

펜틸렌테트라졸로 유도된 실험동물에서 연자육 추출물의 항경련 작용기전

김성훈 · 최종원^{1*}

경희대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 경성대학교 약학대학

Action Mechanism of Anticonvulsive Effect of *Nelumbo Nucifera* in Pentylenetetrazole-induced Animal Models

Sung Hoon Kim, Jong Won Choi^{1*}

Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine, Kyunghee University, 1: College of Pharmacy, Kyungseong University

Nelumbo nucifera(NN) is a oriental medicinal herb which has been used traditionally for the treatment of antidiarrhea, sedative action and various brain diseases including convulsion and epilepsy. In order to examine the mechanism of anticonvulsive effect, we treated the methanol extract of NN(100, 200 mg/kg, P.0) to the sleeping time and pentylenetetrazole(PTZ)-induced convulsive mice. The methanol extract of NN prolonged sleep time by pentobarbital. Methanol extracts of NN were not effected the concentration of GABA and GABA-T activity in the brain of PTZ-induced mice. Methanol extracts of NN significantly inhibited the convulsion state as well as the level of lipid peroxidation in the brain. The butanol and dichloromethane fraction of methanol extracts among the others effectively inhibited in vitro lipid peroxidation dose dependently($5.0 \times 10^{-6} \sim 2.0 \times 10^{-5}$ g/ml). These results suggest that the anticonvulsive effect of NN is possibly due to the antioxidative effects of the free radical formation at brain for the PTZ-induced convulsion if it were by due to generating system.

Key words : *Nelumbo nucifera*, sleeping time, anticonvulsant, antioxidant

서 론

경련은 돌발적이고 일과성인 발작을 특징으로 하는 만성 중추 신경계 질환을 총칭하는 하는 것으로 경미한 경련 상태 및 경련을 수반하지 않는 순간적인 의식 상실 등의 증상까지 포함할 때 총인구의 약 1%의 비율로 흔하게 나타나는 질환으로 보고되고 있다^{1,2)}. 현재 전세계적으로 인구의 약 1%정도가 경련성 질02 환인 간질(epilepsy)환자로 추정되고 있으며, 미국의 경우 약 250만 명이 경련성 환자로 집계되고 있으나 이나마 우리나라는 뚜렷한 통계자료가 없는 실정이다. 따라서 현재 이들의 경련성 질환의 치료제인 항경련성 약물은 신약에서 많이 개발되고 있으나 이들 약물의 상호작용 및 약물 독성에 대한 문제가 심각하며, 질병의 특성상 장기적인 치료가 불가피 하므로 이들 약물에 대한 내성 문제도 대단히 심각하게 대두되고 있는 실정에서 천연자원

* 교신저자 : 최종원, 부산시 남구 수영로 309 경성대학교 약학대학

· E-mail : jwchoi@ks.ac.kr, · Tel : 051-663-4883

· 접수 : 2011/07/07 · 수정 : 2011/08/02 · 채택 : 2011/08/12

물질로부터 새로운 물질을 찾고자 많은 학자들에 의하여 시도되고 있으나 아직까지 대단히 미흡한 실정이다.

현재 임상적으로 경련의 진단은 뇌파기록계상에서 비정상적인 신경 방전이 특징적으로 관찰되고 있다. 이와 같은 병변은 유전적 소인, 생화학적 대사이상, 두개골 손상, 뇌혈류 장애, 퇴행성 뇌기능 장애, 감염 등의 주로 중추신경계의 이상으로 인해 초래되는 것으로 생각되고 있다³⁾. 더욱이 근래에 급증하는 교통사고와 산업 현장에서의 안전사고에 의한 두개골 손상 및 전자오락물, 약물 오. 남용에 의한 중독 등이 간질 발작의 원인이 되고 있는 점을 고려할 때 간질의 환자는 점차 증가하고 있는 추세이다. 이러한 경련의 발생 기전은 정확하게 밝혀지고 있지 않으며 최근에 와서 중추의 흥분성 신경 전달 기능과 억제성 전달 기능 사이의 균형 소실이 발작의 원인이라는 학설이 제시된 후 중추신경계에서 흥분성 또는 억제성 신경 전달 물질로 작용하는 아미노산들이 관심의 대상이 되고있다^{4,5)}.

간질, 치매현상등과 같이 뇌조직의 퇴행성 기능장애를 초래하는 질환들의 병태생리학적 현상들은 활성산소종의 생성과 분

해기구의 조절증이 상실되어질 때 잔존하는 과량의 활성산소들이 뇌조직 중의 불포화지방산을 과산화시켜 세포막의 손상을 유도하는 산화적 스트레스 유도과정과 밀접한 관계를 갖고 있음이 밝혀지고 있다^{6,7)}.

연자육(*Nelumbo nucifera*)은 수련과(Nymphaeaceae)에 속하는 연꽃의 잘 익은 종자를 가을에 수확하여 과피를 제거하여 말린 것으로 한방에서는 비의 기능이 기능을 보하여 설사를 멎게 하며, 자양강장, 식욕증진 및 심장의 열을 식혀주며 정신을 안정시켜주는 효과로 불면증에 효능이 있으며 관련된 연구로서 항균, 항당뇨, 항산화 효능 등⁸⁻¹¹⁾이 보고되고 있고 최근에 와서는 식물 호르몬인 dihydrophaseic acid의 분리 동정, 돌연변이원성에 대한 효과와 연자육에는 아미노산인 세린과 메티오닌이 풍부하다는 보고^{12,13)} 및 우울증에 치료 등에 대한 보고¹⁴⁾가 이루어지고 있다.

이에 본 연구에서는 연자육의 물 추출물을 이용하여 진정효과와 항경련 작용 기전을 항산화 작용과 관련하여 검토하였다.

재료 및 방법

1. 동물 및 재료

본 시험에 사용한 ICR계 30-35 g의 수컷 생쥐는 효창사이언스(대구)로 부터 분양 받아 동물사에서 일정한 조건(온도 : 22±0.5°C, 습도 : 46-60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 검역과 순화·사육을 거친 건강한 동물로 실시되었다. 사료는 실험동물용 고형 사료(천하제일사료, 대전시 대화동), 음수는 상수도를 자유 섭취시켰다. 이때 효소 활성의 일종의 변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다. 실험에 사용된 연자육은 부산진 시장에서 구입한 것을 먼지 등의 부착물을 제거할 목적으로 세척한 후 건조하여 사용하였다. 건조된 연자육을 분말로 하여 1 kg당 3 L의 methanol을 가한 다음 70°C에서 5시간 간격으로 3회 반복추출하고 여과하여 methanol 분획(192 g)을 얻고 농축하였다. 여기에 증류수를 가하여 완전히 현탁시킨후 현탁액에 ether 1 L를 가하여 분별 깔대기에서 3회 분리하여 ether 분획(35 g)을 얻었다. 남은 여액에 150 ml의 n-butanol을 가하고 분리하여 butanol 분획을 얻고 이 분획을 감압농축(18 g)하였다. Butanol 분획에 다시 dichloromethane(CH₂Cl₂)을 가하여 혼합한 후 CH₂Cl₂로 이행되는 부분을 분별깔대기에서 분리하여 감압농축하고 CH₂Cl₂ 분획(7.3 g)으로 하였다. 이렇게 얻어진 연자육 추출물은 1% carboxymethyl cellulose(CMC) 용액에 현탁(100, 200 mg/kg)하여 4주간 esophagus needle을 사용하여 경구로 투여하였으며, 대조군은 같은 방법으로 1% CMC 용액을 경구 투여하였다. 실험동물은 처치 전 12시간 동안 사료를 제거하고 물만 섭취하도록 하였다.

2. 수면유도 및 수면시간 측정¹⁵⁾

생쥐 10마리를 한군으로 하여 시료를 경구투여한 30분후 pentobarbital sodium 42 mg/kg을 복강 주사하였다. 15분 이내에

수면을 취하지 않는 동물은 실험에서 배제 하였고, 정향반사 소실을 지표로 수면효과를 관찰(정향 반사가 소실되는 시점부터 정향반사가 회복되는 시점까지의 시간)하였다. 대조물질로는 염산 chlorpromazine 50 mg/kg을 경구투여 하였다.

3. 항경련효과

경련상태는 Roussinov 등의 방법¹⁶⁾에 따라 경련발작 정도를 5단계(Table 1)로 구분하여 각 단계에서 발생하는 경련의 횟수의 곱을 모두 합하고 이 것을 다시 전체 경련횟수로 나누어 경련강도(severity)를 산출하였다. 또한, Vogel의 방법¹⁷⁾에 준하여 pentylenetetrazole(PTZ, 70 mg/kg, s.c.)을 주사하여 경련의 발현 및 사망의 유무를 관찰하였다. 항경련 효과는 PTZ 투여 후의 경련 발작 발현시간(onset time), 경련 지속시간(duration of convulsion), 회복시간(recover time) 등을 측정하여 종합적인 현상을 참조한 경련상태 지표로 나타내었다.

Table 1. Classification of signs shown in each degree of convulsions

Degree of convulsion	Signs
0	No signs
1	Paralysis and fibrillations
2	Rising forelimbs and convulsions
3	Weak jerking
4	Strong jerking and jumping, shouting
5	Lasting of typical tonic-clonic seizure, expire

4. 뇌 조직중 GABA 함량 및 GABA-T의 활성 측정

GABA 함량 측정은 Allen등¹⁸⁾의 방법을 약간 변경하였다. 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 x g에서 20분간 원심분리 하여 얻은 postmitochondria 분획을 일정량의 200 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 첨가한 후 빙냉의 ethanol로 제단백 시켰다. 이것을 원심분리 하여 얻은 상정액을 membrane filter를 사용하여 여과한 다음 여액중에 함유된 GABA의 함량을 고속액체 크로마토그래프를 이용하여 분리시킨 후 표준품의 유지시간(GABA: 11.3분)과 비교확인한 후 표준 검량선에 준해 그 함량을 산정하였다(Table 2). GABA의 함량은 조직 단백질 1 mg당 nmole로 나타내었다.

Table 2. Conditions of HPLC for the determination of brain GABA concentration in mouse

Parameter	Conditions
Column	TSK-ODS-80-TM(15 cm x 4.0 mm I.D., 10 μm)
Flow rate	0.6 ml/min
Mobile phase	10 mM potassium acetate buffer (pH 6.5) - Methanol
Gradient	Methanol 20% → 70%/40 min
Attenuation	8
Detector	Fluorescence detector (λAC : 340 nm, λEm : 450 nm)

GABA-T의 활성은 Cupello등의 방법¹⁹⁾에 따라 일정량의 0.15 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 60 mM a

-ketoglutaric acid 100 μ l와 기질인 4 μ M GABA 50 μ l 및 조제된 효소원 100 μ l를 첨가하여 incubator에서 30분간 반응시킨 다음, 이때 생성된 succinic semialdehyde에 조효소인 0.12 mM NADP 10 μ l를 첨가하고 20분간 반응시켜 생성되는 NADPH를 340 nm에서 측정하여 효소 활성을 산정한다.

5. 과산화지질 함량 측정

Ohkawa 등의 방법²⁰⁾에 준해 조직 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 용액을 가해 95 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-butanol : pyridine(15:1) 혼합액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 단백 1 mg당 malondialdehyde (MDA)의 양을 nmole로 나타내었다.

6. Hydroxyl radical scavenging 효과 측정

Halliwell 등의 방법²¹⁾에 따라 20 mM potassium dihydrogen phosphate-potassium hydroxide buffer(pH 7.4)에 2.8 mM deoxyribose, 100 μ M ferric chloride, 104 μ M ethylenediaminetetraacetic acid, 1mM hydrogen peroxide, 100 μ M ascorbate를 최종부피가 3 ml되게 가하여 1시간동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 이때 hydroxyl radical에 의해 생성되는 malondialdehyde의 함량을 과산화지질 함량 측정법과 동일한 방법으로 측정하였다.

7. 단백질 정량 및 통계처리

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법²²⁾에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, Fr. V)을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치 \pm 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결 과

1. 수면연장 시간

연자육 추출물 투여에 의한 수면시간을 알아보기 위하여 4주간 연자육 추출물(100, 200 mg/kg)을 경구 투여하고, 투여 마지막날 pentobarbital을 투여하고서 수면유도 및 수면시간을 관찰한 결과가 Table 3이다. 대조군의 수면유도시간은 3,74 \pm 0.36분, 수면시간 67.9 \pm 5.9분이었으며, 연자육 추출물 100 mg/kg과 200 mg/kg을 전처리하고 pentobarbital을 투여함으로써 수면유도시간은 대조군에 비하여 별다른 영향이 없었으나, 수면시간은 용량존적으로 수면이 연장되었다. 대조군인 chlorpromazine의 투여에서는 수면유도시간이 단축되었으며 수면시간도 연장되는 것을 관찰하였다.

2. 경련발작 및 항경련효과에 미치는 영향

연자육 추출물을 전처리하고 PTZ에 의해 유도되는 경련 발작 및 항경련효과에 미치는 영향을 관찰한 결과 연자육 추출물

을 4주간 투여한 군에서는 대조군에 비하여 경련 발작이 용량의 존적으로 억제되었으며(Fig. 1), 경련발현시간, 사망률 및 사망시간에서 유의한 차이는 나타내지 않았으나 연자육 추출물 200 mg/kg을 4주간 투여한군에서는 경련발현 시간이 연장되었으며, 사망률 및 사망시간을 유의적으로 억제시켰다(Table 4).

Table 3. Effect of pretreated of *Nelumbo nucifera*(NN) on onset and sleep in pentobarbital-induced mice

Treatment	Dose (mg/kg, p.o)	Sleeping latency (min)	Sleeping time (min)
Control		3,74 \pm 0.36 ^a	67.9 \pm 5.9 ^d
NN	100	4.12 \pm 0.53 ^a	98.6 \pm 7.7 ^{b,c}
	200	3.98 \pm 0.65 ^a	139.7 \pm 20.9 ^b
CPZ	50	2.49 \pm 0.51 ^b	201.3 \pm 16.5 ^a

Mice were fasted for 24 hr prior to the experiment, the orally administered NN daily for four weeks and 30 min after the final treatment of sample, animals were intraperitoneally injected of pentobarbital(42 mg/kg). Data is mean \pm SD(n=6). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test. CPZ: Chlorpromazine

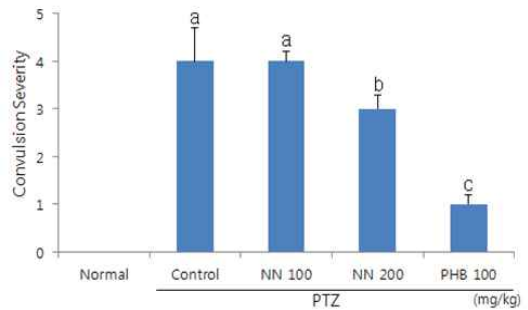


Fig. 1. Effect of *Nelumbo nucifera*(NN) methanol extract on convulsion severity in PTZ-induced convulsion mice. Metanol extract of NN(100, 200 mg/kg) was administrated once a day for four weeks orally to mice. An one hour after the final treatment of NN, animals were received pentylenetetrazole(50 mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values are Mean \pm S.D. and values followed by the same superscript are not significant(p<0.05) each other by new multiple square method. Severity: [Σ (Degree of convulsion) x (Frequency of convulsion for each degree)]/Total frequency of convulsion.

Table 4. Influence of pretreated of *Nelumbo nucifera*(NN) on PTZ-induced convulsion and mortality in rats

Treatment	Dose (mg/kg, p.o)	Onset		T.E.		Mortality	
		Inc (%)	Lat (sec)	Inc (%)	Lat (sec)	Inc (%)	Lat (sec)
Control	0	100	45.1 \pm 5.14 ^b	100	159.3 \pm 6.72 ^b	100	191.5 \pm 5.88 ^c
NN	100	100	54.2 \pm 3.99 ^b	90	172.8 \pm 8.25 ^b	90	221.6 \pm 9.27 ^b
	200	80	83.7 \pm 9.98 ^a	60	210.4 \pm 11.9 ^a	40	289.8 \pm 20.0 ^a
PHB	100	0	-	0	-	0	-

The assay procedure was described in the experimental methods. Value represent means \pm SD (n=6). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test. T.E., tonic extensive: Inc., incidence: Lat., latent time from pentylenetetrazole treatment. PHB: phenobarbital

3. 뇌중 GABA 함량 및 GABA-T 활성에 미치는 영향

연자육 추출물을 전처리하고서 PTZ로 경련을 유발시키고, 뇌 조직중 GABA의 함량 및 GABA-T의 활성을 관찰한 성적이 Table 5이다. GABA 함량의 경우 대조군에 비하여 PTZ를 투여함으로써 현저히 억제되던 뇌 조직내 GABA의 함량이 연자육 추출물의 투여로 별다른 영향이 없었으며, GABA-T의 활성도 정상군이 1.36 \pm 0.08 NADPH nmole/mg protein인데 비하여 PTZ투

여군은 2.17±0.14 NADPH nmole/mg protein으로서 약 45% 증가하였으나 연자육 추출물의 투여로 별다른 영향이 없었다. 한편 대조 약물인 vigabatrine을 100 mg/kg 투여로서 PTZ의 투여로 증가되던 효소의 활성이 정상군의 수준으로 회복되고 있음을 관찰 할 수 있었다.

Table 5. Effect of pretreated of *Nelumbo nucifera*(NN) on the GABA level and GABA-T activity in PTZ-induced rats

Treatment	GABA level nmole/mg protein	GABA-T activity NADPH nmole/mg protein/min
Normal	2.18 ± 0.23 ^a	1.36 ± 0.08 ^d
PTZ	1.30 ± 0.11 ^d	2.17 ± 0.14 ^a
NN 50	1.39 ± 0.14 ^d	2.38 ± 0.18 ^b
100	1.37 ± 0.19 ^b	2.42 ± 0.20 ^{b,c}
VGB 100	1.98 ± 0.12	1.56 ± 0.15 ^{b,c}

The assay procedure was described in the experimental methods. Value represent means ± SD (n=6). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test. VGB: Vigabatrin

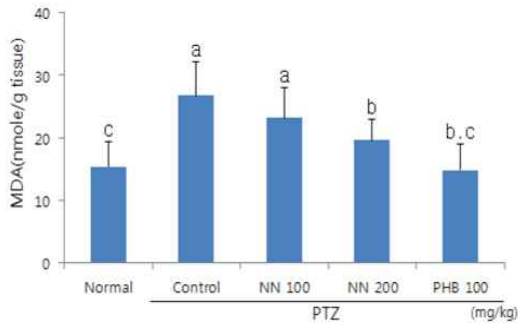


Fig. 2. Effect of *Nelumbo nucifera*(NN) methanol extract on lipid peroxidation in brain homogenate in PTZ-induced convulsion mice. The assay procedure was described in the experimental methods. Value represent means ± SD (n=6). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

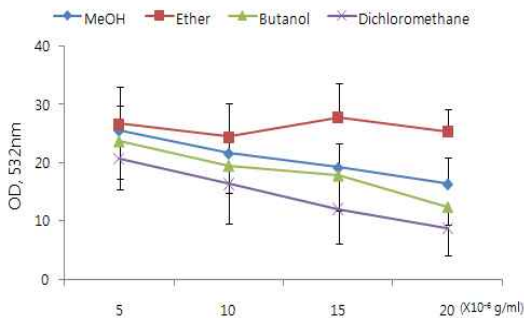


Fig. 3. The hydroxy radical scavenging activity of several fraction of metanol extract of *Nelumbo nucifera*(NN) in vitro. The reaction mixture(3 ml) contained 20 mM potassium dihydrogen phosphate-potassium hydroxide buffer(pH 7.4), 2.8 mM deoxyribose, 100 μM ferric chloride, 104 μM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM hydrogen peroxide, 100 μM ascorbate and enzyme preparation, and various concentration of NN fraction.

4. 지질과산화 함량 및 수산기 소거능에 미치는 영향

연자육 추출물을 전처리하고서 PTZ로 경련을 유발시키고, 뇌 조직중 지질과산화의 함량 및 시험관내에서 hydroxyl radical scavenging 효과를 측정 한 성적이 Fig. 2 & 3이다. PTZ로 경련을 유발시킨 실험동물에서의 뇌중 지질과산화의 함량을 관찰하였던

바 대조군에 비하여 PTZ를 투여함으로써 현저히 증가되던 뇌조직중의 지질과산화의 함량이 연자육 추출물을 용량별로 4주간 전처리함으로써 용량의존적으로 현저히 억제되었으며, PTZ로 유발된 뇌조직을 사용하여 시험관내에 각 분획을 첨가하고서 수산기 소거능을 관찰하였을 때 메탄올, 부탄올 및 디클로로메탄 분획을 각각 용량별(5 × 10⁻⁶에서 2 × 10⁻⁵ g/ml)로 첨가함으로써 약 20%에서 최고 34.3%까지 감소시켰다.

고찰

간질, 치매현상 등과 같이 뇌조직의 퇴행성 기능장애로 초래되는 질환들의 병태생리현상들은 활성산소종의 생성과 분해기구의 조절능이 상실되어질 때 잔존하는 과량의 활성산소종들이 뇌조직 중의 불포화지방산을 과산화시켜 세포막의 손상을 유도하는 oxidative stress 유도과정과 밀접한 관계를 갖고있음이 여러 연구진에 의해서 밝혀지고 있다^{23,24}.

뇌신경조직은 대단히 정밀하면서 복잡하게 구성되어있으며, 그 기능수행도 섬세한 단위기능들이 조화를 이루고 복잡한 반응경로를 거치도록 되어있다. 이와 같은 뇌신경계의 질환에 대해서 많은 연구진에 의해서 연구가 계속 진행되고 있으나 대부분의 경우 확실한 병태생리학적 기전이 아직 밝혀지지 않고 있어 뇌신경계질환 치료제 개발도 많은 어려움이 있다. 최근의 연구결과에 의하면 간질, 치매 및 파킨슨씨 질환 등 퇴행성의 뇌신경계 질환들의 병태생리 조건들은 oxidative stress가 매개하는 과산화지질생성 반응과 밀접한 상관관계가 있다는 사실이 밝혀지고 있어 관심을 갖게 하고 있다²⁵. 본 논문에서는 인위적으로 경련 발작을 유도한 동물모델을 이용하여 간질의 병태생리학적 기전연구 및 치료제로서의 이용가능성이 있는 물질의 작용기전을 연구하고자 하였다. 연자육 추출물은 4주간 경구투여하고 수면연장에 어떠한 영향을 주는 가를 관찰하였던 바 정상군에 비하여 수면이 연장되는 경향을 보였으며 PTZ의 투여로서 나타나는 항경련 효과를 관찰 하였던 바 PTZ에 의한 경련발작의 지속시간과 회복 시간 및 경련발작 정도가 유의성있게 감소됨을 관찰하였다. PTZ는 strychnine과 picrotoxin과는 달리 접합 전 및 접합 후 기능에는 관계없이 중추신경 흥분제로 chloride 이온 전도에 미치는 GABA의 작용을 저해하는 것으로 보고되어 있으며, 현재 absence seizure나 myochlonic seizure의 경련 양상을 일으키는 간질 발작을 유도하는 실험 모델로서의 용도뿐만 주로 사용되고 있는 약물이다^{26,27}. 연자육 추출물을 전처리한 실험동물에 PTZ를 투여하고 뇌중 GABA의 함량을 측정하였을 때, 대조군에 비하여 PTZ 단독 투여군에서는 GABA의 함량이 현저히 감소하였으나, 연자육 추출물을 전처리한 군에서는 이러한 GABA 함량의 감소현상을 억제하지 못하였다. GABA-T는 뇌 조직 중에서 억제성 신경섬유 말단과 망산 세포계 등에 분포되며, 재흡수된 GABA를 glutamic acid와 succinic semialdehyde로 불활성화시키는 역할을 하는 효소이다²⁸⁻³⁰. GABA-T의 활성은 PTZ 단독 투여군에서 대조군에 비해 약 40% 정도 증가하였으나, 연자육 추출물을 전처리한 군에서는 PTZ에 의하여 증가되던 효소의 활성

에도 영향이 없었다. 이로볼 때 연자육 추출물의 항경련 작용은 중추신경계의 억제성 전달물질인 GABA와는 연관이 없는 것으로 생각된다. 지질과산화 반응의 진행은 생리 조건이 정상인 상태에서는 방어체계의 조절에 의하여 free radical의 생성과 억제 균형이 유지되어 지질과산화 반응으로 기인되는 손상이 일어나지 않지만 세포내의 산화적 자극이 증가하여 free radical의 생성이 증가나 방어 체계 능력의 감소가 일어났을 때는 생체에 심각한 독성을 나타내게 된다. 지질과산화의 생성은 병태 생리 현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 지표로 생체막 구성 성분인 인지질의 불포화 지방산은 활성 산소종과 같은 활성산소에 의해 과산화 반응이 시작되며 연쇄적으로 진행된다. 내외인성 요인에 의하여 생성된 친전자성 물질을 포함하는 활성산소에 의한 지질의 과산화 반응은 세포막의 투과성을 항진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 노화 현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리 현상을 초래하는 것으로 알려져 있다³¹⁻³³). 지질과산화의 지표로 부산물인 malondialdehyde의 함량을 측정할 수 있는데 본 연구에서 PTZ의 투여로 경련발작을 유도한 흰쥐에서 PTZ는 뇌조직의 지질과산화반응을 촉진시켰으며 생리식염수만을 투여한 대조군에 비해 과산화지질의 생성량도 40%정도 증가하는 유의성있는 변화가 관찰되었다. 이는 PTZ에 의한 경련발작의 유도는 지질과산화반응이 관여함을 보여주는 것이다. 일반적으로 항산화작용은 free radical의 소거 작용과 상관성이 있는 경우가 많으므로 활성산소종들이 연쇄적인 반응으로 생성되어지는 과정의 마지막 생성물이며 가장 강력한 활성을 지니고 있어서 oxidative stress에 의한 조직 손상과정에서 대단히 중요한 핵심적인 역할을 하는 인자로 알려지고 있는 hydroxy radical^{34,35})에 대한 연자육성분의 소거작용을 조사하였다. 메탄올 추출물은 물론 부탄올 및 디클로로메탄 분획을 시험관내에 용량별로 첨가하였을 때 5×10^{-6} g/ml 농도에서 화학반응으로 생성시킨 반응액 중의 hydroxy radical의 양이 감소하다 최고농도인 2×10^{-5} g/ml의 첨가에서 20%에서 최고 34.3%까지 용량의존적으로 현저히 억제되었다. 또한, ether 추출물은 별다른 영향이 없었다. 이상과 같은 실험결과들을 종합하여 볼 때 연자육성분 중에는 항경련작용을 나타내는 물질이 함유되어 있으며 이 약리작용은 hydroxy radical의 소거작용 등으로 oxidative stress 상태를 개선하여 과산화지질의 생성을 억제하는 기전으로 나타날 것으로 생각되어진다.

결 론

본 연구에서는 연자육 추출물의 수면연장 시간 및 항경련효과에 대하여 관찰한 결과 pentobarbital을 투여함으로써 용량 의존적으로 수면시간이 연장되었으며, pentylenetetrazole(PTZ)에 의해 유도되는 경련 발작 및 항경련효과에 미치는 영향에서는 경련 발작이 억제되었고, 경련발현 시간이 연장되었으며, 사망률 및 사망시간을 유의적으로 억제되었다. 뇌중 GABA 함량 및 GABA-T의 활성에는 별다른 영향이 없었으며, 지질과산화의 함량은 현저히 증가되던 것이 연자육 추출물의 투여로 억제되었다.

시험관내에서 PTZ로 유도된 뇌조직중의 hydroxy radical의 생성량은 methanol, butanol 및 dichloromethane 분획의 첨가(2×10^{-5} g/ml)에서 약 20%에서 최고 35%까지 감소하였다.

감사의 글

이 논문은 2011학년도 경성대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Shackleton, D.P., Westendorp, R.G.J., Kasteleijn-Nolst Trenite, D.G.A., Vandenbroucke, J.P. Mortality in patients with epilepsy: 40 years of followup in a Dutch cohort study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66: 636-640, 1999.
2. Callenbach, P.M., Westendorp, R.G., Geerts, A.T., Arts, W.F., Peeters, E.A., van Donselaar, C.A., Peters, A.C., Stroink, H., Brouwer, O.F. Mortality Risk in Children with Epilepsy: The Dutch Study of Epilepsy in Childhood, *Pediatrics* 107: 1259-1263, 2001.
3. Reuber, M., Fernández, G., Bauer, J., Helmstaedter, C., Elger, C.E. Diagnostic delay in psychogenic nonepileptic seizures. *Neurology* 58(3):493-495, 2002.
4. Baughman, R.W., Gilbert, C.D. Aspartate and glutamate as possible neurotransmitters in the visual cortex. *J Neuroscience* 1(4):427-439, 1981.
5. Aoki, E., Semba, R., Kato, K., Kashiwamata, S. Purification of specific antibody against aspartate and immunocytochemical localization of aspartergic neurons in the rat brain. *Neuroscience* 21(3):755-765, 1987.
6. Halliwell, B. Reactive oxygen species and the central nerve system. *J Neurochem.* 59: 1609-1623, 1992.
7. Coyle, J.T., Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders, *Science* 262(5134):689-695, 1993.
8. Mukherjee, P.K., Pal, S.R., Saha, K., Saha, B.P. Hypoglycemic activity of Nelumbo nuficera rhizome (methanolic extract) in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytotherapy Research.* 9: 522-524, 1995.
9. Mukherjee, P.K., Das, J., Balasubramanian, R., Saha, K., Pal, M., Saha, B.P. Antidiarrhoeal evaluation of Nelumbo nuficera rhizome extract. *Indian J Pharmacol.* 27: 262-364, 1995.
10. Mukherjee, P.K., Giri, S.N., Saha, K., Pal, M., Saha, B.P. Antifungal screening of Nelumbo nuficera (Nymphaeaceae) rhizome extract. *Indian J Pharmacol.* 35: 327-330, 1995.
11. Mukherjee, P.K., Balasubramanian, R., Saha, K., Pal, M., Saha, B.P. Antibacterial efficiency of Nelumbo nuficera

- (Nymphaeaceae) rhizome extract. *Indian Drugs* 32: 274-276, 1995.
12. Hu, M., Skibsted, L.H. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nucifera*). *Food Chemistry* 76: 327-333, 2002.
 13. Seo, J.H., Choi, Y.H., Yoo, M.Y., Hong, K.S., Lee, B.H., Yon, G.H., Kim, Y.S., Kim, Y.K., Ryu, S.Y. Isolation of Dihydrophaseic Acid from Seed Extract of *Nelumbo nucifera*, *Korean J Pharmacognosy* 37: 290-293, 2006.
 14. Song, G.S., Ahn, B.Y., Lee, K.S., Maeng, I.K., Choi, D.S. Effect of hot water extracts from medical plants on the mutagenicity of indirect mutagens. *J Food Sci Technol.* 29: 1288-1294, 1997.
 15. 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 modification of GABAergic system. *J Ethnopharmacol.* 122: 245-250, 2009.
 16. Roussinov, K.S., Azarova, M.B., Atanassova-shopova, S. .On certain relationships between gamma-aminobutyric acid (GABA) and adrenergic mechanisms in convulsive-seizure reaction. *Acta Physiol Pharmacol Bulg.* 2(3):69-76, 1976.
 17. Vogel, H.G. Drug discovery and evaluation-pharmacological assays. Springer Press. pp 422-423, 2007.
 18. Allen, I.C., Griffiths, R. Reversed-phase high performance liquid chromatographic method for determination of brain glutamate carboxylase suitable for use in kinetic studies. *J Chromatography* 336(2):385-391, 1984.
 19. Cupello, A., Larsson, S., Palm, A., Rapallino, M.V. A microelectrophoretic method for the evaluation of GABA transaminase activity. *Neurochemical Research.* 13(7):601-603, 1988.
 20. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yaki, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95(2):351-358, 1979.
 21. Halliwell, B., Gutteridge, M.C., Aruoma, O.I. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem.* 165(1):215-219, 1987.
 22. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Rendall, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-275, 1951.
 23. Hall, E.D., Braugher, M.J. The role of oxygen radical-induced lipid peroxidation in acute CNS trauma. *Oxygen radicals and tissue injury* (Ed Halliwell B.). FASEB Bethesda MD. p 92, 1988.
 24. Carney, J.M., Oliver, C.N., Landum, R.W., Cheng, M.S., Wu, J.F., Floyd, R.A. Reversal of age-related changes in brain protein oxidation decrease in enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci.* 88: 3633-3636, 1991.
 25. Coyle, J.T., Puttfarcken, P. Oxygen stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262(5134):689-695, 1993.
 26. Schwarcz, R., Bennett, J.P. Jr, Coyle, J.T. Inhibitors of GABA metabolism: implications for Huntington's disease. *Ann Neurol.* 2(4):299-303, 1977.
 27. Holdiness, M.R. Chromatographic analysis of glutamic acid decarboxylase in biological samples. *J Chromatography* 277: 1-24, 1984.
 28. Dulac, O., Arthuis, M. Open trials with vaproate in epilepsy. *Epilepsia* 25: S23, 1984.
 29. Elwes, R.D.C., Johnson, A.L., Shorvon, S.D., Reynolds, E.H. The prognosis for seizure control in newly diagnosed epilepsy. *New Engl J Med.* 311: 944-947, 1984.
 30. Callaghan, N., Goggin, T. Adjunctive therapy in resistant epilepsy. *Epilepsia* 29: S29, 1988.
 31. Cohen, G.M., Doherty, M.A. Free radical mediated cell toxicity by redox cycling chemicals. *Br J Cancer Suppl.* 8: 46-52, 1987.
 32. Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R., Schubert, D. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity, *Cell* 77(6):817-827, 1994.
 33. Bejma, J., Ji, L.L. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J Applied Physiology.* 87(1):465-470, 1999.
 34. Valko, M., Rhodesb, C.J., Mocola, J., Izakovica, M., Mazura, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol Interactions* 160(1):1-40, 2006.
 35. Jomova, K., Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol.* 283(2):65-87, 2011.