

## 생약의 Benzodiazepine 수용체 효현활성 검색(I) 수종의 신경안정 생약 추출물에 대한 활성 검색

하정희, 이동웅<sup>1\*</sup>, 박용기<sup>2</sup>, 강병수<sup>2</sup>

영남대학교 의과대학, <sup>1</sup>동국대학교 생화학과, <sup>2</sup>동국대학교 한의과대학

## Agonistic Activities to the Benzodiazepine Receptor by Extracts of Medicinal Plants (I) Screening of Some Sedative Plant Extracts

Jeoung-Hee Ha, Dong-Ung Lee<sup>1\*</sup>, Yong-Ki Park<sup>2</sup> and Byung-Soo Kang<sup>2</sup>

Department of Pharmacology, College of Medicine, Yeungnam University, Taegu, 705-717;

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, College of Natural Science;

<sup>2</sup>College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

**Abstract**—This study was aimed to evaluate an agonistic activity to benzodiazepine receptor of several medicinal plants, which have been used as sedatives in oriental medicine. Methanol extracts of medicinal plants which were used in this study inhibited the binding of [<sup>3</sup>H]Ro15-1788, a selective benzodiazepine receptor antagonist to benzodiazepine receptor of rat cortices. Inhibitory activity of *Cyperus rotundus* was observed to be the highest among the tested medicinal plants. Methanol extracts of *Cyperus rotundus* and *Zizypus jujuba* inhibited a [<sup>3</sup>H]flunitrazepam, a selective benzodiazepine receptor agonist, binding to benzodiazepine receptor. GABA significantly enhanced the inhibition of [<sup>3</sup>H]flunitrazepam binding by *Cyperus rotundus* and *Zizypus jujuba*, and these positive GABA shifts supported the strong possibility of agonistic activity to benzodiazepine receptor. From these results, it may be concluded that the substance or substances with neurochemical properties characteristic of a benzodiazepine receptor agonist may be important components and contribute to the sedative property of these medicinal plants.

**Key words**—Agonistic activity; benzodiazepine receptor; *Cyperus rotundus*; *Zizypus jujuba*.

포유동물의 중추신경계의 중요한 억제성 신경전달체인  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)는 GABA 수용체 복합체의 GABA 수용체에 결합하여 fast-acting, ligand gated 이온통로를 통한 chloride 이온의 세포내 유입을 증강시킴으로써 세포막을 안

정화시킨다. Benzodiazepine 수용체는 GABA-benzodiazepine 수용체 복합체의 한 요소로서 이 수용체가 활성화되면 GABA 수용체의 활성화로 GABA의 그 수용체에 대한 결합이 증가되고, 그 결과 chloride 이온의 세포내 유입이 더욱 증가되는 일련의 과정을 초래하며, 합성 benzodiazepine계 약물의 생체내 반응 즉 불안해소, 진정, 근이완 및

\*교신저자 : Fax 0561-742-9833

항경련작용을 매개하는 중요한 역할을 하고 있다.<sup>1)</sup> 이러한 합성 benzodiazepine계 약물들은 효능이 높은 대신 장기 사용시 내성 및 의존성이 나타나 보다 개선된 새로운 약제의 개발이 필요하다.

생체(실험동물 및 인체)내에도 합성물질과 유사한 천연의 benzodiazepine의 존재가 보고<sup>2-7)</sup> 된 이후, 최근 이들에 대한 연구가 진행중이며, Medina 등<sup>8)</sup>은 남미의 전통진정제로 사용된 생약인 *Passiflora coerulea*로부터 chrysin을 분리하여 이 성분이 중추성 및 말초성 benzodiazepine 수용체에 대한 효현 활성과 함께 항경련 및 근이완작용이 있음을 보고하였다. Lee 등<sup>9)</sup>은 중국의 전통 생약인 *Salvia miltiorrhiza*로부터 miltrone을 분리하였으며, 이 화합물은 중추성 benzodiazepine 수용체에 대한 부분효현제 (partial agonist)로써 급성 근이완작용이나 의존성이 없는 우수한 약리작용을 나타내었다. Viola 등<sup>10)</sup>은 남미의 전통약용차인 *Matricaria recutita*로부터 중추성 benzodiazepine 수용체의 효현활성이 있는 apigenin을 분리하였으며, 이 성분은 생체에서 불안해소작용을 나타내었다. 이러한 생약재료로부터 분리된 활성 성분들은 benzodiazepine 수용체에 대한 부분 효현 활성을 보임으로써 현재 임상에서 사용되고 있는 benzodiazepine계 약물의 심각한 문제점인 내성 및 의존성을 극복할 가능성이 시사되었다.<sup>11-13)</sup>

이에 본 연구에서는 생약으로부터 신경안정물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 우선 한방에서 신경안정의 목적으로 처방되고 있는 수종의 약재의 조추출물에 대한 benzodiazepine 수용체 효현활성을 검색하였다.

## 재료 및 방법

**식물재료** - 실험에 사용된 생약은 시중에서 구입하여 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 감별, 확인하였으며 분말로 만들어 사용하였다.

**기기 및 시약** - 원심분리기는 Beckman제품을, Harvester는 Brandel M-24R를, 그리고 Liquid Scintillation Counter는 Beckman LS 5801을 사용하여 측정하였다. 방사성 동위원소는 Dupont-NEN (Boston, MA, USA)사 제품을, diazepam 및 Ro 14-7437은 Roche사 제품을 사용하였다. GABA

를 비롯한 기타 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였으며 Scintillation cocktail은 Packard사 제품 (Aquasol-2)을 사용하였다. 제작한 각종 조직표본의 단백질 정량을 위하여 bicinchoninic acid 정량 kit을 Pierce사로부터 구입 사용하였다

**시료조제** - 분말로 된 재료 각 100 g을 methanol 300 ml로 가운하에 2시간 추출하고 농축한 다음, 동결건조기로 완전 건조시킨 것을 50 mM tris-citrate 완충용액에 현탁하여 실험에 사용하였다.

**수용체 표본제작** - Benzodiazepine 수용체 표본 제작을 위하여 흰쥐 (웅성, 250-300 g, Sprague-Dawley)는 단두 후 희생시켜, 즉시 대뇌피질조직을 분리하였다. 대뇌피질조직은 무게를 잰 후 50배 부피의 50 mM tris-citrate 완충용액 (pH 7.4)에서 균질화하였다. 균질화한 조직은 20분간 원심분리 (20,000×g, 4℃)시킨 후, 침전물을 다시 50배 부피의 tris-citrate 완충용액에 재분배시켰다. 이와 같은 과정을 3-5번 반복한 후 최종적인 조직침전물을 완충용액에 재분배시킨 후 사용전까지 -70℃에 보관하였다.

**수용체 결합반응** - Benzodiazepine 수용체 결합 반응을 위한 [<sup>3</sup>H]Ro15-1788 (specific activity = 87.0 Ci/mmol) 및 [<sup>3</sup>H] flunitrazepam (specific activity = 82.0 Ci/mmol) 결합반응에서는 각 시험관 당 50 μl의 대뇌피질조직 (약 0.16 mg 단백질에 해당), 50 μl의 방사성 동위원소와 50 μl의 각종 약물(생약 추출액 포함)을 사용하였으며, 50 mM tris-citrate 완충용액을 첨가하여 총 부피 500 μl가 되게 하였다. 모든 assay는 duplicate 혹은 triplicate로 하여 적어도 한 실험을 6회이상 반복하였다. [<sup>3</sup>H] Ro15-1788 결합반응을 위한 실험은 혼합물이 든 시험관을 실온에서, [<sup>3</sup>H] flunitrazepam 결합반응을 위해서는 0-4℃에서 각각 한 시간 방치시킨 후, GF/B 여과지 (Whatman) 상에서 결합분획과 비결합분획을 신속히 분리하였다. 여과지상의 결합분획이 내는 방사성 활성도는 liquid scintillation counter를 사용하여 측정하였다. 제작한 대뇌피질 조직의 단백질 함량은 bicinchoninic acid법을 사용하여 측정하였다.

Benzodiazepine 수용체에 대한 선택적 길항제인 [<sup>3</sup>H]Ro15-1788의 결합 반응에서 생약추출물에 함

유되어 있는 benzodiazepine 수용체에 대한 억제 성물질의 총량의 측정은 동일한 조건하에서 이루어진 이미 알고 있는 용량의 diazepam을 사용하여 반응검사 결과 얻어진 competition 곡선을 비교, 분석하여 계산하였다. 생약추출물내의 benzodiazepine 수용체 활성물질의 활성도의 총량은 'diazepam equivalent' (mg diazepam/g weight) 로 표시하였다.

**통계처리** - 수용체 결합반응에서 얻어진 결과는 비선형회귀 (nonlinear regression, Graphpad Prism, Graphpad Software, Sandiago, CA, USA)시켜 분석하였으며, 각군간의 성적변화의 통계학적 유의성 검정은 ANOVA로 분석후 Neuman-Keul's multiple comparison test를 사용하거나 Student's t-test를 사용하였다.

**결과 및 고찰**

신경안정의 목적으로 사용되고 있는 생약 9종의 조추출물을 대상으로 수용체 효현활성을 검색한 결과, benzodiazepine 수용체 길항제인 [<sup>3</sup>H]Ro15-1788의 흰쥐 대뇌피질막에 대한 결합반응을 용량의 존적으로 억제하였는데, 이러한 억제성 활성도를 표준 약물과 비교하기 위하여 현재 임상에서 신경안정 목적으로 가장 널리 사용되고 있는 diazepam의 benzodiazepine 수용체에 대한 [<sup>3</sup>H]Ro15-1788의 결합반응에서의 억제성 활성도와 비교하였다. 생약추출물 무게(g)당 diazepam 해당량(mg)으로 나타낸 값인 diazepam equivalent (mg/g weight)는 향부자 추출물의 경우가 239.4±7.64 mg/g weight 으로서 다른 생약추출물에 비하여 유의하게 (p<0.05) 높았으며, 석창포 추출물의 경우가 130.7±8.71, 백자인 추출물의 경우가 114.0±3.86, 합환피 추출물의 경우가 61.0±2.82, 조구등 추출물의 경우가 37.4±3.09, 용안육 추출물의 경우가 21.6±1.15, 산조인의 경우가 18.7±0.78, 원지 추출물의 경우가 7.5±0.47이었으며, 백복신 추출물의 경우가 0.4±0.02으로써 가장 미약한 억제 반응을 나타내었다 (Table I).

일반적으로 수용체 효현제는 길항제와 마찬가지로 수용체에 결합을 하지만 길항제와는 달리 세포내 약리작용을 나타낸다. Diazepam과 같은 benzo-

**Table I.** Inhibition of [<sup>3</sup>H]Ro15-1788 binding to rat cerebral cortical membranes by medicinal plants

Medicinal plants	Diazepam equivalents (mg/g)
<i>Zizyphus jujuba</i>	18.7±0.78
<i>Albizzia julibrissin</i>	61.0±2.82
<i>Acorus gramineus</i>	130.7±8.71
<i>Cyperus rotundus</i>	239.4±7.64*
<i>Thuja orientalis</i>	114.0±3.86
<i>Poria cocos</i>	0.4±0.02
<i>Euphoria longan</i>	21.6±1.15
<i>Polygala tenuifolia</i>	7.5±0.47
<i>Uncaria rhynchophylla</i>	37.4±3.09

Values represent mean±SE of 9 experiments. \*p<0.05: Significantly different from the others.

diazepine 수용체 효현제는 [<sup>3</sup>H]Ro15-1788의 결합반응을 억제시킬 뿐 아니라 중추성 benzodiazepine 수용체 효현제인 [<sup>3</sup>H]flunitrazepam의 benzodiazepine 수용체에 대한 결합을 억제시킨다. 또 이러한 [<sup>3</sup>H]flunitrazepam의 결합 억제작용은 GABA와 chloride 이온존재하에서 결합억제 활성이 더욱 증가하는 특징적인 GABA 증강현상을 나타낸다.<sup>1,3,7,14)</sup>

본 연구에 사용된 생약들 중 산조인과 향부자의 추출물은 [<sup>3</sup>H]flunitrazepam의 benzodiazepine 수용체에 대한 결합을 억제시켰으며, 그 억제도 (% inhibition)는 산조인의 경우가 3.4±0.78%, 향부자 추출물의 경우가 0.7±0.42%이었다. 20 μM GABA 및 120 mM NaCl 존재하에서 [<sup>3</sup>H]flunitrazepam 결합은 66%까지 증가하였으나 산조인과 향부자의 추출물 존재하에서 결합이 억제되었으며, 그 억제도는 산조인의 경우가 48.0±1.78%, 향부자 추출물의 경우가 19.5±0.42%로써 20 μM GABA 및 120 mM NaCl이 존재하지 않는 대조군의 3.4±0.78% 및 0.7±0.42%에 비하여 유의하게

**Table II.** Effect of GABA on the inhibition of [<sup>3</sup>H]flunitrazepam binding by medicinal plants

Medicinal plants	Percent inhibition	
	Control	GABA/NaCl
<i>Zizyphus jujuba</i>	3.4±0.78	48.0±1.78*
<i>Cyperus rotundus</i>	0.7±0.42	19.5±0.42*

Values represent mean±SE of 9 experiments. \*p<0.05: Significantly different from the control.

**Table III.** Effect of GABA on the enhancement of [<sup>3</sup>H]flunitrazepam binding by medicinal plants

Medicinal plants	Percent enhancement	
	Control	GABA/NaCl
<i>Albizzia julibrissin</i>	29.4±3.42	-(19.5±0.97)
<i>Acorus gramineus</i>	17.1±0.65	-(28.1±1.69)
<i>Thuja orientalis</i>	60.9±3.17	-(1.6±1.67)
<i>Poria cocos</i>	21.8±2.32	2.5±0.06*
<i>Euphoria longan</i>	44.3±1.29	10.0±1.14*
<i>Polygala tenuifolia</i>	52.0±4.28	-(17.9±1.45)
<i>Uncaria rhynchophylla</i>	10.9±0.86	-(24.8±2.11)

Values represent mean±SE of 9 experiments.

\*p<0.05: Significantly different from the others.

(p<0.05) 증가하였다 (Table II).

산조인과 향부자를 제외한 생약은 [<sup>3</sup>H]flunitrazepam의 수용체 결합반응을 오히려 항진시켰으며, 그 항진도(% enhancement)는 백자인 추출물의 경우가 60.9±3.17, 원지 추출물의 경우가 52.0±4.28, 용안육 추출물의 경우가 44.3±1.29, 합환피 추출물의 경우가 29.4±3.42, 석창포 추출물의 경우가 17.1±0.65, 백복신 추출물의 경우가 21.8±2.32, 주구 등 추출물의 경우가 10.9±0.86의 항진 효과를 나타내었다. 20 μM GABA 및 120 mM NaCl 존재하에서 같은 실험을 반복하였을 때, 백복신 추출물의 경우는 그 항진도가 2.5±0.06, 용안육 추출물의 경우가 10.0±1.14으로써 대조군의 21.8±2.32 및 44.3±1.29에 비하여 유의하게(p<0.05) 감소되었다. [<sup>3</sup>H]flunitrazepam의 수용체 결합증강 현상은 소실되었고 오히려 결합 억제현상이 관찰되었으며, 그 억제도(% inhibition)는 석창포 추출물의 경우가 28.1±1.69, 조구등 추출물의 경우가 24.8±2.11, 향부자 추출물의 경우가 19.5±0.97, 원지 추출물의 경우가 17.9±1.45, 합환피 추출물의 경우가 17.1±2.71, 백자인 추출물의 경우가 1.6±1.67이었다 (Table III).

이상의 결과로부터 수종의 생약들은 benzodiazepine 수용체에 대한 결합력이 있으며 이중 향부자의 추출물이 활성도가 가장 높은 것으로 나타났다. 또 GABA의 존재하에서 [<sup>3</sup>H]flunitrazepam의 수용체 결합 억제현상이 항진되는 GABA 증강현상을 강하게 나타냄으로써 이들 생약 추출물내에는 benzodiazepine 수용체에 효현제 활성을 가지는 물질이 존재할 것으로 생각되었다.

## 결 론

신경안정 목적으로 사용되고 있는 9종의 생약을 대상으로 방사성 동위원소를 이용한 신경수용체 결합반응을 실시하여 benzodiazepine 수용체에 대한 활성도를 검색하고자 하였으며 이를 위하여 선택적인 benzodiazepine 수용체 길항제인 [<sup>3</sup>H]Ro 15-1788의 수용체에 대한 결합반응이 생약추출물에 의해 억압되고, benzodiazepine 수용체 효현제인 [<sup>3</sup>H]flunitrazepam의 수용체에 대한 결합반응이 생약추출물에 의해 억제되며, 중추신경계의 중요한 억제성 신경전달물질인 GABA의 존재가 이를 더욱 항진시키는 GABA 증강 현상을 확인함으로써 이들 생약의 효현활성을 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생약추출물들은 benzodiazepine 수용체 길항제인 [<sup>3</sup>H]Ro15-1788의 환귀 대뇌피질막에 대한 결합반응을 용량의존적으로 억제하였는데, 이러한 억제성 활성도는 향부자 추출물의 경우가 가장 높았다.

2. 산조인과 향부자의 추출물은 benzodiazepine 수용체 효현제인 [<sup>3</sup>H]flunitrazepam의 benzodiazepine 수용체에 대한 결합을 억제시켰으며, 20 μM GABA 및 120 mM NaCl 존재하에서 같은 실험을 반복하였을 때, 그 결합 억제현상이 항진되는 현상을 나타내었다.

3. 이상의 결과로부터 향부자와 산조인은 benzodiazepine 수용체에 대한 결합력이 있으며 또 GABA의 존재하에서 [<sup>3</sup>H]flunitrazepam의 수용체 결합 억제현상이 항진되는 GABA 증강현상을 강하게 나타냄으로써 이들 생약에는 benzodiazepine 수용체에 효현제 활성을 가지는 물질이 존재할 것으로 생각되어 앞으로 성분에 관한 계속적인 연구가 요망된다.

## 사 사

본 연구는 1997년도 한의학발전연구지원사업의 연구비 지원으로 수행되었기에 이에 감사한다.

## 인용문헌

1. Stephen, M. S. (1996) *In Essential psychophar-*

- macology, 167-215. Cambridge University Press, New York.
2. Medina, J. H., Danelon, J. L., Wasowski, C., Levi de Stein, M. and Paladini, A. C. (1991) Production of benzodiazepine-like compounds in bovine rumen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 1046-1055.
  3. Basile, A. S., Jones, E. A. and Skolnick, P. (1991) The pathogenesis and treatment of hepatic encephalopathy: evidence for the involvement of benzodiazepine receptor ligands. *Pharmacol. Rev.* 43: 28-71.
  4. Piva, M., Medina, J. H., de Blas, A. L. and Pena, C. (1991) Formation of benzodiazepine-like molecules in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 961-972.
  5. Medina, J. H., Pena, C., Piva, M., Wolfman, C., Stein, M. L., Wasowski, C., Da Cunkha, C., Izquierdo, I. and Paladini, A. C. (1992) Benzodiazepines in the brain. *Molecul. Neurobiol.* 6: 377-386.
  6. Medina, J. H., Paladini, A. C. and Izquierdo, I. (1993) Naturally occurring benzodiazepines and benzodiazepine-like molecules in brain. *Brain Res.* 600: 1-8.
  7. Drugan, R. C., Basile, A. S., Ha, J. H. and Ferland, R. J. (1994) The protective effects of stress control may be mediated by increased brain levels of benzodiazepine receptor agonists. *Brain Res.* 661: 127-136.
  8. Medina, J. H., Paladini, A. C., Wolfman, C., Levi, S. M., Calvo, D., Diaz, L. E. and Pena, C. (1990) Chrysin(5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. *Biochem. Pharmacol.* 40: 2227-2232.
  9. Lee, C-M., Wong, H.N-C., Chui, K-Y., Choang, T-F., Hon, P-M. and Chang, H-M. (1991) Milt-rone, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza*. *Neuroscience Letters* 127: 237-241.
  10. Viola, H., Wasowski, C., Stein, M. L., Wolfman, C., Silveria, R., Dajas, F., Medina, J. H., and Paladini, A. C. (1995) Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med.* 61: 213-216.
  11. Haefely, W., Martin, J. R., and Schoch, P. (1990) Novel anxiolytics that act as partial agonists at benzodiazepine receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* 11: 452-456.
  12. Brabcova, R., Kubova, H., Velisek, L., and Mares, P. (1993) Effects of a benzodiazepine, bretazenil (Ro16-6028), on rhythmic metrazol EEG activity: Comparison with standard anticonvulsants. *Epilepsia* 34: 1135-1140.
  13. Steppun, K. G., Schneider, H. H., Turski, L. and Stephens, D. N. (1993) Long-term treatment with abecarnil does not induce diazepam-like dependence in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 1395-1400.
  14. Ha, J. H., Pannell, L., Drugan, R. C., Ferland, R. and Basile, A. S. (1996). *In Neuroscience protocols*, 1-12. Elsevier Sciences, Amsterdam. (1999년 1월 10일 접수)