

원저

人蔘이 중추신경계 손상 동물 모델의 재생에 미치는 영향

문형철* · 김윤욱** · 송봉근**

*원광대학교 한의과대학 침구학교실

**원광대학교 한의과대학 내과학교실

Abstract

The Effect of Ginseng Radix on Regeneration After Central Nervous System Injury

Mun Hyung-cheal*, Kim Yun-uk** and Song Bong-keun**

*Dept. of Acupuncture and Moxibustion, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

**Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Objectives : Following central nervous system (CNS) injury, inhibitory influences at the site of axonal damage occur. Glial cells become reactive and form a glial scar, know as gliosis. As well, myelin debris such as MAG inhibits axonal regeneration. Astrocyte-rich gliosis relates to up-regulation of GFAP and CD81, and eventually becomes a physical and mechanical barrier to axonal regeneration.

It is postulated that when the astrocytic reaction is absent, regeneration of axons can occur. It was reported that treatment with anti CD81 antibodies enhanced functional recovery in rats with spinal cord injury.

Methods : MAG is one of several endogenous axon regeneration inhibitors that limit recovery from central nervous system injury and disease. It was reported that molecules which block such inhibitors enhanced axon regeneration and functional recovery.

Results : In this current study, the author investigated the effect of the water extract of Ginseng Radix on the regulation of CD81, GFAP and MAG which increases when gliosis occurs.

MTT analysis was performed to examine cell viability, and cell based ELISA, Western Blot and PCR were used to detect the expression of CD81, GFAP and MAG. Immunohistochemistry was also performed to confirm in vivo.

Conclusions : We observed that Ginseng Radix significantly down-regulates the expression of CD81, GFAP

* 이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2005-003-E00308)

· 접수 : 2007년 11월 12일 · 수정 : 2007년 11월 23일 · 채택 : 2007년 11월 23일

· 교신저자 : 문형철, 광주 남구 주월동 543-8 원광대학교광주한방병원 침구과

Tel. 062-670-6446 E-mail : freer9@hanmail.net

and MAG by means of cell based ELISA, Western Blot and PCR. In immunohistochemistry, expression of CD81, GFAP and MAG also decreased.

Taken together, these results suggest that Ginseng Radix can be a candidate for regenerating CNS injury.

Key words : Ginseng Radix, CNS injury, CD81, axonal regeneration

I. 緒 論

평균수명연장과 출산율 저하로 고령화 사회를 맞아 노령인구에 나타나는 노인성 질환들이 사회문제로 대두되고 있다. 그중 치매는 뇌신경이 일시적 혹은 지속적으로 손상되어 일상생활 유지에 문제가 발생하는 중후군인데 주로 기억력 장애나 인지력 저하가 나타난다^{1,2)}.

한의학에서 痴呆는 呆病³⁾, 癡狂⁴⁾, 健忘^{4,5)} 등의 범주에 속하며, 肝腎虛弱, 稟受不足, 心脾陽虛, 痰濁, 瘀血 등의 원인으로 발생한다.

중추신경계가 손상 후 재생되지 못하는 원인으로 교세포 반흔형성과 myelin내 억제인자의 활동으로 보고된다. 뇌혈관장애나 척수마비와 같은 중추신경계의 손상이 일어나면 그 결과 세포증식 및 교세포 반흔형성이 나타나게 되는데 중추신경계 손상의 마지막 단계에서 나타나는 교세포화(gliosis)는 GFAP 양성으로 나타나는 astrocyte의 성장이며 이는 신경 재생의 물리적 분자학적 장벽으로 작용한다. 아울러 GFAP와 같은 양성으로 CD81의 발현 증가가 동반된다^{6,7)}. 이 중에서 CD81은 뇌, 척수, 망막 등의 중추신경계에 존재하는 표면단백질(transmembrane protein)로 중추신경계에 손상이 가면 급격히 발현이 증가하여 세포의 증식과 이동, 재생들에 관여를 하는 것으로 밝혀지고 있다⁸⁻¹¹⁾. GFAP는 뇌손상, 중추신경계감염 등에서 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로 GFAP가 현저하게 증가하면 astrocyte가 활성화된다는 것을 의미하고 활성화된 astrocyte는 신경변성과정(gliosis)을 촉진하게 된다¹²⁻¹⁴⁾. MAG(myelin-associated glycoprotein)는 중추신경계가 손상을 받았을 때 회복을 방해하는 axon의 재생을 억제하는 세포활성물질이다¹⁵⁻¹⁸⁾.

이처럼 중추신경계의 손상이 일어났을 때 CD81, GFAP, MAG가 발현하여 중추신경계 손상회복에 관여할 것으로 사료된다.

人蔘은 오가피과에 속하는 다년생 초본으로 그 뿌리를 건조하여 사용한다¹⁷⁾. 微溫, 甘微苦, 無毒하여 大補元氣, 補脾益氣, 生津, 寧神益智 효능이 있어 氣脫萎證이나 脾胃虛弱, 消渴에 사용되고 정신불안으로 인한 怔忡, 不眠, 自汗 등에 빈번히 사용 된다^{18,46)}.

人蔘은 元氣의 회복뿐만 아니라 뇌신경에도 영향을 미치는데 주로 중추신경계통에서 고차신경계통에 대해 특이한 작용이 있어 신경활동의 기민성을 높여주는 효과를 나타내기도 한다¹⁹⁾. 최근에는 허²⁰⁾, 김²¹⁾, 전²²⁾ 등의 실험적 연구에 의하여 人蔘이 신경세포 손상 방어효과가 있음을 보고하였다.

현재 중추신경계 회복을 위한 연구는 소염제나 cytokine²³⁾을, astrocyte의 gliosis 반응을 억제하기 위한 protease²⁴⁾를, pyrogen²⁵⁾을, hydroxycholesterol 유도체를⁵¹⁾ 실험적으로 사용하기도 하였다. 또한 방사선을 이용하여 glial cell을 제거하는 방법을 사용하기도 하였고²⁶⁾, 손상 부위에 미분화된 조직을 이식하기도 하였다^{27,28)}.

최근 연구에 의하면 astrocyte에서 GFAP를 제거한 결과 신경의 성장 및 재생이 촉진되었고²⁹⁾, 실험적으로 척수손상을 가한 쥐에 항 CD81 항체를 투여한 결과 신경이 회복되었으며³⁰⁾, MAG의 활동을 억제한 결과 손상된 시신경이 회복을 나타냈다고 보고하였다³¹⁾.

이에 저자는 人蔘이 중추신경계 손상 후 회복에 관련된 효과를 알아보기 위해 흰쥐의 astrocyte를 이용하여 중추신경회복에 관련된 CD81, GFAP, MAG의 발현을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 藥材 및 材料

1) 藥材 및 檢액 조제

본 실험에 사용한 약재는 圓光大學校 本草學教室에서 人蔘 200g을 구입한 후 精選하여 실험에 사용하였다.

실험에 사용할 人蔘 200g을 증류수 2,000ml에 넣고 3시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출물을 Whatman 필터로 여과한 후 감압기로 농축하였다. 감압 농축한 추출물은 동결 건조하였다. 동결 건조한 추출물은 0.9% 식염수에 녹여 사용하였다.

2) 試藥 및 動物

시약들은 Sigma(St Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 1차 항체인 GFAP(sc-33673)와 β -actin(sc-47778)은 Santa Cruz Biotechnology, Inc(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, MAG(MAB 1567)은 Chemicon(Temecula, CA, USA)에서 구입하였다. CD 81항체(AMP1)는 Dr. Geisert(University of Tennessee, TN, USA)로부터 기증받아 실험에 사용하였고, DMEM은 Hyclone(Logan, UT, USA)에서 구입하여 사용하였다.

본 실험에 사용한 동물은 180-200g의 7주된 수컷 흰쥐(SD rats)로 다물 사이언스(대전)에서 구입하였으며 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 기타 동물실험에 관한 규정은 NIH의 실험동물관리 지침(NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)의 규정을 준수하였다.

2. 方法

1) Astrocyte 분리 및 배양

(1) Primary astrocyte preparation

생후 8일된 Sprague-Dawley계 흰쥐를 얼음에 넣어서 마취시킨 후에 뇌를 꺼내서 1×HBSS용액에 넣고 수막을 제거하였다. 그리고 잘게 조각 낸 대뇌 피질을 75cm³ flask에 총량이 10ml가 되도록 1×HBSS를 넣고 80rpm에서 10분 동안 교반하였다. 여기에 0.1% trypsin이 포함된 20ml 1×HBSS를 첨가하여 잘게 부서진 조직이 점성을 가지고 서로 붙을 때까지 약 10-20분 교반하였다. 다음 이렇게 점성을 보이는 primary cell을 10ml pipette를 이용하여 분리시킨 후 70 μ m str-

ainer를 이용하여 filtration하였다.

Filter를 통과한 primary cell은 800rpm에서 5분 동안 원심 분리하였고, 가라앉은 cell에 30ml astrocyte media(20% FBS, 100U/ml penicillin/streptomycin, 2mM glutamin)를 넣고 75cm³ flask에 seeding하였다. Cell들은 3-4일에 한번씩 media를 바꾸어 주었으며 Flask에 cell이 90-100% 자랐을 경우에 0.25% trypsin/EDTA (Hyclone)으로 계대 배양하여 실험에 이용하였다.

(2) Cell culture

Primary astrocyte cell을 1×10⁷⁻⁸씩 100mm cell culture dish에 seeding하고 3-4일에 한 번씩 cell culture용 media(10% FBS, 100U streptomycin/penicillin, DMEM)로 계대 배양하였으며 5-6 passage 이내의 cell들을 실험에 사용하였다.

2) MTT assay

세포 생존율을 조사하기 위하여 MTT를 실시하였다. 즉 人蔘 extract를 10% FBS media에 0.05%, 0.1%, 1%, 5%, 10% 농도별로 녹인 후에 0.45 μ m filter를 이용해서 여과하였다. 다음 96 well plate의 한 well당 1×10⁴개의 astrocytes를 seeding한 후에 준비된 人蔘 extract를 농도별로 처리하고 16시간 배양한다. 배양 후 media를 제거하고, PBS로 한 번 씻어준 다음에 5 mg/ml 10×MTT 용액을 한 well당 100 μ l씩 넣고 37°C, CO₂ incubator에서 4시간 배양한다. 4시간 후에 MTT solution을 제거하고, PBS로 한 번 씻어준 후에 0.2% acid-isopropanol을 100 μ l 넣고 5분간 흔들어 준 다음에 UVM-340 microplate reader(Asys Hitech, Austria)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)

人蔘 extract 처리 후 CD81, GFAP 및 MAG의 발현은 cell-based ELISA 방법으로 측정하였다. 즉 96 well plate의 한 well당 1×10⁴ astrocyte cell을 seeding한 뒤에 10% FBS의 media에 녹인 人蔘 extract를 0.45 μ m filter를 이용해서 여과한 다음 0.05%, 0.1%, 1%의 농도별로 16시간 처리하였다. 다음 media를 제거하고 PBS로 한 번 씻어준 다음에 100 μ l 3.7% formaldehyde로 상온에서 10분간 cell을 고정하였다. 이후 cell을 PBS+0.1% Triton X-100(PBST)으로 5분씩 3회 씻어준 다음 PBST+1% BSA로 상온에서 1시간 blocking 하였다. 다음에 1차 항체(1 : 100)를 PBST+1% BSA

에 희석하여 상온에서 2시간 처리하였고 다시 PBST로 5분씩 3회 씻어준 후에 2차 항체를(1 : 1,000) 동일하게 PBST+1% BSA에 희석하여 상온에서 2시간 처리하였다. 다음 PBST로 2번 씻고 PBS로 1번 씻어준 후 TMB(Sigma-T0440) 용액을 각 well당 100 μ l씩 넣고 5분정도 반응을 시킨 후에 TMB stop solution(Sigma-s-5814) 100 μ l로 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 용액은 UVM-340 microplate reader(Asys Hitech, Austria)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Western blotting

100mm dish에 1 \times 10⁴ astrocyte cell을 seeding한 뒤에 10% FBS의 media에 녹인 1% 人蔘 extract를 0.45 μ m filter를 이용해서 여과한 다음 16시간 처리하였다. 다음 cell을 PBS로 한 번 씻은 후에, 1ml PBS를 넣고, cell scraper를 이용하여 cell을 수거하여 1.5ml tube에 옮긴 후에, 5,000-6,000rpm에서 10초간 원심 분리하여 상층액은 버리고, 가라앉은 cell에 2x protein sample buffer를 넣고, 98 $^{\circ}$ C에서 약 10분간 끓인 다음 5,000-6,000rpm에서 10초간 원심분리 하였다. 상층액은 12-15% SDS-PAGE gradient gel에 loading하여 분리시킨 다음 nitrocellulose membrane에 transfer system (Bio-Rad, USA)을 이용하여 단백질을 전이시켰다(100 volts, 0.35A, 1hr). 다음 nitrocellulose membrane에 1차 antibody를 상온에서 2시간 처리한 다음 10분씩 2회 TBS-T로 씻고, HRP가 결합 되어 있는 2차 antibody를 상온에서 1시간 반응 시켰다. 그리고 다시 TBS-T로 10분씩 3회 씻고, HRP와 반응하는 DAB solution(0.6mg/ml, pH 7.6 Tris-Cl, 3 μ l/ml H₂O₂)에 nitrocellulose membrane을 반응 시켰다.

5) PCR

(1) RNA의 준비

人蔘 extract를 투여한 14일째와 30일째 흰쥐의 뇌를 적출한 다음 Trizol(MRC, USA) 1ml을 넣어서 homogenize하였다. 다음 4 $^{\circ}$ C, 13,000rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 새 튜브에 옮기고 0.2ml의 chloroform을 넣고 15초 정도 잘 섞이게 흔들어준 다음 상온에서 15분 반응 시켰다. 반응 후에 다시 4 $^{\circ}$ C, 13,000rpm으로 15분 원심 분리하여 상층액만을 새 튜브에 옮겼다. 그리고 0.5ml의 isopropanol을 넣고 잘 섞이도록 한 후 같은 방법으로 원심 분리한 다음 상층액을 버리고 남은 pellet을 10분간 말린 후 DEPC를 처리한 물을 적당량 넣어 55 $^{\circ}$ C에서 15분간 녹여 실험에

사용하였으며, 녹인 RNA는 실험 시까지 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

(2) RT-PCR과 PCR

위의 방법으로 얻어진 RNA에 ImProm-IITM Reverse Transcription System(Promega, USA)을 이용해 RT-PCR을 수행(70 $^{\circ}$ C 5분, 4 $^{\circ}$ C 10분, 25 $^{\circ}$ C 5분, 42 $^{\circ}$ C 1시간, 70 $^{\circ}$ C 15분)한 다음 얻어진 cDNA와 아래와 같은 sequence primer를 사용하여 2X PCR Master mix(Solgent, Daejeon)로 PCR을 수행(30 cycle, 94 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분)하였다.

PCR 수행 시 사용한 gene들의 primer sequence들은 CD81(5'-CTG TTT GCC TGT GAG GTA GC-3', 5'-TCA GTG TGG TCA GCG TAT TG-3'), GFAP(5'-AGG GAC AAT CTC ACA CAG GAC-3', 5'-CTC CAG CGA CTC AAC CTT C-3'), GAPDH (5'-ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC G-3' 5'-GTT GTC ATG GAT GAC CTT GGC C-3')이었다. 얻어진 PCR product들은 1x TBE buffer에서 0.1 μ g/ml ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에 전기영동 시켰으며 전기영동 후 자외선 발광 장치에서 사진을 찍어 발현 정도를 비교하였다.

6) Surgery and perfusion

180-200g된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 ketamin/rompun으로 복강마취 한 다음 두피를 절개하여 두개골을 노출시키고 대뇌 피질에 3mm 깊이의 상처를 낸 후에 두피를 다시 덮고 clip으로 봉합하였다. 수술 후 7일, 14일, 30일 동안 人蔘 extract를 0.5g/kg 용량으로 꼬리에 1cc 주사기를 이용하여 정맥 투여하였다.

수술 후 7일, 14일, 30일이 지난 후에 ketamin/rompun으로 복강마취하고 심장에 PBS를 관류시킨 다음 4% paraformaldehyde를 주입하고 고정하였다. 다음 뇌를 적출하여 4% paraformaldehyde에 넣고 1-2일간 고정시킨 후 30% sucrose에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

7) Immunohistochemistry

적출된 뇌조직을 microtome을 이용하여 30-35 μ m 두께로 cryostat section한 뒤에, 24 well plate에서 floating staining하였다. 즉 조직을 BBS로 두 번 씻고, preincubation buffer(2% BSA, 0.05% triton X-100 in BBS)로 30분간 반응시킨 다음 1차 antibody(1 : 100-200)을 0.4% BSA를 포함한 BBS에 희석하여 상온에

서 2시간 교반하면서 반응시켰다. 다시 BBS로 조직을 2번 씻고 HRP가 결합되어 있는 2차 antibody(1 : 2,000)를 0.4% BSA가 포함된 BBS에 희석하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 다음으로 조직을 DAB solution(1mg/ml, pH 7.6 Tris-Cl)에 H₂O₂(3μl/ml)를 첨가하여 반응시키고 PBS로 세척하여 반응을 정지시킨 다음 염색된 조직을 slide에 mounting하고 cover glass로 덮은 다음 현미경(Olympus, Japan)으로 단백질의 발현을 관찰하였다.

8) 통계분석

모든 결과는 평균값±표준오차로 나타냈으며, 그룹간의 평균값 비교를 위해서 Student's paired t-test를 실시하였다. 통계적 유의성을 위한 유의수준은 p<0.05로 판정하였다.

III. 結 果

1. 人蔘 extract의 세포 독성 관찰

人蔘 extract의 세포독성 유무를 관찰하기 위하여 astrocyte에 각각 0.05%, 0.1%, 1%, 5%, 10% 농도의 人蔘 extract를 16시간 단독 처리하여 MTT assay를 실시하였다. 인삼 extract는 1% 이하에서 높은 생존율을 보였다. 즉 人蔘 extract 0.05%에서 90%, 0.1%에서 90%, 1%에서 72%, 5%에서 56%, 10%에서 18%

의 생존율을 보였다(Fig. 1).

2. Astrocyte로부터 人蔘 extract의 CD81, GFAP, MAG 분비 조절 효과

Astrocyte에 人蔘 extract의 세포활성물질 분비 조절 효과를 알아보기 위해 세포활성물질인 CD81, GFAP, MAG의 발현량을 분석하였다. 먼저 astrocyte에 人蔘 extract를 0.05%, 0.1%, 1%로 처리한 후 16시간 후에 CD81, GFAP, MAG를 ELISA 방법으로 정량하였다.

그 결과 CD81은 대조군에 비해 人蔘 extract를 0.05%, 1%일 때 유의성 있게 감소하였으며, MAG는 1%일 때 유의성 있게 감소하였다. 그러나 GFAP는 역시 감소하였으나 유의성은 보이지 않았다(Fig. 2, 3, 4).

3. 人蔘 extract의 CD81과 GFAP 발현 조절 효과

人蔘 extract가 CD81과 GFAP의 발현에 미치는 영향을 살펴보고자 astrocyte에 人蔘 extract를 처리한 후 Western blotting 방법과 PCR 방법으로 CD81과 GFAP의 발현 수준을 분석하였다.

먼저 astrocyte에 人蔘 extract 1%를 처리한 후, 세포질 내에서 CD81과 GFAP의 단백질 발현량의 변화를 Western blotting으로 분석하였다. 그 결과 astrocyte에서 증가된 CD81은 人蔘 extract에 의해 억제되었으나 GFAP는 유의성있는 변화를 보이지 않았다(Fig. 5).

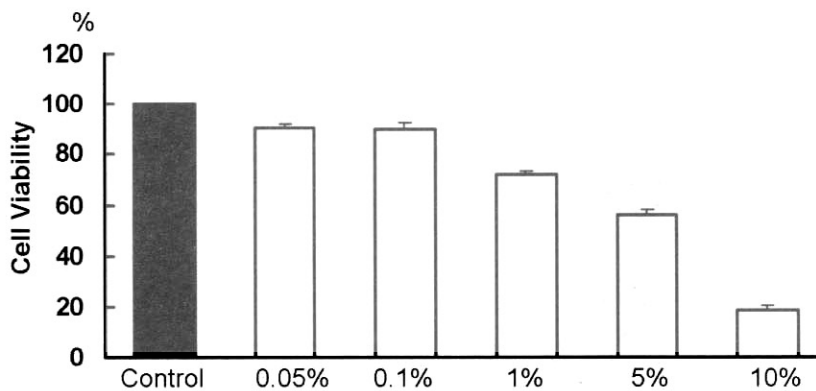


Fig. 1. The effect of the water extract of Ginseng radix on the MTT assay

The cells were incubated for 16h with different concentration of water extract of Ginseng radix. The administration of water extract of Ginseng radix showed about 90% of cell viability at 0.05%, 90% at 0.1% and 72% at 1%. Cell viability was decreased to 56% and 18% at 5% and 10% concentration respectively. Data represent the mean±SEM of four independent experiments.

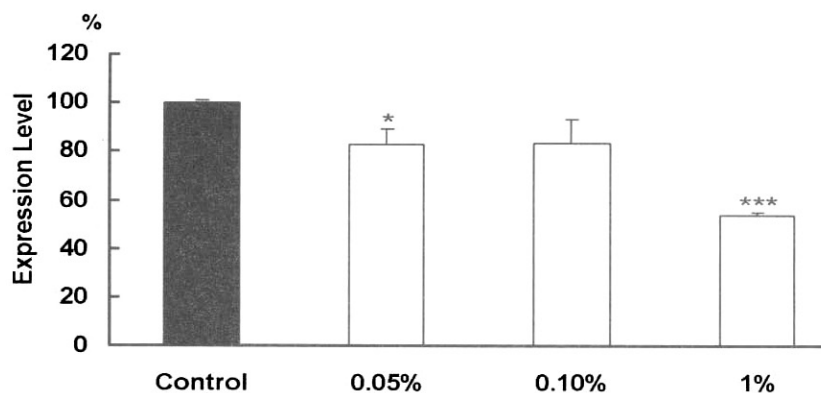


Fig. 2. The effect of water extract of Ginseng radix on the expression of CD81

Astrocytes were pretreated with different concentration of water extract of Ginseng radix for 16hr and CD81 levels were measured from cell supernatants using ELISA method. The administration of water extract of Ginseng radix significantly decreased the CD81 expression at 0.05% and 1%. Values are mean±SEM of duplicate determinations from six separate experiments. Asterisks denote significant differences from the control : * P<0.05, *** P<0.001.

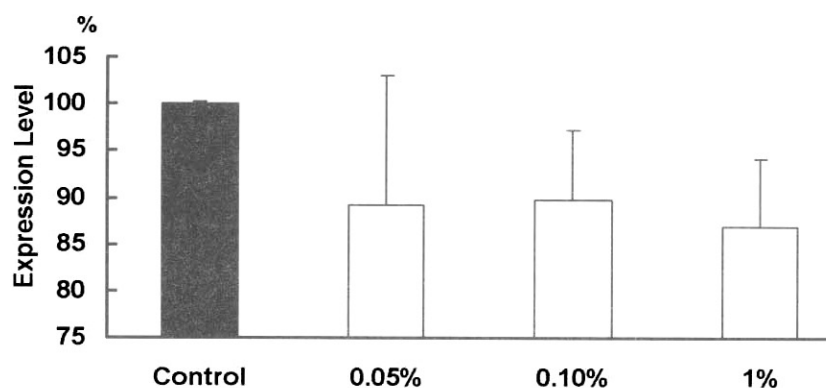


Fig. 3. The effect of the water extract of Ginseng radix on the expression of GFAP

Astrocyte were pretreated with different concentration of Ginseng radix for 16h and GFAP levels were measured from cell supernatants using ELISA method. The administration of Ginseng extract decreased the expression of GFAP without significance. Values are mean±SEM of duplicate determinations from six separate experiments.

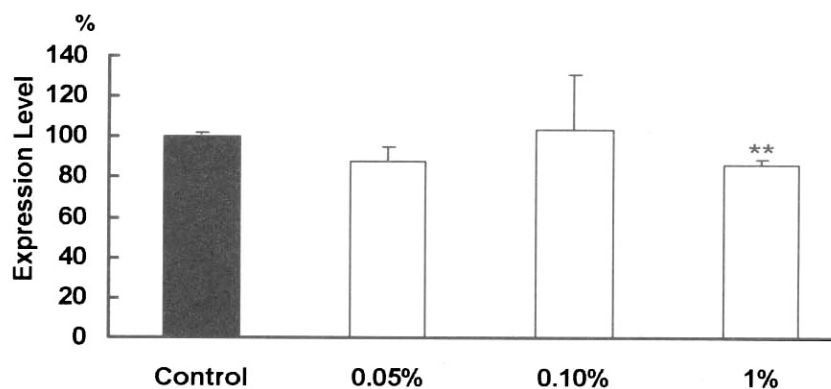


Fig. 4. The effect of the water extract of Ginseng radix on the expression of MAG

Astrocyte were pretreated with different concentration of Ginseng radix for 16h and MAG levels were measured from cell supernatants using ELISA method. The administration of Ginseng radix significantly decreased the expression of MAG at 1%. Values are mean±SEM of duplicate determinations from six separate experiments. Asterisks denote significant differences from the control : ** p<0.01.

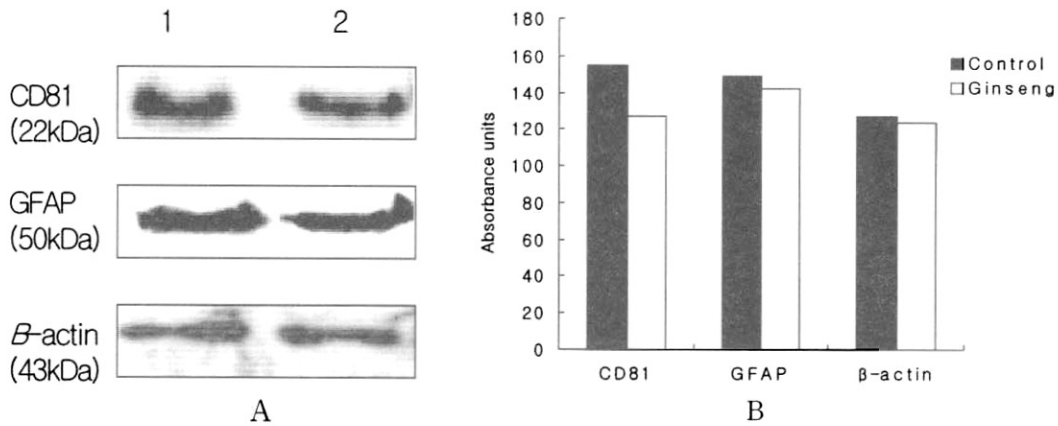


Fig. 5. The expression of CD81 and GFAP after administration of the water extract of Ginseng radix

Astrocyte cells were pretreated with Ginseng radix for 16h and the whole cell lysates were separated with gradient SDS-PAGE gel. Then the protein level was quantified with immunoblot method. The expression level of CD81 was down regulated but GFAP didn't show significant change(A, 1. unstimulated cells ; 2. Ginseng extract 1%). The level of each protein expression was compared using ImageJ and documented into graph at(B). separate.

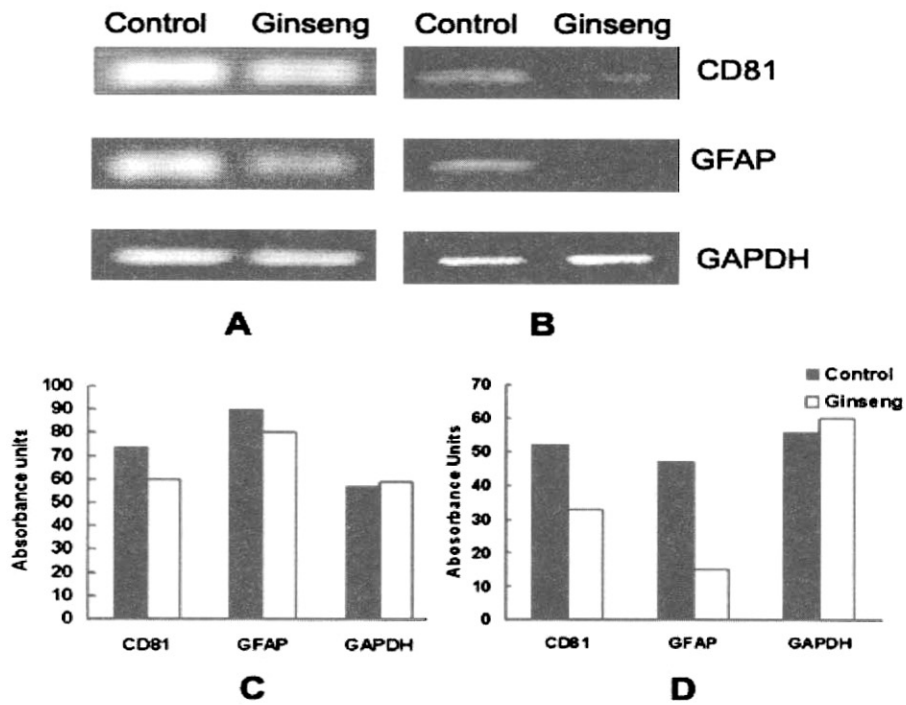


Fig. 6. The effect of the water extract of Ginseng radix on the RNA expression of CD81 and GFAP

Rat brains were homogenized on the 14th and 30th day after treatment and isolated RNA was amplified by PCR. The expression of CD81 and GFAP was decreased at the 14th(A) and 30th day(B). The level of each RNA expression was compared using ImageJ and documented into graph at 14th(C) and 30th day(D).

다음으로 rat의 뇌에 손상을 가한 후 인삼 extract 0.1g/kg를 매일 꼬리정맥에 투여한 후 14일과 30일 뒤에 각각 뇌를 적출하여 PCR 방법으로 CD81과 GFAP

의 RNA 발현을 분석하였다. 그 결과 astrocyte에서 증가된 CD81과 GFAP 발현이 인삼 extract에 의해 억제되었다(Fig. 6).

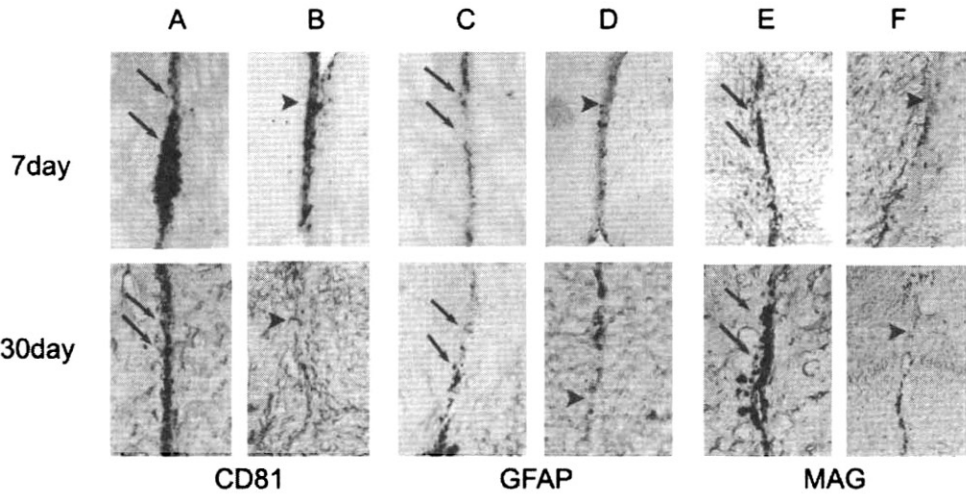


Fig. 7. The effect of the water extract of Ginseng radix on the expression of CD81, GFAP and MAG at the 7th and the 30th day

Stab wounds were made 3mm deep in the cerebral cortex of rats using scalpel blade and the water extract of Ginseng radix was administrated through tail vein. Frozen sections were cut in the coronal plane and stained with immunohistochemical methods. Notice that all the protein immunoreactivity at the site of stab wound shows the down regulation in the experiment(B, D, F) compared with the control(A, C, E). The wound lesions are seen at the control(arrow) and the experiment(arrowhead) group.

4. 손상된 흰 쥐 뇌세포로부터 人蔘 extract의 CD81, GFAP, MAG의 억제 효과

다음은 in vivo 실험으로 人蔘 extract의 신경세포 손상 보호효과를 알아보고자 CD81, GFAP, MAG의 억제능력을 Immunohistochemistry 분석으로 실험하였다.

먼저 rat의 뇌에 손상을 가한 후 人蔘 extract 0.5g/kg을 각각 7일, 14일, 30일 동안 꼬리정맥에 매일 주사하였다. 다음으로 뇌를 적출하여 절편을 만들어 현미경으로 CD81, GFAP, MAG의 발현을 관찰하였다. 그 결과 人蔘 extract를 주입한 손상된 뇌세포에서 CD81, GFAP, MAG의 발현이 대조군에 비해 억제되었다(Fig. 7).

IV. 考 察

한의학에서 뇌에 대한 인식은 처음에 腎과 관련된 奇恒之府 중의 하나로 인식하였다^{32,33}. 그러나 후대에 李³⁴는 “腦爲元神之府”라 하여 뇌가 神을 총괄하는 주체적인 기관이라 하였고, 王³⁵은 “人之記性 皆屬腦中”이라 하여 사람의 정신 사유 활동과 뇌의 기억 간에

밀접한 연관이 있다고 말하여 오늘날 서양의학적인 뇌와 유사하게 생각하였다.

《靈樞 海論篇》³³에서는 “腦爲髓之海 髓海有餘 輕徑多力 自過其度 髓海不足 則腦轉耳鳴 脛痠眩冒 目無所見 懈惰安臥”라 하여 사람이 나이가 들어 뇌의 정상생리기능이 저하되면 髓海가 공허해지고 神明이 총명함을 잃게 된다. 뇌의 기능이 실조 또는 감퇴되면 頭痛, 眩暈, 耳鳴, 失眠, 健忘 등의 증상이 발생하게 된다. 심하면 지능저하, 치매 등이 발생한다^{36,37}.

치매란 의식이 청명한 상태에서 전반적인 인지기능의 장애를 나타내는 질환으로 보통 만성, 또는 진행성 뇌질환에 의해 발생되며 기억, 사고, 지남력, 이해 계산, 학습, 언어, 판단 등 다수의 고위대뇌기능에 장애가 나타나는 증후군이다³⁸. 치매는 임상양상이 다양하여 사실상 그 분류가 불가능하지만 크게 알츠하이머형 치매, 혈관성 치매, 약물 등에 의한 기타 치매로 분류해 볼 수 있으며, 근본적인 원인은 다양한 발병요인에 의한 중추신경세포의 손상이다^{39,40}. 중추신경세포의 손상기전은 노인성 치매, 파킨슨씨병 등의 퇴행성 신경계질환에서는 생체 내의 다양한 생화학적 요인들이 작용하여 신경교세포의 고사를 유발한다고 알려져 있다^{41,42}.

Astrocyte는 신경학적 세포들 중 하나로 중추신경계의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려

저 있다. 항상성을 유지하기 위해서는 다양한 면역매개 세포활성물질들을 합성하고 반응하는데 이 세포활성물질들은 알츠하이머병, 다발성 경화증과 같은 다양한 신경병리학적 질환에 관여 한다^{43,44}.

뇌손상, 중추신경계감염, 치매 등 중추신경계 손상이 일어나면 볼 수 있는 astrocyte의 가장 특징적인 표식자로 GFAP(glial fibrillary acidic protein)를 들 수 있다. GFAP는 8-9nm, 52kDa 정도의 크기로 type III intermediate filament(IF)로 중추신경계에서 성숙 astrocyte의 glial filament의 주성분이다. GFAP는 cytoskeletal protein에 속하는 단백질로 astrocyte의 성장에 구조적 안정화를 제공함으로써 astrocyte의 운동성과 형태를 조절하는데 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다. 고위 척추동물의 중추신경계에서 직접적인 외상, 질병, 유전자에 혹은 화학적 손상 후에 astrocyte는 astrogliosis라는 전형적인 방식으로 반응한다. Astrogliosis는 특징적으로 GFAP의 빠른 합성이 나타나고, 이것은 GFAP antibody를 통해서 증명할 수 있다. 중추신경계에서 astrocyte를 확인하는데 일반적으로 사용되는 방법은 1985년 mouse gene에서 분자학적으로 복제하여 만든 GFAP antisera가 사용되면서 GFAP의 연구영역이 확대되었다⁴⁵.

중추신경계의 손상이 일어나면 그 결과로 세포증식 및 교세포 반흔 형성이 일반적으로 나타나게 된다. 중추신경계에서 손상의 마지막 단계에서 나타나는 교세포화(gliosis)는 glial fibrillary acidic protein(GFAP)양성으로 나타나며, 이는 신경 재생의 물리적 분자학적 장벽으로 작용한다^{12,14}.

아울러 중추신경계 손상 후 GFAP의 발현과 같은 양상으로 CD81의 발현 증가가 동반된다. CD81은 tetraspanin계에 속하는 표면단백질(transmembrane protein)로 뇌, 척수 및 망막 등의 중추신경계에 존재하는 것으로 밝혀져 있으며, 중추신경계 손상 후 급격히 발현이 증가한다. CD81은 237개의 아미노산, 26kDa의 분자량을 가진다. 두 개의 extracellular loop와 intracellular C&N-terminal을 가지고 있으며 세포접촉의 안정화와 교세포의 증식을 molecular switch regulation한다. CD81은 세포간 접촉에서 일어나는 과정에 관여하여 세포의 신호전달경로를 자극하는 세포부착단백질과 관련되어 있으며, CD81/tetraspanin 복합체를 형성하여 제2 신호전달계를 자극함으로써 중추신경계 손상 후 회복과정에 관여하는 것으로 알려져 있다^{8,9}.

또한 중추신경계의 회복을 방해하는 요소로서 myelin 억제제들의 관련도 연구되고 있는데, 특히 MAG

는 중추신경계 손상 후 나타나는 glial scar나 myelin에서 발견되며, 중추신경계 회복을 촉진하는 axon에 결합하여 axon의 성장을 방해 한다^{15,16}.

人蔘은 오가피과에 속하는 다년생 초본으로 그 뿌리를 건조하여 사용한다¹⁷. 微溫, 甘微苦, 無毒하여 大補元氣, 補脾益氣, 生津, 寧神益智 효능이 있어 氣脫萎證이나 脾胃虛弱, 消渴에 사용되고 정신불안으로 인한 怔忡, 不眠, 自汗 등에 빈번히 사용 된다^{18,46}.

人蔘은 신경세포에도 다양한 영향을 미치는데, 주로 중추신경계통에서 고차신경계통에 대한 특이한 작용이 있어 신경활동의 기민성을 높여주며 신경세포보호효과를 나타내기도 한다^{19,22}. 이와 같은 신경세포 보호작용은 허로를 치료하는 중요한 약재로 정기를 보하여 인체를 보호하고 발병시 인체의 회복력을 도와주는 人蔘의 한의학적 효능과 유사하다고 할 수 있다.

人蔘 이외에도 다른 한약재의 신경세포손상에 관한 회복 작용을 보이는데, 葛根⁴⁷, 當歸⁴⁸, 川芎⁴⁹, 大黃⁵⁰ 등이 실험적으로 보고되었다.

본 연구는 人蔘이 중추신경계 손상 후 치유과정에 관여하는 생리적 및 병리적인 작용들을 종합적으로 규명하기 위해, 중추신경계 손상 후 야기되는 CD81, GFAP, MAG 등에 대한 人蔘의 효과를 알아보았다. 흰쥐의 astrocyte에 人蔘을 농도별로 처리한 후 CD81, GFAP, MAG의 변화를 관찰하였으며, 생체의 실험으로 흰쥐의 뇌를 손상시킨 후 人蔘추출액을 주입하여 CD81, GFAP, MAG의 변화에 미치는 영향을 관찰하였다.

먼저 人蔘의 세포독성을 알아보기 위해 MTT 분석법으로 측정하였다. 人蔘extract를 각각 0.05%, 0.1%, 1%, 5%, 10% 농도의 人蔘 extract를 16시간 단독으로 처리한 결과, 人蔘 extract 0.05%에서 90%, 0.1%에서 90%, 1%에서 72%, 5%에서 56%, 10%에서 18%의 생존율을 보여 인삼 extract는 1% 이하에서 높은 생존율을 보였다(Fig. 1).

다음으로 人蔘의 CD81, GFAP, MAG의 억제 효과를 알아보기 위해 astrocyte에 ELISA 방법을 사용하여 CD81, GFAP, MAG의 분비량을 측정하였다. 먼저 astrocyte에 人蔘 extract를 0.05%, 0.1%, 1%로 처리한 후 16시간 후에 CD81, GFAP, MAG를 ELISA 방법으로 정량하였다. 그 결과 CD81은 대조군에 비해 人蔘 extract를 0.05%, 1%일 때 유의성 있게 감소하였으며, MAG는 1%일 때 유의성 있게 감소하였다. 그러나 GFAP는 감소는 하였으나 유의성을 보이지 않았다(Fig. 2, 3, 4).

人蔘이 CD81과 GFAP의 발현에 미치는 영향을 살

피보고자 astrocyte에 人蔘 extract를 처리한 후 Western blotting 방법과 PCR방법으로 CD81과 GFAP의 발현 수준을 분석하였다. Western blotting 방법에서는 astrocyte에서 증가된 CD81은 人蔘 extract에 의해 억제되었으나 GFAP는 유의성있는 변화를 보이지 않았다(Fig. 5). PCR방법에서는 CD81과 GFAP의 RNA 발현을 분석한 결과, astrocyte에서 증가된 CD81과 GFAP의 RNA 발현이 人蔘 extract에 의해 모두 억제되었다(Fig. 6).

마지막으로 in vivo 실험으로 人蔘의 CD81, GFAP, MAG의 억제 효과를 알아보기 위해 흰쥐의 뇌를 손상시킨 후 人蔘 extract를 7일, 14일, 30일 동안 주입한 후 뇌를 적출하여 immunohistochemistry 방법으로 CD81, GFAP, MAG를 살펴보았다. 그 결과 그 결과 人蔘 extract를 주입한 손상된 뇌세포에서 CD81, GFAP, MAG의 발현이 대조군에 비해 억제되었다(Fig. 7).

이런 모든 결과는 人蔘이 손상된 뇌세포에서 증가하는 CD81, MAG의 발현을 억제시켜 중추신경계 손상을 정상적으로 회복시키는 작용을 한다는 것을 알 수 있다. GFAP 역시 ELISA와 Western blotting에서 유의성은 보이지 않았지만 감소를 나타냈다. 결국 이상의 결과를 종합하면 人蔘의 효과는 치매나 파킨슨병, 뇌혈관장애 질환 등 중추신경계 장애로 인한 질환의 치료에 임상적 활용을 위한 중요한 근거 자료가 될 것으로 사료된다.

V. 結 論

중추신경계 손상 후 회복에 관여하는 CD81, GFAP, MAG의 발현에 미치는 人蔘의 효과를 알아보기 위해 신경세포를 배양하여 시험관분석에 의한 조사와 rat를 이용한 동물실험을 통해 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. Astrocyte에 人蔘 extract를 각각 농도에 따라 MTT assay한 결과 1% 농도 이하에서 人蔘 단독으로는 astrocyte에 독성을 나타내지 않았다.
2. Astrocyte에 人蔘의 세포활성물질 분비 조절 효과를 알아보기 위해 ELISA를 이용하여 CD81, GFAP, MAG의 분비량을 분석한 결과 CD81은 대조군에 비해 人蔘 extract가 0.05%, 1%일 때, MAG는 1%일 때 유의성 있게 감소하였다. 그러나 GFAP도 감소는 하였으나 유의성은 없었다.

3. 人蔘의 CD81, GFAP의 발현을 알아보기 위해 western blotting으로 분석한 결과 CD81은 人蔘 extract에 의해 억제되었으나 GFAP는 유의성 있는 변화를 보이지 않았다.
4. 人蔘의 CD81, GFAP의 발현을 알아보기 위해 PCR로 분석한 결과 astrocyte에서 증가된 CD81과 GFAP RNA 발현이 人蔘 extract에 의해 모두 억제되었다.
5. Rat의 뇌에 손상을 가하고 7일, 14일, 30일 동안 人蔘 extract를 주사한 후 뇌절편을 Immunohistochemistry한 결과 CD81, GFAP, MAG 발현이 대조군에 비해 억제되었다.

이상의 결과들을 종합하면 人蔘은 중추신경계 손상 후 회복에 관여하는 CD81, GFAP, MAG의 발현을 억제함을 알 수 있으며 이를 통해 人蔘이 중추신경계 손상을 회복시키는데 영향을 줄 수 있음을 확인하였다.

VI. 參考文獻

1. 이근후. 최신임상정신의학. 서울 : 하나의학사. 1988 : 138, 216-28.
2. 이동원 외. 치매에 관한 동서의학적 비교고찰. 대한한방내과학회지. 2000 ; 16(1) : 2-5, 11, 14.
3. 陳士鐸. 辨證錄. 서울 : 醫聖堂. 1989 : 241-6.
4. 李旻. 編註醫學入門(卷二). 서울 : 大星文化社. 1984 : 180-2.
5. 李仲梓. 醫宗必讀. 서울 : 一中社. 1991 : 323-4.
6. Anders JJ, Hurlock JA. Transplanted glial scar impedes olfactory bulb reinnervation. Exp Neurol. 1996 ; 142(1) : 144-50.
7. McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. J Neurosci. 1991 ; 11(11) : 3398-411.
8. Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. Cell Mol Life Sci. 2001 ; 58(9) : 1189-205.
9. Song BK, Geisert GR, Vazquez-Chona F, Geisert EE Jr. Temporal regulation of CD81 following

- retinal injury in the rat. *Neurosci Lett.* 2003 ; 338(1) : 29-32.
10. Hemler ME. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol.* 2001 ; 155(7) : 1103-7.
 11. Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81(TAPA-1) : A molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1998 ; 16 : 89-10.
 12. Fukuyama R, Izumoto T, Fushiki S. The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. *Eur Neurol.* 2001 ; 46(1) : 35-8.
 13. Minn A, Schubert M, Neiss WF, Muller-Hill B. Enhanced GFAP expression in astrocytes of transgenic mice expressing the human brain-specific trypsinogen IV. *Glia.* 1988 ; 22(4) : 338-47.
 14. Zhao W, Bing-sheng L, Alkon DL, Barker JL, Chang YH, Wu M, Rubinow DR. TNF-alpha induced over-expression of GFAP is associated with MAPKs. *Neuroreport.* 2000 ; 11(2) : 409-12.
 15. McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron.* 1994 ; 13(4) : 805-11.
 16. Mukhopadhyav G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron.* 1994 ; 13(3) : 757-67.
 17. 생약학 교재편찬위원회. 생약학. 서울 : 동명사. 1998 : 147-50.
 18. 신민교. 臨床本草學. 서울 : 영림출판사. 1989 : 166-7.
 19. 강소신의학원 편. 중약대사전 제7권. 서울 : 정담. 1998 : 4481-2.
 20. 허용석. 인간신경모세포종 SH-SY5Y에서 인삼 total ginsenosides의 신경보호기능에 관련된 유전자 발현 양상에 대한 연구. 상지대학교 박사학위논문. 2005.
 21. 김질수. 환경호르몬 PCB의 신경세포에 대한 세포독성기전 및 人蔘의 방어효과, 원광대학교 박사학위논문. 2001.
 22. 전병훈, 강익신, 문병순. 人蔘이 산소유리기로 손상된 척수신경세포의 손상에 미치는 영향, 대한동의병리학회지. 1998 ; 12(1) : 96-101.
 23. Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Loores K, Green J, Dietrich WD. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* 1999 ; 16(10) : 851-63.
 24. Guth L, Albuquerque EX, Deshpande SS, Barrett CP, Donati EJ, Warnick JE. Ineffectiveness of enzyme therapy on regeneration in the transected spinal cord of the rat. *J Neurosurg.* 1980 ; 52(1) : 73-86.
 25. Puchala E, Windle WF. The possibility of structural and functional restitution after spinal cord injury. A review. *Exp Neurol.* 1977 ; 55(1) : 1-42.
 26. Zhang SX, Geddes JW, Owens JL, Holmberg EG. X-irradiation reduces lesion scarring at the contusion site of adult rat spinal cord. *Histol Histopathol.* 2005 ; 20(2) : 519-30.
 27. Broude E, McAtee M, Kelley MS, Bregman BS. Fetal spinal cord transplants and exogenous neurotrophic support enhance c-Jun expression in mature axotomized neurons after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 1999 ; 155(1) : 65-78.
 28. Lee IW. Stem cells and Neurosurgery. *J Korean neurosurgery soc.* 2003 ; 33 : 1-12.
 29. Menet V, Gimenez Y, Ribotta M, Sandillon F, Privat A. GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia.* 2000 ; 31(3) : 267-72.
 30. Dijkstra S, Duis S, Pans IM, Lankhorst AJ, Hamers FP, Veldman H, Bar PR, Gispen WH, Joosten EA, Geisert EE Jr. Intraspinal administration of an antibody against CD81 enhances functional recovery and tissue sparing after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2006 ; 202(1) : 57-66.
 31. Wong EV, David S, Jacob MH, Jay DG. Inactivation of myelin-associated glycoprotein enhances optic nerve regeneration. *J Neurosci.* 2003 ;

- 23(8) : 3112-7.
32. 楊維傑 編. 黃帝內經素問譯解. 서울 : 成輔社. 1980 : 1-12, 42-61, 100-3, 131-45, 206-11, 455-68, 701-4.
 33. 楊維傑 編. 黃帝內經靈樞譯解. 서울 : 成輔社. 1980 : 84-9, 280-3.
 34. 李時珍. 本草綱目. 서울 : 高文社. 1973 : 603-4.
 35. 王清任. 醫林改錯. 臺聯 : 國風出版社. 1975 : 22-5.
 36. 李京燮 外. 東醫心系內科學(上). 서울 : 書苑堂. 1995 : 36-7, 43-4.
 37. 李清福, 劉渡舟 編著. 中醫精神醫學. 天津 : 天津科學技術出版社. 1988 : 211-2.
 38. 배영철 外. 老人醫學. 서울 : 高麗醫學. 1996 : 193-209.
 39. 이광우, 정희원 역. 임상신경학. 서울 : 고려의학. 1998 : 199-210.
 40. 해리슨내과학 편찬위원회. 해리슨내과학. 서울 : 정담. 1997 : 2451-3.
 41. 지제근. 치매의 병리. 대한신경과학회지. 1985 ; 3(1) : 5-9.
 42. 최진호. 노화의 메커니즘과 연구방향. 생화학뉴스. 한국생화학회. 1985 : 5(3) : 39-53.
 43. Malipiero UV, Frei K and Fontana A. Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes. J immunol. 1990 ; 144 : 3816.
 44. Fillit H, Ding WH, Buce L, Kalman J, Altstiel L, Lawior B and Wolf-Klein G. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. Neuroscience Lett. 1991 ; 129 : 318.
 45. Enq Lawrence F, Ghimikar Roopa S, Lee Yuen L. Glial fibrillary acidic protein : GFAP-thirty-one-years(1969-2000). Neurochemical Research. 25. 2000 ; 1439-51.
 46. 김창민 외. 완역. 중약대사전. 서울 : 정담. 1999 : 3479-81.
 47. 부일권, 김연섭. 갈근이 뇌허혈 손상 흰쥐의 해마 신경세포 손상에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2004 ; 19(1) : 77-82.
 48. 전연이, 박치상, 박창국. 당귀의 허혈성 뇌손상 억제작용 및 신경세포 보호효과. 대한본초학회지. 2003 ; 18(4) : 25-35.
 49. 백일성, 박치상, 박창국. 천궁의 허혈성 뇌손상 억제작용 및 신경세포 보호효과. 대한본초학회지. 2003 ; 18(4) : 37-46.
 50. 김범희, 정혁산, 원란, 박지호, 강철훈, 손낙원. Gerbil의 전뇌허혈에 대한 대황의 신경보호효과. 대한한의학회지. 2002 ; 23(3) : 74-84.
 51. Gimenez y, Ribotta M, Rajaofetra N, Morin-Richaud C, Alonso G, Bochelen D, Sandillon F, Legrand A, Mersel M, Privat A. Oxysterol(7 beta-hydroxycholesteryl-3-oleate) promotes serotonergic reinnervation in the lesioned rat spinal cord by reducing glial reaction. J Neurosci Res. 1995 ; 41(1) : 79-95.