

抱膽丸이 Picrotoxin-유도 경련시 뇌중 GABA 및 Glutamate 함량변화에 미치는 영향에 관한 연구

안철효, 이원창, 구병수

동국대학교 한의과대학 신경정신과 교실

Study on the Effects of *Podam-hwan* on Brain GABA and Glutamate Levels in the Picrotoxin-induced Convulsion

Chul-Hyo An, Won-Chang Lee, Byung-Soo Koo

College of Oriental Medicine Graduate School of Dongguk University

Currently convulsion is considered to be a chronic central nerve disease characterized by involuntary and severe muscle contraction or spasm. In many recent studies, convulsion's mechanism is due to unbalance between stimulation and suppression of the central nerve system, such as GABA and glutamic acid.

Objectives : This study was performed to examine the anticonvulsant effects of *Podam-hwan* on brain GABA levels and glutamate content in picrotoxin-induced convulsions and to determine the inhibitory activity on GABA transaminase.

Methods : Brain GABA levels and glutamate content in the brains of picrotoxin-induced mice using reverse phase HPLC method, anticonvulsant effect *in vivo*, and the inhibitory effect on GABA transaminase activity *in vivo* have been investigated.

Results : *Podam-hwan* significantly lengthened the onset time of picrotoxin-induced convulsion at a concentration of 15mg/kg, but did not show a dose-dependent pattern. Also, *Podam-hwan* shortened the duration of convulsion by 52.2% at a dose of 30mg/kg in comparison with the control group. *Podam-hwan* inhibited dose-dependently GABA transaminase activity by 35.5% at 30mg/kg, comparing with the control group. *Podam-hwan* also increased the brain GABA level by 38.7% and 68.8% at doses 15mg/kg and 30mg/kg, respectively. In addition, *Podam-hwan* decreased the brain glutamate level by 9.6% and 17.8% at doses 15mg/kg and 30mg/kg, respectively.

Conclusions : *Podam-hwan* can be prescribed for the treatment of convulsion by enhancement of brain GABA level and inhibition of GABA transaminase activity.. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(3):211-222)

Key Words: *Podam-hwan*, Brain GABA and Glutamate level, Anti-convulsion.

緒 論

경련은 돌발적이고 일과성인 발작을 특징으로 하

는 만성중추신경계질환을 총칭하는 것¹⁾으로 불수의적이고 전반적인 격렬한 근육의 연속을 증상으로 하며^{2,3)}, 한의학에서는 痙瘓, 拘急, 拘攣 등으로 표현되었다⁴⁾.

경련성 질환은 선천성 중추신경계발달이상, 중추신경계감염, 생화학적 대사장애, 뇌종양, 외상에 의한

· 접수 : 2002년 6월 20일 · 채택 : 2002년 8월 1일
· 교신저자 : 안철효, 경기도 구리시 교문동 산5-1 동성한의원
(Tel. 031-554-6608, E-mail : nokdam69@lycos.co.kr)

두개골손상, 뇌혈관질환, 퇴행성 뇌기능장애, 열성경련 등 중추신경계의 이상으로 인해 초래되는 것으로, 이중 가장 대표적인 질환으로 간질이 언급되고 있다⁷⁾.

한의학에서는 痙攣을 項背強急, 四肢抽搖, 角弓反張이 主症인 증상으로 설명하고 있으며⁸⁾, 《素問·奇病論》⁹⁾에 癲疾이라는 명칭으로 癇疾에 대한 기록이 있으며, 《太平聖惠方》¹⁰⁾에 癇疾을 癲癇이라는 하나의 독립된 병명으로 기재한 후 많은 후대 醫家들이 병명으로 간질에 대해 연구하였다.

일반적인 痙攣症狀이나 간질과 같은 痙攣發作性疾患은 中樞神經系의 興奮에 의해 야기되는데 그 원인은 腦中 抑制性 神經傳達物質인 GABA(γ -aminobutyric acid)와 興奮性 神經傳達物質인 glutamate의 불균형에서 비롯될 뿐만 아니라 GABA를 분해하는 효소인 GABA transaminase의 뇌중 활성화도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다¹¹⁻¹²⁾.

현재까지 사용되고 있는 항경련제는 1912년 phenobarbital이 소개된 이후 1980년도에 들어 새로운 항경련제의 개발이 활발히 이루어져 약 20종의 신약이 개발되어 임상실험 단계에 있으며 지금까지 이들의 작용기전은 전압의존성 이온채널의 조절, GABA-mediated inhibition의 증강과 amino acid-mediated excitation의 억제로 대별되고 있다¹³⁾. 그러나 이들 약물들은 현재 중증 간질환자에서 두 가지 약물을 혼합하여 사용되고 있기 때문에 한가지 약물에 의한 완벽한 간질억제효과 여부를 파악하기에는 어려운 실정이다. 또한 이러한 합성약물의 장기간 치료에서는 그 부작용이 심각하여 사용이 제한되고 있는 약물들이 많을 뿐만 아니라 현재 이용되고 있는 약물 또한 장기간 복용 혹은 과용하면 여러 부작용이 빈번하게 나타나는 문제점이 있다. 그러므로 장기간 복용하여도 부작용이 경미하며 간질 발병부위에도 선택적으로 작용하는 치료약물의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다¹⁴⁻¹⁸⁾.

한의학에서는 抗痙攣에 관한 실험적 연구로 瀉靑丸¹⁹⁾, 芍藥甘草湯²⁰⁾, 加味鉤藤飲²¹⁾, 小青龍湯²²⁾, 清心溫膽湯²³⁾, 抑肝散²⁴⁾, 四物安神湯²⁵⁾ 등이 있으나, 鑛物性 本草로 構成된 처방에 의한 報告는 接한 바가 없었다.

이에 따라 본 연구에서는 《東醫寶鑑》²⁶⁾에서 癲癇, 風癇 등에 응용되었던 抱膽丸의 抗痙攣效果를 뇌중 신경전달물질의 함량변화와 GABA분해효소의 활성과 연관지어 검토하였다.

이를 위하여 抱膽丸을 분말상태로 용량별로 실험동물에 경구 투여하여 中樞神經系의 synapse前 抑制機能을 阻害시켜 痙攣을 유발하는 물질인 picrotoxin에 의한 痙攣을 어느 정도 抑制하는지를 痙攣發現時間, 痙攣持續時間 및 死亡率 등을 지표로 관찰하였다. 그리고 이 때의 뇌중 GABA분해효소의 활성변동을 *in vivo*에서 측정하였으며 아울러 痙攣誘發時 GABA와 glutamate의 함량이 어떻게 변하는지를 확인하기 위하여 逆相 HPLC법을 실시하여 定量해 본 결과, 有意한 結果를 얻어 보고하는 바이다.

實 驗

1. 材料

1) 試藥

신경전달물질 정량에 필요한 시약인 γ -aminobutyric acid(GABA), glutamate, 2-aminoethylisothiuronium bromide, pyridoxal-5-phosphate, triethanolamine, o-phthalaldehyde, 효소활성 측정에 사용한 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP)와 α -ketoglutaric acid, 경련유발물질인 picrotoxin, Bradford reagent, HPLC 용매인 potassium acetate 등은 모두 Sigma (St. Louis, MO, USA)사 제품을 사용하였으며 기타 용매, 유기시약 및 buffer용 무기시약은 모두 국산 특급을 사용하였다.

2) 器機

뇌조직 마쇄는 Heidolph RZR 2021 homogenator(독일)를 사용하였고 Ultracentrifuge(초원심분리기)는 Kontron T-2080(스위스)을, High speed refrigerated centrifuge는 Vision VS-21STMN(국산)를 사용하였다. 활성측정을 위한 흡광도는 Shimadzu UV-2001S spectrophotometer(일본)로 측정하였으며 정량을 위한 HPLC는 Shimadzu LC-10AD(일본)를 사용하여

형광검출기로 분석하였다.

3) 動物

한국실험동물개발로부터 구입한 외관상 건강한 ICR계 웅성 mouse (30±1 g) 또는 Sprague-Dawley계 mouse (250-300 g)를 본 대학 동물사육사에서 일정한 조건으로 사육하여 사용하였다. 사육조건은 온도는 21±2℃, 습도는 50-60% 그리고 명암은 12시간 light/dark cycle을 유지시켰다. 실험동물을 1주일간 사육실에서 적응시켰으며 실험개시전 24시간 동안 물만 먹이고 절식시켰다. 동물처치는 효소활성의 일 증변동을 고려하여 오전 10-12사이에 실시하였다. 대조군은 정상적으로 사육시킨 다음, 최종처치일에 痙攣유발물질인 picrotoxin을 saline에 녹여 0.1 ml를 피하주사하였다. 실험군은 한약재를 분말상태로 한 다음 saline에 현탁하여 용량별로 7일간 경구투여하였고, 최종일에 picrotoxin 0.1ml를 피하주사한 다음, 30분 후 처치하였으며 처치한 실험동물의 뇌를 적출하여 각종 실험에 사용하였다.

4) 藥材

본 실험에 사용한 재료는 동국대학교 한방병원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였으며, 《東醫寶鑑》의 조성과 함량과 제법대로 제조한 抱膽丸²⁶⁾粉末을 15 mg/kg와 30 mg/kg의 두 실험군으로 분류하고 7일간 경구 투여한 후, 아래의 실험을 행하였다.

Table 1. Composition of Podam-hwan Prescription

韓藥名	生藥名	重量(g)
黑 鉛	Mtium	100
水 銀	Calomelas	80
朱 砂	Cinnabaris	40
乳 香	Olibanum	40
總 量		260(g)

2. 方法

1) 酵素源의 製造

실험동물에서 뇌조직을 적출한 다음, 조직 1g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를

가하여 약 4℃에서 homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 상정액을 다시 1시간 동안 100,000×g에서 초원심분리(ultracentrifuge)하여 cytosol분획을 얻고 이를 효소원으로 하여 효소활성 실험에 사용하였다. 상기의 모든 조작은 0-4℃에서 실시하였다.

2) Picrotoxin-誘導 痙攣 抑制效果 測定

실험동물에 일정기간 약재를 경구투여한 다음, 경련유발물질인 picrotoxin 5.0 mg/kg을 saline(0.9% 염화나트륨)에 녹이고 그 0.1 ml를 피하주사하여 인위적으로 痙攣을 유발시켰다. 경련억제효과는 경련유발물질의 주사후 약제의 효능에 의해 나타나는 痙攣발현시간(onset time)의 지연정도, 痙攣지속시간(duration)의 단축정도 그리고 경련후의 사망률(lethality) 억제정도를 각각 측정하여 대조군과 그 효과를 비교하였으며 이 때, 경련은 5초 이상 지속되는 것을 유효경련으로 인정하였다.

3) In vivo에서의 GABA transaminase 抑制效果 測定

생체외(in vitro)에서 GABA-T(γ -aminobutyric acid transaminase, EC 2.6.1.19)의 활성측정은 Bergmeyer 등의 방법²⁹⁾에 따라 실시하였다. 즉, 일정량의 0.15 M potassium phosphate buffer (pH 8.0)에 α -ketoglutaric acid와 기질인 GABA 및 뇌조직을 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 다음, 이때 생성된 succinic semialdehyde에 25.5 mM의 β -NADP를 첨가시키고 20분간 반응시켜 생성되는 NADPH를 340 nm에서 측정하여 효소활성을 산정하였다. 효소의 활성도는 1시간당 1 mg의 단백질이 생성시킨 NADPH의 양을 nmole로 표시하였다.

4) 腦組織중의 GABA 含量變化 測定

(1) 검량선 작성

GABA 및 glutamate 표준품을 용량을 달리하여 정확히 제조한 다음, 逆相칼럼을 사용한 고속액체크로마토그래피(reverse phase HPLC)법으로 측정하고 농

도별 검량선을 작성하였다.

(2) GABA 및 glutamate 정량

뇌 조직 중의 GABA 및 glutamate의 정량은 Allen 등의 방법³⁰⁾을 약간 변경하여 실시하였다. 뇌 조직을 1mM 2-aminoethylisothiuronium bromide와 2mM pyridoxal-5-phosphate를 포함하는 0.3M triethanolamine buffer (pH 6.8)로 10% 마쇄균질액을 제조한 다음, 15,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 postmitochondria 분획을 일정량의 200mM potassium phosphate buffer (pH 6.8)에 첨가한 후, 빙냉의 ethanol로 단백질을 제거시켰다. 이것을 원심분리하여 얻은 상정액을 membrane filter (0.2 μm, 13 mm)를 사용하여 여과한 다음, 여액중에 함유된 GABA의 함량을 逆相 고속액체크로마토그래피법으로 측정하여 표준품 (GABA 및 glutamate)의 retention time과 비교, 확인하고 검량선을 이용하여 그 함량을 산정하였다.

HPLC 분석조건을 다음에 나타내었다(Table 2).

Table 2. Conditions of HPLC Measurement for the Determination of Brain GABA and Glutamate Levels in Mice

Parameter	Conditions
column	Inertsil ODS-3 (150×4.6mm, ID: 5μm)
mobile phase (gradient)	20% methanol in 10mM potassium acetate buffer (pH 6.5) to 0% for 40min.
flow rate	0.6ml/min
injection volume	10μl/min
detection	fluorescence detector (λex: 340nm, λem: 450nm)

3. 蛋白質 定量 및 統計處理

단백질의 정량은 Bradford reagent를 사용하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 실시하였다. 즉, 농도별 stock solution (bovine serum albumin) 0.1 ml에 Bradford 시약 3 ml를 혼합하고 25 °C에서 30분간 반응시킨 다음, 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험결과는 통계프로그램인 Origin (Version 3.78)으로 처리하였으며 실험결과는 mean ± S.E.로 표시하였고 통계적 유의성은 Student's t-test

로 검정하였다.

實驗結果

1. Picrotoxin-誘導 痙攣 抑制效果

1) 경련발현 지연효과

抱膽丸 분말을 7일간 경구투여한 다음, 중추신경계의 synapse前 억제기능을 저해(blockade of presynaptic inhibition)시켜 경련을 유발하는 물질인 picrotoxin을 투여하여 경련을 유발시켰을 때, 어느 정도 경련을 억제시키는지를 관찰하였다. 대조군은 경련발현시간이 11.2±1.13분(P<0.05)인데 비해 抱膽丸 분말 15mg/kg 투여군은 22.7±2.86분(P<0.05)으로서 2배 이상 경련발현시간이 지연되는 우수한 항경련효과를 보여주었다. 그러나 30mg/kg 투여군의 경우에는 발현시간이 16.1±5.60분으로 대조군에 비해 늘어나긴 했으나 15mg/kg 투여군에 비해 오히려 효과가 감소한 것으로 나타났다(Fig. 1).

2) 경련지속시간 단축효과

抱膽丸 분말을 7일간 경구투여한 다음, 中樞神經系의 synapse前 抑制機能을 阻害(blockade of

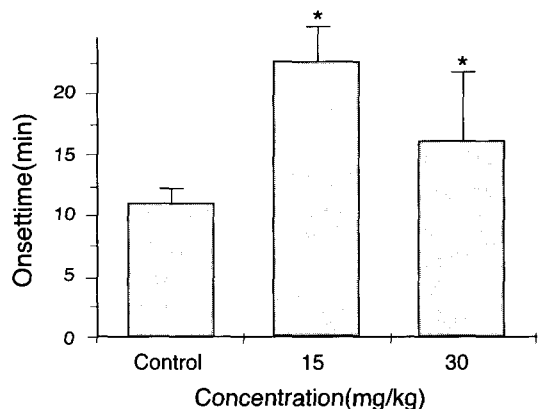


Fig. 1. Anticonvulsive effect (onset time) of Podam-hwan on picrotoxin-induced convulsion. Picrotoxin(5.0mg/kg) was injected subcutaneously at final day. The procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.E. for 7 animals. *: significantly different from the control group(P<0.05).

presynaptic inhibition)시켜 경련을 유발하는 물질인 picrotoxin을 투여하여 경련을 유발시켰을 때, 경련 지속시간이 어느 정도 단축되는지를 측정하였다. 대조군은 경련지속시간이 18.2±3.55분인데 비해 抱膽丸 분말 15 mg/kg 투여군은 12.3±3.28분으로서 32.4% 지연되는 효과를 보여 주었다. 30 mg/kg 투여군의 경우에는 8.7±1.26분으로서 대조군에 비해 경련지속 시간이 52.2% 단축되었다(Fig. 2).

3) 사망을 억제효과

抱膽丸 분말을 경구투여한 다음, picrotoxin-유도 경련에 의한 사망률을 측정한 결과, 대조군이 7마리 중에서 3마리가 사망하여 42.8%의 사망률을 나타낸 데 비해 抱膽丸은 15 mg/kg과 30 mg/kg의 용량에서 모두 사망을 일으키지 않아 사망률을 크게 억제시키는 것으로 조사되었다(Fig. 3).

2. GABA transaminase 抑制效果

抱膽丸 분말을 실험동물에 직접 투여한 다음, 뇌를 적출하여 뇌중 GABA transaminase(GABA-T) 억제효과를 측정한 결과, 용량에 비례하여 억제효과가 증가

하는 것으로 나타났다. Picrotoxin으로 경련을 유발시킨 군은 NADPH 함량이 2.56±0.12 nmoles/mg protein/h (P<0.05)로 나타나 대조군에 비해 약 2배 가량 GABA-T의 활성이 증가하였다. 그러나 약재 15mg/kg을 경구투여하였을 때는 NADPH 함량이 1.87±0.15 nmoles/mg protein/h (P<0.05)로서, picrotoxin 투여군에 비해 27.0% 감소하였으며 약재

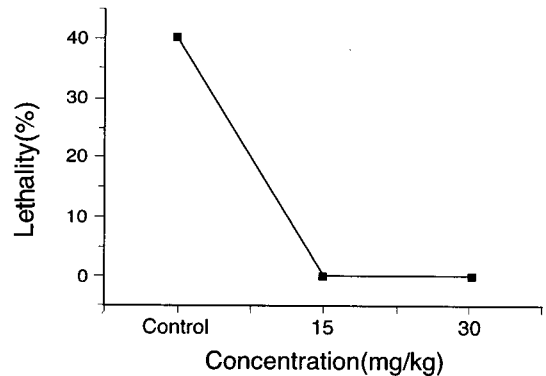


Fig. 3. Effect of *Podam-hwan* on picrotoxin-induced lethality in mice. Picrotoxin(5.0 mg/kg) was injected subcutaneously at final day. The procedure was described in the experimental methods. 7 Animals were used for the test.

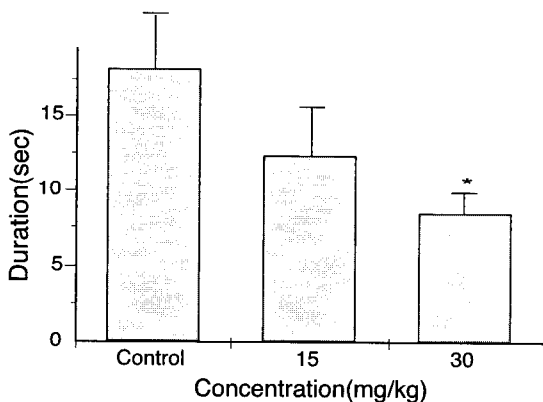


Fig. 2. Anticonvulsive effect (duration) of *Podam-hwan* on picrotoxin-induced convulsion. Picrotoxin(5.0 mg/kg) was injected subcutaneously at final day. The procedure was described in the experimental methods. Values represent mean ± S.E. for 7 animals. *: significantly different from the control group (P<0.05).

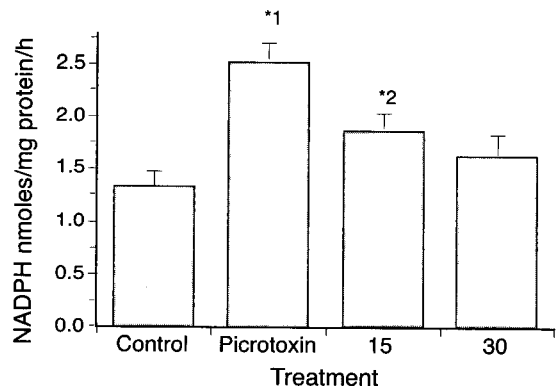


Fig. 4. Inhibitory effect of *Podam-hwan* on GABA-T activity *in vivo*. Picrotoxin(5.0mg/kg) was injected subcutaneously at final day. Values represent mean ± S.E. for 7 animals. *1 : significantly different from the control group (P<0.05). *2 : significantly different from the picrotoxin-treated group (P<0.05).

30mg/kg을 경구투여하였을 때는 NADPH 함량이 1.65 ± 0.18 nmoles/mg protein/h로서, picrotoxin 투여군에 비해 35.5% 감소하였다(Fig. 4).

3. 腦組織中の GABA 含量 變化

1) GABA의 濃度別 檢量線

약재 투여에 의해 변화된 뇌조직中の GABA 함량을 逆相칼럼을 사용한 HPLC법으로 정량하기 위하여 먼저 GABA의 농도에 따른 검량선을 0.02 mM, 0.1 mM 및 0.2 mM의 농도로 측정하였다. 그 결과, 이들 농도에서는 직선이 유지되어 유효한 검량선 임이 확인되었다(Fig. 5). GABA의 HPLC chromatogram을

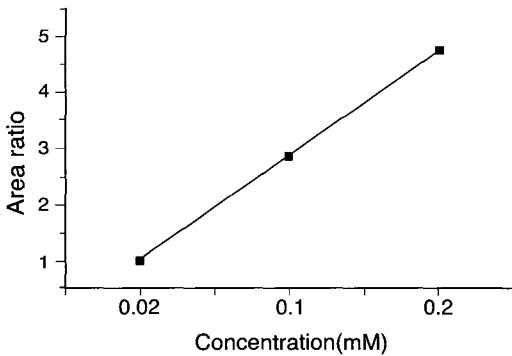


Fig. 5. Calibration curve of GABA with the concentration of 0.02mM, 0.1mM and 0.2mM measured by HPLC. The procedure was described in the experimental methods.

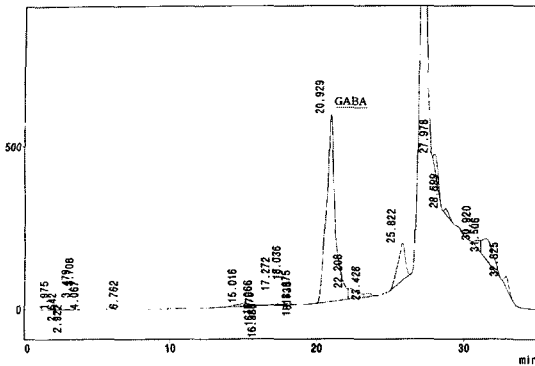


Fig. 6. HPLC chromatogram of standard GABA. Detailed methods were described in the experimental part. Retention time of GABA : 20.929 minute.

나타내었다(Fig. 6).

2) 腦組織中の GABA 定量

억제성 신경전달물질인 GABA의 뇌중 함량은 정상군에서 2.95 mM이었고, 대조군(picrotoxin 투여군)에서는 1.57 mM로 감소되었다(Fig. 7). 그러나 抱膽丸 분말 15 mg/kg을 투여한 실험군에서는 2.56 mM로서 대조군에 비해 38.7% 증가하였고, 30 mg/kg 투여

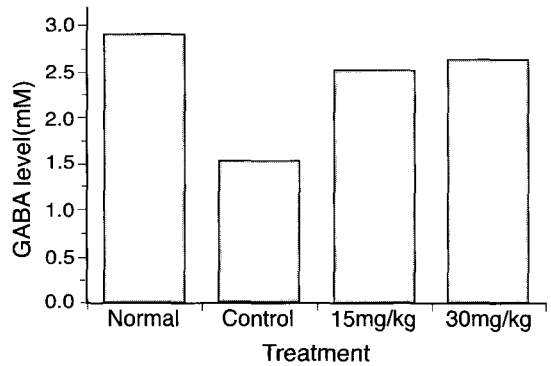


Fig. 7. Effect of *Podam-hwan* on the brain GABA level in picrotoxin-treated mice. Picrotoxin(5.0 mg/kg) was injected subcutaneously at final day. The procedure was described in the experimental methods. Data represent the mean \pm S.E. with 7 animals in each group.

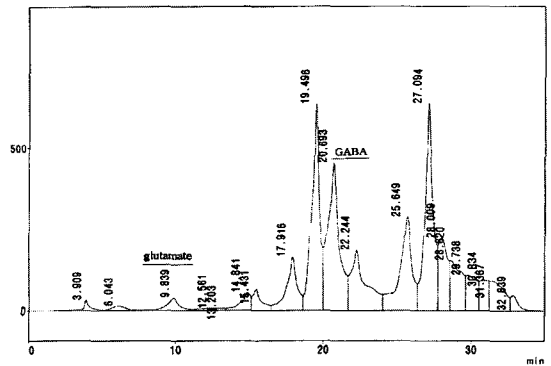


Fig. 8. HPLC chromatogram of the contents of GABA and Glutamate in *Podam-hwan*-treated (15 mg/kg) mice. Retention time : GABA 20.693min., glutamate 9.839min. All samples were treated with ice-cold ethanol and OPA reagent before measurements.

군은 함량이 2.65 mM로서, 대조군보다는 68.8% 증가하였다. 抱膽丸 15 mg/kg 투여군의 뇌조직중의 GABA 함량 변화는 HPLC chromatogram에서 보는 바와 같으며(Fig. 8), 抱膽丸 30 mg/kg 투여군의 뇌조직중의 GABA 함량 변화를 나타내었다(Fig. 9).

4. 腦組織중의 Glutamate 含量 變化

1) Glutamate의 濃度別 檢量線

약재 투여에 의해 변화된 뇌조직중의 glutamate 함량

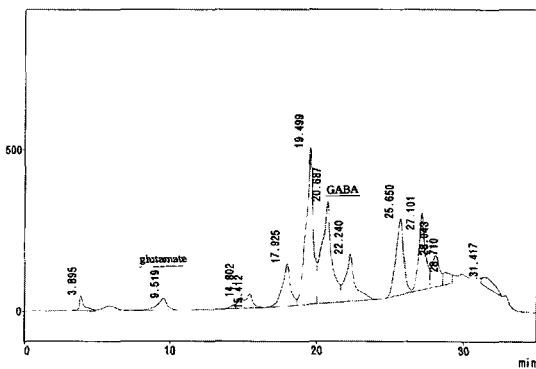


Fig. 9. HPLC chromatogram of the contents of GABA and Glutamate in *Podam-hwan*-treated (30 mg/kg) mice. Retention time : GABA 20.687 min., glutamate 9.519 min. All samples were treated with ice-cold ethanol and OPA reagent before measurements.

을 逆相칼럼을 사용한 HPLC법으로 정량하기 위하여 먼저 glutamate의 농도에 따른 검량선을 0.1 mM, 0.5 mM 및 1.0 mM의 농도로 각각 측정하였다. 그 결과, Fig. 10에서 보는 바와 같이 이들 농도에서는 직선이 유지되어 유효한 검량선임이 확인되었다. Glutamate의 HPLC chromatogram을 나타내었다(Fig. 11).

2) 腦組織중의 Glutamate 定量

흥분성 신경전달물질인 glutamate의 뇌중 함량은

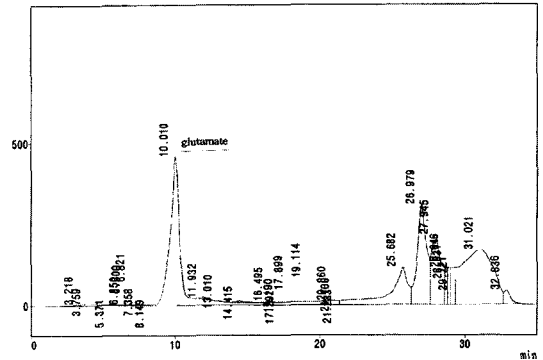


Fig. 11. HPLC chromatogram of standard Glutamate. Detailed methods were described in the experimental part. Retention time of glutamate : 10.010 minute.

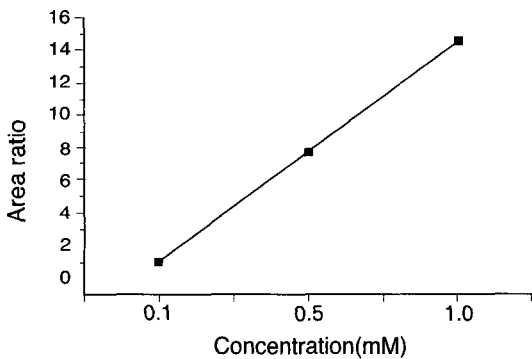


Fig. 10. Calibration curve of Glutamate with the concentration of 0.1mM, 0.5mM and 1.0mM measured by HPLC. The procedure was described in the experimental methods.

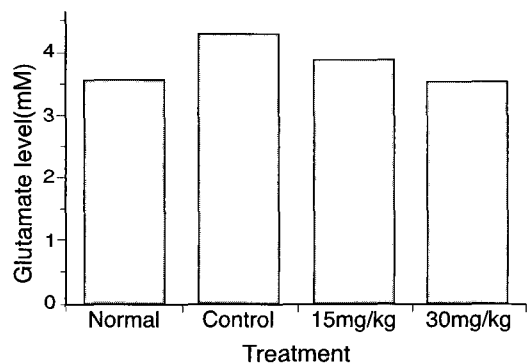


Fig. 12. Effect of *Podam-hwan* on the brain glutamate level in picrotoxin-treated mice. Picrotoxin(5.0 mg/kg) was injected subcutaneously at final day. The procedure was described in the experimental methods. Data represent the mean \pm S.E. with 7 animals in each group.

정상군에서 3.54mM이었고, 대조군(picROTOXIN 투여군)에서는 4.28 mM로 증가되었다(Fig. 12). 그러나 抱膽丸 분말 15 mg/kg을 투여한 실험군에서는 3.87 mM로서 대조군에 비해 9.6% 감소하였고, 30 mg/kg 투여군은 함량이 3.52 mM로서, 대조군보다는 17.8% 감소하였다.

抱膽丸 15 mg/kg 투여군의 뇌조직중의 glutamate 함량 변화는 HPLC chromatogram에서 보는 바와 같으며(Fig. 8), 抱膽丸 30 mg/kg 투여군의 뇌조직중의 glutamate 함량 변화를 나타내었다(Fig. 9).

考 察

한의학에서 경련은 項背強急, 四肢抽搐, 角弓反張을 主症狀으로 하는 病症³¹⁾으로, 《靈樞·經筋論》²⁹⁾에서는 “經筋之病 寒則反折筋急”이라 하였고, 《素問·至眞要大論》³⁰⁾에서는 “諸瘧項強 皆屬於濕”, “諸暴直強 皆屬於風”이라 하여 발병원인으로서 風·寒·濕을 들고 있으며, 《金匱要略》³¹⁾에서는 津液의 耗傷으로 筋脈이 濡養을 받지 못하는 것도 瘧病을 일으키는 원인이 될 수 있다고 하였다. 《醫學入門》³²⁾에서는 痰·火·驚을 癲癇의 주된 原因으로 들고 있으며, 특히 肥人은 多痰한 것이 瘦人은 火盛한 것이 원인이 된다고 하여 痰火가 가장 기본적인 要因임을 언급하고 있다.

또한 瘧變을 意識喪失, 瘧變發作, 意識昏迷나 기타 정신증상이 수반되는 질환으로 보아 驚風에 속하는 데, 驚風은 王肯堂의 《證治準繩》³³⁾에 의하여 처음으로 사용된 용어로 그 이전에는 癇疾과의 구분이 없었다. 그러나 病因의 근원은 《素問·奇病論》⁹⁾에 처음으로 癇疾發作을 포함한 意識喪失, 瘧變發作, 意識昏迷나 기타 정신증상이 수반되는 질환을 癲症으로 취급하였고, 또한 胎病이라고 하여 유전적 소인을 病因의 근원으로 인식하였다.

驚風과 癇疾의 상관성을 언급한 것은 《諸病源候論》³⁴⁾에서 驚候라는 표현을 써서 血氣가 不和하고 熱實內在하면 心腎이 不定하여 驚候를 나타내고 그

정도가 극도로 악화되면 掣縮症狀이 나타나 癇疾이 된다고 설명하여 驚風의 원인이 熱이며, 관련 장기는 心과 腎이고 癇疾로 이행되는 과정을 설명하였다. 驚風의 病理的 機轉에 대해 《小兒藥證直訣》³⁵⁾에서는 心熱로 인하여 肝風을 發하여 驚風이 발생된다고 설명하고, 五臟概念과 心과 肝을 驚風이 발생하는 장기로 간주하였다³⁵⁾. 이후 明의 王肯堂은 實熱에 風邪를 함께 설명하였고³³⁾, 또한 病因을 痰, 熱, 風, 驚의 네 가지 요인으로 설명하면서 驚蓄의 발생기전을 痰生熱, 熱生風, 風生驚, 驚生蓄으로 설명하였다³⁵⁾.

癇疾은 唐代이후 癇으로 분류되기 시작했으며, 宋代에 들어와서 《太平聖惠方》¹⁰⁾, 《幼幼新書》³⁶⁾, 《小兒藥證直訣》³⁵⁾ 등에서 癇을 별도의 질환으로 분류하였다. 특히 王懷隱 등이 편집한 《太平聖惠方》¹⁰⁾에서는 癲癇이라는 하나의 독립된 병명을 사용하였는데, 이후 오늘에 이르기까지 癲狂은 정신신경계통의 질병을, 癲癇은 癇疾을 표기하는 것으로 되었다.

경련의 발생 기전은 정확하게 밝혀지고 있지 않으며 최근에 와서 중추의 흥분성 신경 전달 기능과 억제성 전달 기능 사이의 균형 소실이 발작의 원인이라는 학설³⁷⁻³⁹⁾이 제시된 후, 중추 신경계에서 흥분성 또는 억제성 신경 전달 물질로 작용하는 아미노산들이 관심의 대상이 되고있다. 특히 흥분성 신경전달 물질의 하나인 glutamic acid와 억제성 전달물질인 GABA의 기능적 균형의 장애가 발작기전의 중요한 원인으로 작용한다는 연구 보고가 제시되었다³⁹⁾.

Glutamic acid는 중추 신경계의 대부분의 신경 섬유에서 흥분성 신경 전달 물질로 이용되는 것으로 식이로 섭취되거나 체내에서 생합성되며, 일부 억제성 신경 섬유 및 국소 개체성 신경 섬유에서는 glutamate decarboxylase에 의하여 GABA로 대사되어 신경 전달 물질로 이용된다. GABA는 포유동물의 뇌와 척수에 다량 존재하는 중추신경계의 억제성 신경 전달 물질로 고위 중추에서는 과분극에 수반하는 接合後 억제, 척수에서의 탈분극을 수반하는 synapse前 억제를 일으킨다. 뇌 조직에서의 GABA는 L-glutamic acid가 glutamate decarboxylase에 의해 탈탄산화(decarboxylation)되어 생합성되는데, GABA의

전구체인 glutamate는 주로 TCA cycle에서 유래된 α -ketoglutarate가 transamination되어 생성된다. 또한 간, 신장, 비장, 폐 등의 말초조직에서는 putrescine으로도 생합성된다.

이렇게 생성된 GABA는 GABA-aminotransaminase에 의해 대사되어 glutamic acid와 succinic semialdehyde로 된다.

GABA의 종전까지 알려진 receptor를 GABAA receptor, 그에 반해 새로이 발견된 receptor를 GABAB receptor로 분류한다. GABAA receptor는 muscimol, isoguvacine과 같은 약물에 의하여 흥분되어지고, bicuculline에 의해서는 상경적으로, picrotoxin에 의해서는 비상경적으로 길항한다. GABAA receptor가 활성화되면 chloride ion 전도가 증가하고, benzodiazepine receptor와 coupling하여 거대분자를 형성해 존재하며, benzodiazepine receptor agonist는 GABAA receptor에 대한 GABA의 결합력을 증가시킨다. 한편, GABAB receptor는 mucimol에 의해 활성화되지 않고 bicuculline에 길항되지 않는 receptor로 baclofen에 의해 활성화되며, chloride ion channel과는 연관성이 없으나 potassium ion conductance의 상승을 수반한 과분극에 연관이 있는 것으로 알려져 있고, adenylate cyclase나 calcium channel과의 연관성도 제기되고 있다.

이들 amino acid의 기능적 균형은 신경 섬유내에서의 생합성, 신경 섬유 외부로의 유리, 망상 세포 등으로의 재흡수, 수용체 상에서의 결합 및 대사 등의 변동으로 인해 초래될 수 있을 것이라고 생각된다.

현재까지 사용되고 있는 항경련제는 1912년 phenobarbital이 소개된 1980년도에 들어 새로운 항경련의 개발이 활발히 이루어져 약 20종의 new compound가 개발되고 현재 실험단계 또는 임상시험 단계에 있으며 지금까지 이들의 작용기전은 전압의 존성 이온채널의 조절, GABA-mediated inhibition의 증강과 amino acid-mediated excitation의 억제로 대별되고 있다¹³⁾. 그러나 이들 약물들은 현재 중증 간질환자에서 두 가지 약물을 혼합하여 사용되고 있기 때문에 한가지 약물에 의한 완벽한 간질억제효과 여부

를 파악하기에는 어려운 실정이다. 또한 이러한 합성 약물의 장기간 치료에서는 그 부작용이 심각하여 사용이 제한되고 있는 약물들이 많을 뿐만 아니라 현재 이용되고 있는 약물 또한 장기간 복용 혹은 과용하면 과도한 중추신경 억제 작용과 심혈관 허탈, 안구진탕, 말더듬, 간조직 손상 등의 심각한 부작용이 따르며, 경미하게는 졸음, 두통, 착란, 우울증 등의 부작용이 빈번하게 나타나는 문제점이 있다. 그러므로 장기간 복용하여도 부작용이 경미하며 간질 발병부위에도 선택적으로 작용하는 치료약물의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

이에 저자는 經驗的 癲癇治療劑인 抱膽丸을 15mg/kg와 30mg/kg의 두 투여군으로 분류하여 7일간 경구투여한 후, picrotoxin을 투여하여 경련을 일으켜 중추 신경계의 synapse前 억제기능(presynaptic inhibition)의 저해로 나타나는 흥분작용을 선택적으로 길항하는 GABA transaminase(GABA 분해효소, GABA-T)의 活性度를 측정하고자 하였다.

이에 따라 본 연구에서는 抱膽丸의 항경련효과를 뇌중 신경전달물질의 함량변화와 GABA-T의 활성화와 연관지어 검토하였다.

이를 위하여 抱膽丸을 분말상태로 용량별로 실험동물에 경구투여하여 중추신경계의 synapse前 억제기능을 저해(blockade of presynaptic inhibition)시켜 경련을 유발하는 물질인 picrotoxin에 의한 경련을 어느 정도 억제하는지를 경련발현시간, 경련지속시간 및 사망률등을 지표로 관찰하였다. 그리고 이 때의 뇌중 GABA-T의 활성화변동을 *in vivo*에서 측정하였으며 아울러 경련유발시 뇌중 GABA와 glutamate의 함량이 어떻게 변하는지를 확인하기 위하여 逆相 HPLC법을 실시하여 정량해 본 결과, 유의한 지견을 얻었다.

먼저 抱膽丸 분말을 실험동물에 용량별로 7일간 경구투여한 다음, picrotoxin으로 경련을 유도시키고 약제에 의한 抗痙攣억제 效果를 관찰하였다. 경련발현 지연효과에서는 抱膽丸 粉末 15mg/kg 투여군이 대조군에 비해 2배 이상 경련발현시간이 지연되는 우수한 항경련효과를 보여주었다(Fig. 1). 그러나 30mg/kg

투여군의 경우에는 발현시간이 대조군에 비해 늘어나긴 했으나 15mg/kg 투여군에 비해 오히려 효과가 감소하여 용량의존적 경향은 나타나지 않았다.

抱膽丸이 경련지속시간에 미치는 영향을 대조군과 비교해 보면, 분말 15mg/kg 투여군이 대조군에 비해 32.4%의 경련시간 단축효과를 보였으며 30mg/kg 투여군은 대조군에 비해 52.2%의 단축효과를 나타내었다(Fig. 2). 이러한 결과는 경련발현시간의 경우, 용량이 증가하면 오히려 효과가 감소한 결과와는 부합되지 않는다. 그러나 30mg/kg의 용량에서 경련발현시간이 크게 지연되지는 않았으나 경련지속이 유의성있게 ($P < 0.05$) 감소하였으므로 30mg/kg의 용량에서도 항경련효과가 있는 것으로 평가할 수 있겠다.

抱膽丸 粉末을 경구투여한 다음, picrotoxin-유도 경련에 의한 사망률을 측정할 결과, 대조군이 42.8%의 사망률을 나타내는데 비해 포담환은 15mg/kg과 30mg/kg의 용량에서 모두 사망을 일으키지 않아 사망률을 크게 억제시키는 우수한 효과를 나타내었다.

抱膽丸의 이러한 항경련효과가 뇌중 억제성 신경전달물질인 GABA를 분해하는 GABA-T를 저해함으로써 일어난 것인지를 확인하기 위하여 실험동물의 뇌를 적출하여 뇌중 GABA-T 활성변동을 측정하였다. 뇌조직은 상당량의 GABA를 함유하고 있는데 glutamate의 탈탄산반응에 의해 합성되고 GABA-T에 의해 분해대사된다. GABA는 분해되어 glutamate와 succinic semialdehyde를 생성하는데 이 succinic semialdehyde는 NADP를 환원하여 NADPH를 생성하므로 이 생성물의 흡광도를 340nm에서 측정하여 정량하게 된다.

이러한 실험 결과, 抱膽丸은 용량의존적으로 GABA-T에 대해 억제효과가 있는 것으로 나타났다. 먼저 picrotoxin으로 경련을 유발시킨 군은 NADPH 함량이 대조군에 비해 약 2배 가량 증가하였으므로 GABA-T의 활성이 증가된 것을 확인하였다. 그러나 약재 15mg/kg을 경구투여하였을 때는 NADPH 함량이 picrotoxin 투여군에 비해 27.0% 감소하였으며 약재 30mg/kg을 경구투여하였을 때는 35.5% 감소하였다. 이러한 결과는 포담환이 적은 용량에서도

GABA-T를 억제함으로써 우수한 항경련효과를 나타내는 것으로 풀이된다.

이상의 실험결과, 抱膽丸 투여에 의해 뇌조직중에는 GABA함량이 증가하는 반면 상대적으로 glutamate는 감소될 것으로 예상되므로 실제로 이들 신경전달물질의 함량을 逆相칼럼을 사용한 HPLC법으로 정량하여 보았다. 먼저 GABA와 glutamate의 농도에 따른 검량선(calibration curve)을 작성한 결과, 모두 유효한 검량선임을 확인하였다(Fig. 5, 7). GABA의 retention time은 20.929분이었으며(Fig. 6), glutamate의 retention time은 10.010분이었었다(Fig. 8).

抱膽丸을 경구투여한 실험동물의 腦組織중의 GABA 함량변화를 보면, 분말 15mg/kg을 투여한 실험군에서는 대조군에 비해 38.7% 증가하였고, 30mg/kg 투여군은 함량이 대조군보다는 68.8% 증가하였다(Fig. 10, 11).

실험동물의 腦組織중의 glutamate 함량변화에서는 抱膽丸 粉末 15mg/kg을 투여한 실험군은 대조군에 비해 함량이 9.6% 감소하였고, 30mg/kg 투여군에서는 함량이 대조군보다는 17.8% 감소하여 용량의존적 경향을 보여주었다(Fig. 10, 11).

結 論

抱膽丸의 항경련효과를 검증하기 위하여 경련동물 모델을 사용하여 억제성 신경전달물질인 GABA와 흥분성 신경전달물질인 glutamate의 뇌중 함량변화를 逆相 HPLC법으로 측정하였으며 또한 GABA분해효소인 GABA transaminase의 활성억제효과를 *in vivo*에서 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 抱膽丸은 15mg/kg의 용량에서 picrotoxin-유도 경련시의 경련발현시간을 대조군에 비해 2배 이상 지연시켰으나 용량증가에 따라 그 효과도 증가하지는 않았다.

2. 抱膽丸은 picrotoxin-유도 경련시의 경련지속시간을 용량의존적으로 단축시켰는데 30mg/kg 투여시 대조군에 비해 52.2% 단축되었다.

3. 抱膽丸은 picrotoxin-유도 경련시 한 마리도 치사시키지 않아 매우 우수한 항경련효과를 나타내었다.

4. 抱膽丸은 GABA transaminase 활성을 용량의존적으로 억제하는 효과를 보여주었는데 30mg/kg에서 NADPH량을 대조군에 비해 35.5% 감소시키는 좋은 효과를 나타내었다.

5. 抱膽丸 15mg/kg 투여시 뇌중 GABA의 함량은 대조군에 비해 38.7%, 30mg/kg 투여시에는 68.8%로 각각 증가하여 억제성 신경전달물질인 GABA의 증강효과가 매우 우수함을 알 수 있었다.

6. 抱膽丸 15mg/kg 투여시 뇌중 glutamate의 함량은 대조군에 비해 9.6% 감소하였으며 30mg/kg 투여시에는 17.8%로 감소하여 흥분성 신경전달물질인 glutamate의 억제효과가 있는 것으로 확인되었다.

이상의 연구결과, 抱膽丸은 경련을 억제하는 효과가 강하고 뇌중 신경전달물질인 GABA를 증가시키고 glutamate을 억제시키며 아울러 GABA분해효소의 활성을 억제함으로써 우수한 항경련효과를 가지고 있는 것으로 평가된다.

參考文獻

1. Jackson JH. On the anatomical, physiological and pathological investigation of epilepsies. In "Selected writings of John Hughlings Jackson" J.H. Jackson eds., vol. 1. London: Hodder & Stoughton. 1931:94.
2. 민성길. 최정상신의학. 서울:—潮閣. 1998:418-419.
3. 아담스신경과학 편찬위원회 편. 신경과학. 서울:정담. 1998:287.
4. 南京中醫學院. 諸病源候論校釋. 北京:人民衛生出版社. 1983:19-50.
5. 서울대학교 의과대학. 신경학원론. 서울:서울대학교 출판부. 1984:569-576.
6. Kokenge R, Kutt H, McDowell F. Neurological sequelae following dilantin overdose in a patient and in experimental animals. *Neurol.* 1965:15, 823.

7. Raine A, Niner JM, Pace DG. A comparison of the anticonvulsant, neurotoxic and lethal effects of diphenylbarbituric acid, phenobarbital, diphenylhydantoin in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1973:186, 315.
8. 황의완, 김지혁. 東醫精神醫學. 서울:現代醫學書籍社. 1987:351.
9. 楊維傑. 황제내경소문해석. 서울:成輔社. 1980:52, 88, 102, 207, 293, 325, 361, 381, 443, 474, 551, 593, 702.
10. 王懷隱. 太平聖惠方. 서울:翰成社. 1980:2743-2744.
11. Hauser WA. Epidemiology of epilepsy. *Adv. Neurol.* 1978:19, 313.
12. Porter RJ. Antiepileptic drug development program. *Cleve. Clin. Q.* 1984:51, 293.
13. Horton RW. GABA, epilepsy and anticonvulsant drugs. In "What is epilepsy?" M. Trimble and E.H. Reynolds eds. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1984:281-292.
14. Berl S, Lajtha A, Waelsch H. Amino acid and protein metabolism. VI. Cerebral compartments of glutamic acid metabolism. *J. Neurochem.* 1961:7, 186.
15. Kokenge R, Kutt H, McDowell F. Neurological sequelae following Dilantin overdose in a patient and in experimental animals. *Neurol.* 1965:15, 823.
16. Raines A, Niner JM, Pace DG. A comparison of the anticonvulsant, neurotoxic and lethal effects of diphenylbarbituric acid, phenobarbital, diphenylhydantoin in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1973:186, 315.
17. Kinsley E, Tweedale R, Tolman KG. Hepatotoxicity of sodium valproate and other anticonvulsant in rat hepatocyte cultures. *Epilepsia.* 1980:21, 699.
18. Booker HE. Trimethadione toxicity. In "Antiepileptic drugs" D.M. Woodbury, JU Penry and CE Pippenger eds., Raven. New York. 1982:701-703.
19. 이원철, 구분홍. 小兒熱性疾患에 응용되는 瀉青丸이 鎮痛, 鎮痙, 解熱作用에 미치는 영향. *경희한의대는 문집.* 1981;4:227-233.
20. 정규만, 구분홍. 芍藥甘草湯이 抗痙攣, 鎮痛, 解熱, 抗

- 炎症 및 抗潰瘍 效果에 미치는 영향. 경희한의대는 문집. 1982;5:209-225.
21. 김덕곤, 이진용, 정규만. 加味鉤藤飲의 抗痙攣作用에 관한 實驗的 研究. 대한한의학회지. 1993;14(1):24-30.
22. 김기창, 이형구. 小青龍湯의 鎮痛, 抗痙攣 및 원위肺 損傷에 미치는 영향. 경희한의논문집. 1985;8:129-137.
23. 김재형, 이상용. 清心溫膽湯이 白鼠의 抗痙攣, 解熱, 鎮痛, 鎮靜 및 GABAergic system에 미치는 영향. 동의신경정신과학회지. 1997;8(1):95-109.
24. 현우천, 이상용. 抑肝散과 抑肝散加味方의 鎮痙 및 鎮痛效果에 관한 實驗的 研究. 동의신경정신과학회지. 1994;5(1):69-79.
25. 황의완, 이경섭. 사물안신탕의 효능에 관한 실험적 연구. 경희한의대는문집. 1983;6:169-183.
26. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울:大成文化社. 1992:59.
27. Bergmeyer HU. Method of enzymatic analysis, 3 eds. vol. 2 New York:Academic Press. 1983:191-192.
28. Allen IC, Griffiths R. Reversed-phase high performance liquid chromatographic method for determination of brain glutamate decarboxylase suitable for use in kinetic studies. J. Chromatography. 1984:336, 385.
29. 홍원식. 精校黃帝內經靈樞. 서울:東洋醫學研究院出版部. 1985:11, 102-104.
30. 홍원식. 精校黃帝內經素問. 서울:東洋醫學研究院出版部. 1985:18, 23, 32, 44, 78, 87, 89, 145, 163, 209, 210, 221, 222, 235, 304, 305.
31. 張 機. 金匱要略. 서울:大成文化社. 1995:16-17.
32. 李 梴. 醫學入門. 서울:翰成社. 1997:398.
33. 王肯堂. 六科證治準繩. 臺北:新文豐出版公司. 1984:117.
34. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 臺中:昭人出版社. 1965:8-9.
35. 錢 乙. 小兒藥證直訣. 北京:人民衛生出版社. 1991:10, 14.
36. 劉 昉. 幼幼新書. 北京:人民衛生出版社. 1991:428-432.
37. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science. 1978:201, 875.
38. Pellegrini Giampietro DD, Cherici G, Alesianim M, Carla V, Moroi F. Excitatory amino acid release and free radicals formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J. Neurosci. 1990:10, 1035.
39. Gilman SC, Bonner MJ, Pellmar TC. Effect of oxidative stress on excitatory amino acid release by cerebral cortical synaptosomes. Free Radical Biology and Medicine. 1993:15, 671-675.