

보기, 보양, 온리약의 전처치가 glutamate current에 미치는 영향

Effect of *Bogi*, *Boyang*, *Onri* herbs pretreatment on glutamate ion current

김창주*, 김연정*, 김현배*, 김이화**, 이충열***

1. 서론

이 실험은 한의학에서 보기(補氣), 보양(補陽), 온리약(溫裏藥)으로 분류하고 있는 약물들의 작용상 차이를 객관적으로 검증해 보기 위해 계획되었다.

이전 연구에서 보기, 보양, 온리약 등 흥분성 약물이 유발하는 이온전류에는 억제성 약물과는 달리 Ca^{2+} 전류가 포함되어 있음이 밝혀진바 있다¹⁾²⁾. 그러나 신경계에서 흥분성 작용을 하는 신경전달물질에는 Ca^{2+} 외에도 glutamate와 acetylcholine이 있는 만큼 흥분성 약물의 작용에 대한 보다 구체적인 연구를 위해서는 이들 신경전달물질과의 상관성을 규명하는 것이 필요하다고 생각된다. 이 실험에서는 이들 중 glutamate current에 대한 보기, 보양, 온리약의 작용을 전

위고정하에서 nystatin-perforated patch clamp로 규명하고자 하였다.

지금까지의 연구에서 한약재에 의해 유발된 이온전류는 그 농도가 1mg/ml 이상의 고농도에서 기록되었다¹⁾²⁾. 이러한 방법은 한약재에 의해서 유발되는 이온전류의 특성을 연구할 때는 유용할 수 있겠으나 이것을 생체 내에 실제 한약재를 투여했을 때 나타나는 현상이라고 보기는 힘들다. 따라서 이 실험에서는 방법을 달리하여 약물을 이온전류를 유발시키지 않는 저농도(1mg/ml 미만)로 일정 시간동안 신경세포에 투여하고 이 때 이들 약물이 흥분성 신경전달물질인 glutamate에 의해 유발된 이온전류에 어떠한 영향을 미치는지 비교 실험하였으며 또 보기, 보양, 온리약에 의하여 활성화되는 이온전류에 대한 이차전령인 cyclic AMP-protein kinase system의 조절작용을 연구하였다.

이 실험에서 보기약으로는 인삼, 황기, 보양약으로는 녹용, 육종용, 온리약으로는 부자, 건강을 선정하여 실험하였다.

* : 경희대학교 의과대학 생리학교실

** : 세명대학교 한의과대학 경혈학교실

*** : 경원대학교 한의과대학 생리학교실

* 이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음

II. 실험재료 및 방법

1. 중심회백질 신경세포의 분리

중심회백질 신경세포는 다음과 같은 방법으로 분리하였다³¹⁴⁾. 태어난 지 10일에서 15일 되는 Sprague-Dawley 흰쥐를 Zoletil로 마취 후 뇌를 꺼내어 microslicer(DSK, model DTK-1000, Japan)를 사용하여 400 μ m 두께로 slices를 만들었다. 중심회백질(Periaqueductal gray, PAG) 신경세포가 포함된 slice를 1mg/6ml 농도의 pronase로 30-40분간 32 $^{\circ}$ C에서 효소처리 후 이어서 1mg/6ml 농도의 thermolysin으로 동일한 조건으로 10분간 효소처리 하였다. 효소처리 후 slices는 incubation solution에서 5% CO₂-95% O₂ 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.

2. 용액

이 실험에 사용된 incubation solution의 조성은 다음과 같다. (mM): NaCl 124, KCl 5, KH₂PO₄ 12, MgSO₄ 13, NaHCO₃ 26, 그리고 glucose 10. 이 용액의 pH는 5% CO₂-95% O₂의 혼합 기체로 bubbling 하여 7.4가 유지되게 하였다.

이 실험에 사용된 standard solution의 조성은 다음과 같다. (mM): NaCl 150, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, glucose 10, 그리고 N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES). 이 용액의 pH는 tris-hydroxymethyl-aminomethane(Tris-base)를 이용하여 7.4가 유지되게 하였다.

Patch pipette에 사용되는 internal solution(mM)은 KCl 150, HEPES 10, 그리고

nystatin 200 μ g/ml로 구성되어 있으며 internal solution의 pH는 Tris-base를 이용하여 7.2로 유지하였다.

3. 약제

이 실험에서 보기약으로는 인삼(Ginseng radix)와 황기(Astragali radix)를, 보양약으로는 녹용(Cervi cornu)와 육종용(Boshniakiae herba)를 그리고 보기약으로는 부자(Aconiti tuber)와 건강(Zingiberis rhizoma)를 선정 사용하였다. 한약재는 시중에서 구입하여 사용하였으며 한약재는 증류수로 추출 농축한 후 -70 $^{\circ}$ C에서 냉동 보관 후 사용하였고 실험에서 모든 한약재의 희석은 standard solution을 사용하였다. Glutamate 수용체 길항제에 대한 실험에서는 Mg²⁺을 제거한 standard solution을 사용하였다.

이 실험에 사용된 시약은 다음과 같다. Zoletil은 Vibac사[France] 제품을 구입하였고, pronase, thermolysin, nystatin, glycine, staurosporin 그리고 그 외 모든 시약은 Sigma사 [USA]를 사용하였다. 약제는 'Y-tube' method로 투여하였으며³¹⁴⁾ 이 방법은 10-20 ms내에 신경세포 주위의 용액을 교체할 수 있다.

4. 전류의 측정

전류의 측정은 nystatin perforated patch recording 방법을 사용하였으며 patch-pipette은 외경이 1.5 mm인 glass capillaries를 이용하여 two stage puller(PB-7, Narishige, Japan)로 만들었다. 이온전류의 흐름은 patch clamp amplifier(EPC-7, List-Electronic, Germany)로 측정하였으며, storage oscilloscope(HS-5100A, Iwatsu, Japan)로 관찰하였으며 동시에 thermal-head pen recorder(Nippondenki San-ei, RECTI-HORIZ-8K 21)로 기록하였다.

측정된 값은 means \pm standard error of mean (S.E.M)로 계산하였고 Student's t test로 통계 처리하였다. 모든 실험은 실온(20-22 $^{\circ}$ C)에서 진행되었다.

실험은 먼저 한약재에 의하여 유발되는 이온전류의 크기가 보기, 보양, 온리약을 구별하는 지표가 될 수 있는지를 살펴보기 위해 $10^{-5}M$ 의 glycine을 투여했을 때 기록되는 내향전류의 크기를 대조군으로 하고 이를 각 한약재를 투여했을 때 기록되는 전류의 크기와 비교하였다.

다음 glutamate를 단일 신경세포에 투여했을 때 기록되는 이온전류를 대조군으로 삼고 여기에 다 한약재를 2분 동안 전처치한 후의 glutamate에 의한 이온전류의 변화를 2분 간격으로 기록하였다.

마지막으로 cyclic AMP에 의하여 활성화되는 protein kinase를 억제하였을 때 보기, 보양, 온리약에 의하여 활성화되는 이온통로의 변화를 살펴보기 위해 protein kinase 억제제인 staurosporin을 30초간 전처치한 후 각 한약재에 의해 유발된 이온전류의 변화를 관찰하였다.

III. 실험결과

1. Glycine과 비교한 보기, 보양, 온리약에 의하여 유발된 이온전류

한약재를 단일 신경세포에 투여했을 때 모든 한약재에서 내향전류가 기록되었다.

중심회백질 단일신경세포에 $10^{-5}M$ 의 glycine을 투여하여 기록되는 이온전류의 크기를 대조군으로 하였을 때 3mg/ml의 인삼 투여시에는 $10^{-5}M$ 의 glycine 투여시 기록되는 이온전류의 $122.9 \pm 11.4\%$ (n=10, p <0.01)에 해당하는 전류가 기록되었고 3mg/ml의 황기 투여시에는 $217.6 \pm 25.1\%$ (n=5, p <0.01)에 해당하는 전류가 기록되었다.

중심회백질 단일신경세포에 $10^{-5}M$ 의 glycine을 투여하여 기록되는 이온전류의 크기를 대조군으로 하였을 때 3mg/ml의 녹용 투여시에는 $10^{-5}M$ 의 glycine 투여시 기록되는 이온전류의 $275.4 \pm 17.7\%$ (n=5, p <0.01)에 해당하는 전류가 기록되었고 3mg/ml의 육종용 투여시에는 $64 \pm$

7.84% (n=14 p <0.01)에 해당하는 전류가 기록되었다.

중심회백질 단일신경세포에 $10^{-5}M$ 의 glycine을 투여하여 기록되는 이온전류의 크기를 대조군으로 하였을 때 3mg/ml의 부자 투여시에는 $10^{-5}M$ 의 glycine 투여시 기록되는 이온전류의 $216.4 \pm 22.2\%$ (n=7, p <0.01)에 해당하는 전류가 기록되었고 3mg/ml의 건강 투여시에는 $136.8 \pm 12.2\%$ (n=7 p <0.01)에 해당하는 전류가 기록되었다.

이 실험에서는 $10^{-5}M$ 의 glycine에 의하여 유발되는 이온전류와 한약재에 의하여 유발되는 이온전류의 크기를 비교하였을 때 녹용 > 황기 > 부자 > 건강 > 인삼 > 육종용의 순으로 나타났다.

2. 보기약의 전 처치가 glutamate에 의하여 유발되는 이온전류에 미치는 영향

Glutamate를 단일 신경세포에 투여하여 기록되는 이온전류를 대조군으로 하여 인삼 및 황기 보기약으로 전처치했을 때 glutamate에 의한 이온전류의 변화를 2분 간격으로 기록한 결과는 다음과 같다.

$10^{-5}M$ 의 glutamate에 의하여 유발되는 이온전류는 인삼 0.01mg/ml으로 2분간 전 처치 즉시는 대조군의 0.975 ± 0.012 (n=7, p <0.01), 2분 뒤에는 0.953 ± 0.043 (n=7, p <0.01), 4분 뒤에는 0.947 ± 0.068 (n=4, p <0.01), 6분 뒤에는 0.909 ± 0.086 (n=7, p <0.01), 8분 뒤에는 0.857 ± 0.095 (n=7, p <0.01)로 그리고 10분 뒤에는 0.857 ± 0.020 (n=7, p <0.01)로 감소되었다.

$10^{-5}M$ 의 glutamate에 의하여 유발되는 이온전류는 황기 0.01mg/ml으로 2분간 전 처치 즉시는 대조군의 0.906 ± 0.055 (n=6, p <0.01), 2분 뒤에는 0.828 ± 0.037 (n=7, p <0.01), 4분 뒤에는 0.850 ± 0.097 (n=6, p <0.01), 6분 뒤에는 0.854 ± 0.112 (n=6, p <0.01), 8분 뒤에는 0.838 ± 0.134 (n=5, p <0.01)로 그리고 10분 뒤에는 0.827 ± 0.129 (n=5, p <0.01)로 감소되었다.

3. 보양약의 전 처치가 glutamate에 의하여 유발되는 이온전류에 미치는 영향

10^{-5} M의 glutamate에 의하여 유발되는 이온전류는 녹용 0.01mg/ml으로 2분간 전 처치 즉시는 대조군의 0.984 ± 0.021 (n=6, p < 0.01), 2분 뒤에는 0.913 ± 0.031 (n=6, p < 0.01), 4분 뒤에는 0.808 ± 0.053 (n=6, p < 0.01), 6분 뒤에는 0.8262 ± 0.0492 (n=5, p < 0.01), 8분 뒤에는 0.814 ± 0.037 (n=4, p < 0.01)로 그리고 10분 뒤에는 0.7257 ± 0.0356 (n=4, p < 0.01)로 감소되었다.

10^{-5} M의 glutamate에 의하여 유발되는 이온전류는 육종용 0.01mg/ml으로 2분간 전 처치 즉시는 대조군의 0.994 ± 0.022 (n=7, p < 0.01), 2분 뒤에는 0.905 ± 0.024 (n=7, p < 0.01), 4분 뒤에는 0.887 ± 0.024 (n=7, p < 0.01), 6분 뒤에는 0.8327 ± 0.0246 (n=6, p < 0.01), 8분 뒤에는 0.7955 ± 0.0456 (n=6, p < 0.01)로 그리고 10분 뒤에는 0.8034 ± 0.0543 (n=5, p < 0.01)로 감소되었다.

4. 온리약의 전 처치가 glutamate에 의하여 유발되는 이온전류에 미치는 영향

10^{-5} M의 glutamate에 의하여 유발되는 이온전류는 부자 0.01mg/ml으로 2분간 전 처치 즉시는 대조군의 0.996 ± 0.015 (n=6, p < 0.01), 2분 뒤에는 0.913 ± 0.021 (n=6, p < 0.01), 4분 뒤에는 0.856 ± 0.021 (n=6, p < 0.01), 6분 뒤에는 0.856 ± 0.030 (n=6, p < 0.01), 8분 뒤에는 0.831 ± 0.0425 (n=5, p < 0.01)로 그리고 10분 뒤에는 0.8004 ± 0.0467 (n=5, p < 0.01)로 감소되었다.

10^{-5} M의 glutamate에 의하여 유발되는 이온전류는 건강 0.01mg/ml으로 2분간 전 처치 즉시는 대조군의 0.946 ± 0.019 (n=6, p < 0.01), 2분 뒤에는 0.893 ± 0.033 (n=6, p < 0.01), 4분 뒤에는 0.859 ± 0.035 (n=6, p < 0.01), 6분 뒤에는 0.8047 ± 0.0505 (n=6, p < 0.01), 8분 뒤에는 0.7813 ± 0.0553 (n=6, p < 0.01)로 그리고 10분 뒤에는 0.7704 ± 0.0652 (n=5, p < 0.01)로 감소되었다.

5. Protein kinase 억제제 staurosporin이 보기약에 의하여 유발되는 이온전류에 미치는 영향

보기약인 인삼에 의하여 유발된 이온전류는 10^{-7} M의 staurosporin으로 30초간 전 처치시 대조군의 $90.10 \pm 5.13\%$ (n=4, p < 0.01)에 해당하는 이온전류가 나타났으며 2분 뒤에는 $89.65 \pm 8.64\%$ (n=4, p < 0.01), 4분 뒤에는 $81.05 \pm 11.17\%$ (n=4, p < 0.01), 6분 뒤에는 $77.38 \pm 12.79\%$ (n=4, p < 0.01) 8분 뒤에는 $76.97 \pm 11.48\%$ (n=4, p < 0.01) 그리고 10분 뒤에는 $71.87 \pm 10.48\%$ (n=4, p < 0.01)에 해당하는 이온전류가 기록되었다.

황기에 의하여 유발되는 이온전류는 10^{-7} M의 staurosporin으로 30초간 전 처치시 대조군의 $103.93 \pm 6.04\%$ (n=4, p < 0.01)에 해당하는 이온전류가 나타났으며 2분 뒤에는 $108.90 \pm 8.97\%$ (n=4, p < 0.01), 4분 뒤에는 $112.40 \pm 12.40\%$ (n=4, p < 0.01), 6분 뒤에는 $124.77 \pm 17.91\%$ (n=4, p < 0.01) 8분 뒤에는 $125.63 \pm 22.40\%$ (n=4, p < 0.01) 그리고 10분 뒤에는 $122.33 \pm 25.95\%$ (n=4, p < 0.01)에 해당하는 이온전류가 기록되었다.

이 실험에서 staurosporin에 의하여 이온통로가 탈인산화(dephosphorylation) 되면 인삼에 의하여 활성화되는 이온통로는 활성도가 시간이 지남에 따라 감소되는 반면 황기에 의하여 활성화되는 이온통로는 증가되었다.

6. Protein kinase 억제제 staurosporin이 보양약에 의하여 유발되는 이온전류에 미치는 영향

보양약인 녹용에 의하여 유발된 이온전류는 10^{-7} M의 staurosporin으로 30초간 전 처치시 대조군의 $103.90 \pm 7.06\%$ (n=4, p < 0.01)에 해당하는 이온전류가 나타났으며 2분 뒤에는 $108.77 \pm 9.06\%$ (n=4, p < 0.01), 4분 뒤에는 $114.47 \pm$

12.38%(n=4, p <0.01), 6분 뒤에는 131.30±8.44%(n=4, p <0.01) 8분 뒤에는 134.43±20.80%(n=4, p <0.01) 그리고 10분 뒤에는 141.33±20.73%(n=4, p <0.01)에 해당하는 이온전류가 기록되었다.

육중용에 의하여 유발되는 이온전류는 10^{-7} M의 staurosporin으로 30초간 전처치시 대조군의 $108.30 \pm 15.00\%$ (n=4, p <0.01)에 해당하는 이온전류가 나타났으며 2분 뒤에는 $113.10 \pm 24.50\%$ (n=4, p <0.01), 4분 뒤에는 $108.90 \pm 27.30\%$ (n=4, p <0.01), 6분 뒤에는 $90.90 \pm 20.20\%$ (n=4, p <0.01) 8분 뒤에는 $77.30 \pm 4.00\%$ (n=4, p <0.01) 그리고 10분 뒤에는 $77.0 \pm 4.20\%$ (n=4, p <0.01)에 해당하는 이온전류가 기록되었다.

이 실험에서 staurosporin에 의하여 이온통로가 탈인산화(dephosphorylation) 되면 녹용에 의하여 활성화되는 이온통로는 활성도가 시간이 지남에 따라 증가되는 반면 육중용에 의하여 활성화되는 이온통로의 활성도는 증가하였다가 급격히 감소되었다.

7. Protein kinase 억제제 staurosporin이 온리약에 의하여 유발되는 이온전류에 미치는 영향

온리약인 부자에 의하여 유발된 이온전류는 10^{-7} M의 staurosporin으로 30초간 전처치시 대조군의 $110.05 \pm 1.15\%$ (n=4, p <0.05)에 해당하는 이온전류가 나타났으며 2분 뒤에는 $104.0 \pm 4.5\%$ (n=4, p <0.05), 4분 뒤에는 $124.0 \pm 15.2\%$ (n=4, p <0.05), 6분 뒤에는 $119.7 \pm 19.7\%$ (n=4, p <0.05) 8분 뒤에는 $118.5 \pm 24.4\%$ (n=4, p <0.05) 그리고 10분 뒤에는 $112.87 \pm 23.7\%$ (n=4, p <0.05)에 해당하는 이온전류가 기록되었다.

건강에 의하여 유발되는 이온전류는 10^{-7} M의 staurosporin으로 30초간 전처치시 대조군의 $100.00 \pm 0.04\%$ (n=4, p <0.01)에 해당하는 이온전

류가 나타났으며 2분 뒤에는 $91.80 \pm 2.72\%$ (n=4, p <0.01), 4분 뒤에는 $90.47 \pm 2.98\%$ (n=4, p <0.01), 6분 뒤에는 $78.50 \pm 9.72\%$ (n=4, p <0.01), 8분 뒤에는 $61.40 \pm 12.96\%$ (n=4, p <0.01) 그리고 10분 뒤에는 $47.20 \pm 13.60\%$ (n=4, p <0.01)에 해당하는 이온전류가 기록되었다.

이 실험에서 staurosporin에 의하여 이온통로가 탈인산화(dephosphorylation) 되면 부자에 의하여 활성화되는 이온통로는 활성도가 증가되었으나 건강에 의하여 활성화되는 이온통로의 활성도는 급격히 감소되었다.

IV. 토의

한의학의 기미론은 寒熱溫涼의 四氣와 酸苦甘辛鹹의 五味로 한약의 효능을 상당부분 설명하고 있다. 이 중 사기는 한열의 편차에 따른 구분으로서 사기중 온을 열에 량을 한에 포함시키면 크게 한성(寒性)과 열성(熱性)의 二氣로 요약될 수 있다. 이렇게 생각할 때 한의학의 보기, 보양, 온리약은 모두 열성약의 범주에 속한다. 하지만 같은 열성약이라고 해서 인체에서 모두 동일한 작용을 하는 것은 아니다. 보기, 보양, 온리약은 모두 열성약의 범주에 속하지만 서로 다른 인체의 병증을 개선하기 위해 운용된다. 그러므로 한의학에서의 약물 분류가 실제상의 어떤 구체적인 작용과 연결되어 있는 의미 있는 분류라면 이들 약물들의 작용 사이에도 어떤 차이가 나타나야 한다. 이 실험은 한의학의 이론을 객관화하는 간접적인 방법으로 보기, 보양, 온리약을 대상으로 하여 이들 약물들의 작용상 차이를 객관적으로 드러낼 수 있는 지표가 있는지를 찾아보는데 목적이 있다.

앞선 연구에서 한약을 크게 흥분성(熱性)과 억제성(寒性)으로 이대별(二大別)하고 이들 약물이 단일신경세포에서 어떤 종류의 이온전류를 유발하는지 또 그 차이는 무엇인지를 조사한 바 있다. 그 결과 흥분성 한약재들은 Ca^{2+} 이온 전류를 나타내었으나 억제성 한약재들은 Ca^{2+} 이온 전류

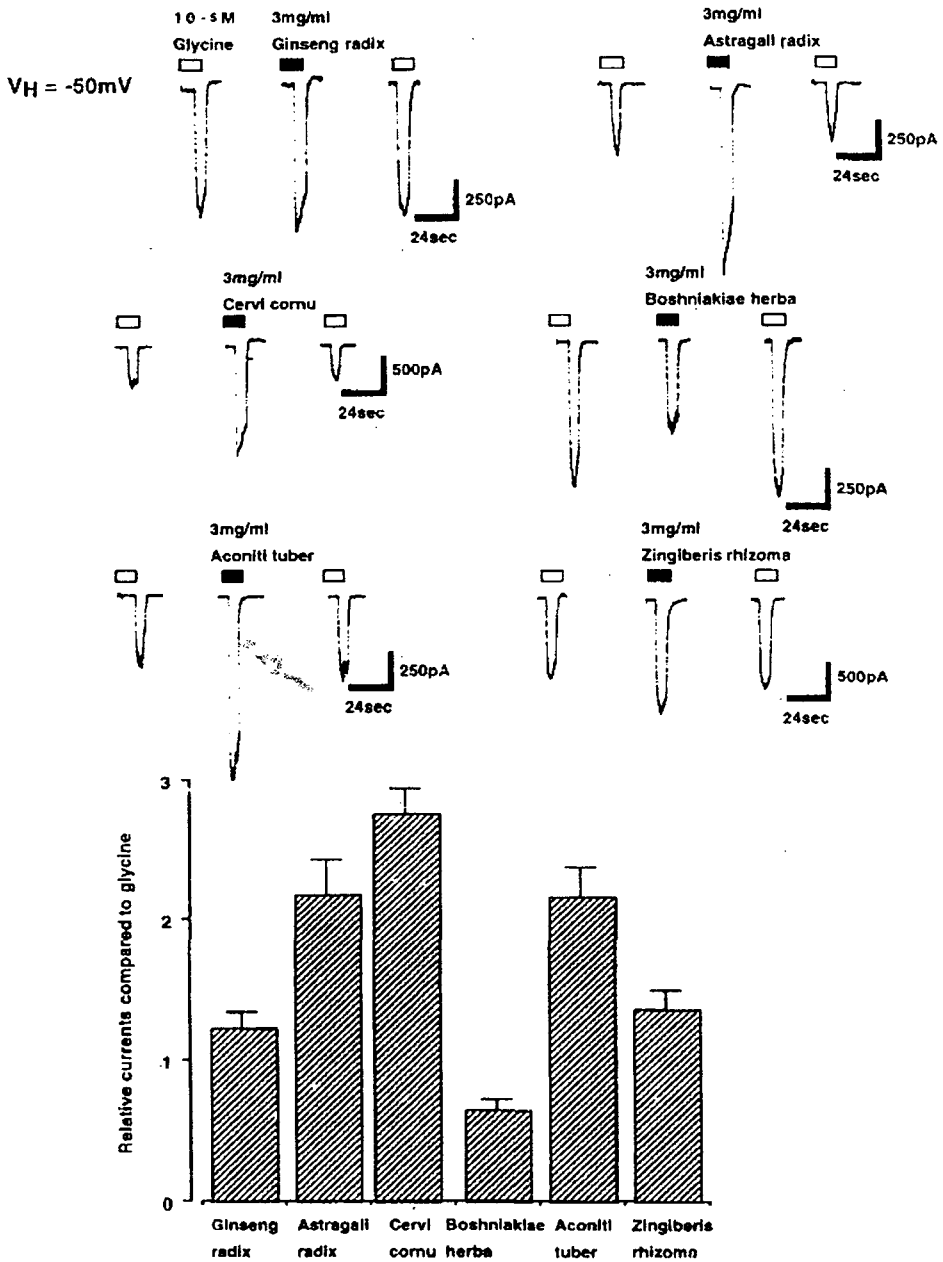


Figure 1. Ion currents activated by *Bogi*, *Boyang* and *Onri* herbs compared to glycine

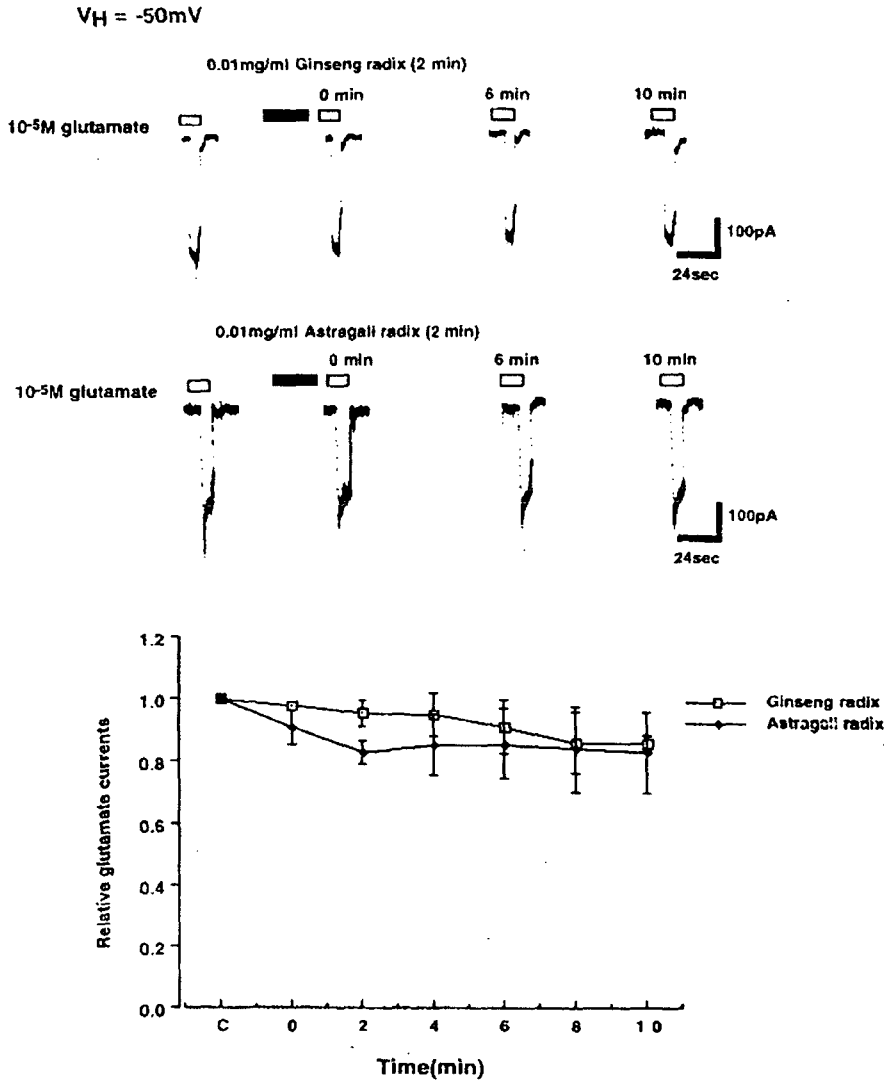


Figure 2. Effects of *Bogi* herbs pre-treatment on glutamate ion current

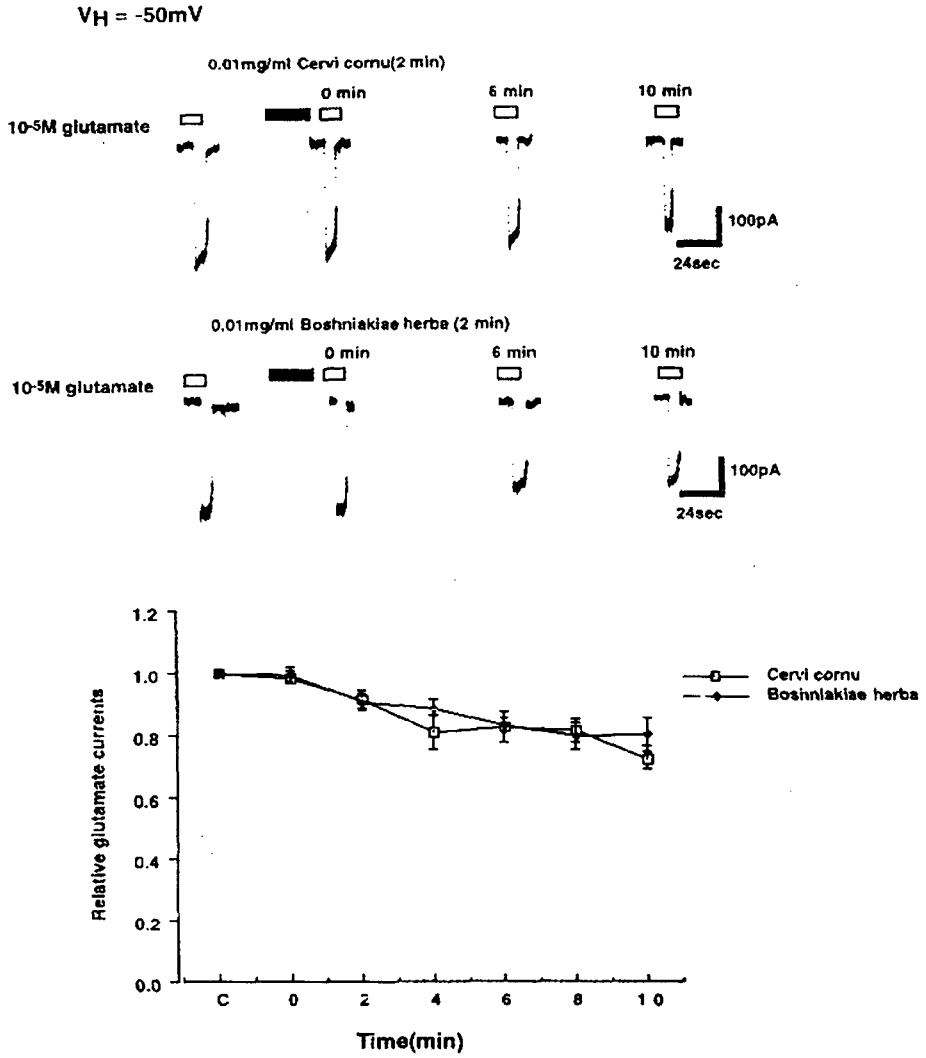


Figure 3. Effects of *Boyang* herbs pre-treatment on glutamate ion current

- 보기, 보양, 온리약의 전처치가 glutamate current에 미치는 영향 -

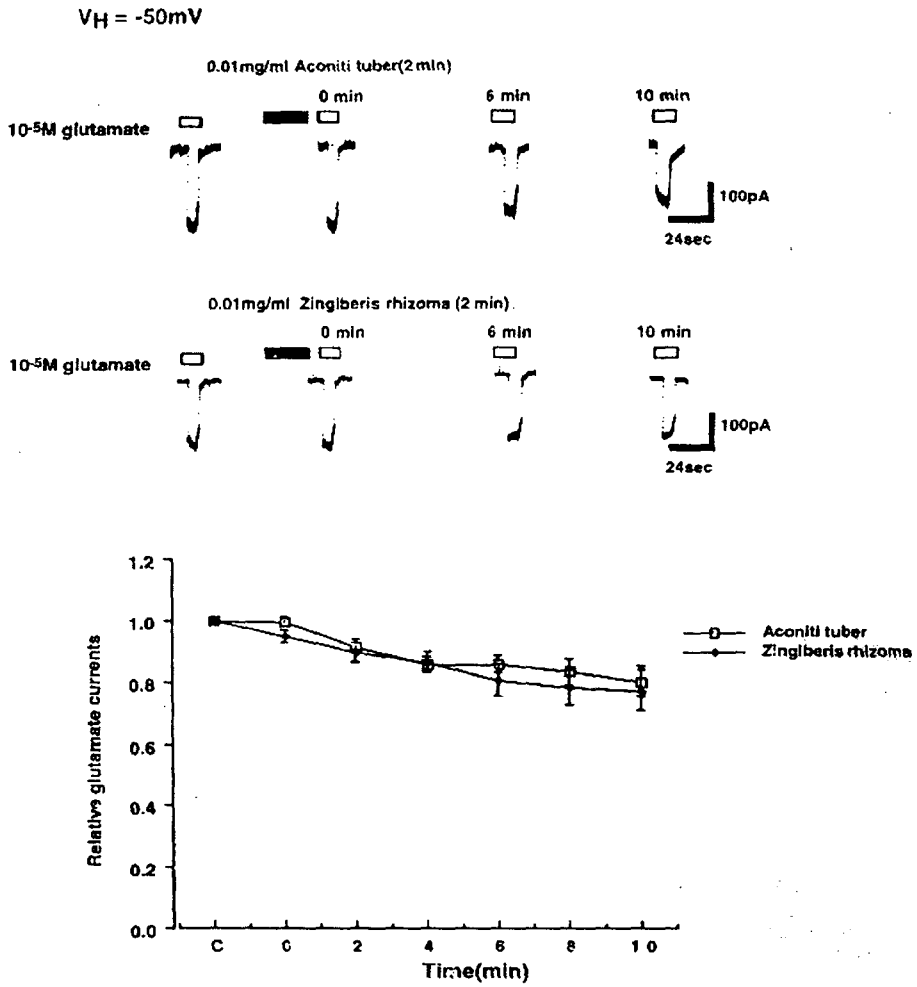


Figure 4. Effects of *Onri* herbs pre-treatment on glutamate ion current

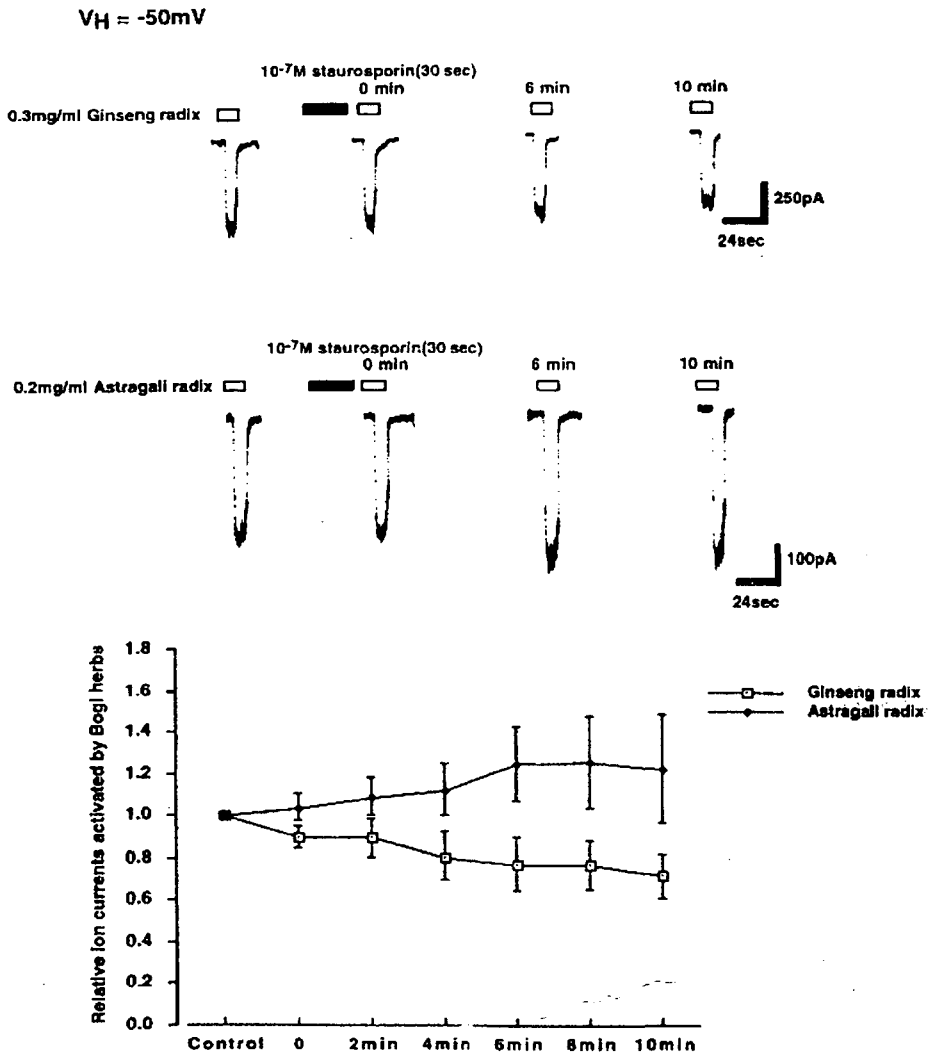


Figure 5. Effects of staurosporin on ion currents activated by *Bogi* herbs

- 보기, 보양, 온리약의 전처치가 glutamate current에 미치는 영향 -

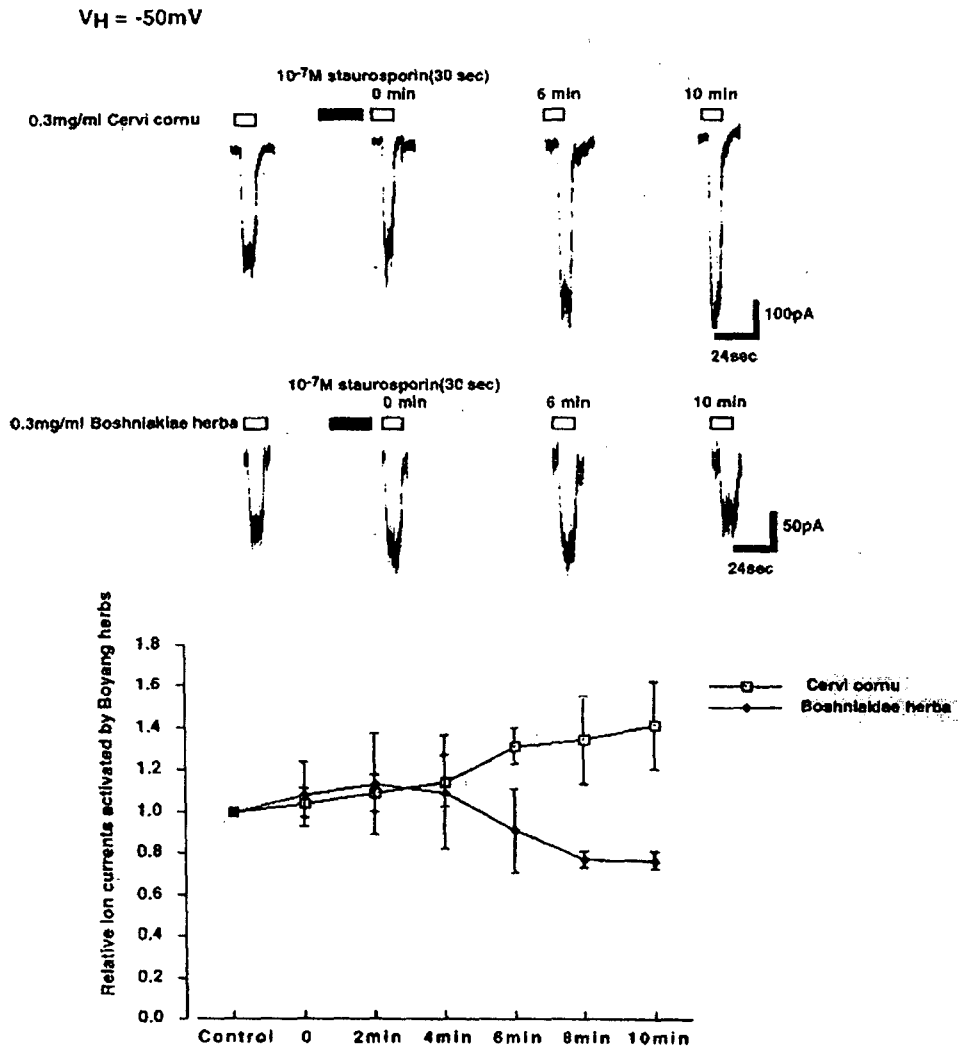


Figure 6. Effects of staurosporin on ion currents activated by *Boyang* herbs

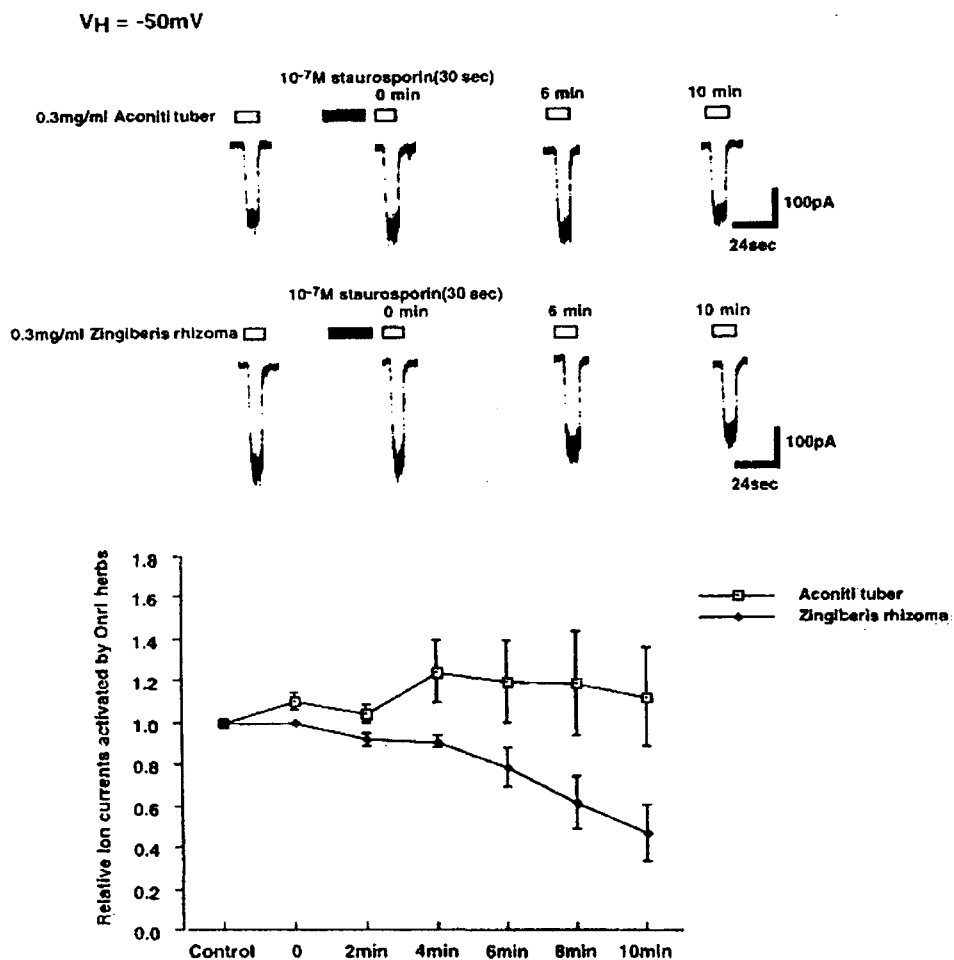


Figure 7. Effects of staurosporin on ion currents activated by *Onni* herbs

를 나타내지 않는다는 경향성이 관찰되었다¹⁾²⁾ 이것은 한의학의 사기이론에 따른 약물분류가 어느 정도 의미가 있다는 것을 보여주는 결과이다. 그러나 Ca^{2+} 이온 전류의 유무만 가지고 모든 흥분성 약물내에서의 보기, 보양, 온리 등 보다 세분된 분류에 속하는 약물들의 작용상 차이를 설명할 수 없다. 따라서 흥분성 약물의 세분된 작용 특성을 밝히기 위해서는 Ca^{2+} 와 함께 신경계에서 흥분성 작용을 하는 대표적인 신경전달물질인 glutamate나 acetylcholine에 대해서도 조사할 필요가 있으며, 또 이전의 연구에서 억제성 약물보다 흥분성 약물에서 신경의 안정화에 기여하는 Cl^{-} 이온전류가 더 많이 포함되어 있는 것으로 관찰된 만큼 흥분성 약물들의 작용상 차이가 억제성 신경전달물질과 관련된 작용도 조사할 필요가 있다.

이 실험에서는 이 중 보기, 보양, 온리약과 glutamate current와의 관계를 살펴보고, 또 cAMP-protein kinase와의 관계를 살펴 보았다.

실험은 먼저 한약재에 의하여 유발되는 이온전류의 크기가 보기, 보양, 온리약을 구별하는 지표가 될 수 있는지를 살펴보기 위해 $10^{-5}M$ 의 glycine을 투여했을 때 기록되는 내향전류의 크기를 대조군으로 하고 이를 각 한약재를 투여했을 때 기록되는 전류의 크기와 비교하였다. 그 결과 녹용> 황기> 부자> 건강> 인삼> 육종용의 순으로 나타나 이온전류의 크기는 이들 약물의 구별에 별 의미가 없는 것으로 나타났다.

다음 glutamate를 단일 신경세포에 투여했을 때 기록되는 이온전류를 대조군으로 삼고 여기에 다 한약재를 2분 동안 전처치한 후의 glutamate에 의한 이온전류의 변화를 2분 간격으로 관찰하였다. 그 결과 이온전류를 유발시키지 않을 정도의 소량의 한약재로 전처치했을 때 glutamate에 의한 이온전류의 활성도는 모든 약물에서 시간에 따라 감소되는 것으로 나타났다.

Glutamate는 척추동물 중추신경계의 많은 synapse에 존재하며 막전위를 탈분극 시켜 흥분을 일으키는 물질로 알려져 있다. Glutamate

receptor는 ionotropic glutamate receptor와 metabotropic glutamate receptor로 크게 분류되며, ionotropic glutamate receptor는 receptor를 활성화시키는 물질에 따라 크게 NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor와 non-NMDA receptor로, non-NMDA receptor는 다시 AMPA와 kainate로 나뉘어진다. Metabotropic glutamate receptor는 G-protein을 통해 다양한 2nd messenger와 연결되어 세포내 작용을 나타내는 receptor로 ionotropic receptor가 신경계에서 glutamate의 빠른 흥분성 synaptic response를 중개한다면, metabotropic receptor는 보다 느리고 조절적인 작용을 중개한다⁶⁾.

이 실험에서 한약재의 전처치에 의해 glutamate에 의한 이온전류가 감소하는 것은 한약재에 의해 glutamate receptor의 불활성화가 일어났기 때문으로 생각되며 그 기전은 이 실험만으로는 정확하게 알 수 없다.

마지막으로 cyclic AMP에 의하여 활성화되는 protein kinase를 억제하였을 때 보기, 보양, 온리약에 의하여 활성화되는 이온통로의 변화를 살펴보기 위해 staurosporin을 신경세포에 전처치하여 세포내 cAMP-protein kinase에 의한 인산화 작용을 억제한 결과 황기와 녹용 그리고 부자에 의하여 활성화되는 이온통로의 활성도는 증가되었으며 육종용에 의하여 활성화되는 이온통로의 활성도는 증가 후 감소되었고 인삼과 건강에 의하여 활성화되는 이온통로의 활성도는 감소되었다.

신경전달물질에 의한 이온통로의 조절은 GTP-binding protein (G-protein)을 매개로 한 직접조절과 cyclic AMP, Ca^{2+} , diacylglycerol 그리고 NO 등 세포내 이차전령에 의한 간접조절의 두 가지 방법이 있다. G-protein을 통한 직접조절에는 voltage dependent K^{+} channel과 voltage dependent Ca^{2+} channel 등⁷⁾이 있으며, 세포내 이차전령에 의한 간접조절은 이차전령 역할을 하는 물질들의 세포내 농도가 높아지면 protein kinase를 활성화시키고 이에 의해 기질 단백질에 인산화가 일어나 각종 이온통로의 활성도가 조절되는

방식이다. 이차전령물질에 의해 활성화되는 protein kinase는 cAMP의존성의 protein kinase A, cGMP 의존성의 protein kinase II 및 protein kinase C 등이 있다.⁸⁾

Cyclic AMP는 protein kinase를 활성화시켜 이온통로의 활성도를 조절하게 된다.⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾ 그러나 protein kinase A 또는 protein kinase C에 의한 이온통로 조절에 대해서는 아직 많은 논란이 있는데 특히 이온통로가 인산화될 경우 활성도가 억제된다는 보고가 있는 반면 증가된다는 보고도 있다.

즉, 포유동물의 뇌에 존재하는 가장 중요한 억제성 신경전달물질인 GABA는 chloride ion channel을 형성하는 GABA_A receptor에 결합하게 되는데 GABA_A receptor는 cAMP-dependent protein kinase에 의하여 인산화되면 channel opening frequency가 감소되어 GABA receptor 반응이 감소된다.¹⁰⁾ 또한 rat의 ventromedial hypothalamic neurones에서 cyclic AMP는 GABA와 glycine에 의한 chloride current를 감소시키는데 이는 protein kinase A를 매개로 한 인산화 작용에 의한 것이라고 보고되었다.¹¹⁾ 또한 noradrenaline은 rat의 sacral dorsal commissural nucleus의 glycine response를 증가시키는데, noradrenaline에 의하여 alpha2-adrenoceptor가 활성화되면 pertussis toxin-sensitive G-protein을 매개로 adenylate cyclase가 억제되어 cAMP의 생성이 감소되고 이것은 protein kinase A의 활성도를 감소시켜 glycine에 의한 Cl⁻ current를 감소시킨다.¹²⁾ 척추동물의 rod photoreceptors는 cyclic nucleotide-gated(CNG) channel에 의하여 빛의 전달이 조절되는데 이 이온 통로는 cGMP에 민감하며 Ca²⁺/calmodulin과 같은 세포내 전령에 의하여 조절된다. Bovine의 rod CNG channel의 alpha subunit에는 tyrosine에 의한 인산화 부위가 있어 세포막에 있는 tyrosine kinase와 phosphatase에 의하여 CNG가 조절되는데 이 부위가 탈인산화 되면 channel이 열리게 되고 인산화 되면 channel이 닫히게 된다.¹³⁾

반대로 증가된다는 보고로는 serotonin은 L-type Ca channel을 증가시키는데 이는 cAMP에 의하여 인산화작용이 L-type Ca channel을 up-regulation시킴으로 나타난다고 하였고¹⁴⁾ 포유동물의 내이 hair cell의 fast activating potassium current는 protein kinase A의 조절을 받는데 PKA 활성화제인 8-bromo-cAMP는 outwardly rectifying current의 amplitude를 증가시키고 PKA 억제제인 H-89에 의하여 감소되었다. 따라서 PKA는 fast activating potassium current를 조절함을 나타내었다.¹⁵⁾ Rat의 ventral tegmental area에서 cAMP-dependent protein kinase A는 glycine activated Cl⁻ current를 조절하는데 PKA activator인 8-br-cAMP는 IGly를 증가시키는 반면 PKA inhibitor인 H-89는 IGly를 억제시켰다고도 하였다.¹⁶⁾

한약재는 많은 성분이 존재하는 복합성분물질로서 한약재를 신경세포에 투여했을 경우 단일성분과는 달리 다양한 기전에 의해 다양한 이온 통로를 동시에 활성화시킬 것이다. 따라서 한약재에 의하여 활성화되는 이온통로의 인산화는 여러 가지 이온통로가 동시에 조절되므로 이온통로의 인산화 결과도 다양하게 나타날 수 있다. 이 실험에서 탈인산화에 의하여 활성도가 증가되는 이온통로들은 대체적으로 glycine과 비교했을 때 이온전류가 크게 나타난 것인 반면 활성도가 급격히 감소된 것들은 이온전류가 작게 기록된 것들이다. 그러나 보기, 보양, 온리약의 구분에 따른 차이는 없었다.

IV. 결론

보기, 보양, 온리약이 glutamate 전류에 미치는 영향과 보기, 보양, 온리약에 의하여 활성화되는 이온전류에 대한 cAMP-protein kinase의 조절작용을 nystatin-perforated patch clamp로 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

I. 10⁻⁵M의 glycine에 의하여 유발되는 이온전류를 대조군으로 한약재에 의하여 유발되는 이온

전류의 크기를 비교하였을 시 녹용> 황기> 부자> 건강> 인삼> 육종용의 순으로 나타났다.

2. 이온전류를 유발시키지 않는 0.01mg/ml의 소량의 보기, 보양, 온리약으로 2분간 전처치했을 때 10^{-5} M의 glutamate에 의하여 활성화되는 이온전류의 활성도는 모두 시간에 따라 감소되었다.

3. Protein kinase 억제제인 10^{-7} M의 staurosporin으로 30초간 전처치했을 때 인삼에 의하여 활성화되는 이온통로는 활성도가 시간이 지남에 따라 감소되는 반면 황기에 의하여 활성화되는 이온통로는 증가되었다.

4. Protein kinase 억제제인 10^{-7} M의 staurosporin으로 30초간 전처치했을 때 녹용에 의하여 활성화되는 이온통로는 활성도가 시간이 지남에 따라 증가되는 반면 육종용에 의하여 활성화되는 이온통로의 활성도는 증가하였다가 급격히 감소되었다.

5. Protein kinase 억제제인 10^{-7} M의 staurosporin으로 30초간 전처치했을 때 부자에 의하여 활성화되는 이온통로는 활성도가 증가되는 반면 건강에 의하여 활성화되는 이온통로의 활성도는 급격히 감소되었다.

이상의 결과를 종합할 때 이온전류의 크기, 한약재를 전처치했을 때의 glutamate current의 변화, protein kinase에 의한 인산화를 억제했을 때의 반응에서 보기, 보양, 온리약의 구분에 따른 차이를 발견할 수 없었다. 차후 또 다른 흥분성 신경전달물질인 acetylcholine에 대한 연구를 진행한 후 보기, 보양, 온리약과 Ca^{2+} , glutamate, acetylcholine과의 관계를 종합할 때 최종적인 판단을 할 수 있을 것이다.

= Abstract =

Effect of Bogi, Boyang, Onri herbs pretreatment on glutamate ion current

Kim, Chang-Ju · Kim, Youn-Jung · Kim,

Hyun-Bae* · Kim, Ee-Hwa · Lee, Choong-Yeol*****

* Department of Physiology, College of Medicine, Kyung-Hee University, Seoul, Korea

** Department of Meridianology, College of Oriental Medicine, Se-Myung University, Jechon, Korea

*** Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyung-Won University, Sunghnam, Korea

The effects of Bogi, Boyang and Onri herbs on glutamate receptor, and the regulatory mechanism of cAMP-protein kinase on the ion currents activated by Bogi, Boyang and Onri herbs using nystatin-perforated patch clamp were investigated and the following results were obtained.

Ginseng radix and *Astragali radix*, *Cervi cornu* and *Boshniakiae herba*, and *Aconiti tuber* and *Zingiberis rhizoma* were chosen as Bogi, Boyang and Onri herbs respectively.

1. The ion currents activated by 10^{-5} M of glycine were used as controls. The magnitudes of the ion currents by the above named herbs were as follows; *Cervi cornu*>*Astragali radix*>*Aconiti tuber*>*Zingiberis rhizoma*>*Ginseng radix*>*Boshniakiae herba*.

2. The magnitudes of the ion currents by 10^{-5} M of glutamate pre-treated with 0.01mg/ml of Bogi, Boyang and Onri herbs were sharply decreased.

3. The activity of ion channels activated by Bogi herbs pre-treated with 10^{-7} M of staurosporin, an inhibitor of protein kinase, for thirty seconds was observed as the experiment proceeded.

Staurosporin brought about dephosphorylation of ion channels. Hence, while the activity of ion channels activated by *Ginseng radix* was decreased, the activity of ion channels activated by *Astragali radix* was increased, as time went by.

4. The activity of ion channels activated by Boyang herbs pre-treated with 10^{-7} M of staurosporin, an inhibitor of protein kinase and an dephosphorylating agent of ion channels, for thirty seconds was

investigated.

While the activity of ion channels activated by *Cervi cornu* was increased, the activity of ion channels activated by *Boshniakiae herba* was initially increased then sharply decreased.

5. The activity of ion channels activated by *Onni* herbs pre-treated with $10^{-7}M$ of staurosporin, an inhibitor of protein kinase and an dephosphorylating agent of ion channels, for thirty seconds was investigated.

While the activity of ion channels activated by *Aconiti tuber* was increased, that of ion channels activated by *Zingiberis rhizomal* sharply declined.

Key words: 보기약, 보양약, 온리약, glutamate, cyclic AMP, protein kinase

參考文獻

1. 이충열, 조선혜, 서종은, 한승호, 조영욱, 민병일, 김창주. 흰쥐 신경세포에서 억제성 및 흥분성 한 약제가 유발한 이온전류의 특성. 대한 한의학회 지19(2): 450-467, 1998
2. 조선혜, 김창주, 이충열. 흰쥐 신경세포에서 맥문 동과 부자에 의해 유발된 이온전류의 특성. 동의 생리 학회지 12(2):155-164, 1997
3. Kim CJ, Rhee JS, Akaike N. Modulation of high-voltage activated Ca^{2+} channels in the rat periaqueductal gray neurons by μ -type opioid agonist. J Neurophysiol 77:1418-1424, 1997
4. Min BI, Kim CJ, Rhee JS, Akaike N. Modulation of glycine-induced chloride current in acutely dissociated rat periaqueductal gray neurons by μ -opioid agonist, DAGO. Brain research 734:72-78, 1996
5. Edmonds B, Gibb AJ, Colquhoun D. Mechanism of activation of glutamate receptors and time course of excitatory synaptic currents. Ann rev Physiol 57:495-519, 1995
6. C. Hammond, Cellular and Molecular Neurobiology : Academic press. 1996 : 332
7. Yatani A. Ion channels that are directly regulated by G proteins. Cell Physiology 378-385, 1995, Academic press
8. 허인회, 안형수 외 편저, 신경전달물질 -기초와 임상-, 서울 : 신일상사, 1996 : 60
9. Agopyan N, Tokutomi N, Akaike N: Proten kinase A-mediated phosphorylation reduces only the fast desensitizing glycine current in acutely dissociated ventromedial hypothalamic neurons. Neuroscience 56:605-615, 1993
10. Porter NM, Twyman RE, Uhler MD, Macdonald RL: Cyclic AMP-dependent protein kinase decreases GABAA receptor current in mouse spinal neurons. Neuron 5:789-796, 1990.
11. Ren J, Ye JH, McArdle JJ: cAMP-dependent protein kinase modulation of glycine-activated chloride current in neurons freshly isolated from rat ventral tegmental area. Brain Res 811:71-78, 1998
12. Nabekura J, Xu TL, Rhee JS, Akaike N: Alpha2-adrenoceptor-mediated enhancement of glycine response in rat sacral dorsal commissural neurons. Neuroscience 89:29-41, 1999
13. Molokanova E, Maddox F, Luetje CW, Kramer RH: Activity-dependent modulation of rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channels mediated by phosphorylation of a specific tyrosine residue. J Neurosci 19:4786-4795, 1999
14. Lukyanetz EA, Kostyuk PG: Two distinct receptors operate the cAMP cascade to up-regulate L-type Ca channel. Pfluger's Arch 432:174-181, 1996
15. Jagger DJ, Ashmore JF: The fast activating potassium current, $I(K,f)$, guinea-pig inner hair cells is regulated by protein kinase A. Neurosci Lett 263:145-148, 1999