

만성구속스트레스 동물모델에 대한 JG02의 항우울 효과

유동근, 서영경, 이지윤, 김주연, 정진형*, 최정준[†], 정인철

대전대학교 한의과대학 한방신경정신과학교실, 대전대학교 천안한방병원 한방신경정신과*, 대전대학교 한의과대학 한의생명융합과학교실[†]

Antidepressant Effects of JG02 on Chronic Restraint Stress Animal Model

Dong Keun You, Young Kyung Seo, Ji-Yoon Lee, Ju Yeon Kim, Jin-Hyeong Jung*, Jeong June Choi[†], In Chul Jung

Department of Oriental Neuropsychiatry, College of Korean Medicine, Daejeon University, *Department of Neuropsychiatry Medicine, Cheonan Korean Medicine Hospital of Daejeon University, [†]Laboratory of Molecular Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

Received: August 12, 2019
Revised: September 17, 2019
Accepted: September 19, 2019

Correspondence to
In Chul Jung
Department of Oriental
Neuropsychiatry, College of Korean
Medicine, Daejeon University, 62
Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon, Korea.
Tel: +82-42-470-9129
Fax: +82-42-470-9005
E-mail: npjeong@dju.kr

Acknowledgement
This work was supported by grants
from the Traditional Korean Medicine
R&D Project, Ministry of Health &
Welfare, Republic of Korea
(HI17C2393, HI15C0006).
This paper is an excerpt from Dong
Keun You's thesis on his master's de-
gree for 2019.

Objectives: As a general emotion, everyone can temporarily experience depression, but depressive disorder is a disease that excessively affects daily life. Among the various causes of depression, the deficiency of monoamine-based neurotransmitters such as serotonin and epinephrine are considered significant. Thus, antidepressants that target monoamines are used frequently. However, side effects such as nausea, vomiting, insomnia, anxiety, and sexual dysfunction are observed. Thus, it is necessary to develop a new therapeutic agent with fewer side effects. In this study, we investigated the antidepressant effect of JG02, used to treat depression by normalizing the flow of qi (氣) in Korean medicine.

Methods: C57BL/6 mice were selected and randomly divided into six groups: normal, control, amitriptyline, and JG02 (50, 125, 250 mg/kg), respectively. Except for normal, depression was induced by applying restraint stress at the same time for six hours daily for 14 consecutive days. Saline, amitriptyline or JG02 samples were orally administered two hours before applying the stress. After that, a forced swimming test and an open field test were performed. Additionally, serum corticosterone, serotonin mRNA, BDNF mRNA, and protein in the hippocampal region were measured and compared.

Results: JG02 decreased immobility time rate in the FST and increased the zone transition number and travel distance in the OFT. Also, JG02 inhibited the release of serum corticosterone, and increased serotonin, BDNF gene expression, and BDNF protein in the hippocampus.

Conclusions: In this study, JG02 showed significant antidepressant effects on the chronic restraint stress mice model. When further research is performed based on JG02, the development of a new antidepressant is considered highly possible.

Key Words: Depression, Depressive disorder, JG02, Jigyul-tang, Zhiju-tang, FST, OFT, Corticosterone, Serotonin, BDNF.

I. 서론

우울장애(depressive disorder)는 우울하고 저조한 감정 상태가 주축이 되어 다양한 임상양상을 나타내는 질환이다. 흥미 혹은 즐거움의 감소와 함께 정신운동 지체 혹은 초조, 불면 혹은 과수면, 식욕 저하 혹은 증가, 자살에 대한 생각 등이 나타날 수 있으며¹⁾, 심한 경우 사회적, 직업적 또는 기타 중요한 기능 영역에서 임상적으로 현저한 고통이나 장애를 야기할 수 있다²⁾.

한국의 64세 이하 주요우울장애 평생유병률은 2001년 4.0%, 2006년 5.6%, 2011년 6.7%로 지속적인 증가추세를 보이다가 2016년 5.1%로 다소 감소한 것으로 나타났다³⁾. 그러나 우울장애로 진료 받은 인원은 지속적으로 증가하여 2011년 대비 2016년에는 약 20%, 2018년에는 약 40% 증가했으며⁴⁾, 또한 2010년 기준 자살자 수는 인구 10만 명당 31.2명으로, 경제협력개발기구(Organization for Economic Cooperation and Development) 회원국 중 가장 높은 것으로 나타나⁵⁾, 우울증 및 우울증 치료에 대한 사회적 관심이 지속적으로 요구된다.

우울증의 원인은 다양한 생물학적, 심리-사회적 요인이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며, 그 중 뇌 내 세로토닌(serotonin)이나 에피네프린(epinephrine)과 같은 모노아민(monoamine)계 신경전달물질의 감소 또는 결핍이 대표적이다⁶⁻⁸⁾. 현재 우울증 치료에 주로 사용되고 있는 약물들에는 모노아민을 표적으로 하는 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressants; TCAs), 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitors; SSRIs), 모노아민 산화효소 억제제(monoamine oxidase inhibitors; MAOIs) 등이 있다⁹⁾. 그러나 이들 모두 일정한 항우울 효과와 더불어 다양한 부작용이 있는 것으로 보고되고 있다. TCAs의 경우 이인화, 혼란, 기립성 저혈압, 심한 진정 작용 등이 초기에 나타나며 시야 혼탁, 심각한 구갈, 체중 증가, 간질과 추체외로계 증상을 야기하는 것으로 알려져 있고, SSRI는 오심, 구토, 설사, 복통, 흥분의 화끈한 느낌, 두통 등을 유발할 수 있으며 복용 환자의 10~20%에서 불면, 불안, 흥분과 같은 증상을, 30~40%에서는 지연사정, 불감증, 발기불능, 성욕감퇴 같은 성기능 장애를 호소한다고 한다^{9,10)}. MAOI의 가장 흔한 부작용은 현기증으로 특히 기립성 저혈압의 경우가 많다¹¹⁾. 또한 티라민(tyramine)을 함유

한 치즈, 와인과 같은 음식물과 함께 섭취할 경우에는 급성 고혈압의 위험이 높아지게 되며¹²⁾, 그 외 급박노, 저혈당, 세로토닌 증후군 등이 발생할 수 있다¹³⁾.

이렇듯 우울장애의 높은 유병률과 더불어 기존 항우울제의 문제점을 해결하기 위해 한약을 이용한 효과적이면서도 부작용이 적은 치료제 개발에 대한 관심이 커지고 있다.

울증(鬱證)은 사려과도(思慮過度), 실의(失意), 비탄(悲嘆) 등 정신적 스트레스에 의해 기(氣)의 흐름에 문제가 발생하는 증후로, 서양의학의 우울증, 신경쇠약, 신경증적 장애 등과 유사하다. 치료는 기의 흐름을 정상화시켜 울체(鬱滯)를 해소하는 것이 기본 원칙이다^{1,14,15)}.

본 연구에 사용된 JG02는 지굴탕(枳橘湯)에 사삼(沙參)을 추가한 처방이다. 지굴탕은 <<동의보감(東醫寶鑑)>>¹⁶⁾ 내경편(內景篇) 기문(氣問)에 기재된 처방으로, 굴피(橘皮)와 지각(枳殼)으로 구성되어 있고 두 약재 모두 이기해울(理氣解鬱) 작용이 강하여 간기울결이 기본병리인 울증¹⁾에 유효할 것으로 기대된다. JG02는 지굴탕에 양음청폐(養陰淸肺), 보음사화(補陰瀉火)의 효능¹⁷⁾이 있는 사삼을 가하여 굴피와 지각의 행기(行氣)작용에 의해 유발될 수 있는 조(燥)를 완화할 수 있도록 구성됐다. 따라서 우울증의 변증(辨證)유형^{18,19)} 중에서는 간기울결(肝氣鬱結), 담기울결(膽氣鬱結) 유형의 우울증에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

항우울 효과에 대한 기존 한약 연구는 부자²⁰⁾, 연자육²¹⁾, 적작약(赤芍藥)²²⁾, 청피(靑皮)²³⁾, 지굴피(地骨皮)와 목단피(牡丹皮) 복합제²⁴⁾, 구기자(枸杞子)²⁵⁾, 인삼(人蔘)과 향부자(香附子)²⁶⁾ 등 단미제와 귀비탕²⁷⁾, 조위승청탕²⁸⁾, 분심기음가미방²⁹⁾, 가미소요산³⁰⁾ 등 복합처방이 있으나 지굴탕을 활용한 연구는 아직 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 동물실험을 통해 JG02의 항우울 효과와 그 작용기전을 알아보고자 C57BL/6 mouse에 JG02 투여와 함께 구속스트레스를 가하여 우울증을 유발시킨 뒤 강제수영검사(forced swimming test; FST), 열린공간검사(open field test; OFT) 및 혈청 코르티코스테론(corticosterone) 검사를 실시하였고, 해마영역에서 세로토닌(serotonin)과 뇌유래신경영양인자(Brain-derived neurotrophic factor; BDNF)의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보고자 세로토닌 mRNA와 BDNF mRNA 및 단백질 발현량을 측정하는 바 유의한 결과를 확인하였기에 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 대상

1) 실험동물

실험동물은 대한바이오텍(Korea)에서 7주령 수컷 C57BL/6 mouse (19~22 g)를 분양받아 사용하였다. 동물은 실험 당일까지 고품사료와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 실험동물은 자유식이 하면서 온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 맞추었고 12시간(light-dark cycle)의 환경에서 7일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 연구의 동물 실험에 관한 모든 사항은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인(DJUARB2017-024)을 받은 후 진행하였다.

2) 약물

본 실험에 사용한 약물 JG02는 <<동의보감(東醫寶鑑)>>¹⁶⁾의 지굴탕에 사삼 4.0 g을 가미한 것으로, (주)한국신약(Korea)에서 제공받아 사용하였다. 추출은 건조된 생약(굴피 중국산 800 g, 지각 중국산 300 g, 사삼 중국산 200 g)을 정확히 칭량하여 생약추출기에 넣고 정제수 10 L를 넣은 후 $95 \pm 3^\circ\text{C}$ 에서 3시간 동안 시행하였다. 추출액은 200호체로 여과한 후 농축기를 이용하여 연조엑스 265 g을 얻었고(수율 20.4%) 처방 1첩의 구성과 비율을 Table 1에 나타냈다.

3) 기기 및 시약

본 실험에 사용한 기기는 다음과 같다.

Video tracking system (SMART 3.0, Panlab S.I., Spain), microtube centrifuge (LaboLab, China), centrifuge (Hanil, Korea), vortexer (Thermo Fisher Scientific, UK), vacutainer tube (BD, USA), NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, UK), polymerase chain reaction machine, QuantStudioTM 3 Real Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, UK), Real-

Time PCR Instrument software (Thermo Fisher Scientific, UK), microplate reader (Molecular Device, USA), ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, USA).

본 실험에 사용한 시약은 다음과 같다.

Amitriptyline (Sigma-Aldrich, USA), PBS (Biosesang, Korea), easy Blue (iNtRON, Korea), chloroform (Sigma-Aldrich, USA), isopropanol (Sigma-Aldrich, USA), ethanol (Sigma-Aldrich, USA), DEPC water (Invitrogen, USA), Easy cDNA Synthesis kit (Nano-Helix, Korea), power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, UK), corticosterone ELISA kit (ENZO life sciences, USA), RIPA buffer (iNtRON, Korea), PVDF membrane (Hybond-P, GE Healthcare, UK), BDNF antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) anti-mouse IgG (1:2000; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) anti-rabbit IgG (1:2000; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), ECL Western blotting detection system (Amersham Biosciences, USA).

2. 방법

1) 동물실험 설계

실험동물을 공급받은 뒤 무작위로 실험동물을 케이지 당 2마리씩 배정하고 1주일 동안 새로운 실험실 환경에 적응하도록 하였다. 적응기간을 거친 후 한 그룹당 6마리씩 무작위로 6그룹으로 나누었다. 정상군(Normal)은 구속스트레스를 주지 않았으나 생리식염수(phosphate buffered saline)를 100 μl 씩 경구투여하였다. 대조군(Con)은 구속스트레스를 부여하였고 동일한 양의 생리식염수를 경구투여하였다. 양성대조군은 amitriptyline을 경구투여하였으며 실험군은 JG02 (50, 125, 250 mg/kg)를 경구투여하였다. JG02 50 mg/kg 투여군은 JG02 연조엑스를 생리식염수를 이용해 1/100로 희석한 용액 100 μl , 125 mg/kg 투여군은 2.5/100로 희석한 용액 100 μl , 250 mg/kg 투여군은 5/100로 희석한 용액 100 μl 를 투여하였다.

구속스트레스는 50 ml 크기의 실험용 튜브(Falcon, USA)의 끝에 환기를 위한 구멍을 뚫고 실험동물을 각각 한 마리씩 넣어 움직임을 제한하는 방식으로 부여하였다. 정상 대조군을 제외한 모든 실험동물은 하루 6시간씩 14일 동안

Table 1. The Herbal Composition of JG02

Herb	Galenical name	Amount (g)
橘皮	Citri Pericarpium	16.0
枳殼	Aurantii Fructus Pericarpium	6.0
沙蔘	Adenophorae Radix	4.0
Total amount		26.0

연속으로 같은 시간에 구속스트레스를 부여하여 우울증을 유발하였다. 구속스트레스를 가하기 2시간 전에 식염수, amitriptyline 또는 JG02 추출물을 경구투여하였다(Fig. 1).

실험기간 중에 실험동물에게 부작용은 나타나지 않았다.

2) 강제수영검사(Forced Swimming Test, FST)

Porsolt 등³¹⁾에 의해 보고된 강제수영검사를 수정하여 강제수영검사를 실시하였다. 깊이 46 cm×직경 20 cm의 원형실린더에 25±2°C 온도의 물을 20 cm까지 채웠다. 모든 실험동물은 FST 실시 하루 전 15분간 예비수영을 시켜 물에 적응하도록 하였다. FST 실시 당일에 실험직전 6분간 강제수영을 실시한 뒤 4분 동안 실험동물의 행동을 Video tracking system을 활용하여 촬영하였다. 이후 4분 동안 수영동작이나 기어오르는 동작을 하지 않고 단순히 떠있는 동작 또는 고개를 들기 위한 최소한의 동작만을 하는 부동자세(immobilization) 시간을 측정하였다.

3) 열린공간검사(Open Field Test, OFT)

Joo 등³²⁾이 활용한 열린공간검사 방법을 수정하여 실험에 활용하였다. 가로, 세로, 높이가 각각 30 cm×30 cm×30 cm인 정사각형의 상자틀에 그림자가 상자를 안쪽에 생기지 않도록 전등을 중앙에 위치한 뒤 행동분석을 실시하였다. 행동측정은 Video tracking system을 활용하였다. 실험시작과 동시에 상자의 중앙에 실험동물을 내려놓은 뒤 실험동물이 움직인 거리를 트래킹 시스템을 활용하여 15분 동안 측정하였다. 상자안의 구역을 4등분하여 임의로 지정한 뒤 각 구역에서 다른 구역으로 이동하는 횟수를 zone transition number로 측정하였으며 이동한 총 거리를 시스템을 활용하여 계산하였다.

4) 실험동물 치사 및 plasma 분리

행동평가를 실시한 다음날 실험동물을 마취시킨 뒤 3 ml 크기의 주사기(23 gauge 주사바늘)를 사용하여 심장에서 직접 채혈을 함으로써 실험동물을 치사하였다. 혈액은 EDTA가 들어있는 vacutainer tube에 넣고 잘 섞어 혈액의 응고를 억제하였다. 이후 1,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 상등액을 취하여 plasma를 얻었다.

5) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

혈청(plasma)에 포함된 corticosterone의 양을 측정하기 위하여 ELISA kit를 활용하여 제조사의 프로토콜에 따라 분석하였다. 혈청을 증류수에 20배 희석하여 추출물을 준비하고 96-well microplate에 혈청 100 µl와 blue conjugate 50 µl, yellow antibody를 50 µl 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 pNPP substrate 200 µl를 넣은 후 상온에서 1시간 동안 반응시키고 stop solution을 50 µl 넣은 뒤 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

6) Total RNA 추출

치사된 실험동물의 뇌를 적출하고 해마영역을 분리하여 이 부위에 들어 있는 총 함량 RNA를 다음과 같이 추출하였다. 실험동물로부터 채취된 골수세포에 10 ml의 PBS를 넣고 pipetting하여 세포를 풀어준 뒤 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상등액을 제거하여 세척하고, 남아있는 골수세포에 easy Blue 0.5 ml를 가하여 균질기(homogenizer)로 세포를 갈아주었다. 이 후 lysis된 골수세포 용액에 클로로포름 100 µl를 넣고 vortex를 사용하여 용액이 잘 섞이도록 교반한 뒤 13,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 200 µl를 새로운 튜브로 옮겨

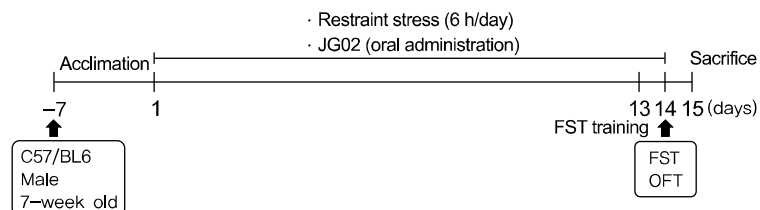


Fig. 1. Scheme of experiment for studying effects of JG02 on chronic restraint stress model through Forced Swimming Test (FST) & Open Field Test (OFT).

준 다음 200 μ l의 아이소프로판올을 가하고 튜브를 위아래로 4~5회 뒤집는 과정을 반복하여 용액이 잘 섞이도록 한 뒤 10분간 실온에서 방치하였다. Total RNA를 침전시키고자 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 침전된 RNA를 수득한 후, 75% 에탄올 1 ml을 가하여 pellet을 씻어주어 남아있는 불순물을 제거하였다. pellet을 잘 말려준 후, DEPC water 20~50 μ l를 첨가하여 RNA를 녹였다.

7) Complementary DNA (cDNA) 합성

얻어진 RNA를 NanoDrop 2000으로 정량하여 200 ng/ μ l로 맞춘 후, Easy cDNA Synthesis kit을 이용하여 다음과 같이 cDNA를 합성하였다. RNA 주형 5 μ l, Oligo-d(T) 1 μ l 그리고 DEPC water 9 μ l를 넣고, 65°C에서 5분 동안 반응시킨 후 즉시 아이스에 방치한다. 각 튜브에 미리 만들어둔 두 번째 혼합물(5 \times RT reaction mix 4 μ l+RT Enzyme mix 1 μ l)을 5 μ l씩 넣어, 50°C에서 40분, 70°C에서 10분 동안 반응시켜 cDNA합성을 완료하였다.

8) 실시간 정량 PCR (Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

유전자들의 발현을 측정하기 위하여 Power SYBR Green PCR Master Mix 를 이용한 실시간 정량 PCR (real time quantitative PCR)을 실시하였고, 기기는 QuantStudioTM 3 Real Time PCR system을 사용하였다. 모든 유전자의 PCR 산물의 크기는 100 bp 내외로 하였고, melting temperature (Tm) 값도 60°C 부근으로 설계하였다. Real-time PCR 반응은 총 20 μ l 내에 1/3으로 희석한 cDNA 2 μ l와 10 μ l의 2X SYBR mix, primer는 각각 10 pmol/ μ l의 농도로 0.3 μ l씩 첨가하였고, 나머지는 증류수로 채

워주었다. 모든 유전자에 대하여 PCR 증폭 단계는 Table 2와 같고, 증폭 cycle은 40 cycle을 실시하였다. Hot start를 위해 95°C에서 10분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 60°C에서 60초, extension을 72°C에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 형광 값이 기록되었다. 모든 cycle이 완료된 후, primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였다. 결과의 분석은 Thermo Fisher Scientific사에서 제공하는 Real-Time PCR Instrument software로 분석하였다.

9) Western blot analysis

뇌의 해마영역을 분리한 뒤 RIPA buffer를 넣고 조직을 균질기(homogenizer)로 분쇄한 뒤 얼음에 10분 동안 방치하였다. 이후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상등액을 취하여 용해물(lysate)을 얻었다. 동일한 양의 단백질을 10% polyacrylamide gel을 이용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였다. 그 후 semidry transfer system을 이용하여 gel에 있던 단백질을 PVDF membrane에 옮겨준 뒤, 0.1% tween-20이 포함된 TBS (tris-buffered saline) 용액을 이용하여 만든 5% (w/v) skim milk로 상온에서 한 시간 가량 blocking 하였다. 그 다음 BDNF antibody를 사용하여 4°C에서 약 24시간 동안 반응시켰다. 마지막으로 horseradish peroxidase (HRP)가 표지된 anti-rabbit 또는 anti-mouse IgG (1:2000; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 상온에서 한 시간 동안 membrane과 반응시켰다. 최종 측정은 ECL Western blotting detection system을 사용하였다. Internal control로는 GAPDH antibody를 사용하였다.

Table 2. Nucleotide Sequence of Primer for Gene Expression measurement

Gene	Primer sequences	
	Forward	Reverse
<i>m5HT1a</i> [*]	CCGCTGCGCTGATCTCGCTC	GATCGGTCTCCGGGGTGC
<i>mBDNF</i> [†]	GAAAGTCCCGGTATCCAAAG	CCAGCCAATTCTCTTTT
<i>mGAPDH</i> [‡]	CCCATCACCATCTCCAGGAGC	CCAGTGAGCTTCCCGTTGAGC

^{*}5-Hydroxytryptamine 1a.

[†]Brain-derived neurotropic factor.

[‡]Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

3. 통계 처리

모든 실험 결과는 mean±SEM 또는 SD로 기록되었으며, 통계처리는 IBM SPSS Statistics 23 프로그램(USA)을 이용하였고, Student's t-test로 유의성을 검증하였다. p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 결과

1. 강제수영검사 부동시간 감소 효과

강제수영검사를 실시한 뒤 부동자세를 취한 시간을 측정한 결과 정상대조군의 부동자세유지시간 비율은 57.43±4.76%이었고 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군은 79.98±6.15%로 유의한 증가를 보였다. 우울증 유발 대조군에 비해 amitriptyline 양성대조군은 60.26±5.23%로 유의하게 감소, JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군은 각각 53.07±7.30, 58.40±7.51, 65.07±4.27%로 감소하였으며 이 중 50, 250 mg/kg, 실험군은 유의한 감소를 보였다(Fig. 2).

2. 열린공간검사 이동거리 증가 효과

열린공간검사에서 이동한 거리를 측정한 결과 정상대조군의 이동거리는 3366±388 cm였고 구속스트레스로 인한

우울증 유발 대조군은 2400±84 cm로 유의하게 감소했다. 우울증 유발 대조군에 비해 amitriptyline 양성대조군은 2953±164 cm로 유의하게 증가, JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군은 각각 3123±121, 3071±176, 3346±97 cm로, 모든 농도에서 유의하게 증가했다(Fig. 3).

3. 열린공간검사 구역이동 증가 효과

열린공간검사에서 구역을 이동하는 횟수를 측정한 결과 정상대조군은 152±12회의 구역이동을 나타냈고 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군은 114±10회로 구역이동이 유의하게 감소했다. 우울증 유발 대조군에 비해 amitriptyline 양성대조군은 150±19회로 증가했고 JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군은 각각 151±6, 148±13, 158±6회로, 모든 농도에서 유의하게 증가했다(Fig. 4).

4. Corticosterone 분비 감소 효과

혈청 내에 존재하는 corticosterone의 양을 ELISA를 이용하여 측정한 결과 정상대조군의 혈청 corticosterone 양은 13.49±0.99 ng/ml의 농도를 나타냈고 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군은 31.14±2.63 ng/ml로 유의하게 증가했다. 우울증 유발 대조군에 비해 amitriptyline 양성대조군은 19.91±3.23 ng/ml로 유의하게 감소했고 JG02

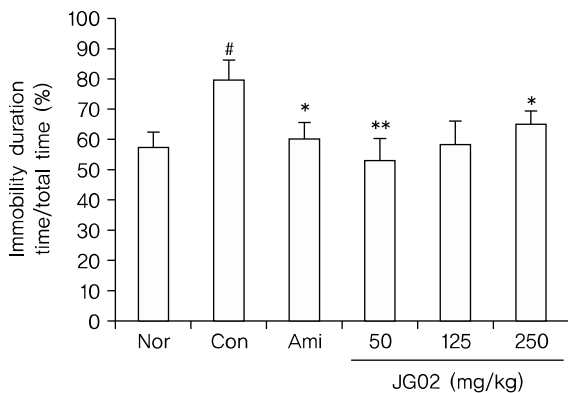


Fig. 2. Effect of JG02 on immobility duration time/total time in forced swimming test. Mice were orally administered with PBS, amitriptyline, or JG02 (50, 125, 250 mg/kg) prior to restraint stress. After 2 h, depression was induced by chronic restraint stress (6 h/day) in C57BL/6 mice (n=6/group) for 14 consecutive days. The next day, FST was performed and immobility duration time for 4 min was analyzed by video tracking system. Data are mean±SEM values. Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, Ami: amitriptyline. #p<0.05 vs Nor, *p<0.05, **p<0.01 vs Con.

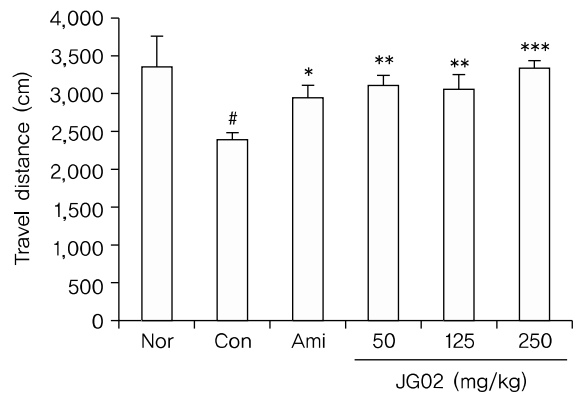


Fig. 3. Effect of JG02 on travel distance in open field test. Mice were orally administered with PBS, amitriptyline, or JG02 (50, 125, 250 mg/kg) prior to restraint stress. After 2 h, depression was induced by chronic restraint stress (6 h/day) in C57BL/6 mice (n=6/group) for 14 consecutive days. The next day of FST, OFT was performed and travel distance 15 min was analyzed by video tracking system. Data are mean±SEM values. Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, Ami: amitriptyline. #p<0.05 vs Nor, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs Con.

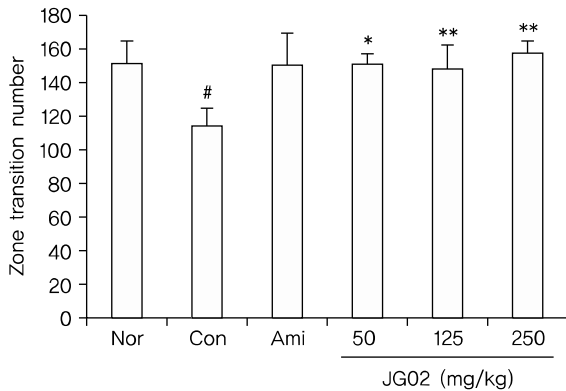


Fig. 4. Effect of JG02 on zone transition in open field test. Mice were orally administered with PBS, amitriptyline, or JG02 (50, 125, 250 mg/kg) prior to restraint stress. After 2 h, depression was induced by chronic restraint stress (6 h/day) in C57BL/6 mice (n=6/group) for 14 consecutive days. The next day of FST, OFT was performed and transition number between 4 zones in open field was analyzed by video tracking system. Data are mean±SEM values. Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, Ami: amitriptyline. #p<0.05 vs Nor, *p<0.05, **p<0.01 vs Con.

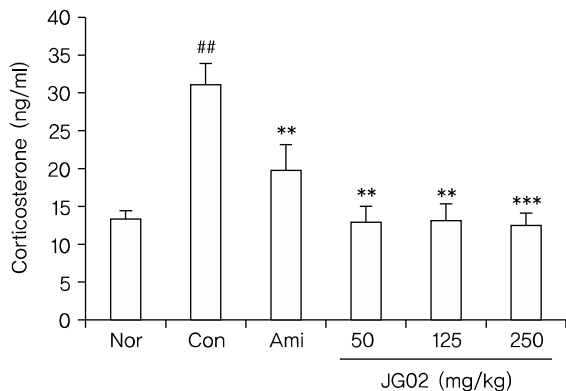


Fig. 5. Effect of JG02 on level of corticosterone in blood plasma. Mice were orally administered with PBS, amitriptyline, or JG02 (50, 125, 250 mg/kg) prior to restraint stress. After 2 h, depression was induced by chronic restraint stress (6 h/day) in C57BL/6 mice (n=6/group) for 14 consecutive days. The level of corticosterone in blood plasma was measured by using commercially available ELISA kit. Data are mean±SD values. Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, Ami: amitriptyline. ##p<0.01 vs Nor, **p<0.01, ***p<0.001 vs Con.

50, 125, 250 mg/kg 실험군은 각각 13.09 ± 2.06 , 13.15 ± 2.14 , 12.69 ± 1.47 ng/ml로, 모든 농도에서 유의하게 감소했다(Fig. 5).

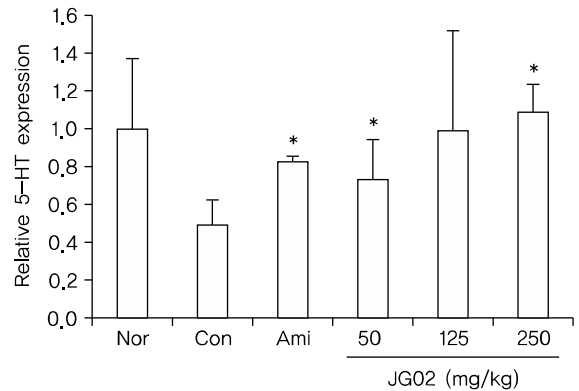


Fig. 6. Effect of JG02 on mRNA expression of serotonin. Mice were orally administered with PBS, amitriptyline, or JG02 (50, 125, 250 mg/kg) prior to restraint stress. After 2 h, depression was induced by chronic restraint stress (6 h/day) in C57BL/6 mice (n=6/group) for 14 consecutive days. The mRNA level of serotonin in hippocampus was measured by real time PCR using serotonin specific primer set. Data are mean±SD values. Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, Ami: amitriptyline. *p<0.05 vs Con.

5. Serotonin mRNA 발현 증가 효과

해마영역에서 serotonin (5-HT)의 유전자 발현량을 측정된 결과 정상대조군의 유전자발현 1.00 ± 0.37 에 대해 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군은 0.49 ± 0.13 로 감소했다. 우울증 유발 대조군과 비교했을 때 amitriptyline 양성대조군은 0.83 ± 0.03 로 발현량이 유의하게 증가했고, JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군은 각각 0.74 ± 0.20 , 1.00 ± 0.52 , 1.09 ± 0.15 로 농도의존적으로 증가했으며 이 중 50, 250 mg/kg 실험군은 유의한 증가를 보였다(Fig. 6).

6. BDNF mRNA 발현 증가 효과

해마영역에서 BDNF mRNA 발현량을 real time-PCR로 측정된 결과 정상대조군의 유전자발현 1.00 ± 0.22 에 대해 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군은 1.24 ± 0.04 로 발현량의 변화가 거의 관찰되지 않았다. 우울증 유발 대조군과 비교했을 때 amitriptyline 양성대조군은 1.99 ± 0.13 로 발현량이 유의하게 증가했고, JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군은 각각 1.79 ± 1.19 , 1.39 ± 1.20 , 2.35 ± 0.68 로 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

7. BDNF 단백질 발현 증가 효과

해마영역에서 BDNF 단백질 발현량을 western blot으로

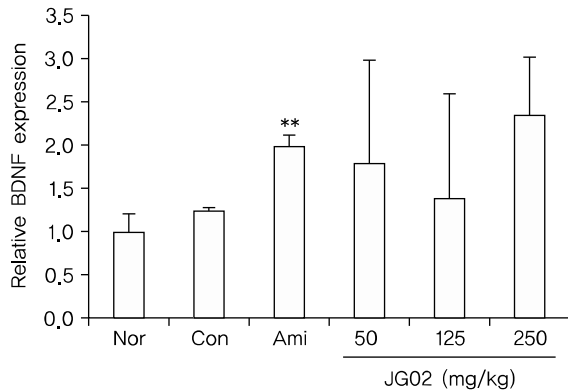


Fig. 7. Effect of JG02 on mRNA expression of BDNF. Mice were orally administered with PBS, amitriptyline, or JG02 (50, 125, 250 mg/kg) prior to restraint stress. After 2 h, depression was induced by chronic restraint stress (6 h/day) in C57BL/6 mice (n=6/group) for 14 consecutive days. The mRNA level of BDNF in hippocampus was measured by real time PCR using BDNF specific primer set. Data are mean±SD values. Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, Ami: amitriptyline. **p<0.01 vs. Con.

측정한 결과 우울증 유발 대조군은 정상대조군에 비해 BDNF의 발현이 감소하였다. 반면 amitriptyline 양성대조군은 우울증 유발 대조군에 비해 약간 증가했고 JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군에서는 BDNF의 발현이 농도의존적으로 증가하였다(Fig. 8).

IV. 고찰

우울증은 짧지 않은 기간 동안 환자의 신체와 정신 뿐 아니라 가정, 사회, 직업능력에까지 영향을 미친다³³⁾.

우울증에 대한 명확한 원인은 밝혀지지 않았으나, 다양한 신경생물학적 요인과 환경적 요인 사이의 복잡한 상호작용을 통해 발생하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 이 중 대표적인 가설은 뇌 속의 모노아민, 특히 노르에피네프린(norepinephrine), 도파민(dopamine), 세로토닌(5-hydroxytryptamine, 5-HT)의 농도와 활성이 감소하면 우울증이 발생한다는 것이다⁹⁾.

우울증은 한의학에서 울증(鬱證)의 범주에 속하며, 전증(顛證), 탈영실정(脫營失情), 허로(虛勞), 불면(不眠), 불사식(不思食) 등과도 연관이 있다. 울증은 정지불서(情志不舒), 칠정(七情), 음식(飮食), 외감(外感) 등에 의해 발생할 수 있는데, 특히 정지와 칠정이 중요한 원인으로 다루어지고 있다³⁵⁾. 치료원칙은 이기개울(理氣開鬱) 즉, 기의 흐름을 정상화시켜

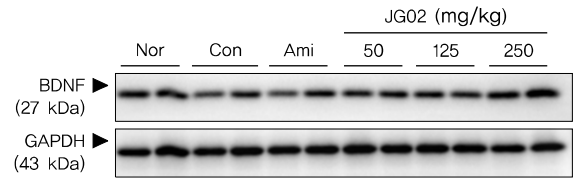


Fig. 8. Effect of JG02 on BDNF production in hippocampus. Mice were orally administered with PBS, amitriptyline, or JG02 (50, 125, 250 mg/kg) prior to restraint stress. After 2 h, depression was induced by chronic restraint stress (6 h/day) in C57BL/6 mice for 14 consecutive days. Total proteins were isolated from hippocampus, and production of BDNF was determined by western blot analysis. Two individual brain lysates were analyzed in each group. Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, Ami: amitriptyline.

울체를 해소하는 것을 기본으로 하며, 실증(實證)에 있어서는 활혈(活血), 강화(降火), 화담(化痰), 거습(祛濕), 소식(消食) 등의 치법을 겸하여 사용하며 허증(虛症)은 손상받은 장부(臟腑), 기혈(氣血), 음양(陰陽)의 휴허(虧虛) 정황에 근거하여 양심안신(養心安神)하거나 보익심비(補益心脾)하거나 자양간신(滋養肝腎)할 수 있다¹⁾. <<동의보감(東醫寶鑑)>>¹⁶⁾은 기울(氣鬱)에 교감단(交感丹), 목향균기산(木香勻氣散), 목향조기산(木香調氣散), 상하분소도기탕(上下分消導氣湯) 등을 제시하고 있다.

지골탕(枳橘湯)은 지각과 귤피로 구성된 처방이며 <<동의보감(東醫寶鑑)>> 내경편(內景篇) 기문(氣門)에 기가 울체되어 생기는 흉비통을 치료하는 처방으로 기재되어 있다. 지각은 파기소적(破氣消積), 귤피는 이기조습(理氣燥濕)의 효능이 있어¹⁷⁾ 우울증 변증유형^{18,19)} 중 간기울결, 담기울결과 같이 기가 통하지 못하여 발생하는 우울증에 효능을 보일 것으로 기대되나 관련연구는 아직 보고된 바 없다.

JG02는 지골탕에 사삼(沙蔘)을 추가함으로써 사삼의 익위생진(益胃生津), 양음청폐(養陰淸肺), 보음사화(補陰瀉火) 효능¹⁷⁾을 통해 지각과 귤피의 작용으로 인해 발생할 수 있는 조(燥)함을 완화하여 비위가 허약한 자도 사용할 수 있게 하였다.

본 실험에서는 C57BL/6 mouse를 이용하여 강제수영검사, 열원공간검사 및 혈청 코르티코스테론 검사, 해마영역에서 세로토닌 mRNA 발현량, BDNF mRNA 발현량, BDNF 단백질 발현량 측정을 수행하였으며 이를 통해 JG02의 항우울 효과와 그 작용기전에 대해 확인하였다.

양성대조군으로 사용한 amitriptyline은 대표적인 삼환계 항우울제로서 우울증 동물모델을 이용한 신약의 항우울

효과 검증 실험³⁶⁾에 사용되고 있다.

먼저 강제수염검사 이후 나타나는 부동시간비율은 정상 대조군에 비해 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군에서 유의하게 증가했다. 우울증 유발 대조군에 비해 amitriptyline 양성대조군에서 부동시간비율은 유의하게 감소했고 JG02 실험군에서도 감소하는 경향을 보였다. 이 중 JG02 50, 250 mg/kg 실험군은 유의한 감소를 보였고 JG02 50, 125 mg/kg 실험군은 amitriptyline 양성대조군보다 부동시간비율이 짧게 나타났다(Fig. 2).

열린공간검사를 통해 측정된 실험동물의 이동거리는 정상대조군에 비해 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군에서 유의하게 감소했다. 우울증 유발 대조군에 비해 amitriptyline 양성대조군에서는 이동거리가 유의하게 증가했으며 JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군에서도 모두 유의하게 증가했다. 또한 JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군은 모두 amitriptyline 양성대조군보다 이동거리가 높게 나타났다(Fig. 3).

열린공간검사를 통해 측정된 실험동물의 구역 간 이동횟수는 정상대조군에 비해 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군에서 유의하게 감소했다. 우울증 유발 대조군에 비해 amitriptyline 양성대조군의 이동횟수는 증가했으며 JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군은 이동횟수가 모두 유의하게 증가했다. 또한 JG02 50, 250 mg/kg 실험군은 amitriptyline 양성대조군보다 구역 간 이동횟수가 높게 나타났다(Fig. 4).

이상의 결과를 통해 14일간 반복된 구속스트레스 상황이 실험동물에 학습된 무기력과 우울 상태를 유발했으며 JG02는 그 정도를 감소시키는 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다. 그러나 위의 두 검사에서 JG02의 농도 의존적 효과는 관찰되지 않았다.

다음으로는 실험동물의 혈중 코르티코스테론 양을 비교함으로써 JG02의 스트레스 호르몬 억제를 통한 항우울 효능을 살펴보았다. 실험 결과, 정상대조군에 비해 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군에서 코르티코스테론 양이 유의하게 증가한 것을 알 수 있었다. 우울증 유발 대조군에 비해 amitriptyline 양성대조군에서는 그 양이 유의하게 감소했으며 JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군에서도 모든 농도에서 유의한 감소를 보였다. 또한 JG02 실험군은 세 가지 농도에서 코르티코스테론의 양에 큰 차이가 없었고 ami-

triptiline 양성대조군보다 낮게 나타났다(Fig. 5).

이상의 결과를 토대로 JG02는 농도에 따른 차이 없이 코르티코스테론 분비를 억제함으로써 항우울 효과를 보이고, amitriptyline 보다 이런 효과는 더욱 크다고 생각된다.

다음은 JG02가 세로토닌 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험동물 해마에서 5-HT mRNA의 발현량을 측정하였다. 해마는 스트레스 반응과 관련이 있는 뇌 영역 중 하나이며³⁷⁾ 다수의 연구에서 우울증 환자에서 용적이 감소되어 있음이 보고되었다³⁸⁾. 정상대조군(1.00 ± 0.37)에 대한 상대적 발현량을 보았을 때 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군은 그 발현량이 약 50% 감소한 것으로 나타났다. 우울증 유발 대조군에 비해 amitriptyline 양성대조군에서는 발현량이 유의하게 증가했고 JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군에서는 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였다. 특히 JG02 50, 250 mg/kg 실험군에서의 발현량은 유의하게 증가했으며 125, 250 mg/kg 실험군은 amitriptyline 양성대조군보다도 발현량이 높았다(Fig. 6).

BDNF는 신경성장촉진인자(nerve growth factor family) 중 하나로서 신경 발달 시 성장과 분화를 유도하는 등 신경계의 유지와 발달에 중요한 역할을 한다³⁷⁾. 또한 여러 연구에 따르면 BDNF가 우울증의 병태생리적 기전과 관련 있으며³⁸⁾, 특히 주요우울증 환자의 혈청 BDNF가 정상 대조군보다 유의하게 낮았다는 보고가 있다³⁹⁾. 동물실험에서도 만성적 스트레스 상황이 해마의 손상과 위축 및 BDNF의 발현을 감소시킨다는 연구들이 있어⁴⁰⁻⁴²⁾, 본 연구에서는 JG02가 실험동물의 해마영역에서 BDNF 유전자 발현에 미치는 영향에 대해서도 알아보려 하였다. 정상대조군(1.00 ± 0.22)에 대한 BDNF mRNA 상대적 발현량은 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군에서 오히려 약간 증가한 것으로 나타났다. 우울증 유발 대조군에 비해 amitriptyline 양성대조군에서는 발현량이 유의하게 증가했고 JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군에서는 발현량이 증가했으나 유의한 차이는 보이지 않았으며 농도에 비례한 분포도 보이지 않았다. 다만 JG02 250 mg/kg 실험군의 발현량은 amitriptyline 양성대조군보다 높았다(Fig. 7).

이상을 통해, JG02 250 mg/kg에서 BDNF 유전자 발현량이 높게 나타났으나 유의미한 차이를 확인하기 위해서는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다. 기존의 연구를 보면, 항우울제 투여 시 해마를 포함하는 대뇌 변연계에서 BDNF

mRNA의 발현이 증가하지만 이러한 변화는 단기간의 투여에서는 증가하지 않고 장기간 투여했을 경우에 증가하였으며⁴³⁾ 이는 항우울제의 치료적 효과가 나타나는 데 필요한 시간 경과와 일치하는 것⁴⁴⁻⁴⁶⁾이라고 할 수 있다. 실제 효과가 좋은 항우울제들도 임상적 반응이 나타날 때까지는 2주 내지 4주 정도의 시간이 필요하다⁴⁷⁾. 따라서 추후 JG02의 투여기간을 늘려서 실험한 결과와 비교해본다면 좀 더 의미 있는 결과가 나올 것으로 기대된다.

BDNF 단백질 발현량은 정상대조군에 비해 구속스트레스로 인한 우울증 유발 대조군에서 감소했고 우울증 유발 대조군에 비해 JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군에서 농도 의존적으로 증가했다(Fig. 8). 이를 통해 JG02는 BDNF의 mRNA 발현보다 단백질 발현에 영향을 주며 단백질 수준에서는 농도가 높을수록 효과가 있는 것으로 유추해볼 수 있다.

이상을 종합하면 JG02는 구속스트레스 우울증 동물모델에서 강제수영검사 이후 부동시간비율 감소, 열린공간검사 시 이동거리 증가, 구역 간 이동 횟수 증가 효과를 보여 항우울 효과를 가지고 있는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 코르티코스테론 분비 억제, 세로토닌 유전자 발현량 증가, BDNF 단백질 발현량 증가 등에 의한 것으로 보인다. 특히 코르티코스테론 감소는 JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군에서 모두 유의하게 나타났으며 세로토닌 유전자와 BDNF 단백질 증가에 대한 효과는 JG02 농도가 높을수록 증가하는 것으로 나타났다.

한편, 강제수영검사에서 부동시간비율이 JG02 농도가 높을수록 오히려 증가하거나, BDNF mRNA 발현량이 농도에 따른 경향성이 없는 등 농도에 따른 효과가 명확하지 않은 결과도 있어 향후 항우울제 투여 횟수나 기간을 고려한 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

또한 코르티코스테론 분비량 및 일부 농도에서의 세로토닌과 BDNF mRNA 발현량에서는 항우울효과가 높은 것으로 나타나 향후 JG02에 대해 추가적인 유효성, 기전연구 및 임상연구를 진행한다면 JG02를 활용한 항우울 한약제제 개발의 가능성이 높다고 판단된다.

V. 결론

JG02의 항우울 효과를 알아보기 위하여 C57BL/6 mouse

에 구속스트레스를 가하여 우울증을 유발시킨 뒤 강제수영검사와 열린공간검사를 실시하고 혈청 코르티코스테론, 해마영역에서의 세로토닌과 BDNF mRNA 발현량 및 BDNF 단백질 양을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 강제수영검사에서 JG02 50, 250 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 부동시간비율이 유의하게 감소하였다.
2. 열린공간검사에서 JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 이동거리가 유의하게 증가하였고 구역이동 횟수 또한 유의하게 증가하였다.
3. JG02 50, 125, 250 mg/kg 실험군 모두에서 혈청 코르티코스테론 양이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.
4. JG02 실험군에서 세로토닌 mRNA 발현량이 농도 의존적으로 증가하였고 50, 250 mg/kg 실험군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였다.
5. JG02 실험군에서 BDNF mRNA 발현량이 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다.
6. JG02 실험군에서 BDNF 단백질 발현량이 대조군에 비해 농도 의존적으로 증가하였다.

REFERENCES

1. The Korean Society of Oriental Neuropsychiatry Textbook Compilation Committee. *Oriental Neuropsychiatry*. 3rd ed; Gyeonggi: Jipmoondang, 2016.
2. Korea Institute of Oriental Medicine. *Korean Medicine Clinical Practice Guideline of Depression*. Seoul: Elsevier Korea L.L.C., 2016.
3. Ministry of Health and Welfare. *The Survey of Mental Disorders in Korea in 2016*. 2017.
4. Health Insurance Review and Assessment Service. *Medical Statistics Information*. <http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olapJdgcChargeInfo.do>
5. Statistics Korea. *The cause of death statistics*. Statistics Korea. 2010.
6. Mass JW, Fawcett JA, Dekirmenjian H. 3-Methoxy-4-hydroxyphenyl-glycol(MHPG) excretion in depressive states. *Arch.Gen.Psychiatry*. 1968;19:129-34.
7. Goodwin FK, Rubovits R, Jimerson DC. 5-HT and norepinephrine "subgroups" in depression. *Metabolites findings and clinical pharmacological correlation*. *Sci.Proc. Am.Psychiatr.Assoc*. 1977;130:108-31.
8. Bouvier, N., T. Trenque, and H. Millart, Development of antidepressant drugs. Experience and prospects. *Presse Med*, 2003;32(11):519-22.
9. Min SG. *Latest psychiatry*. 5thed; Seoul: Iljokak, 2006.
10. Lee MS, *Pharmacological Treatment of Depression*.

- Journal of the Korean Medical Association. 2003;46(1): 69-75.
11. Park WM, Kim CY. Clinical Neuropsychopharmacology. 2nded; Seoul: SigmaPress, 2014.
 12. The Korean Neuropsychiatric Association. Textbook of neuropsychiatry. 3rd ed; Seoul: iMiS Company, 2017.
 13. Lee JS, Management issues in new antidepressant side effects.. Korean J Psychopharmacol. 1999;10(Suppl 1): 35-47.
 14. Yun HY. *Bupleurum falcatum* prevents depression and anxiety-like behaviors in the rats exposed to repeated restraint stress. Master Dissertation. Kyung Hee University. 2012.
 15. Kang HW, Jang HH, Kang IS, Moon HC, Hwang YJ, et al.. A Study on The Oriental-medical Understanding of Depression. J of Oriental Neuropsychiatry. 2001;12(2):1-15.
 16. Heo J. Donguibogam. Gyeongnam: Donguibogam Publishing House. 2006:1382-6.
 17. The Textbook Compilation Committee of Herbalogy of Oriental Medical Schools in Nation. Herbalogy. Seoul: Younglim Publisher. 2016.
 18. Eun Hee Lee, Woo Chang Choi, In Chul Jung. Preliminary Study to Develop the Instrument on Pattern Identifications. 2013;24(4):435-50.
 19. Hun Soo Lee, Wee Chang Kang, In Chul Jung. Reliability and Validity Analysis of the Instrument on Pattern Identifications for Depression. 2015;26(4):407-16.
 20. Chang MK, Kim GW, Koo BS. Anti-depressant Effect of the Extracts of *Aconitum carmichaeli*. J of Oriental Neuropsychiatry. 2009;20(3):9-64.
 21. Lee JW, Hong MC, Shin MK, Bae HS. Comparison of Nelumbinis Semen Extract with Hypericum Perforatum and Fluoxetine in Animal Model of Depression. Korean J. Oriental physiology & Pathology. 2006;20(4):830-43.
 22. Min NK, Lee TH. Effects of Paeoniae Radix Rubra on CRF, c-Fos and TH in the Forced Swimming Test. Kor. J. Herbology. 2010;25(4):61-7.
 23. Kwon YU, Lee TH. Antidepressant Effects of Citri Reticulatae Viride Pericarpium in the Forced Swimming Test. Kor. J. Herbology. 2008;23(4):59-70.
 24. Sim EY, Lee TH. Effects of Mixture of Lycii Radicis Cortex and Moutan Cortex on Corticotropin-Releasing Factor, c-Fos, and Tyrosine Hydroxylase in Forced Swimming Test. Kor. J. Herbology. 2011;26(2):59-66.
 25. Lee DK, Gwak DG, Park SD. Antidepressant effect of Licium chinense Mill. and its influence on serotonin and its metabolite of depression model rats. Herbal Formula Science. 2004;11(2):185-96.
 26. Kim IJ, Lee DW. Experimental Study on the Antidepressant Effect of Ginseng Radix Alba and Cyperi Rhizoma. J of Oriental Neuropsychiatry. 2004;15(1):101-19.
 27. Seong WY, Whang WW, Park EH, Lee JR, Kim HT, Kim JW. The Effects of Qubitang in the Chronic Mild Stress Model of Depression in Rats. J of Oriental Neuropsychiatry. 2002;13(2):121-47.
 28. Ryu JM, Kim JW, Chi SE, Kim EJ, Park EH, Hwang UW. The effects of Jowiseungchungtang versus fluoxetine in the chronic mild stress model of depression in rats. J of Oriental Neuropsychiatry. 2004;15(1):27-41.
 29. Lim JW, Jung IC, Lee SR. The Effects of BunSimGiEum-Gami-Bang(Fenxingjiyinjiameifang) on Serotonin of P815 cell. J of Oriental Neuropsychiatry. 2011;22(2):147-62.
 30. Sim TK, Jung IC, Lee SR. The Effect of Gamisoyo-san (Jiaweixiaoyaosan) on Serotonin Metabolism. J of Oriental Neuropsychiatry. 2011;22(1):37-51.
 31. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. European Journal of Pharmacology. 1978; 47:379-91.
 32. Choi KM, Joo Y, Lee YH, et al. Chronic immobilization stress induces anxiety- and depression-like behaviors and decreases transthyretin in the mouse cortex. Neuroscience Letters. 2009;461(2):121-5.
 33. Woo YS, Park WM. Treatment of Depression. Kor J Medicine, 2005;70(2):239-42.
 34. Textbook of depressive disorder. Korean society for depressive and bipolar disorders. 1st ed; Seoul: Sigma press, 2012.
 35. Lee SH, Kim BY, Kee JI, Kwen SJ, Chung DK. A Case of Mixed Anxiety and Depressive Disorder. J of Oriental Neuropsychiatry. 2003;14(2):127-34.
 36. Lee JH, Kim GW, Koo BS. Experimental Study on the Anti-depressive Effect of Bee Venom Injection. J of Oriental Neuropsychiatry. 2010;21(2):61-73.
 37. Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Prog Neurobiol. 2001;63:71-124.
 38. Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. Biol Psychiatry. 2000;48:732-9.
 39. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. Biol Psychiatry. 2003;54: 70-5.
 40. Nibuya M, Takahashi M, Russell DS, Duman RS. Repeated stress increases catalytic TrkB mRNA in rat hippocampus. Neurosci Lett. 1999;267:81-4.
 41. Smith MA, Makino S, Kim SY, Kvetnansky R. Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. Endocrinology. 1995;136:3743-50.
 42. Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. J Neurosci. 1995;15:1768-77.

43. Lee YM. Association Study Between Brain-Derived Neurotrophic Factor Genetic Polymorphism and Treatment Responses of Selective Serotonin Reuptake Inhibitor in Major Depressive Disorder. *J Korean Geriatric Psychiatry*. 2008;12: 34-9.
44. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. 1995;15:7539-47.
45. Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci*. 1996;16:2365-72.
46. Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW. Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21:679-82.
47. Yong-Ku Kim. Outlook of Future Serotonergic Drugs and Their Clinical Usefulness – Focused on Schizophrenia and Depression -. *Korean J Psychopharmacol*. 2006; 17(3):273-82.