

桃仁이 중추신경 재생 촉진에 미치는 영향

이재원* · 신진봉 · 문 구 · 이종덕¹ · 원진희

·원광대학교 한의과대학 내과학교실, 1:원광대학교 의과대학 영상의학과학교실

Effect of the Water Extract of *Persicae Semen* on Promotion of Axon Regeneration

Jae Won Lee*, Jin Bong Shin, Goo Moon, Jong Deuk Lee¹, Jin Hee Won

*Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
1:Department of Diagnostic Radiology, College of Medicine, Wonkwang University*

Following CNS injury, inhibitory influences at the site of axonal damage occur. Glial cells become reactive and form a glial scar, gliosis. Astrocyte-rich gliosis relates with up-regulation of GFAP and CD81, and eventually becomes physical and mechanical barrier to axonal regeneration. It is postulated that the astrocytic reaction is absent, regeneration of axons can occur. And it was reported that treatment with anti CD81 antibodies enhanced functional recovery in the rat with spinal cord injury. So in this current study, the author investigated the effect of the water extract of *Persicae Semen* on the regulation of GFAP and CD81 that increase when gliosis occurs. *Persicae Semen* decreased the expression of GFAP and CD81 in astrocyte cell by ELISA method. *Persicae Semen* decreased the RNA expression of CD81 and GFAP. The proteins that separate in whole cell were analysed by western blot, and the expression of GFAP and CD81 was decreased. In vivo, rats brains were performed cortical stab wound, the water extracts of *Persicae Semen* were injected for 7 days, 30 days. As a result, GFAP and CD81 expression were decreased in immunohistochemistry. These findings demonstrate that *Persicae Semen* decreases GFAP and CD81 expression. Accordingly, *Persicae Semen* could be a candidate for promotion of axon regeneration after CNS injury.

Key words : *Persicae Semen*, GFAP, CD81, CNS injury, Astrocyte

서 론

중추신경계가 손상 후 재생되지 못하는 요인으로서는 손상 후 glial scar 형성과 myelin내의 axon의 성장 억제인자 활동, axon의 재생능력 결핍 등으로 보고되고 있다. Glial scar(gliosis)는 교세포 반흔으로 중추신경계 손상의 마지막 단계에 나타나서 신경 재생의 물리적 분자학적 장벽으로 작용한다. 한편 Myelin내에는 MAG, Nogo, OMgp, NgR 등과 같은 억제인자들이 axon 성장을 방해하여 궁극적으로 신경재생의 장애요인으로 작용 한다¹⁻⁵⁾.

특히 이 중에서 중추신경계 손상의 후에 나타나는 glial scar는 신경교 증식증 반응(gliosis)의 특징이라고 할 수 있고, 성장

세포의 수적 증가(hyperplasia)와 핵의 크기 증가 및 세포체와 돌기들의 증가(hypertrophy)에 의해 야기되는 것으로 알려져 있다. 이러한 glial scar 안에는 tenascin-R, keratin, CSPGs와 같은 중추신경 재생 억제물질들을 포함하고 있어 이는 궁극적으로 신경재생의 방해요소가 된다¹⁻⁵⁾.

GFAP는 평상시에는 거의 나타나지 않다가 중추신경 손상 시 급격히 증가하기 때문에 GFAP의 발현 정도가 중추신경계의 손상 정도를 구별할 수 있는 지표가 된다^{6,7)}. CD81은 tetraspanin 계에 속하는 단백질로 뇌, 척수 및 망막 등의 중추신경계에 존재하는 것으로 밝혀져 있으며, 중추신경계 손상 후 GFAP발현과 같은 양상으로 급격히 발현이 증가한다. 이제까지의 지견을 종합하면, CD81은 중추신경계 손상 후 glial cell의 성장과 gliar scar 형성에 밀접한 관련이 있을 것으로 보고되고 있다⁸⁻¹¹⁾. 桃仁은 薔薇科에 속한 복사나무 (*Prunus persica* Batsch) 및 산복사나무 (*prunus daviana* Fr) 의 성숙한 과실의 核仁이다. 桃仁의 主成分

* 교신저자 : 이재원, 광주시 남구 주월동 543-8 원광대학교 광주한방병원

· E-mail : hani072@hanmail.net, · Tel : 062-670-6417

· 접수 : 2006/12/27 · 수정 : 2007/01/12 · 채택 : 2007/02/08

은 emulsin과 amygdalin, 精油, 脂肪油 등이며, 抗血栓作用, 抗凝血作用, 抗炎症作用, 血管擴張作用, 血流改善作用, 子宮收縮 및 止血作用, 脂肪酸 酸化作用 등의 藥理作用이 있는 것으로 밝혀지고 있다^{18,26)}. 이에 저자는 중추신경계 손상 후 GFAP와 CD81의 발현에 桃仁이 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 신경세포를 배양하여 시험관분석으로 조사한 후, rat를 이용한 동물실험을 수행하여 유의한 관찰을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 圓光大學校 本草學教室에서 桃仁 200g을 구입한 후 精選하여 실험에 사용하였다.

실험에 사용할 桃仁 200g을 증류수 2,000ml에 넣고 3시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출물을 Whitmann 필터로 여과한 후 감압기로 농축하였다. 감압 농축한 추출물은 동결 건조하였으며 동결 건조한 추출물은 0.9% 식염수에 녹여 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 동물

1차 항체인 GFAP(sc-33673)와 β -actin(sc-47778)은 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, CD81항체 (AMP1)는 Dr Geisert(University of Tennessee, TN, USA)로부터 기증받아 실험에 사용하였다. DMEM은 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하여 사용하였고, 기타 시약들은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용한 동물은 180-200g의 7주된 수컷 흰쥐 (Sprague-Dawley)로 다물 사이언스(대전)에서 구입하였으며 1주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) Primary astrocyte preparation and cell culture

(1) Primary astrocyte preparation

생후 8일된 Sprague-Dawley계 흰쥐를 얼음에 넣어서 마취시킨 후에 뇌를 꺼내서 1×HBSS용액에 넣고 수막을 제거하였다. 그리고 잘게 조각 낸 대뇌 피질을 75cm² flask에 총량이 10ml이 되도록 1×HBSS를 넣고 80rpm에서 10분 동안 교반하였다. 여기에 0.1% trypsin이 포함된 20ml 1×HBSS를 첨가하여 잘게 부서진 조직이 점성을 가지고 서로 붙을 때까지 약 10-20분간 교반하였다. 다음 이렇게 점성을 보이는 primary cell을 10ml pipette을 이용하여 분리시킨 후 70 μ m strainer를 이용하여 filtration하였다.

Filter를 통과한 primary cell은 80rpm에서 5분 동안 원심 분리하였고 가라앉은 cell에 30ml astrocyte media (20% FBS, 100U/ml penicillin/streptomycin, 2mM glutamin)를 넣고 75cm² flask에 seeding하였다. cell들은 3-4일에 한번씩 media를 바꾸어 주었으며 flask에 cell이 90~100% 자랐을 경우에 0.25% trypsin/EDTA (Hyclone)으로 계대 배양하여 실험에 이용하였다.

(2) Cell culture

primary astrocyte cell을 $1 \times 10^7 \sim 8$ 씩 100mm cell culture dish

에 seeding하고 3-4일에 한 번씩 cell culture용 media(10% FBS, 100U streptomycin/penicillin, DMEM)로 계대 배양하였으며 5-6 passage 이내의 cell들을 실험에 사용하였다.

2) MTT assay

세포 생존율을 조사하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 즉 桃仁 추출물을 10% FBS의 media에 0.05%, 0.1%, 1%, 5%, 10% 농도별로 녹인 후에 0.45 μ m filter를 이용해서 여과하였다. 다음 96 well plate의 한 well당 1×10^4 개의 astrocyte를 seeding한 후에 준비된 桃仁 용액을 농도별로 처리하고 16시간 배양하였다. 배양 후 桃仁 처리군에서 media를 제거하고, PBS로 한번 씻어준 다음에 5mg/ml 10 × MTT 용액을 한 well 당 100 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C, CO₂ incubator에서 4시간 배양하였다. 4시간 후에 MTT solution을 제거하고, PBS로 한번 씻어준 후에 0.2% acid-isopropanol을 100 μ l 넣고 5분간 흔들여 준 다음에 UVM-340 microplate reader(EASYS, Austria)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) ELISA

桃仁 추출물 처리 후 CD81, GFAP 발현은 cell-based ELISA 방법으로 측정하였다. 즉 96well plate의 한 well 당 1×10^4 astrocyte cell을 seeding 한 뒤에 10% FBS의 media에 녹인 桃仁 추출물을 0.45 μ m filter 을 이용해서 여과한 다음 0.05%, 0.1%, 1%의 농도별로 16시간 처리하였다. 다음 media를 제거하고 PBS로 한번 씻어준 다음에 100ul 3.7% formaldehyde로 상온에서 10분간 cell을 고정하였다. 이후 cell을 PBS+0.1% Triton X-100(PBST)으로 5분씩 3회 씻어준 다음 PBST+1% BSA로 상온에서 1시간 blocking 하였다. 다음에 1차 항체(1:100)를 PBST+1%BSA에 희석하여 상온에서 2시간 처리하였고 다시 PBST로 5분씩 3회 씻어준 후에 2차 항체를(1:1000) 동일하게 PBST-1% BSA 에 희석하여 상온에서 2시간 처리하였다. 다음 PBST로 2번 씻고 PBS로 1번 씻어 준 후 TMB (Sigma-T0440) 용액을 각 well 당 100ul씩 넣고 5분정도 반응을 시킨 후에 TMB stop solution (Sigma-s-5814) 100ul로 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 용액은 UVM-340 microplate reader (EASYS, Austria)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) RT-PCR

(1) RNA preparation

100mm dish에 1×10^4 astrocyte cell 을 seeding 한 뒤에 10% FBS의 media 에 녹인 0.1%의 桃仁 추출물을 0.45 μ m filter을 이용해서 여과하여 16시간 처리하였다. 다음 PBS로 한 번 씻은 후에 1ml PBS를 넣고 cell scraper를 이용하여 cell을 수거하여 1.5ml tube에 옮긴 후에 5000~6000 rpm에서 10초간 원심 분리하여 상층액은 버리고 가라앉은 cell에 Trizol (MRC, USA) 1ml를 넣고 4 $^{\circ}$ C, 13000rpm으로 5분간 원심 분리하였다 그 다음 상층액을 새 튜브에 옮기고 0.2ml의 chloroform을 넣고 15초 정도 잘 섞이게 흔들여준 다음 상온에서 15분 반응 시켰다. 반응 후에 다시 4 $^{\circ}$ C, 13000rpm으로 15분 원심 분리하여 상층액만을 새 튜브에 옮겼다. 그리고 0.5ml의 isopropanol을 넣고 잘 섞이도록 한 후 같은 방법으로 원심 분리한 다음 상층액을 버리고 남은

pellet을 10분간 말린 후 DEPC를 처리한 물을 적당량 넣어 55도에서 15분간 녹여 실험에 사용하였으며, 녹인 RNA는 실험 시까지 -20℃에서 보관하였다.

(2) RT-PCR

위의 방법으로 얻어진 RNA에 ImProm-ITM Reverse Transcription System(Promega, USA)을 이용해서 RT-PCR을 수행 (70℃ 5분, 4℃ 10분, 25℃ 5분, 42℃ 1시간, 70℃ 15분) 하였다. 다음 얻어진 cDNA와 아래와 같은 sequence primer를 사용하여 2X PCR Master mix (Solgent)로 PCR을 수행 (30cycle, 94℃ 15초, 60℃ 1분, 72℃ 1분) 하였다. PCR 수행 시 사용한 gene들의 primer sequence들은 CD81 (5'- CTG TTT GCC TGT GAG GTA GC -3' , 5'- TCA GTG TGG TCA GCG TAT TG -3'), GFAP (5'- AGG GAC AAT CTC ACA CAG GAC -3', 5'-CTC CAG CGA CTC AAC CTT C-3'), GAPDH (5'- ATG GTG AAG GTC GGT GTG AAC G -3' , 5'- GTT GTC ATG GAT GAC CTT GGC C -3') 이었다. 얻어진 PCR product들은 1 x TBE buffer에서 0.1 µg/ml ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에 전기영동 시켰으며 전기영동 후 자외선 발광 장치에서 사진을 찍어 발현 정도를 비교하였다. 발현정도는 다시 ImageJ 1.37v (NIH, USA)를 이용하여 분석한 다음 결과를 그래프로 변환하였다.

5) Western blot

100mm dish에 1x10⁴ astrocyte cell을 seeding 한 뒤에 10% FBS의 media에 녹인 0.1% 桃仁 추출물을 0.45µm filter 을 이용해서 여과한 다음 16시간 처리하였다. 다음 cell을 PBS로 한 번 씻은 후에, 1ml PBS를 넣고, cell scraper를 이용하여 cell을 수거하여 1.5ml tube에 옮긴 후에, 5000~6000rpm에서 10초간 원심분리하여 상층액은 버리고, 가라앉은 cell에 2x protein sample buffer를 넣고, 98℃에서 약 10분간 끓인 다음 5000-6000 rpm에서 10 초간 원심분리 하였다. 상층액은 12%~15% SDS-PAGE gradient gel에 loading하여 분리시킨 다음 nitrocellulose membrane에 transfer system(Bio-Rad, USA)을 이용하여 단백질을 전이시켰다 (100 volts, 0.35A, 1hr). 다음 nitrocellulose membrane에 1차 antibody를 상온에서 2시간 처리한 다음 10분씩 2회 TBS-T로 씻고, HRP가 결합 되어 있는 2차 antibody를 상온에서 1시간 반응 시켰다. 그리고 다시 TBS-T로 10분씩 3회 씻고, HRP와 반응하는 DAB solution(0.6mg/ml, pH 7.6 Tris-Cl, 3 µl/ml H₂O₂)에 nitrocellulose membrane을 반응 시켰다.

6) Surgery and perfusion

180-200g된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 ketamin/rompun으로 복강마취 한 다음 두피를 절개하여 두개골을 노출시키고 대뇌 피질에 3mm 길이의 상처를 낸 후에 두피를 다시 덮고 clip으로 봉합하였다. 수술 후 7days, 30 days동안 桃仁 추출물을 0.5g/kg 용량으로 꼬리에 1cc 주사기를 이용하여 정맥 투여하였다. 수술 후 7days, 30 days가 지난 후에 ketamin/rompun으로 복강마취하고 심장에 PBS를 관류시킨 다음 4% paraformaldehyde를 주입하고 고정하였다. 다음 뇌를 적출하여 4% paraformaldehyde에 넣고 1-2일간 고정시킨 후 30% sucrose에 넣어 4℃ 에서 보관하였다.

7) Immunohistochemistry

적출된 뇌조직은 microtome을 이용하여 30-35µm 두께로 cryostat section 한 뒤에, 24 well plate에서 floating staining 하였다. 즉 조직을 BBS로 두 번 씻고, pre-incubation buffer (2% BSA, 0.05% triton X -100 in BBS)로 30분간 반응시킨 다음 1차 antibody(1:100~200)을 0.4% BSA를 포함한 BBS에 희석하여 상온에서 2시간 교반하면서 반응시켰다. 다시 BBS로 조직을 2번 씻고 HRP가 결합되어 있는 2차 antibody(1:2000)를 0.4% BSA가 포함된 BBS에 희석하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 다음 조직을 DAB solution (1mg/ml, pH7.6 Tris-Cl)에 H₂O₂(3µl/ml)를 첨가하여 반응시키고 PBS로 세척하여 반응을 정지시킨 다음 염색된 조직을 slide에 mounting하고 cover glass로 덮은 다음 현미경(Olympus, Japan)으로 단백질의 발현을 관찰하였다.

8) 통계처리

모든 결과는 평균값±표준오차로 나타냈으며, 그룹간의 평균값 비교를 위해서 Student paired t-test를 실시하였으며 통계적 유의성을 위한 유의수준은 p<0.05로 판정하였다.

결 과

1. 桃仁 추출물이 astrocyte cell의 세포생존율에 미치는 영향

桃仁 추출물이 astrocyte cell의 세포생존율에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위해 먼저 桃仁의 농도를 변화시켜 생존율을 MTT 정량측정분석법으로 측정하였다. Astrocyte cell에 0.05%, 0.1%, 1%, 5%, 10%의 농도에 따라 桃仁 추출물을 16시간 처리 후에 세포생존율을 측정하였다. MTT assay한 결과 桃仁 추출물 0.05%농도에서 91%, 0.1%에서 90%, 1%에서 75%, 5%에서 60%, 10%에서 58%의 세포 생존율을 보였다. 이와 같은 실험 결과를 볼 때, 桃仁 추출물은 1%이하의 농도에서 astrocyte cell의 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않음을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

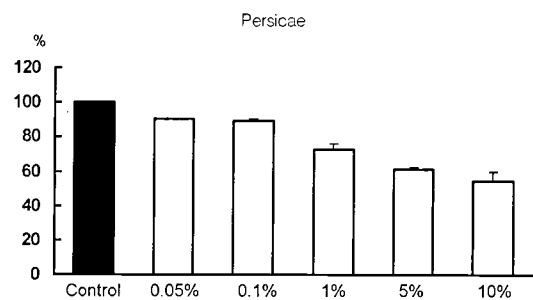


Fig. 1. The effect of the water extract of Persicae Semen on the MTT assay. The administration of the water extract of Persicae Semen showed about 91% of cell viability at 0.05%, 90% at 0.1% and 75% at 1%. Cell viability was decreased to 60% at 5% and 58% at 10% concentration respectively. Results represent the mean ± standard deviation(SD) of two independent experiment.

2. 桃仁 추출물이 astrocyte cell의 GFAP발현에 미치는 영향

Astrocyte cell에 桃仁 추출물을 처리하여 농도에 따라 GFAP발현이 어떻게 변화하는지를 분석하였다. 桃仁 추출물을 0.05%, 0.1%, 1% 농도로 astrocyte cell에 반응시키고 ELISA method를 이용하여 astrocyte cell에서 GFAP발현량을 측정하였

다. 실험결과 桃仁 추출물 0.05%농도에서는 GFAP발현량이 96%였고, 0.1%에서는 88%, 1%에서는 95%임을 보였다. 실험 결과에 의하면 桃仁 추출물은 astrocyte cell에서 GFAP발현을 감소시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

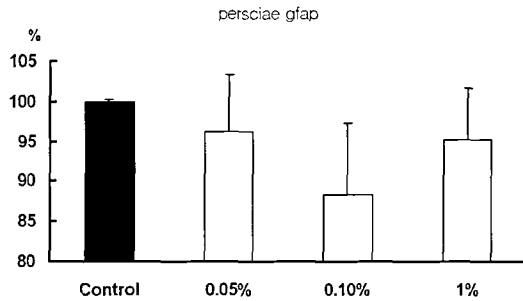


Fig. 2. The effect of the water extract of Persicae Semen on the expression of GFAP. The administration of Persicae Semen decreased the expression of GFAP. The data shown are the mean \pm SD of two independent experiments.

3. 桃仁 추출물이 astrocyte cell의 CD81발현에 미치는 영향

Astrocyte cell에 桃仁 추출물을 처리하여 농도별에 따라 CD81발현이 어떻게 변화하는지를 분석하였다. 桃仁을 0.05%, 0.1%, 1%농도로 astrocyte cell에 반응 시키고 ELISA method를 이용하여 astrocyte cell에서 CD81발현량을 측정하였다. 실험결과 桃仁 추출물 0.05%농도에서 CD81발현량이 66%였고, 0.1%에서는 67%, 1%에서는 78%임을 보였다. 실험 결과에 의하면 桃仁 추출물은 astrocyte cell에서 CD81발현을 유의하게 감소시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

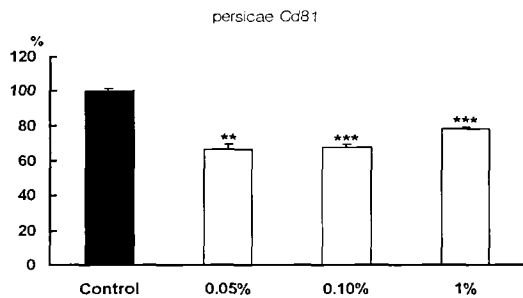


Fig. 3. The effect of the water extract of Persicae Semen on the expression of CD81. The administration of Persicae Semen significantly decrease the CD81 expression. The data shown are the mean \pm SD of two independent experiments. Asterisks denote significant differences from the control. : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4. 桃仁 추출물이 GFAP와 CD81의 RNA 발현에 미치는 영향

桃仁 추출물이 GFAP와 CD81의 발현에 미치는 영향을 RNA 수준에서 살펴보고자 RT-PCR을 실시하였다. 실험 결과 GFAP와 CD81의 RNA 발현이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

5. 桃仁 추출물이 GFAP와 CD81단백질 발현에 미치는 영향

桃仁 추출물이 GFAP와 CD81의 발현에 미치는 영향을 단백질 분자수준에서 살펴보고자 western blotting을 실시하였다. 비교적 세포독성이 적고, ELISA에서 효과가 있다고 판단되는 0.1%농도 桃仁 추출물을 astrocyte cell에 처리하였다. 실험 결과 단백질 수준에서 GFAP와 CD81 발현이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

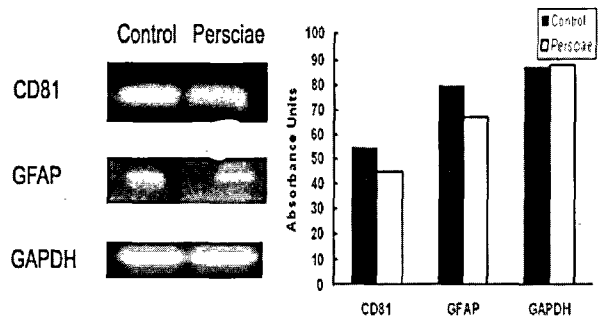


Fig. 4. The effect of the water extract of Persicae Semen on the RNA expression of CD81 and GFAP. The effect of the water extract of Persicae Semen on the RNA expression of CD81 and GFAP. The expression of CD81 and GFAP was down regulated. The level of each RNA expression compared using Image J and documented into graph.

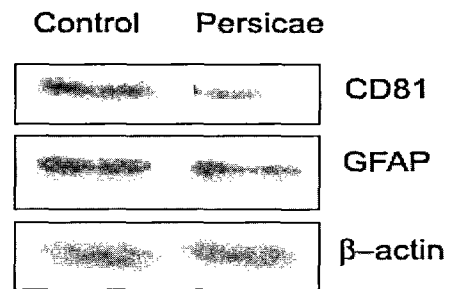


Fig. 5. The expression of CD81 and GFAP after administration of the water extract of Persicae Semen. The protein level was quantified with immunoblot method. The expression level of CD81 and GFAP was shown to be down regulated.

6. 손상된 rat 뇌신경세포에 대한 桃仁 추출물의 CD81, GFAP의 발현에 대한 효과

다음은 동물 실험에서 桃仁 추출물의 효과를 알아보고자 CD81, GFAP를 immunohistochemistry하였다. Rat의 뇌에 인위적 손상을 가한 후 桃仁 추출물을 각각 7일, 30일 동안 정맥주사한 후 뇌조직에서 현미경으로 CD81, GFAP의 변화를 관찰하였다(Fig. 6).

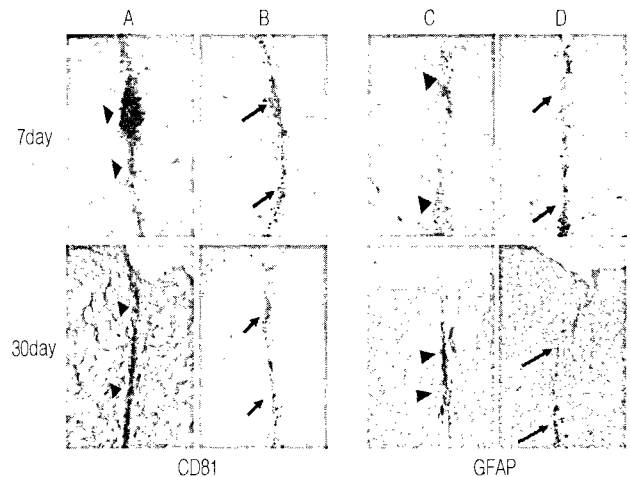


Fig. 6. The effect of the water extract of Persicae Semen on the expression of CD81, GFAP at the 7th and 30th day. All the protein immunoreactivity (B,D) at the site of stab wound shows the down regulation compared with the control (A,C). The wound lesions are seen at the control (arrowhead) and the experiment (arrow) group.

고찰

최근 현대사회가 평균수명의 연장으로 고령화 사회를 맞고 있으며, 생명연장과 함께 노령인구에서 나타나는 질환들이 사회적 문제가 되고 있다. 중풍이나 척수 마비 등을 포함한 중추신경계의 손상은 회복이 비가역적으로 진행되므로 환자 자신이나 사회적으로 매우 불행한 일이며, 이에 대한 경제적, 사회적 손실비용은 매우 크다. 특히 우리나라에 있어서 가장 큰 사망률에 뇌혈관 질환이 거론될 정도로 중추신경계의 손상은 국민 보건 상 매우 중요한 문제이다. 그러나 현재까지 중추신경계의 손상을 회복하기 위한 여러 가지 노력과 투자에도 불구하고 그 결과는 미흡한 실정이다. 따라서 중추신경 손상으로 인한 후유증을 최소화하고 이를 조절하는 인자를 발견하여 중추신경계 손상 후 이를 가역적으로 회복을 촉진하는 약물 개발이 필요하다 하겠다.

桃仁은 薔薇科에 속한 落葉小喬木인 복숭아나무 및 산복사나무의 성숙한 과실의 核仁으로, 7~8월 과실 성숙기에 채취하여 果肉과 核殼을 제거하고 햇볕에 말려 건조한 것이다. 주로 活血祛瘀藥으로 응용되어지고 있으며 한약처방 및 민간 처방에서 다양하게 응용되어지고 있는 한약재 중 하나로서 우리나라 각지에서 재배되고 있다.

桃仁은 《神農本草經》²¹⁾ 下品에 桃核仁의 이름으로 “性味苦平 主瘀血,血閉,瘕痞,殺小蟲”이라 기록된 이래, 《傷寒論》²⁵⁾. 《金匱要略》²⁶⁾에서는 桃核承氣湯, 桂枝茯苓丸, 大黃牡丹皮湯, 抵當湯, 抵當丸, 下瘀血湯의 처방에서 주로 大黃, 芒硝, 桂枝, 茯苓, 白芍藥, 牡丹皮, 冬瓜子, 水蛭, 虵蟲 등과 같이 배합되어 瘀血과 少腹滿痛, 腸癰, 婦人經水不利를 치료하는데 사용되었다. 《東醫寶鑑》²²⁾에서도 “主瘀血,血閉,破癥瘕,通月水, 止心痛,殺三蟲”이라 수록되어 동일한 효능으로 현재까지 응용되어지고 있다. 임상에서는 活血祛瘀, 潤腸通便의 要藥으로서 經閉, 痛經, 癥瘕痞塊, 跌撲損傷, 腸燥便秘 등에 응용되고 있다. 또한 孟詵은 殺三蟲한다 하였고, 張元素는 治血結,血秘,血燥,通潤大腸,破蓄血한다 하였으며, 李時珍은 主血滯風痺,骨蒸,肝癰,寒熱,產後血病한다 하였다²³⁾. 아울러 《本草綱目》²⁴⁾에서는 桃實,桃毛,桃花,桃葉,莖 및 白皮桃膠 등으로 나누어 入藥하였다. 이를 근거로 후대의 여러 본초서에서 이러한 내용이 부분적으로 등장하고 있음을 볼 수 있다¹⁹⁾. 桃仁은 Emulsin 3%와 Amygdalin, 精油, 脂肪油를 주 성분으로 함유하고 있고, 藥理作用에 대해서 항혈전작용, 항응혈작용, 혈류개선작용과 혈관확장작용, 자궁수축 및 지혈작용, 항염증작용, 지방산 산화작용 등이 있으며, 家兔의 죽상동맥경화와 고지혈증에 대해서 유효한 치료효과가 있다고 보고되고 있다³²⁻³⁵⁾. 또 孔³¹⁾에 의하면 桃仁 추출액은 알츠하이머병의 치료에 효과를 보이는 강력한 아세틸콜린분해효소 억제물질로 보고되었는데, 콜린분해효소 억제제로서 알츠하이머병 치료제인 tacrine과 비교실험을 통하여 약리작용을 규명한 결과 桃仁의 약리작용은 중추콜린시스템에 대해서 유용하고 지속적인 효능을 가지고 있다는 것을 보고하였다.

중추신경계의 신경조직은 자극을 받아 흥분을 전도시키는 능력을 가진 신경세포와 신경세포를 지지해주는 신경교로 구성

된다. 신경교는 말초신경에서 Schwann세포에 해당하는 중추신경계의 지주조직으로서 신경교세포와 신경교섬유로 이루어지고, 신경교세포는 성상세포와 미교세포, 희돌기교세포의 3종류로서 1913년에 Cajal이 gold chloride sublimate technique로 성상세포를 동정하였고, 1919년에 del Rio-Hortega가 weak silver carbonate technique으로 미교세포를, 1950년에 Penfield와 Cone이 silver method에 의해 희돌기교세포를 분류 동정하였다. 또한 Penfield는 성상세포를 뇌의 희백질에 많이 분포하며 filament가 적은 원형질성 성상세포와 백질에 주로 분포하며 intermediate filament가 많은 섬유성 성상세포로 분류하였다³⁷⁾. 이러한 신경교세포는 신경세포보다 수적으로 10배 이상 많으며 뇌 전체에 골고루 분포되어 있다. 거대 신경교세포에서 가장 주된 세포인 성상교세포는 중추신경계의 발생과정에서 신경세포의 이동경로 제공과 중추신경계통의 물리적 지지, 전해질 평형, 신경전달물질의 흡수, 중추신경 내 면역학적 기능 및 신경전달의 조절과 같은 기능을 지닌 것으로 알려져 있다³⁷⁾. 중추신경계가 손상 후 재생되지 못하는 요인으로는 손상 후 glial scar 형성과 myelin내의 axon의 성장 억제인자 활동, axon의 재생능력 결핍 등으로 보고되고 있다. Glial scar(gliosis)는 교세포 반흔으로 중추신경계 손상의 마지막 단계에 나타나서 신경재생의 물리적 분자학적 장벽으로 작용한다. 한편 Myelin^{38,39)}내에서는 MAG, Nogo, OMgp, NgR 등과 같은 억제인자들이 axon 성장을 방해하여 궁극적으로 신경재생의 장애요소로 작용한다¹⁻⁵⁾. 특히 이 중에서 중추신경계 손상의 마지막에 나타나는 glial scar는 신경교 증식증 반응(gliosis)의 특징이라고 할 수 있고, 성상세포의 수적 증가(hyperplasia)와 핵의 크기 증가 및 세포체와 돌기들의 증가(hypertrophy)에 의해 야기되는 것으로 알려져 있다. 이러한 glial scar 안에는 tenascin-R, keratin, CSPGs와 같은 중추신경 재생 억제물질들을 포함하고 있어 이는 궁극적으로 신경재생의 방해요소가 된다¹⁻⁵⁾.

중추신경계에서의 손상 후 이러한 교세포의 증식은 손상 받지 않은 조직을 격리시켜 더 이상 손상을 막아주고 정상적인 세포의 환경을 유지시키는 역할을 하지만, 한편으로는 물리적 장벽을 형성하여 신경회로의 재구성을 방해하는 좋지 못한 효과가 있다. Norenberg⁴⁰⁾에 의하면 과거에 반응성 성상세포(reactive astrocyte)들은 손상 받은 중추신경계의 재생에 관여한다고 생각되었지만, 대부분의 신경계 질환에서 성상세포의 증식은 오히려 신경재생과정을 억제하고 신경원세포나 성상세포의 죽음을 유발한다고 보고하였다. 金 등⁴¹⁾의 성상세포에 대한 최근의 보고는 병리적 관점을 중요시 하였다. 즉 뇌에 injury가 일어났을 때 성상세포는 hypertrophy, hyperplasia와 같은 reactive astrocyte로 변화되는데, 초기에는 신경세포에 대한 유익한 작용을 하지만 지속적인 reactive astrocyte는 세포내 칼슘의 변화를 일으키고 NF-κB의 활성화 유도과 Mitochondrial dysfunction을 일으켜서 이윽한 성상세포나 신경세포의 사멸을 동시에 유도한다고 보고하였다. 따라서 이러한 보고들을 종합하여 볼 때 중추신경 손상 후 급격히 증가하는 반응성 성상세포와 이의 결과로 나타나는 glial scarring을 조절한다면 axon regeneration을 촉진하는 데 결정적

인 역할을 할 것으로 생각된다¹⁴⁵⁾.

정상적인 신경조직에서 성상교세포를 표지할 수 있는 물질로는 성상교세포 돌기에 존재하는 중간섭유의 구성성분인 GFAP와 GABA 및 glutamine synthetase 등이 대표적이며 반응성 성상교세포에서는 이외에도 다양한 성장인자, cytokinin, 세포접착분자와 기타 신경세포의 표지인자들도 발현된다고 알려져있다^{6,7,42-45)}.

이 중 성상세포의 표지단백질인 GFAP는 세포 골격단백질로서, 태아기 때의 성상세포는 GFAP의 발현율이 높으며 성인에서는 발현율이 낮아지는 함량의 변화를 가지고 있어 성상세포의 성숙 지표로 이용된다. 또 GFAP는 성상세포의 변형이라고 추측되는 망막 신경교세포, 뇌하수체세포, 송과샘 지지세포에 함유되어 있고, 말초신경계통의 슈만세포에서도 이 단백질이 함유되어 있다고 보고되어 있다⁴⁶⁾. Dahl 등⁴⁷⁾이 GFAP가 성상세포에 특이하게 반응한다고 밝혔으므로 그 이후에도 많은 연구 보고들과 함께 현재 GFAP는 성상세포의 표지단백질로서 진단적인 가치를 갖고 널리 사용되고 있다. 또 Aquino 등⁴⁸⁾에 의하면 GFAP는 다발성 경화증이나 반흔 부분에 성상세포가 집중되어 증식할 때 높은 농도로 존재한다고 보고하였고, 특히 성상세포에만 특이적으로 염색되기 때문에 성상세포의 특이적 표지물질로 사용된다고 하였다. 宋 등⁴⁹⁾이 뇌의 교세포종양에서 GFAP를 통해 신경교종양의 진단과 분화과정을 설명하는데 있어서 GFAP가 성상세포에 특징적으로 염색되므로 신경교종의 진단과 분화과정을 이해하는데 도움을 준다고 보고한 것은 앞서와 같은 맥락으로 볼 수 있다.

일반적으로 astrocyte와 oligodendrocyte를 포함하는 glial cell들은 대부분 설치류에서의 경우 출생 후 완성되며 출생 10일 정도에서 최고에 이른다고 한다. 하지만 출생 2주가 지나면 glial cell은 성숙하고 유사분열은 감소하여 비교적 안정한 세포상태에 이르게 된다. 이 시기에 이르면 중추신경계는 배아기에 보여준 중추신경계의 재생능력을 상실하고 손상을 받게 되면 reactive gliosis 반응을 보이게 된다. CD81은 바로 이러한 시기인 출생 2주 정도에서 현저히 발현이 증가하여, reactive gliosis시 앞서 언급된 GFAP와 더불어 급격히 증가한다⁵⁰⁻⁵²⁾.

CD81은 tetraspanin계에 속하는 표면단백질로 뇌⁵³⁾, 척수⁵⁴⁾, 망막⁵⁵⁾ 등의 중추신경계에 존재하는 것으로 밝혀져 있으며, 중추신경계 손상 후 급격히 발현이 증가한다. 이 CD81은 세포간 접촉에 관여하여 세포의 신호전달경로를 자극하는 세포부착단백질과 관련되어 있으며 궁극적으로는 세포의 증식과 이동과 재생에 관여하는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹¹⁾. 성인 생쥐의 뇌에서 CD81은 astrocyte와 oligodendrocyte를 포함하는 glial cell에서 잘 발현된다. 중추신경계와 망막색소상피 손상 후 CD81은 발현이 증가되며, 시험관내 실험에서 이 단백질에 대한 항체처리는 세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. CD81이 세포증식의 조절에 관여하는 증거로 CD81 knock out 생쥐가 control군에 비해 뇌를 구성하는 glial cell이 현저히 증가되었고, 망막에서도 RPE세포가 증가한다는 것이 실험적으로 밝혀졌다^{8-11,50-55)}. 또 Dijkstra.S 등⁸⁾은 CD81항체 처리는 실험적으로 유도한 spinal cord injury rat의 기능적 회복을 촉진한다고 보고하였고, 이러한 결과는 손상 후 최종적으로 발생하는 glial scar의 감소에 의한다고 보고하였

다. 이러한 실험적 결과와 보고들을 종합하여 볼 때 CD81은 중추신경 손상 후 glial scar형성에 결정적인 역할을 할 것으로 생각된다. 따라서 중추신경 손상 후 CD81의 발현을 조절할 수 있다면 비가역적인 회복을 보이는 중추신경에 대해서 가역적 회복을 촉진할 것으로 생각된다^{8-11,50-55)}.

결국 중추신경 손상 후 반응성 성상세포의 증가는 glial scar를 형성하여 중추신경 재생의 방해인자가 되기 때문에 이러한 반응성 성상세포의 발현을 조절하고, glial scar 형성에 결정적 역할을 하는 CD81 발현을 조절할 수 있는 약물을 찾는 것은 상당히 의미 있는 일이라고 할 수 있다.

따라서 본 연구는 중추신경계에 손상 후 재생 촉진에 桃仁이 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 뇌신경세포를 배양하여 시험관 분석으로 조사한 후 rat을 이용한 동물 실험을 수행 하였다.

桃仁 추출물을 astrocyte cell에 반응시키고 MTT assay한 결과 세포생존율이 감소함을 알 수 있었다(Fig. 1). 하지만 0.05%와 0.1%, 1% 농도에서는 실험에 타당한 세포생존율을 보여 실험 결과를 도출해 내는데 큰 지장이 없음을 확인할 수 있었다. 그리고 桃仁 추출물이 astrocyte cell에서 GFAP와 CD81 발현에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위해 ELISA method 방법으로 분석하였다. 그 결과 桃仁 추출물은 GFAP발현을 감소시키는 것으로 나타났으나 이 결과는 유의성이 떨어지는 것으로 나타났다(Fig. 2). 하지만 RT-PCR과 Western blot 분석을 통한 결과에서도 그 발현 양상이 감소하므로, 桃仁은 astrocyte cell에서 GFAP 발현을 감소시킨다고 할 수 있다 (Fig. 4,5). 그리고 桃仁을 astrocyte cell에 반응시킨 결과 CD81 발현은 농도에 관계없이 모두 유의한 수준으로 발현이 감소하였다. RT-PCR과 Western blot 분석의 결과는 이를 뒷받침 한다(Fig. 4, 5). 이 두 가지의 ELISA 결과를 비교해 볼 때, 桃仁이 중추신경 손상 후 재생 촉진에 미치는 영향은 GFAP 발현보다는 주로 CD81 발현 조절을 통해서 나타날 것으로 판단된다. 하지만 향후 이에 대한 보다 심도 있는 논의가 필요할 것으로 사료된다.

Astrocyte cell과 단백질 및 RNA 수준의 유의한 결과를 바탕으로 rat의 뇌에 인위적으로 손상을 일으키고 桃仁 추출물을 일정기간 동안 지속적으로 rat의 꼬리정맥을 통해 주입하였다. 그리고 나서 최종적으로 immunohistochemistry한 결과 GFAP와 CD81 발현이 모두 감소되는 것을 사진을 통해서 확인할 수 있었다(Fig. 6). 동물실험에서의 이러한 결과는 시험관 분석에 의한 조사에서 桃仁추출물이 GFAP와 CD81 발현을 감소시킨다는 것을 다시 한번 증명해준 것이다.

하지만 桃仁이 중추신경 손상 후 어떠한 기전으로 GFAP 발현 및 CD81 발현을 조절하는지에 대해서는 아직 알려지지 않고 있다. 따라서 추후 이러한 기전을 밝히는 것은 중추신경계 손상 후 재생에 대한 이해를 높여 향후 이를 가역적으로 치료하는데 중요한 정보를 제공해 줄 것으로 사료된다.

이제까지의 연구 결과를 종합하면, 桃仁은 중추신경계 손상 후 신경 재생을 촉진하는 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험은 임상적으로 중추신경계 손상으로 야기되는 반응을 가역

적으로 회복시킴으로써 뇌출혈, 뇌경색 등의 뇌혈관장애와 치매, 파킨슨병과 같은 퇴행성 질환으로 인한 신경장애를 예방하고 치료할 수 있는 가능성을 제시하였다고 할 수 있다.

결 론

중추신경계 손상 후杏仁이 GFAP와 CD81의 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 신경세포를 배양하여 시험관분석으로 조사한 후 rat를 이용한 동물실험을 통해 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

杏仁추출물을 astrocyte cell에 반응시킨 결과, 1% 농도 이하에서는 세포 생존율에 큰 영향을 미치지 않았다.杏仁추출물을 astrocyte cell에 반응시킨 결과, GFAP의 발현이 감소하였다.杏仁추출물을 astrocyte cell에 반응시킨 결과, CD81의 발현이 유의하게 감소하였다. Rat의 뇌에 손상을 가하고 7일, 30일 동안杏仁추출물을 주사하고 Immunohistochemistry한 결과, GFAP의 발현이 감소하였다. Rat의 뇌에 손상을 가하고 7일, 30일 동안杏仁추출물을 주사하고 Immunohistochemistry한 결과, CD81의 발현이 감소하였다.

이상의 결과로 보아杏仁은 중추신경계 손상 후 신경 재생 촉진에 영향을 주어 신경기능의 회복에 관여하는 약물로 일정한 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2006년 원광대학교 교비 지원에 의해 연구되었습니다.

참고문헌

1. Miros Pekny, Michael Nilsson. Astrocyte activation and reactive gliosis. *GLIA*. 50:427-434, 2005.
2. Samuel David. Axon growth promoting and inhibitory molecules involved in regeneration in the adult mammalian central nervous system. *Mental retardation and developmental disabilities research review*. 4:171-178, 1998.
3. Ferraro, G.B., Alabed, Y.Z., Fournier, A.E. Molecular targets to promote central nervous system regeneration. *Curr Neurovasc Res*. 1:61-75, 2004.
4. Fawcett, J.W., Asher, R.A. The glial scar and CNS repair. *Brain Res Bull*. 49(6):377-391, 1999.
5. Schwab, M.E., Bartholdi, D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev*. 76(2):319-370, 1996.
6. 이지윤. 손상된 흰쥐 척수에 이식한 태아 척수조직이 미치는 영향. 가톨릭대학교 대학원, 석사학위 논문, 2002.
7. 권오규. 척수 손상 후 운동기능의 회복 및 아교섬유성 산 단백질의 변화. 건국대학교 대학원, 석사학위 논문, 2003.

8. Dijkstra, S., Duis, S., Pans, I.M., Lankhorst, A.J., Hamers, F.P., Bar, P.R. et al. Intraspinal administration of an antibody CD81 enhances functional recovery and tissue sparing after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*. 202(1):57-66, 2006.
9. Peduzzi, J.D., Grayson, T.B., Fischer, F.R., Geisert, E.E. Jr. The expression of TAPA Correlates with the reactive response of Astrocytes in the Developing Rat CNS. *Exp Neurol*. 160(2):460-468, 1999.
10. Song, B.K., Levy, S., Geisert, E.E. Jr. Increased density of retinal pigment epithelium in CD81 -/- mice. *J Cell Biochem*, 92(6):1160-1170, 2004.
11. Song, B.K., Geisert, G.R., Vazquez-Chona, F., Geisert, E.E. Jr. Temporal regulation of CD81 following retinal injury in the rat. *Neurosci Lett*, 338(1):29-32, 2003.
12. Bethea, J.R., Nagashima, H., Acosta, M.C., Briceno, C., Gomez, F., Marcillo, A.E., Loo, K., Green, J., Dietrich, W.D. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 16(10):851-863, 1999.
13. Guth, L., Albuquerque, E.X., Deshpande, S.S., Barrett, C.P., Donati, E.J., Warnick, J.E. Ineffectiveness of enzyme therapy on regeneration in the transected spinal cord of the rat. *J Neurosurg*. 52(1):73-86, 1980.
14. Puchala, E., Windle, W.F. The possibility of structural and functional restitution after spinal cord injury. A review *Exp Neurol*. 55(1):1-42, 1977.
15. Gimenez y Ribotta, M., Rajaofetra, N., Morin-Richaud, C., et al. Oxysterol (7beta-hydroxycholesteryl-3-oleate) promotes serotonergic reinnervation in the lesioned rat spinal cord by reducing glial reaction. *J Neurosci Res*. 41(1):79-95, 1995.
16. Zhang, S.X., Geddes, J.W., Owens, J.L., Holmberg, E.G. X-irradiation reduces lesion scarring at the contusion site of adult rat spinal cord. *Histol Histopathol*. 20(2):519-530, 2005.
17. Menet, V., Gimenez, Y., Ribotta, M., Sandillon, F., Privat, A. GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia*. 31(3):267-272, 2000.
18. 신민교. 임상본초학. 서울, 영림사, pp 464-465, 1997.
19. 송경송. 도인과 도인기원식물의 외부 및 내부형태. 우석대학교 대학원, 석사학위 논문, 2001.
20. 안덕균. 원색 한국 본초도감. 서울, 교학사, p 568, 2003.
21. 吳普. 神農本草經. 醫道韓國, p 下品 32, 1976.
22. 元素藥 譯. 정교주역 동의보감. 제 5권, 서울, 신우문화사, p 259, 2005.
23. 戴新民. 中國藥材學. 啓業書局, pp 987-988, 1974.
24. 李時珍. 本草綱目. 宏業書局, 제 29권, pp 46-47, 1975.
25. 박병희 譯. 임상응용 상한론해설. 의방출판사, pp 117-238, 2004.

26. 焉哉乎也 譯. 금케요락강화. 의방출판사, pp 382-398, 2003.
27. Kim, M.S., So, H.S., Park, J.S. et al. Hwansodan protects PC12 cells against serum-deprivation-induced apoptosis via a mechanism involving Ras and mitogen-activated protein (MAP)kinase pathway, *Gen Pharmacol.* 34(4):227-235, 2000.
28. Kim, M.S., Lee, J., Lee, K.M. et al. sunghyangjungisan protects PC12 cells against neurotoxicity elicited by withdrawal of tropic support via CRE activation. *Immunoopharmacol Immunotoxicol.* 24(1):97-117, 2000.
29. 류지용. 십전대보탕이 신경교세포의 산화적 손상에 미치는 영향. 원광대학교 대학원, 박사학위논문, 2002.
30. 조현경. 자하거 및 수종 한약재가 척수 신경세포의 축삭돌기 재생에 미치는 효과. 대전대학교 대학원, 박사학위 논문, 2004.
31. 공대중. 도인추출액의 아세틸콜린 분해요소 억제작용에 대한 연구. 동국대학교 대학원, 박사학위 논문, 2002.
32. 윤인한. 도인이 고콜레스테롤 식이에 의한 가토의 죽상동맥 경화에 미치는 영향. 대구한의대 대학원, 박사학위논문, 1996.
33. 신경민, 박영미, 김인태, 홍선표, 홍정표, 이경태. Amygdalin of Murine Macrophage Raw 264.7세포에서 in vitro 항염효과. *생약학회지* 34(3):223-227.
34. 최문범, 김선희. 도인이 가토의 고지혈증에 미치는 영향. *대한본초학회지* 10(1):1-11, 1995.
35. 김상우. 도인, 홍화가 임신에 미치는 영향. 경희대학교대학원, 석사학위논문, 1992.
36. 황문제. 도인 추출액의 콜린분해효소 억제작용에 대한 연구. 동국대학교 대학원, 박사학위논문, 2001.
37. 문연자. 백서배양 Type-1 및 Type-2 별아교세포의 탐식 능력에 관한 연구. 전남대학교 대학원, 박사학위 논문.
38. Alka A. Vyas, Ola Blixt, James C. Paulson. Potent glycan inhibitors of MAG enhance axon outgrowth in vitro. *J Biol Chem.* 280(16):16305-16310, 2005.
39. Gao, Y. et al. Neurotrophins elevate camp to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase. *J Neurosci.* 23(37):11770-11777, 2003.
40. Norenberg, M.D. Astrocytes response to CNS injury. *J Neuropathol, Exp Neurol.* 53(3):213-220. 1994.
41. 김규원, 박정애, 전형오. 성장세포의 새로운 역할. *서울대학교 약학대학, BRIC BioWave.* 6(12), 2004.
42. Norenberg, M.D., Martinez-Hernandez, D. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.* 161(2):303-310, 1979.
43. O'Callaghan, J.P. Use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomed Environ Sci.* 4(1-2):197-206, 1991.
44. Eddelstone, M., Mucke, L. Molecular profiles of reactive astrocytes-implication for their role neurologic disease. *Neurosci.* 54(3):15-36, 1993.
45. 황세진, 조원길, 권기환, 정호삼. 흰쥐 선조체의 일시적 국소 뇌허혈 손상에서 GFAP 및 Vimentin의 면역반응변화에 관한 연구. *한양의대학술지* 19(1):93-102, 1999.
46. Dahl, A., Bignami, A. Immunocytochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.* 61:279-293, 1973.
47. Dahl, D., Bignami, A. Immunogenic properties of glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.* 116:150, 1976.
48. Aquino, D.A., Hozumi, I., Chiu, F.C., Broanan, C.F. Quantative aspects of reactive gliosis. *Neurochem Res.* 17:877-885.
49. 송계용, 유재형, 지제근. 뇌의 교세포종양에서 Gliar Fibrillary Acidic Protein의 출현에 관한 고찰. *대한 신경외과학회지* 13(2):227-231, 1984.
50. Dijkstra, S., Geisert, E.E. Jr, Dijkstra, C.D., Bar, P.R., Joosten, E.A. CD81 and microglial activation in vitro, proliferation, phagocytosis and nitric oxide production. *J Neuroimmunol.* 114:151-159, 2001.
51. Ling, E.A., Leblond, C.P. Investigation of glial cells in semithin sections. II. Variation with age in the numbers of the various glial cell types in rat cortex and corpus callosum. *J Comp Neurol.* 149:73-81, 1973.
52. Parnavelas, J.G., Luder, R., Pollard, S.G., Sullivan, K., Lieberman, A.R. A qualitative and quantitative ultrastructural study of glial cells in the developing visual cortex of the rat. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 301: 55-84, 1983.
53. Geisert, E.E. Jr, Yang, L., Irwin, M.H. Astrocyte growth, reactivity, and the target of the antiproliferative antibody, TAPA. *J Neurosci.* 16: 5478-5487.
54. Dijkstra, S., Geisert, E.J., Gispens, W.H., Bar, P.R., Joosten, E.A. Up-regulation of CD81 by reactive microglia and astrocytes after spinal cord injury in the rat. *J Comp Neurol.* 428:266-277, 2000.
55. Geisert, E.E. Jr, Abel, H.J., Fan, L., Geisert, G.R. Retinal pigment epithelium of the rat express CD81, the target of the anti-proliferative antibody(TAPA). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:274-280, 2002.