

## 전투 스트레스 및 피로 완화 약물 탐색을 위한 생체지표

구효진<sup>1)</sup> · 김창열<sup>2)</sup> · 김연경<sup>2)</sup> · 신소정<sup>2)</sup> · 천기철<sup>3)</sup> · 김동수<sup>\*,1)</sup>

<sup>1)</sup> 공군사관학교 기초과학과

<sup>2)</sup> 대구가톨릭대학교 산업보건학과

<sup>3)</sup> 국방과학연구소 제5기술연구본부

## Biomarkers for Combat-Related Stress and Fatigue-Mitigating Drugs Discovery

Hyojin Koo<sup>1)</sup> · Chang Yul Kim<sup>2)</sup> · Yeonkyung Kim<sup>2)</sup> · So Jung Sin<sup>2)</sup> ·  
Kicheol Cheon<sup>3)</sup> · Dongsoo Kim<sup>\*,1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Basic Science, Air Force Academy, Korea

<sup>2)</sup> Department of Occupational Health, Catholic University of Daegu, Korea

<sup>3)</sup> The 5th Research and Development Institute, Agency for Defense Development, Korea

(Received 29 September 2017 / Revised 28 December 2017 / Accepted 9 February 2018)

### ABSTRACT

Psychological stress and physical fatigue, such as anxiety, fear, sleep disturbance, etc., caused by exposure to the war, can lead to post-traumatic stress syndrome(PTSD) or war syndrome. The military has also prepared for drug use to minimize war syndrome and preserve combat strength. However, efforts to prevent war syndrome are still lacking. This study was conducted to identify biomarkers that can track psychophysiological changes. Psychophysiological changes associated with PTSD can be divided into four main categories. The four categories are behavioral changes, changes in brain cognition, neuroimmunological changes, and changes in innate immunity. This study suggest that biomarker profile can be made by the distance moved and the anxiety-like behavior in the open field for behavior category, brain BDNF levels in the brain cognition category, serum corticosterone in the neuroimmunology category, and inflammatory cytokine levels in the innate immunity category.

Key Words : Stress(스트레스), Fatigue(피로), Biomarker(생체지표), Combat-Related PTSD(전투관련 외상 후 스트레스 증후군), Animal Model(동물모델), Drug(약물)

### 1. 서론

참전 전투원들은 불규칙한 임무-휴식 주기와 군사 장비 사용으로 인해 일상의 활동에 제한을 받으며, 불

\* Corresponding author, E-mail: dongsookim04@gmail.com  
Copyright © The Korea Institute of Military Science and Technology

안, 공포, 수면 부족 등의 위험 요인에 노출될 수 밖에 없다. 위험요인들은 회복되기 힘든 정신적 스트레스와 육체적 피로를 유발하고, 이는 전쟁 증후군 또는 전투 관련 외상 후 스트레스 장애(PTSD)로 진행될 수 있다<sup>[1,2]</sup>. 참전 군인들에게 나타나는 비특이적 신체화 증상들은 1차 대전 이후 꾸준히 보고되어 왔다<sup>[1,3]</sup>. 1, 2차 세계대전에서 보고된 심장증후군부터 걸프전증후군까지 나타난 유사 증상들은 피로, 두통, shortness of breath, 수면장애, 집중력 저하 등이었다<sup>[4]</sup>. 전쟁 중이나 이후에 군인들에게 나타나는 이러한 증상들과 연계된 특이 질병을 전쟁증후군이라 한다. 전쟁증후군 증상들은 참전 군인들에게만 특이하게 나타나기보다는 오히려 정신적 스트레스를 많이 받는 사람과 외상 후 스트레스 증후군(Post Traumatic Stress Syndrome, PTSD)으로 고통받는 사람에게 있어서 공통적으로 나타난다<sup>[5]</sup>. 그리하여 전쟁증후군을 military PTSD라고도 한다. 문제는 military PTSD로 고통 받는 참전 군인의 비율이 자연재해 노출이나 성적 학대 등의 원인에 의한 PTSD 발생 빈도보다 상대적으로 매우 높다는 것이다<sup>[6]</sup>. 전장 환경 노출로 인한 정신생리적 변화와 PTSD 증상들에 대한 치료와 관련된 연구들 또한 활발하게 진행되어 왔으나, 대부분은 PTSD의 원인과 그 치료 효과에 대한 연구에 초점이 맞춰져 있었다<sup>[7-9]</sup>.

Table 1. PTSD animal models

PTSD model	Causes of PTSD
Unpredictable Foot shock	Fear, anxiety
predator exposure	Fear
social defeat stress	Fear, Anxiety

전쟁증후군과 전투 노출관련 PTSD 연구는 예방 방법에 대한 연구로 확대되어야한다. PTSD 예방 연구는 동물모델을 통한 기초연구에서 비롯될 수 있다. 현재 까지 전장 환경 노출 PTSD를 모사하는 동물 모델은 만성적 예측 불가능한 스트레스, 포식자 노출 스트레스, 그리고 사회적 패배 스트레스(social defeat stress) 모델들이었으며, 불안과 공포 유발에 초점이 맞춰진 정신적 스트레스 모델 이었다(Table 1)<sup>[10-12]</sup>. 그러나 전장은 정신적 스트레스 뿐 아니라 육체적 피로가 동시에 가중되는 환경이다.

본 연구진은 전장 노출을 모사하는 장치와 protocol 을 구축하여 국내특허를 획득하였고<sup>[13]</sup>, 구축된 동물 모델을 통하여 극심한 공포, 불안, 그리고 피로에 의해 발생하는 외상성 스트레스 증상의 예방에 효과적인 약물을 탐색하는 것을 목적으로 연구를 진행중이다. 여기에서는 전장 환경 노출로 인해 발생하는 생리적 변화를 추적하여 전장 노출에 의한 PTSD 발병 가능성을 예측하는 생체지표 프로파일을 제안한다. 생체지표 프로파일은 전장 노출 PTSD 예방을 위한 약물을 탐색하는 데 적용될 것이다. 전쟁증후군 연구를 위한 생체신호 프로파일의 탐색은 전장관련 PTSD 연구에 근거한다. PTSD 동물 연구에서 제안된 증상들과 생리적 변화는 크게 네 가지 범주로 우선 나눌 수 있다. 네 가지 범주는 행동변화, 뇌 인지 손상, 신경면역학적 변화, 그리고 고유 면역력 변화이다. 행동에서 나타나는 주요 변화는 불안이나 우울 행동이며 그와 함께 뇌 인지 손상을 동반한다. 실험동물에서 이러한 행동변화는 Open Field Test(OFT)에서 활동성과 불안 유사행동으로 분석할 수 있으며<sup>[14-16]</sup>, 뇌인지 손상은 Brain-derived neurotrophic factor(BDNF), 멜라토닌 같은 뇌의 생체지표 측정으로 유추할 수 있다. 외상성 스트레스는 BDNF나 멜라토닌의 감소로 이어진다<sup>[17,18]</sup>. 신경면역학적 변화는 신경계와 면역계의 연결인자를 분석하면 되는데 그 대상은 스트레스 호르몬인 Corticosterone과 급성 스트레스에서 빠르게 분비되는 아드레날린이 대상이 될 수 있다. Corticosterone은 스트레스에 반응하여 분비량이 증가하나 외상성 스트레스의 경우 오히려 감소할 수 있다<sup>[18-20]</sup>. 고유면역력 변화는 염증지표의 변화를 추적하여 유추할 수 있다. 스트레스를 받으면 염증성 시토카인의 증가가 현저한 것으로 알려져 있다<sup>[18]</sup>. 연구의 개념적 도식을 Fig. 1에 나타내었다.

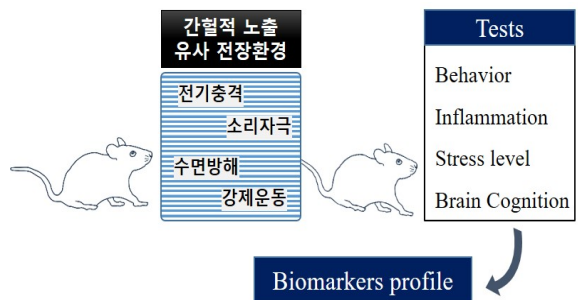


Fig. 1. Concept of research

## 2. 연구방법

### 2.1 Animals and drug administration

실험동물은 BALB/cByJ(7 week-old)를 KOATECH(경기도 평택, 한국)에서 구매를 하였으며 본 실험은 대구 가톨릭대학교 동물실험윤리위원회의 승인(제IACUC-2015-46호)후 진행되었다. 모든 실험이 Animal Care Protocol에 따라 관리되고 수행되었다. 실험동물들은 유사 전장 환경 장치에 15일 동안 무작위로 3회 노출을 시켰다. 1회 노출은 45분 수면방해와 45분 휴식으로 24시간동안 진행이 되며, 수면방해는 1 rpm으로 회전하는 원형의 Cage를 통해 주어졌다. 전장 공포를 모사하기 위해 24 시간 회전 Cage 노출 중 무작위로 100 dB, 10 sec의 소음충격과 0.5 mA, 5 sec 동안의 전기충격이 각각 2회씩 주어졌다. 스트레스 예방 약물인 Ginsenoside Rg1(Rg1)은 스트레스 노출 1주일 전부터 스트레스 노출 실험 끝까지 2주일 동안 위내 투여하였다(10 mg/kg).

### 2.2 Locomotor activity

OFT는 실험동물의 활동성을 측정하는 검사로 불안 및 공포에 의한 스트레스가 동물의 활동성 및 인지행동에 어떠한 영향을 미치는지 확인하는 실험방법이다. 마지막 전장 환경에 노출되고, 부검 전에 자가 제조된 OFT용 box에서 locomotor activity를 측정 하였다. OFT용 box는 가로 30 cm 세로 30 cm 높이 30 cm가 되도록 제조하고, 하나의 box에서 한 마리씩 넣어서 측정을 하였다. 총 4개의 box를 이용해 동시에 행동 실험을 실시하였고, 불안유사행동 분석을 위한 중앙부 구역(16×16×16 cm)이 설정되었다. 불안 행동 실험 전에 행동실험 장소에서 실험동물이 편안함을 유지할 수 있도록 실험 30분전부터 적응을 시켰다. 행동실험 장소는 빛이 차단되어 야행 환경이 조성되도록 하였으며, 실험과정에도 야행 환경을 유지하였다. 실험동물은 30분간 하나의 OFT box에서 자유롭게 돌아다닐 수 있도록 하였다. 이동거리 및 시간 기록 및 분석은 Ethovision XT program을 이용하였다.

### 2.3 수동회피능력 측정(Passive avoidance test)

Passive avoidance Test는 실험동물의 인지 및 기억력을 측정하는 장치로 불안 및 공포에 의한 스트레스가 동물의 인지 및 기억력에 어떠한 영향을 미치는지 확인하는 실험방법이다. 전장 환경 2회 노출 후 바로 측

정하였으며, GEMINI™ Avoidance System을 사용하여 측정하였다. 수동회피능력 측정은 3회 스트레스 후 Locomotor activity 측정이 수행되어야 하고 기타의 행동실험으로 인한 시간의 연장은 스트레스에 의한 생리적 변화를 회복시킬 수 있어 2회 스트레스 후 수행되었다. GEMINI Test station은 가운데에 automatic gate에 의해 분리되는 두 개의 chamber로 구성이 되어 있다. 바닥은 grid floor로 전기쇼크를 가할 수 있는 장치가 되어 있다. 실험은 이를 동안 진행이 되며, 첫 번째 날은 training trial로 실험동물을 한 쪽 방에 넣고 30초간 적응 시간을 준 뒤, 실험동물이 있는 chamber에 조명을 가하면서 가운데 있는 automatic gate가 자동으로 열리게 된다. 이때의 실험동물은 본성에 의하여 맞은편의 어두운 chamber로 건너가게 된다. 실험동물이 어두운 chamber로 들어가면 자동적으로 gate가 닫히면서 0.5 mA의 전기쇼크가 5초간 가해진다. 24시간이 지나고 다음날 retention trial에서는 training을 받은 실험동물에 대하여 똑같은 조건에서 실험하였으며, 어두운 chamber에서 전날에 받은 전기쇼크에 대한 기억으로 조명이 들어온 후 밝은 환경에 머무는 시간이 측정된다. 최대 300초까지만 측정하였다.

### 2.4 혈청 내 Corticosterone(CORT), Adrenaline 측정

실험동물은 행동실험이 끝난 후 CO<sub>2</sub> 가스로 마취되었고, 혈액은 1 ml syringe를 이용하여 심장에서 얻었다. 혈청은 혈액을 E-tube에 넣어 4 °C 냉장고에서 하루 보관 한 후 4000 rpm, 30 min, 4 °C에서 원심분리하여 얻었으며, 채취한 혈청을 이용하여 스트레스 수준 지표인 CORT과 adrenaline을 측정하였다. CORT의 정량은 ELISA kit(Cat #ab108821, abcam), Adrenaline의 정량은 ELISA kit(Cat#:MBS701514, MyBiosource)를 이용하였다. ELISA는 제조회사에서 제시한 protocol을 진행하였으며 일반적으로 다음의 protocol을 사용하였다. 혈청 samples과 standard가 96-well plate에 순차적으로 25 µl 씩 loading되고, 25 µl의 biotinylated CORT가 각 well에 loading 된 후, 96-well plate는 120분간 상온에서 incubation 된다. 이때 각각의 sample 및 standard는 측정 정확도를 위하여 각각 2-well 씩 loading되었다. Plate를 4~5회 세척하고 50 µl의 streptavidin-peroxidase conjugate를 각 well에 넣은 후 30분 동안 incubation 시킨다. 다시 plate를 5회 washing 한 후 각 well에 50 µl의 chromogen substrate를 넣은 후 12분 동안 incubation 을 시킨다. 50 µl의 stop solution을 각 well에 넣은 후

blue color가 yellow color로 완전히 전환이 되면 ELISA reader에서 450 nm 파장 빛의 absorbance를 측정한다.

#### 2.5 Whole brain 균질액 추출 및 단백질 정량

심장채혈이 끝난 실험동물의 뇌는 PBS perfusion을 통하여 잔류 혈액이 방혈 된 후 적출되었다. 균질액화 용액은 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 % NP-40가 함유된 lysis buffer 9.9 ml에 protease inhibitor cocktail 0.1 ml을 혼합하여 만들어졌다. 적출한 전체 뇌 조직은 균질화 용액을 혼합하여 10분간 sonication을 통해 분쇄되었다. 균질액은 뇌 분쇄물을 4 °C, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 상층액을 분리하여 얻었다. 뇌 조직 내 총 단백질은 BCA protein assay kit(Cat#:23225, Thermo SCIENTIFIC)를 사용하여 정량하였다.

#### 2.6 Whole brain 내 BDNF 측정

뇌 BDNF의 분석은 다음과 같은 protocol을 사용하였다. BDNF(Cat#:MBS702200, MyBioSource) 항체가 coating 되어진 96 well plate에 100 µl의 standard와 sample을 각각 넣어 준 후 2시간 동안 37 °C에서 incubation 시킨다. 2시간이 지난 뒤 각 well의 용액을 제거한 후 biotin-antibody를 각각의 well에 100 µl씩 넣고 1시간 동안 37 °C에서 한 번 더 incubation 시킨다. 그리고 washing buffer를 이용하여 3번 washing을 한 후 100 µl의 HRP-avidin을 넣고 37 °C에서 incubation 시킨다. Plate를 5회 washing 한 후 각 well에 90 µl의 TMB substrate를 넣은 후 15분 동안 incubation을 시킨다. 50 µl의 stop solution을 각 well에 넣은 후 blue color가 yellow color로 완전히 전환이 되면 ELISA reader에서 450 nm 파장 빛의 absorbance를 측정한다. 마지막으로 단백질 양에 따른 BDNF 양을 보정하기 위하여 단백질 1 mg 당 BDNF 양을 산출하였다.

#### 2.7 Proinflammatory cytokines-1(TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6 & IL-17)

Proinflammatory cytokines는 비장의 T-cell를 48시간 배양한 상층액에서 정량하였다. TNF- $\alpha$ (Cat #:558534, BD OptEIA™), IFN- $\gamma$ (Cat#:555138, BD OptEIA™), IL-17(Cat#:DY421, R&DSytem), 그리고 IL-6(Cat #:550950, BD OptEIA™)을 이용하여, 다음과 같은 protocol을 사용하였다. Plate는 각 well에 coating buffer에 희석된 100 µl의 capture antibody를 넣은 상태로 4 °C에서

overnight를 시킨다. Capture antibody로 coating 된 plate는 washing buffer로 5회 washing한 후 200 µl의 10 % FBS-PBS로 상온에서 2시간 blocking된다. Plate를 5회 washing하고 상층액 samples과 standard를 96-well plate에 순차적으로 100 µl 씩 loading하고, 96-well plate는 4 °C에서 overnight를 시킨다. Plate를 5회 washing하고 detection antibody 100 µl를 넣은 후 1시간 상온에서 incubation을 시킨다. Plate를 5회 washing을 한 후 enzyme reagent를 100 µl를 넣은 후 30분간 incubation을 시킨다. Plate를 5회 washing하고 각 well에 100 µl의 TMB substrate를 넣은 후 30분 동안 incubation을 시킨다. 50 µl의 stop solution을 각 well에 넣은 후 blue color가 yellow color로 완전히 전환이 되면 ELISA reader에서 450 nm 파장 빛의 absorbance를 측정한다.

#### 2.8 통계처리

모든 실험결과는 mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM)으로 나타냈다. 집단 간 비교분석은 SPSS를 이용하여 ANOVA test를 시행한 결과이다. 유의성은  $p < 0.05$  이었다.

### 3. 연구결과

#### 3.1 행동변화

OFT에서의 활동성은 전체 이동한 거리, 전체 이동한 시간, 그리고 OFT 내의 중앙부에서의 활동거리와 중앙부에서의 활동 시간으로 나누어 기록하고 전체 이동거리 및 이동시간 대비 중앙부에서의 활동비를 분석하였다(Table 2). 간헐적 무작위 스트레스(Intermittent Unpredictable Stress, IUS)에 노출된 생쥐들은 대조군의 생쥐들에 비해 이동거리가 유의하게 길었으나, Open field의 중앙부에서 이동한 거리가 차지하는 비율은 유의하게 낮았다. 중앙부에서의 활동을 탐색활동, 주변부에서의 활동을 불안유사행동으로 분류할 수 있다. 결국 IUS는 생쥐들의 파행행동과 불안유사행동의 수준을 유의하게 높이는 것으로 나타났다.

한편 수동회피실험 결과(Table 3)에서 볼 수 있는 것과 같이 IUS는 상대적으로 기억력의 약화를 유발하였으나 개체 간 편차가 커서 유의미한 차이를 확인할 수 없었다.

Table 2. Locomotor activity

		N	Mean (SEM)	F	$\rho$
Total Distance, cm	1	22	5834.5 (280.1)	<b>13.05**</b>	.001
	2	22	7099.1 (210.0)		
Total Duration, sec	1	22	1705.4 (51.6)	2.04	.16
	2	22	1780.1 (8.3)		
Center Distance, cm	1	22	1171.7 (121.5)	1.57	.22
	2	22	980.9 (91.7)		
Center Duration, sec	1	22	195.0 (27.3)	.31	.58
	2	22	211.8 (12.9)		
% Center, Distance	1	22	19.6 (1.7)	<b>7.92*</b>	.007
	2	22	13.7 (5.6)		
% Center Duration	1	22	11.0 (1.5)	2.79	.10
	2	22	7.8 (5.4)		

1. Control mice, 2. Stress mice;  
\* :  $p < .05$ ; \*\* :  $p < 0.001$ 를 나타내었다.

Table 3. Latency in passive avoidance test

		N	Mean (SEM)	F	$\rho$
Latency sec	1	20	179.02 (26.64)	<b>2.59</b>	.116
	2	20	117.06 (27.80)		

1. Control mice, 2. Stress mice

### 3.2 신경면역 지표 변화

신경면역학적 변화를 추적하기 위해 스트레스 호르몬인 혈청 CORT와 아드레날린 수준을 측정하였다. 아드레날린은 급성 스트레스 지표로 IUS 모델에서는

유의미한 변화가 나타나지 않았으며, CORT 수준은 유의미하게 증가하였다(Table 4). 그러나 개체 간 차이가 컸다. 이는 IUS가 스트레스 반응을 지속적으로 유발하나 확실한 외상성 스트레스는 아니고, 경계 수준의 스트레스 강도임을 나타낸 결과로 판단된다.

Table 4. Splenic pro-inflammatory cytokine levels

		N	Mean (SE)	F	$\rho$
Adrenal. pg/ml	1	22	18.99 (1.48)	<b>3.90</b>	.055
	2	20	14.53 (1.73)		
Cort. ng/ml	1	16	116.47 (19.44)	<b>4.34*</b>	.046
	2	16	202.09 (36.19)		
BDNF, pg/mg protein	1	13	34.05 (2.23)	<b>9.02*</b>	.006
	2	13	22.55 (1.74)		
Melatonin, pg/mg protein	1	12	1.16 (.15)	2.83	.11
	2	10	.86 (0.08)		
TNF $\alpha$ pg/ml	1	12	744.2 (51.6)	<b>5.17*</b>	.003
	2	12	946.1 ( $\pm 72.2$ )		
IFN $\gamma$ ng/ml	1	12	37.4 ( $\pm 3.0$ )	<b>16.30**</b>	.001
	2	12	60.5 ( $\pm 4.9$ )		
IL-6 pg/ml	1	13	262.4 ( $\pm 29.1$ )	2.29	.13
	2	13	391.1 ( $\pm 54.3$ )		
IL-17 pg/ml	1	13	318.6 ( $\pm 45.0$ )	.59	.45
	2	13	364.07 ( $\pm 38.2$ )		

1. Control mice, 2. Stress mice;  
\* :  $p < .05$ ; \*\* :  $p < 0.001$ 를 나타내었다.

### 3.3 뇌 손상 지표 변화

스트레스는 뇌 인지 기능의 손상을 유발할 수 있다. 뇌 인지 손상의 지표로 뇌의 BDNF와 멜라토닌이 측정되었다. 뇌 BDNF와 멜라토닌 모두 IUS 모델에서 감소하였다(Table 4). 그러나 멜라토닌은 유의미한 감소가 아니었으며, 뇌 BDNF만이 IUS 모델에서 유의미하게 감소하여 생체지표로 활용 가능하였다.

### 3.4 염증지표의 변화

IUS모델에서 고유면역력의 변화를 추적하기 위해 비장의 T-세포를 배양하여 상층액에서 pro-inflammatory cytokine인 TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, 그리고 IL-17 수준을 측정하였다. IUS는 전체적으로 pro-inflammatory cytokine의 수준을 유의하게 상승시켰다. 그 중에서도 TNF $\alpha$ 와 IFN $\gamma$ 가 유의미하게 상승하여 생체지표로 활용될 수 있었다(Table 4).

### 3.5 약물, Ginsenoside Rg1의 적용

IUS 동물 모델에서 유발되는 정신생리적 변화를 네 가지 범주로 나누고 각 범주에서 유의미한 변화를 나타낸 생체신호를 각각 도출하였다. 행동 변화에서는 OFT에서의 과잉행동인 총 이동한 거리와 불안유사행동의 상대적 개념인 Open Field의 중앙부 활동 비율이었다. 뇌 기능의 변화 범주에서는 뇌인지 손상 지표인 뇌 BDNF, 그리고 신경면역학적 범주에서는 혈청 CORT가 유의미한 생체지표였다. 고유면역력 변화를 추적하기 위해 분석된 염증지표에서는 TNF $\alpha$ 와 IFN $\gamma$ 가 유의미하게 상승하여 활용 가능한 생체지표로 식별되었다.

이들 생체지표를 활용하여 항스트레스 효과가 보고된 Rg1의 효능을 검증하는 실험을 실시하였다. Rg1은 뇌신경보호 작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 면역기능 증가, 혈소판 응집 억제, 항피로, 항염증, 기억 및 학습기능 증진 및 부신피질 자극 호르몬 분비를 촉진하는 것으로 보고되어 있으며, 스트레스성 성 행동 장애에도 개선효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>[21-24]</sup>. 또한 설치류를 이용한 실험에서도 항스트레스 효과가 있는 것으로 보고되었다<sup>[25,26]</sup>.

Rg1이 네 가지 범주의 생체신호 변화에 미치는 억제 효능을 Fig. 2에 나타내었다. Rg1은 행동변화와 뇌 기능과 관련된 생체지표에는 효능을 나타내지 못하였다. 그러나 스트레스 호르몬의 상승을 유의미하게 억제 하였으며, 염증지표인 TNF $\alpha$ 와 IFN $\gamma$ 의 상승을 효과

적으로 억제하는 것으로 나타났다. Rg1은 IUS 모델에서 뇌 기능과 행동 변화에는 효능을 가지지 못하지만 말초에서의 스트레스 반응의 활성을 억제하고 결과적으로 염증반응을 억제하는 것으로 보인다.

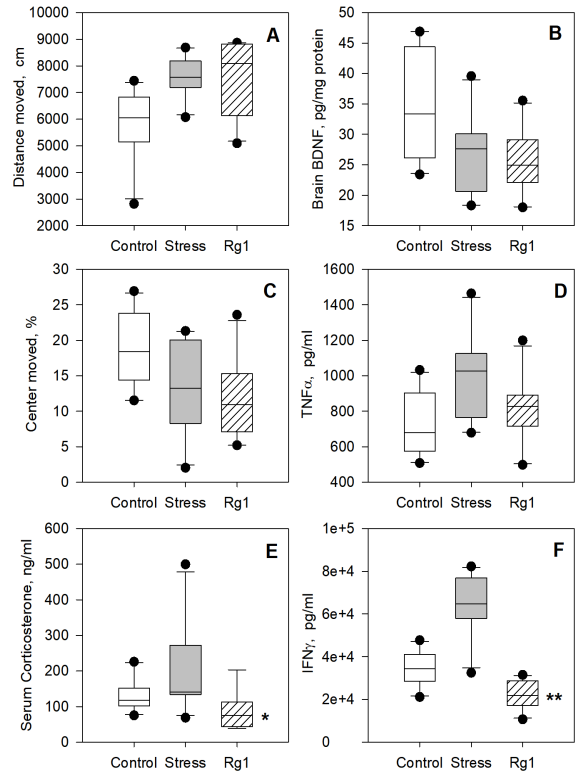


Fig. 2. Anti-stress effect of ginsenoside Rg1

## 4. 결론 및 토의

전장 환경 노출과 같은 스트레스는 정신면역학적 변화를 동반한다<sup>[27,28]</sup>. 스트레스 반응은 스트레스 호르몬을 상승 시키고, 면역기관의 조절 물질 수준에 변화를 유발한다. 이 때 면역억제 작용과 염증지수 상승이 지속되면 전반적 건강상태가 악화될 수 있다<sup>[29]</sup>. 본 연구에서는 전장 노출 모사 장치에 노출된 생쥐들의 정신면역학적 변화를 네 가지 범주로 나누어 탐색한 결과이다. 우선, 스트레스 노출에 의한 행동 변화에서는 과잉행동과 불안유사행동이 유의미하게 증가하였다. 뇌 손상 지표로 분석된 뇌의 BDNF가 스트레스 노출로 유의미한 감소를 나타내었고 멜라토닌은 상대적으로

로 감소했다. 스트레스 호르몬과 신경전달물질의 경우 CORT만이 유의미한 증가를 나타내었다. 염증지표로 분석된 Pro-inflammatory cytokines의 경우 TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, 그리고 IL-17 모두 증가 하였으나 TNF $\alpha$ 과 IFN $\gamma$ 만이 유의미한 증가를 나타내었다.

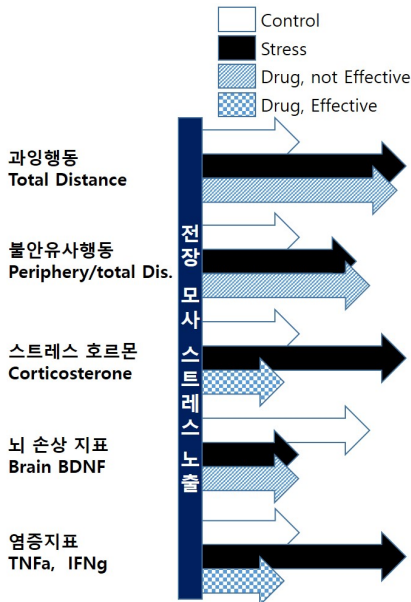


Fig. 3. Biomarkers profile and application of a drug, ginsenoside Rg1

결론적으로 전장 환경 노출을 모사한 IUS 모델에서 주요한 생체신호는 행동지표로 OFT에서 전체 이동거리와 Arena의 중앙부에서의 활동비, 그리고 뇌 손상 지표로는 뇌의 BDNF 수준, 그리고 신경면역 연결인자로 스트레스 수준을 평가할 수 있는 CORT도 생체 지표로 활용 가능하였다. 마지막으로 염증지표인 pro-inflammatory cytokines 중에 TNF $\alpha$ 와 IFN $\gamma$ 가 생체 지표로 활용 가능하였다. 이들 생체지표를 Fig. 2에 정리하였으며, 이를 기준으로 스트레스 노출 전 약물(Rg1)을 복용시킨 후 효능을 검증한 결과도 함께 도식화하였다. Rg1은 스트레스 노출 전 복용되었을 때 말초에서의 반응인 스트레스 반응의 활성화와 염증반응을 억제하는데 효능이 있으나 행동 변화와 뇌 손상 지표의 변화를 억제하지 못했다. 종합하면 전투 환경 노출을 모사한 간헐적 스트레스는 시상하부-뇌하수체-부신 피질 반응 경로를 통해 스트레스 수준을 상승시키고, 뇌인지 손상 가능성을 높이며, 염증반응을 유발

하는 것으로 나타났다.

본 연구 모델을 약물의 효능 탐색을 위해 적용가능하다. 다만 불안 유사행동이 PTSD와 같은 스트레스 반응에서 중요한 지표 중 하나인데 단순 해석에 한계가 있을 수 있으며 Elevated Plus maze나 Elevated Zero maze를 추가 할 수 있다. 또한 뇌 손상 지표인 BDNF의 경우 뇌의 부위에 따라 변화가 달라질 수 있으므로 뇌 부위별 적용으로 확대할 필요가 있다<sup>[30]</sup>. 한편, 스트레스 호르몬인 CORT 수준은 중등도의 스트레스에서는 상승하는 것이 일반적이며, PTSD를 유발할 수준의 강도 높은 스트레스에서는 오히려 감소하는 경향이 있다<sup>[18]</sup>. 그러나 본 실험 모델에서는 상승하는 결과를 나타내었는데 개체별 차이가 크게 나타났다. 결국 간헐적 스트레스 모델인 본 실험모델의 경우 적응 과정을 포함하고 있기 때문에 스트레스 반응에서 편차가 커진 것으로 보이며, 스트레스 노출 횟수가 증가하면 외상성 스트레스로 강화가 유도될 수 있을 것이다.

본 연구는 참전 군인들이 전장 환경에서 경험할 수 있는 정신적 신체적 스트레스와 피로 연구가 가능하도록 설계한 실험동물 모델을 구축하고, 전장 환경에 노출되었을 때 정신생리적 변화를 모니터링할 수 있는 생체신호를 발굴한 결과이다. 본 실험모델과 생체 지표 프로파일이 전장 환경 노출로 유발될 수 있는 정신 생리적 변화를 최소화하거나 변화를 완화시킬 수 있는 약물 탐색에 기여할 수 있기를 기대한다.

## 후 기

이 연구는 국방과학연구소 인체 생리기능 특이성 물질 설계 기술(ADD-13-01-06-18)에 의해 수행되었다.

## References

- [1] Kang HK, BH Natelson, CM Mahan, KY Lee, FM Murphy, "Post-Traumatic Stress Disorder and Chronic Fatigue Syndrome-Like Illness Among Gulf War Veterans: A Population-based Survey of 30,000 Veterans," Am J Epidemiol, 157: 141, 2003.
- [2] Brown M, "Toxicological Assessments of Gulf War Veterans," Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 361: 649, 2006.

- [3] Hyams, K. C., Wignall, F. S., & Roswell, R., "War Syndromes and Their Evaluation: from the US Civil War to the Persian Gulf War," *Annals of Internal Medicine*, 125(5), 398-405, 1996.
- [4] Gray, G. C., Reed, R. J., Kaiser, K. S., Smith, T. C., & Gastañaga, V. M., "Self-Reported Symptoms and Medical Conditions Among 11,868 Gulf War-Era Veterans: The Seabee Health Study," *American Journal of Epidemiology*, 155(11), 1033-1044, 2002.
- [5] Ford, J. D., Campbell, K. A., Storzbach, D., Binder, L. M., Anger, W. K., & Rohlman, D. S., "Posttraumatic Stress Symptomatology is Associated with Unexplained Illness Attributed to Persian Gulf War Military Service," *Psychosomatic Medicine*, 63(5), 842-849, 2001.
- [6] Kessler, R. C., Sonnega, A., Bromet, E., Hughes, M., & Nelson, C. B., "Posttraumatic Stress Disorder in the National Comorbidity Survey," *Archives of General Psychiatry*, 52(12), 1048-1060, 1995.
- [7] Bryant RA, "Posttraumatic Stress Disorder and Traumatic Brain Injury: Can They Co-Exist?" *Clin Psychol Rev*, 21: 931, 2001.
- [8] Mcfarlane AC, "The Long-Term Costs of Traumatic Stress: Intertwined Physical and Psychological Consequences," *World Psychiatry*, 9: 3, 2010.
- [9] Yehuda R, R Bryant, C Marmar, J Zohar, "Pathological Responses to Terrorism," *Neuropsychopharmacology*, 30: 1793, 2005.
- [10] Whitaker AM, NW Gilpin, S Edwards, "Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder and Recent Neurobiological Insights," *Behav Pharmacol*, 25: 398, 2014.
- [11] Goswami S, O Rodríguez-Sierra, M Cascardi, D Paré, "Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder: Face Validity," *Front Neurosci*, 7: 89, 2013.
- [12] Daskalakis NP, R Yehuda, "Principles for Developing Animal Models of Military PTSD," *Eur J Psychotraumatol*, 5, 2014.
- [13] Kim, C., Cheon, K., Kim, D., "War Environment-Simulating Device and Stress Modeling Method," Patent(10-1749645), Republic of Korea, 2017.
- [14] Adamec RE, P Burton, T Shallow, J Budgell, "NMDA Receptors Mediate Lasting Increases in Anxiety-Like Behavior Produced by the Stress of Predator Exposure-Implications for Anxiety Associated with Posttraumatic Stress Disorder," *Physiol Behav*, 65: 723, 1998.
- [15] Shepard JD, KW Barron, DA Myers, "Corticosterone Delivery to the Amygdala Increases Corticotropin-Releasing Factor mRNA in the Central Amygdaloid Nucleus and Anxiety-Like Behavior," *Brain Res*, 861: 288, 2000.
- [16] Wohleb ES, ML Hanke, AW Corona, ND Powell, MS La'tonia, MT Bailey, RJ Nelson, JP Godbout, JF Sheridan, " $\beta$ -Adrenergic Receptor Antagonism Prevents Anxiety-Like Behavior and Microglial Reactivity Induced by Repeated Social Defeat," *J Neurosci*, 31: 6277, 2011.
- [17] Murakami S, H Imbe, Y Morikawa, C Kubo, E Senba, "Chronic Stress, as Well as Acute Stress, Reduces BDNF mRNA Expression in the Rat Hippocampus but Less Robustly," *Neurosci Res*, 53: 129, 2005.
- [18] Patki G, N Solanki, F Atrooz, F Allam, S Salim, "Depression, Anxiety-Like Behavior and Memory Impairment are Associated with Increased Oxidative Stress and Inflammation in a Rat Model of Social Stress," *Brain Res*, 1539: 73, 2013.
- [19] De Kloet ER, M Joëls, F Holsboer, "Stress and the Brain: from Adaptation to Disease," *Nature Reviews, Neuroscience*, 6: 463, 2005.
- [20] Elenkov IJ; GP Chrousos, "Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity," *Ann N Y Acad Sci*, 966: 290, 2002.
- [21] Fang, F., Chen, X., Huang, T., Lue, L.-F., Luddy, J. S., & Yan, S. S., "Multi-Faced Neuroprotective Effects of Ginsenoside Rg1 in an Alzheimer Mouse Model," *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(2), 286-292, 2012.
- [22] Jiang, B., Xiong, Z., Yang, J., Wang, W., Wang, Y., Hu, Z. L., . . . Chen, J. G., "Antidepressant-Like Effects of Ginsenoside Rg1 are Due to Activation of the BDNF Signalling Pathway and



- Neurogenesis in the Hippocampus,” *British Journal of Pharmacology*, 166(6), 1872-1887, 2012.
- [23] Liu, Q., Kou, J.-P., & Yu, B.-Y., “Ginsenoside Rg1 Protects Against Hydrogen Peroxide-Induced Cell Death in PC12 Cells Via Inhibiting NF- $\kappa$ B Activation,” *Neurochemistry international*, 58(1), 119-125, 2011.
- [24] Lee, B. B., & Lee, H. J., “Effect of Ginsenoside Re on Depression-and Anxiety-Like Behaviors and Cognition Memory Deficit Induced by Repeated Immobilization in Rats,” *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(5), 708-720, 2012.
- [25] Yong-Xin, X., & Jian-Jun, Z., “Evaluation of Anti-Fatigue Activity of Total Saponins of Radix Notoginseng,” *Indian Journal of Medical Research*, 137(1), 151, 2013.
- [26] Kim, D.-H., Moon, Y.-S., Lee, T.-H., Jung, J.-S., Suh, H.-W., & Song, D.-K., “The Inhibitory Effect of Ginseng Saponins on the Stress-Induced Plasma Interleukin-6 Level in Mice,” *Neuroscience Letters*, 353(1), 13-16, 2003.
- [27] Brown VJ, “BattleScars: Global Conflicts and Environmental Health,” *Environ Health Perspect*, 112: A994, 2004.
- [28] Kilshaw S, “Gulf War Syndrome: A Reaction to Psychiatry’s Invasion of the Military?” *Cult Med Psychiatry*, 32: 219, 2008.
- [29] Hunt EJ, S Wessely, N Jones, RJ Rona, N Greenberg, “The Mental Health of the UK Armed Forces: Where Facts Meet Fiction,” *Eur J Psychotraumatol*, 5, 2014.
- [30] Murakami, S., Imbe, H., Morikawa, Y., Kubo, C., & Senba, E., “Chronic Stress, as Well as Acute Stress, Reduces BDNF mRNA Expression in the Rat Hippocampus but Less Robustly,” *Neuroscience Research*, 53(2), 129-139, 2005.