동의신경정신과 학회지 제22권 제2호(2011년 6월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2011;22(2):129-146

靈神草의 항우울 효과에 대한 행동약리학적 연구

이은경, 정대규

대구한의대학교 한의과대학 신경정신과교실

Studies on the Behavioral Pharmacology of the Antidepressant Effect of *Polygala japonica* Houtt

Eun-Kyung Lee, Dae-Kyoo Chung

Dept. of Oriental Neurospychiatry, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Abstract

Objectives :

The purpose of this study was to characterize the putative antidepressant and antianxiolytic effects of the 70% ethanol extract of *Polygala japonica*(EEPJ) using animal's behavioral experiment in mice.

Methods :

The effect of EEPJ on the anxioty and depressive disorder was investigated via mice's behavioral experiment like Elevated plus-maze, Horizontal wire test, Open field test, Forced swimming test, Tail suspension test, and it was happen via any mechanism by WAY 100635, a 5-HT_{1A} receptor antagonist and by Flumazenil, a $GABA_A$ antagonist

Results :

1. In the EPM, single treatments of the EEPJ(200 and 400㎎/㎏) had usefully antianxiolytic effects versus vehicle, which was medicated via the serotonergic nervous system.
2. In the HWT, single treatments of the EEPJ were no changes in the myorelaxant effects versus vehicle.
3. In the OFT, single treatments of the EEPJ were no changes in the locomotor activity versus vehicle.
4. In the FST, single treatments of the EEPJ(50㎎/㎏) significantly reduced the immobility time versus vehicle.
5. In the TST, single treatments of the EEPJ(50㎎/㎏) significantly reduced the immobility time versus vehicle.

Conclusions :

These results indicate that EEPJ is an effective antidepressant and antianxiolytic activity in mice, and it might be usefully applied for prevention and treatment of depressive disorder through evolutive study like development of various experimental models.

Key Words :

Polygala japonica, Anxiolytic, Antidepressant, Elevated plus-maze, Forced swimming test

투고 : 2011. 05. 13. 수정 : 2011. 06. 08. 채택 : 2011. 06. 13.
교신저자 : 이은경, 부산 남구 우암2동 189-22번지 상가 1-6 영동한의원
Tel) 051-633-3133, E-mail) hanyi98@naver.com
이 논문은 2009년 2월 대구한의대 일반대학원 한의학과 신경정신과학전공 박사학위 논문임

Ⅰ. 서 론

불안 및 우울증은 정신과 영역에서 매우 일반적인 질환으로서 전체 인구의 약 3-8% 정도가 불안 증세로 고통을 받고 있으며 이 가운데 우울증은 세계 인구의 약 17%가 일생에 한 번쯤은 경험하는 가장 흔한 정신질환이다. 특히 우울증은 현대인의 생활이 복잡다양화 되면서 선진국을 중심으로 발생이 계속 증가하고 있으며 보통 우울감, 흥미상실이나 체중감소, 수면 장애, 죄책감 등의 증상을 나타내고 어떤 경우에는 만성적 피로감이나 요통 등이 증상으로 나타나는 경우도 있다. 또한 우울증은 다른 증상이 없을 경우도 있지만, 일반적으로 불안감이나 특정 불안 장애 증상을 동반하기도 한다[1-3].

우울증을 일으키는 원인은 아직 확실히 밝혀져 있지는 않으나 생물학적, 유전적, 사회심리학적인 요인이 상호 영향을 미치는 것으로 생각되고 있다. 생물학적 원인 가설 중, 뇌의 신경전달물질계의 생화학적 불균형이 우울증을 유발한다는 이론에 의해 우울증에 대한 약물 치료가 이루어지게 되었다[1,4,5]. 항우울제는 크게 세로토닌 재흡수 억제제(SSRI), 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제(SNRI), 노르에피네피린-도파민 재흡수억제제(NDRI)로 나눌 수 있다. 또한 항불안제에서도 세로토닌 신경계에 작용하는 항불안 약물이 많이 개발되어 있지만 여전히 benzodiazepine계의 약물이 불안을 치료하는 약물로 다용되고 있는데, 이러한 약물은 GABA 신경계를 경유하는 작용기전을 가지고 있고 매우 효과적이라고 알려져 있지만, 진정, 기억력 장애, 의존성, 수면장애 등의 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.[6-8]

鬱證은 《內經》[9]에서는 "諸氣膹鬱 皆屬於肺", "久而化鬱", "日久成鬱", "伏之化鬱", "抑之鬱發"이라 하여 급성적이기보다는 만성적인 억압으로 말미암아 형성되는 舒暢, 通暢되지 못하는 상태로 설명되었고, 후대로 갈수록 정신적인 개념의 의미가 커져 명대의 《景岳全書》[10]에서는 怒鬱, 思鬱, 憂鬱 등의 情志之鬱이라는 개념을 설정한 후 우울증을 포함하는 의미가 되었다.

한약을 이용한 항우울 효과에 대한 실험적 연구 중 단일 한약을 이용한 실험 연구는 吳茱萸, 人蔘, 香附子, 水蔘, 枸杞子, 地骨皮, 柴胡, 鹿茸, 蓮子肉 등이 있었고[11-18], 복합처방을 이용한 실험 연구는 歸脾湯, 歸脾溫膽湯, 分心氣飮, 補血安神湯, 天王補心丹, 壽脾煎, 七福飮, 三精丸 등이 있었다[19-26].

靈神草(*Polygala japonica* Houtt)는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 애기풀의 줄기와 잎을 건조시킨 것으로 味苦하면서 微辛하며 性은 平하여 肺, 肝, 心經에 歸經하여 祛痰止咳, 散瘀止血, 寧心安神, 解毒消腫의 효능이 있다[27-29].

이에 저자는 한약재를 이용하여 부작용을 최소화시킨 새로운 우울증 치료제 개발은 매우 의미 있는 연구가 될 수 있을 것으로 사료되어 靈神草의 불안 및 우울증에 대한 효과를 Elevated plus-maze, Horizontal wire test, Open field test, Forced swimming test, Tail suspension test 등 동물행동실험을 통하여 관찰하였고, 이러한 작용이 어떤 기전을 통하여 발생하는지 5-HT_{1A} 수용체와 $GABA_A$ 수용체의 antagonist를 사용하여 규명한 결과 다음과 같은 사실을 확인하여 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

실험동물은 수컷의 ICR mouse(SPF/VAF CrljBgi:CD-1) 5주령을 (주)오리엔트(경기도, 한국)에서

공급받아 사용하였다. 실험동물은 대구한의대 동물실에서 7일간 적응시킨 후 對照群, 陽性對照群 및 靈神草群으로 구분하여 사용하였다. 실험동물은 온도 23 ± 3℃, 습도 50 ± 10% 내외, 명암주기 12시간 주기로 일정하게 유지된 사육실에서 다섯 마리씩 polycarbonate mice cage에 수용하여 사육하였으며 적응 기간 동안 사료와 물을 제한 없이 공급 받았다.

2) 시료의 준비

본 실험에 사용한 靈神草는 대구한의대학교 부속한방병원에서 공급받아 사용하였다.

3) 실험장치

Evaporator(Eyela, SB-1000, Japan)

Freezing Dryer(Eyela, FDU-2000, Japan)

EthoVision system(Noldus, Wageningen, Netherlands)

Elevated Plus-Maze(Noldus, Wageningen, Netherlands)

Black Plexiglas boxes(Noldus, Wageningen, Netherlands)

Hole-board(Bioseb LE-8812, France)

UV/VIS spectrophotometer(Jasco V-530, Japan)

Animal room(Orient Bio, Korea)

Sonicator(Hwashin 410/510, Korea)

Water bath(Vision Scientific, Korea)

Experimental box for place preference(Noldus, Wageningen, Netherlands)

4) 실험물질

본 실험에 사용한 Buspirone hydrochloride (N-[4-[4-(2-Pyrimidinyl)-1-piperazinyl]butyl]-8-azaspiro[4,5]decane-7,9-dione hydrochloride), Way 1000635(N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl] ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexane carboxamide maleate salt), Imipramine hydrochloride (10,11-Dihydro-N, N-dimethyl-5H-dibenz[b,f]azepine-5-propanaminehydrochloride), Tween 80 (Polyethylene glycol sorbitan monooleate), Sodium chloride, Flumazenil($C_{15}H_{14}FN_3O_3$)은 (주)시그마(Sigma, USA)의 제품을 사용하였으며 기타 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최상급을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 조제

靈神草추출물은 준비된 靈神草를 증류수로 2회 세척한 뒤 70% 에탄올을 靈神草의 10배 부피만큼 가한 후 2회 초음파 추출하였다. 이를 rotary evaporator로 감압 농축하여 얻은 점조상의 추출물을 Freezing Dryer에서 건조한 뒤 얻어진 분말을 실험에 사용하였다(이하 EEPJ - 70% ethanol extract *Polygala japonica* 라고 한다, 수득률 14.0%).

2) 행동약리학적 연구

(1) Elevated plus-maze(EPM)

① EPM을 이용한 靈神草의 항불안 작용 확인

항불안 효과는 수컷의 ICR mice를 이용하여 EPM에서 측정하였다. 양성대조군으로는 diazepam (1㎎/㎏, i.p.)을 실험 30분 전에 투여하였고, EEPJ는 50, 100, 200, 및 400㎎/㎏ 용량으로 경구투여하였다. 약물 투여는 실험 시작 1시간 전에 투여가 종료되도록 하였다. 대조군은 10% tween 80을 경구투여하였다. 각 군은 8-10마리로 하였다.

약물 투여가 종료된 후 항불안 효과의 측정은 검정색의 아크릴로 제작된 EPM을 이용하였다.

이 장치는 바닥에서 50㎝ 높이에 설치된 십자형(+) 미로로서, 4개의 통로 가운데 마주보는 2개(길이 30㎝, 폭 5㎝)는 개방되어 있고, 크기가 동일한 다른 2개의 통로는 높이 20㎝의 벽으로 둘러싸여 있다. 중심 platform은 가로 5㎝ 및 세로 5㎝로 하였고, maze의 중앙부 천장에 비디오카메라를 설치하여 동물의 행동을 기록하였으며 광도는 20lux로 조정하였다. 실험을 시작할 때 마우스는 maze의 open arm에 머리를 밖으로 향하게 놓은 다음 maze를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 행동은 5분 간 관찰하였으며, 마우스가 open arm과 closed arm에 머문 시간, 각 arm의 출입 횟수 및 총 이동거리 등을 EthoVision program으로 각각 측정하여 항불안 효과를 측정하였다[30,31]. 각 arm의 출입 횟수는 open arm이나 closed arm의 교차점을 기준으로 할 때 어느 쪽으로나 네 발이 완전하게 진입되었을 때를 1회로 하고 open arm과 closed arm에 대하여 각각 측정한다. 각 arm에 머문 시간의 측정은 각 arm에 진입된 후 머물러 있던 시간의 총 합을 측정하였다. 각 실험이 끝난 후에는 전 실험동물의 흔적을 지우기 위해 70% alcohol로 깨끗이 닦아 다음 실험에 영향을 주지 않도록 하였다.



Fig. 1. Elevated Plus-maze.

② Way 100635와 Flumazenil의 길항작용

靈神草의 항불안 효과의 작용 기전을 관찰하기 위해 5-HT_{1A} 수용체의 antagonist인 Way 100635와 $GABA_A$ 수용체의 antagonist인 Flumazenil을 사용하여 EPM에서 측정하였다.

먼저 예비실험으로 항불안작용과 관련이 깊은 세로토닌 신경계와 GABA 신경계와의 관계를 주요 타겟으로 설정하여 먼저 양성대조군 투여군으로 세로토닌 수용체의 효능제인 buspirone(5-HT_{1A} receptor agonist)과 GABA 신경계의 효능제인 diazepam($GABA_A$ receptor agonist)을 실험 시작 1시간 전에 투여하였다. 계속해서 실험 시작 30분 전에 각각 세로토닌 수용체의 길항제(5-HT_{1A} receptor antagonist)인 Way 100635(0.3㎎/㎏, i.p.)와 GABA 수용체의 길항제($GABA_A$ receptor antagonist)인 Flumazenil(10㎎/㎏, i.p.)을 병용 투여하여 EPM을 실시하였다.

그 후, 본 실험을 시작하기 1시간 전에 EEPJ 400㎎/㎏을 경구투여하고 계속해서 실험 시작 30분 전에 각각 세로토닌 수용체의 길항제(5-HT_{1A} receptor antagonist)인 Way 100635(0.3㎎/㎏, i.p.)와 GABA 수용체의 길항제($GABA_A$ receptor antagonist)인 Flumazenil(10㎎/㎏, i.p.)을 병용 투여하여 EPM을 실시하였다. 대조군은 10% tween 80을 동일 용량으로 경구투여하였다. 각 군은 8-10마리로 하였다.

(2) Horizontal wire test(HWT)

HWT는 실험동물의 근육이완 상태를 확인하는 실험방법이다. 일반적으로 항불안 약물들은 졸음, 근육이완 등의 부작용을 야기하므로 靈神草가 이러한 부작용이 발생하는지를 HWT를 통해 확인하였다. 양성대조군으로는 diazepam(5㎎/㎏, i.p.)을 실험 30분 전에 투여하였고, EEPJ는 50, 100, 200, 및 400㎎/㎏ 용량으로 경구투여하였다. 약물 투여는 실험 시작 1시간 전에 투여가 종료되도록 하였다. 대조군은 10% tween 80을

경구투여하였다. 각 군은 8-10마리로 하였다.

HWT는 양쪽에 기둥을 설치하고 바닥으로부터 30㎝의 높이로 하여 직경 1mm, 길이 40㎝의 wire를 수평으로 설치하여 측정하였다. 먼저 마우스의 앞발이 wire를 쥐게 한 다음, 꼬리를 아래쪽으로 향하여 놓은 후 한 쪽 뒷발이 wire를 쥐거나, 앞발이 10초 이상 wire에 매달려 있으면 통과로 인정하였다[29]. 대조군 및 EEJP 투여군을 EPM 시험 완료 후, 5분 간격으로 2회 실시하였다.



Fig. 2. Horizontal wire test.

(3) Open field test(OFT)

Locomotor activity는 실험동물의 활동성을 측정하는 장치로 약물의 항불안 및 항우울 작용이 동물의 활동성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하는 실험방법이다. Locomotor activity는 자가 제조된 OFT용 box에서 측정하였다. OFT용 box는 가로 41.5㎝, 세로 41.5㎝, 높이 43㎝가 되도록 제조하고, 하나의 box에서 한 마리씩 측정함. 약물은 경구로 투여하며 대조군으로 10% tween 80을 동일 용량으로 경구투여하였다. 각 군은 8-10마리로 하였으며 EthoVision program을 이용하여 총 이동거리 및 rearing 횟수를 측정하였다[30].

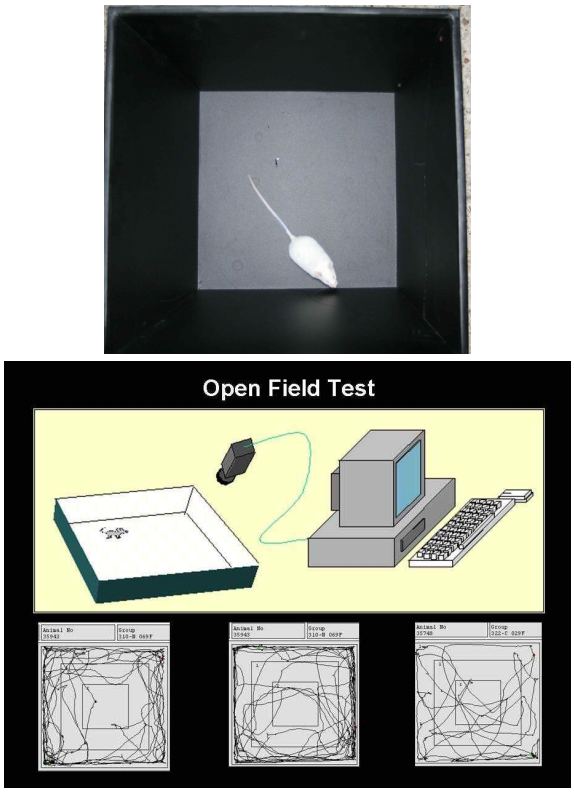


Fig. 3. Open field test.

(4) Forced swimming test(FST)

본 실험에서는 절망행동검사라고도 하는 표준화된 검사법인 FST를 이용하였다. 인간의 질병 연구에 대한 동물모형이 제한점이 있듯이 FST도 일부 논란은 있었으나, 약물개발시의 항우울 효과를 검색하는 가장 기본적인 실험방법으로 알려져 있다. FST의 실험과정은 최초의 제안자인 Porsolt 등의 방법을 따라서 시행하였다[31-33].

약물 투여가 종료된 후 항우울 효과의 측정은 자가 제조된 FST을 이용한다. 이 실험은 높이 25㎝, 지름 11㎝의 투명한 아크릴 원통형 수조를 제작하여 25 ± 1℃의 물에 마우스의 꼬리가 바닥에 닿지 않을 정도의 물 높이에 강제로 빠뜨린 다음 처음 2분간은 적응시키고 4분 동안 EthoVision program을 이용하여 immobility duration을 측정하여 항우울 효과를 측정하였다. 실험 중에 처

음 2분 동안은 마우스가 이를 벗어나기 위해 심한 저항을 보이나, 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어나며 마지막은 거의 부동 상태로 몸을 유지하는 경향이 있다. 전형적인 부동 상태란 마우스가 얼굴의 일부분만 수면 위로 드러낸 채 몸의 균형을 유지하기 위하여 약간의 움직임만을 나타낼 뿐 물 위에 떠 있는 상태이다. FST가 끝난 마우스는 몸의 물기를 닦아준 다음 사육 cage로 돌려보냈으며 물의 온도는 항상 일정하게 25 ± 1℃를 유지하였다. 양성대조군으로는 imipramine(15㎎/㎏, i.p)을 실험 30분 전에 투여하였고, EEPJ는 12.5, 25, 50, 100, 및 200㎎/㎏ 용량으로 경구투여하였다. 약물 투여는 실험 시작 1시간 전에 투여가 종료되도록 하였으며 대조군은 10% tween 80을 경구투여하였다. 각 군은 8-10마리로 하였다.

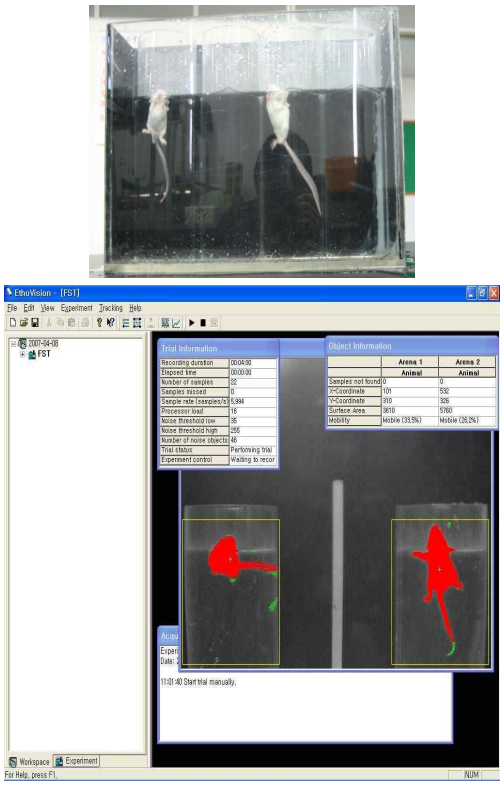


Fig. 4. Forced swimming test.

(5) Tail suspension test

TST에 의한 항우울활성의 측정은 Steru 등의 방법으로 실시하였다. 꼬리가 매달린 마우스는 활동과 부동자세를 교대로 보이는데 항우울 약물은 용량의존적으로 부동자세를 보이는 시간을 감소시키므로 이 시간을 측정하여 항우울 활성을 확인하였다[34,35].

약물 투여가 종료된 후 항우울 효과의 측정은 자가 제조된 TST을 이용한다. 이 실험은 높이 50㎝의 테이블 가장자리에 마우스의 꼬리 끝에서 1㎝된 부위에 테이프를 붙인 후에 10분 동안 immobility duration을 측정하여 항우울 효과를 측정하였다. 양성대조군으로는 imipramine(30㎎/㎏, i.p.)을 실험 30분 전에 투여하였고, EEPJ는 12.5, 25, 50, 100, 및 200㎎/㎏ 용량으로 경구투여하였다. 약물 투여는 실험 시작 1시간 전에 투여가 종료되도록 하였으며 대조군은 10% tween 80을 경구투여하였다. 각 군은 8-10마리로 하였다.



Fig. 5. Tail suspension test

3. 통계처리

모든 실험 결과는 one way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 통계처리 하였고, 유의성이 인정될 경우 Student-Newman-Keuls Method를 이용하여 $P < 0.05$ 수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. Elevated Plus-maze

1) Open arm에서 머문 시간 및 출입한 횟수

EPM을 이용한 EEPJ의 항불안 효과를 Table Ⅰ 및 Fig. 2에 나타내었다. 대조군에서 open arm에 머무는 시간과 open arm에 출입한 횟수의 백분율은 각각 36.51 ± 2.08%와 33.91 ± 2.19% 나타났다. 이에 반해 양성대조군인 diazepam 1 ㎎/㎏ 투여군에서는 open arm에 머무는 시간과 open arm에 출입한 횟수의 백분율이 각각 55.91 ± 2.40%와 61.72 ± 2.19%로 대조군에 비해 유의성 있게 증가함을 알 수 있었다(Table Ⅰ, Fig. 2A and 2B, $P < 0.05$).

Table Ⅰ. General Activity Measures from EPM(mean ± SEM)

Group	Dose (㎎/㎏)	% of time spent in open arm	% of open arm entries
Control		36.51 ± 2.75	33.91 ± 2.22
Diazepam	1	55.91 ± 2.40*	61.72 ± 2.19*
EEPJ	50	36.72 ± 2.69	38.02 ± 0.82
	100	43.08 ± 5.23	40.00 ± 1.44
	200	50.31 ± 2.70*	47.57 ± 3.20*
	400	52.00 ± 2.25*	49.59 ± 2.90*

또한 EEPJ 투여군에서도 200 및 400㎎/㎏에서 open arm에 머무는 시간의 백분율이 각각 50.31 ± 2.70%와 52.00 ± 2.25%로 나타났고 open arm에 출입한 횟수의 백분율이 각각 47.57 ± 3.20%와 49.59 ± 2.90%로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였음을 관찰할 수 있었다. 특히 400㎎/㎏을 투여한 경우는 open arm에서 머무는 시간이 양성 대조군으로 사용한 diazepam 투여군과 유사하게 나타났음을 관찰할 수 있었다(Table Ⅰ, Fig. 2A and 2B, $P < 0.05$).

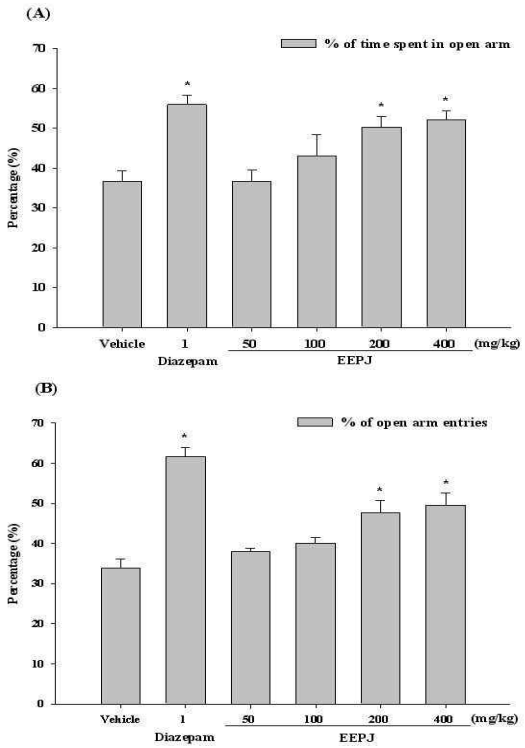


Fig. 6. Effect of a single treatment of the EEPJ on the percentage of the time spent in(A) and the number of entries into(B) the EPM over a 5min test period in the mice. Each bar represents mean ± SEM of 8-10 mice. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (*P < 0.05 as compared with the vehicle group).

2) 총 이동거리의 측정

약물효과가 단순한 운동성 변화에 의한 것인지 확인하기 위해 EPM에서 총 이동거리를 측정하였다. 대조군 및 diazepam 1㎎/㎏ 투여군에서 각각 2024.71 ± 57.69㎝, 1953.52 ± 95.36㎝를 이동하였다. EEPJ 200 및 400㎎/㎏ 투여군에서는 각각 2006.31 ± 51.82㎝, 1876.73 ± 137.70㎝를 이동하여 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(Table Ⅱ).

Table Ⅱ. Total Distance Moved in Closed Arms and Open Arms of EPM over 5min Test in Mice(mean ± SEM)

Group	Dose(㎎/㎏)	Total movement distance (㎝)
Control		2024.71 ± 57.69
Diazepam	1	1953.52 ± 95.36
EEPJ	50	1965.01 ± 125.36
	100	2073.90 ± 84.20
	200	2006.31 ± 51.82
	400	1876.73 ± 137.70

3) WAY 100635 및 Flumazenil의 길항 작용

EEPJ의 항불안 작용이 어떤 신경계를 경유하여 발생하는지를 확인하기 위하여 antagonism study를 EPM을 통하여 확인하였다. 양성대조군을 투여한 예비실험 결과 buspirone 투여군과 diazepam 투여군에서 open arm에 머무는 시간의 백분율이 각각 55.91 ± 6.80%와 53.03 ± 3.08%로 나타났고, open arm에 출입한 횟수의 백분율이 61.72 ± 2.19%와 56.67 ± 1.61%로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3, $P < 0.05$). 그러나 buspirone과 WAY 100635를 병용 투여한 그룹과 diazepam과 Flumazenil를 병용 투여한 그룹에서 open arm에 머무는 시간의 백분율이 각각 30.76 ± 4.57%와 37.75 ± 2.16%로 나타났고, open arm에 출입한 횟수의 백분율이 47.36 ± 2.09%와 50.05 ± 1.95%로 단독으로 투여한 buspirone 투여군과 diazepam 투여군에 비해 유의성 있게 감소되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3, $P < 0.05$). 결과적으로, buspirone과 diazepam의 항불안 작용이 각각의 길항제에 의해 완전히 차단되어지는 것을 확인할 수 있었다.

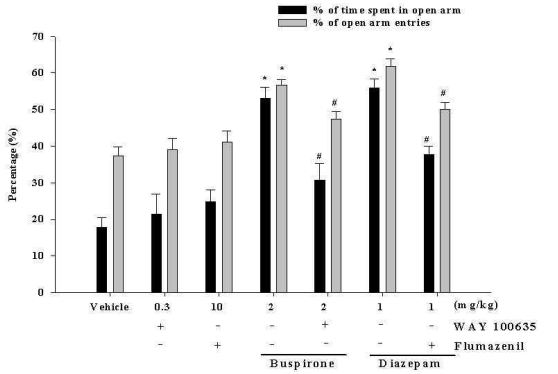


Fig. 7. Anxiolytic-like effects of buspirone or diazepam were blocked by WAY 100635 or Flumazenil, respectively.

Buspirone or diazepam were orally administered at 2 and 1㎎/㎏ to adult male ICR mice. 30min after the last oral administration, WAY 100635(0.3 ㎎/㎏) or Flumazenil(10㎎/㎏) were intraperitoneally treated; N = 8-10 mice per group. The data are expressed as the mean ± SEM of the percentage of the time spent in and the number of entries into the open arms of the EPM over 5min test period. *P* values for group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by the Student Newman-Keuls test(*$P < 0.05$ versus the vehicle treated group, #$P < 0.05$ as compared with the buspirone or diazepam + vehicle treated group)

EEPJ를 이용한 본 실험에서는 open arm에 머무는 시간의 백분율이 대조군에서 33.77 ± 2.27%였으며, Flumazenil 10㎎/㎏ 및 WAY 100635 0.3㎎/㎏ 투여군에서는 각각 33.41 ± 1.15%, 32.98 ± 1.27%로 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화가 없었다. 그러나 EEPJ 400㎎/㎏와 Flumazenil 10㎎/㎏의 병용 투여군에서는 50.20 ± 2.86%로 대조군 및 Flumazenil 투여군에 비해 유의성 있게 증가하였지만 EEPJ 400㎎/㎏와 WAY 100635 0.3㎎/㎏의 병용 투여군에서는 33.64 ± 3.13%로 대조군 및 WAY 100635 투여군에 비해 유의성 있는 변화가 없음을 알 수 있었다. 결과적으로, 靈神草의 항불안 작용이 5-HT_{1A} 수용체의 antagonist인 Way 100635에 의해 완전히 차단되어지는 것을 확인할 수 있었다(Table Ⅲ, Fig. 4A and 4B, $P < 0.05$).

Table Ⅲ. General Activity Measures from EPM (mean ± S.E.M.)

Group(Dose)	% of time spent in open arm	% of open arm entries
Vehicle	33.77 ± 2.27	31.79 ± 2.02
Flumazenil(10)	33.41 ± 1.15	30.64 ± 1.92
WAY 100635(0.3)	32.98 ± 1.27	30.78 ± 2.30
EEPJ(400)	47.35 ± 2.34*	43.28 ± 1.26*
EEPJ+Flumazenil (400+10)	50.20 ± 2.86*	45.10 ± 1.37*
EEPJ+WAY 100635 (400+0.3)	33.64 ± 3.13#	34.15 ± 1.53#

P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test(*P < 0.05 versus the vehicle treated group, #P < 0.05 as compared with the EEPJ treated group).

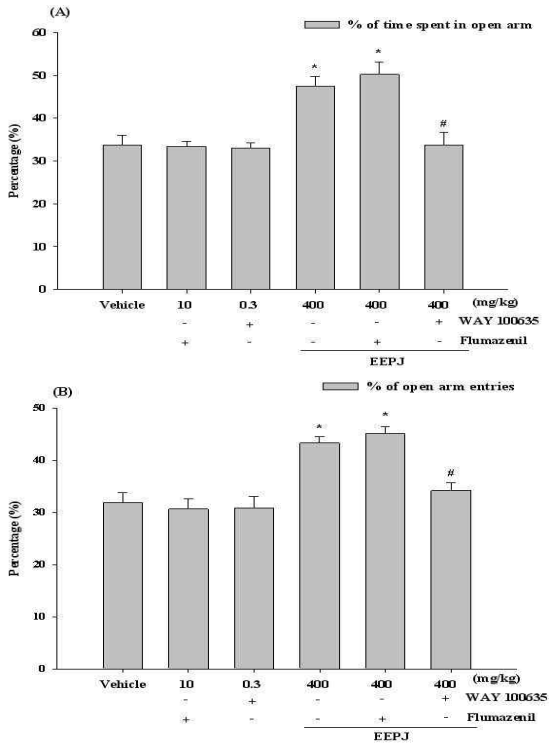


Fig. 8. Anxiolytic-like effects of EEPJ were blocked by WAY 100635 but not by Flumazenil.
The data is expressed as the mean ± SEM of the percentage of the time spent in(A) and the number of entries into(B) the open arms of the EPM, 1h after the oral administration of EEPJ(400㎎/㎏), EEPJ (400㎎/㎏) + WAY 100635(0.3㎎/㎏) or Flumazenil (10㎎/㎏) (30min prior testing, i.p.), or vehicle; N = 8-10 mice per group. *P* values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test(*P < 0.05 versus the vehicle treated group, #P < 0.05 as compared with the EEPJ treated group).

2. Horizontal wire test

EEPJ가 일반적인 항불안 약물들이 가지는 근육이완의 부작용을 나타내는지 확인하기 위하여 HWT를 실시하였다. Fig. 5에서 알 수 있듯이 양성대조군인 diazepam 5㎎/㎏ 투여군에서 실험동물이 wire에 매달리는 행동이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하고 있음을 확인하였다. 그러나 EEPJ 투여군에서는 대조군에 비교하여 어떠한 유의성 있는 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 5, P < 0.05). 이러한 결과로 보아 EEPJ는 일반적인 항불안 약물들의 투여로 발생하는 근육이완의 부작용이 전혀 없음을 확인할 수 있었다.

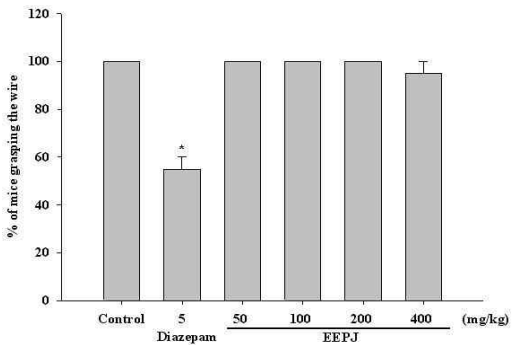


Fig. 9. Performance of mice in the HWT 1h after oral administration of vehicle, diazepam (5㎎/㎏), or EEPJ.
Data represent percentage of mice grasping the wire after administration of EEPJ. Each bar represents the mean ± SEM of 8-10 mice. *P* values for group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test(*P < 0.05 versus the vehicle treated group).

3. Open field test

EEPJ의 항불안 작용이 단순한 활동성의 증가로 인하여 생기는 지를 확인하기 위하여 OFT를 실시하여 locomotor activity를 측정하였다.

대조군 및 EEPJ 400㎎/㎏ 투여군의 총 이동거리는 각각 1544.95 ± 91.82㎝, 1447.53 ± 45.44㎝로 총 이동거리에서 대조군 및 EEPJ에서 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Table Ⅳ, Fig. 6).

Table Ⅳ. The Effects of EEPJ on the Locomotor Activity in the OFT

Drugs	Dose (㎎/㎏)	Locomotor Activity (㎝)
Vehicle		1544.95 ± 54.33
Diazepam	1	1543.95 ± 91.82
EEPJ	50	1548.23 ± 80.42
	100	1601.10 ± 66.69
	200	1445.38 ± 67.06
	400	1447.53 ± 45.44

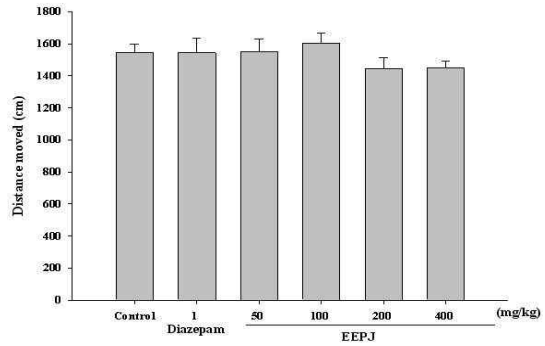


Fig. 10. The effect of EEPJ and diazepam on the locomotor activity in the OFT over 5min test in mice.
Each bar represents mean ± SEM obtained from 8-10 mice.

4. Forced swimming test

EEPJ의 항우울 작용을 확인하기 위하여 FST를 이용하여 부동자세 시간을 측정하였다. 대조군의 경우 immobility time이 211.88 ± 3.70초로 나타났고, 양성대조군인 imipramine(15㎎/㎏, i.p.)인 경우 129.46 ± 10.29초로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였음을 알 수 있었다. 또한 EEPJ 50㎎/㎏ 투여군에서 immobility time이 181.54 ± 7.88초로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였음을 관찰할 수 있었다(Table Ⅴ, Fig. 7, $P < 0.05$).

Table Ⅴ. Inhibitory Effect of EEPJ on the Duration of Immobility by FST

Drugs	Dose (㎎/㎏)	Duration of immobility (sec)
Vehicle		211.88 ± 91.82
Imipramine	15	129.46 ± 3.70*
EEPJ	12.5	207.56 ± 10.29
	25	200.68 ± 6.88
	50	181.54 ± 7.88*
	100	215.57 ± 4.42
	200	203.20 ± 7.81

Data are expressed as mean ± SEM(n=8-10 per group)

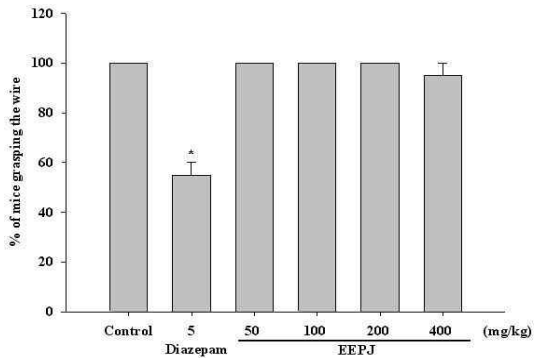


Fig. 11. Anti-depressive effect of single treatment with EEPJ on the FST in mice.
EEPJ was orally treated 1h prior to the test at designated dosage regimens. Imipramine was used as a positive control and intraperitoneally treated 30min prior to the test(15㎎/㎏). Data represent the mean ± SEM(n=8-10). *$P < 0.05$ versus vehicle treated group.

5. Tail suspension test

TST를 이용하여 EEPJ의 항우울 작용을 확인하였다. 대조군의 경우 immobility time이 282.83 ± 6.68초로 나타났고, 양성대조군인 imipramine (30㎎/㎏, i.p.)인 경우 162.26 ± 9.27초로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였음을 알 수 있었다. 또한 EEPJ 50㎎/㎏ 투여군에서 immobility time이 242.05 ± 8.49초로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였음을 관찰할 수 있었다(Table Ⅵ, Fig. 8, $P < 0.05$).

Table Ⅵ. Inhibitory Effect of EEPJ on the Duration of Immobility by TST

Drugs	Dose (㎎/ ㎏)	Duration of immobility (sec)
Vehicle		282.83 ± 6.68
Imipramine	30	162.26 ± 9.27*
EEPJ	12.5	269.60 ± 9.53
	25	264.36 ± 7.74
	50	242.05 ± 8.49*
	100	272.77 ± 9.99
	200	261.76 ± 6.22

Data are expressed as mean ± SEM(n=8-10 per group)

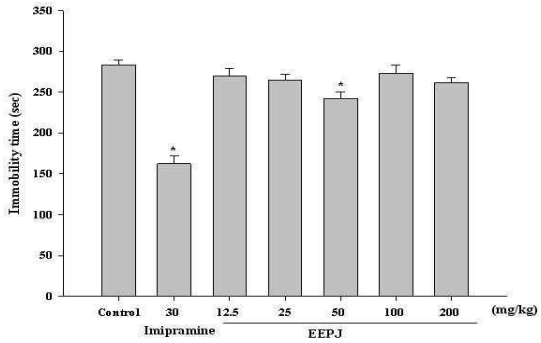


Fig. 12. Anti-depressive effect of single treatment with EEPJ on the TST in mice.
EEPJ was orally treated 1h prior to the test at designated dosage regimens. Imipramine was used as a positive control and intraperitoneally treated 30min prior to the test(30㎎/㎏). Data represent the mean ± SEM(n=8-10). *P < 0.05 versus vehicle treated group.

Ⅳ. 고 찰

고도의 경제성장이 이루어 놓은 풍요로운 물질문명과 정신문화 생활의 불균형은 많은 정신적 스트레스와 불안, 우울증 등을 초래하여 정신질환의 병태생리 조건을 형성하게 되었다. 불안 및 우울증은 현대인의 정신병 중 대부분을 차지한다고 해도 과언이 아닐 만큼 많은 사람들이 이러한 정신병 때문에 고통을 받고 있으며 실제로 높은 경제성장이 이루어진 사회에서 보다 많은 정신질환이 발병한다는 사실은 역학적인 조사에서 증명된 사실이다. 1960년대 후반부터 불안 및 우울증에 대한 생물학적 또는 화학적 연구가 진행되어 이러한 질병을 감소시킬 수 있는 많은 약물과 치료법이 개발되어 왔다[1-3].

우울증이란 어떤 기간 우울하거나 들뜨는 기분의 장애가 주축이 된 일련의 정신장애를 일컫는 기분장애 중 저조한 기분이 있는 상태를 말한다[39]. DSM-Ⅳ의 주요 우울증 삽화의 진단 기준을 보면, 적어도 2주 동안, 하루의 대부분 그리고 거의 매일 지속되는 우울기분 또는 모든 활동에 있어서 흥미나 즐거움의 상실이 필수 증상이며 다음의 부가적 증상 즉 첫째, 체중의 감소나 체중의 증가, 거의 매일 나타나는 식욕의 감소 또는 증가, 둘째, 거의 매일 나타나는 불면이나 과다한 수면, 셋째, 거의 매일 나타나는 정신 운동성 초조나 지체, 넷째, 거의 매일의 피로나 활력 상실, 다섯째, 거의 매일 무가치감 또는 과도하거나 부적절한 죄책감의 느낌, 여섯째, 거의 매일 나타나는 사고력이나 집중력의 감소 또는 우유부단함, 일곱째, 반복되는 죽음에 대한 생각, 특정한 계획 없이 반복되는 자살 생각 또는 자살기도나 자살 수행에 대한 특정 계획, 이 중 최소 4가지 이상의 증상을 경험한 경우로 정의하고 있고, 주요 우울장애는 한 번 이상의 주요 우울증 삽화로 특징지워진다[40].

지난 십 수 년 동안 의학 및 기타 생명 과학 여러 분야의 급속한 발전으로 불안 및 우울증의 본질을 분자 수준에서 이해할 수 있게 되었음에도 불구하고 불안 및 우울증의 발병율과 유병율은 지속적으로 증가하고 있으며, 뚜렷한 메커니즘이 규명되지 못하고 있으며, 정복할 수 있는 획기적인 치료법 또한 개발을 못하고 있는 실정이다. 현재 빈용되고 있는 항불안 약물은 benzodiazepine계 약물, 또는 buspirone, hydroxyzine, zolpidem 등이 있으며[41-44] 대표적인 항우울 치료제에는

TCAs, MAO inhibitors, SSRIs, 5-HT_2 blockers, mirtazapine, venlafaxine 등이 사용되어 왔으나[45-50] 장기간 사용 시, 그 부작용뿐만 아니라 내성 및 의존성 발현 등의 문제점이 발생되어 사용이 제한되어 있어서 보다 안전한 천연약물 개발의 중요성이 대두되고 있다.

또한 한방에서도 사용되고 있는 안신약물들에 대해서도 아직까지 약물들의 작용기전에 대해 여전히 불분명한 상태로 아직 사용에는 논란의 여지가 많은 상태이므로 이러한 한약재의 작용메커니즘을 밝히는 것이 시급하다고 할 수 있다. 불안 및 우울증은 여러 가지 요소들이 작용하는 복합적인 질병이므로 예방제 탐색 및 치료제 연구에서도 이러한 다단계 과정을 제대로 반영할 수 있는 신뢰성 있는 실험모델과 생체지표의 사용이 고려되어야 한다. 최근 연구에 따르면 불안 및 우울증과 연관하여 생물학적 또는 연구가 진행되어 GABA 신경계, 세로토닌 신경계, 노르아드레날린 신경계 및 neuropeptide계 등 각종 신경전달물질과의 관계에 초점이 맞추어져 왔으며 이러한 신경 화학적 지식은 새로운 치료약물의 개발에 커다란 도움을 주고 있으나, 지금까지 개발된 많은 치료 약물들은 그 부작용 등으로 인해 사용에 제한을 받고 있다[51,52].

한의학에서는 우울증과 유사한 개념을 "鬱證"으로 표현하였으며, 鬱에 대해 《內經》[9]에서 "諸氣臢鬱 皆屬於肺"라 하여 처음 소개되었으며, "久而化鬱", "日久成鬱", "伏之化鬱", "抑之鬱發"이라 하여 급성적이기보다는 만성적인 억압으로 말미암아 형성되는 舒暢, 通暢되지 못하는 상태로 설명하였다. 《醫學正傳》[53]에서 鬱證을 병증의 명칭으로 처음 채용하였고, 情志, 外邪, 飮食 등의 소인으로 일어나는 鬱證을 논하였다. 명대 이후 정신적 측면이 중시되어 《景岳全書》[10]에 이르러 怒鬱, 思鬱, 憂鬱 등의 情志之鬱이라는 개념을 설정되었다. 근대에 이르러 黃 등[54]은 "鬱이란 억울되고 침울한 정신상태로 인하여 모든 생리기능이 침체되는 현상이니 발산시킬 수 없는 욕구불만이나 지속되는 우수, 지나친 사려나 비탄이 원인이 되는 수가 많다"라 하였다.

鬱證의 증상은 心情抑鬱, 情緖不寧, 胸悶心悸, 胸腹脹滿, 焦慮緊張, 寐後夢多, 悲常欲哭, 咽中如物梗塞 등의 증상들이 특징으로서 趙[55]는 鬱證을 肝氣鬱結, 氣鬱化火, 痰氣鬱結의 實證과 久鬱傷神, 陰虛火旺의 虛證으로 나누어 다양한 증상을 열거하였는데, 實證과 虛證 모두 火에 의한 증상을 기술하고 있다. 鬱證의 초기는 氣滯와 痰濕, 食積, 熱鬱 등에 기인하여 實證이 많고, 나중에는 氣가 血에 미쳐 實證이 虛證으로 변함으로써 久鬱傷脾, 心脾俱虧, 陰虛火旺한다고 하였다[56].

본 실험에 사용한 靈神草(*Polygala japonica* Houtt)는 遠志科(Polygalaceae)에 속한 애기풀의 줄기와 잎을 건조시킨 것으로 전통적으로 거담, 진정, 진통, 해열작용이 있다고 알려져 있다[57]. 한의학에서 靈神草는 味苦하면서 微辛하며 性은 平하여 肺, 肝, 心經에 歸經하여 祛痰止咳, 散瘀止血, 寧心安神, 解毒消腫의 효능이 있어, 咳嗽痰多, 跌墮損傷, 風濕痺痛, 吐血, 便血, 心悸, 失眠, 咽喉腫痛, 腫瘤瘡瘍, 毒蛇咬傷을 主治한다고 설명하고 있다[27-29].

서양의학에서 靈神草는 천식의 만성적인 기도염증을 억제시키는 치료방법이 주효하게 응용되고 있다. 靈神草의 성분으로는 tenigenin A. B, tetracetyl-polygalitol, salicylic acid, flavonoid, senegin, senegenin, sapogenin, methyl salicylate, alkaloid 등을 함유하고 있고 약리 작용으로는 항균작용, 항염증 작용, 해열작용, 진정작용 등이 알려져 있다[58-60].

Cho 등[61]은 靈神草 추출물을 이용하여 천식이 유발된 생쥐의 염증성 면역세포에 대한 억제작

용을 확인하였고, Zhang 등[62,63]은 靈神草에서 polygalasaponin을 분리 동정하였다. 그러나 불안 및 우울증에 대한 실험연구는 보고된 바가 없다. 이에 저자는 靈神草의 祛痰, 寧心安神의 효능에 착안, 鬱證에 효과가 있을 것이라 사료되어 동물모델을 이용하여 항불안, 항우울 시험을 시행하였다.

불안에 대한 실험 연구 모델로는 geller-type이나 vogel-type의 anticonflict tests, hole-board test, social interaction test, EPM 등이 있는데 이 중 EPM은 흔히 불안 완화제나 불안 유도약물의 효과를 입증할 때 쓰이는 모델로, 좁고 어두운 곳을 선호하는 흰쥐의 특성을 이용한 것이다[64]. 벽이 설치된 closed arm 보다는 벽이 없는 open arm에서 더 많은 불안을 느끼기 때문에 불안이 많은 동물일수록 open arm에 머무는 기간이 짧다. 항불안 약물의 효능은 open arm에서 머문 시간의 연장 및 open arm으로의 진입횟수의 증가로써 평가되는데 이는 closed arm의 진입 회수 및 머문 시간의 감소로 표현된다. EPM을 이용한 본 연구에서 EEPJ 200㎎/㎏ 및 400㎎/㎏ 투여군에서 대조군에 비하여 open arm에서 머무른 시간은 증가하였고, closed arm에서 머무른 시간은 감소하였다. 특히 400㎎/㎏을 투여한 경우는 open arm에서 머무는 시간이 양성대조군으로 사용한 diazepam 투여군과 유사하게 나타났음을 관찰할 수 있었다. 또한 출입횟수는 closed arm에 출입한 횟수도 감소하였고, open arm에 출입한 횟수는 모두 증가하였다. 따라서 본 연구에서 EPM을 이용한 불안 실험동물 모델에서 EEPJ 투여의 경우 항불안 효과와 일치한다고 할 수 있다(Fig. 1). 또한 HWT에서도 diazepam 투여군에서 실험동물이 wire에 매달리는 행동이 대조군에 비해 유의성 있게 감소하고 있음에 반해 대조군과 약물투여군 사이에는 차이를 나타내지 않았다.

Locomotor activity는 실험동물의 활동성을 측정하는 것으로 약물의 항불안 및 항우울 작용이 동물의 활동성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하는 실험방법이다. EEPJ의 투여에 의해 locomotor activity가 변화되었는지 확인하기 위해 OFT용 box에서 총 이동거리를 측정한 결과 EEPJ 투여군에서 대조군과 비교 시 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 영신초가 근이완 및 행동과다의 부작용이 없으면서 항불안 작용을 갖는 것이라고 할 수 있다.

Serotonin 신경계는 raphe nucleus(봉선핵)에서 방출되는 신경섬유로서 hypothalamus와 hippocampus 및 cerebral cortex에 퍼져있는 광범위한 신경섬유이다. Serotonin은 중추신경계에 광범위하게 존재하고 있는 신경전달물질로서 정신기능의 조절에 많은 관여를 하는데, 특히 감정조절, 각성, 공격성 행동, 수면작용, 체온조절, 기억 및 학습, 통증 전달, 성행위, 음식섭취, 운동조절작용, 생물학적 리듬, 스트레스 반응과 여러 가지 신경내분비 기능, 뇌의 발달과 성숙에 관여한다고 알려져 있다[65,66]. 많이 사용되고 있는 또 다른 항불안제인 benzodiazepine계 약물의 작용기전은 억제적 신경전달물질인 GABA의 강화라고 알려져 있다. GABA는 포유류 뇌에서 중요한 억제성 신경전달 물질로 시냅스 후 $GABA_A$수용체의 복합체에서 chloride 이온의 시냅스 후 세포 내로의 투과력을 증가시킴으로써 큰 과분극을 일으켜 시냅스전달의 억제를 일으킨다. 중추신경계의 여러 부위에서 benzodiazepine류는 GABA에 의한 chloride ion의 투과력을 강화하여 간접적으로 GABA 신경전달을 촉진하는 것으로 알려졌다[67,68]. 본 실험에서는 靈神草가 어느 신경계를 경유하여 항불안 작용을 나타내는지 확인하기 위하여 specific $5\text{-}HT_{1A}$ receptor

antagonist인 WAY 100635와 $GABA_A$ receptor antagonist인 Flumazenil를 이용하여 靈神草의 항불안작용에 대한 길항작용을 확인한 결과 $5\text{-}HT_{1A}$ receptor antagonist인 WAY 100635에 의하여 靈神草의 항불안 작용이 차단되었음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 靈神草가 serotonin 신경계를 경유하여 항불안 작용을 나타내고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

또한 본 연구에서는 다양한 항우울 효능 측정 실험 가운데 FST, TST를 측정하였다. FST는 행동적 실망감 모형으로서 약물의 항우울 작용을 예측할 수 있는 타당성이 가장 큰 방법이다. 실험동물을 물이 담긴 원통에 빠뜨리면 처음에는 원통형 수조 밖으로 나가려 애를 쓰다가 결국 포기하고 후반부에 부동자세를 취하는 일종의 행동좌절(behavioral despair) 양상을 보이게 된다[31-33]. 하지만 기존의 항우울제를 FST에 앞서 사전처치하면 immobility time의 발생이 늦어지는데, 기존의 항우울제와 새로운 항우울제 후보물질을 투여한 후, 각 실험군들의 immobility time을 비교실험하여 새로운 항우울제 후보물질의 유의성을 측정하는 방법이다. 시험대상 약물이 효과가 있으면 부동자세를 취하는 시간이 감소하기 때문에 이를 토대로 약물의 효능을 검정할 수 있다. FST 결과 EEPJ 50㎎/㎏ 투여군에서 대조군에 비해 immobility time이 유의성 있게 감소되었다. TST는 Steru 등[37]이 개발한 방법으로서 꼬리가 매달린 쥐는 처음에는 활동적으로 움직이다가 스트레스로 우울해지면 가만히 있는 부동자세를 보이며 이러한 활동과 부동자세를 교대로 나타내는데 항우울 약물을 투여하면 이 immobility time을 감소시키므로 이 시간의 감소 여부를 측정하여 항우울 활성을 검증할 수 있다. TST로 immobility time을 측정한 결과 FST와 마찬가지로 EEPJ 50㎎/㎏ 투여군에서 대조군에 비해 immobility time이 유의성 있게 감소하였음을 확인할 수 있었다.

결론적으로, 본 연구의 결과에서 靈神草의 에탄올 추출물이 EPM, HWT, OFT를 통하여 locomotor activity 및 근육이완이나 진정 등의 부작용이 없으면서 항불안 작용을 나타내었으며, FST 및 TST를 통하여 우수한 항우울 작용을 가지는 약물이라고 생각되며, 약리기전은 특히 serotonin 신경계와 관련이 있음을 알 수 있었다. 향후 靈神草의 항불안 및 항우울 작용의 평가를 위하여 다양한 실험모델의 개발이 필요할 것으로 생각되며, 또한 이러한 작용에 대한 기전 연구가 더욱 상세히 진행되어져야 할 필요성이 있다고 사료된다.

Ⅴ. 결 론

우울증에 대한 靈神草의 효과를 검증하기 위하여 mice를 대상으로 항불안 및 항우울 작용을 측정하기 위한 EPM, HWT, OFT, FST, TST, 이러한 작용이 어떤 기전을 통하여 발생하는지 $5\text{-}HT_{1A}$ 및 $GABA_A$ 수용체의 antagonist를 사용하여 다음의 결론을 얻었다.

1. EPM에서 EEPJ 200 및 400㎎/㎏ 투여군에서 대조군에 비해 불안 반응 억제 효과가 유의하게 나타났고, 靈神草는 serotonin 신경계를 경유하여 항불안 작용을 나타내고 있음을 알 수 있었다.
2. HWT에서 EEPJ 투여군은 항불안 약물들의 투여로 발생하는 근육이완의 부작용이 없음을 확인할 수 있었다.
3. OFT에서 locomotor activity는 EEPJ 투여군에서 대조군에 비해 차이를 보이지 않았다.

4. FST에서 EEPJ 50㎎/㎏ 투여군에서 대조군에 비해 immobility time이 유의성 있게 감소하였다.
5. TST에서 EEPJ 50㎎/㎏ 투여군에서 대조군에 비해 immobility time이 유의성 있게 감소하였다.

이상의 실험결과로 미루어 靈神草는 실험동물에 있어 항불안 및 항우울 작용을 가진 약물로 생각되며, 향후 다양한 실험모델 개발에 의한 보다 발전적인 연구를 통하여 우울증 예방, 치료에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 신경정신과 교과서편찬위원회 편. 한의신경정신 과학. 서울:집문당. 2007:256-65, 472-86, 493-502.
2. 오세관. 신경전달물질과 뇌질환. 서울:신일상사. 2005:297-344.
3. 대한신경정신의학회 편. 신경정신과학. 서울:하나의학사. 1998:351-6.
4. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*. 1997;54(7):597-606.
5. 김용구. 우울증의 신경생물학. 대한의사협회지. 2003;9:783-93.
6. Zhang ZJ. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci*. 2004;75(14):1659-9.
7. Butler SG, Meegan MJ. Recent developments in the design of anti-depressive therapies; targeting the serotonin transporter. *Curr Med Chem*. 2008;15(17):1737-61.
8. Beaubrun G, Gray GE. A review of herbal medicines for psychiatric disorders. *Psychiatr Serv*. 2000;51(9):1130-4.
9. 홍원식 編. 精交黃帝內經素問. 서울:동양의학연구원. 1981:277, 282, 288-9, 303.
10. 張介賓. 景岳全書. 서울:행림서원. 1975:411-7, 841-2.
11. 이태희. 오수유 분획물의 항우울증 효과에 대한 연구. 대한본초학회지. 1998;13(1):139-45.
12. 김인재, 이동원. 인삼과 향부자의 항우울효과에 관한 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 2004;15(1):101-19.
13. 장미경. 수삼추출물 투여 및 향기흡입이 항우울작용에 미치는 영향에 관한 연구. 동국대학교 대학원. 2003.
14. 이덕기. 구기자의 항우울효과 및 serotonin에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2004.
15. Soo-Jeong Kim. Antidepressant-like effects of Lycium chinense Mill. and betaine in an animal model of depression. Graduate school of East-West Medical Science. Kyung Hee University. 2005.
16. 홍성유, 박선동. 시호가 우울증 모델 백서의 catecholamine에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4):235-53.
17. 이인. 녹용의 항우울효과에 관한 실험적 연구. 동국대학교 대학원. 2004.
18. 이진우. 연자육의 항우울 효과 및 프로티움 분석을 통한 기전 연구. 경희대학교 대학원. 2004.
19. 이정아, 김종우, 황의완, 곽소영, 김민정, 박은혜. Chronic Mild Stress로 유발된 우울증 모델 흰쥐에 대한 歸脾湯의 실험적 연구. 동의신경정신과학회지. 2001;12(1):123-36.
20. 조충훈. 귀비온담탕의 CMS로 유발된 우울증

모델 흰쥐에 대한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 2000.
21. 이승기, 김종우, 황의완, 김현택, 곽소영, 박은혜. 분심기음의 우울증 모델 흰쥐에 대한 실험적 연구. 대한한의학회지. 2001;22(3):129-40.
22. 임숭만. 흰쥐에 대한 보혈안신탕의 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 2001.
23. 박종흠. 천왕보심단의 항우울효과 및 monoamine 대사에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 2004.
24. 한윤승. 수비전 추출물의 항우울효과에 관한 연구. 동국대학교 대학원. 2004.
25. 김정기. 칠복음의 항우울에 대한 실험적 연구. 동국대학교 대학원. 2005.
26. 김정기. 삼정환의 항우울에 대한 실험적 연구. 동국대학교 대학원. 2005.
27. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 역. 중약대사전. 서울:도서출판 정담. 1998:424-7.
28. 吳其溶選. 植物名實圖考. 北京:世界書局印行. 1987:383.
29. 中華本草委員會. 中華本草 5권. 上海:上海科學技術出版社. 1999:57.
30. Handley SR and Tricklebank MD. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1995;327:1-5.
31. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open-closed arm entries in an Elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985;14:149-67.
32. Bonetti EP, Pieri L, Cumin R, Schaffner R, Pieri M, Gamzu ER, Muller RKM, Haefely W. Benzodiazepine antagonist Ro 15-1788: neurological and behavioral effects. *Psychopharma-cology*(Berl). 1982;78:8-18.
33. Overstreet DH, Pucilowski O, Rezvani AH, Janowsky DS. Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. *Psychopharma- cology*(Berl). 1995;121(1):27-37.
34. Porsolt RD. Animal model of depression. *Biomedicine*. 1979;30(3):139-40.
35. Brugger AJ, Brugger-Frigols I, Conesa P. Difficulties of animal experiments in psychopharmacology. Punctual aspects of antidepressants. *Rev Esp Fisiol*. 1989;45:245-54.
36. Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychophar-macology* (Berl). 2005;177(3):245-55.
37. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*(Berl). 1985;85(3):367-70.
38. Teste JF, Pelsy-Johann I, Decelle T, Boulu RG. Anti-immobility activity of different antidepressant drugs using the tail suspension test in normal or reserpinized mice. *Fundam Clin Pharmacol*. 1993;7(5):219-26.
39. 이정균 정신의학. 서울:일조각. 1994:212-55.
40. 이근후. 정신장애의 진단 및 통계편람 제4판 (DSM-Ⅳ). 서울:하나출판사. 1995:419-33.
41. Kent JM, Mathew SJ and Gorman JM. Molecular Targets in the Treatment of Anxiety. *Society of Biological Psychiatry*. 2002; 52:1008-30.
42. Uhlenhuth EH. Buspirone: a clinical review of a new, non-benzodiazepine anxiolytic. *J Clin Psychiatry*. 1982;43(12):109-16.

43. Gladney M, Stanley RT, Hendricks SE. Anxiolytic activity of chloral hydrate and hydroxyzine. *Pediatr Dent*. 1994;16(3):183-9.
44. Chouinard G, Lefko-Singh K, Teboul E. Metabolism of anxiolytics and hypnotics: benzodiazepines, buspirone, zoplicone, and zolpidem. *Cell Mol Neurobiol*. 1999;19(4):533-52.
45. Boyce P, Judd F. The place for the tricyclic antidepressants in the treatment of depression. *Aust N Z J Psychiatry*. 1999;33(3):323-7.
46. Bymaster FP, McNamara RK, Tran PV. New approaches to developing antidepressants by enhancing monoaminergic neurotransmission. *Expert Opin Investig Drugs*. 2003;12(4):531-43.
47. Segrave R, Nathan PJ. Pindolol augmentation of selective serotonin reuptake inhibitors: accounting for the variability of results of placebo-controlled double-blind studies in patients with major depression. *Hum Psychopharmacol*. 2005;20(3):163-74.
48. Cowen PJ. A role for 5-HT in the action of antidepressant drugs. *Pharmacol Ther*. 1990; 46(1):43-51.
49. Anttila SA, Leinonen EV. A review of the pharmacological and clinical profile of mirtazapine. *CNS Drug Rev*. 2001;7(3):249-64.
50. Masand PS, Gupta S. Long-term side effects of newer-generation antidepressants: SSRIS, venlafaxine, nefazodone, bupropion, and mirtazapine. *Ann Clin Psychiatry*. 2002;14(3): 175-82.
51. Sheehan DV, Sheehan KH. Current approaches to the pharmacologic treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull*. 2007;40(1) :98-109.
52. Pollack MH. Comorbid anxiety and depression. *J Clin Psychiatry*. 2005;66(8):22-9.
53. 虞搏. 醫學正傳. 서울:대성출판사. 1982:515-27.
54. 황의완, 김지혁. 동의정신의학. 서울:현대의학서적사. 1992:608-11.
55. 趙尙華. 張子琳醫療經驗選輯. 山西:山西人民出版社. 1986:88-91.
56. 李輝東, 周秀芬. 中醫精神科 臨證備要. 北京:中醫古籍出版社. 1996:108-9.
57. 정보섭, 신민교. 도해 향약(생약)대사전(약용식물편). 서울:영림사. 1995:798-9.
58. Kou J, Si M, Dai G, Lin Y, Zhu D. Antiinflammatory activity of *Polygala japonica* extract. *Fitoterapia*. 2006;77(6):411-5.
59. Li TZ, Zhang WD, Yang GJ, Liu WY, Chen HS, Shen YH. Saponins from *Polygala japonica* and their effects on a forced swimming test in mice. *J Nat Prod*. 2006;69(4):591-4.
60. Wang H, Gao J, Kou J, Zhu D, Yu B. Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. *Phytomedicine*. 2008;15(5):321-6.
61. 조은환, 서영배, 노성수. 과자금 추출물과 Cyclosporin A가 OVA로 천식이 유발된 생쥐의염증성 면역세포에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2008;23(2):87-97.
62. Zhang D, Miyase T, Kuroyanagi M, Umehara K, Ueno A. Studies on the constituents of *Polygala japonica* Houtt. I. Structures of polygalasaponins I-X. *Chem Pharm Bull*. 1995; 43(1):115-20.
63. Zhang D, Miyase T, Kuroyanagi M, Umehara K, Ueno A. Studies on the constituents of *Polygala japonica* Houtt. II. Structures of polygalasaponins XI-XIX. *Chem Pharm Bull*.

1995;43(6):966-70.

64. Imaizumi M, Onodera K. Animal models of anxiety. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2000; 115(1):5-12.
65. Moret C, Grimaldi B, Massot O, Fillion G. The role and therapeutic potential of 5-HT-moduline in psychiatry. *Semin Clin Neuropsychiatry*. 2003;8(2):137-46.
66. Gorman JM. New molecular targets for antianxiety interventions. *Clin Psychiatry*. 2003; 64(3):28-35.
67. Leung JW, Xue H. GABAergic functions and depression: from classical therapies to herbal medicine. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2003;2(6):363-74.
68. Harvey RA, Champe MJ, Mycek MJ. Lippincott's Illustrated Reviews Pharmacology, 2nd edition. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins. 2000:89-93, 119-26.