

인삼 사포닌이 일산화탄소중독 및 노화과정에서 흰쥐의 신경전달물질 함량 변화에 미치는 영향

박혜영* · 김춘미 · 주지연 · 최현진

이화여자대학교 약학대학

(Received March 13, 1992)

Effect of Ginseng Saponins on the Amount of Catecholamine Neurotransmitters in Carbon Monoxide-intoxicated Rats and Aged Rats

Hea-Young Park*, Choonmi Kim, Jiyeon Ju and Hyun Jin Choi
College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract—After rats were exposed to 5,000 ppm carbon monoxide for 30 minutes, the amounts of catecholamine neurotransmitters in stratum were measured using high performance liquid chromatograph equipped with electrochemical detector.

The concentration of dopamine in stratum was significantly decreased after carbon monoxide intoxication, but those of dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, and epinephrine was not changed. However the pretreatments of Ginseng total saponin and panaxatriol saponin increased the concentrations of dopamine and its acidic metabolites (DOPAC and HVA). Ginseng total saponin also increased the concentrations of norepinephrine and epinephrine. Similar results were obtained from aged rats.

Keywords □ Carbon monoxide, ginseng total saponins, panaxatriol saponin, dopamine, dihydroxyphenylacetic acid, homovanilic acid, norepinephrine, epinephrine.

일산화탄소는 무연탄을 쓰는 우리나라 뿐만 아니라, 산업이 발달한 구미에서도 공해물질로서 인명피해의 원인이 되고 있다. 일산화탄소 중독 시에는 두통, 기억력 장애, 정신착란 등 여러가지 중추신경계 장애 증상이 다양하게 나타나는 것으로 보고되어 있다.¹⁻⁴⁾ 여기서 한가지 흥미로운 사실은 일산화탄소 중독시에 나타나는 임상증상 들이 중추신경계의 신경전달물질의 변화시에 나타나는 여러 증상들과 매우 유사하다는 점이다.

따라서 일산화탄소 중독 시에도 일시적 또는 지속적인 신경전달물질의 변동이 예상되며 최근 여기에 대한 연구가 진행되고 있다.^{5,6)} 중추신경계 중 adrena-

lin 계에서는 catecholamine류인 norepinephrine, epinephrine, 및 dopamine을 신경전달물질로 사용하고 있는데 이러한 catecholamine과 일산화탄소 중독 또는 산소 결핍증과의 상관관계는 많은 관심을 받고 있으나 아직 정확히 밝혀지지는 않았다.

또한 노화과정에서도 이와 유사한 신경계 장애증상을 많이 보이는데 신경세포의 생리학적 및 생화학적 변화가 중요한 요인이 된다고 믿어지고 있다.⁷⁻⁹⁾ 대표적으로 알츠하이머 병과 choline계 중추신경계 변화와의 관계는 많은 연구가 이루어져서 choline uptake의 감소, cholineacetyltransferase와 acetylcholinesterase의 활성 감소, muscalinic cholinergic receptor 세포의 현저한 감소 등이 보고되었다.^{10,11)} 이러한 변화는 실제로 인간의 기억력 및 학습능력, 그리고

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

운동량과 밀접한 상관관계가 있다는 것이 증명되고 있다.¹²⁾ 또한 노화과정에서 catecholamine의 양이 감소되는 것도 알려지고 있다. Bettler등은 인간의 뇌 부분에서 catecholamine 양을 조사한 결과 70세 이상에서의 norepinephrine, dopamine양의 현저한 감소를 관찰하였으며,¹³⁾ Kim등도 늙은 쥐에서 catechol-O-methyltransferase(COMT)activity의 감소를 보고하였다.¹⁴⁾

이와같이 일산화탄소 중독, 산소결핍 또는 노화과정으로 인한 중추신경계 신경 전달물질의 변화로 여러가지 질병이 나타나게 되나 아직 이러한 질병의 치료약 및 예방약 등은 잘 알려지지 않았으므로 정확한 메카니즘의 규명, 약효 검색 방법 개발 등 다각적인 연구가 필요하다.

한편 Saito 등은 인삼 saponin 성분중 G-7 fraction이 *in vitro* 실험에서 뇌신경세포의 신경전달물질계 효소에 영향을 미치는 것을 보고하였다.¹⁵⁾ 이외에도 인삼은 혈압조절, 기초대사항진 등 여러가지 약리효과를 갖고있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 본 연구에서는 인삼 saponin 성분이 일산화탄소 중독 및 노화과정에서 신경전달물질에 미치는 영향을 측정함으로써, 여러가지 중추신경성 질환의 생화학적 과정을 방지하는데 효과가 있는지를 연구하였다.

실험방법

시약—Norepinephrine(NE), epinephrine(E), dopamine(DA), dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC), dihydroxybenzylamine(DHBA), homovanillic acid(HVA), 및 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol(MOPAG)은 Sigma사 (미국)에서 구입하였다. Ginseng total saponins(GTS), panaxadiol saponin(PDS), 및 panaxatriol saponin(PTS)성분은 한국인삼연초연구소에서 분리 정제 한것을 사용하였다. 즉 앞에서 기술한것처럼¹⁶⁾ 6년근 수삼을 증속가온건조시켜 제조된 홍삼을 약 6 mm로 절단한 다음 80% 메탄올 엑스를 얻어서 수포화 n-부탄올 추출법으로 추출 정제하여 total saponins을 얻었으며 이를 silica gel 컬럼에서 n-butanol/ethyl acetate/water(4:1:5, 상층)으로 전개시켜 panaxadiol saponin 및 panaxatriol saponin을 얻었다.

실험동물 및 약물투여—체중 150~250g의 수컷 흰쥐(Wistar계)를 사용하여, 정상대조군, 일산화탄소

중독군, GTS투여군, PDS투여군 및 PTS투여군으로 나누었으며 각 실험군은 6마리씩의 흰쥐로 구성하였다. 약물투여군은 각각 GTS, PDS 및 PTS를 생리식염수에 녹여 흰쥐 체중 Kg당 각각 250 mg, 50 mg 및 50 mg씩 5일간 경구투여 하였다. 정상대조군과 일산화탄소 중독군은 생리식염수를 투여하였다. 노화과정 실험에서는 체중 450~550g(13주령 이상)의 수컷 흰쥐를 사용하여 위와 같은 방법으로 약물투여 하였다.

일산화탄소 중독—일산화탄소 중독용 chamber 및 CO 검지관과 검지기는 Ga: sc사(일본)에서 구입하였다. 일산화탄소 중독은 180 L용적의 stainless-steel chamber에 CO 1%, N₂ 79%, O₂ 20%의 혼합가스를 2 L/min의 기속으로 10분간 흘린다음 CO혼합가스와 압축공기를 1:1의 비율로 계속 흘려서 chamber내의 CO농도가 5,000 ppm이 유지되도록 하였다. 정상대조군을 제외한 나머지 동물을 chamber속에 30분간 노출시켰고 이때 chamber내 농도는 수시로 측정 확인 하였다.

HbCO양 측정—중독상자에서 동물을 꺼낸 즉시 안정맥총에서 체혈한 혈액과 heparin액(50 IU)을 1:1로 혼합하여 이중 100 μl를 취하여 Tietz 등의 법에 따라 HbCO 포화도를 측정하였으며 상세한 것은 앞의 논문에서 기술하였다.¹⁶⁾

Catecholamine의 추출—Catecholamine의 추출 및 HPLC분석은 김 등의 방법을 약간 변형하여 사용하였다.¹⁷⁾ 일산화탄소 중독시킨 동물은 즉시 단두하여 얼음판 위에서 선조체만을 절취하였으며 dry ice를 이용하여 급속 냉동한 다음 -70℃에서 보관하였다. 절취된 선조체는 차가운 100 mM perchloric acid와 0.4 mM sodium metabisulfite 혼합액 510 μl 및 2 μM dihydroxybenzylamine(내부표준물질) 90 μl를 가한 다음 tissue grinder로 분쇄시켰다. 조직균등액을 11,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻은 후 nitrocellulose막(pore size 0.2 μM)으로 여과하여 여액 10 μl를 HPLC에서 분석하였다.

HPLC 분석—High performance liquid chromatograph는 Waters사 (미국)의 Model 501을 사용하였으며, Bioanalytical System (미국)의 LC4 B electrochemical detector를 사용하였다. glassy carbon electrode를 이용하였는데 Ag/AgCl reference electrode에 대하여 0.82 volt의 전압을 사용하였으며 1 nA/V의

Table I—Effects of ginseng total saponins, panaxadiol saponin, and panaxatriol saponin on dopamine metabolism in young rat striatum upon carbon monoxide intoxication

	Control	CO	GTS+CO	PDS+CO	PTS+CO
DA	24.57±4.60	14.80±4.77 ^a	21.60±5.17	21.12±5.17	40.83±8.12 ^b
DOPAC	1.37±0.35	1.32±0.15	1.64±0.29 ^b	1.45±0.19	1.71±0.24 ^b
HVA	3.06±0.39	2.34±0.28 ^a	2.98±0.21 ^b	2.41±0.24	3.22±0.67 ^b

The units of values are nmole/g wet tissue and all values represent means±S.D.

a: p<0.05 compared with Control group

b: p<0.05 compared with CO group

Table II—Effects of ginseng total saponins, panaxadiol saponin, and panaxatriol saponin on dopamine metabolism in aged rat striatum upon carbon monoxide intoxication

	Control	CO	GTS+CO	PDS+CO	PTS+CO
DA	83.15±38.03	49.59±23.79	115.78±41.99 ^b	29.97±27.90	90.18±43.27
DOPAC	3.66±1.34	3.28±1.19	4.67±1.08	2.18±1.66	2.66±1.43
HVA	6.14±0.51	4.18±1.55 ^a	7.28±2.36 ^b	3.44±1.73	5.29±1.99

The units of values are nmole/g tissue and all values represent means±S.D.

a: p<0.05 compared with Control group

b: p<0.05 compared with CO group

감도에서 측정하였다. Waters사의 길이 15 cm짜리 Novapak C18 column(입자크기 5 μm)를 사용하였으며 분석시 column온도를 30°C로 유지하였다. 이동상으로는 5.2%의 methanol을 함유한 150 mM sodium phosphate, 0.1 mM EDTA, 1.7 mM octane sulfonic acid(pH 3.5) 혼합액을 사용하였으며 유출속도는 1.0 ml/min이었다.

통계분석—실험결과의 유의성검정은 Student's t-test를 이용하였으며 95% 이상 유의성 있는 결과를 a 또는 b로 표시하였다.

실험결과

Calibration Curve—Catecholamine 각 표준물질의 농도를 25, 50, 100, 250 및 500 ppb가 되도록 하였을 때 내부 표준 물질과의 면적 비율이 직선성을 잘 보여 주었다. (r=0.95 이상) 각 표준 물질의 HPLC머무름 시간은 아래와 같다. Norepinephrine; 3.73분, epinephrine; 5.46분, DOPAC; 6.35분, DHBA; 8.26분, HVA; 10.72분 및 DA; 14.56분 이었다.

Dopamine양의 변화—선조체에서 가장 많은 양을 보여준 것은 dopamine으로서 일산화탄소 중독되었을 때 정상대조군과 비교하여 dopamine양이 유의성있게 감소한것을 볼 수 있었다. 인삼 total saponins 및 pa-

naxadiol saponin을 투여한 군에서는 일산화탄소를 중독시켰을 때에도 정상대조군과 비슷한 값을 나타내었으나 일산화탄소 중독군과 비교할 때 유의성을 나타내지는 못하였다. 그러나 panaxatriol saponin을 투여한 군에서는 dopamine의 양이 100% 이상 증가하여 확실한 유의성을 보여주었다.

Dopamine의 대사물질인 DOPAC양에 대한 인삼의 효과도 유사하게 관찰되었다. DOPAC의 양은 일산화탄소 중독군과 정상대조군에서 거의 차이가 없었다. 그러나 total saponin과 panaxatriol saponin의 투여는 DOPAC의 양을 25%정도 증가시켰다. DOPAC이 더욱 대사된 HVA의 양도 일산화탄소를 중독시켰을 때에는 감소되었고, 인삼을 투여한 경우에는 정상치에 가까운 증가를 보였다. 여기에서도 total saponin과 panaxatriol saponin이 HVA의 양을 유의성 있게 증가시키는 것으로 나타났다. Dopamine, DOPAC 및 HVA의 양은 Table I에 제시하였다.

고령 흰쥐에서도 일산화탄소 중독에 대한 인삼의 효과는 아주 유사하게 나타났다.(Table II참조) Dopamine의 양은 일산화탄소를 중독시켰을 때 역시 약 60%로 줄어들었으며 인삼을 투여한 군에서는 감소 현상이 나타나지 않았다. 특히 total saponin은 유의성있게 증가하였으며, panaxatriol saponin의 경우 증가폭은 컸으나 표준편차가 커서 유의성이 없는것

Table III—Effects of ginseng total saponins, panaxadiol saponin, and panaxatriol saponin on norepinephrine and epinephrine contents in young and aged rat striatum upon carbon monoxide intoxication

		Control	CO	GTS+CO	PDS+CO	PTS+CO
Young rats	NE	1.41±0.17	1.39±0.46	1.76±0.26	1.39±0.10	1.75±0.20
	E	0.61±0.17	0.53±0.08	0.69±0.10 ^a	0.56±0.11	0.69±0.07 ^a
Aged rats	NE	1.26±0.36	0.88±0.64	3.19±1.80 ^a	0.46±0.32	1.20±0.88
	E	2.29±0.86	1.37±0.66	2.91±1.19 ^a	0.52±0.33 ^a	0.77±0.54

The units of values are nmole/g wet tissue and all values represent means±S.D.

a: p<0.05 compared with CO group

으로 나타났다. DOPAC의 양은 total saponin이 약간 증가시켰으나 유의성은 없었으며 panaxatriol saponin은 거의 증가시키지 못하였다. HVA의 양도 일산화탄소에 의한 감소와 total saponin에 의한 증가를 보여주었다. 한편 panaxadiol saponin은 dopamine, DOPAC, HVA의 양에 거의 효과를 주지 않는 것으로 나타났다.

Norepinephrine 및 Epinephrine양의 변화—Norepinephrine과 epinephrine의 양은 Table III에 제시하였다. Norepinephrine 및 epinephrine의 양은 일산화탄소 중독시 정상대조군과 거의 차이가 없으므로 나타났다. 인삼 total saponins과 panaxatriol saponin도 norepinephrine의 양에 변화를 주지 않았다. 그러나 epinephrine의 경우에는 total saponins 및 panaxatriol saponin투여군이 일산화탄소 중독군에 비하여 유의성있는 높은값을 보여주었다.

고령 흰쥐에서의 일산화탄소 중독에 대한 인삼의 효과도 유사하였다. 인삼 total saponins이 norepinephrine과 epinephrine의 양을 유의성있게 증가시켰다. 다만 panaxadiol saponin이 epinephrine 양을 감소시키는 것으로 나타난 것만이 달랐다.

고 찰

일산화탄소 중독 후 나타나는 신경구조의 손상은 저산소증과 허혈성 변화가 합병되어서 나타나는 것으로 믿어지고 있다. 저산소증과 허혈상태에서 뇌부위의 신경전달물질을 측정할 실험에는 먼저 David 등의 연구가 있다. 여기서는 gerbil쥐의 한쪽 경동맥을 잘라 허혈상태를 만든다음 대뇌피질의 신경전달물질을 측정하였는데 GABA의 함량은 현저하게 증가하였고 norepinephrine, dopamine, 5-hydroxyl trypta-

mine(HT)는 감소하였다.¹⁸⁾ 최근 Matsumoto 등이 같은 조건에서 선조체의 신경전달물질 함량을 측정하였을때에도 dopamine과 serotonin의 감소를 관찰하였다.¹⁹⁾ 이와는 달리 저산소증에서는 상이한 결과를 보였는데, 5~6%의 저산소농도에 노출시켰을때 dopamine함량의 증가가 보고되었다.²⁰⁾ 한편 일산화탄소 중독시의 신경전달물질변화는 조금씩 다른 결과를 보여주고 있다. 일산화탄소 0.15%에 2시간 노출시켰을때 미상핵의 dopamine함량이 증가되었으며,²¹⁾ 2,000 ppm에서 5시간 노출시켰을 때 선조체의 dopamine과 DOPAC의 양이 증가된것이 보고되었다.⁵⁾ 그러나 Chai와 Bae는 선조체에서 dopamine흡수의 감소와 분비의 증가로 인한 감소를 관찰하여 상이한 결과를 보였으며,²²⁾ 본 실험에서도 dopamine이 유의성있게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 이러한 일련의 실험을 통하여 일산화탄소가 선조체의 dopamine신경계에 작용하여 dopamine의 대사과정에 영향을 미친다고 믿어지고 있다. 또한 본 실험에서는 인삼을 전처리한 경우에는 dopamine계에 대한 일산화탄소의 영향이 대부분 상쇄되는것을 알 수 있었다. 그 효과는 total saponin과 panaxatriol saponin에서 두드러지게 나타나서 dopamine, DOPAC 및 HVA의 양이 모두 증가하여 정상대조군에 가까운것을 볼 수 있다. Dopamine대사과정의 지표가되는 DOPAC/DA와 HVA/DA 비율도 일산화탄소 중독시 증가하였다가 인삼투여군에서는 정상치에 접근하는 것을 볼 수 있었다. 고령 흰쥐를 사용한 경우에도 total saponin의 증가 효과를 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 그러나 인삼 성분이 단순히 dopamine의 합성을 증가시키는 지 아니면 일산화탄소 중독으로 일어나는 신경세포의 손상 메카니즘을 차단하는 효과가 있는지는 더욱 면밀한 연구가 필요하겠다.

Total saponin은 선조체에서 dopamine뿐만아니라 norepinephrine과 epinephrine의 양도 증가시키는 효과가 있는 것으로 나타났는데 이것이 인삼의 혈압 조절 및 대사기능 항진 등의 약리 작용과 관계있을 것으로 사료된다.

결 론

인삼 total saponin, panaxadiol saponin 및 panaxatriol saponin을 전처리한 다음 일산화탄소 5,000 ppm에 30분 노출시켜서 뇌 선조체의 catecholamine계 신경 전달물질의 양을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 인삼 처리하지 않은 경우에는 일산화탄소 중독군이 대조군과 비교하여 dopamine은 유의성있는 감소를 보였으나 DOPAC의 양은 변하지 않았다.

2. 인삼 total saponin과 panaxatriol 전처리군이 선조체의 dopamine, DOPAC, HVA양을 유의성 있게 증가 시켜서 정상대조군과 비슷한 값을 보였다.

3. 인삼 total saponin은 선조체의 norepinephrine 및 epinephrine의 양을 뚜렷하게 증가시켰다.

4. 이와같은 인삼의 효과는 고령 흰쥐에서도 유사한 결과를 보였다.

이상의 실험 결과로 인삼 saponin은 일산화탄소에 의한 선조체의 dopamine계 신경의 신경전달 물질변화를 상쇄하여 거의 정상치가 되도록 하는 효과가 있다고 생각할 수 있었으며 또 norepinephrine 및 epinephrine의 양도 항진 시킴을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 1989년도 교육부 학술진흥재단 부설연구소 연구비 지원에 의하여 이루어졌음에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Saslow, A.R. and Clark, P.S.: Carbon monoxide poisoning, report of an outbreak involving 171 persons. *J. Occup. Med.*, **15**, 490 (1973).
- 2) Smith, J.S. and Brandon, S.: Morbidity from acute carbon monoxide poisoning at 3 year follow up.

- Br. Med. J.*, **1**, 318 (1973).
- 3) 이상복 : 일산화탄소 중독에 대한 임상적 고찰. *최신의학* **20**, 128 (1977).
- 4) 최일생 : 일산화탄소 중독, 임상조건 및 후유증. *최신의학* **26**, 18 (1989).
- 5) 최경규 : 일산화탄소 중독된 흰쥐의 뇌조직 및 뇌척수액에서의 신경전달물질의 변동. 연세대학교 의과대학 박사학위 논문 (1989).
- 6) 윤재순 : 일산화탄소가 뇌내 신경전달물질 및 그 합성효소에 미치는 영향. *약학회지* **34**, 384 (1990).
- 7) Domino, E.F., Dven, A.T. and Giardina, W.F.: Biochemical and neurotransmitter changes in the aging brain. In *Psychopharmacology: A Generation of Progress*, Lipton, M.A., DiMascio, A. and Killiam, K.F. eds, Raven press, New York, p.1507 (1978).
- 8) Reisine, T.D., Fields, J., Yamamura, H., Bird, E., Spokes, E., Schreiner, P. and Enna, S.J.: Neurotransmitter receptor alteration in Parkinson's disease. *Life Sci.*, **21**, 335 (1977).
- 9) Samorajski, T.: Central neurotransmitter substances and aging. A review. *J. Amer. Geriatric Soc.*, **25**, 337 (1977).
- 10) Reisine, T.D., Yamamura, H.I., Bird, E., Spokes, E. and Enna, S.J.: Pre- and postsynaptic neurochemical alterations in Alzheimer's disease. *Brain Res.*, **159**, 477 (1978).
- 11) Algeri, S., Calderini, G., Toffiano, G. and Ponzio, F.: Neurotransmitter alterations in aging rats. In *Aging of the Brain*, Raven Press, New York, No.22, p.227 (1983).
- 12) Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B. and Lippa, A.S.: The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, A critical review, *Science*, **217**, 408 (1982).
- 13) Bertler, A.: Occurrence and localization of catecholamines in the human brain. *Acta Physiol. Scand.*, **51**, 97 (1961).
- 14) Kim, E.J.: Untersuchungen zur Altersabhaengigkeit der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) sowie der Catechol-Oestrogene bei der Ratte und Einfluss von Piracetam. Dissertation, Fachbereich Pharmazie der Freien Universitaet Berlin (1985).
- 15) Saito, H.: Ginsenoside Rb and nerve growth factor, *Proc. 3th Int. Ginseng Symp.*, p.181 (1980).

- 16) 윤혜정, 신정희, 최현진, 윤재순 : 인삼 saponin이 일산화탄소와 노화에 의한 신경전달계 변화에 미치는 영향 - 기억력 장애에 미치는 영향. 약학회지, **36**, 56 (1992).
- 17) 김우일, 이용성, 고재경, 양병환 : Haloperidol이 stress에 의한 흰쥐 선조체의 monoamine neurotransmitter 대사변화에 미치는 영향. 한양의대 학술지, **10**, 118 (1990).
- 18) David, W.L., Bogomir B., Branislava, J., Janet, V.P. and Igor, K.: Putative neurotransmitters and cyclic nucleotides in prolonged ischemia of cerebral cortex. *Brain Res.*, **98**, 394 (1975).
- 19) Matsumoto, M., Kimura, K., Fujisawa, A., Matsuyama, T., Fukunaga, T.R., Yoneda, S., Wada, H. and Abe, H.: Differential effect of cerebral ischemia on monoamine content of discrete brain regions of the mongolian gerbil. *J. Neurochem.*, **42**, 647 (1984).
- 20) Davis, J.N. and Carlsson, A.: The effect of hypoxia on monoamin synthesis, levels and metabolism in rat brain. *J. Neurochem.*, **21**, 783 (1973).
- 21) Newby, M.B., Roberts, R.B. and Bhatnayar, R.K.: Carbon monoxide- and hypoxia-induced effects on catecholamines in the mature and developing rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **206**, 61 (1978).
- 22) Chai, K.J. and Bae, S.K.: Effect of carbon monoxide induced hypoxia on synaptosomal uptake and release of dopamine in rat striatum. *Yonsei Med. J.*, **29**, 129 (1988).