

생약의 Benzodiazepine 수용체 효능활성 검색(II). 천마성분 및 유효분획의 활성

하정희, 이동웅^{1*}, 용철순², 김정애², 허 근²

영남대학교 의과대학, ¹동국대학교 자연과학대학, ²영남대학교 약학대학

Agonistic Activities to the Benzodiazepine Receptor by Extracts of Medicinal Plants(II). Activities of Component and Active Fractions from *Gastrodia elata*

Jeoung-Hee Ha, Dong-Ung Lee^{1*}, Chul-Soon Yong², Jung-Ae Kim² and Keun Huh²

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

¹Department of Biochemistry, College of Natural Science, Dongguk University, Kyongju 780-714;

²College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract – In order to find active ingredients having an agonistic activity to benzodiazepine receptor from *Gastrodia elata* Blume (Orchidaceae) which has been used as an anticonvulsant in oriental medicine, one component and some fractions were separated from the butanol extract of the rhizomes of this plant and evaluated for their activities on GABA/benzodiazepine receptor *in vitro*. As a result, one crude mixture (F4f) obtained from the most active fraction (F4) inhibited significantly the binding of [³H]Ro15-1788, a selective benzodiazepine receptor antagonist, to benzodiazepine receptor of rat cortices. GABA significantly enhanced the inhibition of [³H]flunitrazepam binding by F4f, and this positive GABA shift supported the strong possibility of the agonistic activity of F4f to benzodiazepine receptor.

Key words – *Gastrodia elata* Blume; anticonvulsant; GABA; benzodiazepine; receptor agonist.

천마 (天麻, *Gastrodia elata* Blume)는 난초과 (Orchidaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 한국, 일본, 중국 등지에 자생하며 엽록소가 없어서 탄소동화작용을 이용한 영양물질의 광합성이 불가능하고, 뿌리도 없으므로 기생하는 곰팡이 (*Armillaria mellea*)로부터 영양을 공급받아 성장한다. 천마의 근경은 옛부터 두통, 신경통, 현기증, 소아경련, 간질, 류마티스 등에 사용되어 왔으며^{1,2)} 최근 새로운 약리활성으로서 항혈전작용,³⁾ 항산화작용,⁴⁾ GABA성 신경 전달 조절작용⁵⁾이 있음이 밝혀졌고 항경련작용기전이 보고되었다.⁶⁾

지금까지 분리된 천마의 성분은 대부분 페놀성 화합물로서 *gastrodin*을 비롯한 페놀성 배당체,^{7,8)} *ga-*

strodigenin 외 다수의 페놀성 화합물,^{7,9,10)} 그리고 유허 함유 페놀성 화합물^{11,12)} 등이 있으며 비페놀성 화합물로는 *circiumaldehyde*가 보고되어 있다.¹³⁾ 이와 같이 천마의 성분은 최근까지 계속 분리되고 있으며 천마의 다양한 약리활성을 고려하면 앞으로도 미지성분에 관한 연구가 더 이루어져야 할 것이다.

저자 등은 천마의 조추출물이 GABA/benzodiazepine 수용체에 대한 효능활성을 가지고 있음을 확인하고, 이러한 수용체 활성도를 나타내는 유효성분을 추적할 목적으로 조추출물의 분획화를 실시하였으며, 그 결과 *butanol* 분획이 *in vivo*에서 생쥐의 *pentyleneetetrazole* 유발 경련을 유의하게 감소시킴을 확인하였다.⁵⁾ 이에 따라 천마로부터 *benzodiazepine* 수용체 효능활성을 나타내는 성분을 탐색하고

*교신저자 : Fax 0561-742-9833

자 butanol분획을 chromatography법으로 재분획화하여 일부 성분 및 가장 유효한 성분분획을 분리하고 이들의 활성을 비교, 검토하였다.

재료 및 방법

식물재료 - 실험에 사용된 천마 근경은 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. NMR은 Varian Gemini200 (200 MHz) (internal standard:TMS)을 사용하여 측정하였으며 HPLC는 LC-10AD(Shimadzu)로 분석하였다. 방사성 동위원소는 Dupont-NEN(Boston, MA, USA)사 제품을, diazepam, [³H]Ro15-1788, Ro14-7437은 Roche사 제품을 사용하였다. GABA를 비롯한 기타 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였으며 Scintillation cocktail은 Packard사 제품 (Aquasol-2)을 사용하였다. 제작한 각종 조직 표본의 단백질 정량을 위하여 bicinchoninic acid 정량 kit을 Pierce사로부터 구입 사용하였다.

시료분획 제조 및 성분분리 - 전보³⁾의 방법에 따라 천마의 butanol분획을 제조한 다음, silicagel을 사용한 column chromatography법으로 5개의 소분획(F1-F5)으로 나누었다. 용매는 CHCl₃-MeOH (19:1)에서 CHCl₃-MeOH(9:1)로 극성을 증가시키면서 분리하였다. 분획가운데 가장 활성이 강하게 나타난 소분획 F4를 다시 CHCl₃-MeOH(1:1)로 분리하여 한 종류의 단일성분, oil상 혼합물 및 약간 불순한 상태의 분말(F4f)을 얻고 이들의 활성을 비교하였다. F4f의 HPLC분석은 CLC-ODS를 충전한 reverse phase column (4×250 mm)을 사용하여 260 nm에서 측정하였다.

수용체 표본제작 - Benzodiazepine 수용체 표본제작을 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°C) 시킨 후, 침전물을 다시 50배 부피의 tris-citrate 완충용액에 재분배시켰다. 이와 같은 과정을 3-5번 반복한 후 최종적인 조직침전물을 완충용액에

재분배시킨 후 사용전까지 -70°C에 보관하였다.

수용체 결합반응 - Benzodiazepine 수용체 결합반응을 위한 [³H]Ro15-1788 (specific activity=87.0 Ci/mmol) 및 [³H] 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 500μl가 되게 하였다. 모든 assay는 duplicate 혹은 triplicate로 하여 적어도 한 실험을 6회이상 반복하였다. [³H]Ro15-1788 결합반응을 위한 실험은 혼합물이 든 시험관을 실온에서, [³H]flunitrazepam 결합반응을 위해서는 0-4°C에서 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 [³H]Ro15-1788의 결합 반응에서 시료에 함유되어 있는 benzodiazepine 수용체에 대한 억제성물질의 총량의 측정은 동일한 조건하에서 이루어진 이미 알고 있는 용량의 diazepam을 사용하여 반응검사 결과 얻어진 competition 곡선을 비교, 분석하여 계산하였다. 시료분획내의 benzodiazepine 수용체 활성 물질의 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

활성분획 및 성분분리 - 천마근경의 methanol추출물을 순차적으로 butanol로 분획화한 다음, 다시 용매의 극성을 달리하여 분리한 5개의 소분획(극성이 증가하는 순서로 F1부터 F5까지)을 대상으로 benzodiazepine 수용체에 대한 효현활성을 검색한 결과, F4분획이 가장 활성이 강하였다. 이 분획은 TLC에

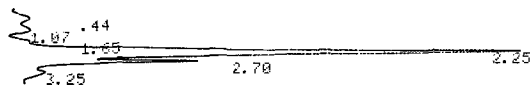


Fig. 1. HPLC chromatogram of F4f. The purity of the main compound (Rt=2.25 min) was determined to be 71.543%.

서 극성이 다른 다수의 화합물을 함유하고 있었으므로 column chromatography로 3개의 분획으로 나누었다. 첫째 분획에서 얻은 화합물은 기기분석(NMR) 및 표준품과의 비교에서 gastrodigenin⁷⁾으로 동정하였다. 이 화합물은 천마의 주성분으로 알려진 gastrodin의 aglycone이다. 둘째 분획은 불순한 oil 상 혼합물로 얻어졌으며 마지막으로 극성이 가장 강한 부분은 정제되지 않은 분말형태(F4f)로 분리하였다. 가장 강한 활성을 보인 F4f는 성분예시시험에서 배당체의 혼합물로 추정되었으나 FeCl₃ test와 Liebermann-Burchard test에 모두 음성으로 나타나 페놀성 배당체나 saponin이 아닌 다른 종류의 배당체가 함유되어 있는 것으로 추정하였다. 이 F4f는 HPLC(Fig. 1)에서 두 개의 peak로 나타났는데 주 성분(Rt=2.25 min.)의 함량은 전체 분획중에 약 71.5%이었으며 미량 성분(Rt=2.70 min.)은 약 16.1%정도 혼재되어 있었다.

Benzodiazepine 수용체 효능활성 - 포유동물의 중추신경계의 중요한 억제성 신경전달체인 *g*-aminobutyric acid(GABA)는 GABAA 수용체 복합체의 GABA 수용체에 결합하여 fast-acting, ligand gated 이온통로를 통한 chloride 이온의 세포내 유입을 증강시킴으로써 세포막을 안정화시킨다. Benzodiazepine 수용체는 GABAA-benzodiazepine 수용체 복합체의 한 요소로써 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 항경련작용을 매개하는 중요한 역할을 하고 있다.¹⁴⁾ 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 보고¹⁵⁻²⁰⁾ 된 이후, 최근 이들에 대한 연구가 진행중이며, Medina 등²¹⁾은 남미의 전통진정제로 사용된 생약인 *Passiflora*

*coerulea*로부터 chrysin을 분리하여 이 성분이 중추성 및 말초성 benzodiazepine 수용체에 대한 효능활성과 함께 항경련 및 근이완작용이 있음을 보고하였다. Lee 등²²⁾은 중국의 전통 생약인 *Salvia miltiorrhiza*로부터 miltrone을 분리하였으며, 이 화합물은 중추성 benzodiazepine 수용체에 대한 부분효능제(partial agonist)로써 급성근이완작용이나 의존성이 없는 우수한 약리작용을 나타내었다. Viola 등²³⁾은 남미의 전통약용차인 *Matricaria recutita*로부터 중추성 benzodiazepine 수용체의 효능활성이 있는 apigenin을 분리하였으며, 이 성분은 생체에서 불안해소작용을 나타내었다. 이러한 생약제로부터 분리된 활성 성분들은 benzodiazepine 수용체에 대한 부분 효능활성을 보임으로써 현재 임상에서 사용되고 있는 benzodiazepine계 약물의 심각한 문제점인 내성 및 의존성을 극복할 가능성이 시사되었다.^{24,26)}

전보⁵⁾에서 천마의 benzodiazepine수용체 효능활성 분획은 여러 가지의 용매분획중에서 butanol분획임을 확인하였으며 이번의 연구에서는 butanol분획을 재분획하여 얻은 5개의 분획(F1-F5)을 대상으로 benzodiazepine 수용체의 선택적인 길항제인 [³H]Ro15-1788의 수용체에 대한 결합 반응을 억제하는 활성도를 측정하였다. 그 결과, F4분획의 diazepam equivalent(mg/g of fraction)는 820±9.8로써 F1의 130±12.6, F2의 60±7.8, F3의 215±2.4, F5의 210±7.9에 비하여 유의하게 높았으며, butanol분획의 200±9.8에 비하여 유의하게(p<0.05) 높았다 (Table I).

F1분획과 F2분획은 butanol추출물 보다 오히려 활성이 낮았으며 F3분획과 F4분획은 butanol추출물 보다 활성이 약간 강하게 나타났으므로 수용체 효능활성을 나타내는 성분은 비교적 극성이 큰 화합물로

Table I. Inhibition of [³H]Ro15-1788 binding to the benzodiazepine receptors by fractions from the butanol extract of *Gastrodia elata*

Fractions	Diazepam equivalent (μg/g of fraction)
Butanol	200 ± 9.8
F1	130 ± 12.6
F2	60 ± 7.8
F3	215 ± 2.4
F4	820 ± 9.8*
F5	210 ± 7.9

*p<0.05: Significantly different from the others.

Table II. Inhibition of [³H]Ro15-1788 binding to the benzodiazepine receptors by component and subfractions from F4 fraction of *Gastrodia elata*

Fractions	Diazepam equivalent (μg/g of fraction)
F4	820 ± 9.8
gastrodigenin	-
oily mixture	426,000 ± 1,260*
F4f	66,890 ± 450 [#]

*p<0.05: Significantly different from the others.

[#]p<0.05: Significantly different from F4 fraction.

추정되었다. 활성이 매우 강한 F4분획에서 분리한 gastrodigenin은 [³H]Ro15-1788의 benzodiazepine 수용체에 대한 결합 반응을 억제하지 않았으며, oil 상 혼합물의 경우에는 [³H]Ro15-1788의 benzodiazepine 수용체에 대한 결합반응을 억제하였는데, diazepam equivalent(mg/g of fraction)는 426,000 ± 1,260으로써 F4f의 66,890 ± 450에 비하여 유의하게 (p<0.05) 높게 관찰되었다(Table II). 그러나 이 oil 상 혼합물은 benzodiazepine 수용체 효능제인 [³H] flunitrazepam 결합반응에서 positive GABA shift를 나타내지 않으므로써 효능활성이 없는 것으로 관찰되었다(Table III). F4분획에서 분리된 불순한 분말형태의 F4f는 benzodiazepine 수용체 길항제인 [³H]Ro15-1788과 수용체 결합반응을 용량 의존적인 양상으로 억제하였는데, diazepam equivalent(μg/g of fraction)는 66,890 ± 450으로써 F4분획의 820 ± 9.8에 비하여 유의하게 (p<0.05) 높게 관찰되어 F4f는 benzodiazepine 수용체의 선택적인 길항제인 [³H]Ro15-1788의 수용체에 대한 결합 반응을 억제하는 활성도가 높음을 확인하였다(Table II, Fig. 2).

이러한 활성도의 특성을 검색하기 위하여 [³H]Ro15-1788를 사용한 포합결합반응(saturation binding assay)을 실시하였으며, 그 결과 F4f의 존재하에

Table III. Effect of GABA on inhibition of [³H]flunitrazepam binding by oily mixture to the benzodiazepine receptors of rat cerebral cortices

	Percent inhibition of [³ H]	
	control	GABA/NaCl
diazepam	58.3 ± 1.2	70.3 ± 0.7*
oily mixture	61.9 ± 1.6	53.4 ± 0.9*

Values represent mean ± SE of 5~7 experiments.

*p<0.05: Significantly different from the control.

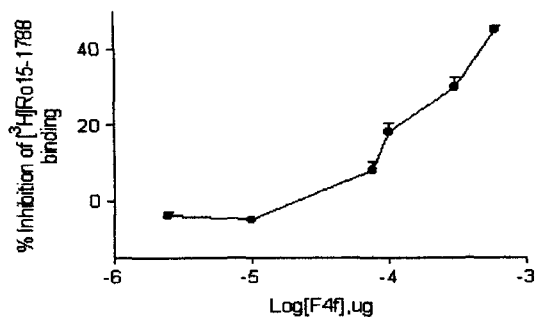


Fig. 2. Effect of F4f fraction of [³H]Ro15-1788 binding to the benzodiazepine receptor of rat cortices values represent mean ± SE of 7 experiments. *p<0.05: Significantly different from the control.

서 [³H]Ro15-1788의 benzodiazepine 수용체에 대한 결합 반응의 최대결합력(Bmax, pmol/mg protein)은 1.4 ± 0.52으로서 대조군의 1.6 ± 0.16에 비하여 유의한 차이가 없었으며, 친화도(Kd, nM)은 12.6 ± 0.59으로서 대조군의 5.1 ± 0.48에 비하여 유의하게 (p<0.05) 증가하여, F4f가 [³H]Ro15-1788의 benzodiazepine 수용체에 대한 결합반응을 상경적으로 억제함을 관찰하였다(Table IV).

한편, F4f는 benzodiazepine 수용체 효능제인 [³H]flunitrazepam의 흰쥐 대뇌피질 benzodiazepine 수용체에 대한 결합반응을 억제하였는데, 그 억제도(%)는 22.2 ± 1.6이었으며, 120 mM NaCl 및 20 mM GABA 존재하에서 그 억제도(%)는 45.1 ± 0.9으로써 대조군에 비하여 유의하게 (p<0.05) 항진되는 positive GABA shift²⁷⁾가 관찰되어 F4f가 흰쥐 대뇌피질의 benzodiazepine 수용체에 대하여 효능활성을 가짐을 확인하였다(Fig 3).

Table IV. Alteration of equilibrium binding constants of [³H]Ro15-1788 binding to the benzodiazepine receptor of rat cortices by F4f

	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg of protein)
control	5.1 ± 0.48	1.6 ± 0.16
F4f	12.6 ± 0.59	1.4 ± 0.52

The Kd and Bmax values were determined using non-linear regression analysis. Values represent mean ± SE of 7 experiments. *p<0.05: Significantly different from the control.

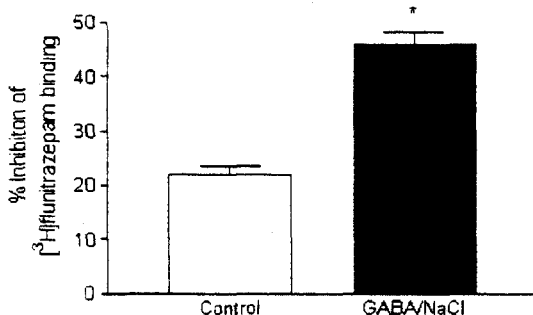


Fig. 3. Effect of GABA on inhibition of $[^3\text{H}]$ flunitrazepam binding by F4f fraction. Data are mean \pm SE values from 7 observation. GABA/NaCl: group treated with 120 mM NaCl and 20 μM GABA. * $p < 0.05$: Significantly different from the control.

결론

천마 근경으로부터 activity-guided fractionation에 의한 유효분획을 선별하고 일부 성분을 분리하였으며 이들에 대한 benzodiazepine 수용체 효능활성을 검토하였다. Benzodiazepine 수용체 길항제인 $[^3\text{H}]$ Ro15-1788의 수용체에 대한 결합 반응 억제활성을 측정된 결과, 극성분획의 활성이 강하게 나타났다. 이 분획에서 분리된 미정제물질은 benzodiazepine 수용체 효능제인 $[^3\text{H}]$ flunitrazepam의 수용체 결합반응을 용량 의존적인 양상으로 억제하였으며, 포합 결합반응 결과 상경적인 억제현상을 나타내어 benzodiazepine 수용체에 대한 활성도를 나타내었다. 미정제 물질의 $[^3\text{H}]$ flunitrazepam 결합반응 억제효과는 120 mM NaCl 및 20 mM GABA 존재하에서 대조군에 비하여 향진되는 positive GABA shift가 관찰되어 benzodiazepine 수용체 효능제로 확인되었다.

사사

본 연구는 1998년도 보건복지부 보건의료기술연구개발사업(의약품분야/신약탐색연구: 과제번호:HMP-97-D-4-0019) 연구비지원에 의한 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Besnky, D. and Gamble, A. (1986) Chinese herbal medicine materia medica. 605-605.

Eastern Press, Seattle.

- Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992) Chinese drugs of plant origin, chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine. 545-547. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- 백영숙, 송재경, 윤춘희, 정교순, 윤혜숙 (1995) 천마 (*Gastrodia elata* Blume)의 항 혈소판, 항혈전 활성. 생약학회지 26(4): 385-389.
- 허근, 김진숙, 권태평, 김정애, 용철순, 하정희, 이동웅 (1998) 펜틸렌테트라졸 투여 쥐위에서의 천마의 항경련작용 기전. 약학회지 42(3): 330-335.
- 하정희, 이동웅, 어경운, 하정상, 김현주, 용철순, 허근 (1997) 천마의 GABA- benzodiazepine 수용체 복합체에 대한 조절작용. 응용약물학회지 5: 325-330.
- 허근, 이수진, 신익섭, 박종민 (1995) 천마의 항경련작용기전 연구. 응용약물학회지 3: 199-204.
- Taguchi, H., Yosioka, I., Yamasaki, K. and Kim, I. L. (1981) Studies on the Constituents of *Gastrodia elata* Blume. *Chem. Pharm. Bull.* 29: 55-62.
- Lin, J.-H., Liu, Y.-C., Hau, J.-P. and Wen, K.-C. (1996) Parishins B and C from rhizomes of *Gastrodia elata*. *Phytochem.* 42: 549-551.
- Noda, N., Kobayashi, Y., Miyahara, K. and Fukahori, S. (1995) 2,4-Bis-(4-hydroxybenzyl) phenol from *Gastrodia elata*. *Phytochem.* 39: 1247-1248.
- Yun-Choi, H. S., Pyo, M. K. and Park, K. M. (1998) Isolation of 3-O-(4'-hydroxybenzyl)- β -sitosterol and 4-[4'-(4"-hydroxybenzyloxy)benzyloxy] benzyl methyl ether from frash tubers of *Gastrodia elata*. *Arch. Pharm. Res.* 21: 357-360.
- Yun-Choi, H. S. and Pyo, M. K. (1997) Isolation of 4,4'-dihydroxybenzyl sulfoxide from *Gastrodia elata*. *Arch. Pharm. Res.* 20: 91-92.
- Andersson, M., Bergendorff, O., Nielsen, M., Sterner, O., Witt, R., Ai, J., Lu, A. and Wang, A. M. (1995) Inhibition of kainic acid binding to glutamate receptors by extracts of *Gastrodia*. *Phytochem.* 38: 835-836.
- Yun-Choi, H. S., Pyo, M. K. and Park, K. M. (1997) Circiumaldehyde from *Gastrodia elata*. *Nat. Prod. Sci.* 3: 104-105.

14. Stephen, M. S.(1996) *In* Essential psychopharmacology. 167-215. Cambridge University Press, New York.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Medina, J. H., Pena, C., Piva, M., Wolfman, C., Stein, M. L., Wasowski, C., Da Cunha, C., Izquierdo, I. and Paladini, A. C. (1992) Benzodiazepines in the brain. *Molecul. Neurobiol.* 6: 377-386.
19. Medina, J. H., Paladini, A. C. and Izquierdo, I. (1993) Naturally occurring benzodiazepines and benzodiazepine-like molecules in brain. *Brain Res.* 660: 1-8.
20. 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.
21. 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.
22. Lee, C-M., Wong, H.N-C., Chui, K-Y., Chong, T-F, Hon, P-M. and Chang, H-M. (1991) Miltrone, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza*. *Neuroscience Letters* 127: 237-241.
23. Viola, H., Wasowski, C., Stein, M. L., Wolfman, C., Silveira, 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.
24. 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.
25. 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 anti-convulsants. *Epilepsia* 34: 1135-1140.
26. 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.
27. Ha, J. H., Pannell, L., Drugan, R. C., Ferland, R. and Basile, A. S. (1996) *In* Neuroscience protocols, 1-12. Elsevier Sciences, Amsterdam.

(1999년 4월 30일 접수)