

## 승마 에탄올 추출물의 진정 효과

최윤정 · 윤서영 · 최지영 · 우태선 · 손건호\* · 이용수\*\* · 정재훈#

삼육대학교 의명신경과학연구소, \*안동대학교 식품영양학과, \*\*덕성여자대학교 약학대학 약학과  
(Received February 28, 2011; Revised April 25, 2011; Accepted April 27, 2011)

### The Sedative Effects of Ethanol Extract from Cimicifugae Rhizoma

Yun Jung Choi, Seo Young Yoon, Ji Young Choi, Tae Seon Woo, Kun Ho Son\*, Yong Soo Lee\*\* and Jae Hoon Cheong#

Uimyung Research Institute for Neuroscience, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

\*Department of Food Science and Nutrition, Andong National University, Gyeongbuk 760-749, Korea

\*\*Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

**Abstract** — The aim of this study is to evaluate the sedative effects of ethanol extract and the three major constituents of Cimicifugae Rhizoma. They decreased locomotor activity significantly, and enhanced sleeping duration induced by thiopental sodium. The ethanol extract of Cimicifugae rhizoma and 24-epi-7,8-didehydrocimigenol-3-xyloside (24-epi-) increased the Cl<sup>-</sup> influx into the intracellular area of SH-SY5Y neuroblastoma cells significantly. The present results demonstrate that the sedative effects of Cimicifugae rhizoma are mediated via the GABA-gated Cl<sup>-</sup> channel, partly by 24-epi.

**Keywords** □ Cimicifugae Rhizoma, sedative effect, Cl<sup>-</sup> influx, GABA receptor, triterpenoids

불면증은 잠을 이루기 어렵거나, 일단 잠은 들지만 지속적으로 유지하기 어렵기 때문에 개운한 수면을 취하지 못한다는 주관적인 느낌으로 정의되고 있다. 그러나 최근에는 개인이 정상기능을 하고 안녕감을 느끼는 데 필요한 만큼 수면을 취하지 못하는 것으로도 정의되어야 한다는 주장이 있다. 불면증의 가장 흔한 형태는 갑작스런 환경적 요인에 의해 생기는 일시적인 불면증이다. 만성 불면증은 감정부전장애, 주요우울증, 불안장애, 정신증, 물질남용 등의 정신질환에 의한 경우가 가장 흔하다. 여러 가지 신체질환들이 통증, 메스꺼움, 이상감각, 호흡곤란, 위식도 역류, 죽음에 대한 불안 및 공포를 유발하며 동시에 불면증을 일으킬 수도 있다.<sup>1)</sup> 불면증의 유병률 조사에 의하면 성인의 약 30%가 불면증을 경험한다.<sup>2)</sup> 이 중 최소한 10%가 만성적인 불면증을 앓고 있다.<sup>3)</sup> 수면문제는 우리가 생각하는 것 이상으로 많은 장애를 초래할 수 있는데 예를 들면 의료비 지출의 상승, 생산성 저하, 결근율 증가, 사고율 증가 등이다. 그러나 대부분은 수면장애에 대하여 지나칠 만큼 무지하고, 불행히도 의료계에서조차 불면증의

공중 보건에 대한 영향이 충분히 인식되지 못하고 있다.

불면증 치료에는 다양한 진정수면제가 사용된다. 대표적인 것으로 benzodiazepines, barbiturates, imidazopyridines, cyclopyrrolones, 항우울제, 항히스타민제 등이 있다. Barbiturates는 1960년대 가장 흔히 처방된 수면제이나 benzodiazepines의 발매가 시작되면서 감소되기 시작하여 더 이상 수면제로 사용되지는 않는다. 가끔 benzodiazepines가 효과가 없을 때 사용하거나, 다른 약물로 바꾸기를 거절하는 노인환자에게 가끔 사용된다. 불면증을 호소하는 환자 중 많은 수에서 우울하다는 보고가 있으며, 항우울제 사용이 두 배로 증가하고 있다. 그러나 저용량을 사용할 때조차 항콜린성 부작용이 나타날 수 있다.<sup>1)</sup> 항히스타민제는 수면제로 사용하기에 효과가 약하다. Benzodiazepines는 안전하고 빠른 작용시간으로 인해 널리 사용되고 있다. 호흡중추억제가 부작용으로 나타나므로, 수면 무호흡증이 있을 때 주의한다. 또한 남용과 의존성이 우려된다. 따라서 부작용이 없는 새로운 수면진정제를 개발하기 위한 노력이 지속되고 있다.<sup>3)</sup>

승마(Cimicifugae Rhizoma, 이하 CR)는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 승마(*Cimicifuga heracleifolia* Kom.) 또는 기타 동속식물의 뿌리줄기이다. 승마(*C. heracleifolia* Kom.)의 동속식물은 전 세계에 약 20여종이 분포하는 것으로 보고되어 있다.<sup>4)</sup> 우리나라에는 승마의 동속식물로 눈빛승마(*C. dahurica*

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-3399-1605 (팩스) 02-3399-1617  
(E-mail) cheongjh@syu.ac.kr  
본 연구에는 최윤정, 윤서영이 공동으로 기여하였습니다.

Huth), 황새승마(*C. foetida* L.), 촛대승마(*C. simplex* Wormsk ex DC.) 등이 있다. 중국에서는 승마를 대삼엽승마로, 눈빛승마를 흥안승마로, 황새승마를 승마라고 한다. 일본에서는 촛대승마 및 기타 동속 식물의 뿌리줄기를 쓴다. 북아메리카 승마는 *Cimicifuga racemosa*, *Cimicifuga americana*, *Cimicifuga rubifolia*의 3종이 있다. 승마(CR)는 아메리카 대륙, 유럽, 중국 등에서 오래 전부터 월경 장애, 폐경증상, 관절통, 류마티스 질환, 전신쇠약, 인후통, 신장질환 및 말라리아 등에 사용되어 왔다.<sup>5)</sup> 한방에서는 발한, 해열, 해독, 소염제로 분류되어 신열(身熱), 두통, 구내염, 편도선염, 치질, 류머티즘 등에 사용되어 왔다. 또한 위하수와 탈항에 유효하다는 임상 보고도 있다.<sup>6)</sup>

승마(CR)는 cycloartane계의 tetracyclic triterpenoid를 다수 함유하고 있으나, 그 종류 및 함량은 기원식물의 종류에 따라 다르다.<sup>6)</sup> 승마(CR)에 함유되어 있는 phenylpropanoid계열의 화합물은 isoferulic acid, ferulic acid, caffeic acid이다. 이들은 발한 및 피부의 발진을 촉진하며 진통작용을 나타낸다. Ferulic acid와 isoferulic acid를 influenza virus(1,000 PFU)를 감염시킨 실험동물에 경구투여하면 virus yield에는 영향을 미치지 않으나 murine IL-8의 생성을 강력하게 차단하여 염증 생성을 억제한다.<sup>7)</sup> Chromone계열의 visaminol, visnagin은 진경효과가 있고, cimicifugin은 중추억제작용을 나타낸다.<sup>8)</sup>

본 연구에서는 승마(CR) 에탄올 추출물의 중추신경계 약리효능을 검증하기 위하여 행동약리 실험을 수행하였으며, 이 과정에서 승마(CR) 에탄올 추출물의 진정효능을 확인하였다. 이에 따라 승마(CR) 에탄올 추출물의 진정효능에 기여하는 활성성분을 확인하고자 추출물에서 분리된 주요성분인 cimicifugoside(CF), 24-epi-7,8-didehydrocimigenol-3-xyloside(24-epi), 27-deoxyacetatein(27-deoxy)의 행동약리 실험도 수행하였다. 진정효능은 중추신경계에서 작용하는 대표적인 억제성 신경전달물질인 GABA성 신경을 통해 나타나는 것으로 알려져 있으므로,<sup>3)</sup> 승마(CR) 에탄올 추출물과 그 성분의 진정효과 기전이 GABA성 신경을 통해 나타나는지 확인하기 위해 전기 생리학적 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

실험동물은 4주령 양성 ICR 마우스를 한림 실험동물 주식회사(화성, 한국)에서 구입하였다. 1주일간의 안정화 기간과 실험 기간 중에는 항온(22±3°C), 항습(55±5%)이 유지되고, 적절한 조명(200~300 LUX)이 주어졌고 하루 12시간 단위로 명암 주기가 조절되었으며, 40 dB 이하의 소음이 없는 환경에서 사육하였고, 사육기간 동안 사료와 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 실험 당일에는 승마(CR) 에탄올 추출물과 투여 약물을 경구투여하고 30분 후에 각 실험을 시행하였다.

### 시약 및 추출물

승마(CR) 에탄올 추출물과 활성 성분들(24-epi, CF, 27-deoxy)은 한약재 과학화 사업단에서 공급받아 사용하였다. Diazepam (DZP, 명인제약)과 thiopental sodium(중외제약)은 성십자약품(주)(서울, 한국)에서 구입하였으며, N-(6-methoxy-quinoly)acetoethyl-ester(MQAE)는 Invitrogen(Carlsbad, USA)에서 구입하였다. Methylphenidate(MPH)는 환인제약(주)(서울, 한국)에서 공급받아 사용하였다. 승마(CR) 에탄올 추출물은 증류수에 녹여 50, 100, 200 mg/kg의 용량으로 경구투여 하였다. 승마(CR)의 세 가지 함유성분은 2.5, 10, 20 mg/kg의 용량으로 경구투여 하였으며, 대조군은 같은 용량의 생리식염수를 경구투여 하였다. DZP(5 mg/kg)와 thiopental sodium(50 mg/kg)은 복강 내로 투여하였다. 행동약리실험은 각 시약을 투여하고 30분 후에 시행하였다.

### Open field test

실험동물의 일반운동 활성을 측정하기 위해 비디오 모니터-컴퓨터 시스템으로 체계화된 EthoVision system(Noldus IT b.v., Netherlands)을 활용하였다. 시험 박스(42×42×47 cm) 중앙에 생쥐를 놓고 10분간 움직이는 거리와 움직이는 시간, rearing frequency, turn angle degree를 측정하였으며, 가로, 세로 15 cm의 중앙에서의 일반운동 활성도 측정하였다. 이 실험을 통해 얻은 결과는 정신 운동 기능의 항진과 저하, 진정, 흥분, 불안, 우울, 회피 정도의 자료로 활용하였다.<sup>9,10)</sup>

### Rotarod test

직경 3.5 cm, 36 rpm 속도의 회전판(UGO BASILE, Italy)에서 떨어질 때까지 건디는 시간과 20분 동안 떨어지는 횟수를 측정하였다. 이 실험을 통해 동물의 운동 협응 능력과 균형감각, 근이완 작용을 평가하였다.

### Thiopental sodium induced sleeping test

승마 에탄올 추출물의 진정 효능을 검증하기 위해 승마 에탄올 추출물을 경구투여 한 생쥐에게 thiopental sodium을 복강 내 투여하여 수면 유도 시간과 수면 지속 시간이 어떻게 변화하는지 측정하였다. 수면의 시작은 정좌반사가 소실되는 시점을 기준으로 하였다.<sup>11)</sup>

### 세포내 염소이온 농도의 측정

세포내 염소이온의 농도 변화는 배양된 human neuroblastoma cell인 SH-SY5Y에 염소이온에 민감한 형광탐침인 N-(6-methoxyquinoly) acetoethyl-ester(MQAE)를 세포내로 봉입시킨 후 실험을 통해 측정하였다.<sup>12)</sup> 실험과정은 West and Molly<sup>13)</sup>에 의해 설계된 방법으로 진행되었다. 배양된 세포를 4×10<sup>5</sup> cells/ml로 Hank's solution에 현탁시킨후 MQAE를 최종농도 5 mM로

2시간 이상 배양하였다. 배양된 세포를 Hank's solution으로 두 번 세척하였다. 형광(excitation wavelength=355 nm; emission wavelength=450 nm)을 교반중인 cuvette 내에서 측정하였다. 실험은 실온에서 시행하여 형광탐침이 새어 나오는 것을 최소화하였다. 실험결과는 세포내 염소이온과 비례하는 값인 상대적 형광(F/F<sub>0</sub>; F<sub>0</sub>=염소이온이 없을 때 형광치, F=시간에 따른 형광치)으로 나타내었다. 모든 형광 값은 MQAE 이온-선택적 신호를 최대로 제거하는 5 µM valinomycin을 포함하는 HEPES-buffered KSCN 용액을 이용하여 따로 측정한 배경형광치(background fluorescence)를 통해 보정하였다.<sup>14)</sup> 다른 실험으로 F<sub>0</sub> 값은 10 mM tributyltin 및 10 mM nigericin을 포함하는 염소-제거 KNO<sub>3</sub> 용액에 세포를 현탁시켜 측정하였다.

**통계처리**

데이터는 평균±S.E.M.으로 표시하였다. 통계처리를 위해 One-way ANOVA를 사용하였으며, 유의성 검정은 p<0.05를 기준으로 하였다. Newman-Keuls test를 통해 모든 군의 유의성을 비교하였다.

**결과 및 고찰**

**Open field test**

승마 에탄올 추출물 100, 200 mg/kg은 일반운동 활성을 유의

성 있게 감소시켰다. 승마(CR) 성분들은 일반운동 활성에 유의성 있는 변화를 초래하지 않았다(Fig. 1). 일반운동 활성은 동물의 운동 기능과 각성, 진정, 불안, 우울 등의 정서를 확인하는데 활용 된다.<sup>14)</sup> 일반운동 활성의 저하는 승마(CR)의 에탄올 추출물이 진정효과가 있음을 시사한다. 승마(CR)의 진정 효능은 다른 연구자도 보고한바 있으나 그 근원식물을 비교할 수는 없었다.<sup>15)</sup>

**Rota-rod test**

Rotarod test는 근이완 효능, 운동 협응력 및 진정 효능을 확인하는 실험방법이다. 100 mg/kg의 승마 에탄올 추출물은 rotarod에서 떨어지는 횟수를 유의성 있게 증가시켜 진정효능을 나타내었다. 승마(CR) 성분에서는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다(Fig. 2). 이러한 결과를 통해, 승마 에탄올 추출물이 일반운동 활성을 감소시킨 결과와 일치하게 진정효과를 초래함을 확인할 수 있었다.

**Thiopental sodium으로 유도한 수면실험**

승마 에탄올 추출물은 100 mg/kg의 용량에서 유의성 있게 수면 유도 시간을 감소시키는 효과가 있었다. 수면 지속 시간은 용량 의존적으로 유의성 있게 증가시켰다. 27-deoxy는 10 mg/kg의 용량에서 유의성 있게 수면 유도시간을 감소시켰다. 24-epi와 27-deoxy는 수면지속시간도 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 3).

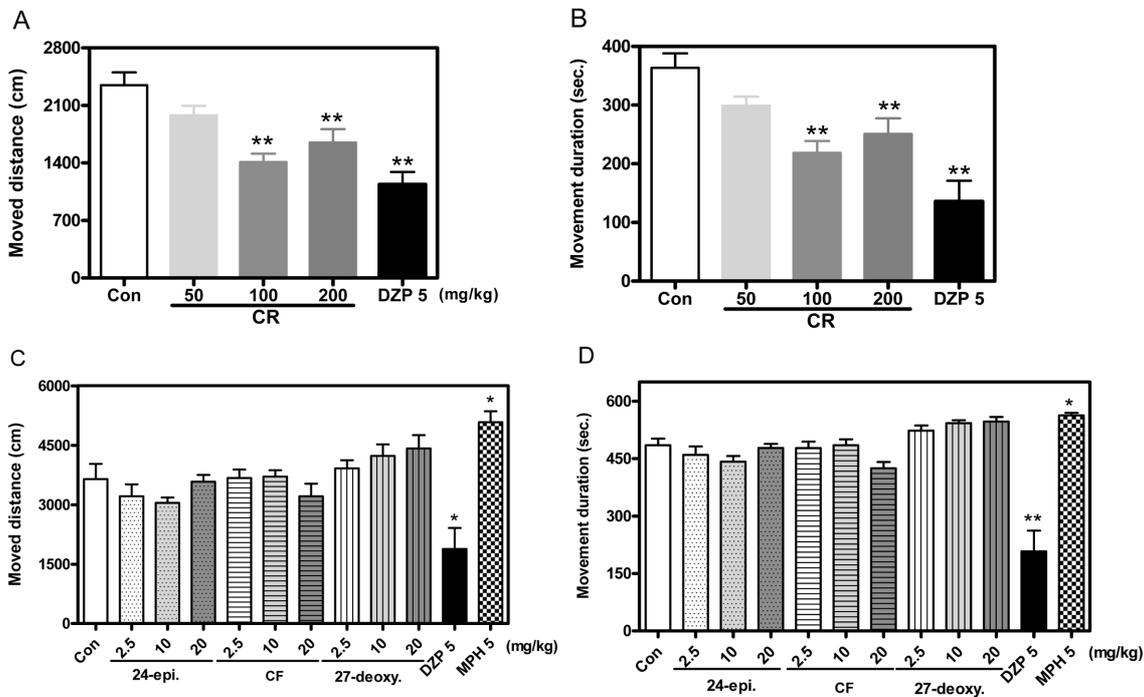


Fig. 1 – Effects of CR and its constituents on locomotor activity in mice (n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the moved distance, movement duration for 10 minutes (\*p<0.05, \*\*p<0.01 CR, its constituents, DZP, and MPH versus control). DZP means diazepam and MPH means methylphenidate.

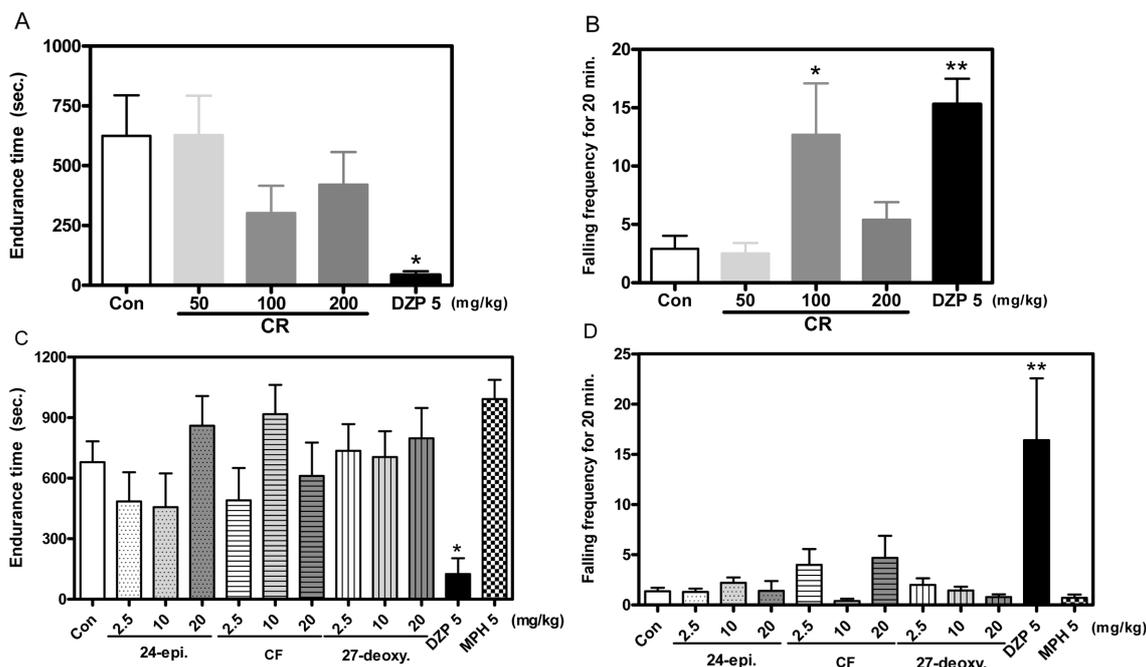


Fig. 2 – Effects of CR and its constituents on activity on the rota-rod in mice (n=8~10). Each bar represents the mean±S.E.M of the endurance time or falling frequency for 20 minutes (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01 CR, its constituents, DZP, and MPH versus control). DZP means diazepam and MPH means methylphenidate.

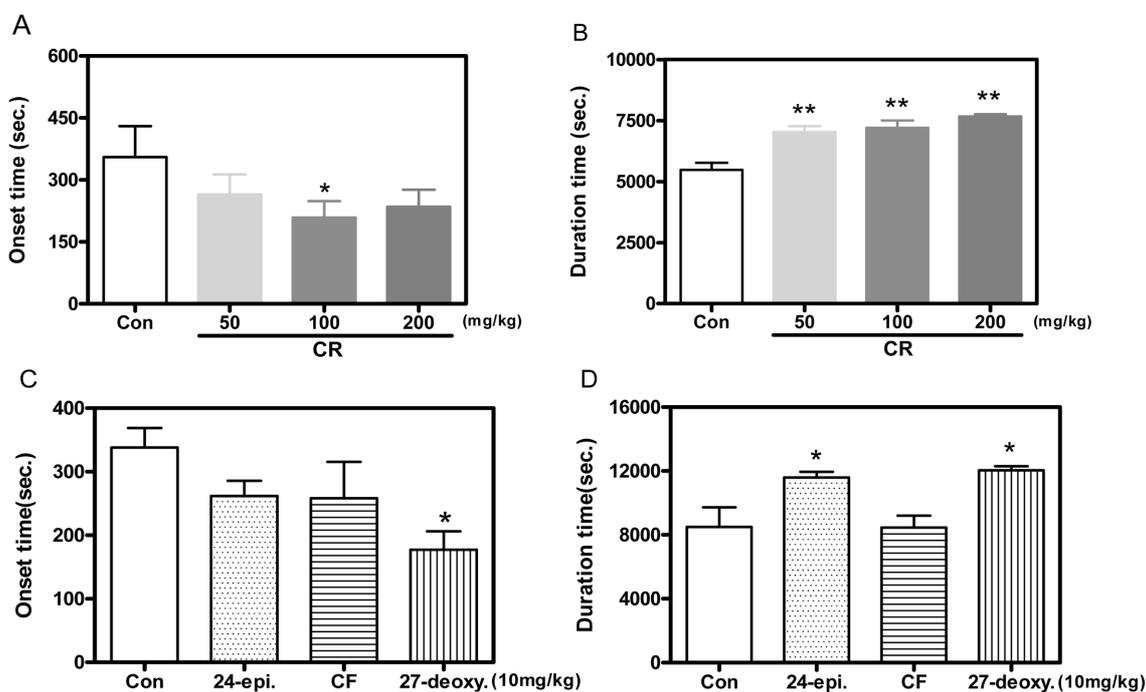


Fig. 3 – Effects of CR and its constituents on thiopental induced sleeping in mice (n=10). Each bar represents mean±S.E.M of onset and duration time of sleeping induced by thiopental (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01 CR and its constituents versus control).

승마 에탄올 추출물은 thiopental sodium의 수면 효과를 증가시킴으로써 진정 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 효과에 기여하는 성분으로는 24-epi와 27-deoxy일 것으로 사료된다.

승마 에탄올 추출물이 세포내 염소이온 농도에 미치는 영향  
 승마 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 세포내 염소이온의 유입을 초래하였다. 이러한 효과는 GABA 길항제인 bicuculline에

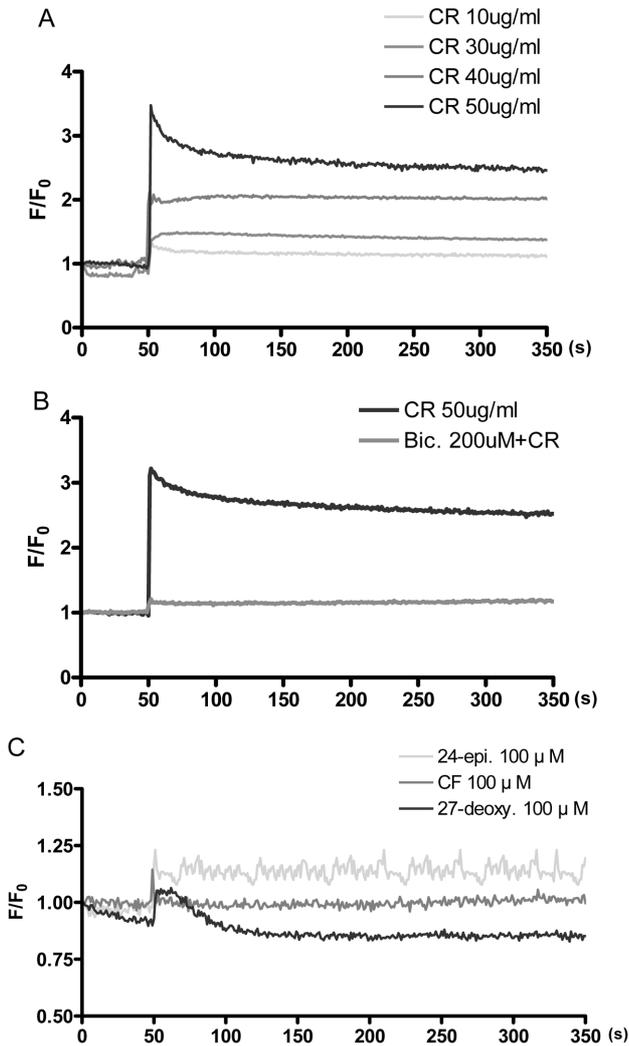


Fig. 4 – Effects of CR and its constituents on Cl<sup>-</sup> influx from SH-SY5Y cells. Fluorescence was monitored in the excitation wavelength at 365 nm and the emission wavelength at 450 nm using the Cl<sup>-</sup> Sensitive indicator, N-(6-methoxyquinolyl) acetoethyl ester (MQAE). Contents of influxed Cl<sup>-</sup> ion were expressed as F/F<sub>0</sub>.

의해 억제되었다(Fig. 4A, 4B). 이는 승마 에탄올 추출물의 진정 효능이 GABA 신경을 통한 기전으로 나타날 수 있음을 시사한다. 승마(CR) 성분 중에서 24-epi는 세포내 염소이온의 유입을 증가시키는 효과가 있었다. 27-deoxy와 CF는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다(Fig. 4C).

이러한 결과를 종합해 볼 때 승마 에탄올 추출물은 일반운동 활성을 감소시키고, rotarod에서 떨어지는 횟수를 증가시켜 진정 효능을 나타내었다. 승마 에탄올 추출물은 thiopental sod.에 의한 수면 효과를 증가시켰으며, 승마 성분 중에서 24-epi와 27-deoxy. 또한 수면 지속 시간을 증가시키는 효과가 있었다. GABA<sub>A</sub> receptor의 작용을 확인하기 위한 Cl<sup>-</sup> influx test에서 승마 에탄올 추출물은 염소이온의 유입을 증가시켰으며, 이러한 작용은

GABA 길항제인 bicuculline에 의해 차단되었으므로, 승마 에탄올 추출물의 효과가 GABA 수용체와 관련되어 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 승마 성분 중에서는 24-epi가 염소이온의 유입에 기여할 것으로 사료된다.

### 결론

본 연구에서 승마 에탄올 추출물은 진정 효능을 가지고 있었고, 그 기전은 중추신경계의 억제성 신경 전달물질인 GABA를 통해 염소이온 통로에 작용하는 것으로 사료되며, 이에 기여하는 성분은 염소이온의 유입을 초래하는 24-epi일 것으로 추정된다. 승마 에탄올 추출물과 그 함유성분의 진정 효능은 향후 불면증 치료제로써 개발 가능하다. 본 연구 결과는 부작용이 적은 불면증 치료제로써 승마 에탄올 추출물과 그 함유성분에 대한 연구가 더 필요함을 시사한다.

### 감사의 말씀

본 연구는 식약청 한약재 과학화 사업(과제번호 09112한약재 890)으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- 1) 양창국 : 불면증의 약물치료. *생물치료정신의학* **4**, 103 (1998).
- 2) 김인, 최윤경, 서광윤 : 서울 거주 일반인의 수면위생에 대한 인식과 실행. *신경정신의학* **36**, 712 (1997).
- 3) Ebert, B., Wafford, K. A. and Deacon, S. : Treating insomnia: Current and investigational pharmacological approaches. *Pharmacology & Therapeutics* **112**, 612 (2006).
- 4) 이현우, 박중옥 : 한국산 승마속 식물(미나리아재비과)의 핵형 분석. *한국식물분류학회* **28**, 385 (1998).
- 5) 조향순 : 쫄대 승마와 황새 승마 뿌리의 항산화 활성 및 Nitric Oxide 생성 억제 활성. *중앙대학교 의약품식품대학원 석사학위논문집* (2007).
- 6) 생약학교재편찬위원회, 생약학, 동명사, 경기도 (2008).
- 7) Hirabayashi, T., Ochiai, H., Sakai, S., Nakajima, K. and Terasawa, K. : Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on murine interleukin-8 production in response to influenza virus infections *in vitro* and *in vivo*. *Planta Med.* **61**, 221 (1995).
- 8) Ito, M., Kondo, Y. and Takemoto, T. : *Spasmolytic substances from Cimicifuga dahurica maxim.* *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 580 (1976).
- 9) Kim, M. K., Yu, G. Y., Tan-Lee, B. S., Oh, H. J., Dong, K. W., Jeong, S. H., Han, S. W. and Cheong, J. H. : Anti-stress effect of *Pyroligneous liquid* in SD rats and ICR mice. *J. Appl. Pharmacol.* **11**, 249 (2003).

- 10) Noldus, L. P. J. J., Spink, A. J. and Tegelenbosch, A. J. : EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput.* **33**, 398 (2001).
- 11) 고석태, 임동윤, 강경원 : 새로운 항암성 백금착제의 일반 약리작용(II). *약학연구지* **18**, 57 (1996).
- 12) Verkman, A. S., Sellers, M. C., Chao, A. C., Leung, T. and Ketcham, R. : Synthesis and characterization of improved chloride-sensitive fluorescent indicators for biological applications. *Anal. Biochem.* **178**, 355 (1989).
- 13) West, M. R. and Molloy, C. R. : A microplate assay measuring chloride ion channel activity. *Anal. Biochem.* **241**, 51 (1996).
- 14) Shumaker, H., Amlal, H., Frizzell, R., Ulrich, C. D. Jr. and Soleimani, M. : CFTR drives  $\text{Na}^+\text{-nHCO}_3^-$  cotransport in pancreatic duct cells: a basis for defective  $\text{HCO}_3^-$  secretion in CF. *Am. J. Physiol.* **276**, C16 (1999).
- 15) Cao, L., Sun, H., Li, Z. and Pan, R. L. : Comparison of activities of various species of *Rhizoma Cimicifugae* and their honey processed products. *Zhong Yao Cai.* **30**, 1561 (2007).