

복합향(丁香, 辛夷)이 항경련효과 기전에 관한 실험실적 연구*

동국대학교 한의과대학 신경정신과 교실

具炳壽

I. 緒 論

간질은 대뇌의 각종 질병에 의하여 반복적으로 痙攣性發作과 만성병태를 말하는 것으로¹²⁾, 간질발작은 여러 가지 원인에 의해 뇌의 신경세포가 일시적으로 과잉 흥분되어 그 부위가 담당하는 뇌 기능이 혼란해진 결과 나타나는 현상이다. 우리나라의 경우는 매년 20,000명 정도의 새로운 환자가 발생하며 현재 약 25-50만명이 어떤 형태로든 간질을 갖고 있을 것으로 추산된다.¹⁷⁾

한의학에서는 <素問: 胎病論>⁵⁾에 소아의 선천성 간질에 대하여 언급이 되어 있고, <難經 20難>³⁾에 “重陰者癲”으로, <傷寒論¹³⁾에서는 太陽病에서 “若被下者 小便不利 直視失溲 若被下者微發黃色 劇則如驚癇 時瘖瘖 若火熏之”로 표현이 되고 있다

현재 임상적으로 경련의 진단은 뇌파기록계상에서 비정상적인 신경 방전이 특징적으로 관찰되고 있다.^{37,41)} 특히 흥분성 신경전달 물질의 하나인 glutamic acid와 억제성 전달물질인 GABA의 기능적 균형의 장애가 발작기전의 중요한 원인으로 작용한다는 연구 보고가 제시되었으며, 1980년대 이후의 간질 치료제의 개발은 주로 이와 같은 연구를 토대로 하여 이루어지고 있다.³⁰⁾ 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 생각되나 이들 약물들은 현재 severe, intractable epileptic 환자에서 두 가지 약물을 공용하여 사용되는 second-line으로 사용되고 있기 때문에 한

가지 약물로서의 full antiepileptic effect를 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 과도한 중추신경 억제 작용과 심혈관 허탈, 안구 진탕, 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.^{22,24,36,37,41)}

이에 대한 대안으로 천연 약물의 향기를 이용하여 항경련 효과를 보기 위하여 향기를 사용하였는데, 이는 한의학적으로 보면 鼻療法이라 하여 <黃帝內經>^{5,6)}, <傷寒雜病論>⁹⁾, <華佗神醫秘傳>¹⁶⁾, <千金要方>⁴⁾, <外臺秘要>⁷⁾, <壽世保元>¹⁾, <本草綱目>⁸⁾에 문헌적으로 기록되어 있으며, 나타나 있으며 氣味論에 기초하여 藥物이나 藥物的 煙氣, 蒸氣 등을 鼻腔內로 吸入하여 疾病을 豫防하고 治療하는 방법으로 사용되었다¹⁴⁾. 향기치료의 原理는 <素問·氣厥論>⁵⁾에는 “膽移熱於腦 則辛頰鼻淵”, “蓋腦爲精髓之海 髓者骨之充也 腦者陰也 故腦滲則爲涕”라 하여 腦와 鼻가 매우 밀접한 관계가 있음을 말하고 있다.

本草綱目⁸⁾에 辛夷는 頭風腦痛面黧를 主治한다 하였고, 丁香은 吹鼻殺腦疳를 主치한다 하였으며, 張¹⁰⁾은 한약에 따라 뇌의 각각 부위에 引經하는 연구를 하였고, 蒼耳辛夷散은 嗅神經을 통하여, 향기 중 開窺시키는 약은 醒腦 回生시키는 작용과 痰濁阻蔽로 인하여 神昏謔語 意識障礙 驚癇에 응용할 수 있다고 하였다.¹⁵⁾

최근 향에 대한 연구 중 경련에 관련된 것으로 崔¹⁴⁾의

* 본 연구는 동국대학교 전문학술지 논문 게재연구비 지원으로 이루어졌음.

논문이 보고가 되고 있으며, 이에 본 연구에서는 丁香 辛 夷의 복합향이 항경련효과의 기전을 밝히고자 뇌중에서 경련과 관련이 깊은 뇌 조직중의 아미노산의 함량을 정량하고 이들 아미노산의 생합성과 대사에 관여하는 효소활성의 변동을 관찰함으로써 항경련 작용의 기전을 살펴보고자 하였다.

II. 實 驗

1. 材 料

1) 시약 및 기구

시약중 pentylenetetrazole, strychnine, bicuculline, picrotoxin, γ -aminobutyric acid, L-glutamic acid, o-phthaldialdehyde, 2-aminoethylisothiuronium bromide, ATP, nicotinamide, NADH, NADPH, α -ketoglutaric acid, L- α -aminobutyric acid 등은 Sigma제, glycine, N,N'-methyl-bis-acrylamide, malondialdehyde는 Aldrich제, semicarbazide, 2-mercaptoethanol은 Junsei chemical제, trichloroacetic acid, sodium tungstate는 Katayama제, high performance liquid chromatography에 사용된 물과 methanol 및 ethanol은 Merck사 제품을 사용하였으며 기타 사용한 시약은 특급내지 일급시약으로 실험목적에 적합한 것을 사용하였다.

실험에 사용한 기구는 membrane filter(Gelman, 47 mm, 0.2 μ m: Microfiltration systems, 13 mm, 0.2 μ m), filter holder(Milipore, 47 mm: Gelman, 13mm), UV-spectrophotometer(Shimadzu, UV-240), refrigerated centrifuge(Beckman, J2-21), ultracentrifuge(Hitachi, 65-P7), HPLC column(Water, RP-C₁₈, 4.0 mm I.D. 10 μ m), HPLC pump (Varian 5000), HPLC controller(Varian ODS 401), fluorescence detector(Varian), cold lab. chamber (Korean manhattan, KMC-8512), ECT unit 7801(Ugo Basile, Italy) 등이었다.

2) 동물

실험동물은 한국실험동물개발로부터 분양받아 본 대학

동물사에서 일정한 조건(온도 : 20 \pm 2 $^{\circ}$ C, 습도 : 40-60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 2주 동안 적응시킨 체중 25g 내외의 ICR계 웅성(雄性) 생쥐를 사용하였다. 실험 전 24시간 동안은 사료를 제거하고 물만 섭취케 하였다. 이때 효소활성의 일중 변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00-12:00)내에 처치하였다.

3) 동물의 처치

본 실험에 사용한 재료는 동국대학교 한방병원에서 구입하여 엄선한 것을 사용하였으며, 丁香 및 辛夷는 상자(크기 : 1.5x8x3.6cm/30마리, 30g/30마리)에 넣어서 2, 4, 8, 12, 24시간 실험동물에 흡입하고서 아래의 실험을 행하였다.

2. 항경련 효과

1) 최대전격경련

Woodbury등⁴⁸⁾의 방법에 준해 전격경련 자극장치를 이용하여 생리식염수를 점적한 양눈에 50mA, 110V, 60Hz의 정전류를 0.2초간 통전하여 뒷발의 강직성 신전경련의 발현을 지표로 하여 최대 전격 경련의 발현 및 사망의 유무를 관찰하였다.

2) Strychnine 경련

Araki등²⁰⁾의 방법에 준하여 strychnine 2.5mg/kg을 복강 내에 주사하여 경련의 발현 및 사망의 유무를 관찰하였다.

3) Pentylenetetrazole 경련

Sohn등⁴⁵⁾의 방법에 준하여 pentylenetetrazole(70mg/kg, s.c.)을 주사하여 경련의 발현 및 사망의 유무를 관찰하였다.

4) Bicuculline 및 Picrotoxin 경련

Holland등³⁴⁾의 방법에 준하여 bicuculline(3.2 mg/kg) 및 picrotoxin(5.0 mg/kg)을 주사하여 경련의 발현 및 사망의 유무를 관찰하였다.

3. 효소원의 조제

실험동물을 탄산가스로 마취 치사하고 두개골을 정중 선을 따라 절개하고 뇌 조직을 적출하여 0.9% 생리식염수로 씻은 다음 조직 1g당 1ml의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. GABA-T 활성 측정의 효소원은 마쇄 균질액을 35,000xg에서 30분간 원심분리하여 얻은 상정액을 사용하였다. GAD 활성 측정의 효소원은 뇌조직을 1mM aminoethylisothiuronium bromide와 2mM pyridoxal-5'-phosphate를 포함하는 0.3M triethanolamine buffer(pH 6.8)로 균질 마쇄한 다음 15,000xg에서 20분간 원심분리하여 얻은 상정액을 효소원으로 사용하였다.

4. 뇌 조직중 GABA 및 glutamic acid함량 측정

뇌 조직중 GABA 및 Glutamic acid의 함량 측정은 Allen등²⁸⁾의 방법을 약간 변경하였다. 뇌 조직을 1mM aminoethylisothiuronium bromide와 2mM pyridoxal-5'-phosphate를 포함하는 0.3M triethanolamine buffer(pH 6.8)로 10% 마쇄균질액을 조제한 다음 15,000xg에서 20분간 원심분리하여 얻은 postmitochondria 분획을 일정량의 200mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 첨가한 후 빙냉의 ethanol로 재단백 시켰다. 이것을 원심분리하여 얻은 상정액을 membrane filter를 사용하여 여과한 다음 여액중에 함유된 GABA 및 Glutamic acid의 함량을 고속액체 크로마토그래프를 이용하여 분리시킨 후 표준품의 유지시간(GABA: 11.3분, glutamic acid: 19.8분)과 비교확정한 후 표준 검량선에 준해 그 함량을 산정하였다 (Table 1). GABA 및 glutamic acid의 함량은 조직 단백질 1mg당 nmole로 나타내었다.

Table 1. Conditions of HPLC for the determination of brain GABA and glutamic acid concentration in mouse

Parameter	Conditions
Column	RP-C ₁₈ (150 × 4.0 mm I.D., 10 μm)
Flow rate	0.6 ml/min
Mobile phase	10mM potassium acetate buffer (pH 6.5) - Methanol
Gradient	Methanol 20% → 70%/40 min
Attenuation	8
Detector	Fluorescence detector (λAC : 340nm, λEm : 450nm)

5. 효소활성 측정

1) GABA-T의 측정

GABA-T의 활성은 Bergmeyer²¹⁾의 방법에 따라 일정량의 0.15M potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 60mM α-ketoglutaric acid 100μl와 기질인 4μM GABA 50μl및 조제된 효소원 100μl를 첨가하여 incubator에서 30분간 반응시킨 다음, 이때 생성된 succinic semialdehyde에 조효소인 0.12mM NADP 10μl를 첨가하고 20분간 반응시켜 생성되는 NADPH를 340nm에서 측정하여 효소 활성을 산정한다.

2) GAD활성 측정

GAD의 활성은 Allen등¹⁸⁾의 방법에 따라 일정량의 200mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 기질인 0.4mM glutamic acid 200μl와 조효소인 10mM pyridoxal-5'-phosphate 400μl및 조제된 효소원 100μl를 함께 첨가하여 incubator상에서 20분간 반응시킨 후 빙냉의 ethanol로 반응을 종료시키고 원심 분리하여 얻은 상정액을 membrane filter를 사용하여 여과한 다음 그 여액중에 함유된 GABA의 함량을 고속 액체 크로마토그래프를 이용하여 정량하였다.

6. 단백질 정량 및 통계처리

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법³⁰⁾에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, Fr. No IV)을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차

로 표시하였고, 통계적 유의성은 Duncan's new multiple range test를 이용하였다.

III. 實驗結果

1. 향경련 효과

1) 최대전격경련

丁香과 辛夷 향기를 2, 4, 8, 12, 24시간 흡입하고 MES로 경련을 유발 시켰을 때 각 실험예에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 양성대조물질로 사용한 phenobarbital 100mg/kg 경구투여에서는 강직성경련 및 사망수를 억제시켰다(Table 2).

Table 2. Effect of Eugeniae Flos and Magnoliae Flos on the MES-induced convulsion and mortality in mice

Treatment	Time (hr)	N	Convulsion(%)		Mortality(%)
			T.E.	C.C.	
Control	10	100	10	10	90
Eug. & Mag.	2	100	100	20	80
	4	100	100	20	80
	8	100	100	30	70
	12	100	100	20	80
	24	100	100	30	70
PHB	10	0	100	0	0

Fragrance was inhaled for 2, 4, 8, 12, 24 hours once a day to mice. An ten min after the final inhalation of sample, animals were received electric shock(110V, 50mA, 0.2 seconds). The procedure was described in the experimental methods.

T.E., tonic extensive convulsion; C.C., clonic convulsion

2) Strychnine 경련

丁香과 辛夷 향기를 2, 4, 8, 12, 24시간 흡입하고 strychnine으로 경련을 유발 시켰을 때 각 실험예에서 대조군에 비하여 경련 발현시간, 사망률 및 사망시간에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 양성대조물질로 사용한 phenobarbital 100mg/kg 경구투여에서는 경련발현 시간, 사망률 및 사망시간을 유의적으로 증가시켜 향경련 작용을 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of Eugeniae Flos and Magnoliae Flos on the strychnine induced convulsion and mortality in mice

Treatment	Time	N	Onset		T.E.		Mortality	
			Inc (%)	Lat (sec)	Inc (%)	Lat (sec)	Inc (%)	Lat (sec)
Control	10	100	230.6±22.3 ^a	100	249.4±20.6 ^{ab}	100	252.6±24.7 ^{ab}	
Eug. & Mag.	2	100	252.1±20.4 ^a	100	269.7±22.4 ^b	100	278.3±23.2 ^a	
	4	100	256.3±29.3 ^a	100	279.4±21.0 ^b	100	285.0±27.3 ^a	
	8	100	240.6±30.1 ^a	100	250.8±29.4 ^a	100	273.2±30.4 ^b	
	12	100	250.7±32.4 ^a	100	273.6±31.9 ^b	100	284.8±29.2 ^b	
	24	100	252.9±30.9 ^a	100	284.9±25.5 ^b	100	290.9±24.9 ^b	
PHB	10	90	492.0±40.3 ^b	50	-	0	-	

Fragrance was inhaled for 2, 4, 8, 12, 24 hours once a day to mice. An ten min after the final inhalation of sample, animals were received strychnine (2.5mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± S.D. and values followed by the same superscript are not significantly different(p<0.05) each other by New multiple square method.

T.E., tonic extensive Inc., incidence; Lat., latent time from strychnine treatments.

3) Pentylenetetrazole 경련

丁香과 辛夷 향기를 2, 4, 8, 12, 24시간 흡입하고 pentylenetetrazole로 경련을 유발시켰을 때 2시간의 흡입에서 대조군에 비하여 경련 발현시간, 사망률 및 사망시간에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 4시간 동안 흡입하였을 때는 경련 발현시간 및 사망률에서 유의적으로 증가시킴을 관찰할 수 있었으며 8, 12, 24시간 흡입에서 시간이 경과함에 따라 현저한 항경련효과를 관찰할 수 있었다. 또한 양성대조물질로 사용한 phenobarbital 100mg/kg 경구투여에서는 경련발현시간, 사망률 및 사망시간을 유의적으로 증가시켜 항경련작용을 나타내었다 (Table 4).

Table 4. Effect of Eugeniae Flos and Magnoliae Flos on the pentylenetetrazole-induced convulsion and mortality in mice

Treatment	Time N	Onset		T.E.		Mortality	
		Inc	Lat	Inc	Lat	Inc	Lat
		(%)	(sec)	(%)	(sec)	(%)	(sec)
Control	10	100	45.9±	173.2±	200.1±		
			2.17 ^a	20.1 ^a	10.1 ^a		
			53.9±	194.3±	210.6±		
			3.19 ^a	24.6 ^a	20.3 ^a		
			82.3±	246.3±	284.6±		
Eug. & Mag.	2	100	6.97 ^b	26.2 ^b	25.3 ^b		
			180.3±	290.7±	344.0±		
			17.9 ^c	36.1 ^b	19.2 ^c		
			210.4±	300.3±	369.5±		
			21.3 ^c	23.7 ^c	32.6 ^d		
Eug. & Mag.	4	100	82.3±	246.3±	284.6±		
			6.97 ^b	26.2 ^b	25.3 ^b		
			180.3±	290.7±	344.0±		
			17.9 ^c	36.1 ^b	19.2 ^c		
			210.4±	300.3±	369.5±		
Eug. & Mag.	8	100	210.4±	300.3±	369.5±		
			21.3 ^c	23.7 ^c	32.6 ^d		
			230.9±	310.9±	370.8±		
			20.4 ^d	24.8 ^c	33.1 ^d		
			230.9±	310.9±	370.8±		
PHB	10	0	-	-	0		
			-	-	0		
			-	-	0		
			-	-	0		
			-	-	0		

Fragrance was inhaled for 2, 4, 8, 12, 24 hours once a day to mice. An ten min after the final inhalation of sample, animals were received pentylenetetrazole (70 mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values are Mean ± S.D. and values followed by the same superscript are not significant (p<0.05) each other by new multiple square method.

T.E., tonic extensive; Inc., incidence; Lat., latent time from pentylenetetrazole treatments.

4) Bicuculline 경련

丁香과 辛夷 향기를 2, 4, 8, 12, 24시간 흡입하고 bicuculline 및 picrotoxin으로 경련을 유발 시켰을 때 각 추출물에서의 경련 발현시간, 사망률 및 사망시간에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 양성대조물질로 사용한 phenobarbital 100mg/kg 경구투여에서는 경련발현시간, 사망률 및 사망시간을 유의적으로 증가시켜 항경련작용을 나타내었다(Table 5).

Table 5. Effect of Eugeniae Flos and Magnoliae Flos on the bicuculline-induced convulsion and mortality in mice

Treatment	Time N	Onset		T.E.		Mortality	
		Inc	Lat(sec)	Inc	Lat(sec)	Inc	Lat(sec)
		(%)	(sec)	(%)	(sec)	(%)	(sec)
Control	10	100	342.2±	363.8±	382.9±		
			35.2 ^a	35.8 ^a	21.6 ^a		
			329.3±	355.9±	375.2±		
			27.0 ^a	29.6 ^a	23.5 ^a		
			324.9±	358.6±	372.1±		
Eug. & Mag.	2	100	27.5 ^a	23.3 ^a	33.9 ^a		
			329.3±	355.9±	375.2±		
			27.0 ^a	29.6 ^a	23.5 ^a		
			324.9±	358.6±	372.1±		
			27.5 ^a	23.3 ^a	33.9 ^a		
Eug. & Mag.	4	100	321.9±	346.9±	368.5±		
			27.8 ^a	29.2 ^a	31.1 ^a		
			319.3±	327.9±	364.6±		
			37.2 ^a	27.8 ^a	29.9 ^a		
			313.0±	330.6±	379.8±		
Eug. & Mag.	8	100	313.0±	330.6±	379.8±		
			23.4 ^a	37.3 ^a	20.9 ^a		
			313.0±	330.6±	379.8±		
			23.4 ^a	37.3 ^a	20.9 ^a		
			313.0±	330.6±	379.8±		
PHB	10	0	-	-	0		
			-	-	0		
			-	-	0		
			-	-	0		
			-	-	0		

Fragrance was inhaled for 2, 4, 8, 12, 24 hours once a day to mice. An ten min after the final inhalation of sample, animals were received bicuculline(3.2 mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± S.D. and values followed by the same superscript are not significantly different(p<0.05) each other by New multiple square method.

T.E., tonic extensive convulsion; Inc., incidence; Lat., latent time from bicuculline treatments.

5) Picrtoxin 경련

丁香과 辛夷 향기를 2, 4, 8, 12, 24시간 흡입하고 picrotoxin으로 경련을 유발 시켰을 때 각 추출물에서의 경련 발현시간, 사망률 및 사망시간에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 양성대조물질로 사용한 phenobarbital 100mg/kg 경구투여에서는 경련발현시간, 사망률 및 사망시간을 유의적으로 증가시켜 항경련작용을 나타내었다(Table 6).

Table 6. Effect of Eugeniae Flos and Magnoliae Flos on the picrotoxin-induced convulsion and mortality in mice

Treatment	Time	N	Onset		T.E.		Mortality	
			Inc (%)	Lat (sec)	Inc (%)	Lat (sec)	Inc (%)	Lat (sec)
Control	10	100	626.7±35.2 ^a	100	637.8±36.9 ^{ab}	100	661.4±23.5 ^a	
Eug. & Mag.	2	100	639.2±48.1 ^a	100	665.2±38.1 ^b	100	682.1±43.4 ^a	
	4	100	634.9±37.3 ^a	100	659.2±33.2 ^a	100	680.2±33.3 ^a	
	8	100	631.2±48.5 ^a	100	656.8±25.5 ^a	100	675.4±31.9 ^a	
	12	100	623.4±34.2 ^a	100	647.0±40.6 ^a	100	665.7±40.9 ^a	
	24	100	628.0±43.2 ^a	100	648.7±38.4 ^a	100	654.9±31.9 ^a	
PHB	10	0	-	0	-	0	-	

Fragrance was inhaled for 2, 4, 8, 12, 24 hours once a day to mice. An ten min after the final inhalation of sample, animals were received picrotoxine(5.0 mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± S.D. and values followed by the same superscript are not significantly different(p<0.05) each other by New multiple square method.

T.E., tonic extensive convulsion: Inc., incidence: Lat., latent time from picrotoxin treatments.

2. 뇌중 GABA 함량에 미치는 영향

GABA 함량의 경우 대조군이 2.18±0.13 GABA nmole/mg protein인데 비하여 PTZ투여군은 1.30±0.10 GABA nmole/mg protein로서 약 40% 감소하였고,丁香과 辛夷 향기를 8시간, 12시간, 24시간 향기를 흡입한 군은 각각 1.58 ± 0.06 GABA nmole/mg protein, 1.49 ± 0.12 GABA nmole/mg protein, 1.66 ± 0.18 GABA nmole/mg protein 로 PTZ 투여군보다 22%, 15%, 28%로 증가하여 대조군의 수준에는 미치지 못하나 증가됨을 관찰 할 수 있었다 (Table 7).

Table 7. Effect of Eugeniae Flos and Magnoliae Flos on the brain GABA level in pentylene-tetrazole-induced mice

Treatment	Time (hr)	Content ¹⁾	% of control
Control		2.18 ± 0.13 ^a	100
PTZ		1.30 ± 0.10 ^p	60
Eug. & Mag.	2	1.21 ± 0.15 ^p	51
	4	1.39 ± 0.17 ^p	64
	8	1.58 ± 0.06 ^{bc}	72
	12	1.49 ± 0.12 ^p	68
	24	1.66 ± 0.18 ^c	76

Fragrance was inhaled for 2, 4, 8, 12, 24 hours once a day to mice. An ten min after the final inhalation of sample, animals were received pentylene-tetrazole(70 mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values represent means±S.D.(n=7) and by the same superscript are not significantly different (p<0.05) each other by new multiple square method.

¹⁾content : GABA nmole/mg protein

3. 뇌중 glutamic acid 함량에 미치는 영향

대조군이 10.2 ± 0.31 glutamate nmole/mg protein인데 PTZ투여군은 17.6 ± 0.23 glutamate nmole/mg protein으로 약 73% 증가를 보였고, 丁香과 辛夷 향기를 8시간, 12시간, 24시간 향기를 흡입한 군은 각각 12.9 ± 0.19 glutamate nmole/mg protein, 12.7 ± 0.20 glutamate nmole/mg protein, 11.8 ± 0.17 glutamate nmole/mg protein으로 PTZ 투여군의 72%, 72%, 67%로 억제되었다. 한편 丁香과 辛夷 향기를 2시간, 4시간 흡입한 군은 pentylenetetrazole에 의하여 감소되는 뇌중의 GABA의 농도 및 glutamic acid 농도에는 유의성 있는 영향을 미치지 못하였다.(Table 8)

Table 8. Effect of Eugeniae Flos and Magnoliae Flos on the brain glutamic acid level in pentylenetetrazole-induced mice

Treatment	Time (hr)	Content ¹⁾	% of control
Control		10.21 ± 0.31^a	100
PTZ		17.64 ± 0.23^b	173
Eug. & Mag.	2	18.48 ± 0.36^b	181
	4	15.32 ± 0.21^b	150
	8	12.93 ± 0.19^c	127
	12	12.75 ± 0.20^c	125
	24	$11.89 \pm 0.17^{c,d}$	116

Fragrance was inhaled for 2, 4, 8, 12, 24 hours once a day to mice. An ten min after the final inhalation of sample, animals were received pentylenetetrazole(70 mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values represent means \pm S.D.(n=7) and by the same superscript are not significantly different ($p < 0.05$) each other by new multiple square method.

¹⁾content : Glutamate nmole/mg protein

4. 뇌중 GABA 및 glutamic acid의 생합성과 대사에 관여하는 효소활성에 미치는 영향

丁香과 辛夷 향기를 2, 4, 8, 12, 24시간 흡입하고서 PTZ로 경련을 유발시키고, 뇌중 GABA-T 및 GAD의 활성에 미치는 영향을 관찰한 성적이다(Table 9, 10).

GABA-T의 활성은 대조군이 1.38 ± 0.07 NADPH nmole/mg protein인데 비하여 PTZ투여군은 2.15 ± 0.13 NADPH nmole/mg protein으로서 약 56% 증가하였고, 丁香과 辛夷 향기를 8, 12, 24시간 흡입한 군은 각각 1.52 ± 0.20 NADPH nmole/mg protein, 1.48 ± 0.10 NADPH nmole/mg protein, 1.53 ± 0.12 NADPH nmole/mg protein으로 PTZ 투여군의 70%, 69%, 71%로 감소하여 대조군의 수준으로 회복되고 있음을 관찰할 수 있었다. 한편, 丁香과 辛夷향기를 2시간, 4시간 흡입에서는 PTZ의 투여로서 현저히 증가되는 GABA-T의 활성을 저지하지는 못하였다. GAD의 활성은 대조군이 7.18 ± 0.41 GABA nmole/mg protein인데 비하여 PTZ투여군은 7.67 ± 0.40 GABA nmole/mg protein으로서 약 7% 증가를 보였으나 통계적인 유의성은 없었으며, 丁香과 辛夷 향기를 2, 4, 8, 12, 24시간 흡입하므로써 본 효소의 활성은 다소 변동이 있었으나 대조군과 유의적인 변화는 없었다.

Table 9. Effect of Eugeniae Flos and Magnoliae Flos on the brain GABA-T activity in pentylenetetrazole-induced mice

Treatment	Time (hr)	Activity ¹⁾	% of control
Control		1.38 ± 0.07^a	100
PTZ		2.15 ± 0.13^b	156
Eug. & Mag.	2	2.20 ± 0.18^b	159
	4	1.86 ± 0.17^b	135
	8	1.52 ± 0.20^c	110
	12	1.48 ± 0.10^c	107
	24	1.53 ± 0.12^c	111

Fragrance was inhaled for 2, 4, 8, 12, 24 hours once a day to mice. An ten min after the final inhalation of sample, animals were received pentylenetetrazole(70 mg/kg,

i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values represent means±S.D.(n=7) and by the same superscript are not significantly different (p<0.05) each other by new multiple square method.

¹⁾activity : NADPH nmole/mg protein/hr

Table 10. Effect of Eugeniae Flos and Magnoliae Flos on the brain GAD activity in pentylenetetrazole-induced mice

Treatment	Time (hr)	Activity ¹⁾	% of control
Control		7.18 ± 0.41 ^{ab}	100
PTZ		7.67 ± 0.40 ^b	107
Eug. & Mag.	2	7.59 ± 0.36 ^a	106
	4	7.55 ± 0.29 ^a	105
	8	7.64 ± 0.39 ^b	106
	12	7.46 ± 0.45 ^a	104
	24	7.56 ± 0.39 ^a	105

Fragrance was inhaled for 2, 4, 8, 12, 24 hours once a day to mice. An ten min after the final inhalation of sample, animals were received pentylenetetrazole(70 mg/kg, i.p.). The procedure was described in the experimental methods. Values represent means±S.D.(n=7) and by the same superscript are not significantly different (p<0.05) each other by new multiple square method.

¹⁾activity : GABA nmole/mg protein/hr

VI. 考 察

간질은 <素問: 胎病論>⁵⁾에서는 소아의 선천성 간질에 대하여 언급이 되어 있고, <難經 20難>³⁾에서는 “重陰者癲”으로, 傷寒論³⁾에서는 太陽病에서 “若被下者 小便不利 直視失溲 若被下者微發黃色 劇則如驚癇 時瘦瘵 若火熏之”로 표현이 되고 있다.

丁香과 辛夷 향기의 향경련 작용의 기전을 중추의 흥

분성 전달물질로 이용되는 glutamic acid와 억제성 전달 물질로 알려진 GABA의 뇌 조직중 함량변화 연관지어 구 명해 보고자하였다.

먼저 丁香과 辛夷 향기를 실험동물에 2, 4, 8, 12, 24시간 흡입시키고 Maximal electric seizure(MES), Pentylenetetrazole (PTZ), Strychnine, Bicuculline 및 Picrotoxin에 의해 유도되는 경련발작에 미치는 영향을 검토하였을 때, MES, Strychnine, Bicuculline 및 Picrotoxin에 의하여 유도되는 경련에는 별다른 영향이 없었으나, 정향과 신이 향기의 흡입군에서 각군의 시간상 차이는 있으나 PTZ에 의하여 유도되는 경련 발작 상태가 감소되었다.

MES의 시험은 gland mal의 특징적인 징후인 generalized tonic clonic seizure의 조절에 관련이 있으며, strychnine은 중추신경계를 전반적으로 흥분시키지만 주로 척수부위를 흥분시킨다. 이의 작용기전은 척수에서 억제성 전달인자인 glycine과 선택적 길항 및 rensow 세포의 활동을 차단하여 접합 후 억제기능(postsynaptic inhibition)을 저해시켜 흥분 및 강직성 경련을 일으키는 것으로 알려져 있다. Bicuculline 및 picrotoxin은 중추신경계의 접합 전 억제기능(pre-synaptic inhibition)의 저해로 흥분작용이 나타나며 이의 기전은 GABA-A수용체와 선택적으로 길항하여 경련을 일으키는 것으로 알려져 있다.^{23,26,32,47)}

PTZ는 strychnine과 picrotoxin과는 달리 접합전 및 접합후 기능에는 관계 없이 중추신경 흥분제로 chloride 이온 전도에 미치는 GABA의 작용을 저해하는 것으로 보고 되어 있으나, 자세한 저해 기전은 알려지지 않고 있으며, 현재 absence seizure나 myochlonic seizure의 경련 양상을 일으키는 간질 발작을 유도하는 실험 모델로서의 용도로만 주로 사용되고 있는 약물이다.^{33,40)}

丁香과 辛夷 향기를 시간별로 흡입한 실험동물에 PTZ를 투여하고 뇌중 GABA의 함량을 측정하였을 때, 대조군에 비하여 PTZ 단독 투여군에서는 GABA의 함량이 현저히 감소하였으나, 丁香과 辛夷 향기를 흡입한 군에서는 이러한 GABA 함량의 감소현상이 현저히 억제되어 대조군 수준에 가깝게 증가되었다.

GABA-T는 뇌 조직 중에서 억제성 신경섬유 말단과 망산 세포계 등에 분포되며, 재흡수된 GABA를 glutamic

acid와 succinic semialdehyde로 불활성화 시키는 역할을 하는 효소이다^{19,27,29}). GABA-T의 활성은 PTZ 단독 투여 군에서 대조군에 비해 약 56% 정도 증가하였으나, 丁香과 辛夷 향기를 흡입한 군에서는 PTZ에 의하여 증가되던 효소의 활성이 억제되었다.

이와 같은 GABA-T 활성의 변동은 GABA의 함량의 변화와 연관시켜 생각 할 수 있으며, 丁香과 辛夷 향기의 항경련 작용은 뇌중 GABA-T와 이에 따른 GABA 함량의 변동에 기인하는 것으로 생각할 수 있다.

한편, PTZ에 의하여 유도되는 경련 발작 상태에서 뇌중의 glutamic acid 함량 변화를 검토하였을 때, 현저한 함량의 증가 현상을 관찰 할 수 있었으며, 이러한 현상은 한 GABA 함량, 丁香과 辛夷 향기를 흡입하므로써 함량이 감소되는 경향을 보였다. 그러므로 PTZ에 의해 유발되는 경련의 발작 상태가 뇌중 glutamic acid의 함량과 무관하지 않을 것으로 생각 할 수 있었다.

Glutamic acid의 함량 증가 현상은 억제성 신경 섬유 (GABAergic neuron)에서 GABA-T 활성의 증가로 인한 대사산물로서의 증가와, 흥분성 신경섬유(glutamatergic neuron) 말단에서 유리되는 신경 전달 물질로서의 증가라는 두 가지 요인과 관련시켜 설명할 수 있다^{25,28,42}). 그러나 PTZ에 의해 유발되는 발작 상태에서 관찰되는 뇌중 glutamic acid 함량 증가 현상의 정도가 GABA-T의 활성 정도에 비하여 현저한 차이가 있으므로, 이러한 현상은 억제성 신경 섬유에서 GABA-T 활성의 증가로 인한 GABA 대사 산물이 증가하기 때문이라기 보다는 흥분성 신경 섬유의 작용이 GABA의 함량감소로 인해 저하되었기 때문이라고 생각되지만, 이점에 대하여서는 좀더 깊은 연구가 검토되어야 할 것으로 생각된다.

섭취되거나 생합성된 glutamic acid는 뇌중 억제성 신경섬유에 분포하는 효소인 GAD에 의하여 GABA로 대사된다^{31,38,43,44,46}). Glutamic acid가 PTZ의 투여로 현저한 함량 증가를 보이는 것에 비하여, GAD의 활성은 다소 증가하는 경향만을 보이므로, glutamic acid의 함량 증가에 관여하는 억제성 신경섬유 작용의 비중은 그리 크지 않을 것으로 생각할 수 있다. 한편, 이러한 현상은 丁香과 辛夷 향기를 흡입하므로써 별다른 변동을 보이지 않는 것으로

보아, GABA 함량을 조절하는 丁香과 辛夷 향기의 작용은 GAD와는 무관할 것으로 생각된다.

이러한 결과에서 丁香과 辛夷 향기의 흡입으로 인한 PTZ에 의한 항경련 효과의 기전은 뇌중 GABA 및 glutamic acid의 함량과 연관이 있을 것으로 생각되며, 이러한 작용은 GABA-T의 활성에 의한 것보다는 흥분성 신경 섬유 자체의 활성에 기인된 것으로 생각된다. 또한 흥분성 신경 섬유상에서 GABA-B 수용체가 발견되므로서 GABA 함량의 감소가 흥분성 신경 섬유 활성화와 연관성이 있는 것으로 사료된다.

V. 結 論

PTZ에 의해 유도되는 丁香과 辛夷 향기의 항경련 작용의 기전을 중추의 흥분성 전달물질로 이용되는 glutamic acid와 억제성 전달물질로 알려진 GABA의 뇌 조직중 함량변화에 대하여 병행하여 관찰하였다.

1. 丁香과 辛夷 향기를 흡입하고 MES, PTZ, Strychnine, Bicuculline 및 Picrotoxin에 의해 유도되는 경련발작에 미치는 영향을 검토하였을 때, MES, Strychnine, Bicuculline 및 Picrotoxin에 의하여 유도되는 경련에는 별다른 영향이 없었으나, 丁香과 辛夷 향기를 흡입한군에서 PTZ에 의하여 유도되는 경련 발작 상태가 감소되었다.
2. 丁香과 辛夷 향기를 흡입한 실험동물에 PTZ를 투여하고 뇌중 GABA의 함량을 측정하였을 때, 대조군에 비하여 PTZ 단독 투여군에서는 GABA의 함량이 현저히 감소하였으나, 丁香과 辛夷 향기를 흡입한 군에서는 이러한 GABA 함량의 감소현상이 현저히 억제되어 대조군 수준에 가깝게 증가되었다.
3. GABA-T의 활성은 PTZ 단독 투여군에서 대조군에 비해 약 56% 정도 증가하였으나, 丁香과 辛夷 향기를 흡입한 군에서는 PTZ에 의하여 증가되던 효소의 활성이 억제되었다. GAD의 활성에는 별다른 영향이 없었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 PTZ의 유도에 의한 丁香과 辛夷 향기의 항경련 효과는 뇌중 GABA의 감소 및 glutamic acid의 함량증가 현상과 관련이 있을 것으로 뇌중에 존재하는 아미노산의 대사계에 영향을 초래 할 것으로 생각된다.

參 考 文 獻

1. 龔廷賢: 壽世保元, 서울, 醫聖堂, p.307, p.661, p.702, 1993.
2. 江蘇新醫學院編: 中藥大辭典, 上海科學技術出版社, p.13, 1982.
3. 成樂箕編著: 八十一難經解釋, 高文社, p.32, 1982.
4. 孫思邈: 備急千金要方, 서울, 大星文化社, pp.139-141, 1992.
5. 楊維傑: 黃帝內經素問譯解, 서울, 成輔社, p.52, p.88, p.102, p.207, p.293, p.325, p.361, p.381, p.443, p.474, p.551, p.593, p.702, 1980.
6. 楊維傑: 黃帝內經靈樞譯解, 서울, 成輔社, p.89, pp.105-145, pp.148-151, p.250, p.269, p.359, pp.367-374, 1980.
7. 王 焘: 外臺秘要, 서울, 大星文化社, pp.337-338, p.351, 1992.
8. 李時珍: 本草綱目, 서울, 醫聖堂, p.895, p.900, p.902, p.910, pp.1941-1942, p.1945, pp.1965-1968, 1993.
9. 張仲景: 新編仲景全書, 서울, 大星文化社, p.9, 1993.
10. 張湯敏: 癲癇治療經驗方, 人民軍醫出版社, p.9, 1996.
11. 趙 佶: 聖濟總錄, 서울, 醫聖堂, p.1754, pp.1766-1768, 1993.
12. 周紹華, 周佩雲: 常見疾病 神經系統中醫診治, p.192, 1993
13. 蔡仁植: 傷寒論譯註, 高文社, p.13, 1985.
14. 崔殷圭: 龍腦香이 mouse에서의 抗痙攣 效果, 서울, 東國大學校 大學院, 1998.
15. 楊醫亞: 中醫學問答(上册), 人民衛生出版社, pp. 488- 489, 1985.
16. 華 佗: 華佗神醫秘傳, 서울, 杏林書院, pp.335-336, 1958.
17. 황경태 : 간질은 불치병이 아니다, 최신의학사, 서울, p1, 5, 7, 1996
18. Allen, I.C. and Griffiths, R. : Reversed-phase high performance liquid chromatographic method for determination of brain glutamate decarboxylase suitable for use in kinetic studies. J. Chromatography, 336, 385(1984)
19. Annegers, J.F., Hauser, W.A. and Elveback, L.R. : Remission of seizures and relapse in patients with epilepsy. Epilepsia, 20, 729 (1979)
20. Araki, S. and Ueki, S. : Changes in sensitivity to convulsion in mice with olfactory bulb ablation. Jap. J. Pharmacol., 22, 447(1972)
21. Bergmeyer, H.U. : Method of enzymatic analysis, 3 eds., vol. 2, Academic press, new York, pp. 191-192(1983)
22. Berl, S., Lajtha, A. and Waelsch, H. : Amino acid and protein metabolism. VI. Cerebral compartments of glutamic acid metabolism. J. Neurochem., 7, 186(1961)
23. Bitcher, R.P., Kanai, T. and Wang, S.C. : Intravenous, cortical and intraventricular dose-effect relationship of pentylenetetrazole, picrotoxin and deslanoside in dogs. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol., 14, 256(1962)
24. Booker, H.E. : Trimethadione toxicity. In "Antiepileptic drugs" D.M. Woodbury, J.U. Penry and C.E. Pippenger eds., Raven, New York, pp. 701-703(1982)
25. Callaghan, n. and Goggin, T. : Adjunctive therapy in resistant epilepsy. Epilepsia, 29, S29(1988)
26. Chapman, A.G., Riley, K., Evans, M.G. and Meldrum, B.S. : Acute effect of sodium valproate and γ -vinyl GABA on regional amino acid metabolism in the rat brain. Neurochem. Res., 7, 1089(1982)
27. Dulac, O. and Arthuis, M. : Open trials with vaproate in epilepsy. Epilepsia, 25, S23(1984)
28. Dulac, O., Chiron, C. and Luna, D. : Vigavatr in childhood epilepsy. J. Child Neuro., 6, 2S30(1991)
29. Elwes, R.D.C., Johnson, A.L., Shorvon, S.D. and Reynolds, E.H. : The prognosis for seizure control in newly diagnosed epilepsy. NEJM, 311, 944(1984)

30. Gibbs, E.L., Gibbs, F.A. and Lennox, W.G. : Cerebral dysrhythmias of epilepsy. Arch. Neurol. Psychiatr., 39, 298(1938)
31. Harold, K., Kailash, N.S., Phillippe, L., David, W.R. and J. David, L. : Preparation and anticonvulsant activity of a series of functionalized α -heteroatom-substituted amino acids. J. Med. Chem., 34, 2444 (1991)
32. Hildebrandt, F. : Pentametylenetetrazole(Cordiazol). Arch. Exp. pathol. Pharmacol., 116, 100(1926)
33. Holdiness, M.R. : Chromatographic analysis of glutamic acid decarboxylase in biological samples. J. Chromatography, 277, 1(1984)
34. Holland, K.D., McKeon, A.C., Canney, D.J., Covey, D.F. and Ferrendelli, J.A. : Relative anticonvulsant effect of GABA-mimetic and GABA modulatory agents. Epilepsia, 33, 981(1992)
35. Jackson, J.H.: On the anatomical, physiological and pathological investigation of epilepsies. In "Selected writings of John Hughlings Jackson" J.H. Jackson eds., vol. 1. Hodder & Stoughton, London, p. 94 (1931)
36. Kinsley, E., Tweedale, R. and Tolman, K.G. : Hepatotoxicity of sodium valproate and other anticonvulsant in rat hepatocyte cultures. Epilepsia, 21, 699(1980)
37. Kokenge, R., Kutt, H. and McDowell, F.: Neurological sequelae following dilantin overdose in a patient and in experimental animals. Neurol., 15, 823 (1965)
38. Leppik, I.E., Willmore, L.J. and Homan, R.W. : Efficacy and safety of zonisemide: results of a multicenter study. Epilepsy Res., 14, 165(1993)
39. Lowry, O. H., Rodebrough, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265(1951)
40. Metcalf, B.W. : Inhibitors of GABA metabolism. Biochem. Pharmacol., 28, 1705(1979)
41. Raines, A., Niner, J.M. and Pace, D.G.: A comparison of the anticonvulsant, neurotoxic and lethal effects of diphenylbarbituric acid, phenobarbital, diphenylhydantoin in the mouse. J. Pharmacol. Exp. Ther., 186, 315(1973)
42. Sachdeo, R., Kramer, L.D., Rosenberg, A. and Sachdeo, S. : Felbamate monotherapy: controlled trial in patients with partial onset seizure. Ann. Neurol., 32, 368(1992)
43. Sheryl, J.H., Michael, J.R., Daniel, F.O., Graham, J., Roy, D.S., Denise, K.B., Laura, F.C., Mark, G.V. and Peter, A.B. : Substituted 2-bezothiazolamines as sodium flux inhibitors: quantitative structure-activity relationships and anticonvulsion activity. J. Pharmaceut. Sci., 83, 1425(1994)
44. Shorvon, S.D. : Medical assessment and treatment of chronic epilepsy. B.M.J., 302, 363(1991)
45. Sohn, Y.J., Levitt, B. and Raines, A., Anticonvulsant properties of diphenylthiohydantoin. Arch. Int. Pharmacodyn., 188, 284(1970)
46. Svensson, T.H. and Thieme, G.: An investigation of a new instrument to measure motor activity of small animals. Psychopharmacologia,(Berl.) 14, 157 (1969)
47. Swinyard, E.A. : Laboratory evaluation of antiepileptic drugs. Epilepsia, 10, 107(1969)
48. Woodbury, L.A. and Davenport, V.D. : Design and use of a new electroshock seizure apparatus, and analysis of factors altering seizure threshold and pattern. Arch. Int. Pharmacodyn., 92, 97(1952)