

동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 13. No. 2, 2002

加減歸脾湯의 진정 효과에 대한 실험적 연구

김은정, 김인재, 이동원, 류종삼*, 홍석*
동신대학교 한의과대학 신경정신과학교실, 동신대학교 한의과대학 내과학교실*

Experimental Study on the Sedative Effect of *Gagamguibitang*

Eun-jung Kim, In-jae Kim, Dong-won Lee, Jong-sam Ryu*, Seok Hong*
Department of Neuropsychiatry, College of Oriental Medicine, Dongshin University
Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongshin University

Gagamguibitang, a composite Korean medicinal drug prescribed by us, was evaluated for its sedative effects by measurements of potentiation on pentobarbital-induced sleeping time, anticonvulsive activities in animal model, inhibitory effect on GABA transaminase activity, and antioxidative activities *in vitro*- and/or *in vivo* assay.

The results were summerized as follows :

1. *Gagamguibitang* showed about 2-fold prolongation of pentobarbital-induced sleeping time compared to the control group after administration(p.o) with 2.0g/kg of mice body weight.
2. *Gagamguibitang* strongly lengthened onset time of pentylenetetrazole-induced convulsion, shortened the duration of convulsion and diminished the lethality after treatment(p.o) with 1.0g/kg of mice body weight.
3. *Gagamguibitang* inhibited dose-dependently the brain GABA transaminase activity *in vitro* compared to the control group and *in vivo* compared to the pentylenetetrazole-treated group.
4. *Gagamguibitang* inhibited effectively brain lipid peroxidation by 45.8% at a dose of 10mg/ml *in vitro* and by 47.5% after oral treatment with 0.5g/kg of mice body weight *in vivo* assay.
5. *Gagamguibitang* exhibited a potent scavenging activity on DPPH radical in a dose-dependent manner with ca. 92% activity at 10mg/ml.

As a result, *Gagamguibitang* can be useful for the effective sedative drug in clinical application.

key word: *Gagamguibitang*, sedation, sleep, anticonvulsion, GABA transaminase, antioxidation, lipid peroxidation, free radical.

· 교신저자 : 김은정, 전남 순천시 조례동 1722-9 동신
대학교 순천한방병원 신경정신과(Tel. 061-
729-7280, E-mail: dreaming_ej@hanmail.
net)

I. 結 論

불면이란 수면 상태나 시간 등이 부적절한 것으로 잠들기 어렵거나 깊게 잠들지 못하며 쉽게 깨는 경우를 말하는데 이는 중추신경계의 흥분으로 인하여 유발되며 정신활동이 많은 현대인들에게 빈번히 발생된다^{1,2)}. 또한 중추신경의 과도한 흥분으로 신경방전이 일어나면 경련이 발생하며 간질은 경련을 주소로 하는 대표적인 질환이다¹⁾.

수면을 생성하는 신경해부학적부위와 각성을 담당하는 부위의 상호작용에 의해 불면이나 수면이 야기되는데, 신경화학적으로 serotonin, GABA-receptor complex는 수면효과를, catecholamine은 각성효과를 가져온다²⁾. 경련을 야기하는 기전은 여러학설이 있으나, 그중 뇌내의 GABA기전의 억제현상 등이 가장 설득력 있다²⁾.

불면과 경련에 대한 대증요법으로 현재 약물치료가 가장 중요한 비중을 차지하고 있는 데, 대표적으로 Barbiturate는 소량에서도 GABA 유사작용을 나타내거나 GABA의 작용을 촉진시킨다³⁾.

본 실험의 加減歸脾湯은 『晴崗醫鑑』에 수록된 방제로 신체적·정신적으로 과로하거나 큰 충격으로 인해 발생하는 불면증을 비롯한 怔忡, 疲勞,

食慾不振, 心悸亢進 등에 널리 사용하는 처방이다⁴⁾.

최근 龍眼肉, 酸棗仁, 遠志 등의 단일약물⁵⁾과 四物安神湯⁶⁾이 수면 및 항경련 등에 효과가 있음이, 鎮痙溫膽湯⁷⁾, 桂枝茯苓丸⁸⁾ 등이 항경련에 효과가 있음이 보고되었으나 아직까지 加減歸脾湯이 진정 작용에 미치는 연구보고는 접할 수 없었다.

이에, 본 연구에서는 加減歸脾湯의 진정효과를 확인하고 검증하기 위하여 pentobarbital에 의해 유도된 수면시간의 증강여부와 경련 동물모델을 대상으로 한 항경련 효과, 신경전달에 관여하는 효소의 활성변동 그리고 뇌신경 세포를 보호하는 항산화 작용이 있는지를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 藥物

본 실험에 사용된 약제는 『晴崗醫鑑』⁴⁾에 수록된 처방으로 그 구성, 용량 및 생약명은 다음과 같다.

Table I. The Compositions of Gagamguibitang(이하 'GGT') Extracts

韓藥名	生藥名	重量(g)
龍眼肉	Longanae Arillus	7.5
酸棗仁(炒)	Zizyphi Spinosae Semen	7.5
當歸	Angelicae Sinensis Radix	5.625
白茯苓	Poria	5.625
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	5.625
白芍藥(炒)	Paeoniae Radix Alba	5.625
橘紅	Citri Pericarpium	3.75
遠志	Polygalae Radix	2.625
甘草	Glycyrrhizae Radix	1.875
生薑	Zingiberis Rhizoma	7.125
大棗	Jujubae Fructus	7.125
總量		60

2) 藥物의 抽出

加減歸脾湯의 추출물은 약재 600g을 80℃의 70% methanol로 3시간동안 추출하여 여과시킨 후, 분말상태로 하여 추출하였으며, 최종단계에서 얻어진 액상의 추출물을 동결건조기(freeze dryer)로 완전 건조시켜 고체상태로 만들어 얻어진 85g을 실험의 시료로 사용하였다.

3) 實驗動物

한국실험동물개발로부터 구입한 ICR계 웅성 mouse(30±1g)를 동물사육사에서 일정한 조건(온도 : 21±2℃, 습도 : 50-60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 사육하여 사용하였다.

실험동물을 1주일간 적응시켰으며 실험개시전 24시간 동안 물만 먹이고 절식시켰다. 동물처치는 효소활성의 일중변동을 고려하여 오전 10-12시 사이에 실시하였다.

2. 방법

1) 酵素源의 製造

동물에서 뇌조직을 적출한 다음, 조직 1g당 4배량의 0.15M potassium phosphate buffer(pH 8.0)를 가하여 약 4℃에서 homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액 일부는 지질과산화 억제효과 실험에 사용하였으며 나머지를 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 다음, 상정액(supernatant)을 얻고 이 상정액을 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 분리한 상정액을 1시간 동안 100,000×g에서 초원심분리하여 cytosol 분획을 얻어 γ -aminobutyric acid transaminase(이하 'GABA-T')의 효소원으로 하였다. 상기의 모든 조작은 0~4℃에서 실시하였다.

2) Pentobarbital 유도 수면시간 연장효과 측정

加減歸脾湯의 진정효과를 측정하기 위하여 추출물을 용량별(1g/kg, 2g/kg)로 7일간 각각 경구 투여한 다음, 1시간 뒤 pentobarbital 나트륨 50mg/kg을 normal saline에 녹여 복강주사하고 그 수면시간을 측정하였다. 수면시간은 동물의 꼬 끝에 손을 대어보아 정향반사(righting reflex)

가 소실되는 시점을 기준으로 다시 정향반사가 회복될때까지의 시간을 측정, 비교하였다. 대조군에는 추출물대신 1% Carboxymethyl cellulose를 투여하였으며 양성대조물질(positive control)로는 진정제인 chlorpromazine hydrochloride 10mg/kg을 사용하였다.

3) 경련동물모델에서의 항경련 효과 測定

항경련 효과는 실험동물에 7일간 加減歸脾湯 추출물을 용량별(0.5g/kg, 1.0g/kg)로 경구투여한 다음, 최종투여 1시간 후, 경련유발물질인 PTZ 70mg/kg을 피하주사하고 최초경련발현시간(onset time), 경련지속시간(duration) 및 사망률(lethality)을 측정하였다. 양성대조물질로는 잘 알려진 항경련제인 vigabatrin을 사용하여 추출물의 효과를 서로 비교하였다.

4) GABA-T의 억제活性測定

① In vitro에서의 GABA-T 억제활성 측정

In vitro에서의 GABA-T(EC 2.6.1.19) 활성측정은 Bergmeyer등의 방법⁹⁾에 따라 일정량의 0.15M potassium phosphate buffer(pH 8.0)에 α -ketoglutaric acid와 기질인 GABA 및 효소인 GABAse를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 다음, 이때 생성된 succinic semialdehyde에 25.5mM의 β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(이하 ' β -NADP')를 첨가시키고 20분간 반응시켜 생성되는 NADPH를 340nm에서 측정하여 효소활성을 산정하였다. 효소의 활성도는 1시간당 1mg의 단백질이 생성시킨 NADPH의 양을 nmole로 표시하였다.

② In vivo에서의 GABA-T 억제활성 측정

In vivo에서의 GABA-T 활성측정은 실험동물에 시료를 용량별(0.5g/kg, 1.0g/kg)로 각각 경구 투여한 다음, 뇌를 적출하여 효소원을 만들고 4)①과 같은 방법으로 측정하여 정상군 및 대조군의 활성도를 비교, 검토하였다.

5) 과산화지질 생성 억제효과 測定

① In vitro에서의 과산화지질 억제효과 測定

*In vitro*에서의 과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법¹⁰⁾에 준하였다. 뇌조직 마쇄균질액 0.1ml에 加減歸脾湯 추출물을 용량별(0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 5.0mg/ml, 10.0mg/ml)로 0.05ml씩 혼합하고 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 0.65ml를 가한 다음, 37℃에서 1시간 incubation하였다. 여기에 8.1% sodium dodesyl sulfate 0.2ml, 20% acetate buffer(pH 3.5) 1.5ml 및 0.8% 2-thiobarbituric acid용액 1.5ml를 가해 95℃에서 1시간동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음, 생성된 홍색의 착색물질을 *n*-butanol : pyridine(15:1, v/v) 혼액으로 이행시켜 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 다음, 상정액을 취하여 파장 532nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 조직 1g당 malondialdehyde(이하 'MDA')의 양을 nmole로 나타내었다.

② *In vivo*에서의 과산화지질 억제효과測定

생체내에서의 과산화지질 억제효과 실험은 실험동물에 加減歸脾湯 추출물을 용량별(0.5g/kg, 1.0g/kg)로 각각 7일간 경구투여한 다음, PTZ로 경련을 유발시킨 실험동물의 뇌를 적출하여 5)-①과 같은 방법으로 과산화지질의 함량을 측정하고 대조군 및 양성대조군, 실험군과 그 활성을 비교, 검토하였다.

6) 라디칼 消去效果測定

실험에 사용한 라디칼은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(이하 'DPPH') radical이며 그 함량 측정은 Blosi의 방법¹¹⁾에 따라 추출물을 농도별(0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 5.0mg/ml, 10.0mg/ml)로 각각 DPPH radical의 1.5×10^{-5} M ethanol용액 4ml에 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 다음, 520nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. DPPH radical의 소거활성은 다음 식으로 산정하였다.

$$\text{Radical scavenging activity (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}}{1} \times 100$$

7) 蛋白質 定量

단백질의 정량은 Bradford reagent(Sigma Co.)를 사용하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 실시하였다. 즉, 농도별 stock solution (bovine serum albumin) 0.1ml에 Bradford 시약 3ml를 혼합하고 25℃에서 30분간 반응시킨 다음, 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 統計處理

모든 실험결과는 mean±S.E.로 표시하였고 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 검정하였으며, *p*-value가 0.05이하인 경우에만 인정하였다.

II. 實驗成積

1. Pentobarbital로 유도된 마우스의 수면에 미치는 효과

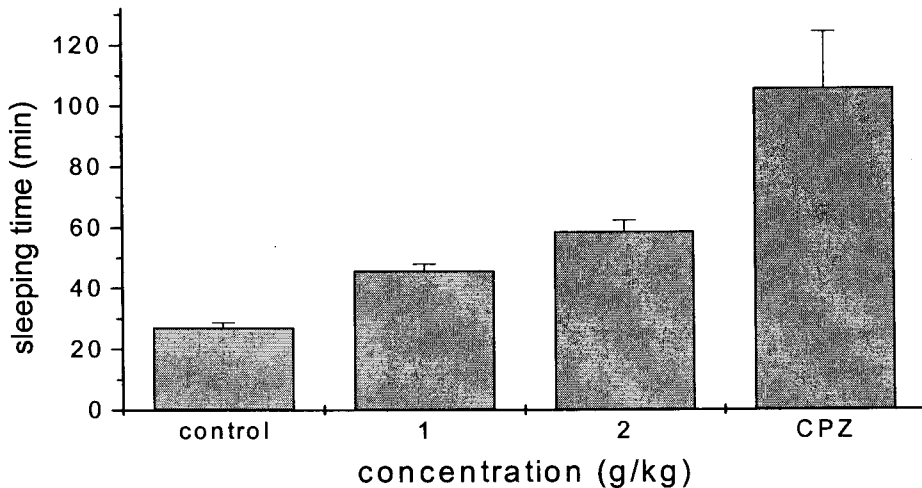
추출물을 7일간 경구투여한 다음, 처치 1시간 전 실험동물에 pentobarbital을 주사한 후의 수면 시간을 대조군 및 염산 클로로프로마진과 그 효과를 비교한 결과, 추출물의 투여량이 증가할수록

수면시간도 연장되었는데 1g/kg 투여시는 수면시간이 45.8분으로서 대조군에 비해 68.4% 증가하였으며, 2g/kg 투여시의 수면 시간은 58.8초로 대조군보다 116.2% 증가하였다. 양성대조약물인 염산 chlorpromazine 10mg/kg을 투여했을 때의 수면연장 효과는 추출물 2g/kg 투여시의 효과보다 약 1.8배 강하게 나타났다(Table II, Fig. 1).

Table II. Effects of the extract of GGT and chlorpromazine on the pentobarbital-induced sleeping time in mice. Each extract was administered (p.o.) once a day for 7 days to mice. Values are mean \pm S.E. for 7 animals.

Treatment	Dose	Sleeping time(min)	% increase
control	-	27.2 \pm 1.54	-
GGT	1000mg/kg	45.8 \pm 2.12	68.4
	2000mg/kg	58.8 \pm 3.55	116.2
chlorpromazine	10mg/kg	105.8 \pm 18.5	289.0

Fig. 1. Effects of the extract of GGT and chlorpromazine on the pentobarbital-induced sleeping time in mice. CPZ : chlorpromazine hydrochloride (dose: 10mg/kg)



2. 경련동물모델에서의 항경련효과

1) 최초경련 발현시간 지연효과

加減歸脾湯 추출물 0.5g/kg, 1.0g/kg을 7일간
 흰쥐에 각각 경구투여한 다음, 마지막 투여일에
 경련물질인 PTZ로 경련을 유발시켰을 때, 어느
 정도 경련을 억제시키는지에 대하여 관찰한 결과,

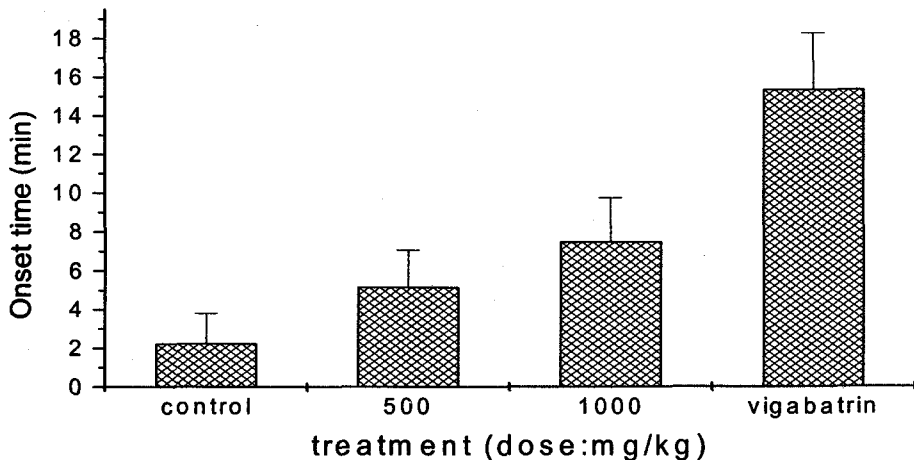
최초 경련발현시간(onset time)은 추출물 0.5g/kg
 및 1.0g/kg 투여시, 대조군에 비해 각각 2.3배 및
 3.5배로 추출물 투여용량 증가에 따라 경련발현
 이 더욱 억제된 것으로 나타났다. 특히, 추출물
 1.0g/kg투여시의 효과는 양성대조약물인
 vigabatrin 10mg/kg 투여시 효과의 약 50%에
 해당된다(Table III, Fig. 2).

Table III. Effects of the extract of GGT and vigabatrin on PTZ-induced convulsion and lethality in mice

Administration (mg/kg)	Dose	Onset ime (min)	Duration (sec)	Lethality (%)
control	-	2.24±1.56	7.1±3.24	71.4
Gagamguibitang	500mg/kg	5.19±1.87	6.5±2.45	14.3
	1000mg/kg	7.51±2.23	5.4±2.02	14.3
vigabatrin	10mg/kg	15.35±2.88	2.0±0.98	0

Each extract was administered (p.o.) once a day for 7 days to mice.
 PTZ (70mg/kg) was injected subcutaneously at final day. The procedure
 was described in the experimental methods.
 Values represent mean±S.E. for 7 animals.

Fig. 2. Anticonvulsive effects (onset time) of the extract of GGT and vigabatrin as a positive control.
 Dose of vigabatrin : 10mg/kg



2) 경련지속시간 단축효과

加減歸脾湯 추출물이 최초경련 발현후의 경련 지속시간을 어느 정도 감소시키는지 알아보기 위하여 용량별로 경구투여한 다음, 경련 단축 효과를 조사한 결과, 모든 용량에서 대조군에 비해

경련시간이 단축되었음을 알 수 있는데 0.5g/kg 투여시는 대조군보다 8.5% 감소하였고, 1.0g/kg의 용량에서는 23.9% 감소하였다. 양성대조약물인 vigabatrin의 경우 10mg/kg 투여시 경련지속시간이 2.0분이었다(Table III, Fig. 3).

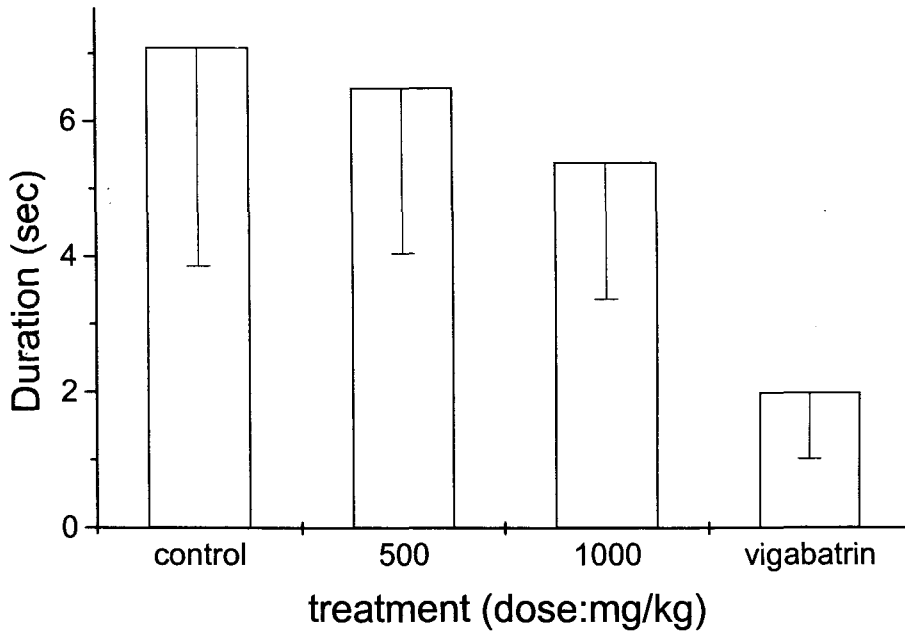


Fig. 3. Anticonvulsive effects (duration) of the extract of GGT and vigabatrin as a positive control.
Dose of vigabatrin : 10mg/kg

3) 사망률 감소효과

인위적 경련유발물질인 PTZ를 투여하였을 때, 경련을 효과적으로 억제하지 못하면 사망할 수 있으므로 加減歸脾湯 추출물이 PTZ에 의한 사망률에 미치는 영향을 대조군과 비교, 검토한 결과, 약물을 투여하지 않은 대조군은 7마리중에서 5마

리가 사망하여 71.4%의 사망률을 보인데 비해, 0.5g/kg 투여시와 1.0g/kg 투여시는 7마리중 한 마리가 사망하여 加減歸脾湯 추출물이 경련에 의한 사망률을 크게 감소시키는 것으로 관찰되었다. 양성대조약물인 vigabatrin 투여시에는 같은 조건에서 한 마리도 사망하지 않았다(Table III, Fig. 4).

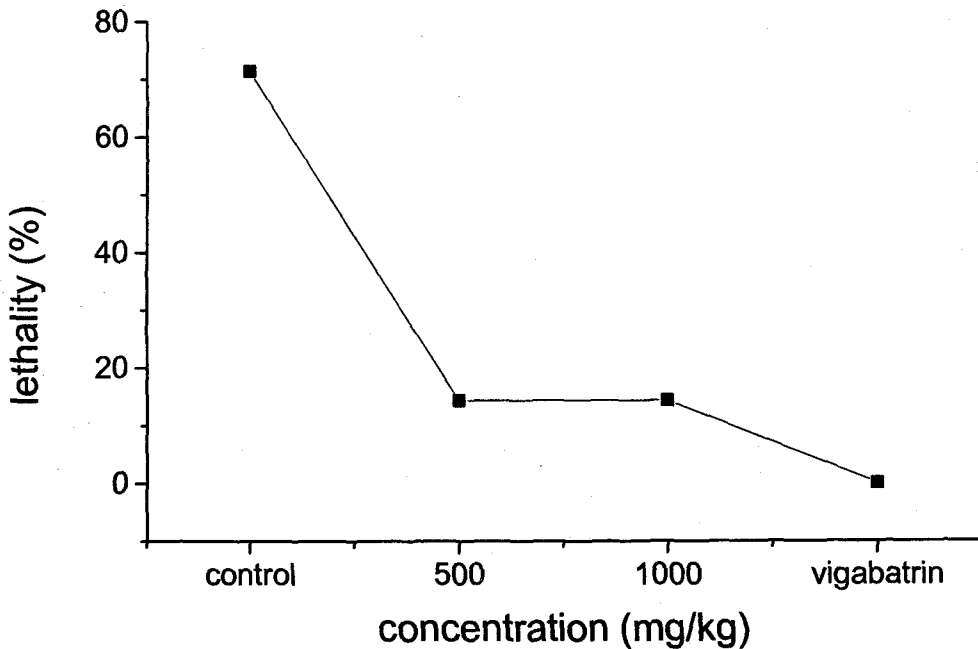


Fig. 4. Anticonvulsive effects (lethality) of the extract of GGT and vigabatrin as a positive control. Dose of vigabatrin : 10mg/kg

3. GABA-T에 대한 억제활성

1) *In vitro*에서의 GABA-T 억제활성

加減歸脾湯 추출물의 항경련 효과를 억제성 뇌 신경전달물질인 GABA의 분해효소 GABA-T에 대한 억제활성을 지표로 삼아 *in vitro*에서 측정한 결과, 모든 용량에서 투여용량이 증가할수록 억제활성도 증가하는 용량의존적인 경향을 보였

는데 0.5mg/ml의 농도에서 약 50%의 효소억제효과를 보였고 1.0mg/ml에서는 약 28%의 효소활성을 나타내었다.

양성대조약물인 vigabatrin(IC₅₀ = 0.13mg/ml)은 0.13mg/ml에서 50%의 효소활성을 보였으므로 加減歸脾湯의 효과는 vigabatrin의 약 1/4에 해당하며 또 다른 대조약물인 valproic acid(IC₅₀ = 0.97mg/ml) 보다는 약 2배의 효과를 나타냈다(Table IV, Fig. 5).

Table IV. Inhibitory effects of the extract of GGT and positive controls on GABA-T activity *in vitro*.

	Dose(mg/ml)	NADPH content ¹⁾	Activity(%)
control	-	1.35 ± 0.15	100
GGT	0.1	1.12 ± 0.25	83.0
	0.5	0.67 ± 0.10	49.6
	1.0	0.38 ± 0.05*	28.1
IC ₅₀ of vigabatrin	0.13 ²⁾		
IC ₅₀ of valproic acid	0.97 ²⁾		

¹⁾ unit: nmoles/mg protein/hr

²⁾ IC₅₀ value represents the concentration for 50% inhibition of GABA-T activity.

*: significantly different from the control group (p<0.05).

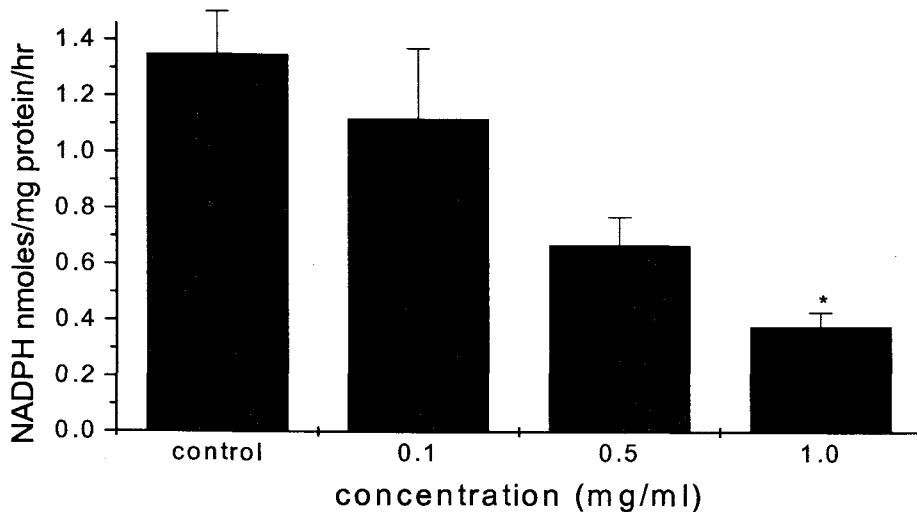


Fig. 5. Dose-dependent inhibitory effect of the extract of GGT GABA-T activity *in vitro*.

*: significantly different from the control group (p<0.05).

2) *In vivo*에서의 GABA-T 억제활성

加減歸脾湯 추출물의 *in vitro*에서의 GABA-T 억제효과를 *in vivo*에서도 확인하기 위하여 추출물의 용량을 달리하면서 경구 투여한 다음, PTZ로 유도한 경련유발 동물모델을 대상으로 그 효과를 관찰한 결과, PTZ에 의한 경련유발시 흰쥐의 뇌중 효소활성은 3.58 NADPH nmoles/mg

protein/hr로서 대조군보다 증가하였으나 추출물 0.5g/kg 및 1.0g/kg을 투여했을 때는, 각각 2.79 NADPH nmoles/mg protein/hr 및 2.36 NADPH nmoles/mg protein/hr로 효소활성이 감소하는 경향을 나타내었다. 특히, 추출물 1.0g/kg투여시 대조약물인 vigabatrin보다는 약하였으나 효소활성을 거의 정상군 수준으로 억제하였다(Table V, Fig. 6).

Table V. Inhibitory effects of the extract of GGT and vigabatrin on GABA-T activity in PTZ-treated mice.

	Dose (mg/kg)	NADPH content ¹⁾
control	-	2.24±0.35
PTZ	70	3.58±0.56
GGT	500	2.79±0.21
	1000	2.36±0.18
vigabatrin	10	0.85±0.14*

¹⁾ unit: nmoles/mg protein/hr

PTZ (70mg/kg) was injected subcutaneously at final day.

Values represent mean±S.E. for 7 animals.

*: significantly different from the PTZ-treated group (p<0.05).

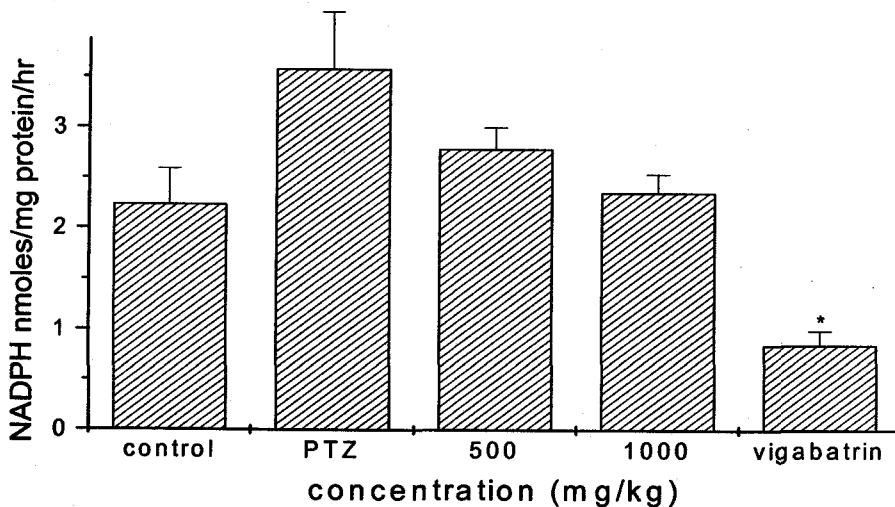


Fig. 6. Inhibitory effects of the extract of GGT and vigabatrin as a positive control on GABA-T activity in PTZ-treated mice.

Dose of vigabatrin : 10mg/kg

*: significantly different from the PTZ-treated group (p<0.05).

4. 過酸化脂質 생성 억제효과

1) *In vitro*에서의 過酸化脂質 抑制效果

加減歸脾湯 추출물의 항산화활성을 알아 보기 위하여 먼저 과산화지질의 생성 억제활성을 *in vitro*에서 측정 한 결과, 추출물의 용량을 0.5mg

/ml에서 10mg/ml로 증가시킬수록 활성도가 증가 하는 용량-반응 상관관계를 보여주었는데, 추출 물이 미량 (0.5mg/ml)일 경우에는 활성이 5.3%로 약하였으나 5.0mg/ml의 용량에서는 41.8%, 10mg/ml에서는 45.8%로 과산화지질 억제효과가 증가하였다(Table VI, Fig. 7).

Table VI. Inhibitory effects of the extract of GGT and α -tocopherol as a positive control on brain lipid peroxidation *in vitro*.

	Dose(mg/ml)	MDA content ¹⁾	%Inhibition ²⁾
control	-	22.5±2.45	-
GGT	0.5	21.3±2.16	5.3
	1.0	8.6±0.79	17.3
	5.0	13.1±0.90*	41.8
	10.0	12.2±0.36**	45.8
	α -tocopherol	0.5	4.5±0.28**
	1.0	1.8±0.20*	92.0

¹⁾ unit : nmoles/g of tissue

²⁾ % Inhibition represents the inhibitory effect of each sample compared to the control group.

Values are mean±S.E. for 3 separated experiments.

*: significantly different from the control group: * p<0.05, ** p<0.01.

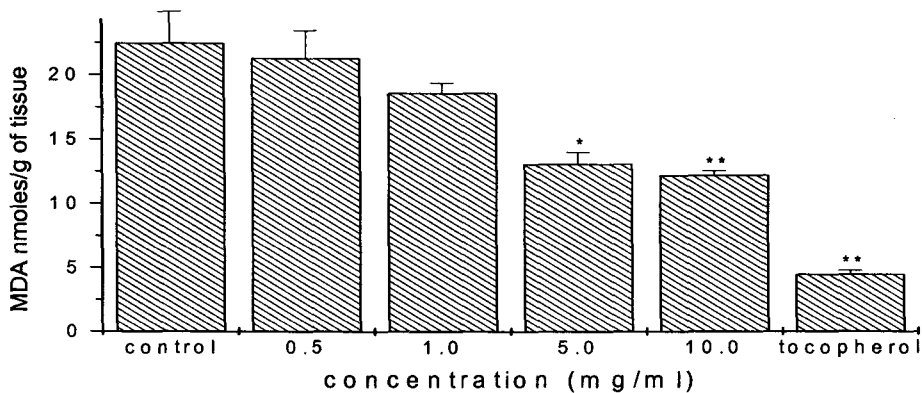


Fig. 7. Inhibitory effects of the extract of GGT and α -tocopherol as a positive control on brain lipid peroxidation *in vitro*.

Dose of α -tocopherol : 0.5mg/ml.

*: significantly different from the control group: * p<0.05, ** p<0.01.

2) *In vivo*에서의 過酸化脂質 抑制效果

加減歸脾湯 추출물의 *in vitro*에서 나타난 加減歸脾湯 추출물이 지질과산화 억제효과를 *in vivo*에서도 확인하기 위하여 추출물을 용량을 달리하면서 투여한 다음, PTZ로 유도한 경련유발 동물 모델을 대상으로 관찰한 결과, PTZ에 의한 경련 유발시 흰쥐의 뇌에서는 과산화지질의 생성이

23.6% 증가하였으나 추출물 0.5g/kg 투여시 대조군인 PTZ 투여군에 비해 과산화지질의 생성량을 47.5% 감소시켰다. 그러나 과량인 1.0g/kg 투여시에는 PTZ 투여군보다 뇌중 지질과산화 반응을 29.1% 감소시킨 것으로 나타나 0.5g/kg 투여시보다 효과가 오히려 약한 것으로 나타났다(Table VII, Fig. 8).

Table VII. Inhibitory effect of the extract of GGT on brain lipid peroxidation *in vivo*.

	Dose(mg/kg)	MDA content ¹⁾	²⁾ %Inhibition
control	-	22.5±2.34	
PTZ	70	27.8±2.56	
GGT	500	14.6±0.69*	47.5
	1000	19.7±0.57*	29.1

¹⁾ MDA: malondialdehyde (unit : nmoles/g of tissue)

²⁾ Inhibition ratio is compared to the PTZ group

Values are mean±S.E. for 7 animals.

*: significantly different from the PTZ-treated group (p<0.05).

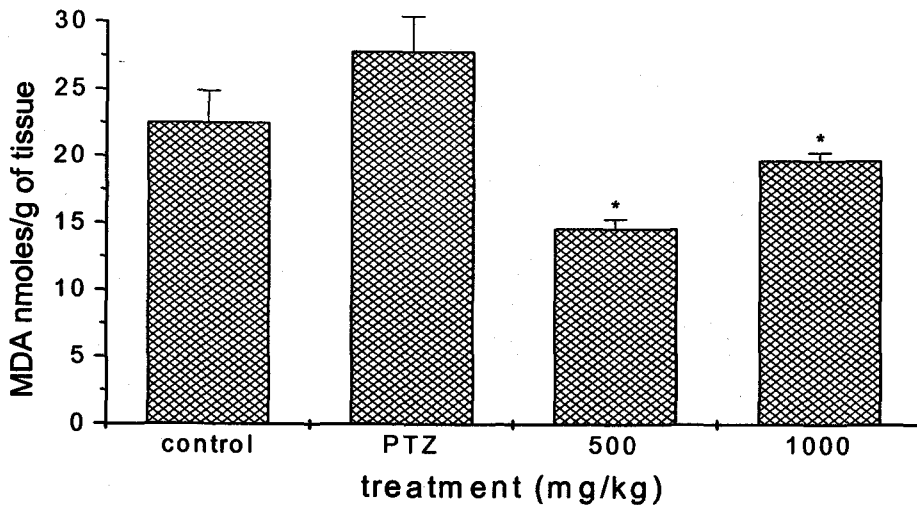


Fig. 8. Inhibitory effect of the extract of GGT on brain lipid peroxidation *in vivo*.

*: significantly different from the PTZ-treated group (p<0.05).

5. 라디칼 消去效果

항산화활성을 검정하는 또 다른 지표로 加減歸脾湯 추출물의 라디칼 소거효과를 DPPH 라디칼을 사용하여 조사한 결과, 추출물의 용량이 증가

함에 따라 전반적으로 소거효과도 증가하는 용량-반응 관계를 보여주었는데 특히, 10mg/ml의 용량에서는 약 92%의 소거효과를 나타내었다. 이 효과는 천연 항산화제인 α -tocopherol 0.5mg/ml에서의 효과와 비슷하였다(Table VIII, Fig. 9).

Table VIII. Comparison of DPPH radical scavenging activities of the extract of GGT and α -tocopherol.

	Dose(mg/ml)	Scavenging activity(%)
GGT	0.5	8.05 ± 0.58
	1.0	20.41 ± 4.89
	5.0	45.98 ± 1.73
	10.0	91.95 ± 2.02
α -tocopherol	0.5	91.38 ± 1.95
	1.0	93.11 ± 1.73

Values are mean ± S.E. for 3 separated experiments.

Activity (%) = $\{(OD_{control} - OD_{sample}) / OD_{control}\} \times 100$

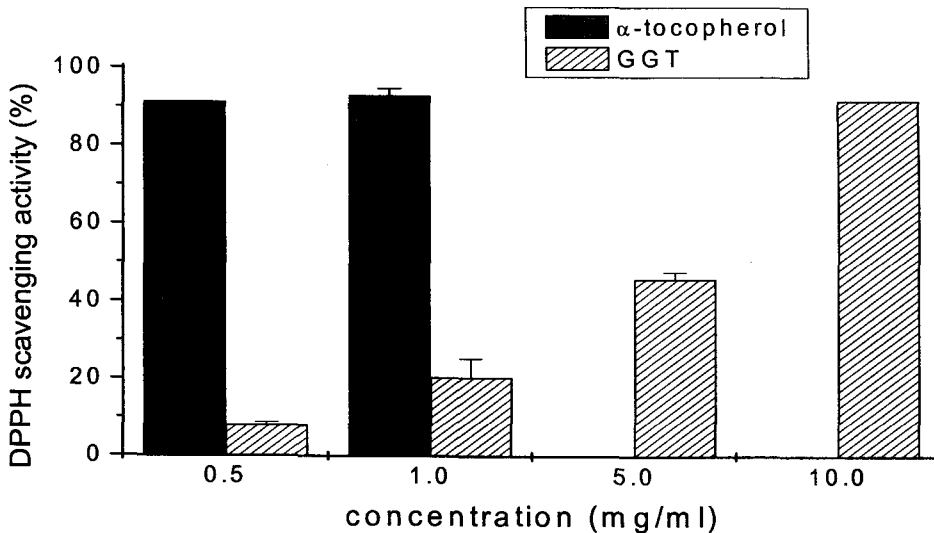


Fig. 9. DPPH radical scavenging effects of the extract of GGT and α -tocopherol as a positive control.

Activity (%) = $\{(OD_{control} - OD_{sample}) / OD_{control}\} \times 100$

IV. 考 察

수면은 급속 안구운동 수면인 REM(Rapid Eye Movement)수면과 비급속안구운동수면인 NREM(Non-Rapid Eye Movement)수면으로 구분하며, 수면장애는 중추신경계의 흥분에 의해 야기되는 증상으로서 잠이 들기 어려운 경우, 자주 깨어나 깨어 있는 경우 그리고 충분한 기간의 수면을 취하였지만 계속 졸린 경우 등이 있다. 수면에 대한 실험적 연구 중, 뇌간 봉선핵의 serotonin을 일차적인 수면을 증진시키는 신경전달물질로, catecholamines을 각성에 관여하는 물질로 밝혀진 이래, Caffeine의 각성효과는 Adenosine과 관련이 있고, benzodiazepines와 barbiturate의 수면효과는 GABA수용체 복합체와 관련한다는 등의 보고로, 수면을 증진시키는 펩티드 계통의 물질이 밝혀져 왔다²⁾.

경련성 질환은 중추신경계의 이상으로 초래되며 복합증상을 수반하는 질환으로서 뇌의 특정 부위에서 비롯되는 갑작스럽고도 과도한 신경방전(neural discharge)에 의해 야기되어 의식상실, 불수의적 경련, 지각이상, 자율신경증상 및 정신이상 증상이 나타난다. 최근의 연구보고에 의하면 간질과 같은 경련성 질환의 병태생리현상들은 활성산소종의 생성과 분해기구의 조절능이 상실되어질 때, 잔존하는 과량의 활성산소종이 뇌조직중의 불포화지방산을 산화시켜 세포막의 손상을 유도하는 산화적스트레스(oxidative stress) 유도과정과 밀접한 관계를 가지고 있음이 밝혀지고 있고¹²⁻¹⁹⁾, 또 다른 원인으로서 뇌중 억제성 신경전달물질인 GABA를 분해하는 효소의 활성이 직접적인 영향을 미치고 있는 것으로 알려져 중추의 억제성 및 흥분성 신경전달물질간의 기능적 균형상실로 인해 간질과 같은 경련증상이 발생한다는 학설이 제시되고 있다²⁰⁻²²⁾.

GABA-T는 억제성 신경전달 아미노산인 GABA를 흥분성 신경전달 아미노산인 glutamate로 분해하는 효소이다. 이들 아미노산의 기능적 균형은 신경섬유내에서의 생합성, 신경섬유 외부로의 유리, 망상세포 등으로의 재흡수(reuptake), 수용체 상에서의 결합 및 대사 등의 변동으로 이

루어지고 있다고 알려져 있으며 따라서 GABA-T 저해제 개발이 오늘날 간질 등을 비롯한 경련치료제 개발의 주류를 차지하고 있다²³⁻²⁵⁾.

세포막을 구성하는 성분인 인지질의 불포화지방산은 자유라디칼(free radical)을 비롯한 각종 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)에 의해 지질과산화반응 (lipid peroxidation)을 일으키며, 이 때 생성된 과산화지질(lipid peroxides)은 뇌 신경세포를 비롯한 세포막 손상의 주요 원인이 되어 각종 조직에 손상을 가져오는 것으로 파악되고 있다^{12,26)}.

서양의학에서 지금까지 개발된 대부분의 진정제는 약리작용상 주로 GABA성 중추신경계에 작용하는 것이 대부분이다. 오늘날 barbiturate, benzodiazepine은 GABA로 인한 억제 현상을 증가시킨다²⁾. 이들 항경련제들은 모두 위장, 간장, 심장 및 혈액장애를 일으키는 심각한 부작용이 있으며 장기 사용시의 안전성 등이 문제시되고 있다³¹⁾.

《晴崗醫鑑》에 기재된 加減歸脾湯은 補益心脾, 養血安神작용으로 心悸怔忡, 健忘失眠을 治하는 龍眼肉과, 補肝, 寧神, 斂汗, 生津작용으로 虛煩不眠, 驚悸多夢을 治하는 酸棗仁이 君藥으로 되어 있으며²⁸⁾, 그 외에도 白茯神, 遠志, 當歸, 大棗 등으로 구성되어 있어 心神過勞나 脫營失志로 생긴 不眠, 怔忡, 氣困, 虛煩不食, 不眠, 神經衰弱症, 焦燥 등의 경우에 다용되어 왔다⁴⁾. 따라서 저자는 본 加減歸脾湯이 진정 효과가 우수할 것으로 사료되어 실험에 임하였다.

蒼朮, 當歸, 牛黃, 川芎, 人蔘, 桑白皮 등은 소량으로도 대뇌억제 및 진정작용이 있는 것으로 밝혀져 있으며, 薄荷, 半夏, 黃連 등은 중추신경계 억제와 구토억제 작용이 있는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 또한 박 등⁵⁾이 鈞鉤藤, 龍眼肉의 GABA-T 억제활성효과, 石菖蒲의 MAO억제활성효과, 香附子, 鈞鉤藤의 Aldehyde oxidased 억제활성효과, 石菖蒲, 龍眼肉의 지질과산화반응 억제효과가 있음을 보고하였으며, 구^{30,31)}, 신³²⁾는 용뇌향, 복합향과 신이향에 대해 PTZ의 유도에 의한 丁香과 辛夷 향기가 뇌중 GABA의 증가 및 glutamic acid의 함량의 억제로 항경련 효과가 있음을 보

고하였고, 권⁶⁾은 四物安神湯이 glutamic acid 농도의 감소, GABA의 농도 증가, PTZ로 유발된 경련에 항경련 효과, 경련 유발시의 뇌중 활성효소의 생성 및 분해에 유의한 효과가 있다고 하였다.

본 연구에서는 신경안정 효능이 있는 加減歸脾湯 추출물을 이용하여 진정 및 항경련 효과를 검증하는 일련의 실험방법으로서 수면시간 연장효과, 경련동물모델에서의 항경련 효과 그리고 *in vitro*와 *in vivo*에서 신경전달물질을 분해시킬 수 있는 효소 억제 활성 및 항산화 효과 등을 측정하였다.

加減歸脾湯의 진정효과를 조사한 결과, 유의할 만한 수면연장효과를 보여, 이³³⁾의 보고와는 유사하지만, 권⁶⁾의 四物安神湯의 효과와는 대조적인 결과를 보였다. 이 실험결과로 보아 수면연장효과에 있어서 加減歸脾湯이 효과적임을 확인 할 수 있었다.

경련동물모델에서 PTZ에 의해 유발된 경련 억제 효과를 조사한 결과, 경련발현시간, 지속시간, 사망률에 있어서 모두 유의할 만한 효과를 나타내었다. 이는 권⁶⁾, 구³¹⁾, 신³²⁾ 등의 보고와도 유사하며, 특히 김⁷⁾도 鎮痙溫膽湯이 PTZ 이외에도 전기자극, Caffeine, Picrotoxin에 의해 유발된 경련에 대해서 최초발현시간에 유의성을 보이고, strychnine에 의한 경련에 대해서 사망에 이르는 시간을 유의성 있게 증가시켰다고 보고하였다. 여기서 Caffeine은 대뇌피질의 지각 및 통합증추에 작용하여 痲疾性 痙攣을, Picrotoxin은 뇌간 연수의 경련증추에 작용하여 間代性 痙攣을, strychnine은 척수의 반사기능을 항진시켜 強直性 痙攣을³⁴⁾, PTZ는 이와 달리 중추신경계 흥분제로 GABA의 작용을 저해하는 것으로 보고되어 있다^{35,36)}. 따라서 앞으로 각각의 경련의 양상에 따른 경련억제제에 대한 연구가 더 필요하리라 사료된다.

*In vitro*에서의 加減歸脾湯의 GABA-T 억제활성은 용량의존적 경향 (dose-response pattern)을 보였고, *in vivo*에서도 활성을 나타내는지를 확인한 결과 효소활성이 감소하는 경향을 나타내었는데, 이는 박⁵⁾, 권⁶⁾, 구^{30,31)}, 신³²⁾의 보고와 유사하

다.

다음으로 加減歸脾湯의 항산화활성을 검토하기 위해 *in vitro*에서의 지질과산화 억제효과를 측정 한 결과, 加減歸脾湯 추출물은 용량-반응 상관관계를 보여주었고, *in vivo*에서는 용량의존적 경향에 대한 유의성을 나타내지 않아, 권⁶⁾의 四物安神湯과 윤³⁷⁾의 左歸飲이 용량의존적으로 지질과산화억제를 보인 것과는 달리 나타났다. 이에 대해서 더 자세한 기전과 연구가 필요할 것으로 사료된다.

항산화활성을 검증하는 또 다른 지표로서 加減歸脾湯 추출물의 라디칼 소거효과를 DPPH 라디칼을 대상으로 측정한 결과, 용량-반응 관계를 보여주었고, 이는 박⁵⁾의 구조등이 라디칼 소거에 유의성을 보인 보고와 유사하다.

이상의 실험결과, 加減歸脾湯은 수면시간을 연장하고 경련을 효과적으로 감소시키며 GABA분해를 저해함으로써 신경흥분을 억제하는 작용이 있음과 동시에 뇌세포를 보호하는 항산화효과가 있어 불면이나 경련성 질환 등에 진정 작용에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 생각되나 그 기전 등에 관하여 앞으로의 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

加減歸脾湯의 진정 효과를 알아보기 위하여 pentobarbital 유도 수면시간 변화, 경련억제효과를 조사하였고, 억제성 신경전달물질인 GABA-T 활성에 미치는 영향, 과산화지질 억제활성과 DPPH 라디칼 소거활성을 *in vitro*와 *in vivo*에서 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加減歸脾湯 추출물의 진정작용에서는 수면시간 연장효과가 관찰되었는데 2000mg/kg 투여시는 대조군보다 수면시간이 2.2배 증가하였다.

2. 加減歸脾湯 추출물은 1000mg/kg 투여시 최초경련발현시간을 대조군에 비해 3.5배 지연시켰

고, 경련지속시간을 23.9% 감소시켰으며 또한 사망률도 저하시켰다.

3. 加減歸脾湯 추출물의 GABA-T 억제효과는, *in vitro*에서 용량의존적으로 증가시켰고, *in vivo*에서는 추출물 1000mg/kg 투여시 효소활성을 정상군 수준으로 억제하였다.

4. 加減歸脾湯 추출물의 지질과산화 억제효과는, *in vitro*에서는 추출물 10mg/ml에 45.8%의 억제효과를 보였으며 *in vivo*에서는 추출물 500mg/kg 투여시 대조군에 비해 과산화지질의 생성량을 47.5% 감소시켰다.

5. 加減歸脾湯 추출물의 라디칼 소거효과는 용량의존적으로 증가하였으며 10mg/ml의 용량에서 92%의 소거효과를 나타내었다.

參 考 文 獻

1. 대한신경정신의학회. 신경정신과학. 서울;하나의학사. 1998:251-252,514.
2. 해리슨내과학편찬위원회. HARRISON'S내과학. 서울;정담. 1997:176-86.2401-2.
3. 홍사석. 이우주의 약리학강의. 서울;의학문화사. 1993:221,259.
4. 金永勳. 晴崗醫鑑. 서울;정보사.1995:242,243.
5. 박용기, 강병수, 윤은경, 강소임, 박창훈, 이남재 등. 신경안정 생약 추출물이 신경전달 효소계 및 항산화계에 미치는 영향. 약학회지. 2000;44:22-8.
6. 권보형. 四物安神湯의 항경련 효과 및 작용기전에 관한 실험적연구. 東醫神 經精神科學會誌. 1999;10:1-28.
7. 金禹淵. 鎮痙溫膽湯의 항경련 작용에 관한 실험적 연구. 대한한방소아과학회지. 1995;9: 221-36.
8. 하동주. 계지복령환이 실험동물의 鎮痛, 抗 炎, 抗痙攣, 筋弛緩 및 正常體溫에 미 치는 영향. 대한한의학회지. 1995;16:39-50.
9. Bergmeyer, H.U. Method of enzymatic analysis, 3 eds. vol. 2, Academic Press, New York. 1983:191-2.
10. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 1979;95:351.
11. Blosi, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181:1199.
12. Marttila, R.J., Lorenz, H. and Rinne, U.K. Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. J. Neurol. Sci. 1988; 86:321.
13. Johannsen, P., Velandar, G. and Mai, J. Glutathione peroxidase in early and advanced Parkinson's disease. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. 1991;54:679.

14. 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.
15. Zelman, F.A., Thienhaus, O.J. and Bosmann, H.B. Superoxide Dismutase activity in Alzheimer's disease. possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Res.* 1988;160:476.
16. Gutterige, J.M.C., Quinlan, G.J., Clark, I., and Halliwell, B. Aluminum salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochem. Biophys. Acta.* 1985 ;441:835.
17. Lester, P, Midori, H. and Toshikazu, Y. Free radicals in brain physiology and disorders. Academic Press. 1996:51-64.
18. Coyle, J.T. and Puttfarcken, P.S. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science.* 1993;262:689-94.
19. Halliwell, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 1992;59:1609-23.
20. Croucher, M.J. Collins, J.F. and Meldrum, B.S. Anticonvulsant action of antagonists of neuronal excitation due to dicarboxylic amino acids. *Science.* 1982;216:899.
21. Crawford, J.M. The effect upon mice if intraventricular injection of excitant and depressant amino acids. *Biochem. Pharmacol.* 1963;12:1443-50.
22. Baughman, R.W. and Gilbert, C.D. Aspartate and glutamate as possible neurotransmitters of cells in layer 6 of the visual cortex. *Nature* 1980;287:848-850.
23. 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.
24. Horton, R.W. GABA, epilepsy and anticonvulsant drugs. In Trimble, M. and Reynolds, E.H. (eds.) *What is epilepsy ?* Chulchill Livingston, Edinburgh. 1984:281-292.
25. Berl, S., Lajtha, A. and Waelach, H. amino acid and protein metabolism. VI. cerebral compartments of glutamic acid metabolism. *J. neurochem.* 1961;7:186.
26. Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978;201:875.
27. Schuckit, M.A. Current therapeutic options in the management of anxiety, *J. Clin. Psychiat.* 1981:15-24,42.
28. 전국한의과대학본초학교실. 본초학. 서울:영림사. 1999:493,585.
29. 우종인. 동의보감에 나타난 정신장애의 약물 요법. *신경정신의학.* 1986;15:338-342.
30. 具炳壽, 崔殷圭. PTZ에 의해 痙攣유발된 mouse에서 龍腦香의 抗痙攣 효과에 대한 실험적 연구. *동국논집.* 1999;18:257-278.
31. 具炳壽. 복합향(丁香, 辛夷)이 抗痙攣效果 기전에 關한 실험실적 연구. *東醫神 經精神科 學會誌.* 1999;10:121-31.
32. 辛容玟, 具炳壽. 辛夷香이 mouse의 誘導痙攣에 미치는 영향. *東醫神經精神科學 會誌.* 1999;10:85-104.
33. 李熙晟. 散風丹이 생쥐의 상경련 진정 및 진통작용에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지.* 1997;11:205-25.
34. 한대섭 등. *藥理學.* 서울;구문사. 1987:37,40-44.
35. Metcalf, B.W. Inhibitors of GABA metabolism, *Biochem. pharmacol.* 1979; 28:1705
36. Holdness, M.R. Chromatographic analysis of glutamic acid decarboxylase in biological samples. *J. Chromatography.* 1984;1:277.
37. 윤철호, 신억섭. 흰쥐의 신에서 과산화지질 생성 및 Oxygen Free radical 생성계 산소활성에 미치는 좌귀음과 우귀음의 영향. *대한한방내과학회지.* 1996;17:265-77.