

인삼 Dammarane Glycoside류 분획물이 일차배양한 계배의 뇌세포에 미치는 영향

박미정·송진호·김영중

서울대학교 약학대학

(Received January 4, 1989)

The Effect of Dammarane Glycosides of *Panax ginseng* on Primary Cultured Chicken Brain Cells

Mi Jung Park, Jin Ho Song, and Young Choong Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

Abstract—Effects of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on primary cultured chicken embryonic brain cells were studied by microscopic observation and determination of the activity of pyruvate dehydrogenase complex (PDHC). Brain cells were prepared from the brain of 10-day-old chicken embryo and cultured with either a standard medium consisted of 85% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10% horse serum and 5% chicken embryonic extracts or a deficient medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum. It was observed that dammarane glycosides of *Panax ginseng* seemed to show the tendency to stimulate the neurite outgrowth of brain cells which were cultured with a deficient medium under microscopic observation. The activity of PDHC in brain cells cultured with a deficient medium was increased by dammarane glycosides of *Panax ginseng*.

Keywords—Dammarane glycosides, *Panax ginseng*, chicken embryo, brain cell culture, pyruvate dehydrogenase complex.

인삼은 그 약효를 동양은 물론 서양에서도 인정받기에 이르러 화학적, 생화학적, 약리학적 성질에 대한 수많은 연구논문이 발표되고 있다.^{1,2)} 인삼의 약리작용으로는 단백질 및 RNA 합성을 촉진시키며,³⁾ 피로회복^{4,5)} 및 혈압조절과 조혈작용에도 영향을 미치고 있을 뿐만 아니라,⁶⁾ 체내 기초대사를 향상시키며,⁶⁾ 중추신경계를 강화하고 stress에 대한 방어작용이 있다는⁷⁻¹¹⁾ 것이 보고되었다.

본 연구에서는 인삼의 약효 연구에 세포 수준에서 짧은 시간내에 다른 장구나 기관의 영향을 배제한 상태에서 미량으로 생리활성 물질의 작용을 규명할 수 있는 일차 세포배양법을 도입하여 보았다. 이 방법을 이용하여 인삼의 약리작용 및 그 기전을 규명하기 위한 연구의 일환으로 우선 인삼성분중 dammarane계 glycoside의 분획물이 어떻게 뇌세포에 영향을 미치는가를 알아보았다. 즉 계배의 뇌로부터 뇌세포를 직접 분리하여 배양하면서 이에 미

치는 인삼 dammarane계 glycoside 분획물의 영향을 현미경 관찰과 함께 신경세포의 성장과 밀접한 관계가 있는 효소인 Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDHC)의 활성을 측정함으로써 알아보았다.

실험재료 및 방법

재료 및 시약—본 실험에서 사용한 인삼은 강화산 6년근이며 계배 (chicken embryo)는 일령 10일 된 것을 초원농장(서울, 내곡동)에서 구입하였다. 조직 배양에 필요한 시약은 Grand Island Biological Company (GIBCO: U. S. A.) 제품을, 기타 시약은 Sigma Chemical Company와 일본의 Kanto, Shiny의 특급시약을 사용하였다.

인삼 dammarane계 glycosides 제조^{12,13)}—인삼 500g의 메탄올 추출물(1L×3회)을 감압 농축한

후, 농축물을 최소량의 물에 녹이고 ether로 세척하여 유상물질을 제거하였다. 물층을 n-BuOH로 추출하여 총 dammarane계 glycosides 분획물을 얻었으며, n-BuOH 층을 5% NaOH로 처리한 후 n-BuOH 층을 농축하여 panaxatriol glycosides 분획물을 얻고 NaOH 층을 1N-HCl로 중화하고 중화층을 다시 n-BuOH로 추출 농축하여 panaxadiol glycosides 분획물을 얻었다.

계배 추출물(chicken embryonic extract)의 제조¹⁴⁾—일령의 10일 된 계배를 적출하여 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 세척한 후 주사기를 이용하여 원심분리관 속에 압출하고, 동량의 HBSS로 희석하였다. 실온에서 30분간 방치한 후, 4°C에서 18,000 r. p. m.으로 25분간 원심분리 하면서 그 상등액을 취하여 사용하였다.

일차 세포배양법에 의한 계배의 뇌세포 및 척수세포의 배양—일령이 10일 된 계배에서 뇌와 척수를

각각 적출한 후 결합조직을 제거하고 0.15% trypsin으로 조직을 연화시켰다. 이것을 collagen을 입힌(5 μg/cm²) 배양용기(Linbro dish, 35×10 mm: Green T. C., 녹십자, 100×20 mm)에 뇌세포와 척수세포가 각각 7×10⁵ cell/ml 배양액이 되게 이식하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DSEM) 85.5%, 말혈청 10.0%, 계배추출물 2.5%, Penicillin 10,000 IU/100 ml 배양액, Streptomycin 1,000 μg/100 ml 배양액과 Amphotericin B 500 μg/100 ml 배양액으로 구성된 표준배양액과 이 표준배양액에서 세포성장에 필수성분인 계배 추출물을 제거한 결핍 배양액을 사용하였다. 세포의 배양은 일정한 습도를 유지하는 37°C 배양기에서 공기(95%)와 CO₂(5%)의 혼합기체를 계속 공급시키면서 수행하였다.

생약의 투여—인삼 총 dammarane계 glycosides, panaxadiol glycosides, panaxatriol

Table I— The effect of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on the number of chicken embryonic brain and spinal cord cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 23 hours.

Substance	Concentration of dammarane glycosides of <i>Panax ginseng</i> (μg/ml)	Number of cells with neurite outgrowth	
		Brain cells	Spinal cord cells
Control	0	20.33 ± 4.51	38.00 ± 2.56
Total dammarane glycosides	10	45.25 ± 7.41	74.67 ± 6.03
	20	33.00 ± 4.08	56.00 ± 3.61
	30	33.50 ± 2.08	59.00 ± 7.55
	50	34.16 ± 3.11	72.00 ± 6.56
	70	37.75 ± 3.59	63.00 ± 9.00
	100	40.00 ± 3.37	72.33 ± 5.77
Panaxadiol glycosides	10	31.00 ± 5.16	71.00 ± 1.73
	20	36.25 ± 4.92	65.00 ± 6.56
	30	46.25 ± 6.80	62.67 ± 7.64
	50	44.50 ± 5.20	65.00 ± 6.56
	70	43.00 ± 4.55	63.33 ± 6.11
	100	28.00 ± 4.08	74.00 ± 6.00
Panaxatriol glycosides	10	33.25 ± 5.74	49.00 ± 5.57
	20	48.25 ± 4.57	42.33 ± 5.13
	30	47.75 ± 6.18	57.00 ± 6.56
	50	25.50 ± 4.43	70.67 ± 6.11
	70	22.25 ± 3.50	74.67 ± 7.37
	100	21.50 ± 2.65	76.67 ± 4.04

glycosides은 각각 증류수에 녹여서(1mg/ml) millipore membrane(0.22 μ m, Millex-GV, U. S. A)을 사용하여 멸균하였다.

단백질의 정량¹⁵⁾—단백질 함량은 Lowry 방법에 의하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

PDHC의 정량¹⁶⁾—PDHC의 활성은 PDHC가 환원시킨 NADH의 양을 측정하여 정량하였다. 균질

화된 세포에 2.5mM NAD, 0.2mM thiamine pyrophosphate, 0.1mM coenzyme A, 0.3mM dithiothreitol, 5mM pyruvate, 1mM magnesium chloride, 1mg/ml의 bovine serum albumin, 0.6mM p-iodonitrotetrazolium, 0.1mg/ml lipoamide dehydrogenase, 1mM 2-mercaptoethanol, 1mM EDTA, 0.1% Triton X-100이 함유된 0.05M potassium phosphate

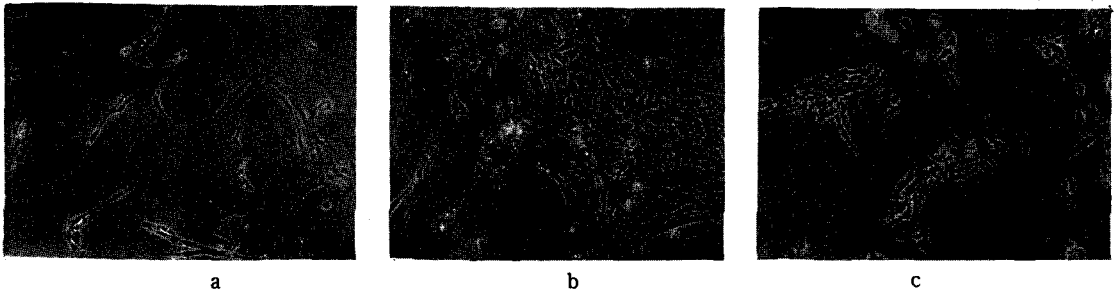


Fig. 1. The effect of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on the growth of chicken embryonic brain cells with a deficient medium for 4 days ($\times 200$)

- Brain cells cultured in the absence of dammarane glycosides of *Panax ginseng*.
- Brain cells cultured in the presence of 50 μ g/ml total dammarane glycosides.
- Brain cells cultured in the presence of 50 μ g/ml panaxatriol glycosides.

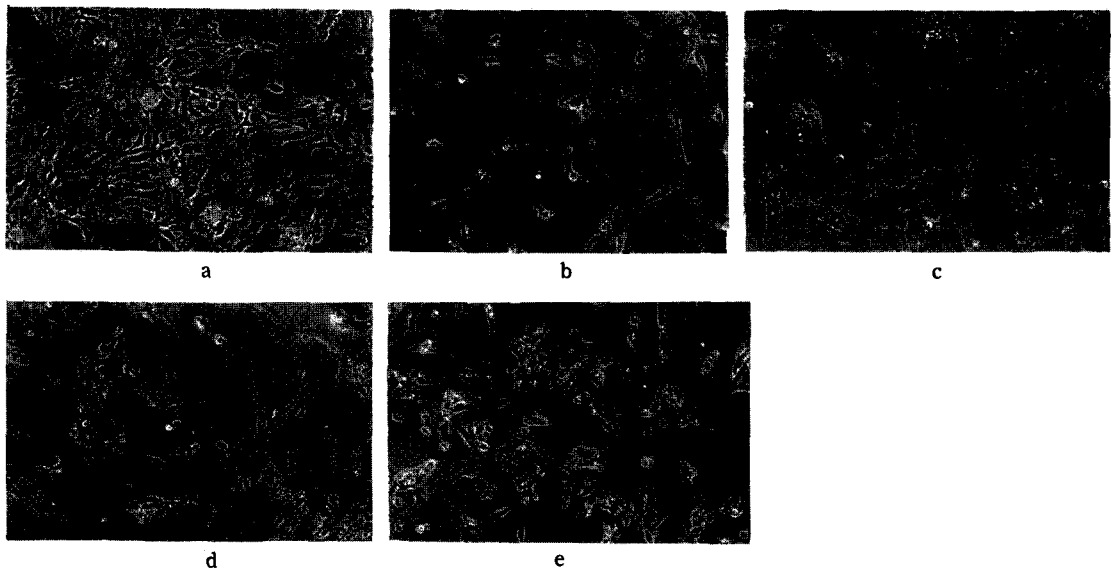


Fig. 2. The effect of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on the growth of chicken embryonic spinal cord cells for 4 days ($\times 200$).

- Spinal cord cells cultured with a standard medium.
- Spinal cord cells cultured with a deficient medium.
- Spinal cord cells cultured with a deficient medium in the presence of 50 μ g/ml total dammarane glycosides.
- Spinal cord cells cultured with a deficient medium in the presence of 50 μ g/ml panaxadiol glycosides.
- Spinal cord cells cultured with a deficient medium in the presence of 50 μ g/ml panaxatriol glycosides.

buffer (pH 7.8) 용액의 반응시약을 1분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

인삼 dammarane계 glycosides 분획물의 약리작용을 계배의 뇌세포 및 척수세포를 정상상태와 비정상상태로 배양하면서 세포수준에서 밝혀보았다. 생체에 미치는 생리활성 물질의 약리작용은 정상상태에서 보다는 비정상상태에서 그 효과가 더 뚜렷할 것이다. 따라서 뇌세포와 척수세포를 결핍배양액으로 배양하여 비정상상태로 유도하면서 총 dammarane계 glycosides, panaxadiol glycosides와 panaxatriol glycosides를 각각 10, 20, 30, 50, 70, 100 $\mu\text{g/ml}$ 씩 투여하여 24시간 배양한 후, 신경축색돌기(neurite)를 생성하는 신경세포의 수를 다섯 부위에서 측정하여 이들의 효과를 알아보았다

(Table I). 현미경 관찰에 의한 소견으로는 인삼 dammarane계 glycosides 분획물은 뇌세포 및 척수세포를 결핍배양액을 배양하였을 때의 성장제한을 유의성 있게 회복시켰다(Fig. 1, 2). 이를 뒷받침하기 위하여 뇌세포에 존재하는 효소 중에서 에너지 대사 및 신경전달 물질인 acetylcholine의 생합성에 관여하는 효소로 알려진 PDHC의 활성을 측정하였다(Table II). 총 dammarane계 glycosides, panaxadiol glycosides 및 panaxatriol glycosides 모두 PDHC의 활성을 유의성있게 증가시켰다. 특히 panaxadiol glycosides 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 70 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 투여시 PDHC 활성을 2배 이상 증가시키는 것은 주목할만하다. 김¹⁷⁾ 등은 현미경 관찰에 의하여서는 인삼 dammarane계 glycosides 분획물이 각각 신경기관인 dorsal root ganglia에서 신경 섬유 생성 및 성장을 촉진, 강화시키며 생존기간도 연장시켰으나, 중추신경세포에는 별다른 영향을 미

Table II—The effect of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on the activity of PDHC in chicken embryonic brain cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 4 days.

Substance	Concentration of dammarane glycosides of <i>Panax ginseng</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Activity of PDHC	
		Specific activity (nmol/min/mg protein)	Relative activity (%)
Control	0	40.53 \pm 2.83	100
Total dammarane glycosides	10	72.13 \pm 3.75	178
	20	71.05 \pm 6.21	175
	30	70.10 \pm 5.78	173
	50	69.18 \pm 5.81	171
	70	68.81 \pm 4.19	170
	100	65.29 \pm 5.06	161
Panaxadiol glycosides	10	46.12 \pm 1.43	114
	20	64.36 \pm 2.64	159
	30	82.60 \pm 7.16	204
	50	88.14 \pm 6.32	217
	70	88.24 \pm 7.59	218
	100	61.19 \pm 6.56	151
Panaxatriol glycosides	10	52.74 \pm 6.51	130
	20	64.45 \pm 7.00	159
	30	76.15 \pm 6.88	188
	50	68.85 \pm 2.30	170
	70	63.63 \pm 2.30	157
	100	55.10 \pm 4.98	131

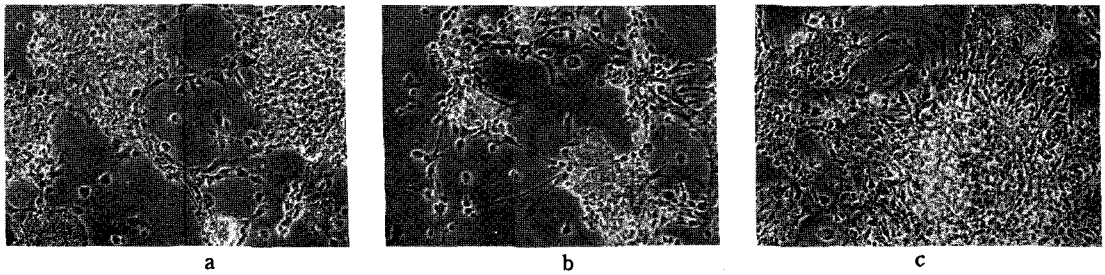


Fig. 3. The effect of dammarane glycosides of *Panaxa ginseng* on the growth of chicken embryonic brain cells with a standard medium for 4 days ($\times 200$).

- a. Brain cells cultured in the absence of dammarane glycosides of *Panax ginseng*.
- b. Brain cells cultured in the presence of 50 $\mu\text{g/ml}$ total dammarane glycosides.
- c. Brain cells cultured in the presence of 50 $\mu\text{g/ml}$ panaxadiol glycosides.

Table III—The effect of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on the activity of PDHC in chicken embryonic brain cells cultured with a medium consisted of 85% DMEM, 10% horse surum and 5% embryonic extract for 4 days.

Substance	Concentration of dammarane glycosides of <i>Panax ginseng</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Activity of PDHC	
		Specific activity (nmol/min/mg protein)	Relative activity (%)
Control	0	124.79 \pm 7.16	100
Total dammarane glycosides	10	115.00 \pm 6.07	92
Panaxadiol glycosides	70	110.46 \pm 3.81	91
Panaxatriol glycosides	30	113.70 \pm 3.45	88

치지 않는다고 하였다. 그러나, 본 연구에서는 뇌세포를 비정상상태로 유도하면서 배양하였을 때, 인삼 dammarane계 glycosides 분획물이 뇌세포의 PDHC 활성을 정상상태의 70%까지 회복시킬 뿐만 아니라 현미경 관찰에 의하여서도 신경축색돌기의 생성을 촉진시키는 것을 볼 수 있었다. 이러한 상이한 결과는 아마도 인삼 dammarane계 glycosides 분획물이 뇌세포 및 척수세포의 생존기간에 미치는 영향을 연구한 김¹⁷⁾ 등의 보고와는 달리, 본 연구에서는 세포를 비정상상태로 유도배양하면서 초기 성장단계에 미치는 영향을 연구한 때문인 것으로 사료된다.

인삼 dammarane계 glycosides 분획물이 비정상상태로 유도배양된 뇌세포에는 뚜렷한 효과를 나타냈으나 정상상태의 뇌세포에는 PDHC 활성이나 신

경축색돌기의 생성에 별다른 영향을 미치지 않았다 (Fig. 3, Table III).

PDHC는 뇌의 에너지대사에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 acetyl CoA를 생성시켜 신경전달물질인 acetylcholine의 생합성 전구체를 제공하여 주고, Tricarboxylic acid cycle에 관여함으로써 cycle의 생산물이며 신경전달 물질인 glutamate의 생성에 영향을 미친다.¹⁸⁻²⁰⁾ 또한 최근 연구에서 신경질환인 Leigh disease,^{21,22)} Huntington disease,²³⁾ Alzheimer's disease,^{23,24)} Friedreich ataxia^{25,26)} 등에서 PDHC 활성이 감소된다는 보고가 있다. 본 연구결과, 비정상상태로 유도배양된 뇌세포에 대한 인삼의 PDHC 활성증가 효과는 이러한 신경질환의 예방이나 치료에 인삼의 사용가능성을 부여한다 하겠다.

결 론

인삼 총 dammarane계 glycosides, panaxadiol glycosides, panaxatriol glycosides 모두 비정상상태로 유도배양한 뇌세포 및 척수세포의 성장과 뇌세포의 PDHC 활성증가를 촉진시켰다. 특히 panaxadiol glycosides 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도는 PDHC 활성을 정상상태의 70% 수준까지 회복시켰다.

감사의 말씀

본 연구에 소요된 경비의 일부는 한국과학재단의 연구비로 충당되었으며 이 연구비 지원에 대하여 깊이 감사하는 바이다.

문 헌

- 1) Kim J.Y. and Staba E.J., *Korean Ginseng Studies*. Ilwha Co. Ltd., Seoul Korea, p. 1 (1977).
- 2) Han B.H. and Woo L.H.: *ibid.* p. 22.
- 3) Oura H., Nakashima S. and Tsukada K., Effect of *Panax Ginseng* Extract on Serum Protein Synthesis, *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 980 (1972).
- 4) Korean Ginseng Research Institute, *Korean Ginseng*, p. 173 (1978).
- 5) Saito, H., Yoshida, Y. and Takagi, K., Effect of *Panax ginseng* Root on Exhaustive Exercise in Mice, *Japan. J. Pharma. Col.* **24**, 119 (1974).
- 6) Yokozawa, T., Semo, H. and Oura, H., Effect of Ginseng Extract on Lipid and Sugar Metabolism I. Metabolic Correlation between Liver and Adipose Tissue, *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 3095 (1975).
- 7) Korean Ginseng Research Institute, Republic of Korea, *Pharmacological Actions of Ginseng*, p. 46 (1978).
- 8) Takagi, K., Saito, H. and Nabata, H., Pharmacological Studies of *Panax Ginseng* Root, *Japan J. Pharmacol.* **22**, 245, (1972).
- 9) Saito, H., Yoshida, Y., and Takagi, K., Effect of *Panax ginseng* Root on Exhaustive in Mice, *Japan J. Pharmacol.* **24**, 119 (1974).
- 10) Nabata, H., Saito, H., and Takagi, K., Pharmacological Studies of Neutral Saonin of *Panax ginseng* root, *Japan. J. Pharmaco.* **23**, 29 (1973).
- 11) Brekhman, I.I., and Dardymov. I.V., New Substance of Plant Origin which which Increase Nonspecific Vesistance, *Ann. Rev. Pharm.* **9**, 419 (1969).
- 12) Shibata, S., Tanaka, O., Soda, M., and Tsushima, S., On Genuine Sapogenin of Ginseng, *Tetrahedron letters* **12**, 795 (1963).
- 13) Shibata, S., Tanaka, O., Soda, M. and Tsushima, S., Studies on the Constituents of Japanese and Chinese Crude Drugs XI, *Chem. Pharm. Bull.* **11**, 759 (1963).
- 14) P. R. White, *The cultivation of animal and plant cells*, The Ronald Press Company, New York, p. 66 (1963).
- 15) Lowry, O. H., Resebrough N. J., Farr A.L. and Randall R.J., Protein Measurment with the Folinphenol Reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 16) Lois M.H. and John P.B., An NADH-Linked Spectrophotometric Assay for Phruvate Dehydrogenase Complex in Crude Tissue Homogenates, *J. Biol. Chem.* **256**, 13, 6583 (1981).
- 17) Young Choong Kim and Eun Kyung Kim, Studies on the Effect of Ginseng Extract on Chick Embryonic Nerve and Muscle Cells. *Yakhak Hoeji* **24**, 3 (1980).
- 18) Tucek S. and Cheng S.C., Provenance of the Acetyl group of Acetylcholine and Compartmentation of Acetyl-CoA and Krebs Cycle Intermediates in the Brain *in vivo*, *J. Neurochem.* **22**, 893 (1974).
- 19) Lefresne, P., Beaujouan, J.C. and Glowinski, J. Evidence for Extramitochondrial Pyruvate Dehydrogenase involved in Acetylcholine Synthesis in Nerve Endings, *Nature* **273**, 3, 490 (1978).
- 20) Bibson G.E., Jope R. and Blass J.P., Decreased Synthesis of Acetylcholine Accompanying impaired Oxidation of Pyruvic acid in Rat Brain Minces, *Biochem. J.* **148**, 17 (1975).
- 21) Sandro S. and John P.B., Abnormal Actioation of Pyruvate Dehydrogenase in Leigh Disease Fibroblast, *Neurology* **32**, 555 (1982).
- 22) Han A.K., Stephen J.D., Thomas K.K., Mulchand S.P., Christopher J.L.N., Kathleen A.S., and Seymour P., Pyruvate Dehydrogenase Complex Deficiency as a Cause of Subacute Necrotizing Encephalopathy, *Pediatrics* **79**, 370 (1987).
- 23) Sandro S. Edward D.B. and John P.B., Decreased Pyruvate Dehydrogenase Complex Activity in Huntington and Alzheimer Brain, *Ann. Neurol.* **13**,

- 72 (1983).
- 24) Kwan F.R.S., Young T.K., John P.B., and Marc E.W., An Immunochemical Study of the Pyruvate Dehydrogenase Deficit in Alzheimer's Disease Brain, *Ann. Neurol.* **17**, 444 (1985).
- 25) R.A.P. Kark and M. Rodriguez-Budelli, Pyruvate Dehydrogenase Deficiency in Spinocerebellar Degenerations, *Neurology* **29**, 126 (1979).
- 26) Kark R.A.P., Blass J.P., Eugel W.K., Pyruvate Oxidation in Neuromuscular Disease, *Neurology* **24**, 964 (1974).