

배양된 흰쥐 뇌간 신경세포에서 5-Hydroxytryptamine 흡수에 대한 각종 전통 생약 추출물의 억제효과

조현미 · 정전섭* · 이태희** · 손건호*** · 서홍원 · 송동근 · 김영희
한림대학교 의과대학 약리학교실, 천연의약연구소, *삼천당제약 중앙연구소,
경원대학교 한의과대학, *안동대학교 식품영양학과

Inhibitory Effects of Extracts from Traditional Herbal Drugs on 5-Hydroxytryptamine Uptake in Primary Cultured Rat Brainstem Neurons

Hyun Mi Cho, Jun Sub Jung*, Tae Hee Lee**, Kun Ho Son***, Hong Won Suh,
Dong Keun Song and Yung Hi Kim

Department of Pharmacology, College of Medicine, Institute of Natural Medicine, Hallym University,
Chunchon 200-702, *Sam-Chun-Dang Pharm. Co. Research Institute, Chunchon 200-160,
Oriental Medical College, Kyungwon University, Seongnam 461-701, *Department of Food and
Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Abstract—Crude methanolic(80%) extracts from 109 kinds of traditional herbal drugs were randomly screened for inhibitory effects on 5-hydroxytryptamine(5-HT) uptake in primary cultured rat brainstem neurons. Rat brainstem neurons were cultured from embryonic day 14, and maintained for 7-9 days *in vitro*. Clomipramine (500 nM), a reference drug, decreased 5-HT uptake to 16% of control values. Of the 109 herbal drugs screened, Citri immaturi Pericarpium(靑皮), Coptidis Rhizoma(黃連), Cnidii Rhizoma(土川芎) showed the most potent 5-HT uptake inhibiting activities. These herbal drugs, at the concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$, inhibited 5-HT uptake 69, 69, and 57% respectively, when inhibition(%) was expressed as a relative value compared to the 500 nM clomipramine-induced inhibition.

Keywords—serotonin uptake inhibition · primary cultured rat brainstem neurons · crude methanol extracts

전체 인구 중에서 2~3%의 높은 유병율을 보이고 있는 우울증은 사회적으로나 경제적으로 엄청난 부담을 요구하고 있다. 항우울제중 지난 40년 동안 널리 사용되어 온 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressant)는 중추신경계에서 노르에피네프린(norepinephrine) 및 세로토닌(serotonin)의 재흡수(reuptake)를 억제시킴으로써 항우울활성을 나타내나, 치료적 용량에서 무스카린성 수용

체를 차단함으로써 항콜린성 부작용, 진정작용, 심혈관계에 대한 부작용을 유발하여 이점이 이들 약물의 사용에 큰 문제점이 되고있다.¹⁾ 그러나 최근에 이와같은 부작용이 없는 세로토닌 선택성 재흡수 차단제들(selective serotonin reuptake inhibitors)이 개발되어 현재 임상적으로 우울증의 치료에 있어서 큰 전기를 마련하고 있다.^{2,3)} 본 연구에서는 천연약물 중에서 세로토닌 재흡수

억제 활성이 있는 물질이 있는지를 세로토닌 신경세포가 집중적으로 분포하고 있는 뇌간부위 배양을 이용하여 세로토닌(5-hydroxytryptamine; 5-HT)의 흡수(uptake)에 대한 생약의 억제활성을 검색함으로써 알아보려고 하였다.

실험방법

생약의 추출 - 검색에 사용한 총 109가지의 생약은 춘천시내의 건재한약방에서 구입하였다. 이들 생약의 메탄올 조추출물의 제조는 다음과 같이 하였다.⁴⁾ 생약재료를 추출에 적합하도록 절단 또는 분쇄한 것 일정량을 평량한 다음, 추출병에 넣고 시료가 잠기도록 80% 메탄올을 가하고 환류냉각기를 장치하여 3시간 동안 2회 추출한 후 온시 여과하였다. 그 여과액을 합하여 회전농축기를 사용하여 감압 건조시킨 후 무게를 계산하였다.

뇌간 신경세포의 배양 및 5-HT 흡수측정 - 세로토닌 신경세포의 배양 및 5-HT 흡수측정은 Azmitia의 방법에 따라 시행하였다.⁵⁾ 임신 14일 된 Sprague-Dawley계 흰쥐로부터 태아의 뇌간을 얻은 다음, 세로토닌 신경세포가 집중적으로 분포되어 있는 중간 1/3 부분을 절제하고, 기계적인 방법으로 각각의 세포로 분리시키고 세척하였다. 그런다음, 간단히 원심분리한 후 10% 우태아 혈청(fetal calf serum) 및 말혈청(horse serum)을 함유한 최소배지(minimum essential medium)에 부유시키고, poly-L-lysine (10 µg/ml)이 처리된 96-다공 플레이트(multiwell plate)에 세포농도 1×10^5 cells/well로 심었다. 포화습도 하에서 5% CO₂ 항온기(37°C)에서 매 3일 마다 배양액을 50% 교환하면서, 7~9일간 배양하였다. 7~9일 동안 배양된 세포를 그 배양액을 제거하고, 0.5% 글루코스가 함유된 MEM으로 2회 세척한 후, 50 nM [³H]5-HT(19-27 Ci/mmol; NEN), 0.5% 글루코스, 10 µM pargyline과 검색 생약이 함유된 반응액 200 µl를 첨가한 후 37°C에서 20 분 동안 반응시켰다. 20분 후 배양액을 제거하고, phosphate-buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 다음, 건조시켰다. 200 µl 에탄올을 첨가하고 상온에서 1시간 방치

한 다음, 150 µl를 취하여 리퀴드 신틸레이션 계수기(liquid scintillation counter)로 측정하였다. 검색시의 검색생약의 메탄올 조추출물의 농도는 1 mg/ml로 하였고, 이 농도에서 현저한 활성을 보이는 16종의 생약은 1, 10, 100 µg/ml의 농도에서 농도의존적 5-HT uptake 억제효과가 있는지를 관찰하였다. [³H]5-HT의 비특이성 흡수는 세로토닌 흡수의 차단제인 clomipramine 500 nM 존재하에서의 값으로 하였다.

결과 및 고찰

배양한지 7~8일 된 뇌간 세포에서의 5-HT uptake는 $12,117 \pm 3474$ (mean \pm S.E.M.) cpm/well이었으며, 5-HT uptake 억제제로서 양성 대조 약물(positive control)로 사용한 clomipramine 500 nM 존재하에서는 1994 ± 603 (mean \pm S.E.M.) cpm/well로서 84% 감소하였다. 검색생약의 메탄올 조추출물의 5-HT uptake 억제활성의 정도는 500 nM clomipramine의 효과를 100%로 하였을 때의 상대치로 표시하였다.

검색생약의 메탄올 조추출물의 농도 1 mg/ml에서 109종의 생약에 대하여 배양된 뇌간 신경세포에서의 5-HT 흡수에 대한 억제효과를 검색한 결과가 Table 1에 제시되었다. 맥문동, 목단, 애엽, 육종용, 차전자, 천근피, 천마, 토남성, 현삼, 황백, 희침은 전혀 활성이 없었으며, 길경, 몰약, 산수유, 생건지, 위령선, 죽엽, 천산갑, 행인, 황정은 거의 활성이 없었다(0~20%). 갈근, 구기자, 단삼, 독활, 만삼, 만형자, 모려, 목통, 백개자, 백두구, 백자인, 백작, 복분자, 산사, 속단, 여정실, 원육, 조각자, 죽여, 택사, 향부자는 20~40%의 매우 미약한 활성을 보였다. 가구자, 감국, 감초, 곽향, 두충, 방풍, 백부자, 백선피, 백하수오, 봉출, 사삼, 사상자, 삼릉, 소회향, 오미자, 적복령, 초용담, 황금은 약 40~60%의 억제활성을 보였다. 계혈등, 고본, 맥아, 백복령, 백편두, 상백피, 세신, 오매, 우방자, 우슬, 익지인, 자초, 지각, 지모, 천화본, 파고지, 포황, 형개는 약 60~80%의 상당한 억제활성을 보였다. 건강, 공사인, 모과, 빈랑, 식산

Table 1. Inhibitory effects of crude methanolic extracts from traditional medicinal plants on 5-hydroxytryptamine uptake in primary cultured rat brainstem neurons

Herbal drugs	Inhibition(%)*
Achyranthis Radix (우슬, 牛膝)	65±13
Aconiti koreani Rhizoma (백부자, 白附子)	44±10
Acori Rhizoma (석창포, 石菖蒲)	100
Adenophorae Radix (사삼, 沙蔘)	46±18
Akebiae Caulis (목통, 木通)	32±7
Alismatis Rhizoma (택사, 澤瀉)	32±20
Allii tuberosi Semen (가구자, 家韭子)	48±4
Alpiniae Fructus (익지인, 益智仁)	71±8
Alpiniae Rhizoma (양강, 良薑)	83±15
Amomi Fructus (공사인, 貢砂仁)	84±0
Amomi rotundus Fructus (백두구, 白豆蔻)	38±11
Anemarrhenae Rhizoma (지모, 知母)	71±8
Angelicae gigantis Radix (당귀신, 當歸身)	100
Angelicae koreanae Radix (강활, 羌活)	100
Araliae Radix (독활, 獨活)	38±2
Arctii Fructus (우방자, 牛蒡子)	79±11
Arecae Semen (빈랑, 檳榔)	85±1
Arisaematis Rhizoma (토남성, 土南星)	0
Armeniacae amarum Semen (행인, 杏仁)	17±6
Artemisiae Folium (애엽, 艾葉)	0
Asiasari Radix (세신, 細辛)	78±24
Asini Gelatinum (아교주, 阿膠珠)	86±16
Astragali Radix (토황기, 土黃芪)	100
Aurantii Fructus (지각, 枳殼)	75±8
Bambusae Caulis in Taeniis (죽여, 竹茹)	33±2
Bombyx Batryticatus (백강잠, 白孤蠶)	100
Chaenomelis Fructus (모과, 木瓜)	83±1
Chrysanthemi Flos (감국, 甘菊)	50±6
Cirsii japonici Herba (대계근, 大薊根)	100
Cistanches Herba (육종용, 肉從蓉)	0
Citri Pericarpium (진피, 陳皮)	100
Citri immaturi Pericarpium (청피, 靑皮)	100
Clematidis Radix (위령선, 威靈仙)	7±6
Cnidii Fructus (사상자, 蛇床子)	56±13
Cnidii Rhizoma (토천궁, 土川芎)	100
Codonopsis pilosulae Radix (만삼, 蔓蔘)	29±2
Coicis Semen (의이인, 薏苡仁)	88±23
Coptidis Rhizoma (황련, 黃連)	100
Corni Fructus (산수유, 山茱萸)	5±5
Corydalis Tuber (현호색, 玄胡索)	100
Crataegi Fructus (산사, 山楂)	36±16
Cyperi Rhizoma (향부자, 香附子)	36±8
Dictamni Radicis Cortex (백선피, 白鮮皮)	58±13
Dioscoreae Rhizoma (식산약, 植山藥)	81±6
Dipsaci Radix (속단, 續斷)	23±7

Table 1. Continued

Herbal drugs	Inhibition(%)*
Dolichoris Semen (백편두, 白扁豆)	72±8
Eucommiae Cortex (두충, 杜仲)	54±6
Foeniculi Fructus (소회향, 小茴香)	54±8
Gastrodiae Rhizoma (천마, 天麻)	0
Gentianae scabrae Radix (초롱담, 草龍膽)	44±38
Gleditsiae Spina (조각자, 皂角刺)	38±1
Glycyrrhizae Radix (감초, 甘草)	55±10
Haliotidis Concha (석결명, 石決明)	100
Hoelen (백복령, 白茯苓)	66±9
Hordei Fructus germinatus (맥아, 麥芽)	65±5
Ledebouriae Radix (방풍, 防風)	58±18
Leonuri Herba (익모초, 益母草)	100
Ligustici Rhizoma (고본, 藁本)	67±0
Ligustri Fructus (여정실, 女貞實)	23±7
Liriopsis Tuber (맥문동, 麥門冬)	0
Lithospermi Radix (자초, 紫草)	75±6
Longanae Arillus (원육, 圓肉)	40±0
Lycii Fructus (구기자, 枸杞子)	39±13
Magnoliae Cortex (일후박, 日厚朴)	100
Manitis Squama (천산갑, 穿山甲)	8±6
Mori Radicis Cortex (상백피, 桑白皮)	64±5
Moutan Cortex (목단, 牡丹皮)	0
Mume Fructus (오매, 烏梅)	62±10
Myristicae Semen (육두구, 肉豆蔻)	100
Myrrha (몰약, 沒藥)	15±2
Ostreae Testa (모려, 牡蠣)	39±3
Paeoniae Radix alba (백작약, 白芍藥)	29±27
Paeoniae Radix rubra (적작약, 赤芍藥)	83±19
Phellodendri Cortex (황백, 黃柏)	0
Phyllostachys Folium (죽엽, 竹葉)	13±7
Plantaginis Semen (차전자, 車前子)	0
Platycodi Radix (길경, 桔梗)	2±11
Pogostemi Herba (괭향, 藿香)	55±5
Poligonati Rhizoma (황정, 黃精)	13±6
Polygalae Radix (원지, 遠志)	100
Polygoni multiflori Radix (백하수오, 白何首烏)	48±8
Polyporus (저령, 豬苓)	100
Ponciri Fructus Immaturus (지실, 枳實)	95±1
Poria (적복령, 赤茯苓)	42±1
Psoraleae Fructus (파고지, 破故紙)	67±15
Puerariae Radix (갈근, 葛根)	31±2
Rehmanniae Radix (생건지, 生乾地黃)	8±7
Rubi Fructus (복분자, 覆盆子)	37±13
Rubiae Radix (천초, 茜草)	0
Salviae Radix (단삼, 丹蔘)	20±8
Schizandrae Fructus (오미자, 五味子)	44±5

Table 1. Continued

Herbal drugs	Inhibition(%)*
Schizonepetae Herba (형개, 荊芥)	72±5
Scrophulariae Radix (현삼, 玄蔘)	0
Scutellariae Radix (황금, 黃芩)	50±11
Siegesbeckiae Herba (회침, 豨薟)	0
Sinapis Semen (백개자, 白芥子)	39±3
Sophorae Flos (괴화, 槐花)	100
Sparganii Rhizoma (삼릉, 三棱)	48±4
Spatholobi Caulis (계혈등, 鷄血藤)	76±1
Thujae Semen (백자인, 栝子仁)	32±6
Trichosanthis Radix (천화분, 天花粉)	74±4
Trionycis Carapax (별갑, 鱉甲)	100
Tsaoko Fructus (초과, 草果)	100
Typhae Pollen (포황, 蒲黃)	61±7
Uncariae Ramulus et Uncus (조구등, 釣鈎藤)	97±5
Vitici Fructus (만형자, 蔓荊子)	40±11
Zanthoxyli Fructus (천초, 川椒)	84±5
Zedoariae Rhizoma (봉출, 蓬朮)	50±7
Zingiberis Rhizoma (건강, 乾薑)	81±8

*5-HT uptake was assayed as described in the experimental method. Inhibition(%) was expressed as a relative value compared to the 500 nM clomipramine-induced inhibition. The concentration of crude methanolic extracts was 1 mg/ml.

Table 2. Concentration-dependent inhibitory effects of some selected crude methanolic herbal drug extracts on 5-hydroxytryptamine uptake

Herbal drugs	Inhibition(%)*		
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	10	100	1000
Angelicae gigantis Radix (당귀신, 當歸身)	23±7	56±6	77±7
Astragali Radix (토황기, 土黃芪)	0	37±2	100
Citri immaturi Pericarpium (청피, 靑皮)	69±3	85±9	100
Cnidii Rhizoma (토천궁, 土川芎)	57±14	82±1	93±14
Coptidis Rhizoma (황련, 黃連)	69±16	47±13	85±8
Corydalis Tuber (현호색, 玄胡索)	ND	43±5	82±2
Leonuri Herba (익모초, 益母草)	43±13	39±5	78±3
Magnoliae Cortex (일후박, 日厚朴)	22±6	100	100
Polygalae Radix (원지, 遠志)	0	18±9	100
Ponciri Fructus Immaturus (지실, 枳實)	15±10	18±8	100±5
Spatholobi Caulis (계혈등, 鷄血藤)	13±13	22±4	88±13

*5-HT uptake was assayed as described in the experimental method. Inhibition(%) was expressed as a relative value compared to the 500 nM clomipramine-induced inhibition. ND; not determined.

약, 아교주, 양강, 의이인, 적작약, 조구등, 지실, 천초는 약 80~99%의 매우 우수한 억제활성을 보였다. 특히 강활, 괴화, 대계근, 백강잠, 별갑, 석결명, 석창포, 신당귀, 원지, 육두구, 익모초, 일후박, 저령, 진피, 청피, 초파, 토천궁, 토황기, 현호색, 황련은 100%의 억제활성을 보였다. 이들 중 일부는 비특이성 세포용해(cytolysis)를 초래하였다.

특히 현저한 활성을 보이는 식물 11종(계혈등, 신당귀, 원지, 익모초, 일후박, 지실, 청피, 토천궁, 토황기, 현호색, 황련)에 대하여 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 농도의존적인 5-HT uptake 억제효과를 관찰하였다(Table 2). 그중에서 청피, 황련, 토천궁, 익모초, 일후박, 신당귀 등이 가장 우수한 농도 의존적 5-HT uptake 억제작용을 나타내었다(Table 2). 한편, 황련의 주성분인 berberine은 5-HT uptake를 억제하지 못하였다(결과 미제시).

이상의 결과는 5-HT uptake 억제효과에 대하여 전통 생약을 대상으로 시행한 무작위 검색(random screening)의 결과이다. 본 검사는 배양된 신경세포에 있어서의 *in vitro* 검사 결과로서, 본 검사에서 현저한 활성을 보인 수종의 생약들이 *in vivo*로 투여되었을 때에도 중추신경계에서 5-HT uptake를 억제하는 지에 대하여 *p*-chloroamphetamine에 의한 5-HT 소실에 대한 억제효과와 같은 *in vivo* 검사⁶⁾가 추가로 실시되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀 - 본 연구는 과학기술처 선도기술개발사업 중 신동의약과제의 지원에 의해 수행

되었습니다.

<1995년 8월 28일 접수>

참고문헌

1. Baldessarini, R.J.: Drugs and the treatment of psychiatric disorders, in Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 5th ed., Pergamon Press, New York, U.S.A., p. 383 (1990).
2. Gastpar, M. and Wakelin, J.S.: Selective 5-HT Reuptake Inhibitors: Novel or Commonplace Agents? Advances in Biological Psychiatry, Vol. 17., Karger, Basel, Switzerland (1988).
3. Feighner, J.P. and Boyer, W.F.: Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, Perspectives in Psychiatry, Vol. 1., John Wiley & Sons, Chichester, England (1991).
4. 강삼식, 김영호, 김진용, 노동석, 성열익, 성충기, 손건호, 정지형, 최재수: 표준엑스와 표준분획 제조법, 전통약물로부터 신약개발연구법, 서울대학교 천연물과학연구소, 서울, p. 9 (1993).
5. Azmitia, E.C.: Microcultures of dissociated primary central nervous system neurons, in Cell Culture, Methods in Neurosciences, Vol. 2, Academic Press, San Diego, U.S.A., p. 263 (1990).
6. Fuller, R.W., Hemrick-Luecke, S.K. and Snoddy, H.D.: Effects of duloxetine, an antidepressant drug candidate, on concentrations of monoamines and their metabolites in rats and mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 132 (1994).