

천마의 GABA-benzodiazepine 수용체 복합체에 대한 조절작용

하정희 · 이동웅¹ · 어경윤² · 하정상 · 김현주³ · 용철순⁴ · 허 근^{4*}
영남대학교 의과대학, ¹동국대학교 자연과학대학, ²동국대학교 의과대학,
³울산대학교 생명과학부, ^{4*}영남대학교 약학대학

Modulation of Ligand Binding to the GABA-benzodiazepine Receptor Complex by *Gastrodia elata* Blume

Jeoung-Hee HA, Dong-Ung LEE¹, Kyung-Yoon EAH², Jung-Sang HAH,
Hyun-Ju KIM³, Chul-Soon YONG⁴, Keun-HUH^{4*}

College of Medicine and ⁴College of Pharmacy, Yeungnam University,
¹College of Natural Science and ²Medicine, Dongguk University, ³Ulsan University

(Received October 14, 1997; accepted October 28, 1997)

Abstract – Methanol extract of *G. elata* inhibited the binding of [³H]Ro15-1788, a selective benzodiazepine receptor antagonist, to benzodiazepine receptor of rat cortices. Saturation experiments followed by Scatchard analysis of the results showed that the inhibition of [³H]Ro15-1788 binding by *G. elata* appeared to be competitive. These competitive inhibition of the butanol fraction was observed to be higher than the methanol extract. Methanol extract of *G. elata* inhibited a [³H]flunitrazepam, a selective benzodiazepine receptor agonist, binding to benzodiazepine receptor. GABA significantly enhanced the inhibition of [³H]flunitrazepam binding by *G. elata*, and these "positive GABA shift" supported the strong possibility of agonistic activity to benzodiazepine receptor. Butanol fraction was observed to be higher than crude extract by methanol in an agonistic activity to benzodiazepine receptor, furthermore enhanced the binding of [³H]SR95531 to GABA_A receptor. Butanol fraction of *G. elata* significantly diminished the pentylenetetrazole-induced lethality of mice. From these results, it can be concluded that substance or substances with neurochemical properties characteristic of a benzodiazepine receptor agonist may be important components, and contribute to the anticonvulsant property of *G. elata*.

Keyword □ *Gastrodia elata* Bl., anticonvulsant, benzodiazepine receptor agonist, GABA

간질(epilepsy)은 뇌의 특정부위에서 비롯되는 갑작스럽고도 과도한 신경방전(neuronal discharge)에 의해 야기되는 현상으로 의식 상실, 불수의적인 경련, 지각이상, 자율신경 증상 및 정신이상 증상이 복합적으로 또는 별개로 나타나는 발작적 질환이다. 이러한 간질 치료약물로서는 phenobarbital의 많은 유도체가 합성되어 이용되었으며, 근래에는 중추신경계의 중요한 억제성 신경전달체인 γ -aminobutyric acid(GABA)의 작용을 증강시키거나, GABA의 함량을 조절하는 약물들이 현재까지 개발된 간질 치료약물의 주류를 이루고 있다(Hardman 등 1995).

천마(天麻, *Gastrodia elata* Blume)는 난초과(Orchidaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 엽록소가 없어서 탄소동화작

용을 이용한 영양물질의 광합성이 불가능하고, 뿌리도 없으므로 기생하는 곰팡이(Armillaria Mellea)로부터 영양을 공급받아 성장한다. 천마의 근경을 말린 것을 간질치료제 등의 약용으로 이용하고 있었으며, 성분 연구결과 gasterodin, 페놀성 화합물, 유기산, 당 및 β -sitosterol 등 몇 종류의 성분이 분리되었으나 그외의 다른 활성물질에 대한 연구가 더 필요한 실정이다. 한의학계에서는 오래전부터 여러 형태의 간질치료를 사용하고 있었으나 어떤 작용기전을 통해 간질치료제의 약리작용을 나타내는지를 충분히 설명하지 못하고 있다(Taguchi 등, 1981). 천마는 각종 실험동물 및 인체실험에서 진정작용을 나타내었으며, 생쥐 및 guinea pig에서 관찰된 항경련작용은 diazepam과 비교하여 보았을 때 그 약효는 낮으나 부작용이 거의 없다는 실험보고가 있다(Tang 등, 1993).

* To whom correspondence should be addressed.

포유동물의 중추신경계의 중요한 억제성 신경전달체인 γ -aminobutyric acid(GABA)는 GABA_A 수용체 복합체의 GABA 수용체에 결합하여 fast-acting, ligand gated 이온통로를 통한 chloride 이온의 세포내 유입을 증강시킴으로써 세포막을 안정화시킨다. Benzodiazepine 수용체는 GABA_A 수용체 복합체에 위치하는데, benzodiazepine 수용체 ligand에 의해 수용체가 활성화되면, GABA_A 수용체의 활성화가 증가되고 이러한 과정에 의해 benzodiazepine계 약물의 항불안, 진정 및 항경련작용이 매개된다(Stephen, 1996).

천마의 methanol 추출물 중 ether 분획이 흰쥐의 뇌조직에서 GABA의 함량을 증가시켜 항경련작용을 나타낸다는 보고(허근 등, 1995)는 천마의 GABA성 신경전달계에 대한 조절작용을 시사하였으나 GABA_A-benzodiazepine 수용체 결합반응에 미치는 영향에 대해서는 연구된 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 천마의 항경련작용을 관찰하고 그 작용기전을 규명하여 보고자 천마를 극성 및 비극성 용매로 추출하여 분획을 만들고 이들 분획의 GABA-benzodiazepine 수용체 결합반응에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

실험방법

천마 성분의 추출

표준 천연물 추출법(윤혜숙 등, 1993)에 따라 건조된 천마의 근경을 분말로하여 1 kg당 3리터의 methanol을 가한 다음 80°C에서 8시간동안 3회 반복추출하고 여과하여 methanol분획을 얻고 농축하였다. 여기에 증류수를 가하여 완전히 현탁시킨 후 그 현탁액에 ether 1리터를 가하고 분별 깔대기에서 3회 추출하여 ether 분획을 얻었다. 남은 수층(현탁액)에 150 ml의 n-butanol을 가하고 추출하여 butanol 분획을 얻고 이 분획을 감압, 농축하였다. 수층을 다시 chloroform으로 추출, 농축하여 chloroform 분획을 얻었다(Fig. 1). 각각의 농축한 분획을 동결건조기로 완전 건조시킨 것을 50 mM Tris-citrate 완충용액에 현탁하여 실험에 사용하였다.

수용체 결합반응에 대한 천마의 영향

Benzodiazepine 수용체 표본제작을 위하여 흰쥐(웅성, 250-300 g, Sprague-Dawley)는 단두 후 희생시켜, 즉시 대뇌피질조직을 분리하였다. 대뇌피질조직은 무게를 잰 후 50배 부피의 50 mM Tris-citrate 완충용액(pH=7.4)에서 균질화(Homogenization)하였다. 균질화한 조직은 원심분리기(20,000 g, 4°C, Beckman, USA)를 사용하여 20분간 원심분리시킨 후 그 결과 생겨나는 침전물은 다시 50배 부피의 Tris-Citrate 완충용액에 재분배(resuspension) 시켰다. 이와 같은 과정을 3~5번 반복한 후 최종적인 조직침전물을 완충용액에 재분배시킨 후 사용전까지 -70°C에 보관하였다.

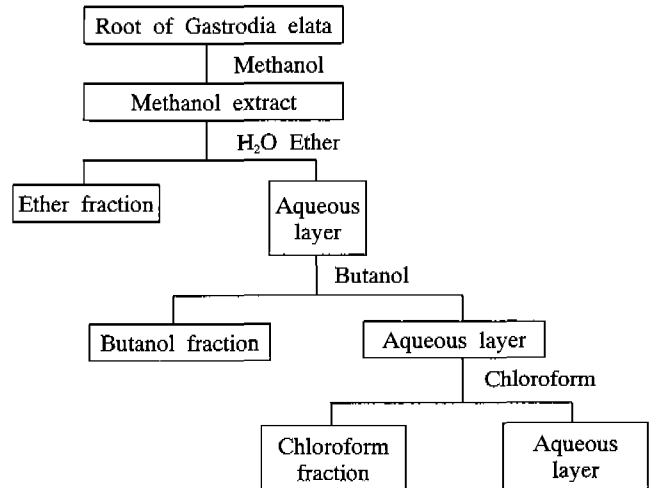


Fig. 1. Preparation of extracts of *G. elata*.

Benzodiazepine 수용체 결합반응(receptor binding assay)을 위한 [³H]Ro15-1788(specific activity=87.0 Ci/mmol) 및 [³H] flunitrazepam (specific activity=82.0 Ci/mmol) 결합반응에서는 각 시험관 당 50 μ l의 대뇌피질조직(약 0.16 mg 단백질에 해당), 50 μ l의 방사성 동위원소와 50 μ l의 각종 약물(천마 추출액포함)을 사용하였으며, 50 mM Tris-Citrate 완충용액을 첨가하여 총 부피 500 μ l가 되게 하였다. GABA_A 수용체에 대한 방사성 배위자 결합반응을 위하여 [³H] SR95531(2-(carboxypropyl)-3-amino-6-(4-methoxyphenyl)pyridinium bromide, specific activity=49.0 Ci/mmol)을 사용하였으며(Williams 등, 1979; Heaulme 등, 1994), 각 시험관내에 100 μ l의 피질조직(약 0.32 mg의 단백질에 해당함)을 첨가하였다. 모든 assay는 duplicate 혹은 triplicate로 하여 적어도 한 실험을 6회 이상 반복하였다. [³H]Ro15-1788 결합반응을 위한 실험은 혼합물이 든 시험관들을 실온에서, [³H]flunitrazepam 및 [³H]SR95531 결합반응을 위해서는 0~4°C에서 각각 한 시간 방치시킨 후, GF/B 여과지(Whatman)상에서 Brandel M-24R(Brandel Instruments, Gaithersburg, MD, USA)을 사용하여 결합분획과 비결합분획을 신속히 분리하였다. 여과지상의 결합분획이 내는 방사성 활성도는 liquid scintillation counter(Beckman LS 5801)을 사용하여 측정하였다. 제작한 대뇌피질 조직의 단백질 함량은 bicinchoninic acid법(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 측정하였다.

Benzodiazepine 수용체에 대한 선택적 길항제인 [³H]Ro15-1788의 결합 반응에서 천마추출물에 함유되어 있는 benzodiazepine 수용체에 대한 억제성물질의 총량의 측정은 동일한 조건하에서 이루어진 이미 알고 있는 용량의 diazepam을 사용하여 반응검사 결과 얻어진 competition 곡선을 비교, 분석하여 계산하였다. 천마추출물내의 benzodiazepine 수용체 활성물질의 활성도의 총량은 'diazepam equiv-

alent'(ng diazepam/g weight)로 표시하였다.

GABA_A 수용체에 대한 선택적인 길항제인 [³H]SR95531의 결합반응에서 천마추출물에 의한 수용체 결합의 변화 정도는, 천마추출물이 존재하지 않을 때의 결합정도를 100%로 보고 천마추출물에 의한 결합 증강률(percent enhancement)로 나타내었다.

항경련작용 검색

생쥐(ICR)에 pentylenetetrazole 100 mg/kg을 피하주사하여 경련을 유발시켰다. 천마의 butanol 분획을 경구투여 30분 후 같은 방법으로 pentylenetetrazole을 투여하여 관찰되는 실험동물의 사망률과 생리식염수 투여 후의 pentylenetetrazole에 의한 사망률을 비교하였다.

통계 처리

수용체 결합반응에서 얻어진 결과는 nonlinear regression 시켜(Graphpad Prism, Graphpad Software, Sandiago, CA, USA) 분석하였으며, 각군간의 성적변화의 통계학적 유의성 검정은 ANOVA로 분석후 Neuman-Keul's multiple comparison test를 사용하였다.

사용 시약 및 약물

방사성 동위원소는 Dupont-NEN(Boston, MA, USA)사에서 구입하였으며, diazepam 및 Ro 14-7437은 Roche사 제품을 사용하였다. Tris, citric acid, GABA, polyethyleneamine, sodium chloride, sucrose 등의 시약은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, SR95531은 RBI(Research Biochemical International Inc, Natick, MA, USA)로부터 구입하였다. Scintillation cocktail(Aquasol-2)은 Packard사(Packard instrument B.V. Chemical operations, Groningen, Netherlands)에서 구입하였다. 제작한 각종 조직표본의 단백질 정량을 위하여 bicinchoninic acid 정량 kit을 Pierce(Rockford, IL, USA)사로부터 구입 사용하였다.

실험결과

천마의 methanol 추출물분획은 중추성 benzodiazepine 수용체 길항제인 [³H]Ro15-1788의 수용체 결합을 억제하였는데, 이러한 억제성 활성도(diazepam equivalent, ng/g weight)는 butanol분획의 경우가 10.9±0.78 µg/g weight로서, methanol추출물의 0.9±0.42에 비하여 유의하게(p<0.01) 높았으며, ether분획의 5.1±0.26 및 chlorform분획의 7.2±0.42 µg/g weight에 비하여 유의하게(p<0.05) 높은 활성도를 보였다(Table 1).

천마의 methanol추출물은 중추성 benzodiazepine 수용체 길항제인 [³H]Ro15-1788을 사용한 benzodiazepine수용체 포함결합반응의 상수(constant)를 변화시켰는데, 천마의 추출액 존재하에서 결합반응의 Kd는 8.7±0.59 nM로서 대조군의 5.1±0.48 nM에 비하여 유의하게(p<0.05) 증가하였다.

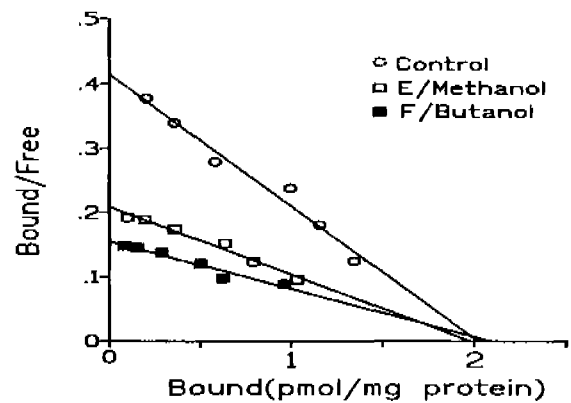
Table 1. Inhibition of [³H]Ro15-1788 binding to rat cerebral cortical membranes by *G. elata*

<i>G. elata</i>	Diazepam Equivalents (µg/g)
Methanol extract	0.9±0.42
Ether fraction	5.1±0.26
Butanol fraction	10.9±0.78*

Values represent mean±SE of 9 experiments. *p<0.05: Significantly different from others.

천마의 methanol추출액 존재하에서 결합반응의 B_{max}는 1.4±0.52 pmol/mg protein로서 대조군의 1.6±0.16 pmol/mg protein에 비하여 유의한 차이가 없었다(Fig. 1). 천마의 butanol분획은 중추성 benzodiazepine 수용체 길항제인 [³H]Ro 15-1788을 사용한 benzodiazepine 수용체 포함결합반응의 상수를 변화시켰는데, 천마의 butanol분획 존재하에서 결합반응의 Kd는 12.4±1.67 nM로서 대조군의 5.1±0.48 nM, 천마 methanol추출물의 8.7±0.59 nM에 비하여 유의하게(p<0.05) 증가하였다. 천마의 butanol분획 존재하에서 결합반응의 B_{max}는 1.5±0.64 pmol/mg protein로서 대조군의 1.6±0.16 pmol/mg protein, 천마 methanol 추출물의 1.4±0.52 pmol/mg protein에 비하여 유의한 차이가 없었다(Fig. 2).

천마의 methanol 추출물은 중추성 benzodiazepine 수용체 효현제인 [³H]flunitrazepam의 수용체 결합을 6.5±1.93%



	Kd (nM)	B _{max} (pmol/mg protein)
Control	5.1±0.48	1.6±0.16
<i>G. elata</i> (E/Methanol)	8.7±0.59*	1.4±0.52
<i>G. elata</i> (F/Butanol)	12.4±1.67*	1.5±0.64

Fig. 2. Effect of *G. elata*, on the [³H]Ro15-1788 binding to the benzodiazepine receptor of rat cortices (A: Scatchard-Rosenthal Plot, B: Kd and B_{max}).

E/Methanol; group treated with methanol extract of *G. elata* F/Butanol; group treated with butanol fraction of *G. elata*

Values represent mean±SE of 7 experiments.

*p<0.05: Significantly different from control.

억제시켰다. 20 μ M GABA 및 120 mM NaCl 존재하에서 흰쥐대뇌피질막의 benzodiazepine 수용체에 대한 [3 H]flunitrazepam 결합은 66%까지 증가하였으나, 천마의 methanol 추출물 존재하에서는 결합이 억제되었으며, 그 억제도는 $13.4 \pm 2.93\%$ 로써 대조군의 $6.5 \pm 1.93\%$ 에 비하여 유의하게 ($p < 0.05$) 항진되었다(Table 3). 천마의 butanol 분획은 중추성 benzodiazepine 수용체 효현제인 [3 H]flunitrazepam의 수용체 결합을 $30.1 \pm 1.22\%$ 억제시켜, 천마의 methanol 추출물의 $6.5 \pm 1.93\%$ 에 비하여 유의하게 증가되었다. 천마의 butanol 분획 및 20 μ M GABA 존재하에서 [3 H] flunitrazepam 결합반응 억제도는 $45.4 \pm 1.45\%$ 로써 대조군의 $30.1 \pm 1.22\%$ 에 비하여 유의하게 ($p < 0.05$) 항진되었다(Table 2).

천마의 methanol 추출물 분획은 GABA_A 수용체 길항제인 [3 H]SR95531의 수용체 결합을 억제하였는데, ether 분획, butanol 분획 및 chlorform 분획에서는 [3 H]SR95531의 수용체 결합을 용량의존적으로 증강시켰다(Fig. 3).

생쥐에 pentylenetetrazole을 100 mg/kg을 주사하였을 때

Table 2. Effect of GABA on inhibition of [3 H]flunitrazepam binding by *G. elata*

<i>G. elata</i>	Percent Inhibition
E/Methanol	6.5 ± 1.93
GABA+E/Methanol	$13.4 \pm 2.93^*$
F/Butanol	$30.1 \pm 1.22^*$
GABA+F/Butanol	$45.4 \pm 1.45^*$

Data are mean \pm SE values from 7 observations.

E/Methanol; group treated with methanol extract of *G. elata*

GABA+E/Methanol; group treated with methanol extract of *G. elata* and 20 μ M GABA

F/Butanol; group treated with butanol fraction of *G. elata*

GABA+F/Butanol; group treated with butanol fraction of *G. elata* and 20 μ M GABA

* $p < 0.05$: Significantly different from E/Methanol group.

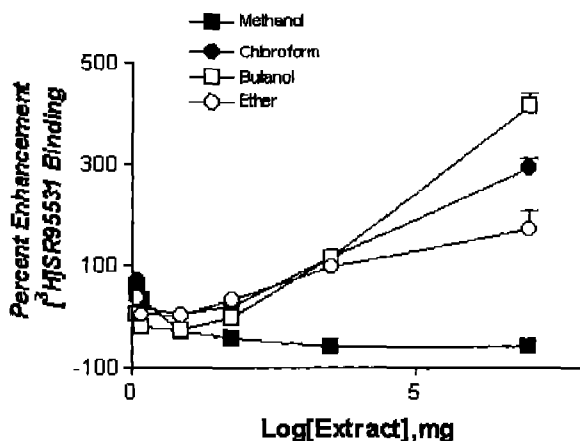


Fig. 3. Effect of *G. elata* on the [3 H]SR95531 binding to the GABA_A receptor of rat cortices

Values represent mean \pm SE of 7 experiments.

Table 3. Reduction of pentylenetetrazole-induced lethality by butanol fraction of *G. elata*

	Percent lethality
Control	55 ± 5.6
<i>G. elata</i>	$10 \pm 2.7^*$

Values represents mean \pm SE of 70 experiments.

* $p < 0.05$: Significantly different from control.

전신성 강직성-간대성 경련(generalized tonic-clonic seizure)을 나타내었으며, 그 중 일부는 사망하였는데, 천마의 butanol 분획 처치군에서는 그 사망률이 $10 \pm 2.7\%$ 으로서 생리식염수투여군의 $55 \pm 5.6\%$ 에 비하여 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다(Table 3).

고 찰

천마(*Gastrodia Rhizoma*)는 *Gastrodia elata* Blume(Orchidaceae)를 건조시킨 근경(tuber)이다. 이것은 늦은 가을부터 이른 봄 사이에 추수하여 수증기조에서 가열한 후 실온에서 건조시킨다. 현기증, 전신마비, 간질 및 과상풍 등의 질환에서 항경련, 진통 및 진정 목적으로 사용되었던 전통 민간약제이다. Gastrodin는 새로운 phenolic glycoside로서 천마의 유효성분을 분리하는 연구실험에서 처음 분리된 활성 물질이다. *G. Elata*내의 gastrodin 함량은 추수장소와 시기에 따라 다양한데, 9월군이 0.31%, 12월군이 0.23% 및 7월군이 0.93%이며, 야생군이 양식군보다 함량이 높다고 한다. Gastrodin 외에도 aglycone인 4-hydroxybenzyl alcohol, 4-hydroxybenzaldehyde, succinic acid, citric acid 및 이들의 monoethyl ester, palmitic acid, sucrose, β -sitosterol, daucosterol 등이 함유되어 있음이 보고(Taguchi 등, 1981)되었다. Gastrodin과 이의 aglycone인 4-hydroxybenzyl alcohol은 생쥐에게 5 g/kg 이하의 용량을 투여하였을 때 독성이 관찰되지 않았으며, 각종 실험동물 및 인체실험에서 진정작용을 나타내었다. 또 생쥐 및 해명에서 항경련작용을 관찰하였으며, 이러한 약리작용은 diazepam과 비교하여 보았을 때 그 약효는 낮으나 부작용이 없는 것으로 나타났다(Tang 등, 1993). 최근 천마는 중추신경계의 억제성 신경전달체인 GABA성 신경전달을 조절함으로써 항경련작용을 나타낼 것이라는 가능성이 보고되었다(허 근 등, 1995). γ -Aminobutyric acid(GABA)는 포유동물의 중추신경계의 중요한 억제성 신경전달체이다. Benzodiazepine 수용체는 GABA_A 수용체 복합체의 중요한 요소로서 benzodiazepine계 약물의 항불안, 진정, 항경련 및 근육이완작용 등의 생체내 반응을 매개한다(Stephen, 1996).

Benzodiazepine계 약물은 실험동물 및 인체의 여러 형태의 간질성경련에서 항경련작용을 나타내나, 장기간 사용할 때 내성 및 의존성의 발현이 문제점으로 알려져 있다(Wil-

liams 등, 1979; Basile 등, 1989). 그러므로 내성 및 의존성이 낮은 새로운 benzodiazepine 수용체 배위자의 개발은 필수적이며, 이러한 목적으로 두 방향의 연구가 진행중이다. 첫번째 노력은 부분효현제(partial agonist)의 개발인데, imidazobenzodiazepine bretazenil (Ro16-6028)같은 부분효현제는 전효현제(full agonist)인 diazepam과 동일한 분획의 수용체를 점유하였을 때 diazepam에 비하여 더 낮은 반응을 나타낸다. 이 약물은 실험동물에서 항경련작용에 대한 내성을 유발하지 않으며, 육체적 의존성도 거의 없는 것으로 밝혀졌다(Heulme 등, 1994; Woods 등, 1987). 두번째의 노력은 benzodiazepine 수용체 subtype 선택적 효현제(selective agonist)로서 β -carboline abecarnil같은 약물이 이에 속하며 수용체 subtype 비선택적인 효현제(nonselective agonist)인 diazepam이 나타내는 여러 범주의 약리작용들 중 일부 작용만 나타낸다. 이들은 감약된 내성 및 의존성을 가진다는 것이 여러 종의 동물실험 및 인체실험 결과 밝혀졌다(Woods 등, 1987; Haefely 등, 1990). 이러한 보고들을 고려하여 볼 때 benzodiazepine 수용체의 부분효현제나 수용체 subtype 선택적 효현제의 성질을 가진 새로운 benzodiazepine 수용체 배위자의 개발은 간질의 치료적 측면에서 아주 중요하다.

Benzodiazepine 수용체에 작용하는 화합물로는 diazepam, DMCM 및 flumazenil과 같은 합성 배위자(ligand)들이 있으며, 그 외에도 내인성(endogenous) benzodiazepine 수용체 배위자가 보고(Brabcova 등, 1993; Steppun 등, 1993; Rundfeldt 등, 1995)되었다. 내인성 benzodiazepine 수용체 배위자는 체내에서 합성되거나 혹은 외부에서 섭취되어 저장되어 있다가 생리적 신호에 의해 유리되어 호르몬이나 신경전달체처럼 작용하리라 생각되는 천연물질이다. 이미 1,4-benzodiazepine, β -CCE, inosine 및 diazepam binding inhibitor(DBI) 등이 그 후보물질로 보고(De Blas 등, 1987; Piva 등, 1991; Ha 등, 1996)되었으나 더 많은 연구가 필요한 실정이다. 이 내인성물질은 합성 benzodiazepine계 약물과 마찬가지로 GABA성 신경전달 조절작용을 가진다고 보고(Basile 등, 1990a; Basile 등, 1990b; Basile 등, 1991; Medina 등, 1991; Medina 등, 1992; Medina 등, 1993; Drugan 등, 1994)되었다.

이 물질은 감자의 근경(tuber), 쌀, 밀 등 보통의 식이(diet)나 일부 약용식물에서 발견되는 자연산물로서 식이를 통한 물질 자체 혹은 그 전구체의 섭취가 가능하며 그 후 장내 미생물에 의해 변환을 받을 수 있으며, neuron 및 glia에서의 내인성합성 등이 기대되는 것으로 최근 이에 대한 보고(Basile 등, 1990b; Medina 등, 1991; Medina 등, 1992; Medina 등, 1993; Viola 등, 1994; Yurdaydin 등, 1995)가 증가되고 있는 실정이다. 이러한 내인성 물질의 규명을 위한 연구의 한 방법으로 진통약제들 중 진정수면제 및 항경련

제를 대상으로 약제의 유효구성 단일성분을 추적 중에 있으며 이러한 목적의 초보단계로 본 연구가 고안되었다.

실험결과 천마의 메탄올 추출물은 benzodiazepine 수용체 길항제인 [3 H]Ro15-1788 결합을 억제하였으며, 포함결합반응 결과, 천마추출물은 [3 H]Ro15-1788의 수용체 결합에 대한 최대 결합력(B_{max})은 변화시키지 않고, 친화력(affinity)을 감소시킴으로써 상경적인 결합양상을 나타내었다. 이러한 수용체 활성도를 나타내는 구성성분을 추적하고자 천마추출물의 분획화를 실시하여 얻은 각 분획들의 수용체 활성도를 검색한 결과 butanol분획에서 가장 높은 활성도를 관찰하였으며, 그 활성도는 crude한 메탄올 추출물에서의 활성도에 비하여 유의하게 증가하였다. Butanol분획의 수용체 결합양상은 상경적으로 그 친화력이 감소되었는데, 감소된 정도는 crude한 메탄올 추출물에서의 그것에 비하여 유의하게 증가하였다. 이러한 결과로 보아 천마는 수용체 길항제인 [3 H]Ro15-1788의 benzodiazepine 수용체에 대한 결합을 상경적으로 방해하는 물질을 포함하고 있음을 추측할 수 있었다.

천마의 메탄올 추출물은 benzodiazepine 수용체의 효현제인 flunitrazepam의 수용체 결합반응을 억제시켰는데, 이러한 억제도는 GABA 및 chloride 존재하에서 항진되는 즉 positive GABA shift현상을 관찰하였다. 이러한 positive GABA shift현상은 천마내의 benzodiazepine 수용체 활성물질이 효현제 성질(Basile 등, 1989; Ha 등, 1996)을 가지고 있음을 강력히 뒷받침해주는 결과이다. 이러한 positive GABA shift 현상은 천마의 butanol 분획에서도 관찰되었으며, 그 정도는 crude한 methanol 추출물에 비하여 유의한 증가현상을 나타내었다.

천마추출물의 GABA_A 수용체 복합체의 여러 요소 중 GABA 결합부위에 대한 영향을 알아보기 위하여, [3 H]SR95531 결합반응에 미치는 천마추출물의 영향을 검색하였으며, 그 결과 천마의 methanol 추출물은 용량의존적으로 [3 H]SR95531의 수용체 결합을 억제하였으나, ether, butanol 및 chloroform 분획은 결합을 용량의존적으로 증가시킴으로써 천마내의 benzodiazepine 수용체 효현성분에 의해 GABA 결합부위의 활성화가 증가 되었음을(Stephen, 1996) 확인할 수 있었다.

지금까지 시험관내 실험을 통해 관찰한 천마내의 benzodiazepine 수용체 효현성분의 약리작용을 생체실험을 통하여 확인하고자 생쥐에게 pentylenetetrazole 투여로 유발한 경련모델에게 천마의 butanol 추출물을 투여하여 보았는데, 천마의 butanol분획을 경련유발 전에 투여한 군에서는 pentylenetetrazole에 의한 사망률이 유의하게 감소하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 천마의 butanol분획내에는 benzodiazepine 수용체에 대해 효현제 활성을 지니는 물질이 있음을 추측할 수 있으며, 이러한 물질에 의한 GABA성

신경전달의 항진작용이 천마의 항경련작용의 중요한 기전으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 1997년도 보건복지부 보건의료기술 연구개발사업(의약품분야/신약탐색연구) 연구비지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Basile, A. S., Gammal, S. H., Jones, E. A. and Skolnick, P. (1989). Characterization of the GABA-benzodiazepine receptor supramolecular complex in thioacetamide-treated rats: evidence for the presence of endogenous ligands for the benzodiazepine receptor in hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.* **53**, 1057-63.
- Basile, A. S., Ostrowski, N. L., Gammal, S. H., Jones, E. A. and Skolnick, P. (1990a). The GABA_A receptor complex in hepatic encephalopathy: autoradiographic evidence for the presence of elevated levels of a benzodiazepine receptor ligand. *Neuropsychopharmacology*. **3**, 61-71.
- Basile, A. S., Pannell, L., Jaouni, T., Gammal, S., Fales, H. M., Jones, E. A. and Skolnick, P. (1990b). Brain concentration of benzodiazepines are elevated in an animal model of hepatic encephalopathy. *Proc. Natl. Aca. Sci.* **87**, 563-567.
- Basile, A. S., Jones, E. A., Skolnick, P. (1991). The pathogenesis and treatment of hepatic encephalopathy: evidence for the involvement of benzodiazepine receptor ligands. *Pharmacol. Rev.* **43**, 28-71.
- Brabcova, R., Kubova, H., Velisek, L. and Mares, P. (1993). Effects of a benzodiazepine, bretazenil (Ro16-6028), on rhythmic metrazol EEG activity: Comparison with standard anticonvulsants. *Epilepsia*. **34**(6), 1135-40.
- De Blas, A. L., Park, D. and Friedrich, P. (1987). Endogenous benzodiazepine-like molecules in the human, rat and bovine brains studies with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Brain. Res.* **413**, 264-75.
- Drugan, R. C., Basile, A. S., Ha, J. H. and Ferland, R. J. (1994). The protective effects of stress control may be mediated by increased brain levels of benzodiazepine receptor agonists. *Brain. Res.* **661**, 127-36.
- Ha, J. H., Pannell, L., Drugan, R. C., Ferland, R. and Basile, A. S. (1996). Extraction of benzodiazepine receptor ligands from mammalian tissues. In *Neuroscience Protocols*, pp 1-12, Elsevier Sciences, Amsterdam.
- Haefely, W., Martin, J. R. and Schoch, P. (1990). Novel anxiolytics that act as partial agonists at benzodiazepine receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* **11**, 452-6.
- Heaulme, M., Chambon, J. P., Leyris, R., Wermuth, C. G. and Biziere, K. (1994). Specific binding of a phenyl-pyridazinium derivative endowed with GABA_A receptor antagonist activity to rat brain. *Neuropharmacol* **25**: 197-204.
- Mcnamara, J. O. (1995). Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In *pharmacological basis of therapeutics* (Hardman, J. G., Limbard, L. E. Ed), pp 461-86, McGraw-Hill, New York.
- Medina, J. H., Danelon, J. L., Wasowski, C., Levi de Stein, M. and Paladini, A. C. (1991). Production of benzodiazepine-like compounds in bovine rumen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1046-55.
- Medina, J. H., Pena, C., Piva, M., Wolfman, C., de Stein, M. L., Wasoski, C., Da Cunha, C., Izquierdo, I. and Paldini, A. C. (1992). Benzodiazepines in the brain. *Molecul. Neurobiol.* **6**(4), 377-86.
- Medina, J. H., Paladini, A. C. and Izquierdo, I. (1993). Naturally occurring benzodiazepines and benzodiazepine-like molecules in brain. *Brain. Res.* **660**, 1-8.
- Piva, M., Medina, J. H., de Blas, A. L. and Pena, C. (1991). Formation of benzodiazepine-like molecules in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **180**, 961-72.
- Rundfeldt, C., Wlaz, P., Honack, D. and Loscher, W. (1995). Anticonvulsant tolerance and withdrawal characteristics of benzodiazepine receptor ligands in different seizure models in mice. Comparison of diazepam, bretazenil and abecarnil. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**(2), 693-702.
- Stephen, M. S. (1996). Anxiolytics and sedative-hypnotics. In *Essential psychopharmacology*. pp. 167-215, Cambridge University Press, New York.
- Steppun, K. G., Schneider, H. H., Turski, L. and Stephens, D. N. (1993). Long-term treatment with abecarnil does not induce diazepam-like dependence in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **264**, 1395-400.
- Taguchi, H., Yoshioka, I., Yamasak, I. K. and Kim, I. H. (1981). Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume. *Chem. Pharm. Bull.* **29**(1), 55-62.
- Tang, W. and Eisenbrand, G. (1993). In *Chinese drugs of plant origin*. pp 545-8, Springer-verlag, Berlin.
- Viola, H., Wolfman, C., de Stein, M. L., Wasoski, C., Pena, C., Medina, J. H. and Paldini, A. C. (1994). Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). *J. Ethnopharma.* **44**, 47-53.
- Williams, M. and Risley, E. A. (1979). Characterization of the binding of [³H]muscimol, a potent γ -aminobutyric acid agonist, to rat brain synaptosomal membranes using a filtration assay. *J. Neurochem.* **32**: 713-718.
- Woods, J. H., Katz, J. L. and Winger, G. (1987). Abuse liability of benzodiazepines. *Pharmacol. Rev.* **39**, 251-419.
- Yurdaydin, C., Walsh, T. J., Engler, D. E., Ha, J. H., Li, Y., Jones, E. A. and Basile, A. S. (1995). The role of gut bacteria in the accumulation of benzodiazepine receptor ligands in a rat model of hepatic encephalopathy. *Brain. Res.* **679**, 42-8.
- 강삼식, 김영호, 김진웅, 노동석, 성열익, 성충기, 손건호, 정지형, 최재수 (1993). 전통 약물로부터 신약개발연구법, pp 9-15, 서울대학교 천연물과학연구소(윤혜숙, 장일무 발간), 서울.
- 허근, 이수진, 신역섭, 박종민 (1995). 천마의 항경련 작용기전 연구. *응용약물학회지* **3**: 199-204.