.

제브라피쉬에서는 외부적인 스트레스를 받으면 힘 없는 유영이나 부동 상태가 나타나는데 부동시간에서는 아무런 움직임 없이 가만히 있는 부동상태의 시간을 측정하였고 스트레스를 받은 제브라피쉬는 부동시간이 많음을 알 수 있다²⁵⁾. 본 연구에서는 정상군과 비교하여 대조군에서 부동시간이 많이 관측되었고 OF70E를 투여하였을 때 정상 수준으로 회복되는 것을 보아 OF70E가 불안을 억제했을 거라 추측한다.

제브라피쉬는 일반적으로 스트레스를 받았을 때 스트레스를 받지 않은 군에 비하여 더 많은 부동 상태의 시간을 가지며 부동 상태 이후에는 움직임이 빨라지고 회전각과 meandering movement가 증가하는 과흥분 운동상태를 보인다²⁷⁾. 이에 본 연구에서는 OFT를 이용하여 총 이동거리를 측정하였으며 대조군과 비교하여 정상군이 더 많은 움직임을 나타내고 있고, OF70E를 선처리 하고 NHS를 가했을 때 OF70E 그룹에서 대조군보다 움직임이 많고 정상군과 비슷한 수치까지 증가함에 따라 OF70E는 스트레스에 의한 부동 상태를 회복시키는 것으로 추측된다.

OFT를 실시한 결과를 종합하면, 대조군에서의 총 이동거리는 정상군과 비교하여 NHS에 의해 감소하였다. 이는 부동시간의 증가에 기인한 것으로 NHS에 의해 자발운동량이 감소하였음을 알 수 있으며, 적은 움직임에 반해 대조군에서 회전각과 meandering movement가 크게 증가하는 것은 NHS에 의하여 비정상적인 유영을 한 것을 확인할 수 있다.

또한 cortisol은 일반적으로 외부의 스트레스가 말초신경을 통해 내분비계를 자극하여 cortisol이 증가하게 되고 본 연구에서도 NHS를 통해 대조군의 whole-body cortisol의 양이 정상군과 비교하여 유의성 있게 증가하는 것을 관찰하였고 본 연구와 유사한 Takemoto 등의 실험에서는 mice를 15분간 억압하여 스트레스 유도 후 Valerena-4,7(11)-diene(VLD)를 투여하여 mice의 행동과 내분비계의 변화를 관찰 하였는데 억압스트레스 유도 후 mice는 심장박동과 맥박이 빨라지면서 immobility와 sleeping time이 길어지고 HPA축의 활성화 되어 혈중 cortisol, serotonin 및 dopamine 양이 증가됨 관찰되었으나 VLD 투여 후 immobility 시간이 짧아졌고 VLD는 양성대조군인 chlorpromazine 그룹과 유사한 결과를 가졌다²⁸⁾.

이에 본 연구에서 확인된 OF70E의 스트레스 억제효과가 백년초의 어떤 성분에 기인하는지는 확인되지 않았지만 OF70E의 투여에 의한 whole-body cortisol의 농도를 확인한 결과, OF70E의 투여는 NHS를 유도한 대조군의 절반 수준으로 cortisol의 농도를 억제하였고 이는 정상군 수준의

whole-body cortisol 수준과 유사한 정도임을 확인하였다. 이는 OF70E가 cortisol의 증가를 차단한 것으로 추측된다. 그러나 NHS를 유도하고 약물을 투여했을 때는 대조군과 비교하여 유의성 있는 차이가 나타나지 않았는데 이에 OF70E는 이미 분비된 cortisol을 감소시켜 주는 효과가 아닌 cortisol이 증가하는 것을 억제시키는 효과만 있을 것이라 사료된다(data not shown).

최근에 스트레스로 인한 질병이 증가함에 따라 스트레스와 관련된 질병을 효율적으로 치료하기 위하여 부작용이 적은 오미자 및 황금 등과 같은 천연물 제제가 많이 연구되는 추세이다²⁹⁾. 본 연구 결과는 OF70E가 스트레스 억제하는 약물 또는 기능성 식품 원료로 개발될 수 있음을 나타내고 있다. 그러나 OF70E의 스트레스 억제효과가 백년초의 어떤 성분에 기인하는지는 확인되지 않아 향후 연구를 통하여 스트레스 억제 효과가 어떤 성분에 기인하며 어떤 작용기전을 통하여 발현되는지 밝혀야 할 것이다.

감사의 글

본 결과물은 교육부의 재원으로 지원을 받아 수행된 산학협력 선도대학(LINC) 육성사업의 연구결과입니다.

References

1. Andrade L, Caraveo-Anduag JJ, Berglund P, Bijl R, Kessler RC, Demler O, Walters E, Offord D. Cross-national comparisons of the prevalences and correlates of mental disorders. WHO International Consortium in Psychiatric Epidemiology. Bull World Health Organ. 2000 ; 78(4) : 413-26.
2. Engert V, Plessow F, Miller R, Kirschbaum C, Singer T. Cortisol increase in empathic stress is modulated by emotional closeness and observation modality. Psychoneuroendocrinology. 2014 ; 45 : 192-201.
3. Cohen S, Herbert TB. Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. Annu Rev Psychol. 1996 ; 47 : 113-42.
4. Brittijn SA, Duivestijn SJ, Belmamoune M, Bertens LF, Bitter W, de Bruijn JD, Champagne DL, Cuppen E, Flik G, Vandenbroucke-Grauls CM, Janssen RA, de Jong IM, de Kloet ER, Kros A, Meijer AH, Metz JR, van der Sar AM, Schaaf MJ, Schulte-Merker S, Spaank HP, Tak PP, Verbeek FJ, Vervoordeldonk MJ, Vonk FJ, Witte F, Yuan H, Richardson MK. Zebrafish development and regeneration: new tools for biomedical research. Int J Dev Biol. 2009 ; 53(5-6) : 835-50.
5. Spitsbergen JM, Kent ML. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—advantages and current limitations.

- Toxicol Pathol. 2003 ; 31 : 62–87.
6. Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2000 ; 10(3) : 252–6.
 7. Alderman SL, Bernier NJ. Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in zebrafish. *Gen Comp Endocrinol*. 2009 ; 164(1) : 61–9.
 8. Alsop D, Vijayan MM. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 ; 294(3) : R711–9.
 9. Dhabhar FS. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res*. 2014 ; 58(2–3) : 193–210.
 10. Gerlai R. Zebrafish antipredatory responses: a future for translational research? *Behav Brain Res*. 2010 ; 207(2) : 223–31.
 11. Chakravarty S, Reddy BR, Sudhakar SR, Saxena S, Das T, Meghah V, Brahmendra Swamy CV, Kumar A, Idris MM. Chronic unpredictable stress (CUS)-induced anxiety and related mood disorders in a zebrafish model: altered brain proteome profile implicates mitochondrial dysfunction. *PLoS One*. 2013 ; 8(5) : e63302.
 12. Ramsay JM, Feist GW, Varga ZM, Westerfield M, Kent ML, Schreck CB. Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress. *Aquaculture*. 2009 ; 297(1–4) : 157–62.
 13. Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *J Agric Food Chem*. 2002 ; 50(22) : 6490–6.
 14. Bensadon S, Hervert-Hernandez D, Sayago-Ayerdi SG, Goni I. By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber. *Plant Foods Hum Nutr*. 2010 ; 65(3) : 210–6.
 15. Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS, Lee YH, Jin C, Lee YS, Cho J. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res*. 2003 ; 965(1–2) : 130–6.
 16. Piatto AL, Capiotti KM, Tamborski AR, Osés JP, Barcellos LJ, Bogo MR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 ; 35(2) : 561–7.
 17. Ramsay JM, Watral V, Schreck CB, Kent ML. *Pseudoloma neurophilia* infections in zebrafish *Danio rerio*: effects of stress on survival, growth, and reproduction. *Dis Aquat Organ*. 2009 ; 88(1) : 69–84.
 18. Stewart A, Cachat J, Wong K, Gaikwad S, Gilder T, DiLeo J, Chang K, Utterback E, Kalueff AV. Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms. *Behav Processes*. 2010 ; 85(2) : 198–203.
 19. Ghisleni G, Capiotti KM, Da Silva RS, Osés JP, Piatto AL, Soares V, Bogo MR, Bonan CD. The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012 ; 36(1) : 176–82.
 20. DeVries AC, Glasper ER, Detillion CE. Social modulation of stress responses. *Physiol Behav*. 2003 ; 79(3) : 399–407.
 21. Harris RB, Mitchell TD, Simpson J, Redmann SM, Jr., Youngblood BD, Ryan DH. Weight loss in rats exposed to repeated acute restraint stress is independent of energy or leptin status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 ; 282(1) : R77–88.
 22. Smagin GN, Howell LA, Redmann S, Jr., Ryan DH, Harris RB. Prevention of stress-induced weight loss by third ventricle CRF receptor antagonist. *Am J Physiol*. 1999 ; 276(5 Pt 2) : R1461–8.
 23. 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.
 24. Champagne DL, Hoefnagels CC, de Kloet RE, Richardson MK. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behav Brain Res*. 2010 ; 214(2) : 332–42.
 25. Speedie N, Gerlai R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2008 ; 188(1) : 168–77.
 26. Blaser RE, Chadwick L, McGinnis GC. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2012 ; 208(1) : 56–62.
 27. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, Elkhayat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien DH, Mohnot S, Beeson E, Glasgow E, Amri H, Zukowska Z, Kalueff AV. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res*. 2009 ; 205(1) : 38–44.
 28. Takemoto H, Omameuda Y, Ito M, Fukuda T, Kaneko S, Akaike A, Kobayashi Y. Inhalation administration of valerenen-4,7(11)-diene from *Nardostachys chinensis* roots ameliorates restraint stress-induced changes in murine behavior and stress-related factors. *Biol Pharm Bull*. 2014 ; 37(6) : 1050–5.
 29. Lee S, Kim DH, Jung JW, Oh JH, Park HJ, Park C, Huh Y, Cheong JH, Oh TH, Ryu JH. *Schizandra chinensis* and *Scutellaria baicalensis* counter stress

behaviors in mice. *Phytother Res.* 2007 ; 21(12) :
1187-92.