

펜틸렌테트라졸 투여 흰쥐에서의 천마의 항경련 작용기전

허 근[#] · 김진숙 · 권태협 · 김정애 · 용철순 · 하정희* · 이동웅**

영남대학교 약학대학, *의과대학, **동국대학교 자연과학대학

(Received February 11, 1998)

The Mechanism of Anticonvulsive Effect of the Rhizoma of *Gastrodia Elata* in Pentylentetrazole Treated Rats

Keun Huh[#], Jin-Sook Kim, Tae-Hyub Kwon, Jeoung-Ae Kim,
Chul-Soon Yong, Jeoung-Hee Ha* and Dong-Ung Lee**

College of Pharmacy, Gyongsan 713-749

*College of Medicine, Yeungnam University, Taegu 705-035

**College of Natural Science, Dongguk University, Kyongju, Kyongbuk 780-714

Abstract—*Gastrodia elata* (GE) is an oriental medicinal herb which has been used traditionally for the treatment of various brain diseases including convulsion and epilepsy. In order to examine the mechanism of anticonvulsive effect, we treated the methanol extract of GE (500 mg/kg, P.O) to the pentylentetrazole (PTZ)-induced convulsive rats. Methanol extracts of GE significantly inhibited (35%) the convulsion state as well as the level of lipid peroxidation (25%) in the brain. The ether fraction of methanol extracts among the others effectively inhibited *in vitro* lipid peroxidation dose dependently ($5.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ g/ml). The scavenging effect on hydroxy radicals was found in all the fractions of ether, butanol, and dichloromethane. These results suggest that the anticonvulsive effect of GE is possibly due to the antioxidative effects of the active components in GE.

Keywords □ *Gastrodia elata*, anticonvulsant, antioxidant, oxygen radical scavenging.

천마(天麻, *Gastrodia elata* Blume)는 난초과(Orchidaceae)에 속하는 약용식물로 뿌리와 잎이 없으며 갈색을 띄고 있다. 푸른잎이 없으므로 엽록소의 특수기능인 광합성이 이루어지지 않을 뿐만 아니라 생장에 필요한 영양소를 뿌리에서 흡수하지 못하고 자신에 기생하는 곰팡이(*Armillaria Mellea*)가 생산하는 영양소에 에너지 공급을 의존하는 특이한 식물이다. 이와 같은 특이한 성상을 띄고 있기 때문에 오래 전부터 관찰대상이 되었으며 천마의 근경을 건조한 것은 신농본초경에 상품으로 수록되어 있어 오래 전부터 상등급 약제로 이용되어지고 있다. 천마는 거풍진경의 효과가 있으므로 간질, 중풍 등 난치성 신경질환에 치료약제로 민간과 한방에서 이용되

어지는 약용식물이다.¹⁻⁵ 천마는 뇌혈류장애에 기인된 질환,⁶ 신경쇠약,⁷ 간질,^{8,9} 치매¹⁰ 등 뇌신경질환을 개선하는 효과가 있음이 여러 연구진에 의해서 실험적으로 확인한 연구보고는 있으나 그 유효성분의 확인이나 항경련 효과를 나타내는 작용기전에 대해서는 아직 미해결의 분야가 많이 남아있다. 간질, 치매현상등과 같이 뇌조직의 퇴행성 기능장애로 초래되는 질환들의 병태생리현상들은 활성산소종의 생성과 분해기구의 조절능이 상실되어질 때 잔존하는 과량의 활성산소종들이 뇌조직 중의 불포화지방산을 과산화시켜 세포막의 손상을 유도하는 oxidative stress 유도과정과 밀접한 관계를 갖고 있음이 여러 연구진에 의해서 밝혀지고 있다.¹¹⁻¹⁵ 그러므로 이 연구에서는 천마를 methanol, ether, butanol, dichloromethane으로 추출한 분획을 이용하여 항경련 작용기전을 항산화 작용과 관련시켜 검토하고자 하였다.

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 053-810-2814 (팩스) 053-811-3871

실험방법

재료 및 시약

천마는 시중에서 구입한 것을 물로 씻어 먼지 등을 제거하고 건조한 것을 마쇄하여 사용하였다. Pentylentetrazole(PTZ) 등의 모든 시약은 sigma사 제품을 사용하였으며 methanol 과 다른 용매들은 특급품 내지는 일급품을 재증류하여 사용하였다.

천마 성분의 추출

성분 분석의 추출은 일반적으로 널리 활용되고 있으며 서울대학교 천연물연구소에서 표준 엑시료제조법¹⁶⁾으로 제시한 방법에 따라 시행하였다(Scheme I). 실험에 사용한 천마는 시중에서 구입한 것을 먼지 등의 부착물을 제거할 목적으로 세척한 후 건조하여 사용하였다. 건조된 천마를 분말로 하여 1 kg당 3 l의 methanol을 가한 다음 70°C에서 5시간 간격으로 3회 반복추출하고 여과하여 methanol 분획을 얻고 농축하였다. 여기에 증류수를 가하여 완전히 현탁시킨후 현탁액에 ether 1 l를 가하여 분별 깔대기에서 3회 분리하여 ether 분획을 얻었다. 남은 여액에 150 ml의 n-butanol을 가하고 분리하여 butanol 분획을 얻고 이 분획을 감압농축하였다. Butanol 분획에 다시 dichloromethane(CH₂Cl₂)을 가하여 혼합한 후 CH₂Cl₂로 이행되는 부분을 분별깔대기에서 분리하여

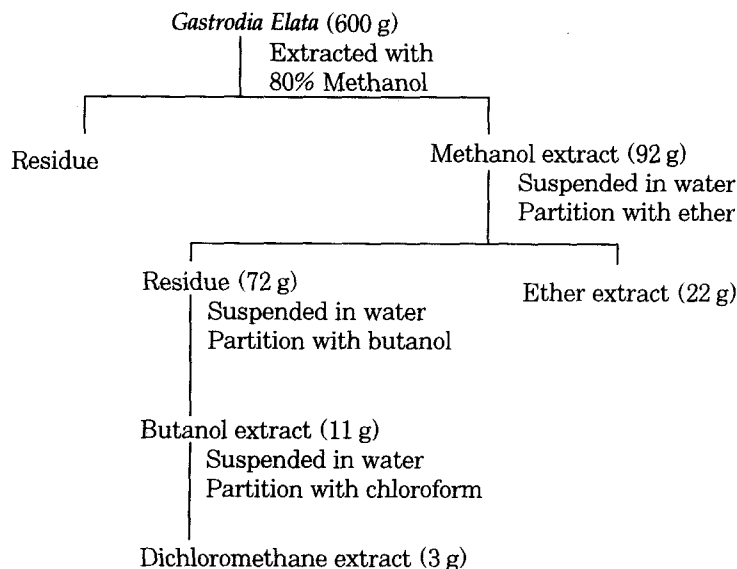
감압농축하고 CH₂Cl₂분획으로 하였다.

실험동물 처치 및 경련유도

본 대학 동물사에서 오전 7시에 전등이 켜졌다 12시간 후에 전등이 꺼지고 실내 온도가 22°C 정도로 유지되며 습도가 일정하게 유지되는 일정한 조건에서 사육한 150~200 g의 체중을 갖는 Sprague-Dawley계의 흰쥐(웅성)를 실험동물로 사용하였다. 천마 추출물은 1% carboxymethyl cellulose(CMC) 용액에 현탁시켜 kg당 500 mg의 용량으로 1일 1회 7일간 esophagus-needle을 사용하여 경구 투여하였으며, 대조군은 같은 방법으로 1% CMC 용액을 경구 투여하였다. 경련 유발 실험은 Giorgi 등의 방법¹⁷⁾에 준해 PTZ를 kg당 50 mg 되게 피하 주사하여 경련 발작을 유도하였고 경련상태를 5단계로 구분하여 관찰하였다(Table I).

항경련효과

항경련 효과는 PTZ 투여 후의 경련 발작 발현시간(onset time), 경련 지속시간(duration of convulsion), 회복시간(recover time) 등을 측정하여 종합적인 현상을 참조한 경련상태 지표로 나타내었다. 또한, 경련상태는 Roussinov 등의 방법¹⁸⁾에 따라 경련발작 정도를 5단계로 구분하여 각 단계에서 발생하는 경련의 횟수의 곱을 모두 합하고 이것을 다시 전체 경련횟수로 나누어 경련강도(severity)를 산출하였다.



Scheme 1. The fractionation of the rhizoma of *Gastrodia Elata*.

Table I—Classification of signs shown in each degree of convulsions

Degree of convulsion	Signs
0	No signs
1	Paralysis and fibrillations
2	Rising forelimbs and convulsions
3	Weak jerking
4	Strong jerking and jumping, shouting
5	Lasting of typical tonic-clonic seizure, expire

과산화지질 함량 측정

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa¹⁹⁾ 등의 방법에 준해 조직 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 용액을 가해 95°C에서 1시간동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-butanol:pyridine(15:1) 혼액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 단백 1 mg당 malondialdehyde(MDA)의 양을 nmole로 나타내었다.

Hydroxyl radical scavenging 효과 측정

Hydroxyl radical scavenging 효과는 Halliwell²⁰⁾ 등의 방법에 따라 20 mM potassium dihydrogen phosphate-potassium hydroxide buffer(pH 7.4)에 2.8 mM deoxyribose, 100 μM ferric chloride, 104 μM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM hydrogen peroxide, 100 μM ascorbate를 최종부피가 1 ml되게 가하여 1시간동안 37°C에서 반응시켜 이때 hydroxyl radical에 의해 생성되는 malondialdehyde의 함량을 과산화지질 함량 측정법과 동일한 방법으로 측정하였다.

통계처리

모든 자료는 mean±S.E.로 나타내었고 student's *t*-test로 유의성 검정을 수행하였으며 $p < 0.01$ 과 $p < 0.05$ 수준에서 판정하였다.

실험 결과 및 고찰

뇌신경조직은 대단히 정밀하면서 복잡하게 구성되어 있으며, 그 기능수행도 섬세한 단위기능들이 조화를 이

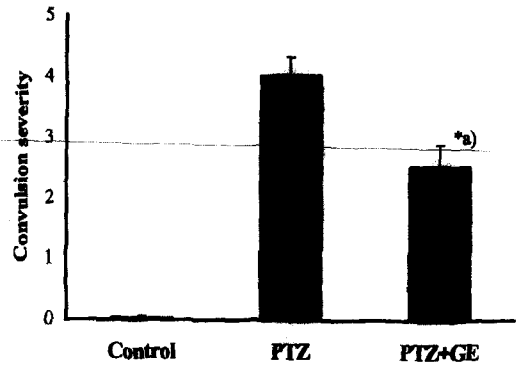


Fig. 1—Effect of *Gastrodia elata* methanol ext. on convulsion severity in PTZ-induced convulsion rat. Methanol extract of GE (500 mg/kg, P.O) was administered daily for 7 days to rats. PTZ (50 mg/kg S.C) was injected 3hr after last administration of G.E. methanol extrats. Values are mean±S.E. for 7 animals.

*a): Significantly different from PTZ ($P < 0.05$)

Severity: $\Sigma(\text{Degree of convulsion}) \times (\text{Frequency of convulsion for each degree}) / \text{Total frequency of convulsion}$

루고 복합적인 반응경로를 거치도록 되어 있다. 이와 같은 뇌신경계의 질환에 대해서 많은 연구진에 의해서 연구가 계속 진행되고 있으나 대부분의 경우 확실한 병태생리학적 기전이 아직 밝혀지지 않고 있어 뇌신경계질환 치료제 개발도 많은 어려움이 있다. 최근의 연구결과에 의하면 간질, 치매 및 파킨슨씨 질환 등 퇴행성의 뇌신경질환들의 병태생리 조건들은 oxidative stress가 매개하는 과산화지질생성 반응과 밀접한 상관관계가 있다는 사실이 밝혀지고 있어 관심을 갖게하고 있다.¹¹⁻¹⁵⁾ 본 논문에서는 인위적으로 경련 발작을 유도한 동물모델을 이용하여 간질의 병태생리학적 기전연구 및 치료제로서의 이용가능성이 있는 물질의 작용기전을 연구하고자 하였다.

경련을 유발하는 인자로 잘 알려진 PTZ를 투여하여 경련발작상태를 유도한 흰쥐에서(Fig. 1) PTZ는 뇌조직의 지질과산화반응을 촉진시켰으며 생리식염수만을 투여한 대조군에 비해 과산화지질의 생성량도 20%정도 증가하는 유의성있는 변화가 관찰되었다(Fig. 2). 이는 PTZ에 의한 경련발작의 유도는 지질과산화반응이 관여함을 보여주는 것이다. 천마의 methanol 추출물을 7일간 전처치하였을 때 PTZ에 의한 경련발작의 지속시간과 회복시간 및 경련발작 정도가 유의성있게 감소됨을 관찰하였다(Fig. 1, Table II). 더욱이 천마 추출물 투여군의 뇌조직중의 과산화지질의 농도는 대조군과 거의 차

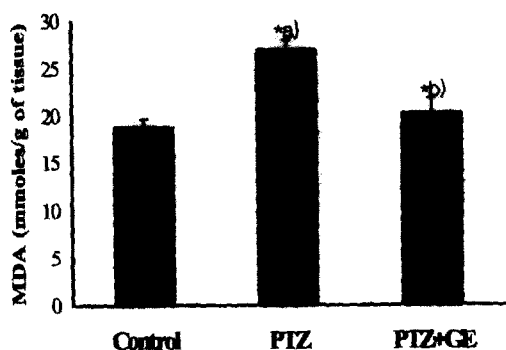


Fig. 2—Effect of PTZ on lipid peroxidation in brain tissue homogenate Rats were administered methanol extract of GE (500 mg/kg P.O) daily for 7 days. Control was given only saline solution with comparable volume to the methanol extracts by oral administration. PTZ (50 mg/kg) was dissolved in saline and injected by S.C. Rats were sacrificed with decapitation after 30min the PTZ administration. ^{*a)} significantly different from control (p<0.05) ^{*b)} significantly different from PTZ-treated (p<0.05)

이가 없었으나 PTZ만을 투여한 실험군에 비해 유의성 있게 감소되고 있음이 관찰되었다(Fig. 2). 이와 같은 실험결과는 천마의 methanol 추출물 중에는 뇌조직에서 PTZ에 의한 과산화지질의 생성을 억제적으로 조절하는 성분이 함유되어 있음을 암시하고 있다.

PTZ에 의해 뇌조직중의 과산화지질의 함량이 증가하는 현상은 본 연구진에 의해서 처음 밝혀진 것으로 그 기전에 대해 계속해서 연구해야할 과제를 부여하였다 고 본다. 천마 methanol추출물을 일주일간 경구적으

Table II—Effect of methanol extract of *Gastrodia elata* (GE) on PTZ-induced convulsion in

	rat onset of convulsion (min)	duration of convulsion (min)	recovery time (min)	Degree of convulsion
control	-	-	-	0
PTZ	17.3±2.1	1.5±0.7	30.5±3.2	4
PTZ+GE	20.1±1.5	1.2±0.5*	24.6±3.5*	2

GE (methanol extract of *Gastrodia elata*, 500 mg/kg P.O) was administered daily for 7 days to rats. PTZ was injected with 50 mg/kg doses by S.C after 30 min the last oral administration of GE as described in the experimental methods. The values are means± S.E. for 7 animals.

*p<0.05: significantly different from PTZ groups

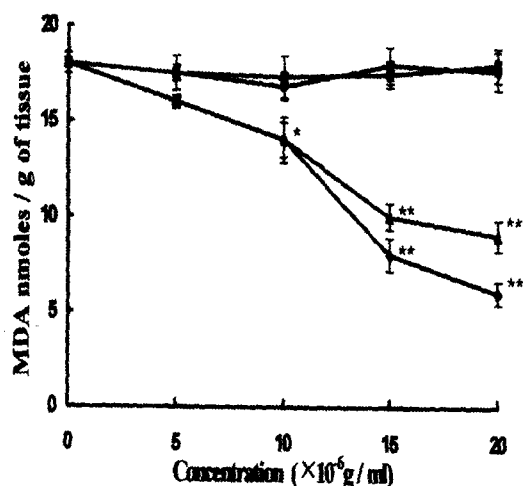


Fig. 3—Effect of several fraction of methanol extract of *Gastrodia elata* on lipid peroxidation in brain tissue *in vitro* O: dichloromethane fraction, ■: butanol fraction, △: ether fraction, ◆: methanol extract ^{*}significantly different from control (p<0.05)

로 투여하고 경련유발량의 PTZ를 투여하였을 때는 경련상태가 유의성있게 감소되며 과산화지질생성이 억제 되는 실험결과는 PTZ에 의한 경련 발작과 뇌조직의 과산화지질 생성증가의 상관관계 및 천마성분의 항경련 효과와 항산화작용을 결부시켜 검토하는 계기를 부여 한 흥미있는 연구결과라고 생각된다.

천마의 항산화작용을 검토하는 실험에서 천마 methanol 추출물이 *in vitro*에서 지질의 과산화반응을 억제하는 것을 확인한뒤 이 methanol 추출분획을 표준 엑스제조법에 준하여 여러 가지 용매로 추출하고 (Scheme 1), 뇌조직의 homogenate가 들어 있는 시험관에 천마의 각 추출분획을 각각 첨가하여 지질의 과산화반응상태를 관찰한 결과(Fig. 3), methanol extract와 그 ether분획은 반응액중에 첨가한 농도에 비례하여 과산화지질의 생성을 억제하고 있음을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 실험결과로 보아 천마 중에는 항산화작용을 나타내는 성분이 함유되어 있으며 이 물질은 methanol에 용출되어지고 ether분획으로 이행되어지는 성질을 갖고 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 항산화작용 실험결과들은 PTZ유도 경련 발작정도가 천마의 methanol분획 투여 실험군에서는 현저히 감소되고 이 실험 결과와 ether 분획 전처치가 PTZ성 경련 model의 상태를 현저히 개선하였다는 연구보고⁹⁾와 상

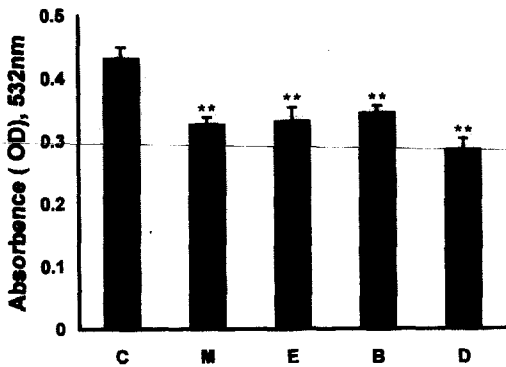


Fig. 4—The hydroxy radical scavenging effect of several fraction of methanol extract of *Gastrodia elata*

Each fraction added to the reaction mixture with 5.0×10^{-6} g/ml concentration. C: control, M: methanol extract, E: ether fraction, B: butanol fraction, D: dichloromethane fraction

**significantly different from control ($p < 0.01$)

관성이 있음을 시사해주고 있다. 또한 실험적으로 제시하지 않았지만 dichloromethane과 butanol분획의 경우도 4.5×10^{-5} g/ml 농도에서 뇌조직의 과산화 지질생성량이 각각 21%와 47.5% 감소되며 그 이상의 농도에 비례하여 점차 지질의 과산화 반응이 억제되었다.

일반적으로 항산화작용은 free radical의 소거 작용(scavenging effect)과 상관성이 있는 경우가 많으므로 활성산소종들이 연쇄적인 반응으로 생성되어지는 과정($O_2 \rightarrow \cdot O_2 \rightarrow H_2O_2 \rightarrow \cdot OH$)의 마지막 생성물이며 가장 강력한 활성을 지니고 있어서 oxidative stress에 의한 조직 손상 과정에서 대단히 중요한 핵심적인 역할을 하는 인자로 알려지고 있는 hydroxy radical에 대한 천마성분의 소거작용을 조사하였다(Fig. 4). Methanol extract는 물론 ether, butanol 및 dichloromethane의 모든 분획이 5×10^{-6} g/ml의 농도에서 화학반응으로 생성시킨 반응액 중의 hydroxy radical의 양을 20%에서 최고 34.3%까지 감소시켰다. 이상과 같은 실험결과들을 종합하여 볼 때 천마성분중에는 항경련작용을 나타내는 물질이 함유되어 있으며 이 약리작용은 hydroxy radical의 소거 작용 등으로 oxidative stress 상태를 개선하여 과산화지질의 생성을 억제하는 기전으로 나타날 것으로 생각되어진다.

이외에도 천마의 butanol분획은 benzodiazepine 수용체에 agonistic effect(효현 효과)를 나타내는 성분들이 함유되어 있으며 이 성분이 항경련 효과를 나

타낼 것이라고 보고되고 있다.²³⁾ 또한 천마의 methanol extract와 ether분획 중에는 γ -aminobutyric acid(GABA)를 succinate로 분해하는 효소인 뇌의 GABA-transaminase활성을 억제하는 인자가 함유되어 있어 뇌중 GABA함량을 보존하는 작용에 의해 항경련 작용을 나타낼 것이라고 보고한 논문과 결부시켜 볼 때^{9, 24)} 천마 중에는 free radical 소거인자와 더불어 GABA함량을 보존하는 성분 및 benzodiazepine 수용체 agonist등의 성분들이 함유되어 있음을 시사해 주고 있다. 이와 같은 연구결과들은 천마로부터의 뇌신경질환 치료제를 개발하는 프로그램에 적극적으로 참여케 하는 고무적인 연구 분위기를 조성하는 계기를 제공하였다고 본다.

이 결과에 이어 천마로부터 유효 성분을 단리하고 활성을 검색하는 과정에서 p-hydroxybenzaldehyde와 같은 phenol성 화합물에서 유의성 있는 실험결과를 얻고 현재 그 유도체들에 대한 약리작용을 검토 중에 있다.

감사의 말씀

본 연구는 1997년도 보건의료 기술연구기획평가단 연구비지원(93-G7 및 97-D-4-0019)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) 이영명 : 동의학 사전, 삼문당, 서울, p. 814 (1990).
- 2) 吳 晋 : 신농본초경, 인민위생출판사, 북경, p. 200 (1986).
- 3) 許 俊 : 동의보감, 남산당, 서울, p. 374 (1976).
- 4) 吳儀洛 : 本草(從身), 행림출판, 서울, p. 212 (1992).
- 5) 馬興民 : 실용명귀중약재, 천축출판사 p. 54 (1989).
- 6) Huang, Z. L. : J. Modern Develop. *Traditional Med.* 5, 251 (1985).
- 7) Kao, N. N., Yu, S. Z., Lin, R. H., and Hsu, C. T. : *Chinese Traditional Herbal Drugs*, 25, 521 (1994).
- 8) Shen, D. and Chang, H. : The anticonvulsant and analgesic activity of Tianma. *Acta Pharm. Sin.* 10, 242 (1963).
- 9) K. Huh, S. J. Yi, H. S. Shin and J. M. Park : Effect of the ether fraction of *Gastrodia Elata* on the PTZ-induced seizures. *J. Appl. Pharmacol.*

- (Korea) **3**, 199 (1995).
- 10) C. R. Wu, M. T. Hsieh, S. C. Huang, W. H. Peng, Y. S. Chang and C. F. Chen : Effect of *Gastrodia elata* and its active constituents on scopolamine-induced Amnesia in rats. *Planta. Med.* **62**, 317 (1996).
 - 11) Cohen G. : Oxygen radicals and Parkinson's disease. In oxygen radicals and tissue injury (Ed Halliwell B), FASEB Bethesda MD. p.130 (1988).
 - 12) Carney, J. M., Oliver, C. N., Landum, R. W., Cheng, M. S., Wu, J. F and Floyd, R. A. : Reversal of age-related changes in brain protein oxidation decrease in enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **88**, 3633 (1991).
 - 13) Halliwell B. : Reactive oxygen species and the central nerve system. *J. Neurochem.* **59**, 1609-1623 (1992).
 - 14) Hall, E. D. and Braugler M. J. : The role of oxygen radical-induced lipid peroxidation in acute CNS trauma. Oxygen radicals and tissue injury (Ed Halliwell B), FASEB Bethesda, MD. p. 92 (1988).
 - 15) Coyle, J. T and Puttfarcken, P. : Oxygen stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689 (1993).
 - 16) 강삼식, 윤혜숙 : 전통약물로부터 신약개발 연구법, 서울대 천연물 과학연구소, 서울. p.9 (1993).
 - 17) Giorgi, O., Orlandi, M. and Lecca, D. : MK-801 prevents chemical kindling induced by PTZ in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **193**(3), 363 (1991).
 - 18) Roussinov, K. S., Lazarova, M. B. and Atabassova, S. S. : On certain relationships between GABA and adrenergic mechanism in convulsive-seizure reaction. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* **2**, 69 (1976).
 - 19) Ohkawa H, Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **106**, 207 (1980).
 - 20) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* **165**, 215 (1987).
 - 21) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci.* **8**, 22 (1985).
 - 22) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview: *Methods Enzymol.* **186**, 1 (1990).
 - 23) Ha, J. H., Lee, D. U., Yong, C. S. and Huh, K. : Modulation of ligand binding to the GABA-benzodiazepine receptor complex by *Gastrodia Elata* Blume. *J. Appl. Pharmacol (Korea)*, **5**, 325 (1997).