

이중탕, 육군자탕, 보중익기탕의 이상지질혈증 및 고혈압과 관련된 일과성 수용체 전압 바닐로이드 4 이온통로 조절에 관한 연구

김병주

부산대학교 한의학전문대학원 양생기능의학부

Effects of Leejung-tang, Rikkunshito, and Bojungikgi-tang on Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channels

Byung Joo Kim

Division of Longevity and Biofunctional Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University

Received: October 29, 2018
Revised: November 21, 2018
Accepted: November 29, 2018

Correspondence to: Byung Joo Kim
Division of Longevity and Biofunctional
Medicine, School of Korean Medicine,
Pusan National University, 49
Busandaehak-ro, Mulgeum-eup,
Yongsan 50612, Korea
Tel: +82-51-510-8469
Fax: +82-51-510-8420
E-mail: vision@pusan.ac.kr

Copyright © 2018 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: Metabolic syndrome is defined by a cluster of major cardiovascular risk factors: obesity, insulin resistance, dyslipidemia, and arterial hypertension. Several members of a large family of nonselective cation entry channels, e.g., transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channels have been associated with the development of dyslipidemia and hypertension. The purpose of this study was to investigate the effects of Leejung-tang (Lizhong-tang), Rikkunshito, and Bojungikgi-tang (Buzhongyiqi-tang) on TRPV4 channel.

Methods: Human embryonic kidney 293 cells stably transfected with the TRPV4 expression vectors were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 5 μ g/mL blasticidin, and 0.4 mg/mL zeocin in a humidified 20% O₂/10% CO₂ atmosphere at 37°C. Whole-cell patch clamp recordings were obtained using an Axopatch 700B amplifier and pClamp v.10.4 software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA), and signals were digitalized at 5 kHz using Digidata 1422A.

Results: Leejung-tang and Rikkunshito (10, 30 and 50 mg/mL) had no effects on the TRPV4 whole-cell currents at dose dependent manner. However, Bojungikgi-tang (10, 30, and 50 mg/mL) inhibited the TRPV4 whole-cell currents in a dose dependent manner and the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of Bojungikgi-tang was 18.2 mg/mL.

Conclusions: These results suggest that Bojungikgi-tang plays an important roles to inhibit the TRPV4 channel, suggesting that Bojungikgi-tang is considered one of the candidate agents for the treatment of metabolic syndrome such as dyslipidemia and hypertension.

Key Words: Metabolic syndrome, Leejung-tang, Rikkunshito, Bojungikgi-tang, Ion channel

서론

대사성 질환(metabolic disease, metabolic syndrome)은 포도당, 지방, 단백질 등의 대사이상에서 기원하는 질병을 말하며, 주로 포도당과 지방대사의 이상으로 유발되는 암, 당뇨병, 골대사 질환, 지방간, 비만, 심혈관계 질환 등을 통칭하는 질환이다¹⁾. 최근 국내에서도 식생활의 서구화와 생활양식의 변화로 비만 인구가 폭발적으로 증가하

고 있으며 이에 따라 대사성 질환의 유병률도 빠르게 증가되고 있다. 대사성 질환은 심혈관 질환과 제2형 당뇨병을 유발하므로 대사성 질환의 조기진단 및 치료는 임상적으로 매우 중요하다²⁾.

일과성 수용체 전압(transient receptor potential, TRP) 이온통로는 돌연변이 *Drosophila*에서 지속적인 광수용체(photoreceptor) 활동도 대신에 일시적인 수용체 전압만을 보이는 현상을 통해 1969년 처음 설명되었다³⁾. 통증 분야

에서는 1997년 Caterina 등이 바닐로이드(vanilloid) 수용체를 보고한 이후 통증 연구 분야에 있어서 TRP 이온통로에 대한 관심이 집중되고 있다. 이들이 보고한 바닐로이드 수용체는 캡사이신(capsaicin)에 의해 활성화되며 또한 유해한 열에도 반응하는 특성을 지닌 TRP 이온통로로 여겨진다. 이 외에 최근까지 알려진 TRP 이온통로는 30여 종류로, 크게 TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPA (ankyrin)로 분류되고 있다.³⁾ 이들의 구조적인 차이는 존재하지만 네 개의 아단위로 구성되어 있으며 각 아단위는 여섯 개의 막관통영역(transmembrane domain)으로 이루어진다.^{4,5)}

많은 TRP 이온통로들 중 transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)는 대사성 질환과 관련되는 이상지질혈증 및 고혈압과 주로 관련있는 것으로 알려져 있다⁶⁻¹¹⁾. 따라서 본 연구에서는 한방임상에서 위장관 질환에 주로 사용되는 이중탕(理中湯, Leejung-tang), 육군자탕(六君子湯, Rikkunshito), 보중익기탕(補中益氣湯, Bojungikgi-tang)에 의한 TRPV4 이온통로에서의 효능을 확인하여 대사성 질환의 치료 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 약재

이중탕(인삼, 감초, 백출, 건강)과 보중익기탕(인삼, 백출, 황기, 당귀, 진피, 시호, 감초, 승마)은 한국신약 제약회사(Hankookshinyak Pharmaceutical Co., LTD., Nonsan, Korea; <http://www.hsp.co.kr/>)에서 기증 받아 사용하였다. 육군자탕(창출, 인삼, 반하, 복령, 대추, 진피, 감초, 생강)은 쓰무라 제약회사(Tsumura Kampo 43, Tokyo, Japan; <http://www.tsumura.co.jp/>)에서 구입하여 사용하였다. 증류수에 0.5 g/mL의 농도로 녹인 후에 냉장고에 보관 사용하였다. 일반적으로 한약제제에 의한 이온통로 조절 실험은 50 mg/mL의 농도에서 최고의 반응을 보여¹²⁾, 본 실험에서도 각각 10-50 mg/mL의 농도로 효능을 측정하였다.

2. 재료

본 실험에 사용한 TRPV4 유전자는 pCDNA 플라스미드 벡터(plasmid vector)에 클로닝(cloning)한 것을 사용하였다.

3. 세포배양 및 형질전환

TRPV4를 발현시키기 위해 사용한 human embryonic kidney (HEK) 293 세포주는 ATCC (Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium 배지에 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 배양하였다. Transient transfection을 위해 리포펙타민(lipofectamin)을 이용하였으며, HEK 293 세포를 6-well 세포배양 plates에 5×10^5 세포에 24시간 배양한 후 이용하였다. Transfection 후 24시간이 지난 다음 실험을 진행하였다.

4. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide assay (MTT assay)

세포 생존을 측정은 세포 배양판(24-well)에 카탈세포를 1 mL씩 분주하여 24시간 이상 배양 후 이중탕, 육군자탕, 보중익기탕을 10, 30, 50 mg/mL로 처리한 다음, 37°C, 5% CO₂하에서 24시간 배양한 후, MTT 용액(5 mg/mL)을 배양액에 첨가하였다. 2-3시간 후 배양액을 제거하고 침전물을 dimethyl sulfoxide 1 mL로 녹여서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 전세포 패치 클램프(whole cell patch clamp)

TRPV4를 통하는 전류의 흐름을 측정하기 위한 전기생리 실험은 Axopatch 200B 증폭기(Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA)를 이용하여 패치클램프를 실시하였다. 유리관(glass capillary)을 이용하여 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 3-5메가옴(mega-ohm)에 해당하는 것을 실험에 이용하였다. 막전압 고정법(voltage-clamp method)을 이용하여 전류를 측정하였고, ramp protocol (-100 mV로부터 +100 mV까지)을 이용하였다. 모든 전기생리학적 실험은 실온에서 시행하였다.

6. 실험용액 및 시약

TRPV4를 통한 전류를 측정하기 위한 pipette 용액은 120 mM L-glutamic acid, 20 mM CsCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 5 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 3 mM Magnesium Adenosine triphosphate를 포함한 용액에 CsOH를 이용하여 pH 7.2로 맞추어 사용하였다. Bath 용액은 145 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES를 포함한 용액을 NaOH 용액으로 pH 7.4로

맞춘 후 사용하였다.

7. 통계 처리

대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 Student's *t*-test를 사용하였으며 유의수준 $P < 0.05$ 를 사용하였다. 실험결과는 빈도(%)로 기재하였다.

결과

1. TRPV4가 과발현된 HEK 293 세포 생존율에 미치는 영향

이중탕, 육군자탕, 보중익기탕이 TRPV4가 과발현된 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 농도별로 이중탕, 육군자탕, 보중익기탕을 투여하고 24시간 후, 세포 생존율을 측정된 결과 50 mg/mL의 농도까지는 세포 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1). 따라서 이중탕, 육군자탕, 보중익기탕 각각 50 mg/mL 농도까지는 유의한 세포 생존율을 보였다.

2. 이중탕에 의한 TRPV4의 기능 변화

본 연구에서 전기생리학적 연구 결과를 얻기 위한 세포

패치클램프 실험을 위해 사용한 기본적인 방법을 Fig. 2A, 2B에 표시하였다. Fig. 2A는 세포 패치클램프 시 사용한 세포외액과 내액의 조성을 표시한 것이며, Fig. 2B는 세포막을 흐르는 미세전류를 측정하기 위한 실험 프로토콜을 표시한 것이다. 과발현된 TRPV4 이온통로가 잘 기능하는지를 알아보기 위해서 TRPV4가 과발현된 HEK 293 세포에서 패치클램프 방법을 이용하여 TRPV4 작용제인 GSK1016790A 300 nM을 투여해 보니 TRPV4 전류가 잘 기록되었으며 TRPV4 길항제인 ruthenium red에 의해 억제되는 현상을 확인하였다(Fig. 2C). TRPV4가 과발현된 세포에 이중탕(10-50 mg/mL)을 주면 농도 변화에 상관없이 외향 전류 및 내향 전류의 변화가 없다(Fig. 2B, 3A). 이중탕에 의한 상대적인 전류의 감소는 10 mg/mL에서 $100 \pm 0.3\%$, 30 mg/mL에서 $98.1 \pm 5.1\%$, 50 mg/mL에서 $96.1 \pm 6.2\%$ 였다 (Fig. 3B, 3C). 이중탕은 TRPV4에 아무런 효능을 주지 않는 것으로 나타났다.

3. 육군자탕에 의한 TRPV4의 기능 변화

육군자탕 10-50 mg/mL에서는 이중탕처럼 TRPV4 전류에 아무런 효과가 없었다(Fig. 4). 따라서 육군자탕은 이중

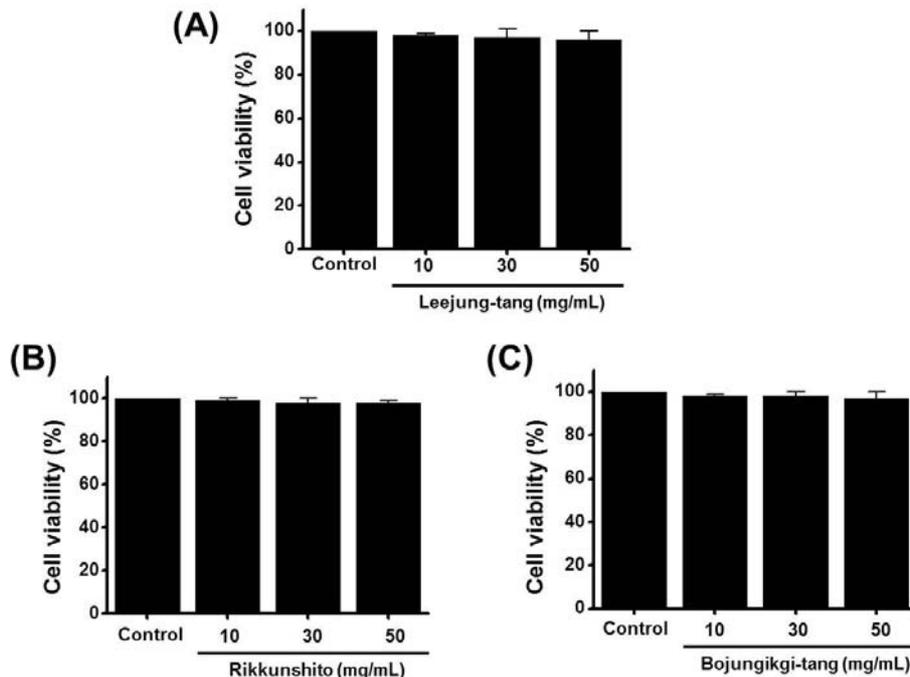


Fig. 1. Effects of Leejung-tang, Rikkunshito, Bojungikgi-tang on cell viability of overexpressed transient receptor potential vanilloid 4 currents in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. HEK 293 cells were attached 6-well plate and added (A) Leejung-tang, (B) Rikkunshito, (C) Bojungikgi-tang as indicated concentrations respectively. After 24 hour incubation, cell viabilities were measured using MTT methods. Values are expressed as mean \pm standard Deviation MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide.

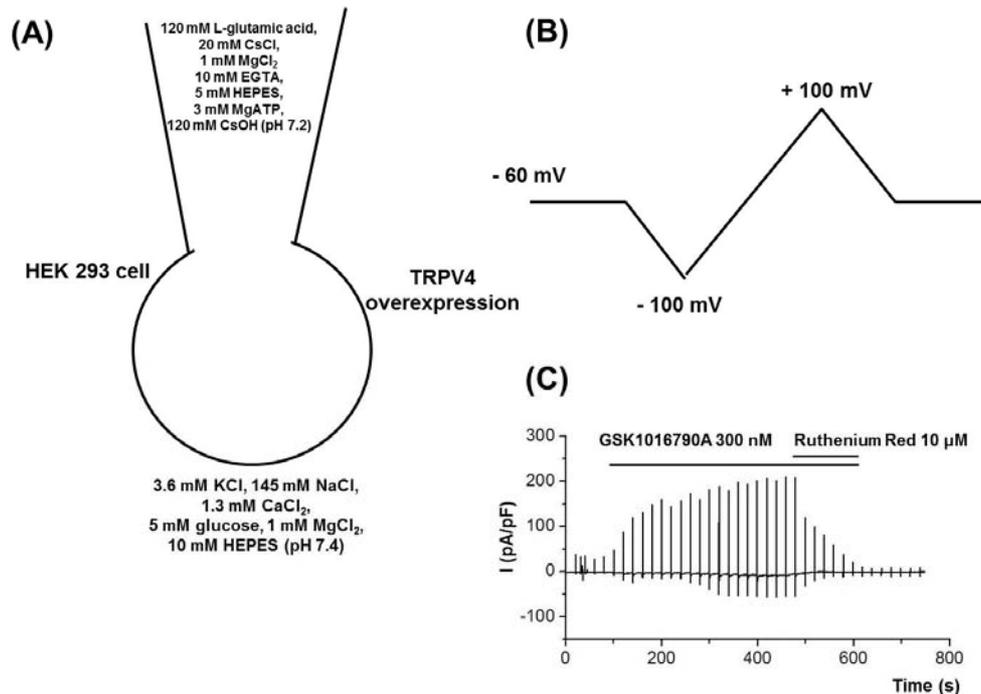


Fig. 2. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) regulation. (A) The components of extra- and intracellular solution, Numbers mean the concentrations (mM). (B) The protocol to check the currents. (C) Effects of TRPV4 agonist, GSK1016790A on overexpressed TRPV4 currents in human embryonic kidney (HEK) 293 cells.

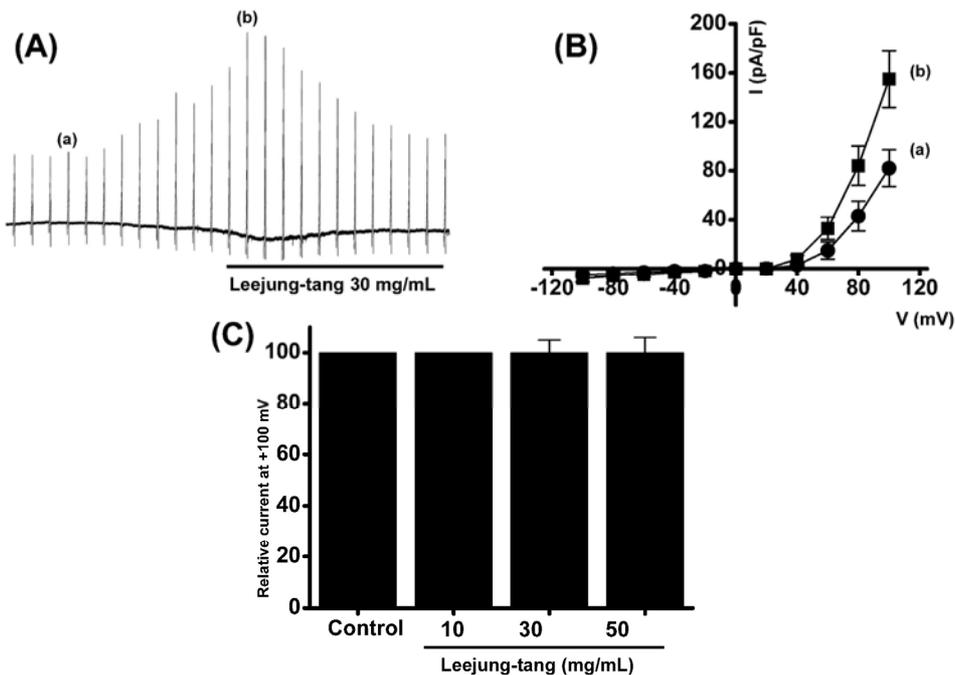


Fig. 3. Effects of Leejung-tang on overexpressed transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) currents in human embryonic kidney (HEK) 293 cells and the current-voltage (I-V) relationship using the whole cell patch-clamp technique, (A) Leejung-tang had no effect on the overexpressed TRPV4 currents in HEK 293 cells at a dose dependent manner. Slow ramp depolarizations from +100 to -100 mV were applied from a holding potential of -60 mV before (a) and during (b) treatment with Leejung-tang. (B) I-V relationships were determined before (a) and during (b) treatment. (C) Concentration-dependent effects of TRPV4 currents by Leejung-tang.

탕처럼 TRPV4 기능 변화에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

4. 보중익기탕에 의한 TRPV4의 기능 변화

보중익기탕에서는 10-50 mg/mL에서 농도 의존적으로 외향 전류 및 내향 전류가 억제되었다(Fig. 5). 보중익기탕에 의한 상대적인 전류의 감소는 10 mg/mL에서 75.2±9.2% ($P<0.05$), 30 mg/mL에서 31.3±12.2% ($P<0.01$), 50 mg/mL

에서 14.1±5.3% ($P<0.01$)였다(Fig. 6A). 보중익기탕에 의한 TRPV4 억제 중간값은 18.2 mg/mL였다(Fig. 6B).

고찰

대사증후군이란 복합적 대사장애가 오랜 시간을 두고 서서히 진행되어 임상적 질병으로 발견된 상태를 의미한다. 따라서 대사증후군으로 진단된 경우에는 임상적인 질

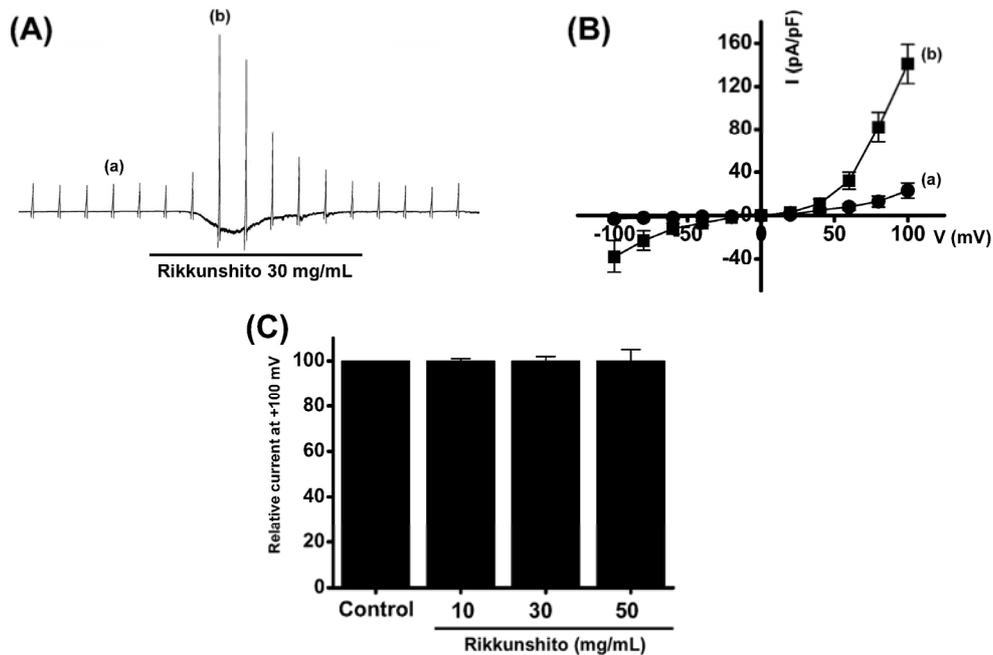


Fig. 4. Effects of Rikkunshito on overexpressed transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) currents in human embryonic kidney (HEK) 293 cells and the current-voltage (I-V) relationship using the whole cell patch-clamp technique. (A) Rikkunshito had no effect on the overexpressed TRPV4 currents in HEK 293 cells at a dose dependent manner. Slow ramp depolarizations from +100 to -100 mV were applied from a holding potential of -60 mV before (a) and during (b) treatment with Rikkunshito. (B) I-V relationships were determined before (a) and during (b) treatment. (C) Concentration-dependent effects of TRPV4 currents by Rikkunshito.

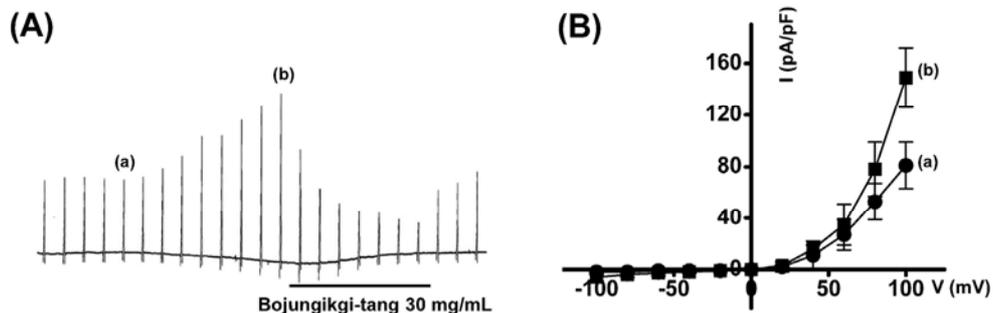


Fig. 5. Effects of Bojungikgi-tang on overexpressed transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) currents in human embryonic kidney (HEK) 293 cells and the current-voltage (I-V) relationship using the whole cell patch-clamp technique. (A) Bojungikgi-tang inhibited the overexpressed TRPV4 currents in HEK 293 cells at a dose dependent manner. Slow ramp depolarizations from +100 to -100 mV were applied from a holding potential of -60 mV before (a) and during (b) treatment with Bojungikgi-tang. (B) I-V relationships were determined before (a) and during (b) treatment.

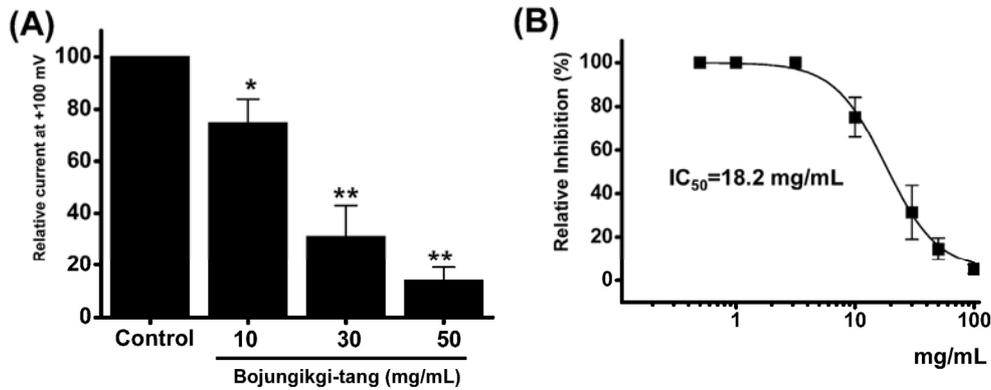


Fig. 6. Responses to Bojungikgi-tang on transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) currents. (A) Concentration-dependent inhibition of TRPV4 currents by Bojungikgi-tang. (B) The estimated median inhibitory concentration value for ginger was 18.2 mg/mL. Bars represent means±standard errors. *P<0.05, **P<0.01.

환 이전에 적극적인 치료로 상태의 악화를 막아야 한다. 현재는 사망 원인 1위가 암이지만 점차 노인 인구가 증가하면서 심장 및 뇌혈관의 동맥 경화에 의한 대사증후군으로 인한 질환이 주요 사망 원인이 될 것이다²⁾.

이중탕, 육군자탕, 보중익기탕은 보험용 한약제제로 소화기 계통 등에 주로 사용되고 있다. 이중탕은 위장기능이 허약하여 혈색이 나쁘고 수족이 차며, 종종 구토, 두중(頭重), 위통(胃痛)일 때에 쓰이고¹³⁾, 육군자탕은 만성 위카타르, 위약증(胃弱症), 위궤양으로 심장하부(心臟下部)가 결리고 식욕부진, 피로가 오며, 손발이 차고 빈혈 증세를 보일 때 주로 쓰인다¹⁴⁾. 보중익기탕은 체력증강제로 사용하는 처방으로 결핵증, 여름타는 병, 병후의 피로, 허약체질 개선, 식욕부진, 허약자의 감기 등에 쓰인다¹⁵⁾.

본 연구에서는 이러한 보험용 한약제제의 새로운 효능에 대한 연구를 진행하던 중에 대사성 질환과 관련된 TRPV4라는 이온통로를 알게 되었으며 TRPV4에 대한 효능을 연구하여, 이중탕 및 육군자탕은 효능이 없지만 보중익기탕은 대사성 질환과 관련된 TRPV4 이온통로를 조절할 수 있음을 알게 되었다. TRPV4 이온통로는 따뜻한 온도(warm temperature)에 반응하는 감수기로 27-34°C의 온도에서 활성화되며 다양한 화학물질, 예를 들어 phorbol ester인 4-alpha-phorbol 12,13-didecanoate와 phorbol 12-myristate 13-acetate, 낮은 pH, citrate, endocannabinoids, 아라키돈산 대사체, 일산화질소 등에 의해서도 활성화된다³⁻⁵⁾. TRPV4 이온통로는 피부 keratinocyte에 분포하고 있기 때문에 신경세포에서 직접 온도를 감지하기보다는 keratinocyte에서 감각신경으로 신호를 전달할 가능성이 있다³⁾.

또한 대사성 질환에서의 역할이 잘 알려져 있다. TRPV4는 polyunsaturated fatty acid의 조절에 관여하는 것으로 알려지고 있으며, 혈관에서 작용 및 다양한 이온을 조절해서 혈압을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다. 또한 고지혈증 및 당뇨병의 조절에서 관여함이 잘 알려져 있다⁶⁻¹¹⁾.

다양한 이온통로들이 대사성 질환과 관련되고 있음이 알려져 있다. 가장 잘 알려진 이온통로로는 췌장 베타세포에서 인슐린 조절과 관련된 포타슘에 의해 활성화되는 ATP 이온통로가 있으며, 그 외에 다양한 칼륨채널, 칼슘채널, 나트륨채널 등이 있다⁶⁾. 하지만 현재까지도 이러한 이온통로가 대사성 질환에 어떤 역할을 하는지는 정확하게 알려져 있지 않다. 최근에 TRP 이온통로가 새롭게 발견되면서 TRP 이온통로가 속한 비선택성 양이온 통로에 대한 관심이 커지고 있다. 많은 TRP 이온통로 중에서 TRPV계통은 주로 피부나 통증에 관여함이 알려지고 있으나 최근에는 대사성 질환과의 관련성에 대한 연구가 관심을 끌고 있다.

결론

현재 많이 사용되는 이중탕, 육군자탕, 보중익기탕은 가정 상비약으로 많은 환자들에게 이용되는 한약제제이다. 이런 한약제제의 새로운 치료 가능성을 확인하는 연구는 중요하며 꼭 필요한 연구라 생각된다. 추후 본 연구에서 확인된 보중익기탕의 효능을 검증하기 위하여 동물실험까지 수행하는 좀 더 깊이 있는 연구가 필요하리라 생각된다. 또한 본 연구를 통해 보중익기탕의 TRPV4 통로 조절 효과

가 있음을 확인함으로써 향후 대사성 질환의 새로운 한약 제제 조합 및 이온통로 조절을 통한 질환 예방 및 치료 소재발굴에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의글

이 논문은 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2017R1A2B2003764).

References

1. Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006 ; 444(7121) : 881-7.
2. Lee HW. Diagnosis and treatment of metabolic syndrome. *Korean J Med*. 2006 ; 71(4) : 463-7.
3. Jung SJ. The role of transient receptor potential channel in pain. *Hanyang Med Rev*. 2011 ; 31(2) : 116-22.
4. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003 ; 426(6966) : 517-24.
5. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. 2005 ; 38(3-4) : 233-52.
6. Gao F, Wang DH. Impairment in function and expression of transient receptor potential vanilloid type 4 in Dahl salt-sensitive rats: significance and mechanism. *Hypertension*. 2010 ; 55(4) : 1018-25.
7. Earley S, Pauyo T, Drapp R, Tavares MJ, Liedtke W, Brayden JE. TRPV4-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 ; 297(3) : H1096-102.
8. Lakk M, Vazquez-Chona F, Yarishkin O, Križaj D. Dyslipidemia modulates Müller glial sensing and transduction of ambient information. *Neural Regen Res*. 2018 ; 13(2) : 207-10.
9. Mamenko MV, Boukelmoune N, Tomilin VN, Zaika OL, Jensen VB, O'Neil RG, et al. The renal TRPV4 channel is essential for adaptation to increased dietary potassium. *Kidney Int*. 2017 ; 91(6) : 1398-409.
10. Sánchez JC, Rivera RA, Muñoz LV. TRPV4 Channels in human white adipocytes: electrophysiological characterization and regulation by insulin. *J Cell Physiol*. 2016 ; 231(4) : 954-63.
11. O'Connor CJ, Leddy HA, Benefield HC, Liedtke WB, Guilak F. TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 ; 111(4) : 1316-21.
12. Kim D, Kim JN, Nam JH, Lee JR, Kim SC, Kim BJ. Modulation of pacemaker potentials in murine small intestinal interstitial cells of Cajal by Gamisoyo-San, a traditional Chinese herbal medicine. *Digestion*. 2018 ; 98(1) : 56-68.
13. Nam HJ, Chae BY. The experimental study in the anti-allergic effects of Leejungtang and Leejungtanggamibang. *J Kor Ori Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*. 2000 ; 13(1) : 60-77.
14. Kim YM, Park YC, Jo JH, Kang WC, Son MW, Hong KE. Effect of herb medicine treatment for functional dyspepsia: a randomized placebo-controlled and compared standard treatment trial. *J Korean Med*. 2010 ; 31(1) : 1-13.
15. Park YS, Yoon SH. Effect of Bojoongikki-tang, Sipjeondaebotang, Youngkaechulgam-tang on gastric contractility estimated by bowel sound in rats. *Korean J Intern Med*. 2010 ; 31(2) : 212-23.
16. Hiriart M, Velasco M, Larqué C, Diaz-Garcia CM. Metabolic syndrome and ionic channels in pancreatic beta cells. *Vitam Horm*. 2014 ; 95 : 87-114.