

일차배양한 계배 뇌세포 내의 콜린성 신경에 대한 인삼 Dammarane계 Glycosides의 작용

김소라 · 박미정 · 허훈 · 이흠숙*[#] · 김영중[#]

서울대학교 약학대학, *서울산업대학교 식품공학과

(Received May 10, 1994)

Effects of Dammarane Glycosides of *Panax ginseng* on Cholinergic Neurons in Primary Cultured Chicken Embryonic Brain Cells

So Ra Kim, Mi Jung Park, Hoon Huh, Heum Sook Lee* and Young Choong Kim[#]

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

*Dept. of Food Engineering, Seoul National Polytechnic University, Seoul 139-743, Korea

Abstract—The cholinergic activity of dammarane glycosides of *Panax ginseng* was examined both morphologically and chemically on primary cultures of chicken embryonic brain cells. When primary cultured chicken embryonic cells were treated with 50 µg/ml of total dammarane glycosides of *Panax ginseng* followed by the exposure to 10mM atropine for 48 hr, lactate dehydrogenase levels within the cells remained at 36% of untreated control values while atropine-treated controls fell to 0% lactate dehydrogenase. It was found that cholinergic activity was mainly exerted by the panaxadiol glycosides. The treatment of the cells with 50 µg/ml of panaxadiol glycosides followed by the exposure to atropine, lactate dehydrogenase levels within the cells remained at 60% of untreated control values. Ginsenoside Rb₁, a component of panaxadiol glycosides, was found to exert the cholinergic activity keeping the lactate dehydrogenase levels within the cells at 70% of untreated control values. The cholinergic activity of ginsenoside Rb₁ seems to be exerted through acting on the Ca²⁺ channel in cultured brain cells.

Keywords □ Dammarane glycosides, cholinergic neurons, primary cultured chicken embryonic brain cells, lactate dehydrogenase

인삼은 한국의 특산 생약으로 수 천년 전부터 한국을 비롯하여 중국, 일본 등지에서 불로장생의 영약으로 사용되어 왔으며 보혈 강장제로서의 인삼에 대한 기호는 근래 가히 세계적이라고 할 수 있다.¹⁾ 따라서 이러한 인삼의 약효를 과학적으로 규명하기 위하여 그 동안 수 많은 연구가 다각적인 방향에서 수행되어²⁻⁴⁾ 중추신경계 강화작용,^{5,6)} 기초대사 항진,⁷⁾ 생체내 단백질 합성 촉진,⁸⁾ 빈혈,^{9,10)} 암,^{11,12)} 당뇨병,^{13,14)} 고혈압에 대한 저항력,^{15,16)} 피로회복¹⁷⁾ 및 스트레스에 대한 방어 작용^{18,19)} 등의 약리작용이 보고되었다. 이와 같이 인삼에 대한 연구가 활발히 수행되어 다양한

약리작용이 밝혀지고 있으나 아직도 그 작용기전은 체계적으로 규명되지 못하였다. 인삼의 여러 약리작용 중 중추신경계에 대한 작용은 중추신경계를 흥분시키는 작용과 억제시키는 작용²⁰⁻²²⁾ 또는 외래 유해 자극에 대한 진정작용²³⁻²⁵⁾을 다가가져 중추신경계에 대하여 양면성을 나타내며 이러한 결과는 인삼의 용량과 깊은 관계가 있을 것으로 추측되고 있다.²¹⁾

이에 본 연구실에서는 인삼의 중추신경계에 대한 작용을 일차배양한 뇌세포를 이용하여 세포 수준에서 밝혀보려는 시도를 하여 dammarane계 glycosides 분획물이 비정상 상태로 유도 배양한 계배의 뇌세포 및 척수세포의 성장을 촉진시키며, 뇌세포의 pyruvate dehydrogenase complex의 활성을 증가시키는 것을

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

이미 밝힌 바 있다.²⁶⁾ 또한 dammarane계 glycosides는 말초신경계에도 작용하여 신경 섬유의 생성 및 성장을 촉진시키고 그 수명도 연장시키는 것을 현미경 관찰로 확인한 바 있다.²⁷⁾ 본 연구에서는 인삼의 중추신경계에 대한 작용에 관한 연구중의 하나로 콜린성 신경에 대한 인삼 dammarane계 glycosides의 작용 및 그 기전을 규명하였다.

실험방법

실험동물—계배는 일령이 10일된 것을 홍일 부화장(오류동, 서울)에서 구입하여 사용하였다.

실험재료 및 시약—인삼은 경동시장의 한약재상에서 구입한 후 서울대학교 명예교수이신 한대석 교수의 감정을 받은 후 사용하였으며 ginsenosides Rb₁, Rc, Re 및 Rg₁은 한국인삼연초연구소에서 기증받아 사용하였다. Dulbecco's modified eagle medium(DMEM), Hank's balanced salt solution(HBSS)과 trypsin은 Gibco Lab.(Grand Island, U.S.A.)에서, 말혈청은 Hyclone(Logan, U.S.A.)에서, penicillin-streptomycin, amphotericin B, atropine, dextromethorphan 및 lactate dehydrogenase(LDH) 활성검사에 필요한 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

인삼 dammarane계 glycosides의 추출 및 분획—인삼의 MeOH 추출물을 감압농축한 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 panaxadiol계 glycosides 분획물을 얻고 NaOH 층을 1N-HCl로 중화하고 중화층을 다시 *n*-BuOH로 추출 농축하여서 panaxatriol계 glycosides 분획물을 얻었다.^{28,29)}

계배의 뇌신경세포 배양²⁷⁾—일령이 10일된 계배에서 뇌를 적출하여 HBSS로 세척한 후, 결합조직을 제거하고 0.15% trypsin으로 15분간 처리하여 조직을 연화시켜 세포상태로 분리하였다. 분리한 세포를 collagen(5 µg/cm²)으로 도포한 배양용기(Corning, 15 × 24 mm)에 1 × 10⁶ cells/ml씩 이식하여 배양하였다. 배양액은 DMEM 85%, 말혈청 10%, 계배 추출물 5%, penicillin 10,000 IU/100 ml 배양액, streptomycin

1,000 µg/100 ml 배양액과 amphotericin B 500 µg/100 ml 배양액으로 구성된 것을 사용하였다. 세포의 배양은 일정한 습도를 유지하는 37°C 배양기에서 공기(95%)와 CO₂ (5%)의 혼합기체를 계속 공급시키면서 수행하였다.

인삼의 dammarane계 glycosides 분획물 및 각각의 ginsenosides 투여—인삼 dammarane계 glycosides와 ginsenosides Rb₁, Rc, Re 및 Rg₁ 각각을 증류수에 1 mg/ml의 농도로 용해시킨 다음 한외여과막(0.22 µm, Millex-GV, U.S.A.)을 통과시켜 무균상태로 만든 후 농도를 달리하여 배양중인 신경세포에 투여하였다.

Lactate dehydrogenase(LDH)의 정량³⁰⁾—각 배양용기 내의 뇌신경세포를 Triton X-100 400 µl에 용해시킨 후 그 30 µl를 NADH 0.3 mg이 함유된 pyruvate 0.75 mM 용액 300 µl에 첨가하고 37°C 항온조에서 30분간 반응시켜 LDH 작용에 의하여 pyruvate가 lactate로 변환되게 한 후 2, 4-dinitrophenylhydrazine 20 mg%를 넣어 반응을 종결시켰다. 20분 후에 0.4N NaOH 3 ml를 넣어 발색시켜 5분후에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정상대조군의 LDH 값을 100%로 하고 비정상 상태로 유도된 대조군의 LDH 값을 0%로 하여 dammarane계 glycosides 분획물 및 각각의 ginsenosides가 정상대조군 때의 LDH 값의 몇 % 수준까지 회복시키는지 알아보았다.

통계처리—통계적 유의성 검토는 대조치로부터의 변동을 "one way ANOVA" test로 하였다. P값이 5% 미만일 때는 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

인삼은 중추신경계를 강화시킨다는 보고가 있으나 그 작용기전에 대한 정설은 확립되어 있지 않다. 이에 본 연구에서는 인삼의 중추신경계에 대한 작용을 밝히기 위한 연구의 일환으로 콜린성 신경에 대한 인삼 dammarane계 glycosides의 작용을 일차배양한 계배의 뇌신경세포를 이용하여 알아보았다.

일차배양한 계배의 뇌신경세포에 atropine을 작용시켜 콜린성 신경의 정상적인 전달을 차단시키면서 콜린성 신경에 미치는 인삼 dammarane계 glycosides의 작용을 알아보았다. 배양 중인 계배의 뇌신경세포에 atropine 10 mM을 작용시키면 신경축색돌기의 굵기가 가늘어지며 결국에는 신경세포가 사멸되

었다. 실험동물에서는 콜린성 신경전달을 차단시킴으로써 어떠한 급격한 변화를 관찰할 수 없으나 일차배양한 뇌신경세포의 경우는 단절된 환경이므로 atropine에 의하여 콜린성 신경전달이 차단되면 그로 인하여 결국은 세포가 사멸됨을 알 수 있었다. 또한, 배양한 세포를 수집하여 세포내의 LDH 값을 측정함으로써 atropine으로 인한 뇌신경세포의 괴사 정도를 알아보았다. LDH는 세포내에 존재하는 효소로서 세포의 막이 파괴되어 사멸될 때 세포 밖으로 유리된다. 과량의 atropine에 의하여 세포내의 LDH 값이 감소되었다는 것은 atropine이 무스카린 수용체에 결합함으로써 콜린성 신경세포의 기능이 차단되어 결국에는 신경세포가 사멸되었음을 의미하는 것이라 하겠다.

일차배양 뇌신경세포에서 콜린성 수용체에 대한 길항제의 작용은 그 수용체가 완전히 발달되어야만 효과가 나타날 것이므로 계배의 뇌신경세포의 배양 기간 및 atropine의 농도를 달리하여 작용시킨 다음 생존해 있는 세포내의 LDH 값을 측정하여 배양 기간과 콜린성 수용체의 발달관계를 알아 보았다(Fig. 1). 계배의 뇌신경세포를 1, 4, 8, 12일 동안 배양한 후 1, 5, 10, 20 mM atropine을 48시간 동안 작용시

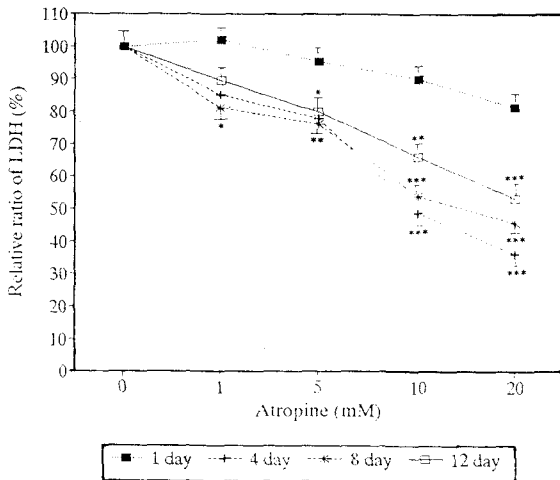


Fig. 1—The toxic effect of atropine expressed in terms of relative ratio of LDH on the chicken embryonic brain cells as a function of culture period.

Control^{a)}: normal chicken embryonic brain cells
Control^{b)}: chicken embryonic brain cells exposed to atropine

켰을 경우 atropine을 작용시키지 않은 정상대조군에 비하여 1일 배양한 뇌신경세포에 작용시킨 경우에는 신경축색돌기의 끊어짐이나 세포의 사멸을 현미경으로 거의 관찰할 수 없었으며 세포내 LDH 값도 거의 정상대조군 수준이었다. 그러나 4일간 배양한 뇌세포에서 atropine 10, 20 mM을 작용시켰을 때는 각각 정상대조군의 LDH 값의 49, 38% 수준밖에 되지 않아 뇌신경세포가 atropine으로 인하여 정상적인 기능을 잃게 되고 결국에는 사멸되어 생존세포의 수가 감소되었음을 알 수 있었다. 8일이나 12일간 배양한 세포에 atropine 10 mM을 작용시킨 경우에도 역시 뇌신경세포가 사멸되었으나 각각 정상대조군의 54%와 66% 수준에 해당하는 LDH 값을 가져 그 정도가 둔화되었음을 알 수 있었다. 이는 신경세포의 배양기간이 길어질수록 신경세포가 발달되어 신경축색돌기가 굵고 길어지며 신경축색돌기 간에 그물망이 형성되면서 무스카린 수용체의 수도 증가하고 콜린성 신경의 신경전달물질인 아세틸콜린을 합성하는 능력도 증가되어 무스카린 수용체의 길항제에 의한 정상적인 신경전달 차단이 상대적으로 둔화되어서 일어나는 결과로 생각된다. 이상의 실험에서 atropine으로 신경세포의 사멸을 유도하기 위한 조건으로는 4일간 배양한 뇌신경세포를 사용하는 것이 적당하다고 생각되어 세포의 배양기간을 4일로 정하였다. Atropine에 노출된 시간 및 농도에 따른 배양세포의 변화를 알아보기 위하여 신경세포를 각각 atropine 1, 5, 10

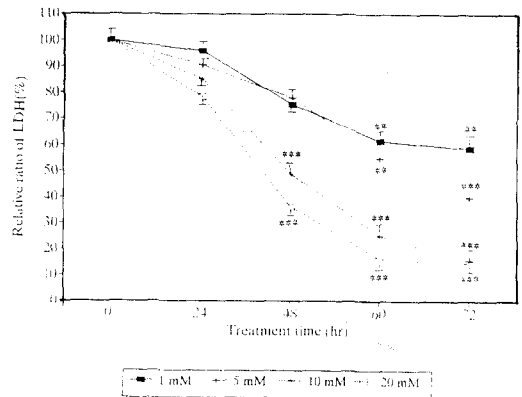


Fig. 2—The toxic effect of atropine expressed in terms of relative ratio of LDH on the chicken embryonic brain cells as functions of concentration and exposure time.

및 20 mM에 24, 48, 60 및 72시간 동안 노출시킨 후에 배양세포내의 LDH 값을 측정하였다(Fig. 2). Atropine으로 인한 신경세포의 사멸은 atropine에 노출시킨 후 24시간이 지나서야 나타나기 시작하였으며 노출 기간이 길어짐에 따라 그 정도도 심화되었다. 즉, atropine 10 mM을 24시간 동안 신경세포에 작용시키면 정상대조군의 78% 수준의 LDH 값을 나타내나 atropine 10 mM을 48시간 동안 작용시키면 정상대조군의 LDH 값의 49%, 60시간 이상 신경세포에 작용시키면 30% 수준밖에 되지않아 세포가 심하게 손상되는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 atropine에 의한 신경세포의 사멸을 LDH 값으로 인지할 수 있기 까지는 어느 정도의 시간이 필요한 것으로 나타났는데 이것이 신경세포에서 atropine이 작용하는데 필요한 기간인지, 아니면 atropine은 즉각적으로 신경세포에 작용하나 대조군과 비교하여 그 차이를 인지할 수 있을 정도가 되기까지 어느 정도의 시간이 필요한 것인지는 분명하지 않다. 이상의 실험에서 atropine을 48시간 이상 뇌신경세포에 작용시키면 너무 심한 손상을 일으켜 신경세포의 회복이 거의 불가능하여지므로 atropine에 의한 콜린성 신경전달 차단을 회복시키는 생리활성물질을 천연물에서부터 검색하기 위한 검색방법으로 이용하기 위한 atropine의 농도는 10 mM, 작용시간은 48시간으로 결정하였다.

따라서 본 연구에서는 4일간 배양한 계배의 뇌신경세포에 atropine 10 mM을 48시간 동안 작용시켜 비정상상태를 유발시키면서 인삼의 콜린성 신경에 대한 작용을 알아보았다.

인삼의 대표적인 성분인 dammarane계 glycosides 분획물 1, 10, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 각각 atropine 10 mM과 동시에 일차배양한 계배의 뇌신경세포에 투여하여 콜린성 신경에 대한 작용을 알아보았다(Fig. 3). 인삼의 총 dammarane계 glycosides 분획물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 투여하였을 경우 atropine의 작용을 유의성 있게 차단시켜 정상대조군의 LDH 값의 36% 수준까지 유지시켰으나 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 오히려 atropine만을 작용시킨 대조군보다 더 심한 세포독성을 나타내었다. 이러한 인삼의 총 dammarane계 glycosides 분획물의 효과를 나타내는 주 성분을 규명하기 위하여 총 dammarane계 glycosides분획물을 panaxadiol계 glycosides 분획물과 panaxatriol계 glycosides 분획물로 다시 크게 분획하여 이들 각

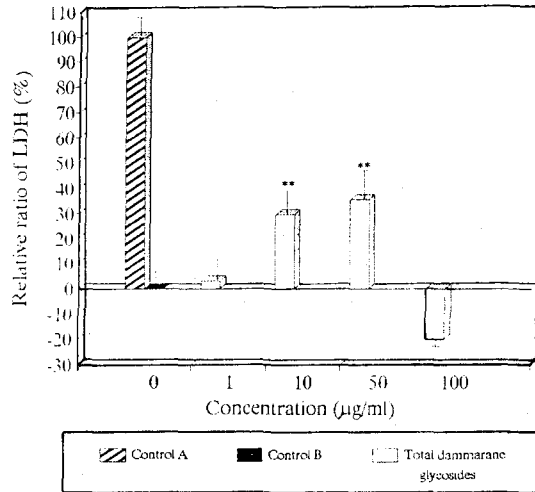


Fig. 3—Effect of total dammarane glycosides expressed in terms of relative ratio of LDH on the atropine-induced abnormality in cultured chicken embryonic brain cells.

Control^{a)}: normal chicken embryonic brain cells
Control^{b)}: chicken embryonic brain cells exposed to atropine

각의 atropine에 의한 신경전달차단에 의하여 유발된 비정상 상태에 어떻게 작용하는지 알아보았다. Panaxadiol계 glycosides 분획물은 0.1, 1, 10, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 각각 atropine을 작용시키기 직전에 투여한 경우에는 atropine에 의한 신경전달차단을 막아주는 효과가 농도의존적으로 증가하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 정상대조군의 60% 수준에 해당하는 LDH 값을 유지시켰음을 알 수 있었다(Fig. 4). 그러나 panaxatriol계 glycosides 분획물은 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 정상대조군의 LDH 값의 31% 수준의 효과를 나타내었으나 농도를 증가시키에 따라 그 효과는 점점 감소되어 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 정상대조군의 LDH 값의 9%에 불과하는 세포를 유지시켰으며 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 총 dammarane계 glycosides 분획물의 경우와 마찬가지로 atropine 대조군보다 더 심하게 신경세포의 사멸을 유발하였다(Fig. 4). 이상의 결과에서 panaxadiol계 glycosides 분획물은 atropine에 의한 콜린성 신경전달의 차단에 기인한 신경세포의 사멸을 효과적으로 차단하는 효과가 있음을 확인하였으며 panaxatriol계 glycosides 분획물은 농도를 증가시키에 따라 콜린성 신경전달의 차단에 기

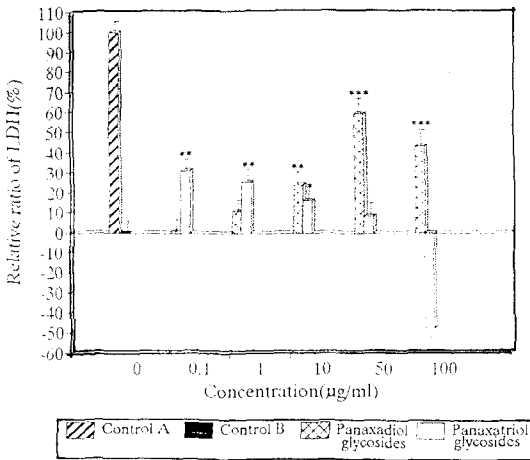


Fig. 4—Effect of panaxadiol or panaxatriol glycosides expressed in terms of relative ratio of LDH on the atropine-induced abnormality in cultured chicken embryonic brain cells.
Control^{a)}: normal chicken embryonic brain cells
Control^{b)}: chicken embryonic brain cells exposed to atropine

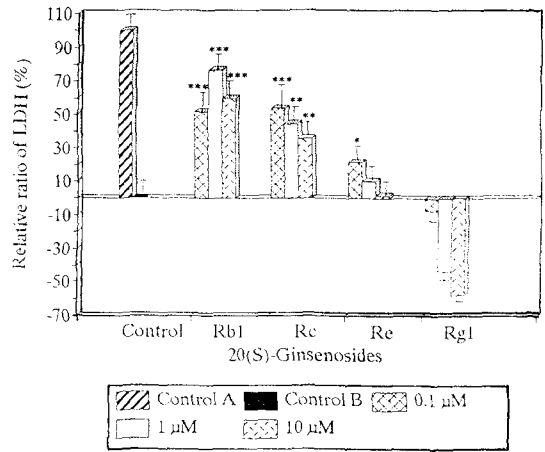


Fig. 5—The effect of 20(S)-ginsenosides expressed in terms of relative ratio of LDH on the atropine-induced abnormality in cultured chicken embryonic brain cells.
Control^{a)}: normal chicken embryonic brain cells
Control^{b)}: chicken embryonic brain cells exposed to atropine

인한 세포사멸을 오히려 증가시키는 것을 알 수 있었으며 이로써 panaxadiol계와 panaxatriol계 glycosides 분획물은 서로 다른 양상으로 신경세포에 작용함을 유추할 수 있었다.

이러한 panaxadiol계 glycosides 분획물과 panaxatriol계 glycosides 분획물의 효과가 어떠한 성분에 의하여 나타나는지를 밝히기 위하여 panaxadiol계 glycosides 분획물의 대표적인 성분인 ginsenoside Rb₁ 및 ginsenoside Rc, panaxatriol계 glycosides 분획물의 대표적인 성분인 ginsenoside Re 및 ginsenoside Rg₁을 각각 0.1, 1, 10 µM 농도로 일차배양한 계배의 뇌신경세포에 투여하여 이들의 atropine의 작용에 기인한 신경세포의 사멸에 대한 작용을 알아보았다. Panaxadiol계 glycosides 분획물의 성분 중 ginsenoside Rb₁ 1 µM은 정상대조군의 LDH 값의 70% 수준까지 회복시켜 총 panaxadiol계 glycosides 분획물을 투여하였을 경우보다 효과가 뛰어났으며 ginsenoside Rc 1 µM은 정상대조군의 LDH 값의 45% 수준에 이르는 효과를 나타내었다(Fig. 5). Panaxatriol계 glycosides 분획물의 성분 중 ginsenoside Re는 panaxatriol계 glycosides 분획물 0.1, 1, 10 및 50 µg/ml을 투여하였을 경우와 마찬가지로 미약하게

atropine의 작용에 기인한 신경세포의 사멸을 차단하는 효과가 있었으나 ginsenoside Rg₁은 atropine만을 작용시킨 경우보다 더 심하게 신경세포의 사멸을 유발하였다(Fig. 5). 이상의 결과에서 ginsenoside Rb₁은 atropine에 의하여 유도된 신경세포의 사멸을 효과적으로 차단시키는 panaxadiol계 glycosides 중 대표적인 유효 성분이라 할 수 있으며 이와는 반대로 ginsenoside Rg₁은 오히려 atropine에 의한 콜린성 신경전달차단을 증진시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

이러한 ginsenoside Rb₁의 과량의 atropine에 의한 신경세포의 사멸을 차단시키는 효과는 ginsenoside Rb₁이 무스카린 수용체에 작용할 가능성이 있음을 시사하는 결과이다. 그러나, ginsenoside Rb₁은 그 분자 구조가 이미 알려진 무스카린 효능제의 구조와 판이하게 다를 뿐만 아니라 분자량도 비교적 커서 직접 무스카린 수용체에 작용하여 이러한 효과를 나타낼 가능성은 적을 것으로 추측된다. 이러한 ginsenoside Rb₁의 효과가 ginsenoside Rb₁이 saponin의 일종이라는 점을 생각할 때 saponin의 일반적인 성질인 계면활성작용에 의한 것일 가능성이 있으므로 계면활성제인 sodium dodecyl sulfate가 atropine으

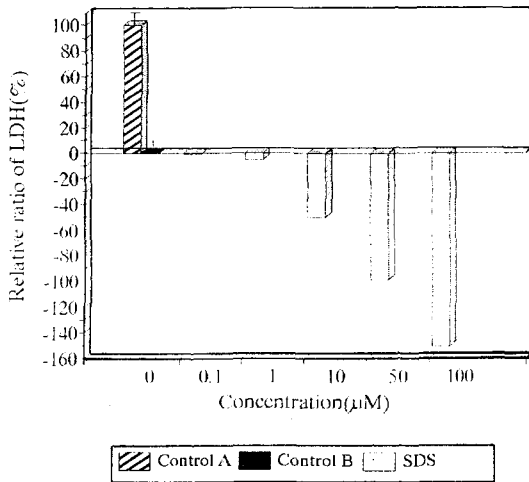


Fig. 6 – The effect of sodium dodecyl sulfate expressed in terms of relative ratio of LDH on the atropine-induced abnormality in cultured chicken embryonic brain cells.

Control^{a)}: normal chicken embryonic brain cells
 Control^{b)}: chicken embryonic brain cells exposed to atropine

로 인한 콜린성 신경전달 차단에 미치는 영향을 알아보았다. Sodium dodecyl sulfate는 1 µM 이하에서는 별다른 영향을 미치지 못하였으나 1 µM 이상의 농도에서는 과량의 atropine으로 인한 신경세포의 사멸을 심화시켰다(Fig. 6). 이상의 결과에서 콜린성 신경전달을 활성화시키는 ginsenoside Rb₁의 효과는 saponin의 계면활성작용과는 아무런 관계가 없는 것으로 생각된다. Ginsenoside Rb₁이 수용체에 직접 작용하지 않고도 atropine에 의한 신경세포의 사멸을 차단시키는 효과를 나타내는 것은 콜린성 신경의 전달물질인 아세틸콜린의 생합성이나 대사에 관여하는 효소에 작용하여 간접적으로 콜린성 신경의 작용을 활성화시켜 줄 가능성이 있을 것으로 생각되어 우선 acetylcholinesterase의 활성화에 미치는 ginsenoside Rb₁ 및 다른 ginsenosides의 작용을 알아 보았다. Acetylcholinesterase는 아세틸콜린을 acetate와 콜린으로 분해시키는 효소로 acetylcholinesterase의 저해제로 작용하는 물질은 신경절에서의 아세틸콜린 양을 증가시킴으로써 atropine의 작용을 간접적으로 억제시키는 효과를 나타낼 수 있다. 그러나 ginsenoside Rb₁은 acetylcholinesterase의 활성화에 아무런 영향도 미치지 않았다(Fig. 7). 또 다른 가능한 작용기

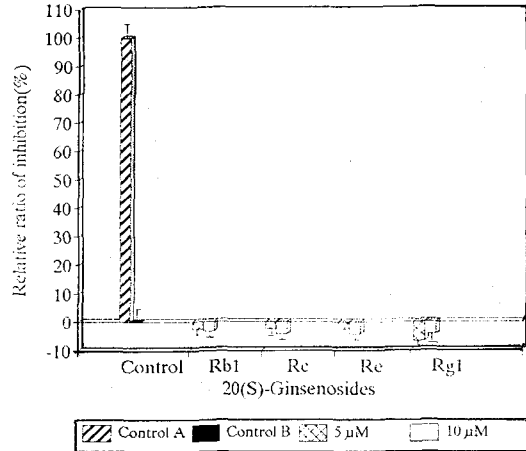


Fig. 7 – The inhibitory effect of 20(S)-ginsenosides expressed in terms of relative ratio on the acetylcholinesterase activity.

전으로 생각할 수 있는 것은 ginsenoside Rb₁이 이온 channel에 작용하여 atropine의 작용을 제어시키는 것으로 생각할 수 있다. 이에 절전 신경세포에서 아세틸콜린이 유리되려면 Ca²⁺이 필수적이므로 Ca²⁺ channel 차단제인 dextromethorphan이 계배의 뇌 신경세포에서 atropine의 작용에 어떻게 영향을 미치는지를 알아보았다. Dextromethorphan은 계배의 뇌신경세포를 atropine으로 작용시켜 콜린성 신경전달을 차단시키므로써 신경세포의 사멸을 유발시켰을 때 이를 더욱 심화시켰다(Fig. 8). 이는 dextromethorphan에 의하여 절전신경세포 내로의 Ca²⁺ 유입이 차단되어 아세틸콜린의 유리가 감소되고 결국에는 atropine의 작용을 강화시켜 주는 역할을 하는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 ginsenoside Rb₁의 Ca²⁺ channel에 대한 작용을 알아보았다. 이를 위하여 ginsenosides가 Ca²⁺ channel에 작용하는지를 알아보기 위하여 우선 channel에 작용하는 물질을 찾는 방법을 확립하였다. 신경축색돌기가 굵고 길게 잘 발달되어 있는 4일간 배양한 계배의 뇌신경세포에 dextromethorphan 0.1, 0.5 및 1 mM을 48시간 동안 작용시킨 경우 각각 정상대조군의 LDH 값의 75, 47, 35% 수준 밖에 되지 않아 과량의 dextromethorphan에 의해 신경세포의 사멸이 유발되는 것을 알 수 있었다(Fig. 9). Ginsenoside Rb₁의 atropine에 의한 신경세포의 사멸을 회복시키는 효과가 Ca²⁺ channel에 작용하여 나타나는 것인지를 밝히기 위하여 dex-

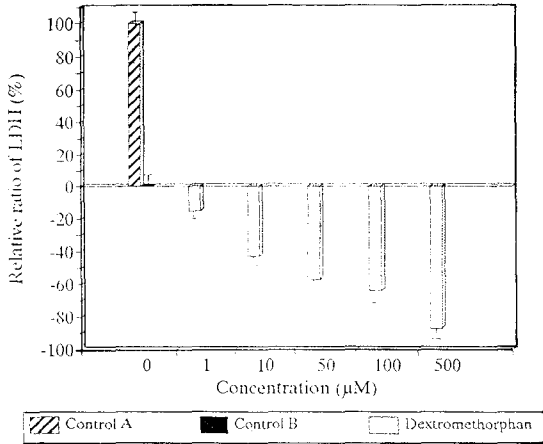


Fig. 8—The effect of dextromethorphan expressed in terms of relative ratio of LDH on the atropine-induced abnormality in cultured chicken embryonic brain cells.
 Control^{a)}: normal chicken embryonic brain cells
 Control^{b)}: chicken embryonic brain cells exposed to atropine

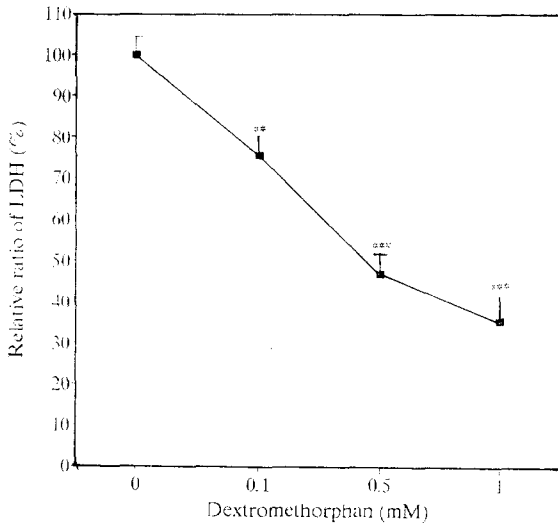


Fig. 9—The toxic effect of dextromethorphan expressed in terms of relative ratio of LDH on the cultured chicken embryonic brain cells as a function of concentration.

tromethorphan 0.5 mM로 48시간 동안 세포독성을 유발하면서 ginsenoside Rb₁을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 및 10 μM을 각각 작용시켜 ginsenoside Rb₁의 효과를 알아보았다(Fig. 10). Ginsenoside Rb₁은 농도

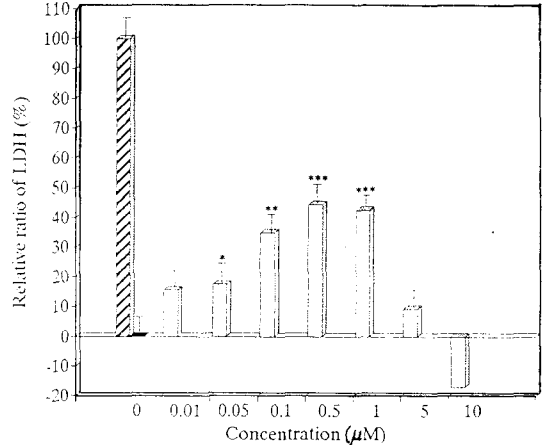


Fig. 10—The effect of 20(S)-ginsenoside-Rb₁ expressed in terms of relative ratio of LDH on the dextromethorphan-induced abnormality in cultured chicken embryonic brain cells
 Control^{a)}: normal chicken embryonic brain cells
 Control^{b)}: chicken embryonic brain cells exposed to dextromethorphan

의존적으로 dextromethorphan으로 인한 신경세포의 사멸을 막아주어 0.5 μM에서는 정상대조군의 LDH 값의 48% 수준까지 회복시켜 신경세포의 사멸을 막아주었다.

이상의 실험으로 ginsenoside Rb₁은 Ca²⁺ channel에 작용하여 세포 외로부터 세포 내로의 Ca²⁺ 유입과 세포 내의 망상소포체(Endoplasmic Reticulum)에 저장되어 있는 Ca²⁺의 유리를 도와 세포 내의 Ca²⁺의 농도를 높여 atropine의 콜린성 신경전달의 차단을 막아줌으로써 배양한 세포에서 atropine에 의한 사멸을 완화시키는 것으로 일차적으로 유추할 수 있다. 그러나 ginsenoside Rb₁의 이러한 작용기전 외에 생각할 수 있는 또 다른 작용기전 규명을 위한 연구는 수행중에 있다.

결론

1. 인삼의 총 dammarane계 glycosides를 일차배양한 뇌신경세포에 atropine 10 mM과 동시에 작용시켰을 경우 atropine으로 인한 신경세포의 사멸을 유의성 있게 감소시켰으며 배양세포 내의 LDH 값도 정상상태의 36% 수준까지 회복시켰다.

2. 이러한 인삼의 총 dammarane계 glycosides의 효과는 panaxadiol계 glycosides에 의한 효과로 panaxadiol계 glycosides중 ginsenoside Rb₁의 효과가 가장 뛰어나 배양세포 내의 LDH 값을 정상상태의 70% 수준까지 회복시켰다.

3. Ginsenoside Rb₁의 atropine에 의한 신경세포의 사멸을 차단하는 효과는 Ca²⁺ channel에 작용하여 나타나는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구에 소요된 경비의 일부는 신의약품 개발 연구센터(한국과학재단 지원)의 연구비로 충당된 것으로 이 연구비 지원에 감사드리며, ginsenosides Rb₁, Rc, Re 및 Rg₁을 제공해 주신 한국인삼연초 연구소에 또한 감사드립니다.

문 헌

- 1) Popov, I. M. and Goldberg, W. J., Korean Ginseng Studies, Ilwha Co., Ltd., Seoul, Korea, **1**: 328 (1977).
- 2) 한병훈: 인삼의 성분 연구, 생화학 뉴스, **4**: 57 (1984).
- 3) 주충노: 생화학적 측면에서 본 인삼의 연구, 생화학 뉴스, **4**: 5 (1984).
- 4) 박찬웅: 약리적인 측면에서 본 인삼의 연구, 생화학 뉴스, **4**: 37 (1984).
- 5) 김낙두, 김충규, 김봉기, 한병훈, 이상섭: 인삼의 강장 효과에 관한 연구, 약학회지, **24**: 15 (1980).
- 6) Lee, K. S.: Effect of Ginseng Saponin in Protein Synthesis, Proc. 2nd. Symp. 93 (1987).
- 7) Yamamoto, M., Kumagai, A. and Yamamura, Y.: Metabolic Actions of Ginseng Principles in Bone Marrow and Testes, Proc. 1st. Symp. 129 (1974).
- 8) 이상복, 이덕희, 이흥범: 인삼이 조혈기능에 미치는 영향, 최신의학, **14**: 83 (1971).
- 9) 한만동, 김진복: 인삼추출물이 N-methyl-N'-nitrosoguanidine에 의한 Wistar 쥐의 위암 발생에 미치는 영향에 관한 연구, 대한의학협회지, **26**: 1126 (1983).
- 10) Yun, T. K., Yun, Y. S. and Han, I. W.: An Experimental Study on Tumor Inhibitory Effect of Red Ginseng in Mice and Rats Exposed to Various Chemical Carcinogens, Proc. of the 3rd. Intern. Ginseng Symp. 87 (1980).
- 11) Kimura, M., Suzuki, J. and Imamura, M.: Mechanisms of Insulin Release Stimulated by the Hypoglycemic Component, Pros. Symp. Wakan-Yaku, **14**: 129 (1981).
- 12) Kimura, M., Waki, I., Ghujo, T., Kikuchi, T., Hiyama, C., Kazuo, Y. and Tanaka, O.: Effects of Hypoglycemic Components in Ginseng Radix on Blood Insulin Level in Alloxan Diabetic Mice and on Insulin Release from Perfused Rat Pancreas, *J. Pharm. Dyn.*, **4**: 410 (1980).
- 13) 허봉열, 이영우, 손의석: 자연발생성 고혈압 쥐의 고혈압 발생과정에 관한 관찰과 이에 미치는 인삼의 영향에 관한 실험적 연구, 순환기학회잡지, **11**: 1 (1981).
- 14) 손의석, 허봉열, 이동후, 송병상, 석성억, 이재익, 박승철, 박찬웅, 김해중: 인삼을 본태성고혈압 환자에 경구투여할 때 혈압에 미치는 영향에 관한 연구, 대한의학협회지, **21**: 227 (1980).
- 15) Avakian, E. V., Enonuk, Jr. E.: Effect of Panax Ginseng Extract on Tissue Glycogen and Adrenal Cholesterol Depletion During Prolonged Exercise, *Planta Medica*, **36**: 43 (1979).
- 16) 김정진: 인삼주정추출액이 스트레스에 폭로된 동물의 생체반응에 미치는 영향, 고려인삼학회지, **3**: 168 (1979).
- 17) 김낙두, 한병훈, 이은방, 공재양, 김명혜, 장배진: 인삼의 항스트레스 작용에 관한 연구, 생약학회지, **10**: 61 (1979).
- 19) 이수월: 인삼의 중추신경에 대한 작용, 대한약리학회지, **10**: 85 (1974).
- 20) 김응찬, 조항영, 김주명: 인삼의 중추신경계에 대한 작용-인삼의 흰쥐의 정서반응에 미치는 영향, 생약학회지, **2**: 45 (1971).
- 21) 홍사악, 박찬웅, 김재훈, 홍순근, 장현갑: 인삼 사포닌의 동물행동에 대한 작용, 대한약리학잡지, **10**: 1 (1974).
- 22) Saito, H., Kouso, T., Tozuka, K. and Takagi, K.: Biological Evaluation of Panax ginseng Callus (I), *Shoyakugaku Z.*, **31**: 177 (1979).
- 23) 민성길: 인삼이 경련역가에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, 연대의대논문집, **8**: 93 (1975).
- 24) 홍사악, 박찬웅, 장현갑: 인삼이 흰쥐의 조건회피반응 습득에 미치는 영향, 대한약리학잡지, **12**: 1 (1976).
- 25) 오진섭, 홍사악, 박찬웅, 노기석: 인삼의 중추신경계에

- 대한 작용-인삼의 항정신작용에 관한 연구, 서울의 대잡지, **14**: 31 (1973).
- 26) 정영경, 박미정, 송진호, 김영중: 인삼의 dammarane계 glycosides 분획물이 일차배양한 계배의 근육세포에 미치는 영향, *Yakhak Hoeji*, **33**: 1 (1989).
- 27) 김영중, 김은경: 인삼이 신경 및 근육세포에 미치는 영향에 대한 연구, *약학회지*, **24**: 143 (1980).
- 28) Shibata, S., Tanaka, O., Soda, M. and Tsushima, S.: Studies on the Constituents of Japanese and Chinese Crude Drugs. XI, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**: 759 (1963).
- 29) Shibata, S., Tanaka, O., Soda, M. and Tsushima, S.: On Genuine Sapogenin of Ginseng, *Tetrahedron Letters*, **12**: 795 (1963).
- 30) Choi, D. W. and Koh, J. Y.: Quantitative Determination of Glutamate Mediated Cortical Neuronal Injury in Cell Culture by Lactate Dehydrogenase, *J. Neurosci. Methods*, **20**: 83 (1987).