

Elevated Plus-maze를 이용한 Phenylpropanoid의 항불안 효과

윤병훈 · 최지웅* · 정지욱 · 신진선 · 현성예 · 정재훈** · 류중훈 · 고광호*#

경희대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학, **삼육대학교 약학과
(Received September 27, 2005; Revised October 12, 2005)

Anxiolytic-like Effects of Phenylpropanoids Using the Elevated Plus-Maze in Mice

Byung Hoon Yoon, Ji Woong Choi*, Ji Wook Jung, Jin Sun Shin, Seong Ye Hyeon,
Jae Hoon Cheong**, Jong Hoon Ryu and Kwang Ho Ko*#

Department of Oriental Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University,
Hoeki-dong, Dongdaemoon-Ku, Seoul 130-701, Korea

*Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Seoul National University,
San 56-1, Shinlim-Dong, Kwanak-Gu, Seoul 151-742, Korea

**Department of Pharmacy, Sahmyook University, Nowon-Ku, Seoul 139-742, Korea

Abstract — The purpose of this study was to characterize the putative anxiolytic-like effects of phenylpropanoids using the elevated plus maze (EPM) test in mice. Cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid and ferulic acid were orally administered to male ICR mice, 1 h before behavioral evaluation in an EPM, respectively. Control mice were treated with an equal volume of vehicle, and positive control mice diazepam (1 mg/kg). A single treatment with phenylpropanoids (at 8 mg/kg) significantly increased time-spent and arm entries into the open arms of the EPM, and decreased time-spent and arm entries into the closed arms of the EPM versus control ($P < 0.05$). However, no changes in the locomotor activity and myorelaxant effect were seen in any group versus the saline control. These results suggest that phenylpropanoids may be an effective anxiolytic agent.

Keywords □ anxiety, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, elevated plus-maze

불안(anxiety)은 막연하게 어떤 위험이 닥칠 것이라는 생각 때문에 불쾌하고 가슴이 두근거리려 어찌할 바를 모르는 심리적 상태이며, 주요 증상으로는 가슴의 울렁거림, 호흡곤란, 식은땀 등의 자율신경계와 관련된 증상과 과민한 행동 서성거림 등과 같은 행동이상이다.^{1,2)} 이는 익숙하지 않은 환경에 적응하기 위한 가장 기본적인 반응이며 정상인도 위험이나 고통이 예견되거나 예기치 않은 현상에 직면하게 되면 불안을 경험하기도 하고, 성격장애나 우울증 등의 정신질환 시에 자주 나타난다.^{1,2)} 불안 및 우울, 이에 따른 불면증 등은 현대인의 정신병 중 많은 부분을 차지하고 있고, 실제로 많은 사람들이 이로 인해 고통 받고 있다.^{1,2)}

불안을 치료하는 약물에 대한 연구는 주로 오래된 약물에 대

한 재평가 및 적응증 확대뿐만 아니라 새로운 약물의 개발, 특히 5-hydroxytryptamine(5-HT) 재흡수 억제제 등을 활용한 개발에 관심이 모아지고 있다.²⁾ 현재 빈용되고 있는 약물은 benzodiazepine계 약물, buspirone, hydroxyzine, zolpidem 등이 있으나 임상적으로 항불안 효과뿐만 아니라 진정, 금단현상의 유발 등의 부작용 때문에 사용에 신중을 기해야 하는 단점이 있다.

Phenylpropanoid 계열의 화합물은 우리가 흔히 접하는 식품에 많이 함유되어 있어 활용가치가 높고 신경안정 효과가 있다면 건강기능식품으로서의 개발 가능성이 있다고 생각된다.

Yu 등은 육계가 항불안 작용이 있다고 보고한 바 있으나, 아직까지 그 구체적인 효능성분에 대한 연구는 이루어져 있지 않다.³⁾ 본 연구자들은 육계에 함유되어 있으면서 phenylpropanoid 계열 화합물 중 가장 기본적인 구조를 가지고 있는 cinnamic acid가 elevated plus-maze(EPM)를 이용한 항불안 효능 검색에서 우수한 항불안 작용이 있다는 사실로부터 본 연구에서는 cinnamic acid의 유도체인 *p*-coumaric acid, caffeic acid 및 ferulic acid의

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-880-7848 (팩스) 02-885-8211
(E-mail) khk123@snu.ac.kr

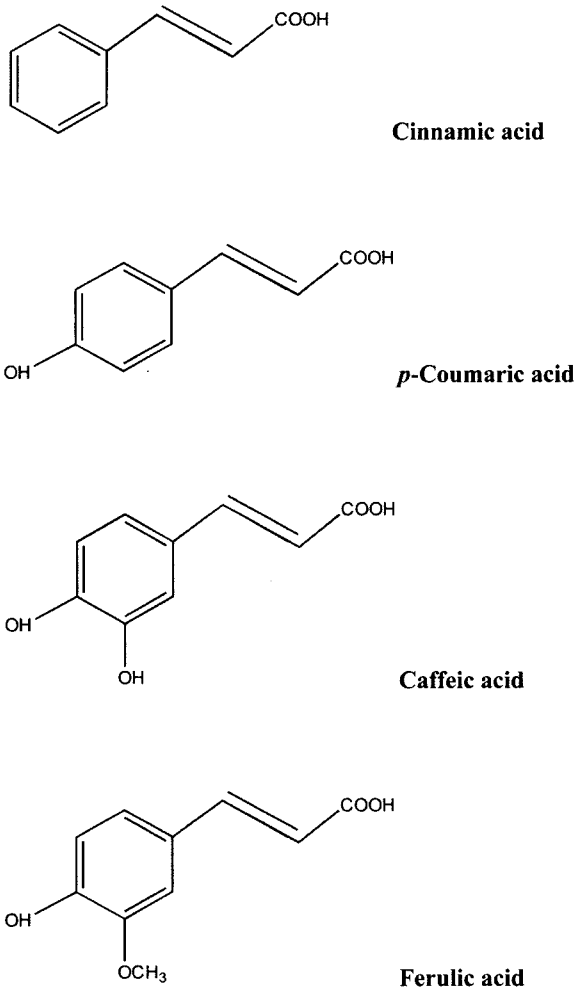


Fig. 1 - Structures of phenylpropanoids.

항불안 효과를 측정함과 동시에 치환기의 변화에 따른 활성 변화를 확인하여 우수한 항불안 작용을 갖는 물질을 도출하고자 했다. 실험에 사용된 phenylpropanoids의 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 6 주령의 수컷 ICR 생쥐를 오리엔트(주)(Seoul, Korea)사에서 공급받아 경희대학교 약학대학의 clean cage에 약 7일간 적응시켜 사용하였으며, 명암주기는 12시간씩 자동적으로 조절되는 환경에서 부드러운 깔짚이 깔린 상자에 5마리씩 사육하였다. 사육실의 온도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지되었고, 습도는 $55 \pm 10\%$ 로 하였으며, 먹이와 물은 동물들이 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

재료

Cinnamic acid, ferulic acid, caffeic acid 및 *p*-coumaric acid

는 Sigma Chemical Co.(ST, Louis, MO, USA)사에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약들은 시중에서 구입할 수 있는 최상급을 사용하였다.

항불안 효과 측정

항불안 효과는 ICR 생쥐를 이용하여 EPM에서 측정하였다. 양성대조군으로는 diazepam(1 mg/kg, i.p)을 실험 1시간 전에 투여하였고, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid 및 ferulic acid는 각각 2, 4, 8, 16 mg/kg 용량으로 경구 투여하였다. 약물 투여는 실험 시작 1시간 전에 투여가 종료되도록 하였으며 대조군은 10% Tween-80을 경구 투여하였다. 각 군은 10~12마리로 하였다.

약물 투여가 종료된 후 항불안 효과의 측정은 검정색의 아크릴로 제작된 elevated plus-maze(EPM)를 이용하였다. 이 장치는 바닥에서 50 cm 높이에 설치된 십자형(+) 미로로서, 4개의 통로 가운데 마주보는 2개(길이 30 cm, 폭 7 cm)는 개방되어 있고, 크기가 동일한 다른 2개의 통로는 높이 20 cm의 벽으로 둘러싸여 있다. 중심 platform은 가로 7 cm 및 세로 7 cm로 하였고, maze의 중앙부 천장에 비디오카메라를 설치하여 동물의 행동을 기록하였으며 광도는 30 lux로 조정하였다. 실험을 시작할 때 생쥐는 maze의 중앙에서 open arm쪽으로 머리를 향하게 하여 살며시 내려놓은 다음 maze를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 행동은 5분 간 관찰하였으며, 생쥐가 open arm과 closed arm에 머문 시간, 각 arm의 출입 횟수 및 총 이동거리 등을 EthoVision program(Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands)으로 각각 측정하여 항불안 효과를 확인하였다.^{4,5)}

Locomotor activity 측정

Locomotor activity는 자가 제조된 open field test용 box에서 측정하였다. Open field test용 box는 가로 41.5 cm, 세로 41.5 cm, 높이 43 cm가 되도록 만들었으며, 하나의 box에서 한 마리씩 측정하였다. Cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid 및 ferulic acid는 각각 2, 4, 8, 및 16 mg/kg 용량으로 실험 1시간 전에 경구 투여하였으며 대조군으로 10% Tween-80을 동일 용량으로 경구 투여하였다. 각 군은 10마리로 하였으며 Ethovision program(Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands)을 이용하여 총 이동거리를 측정하였다.

Horizontal wire test

Horizontal wire test는 ICR 생쥐를 이용하여 양쪽에 기둥을 설치하고 바닥으로부터 20 cm의 높이로 하여 직경 1 mm의 wire를 길이 15 cm로 하여 수평으로 설치하여 측정하였다. 먼저 생쥐의 꼬리를 들어 wire 위에서 생쥐가 앞발로 wire를 잡을 수 있도록 한 다음, 꼬리를 아래쪽으로 향하여 놓는다. 실험 측정은 생

쥐의 앞발을 wire에 쥐게 한 후 적어도 한쪽 뒷발이 wire를 쥐거나, 앞발로 10초 이상 wire에 매달려 있으면 통과로 인정하였다. 대조군, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid 및 ferulic acid는 각각 8 mg/kg 투여군을 elevated plus-maze 시험 완료 후, 5분 간격으로 2번의 wire test를 실시하여 2회의 평균 값을 이용하였다.⁶⁾

통계처리

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

결 과

EPM에서 phenylpropanoid의 항불안 효과

EPM을 이용한 phenylpropanoid의 항불안 효과를 Figs. 2~5에 나타내었다. Fig. 2에서 알 수 있는 바와 같이, 대조군은 open arm에 들어간 횟수와 머무는 시간에 대한 백분율이 각각 $41.14 \pm 1.82\%$, $28.18 \pm 1.28\%$ 였으며, 양성대조군인 diazepam 투여군에서는 각각 $50.37 \pm 1.62\%$, $45.51 \pm 2.13\%$ 를 보였다(Fig. 2; $P < 0.05$). Cinnamic acid와 *p*-coumaric acid는 8 mg/kg 투여군에서 open arm에 머무는 시간에 대한 백분율이 대조군에 비해 유의성있게 증가하였음을 관찰할 수 있었다(Figs. 2 및 3; $P < 0.05$). 또한 open arm에 들어간 횟수에 대한 백분율도 대조군에 비해 유의성있게 증가하였음을 관찰할 수 있었다(Figs. 2 및 3; $P <$

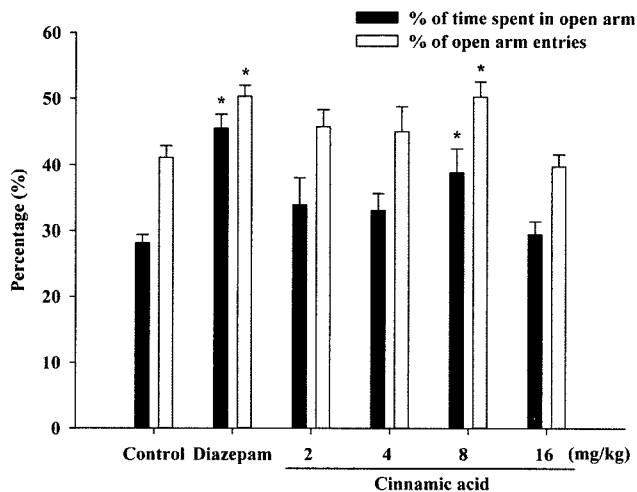


Fig. 2 – Effect of cinnamic acid on the percentage of the time spent in open arm and entries into open arm for 5-min in mice. Each bar represents mean \pm S.E.M of 10~12 mice. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($*P < 0.05$ as compared with the control group).

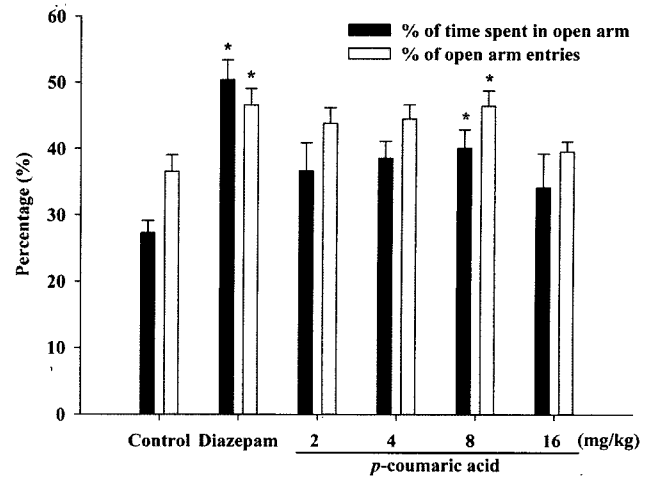


Fig. 3 – Effect of *p*-coumaric acid on the percentage of the time spent in open arm and entries into open arm for 5-min in mice. Each bar represents mean \pm S.E.M of 10~12 mice. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($*P < 0.05$ as compared with the control group).

0.05). 그러나, 그러한 효과가 뚜렷한 용량 의존성을 보이지는 않았다. 본 실험에서 사용한 최대 용량인 16 mg/kg에서는 오히려 open arm에 머무는 시간이 감소하는 경향을 나타내었다. Caffeic acid와 ferulic acid는 용량 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 8 mg/kg 및 16 mg/kg에서 대조군에 비해 유의성있게 증가함을 관찰할 수 있었다. 또한 open arm에 들어간 횟수에 대한 백분율도 대조군에 비해 유의성있게 증가함을 관찰할 수 있었다(Figs. 4 및 5; $P < 0.05$). 그러나 사용된 phenylpropanoid 화합

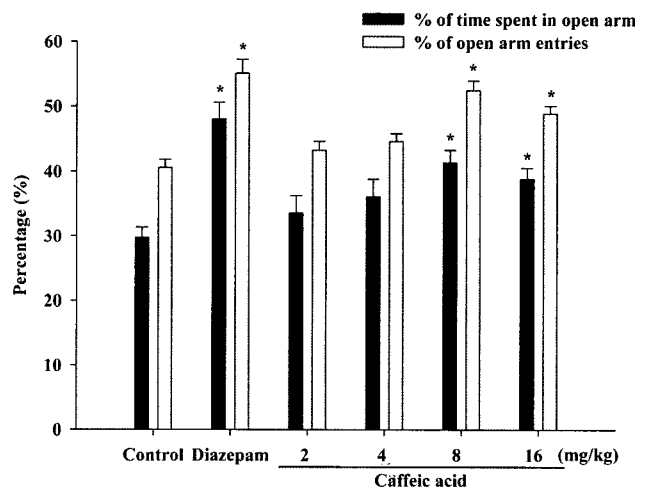


Fig. 4 – Effect of caffeic acid on the percentage of the time spent in open arm and entries into open arm for 5-min in mice. Each bar represents mean \pm S.E.M of 10~12 mice. P values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test ($*P < 0.05$ as compared with the control group).

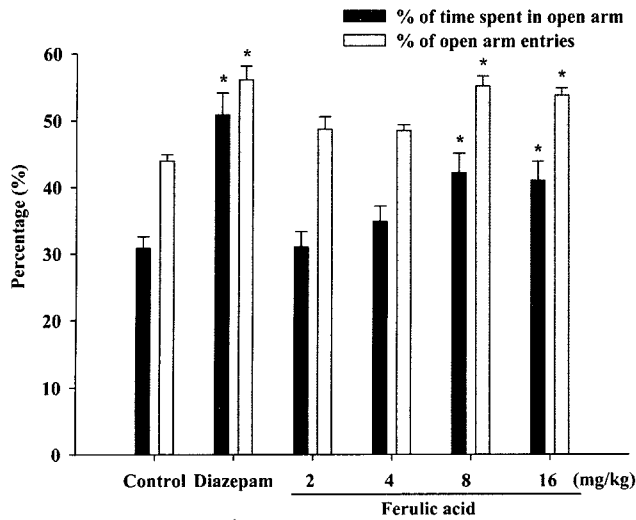


Fig. 5 – Effect of ferulic acid on the percentage of the time spent in open arm and entries into open arm for 5-min in mice. Each bar represents mean±S.E.M of 10~12 mice. *P* values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (**P*<0.05 as compared with the control group).

물의 활성은 양성 대조군으로 사용한 diazepam에는 미치지 못했다.

Open field에서의 locomotor activity

약물효과가 단순한 운동성 변화에 의한 것인지 확인하기 위해 open field에서 총 이동거리를 측정하였다. Table I에서 알 수 있

Table I – The effects of phenylpropanoid compounds on the locomotor activity in the open field test

Group	Dose (mg/kg)	Locomotor activity (cm)
Control	-	1812.18±74.77
Diazepam	1	1643.50±107.32
	2	1676.80±30.69
Cinnamic acid	4	1693.94±45.83
	8	1777.80±22.32
	16	1941.27±50.33
	2	1570.53±103.61
<i>p</i> -Coumaric acid	4	1653.47±76.32
	8	1706.01±38.88
	16	1675.85±125.90
	2	1858.60±91.20
Caffeic acid	4	1791.00±43.24
	8	1746.94±37.04
	16	1842.93±78.21
	2	1727.20±85.66
Ferulic acid	4	1751.47±102.45
	8	1980.71±138.75
	16	1881.30±51.07

Control group was treated with 10% tween-80 solution. Diazepam-treated group was used to positive control group. Data are expressed as means±S.E.M (n=10 per group).

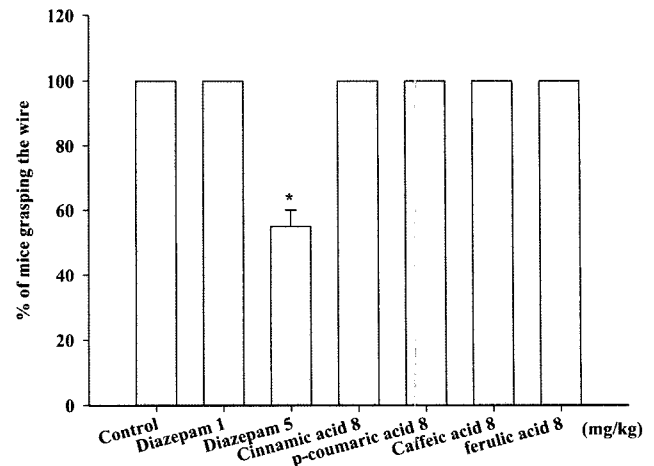


Fig. 6 – Performance of mouse in the horizontal wire test 1 hr after oral administration of the control, diazepam, cinnamic acid, caffeic acid and ferulic acid. Each bar represents mean±S.E.M of 10~12 mice. *P* values for the group comparisons were obtained by one way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test (**P*<0.05 as compared with the control group).

는 바와 같이 대조군, 양성 대조군, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid 및 ferulic acid 투여군 모두 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Table I).

Horizontal wire test

신경안정 또는 항불안 효과를 갖는 약물들의 일반적인 부작용으로 알려져 있는 근육이완 작용이 관찰되는지 확인하기 위해 horizontal wire test를 실시하였다. Fig. 6에서 알 수 있는 바와 같이 양성대조군인 diazepam 5 mg/kg 투여군에서 현저한 근육이완작용이 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid 및 ferulic acid의 8 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비해 어떠한 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 6).

고 찰

본 연구는 phenylpropanoid 구조를 가진 화합물들의 구조 변화에 의한 항불안 작용의 상관관계를 확인하고자 하였다. Cinnamic acid 및 관련화합물의 8 mg/kg 투여군에서 유의성있게 open arm에 머문 시간은 증가하고, closed arm에 머문 시간은 감소하였다. 특히, caffeic acid와 ferulic acid의 경우에 16 mg/kg 투여군에서도 같은 효과를 보였다. 자발운동량 실험에서도 총 이동거리의 변화가 없었으며, 또한 horizontal wire test에서도 대조군과 약물 투여군 사이에 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 cinnamic acid 및 이의 유도체의 경우 근이완 및 행동과다의 부작용이 없으면서 항불안 효과를 나타낸다는 것을 의미한다.

EPM은 흔히 불안 완화제나 불안유도 약물의 효과를 확인하는데 사용되는 모델로 쥐가 좁고 어두운 곳을 선호하는 습성을 이용한 것이다.⁷⁾ 벽이 설치된 closed arm보다 벽이 없는 open arm에서 더 많은 불안을 느끼므로 불안이 많을수록 open arm에 머무는 시간이 짧아진다. 항불안 약물의 검색은 open arm에서 머문 시간의 연장 및 open arm으로의 진입 횟수의 증가로 평가되는데 이는 close arm으로의 진입 횟수 및 머문 시간의 감소로 표현된다.³⁾ 본 연구에서 EPM을 이용한 불안 실험동물 모델에서 cinnamic acid 및 *p*-coumaric acid의 경우 open arm에 머문 시간 및 open arm으로의 진입 횟수가 대조군에 비하여 유의성 있게 증가됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 caffeic acid 및 ferulic acid의 경우에도 동일한 정도였다. 양성 대조군으로 사용한 diazepam의 경우 open arm에 머문 시간 비율이 $45.51 \pm 2.13\%$ 였는데, 모든 경우 여기에 미치지 못하였다. 그러나, 각 약물의 8 mg/kg의 투여군에서 open arm으로 진입한 횟수의 비율은 양성 대조군과 거의 유사한 정도로 관찰되었다. 이러한 결과는 본 연구에 사용한 cinnamic acid 유도체들은 거의 유사한 정도의 항불안 작용을 나타낸다는 것을 의미하며 phenyl기에 치환되는 수산기의 개수에 의해서 크게 영향받지 않는다는 것을 의미한다. 그러나, *m*- 위치의 -OH기 또는 -OCH₃기의 치환에 의해 유의성있는 변화는 아니었지만, 다소 효능의 상승이 관찰되었다. 이러한 사실은 phenyl기에서의 치환기 변화는 항불안 작용에 큰 영향을 미치지 않을 가능성을 제시하는 것이라고 여겨진다. 또한 본 실험에서의 각 약물은 자발운동량의 변화에 영향을 미치지 않으면서 horizontal wire test에서 측정된 근이완 작용도 나타내지 않았다.

이번 실험에 사용된 cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid는 모두 phenylpropanoid에 속하는 화합물로서 Giacomelli 등⁸⁾은 O-H 결합해리 엔탈피를 측정하여 4개의 화합물에서 공통적으로 항산화작용이 있다는 것을 확인하였으며, *in vivo* 또는 *in vitro*에서도 이러한 항산화 활성이 확인되어 있다.⁹⁻¹¹⁾ 한편, 본 연구자들은 항불안 효과 및 항산화 작용과의 상관관계를 항산화 활성이 높은 약물인 황금 추출물 및 황금의 활성 성분인 wogonin을 이용하여 확인한 결과, 이들 약물이 우수한 항불안 작용을 가지며 작용 기전은 GABA_A 수용체를 경유한다는 사실을 확인한 바 있다.¹²⁾ 그러나, 항산화 활성이 높지 않은 합환피 추출물 역시 높은 항불안 작용을 가지며, 합환피의 항불안 작용은 5-HT_{1A} 수용체를 경유한다는 사실을 확인한 바 있다.^{13,14)} 이와 같이 항산화 작용은 갖는다고 해서 항불안 작용이 반드시 나타난다고 볼 수 없다.

본 연구에서 사용한 각 약물들이 GABA_A 수용체 결합 실험에서 GABA 결합 부위에 대한 결합 활성은 전혀 관찰할 수 없었다(data not shown). 본 연구에 사용한 phenylpropanoid 계열 화합물들은 세로토닌, 도파민, 노르아드레날린과 같은 모노아민성

신경계에 대한 작용¹⁵⁾을 통하여 항불안 효과를 발현할 것으로 예측되나 아직 밝혀진바 없으므로 향후 항불안 활성이 예상되는 수용체에 대한 결합 실험으로부터 작용기전에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것이다.

결론적으로, 본 연구 결과는 phenylpropanoid 계열 화합물 중, cinnamic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid의 경우, 행동 과다 및 근이완의 부작용이 없으면서 항불안작용을 가지는 화합물이라고 생각되며, 신경 안정 효과를 갖는 건강기능식품이나 의약품으로서 개발 가능성이 충분한 천연물질을 시사하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술 개발 사업단의 연구지원(PF0320601-00)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Sandford, J. J., Argyropoulos, S. V. and Nutt, D. J. : The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1. *Pharmacol. Ther.* **88**, 197 (2000).
- 2) Argyropoulos, S. V., Sandford, J. J. and Nutt, D. J. : The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 2. *Pharmacol. Ther.* **88**, 213 (2000).
- 3) Yu, H., Cho, J., Yoo, J., Lee, K., You, I., Kim, S., Lee, S., Jang, C. : The anxiolytic-like effects of cinnamomum cassia related with 5-HT_{1A} and GABA_A receptor in the elevated plus maze. *Proceedings of the convention of the pharmaceutical society of Korea*, p. 180 (2005).
- 4) Handley, S. R. and Tricklebank, M. D. : Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **327**, 1 (1995).
- 5) Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. and Briley, M. : Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci Methods* **14**, 149 (1985).
- 6) Bonetti, E. P., Pieri, L., Cumin, R., Schaffner, R., Pieri, M., Gamzu, E. R., Muller, R. K. M. and Haefely, W. : Benzodiazepine antagonist Ro 15-1788: neurological and behavioral effects. *Psychopharmacology (Berl)*. **78**, 8 (1982).
- 7) Imaizumi, M. and Onodera, K. : Animal models of anxiety. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **115**, 5 (2000).
- 8) Giacomelli, C., Miranda Fda, S., Goncalves, N. S. and Spinelli, A. : Antioxidant activity of phenolic and related compounds : a density functional theory study on the O-H bond dissociation

- enthalpy. *Redox Rep.* **9**, 263 (2004).
- 9) Shimizu, K., Ashida, H., Matsuura, Y. and Kanazawa, K. : Antioxidative bioavailability of artemisinin in Brazilian propolis. *Arch. Biochem. Biophys.* **424**, 181 (2004).
- 10) Nitzsche, A., Tokalov, S. V., Gutzeit, H. O. and Ludwig-Muller, J. : Chemical and biological characterization of cinnamic acid derivatives from cell cultures of lavender (*Lavandula officinalis*) induced by stress and jasmonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2915 (2004).
- 11) Srinivasan, M., Rukkumani, R., Ram Sudheer, A., Menon, V. P. : Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Fundam Clin Pharmacol.* **19**, 491 (2005).
- 12) 정지옥, 안남윤, 박성환, 오진경, 오혜림, 이보경, 엄애선, 김범수, 김동현, 류중훈 : Rat에서 elevated plus-maze를 이용한 황금의 항불안 효과. *Kor. J. Pharmacogn.* **35**, 22 (2004).
- 13) Kim, W., Jung, J., Ahn, N., Oh, H., Lee, B., Oh, J., Cheong, J., Chun, H. and Ryu, J. : Anxiolytic-like effects of extracts from *Albizzia julibrissin* bark in the elevated plus-maze in rats. *Life Sci.* **75**, 2787 (2004).
- 14) Jung, J., Cho, J., Ahn, N., Oh, H., Kim, S., Jang, C. and Ryu, J. : Effect of chronic *Albizzia julibrissin* treatment on 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **81**, 205 (2005).
- 15) Nakazawa, T., Yasuda, T., Ueda, J. and Ohsawa, K. : Antidepressant-like effects of apigenin and 2,4,5-trimethoxycinnamic acid from *Perilla frutescens* in the forced swimming test. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 474 (2003).