

## 생약의 Benzodiazepine 수용체 효능활성 검색(Ⅲ) 생약복합제제 추출물 및 성분분획의 활성

하정희 · 강병수<sup>1</sup> · 이갑득<sup>2</sup> · 이동웅<sup>3\*</sup>

영남대학교 의과대학 약리학교실

<sup>1</sup>동국대학교 한의과대학 본초학교실

<sup>2</sup>동국대학교 자연과학대학 화학과

<sup>3</sup>동국대학교 자연과학대학 생화학과

## Agonistic Activities to the Benzodiazepine Receptor by Extracts of Medicinal Plants(III) Activities of Composite Drugs and Component Fractions

Jeoung-Hee Ha, Byung-Soo Kang<sup>1</sup>, Kap-Duk Lee<sup>2</sup> and Dong-Ung Lee<sup>3\*</sup>

Department of Pharmacology, College of Medicine, Yeungnam University, Taegu 705-717

<sup>1</sup>College of Oriental Medicine, <sup>2</sup>Department of Chemistry and <sup>3</sup>Department of Biochemistry,  
College of Natural Science, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

### Abstract

This study was attempted to evaluate an agonistic activity to benzodiazepine receptor of several medicinal plants, which have been used as sedatives in oriental medicine. The activities of the methanol extracts of composite preparation of oriental drugs were compared with those of the simple drugs, furthermore, the active fraction was found out from the simple preparation. Inhibitory effects of composite preparations, *Cyperus rotundus/Acorus gramineus*, *Thuja orientalis/Euphoria longan*, *Thuja orientalis/Albizzia julibrissin*, on the binding of [<sup>3</sup>H]Ro15-1788, a selective benzodiazepine receptor antagonist to benzodiazepine receptor of rat cortices, were observed to be lower than those of corresponding simple preparations. These unexpected results suggest that some components of the composite drugs may rather act as an obstacle, not to show the synergistic effect. The methanol extracts of *Cyperus rotundus* having the highest activity were fractionated using polar and nonpolar solvents to give ethylacetate and hexane fractions, respectively. The ethylacetate fraction containing relatively polar components exhibited much higher activity than the hexane fraction, which consists of nonpolar ingredients. Moreover, the ethylacetate fraction enhanced a [<sup>3</sup>H]flunitrazepam, a selective benzodiazepine receptor agonist, binding to benzodiazepine receptor. However, in the presence of GABA, this fraction inhibited [<sup>3</sup>H]flunitrazepam binding, and these positive GABA shift supported the strong possibility of agonistic activity to benzodiazepine receptor. As a result, it may be concluded that the substance or substances with neurochemical properties as a benzodiazepine receptor agonist may contribute to the sedative property of *Cyperus rotundus*.

**Key words** — Benzodiazepine receptor, Receptor binding assay, *Cyperus rotundus*, Sedative herbs

\*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 054-770-2224, Fax : 054-742-9833

E-mail : dulee@mail.dongguk.ac.kr

## 서 론

포유동물의 중추신경계의 중요한 억제성 신경전달체인  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)은 GABA<sub>A</sub> 수용체 복합체의 GABA 수용체에 결합하여 fast-acting ligand gated ion channel을 통한 chloride 이온의 세포내 유입을 증강시킴으로써 세포막을 안정화시킨다. Benzodiazepine 수용체는 GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine 수용체 복합체의 한 요소로써 이 수용체가 활성화되면 GABA 수용체의 활성화로 GABA의 그 수용체에 대한 결합이 증가되고, 그 결과 chloride 이온의 세포내 유입이 더욱 증가되는 일련의 과정을 초래하며, 합성 benzodiazepine 계 약물의 생체내 반응 즉 불안해소, 진정, 근이완 및 항경련작용을 매개하는 중요한 역할을 하고 있다[1]. 이러한 합성 benzodiazepine 계 약물들은 효능이 높은 대신 장기 사용시 내성 및 의존성이 나타나 보다 개선된 약제의 개발이 필요하다.

생체(실험동물 및 인체)내에도 합성물질과 유사한 천연의 benzodiazepine의 존재가 보고[2-7]된 이후, 최근 이들에 대한 연구가 진행 중이며, Medina 등[8]은 남미의 전통진정제로 사용된 생약인 *Passiflora coerulea*로부터 chrysanthemum (5,7-dihydroxyflavone)을 분리하여 이 성분이 중추성 및 말초성 benzodiazepine 수용체에 대한 효능 활성과 함께 항경련 및 근이완작용이 있음을 보고하였다. Lee 등[9]은 중국의 전통 생약인 *Salvia miltiorrhiza*로부터 miltrone을 분리하였으며, 이 화합물은 중추성 benzodiazepine 수용체에 대한 부분효능제 (partial agonist)로써 급성 근이완작용이나 의존성이 없는 우수한 약리작용을 나타내었다. Viola 등[10]은 남미의 전통약용차인 *Matricaria recutita*로부터 중추성 benzodiazepine 수용체의 효능활성이 있는 apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone)을 분리하였으며, 이 성분은 생체에서 불안해소작용을 나타내었다. 이러한 생약제로부터 분리된 활성성분들은 benzodiazepine 수용체에 대한 부분효능활성을 보임으로써 현재 임상에서 사용되고 있는 benzodiazepine 계 약물의 심각한 문제점인 내성 및 의존성을 극복할 가능성이 시사되었다 [11-13]. 뿐만 아니라, 본 연구팀은 한방에서 신경안정의 목적으로 처방되고 있는 수종 생약의 추출물에 대한 benzodiazepine 수용체 효능활성을 검색하여, 그 중 향부자와 산조인에 활성성분이 존재할 가능성이 높음을 보고 [14]한 바 있다.

이에 본 연구에서는 식물생약으로부터 새로운 신경안정

제 개발을 위한 기본 자료를 제공하기 위하여 단일약제에 대한 효능검정에 이어 효능이 우수한 단일약제를 배합한 복합 생약제 추출물의 benzodiazepine 수용체에 대한 효능 활성 여부를 검색하고자 하였다. 또한 앞으로의 활성성분 연구를 위하여 가장 높은 활성을 가진 생약의 성분분획들에 대한 효능을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 시료제조

실험에 사용된 생약은 시중에서 구입하여 동국대학교 한의과대학 본초학교실에서 감별, 확인하였으며 분말로 만들어 사용하였다. 분말로 된 재료 각 100 g을 methanol 300 ml로 가온하에 2시간 추출하고 농축한 다음, 동결건조기로 완전 건조시킨 것을 50 mM Tris-citrate 완충용액에 혼탁하여 실험에 사용하였다. 성분분획은 위의 methanol 추출물에 물을 가하고 n-hexane 및 ethylacetate로 각각 순차추출한 다음, 농축하여 사용하였다. 실험에 사용한 생약의 종류 및 복합제제의 조성은 다음과 같다.

단일약제 : 향부자(*Cyperus rotundus*), 석창포(*Acorus gramineus*), 용안육(*Euphorbia longan*), 백자인(*Thuja orientalis*), 합환피(*Albizzia julibrissin*)

복합약제 : Composite I (향부자와 석창포), Composite II (백자인과 용안육), Composite III (백자인과 합환피)

### 기기 및 시약

원심분리기는 Beckman제품을, Harvester는 Brandel M-24R을, 그리고 Liquid Scintillation Counter는 Beckman LS 5801을 사용하여 측정하였다. 방사성 동위원소는 Dupont-NEN (Boston, MA, USA)사 제품을, diazepam 및 Ro14-7437은 Roche사 제품을 사용하였다. GABA를 비롯한 기타 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였으며 Scintillation cocktail은 Packard사 제품 (Aquasol-2)를 사용하였다. 제작한 각종 조직표본의 단백질 정량을 위하여 bi-cinchoninic acid 정량 kit을 Pierce사로부터 구입하여 사용하였다.

### 수용체 표본제작

Benzodiazepine 수용체 표본제작을 위하여 흰쥐 (웅성,

250-300 g, Sprague-Dawley)는 단두 후 희생시켜, 즉시 대뇌 피질조직을 분리하였다. 대뇌 피질조직은 무게를 쟁 후 50배 부피의 50 mM Tris-citrate 완충용액 (pH 7.4)에서 균질화하였다. 균질화한 조직은 원심분리기 (20,000xg, 4°C, Beckman, USA)를 사용하여 20분간 원심분리시킨 후 그 결과 생겨나는 침전물은 다시 50배 부피의 Tris-citrate 완충용액에 재분배시켰다. 이와같은 과정을 3-5번 반복한 후 최종적인 조직침전물을 완충용액에 재분배시키고 사용 전까지 -70 °C에 보관하였다.

#### 수용체 결합반응

Benzodiazepine 수용체 결합반응을 위한 [<sup>3</sup>H] Ro15-1788 (specific activity=87.0 Ci/mmol) 및 flunitrazepam (specific activity= 82.0 Ci/mmol) 결합반응에서는 각 시험관 당 50 μl의 대뇌 피질 조직 (약 0.16 mg 단백에 해당), 50 μl의 방사성 동위원소와 50 μl의 각종 약물 (생약추출물 포함) 을 사용하였으며, 50 mM Tris-citrate 완충용액을 첨가하여 총 부피를 500 μl가 되게 하였다. 모든 assay는 duplicate 혹은 triplicate로 하여 적어도 한 실험을 6회 이상 반복하였다. [<sup>3</sup>H] Ro15-1788 결합 반응을 위해서는 혼합물이 든 시험관들을 실온에, [<sup>3</sup>H] flunitrazepam 결합반응을 위해서는 0-4 °C에서 각각 한 시간 방치시킨 후, GF/B 여과지 (Whatman) 상에서 Brandel M-24R을 사용하여 결합분획과 비결합분획을 신속히 분리하였다. 여과지상의 결합분획이나는 방사성 활성도는 liquid scintillation counter를 사용하여 측정하였다. 제작한 대뇌피질 조직의 단백질 함량은 bicinchoninic acid법을 사용하여 측정하였다.

Benzodiazepine 수용체에 대한 선택적 길항제인 [<sup>3</sup>H] Ro15-1788의 결합 반응에서 생약 추출물에 함유되어 있는 benzodiazepine 수용체에 대한 억제성 물질의 총량의 측정은 동일한 조건하에서 이루어진 이미 알고 있는 용량의 diazepam을 사용하여 반응 검사 결과 얻어진 competition 곡선을 비교, 분석하여 계산하였다. Benzodiazepine 수용체를 활성화시키는 생약의 활성도의 총량은 'diazepam equivalent' ( $\mu\text{g diazepam/g of weight}$ )로 표시하였다.

#### 통계분석

수용체 결합실험에서 얻어진 결과는 비선형회귀 (non-linear regression, Graphpad Prism, Graphpad Software,

Sandiago, CA, USA)시켜 분석하였으며, 각 군간의 성질변화의 통계학적 유의성 검정은 ANOVA로 분석후 Neuman-Keul's multiple comparison test를 사용하거나 Student's t-test를 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

본 연구에서는 한방에서 신경안정의 목적으로 사용하고 있는 생약의 효능을 검정하고 나아가 새로운 신경안정제 개발을 위한 기본 자료를 제공하기 위하여 단일약제의 성분분획 및 단일약제를 조합한 복합약제 추출물의 benzodiazepine 수용체에 대한 효능활성(agonistic activity)여부를 검색하였다.

먼저 생약단일제제 및 복합제제 추출물들의 효능을 농도를 증가시키면서 관찰한 결과, 이들은 모두 방사성 동위원소의 흰쥐 대뇌피질막에 대한 결합반응을 용량의존적으로 억제하였다(Fig. 1). 이러한 억제성 활성도를 생약 추출물 무게(g)당 diazepam 해당량( $\mu\text{g}$ )으로 나타낸 값인 diazepam equivalent ( $\mu\text{g/g of weight}$ )는 향부자의 경우가  $232.7 \pm 7.64$ , 석창포의 경우가  $106.9 \pm 8.71$ 이었으나, 향부자와 석창포 복합약제(Composite I)는  $11.2 \pm 0.20$ 으로써 향부자 단독의 경우보다 그 활성도가 유의하게( $p<0.05$ ) 감소하였다. 그리고 백자인은  $107.5 \pm 3.86$ , 합환피는  $50.0 \pm 2.82$ , 용안육은  $29.9 \pm 1.15$ 를 나타내었으나, 백자인과 용안육 복합약제(Composite II)의 경우가  $7.8 \pm 0.14$ , 백자인과 합환피 복합약제(Composite III)의 경우가  $17.1 \pm 0.26$ 으로써 백자인, 용안육 및 합환피 단독의 경우보다 그 활성도가 유의하게( $p<0.05$ ) 감소하였다(Fig. 2). 신경안정생약의 복합제제가 단일제제보다 benzodiazepine 수용체에 대한 활성이 현저히 감소하는 이유중의 하나로 복합제제에 활성을 저해하는 어떤 성분들이 함유되어 있을 것으로 추정해 볼 수 있다.

이에 활성이 가장 높은 것으로 판찰된 향부자를 대상으로 hexane분획과 ethylacetate분획을 제조하여 각각의 활성을 검색한 결과, diazepam equivalent ( $\mu\text{g/g of weight}$ )는 향부자 methanol추출물의 경우가  $328.9 \pm 7.64$ 이었으며, hexane분획의 경우가  $39.2 \pm 8.71$ 으로 유의하게( $p<0.05$ ) 감소하였으나, ethylacetate 분획의 경우가  $1,587.9 \pm 28.20$ 으로써 methanol추출물보다 그 활성도가 크게( $p<0.05$ ) 증가하였다(Fig. 3). 뿐만 아니라, 향부자의 ethylacetate 분획

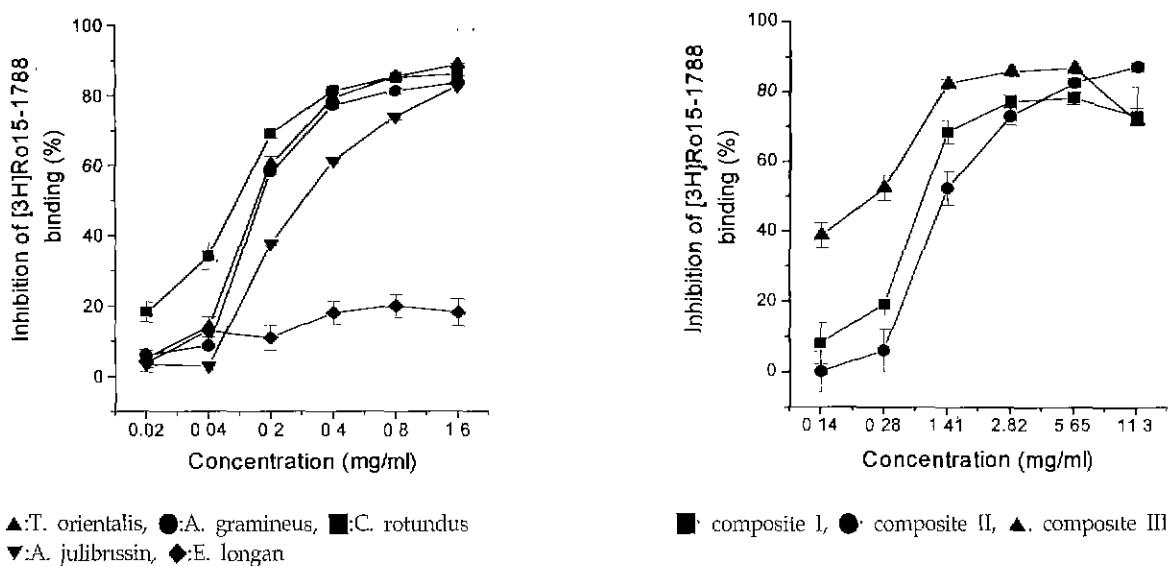


Fig. 1. Concentration-dependent inhibition of  $[^3\text{H}]$ Ro15-1788 binding to rat cerebral cortical membranes by extracts of simple (left) and composite drugs (right). Values represent mean $\pm$ S.E. of 9 experiments.

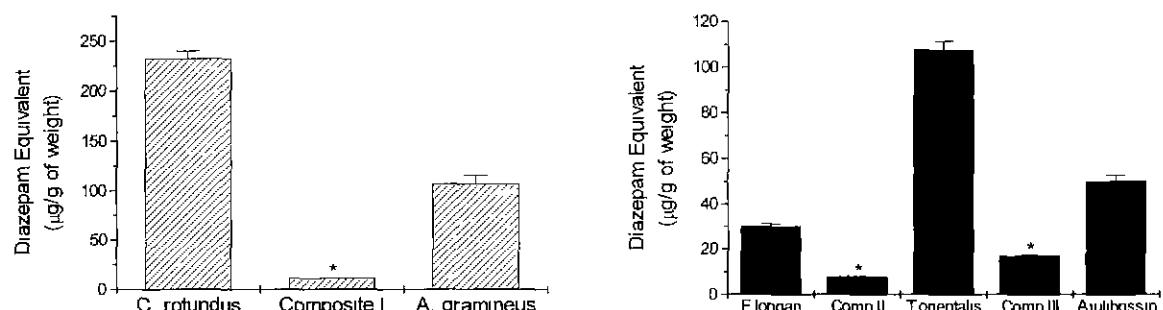


Fig. 2. Inhibitory effects of  $[^3\text{H}]$ Ro15-1788 binding to rat cerebral cortical membranes by simple and composite drugs. Values represent mean $\pm$ S.E. of 9 experiments. \* $p<0.05$ : Significantly different from corresponding simple preparations.

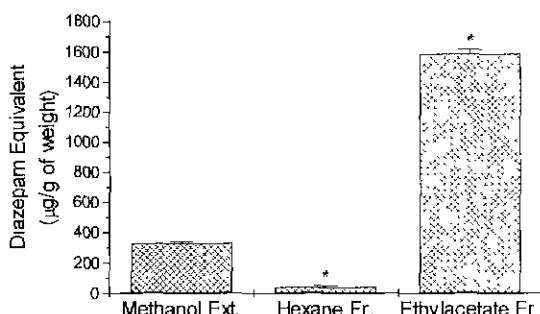


Fig. 3. Inhibitory effects of  $[^3\text{H}]$ Ro15-1788 binding to rat cerebral cortical membranes by the fractions of *Cyperus rotundus*. Values represent mean $\pm$ S.E. of 9 experiments. \* $p<0.05$ : Significantly different from methanol extracts.

은 GABA의 존재하에서 benzodiazepine 수용체의 선택적 효현제인  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam의 흰쥐 대뇌 피질 benzodiazepine 수용체에 대한 결합반응 억제도가 항진되는 양성 GABA 현상(positive GABA shift)을 나타냄으로써 효능활성 물질의 존재가능성[15]을 강력하게 시사하였다. 20  $\mu\text{M}$  GABA와 120mM NaCl 존재하에서의 결합반응 억제도(%)는  $8.2 \pm 1.18$ 로써 대조군의 억제도  $-10.7 \pm 1.43\%$ 에 비하여 유의하게( $p<0.05$ ) 상승하였다 (Fig. 4).

이상의 결과로부터 항부자의 ethylacetate 분획은 benzodiazepine 수용체에 대한 결합력이 methanol추출물이나 다른 분획에 비하여 높으며, 또 GABA 존재하에서  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam의 수용체 결합 억제 현상이 항진되는 양성 GABA

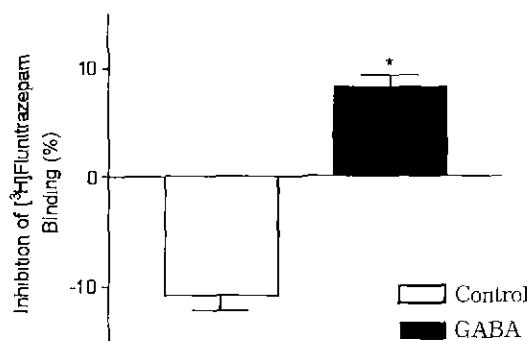


Fig. 4. Effect of GABA on the  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam binding by the ethylacetate fraction of *Cyperus rotundus*. Values represent mean  $\pm$  S.E. of 9 experiments.  
\* $p<0.05$ : Significantly different from the control.

현상(positive GABA shift)을 강하게 나타냄으로써 이를 분획내에는 benzodiazepine 수용체에 효능활성을 가지는 성분이 존재할 것으로 생각된다. 앞으로 이러한 성분에 관한 계속적인 연구가 요망된다.

## 요 약

한방생약제로부터 새로운 신경안정제 개발을 위한 기본 자료를 제공하기 위하여 생약 추출물 및 성분분획의 benzodiazepine 수용체에 대한 효능활성(agonistic activity)여부를 검토하였다. 연구결과, 생약의 추출물들은 방사성 동위 원소의 흰쥐 대뇌피질막에 대한 결합반응을 용량의존적으로 억제하였다. 이러한 억제성 활성도는 향부자와 석창포 복합약제의 경우가 향부자 단독의 경우보다 그 활성도가 감소하였으며, 백자인과 용안육 복합약제 및 백자인과 합환피 복합약제의 경우가 백자인, 용안육 및 합환피 단독의 경우보다 그 활성도가 감소하였다. 이러한 결과를 종합해 보면, 복합제제에는 수용체 활성을 저해하는 어떤 성분들이 함유되어 있어 단일제제보다 수용체에 대한 활성이 현저히 감소하는 것으로 추정해 볼 수 있다.

이에 활성이 가장 높은 것으로 관찰된 향부자를 대상으로 hexane분획과 ethylacetate분획을 제조하여 각각의 활성을 검색한 결과, 향부자의 ethylacetate분획의 활성도가 methanol추출물이나 hexane분획보다 증가하였으며, GABA 존재하에서 benzodiazepine 수용체의 선택적인 효능제

(agonist)인  $[^3\text{H}]$ flunitrazepam의 흰쥐 대뇌피질 benzodiazepine 수용체에 대한 결합반응 억제도가 항진되는 양성 GABA 현상(positive GABA shift)을 나타냄으로써 효능활성 물질의 존재가능성을 강력하게 시사하였다.

## 감사의 글

본 연구는 1998년도 한방치료기술개발연구지원사업의 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Stephen, M. S. 1996. *Essential psychopharmacology*. pp. 167-215. Cambridge University Press, New York.
- Basile, A. S., E. A. Jones and P. Skolnick. 1991. The pathogenesis and treatment of hepatic encephalopathy: evidence for the involvement of benzodiazepine receptor ligands. *Pharmacol. Rev.* **43**, 28-71.
- Drugan, R. C., A. S. Basile, J. H. Ha and R. J. Ferland. 1994. The protective effects of stress control may be mediated by increased brain levels of benzodiazepine receptor agonists. *Brain Res.* **661**, 127-136.
- Medina, J. H., J. L. Danelon, C. Wasoski, de Stein, M. Levi and A. C. Paladini. 1991. Production of benzodiazepine-like compounds in bovine rumen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1046-1055.
- Medina, J. H., C. Pena, M. Piva, C. Wolfman, M. L. Stein, C. Wasoski, C. Da Cunkha, I. Izquierdo and A. C. Paladini. 1992. Benzodiazepines in the brain. *Molecul. Neurobiol.* **6**, 377-386.
- Medina, J. H., A. C. Paladini and I. Izquierdo. 1993. Naturally occurring benzodiazepines and benzodiazepine-like molecules in brain. *Brain Res.* **600**, 1-8.
- Piva, M., J. H. Medina, A. L. de Blas and C. Pena. 1991. Formation of benzodiazepine-like molecules in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **180**, 961-972.
- Medina, J. H., A. C. Paladini, C. Wolfman, S. M. Levi, D. Calvo, L. E. Diaz and C. Pena. 1990. Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors with anticonvulsant properties. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 2227-2232.
- Lee, C.-M., H.-C. Wong, K.-Y. Chui, T.-F. Choang, P.-M. Hon and H.-M. Chang. 1991. Miltrone, a central

- benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza*. *Neuroscience Letters* **127**, 237-241.
10. Viola, H., C. Wasoski, M. L. Stein, C. Wolfman, R. Silveria, F. Dajas, J. H. Medina and A. C. Paladini. 1995. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med.* **61**, 213-216.
11. Haefely, W., J. R. Martin and P. Schoch. 1990. Novel anxiolytics that act as partial agonists at benzodiazepine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 452-456.
12. Bracova, R., H. Kubova, L. Velisek and P. Mares. 1993. Effects of a benzodiazepine, bretazenil (Ro16-6028) on rhythmic metrazol EEG activity: Comparision with standard anticonvulsants. *Epilepsia* **34**, 1135-1140.
13. Steppun, K. G., H. H. Schneider, L. Turski and D. N. Stephens. 1993. Long-term treatment with abecarnil does not induce diazepam-like dependence in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**, 1395-1400.
14. 하정희, 이동웅, 박용기, 강병수. 1999. 생약의 benzodiazepine 수용체 효현활성 검색(I). 수증의 신경안정 생약 추출물에 대한 활성 검색. *생약학회지* **30**, 211-215,
15. Ha, J. H., L. Pannell, R. C. Drugan, R. Ferland and A. S. Basile. 1996. *Neuroscience protocols*. pp.1-12. Elsevier Sciences, Amsterdam.