

조구등(釣鉤藤) 성분의 항경련효과 II. 메탄올추출물 및 에틸 아세테이트 분획의 뇌 신경전달 관련물질에 미치는 효과

김동영, 최종원*, 박종철¹, 이정규

경성대학교 약학대학, ¹순천대학교 한약자원학과

Anticonvulsant Effect of Uncariae Ramulus et Uncus. II. Effects of Methanol Extract and Ethyl Acetate Fraction on Neurotransmitters related Components in Brain

Dong Young Kim, Jong Won Choi*, Jong Cheol Park¹ and Chung Kyu Lee

College of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea and

¹Department of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University,
Suncheon 540-742, Korea

Abstract - The fractions of Uncariae Ramulus et Uncus seemed to be closely related with the levels of amino acids and other components which concerns with formation and metabolism of neurotransmitters in brain. The pretreatments of methanolic extract and its fractions prohibited the pentylenetetrazole (PTZ) induced convulsion. In such cases, lowered levels of γ -aminobutyric acid and glutathione in brain were significantly recovered. And also the increased levels or activities of lipid peroxide, γ -aminobutyric acid aminotransferase, xanthine oxidase, aldehyde oxidase, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase by PTZ-convulsion were lowered to normal state.

Key words - Uncariae Ramulus et Uncus; anticonvulsant; neurotransmitter metabolism.

경련은 총인구의 약 1%의 비율로 흔하게 나타나는 질환이며¹⁾ 더우기 근래에 급증하는 교통사고와 산업 현장에서의 안전 사고 등에 의해 발생 가능성이 더욱 높아지고 있다. 경련의 발생 기전은 아직 명확하게 밝혀지고 있지 않으나 최근 중추의 흥분성 신경전달 기능과 억제성 전달 기능 사이의 균형 소실이 그 원인이라는 학설이 제시된 후 중추 신경계에서 흥분성 또는 억제성 신경 전달 물질로 작용하는 아미노산들이 관심의 대상이 되고있다.²⁻⁴⁾ 특히 흥분성 신

경전달 물질의 하나인 glutamic acid와 억제성 전달물질인 γ -aminobutyric acid(GABA)의 기능적 균형의 장애가 발작기전의 중요한 원인으로 작용한다는 연구보고가 제시되었으며, 1980년대 이후의 간질 치료제의 개발은 주로 이와 같은 연구를 토대로 하여 이루어지고 있다. 본 연구자 등은 한방 및 민간에서 전간의 치료 목적으로 널리 사용되고 있는 조구등(Uncariae Ramulus et Uncus)의 전기충격, 스트리크닌 및 펜틸렌 테트라졸에 의한 전간발작 및 사망물에 미치는 영향을 검토하고 특히 에틸 아세테이트분획이 유효함을 보고한 바 있다.⁵⁾ 본보에서는

*교신저자 : Fax 051-628-6540

조구등 메탄올 추출물과 이로부터 얻은 분획을 대상으로 뇌조직 중의 아미노산의 함량과 이들 아미노산의 생합성과 대사에 관여하는 효소활성의 변동 및 경련시 야기되는 뇌중 활성산소의 생성 및 제거계에 미치는 효과를 비교 관찰함으로써 조구등의 항경련 작용의 기전을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 분획 - 전보⁵⁾에서 보고한 바와 같이 시중 건재상에서 구입, 확인한 중국산 조구등(*U. rhynchophylla*) 4.8 kg로 부터 메탄올 총추출물(MeOH ex.)을 얻고 이것을 물에 현탁한 후 용매의 극성차이를 이용한 분배조작을 거쳐 얻은 분획 중 앞의 실험에서 효과가 있었던 에틸 아세테이트 분획(EtOAc fr.)을 사용하였다.

투여액조제 및 투여계획 - 시료는 1% CMC-Na 용액에 현탁하여 10일간 경구투여 하였다.

실험동물 - 한국실험동물개발원에서 구입한 동물을 본대학 동물사에서 일정한 조건(온도: $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도: 40~60%, 명암: 12시간 light/dark cycle) 하에서 2주간 적응시킨 체중 20 ± 5 g 내외의 ICR계 웅성 생쥐를 사용하였으며 각각 실험의 한 군을 7~10마리로 하여 실험 시작전 24시간 동안 물만 공급하고 절식시켰다.

시약 및 기기 - 사용한 시약은 특급 내지 일급 시약으로 실험목적에 적합한 것을 사용하였으며 기기는 membrane filter(Gelman, 47 mm, $0.2 \mu\text{m}$: Microfiltration systems, 13 mm, $0.2 \mu\text{m}$), filter holder(Milipore, 47 mm: Gelman, 13 mm), refrigerated centrifuge(Beckman, J2-21), ultracentrifuge(Hitachi, 65-P7), HPLC column(Water, RP-C₁₈, 4.0 mm I.D. $10 \mu\text{m}$), HPLC pump(Varian 5000), HPLC controller(Varian ODS 401) 등을 사용하였다.

Pentylentetrazole(PTZ) 처리 - Sohn 등⁷⁾의 방법에 준하여 최종 시료 투여 24시간 후 PTZ(70 mg/kg, s.c.)을 주사하였다.

효소원의 조제 - 효소 활성 측정을 위한 뇌조직 효소원은 PTZ 투여 30분 후 실험동물을 탄산가스로서 마취 치사하고 뇌조직을 적출하여 균질액을 만들어 사용하였다. 우선 뇌조직 일부를 1 g당 1 ml의 0.1

M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄였다. γ -aminobutyric acid aminotransferase(GABA-T) 활성 측정의 효소원은 마쇄 균질액을 $35,000 \times \text{g}$ 에서 30분간 원심분리한 상정액을 사용하였다. 뇌조직에 동량의 1 mM aminoethylisothiuronium bromide와 2 mM pyridoxal 5'-phosphate를 포함하는 0.3 M triethanolamine buffer(pH 6.8)로 균질 마쇄한 다음 $15,000 \times \text{g}$ 에서 20분간 원심분리한 상정액을 glutamic acid decarboxylase(GAD) 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 뇌조직 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 마쇄하고 $600 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 세포부분을 제거한 다음 다시 $10,000 \times \text{g}$ 에서 20분간 원심분리한 침전물에 일정량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하고 현탁시킨 것을 mitochondria 분획으로 catalase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. $10,000 \times \text{g}$ 상정액은 다시 $105,000 \times \text{g}$ 에서 1시간 동안 초원심분리하여 얻은 상정액을 cytosol 분획으로 glutathione 함량과 xanthine oxidase, aldehyde oxidase, γ -glutamylcysteine synthetase, glutathione reductase 및 glutathione S-transferase 활성의 측정에 각각 사용하였다. 사용 효소원은 해당 균질액에 생리식염수를 가하여 10% 농도로 조정하였다.

뇌 조직중 GABA, glutamic acid 및 지질과산화물 측정 - 뇌 조직중 GABA와 glutamic acid의 함량 측정은 Allen 등⁸⁾의 방법을 약간 변경하였다. 즉, 뇌 조직을 1 mM aminoethylisothiuronium bromide와 2 mM pyridoxal 5'-phosphate를 포함하는 0.3 M triethanolamine buffer(pH 6.8)로 10% 마쇄균질액을 조제한 다음 $15,000 \times \text{g}$ 에서 20분간 원심분리 하여 얻은 postmitochondria 분획을 이후 제단백 및 membrane filtration 과정을 거친 다음 여액 중에 함유된 GABA 및 glutamic acid의 함량을 고속액체 크로마토그래프를 이용하여 분리시킨 후 표준품의 retention time(GABA, 11.3분; glutamic acid, 19.8분)과 비교, 확인한 후 표준 검량선에 준해 그 함량을 산정하였다. GABA 및 glutamic acid의 함량은 조직 단백질 1

mg당 nmole로 나타내었다. 또한 지질과산화물은 Ohkawa 등⁹⁾의 방법에 준하여 처리하고 미리 작성한 표준검량선에 의하여 뇌조직 1g당 malondialdehyde의 양(nmole)로 표시하였으며 glutathione함량은 Ellman¹⁰⁾의 방법에 준하여 412 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 준하여 산정하였다.

뇌조직 중 효소활성 - 뇌조직 중 GABA-T의 활성은 Bergmeyer¹¹⁾의 방법에 따라 처리하여 생성되는 NADPH를 340 nm에서 측정하여 효소 활성을 산정하였고 GAD의 활성은 Allen 등⁸⁾의 방법에 따라 처리하여 GABA의 함량을 고속 액체 크로마토그래프를 이용하여 정량하였으며 xanthine oxidase 활성은 Stirpe과 Della¹²⁾의 방법에 준하여 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도를 측정하되 표준검량선에 의하여 효소활성도를 1분당 1 mg protein이 생성하는 uric acid의 양(nmole)으로 나타내었으며 aldehyde oxidase 활성은 Rajagopalan 등¹³⁾의 방법에 준하여 생성물인 2-pyridone를 300 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 의하여 효소활성도를 1분당 1 mg protein이 생성하는 2-pyridone의 양(nmole)으로 나타내었으며 glutathione S-transferase 활성은 Habig 등¹⁴⁾의 방법에 따라 실시하고 생성된 2,4-dinitrochlorobenzene의 양을 340 nm에서 측정하고 mole 흡광계수 $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 로 산정하였다. 또 γ -glutamylcysteine synthetase 활성은 Meister와 Richman¹⁵⁾의 방법에 준하여 유리되는 Pi를 molybdic acid와 aminonaphthol sulfonic acid를 가하여 생성하는 황색액을 파장 600 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 따라 효소활성도를 1분당 1 mg protein이 생성한 Pi의 양(nmole)으로 나타내었고 glutathione reductase 활성은 Mize와 Langdon¹⁶⁾의 방법에 준하여 감소되는 NADPH의 양을 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 따라 효소활성도를 1분당 1 mg protein이 생성하는 glutathione의 양(nmole)으로 표시하였으며 superoxide dismutase 활성은 Marklund와 Marklund¹⁷⁾의 방법에 준하여 파장 550 nm에서 감소되는 cytochrome C의 흡광도를 측정하고 alkaline DMSO-mediated cytochrome C reduction을 50% 억제하는 enzyme량을 1

unit로 산정하여 표시하였고 catalase 활성은 Aebi¹⁸⁾의 방법에 준하여 H_2O_2 의 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 측정하고 분자흡광계수 $0.041 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 을 이용하여 효소활성도를 1분당 1 mg protein이 분해하는 hydrogen peroxide의 양(mole)으로 표시하였으며 glutathione peroxidase는 Paglia와 Valentine¹⁹⁾의 방법에 준하여 파장 340 nm에서 NADP 양을 측정하고 표준검량선에 준하여 1분당 1 mg protein이 생성하는 NADP의 양(nmole)으로 표시하였다.

단백질 정량 및 통계처리 - 단백질의 함량은 Lowry 등²⁰⁾의 방법에 준하여 bovine serum albumin (Sigma, Fr. IV)을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성은 Duncan's new multiple range test에 의하여 검정하였다.

결과 및 고찰

뇌중 GABA 및 glutamic acid 함량에 미치는 영향 - MeOH ex. 및 에틸 아세테이트 분획(EtOAc fr.)을 투여한 다음 PTZ로 경련을 유발시키고, 뇌조직중 GABA의 함량 변화를 Fig. 1에 나타내었다. GABA 함량의 경우 정상군이 2.15 nmole인데 비하여 PTZ 처리군은 1.32 nmole로서 30% 이상 감소한데 비해 조구동 MeOH ex. 및 EtOAc fr. 투여군은 각각 1.65 및 1.87 nmole로 10~20% 정도의 감소에 그쳐 정상 수준으로 회복되었음을 관찰할 수 있었다. 한편, glutamic acid의 함량은 정상군이 9.85 nmole인데 PTZ 처리군은 17.9 nmole로서 80% 이상의 증가를 보인 반면 MeOH ex. 및 EtOAc fr. 투여군은 각각 12.3(약 25% 증가) 및 10.8(약 10% 증가) nmole로 PTZ 처리군에 비해 증가율이 억제되었다.

뇌중 GABA 및 glutamic acid의 생합성과 대사에 관여하는 효소활성에 미치는 영향 - GABA-T는 뇌 조직 중에서 억제성 신경섬유 말단과 망산 세포 등에 분포되며, 재흡수된 GABA를 glutamic acid와 succinic semialdehyde로 불활성화 하는 효소이다.²¹⁻²³⁾ GABA-T 활성의 변동은 GABA의 함량의 변화와 연관시켜 생각 할 수 있으므로 항경련작용의 기전을 이해하기 위하여 뇌중 GABA-T와

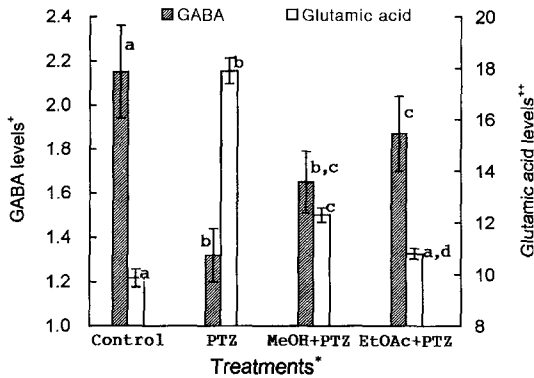


Fig. 1. Effect of pretreatment of *Uncaria Ramulus* et *Uncus* on the brain GABA and glutamic acid levels in pentylenetetrazole (PTZ)-treated mice.

*Each sample was administrated once a day for ten days to seven mice. One hour after the final treatment of sample, animals were treated with PTZ (70 mg/kg, *i.p.*) then sacrificed 30 mins later. Values represent means \pm S.D., of which followed by the same superscript are not significantly different ($p < 0.05$) each other by Duncan's new multiple square method. *GABA nmoles/mg protein and **glutamate nmoles/mg protein.

이에 따른 GABA 함량의 변동을 관찰하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 GABA-T의 활성은 정상군이 1.36 nmole인데 비하여 PTZ 처리군은 1.96 nmole로서 약 45% 증가하였고, 조구등의 MeOH ex. 및 EtOAc fr. 투여군은 각각 1.69 및 1.56 nmole로 PTZ 처리군 보다 14%, 20%로 감소하여 대조군의 수준으로 회복되고 있음을 관찰할 수 있었다. 한편,

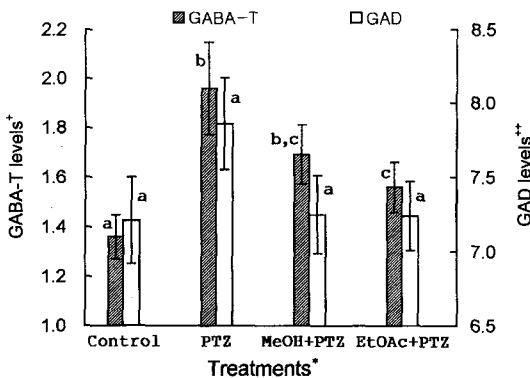


Fig. 2. Effect of pretreatment of *Uncaria Ramulus* et *Uncus* on the brain GABA-T and GAD activities in pentylenetetrazoletreated mice.

*Experimental procedure and legends are same with those of Fig. 1. *NADPH nmoles/mg protein/hr and **GABA nmoles/mg protein/hr

GAD의 활성은 정상군이 7.21 nmole인데 비하여 PTZ 투여군은 7.86 nmole로서 약 10% 증가를 보였으나 통계적인 유의성은 없었으며, 조구등의 MeOH ex. 및 EtOAc fr. 투여군에서도 본 효소의 활성은 다소 변동이 있었으나 대조군과 유의적인 변화는 없었다. 체내에서 glutamic acid는 뇌중 억제성 신경 섬유에 분포하는 효소인 GAD에 의하여 GABA로 대사된다.²⁴⁻²⁸⁾ PTZ에 의하여 유도되는 경련 발작 상태에서 뇌 중의 glutamic acid 함량 변화를 검토하였을 때, 현저한 함량의 증가 현상을 관찰 할 수 있었으며, 이러한 현상은 한 GABA 함량 조구등의 MeOH ex. 및 EtOAc fr.을 전처리 함으로써 함량이 감소되는 경향을 보였다. 이에 반해 GAD의 활성은 다소 증가하는 경향 만을 보이므로, glutamic acid의 함량 증가에 관여하는 억제성 신경섬유 작용의 비중은 그리 크지 않을 것으로 생각할 수 있다. 그러므로 PTZ에 의해 유발되는 경련의 발작 상대가 뇌중 glutamic acid의 함량과 무관하지 않을 것으로 생각 할 수 있었다.

뇌중 지질과산화물 함량 및 glutathione S-transferase(G-S-T)의 활성에 미치는 영향 - 뇌중 지질과산화물의 함량 변동과 이에 따른 활성 산소의 생성 및 소거 기전에 어떠한 영향이 있는가를 추구하고자 조구등 MeOH ex. 및 EtOAc fr.을 투여한 다음 PTZ로 경련을 유발시키고, 뇌조직중 지질과산화물의 함량을 측정 한 실험결과는 Table IV이다. 즉 정상군의 43.6 nmole에 비하여 PTZ 처리군에서는 132.7 nmole로서 현저히 증가되었으며, MeOH ex. 전처리군에서는 90.7 nmole로 경련 유발군에 비하여 30% 이상 감소되었다. 한편 EtOAc fr. 전처리군에서는 67.9 nmole로 50% 이상 감소되었다.

한편 앞의 실험에서 glutathione 함량에 미치는 조구등의 영향을 검토하였으므로 glutathione을 이용하여 체내의 독성 물질과 과산화물을 전이 분해시키는 G-S-T 활성에 미치는 영향을 검토하였다. Table I에 나타난 바와 같이 정상군의 활성은 110.3 nmole인데 비하여 PTZ 처리군에서의 활성은 146.3 nmole로 다소 증가되는 경향은 있었으나 통계적인 유의성은 없었고 마찬가지로 조구등 MeOH ex. 및 EtOAc fr.을 전처리군에서도 정상군과 별다른 영향이 없었다.

뇌중 xanthine oxidase 및 aldehyde oxidase

Table I. Effect of pretreatment of *Uncaria Ramulus et Uncus* on the brain lipid peroxide and glutathione S-transferase levels in pentylenetetrazole (PTZ)-treated mice*

Treatments	Lipid peroxide ⁺	% of Control	Glutathione S-transferase ⁺⁺	% of Control
Control	43.6±6.80 ^a	100.0	110.3±18.4 ^a	100
PTZ	132.7±27.49 ^b	304.4	146.3±14.3 ^b	133
PTZ after MeOH ex.	90.7±10.63 ^c	208.0	116.4±29.0 ^a	105
PTZ after EtOAc fr.	67.9±19.67 ^{c,d}	155.7	131.9±19.8 ^b	120

*Experimental procedure and legends are same with those of Fig. 1. ⁺ Malondialdehyde nmole/g protein and ⁺⁺ conjugated 2,4-dinitrochlorobenzene nmole/mg protein/min.

의 활성에 미치는 영향 - Xanthine oxidase는 산화 환원 효소중의 하나로서 동식물 및 세균 등 모든 생물종에 널리 분포되어 있고 동물조직에서는 간 및 소장조직의 세포질에서 활성이 높다고 알려져 있다.²⁹⁾ 최근에 노화과정과 이에 따르는 여러 가지 난치성 성인병의 원인이 free radical에 기인하는 것으로 추정되고 있으며, 이러한 free radical의 생성과정에 xanthine dehydrogenase로 부터 형 전환된 oxidase형이 생화학적으로 중요한 역할을 수행하고 있음이 여러 연구진에 의하여 보고되고 있다.³⁰⁾ 한편 aldehyde oxidase는 xanthine oxidase와 더불어 cytosol 분획에 존재하는 molybdenum 함유 산화효소로서 생화학적 반응을 촉매하는 과정에서 xanthine oxidase와 동일한 작용을 가지는 효소이다. 조구등 MeOH ex. 및 EtOAc fr.을 투여한 다음 PTZ로 경련을 유발시키고, 뇌중 cytosolic 분획에 있는 free radicals 생성 효소인 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase의 활성 변동을 측정 한 실험적이지 Fig. 3이다. Xanthine oxidase의 경우 PTZ 처리군에서의 뇌중 효소의 활성은 3.37 nmole로 정상군 1.52 nmole에 비하여 현저히 증가되었으며, MeOH ex. 전처리군은 2.42 nmole로 PTZ 처리군에 비하여 약 30% 감소되었다. 한편 EtOAc fr. 전처리군은 2.22 nmole로 대조군 수준으로 감소되었다. Aldehyde oxidase의 활성도 xanthine oxidase의 활성과 비슷한 경향을 나타내었다. 뇌중 지질과산화의 함량 변동과 더불어 생각할 때 이러한 효과는 cytosol에 존재하는 효소계를 조절함으로써 나타나는 결과인 것으로 생각된다.

뇌중 glutathione의 함량 및 superoxide dismutase의 활성에 미치는 영향 - 친전자성 물질을 비롯한 활성 산소 및 과산화물 등의 최종 무독화 과정에는 필연적으로 glutathione이 요구되며 이 물질의

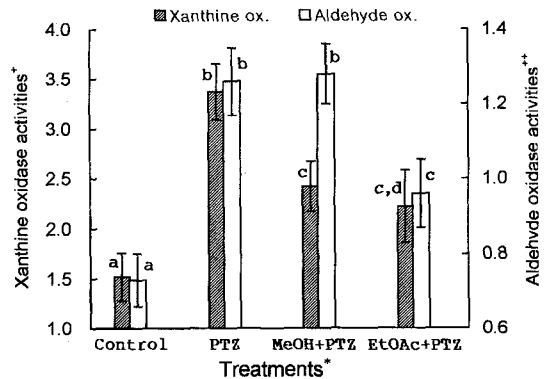


Fig. 3. Effect of pretreatment of *Uncaria Ramulus et Uncus* on the brain xanthine oxidase and aldehyde oxidase activities in pentylenetetrazole-treated mice.

*Experimental procedure and legends are same with those of Fig. 1. ⁺ nmole/mg protein/min and ⁺⁺ 2-pyridone nmole/mg protein/min.

세포내 함량의 유지에는 glutathione 생합성 관련 효소와 산화형 glutathione의 환원효소가 관여한다.^{31,32)} PTZ 처리시 뇌중 glutathione의 양과 이에 관련된 효소계의 활성 변동을 검토하기 위하여 우선 glutathione의 양을 측정한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 정상군의 glutathione 함량은 41.4 nmole인데 반해 PTZ 처리군은 21.6 nmole로 현저히 감소되었고 조구등의 MeOH ex. 및 EtOAc fr.의 전처리로 PTZ 처리군 보다 50 및 75% 증가되었다. 이러한 glutathione의 함량 변동은 glutathione을 산화형에서 환원형으로 환원시키는 glutathione reductase와 glutathione의 합성에 관여하는 γ -glutamylcystein synthetase와 더불어 glutathione S-transferase의 활성³³⁾을 검토할 필요성을 제기한다. 한편 PTZ에 의한 경련 유도 시 cytosol 효소인 xanthine oxidase 및 al-

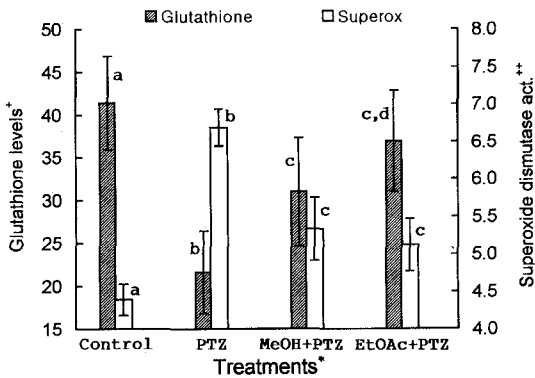


Fig. 4. Effect of pretreatment of *Uncaria Ramulus* et *Uncus* on the brain glutathione content and superoxide dismutase activity in pentylene-tetrazole-treated mice.

*Experimental procedure and legends are same with those of Fig. 1. ⁺glutathione nmole/mg protein and ^{††}units/mg protein, where one unit of superoxide dismutase activity was defined as inhibition of oxidation of pyrogallol by cytochrome c as 50%.

dehydrogenase의 증가로 superoxide 형성이 증가되며 이때 생성된 superoxide를 H₂O₂로 전환시키는데 관여하는 superoxide dismutase³⁴⁾의 활성에 미치는 조구등 MeOH ex. 및 EtOAc fr.의 활성을 관찰한 결과도 Fig. 4에 나타난 바와 같다. PTZ 처리군에서의 뇌중 superoxide dismutase의 활성은 6.69 unit로 정상군의 4.39 unit에 비하여 현저히 증가되었으며, MeOH ex. 전처리군은 5.33 unit로 경련 유발군에 비하여 약 20% 감소되었다. 한편 EtOAc fr. 전처리군은 5.12 unit로서 정상군 수준으로 감소되었다.

뇌중 glutathione 생성계에 미치는 영향-앞의 실험에서 glutathione 함량에 미치는 조구등의 영향을 검토하였으므로 glutathione을 산화형에서 환원형

으로 변환시키는 γ -glutamylcystein synthetase (γ -GS)³⁴⁾의 활성에 미치는 조구등의 영향을 검토하였다. Table II에 나타난 바와 같이 γ -GS의 경우 서로 처리군에서의 활성은 정상군 10.4 nmole과 별다른 차이가 없었으며 PTZ 처리군에서도 별다른 활성의 변동은 없었다. 또 glutathione reductase의 활성에서도 약간의 차이가 있으나 γ -GS의 경우와 유사하였다.

PTZ 경련시 뇌중 catalase 및 glutathione peroxidase의 활성에 미치는 조구등의 영향-PTZ 처리에 의해 superoxide dismutase의 활성이 증가되고 이로 인하여 생성된 H₂O₂를 H₂O와 산소로 분해하는 catalase와 생성된 유리기를 다시 H₂O로 분해하는 glutathione peroxidase의 활성에 미치는 조구등의 영향을 관찰한 성적이 Fig. 5이다. PTZ 처리군에서의 뇌중 catalase의 활성은 3.46

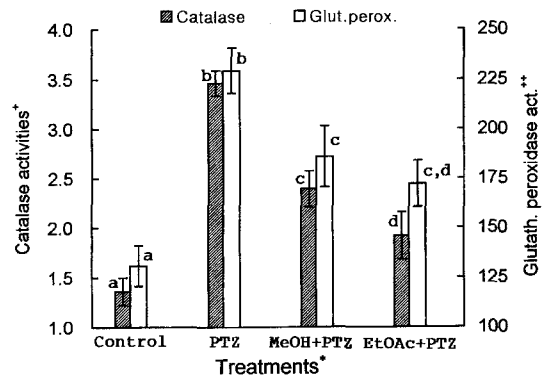


Fig. 5. Effect of pretreatment of *Uncaria Ramulus* et *Uncus* on the brain catalase and glutathione peroxidase activities in pentylene-tetrazole-treated mice.

*Experimental procedure and legends are same with those of Fig. 1. ⁺hydrogen peroxide decreased nmole/mg protein/min and ^{††}oxidized NADPH nmole/mg protein/min.

Table II. Effect of pretreatment of *Uncaria Ramulus* et *Uncus* on the brain γ -glutamylcystein synthetase (γ -GS) and glutathione reductase (GR) activities in pentylene-tetrazole (PTZ)-treated mice*

Treatments*	γ -GS		GR	
	Activity ⁺	% of control	Activity ^{††}	% of control
Control	10.4±1.22 ^{N.S.}	100	18.6±4.36 ^{N.S.}	100
PTZ	11.7±3.26	112	17.8±2.67	102
PTZ after MeOH ex.	12.7±4.28	122	16.5±2.36	94
PTZ after EtOAc fr.	12.3±2.47	118	14.3±3.62	87

*Experimental procedure and legends are same with those of Fig. 1. ⁺Pi nmole/mg protein/min and ^{††} glutathione nmole/mg protein/min. N.S.: not significant.

nmole로 정상군의 1.36 nmole에 비하여 현저히 증가되었으며, MeOH ex. 전처리군은 2.39 nmole로 30% 이상 감소되었다. 한편 EtOAc fr. 전처리군은 1.92 nmole로 약 45%의 감소 현상을 보였다. 한편, glutathione peroxidase 활성에서도 유사한 경향을 나타내었다. 이상의 몇몇 실험결과를 종합해 보면 뇌 조직중의 glutathione 함량의 변화는 조구등 시료의 전처리로 glutathione peroxidase의 활성이 변화하고 이에 따라 뇌조직 중 glutathione의 이용이 증감되므로 glutathione의 함량의 변동이 초래되는 것으로 생각된다.

결 론

조구등 메탄올추출물 및 이로 부터 얻은 각 분획을 10일간 실험동물에 경구투여하고, pentylene-tetrazole(PTZ)에 의해 유도되는 경련발작에 미치는 영향을 검토하였을 때, 경련 발작 상태가 현저히 감소되었으므로 이러한 현상을 구명하기 위하여 조구등 각 분획을 전처리한 실험동물에 PTZ를 투여한 다음 뇌조직 중의 신경전달물질에 관련된 아미노산을 비롯한 각종 성분과 효소의 활성을 측정할 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. PTZ의 처리로 감소되는 GABA 및 glutathione 양은 조구등 분획의 투여로 정상 수준에 가깝게 회복되었으며, 크게 증가하는 지질과산화물의 함량과 GABA-T, xanthine oxidase, aldehyde oxidase, superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase 등의 활성은 현저히 억제되어 정상 수준에 접근하였다. 반면 GAD, glutathione reductase, γ -glutamylcysteine synthetase 및 glutathione S-transferase 등의 활성에는 영향을 미치지 않았다.

인용문헌

1. Hauser, W. A. (1978) Epidemiology of epilepsy. *Adv. Neurol.* 19: 313-339.
2. Crawford, J. M. (1963) The effect upon mice if intraventricular injection of excitant and depressant amino acids. *Biochem. Pharmacol.* 12: 1443-1450.
3. Baughman, R. W. and Gilbert, C. D. (1980) As-

partate and glutamate as possible neurotransmitters of cells in layer 6 of the visual cortex. *Nature* 287: 848-850.

4. Croucher, M. J., Collins, J. F. and Meldrum, B. S. (1982) Anticonvulsant action of antagonists of neuronal excitation due to dicarboxylic amino acids. *Science* 216: 899-901.
5. Kim, D. Y., Choi, J. W., Kim, H. Y., Park, M. S. and Lee, C. K. (1996) Anticonvulsant effects of *Uncariae Ramulus et Uncus*. I. Anticonvulsant effect of ethyl acetate fraction. *Kor. J. Pharmacogn.* 27(1): 53-57.
6. Holland, K. D., McKeon, A. C., Canney, D. J., Covey, D. F. and Ferrendelli, J. A. (1992) Relative anticonvulsant effect of GABA mimetic and GABA modulatory agents. *Epilepsia*, 33: 981-986.
7. Sohn, Y. J., Levitt, B. and Raines, A. (1970) Anticonvulsant properties of diphenylthiohydantoin. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 188: 284-289.
8. Allen, I. C. and Griffiths, R. (1984) Reversed-phase high performance liquid chromatographic method for determination of brain glutamate decarboxylase suitable for use in kinetic studies. *J. Chromatography* 336: 385-391.
9. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
10. Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biophys.* 30: 2409-2420.
11. Bergmeyer, H. U. (1983) Method of enzymatic analysis, 3 eds., Vol. 2, 1690-1693. Academic Press, New York.
12. Stirpe, F. and Della, C. E. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase: *In vitro* conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O). *J. Biol. Chem.* 244: 3855-3863.
13. Rajagopalan, K. V., Fridovich, I. and Handler, P. (1962) Hepatic aldehyde oxidase: Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 237: 922-933.
14. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferase. The first step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
15. Richman, P. G. and Meister, A. (1975) Regulation of γ -glutamylcysteine synthesis by nonal-

- losteric feedback inhibition by glutathione, *J. Biol. Chem.* 250: 1422-1426.
16. Mize, C. E. and Langdon, R. G. (1962) Hepatic glutathione reductase. Purification and general kinetic properties, *J. Biol. Chem.* 237: 1589-1593.
 17. Marklund, S. and Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.* 47: 469-474.
 18. Aebi, H. (1974) Catalase. In Vergmeyer, M. U. (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, 673-677. Academic Press, New York.
 19. Paglia, D. E. and Valentine, W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169.
 20. Lowry, O. H., Rodebrough, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
 21. Annegers, J. F., Hauser, W.A. and Elveback, L. R. (1979) Remission of seizures and relapse in patients with epilepsy. *Epilepsia* 20: 729-737.
 22. Dulac, O. and Arthuis, M. (1984) Open trials with vaproate in epilepsy. *Epilepsia* 25: S23-31.
 23. Elwes, R. D., Johnson, A. L., Shorvon, S. D. and Reynolds, E. H. (1984) The prognosis for seizure control in newly diagnosed epilepsy. *New Eng. J. Med.* 311: 944-947.
 24. Leppik, I. E., Willmore, L. J. and Homan, R. W. (1993) Efficacy and safety of zonisemide: results of a multicenter study. *Epilepsy Res.* 14: 165-173.
 25. Shorvon, S. D. (1991) Medical assessment and treatment of chronic epilepsy. *Brit. Med. J.* 302: 363-366.
 26. Harold, K., Kailash, N. S., Phillippe, L., David, W. R. and David, L. (1991) Preparation and anticonvulsant activity of a series of functionalized α -heteroatomsubstituted amino acids. *J. Med. Chem.* 34: 2444-2453.
 27. Sheryl, J. H., Michael, J. R., Daniel, F. O., Graham, J., Roy, D. S., Denise, K. B., Laura, F. C., Mark, G. V. and Peter, A. B. (1994) Substituted 2-benzothiazolamines as sodium flux inhibitors: quantitative structure-activity relationships and anticonvulsion activity. *J. Pharmaceut. Sci.* 83: 1425-1432.
 28. Svensson, T. H. and Thieme, G. (1969) An investigation of a new instrument to measure motor activity of small animals. *Psychopharmacologia(Berl.)* 14: 157-163.
 29. Crosby, P. F., Matos, M. L. and Rivera-Collazo, E. (1969) Liver xanthine oxidase activity in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 55: 673-.
 30. Cohen, G. (1988) Oxygen radicals and Parkinson's disease, Oxygen radicals and tissue injury, 130. Bethesda, Maryland.
 31. Conney, A. H. (1967): Pharmacological implications of microsomal enzyme induction, *Pharmacol. Rev.* 19: 317-366.
 32. Kuntzman, R., Ikeda, M., Jacobson, M. and Conney, A. H. (1967) A sensitive method for the determination and isolation of pentobarbital-C14 metabolites and its application to *in vitro* studies of drug metabolism, *J. Pharmacol. Exp. Therp.* 157: 220-226.
 33. Orrenius, S. and Jones, D. P. (1978) Functions of glutathione in drug metabolism. In *Functions of glutathion in liver and kidney*, Sies, H. and Wendell, A. (eds.), 164-166. Springer-Verlag, Berlin.
 34. Free, J. A. (1980) Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity In *Metalion activation of dioxygen*, Spiro, J. G. (ed.), 209. John Willy & Sons, Inc.

(1998년 6월 24일 접수)