

파극천 추출물이 펜틸렌테트라졸로 유도된 실험동물에서 항 뇌전증 작용

허진선, 최종원^{1*}

아이케이사이언스㈜, ¹경성대학교 약학과

Anti-epilepsy Effect of Methanol Extract of *Morinda officinalis* Augments Pentylenetetrazol-Induced Convulsion Behaviors

Jin-sun Heo and Jong-won Choi^{1*}

IK science Co., Ltd. Busan 608-810, Korea

¹Department of Pharmacology, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

Abstract - *Morinda officinalis* (MO) is a oriental medicinal herb which has been used traditionally for the treatment of impotence, anti-inflammatory, menstrual irregularity action and various brain diseases including antidepressant and anti-stress. In order to examine the mechanism of anticonvulsive effect, we treated the methanol extract of MO (100, 200 mg/kg, P.O) to the sleeping time and pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsive mice. The methanol extract of MO prolonged sleep time by pentobarbital. Dose-dependent of methanol extracts of MO were effected the concentration of GABA and GABA-T activity in the brain of PTZ-induced mice. Methanol extracts of MO 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 ($5.0 \times 10^{-2} \sim 20.0 \times 10^{-2}$ g/ml).

Key words - *Morinda officinalis*, Sleeping time, Anti-epilepsy, Antioxidant

서 언

파극천(*Morinda officinalis*)은 꼭두서니과(*Rubiaceae*)에 속하는 다년성 초본의 뿌리로 한방에서는 신양을 보양하고 뼈와 근육을 튼튼하게 하며 풍사를 몰아내고 습사를 없애는 효능이 있어 음위, 소복부의 차갑고 통증이 있는 것, 요실금, 자궁이 허하고 냉한 것, 풍한습으로 인한 저린 증상과 무릎과 허리가 아픈 것을 치료하는 약재로 이용된다(Kim, 2004.). 약리작용으로는 추출물을 이용한 항우울증, 항스트레스, 면역기능 강화, 소염작용과 남자에게는 발기불능증, 여성에게는 월경불순 및 소변실금 등의 치료에도 처방(Ji and Lee, 1989; Kim *et al.*, 1988) 되는 것으로 파극천의 주요성분으로는 비타민 C와 당류, rubiadine,

physson, palmitic acid, nonadecane, morindoleide, tectoquinone, oxositosterol등의 다양한 성분이 보고되고 있다(Chang and Lee, 1984; Masayuki *et al.*, 1995). 이들 성분중 anthraquinone류 화합물은 항암활성(Hiramatsu *et al.*, 1993; Sedeghi-Aliabadi *et al.*, 2004) 및 항바이러스(Kotama *et al.*, 2001; Taloua *et al.*, 2001)등의 치료 효과에 대하여서도 연구되고 있으나 뇌전증 즉, 간질에 대하여서는 아직 보고되고 있지 않는 실정이다. 현재 이들의 경련성 질환의 치료제인 항경련성 약물은 신약에서 많이 개발되고 있으나 이들 약물의 상호작용 및 약물 독성에 대한 문제가 심각하며, 질병의 특성상 장기적인 치료가 불가피하므로 이들 약물에 대한 내성 문제도 대단히 심각하게 대두되고 있는 실정에서 천연자원 물질로부터 새로운 물질을 찾고자 많은 학자(Ha *et al.*, 1999; Martin and Hui, 2008)들에 의하여 시도되고 있으나 아직까지 대단히

*교신저자(E-mail) : jwchoi@ks.ac.kr

미흡한 실정이다. 경련의 발생 기전은 정확하게 밝혀지고 있지 않으며 최근에 와서 중추의 흥분성 신경 전달 기능과 억제성 전달 기능사이의 균형 소실이 발작의 원인이라는 학설이 제시된 후 중추신경계에서 흥분성 또는 억제성 신경 전달 물질로 작용하는 아미노산들이 관심의 대상이 되고 있다(Baughman and Gilbert, 1981; Aoki *et al.*, 1987). 간질등과 같이 뇌조직의 퇴행성 기능장애를 초래하는 질환들의 병태생리학적 현상들은 활성산소종의 생성과 분해기구의 조절 증이 상실 되어질 때 잔존하는 과량의 활성산소들이 뇌조직 중의 불포화지방산을 과산화 시켜 세포막의 손상을 유도하는 산화적 스트레스 유도과정과 밀접한 관계를 갖고 있음이 밝혀지고 있다(Halliwell, 1992; Coyle and Puttfarcken, 1993). 이에 본 연구에서는 파극천의 메탄올 추출물을 이용하여 진정효과와 항 뇌전증 작용기전 및 시험관 내에서 파극천의 각 분획별로 항산화 작용을 검토하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 시험에 사용한 ICR계 30-35 g의 수컷 생쥐를 효창사이언스(주)(대구, 한국)에서 구입하여 본 대학교 동물사에서 일정한 조건(온도: $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 습도: 46-60%, 명암 : 12 시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 검역과 순화 사육을 거친 건강한 동물로 실시되었다. 사료는 실험동물용 고품 사료(천하제일사료, 대전, 한국), 음수는 상수도를 자유 섭취시켰다. 이때 효소 활성의 일종의 변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다.

실험재료

실험재료는 부산진 시장(부산시 동구 범일동)의 약제사에서 구입하였으며 본 대학교 생물학과 문 성기 교수에게 검증을 받은 후 표본은 약학대학 생약학교실에 보관하고 있는 파극천을 먼지 등의 부착물을 제거할 목적으로 세척한 후 건조하여 사용하였다. 건조된 파극천을 분말로 하여 1 kg당 3L의 methanol을 가한 다음 70°C 에서 5시간 간격으로 3회 반복추출하고 여과하여 methanol분획(243 g)을 얻고 농축하였다. 여기에 증류수를 가하여 완전히 현탁시킨 후 현탁액에 ether를 가하여 분별 깔대기에서 3회 분리하여 ether분획(46 g)을 얻었다. 남은 여액에 n-butanol을

가하고 분리하여 butanol분획을 감압농축(21 g)하였다. Butanol분획에 다시 dichloromethane(CH_2Cl_2)을 가하여 혼합한 후 CH_2Cl_2 로 이행되는 부분을 분별 깔대기에서 분리하여 감압농축하고 CH_2Cl_2 분획(8.5 g)으로 하였다. 이렇게 얻어진 파극천 추출물은 생리식염수에 용해한 1% 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.

수면유도 및 수면시간 측정

생쥐 10마리를 한 군으로 하여 사료를 경구투여 한 30분 후 pentobarbital sodium(42 mg/kg)을 복강 주사하였다. 15분 이내에 수면을 취하지 않는 동물은 실험에서 배제하였고, 정향반사 소실을 지표로 수면효과를 관찰(정향 반사가 소실되는 시점부터 정향반사가 회복되는 시점까지의 시간)하였다. 대조물질로는 muscimol(0.2 mg/kg)을 경구투여 하였다(Wolfman *et al.*, 1996).

항경련 효과

경련상태는 Roussinov 등의 방법(Roussinov *et al.*, 1976)에 따라 경련발작 정도를 5단계로 구분하여 각 단계에서 발생하는 경련의 횟수의 곱을 모두 합하고 이것을 다시 전체 경련횟수로 나누어 경련강도(severity)를 산출하였다. 또한, Vogel의 방법(Vogel, 2007)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.

뇌 조직중 GABA 함량 및 GABA-T의 활성 측정

GABA 함량 측정(Allen and Griffthis, 1984)은 뇌 조직을 1 mM aminoethyl-isothiuronium bromide와 2 mM pyridoxal-5'-phosphate를 포함하는 0.3 M triethanolamine buffer(pH 6.8)로 10% 마쇄균질액을 조제한 다음 15,000 × g에서 20분간 원심분리 하여 얻은 postmitochondria분획을 일정량의 200 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 첨가한 후 빙냉의 ethanol로 제단백 시켰다. 이것을 원심분리 하여 얻은 상청액을 membrane filter를 사용

하여 여과한 다음 여액 중에 함유된 GABA의 함량을 고속 액체 크로마토그래프를 이용하여 분리시킨 후 표준품의 유지시간(GABA: 11.3분)과 비교 확인한 후 표준 검량선에 준해 그 함량을 산정하였다. GABA의 함량은 조직 단백질 1 mg당 nmole로 나타내었다. GABA-T의 활성(Cupello *et al.*, 1988)은 일정량의 0.15 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 60 mM α -ketoglutaric acid 100 μ l와 기질인 4 μ M GABA 50 μ l 및 조제 된 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.

과산화지질 함량 측정

Ohkawa 등의 방법(Ohkawa *et al.*, 1979)에 준해 조직 마쇄 균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 95°C에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-butanol : pyridine(15:1)혼액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 단백 1 mg당 malondialdehyde (MDA)의 양을 nmole로 나타내었다.

Hydroxyl radical scavenging 효과 측정

Halliwell 등의 방법(Halliwell *et al.*, 1987)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, 1

mM hydrogen peroxide, 100 μ M ascorbate를 최종부피가 3 ml 되게 가하여 1시간 동안 37°C에서 반응시켜 이때 hydroxyl radical에 의해 생성되는 malondialdehyde의 함량을 과산화지질 함량 측정법과 동일한 방법으로 측정하였다.

단백질 정량 및 통계처리

단백질의 함량(Lowry *et al.*, 1951)은 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA)을 표준 품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치 \pm 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결 과

수면연장 시간

파극천 추출물 투여에 의한 수면시간을 알아보기 위하여 4주간 파극천 추출물을 경구 투여하고, 투여 마지막 날 pentobarbital을 투여하고서 수면유도 및 수면시간을 관찰한 결과가 Table 1이다. 대조군의 수면유도시간은 3.77 \pm 0.56분, 수면시간 68.3 \pm 6.8분이었으며, 파극천 추출물 100 mg/kg과 200 mg/kg을 전 처리하고 pentobarbital을 투여 함으로서 수면유도시간은 대조군에 비하여 별다른 영향이 없었으나, 수면시간은 용량 의존적으로 수면이 연장되었다. 대조군인 muscimol의 투여에서는 수면유도시간이 단축되었으며 수면시간도 연장되는 것을 관찰하였다.

경련발작 및 항경련효과에 미치는 영향

파극천 추출물을 전처리하고 PTZ에 의해 유도되는 경련

Table 1. Effect of pretreated of *Morinda officinalis* (MO) on onset and sleep in pentobarbital-induced mice

Treatment	Dose (mg/kg, P.O)	Sleep onset	Sleep time Min
Control	-	3.77 \pm 0.56 ^a	68.3 \pm 6.8 ^d
MO	100	4.21 \pm 0.42 ^a	79.8 \pm 8.4 ^d
	200	3.95 \pm 0.53 ^a	110.4 \pm 10.3 ^e
Muscimol	0.2	2.57 \pm 0.41 ^b	166.7 \pm 13.6 ^a

Mice were fasted for 24 hr prior to the experiment. Samples were orally administered daily for four weeks. Thirty min after the final treatment of samples, animals were intraperitoneally injected with pentobarbital (42 mg/kg). Data are mean \pm SD (n=10). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

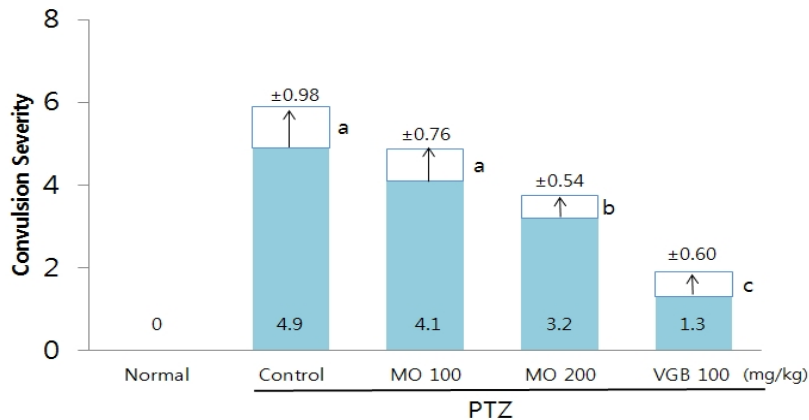


Fig. 1. Effect of *Morinda officinalis* (MO) methanol extract on convulsion severity in PTZ-induced convulsion mice.

Methanol extract of MO(100, 200 mg/kg) was orally administered once a day for four weeks. An one hour after the final treatment of MO, animals were received pentylenetetrazole(50 mg/kg, ip). The procedure was described in the experimental methods. Data are mean ± SD (n=6) and values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's multiple range test. *Severity: [\sum (Degree of convulsion) x (Frequency of convulsion for each degree/Total frequency of convulsion)]

발작 및 항경련 효과에 미치는 영향을 관찰한 결과 파극천 추출물을 100 mg/kg 4주간 투여하고 PTZ를 투여한 군에서는 PTZ를 단독으로 투여한 대조군에 비하여 경련 발작이 용량의존적으로 억제되었으며(Fig. 1), 경련발현시간, 경련시간 및 사망시간에서 유의한 차이는 나타내지 않았으나 파극천 추출물 200 mg/kg을 4주간 투여한 군에서는 경련발현 시간이 연장되었으며, 경련발현 시간, 경련시간 및 사망시간을 유의적으로 억제 되었다(Table 2).

뇌중 GABA 함량 및 GABA-T 활성에 미치는 영향

파극천 추출물을 전처리 하고서 PTZ로 경련을 유발시키고, 뇌 조직 중 GABA의 함량 및 GABA-T의 활성을 관찰한 성적이 Table 3이다. GABA 함량의 경우 정상군(2.23 ± 0.22 nmole/mg protein)에 비하여 PTZ를 투여한 군

(1.04 ± 0.13 nmole/mg protein)에서 현저히 억제되던 뇌 조직 내 GABA의 함량이 파극천 추출물의 전처리 100 mg/kg의 투여에서는 다소 증가 되었으나 통계적으로 유의성이 없었으며, 200 mg/kg 투여군(1.56 ± 0.34 nmole/mg protein)로 PTZ 단독투여군에 비하여 증가되었다. 한편, GABA-T의 활성은 정상군(1.46 ± 0.09 NADPH nmole/mg protein/min)인데 비하여 PTZ투여군(2.77 ± 0.13 NADPH nmole/mg protein/min)은 정상군에 비하여 약 85% 증가하였으며 파극천 추출물 200 mg/kg의 투여로 PTZ 투여군 보다 약 25% 정도 억제되었다. 대조 약물인 vigabatrin(100 mg/kg)의 투여로서 PTZ의 투여로 증가되던 효소의 활성이 정상군의 수준으로 회복되고 있음을 관찰 할 수 있었다.

Table 2. Influence of *Morinda officinalis* (MO) on the pentylenetetrazole-induced convulsion and mortality in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Onset time		T.E.		Mortality	
		Inc (%)	Lat (sec)	Inc (%)	Lat (sec)	Inc (%)	Lat (sec)
Control	0	100	43.1 ± 6.14 ^c	100	149.3 ± 16.3 ^d	100	186.5 ± 18.5 ^d
MO.	100	100	53.4 ± 8.42 ^c	90	177.7 ± 19.7 ^{cd}	90	231.2 ± 17.9 ^{cd}
	200	80	84.2 ± 7.01 ^b	60	244.9 ± 21.4 ^b	50	316.4 ± 23.7 ^b
Vigabatrin	100	60	145.6 ± 16.2 ^a	40	356.4 ± 19.9 ^a	30	541.2 ± 33.5 ^a

The assay procedure was described in the experimental methods.

T.E., tonic extensive; Inc., incidence; Lat., latent time after a pentylenetetrazole treatment.

Table 3. Effect of pretreated of *Morinda officinalis* (MO) on the GABA level and GABA-T activity in PTZ-induced rats

Treatment	Dose (mg/kg, P.O)	GABA	
		nmole/mg protein	GABA-T NADPH nmole/mg protein/min
Normal	-	2.23 ± 0.22 ^a	1.46 ± 0.09 ^{de}
Control	-	1.04 ± 0.13 ^d	2.77 ± 0.13 ^a
MO	100	1.21 ± 0.11 ^{cd}	2.38 ± 0.18 ^b
	200	1.56 ± 0.34 ^{bc}	2.14 ± 0.15 ^{bc}
Vigabatrin	100	2.09 ± 0.27 ^b	1.74 ± 0.21 ^d

The assay procedure was described in the experimental methods. Data are mean ± SD (n=10). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

지질과산화 함량 및 수산기 소거능에 미치는 영향

파극천 추출물을 전처리 하고서 PTZ로 경련을 유발시키고, 뇌 조직 중 지질과산화의 함량 및 시험관내에서 hydroxyl radical scavenging활성을 측정 한 성적이 Fig. 2와 Table 4이다. PTZ로 경련을 유발시킨 실험동물에서의 뇌중 지질과산화의 함량을 관찰하였던바 대조군에 비하여 PTZ를 투여함으로써 현저히 증가되던 뇌조직중의 지질과산화의 함량이 파극천 추출물을 용량별로 4주간 전처리하고 PTZ를 투여함으로써 용량의존적으로 억제되었으며, PTZ로 유발된 뇌조직을 효소원으로 사용하여 시험관내에 파극천의 각 분획을 첨가하고서 수산기 소거능을 관찰하였을 때 부탄올 및 디클로로메탄분획을 각각 용량 별(5 × 10⁻²에서 20 × 10⁻² g/ml)로 첨가함으로써 약 35%에서 50%까지 감소시켰다.

고 찰

뇌조직의 퇴행성 기능장애로 초래되는 질환의 병태생리 현상은 활성산소 종의 생성과 분해기구의 조절능의 균형이 상실되어질 때 남아있는 과량의 활성산소 종들이 뇌조직중의 불포화지방산을 과산화시켜 세포막의 손상을 유도하는 산화적 스트레스의 유도 과정과 밀접한 관계를 갖고 있음이 보고되고 있다(Hall and Braughler, 1988; Carney *et al.*, 1991). 뇌신경조직은 정밀하면서 복잡하게 구성되어 있어 그 기능수행도 섬세한 단위기능들이 서로 조화를 이루어 복합적인 반응경로를 거쳐 기능을 발휘하도록 되어있다. 뇌신경계의 질환에 대해서 많은 연구진에 의해서 연구가 계속 진행되고 있으나 대부분의 경우 확실한 병태생리학적 기전이 아직 밝혀지지 않고 있어 뇌신경계질환 치료

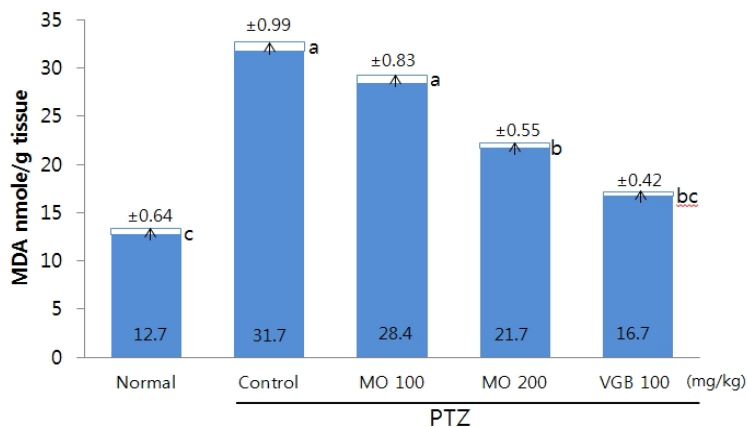


Fig. 2. Effect of *Morinda officinalis* (MO) methanol extract on lipid peroxidation in brain homogenate in PTZ-induced convulsion mice.

The assay procedure was described in the experimental methods. Data are mean ± SD (n=10). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 4. The hydroxy radical scavenging activity of several fraction of methanol extract of *Morinda officinalis* in vitro

Fraction	OD (532 nm)				
	Concentration($\times 10^{-2}$ g/ml)(%)				
	0	5	10	15	20
MeOH	26.8 \pm 0.35	25.3 \pm 0.48(100) ^a	23.2 \pm 0.39(100) ^a	20.3 \pm 0.40(100) ^a	21.8 \pm 0.56(100) ^a
Ether		27.4 \pm 0.57(108) ^a	21.6 \pm 0.42(93.1) ^a	18.5 \pm 0.47(91.1) ^a	18.7 \pm 0.39(85.8) ^{ab}
BuOH		21.6 \pm 0.41(85.4) ^a	18.7 \pm 0.55(80.6) ^{ab}	15.2 \pm 0.49(74.8) ^b	13.8 \pm 0.46(63.3) ^b
Dichloromethane		20.4 \pm 0.63(80.4) ^a	15.4 \pm 0.43(66.4) ^c	13.3 \pm 0.30(65.5) ^c	10.6 \pm 0.37(48.6) ^c

The reaction mixture(3 ml) contained 20 mM potassium dihydrogen phosphate-potassium hydroxide buffer(pH 7.4), 28 mM deoxyribose, 100 μ M ferric chloride, 104 μ M EDTA, 1 mM hydrogen peroxide, 100 μ M ascorbate and brain enzyme(PTZ-induced mice) preparation and various concentration of MO fraction. Data are mean \pm SD (n=3). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

제 개발도 많은 어려움이 있다. 최근의 연구결과에 의하면 간질, 치매 및 파킨슨씨 질환 등 퇴행성의 뇌신경질환들의 병태생리 조건들은 산화적 스트레스가 매개하는 과산화지질 생성 반응과 밀접한 상관관계가 있다는 사실이 밝혀지고 있어 관심을 갖게 하고 있다(Coyle and Puttfarcken, 1993; Zhou *et al.*, 2008). 이에 본 연구에서는 경련 발작을 유도한 동물모델을 이용하여 간질의 병태생리학적 기전 연구 및 치료제로서의 이용가능성이 있는 물질의 작용기전을 연구하고자 하였다. 파극천 추출물은 4주간 경구투여하고 수면연장에 어떠한 영향을 주는가를 관찰하였던 바 pentobarbital로 유도한 생쥐의 수면유도 시간 및 수면시간이 정상군에 비하여 수면이 연장되는 경향을 보였다. 또한, PTZ의 투여로서 나타나는 항경련 효과를 관찰하였던 바 PTZ에 의한 경련발작의 지속시간과 회복시간 및 경련발작 정도가 유의성 있게 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 myoclonic seizure의 경련 양상을 일으키는 간질 발작을 유도하는 실험 모델로서의 용도로만 주로 사용되고 있는 약물이다(Jung *et al.*, 2002; Fernadez *et al.*, 2007). 파극천 추출물을 전처리한 실험동물에 PTZ를 투여하고 뇌중 GABA의 함량을 측정하였을 때, 정상군에 비하여 PTZ 단독 투여군에서는 GABA의 함량이 현저히 감소하던 것이 파극천 추출물을 전 처리한 군에서는 이러한 GABA 함량의 감소현상을 억제하지 못하였다. GABA-T는 뇌 조직 중에서 억제성 신경섬유 말단과 망상 세포계 등에 분포되며, 재 흡수된 GABA를 glutamic

acid와 succinic semialdehyde로 불활성화 시키는 역할을 하는 효소이다(Dulac and Arthuis, 1984; Elwes *et al.*, 1984; Callaghan and Goggin, 1988). GABA-T의 활성은 PTZ 단독 투여군에서 정상군에 비해 약 40% 정도 증가하였으나, 파극천 추출물을 전처리한 군에서는 PTZ에 의하여 증가되던 효소의 활성에도 영향이 없었다. 이로 보아 파극천 추출물의 PTZ 유도에 항경련 작용은 중추신경계의 억제성 전달물질인 GABA의 농도와는 무관한 것으로 생각된다. 지질과산화 반응의 진행은 생리 조건이 정상인 상태에서는 방어체계의 조절에 의하여 활성산소의 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(Stohs, 1995; Douglas, 1998). 내외인성 요인에 의하여 생성된 친전자성 물질을 포함하는 활성산소에 의한 지질의 과산화 반응은 세포막의 투과성을 향진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 초래하여 노화 현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 초래하는 것으로 알려져 있다(Cohen and Doherty, 1987; Behl *et al.*, 1994; Bejma and Ji, 1999). 지질과산화의 지표로 부산물인 malondialdehyde의 함량을 측정하여 지질과산화의 생성 정도를 살펴 본 결과 PTZ의 투여로 경련발작을 유도한 흰쥐에서 PTZ는 뇌조직의 지질과산화반응을 생리식염수만을 투여한 정상군에 비해 과산화지질의 생성량도 40%정도 증가하는 유의성 있는 변화가 관찰되었다. 이는 PTZ에 의한 경련발작의 유도는 지질과산화반응이 관여하는 것으로 사료된다. 일반적으로 항산화 작용은 활성산소의 소거 작용과 상관성이 있는 경우

가 많으므로 활성산소 종들의 연쇄적인 반응으로 생성되어 지는 과정($O_2 \rightarrow \cdot O_2 \rightarrow H_2O_2 \rightarrow \cdot OH$)의 마지막 생성물이며 가장 강력한 활성을 지니고 있어서 산화적 스트레스에 의한 조직 손상 과정에서 대단히 중요한 핵심적인 역할을 하는 인자로 알려지고 있는 hydroxy radical(Valko *et al.*, 2006; Jomova and Valko, 2011)에 대한 파극천을 용매를 사용하여 각 분획을 재조하여 이 분획에 대한 소거작용을 관찰하여 본 결과 부탄올 및 디클로로메탄 분획을 시험관내에 용량 별로 첨가하였을 때 5×10^{-2} g/ml 농도에서 화학반응으로 생성시킨 반응액 중의 hydroxy radical의 양이 감소하다 최고농도인 20×10^{-2} g/ml의 첨가에서 약 35%에서 최고 50%까지 용량의존적으로 현저히 억제되었다. 한편 메탄올 및 ether추출물은 다소 감소하는 경향은 보였으나 별다른 영향이 없었다. 이상의 실험결과들을 종합하여 볼 때 파극천 성분 중에는 PTZ로 유도한 항경련 작용을 억제하는 물질이 함유되어 있으며 이 작용은 hydroxy radical의 소거작용 등으로 산화적 스트레스 상태를 개선하여 과산화지질의 생성을 억제하여 경련작용을 억제하는 것으로 생각되며 계속하여 활성 산소의 생성 및 해독계에 대하여 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2012학년도 경성대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

적 요

본 연구에서는 파극천 추출물의 수면연장 시간, 항 경련 효과 및 시험관내에서 파극천의 각 분획별 활성산소의 소거능을 관찰하여 본 결과 pentobarbital을 투여한 대조군의 수면 유도시간 및 수면시간(3.77 ± 0.56 분, 수면시간 68.3 ± 6.8 분)이 파극천 추출물(200 mg/kg)을 전 처리하고 pentobarbital을 투여함으로써 수면유도 시간(3.95 ± 0.56 분) 및 수면시간(110.4 ± 10.3 분)이 연장되었다. PTZ에 의해 유도되는 경련 발작이 대조군 4.9 ± 0.98 인데 비해 파극천(200 mg/kg)의 전처리로 경련발작이 3.2 ± 0.54 로 현저히 억제되었으며 이 결과는 PTZ의 경련발현 시간, 경련유지시간 및 사망시간에 미치는 파극천의 영향과 유사하였다. 뇌중 GABA 함량은 PTZ의 투여로 정상군

에 비하여 억제되던 것이 파극천의 전처리로 증가 되었으며, GABA-T의 활성과 지질과산화의 함량은 PTZ의 투여로 각각 증가되던 것이 파극천 추출물의 투여로 억제되었다. 시험관내에서 PTZ로 유도된 뇌조직중의 hydroxy radical의 생성량은 butanol 및 dichloromethane 분획의 첨가(20×10^{-2} g/ml)에서 약 35%에서 50%까지 감소하였다.

인용문헌

- Allen, I.C. and R. Griffiths. 1984. Reversed-phase high performance liquid chromatographic method for determination of brain glutamate carboxylase suitable for use in kinetic studies. *J. Chromatogr.* 336(2):385-391.
- Aoki, E., R. Semba, K. Kato and S. Kashiwamata. 1987. Purification of specific antibody against aspartate and immunocytochemical localization of aspartergic neurons in the rat brain. *Neuroscience* 21(3):755-765.
- Baughman, R.W. and C.D. Gilbert. 1981. Aspartate and glutamate as possible neurotransmitters in the visual cortex. *J. Neurosci.* 1(4):427-439.
- Behl, C., J.B. Davis, R. Lesley and D. Schubert. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity. *Cell* 77(6):817-827.
- Bejma, J. and L.L. Ji. 1999. Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 87(1):465-470.
- Buechter, D.D. 1998. Free radicals and oxygen toxicity. *Pharmaceut. Res.* (5):253-260.
- Callaghan, N. and T. Goggin. 1988. Adjunctive therapy in resistant epilepsy. *Epilepsia* 29(1):S29-35.
- Carney, J.M., C.N. Oliver, R.W. Landum, M.S. Cheng, J.F. Wu and R.A. Floyd. 1991. Reversal of age-related changes in brain protein oxidation decrease in enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88(9):3633-3636.
- Chang, P. and K.H. Lee. 1984. Cytotoxic antileukemic anthraquinones from *Morinda parvifolia*. *Phytochemistry* 23(8):1733-1736.
- Cohen, G.M. and M.A. Doherty. 1987. Free radical mediated cell toxicity by redox cycling chemicals. *Br. J. Cancer Suppl.* 8:46-52.
- Coyle, J.T. and P. Puttfarcken. 1993. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262(5134):689-695.
- Cupello, A., S. Larsson, A. Palm and M.V. Rapallino. 1988. A microelectro-phoretic method for the evaluation of

- GABA transaminase activity. *Neurochem. Res.* 13(7):601-603.
- Dulac, O. and M. Arthuis 1984 Open trials with vaproate in epilepsy. *Epilepsia* 25:S23-31.
- Elwes, R.D.C., A.L. Johnson, S.D. Shorvon and E.H. Reynolds. 1984. The prognosis for seizure control in newly diagnosed epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 311:944-947.
- Fernandez, F., W. Morishita, E. Zuniga, J. Nguyen, M. Blank, R. Malenka and C. Garner. 2007. Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nat. Neurosci.* 10(4):411-413.
- Ha, J., D. Lee, C. Young, J. Kim and K. Huh. 1999. Agonistic activities to the benzodiazepine receptor by extract of medicinal plants(II). *Kor. J. Pharmacog.* 30(3): 284-289.
- Hall, E.D. and M.J. Braughler, 1888. The role of oxygen radical-induced lipid peroxidation in acute CNS trauma. *In* Halliwell B. (ed.), *Oxygen Radicals in Tissue Injury*. FASEB, Bethesda, Maryland, USA. pp. 92-96.
- Halliwell, B. 1992. Reactive oxygen species and the central nerve system. *J. Neurochem.* 59(5):1609-1623.
- Halliwell, M., C. Gutteridge and O.I. Aruoma. 1987. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165(1):215-219.
- Hiramatsu, T., M. Imoto, T. Koyano and K. Umezawa. 1993. Induction of normal phenotypes if ras-transformed cells by damnacanthol from *Morinda cirifolia*. *Cancer Lett.* 73(3): 161-166.
- Ji, H.J. and S.I. Lee. 1989. Handbook of the Korean Pharmacopoenia. Korean Medical Index. Shinilbooks, Seoul, Korea. p. 494 (in Korean).
- Jomova, K. and M. Valko. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283(2):65-87.
- Jung, M., H. Lal and M. Gatch. 2002. The discriminative stimulus effects of pentylenetetrazol as a model of anxiety: recent developments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26(4):429-439.
- Kim, C.M., M.K. Shin, D.K. Ahn and K.S. Lee. 1988. Choongyakdaesajeon. Jongdam publishing Co., Seoul, Korea. pp. 5766-5770 (in Korean).
- Kim, H.C. 2004. Hanyakyakrihak. Jipmoondang Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 443-445 (in Korean).
- Kotama, J., I. Morita, K. Tagahara, O.T. Mukainakab, H. Tokudab and H. Nishinob. 2001. Inhibitory effects of anthraquinones and bianthraquinones. Epstein-Barr virus activation. *Cancer Lett.* 170(1):15-18.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Rendall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1):265-275, 1951.
- Martin, T. and L. Hui. 2008. Severe cutaneous adverse drug reactions: a review on epidemiology, etiology, clinical manifestation and pathogenesis. *Chin. Med. J.* 121(8):756-761.
- Masayuki, Y., Y. Shoko, N. Hiroto, Y. Johji and M. Nobutoshi. 1995. Chemical constituents of Chinese natural medicine, *Morindae Radix*, the dried roots of *Morinda officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 43(9):1462-1465.
- Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yaki. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95(2):351-358.
- Roussinov, K.S., M.B. Azarova and S. Atanassova-shopova. 1976. On certain relationships between gamma-aminobutyric acid (GABA) and adrenergic mechanisms in convulsive-seizure reaction. *Acta. Physiol. Pharmacol. Bulg.* 2(3):69-76.
- Sedeghi-Aliabadi, H., T. Tabarzadi and A. Zarghi. 2004. Synthesis and cytotoxic evaluation of two novel anthraquinone derivatives. *II Farmaco.* 59(8): 645-649.
- Stohs, S.J. 1995. The role of free radicals in toxicity and disease. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 6(3-4):205-228.
- Taloua, J.R., M.C. Verbernea, R.A.B. Muljonoa, L.J.P. Tegelenc, B.G. Bernala, H.J.M. Linthorstb, G.J. Wullemsc, J.F. Bolb and R. Verpoortea. 2001. Isochorismate synthase transgenic expression in *Catharanthus roseus* cell suspensions. *Plant Physiol. Biochem.* 39:595-602.
- Valko, M., C.J. Rhodesb, J. Mocola, M. Izakovica and M. Mazura. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160 (1):1-40.
- Vogel, H.G. 2007. Drug discovery and evaluation-pharmacological assays. Springer Press. Berlin, Germany. pp. 422-423.
- Wolfman, C., H. Viola, M. Marder, C. Wasowski, P. Aedenghi, I. Izquierdo, A.C. Paladini and J.H. Medina. 1996. Anxiolytic properties of 6,3-dinitroflavone a high-affinity benzodiazepine receptor ligand. *Eur. J. Pharmacol.* 318:23-30.
- Zhou, C., Y. Huang and S. Przedborski. 2008. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1147:93-104.

(Received 13 August 2012 ; Revised 9 January 2013 ; Accepted 22 January 2013)