동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 19. No. 1, 2008

加味豨薟丸이 GABA性 신경전달에 미치는 영향에 관한 연구

서종훈, 김동현, 이동웅*, 김근우, 구병수
동국대학교 한의과대학 신경정신과학교실, 동국대학교 과학기술대학 생명공학과*

Effect of Gamiheichumhwan Extract on the GABAergic Neurotransmission

Jong-Hoon Seo, Dong-Hyun Kim, Dong-Ung Lee*, Geun-Woo Kim, Byung-Soo Koo
Department of Oriental Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dongguk University
Department of Biotechnology, College of Science and Technology, Dongguk University*

Abstract

Objective : The aim of this study is to evaluate the anticonvulsive effects of Gamiheichumhwan extract and to explain its action in GABAergic neuromodulation of the rat brain.

Method : The extracts of Gamiheichumhwan were investigated for their inhibitory effect on GABA transaminase activity, their influence on brain GABA and glutamate levels, their agonistic activity on GABA/benzodiazepine receptor and anticonvulsive action using in vitro and in vivo assays.

Results :

1. The extract inhibited dose-dependently GABA transaminase (GABA-T) activity by 4.6% and 18.9%, respectively at dosages of 250 mg/kg and 500mg/kg mouse (p.o.).
2. Brian GABA level was increased to 72.0% and brain glutamate level was decreased to 9.6% at a dosage of 500 mg/kg mouse (p.o.).
3. The extract suppressed [3H]Ro15-1788 binding to rat cerebral cortical membrane by 81.4±0.8% at a dosage of 3.2 mg, suggesting its agonistic activity on GABA/benzodiazepin receptor.
4. The extract showed anticonvulsive effect by lengthening the onset time of convulsion, shortening the convulsion duration and diminishing the lethality.

Conclusion : It is suggested that Gamiheichumhwan can be used to somnipathy and adapted to treatment and prevention of epilepsy or convulsion.

Key Words : Gamiheichumhwan, Anticonvulsive Effect, GABA-transaminase, Neuromodulation, GABA, Glutamate

---

투고일 : 2/8 수정일 : 2/18 채택일 : 3/10
* 교신저자 : 구병수, 주소 : 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 일산한방병원 신경정신과
Tel : 031-961-9140 Fax : 031-961-9009 E-mail: koobs@dongguk.ac.kr

I. 서 론

뇌신경계의 장애에서 발생되는 여러 질환중에서 癎疾은 돌발적이고 일과성의 痙攣發作을 특징으로 하는 만성 중추신경계 질환의 총칭으로서[1], 韓醫學에서는 癎疾을 拘急, 拘攣 등[2]과 유사한 의미로 사용하였다.

역사적인 기록은《素問·奇病論》[3]에 癎疾이라는 명칭이 있고,《太平聖惠方》[4]에 癲癎이라는 독립된 병명으로 기재된 후 여러 醫家들이 癲癎이라는 병명으로 癎疾에 대하여 연구하였다[5].

현재 임상에서 여러 종류의 약물들이 癎疾치료에 이용되고 있는데, 그 중 대표적인 신경안정제인 benzodiazepine계 약물은 抗痙攣, 抗不安, 鎭靜, 筋弛緩 등에 널리 사용되고 있으나 장기간 사용시, 胃의 부작용 뿐만 아니라 내성 및 의존성이 발현되는 등의 문제점 때문에 사용이 제한되어 있다[6,7].

따라서 현재 사용되고 있는 신경안정제들의 부작용 때문에 전통 韓藥의 신경안정 효능에 관한 연구는 장기간 사용될 수 있는 새로운 약재를 개발하기 위하여 중요한 과제인 것이다.

연구재료로 사용된 加味豨薟丸의 구성약물 중 防風은 風邪, 四肢攣急, 骨節疼痛 등을 치료하고, 安神, 定志, 搜肝氣의 효능이 있으며, 豨薟은 降壓, 鎭靜 및 風濕을 제거하는 작용이 있어 安神, 安眠에 九蒸九炮하여 사용하였다. 乾薑은 回陽通脈하여 風寒濕痺와 痰飮 등을 치료하는 효능이 있다.[8]

防風에 관한 연구로는 抗痙攣과 鎭痛, 鎭靜, 消炎, 抗菌, 解熱, 降血壓, 降血糖作用을 보고[9-14]되였고, 신[15]은 豨薟의 DPPH radical 소거효과 및 항산화작용, 그리고 암세포의 성장억제에 대하여 보고하였으나 이들 약재를 혼합한 약물에 대한 보고는 아직 없었다.

이에 저자는 加味豨薟丸의 중추신경억제효과를 실험적으로 검증하기 위하여 동물모델을 대상으로 항경련효과를 측정하였고, *in vitro*에서 신경전달에 관여하는 효소의 활성변동을 측정하였으며, 뇌조직중의 신경전달물질의 함량변화를 조사하고 나아가 신경수용체에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 실 험

1. 實驗動物 및 藥材

1) 실험동물

실험에 사용한 백서는 한국실험동물개발로부터 구입하였으며 미생물 monotoring에서 모두 음성을 나타낸 건강한 ICR계 웅성 mouse (30±1 g)와 Sprague-Dawley계 웅성 rat (250-300 g)를 본 대학 동물사육사에서 일정한 조건으로 사육하여 사용하였다. 사육조건은 온도는 22±1℃, 습도는 55±5% 그리고 명암은 12시간 light/dark cycle을 유지시켰다. 실험동물을 1주일간 사육실에서 적응시켰으며 실험개시전 24시간 동안 물만 먹이고 절식시켰다. 동물처치는 효소활성의 일중변동을 고려하여 오전 10-12사이에 실시하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한방병원에서 처방하는 약재를 사용하였고, 加味豨薟丸의 처방구성은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of Gamiheichumhwan Prescription

韓藥名	學名	重量
山羊腦	Capra hircus L.	15g
防風	Saposhnikovia divaricata Schischik.	20g
豨薟	Siegesbeckia orientalis L. var. pubescens Mak.	50g
乾薑	Zingiber officinale Rosc.	15g
Total		100g

2. 한약재 시료의 제조

한약재 100 g을 분말로 만든 후, 80% methanol 300 ml를 가하고 3시간 가온 추출하였다. 추출물을 온시여과하고 감압농축기를 이용하여 용매와 물을 제거하였다. 같은 방법으로 추출을 3회 반복하고 전체 농축액을 합한 후, 동결건조시킨 분말로 하여 실험에 사용하였다. 추출물의 수득량은 32.5 g이었다.

3. 효소원의 제조

실험동물의 뇌조직을 적출한 후 1 g당 4배의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 약 4℃에서 homogenizer로 마쇄하였다. 마쇄균질액을 600 × *g*에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 상징액을 다시 1시간 동안 100,000 × *g*에서 초원심분리하여 얻어진 cytosol 분획을 효소활성 실험에 사용하였다. 상기의 모든 조작은 0~4℃에서 실시하였다.

4. GABA-T의 活性 測定

중추신경계 억제 신경전달효소인 GABA-T (γ-aminobutyric acid transaminase, EC 2.6.1.19)의 활성측정은 Bergmeyer등의 방법[16]에 따라, 일정량의 0.15 M potassium phosphate buffer (pH 8.0)에 α-ketoglutaric acid와 기질인 GABA 및 뇌조직을 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 다음, 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.

5. 뇌조직중의 신경전달물질 함량 정량

뇌 조직 중의 GABA 및 glutamate의 함량 측정은 Allen등의 방법[17] 을 참고하여 실시하였다. 뇌 조직을 1 mM 2 - aminoethylisothiouronium bromide와 2 mM pyridoxal - 5 - phosphate를 포함하는 0.3 M triethanolamine buffer (pH 6.8)로 10% 마쇄균질액을 제조한 다음, 15,000 × *g*에서 20분간 원심 분리하여 얻은 postmitochondria 분획을 일정량의 200 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8)에 첨가한 후, ethanol로 단백질을 제거시켰다.

이것을 원심분리하여 얻은 상징액을 membrane filter (0.2 μm, 13 mm)를 사용하여 여과한 다음, 여액중에 함유된 GABA의 함량을 HPLC (Table 2)로 측정하여 표준품의 retention time과 비교, 확인하고 표준검량선에 준해 그 함량을 산정하였다.

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

Column	Inertsil ODS-3 (150×4.6 mm, ID: 5 μm)
Mobile phase	20% methanol in 10 mM potassium acetate buffer (pH 6.5) to 0% for 40min.
Injection volume	10 μl/min
Flow rate	0.6 ml/min
Detector	fluorescence detector (λex: 340 nm, λem: 450 nm)

6. 신경수용체 활성 측정

1) 수용체 표본 제작

Benzodiazepine 수용체 표본제작[18]을 위하여 흰쥐를 단두 후 희생시켜, 즉시 대뇌피질조직을 분리하였다. 대뇌피질조직은 무게를 잰 후 50배 부피의 50 mM tris-citrate 완충용액(pH 7.4)에서 균질화하였다. 균질화한 조직은 20분간 원심분리 (20,000 × *g*, 4℃)시킨 후, 침전물을 다시 50배 부피의 tris-citrate 완충용액에 재분배시켰다. 이와같은 과정을 3~5번 반복한 후 최종적인 조직침전물을 완충용액에 재분배시킨 후, 사용 전까지 -70℃에 보관하였다.

2) 수용체 결합반응

Benzodiazepine 수용체 결합반응을 위한 [^{3}H]Ro15-1788 (specific activity = 87.0 Ci/mmol) 및 [^{3}H]flunitrazepam (specific activity = 82.0 Ci/mmol) 결합반응에서는 각 시험관 당 50 μl의 대뇌피질조직 (약 0.16 mg 단백에 해당), 50 μl의 방사성 동위원소와 50 μl의 추출물을 사용하였으며, 50 mM tris - citrate 완충용액을 첨가하여 총 부피 가 500 μl가 되게 하였다. 모든 assay는 duplicate 혹은 triplicate로 하여 적어도 한 실험을 6회 이상 반복하였다. [^{3}H] Ro15 - 1788 결합반응을 위한 실험은 혼합물이 든 시험관을 실온에서, [^{3}H]flunitrazepam 결합반응을 위해서는 0 ~ 4℃에서 각각 한 시간 방치시킨 후, GF / B 여과지(Whatman)상에서 결합분획과 비결합분획을 신속히 분리하였다. 여과지상의 결합분획이 내는 방사성 활성도는 liquid scintillation counter를 사용하여 측정하였다. 제작한 대뇌피질 조직의 단백질 함량은 bicinchoninic acid 법을 사용하여 측정하였다. Benzodiazepine 수용체에 대한 억제성물질의 총량의 측정은 동일한 조건하에서 정해진 용량의 diazepam을 사용하여 반응검사 결과 얻어진 competition 곡선을 비교, 분석하였다. 추출물내의 benzodiazepine 수용체 활성물질의 활성도의 총량은 diazepam equivalent (mg diazepam / g weight)로 표시하였다.

7. 항경련효과 측정

항경련효과 측정[19]은 실험동물에 7일간 한약재 추출물을 경구투여한 후, 경련유발물질인 PTZ를 주사하고 경련발현시간 (onset time), 경련지속시간 (duration) 및 사망률 (lethality)을 측정하여 정상군 및 대조군과 효과를 비교, 검토하였다.

8. 통계처리

수용체 결합반응에서 얻어진 결과는 비선형회귀 (nonlinear regression, Graphpad Prism, Graphpad Software, Sandiago, CA, USA)시켜 분석하였으며, 각 군간의 성적변화의 통계학적 유의성 검정은 ANOVA로 분석후 Neuman-Keul's multiple comparison test를 사용하거나 Student's *t*-test를 사용하였다. 모든 실험결과는 mean±S.D.로 표시하였다.

III. 실 험 결 과

1. 가미희첨환의 GABA-T 효소 억제효과

정상군의 NADPH량은 1.48 nmoles/mg protein/h인데 비해 경련을 유발한 대조군은 1.96 nmoles/mg protein/h로서 효소활성이 크게 증가되었음을 볼 수 있다. 이에 대해 추출물

250 mg/kg 투여시 NADPH가 1.87 nmoles/mg으로 대조군에 비해 4.6% 감소하였으며 500 mg/kg 투여시에는 NADPH가 1.59 nmoles/mg로 18.9%의 유의성 있는 감소를 나타내어 약재가 효소활성 억제효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

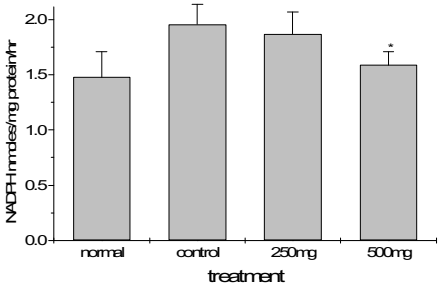


Fig. 1. Effect of pretreatment of the Gamiheichumhwan extract. depending on the concentration. Data represents the mean±S.D. (n = 7).
*: significantly different from the control group($p<0.05$).

2. 뇌조직중의 신경전달물질 함량에 미치는 영향

1) GABA 및 glutamate의 농도별 검량선 작성

가미희참환 추출물 투여에 따른 뇌조직중의 신경전달물질 함량을 정량하기 위하여 GABA 및 glutamate의 농도별 검량선을 고성능액체크로마토그래피 (HPLC)법으로 작성하였는다. 그 결과, GABA는 0.02-0.2 mM의 농도사이에서 직선이 유지되었고 glutamate는0.1-1.0 mM의 농도사이에서 직선이 유지되어 모두 유효한 검량선임을 확인하였다.

2) 뇌조직중의 GABA 함량에 미치는 영향

신경전달물질인 GABA의 뇌중 함량은 정상군에서 2.75 mM이었고, 대조군에서는 1.57 mM로 감소되었다. 그러나 추출물 250 mg/kg을 투여한 실험군에서는 2.35 mM로서 대조군에 비해 49.7% 증가하였고, 500 mg/kg 투여군은 함량이 2.70 mM로서, 대조군보다는 72.0% 증가하였다(Fig. 2). 각 군의 뇌조직중의 GABA함량을 HPLC chromatogram으로 분석한 그림을 Fig. 3에 나타내었다.

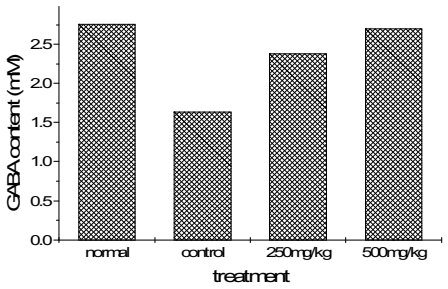


Fig. 2. Effect of the Gamiheichumhwan extract on the brain GABA content in PTZ-induced mice. Data represents the mean±S.D. (n = 7).

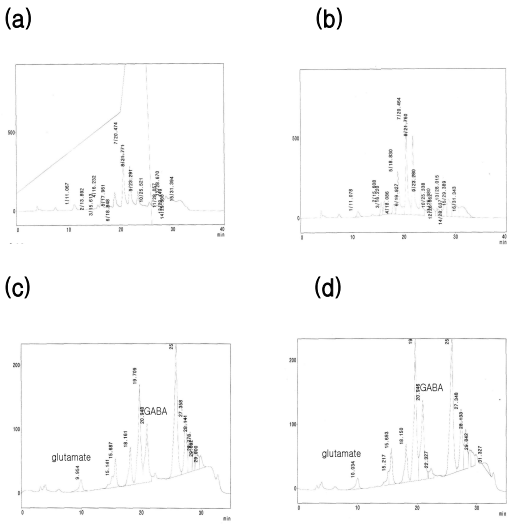


Fig. 3. HPLC chromatograms of normal group(a), control group(b), 250 mg/kg-treated group(c) and 500 mg/kg-treated group(d). All samples were treated with ice-cold ethanol and OPA reagent before meaurements.

3) 뇌조직중의 glutamate 함량에 미치는 영향

뇌조직 중의 glutamate 함량은 정상군에서 3.54 mM이었으며 대조군에서는 4.28 mM로 증가하였다. 그러나 추출물 250 mg/kg 투여군에서는 4.05 mM로서 대조군에 비해 5.4% 감소하였고, 500 mg/kg 투여군은 3.87 mM로서 대조군보다 9.6% 감소하였으며 모두 유의성은 없었다(Fig. 4). 각 군의 뇌조직중의 glutamate함량을 나타낸 HPLC chromatogram은 Fig. 3과 같다.

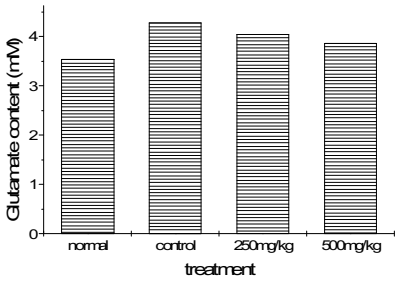


Fig. 4. Effect of the Gamiheichumhwan extract on the brain glutamate level in PTZ-induced mice. Data represent the mean±S.D. (n = 7).

3. 신경수용체 활성효과

가미희첨환 추출물의 $GABA_A$ / benzodiazepine 수용체 복합체 활성 여부를 방사성 동위원소의 수용체 결합반응을 이용하여 조사하였다. 추출물은 benzodiazepine 수용체 길항제인 [^{3}H]Ro15-1788의 흰쥐대뇌 피질수용체에 대하여 결합반응을 농도의존적으로 억제하였는데 그 효과는 추출물 3.2 mg의 용량에서 81.4±0.8%이었다 (Fig. 5). 이러한 활성도를 시료 무게 (g)당 diazepam 해당량으로 나타낸 값인 diazepam equivalent (mg/g of weight)로 환산해보면 15.05±2.1 정도로서 추출물의 신경수용체 효능활성은 그리 강하지 않은 것으로 평가된다. 따라서 본 한약재의 중추신경 억제효과는 GABA-T 억제에 의한 뇌중 GABA 함량증가가 보다 큰 원인인 것으로 추정된다.

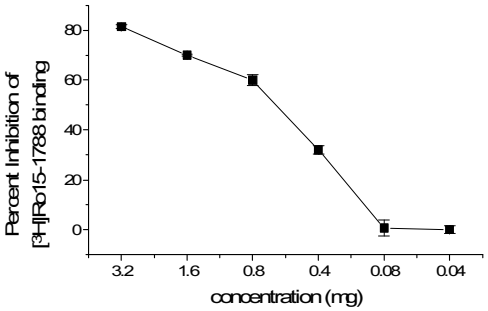


Fig. 5. Effects of [3H]Ro15-1788 binding to rat cerebral cortical membranes by the total extract.
Data represent the mean±S.D. of 9 independent experiments.

4. 동물모델에서의 항경련 효과

가미희첨환 추출물을 농도를 달리하여 실험동물에 경구투여한 다음, 경련억제 효과를 대조군 (PTZ 투여군)과 비교하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 대조군의 최초 경련발현시간 (onset time)이 2.45±1.24분으로 짧은데 비해 약재 250 mg/kg 및 500 mg/kg 투여시각각 4.77±2.32분($p<0.05$)과 8.54±3.14분으로 용량의존적으로 경련이 늦게 시작되어 약재의 항경련 효과를 인정할 수 있었다. 경련지속시간의 경우에도 대조군보다 250 mg/kg 투여시 4.33±2.36분으로 짧아져 약재가 경련억제 효과가 있음을 알 수 있었으나 용량을 증가시켜도 경련지속시간이 더 짧아지지 않아 경련기간은 약재의 용량과는 비례하지 않는 것으로 측정되었다. 한편, 경련유발시의 사망률에서는 대조군보다 사망률이 크게 감소하였다.

Table 3. Effect of the Gamiheichumhwan Extract on PTZ-induced Convulsion

Administration	Onset time(min)	Duration(sec)	Lethality(%)
Control	2.45±1.24	7.26±3.55	71.4
250 mg/kg	4.77±2.32*	4.33±2.36*	14.3
500 mg/kg	8.54±3.14	4.27±2.16	0

Extracts(250 mg/kg, 500 mg/kg) were orally administered for 7 days,
respectively. PTZ(70 mg/kg) was injected intraperitoneally at final day.
The procedure was described in the experimental methods.
Values represent mean±S.D. (n = 7).
*: significantly different from the control group($p<0.05$).

IV. 고 찰

경련은 돌발적이고 일과성의 경련발작을 특징으로 하는 만성 중추신경계 질환의 총칭으로서[1], 경련발작의 원인에는 유전적인 요인도 있지만 뇌조직의 생화학적 대사이상, 뇌혈류장애, 두개골손상, 퇴행성 뇌기능장애, 감염과 같은 중추신경계 장애가 대부분이며, 경련을 일으키는 대표적인 질환으로 간질이 언급되고 있는데,[20] 이러한 경련이 만성적으로 반복되어 나타날 때 간질(epilepsy)이라고 정의 할 수 있다[21].

韓醫學에서는《素問·奇病論》에 癎疾이라는 명칭으로 기록이 있으며,《太平聖惠方》에 癎疾이 癲癎이라는 독립된 병명으로 기재된 후 여러 醫家들이 癲癎이라는 병명으로 癎疾에 대하여 연구하였다[5]. 또한 痙攣을 痙攣, 拘急, 拘攣 등으로 표현하고 있고, 痙攣을 나타내는 병증에는 小兒驚風, 小兒肝氣, 驚厥, 痙, 霍亂轉筋, 破傷風, 癲癎 등이 있다[22].

痙攣의 誘發要因에 대해서 《素問·至眞要大論》에는 "諸痙項强 皆屬於濕"이라 하였고[2] 《靈樞·經筋編》에는 "經筋之病 寒則反折筋急 熱則筋弛縱不收"라 하였다[23]. 張[24]은 眞陰不足으로 인한 肝火 때문에 風이 動하여 생긴다 하였고, 虞[25]는 眞水가 未旺하여 心火上炎으로 발생한다고 하였으며, 朱[26]는 "…因氣虛挾痰火", "癎症病 本痰熱"이라 하여 결국 寒, 濕, 熱, 風, 痰, 火, 驚 등에 의한 氣血凝滯라 설명하고 있다.

현재 임상에서 간질치료에 이용되고 있는 양방약물들은 대부분 발병부위에 따른 선택성이 없으며, 여러 가지 부작용 때문에 사용에 있어 많은 제약을 받고 있다[27,28]. 따라서 전통 한약의 신경안정 효능에 관한 연구 과제는 부작용이 없이 장기간 사용할 수 있는 새로운 약재를 개발하는 것이라 할 수 있다. 뇌중 억제성 신경전달 물질인 γ-aminobutyric acid(GABA)는 γ-amino butyric acid transaminase(GABA-T)에 의해 대사되어 뇌중 흥분성 신경전달물질인 glutamate로 변하므로 뇌중 GABA의 농도를 적절히 유지하기 위한 GABA-T 저해제 탐색이 경련치료제 개발에서 중요하게 인식되고 있다.

중추신경계에 작용하여 진정효과 및 경련억제를 나타내는 약물 중 현재까지 가장 주목받고 있는 것은 GABA수용체($GABA_A$ / benzodiazepine수용체 복합체)에 작용하는 약물들이다. 신경말단으로부터 방출된 GABA는 GABA수용체에 결합하여 抗不安, 抗痙攣등의 작용을 일으키므로 이 수용체의 활성화는 신경안정에 있어서 중요한 역할을 하고 있다. GABA수용체에 작용하는 약제들은 수용체의 GABA에 대한 친화력을 증가시키거나 수용체내 chloride channel의 투과력을 증가시킴으로서 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.[29]

이러한 관점에서 韓藥의 항경련효능을 보다 정확히 판단하기 위한 실험적 방법으로 위

의 최근 연구동향에 따른 신경전달 효소활성 억제효과 검색 및 신경수용체 효능활성 검색을 중점적으로 사용하며 이외에도 수면연장효과, 한약재 투여시 뇌중 GABA 및 glutamate함량 정량, 동물모델을 사용한 항경련효과 등을 측정지표로 삼아 종합적으로 검토하는 것이 바람직한 것으로 인식되고 있는 것이다.

연구재료로 사용된 防風(Saposhnikoviae Radix)은 銅藝, 茴藝, 茴草, 百枝, 屛風, 茼根, 百蕫, 防丰 등의 異名을 갖고 있는 미나리과(Umbelliferae)에 속한 다년생 초본인 방풍 *Saposhnikovia divaricata* (=Ledebouriella seseloides)의 뿌리를 봄이나 가을에 채취하여 건조한 것으로[30], 神農本草經[31] 上品에 "味甘溫無毒 主大風頭眩痛惡風風邪 目盲武所見 風行周身 骨節疼痺 煩滿 久服輕身 一名銅芸 生川澤"이라고 처음 수재된 이래, 여러 문헌에 辛甘하고 溫한 性味와 去風解表 勝濕止痛 止痙의 효능으로, 外感風寒으로 인한 頭痛目眩과 周身盡痛 骨節疼痛 四肢攣急 및 風疹瘙痒 破傷風 등 증상을 치료하기 위하여 사용되고 있는 것으로 기재되어 있다.

防風에 관한 연구로 崔[9]는 항경련효과에 관한 유의성 있는 결과를 보고하였으며 李 등[21]은 防風水鍼이 鎭痙효과에 있어 경련발현시간에서는 유의성이 없었으며, 다만 사망시간연장에서는 유의성이 나타났다고 보고하였다. 金 등[11]은 防風水鍼이 한냉노출로 인한 흰쥐의 기관상피세포 손상에 대하여 어느 정도 보호적 영향을 미치고, 점액분비를 촉진시킨다고 하였으며, 盧 등[12]은 防風水鍼이 혈압강하효과가 있으며 고지혈증으로 인해 상승된 혈청 성분 및 효소활성도에 대하여 감소효과가 있다고 보고하였다.

豨薟은 국화과(Compositae)에 속한 1년생 초본인 진득찰(*Siegesbeckia glabrescens*)과 동속 근연식물의 전초로 여름에 꽃이 피기 전에 채취하여 晒乾한 것으로 豨薟이 기재된 최초의 본초서는 《新修本草》[32]로 "豨薟 味苦寒 有少毒. 主熱蠶煩滿 不能食. 生搗汁 服三 四合 多則令人吐. 葉似酸漿而挾長 花黃白色 一名火薟 田野皆識之. 新附."라고 기재되었으며 希仙, 猳薟, 火薟, 豬膏草, 粘糊菜, 虎薟, 火枚草, 狗膏 등의 異名[33]이 있다.

'豨'라는 것은 큰돼지를 말하는 것이고, '薟'이라는 것은 險하다는 뜻으로 《新修本草》[32]에서는 "此草臭如猪而味薟螫 故謂之豨薟"이라 하여 豨薟의 냄새가 돼지의 냄새가 나서 "豨"라는 말을 한 것이고, 그 성질이 辛毒하여서 險하다는 '薟'을 사용하여 '豨薟'이라고 이름하였다고 하였다. 豨薟으로 사용되는 진득찰속 식물에는 진득찰(*Siegesbeckia orientalis* L. var. *glabrescens* MAKINO), 제주진득찰(*Siegesbeckia orientalis* L.), 털진득찰(*Siegesbeckia orientalis* L. var. *pubescens* MAKINO)등이 있다. 豨薟의 效能과 主治에 대하여 살펴보면 豨薟의 氣味는 苦寒으로 《新修本草》[32]에 "主熱蠶煩滿 不能食"이라 기재된 이래 여러 본초서에 의하면 去風濕, 補虛, 安五臟, 生毛髮, 明眼目, 壯筋力의 효능으로 肝腎風氣, 四肢痲痺, 腰膝無力, 風濕瘡, 肌肉頑痺, 夫人久冷, 中風失音不語, 口眼喎斜, 時吐涎沫 등의 증상치료에 사용되고 있으나, 근래의 많은 문헌에서는 豨薟을 去風濕藥으로 분류하고 있고, 임상에 있어서는 중풍과, 고혈압, 그리고 중풍의 우유중에 사용을 하고 있으며 세간에는 당뇨에도 이용을 하고 있는데 이상의 효능과 주치를 볼 때 다양한 주치증을 가지고 있다.[13] 豨薟에 관한 연구는 趙[13]가 고혈당과 고혈압에 대하여 유의성이 있다고 보고하였고 申[15]은 DPPH radical의 소거효과 및 항산화작용, 그리고 암세포의 성장억제에 대한 유의한 결과를 보고하였고, 金[14] 등은 生豨薟과 酒蒸豨薟의 혈압강하효과를 보고하였다.

乾薑은 생강과(Zingiberaceaea)에 속하는 다년생 宿根초본인 生薑(*Zingiber of ficinale*)의 근경이다. 가을에 채취하여 曬乾하거나 혹은 微火로 烘乾한다. 특이한 향기와 辛味가 있다. 乾薑은 溫中去寒, 回陽求逆의 효능이 있으므로 脾胃虛寒證, 腹痛泄瀉, 亡陽證, 陽虛慾脫證, 四肢厥冷을 치료하며 溫肺化痰의 효능으로 寒飮을 제거하고 喘咳를 멈추게 하는 효능이우수하며 溫經止血의 효능이 있어 虛寒으로 발생하는 便血, 자궁출혈 등 출혈성 질환의 치료에 사용할 수 있다[8].

저자는 防風과 豨薟,乾薑이 한방에서 攣急이나 중풍 등에 처방되어 온 사실에 주목하고, 萬病回春[27]에 기재된 처방의 내용에 豨薟과 防風을 첨가하여 혼합약재를 추출한 후 쥐(mouse)에 강제투여시켜 실험한 *in vivo* test와 추출물 자체를 대상으로 실험한 *in vitro* test를 통해 추출물의 항경련 효능을 검토하였다.

먼저 가미희첨환의 γ- Aminobutyric acid transaminase(GABA-T) 효소활성에 대한 억제효과를 측정하였다. GABA-T는 억제성 신경전달 아미노산의 일종인 GABA를 역시 아미노산인 glutamate로 분해하는 효소이다. 이들 아미노산의 기능적 균형은 신경섬유내에서의 생합성, 신경섬유 외부로의 유리, 망상세포등으로의 재흡수 (reuptake), 수용체 상에서의 결합 및 대사등의 변동으로 이루어지고 있다고 알려져 있으며, 따라서 GABA-T 저해제 개발이 오늘날 간질을 비롯한 경련치료제 개발의 주류를 차지한 이유인 것이다[34-36].

약재 추출물 250mg/kg과 500mg/kg을 각각 투여하였을때의 뇌중 GABA-T 억제효과를 PTZ로 경련을 유발시킨 대조군과 비교하면 효과가 각각 4.6%와 18.9%로 증가하는 용량-반응 상관관계를 보여주었다. 즉, 본 약재는 GABA-T를 억제함으로써 GABA의 농도를 적절히 유지시켜 경련억제등의 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

본 한약재가 GABA-T에 대한 억제효과가 있으므로 이러한 효과를 직접적으로 확인하기 위하여 한약재를 투여한 다음, 뇌중의 GABA 및 glutamate의 함량을 정량하였다. GABA는 포유동물의 뇌와 척수에 다량 존재하는 억제성 신경전달물질로 glutamate decarboxylase에 의해 glutamate로 부터 생합성되는데 다시 GABA-T에 의해 glutamate와 succinic semialdehyde로 분해된다[37-39]. 뇌조직중의 신경전달물질 함량을 정량하기 위하여 먼저 GABA 및 glutamate의 농도별 검량선을 HPLC(high performance liquid chromatography)법으로 작성해 본 결과, 각각 농도별 직선이 유지되어 유효한 검량선임을 확인하였다. 먼저 뇌조직중의 GABA 함량에 미치는 영향을 보면, 약재를 투여하였을 때, 250 mg/kg에서는 뇌중 GABA함량이 대조군에 비해 24.2% 증가하였으며 500 mg/kg 투여시에는 대조군보다 72.0%나 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 약재 추출물이 뇌중의 GABA 농도를 상승시킴으로써 경련등의 신경흥분을 효과적으로 억제시킬 수 있을 것으로 분석되며 그 효과는 용량이 증가할수록 우수한 것으로 나타났다.

한편, 뇌조직중의 glutamate 함량에 미치는 영향을 보면, 추출물 250 mg/kg 투여군에서는 뇌중 glutamate 함량이 대조군에 비해 5.4% 감소하였으며 500 mg/kg 투여군은 glutamate 함량이 대조군보다 9.6% 감소하였다. 이러한 결과는 약재 추출물이 뇌중 glutamate의 함량을 어느 정도 감소시킴으로써 신경흥분성을 억제하는 효과는 있으나 GABA함량 증가로 인한 신경억제 효과보다는 약한 것으로 분석된다.

다음으로 한약재가 신경수용체에 어떠한 효능활성을 보이는지를 측정하였다. GABA 중 지금까지 알려진 수용체(receptor)를 $GABA_A$

수용체라 부르고 새로 발견된 수용체를 $GABA_B$ 수용체라 부른다. $GABA_A$ 수용체가 약물에 의해 활성화되면 chloride channel이 열려 chloride ion위 전도가 증가하고 benzodiazepine 수용체 효능제(agonist)는 $GABA_A$ 수용체에 대한 GABA의 결합력을 증가시킴으로써 항경련, 불안해소, 진정, 근이완등의 작용을 매개하는 중요한 역할을 하고 있다.

신경수용체에 대한 효능활성은 신경수용체를 길항하는 방사성동위원소($[^3H]$Ro15-1788)와 수용체와의 결합반응을 차단시키는지 여부를 측정함으로써 약물의 수용체 활성효과를 판단하고 있다. 가미희첨환 추출물을 용량을 달리하여 $[^3H]$Ro15-1788의 흰쥐 대뇌피질수용체에 대한 결합반응을 측정한 결과, 농도의존적으로 억제하였다. 그 억제효과는 추출물 3.2 mg의 용량에서 81.4±0.8%이었으며 이러한 활성도를 시료 무게 (g)당 diazepam 해당량으로 나타낸 값인 diazepam equivalent (mg/g of weight)로 환산해보면 15.05±2.1 정도로서 추출물의 신경수용체 효능활성은 그리 강하지 않은 것으로 평가된다. 따라서 본 한약재의 중추신경 억제효과는 GABA-T 억제에 의한 뇌중 GABA 함량증가가 보다 큰 원인인 것으로 추정된다.

마지막으로 실험동물모델에서 직접적인 항경련효과를 측정하였다. 즉, 약재를 투여하지 않고 인위적으로 경련을 유발시킨 동물과 약재를 투여한 다음, 경련을 유발시킨 동물에서의 경련억제 정도를 비교하였다.

약재추출물을 농도를 달리하여 실험동물에 경구투여한 다음, 경련억제 효과를 대조군(PTZ 투여군)과 비교해 본 결과, 대조군의 최초 경련발현시간(onset time)이 2.45±1.24분으로 짧은데 비해 약재 250 mg/kg 투여시는 4.77±2.32분으로 길어졌으며 500 mg/kg 투여시는 8.54±3.14분으로 경련이 매우 늦게 시작되어 약재의 항경련효과를 인정할 수 있었다. 경련지속시간의 경우에도 실험군은 대조군에 비해 짧아져 약재가 경련억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 그리고 경련유발시의 사망률을 비교해 보면, 대조군보다 사망률이 크게 감소하였으며 특히, 500 mg/kg 투여군에서는 한 마리도 사망하지 않아 우수한 효과를 보여주었다.

이상의 결과를 종합하면 加味豨薟丸은 실험동물에서 우수한 항경련효과를 나타내었으므로 간질을 비롯한 경련의 치료 및 예방목적에 응용할 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 효과는 GABA-T의 활성이 억제되고, GABA 수용체의 효능이 활성화되는 기전으로 추측해 볼 수 있는데, 이에 대한 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

加味豨薟丸의 경련억제효과를 실험적으로 검증하기 위하여 GABA-T 효소활성 억제효과를 측정하였고, 뇌조직중의 신경전달물질 함량을 분석하였으며. 신경수용체에 미치는 영향을 검토하고, 동물모델을 사용한 항경련효과를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 억제성 신경전달물질인 GABA를 분해하는 효소인 GABA-T에 대한 억제활성은 대조군에 비해 추출물 500 mg/kg 투여시에 18.9%의 유의성 있는 억제효과를 보여 가미희첨환의 항경련효과는 이 효소의 억제효과에 의한 것으로 판단된다.
2. 뇌조직중의 GABA 함량은 250 mg/kg과 500 mg/kg에서 대조군에 비해 각각 49.7%, 72.0% 증가한 것으로 나타났으며 이러한 결과는 약재가 뇌중의 GABA 농도를 상승시킴

으로써 경련등의 신경흥분을 효과적으로 억제시킬 수 있을 것으로 분석된다.

3. 뇌조직중의 glutamate 함량은 250 mg/kg과 500 mg/kg에서 대조군에 비해 각각 5.4%, 9.6% 감소하였다. 이러한 결과는 약재가 뇌중 glutamate의 함량을 어느 정도 감소시킴으로써 신경흥분성을 억제하는 효과는 있으나 GABA함량 증가로 인한 신경억제 효과보다는 약한 것으로 분석된다.
4. 신경수용체에 대한 효능활성에서는 [^{3}H]Ro15-1788의 대뇌피질수용체에 대한 결합반응을 81.4±0.8% 억제하였으나 이러한 활성도는 diazepam equivalent 15.05±2.1 정도로서 추출물의 신경수용체 효능활성은 그리 강하지 않은 것으로 평가된다.
5. 실험동물 모델을 이용한 항경련효과 실험에서는 용량이 증가함에 따라 최초경련 발현시간이 길어지고 경련지 속시간은 짧아졌으며 사망률도 크게 감소하여 실제적인 경련억제 효과를 인정할 수 있었다.

이상의 결과, 가미희첨환은 GABA-T 억제에 의한 뇌중 GABA 함량증가로 우수한 항경련효과를 나타내었으므로 경련등의 치료에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Jackson, J . H ., On the anatomical, physiological and pathological investigation of epilepsies. In Selected writings of John Hughlings Jackson, Vol. I. London : Hodder & Stoughton, 1931:94.
2. 楊思樹, 張樹生, 傅景華. 東醫臨床內科學. 서울: 法人文化社. 1999:570.
3. 王琦, 李炳文, 丘德文 編著. 素問今釋. 貴州: 貴州人民出版社. 1981:223,439.
4. 王懷隱. 太平聖惠方. 서울: 翰成社. 1980:2743-2744.
5. 朴慶洙. 石菖蒲 精油 香氣의 吸入이 白鼠의 痙攣抑制에 미치는 影響. 東國大學校 碩士學位論文. 2000.
6. Skolnick, P. and Paul, S. The benzodiazepine/GABA receptor chloride channel complex. I.S.I. Atlas of Science. Pharmacol. 1988:2, 19.
7. Tagaki, H., Oomura, Y., Ito, M. and Otsuka, M. Biowarning system in the brain. Tokyo:University of Tokyo Press. 1988:227-241.
8. 康秉秀, 金永坂. 臨床配合本草學. 서울: 永林社. 1994:189,460,656.
9. 崔湖榮. 防風의 規格化에 關한 硏究. 慶熙韓醫大論文集. 1996;30-32.
10. 李鍾國, 姜成吉. 防風水鍼이 鎭痛, 消炎, 解熱 및 鎭痙에 미치는 影響. 大韓鍼灸學會誌. 1986;3:11-23.
11. 金洋植, 崔容泰. 防風水鍼이 흰쥐의 氣管 上皮細胞에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集 1984;7:335-344.
12. 盧昇奎, 姜成吉. 防風水鍼이 高血壓 및 高脂血症에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集 1985;8:157-158.
13. 趙賢模. 豨薟이 血壓과 血糖에 미치는 影響. 大田大學校碩士學位論文. 1998.
14. 김호철, 안덕균 이상인. 生豨薟과 酒蒸豨薟 추출물이 자발성고혈압흰쥐의 항고혈압작용에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 1998;13(1):53-58.
15. 신흥묵. 豨薟의 혈관이완 효능과 항산화 동태에 관한 연구. 大韓韓醫學會誌. 2000;21(1):77-83.

16. Bergmeyer, H.U. Method of enzymatic analysis, 3 eds., vol. 2. New York:Academic Press. 1983: 191-192.
17. Allen, I.C. and Griffthis, 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.
18. 하정희, 이동웅, 용철순, 김정애, 허근. 생약의 benzodiazepine 수용체 효능활성 검색 (II). 천마성분 및 유효분획의 활성. 生藥學會誌. 1999:30, 284-289.
19. 허근, 김진숙, 권태협, 김정애, 용철순, 하정희, 이동웅. 펜틸렌테트라졸 투여 흰쥐에서의 천마의 항경련 작용기전. 藥學會誌. 1998:42, 330-335.
20. Poter, R.J. Antiepileptic drug development program. Cleve. Clin. Q. 1984:51,293.
21. Hauser, W.A. Epidemologynof epilepsy. Adv. Neurol. 1978:19, 313.
22. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1976:374-376.
23. 楊維傑 編著. 黃帝內經靈樞. 臺北: 大聯國風出版社. 1981:171.
24. 張介賓. 景岳全書(上). 서울: 大星文化社. 1988:243.
25. 虞摶. 醫學正傳. 서울: 醫藥社. 1973:360, 700.
26. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울: 大星文化社. 1993:588-589.
27. Johannsen, P., Velander, G. and Mai, J. Glutathione peroxidase in early and advanced Parkinson's disease. J. Neurol. Neurolsurg. Psychiat. 1991:54, 679.
28. Good, P.F., Olanow, C.W. and Perl, D.P. Neuromelanin-containing neurons of the Substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease. Brain. Res.. 1992:343,593.
29. Marsden, C.A. The pharmacology of new anxiolytics acting on 5-HT neurons. Postgrad. Med. J. 1990:66.
30. 中華人民共和國衛生部藥醫委員會. 中華人民共和國藥典(一部). 上海: 廣東科技出版社. 1995:126.
31. 黃爽(淸) 輯. 神農本草經. 北京: 中醫古籍出版社. 1987:74-45.
32. 蘇敬. 新修本草. 合肥: 安徽科學技術出版社. 1981:169.
33. 李時珍. 本草綱目. 北京:人民衛生出版社. 1982:997-999.
34. Enna, S.J., Maggi, A., Worms, P., Lloyd, K.G. : Mucimol. Brain penetration and anticonvulsant potency following GABA-T inhibition. Brain Res. Bull. 1980:5, 461.
35. Horton, R.W. GABA, epilepsy and anticonvulsant drugs. In Trimble, M. and Reynolds, E.H. (eds.) What is epilepsy? Edinburgh:Chulchill Livingston. 1984: 281-292.
36. Berl, S., Lajtha, A. and Waelach, H. amino acid and protein metabolism. VI. cerebral compartments of glutamic acid metabolism. J. neurochem. 1961:7, 186.
37. Gibbs, E.L., Gibbs, F.A. and Lennox, W.G. Cerebral dysrhythmias of epilepsy. Arch. Neurol. Psychiatr. 1938:39, 298.
38. Lennox, W.G. Epilepsy and related disorders. Boston:Little Brown, 1960:31-34.
39. Curtis, D.R., Johnston, G.A.R. Amino acid transmitters in the mammalian nervous system. In 'Review of physiology, pharmacology and biochemistry vol. 69, Berlin-Heidelberg:Springer. 1974: 97-188.