

레서핀 반복 투여를 통한 제브라피쉬 우울증 모델

김세영¹ · 한창수² · 고영훈¹ · 김용구¹ · 윤호경¹ · 이종하¹ · 김수현^{3,4} · 이찬희⁴ · 신철민^{1,4}

¹고려대학교 안산병원 정신건강의학과, ²고려대학교 구로병원 정신건강의학과, ³고려대학교 의과대학 의과학과, ⁴고려대학교 안산병원 제브라피쉬 중개의학 연구소

Chronic Reserpine Administration for Depression Modeling in Zebrafish

Seyoung Kim, MD,¹ Changsu Han, MD, PhD,² Young-Hoon Ko, MD, PhD,¹
Yong-Ku Kim, MD, PhD,¹ Ho-Kyoung Yoon, MD, PhD,¹ Jongha Lee, MD, PhD,¹
Suhyun Kim, PhD,^{3,4} Chanhee Lee, PhD,⁴ Cheolmin Shin, MD, PhD^{1,4}

¹Department of Psychiatry, Korea University Ansan Hospital, Korea University College of Medicine, Ansan, Korea

²Department of Psychiatry, Korea University Guro Hospital, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

³Department of Biomedical Sciences, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

⁴Zebrafish Translational Medical Research Center, Korea University, Ansan, Korea

Objectives This study aims to develop valid experimental models for depression through chronic reserpine exposure to zebrafish (*Danio rerio*).

Methods The effect of chronic reserpine on zebrafish behavior in the novel tank was examined. Changes of gene expression on telencephalon were also investigated.

Results Chronic reserpine (40 mg/L, 7 days) induced overt behavioral effects, but markedly reduced activity, resembling motor retardation in depression. In telencephalon of zebrafish, gene expression associated with monoamine oxidase and norepinephrine transporter was decreased. Expression of serotonin transporter gene was increased.

Conclusions Our results show that the pharmacological model of depression in zebrafish can induce not only behavioral changes, but also monoamine changes in the homology of human mood regulation centers.

Keywords Reserpine; Depression; Zebrafish; Animal model; Experimental model.

Received: November 14, 2022 / Revised: November 16, 2022 / Accepted: November 18, 2022

Address for correspondence: Cheolmin Shin, MD, PhD

Department of Psychiatry, Korea University Ansan Hospital, Korea University College of Medicine, 123 Jeokgeum-ro, Danwon-gu, Ansan 15355, Korea

Tel: +82-31-412-5140, Fax: +82-31-412-5132, E-mail: shincm@korea.ac.kr

서론

우울 장애는 우울한 기분, 흥미 감소, 인지 저하, 정신 운동 증상 등 다양한 증상으로 나타나며 여러 영역에서 개인의 기능 저하를 유발한다. 매년 3억 명 이상이 우울증으로 고통받고 있고 그 수는 점점 증가하고 있다. 우울은 전세계적으로 장애 발생의 요인으로 여겨지고 자살의 위험 인자로 여겨지며 이러한 상병과 사망을 하나로 포함한 양적 지표는 장애로 인

한 건강년수의 상실로 계산할 수 있다.¹⁾ 2015년 세계보건기구에서 시행한 세계의 질병부담 연구에서 우울 장애로 인해 총 5000만 이상의 건강년수 상실이 발생하였고, 이는 단일 요인 중에서는 비치명적 건강 손실에 가장 큰 영향을 미치는 것이었다.²⁾

세로토닌, 노르아드레날린, 도파민과 같은 단가아민 신경전달물질은 우울증의 발병에 관련이 있는 것으로 알려져 있고, 여러 연구에서 우울 장애에서 단가아민 기전을 지지하는 결과를 도출해 왔다. 대부분의 항우울제는 신경원의 연결부위에서 이들 신경전달물질을 증가시키고 신경원의 발화를, 신경전달을 촉진하게 된다. 하지만 여전히 질병의 병태생리가

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

밝혀지지 않은 부분이 남아있고 새로운 항우울제의 개발을 위해서도 병의 기전에 대한 추가 연구가 필수적인 것으로 생각된다.³⁾

연구 목적에 따라 다양한 동물 모델이 필요하기 때문에 우울증에 대한 새로운 동물 모델 개발 필요성이 대두되었다.^{4,5)} 우울증 연구에서 통상적으로 설치류 동물 모델을 통해 병리 기전에 대한 연구가 진행되어 왔지만, 제브라피쉬(zebrafish, *Danio rerio*)는 신경 해부학, 신경 내분비학, 신경 화학과 같은 생리학적 특성과 유전적 특성에서 인간과 유사하여 의생명연구에서 점차 일반적인 실험 동물로 사용되고 있다.⁶⁾ 또한 제브라피쉬는 다른 *in vitro* 모델처럼 저렴하고 사용하기 편리할 뿐 아니라 이미 검증된 *in vivo* 설치류 모델에 존재하는 뇌 기능에 있어 필수적인 해부 생리학적 특수성을 지니고 있다.^{6,7)}

Reserpine은 알칼로이드 추출물로 수 백 년 전부터 다양한 질병 특히 고혈압 치료제로 사용되어왔다. Reserpine은 고혈압의 일차 치료제로 채택되었으나 정신과적 부작용 등으로 인해 더 이상 고혈압 치료제로서 임상적으로 활발하게 사용되지 않고 있다.⁸⁾ 투약한 환자 중 일부가 슬픔, 자살 사고를 보고했고, 이는 reserpine이 단가아민 수용체의 비가역적 억제제로 작용함으로써 카테콜아민을 고갈시키는 기전 때문인 것으로 추정되었다. 사람에서 reserpine 복용이 우울증 발생을 유발하는지에 대해서는 무작위 대조 연구가 충분하지 않지만,⁹⁾ reserpine은 강력한 카테콜아민 고갈 능력으로 인해 우울증의 새로운 동물 모델에서 증상 유발 약물로 각광 받고 있다.⁹⁾ 일전 연구 결과에서 쥐에 반복적으로 reserpine을 주사하여 우울증의 동물 모델로 사용할 수 있음을 시사하였다.¹⁰⁾ 이에 따라 reserpine 투여로 유도한 설치류 우울증 동물 모델은 수 십년 전부터 구축되었다. 대체로 reserpine을 설치류 동물 개체에 경구 투약하는 경우 반복 투여를 통해 우울 증상을 유도하였다.^{10,11)} 제브라피쉬에서도 reserpine 경구 단회 투여 후 우울 증상을 모델링한 것이 보고되기도 했지만¹²⁾ 반복적 경구 투여로 우울증을 유도하는 모델의 자세한 프로토콜은 거의 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 제브라피쉬에서 reserpine 반복 투여 후 행동 패턴을 관찰하고 생물학적 지표를 분석하여 새로운 우울증 동물 모델을 구축하고자 하는 목적으로 설계하였다.

방 법

제브라피쉬

Wild-type 성체 제브라피쉬(산란 후 4-5개월) 암수 총 32 마리(대략 50:50 비율)를 상업 유통업체(Fishzzang, Korea)에서 구매하였고 고려대학교 제브라피쉬 중개의학 연구센터의

순환 양식 시스템에서 3주간 적응 기간을 거쳤다. 25°C-27°C 온도의 system water로 채워진 3 L 수조에 10-15마리씩 나누어졌다. 실내는 28.5°C 온도와 명암 주기(14시간 명/10시간 암, 오전 8시 30분부터 오후 10시 30분까지)를 일정하게 유지하였고 절반의 물이 매일 교체되었다. 하루 2번 신선한 브라인슈림프를 먹이로 제공하였다. 동물 보호와 실험은 국가 지침에 따라 수행하였고 고려대학교 의과대학 동물실험 윤리 위원회의 승인 및 감독하에 진행되었다(과제번호: KOREA-2018-0152). 모든 제브라피쉬는 실험에 앞서 육안 검사를 통해 건강 상태를 확인하였다. 행동 시험 이후 제브라피쉬는 500 mg/L 트리케인(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 투여하여 안락사 하였고 즉시 추가 분석을 위해 얼음 위에서 해부 되었다.

약물 투여

Reserpine (purity \geq 99.0%; Sigma-Aldrich)는 40 g/L Dimethyl sulfoxide (DMSO) 용액에 용해되어 사용 전 -20°C 탱크에서 저장하였다. 40 g/L reserpine 표준 용액은 E3 용액 (0.25 M NaCl, 0.0085 M KCl, 0.0165 M CaCl₂·H₂O, 0.0165 M MgSO₄·7H₂O)에서 노출 농도(20 mg/L)로 희석하였다. DMSO는 탱크 당 0.05%로 정상화되었다.

제브라피쉬는 행동 분석을 위해 탱크 당 16마리로 나뉘어 reserpine (20 mg/L)을 포함한 E3 용액 혹은 대조군 (0.05% DMSO)에 20분간 담긴 상태로 노출되었다. 화학 노출은 연속적으로 7일간 시행하였다.

행동 실험

모든 행동 실험에는 EthoVision XT (Noldus, Wageningen, the Netherlands)를 사용하였다. 제브라피쉬의 우울 행동을 평가하기 위해 사용된 novel tank는 투명 아크릴 유리 소재의 직사각형 탱크(길이 × 폭 × 깊이: 14 cm × 9 cm × 8 cm)였고 25°C-27°C의 계수가 최대치로 채워진다. 실험 전 제브라피쉬는 1시간 동안 해당 환경에 적응하였다. 모든 행동 실험은 오전 11시에 시작하였다. 모든 장치는 수평으로 안정된 표면에 놓여있었고 실험 시 소음의 영향을 최소화 하기 위해 비교적 방음이 잘 되는 방에서 수행하였다. Novel tank는 발광다이오드(light-emitting diode) 광원 앞에 배치되었다. Novel tank에 제브라피쉬를 넣은 후 15분 동안 유영 행동을 측정하였다. 소프트웨어로 가상의 중간선을 표시하여 탱크를 수평으로 동등하게 두 영역으로 나누어 중간선 위는 “top”, 아래는 “bottom”으로 지칭했다. Novel tank에서 행동 측정 지표로 측정된 값은 다음과 같다:⁷⁾ 상층부 진입까지 걸리는 시간(sec), 상층부에서 머무는 시간(sec), 상층부에서 이동 거리(cm), 하단부에서 이동 거리(cm), 총 이동 거리(cm), 평균

속도(cm/s), 및 부동 시간(sec).

결 과

Ribonucleic acid 추출 및 상보적 DNA

(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) 합성

7일간 약물 투여 후 제조사의 프로토콜(Sigma-Aldrich)에 따라 Trizol을 사용하여 뇌 조직에서 total ribonucleic acid (RNA)가 추출되었다. 추출된 RNA는 PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, Tokyo, Japan)를 사용하여 역전사 되었다.

정량적 증합효소연쇄반응(quantitative PCR, qPCR)

반응 샘플로 20 ng의 cDNA를 사용하였다. 모든 qPCR 분석은 ExcelTaq™ 2X Fast Q-PCR Master Mix (SMOBIO, Taiwan)로 수행하였다. Reaction mix는 제조사의 프로토콜에 따라 준비되었다. 모노아민 시스템 기능 관련 유전자가 분석되었다: *CRF* (corticotropin-releasing factor), *GR* (glucocorticoid receptor), *MAO* (monoamine oxidase), *NET* (norepinephrine transporter), *SERTA* (serotonin transporter), *VMAT2* (vesicular monoamine transporter). β -actin 유전자가 data normalization에 사용되었다. Primer sequence는 표 1에 나열되어 있다. 데이터 분석은 Applied Biosystems사의 소프트웨어로 시행하였다. 정량화는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method를 통해 수행하였다.

통계 분석

모든 quantitative real time-PCR 데이터는 독립적으로 최소 3회 반복하였다. 통계 분석과 그래프는 GraphPad Prism 9 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA)를 통해 시행하였다. 모든 군들을 대상으로 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 Dunnett's test로 사후 검정을 시행하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(mean \pm standard error of the mean)로 표현하였다. 분석 결과 p-value가 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

행동 실험

앞서 설명된 방법으로 상층부 진입까지 걸리는 시간(sec), 상층부에서 머무는 시간(sec), 상층부에서 이동 거리(cm), 하층부에서 이동 거리(cm), 총 이동 거리(cm), 평균 속도(cm/s), 및 부동 시간(sec)을 측정하였고 결과는 평균 \pm 표준오차로 표기하였다.

Novel tank test에서 reserpine을 투여한 군(164.10 \pm 20.75 cm)은 대조군(215.30 \pm 20.60 cm)에 비해 통계적으로 유의하게 총 이동 거리의 감소(p = 0.0065)가 확인되었다. 실험 중 평균 속도가 reserpine 투여군(5.34 \pm 0.76 cm/s)에서 대조군(6.81 \pm 0.86 cm/s)에 비해 느렸고 통계적으로 유의했다(p = 0.007).

Reserpine 투여군에서 최초 상층부 진입(5.34 \pm 1.10 sec)까지 걸리는 시간이 대조군(6.88 \pm 0.71 sec)보다 짧았다. 상층부에서 머무는 시간과 부동 시간은 약물 투여군(상층부에서 머무는 시간: 20.93 \pm 6.76 sec/부동 시간: 16.29 \pm 4.98 sec)이 대조군(상층부에서 머무는 시간: 12.76 \pm 3.87 sec/부동 시간: 9.46 \pm 2.09 sec)보다 더 길었지만 통계적으로 유의한 결과는 아니었다(그림 1).

유전자 발현

Reserpine 처치군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 낮은 *MAO* 유전자 발현을 관찰할 수 있었다(t = 9.609, p < 0.001). *CRF* 유전자는 약물 처치군이 대조군보다 통계적으로 유의한 수준에서 낮게 확인되었다(t = 7.682, p < 0.001). 노르에피네프린 수용체(*NET*) 유전자는 reserpine 투여한 군에서 대조군에 비해 낮은 유전자 발현이 관찰되었고(t = 7.519, p < 0.001), *SERTA* 유전자의 발현은 reserpine 투여 군에서 높았다(t = 2.43, p < 0.05). *GR*, *VMAT2* 유전자

Table 1. Primer sequences used in this study

Genes	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
<i>β-actin</i>	GTGATGGACTCTGGTATGGTG	GCTGTGGTGGTGAAGCTGT
<i>CRF</i>	GATACTGGGATGTCTCGGGG	TCTGCTCGTTGCCITTCAC
<i>GR</i>	ACACTTGACAGTCGCACAAAT	TGTGTTTCGCTCCAGACCT
<i>SERTA</i>	CCCAGCCAGTTGATGAAGA	CCTGTCCCTTTTCGAGCCA
<i>NET</i>	GAACGCTGGACTGACAAACT	TGGTTCATGGCGTGGACAG
<i>VMAT2</i>	CATTGTGCCAGCCAGCATC	GGCGAATCCAACACCAAAGT
<i>MAO</i>	CGAACAGAGTGCCAAAGCG	AGAGCCCCACATGCTGAAGA

CRF, corticotropin-releasing factor; *GR*, glucocorticoid receptor; *SERTA*, serotonin transporter; *NET*, norepinephrine transporter; *VMAT2*, vesicular monoamine transporter; *MAO*, monoamine oxidase

발현 정도는 약물 처치군에서 대조군보다 다소 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(그림 2).

고찰

본 연구에서는 reserpine의 반복 투여를 통해 제브라피쉬에서 우울증 발병 기전을 모델링 하고자 하였다. 위와 같은

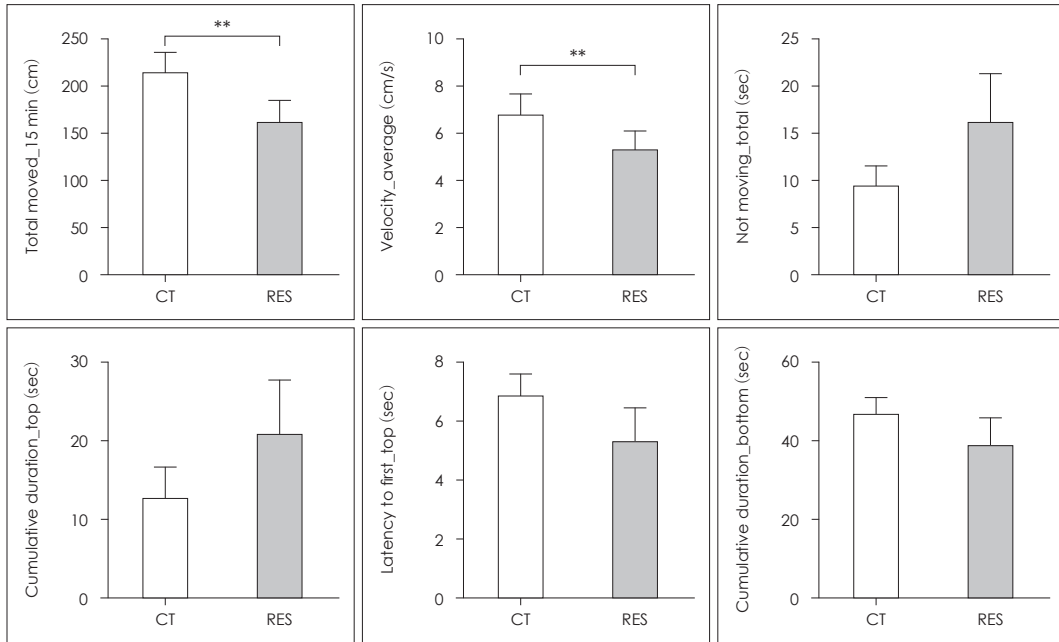


Fig. 1. Behavioral profiles of repeated reserpine exposure in adult zebrafish. Data are expressed as mean ± SEM. **p < 0.01 vs. control. CT, control group; RES, reserpine group; SEM, standard error of the mean.

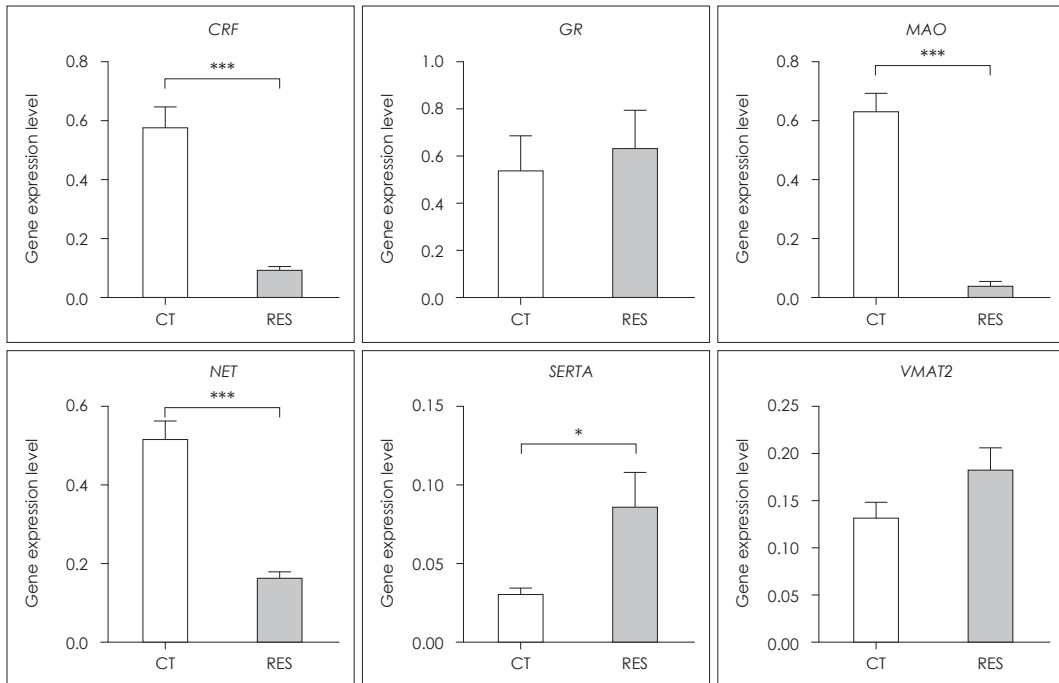


Fig. 2. Effects of repeated reserpine administration on gene expression. Data are expressed as mean ± SEM. *p < 0.05 vs. control; ***p < 0.0001 vs. control. CT, control group; RES, reserpine group; CRF, corticotropin-releasing factor; GR, glucocorticoid receptor; MAO, monoamine oxidase; NET, norepinephrine transporter; SERTA, serotonin transporter; VMAT2, vesicular monoamine transporter-2; SEM, standard error of the mean.

처치를 통해 제브라피쉬가 행동적 측면에서 우울 상태로의 행동 패턴 변화를 관찰하였다. 유전적인 측면에서도 reserpine 투약을 시행한 제브라피쉬에서 우울증과 관련된 유전자 발현을 확인하였다.

신경전달물질이 신경연접부로 방출되기 이전에 소포 내로 능동수송 과정이 필요하고 이 과정이 소포성 단가아민 수송체에 의해 매개된다. Reserpine의 경우 해당 수송체의 비가역적인 억제제로 작용하여 세로토닌, 노르에피네프린, 도파민 등의 단가아민이 정상적으로 방출되지 못하고 이로 인한 우울, 무력과 같은 증상이 발생한다.¹³⁾

기존 연구에서는 reserpine을 한 차례 20분간 단기 투여 후 우울 유사 행동을 유도하였다고 보고하였다.¹²⁾ Reserpine 반복 투여로 인한 증상 발생에 대한 결과가 보고되기도 했으나 세부 과정이 기술되어 있지 않아 유도 프로토콜을 구축하는 데 제한이 있었다.¹⁴⁾ 약물학 연구에서 우울증 동물 모델로 설치류를 사용하는 경우 reserpine 단회 투여보다 반복 투여 시 확실한 행동 변화를 보여 일반적으로 반복 투여 방법을 사용하고 있다.¹⁰⁾¹⁵⁾

제브라피쉬는 novel tank test에서 스트레스에 대한 행동 변화로 총이동 거리의 감소, 부동 시간의 증가, 상층부 최초 진입 시간의 지연이 있고 초반에 하층부에서 머무르려 하며 상층부에 머무르는 시간이 감소한다.¹⁶⁾¹⁷⁾ 선행 연구에서 reserpine 반복 투여 후 구축한 우울증 모델에서 상층부 진입 시간의 지연, 상층부 유영시간 감소, 부동 시간 증가를 보였던 바 있다.¹²⁾¹⁸⁾ 본 연구 결과에서도 이전 연구와 유사하게 총 이동 거리 측면에서 통계적으로 유의한 행동 변화를 보였고 앞선 reserpine 우울증 동물 모델에서는 보고되지 않았던 평균 속도의 유의미한 저하도 새롭게 확인되었다. 또한 이전 만성 미세축성 스트레스를 가한 설치류 우울증 동물 모델에서의 행동 패턴 변화와 유사한 것도 확인 가능하였다.¹⁹⁾ 이번 연구를 통해 reserpine을 반복 투여한 제브라피쉬에서 우울 행동으로의 변화가 생성되는 타당한 모델임을 확인하였다.

포유류의 우울증 모델에서 해마는 대조군과 비교했을 때 위축이 확인되는 등 질병에 영향을 받는 부위로 알려져 있다. 이와 같이 경골 어류에서 측면 중뇌의 창백 형성은 포유류에서 해마와 상응하는 해부학적 구조로 여겨진다. 이번 연구에서 reserpine 투여에 의한 단가아민 고갈은 제브라피쉬의 중뇌에서 두드러졌고 유전자 분석 결과에서도 CRF, MAO, NET, SERTA 유전자에서 약물 투여군의 유전자 발현량의 유의미한 차이가 확인되었다.

각 결과에 대해 살펴보면 MAO 유전자는 단가아민산화효소 생성에 관여하는 유전자로 신경전연접부 말단에서 생성되는 도파민, 세로토닌, 노르에피네프린과 같은 단가아민은

MAO와 카테콜-O-메틸전달효소(catechol ortho-methyltransferase)에 의해 분해된다.²⁰⁾ MAO는 여러 정신과적 질환에 관여하고 만성 스트레스로 인해 뇌에서 장기적으로 높게 유지될 경우 활성산소종(reactive oxygen species)을 생성하여 세포를 손상을 초래한다.²¹⁾ 선행 연구 결과²²⁾에서는 MAO 유전자 발현이 스트레스에 반응하여 높게 확인되기도 했지만 이번 연구에서는 유전자 발현이 약물 처치 군에서 대조군보다 통계적으로 유의한 수준에서 낮게 나타났다. 이전 reserpine 투여를 통해 유도된 설치류 모델에서도 투여 후 MAO 활성의 저하를 보였다.²³⁾ 약제의 기전이 소포성 단가아민 수송체(vesicular monoamine transporter)가 억제되어 세포질 내 단가아민이 증가하고 MAO에 의해 산화되면 신경 손상을 유발할 수 있다.²⁴⁾ MAO 또한 산화 스트레스에 민감한 효소이기 때문에 reserpine 반복 투여로 인해 초기 대사가 증가함에 따라 MAO 유전자의 발현도 낮게 나타난 것으로 추측해볼 수 있었다.

CRF 유전자는 41개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드로서 뇌하수체에서 분비되는 부신피질자극호르몬을 조절하는 주요 인자이다. 이 유전자의 발현은 스트레스에 반응하여 증가하고 불안을 매개하는 것으로 알려져 있다.²⁵⁾ 이번 연구에서 약물 조작을 가한 제브라피쉬군에서 CRF 유전자의 발현이 증가할 것으로 예측했으나 중뇌에서 대조군보다 통계적으로 유의한 정도로 낮게 확인되었다. 이 또한 앞선 결과와 마찬가지로 약물 투여 일수에 의해 시간 경과에 따른 변화를 고려해볼 수 있겠다.²⁶⁾

SERTA, NET은 각 신경전달물질의 재흡수를 통해 비활성화 시키고 스트레스 과정에 관련된 것으로 알려져 있다.²⁷⁾²⁸⁾ 선행 동물 모델 연구에서는 스트레스 유발 시 SERTA 유전자 발현 증가를 보였다.²⁹⁾³⁰⁾ 이번 연구에서도 reserpine 투약한 군에서 SERTA 유전자 발현이 통계적으로 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이전 연구와 같은 결과가 확인되어 새로운 사실은 아니었지만 제브라피쉬 모델에서 우울증의 신경생화학 반응을 약물학적 조작을 통해 확인했다는 점에서 의의가 있다. NET의 경우 이전 우울증 동물 모델에서 유의미한 변화를 보이지 않았는데,²²⁾³¹⁾ 이는 NET이 우울증뿐만 아니라 통증 등 다른 증상에도 관여를 하고 다른 신경전달물질이 동시에 작용할 가능성이 추측되기도 하였다.³²⁾ 본 연구에서는 약물 투여군에서 NET 유전자 발현이 통계적으로 유의하게 낮게 확인되었다.

본 연구의 제한점으로는 단가아민가설 외에 시상하부-뇌하수체-부신 축,³³⁾ 염증 반응 관련 물질 등 다른 우울증 가설의 표지자를 포괄적으로 확인하지 못한 점이다. 또한 제브라피쉬 우울증 모델에서도 novel tank test 외에도 명암 상차

시험, 인지 모델, 사회 모델⁷⁾ 등 다양한 시험을 진행하지 못한 것도 제한점으로 생각된다. 이번 연구를 기반으로 추후 제브라피쉬에서 다양한 연구 방법을 적용한 후속 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

결론적으로, reserpine 반복 투여로 유도된 제브라피쉬 모델은 기존 동물 모델에서 확인되어 온 우울증의 특징적인 행동 패턴 변화와 내적 표현형을 나타내는 것을 알 수 있다. 제브라피쉬는 단기간에 상대적으로 간단한 프로토콜로 우울증 모델링이 가능하여 중개 연구에 활용이 유용할 것으로 생각된다.

중심 단어: 레서핀; 우울; 제브라피쉬; 동물 모델; 실험 모델.

Acknowledgments

This research was supported by a Korea University grant and Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (grant number: 2019R111A1A01056594).

Conflicts of interest

The authors have no financial conflicts of interest.

Author Contributions

Conceptualization: Suhyun Kim, Cheolmin Shin. Data curation: Seyoung Kim, Cheolmin Shin. Formal analysis: Chanhee Lee, Cheolmin Shin. Funding acquisition: Cheolmin Shin. Investigation: Seyoung Kim, Jongha Lee, Cheolmin Shin. Methodology: Suhyun Kim, Cheolmin Shin. Project administration: Chanhee Lee, Cheolmin Shin. Resources: Cheolmin Shin. Software: Chanhee Lee, Cheolmin Shin. Supervision: Changsu Han, Young-Hoon Ko, Yong-ku Kim, Ho-Kyoung Yoon, Suhyun Kim. Visualization: Chanhee Lee, Cheolmin Shin. Writing—original draft: Cheolmin Shin. Writing—review & editing: Seyoung Kim, Cheolmin Shin.

ORCID iDs

- Seyoung Kim <https://orcid.org/0000-0003-2902-7269>
- Changsu Han <https://orcid.org/0000-0002-4021-8907>
- Young-Hoon Ko <https://orcid.org/0000-0002-5352-2158>
- Yong-Ku Kim <https://orcid.org/0000-0001-5694-7840>
- Ho-Kyoung Yoon <https://orcid.org/0000-0003-1497-8416>
- Jongha Lee <https://orcid.org/0000-0003-0824-8564>
- Suhyun Kim <https://orcid.org/0000-0001-7425-1310>
- Chanhee Lee <https://orcid.org/0000-0002-6406-5167>
- Cheolmin Shin <https://orcid.org/0000-0002-8232-2921>

REFERENCES

- 1) **World Health Organization.** Depression and other common mental disorders: global health estimates. Geneva: World Health Organization;2017.
- 2) **GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators; Vos T, Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, et al.** Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden

- of Disease Study 2016. *Lancet* 2017;390:1211-1259.
- 3) **Elhwuegi AS.** Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28:435-451.
- 4) **Kalueff AV, Wheaton M, Murphy DL.** What’s wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. *Behav Brain Res* 2007;179:1-18.
- 5) **Ma L, Demin KA, Kolesnikova TO, Khatsko SL, Zhu X, Yuan X, et al.** Animal inflammation-based models of depression and their application to drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2017;12:995-1009.
- 6) **Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R.** Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2014; 35:63-75.
- 7) **Fonseka TM, Wen XY, Foster JA, Kennedy SH.** Zebrafish models of major depressive disorders. *J Neurosci Res* 2016;94:3-14.
- 8) **Shamon SD, Perez MI.** Blood pressure-lowering efficacy of reserpine for primary hypertension. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 12:CD007655.
- 9) **Strawbridge R, Javed RR, Cave J, Jauhar S, Young AH.** The effects of reserpine on depression: a systematic review. *J Psychopharmacol* 2023;37:248-260.
- 10) **Ikram H, Haleem DJ.** Repeated treatment with reserpine as a progressive animal model of depression. *Pak J Pharm Sci* 2017;30:897-902.
- 11) **Ruiz P, Calliari A, Pautassi RM.** Reserpine-induced depression is associated in female, but not in male, adolescent rats with heightened, fluoxetine-sensitive, ethanol consumption. *Behav Brain Res* 2018;348:160-170.
- 12) **Kyzar E, Stewart AM, Landsman S, Collins C, Gebhardt M, Robinson K, et al.** Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish. *Brain Res* 2013;1527:108-116.
- 13) **Bernstein AI, Stout KA, Miller GW.** The vesicular monoamine transporter 2: an underexplored pharmacological target. *Neurochem Int* 2014;73:89-97.
- 14) **Kyzar E, Roth A, Green J, Gaikwad S, Monnig L, Kalueff A.** Developing zebrafish models of depression?: effects of reserpine on zebrafish behavior and physiology. *FASEB J* 2012;26:1045.12.
- 15) **Antkiewicz-Michaluk L, Waśik A, Możdżeń E, Romańska I, Michaluk J.** Antidepressant-like effect of tetrahydroisoquinoline amines in the animal model of depressive disorder induced by repeated administration of a low dose of reserpine: behavioral and neurochemical studies in the rat. *Neurotox Res* 2014;26:85-98.
- 16) **Bencan Z, Sledge D, Levin ED.** Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;94:75-80.
- 17) **Blaser RE, Roseberg DB.** Measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*): dissociation of black/white preference and novel tank test. *PLoS One* 2012;7:e36931.
- 18) **Tang YQ, Li ZR, Zhang SZ, Mi P, Chen DY, Feng XZ.** Venlafaxine plus melatonin ameliorate reserpine-induced depression-like behavior in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 2019;76:106835.
- 19) **Piato AL, Capiotti KM, Tamborski AR, Oses JP, Barcellos LJ, Bogo MR, et al.** Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35:561-567.
- 20) **Guillot TS, Miller GW.** Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. *Mol Neurobiol* 2009;39:149-170.
- 21) **Duncan J, Johnson S, Ou XM.** Monoamine oxidases in major depressive disorder and alcoholism. *Drug Discov Ther* 2012;6:112-122.
- 22) **Stefanovic B, Spasojevic N, Jovanovic P, Jasnica N, Djordjevic J,**

- Dronjak S.** Melatonin mediated antidepressant-like effect in the hippocampus of chronic stress-induced depression rats: regulating vesicular monoamine transporter 2 and monoamine oxidase A levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 2016;26:1629-1637.
- 23) **de Freitas CM, Busanello A, Schaffer LF, Peroza LR, Krum BN, Leal CQ, et al.** Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2016;233:457-467.
 - 24) **Simonian NA, Coyle JT.** Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:83-106.
 - 25) **Binder EB, Nemeroff CB.** The CRF system, stress, depression and anxiety—insights from human genetic studies. *Mol Psychiatry* 2010;15:574-588.
 - 26) **Suda T, Tomori N, Yajima F, Sumitomo T, Nakagami Y, Ushiyama T, et al.** Time course study on the effect of reserpine on hypothalamic immunoreactive CRF levels in rats. *Brain Res* 1987;405:247-252.
 - 27) **Chaouloff F.** Serotonin, stress and corticoids. *J Psychopharmacol* 2000;14:139-151.
 - 28) **Schwarz LA, Luo L.** Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Curr Biol* 2015;25:R1051-R1056.
 - 29) **Filipenko ML, Beilina AG, Alekseyenko OV, Dolgov VV, Kudryavtseva NN.** Repeated experience of social defeats increases serotonin transporter and monoamine oxidase A mRNA levels in raphe nuclei of male mice. *Neurosci Lett* 2002;321:25-28.
 - 30) **Morozova AY, Zubkov EA, Koshkin FA, Storozheva ZI, Chekhonin VP.** Expression of genes encoding serotonin receptors and SERT in various brain structures of stressed rats after chronic exposure to ultrasound. *Bull Exp Biol Med* 2014;156:317-319.
 - 31) **Bravo L, Torres-Sanchez S, Alba-Delgado C, Mico JA, Berrocoso E.** Pain exacerbates chronic mild stress-induced changes in noradrenergic transmission in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014;24:996-1003.
 - 32) **Bravo L, Alba-Delgado C, Torres-Sanchez S, Mico JA, Neto FL, Berrocoso E.** Social stress exacerbates the aversion to painful experiences in rats exposed to chronic pain: the role of the locus coeruleus. *Pain* 2013;154:2014-2023.
 - 33) **Ghisleni G, Capiotti KM, Da Silva RS, Oses JB, Piato ÂL, Soares V, et al.** The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012;36:176-182.