

Flutamide의 항경련 작용에 대한 *in vitro* 연구

김원주 · 이수연 · 이병인
연세대학교 의과대학 신경과학교실

Anticonvulsant Effect of Flutamide *in vitro* Seizure Model

Won-Joo Kim, M.D., Soo-Yeon Lee, M.D. and Byung-In Lee, M.D.

Department of Neurology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Purpose: Flutamide (4-nitro-3-t-trifluoromethyl-isobutyranilide) is an androgen-receptor antagonist with typical antiandrogenic effect, used to treat androgen-dependent disorders such as prostate cancer. However, some reports noted that flutamide has direct effects to neuronal cells. It has been shown to retard the development of electrical kindling in rats.

Methods: We used the chemoconvulsant 4-aminopyridine (4-AP) and picrotoxin (PTX) in the *in vitro* hippocampal slice model to determine of flutamide for the suppression of epileptiform discharges. Extracellular field potential recordings were obtained from the CA3 pyramidal layer of hippocampus.

Results: The concentration of 30 and 100 μ M flutamide suppre-

ssed the whole mean number of epileptiform discharges to 57.8% and 66.8% each compared with the 4-AP only slices. In 100 μ M PTX, 10 and 30 μ M flutamide suppressed the whole mean number of epileptiform discharges to 56.6% and 82.5% each. Intermixed with flumazenil, the anticonvulsant effect of flutamide was decreased.

Conclusions: Flutamide suppressed epileptiform discharges induced by 4-AP and PTX in *in vitro* seizure model. It suggests that flutamide influence to anti-epileptic activity by benzodiazepine site of the GABA_A receptor. (J Korean Epilep Soc 2008;12 (2) :92-95)

KEY WORDS: Flutamide · Seizure · Benzodiazepine.

Flutamide는 남성호르몬인 테스토스테론의 세포내 수용체에서 길항 작용을 나타내는 화합물로 전립선암의 치료 약물로 개발되었다.¹⁻³ 이 flutamide는 테스토스테론과 남성호르몬 성격이 더 강한 dihydrotestosterone (DHT) 이 전립선 세포의 남성호르몬 수용체에 결합하는 효과를 억제하는 작용을 가지고 있으나, 이 물질의 화학구조를 보면 벤조다이아제핀과 유사한 구조를 가지고 있어⁴ 전립선에서 작용하는 남성호르몬과의 길항적인 역할 이외의 다른 효과도 가지고 있으리라는 추정을 할 수 있다. 여러 연구에서 flutamide가 척수에 작용하여 진통 효과를 나타낸다는 결과와 중추신경계에 직접적인 영향을 준다는 보고도 있다.^{5,6} 이러한 결과들을 통하여 flutamide가 항경

련 효과도 나타낼 수 있기에 이를 확인하고자 해마절편을 이용한 간질의 *in vitro* 모델을 사용하여 실험을 시행하였다.

대상과 방법

해마절편 표본제작

대상은 100~200 g의 성인 웅성 Sprague-Dawley 백서를 사용하였으며, 동물 관리실에서 12시간 낮과 12시간 밤의 주기를 주며 사육하였다. 백서는 연세대학교 동물윤리 위원회의 권장 사항을 준수하여 모든 실험 과정을 진행하였다. 백서를 이산화탄소를 짧게 투여하여 마취를 시키고 단두하였다. 뇌조직을 sucrose 인공뇌척수액으로 옮긴 후, 반구를 분리하고 나서 한쪽 반구를 vibratome slicer를(Vibratome 1,000, St. Louis, USA) 이용하여 500 μ m의 두께로 절편을 만들었다. 절편들은 36°C로 온도를 맞춘 인공뇌척수액 배양기에 옮겨서 약 1시간 동안 배양하였다. 이때에 사용한 인공뇌척수액은 130 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.25 mM Na₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, 1mM MgCl₂, and 2 mM CaCl의 성분을

Received 6 January 2009

Accepted 10 March 2009

Corresponding author: Won-Joo Kim, M.D., Department of Neurology, Yongdong Severance Hospital, College of Medicine, Yonsei University, 146-92 Dogok-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-720, Korea

E-mail: kzoo@yuhs.ac

This study was supported by a faculty research grant of Yonsei University College of Medicine for 2004 (6-2004-1115).

가지고 있으며 95% O₂와 5% CO₂ 혼합공기를 지속적으로 주입하였다.

절편에서 활동전위 측정

모든 해마절편은 배양시킨 후에 recording chamber (Harvard, Holliston, USA)로 옮겨 전기생리학적 기록을 시행하였다. 기록을 하는 동안 인공뇌척수액을 95% O₂와 5% CO₂ 혼합공기와 같이 지속적으로 2 mL/분의 속도로 절편에 투여하며 유지하였다. 간질모양파를 일으키는 약물들은 관류회로를 통하여 인공뇌척수액에 혼합하여 해마절편에 투여하였다. 세포외 활동전위는 저항이 2~10 Ω이 유지가 되도록 만든 인공뇌척수액을 주입한 유리 모세관 (A-M system Inc., Everett, USA)을 사용하여 측정하였다.

세포외 활동전위는 치아이랑의 Mossy fiber를 자극하면서 해마의 CA3부분에서 활동전위가 가장 잘 관찰되는 부위에 전극을 위치시켰다. 활동전위는 DAM 50 증폭기 (World Precision instruments, Sarasota, USA)와 pCLAMP 버전 9.0 (Axon Instruments Inc., Burlingame, USA) 프로그램을 통하여 디지털화 한 전압을 측정하여 기록하였다.

절편에 투여하여 간질모양파를 일으키는 물질로는 칼륨 통로차단제인 4-aminopyridine (4-AP, Sigma, St. Louis, USA)과 GABA_A 수용체의 길항제인 picrotoxin (PTX)을 사용하였다.⁷

이들의 원액을 희석하여 4-AP는 55 μM, PTX는 100 μM의 농도로 지속적으로 투여하였으며, flutamide는 농도를 10 μM, 30 μM과 100 μM으로 증량시키며 투여하여 농도에 따르는 변화를 관찰하였다. 각군은 최소한 4개 이상의 해마절편을 사용하여 측정하였으며 각 절편에서 60분 동안 발생하는 간질모양파를 기록하였다. 또한 PTX를 투여한 실험에서는 flumazenil (FMZ) 10 μM을 flutamide와 동시에 투여하여 간질모양파의 변화를 관찰하였다.

측정된 간질모양파는 전압이 0.25 mV 이상인 경우일 때에 유의한 것으로 추정하여 Minianalysis (version 6.0, Synaptosoft, Decatur, USA) 10분 간격으로 발생하는 간질모양파를 합하여 시간별 간질모양파의 횟수와 60분 동안에 발생하는 전체 간질모양파 횟수를 합하여 평균횟수로 평가하였다.

통계학적 분석은 각군간의 전체적 비교를 위하여 Repeated measured ANOVA를 사용하였으며, 각 군 간의 관계는 t-test를 사용하여 비교하였다. 분석에서는 SPSS (version 12.0, SPSS, Chicago, USA) 프로그램을 사용하였다.

결 과

4-aminopyridine에 대한 flutamide의 억제 효과

4-AP로 유발되는 간질모양파의 전체 횟수는 대조군이 2,604±315회이었고 flutamide투여군은 농도가 10 μM인 군이 2,518±445회, 30 μM군은 1,099±731회와 100 μM군은 864±391회로 각각 측정되었다. 대조군의 평균과 비교하여 flutamide 10 μM군은 3.3%의 간질모양파가 감소되었으며, 30 μM군은 57.8%으로, 100 μM군은 66.8%가 감소하여 통계학적으로 30 μM군과 100 μM군에서는 대조군보다 의미있게 감소되었으나 10 μM군에서는 대조군과 차이가 없었다.

시간적인 변화를 비교하였을 때에도 flutamide가 간질모양파의 억제 효과가 있었으며, post hoc검사에서 30 μM군과 100 μM군은 대조군과 비교하여 의미 있게 감소되었으나(p<0.05) 10 μM군은 차이가 없었다. 또한 30 μM군과 100 μM군 사이에는 통계적 차이가 관찰되지 않았다(Figure 1).

Picrotoxin에 대한 flutamide의 억제효과

PTX로 유발되는 간질모양파의 전체 횟수는 대조군이 347±125회이었고 flutamide투여군은 농도가 10 μM인 군이 151±136회, 30 μM군은 61±42회로 각각 측정되었다. 대조군의 평균과 비교하여 flutamide 10 μM군은 56.6%의 간질모양파가 감소되었으며, 30 μM군은

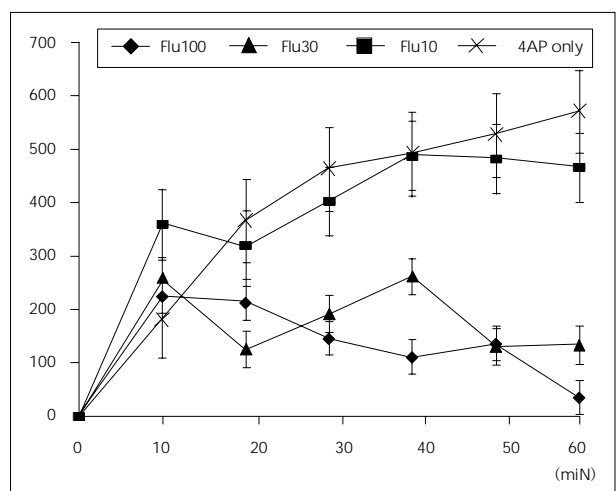


Figure 1. Flutamide was added to the running aCSF with 55 μM 4-AP. 10 μM flutamide suppressed the whole mean number of epileptiform discharges to 3.3% compared with the 4-AP only slices, but could not show statistically significant change. Increasing the concentration of flutamide to 30 and 100 μM decreased discharges to 57.8% and 66.8% each, and showed significant suppression (p<0.005).

82.5%으로 감소되어 통계학적으로 30 μ M군에서는 대조군보다 의미 있게 감소되었으나 10 μ M군에서는 대조군과 차이가 없었다.

시간적인 변화를 비교하였을 때에도 30 μ M군 대조군과 비교하여 의미 있게 감소되었으나($p < 0.05$), 10 μ M군은 대조군과 차이가 없었다. 또한 10 μ M군과 30 μ M군 사이에는 통계적 차이가 관찰되지 않았다 (Figure 2).

FMZ 10 μ M를 flutamide 30 μ M와 같이 투여한 군에서는 PTX 단독을 투여한 대조군과 간질모양파의 발생 횟수의 차이가 관찰되지 않았다.

고 찰

Flutamide는 경구로 복용이 가능한 항남성(antiandrogenic) 약물이다. 이 약물은 전립선암의 호르몬적 치료를 위하여 개발되었다.^{8,9} Flutamide는 테스토스테론과 남성

호르몬 작용이 더 강력한 대사물질인 dihydrotestosterone (DHT)이 전립선의 남성호르몬 수용체에 결합하는 작용에서 경쟁적으로 결합하여 항남성효과를 나타내게 된다. 그러나 화학적으로 flutamide는 스테로이드계 약물과 구조가 다른 치환된 anilide기를 가지고 있는 것이 특징이다 (Figure 3).⁴

Flutamide가 이러한 전립선에서의 항남성효과 뿐만 아니라 중추신경계에도 다양한 효과를 가지고 있다는 결과들이 보고되었다.¹⁰ 즉 척수에서는 뒷뿔(dorsal horn)에 분포하고 있는 세로토닌 수용체가 통각을 담당하고 있는데 flutamide가 이 수용체에 작용하여 국소적 염증성 통증이 발생하는 현상을 완화시키는 효과가 있다고 보고하였고, 중추신경계에서는 해마부위에 항남성 수용체가 분포하고 있는데 여기에서 항남성 효과를 나타내어 개체의 학습과 기억에 영향을 주게 되어 결과적으로 인지기능의 저하를 일으키게 된다.¹¹

그러나 flutamide와 경련에 대한 연구는 그 동안 매우 드물었다. 테스토스테론의 항경련효과를 관찰한 연구에서 5단계의 kindling이 될 때까지 필요로 하는 후방전(after-discharge)의 수를 비교하였을 때에 testosterone, DHT와 estrogen은 모두 대조정상군보다 발작을 악화시키는 경향을 보였으나 flutamide는 이와 반대로 kindling 발작을 억제시키는 효과를 보여 항경련 효과가 있다는 것을 알게 되었다.¹² 이후에 Ahmadiani 등의 연구에서는 백서를 사용한 *in vivo* 실험을 통하여 flutamide의 항경련 효과를 더 자세하게 보고 하였다.¹³ 이 연구결과에서 여러 종류의 화학적 경련유발 물질을 투여하였을 때에 pentylenetetrazole (PTZ)를 투여한 군에서만 flutamide가 농도에 비례하여 항경련 효과를 나타내었고 다른 유발약물들을 사용한 간질모델에서는 완전한 발작 억제 효과를 보이지는 않는다고 보고하였다. 또한 같은 연구에서 Kindling 모델이나 maximal electroshock seizure (MES) 모델에서도 flutamide의 항경련 효과는 나타나지 않았다고 하였다. 본 연구에서 간질모양파를 발생시키는데 사용한 4-AP는 voltage-activated K⁺ channels군 중에서 Kv1를 선택적으로 차단시켜 경련을 일으키는 약물이다.¹⁴ 본 연구 결과에서도 4-AP로 발작을 유발시킨 군에서 결과를 보면 대조군 보다는 flutamide의 농도가 높을수록 간질모양파의 억제 소견을 보여 항경련 효과를 나타냈지만, 30 μ M에서 농도를 100 μ M까지 증량한 후에도 항경련 효과가 30 μ M군과 차이 나지 않으며 완전하게 간질모양파를 억제시키지 못한 결과를 보면 고용량의 flutamide도 강력한 항경련효과를 보이기는 어려울 것으로 예상된다.

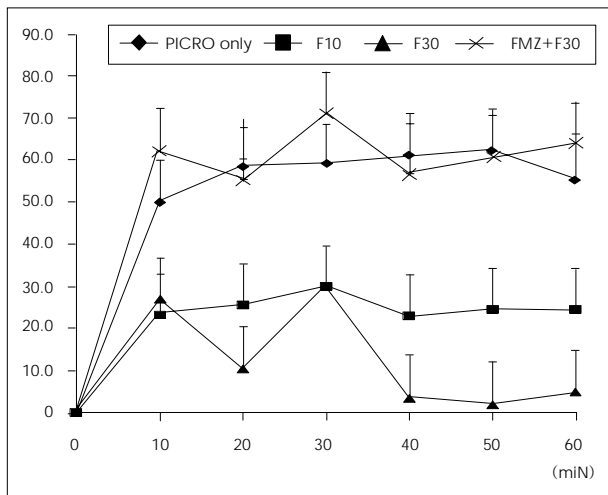


Figure 2. Flutamide was added to the running aCSF with 100 μ M picrotoxin (PTX). 10 μ M, 30 μ M flutamide suppressed the whole mean number of epileptiform discharges to 56.6% and 82.5% each compared with the PTX only slices, and showed significant suppression ($p=0.003$). 30 μ M flutamide mixed with 10 μ M flumazenil showed no difference with PTX only group.

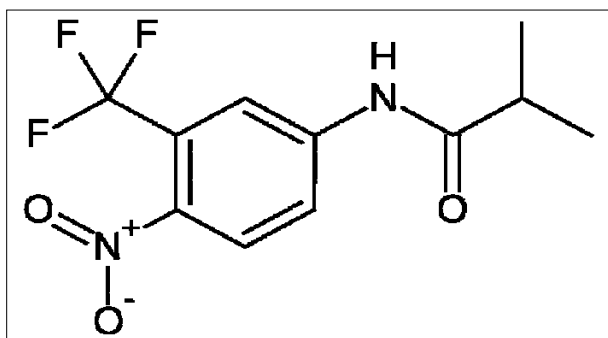


Figure 3. Chemical structure of flutamide.

이러한 flutamide가 항경련 효과를 나타내는 기전은 PTZ에 의하여 유발되는 발작을 flutamide가 억제하는 현상을 통하여 GABA_A 수용체에 작용한다고 추정되었다.¹³ 다른 연구에서도 flutamide를 장기간 투여하였을 경우에 중추신경계의 GABA 농도가 증가되는 현상이 보고되며 GABA 수용체와의 관련성이 높아지게 되었다.¹⁵ Flutamide가 GABA_A 수용체에 작용을 할 때에 주로 결합하는 부위는 먼저 flutamide가 가지고 있는 항남성호르몬 효과에 의하여 neurosteroid 결합 부위와의 연관성을 추정할 수 있다. 그러나 neurosteroid 결합 부위에 작용하기 위해서는 스테로이드 호르몬의 공통적인 구조인 네 개의 고리(ring) 구조를 가지고 있어야 하지만 flutamide는 이러한 구조를 가지고 있지 않아 neurosteroid 결합부위와의 연관성이 떨어지게 된다.^{16,17} 또한 스테로이드계 물질들과 다르게¹⁸⁻²⁰ flutamide는 kindling, MES이나 kainic acid 발작모델에서의 항경련 효과가 없기 때문에 neurosteroid 결합부위와는 작용 부위가 다르다고 예상 할 수 있다.

다른 기전으로는 flutamide의 구조에서 벤조디아제핀계통 약물의 화학구조 중에 공통적으로 존재하는 phenyl-N-CO-C분절을 가지고 있기 때문에 체내에서 벤조디아제핀과 유사한 작용을 가질 수 있다는 연구가 보고되었다. 방사선리간드인 [3H]Ro 5-4864를 사용하여 말초형 벤조디아제핀 수용체의 분포를 확인하는 연구에서 flutamide가 이 리간드를 치환하는 효과가 있다는 것이 밝혀지게 되었다.²¹ 이 효과는 중추형 벤조디아제핀 수용체에서도 유사하여 flutamide가 벤조디아제핀 결합부위에 작용한다고 추정되었다.

본 연구에서도 GABA_A 수용체의 길항제인 PTX에 의하여 간질모양파를 유발 시킨 후에 flutamide를 투여한 결과가 4-AP로 간질모양파를 유발 시킨 모델에서 보다도 더 낮은 농도에서 항경련 효과를 나타내었으며, 벤조디아제핀 수용체의 길항제인 FMZ을 투여 하였을 때에 flutamide의 항경련 효과가 소실되는 결과를 보여, flutamide는 벤조디아제핀 수용체에 작용하여 항경련 효과를 나타낸다는 기전을 뒷받침하였다. 이러한 결과는 다른 연구에서도 간질모델에 diazepam (DZP)을 flutamide와 동시에 투여하였을 때에 DZP의 항경련 효과를 증가시키며, FMZ을 투여하였을 때에는 항경련 효과가 감소되는 양상을 나타내어 같은 결과를 보였다.¹³

결론적으로 본 연구에서 flutamide는 기존의 항경련제에 비하여 약한 항경련 효과를 *in vitro* 간질모델에서 나타내었으며, 항경련을 나타내는 기전은 GABA_A 수용체의 벤조디아제핀 결합부위에 작용한다는 것을 시사하였다.

REFERENCES

1. Chodak G, Gomella L, Phung de H. Combined androgen blockade in advanced prostate cancer: looking back to move forward. *Clin Genitourin Cancer* 2007;5:371-8.
2. Daskivich TJ, Oh WK. Recent progress in hormonal therapy for advanced prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2006;16:173-8.
3. Klotz L. Combined androgen blockade: an update. *Urol Clin North Am* 2006;33:161-6, v-vi.
4. Singh SM, Gauthier S, Labrie F. Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships. *Curr Med Chem* 2000;7:211-47.
5. Nayebi AR, Ahmadiani A. Involvement of the spinal serotonergic system in analgesia produced by castration. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;64:467-71.
6. Naghdi N, Nafisy N, Majlessi N. The effects of intrahippocampal testosterone and flutamide on spatial localization in the Morris water maze. *Brain Res* 2001;897:44-51.
7. Salazar P, Tapia R, Rogawski MA. Effects of neurosteroids on epileptiform activity induced by picrotoxin and 4-aminopyridine in the rat hippocampal slice. *Epilepsy Res* 2003;55:71-82.
8. Labrie F, Dupont A, Cusan L, et al. Combination therapy with flutamide and castration: its benefits at various stages of prostate cancer. *Prog Clin Biol Res* 1989;303:161-7.
9. Labrie F, Dupont A, Belanger A, et al. Combination therapy with flutamide and castration (LHRH agonist or orchiectomy) in advanced prostate cancer: a marked improvement in response and survival. *J Steroid Biochem* 1985;23:833-41.
10. Nayebi AR, Rezazadeh H. Involvement of serotonergic mechanism in analgesia by castration and flutamide, a testosterone antagonist, in the rat formalin test. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;77:9-14.
11. Naghdi N, Oryan S, Etemadi R. The study of spatial memory in adult male rats with injection of testosterone enanthate and flutamide into the basolateral nucleus of the amygdala in Morris water maze. *Brain Res* 2003;972:1-8.
12. Edwards HE, Burnham WM, MacLusky NJ. Testosterone and its metabolites affect afterdischarge thresholds and the development of amygdala kindled seizures. *Brain Res* 1999;838:151-7.
13. Ahmadiani A, Mandgary A, Sayyah M. Anticonvulsant effect of flutamide on seizures induced by pentylenetetrazole: involvement of benzodiazepine receptors. *Epilepsia* 2003;44:629-35.
14. Saito M, Murai Y, Sato H, et al. Two opposing roles of 4-AP-sensitive K⁺ current in initiation and invasion of spikes in rat mesencephalic trigeminal neurons. *J Neurophysiol* 2006;96:1887-901.
15. Shrivastava VK, Sathyanesan AG. Effect of antiandrogens on the hypothalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) and glutamate contents of the Indian palm squirrel (*Funambulus pennanti*, Wroughton). *Exp Clin Endocrinol* 1986;87:349-52.
16. Akk G, Covey DF, Evers AS, Steinbach JH, Zorumski CF, Mennerick S. Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA (A) receptors. *Pharmacol Ther* 2007;116:35-57.
17. Hosie AM, Wilkins ME, Smart TG. Neurosteroid binding sites on GABA (A) receptors. *Pharmacol Ther* 2007;116:7-19.
18. Belelli D, Bolger MB, Gee KW. Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 alpha-pregnan-3 alpha-ol-20-one. *Eur J Pharmacol* 1989;166:325-9.
19. Kokate TG, Cohen AL, Karp E, Rogawski MA. Neuroactive steroids protect against pilocarpine- and kainic acid-induced limbic seizures and status epilepticus in mice. *Neuropharmacology* 1996;35:1049-56.
20. Kokate TG, Svensson BE, Rogawski MA. Anticonvulsant activity of neurosteroids: correlation with gamma-aminobutyric acid-evoked chloride current potentiation. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:1223-9.
21. Camins A, Sureda FX, Camarasa J, Escubedo E. Specific binding sites for [3H]Ro 5-4864 in rat prostate and seminal vesicle. *Gen Pharmacol* 1992;23:381-4.