

## 수종 생약재의 GABA 대사 관련 효소의 활성화에 미치는 영향

백남인,\* 안은미, 한재택, 박진규,<sup>1</sup> 조성우,<sup>2</sup> 전성규,<sup>3</sup> 반재훈,<sup>3</sup> 선현정,<sup>3</sup> 최수영<sup>3</sup>

경희대학교 생명과학부 및 생명과학연구원, <sup>1</sup>한국인삼연초연구원,  
<sup>2</sup>울산대학교 의과대학 생화학교실, <sup>3</sup>한림대학교 생명과학부 유전공학과

### Effects of Several Medicinal Plants on the Activity of GABA-metabolizing Enzymes

Nam-In Baek,\* Eun-Mi Ahn, Jae-Taek Han, Jin-Kyu Park,<sup>1</sup> Sung-Woo Cho,<sup>2</sup>  
Seong Gyu Jeon,<sup>3</sup> Jae Hoon Bahn,<sup>3</sup> Hyun Jung Sun<sup>3</sup> and Soo Young Choi<sup>3</sup>

*Department of Life Sciences and Institute of Life Sciences, Kyung Hee University,  
Suwon 449-701, <sup>1</sup>Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345,*

*<sup>2</sup>University of Ulsan College of Medicine, Department of Biochemistry, Seoul 138-736,*

*<sup>3</sup>Department of Genetic Engineering, Division of Life Science, Chunchon 200-702*

**Abstract** – The effect of seventy kinds of medicinal plants on the activities of GABA-metabolizing enzymes as glutamate dehydrogenase I (GDH I), glutamate dehydrogenase II (GDH II), GABA transaminase (GABA-T), succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) and succinic semialdehyde reductase (SSAR) were estimated. The following plants extracts from *Acori graminei* Rhizoma, *Longnae Arillus*, *Gastrodiae Herba*, *Lycii Fructus*, *Ligusticum officinale*, *Ferula assafoetida*, *Corydalis Tuber*, *Eucommiae Cortex*, *Zizyphi spinosi Semen* activated the activity of GDH I to more than 35%, and the following ones from *Visci Ramulus*, *Ligusticum officinale*, *Myristicae Semen*, *Ferulae Resina*, *Scolopendrae Corpus*, *Corydalis Tuber*, *Eucommiae Cortex*, *Zizyphi spinosi Semen* did that of GDH II. The plant extracts from *Cynanchi Radix*, *Astragali Semen*, *Angelicae dahuricae Radix*, *Biotae orientalis Folium*, *Uncariae Ramulus et Uncus*, *Polygalae Radix*, *Cynomorii Herba* inhibited that of GABA-T to 35% and over, and the following ones from *Hyoscyamus niger*, *Cynanchi Radix*, *Acori graminei*, *Caesalpiniae Lignum*, *Cannabis Semen*, *Sedum aizoon*, *Sedum kamtschaticum*, *Schisandrae Fructus*, *Lilii Bulbus*, *Biotae orientalis Folium*, *Uncariae Ramulus et Uncus*, *Myristicae Semen*, *Akebiae Fructus*, *Cynomorii Herba*, *Buddleiae Flos*, *Mucunae Caulis*, *Zizyphi Fructus*, *Paeoniae Radix rubra* did that of SSADH to 70% and over; the following ones from, *Caesalpiniae Lignum*, *Sedum kamtschaticum*, *Schisandrae Fructus*, *Astragali Semen*, *Angelicae dahuricae Radix*, *Dioscorea nipponica*, *Myristicae Semen*, *Akebiae Fructus*, *Cynomorii Herba*, *Scutellariae Radix* did that of SSAR.

**Key words** – Anticonvulsant, GDH I, GDH II, GABA-T, SSAR, SSADH

간질, 발작, 경련의 신경 생화학적 주 원인은 신경 세포사이에서 신경전달이 일어날 때, 흥분성 신경전달과 억제성 신경전달 사이의 균형이 깨지면서 발생하는 것으로, 이러한 신경전달 과정이나 신경전달에 관여하는 신경 전달물질의 대사과정을 조절함으로써 그 치료가 가능하다. 그 중 중추신경계에서 주 억제성 신경 전달 물질로 작용하는 GABA ( $\gamma$ -aminobuty-

ric acid) 농도의 극심한 감소가 경련의 원인이 되므로<sup>1)</sup> GABA의 농도를 높여주는 약제들을 개발함으로써 항 경련 치료제의 개발이 가능하다.<sup>2)</sup> GABA의 농도는 GABA 대사 관련 효소인 glutamate dehydrogenase (GDH), glutamate decarboxylase (GAD), GABA transaminase (GABA-T), succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) 및 succinic semialdehyde reductase (SSAR)에 의하여 조절되고 있다. GABA의

\*교신저자 : Fax 0331-204-8116

전구 물질인 glutamate는 GDH에 의해 2-oxoglutarate로부터 생합성되며 glutamate는 다시 GAD에 의해 GABA로 변환된다.<sup>3)</sup> 또한 GABA는 GABA-T에 의하여 succinic semialdehyde (SSA)로 대사됨으로써 신경 전달 물질로의 역할이 불활성화 되며<sup>4)</sup> SSA는 주로 SSADH에 의하여 succinate (SA)로 산화되기도 하고, 일부는 SSAR에 의하여 또 다른 신경 조절 물질인  $\gamma$ -hydroxybutyrate (GHB)로 변환되기도 함으로써 GABA 농도의 감소에 관여한다.<sup>5)</sup> 따라서 간질 및 발작 증세의 감소를 위해서는 GABA의 농도를 높여 줄 수 있는 약제를 사용하게 되는데, 이는 GABA 합성 효소인 GDH나 GAD의 활성제, 또는 GABA 분해 대사에 관여하는 GABA-T, SSADH, SSAR의 저해제를 탐색함으로써 가능하다.

따라서 항정신성 관련 효능을 가진 것으로 알려진 생약제<sup>6)</sup>를 이용하여 GABA 대사조절 효소들에 대한 활성 및 저해 효과를 검색하여, 항경련 치료제를 개발하기 위한 생약제를 선별하고자 하였다. 이 약제로부터 활성 성분을 분리, 결정하고 이 성분을 기존 치료제와의 복합적 치료방법에 이용함으로써 기존 약제의 독성을 감소시키고 항간질 및 발작 효능을 증진시킬 수 있는 약제 개발의 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 소의 뇌조직은 서울 마장동 도축장에서 구입하였으며 식물 시료들은 서울 경동시장에서 구입하였고, 식물 표본시료는 경희대학교 (수원) 천연물화학 실험실에 보관하였다. (Table I)

**기기 및 시약** - 시료의 추출에 사용한 유기 용매는 대정화학 주식회사에서 생산한 특급 시약을 사용하였고, 활성 검정용 시약은 Sigma사 등으로부터 구입하여 사용하였으며, 그렇지 않은 시약들은 실험 과정에 명시하였다. 효소의 활성 검정을 위한 흡광도의 변화는 KONTRON사의 UVIKON 930 UV spectrophotometer를 사용하였다.

**활성 검정용 시료 조제** - 수집한 식물체의 풍건 분말시료를 100 g씩 80% MeOH(500 ml)로 2회 추출한 뒤 여과, 감압 농축하여 MeOH 추출물을 만들었다. 이 추출물들에 대하여 GABA 합성 및 분해 대사에 관여하는 GDH I, GAD (GDH II), GABA-T, SSAR 및 SSADH 효소들의 활성도 변화에 미치는 효과를 측정하였다.

**GABA 대사 조절 효소의 정제** - 소 뇌조직으로부터

GDH I, GDH II, GABA-T, SSAR 및 SSADH 등의 효소들을 ammonium sulfate fractionation, Q-sepharose, CM-Sephadex, DEAE-Sephadex, Hydroxyapatite, heparin sepharose, derivatized sepharose 및 5'-AMP-sepharose 등의 다양한 크로마토그래피 방법을 이용하여 정제하고<sup>7-10)</sup> 효소의 순도를 SDS-PAGE 방법으로 확인한 후<sup>11)</sup> 효소의 활성 검정을 위한 효소원으로 사용하였다.

**GABA transaminase 억제 활성** - GABA transaminase (GABA-T)의 효소 활성도 측정은 5 mM  $\text{NAD}^+$ , 20 mM GABA, 그리고 10 mM  $\alpha$ -ketoglutarate와 SSADH를 포함하는 0.1M sodium pyrophosphate (pH 8.4) 용액에서 coupling assay 방법으로 행하고  $\text{NAD}^+$ 의 환원에 의해 생성되는 NADH의 증가를 340 nm에서의 absorbance 변화를 측정함으로써 검정하였다. 생약제들에 의한 GABA-T의 효소활성도 변화는 생약제 추출물을 효소에 <1% (w/v) 정도로 혼합한 뒤, 상온에서 1 시간 가량 방치한 뒤 측정하였다.

**Succinic semialdehyde dehydrogenase 억제 활성** - Succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH)의 효소 활성도 측정은 최종농도 500  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$ , 30  $\mu\text{M}$  succinic semialdehyde를 포함하는 0.1M potassium phosphate (pH 8.4) buffer에 효소를 넣어 25°C에서 반응시켜 NADH가 생성되는 양을 spectrophotometric 방법에 의해 340 nm에서 측정하였다. SSADH의 생약제들에 의한 효소 활성도 변화의 측정은 위와 같은 방법으로 시행하였다.

**Succinic semialdehyde reductase 억제 활성** - Succinic semialdehyde reductase (SSAR)의 효소 활성도 측정은 SSAR에 의해 SSA가 분해될 때 보조 효소인 NADPH의 산화로 인해 생성 되는  $\text{NADP}^+$ 를 340 nm에서의 흡광도 값의 감소로써 측정하였고, assay mixture는 succinic semialdehyde (120  $\mu\text{M}$ )와 NADPH (50  $\mu\text{M}$ )를 포함하는 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.2, 25°C)를 사용하여 측정하였다. SSAR의 생약제들에 의한 효소 활성도 변화의 측정은 위와 같은 방법으로 시행하였다.

**GDH I 및 GDH II 활성 효과** - Glutamate dehydrogenase (GDH) I과 II의 효소활성도 측정은 GDH의 효소 반응으로 인한 보조 효소인 NADH의 산화를 340 nm에서의 흡광도 감소로써 측정하였다. Assay mixture로는 0.1M Tris/HCl (pH 8.0), 5 mM 2-oxoglutarate, 100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.25 mM EDTA 및 0.15

Table I. Activity of GABA-regulating enzymes treated with plant extracts

| Plant Name                   | Parts used     | GABA-SE* |        | GABA-DE** |       |      |
|------------------------------|----------------|----------|--------|-----------|-------|------|
|                              |                | GDH I    | GDH II | GABA-T    | SSADH | SSAR |
| Control                      |                | 100      | 100    | 100       | 100   | 100  |
| Stemona Radix                | roots          | 97       | 107    | 105       | 118   | 109  |
| Akebiae Fructus              | fruits         | 100      | 86     | 96        | 62    | 104  |
| <i>Hyoscyamus niger</i>      | seeds          | 116      | 98     | 92        | 0     | 87   |
| Cynanchi Radix               | roots          | 97       | 62     | 64        | 23    | 85   |
| Acori graminei Rhizoma       | rhizome        | 153      | 66     | 98        | 29    | 100  |
| Caesalpiniae Lignum          | wood           | 13       | 5      | 94        | 0     | 30   |
| Longanae Arillus             | arils          | 172      | 112    | 89        | 42    | 136  |
| Gastrodiae Herba             | rhizome        | 138      | 66     | 87        | 72    | 85   |
| Ginseng Radix Palva          | root           | 84       | 76     | 80        | 87    | 104  |
| Lycii Fructus                | velamens       | 156      | 91     | 72        | 39    | 115  |
| Cannabis Semen               | seed           | 6        | 67     | 92        | 27    | 98   |
| <i>Sedum aizoon</i>          | whole plants   | 63       | 86     | 92        | 18    | 96   |
| <i>Sedum kamtschaticum</i>   | whole plants   | 0        | 2      | 75        | 29    | 26   |
| Schisandrae Fructus          | fruits         | 22       | 0      | 76        | 0     | 4    |
| Astragali Semen              | roots          | 25       | 5      | 58        | 85    | 0    |
| Scrophulariae Radix          | roots          | 3        | 26     | 88        | 31    | 85   |
| Arisaematis Tuber            | rhizome        | 53       | 74     | 73        | 35    | 85   |
| Angelicae dahuricae Radix    | roots          | 6        | 3      | 0         | 53    | 0    |
| Lilii Bulbus                 | bulb           | 3        | 26     | 76        | 17    | 34   |
| <i>Veronica angustifolia</i> | whole plants   | 97       | 90     | 98        | 33    | 49   |
| <i>Dioscorea nipponica</i>   | tuber          | 12       | 47     | 97        | 61    | 26   |
| Salviae Radix                | roots          | 44       | 31     | 84        | 39    | 36   |
| Visci Ramulus                | branch, leaves | 127      | 270    | 75        | 54    | 80   |
| Asiasari Radix               | whole plants   | 100      | 100    | 93        | 61    | 134  |
| <i>Poria cocos</i>           | sclerotium     | 100      | 100    | 99        | 65    | 96   |
| Gardeniae Fructus            | fruits         | 0        | 0      | 91        | 69    | 75   |
| Biotae orientalis Folium     | leaflet        | 0        | 0      | 65        | 0     | 57   |
| Ligustri Fructus             | fruits         | 67       | 20     | 102       | 51    | 97   |
| Phellodendri Cortex          | bark           | 0        | 0      | 101       | 88    | 103  |
| Epimedii Herba               | stem, leaves   | 38       | 30     | 96        | 50    | 87   |
| <i>Ligusticum officinale</i> | rhizome        | 146      | 137    | 85        | 83    | 79   |
| Uncariae Ramulus et Uncus    | branch         | 0        | 0      | 0         | 0     | 41   |
| Cinnamomi Cortex             | bark           | 37       | 23     | 94        | 54    | 91   |
| Sinomenii Caulis et Rhizoma  | stem           | 100      | 100    | 90        | 59    | 93   |
| Thujae Semen                 | seed           | 100      | 100    | 84        | 57    | 135  |
| Angelicae gigantis Radix     | roots          | 0        | 0      | 72        | 91    | 81   |
| Polygalae Radix              | roots          | 0        | 0      | 0         | 100   | 102  |
| Magnoliae Flos               | flower bud     | 0        | 0      | 80        | 101   | 119  |
| Myristicae Semen             | seed           | 48       | 135    | 99        | 5     | 14   |
| Mori Radicis Cortex          | root bast      | 0        | 0      | 79        | 69    | 72   |
| Akebiae Caulis               | stem           | 0        | 0      | 84        | 26    | 10   |
| Cynomorii Herba              | whole plants   | 0        | 38     | 44        | 0     | 24   |
| Cynanchi wilfordii Radix     | tuber          | 0        | 0      | 82        | 67    | 121  |
| Elephas spp.                 | bone           | 0        | 88     | 93        | 103   | 180  |
| Helenii Radix                | roots          | 0        | 0      | 78        | 70    | 80   |
| Mantidis Dotheca             | egg capsule    | 125      | 100    | 81        | 67    | 90   |
| Ferulae Resina               | resin          | 156      | 198    | 100       | 50    | 105  |
| Pinelliae Tuber              | tuber          | 115      | 110    | 83        | 79    | 81   |
| Scolopendrae Corpus          | whole body     | 133      | 145    | 72        | 77    | 86   |
| Buddleiae Flos               | flower bud     | 0        | 0      | 88        | 0     | 117  |
| Corydalis Tuber              | tuber          | 190      | 185    | 71        | 50    | 160  |
| Dioscoreae Rhizoma           | tuber          | 100      | 100    | 83        | 91    | 123  |
| Ledebouriellae Radix         | roots          | 100      | 100    | 77        | 65    | 84   |
| Mucunae Caulis               | vine           | 0        | 0      | 84        | 0     | 47   |
| Scutellariae Radix           | roots          | 112      | 120    | 94        | 7     | 25   |
| Glycyrrhizae Radix           | roots          | 0        | 0      | 102       | 79    | 101  |
| Zizyphi Fructus              | fruits         | 65       | 70     | 77        | 9     | 46   |
| Cimicifugae Rhizoma          | rhizome        | 73       | 70     | 97        | 51    | 83   |
| Bupleuri Radix               | roots          | 94       | 90     | 80        | 52    | 91   |
| Coryophylli Flos             | flower bud     | 0        | 0      | 74        | 101   | 104  |

Table I. (continued)

| Plant Name                    | Parts used | GABA-SE* |        | GABA-DE** |       |      |
|-------------------------------|------------|----------|--------|-----------|-------|------|
|                               |            | GDH I    | GDH II | GABA-T    | SSADH | SSAR |
| <i>Araliae cordatae</i> Radix | roots      | 92       | 100    | 85        | 84    | 70   |
| <i>Aconitum loczyanum</i>     | roots      | 73       | 90     | 101       | 77    | 89   |
| <i>Eucommiae</i> Cortex       | bark       | 142      | 163    | 89        | 40    | 15   |
| <i>Piperis nigri</i> Fructus  | fruits     | 0        | 0      | 75        | 36    | 16   |
| <i>Coicis</i> Semen           | seed       | 100      | 100    | 94        | 67    | 87   |
| <i>Zizyphus spinosi</i> Semen | Seed       | 154      | 170    | 92        | 66    | 94   |
| <i>Hoelen cum</i> Radix       | Sclerotium | 112      | 110    | 103       | 78    | 95   |
| <i>Coptidis</i> Rhizoma       | Rhizome    | 0        | 0      | 101       | 90    | 87   |
| <i>Antelopis</i> Cornu        | Horn       | 94       | 100    | 97        | 91    | 97   |
| <i>Paeoniae</i> Radix rubra   | Roots      | 0        | 0      | 70        | 20    | 40   |

\* GABA-SE : GABA synthesizing enzymes

\*\* GABA-DE : GABA degradative enzymes

mM NADH가 사용되었고 생약재에 의한 효소 활성도의 증가는 역시 위와 같은 방법으로 측정하였다.

### 결과 및 고찰

중약대사전, 동의보감 등의 문헌에서 향경련, 마취, 진정등 항정신성 효능을 가진 것으로 알려진 생약재 70종을 수집, 동정하였다.<sup>6)</sup> 이 약재로부터 향경련 활성을 가진 물질을 탐색하기 위하여 GABA 생합성에 관여하는 효소인 GDH I, GDH II와 GABA 분해에 관여하는 효소인 GABA-T, SSAR 및 SSADH를 소의 뇌조직으로부터 저자들이 확립한 방법<sup>7-10)</sup>에 따라 정제하였다. 한편, 식물체로부터 1차 대사산물인 cellulose, 전분, 단백질을 제외한 대부분의 2차대사 산물을 추출하는데에 일반적으로 사용되는 80% MeOH 수용액을 이용하여 생약재 건조 분말을 실온에서 추출하였다. 여과, 감압, 농축하여 얻어진 MeOH 추출물을 첨가하여 각 효소의 활성도 변화를 측정하였다. (Table 1)

GABA의 생합성 관련 효소인 GDH I의 활성을 35% 이상 활성화 시킨 약재는 석창포, 용안육, 천마, 지골피, 천궁, 아귀, 현호색, 두충 및 산조인의 9종으로 나타났고, GDH II의 활성을 35% 이상 활성화 시킨 약재는 상기생, 천궁, 육두구, 아귀, 오공, 현호색, 두충 및 산조인의 8종으로 밝혀졌으며, 두가지 효소에 모두 활성 증가효과를 보인 약재는 상기생, 천궁, 아귀, 현호색, 두충 및 산조인으로 판명되었다. 한편 GABA 분해 관련 효소인 GABA-T의 활성을 35% 이상 억제한 약재로는 백미, 황기, 백지, 측백엽, 조구등, 원지 및 쇠양의 7종으로, SSADH의 활성을 70% 이상 억제한 약재로는 천선자, 백미, 석창포, 소목, 마자인,

경천삼칠, 비채, 오미자, 백합측백엽, 조구등, 육두구, 목통, 쇠양, 밀몽화, 계혈, 대조, 적작약의 17종으로, SSAR의 활성을 70% 이상 억제한 약재로는 소목, 비채, 오미자, 황기, 백지, 천산릉, 육두구, 목통, 쇠양, 황금의 10종으로 나타났다. 3종의 GABA 분해 효소의 활성에 전반적으로 높은 억제 효과를 보인 약재로는 백미, 소목, 비채, 오미자, 황기, 백지, 백합, 측백엽, 조구등, 육두구, 목통, 쇠양 등으로 판명되었다. 앞으로 위의 활성 효과가 있는 물질들로부터 순수 화합물을 분리하여 부작용 없는 향경련 치료제로 개발할 수 있는 가능성을 제시하고자 한다.

### 사 사

본 연구는 보건과학기술연구개발사업(HMP-97-D-4-0024)과 관련하여 보건복지부로부터 지원 받은 연구비에 의해 수행되었습니다.

### 인용문헌

- Llyod, K. G., Shemen, L. and Kiewicz, O. H. (1977) Distribution of high affinity sodium independent [<sup>3</sup>H]  $\gamma$ -aminobutyric acid binding in the human brain: alteration in Parkinson disease. *Brain Res.* 127: 269-275.
- Lippert, B., Metcalf, W., Jung, M. J. and Casara, P. (1977) 4-Aminohex-5-enoic acids: a selective catalytic inhibitor of 4-aminobutyrate aminotransferase in mammalian brain. *Eur. J. Biochem.* 74: 441-445.
- Baek, N. -I., Choi, S. Y., Park, J. K., Cho, S. -W., Ahn, E. -M., Jeon, S. G., Lee, B. R., Bahn, J. H., Kim, Y. K. and Shon, I. H. (1999) Isolation and identification

- of succinic semialdehyde dehydrogenase inhibitory compound from the rhizome of *Gastrodia elata* Blume. *Arch. Pharm. Res.* 22(2): 219-224.
4. Fletcher, A. and Fowler, L. J. (1980) 4-Aminobutyric acid metabolism in rat brain following chronic oral administration of ethanolamine-O-sulfate. *Biochem. Pharmacol.* 29: 1451-1454.
  5. Fishbein, W. and Bessman, P. (1964)  $\gamma$ -Hydroxybutyrate in mammalian brain, reversible oxidation by lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 211: 757-762.
  6. Shanghai Science & Technology Press (1985) Encyclopedia of Chinese Drugs, Vol. 3, 1964-1966, Shogakukan, Tokyo, Japan.
  7. Cho, S. W., Lee, J. W. and Choi, S. Y. (1995) Two Soluble forms of glutamate dehydrogenase isoproteins from bovine brain. *Eur. J. Biochem.* 233: 340-346.
  8. Choi, S. Y., Kim, I., Jang, S. H., Lee, S. J., Song, M. S., Lee, Y. S. and Cho, S. W. (1993) Purification and properties of GABA transaminase from bovine brain. *Mol. & Cell.* 3: 397-401.
  9. Cho, S. W., Song, M. S., Kim, G. Y., Choi, E. Y., Kang, W. D. and Choi, S. Y. (1993) Kinetics and mechanism of an NADPH-dependent succinic semialdehyde reductase from bovine brain. *Eur. J. Biochem.* 211: 957-962.
  10. Lee, B. R., Hong, J. W., Yoo, B. K., Lee, S. J., Cho, S. W. and Choi, S. Y. (1995) Bovine brain succinic semialdehyde dehydrogenase : Purification, kinetics and reactivity of lysyl residues connected with catalytic activity. *Mol. & Cell.* 5: 957-962.
  11. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

(1999년 11월 29일 접수)