



9일령 Chick DRG를 thrombin을 함유한 DMEM배지와 함께, 96-well culture plate에 넣고, 단계적으로 희석된 NGF 단독 또는 검체를 함께 넣은 다음, chick plasma를 넣어 한천화한 배지에서 24시간 배양한 뒤 neurite outgrowth를 평가하였다. GRb1-m (30  $\mu$ M)은 GRb1 (30  $\mu$ M)과 동정도로 neurite outgrowth를 촉진하였다.

Dissociated culture에서도 동일한 효과가 있는지를 보기 위하여 DRG를 trypsin처리하여 얻은 DRG neuron을 1,000 cells/cm<sup>2</sup>의 밀도로 5% Horse Serum과 10% Chick embryo extract를 첨가한 EMEM배지하에 검체와 함께 배양한 뒤, 각기 24시간후, 48시간후, 72시간후의 생존한 신경세포수 및 neurite outgrowth를 평가하였다. GRb1과 GRb1-m은 생존, neurite를 갖는 세포들의 비율에는 변화를 주지않았다. Neurite length를 자세히 평가하기 위하여 48시간후, 현미경하 건강한 DRG neuron의 사진을 찍고, 검체를 함유한 새 배지로 교환한 뒤, 24시간 후, 48시간후의 동일 DRG neuron의 사진을 찍어 늘어난 neurite length를 digitometer로 측정하였다. Neurite가 regeneration되는 과정에 미치는 영향을 보기 위하여는, 상기와 정중 48시간후의 건강한 DRG neuron의 사진을 찍기 직전 laser beam에 의한 growth cone손상을 유도한다음 등 과정으로 배양하였다.

GRb1(1-30  $\mu$ M)은 laser beam조사를 하지 않은 neurite outgrowth에 대한 NGF(10 ng/ml)의 작용을 증강하는 경향을 나타냈다. GRb1-m(1-30  $\mu$ M)은 laser beam조사의 유무와 관계없이 neurite outgrowth에 대한 NGF의 작용을 증강하는 경향을 나타냈다.

## 2. Rat embryo의 뇌신경세포의 생존에 대한 영향

16일령의 rat embryo의 cerebral cortex, septum, thalamus, midbrain, cerebellum으로부터 단리한 신경세포를 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>의 밀도로 배양후 그 생존연장효과에 대하여 검토하였으나 GRb1(1-10  $\mu$ M)과 GRb1-m(1-10  $\mu$ M) 모두 유의적인 작용이 없었다. 그러나 대뇌피질신경세포를 3X10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>로 15일간 15% FCS함유 DMEM배지에서 배양하였을 때, GRb1(30  $\mu$ M)은 생존을 연장하였으나, GRb1-m(30  $\mu$ M)은 생존을 억제하였다. 그러나 대뇌피질유래 glial cell들의 증식곡선에 대하여는 동일 농도의 saponin 모두에서 유의적인 영향이 없었으므로 이들작용이 glial cell증식작용의 차이에 의한 2차적인 것이 아님이 추정되었다. 두 saponin(1-10  $\mu$ M)은 7일간 배양된 Rat embryonic septal neuron들의 choline acetyltransferase 활성과 midbrain neuron들의 dopamine uptake능력에 유의적 영향을 미치지 않았고, hippocapaml neuron의 정상적인 neurite outgrowth나 laser-beam조사후의 regeneration에도 유의적인 영향이 없었다.

## 3. LTP에 미치는 영향<sup>2)</sup>

1) In vivo하 LTP에 미치는 영향: 유발전위의 기록은 다음과 같이 하여 기록하였다. 8-9주령의 Wistar계의 숫컷 흰쥐를 urethane (1g/Kg) 과  $\alpha$ -chloralose (25 mg/Kg, i.p.)의 혼합액으로 마취한 다음 뇌정위고정장치 (stereotaxic frame)에 고정하였다. 관통섬유를 자극하기 위한 양극성의 자극 전극을, 좌측내취야 피질에 꽂고, 기록전극은 동측의 배측치상회의 과립세포층에 꽂아 세포외에서 유발전위를 기록하였다. 단회성(지속시간 0.08 ms)의 시험자극을 30초 간격으로 가한 다음, 자극강도를 최대 집합전위 (population spike)의 50%가 되도록 조정하였다. 일시적인 tetanus성 자극은 시험자극시 사용된 자극전극과 동일한

전극을 통하여, 같은 강도로 가해졌다. 대조군에서는 Phosphate-buffered saline (PBS)을 vehicle로 사용하였고, 약물은 PBS에 녹여, 총 5  $\mu$ l를 microsyringe를 통하여 반대측의 측 뇌실로 투여하였다 (5  $\mu$ l/min).

약물의 효과는 tetanus자극후 시간경과에 따른 집합전위의 증강정도로 평가하였다. 일부 그 효과들의 요약을 위하여, tetanus자극후 10분에서 60분에 걸쳐 얻어진 집합전위곡선의 area under the curve (AUC)를 계산하였다. tetanus자극후 30-60분후 baseline수준보다 20% 이상 높은 집합전위가 기록될때를 LTP가 발생한 것으로 간주하였다.

GRb1 (5 nmol, i.c.v.)은 시험자극에 의한 반응에는 영향을 미치지 않았으나, 100Hz, 100 pulse의 tetanus자극에 의하여 유도된 LTP를 유의적으로 억제하였다 (Fig. 2.). 그 유의적 억제반응은 GRb1 고용량 (5 nmol, i.c.v.)에서도 관찰되었다. GRb1-m (5 nmol, i.c.v.) 역시 시험자극에 의한 반응에는 영향을 미치지 않았으나, 100Hz, 100 pulse에 의해 유도된 LTP에 대하여, 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

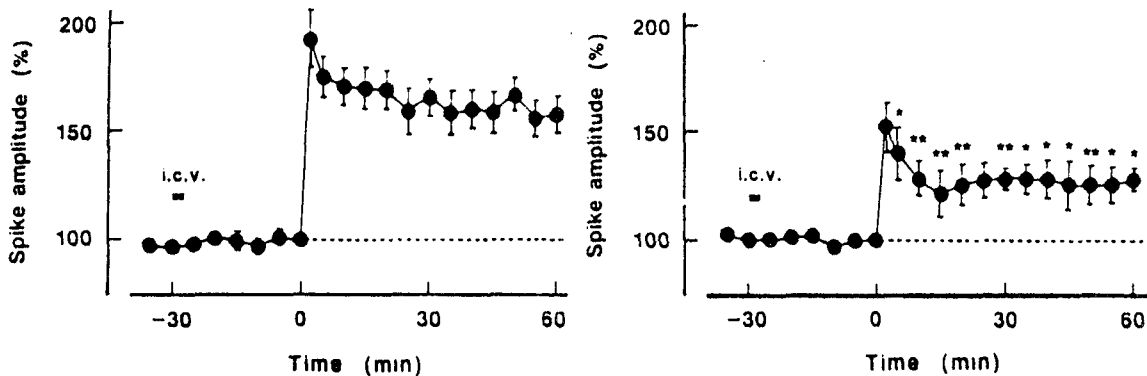


Fig. 2. Effects on LTP induced by strong tetanic stimulation (100 Hz, 100 pulses). GRb1 (5 nmol, i.c.v.)-treated group (right panel) shows significant inhibition compared with the control group (left panel). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

한편 저자는 예비실험을 통하여 LTP를 유도하는데 적어도 60 Hz, 30 pulses의 tetanus자극이 필요함을 알았다. 따라서 60 Hz, 20 pulse의 자극을 LTP를 유도하는데 있어서 subthreshold 자극으로 보고, 미지약물들 투여후 이 조건의 자극을 가하였을 때 LTP 유도를 증강하는지를 보는 수단으로 이 자극조건을 사용하였다. GRb1 (5 nmol, i.c.v.)은 60 Hz, 20 pulse의 tetanus자극에 의하여 유도된 short-lasting potentiation에 변화를 주지 않았다. 그러나 GRb1-m (5 nmol, i.c.v.)은 60Hz, 20 pulse에 의해 유도된 short-lasting potentiation을 유의적으로 증강하였다 (Fig. 3.). 이효과는 고용량의 GRb1-m (50 nmol, i.c.v.)에 의하여는 감소되어 증강 경향을 나타내는데 그쳤다.

한편 인삼의 다른 주요한 주성분으로 알려져 있는 GRg1 (5 nmol, i.c.v.)의 경우에는 100Hz, 100 pulse의 tetanus자극에 의하여 유도된 LTP에 대하여도, 60Hz, 20 pulse에 의해 유도된 short-lasting potentiation에 대하여도 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. Malonate (5 nmol, i.c.v.)은 60Hz, 20 pulse에 의해 유도된 short-lasting potentiation에 대하여 유의적인 변화를 일으키지 않았다.

2) In vitro 조건하에  $Mg^{2+}$ -free ACSF 용액하에서 유도된 해마절편의 evoked potential에 대한 영향: 약 400-500  $\mu m$ 의 해마절편을 작성하여, 관류섬유 자극에 의하여 유도된 치상회에서의 evoked potential을 기록하였다.  $Mg^{2+}$ -free ACSF(Artificial cerebrospinal fluid) 용액하 활성화된 evoked potential에 미치는 두 saponin의 효과를 보았다. GRb1 (0.3 mM)은 presynaptic component 및 postsynaptic component를 강력히 억제하였으나, GRb1-m (0.3 mM)은 매우 약한 영향밖에 나타내지 않았다.

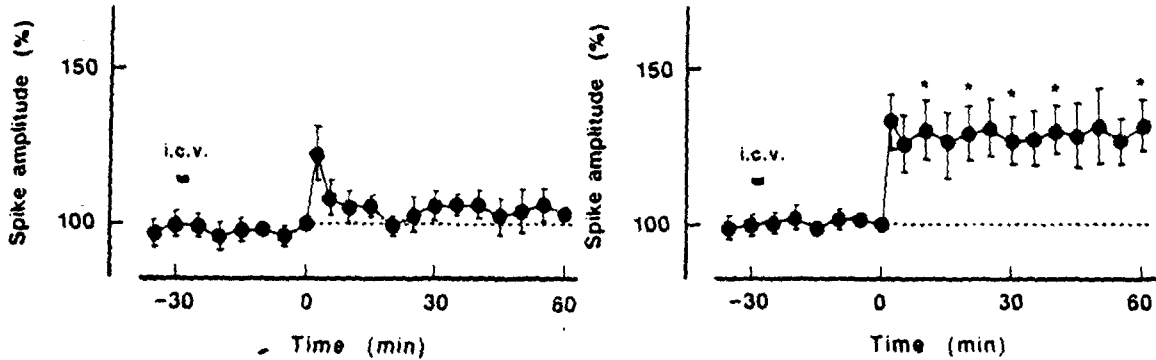


Fig. 3. Effects on short-lasting potentiation induced by weak tetanic stimulation (60 Hz, 20 pulses). GRb1 (5 nmol, i.c.v.)-treated group (right panel) shows significant increase compared with the control group (left panel). \*  $p < 0.05$ .

3) Hippocampal neuron의 세포내  $Ca^{2+}$  농도에 미치는 영향: 자발적 oscillation을 보이는 해마신경의 세포내  $Ca^{2+}$  농도의 변동, NMDA 자극에 의한 해마신경의 세포내  $Ca^{2+}$  농도의 상승과, non NMDA receptor를 자극하는 quisqualic acid에 의한 non NMDA receptor 자극에 의하여 유도된 세포내  $Ca^{2+}$  농도에 미치는 두 saponin의 영향을, Fura-2에 의한 형광과 화학 분석장치를 이용하여 검정하였다. GRb1 (10  $\mu M$ )과 GRb1-m (10  $\mu M$ )은 세포내  $Ca^{2+}$  농도의 basal level 및 자발적 oscillation에 대하여 영향을 미치지 않았다. 두 saponin은 대부분의 세포에 대하여 영향을 미치지 않았으나, 5-10%의 예에서 NMDA 또는 quisqualic acid 자극에 의하여 유도된 세포내  $Ca^{2+}$  농도에 억제작용을 나타냈다.

GRb1과 GRb1-m이 저 빈도의 시험 자극에는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 보아, 본 실험 조건 하에서는 정상적인 상태의 postsynaptic 또는 presynaptic membrane에 대하여 막 투과성이나 neurotransmitter 유리에는 큰 변화를 주지 않는 것으로 보인다. 그러나 GRb1과 GRb1-m은 tetanus 자극 후 발생하는 과정을 선택적으로 조절할 가능성이 있다.

인삼사포닌은 ACTH를 증가시키고, steroid receptor에 결합하며<sup>8)</sup>, 해마절편으로 부터 acetylcholine 유리를 증가시키고<sup>9)</sup>, serotonin metabolism을 감소시킨다고 보고되어 있다<sup>14)</sup>. GRb1과 GRb1-m의 효과가 이 과정들이 간접적으로 LTP의 유도나 조절 과정에 영향을 주어 나타난 결과일 수도 있을 것이다. 흥미있는 것은 GRb1의 3번 탄소에 부착된 second glucose moiety의 malonyl기 부착은 in vivo에 있어서 GRb1의 약리활성을 역전시켰다는 점이다. Malonate (5 mmol, i.c.v.)는 60Hz, 20 pulse에 의해 유도된 short-lasting potentiation에 대하여 유의적인 변화를 일으키지 않았으므로, GRb1-m이 뇌내에서 대사되어 GRb1과 malonic acid로 된다하더라도 그 malonate에 의하여 그 short-lasting potentiation이 나타

난 것이 아님을 시사한다. In vivo하에서는 in vitro의 경우와 다른 많은 조건-예를 들면, 다른 신경회로들의 존재와 같은-이 있으므로 이들의 작용기전에 관하여는 더 자세한 검토가 필요하다고 생각된다. 결론적으로 GRb1-m이 실령 강력한 촉진작용은 갖지 않았더라도, 그 LTP에 관련한 억제작용은 GRb1에 비하여 매우 약한 것은 확실하다.

백삼에는 홍삼의 GRb2, GRc, GRd에 상응하는 malonyl-GRb1, malonyl-GRc, malonyl-GRd도 함유되어 있으므로, 본 연구는 이들 화합물에 있어서, malonyl기 부착에 의한 약리작용의 수식여부를 비교하는데 있어서 선발적 연구의 의미가 있다고 본다.

## References

- 1) Nishiyama N., Cho, S. I., Kitagawa, I., and Saito, H. (1994) Malonylginsenoside Rb1 potentiates nerve growth factor (NGF)-induced neurite outgrowth of cultured chick embryonic dorsal root ganglia. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 509-513.
- 2) Abe, K., Cho, S. I., Kitagawa, I., and Saito, H. (1994) Differential effects of ginsenoside Rb1 and malonylginsenoside Rb1 on long-term potentiation in the dentate gyrus of rats. *Brain Res.* **649**, 7-11.
- 3) Benishine, C., Lee, R., Wang, L.C.H., and Liu, H. J., (1991) Effects of ginsenoside Rb1 on central cholinergic metabolism. *Pharmacology* **42**, 223-229.
- 4) Himi, T., Saito, H., and Nishiyama, N. (1989) Effect of ginseng saponins on the survival of cerebral cortex neurons in cell cultures. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 184-484.
- 5) Ishiyama, J., Saito, H., and Abe, K. (1991) Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor promote the generation of long-term potentiation in the dentate gyrus of anesthetized rats. *Neurosci. Res.* **12**, 403-411.
- 6) Kitagawa, T., Taniyama, T., Yoshikawa, M., Ikenishi, Y., and Nakagawa, Y. (1989) Chemical studies on crude drug processing. VI. Chemical structure of malonylginsenoside Rb1, Rb2, Rc and Rd isolated from the root of *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2961-2970.
- 7) Oomura, Y., Sasaki, K., Nijima, A., Shimizu, N., Kai, Y., Fukuda, A., and Nabekura, J. (1990) Effects of ginsenoside functions on alimentation neuron modulators. In S. Shibata, Y. Ohtsuka and H. Saito (Eds.), *Recent Advances in Ginseng Studies, Proceedings of the international Ginseng Seminar*, Hirokawa Publishing Company, Tokyo, pp. 63-71.
- 8) Pears, P. T., Zois, I., Wynne, K. N., and Funder, J. W. (1982) *Panax ginseng* and *Eleutherooccus senticosus* extracts in vitro studies on binding to steroid receptors. *Endocrinol. Japan.* **29**, 567-573.
- 9) Saito, H. (1990) Effects of ginsenoside Rb1 and ginsenoside Rg1 on learning and memory; In S. Shibata, Y. Ohtsuka and H. Saito (Eds.), *Recent Advances in Ginseng Studies, Proceedings of the international Ginseng Seminar*, Hirokawa Publishing Company, Tokyo, pp. 99-111.

- 10) Saito, H., Suda, K., Schwab, M., and Thoenen, H. (1977) Potentiation of the NGF-mediated nerve fiber outgrowth by ginsenoside Rb1 in organ cultures of chicken dorsal root ganglia, *Japan. J. Pharmacol.* **27**, 445-451.
- 11) Takemoto, Y., Ueyama, T., Saito, H., Horio, S., Sanada, S., Shoji, J., Yahara, S., Tanaka, O., and Shibata, S. (1984) Potentiation of nerve growth factor-mediated nerve fiber production in organ cultures of chicken embryonic ganglia by ginseng saponins; structure-activity relationship, *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 481-484.
- 12) Yoshimura, H., Watanabe, K., and Ogawa, N. (1988) Psychotropic effects of ginseng saponins on agonistic behavior between resident and intruder mice. *Eur. J. Pharmacol.* **150**, 319-324.
- 13) Yoshimura, H., Watanabe, K., and Ogawa, N. (1988) Acute and chronic effects of ginseng saponins on maternal aggression in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **150**, 319-324.
- 14) Zhang, J. T., Qu, Z. W., and Liu, Y. (1990) Preliminary study on anti-amnesic mechanism of ginsenoside Rg1 and Rb1, *Chinese Med. J.* **103**, 932-938.