

人蔘이 神經 및 근육 細胞에 미치는 영향에 대한 연구

金榮中 · 金恩卿

서울대학교 藥學大學

(Received October 5, 1980)

Young Choong Kim and Eun Kyung Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Studies on the Effect of Ginseng Extract on Chick Embryonic Nerve and Muscle Cells

Abstract—The effect of ginseng saponin on chick embryonic dorsal root ganglia organ culture and brain, spinal cord, muscle dissociation cultures was studied. The fiber outgrowth in explanted chick embryonic dorsal root ganglia was markedly induced by water and alcohol extracts of ginseng, total ginseng saponin, protopanaxadiol and protopanaxatriol glycosides as well as ginsenosides R_{b1} , R_d , $R_0+R_a+R_{b1}$, and $R_{b2}+R_c+R_e$ mixtures. The life span of the cultured chick embryonic dorsal root ganglia and potentiation of nerve cell density were also observed with all of these ginseng saponins. The effect of ginseng saponin on chick embryonic dorsal root ganglia organ culture was more marked in the absence of the chick embryonic extract which was known to contain nerve growth factor-like material in the culture media. However, the ginseng saponin did not influence the cultured central nervous system such as brain and spinal cord cells and cultured skeletal muscle cells with respect to the morphological changes, maturation and life span of these cells.

인삼은 强壯, 强精작용이 있다하여 韓國, 日本, 中國에서 不老長壽藥으로 약 2천년 前부터 사용되어 왔으며 특히 최근에는 그 藥効를 세계적으로 인정받기에 이르고 있다¹⁾. 인삼의 藥効를 科學적으로 규명하기 위하여 化學的, 生化學的 연구는 물론 藥理作用을 밝히려는 試圖가 활발히 진행되었다^{2~5)}. 그 결과 인삼은 基礎代謝를 향진시키고^{6,7)} 생체내에서 단백질의 합성을 촉진하며⁸⁾ 빈혈, 癌, 糖尿病에 대해 저항력을 나타내고⁹⁾ 피로를 회복시키고^{10,11)} stress에 대한 방어작용이 있으며 中樞神經系를 強化시킨다¹⁰⁾는 등 생체내에서 일어나는 여러 生理作用에 관여한다고 알려졌다⁹⁾. 그러나 이러한 인삼의 効果는 인삼의 어느 특수한 成分에 의한 것이며 또 어떠한 機轉에 의해 일어나는 것인지 구체적으로 밝혀지지 않았다.

본 연구는 인삼의 效果를 짧은 기간안에 細胞수준에서 이해할 수 있도록 chick embryo에서 신경 및 근육세포를 떼어내어 體外에서 培養시켜 인삼의 藥効成分으로 알려진 ginsenoside가 이에 어떠한 영향을 미치는지 밝히기 위해 수행되었다.

실험 재료 및 방법

본 실험에서 사용한 인삼은 따로 기술하지 않는 한 錦山産 4년생 細根이며 chick embryo는 일령 8~12일 된 부화란을 이문부화장(서울, 이문동)에서 구입했다. 組織培養에 필요한 시약은

Grand Island Biological Company (U. S. A.) 제품을, 기타 시약은 특급 시약을 사용했다.

인삼 엑기스 및 인삼 사포닌 제조—인삼의 수용성 엑기스와 50% 알콜 엑기스는 세균 100g을 세척, 실온에서 풍건한후 분쇄하여 각각 250 ml의 증류수와 50% 에탄올을 사용하여 Shibata 등의 方法에 의하여 제조하였다¹²⁾. 인삼의 protopanaxadiol 및 protopanaxatriol계 ginsenosides는 Shibata 등^{12, 13)}의 方法을 약간 수정하여 column chromatography에 의하여 얻었다. 분리 정제한 각각의 ginsenoside는 TLC에 의하여 표준품과 대조하여 확인하였다.

Chick Embryo의 組織 및 細胞培養—모든 조작은 무균상태에서 행하여졌으며 배양액은 따로 기술하지 않는 한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 175ml, horse serum 20ml, chick embryo 추출물 5ml의 비율로 혼합한 것(표준배양액)이다. 배양용기는 35×10mm 크기의 plastic petri dish (Falcon, U. S. A.)에 collagen을 입힌 것을 사용하였다. 組織 및 細胞의 배양은 일정한 습도를 유지하는 37°C의 배양기에서 95% 공기와 5% CO₂ 혼합기체를 계속 공급시키면서 배양액을 3일마다 교환해 주면서 행하였다.

dorsal root ganglia (DRG)의 組織培養: 일령 12일 된 chick embryo에서 sympathetic dorsal root ganglia를 적출하여 collagen을 입힌 배양용기 중심에 배양액 1적을 떨어뜨려 넓게 편 후 적출한 dorsal root ganglia 5을 이식하여 배양하였다¹⁴⁾.

뇌 및 척수(spinal cord) 세포배양: 일령이 10일 된 chick embryo에서 뇌와 척수를 각각 적출한 후 결합조직을 될 수 있는 한 많이 제거하고 trypsin으로 조직을 연화시킨 후 세포상태로 분리하여 5×10⁶ 정도의 세포를 배양용기에 이식하여 배양하였다¹⁵⁾.

근육 세포 배양: 일령 12일 된 chick embryo의 가슴 근육을 떼어내어 trypsin으로 조직을 연화시킨 후 세포상태로 분리하였다¹⁶⁾. fibroblast를 제거하기 위하여 근육세포를 collagen을 입히지 않은 배양용기(200×15mm)에 약 1×10⁶ 세포를 이식시켰다. 37°C에서 45분간 배양한 후 상등액만 취하여¹⁷⁾ collagen을 입힌 배양 용기에 5×10⁵정도의 세포를 이식하여 배양하였다.

實驗 結果

인삼이 chick embryo의 DRG에 미치는 영향을 보기 위하여 준비한 인삼의 수용성 엑기스, 50% 알콜 엑기스, 백삼 사포닌, protopanaxadiol 및 protopanaxatriol glycosides, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rd, ginsenoside R₀, Ra, Rb₁의 혼합물과 Rb₂, Rc, Re의 혼합물을 사용하였다.

인삼 사포닌은 각각 증류수에 용해시켜 (3.3mg/ml) 따로 기술하지 않는 한 培養液 1ml 당 70 μg의 인삼 사포닌을 함유하도록 하였다. 일령이 12일 된 chick embryo의 DRG를 적출하여 준비한 培養液으로 組織培養시키면서 현미경으로 관찰하였다.

배양시킨 DRG에서 神經纖維의 生成은 實驗에 사용한 모든 인삼 사포닌에 의해 促進되었을 뿐만 아니라 神經纖維의 數도 증가되어 밀집된 神經纖維群을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 또한 인삼 사포닌은 神經細胞軸索突起(neurite) 자체를 더욱 길고 굵게 발달시키며 組織培養한 DRG의 생존기간도 연장시키는 것을 볼 수 있었다.

인삼 사포닌의 効果を 측정하기 위해 chick embryo의 神經細胞軸索突起가 가장 길게 뻗어나간 끝에서 끝까지를 측정 했을 때 그 크기는 Table I 과 같다.

본 實驗 結果 인삼 사포닌은 DRG에서 神經纖維의 生成 및 發達을 현저히 強化, 促進시키는 事實을 알 수 있었다.

인삼 사포닌이 어떻게 神經纖維의 生成을 促進시키는지 그 作用機轉을 밝히기 위하여 組織培

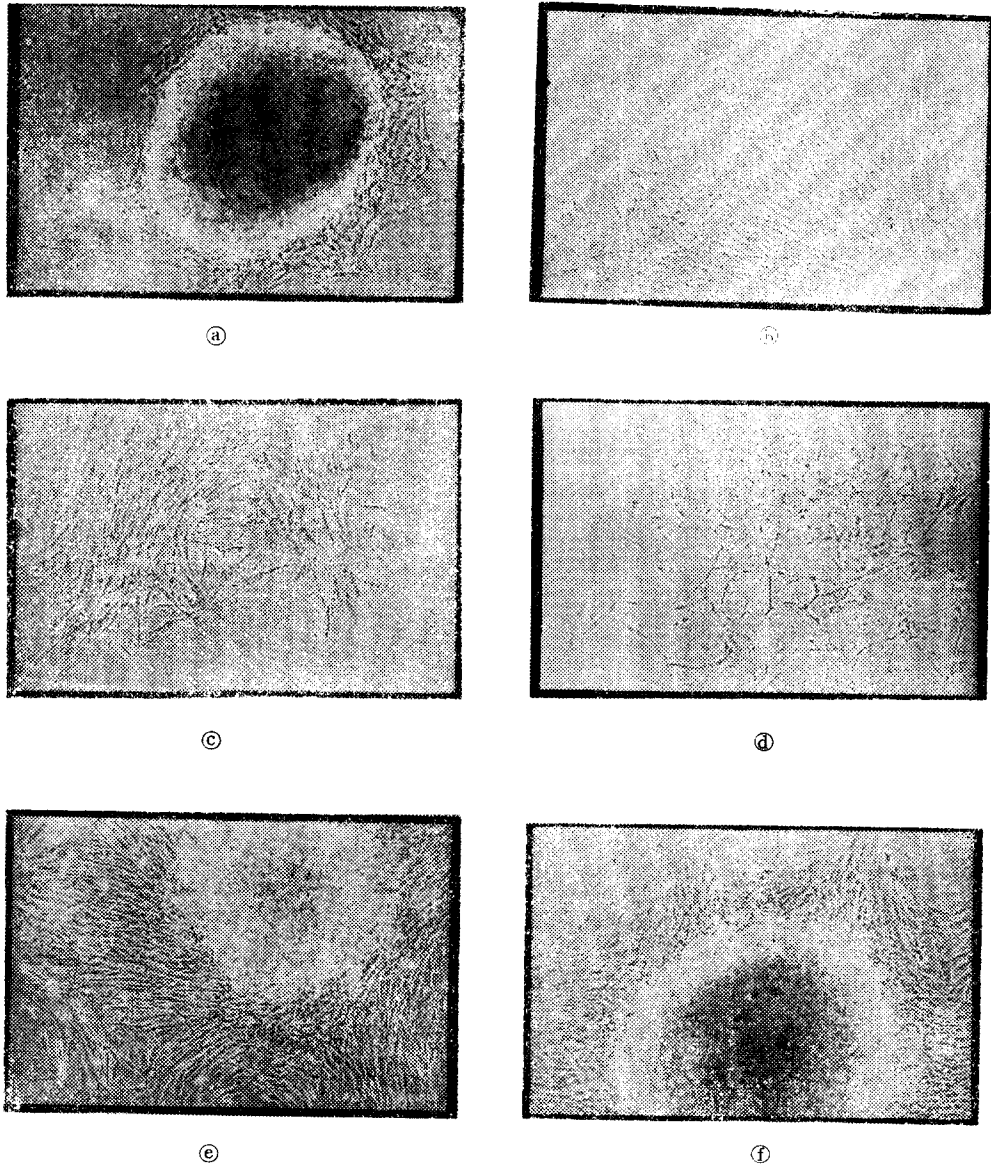


Fig. 1—The effect of ginseng saponin on the chick embryonic DRG organ culture. $\times 100$.

The DRG was cultured for 48 hours with standard media as shown in (a). Cultures shown in (b), (c), (d), (e), and (f) are DRG organ cultures treated with water extract of ginseng, protopanaxadiol glycoside, protopanaxatriol glycoside, ginsenoside R_{b1} and ginsenoside R_d , respectively.

Table I—Size of the cultured chick embryonic DRG

Substances in culture media	Culture period	Size of DRG (μm)	
		24hrs	48hrs
Control		170	268
Water extract		287	412
50% alcohol extract		215	312
Total saponin		250	350
Protopanaxadiol glycoside		344	450
Protopanaxatriol glycoside		200	340
Ginsenoside Rb ₁		288	412
Ginsenoside Rd		212	315
Ginsenoside Ro, Ra, Rb ₁		338	425
Ginsenoside Rb ₂ , Rc, Re		248	388

*The numerical numbers in the table are the average of the size of five cultured DRG.

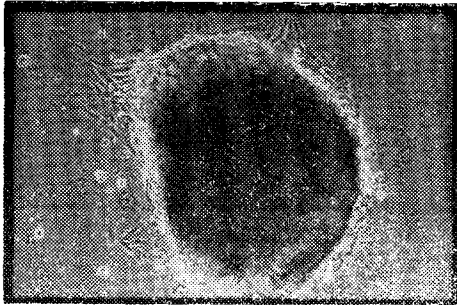


Fig. 2—Forty eight hour-cultured chick embryonic DRG with DMEM: horse serum(9 : 1, v/v). ×100

Table II—Size of the cultured chick embryonic DRG

Substances in culture media	Culture period	Size of DRG (μm)	
		24hrs	48hrs
Control		125	67
Water extract		267	315
Total saponin		210	256
50% alcohol extract		243	310
Protopanaxadiol glycoside		275	350
Protopanaxatriol glycoside		250	290
Ginsenoside Rb ₁		270	335
Ginsenoside Rd		212	290
Ginsenoside Ro, Ra, Rb ₁		275	320
Ginsenoside Rb ₂ , Rc, Re		200	247

*The culture media consisted of DMEM and horse serum (9 : 1, v/v).

*The numerical numbers in the table are the average of the size of five cultured DRG.

양에 필수성분인 chick embryo 추출물을 배양액중에서 우선 제거시키고 인삼의 효과를 살펴보았다. 즉 chick embryo의 DRG를 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)과 horse serum (9 : 1 v/v) 혼합액 만으로 배양하면서 인삼 사포닌의 효과를 관찰하였다. 배양액에서 chick embryo 추출물을 제거하고 DRG를 배양했을 때 chick embryo의 DRG에서의 신경纖維의 생성 및 성장은 현저하게 억제되었다(Fig. 2), 그러나 인삼 사포닌은 배양액중에서 chick embryo 추출물의不在時에 일어나는 신경纖維의 성장 억제를 극복시켜 DRG에서 신경纖維를 생성시키고 발달시키는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3). 또한 본 실험에 사용할 모든 인삼 사포닌의 신경纖維의 생성 및 발달에 미치는 효과를 비교하기 위해 배양시킨 DRG의 크기를 측정했다(Table II). 인삼 사포닌은 DRG의 生存期間에도 크게 영향을 미쳐 DMEM과 horse serum (9 : 1, v/v) 만으로 배양시킨 DRG의 경우에는 배양 시작할 지 48시간 후에는 DRG가 거의 소멸했으나 인삼 사포닌을 첨가하여 배양했을 때는 계속 성장하는 것을 볼 수 있었다.

인삼 사포닌이 chick embryo의 DRG로부터 신경섬유 발달에 미치는 효과와 농도는 어떠한 관계가 있는지 보았다. 본 실험에 사용한 인삼 사포닌에서 protopanaxadiol glycosides를 선택하여 배양액 1 ml 당 30 μg에서 300 μg까지 protopanaxadiol glycoside를 첨가한 표준배양액과 DMEM과 horse serum (9 : 1, v/v)을 혼합한 배양액으로 각각 DRG를 24시간 배양시킨 후 그 크기를 측정해 비교해서 보았다(Table III). protopanaxadiol glycosides를 30 μg에서 180 μg까지 점차적으로 증가시키면 그 효과도 점점 상승되는 경향을 보았으나 그 이상의 농도에서는 더 이상의 상승효과를 볼 수 없었다.

인삼이 chick embryo의 中樞神經細胞에

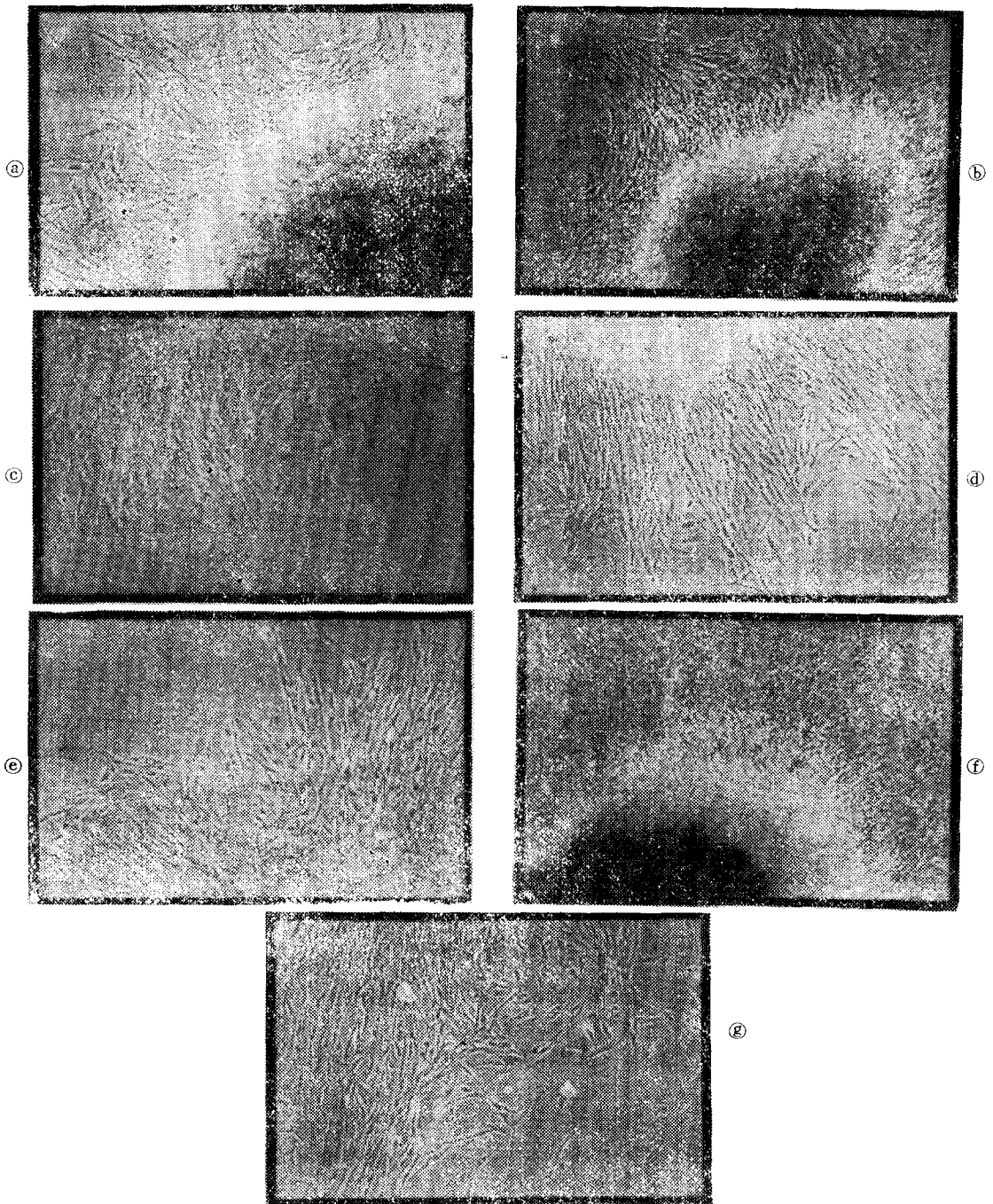


Fig. 3—The effect of ginseng saponin on the chick embryonic DRG organ culture with DMEM: horse serum (9 : 1, v/v). $\times 100$.
 Cultures shown in (a) through (g) are DRG organ cultures treated with water extract, 50% alcohol extract, white ginseng saponin, protopanaxadiol glycoside, protopanaxatriol glycoside, ginsenoside R_d , and mixture of ginsenosides R_0 , R_a , R_{b1} , respectively.

Table III—Effect of the concentration of protopanaxadiol glycoside on chick embryonic DRG

Culture media Concentration of PDG* ($\mu\text{g/ml}$)	Size of DRG (μm)	
	Standard media	DMEM: horse serum (9 : 1, v/v)
Control	170	125
30	278	250
70	345	281
120	360	285
180	375	290
300	350	275

*PDG; protopanaxadiol glycoside

나 현재의 배양기술상의 문제를 감안할 때 현미경 관찰만으로 中樞神經系에 미치는 인삼의 효과를 거론하기에는 부족하다고 하겠다. 따라서 다음 단계로 中樞神經細胞에存在하는 酵素의 活性과 단백질 및 핵산의 合成에 미치는 生化學的 변화를 측정하여 인삼의 효과를 밝히려고 이에 필요한 實驗을 진행중에 있다.

인삼이 chick embryo의 흉부근육에서 얻은 근육세포의 體外培養에 미치는 영향을 보기 위하여 中樞神經細胞에 대하여 행한 實驗과 동일한 조건에서 2주일동안 培養하면서 현미경으로 관찰했다.

인삼 사포닌은 근육세포의 성숙도, 培養細胞의 형태변화, 생존기간에 별로 영향을 미치지 않는 듯 하였다. 한편 protopanaxadiol glycoside의 농도를 培養液 1 ml 당 30 μg 에서 700 μg 까지 점차적으로 증가시키면서 근육세포에 미치는 영향을 보았으나 별다른 효과를 전 농도에서 인정할 수 없었다. 이와같이 본 實驗에서 사용한 인삼 사포닌은 근육세포를 體外培養했을 때 적어도 형태 및 생존기간에는 어떠한 영향도 미치지 않았으나 培養한 근육세포내에 存在하는 酵素의 活性이나 단백질의 合成 및 분해속도 등을 측정하지 못했으므로 근육세포에 어떠한 영향도 미치지 않는다고 결론을 내리기에 이르다고 하겠다.

考察 및 結論

본 研究는 인삼 體外에서 培養시킨 chick embryo의 組織이나 細胞의 성숙도, 생존기간등에 어떠한 영향을 미치는지 보기 위해 수행되었다.

인삼 사포닌은 體外에서 培養시킨 chick embryo의 DRG에서 神經纖維의 生成 및 成長을 促進, 強化시키며 생존기간도 延長시키는 것을 본 研究結果 알 수 있었다. 즉 인삼 사포닌은 培養液중에 nerve growth factor (NGF)와 유사한 물질을 함유하고 있다고 알려진¹⁸⁾ chick embryo 추출물의 존재 여부에 관계없이 chick embryo의 DRG에서 神經纖維를 生成시키는 것을 볼 수 있었다. 더우기 이러한 인삼 사포닌의 효과는 培養液에서 chick embryo 추출물을 제거했을 때 더욱 현저한 것을 알 수 있었다. 이와같은 결과는 Saito 등의 ginsenoside Rb₁ 자체는 chick embryo의 DRG에서 神經纖維 生成을 유발시키지 못하나 培養液중에 존재하는 NGF의 효과를 현저히 강화시킨다는 보고¹⁹⁾와 일치하지 않는다. 즉 Saito 등은 ginsenoside Rb₁이

미치는 영향을 보기 위하여 뇌와 척수를 각각 chick embryo에서 적출하여 인삼의 수용성엑기스, 50%알콜엑기스, 백삼 사포닌, protopanaxadiol 및 protopanaxatriol glycosides, ginsenoside Rb₁, Rd, ginsenoside R₀, Ra, Rb₁의 혼합물, Rb₂, Rc, Re의 혼합물을 각각 함유하고 있는 培養液으로 30일간 培養하면서 현미경으로 관찰했다. 각 인삼 사포닌은 증류수에 용해시켜 (3.3 mg/ml) 培養液 1 ml 당 70 μg 씩 첨가하여 그 培養液을 3일마다 갈아주었다.

인삼 사포닌은 中樞神經細胞의 生存期間이나 神經細胞에서 生成되는 axon의 數나 길이에는 별로 영향을 미치지 않는 듯 하였다. 그러

NGF가 chick embryo의 DRG에서 神經纖維를 生成시키는 것을 강화시키나 培養液중에서 NGF를 제거했을 때는 ginsenoside Rb₁ 자체만으로는 神經纖維를 生成시키지 못한다고 하였다. 그러나 본 研究에서는 ginsenoside Rb₁의 効果는 培養液중에서 NGF와 유사한 물질을 함유하고 있는 chick embryo 추출물을 제거했을 때 더욱 현저하게 나타나는 것을 볼 수 있었다. 이와같은 상반된 결과를 說明하기에는 두 실험에서 사용한 培養液의 造成과 各成分의 含量이 다르다는 것 만으로는 충분치 않아 현재 본 연구실에서 세밀한 연구가 진행중에 있다. 더우기 chick embryo의 DRG에 미치는 ginsenoside Rb₁의 効果는 본 研究에서 사용한 모든 인삼 사포닌, 즉 인삼의 수용성엑기스, 50% 알콜엑기스, protopanaxadiol 및 protopanaxatriol glycosides, ginsenoside Rd, ginsenoside Ro, Ra, Rb₁의 혼합물, Rb₂, Rc, Re의 혼합물에서도 볼 수 있었다. 본 研究結果로 미루어 보아 ginsenoside Rb₁ 뿐만 아니라 인삼에 함유되어 있는 거의 모든 다른 ginsenoside 들도 DRG에서 神經纖維의 發達을 강화시킨다고 추정할 수 있겠다.

그러나 실험에 사용한 모든 인삼 사포닌은 中樞神經系나 근육에는 아무런 영향을 미치지 않는 것을 볼 수 있었다. 뇌세포, 척수세포, 근육세포를 각각 체외에서 배양시키면서 인삼 사포닌의 效果를 培養細胞의 형태, 성숙도, 생존기간에 미치는 변화에 의해 측정하려 하였으나 현미경 관찰만으로는 아무런 인삼의 效果도 찾을 수 없었다. 그러나 인삼 사포닌이 중추신경계나 근육에 어떠한 영향도 미치지 않는다고 결론을 내리기에는 현재의 결과만으로는 이르다고 하겠다. 더욱 배양기술상의 문제를 감안할 때 현미경 관찰에 의한 결과는 예비실험결과에 불과하다고 사료된다. 본 研究室에서는 인삼이 培養細胞에 存在하는 酵素의 活性, 단백질과 핵산합성 및 각각의 培養細胞에 특이하게 存在하는 물질에 미치는 效果를 보기 위하여 일련의 生化學的 方法에 의한 研究가 수행중에 있다.

이 연구에 소요되는 경비의 일부는 峨山社會福祉事業財團의 연구비로 충당되었으며 이 연구비 지원에 대하여 깊이 감사하는 바이다.

文 獻

1. I.M. Popov and W.J. Coldwag, Korean Ginseng Studies, Ilwha Co., Ltd, Seoul, Korea, vol. 1, 328, 1977.
2. J.Y. Kim and E.J. Staba, *ibid.*, vol. 1, 1, 77.
3. B.H. Han and L.K. Woo, *ibid.*, vol. 1, 22(1977).
4. K. Takagi, H. Saito and H. Nabata, *Japan J. Pharmacol.*, **22**, 245(1972).
5. K. Takagi, H. Saito and M. Tsuchiya, *ibid.*, **22**, 339(1972).
6. T. Yokozawa, H. Semo and H. Oura, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3095(1975).
7. T. Yokozawa and H. Oura, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 987(1976).
8. H. Oura, S. Nakashima, K. Tsukada and Y. Ohta, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 980(1972).
9. Korean Ginseng Research Institute, Republic of Korea, Korean Ginseng, p.173, 1978.
10. Korean Ginseng Research Institute, Republic of Korea, Korean Ginseng, p.116, 1978.
11. H. Saito, Y. Yoshida and K. Takagi, *Japan J. Pharmacol.*, **24**, 119(1974).
12. S. Sanada, N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka and S. Shibata, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 421(1974).
13. S. Sanada, N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka and S. Shibata, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 2407(1974).
14. E.M. Fenton, *Exptl. Cell Res.*, **59**, 383(1970).

15. Y. Shimada, D.A. Fischman and A.A. Moscona, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **62**, 715(1969).
16. T.H. Oh and D.D. Johnson, *Exp. Neurol.*, **37**, 360(1972).
17. C. Richler and D. Yaffe, *Dev. Biol.*, **23**, 1(1970).
18. D. Gospodarowicz and J.S. Moran, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 531(1976).
19. H. Saito, K. Suda, M. Schwab and H. Thoenen, *Japan J. Pharmacol.*, **27**, 445(1977).