大韓本草學會誌 제36권 제6호(2021년 11월)
Kor. J. Herbol. 2021 ; 36(6) : 1-8

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2021.36.6.1.

뇌전증 동물 모델에 대한 백출 추출물의 보호 효과

강소희[1#], 이수은[2], 이아영[2], 서윤수[2], 문창종[1], 김성호[1], 이지혜[3*], 김중선[1,2*]

1 : 전남대학교 수의과대학, 2 : 한국한의학연구원 한약자원연구센터, 3 : 세명대학교 한의과대학

Protective effects of Atractylodis Rhizoma Alba Extract on seizures mice model

Sohi Kang[1#], Su Eun Lee[2], Ayeong Lee[2], Yun-Soo Seo[2], Changjong Moon[1]
Sung Ho Kim[1], Jihye Lee[3*], Joong Sun Kim[1,2*]

1 : College of Veterinary Medicine (BK21 Project Team), Chonnam National University, 77 Yongbong-ro, Gwangju 61186, Republic of Korea

2 : Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 111 Geonjae-ro, Naju-si, Jeollanam-do 58245, Republic of Korea

3 : College of Korean Medicine, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 27136, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Atractylodis rhizoma Alba has been traditionally used as a medicinal resource that is used for enhancing Qi (氣) in traditional medicine in Korea, China, and Japan. This study investigated the protective effects of Atractylodis rhizoma Alba extract (ARE) against trimethyltin (TMT), a neurotoxin that causes selective hippocampal injury, using both *in vitro* and *in vivo* models.

Methods : We investigated the effects of ARE on TMT- (5mM) induced cytotoxicity in primary cultures of mouse hippocampal cells (7 days *in vitro*) and on hippocampal injury in C57BL/6 mice injected with TMT (2.6 mg/kg).

Results : We observed that ARE treatment (0 - 50 μg/mL) significantly reduced TMT-induced cytotoxicity in cultured hippocampal neurons in a dose-dependent manner, based on results of lactate dehydrogenase and 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide assays. Additionally, this study showed that orally administered ARE (5 mg/kg; between -6 and 0 days before TMT injection) significantly attenuated seizures in adult mice. Furthermore, quantitative analysis of allograft inflammatory factor-1 (Iba-1)- and glial fibrillary acidic protein (GFAP)- positive cells showed significantly reduced levels of Iba-1- and GFAP-positive cell bodies in the dentate gyrus of mice treated with ARE prior to TMT injection. These findings indicate the significant protective effects of ARE against the TMT-induced massive activation of microglia and astrocytes in the hippocampus.

*Corresponding author : Joong Sun Kim, College of Veterinary Medicine (BK21 Project Team), Chonnam National University, 77 Yongbong-ro, Gwangju 61186, Republic of Korea.
Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 111 Geonjae-ro, Naju-si, Jeollanam-do 58245, Republic of Korea.
· Tel : +82-62-530-2815 · E-mail : centraline@jnu.ac.kr
Jihye Lee, College of Korean Medicine, Semyung University, 65, Semyung-ro, Jecheon, Chungbuk, 27136, Republic of Korea.
· Tel : +82-43-649-1697 · E-mail : leejh@semyung.ac.kr
#First author : Sohi Kang, College of Veterinary Medicine (BK21 Project Team), Chonnam National University, 77 Yongbong-ro, Gwangju 61186, Republic of Korea.
· Tel : +82-62-530-2899 · E-mail : shrloveu@jnu.ac.kr
· Received : 11 August 2021 · Revised : 28 September 2021 · Accepted : 25 November 2021

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2021.36.6.1.

Conclusions : We conclude that ARE minimizes the detrimental effects of TMT-induced hippocampal neurotoxicity, both *in vitro* and *in vivo*. Our findings may serve as useful guidelines to support ARE administration as a promising pharmacotherapeutic approach to hippocampal degeneration.

Key words : Atractylodis Rhizoma Alba, trimethyltin, neuronal degeneration, hippocampus, seizure

Ⅰ. 서 론

뇌전증은 뇌신경세포가 과도하게 흥분 또는 억제되면서 발작이 돌발적이고 반복적으로 나타나는 질환이다[1,2]. 발작파의 발생 및 전파 경로에 따라 특징적인 증상이 진행되며, 대부분의 발작은 의식적으로 통제가 불가능한 것이 일반적이다[3]. 또한 발작의 예측 역시 불가능하여 발작에 대한 불안과 공포를 유발하므로, 뇌전증은 신체적인 문제뿐 아니라 정신적, 사회적 문제점을 함께 동반할 수 있어 환자의 삶의 질을 현저하게 저하시킨다[4]. 국내 뇌전증 환자 수는 약 25 ~ 36만 명 정도로 추정되며[5], 노인에서는 뇌졸중, 치매에 이어 세 번째로 흔히 발생하는 신경학적 질환이다[6]. 따라서 이로 인한 경제적 부담 역시 상당하며, 뇌전증으로 인한 경제적 비용은 전체 의료비의 약 0.64%를 차지하고 국내총생산(GDP)의 0.05%를 차지한다고 보고되고 있다[7,8].

뇌전증 치료에는 약물치료, 수술요법, 미주신경 자극술, 심부뇌 자극술, 케톤식이요법 등 다양한 방법이 사용되고 있다[9]. 이 중 약물치료는 가장 기본적인 치료법으로서, 이에 사용되는 전통적인 항경련제로는 henytoin, phenobarbital, valproic acid, carbamazepine 등이 있으며, 1990년대부터 사용되기 시작한 topiramate, zonisamide, lamotrigine, felbamate 등 역시 임상에서 사용되고 있다[10]. 항경련제 약제의 종류에 따라 차이가 있으나 현기증, 졸음, 인지기능장애, 오심, 시각장애, 피부발진 등의 부작용이 발생할 수 있고[11], 특히 GABA 관련 약제들은 부작용을 줄이기 위해 polytherapy를 해야 한다는 단점이 있다[12]. 따라서 효과적이고 안전한 약제를 개발하기 위한 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 발굴한 물질의 유효성을 평가하기 위한 전임상연구에 트리메틸틴(trimethyltin, TMT)을 이용하여 발작을 유도한 동물 모델이 대표적으로 사용된다. 트리메틸틴은 중추신경계, 특히 해마에 심각한 신경변성과 신경세포 사멸을 유발한다[13]. 트리메틸틴에 의한 해마 신경세포의 손상은 공격성, 두통, 인지장애 및 강직성 발작을 유발한다고 알려져 있다[14,15]. 이러한 증상은 성인에서 관찰되는 측두엽 뇌전증과 임상적으로 유사하다[16,17]. 트리메틸틴 투여 마우스 모델은 변연계 신경 퇴행과 함께 진전, 자발성뇌전증, 공격성 증가, 자극 과민성, 반응성 항진 등의 행동 이상이 관찰되어, 뇌전증의 가장 일반적인 동물모델로 사용되고 있다[18].

東醫寶鑑 內經篇에 기술된 "凡癲癎, 仆時口中作聲, 將省時吐涎沫, 省後又復發, 時作時止而不休息"의 내용에서 알 수 있

Fig. 1. Main target and efficacy in Traditional Korean Medicine correlation network of Atractylodis Rhizoma Alba using Oriental Medicine Advanced Searching Integrated System (OASIS).

듯이 한의학에서는 뇌전증을 癲癎에 대응하여 치료한다. 癲癎의 원인은 크게 痰, 火, 心藏虛損 氣血不足로 나뉘며 각각의 원인에 맞게 치료하게 되는데, 痰으로 인한 경우 金箔鎭心丸 · 控涎丸을, 火로 인한 경우에는 淸心滾痰丸 · 龍腦安神丸을, 心藏虛損 氣血不足의 경우에는 滋陰寧神湯, 淸心溫膽湯 등의 처방을 사용할 수 있다[19].

국화과(Compositae)에 속한 삽주(*Atractylodes japonica* Koidz.) 또는 백출(*Atractylodes macrocephala* Koidz) 뿌리인 백출(白朮)은 癲癎의 치료에 사용되는 滋陰寧神湯, 淸心溫膽湯의 구성 약물 중 하나이다. 益氣建脾하는 효능을 바탕으로 補血藥, 安神藥 및 開竅藥 등과 配伍되어 氣血不足으로 변증된 癲癎을 치료하는데 사용되고 있다(Fig. 1)[20]. 임상에서 활발히 사용되는 만큼 백출의 효능에 대한 실험연구가 다수 진행되었으며, 이를 통해 파골세포 분화 조절 효과, 항산화 효과, 황금 · 산조인 · 백출 추출물의 생리활성에 따른 암세포 증식 억제 효과, 당뇨병 흰쥐에서 췌장 및 신장 보호 효과 등이 보고된 바 있다[21-24]. 하지만 아직까지 뇌전증에서의 백출의 약리효능평가는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구는 滋陰寧神湯, 淸心溫膽湯의 구성약물인 백출이 뇌전증 동물모델에서 개선에 효과를 나타낼 것으로 기대하고 트리메틸틴 유도 뇌전증 동물모델에서 백출 추출물의 효능을 알아보고자 실시되었다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 추출물 제조

본 연구에 사용된 중국산 백출(*Atractylodes macrocephala* Koidzumi, Atractyloidis Rhizoma Alba)은 광명당(Ulsan, Korea)에서 구매하였고 한국한의학연구원(Herbal Medicine Resources Research Center, Naju, Korea) 최고야 박사의 형태감별을 거쳐 검증 후 실험에 사용하였다. 동정표본(accession number: 2-18-0148)은 한국한의학연구원 한약자원연구센터에 보관하였다. 백출에탄올 추출물은 70% 에탄올 5L에 백출 500g을 1시간 동안 35 ± 1℃에서 초음파 추출하였다. 여과한 70% 에탄올 추출액을 감압농축기로 농축한 후 동결 건조하고 균질화하여 얻은 추출물(136.79g, 추출물 번호 3-18-0011)을 본 실험에 사용하였다(수득률 27.36%, w/w).

2. 해마 신경세포 배양 및 추출물 처치

마우스 해마 신경세포 배양은 태령 17 ~ 18일된 마우스의 해마 신경세포를 일차 배양하여 사용하였다. 임신 17 ~ 18일된 C57BL/6 암컷 마우스의 자궁에서 태아의 해마를 적출하여 계대배양하였다. 배양 환경은 5% CO_2, 37℃ 및 포화습도 하의 항온기에서 유지되었다. 7일간 배양된 해마 신경세포에 50 mM의 트리메틸틴을 투여하고 24시간 후 평가하였다. 트리메틸틴에 의한 성숙 해마 신경세포의 손상에 대한 백출 추출물의 효능을 확인하기 위해, 백출 추출물(0 - 50 ug/mL)이 트리메틸틴 투여 1시간 전에 처리되었다.

3. 세포독성 및 세포생존율 평가

세포독성 평가는 Lactate dehydrogenase(LDH) release assay로 수행하였다. 모든 실험은 LDH cytotoxicity colorimetric assay kit(Bio Vision, CA, USA)의 실험방법에 따라 수행하였다. LDH의 방출은 microplate ELISA reader (EMax, Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포생존율을 측정하기 위해 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma-Aldrich, MO, USA) assay를 사용하였다. 간략히 설명하면 이 분석법은 살아있는 세포에서 MTT가 감소되어 수용성 포르마잔 생성하는 것에 기초한다. MTT 평가는 microplate ELISA reader를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 실험동물

8주령, 무게 20 ~ 25 g의 수컷 C57BL/6 마우스 15마리를 오리엔트바이오(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 2주일 동안 동물 사육실에서 격리조치 하여 순화과정을 거친 후, 각 군당 3마리씩 5개의 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 사육환경은 온도 23 ± 3℃, 습도 50 ± 10%, 환기횟수 10 ~ 20회/h, 조도 150 ~ 300 Lux, 12시간 간격으로 명암 주기를 조절하였다. 모든 동물은 고형사료(항생체 무첨가, 삼양사료)와 물을 자유 섭취시켜 사육하였고 모든 사육기자재는 멸균하여 사용하였다. 모든 실험은 미국국립보건원(National Institutes of Health)의 규정에 따라 수행하였고, 국제동물복지법에 근거한 전남대학교 동물실험윤리위원회의 승인(Approval number: CNU IACUC-YB-2018-69)을 받아 실험을 진행하였다. 실험군은 비투여군(vehicle), ARE를 5 mg/kg로 7일간 경구투여한 군(ARE 5), ARE를 25 mg/kg로 7일간 경구투여한 군(ARE 25), ARE 전처리 없이 트리메틸틴을 2.6 mg/kg로 복강투여한 군(TMT), ARE를 5 mg/kg로 7일간 경구투여하고 트리메틸틴을 2.6 mg/kg로 복강투여한 군(ARE 5 + TMT), ARE를 25 mg/kg로 7일간 경구투여하고 트리메틸틴을 2.6 mg/kg로 복강투여한 군(ARE 25 + TMT)으로 구성되었다.

5. 추출물 및 약물 투여

트리메틸틴-유발 손상에 대한 백출 추출물의 효능을 확인하기 위해, 마우스는 백출 추출물 투여군(5, 25 mg/kg/day) 또는 대조군(0.9% 생리식염수)로 나누어 1회/1일 경구투여하였다. 트리메틸틴(Wako, Osaka, Japan)는 멸균 0.9% 생리식염수에 희석하고, 추출물 경구투여 일주일 후 2.6 mg/kg 의 농도로 복강투여 하였다. 트리메틸틴 투여 후 3일 동안 발작행동측정 후, 4일째 희생시켜 해마 조직을 관찰하였다.

6. 발작 측정

발작 검사는 40 × 40 cm의 밝은색 박스(250 Lux 이상)에서 실시하였으며, 행동 변화는 다음과 같이 5단계로 나누어 측정하였다; 1(공격성이 있음), 2(약한 진전), 3(전신 진전), 4(돌발적인 보행 및 보행 불능), 5(죽음).

7. 조직병리학적 분석

트리메틸틴 투여 4일 후 모든 실험 동물들은 85 mg/kg 알팍산(Alfaxan; Careside, 경기도, 대한민국)과 10 mg/kg 자일라진(Rompun, 바이엘코리아, 서울, 대한민국) 합제로 마취 후 방혈을 통해 안락사 하였고, 조직병리학적 분석을 위해 뇌 조직을 10% neutral-buffered formalin (NBF)으로 고정하였으며, 30% sucrose 용액에서 4일간 침적 후, 30 μm 두께로 동결절편기(SM2010R; Leica microsystems, Wetzlar, Germany)로 박절하여 면역조직화학염색을 진행하였다.

8. 면역조직화학염색 및 분석

해마에서 염증반응에 관련된 단백질 발현을 관찰하기 위하여 avidin-biotin-complex-horseradish conjugation(ABC-HRP) 방법(Vector laboratories, CA, USA)에 따라 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 30 μm 두께의 뇌조직 절편은 자유부유법(free floating method)으로 염색이 진행되었으며, 0.3% 과산화수소수가 포함된 3차 증류수에 20분간 침적하여 내인성 peroxidase를 억제시킨 후 phosphate buffer saline (PBS, 0.01M, pH 7.4) 용액으로 3회 세척하였다. 이어서 비특이적인 면역 globulin의 결합을 방지하기 위하여 normal goat serum 또는 normal horse serum으로 실온에서 1시간 전처리 후 GFAP 또는 Iba-1 항혈청에 4℃에서 24시간 반응시키고, PBS로 3회 세척했다. 이후 biotinylated anti-rabbit serum 또는 biotinylated anti-mouse serum로 상온에서 1시간 방치 후 PBS로 3회 세척하였다. DAB 용액(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H_2O_2 in Tris-HCl Buffer)으로 발색시킨 후 gelatin이 입혀진 슬라이드 위에 얹어 4℃에서 2시간 이상 건조했다. 그 후 통상적인 방법에 따라 ethanol과 xylene의 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경 하에서 관찰하였다.

9. 통계처리

모든 실험의 결과는 평균값 ± 표준오차(mean ± S.E.)로 나타내었으며, 대조군 대비 실험군간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다($^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$).

Ⅲ. 결 과

1. 해마 신경세포 배양에서 세포독성 및 세포생존율 평가

해마신경세포 배양에서 트리메틸틴에 의한 세포독성 및 백출 추출물의 신경독성 보호 효과를 확인하기 위해 세포독성 및 세포생존율을 평가하였다. 해마 신경세포 배양에서 생리식염수와 비교하여 트리메틸틴(5 mM) 투여 24시간 후 LDH 방출의 유의적 증가가 관찰되었다(Vehicle: 100 ± 3.7 %, TMT: 136.7 ± 8.8 %, $p < 0.05$; Fig. 2A). 또한, 백출 추출물의 전처리는 트리메틸틴-유발 신경 세포 독성에 대하여 용량 의존적으로 보호 효과가 있음을 확인하였다(ARE 50 + TMT: 104.9 ± 5.1 %, $p < 0.05$; Fig. 2A). 이 결과는 트리메틸틴-유발 신경세포 사멸에서 백출 추출물의 보호효과를 의미한다. 본 결과를 더 명확히 하기 위해, 세포생존율을 확인하기 위해 트리메틸틴 투여 24시간 후 MTT 분석을 수행하였다. 트리메틸틴 투여 후 세포 생존율의 유의적 감소를 확인하였고(Vehicle: 100 ± 2.4 %, TMT: 53.2 ± 1.4 %, $p < 0.001$; Fig. 2B), 트리메틸틴-유발 신경세포 사멸에서 ARE의 전처리가 보호효과가 있음을 확인하였다(ARE 50 + TMT: 58.6 ± 0.9 %, $p < 0.05$). 따라서, 해마 신경세포 배양에서 세포독성과 세포생존율 분석 결과는 백출 추출물의 전처리가 트리메틸틴-유발 신경세포 사멸을 유의성 있게 감소시킴을 입증하였다.

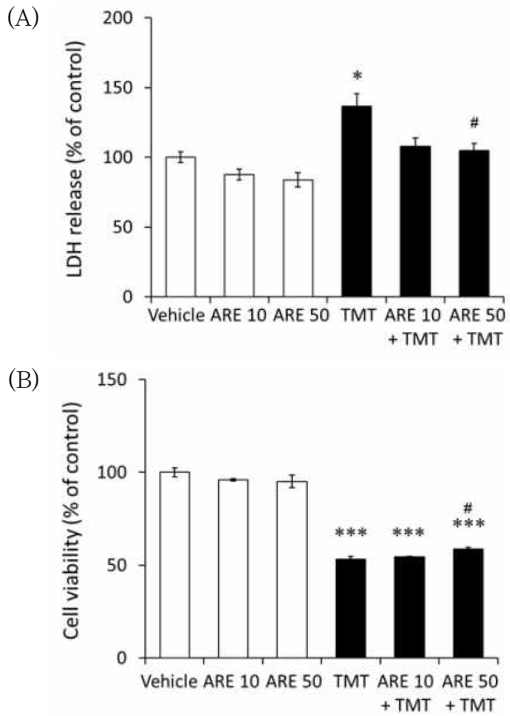

Fig. 2. Protective effects of Atractylodis Rhizoma Alba extract (ARE) on trimethyltin (TMT)- induced cytotoxicity.
ARE treatment reduced cytotoxic effects of TMT on hippocampal neurons. (A): Lactate dehydrogenase (LDH) assay. (B): 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Values are reported as mean ± SE. $^{*}p < 0.05$, $^{***}p < 0.01$ vs. vehicle-treated controls. $^{\#}p < 0.05$ vs. TMT-treated controls.

2. 행동학적 검사

마우스에 트리메틸틴 투여 후, 떨림, 발작과 같은 증상은 빠르게 발현하므로 투여 후 매일 행동학적 검사를 진행하였다(Fig. 3A). 트리메틸틴 투여군에 비해 백출 추출물 전처리군에서 용량 의존적으로 행동 스코어가 낮은 경향을 보이고 있으며, 트리메틸틴 투여 후 3일째, 트리메틸틴군과 비교하여 백출 추출물의 전처리가 용량 의존적으로 뇌전증 증상을 완화시킴을 확인하였다(Day 3; TMT: 3.2 ± 0.2, ARE 25 + TMT: 2.3 ± 0.3, $p < 0.05$; Fig. 3B).

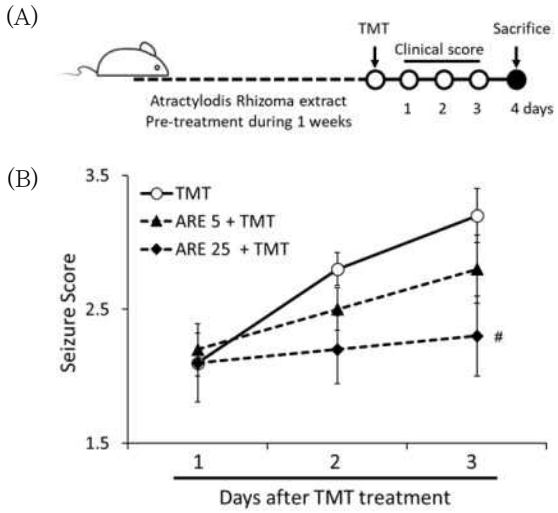

Fig. 3. Protective effects of ARE on seizure symptoms in TMT-treated mice.
(A): Schematic diagram of drug treatment, tissue preparation, and behavioral test. (B): ARE treatment ameliorated TMT-induced seizure behaviors. Values are reported as mean ± SE, $^{\#}p < 0.05$ vs. TMT-treated time-matched controls.

3. 면역조직화학염색 분석

트리메틸틴에 의한 신경염증으로 유발되는 별아교세포와 미세아교세포의 활성에 대한 백출 추출물의 효과를 확인하기 위해 면역조직화학염색 및 분석을 수행하였다. 트리메틸틴 투여 4일 후 해마에서 별아교세포 지표인 GFAP와 미세아교세포 지표인 Iba-1 양성세포를 계측하였다. GFAP 염색 결과, 해마 치아이랑(dentate gyrus, DG)에 산재해 있는 GFAP 양성 세포(Fig. 4A)는 트리메틸틴 투여 4일 후 유의성 있게 증가하였으며(Vehicle: 1.00 ± 0.31, TMT: 2.17 ± 0.16, $p < 0.05$; Fig. 4B left panel), 백출 추출물의 전처리는 5 mg/kg 군에서 유의성 있는 억제 효과가 관찰되었다(ARE 5 + TMT: 1.13 ± 0.18, $p < 0.05$; Fig. 4B left panel). 더욱이, 치아이랑문(dentate gyrus hilus, DG hilus)에서 트리메틸틴에 의한 GFAP 활성이 도드라지고(Vehicle: 1.00 ± 0.36, TMT: 3.09 ± 0.17, $p < 0.01$; Fig. 4B right panel), 백출 추출물을 농도별로 전처리한 모든 군에서 유의성 있는 억제 효과를 확인하였다(ARE 5 + TMT: 1.55 ± 0.49, $p < 0.05$, ARE 25 + TMT: 1.36 ± 0.60, $p < 0.05$; Fig. 4B right panel). 이와 유사한 경향으로, Iba-1 염색 결과, 해마 치아이랑에 상재해 있는 Iba-1 양성 세포(Fig. 5A)는 트리메틸틴 투여 4일 후 폭발적으로 증가하였으며(Vehicle: 1.00 ± 0.09, TMT: 9.42 ± 1.83, $p < 0.05$; Fig. 5B left panel), 백출 추출물의 전처리는 25 mg/kg 군에서 유의성 있는 억제효과가 관찰되었다(ARE 25 + TMT: 3.69 ± 0.42, $p < 0.05$; Fig. 5 right panel). 반면, 치아이랑문에서 트리메틸틴에 의한 Iba-1 활성은 증가하였지만(Vehicle: 1.00 ± 0.16, TMT: 10.36 ± 3.67, $p > 0.05$; Fig. 5B right panel), 백출 추출물에 의한 유의성있는 보호효과는 관찰되지 않았다.

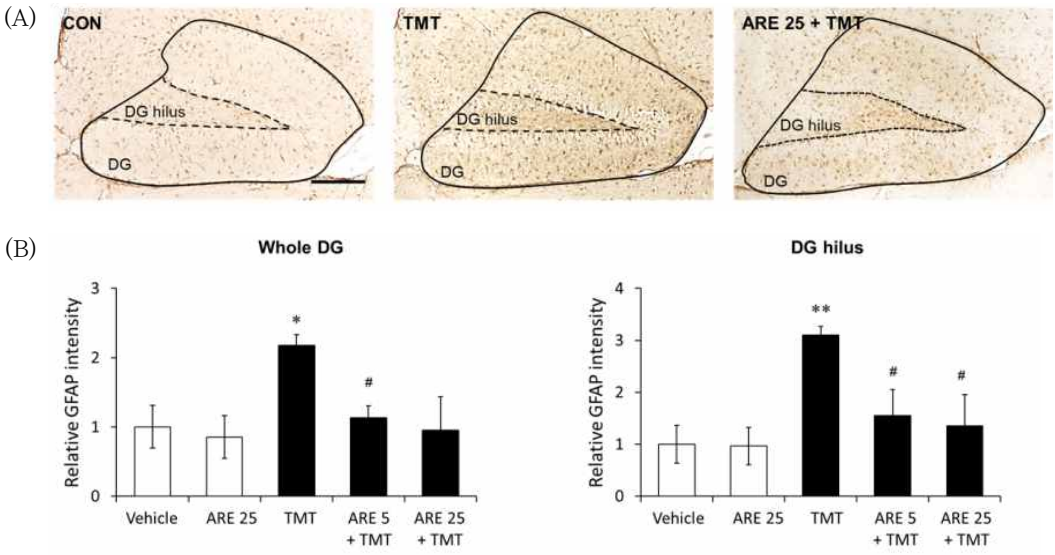

Fig. 4. Protective effects of ARE on astrocyte levels in the dentate gyrus (DG), 4 days after TMT treatment.
(A): Representative images (X 200) showing GFAP immunostaining in untreated control, TMT control, and ARE 25 + TMT group. Black line area represents DG and black dotted area represents DG hilus. Scale bar = 500 ㎛. (B): The graphs depict the relative number of GFAP-positive cells per DG and DG hilus in the hippocampus sections. Values are reported as mean ± SE, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ vs. vehicle-treated controls. $^{\#}p < 0.05$ vs. TMT-treated time-matched controls.

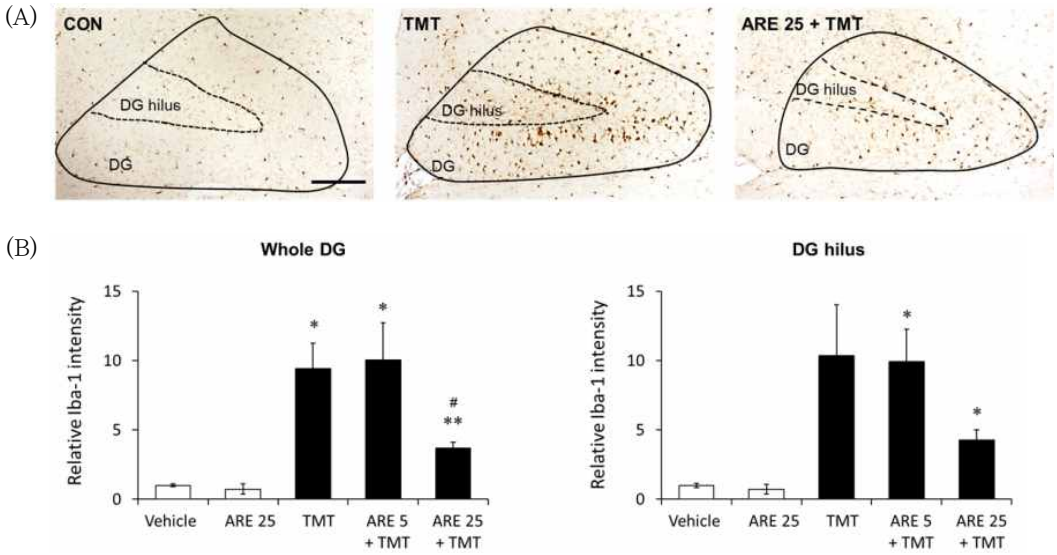

Fig. 5. Protective effects of ARE on microglial cell activation in the hippocampus 4 days after TMT treatment. (A): Representative images (X 200) showing Iba-1 immunostaining in untreated control, TMT control, and ARE 25 + TMT group. black line area represents DG and black dotted area represents DG hilus. Scale bar = 500 ㎛. (B): The graphs depict the relative number of Iba-1-positive cells per DG and DG hilus in the hippocampus sections. Values are reported as mean ± SE. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ vs. vehicle-treated controls. $^{\#}p < 0.05$ vs. TMT-treated time-matched controls.

IV. 고 찰

뇌전증의 병리학적 기전은 아직 명확하지 않지만 서로 다른 뇌 영역에서 동시 다발적으로 신경활동이 과도하게 일어나 신경세포에 글루타메이트 수용체의 과활성과 같은 흥분성 신경독성을 나타내고 산화적 스트레스를 증가시켜 신경염증을 유발하고 경련과 같은 행동이 나타나게 된다[25]. 따라서, 항경련제와 약물-내성 뇌전증을 유발하지 않고, 항산화 기전을 바탕으로 한 항염작용 치료물질이 뇌전증 치료에 새롭게 적용되고 있다[26,27]. 트리메틸틴은 포유류 변연계 신경변성을 유도하는 신경독성 물질로, 트리메틸틴의 독성은 해마 신경염, 글루타메이트 흥분독성, 세포내 칼슘 과부하, 산화스트레스, 미토콘드리아 기능장애 및 신경전달장애를 포함한 다양하고 복잡한 현상을 동반하고 발작과 같은 임상증상을 나타내기 때문에 뇌전증 동물모델로 활용되고 있다[14,28].

백출은 임상에 다용되는 대표적인 本草 중 하나이다. 建脾益氣하고 燥濕利水하는 효능이 있어 氣虛로 발생한 食少, 自汗, 泄瀉를 치료할 수 있을 뿐 아니라 脾의 運化作用의 이상으로 濕滯하여 발생하는 水腫 및 眩暈에도 응용된다(Fig. 1)[20]. 이와 같이 建脾益氣하는 효능을 바탕으로 백출은 滋陰寧神湯, 淸心溫膽湯의 구성약물이 되어 心藏虛損 氣血不足으로 변증된 癲癎의 치료에 사용되고 있다. 백출 추출물에 대한 대표적인 약리학적인 연구로는 항산화효과로 항암, 항노화, 세포 성장 및 분화를 촉진하고, 자유라디칼 소거 기능을 증대시킨다고 알려져 있다[29]. 또한, 백출 추출물은 흥분성 신경독성 물질로 유발된 산화적 손상을 보호하는 기능이 밝혀져 있다[30]. 이에 본 연구에서는 항산화 및 항염증 효과가 있다고 알려진 백출 추출물을 이용하여 흥분성 신경독성 물질인 트리메틸틴-유발 신경독성에 대한 효능을 평가하였고, *in vitro* 및 *in vivo* 수준에서 신경보호효과를 확인하였다.

세포 수준에서 트리메틸틴의 산화적 손상에 대하여 백출 추출물의 방어효과를 LDH 활성도의 측정을 통하여 조사하였다. 먼저 LDH 활성도에 있어서 트리메틸틴에 의한 신경세포 독성을 확인하였고, 백출 추출물의 전처리는 농도에 비례하여 LDH 활성도를 감소시켰다. 이러한 결과는 백출 추출물이 트리메틸틴에 의해 손상된 배양 해마 신경세포에 대하여 방어효과가 있음을 시사한다. 백출 추출물에 의한 신경세포 독성 여부를 확인하기 위해 MTT assay를 실시한 결과, 백출 추출물이 신경세포에 독성이 없음을 나타낼 뿐 아니라 신경독성물질인 트리메틸틴에 손상된 신경세포의 생존율을 증가시킴으로써 세포활성에 도움을 주는 것을 확인하였다.

트리메틸틴 투여 후 마우스에서 발작과 같은 행동학적 장애가 관찰되며, 시간이 지나면서 자연스럽게 그 증세가 회복된다[31]. 백출 추출물의 트리메틸틴 신경독성 방어효과를 확인하기 위해 발작의 정도를 점수화 하여 계측하였고, 백출 추출물의 전처리가 그 정도를 완화시킴을 확인하였다. 행동학적 변화의 기전을 확인하기 위해 실험동물을 희생시켜 조직시편 분석을 진행하였다. 트리메틸틴 투여 후 면역조직화학염색 분석에서 별아교세포의 지표인 GFAP와 미세아교세포의 지표인 Iba-1의 증가가 관찰되었고, 이는 선행연구에서 사이토카인 등 염증성 물질을 분비해 산화적 스트레스를 일으키고, 신경염증을 유발해 해마의 기능을 손상시킨다고 알려져 있다[14]. 이에 항산화제를 병용했을 때, 트리메틸틴에 의한 신경독성이 감소함을 확인하였다[32]. 백출 추출물은 항산화 효과가 있어 항관절염[33], 지방세포염증 억제[34] 뿐만 아니라 일부 신경염증에 대한 보호효과[35]에 대한 연구결과가 보고되어 있지만, 뇌전증 모델에서 신경염증에 대한 연구는 아직 부족하였다. 본 연구에서 관찰한 바와 같이, 트리메틸틴에 의한 신경염증 반

응은 백출 추출물의 전처리로 유의성있게 완화되었다. 백출 추출물의 투여는 트리메틸틴을 투여한 마우스에서 별아교세포와 미세아교세포 수를 감소시킴으로써 항염증 효과를 보였고 이러한 해마 신경세포의 변화가 경련 등의 임상증상을 완화시킨 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

본 연구는 트리메틸틴으로 유발한 뇌전증 신경세포 및 동물모델에서 백출 추출물의 신경세포 보호효과를 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *In vitro* 수준에서, 세포독성 및 생존률 검사 결과, 백출 추출물은 트리메틸틴에 의해 증가된 LDH 방출을 유의하게 억제하였으며, 트리메틸틴의 신경독성에 의한 세포사멸에서도 보호효과를 보이는 것을 확인하였다.

2. *In vivo* 수준에서, 행동학적 검사 결과 뇌전증 유사 행동은 트리메틸틴 대조군에 비하여 백출 추출물 25 mg/kg 투여군에서 유의하게 감소하였다.

3. *In vivo* 수준에서, 신경조직형태학적 분석 결과 백출 추출물은 해마 치아이랑과 치아이랑문에서 발현되는 별아교세포(GFAP)와 미세아교세포(Iba-I)의 발현을 유의하게 억제하였다.

4. 이상으로 본 실험 조건 하에서 트리메틸틴 유발 신경독성 전처리로 백출 추출물의 처치가 세포 및 동물수준의 결과에서 신경독성 보호 효과를 입증하였다. 본 결과를 바탕으로 뇌전증에 대한 예방과 개선 효능을 가진 새로운 천연 소재로써 활용될 수 있다. 백출 추출물의 신경세포 보호 효과에 대한 자세한 기전을 규명하기 위해서 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

Acknowledgments

본 연구에 사용된 시료는 한국한의학연구원 한약표준표본관에 제공받았습니다. 시료를 제공해준 한국한의학연구원 한약표준표본관에 감사드립니다.

References

1. Korean Epilepsy Society. Epilepsy [Internet]. Korea: Korean Epilepsy Society; 2018 [cited 2018 Jun 15] Available from : http://www.kes.or.kr/sub04/sub01.html.
2. Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. The Lancet. 2006;367(9516):1087-100.
3. Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy. Epilepsy research. 2018;139:73-9.
4. JE Oh, SH Bae. The Effect of Anxiety and Depression on Sleep Quality among Adult Epilepsy Patients. Health & Nursing. 2018;30(2):21-32.
5. Jung KY. Epilepsy: More than Seizures. Epilia: Epilepsy and Community. 2020;2(2):31-2.
6. TALLIS R, HALL G, CRAIG I, DEAN A. How common are epileptic seizures in old age? Age and ageing. 1991;20(6):442-8.
7. Lee SY, Jung KY, Lee IK, Do Yi S, Cho YW, Kim DW, et al. Prevalence of treated epilepsy in Korea based on national health insurance data. Journal of Korean medical science. 2012;27(3):285-90.
8. Jung J, Seo HY, Kim YA, Oh IH, Lee YH, Yoon SJ. The economic burden of epilepsy in Korea, 2010. Journal of Preventive Medicine and Public Health. 2013;46(6):293.
9. Lee J, Kim KT, Cho YW. Self-management in epilepsy. Epilia: Epilepsy and Community. 2020;2(1):11-6.
10. SO Nam. The Pharmacotherapy of Childhood Epilepsy. Korean Journal of Pediatrics. 2004;47(8):821-6.
11. Heo K. Epilepsy: Drug Treatment. Journal of the Korean Medical Association. 2003;46(4):287-97.
12. Barker-Haliski M, Sills GJ, White HS. What are the arguments for and against rational therapy for epilepsy? Issues in clinical epileptology: a view from the bench. 2014:295-308.
13. Tsunashima K, Sadamatsu M, Takahashi Y, Kato N, Sperk G. Trimethyltin intoxication induces marked changes in neuropeptide expression in the rat hippocampus. Synapse. 1998;29(4):333-42.
14. Lee S, Yang M, Kim J, Kang S, Kim J, Kim JC, et al. Trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration: A mechanism-based review. Brain research bulletin. 2016;125:187-99.
15. Besser R, Krämer G, Thümler R, Bohl J, Gutmann L, Hopf H. Acute trimethyltin limbic-cerebellar syndrome. Neurology. 1987;37(6):945-50.
16. Ishida N, Akaike M, Tsutsumi S, Kanai H, Masui A, Sadamatsu M, et al. Trimethyltin syndrome as a hippocampal degeneration model: temporal changes and neurochemical features of seizure susceptibility and learning impairment. Neuroscience. 1997;81(4):1183-91.
17. Nishimura T, Imai H, Minabe Y, Sawa A, Kato N. Beneficial effects of FK506 for experimental temporal lobe epilepsy. Neuroscience research. 2006;56(4):386-90.
18. Geloso MC, Corvino V, Michetti F. Trimethyltin-induced hippocampal degeneration as a tool to investigate neurodegenerative processes.

Neurochemistry international. 2011;58(7):729-38.
19. Heo Jun. Donguibogam. 1613. Donguibogam. publishing Buvin puvlishers CO. 2005: p.206-9.
20. Textbook Compilation Committee of National Universitiy of Korean Medicine. Herbology. Seoul: Yeonglimsa. 2007:p579-80.
21. Park ST, Lee MS, Jeon BH, Park KI, Oh JM. Effect of Atractylodis Rhizoma alba on osteoclast formation. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2011;25(1):109-14.
22. Choi S. Pharmacological and Molecular studies of Atracylodes japonica Koidzumi on anti-oxidant activity. Kyunghee University Graduate School. 2011.
23. Park CS, Kim DH. Biological activities of extracts from Scutellaria baicalensis, Zizyphus jujuba and Atractylodes macrocephala. The Korea Journal of Herbology. 2008;23(3):41-51.
24. Han YK, Park YK. Effect of Atractylodis Rhizoma Alba water extract on streptozotocin-induced diabetes in rats. The Korea Journal of Herbology. 2011;26(4):23-30.
25. Lin TK, Chen SD, Lin KJ, Chuang YC. Seizure-induced oxidative stress in status epilepticus: Is antioxidant beneficial? Antioxidants. 2020;9(11): 1029.
26. Seo YS, Ang MJ, Moon BC, Kim HS, Choi G, Lim HS, et al. Protective Effects of Scolopendra Water Extract on Trimethyltin-Induced Hippocampal Neurodegeneration and Seizures in Mice. Brain sciences. 2019;9(12):369.
27. Lee S, Seo YH, Song JH, Kim WJ, Lee JH, Moon BC, et al. Neuroprotective Effect of Protaetia brevitarsis seulensis' Water Extract on Trimethyltin-Induced Seizures and Hippocampal Neurodegeneration. International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(2):679.
28. Corvino V, Marchese E, Michetti F, Geloso MC. Neuroprotective strategies in hippocampal neurodegeneration induced by the neurotoxicant trimethyltin. Neurochemical research. 2013;38(2): 240-53.
29. Li X, Lin J, Han W, Mai W, Wang L, Li Q, et al. Antioxidant ability and mechanism of rhizoma Atractylodes macrocephala. Molecules. 2012;17(11): 13457-72.
30. Gao Q, Ji ZH, Yang Y, Cheng R, Yu XY. Neuroprotective effect of Rhizoma Atractylodis macrocephalae against excitotoxicity-induced apoptosis in cultured cerebral cortical neurons. Phytotherapy Research. 2012;26(4):557-61.
31. Perretta G, Righi FR, Gozzo S. Neuropathological and behavioral toxicology of trimethyltin exposure. ANNALI-ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA. 1993;29:167-74.
32. Jang S, Choi S, Park C, Ahn M, Shin T, Kim S. Inducible nitric oxide synthase is involved in neuronal death induced by trimethyltin in the rat hippocampus. Korean Journal of Veterinary Research. 2011;51(3):185-91.
33. Park MH, Kim CJ, Lee JY, Keum CY, Kim IS, Jin CH, et al. Anti-Arthritic Effect of Radiation Mutant Perilla frutescens var. crispa and Atractylodes macrophala koidz. Journal of the Korean Applied Science and Technology. 2020;37(1):102-13.
34. Bin CH, Song CH. Ameliorating Effects of Atractylodes macrocephala Koidzumi on TNF-α-induced 3T3-L1 Adipocyte Dysfunction. Korean Journal of Acupuncture. 2015;32(3):116-23.
35. Bailly C. Atractylenolides, essential components of Atractylodes-based traditional herbal medicines: antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties. European journal of pharmacology. 2020:173735.