ORIGINAL ARTICLE

pISSN 1226-6396, eISSN 2234-4942
J of Oriental Neuropsychiatry 2021;32(1):25-37
https://doi.org/10.7231/jon.2021.32.1.025

JON Journal of Oriental Neuropsychiatry

# 한약처방 JSB가 구금스트레스로 우울증을 유발한 생쥐의 행동과 생체지표에 미치는 영향

신윤민#, 임형택*,#, 황은영*, 김가나*, 이원길, 김연경, 장희진, 최정준

대전대학교 한의과대학 분자의학실험실, 자하연한의원*

# Effects of JSB, a Korean Medicine, on Behaviors and Biological Factors in a Mouse Model of Depression Induced by Restraint Stress

**Younmin Shin#, Hyung Taeck Lim*,#, Eun-Young Hwang*, Ka-Na Kim*, Won Kil Lee, Yeongyeong Kim, Heejin Jang, Jeong June Choi**

Laboratory of Molecular Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University, *Jahayun Korean Medical Clinic

**Received:** October 25, 2020
**Revised:** March 11, 2021
**Accepted:** March 25, 2021

**Correspondence to**
Jeong June Choi
Laboratory of Molecular Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University, 62 Daehak-ro, Daejeon, Korea.
Tel: +82-42-280-2648
Fax: +82-42-274-2600
E-mail: c27022@dju.ac.kr
#The first two authors contributed equally to this study.

**Acknowledgement**
This research was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (NRF-2018R1A6A1A03025221) and the Ministry of Education (2020R1I1A307155911).

**Objectives:** Depression is a mood disorder showing low energy, loss of interest, anhedonia, and anxiety. It affects a patients' daily life. This disease is considered a social problem because the patient may commit suicide in extreme cases. JSB is composed of 12 Korean medicinal herbs. It has been prescribed to patients with depression. The objective of this study is to investigate anti-depressive effects of JSB on restraint stress-induced depression in a mouse model.
**Methods:** Depression was induced by restraint stress. Mice were orally administered JSB at 10, 20, or 40 mg/kg for 14 days. Forced swimming test (FST) and open field test (OFT) were performed. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA level was measured by real time-PCR. Plasma levels of corticosterone and serotonin were measured by ELISA. Blood levels of AST and ALS were measured using a biochemical analyzer.
**Results:** JSB treatment significantly reduced the immobility time in FST. BDNF mRNA level was increased by JSB treatment in the hippocampi of mice. Although the expression of TNF-α was also increased by JSB, such increase was not statistically significant. The increase of corticosterone level in plasma induced by restraint stress was significantly down-regulated by JSB. JSB reduced blood level of AST, but not ALT.
**Conclusions:** JSB has a potential to manage depression, setting a foundation for clinical application of Korean medicine with safety.

**Key Words:** Herbal medicine, Depression, Restraint stress, Brain-derived neurotrophic factor.

Copyright © 2021 by The Korean Society of Oriental Neuropsychiatry. All rights reserved.
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://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.

# I. 서론

우울장애(depressive disorder)는 우울한 기분, 즐거움 및 흥미의 저하와 함께 식욕 감소 혹은 증가, 불면 혹은 과수면, 정신운동 흥분 혹은 지체, 피로 혹은 무력감, 무가치함, 사고력 집중력 감퇴 등의 증상을 동반하고 심각한 경우 자살을 시도하는 등 사회적인 문제까지 야기하는 정신장애이다[1]. 일상생활뿐만 아니라 다양한 상황에서 겪는 스트레스는 정신적, 심리적으로 인체에 여러 가지 변화를 일으키는데 지속적으로 스트레스에 노출되면 이러한 변화는 질병으로 이어져 불안, 우울장애와 같은 정신적 장애를 유발하는 위험요소로 작용할 수 있다[2]. 1994년부터 2014년 사이에 30개국에 대한 우울증 유병률을 분석한 결과, 합계시점유병률은 12.9%, 1년유병률은 7.2%, 평생유병률은 10.8%로 나타났다[3]. 한국의 경우 2019년 시행한 국민건강영양조사(제8기 1차년도)에서 최근 1년 동안 2주 이상 연속적으로 일상생활에 지장을 줄 정도의 슬픔이나 우울감을 느꼈다고 답한 비율이 10.5%였으며 70대 이상의 노인들과 19~29세의 젊은 나이에서 가장 많이 경험하였다[4]. 또한 2012년 조사에 의하면 우울장애 환자의 의료비용은 1,273,045원이었고 치료저항성이 있는 경우 6,610,487원으로 더 많은 비용을 지출하여 개인뿐만 아니라 사회적인 경제부담으로 작용하고 있다[5]. 이처럼 우울장애는 개인의 건강에 영향을 미칠뿐만 아니라 사회적 손실을 유발하므로 이를 적극적으로 대응해야할 필요성이 꾸준히 제기되고 있다.

우울증을 유발하는 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나 현재 가장 널리 받아들여지고 있는 대표적인 병리기전은 중추신경계에서 세로토닌, 도파민 등 모노아민 계열 신경전달물질의 감소 또는 결핍이다[6]. 이외에도 세로토닌 수용체와 세로토닌 이동 단백질에 변이가 나타나거나 발현량이 줄어들어도 우울증이 유발된다[7,8]. 도파민의 결핍도 우울증상을 유발하는데 주요우울장애 환자의 꼬리핵(caudate nucleus) 영역은 도파민 결핍으로 뇌기능이 저하되어 있으며 이는 대뇌의 보상체계를 붕괴하여 무욕구, 무기력의 증상을 유발한다[9]. 또 다른 기전으로는 시상하부-뇌하수체-부신피질(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)축이 비정상적으로 반응하는 것으로 스트레스에 더 취약하게 만들어 보상에 대한 감정 저하, 식욕과 성욕의 감퇴, 인지기능의 저하의 증상을 동반하는 기분장애를 유발하게 된다[10]. 최근 대두되고 있는 우울증 병리기전은 면역계의 이상에 의한 것으로 IL-6, TNF-$\alpha$와 같은 사이토카인 및 CRP 단백질의 발현이 주요우울장애 환자에서 증가되어 있으며 이러한 과도한 면역반응은 자살행동까지 유발하는 것으로 제시되었다[11]. 이처럼 우울증의 병리기전으로 제시된 신경전달물질의 감소와 HPA축 호르몬의 과반응, 면역매개물질의 과발현은 서로 네트워크를 형성하고 상호간 영향을 주고받으며 우울증의 유발에 함께 관여하기도 한다.

현재 임상에서 사용되는 우울증 치료제들은 모노아민 계열 신경전달물질의 분비를 조절하여 증상을 개선하는데 초점이 맞추어져 있다. 가장 널리 사용되는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(selective serotinon reuptake inhibitors, SSRIs)를 비롯하여 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressants, TCAs), 모노아민 산화효소 억제제(monoamine oxidase inhibitors, MAOIs) 등은 시냅스에서 신경전달물질 작용시간을 연장하여 우울증을 개선하는데 어느 정도 도움을 주는 것으로 알려져 있다[12]. 하지만 이러한 항우울제제들은 낮은 회복률에 비해 두통, 불면, 식욕감소, 성기능장애, 기립성 저혈압 등의 부작용을 유발하고 항우울제에 반응을 하지 않는 환자가 다수 존재하는 문제가 있다[13]. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해 최근 효능이 우수하면서도 부작용이 적은 한약기반의 항우울제에 대한 연구개발의 필요성이 제기되고 있다. 항우울 효과를 제시한 기존 복합처방 한약의 연구에서는 천왕보심단(天王補心丹), 사역산(四逆散), 온담탕가오약(溫膽湯加烏藥), 분심기음가미방(分心氣飮加味方), 가미귀비탕(加味歸脾湯), 소오침탕가감방(小烏沈湯加減方, SOCG), JG02 등이 세로토닌과 노르에피네프린 등 모노아민의 발현을 증가하여 항우울 효과를 나타냄이 연구되었으며, HPA축에 관여하는 호르몬인 코르티코스테론, CRF, ACTH을 감소시켜 항우울 효과를 나타낸 한약으로는 고암심신환거주사방(古庵心腎丸去朱砂方), 청화보심탕(淸火補心湯), 황련해독탕(黃連解毒湯), 반하후박탕(半夏厚朴湯), 온담탕가오약(溫膽湯加烏藥), 소오침탕가감방(小烏沈湯加減方) 등이 있었다[14-16]. 또한 AMPA GluR1 발현 증가를 통한 조위승청탕(調胃升淸湯)의 신경가소성 활성화와 혈당조절 능력을 통한 반하후박탕(半夏厚朴湯)의 항우울 효과, 그리고 소요산(逍遙散)이 chronic unpredictable mild stress 우울증 동물모델에서 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)를 상승시킨 것을 보고하여 한약이 다중표적 항우울제로 활

용될 수 있는 가능성이 제기되었다[14].

울증은 우울, 사려과도, 번뇌, 긴장 등의 정신적 스트레스로 인해 간(肝), 비(脾), 심(心)에 장애가 온 것으로 보고 있다[17]. 한국의 우울장애 환자는 소화기 계통, 심장계통 증상을 위시한 신체 증상, 건강염려증을 많이 보이며[18], 화병을 동반한 주요우울장애 환자들에게서 심음양야허증(心陰陽兩虛證)이나 심기혈양허증(心氣血兩虛證) 등 심장(心臟)과 관련된 변증에 가장 많은 환자들이 포함되는 것으로 보고되었다[19].

본 연구에서 사용된 JSB의 창방원리는 청심해울(淸心解鬱)이다. JSB의 군약은 심장으로 귀경하여 양심안신(養心安神)하는 효능을 가진 연자육(蓮子肉), 산조인(酸棗仁)이고, 신약은 소간해울(疏肝解鬱)의 효능이 있는 시호(柴胡), 청심제번사화(淸心除煩瀉火)의 효능이 있는 황련(黃連), 치자(梔子), 현삼(玄蔘), 안신의 효능이 있는 석창포(石菖蒲)와 모려(牡蠣)이다. 좌약은 자음보혈양혈(滋陰補血養血)의 효능이 있는 숙지황(熟地黃), 당귀(當歸), 백작약(白芍藥)이고, 사약은 건비이기(建碑理氣)의 효능이 있는 사인(砂仁)으로 하여 간(肝), 비(脾), 심(心)의 기능을 조절하고자 하였다. 이 처방은 걱정이 많아 우울한 경우, 불안이 심하여 가슴답답함이나 두근거림을 느끼는 경우, 생각이 많아 집중력이 떨어지고 잠을 잘 못자는 경우 등에 임상적으로 사용하고 있다.

본 연구에서는 구금스트레스를 가하여 우울증을 유발된 동물모델에 항우울 효능을 검증하고자 JSB를 경구투여하였다. 강제수영검사, 열린공간검사 등의 행동학적 변화 및 스트레스 관련 호르몬인 코르티코스테론과 세로토닌의 변화를 확인함으로써 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 대한바이오링크(Eum-seong, Korea)에서 7주령 수컷 C57BL/6 마우스(18~22 g)를 분양받아 사용하였다. 동물 사육실 환경은 12시간씩 밤낮 주기로 이루어졌으며, 약 23±1°C의 온도를 유지하도록 하였다. 실험동물은 사료와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 본 연구의 동물 실험에 관한 모든 사항 및 절차는 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인(DJUARB2019-008)을 받은 후 진행하였다.

### 2. 약재 제조

본 실험에 사용한 JSB의 구성 약재는 옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 한첩 분량의 한약재 81 g에 증류수 1 L를 넣고 약탕기를 이용하여 약 2시간 동안 열수 추출하였다(Table 1). 끓인 약재는 Whatmann No.2 여과지를 이용하여 여과시킨 후 여액은 감압증발 하였다. 동결건조하여 14.8 g의 건조분말을 얻었으며, 건조된 약재의 추출효율은 18.27%였다. 건조된 분말은 -80°C에 보관하였고 필요시 식염수에 희석하여 사용하였다.

### 3. 동물실험 설계

7주령 수컷 C57BL/6 마우스를 분양받은 뒤 무작위로 실험동물을 케이지 당 2마리씩 배정하여 7일간 동물 사육실 환경에서 적응하도록 하였다. 적응기간 후에 한 그룹당 6마리씩 무작위로 6그룹으로 나누었다. 양성대조군은 플루오세틴(20 mg/kg)을 사용하였으며, 실험군은 JSB (10, 20, 40 mg/kg)를 100 $\mu$l씩 경구투여 하였다.

구금스트레스는 50 ml 튜브(SPL Life Sciences, Korea)에 환기를 위한 구멍을 뚫고 실험동물을 한 마리씩 넣어 움직임을 제한하는 방식으로, 정상군(normal)을 제외한 모든 그룹의 실험동물에게 구금스트레스를 부여하였다. 하루 6시간씩 14일간 같은 시간에 구금스트레스를 부여하여 우울증을 유발하였다. 약물투여는 구금스트레스를 가하기 2시간 전에 실시하였다.

Table 1. The Herbal Composition of JSB

| 韓藥名 | Scientific name | Weight (g) |
|---|---|---|
| 蓮子肉 | *Nelumbo nucifera* Gaertner | 10 |
| 酸棗仁(生) | *Zizyphus jujuba* Mill | 10 |
| 熟地黃 | *Rehmannia* glutinosa | 10 |
| 當歸 | *Angelica gigas* Nakai | 8 |
| 玄蔘 | *Scrophularia buergeriana* Miq. | 8 |
| 柴胡 | *Bupleurum falcatum* Linne | 8 |
| 牡蠣 | *Ostrea gigas* Thunb. | 6 |
| 白芍藥 | *Paeonia albiflora* Pallas | 5 |
| 砂仁 | *Amomum villosum* Lour. | 5 |
| 黃連 | *Coptis chinensis* | 4 |
| 梔子 | *Gardenia jasminoides* | 4 |
| 石菖蒲 | *Acorus gramineus* Solander | 3 |
| Total amount | | 81 |

### 4. 강제수영검사(Forced Swimming Test, FST)

높이 25 cm×직경 10 cm의 원형실린더에 25±2°C 온도의 물을 15 cm까지 채웠다. 모든 실험동물은 FST 실시 전날 15분간 예비수영을 시켜 물에 적응하도록 하였다. FST 실시 당일 6분간 강제수영을 실시한 뒤 4분 동안 실험동물의 움직임을 행동테스트 측정 프로그램(SMART 3.0 Video Tracking System; PanlabS.I., Spain)을 사용하여 측정하였다. 4분 동안 실험동물이 수영 동작을 하지 않고 단순히 떠있는 동작만을 하는 부동자세를 유지하는 시간(immobility duration)을 측정하였다.

### 5. 열린공간검사(Open Field Test, OFT)

가로, 세로, 높이가 각각 30 cm×30 cm×30 cm인 정사각형의 상자틀을 이용하여 행동분석을 실시하였다. 실험시작과 동시에 실험동물을 상자 안에 내려놓은 뒤 움직인 거리를 행동테스트 측정 프로그램(SMART 3.0 Video Tracking System; PanlabS.I.)을 사용하여 15분 동안 측정하였다. 상자안의 구역을 사분면으로 나누고 각 구역에서 다른 구역으로 이동하는 횟수(zone transition number)를 측정하였다.

### 6. 실험동물 치사 및 혈장 분리

행동평가를 실시한 다음날 실험동물을 마취시킨 뒤 3 ml 크기의 주사기를 사용하여 심장에서 직접 채혈을 하였다. 혈액은 heparin vacutainer tube (BD, USA)에 넣고 흔들어주어 혈액의 응고를 방지하였다. 이후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈장을 분리하였다.

### 7. Total RNA 분리 및 cDNA 합성

실험동물의 뇌 조직을 빠르게 적출하여 분리된 해마로부터 총 함량 RNA를 다음과 같이 추출하였다. 분리된 해마에 Tri-RNA Reagent (Favorgen, Taiwan) 0.5 ml를 가하여 호모게나이저로 조직을 갈아주었다. 이 후 용액에 클로로포름 100 $\mu$l를 넣고 교반한 뒤 실온에서 3분간 방치한 후에 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액 200 $\mu$l를 새로운 튜브로 옮겨준 다음 이소프로파놀 200 $\mu$l를 넣고 용액이 잘 섞이도록 튜브를 위아래로 반복적으로 뒤집어준 뒤 실온에서 10분간 방치하였다. RNA를 침전시키고자 12,000 rpm, 4°C에 10분간 원심분리하고 상등액을 제거한 후, 75% 에탄올 1 ml을 가하여 침전된 RNA를 씻어주었다. 이 후 7,500 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 한 뒤 상등액을 제거하여 실온에서 건조시킨 후에 DEPC water (Invitrogen, USA) 20 $\mu$l를 첨가하여 RNA를 녹였다.

총 RNA를 200 ng/$\mu$l 로 맞춘 후, Easy cDNA Synthesis kit (NanoHelix, Korea)을 이용하여 제품 제조사의 매뉴얼에 따라 다음과 같이 cDNA를 합성하였다. RNA 주형 5 $\mu$l, oligo-d(T)$_{20}$ 1 $\mu$l, DEPC water 9 $\mu$l를 넣고 65°C에서 5분간 반응시킨 후에 즉시 얼음에 방치하였다. 이 후에 미리 만들어둔 혼합물(Easy 5×RT Reaction Mix 4 $\mu$l+Easy RT Enzyme Mix 1 $\mu$l)을 5 $\mu$l 씩 넣어 50°C에서 40분, 70°C에서 10분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

### 8. 실시간 정량 PCR (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction)

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), TNF-$\alpha$의 mRNA 발현을 알아보기 위해 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK)을 이용하여 실시간 정량 PCR을 실시하였고, 기기는 QuantStudio™ 3 Real Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Singapore)을 사용하였다. cDNA 1 $\mu$l와 10 $\mu$l의 2×SYBR Green PCR Master Mix, 10 pmol/$\mu$l의 농도를 가진 primer (forward+reverse) (Table 2) 0.6 $\mu$l, 그리고 DEPC water로 20 $\mu$l를 맞추었다. 모든 유전자에 대해서 95°C에서 15초, 60°C에서 60초, 2°C에서 30초간 총 40번 반복하였으며, 각 합성마다 형광 값을 기록한 뒤, Thermo Fisher Scientific에서 제공되는 Real-Time PCR instrument software로 결과를 분석하였다.

Table 2. Nucleotide Sequence of Primers

| Gene | Primer | Sequence (5'→3') |
|---|---|---|
| BDNF | Forward | GAA AGT CCC GGT ATC CAA AG |
| | Reverse | CCA GCC AAT TCT CTT TTT |
| TNF-$\alpha$ | Forward | CTG TAG CCC ACG TCG TAG C |
| | Reverse | TTG AGA TCC ATG CCG TTG |
| GAPDH | Forward | TGG CAA AGT GGA GAT TGT TG |
| | Reverse | CAT TCT CGG CCT TGA CTG TG |

### 9. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

#### 1) 코르티코스테론 측정

혈장(plasma)에 포함된 코르티코스테론의 양을 측정하기 위하여 ELISA kit (Enzo life sciences, USA)를 활용하여 제조사의 프로토콜에 따라 분석하였다. 96-well microplate에 혈장은 100 ㎕를 사용하여 상온에서 2시간 동안 항체와 반응시켰다. 이 후 plate well를 3번 세척한 뒤 pNPP substrate 200 ㎕ 넣어 상온에서 1시간 반응시켰다. Stop solution을 50 ㎕ 넣어 반응을 멈춘 후에 microplate reader (Molecular Device, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2) 세로토닌 측정

혈장에 포함된 세로토닌의 양을 측정하기 위하여 ELISA kit (Enzo life sciences, USA)를 활용하여 제조사의 프로토콜에 따라 분석하였다. 96-well microplate에 혈장 100 ㎕와 항체를 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이 후 3번 세척한 뒤 기질을 200 ㎕ 넣어 상온에서 1시간 반응시켰다. Stop solution을 50 ㎕ 넣어 반응을 멈춘 후에 microplate reader (Molecular Device, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 10. 혈당 측정

실험시작 후 주 1회 마우스의 혈당을 측정하였다. 혈당은 측정 전날 오후 6시에 식이를 제거하여 절식한 뒤 공복 15시간 후 마우스의 꼬리 미정맥에서 휴대용 혈당계(OneTouch Select Plus® Blood Glucose Meter, Johnson & Johnson, USA)를 사용하여 측정하였다.

### 11. 통계처리

모든 실험결과는 mean±SD 또는 SEM으로 기록하였으며, 통계처리는 Prism 5 (GraphicPad Software Inc., USA)을 이용하였고, Student's *t*-test로 유의성을 검증하였다. p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

## III. 결과

### 1. 행동실험(FST, OFT)

JSB가 우울증이 유발된 생쥐의 행동에 미치는 영향을 알아보고자 14일 동안 구금스트레스를 부여하면서 JSB를 농도별로 경구투여하였다. 이후 FST, OFT의 행동실험을 실시하여 우울증과 연관된 행동에 미치는 약물의 효능을 분석하였다(Fig. 1).

강제수영검사에서 실험동물이 부동자세를 유지하는 시간을 비율로 측정한 결과 정상군(Nor)은 63.98±4.55%이었으며, 구금스트레스로 인한 우울증이 유발된 대조군(Con)은 86.12±2.40%로 통계적으로 유의한 증가를 보였다. 양성대조군(PC)은 75.74±4.97%의 부동자세 유지 시간을 보였다. JSB 10, 20, 40 mg/kg 투여군은 각각 70.84±4.23%, 73.01±1.51%, 74.62±3.22%로 실험군은 유의한 감소를 보였다(Fig. 2A).

열린공간검사에서 상자안의 구역을 임의의 사분면으로 나누고 각 구역에서 다른 구역으로 이동하는 횟수를 측정한 결과 정상군은 208.50±44.15회의 구역 이동을 나타내었다. 우울증이 유발된 대조군은 163.43±47.32회의 구역이동 횟수를 보여 그 횟수가 줄었으나 fluoxetine을 투여한 양성대조군은 228.00±5.66회로 그 횟수가 증가하였다. JSB 10, 20, 40 mg/kg 투여군은 각각 167.80±41.78, 173.60±32.68, 216.00±52.01회의 구역이동 횟수를 보여 농도의존적으로 횟수가 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 2B). 위의 결과를 보면 JSB는 구금스트레스로 유발한 우울증 관련 행동을 개선하는 것으로 여겨진다.

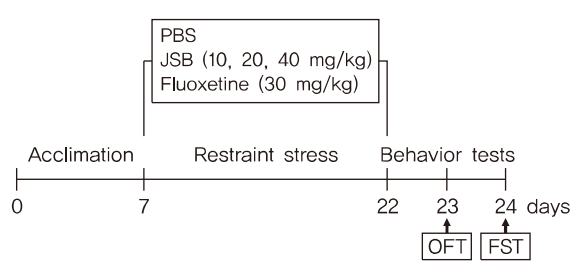



Fig. 1. Schematic diagram of experiments.
OFT: open field test, FST: forced swimming test.

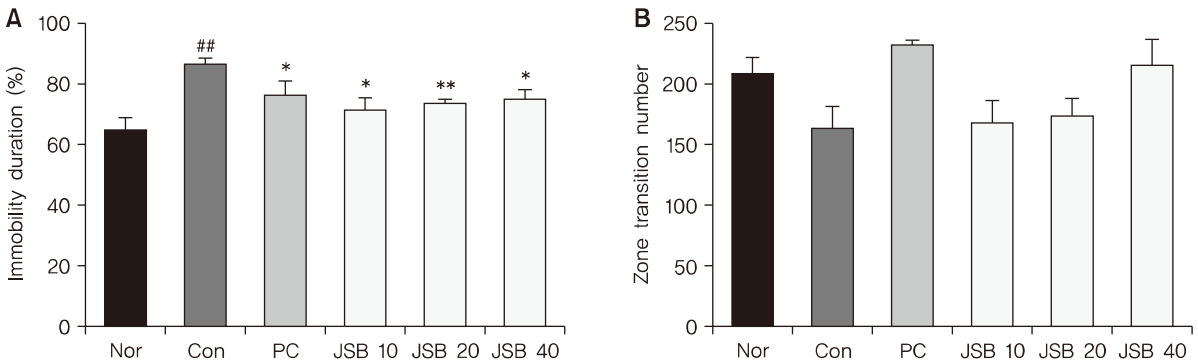



Fig. 2. Effects of JSB on depressive-like behaviors. Mice were orally administered with PBS, fluoxetine, or JSB (10, 20, 40 mg/kg) prior to restraint stress. Depression was induced by chronic restraint stress in C57BL/6 mice (n=6/group) for 14 consecutive days. (A) FST was performed and immobility duration time for 4 min was analyzed by video tracking system. (B) OFT was performed and the number of transition across asigned quadrant zones for 15 min was analyzed. Data are mean±SEM values.
Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, PC: positive control (fluoxetine). $^{\#\#}p<0.01$ vs Nor, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.05$ vs Con.

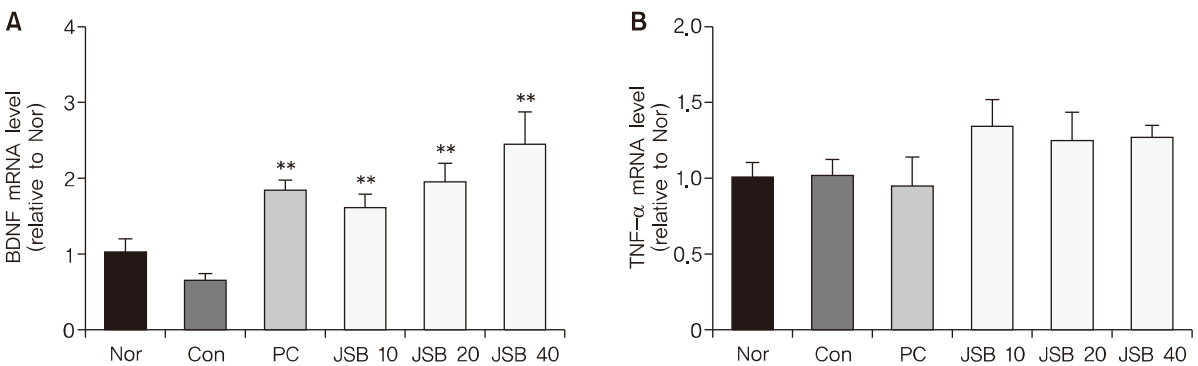



Fig. 3. Effects of JSB on expressions of BDNF and TNF-$\alpha$ in brain. Mice were orally administered with PBS, fluoxetine, or JSB (10, 20, 40 mg/kg) prior to restraint stress. Depression was induced by chronic restraint stress in C57BL/6 mice (n=6/group) for 14 consecutive days. Total mRNAs were isolated from hippocampus of mice and real-time PCR was performed using (A) BDNF and (B) TNF-$\alpha$ specific primer sets. Data are mean±SD values.
Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, PC: positive control (fluoxetine). $^{**}p<0.01$ vs Con.

## 2. BDNF와 TNF-α의 mRNA 발현 분석

JSB가 구금스트레스로 우울증이 유발된 실험동물의 해마에서 BDNF와 TNF-$\alpha$의 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보고자 Real time-PCR을 수행하였다. 해마영역에서 BDNF의 발현량을 측정한 결과 정상군(1.00±0.46배) 대비 상대적 mRNA 발현량에 있어서 대조군의 발현량은 0.63±0.22배로 감소하였다. 반면에 양성대조군은 1.82±0.38 ($p<0.01$)으로 대조군에 비하여 mRNA 발현량이 유의하게 증가하였다. JSB 10, 20, 40 mg/kg 투여군의 BDNF 발현량은 각각 1.60±0.46, 1.95±0.58, 2.43±1.10배($p<0.01$)로 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 3A).

TNF-$\alpha$의 발현량을 측정한 결과 정상대조군의 유전자 발현 1.00±0.31에 대해 대조군과 양성대조군의 발현량은 각각 1.01±0.33, 0.95±0.27로 발현량의 변화가 거의 관찰되지 않았다. JSB 10, 20, 40 mg/kg 투여군은 각각 1.34±0.44, 1.25±0.46, 1.27±0.20로 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다(Fig. 3B). 위의 결과를 보면 JSB는 구금스트레스로 인해 감소된 BDNF 발현량을 증가시키지만, TNF-$\alpha$에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

## 3. 혈장내 호르몬 발현 분석

JSB가 구금스트레스로 우울증이 유발된 생쥐에서 스트레

스와 관련된 호르몬인 코르티코스테론과 세로토닌의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 실험동물의 혈장에 존재하는 각 호르몬의 양을 ELISA로 측정하였다. 그 결과 코르티코스테론의 경우 정상군의 혈장에는 37.14±13.81 ng/ml인 반면 대조군과 양성대조군은 각각 45.69±11.64, 43.47±22.76 ng/ml의 코르티코스테론이 존재하였다. JSB 10, 20, 40 mg/kg 투여군은 각각 30.51±7.39, 28.27±9.47 ($p<0.05$), 21.17±11.43 ($p<0.05$) ng/ml로 농도의존적으로 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 4A).

세로토닌을 측정한 결과 정상군의 혈장에는 261.52±99.16 ng/ml 농도의 세로토닌이 존재하였으나, 우울증이 유발된 대조군의 혈장에는 83.61±62.65 ng/ml ($p<0.05$)로 유의하게 감소하였다. 양성대조군은 60.36±54.29 ng/ml의 세로토닌이 존재하였다. JSB 10, 20, 40 mg/kg 투여군은 각각 91.03±31.40, 108.83±70.18, 146.93±42.09 ng/ml로 대조군에 비하여 혈장 내 세로토닌의 양이 농도의존적으로 증가하였으나 유의적이지는 않았다(Fig. 4B). 위의 결과를 보면 JSB는 구금스트레스로 우울증이 유발된 생쥐에서 스트레스호르몬인 코르티코스테론의 분비를 억제하는 반면 통계적으로 유의하지 않았으나 세로토닌의 분비를 증가시켰다.

### 4. 혈당 분석

JSB 투여에 의한 혈당의 변화를 확인하고자 약물투여 후 7일과 15일째에 실험동물의 꼬리 미정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 그 결과 실험 시작 7일 후 정상군의 혈당은 87.20±26.89 mg/dl, 대조군은 99.63±23.27 mg/dl이었으며 JSB 10, 20, 40 mg/kg 투여군은 각각 89.00±16.52, 101.17±18.90, 92.50±20.30 mg/dl의 혈당으로 나타나 변화가 없었다(Fig. 5A). 약물을 15일 동안 투여한 후 혈당을 측정한 결과 정상군은 117.40±15.63 mg/dl, 대조군은 103.38±13.39 mg/dl의 혈당을 나타내었다. JSB 10, 20, 40 mg/kg 투여군의 혈당은 각각 99.67±15.12, 123.00±14.72, 124.67±14.56 mg/dl으로 나타나 JSB 20, 40 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의적으로 혈당의 농도가 증가하였다(Fig. 5B).

### 5. ALT와 AST 분석

JSB를 투여한 실험동물의 혈액 내에 존재하는 ALT와 AST의 양을 측정한 결과 ALT는 전체 그룹에서 55~60 U/L로 비슷한 농도를 나타내어 JSB에 의한 변화는 없었다(Fig. 6A). AST의 경우 정상군은 263.85±71.29 U/L이었고 대조군은 237.31±31.46 U/L로 구금스트레스에 의해 AST의 농도는 통계적으로 변화가 없었다. 그러나 JSB를 투여한 경우 10, 20, 40 mg/kg에서 각각 182.52±45.75 U/L, 156.88±14.98 U/L, 137.73±9.86 U/L로 농도의존적으로 감소하였으며 가장 높은 농도의 JSB를 투여한 그룹에서는 통계적으로 유의성있게 AST의 농도가 감소하였다.

## IV. 고찰

본 연구에서는 C57BL/6 mouse에 구금스트레스를 가하

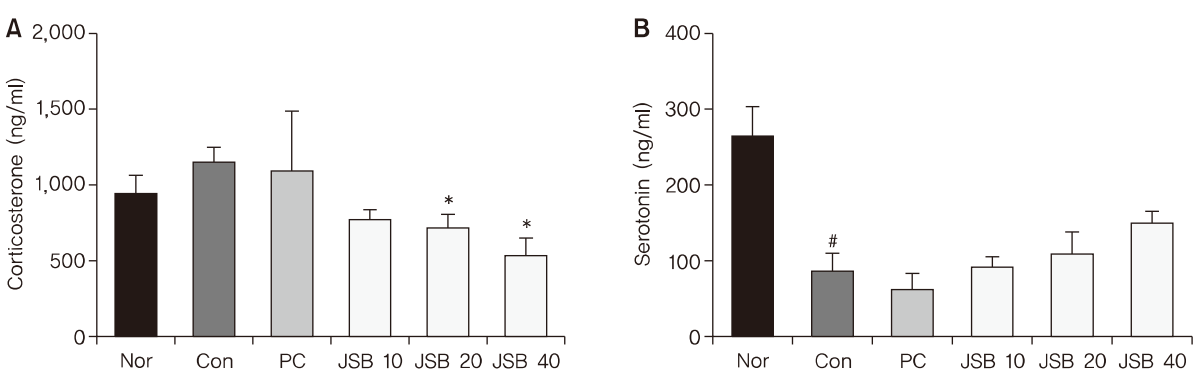



Fig. 4. Effects of JSB on the levels of corticosterone and serotonin in plasma. Mice were orally administered with PBS, fluoxetine, or JSB (10, 20, 40 mg/kg) prior to restraint stress. Depression was induced by chronic restraint stress in C57BL/6 mice (n=6/group) for 14 consecutive days. The levels of (A) corticosterone and (B) serotonin in blood plasma were measured by ELISA kits. Data are mean±SEM values.
Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, PC: positive control (fluoxetine). #$p<0.05$ vs Nor, *$p<0.05$ vs Con.

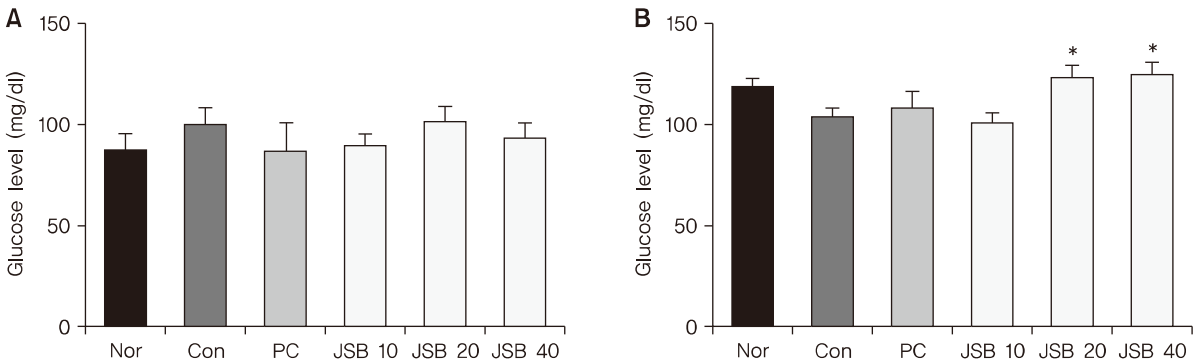



Fig. 5. Effects of JSB on the level of blood glucose. Mice were orally administered with PBS, fluoxetine, or JSB (10, 20, 40 mg/kg) prior to restraint stress. Depression was induced by chronic restraint stress in C57BL/6 mice (n=6/group) for 14 consecutive days. The level of blood glucose was measured on (A) 7 days and (B) 14 days. Data are mean±SEM values.
Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, PC: positive control (fluoxetine). *p<0.05 vs Con.

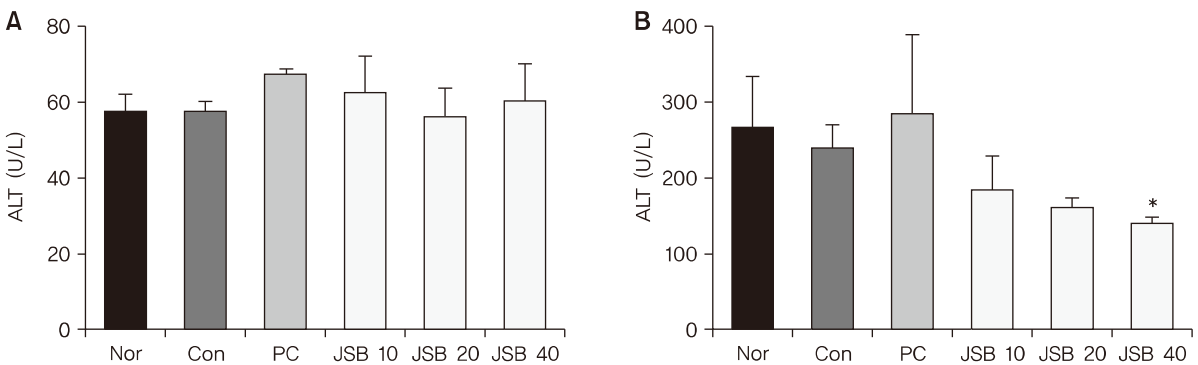



Fig. 6. Effects of JSB on the levels of ALT and AST in plasma. Mice were orally administered with PBS, fluoxetine, or JSB (10, 20, 40 mg/kg) prior to restraint stress. Depression was induced by chronic restraint stress in C57BL/6 mice (n=6/group) for 14 consecutive days. The levels of (A) ALT and (B) AST in blood plasma were measured by automatic biochemical analyzer. Data are mean±SEM values.
Nor: without restraint stress, Con: restraint stress with vehicle, PC: positive control (fluoxetine). *p<0.05 vs Con.

여 실험동물에게 불안 및 우울증 상태를 유발하고 JSB를 경구투여하여 항우울 효과를 확인하였다. 행동학적 분석은 강제수영검사, 열린공간검사를 실시하였고 스트레스 관련 호르몬인 코르티코스테론과 모노아민 계열 신경전달물질인 세로토닌의 양을 혈액에서 ELISA로 측정하였다. 또한 해마영역에서 BNDF와 TNF-$\alpha$의 mRNA 발현을 측정하고 혈당을 분석하였다. 행동분석 결과 강제수영검사에서 JSB 실험군의 모든 농도에서 부동자세 지속한 시간이 대조군에 유의적으로 감소하였다. 더욱이 양성대조군인 fluoxetine 투여군에 비해서도 부동자세 지속시간이 더 많이 감소하여 우수한 항우울 효과를 나타냈다. 또한 열린공간검사에서 대조군에 비해 JSB 40 mg/kg 실험군에서의 구역 이동횟수가 증가하여 JSB는 우울증 행동 개선에 효과가 있었다.

BDNF는 뇌의 기억력증진과 스트레스 호르몬을 억제하는 것으로 알려져 있다[20,21]. 건강한 대조군과 비교하였을 때 우울증 환자의 BDNF의 수치가 낮으며, 항우울제 치료는 BDNF의 발현을 상승시킨다[22]. 또한 BDNF는 신경세포의 재생을 도우며 시냅스 사이의 연결을 회복시키는 기능이 있고[23] 주요우울장애환자 중에서 자살 고위험군은 저위험군에 비해 BDNF의 발현이 감소되어 있다고 보고되었다[24]. 본 연구에서 JSB 10, 20, 40 mg/kg를 투여한 실험동물의 해마영역에서 BDNF 유전자의 발현이 모두 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 게다가 BDNF 유전자의 발현량은 양성대조군인 fluoxetine 투여군보다 JSB 20, 40 mg/kg 실험군에서 더 높았다. 지귤탕(枳橘湯)에 사삼(沙蔘)을 첨가한 한약인 JG02는 해마영역에서 BDNF mRNA의 발현을 증가시

키고 FST의 부동시간의 감소와 OFT에서 이동거리를 증가시키는 등의 우울관련 행동을 개선하여 항우울 효능이 있음이 연구되었다[15]. 또한 구금스트레스로 우울증이 유발된 실험동물에서 소오침탕가미방의 경구투여도 FST의 부동시간을 감소시키는 반면 OFT의 이동거리를 증가시키는 등 우울증 관련 행동을 억제하였으며, 코르티코스테론의 혈중 농도를 감소시킴과 동시에 해마의 CA1과 CA3 영역에 존재하는 BDNF 단백질의 양을 증가시키는 효능을 보였다[25]. 이외에도 동신기혈양수방[26], 윤조교심탕(潤燥交心湯)[27] 등 많은 한약들의 경구투여가 대뇌에서 BDNF의 생성을 촉진시킨다고 보고되어 JSB의 항우울 효과도 대뇌에서 BDNF 발현의 증가에 의한 것으로 추측된다.

스트레스에 의한 인체의 생리학적 반응은 HPA를 통해 조절되며 이 통로는 정신장애의 발병과 깊은 관련이 있는 것으로 제시되고 있다[10]. 스트레스에 의해 HPA가 활성화되면 이에 대항하기 위하여 스트레스 호르몬인 코티솔이 인체에서는 분비되며 실험동물에서는 코르티코스테론의 혈중 농도가 증가한다[2]. 본 연구에서 JSB 20, 40 mg/kg를 투여한 실험군은 구금스트레스에 의해 증가된 혈중 코르티코스테론의 양을 유의적으로 억제하는 효능을 나타내었다. 또한 모든 JSB 실험군은 양성대조군인 fluoxetine 투여군에 비해 코르티코스테론의 분비를 더 많이 억제하였다. 따라서 JSB는 만성 구금스트레스에 대한 HPA축의 과도한 반응을 억제하거나 스트레스에 대한 감수성을 조절하여 항우울 효과를 나타내는 것으로 여겨진다.

스트레스에 의해 분비되는 코티졸이나 코르티코스테론은 간에서 당생성을 촉진시키고 근육과 백색지방세포에서 당흡수를 억제함으로써 혈당을 상승시키는 것으로 알려져 있다[28]. 단기 구금스트레스를 준 실험동물에서는 최소 30분 이내에 코르티코스테론과 혈당이 모두 증가한다[29]. 또한 만성적으로 분비된 코르티코스테론은 대뇌의 해마영역에서 인슐린 신호에 대한 반응을 낮추거나 인슐린에 대한 저항성을 증가시킨다[30]. 이처럼 스트레스에 의한 우울증은 혈당과 인슐린저항성을 높이며 혈당조절능력의 상실을 야기한다. 본 연구에서 JSB 20, 40 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 14일에 혈당이 유의적으로 높았다. 이는 대조군에서 혈당 변화의 폭이 커지면서 JSB를 투여한 실험동물의 혈당이 대조군에 비해 상대적으로 높게 측정된 것으로 여겨진다. 대조군의 혈당은 구금스트레스 7일에 증가하였으나 14일에는 감소하는 것으로 나타나 구금스트레스에 의해 혈당 변화의 폭이 컸다. 반면 JSB를 투여한 실험군의 혈당은 비교적 안정적으로 정상군과 비슷한 수준의 혈당을 유지하였고 7일과 14일 모두 90~125 mg/dL 사이로 정상범위였다. JSB 실험군은 정상군과 같은 수준의 혈당을 유지하였으므로 본 연구에 사용한 한약이 혈당에 대한 항상성(homeostasis)을 조절하는 효능을 갖춘 것으로 예상된다. 실제로 JSB를 구성하는 숙지황[31], 당귀[32], 황련[33], 치자[34]는 당뇨모델 실험동물에서 혈당을 낮추고 인슐린 저항성을 개선하는 효능이 보고되어 있으나 JSB의 혈당조절 작용에 대한 정확한 효능과 기전은 향후 연구되어야 할 부분이다.

세로토닌은 기분조절(진정 또는 이완작용)과 섭식, 수면, 각성, 공격행동, 통각조절, 체온조절, 심혈관계 반응, 성행위, 불안, 우울 등 인간의 기본적인 여러 생리현상을 조절한다[35]. 그러나 본 연구에서 JSB에 의해 혈액 내 세로토닌의 분비량을 증가시키는 효능은 제한적인 것으로 여겨진다. 비록 대조군에 비해 JSB 실험군의 혈청 내 세로토닌의 양이 농도의존적으로 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다. 기존의 한약연구에 따르면 온담탕가오약은 우울증이 유발된 실험동물의 뇌에서 세로토닌의 분비를 증가시켜 우울증을 개선하는 것으로 보고되었고[36] 향부자가 세로토닌의 생성을 증가시킨다는 대사산물들의 간접적인 증거가 제시되어[37] 한약의 세로토닌 분비증가에 의한 항우울 효능이 보고되고 있다. 반면 P815세포주를 이용한 실험연구에서는 온담탕가미방[38]과 가미소요산[39]이 세로토닌의 생성과 관련된 대사과정을 억제하는 것으로 나타나 이들 한약의 항우울 효능이 중추신경계에서의 산화스트레스 조절과 같은 다른 작용으로 효능이 나타날 수 있음이 제시된바 있어 이와 마찬가지로 JSB의 항우울 작용이 세로토닌 경로를 거치지 않을 가능성이 있다. 그러나 본 연구에서는 말초혈액에서의 세로토닌의 농도를 측정한 실험적 한계가 있으므로 향후 우울증과 연관된 뇌의 영역에서 세로토닌의 양을 측정하는 연구를 수행하여야 JSB의 정확한 항우울 기전을 제시할 수 있을 것이다.

최근 신경염증(neuroinflammation) 반응은 우울증을 유발하는 요인의 하나로 지목되고 있다. 우울증이 유발된 실험동물의 뇌에서는 IL-6, TNF-$\alpha$ 등의 염증유발 사이토카인의 발현이 유의하게 높아진다고 보고되어 있다[40]. 이에, 본 연구에서는 JSB가 실험동물의 해마영역에서 TNF-$\alpha$ 유전자 발현에 미치는 영향에 대하여 알아보고자 mRNA 수준

에서 그 양을 측정하였다. 그 결과 모든 JSB 실험군의 해마에서 TNF-$\alpha$ 유전자의 발현이 대조군에 비해 증가하였으나 유의적이지 않았다. 그런데 본 연구에서 구금스트레스가 주어진 대조군의 해마 영역에 존재하는 TNF-$\alpha$의 mRNA는 구금스트레스가 없는 정상군과 비교하여 그 양이 증가하지 않아 구금스트레스에 의해 신경염증이 유발되지 않은 것으로 보인다. 기존의 연구에서는 실험동물을 구금스트레스 직후 안락사한 반면, 본 연구에서는 구금스트레스 이후 행동분석을 실시하고 다음날 안락사한 차이가 있어 구금스트레스 이후 시간이 지남에 따라 TNF-$\alpha$ 유전자의 양이 줄어들어 차이가 나지 않은 것으로 예상된다. 다른 연구에서도 구금스트레스가 대뇌에서 TNF-$\alpha$ 유전자의 발현을 유의적으로 증가시키지 않은 보고가 있어[41] 본 연구에서도 JSB의 항신경염증(anti-neuroinflammation) 효능을 볼 수 없었던 것으로 여겨진다. 반면 동신기혈양수방 액상스틱 파우치의 항스트레스 효능을 다른 스트레스 동물모델인 chronic mild stress가 주어진 랫드에서 평가한 연구에서는 해당 한약이 뇌에서 TNF-$\alpha$의 생성을 유의적으로 감소시키는 효과가 보고되었다[26]. 백작약, 산조인, 숙지황, 당귀, 사인, 현삼, 시호 등이 공통적으로 사용된 약재이므로 JSB도 신경염증을 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

JSB에는 연자육, 산조인, 숙지황과 함께 당귀, 현삼, 시호가 가장 큰 비율을 차지하고 있다. 연꽃의 씨앗인 연자육은 여성의 가벼운 우울증상이나 불안증 등의 치료를 위하여 한방에서 전통적으로 처방되어왔다. 연자육은 수면박탈된 실험동물의 신경세포를 산화스트레스로부터 보호하는 효능이 있음이 연구되었으며 랫트에 추출물을 투여하면 우울증 관련 행동을 개선하는데 효능을 나타내는 것이 보고되었다[42,43]. 산조인은 전기충격으로 스트레스를 유발하는 생쥐에서 코르티코스테론의 농도를 낮추는 효능이 있으며 구성성분인 sanjoinine A는 GABA 수용체의 발현을 조절하여 항불안 작용과 수면 촉진 작용을 나타낸다[44,45]. 숙지황은 조혈모세포의 분화를 촉진하여 적혈구의 생성을 촉진하는 것이 보고되었으며 뇌성상세포를 활용한 세포배양실험에서는 TNF-$\alpha$와 IL-1$\beta$의 발현을 억제하는 항염증작용이 제시되었다[46,47]. 당귀는 코르티코스테론 주입으로 우울증을 유발한 실험동물에서 FST, OFT, 상승십자미로(elevated plus maze, EPM)의 행동분석 결과 우울증 관련 행동을 개선하였으며 대뇌의 해마영역에서 BDNF의 발현을 증가시켰다[48]. 또한 당귀에서 분리한 decursin 성분은 모노아민산화효소(monoamine oxidase, MAO)의 181번 아미노산인 아스파라진과 결합함으로써 효소작용을 억제하여 항우울 효능을 나타낼 수 있음이 보고되었다[49]. 현삼을 투여한 ICR 생쥐는 OFT, EPM 연구에서 GABA 신경계를 통해 불안 또는 우울과 관련된 행동을 억제하였으며[50], 현삼에서 분리한 *E*-p-methoxycinnamic acid 및 *E*-harpagoside와 8-O-*E*-p-methoxycinnamoylharpagide (MCA-Hg)는 아세틸콜린에스터레이즈(acetylcholinesterase)의 작용을 억제하여 인지능력을 향상하는 것으로 보고되었다[51,52]. JSB의 또 다른 주요 구성약재 중 하나인 시호는 구금스트레스로 우울증을 유발한 랫드 모델에서 FST, EPM에서 항우울 행동을 개선하고 코르티코스테론의 농도를 낮출 수 있음이 제시되었다[53]. 시호의 항우울 효능은 대뇌피질, 선조제, 시상하부에서 도파민과 같은 카테콜아민(catecholamine)의 생성을 촉진하여 나타난 것으로 여겨진다[54]. JSB를 구성하는 약재에 대한 이러한 기존의 연구 결과를 종합해볼 때, JSB는 항스트레스, 항우울, 항불안의 효과가 있으며 뇌의 기억력을 증진시키고 섭식장애, 분노조절, 신체통증을 개선하고 스트레스로 인한 신체의 염증 감소에도 효능을 보일 것으로 예상된다. 또한 수면 촉진 작용이 있는 산조인을 포함하고 있어 수면에도 효과가 있을 것으로 예측되므로 향후 JSB가 우울증으로 인한 수면장애에 개선 효과를 나타내는지에 대한 추가적인 유효성 검증 및 임상연구가 필요할 것으로 보인다.

이상을 종합하면 JSB는 구금스트레스 우울증 동물모델에서 강제수영검사의 부동시간을 감소시키고 열린공간검사의 구역이동 횟수를 증가시켜 우울 관련 행동에 개선 효과를 보였다. 이러한 효과는 혈청 코르티코스테론 분비 억제와 해마 내 BDNF 유전자 발현의 증가와 연관되어 있는 것으로 보인다. 그러나 혈청 세로토닌은 JSB에 의해 유의적으로 증가하지 않았다. 다만 혈액 내 세로토닌의 양이 우울증 행동과 완벽한 상관관계를 나타내지 않는 보고가 있어[55] 향후 말초혈액 외에도 해마영역 등 중추신경계에서 분비되는 세로토닌에 대한 JSB의 효능과 함께 세로토닌의 수용체의 발현에 미치는 효과를 연구해야 할 것으로 사료된다.

비록 유의적이지는 않았으나 JSB 실험군은 대조군에 비해 TNF-$\alpha$의 mRNA 발현이 높아 항신경염증 효과를 관찰할 수 없었다. 그러나 본 연구모델에서는 TNF-$\alpha$의 유전자 발현이 구금스트레스에 의해 증가하지 않아 JSB의 중추신경

계에 미치는 항염증 작용 여부에 대한 효과는 명확하지 않았다. 따라서 향후 신경염증으로 우울증을 유발한 실험동물 모델을 활용한 연구를 통해 mRNA는 물론 단백질 수준에서 JSB가 TNF-$\alpha$ 등 신경염증 매개물질의 발현에 미치는 효과를 연구할 필요성이 있어 보인다.

## V. 결론

한약처방 JSB의 항우울 효과에 대해 알아보고자 구금스트레스를 가하여 우울증이 유발된 동물모델을 이용하여 강제수영검사, 열린공간검사를 실시하고 혈청 내 코르티코스테론 및 세로토닌 분비, 해마영역에서의 BDNF와 TNF-$\alpha$의 mRNA 발현량을 확인하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 강제수영검사에서 JSB 10, 20, 40 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 부동시간비율이 유의하게 감소하였다.

2. 열린공간검사에서 JSB 실험군이 대조군에 비해 구역이동 횟수가 증가하였으나 그 차이는 유의하지 않았다.

3. JSB 10, 20, 40 mg/kg 실험군은 대조군에 비해 해마영역에서 BDNF mRNA의 발현을 유의하게 증가시켰다.

4. JSB 실험군은 대조군에 비해 해마영역의 TNF-$\alpha$ mRNA 발현이 높았으나 유의하지 않았다.

5. 혈청 코르티코스테론 양은 JSB 20, 40 mg/kg 실험군이 대조군에 비해 유의하게 낮았다.

6. 혈청 세로토닌 양은 대조군에 비해 JSB 실험군에서 증가하였으나 그 차이는 유의하지 않았다.

7. 혈청 AST의 양은 JSB 40 mg/kg에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.

## REFERENCES


1. The Korean Society of Oriental Neuropsychiastry Textbook Compilation Committe. Oriental Neuropsychiatry. 3rd ed. Gyeonggi: Jipmoondang; 2016:476-96.
2. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat Rev Neurosci. 2005;6(6): 463-75.
3. Lim GY, Tam WW, Lu Y, Ho CS, Zhang MW, Ho RC. Prevalence of depression in the community from 30 countries between 1994 and 2014. Sci. Rep. 2018;8(1):1-10.
4. Korea Centers for Disease Control and Prevention. Korea Health Statistics 2019: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES VIII-1). 2020. 83-85
5. Shin D, Kim NW, Kim MJ, Rhee SJ, Park CHK, Kim H, Yang BR, Kim M, Choi GJ, Koh M. Cost analysis of depression using the national insurance system in South Korea: a comparison of depression and treatment-resistant depression. BMC Health Services Res. 2020;20:1-11.
6. Nutt DJ. Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. J Clin Psychiatry. 2008; 69 Suppl E1:4-7.
7. Massart R, Mongeau R, Lanfumey L. Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol Sci. 2012;367(1601):2485-94.
8. Pang TY, Du X, Zajac MS, Howard ML, Hannan AJ. Altered serotonin receptor expression is associated with depression-related behavior in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease. Hum Mol Genet. 2009; 18(4):753-66.
9. Sarchiapone M, Carli V, Camardese G, Cuomo C, Di Giuda D, Calcagni M, Focacci C, De Risio S. Dopamine transporter binding in depressed patients with anhedonia. Psychiatry Research: Neuroimaging. 2006;147(2-3):243-8.
10. Bao A, Swaab DF. The human hypothalamus in mood disorders: the HPA axis in the center. IBRO Reports. 2019; 6:45-53.
11. Beurel E, Toups M, Nemeroff CB. The bidirectional relationship of depression and inflammation: double trouble. Neuron. 2020.
12. Lanni C, Govoni S, Lucchelli A, Boselli C. Depression and antidepressants: molecular and cellular aspects. Cell Mol Life Sci. 2009;66(18):2985-3008.
13. Predictable S, Laurencic G, Malone D. Side effects of antidepressants: an overview. Cleveland Clin J Med. 2006; 73(4):351-361.
14. Han D, Kim S, Chung D. A Review of the Korean Experimental Studies on the Antidepressant Effect of Herbal Medicines. J of Oriental Neuropsychiatry. 2019;30(2):71-88.
15. You DK, Seo YK, Lee J, Kim JY, Jung J, Choi JJ, Jung IC. Antidepressant Effects of JG02 on Chronic Restraint Stress Animal Model. J of Oriental Neuropsychiatry. 2019; 30(3):209-20.
16. Jin M, Park SY, Choi HJ, Shin Y, Chun E, Jung IC, Choi JJ. So-Ochim-Tang-Gamibang, a Traditional Herbal Formula, Ameliorates Depression by Regulating Hyperactive Glucocorticoid Signaling In Vitro and In Vivo. Evid Based Complement Alternat Med. 2020;2020.
17. The Korean Society of Oriental Neuropsychiastry Textbook Compilation Committe. Oriental Neuropsychiatry. 3rd ed. Gyeonggi: Jipmoondang; 2016:251.
18. Choi M, Kim K, Kurita H, Sekine Y, Ono H, Sasaki Y. A Study on Illness Behavior of Depressed Patients. J Korean Neuropsychiatry Association. 1995;34(3):724-40.

19. Kim J, Kim S, Chung S, Park S, Byun S, Kim J, Whang W. A comparative study on pattern identification by OMS-Prime of Hwa-Byung group and Hwa-Byung with major depression double diagnosis group. J of Oriental Neuropsychiatry. 2007;18(3):1-14.
20. Gururajan A, Hill RA, van den Buuse M. Brain-derived neurotrophic factor heterozygous mutant rats show selective cognitive changes and vulnerability to chronic corticosterone treatment. Neurosci. 2015;284:297-310.
21. Naert G, Ixart G, Maurice T, Tapia-Arancibia L, Givalois L. Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress. Mol Cell Neurosci. 2011;46(1):55-66.
22. Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. Arch Gen Psychiatry. 2003;60(8):804-15.
23. Yang T, Nie Z, Shu H, Kuang Y, Chen X, Cheng J, Yu S, Liu H. The role of BDNF on neural plasticity in depression. Front Cell Neurosci. 2020;14:82.
24. Dawood T, Anderson J, Barton D, Lambert E, Esler M, Hotchkin E, Haikerwal D, Lambert G. Reduced overflow of BDNF from the brain is linked with suicide risk in depressive illness. Mol Psychiatry. 2007;12(11):981-3.
25. Choi JE, Park DM, Chun E, Choi JJ, Seo JH, Kim S, Son J, Do M, Kim SY, Park YC, Jung IC, Jin M. Control of stress-induced depressive disorders by So-ochim-tang-gamibang, a Korean herbal medicine. J Ethnopharmacol. 2017;196:141-50.
26. Choi C, Lee Y, Moon Y, Kim K. The Effects Liquid Stick Packs of Dongshingihyeolyangsubang on Stress and Sleep-Related Substance of Rats Induced by Chronic Mild Stress. J of Oriental Neuropsychiatry. 2017;28(3):231-48.
27. Kim H, Kim K. The Effects of Yunjogyosim-tang on Stress and Sleep-related Substance of Rats induced by Chronic Mild Stress. J of Oriental Neuropsychiatry. 2017;28(1):25-38.
28. Kuo T, McQueen A, Chen T, Wang J. Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. Glucocorticoid Signaling. 2015:99-126.
29. Harizi H, Homo-Delarche F, Amrani A, Coulaud J, Mormède P. Marked genetic differences in the regulation of blood glucose under immune and restraint stress in mice reveals a wide range of corticosensitivity. J Neuroimmunol. 2007;189(1-2):59-68.
30. Woo H, Hong CJ, Jung S, Choe S, Yu S. Chronic restraint stress induces hippocampal memory deficits by impairing insulin signaling. Mol Brain. 2018;11(1):1-13.
31. Zhang R, Zhou J, Jia Z, Zhang Y, Gu G. Hypoglycemic effect of Rehmannia glutinosa oligosaccharide in hyperglycemic and alloxan-induced diabetic rats and its mechanism. J Ethnopharmacol. 2004;90(1):39-43.
32. Park M, Kang S, Kim A. Hypoglycemic effect of Angelica gigas Naki extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Korean J Food & Nutr. 2009;22(2):246-51.
33. Jiang S, Du P, An L, Yuan G, Sun Z. Anti-diabetic effect of Coptis Chinensis polysaccharide in high-fat diet with STZ-induced diabetic mice. Int J Biol Macromol. 2013;55:118-22.
34. Chen Y, Cheng Y, Tzeng C, Lee Y, Chang Y, Lee S, Tsai C, Chen J, Tzen JT, Chang S. Peroxisome proliferator-activated receptor activating hypoglycemic effect of Gardenia jasminoides Ellis aqueous extract and improvement of insulin sensitivity in steroid induced insulin resistant rats. BMC Complement Altern Med. 2014;14(1):1-7.
35. Carhart-Harris RL, Nutt DJ. Serotonin and brain function: a tale of two receptors. J Psychopharmacol. 2017;31(9):1091-120.
36. Lee EH, Jung IC. Anti-Depressive Effects of OnDam-Tang with Addition of Linderae Radix (ODT-L) after Chronic Immobilization Stress in C57BL/6 Mice. J Physiol & Pathol Korean Med. 2014;28(4):403-10.
37. Lee D, Kim I. Experimental study on the antidepressant effect of Ginseng Radix Alba and Cyperi Rhizoma. J of Oriental Neuropsychiatry. 2004;15(1):101-19.
38. Seol S, Lee SR, Jung IC. The Effects of OnDam-tang-Kami-bang (ODK) in Antioxidant and Serotonin Metabolism Testing on P815 Cell. J of Oriental Neuropsychiatry. 2013;24(2):189-200.
39. Sim T, Jung I, Lee S. The effect of Gamisoyo-san (Jiaweixiaoyaosan) on serotonin metabolism. J of Oriental Neuropsychiatry. 2011;22(1):37-51.
40. Sathyanesan M, Haiar JM, Watt MJ, Newton SS. Restraint stress differentially regulates inflammation and glutamate receptor gene expression in the hippocampus of C57BL/6 and BALB/c mice. Stress. 2017;20(2):197-204.
41. Perez Nievas BG, Hammerschmidt T, Kummer MP, Terwel D, Leza JC, Heneka MT. Restraint stress increases neuroinflammation independently of amyloid $\beta$ levels in amyloid precursor protein/PS1 transgenic mice. J Neurochem. 2011;116(1):43-52.
42. Choi MH, Park IS. Neuroprotective Effect of Lilii bulbus, Nelumbins semen on the Sleep Deprivation-induced Oxidative Stress in the Hippocampus Dentate Gyrus. J Physiol & Pathol Korean Med. 2017;31(1):65-74.
43. Lee K, Cho C, Kang M, Bae H, Kim K, Shim I. The antidepressant effect of nelumbinis semen on forced swimming test in the rat. Korean J Stress Res. 2008;16(2):99-106.
44. Ma Y, Han H, Eun JS, Kim HC, Hong JT, Oh KW. Sanjoinine A isolated from Zizyphi Spinosi Semen augments pentobarbital-induced sleeping behaviors through the modification of GABA-ergic systems. Biol Pharm Bull. 2007;30(9):1748-53.
45. Han H, Ma Y, Eun JS, Li R, Hong JT, Lee MK, Oh KW.

Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from Zizyphi Spinosi Semen: possible involvement of GABAergic transmission. Pharmacol Biochem Behav. 2009;92(2): 206-13.
46. Jeong D, Seo Y. Experimental Studies on the Haematopoietic Effects of the Rehmanniae Radix Preparat. Korea J Herbology. 2001;16(1):73.
47. Jung Y, Kang H. Studies on the anti-inflammatory action of steamed Rehmannia glutinosa in central nervous system. J of Oriental Neuropsychiatry. 1999;10(2):59-70.
48. Lee B, Sur B, Shim I, Lee H, Hahm D. Angelica gigas ameliorate depression-like symptoms in rats following chronic corticosterone injection. BMC Complement Altern Med. 2015;15(1):1-13.
49. Lee HW, Ryu HW, Kang M, Park D, Lee H, Shin HM, Oh S, Kim H. Potent inhibition of monoamine oxidase A by decursin from Angelica gigas Nakai and by wogonin from Scutellaria baicalensis Georgi. Int J Biol Macromol. 2017; 97:598-605.
50. Choi Y, Jung J. Anxiolytic-like effects of Scrophularia buergeriana Miquel using the elevated plus-maze in mice: Involvement of GABAergic nervous system. J Physiol & Pathol Korean Med. 2010;24(3):476-83.
51. Kim SR, Kang SY, Lee KY, Kim SH, Markelonis GJ, Oh TH, Kim YC. Anti-amnestic activity of Ep-methoxycinnamic acid from Scrophularia buergeriana. Cognitive Brain Res. 2003;17(2):454-61.
52. Jeong EJ, Lee KY, Kim SH, Sung SH, Kim YC. Cognitive-enhancing and antioxidant activities of iridoid glycosides from Scrophularia buergeriana in scopolamine-treated mice. Eur J Pharmacol. 2008;588(1):78-84.
53. Lee B, Yun H, Shim I, Lee H, Hahm D. Bupleurum falcatum prevents depression and anxiety-like behaviors in rats exposed to repeated restraint stress. J Microbiol & Biotechnol. 2012;22(3):422-30.
54. Hong S, Park S. The effect of Bupleurum falcatum L. on the catecholamines of depression rat model. Korea J Herbology. 2003;18(4):245.
55. Saldanha D, Kumar N, Ryali V, Srivastava K, Pawar AA. Serum Serotonin Abnormality in Depression. Med J Armed Forces India. 2009;65(2):108-12.