대한한방내과학회지 제36권 4호(2015년 12월)
J. Int. Korean Med. 2015:36(4)507-517

후박 에탄올 추출물의 불안 및 인지기능에 대한 효과

이현기, 이언정
원광대학교 한의과대학 내과학교실

Effects of Ethanol Extract from *Magnolia Officinalis* on Anxiety and Cognitive Function

Hyun-ki Lee, Un-jung Lee
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Won-Kwang University

ABSTRACT

The bark of *Magnolia officinalis* has been used in traditional oriental medicine to treat a variety of mental disorders including anxiety and depression. The purpose of this study was to examine the effect of M. officinalis ethanol extract on stress-induced alterations in learning and cognitive function using a passive avoidance test (PAT) and also on anxiety-related behavior using the elevated plus-maze test (EPM) in female rats . The degree of Tyrosine hydroxylase (TH) in the region of the ventral tegmental area (VTA) and the locus coeruleus (LC) was measured using an immunohistochemical method. Corticosterone concentrations in serum were also measured. The ethanol extract from *Magnolia officinalis* was orally administered to female rats 30 minutes before evaluating their immobilization stress and anxiety-related behavior using an elevated plus-maze test and a passive avoidance test.

Time spent in the open arms of the EPM increased in the M. officinalis-treated group compared with that of the saline-treated control group. In the passive avoidance test, the memory and cognitive function improved in the M. officinalis extract-treated group. M. officinalis extracts reduced elevated corticosterone concentrations in serum. Also, stress-induced TH increases were suppressed in the M. officinalis extract-treated group in the LC and the VTA region.

These results suggest that M. officinalis might prove to be an effective anxiolytic anti-stress agent.

Key words: *Magnolia officinalis*, anxiety, stress, elevated plus-maze test, passive avoidance test, tyrosine hydroxylase, locus coeruleus, ventral tegmental area, corticosterone

Ⅰ. 서 론

급성 스트레스는 불안, 기억 장애 등을 동반하게 되는데, 불안 및 우울 등은 현대인의 정신병 중 많은 부분을 차지하고 있고 실제로 많은 사람들이 이로 인해 고통받고 있다[1,2]. 또한 이러한 정서반응이 유도되어 있을 경우 기억력이 감퇴되는 등의 인지결함을 볼 수가 있다.

한의학에서는 스트레스 인자에 대해 ≪靈樞·口問編≫[3]의 氣候, 情動, 飮食, 起居 등과 ≪三因方≫[4]의 內因, 外因, 不內外因으로 인식하였다. 이러한 인자들은 氣에 氣鬱, 氣逆 등의 변조를 야기하고, 인체에 대하여 병적요인을 제공하여 제반질환을 야기한다고 보는 등[5] 한의학에서도 스트레스와 질병에 관한 관점이 있었다.

한약재 투여에 따른 항스트레스, 항불안 효과에 대한 국내외의 연구가 다양하게 있었는데, 복합 방

· 투고일: 2015.11.12, 심사일: 2015.12.11, 게재확정일: 2015.12.29
· 교신저자: 이언정 전북 전주시 덕진구 덕진동 2가 142-1
원광대학교 한방병원 6내과
TEL: 063-270-1065 FAX: 063-270-1199
E-mail: ejlee1016@hanmail.net

제에 대한 연구 보고로는 分心氣飮[6], 抑肝散[7], 柴朴湯[8] 등의 연구가 있었으며, 단일 약재에 대한 연구로는 人蔘[9], 遠志[10], 半夏[11], 石菖蒲[12], 紅蔘[13], 酸棗仁[14], 天麻[15] 등에 대한 연구가 있었다.

본 실험에서 사용한 후박은 목련과의 낙엽교목 중국후박나무(Magnolia officinale Rheder et Wils.), 일목련(Magnolia obovata Thunb.)의 나무 껍질이며 성미는 苦辛, 溫하고 行氣, 消積, 燥濕, 下氣, 消痰平喘의 효능이 있다고 알려져 있고[16], 위장관질환, 우울, 불안장애, 알레르기 질환등에 사용되어 왔다[17]. 또한 후박이 배오된 처방인 반하후박탕, 시박탕 등은 현재도 임상에서 널리 사용되고 있다. 또한 후박에는 최소 255가지의 성분(alkaloids, coumarins, flavonoids, lignans, neolignans, phenylpropanoids, terpenoids)이 있다고 보고되고 있는데[18,19], 이 중 후박의 약리학적 효능에 있어서는 magnolol, honokiol, 4-O-methylhonokiol, obovatol 등의 neolignan에 초점이 맞춰 연구되고 있다[17].

지금까지 半夏厚朴湯[20-22]이나 柴朴湯[23,24] 같은 후박이 배오된 처방 또는 후박의 유효성분에 대한 항 스트레스, 불안, 인지결함 효과에 관한 보고가 있었고, 후박 단일 약재 추출물에 대한 보고로는 혈소판 응집 저해 효과[25], 항 고지혈증 효과[26], 지방생성 억제 효능[27] 등에 관한 보고 등이 있었다.

저자는 스트레스로 인한 불안 및 기억 장애에 대한 후박의 효과를 알아보기 위하여 후박 에탄올 추출물을 투여한 급성 스트레스 부과 동물모델에서 행동실험으로써 elevated plus-maze test, passive avoidance test를 수행하여 불안행동 및 기억행동을 측정하고, 행동실험이 끝난 후 채혈을 하여 혈중 Corticosterone의 발현을 분석하였으며, catecholamine계에 미치는 영향을 확인하기 위하여 면역조직화학법으로 뇌 내 영역 중 청반(Locus Coeruleus, LC)과 복측피개야(Ventral Tegmental Area, VTA)에서 티로신 수산화효소(Tyrosine Hydroxylase, TH)의 변화를 관찰하여 의미있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 한약 제조

건조된 후박(Cortex Magnoliae Officinalis, 사천성 후박) 3 kg을 분쇄하여 90% 에탄올 12 L를 첨가한 후 60 ℃의 수욕에서 2시간 동안 추출하였다. 추출 완료 후, 1차 여과를 수행하고 여과지로 한번 2차 여과한 후 감압 농축하여 270 g(수율 9%)을 얻었다. 농축된 후박 추출물을 증류수에 섞어 수용액으로 만든 후 실험에 이용하였다.

2) 실험 동물

실험에 사용된 동물은 체중 220~250 g의 Sprague Dawley계 암컷 흰쥐(샘타코, 경기도, 한국)로 일주일간 사육실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육실 온도는 22±2 ℃, 습도는 55~60%로 유지하였고, 사육실 내 환풍기와 공기전환기를 항시 가동시켰다. Light-dark cycle이 12시간 단위로 조절되게 한 후, 흰쥐용 고형사료와 물을 제한 없이 공급 하였다.

2. 방 법

1) 실험군의 구분

실험에 사용된 실험동물은 아래와 같이 4군으로 나누었고, 약물은 스트레스 부과 30분전에 투여하였다.

Normal : Immobilization stress를 부과하지 않고, 약물을 투여하지 않은 군으로 n=5마리였다.

Control : Immobilization stress(2h, acute)를 부과하고, saline을 1 ml/kg로 투여(p.o.)한 군으로 n=5마리였다.

Hubak 200 mg/kg : Immobilization stress(2h, acute)를 부과하고, 제조한 후박을 200 mg/kg로 투여(p.o.)하였으며 n=5마리였다.

Hubak 400 mg/kg : Immobilization stress(2h, acute)를 부과하고, 제조한 후박을 400 mg/kg로 투여(p.o.)하였으며 n=5마리였다.

2) 구속 스트레스 부과

2시간의 구속 스트레스 부과는 고깔 모양의 비닐

구속을 이용하였는데, 실험동물의 머리가 삼각뿔 방향으로 향하게 하여 투입시킨 후 꼬리만 밖으로 나오게 한 뒤 테이프로 고정시켰으며 머리 쪽 비닐은 호흡이 가능할 정도만 개봉하여 실험동물의 크기와 상관없이 일정한 강도의 구속이 가해질 수 있도록 하였다[28].

3) Elevated plus-maze test[29]

구속 스트레스 부과가 끝나고 난 뒤, 검정색의 아크릴로 제작된 Elevated plus-maze를 이용하여 불안 행동을 평가하였다. 이 장치는 바닥에서 50 cm 높이에 설치된 십자형(+) 미로로서, 4개의 통로 가운데 마주보는 2개(각 길이 50 cm, 폭10 cm)는 개방되어 있고(open arm), 크기가 동일한 다른 2개의 통로는 높이 40 cm의 벽으로 둘러싸여 있다(closed arm). 중심 platform은 10 cm×10 cm로 하였다. 테스트는 5분간 진행되며, 10 cm×10 cm의 중앙에 실험동물을 두고 실험을 시작하여 maze를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 5분 동안 closed arm 또는 open arm에 머문 총 시간을 측정하여, 불안 행동을 평가하였다.

Fig. 1. Immobilization (IMO) stress.

Fig. 2. Equipment of elevated plus-maze.

4) Passive avoidance test[30]

학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용하고 있는 Passive avoidance test(수동회피실험)는 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법이다. 수동회피실험 장치는 두 칸의 방으로 나뉘어 있는 shuttle box로 한쪽 방에는 밝은 전구가 설치되어 있어 실험동물이 싫어하는 밝은 환경을 조성할 수 있게 하였으며, 다른 한쪽 방에는 빛이 들어오지 않게 하여 실험동물이 편안함을 느끼게 하였다. 2시간의 스트레스 부과가 끝나고 난 뒤, 수동회피반응을 시험한다(training test). 어두운 방의 바닥에는 알루미늄 막대가 일정한 간격으로 깔려 있어서 이를 통해 동물의 발바닥에 전기충격을 가할 수 있다. 실험동물은 어두운 방에 들어가려는 경향이 있어, 밝은 방에 두었다가 어두운 방에 들어가게 되면 전기쇼크(5 V, 0.5 mA, 10 sec)를 주어 동물이 이를 기억하게 한다. 이 후 곧바로, 24시간 후, 48시간 후에 전기쇼크 없이, 어두운 방으로 들어가는 시간(latency time)을 90초까지 측정한다(retention test 1, 2, 3).

Fig. 3. Equipment of passive avoidance test.

5) ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)

행동실험이 끝난 쥐를 sodium pentobarbital(80 mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 심장에서 혈액을 채취해 1000 g에서 10분간 centrifugation해서 -70 ℃의 온도로 deep freezer에 보관한다. 스트레스와 관련이 있는 호르몬인 corticosterone의 발현을 commercial ELISA kit(Cayman, CA, U.S.A)를 이용하여 분석하였다.

6) 면역조직화학법(Immunohistochemistry)

Catecholamine계에 미치는 영향을 확인하기 위하여 면역조직화학법으로 뇌 내 영역 중 청반(Locus Coeruleus, LC)과 복측피개야(Ventral Tegmental Area, VTA)에서 티로신수산화효소(Tyrosine Hydroxylase, TH)를 측정하였다.

행동실험이 끝난 쥐를 sodium pentobarbital(80 mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 0.9% saline 200 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formalin 용액 800 ml를 심장을 통해 관류하였다. 고정이 끝난 쥐는 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2시간 후고정시키고, 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에 넣어 4 ℃에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후 뇌 조직을 30 μm의 크기로 잘랐다. PBS로 조직을 몇 차례 씻고, TH(1:2000, rabbit monoclonal antibody, Santacruz, CA, USA)에 담궜다. Primary antibody는 0.3% triton X-100 (PBST)에서 2% bovine serum(Sigma, ST. Louis, MO, USA)에 희석하여 준비하였다. 뇌 조직은 primary antiserum에 4 ℃에서 72시간 동안 배양하였다. 그 후 뇌 조직을 PBST로 씻은 다음, 2시간 동안 실온에서 2% bovine serum을 함유한 PBST에서 200배로 희석한 biotinylated goat anti-rabbit serum(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에서 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Elite Standard Vectastain avidin-biotin complex reagent(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 담구어 반응시켰다. PBST로 몇 번 헹군 다음, 뇌 조직을 착색제인 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Sigma, ST. Louis, MO, USA)을 사용하여 발색시켰다. 발색이 끝난 조직은 slide glass에 얹어서 실온에서 건조시킨 후, xylene으로 투명화 시켜 polymount로 봉입하였다. 뇌 조직의 각 부위의 발색 정도는 광학현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위의 명칭은 Paxinos 와 Wastson[31]의 부도를 참고하였다. 현상된 사진에서 격자(200×200 μm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성 정도를 counting 하였다. 세포 counting은 각 동물당 3개의 조직 샘플을 평균내어 단위 면적당 세포 개수를 계산하였다.

7) 통계 처리

모든 측정 값은 평균값±표준오차(mean±S.E.M)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 window용 SPSS 11.0 version을 이용하였다. 행동검사와 조직분석법의 측정값은 one-way analysis of variance(ANOVA)를 시행하였으며, 사후검증은 Tukey's test를 이용하였다. 통계적 유의성은 신뢰구간 $P<0.05$에서 의미를 부여하였다.

III. 결 과

1. Elevated plus-maze(EPM)에서 후박의 항불안 효과

EPM을 이용한 후박의 항불안 효과를 Table 1과 Fig. 4에 나타내었다. Table 1과 Fig. 4에서 알 수 있는 바와 같이 open arm에 머무는 시간이 정상군에서는 12.4±3.3초인데 비해, 대조군에서는 2.2±1.4초로 70%정도 감소하였으며, 후박추출물 200 mg/kg 및 400 mg/kg 투여군에서는 각각 12.2±4초, 9.6±3.5초로 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

Closed arm에 머문시간은 정상군이 204.8±11.2초, 대조군에서는 273.2±14.1초였으며, 후박추출물 200 mg/kg 및 400 mg/kg 투여군에서는 각각 238±15.9초, 236.8±9.9초로 대조군과 비교하여 큰 차이가 없었다.

Table 1. Time Spent of the Elevated Plus Maze in the Rats

Group	Dose	Time spent in closed arm (sec)	Time spent in open arm (sec)
Normal		204.8±11.2	12.4±3.3
Control		273.2±14.1	2.2±1.4
Hubak	200 mg/kg	238±15.9	12.2±4
	400 mg/kg	236.8±9.9	9.6±3.5

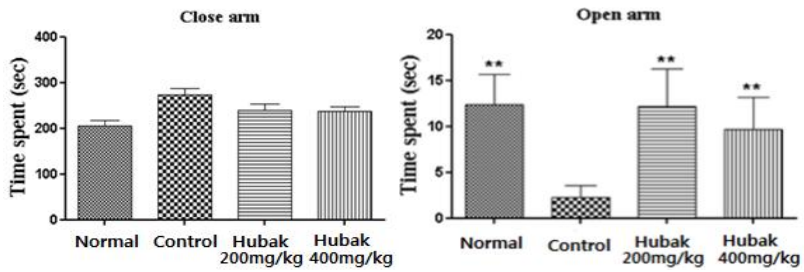

Fig. 4. Time spent of the elevated plus maze in the rats.

The result of EPM was analyzed by performing separate one-way ANOVA among the groups. Each value represents the mean±S.E.M. **P<0.01 compared to the control group.

2. Passive avoidance test에서 후박의 효과

Passive avoidance test(수동회피실험)를 이용하여 분석한 결과를 Table 2와 Fig. 5에 나타내었다. 정상군에 비하여 스트레스 부과 후 saline을 투여한 대조군은 retention test(기억력 검사)를 진행함에 따라 latency time이 점점 감소(90, 78±7.5, 69.6±12.4초)하였다. 하지만 후박을 투여한 군에서는 retention test에서도 기억행동이 유지되는 것을 알 수 있었다. 이는 후박의 투여가 급성 스트레스 부과에 따른 기억력 감소를 억제해주는 경향을 나타낸다.

Table 2. Time Spent of the Passive Avoidance Test in the Rats

Group	Dose	Test	Retention 1	Retention 2	Retention 3
		Latency time (sec)			
Normal		7.6±2.2	90	90	83.8±6.2
Control		22.2±4.4	90	78±7.5	69.6±12.4
Hubak	200 mg/kg	15±3.5	90	88.4±1.6	90
	400 mg/kg	19.4±12.9	90	90	89.4±0.6

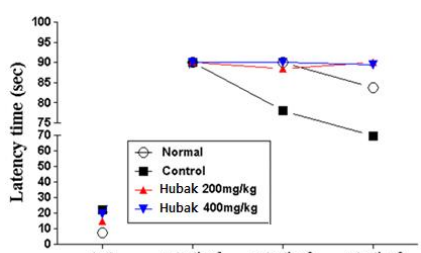

Fig. 5. Time spent of the passive avoidance test in the rats.

Each value represents the mean±S.E.M. The result of PAT was analyzed by performing separate one-way ANOVA among the groups.

3. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

혈청 중 코르티코스테론(Corticosterone, CORT)의 발현을 알아본 결과를 Table 3와 Fig. 6에 나타내었다. 혈액 내의 Corticosterone의 발현은 대조군에서는 27017±10654.9, 정상군에서는 22373±255.2이었으며, 후박 200 mg/kg, 400 mg/kg을 투여한 군에서는 각각 21359.9±949.3, 17162.3±5404.44였으며 통계적으로 유의미한 차이를 나타내지는 않았다.

Table 3. The Concentration of CORT in the Serum

Group	Dose	Concentration of CORT (pg/ml)
Normal		22373±255.2
Control		27017±10654.9
Hubak	200 mg/kg	21359.9±949.3
	400 mg/kg	17162.3±5404.44

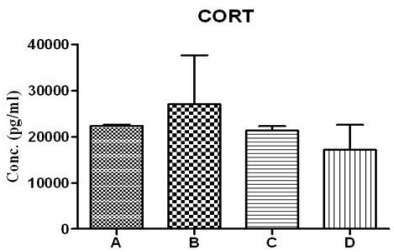

Fig. 6. The concentration of CORT in the serum.

The results of ELISA were analyzed by performing separate one-way ANOVA on the level of the CORT among groups. Each value represents the mean±S.E.M. The level of CORT in the serum of normal group (A), control (B), Hubak 200 mg/kg (C) and Hubak 400 mg/kg (D).

4. 면역조직화학법(Immunohistochemistry)

복측피개야(Ventral Tegmental Area, VTA) 및 청반(Locus Coeruleus, LC)에서 티로신수산화효소(Tyrosine Hydroxylase, TH)의 발현을 관찰한 결과를 Table 4와 Fig. 7에 나타내었다. VTA에서 TH 발현은 정상군은 7.6±0.6개, 대조군에서는 10.5±0.7개였으며, 후박 200 mg/kg, 후박 400 mg/kg을 투여한 군에서는 각각 8.7±1, 8.8±0.9개 였다. LC에서 TH발현은 정상군 4.8±0.7개, 대조군 7.5±0.4개로 정상군은 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며(*P<0.05), 후박 200 mg/kg을 투여한 군에서는 6.2±0.7개였다. 후박 400 mg/kg을 투여한 군에서는 4±0.6개로 대조군에 비해 유의하게 감소함을 알 수 있었다(**P<0.01). 이는 후박이 스트레스 억제에 유의한 효과가 있음을 의미한다.

Table 4. The Number of TH Immunostained Nuclei in the VTA, LC Regions

Group	Dose	VTA	LC
		TH	
Normal		7.6±0.6	4.8±0.7
Control		10.5±0.7	7.5±0.4
Hubak	200 mg/kg	8.7±1	6.2±0.7
	400 mg/kg	8.8±0.9	4±0.6

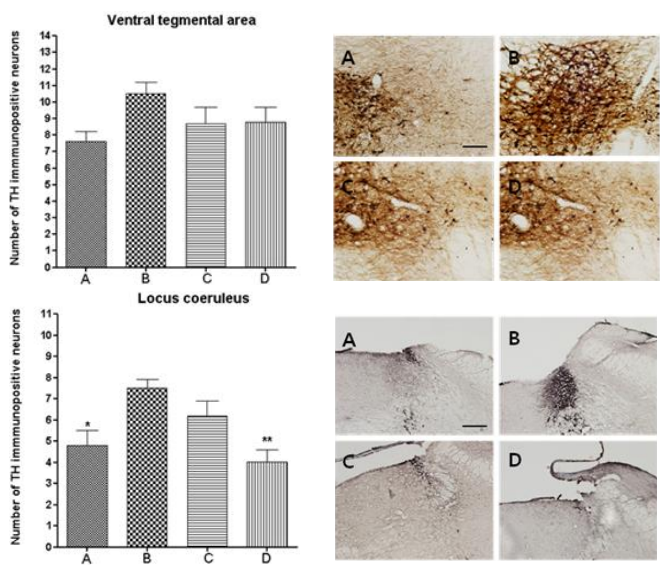

Fig. 7. The number of TH immunostained nuclei in the VTA, LC regions.

The results of TH-reactivity were analyzed by performing separate one-way ANOVA on the number of the TH immunostained neurons among the groups. Each value represents the mean±S.E.M. *P<0.05, **P<0.01 compared to the control group. Photographs showing the distribution of TH-immunoreactive cells in the brain of normal group (A), control (B), Hubak 200 mg/kg (C) and Hubak 400 mg/kg (D). Sections were cut coronally at 30 μm and the scale bar represents 200 μm.

Ⅳ. 고 찰

스트레스는 생체에 가해진 각종 유해 작용인 신체적, 심리적 압박 상태를 총칭하는 것으로, 과도한 자극은 생체의 적응기전을 파탄시켜 체내 항상성의 불균형 상태를 야기할 수 있다[32]. 스트레스를 완전히 없애는 것은 사실상 불가능하며, 적절한 스트레스는 삶의 의욕을 고취시키는 원동력이 될 수도 있으므로 스트레스를 적절한 수준으로 관리하고 건강과의 연관성을 살펴 스트레스로 인하여 질병이 발생하거나 악화되지 않도록 하는 노력하는 것이 중요하다[33].

이전의 후박이 스트레스에 미치는 영향에 관한 연구들은 항불안 효과에 대한 보고가 주를 이루고 있으며, 기억력 개선 효과[34]에 대한 보고도 찾아볼 수 있다. Kuribara H 등[23]은 반하후박탕과 시박탕의 항불안 효과 실험에서 후박을 제외한 처방은 항불안 효과가 없음을 확인하여 후박의 honokiol 성분이 항불안 효과를 나타나게 하는 화학물질임을 보고하였으며, Maruyama 등[24]은 시박탕에서 항불안 작용을 하는 주요 성분은 magnolol, honokiol이며 elevated plus-maze test를 이용한 mice 실험에서 honokiol이 시박탕 과립에 비하여 5000배 정도 강한 항불안효과가 있다고 하였다. 또한 Lee 등[34]은 후박 에탄올 추출물과 후박의 4-O-methylhonokiol 성분이 scopolamine으로 유도된 기억력 장애를 개선하였으며, in vitro에서 acetylcholinesterase(AChE)의 활성을 억제함을 확인하여 Alzheimer's disease의 진행 억제에 유용할 수 있음을 보고하였다. 미국에서는 후박과 산조인 추출 복합물과 후박과 황백 추출 복합물이 각각 Seditol®과 Relora®라는 이름의 proprietary product로서 스트레스나 불안으로 인한 수면장애에 사용되며[35,36], cortisol치 감소에 의미가 있다는 보고가 있다[36].

스트레스가 발생하면 그 스트레스 상황에 대한 예측 가능성과 통제성, 개인의 자신감에 따라 스트레스 상황을 평가하고 대처하는 과정 중에서 부정적인 부산물로 불안이 발생하게 되는데[37], 본 실험에서는 스트레스를 실험 동물에 부과한 후 후박 에탄올 추출물의 항불안 효과를 확인하기 위하여 elevated plus-maze test를 이용하였다. elevated plus-maze test는 흔히 불안 완화제나 불안 유도약물의 효과를 입증할 때 쓰이는 모델로 좁고 어두운 곳을 선호하는 흰 쥐의 특성을 이용한 것이다[29]. 벽이 설치된 closed arm보다는 벽이 없는 open arm에서 더 많은 불안을 느끼기 때문에 불안이 많은 동물일수록 open arm에 머무는 기간이 더 짧다. 즉, 항불안 약물의 검색은 open arm에서 머문 시간의 연장 및 closed arm에서 머문 시간의 감소로 표현된다.

본 실험에서 정상군에 비해 스트레스를 부과한 후 saline을 투여한 대조군에서 closed arm에 머문 시간은 큰 차이가 없었다. 하지만 open arm에 머문 시간은 70% 정도 감소하는 것을 알 수 있는데, 이는 스트레스로 인하여 실험동물에 불안이 유발되었음을 의미한다. 또한 후박을 투여한 군에서는 open arm에 머문 시간이 대조군에 비해 약 3배 이상 유의하게 증가하였는데, 이는 후박의 투여가 불안 행동을 감소시킴을 나타낸다.

스트레스를 받은 실험동물은 기억능력이 저하되는데, 본 실험에서는 passive avoidance test(수동회피시험)를 시행하여 후박 추출물의 학습 및 기억에 대한 효과를 알아보았다. Passive avoidance test는 흔히 단순 기억에 대한 효과를 입증할 때 쓰이는 모델로 어두운 곳을 선호하는 흰 쥐의 특성을 이용한 것이다[30]. 즉 어두운 방의 전기 충격을 기억하여 어두운 방으로 가고 싶은 본성을 억제하여 밝은 방에서의 체류 시간(latency time)을 측정하며 latency time이 길수록 수동회피의 학습과 기억이 좋음을 나타낸다. 구속 스트레스를 부과한 후 수동회피실험을 실시하여 밝은 방에서의 체류 시간을 측정하여 비교한 결과 retention test(기억력 검사) 1에서는 각 그룹간의 차이를 보이지 않았으나, retention test를 진행하여 나감에 따라 saline을 투여한 대조군에서는 latency time이 점점 감소하

였다. 하지만, 후박을 투여한 군에서는 retention test에서도 기억 행동이 유지되는 것을 알 수 있었다. 이는 후박의 투여가 급성 스트레스 부과에 따른 기억력 감소를 억제해 주는 것을 나타낸다.

글루코코르티코이드의 일종인 코르티코스테론(corticosterone)은 스트레스반응에 대한 객관적인 척도로 많이 이용되며, 이전의 연구에서 스트레스 발생시 혈장 내에서 증가됨이 보고되어 왔고[38], 후박으로부터 분리한 magnolol과 honokiol 혼합물이 스트레스로 인해 상승된 corticosterone 농도를 감소시켜 과항진된 HPA axis를 정상화시켰다는 보고도 있다[39]. 하지만 본 연구에서 행동 실험 후 serum 내에서 corticosterone의 발현을 알아본 결과 통계적으로 유의미한 차이는 없었다.

스트레스를 받게 되면 그에 대한 적응반응으로 catecholamine 대사가 활성화되어 norepinephrine 및 epinephrine의 합성이 증가하게 되므로 catecholamine의 생합성을 조절하는 TH의 수준 또한 증가하게 된다[40,41].

VTA는 기존의 보고들에서 dopamine계 대사에 관계하는 많은 신경세포들을 가지고 있는 부위로 알려져 있다[42]. LC는 뇌교부위 제4뇌실 바닥에 위치하며 두뇌 중 가장 큰 catecholamine성 신경계 세포체 모임으로 GABA와 함께 불안과 관련된 신경전달물질인 norepinephrine은 LC에 많이 함유되어 있으며 그 경로는 대뇌피질과 변연계, 뇌간, 척수로 연결되고 있다[41,43]. 우울증에 행동학적, 생리학적으로 반응하는 세포핵으로서 감정적 질환과 연관되며[44], 이 체계를 자극하면 불안이 발생하고, 억제하면 불안이 감퇴한다[43].

본 실험에서는 행동 실험을 마친 흰 쥐의 뇌의 여러 영역 중 VTA와 LC에서 TH수준을 측정하였는데, 대조군에서는 정상군에 비해 VTA에서 TH의 발현이 약 30% 증가하였으나, 후박을 투여한 군에서는 TH수준의 대조군과의 차이가 관찰되었다. 특히 후박 400 mg/kg을 투여한 군에서는 LC에서 TH의 발현이 유의하게 감소하는 것을 알 수 있었다. 이는 후박이 스트레스 억제에 유의한 효과가 있음을 의미한다.

이상의 결과들을 종합하여 보면 후박추출물은 elevated plus-maze test, passive avoidance test를 통하여 항불안 작용과 인지기능 개선에 효과가 있는 약재로 생각되며 스트레스로 인해 발생하는 일부 병리적인 지표의 증가도 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 향후 후박의 작용을 평가하기 위하여 다양한 유효 성분에 대한 연구와 다양한 실험 모델의 개발이 필요하리라 생각되며 또한 이러한 작용 기전에 대한 연구가 더욱 상세히 진행될 필요가 있다고 사료된다.

Ⅴ. 결 론

후박 에탄올 추출물의 효과를 탐색하기 위하여 급성 스트레스 부과 모델을 이용하여 elevated plus-maze test, passive avoidance test 등의 행동실험을 수행하였으며, 행동실험이 끝난 후 serum내의 corticosterone의 발현을 측정하였으며, 면역조직화학법으로 뇌 내 영역 중 VTA와 LC에서 TH의 발현을 측정한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 후박 에탄올 추출물 투여로 Elevated plus-maze test에서 open arm에서 머무는 시간이 실험군에서 대조군에 비해 증가하였다.
2. 후박 에탄올 추출물 투여로 Passive avoidance test에서 latency time이 실험군에서 대조군에 비해 증가하였다.
3. 혈청 corticosterome은 대조군, 후박 에탄올 추출물 투여한 실험군에서 통계적으로 유의미한 차이가 없었다.
4. VTA와 LC에서 TH의 발현은 대조군에서 증가되었으며, 특히 LC에서 TH의 발현은 후박 에탄올 추출물을 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 감소하였다.

이와 같은 결과로 보아 후박은 항불안, 항스트레스 효과가 있으며, 인지 기능을 개선시킬 수 있는 약재로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2013년 원광대학교 교비지원에 의해 이루어짐.

참고문헌

1. Sandford JJ, Argyropoulos SV, Nutt DJ. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. *Pharmacol Ther* 2000 Dec;88(3):197-212.
2. Argyropoulos SV, Sandford JJ, Nutt DJ. The psychobiology of anxiolytic drug. Part 2: Pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacol Ther* 2000 Dec;88(3):213-27.
3. 洪元稙. 精校 黃帝內經靈樞. 서울: 동양의학연구원출판사; 1985, p. 158-9, 286.
4. 陳聯. 陳無擇三因方 2卷. 臺北: 대연국풍출판사; 1978, p. 6
5. 대한한방신경정신과학회 편. 한방신경정신의학. 파주: 집문당; 2010, p. 404-15.
6. 김경욱, 김종우, 황의완, 김현택, 박순권, 김현주. 분심기음가미방이 흰 쥐의 수면장애와 불안에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 2000;11(2):53-62.
7. Kamei J, Miyata S, Ohsawa M. Involvement of the benzodiazepine system in the anxiolytic-like effect of Yokukansan(Yi-gan san). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33(8):1431-7.
8. Yuzurihara M, Ikarashi Y, Ishige A, Sasaki H, Maruyama Y. Anxiolytic-like effect of saiboku-to, an oriental herbal medicine, on histaminergics-induced anxiety in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2000 Nov;67(3):489-95.
9. Park JH, Cha HY, Seo JJ, Hong JT, Han K, Oh KW. Anxiolytic-like effects of ginseng in the elevated plus-maze model: comparison of red ginseng and sun ginseng. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005 Jul;29(6):895-900.
10. 김경호, 정현우, 이동원, 김정숙, 김영균, 조수인. 遠志 추출물이 사회 심리적 스트레스에 미치는 영향. 대한본초학회지 2003;18(1):99-108.
11. 김수연, 임세현, 조수인, 최창원, 김경옥. 半夏 추출물이 생쥐의 사회·심리적 스트레스에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지 2009;20(3):35-47.
12. 조수인, 김형우, 정용식. 石菖蒲 추출물이 생쥐의 사회·심리적 스트레스에 미치는 영향. 대한본초학회지 2004;19(4):1-7.
13. 김정우. 생쥐에 있어서 elevated plus-maze test를 통한 홍삼의 사포닌과 비사포닌 분획물 투여 후의 항스트레스 효과 비교 연구. 경희대학교 동서의학대학원 2009.
14. Peng WH, Hsieh MT, Lee YS, Lin YC, Liao J. Anxiolytic effect of seed of Ziziphus jujuba in mouse models of anxiety. *J Ethnopharmacol* 2000;72(3):435-41.
15. 김여환, 최형철, 손의동, 이광윤, 김원준, 박형배, 등. 천마의 항 불안 효과. 생물치료정신의학 1996;2(2):108-14.
16. 안덕균 저. 원색한국본초도감. 서울: 교학사; 2003, p. 488.
17. Lee YJ, Lee YM, Lee CK, Jung JK, Han SB, Hong JT. Therapeutic applications of compounds in the Magnolia family. *Pharmacol Ther* 2011 May;130(2):157-76.
18. Ito K, Iida T, Ichino K, Tsunezuka M, Hattori M, Namba T. Obovatol and obovatal, novel biphenyl ether lignans from the leaves of Magnolia obovata Thunb. *Chem Pharm Bull(Tokyo)* 1982

Sep;30(9):3347-53.
19. Tachikawa E, Takahashi M, Kashimoto T. Effects of extract and ingredients isolated from Magnolia obovata thunberg on catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem Pharmacol* 2000 Aug 1;60(3):433-40.
20. Naito T, Itoh H, Takeyama M. Some gastrointestinal function regulatory Kampo medicines have modulatory effects on human plasma adrenocorticotropic hormome and cortisol levels with continual stress exposure. *Biol Pharm Bull* 2003;26(1):101-4.
21. Kaneko A, Cho S, Hirai K, Okabe T, Iwasaki K, Nanba Y, et al. Hange-koboku-to, a Kampo medicine, modulates cerebral levels of 5-HT (5-hydroxytryptamine), NA(noradrenaline) and DA(dopamine) in mice. *Phytotherapy Research* 2005;19(6):491-5.
22. Luo L, Nong WJ, Kong LD, Jiang QG, Tan RX. Antidepressant effects of Banxia Houpu decoction, a traditional Chinese medicinal empirical formula. *J Ethnopharmacol* 2000;73(1-2):277-81.
23. Kuribara H, Kishi E, Hattori N, Okada M, Maruyama Y. The anxiolytic effect of two oriental herbal drugs in Japan attributed to honokiol from magnolia bark. *J Pharm Pharmacol* 2000 Nov; 52(11):1425-9.
24. Maruyama Y, Kuribara H, Morita M, Yuzurihara M, Weintraub ST. Identification of magnolol and honokiol as anxiolytic agents in extracts of saiboku-to, an oriental herbal medicine. *J Nat Prod* 1998 Jan;61(1):135-8.
25. 장재형. 후박의 혈소판 응집 억제 작용에 대한 연구. 경희대학교 동서의학대학원 2010.
26. 박지영. 후박추출물과 항고지혈제제(Statin) 투여에 따른 쥐의 간조직 및 염증지표 영향에 관한 연구. 경희대학교 동서의학대학원 2010.
27. 김현주, 이여명, 김연향, 원선임, 최성아, 최신욱. 후박추출물의 지방세포 분화 억제 효능에 관한 연구. 대한화장품학회지 2009 June;35(2):117-23.
28. Park HJ, Shim HS, Chung SY, Lee TH, Shim I. Soyo-san reduces depressive-like behavior and proinflammatory cytokines in ovariectomized female rats. *BMC CAM* 2014;14:34.
29. Imaizumi M, Onodera K. Animal models of 'anxiety'. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 2000 Jan; 115(1):5-12.
30. Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Reviews* 2003 Mar;41(2-3):268-87.
31. Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *Journal of neuroscience methods* 1985 Apr;13(2):139-43.
32. 李丙允. 정신의학사전. 서울: 일조각; 1990, p. 272.
33. 대한가정의학회. 최신가정의학. 서울: 한국의학; 2007, p. 277.
34. Lee YK, Yuk DY, Kim TI, Kim YH, Kim KT, Kim KH, et al. Protective effect of the ethanol extract of Magnolia officinalis and 4-O-methylhonokiol on scopolamine-induced memory impairment and the inhibition of acetylcholinesterase activity. *J Nat Med* 2009 Jul;63(3):274-82.
35. Koetter U, Barrett M, Lacher S, Abdelrahman A, Dolnick D. Interactions of Magnolia and Ziziphus extracts with selected central nervous system receptors. *J Ethnopharmacol* 2009 Jul 30;124(3):421-5.
36. Kalman DS, Feldman S, Feldman R, Schwartz HI, Krieger DR, Garrison R. Effect of a proprietary Magnolia and Phellodendron extract on stress levels in healthy women: a pilot, double-blind,

placebo-controlled clinical trial. *Nutrition Journal* 2008;7:1475-2891.

37. 대한심신스트레스학회 편. 스트레스 과학의 이해. 서울: 신광출판사; 1997, p. 11-67, 199-209.
38. Patterson-Buckendahl P, Pohorecky LA, Kvetnansky R. Differing effects of acute and chronic stressors on plasma osteocalcin and leptin in rats. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress* 2007 Jun;10(2):163-72.
39. Xu Q, Yi LT, Pan Y, Wang X, Li YC, Li JM, et al. Antidepressant-like effects of the mixture of honokiol and magnolol from the barks of Magnolia officinalis in stressed rodents. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008 Apr 1;32(3):715-25.
40. Beitner-Johnson D, Guitart X, Nestler EJ. Neurofilament proteins and the mesolimbic dopamine system: common regulation by chronic morphine and chronic cocaine in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci* 1992 Jun;12(6): 2165-76.
41. Nakazato T. Locus coeruleus neurons projecting to the forebrain and the spinal cord in the cat. *Neuroscience* 1987 Nov;23(2):529-38.
42. Ortiz J, Fitzgerald LW, Lane S, Terwilliger R, Nestler EJ. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. *Neuropsychopharmacology* 1996 Jun;14(6):443-52.
43. 민성길. 최신정신의학. 서울: 일조각; 2006, p. 323, 326, 752-7.
44. Smith MA, Makino S, Altemus M, Michelson D, Hong SK, Kvetnansky R, et al. Stress and antidepressants differentially regulate neurotrophin 3 mRNA expression in the locus coeruleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 Sep 12;92(19): 8788-92.