

원저

## 부자이중탕과 보중익기탕의 억제성 및 흥분성 신경전달 물질에 의하여 활성화되는 이온통로 조절작용

이혜정<sup>1)</sup> · 서정철<sup>2)</sup> · 이재동<sup>2)</sup> · 김이화<sup>3)</sup> · 이충열<sup>4)</sup>  
정주호<sup>5)</sup> · 신민철<sup>6)</sup> · 김현배<sup>6)</sup> · 김연정<sup>6)</sup> · 김창주<sup>6)</sup>

경희대학교 동서의학대학원 침구경혈학부 <sup>1)</sup> 경희대학교 한의과대학 침구학교실 <sup>2)</sup>  
세명대학교 한의과대학 경혈학교실 <sup>3)</sup> 경원대학교 한의과대학 생리학교실 <sup>4)</sup>  
경희대학교 의과대학 약리학교실 <sup>5)</sup> 경희대학교 의과대학 생리학교실 <sup>6)</sup>

### Abstract

## Modulation of Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang on Inhibitory and Excitatory Neurotransmitters Activated Ion Channels

Hye-Jung, Lee<sup>1)</sup> · Jung-Chul, Seo<sup>2)</sup> · Jae-Dong Lee<sup>2)</sup> · Ee-Hwa, Kim<sup>3)</sup>  
Choong-Yeol, Lee<sup>4)</sup> · Joo-Ho, Chung<sup>5)</sup> · Min-Chul, Shin<sup>6)</sup>  
Hyun-Bae, Kim<sup>6)</sup> · Youn-Jung, Kim<sup>6)</sup> · Chang-Ju, Kim<sup>6)</sup>

- <sup>1)</sup> Department of Acupuncture & Meridianology, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University
- <sup>2)</sup> Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University
- <sup>3)</sup> Department of Meridianology, College of Oriental Medicine, Se Myung University
- <sup>4)</sup> Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyung Won University
- <sup>5)</sup> Department of Pharmacology, College of Medicine, Kyung Hee University
- <sup>6)</sup> Department of Physiology, College of Medicine, Kyung Hee University

※ 본 연구는 보건과학기술연구개발사업의 연구비에 의하여 지원되었음. (HMP-97-M-6-0064)  
· 접수 : 2000년 10월 27일 · 수정 : 11월 8일 · 채택 : 11월 10일  
· 교신저자 : 김창주, 서울 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 의과대학 생리학교실(Tel: 02-961-0407)

To research the characteristics of ion currents induced by Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang, nystatin-perforated patch clamp technique under voltage-clamp condition was used. Periaqueductal gray neuron was dissociated from Sprague-Dawley rat, 10-15 days old. Cytotoxicity of Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang showed incubation time and concentration dependent manner. Ion current activated by Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang were inhibited by bicuculline and strychnine and CNQX. It can be suggested that Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang modulate inhibitory and excitatory neurotransmitters, GABA, glycine and non-NMDA, activated ion channels. Modulatory effect of Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang was more greater in inhibitory neurotransmitters. Low concentration of Bujaijung-tang which dose not elicit ion current itself, activated GABA and glycine induced chloride currents. In this study, we can found that the activation of Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang on non-NMDA subtypes of glutamate receptor is its major action mechanism and can be used as very effective Herb treatment on Myasthenia gravis patient

**Key words** : 근무력증, 부자이중탕, 보중익기탕, GABA, glycine, glutamate

## I. 서 론

근무력증이란 골격근의 신경중판에 위치한 아세틸콜린수용체 (AChR)에 대한 항체의 생성으로 인해 상당수의 아세틸콜린수용체가 파괴되어 골격근의 수축반응에 문제가 일어나는 질환이다<sup>1)</sup>. 즉 근무력증은 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)에 대한 항체 (antibody, Ab)에 의하여 발생하는 자가면역질환 (autoimmune disorder)의 일종으로서 이 Ab에 의하여 AChR 수가 감소되거나 ACh와 AChR의 결합이 방해되어 결과적으로 골격근의 weakness를 초래하게 된다<sup>2)</sup>. 현재 이 질환의 치료 방법은 약물치료로 neostigmine, pyridostigmine 같은 acetylcholinesterase 억제제나 면역억제제 등이 사용되고, 병인이 흥선과 관련이 있는 경우 흥선 절제를 하고 있다. 그러나 현재 임상에서 근무력증 치료를 위해 사용되고 있는 방법들은 근무력증을 완치시키는데 문제가 없지 않으며 따라서

약물치료의 risk-benefit ratio를 개선시킬 수 있는 약제의 개발은 필수적이다.

근무력증은 한의학적으로 痿證의 범위에 속하는 것으로 보고 있다. 위중에 대해서는 <黃帝內經 素問 痿論>에서 “肺主身之皮毛, 心主身之血脈, 肝主身之筋脈, 脾主身之肌肉, 腎主身之骨髓”의 생리기능에 근거하여 각각 肺痿, 脈痿, 筋痿, 肉痿, 骨痿로 분류하고 치법을 제시하였고 그 후 많은 의가들이 위중의 병리기전과 치법, 처방에 대해 논의함으로써 병인병리와 처방에 대한 인식에 진전이 있었으며, 현재로는 火熱, 濕熱, 濕痰, 氣血虧損, 瘀血, 情志失調 등이 발병에 중요한 작용을 한다고 보고, 滋陰清火, 清肺潤燥, 補益脾胃, 調補肝腎, 活血化瘀 등의 치법이 주로 제시되고 있다<sup>3)</sup>. 위중 중에서도 근무력증과 가장 유사한 질병범주는 肉痿이다. 육위는 주로 비위의 생리기능 不調로 인해 발병하며, 脾虛氣弱이나 脾腎陽虛, 肝腎虧損, 氣血兩虛 등의 원인에 의해 발생한다고 보아 培補脾腎의 치법이 주로 사용된다<sup>4)5)</sup>.

근무력증은 acetylcholine 수용체와 밀접한 관련

이 있다. Nicotinic acetylcholine 수용체는 당단백질로 nicotinic cholinergic synapses에 존재하며 rosette 모양을 하고 있다. 각각의 subunits는 non-covalent interactions을 하고 있으며 대칭축을 중심으로  $\alpha\beta\gamma\delta$  또는  $\alpha\gamma\alpha\beta\delta$ 의 두 가지 형태를 하고 있다. 두 분자의 acetylcholine이  $\alpha$  subunits에 결합되면 형태변화가 일어나 이온 통로가 열리게 되어  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  그리고  $\text{Mg}^{2+}$  이 통과하게 된다. 그러나 이 경우  $\text{Ca}^{2+}$ 과  $\text{Mg}^{2+}$ 은 막전위에 그리 큰 영향을 미치지 못하고  $\text{Na}^+$ 과  $\text{K}^+$ 이 중요한 영향을 미치게 된다<sup>6)</sup>. 전 연구에서 부자이중탕(附子理中湯)과 보중익기탕(補中益氣湯)에 의하여 유발된 이온 전류는 nicotinic acetylcholine 수용체 길항제인 tubocurarine과 nicotinic acetylcholine 이온 통로 차단제인 procaine에 의해 의미 있게 억제되어 부자이중탕과 보중익기탕은 nicotinic acetylcholine 이온통로를 활성화시키는 작용이 있음을 나타내었으며 따라서 부자이중탕과 보중익기탕은 근무력증 환자에서 acetylcholine 수용체에 대해 upregulation과 같은 효과를 나타낼 것이라고 제시되었다<sup>7)</sup>.

신경세포의 활성도를 조절하는 여러 신경전달 물질 중에서  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)와 glycine은 중추신경계의 대표적 억제성 신경전달 물질로 chloride 전류를 증가시켜 막전위를 과분극시킨다<sup>8),9),10)</sup>. 또한 glutamate는 여러 종류의 양이온의 투과도를 증가시켜 흥분성 신경전달 물질로 작용한다<sup>11)</sup>. 본 연구에서는 현재 한의학에서 근무력증에 사용되고 있는 부자이중탕과 보중익기탕의 억제성 및 흥분성 신경전달 물질에 의하여 활성화되는 신경세포의 이온통로 (ion channel)에 대한 조절작용을 patch clamp technique를 이용하여 실험하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포독성 검사 (MTT assay)

한약재의 농도와 배양 시간에 따른 세포독성을 검사하기 위하여 MTT-based cytotoxicity assay를 시행하였다. 이는 세포배양에서 생존하는 세포의 수를 측정하는 방법으로 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 기질 MTT를 검푸른 색깔의 formazan으로 변환시키는 작용을 이용한 것으로 흡광도 (OD)의 값은 살아있는 세포의 수를 반영한다. P815 mastocytoma (mouse)를 10% FBS가 함유된 DMEM 용액에서 5%  $\text{CO}_2$ -95%  $\text{O}_2$ , 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 그리고 P815 mastocytoma 세포를 96 well plate에 well당  $2.0 \times 10^4$ 의 세포수가 되도록 분주하고 배양액 100 $\mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 한약재의 최종농도가 1mg/ml, 10mg/ml이 되도록 처치하고 한약재를 처치하지 않은 세포군을 대조군으로 하였다. 24시간과 48시간 동안 5%  $\text{CO}_2$ -95%  $\text{O}_2$ , 37°C 온도가 유지되는 세포 배양기에서 배양한 후, MTT solution을 10 $\mu\text{l}$ 씩 가한 뒤 4시간 동안 배양하였다. 그 후 solubilization solution을 100 $\mu\text{l}$  첨가하여 알루미늄 호일로 덮어 빛에 노출되지 않게 하여 overnight 시킨 후 ELISA reader로 690nm에서 흡광도를 측정한 뒤 595nm에서 측정한 흡광도를 제한 값을 세포독성 지수로 나타내었다.

### 2. 중심회백질 신경세포의 분리

중심회백질 신경세포 (periaqueductal gray neuron)는 다음과 같은 방법으로 분리하였다<sup>12)</sup>. 태어난 지 10일에서 15일 되는 Sprague-Dawley 흰쥐를 Zoletil 50 (10 mg/kg i.m.)으로 마취 후 뇌를 꺼내어 microslicer (DTK-1000, DSK, Tokyo, Japan)를 사용하여 400  $\mu\text{m}$  두께로 slices를

만들었다. 중심회백질 신경세포가 포함된 slice를 1 mg/6ml 농도의 pronase로 30~40분간 32°C에서 효소처리 후 이어서 1mg/6ml 농도의 ther-molysin으로 동일한 조건으로 10분간 효소 처리하였다. 효소처리 후 slices는 incubation solution에서 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub> 혼합기체로 1시간 이상 bubbling 한 후 사용하였다.

중심회백질 신경세포 부위는 주사기를 이용하여 micropunching하였으며 standard solution이 들어 있는 culture dish에서 굵기가 다른 micropipette을 이용하여 기계적으로 분리하였다. 이러한 방법으로 분리된 단일 신경세포는 5분내에 culture dish 바닥에 부착되었다.

### 3. 시약 및 용액

부자이중탕은 부자 4g, 인삼 4g, 백출 4g, 건강 4g, 감초 4g, 그리고 보중익기탕은 황기 6g, 인삼 4g, 백출 4g, 감초 4g, 당귀 2g, 진피 2g, 승마 1g, 시호 1g의 비율로 제조하였으며 각각을 10배 증류수로 5시간 동안 2회 추출 후 온시상에 여과하고 여액을 감압 농축 후 동결 건조로 완전하게 말려 얻은 분말을 -70°C에서 냉동 보관 후 사용하였다. 한약재를 신경세포에 투여할 때는 standard solution에 희석하여 사용하였다.

Zoletil 50은 France의 Vibac에서 strychnine은 USA의 RBI에서 그리고 D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5)와 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)는 USA의 TOCRIS에서 구입하였다. 그 외 본 실험에 사용된 pronase, thermolysin, nystatin, bicuculline, tubocurarine, GABA, glycine, glutamate 등 그 외 모든 시약은 USA의 Sigma 제품을 사용하였다. 약제는 'Y-tube' method<sup>12)</sup>로 투여하였으며 이 방법은 10~20ms내에 신경세포 주위의 용액을 교체할 수 있다.

Incubation solution의 조성은 다음과 같다 (mM): NaCl 124, KCl 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.3, CaCl<sub>2</sub> 2.4, glucose 10 그리고 NaHCO<sub>3</sub> 24. 이 용액의 pH는 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>를 계속 bubbling 하여 7.4로 맞추었다. Standard solution의 조성은 다음과 같다 (mM): NaCl 150, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 2, glucose 10 그리고 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid(HEPES) 10. 이 용액의 pH는 tris-hydroxymethylaminomethane (Tris-base)을 넣어 7.4로 맞추었다. Nystatin-perforated patch recording에 사용되는 internal pipette solution의 조성은 다음과 같다 (mM): KCl 150 그리고 HEPES 10. 이 용액의 pH는 Tris-base를 넣어 7.2로 맞추었으며 10mg/ml의 nystatin을 함유하는 stock solution은 200µg/ml가 되도록 희석하여 사용하였다.

### 4. 전류의 측정

전류의 측정은 세포에 가장 안정적인 nystatin perforated patch recording 방법을 사용하였으며 patch-pipette은 외경이 1.5 mm인 glass capillaries를 이용하여 two stage puller로 만들었다. 이온전류의 흐름은 EPC-7 patch clamp amplifier (List-Electronic, Darmstadt / Eberstat, Germany)로 측정하였으며 storage oscilloscope로 관찰하며 thermal-head pen recorder (Recti-Horiz-8K, NEC San-ei, Tokyo, Japan)로 기록하였다. 모든 실험은 실온 (22~24°C)에서 진행하였다. 실험결과는 mean±standard error mean (S.E.M.)으로 표시하였으며 Student's t-test로 통계 처리하여 p-value가 0.05이하일 때 의미 있는 것으로 간주하였다.

### III. 결 과

#### 1. 부자이중탕과 보중익기탕의 세포독성 검사

부자이중탕 1mg/ml로 24시간 배양 시 흡광도는 1.68±0.04, 보중익기탕 1mg/ml로 24시간 배양시 흡광도는 1.72±0.03으로 나타나 대조군의 흡광도 1.60±0.09과 별 차이가 없었다 (n=6, p>0.05). 부자이중탕 10mg/ml로 24시간 배양 시 흡광도는 1.60±0.03, 보중익기탕 1mg/ml로 24시간 배양 시 흡광도는 1.60±0.01으로 나타나 역시 대조군의 흡광도 1.62±0.07과 별 차이가 없었다 (n=6, p>0.05). 따라서 24시간 배양 시는 부자이중탕과 보중익기탕 모두에서 세포독성이 나타나지 않음을 알 수 있었다 (Figure 1A).

부자이중탕 1mg/ml로 48시간 배양 시 흡광도는 0.89±0.04으로 대조군의 흡광도 1.35±0.05보다 감소하여 유의한 세포독성을 나타내었으며 (n=6, p<0.05), 보중익기탕 1mg/ml로 48시간 배양 시 흡

광도는 1.16±0.04으로 나타나 대조군에 비하여 약간 감소하여 역시 세포독성을 나타내었다 (n=6, p<0.05). 부자이중탕 10mg/ml로 48시간 배양 시 흡광도는 0.37±0.03으로 대조군의 흡광도 1.35±0.04로 강한 세포독성을 나타내었고 (n=6, p<0.05), 보중익기탕 10mg/ml로 48시간 배양 시 흡광도는 0.85±0.01으로 대조군에 비하여 역시 세포독성을 나타내었다 (n=6, p<0.05). 따라서 48시간 배양 시는 부자이중탕과 보중익기탕 모두에서 세포독성이 나타났으며 농도에 따라 세포독성이 증가하였다. 또한 같은 조건에서는 부자이중탕의 세포독성이 보중익기탕보다 큰 것으로 판명되었다 (Figure 1B).

#### 2. 부자이중탕과 보중익기탕에 의하여 유발된 이온전류에 bicuculline이 미치는 영향

부자이중탕 0.5mg/ml를 투여했을 때 신경세포에서 기록되는 이온 전류를 측정하여 대조군으로 하고 0.5mg/ml의 부자이중탕과 GABA<sub>A</sub> 수용체 길항제인 10<sup>-4</sup>M bicuculline을 같이 투여하여 기록되는 이온 전류를 비교하였다. Bicuculline은 부자이중탕 단독으로 투여했을 때 기록되는 이온 전류를 81.56

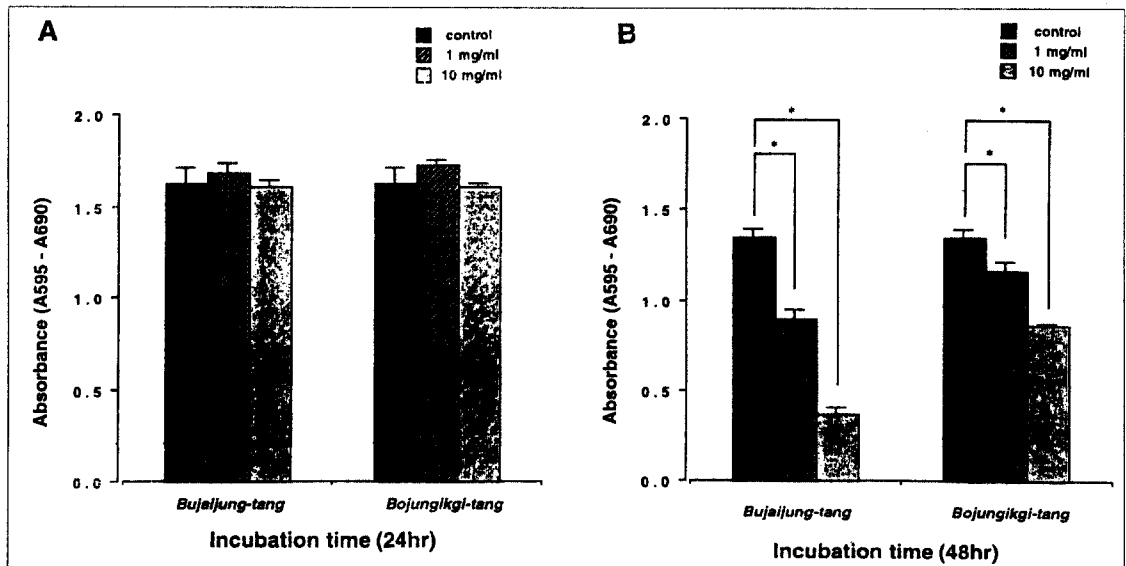


Figure 1. Cytotoxicity test of Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang. \* means p<0.05 compared to control.

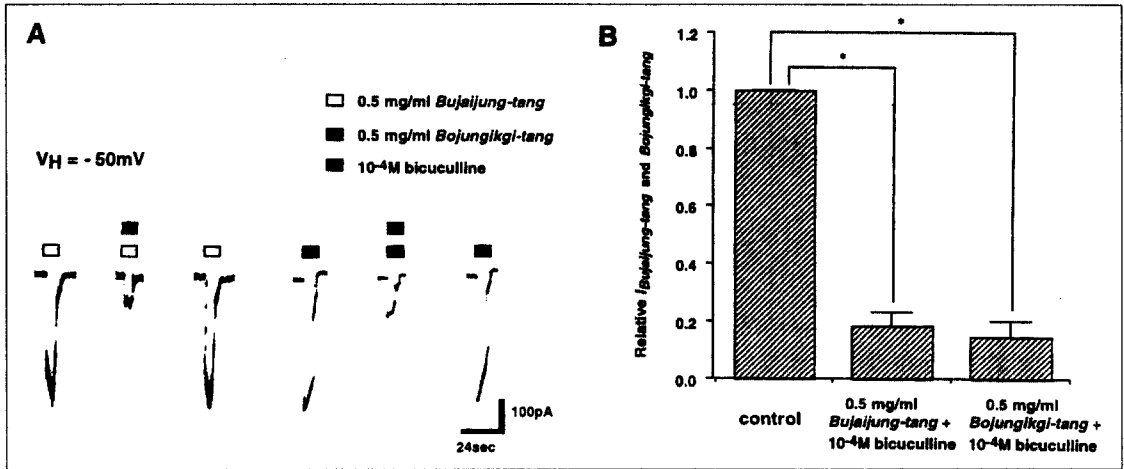


Figure 2. Effect of bicuculline on ion current induced by Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang. Ion current activated by Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang was significantly inhibited by bicuculline. \* means  $p < 0.05$  compared to control.

$\pm 4.95\%$  억제하였다 ( $n=5, p < 0.05$ ) (Figure 2).

보중익기탕 0.5mg/ml을 대조군으로 하고 0.5mg/ml의 보중익기탕과  $10^{-4}$ M bicuculline을 같이 투여했을 때 기록되는 이온 전류를 비교하였으며 그 결과 bicuculline은 보중익기탕에 의하여 유발된 이온 전류를  $85.45 \pm 5.67\%$  억제하였다 ( $n=4, p < 0.05$ ) (Figure 2).

### 3. 부자이중탕과 보중익기탕에 의하여 유발된 이온전류에 strychnine이 미치는 영향

부자이중탕 0.5mg/ml를 투여했을 때 신경세포에서 기록되는 이온전류를 측정하여 대조군으로 하고 0.5mg/ml의 부자이중탕과 glycine 수용체 길항제인  $10^{-4}$ M strychnine을 같이 투여하여 기록되는 이온 전류를 비교하였다. Strychnine은 부자이중탕 단독으로 투여했을 때 기록되는 이온전류를  $90.92 \pm 3.30\%$  억제하였다 ( $n=4, p < 0.05$ ) (Figure 3).

보중익기탕 0.5mg/ml을 대조군으로 하고 0.5mg/ml의 보중익기탕과  $10^{-4}$ M strychnine을 같이 투여했을 때 기록되는 이온전류를 비교하였으며 그 결

과 strychnine은 보중익기탕에 의하여 유발된 이온 전류를  $95.15 \pm 3.38\%$  억제하였다 ( $n=4, p < 0.05$ ) (Figure 3).

### 4. 부자이중탕과 보중익기탕에 의하여 유발된 이온전류에 D-AP5가 미치는 영향

부자이중탕 0.5mg/ml를 투여했을 때 신경세포에서 기록되는 이온전류를 측정하여 대조군으로 하고 0.5mg/ml의 부자이중탕과 glutamate의 NMDA 수용체 길항제인  $10^{-4}$ M D-AP5를 같이 투여하여 기록되는 이온전류를 비교하였다. D-AP5는 부자이중탕 단독으로 투여했을 때 기록되는 이온전류를 의미 있게 억제하지 못했다 ( $3.72 \pm 2.99\%$ ,  $n=8, p > 0.05$ ) (Figure 4).

보중익기탕 0.5mg/ml을 대조군으로 하고 0.5mg/ml의 보중익기탕과  $10^{-4}$ M D-AP5를 같이 투여했을 때 기록되는 이온전류를 비교하였으며 그 결과 D-AP5는 보중익기탕에 의하여 유발된 이온전류를 의미 있게 억제하지 못했다 ( $2.28 \pm 1.85$ ,  $n=7, p > 0.05$ ) (Figure 4).

5. 부자이중탕과 보중익기탕에 의하여 유발된 이온전류에 CNQX가 미치는 영향

부자이중탕 0.5mg/ml를 투여했을 때 신경세포에서 기록되는 이온전류를 측정하여 대조군으로 하고 0.5mg/ml의 부자이중탕과 glutamate의 non-NMDA 수용체 길항제인  $10^{-4}$ M CNQX를 같이 투여하여

기록되는 이온전류를 비교하였다. CNQX는 부자이중탕 단독으로 투여했을 때 기록되는 이온전류를  $19.98 \pm 4.38\%$  억제하였다( $n=5, p < 0.05$ ) (Figure 5).

보중익기탕 0.5mg/ml을 대조군으로 하고 0.5mg/ml의 보중익기탕과  $10^{-4}$ M CNQX를 같이 투여했을 때 기록되는 이온전류를 비교하였으며 그 결과 CNQX는 보중익기탕에 의하여 유발된 이온전류를  $12.88 \pm$

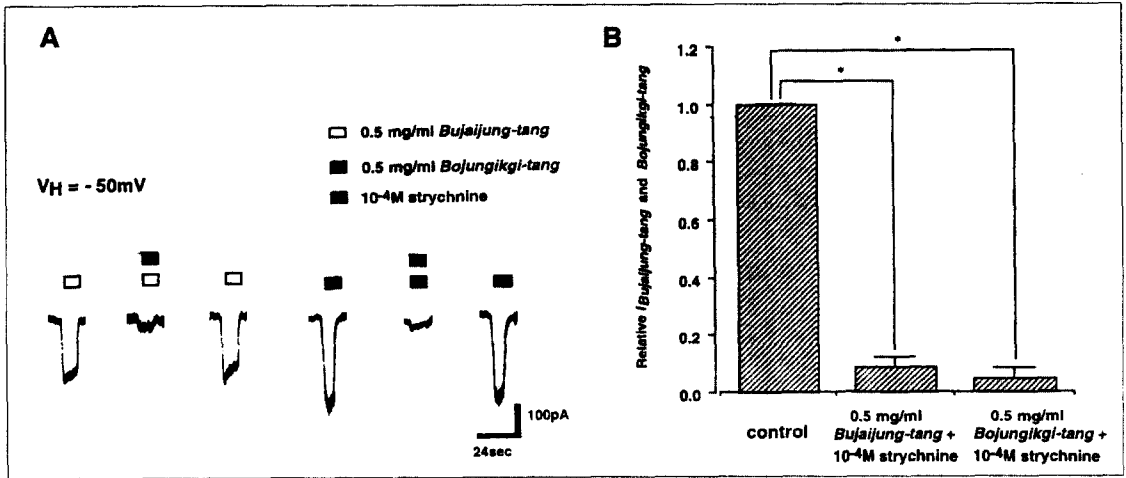


Figure 3. Effect of strychnine on ion current induced by Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang. Ion current activated by Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang was significantly inhibited by strychnine. \* means  $p < 0.05$  compared to control.

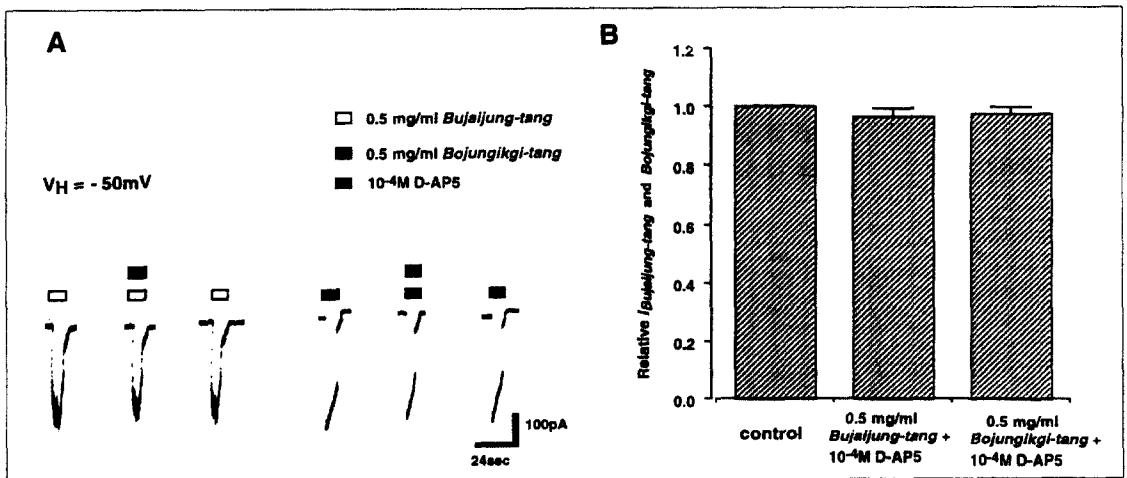


Figure 4. Effect of D-AP5 on ion current induced by Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang. Ion current activated by Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang was not affected by D-AP5 significantly.

2.86% 억제하였다 (n=9, p <0.05) (Figure 5).

6. 부자이중탕과 보중익기탕의 GABA에 의하여 활성화되는 chloride 전류 조절작용  
 GABA에 의하여 유발되는 chloride 전류에 대한 부자이중탕의 조절작용을 실험하였다.  $10^{-5}$ M GABA에 의하여 활성화되는 이온전류를 대조군으로

하고 그 자체로는 이온전류를 유발시키지 않는 0.01mg/ml의 부자이중탕을 같이 투여시 기록되는 이온전류를 비교하였다. 부자이중탕은 GABA에 의하여 유발되는 chloride 전류를  $8.96 \pm 3.10\%$  촉진하였다 (n=5, p <0.05) (Figure 6).

GABA에 의하여 유발되는 chloride 전류에 대한 보중익기탕의 조절작용을 실험하였다.  $10^{-5}$ M GABA

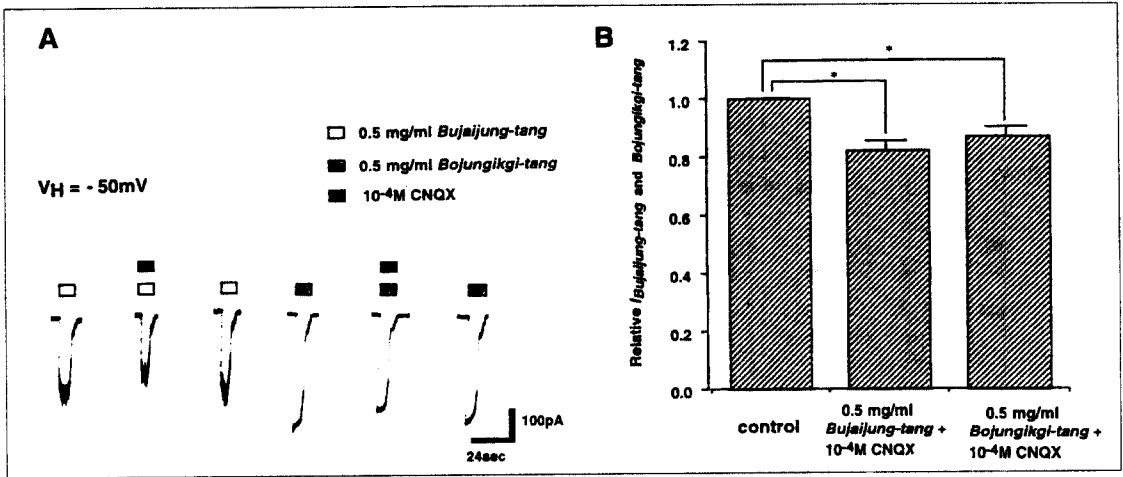


Figure 5. Effect of CNQX on ion current induced by Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang. Ion current activated by Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang was significantly inhibited by CNQX. \* means p < 0.05 compared to control.

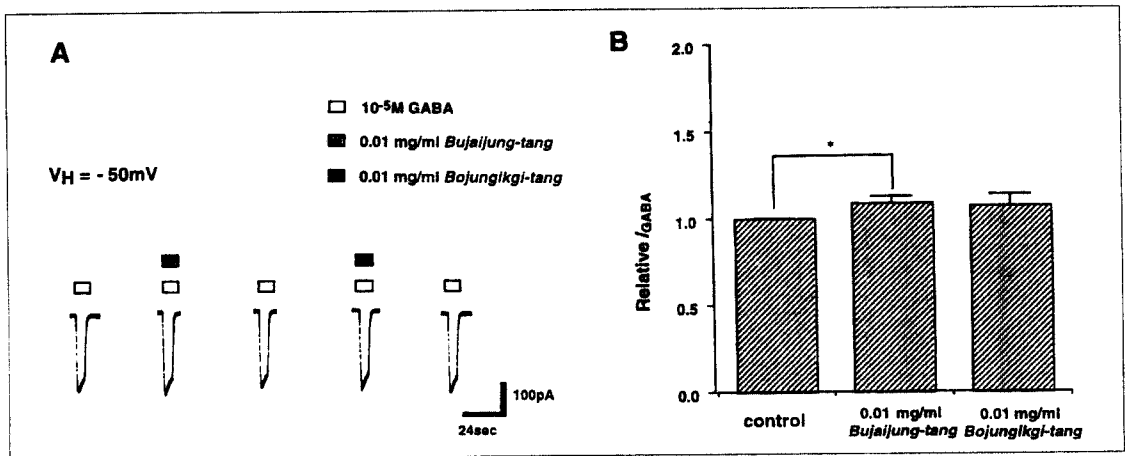


Figure 6. Modulation of Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang on GABA activated chloride current. Chloride current activated by GABA was potentiated by Bujaijung-tang while Bojungikgi-tang had no effect on GABA activated chloride current. \* means p < 0.05 compared to control.



BA에 의하여 활성화되는 이온전류를 대조군으로 하고 그 자체로는 이온전류를 유발시키지 않는 0.01mg/ml의 보중익기탕을 같이 투여시 기록되는 이온전류를 비교하였다. 보중익기탕은 GABA에 의하여 유발되는 chloride 전류에 영향을 미치지 않았다(6.80±6.08% 촉진, n=4, p> 0.05)(Figure 6).

7. 부자이중탕과 보중익기탕의 glycine에 의하여 활성화되는 chloride 전류 조절작용

Glycine에 의하여 유발되는 chloride 전류에 대한 부자이중탕의 조절작용을 실험하였다. 10<sup>-5</sup>M glycine에 의하여 활성화되는 이온전류를 대조군으로 하고 그 자체로는 이온전류를 유발시키지 않는 0.01mg/ml의 부자이중탕을 같이 투여시 기록되는 이온전류를 비교하였다. 부자이중탕은 glycine에 의하여 유발되는 chloride 전류를 26.75±7.19% 촉진하였다 (n=12, p <0.05)(Figure 7).

Glycine에 의하여 유발되는 chloride 전류에 대한 보중익기탕의 조절작용을 실험하였다. 10<sup>-5</sup>M glycine에 의하여 활성화되는 이온전류를 대조군으로

로 하고 그 자체로는 이온전류를 유발시키지 않는 0.01mg/ml의 보중익기탕을 같이 투여시 기록되는 이온전류를 비교하였다. 보중익기탕은 glycine에 의하여 유발되는 chloride 전류에 영향을 미치지 않았다(22.51±10.31% 촉진, n=8, p> 0.05)(Figure 7).

8. 부자이중탕과 보중익기탕의 glutamate에 의하여 활성화되는 이온 전류 조절작용

Glutamate에 의하여 유발되는 이온전류에 대한 부자이중탕의 조절작용을 실험하였다. 10<sup>-5</sup>M glutamate에 의하여 활성화되는 이온전류를 대조군으로 하고 그 자체로는 이온전류를 유발시키지 않는 0.01mg/ml의 부자이중탕을 같이 투여시 기록되는 이온전류를 비교하였다. 부자이중탕은 glutamate에 의하여 유발되는 이온전류에 영향을 미치지 않았다(6.44±4.10% 억제, n=7, p> 0.05)(Figure 8).

Glutamate에 의하여 유발되는 이온전류에 대한 보중익기탕의 조절작용을 실험하였다. 10<sup>-5</sup>M glutamate에 의하여 활성화되는 이온전류를 대조군으로 하고 그 자체로는 이온전류를 유발시키지 않는

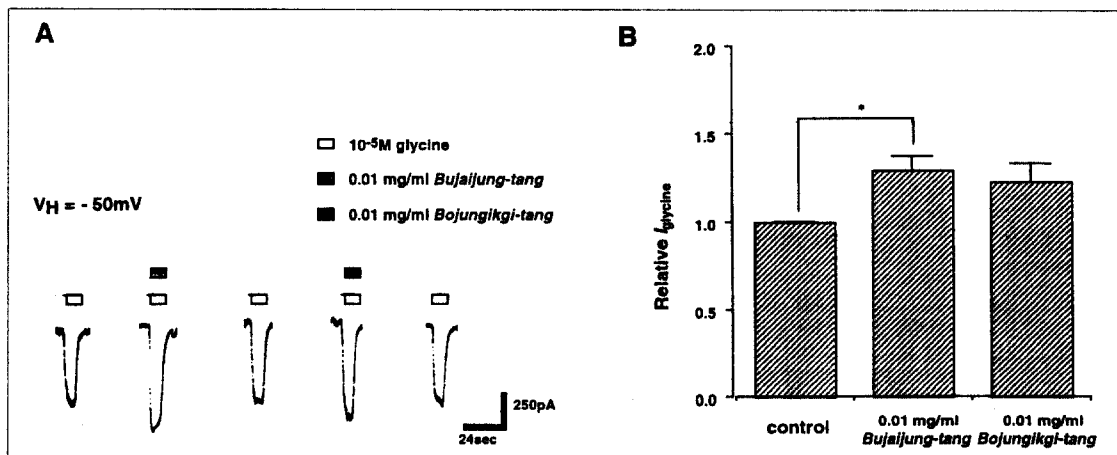


Figure 7. Modulation of Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang on glycine activated chloride current. Chloride current activated by glycine was potentiated by Bujaijung-tang while Bojungikgi-tang had no effect on glycine activated chloride current. \* means p<0.05 compared to control.

0.01mg/ml의 보중익기탕을 같이 투여시 기록되는 이온전류를 비교하였다. 보중익기탕은 glutamate에 의하여 유발되는 이온전류에 영향을 미치지 않았다 ( $7.06 \pm 5.08\%$  촉진,  $n=8$ ,  $p > 0.05$ ) (Figure 8).

#### IV. 고 찰

근무력증은 임상적으로 眼筋의 脫力으로 인한 眼瞼下垂나 複視, 안면근 장애 등 안면부위에 증상이 주로 나타나고, 근육계의 피로와 심한 쇠약이 전신적으로 나타난다.<sup>4),13)</sup> 근무력증은 한의학적으로 痿證의 범주, 그 중에서도 특히 肉痿에 가까운 질병으로 인식되고 있으며<sup>4)</sup>, 脾虛로 인해 水穀의 精微를 운화하지 못해 四肢의 肌肉을 濡養할 수 없거나, 腎虛로 인해 精氣가 匱乏하여 형체를 충실하게 하지 못해 나타나는 것으로 보고 있다. 따라서 근무력증에서는 脾虛氣弱, 脾腎氣陰兩虛, 脾腎陽虛 등의 변증유형이 잘 나타나며 치료원칙은 培補脾腎이 중심이 된다<sup>5),13)</sup>. 본 실험에서는 임상에서 근무력증의 치료에 활용되고 있는 부자이중탕과 보중익기탕을 사용하여 부자이중탕과 보중익기탕이 억제성 신경

전달 물질인 GABA와 glycine 수용체와 흥분성 신경전달 물질인 glutamate 수용체에 미치는 영향을 nystatin-perforated patch clamp로 연구하였다.

한약재의 세포독성 실험에서는 24시간 배양 시는 부자이중탕과 보중익기탕 모두에서 세포독성이 나타나지 않았으나 48시간 배양 시는 부자이중탕과 보중익기탕 모두에서 세포독성이 나타났으며 한약재의 농도에 따라 세포독성이 증가하였고 부자이중탕의 세포독성이 보중익기탕 보다 큰 것으로 나타났다.

GABA와 glycine은 중추신경계에서 주요한 억제성 신경전달물질로 알려져 있으며 GABA는  $GABA_A$  수용체와  $GABA_B$  수용체를 활성화시키는데  $GABA_A$  수용체는 chloride 이온 통로의 활성도를 조절하여 여러 조직에서 세포의 억제성 조절을 담당하는 것으로 알려져 있다<sup>8),9)</sup>. 이러한 GABA 또는  $GABA_A$  수용체 agonist인 muscimol 등이  $GABA_A$  수용체에 결합하게 되면 chloride 통로가 열리게 되어 세포의 활성도를 억제하게 되며, bicuculline은  $GABA_A$  수용체와 경쟁적 억제작용을 하여  $Cl^-$  통로가 열리는 것을 차단하게 된다<sup>8)</sup>. 또한 glycine도 chloride 통로를 열어 막전위를 과분극시켜 억제성

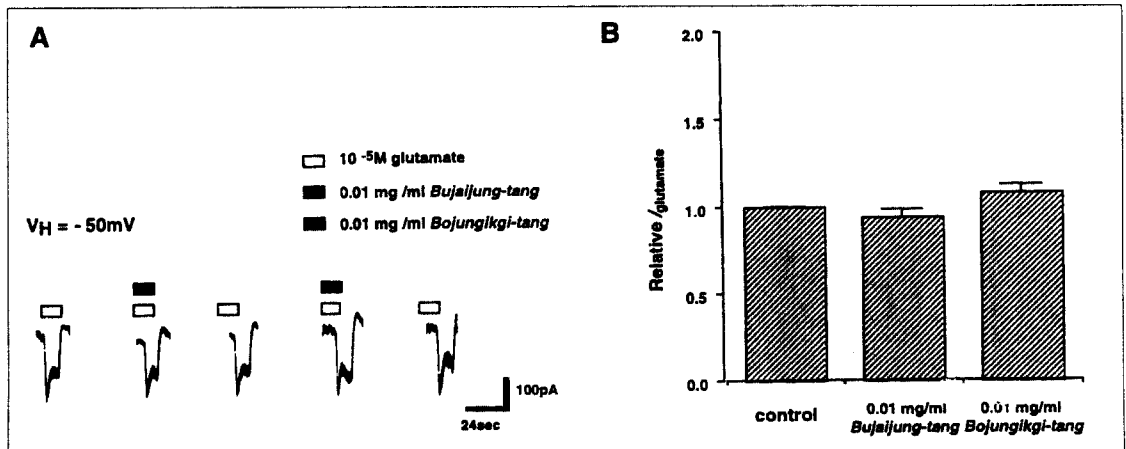


Figure 8. Modulation of Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang on glutamate activated ion current. Ion current activated by glutamate was not affected by Bujaijung-tang and Bojungikgi-tang.

신경전달 물질로 작용하며 stry - chnine은 glycine 수용체를 차단한다<sup>9),10)</sup>. 부자이중탕과 보중익기탕에 의하여 유발되는 이온전류의 특성을 실험한 결과 부자이중탕 (0.5mg/ml)과 보중익기탕 (0.5mg/ml)에 의하여 유발되는 이온전류는 대부분 GABA나 glycine 수용체를 자극하여 나타나는 chloride 이온 전류임을 알 수 있었다. 또한 한약재 자체로는 이온 전류를 나타내지 않는 저농도의 부자이중탕 (0.01 mg/ml)과 보중익기탕 (0.01mg/ml)에 의한 GABA와 glycine에 의하여 활성화되는 chloride 이온통로의 조절작용에서는 부자이중탕만이 GABA와 glycine에 의하여 유발되는 chloride 전류를 증가시켰다.

흥분성 아미노산인 glutamate는 척추동물 중추신 경계의 많은 synapse에 존재하며 막전위를 탈분극 시켜 흥분을 일으키는 물질로 알려져 있다<sup>14)</sup>. 또한 ischemia시는 glutamate와 aspartate와 같은 흥분 성 신경전달 물질의 유리가 증가됨으로써 ex - citatory neuron의 흥분이 지속되어 이것이 neuron 의 death의 원인이 되며<sup>15)</sup> 이러한 glutamate 증가는 calcium-independent efflux에 의한 과정에 의한 것으로 anoxia시 glutamate의 presynaptic release를 감소시키면 glutamate neurotoxicity를 감소시킬 수 있을 것으로 보고되었다<sup>16)</sup>. 흥분성 신경전달물질인 glutamate 수용체는 inotropic glutamate 수용체와 metabotropic glutamate 수용체로 크게 두 가지로 분류되며, inotropic glutamate 수용체는 수용체를 활성화시키는 물질에 따라 크게 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 수용체와 non-NMDA 수용체로 분류되며 non-NMDA 수용체에는 다시 AMPA와 kainate가 포함된다<sup>17)</sup>. NMDA와 non-NMDA 수용체는 많은 신경세포에 동시에 존재하고 있으며 non-NMDA 수용체는 cation을 통과시키는 반면에 NMDA 수용체는 monovalent ion과 Ca<sup>2+</sup> ion을 통과시키며 이 NMDA 수용체는 Mg<sup>2+</sup> ion에 의해 차단된다<sup>18)</sup>. 또한 NMDA 수용체는 glycine에 의해 그

작용이 증폭되는 반면에 non-NMDA 수용체는 glycine에 그 영향을 받지 않는다<sup>19)</sup>. D-AP5는 NMDA 수용체를 선택적으로 억제하며 CNQX는 non-NMDA 수용체를 차단한다. 고농도의 부자이중탕 (0.5mg/ml)과 보중익기탕 (0.5mg/ml)에 의하여 유발되는 이온전류에는 glutamate 수용체 중 non-NMDA 수용체를 자극하여 나타나는 이온전류를 포함하고 있는 것으로 나타났으나 NMDA 수용체에 의한 이온전류는 기록되지 않았다. 한약재 자체로는 이온전류를 유발시키지 않는 저농도의 부자이중탕 (0.01mg/ml)과 보중익기탕 (0.01mg/ml)은 glutamate에 의한 이온전류에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 따라서 고농도의 부자이중탕과 보중익기탕이 non-NMDA 수용체를 자극하는 작용은 nicotinic acetylcholine 수용체를 자극하는 작용<sup>7)</sup>과 더불어 본 한약재의 주 치료기전으로 생각되어진다. 즉 부자이중탕과 보중익기탕에 의하여 신경세포의 양이온의 투과도가 증가됨으로써 신경 후 접합부의 흥분성이 증진되어 근무력증에 치료효과를 나타내리라 생각 할 수 있다.

이 실험에서는 임상에서 근무력증의 치료에 활용되고 있는 附子理中湯과 補中益氣湯을 사용하였다. 부자이중탕-원명 附子理中丸-은 <太平惠民 和劑局方>에 수록된 방제로서 주로 脾胃虛寒으로 인한 嘔吐瀉利, 脘腹絞痛, 心下逆滿, 手足厥寒, 腹中雷鳴, 飲食不振, 霍亂轉筋 등의 증상을 치료하는 처방이며 주로 脾胃虛寒이나 脾腎陽虛 등의 증후에 적용된다<sup>20)</sup>. 또 보중익기탕은 <脾胃論>에 수록된 방제로 脾胃氣虛로 인한 身熱有汗, 渴喜熱飲, 頭痛惡寒, 少氣懶言, 飲食無味, 四肢乏力, 舌嫩色淡, 脈虛大나 氣虛下陷으로 인한 久瀉脫肛, 子宮脫垂 등증을 치료하는 처방이며 주로 脾虛氣弱, 中氣下陷 등의 증후에 적용된다<sup>20)</sup>.

본 실험에서 보양약에 속하는 부자이중탕과 보중익기탕이 신경세포의 안정화에 기여하는 chloride

전류를 유발시키는 것으로 나타난 것은 매우 흥미 있는 사실이다. 한의학적으로 순음(純陰), 순양(純陽)이란 현실적으로 존재하지 않으며, 음양의 구분은 속소속다(孰少孰多)의 구분으로서 어느 한쪽이 우세 하느냐에 따라 이루어짐을 생각할 때 부자이중탕과 보중익기탕이 chloride 전류를 유발시키는 것은 본 한약재의 보양으로 인한 apoptosis<sup>21)</sup>를 방지하는 효과가 있을 것이다.

이상의 실험 결과를 종합하여 보면 부자이중탕과 보중익탕은 억제성 및 흥분성 신경전달물질에 의하여 활성화되는 신경세포의 이온통로를 모두 조절하고 있음을 알 수 있었고, glutamate의 non-NMDA 수용체를 자극하는 것이 본 한약재의 중요한 치료 기전의 하나로 생각되어진다. 또한 GABA와 glycine 수용체를 자극함으로써 보양제의 부작용을 막아주는 작용도 있으리라 추측되어진다.

## V. 결 론

임상에서 근무력증의 치료에 사용되는 부자이중탕과 보중익기탕이 억제성 신경전달물질 (GABA와 glycine)에 의하여 활성화되는 이온통로와 흥분성 신경전달물질 (glutamate)에 의하여 활성화되는 이온통로에 미치는 영향을 전위고정 (voltage clamp) 하에서 nystatin-perforated patch clamp로 연구하였다.

고농도의 부자이중탕 (0.5mg/ml)과 보중익기탕 (0.5mg/ml)은 신경세포에서 이온전류를 나타내며, 이러한 이온전류는 GABA 및 glycine 수용체 자극에 의한 이온전류뿐 아니라 glutamate receptor 중 non-NMDA subtype을 자극하여 나타나는 이온전류도 포함하고 있다. 따라서 부자이중탕과 보중익기탕은 glutamate의 non-NMDA 수용체에 의하여 활성화되는 이온통로를 조절하여 그 약효를 나타내

는 것으로 판단되어진다.

저농도의 부자이중탕 (0.01mg/ml)은 GABA와 glycine에 의한 chloride 전류를 증가시켰으나 glutamate에 의한 이온전류에는 영향을 미치지 않았다. 저농도의 보중익기탕 (0.01mg/ml)은 GABA, glycine 그리고 glutamate 모두에 영향을 미치지 않았다.

본 실험의 결과를 통하여 부자이중탕과 보중익탕은 glutamate의 non-NMDA 수용체를 자극하는 것이 본 한약재의 중요한 치료 기전의 하나로 생각되어지며 부자이중탕과 보중익기탕은 억제성 및 흥분성 신경전달물질에 의하여 활성화되는 신경세포의 이온통로를 조절하고 있음을 알 수 있었다.

## VI. 참고문헌

1. Fambrough DM, Drachman DB, Satyamurti S. Neuromuscular junction in myasthenia gravis: Decreased acetylcholine receptors. Science. 1973;182:293~5.
2. Vincent A. Immunology of acetylcholine receptors in relation to myasthenia gravis. Physiol Rev. 1980;60:756~824.
3. 홍원식. 교합편찬: 정교황제내경소문. 서울:동양의학연구원 출판부. 1981:166~7.
4. 전국한외과대학 재활의학과학교실 편저. 동의재활의학과학. 서울:서원당. 1995:164~79.
5. 陳可冀 總編. 實用中醫藥臨床治療手冊. 북경:중국의약과기출판사. 1994:431~3.
6. Changeux JP, Revah F. The acetylcholine receptor molecule: allosteric sites and the ion channel. Trends Neurosci. 1987;10: 245~50.
7. 김창주, 김연정, 정성현, 이충열, 류재환, 이혜정. 附子理中湯과 補中益氣湯에 의한 이온전류와 nicotinic acetylcholine 수용체. 동의생리

- 학회지. 1999;14:35~43.
8. Macdonald L, Olsen RW. GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Ann Rev Neurosci.* 1994;17: 569~602.
  9. Peng YB, Lin QL, Willis WD. Effects of GABA and glycine receptor antagonists on the activity and PAG-induced inhibition of rat dorsal horn neurons. *Brain Res.* 1996;736:189~201.
  10. Maione S, Marabese I, Sca Rossi F, Berrino L, Palazzo E, Trabace L, Rossi F. Effects of persistent nociception of periaqueductal gray glycine release. *Neuroscience.* 2000;97:311~6.
  11. Chen L, Huang L-YM. Sustained potentiation of NMDA receptor-mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a  $\mu$  opioid. *Neuron.* 1991;7:319~26.
  12. Kim CJ, Rhee JS, Akaike N. Modulation of high-voltage activated Ca<sup>2+</sup> channels in the rat periaqueductal gray neurons by  $\mu$ -type opioid agonist. *J Neurophysiol.* 1997;77:1418~24.
  13. 채병윤. 중증근무력증에 대한 임상적 연구. 대한한의학회지. 1996;17:190~211.
  14. Edmonds B, Gibb AJ, Colquhoun D. Mechanism of activation of glutamate receptors and time course of excitatory synaptic currents. *Ann Rev Physiol.* 1995;57:495~519.
  15. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor—still lethal after eight years. *Trends Neurosci.* 1995;18:57~8.
  16. Rubio I, Torres M, Miras-Portugal MT, Sanchez-Prieto J. Ca<sup>2+</sup>-independent release of glutamate during in vitro anoxia in isolated nerve terminals. *J Neurochem.* 1991;57:1159~64.
  17. Seeburg PH. The molecular biology of glutamate receptor channel. *Trend Neurosci.* 1993;16:359~65.
  18. Ascher P, Nowak L. The role of divalent cations in the *N*-methyl-D-aspartate responses of the mouse central neurons in culture. *J Physiol.* 1988;399: 247~66.
  19. Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA responses in culture mouse brain neurons. *Nature.* 1987; 325:529~31.
  20. 江克明,包明蕙 편저. 簡明方劑辭典, 상해: 상해과학기술출판사. 1989:569~99.
  21. Cagnoli CM, Kharlamov E, Atabay C, Uz T, Manev H. Apoptosis induced in neuronal cultures by either the phosphatase inhibitor okadaic acid or the kinase inhibitor staurosporine is attenuated by isoquinolinesulfonamides H~7, H~8 and H~9. *J Mol Neurosci.* 1996;7:65~76.