동의신경정신과 학회지
J. of Oriental Neuropsychiatry
Vol. 20. No. 1, 2009

人蔘이 허혈성 중추신경 손상으로 발현 증가된 CD81 및 GFAP에 미치는 영향

서종훈 *, 송봉근† , 류영수, 강형원, 김태헌
원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과 *, 원광대학교 한의과대학 내과학교실† ,
원광대학교 한의과대학 신경정신과 교실

The Effect of the *Radix Ginseng* on Expression of CD81 and GFAP Following Hypoxic Injury on Central Nervous System

Jong-Hoon Seo *, Bong-Gun Song† , Yeoung-Su Lyu, Hyung-Won Kang, Tae-Heon Kim
Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University *
Department of Internal Medicine, Wonkwang University Oriental Medical School, Iksan, Korea†
Dept. of Neoropsychiatry, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Abstract

Objectives :
Gliosis disturbs recovery of damaged astrocytes following central nervous system(CNS) injury. Gliosis relates to up-regulation of CD81 and GFAP. In glial cells at injured CNS, the expression of CD81 and GFAP is increased. It is possible that when the gliosis formation is suppressed, regeneration of axons can occur. According to the recent study, the treatment with anti CD81 antibodies enhanced functional recovery in rats with spinal injury. So, the author studies the effect of water extract of *Radix Ginseng* on regulation of CD81 and GFAP with CNS injury.

Methods :
In the cell study, hypoxic damage was induced by CoCl2. And according to Longa et al, cerebral ischemia was made by middle cerebral artery occlusion in the rat. Cross sections of rat brain were examined under microscope. MTT analysis was performed to examine cell viability, cell based ELISA, Western Blot and PCR were used to detect the expression of CD81 and GFAP.

Results :
The following results were obtained.
1. We found that CD81 and GFAP were decreased in hypoxic injured cells following *Radix Ginseng* administration.

투고일 : 2/1 수정일 : 3/1 채택일 : 3/5
교신저자 : 김태헌, 광주광역시 남구 주월동 543-8 원광대학교광주한방병원 신경정신과
Tel : 062-670-6472, Fax : 062-670-6767, E-mail : jayou88@wonkwang.ac.kr

2. We injected the extract of *Radix Ginseng* to the middle cerebral artery occlusion in rats, and the immunohistochemistry analysis showed that CD81 and GFAP were decreased.

Conclusions :
These results show that the extract of *Radix Ginseng* could suppress the gliosis formation and prevent cell death, by controlling the expression of CD81 and GFAP. Therefore, *Radix Ginseng* could be a useful to regenerate CNS injury.

Key Words :
Radix Ginseng, Hypoxic injury, Axonal regeneration, CD81, GFAP, Middle cerebral artery occlusion

Ⅰ.서 론

최근 들어 우리나라에서는 평균수명의 연장으로 인해 노년층 인구의 비율이 급속히 증가하면서 치매나 중풍, 파킨슨병 등과 같은 퇴행성 신경계질환 또한 빠른 속도로 증가하고 있다[1]. 그러나 이러한 퇴행성 신경계질환으로 인한 중추신경계의 손상은 대부분 비가역적으로 일어나며 이를 회복하기가 사실상 어려워 환자나 가족들에게 많은 고통을 안겨 줄 뿐만 아니라 경제적, 사회적으로도 손실이 매우 크다고 하겠다. 그러므로 중추신경계 손상으로 인한 후유증을 최소화하고 손상 후 재생을 도와줄 수 있는 연구가 절실한 실정이다.

뇌 및 척수와 같은 중추신경계에서 신경재생이 잘 일어나지 않는 이유는 손상된 축삭부위(axon)의 성상세포(astrocyte)가 활성화되어 교세포 반흔(glial scar)을 형성하게 되며, 손상의 마지막 단계에서는 교세포화(gliosis)가 일어나게 되는데 이러한 교세포화는 인근 신경세포의 추가적인 손상을 막아주기도 하지만 물리적, 분자학적 장벽으로 작용함으로써 신경세포의 재생을 억제하는 결과를 초래하기도 한다[2].

한편 손상된 부위에서는 성상세포의 glial filament의 주성분으로서 반응성 성상세포(reactive astrocyte)를 표지할 수 있는 물질인 GFAP (glial fibrillary acidic protein)의 발현 증가와 함께 TAPA (target of the antiproliferative antibody)라고도 불리는 CD81이 함께 발현이 증가되는데[3,4], CD81은 여러 조직에 존재하지만 특히 중추신경계의 교세포(glial cell)에서 많이 발현되며 중추신경계 손상 후 교세포반응(glial response)에 관여하여 반흔 형성과 신경세포의 증식을 조절하는 것으로 알려져 있다[5-8].

GFAP와 CD81에 관한 최근의 연구에 의하면 척수손상 백서의 손상부위에 CD81에 대한 항체를 처리하였더니 신경의 기능적 회복과 재생촉진이 일어났다는 결과를 보고하였고[9], CD81 knock out 백서에서는 뇌가 정상 백서보다 30%정도 커졌다는 보고가 있었다[10]. 그리고 GFAP를 제거한 성상세포에서도 신경의 성장과 재생이 촉진되었다는 결과가 보고되었으며[11], GFAP knock out 백서에서는 교세포 반

흔 형성이 억제되어 상처의 회복이 느려졌다는 보고도 있었다[12]. 이러한 실험결과들을 종합하여 볼 때 중추신경계 손상 시에 GFAP와 CD81의 발현을 조절할 수 있다면 신경재생 또한 조절할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

한의학에서 人蔘은 五加科(오갈피나무과: Araliaceae)에 속한 다년생 초본인 인삼*(Radix Ginseng)*의 뿌리에서 수염뿌리를 제거하고 건조한 것으로 大補元氣, 生津止渴하는 작용뿐만 아니라 安精神, 開心益智 등의 효능이 있어 치매, 건망 등의 증상에 다용하였다[13,14].

人蔘에 관한 실험적 연구는 국내외적으로 많이 이루어지고 있는데 중추신경계에 미치는 영향을 연구한 실험에서 人蔘이 항치매 효과가 있음을 보고하였고[15,16], 신경세포 손상 방어 효과가 있음을 보고한 연구도 있었으며[17], 실험동물의 허혈 유발 후 회복에 효과가 있었다는 보고도 있었다[18]. 또한 middle cerebral artery occlusion(MCAO)로 허혈을 유발한 백서에 人蔘의 진세노사이드 성분을 투여하였더니 뇌경색의 크기가 감소되었다는 보고도 있었다[19].

그 외에도 다른 한약재를 사용하여 CD81과 GFAP에 대한 효과를 관찰한 실험적 연구가 있었으나[20,21] 허혈 유발 후 人蔘을 사용하여 CD81과 GFAP에 대한 효과를 관찰한 실험연구는 전무한 실정이다.

이에 저자는 이러한 여러 연구결과들을 바탕으로 $CoCl_2$와 중대뇌동맥 결찰법을 이용하여 백서의 성상세포와 대뇌에 허혈성 중추신경계 손상을 유발한 후 발현 증가되는 CD81 및 GFAP에 대한 人蔘의 효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 약재 및 재료

1) 실험동물

세포 실험에 사용한 동물은 생후 4일된 Sprague-Dawley계 어린 백서를 다물 사이언스(대전)에서 구입하여 생후 8일째 세포배양에 사용하였다.

人蔘이 MCAO 모델 흰쥐에 미치는 영향을 알아보기 위한 동물 실험에서는 6주령의 200-300 g의 웅성 Sprague-Dawley 백서(샘타코)를 구입하여 일주일 정도 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 cage 당 3-4 마리씩 넣어두었으며 물과 사료를 자유로이 섭취하도록 하였다. 기타 동물실험에 관한 규정은 NIH 실험동물관리 지침(NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)을 준수하였다.

2) 약재 및 시약

본 실험에 사용한 人蔘은 금산인삼조합으로부터 4년근 직삼을 구입하여 정선하여 사용하였다. 실험에 사용한 시약은 Sigma Chemical (St. Louis, MO, U.S.A) 제품을 구입하였으며, 1차 항체인 CD81 항체(AMP1)은 Dr. Geisert (University of Tennesse, TN, U.S.A)로부터 기증받아 실험에 사용하였고, GFAP(sc-33673)와 β-actin(sc-47778)은 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, U.S.A)에서 구입하였다. DMEM은 Hyclone (Logan, UT, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

3) 검액의 조제

먼저 실험에 사용할 人蔘 200 g을 증류수 2,000 ㎖에 넣고 3시간 동안 가열하여 추출한

후, 추출물을 Whatman 필터로 여과한 후 감압 농축하여 동결 건조 하였다. 건조 후 추출물은 0.9% 식염수에 녹여서 사용하였다.

2. 방 법

1) 성상세포의 배양

생후 8일 된 Sprague-Dawley계 백서를 얼음에 넣어 마취시킨 후 두개골을 절개하여 뇌를 꺼내었다. 이것을 1×HBSS용액에 넣고 수막을 제거한 후 대뇌 피질을 잘게 조각내어 75 ㎠ flask에 총량이 10 ㎖가 되도록 1×HBSS용액을 넣는다. 80 rpm에서 10분 동안 교반한 후에 0.1% trypsin이 포함된 20 ㎖ 1×HBSS을 첨가하여 대뇌 피질 조각들이 점성을 가지고 서로 붙을 때까지 약 10-20분간 다시 교반하였다. 다음 이렇게 점성을 띠는 primary cell을 10 ㎖ pipette을 이용하여 분리시킨 후 70 ㎛ strainer를 이용하여 여과하였다.

여과기를 통과한 primary cell을 800 rpm에서 5분 동안 원심 분리하였다. 가라앉은 cell은 30 ㎖ astrocyte media (20% FBS, 100 U/㎖ penicillin/streptomycin, 2 mM glutamin)를 넣고 75 ㎠ flask에 seeding하였다. 3-4일마다 한 번씩 media를 바꾸어 주었고, Flask에 cell이 90~100% 자랐을 때 0.25% trypsin/EDTA (Hyclone)으로 계대 배양하였다. 계대 배양은 cell을 $1\times10^{7-8}$씩 100 ㎜ cell culture dish에 seeding하고 3-4일에 한 번씩 cell culture용 media (10% FBS, 100 U/㎖ streptomycin/penicillin, DMEM)로 시행하였으며, 5-6 passage 이내의 cell들을 실험에 사용하였다.

2) $CoCl_2$에 의한 hypoxia의 유발

배양된 세포에 $CoCl_2$를 가하여 hypoxia에 의한 세포 손상을 유발하였다. Hypoxia 유발은 0.5 mM과 1 mM 용액을 세포에 가한 후, 4, 8, 16 및 24 시간 처리하였다. 인삼에 의한 세포 손상 억제 작용을 관찰하기 위하여 용액 투여 전 인삼 추출액을 8시간 전처리 하였다.

3) MTT assay

세포 생존율 조사를 위하여 MTT를 실행하였다. 인삼 추출물을 10% media에 0.05%, 0.1%, 5%, 10% 농도별로 녹인 후, 0.45 ㎛ 여과기를 이용하여 여과하였다. 그 후 96 well plate의 한 well 당 1×10^4개의 astrocyte를 seeding한 다음, 준비된 인삼 추출물을 농도별로 처리하고 16시간 동안 배양하였다. 배양 후 media를 제거하여 PBS로 씻은 다음 5 ㎎/㎖ 10× MTT 용액을 한 well 당 100 ㎕씩 넣고 37℃, CO_2 incubator에서 4시간 배양한다. 4시간 후 MTT용액을 제거하고 PBS로 씻은 후 0.2% acid-isopropanol을 100 ㎕ 넣고 5분간 흔들었다. 이것을 UVM-340 micoplate reader(Asys Hitech, Austria)를 이용하여 570 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

4) ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

인삼 추출물 처리 후 CD81 및 GFAP의 발현은 cell-based ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 96 well plate의 한 well 당 1×10^4개의 astrocyte cell을 seeding 한 후에 10% FBS media에 녹인 인삼 추출물을 0.45 ㎛ 여과기를 이용하여 여과한 후, 0.05%, 0.1%, 1%의 농도별로 나누어 16시간 동안 처리하였다. 그 후로 media를 제거하여 PBS로 씻어 준 다음에 100 ㎕ 3.7% formaldehyde 상온에서 10분간 cell을 고정하였고 이후 cell을 PBS +0.1% TritonX-100(PBST)으로 5분씩 3번 씻어준 다음 PBST+1 % BSA로 상온에서 1시간 blocking하였다. 그 후 1차 항체(1:100)를 PBST+1% BSA에 희석하여 상온에서 2시간 처리하였고 다시

PBST로 2번 씻고 PBS로 1회 씻어준 후에 TMB(Sigma-T0440) 용액을 각 well 당 100 ㎕씩 넣고 5분 정도 반응시킨 후 TMB stop solution(Sigma-s-5814) 100 ㎕로 반응을 정지시켰다. 반응이 멈춘 용액은 UVM-340 micoplate reader(Asys Hitech, Austria)를 이용하여 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

5) Western Blotting

100 ㎜ 접시에 1×10^4개 astrocyte cell을 seeding 한 뒤, 10% FBS의 media에 녹인 1% 인삼추출물을 0.45 ㎛ 여과기를 이용하여 여과한 후 16시간 동안 처리하였다. 그 후 cell을 PBS로 1회 씻고 나서 1 ㎖ PBS를 넣고 cell scraper를 이용하여 cell을 수거하여 1.5 ㎖ tube에 옮겨 담는다. 5000-6000 rpm에서 10초간 원심 분리하여 상층액은 덜어내고 가라앉은 cell에 2X protein sample buffer를 넣었다. 이것을 98℃에서 약 10분간 끓인 후에 다시 5000-6000 rpm에서 10초간 원심 분리하였다.

상층액은 12-15% SDS-PAGE gradient gel에 loading하여 분리시킨 다음 nitrocellulose membrane에 transfer system(Bio-Rad, U.S.A)를 이용하여 단백질을 전이시켰다(100 volts, 0.35 A, 1 hour). 그 후 nitrocellulose membrane에 1차 antibody를 상온에서 2시간 처리한 다음, 각각 10분 동안 2회 TBS-T로 씻고, HRP가 결합되어 있는 2차 antibody를 상온에서 1시간 동안 반응을 시켰다. 그리고 다시 TBS-T로 10분씩 3회 씻고, HRP와 반응하는 DAB solution(0.6 ㎎/㎖, pH 7.6 Tris-Cl, 3 ㎕/㎖ H_2O_2)에 nitrocellulose membrane을 반응시켰다.

6) RT-PCR

배양된 세포를 Trizol(MRC, U.S.A) 1 ㎖를 넣어서 lysis한 후, 4℃, 13,000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 새 tube로 옮긴 다음 0.2 ㎖의 chloroform을 넣고 15초 간 잘 섞이게 흔들어 준 후, 상온에서 15분간 반응시켰다. 이것을 다시 4℃, 13,000 rpm으로 15분 원심 분리하여 상층액을 새 tube로 옮겨 0.5 ㎖의 isoprophanol을 넣고 잘 섞은 다음 같은 방법으로 원심 분리하여 상층액을 버리고 남은 pellet을 10분간 건조시킨 후 DEPC를 처리한 물로 55℃에서 15분 동안 녹여 실험에 사용하였다. 녹인 RNA는 실험 시까지 영하 20℃에서 보관하였다.

RT-PCR은 RNA에 InProm-Ⅱ™ Reverse Transcription System(Promega, U.S.A)을 이용하였으며, RT-PCR을 수행(70℃ 5분, 4℃ 10분, 25℃ 5분, 42℃ 1시간, 70℃ 15분)한 다음 얻어진 cDNA와 sequence primer를 사용하여 2X PCR Master mix(Solgent, Daejeon)로 PCR을 수행(30 cycle, 94℃ 15초, 60℃ 1분, 72℃ 1분)하였다.

얻어진 PCR product들은 1X TBE buffer에서 0.1 ㎍/㎖ ethidium bromide가 포함된 1% agaros gel에 전기영동 시켰으며 전기영동 후에 자외선 발광장치에서 사진을 찍어 발현 정도를 비교하였다.

PCR 수행 시 사용한 gene들의 sequence primer들은 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.

7) 약물의 투여

약물의 투여는 인삼 추출물을 0.9% 생리식염수에 녹여 여과한 다음 100 ㎎/㎏의 용량을

꼬리정맥으로 1일 2회 투여하였다. 약물의 투여는 수술 1시간 전에 투여하고, 수술 후 1 시간에 투여하였으며, 수술 다음 날부터는 1일 2회 오전 9시와 5시에 7일간 투여하였다. 대조군에는 동량의 생리식염수를 투여하였다.

8) MCAO에 의한 국소적 뇌허혈 손상의 유발

일시적인 국소 뇌허혈은 Longa[22] 등의 방법에 따라 중대뇌동맥을 폐색시켜 만들었다. 실험동물을 70% N_2O, 30% O_2가 혼합된 5% isoflurane을 이용하여 흡입마취를 유도한 후 2% isoflurane으로 마취상태를 계속 유지시켰다.

중대뇌동맥을 폐색하기 위하여 경부 정중선을 따라 피부를 절개하고 흉골혀근과 흉골저작근 사이의 총경동맥을 노출시킨 후 총경동맥을 일시적으로 폐쇄시키고 내경동맥과 외경동맥 분지 사이에 27 G 주사침을 이용하여 작은 구멍을 낸 다음 내경동맥내로 치과 인상제(Durelon, Germany)가 발라진 4-0 nylon의 intraluminal filament (직경 0.28 ㎜, rounded tip)을 18.5-19.0 ㎜ 정도 삽입하여 그 끝이 중대뇌동맥의 기시부를 지나 전대뇌동맥의 근위부까지 도달하도록 하였다. 다음 총경동맥과 외경동맥은 결찰한 후 수술 부위를 봉합하였으며 혈류차단 2시간이 지난 후 intraluminal filament를 제거하고 우측 총경동맥을 결찰하여 측부 순환을 통하여 재관류 시켰다. 모든 수술조작기간 및 마취회복기간에는 동물의 직장온도를 37±0.5℃로 유지하였다. 실험동물은 상처를 봉합한 다음 백열전등을 비춘 다음 heating pad에 두어 회복하도록 하였다. 중대뇌동맥 폐색 후 실험동물이 마취에서 깨어나면 신경학적 검사를 하여 동맥폐쇄를 확인하였다.

9) 고정액의 관류

약물 투여 7일 후 흰쥐를 ketamine(50 ㎎/㎏)과 xylazine(10 ㎎/㎏)을 섞은 마취액을 복강으로 주사하여 마취를 유도한 다음 흉벽을 제거하고 왼쪽 심실에서 대동맥 방향으로 18 G 주사바늘을 삽입하였다. 그 다음 오른쪽 심방귀를 가위로 절단한 뒤 50 ㎖/min의 속도로 연동펌프(peristaltic pump)를 이용하여 phosphate buffered saline (PBS)으로 관류시켜 혈액을 제거하였다. 그리고 4% paraformaldehyde용액 250-300 ㎖를 관류시켜 고정을 시행하였다. 적출한 뇌조직은 4℃에서 24시간 동안 4% paraformaldehyde 용액에 고정을 시행한 후 30% sucrose 용액에 4 ℃에서 하루 이상 보관하였다. 다음 적출한 대뇌의 정수리점(bregma)에서 뒤로 3.6 ㎜에서 4.5 ㎜ 떨어진 곳에 해당하는 부위를 동결절편기를 이용하여 두께가 40 ㎛가 되게 관상으로 박절한 후, 조직 절편을 보존액(cryoprotectant solution)이 들어있는 24-well 배양기에 조직 절편을 매 절편마다 각 well에 순차적으로 반복하여 넣은 후 영하 20℃에서 보존하였다.

10) Cresyl violet 염색

적출된 뇌조직의 관상절편을 만든 다음 0.05 M PBS으로 3회 세척하였다. 다음 절편을 xylen에 5분, 100% alcohol에 2분 그리고 95% alcohol에 1분 담그고 다시 70% alcohol에 1분 담근 다음 증류수에 2분 세척하여 탈지와 탈수 과정을 거쳤다. 그리고 0.5% cresyl violet 용액으로 30분간 염색하였다. 염색이 끝난 조직은 광학현미경 (Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

11) 뇌허혈 부위의 크기 측정

염색된 조직은 스캐너를 이용하여 전체 뇌반구 크기와 허혈 영역의 크기를 산출하였다. 이때 뇌허혈이 온 부위는 반대측의 정상 뇌반구의 넓이에서 허혈 손상 부위의 넓이를 뺀 크기로 하여 부종으로 인한 변화를 최소화하

였다. 각 절편에서의 뇌허혈 손상의 넓이에 절편두께인 2 ㎜를 곱하여 전체 뇌허혈의 부피(㎣)를 산출하였고, 뇌허혈 손상 부위의 크기를 표준화 하기 위해 전체 뇌부피에 대한 뇌허혈 손상 부피 비율을 %로 표시하였다.

12) 면역조직화학

조직절편을 24-well 배양기에 5-10개씩 넣고, 0.05 M PBS 용액으로 10분씩 3회 교반기를 이용하여 세척하였다. 15-20분간 1.0% H_2O_2로 반응시키고 같은 방법으로 세척한 후 0.2% Triton X-100 용액에 20분 반응시키고 PBS 용액으로 세척하였다. 이어서 여기에 말 혈청과 정상 염소 혈청을 1:100으로 희석시킨 차단항체를 실온에서 0.5-1시간 반응시킨 후 PBS 용액으로 세척하고, 48시간 동안 4℃에서 일차항체(GFAP, CD81)를 가한 후 PBS 용액으로 세척하였다. 그리고 2시간 실온에서 이차항체(horse anti-mouse IgG, goat anti-rabbit IgG, 1:100)를 가한 후 PBS 용액으로 세척하였다. Avidin-biotin peroxidase complex와 실온에서 1시간 반응시키고 PBS 용액으로 세척한 후 0.05%3,3′-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemical Co., St.Louis, USA)로 발색시켰다. 그 다음 조직 절편을 30분 전에 꺼내놓은 gelatin coated slide에 올린 후 실온에서 두 시간 말렸다. 이어서 슬라이드를 증류수에 10분 동안 담근 후 alcohol로 탈수시키고 xylene으로 투명화한 후 캐나다 발삼으로 봉입시키고 광학현미경으로 관찰하였다.

13) 광학현미경적 검사

염색된 조직은 슬라이드에 부착하였으며 광학현미경을 이용하여 해마의 피라미드세포수를 CA1의 내측과 외측 두 부위, CA2 한 부위를 400배 배율로 양측에서 각각 측정하여 평균치를 이용하였다. 따라서 CA1에서 4부위를 측정하였고 CA2에서 2부위를 측정하였다.

3. 통계분석

실험성적은 평균치±표준오차(Mean±SEM)으로 나타냈으며 그룹간의 평균값 비교를 위하여 one way ANOVA를 실시하였다. MCAO 모델 실험은 각 그룹 간의 차이는 t-검정 및 Mann-Whitney rank sum 검정과 one-way ANOVA를 통하여 이루어졌다. P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 실 험 결 과

1. Hypoxia에 의한 세포의 변화

Hypoxia로 인한 세포 손상을 관찰하기 위하여 각 농도별로 $CoCl_2$를 투여하고 5% CO_2 incubator에서 37℃로 온도를 조절하여 8시간 동안 배양하였다. 이후 현미경으로 세포의 형태 변화를 관찰하였는데, $CoCl_2$로 유발된 hypoxia 하에서 세포막의 파괴가 나타났고 농도가 증가함에 따라 세포의 파괴 정도도 증가하였다(Fig. 1).

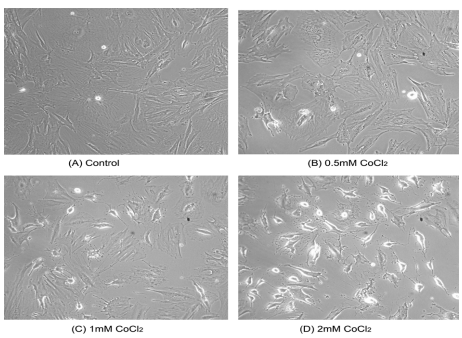


Fig. 1. The morphology of astrocyte after hypoxic injury induced by CoCl2. The cells were incubated for 8 hours at 37℃ in 5 % CO2

incubator. Note hypoxic damaged cells show destructed cell bodies (B, C, D) compared with well preserved control cells (A). Cells were destructed more in higher concentration of CoCl2.

2. Hypoxic injury 후 시간 경과에 따른 CD81 및 GFAP의 발현 변화

저산소에 의한 astrocyte의 손상 후 시간 경과에 따른 CD81 및 GFAP의 발현을 HIF-1발현과 비교하였다. 세포에 0.5 mM $CoCl_2$ 농도로 투여하여 37℃에서 각각 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 동안 세포를 배양하였다. 그 결과 $CoCl_2$로 유발된 저산소 손상 시 CD81의 발현은 시간이 증가함에 따라 증가되었고, 24시간 이후에는 오히려 감소하는 경향을 보였다. GFAP의 발현 또한 CD81의 발현양상과 유사하였으며, HIF-1의 발현도 시간이 증가함에 따라 증가하다가 16시간 이후 감소하는 양상을 보였다(Fig. 2).

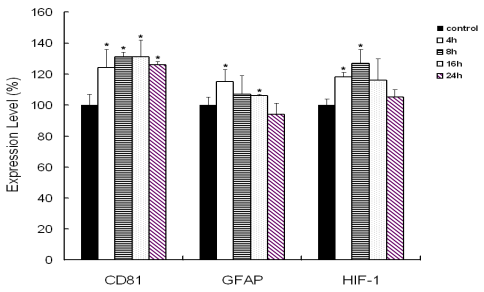


Fig. 2. The expression of CD81, GFAP and HIF-1 following hypoxic injury induced by CoCl2. The protein expression in the astrocyte cell line was analyzed by ELISA at periods of 4 hours, 16 hours, and 24 hours. The protein expression was significantly increased after hypoxic exposure. Especially the up regulation of GFAP expression was accompanied with increased CD81 expression. *; compared with control group * $p<0.05$

3. Hypoxic injury에 의한 CD81 및 GFAP의 발현

저산소에 의한 astorcyte의 손상 후 CD81의 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 $CoCl_2$를 각 농도별로 투여하여 37℃에서 24시간 동안 incubation 시켰다. 저산소에 의한 손상의 결과로 세포는 0.5 mM $CoCl_2$ 투여시 CD81과 GFAP의 발현 증가를 나타냈으나 1 mM 농도 투여 시에는 모든 단백질의 발현 감소를 보였다(Fig. 3). 이는 과농도에 따른 세포사멸과 관련된 것이기에(Data not shown), 본 실험에서 저산소증의 유발은 0.5 mM 농도의 투여로 유도되었다.

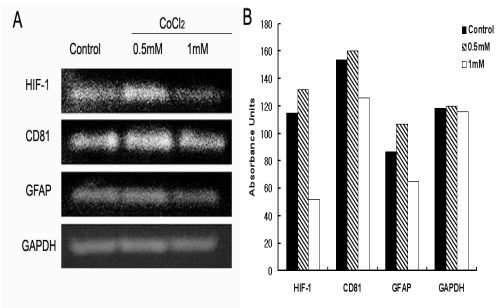


Fig. 3. The expression of CD81, GFAP and HIF-1 following hypoxic injury induced by CoCl2. All the proteins by using PCR showed down-regulation after injury at the concentration of 0.5 mM CoCl2 (A). The level of protein expression was compared using Image J and documented into graph (B).

4. 人蔘의 세포독성 관찰

人蔘의 세포독성 유무를 관찰하기 위하여 배양된 astrocyte에 人蔘 추출액을 농도별로 투여하고 37℃에서 16시간 동안 incubation 하였다. MTT assay를 실시하여 人蔘이 세포독성에 미치는 영향을 관찰하였는데, 그 결과 人蔘 추출물은 0.1% 이하에서는 세포 생존에 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 4).

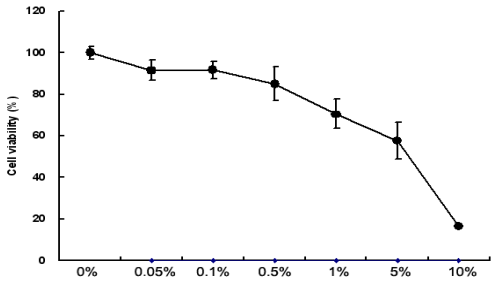


Fig. 4. The effect of the water extract of *Radix Ginseng* on cell viability by MTT assay. The cells were incubated for 16 hours with different concentration of water extract of *Radix Ginseng*. Data represent the mean ± SEM of four independent experiments.

5. 人蔘 추출물의 Hypoxic injury에 대한 세포보호 효과

저산소로 유발된 세포 손상에 人蔘의 세포 보호 효과를 관찰하기 위하여 0.1% 농도의 人蔘 추출물을 16시간 전처리하고 0.5 mM $CoCl_2$를 투여하여 저산소증을 유발시켰다. 이것을 37℃에서 8시간 동안 배양하였는데, 실험결과 $CoCl_2$로 유발된 저산소증에 의한 세포의 손상을 人蔘 추출물이 유의성 있게 억제하였다(Fig. 5).

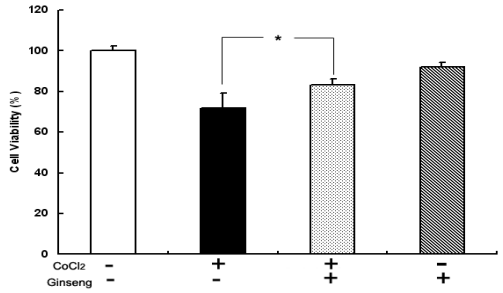


Fig. 5. The effect of the water extract of *Radix Ginseng* on the inhibition of cell death. Cells were pretreated with the water extract for 16 hours before incubation with 0.5 mM CoCl2 for 8 hours. Cells showed increased cell viability with the administration of water extracts compared with hypoxic damaged cells. Asterisk denotes significant difference between two groups: * $p<0.05$

6. 人蔘 추출물의 Hypoxic injury에 대한 세포 손상 억제 효과

人蔘 추출물이 저산소로 유도된 세포 손상을 억제하는 효과를 관찰하기 위하여 0.1% 농도의 人蔘 추출물을 전처리한 후 1 mM $CoCl_2$를 투여하고 37℃에서 8시간 동안 배양하였다. 그 다음 현미경으로 관찰한 결과 人蔘은 $CoCl_2$로 유발된 저산소 손상에 의한 세포 손상을 억제하였다(Fig. 6).

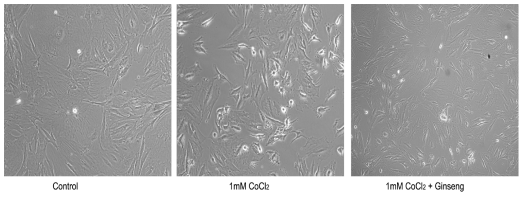


Fig. 6. The effect of the water extract of *Radix Ginseng* on the inhibition of cell death in hypoxic injured astrocyte cells. The cells were pretreated with the *Radix Ginseng* extract and incubated 8 hours followed by 1 mM CoCl2 exposure. Note cell death was inhibited in *Radix Ginseng*.

7. 人蔘의 저산소증에서의 CD81 및 GFAP 발현 억제 효과

人蔘의 조절 효과를 관찰하기 위하여 0.1% 농도의 人蔘 추출물을 투여하고 16시간 동안 배양한 다음, 0.5 mM $CoCl_2$를 투여하여 저산소증에 의한 세포손상을 유도하였다. 이것을 37℃에서 8시간 동안 배양한 결과 人蔘은 저산소 손상에 의해 발현이 증가된 CD81과 GFAP의 발현을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 7).

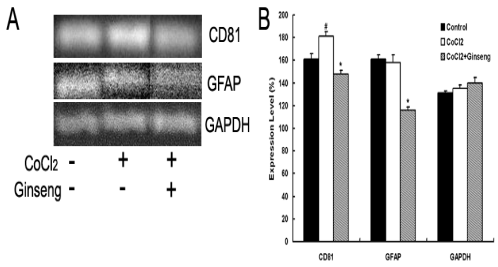


Fig. 7. The effects on the inhibition of the expression of CD81 and GFAP. CD81 expression was down regulated by PCR (A) and ELISA (B) after the administration of water extract of *Radix Ginseng* on the hypoxic injured cells. # ; significant difference compared with the control. * ; compared with hypoxia group * $p<0.05$

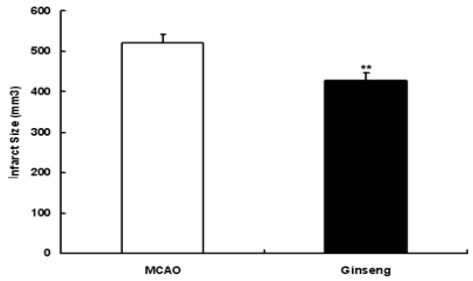
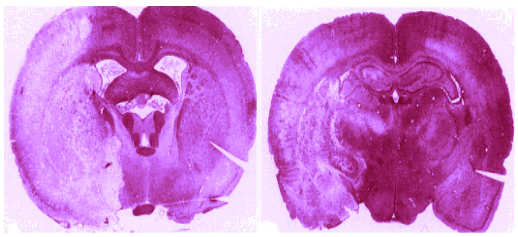


Fig. 8. Effects of Ginseng water extract on infarct volume measured after 7 day of reperfusion following MCAO in male SD rats. Representative photomicrographs of TTC-stained coronal slices demonstrating infarcts (nonstained region) in the ipsilateral (left) cortex and striatum show significant reduction in infarct size in Ginseng group compared with MCAO rats. Bar graphs depict infarct size in all the animals. Results are given mean ± sem **p <0.01 vs MCAO.

8. 人蔘의 투여가 뇌허혈 부위의 감소에 미치는 영향

중대뇌동맥 폐쇄에 의한 일시적 뇌허혈 유발 백서에서 人蔘 투여가 뇌허혈 부위의 감소에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 人蔘 투여 후 뇌조직을 적출하여 뇌허혈 부위의 크기를 관찰하였다. 그 결과 人蔘 투여 후 뇌허혈 부위는 대조군에 비하여 人蔘 투여군에서 유의하게 감소하였다. 즉 생리식염수만을 투여한 허혈군에서 뇌허혈 손상부위의 크기는 521±21.5 ㎣ 이었으나 人蔘 투여군에서는 428±18.4 ㎣ 로 허혈군에서 손상부위가 28%였으나 人蔘 투여 후 23%로 유의하게 감소하였다(Fig. 8).



MCAO MCAO + Ginseng

9. 일시적인 뇌허혈 후 해마의 뇌세포사 보호 효과

일시적 뇌허혈 후 人蔘의 투여가 해마의 뇌세포사에 대한 신경 보호효과를 관찰하기 위하여 피라미드세포의 사멸을 관찰하였다. 일시적 뇌허혈 손상 후 7일에서는 CA1의 내측에서 피라미드세포핵의 신경세포가 허혈군에서 감소되었음을 볼 수 있었다. 해마의 CA1에서 고배율(×400)로 측정한 평균 피라미드세포 수는 아무런 처치도 하지 않은 대조군에서는 172±6.1이고, 허혈군에서는 127±7.6으로 유의하게 감소되었다. 그러나 人蔘 투여군에서는 167±7.4로 허혈군에 비하여 유의하게 증가하였다. 그리고 CA2에서 평균 피라미드세포 수는 대조군, 허혈군, 人蔘 투여군에서 각각 189±8.1, 120±8.7, 187±7.1로 人蔘 투여군에서 허혈군에 비하여 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 이상의 결과로 人蔘 투여 후 CA1에서 허혈군에 비하여 23%의 신경세포사가 감소됨을 관찰할 수 있었다($p<0.05$). 또한 CA2에서 人蔘 투

여로 허혈군에 비하여 35.5%의 신경세포사가 감소됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 9, 10).

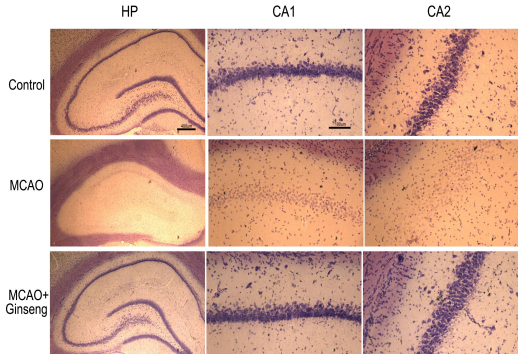


Fig 9. Effect of Ginseng water extract administration on pyramidal cell death protection measured after 7 day following MCAO in male SD rats. Coronal sections were stained with cresyl violet. Number of Nissle stained pyramidal cells measured in CA1 and CA2 of hippocampus was decreased in MCAO group rats and increased after Ginseng administration. The section were taken pictures using microscope HP at 40× and CA1, CA2 at 400×. HP; Hippocampus. Scale bar =400 ㎛ at HP, 100㎛ at CA1 and CA2.

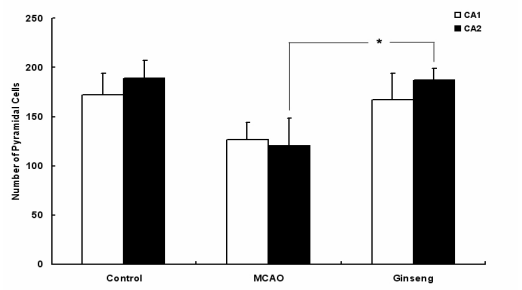


Fig. 10. Number of pyramidal cells in hippocampus following MCAO injury in SD rats. Ginseng water extracts were intravenously injected for 7 days and coronal sections were stained with Cresyl violet. Bar graphs show number of pyramidal cells with significant increment in Ginseng group compared with MCAO. * $p<0.05$, HP; hippocampus.

10. 人蔘의 투여가 CD81 활성에 미치는 영향

뇌허혈 손상 후 중추신경계에 발생하는 교세포화의 억제에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 적출된 뇌조직을 세척한 다음 CD81 면역염색을 실시하여 CD81의 발현여부를 관찰하였다. 그 결과 일시적 뇌허혈 손상 후 해마의 CA1 부위에서 CD81의 발현 증가 양상을 보였으나, 人蔘 투여군에서는 허혈군에 비하여 대조군과 유사한 양상을 보여 CD81의 발현 감소 현상을 나타냈다. 즉 대조군, 허혈군, 人蔘 투여군은 각각 55±2.3, 69±4.5, 61±4.3 %로 허혈군에 비하여 人蔘투여군에서 CD81의 발현 감소를 나타냈다(Fig. 11, 12).

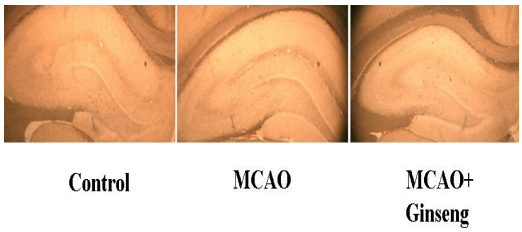


Fig. 11. Effects of Ginseng water extract administration on CD81 expression following ischemic injury by MCAO in SD rats. Coronal sections were rinsed and probed with CD81 antibody on the 7th day following MCAO. The sections were taken pictures using microscope at 40X. CD81 expression in hippocampus was increased after MCAO with darker staining and decreased with Ginseng administration. Scale bar=500㎛

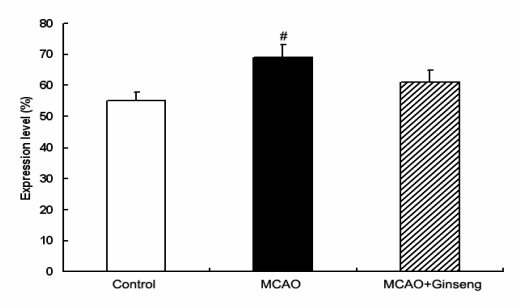


Fig. 12. CD81 expression was decreased with Ginseng water extract administration following MCAO in SD rats. CD81 expression was measured from coronal sections of the rat and converted into graphs. Data show mean and standard deviation between MCAO and control or Ginseng group. CD81 expression was decreased after Ginseng water extract administration without significant difference compared with MCAO. # $p<0.05$ control vs MCAO.

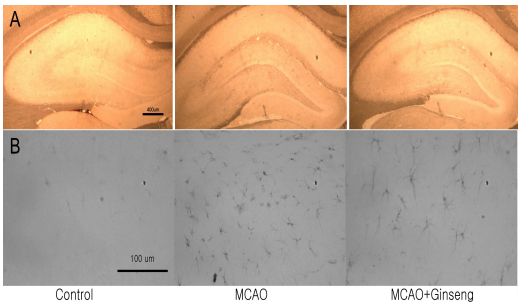


Fig. 13. Effects of Ginseng water extract administration on GFAP expression following ischemic injury by MCAO in SD rats. Coronal sections were rinsed and probed with GFAP antibody on the 7th day following MCAO. The sections were taken pictures using microscope at 40X. GFAP expression in hippocampus was increased after MCAO with darker staining and decreased with Ginseng administration. Photomicrographs were taken at X40 (A) and X400 (B). Sacle bar = 400㎛ (A), 100㎛ (B)

11. 人蔘의 투여가 뇌허혈 손상 후 GFAP 활성에 미치는 영향

뇌허혈 손상 후 나타나는 교세포화 과정에서 CD81의 발현 증가와 더불어 동반되는 GFAP의 발현 증가 억제 현상을 관찰하기 위하여 적출된 뇌조직을 세척한 다음 GFAP 면역염색을 실시하여 GFAP의 발현여부를 관찰하였다. GFAP 면역염색에 의하면 대조군에 비하여 허혈군에서 GFAP는 발현의 증가가 뚜렷하였으나 人蔘 투여군에서는 허혈군에 비하여 발현의 감소가 관찰되었다. 즉 대조군에서 발현 정도는 43±2.3%, 허혈군 67±5.3%이었으나 人蔘 투여군에서는 52±4.2 %로 人蔘 투여군에서 유의하게 감소하였다(Fig. 13, 14).

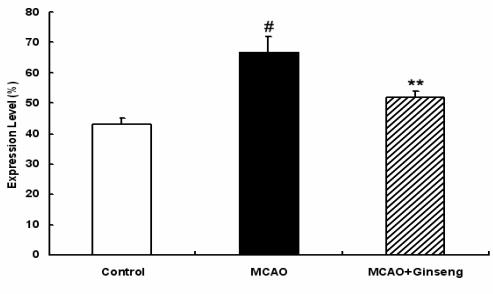


Fig. 14. GFAP expression was decreased with Ginseng water extract administration following MCAO in SD rats. GFAP expression was measured from coronal sections of the rat and converted into graphs. Data show mean and standard deviation between MCAO and control or Ginseng group with significant difference. # $p<0.05$ control vs MCAO, ** $p<0.01$ MCAO vs Ginseng.

Ⅳ. 고 찰

중추신경계의 신경교세포 중에서 가장 주된 세포인 성상세포는 중추신경계의 물리적 지지 역할뿐만 아니라 중추신경계의 발생과정에서 신경세포의 이동경로를 제공하고, 세포외액의 전해질 평형과 항상성을 유지하며, 손상된 신경조직이 있을 때 증식하여 더 이상 손상이 확산되는 것을 막아주는 역할도 한다[2-4].

말초신경계는 세포체(neural body)의 손상이 없는 경우에는 신경자극을 전달하는 축삭(axon)이 재생되지만 중추신경계는 축삭의 재생이 거의 일어나지 않는다. 그 이유는 축삭이 손상되면 손상 원위부의 축삭에서는 부종과 함께 축삭(axon)과 수초(myelin sheath)의 분절현상(fragmentation)이 나타나고 파괴된 축삭과 수초의 잔해들은 대식세포(macrophage)와 슈반세포(Schwann cell)에 의해 포식 처리되면서 손상부위를 슈반세포가 채우게 되는데 이를 뷩거띠(Bunger's band)라고 한다. 한편 손상 근위부의 축삭에서는 성장돌기(axon sprout)가 뷩거띠로 들어가 손상 원위부 쪽으로 성장하면서 재생이 일어나게 되는데 말초신경계에서는 이러한 축삭재생이 잘 일어나는 반면에 중추신경계에서는 손상된 축삭과 수초의 포식 처리과정이 더 천천히 일어나며, 뷩거띠가 잘 형성되지 않는다. 그리고 성상세포가 활성화되어 이 부분을 채우면서 교세포 반흔을 형성하게 되고, GFAP(glial fibrillary acidic protein) 양성으로 나타나는 교세포화를 야기함으로써 결과적으로 신경재생을 억제하게 된다[2-4]. 아울러 GFAP의 발현과 같은 양상으로 CD81의 발현 증가도 동반된다[6]. 이러한 교세포화의 증식은 손상 받지 않은 조직을 격리시켜 더 이상의 손상을 막아주고 정상적인 세포의 환경을 유지시키는 역할을 하지만, 한편으로는 물리적 장벽을 형성하여 신경회로의 재생을 방해하는 좋지 못한 결과를 초래한다[2]. 또한 중추신경계의 수초를 형성하는 희돌기교세포에서도 Nogo, Omgp(oligodendrocyte-myelin glycoportein), Ngr 그리고 MAG(myelin - associated glycoprotein) 등과 같은 축삭 재생을 방해하는 분자물질들이 생성되며[23], 이미 형성된 교세포 반흔에서도 tenascin-R, keratin, CSPGs(choldroitin sulphate proteoglycans)와 같은 신경재생억제 분자 물질이 생성된다. 이와 같은 여러 이유로 인해 중추신경은 손상 후에 재생이 잘 되지 않는다[3,4].

한편 교세포화에 관여하는 단백질인 GFAP는 8-9 nm, 52 kDa 정도의 크기로 type Ⅲ intermediate filament(IF)이며, cytoskeletal protein에 속하는 단백질로서 성상세포의 glial filament의 주성분이다[24]. 성상세포는 중풍, 치매, 뇌손상 등 중추신경계 손상이 있을 때 이상비대(hypertrophy), 이상증식(hyperplasia)와 같은 반응성 성상세포(reactive astrocyte)로 변화되며[25] 이러한 반응성 성상세포를 표지할 수 있는 물질로 GFAP와 GABA 및 glutamine synthetics 등이 대표적이고, 이외에도 다양한 성장인자, cytokinin, 세포접착분자와 기타 신경세포의 표지인자들도 발현된다고 알려져 있다[26,27]. 하지만 이 중에서도 GFAP가 가장 특징적인 표지자로서[28,29] 1971년 다발성경화증 환자의 plague에서 처음 추출된 수용성단백질이다[30]. 그리고 GFAP의 증가는 성상세포의 활성화를 의미하고 활성화된 성상세포는 교세포화를 촉진하게 되므로 중추신경계의 손상 정도를 구별할 수 있는 지표가 된다[26,27]. 이는 1985년 mouse gene에서 분자학적으로 복제하여 만든 GFAP antisera를 통해서 확인할 수 있다[31].

GFAP의 발현과 같은 양상으로 발현 증가가 동반되는 CD81은 중추신경계 손상 후 나타나

는 교세포 반흔의 같은 부위에 나타남으로써 매우 밀접한 관계를 가지고 있다[32].

TAPA(target of the antiproliferative antibody)라고도 불리는 CD81은[33] tetraspanin 계열에 속하는 표면단백질(transmembrane protein)로서 237개의 아미노산, 26kDa의 분자량을 가지고 있으며, 4개의 transmembrane domain과 2개의 extracellular loop, intracellular N & C-terminal region을 특징으로 한다[33-34]. 그리고 척수, 뇌, 망막 등의 중추신경계에 존재하는데 특히, 성상세포와 희돌기교세포 등에서 잘 발현되어 중추신경계 손상 후에 급격히 증가 한다[5-7]. 이러한 CD81은 세포간 접촉에서 일어나는 과정에 관여하여 세포의 신호전달경로를 자극하는 세포부착단백질과 관련되어 있으며[35], CD81/tetraspanin 복합체를 형성하여 세포들로 하여금 세포막에서부터 2차 전달 시스템으로 상호작용을 유도하는 역할을 함으로써 궁극적으로 세포 간의 접촉을 억제하고 세포의 증식과 이동, 재생 등에 관여하는 것으로 보인다[8]. 따라서 CD81의 작용은 교세포 반흔에서 성상세포 돌기(astrocytic process)들의 관계 사이에 결합의 상호작용을 안정화하는 것으로 추측되어진다[6].

최근 연구에 의하면 Dijkstra S[9]등이 백서의 척추 7-9번을 손상시킨 후 손상부위에 CD81에 대한 항체를 처리하였더니 Grid-walk test에서 30% 가량 오류감소와 함께 재생이 촉진되었다고 보고하였고, Geisert EE Jr[7]등은 망막색소상피(retinal pigment epithelium, RPE) 손상 후의 백서실험에서 CD81에 대한 항체를 처리하였을 때 세포의 증식이 억제되었다는 연구결과를 보고하였으며, CD81 knock out 백서에서는 CD81의 결핍으로 인한 신경교세포의 증가로 인해 정상 백서보다 30% 정도 크기의 증가와 함께 무게도 증가하였고 피질도 두꺼워진 반면에 신경세포는 감소하였다고 보고하였다[10]. 또한 GFAP가 축삭의 재생에 관련되어 있는지에 대한 실험에서 Menet V[11]등은 GFAP를 제거한 성상세포에서는 신경의 성장과 재생이 촉진되었다는 결과를 보고되었으며, Pekny M[12]등은 GFAP knock out 백서에서 뇌에 needle로 외상을 준 후 관찰하였더니 교세포 반흔 형성이 억제되어 상처회복이 느려졌다는 보고도 있었다.

한편 중추 신경계의 재생을 촉진하는 다른 실험적 방법으로는 축삭의 재생을 방해하는 교세포화의 억제에 대한 연구들이 많이 있었으며[3,36], 방사선을 이용하여 glial cell을 제거하거나[37], cytokine을 사용하거나[38], 손상 부위에 미분화된 조직을 이식하기도 하였다[39]. 또 protease를 사용해서 astrocyte의 gliosis반응을 억제하거나[40], pyrogen을 이용하거나[41], hydroxycholesterol 유도체를 실험적으로 사용하기도 하였다[42].

본 연구에서 사용한 人蔘은 五加科(오갈피나무과; Araliaceae)에 속한 다년생 초본인 인삼(*Radix Ginseng*)의 뿌리에서 수염뿌리를 제거하고 건조한 것으로, 『神農本草經』[14]에서는 脾·肺經으로 들어가 大補元氣, 生津止渴하는 작용이 있으며 主補五臟, 安精神, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心益智 등의 효능이 있다고 언급되어 있으며, 심신불안, 치매, 건망 등의 질환에 응용되고 있다[13,14]. 인삼 내 유효성분으로는 Brekhman[43]에 의해 사포닌 성분임에 제시된 이후 배당체 성분인 30여종 이상의 ginsenosides를 비롯하여 비사포닌계의 생리활성물질로 polyacetylens, phenolic compounds, acidic polysaccharides, peptides, alkaloids, amino acids 유도체 등이 발견되었으며, 기타 성분으로 volatile oil, sugar, starch, pectins, minerals등도 함유되어 있다[44].

人蔘이 중추신경계에 미치는 영향을 연구한 실험은 국내외적으로 많이 이루어졌는데 국내

에서는 문[45]등이 rat의 뇌에 직접 손상을 가한 동물 모델에서 人蔘이 CD81, GFAP, MAG의 발현을 유의하게 억제함을 보고하였고, 한[15]등은 人蔘의 사포닌 성분이 MCAO로 뇌허혈을 유발한 흰쥐모델에서 학습과 기억에 효과가 있음을, 박[18]등은 Hypoxic chamber를 이용한 허혈성 동물모델에서 人蔘이 실험동물의 사망과 허혈로 부터의 회복에 유의한 효과가 있으며 해마의 CA1의 감소를 억제하였음을 보고하였다. 그리고 외국의 실험연구에서는 Shieh[46]등이 Aβ로 유발된 rat의 성상세포에서 인삼이 이를 억제하여 치매에 유효함을, Zhang[16]등은 MCAO에 의한 혈관성 치매 동물모델에서 인삼이 세포자멸사를 억제함을, Naval[47]등은 H_2O_2로 ROS가 증가되어 유발된 rat의 성상세포 사멸을 유의하게 억제함을, Zhang[19]등은 MCAO 백서 모델에서 人蔘의 진세노사이드 성분이 뇌경색의 크기를 20-49% 가량 감소시킨다고 보고하였다. 이러한 여러 연구결과들을 종합한 결과 人蔘이 중추신경계에서 세포의 사멸과 회복에 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 그 밖에도 다른 한약재를 사용하여 CD81과 GFAP에 대한 효과를 관찰한 실험적 연구로는 釣鉤藤[20]이나 牧丹皮[21], 丹蔘[48], 桃仁[49], 當歸[50] 등의 한약재가 중추신경계 손상 후에 발현 증가된 CD81과 GFAP를 감소시키고, 손상된 뇌의 회복에 도움이 되었다는 보고가 있었다.

이에 본 실험연구에서는 여러 중추신경계 손상 중에서도 발병률이 높은 허혈성 뇌혈관 질환과 유사한 환경을 만들기 위해 in vitro에서 $CoCl_2$를 이용하여 성상 세포에 저산소증을 유발하였고, in vivo에서는 백서의 중대뇌동맥을 결찰함으로써 국소 허혈을 유발하는 방법을 사용하였다.

In vitro에서 뇌허혈 상태를 만들기 위해서 사용한 $CoCl_2$는 금속성 약재이며 iron antagonist로서 heme 단백질과 산소가 붙어있는 상태에서 Fe^{2+}이온과 치환함으로써 세포들의 산소 이용률을 떨어뜨려 저산소증을 유발하고[51], 활성산소를 생성한다[52]. 그리고 p53, p21, pCNA와 같은 유전자의 전사를 변화시키는 것으로 알려져 있으며[53], caspase 8, 9, 3의 활동성에 관계하여 세포의 사멸에 영향을 준다[54]. 이러한 $CoCl_2$에 의해 유도되는 세포자멸사 조건은 hypoxia와 관련된 신경세포 죽음에 대한 분자생물학적 기전을 연구하기 위하여 비교적 간단하게 일반적으로 이용되고 있는 in vitro model로 알려져 있다[52,55]. 또한 $CoCl_2$는 HIF-1(hypoxia nducing factor 1)의 자연적인 분해과정에서 필요한 iron에 대한 길항작용으로 HIF-1의 파괴를 방해하여 저산소증을 미리 일으킨 것과 유사한 작용을 일으키는데[56], HIF-1은 산소 농도에 의존하는 여러 전사인자 중 가장 핵심적인 조절인자로서 혈관신생, 세포증식과 생존, 당 대사와 관련되어 있으며[57], HIF-1 수치가 상승하게 되면 교세포화가 유발되어 glycolytic enzymes, erythropoietin, heat shock protein등이 상승함으로써 저산소성 환경을 유도하게 된다[58]. 따라서 HIF-1은 $CoCl_2$에 의한 뇌허혈의 정도를 표지하는 물질로 사용한다.

In vivo에서는 Longa[22] 등의 중대뇌동맥 결찰법으로 백서의 중대뇌동맥 폐쇄를 통해 뇌허혈을 야기하는 방법을 사용하였는데 이러한 방법은 뇌허혈이 前腦부분에만 국한되고 後腦부분에서는 혈류흐름에 영향을 주지 않기 때문에 뇌허혈 유발 중에 백서의 사망을 최소화할 수 있을 뿐만 아니라 시술이 비교적 용이하고, 두개골 절개가 필요 없어 손상 범위가 넓지 않아 널리 사용되고 있는 방법이다[59]. 또한 중대뇌동맥을 차단한 후 주위 혈관을 통해 재관류하게 되면 5-7일 경과 후에 신경세포 손상을 일으키게 되는데[60], 신경세포의 손상은

다른 부위에 비해 hippocampus의 CA1, CA2 pyramidal neuron등에서 선택적으로 발생하게 되며 그 기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다[61]. Hippocampus는 해마형성체의 일부분으로서 medial septal nucleus에 위치한 세포체로부터 투사되는 choline성 신경전달경로이며[62], 해마이행부쪽에서부터 CA1, CA2, CA3, CA4의 네 부분으로 나누어지는데[2] 기억과 학습에 관여하므로 손상 시 방사형 미로와 같은 공간 기억과제를 학습하는 능력에 장애를 보이게 된다[63].

이상의 연구결과들을 바탕으로 저자는 허혈성 중추신경계 손상 유발 후 발현 증가되는 CD81 및 GFAP에 대한 人蔘의 효과를 알아보기 위해 人蔘 수추출물을 in vivo에서는 전처리 하였으며, in vitro에서는 중대뇌동맥 결찰 전후에 투여하여 관찰하였다.

$CoCl_2$에 의한 세포손상의 정도를 관찰하기 위해 $CoCl_2$를 0.5 mM, 1 mM, 2 mM 농도별로 투여하고 8시간 동안 배양하여 저산소증을 유도한 후 백서의 성상세포를 관찰한 결과 $CoCl_2$의 농도 증가에 따라 세포막의 파괴에 의한 세포사멸의 정도도 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 또한 저산소증에 따른 CD81과 GFAP의 발현정도를 관찰하기 위해 $CoCl_2$를 각 농도별로 투여하여 관찰한 결과에서는 0.5 mM $CoCl_2$ 투여 시에 대조군에 비해 CD81과 GFAP의 발현이 증가하였으나 1 mM 농도 투여 시에는 오히려 대조군에 비해 CD81과 GFAP의 발현이 감소하였다(Fig. 3). 이는 $CoCl_2$의 과농도에 따른 세포사멸과 관련된 것으로서(Data not shown), 이하 본 실험에서는 0.5 mM 농도의 $CoCl_2$ 투여로 저산소증을 유도하였다. 그리고 시간 경과에 따른 CD81과 GFAP, HIF-1의 발현의 정도를 관찰하기 위해 $CoCl_2$ 0.5 mM을 투여 후 4, 8, 16, 24시간 동안 세포를 배양한 결과, CD81은 16시간 까지는 발현이 증가하다가 24시간 이후에는 오히려 감소하는 경향을 보였으며, GFAP에서는 4시간 이후로 발현이 계속 감소하였고, HIF-1의 발현은 8시간 까지는 발현이 증가하다가 16시간 이후로는 발현이 다시 감소하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 CD81과 GFAP, HIF-1의 각 단백질간의 차이에 의한 것으로 보인다(Fig. 2). 人蔘의 세포독성 유무를 관찰하기 위해 MTT assay를 실시한 결과 0.1% 이하 농도에서는 세포 생존에 큰 영향을 미치지 않아 이후의 실험에 0.1%의 농도로 人蔘 수추출물을 사용하였다(Fig. 4). 人蔘의 세포보호 효과를 관찰하기 위하여 0.1% 농도의 人蔘을 16시간 동안 전처리하고 0.5 mM $CoCl_2$를 투여하여 저산소증을 유발시킨 뒤 관찰한 결과 $CoCl_2$투여군에 비해 人蔘 투여군이 세포의 손상을 유의하게 억제함을 MTT assay를 통해 관찰할 수 있었으며(Fig. 5), 현미경으로 관찰한 결과에서도 동일한 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 6). 人蔘의 CD81과 GFAP의 조절효과를 관찰하기 위해 PCR과 ELISA를 시행한 결과에서는 人蔘 투여군이 $CoCl_2$투여로 발현 증가된 CD81과 GFAP를 유의하게 억제함을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

이러한 세포실험 결과를 근거로 동물실험에서 인삼의 효과를 확인하기 위해 백서의 중대뇌동맥을 결찰하여 뇌허혈을 유발한 후 대조군은 꼬리정맥으로 생리식염수만을 투여하였고, 실험군은 꼬리정맥으로 人蔘 수추출물을 투여하였다. 뇌허혈 유발 7일 후 뇌조직을 적출하여 뇌허혈로 인한 손상 부위의 크기를 관찰한 결과 생리식염수만을 투여한 대조군은 손상부위가 28% 이었으나 人蔘 투여군은 23%로 손상 부위의 크기가 유의하게 감소하였음을 관찰할 수 있었다(Fig. 8). 또한 해마부위에서의 뇌세포사에 대한 신경의 보호효과를 관찰한 결과 CA1에서는 허혈군에 비해 人蔘 수

추출물 투여군이 23% 신경세포사가 감소하였고, CA2에서는 35.5% 신경세포사가 감소하였음을 관찰할 수 있었다(Fig. 9, 10). 이러한 결과는 人蔘이 뇌허혈로 인한 뇌세포사를 유의하게 억제함을 보여주는 것이라고 하겠다. 그리고 CA1에서 교세포화에 의한 CD81과 GFAP의 발현증가와 관련해서 인삼의 효과를 관찰한 결과 人蔘 수추출물 투여군에서 CD81과 GFAP 모두 발현이 유의하게 억제되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 11-14).

이러한 실험결과들을 종합하여 볼 때 人蔘이 허혈성 중추신경계 손상 후 발현 증가되는 CD81과 GFAP를 유의하게 억제하였으며, 이는 교세포화를 억제하여 신경재생에도 효과가 있을 것으로 기대된다. 또한 뇌의 허혈성 질환에 의한 치매나 중풍과 같은 질환에도 임상적 응용이 가능할 것으로 사료되며 향후 이에 대한 지속적인 연구가 진행되어져야 할 것으로 생각된다.

Ⅴ. 결 론

人蔘 추출물이 허혈성 중추신경계 손상 후 발현 증가하는 CD81과 GFAP에 미치는 효과를 알아보기 위하여 성상세포를 배양하여 $CoCl_2$를 투여하고, 백서에 MCAO를 시행하여 세포의 변화를 관찰한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. 성상세포는 $CoCl_2$ 투여에 의한 저산소 손상으로 세포 사멸이 일어났으며, 사멸의 정도는 농도에 비례하였다.

2. 성상세포에 $CoCl_2$ 투여에 의한 저산소 손상시 HIF-1, CD81, GFAP의 발현은 시간이 경과함에 따라 증가하다가 감소하는 양상을 보였다.

3. 성상세포에 $CoCl_2$ 투여에 의한 저산소 손상시 CD81 및 GFAP의 발현은 증가하였다.

4. 성상세포에 대한 人蔘 추출물은 0.1%농도 이하에서는 세포 생존에 큰 영향을 미치지 않았다.

5. 人蔘 추출물은 $CoCl_2$로 유도된 저산소 손상 성상세포의 생존율을 향상시켰으며, 세포 사멸을 억제하였다.

6. 人蔘 추출물은 저산소 손상시 성상세포에서 증가된 CD81 및 GFAP의 발현을 감소시켰다.

7. 人蔘 추출물은 중대뇌동맥 폐쇄로 뇌허혈이 유발된 백서에서 뇌허혈 부위의 크기를 유의하게 감소시켰다.

8. 人蔘 추출물은 뇌허혈이 유발된 해마에서 신경세포의 세포사를 유의하게 감소시켰다.

9. 人蔘 추출물은 뇌허혈이 유발된 해마에서 CD81 및 GFAP의 발현을 유의하게 감소시켰다.

이상의 실험결과로 보아 人蔘 추출물은 허혈성 중추신경계 손상 후에 발현 증가하는 CD81 및 GFAP를 유의하게 감소시킴으로써 교세포화를 억제하여 신경 재생 과정에 도움을 줄 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2006-331-E00419)

참 고 문 헌

1. 대한노인병학회 저. 노인병학. 서울: 도서출판 의학출판사. 2002:67-71.
2. 이원택, 박경아. 의학신경해부학. 서울: 고려의학. 1996:118-22, 673-7.
3. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and CNS repair. Brain Res Bull. 1999;9(6):377-91.
4. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. GLIA. 2005;50:427-34.
5. Dijkstra S, Geisert EE Jr, Gipsen WH, Bar PR, Joosten EAJ. Up-regulation of CD81(target of the antiproliferative antibody; TAPA) by reactive microglia and astrocytes after spinal cord injury in the rat. J Comp Neurol. 2004;428:266-77.
6. Geisert EE Jr, Yang L, Irwin MH. Astrocyte growth, reactivity, and the target of the antiproliferative antibody, TAPA. J Neurosci. 1996;16(17):5478-87.
7. Geisert EE Jr, Abel HJ, Fan L, Geisert GR. Retinal pigment Epithelium of the rat express CD81, the target of the antiproliferative antibody(TAPA). Invest Ophthalmol & Vis Sci. 2002;43(1):274-80.
8. Song BK, Geisert GR, Vazquez-Chona F, Giesert EE Jr. Temporal regulation of CD81 followng retinal injury in the rat. Neurosci Lett. 2003;338(1):29-32.
9. Dijkstra S, Duis S, Pans IM, Lankhorst AJ, Hamers FPT, Veldman H, Bar PR, ispen 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.
10. Geisert EE Jr, Williams RW, Geisert GR, Fan L, Asbury AM, Maecker HT, Deng J, Levy S. Increased brain size and glial cell number in CD81-null mice. J Comp Neurol 2002;453:22-32.
11. 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.
12. Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisen J.Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrilary acidic protein and vimentin. J Cell Biol. 1999;145:503-14.
13. 李時珍. 本草綱目. 北京:人民衛生出版社. 1982:699.
14. 孫星衍. 神農本草經. 臺北:문광도서유한공사. 1979:40-1.
15. 한정희. 허혈성기억장애 흰쥐모델에서 인삼사포닌이 학습과 기억에 미치는 영향. 동국대학교 석사학위 논문. 2005
16. Zhang G, Liu A, Zhou Y, San X, Jin T, Jin Y. Panax ginseng ginsenoside - Rg2 protects memory impairment via anti - apoptosis in a rat

model with vascular dementia. J. Ethnopharmacology. 2008;115:441-8.
17. 김질수. 환경호르몬 PCB 52의 신경세포에 대한 세포 독성기전 및 人蔘의 방어효과, 원광대학교 박사학위 논문. 2001.
18. Park JK et al. Calcium-independent CaMKII activity is involved in ginsenoside Rb1-mediated neuronal recovery after hypoxic damage. Life Sciences 2005;76:1013-25.
19. Zhang YG et al. Influences of ginsenosides Rb1 and Rg1 on reversible focal brain ischemia in rats. Acta Pharmacologica Sinica. 1996;17(1):44-8.
20. 이진구. 중추신경계 손상 시 CD81, GFAP 그리고 MAG의 발현에 대한 조구등의 영향. 원광대학교 대학원 박사학위 논문. 2006.
21. 문성진. 목단피가 손상된 성상신경세포의 CD81 및 GFAP의 발현에 미치는 영향. 원광대학교 대학원 석사학위 논문. 2007.
22. Zea Longa E, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989;20:84-91.
23. 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;13:805-11.
24. Ludwin SK, Kosek JC, Eng LF. The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adu1t rat brain: an immunohistochemica1 study using horseradish peroxidase-labened antibodies. J Comp Neurol. 1976;165(2):197-207.
25. 김규원, 박정애, 전형오. 성상세포의 새로운 역할. 서울대학교 약학대학, BRIC BioWave. 2004;6(12).
26. 권오규. 척수 손상 후 운동기능의 회복 및 아교섬유성 산 단백질의 변화. 건국대학교 대학원 석사학위 논문. 2003.
27. Eddelstone M, Mucke L. Molecu1ar profi1es of reactive astrocytes-implication for their role neurologic disease. Neurosci. 1993;54(3):1536.
28. Fukuyama R, Izumoto T, Fushiki S. The cerebrospinal fluid level of glialfibrillary 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.
29. Zhang L, Zhao W, Bing-sheng L, AIkon 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.
30. Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. Brain Res. 1971;28(2):351-4.
31. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein : FAP-thirty-one-years(1969-2000). Neurochemical Research. 2000;25:1439-51.
32. Brook GA, Plate D, Franzen R, Martin D, Moonen G, Schoenen J, Schmitt AB, Noth J, Nacimiento W. Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression

injury of the rat. J Neurosci Res. 1998;53:51-65.
33. Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. Mol Cell Biol. 1990;10:4007-15.
34. 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;16:89-109.
35. Berditchevski F, Tolias KF, Wong K, Carpenter CL, Hemler ME. A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. J Biol Chem. 1997;272(5):2595-8.
36. Moon LD, Brecknell JE, Franklin RJM, Dunnett SB, Fawcett JW. Robust regeneration of CNS axons through a track depleted of CNS glia. Exp. Neurol. 2000;161:49-66.
37. 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.
38. Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Loor 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.
39. Lee IW. Stem cells and Neurosurgery. J korean neurosurgery Soc. 2003;33:1-12.
40. 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.
41. Puchala E, Windle WF. The possibility of structural and functional restitution after spinal cord injury. A review. Exp Neurol. 1977;55(1):1-42.
42. Gimenez Y, Ribotta M, Rajaofetra N, Morin-Richaud C, et al. Oxysterol (7beta-hydroxycholesteryl-3-oleate) promotes serotonergic reinnervation in the lesioned rat spinal cord by reducing glial reaction. J Neurosci Res. 1995;41(1):79-95.
43. Brekhman II. Gosudarst lsdat et Med. Lit Leningrad. 1957:118.
44. 강소신의학원 編, 김창민 外 譯. 중약대사전. 서울:정담. 1998:4481.
45. 문형철, 김윤욱, 송봉근. 인삼이 중추신경계 손상 동물 모델의 재생에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2007;24(6):137-48.
46. Shieh PC, Taso CW, Li JS, Wu HT, Wen YJ, Kou DH, Cheng JT. Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the action of ginsenoside Rh2 against beta-amyloid-induced inhibition of rat brain astrocytes. Neuroscience Letters. 2008;434:1-5.
47. Naval MV, Gomez-Serranillos MP, Carretero ME, Villar AM. Neuroprotective effect of a ginseng(Panax ginseng) root extract on astrocytes primary culture. J. Ethnopharmacology. 2007;112:262-70.
48. 심하나. 단삼이 손상된 뇌신경세포에 미치는 영향. 원광대학교 대학원 석사학위 논문. 2006

49. 이재원. 도인이 중추신경 재생 촉진에 미치는 영향. 원광대학교 대학원 석사학위 논문. 2006
50. 이승희. 당귀가 저산소로 손상된 성상세포의 gliosis 억제에 미치는 영향. 원광대학교 대학원 석사학위 논문. 2007
51. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene : evidence that the oxygen sensor is a heme protein. Science. 1988;242(4884):1412-15.
52. Tomaro ML, Frydman J, Frydman RB. Heme oxygenase induction by $CoCl_2$, Co-protoporphyrin IX, phenylhydrazine, and diamide: evidence for oxidative stress involvement. Arch. Biochem. Biophys. 1991:610-17.
53. Wang G, Hazra TK, Mitra S, Lee HM, Englander EW. Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by $CoCl_2$ in rat neuronal PC12 cells. Nucleic Acids Res. 2000;28:2135-40.
54. Zou W, Zeng J, Zhuo M, Xu W, Sun L, Wang J, Liu X. Involvement of caspase 3 and p38 mitogen activated protein kinase in cobalt chloride induced apoptosis in PC12 cells. J neurosci Res. 2002;28:2135-40.
55. Pulido MD, Parrish AR. Review Metal-induced apoptosis: mechanisms Mutat Res. Dec. 2003;533(1-2):227-41.
56. Matsumoto M, Makino Y, Tanaka T, Tanaka H, Ishizaka N, Noiri E, Fujita T, Nangaku M. Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. J Am Soc Nephrol. 200314:1825-32.
57. Park BC, Huh MH, Seo JH. Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin like growth factor 2 in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 1995;22:286-94.
58. Wiesener MS, Maxwell PH. HIF and oxygen sensing; as important to life as the air we breathe. Ann Med. 2003;35:183-90.
59. 김인세, 박두진, 권재영, 김해규, 신상욱. 백서의 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 허혈성 뇌손상 모델에서 Dexamethasone과 MK-801이 뇌부종 형성에 미치는 영향. 대한마취과학회지. 1999;37:327-33.
60. Buchan A, Pulsinelli WA. Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. J Neurosci. 1990;10(1):311-6.
61. Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. Neurology. 1987;37(8):1281-6.
62. Johnston M, Mckinney M, Coyle J. Evidence for a cholinergic projection to neocortex form neurons in basal forebrain. Proceedings of the National Academy of Science. 1979;76:5392-6.
63. Sutherland RJ, Rodriguez AJ. The role of the fomix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. Behavioral Brain Research. 1989;32:265-77.