

## 지유(Sanguisorbae Radix)의 항 불안 활성

이소영 · 정성현\*

경희대학교 약학대학 약물학교실

(Received August 9, 1994)

### Anxiolytic Activities of Sanguisorbae Radix

So Young Lee and Sung Hyun Chung\*

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

**Abstract**—To detect anxiolytic activity from Sanguisorbae Radix we used various animal models of fear or anxiety that are sensitive to known anxiolytic drugs. While diazepam showed significant anxiolytic activities in all five animal models employed in this study, 5-HT<sub>3</sub> antagonist ondansetron and ethylacetate fraction of Sanguisorbae Radix did show anti-anxiety effects in social interaction and two compartment exploration tests. Ethylacetate fraction of Sanguisorbae Radix and 5-HT related drugs like ondansetron and buspirone, however, seem to have merit over diazepam in terms of not causing drowsiness. Among ten subfractions obtained from ethylacetate fraction of Sanguisorbae Radix by silica gel chromatography, subfraction I showed higher anxiolytic activities than subfraction DEF in two animal models, social interaction and two compartment exploration tests. There is growing evidence for the role of 5-HT in the control of anxiety. We hope that new compound(s) will be found from the active fractions of Sanguisorbae Radix as a potential anxiolytic agent in the future.

현대사회에 와서 그 구성인에게 요구되는 일이 과도해지면서 불안증을 경험하는 사람이 많아졌다. 불안(anxiety)이란 정상인들에게도 나타날 수 있는 감정상태로 예상되는 절박한 상황을 피할 수 없으리라는 무기력감 때문에 생기는 일종의 두려운 기대감(fearful anticipation)이며, 그 의미는 다양하지만 대부분의 경우 'fear'나 'stress'와 같은 뜻으로 사용할 수 있다. 그러나 이 불안의 정도가 심하여 과도한 자극을 인식하게 되면 정신적으로나 육체적으로 지체게 된다. 이 심리적인 변화는 교감신경을 활성화시켜 혈압과 심박수를 증가시키고 호흡곤란, 골격근 긴장도 증가, 구갈, 복통 및 설사 등을 동반하여 정상적인 생활에 지장을 주게되며 이러한 경우의 불안은 정신질환으로 진단하여 적절한 대처가 요구된다.

1960년대 초에 Roche 연구소는 새로운 불안증 치료제로 benzodiazepine 계열의 신경안정제인 chlordiazepoxide와 diazepam을 소개하였다. 그 이후

1970년대초에 이르러서는 benzodiazepine 계열의 약물이 barbiturate 약물 대부분을 대체하였으며 현재 임상에서는 신경안정제로 benzodiazepine류를 주로 사용하고 있다.

대뇌에서 benzodiazepine류나 항불안 활성을 갖는 약물들의 작용점을 raphe nuclei와 amygdala를 들 수 있다. 중뇌의 raphe nuclei에는 변연계로 GABA와 glycine 수용체뿐 아니라 5-HT 신경이 분포되어 있다.<sup>1)</sup> 최근에는 dorsal raphe nuclei 신경에 5-HT와 GABA가 공존한다는 주장이 제기되고 있다. 그러므로 raphe nuclei의 유입변화는 이차적으로 5-HT신경계에 영향을 줄 수 있다고 판단되며 실제로 habenular nuclei부위를 전기적으로 손상시켰을 때 GABA효능제의 활성이 차단되고 신경말단에서 세로토닌의 대사체인 5-HTP 축적이 감소된다. raphe로부터 나가는 5-HT 신경이 amygdala에 많이 투사되어 있고 이곳에 GABA를 합성하는 glutamic acid decarboxylase 효소가 있다. 이 부위가 손상되면 공포감에 의해 나타

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

나는 놀람 반응이 손상받고 이 부위에 benzodiazepine계 약물을 주입시 항불안 효과가 나타난다. 이와 같이 5-HT는 불안과 관련되어 있다. 5-HT유리가 증가되면 불안이 유발된다는 것이 여러 동물실험 모델에서 관찰되었다. 5-HT<sub>1c</sub> 수용체 효능제인 1-(m-chlorophenyl)piperazine dihydrochloride 경우 불안을 유발시켜 불안관련 동물실험 모델에서 social interaction을 감소시키고 light/dark box의 밝은 부분에서 생쥐의 활동성을 감소시키는 것으로 나타났다.<sup>2)</sup>

지금까지 benzodiazepine류를 임상에서 주로 사용하였으나 부작용과 의존성이 있으므로 GABA기전을 거치지 않고 불안증을 치료할 수 있는 5-HT계에 작용을 나타내는 약물이 흥미를 모으고 있다.<sup>3)</sup> 여러해 동안의 연구로서 5-HT가 불안증이 유발되는 과정에서 중요한 역할을 담당한다는 것이 확인되었으나 각 5-HT 아형 수용체에 대한 선택적 길항제의 부재로 5-HT신경계와 관련된 새로운 항불안제 개발이 이루어지지 못했다. 그러나 최근에 여러 불안 관련 동물 실험 모델이 개발됨으로서 5-HT 유리증가로 불안이 유발된다는 것이 관찰되었고 이를 이용한 새로운 선택적 화합물들이 발견되어지고 있다.<sup>4)</sup> 非 benzodiazepine류로써 항불안제로 최초로 허가받은 것이 5-HT<sub>1a</sub> 선택적 효능제인 Buspirone이다.<sup>5,6)</sup> 신경말단에 있는 5-HT의 활성이 감소되므로 항불안 효과를 나타낸다.<sup>7)</sup> 최근 동물 행동약리 실험결과에 의하면 화학요법제나 항암제 투여후 생기는 구토증을 억제할 목적으로 임상에서 쓰이고 있는 5-HT<sub>3</sub> 길항제들이 강력한 항불안 효과가 있는 것으로 나타나 흥미를 모으고 있다.<sup>8)</sup> 중추에서의 5-HT<sub>3</sub> 결합부위가 뇌간의 postrema부분, 대뇌피질 그리고 mesolimbic system에서 발견되고 이 화합물들이 동물실험에서 항정신성 및 항불안 작용을 나타내므로 mesolimbic system에서 dopamine 유리 억제와도 관련이 있으리라 사료된다.<sup>9)</sup>

본 연구에서는 중추관련 질환에 주로 사용해 왔던 수종의 전통 약물들 중에서 항세로토닌 활성을 가지면서 항불안활성을 나타내는 생약을 추적하기 위해 경희의료원 한방약제과의 처방전을 참고로 정신성 질환에 사용 빈도수가 높은 한약제 35종을 선별한 후 일차적으로 흰쥐 적출 회장을 이용한 세로토닌 매개 수축반응의 억제 실험을 실시한 결과 가장 선택적인 항세로토닌 활성을 보인 지유 *Sanguisorba officinalis*

L.를 얻었다.<sup>10)</sup> 계속하여 anxiety model<sup>11)</sup>에서 지유의 항불안 활성을 검색하고 활성분획을 추적하여 현재 주로 항불안약으로 사용되는 benzodiazepine계 약물이 나타내는 대표적인 부작용인 진정작용은 없으면서 5-HT와 관련하여 항불안 활성을 가지는 약물을 전통약물로 부터 찾고자 하는 것이다.

## 실험재료

**재료**—지유는 서울 시내 한약 건재상(경동시장)에서 1992년 6월에 구입한 것을 사용하였다.

**시약 및 기기**—5-Hydroxytryptamine, acetylcholine chloride, angiotensin II, bradykinin acetate salt, pentylenetetrazole, 1-(m-chlorophenyl)piperazine dihydrochloride(m-CPP) 등은 Sigma로부터 구입하였다. 8-[4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]butyl-8-azaspiro-[4,5]-decane-7,9-dionemonohydrochloride(buspirone)은 보령제약, GR 38032F(ondansetron HCl)은 한국그락스, cyproheptadine HCl은 국제약품으로부터 공급받아 사용하였다. Kiesel gel 60과 thin layer chromatography plate precoated Kiesel gel 60G F254는 Merck사의 것을 사용하였으며 기타 시약은 시판 특급 혹은 1급을 사용하였다.

기기로는 Physiograph(Harvard 480), Automatic reflex conditioner(Ugo Basile Cat 7503)을 사용하였으며, 한편 시료의 항불안 활성을 검색하기 위해 이용한 anxiety model 중 social interaction test는 45×45×27 cm, two compartment exploration test는 45×27×27 cm, elevated plus maze test는 높이 50 cm에 open arm 50×10 cm과 enclosed arm 40×10×40 cm의 크기의 모형을 자체 제작하여 본 실험에 사용하였다. S.D.계의 체중 150~200 g의 흰쥐 및 ICR계 15~25 g의 생쥐를 사용하였으며, 주위환경에 적응시키기 위해 본 실험에 들어가기 적어도 1주일전부터 실험실내의 동물장에서 사육하였다. 이때 고형사료와 물은 실험동물이 자유롭게 먹도록 충분히 공급하였다.

## 실험방법

### 지유의 추출 및 분획

시료생약 4.3 kg(지유)를 MeOH로 3시간씩 3번 추

출한 후 얻어진 MeOH추출물을 ethylacetate와 물로 분획하였으며, ethylacetate 층은 용매를 감압 농축한 후 silica gel column을 이용하여 Hexane-Acetone(100 : 1)→Hexane-Acetone-EtOH(1 : 6 : 1)의 용매로 분리하였는데 이때 TLC상에서 지유 ethylacetate 분획물을 Hexane-Acetone-EtOH(12 : 3 : 2)의 용매로 전개시켜 얻은 Rf치에 따라 소분획 A로부터 N까지 분리하였다.

#### 적출 회장에 대한 검색(rat ileum assay)

웅성 S.D. 계열의 흰쥐(체중 180~200 g)를 1주일 동안 실험실 환경하에서 적응시킨 뒤 실험전날 16시간 절식을 시킨 후 개복하여 회장을 적출한 후 50 ml의 Krebs's solution이 담겨있는 마그누스관에 고정시킨 후, 95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하였다. 회장에 7.5 mg의 tension을 주어서 잠시후에 자동수축을 관찰할 수 있도록 하였고 organ bath내의 온도는 섭씨 35도로 유지하였다. 시료는 0.5% 에탄올에 녹여 사용하였다. 0.5% EtOH Krebs's solution 50 ml이 있는 organ bath에 5-HT(1×10<sup>-6</sup> g/ml)를 가해 수축도를 조사한 뒤 3~4번 세척한 후 안정화되면 시료를 가하고 5분 후에 같은 농도의 5-HT를 가한 후 수축변화를 조사하였다. 3~4번 세척후 0.5% EtOH Krebs's solution에 5-HT를 가해 수축이 회복을 보았다.

#### 항불안 활성 검색시험

ICR계 생쥐(20~25 g)가 cage에서 자유로이 사료 및 물을 섭취할 수 있고 12시간을 주기로 밤음과 어두움을 일정하게 유지시킨 환경하에서 사육시킨 뒤 실온이 유지되며 빛이 차단된 실험실에서 오전 11시와 오후 5시 사이에 관찰하였다. 지유 ethylacetate 분획물과 소획물들은 물에 녹지 않아 경구투여시 0.5% PVP현탁액을 만들어 사용하였다.

**Social interaction test**<sup>12,13</sup>—실험에 필요한 한쌍의 생쥐는 각각 분리된 cage에서 사육된 것으로 선택했다. 관찰 cage(45×45×27 cm)는 자체 제작하여 사용했으며 천정을 노출시켜 동물의 행동이 용이하게 관찰될 수 있도록 만들었다. 불안을 유발시키기 위해서 빛자극을 이용하여 두 가지 조건을 선택하였다. 하나는 high light unfamiliar condition이고 또 하나는 low light unfamiliar condition이다. 우선 low light unfamiliar condition이란 관찰 cage내를 검게 칠하고

주위 조명을 차단시켜 생쥐가 스트레스나 공포감을 느끼지 않는 조건하에서 단지 서로 익숙치 않은, 분리된 cage에서 사육된 생쥐간의 social interaction을 관찰하는 것이다. High light unfamiliar condition은 실험하는 주위 조건이 보다 공포나 스트레스를 느낄수 있기 위해 관찰 cage내를 하얗게 칠했으며 마주보는 양벽위에 강력한 조명(6400 LUX)을 설치해 비추게 하였다. 한쌍의 각 생쥐는 각 분리된 cage에서 사육된 것을 선택했으며 실험 2시간 전부터 빛이 차단된 분획 cage에 홀로 둔 후 10분 관찰하였다. High light unfamiliar condition하의 test를 통해 공포감에 의해 불안이 유발됨을 확인할 수 있었으므로 이 조건하에서 기존의 항불안제와 지유 메탄올 엑스의 ethylacetate 분획물, 이 분획물의 소분획물로서 흰쥐 적출회장관에서 5-HT 길항효과가 큰 DEF 및 I에 대한 시험을 하였다. 시험 45분전에 대조 약물로 diazepam 1 mg/kg, ondansetron 10 µg/kg을 투여하였고, 한편 지유 메탄올 엑스의 ethylacetate 분획물 40 mg/kg/day은 7일 연속투여 한 후 시험하는 날 300 mg/kg 고용량을 투여한 것과 이 분획물을 500 mg/kg으로 단일 투여한 것을 비교 관찰하였다. 이 분획물의 chromatography를 통해 얻은 소분획 DEF 및 I는 70 mg/kg/day 7일간 연속 투여하였다.

**Two compartment exploration test**<sup>12</sup>—open-topped box(45×27×27 cm)를 2 : 3으로 small 및 large area로 구획하였으며, 바닥에 7.5×7.5 cm크기의 통로를 만들어 두방사이의 이동을 가능하게 하였다. 작은 방의 벽은 검게 칠하고 조명을 비추지 않으며 한편 큰 방의 벽은 하얗게 칠하고 바닥으로부터 17 cm 높이에서 100W tungsten 조명을 비추었다. 검색시료나 대조약물은 시험 45분전에 투여하며, 5분간 아래의 사항을 관찰하였다.

첫째, 각 방에서 머무르는 시간

둘째, 각 방에서 뒷발로 서는 횟수

대조약물로는 diazepam 2 mg/kg, buspirone 5 mg/kg, GR38032F(ondansetron) 100 µg/kg 등이 사용되었으며 지유 ethylacetate 분획물은 7일간 40 mg/kg/day 투여 후 8일째되는 날 300 mg/kg 경구 투여하고 지유 ethylacetate 분획물의 소분획 DEF와 I는 각각 50 mg/kg/day 8일간 경구투여한 후 관찰하였다.

**Elevated plus maze test**<sup>14</sup>—여기서 elevated plus

maze라 함은 2개의 open arm(50×10 cm)과 2개의 enclosed arm(40×10×40 cm)이 각각 마주보는 십자형의 maze로 그 높이가 바닥으로부터 50 cm인 모형을 말한다. 여기서 open arm이란 가로가 10 cm인 면이 높이 50 cm위에 위치하고 주위벽이 open된 것으로 생쥐가 이 공간 안에 있게 되면 공포감을 느끼게 된다는 것이 배변, 사지떨림, 스트레스 관련 호르몬의 분비 등으로 확인되었으며 정상적인 생쥐의 경우 이 공간을 꺼려하는 것이 관찰된다. 이러한 높이감에서 오는 공포감이나 불안을 이용하여 항불안 활성 검색에 이용하였다. 검색약물을 시험 45분전에 주입한 후 생쥐를 elevated plus maze의 중심에 놓고 5분간 생쥐의 open arm에서 보내는 시간을 측정하였다. 대조약물로는 diazepam 2 mg/kg, cyproheptadine 4 mg/kg, ondansetron 10 µg/kg, m-CPP 5 mg/kg를 투여하고, 한편 지유 ethylacetate 분획층은 50 mg/kg/day을 8일간 연속투여한 후 시험하였다.

**Two-way avoidance test<sup>15</sup>**—바닥에 통로가 있어 두 구역간의 이동이 가능한 1:1로 구획된 open-topped box(40×10×15 cm)로 전기자극이 밑바닥의 bar를 통하여 가하여 질수 있고 15 cm 높이에서 빛과 소리 자극이 가해질 수 있는 Automatic reflex conditioner(Ugo Basile, Cat. 7503)를 본 실험에 이용하였다. 이 기기를 이용하여 생쥐에게 해로운 자극을 가하였을 때 자극을 피하기 위해 다른 구역으로 이동하기까지의 시간을 latency로 하여 400초 동안 9초간격으로 11초씩 자극을 가하였을 때 생쥐가 소리, 빛, 전기자극으로 인한 스트레스에 대해 어떻게 반응하는지를 관찰한 후 항불안제인 benzodiazepine계 약물, 5-HT 관련약물, 지유 ethylacetate 분획물을 투여한 후의 반응을 비교관찰 하였다. 이때 Automatic reflex conditioner의 작동조건은 소리(sound level 60 dB, sound frequency 670 Hz), 빛, 전기자극(0.4 mA)순으로 11초의 자극을 가하는 것을 9 sec 간격으로 20회 반복해 400초 동안 220초간의 유해한 자극을 가하게 프로그램 하였다. 비교약물로는 diazepam 2 mg/kg, ondansetron 100 µg/kg, buspirone 5 mg/kg을 시험 40분전에 투여하고 지유 ethylacetate 분획물 50 mg/kg/day은 7일간 연속 투여한 후 시험하였다.

**Pentylentetrazole(PTZ)-induced convulsion test<sup>13</sup>**—항불안 작용을 알아보기 위해 예전부터 자주 써왔던 방법이 설치류에서 PTZ에 의해 유도된 발작

중세의 억제력을 보는 것이다. 여러가지 항불안제가 PTZ test에 적절하며 PTZ가 유도하는 발작을 차단시키는 항불안 활성은 사람에 있어 항불안 효과 크기와 유사하다고 가정하고 본 실험을 실시하였다. 검색시료와 대조약물을 투여하고 1시간 후에 PTZ 투여(60 mg/kg, IV)로 유도되는 발작의 발생빈도를 측정하였다. 측정된 빈도수를 기준으로 하여 6가지 등급으로 나누어 효과를 검색하였다. 0등급: 0~6회, 1등급: 7~12회, 2등급: 13~18회, 3등급: 17~24회, 4등급: 25~30회, 5등급: 31회 이상의 값을 기준으로 하여 실험하였다. 대조약물로는 diazepam 2.5 mg/kg과 지유 ethylacetate 분획물을 각각 5일간 50 mg/kg/day경구투여한 후 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 지유 분획물의 5-HT억제작용에 대한 검색

4.3 kg의 Sanguisorbae Radix를 분획하여 ethylacetate분획물 83 g을 얻었다. 이 분획물로 흰쥐 적출 회장 assay를 실시한 결과 ethylacetate층이 acetylcholine, angiotensin II, bradykinin에는 길항활성이 적은 반면 5-HT에 대해서는 57%라는 큰 억제작용을 나타내므로 5-HT 선택적 길항작용을 가지는 이 분획을 선택하여 본 실험을 계속하였다(Table I). 물질 분리를 위한 용출용매로는 Hexane : Acetone(100 : 1)→Hexane : Acetone : Ethanol(1 : 6 : 1)를 사용하였으며 Hexane : Acetone : Ethanol(12 : 3 : 2)의 전개용매로 TLC에 전개된 Rf치에 따라 A로부터 N까지의 소분획들을 얻었다. 수득된 각각의 소분획들을 0.5% 에탄올에 녹여  $1 \times 10^{-3}$  g/ml 용량으로 흰쥐의 적출 회장관을 이용한 5-HT에 대한 길항효과를 관찰하였다. 5-HT에 대해 길항효과가 높았으며, 특히

**Table I**—Inhibitory effects of Sanguisorbae Radix ethylacetate fraction against serotonin(5-HT), acetylcholine, angiotensin II and bradykinin on the isolated rat ileum

Treatment ( $1 \times 10^{-6}$ g/ml)	% Inhibition Sanguisorbae Radix EtoAc fr.( $2 \times 10^{-3}$ g/ml)
5-Hydroxytryptamine	57
Acetylcholine	—
Angiotensin II	17
Bradykinin	14

**Table II**—Inhibitory effects of ten subfractions obtained from Sanguisorbae Radix ethylacetate fraction on isolated rat ileum

지유 EtoAc fr.의 subfractions (1×10 <sup>-3</sup> g/ml)	% Inhibition	
	5-HT (1×10 <sup>-6</sup> ml)	Ach
A	10	—
B*	60	—
DEF*	72	—
H	44	—
I*	68	—
J	50	—
K	6	—
L	—	—
M	23	—
N	30	—

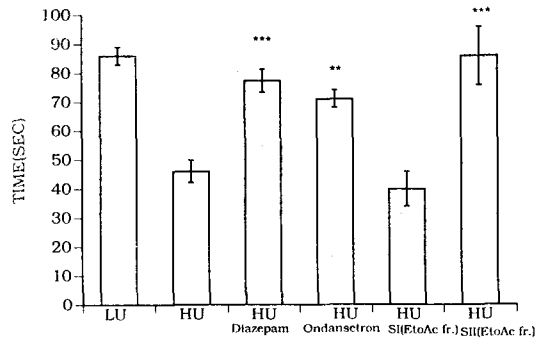
— negligible

\* active subfraction

소분획 DEF 및 I 분획층은 5-HT에 대하여 각각 72%, 68%의 큰 억제작용을 나타내며 아세틸콜린에 의한 장관수축에는 영향을 미치지 않는 점으로 보아 5-HT에 대해 보다 선택적으로 억제작용을 갖는 것으로 추정되었다(Table II). 소분획 DEF는 상호 TLC상에서의 Rf치가 거의 유사하므로 이 세분획을 한분획으로 모아서 항불안 활성 검색에 사용하였다.

**불안관련 행동실험 모델을 이용한 지유의 항불안 활성 검색**

**Social interaction test**—Fig. 1 및 2에서 보듯이 social interaction(생쥐간 상호 부대끼면서 노는데 사용되는 시간)이 low light unfamiliar condition (LU)에 비해서 high light unfamiliar condition (HU) 하에서 보다 현저히 감소하는 것으로 보아 high light unfamiliar condition에서 불안증이 유발되어 실험 동물간의 social interaction이 감소된 것이라 판단되어 이 조건하에서 비교약물들 및 지유의 항불안작용을 검색하였다. 비교약물로서는 항불안약으로 현재 널리 사용되고 있는 benzodiazepine계 약물인 diazepam과 최근 새로운 항불안제로서 대두되는 buspirone과 ondansetron을 사용하였다. buspirone과 ondansetron은 GABA계에 작용을 나타내는 diazepam과는 달리 5-HT계에 관여하는 약물이며 非-benzodiazepine계 약물로 benzodiazepine계 약물이 가지는 단점을 보완할 수 있는 약물로써 근래 관심을 모으고 있는



**Fig. 1**—The effects of Sanguisorbae Radix EtoAc fraction on social interaction in mice under high light unfamiliar condition(HU).

LU: Pair of mice were tested under low light unfamiliar condition

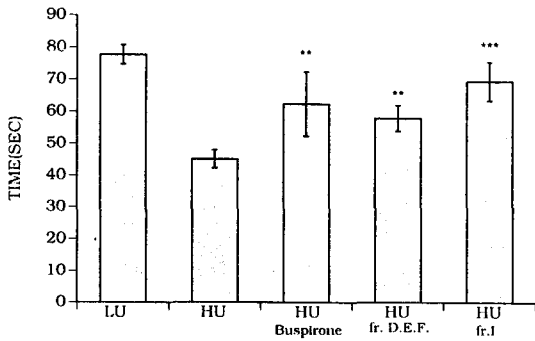
HU: Pair of mice were tested under high light unfamiliar condition

Diazepam, 1 mg/kg; Ondansetron, 10 µg/kg; Sanguisorbae Radix EtoAc fr., 500 mg/kg(SI); Sanguisorbae Radix EtoAc fr., 40 mg/kg/day for 7 days and on the 8th day mice were treated with 300 mg/kg of the sample(SII)

n=6-8 per group. \*p<0.1, \*\*p<0.05, \*\*\*p<0.01.

약물들이다. 위 비교약물들을 social interaction 시험한 결과 항불안제인 diazepam, ondansetron(GR3 8032F), buspirone 등 모두가 HU에서 유의성 있는 불안억제 활성을 나타냈으며 buspirone이나 ondansetron의 경우 social interaction test에서 활성이 있다는 것이 보고된 바 있고 이것이 본 실험에서 확인되었다. 지유 메탄올 엑스의 ethylacetate 분획층 40 mg/kg/day를 연속 7일 동안 투여한 후 시험날 300 mg/kg 과량투여한 경우 HU에서 social interaction time이 85.6±7.9초로 LU에서의 시간 만큼이나 증가되는 것이 나타났으므로 이 경우 불안 억제활성이 있는 것으로 사료된다(Fig. 1). 또한 지유 ethylacetate층에서 얻은 소분획으로 실시한 흰쥐 적출회장 assay에서 5-HT 길항활성이 컸던 소분획 I가 p<0.01의 유의성 있는 불안 억제 활성을 나타냈으며 비교약물로 사용한 buspirone보다도 그 활성이 크게 나타났다(Fig. 2).

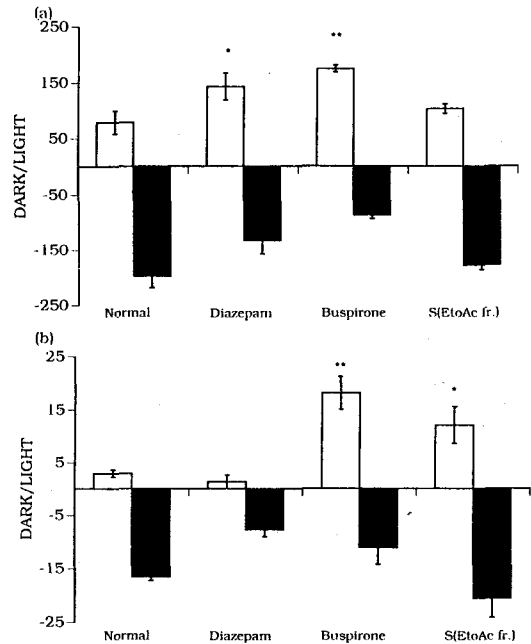
**Two compar tment exploration test**—Fig. 3 및 4에서 볼 수 있듯이 buspirone, ondansetron의 경우 white area에서 머무르는 시간(retention time)이



**Fig. 2**—The effects of *Sanguisorbæ Radix EtoAc* subfraction on social interaction in mice under high light unfamiliar condition. Buspiron, 5 mg/kg; *Sanguisorbæ Radix EtoAc* subfr. DEF, 70 mg/kg/day for 7 days(fr. D.E.F); *Sanguisorbæ Radix EtoAc* subfr. I, 70 mg/kg/day for 7 days(fr. I). n=6-8 per group. \*p<0.1, \*\*p<0.05, \*\*\*p<0.01.

diazepam 못지 않게 normal군에 비해 현저히 증가 되는 것으로 나타났으며 buspiron의 경우는 diazepam보다 retention time이 길었다. 그러나, white area에서의 rearing number에 있어서는, diazepam의 경우 진정작용에 의해 normal이하로 현저히 감소하는 것으로 나타난 반면, 5-HT 수용체에 작용하는 buspiron과 ondansetron은 normal에 비해 오히려 증가되는 것으로 나타났다. 위 비교약물들의 결과와 비교했을 때 지유 메탄올 엑스의 ethylacetate 분획층은 비교약물들의 결과와 비교했을 때 지유 메탄올 엑스의 ethylacetate 분획층은 비교약물들의 retention time 만큼 현저한 증가는 보이지 않으나 normal에 비해서는 증가되었으며 rearing number에 있어서는 diazepam과는 달리 5-HT 관련 비교약물들처럼 유의성 있는 증가를 나타내므로 진정작용은 일으키지 않는다고 본다(Fig. 3). 반면 silica gel chromatography를 해서 얻어낸 소분획 DEF 및 I를 가지고 같은 시험을 해 본 결과 white area에서의 retention time이나 rearing number로 보다 소분획 I가 큰 항불안 활성을 가진다고 판단되었다(Fig. 4).

**Elevated plus maze test**—Fig. 5에서 보는 바와 같이 benzodiazepine계인 diazepam은 open arm에서 보내는 시간이 긴 것으로 보아 큰 항불안 활성을 나타내는 것으로 보이며 기타 5-HT관련 비교약물들이 이 모델에서 활성이 있기는 하나 diazepam만큼 큰

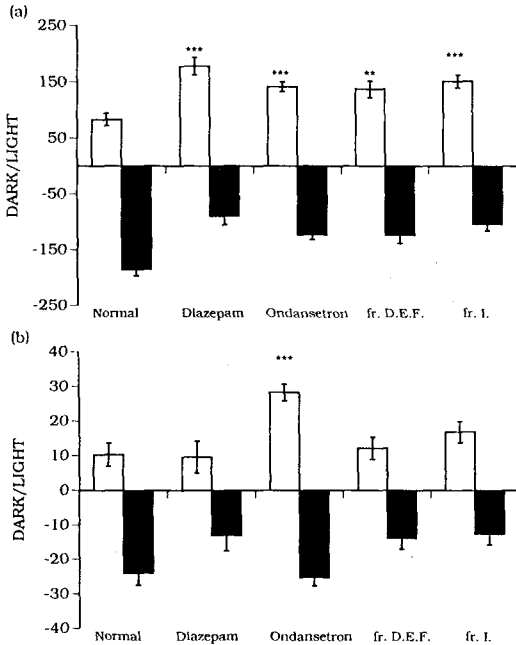


**Fig. 3**—The effects of *Sanguisorbæ Radix EtoAc* fraction in the light/dark exploration test in mice. Treatment were given orally at the doses specified 45 min before testing.

(a) and (b) represent retention time expressed in second and rearing number, respectively. Diazepam, 2 mg/kg; Buspiron, 5 mg/kg; *Sanguisorbæ Radix EtoAc* fr., 40 mg/kg/day for 7 days and on the 8th day mice were treated with 300 mg/kg of the sample. n=6-8 per group. \*p<0.1, \*\*p<0.05, \*\*\*p<0.01.

활성을 보이지 않았다. 지유 메탄올 엑스의 ethylacetate 분획층의 경우 이 불안모델에서는 유의성 있는 불안 억제활성을 보이지 않았다. 한편 불안을 유발하는 것으로 알려진 m-CPP경우 open arm에서의 소요시간이 정상적인 생쥐의 경우 보다 감소되는 것을 볼 수 있었으나 유의성 있는 차이는 나타내지 않았다. 이 모델은 5-HT 관련 약물의 항불안 활성을 검색하기에는 적합하지 않다고 사료되며 지유 메탄올 엑스 또한 활성이 없어 소분획에 대해서는 활성을 검색하지 않았다.

**Two-way avoidance test**—동물을 이용한 기존의 aversive learning paradigm을 개발하여 항불안 작용을 가지는 화합물과 그들의 항불안 활성의 신경화학적 토대를 확인하는 데 사용해보려는 많은 시도가

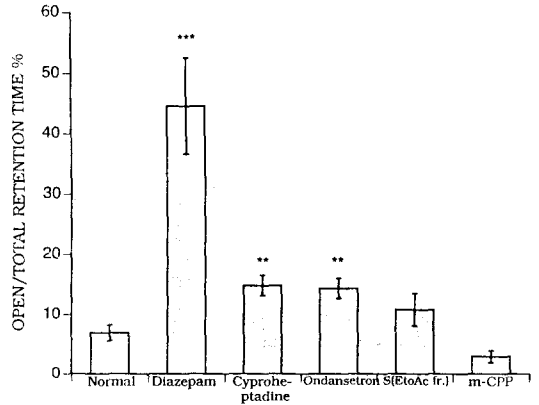


**Fig. 4**—The effects of Sanguisorbae Radix EtoAc subfraction in the light/dark exploration test in mice. Treatment were given orally at the doses specified 45 min before testing.

(a) and (b) represent retention time expressed in second and rearing number, respectively. Diazepam, 2 mg/kg Ondansetron 100 µg/kg; Sanguisorbae Radix EtoAc subfr. D.E.F, 50 mg/kg/day for 8 days(fr. D.E.F); Sanguisorbae Radix EtoAc subfr. I, 50 mg/kg/day for 8 days (fr. I).

n=6-8 per group. \*p<0.1, \*\*p<0.05, \*\*\*p<0.01.

있어 왔다.<sup>15)</sup> 이러한 노력은 이 aversive learning paradigm이 인간의 불안을 관찰할 수 있는 가장 좋은 동물모델이라는 가정에 그 근거를 둔 것이다. 다시 말해서 미리 경험되어지거나 예상되어지는 해로운 자극(aversive stimuli)이 이론적으로 거의 모든 불안에 있어 중요한 원인이라는 것이다. Fig. 6에서 보듯 항불안제로 비교적 널리 사용되는 diazepam의 경우 normal에 비해 현저한 증가를 보였으며 5-HT와 관련하여 그 작용을 나타내는 buspirone의 경우도 유의성 있는 증가를 나타내었다. 그러나 5-HT<sub>3</sub> 길항제인 ondansetron과 지유 ethylacetate 분획물의 경우는 normal에 비해 별다른 변화가 없는 것으로 보아 이 불안모델은 지유추출물의 항불안 활성을 확인하는 데



**Fig. 5**—The effects of Sanguisorbae Radix EtoAc fraction in the elevated plus maze in mice. Mean percentage of time(sec) spent in the open arm entries in mice placed at the center with vehicle control, diazepam 2 mg/kg, cyproheptadine 4 mg/kg, Ondansetron 100 µg/kg, Sanguisorbae Radix EtoAc fr. 50 mg/kg/day for 8 days and m-CPP 5 mg/kg.

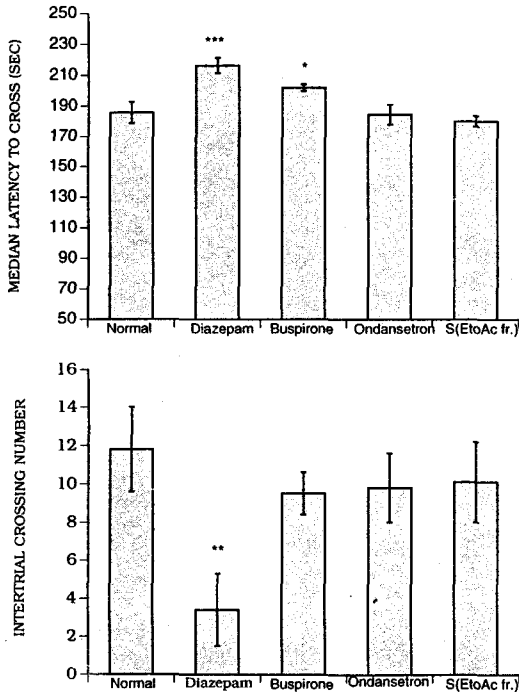
n=6-8 per group. \*p<0.1, \*\*p<0.05, \*\*\*p<0.01.

적합치 않다고 사료되었다. 이 결과에서 또한 흥미로운 것을 구역간의 이동을 시도하는 횟수를 측정 한 intertrial crossing number의 결과를 보면 diazepam은 다른 구역으로의 이동하려는 시도가 거의 없는 반면 buspirone의 경우는 자극이 가하여지는 구역에서 보내는 시간도 증가되었으며 intertrial crossing number에 있어서는 diazepam의 경우와 같은 지나친 운동기능 억제 반응은 나타나지 않았다.

**Pentylentetrazole-induced convulsion test**—유발 발작에 대한 억제활성 검색 실험으로 benzodiazepine류인 diazepam과 일차 흰쥐 적출회장 assay에서 비교적 선택적 항세로토닌 효과가 컸던 지유 ethylacetate 분획을 비교검사한 결과 diazepam의 경우 PTZ에 의한 발작 억제가 가장 현저했으며 5일 연속 투여한 지유 ethylacetate분획의 경우 약간의 유의성을 나타내었으나 그 억제활성이 크지는 않았다.

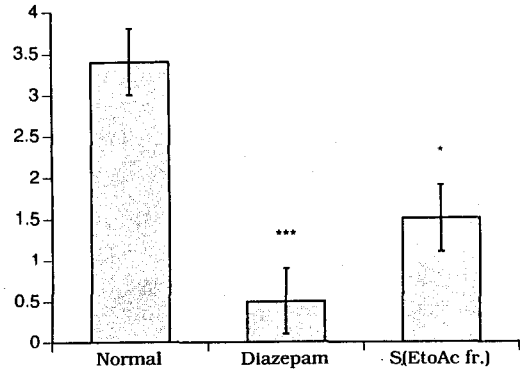
**결 론**

항불안 검색을 위한 행동실험 모델로서 주로 이용되는 social interaction test, two compartment ex-



**Fig. 6**—The effects of *Sanguisorbae Radix* EtoAc fraction in two-way avoidance test in mice. Treatment were given orally at the doses specified 40 min before testing. Upper and lower panels, represent mean latency to cross and intertrial crossing number, respectively. Diazepam, 2 mg/kg; Ondansetron 100  $\mu$ g/kg; Buspirone, 5 mg/kg; *Sanguisorbae Radix* EtoAc fr., 50 mg/kg/day for 7 days. n=6-8 per group. \* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$ .

ploration test, elevated plus maze test, two way avoidance test, pentylentetrazole-induced convulsion test를 통해 5-HT 수용체 관련약물, benzodiazepine계 약물, 지유 ethylacetate 분획물의 항불안 활성을 검색하여 본 결과 diazepam의 경우 본 실험에서 이용된 모든 불안관련 모델에서 유의성 있는 항불안 활성을 나타내는 반면 5-HT 수용체 관련 약물 중 5-HT<sub>3</sub> 길항제인 ondansetron과 지유 ethylacetate 분획물은 social interaction test와 two compartment exploration test에서 상호 유사한 항불안 활성을 나타내었다. 또한 two compartment exploration test에서 diazepam의 경우 진정작용이 크게 나타나 rearing number가 현저히 감소하는 반면 지유 ethyl-



**Fig. 7**—The effects of *Sanguisorbae Radix* EtoAc fraction on pentylentetrazole-induced convulsion in mice. Treatment were administered orally 1 h before the mice were injected with pentylentetrazole 60 mg/kg intravenously. n=6-8 per group. \* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$ .

acetate분획물과 5-HT관련약물의 경우는 diazepam과 같은 지나친 진정작용이 없고 오히려 활동성이 좋아지는 것으로 나타났다. silica gel column chromatography하여 지유 ethylacetate 분획물로부터 얻은 소분획들 중 흰쥐 적출회장 assay에서 세로토닌 길항효과가 큰 소분획 DEF, I에 대해서도 불안 관련 행동실험을 동일하게 실시한 결과 소분획 I가 DEF보다 활성이 큰 것으로 나타났다.

## 문 헌

- 1) Kruk, Z. L., and Pycocck, C. J.: 5-Hydroxytryptamine. *Neurotransmitters and drug*, 3rd edition, edited by St. Edmundsbury press, p116 (1991).
- 2) Gerald, C., and Guy, A. K.: m-CPP; a tool for studying behavioral responses associated with 5-HT<sub>1C</sub> receptors. *TIPS*, **11**, 181 (1990).
- 3) Rodgers, R. J. and Cooper, S. J.: Anxiolytics change gear, *TIPS*, **14**, 77 (1993).
- 4) Chopin, P., and Briely, M.: Animal models of anxiety; the effect of compound that modify 5-HT transmission. *TIPS*, **8**, 383 (1987).
- 5) Hoyer, D., and Middlemiss, D. N.: Species difference in the pharmacology of terminal 5-HT autoreceptors in mammalian brain. *TIPS*, **10** (1989).
- 6) Callaway, C. W., Rempel, N., Peng, R. Y., and Geyer,



- M. A.: Serotonin 5-HT<sub>1</sub>-like receptors mediate hyperactivity in rats induced by 3,4-methylenedioxy-meth amphetamine. *Neuropsychopharmacology*, **7**(2), 113 (1992).
- 7) Van de kar, L. D., Urban, J. H., Lorens, S. A., and Richardson, K. D.: The nonbenzodiazepine anxiolytic buspirone inhibits stress-induced renin secretion and lowers heart rate. *Life science*, **36**, 1149 (1985).
- 8) Costall, B., Domeney, A. M., Kelly, M. E., and Naylor, R. J.: Zacopride; anxiolytic profile in rodent and primate models of anxiety. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 302 (1988).
- 9) Peroutka, S. J., and Snyder, S. H.: Relation of neuroleptic drug effects at brain dopamine, serotonin, adrenergic and histamine receptors to clinical potency. *Am. J. Psychiatry*, **137**(12), 1518 (1980).
- 10) Chang, K. S., Lee, S. Y. and Chung, S. H.: Antagonistic activities of several medical plants on serotonin-mediated actions. *J. App. Pharmacol.*, **1**, 77 (1993).
- 11) Winslow, J. T., and Insel, T. R.: The infant rat separation paradigm; a novel test for novel anxiolytics. *TIPS*, **12**, 402 (1991).
- 12) Jone, B. J., Costall, B., Domeney, A. M., Kelly, M. E., Naylor, P. J., Oakley, N. R., and Tyers, M. B.: The potential anxiolytic activity of GR 38032 F, a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, **93**, 985 (1988).
- 13) Dallas, T.: Animal models for the study of anti-anxiety agent. *Neuroscience and Biobehavior Review*, **9**, 203 (1985).
- 14) Pellao, S., Chopin, P., File, S. E., and Briley, M.: Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neuroscience Method*, **14**, 149 (1985).
- 15) Davis, M.: The role of the amygdala in fear-potentiated startle; implication for animal models of anxiety. *TIPS*, **13**, 35 (1992).
- 16) Hayes, P. E., and Kirkwood, C. K.: Anxiety disorders. *Psychiatric disorders*, **51**, 765.