

지치 유래 naphthoquinone을 전처치한 생쥐에서 우울 및 불안 조절 효과

제현동¹, 민영실^{2*}

¹대구가톨릭대학교 약학과 교수, ²중원대학교 제약공학과 조교수

The effect of pretreated *Lithospermum erythrorhizon* derived-naphthoquinone on anxiety, depression in mice

Hyun Dong Je¹, Young Sil Min^{2*}

¹Professor, Dept. of Pharmacology, College of Pharmacy, Daegu Catholic University

²Assistant Professor, Dept. of Pharmaceutical Science, Jungwon University

요약 본 연구는 불안, 불면증, 우울증 또는 삶의 질에 대하여 지치(*Lithospermum erythrorhizon*) 유래 naphthoquinone, 즉 shikonin의 영향을 고찰하고, 확실히 밝혀지지 않은 메커니즘을 규명하고자한다. 우리는 지치의 주요성분인 naphthoquinone이 스트레스에 의한 수면장애, 강제수영에 의한 우울, 미로에 의해 유발된 불안현상 등의 조절에 영향을 미칠 것이라고 가설을 세웠다. 수컷 쥐를 이용하여 부동 혹은 수영시간, 수면시간, open arms으로 지속시간 및 진입빈도를 측정하고 기록하였다. Naphthoquinone(10, 30 & 100mg/kg)의 투여군에서 GABA_A receptor의 활성화로 일어나는 barbiturate-유도 수면을 증가시켰다. 미로에서 open arms 상태로 지속되는 시간이 증가되고, 강제수영에서 부동시간이 줄었다. 결과적으로 naphthoquinone은 불안을 완화, 수면과 항우울경향이 있고, 불안, 불면과 우울증에서 효과적인 치료효과가 있었다.

주제어 : 불안, 우울, 수면, 지치, 나프토크논

Abstract This study was undertaken to investigate the influence and related mechanisms that have yet to be clearly demonstrated of *Lithospermum erythrorhizon* derived-naphthoquinone (shikonin) on the anxiety, insomnia, depression in rats. We hypothesized that naphthoquinone, the primary ingredient of *Lithospermum erythrorhizon*, plays a role in the modulation of insomnia evoked by stress, depression evoked by forced swimming or anxiety evoked by elevated plus maze. Male ICR (Institute of Cancer Research) mice were used and the immobility or swimming time, the duration of sleep, the duration and entry frequency into open arms were measured and recorded. The administration of naphthoquinone (10, 30 and 100 mg/kg) potentiated barbiturate-induced sleep suggesting the activation of GABA_A receptor. It also potentiated the time spent in open arms of the maze and decreased the immobility time in forced swimming. In conclusion, naphthoquinone has anxiolytic, hypnotic and anti-depressant properties and is a potential therapeutic for anxiety, insomnia and depression.

Key Words : Anxiety, Depression, Hypnotic, *Lithospermum erythrorhizon*, Naphthoquinone

1. 서론

스트레스로 인해 발생하는 정신의학적 증상에 불안장애

애, 정서장애, 적응장애, 급성정신병, 자살시도 등이 있으며 사회의 복잡화와 다양화로 인해 우울증, 불안장애 등이 증가하고 있는데 이러한 스트레스, 불안, 우울 등

*Corresponding Author : Young Sil Min (youngsil31@jwu.ac.kr)

Received March 26, 2020

Accepted July 20, 2020

Revised June 22, 2020

Published July 28, 2020

에 의해 불면증이 초래된다. 그 중 불안은 인간의 기본적인 정서이며 혐오적인 사건을 예측할 수 없고 통제할 수 없는 것으로 생각하는 것이다[1]. 이러한 불안 수준이 정상적 범위를 초월하면 정신적인 고통과 신체적인 증상을 초래한다. 우울증은 치명적인 정신과적 질환이며 전 세계적으로 5%의 발병률을 보이며 일생동안 15-20%의 유병률을 보인다. 우울증은 삶의 질을 저하시키고 건강 관련 비용을 증가시키고 심혈관 질환, 대사 질환 및 신경정신 질환 등 많은 질환에 대한 주요 위험 인자로 고려된다[2]. 그리고 수면은 신체적, 신경학적, 정서적인 면에서 필수적인 회복 과정으로 생명 유지의 중요한 부분으로 여겨지고 있으며 수면이 부족해질 경우 단계적으로 주의력과 집중력이 감소되고 삶의 질이 저하되고 장기적으로 관상동맥 질환, 심부전, 고혈압, 비만, 당뇨, 뇌졸중, 우울증, 기억력 감퇴, 면역기능 저하를 초래한다[3]. 불안 및 우울 이에 따른 불면증 등은 현대인의 정신병 중 많은 부분을 차지하고 있고 실제로 많은 사람들이 이로 인해 고통 받고 있다[4].

지치(*Lithospermum erythrorhizon*)는 지치과의 다년생 초본 식물로서 뿌리의 외피 부위에 적색 색소를 포함하고 있고 지치의 성분 확인에 대한 연구에서 naphthoquinone pigments 유도체가 포함되어 있는 shikonin, acetylshikonin, isobutyryl-shikonin 및 이성질체인 alkannin이 존재한다는 것이 알려졌다. 그 중 shikonin (5,8-dihydroxy-2-[(1S)-1-hydroxy-4-methylpent-3-en-1-yl]naphthalene-1,4-dione)은 지치의 근경에서 발견되는 식이성 naphthoquinone이다[5]. 그 구조식은 다음 Fig. 1과 같다

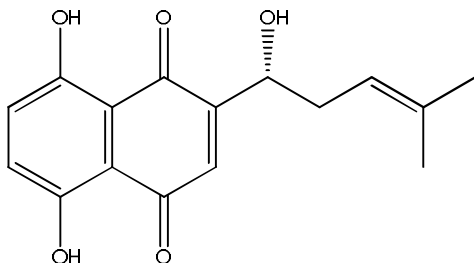


Fig. 1. Chemical structure of naphthoquinone (shikonin).

이러한 naphthoquinone (shikonin)은 항산화, 항염증, 항혈전, 항바이러스, 항균 및 항암 작용 등의 약리 효과가 있는 것으로 알려져 있다[6-8]. 이들 연구에서 naphthoquinone (shikonin) 처치는 종양 세포 증식을 억제하고 종양 세포 자멸사를 유도하고 세포 주기를

변화시켜 항암 작용을 나타내었다[9,10].

따라서 이번 연구의 목적은 실험용 흰 쥐모델을 사용하여 지치에서 유래된 shikonin의 항불안, 항우울과 수면 조절을 관찰하고 평가하는 것이다. 본 실험에서 elevated plus maze로 불안을 유도하고 forced swimming으로 우울을 유도하고 pentobarbital로 수면을 유도하여 shikonin의 억제 활성을 측정하고 비교하여 천연물 유래 활성성분의 항불안, 항우울 및 수면 유도제를 개발하고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1 재료, 시약 및 기기

다음과 같은 약품이 사용되었다. Sodium chloride, potassium chloride(Sigma, St. Louis, MO, USA), sodium bicarbonate(Sigma, St. Louis, MO, USA), D-(+)-glucose(Sigma, St. Louis, MO, USA), naphthoquinone (shikonin)(Sigma, St. Louis, MO, USA), pentobarbital sodium (Dongwon, Ansan, Korea), absolute ethanol (Duksan, Ansan, Korea), tween 20 (Generay Biotech, shanghai, China), ICR (Institute of Cancer Research) 생쥐는 Hyochang Science(Pohang, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 다른 시약은 특급 또는 일급으로 사용하였다. 약품은 3차 증류수에 용해되어 필요에 따라 Krebs 용액이나 생리식염수에 첨가되었다.

2.2 실험과정

본 실험은 US National Institute of Health (NIH, 1996)에 의해 출판된 실험동물의 care와 use에 대한 guide에 따라서 수행되었다[17]. 체중 25-30g의 성숙한 웅성 ICR 마우스가 실험에 사용되었다. 실험동물은 분리된 상자에 개별적으로 수용되었고 1주일 이상 사료와 물이 충분히 공급되었고 점진적인 적응기를 거쳐 실험에 사용되었다. 그 다음 무작위로 대조군, 대조약 및 시험약 처치군으로 분류되었고 점진적인 적응기를 거쳐 불안과 우울 등에 노출되었다.

2.3 불안유도

마우스를 elevated plus maze에 넣고 10분간 open arms에서의 duration과 entry frequency를 측

정하였다. 마우스는 elevated plus maze에 넣기 1시간 전에 생리식염수 (대조군), shikonin (10, 30, 100 mg/kg)을 각각 전처치 (복강 투여) 하였다. 이 장치는 바닥에서 50cm 높이에 설치된 십자형 미로로서 4개의 통로 가운데 마주보는 2개 (길이 30 cm, 폭 10 cm)는 개방되어 있고 크기가 동일한 다른 2개의 통로는 높이 20 cm의 벽으로 둘러싸여 있다. 중심 platform은 가로 10 cm 및 세로 10 cm로 조정하였다. 실험을 시작할 때 마우스를 maze의 중앙에서 open arm 쪽으로 머리를 향하게 하여 살며시 내려놓은 다음 maze를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 행동은 10분간 관찰하였으며 마우스가 open arm과 closed arm에 머문 시간, 각 arm의 출입 횟수 및 총 이동거리 등을 각각 측정하여 항불안 효과를 확인하였다[11].

2.4 우울유도

마우스를 forced swimming에 넣고 4분간 immobility time과 swimming time를 측정하였다. 마우스는 forced swimming에 넣기 1시간 전에 생리식염수 (대조군), shikonin (10, 30, 100 mg/kg)을 각각 전처치 (복강 투여) 하였다. 강제수영 실험에서 도망갈 수 없는 좁은 용기 안에서 강제로 수영을 하도록 고안된 Porsalt 등의 실험방법을 이용하였다[12]. 투명한 항온조 (안지름 20 cm, 높이 20 cm) 안에 물을 10 cm 까지 채우고 물의 온도를 25°C로 일정하게 유지하였다. 개체 차이를 줄이기 위해 실험 하루 전날 5분간 강제수영을 미리 실시하였으며 24시간 후에 동일한 환경에서 6분간 실험을 진행하고 2분이 경과한 후부터 4분간 immobile duration과 mobile duration을 측정하였다[13].

2.5 수면유도

마우스에 pentobarbital sodium 25 mg/kg을 복강 주사하여 수면을 유도하였다. 마우스는 pentobarbital sodium 복강 투여 1시간 전에 생리식염수 (대조군), shikonin (10, 30, 100 mg/kg)을 각각 전처치 (복강 투여) 하고 수면시간을 측정하였다. 수면시간의 판정은 정상반사 (right reflex)가 소실되는 시점 (off set)과 회복되는 시점 (on set)의 사이를 수면시간으로 하였다[14].

2.6 통계분석

모든 실험결과들은 평균 \pm 표준오차로 나타내었고 통

계 처리는 two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test 또는 Student's t-test (Fig. 2, 3, 4)를 실시하여 $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

3. 실험결과

3.1 Elevated plus maze에 의해 유도된 불안에 대한 전처치된 naphthoquinone(shikonin)의 억제효과

1시간 전에 복강 투여로 전처치된 naphthoquinone (shikonin)은 10분간의 항불안 실험에서 elevated plus maze의 open arms에서 duration과 entry frequency로 측정된 불안 발생에 대해 농도 의존적으로 이동 시간에 대한 증가 효과가 있었다 (Fig. 2). 즉 이동 시간의 경우에 대조군에서의 1.0 ± 0.35 분에 비해 100 mg/kg 처리군에서 4.0 ± 0.61 분으로 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.05$).

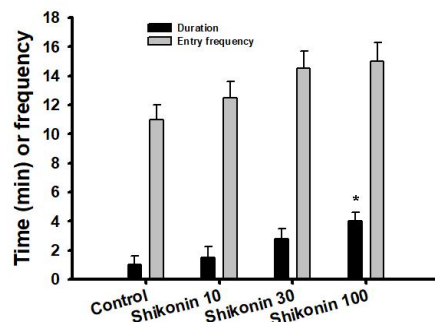


Fig. 2. The effect of pretreated naphthoquinone (shikonin) on the elevated maze-induced anxiety in the mice (the time spent in open arm and entries into open arm). Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. * $P < 0.05$, presence versus absence of pretreated naphthoquinone (shikonin).

3.2 Pentobarbital에 의해 유도된 수면에 대한 전처치된 naphthoquinone(shikonin)의 억제효과

1시간 전에 복강 투여로 전처치된 naphthoquinone (shikonin)은 마우스에서 저용량의 pentobarbital에 의해 유도된 수면에 대해 수면 유도에 농도 의존적으로 단축 효과가 약하게 있었고 수면 시간에서는 Fig. 3과 같이 농도 의존적으로 증가 효과가 있었다. 즉 수면시간의 경우에 대조군에서의 9.5 ± 0.56 분에 비해 100 mg/kg

처리군에서 14.2 ± 0.61 분으로 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.05$).

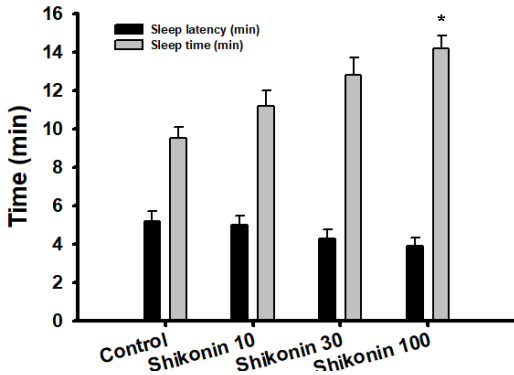


Fig. 3. The effect of pretreated naphthoquinone (shikonin) on the barbiturate-induced anesthesia in the mice. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. * $P < 0.05$, presence versus absence of pretreated naphthoquinone (shikonin).

3.3 Forced swimming에 의해 유도된 우울에 대한 전 처치된 naphthoquinone(shikoonin)의 억제효과

1시간 전에 복강 투여로 전처치된 naphthoquinone (shikonin)은 2분간의 휴식기와 4분간의 forced swim test에서 Fig. 4처럼 immobility time을 감소시켰고 swimming time을 유의성 있게 증가시키지 않았다. 즉 부동 시간의 경우에 대조군에서의 132 ± 9.3 초에 비해 100 mg/kg 처리군에서 86 ± 6.3 초로 유의성 있게 감소되었다 ($p < 0.05$).

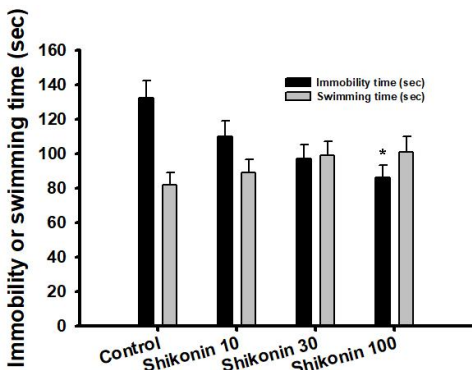


Fig. 4. The effect of pretreated naphthoquinone (shikonin) on the forced swimming-induced depression (immobility and swimming time) in

the mice. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. * $P < 0.05$, presence versus absence of pretreated naphthoquinone (shikonin).

4. 결과분석 및 논의

Shikonin은 과거 자주색 염료로 사용된 지치의 근경에서 발견되는 naphthoquinone (shikonin)으로서 항암 특성에 대해 연구가 널리 진행되었고 항산화 효과, 항염증 효과, 혈전응집 억제 효과 등이 보고되었다 [6-10]. 따라서 이번 실험에서 ICR 마우스를 이용하여 항불안, 항우울, 마취, 통증 조절 등 지치 유래 유효 성분인 naphthoquinone (shikonin)의 추가 작용을 조사하게 되었다.

Elevated plus maze는 흔히 불안 완화제나 불안우도 약물의 효과를 확인하는데 사용되는 모델로 쥐가 좁고 어두운 곳을 선호하는 습성을 이용한 것이다[15]. 벽이 설치된 closed arm보다 벽이 없는 open arm에서 더 많은 불안을 느끼므로 불안이 많을수록 open arm에 머무는 시간이 짧아진다. 항불안 약물의 검색은 open arm에서 머문 시간의 연장 및 open arm으로의 진입 횟수의 증가로 평가되는데 이는 close arm으로의 진입 횟수 및 머문 시간의 감소로 표현된다. 본 연구에서 elevated plus maze를 이용한 불안 실험동물 모델에서 naphthoquinone (shikonin) 전처치 후 open arm에 머문 시간 및 open arm으로의 진입 횟수를 대조군과 비교하여 관찰하였다. 마우스를 elevated plus maze에 넣고 10분간의 항불안 실험에서 open arms에서의 지속시간 duration과 빈도 entry frequency를 측정하였는데 Fig. 2와 같이 naphthoquinone (shikonin)의 전처치는 open arms에서 지속시간 duration를 증가하여 농도 의존적으로 항불안 작용을 나타내었다.

Pentobarbital에 의해 유도된 수면은 수면 유도제의 개발과 연구를 위해 널리 사용되는 급성 불면증 모델로 간주된다. 특히 이런 모델은 GABA_A 효능제에 민감한 것으로 알려져 있고 수면 유도제의 효과를 평가하기 위해 사용되어 왔다. 이번 실험에서 naphthoquinone (shikonin)의 전처치는 Fig. 3에서 보여주듯이 수면 유도를 약하게 단축시켰고 수면 지속시간을 연장시켰다. 이렇게 pentobarbital 투여 후 유의성 있는 수면 지속 효과를 나타내었기에 GABA_A 수용체를 활성화시켜 작용

하는 것으로 생각된다. 불안 시험과 수면 시험에서 naphthoquinone (shikonin)의 전처치가 대조군에 비해 이동 빈도와 수면 시간을 유의성 있게 증가시켜 항불안 및 수면 유도 기능성 식품 또는 의약품의 원료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

항우울효과 검증을 위해 여러 동물 모델들이 이용되고 있다. 꼬리를 묶거나 간신히 호흡할 수 있는 깊이의 물속에 넣어 움직임을 제한하는 등 물리적 스트레스를 가하는 동물 모델 (행동적 실감감 모형-강제수영검사), 학습된 무기력처럼 통제 불가능한 쇼크를 가하는 동물 모델 (학습된 무력감 모형), 어린 영장류를 격리 성장시키거나 성인기에 사회적으로 고립하여 생활하게 하는 격리 스트레스를 이용한 동물모델 (격리모형) 등이 이용되고 있다[16]. 이러한 동물 모델 중에 가장 편리하고 신뢰성이 있는 것으로 알려진 강제수영검사는 Porsolt에 의해 개발되어 가장 널리 사용되고 있다[12]. 이 모델은 물이 채워진 좁은 실린더 안에 동물을 빠뜨렸을 때 처음에는 동물이 탈출하려는 행동을 보이다가 이내 움직임을 멈추는 부동성 immobility를 보이며 24시간 후 다시 실린더의 물에 빠뜨리면 전날에 비해 더 많은 부동성을 보인다는 사실에 기초하며 이러한 부동성의 증가와 활동성의 감소가 우울증 유발의 지표가 되는 것이다[12]. Fig. 4와 같이 강제수영 검사에서 naphthoquinone (shikonin)의 전처치는 4분간의 forced swim test에서 immobility time을 감소시켰고 swimming time을 유의성 있게 증가시키지 않았다. 강제수영 검사에서 naphthoquinone (shikonin)의 전처치가 대조군에 비해 immobile duration을 유의성 있게 감소시켜 기능성 식품 또는 의약품의 원료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

현재 임상에서 다양한 항불안, 항우울, 수면제가 사용되고 있으나 이러한 치료제는 제한된 효능과 신체적, 정신적 의존성, 인지 둔화 또는 심장발작, 뇌졸중 등 순환기계, 자율신경계 및 소화기계 부작용을 초래할 수 있으므로 이러한 문제점을 해결할 수 있는 새로운 항우울, 항불안 및 수면제의 개발이 요구되고 있고 이에 부응하여 천연물이 이러한 항우울, 항불안 및 수면제의 소재의 중요한 원천으로서 천연물을 활용한 약물 요법이 기대되고 있다.

5. 결론

본 실험에서는 우울, 불안, 불면 등 삶의 질에 대해 예방과 치료를 목적으로 사용될 수 있는 naphthoquinone

(shikonin)에서의 불안, 우울과 수면 조절 기전에 대해 조사하여 새로운 가능성을 확인하고자 하였다. Shikonin은 다양한 실험동물모델에서 유의성 있는 항불안, 항우울, 수면 유도 효과를 나타내었고 이는 imipramine 보다 약하게 나타났다[14]. 향후 naphthoquinone (shikonin)의 활성과 관련하여 NMDA receptor, GABA_A receptor, norepinephrine transporter 및 serotonin transporter 등을 포함하는 항불안, 항우울 및 수면 조절 경로 등을 생화학적 방법으로 확인하고자 한다.

REFERENCES

- [1] B. Bandelow & S. Michaelis (2015). Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci.*, 17(3), 327-335. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26487813/>
- [2] J. F. Cryan & A. Holmes (2005). A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov.*, 4(9), 775- 790 DOI: 10.1038/nrd1825
- [3] D. J. Taylor, K. L. Lichstein & H. H. Durrence. (2003). Insomnia as a health risk factor. *Behav Sleep Med.*, 1(4), 227-247 DOI: 10.1207/S15402010BSM0104_5
- [4] J. W. Tiller. (2013). Depression and anxiety. *Med J Aust.*, 199(S6), S28-S31. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25370281/>
- [5] C. Guo et al. (2019). Pharmacological properties of shikonin-A review in recent years. *Pharmacol Res.*, 149, 104463 DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104463
- [6] X. Chen et al. (2002). Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. *Phytother. Res.*, 16(3), 199-209. DOI: 10.1002/ptr.1100
- [7] L. Lu et al. (2011). Shikonin extracted from medicinal chinese herbs exerts anti-inflammatory effect via proteasomeinhibition. *Eur. J. Pharmacol.*, 658(2-3), 242-247 DOI : 10.1016/j.ejphar.2011.02.043
- [8] Y. Wang et al. (2014). Shikonin suppresses tumor growth and synergizes with gemcitabine in a pancreatic cancer xenograft model: Involvement of NF- κ B signaling pathway. *Biochem Pharmacol.*, 88(3), 322-333 DOI : 10.1016/j.bcp.2014.01.041
- [9] W. Han et al. (2007). Shikonin circumvents cancer

drug resistance by induction of a necroptotic death. *Mol Cancer Ther.*, 6(5), 1641-1649
DOI : 10.1158/1535-7163.MCT-06-0511

- [10] I. C. Chang et al. (2010). Shikonin induces apoptosis through reactive oxygen species extracellular signal-regulated kinase pathway in osteosarcoma cells. *Biol Pharm Bull.*, 33(5), 816-824.
DOI : 10.1248/bpb.33.816
- [11] S. L. Handley & S. Mithani. (1984). Effects of alphaadrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 327(1), 1-5.
DOI : 10.1007/BF00504983
- [12] R. D. Porsolt, A. Bertin, M. Jalfre (1977), Behavioral despair in mice : a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, 299(2), 327-336
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/596982/>
- [13] S. C. Barauna, M.P. Kaster et al (2006), Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmac. Biochem Behav.*, 85(1), 160-169
DOI : 10.1016/j.pbb.2006.07.030
- [14] A. Taylor, O. Oyedjeji Kogi, et al. (2016), Assessment of the analgesic, anti-inflammatory and sedative effects of the dichloromethanol extract of *Schinus molle*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 20(2), 372-380
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26875910/>
- [15] M. Imaizumi & K. Onodera (2000). Animal models of anxiety. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 115, 5
- [16] J. F. Cryan, A. Markou & I. Lucki. (2002), Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.*, 23(5), 238-245
DOI: 10.1016/s0165-6147(02)02017-5
- [17] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). *National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 62-147.
DOI : 10.17226/12910

제 현 동(Hyun Dong Je)

[정회원]



- 1994년 2월 : 중앙대학교 약학과 (약학사)
- 1996년 8월 : 중앙대학교 약학과 (약학석사)
- 1999년 2월 : 중앙대학교 약학과 (약학박사)

- 1999년 3월 : 미국생물의학연구소 연구원
- 2005년 9월 ~ 현재 : 대구가톨릭대학교 약학과 교수
- 관심분야 : 약학, 생약추출물, 정신건강
- E-Mail : hyundong@cu.ac.kr

민 영 실(Young Sil Min)

[정회원]



- 1992년 2월 : 중앙대학교 (약학사)
- 2001년 2월 : 중앙대학교 (약학석사)
- 2004년 2월 : 중앙대학교 (약학박사)
- 2009년 3월 ~ 현재 : 중원대학교 제약공학과 조교수
- 관심분야 : 건강, 운동, 식생활
- E-Mail : youngsil31@jwu.ac.kr