

Kainic acid로 유도된 생쥐의 간질 발작에 대한 천마 메탄올 추출물의 항경련 효과 연구

장정희 · 배창환 · 김형우¹ · 김승태*

부산대학교 한의학전문대학원 경락구조의학부, 1: 약물의학부

Anti-convulsant Effects of Methanol Extract of *Gastrodia Elata* on Kainic Acid-induced Epilepsy Mouse Model

Jung Hee Jang, Chang-Hwan Bae, Hyungwoo Kim¹, Seungtae Kim*

Division of Meridian and Structural Medicine, 1: Division of Pharmacology, School of Korean Medicine, Pusan National University

Kainic acid (KA) is a excitatory agonist causing epileptic seizure and excitotoxicity in the hippocampus. *Gastrodia Elata* (GE) is known to have anti-convulsant and anti-oxidant effects. This study was investigated a possible role of GE in suppressing epileptic seizure using KA-induced epilepsy mouse model. Eight-week-old male C57BL/6 mice were administrated GE (50 or 500 mg/kg) once a day for 5 days, and then injected KA (30 mg/kg) intraperitoneally. Behavioral changes in mice by KA were evaluated for 90 minutes immediately after the KA administration. Six hours after the KA administration, their brains were harvested and the expressions of glutamate decarboxylase 67 (GAD-67) and K⁺-Cl⁻ cotransporter 2 (KCC2) in the hippocampus of the mice were measured by immunohistochemistry. GE delayed the onset of epileptic seizure after KA administration, suppressed the severity of the seizure and decreased the number of severe seizures dose dependently. Moreover, GAD-67 and KCC2 expressions in the cornu ammonis (CA) 1 and CA3 of 500 mg/kg GE administrated mice were significantly increased compared to those in KA-treated mice. GAD-67 and KCC2 play an important role in regulating GABAergic system. Our results suggest that GE has anti-convulsant effect against KA-induced epileptic seizure through enhancing GABAergic system.

keywords : *Gastrodia elata*, seizure, kainic acid, glutamate decarboxylase, potassium chloride cotransporter 2

서 론

간질은 대뇌 신경세포의 비정상적인 전기적 흥분에 따른 급격하고 불수의적이며 가역적인 신경 기능의 장애인 경련이 반복적이고 만성적으로 나타나는 질환이다¹⁾. 이 질병은 비교적 흔하게 발생하며, 여성보다 남성에게 조금 더 많이 나타나고, 전체 환자 가운데 70% 이상은 20세 이전에 첫 발작이 생긴다²⁾. 간질 발작은 억제성 및 흥분성 신경전달, 이온 채널, 신경조절자 등의 기능 이상이 신경세포 흥분에 관여함으로써 발생하게 되는데, 이 중에서 특히 gamma-aminobutyric acid(GABA)와 관련된 신경계의 이상이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. GABA 수용기 길항제 투여, 해마 신경세포의 파괴 등으로 인해 뇌 내 GABA 신경계에 장애가 발생하면 glutamate성 신경의 과방전이 야기되고, 이것이 전파되면서 간질 발작 증상이 나타난다³⁾. 따라서 간질 발작을 억제하기 위해

서는 GABA 신경계의 이상을 회복시키는 것이 매우 중요하다.

한의학 문헌에서는 간질을 癲癇, 癲疾, 癇症 등으로 표현하였으며, 그 발병 기전은 腎虛하여 肝을 養護하지 못하게 되거나, 脾虛하여 痰이 생겨 情志가 失調하게 되거나, 肝風內動하여 발병 하게 되는 것으로 알려져 있다⁴⁾. 간질을 치료하기 위하여 전통적으로 침과 한약 등 한의학적 치료법을 사용해왔으며, 실제로 한의학적 치료법이 효과가 있다는 연구가 상당수 보고되어 있다. 침의 경우 pentylentetrazol을 이용한 간질 동물 모델에서 전침 자극이 간질 소발작을 억제하며⁴⁾, kainic acid(KA)를 이용한 간질 동물 모델에서 소부(HT8) 자침이 간질발작을 억제하고 해마 치상회의 신경세포를 보호하고²⁾, 곡지(LI11) 자침이 kainic acid 투여로 인한 해마의 신경세포 파괴 및 염증 관련 인자의 발현을 억제한다⁵⁾는 연구 내용이 발표되었으며, 한약의 경우 가미곽향정기산 투여가 소아간질을 호전시킨다는 사례가 보고된 바가 있다¹⁾.

* Corresponding author

Seungtae Kim, Division of Meridian and Structural Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, Korea

E-mail : kimst@pusan.ac.kr · Tel : +82-51-510-8473

Received : 2014/08/15 · Revised : 2014/10/24 · Accepted : 2014/12/04

© The Korean Society of Korean Pathology, The Korean Society of Korean Physiology

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.17208/kjopp.2014.12.28.6.614

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kjoc=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

천마(*gastrodia elata*)는 난초과에 속하는 약용식물로 息風止癢의 효능이 있어 오래전부터 중풍 등 뇌혈류장애에 기인된 질환, 치매, 간질 등 뇌신경질환을 치료하는데 사용되어왔으며⁶⁾, 항경련, 항산화, 항염증의 효과가 있는 것으로 알려져 두통, 현기증, 류머티즘, 신경통, 마비, 고혈압 및 신경통 질환의 치료에도 활용되고 있다⁷⁾. 이중에서도 천마의 항경련 작용에 대한 연구를 살펴보면, 천마가 흰쥐에 pentylenetetrazol을 투여하여 나타난 경련⁶⁾ 및 ICR계 생쥐에 strychnine 투여로 인하여 나타나는 강직성 경련과 picrotoxin 투여로 인한 경련⁸⁾에 대하여 효과가 있으며, 이러한 효과는 GABA 신경계를 활성화시킴으로써 나타나게 되는 것으로 판단된다^{9,10)}. 이외에도 천마는 활성산소로 인한 세포손상을 항산화 작용을 통하여 억제하며^{6,11-14)}, 염증 유발 물질 중 하나인 prostaglandin을 합성하는 효소 COX-2의 생성을 감소시켜 염증을 억제하기도 한다^{7,15)}. 이러한 결과는 천마가 간질로 인한 경련에도 효과가 있을 가능성이 높음을 암시하고 있으나, 천마가 실제로 간질 발작을 억제할 수 있는지, 그리고 어떠한 기전을 통해 그 효과가 나타나는가는 아직까지 명확하지 않다.

Glutamate decarboxylase(GAD)-67은 흥분성 신경전달물질인 glutamate를 억제성 신경전달물질인 GABA와 CO₂로 분해함으로써 GABA의 양을 조절하는 효소로, 간질 발작이 발생하면 이 효소의 해마 내 발현이 감소되는 것으로 알려져 있다²⁾. 또한 K⁺-Cl⁻ cotransporter 2(KCC2)는 세포 내의 Cl⁻의 농도를 낮게 유지시키는 수송체로, 신경의 과흥분으로 인한 세포의 파괴를 억제하고 신경의 가소성을 조절하는 기능을 하는 것으로 알려져 있으며¹⁶⁾, 신경손상으로 인한 KCC2의 감소는 발작을 야기하기도 한다¹⁷⁾. 하지만 천마가 GAD-67 및 KCC2의 발현에 어떠한 영향을 주는가에 대해서는 아직까지 별다른 연구가 없는 실정이다.

이에 본 연구는 glutamate 유사 화합물로 glutamate와 GABA로 중계되는 신경 전달을 왜곡시켜 간질 발작을 유도하는 KA를 이용하여⁵⁾ 간질 발작 동물 모델을 제작하고, 천마가 KA 주입으로 인한 GABA 신경계의 이상을 GAD-67 및 KCC2의 발현을 회복시킴으로써 간질 발작을 억제한다는 가정 하에 연구를 수행하고 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻은 후 진행되었다(PNU-2014-0538). 실험동물은 체중 20~25 g의 8주령 C57/BL6계 수컷 검정 생쥐(오리엔트바이오, 한국)를 사용하였으며, 실험기간동안 스트레스 및 환경의 변화에 따른 영향을 최소화하기 위하여 실험 1주일 전부터 한국 실험동물 관리 수칙(Guidelines of the Korean Academy of Medical Sciences)에 따라 실온(22 ± 3 °C)에서 12시간씩 낮과 밤이 바뀌는 환경에서 물과 실험동물용 고형 사료(에그리브랜드퓨리나코리아, 한국)를 자유롭게 섭취하게 하였다.

2. 시료

본 연구에 사용된 천마는 광명당 제약(울산, 한국)에서 규격품

을 구입하였으며, 부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부에서 기원의 진위와 품질의 상태를 감정한 후 정선하여 사용하였다. 100 g의 천마를 메탄올 500 ml에 넣고 30분간 초음파로 진탕한 다음 실온에서 24시간 동안 추출한 후, 상층액을 별도로 덜어내고 남은 약재에 다시 메탄올 500 ml를 넣고 동일한 방법으로 재차 추출하였다. 상층액을 모은 후 왓만지(No. 20)로 2회 거른 다음 감압농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 농축하였으며, 농축액은 다시 동결건조기(Labconco, Kansas City, MO, 미국)를 이용하여 -150°C에서 건조시켜 동결건조 분말 530 mg을 얻었으며, 이 분말을 물에 녹여 실험 동물에 경구투여 하였다.

3. 실험군 분류 및 천마 투여

동물을 무작위로 정상군(normal group), 대조군(control group), 천마투여군(GE groups)으로 나누었다. 정상군(n=6) 및 대조군(n=6)에는 존데를 이용하여 물을 1일 1회씩 3일간 경구 투여하였으며, 천마투여군에는 존데를 이용하여 각각 50 mg/kg(n=6) 또는 500 mg/kg(n=6) 용량의 천마를 1일 1회씩 3일간 경구 투여하였다.

4. KA 주입 및 행동 실험

마지막으로 물 또는 천마를 경구 투여를 한 후, 30분 뒤에 정상군에는 멸균된 생리식염수를 30 게이지 BD ultra-Fine II insuline syringe를 이용하여 복강 내 주사하였고, 나머지 군에는 30mg/kg의 KA(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 멸균된 생리식염수에 적정 농도로 용해시킨 후 같은 종류의 주사기를 이용하여 복강 내 주사하였다. KA 주입 직후부터 간질발작의 심한 정도를 보기 위하여 생쥐들의 행동 변화를 90분 동안 관찰하였다. 발작의 정도는 Morrison¹⁸⁾의 방법을 일부 수정하여 점수화했다. 이 점수는 0에서부터 6까지 있는데, 정상은 0점, 20초 이상 움직이지 않으면 1점, 경직된 자세를 취하면 2점, 반복적으로 굽거나 빙빙 돌거나 고개를 끄덕거리는 행동을 하면 3점, 앞다리의 경련이 일어나거나 강직성간대발작이 일어나면 4점, 10분간 앞다리의 경련 또는 강직성간대발작이 2회 이상 일어나면 5점, 강직성간대발작이 심하게 발생하여 데굴데굴 구르거나 누워서 일어나지 못하면 6점을 부여한다. 발작의 정도는 처음으로 20초 이상 제자리에 가만히 멈추어 있는 시점인 발작 시작 시간, 90분 간 최대 발작 점수, 90분 간 3점 이상의 심한 발작이 발생한 횟수로 평가하였다.

5. 조직 절편

KA 주입 6시간 후, isoflurane(포란액, 중의제약, 한국)을 이용하여 생쥐들을 마취시키고, 0.05 M phosphate buffered saline(PBS)로 관류하여 체내의 혈액을 제거시켰으며, 0.1 M phosphate buffer에 4 % paraformaldehyde(PFA)를 녹인 용액을 관류시켜 조직을 고정시켰다. 그 후 생쥐의 뇌를 적출하여 하루 동안 PFA에 담가 조직을 완전히 고정시키고, 30 %의 sucrose 용액에 담근 후 조직을 절편할 때 까지 4 °C 냉장 보관하였다. 뇌 조직은 40 μm의 두께로 cryotome(Leica Microsystems, Wetzlar, 독일)을 사용하여 절편하였으며, 조직 중 해마 부분(-1.82 ~ -2.06 mm

from the bregma)을 선정하여 이 부위를 주로 사용하였다.

6. 면역조직염색화학법 (Immunohistochemistry)

뇌 조직 중의 GAD67, KCC2 발현 정도를 측정하기 위하여 면역조직염색화학법을 실시하였다. GAD-67과 KCC2 일차 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, 미국)를 각각 0.05 M PBS에 희석한 용액에 1:100의 비율로 희석시키고, 조직과 4 °C에서 하루 동안 반응시켰다. 그 후 0.05 M PBS로 5분간 3번씩 세척한 후, 이차 항체인 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, 미국)를 조직과 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 Avidin Biotin Complex(Vector Laboratories Inc.)를 만들어 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 이것을 diaminobenzidine을 이용하여 5분간 발색시키고, 조직을 슬라이드에 부착한 후 알코올을 이용하여 탈수시켰으며, mounting fluid를 이용하여 커버글래스를 붙였다. 현미경(Axio Scope.A1 microscope, ZEISS, 독일)과 카메라(AxioCam ICc3 camera, ZEISS)를 이용하여 해마의 cornu ammonis (CA) 1, CA3 부위를 촬영한 후, Image-pro plus 5.1(Media cybernetics, MD, 미국) 프로그램을 이용하여 optical density(OD)를 평가함으로써 GAD-67, KCC2의 발현 정도를 측정하였다.

7. 자료분석

모든 자료는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 모든 통계는 SPSS 12.0을 사용하였으며, 간질발작 정도의 그룹간 차이 및 GAD-67, KCC2의 발현 정도는 일원분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 시행한 후 Scheffe post-hoc test를 사용해 사후 검정하였다. 유의수준은 p 값이 0.05보다 적은 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 천마가 KA로 유발된 간질 발작에 미치는 영향

발작 시작 시간인 생쥐가 KA 투여 직후부터 처음으로 20초 이상 제자리에 가만히 멈추어 있는 시점을 분석한 결과, 정상군의 경우 관찰하는 동안 발작이 관찰되지 않았으며, 대조군의 경우 167.00 ± 14.88 초에서 발작이 시작됨을 관찰할 수 있었다. 천마투여군의 경우 50 mg/kg를 투여하면 207.75 ± 13.83 초, 500 mg/kg를 투여하면 238.80 ± 6.69 초 후 발작이 시작되는 것을 관찰하였으며, 모두 대조군에 비해 유의하게 발작 시작 시간이 늦추어졌다(50 mg/kg: $p < 0.05$; 500 mg/kg: $p < 0.01$; Fig. 1A).

다음으로 KA 투여 후 90분간 최대 발작 점수를 평가한 결과, 대조군의 경우 최대 발작 점수가 평균 5.25 ± 0.25 점이었으나, 천마투여군의 경우 50 mg/kg를 투여한 경우 3.50 ± 0.87 점으로 감소하였지만 대조군에 비해 유의한 변화는 관찰되지 않았으며, 500 mg/kg를 투여한 경우 1.50 ± 1.19 점으로 대조군에 비해 최대 발작 점수가 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다(Fig. 1B).

마지막으로 KA 투여 후 90분간 3점 이상의 심한 발작을 일으키는 횟수를 평가한 결과, 대조군의 경우 90분 간 심한 발작이

10.67 ± 2.87 회 관찰되었으나, 천마투여군의 경우 50 mg/kg 투여 시 3.40 ± 1.69 회, 500 mg/kg 투여 시 2.60 ± 1.14 회로 두 용량 모두 대조군에 비해 유의하게($p < 0.05$) 심한 간질 발작을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1C).

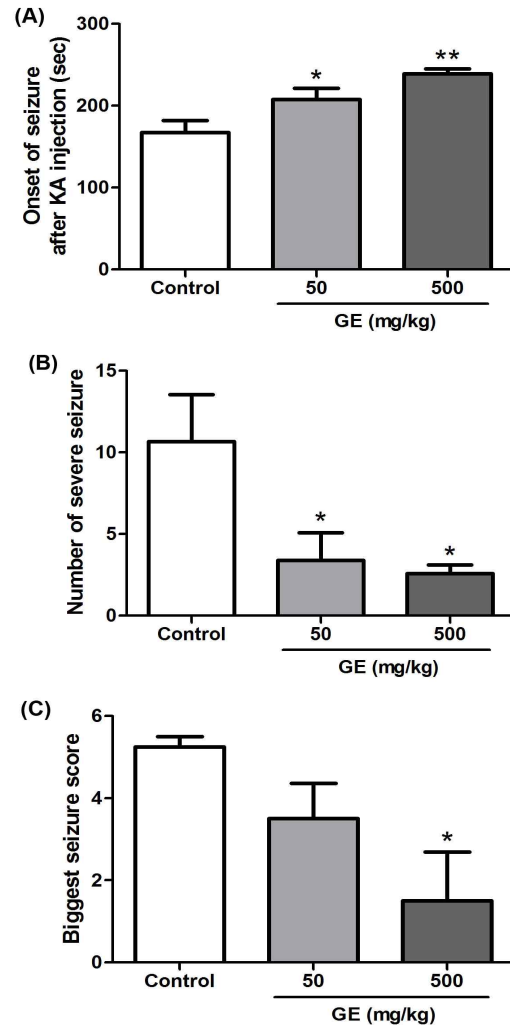


Fig. 1. Effect of GE on kainic acid (KA)-induced epileptic seizure. (A) Onset of immobility after KA administration. (B) Biggest seizure score and (C) Number of severe seizures during 90 min after KA administration. Normal, saline-injected group; Control, KA-injected group; GE, gastrodia elata-administrated and KA-injected group. Data are shown as means \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the control group.

2. 천마가 KA로 유도된 해마 CA1, CA3에서의 GAD-67 발현에 미치는 영향

천마를 복용시킨 KA 유도 간질 생쥐의 해마 CA1과 CA3 영역에서 GAD-67의 발현 변화를 optical density를 이용하여 조사한 결과, CA1 영역의 경우 정상군($100.00 \pm 5.75\%$)에 비해 GAD-67의 발현이 유의하게($75.71 \pm 4.52\%$, $p < 0.05$) 감소하였으나, 천마를 투여한 경우 GAD-67의 발현이 정상군 대비 50 mg/kg의 경우 $95.01 \pm 3.43\%$, 500 mg/kg의 경우 $102.00 \pm 6.66\%$ 로 나타났으며, 두 용량 모두 대조군에 비해 유의하게($p < 0.05$) 발현이 증가하였다. CA3 영역의 경우 GAD-67의 발현 또한 KA 투여 시 정상군

(100.0 ± 5.02 %)에 비해 유의하게 감소(78.10 ± 0.49%, p<0.05) 하였으며, 천마 투여 시 GAD-67의 발현이 50 mg/kg의 경우 정상군 대비 88.38 ± 3.97%로 회복되었으나 대조군에 비해 통계적 유의성은 없었고, 500 mg/kg의 경우 정상군 대비 107.70 ± 8.06%로 GAD-67의 발현이 대조군에 비해 유의하게(p<0.01) 상승하였다 (Fig. 2).

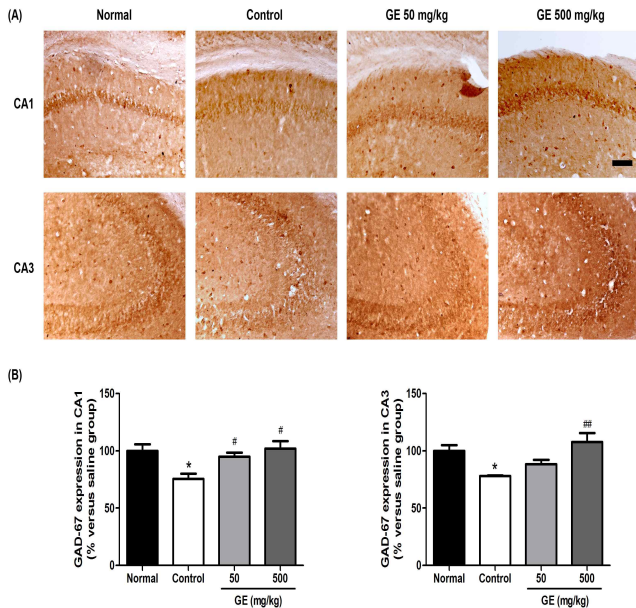


Fig. 2. Effect of GE on kainic acid (KA)-induced glutamate decarboxylase (GAD)-67 immunoreactivity in CA1 and CA3 of the hippocampus. (A) Results of GAD-67 immunostaining in the CA1 and CA3 of the hippocampus. (B) Relative values of GAD-67 expressions in the CA1 and CA3. Scale bar represents 100 μ m. Normal, saline-injected group; Control, KA-injected group; GE, gastrodia elata-administrated and KA-injected group. Data are shown as means \pm SEM. *p<0.05 compared with the normal group, #p<0.05 and ##p<0.01 compared with the control group.

3. 천마가 KA로 유도된 해마 CA1, CA3 세포에서의 KCC2 발현에 미치는 영향

천마를 복용시킨 KA유도 간질 생쥐의 해마 CA1과 CA3 영역에서 KCC2 발현의 변화를 optical density를 이용하여 측정된 결과, CA1 영역의 경우 KA 투여 시 KCC2의 발현이 정상군(100.00 \pm 16.96%)에 비해 감소(69.11 \pm 10.96%)하였으나 통계적 유의성은 없었으며, 50 mg/kg의 천마 투여 시에는 KCC2 발현이 정상군 대비 77.46 \pm 2.72%로 회복되었으나 마찬가지로 통계적 유의성이 없었다. 500 mg/kg의 천마 투여 시에는 발현이 정상군 대비 133.46 \pm 13.58% 증가하였으며, 이는 KA를 투여한 대조군 및 50 mg/kg의 천마 투여군에 비해 유의하게(p<0.05) 증가한 것이다. CA3의 경우 KA를 투여한 대조군의 KCC2 발현이 정상군(100.00 \pm 7.93%)에 비해 감소(81.76 \pm 10.37%)하였으나 통계적 유의성은 없었으며, 50 mg/kg의 천마 투여 시에는 KCC2 발현이 정상군 대비 116.07 \pm 14.22%로 회복되었으나 마찬가지로 통계적 유의성이 없었다. 500 mg/kg의 천마 투여 시에는 KCC2의 발현이 정상군 대비 135.78 \pm 14.16% 증가하였는데, 이는 KA를 투여한 대조군에 비해

유의하게(p<0.05) 증가한 것이다(Fig. 3).

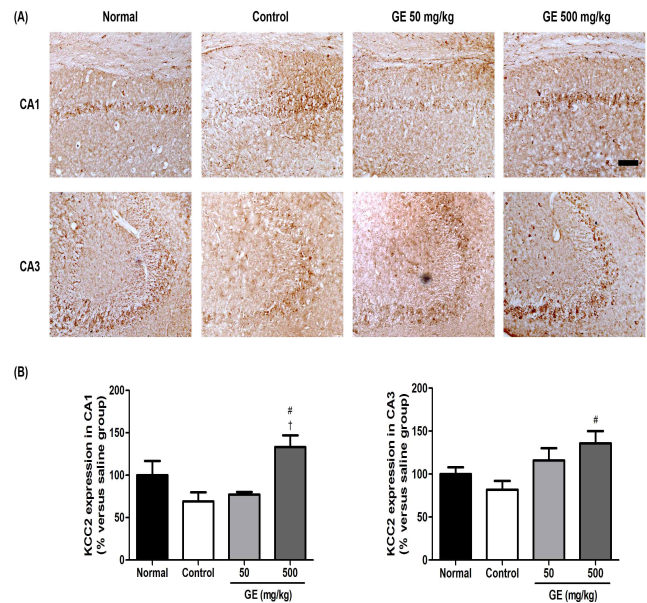


Fig. 3. Effect of GE on kainic acid (KA)-induced KCC2 immunoreactivity in CA1 and CA3 of the hippocampus. (A) Results of KCC2 immunostaining in the CA1 and CA3 of the hippocampus. (B) Relative values of KCC2 expressions in the CA1 and CA3. Scale bar represents 100 μ m. Normal, saline-injected group; Control, KA-injected group; GE, gastrodia elata-administrated and KA-injected group. Data are shown as means \pm SEM. #p<0.05 compared with the control group, + p<0.05 compared with the 50 mg/kg GE-administrated group.

고 찰

간질은 병적 뇌신경원의 과도한 방전으로 인하여 발작이 반복적으로 발생하는 신경계 질환으로, 억제성 신경전달 물질, 이온 채널, 이온의 항상성, 호르몬, 및 신경조절자들의 이상 등으로 발병하며, 이러한 요인들 중에서 뇌신경에서 신호의 전달을 억제하는 신경전달물질인 GABA와 관련된 신경계의 이상으로 인한 과흥분 상태가 주요한 발병 기전 중 하나이다¹⁹⁾.

천마는 예로부터 중풍, 치매, 간질 등 뇌신경질환을 치료하는데 사용되어왔으며, 실험적 연구를 통해 뇌경색 및 뇌부종 감소 효과²¹⁾와 뇌 내 신경세포 보호 효과¹²⁾가 있음이 입증되었으며, 간질 발작 동물 모델에서는 GABA 수용체의 활성화⁹⁾를 통해 간질 발작의 시작 시간을 늦추고 발작의 강도를 낮추는 등의 항경련 작용이 있다고 보고되었다^{22,23)}. 또한 천마는 pentylentetrazole을 투여하여 간질 발작을 유도한 흰 쥐의 뇌 조직에서 glutamate를 감소시키고 GABA를 증가시키며⁸⁾, AIC13 투여로 기억 장애를 유발한 흰 쥐의 뇌 조직 내 glutamate와 GABA의 수준을 정상범위로 조절하는²⁴⁾ 등 glutamate와 GABA의 양을 조절함으로써 발작, 기억 장애 등 뇌신경의 이상으로 발생하는 증상을 개선시킨다. 종합하면 천마가 glutamate와 GABA의 양을 조절하고 GABA 수용체를 활성화함으로써 간질 발작을 억제하는 것으로 판단되나, 천마가 glutamate와 GABA의 양을 어떠한 기전을 통하여 조절하는지는 아직까지 알려져 있지 않다. 이에 저자들은 천마가 glutamate를 GABA로 전환시키는

GAD-67의 발현을 조절할 것이라는 가정 하에 연구를 진행하였다.

GAD-67은 흥분성 신경전달물질인 glutamate를 억제성 신경전달물질인 GABA로 전환시키는 효소로써, 이 효소의 발현이 증가하게 되면 중추신경계 내 GABA의 양이 증가하게 되며, 증가된 GABA가 세포막에 있는 수용기에 결합하면 이로 인해 음이온인 Cl^- 이온이 GABA 수용기를 통해 세포내로 유입되어 신경세포의 흥분성을 억제하게 된다. 본 연구에서 간질을 유발시키기 위해 사용한 KA는 glutamate 유사 화합물로, 투여 시 뇌 내 glutamate 수용기를 과도하게 자극하여 glutamate 및 GABA성 신경 전달 체계의 기능 이상을 발생시키고 GAD-67의 발현을 감소²⁾시키는데, 이러한 뇌 내 신경 기능의 변화는 간질 발작을 야기하게 된다⁵⁾. 하지만 KA 투여로 인한 간질 발작의 강도를 약화시키고 해마신경세포를 보호하는 침 치료²⁾와 KA 투여로 인한 치사율 및 발작기간을 감소시키는 타우린 투여¹⁹⁾의 경우 모두 KA 투여로 인한 GAD-67의 발현 억제를 회복시킨다는 공통점이 있는데, 이는 GAD-67의 발현 조절이 KA 투여로 인한 간질 발작의 억제에 중요한 역할을 한다는 것을 암시한다. 본 연구에서는 KA 투여 후 해마 CA1 및 CA3에서의 GAD-67 발현이 억제되었으며, 천마를 투여하면 KA 투여로 인한 GAD-67 발현의 억제를 회복시키는 것으로 나타났는데, 이는 천마가 해마 내 GAD-67의 발현을 회복시킴으로써 흥분성 신경전달물질인 glutamate를 감소시키고 억제성 신경전달물질인 GABA를 증가시켜 KA 투여로 인한 신경의 과흥분을 억제함으로써 간질 발작 증상을 완화시키는 것으로 사료된다.

KCC2는 세포막의 Cl^- 이온 기울기에 관여하는 단백질로, GABAA 수용기의 작용을 돕는다. 이 단백질은 세포 내의 Cl^- 를 세포 밖으로 배출시킴으로써 세포 내 Cl^- 의 농도를 낮추는데, 이러한 KCC2의 Cl^- 이온 기울기 조절 기능은 연접 후 억제(postsynaptic inhibition) 및 흥분세포독성(excitotoxicity)으로 인한 신경 네트워크의 파괴를 억제하는데 중요한 역할을 한다²⁵⁾. 본 연구에서는 간질 동물 모델에 천마를 500 mg/kg의 용량으로 투여하자 CA1 및 CA3에서 KCC2의 발현이 대조군에 비해 유의하게 증가하는 것을 확인하였는데, 이러한 천마 복용으로 인한 KCC2 발현의 증가는 Cl^- 를 세포 밖으로 배출시키면서 세포막이 과분극 되어 CA1 및 CA3 신경세포의 과흥분 상태를 억제시킴으로써 KA 투여로 인한 흥분세포독성을 억제하고 GABA의 작용을 보조함으로써 간질 발작 억제에 기여한 것으로 사료된다. 또한 천마는 신경세포를 보호하는 효과가 있는 것으로 알려져 있는데^{26,27)}, 이러한 천마의 신경세포 보호 기전에 천마 투여로 인한 KCC2의 발현 증가가 일정 부분 기여할 것으로 추측되나, 이에 대해서는 추가 연구가 필요하다.

본 연구를 통하여 천마가 CA1 및 CA3 부위의 GAD-67의 발현을 증가시킴으로써 GABA 신경계를 조절하고, KCC2 발현을 증가시킴으로써 흥분세포독성을 억제하여 간질 발작을 억제한다는 것을 확인하였다. 하지만 천마의 어떠한 유효성분이 GAD-67 및 KCC2의 활성화에 관여하는지, 그리고 이 기전 이외에 다른 간질 발작 억제 기전이 존재하는가는 아직까지 명확하게 연구되어 있지 않다. 실제로 본 연구에는 천마를 50 mg/kg 투여했을 때 간질 발작의 시작 시간 및 심각한 발작의 횟수를 유의하게 감소시켰으나 GAD-67 및 KCC2의 발현은 유의한 차이가 없었기에, GABA 신경세포의 활성

회복 이외에 다른 간질 발작 억제 기전이 존재할 가능성이 있는 것으로 판단되며, 이에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다.

결 론

간질 동물 모델을 사용하여 천마의 간질의 치료 효과 및 기전을 알아보고자 본 연구를 수행하고 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

KA로 유발된 생쥐의 간질 발작 정도를 Morrison의 방법을 이용하여 비교, 평가한 결과 천마가 간질 발작의 시작 시간을 늦추고, 발작의 강도 및 심한 발작의 횟수를 감소시켰다.

KA를 주입한 동물의 경우 해마 CA1과 CA3에서 glutamate를 GABA로 전환시키는 GAD-67의 발현이 통계적으로 유의하게 감소되었으나, 천마를 복용한 경우 GAD-67의 발현이 통계적으로 유의하게 증가되었다.

천마 복용 후 KA가 주입된 동물의 해마 CA1과 CA3에서 세포 내의 Cl^- 를 세포 밖으로 배출시키는 KCC2의 발현이 천마를 복용하지 않고 KA가 주입된 동물에 비해 통계적으로 유의하게 증가되었다.

이상을 종합해 볼 때, 천마는 GAD-67과 KCC2의 발현을 증가시킴으로써 KA 투여로 인한 GABA 신경세포의 활성 저하를 회복시키고, 해마 신경세포의 과흥분 상태를 조절함으로써 간질 발작의 시작 시간을 늦추고, 발작의 강도 및 횟수를 줄이는 것으로 판단된다. 본 연구를 통하여 도출된 천마의 간질 발작 억제 효과는 추후 간질 발작을 억제할 수 있는 신약 개발 및 천마 약침 개발에 도움이 될 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

1. Na, W.K., Han, K.H., Lee, H.J., Park, E.J. A case report of epileptic children. *J Korean Oriental Pediatrics* 18(1):131-138, 2004.
2. Kim, S.T., Chung, J.H., Jeong, W.B., Kim, J.H., Kang, M.J., Hong, M.S., Park, H.J., Kim, Y.J., Park, H.J., Lee, H.J. Acupuncture Treatment at HT8 Protects Hippocampal Cells in Dentate Gyrus on Kainic Acid-Induced Epilepsy Mice Model. *Korean Journal of Acupuncture* 24(4):99-110, 2007.
3. DeLorey, T.M., Handforth, A., Anagnostaras, S.G., Homanics, G.E., Minassian, B.A., Asatourian, A., Fanselow, M.S., Delgado-Escueta, A., Ellison, G.D., Olsen, R.W. Mice lacking the subunit of the GABA(A) receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J*

- Neurosci 18(20):8505-8514, 1998.
4. Kim, Y.J., Kim, J.H., Ma, C., Shen, M.H., Li, C.R., Sohn, I.C. Electroacupuncture suppresses epileptic EEG in experimental induced epileptic rats. *Korean Journal of Acupuncture* 23(2):105-111, 2006.
 5. Lee, J.B., Hwang, K.N., You, T.W., Bae, C.H., Kwon, S.O., Kim, S.T. Acupuncture Stimulation at LI11 Suppresses Seizure and Apoptosis in Hippocampi on an Epilepsy Mouse Model. *Korean Journal of Acupuncture* 30(1):73-80, 2013.
 6. Huh, K., Kim, J.S., Kwon, T.H., Kim, J.A., Yong, C.W., Ha, J.H., Lee, D.U. The Mechanism of Anticonvulsive Effect of the Rhizoma of *Gastrodia Elata* in Pentylentetrazole Treated Rats. *Yakhak Hoeji* 42(3):330-335, 1998.
 7. Ahn, E.K., Jeon, H.J., Lim, E.J., Jung, H.J., Park, E.H.. Anti-inflammatory and anti-angiogenic activities of *Gastrodia elata* Blume. *J Ethnopharmacol* 110(3):476-482, 2007.
 8. Huh, K., Lee, S.J., Shin, U.S., Park, J.M. Effect of the Ether Fraction of *Gastrodia elata* Methanol Extract on the Pentylentetrazole-induced Seizures. *The Journal of Applied Pharmacology* 3(3):199-204, 1995.
 9. Shin, E.J., Bach, J.H., Nguyen, T.T., Jung, B.D., Oh, K.W., Kim, M.J., Jang, C.G., Ali, S.F., Ko, S.K., Yang, C.H., Kim, H.C.. *Gastrodia elata* Bl attenuates cocaine-induced conditioned place preference and convulsion, but not behavioral sensitization in mice: importance of GABA(A) receptor. *Curr Neuropharmacol* 9(1):26-29, 2011.
 10. Kim, H.J., Hwang, I.K., Won, M.H. Vanillin, 4-hydroxybenzyl aldehyde and 4-hydroxybenzyl alcohol prevent hippocampal CA1 cell death following global ischemia. *Brain Res* 1181: 130-141, 2007.
 11. An, H., Kim, I.S., Koppula, S., Kim, B.W., Park, P.J., Lim, B.O., Choi, W.S., Lee, K.H., Choi, D.K. Protective effects of *Gastrodia elata* Blume on MPP+-induced cytotoxicity in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Ethnopharmacol* 130(2):290-298, 2010.
 12. Hsieh, C.L., Chen, C.L., Tang, N.Y., Chuang, C.M., Hsieh, C.T., Chiang, S.Y., Lin, J.G., Hsu, S.F. *Gastrodia elata* BL Mediates the Suppression of nNOS and Microglia activation to protect against neuronal damage in kainic acid-treated rats. *Am J Chin Med* 33(4):599-611, 2005.
 13. Jiang, G., Wu, H., Hu, Y., Li, J., Li, Q. *Gastrodin* inhibits glutamate-induced apoptosis of PC12 cells via inhibition of CaMKII/ASK-1/p38 MAPK/p53 signaling cascade. *Cell Mol Neurobiol* 34(4):591-602, 2014.
 14. Kim, I.S., Choi, D.K., Jung, H.J. Neuroprotective effects of vanillyl alcohol in *Gastrodia elata* Blume through suppression of oxidative stress and anti-apoptotic activity in toxin-induced dopaminergic MN9D cells. *Molecules* 16(7):5349-5361, 2011.
 15. Kim, B.W., Koppula, S., Kim, J.W., Lim, H.W., Hwang, J.W., Kim, I.S., Park, P.J., Choi, D.K. Modulation of LPS stimulated neuroinflammation in BV-2 microglia by *Gastrodia elata*: 4-hydroxybenzyl alcohol is the bioactive candidate. *J Ethnopharmacol* 139(2):549-557, 2012.
 16. Kin, H., Kim, J., Shimizu-Okabe, C., Okabe, A., Takayama, C. Embryonic development of GABAergic signaling in the mouse spinal trigeminal nucleus interpolaris. *Neurosci Lett* 566: 221-225, 2014.
 17. Vinay, L., Jean-Xavier, C. Plasticity of spinal cord locomotor networks and contribution of cation-chloride cotransporters. *Brain Res Rev* 57(1):103-110, 2008.
 18. Morrison, R.S., Wenzel, H.J., Kinoshita, Y., Robbins, C.A., Donehower, L.A., Schwartzkroin, P.A. Loss of the p53 tumor suppressor gene protects neurons from kainate-induced cell death. *J Neurosci* 16(4):1337-1345, 1996.
 19. El Idrissi, A., L'Amoreaux, W.J. Selective resistance of taurine-fed mice to isoniazide-potentiated seizures: In vivo functional test for the activity of glutamic acid decarboxylase. *Neuroscience* 156(3):693-699, 2008.
 20. Shin, H.J., Jeon, B.T., Kim, J., Jeong, E.A., Kim, M.J., Lee, D.H., Kim, H.J., Kang, S.S., Cho, G.J., Choi, W.S., Roh, G.S. Effect of the calcineurin inhibitor FK506 on K+-Cl- cotransporter 2 expression in the mouse hippocampus after kainic acid-induced status epilepticus. *J Neural Transm* 119(6):669-677, 2012.
 21. Zeng, X., Zhang, S., Zhang, L., Zhang, K., Zheng, X. A study of the neuroprotective effect of the phenolic glucoside *gastrodin* during cerebral ischemia in vivo and in vitro. *Planta Med* 72(15):1359-1365, 2006.
 22. Kim, H.J., Moon, K.D., Oh, S.Y., Kim, S.P., Lee, S.R. Ether fraction of methanol extracts of *Gastrodia elata*, a traditional medicinal herb, protects against kainic acid-induced neuronal damage in the mouse hippocampus. *Neurosci Lett* 314: 65-68, 2001.
 23. Kim, H.J., Lee, S.R., Moon, K.D. Ether fraction of methanol extracts of *Gastrodia elata*, medicinal herb protects against neuronal cell damage after transient global ischemia in gerbils. *Phytother Res* 17(8):909-912, 2003.
 24. Shuchang, H., Qiao, N., Piye, N., Mingwei, H., Xiaoshu, S., Feng, S., Sheng, W., Opler, M. Protective effects of

- gastrodia elata on aluminium-chloride-induced learning impairments and alterations of amino acid neurotransmitter release in adult rats. *Restor Neurol Neurosci* 26(6):467-473, 2008.
25. Gulyas, A.I., Sik, A., Payne, J.A., Kaila, K., Freund, T.F. The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 13(12):2205-2217, 2001.
26. Yu, S.J., Kim, J.R., Lee, C.K., Han, J.E., Lee, J.H., Kim, H.S., Hong, J.H., Kang, S.G. Gastrodia elata blume and an active component, p-hydroxybenzyl alcohol reduce focal ischemic brain injury through antioxidant related gene expressions. *Biol Pharm Bull* 28(6):1016-1020, 2005.
27. Tsai, C.F., Huang, C.L., Lin, Y.L., Lee, Y.C., Yang, Y.C., Huang, N.K. The neuroprotective effects of an extract of Gastrodia elata. *J Ethnopharmacol* 138(1):119-125, 2011.