

芎藭化痰煎 투여가 PTZ 경련 유발시 뇌조직 중 경련 및 산화 관련물질에 미치는 영향

김락형* · 권보형 · 이광규 · 오찬호¹

우석대학교 한의과대학, 1: 우석대학교 생명공학부

Anticonvulsant, Antioxidant Effect of Gungchihwadam-jeon

Lak hyung Kim*, Bo Hyung Kwon, Kwang Gyu Lee, Chan Ho Oh¹

Department of Oriental Medicine, 1: Division of Biotechnology Woosuk University

This study was performed to evaluate the anticonvulsant, antioxidant effect of modified formulas Korean traditional medicine Gungchihwadam- Jeon(GCHDJ) The extract of GCHDJ was administered (p.o.) to mice for 14 days in anticonvulsant and antioxidant tests. The pretreatment of GCHDJ extract prohibited the pentylenetetrazol(PTZ)-induced convulsion In PTZ-induced convulsion, lowered level of brain r-aminobutyric acid(GABA) was restored by the pretreatment of GCHDJ. Increased level of brain glutamic acid was lowered to normal state by GCHDJ, and increased activity of brain r-aminobutyric acid transaminase(GABA-T) was reduced by GCHDJ. In PTZ-induced convulsion, increased level of brain lipid peroxide was lowered to normal state by the pretreatment of GCHDJ. Increased activity of brain xanthine oxidase(XOD) was lowered to normal state by GCHDJ. and increased activity of brain aldehyde oxidase lowered to normal state by GCHDJ. In PTZ-induced convulsion, increased activities of superoxide dismutase(SOD) and catalase in brain were lowered by the pretreatment of GCHDJ, whereas increased level of glutathione and increased activity of glutathione peroxidase in brain were not changed significantly. Above results suggest that GCHDJ have anticonvulsant, antioxidant effect. That seems to be strongly related with the levels of GABA, glutamate, lipid peroxide and the activities of GABA-T, XOD, aldehyde oxidase, SOD, catalase in brain tissue. From these results, GCHDJ could be applied to various convulsive disorders.

Key words : Gungchihwadam-jeon(芎藭化痰煎), Anticonvulsant, Antioxidant, PTZ

서 론

경련은 본인의 의사와는 관계없이 전신 혹은 일부의 근육에서 발생하는 발작적인 운동을 말하는데¹⁻³⁾, glutamic acid와 r-aminobutyric acid(GABA)의 기능적 균형장애가 발작기전의 중요한 원인으로 생각되고 있으며, 그 치료 역시 GABA 대사를 중심으로 연구되어지고 있다^{4,5)}. 또한 경련 발작은 프리라디칼의 생성을 통하여 세포손상을 일으키며, 활성산소로 인한 과산화는 GABA의 작용을 억제한다⁶⁻¹⁰⁾고 알려져 있다. 프리라디칼은 방사선 손상, 화학적 손상, 세포성 노화, 염증성 손상, 정상적인 대사 등 다양한 과정에서 생성되어 세포에 손상을 일으켜 질병

과 노화를 유발하는 공통 경로로 주목되고 있다¹¹⁻¹³⁾.

한의학에서는 경련에 대하여 《靈樞·經筋篇》¹⁴⁾에서 “經筋之病 寒則反折筋急”, 《素問·至真要大論》¹⁴⁾에서 “諸瘧項強 皆屬于濕”, “諸暴強直 皆屬于風”이라 하여 風·寒·濕을, 《醫學入門》¹⁵⁾에서 痰·火·驚을 癇疾의 주원인으로 들었다. 따라서 癇疾의 치료는 祛痰이 위주가 되고, 順氣, 化中, 清火시키는 방법³⁾이 이용되고 있다. 芎藭化痰煎은 《晴崗醫鑑》¹⁶⁾에 기재되어 脫營, 氣鬱 등으로 인한 신경증에 광범위하게 활용되는 처방이다. 芎藭化痰煎에 대하여 박이 항스트레스 효과에 대해 보고¹⁷⁾한 바 있으나, 실험적 연구는 부족한 실정이다.

본연구에서는 芎藭化痰煎의 효능을 알아보고자 항경련 효과 및 경련관련 신경전달물질에 미치는 영향을 살펴보았으며, 경련 유발시 뇌조직에서의 산화관련 물질에 미치는 영향에 대하여 살펴보았다.

* 교신저자 : 김락형, 전주시 완산구 중화산동 2가 5, 우석대학교 한방병원
· E-mail : kimlak@yahoo.co.kr · Tel : 063-220-8617
· 접수 : 2003/12/05 · 수정 : 2003/12/27 · 채택 : 2004/01/26

재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용한 실험동물은 BALB/c계통 雌性(8 週齡, 20±2 g)생쥐를 다물 science(주)에서 구입해서 사용했으며, 사육은 온도 22±2 °C, 습도 55±5 %, dark/light(12 시간)조건 하에서 고형 pellet 사료와 물을 자유 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 phosphate buffered saline(PBS), sodium dodesyl sulfate(SDS), chlorpromazine, strychnine, picrotoxin, pentylenetetrazol, pentobarbital, 6-methyl purine, γ -aminobutylic acid(GABA), nicotinamide, β -NADH, NADPH, glutathione reductase, ATP, 2-thiobarbituric acid, 5-sulfosalicylic acid $^2\text{H}_2\text{O}$, reduced glutathione, 2,4-dinitrochlorobenzene, triethanolamine, UDP-glucuronic acid, sodium borate, reduced glutathione, semicarbazide, t-butyl hydroperoxide, aminopyrine, malondialdehyde, 2-aminoethylisothiuronium bromide, N'-methylnicotinamide, sodium azide, α -ketoglutaric acid, sodium tungstate, sodium xanthine, xanthine oxidase, bovine serum albumin(BSA), pyridoxal-5'-phosphate 등을 Sigma 제품을, 기타 시약은 특급시약 및 세포배양용 시약을 사용하였다.

사용기기로서는 ELISA reader(Dynatech, MR5000), cell counter(Japan, Sysmax K-1000), UV/VIS spectrophotometer (Shimazu, UV-1601), clinical spectrophotometer(Cobas integra-400), ultracentrifuge (Hitachi, 65-P7), HPLC column(Waters, RP-C18, 4.0 mm I.D. 10 μm), HPLC pump((Varian 5000), HPLC controller(Varian ODS401), fluorescence detector(Varian)와 그 외 centrifuge (VS-15000CF), CO₂ incubator, freeze dryer, deep freezer 등은 Vision Scientific Co.의 제품을 사용하였다.

Table 1. Contents of Gungchihwadam-Jeon

韓藥名	生藥名	重量 (g)
香附子	<i>Cyperi Rhizoma</i>	10 g
陳皮	<i>Citri Pericarpium</i>	6 g
蒼朮	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	4 g
半夏(薑拌)	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	4 g
赤茯苓	<i>Poria</i>	4 g
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4 g
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	4 g
枳殼	<i>Aurantii Fructus</i>	4 g
神麩(炒)	<i>Massa Medicata Fermentata</i>	4 g
梔子(炒)	<i>Gardeniae Fructus</i>	2 g
木香	<i>Aucklandiae Radix</i>	2 g
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	4 g
總重量		48 g

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 芎藭化痰煎 구성은 《晴崗醫鑑》¹⁶⁾에 따르면, 사용한 약재들은 우석대학교 부속한방병원에서 구입, 엄선하여 사용하였고, 1 錢을 편의상 4 g으로, 生薑 3片은 4 g으로 하여 각 2 貼 분량(96 g, 96.8 g)을 증류수 2000 ml로 가열 추출한

후, 여과해서 濃液을 rotary evaporator로 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 각각 분말 12.5 g(수득율: 13.0 %)을 얻어 (이하 GCHD)이라 함), 동물실험 시에는 생리식염수에 용해시켜 사용하였다. 芎藭化痰煎 1 貼의 처방구성 내용은 다음과 같다.

4. 동물모델을 이용한 항경련 효과 측정

Sohn 등의 방법¹⁸⁾에 준해 pentylenetetrazol(PTZ) 70 mg/kg을 복강 내에 주사하여 경련의 발현 및 사망의 유무를 관찰하였다.

5. 뇌조직 중 GABA 및 glutamic acid 함량 측정

뇌조직 중 GABA 및 glutamic acid 함량 측정은 Allen 등¹⁹⁾의 방법을 약간 변경하였다. 뇌조직을 1 mM aminoethyliso-thiuronium bromide와 2 mM pyridoxal-5'-phosphate를 포함하는 0.3 M triethanolamine buffer(pH 6.8)로 10 % 마쇄균질액을 조제한 후, 원심분리(15,000 \times g, 20 분)하여 얻은 postmitochondria 분획을 일정량의 200 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 첨가한 후 氷冷의 ethanol로 除蛋白質시켰다. 이것을 원심분리하여 얻은 上澄液을 membrane filter를 사용하여 여과한 다음 여액 중에 함유된 GABA 및 glutamic acid의 함량을 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 분리시킨 후 표준품의 유지시간(GABA 11.3 분, glutamic acid 19.9 분)과 비교확인한 후 표준 검량선에 준해 그 함량을 산정하였다. GABA 및 glutamic acid의 함량은 뇌조직 단 백질 1 mg당 n mole로 나타내었다.

Table 2. Condition of HPLC for the Determination of Brain GABA and Glutamic Acid Concentration in mouse

Parameter	Conditions
Column	RP-C18(150 \times 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 % \rightarrow 70 %/40 min
Attenuation	8
Detector	Fluorescence detector (λ AC : 340 nm, λ Em : 450 nm)

6. 酵素源의 調製

실험동물을 탄산가스로 마취 처사시켜 두개골을 정중선을 따라 절개하여 뇌조직을 적출하고 0.9 % 생리식염수로 씻은 후 조직 1 g당 1 ml의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 氷冷下에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. GABA-T 활성 측정의 효소원은 마쇄 균질액을 원심분리(35,000 \times g, 30 분)하여 얻은 上澄液을 사용하였다. GAD활성 측정용의 효소원은 뇌조직을 1mM amino-ethylisothiuronium bromide와 2mM pyridoxal-5'-phosphate를 포함하는 0.3 M triethanolamine buffer(pH 6.8)로 균질 마쇄한 다음 원심분리(15,000 \times g, 20 분)하여 얻은 上澄液을 효소원으로 사용하였다.

뇌조직 1 g당 4 倍量의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 氷冷下에서 glass teflon homonizer로

마쇄하였다. 이 마쇄액을 homogenate 분획으로 하였으며, 이것을 원심분리(600 × g, 10 분)하여 核 및 未磨碎 세포부분을 제거하고 다시 10,000 × g에서 20 분간 원심분리하여 그 침전물에 일정량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하고 현탁시켜 mitochondria 분획으로 하고 上澄液을 다시 105,000 × g에서 1 시간 동안 초원심분리하여 얻은 上澄液을 cytosol 분획으로, 그 침전물에 동일한 양의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 현탁시킨 액을 microsome 분획으로 하였다. mitochondria와 microsome 분획은 현탁한 후 재원심분리하여 효소원으로 사용하였다. 이렇게 얻어진 homogenate는 glutathione 및 lipid peroxide 함량의 측정, cytosol 분획은 xanthine oxidase, aldehyde oxidase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase 활성의 측정에 사용하였으며, mitochondria 분획은 catalase 활성측정의 효소원으로 사용하였다.

7. 뇌조직 중 과산화지질(LPO)의 함량 측정

Ohkawa 등²⁰⁾의 방법에 준하여 뇌조직 1 g당 9 배량의 생리 식염수를 가해 마쇄하고, 이 마쇄액(0.2 ml)에 8.1 % sodium dodecyl sulfate 0.2 ml와 20 % acetate buffer(pH 3.5) 1.5 ml와 발색 목적으로 0.8 % thiobarbituric acid 1.5 ml를 가한 후 총 4.0 ml로 하여 95℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 실온에서 냉각시켜 n-BuOH: pyridine(15:1) 5.0 ml를 첨가하여 혼합한 후, 원심분리(800 × g, 15 분)한 후 적색의 n-BuOH: Pyridine층을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정하고 LPO의 함량을 뇌조직 1 g당 malondialdehyde n mole로 표시하였다. 표준물질로는 malonaldehyde bis(dimethyl acetal)을 동일한 방법으로 반응시켜 그 흡광도치로부터 과산화지질(LPO)양을 산출하였다.

$$\text{LPO 양} = 0.5 \times 5/F \times 1.0/0.1 = 5 \times 1/F \times n \text{ mole/g tissue}$$

F: 표준물질(0.5 n mole)의 흡광도 f: 시료의 흡광도

8. 뇌조직 중 glutathione의 정량

뇌조직 중 glutathione의 함량 측정은 Alwin 등²¹⁾의 방법에 준하여 뇌조직 cytosol 분획 0.5 ml에 0.04 M H₂SO₄ 1 ml를 가하고 20 ℃에서 10 분간 정치한 다음 여기에 0.1 M EDTA에 희석한 10 % sodium tungstate 0.2 ml를 가하여 5 분간 혼합하고 4 ℃에서 10 분간 방치한다. 원심분리(600 × g, 5 분)한 후 上澄液 1 ml를 취하여 1 M tris-HCl 1.25 ml와 40 mg/dl의 DTNB 0.1 ml를 혼합한 다음 412 nm에서 흡광도를 구하고 표준검량선에 준하여 산정하였다.

9. 효소활성 측정

1) GABA-T의 활성측정

GABA-T의 활성은 Bergmeyer의 방법²²⁾에 따라 일정량의 0.15 M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 60 mM α-ketoglutaric acid 100 μl와 기질인 4 μM GABA 50 μl 및 조제된 효소원 100 μl를 첨가하여 incubator에서 30 분간 반응시킨 다음, 이때 생성된 succinic semialdehyde에 보효소인 0.12 mM의 NADP 10 μl를 첨가하고 20 분간 반응시켜 생성되는

NADPH를 340 nm에서 측정하여 효소 활성을 산정하였다.

2) Xanthine oxidase(XOD)의 활성측정

Saugstad의 방법²³⁾에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 1.0 ml에 효소원액 0.4 ml에 17.4 mg/10 ml의 sodium xanthine 15 μl를 가한 후 250 U/ml의 xanthine oxidase를 가한 다음 25 ℃에서 3 분간 295 nm에서의 흡광도의 변화를 보고 다음 식으로 생성된 uric acid의 양을 구하였다.

$$\text{uric acid(nM)} = (\Delta A/\text{min}) / 12,300$$

3) Aldehyde oxidase의 활성측정

Rodriguez 등의 방법²⁴⁾에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.8)에 현탁시킨 cytosol 효소분획 0.4 ml에 1 mM의 potassium ferricyanide와 1 mM의 EDTA 용액을 각각 0.3 ml씩 가하여 혼합하고 여기에 기질인 5 mM의 N'-methyl nicotinamide와 3.5 mM의 6-methylpurine을 0.5 ml를 가하여 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 활성도를 산출하였다. 효소활성의 단위는 1 분당 1 mg protein이 환원시킨 potassium ferricyanide의 양을 n mole로 나타내었다.

$$\text{Enzyme activity(n mole/min/mg protein)}$$

4) Superoxide dismutase(SOD)의 활성측정

McCord 등의 방법²⁵⁾에 준하여 0.3 M potassium phosphate buffer(60 μM cytochrome c, 100 μM EDTA 함유, pH 7.8) 1.0 ml와 효소원액 0.4 ml를 가하여 ice bath상에서 20 분간 방치하고 0.3 mM의 xanthine 0.4 ml와 10 mM의 KCN 1.0 ml를 가하여 37 ℃에서 30 분간 반응시킨 후 1 μM의 XOD 0.2 ml를 첨가하고 즉시 550 nm에서 감소되는 cytochrome c의 흡광도를 측정하고 흡광도의 변화를 50 % 저해하는 양을 1 unit로 산정하여 활성도를 표시하였다.

5) Catalase의 활성측정

Aebi의 방법²⁶⁾에 준하여 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 중에 기질인 10 mM H₂O₂의 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 흡광도를 측정하고 분자흡광계수 0.041 mM⁻¹cm⁻¹를 이용하여 효소활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1 분당 1 mg protein이 분해하는 hydrogen peroxide(H₂O₂)의 양을 n mole로 표시하였다.

6) Glutathione peroxidase의 활성측정

Hiraiwa 등의 방법²⁷⁾에 준하여 효소원액에 50 mM Tri-HCL buffer(pH 7.0), 0.1 mM NADPH, 1U/ml glutathione reductase, 4 mM reduced glutathione, 4 mM EDTA 및 2 mM sodium azide를 가하여 총액이 2.9 ml로 하여 37℃에서 5 분간 반응시킨 후 7 mM tert-butyl hydroperoxide 0.1 ml를 가한 다음 340 nm(37 ℃조건)에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 단위는 1 분 동안에 산화된 NADPH의 양(n mole)을 1 unit로 하였다.

10. 단백질 정량 및 통계처리

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법²⁶⁾에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, Fr. No. IV)을 표준단백질로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차로 표시하였으며, 통계적 유의성은 Duncan's new multiple range test를 이용하였다.

실험 결과

1. 芎藭化痰煎의 투여가 PTZ으로 유발된 경련에 미치는 효과
 芎藭化痰煎을 14 일간 투여하고 PTZ로 경련을 유발시켰을 때 芎藭化痰煎 500 mg/kg 투여군에서 사망시간이 각각 179.3±7.56 sec로 정상대조군에서의 147.8±6.09 sec에 비하여 사망시간이 유의성있게 증가하였으며, 나머지 각 실험군에서는 대조군에 비해 경련발현시간 및 사망시간에서 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. 양성대조군으로 사용한 phenobarbital 100 mg/kg 경구투여군에서는 각 약물 처치에 따른 경련실험에서 경련발현시간, 사망률 및 사망시간을 유의성있게 증가시켰다(Table 3).

Table 3. Effect of GCHDJ on the PTZ - induced Convulsion and Mortality in mice.

Treatm-ent	Dose (mg/kg)	N	Onset (min)	Mortality
Control	0	10	54.2±3.92 ^a	147.8±6.09 ^a
GCHDJ	100	10	54.9±4.96 ^a	157.3±6.87 ^a
	250	10	58.9±3.67 ^a	158.7±6.45 ^a
	500	10	60.2±5.23 ^a	179.3±7.56 ^b
PHB	100	10	-	-

Each sample was administered(p.o.) once a day for 14 days to mice. An one hour after the final treatment of sample, mice were received pentylenetetrazol(PTZ) (70 mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values represent means±S.D. of latent time(sec.) from treatments, (n=10) and by the same superscript are not significantly different (p<0.05) each other by new multiple score method.

2. PTZ 경련시 뇌조직 중 GABA 및 glutamic acid 함량 및 GABA-T의 생합성에 미치는 효과

芎藭化痰煎을 14 일간 투여하고 PTZ로 경련을 유발시켰을 때, 뇌조직 중 GABA의 함량은 정상대조군이 4.12±0.23 GABA n mole/mg protein인데 비하여 PTZ(70 mg/kg)에 의한 경련 유발군에서는 2.24±0.12 GABA n mole/mg protein으로 감소하였으며, 芎藭化痰煎 100, 250 및 500 mg/kg 투여군은 각각 3.07±0.27, 2.76±0.18 및 2.91±0.14 GABA n mole/mg protein으로 증가하였다. Glutamic acid의 함량은 대조군이 13.93±1.06 glutamate n mole/mg protein인데 비하여 PTZ 투여군은 19.98±1.34 glutamate n mole/mg protein으로 증가하였고, 芎藭化痰煎 100, 250 및 500 mg/kg 투여군은 각각 14.55±1.21, 14.26±1.15 및 13.38±1.29 glutamate n mole/mg protein으로 감소되었다(Table 12, Fig. 8). 芎藭化痰煎을 14 일간 투여하고 PTZ로 경련을 유발시켰을 때, GABA-T의 활성은 정상대조군이 1.47±0.11 NADPH n mole/mg protein였으며, PTZ에 의한 경련 유발시에는 2.09±0.17 NADPH n mole/mg protein으로 증가하였다. 芎藭化痰煎 100, 250 및 500 mg/kg 투여군에서는 각각 1.64±0.14, 1.78±0.19 및 1.79±0.12 NADPH n mole/mg protein으로 감소되었다(Table 4, Fig. 1).

Table 4. Effect of GCHDJ on the Brain GABA, glutamic acid Level and Brain GABA-T activity in PTZ-induced Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	GABA	glutamic acid ²⁾	GABA-T ³⁾
		Content ¹⁾	Content ¹⁾	Activity ¹⁾
Control		4.12±0.23 ^a	13.93±1.06 ^a	1.47±0.11 ^a
PTZ	70	2.24±0.12 ^b	19.98±1.34 ^b	2.09±0.17 ^b
	100	3.07±0.27 ^c	14.55±1.21 ^a	1.64±0.14 ^{bc}
GCHDJ	250	2.76±0.18 ^c	14.26±1.15 ^a	1.78±0.19 ^c
	500	2.91±0.14 ^c	13.38±1.29 ^a	1.79±0.12 ^c

Each sample was administered(p.o.) once a day for 14 days to mice. An one hour after the final treatment of sample, mice were received PTZ(70 mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values represent means±S.D.(n=10) and by the same superscript are not significantly different(p<0.05) each other by new multiple score method.

1)content : GABA n mole/mg protein 2)content : glutamate n mole/mg protein 3)activity : NADPH n mole/mg protein/hr

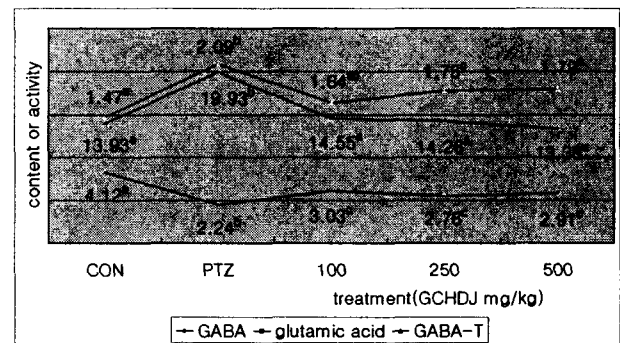


Fig. 1. Effect of GCHDJ on the Brain GABA1), glutamic acid2) level and GABA-T activity3) in PTZ-induced Mice. Values represent means and the different superscript represents significant difference with each other by new multiple score method (p<0.05). 1)content : GABA n mole/mg protein 2)content : glutamate n mole/mg protein 3)activity : NADPH n mole/mg protein/hr

3. PTZ 경련시 뇌조직 중 과산화지질(LPO) 함량, xanthine oxidase(XOD) 및 aldehyde oxidase의 활성에 미치는 효과

芎藭化痰煎을 14 일간 투여하고 PTZ로 경련을 유발시켰을 때, 뇌조직 중 과산화지질의 함량을 측정한 결과, 정상대조군에서 93.7±7.17 MDA n mole/mg of tissue였으며, PTZ에 의한 경련 유발시에는 198.2±17.8 MDA n mole/mg of tissue로 현저하게 증가하였다. 芎藭化痰煎 250 mg/kg 투여군에서는 158.3±17.8로 감소하였으며, 芎藭化痰煎 500 mg/kg 투여군에서는 79.5±9.01로 정상대조군 수준으로 감소를 나타내었다.

Table 5. Effect of GCHDJ on the Brain Lipid Peroxide Content and Brain Cytosolic Enzyme activities in PTZ-induced Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Lipid Peroxide	Xanthine Oxidase	Aldehyde Oxidase
		Content ¹⁾	Activity ²⁾	Activity ³⁾
Control		93.7±7.17 ^a	1.36±0.15 ^a	0.91±0.09 ^a
PTZ	70	198.2±17.8 ^b	2.31±0.18 ^b	1.29±0.11 ^b
	100	201.7±16.9 ^b	1.89±0.14 ^c	1.05±0.13 ^{bc}
GCHDJ	250	158.3±17.8 ^c	1.66±0.11 ^{bc}	1.06±0.11 ^{bc}
	500	79.5±9.01 ^a	1.52±0.13 ^a	0.96±0.09 ^a

Each sample was administered(p.o.) once a day for 14 days to mice. An one hour after the final treatment of sample, mice were received PTZ(70 mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values represent means±S.D.(n=10) and by the same superscript are not significantly different (p<0.05) each other by new multiple score method.

1) content : MDA n mole/mg of tissue, 2) activity uric acid n mole/mg protein/min 3) activity : pyridone n mole/mg protein/min

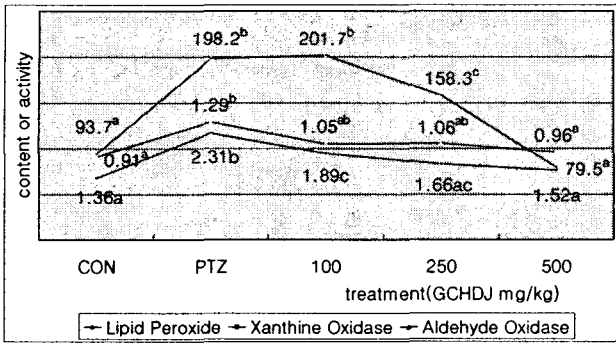


Fig. 2. Effect of GCHDJ on the Brain Lipid Peroxide content¹⁾ and XOD²⁾, aldehyde Oxidase³⁾ activities in PTZ-induced Mice. Values represent means and the different superscript represents significant difference with each other by new multiple scare method (p<0.05). 1) content : MDA n mole/mg of tissue 2) activity uric acid n mole/mg protein/min 3) activity : pyridone n mole/mg protein/min

芎藭化痰煎을 14 일간 투여하고 PTZ로 경련을 유발시켰을 때, xanthine oxidase의 활성은 정상대조군에서 1.36±0.15 uric acid n mole/mg protein/min인데 비하여, PTZ에 의한 경련 유발 시에는 2.31±0.18 uric acid n mole/mg protein/min으로 현저하게 증가하였으며,芎藭化痰煎 100, 250 및 500 mg/kg을 투여한 군에서는 각각 1.89±0.14, 1.66±0.11 및 1.52±0.13으로, xanthine oxidase 활성이 감소되었으며,芎藭化痰煎 500 mg/kg을 투여한 군에서는 정상대조군 수준으로 감소되었다. Aldehyde oxidase 활성은芎藭化痰煎 500 mg/kg투여군에서 정상대조군 수준으로의 회복이 관찰되었다(Table 5, Fig. 2).

4. PTZ 경련시 뇌조직 중 glutathione의 함량 및 superoxide dismutase(SOD), catalase , glutathione peroxidase의 활성에 미치는 효과

芎藭化痰煎을 14 일간 투여하고 PTZ로 경련을 유발시켰을 때, 뇌조직 중 glutathione의 함량은 정상대조군이 30.7±2.59 n mole/mg of tissue인데 비하여 PTZ에 의한 경련 유발시에는 16.9±1.32 n mole/mg of tissue로 현저히 감소하였으나,芎藭化痰煎의 전처리에 의한 glutathione 함량의 개선효과는 관찰할 수 없었다.

芎藭化痰煎을 14 일간 투여하고 PTZ로 경련을 유발시켰을 때, SOD 활성은 정상대조군에서 3.32±0.25 unit/mg protein 이었으며, PTZ에 의한 경련 유발시에는 6.13±0.31 unit/mg protein 으로 증가하였다.芎藭化痰煎 500 mg/kg 투여군에서 SOD활성이 유의성있게 감소되었다.

정상대조군이 1.79±0.17 H₂O₂ decreased n mole/mg protein/min인데 비하여 PTZ경련 유발시에는 3.17±0.21 H₂O₂ decreased n mole/mg protein/min로 증가했으며,芎藭化痰煎 500 mg/kg 투여군에서 PTZ에 의해 증가된 catalase 효소의 활성이 유의성있게 감소되었다. Glutathione peroxidase의 활성은 정상대조군에서 114.9±13.1 oxidized NADPH n mole/mg protein/min이었으며 PTZ에 의한 경련 유발시에는 172.8±21.2 oxidized NADPH n mole/mg protein/min으로 증가하였고,芎

芭化痰煎 500 mg/kg 투여군에서 효소활성이 감소하였으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 6, Fig. 3, 4).

Table 6. Effect of GCHDJ on the Brain Superoxide Dismutase Activity in PTZ-induced Mice

Treatment	Dose (mg/kg)	glutathione Content ¹⁾	Superoxide Dismutase Activity ²⁾	Catalase Activity ³⁾	Glutathione Peroxidase Activity ⁴⁾
Control		30.7±2.59 ^a	3.32±0.25 ^a	1.79±0.17 ^a	114.9±13.1 ^a
PTZ	70	16.9±1.32 ^b	6.13±0.31 ^b	3.17±0.21 ^b	172.8±21.2 ^b
	100	18.7±1.94 ^b	5.47±0.34 ^{bc}	3.41±0.23 ^b	158.6±14.5 ^b
GCHDJ	250	18.3±1.58 ^b	5.32±0.46 ^{bc}	3.23±0.26 ^b	144.5±12.9 ^b
	500	19.5±1.93 ^b	5.15±0.51 ^c	2.48±0.21 ^c	136.7±13.9 ^b

Each sample was administered(p.o.) once a day for 14 days to mice. An one hour after the final treatment of sample, mice were received PTZ(70 mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values represent means±S.D.(n=10) and by the same superscript are not significantly different (p<0.05) each other by new multiple scare method.

1)content : n mole/mg of tissue, 2) activity : unit/mg protein * : 1 unit of SOD activity was defined as the which inhibited the reduction of alkaline DMSO-mediated cytochrome c by 50% , 3) activity : H₂O₂ decreased n mole/mg protein/min 4) activity : oxidized NADPH n mole/mg protein/min

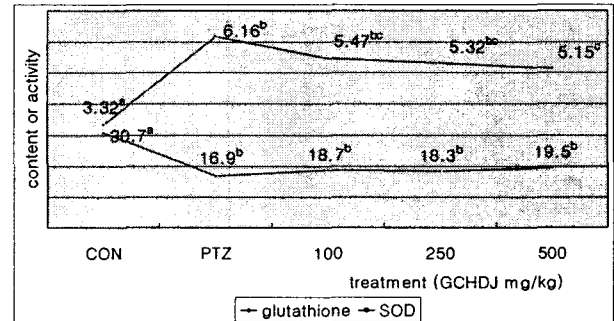


Fig. 3. Effect of GCHDJ on the Brain Glutathione Content¹⁾ and SOD activity²⁾ in PTZ-induced Mice. Values represent means and the different superscript represents significant difference with each other by new multiple scare method (p<0.05). 1)content : n mole/mg of tissue 2) activity : unit/mg protein * : 1 unit of SOD activity was defined as the which inhibited the reduction of alkaline DMSO-mediated cytochrome c by 50%

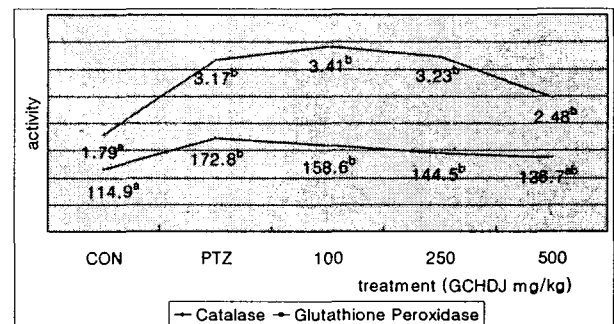


Fig. 4. Effect of GCHDJ on the Brain Catalase¹⁾ and Glutathione Peroxidase²⁾ activities in PTZ-induced Mice. Values represent means and the different superscript represents significant difference with each other by new multiple scare method (p<0.05). 1) activity : H₂O₂ decreased n mole/mg protein/min, 2) activity : oxidized NADPH n mole/mg protein/min

고찰

경련은 중추성 또는 말초성 운동신경원의 이상흥분으로 나타나

는 일과성 불수의적인 근육운동을 말하며^{1,3,29)} 간질, 두부손상, 중풍, 중추신경계 변성질환, 중추신경계 감염, 파상풍, 뇌종양, 급성 중독 및 대사성 질환, 고열 등^{1,4,30,31)}의 원인으로 일어난다. 이 중 간질은 뇌신경원의 발작적인 과도한 방전으로 인한 만성적 반복적 신경장애로 경련을 주증상으로 하는 대표적인 만성질환 중 하나이다^{1,4)}. 경련의 발생기전은 중추의 흥분성-억제성 전달기능사이의 균형소실이 주요 원인으로 추정되고 있는데, 특히 흥분성 신경전달물질인 glutamic acid와 억제성 전달물질인 GABA의 기능적 균형장애가 발작 기전의 주요한 원인으로 생각되어지며, 경련치료약물 개발 연구의 토대가 되고 있다^{2,4,5,32)}.

최근의 연구에서 경련발작은 프리라디칼(free radical)의 생성을 가져오며 이는 신경세포손상 및 신경전달물질의 생성에 영향을 미친다고^{6-10,33,34)} 보고되고 있다. 여러 연구를 통하여 프리라디칼의 독성이 질병의 발생과 관련되어 있음이 밝혀지고 있으며, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성 경화증, 뇌손상, 간질 등 신경계 장애도 역시 프리라디칼과의 관련되어 있음이 보고되고 있다¹¹⁻¹³⁾. 프리라디칼과 경련과의 관계에 대하여 활성산소종에 의한 과산화는 GABA를 비롯한 각종 신경전달물질의 생성을 억제하며, 경련발작은 프리라디칼의 생성을 가져오고 이것은 또한 경련으로 인한 신경세포 손상과 관련되어 있다고 보고되었다^{6-10,34)}. 또한 간질에 이용되는 항경련 약물치료는 프리라디칼의 생성과 과산화지질 생성을 막아주며, 항경련 작용이 있는 여러 한약 및 처방에서 항산화 작용이 있음이 보고되고 있다^{33,35,36)}.

최근 들어 경련을 비롯한 중추신경계 장애와 활성산소종이 관여하는 산화적 스트레스와의 관계에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다.

한의학에서는 경련 증상을 특징으로 하는 病證으로 癇癇, 痙證, 顛證, 癱瘓, 拘攣, 抽風, 搐搦, 拘急, 驚風 등^{37,38,39)}이 기술되었는데, 이 중 癇癇은 반복적 발작을 특징으로 하는 간질에 해당하며^{3,40)}, 痰·火·驚을 癇疾의 주요 원인⁴¹⁾으로 제시하고 있어 祛痰을 위주로 하고 證에 따라 順氣, 化中, 清火시키는 방법³⁾으로 치료하여왔다.

본 연구에서 사용한 芎藭化痰煎은 六鬱湯의 변방으로 《晴崗醫鑑》¹⁶⁾에 기재되어 脫營 氣鬱로 인한 神經證에 사용된 처방이며, 박¹⁷⁾이 구속스트레스 환경에서 항스트레스 효과를 보고한 바 있으나, 항경련작용, 항산화작용 등에 대한 연구는 보고되지 않았다. 이에 본 실험에서는 임상에서 다양한 病證에 활용되는 芎藭化痰煎의 효능을 실험적으로 규명하고자 항경련작용과 경련시의 항산화작용 등을 관찰하였다. 두 약물을 14 일간의 경구투여 후 경련을 유발시킨 실험군과 전처리를 하지 않고 경련을 유발시킨 대조군 및 경련유발전의 정상대조군과 비교하여 살펴보았다.

芎藭化痰煎은 strychnine, picrotoxin 및 전신성 발작 특이 결신발작의 임상양상과 유사한 PTZ의 복강내 주사로 유발된 경련^{5,42)}에 대해 芎藭化痰煎 투여군의 일부에서 항경련작용이 인정되었으나, 용량의 증가에 따른 항경련 효과의 차이는 나타나지 않았다. 두 약물의 항경련작용은 양성대조물질로 사용한 phenobarbital 100 mg/kg에서 경련발현시간의 현저한 증가 또는 경련이 일어나지 않은 것에 비하여 약한 수준이었다. PTZ로 경

련을 유발하였을 때 뇌조직 중 GABA의 함량이 감소하고, glutamic acid의 함량과 GABA-T의 활성이 증가하여 PTZ로 인한 경련유발이 GABA를 매개로 하는 시냅스 전달의 흥분-억제작용과 관련되어 있음을 보여주었다. 芎藭化痰煎 투여군에서 PTZ로 경련을 유발시켰을 때 대조군에 비하여 뇌조직 중 GABA의 함량은 증가하고, glutamic acid의 함량과 GABA-T의 활성은 감소하였다. 본 실험결과, 경련관련 실험시 양성대조물질로 사용하는 lamotrigine, vigabatrin이나 phenobarbital에 비하여 약한 수준이지만^{43,44)}, 芎藭化痰煎은 뇌 중의 GABA를 매개로 하는 시냅스 전달의 억제작용을 항진시켜 항경련 작용을 나타내는 것으로 나타났다.

본 실험에서 PTZ 경련 유발로 뇌 중 프리라디칼 생성의 지표인 과산화지질의 함량이 정상군에 비하여 현저하게 증가하였으며, 그 생성계의 관여 효소인 XOD, aldehyde oxidase활성이 현저하게 증가하였다. 이를 볼 때 PTZ로 유발된 경련발작은 산화적 스트레스로 작용하여 뇌조직의 과산화지질을 증가시켜 뇌신경세포를 손상시키며, 프리라디칼을 생성은 GABA를 비롯한 신경전달물질의 생성을 억제하여 경련 유발 과정에 관여될 것으로 생각된다. 芎藭化痰煎을 14 일간 경구투여한 후 PTZ로 경련을 유발시켰을 때, 대조군에 비하여 과산화지질 함량이 감소하고, XOD와 aldehyde oxidase의 활성이 감소하였다. 芎藭化痰煎 500 mg/kg 투여군에서 과산화지질의 함량이 정상대조군 수준으로 감소되었고, XOD는 芎藭化痰煎 250 mg/kg 투여군에서, aldehyde oxidase는 芎藭化痰煎 500 mg/kg 투여군에서 정상대조군 수준으로 감소하였다. 芎藭化痰煎의 투여가 경련발작시의 뇌조직 중 프리라디칼의 생성을 억제하여 뇌신경세포 손상을 막아주며, 경련발작으로 발생한 과산화로 인하여 GABA작용이 억제되는 것을 막아주는 작용을 통해 항경련작용에 영향을 주는 것으로 생각된다. 한편 PTZ에 의한 경련 유발시 SOD, catalase, 및 glutathione peroxidase의 활성이 증가되었는데, XOD 및 aldehyde oxidase의 증가로 superoxide 형성이 증가됨에 따라 이 때 생성된 superoxide를 H₂O₂로 전환시키는데 관여하는 SOD의 활성이 증가되고, SOD 활성의 증가로 인하여 생성된 H₂O₂를 H₂O와 산소로 분해하는 catalase 및 생성된 유기기를 물로 분해하는 glutathione peroxidase의 활성도 증가되는 것으로 생각된다^{12,13)}. 芎藭化痰煎의 전처리로 SOD와 catalase의 활성이 감소하였는데, SOD는 芎藭化痰煎 250 mg/kg 투여군에서, catalase는 芎藭化痰煎 500 mg/kg 투여군에서 유의하였다. 이러한 결과는 약물의 투여시 XOD, aldehyde oxidase활성의 감소로 superoxide 형성이 감소함에 따라 이를 분해하는 효소인 SOD와 catalase의 활성이 감소하는 것으로 생각된다.

이상의 실험결과를 통하여 芎藭化痰煎은 항경련작용이 있으며, 이는 뇌 중의 GABA와 glutamic acid의 기능적 균형과 관련되어 있음을 알 수 있었다. 또한 궁치화담전의 투여가 경련으로 유발된 뇌조직 중의 산화반응에 대하여 활성산소의 생성과 분해에 유의한 영향을 가지고 있어 경련 및 중추신경계 산화작용과 관련된 癇癇, 痙證, 癱瘓 등에 다양한 임상활용이 가능하리라 사료된다.

결 론

본 연구는 芎藭化痰煎의 효능을 실험적으로 규명하고자, 실험동물에서 PTZ로 경련을 유발하여 항경련효과, 뇌조직 중 GABA, glutamic acid의 함량 및 GABA-T의 활성 변화, 경련 유발시 뇌조직 중 활성산소의 생성 및 분해계에 미치는 영향 등을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

항경련 실험에서 芎藭化痰煎은 PTZ로 유발된 경련에 일부 농도의 투여군에서 항경련 작용이 인정되었다. 약물의 투여는 PTZ로 경련 유발시 감소된 뇌조직 중 GABA의 함량을 증가시키고, 증가된 glutamic acid의 함량과 GABA-T의 활성을 감소시켰다. 특히 glutamic acid의 함량은 약물 투여군에서 정상대조군 수준으로 회복되었다. PTZ로 경련 유발시 증가된 뇌조직 중 과산화지질 함량이 약물의 투여군에서 정상대조군 수준으로 회복하였으며, 증가된 뇌조직 중 XOD와 aldehyde oxidase의 활성은 약물의 투여군에서 감소되었고, 일부 용량에서는 정상대조군 수준으로 회복되었다. PTZ로 경련 유발시 감소된 뇌조직 중 glutathione의 함량과 증가된 glutathione peroxidase의 활성은 약물의 투여군에서 변화가 없었으나, 경련 유발시 증가된 뇌조직 중 SOD와 catalase의 활성이 약물의 투여로 감소되었다.

이상의 결과에서 芎藭化痰煎은 독성이 없는 안전한 약으로 뇌 중 GABA계에 작용하여 항경련작용이 있으며, 경련유발시 뇌 조직 중 활성산소의 생성에 대해 항산화작용을 가지고 있어 간질을 비롯한 경련성 질환 및 중추신경계의 산화작용과 관련된 여러 질환에 활용이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. Lawrence M. Tieney, Jr., Stephen J. McPhee, and Maxine A. Papadakis. *Current Medical Diagnosis & Treatment*. London:Paramount Publishing Business and Professional Group. p.803-7, 1994.
2. 민성길. 최신정신의학. 서울:일조각. p.33-4,38-9,380-1, 1996.
3. 黃義完, 金知赫 編著. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. p.157-61, 401-14, 651-2, 1992.
4. 대한신경정신의학회. 신경정신과학. 서울:하나의학사. p.251-60, 461-9, 1998.
5. 서울대학교 의과대학 약리학 교실. 약리학. 서울:고려의학. p.164-5, 266-84, 1994.
6. Denson G. Fujikawa, Steve S. Shinmaei, and Baiyaun Cai. Seizure-Induced Neuronal Necrosis: Implications for Programmed Cell Death Mechanism. *Epilepsia*. 41(86): S9-13, 2000.

7. Braughler J. M., Duncan L. A., and Goodman T. Calcium enhances in vitro free radical-induced damage to brain synaptosomes, mitochondria, and cultured spinal cord neurons. *J. Neurochemistry*. 45: 288-93, 1985.
8. Colton J. S., Colton C. A. Effect of oxygen at high pressure on spontaneous transmitter release. *Am. J. Physiol.* 235(5): C233-7, 1978.
9. Debler, E.A., Sershen H., Lajtha, A., and Gennaro Jr. J. F. Superoxide radical-mediated alteration of synaptosome membrane structure and high affinity r-[14C] aminobutylic acid uptake. *J. Neurochemistry*. 47:1804-13, 1986.
10. Schwarz R. D., Skolnick, P., and Paul, S. M. Regulation of r-aminobutylic acid/Barbiturate receptor-gated chloride ion flux in brain vesicles by phospholipase A2 : Possible role of oxygen radicals. *J. Neurochemistry*. 50:565-71, 1988.
11. 대한병리학회. 病理學 I. 서울:고문사. p.34,38,43,49-51, 1995.
12. 김영근, 김영표. 프리라디칼. 서울:여문각. p.154-8, 240-51, 267-8,359, 1997.
13. Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Freeradicals in biology and medicine*. New York:Oxford University Press. p.105, 134, 140, 146, 246-53, 721-2, 733-6, 744, 751, 755-61, 1999.
14. 郭露春 編著. 黃帝內經素問校注語釋. 서울:一中社. p.284, 286, 288, 1991.
15. 李挺. 編註醫學入門. 서울:大星文化社. p.261-3, 1994.
16. 김영훈. 靑崗醫鑑. 서울:成輔社. p.248,252, 1992.
17. 박두병. 芎藭化痰煎의 항스트레스 효과에 대한 실험적 연구. 대한한의학회지. 20(1):172-84, 1999.
18. Sohn Y.J., Levitt B. and Raines A. Anticonvulsant properties of diphenylthiohydantoin. *Arch. Int. Pharmacodyn.* p.188:284, 1970.
19. Allen I.C., Griffiths R. Reversed-phase high performance liquid chromatographic method for determination of brain glutamate decarboxylase suitable for use in kinetic studies. *J. Chromatography*. p.336:385, 1984.
20. Ohkawa H., Ohishi N. and Yaki K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* p.95:351, 1979.
21. Alwin A.V., Johanners A.L. and Dirk R. Changes in the levels of glutathione in phagocytosing human neutrophils. *Blood*. 55(5): 741-7, 1980.
22. Bergmeyer H.U. *Method of enzymatic analysis* 3eds. vol. 2. New York:Academic press. p.191-2, 1983.
23. Saugstad O.D. Role of Xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia : reoxygenation injury. *Pediatrics*. 98:1, 1996.
24. Rodriguese A.D. Comparison of levels of aldehyde oxidase with cytochrome P450 activities in human liver in vitro. *Biochemical pharmacology*. 48(1):197-200, 1994.

25. McCord J.M and Fridovich I. Superoxide dismutase; an enzymic function for erythrocyte. J. Biological chemistry. 244(22): 6049-55, 1969.
26. Aebi H. Catalase. In "Methods of enzymetic analysis" Vergmeyer, M.U. Newyork:Academic Press. 2:673, 1974.
27. Hiraiwa K., Oka T. and Yagi K. Effect of bleomycin on lipid peroxides, lutathine reductase and collagenase in culture lung fibroblasts. J. Biochemistry. 93:1203-10, 1983.
28. Lowry O.H., Rodebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. p.193:265, 1961.
29. 吉利和. 내과진단학. 서울:제일의학사. p.193-4, 1991.
30. Joseph I. Sirven. Acute and Chronic Seizures in Patients Older Than 60 Years. Mayo Clin Proc. 76:175-83, 2001.
31. 田崎義昭, 齋藤佳雄. 臨床神經診察法. 光州:瑞光醫學書林. p.375-8, 1990.
32. Brian W. Metcalf. Inhibitor of GABA metabolism. Biochemical Pharmacology. 28:1705-12, 1971.
33. Hung-Ming Wu, Chin-San Liu, Jing-Jane Tsai, Lie-Yon Ko, and Yau-Huei Wei. Antioxidant and Anticonvulsant Effect of a Modified Formula of Chaihu-Longu-Muli-Tang. The American Journal of Chinese Medicine. 30(2&3):339-46, 2002.
34. Marina V. Frantseva, Jose L. Perez Velazquez, Paul A. Hwang and Peter L. Carlen. Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy. European Journal of Neuroscience. 12(4):1431-9, 2000.
35. 구병수. 복합향(丁香, 辛夷)이 항경련효과 기전에 관한 실험실적 연구. 동의신경정신과학회지. 10(1):121-32, 1999.
36. 辛容玟, 具炳壽. 辛夷香이 mouse의 誘導痙攣에 미치는 影響. 동의신경정신과학회지. 10(2):85-104, 1999.
37. 中醫研究院主編. 中醫症狀鑑別診斷學. 北京:人民衛生出版社. p.53-5, 81-8, 1987.
38. 中國中醫研究院廣安門醫院 主編. 實用中醫腦病學. 北京:學苑出版社. p.154-215, 1993.
39. 楊思澍, 張樹生, 傅景華 主編. 中醫臨床大全. 北京:北京科學技術出版社. p.220-1, 1991.
40. 陳貴廷, 楊思澍 主編. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京:中國醫藥科技出版社. p.731-8, 1991.
41. 張伯臾. 中醫內科學. 서울:醫聖堂. p.253-60, 1993.
42. Bertram G. Katzung. 임상약리학. 서울:한우리. p.439-41, 462-3, 1998.
43. 辛容玟. 加減蘇合香元 香氣 및 癩寶丹이 中樞神經抑制 및 腦神經受容體 活性에 미치는 影響. 東國大學校 博士學位論文. 2000.
44. 權保亨. 四物安神湯의 抗痙攣效果 및 作用機轉에 關한 實驗的 研究. 東國大學校 博士學位論文. 1998.