

흰쥐 신경세포에서 억제성 및 흥분성 한약재가 유발한 이온전류의 특성

이충열* · 조선헤* · 서종은* · 한승호** · 조영욱** · 민병일** · 김창주**

ABSTRACT

Characterization of ion current induced by inhibitory and excitatory herbs in rat periaqueductal gray neuron

Lee, Choong-Yeol* · Cho, Sun-Hye* · Seo, Jong-Eun* · Han, Seung-Ho** ·
Cho, Young-Wuk** · Min, Byung-Il** · Kim, Chang-Ju**

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

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

To research the characteristics of ion currents induced by inhibitory and excitatory herbs of oriental medicine, we used nystatin-perforated patch clamp technique under voltage clamp condition in periaqueductal gray neuron dissociated from Sprague-Dawley rat, 10-15 days old.

The results are as follows.

1. Ion current induced by 10mg/ml of Bupleuri Radix was inhibited $59.50 \pm 4.29\%$ by $10^{-4}M$ bicuculline ($p < 0.01$) but inhibition of $10.75 \pm 4.77\%$ by $10^{-4}M$ tubocurarine and $4.75 \pm 4.23\%$ by $10^{-4}M$ verapamil had no statistical significance ($p > 0.05$). So ion current induced by Bupleuri Radix revealed only GABA induced Cl^- current, not acetylcholine and Ca^{2+} current.

* 경원대학교 한의과대학 생리학교실

** 경희대학교 의과대학 생리학교실

- 이 논문은 한국한의학회 연구원의 '97 한의학 발전 연구지원사업에 의해 이루어진 것임.

2. Ion current induced by 20mg/ml of *Coptidis Rhizoma* was inhibited $47.20 \pm 7.88\%$ by 10^{-4} M bicuculline ($p < 0.01$) but $3.20 \pm 2.33\%$ inhibition by 10^{-4} M tubocurarine and $1.00 \pm 1.00\%$ inhibition by 10^{-4} M verapamil had no significance ($p > 0.05$). So ion current induced by *Coptidis Rhizoma* revealed only GABA induced Cl^- current, not acetylcholine and Ca^{2+} current.

3. Ion current induced by 20mg/ml of *Ecliptae Herba* was inhibited $55.00 \pm 4.92\%$ by 10^{-4} M bicuculline ($p < 0.01$), and also inhibited $15.00 \pm 4.26\%$ by 10^{-4} M tubocurarine ($p < 0.05$), but inhibition of $6.00 \pm 3.03\%$ by 10^{-4} M verapamil had no significance ($p > 0.05$). So ion current induced by *Ecliptae Herba* showed GABA activated Cl^- current and acetylcholine activated cation current, not Ca^{2+} current

4. Ion current induced by 5mg/ml of *Liriopis Tuber* was inhibited $15.20 \pm 4.57\%$ by 10^{-4} M bicuculline ($p < 0.05$) and also inhibited $14.00 \pm 3.00\%$ by 10^{-4} M tubocurarine ($p < 0.05$), but inhibition of $5.20 \pm 4.80\%$ by 10^{-4} M verapamil had no significance ($p > 0.05$). So ion current induced by *Liriopis Tuber* showed GABA activated Cl^- current and acetylcholine activated cation current, not Ca^{2+} current.

5. Ion current induced by 5mg/ml of *Aconiti Tuber* was inhibited $97.00 \pm 1.34\%$ by 10^{-4} M bicuculline ($p < 0.01$), $80.00 \pm 9.83\%$ by 10^{-4} M tubocurarine ($p < 0.01$), and $24.00 \pm 6.18\%$ by 10^{-4} M verapamil ($p < 0.05$). So ion current induced by *Aconiti Tuber* revealed GABA activated Cl^- current and acetylcholine activated cation current and Ca^{2+} current.

6. Ion current induced by 10mg/ml of *Zingiberis Rhizoma* was inhibited $33.00 \pm 7.43\%$ by 10^{-4} M bicuculline ($p < 0.05$), $10.20 \pm 1.83\%$ by 10^{-4} M tubocurarine ($p < 0.01$), and $14.00 \pm 2.16\%$ by 10^{-4} M verapamil ($p < 0.01$). So ion current induced by *Zingiberis Rhizoma* revealed GABA activated Cl^- current and acetylcholine activated cation current and Ca^{2+} current.

7. Ion current induced by 10mg/ml of *Boshniakiae Herba* was inhibited $65.00 \pm 13.75\%$ by 10^{-4} M bicuculline ($p < 0.05$), $38.00 \pm 9.24\%$ by 10^{-4} M tubocurarine ($p < 0.05$), and $33.25 \pm 7.42\%$ by 10^{-4} M verapamil ($p < 0.05$). So ion current induced by *Boshniakiae Herba* revealed GABA activated Cl^- current and acetylcholine activated cation current and Ca^{2+} current.

These results suggest that a point of difference between inhibitory and excitatory herbs is existence of Ca^{2+} current.

Key Word : 신경세포, patch clamp, 이온통로, 이온전류, 한약재

I. 서론

음양이론은 한의학에서 인체의 생리나 병리 현상을 설명하는데 없어서는 안될 핵심적인 이

론이다. 최근 한의학의 이론이나 임상을 객관화 하고 현대화해야 한다는 시대적 흐름에 따라 음양이론에 대해서도 이같은 방향의 연구가 많이 시도되고 있다.

국내에서는 윤¹⁾이 한의학에서의 음양이론을

인체 대사과정과 연결짓고 이화과정과 동화과정을 각각 한의학의 陽化氣, 陰成形의 과정으로 해석한 이래 주로 이러한 관점에서 문헌적 또는 실험적 연구가 이루어졌다.²⁾³⁾

국외에서는 주로 중국에서 陰虛, 陽虛證 환자들을 대상으로 면역, 혈액학, 혈류동역학 및 미세순환, 체내미량원소, 내분비, 자율신경계, 에너지대사 등의 변화를 측정하여 인체에서의 음양개념이나 이론을 규명하는 연구가 진행되었다.⁴⁾ 이들 연구에서 나타난 비교적 의미있는 경향으로는 혈장 cAMP와 cGMP의 함량변화와 음양이론을 연결지어 살펴본 것이다.⁴⁾ 그러나 cAMP와 cGMP는 반드시 모든 조직이나 기관에서 길항적으로 작용하는 것은 아니며 또 cAMP, cGMP 각각의 작용이 장거나 조직에 따라 다르게 나타나기 때문에 연구가 난관에 봉착해 있다.

이 실험은 그 동안의 음양이론 연구에서 비교적 소외되었던 뇌의 신경세포를 대상으로 신경세포의 흥분과 억제현상이 음양현상과 유사하다는데 착안하여 이들 현상과 음양이론과의 상관성을 약물을 이용하여 간접적으로 연구한 것이다. 즉, 한약을 크게 흥분성과 억제성 약물로 이대별하고 이들 약물이 신경세포막에서 유발하는 이온전류의 특성을 다양한 이온통로와 관련하여 조사함으로써 간접적인 방법으로 한의학에서 생명현상의 설명에 적용해왔던 음양이론에 타당성이 있음을 밝히고, 또 이 과정에서 음양이론을 객관적으로 적정할 수 있는 지표를 찾아보고자 한 것이다.

실험은 태어난 지 10-15일 사이의 흰쥐 뇌의 중심회백질 신경세포 (periaqueductal gray neuron, PAG)를 분리하여, 이 신경세포에서 흥분성 및 억제성 한약재가 유발하는 이온전류의 특성을 전위고정하에서 nystatin-perforated patch clamp 방법으로 연구하였으며, 이번 실험에서는 억제성 신경전달 물질인 γ -aminobutyric acid (GABA)에 의한 Cl^- 통로,⁵⁾⁶⁾ 흥분성 신경전달물질로 작용하는 acetylcholine에 의한 양이온 통

로,⁷⁾ 그리고 활동전위를 유발시키며 근 수축을 조절할 뿐 아니라⁸⁾ 말초신경⁹⁾¹⁰⁾과 중추신경세포에서도 신경전달물질의 분비에 관여한다고 알려져 있는¹¹⁾ Ca^{2+} 통로와 어떤 관련이 있는지를 각각의 이온통로 길항제를 사용하여 실험하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 중심회백질 신경세포의 분리

중심회백질 신경세포는 다음과 같은 방법으로 분리하였다.¹²⁾¹³⁾ 태어난지 10일에서 15일 되는 Sprague-Dawley 흰쥐를 20% urethane으로 마취 후 뇌를 꺼내어 microslicer(DSK, model DTK-1000, Japan)를 사용하여 400 μ m 두께로 slices를 만들었다. 중심회백질 신경세포가 포함된 slice를 1mg/6ml 농도의 pronase로 30 - 40분간 32°C에서 효소처리 후 이어서 1mg/6ml 농도의 thermolysin으로 동일한 조건으로 10분간 효소처리하였다. 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

본 실험에 사용되는 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.

본 실험에 사용되는 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-hydroxy-methyl-aminomethane(Tris-base)를 이용하여 7.4가 유지되게 하였다.

Patch pipette에 사용되는 internal solution (mM)은 KCl 150, HEPES 10, 그리고 nystatin 200 µg/ml로 구성되어 있으며 internal solution의 pH는 Tris-base를 이용하여 7.2로 유지하였다.

3. 약제

본 실험에 사용된 시호, 황련, 한련초, 맥문동, 부자, 건강, 육종용 등의 한약재는 시중에서 구입하여 정선하여 사용하였다. 한약재는 증류수로 추출한 후 -70°C에서 냉동 보관 후 사용하였으며 모든 약제의 희석은 standard solution을 사용하였다.

이 실험에 사용된 시약은 다음과 같다. Pronase는 Calbiochem사 [USA], thermolysin, nystatin, bicucullin, tubocurarine, verapamil 그리고 그 외 모든 시약은 Sigma사 [USA]를 사용하였다. 약제는 'Y-tube' method로 투여하였으며¹³⁾¹⁴⁾ 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 측정하였고, storage oscilloscope(HS-5100A, Iwatsu, Japan)로 관찰하였고 동시에 thermal-head pen recorder (Nippondenki San-ei, RECTI-HORIZ- 8K 21)로 기록하였다.

측정된 값은 means ± standard error of mean (S.E.M)로 계산하였고 Student's *t* test로 통계 처리하였다. 모든 실험은 실온(20 - 22°C)에서 진행되었다.

III. 결과

1. 시호에 의해 유발된 이온전류의 특징

중심회백질 신경세포에 시호 10mg/ml의 투여로 이온전류가 기록되었으며 시호에 의하여 유발된 이온전류는 10⁻⁴M bicuculline에 의하여 59.50±4.29% 억제되었고(p<0.01), 10⁻⁴M tubocurarine에 의하여 10.75±4.77% 억제되었으나 통계적으로 유의성이 없었으며(p>0.05), 10⁻⁴M verapamil에 의하여 4.75±4.23% 억제되었으나 통계적으로 유의성이 없었다(p>0.05) (Figure 1).

따라서 시호에 의하여 유발된 이온전류에는 GABA에 의한 Cl⁻ 전류만 나타났으며 acetylcholine에 의한 전류나 Ca²⁺ 전류는 나타나지 않았다.

-이충열의 6인 : 흰쥐 신경세포에서 억제성 및 흥분성 한약재가 유발한 이온전류의 특성-

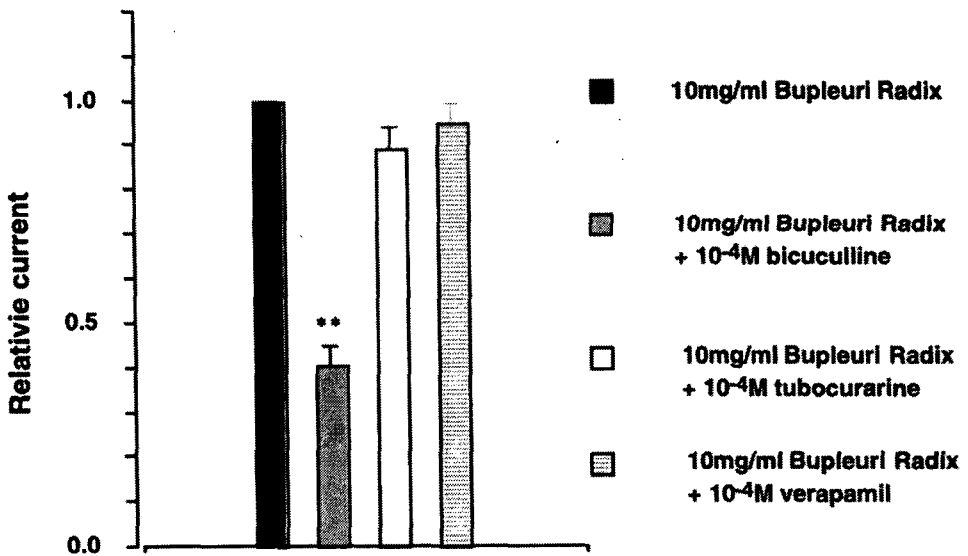
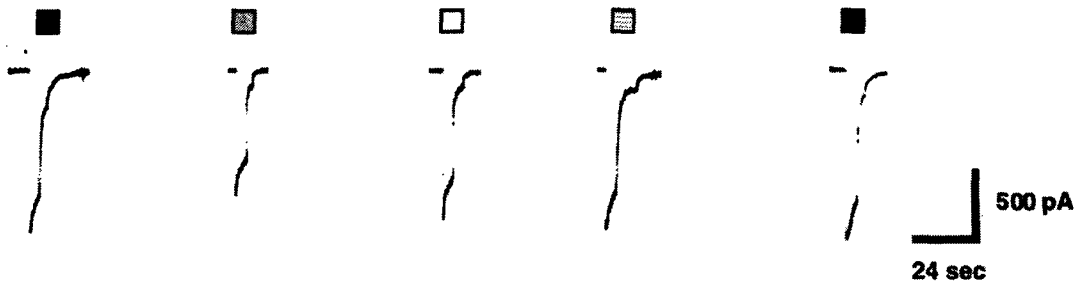


Figure 1. Characterization of ion current induced by Bupleuri Radix

** = $p < 0.01$, Holding potential(V_H) = -50 mV, $n = 5$

2. 황련에 의하여 유발된 이온전류의 특징

중심회백질 세포에 황련 20mg/ml의 투여로 이온전류가 나타났으며 황련에 의하여 유발된 이온전류는 10^{-4} M bicuculline에 의하여 $47.20 \pm 7.88\%$ 억제되었고($p < 0.01$), 10^{-4} M tubocurarine에 의하여 $3.20 \pm 2.33\%$ 억제되었으나 통계적으로 유의성이 없었으며($p > 0.05$), 10^{-4} M verapamil

에 의하여 $1.00 \pm 1.00\%$ 억제되었으나 통계적으로 유의성이 없었다($p > 0.05$)(Figure 2).

따라서 황련에 의하여 유발된 이온전류에는 GABA에 의한 Cl^- 전류만 나타났으며 acetylcholine에 의한 전류나 Ca^{2+} 전류는 나타나지 않았다.

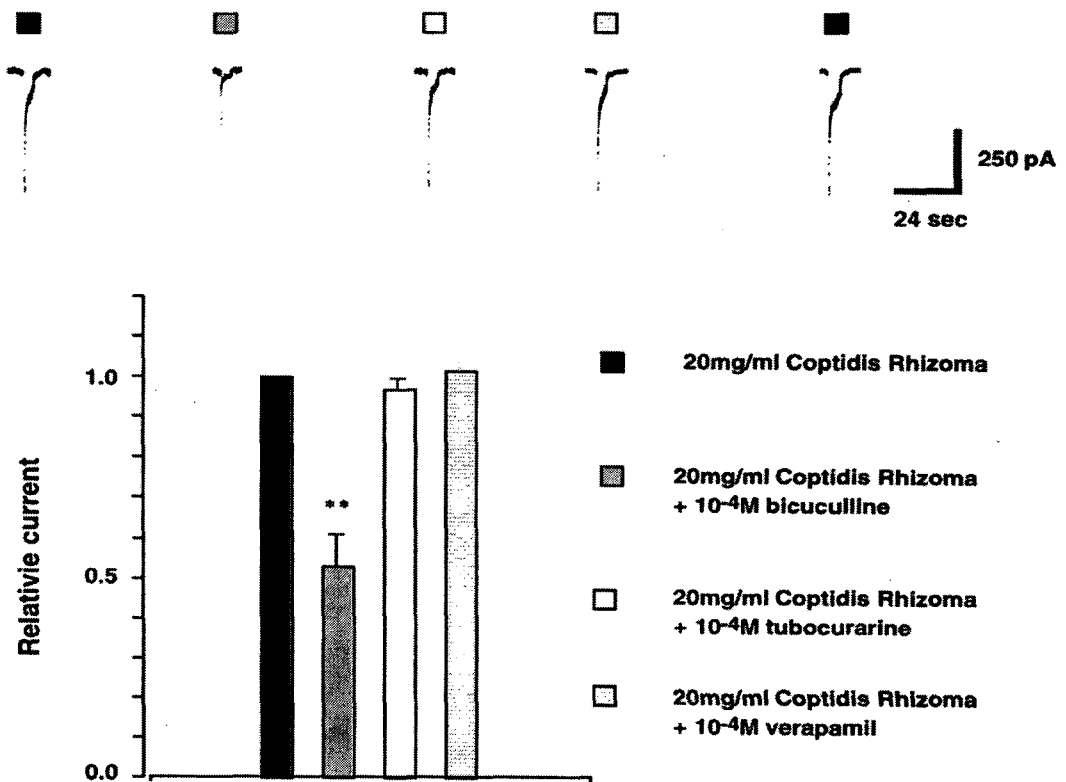


Figure 2. Characterization of ion current induced by Coptidis Rhizoma

** = $p < 0.01$, Holding potential(V_H) = -50mV , $n = 5$

3. 한련초에 의하여 유발된 이온전류의 특징

한련초 20mg/ml의 투여로 중심회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었다. 한련초에 의하여 유발된 이온전류는 10^{-4} M bicuculline에 의하여 $55.00 \pm 4.92\%$ 억제되었고($p < 0.01$), 10^{-4} M tubocurarine에 의하여 $15.00 \pm 4.26\%$ 억제되었으며($p < 0.05$), 10^{-4} M verapamil에 의하여 $6.00 \pm$

3.03% 억제되었으나 통계적으로 유의성이 없었다($p > 0.05$)(Figure 3).

따라서 한련초에 의하여 유발된 이온전류는 GABA에 의한 Cl^- 전류와 acetylcholine에 의한 양이온 전류는 나타났으나 Ca^{2+} 전류는 없었다.

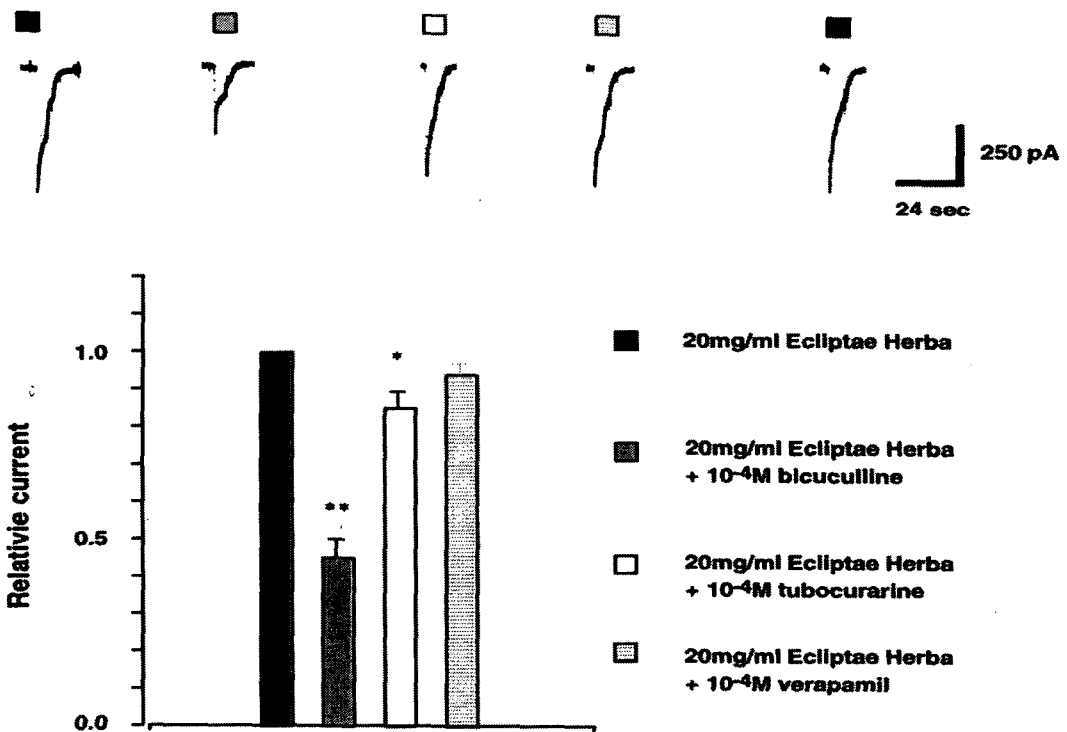


Figure 3. Characterization of ion current induced by Ecliptae Herba

** = $p < 0.01$, Holding potential(V_H) = -50 mV, $n = 5$

4. 맥문동에 의하여 유발된 이온전류의 특징

맥문동 5mg/ml의 투여로 중심회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었으며 맥문동에 의하여 유발된 이온전류는 10^{-4} M bicuculline에 의하여 $15.20 \pm 4.57\%$ 억제되었고($p < 0.05$), 10^{-4} M tubocurarine에 의하여 $14.00 \pm 3.00\%$ 억제되었으며($p < 0.05$), 10^{-4} M verapamil에 의하여 $5.20 \pm$

4.80% 억제되었으나 통계적으로 유의성이 없었다($p > 0.05$)(Figure 4).

따라서 맥문동에 의하여 유발된 이온전류는 GABA에 의한 Cl^- 전류와 acetylcholine에 의한 양이온 전류는 나타났으나 Ca^{2+} 전류는 없었다.

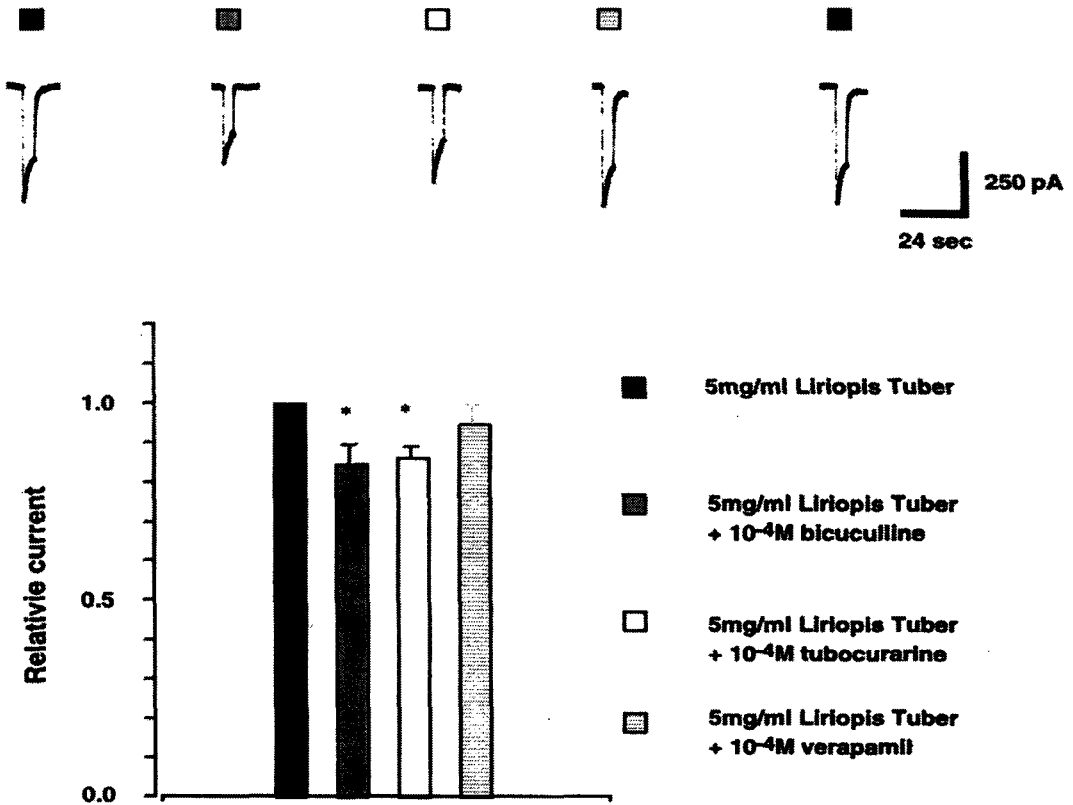


Figure 4. Characterization of ion current induced by Liriopsis tuber
 ** = $p < 0.05$, Holding potential(V_H) = $-50mV$, $n = 5$

5. 부자에 의하여 유발된 이온전류의 특징

부자 5mg/ml의 투여로 중심회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었다. 부자에 의하여 유발된 이온전류는 10^{-4} M bicuculline에 의하여 $97.00 \pm 1.34\%$ 억제되었고($p < 0.01$), 10^{-4} M tubocurarine에 의하여 $80.00 \pm 9.83\%$ 억제되었으며

($p < 0.01$), 10^{-4} M verapamil에 의하여 $24.00 \pm 6.18\%$ 억제되었다($p < 0.05$)(Figure 5).

따라서 부자에 의하여 유발된 이온전류에는 GABA에 의한 Cl^- 전류, acetylcholine에 의한 양이온 전류 그리고 Ca^{2+} 전류 모두 나타났다.

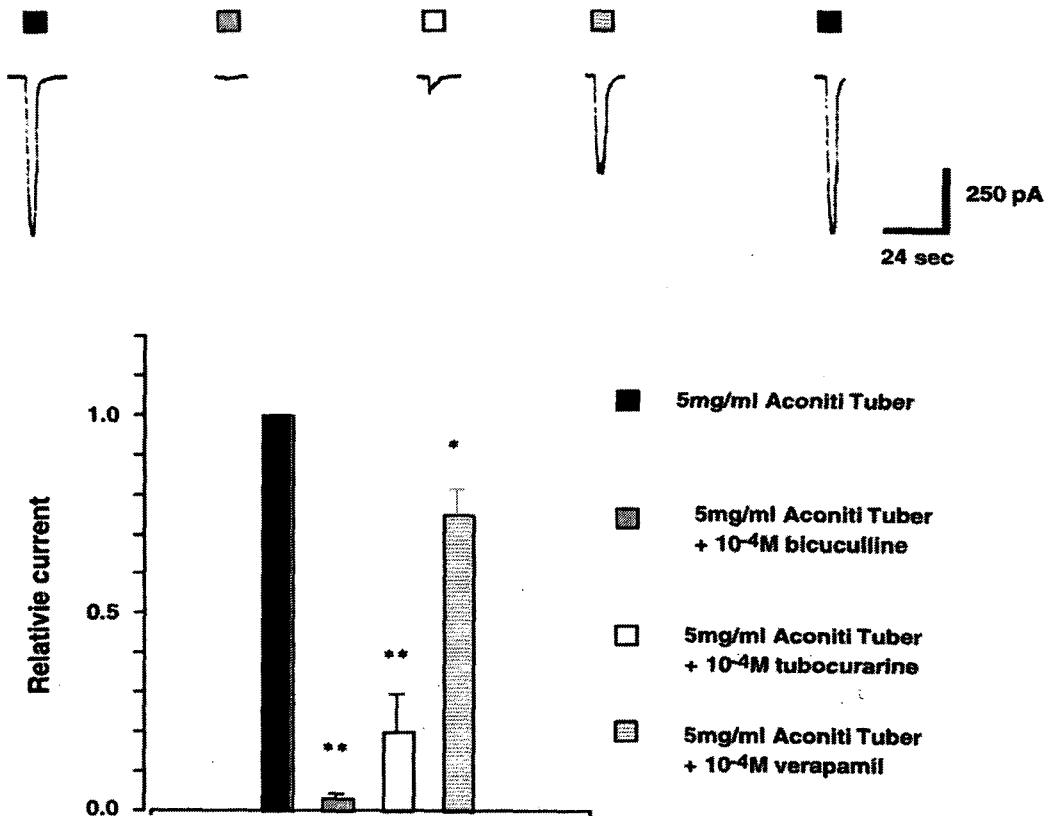


Figure 5. Characterization of ion current induced by Aconiti Tuber
 * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, Holding potential(V_H) = -50 mV, $n = 5$

6. 건강에 의하여 유발된 이온전류의 특징

건강 10mg/ml의 투여로 중심회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었고 건강에 의하여 유발된 이온전류는 10^{-4} M bicuculline에 의하여 $33.00 \pm 7.43\%$ 억제되었고($p < 0.05$), 10^{-4} M tubocurarine에 의하여 $10.20 \pm 1.83\%$ 억제되었으며

($p < 0.01$), 10^{-4} M verapamil에 의하여 $14.00 \pm 2.16\%$ 억제되었다($p < 0.01$)(Figure 6).

따라서 건강에 의하여 유발된 이온전류에는 GABA에 의한 Cl^- 전류, acetylcholine에 의한 양이온 전류 그리고 Ca^{2+} 전류 모두 나타났다.

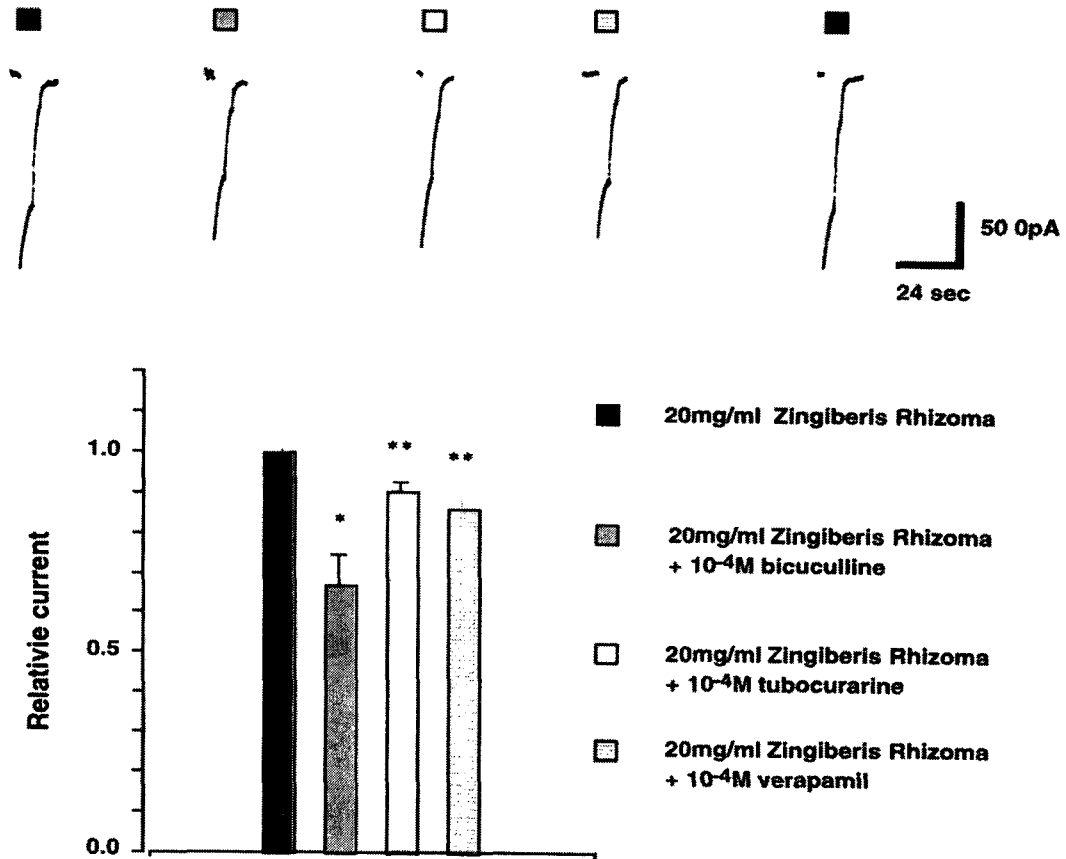


Figure 6. Characterization of ion current induced by Zingiberis Rhizoma
 * = $p < 0.05$, ** < 0.01 , Holding potential(V_H) = $-50mV$, $n = 5$

7. 육종용에 의하여 유발된 이온전류의 특징

육종용 10mg/ml의 투여로 중심회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었으며 육종용에 의하여 유발된 이온전류는 10^{-4} M bicuculline에 의하여 $65.00 \pm 13.75\%$ 억제되었고($p < 0.05$), 10^{-4} M tubocurarine에 의하여 $38.00 \pm 9.24\%$ 억제되었으며($p < 0.05$), 10^{-4} M verapamil에 의하여 33.25

$\pm 7.42\%$ 억제되었다($p < 0.05$)(Figure 7).

따라서 육종용에 의하여 유발된 이온전류에는 GABA에 의한 Cl^- 전류, acetylcholine에 의한 양이온전류 그리고 Ca^{2+} 전류 모두 나타났다.

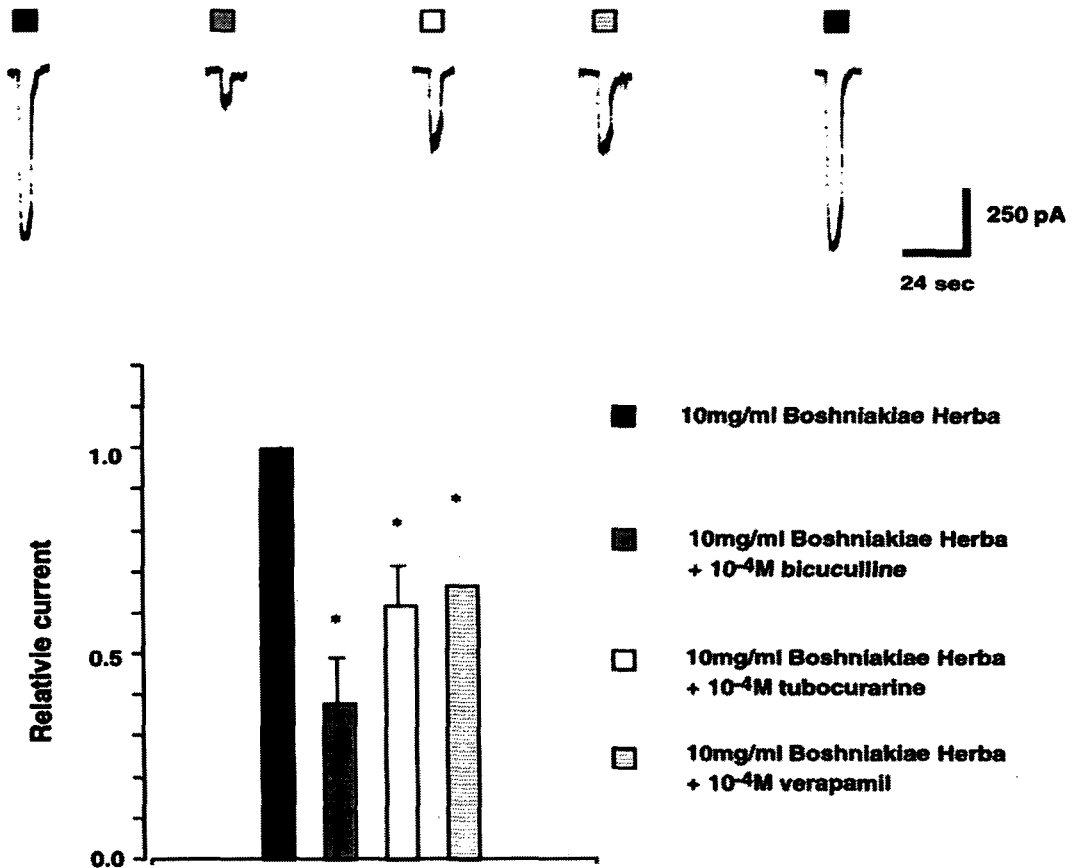


Figure 7. Characterization of ion current induced by Boshniakiae Herba

* = $p < 0.05$, Holding potential(V_H) = $-50mV$, $n = 5$

IV. 고찰

한의학에서는 인체를 하나의 조화로운 전체로 규정하고 인체 생명 현상을 음양이나 오행 사이의 동태적 평형이라는 관점에서 인식해왔다. 즉, 인체의 생리·병리현상을 음양세력(陰陽氣)이나 오행세력(五行氣)이 서로 끊임없이 유동하면서 상대적 평형을 유지하려는 과정에서 나타난 현상으로 보는 것이다. 이 과정에서 동태적 평형 유지에 차질이 생겨 나타난 현상이 병리 현상이다.

인체의 병리 현상을 음양허실의 관점에서 분류하면, 양세력이 異常亢進된 陽實證, 양세력이 異常沈衰된 陽虛證, 음세력이 異常亢進된 陰實證, 음세력이 異常沈衰된 陰虛證으로 구분할 수 있다.¹⁵⁾

음양허실증은 각각 인체내외의 한열현상을 특징적으로 나타내는데, 陽實證은 외열(陽盛則外熱), 陽虛證은 외한(陽虛則外寒), 陰實證은 내한(陰盛則內寒), 陰虛證은 내열(陰虛則內熱)을 나타낸다.¹⁵⁾¹⁶⁾ 이를 한열의 관점에서 정리하면 음실증과 양허증은 寒證이고, 양실증과 음허증은 熱證이다. 인체의 한열현상은 인체 음양세력의 전체적 우열상황을 판단할 수 있는 현상적 지표로서 중요한 의미가 있다.

한증은 양허증이나 음실증 등 양세력이 음세력에 비해 상대적으로 열세인 상태에서 나타나는 현상(陰勝則寒)¹⁶⁾으로 인체 대사의 침쇠상태를 의미하며, 열증은 음허증이나 양실증 등 양세력이 음세력에 비해 상대적으로 우세한 상태에서 나타나는 현상(陽勝則熱)¹⁶⁾으로 인체 대사의 이상항진상태를 의미한다. 여기서 한증과 열증을 대사의 침쇠상태와 이상항진상태로 정의한 것은 한의학의 한열개념이 인체 대사와 밀접하게 관련이 있다는 보고들에 근거한 것이다.¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾

한증의 경우 한의학에서는 부족한 양세력을 돕거나 항진된 음세력을 제약하여 침쇠된 양세

력을 흥분시키기 위해 溫熱性 계통의 약물을 사용하고, 열증의 경우에는 부족한 음세력을 돕거나 항진된 양세력을 억제시킬 수 있는 寒涼性 계통의 약물을 사용하여 치료한다. 이러한 관점에서 볼 때 한증에 적용되는 약물은 대사의 異常沈衰상태를 흥분시키는 작용을 하므로 흥분성 약물로, 열증에 적용되는 약물은 대사의 異常亢進상태를 억제시키는 작용을 하므로 억제성 약물로 불려도 무방할 것이다. 여기서 굳이 온열성과 한량성이라는 용어 대신 흥분성과 억제성이라는 용어를 사용하려는 이유는 이 용어가 음양한열현상을 대사의 이상항진과 침쇠로 해석한 이 논문의 방향과 부합하기 때문이다. 예를 들어 기본적인 음양관념에 비추어 볼 때 보기약은 흥분성 약물로 보혈약은 억제성 약물로 분류될 수 있겠지만 보혈약 중에는 온성약이 다수 포함되어 있어 약물의 한열온량 분류와 흥분억제성분류는 서로 완전히 일치하지 않는다. 이것은 인체의 한열현상이 음양대사의 결과로 나타나는 현상으로서 양허나 음허에 비해 음양차질이 심하지 않은 기허나 혈허증에서는 뚜렷하게 나타나지 않으며 따라서 이것에 적용되는 약물도 한열의 구분이 크게 의미를 가질 수 없는데 기인한 것이다. 그러므로 비록 한약을 흥분성과 억제성으로 이대별하는 것이 극단적이어서 문제가 없지는 않지만 이 논문에서는 편의상 한약을 흥분성과 억제성으로 분류하여 실험하였다.

이 실험은 신경세포의 흥분과 안정현상이 음양현상과 유사하다는 점에 착안하여 한의학의 흥분성 약물과 억제성 약물이 신경세포에서 일으키는 이온전류의 특성을 조사함으로써 간접적인 방법으로 한의학에서 생명현상의 설명에 적용하는 음양이론에 타당성이 있음을 밝히고, 또 이 과정에서 음양이론을 객관적으로 적정할 수 있는 지표를 찾아보고자 계획된 것이다.

즉, 척추동물에서의 신경접합은 거의 화학시냅스(chemical synapse)이다. 이 경우 시냅스 전 신경세포에서 활동전압이 일어나면 그 말단

에서 신경전달물질이 유리되며, 유리된 신경전달물질은 확산에 의해 시냅스 후 세포막에 있는 수용체 단백질과 결합하여 특정이온에 대한 투과성을 변화시키는데 이때 이동하는 이온의 종류에 따라 흥분성 혹은 억제성 반응이 나타나게 된다.²⁰⁾

흥분성 신경전달물질이 수용체단백과 결합하면 시냅스 후 신경세포의 이온 채널을 통해 Na^+ 이나 Ca^{2+} 의 투과성이 증가하여 탈분극(depolarization)이 일어나고 시냅스 후 신경세포에서 흥분성 시냅스 후 전압(excitatory postsynaptic potential, EPSP)이 생성된다. 반대로 억제성 신경전달물질이 수용체 단백질과 결합하면 K^+ 이나 Cl^- 의 투과성이 증가하여 과분극(hyperpolarization)이 일어나고 억제성 시냅스 후 전압(inhibitory post-synaptic potential, IPSP)이 생성된다. 다시 말해 K^+ 이나 Cl^- 통로가 활성화되어 K^+ 이나 Cl^- 의 투과성이 증가한다면 막전위는 과분극상태가 되어 신경세포는 안정막전위상태로 되며 세포의 흥분성이 감소하게 된다. 또 Na^+ 이나 Ca^{2+} 통로가 활성화되어 Na^+ 이나 Ca^{2+} 의 투과성이 증가한다면 막전위는 탈분극상태가 되어 신경세포는 흥분하게 된다.²⁰⁾

이와 같은 현상은 음양현상과 매우 유사한 것으로서 만일 흥분성 약물을 투여했을 때 세포의 흥분성이 증가되고, 억제성 약물을 투여했을 때 세포의 흥분성이 억제된다면 위의 현상은 인체 전체의 음양현상과 밀접한 관련이 있는 현상중 하나라고 할 수 있으며, 또 신경세포의 흥분성과 억제성은 음양현상을 객관적으로 지시하는 유력한 지표 중 하나가 될 수 있을 것이다.

이 실험은 이와 같은 가설을 기초로 억제성 약물로 시호, 황련, 한련초, 맥문동을, 흥분성 약물로 부자, 건강, 육종용을 선정¹²⁾하여 이들이 각기 신경세포에 대해 일으키는 이온전류의 특성을 관찰하였다.

그리고 이들 약물이 유발한 이온전류의 특성을 알아내기 위해 1차로 GABA_A 수용체 길항

제인 bicuculline과 nicotinic acetylcholine 수용체 길항제인 tubocurarine 그리고 Ca^{2+} 통로 길항제인 verapamil을 사용하여 이들 길항제가 한약재에 의하여 유발된 이온전류에 미치는 영향을 비교분석하였다.

γ -Aminobutyric acid(GABA)는 중추신경계에서 주요한 억제성 신경전달물질로 알려져 있으며⁵⁶⁾ GABA는 GABA_A 수용체와 GABA_B 수용체를 활성화시키는데 GABA_A 수용체는 Cl^- 통로의 활성도를 조절하여 여러 조직에서 세포의 억제성 조절을 담당하는 것으로 알려져 있다.²¹⁾²²⁾²³⁾ GABA_A 수용체- Cl^- 통로 복합체는 α , β , ν , δ 그리고 ρ 와 같은 여러 subunit로 구성되어 있는데 각각의 subunit는 α_{1-6} , β_{1-4} , ν_{1-3} 와 같은 isoforms이 있으며²⁴⁾²⁵⁾ 또한 GABA_A 수용체- Cl^- 통로 복합체에는 benzodiazepines, barbiturates, 일부의 convulsants, steroids, Zn^{2+} 등 여러 ligand의 결합부위가 있으며 이러한 ligand의 결합에 의하여 Cl^- 통로의 활성도가 조절된다.²⁶⁾²⁷⁾ 이러한 GABA 또는 GABA_A 수용체 agonist인 muscimol 등이 GABA_A 수용체에 결합하게 되면 Cl^- 통로가 열리게 되어 세포의 활성도를 억제하게 되며, bicuculline은 GABA_A 수용체와 경쟁적 억제작용을 하여 Cl^- 통로가 열리는 것을 차단하게 된다.²⁸⁾

이 실험에서 GABA_A 수용체 차단제인 bicuculline은 억제성, 흥분성 한약재의 구별없이 모든 한약재에 의해 유발된 이온 전류를 감소시켰다. 이것은 한약재의 일부 성분에 의하여 GABA_A 수용체가 자극되었음을 의미하며 이는 억제성과 흥분성 한약재 모두에서 GABA와 같은 성분이 있어 Cl^- 전류를 나타냄을 의미한다.

Acetylcholine 수용체는 nicotinic acetylcholine 수용체와 muscarinic acetylcholine 수용체가 있는데 nicotinic acetylcholine 수용체는 nicotinic cholinergic synapse에 존재하는 glycoprotein으로 포유동물의 말초신경계에서는 neuromuscular junction과 자율신경계의 pre-와 post-ganglionic

neuron에 그리고 중추신경계에도 존재하고 있다. Nicotinic acetylcholine 수용체는 $\alpha 2\beta\gamma\delta$ 의 subunit로 구성되며 두 분자의 acetylcholine이 2개의 α subunit에 결합하면 이온통로가 열려²⁹⁾ 양이온에 대한 투과도가 커지게 된다. acetylcholine에 의해 nicotinic channel이 열리면 이 때의 이온 전류는 patch clamp에서 inward current로 기록되며 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 그리고 Mg^{2+} 이온에 대한 투과도가 있으나 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 은 nicotinic current에는 큰 영향을 미치지 못하고 Na^+ 과 K^+ 이 주된 이온의 흐름이다.⁷⁾

Tubocurarine은 nicotinic acetylcholine 수용체 길항제로서 한약재가 유발한 이온전류가 tubocurarine에 의해 의미있게 감소되었다는 것은 이들 한약재에 nicotinic acetylcholine 수용체를 자극하는 물질이 있다는 증거가 된다. 이 실험에서 tubocurarine은 부자, 건강, 육종용 등 흥분성 한약재 모두와 또 억제성 한약재 중 한련초, 맥문동이 유발한 이온전류를 감소시켰다. 그러나 시호와 황련은 억제성 한약재이면서도 tubocurarine에 의하여 의미 있게 이온전류가 억제되지 않아 같은 억제성 약물인 한련초, 맥문동과 차이를 보였으나 그 이유에 대해 이 실험에서는 아직 언급할 단계가 아니다.

Ca^{2+} 통로는 Na^+ 과 같이 활동전위를 유발시키며 근 수축을 조절할 뿐 아니라⁸⁾ 말초신경과⁹⁾¹⁰⁾ 중추신경 세포에서도 신경전달물질의 분비에 관여한다고 알려져 있다.¹¹⁾ 임상에서 사용되는 Ca^{2+} 통로 길항제는 nifedipine, verapamil 그리고 diltiazem 등이 있으며 verapamil은 특히 심장의 부정맥에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.³⁰⁾

신경세포에는 여러 종류의 Ca^{2+} 이온통로가 존재하며 활성화되는 역치에 따라 저전위 의존성 Ca^{2+} 통로(low voltage activated Ca^{2+} channel, T-type)와 고전위 의존성 Ca^{2+} 통로(high voltage activated Ca^{2+} channel)로 나뉘어 진다.³¹⁾³²⁾ 고전위 의존성 Ca^{2+} 통로는 여러 종류의 antagonist

에 의하여 다시 분류되는데 dihydropyridine(DHP)에 감수성이 있는 L-type, ω -conotoxin-GVIA에 감수성이 있는 N-type, ω -agatoxin-IVA에 감수성이 있는 P-type, ω -conotoxin-MV1C에는 감수성이 있으나 DHP/ ω -conotoxin-GVIA/ ω -agatoxin-IVA에는 감수성이 없는 Q type 그리고 나머지 부분으로 이러한 유기 Ca^{2+} 길항제에는 반응하지 않는 R type Ca^{2+} 통로로 분류되며 이 모든 Ca^{2+} 통로는 무기 Ca^{2+} 길항제인 Cd^{2+} , Ni^{2+} 그리고 Co^{2+} 에 의하여 차단된다.³³⁾³⁴⁾³⁵⁾ 중심회백질 신경세포에는 이 모든 종류의 고전위 의존성 Ca^{2+} 통로가 존재한다고 알려져 있다.¹⁴⁾

이 실험에서는 억제성 한약재에 의해 유발된 이온전류는 모두 verapamil에 의해 억제되지 않은 반면 흥분성 한약재는 모두 verapamil에 의해 유의하게 억제되어, Ca^{2+} 전류의 존재여부가 흥분성 한약재와 억제성 한약재의 가장 특징적인 차이로 나타났다. 이것은 비록 흥분성 한약재에 의해 유발된 Ca^{2+} 전류의 subtype은 알 수 없었지만, 흥분성 한약재에는 억제성 한약재와 달리 Ca^{2+} 전류를 유발시키는 성분이 있음을 의미하는 것이다.

이상의 결과를 요약하면 다음과 같다. 첫째, 억제성, 흥분성의 구분 없이 모든 한약재가 유발한 이온전류에는 Cl^- 전류가 포함되어 있었다. 둘째, acetylcholine에 의한 양이온 전류는 흥분성 한약재뿐만 아니라 한련초와 맥문동 등 일부 억제성 한약재에서도 나타났다. 셋째, Ca^{2+} 전류는 흥분성 한약재에서만 나타났다.

이 실험에서 가장 의미 있는 결과는 Ca^{2+} 전류의 존재여부가 흥분성 한약재와 억제성 한약재의 중요한 차이로 나타난 것이다. 흥분성 한약재와 억제성 한약재 사이의 이러한 차이는 음양이론의 새로운 기준을 제시하는 것으로 생각할 수 있다.

그러나 일부 결과는 우리가 실험에 앞서 세웠던 가설과 비교할 때 몇 가지 차이가 있다. 첫

제, Cl^- 전류는 신경세포의 안정화에 기여하는 것으로 억제성 약물에서만 주로 나타나야하나 흥분성 약물에서도 나타났으며, 특히 부자와 같은 흥분성이 강한 약물에서 더 많은 비율의 Cl^- 전류를 포함하고 있다는 점이다. 이는 흥분성 약물에 의해 Ca^{2+} 이 세포내로 다량 유입되면 세포의 흥분성이 증가하지만 이러한 Ca^{2+} 유입이 과다할 때는 단백질 분해효소의 활성화를 유발시켜 apoptosis를 일으키기도 한다.³⁶⁾ 따라서 흥분성 약물에 의하여 Ca^{2+} 과 함께 Cl^- 가 유입된다는 것은 이러한 현상을 방지하는 효과가 있지 않을까 생각된다. 한의학적으로도 순음(純陰), 순양(純陽)이란 현실적으로 존재하지 않으며, 음양의 구분은 숙소숙다(孰少孰多)의 구분으로서 어느 쪽이 보다 우세하나에 의해 이루어짐을 생각할 때 흥분성 한약제에서의 Cl^- 전류의 존재는 상당히 의미가 있는 결과일 수도 있다고 생각된다. 이것에 대해서는 차후 계속적인 연구가 필요할 것이다. 둘째, nicotinic acetylcholine receptor가 활성화되면 Na^+ , K^+ 등 양이온을 통과시키며, 이 중에서도 Na^+ 이온이 대부분을 차지하는 것으로 알려져 있어 acetylcholine은 흥분성 신경전달물질로 분류된다. 그러나 이 실험에서는 흥분성 한약제뿐만 아니라 한련초와 맥문동 등 일부 억제성 한약제에서도 nicotinic acetylcholine receptor에 의한 전류가 나타나 억제성 한약제에 대한 가설과 약간의 차이를 보였다. 하지만 acetylcholine 이온전류가 나타난 한련초, 맥문동은 보음약에 속하는 반면, acetylcholine 이온전류가 나타나지 않은 시호, 황련은 청열약에 속하므로, 보음과 청열약의 구분이 nicotinic acetylcholine receptor에 의한 전류와 어떤 연관성이 있는지는 차후 더 자세한 연구가 있어야 할 것이다.

V. 결론

흰쥐 뇌의 중심회백질 신경세포에서 중심회

백질 신경세포에서 억제성 한약제인 시호, 황련, 한련초, 맥문동과 흥분성 한약제인 부자, 건강, 육중용에 의해 유발된 이온 전류의 특성을 전위 고정하에서 nystatin perforated patch clamp로 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 시호(Bupleuri Radix) 10mg/ml의 투여로 중심회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었으며 시호에 의해 유발된 이온전류는 $10^{-4}M$ bicuculline에 의해 $59.50 \pm 4.29\%$ 억제되었고 ($p < 0.01$), $10^{-4}M$ tubocurarine에 의해 $10.75 \pm 4.77\%$, $10^{-4}M$ verapamil에 의해 $4.75 \pm 4.23\%$ 억제되었으나 통계적으로 유의성이 없었다 ($p > 0.05$).

2. 황련(Coptidis Rhizoma) 20mg/ml의 투여로 중심회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었으며 황련에 의해 유발된 이온전류는 $10^{-4}M$ bicuculline에 의해 $47.20 \pm 7.88\%$ 억제되었고 ($p < 0.01$), $10^{-4}M$ tubocurarine에 의해 $3.20 \pm 2.33\%$, $10^{-4}M$ verapamil에 의해 $1.00 \pm 1.00\%$ 억제되었으나 통계적으로 유의성이 없었다 ($p > 0.05$).

3. 한련초(Ecliptae Herba) 20mg/ml의 투여로 중심회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었으며 한련초에 의해 유발된 이온전류는 $10^{-4}M$ bicuculline에 의해 $55.00 \pm 4.92\%$ 억제되었고 ($p < 0.01$), $10^{-4}M$ tubocurarine에 의해 $15.00 \pm 4.26\%$, 억제되었으며 ($p < 0.05$), $10^{-4}M$ verapamil에 의해 $6.00 \pm 3.03\%$ 억제되었으나 통계적으로 유의성이 없었다 ($p > 0.05$).

4. 맥문동(Liriopsis Tuber) 5mg/ml의 투여로 중심회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었으며 맥문동에 의해 유발된 이온전류는 $10^{-4}M$ bicuculline에 의해 $15.20 \pm 4.57\%$ 억제되었고 ($p < 0.05$), $10^{-4}M$ tubocurarine에 의해 $14.00 \pm 3.00\%$ 억제되었으며 ($p < 0.05$), $10^{-4}M$ verapamil에 의해 $5.20 \pm 4.80\%$ 억제되었으나 통계적으로 유의성이 없었다 ($p > 0.05$).

5. 부자(Aconiti Tuber) 5mg/ml의 투여로 중심

회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었으며 부자에 의해 유발된 이온전류는 10^{-4} M bicuculline에 의해 $97.00 \pm 1.34\%$ 억제되었고 ($p < 0.01$), 10^{-4} M tubocurarine에 의해 $80.00 \pm 9.83\%$ 억제되었으며 ($p < 0.01$), 10^{-4} M verapamil에 의해 $24.00 \pm 6.18\%$ 억제되었다 ($p < 0.05$).

6. 건강(Zingiberis Rhizoma) 10mg/ml의 투여로 중심회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었으며 건강에 의해 유발된 이온전류는 10^{-4} M bicuculline에 의해 $33.00 \pm 7.43\%$ 억제되었고 ($p < 0.05$), 10^{-4} M tubocurarine에 의해 $10.20 \pm 1.83\%$ 억제되었으며 ($p < 0.01$), 10^{-4} M verapamil에 의해 $14.00 \pm 2.16\%$ 억제되었다 ($p < 0.01$).

7. 육종용(Boshniakiae Herba) 10mg/ml의 투여로 중심회백질 신경세포에서 이온전류를 나타내었으며 육종용에 의해 유발된 이온전류는 10^{-4} M bicuculline에 의해 $65.00 \pm 13.75\%$ 억제되었고 ($p < 0.05$), 10^{-4} tubocurarine에 의해 $38.00 \pm 9.24\%$ 억제되었으며 ($p < 0.05$), 10^{-4} M verapamil에 의해 $33.25 \pm 7.42\%$ 억제되었다 ($p < 0.05$).

이상의 실험 결과 Cl^- 전류는 억제성과 흥분성 약물 모두에서 나타났으며, acetylcholine에 의한 양이온전류는 흥분성 한약재 모두와 한련초, 맥문동 등 일부 억제성 약물에서도 나타났고, Ca^{2+} 전류는 흥분성 한약재에서만 나타났다.

이 실험에서 가장 의미있는 결과는 Ca^{2+} 전류의 존재여부가 흥분성 한약재와 억제성 한약재의 중요한 차이로 나타난 것인데 흥분성 한약재와 억제성 한약재 사이의 이러한 차이는 음양이론의 새로운 기준을 제시하는 것으로 생각할 수 있다. 그리고 흥분성 한약재에서도 상당 비율의 Cl^- 전류가 나타난 점과, 억제성 한약재 중 청열약에 속하는 시호, 황련에는 acetylcholine에 의한 양이온 전류가 나타나지 않고 보음약에 속하는 한련초, 맥문동에만 나타난 점 등은 앞으로 더 자세하게 연구해볼 만한 가치가 있는 부분으로 생각된다.

참고문헌

1. 윤길영, 동의학의 방법론 연구, 서울 : 정보사. 1983 : 28, 57-65.
2. 김원중, 김완희, 혈액학적 지표를 이용한 기아상태의 음양론적 해석에 대한 실험적 연구, 동의생리학회지 1991 ; 6(1) : 41-58.
3. 이충열, 홍무창, 김완희, 기아상태의 음양론적 해석에 대한 실험적 연구-대분비 지표를 중심으로-, 동의생리학회지 1991 ; 6(1) : 25-40.
4. 陳達理, 周立紅 編, 中醫基礎理論現代研究, 上海 : 上海中醫學院出版社, 1989 : 1-64.
5. Krnjevic K. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol Rev* 1974;54:418-540
6. Krnjevic K, Schwartz S. Is gamma-aminobutyric acid an inhibitory transmitter? *Nature* 1966;211:1372
7. Colquhoun D, Ogden DC, Mathie A. Nicotinic acetylcholine receptors of nerve and muscle: functional aspects. *TINS* 1987;8:465-472
8. Morad M, Davies NW, Ulrich G, Schultheiss HP. Antibodies against ADP-ATP carrier enhance Ca^{2+} current in isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1988;255:H960-H964
9. Hille B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 1994;17:531-536
10. Toth PT, Bindokas VP, Bleakman D, Colmers WF, Miller RJ. Mechanism of presynaptic inhibition by neuropeptide Y at sympathetic nerve terminals. *Nature* 1993;362:635-639

11. Takahashi T, Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 1993;366: 156-158
12. Murase K, Randic M, Shirasaki T, Nakagawa T, Akaike N. Serotonin suppresses *N*-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated spinal horn neurons of the rat. *Brain Res* 1990;525: 84-91
13. 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 Res* 1996;734:72-78
14. 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* 1997;77:1418-1424
15. 윤길영, 동의학의 방법론 연구, 서울 : 정보사. 1983 : 28, 57-65.
16. 홍원식 교합, 정교 황제내경소문, 서울 : 동양의학연구원 출판부. 1981:218, 23.
17. 김완희, 한의학에 있어서의 한열발생 기전에 관한 연구, 황제의학 1978;3:566-575.
18. 候燦, 현대의학적 관점에서의 八綱(I), 동양의학 1982;57-62.
19. 梁月華, 寒熱本質研究的의進展, 中醫雜誌 1988;29(2)
20. 이석강 엮음, 인체 생리학(제2판), 서울 : 계축문화사, 1997:443-452.
21. Akaike N, Hattori K, Inomata N, Oomura Y. γ -Aminobutyric-acid and pentobarbitone-gated chloride currents in internally perfused frog sensory neurones. *J Physiol* 1985;360:367-386
22. Takeuchi A, Takeuchi N. A study of the action of picrotoxin on the inhibitory neuromuscular junction of the cray fish. *J Physiol* 1969;205:377-391
23. Tokutomi N, Ozoe Y, Katayama N, Akaike N. Effects of lindane (γ -BHC) and related convulsants on GABA_A receptor-operated chloride channels in frog dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 1994;643:66-73
24. Olsen RW, Tobin AJ. Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB J* 1990;4: 1469-1480.
25. Burt DR, Kamatchi GL. GABA_A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB J* 1991;5:2916-2923
26. Olsen RW. Drug interactions at the GABA receptor inophore complex. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1982;22:245-277
27. Sieghart W. GABA_A receptors: ligand-gated Cl^- ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:446-450,
28. Macdonald RL, Olsen RW. GABA_A receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 1994 ;17:569-602.
29. Changeux JP, Revah F. The acetylcholine receptor molecule: allosteric sites and the ion channel. *TINS* 1987;10:245-250
30. Triggle DJ. Calcium, calcium channels, and calcium channel antagonists. *Can J Physiol Pharmacol* 1990;68:1474-1481
31. Akaike N, Kostyuk PG, Osipchuk YV. Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *J Physiol* 1989;412: 181-195.
32. Takahashi K, Akaike N. Calcium antagonist effects on low-threshold (T-type) calcium current in rat isolated

- hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Pharm Exp Therap* 1991;256:169-175
33. Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ. Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* 1995;18:89-98
34. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three different types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 1985;316:440-443
35. Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 1993;32:1075-1088
36. 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(1):65-76