

Planarian 모델을 이용한 억간산의 항발작 효과

박웅, 유두만, 소준노*

Effects of Ukgansan (Yokukansan in Japanese, Yigansan in chinese) on the Locomotor Velocity and Glutamate-Induce Paroxysm in Planarian

Woong Park, Du Man Yoo, and June No So*

접수: 2014년 2월 7일 / 게재승인: 2013년 2월 24일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Planaria were recently reported to be a simple and sensitive model to investigate the mechanistic aspect of seizure and to screen potential anticonvulsants. Using planarian model, we analyzed the pharmacological effect of ukgansan (UGS), an oriental herbal medicine containing seven medicinal herbs, on the planarian locomotor velocity (pLMV) and glutamate-induced seizure-like activity (pSLA). To test whether *D. japonica* is suitable for studying anti-seizure agents, we investigated the effect of glutamate on pLMV and pSLA in *D. japonica*. In the present study we first confirmed that pSLA in *D. japonica* was induced by L-glutamate. Glutamate significantly produced pSLA in a dose dependent manner, but did not affect pLMV. These glutamate-induced paroxysms were decreased by antiepileptic drug, topiramate. A similar inhibitory effect on glutamate-induced pSLA was observed after the treatment of UGS. The present results suggest that UGS and its active constituents possess useful substance inhibiting seizure in planarian and that *D. japonica* provides a convenient model to search active herbs containing anti-seizure activity.

Keywords: Planaria, pLMV, Glutamate-induced pSLA, Ukgansan

1. 서론

통제되지 않는 과도한 신경활동에 의한 비정상적인 반복성 근수축과 이완을 특징으로 하는 발작 (seizure)은 전체 인구의 1%가 겪는 주요 신경질환의 하나로 알려져 있다 [1]. 발작은 원인이 분명하지 않은 경우가 매우 많으며 그 양상도 매우 다양하지만, 치료약물은 제한적이고 부작용이 동반되는 경우가 많아 새로운 치료제를 개발하기 위한 시도가 계속되고 있다 [2]. 다른 경우와 마찬가지로, 발작 치료제 개발에도 target-focused strategy와 더불어 다양한 형태의 실험동물 모델로 하는 phenotypic screening이 주로 사용되고 있는데 [3], 많은 후보 물질들의 항발작 효능 여부를 짧은 기간 내에 검색하기 위해서는 보다 용이하고 단순한 동물모델이 필요하다.

Planaria (*Dugesia spp.*)는 편형동물문에 속하며 재생능력이 매우 뛰어나 생물체의 재생과 줄기세포의 상호관계 및 재생과정의 신호전달 기작을 밝히는데 선호되고 있는 실험동물이다 [4]. 최근에는 플라나리아가 지닌 좌우대칭형의 신경계의 구성 요소, 즉 신경전달물질과 신호전달시스템도 인간을 비롯한 포유동물과 유사한 것으로 보고되고 있으며, 이를 바탕으로 각종 약물과 천연산물의 관련된 약리효과를 평가하고 연구하는 데에도 널리 활용되고 있다 [5]. 플라나리아의 운동능력 (locomotor activity)이 체내 또는 체외의 여러 가지 신경전달물질에 의해 조절되며, 특히 흥분성 신경전달물질인 glutamate의 처리는 planaria의 발작행동 (planarian seizure-like activity, pSLA)을 일으킨다고 알려져 있다 [6,7]. 이와 같은 glutamate-유도 발작행동은 항발작 약물 작용점의 하나인 NMDA수용체와 AMPA수용체를 경유하여 나타난 것으로 파악되어 발작 치료 약물의 작용메커니즘을 조사하는데, 그

우석대학교 제약공학과
Department of Pharmaceutical Engineering, Woosuk University,
Wanju 565-701, Korea
Tel: +82-63-290-1432, Fax: +82-63-290-1436
e-mail: sojn@woosuk.ac.kr

리고 발작억제 후보약물의 효능 여부를 평가하는데 응용될 수 있다.

억간산은 조구등, 백출, 백복령, 당귀, 천궁, 시호, 감초 등 7가지 한약재로 구성된 한약처방으로 전통적으로 청열진경의 효능이 있다고 알려져 신경증, 불면증, 불안 등의 치료에 이용되어 왔다 [8-10]. 최근에는 그 작용 메커니즘은 분명하지 않으나, 억간산이 배양세포에 대한 glutamate의 세포독성을 차단하며 [11], 여러 가지 난치성 신경질환을 치료하는데 적용될 수 있다는 보고가 있다. 특히, glutamate-매개 세포독성은 퇴행성신경질환은 물론 간질 발작의 유발에도 관여된 것으로 알려져 있다 [12].

본 연구에서는 실험 모델로서 *D. japonica*의 운동능력 (planarian locomotor velocity, pLMV)의 정도와 glutamate-유도 발작행동이 어느 정도 유발되는지를 조사하여, 발작억제물질의 검색할 수 있는 조건을 마련하고, 그 조건 하에서 한방 약제의 하나인 억간산과 그 조성물들이 얼마나 발작억제 효과를 보이는지를 평가하여 발작억제물질 개발의 기초로 활용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험동물과 시약

우석대학교 제약공학과 생물의약실험실에서 번식시키며 유지, 관리하고 있는 planaria (*Dugesia japonica*)를 실험에 사용하였다. Planaria는 1주일에 2회, 반죽 형태의 소의 간을 먹이로 주며 21°C 내외의 멸균 생수에서 사육하였으며, 실험에 사용되는 경우, 실험 1주일 전부터는 먹이 공급을 중지하였다. 실험에 사용된 시약은 Sigma에서 구입하였으며, 억간산 및 그 조성 약제는 우석대학교 한의과 대학에서 제공받아 실험에 사용하였다.

2.2. 억간산 및 조성 약제의 추출

억간산 (1첩 분량)과 억간산의 조성 약제 (약제 당 10 g)인 조구등 (*Uncaria rhynchophylla*), 시호 (*Bupleuri radix*), 천궁 (*Cnidii rhizoma*), 백복령 (*Poria cocos*), 백출 (*Atractylodes macrocephalae rhizoma*), 감초 (*Glycyrrhizae radix*), 당귀 (*Angelicae gigantis radix*)는 각각 증류수 300 mL에 넣어 3시간 동안 끓여서 추출하였으며, 추출액은 여과한 후 동결 건조하여 분말로 만들어 사용하였다.

2.3. Planarian 운동능력 (planarian locomotor velocity, pLMV) 조사

Planaria의 운동능력 (pLMV)은 실험동물의 자연 상태의 수영 능력을 응용한 Raffa 등의 방법 [13]을 이용하여 측정하였다. 대조 용액 또는 약물 용액이 함유된 vial에서 1시간 동안 planaria를 처리한 다음, 생수로 채워진 p-dish에 옮겼다. 그런 다음, 0.5 cm 간격의 격자판 위에 이 p-dish를 올려놓고, 5분간 관찰하면서 planaria가 통과하는 격자 선의 수를 세어 운동

능력의 정도 (crossed gridlines/5 min)로 평가하였다.

2.4. Planarian 발작유사행동 (planarian seizure-like activity, pSLA) 측정

발작 또는 경련에 대한 억간산의 효과를 planaria 모델에 적용하여 측정하기 위해 Rawls 등의 방법 [6]을 이용하였다. Planaria의 발작유사행동을 일으키기 위해 glutamate가 함유된 p-dish에 planaria를 넣은 후, 5분간 관찰하면서 정상상태의 활주운동이 아닌 C자형 수축운동, 꼬임형 (screw-like) 운동, snake형 운동 등과 같은 돌발적인 이상행동 (Fig. 1)의 발생 횟수를 측정하였다. 약물 또는 추출물에 의한 pSLA 억제 효과를 보기 위해서, glutamate 처리 전 topiramate 또는 추출물이 각각 첨가된 vial과 대조군 vial에서 planaria를 15분간 전 처리한 후, glutamate와 추출물이 각각 또는 혼합된 p-dish에 옮겨 관찰하였다.

2.5. 통계처리

반복 시험된 측정치의 평균값과 표준오차는 Student's t-test로 통계 처리하여 비교하였다. *p*값이 0.05보다 작은 경우를 유의성이 있는 것으로 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Planaria의 운동능력 (pLMV)과 발작행동 (pSLA)에 대한 glutamate의 영향

플라나리아의 신경계와 그 구성은 인간을 비롯한 고도로 복

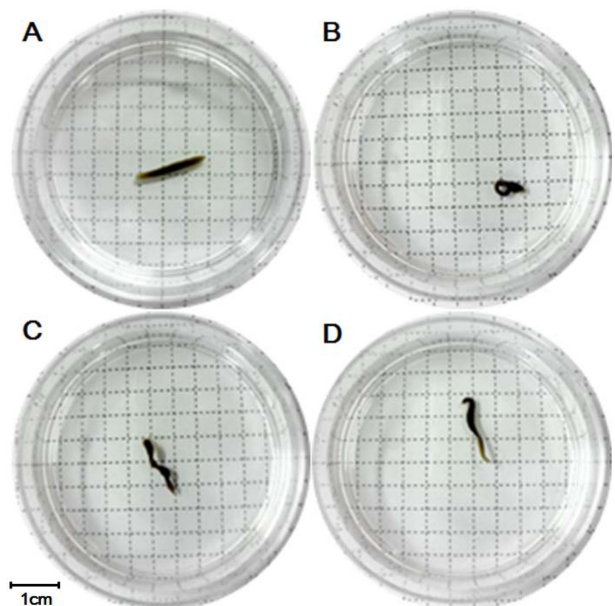


Fig. 1. Representative photographs of the spontaneous planarian locomotor activity and glutamate-induced paroxysms. Normal gliding movement in fresh water (A), Condensed C-like (B), screw-like (C) pSLA, and snake-like pSLA in 10 mM L-glutamate.

잡한 척추동물의 그것과 기본적인 틀이 같기 때문에, 신경계에 작용하는 각종 약물의 신경약리학적 연구의 모델로 사용되어 오고 있다 [14]. 약물에 의한 콜린성 뉴론의 자극이 플라나리아의 운동저하 (hypokinesia)를 일으키고, 콜린성 신경전달 차단 약물은 과잉운동 (hyperkinesia)을 유발하며 [15], 도파민성 신경전달에 의한 운동조절 작용은 콜린성 신경전달의 경우와 반대로 나타난다는 사실 [16]은 플라나리아의 운동능력 (pLMV)이 콜린성 신경전달과 도파민성 신경전달의 평형에 의존되어 있다는 점을 시사한다. NMDA 길항제에 의해 glutamate 수용체가 차단되는 경우, 정상적인 pLMV에는 변화가 없으나 cocaine, opioids 및 cannabinoid 작용제 등에 의한 pLMV의 감소를 완화시키는 점은 이들 약물에 대한 의존성이 glutamate 수용체의 하나인 NMDA 수용체에 의해 매개되고 있다는 점을 보여준다 [17]. 하지만, pLMV에 대한 glutamate의 직접적인 작용에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 따라서, Planaria의 정상적인 활주 운동인 pLMV에 대한 glutamate의 직접적인 작용을 알기 위해, 다양한 농도의 glutamate (0, 1, 2.5, 5, 10, 20 mM) 존재 하에서 5분간 pLMV를 측정 한 결과 (Fig. 2), 대조군의 5분간 누적 pLMV는 $91.9 \pm 9.8/5 \text{ min}$ 이었으며, glutamate처리군의 pLMV는 10 mM까지는 glutamate 농도에 무관하게 대조군의 그것과 차이가 없었으나, glutamate 20 mM 처리에 의해서는 약간 감소하였다. 이와 같은 결과는 glutamate 자체가 낮은 농도에서는 planaria의 정상적인 운동에는 영향을 주지 않지만, 고농도에서는 glutamate에 의해 유발되는 발작행동으로 인해 전방 이동능력이 방해받기 때문이라고 생각된다.

Glutamate가 잘 알려진 흥분성 신경전달물질이며, 인간을 포함한 동물의 발작 또는 경련이 glutamate에 의해 활성화되는 시냅스의 이온통로형 glutamate 수용체 (iGluR)와 밀접하게 연관되어 있다는 사실 [2]과 부합되는 이런 현상은 glutamate-유도되는 planaria의 발작 반응을 관련된 질병의 기초적인 메커니즘을 보다 자세하게 파악할 수 있는 수단이 될 수 있다는 점과 더불어 항발작제의 자원이 될 수 있는 새로운 발작 억제물질을 탐색하는 도구로 활용될 수 있다는 사실을 시사한다 [18]. 화학물질 유도 발작 조건을 확정하기 위하여 다양한 농도의 glutamate에 의해 유발되는 pSLA를 조사한 결과, 꼬임형-과잉운동, C형태-과잉운동, snake형-과잉운동 등, 1~2초간 지속되는 여러 형태의 발작유사 행동을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). Glutamate의 농도가 증가함에 따라 pSLA도 현저하게 증가되어 glutamate 10 mM은 $6.9 \pm 1.3/5 \text{ min}$ pSLA, 20 mM은 $12.4 \pm 2.2/5 \text{ min}$ pSLA를 유발하는 것으로 측정되었다 (Fig. 2). 이와 같은 결과는 glutamate-유도 pSLA 값이 높게 나온 Raffa 등의 결과 [7]와 비교될 수 있다. *D. dorocephala*를 대상으로 한 연구 결과 [6]와 *D. tigrina*를 이용한 경우 [19]는 낮은 농도의 glutamate에 의해서도 민감하게 발작이 유발되며, 동시에 glutamate 자극이 없는 정상상태에서도 일정 수준의 발작이 있음을 보여주고 있는 반면에, *D. japonica*를 사용한 본 실험결과는 대조군의 pSLA가 $0.1 \pm 0.01/5 \text{ min}$ 으로 정상 상태의 planaria 경우 발작이 거의 일어나지 않고 있음을 보

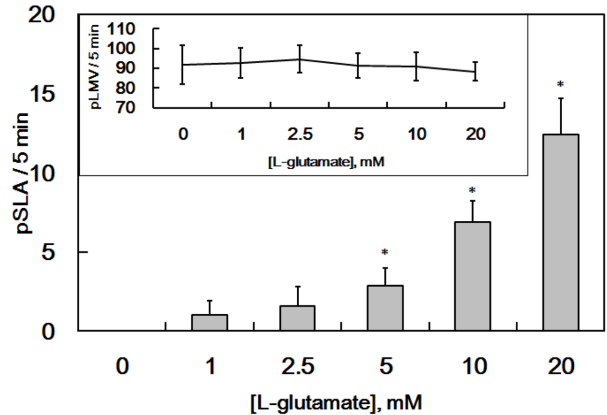


Fig. 2. L-Glutamate induced concentration-related pSLA, expressed as the cumulative mean (\pm S.E.M.) over a 5-min period. $*p < 0.01$ compared to control. $N=8-15$ planarians per group. Upper inset. Effects of L-glutamate on pLMV, expressed as the mean (\pm S.E.M.) cumulative number of gridlines crossed over a 5-min period. $*p < 0.01$ compared to control. $N=7-12$ planarians per group.

여 주고 있다. 이와 같은 대조군의 안정성은 *D. japonica*의 경우가 항발작 물질을 검색하기 위한 glutamate-유도 발작 모델로서 장점이라 생각할 수 있다.

3.2. Topiramate와 억간산에 의한 glutamate-유도 pSLA 억제 작용

항발작제로 사용되고 있는 topiramate가 이와 같은 *D. japonica*의 glutamate-유도 pSLA에 어떻게 작용하는지를 위해 조사한 결과, Fig. 3에서 볼 수 있는 것처럼, *Dugesia japonica*가 모델인 본 실험에서도 *D. dorocephala* 모델을 사용한 선행 연구 [7]에서와 같이, 항발작약물인 topiramate는 glutamate (10 mM)-유도 pSLA를 농도의존적으로 억제하였다. 억간산은 Alzheimer병 모델로 알려진 APP-Tg(+) mouse의 학습능력을 개선하고 운동능력을 증가시키며 [10], glutamate의 흥분성 신호전달에 의한 세포독성 차단작용이 있는 것으로 알려져 있다 [11,20]. 또한 억간산은 포유동물을 이용한 다른 형태의 발작 모델에서 발작억제 작용이 있는 것으로 보고된 바 있다 [21]. 억간산이 플라나리아 모델의 glutamate-유도 발작에도 작용하는지를 알기 위한 본 실험에서, 한방약제인 억간산 (UGS)은 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 대조군의 pSLA ($8.6 \pm 1.8/5 \text{ min}$)에 비하여 약 30~90% 정도의 억제 효과를 보였다 (Fig. 3). 이는 앞서 언급한 기존의 항발작제인 topiramate의 억제 효과와 비교될 수 있는 결과이지만, 억간산의 발작억제 작용이 glutamate의 신경전달 경로와 직접 관련된 것인지를 규명하기 위해서는 다른 발작유도물질을 이용한 후속 연구가 진행되어야 할 것이다.

3.3 Glutamate-유도 pSLA에 대한 억간산 조성 개별 약제의 영향

억간산의 pSLA 억제작용을 좀 더 파악하기 위하여, 억간산

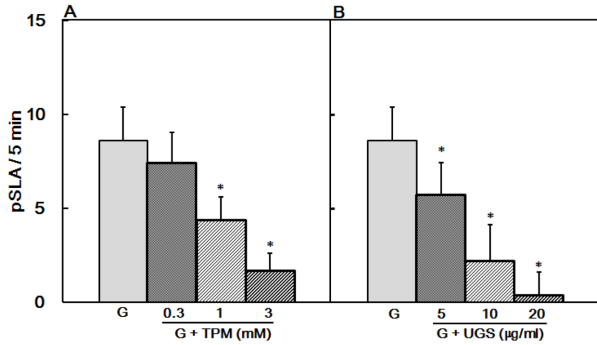


Fig. 3. Effects of co-treatment of topiramate (A) and Ukgansan (B) on the pSLA. Topiramate (TPM, 0.3-3 mM) and ukgansan (UGS, 2-20 µg/mL) inhibited the pSLA induced by a fixed concentration of L-glutamate (10 mM). **p*<0.01 compared to control. N=8-15 planarians per group.

에 포함된 7가지 개별 약제 (조구등, 백복령, 시호, 감초, 천궁, 백출, 당귀)에 의해 pSLA가 변하는지를 조사하였다. 먼저 20 mM의 glutamate로 유발된 pSLA가 개별 약제 추출물 (1 µg/mL)에 의해 억제되는지 그 여부를 평가하였다. Glutamate에 의한 PC12 세포의 사멸이 억간산을 조성하는 약제들 중 조구등과 감초에 의해 차단된다는 보고 [21]와는 달리, pSLA를 억제하는 효과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 조구등, 백복령, 당귀, 백출, 감초의 추출물은 각기 유의한 억제효과를 가지고 있는 반면, 천궁과 시호의 추출물은 pSLA를 억제하지 못했다.

이러한 조구등, 백복령, 당귀, 백출, 감초 등의 glutamate-유도 pSLA 억제효과가 농도의존적인 것인지, pLMV에 대한 영

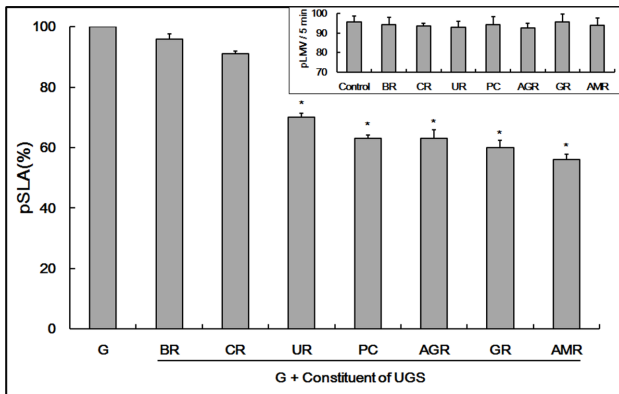


Fig. 4. Effects of seven constituent herbs of Ukgansan on glutamate-induced seizure-like activity in planarian (pSLA). Planaria were treated in water containing 20 mM L-glutamate and a extract (1 µg/mL) of each constituent of ukgansan: Bupleuri radix (BR), Cnidii rhizoma (CR), Uncaria rhynchophylla (UR), PC (Poria cocos), Angelicae gigantis radix (AGR), Glycyrrhizae radix (GR), Atractylodes macrocephalae rhizoma (AMR). pSLA measured over a 5-min period. **p*<0.01 compared to control. N=8-15 planaria per group. Inset) Effects of L-glutamate on pLMV, expressed as the mean (±S.E.M.) cumulative number of gridlines crossed over a 5-min period.

향이 있는지를 조사하기 위해, 여러 농도 (0~20 µg/mL)의 개별 약제 추출물이 첨가된 조건 하에서 pLMV와 glutamate-유도 pSLA를 측정하였다. 이들 개별 약제 추출물은 농도에 관계없이 대조군의 pLMV와 거의 차이를 보이지 않아 planaria의 정상적인 운동에는 영향을 주지 않는다는 점을 알 수 있었다(Fig. 4, inset). 백복령은 다른 약제들과는 달리 glutamate-유도 pSLA 억제효과가 농도의존적이지 않았으며, 약 35~50% 정도의 억제효과를 보였다 (Fig. 5). 조구등은 추출물의 농도 증가에 따라 glutamate-유도 pSLA를 최대 60%까지 억제하였다 (Fig. 5). 당귀 추출물 1 µg/mL은 pSLA를 약 30% 억제하였고 억제효과는 추출물의 농도에 의존적이었으며, 최대 억제효과는 조구등의 그것과 비슷하였다 (Fig. 5). 백출의 경우, Fig. 5에서 보는 바와 같이 농도의존적인 억제효과는 조구등, 당귀 등과 유사한 패턴이나, 그 정도는 가장 크게 나타났으며 (대조군 pSLA; 10.1±1.8/5 min, 1 µg/mL pSLA; 5.76±1.9/5 min), 감초의 경우도 최대 억제 효과는 약 60% 정도였다.

4. 결론

본 실험은 플라나리아 (*D. japonica*)를 실험모델로 하여 운동 능력 (pLMV)과 glutamate-유도 발작 (pSLA)에 대한 한방약제 억간산의 영향을 조사한 것이다. Glutamate는 *D. japonica*의 pLMV에는 영향을 주지 않았으나, pSLA를 농도 의존적으로 증가시켰다. 이와 같은 glutamate-유도 pSLA는 항발작제인 topiramate에 의해 억제되었다.

한약제인 억간산은 topiramate와 같은 정도로 glutamate-유도 발작을 억제하였다. 억간산을 구성하는 7가지 약제 중 시호와 천궁을 제외한 조구등, 백복령, 당귀, 백출, 감초는 pSLA를 각각 30~60% 정도 억제하였다.

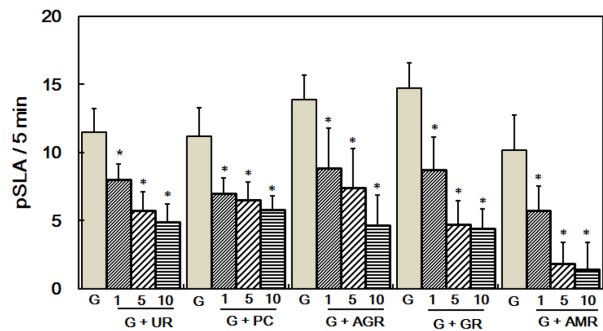


Fig. 5. Five constituent herbs of ukgansan (UGS) reduced pSLA by the fixed concentration of L-glutamate (20 mM) in a dose related manner. Value of pSLA expressed as the cumulative mean (±S.E.M.) over a 5-min observation period. The control (G) represents pSLA induced by L-glutamate without the extract of herbs. Experimental groups were tested in the fresh water containing 20 mM L-glutamate (G) + various concentrations of each constituent (1, 5, 10): Uncaria rhynchophylla (UR), Poria cocos (PC), Angelicae gigantis radix (AGR), Glycyrrhizae radix (GR), Atractylodes macrocephalae rhizoma (AMR). **p*<0.01 compared to control. N=8-15 planaria per group.

실험 모델로서의 *D. japonica*의 운동능력 (pLMV)과 발작 (pSLA)이 어느 정도 유발되는지, 억간산에 의해서 pSLA가 억제되는지를 평가한 결과, 본 실험에서 사용된 방법은 항발작 활성을 지닌 약용식물을 찾기 위한 단순하며 유용한 탐색법이 될 수 있다는 점과 억간산과 그 구성 약제들에 항발작 물질이 함유되어 있다는 사실도 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- Loscher, W., H. Klitgaard, R. E. Twyman, and D. Schmidt (2013) New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nature Rev. Drug Discov.* 12: 757-776.
- Lason, W., M. Chlebicka, and K. Rejdak (2013) Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol. Rep.* 65: 787-801.
- Baraban, S. C. (2007) Emerging epilepsy models: Insight from mice, flies, worms and fish. *Curr. Opin. Neurol.* 20: 164-168.
- Rink, J. C. (2013) Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev. Genes Evol.* 223: 67-84.
- Buttarelli, F. R., C. Pellicano, and F. E. Pontieri (2008) Neuropharmacology and behavior in planarians: Translation to mammals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 147: 399-408.
- Rawls, S. M., T. Thomas, M. Adeola, T. Patil, N. Raymondi, A. Poles, M. Loo, and R. B. Raffa (2009) Topiramate antagonizes NMDA- and AMPA-induced seizure-like activity in planarians. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93: 363-367.
- Raffa, R. B., K. E. Finno, C. S. Tallarida, and S. M. Rawls (2010) Topiramate-antagonism of L-glutamate-induced paroxysms in planarians. *Eur. J. Pharmacol.* 643: 150-153.
- Hyun, W. H. and S. R. Lee (1994) Studies on the effect of anti-convulsion and analgesic by uk-gansan and uk-gansangami. *J. Oriental Neuropsychiatry* 5: 69-79.
- Kamei, J., S. Miyata, and M. Ohsawa (2009) Involvement of benzodiazepine system in the anxiolytic-effect of Yokukansan (Yi-gansan). *Progress in Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33: 1431-1437.
- Tabuchi, M., T. Yamaguchi, S. Iizuka, S. Imamura, Y. Ikarashi, and Y. Kase (2009) Ameliorative effects of Yukukansan, a traditional Japanese medicine, on learning and non-cognitive disturbances in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Ethnopharmacol.* 122: 157-162.
- Kawakami, Z., H. Kanno, T. Ueki, K. Terawaki, M. Tabuchi, Y. Ikarashi, and Y. Kase (2009) Neuroprotective effects of Yokukansan, a traditional Japanese medicine, on glutamate-mediated excitotoxicity in cultured cells. *Neuroscience* 159: 1397-1407.
- Vincent, P. and C. Muller (2009) Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158: 309-323.
- Raffa, R. B., L. J. Holland, and R. J. Schulingkamp (2001) Quantitative assessment of dopamine D2 antagonist activity using invertebrate (Planaria) locomotion as a functional endpoint. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 45: 223-226.
- Buttarelli, F. R., C. Pellicano, and F. E. Pontieri (2008) Neuropharmacology and behavior in planarians: Translations to mammals. *Comparative Biochem. Physiol. Part C* 147: 399-408.
- Buttarelli, F. R., F. E. Pontieri, V. Margotta, and G. Palladini (2000) Acetylcholine/dopamine interactions in planaria. *Comparative Biochem. Physiol. Part C* 125: 225-231.
- Passarelli, F., A. Merante, F. E. Pontieri, V. Margotta, G. Venturini, and G. Palladini (1999) Opioid-dopamine interaction in planaria: a behavioral study. *Comparative Biochem. Physiol. Part C* 124: 51-55.
- Rawls, S. M., T. Gomez, and R. B. Raffa (2007) An NMDA antagonist (LY 235959) attenuates abstinence-induced withdrawal of planarians following acute exposure to a cannabinoid agonist (WIN 55212-2). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86: 499-504.
- Rowley, N. M., K. K. Madsen, A. Schousboe, and H. S. White (2012) Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem. Int.* 61: 546-558.
- Ramakrishnan, L. and C. DeSaer (2011) Cabamazepine inhibits distinct chemoconvulsant-induced seizure-like activity in *Dugesia tigrina*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99: 665-670.
- Kawakami, Z., H. Kanno, Y. Ikarashi, and Y. Kase (2011) Yokukansan, a kampo medicine, protects against glutamate cytotoxicity due to oxidative stress in PC12 cells. *J. Ethnopharmacol.* 134: 74-81.
- Kim, K. S., G. K. Sung, and B. S. Moon (1998) An experimental study on the anti-epileptic effects of uk-gansan. *Kor. Intern. Med. Soc.* 19: 57-72.