



만성 스트레스로 유발된 우울증 쥐 모델에서 캡사이신의 항우울 효과

임재옥¹, 김민지¹, 배준범¹, 전찬혁¹, 한재현¹, 심태혁², 김연정^{1,3}

¹경희대학교 간호과학대학, ²경희대학교 일반대학원 간호학과, ³경희대학교 동서간호학 연구소

Antidepressant effects of capsaicin in rats with chronic unpredictable mild stress-induced depression

Jae Ock Lim¹, Min Ji Kim¹, Jun Beom Bae¹, Chan Hyeok Jeon¹, Jae Hyeon Han¹, Tae Hyeok Sim², Youn Jung Kim^{1,3}

¹College of Nursing Science, Kyung Hee University, Seoul, Korea

²Graduate Student, College of Nursing Science, Kyung Hee University, Seoul, Korea

³East West Nursing Institute, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Purpose: This study was conducted to assess the antidepressant effects of capsaicin in chronic depressive rats and elucidate the mechanism underlying its effects.

Methods: Male Wistar rats (280~320 g, 8 weeks of age) were subjected to depression induced by chronic unpredictable mild stresses. The rats were exposed to 8 kinds of stresses for 8 weeks. In the last 2 weeks, fluoxetine or capsaicin was injected subcutaneously. The dose of fluoxetine was 10 mg/kg (body weight), while the doses of capsaicin consisted of low (1 mg/kg), middle (5 mg/kg), and high (10 mg/kg). The forced swim test (FST) was conducted to evaluate the immobility time of rats. The immobility time indicates despair, one of symptoms of depression. The change of tryptophan hydroxylase (TPH) in the dorsal raphe was investigated using immunohistochemistry. In the hippocampus cornu ammonis (CA) 1 and 3, glucocorticoid receptor (GR) expression was measured.

Results: The immobility time in the FST was significantly lower ($p < .05$) in the low-dose ($M = 32.40 \pm 13.41$ seconds) and middle-dose ($M = 28.48 \pm 19.57$ seconds) groups than in the non-treated depressive rats ($M = 90.19 \pm 45.34$ seconds). The amount of TPH in the dorsal raphe was significantly higher ($p < .05$) in the middle-dose ($M = 249.17 \pm 35.02$) and high-dose ($M = 251.0 \pm 56.85$) groups than in the non-treated depressive rats ($M = 159.78 \pm 41.16$). However, GR expression in the hippocampus CA1 and CA3 did not show significant differences between the non-treated depressive rats and the capsaicin-injected rats.

Conclusion: This study suggests that capsaicin produces an antidepressant-like effect on chronic unpredictable mild stress-induced depression in rats via the serotonin biosynthesis pathway.

Key Words: Capsaicin; Depression; Tryptophan Hydroxylase; Glucocorticoid Receptor

주요어: 캡사이신, 우울, 세로토닌 합성효소, 글루코코르티코이드 수용체

Received: October 31, 2022

Revised: January 17, 2023

Accepted: February 10, 2023

Corresponding author:

Youn Jung Kim
College of Nursing Science, East
West Nursing Institute, Kyung
Hee University, 26 Kyungheedae-
ro, Dongdaemun-gu, Seoul 130-
701, Korea

Tel: +82-2-961-0311

Fax: +82-2-961-9398

E-mail: yj129@khu.ac.kr

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.

© 2023 Korean Society of Biological Nursing Science

서론

1. 연구의 필요성

우울증은 지속적인 슬픔과 흥미 상실로 인한 의욕 저하를 유발하여 다양한 인지적, 정신적, 신체적 증상들을 일으켜 일상 기능을 방해하는 질환을 말한다[1]. 가장 심각한 증상은 자살 사고로, 우울증 환자의 2/3에서 자살을 생각하고 10~15%에서 실제로 자살을 시행할 정도로 생명과 아주 밀접한 질환이다. 우울증과 사망의 상관관계 연구에 따르면, 우울증 환자의 약 1/3이 우울증 발병 후 1년 이내에 사망했다고 보고된다[2]. 건강보험심사평가원에 따르면 최근 5년(2017~2021년) 우울증의 진료 추이를 분석한 결과, 우울증 환자 수는 2017년 69만 1,164명에서 2021년에는 93만 3,481명으로 35.1%(연평균 7.8%) 증가하였다. 또한 인구 천 명당 우울증 환자 수를 확인한 결과, 2017년 13.3명에서 2021년 18.1명으로 36.1%(연평균 8.0%) 증가한 양상을 보였다[3]. 한편, 코로나19 팬데믹이 2년 넘게 지속되는 가운데 보건복지부에서 발표한 '2021년 코로나19 국민 정신건강 실태 조사'에 따르면, 코로나19 발생 초기인 2020년 3월 대비 자살을 생각한 사람의 비율이 40% 증가하였고, 5명 중 1명이 우울 위험에 노출되어있는 것으로 나타났다[4]. 따라서, 최근 몇 년간 우울증 유병률 증가에 대한 연구가 중요시되고 있다.

우울증의 원인은 아직 명확하게 밝혀지지는 않았지만, 여러 정신 질환과 마찬가지로 다양한 유전적, 생화학적, 심리적, 사회적, 신체적, 생물학적 요인들이 우울증을 일으킨다[5]. 특히, 뇌 속의 신경전달물질의 이상으로 인해서 발생하며, 세로토닌(serotonin), 노르에피네프린(norepinephrine), 도파민(dopamine) 등의 양이 감소하면 우울증이 발생한다는 가설이 가장 많은 지지를 받고 있다[6,7]. 특히, 필수아미노산 중 하나인 트립토판(tryptophan)에서 유도되는 세로토닌은 모노아민 신경전달 물질의 하나이며, 낮은 트립토판과 세로토닌의 수치가 우울증을 유발한다[8]. 세로토닌의 감소로 인한 우울증을 치료하기 위한 대표적인 항우울제 약물인 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs), 모노아민 산화효소 저해제(monoamine oxidase inhibitors, MAOIs), 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressants, TCAs) 등을 이용하여 신경전달물질의 불균형을 조절하려고 하였다[9]. 하지만, 항우울제는 위장 장애, 체중 감소, 졸음, 성 기능 장애 등의 지속적인 부작용을 가지고 있으며[10], 또한 SSRI 복용을 중단하게 되면 어지러움, 불면증, 신경과민, 메스꺼움 및 초조함을 포함한 부작용이 나타나기 때문에 이를 개선하기 위한 연구가 필요하다[11].

세로토닌은 뇌간에 위치한 솔기핵에서 분비되며, SSRI는 솔기핵에 작용하여 약리적 효과를 나타낸다[12]. 뒤솔기핵(dorsal raphe nuclei)은 뇌의 세로토닌성 핵(serotonergic nuclei) 중 가장 크며, 중추신경계에서 세로토닌을 가장 많이 생성하는 부위로 이곳에서 세로토닌이 합성되는 과정에는 tryptophan hydroxylase (TPH)가 관여한다[13]. 스트레스로 인해 우울증이 유발된 실험동물의 뒤솔기

핵에서 TPH 발현 및 세로토닌 생성이 억제되었고, 이는 SSRI 투여로 인해 개선되었다[14]. 따라서 TPH가 결핍된 경우, 세로토닌의 모노아민 시스템 기능 장애가 나타나며 기분 조절에 부정적인 영향을 끼친다고 볼 수 있다.

스트레스는 뇌 영역인 해마(hippocampus)에 영향을 끼쳐 해마에서의 신경세포의 사멸을 유도하며 이는 우울증 발병과 밀접하게 관련되어 있다[15]. 스트레스에 노출된 상황에서 스트레스 호르몬인 글루코코르티코이드(glucocorticoid)의 분비가 증가하는데[16], 이 호르몬의 수용체인 글루코코르티코이드 수용체(glucocorticoid receptor, GR)의 활성화가 해마의 신경세포 손실을 초래한다[17]. GR이 존재하는 해마에서 신경전달물질의 조절 및 신경 가소성에 중요한 역할을 하는 물질들의 발현이 감소하면서 세포 자멸과 위축이 일어나고 결국 뇌에 손상이 초래되어 우울증이 발생한다[18].

캡사이신(capsaicin)은 매운 식품인 고추에서 발견되어 매운맛을 내는 원인이 되며, 생물학적 효능으로 항염증, 진통, 항산화 등의 유익한 도움을 주는 것으로 보고된다[19]. 캡사이신이 함유된 매운 음식을 먹을 때 입안은 고통을 느끼게 되며, 매운맛은 미각이 아니라 고통을 느끼는 통각으로 알려져 있다[20]. 이때 입안에 생긴 통증을 완화하기 위해 엔도르핀과 아드레날린 분비가 촉진된다. 이들 호르몬은 정신적, 육체적 스트레스를 이겨낼 수 있는 진통제 역할을 하게 된다[21]. 소량의 캡사이신 투여는 동물 실험 중 절망감과 관련된 강제 수영 실험(forced swim test, FST)에서 우울 관련 행동이 개선되었고, 높은 십자형 미로(elevated plus maze, EPM)에서 항우울제 부작용인 불안 관련 행동이 나타나지 않았다[22]. 하지만, 선행연구에서의 우울증은 지질다당류[23], 약물[24], 부동[25] 등 그 원인이 단기간 작용해서 유발된 것이었다. 만성적인 우울 상태에서의 캡사이신의 효과는 검토되지 않았으며, 특히 캡사이신 투여가 항우울 효과를 나타낼 때 뇌의 뒤솔기핵에서의 세로토닌 합성효소인 TPH의 변화와 해마에서의 글루코코르티코이드 수용체인 GR의 변화를 살펴보는 연구는 되어 있지 않았다.

이에 본 연구에서는 캡사이신의 항우울 효과를 입증하기 위하여 만성 스트레스로 유발된 우울증 쥐 모델에서 캡사이신 투여에 대한 행동학적, 신경과학적 변화를 확인하고자 한다.

2. 연구의 목적

본 연구의 목적은 만성 우울증 동물모델에서 캡사이신의 항우울 효과를 확인하여 항우울제를 대체할 수 있는 효과적인 중재인지 살펴보는 것이다. 구체적인 목표는 다음과 같다.

- 1) 만성 우울증 동물모델에 캡사이신을 저농도, 중농도, 고농도로 투여하는 것이 농도에 따라 항우울 효과에 차이를 보이는지를 분석 및 확인한다.
- 2) 만성 우울증 동물모델에 캡사이신을 저농도, 중농도, 고농도로 투여하여 행동 실험을 통해서 우울 행동의 극복 효과를 나타내는지를 확인하고, 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 통해 뒤

솔기핵에서는 우울증으로 인해 감소하였던 세로토닌 합성효소인 TPH의 발현이 증가하는지를, 해마의 cornu ammonis (CA) 1과 3에서는 우울증으로 인해 증가했던 GR의 발현이 감소하는지를 분석 및 확인하여 캡사이신이 어떤 우울증 발생 기전에 작용하여 항우울 효과를 나타내는지를 밝혀낸다.

연구방법

1. 연구설계

본 연구는 만성적인 스트레스에 의해 우울증이 유발된 실험동물을 대상으로 캡사이신을 투여함으로써 어떤 행동학적, 신경과학적 변화가 일어나 항우울 효과가 나타나는지를 확인하기 위한 순수 실험연구이다. 구체적인 내용은 다음과 같이 Figure 1에 제시하였다.

2. 실험동물

수컷 Wistar 쥐 (280~320g, 8 weeks, Orient. Bio, Korea) 42마리를 군별로 표준 케이지(26 × 42 × 18 cm)에 2~3마리씩 생활하도록 하였고, 실험기간 동안 평균 온도 22 ± 1°C, 습도 60 ± 10%로 유지하였으며, 밤낮 주기(12시간 light/12시간 dark, light turn on 8 am)가 조절되는 환경에 수용하였다. 고품사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 제공하였다. 실험동물은 7마리씩 무작위로 선별해서 대조군(control, CON), 우울장애군(depression, DEP), 우울장애+항우울제군(depression+fluoxetine, DEP+Flx), 우울장애+캡사이신 저농도군(depression+capsaicin low dose, DEP+Cap L), 우울장애+캡사이신 중농도군(depression+capsaicin middle dose, DEP+Cap M), 우울장애+캡사이신 고농도군(depression+capsaicin high dose, DEP+Cap H)의 6가지 군으로 구분하였다.

3. 실험방법

1) 우울증 모델 제작(chronic unpredictable mild stress, CUMS)

16일간의 적응 기간 후에 CON군을 제외한 DEP, DEP+Flx, DEP+Cap L, DEP+Cap M, DEP+Cap H군에게는 총 42일간(Day 17~59, Day 45은 제외) 기존 선행연구를 변형하여[26,27], chronic

unpredictable mild stress (CUMS)를 시행하였다. 쥐들은 6주 동안 무작위로 계획된 다양한 사회적, 환경적 스트레스 요인들에 만성적으로 노출되었다. 증재한 요인들의 목록은 다음과 같다.

- food restriction (24시간 동안 음식을 제공하지 않음)
- water restriction (24시간 동안 물을 제공하지 않음)
- wet cage (배지가 다 젖을 정도로 물을 케이지에 추가한 채로 24시간 동안 수용시킴)
- restraint (밑변이 24cm이고 높이가 35cm인 직각삼각형 모양의 짚 주머니에 넣고 4시간 동안 움직이지 못하도록 고정함)
- cold forced swim (8±2°C의 신선한 차가운 물에서 5분간 강제수영시킴)
- tail pinch (옷핀을 꼬리 밑부분에 1cm 떨어진 곳에 놓아 쥐의 꼬리를 5분 동안 집음)
- increase housing density (24시간 동안 쥐를 케이지당 5~6마리씩 수용시킴)
- tilted cage (케이지를 수평에서 40도 기울인 채로 24시간 동안 수용시킴)

쥐들은 하루에 이러한 스트레스 요인 중 하나를 받았다(Table 1). 2일 연속 동일한 스트레스 요인을 가하지 않아 쥐들은 자극 유발을 예측할 수 없게 하였다.

2) 약물 투여

약물 투여는 피하 주사(subcutaneous injection)하였으며, 우울증 모델 확인 후 1차 FST 당일부터 CUMS는 유지한 상태로 2주 동안 매일 오후 4시 30분에 DEP+Flx군에게는 0.9% 생리식염수(normal saline)에 희석된 10 mg/kg 용량의 fluoxetine 0.1ml를 주입하였다. DEP+Cap L, DEP+Cap M, DEP+Cap H군에게는 첫 9일 동안은 15% 에탄올에, 남은 5일 동안은 50% DMSO 용액에 희석하여 각각 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg 용량의 capsaicin 0.1 ml를 투여하였다. DEP군은 투여로 인한 통증 및 스트레스를 통제하기 위하여 위와 동일한 방법으로 생리식염수 0.1 ml를 투여하였고, CON군은 아무런 약물도 투여하지 않았다.

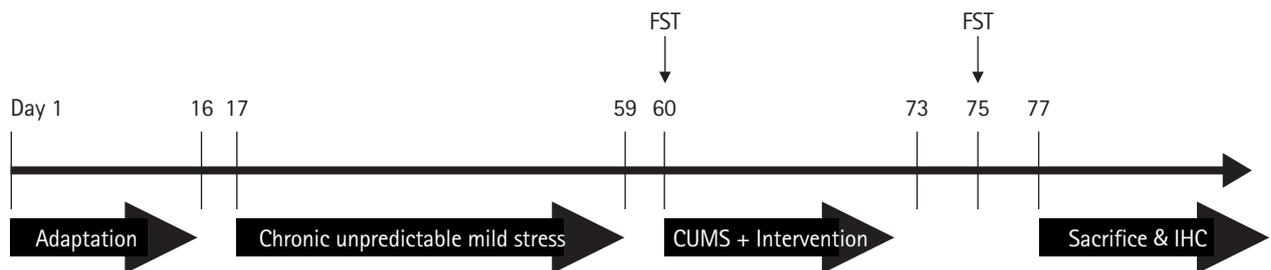


Figure 1. Experimental design. The intervention was the administration of fluoxetine or capsaicin. CUMS=chronic unpredictable mild stress; FST=forced swim test; IHC=immunohistochemistry.

Table 1. Experimental Schedule

Day 1~16	Day 17	Day 18	Day 19	Day 20	Day 21	Day 22
Adaptation	Food restriction (24 h)	Water restriction (24 h)	Wet cage (24 h)	Restraint (4 h)	Cold forced swim (5 min)	Tail pinch (5 min)
Day 23	Day 24	Day 25	Day 26	Day 27	Day 28	Day 29
Increase housing density (24 h)	Water restriction (24 h)	Tail pinch (5 min)	Wet cage (24 h)	Food restriction (24 h)	Increase housing density (24 h)	Tilted cage (24 h)
Day 30	Day 31	Day 32	Day 33	Day 34	Day 35	Day 36
Food restriction (24 h)	Tail pinch (5 min)	Cold forced swim (5 min)	Wet cage (24 h)	Food restriction (24 h)	Water restriction (24 h)	Cold forced swim (5 min)
Day 37	Day 38	Day 39	Day 40	Day 41	Day 42	Day 43
Tail pinch (5 min)	Increase housing density (24 h)	Restraint (4 h)	Wet cage (24 h)	Tilted cage (24 h)	Tail pinch (5 min)	Cold forced swim (5 min)
Day 44	Day 45	Day 46	Day 47	Day 48	Day 49	Day 50
Restraint (4 h)		Food restriction (24 h)	Tail pinch (5 min)	Increase housing density (24 h)	Restraint (4 h)	Cold forced swim (5 min)
Day 51	Day 52	Day 53	Day 54	Day 55	Day 56	Day 57
Tail pinch (5 min)	Restraint (4 h)	Increase housing density (24 h)	Restraint (4 h)	Cold forced swim (5 min)	Restraint (4 h)	Cold forced swim (5 min)
Day 58	Day 59	Day 60	Day 61	Day 62	Day 63	Day 64
Tail pinch (5 min)	Restraint (4 h)	1st FST	Tilted cage (24 h)	Water restriction (24 h)	Tail pinch (5 min)	Water restriction (24 h)
		Drug administration	Drug administration	Drug administration	Drug administration	Drug administration
		Food restriction (24 h)				
Day 65	Day 66	Day 67	Day 68	Day 69	Day 70	Day 71
Increase housing density (24 h)	Cold forced swim (5 min)	Water restriction (24 h)	Tilted cage (24 h)	Food restriction (24 h)	Restraint (4 h)	Cold forced
Drug administration	Drug administration	Drug administration	Drug administration	Drug administration	Drug administration	Swim (5 min)
						Drug administration
Day 72	Day 73	Day 74	Day 75	Day 76	Day 77	
Food restriction (24 h)	Tail pinch (5 min)		2nd FST		Sacrifice	
Drug administration	Drug administration					

FST=forced swim test; h=hours; min=minutes.

3) 체중 측정

체중 감소는 우울증의 특성 중의 하나로 우울증의 진단 기준으로 사용될 수 있으며[28], 만성 스트레스로 인한 우울증 동물모델에서도 대조군에 비해서 현저히 낮은 체중을 나타냈다[29]. CON 군과 CUMS 중재 군들(DEP, DEP+Flx, DEP+Cap L, DEP+Cap M, DEP+Cap H) 사이의 체중을 비교하기 위해 우울증 모델 제작 1주 전부터 시작해서 우울증 제작 마지막 주인 17주까지 매주 금요일마다 몸무게를 측정하였다.

4) 강제 수영 테스트(forced swim test, FST)

FST는 항우울 효과를 평가하기 위한 동물 행동 실험 중 하나이다. 쥐가 움직이지 않는 것(immobility)은 부정적인 기분과 상관관계가 있는 행동으로 해석되며, 쥐에게는 우울증 대표 증상 중 하나인 절망감을 의미한다. 원통형 수영 탱크(지름 20 cm, 높이 90 cm)에 쥐의 꼬리나 뒷발이 탱크의 바닥에 닿지 않을 만큼의 높이로

26°C 수돗물을 채웠다. 이때 실험 중에 쥐들이 서로를 볼 수 없도록 판을 사용하여 용기를 서로 분리하였다[30]. 행동 실험 24시간 전에 적응을 위해 15분간 물속에 쥐를 빠뜨려 놓았고, 당일에는 6분 동안 빠뜨렸다. 실험 후 동영상 분석하여 1차 실험에서는 처음부터 5분[26], 2차 실험에선 맨 앞의 1분을 제외하고 5분 중 부동 시간(immobility time)이 얼마만큼 차지하는지를 연구자가 직접 기록하였다[31].

FST는 실험 중 2번 시행되며, 1차는 6주차(Day 60)에 우울증 모델 확인을 위해서, 2차는 2주간의 약물 투여가 끝난 후 Day 75에 항우울 효과를 보기 위해 시행되었다.

5) 뇌 적출 및 조직처리

실험동물은 행동 실험이 종료되고 2일 후에 희생(sacrifice)시켰으며 쥐의 흉강을 열어 심장의 좌심실에 바늘을 연결하고 50 mM 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 관류시켜

혈관 내 혈액을 제거한 후 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA)가 용해된 20 mM 인산염 완충액(phosphate buffer, PB)로 뇌를 고정하였다. 뇌를 꺼내 4% PFA 고정액에 담아 43시간~52시간 동안 고정하고, 고정된 뇌 조직은 30% sucrose 용액으로 옮겨 4일간 침전시켜 냉동조직절편기(LeicaCM3050S, Leica, Berlin, Germany)를 이용하여 뇌 조직을 40 μ m 두께로 연속 관상 절편(coronal section)하여 4°C 냉장 보관하였다.

6) 면역조직화학염색(immunohistochemistry, IHC)

세로토닌 합성효소인 TPH의 발현을 확인하기 위해서 각 그룹에서 뒤술기핵 부위 조직을 꺼내고, GR의 발현을 확인하기 위해서는 해마 부위 조직을 꺼내서 각각 PBS로 5분씩 3회 세척한 후 3% H₂O₂가 용해된 PBS에서 30분간 반응시키고 기포가 사라질 때까지 충분히 세척하였다. blocking 용액에 90분간 반응시킨 후 PBS로 5분씩 3회 세척하고 나서 뒤술기핵은 1차 항체인 TPH (AB1541, 1:1000, Millipore, Darmstadt, Hessen, Germany)와 해마는 GR (SC56851, 1:500, Santa Cruz, Dallas, Texas, USA)와 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 이 조직절편을 다시 PBS 용액으로 5분씩 3회 세척한 후 2차 항체를 실온에서 2시간 동안 반응시키고 PBS로 세척하고, avidin-biotin complex (Vectastain-Elite ABC kit, Vector Laboratories, Newark, California, USA)와 2시간 동안 반응시키고 PBS로 세척하였다. 이후 발색제인 diaminobenzidine (ImmPACT DAB Substrate Kit, Vector Laboratories, Newark, California, USA)를 사용하여 10분 동안 반응시킨 후 PBS로 세척하여 조직을 슬라이드 글라스에 붙여 자연 건조하였다. 건조 후에는 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 에탄올을 이용하여 각각 5분에서 10분간 순차적으로 탈수과정을 거친 후 또 한 번 건조하였다. 그 후 조직의 투명화를 위해 xylene 처리를 5분간 2회 한 후에 permount (SP15-500, Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA)를 사용하여 커버 글라스를 덮었다. 모든 과정 후 광학현미경(BX51, Olympus, Tokyo, Japan) 10배에서 촬영하였고, 3명의 측정자가 뒤술기핵에서의 TPH의 수와 해마의 cornu ammonis (CA) 1과 CA3에서의 GR의 수를 육안으로 측정한 후 종합하여 평균값을 구하였다.

4. 자료 분석

모든 실험 결과는 SPSS 26 프로그램을 이용하여 평균, 표준편차, 표준오차를 산출하였고, independent t-test와 one-way ANOVA로 분석한 후 Tukey HSD test로 사후 검정을 하였고, 통계적 유의수준은 $p < .05$ 에서 채택하였다.

5. 윤리적 고려

본 연구는 경희대학교의 실험동물윤리 위원회의 승인을 받은 후 관련 규정에 따라 실행하였다(KHSASP-22-273). 또한, 실험동물 취급 및 모든 실험 절차는 NIH Guide for the Care and Use of

Laboratory Animals에 입각하였다[32].

연구 결과

1. 우울증 모델 확인

1) 체중 변화

모든 실험동물은 우울증 모델 제작 1주 전부터 시작해서 우울증 제작 마지막 주인 17주까지 매주 금요일마다 체중을 측정하였다. 17주에 마지막으로 측정했을 때, 체중의 변화는 CUMS 중재 군들(408.86 \pm 22.29 g)은 CON군(463.14 \pm 33.92 g)과 비교해서 체중 증가의 폭이 크지 않았다. 우울증 유도 후 CUMS 중재 군들은 CON군과 비교해서 통계적으로 유의하게 체중이 감소되었다($t = 5.38, p < .001$)(Figure 2-A).

2) 강제 수영 테스트(forced swim test, FST)

우울증 모델을 확인하기 위한 1차 FST를 시행한 결과는 Figure 2-B와 같다. CUMS 중재 군들(49.96 \pm 38.87초)은 CON군(11.03 \pm 5.12초)과 비교해서 부동시간이 통계적으로 유의하게 증가하였다($t = -5.65, p < .001$)(Figure 2-B). 우울증을 유발한 쥐들에서 부동시간이 증가하는 것으로 나타나서 우울증 동물모델이 성공적으로 제작되었음을 확인하였다.

2. 약물의 항우울효과 확인

1) 강제 수영 테스트(forced swim test, FST)

캡사이신을 투여한 후 우울증 극복 정도를 2차 FST를 통해 확인한 결과는 Figure 3-A와 같다. CON군(20.29 \pm 7.11초), DEP군(90.19 \pm 45.34초), DEP+Flx군(19.05 \pm 7.14초), DEP+Cap L군(32.40 \pm 13.41초), DEP+Cap M군(28.48 \pm 19.57초), DEP+Cap H군(47.72 \pm 51.75초) 사이의 부동시간은 통계적으로 유의하게 차이가 나타났다($F = 5.60, p = .001$). 추가로 사후 분석한 결과, DEP군은 CON군과 비교해서 유의하게 부동시간이 증가하였다($p = .001$). 하지만, DEP+Flx군($p = .001$), DEP+Cap L군($p = .011$), DEP+Cap M군($p = .006$)은 DEP군과 비교해서 유의하게 부동시간이 감소하였다. 반면, DEP+Cap H군은 DEP군과 비교해서 유의한 차이를 보이지 않았다($p = .111$)(Figure 3-A). FST를 통해 우울증 쥐 모델에서 캡사이신 저농도와 중농도를 처치한 군에서 우울증 감소의 효과가 있음을 확인하였다.

2) 뒤술기핵 부위에서 TPH 발현 확인

우울증 동물모델에서는 뒤술기핵에서 세로토닌 합성효소인 TPH의 감소가 나타나며, 면역조직화학염색을 이용하여 TPH의 발현 정도를 확인한 결과는 Figure 3-B와 같다. CON군(297.60 \pm 9.23개), DEP군(159.78 \pm 41.16개), DEP+Flx군(218.83 \pm 49.74개), DEP+Cap L군(208.39 \pm 62.24개), DEP+Cap M군(249.17

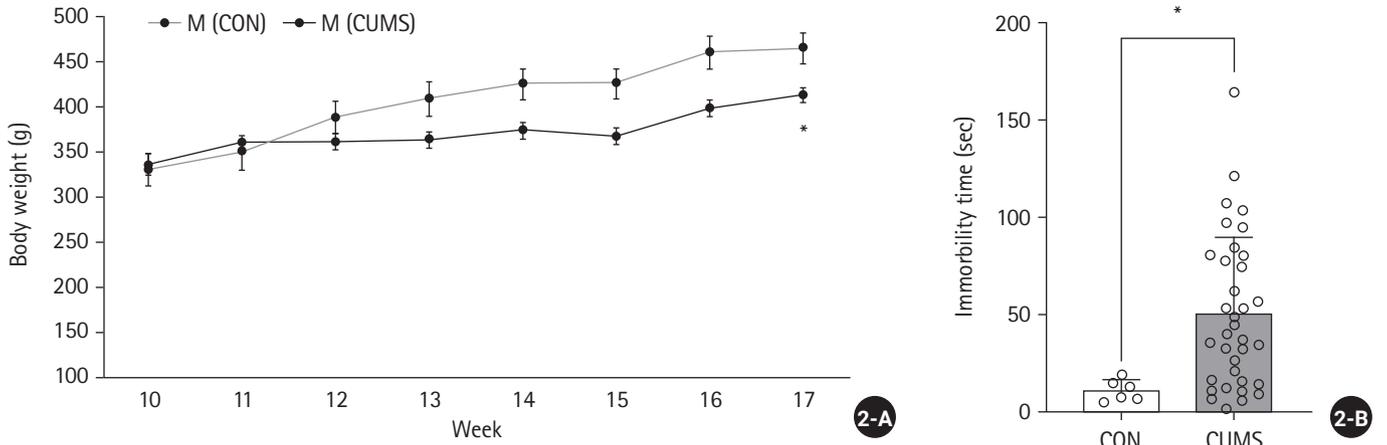


Figure 2. Confirmation of the depressive animal model. (2-A) Weekly changes in body weight. (2-B) Results of immobility time in the FST. Data are presented as the mean \pm standard deviation of the mean * $p < .001$, significantly different from CON. CON=control; CUMS=chronic unpredictable mild stress; FST=forced swim test.

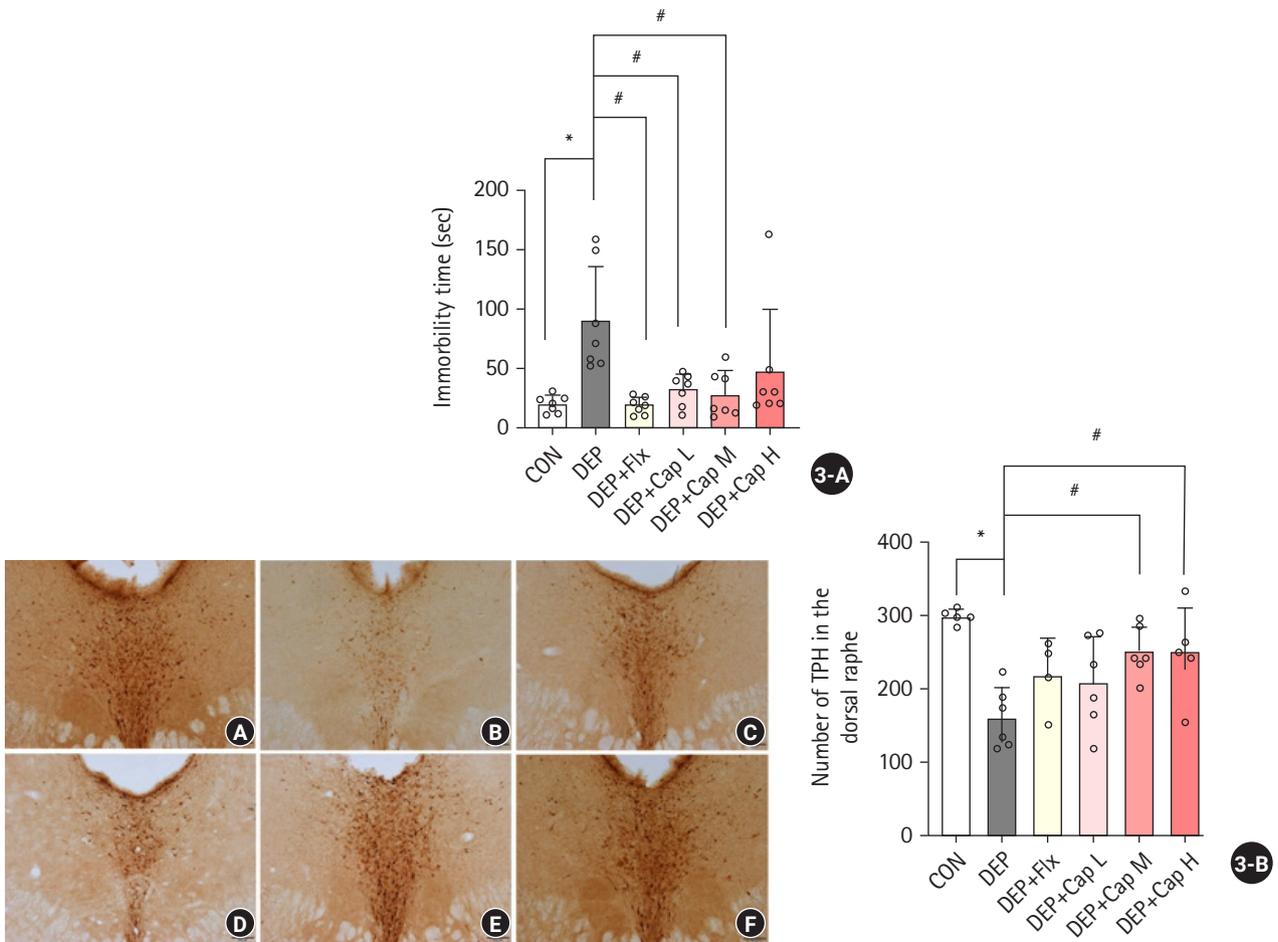


Figure 3. The antidepressant effects of capsaicin. (3-A) Effect on immobility time in the FST. (3-B) Immunohistochemical staining of TPH. (A) CON, (B) DEP, (C) DEP+Flx (D) DEP+Cap L, (E) DEP+Cap M, (F) DEP+Cap H. The tissue was measured by microscopy at a magnification of $\times 10$. Data are presented as the mean \pm standard deviation of the mean * $p < .05$, significantly different from CON. # $p < .05$, significantly different from DEP. CON=control; DEP=depression; DEP+Flx=depression+fluoxetine; DEP+Cap L=depression+capsaicin low dose; DEP+Cap M=depression+capsaicin middle dose; DEP+Cap H=depression+capsaicin high dose; FST=forced swim test; TPH=tryptophan hydroxylase.

± 35.02개), DEP+Cap H군(251.00 ± 56.85개) 사이의 TPH 발현량은 통계적으로 유의하게 차이가 나타났다($F = 5.66, p = .001$). 추가로 사후 분석한 결과, DEP군은 CON군과 비교해서 TPH 발현량이 유의하게 감소하였다($p < .001$). 하지만, DEP+Cap M군($p = .026$)과 DEP+Cap H군($p = .022$)은 DEP군과 비교해서 TPH 발현량이 유의하게 증가하였다. 반면, DEP+Flx군($p = .381$)과 DEP+Cap L군($p = .471$)은 DEP군과 비교해서 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 우울증을 유도한 쥐 모델에서 중농도와 고농도의 캡사이신 투여가 TPH의 감소를 개선할 수 있음을 확인하였다.

3) 해마 CA1과 CA3 부위에서 GR 발현 확인

우울증 동물모델의 해마를 관찰하면, 스트레스로 인해 glucocorticoid가 과다하게 분비되고 그에 따라 그 수용체인 GR도 증가해 있는 양상을 보인다. 해마의 CA1 영역에서 glucocorticoid의 수용체인 GR을 면역조직화학염색을 이용하여 발현 정도를 확인한 결과는 Figure 4-A와 같다. CON군(162.72 ± 96.30개), DEP군(286.12 ± 81.95개), DEP+Flx군(145.14 ± 56.20개), DEP+Cap L군(257.00 ± 39.02개), DEP+Cap M군(253.24 ± 42.96개), DEP+Cap H군(237.54 ± 65.20개) 사이에 GR 발현량은 통계적으로 유의한 차이를 보였다($F = 5.22, p = .001$). 추가로 사후 분석한 결과, DEP군은 CON군과 비교해서 해마 CA1 영역에서 GR 발현

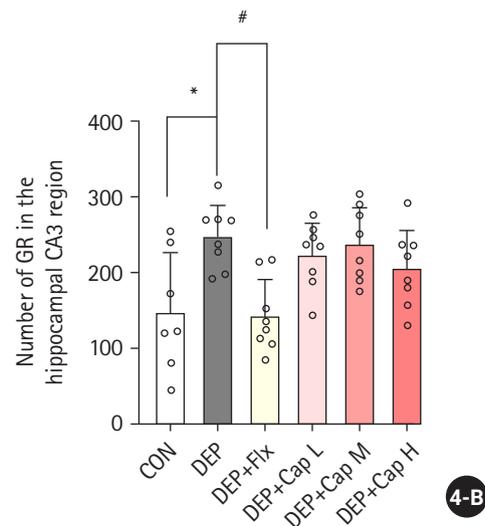
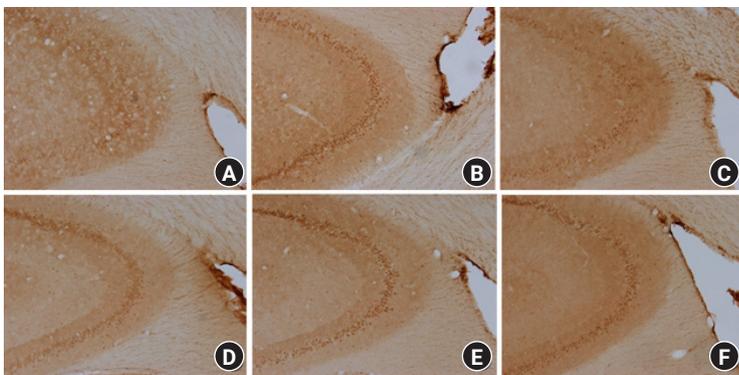
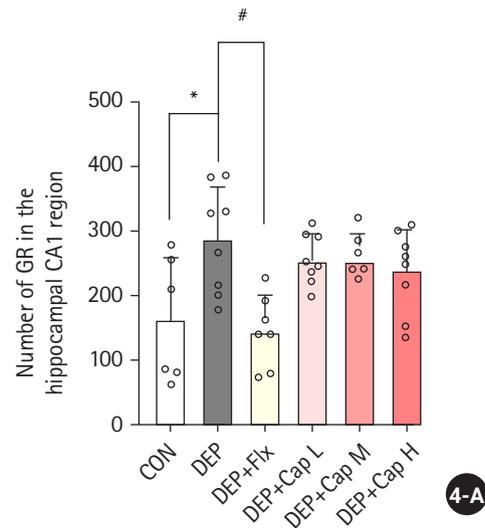
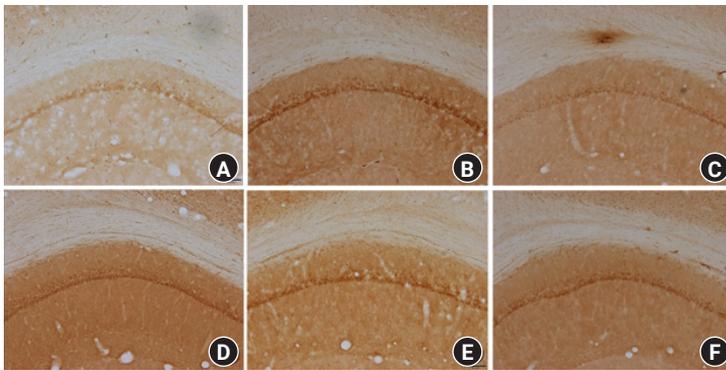


Figure 4. Immunohistochemical staining of GR. (4-A) GR expression in CA1. (4-B) GR expression in CA3. (A) CON, (B) DEP, (C) DEP+Flx (D) DEP+Cap L, (E) DEP+Cap M, (F) DEP+Cap H. The tissue was measured by microscope at a magnification of ×10. Data are presented as the mean ± standard deviation of the mean * $p < .05$, significantly different from CON. # $p < .05$, significantly different from DEP. CA=cornu ammonis; CON=control; DEP=depression; DEP+Flx=depression+fluoxetine; DEP+Cap L=depression+capsaicin low dose; DEP+Cap M=depression+capsaicin middle dose; DEP+Cap H=depression+capsaicin high dose; GR=glucocorticoid receptor.

량이 유의하게 증가하였다($p = .015$). 그러나 DEP+Flx군은 DEP군과 비교해서 GR 발현량이 유의하게 감소하였다($p = .002$). 반면, DEP+Cap L군($p = .947$), DEP+Cap M군($p = .925$), DEP+-Cap H군($p = .679$)은 DEP군과 비교해서 유의한 차이가 없었다(Figure 4-A). 캡사이신 저, 중, 고농도의 투여는 GR의 증가를 억제하는 데에 관여하지는 않는 것으로 나타났다.

또한, 해마의 CA3 영역에서 GR 발현 정도를 확인한 결과는 Figure 4-B와 같다. CON군(148.00 ± 78.51 개), DEP군(247.06 ± 40.86 개), DEP+Flx군(143.44 ± 48.54 개), DEP+Cap L군(223.31 ± 42.78 개), DEP+Cap M군(237.63 ± 49.05 개), DEP+Cap H군(205.25 ± 51.28 개) 사이에 해마 CA3 영역에서의 GR 발현량은 통계적으로 유의한 차이가 보였다($F = 5.65, p < .001$). 추가로 사후 분석한 결과, DEP군은 CON군과 비교해서 GR 발현량이 통계적으로 유의하게 증가하였다($p = .009$). 그러나 DEP+Flx군은 DEP군과 비교해서 유의하게 감소하였다($p = .004$). 반면, DEP+-Cap L군($p = .943$), DEP+Cap M군($p = .999$), DEP+Cap H군($p = .609$)은 DEP군과 비교해서 유의한 차이가 없었다(Figure 4-B). CA3 영역에서도 캡사이신 투여로 인한 GR의 감소는 나타나지는 않았다.

논의

본 연구는 CUMS로 인한 우울증 동물모델을 통해 캡사이신의 항우울 효과를 검증하기 위해 진행되었다. CUMS는 우울증 동물모델을 제작할 목적으로 사용되었으며, 예측할 수 없어 적응하기 힘들도록 만성적인 스트레스를 무작위로 선택하여 중재함으로써 실험 동물에게 우울증과 같은 유사 행동 상태를 유도하였다[26].

우울증 동물모델에서 우울증 증상의 하나로 체중 감소가 나타나며, 우울증 환자 중 일부는 급격한 체중 감소가 나타난다[33]. 본 연구에서도 대조군과 비교해서 CUMS 중재 군들은 우울증 유발 8주째에 유의하게 체중 감소가 나타났다. 이에 더하여 우울증 증상 중 하나인 절망감의 정도를 의미하는 부동시간을 측정하는 FST에서도 CUMS 중재 군들이 대조군과 비교해서 더 오래 부동자세를 유지하였다. 그러나 fluoxetine 처치와 마찬가지로 저농도와 중농도 캡사이신 처치 후 증가했던 부동시간이 감소하였다. 따라서 캡사이신이 우울 행동 개선에 효과가 있는 것으로 사료된다.

세로토닌의 감소는 우울증을 일으키며[6,7], SSRI를 포함한 항우울제 또한 이를 개선하여 약물의 효과를 나타낸다[9]. 세로토닌 생합성의 1단계인 트립토판의 5-hydroxytryptophan으로의 전환을 촉매하는 TPH의 발현 정도는 뇌의 세로토닌 발현 정도를 대체할 수 있으며[34], 실제로 낮은 TPH의 수준은 우울증의 지표가 되기 때문에[13], 중재로 인한 TPH 증가를 통해 해당 중재의 항우울 효과를 논할 수 있다[35]. CUMS 노출로 인해 우울증이 발병된 동물은 뒤슬기핵에서 TPH의 발현이 감소하는데[14], 이번 실험에서도

그 변화를 확인하였다. fluoxetine 처치는 세로토닌의 증가를 유도한다고 보고된다[36]. 하지만 fluoxetine를 처치한 군보다 캡사이신을 처치한 군들에서 TPH의 발현이 농도 의존적으로 더욱 증가하였다. 저농도에서의 변화는 유의하지 않았지만, 농도를 높일수록 유의했기 때문에 고농도의 처치가 TPH를 증가시켜 우울증 회복에 더 기여하는 것으로 보인다.

TPH 발현에서 고농도가 중농도보다 우울증 극복에 더 큰 효과를 나타낸 것을 통해 캡사이신의 농도와 항우울 효과가 비례함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 $0.001 \sim 0.25$ mg/kg까지 다양한 농도로 캡사이신을 투여했을 때 0.05 mg/kg에서 최대효과를 보이면서 그 효과가 농도 의존적이었던 Reyes 등의 결과[22]와 유사하며, $0.01 \sim 0.15$ mg/kg까지 농도를 다르게 하여 단독 투여했을 때와 SSRI 계열 약물인 citalopram과 병용 투여하면서 농도에 따른 효과를 알아보았던 Aguilar 등의 연구[37]와도 유사한 결론에 도달하였다.

지속적인 스트레스는 우울증을 유발하고 이때 해마에서는 스트레스와 관련된 호르몬인 glucocorticoid (cortisol)의 수용체인 GR의 발현이 증가한다. GR은 스트레스와 관련된 호르몬인 cortisol의 수용체로, 높은 GR의 활성도는 높은 스트레스 상황을 의미한다[38]. 이는 특히, 해마에서 기능적 손상과 연관되어 신경 발생 감소 및 신경 가소성 손상을 초래하기도 한다[39]. 따라서 스트레스 호르몬의 작용을 억제하는 것은 해마의 손상을 막아주고 우울증을 완화할 수 있다. 이번 실험의 결과에서도 DEP군은 대조군과 비교해서 해마의 CA1과 CA3 영역에서 GR의 활성이 증가하였다. 항우울제인 fluoxetine 처치한 군은 DEP군과 비교해서 유의하게 GR의 발현을 감소시켰다. 하지만, 캡사이신을 처치한 군들에서는 GR 발현을 유의하게 감소하지는 않았지만, 그 경향성은 나타났다.

캡사이신은 transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1)의 작용제로서, TRPV1 채널을 활성화시킨다. TRPV1은 칼슘 투과성 양이온 채널의 계열에 속하는 수용체로[40], 중추신경계와 말초신경계 모두에 분포되어 있다[41]. 말초신경계에서는 통증 매개체로서의 역할과 온도, pH 민감성과 관련된 감각 전달 뉴런으로서의 작용을 연구하는 실험들이 주로 진행되어 왔다[42,43]. TRPV1이 중추신경계에 미치는 영향에 대해서도 다양한 연구가 이루어지고 있는데, 우울증 발생 기전과 관련이 깊은 뒤슬기핵과 해마에서도 TRPV1이 발견되면서[44,45] 우울증과 불안감에 미치는 긍정적인 영향에 대한 연구들도 증가하고 있다[46]. 캡사이신에 의한 TRPV1의 활성화는 시냅스 후 뉴런의 대사성 글루타메이트 수용체 1과 5(metabotropic glutamate receptor 1 & 5, mGlu1 & mGlu5), 그리고 이온성 글루타메이트 수용체 중 하나인 N-메틸-D-아스파르트산 수용체(n-methyl-m-aspartate receptor, NMDAR)를 활성화함으로써 칼슘의 세포 내 유입을 증가시키고, 이는 뉴런의 장기강화작용(long term potentiation, LTP)을 일으켜 시냅스 가소성(synaptic plasticity)을 유발한다[47]. 그런데 생쥐 뇌에서 TRPV1의

발현을 확인한 연구에서 TRPV1이 뒤술기핵이 위치한 수도관주위 회색질(periaqueductal gray, PAG)에 위치하는 것을 볼 때[48] 뒤술기핵에서도 해당 과정이 일어나 세로토닌성 뉴런의 활성을 가져오므로써 가장 일반적으로 알려진 항우울제의 기능인 세로토닌의 시냅스 공간 내 농도 향상이 일어나는 것으로 보이며, 그리하여 본 실험에서 캡사이신 투여가 TPH의 발현 증가를 가져와 항우울 효과를 나타냈던 것으로 사료된다. 이와 유사하게 TRPV1의 활성화가 세로토닌 및 도파민의 농도를 상승시키고 동시에 항불안 효과를 나타낸다는 사실이 선행연구에서 확인된 바 있었다[49]. 그러나 근본적인 이해를 위해서는 본 연구에서는 확인해보지 못한, 캡사이신이 항우울 효과를 나타낼 때 뒤술기핵과 해마의 TRPV1에서 어떤 변화가 일어나는지 실제로 확인해보는 추가 연구가 필요하다.

또한 앞서 본 연구 결과에서 행동 실험과 조직 실험에서 농도에 따른 효과가 일치하지 않았다. 행동 실험에서는 저농도와 중농도에서, TPH 발현을 확인하는 조직 실험에서는 중농도와 고농도에서 캡사이신의 효과를 확인하였다. 따라서, 캡사이신의 농도에 대한 재고찰을 바탕으로 그 농도와 항우울 효력의 연관성을 확인하는 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

더불어 캡사이신에 의해 엔도르핀과 아드레날린 분비가 촉진되면서 스트레스가 해소되는데, 해당 호르몬 또는 그 수용체의 활성 여부를 추후 연구를 통해 추가로 확인한다면, 이번 실험의 결론을 강화할 수 있을 것으로 보인다[21].

그럼에도 지질다당류[23], 약물[24], 부동[25] 등 그 원인을 단기간 작용시켜 우울증을 유발했던 선행연구와 달리 6주라는 장기간 스트레스로 인해 만성적인 우울증에 걸린 동물을 대상으로도 캡사이신이 항우울 효과가 나타남을 입증했다는 것에 의의가 있다. 게다가 캡사이신의 항우울 효과가 뒤술기핵에서의 TPH 발현 증가와 연관 있음을 밝혀냄으로써 캡사이신을 기반으로 한 만성적인 우울증 환자 대상 중재 개발에 일조하였다.

결론

본 연구는 흰 쥐를 대상으로 6주 동안 CUMS를 실시하여 우울증 동물모델을 성공적으로 만들었으며, 캡사이신의 농도에 따른 항우울 효과를 평가하기 위해 저, 중, 고농도로 나누어 행동 실험과 분자생물학적 분석을 진행하였다. CUMS를 통해 체중 감소와 부동시간의 증가를 유발하여 우울증 모델이 잘 만들어지는 것을 확인하였고, 캡사이신 투여가 부동과 같은 우울 모델의 행동 특성을 완화했고, 항우울제를 투여한 그룹과 유사한 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 또한 캡사이신이 스트레스 완화가 아닌 세로토닌 합성 효소인 TPH의 감소를 개선함으로써 우울증 극복에 효과가 있음을 입증했다. 본 연구결과는 매운맛의 원인인 캡사이신이 단기간의 스트레스 해소 및 기분 개선 수준을 넘어 만성적인 우울증의 증상 완화에도 효과가 있음을 제시하였다. 우울증 환자 치료에 있어 새로

운 접근법을 제시한 계기가 될 수 있으며, 부작용이 많은 항우울제를 대체할 만한 중재 개발의 기초자료로서도 의의가 있다.

ORCID

Jae Ock Lim, <https://orcid.org/0000-0003-2246-7333>

Min Ji Kim, <https://orcid.org/0000-0002-9371-8403>

Jun Beom Bae, <https://orcid.org/0000-0002-5442-9131>

Chan Hyeok Jeon, <https://orcid.org/0000-0002-2097-6794>

Jae Hyeon Han, <https://orcid.org/0000-0003-0839-4510>

Tae Hyeok Sim, <https://orcid.org/0000-0003-1150-504X>

Youn Jung Kim, <https://orcid.org/0000-0003-4991-0825>

CONFLICT OF INTEREST

The authors declared no conflict of interest.

AUTHORSHIP

All authors contributed to the conception and design of this study; JOL, MJK, JBB, CHJ, JHH, and THS collected data; JOL performed the statistical analysis and interpretation; JOL, MJK and JBB drafted the manuscript; JOL and YJK critically revised the manuscript; YJK supervised the whole study process. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

None.

REFERENCES

1. Truax P, Seltho L. Mood disorders. In: Hersen, Michel, Turner, Samuel M, editors. Diagnostic interviewing. 3rd ed. Boston, MA: Springer; 2003. p. 111-147.
2. Hunt IM, Kapur N, Robinson J, Shaw J, Flynn S, Bailey H, et al. Suicide within 12 months of mental health service contact in different age and diagnostic groups. *British Journal of Psychiatry*. 2006;188(2):135-142. <https://doi.org/10.1192/bjp.188.2.135>
3. Department of Mental Health Care. Announcement of the COVID-19 national mental health survey results in the second quarter of 2022 [Internet]. Sejong: Ministry of Health and Welfare; 2022 Aug 11 [cited 2022 Aug 20]. Available

- from: http://www.mohw.go.kr/react/al/sal0301vw.jsp?PAR_MENU_ID=04&MENU_ID=0403&page=1&CONT_SEQ=372545
4. Benefits Information Analysis Department. Analysis of the current status of the treatment of depression and anxiety disorders in the last 5 years (2017-2021) [Internet]. Wonju: Health Insurance Review & Assessment Service; 2022 Jun 24 [cited 2022 Aug 20]. Available from: <https://www.hira.or.kr/bbsDummy.do?pgmid=HIRAA020041000100&brdScnBltno=4&brdBltno=10627&pageIndex=1#a>
 5. Beck AT. Depression: causes and treatment. Philadelphia, PA: University of Pennsylvania Press; 1972. p. 370.
 6. Stahl SM. Molecular neurobiology for practicing psychiatrists, part 5: how a leucine zipper can turn on genes: immediate-early genes activate late-gene expression in the brain. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2000;61(1):7-8. <https://doi.org/10.4088/jcp.v61n0103>
 7. Liu Y, Zhao J, Guo W. Emotional roles of mono-aminergic neurotransmitters in major depressive disorder and anxiety disorders. *Frontiers in Psychology*. 2018;9:2201. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.02201>
 8. Cowen PJ, Browning M. What has serotonin to do with depression? *World Psychiatry*. 2015;14(2):158-160. <https://doi.org/10.1002/wps.20229>
 9. Taylor C, Fricker AD, Devi LA, Gomes I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cellular Signalling*. 2005;17(5):549-557. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.12.007>
 10. Ferguson JM. SSRI antidepressant medications: adverse effects and tolerability. *Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry*. 2001;3(1):22-27. <http://doi.org/10.4088/pcc.v03n0105>
 11. Rosenbaum JF, Fava M, Hoog SL, Ascroft RC, Krebs WB. Selective serotonin reuptake inhibitor discontinuation syndrome: a randomized clinical trial. *Biological Psychiatry*. 1998;44(2):77-87. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(98\)00126-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(98)00126-7)
 12. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*. 2009;60:355-366. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
 13. Hornung JP. The neuroanatomy of the serotonergic system. In: Christian PM, Barry LJ, editors. *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin*. 1st ed. London: Academic Press; 2010. p. 51-64.
 14. Chen Y, Xu H, Zhu M, Liu K, Lin B, Luo R, et al. Stress inhibits tryptophan hydroxylase expression in a rat model of depression. *Oncotarget*. 2017;8(38):63247-63257. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18780>
 15. Sapolsky RM. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biological Psychiatry*. 2000;48(8):755-765. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)00971-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)00971-9)
 16. Wingenfeld K, Wolf OT. Stress, memory, and the hippocampus. *The Hippocampus in Clinical Neuroscience*. 2014;34:109-120. <https://doi.org/10.1159/000356423>
 17. Lucassen PJ, Müller MB, Holsboer F, Bauer J, Holtrop A, Wouda J, et al. Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *The American Journal of Pathology*. 2001;158(2):453-468. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63988-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63988-0)
 18. Chourbaji S, Gass P. Glucocorticoid receptor transgenic mice as models for depression. *Brain Research Reviews*. 2008;57(2):554-560. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.04.008>
 19. Srinivasan K. Biological activities of red pepper (*Capsicum annum*) and its pungent principle capsaicin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015;56(9):1488-1500. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.772090>
 20. Winter J, Bevan S, Campbell EA. Capsaicin and pain mechanisms. *British Journal of Anaesthesia*. 1995;75(2):157-168. <http://dx.doi.org/10.1093/bja/75.2.157>
 21. Jain A, Mishra A, Shakkarpude J, Lakhani P. Beta endorphins: the natural opioids. *International Journal of Chemical Studies*. 2019;7(3):323-332.
 22. Reyes-Mendez ME, Castro-Sánchez LA, Dagnino-Acosta A, Aguilar-Martínez I, Pérez-Burgos A, Vázquez-Jiménez C, et al. Capsaicin produces antidepressant-like effects in the forced swimming test and enhances the response of a sub-effective dose of amitriptyline in rats. *Physiology & Behavior*. 2018;195:158-166. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.08.006>
 23. Xia J, Gu L, Guo Y, Feng H, Chen S, Jurat J, et al. Gut microbiota mediates the preventive effects of dietary capsaicin against depression-like behavior induced by lipopolysaccharide in mice. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11:627608. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.627608>

24. Amiri S, Alijanpour S, Tirgar F, Haj Mirzaian A, Amini Khoei H, Rahimi Balaei M, et al. NMDA receptors are involved in the antidepressant like effects of capsaicin following amphetamine withdrawal in male mice. *Neuroscience*. 2016;329:122-133. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.003>
25. Hayase T. Differential effects of TRPV1 receptor ligands against nicotine-induced depression-like behaviors. *BMC Pharmacology*. 2011;11(1):1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-11-6>
26. Seong HH, Park JM, Kim YJ. Antidepressive effects of environmental enrichment in chronic stress-induced depression in rats. *Biological Research For Nursing*. 2017;20(1):40-48. <https://doi.org/10.1177/1099800417730400>
27. Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*. 1987;93(3):358-364. <https://doi.org/10.1007/bf00187257>
28. Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002;34(1):13-25. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00653-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00653-0)
29. Tang M, Jiang P, Li H, Liu Y, Cai H, Dang R, et al. Fish oil supplementation alleviates depressant-like behaviors and modulates lipid profiles in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2015;15(1):239-239. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0778-1>
30. Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A, Doron R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;97. <https://doi.org/10.3791/52587>
31. Shaleh LA, Almutairi FM, Alorabi WK, Alkuhayli BA, Alzaidi SS, Alzahrani SB, et al. Short and long term effects of vitamin D treatment on Bacillus Calmette-Guerin induced depressive like behavior in mice. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2021;17:711-720. <https://doi.org/10.2147/ndt.s291793>
32. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals [Internet]. Washington DC: The National Academies Press; 2010 [cited 2023 Feb 7]. Available from: https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals_prepub.pdf
33. Willner P. Animal models as simulations of depression. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1991;12:131-136. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90529-2](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90529-2)
34. Haycock JW, Kumer SC, Lewis DA, Vrana KE, Stockmeier CA. A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope. *Journal of Neuroscience Methods*. 2002;114(2):205-212. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(01\)00530-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(01)00530-1)
35. Seoung HH, Jung SM, Kim SW, Kim YJ. Effects of physical activity and melatonin in a rat model of depression induced by chronic stress. *Journal of Korean Biological Nursing Science*. 2015;17(1):37-43. <https://doi.org/10.7586/jkbns.2015.17.1.37>
36. Cheer SM, Goa KL. Fluoxetine. *Drugs*. 2001;61:81-110. <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-200161010-00010>
37. Aguilar-Martinez IS, Reyes-Mendes ME, Herrera-Zamora JM, Osuna-Lopez F, Virgen-Ortiz A, Mendoza-Munoz N. Synergistic antidepressant like effect of capsaicin and citalopram reduces the side effects of citalopram on anxiety and working memory in rats. *Psychopharmacology*. 2020;237(7):2173-2185. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05528-6>
38. Baes C, von W, Martins CMS, Tofoli SM de C, Juruena MF. Early life stress in depressive patients: HPA axis response to GR and MR agonist. *Frontiers in Psychiatry*. 2014;5:2-2. <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2014.00002>
39. Sousa N, Cerqueira JJ, Almeida OFX. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. *Brain Research Reviews*. 2008;57(2):561-570. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.007>
40. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389:816-824. <http://dx.doi.org/10.1038/39807>
41. Szallasi A, Nilsson S, Farkas-Szallasi T, Blumberg PM, Hökfelt T, Lundberg JM. Vanilloid (capsaicin) receptors in the rat: distribution in the brain, regional differences in the spinal cord, axonal transport to the periphery, and depletion by systemic vanilloid treatment. *Brain Research*. 1995;703(1-2):175-183. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01094-7](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(95)01094-7)
42. Chávez AE, Chiu CQ, Castillo PE. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nature Neuroscience*. 2010;13:1511-1518. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2684>
43. Szallasi A, Cruz F, Geppetti P. TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends in Molecular Medicine*. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90529-2](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90529-2)

- 2006;12(11):545-554. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2006.09.001>
44. Kauer JA, Gibson HE. Hot flash: TRPV channels in the brain. *Trends in Neurosciences*. 2009;32(4):215-224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2008.12.006>
45. Marinelli S, Pascucci T, Bernardi G, Puglisi-Allegra S, Mercuri NB. Activation of TRPV1 in the VTA excites dopaminergic neurons and increases chemical-and noxious-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:864-870. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1300615>
46. Madasu MK, Roche M, Finn DP. Supraspinal transient receptor potential subfamily V member 1 (TRPV1) in pain and psychiatric disorders. *Pain in Psychiatric Disorders*. 2015; 30:80-93. <http://dx.doi.org/10.1159/000435934>
47. Fattori V, Hohmann MS, Rossaneis AC, Pinho-Ribeiro FA, Verri Jr WA. Capsaicin: current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. *Molecules*. 2016;21(7):844. <https://doi.org/10.3390/molecules21070844>
48. Cavanaugh DJ, Chesler AT, Jackson AC, Sigal YM, Yamanaka H, Grant R, et al. TRPV1 reporter mice reveal highly restricted brain distribution and functional expression in arterial or smooth muscle cells. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(13): 5067-5077. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6451-10.2011>
49. Guler AD, Rainwater A, Parker JG, Jones GL, Argilli E, Arenkiel BR, et al. Transient activation of specific neurons in mice by selective expression of the capsaicin receptor. *Nature Communications*. 2012;3(1):1-10. <https://doi.org/10.1038/ncomms1749>