

천궁(Cnidii Rhizoma)의 메탄올 추출물이 GABA 및 Glycine 수용체에 미치는 영향

이종태 · 박재홍 · 이금호

경희대학교 치과대학 소아치과학교실

국문초록

천궁의 메탄올 수용액 추출물의 진정 작용을 밝히기 위하여 staircase test를 시행하였으며, 근육이완 효과를 검색하기 위하여 rotarod test를 시행하였다. 진정 작용의 기전 구명을 위하여 GABA 및 glycine 수용체에 작용하는 약물인 picrotoxin, yohimbine, isoniazid, strychnine 등의 약물을 이용하여 발작 유도에 걸리는 시간을 비교 관찰하였다. 또한 생체에서의 안전성을 검증하기 위하여 Irwin의 행동시험 및 신경세포에 대한 독성을 평가하기 위하여 MTT test를 실시하여 다음의 결과를 얻었다.

1. Staircase 실험에서 천궁 추출물을 10mg/kg 용량으로 경구 투여했을 때 climbing수는 대조군과 차이가 없었으나, rearing수에서는 대조군에 비하여 42%의 감소를 보였다.
2. 30mg/kg의 용량으로 경구 투여했을 때, climbing수는 대조군과 차이가 없었으나, rearing수에서는 51%의 감소를 유발하였다.
3. 근육이완 작용을 탐색하기 위한 rotarod 실험에서는 대조군과 차이를 나타내지 않았다.
4. 천궁 추출물의 투여는 picrotoxin, isoniazid, yohimbine에 의한 발작에서는 큰 변화를 유발하지 않았으나, strychnine에 의한 발작 유도시간은 41%의 증가를 유발하였다.
5. 일반 행동에서도 특이한 변화를 유발하지 않았으며, 신경세포에 적용했을 때 특이한 독성 반응을 나타내지 않았다.

천궁의 메탄올 수용액 추출물은 현저한 진정 작용을 유발하며, 그 작용 기전으로서 glycine의 작용을 증가시켜 chloride ion의 세포내 유입으로 인한 억제성 신경전도를 유도한다고 사료된다. 또한 근육이완 작용도 나타나지 않았으며, 특이한 생체독성도 유발되지 않은 것으로 보아, 향후 치과임상에서 진정요법의 한 수단으로서 사용될 수 있다는 가능성을 제시한다.

주요어 : 천궁, 진정 요법, GABA, Glycine

I. 서 론

치과 진료에 있어서 공포와 불안은 효과적인 치료를 저해하는 문제로 대두되고 있다. 특히 소아환자들은 성인과 달리 정신적, 신체적, 정서적 발육과정에 있어 새로운 환경에 대한 적응력이 부족하며 치과 진료에 어려움을 겪는 경우가 많다^{1,2)}.

일반적으로 원활한 치과 진료를 위해 심리적 행동조절법, 물

리적 행동조절법 등이 이용되나 극도로 불안한 소아환자들은 상기의 행동조절법으로는 행동조절이 불가능한 경우 약물을 이용한 진정 요법이 추천되고 있는데³⁾, 약물을 이용한 진정 요법은 선택한 진정제를 치료하기 전에 미리 투여하여, 치료시점에서 최대의 효과가 나타날 수 있게 하는 방식으로서 지체 장애인, 의학적 장애인, 또는 자발적인 협조가 어려운 소아환자를 효과적으로 진정시켜 효율적인 치과 치료를 제공할 수 있는 안전한 방법으로 사용이 늘어나고 있다.

진정 목적으로 치과임상에서 N₂O-O₂ 가스를 이용한 흡입진정과 chloral hydrate, hydroxyzine, diazepam 등의 경구투여, midazolam의 근육주사나 비강내 투여, ketamine의 근육주사나 정맥주사 등을 많이 사용하고 있지만 이러한 합성된 진정 약물들은 단독 투여시 효과가 미약하여, 병용 투여가 권장되

교신저자 : 박재홍

서울시 동대문구 회기동 1
경희대학교 치과대학 소아치과학교실
Tel: 02-958-9371
E-mail: pedopjh@khu.ac.kr

고 있으며 여러 가지 부작용과 독성발현의 가능성 때문에 임상적 적용에 제한이 많다⁴⁻⁶⁾.

이러한 부작용을 줄여보고자 고래로 부작용 없이 안전하게 사용되고 있는 천연물 추출물의 진정 작용에 대한 약효연구가 활발하게 진행 되어 천궁⁷⁻¹⁸⁾, 석창포¹⁹⁻²¹⁾, 육두구씨²²⁾, 구주콩나무²³⁾, 생강²⁴⁾, 광활나무²⁵⁾ 등으로부터 얻은 추출물에 진정 효과가 있다고 보고 되고 있다.

천궁(Cnidii Rhizoma, CR)은 미나리과에 속하는 다년생 초본인 궁궁이의 근경이며, 함유 성분으로는 phthalides, alkaloids 및 acids 등이 존재한다. 현재 알려진 약리작용으로는 동맥경화 경감효과, 심장 수축력 증가, 관상동맥 혈류의 증진, 혈소판 응집 억제효과 및 말초 혈관저항성을 낮추어 혈압강하를 유발하는 효과가 있다. 또한 중추신경계에서는 진정 효과가 있다고 보고 되고 있다^{7,18)}.

진정제의 약효와 효능을 평가하기 위하여 선학들의 많은 연구가 있었는데, 항불안 효과를 평가하기 위해서 Simiand 등²⁶⁾은 staircase test를, Pellow와 File²⁷⁾은 Elevated Plus Maze(EPM) test를 사용하였다. 진정제의 근육이완 효과유무를 평가하기 위해서 Tsuda 등²⁸⁾은 rotarod test를, Rudzik 등²⁹⁾은 traction test를, Randall³⁰⁾은 30° inclined screen test를 사용하였다. 그리고 GABA(Gamma-Amino-Butyric Acid) 및 Glycine 수용체와 연관된 발작을 연구하기 위해서 Usunoff 등³¹⁾, Dunn과 Fielding³²⁾, Costa 등³³⁾과 Bigler³⁴⁾는 picrotoxin, yohimbine, isoniazid, strychnine을 사용하였다. Mosmann³⁵⁾은 세포독성 검사를 위해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) test를 연구하였으며 Irwin 등³⁶⁾, Dixit와 Varma³⁷⁾, Mukherjee 등³⁸⁾은 약물 투여 후 실험동물의 일반행동 변화의 관찰방법을 발표하였다.

기존 사용하고 있는 합성된 진정 약물의 대체 약물로 천궁의 메탄올 추출물의 가능성을 구명하며, 최근 본 교실에서 발표된 바 있는 석창포의 진정 작용과 비교하기 위하여 본 연구를 하였는데 항불안 작용의 효과는 staircase test로, 근육이완 효과 유무는 rotarod test를 시행하였다. 천궁의 메탄올 추출물이 GABA 및 Glycine 수용체에 미치는 영향을 구명하기 위해서는 picrotoxin, yohimbine, isoniazid, strychnine을 사용해서 발작 양상을 비교 하였으며, 생체안전성을 확보하기 위하여 MTT test를 시행하였고, 일반 행동 변화는 Irwin 등³⁶⁾의 방법을 사용하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물 및 시약

실험동물은 18-22g 음성 ICR(The Institute for Cancer Research) 마우스(한림실험동물원)였으며 시약 strychnine,

picrotoxin, isoniazid, yohimbine들은 Tocris사(USA)에서 구입하였으며 기타 시약은 Sigma사(USA)에서 구입하였다.

2) 약물제조

본 실험에 사용한 천궁 제조법은 다음과 같다. 건조한 천궁을 세절하고 70% 메탄올에 넣고 Soxhlet장치를 사용하여 3번 추출하고 추출액은 rotary evaporator를 이용하여 농축한 후에 동결건조기를 사용하여 건조하였다.

3) 세포배양

본 연구에 사용된 세포는 SK-N-SH cell (human brain)로서, 한국 세포주 은행에서 분양 받았다. SK-N-SH cell은 RPMI medium 1640(GibcoBRL, USA)배지에 10% fetal bovine serum(FBS; Bio-whittaker, USA), 100µg/ml streptomycin(GibcoBRL, USA), 100unit/ml penicillin(GibcoBRL, USA)을 넣어서 37℃에서, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 또 SK-N-SH cell은 10µM retinoic acid (Sigma 사, USA)를 사용하여 각각 5일 동안 신경세포로 분화시켰다.

2. 실험방법

1) 진정작용 탐색

마우스를 staircase 박스(10cm×45cm×25cm)의 바닥에 두고 꼬리를 staircase로 향하게 한다. 그 후 3분 동안에 올라간 step수 (number of steps climbed)와 뒷발로 선 수 (number of rears)를 측정하였는데, 마우스의 네발 모두가 계단에 닿았을 때만 한 step으로 간주하였다. 그리고 관찰을 단순화하기 위하여 아래로 내려온 step은 계산하지 않았다. 실험이 끝난 후 다음 마우스를 위하여 후각자극이 가하지 않도록 staircase 박스를 신속하게 깨끗이 치웠다. 약물은 실험시작 60분 전에 10mg/kg 또는 30mg/kg을 경구 투여하였다. 모든 실험은 오전 8시에서 오후 5시 사이에 실시하였다.

2) 근육이완 작용 탐색

Rotarod test로 평가하였다. 각 마우스를 rotarod 장치 (직경 3 cm, 속도 8 rpm)에서 1분 이상 위치할 때까지 훈련시켰다. 24시간 후에, 천궁 추출물 (10mg/kg)을 투여하고 1시간 후에 rotarod에서 위치하는 시간을 240초까지 측정하였다.

3) GABA 수용체와의 연관성

a. Picrotoxin-induced convulsions

천궁 추출물(10mg/kg)을 경구로 투여하고 1시간 후에 3.5mg/kg picrotoxin을 피하주사하고, 그 후 30분 동안 발작이 나타날 때 까지 걸리는 시간을 측정하였다.

b. Yohimbine-induced convulsions

천궁 추출물(10mg/kg)을 경구로 투여하고 1시간 후에

45mg/kg yohimbine HCl을 피하주사하고, 그 후 1시간 동안 발작이 나타날 때 까지 걸리는 시간을 측정하였다.

c. Isoniazid-induced convulsions

천궁 추출물(10mg/kg)을 경구로 투여하고 1시간 후에 300mg/kg isoniazid를 피하주사하고, 그 후 2시간 동안 발작이 나타날 때까지 걸리는 시간을 측정하였다.

4) Glycine 수용체와의 연관성

천궁 추출물(10mg/kg)을 경구로 투여하고 한 시간 후에 2mg/kg strychnine nitrate를 복강내 주사하고, 그 후 1시간 동안 발작이 나타날 때까지 걸리는 시간을 측정하였다.

5) 세포독성 시험

세포의 생존율은 MTT assay를 통해 관찰하였다. 세포를 96-well microplate에 넣고 8시간동안 starvation 배지로 처리한 후 천궁추출물을 투여하고 20시간동안 배양하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT; Sigma, USA)는 PBS에 5mg/ml로 녹여 0.2 μ m filter로 거른 뒤 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였고 필요 시 녹여서 사용하였다. MTT용액 20 μ l를 가하고 4시간 동안 배양 후 각 well의 배양액을 제거하고 형성된 formazan salt에 dimethylsulfoxide(Duchefa, Netherland) 100 μ l를 넣어 가볍게 진탕하여 완전히 용해시킨 후 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6) 일반행동 시험

동물은 ICR 마우스 수컷 (체중 18-22g)을 각 군당 4마리씩 사용하였다. 실험 방법은 변형된 Irwin 방법을 사용하였고, 천궁 추출물 (10mg/kg)을 투여 전 및 투여 후 15, 30, 60, 120 및 240분에 실험용 관찰 cage를 이용하여 다음과 같은 일반 행동을 관찰하였다.

- (1) Catalepsy (강경증)
- (2) Traction (근육수축)
- (3) Tremor (진전)
- (4) Convulsion (발작)
- (5) Exophthalmos (안구돌출)
- (6) Piloerection (입모)
- (7) Salivation (타액분비)
- (8) Lacrimation (유루)
- (9) Defecation (배변)
- (10) Skin color (피부색)
- (11) Pinna reflex (이개반사)
- (12) Righting reflex (정향반사)
- (13) Body tone (신체긴장도)
- (14) Tail elevation (거미 반응)
- (15) Eyelid (안검하수)
- (16) Locomotion (자발운동성)
- (17) Respiratory rate (호흡율)
- (18) Death (사망)

III. 실험결과

1. 진정작용 탐색

마우스에게 천궁추출물 10mg/kg과 30mg/kg을 각각 경구 투여하고 1시간 후에 staircase test를 실시하였다. climbing 수는 10mg/kg 투여 시 대조군에서 14.1회, 천궁 투여군에서는 12.6회 였고(Table 1, Fig. 1), 30mg/kg 투여 시 대조군에서 12.8회 천궁 투여군에서는 13.8회였다(Table 2, Fig. 2). 10mg/kg과 30mg/kg 모두에서 두 군 간에 통계학적 유의성은 없었다.

Rearing 수는 10mg/kg 투여 시 대조군에서 9.7회, 천궁 투여군에서는 5.6회였고(Table 3, Fig. 3), 30mg/kg 투여 시 대조군에서는 8.2회 천궁 투여군에서는 4회였다(Table 4, Fig.

Table 1. Climbing test with CR(10mg/kg) extract

	average	SD
Control	14.14	1.67
CR(10mg/kg)	12.60	6.60

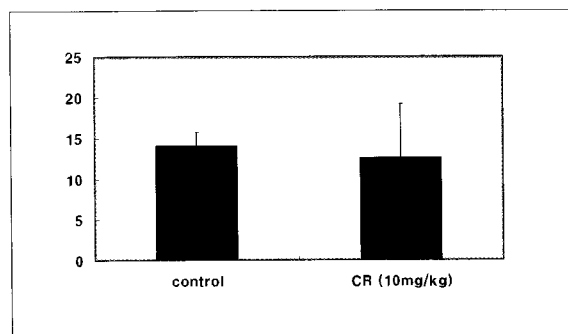


Fig. 1. Climbing test with CR(10mg/kg) extract

Table 2. Climbing test with CR(30mg/kg) extract

	average	SD
Control	12.88	4.61
CR(30mg/kg)	13.89	3.51

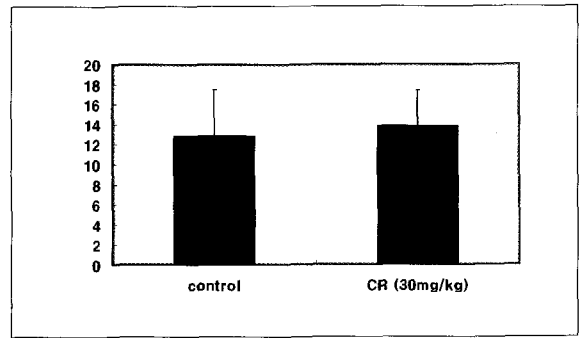


Fig. 2. Climbing test with CR(30mg/kg) extract

Table 3. Rearing test with CR(10mg/kg) extract

	average	SD
Control	9.71	2.87
CR(10mg/kg)	5.63*	3.70

Significant values: * p<0.05

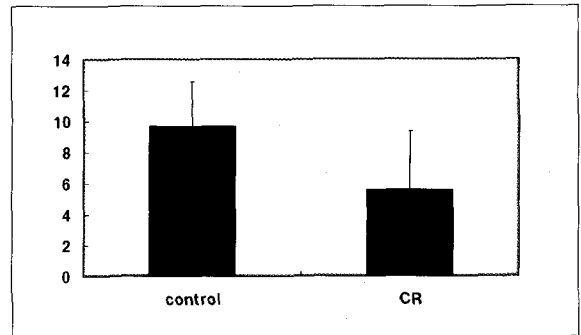


Fig. 3. Rearing test with CR(10mg/kg) extract

Table 4. Rearing test with CR(30mg/kg) extract

	average	SD
Control	8.2	0.84
CR(30mg/kg)	4.0**	1.87

Significant values: **p<0.01

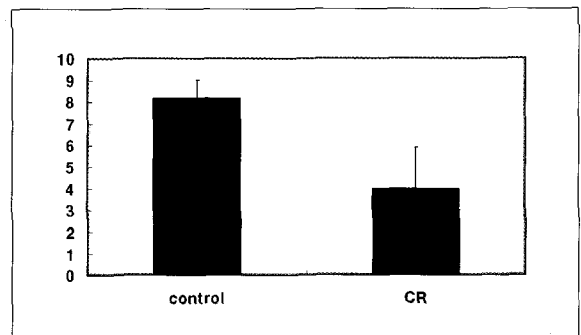


Fig. 4. Rearing test with CR(30mg/kg) extract

4). 10mg/kg과 30mg/kg 모두에서 천궁 투여군이 통계학적으로 유의성이 있는 항불안 효과를 나타냈다.

2. 근육이완 작용 탐색

근육이완 작용은 rotarod 장치를 이용하여 측정하였다. 대조군의 경우 회전봉에서 떨어지는데 240초가 소요된 반면, 천궁 추출물 (10mg/kg)을 경구로 투여한 경우에도 회전봉에서 떨어지는데 240초가 소요되었다(Table 5, Fig. 5). 두 군 간에 통계학적 유의성이 없었다.

3. GABA 수용체와의 관련성 탐색

천궁 추출물(10mg/kg)을 경구 투여한 후 picrotoxin에 의한 발작 유도 실험에서, Table 6에서 나타난 바와 같이 대조군에서는 발작을 유도하는데 16.1초가 소요된 반면 천궁 투여군에서도 14.5초가 유도되어 두 군 간에 통계학적 차이가 없었다 (Table 6, Fig. 6).

Yohimbine투여로 인한 발작 실험에서는, 천궁 투여군에서는 발작이 유도되는 시간은 35.4초였으며, 대조군에서는 36.3초로 나타났다. 두 군간에 통계학적 유의성은 없었다(Table 7, Fig. 7).

Table 5. Rotarod test with CR extract

	mean	SD
Control	240	11.2
CR(10mg/kg)	240	15.0

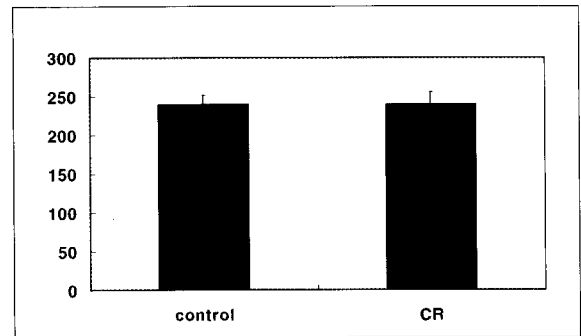


Fig. 5. Rotarod test with CR extract

Table 6. Picrotoxin-induced convulsion

	mean	SD
Control	16.19	1.27
CR(10mg/kg)	14.51	3.11

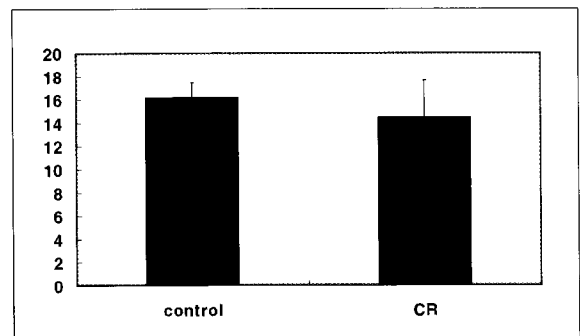


Fig. 6. Picrotoxin-induced convulsion

Table 7. Yohimbine-induced convulsion

	mean	SD
Control	36.34	10.34
CR(10mg/kg)	35.48	10.48

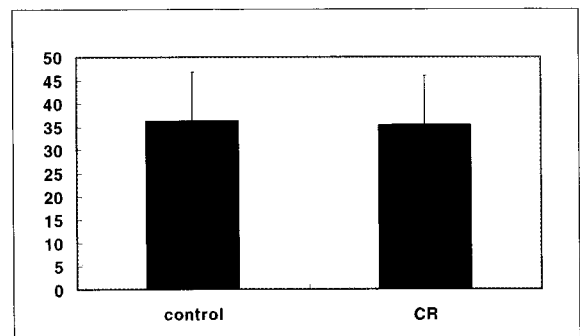


Fig. 7. Yohimbine-induced convulsion

Isoniazid에 의한 발작유도 실험에서는, 대조군에서는 28.6초, 천궁 투여군에서는 30.5초의 발작유도 시간이 소요되었다 (Table 8, Fig. 8). 대조군에 비하여 통계학적으로는 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다.

4. Glycine 수용체와의 관련성 탐색

대조군의 경우 발작유도 시간이 약 147.7초인 반면, 천궁 추출물(10mg/kg)을 경구로 투여한 경우 strychnine에 의한 발작유도 시간이 약 207.8초까지 연장되었으며 이는 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성이 있는 차이였다(Table 9, Fig. 9).

5. 신경세포 독성 시험

MTT test 시행결과 대조군의 흡광도 0.24에 비하여 천궁 추출물 10 μ g/ml, 30 μ g/ml, 90 μ g/ml을 각각 투여한 경우에도 0.25, 0.25, 0.26 흡광도를 각각 나타냄으로서, 천궁 추출물은 신경세포에 대하여 독성반응을 거의 유발시키지 않았다(Table 10, Fig. 10).

6. 일반행동 시험

천궁 추출물을 투여한 후 Irwin의 일반 행동을 시간에 따라

Table 8. Isoniazid-induced convulsion

	mean	SD
Control	28.67	2.65
CR(10mg/kg)	30.55	11.10

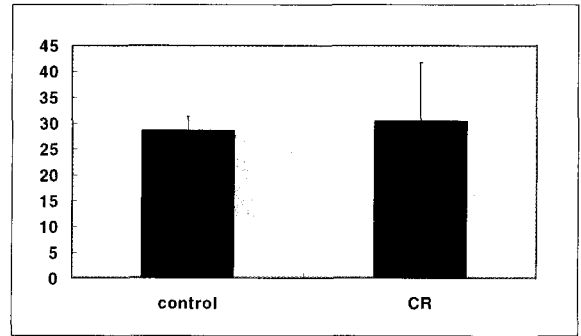


Fig. 8. Isoniazid-induced convulsion

Table 9. Strychnine-induced convulsion

	mean	SD
Control	147.71	23.22
CR(10mg/kg)	207.86**	36.61

Significant value: **p<0.01

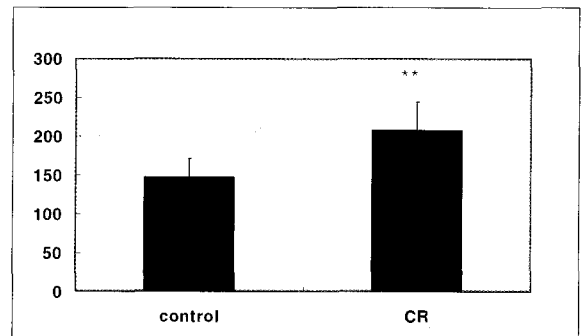


Fig. 9. Strychnine-induced convulsion

Table 10. MTT test

	control	10 μ g/ml	30 μ g/ml	90 μ g/ml
Average	0.24	0.25	0.25	0.26
SD	0.014	0.003	0.042	0.019

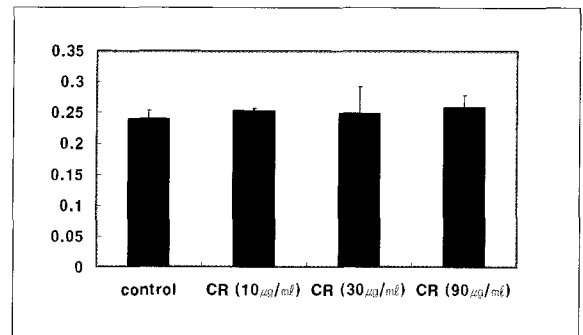


Fig. 10. MTT test

관찰한 결과 대조군에 비하여 특이한 행동변화를 유발하지 않았다.

IV. 고 찰

많은 소아환자들이 치과 치료에 불안과 공포심을 가지며, 이로 인해 치과 치료에 비협조적인 경우가 많다. 환자의 협조를 유도하기 위해 여러 가지 행동조절법을 사용하지만 통상적인 방법으로 해결하기 어려운 경우 약물을 이용한 진정 요법을 시행할 수 있다.

현재 치과에서 임상적으로 많이 사용하는 진정제는 N₂O-O₂,

chloral hydrate, hydroxyzine, diazepam, midazolam, ketamine 등인데⁴⁻⁶⁾ N₂O-O₂는 치과치료 시 환자의 불안과 공포를 감소시키는 안전한 보조 수단으로 알려져 있으나 근무하는 직원에게 혈액학적 문제점과 특히 임신부의 경우 태아에 미치는 부작용이 보고 되고 있으며^{39,40)}, chloral hydrate도 경구용 진정제로 소아에게 널리 사용되는 약물이나 일부 연구에서 과도한 중추신경계 기능 억제, 위장관 장애, 피부손상 작용 등의 부작용이 보고 되고 있다⁴¹⁾.

Benzodiazepines 유도체인 diazepam과 midazolam은 자연수면과 비슷한 수면을 일으키고 진정 효과뿐 아니라 근육이완작용 및 항경련 작용 등 다양한 작용을 가지며 약물의 안전도

가 크고, 또한 간장의 약물 대사 효소합성을 유도하지 않고 부작용 내지 독작용이 다른 약물에 비해 미약하므로 현재 많이 사용되고 있다^{42,43}. 흥미롭게도 diazepam은 어떤 어린이에게는 오히려 흥분을 유발한다는 보고도 있다⁴⁴. 수용성 imidazobenzodiazepine 유도체인 midazolam은 효용성면에서 diazepam보다 훨씬 우수하다. 하지만, 그것의 쓴맛 때문에 어린이에게 투여시 정확한 용량을 주입하기가 어려운 문제로 대두되고 있다⁴⁵. 또한, midazolam은 어린이에게서 환각, 흥분, 울음과 같은 모순된 역리반응(paradoxical reaction)을 유발한다는 사실이 발표되었으며, 소수이긴 하지만 diazepam을 투여 받은 환자에게서도 이와 같은 부작용이 나타난다⁴⁶.

또한 phencyclidine 유도체인 ketamine은 뇌의 thalamo-neocortical system에 있는 cortical area들을 연결하는 신경전도를 방해하여 통증을 억제하는 약물로서 신경전도의 혼란이 발생되어 타액분비 및 기관지 분비를 증가시키기 때문에 항콜린성 약물을 같이 투여해야하는 단점들이 있고^{47,48}, 용량의 과다투여 시 지각장애 및 정신장애와 같은 부작용이 발생한다는 보고도 있다^{49,50}.

최근에 이러한 부작용을 줄여 보고자 천연물을 이용한 진정제의 약효연구가 활발하게 진행되어 강 등⁷¹은 elevated plus maze 검사를 이용하여 천궁추출물의 진정 작용을 발표하였으며, 궁과 이¹⁹는 석창포의 glycine 수용체를 통한 진정 기전을 보고하였다. Sonavane 등²²은 육두구씨(Myristica fragrans seeds)의 추출물을 실험동물에게 투여한 후 elevated plus maze 검사를 시행한 결과 개방경로에서 보내는 시간이 증가함으로써 진정 작용이 있는 것으로 발표하였으며, Avallone 등²³은 구주콩나부(Ceratonia siliqua)의 진정 기전이 GABA 수용체와 연관이 있다고 보고하였다. 또한 Vishwakarma 등²⁴은 생강(Zingiber officinale)에서, Carvalho-Freitas와 Costa²⁵는 광귤나무(Citrus aurantium)등으로부터 얻은 추출물에 진정 작용이 있음을 보고하였다. 따라서 부작용이 적으면서 적절한 진정 효과를 가지는 약물을 개발하는 것은 아주 중요한 과제이며, 본 연구에서는 고래로 우리 선조들이 사용해와 그 안전성이 검증되어 있는 천궁 추출물의 진정 작용을 구명하고자 하였다.

천궁(Cnidii Rhizoma, CR)에 함유되어 있는 성분으로는 정유가 1.5% 정도 존재하며 대부분은 phthalides가 주축을 이룬다. Phthalide로는 ligustilide, chuanxiongol, butyl-phthalide, butylenephthalide, senkyunolide, neocnidilide, 3-butyl-3-hydroxy-4,5,6,7-tetrahydro-6,7-dihydroxyphthalide, ligustilidiol, diligustilide가 있다. 그 외에 alkaloid 류도 함유되어 있으며, 구체적으로 나열하면 tetramethylpyrazine (lingustrazine), L-isoleucyl-L-valine anhydride, perlolyrine, L-valyl-L-valine anhydride, uridine, trimethylamine hydrochloride, choline chloride 및 1-acetyl-β-carboline이다. 이들 성분 외에도 ferulic acid, chrysophanic acid, sedanoic acid, vanillin 등의 성분도 존재한다고 알려지고 있다^{8-11,18}.

밝혀진 천궁의 약리 작용으로는 소량 투여 시에는 대뇌기능의 억제작용이 유발되며, 심장에 대하여는 심혈류를 증가시키며 말초혈관확장작용을 나타내고 소량 사용 시 혈압이 상승되며, 자궁수축이 일어난다. 그러나 천궁을 대량 사용할 시에는 오히려 혈압이 하강하고 자궁을 마비시킨다고 알려지고 있다. 또한 다양한 종류의 세균에 대하여 억제작용을 나타내며, 피부사상균에 대해서도 억제효과를 유발한다. 천궁은 민간요법에서는 관상동맥질환, 편두통, 뇌혈관 질환, 고혈압 등의 치료에 사용되어 왔다¹²⁻¹⁵.

새로운 약물의 진정 작용을 평가하기 위한 여러 방법들이 개발되어 사용되어 왔는데, conflict test와 social interaction에 의한 방법⁵¹⁻⁵³, 그리고 벌칙의 유무로 행동변화를 관찰하거나⁵⁴ 굶긴 후에 섭취 행동변화를 관찰하는 방법⁵⁵ 등이 소개되었으나 결과에 대한 신뢰성이 부족하여 잘 사용하지 않는다.

두개의 개방경로와 두개의 폐쇄경로를 가진 십자경로의 미로(plus maze)를 50cm높이에 띄워서 실험동물의 불안을 관찰하는 elevated plus maze 검사법²⁷과 미리 제작된 staircase 박스를 이용해서 올라간 계단수와 뒷다리로 선 수를 측정해서 실험동물의 불안을 관찰하는 staircase test^{26,36,37} 경제적이며, 선택적이고 단순하며, 결과에 대해 신뢰할 수 있는데, 본 연구에서는 staircase test를 실시하였다.

본 연구에서 천궁 추출물은 10mg/kg을 마우스에게 경구투여하였을 때 staircase test에서 climbing수에는 대조군에 비하여 큰 차이를 보이지 않았지만, rearing수에 있어서는 대조군에 비하여 천궁 추출물을 투여한 군에서 현저한 감소가 유발되었다. 이 결과는 천궁 추출물은 마우스의 일반 탐험 행동에는 영향을 미치지 않으나, 불안은 현저하게 감소시킴을 증명하고 있다.

Benzodiazepine 유도체의 진정제들은 중추신경계 억제효과를 통한 진정 효과 외에도 근육이완작용이 있어, 약물 작용의 선택성 측면에서 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 천궁추출물이 근육이완 작용을 유발하는지 시험하는 것은 아주 중요한 사실이다. 근육이완 작용의 유무를 평가하는 방법으로 rotarod test가 유용한 데 Dunham과 Miya⁵⁸는 직경 32mm, 5 rpm의 속도로 회전하는 나무봉에서 180초 이상 위치하는 지를, Tsuda 등²⁸은 직경 30mm, 8 rpm의 속도에서 240초 이상 위치할 수 있는지를 기준으로 하는 평가방법을 제시하였다. 그 외 Rudzik 등²⁹은 가는 꼬인 철사줄에 매달리게 했을 때 5초 이내에 뒷발을 걸칠 수 있는지를 관찰하는 traction test를, Randall³⁰은 경사진 스크린 위에서 미끄러지지 않고 4시간 이상 유지할 수 있는가를 관찰하는 30° inclined screen test를 사용하여 근육이완 작용의 유무를 평가하는 방법을 발표하였다.

진정 작용을 유발하는 용량의 천궁 추출물을 마우스에 투여한 후 rotarod test를 통하여 근육이완 효과의 유무를 시험한 결과, 천궁 추출물 투여로 인하여 근육이완 효과가 유도되지 않음이 관찰되었다. 이 결과는 천궁 추출물은 benzodiazepine계통의 진정제에 비하여 아주 선택적으로 진정 효과를 유발함을 제시하고 있다.

진정 작용의 매개에 관여하는 단백질로는 GABA 수용체와 Glycine 수용체가 널리 인용되고 있다. GABA 수용체는 이 단백질의 구조내에 chloride channel과 complex형태를 이루고 있는데, 활성화 부위에 약물이 결합하여 수용체를 활성화 시키면, complex형태로 존재하는 chloride channel이 열리면서 세포외에 과량 존재하는 Cl⁻ 이온이 세포내로 유입되어 과분극이 일어나게 되며, 이 결과로 신경전도가 차단된다⁵⁹⁾. GABA 수용체에는 GABA 결합부위 외에도 yohimbine과 picrotoxin과 같은 약물의 결합 부위에 존재하며, 이 약물들이 GABA 수용체에 결합하게 되면 complex형태로 존재하는 chloride channel이 차단되어, 오히려 신경의 흥분 및 발작을 유발시킨다. Picrotoxin에 의하여 유도되는 발작반응은 새로운 진정제가 GABA 수용체를 매개로 하여 작용을 나타내는 것을 밝히는데 중요한 도구로 사용되고 있다⁶¹⁾. 그리고 yohimbine은 α 2-receptor 길항제로서 사용되는 약물이지만, 부가적으로 GABA receptor에도 결합하는 능력을 보유함으로써 시험약물이 GABA 수용체를 매개로 하여 진정 작용을 유발하는지의 여부를 판단하는데 중요한 도구로서 사용된다⁶⁰⁾. 또한 isoniazid는 폐결핵 치료제로 사용되는 약물이지만 추가적으로 GABA의 합성을 억제하는 기능을 가지고 있으므로, 진정약물에 의한 진정 효과를 GABA의 매개와 관련하여 평가하는데 사용하는 중요한 수단으로 이용되고 있다¹⁹⁾.

본 연구의 결과를 분석해 보면 천궁 추출물을 진정 효과를 유발하는 용량으로 마우스에 투여한 경우, picrotoxin, yohimbine 및 isoniazid로 인한 발작 유도시간이 대조군과 유의성 있는 차이를 보이지 않고 있다. 이 결과는 천궁 추출물의 진정 효과 유도는 GABA 수용체를 통해서 나타나는 것이 아니며, 또한 GABA의 합성과는 무관하다는 사실을 시사하는 것으로 생각된다.

Glycine 수용체도 ligand-gated ion channel의 구조를 가지고 있으며 수용체가 활성화되면 chloride channel이 열리게 되어 과분극이 유도되고 따라서 신경전도가 억제된다. 이 glycine 수용체에는 glycine 결합부위 외에도 strychnine이 결합하는 부위가 존재하여, strychnine이 glycine수용체에 결합하면 glycine의 작용이 억제되어 신경의 흥분 및 발작이 유도된다⁶¹⁾. 그러므로 천궁추출물은 마우스의 glycine수용체의 기능을 증가시켜 진정 작용을 유발한다고 설명할 수 있다.

최근 강 등¹⁷⁾은 천궁의 100% 메탄올 추출물이 elevated plus maze를 이용한 실험에서 진정 효과가 있음을 보고하였으며, 작용기전으로 GABA 수용체에 결합을 통하여 진정 작용을 나타낸다고 보고하였다. 강 등¹⁷⁾의 연구에서는 천궁을 100% 메탄올로 추출하여 진정 작용 시험에 사용한 반면, 본 연구에서는 70% 메탄올과 물 30%를 혼합한 수용액으로 추출하였기 때문에 유기용매에 용해되는 소수성 성분 뿐 아니라 물에 용해되는 친수성 성분도 같이 함유되어 있으므로 추출물에 포함되어 있는 성분이 상이하게 구성되어 있다. 이는 약리 작용에 있어서도 서로 다른 작용을 나타낼 수 있음을 제시하고 있다. 실제 본

실험의 연구결과 천궁추출물은 GABA 수용체에는 결합하는 양상을 보이지 않은 반면, glycine 수용체를 통한 효과가 현저히 발현됨을 관찰하였다. 이는 천궁의 성분중 물에 용해되는 많은 수용성 성분들에 의하여 GABA 수용체가 아닌 glycine 수용체를 통해서 진정 작용이 나타남을 제시하고 있다. 향후 천궁의 메탄올 수용액 추출물에 대한 성분의 분리와 구조의 구명이 이루어진다면 어떤 성분에 의하여 진정 효과가 유발되는지 밝혀질 수 있으리라 사료된다.

본 연구에서 천궁의 70% 메탄올 추출물이 진정 작용을 유발한 결과는 향후 천궁의 성분 중 진정 효과를 일으키는 성분을 분리하여 단일 성분으로 구성된 새로운 진정제를 개발하는데 중요한 기초가 되리라 사료된다. 현실점에서 생각할 수 있는 가능성 있는 진정 유발 성분으로는, 물과 메탄올에 잘 용해하는 물질들이다. 현재 알려진 천궁의 성분은 phthalides, alkaloids 및 acid 등인데^{8-11,18)} 이들 중 물과 메탄올에 잘 용해하는 alkaloids 와 acid 등이 진정 효과와 관련이 있으리라 추측된다. 하지만 이들 성분 중 어떤 성분이 진정 효과를 유발시키는지는 다양한 분리 기술을 이용한 장기간의 연구를 통한 단일 성분의 분리가 이루어져야 할 것이다.

약물의 작용 측면에서 또 고려해야 할 사항은 반드시 단일 성분이 진정 효과의 유발에 관련이 있다고 단정 할 수 없으며, 오히려 본 연구에서와 같이 여러 성분이 혼합된 상태로 각각의 성분이 서로 복합적으로 작용함으로써 원하는 진정 작용이 유도되었을 가능성도 있다고 사료된다. 따라서 임상적용의 측면에서는 오히려 단일성분으로 구성된 약물체제보다는 여러 성분이 복합적으로 함유된 천연물 추출물의 유용성이 더 우수할 수 있다. 특히, 천연성분의 추출물은 그 생체에 미치는 독성이 거의 존재하지 않음도 주목할 필요가 있다.

본 연구의 결과 천궁 추출물은 GABA 수용체와는 관련성이 없고, Glycine수용체와 작용함을 보여주고 있다. 현재 화학적 합성을 통해 만들어진 진정제들인 benzodiazepam계, barbiturate계, chloral hydrate계 약물들은 모두 GABA 수용체에 작용하여 진정 효과를 유발하며, 항히스타민제이면서 진정제로 이용되는 약물은 항히스타민 효과에 부수해서 나타나는 부작용으로서 졸리움을 진정 효과로 이용하는 경우이다. 따라서 천궁 추출물이 Glycine 수용체와 작용하여 진정 효과를 유발한다는 것은, 천궁 추출물의 성분들이 benzodiazepine, barbiturate, chloral hydrate 그리고 항히스타민 계의 약물과는 구조적으로 상이하다는 것을 제시하고 있다. 최근에 본 교실에서 발표한 석창포 추출물의 경우, Glycine 수용체와 작용한다는 측면에서 천궁과 유사하다. 하지만 천궁은 석창포와 달리 근육이완 작용이 없었다.

요약하면, 천궁 추출물은 기존의 화학적 진정제와는 그 작용 기전이 확연히 상이하며, 또한 석창포의 작용과 비교할 때도 근육이완 작용이 존재하지 않으므로, 아주 특이적인 진정 작용 기전을 가진다고 사료되므로 추가적인 연구와 임상실험 등이 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

천궁의 메탄올 수용액 추출물의 진정 작용을 밝히기 위하여 18-22g 웅성 mouse를 대상으로 staircase test를 시행하였고, 근육이완 효과를 검색하기 위하여 rotarod test를 시행하였다. 진정 작용의 기전을 구명하기 위하여 GABA 및 glycine 수용체에 미치는 영향을 평가하기 위해 picrotoxin, yohimbine, isoniazid, strychnine 등의 약물을 이용하여 발작 유도에 걸리는 시간을 비교 관찰하였다. 또한 생체에서의 안전성을 검증하기 위하여 MTT test 및 Irwin의 행동시험을 시행하여 다음의 결과를 얻었다.

1. Climbing 수는 천궁 추출물 10mg/kg과 30mg/kg 용량으로 경구 투여했을 때 각각에서대조군과 차이가 없었다.
2. Rearing 수에서는 천궁추출물 10mg/kg의 용량으로 경구 투여했을 때 대조군에 비해서 42%의 감소를 보였으며, 30mg/kg 에서는 51%의 감소를 보였다.
3. 근육이완 작용을 탐색하기 위한 rotarod 실험에서는 대조군과 차이를 나타내지 않았다.
4. 천궁 추출물의 투여는 picrotoxin, isoniazid, yohimbine에 의한 발작에서는 큰 변화를 유발하지 않았으나, strychnine에 의한 발작 유도시간은 41%의 증가를 유발하였다.
5. 신경세포에 적용했을 때 특이한 독성 반응을 나타내지 않았으며, 일반 행동에서도 특이한 변화를 유발하지 않았다.

요약하면, 천궁의 메탄올 수용액 추출물은 현저한 진정 작용을 유발하며, 그 작용 기전으로서 glycine의 작용을 증가시켜 chloride ion의 세포내 유입으로 인한 억제성 신경전도를 유도한다고 사료된다. 또한 근육이완 작용도 나타나지 않았으며, 특이한 생체독성도 유발되지 않은 것으로 보아, 향후 치과임상에서 진정 요법의 한 수단으로서 사용될 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

참고문헌

1. 김령, 이궁호 : Midazolam의 투여방법에 따른 진정효과의 비교 연구. 대한소아치과학회지, 27(2):283-290, 2000.
2. McDonald RE, Avery DR : Dentistry for the child and adolescent. 5th ed Mosby Co., Missouri, 318-344, 1987.
3. 이상민, 김종수, 김용기 : Chloral hydrate경구 진정에 실패한 소아환자를 대상으로 사용한 두가지 진정요법의 효과. 대한소아치과학회지, 27(4):505-515, 2000.
4. Houpt M : Report of project USAP: The use of sedative agents in pediatric dentistry. J Dent Child, 40:185-187, 1973.
5. Haupt M : Project USAP the use of sedative agents in pediatric dentistry: 1991 update. Pediatr Dent, 15:36-40, 1993.

6. 대한소아치과학회 : 소아.청소년치과학. 신흥인터내셔널, 183-206, 1999.
7. Zhu YP : Chinese Materia medica:Chemistry, Pharmacology and Applications. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 438-443, 1998.
8. Lu RM, He LY, Fang HJ, et al. : Thin layer chromatography and densitometry of ligustilide in umbelliferae plants. Acta Pharmaceutica Sinica, 15:371-374, 1980.
9. Cao FY, Liu WX, Wen YS, et al. : Studies on chemical constituents of Ligusticum chuanxing. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 14:241-242, 1983.
10. Wang PS, Gao XL, Fukuyama Y, et al. : Chemical constituents of Ligusticum chuanxiong Hort.- A terpenoid compound. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 16:174, 1985.
11. Xue KF, Cao FY : Chemical components of Ligusticum chuanxiong. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 17:122, 1980.
12. Yu Z, Chen KJ, Qian ZH, et al. : Effect of chuanxiong granule on platelet function and prostaglandin metabolism in coronary disease patients. Chinese Journal of Integrated Traditional and Modern Medicine, 7:8-11, 1987.
13. Han DL, Tang WY : Effect of sodium ferulate on migraine in open and double-blind controlled trials. Chinese Journal of Internal Medicine, 27:637-640, 1988.
14. Huang KC : Pharmacology of Chinese Herbs. Boca Raton, CRC Press, 84-85, 1993
15. Wu BJ : Pharmacology of Chinese Herbal Medicines. People's Health Publisher, Beijing, 82-84, 1983.
16. Wang YS : Pharmacology and applications of Chinese materia medica. People's Health Publisher, Beijing, 119-128, 1983.
17. 강지현, 이동웅, 하정희 : 천궁의 GABAA-Benzodiazepine 수용체 복합체와의 상호작용. 생물치료 정신의학, 3:169-176, 1997.
18. Beijing Institute of Pharmaceutical Industry: Chemical studies on the components of Ligusticum chuanxiong, Chinese Pharmaceutical Bulletin, 15:39, 1980.
19. 궁화수, 이궁호 : 석창포(Acorus Gramineus SOLAND)의 진정효과에 관한 연구. 경희시대논문집, 25:127-139, 2003.
20. Cho J, Kim YH, Kong JY, et al. : Protection of cultured rat cortical neurons from excitotoxicity by

- asarone, a major essential oil component in the rhizome of *Acorus gramineus*. *Life Sci*, 71:591-599, 2002.
21. Liao JF, Huang SY, Jan YM, et al. : Central inhibitory effects of water extract of *Acori graminei* rhizoma in mice. *J Ethnopharmacology*, 61:185-193, 1988.
 22. Sonavane GS, Sarveija VP, Kasture VS, et al. : Anxiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 71:247-252, 2002.
 23. Avallone R, Cosenza F, Farina F, et al. : Extraction and purification from *Ceratonia siliqua* of compounds acting on central and peripheral benzodiazepine receptors. *Fitoterapia*, 73:390-396, 2002.
 24. Vishwakarma SL, Pal SC, Kasture VS, et al. : Anxiolytic and antiemetic activity of *Zingiber officinale*. *Psychotherapy Res*, 16:621-626, 2002.
 25. Carvalho-Freitas MIR, Costa M : Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. *Biol Pharm Bull*, 25:1629-1633, 2002.
 26. Simiand J, Keane PE, Morre M : The staircase test in mice: A simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents. *Psychopharmacology*, 84:48-53, 1984.
 27. Pellow S, File S : Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus maze: a Novel Test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 24:525-529, 1986.
 28. Tsuda M, Suzuki T, Misawa M, et al. : Involvement of the opioid system in the anxiolytic effect of diazepam in mice. *Eur J Pharmacol*, 307:7-14, 1996.
 29. Rudzik AD, Haster JB, Tang AH, et al. : The Benzodiazepines. Raven Press, New York, 285-297, 1973.
 30. Randall P : Studies on the neurological effects using simple experimental model. *J Pharmacol Exp Ther*, 135:543-545, 1960.
 31. Usunoff G, Atsev E, Tchavdarov D : On the mechanisms of picrotoxin epileptic seizure (macro- and micro-electrode investigations). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 27:444, 1969.
 32. Dunn R, Fielding S : Yohimbine-induced seizures in mice: A model predictive of potential anxiolytic and GABA-mimetic agents. *Drug Dev Res*, 10:177-188, 1987.
 33. Costa E, Guidotti A, Mao CC : Evidence for involvement of GABA in the action of benzodiazepines: Studies on rat cerebellum. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 14:113-151, 1975.
 34. Bigler ED : Comparison of effects of bicuculline, strychnine, and picrotoxin with those of pentylentetrazol on photoically evoked aftercharges. *Epilepsia*, 18:465-470, 1977.
 35. Mosmann T : Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65:55-63, 1983.
 36. Irwin SI, Nodine JH, Siegler PE : Animal and clinical pharmacologic techniques in drug evaluation. Yearbook Medical Publishers, Chicago, 36-54, 1964.
 37. Dixit VK, Varma KC : Effects of essential oil of leaves of *Blumea lacera* DC on central nervous system. *Indian J Pharmacol*, 18:7-11, 1976.
 38. Mukherjee PK, Saha K, Balsubramanian R, et al. : Studies on psychopharmacological effects of *Nelumbo nucifera* rhizome extract. *J Ethnopharmacol*, 54:63-67, 1996.
 39. Donaldson D, Meechan JG : The hazard of chronic exposure to nitrous oxide : an update. *British Dental Journal*, 178:95-100, 1995.
 40. Stach DJ : Nitrous oxide: understanding the benefits and risks. *American Dental Journal*, 8:47-50, 1995.
 41. Giovannitti JA : Regimens for pediatric sedation. *Compendium of continuing education in dentistry*, 14:1002-1012, 1993.
 42. 김경환 : 이우주의 약리학 강의. 제 4판, 의학 문화사, 211-223, 1997.
 43. Aitkenhead AR, Smith G : Drugs used to supplement anesthesia. *Textbook of Anesthesia*. 2nd ed, Churchill Livingstone, Great Britain, 203, 1992.
 44. Ashton H, Braham RL, Fukuta O, et al. : A study of the sedative treatment of children. *Int J Pediatr Dent*, 6:13-17, 1996.
 45. Fuks AZB, Kuufman E, Kam D, et al. : Assessment of two doses of intranasal midazolam for sedation of young pediatric dental patients. *Pediatr Dent*, 16:301-305, 1994.
 46. Folyan MO, Faponle A, Lamikanra A : A review of the pharmacological approach to the management of dental anxiety in children. *Int J Pediatr Dent*, 12:347-354, 2002.

47. Handerson JM, Broadsky DA, Fisher DM, et al. : preinduction of anesthesia in pediatric patients with nasally-administered suffentanil. *Anesthesiology*, 68:671-675, 1998.
48. Morgensen F, Muller D, Valentine N : Glycopyrolate during ketamine/diazepam anesthesia: a double-blind comparison with atropine. *Acta Anesthesiologica Scandinavica*, 30:332-336, 1986.
49. Hass DA, Harper AG : Ketamine: a review of its use in ambulatory anesthesia. *Anesthesiology Progress*, 39:61-68, 1992.
50. White PF, Way WL, Trevor AJ : ketamine-its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology*, 56:119-136, 1992.
51. Geller I, Seifyer J : The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia*, 21:1-7, 1960.
52. Vogel JR, Beer B, Clody DE : A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacologia*, 21:1-7, 1971.
53. File S: The use of social interactions as a method for detecting anxiolytic activity of chlorodiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Methods*, 2:219-238, 1980.
54. Crawley JN : Neuropharmacological specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behavior*, 15:695-699, 1981.
55. Stephens RJ : The influence of mild stress on food consumption in untreated mice and the effects of drugs. *Br J Pharmacol*, 47:146, 1973.
56. Thiebot MH, Soubrie P, Simon P, et al. : Dissociation de deux composantes du comportement chez le rat sous l'effet de psychotropes. Application a l'etude des anxiolytiques. *Psychopharmacologia*, 31:77-90, 1973.
57. Thiebot MH, Soubrie P, Simon P, et al. : Specificite d'action des tranquillisants mineurs dans le test de l'escalier. Relation entre ces effets et leurs proprietes anxiolytiques. *J Pharmacol(Paris)*, 7:87-102, 1976.
58. Dunham NW, Miya TS : A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Sci Ed*, 46:208-209, 1957.
59. Leite JF, Cascio M : Structure of ligand-gated ion channels: critical assessment of biochemical data supports novel topology. *Mol Cell neurosci*, 17:777-792, 2001.
60. Dunn RW, Corbett R : Yohimbine-induced seizures involve NMDA and GABA transmission. *Neuropharmacol*, 31:389-395, 1992.
61. Pfeiffer F, Graham D, Betz H : Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem*, 257:9389-9393, 1982.

Abstract

EFFECT OF METHANOL EXTRACT OF CNIDII RHIZOMA
ON THE FUNCTION OF RECEPTORS FOR GABA AND GLYCINE

Jong-Tae Lee, Jae-Hong Park, Keung-Ho Lee

Department of Pediatric Dentistry, College of Dentistry, Kyung Hee University

Cnidii Rhizoma (CR) was subjected to extraction with 70% methanol and tested to determine whether it has anxiolytic activity in mouse by employing staircase and rotarod tests. In addition, to understand the mechanism of anxiolytic action, CR, picrotoxin, yohimbine, isoniazid and strychnine were utilized to delineate the potential involvement of GABA and glycine receptors in the action of Cnidii Rhizoma. To gain insights into the safety of Cnidii Rhizoma extract, behavioral and MTT tests were carried out. The results were obtained as follows:

1. CR extract had little effect on climbing numbers in the stair case test.
2. CR extract had considerable anti-anxiety effects as evidenced by the reduction of rearing numbers in the stair case test.
3. CR extract had little effect on muscle relaxation.
4. Anxiolytic actions of CR extract appeared to be mediated by glycine receptor activation.
5. Cytotoxicity in the neuronal cell was not observed and no strange behaviors were found.

In short, these results indicate that CR extract has the ability to exert anxiolytic activity, possibly by activating glycine receptor with little side effects in mouse.

Key words : Cnidii Rhizoma, Sedation, Anxiolytic, GABA, Glycine, MTT, Irwins' s behavior test