

# 복합한약제제의 수면에 대한 연구 -더웰 제제에 대하여-

방금엽 · 이미경 · 서승용 · 전 훈 · 김대근 · 오기완<sup>1</sup> · 조형권<sup>2</sup> · 은재순\*

우석대학교 약학대학, 1: 충북대학교 약학대학, 2: (유)한풍제약

## Study on Sleeping Behaviors of The Combined-Preparation of Crude Drugs -on The Well™ Preparation-

Jinye Pang, Mi Kyung Lee, Seung Young Seo, Hoon Jeon, Dae Keun Kim, Ki Wan Oh<sup>1</sup>,  
Hyoungh Kwon Cho<sup>2</sup>, Jae Soon Eun\*

College of Pharmacy, Woosuk University, 1: College of Pharmacy, Chungbuk National University,  
2: Hanpoong Pharmaceutical Company

This experiment was performed to investigate whether the combined-preparation of crude drugs (The Well™ Preparation, TW), has hypnotic effects and/or enhances pentobarbital-induced sleep behaviors. TW was mixed with water extracts of Ginseng Radix red, Germinated brown rice, cultured mountain ginseng, and 50% ethanol extracts of Longanae Arillus, Nelumbinis Folium and Chrysanthemi Flos. TW (100 mg/kg, *p.o.*) reduced sleep onset and prolonged sleep time induced by pentobarbital similar to muscimol (0.2 μM), a GABA<sub>A</sub> receptor agonist. Also, TW (2 μg/ml) and pentobarbital (2.5 μM) did not affect the chloride influx in primary cultured cerebellar granule cells, respectively, but the combined-treatment of TW (2 μg/ml) and pentobarbital (2.5 μM) increased the chloride influx onto the cells. In conclusion, TW augments pentobarbital-induced sleep behaviors; these effects may result from chloride channel activation.

Key words : ginseng radix red, germinated brown rice, cultured mountain ginseng, longanae arillus, nelumbinis folium, chrysanthemi flos, sleep latency, sleep time, chloride ion

### 서 론

불면증의 원인은 스트레스, 긴장, 공포, 불안 등 다양하며, benzodiazepine계열의 약물, non-benzodiazepine계열의 약물, benzodiazepine receptor agonists와 항우울약 등이 치료제로 사용되고 있으나, 이러한 약물들은 장기간 사용하였을 때 내성 및 의존성을 형성하기 때문에, 사용하는데 많은 부작용을 나타낸다. 따라서 부작용이 적으면서 불면을 치료할 수 있는 약물을 개발하는 것이 필요하다<sup>1)</sup>. 따라서 본 연구자들은 기존 약물들이 가지고 있는 부작용인 내성 및 의존성이 적으면서, 불면증을 치료할 수 있는 기능성식품을 개발하기 위해 다양한 천연물들을 추출하여 실험을 진행하고 있는 중이다.

감국은 항산화작용<sup>2)</sup>, 심혈관보호작용<sup>3)</sup>, 항암작용<sup>4)</sup> 및 항염

\* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 삼례로 333, 우석대학교 약학대학

· E-mail : jseun@mail.woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1569

· 접수 : 2011/09/06 · 수정 : 2011/11/01 · 채택 : 2011/11/08

작용<sup>5)</sup> 등 다양한 약리작용이 있음이 보고되었고, 이러한 약리작용들은 주로 flavonoids와 관련된 것으로 알려져 있으며<sup>6)</sup>, 감국 및 하엽을 건조하여 차로 마시면 불면증에 효능이 있다고 알려져 있어 민간에서 많이 사용하고 있었으나, 과학적인 근거는 거의 없는 실정이었다. 최근 본 연구자들은 용안육<sup>7,8)</sup>, 감국<sup>9)</sup> 및 하엽<sup>10)</sup>이 세포의 Cl<sup>-</sup> channel을 활성화하여 수면시간을 증강시킬 수 있음을 보고하였으며, 또한, 홍삼<sup>11)</sup>이 GABA<sub>A</sub> receptor의 subunit 및 glutamic acid decarboxylase의 expression을 증가시킨다는 것을 보고한바 있다.

또한, 전보<sup>12)</sup>에서 저자들은 발아현미, 배양산삼 및 용안육 혼합제제가 GABAergic system을 조절하여 수면시간을 증강시킬 수 있음을 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 스트레스 및 불면증에 효능이 있는 기능성식품의 약효를 증강시키고자, 전보에서 제조한 발아현미, 배양산삼 및 용안육 혼합제제에 홍삼, 감국 및 하엽을 가미하여 수면에 대한 효능을 측정할 결과 약간의 지견을 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 생쥐는 ICR계 수컷 20 ± 2 g, 흰쥐는 SD계 200 ± 20 g를 Samtako사에서 구입하여, 온도 20 ± 3°C, 습도 50 ± 5%, dark/light 12시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고품사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

### 2. 시약

실험에 사용한 시약은 arabinofuranoside, poly-D-lysine, cytosine은 Sigma Co.에서, fetal bovine serum, basal Eagle's medium은 Life Technologies Co.에서, pentobarbital sodium은 Hanlim Pharm. Co.에서, MQAE는 Dojindo Co.에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 multi-well plate는 Nunc Co.에서 구입하여 사용하였으며, FLUOstar (BMG Lab Technology), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.) 등을 사용하였다.

### 3. 검액의 조제

발아현미, 산삼배양근 및 홍삼은 증류수로 2회 반복하여 가열추출한 다음, 여과하여 동결건조 하였으며, 용안육, 감국 및 하엽은 50% ethyl alcohol로 2회 반복하여 가열추출한 다음 여과하여 동결건조한 후 혼합하여 사용하였다(이하 TW라 함, Table 1).

Table 1. Yield of The Well™ preparations (TW)

韓藥名	生藥名	중량(g)
發芽玄米	Germinated brown rice	3.97
山蔘培養根	Cultured mountain Ginseng	0.08
龍眼肉	Longanae Arillus	5.2
紅 蔘	Ginseng Radix Red	1.2
甘 菊	Chrysanthemi Flos	0.27
荷 葉	Nelumbinis Folium	0.38
合 計		11.1

### 4. Pentobarbital로 유도한 생쥐의 수면유도시간 및 수면시간 측정<sup>13)</sup>

생쥐 10마리를 1군으로 하여 24 시간 동안 절식시킨 후 TW 50 및 100 mg/kg을 경구투여 하였다. 30분 후에 pentobarbital 28 또는 42 mg/kg을 복강으로 주사하고, 수면시간을 측정하였다. 수면시간은 정향반사가 소실되는 시점에서 회복되는 시간으로 하였으며, pentobarbital 투여 후 15분 이내에 수면을 취하지 않는 동물은 실험에서 배제하였다. 약물대조군으로는 muscimol을 사용하였다.

### 5. 신경세포 분리 및 세포내 Cl<sup>-</sup> ion 측정<sup>14)</sup>

임신 8일째의 흰쥐에서 태아를 꺼내, 뇌로부터 소뇌를 제거하고 뇌척수막을 떼어내 신경세포를 분리한 다음 신경세포를 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 24시간 배양한 후, Cytosine arabinofuranoside를 첨가해 비신경 세포의 성장을 막고, 5일 동안 배양하여 Cl<sup>-</sup> ion 측정에 사용하였다. Cl<sup>-</sup> ion 측정은 신경세포에 MQAE 용액을 처

리하여 하룻밤 방치한 후, Cl<sup>-</sup> ion 완충액을 섞어 5분 동안 배양한 다음, 형광측정기로 Cl<sup>-</sup> ion 양을 측정하였다.

### 6. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean ± S.E.M.으로 나타내었고, 통계처리는 Student's *t*-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

## 결 과

### 1. Pentobarbital, muscimol 및 TW가 수면유도에 미치는 효과

Pentobarbital 28 mg/kg을 투여하였을 경우 생쥐 15마리 중 7마리가 수면이 유도되었고, 수면시간은 27.5 ± 3.1분 이었으며, 42 mg/kg을 투여하였을 경우에는 생쥐 15마리 중 14 마리가 수면이 유도되었고, 수면시간은 70.9 ± 5.7분 이었다. 약물대조군인 muscimol 10 mg/kg을 투여하였을 경우 생쥐 15마리 중 수면이 유도된 동물은 없었으며, TW 300 mg/kg을 투여하였을 경우에도 생쥐 15마리 중 수면이 유도된 동물은 없었다(Table 2).

Table 2. Sleep-inducing effects of pentobarbital, muscimol and TW in mice

Group	Dose (mg/kg)	Number of falling asleep/total	Sleeping time (min.)
Pentobarbital	28	7/15	27.5 ± 3.1
	42	14/15	70.9 ± 5.7
Muscimol	10	0/15	0
TW	300	0/15	0

Each value represents the mean ± S.E.M. (n=15).

### 2. TW가 pentobarbital로 유도한 생쥐의 수면유도시간에 미치는 효과

Pentobarbital 42 mg/kg을 투여하였을 때 대조군의 수면유도시간은 3.7 ± 0.3분 이었으며, muscimol 0.2 mg/kg을 투여하고 pentobarbital을 투여하였을 때는 2.2 ± 0.2분으로 대조군에 비해 단축되었다. TW 50 mg/kg을 투여하고 pentobarbital을 투여하였을 때는 2.9 ± 0.2분으로, TW 100 mg/kg을 투여하였을 때는 2.4 ± 0.2분으로 대조군에 비해 수면유도시간이 단축되었다(Table 3).

Table 3. Effects of TW on sleep onset time in pentobarbital-treated mice

Group	Dose (mg/kg)	Sleep onset time (min.)
Control	-	3.7 ± 0.3
Muscimol	0.2	2.2 ± 0.2 <sup>***</sup>
	50	2.9 ± 0.2 <sup>*</sup>
TW	100	2.4 ± 0.2 <sup>**</sup>

Mice were fasted for 24 h before the experiment. After the administration of TW was given orally to mice and pentobarbital (42 mg/kg) was given intraperitoneally to mice. Each value represents the mean ± S.E.M. <sup>\*</sup>; Significantly different from control group (: p<0.05, <sup>\*\*</sup>; p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>; p<0.001).

### 3. FW가 pentobarbital로 유도한 생쥐의 수면시간에 미치는 효과

Pentobarbital 42 mg/kg을 투여하였을 때 대조군의 수면시간은 68.7 ± 7.9분이었으며, muscimol 0.2 mg/kg을 투여하고 pentobarbital을 투여하였을 때는 125.2 ± 11.2분으로 대조군에 비

해 연장되었다. TW 50 mg/kg을 투여하고 pentobarbital을 투여하였을 때는 94.5 ± 8.2분으로, FW 100 mg/kg을 투여하였을 때는 135.7 ± 10.7분으로 대조군에 비해 수면시간이 연장되었다 (Table 4).

**Table 4. Effects of TW on sleep time in pentobarbital-treated mice**

Group	Dose (mg/kg)	Sleep time (min.)
Control	-	68.7 ± 7.9
Muscimol	0.2	125.2 ± 11.2 <sup>***</sup>
	50	94.5 ± 8.2 <sup>*</sup>
TW	100	135.7 ± 10.7 <sup>***</sup>

Each value represents the mean ± S.E.M. ; Significantly different from control group ( ; p<0.05, <sup>\*\*\*</sup>; p<0.001).

**4. TW가 신경세포내 Cl<sup>-</sup> ion 양에 미치는 효과**

대조군의 세포내 Cl<sup>-</sup> 양은 11.2 ± 3.2 mM 이었으며, pentobarbital을 2.5 μM 처리하였을 때는 17.3 ± 3.4 mM로, muscimol 20 μM 처리하였을 때는 18.8 ± 4.7 mM로, TW 2 μg/ml를 처리하였을 때는 19.1 ± 5.3 mM로 대조군에 비해 별 차이가 없었으나, pentobarbital 5.0 μM을 처리하면 27.3 ± 5.7 mM로, muscimol 40 μM 처리하였을 때는 28.5 ± 7.8 mM로, TW 4 μg/ml를 처리하였을 때는 30.2 ± 7.5 mM로 대조군에 비해 세포내 Cl<sup>-</sup> 양이 증가하였다. Pentobarbital을 2.5 μM 처리하고 muscimol 20 μM 처리하면 72.4 ± 8.9 mM로, pentobarbital을 2.5 μM 처리하고 TW 2 μg/ml 처리하였을 때는 75.2 ± 10.3 mM로 대조군에 비해 세포내 Cl<sup>-</sup> 양이 증가하였다 (Table 5).

**Table 5. Effects of TW on chloride influx in primary cultured cerebellar granule cells**

Group	Chloride influx (mM)
Control	11.2 ± 3.2
Pentobarbital 2.5 μM	17.3 ± 3.4
Pentobarbital 5.0 μM	27.3 ± 5.7 <sup>***</sup>
Muscimol 20 μM	18.8 ± 4.7
Muscimol 40 μM	28.5 ± 7.8 <sup>***</sup>
TW 2 μg/ml	19.1 ± 5.3
TW 4 μg/ml	30.2 ± 7.5 <sup>**</sup>
Pentobarbital 2.5 μM + Muscimol 20 μM	72.4 ± 8.9 <sup>###</sup>
Pentobarbital 2.5 μM + TW 2 μg/ml	75.2 ± 10.3 <sup>###</sup>

Each value represents the mean ± S.E.M. ; Significantly different from control group ( ; p<0.01, <sup>\*\*\*</sup>; p<0.001). <sup>\*</sup>; Significantly different from pentobarbital-treated group (<sup>###</sup>, p<0.001).

**고 찰**

Pentobarbital로 유도된 수면시간을 증가시키는 약물들은 다양하며<sup>15,16)</sup>, 이들 작용은 중추신경계의 GABA 효능을 증가시켜 나타난다는 것은 잘 알려진 사실이다<sup>17-19)</sup>.

실험결과 pentobarbital은 28 mg/kg을 투여하였을 때 생쥐 15마리 중 7마리가 수면이 유도되었으며, pentobarbital은 42 mg/kg을 투여하였을 때는 15마리 중 대다수인 14마리가 수면이 유도되었기에, 이하 실험에서는 pentobarbital을 42 mg/kg 사용하였다. Muscimol 10 mg/kg을 투여하거나, TW 300 mg/kg을 투여하였을 때 수면이 유도되지 않았다. 이는 TW가 직접적으로

수면을 유도하지는 않는다는 것을 의미하는 것이다. Muscimol 0.2 mg/kg을 투여하고, pentobarbital을 투여하였을 때 대조군에 비해 수면유도시간이 단축되고 수면시간이 연장되었다. TW 50 및 100 mg/kg을 투여하고, pentobarbital을 투여하였을 때도 대조군에 비해 수면유도시간이 단축되고 수면시간이 연장되었으며, muscimol 0.2 mg/kg을 투여하였을 때와 TW 100 mg/kg을 투여하였을 때의 효력이 비슷하게 나타났다.

이의 작용기전을 규명하고자 신경세포 내 Cl<sup>-</sup> 양을 측정 한 결과, pentobarbital 2.5 μM, muscimol 20 μM, TW 2 μg/ml를 각각 처리하였을 때는 대조군과 별 차이가 없었으나, pentobarbital 5.0 μM, muscimol 40 μM, TW 4 μg/ml를 처리하였을 때는 대조군에 비해 세포내 Cl<sup>-</sup> 양이 증가하였다. 또한, pentobarbital 2.5 μM과 muscimol 20 μM을 병용 처리하였을 때와 pentobarbital 2.5 μM과 TW 2 μg/ml를 병용 처리하였을 때는 pentobarbital만을 처리한 군에 비해 세포내 Cl<sup>-</sup> 양이 현저히 증가하였다.

이상의 실험결과 TW는 GABA 수용체 효능약인 muscimol과 유사하게, 신경세포의 Cl<sup>-</sup> channel을 활성화하여 수면유도시간을 단축하고 수면시간을 연장하기 때문에, 부작용이 적은 새로운 수면유도 및 신경안정작용이 있는 기능성식품으로 개발할 가치가 있다고 사료된다.

**결 론**

발아현미, 용안육, 산삼배양근, 홍삼, 감국 및 하엽 추출물을 혼합한 더웰 (TW) 제제는 신경세포의 Cl<sup>-</sup> channel을 활성화하여 pentobarbital로 유도된 생쥐의 수면유도시간을 단축하고 수면시간을 연장시킨다고 사료된다.

**감사의 글**

이 논문은 2011년도 교육과학기술부(지역거점연구단육성사업/헬스케어기술개발사업단) 및 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

**참고문헌**

1. Waldman, S.A., Terzic, A. Pharmacology and Therapeutics. Saunders, pp 849-855, 2009.
2. Kim, H., Lee, Y.S. Identification of new dicaffeoylquinic acids from Chrysanthemum morifolium and their antioxidant activities. *Planta Medica*, 71(9):871-876, 2005.
3. Jiang, H., Xia, Q., Xu, W., Zheng, M. Chrysanthemum morifolium attenuated the reduction of contraction of isolated rat heart and cardiomyocytes induced by ischemia/reperfusion. *Pharmazie*, 59(7):565-567, 2004.
4. Miyazawa, M., Hisama, M. Antimutagenic activity of flavonoids from Chrysanthemum morifolium. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(10):2091-2099, 2003.

5. Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., et al. Constituents of Compositae plants. 2. Triterpene diols, triols, and their 3-O-fatty acid esters from edible Chrysanthemum flower extract and their anti-inflammatory effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7):3187-3197, 2001.
6. Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 342(8878):1007-1011, 1993.
7. Ma, Y., Ma, H., Eun, J.S., Nam, S.Y., Kim, Y.B., Hong, J.T., Lee, M.K., Oh, K.W. Methanol extract of Longanae Arillus augments pentobarbital-induced sleep behaviors through the modification of GABAergic systems. *J. Ethnopharmacology*, 122: 245-250, 2009.
8. Ma, Y., Eun, J.S., Lee, K.S., Lee, E.S., Kim, C.S., Hwang, B.Y., Oh, K.W. Methanol extract of Longanae Arillus regulates sleep architecture and EEG power spectra in restraint-stressed rats. *Natural Product Sciences*, 15(4):213-221, 2009.
9. Kim, J.W., Han, J.Y., Hong, J.T., Li, R., Eun, J.S., Oh, K.W. Ethanol Extract of the Flower Chrysanthemum mori folium Augments Pentobarbital-Induced Sleep Behaviors: Involvement of Cl Channel Activation. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, pp 109-164, 2011.
10. Oh, S.H., Yu, J.J., Kim, H.J., Oh, K.W. and Eun, J.S. Effects of white lotus extracts on sleeping, chloride influx, and oxidation. *Food Sci. Biotechnol.*, 20(4):949-954, 2011.
11. Yang, S.L., Nam, S.Y., Han, J.Y., Kim, J.C., Lee, K.N., Hong, J.T., Oh, K.W. and Eun, J.S. Alterations of spontaneous sleep architecture and cortical electroencephalogram power spectra by Red Ginseng extract vis GABAergic systems. *J. Ginseng Res.*, 34(4):304-313, 2010.
12. Oh, S.H., Oh, K.W., Cho, H.K., Eun, J.S. Effects of the combined-preparation of Germinated Brown rice, cultured mountain Ginseng and Longanae Arillus on pentobarbital-induced sleeping time. *Kor. J. Oriental Physiology & Pathology*, 24(4):598-601, 2010.
13. Wolfman, C., Viola, H., Marder, M., Wasowski, C., Ardenghi, P., Izquierdo, I., Paladini, A.C., Medina, J.H. Anxiolytic properties of 6,3'-dinitroflavone, a high-affinity benzodiazepine receptor ligand. *Eur. J. of Pharmacology*, 318: 23-30, 1996.
14. West, M.R., Molloy, C.R. A microplate assay measuring chloride ion channel activity. *Analytical Biochemistry*. 241(1):51-58, 1996.
15. Zhu, S, Baker, R.C. Effects of inhalation anesthetics of Kainate-induced glutamate release from cerebellar granule cells. *Life Sci.*, 58(16):1359-1366, 1996.
16. De Sousa, F.C., Pereira, B.A., Lima, V.T., Lacerda, C.D., Melo, C.T., Barbosa-Filho, J.M., Vasconcelos, S.M., Viana, G.S. Central nervous system activity of yangambin from *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae) in mice. *Phytother. Res.*, 19(4):282-286, 2005.
17. Chu, Q.P., Wang, L.E., Cui, X.Y., Fu, H.Z., Lin, Z.B., Lin, S.Q., Zhang, Y.H. Extract of *Ganoderma lucidum* potentiates pentobarbital-induced sleep via a GABAergic mechanism. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 86(4):693-698, 2007.
18. Ma, Y., Han, H., Eun, J.S., Kim, H.C., Hong, J.T., Oh, K.W. Sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi Semen* augments pentobarbital-induced sleeping behaviors through the modification of GABA-ergic systems. *Biol. Pharm. Bull.*, 30(9):1748-1753, 2007.
19. Martínez, A.L., Domínguez, F., Orozco, S., Chávez, M., Salgado, H., González, M., González-Trujano, M.E. Neuropharmacological effects of an ethanol extract of the *Magnolia dealbata* Zucc. leaves in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 106(2):250-255, 2006.
18. Lolli, L.F., Sato, C.M., Romanini, C.V., Villas-Boas, Lde. B., Santos, C.A., de Oliveira, R.M. Possible involvement of GABA A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 111(2):308-314, 2007.
19. Silva, M.I., de Aquino, Neto M.R., Teixeira, Neto P.F., Moura, B.A., do Amaral, J.F., de Sousa, D.P., Vasconcelos, S.M., de Sousa, F.C. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 88(2):141-147, 2007.