

생쥐의 파킨슨병 모델에서 인삼사포닌이 도파민성 신경세포에 미치는 영향

식품의약품안전본부 독성연구소 조직병리과, *인삼연초연구원
및 **전남대학교 의과대학 병리학교실

김창옥 · 김기석 · 허영범 · 안병우
한범석 · 최광식 · 남기열* · 정상우**

The Effect of Ginseng Saponin on the Dopaminergic Neurons in the Parkinson's Disease Model in Mice

Chang Ok Kim, M.D., Ki Sok Kim, M.P.H., Young Buhm Huh, M.D.
Byeong Woo Ahn, Ph.D., Beom Seok Han, Ph.D., Kwang Sik Choi, Ph.D.
Ki Yul Nam, Ph.D.* and Sang Woo Juhng, M.D.**

Department of Histopathology, National Institute of Toxicological Research,
*Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Seoul, Korea

**Department of Pathology, College of Medicine, Chonnam National University, Kwangju, Korea

Saponin has been known to be a major antioxidant component in panax ginseng. Recent experimental study suggests that some antioxidant materials prevent Parkinson's disease caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in an animal model. The present study was performed to demonstrate the effect of ginseng saponins in the Parkinson's disease model induced by MPTP. To verify the effect of ginseng saponin on dopaminergic neurons in the mice brain, the tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-ir) neurons were observed by immunohistochemical stain and immunoelectron microscopy (preembedding method). Also, in order to estimate the immunoreactivity of dopaminergic neuropils, they were quantified by image analysis. The number of TH-ir neurons of substantia nigra was significantly increased in the high-dose (0.46 mg/kg) ginseng saponin group compared with the MPTP injected group. The immunoreactivity of TH-ir neuropils in striatum was significantly increased in both high and low-dose (0.1 mg/kg) ginseng saponin groups compared with the MPTP injected group. In immunoelectron microscopic observation, TH-ir neurons of the control and both ginseng saponin injected group showed normal nuclei and well preserved cytoplasmic organelles. In the MPTP injected group, dying dopaminergic neurons showed destroyed nuclei and cytoplasmic organelles. These results suggest that ginseng saponin has a protective effect on the Parkinson's disease model induced by MPTP. (Korean J Pathol 1997; 31: 805~814)

Key Words: Parkinson's disease, Tyrosine hydroxylase, Immunoelectron microscopy, Image analysis, Ginseng saponin

접 수: 1997년 1월 3일, 게재승인: 1997년 7월 3일

주 소: 서울시 은평구 녹번동 5, 우편번호 122-704

식품의약품안전본부 독성연구소 조직병리과, 김창옥

ISSN : 0379-1149

서 론

인구의 고령화에 동반된 알츠하이머병 및 파킨슨병 같은 중추신경계의 퇴행성 신경질환의 증가는 사회적으로 큰 영향을 미쳐 최근 세계적으로 그 연구가 많이 진행되고 있다. 그 중에서 미국의 경우 60세 이상의 노년층에서 높은 유병률을 보이는 파킨슨병은 여러가지 유발요인에 의해 가속화된 세포노화 현상으로 발병되며, 특히 흑질부위에 선택적으로 도파민성 신경세포의 변성 및 세포소실로 인한 운동장애 뿐만 아니라 노인성 치매를 동반하여 노인층에서는 치명적인 질환이다¹.

최근에는 파킨슨병 모델의 연구가 활발히 진행되고 있는데, meperidine계 마약인 4-propyloxy-4-phenyl-N-methylpiperidine (PPMP)의 합성과정에서 생기는 하나의 부산물인 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)을 C₅₇BL/6 생쥐에게 투여한 후 대뇌 흑질과 선조체에 대한 생화학 및 병리학적인 연구가 이루어지고 있다²⁻⁴. MPTP는 영장류 등에서 원발성 파킨슨병과 유사한 임상증상인 경직 (rigidity), 진전 (tremor)과 흑질의 도파민성 신경세포 손실을 보이는 병리학적인 변화를 유발시킨다⁵. 그러나 파킨슨병의 치료 방법 중 levodopa, carbidopa 등은 일시적인 임상증상 완화만을 가져오고 도파민 신경세포 이식도 일부에서 시행되고 있으나 신경세포의 손상을 방지할 수 있는 근본적인 치료는 아직 이루어지지 않고 있다⁶.

인삼은 자양 강장 뿐만 아니라⁷ 중추신경계의 강화, 스트레스에 대한 방어작용이 있다고 하며⁸ 인삼 함유 처방은 노화와 관련된 전신기능의 감퇴에도 효과가 있다고 알려지고 있다⁹. 근년에 분석방법의 발전으로 인삼성분의 개별화가 이루어지고 이들 성분들에 대한 약리학적 검토가 다각적으로 이루어지고 있으며 그 중에서 인삼 사포닌은 인삼의 중요 성분 중의 하나로서 중추신경계에 억제 또는 흥분 작용을 나타내며¹⁰⁻¹² 산소대사물에 대한 보호 작용 등 많은 작용이 보고 되고 있다¹³⁻¹⁵. 그리고 인삼사포닌은 중추신경계의 도파민 신경활성에 작용하는 것으로 알려졌는데 선조체에서 도파민과 도파민 대사체의 농도를 증가시킨다고 하였다¹⁶. 또한 6-hydroxy dopamine으로 뇌를 손상시킨 흰쥐에서도 인삼사포닌 투여시 현저한 자발운동량의 증가를 보였다는 보고¹⁷가 있었지만 사람의 파킨슨병과 가장 유사한 MPTP로 뇌를 손상시켜 만든 파킨슨병 모델에서의 인삼사포닌의 도파민 신경활성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 인삼사포닌의 파킨슨병에 대한 효과를 알아보기 위하여 MPTP를 C₅₇BL/6 생쥐에 투여하여 파킨슨병 모델을 만든 후 인삼사포닌에 의한 도파민 신경세포의 변화를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 방법

출생 9주령된 수컷 C₅₇BL/6 생쥐를 사용하였다. 고품사료 및 수도물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물사육 조건은 온도 23±2°C, 상대습도 55±5%, 환기횟수 15/hr, 명암교대 12시간 (조명/7:00~19:00)으로 하였다. MPTP는 Aldrich (USA)에서 입수하였고 인삼의 총 사포닌 (total saponin)은 6년근 고려홍삼으로 부터 제조한 것으로써 한국인삼연초연구원에서 공급받았다. 대조군 및 실험군으로 각 5마리씩의 C₅₇BL/6 생쥐를 사용하였다.

대조군은 생리식염수를 복강주사한 30분 후에 다시 생리식염수를 복강주사하였고, MPTP 투여군은 생리식염수 복강주사 30분 후 MPTP 30 mg/kg을 복강주사하였다. 인삼사포닌 저용량 투여군은 인삼사포닌을 0.1 mg/kg, 고용량 투여군은 인삼사포닌을 0.46 mg/kg 복강주사한 30분 후 MPTP 30 mg/kg을 복강주사하였고 투여종료 7일 후에 실험동물을 관류고정하였다.

2. 면역조직화학 염색 및 상대적 정량분석

1) 관류고정 및 TH (tyrosine hydroxylase) 면역조직화학: 실험동물은 pentobarbital sodium (60 mg/kg)을 복강주사하여 마취시킨 후 흉곽을 절개하고 좌심실을 통하여 0.05 M phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS)과 4% paraformaldehyde-용액 (4°C)을 차례로 관류시킨 후 뇌를 적출하였다. 적출된 뇌는 brain matrix를 사용하여 2 mm 두께로 흑질부위를 포함하는 중뇌부위와 선조체를 포함하는 대뇌 기저핵부위의 관상단면표본을 만들어 동일한 고정액에서 후고정을 한 후 20% sucrose-용액에 침적시켰다. 침적된 뇌는 동결절편기를 사용하여 30 μm 두께로 연속관상절편을 제작하였고, 조직절편중 흑질과 기저핵 부위에 대하여 염색을 시행하였다. TH 면역조직화학은 자유부유 (free-floating)법을 사용하였다.

면역조직화학 염색에 사용된 일차항체는 mouse anti-tyrosine hydroxylase (Boehringer Mannheim, Germany)로 0.3% Triton X-100과 1.5% normal horse serum 및 0.05% bovine serum albumin이 포함된 PBS에 1 : 2000으로 희석하여 4°C에서 24시간 동안 반

응시했다. 일차항체에서 반응이 끝난후 biotinylated IgG (Vector, USA)를 1 : 200으로 희석하여 1시간 반응시킨후 avidin-biotin peroxidase complex (Vector, USA)를 1 : 100으로 희석하여 1시간 반응시켰다. 발색반응은 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride에 0.07% nickel chloride, 0.02% H₂O₂를 섞어서 반응시켰다. 발색이 끝난 절편은 double gelatin-coated 된 슬라이드에 부착시킨 후 건조시켜 ethanol로 탈수, xylene으로 투명과정을 거친 후 Eukitt (Riedel-deHaen, Germany)로 봉입하였다.

2. 상대적 정량분석

1) **흑질의 신경세포 수 측정:** TH 면역조직화학 염색을 시행한 조직중에서 동일한 흑질부의 절편을 선택하였다. 선택된 조직절편은 배측구개피질 (ventral tegmental area)와 내측모대 (medial lemniscus)를 제외한 흑질 치밀부위 (substantia nigra compacta)와 흑질 망상부위 (substantia nigra reticularis)의 TH 양성반응을 보이는 신경세포의 수를 광학현미경 200배하에서 측정하였다.

2) **선조체부위의 영상분석기를 이용한 TH 면역염색성 측정:** 동일한 선조체 부위를 포함한 대뇌 기저핵 부위의 절편을 선택하였다. 선택된 기저핵부위 절편은 IBAS 영상분석기 (Kontron, Germany)를 사용하여 선조체부위의 TH 면역염색성을 측정하였다. 측정방법은 현미경 광원의 색온도를 5500°K로 고정 한 후 동일한 광원하에서 영상분석기의 densitometry 기능을 이용하여 측정하였다. Densitometry는 검은색이 scale 0이고 흰색은 scale 255로 256단계의 gray level로 표시가 된다. 측정시에 전교련 (anterior commissure)과 복측담창구 (ventral pallidum), 측좌핵 (nucleus accumbens), 후결절 (olfactory tubercle)을 제외한 TH 양성반응을 보이는 미상피각핵 (caudatoputamen)부위의 면역염색성을 측정하였다.

3) **통계처리 및 분석:** 흑질부위의 신경세포 수의 측정과 선조체 부위의 영상분석기를 이용한 면역염색성 측정 결과는 one-way analysis of variance (ANOVA)와 Student's t-test로 유의성을 검정하였다.

3. 포매전 방법의 면역투과전자현미경 염색

1) **관류고정:** 광학현미경 관찰을 위한 관류고정법과 동일한 방법으로 시행하였으나 고정액은 전자현미경 관찰을 위해 4% paraformaldehyde에 0.1% glutaraldehyde를 섞어서 사용하였다. 관류고정 후 적출된 뇌는 vibratome (Dosaka, Japan)을 사용하여 60 μm 두께로 박절하였다.

2) **면역조직화학 염색:** 면역조직화학 염색법은 광학현미경 관찰을 위한 방법과 같으나 계면활성 물질은 Triton X-100 대신에 0.2% saponin을 써서 초미세구조의 변형을 최대한 억제하였다.

3) **투과전자현미경 관찰을 위한 조직처리:** 면역조직화학으로 TH 염색된 조직을 0.1M phosphate buffer (PB)로 세척한후 1% osmium tetroxide에서 20분간 후고정하였다. 후고정한 조직은 PB로 15분씩 세번 침적한 후 50% ethanol로 충분히 세척하여 phosphate ion을 제거하였다. 다음으로 70% ethanol에 녹인 1% uranyl acetate로 30분간 전자염색을 하였다. 그 후 95% ethanol과 absolute ethanol로 탈수한 다음 propylene oxide로 치환한 후, aluminum boat에 조직과 epon-araldite resin을 넣어 24시간 상온에서 침투시켰다. 침투시킨 조직을 필름위에 올린후 epon-araldite resin으로 포매시켰다. 포매된 조직은 광학현미경하에서 TH 양성 신경세포를 확인하여 삭절한 후 epon block에 접착시켰다. 조직을 접착시킨 epon block을 준초박절하여 TH 양성 신경세포를 확인한 후 600~800A의 두께로 초박절하여 lead nitrate용액으로 전자염색을 한 다음 투과전자현미경 (Philips, Netherland)으로 관찰하였다.

결 과

1. 면역조직화학 염색 및 상대적 정량분석

1) **흑질부위의 TH 양성 신경세포 수의 측정 (Fig. 1):** 흑질의 TH 양성 신경세포 수는 대조군에 비해 MPTP 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다. 저용량 인삼사포닌 투여군에서는 MPTP 투여군에 비해 유의성있는 차이가 없었으나 고용량 인삼사포닌 투여군에서는 MPTP 투여군에 비해 유의성있는 증가를 보였다 (Table 1).

2) **선조체부위의 영상분석기를 이용한 TH 면역염색성 측정 (Fig. 2):** 선조체를 포함하는 대뇌기저핵 부위의 TH 면역조직화학염색에서 MPTP 투여군에서는 미상피각핵부위에 현저한 면역염색성의 감소가 관찰되었으나 측좌핵과 후결절부위의 분명한 감소는 관찰되지 않았다. 미상피각핵 부위중에서도 중심부 미상피각핵부위에 TH 면역염색성의 감소가 내측과 외측 미상피각핵부위에 비해 그 정도가 현저하였다. 그러나 두 가지 용량별 인삼사포닌 투여군에서 부위에 따른 면역염색성의 차이는 관찰되지 않았다.

선조체부위에 있어서 영상분석기의 densitometry기능을 이용한 TH 면역염색성의 정량적 분석에서 저

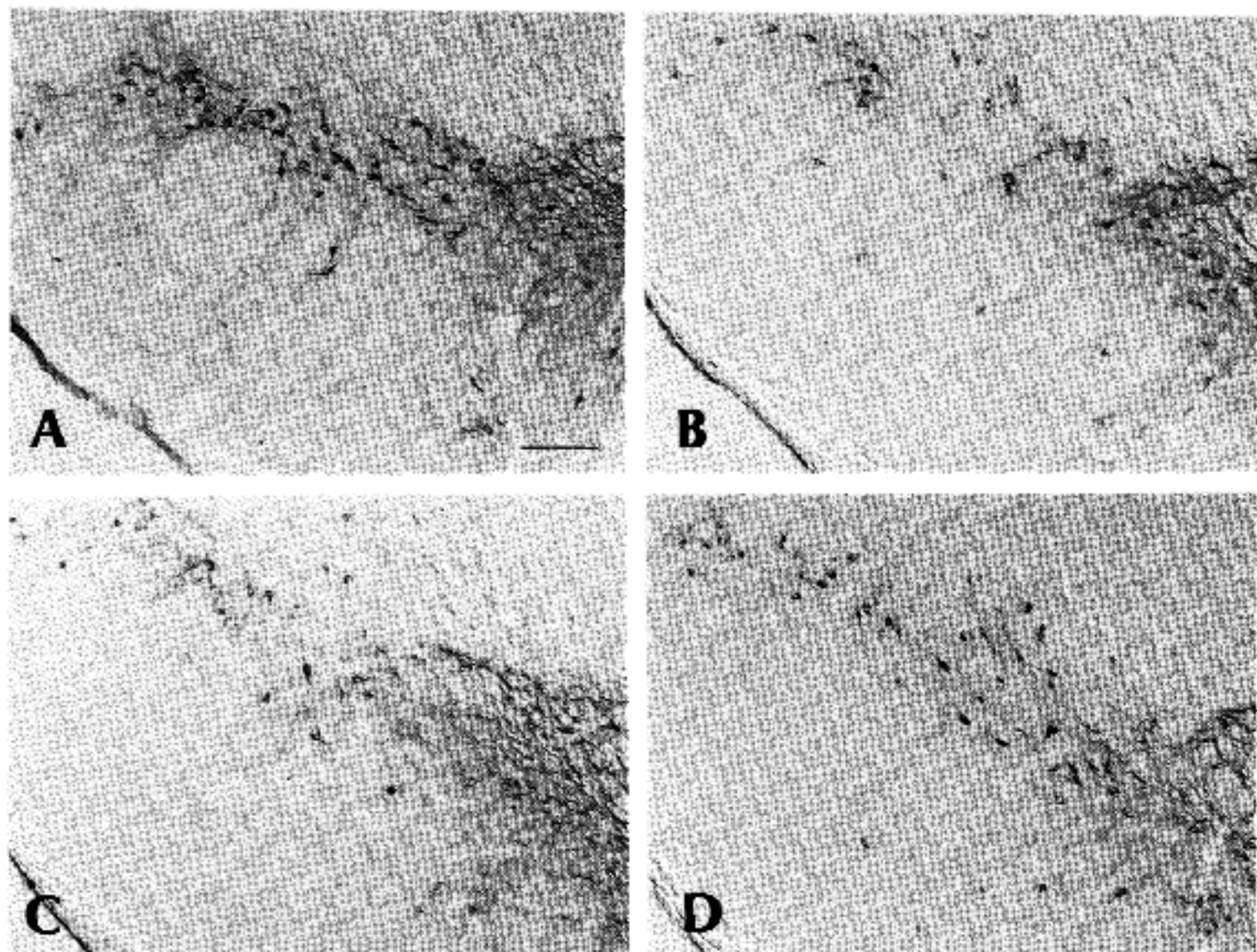


Fig. 1. Photomicrograph of tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-ir) neurons in the mouse substantia nigra. A. Control group. B. MPTP injected group. The number of TH-ir neurons is decreased as compared with control group. C. Low-dose ginseng saponin group. D. High-dose ginseng saponin group. The number of TH-ir neurons is increased as compared with MPTP injected group. Scale bar=100 μ m.

Table 1. Quantitative analysis of tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-ir) neurons in the substantia nigra

Group	No. of TH-ir neurons
Control	78.2 \pm 2.8*
MPTP (30 mg/Kg) injected	46.8 \pm 3.5
Low-dose ginseng saponin (Saponin (0.1 mg/Kg) and MPTP (30 mg/Kg) injection)	48.6 \pm 2.4
High-dose ginseng saponin (Saponin (0.46 mg/Kg) and MPTP (30 mg/Kg) injection)	62.2 \pm 4.2*

Values represent mean \pm S.E.M. Statistical analysis is carried out one-way ANOVA and Student's t-test. *P<0.01, compared with MPTP injected group.

용량 및 고용량 인삼사포닌 투여군 모두에서 MPTP 투여군에 비해 유의성 있는 차이를 나타내었다 (Table 2).

2. 포매전 방법을 이용한 면역투과전자현미경의 관찰 (Fig. 3, 4)

대조군과 MPTP 투여군 및 인삼사포닌 투여군 모두에서 TH에 강한 면역반응을 보이는 신경세포는 조면세포질네망 (rough endoplasmic reticulum)과 리보솜, 미토콘드리아가 관찰되었고 핵은 둥글고 미세한 염색질을 보여 신경세포 변성등의 이상소견은 관찰되지 않았다. 그러나 MPTP 투여군에서는 죽어가고 있는 도파민 신경세포는 세포의 핵내 구조물이 파괴되어 거의 관찰되지 않는 dark cell로 관찰되었으며, dark cell은 대조군 및 인삼사포닌 투여군에서는 관찰되지 않았다.

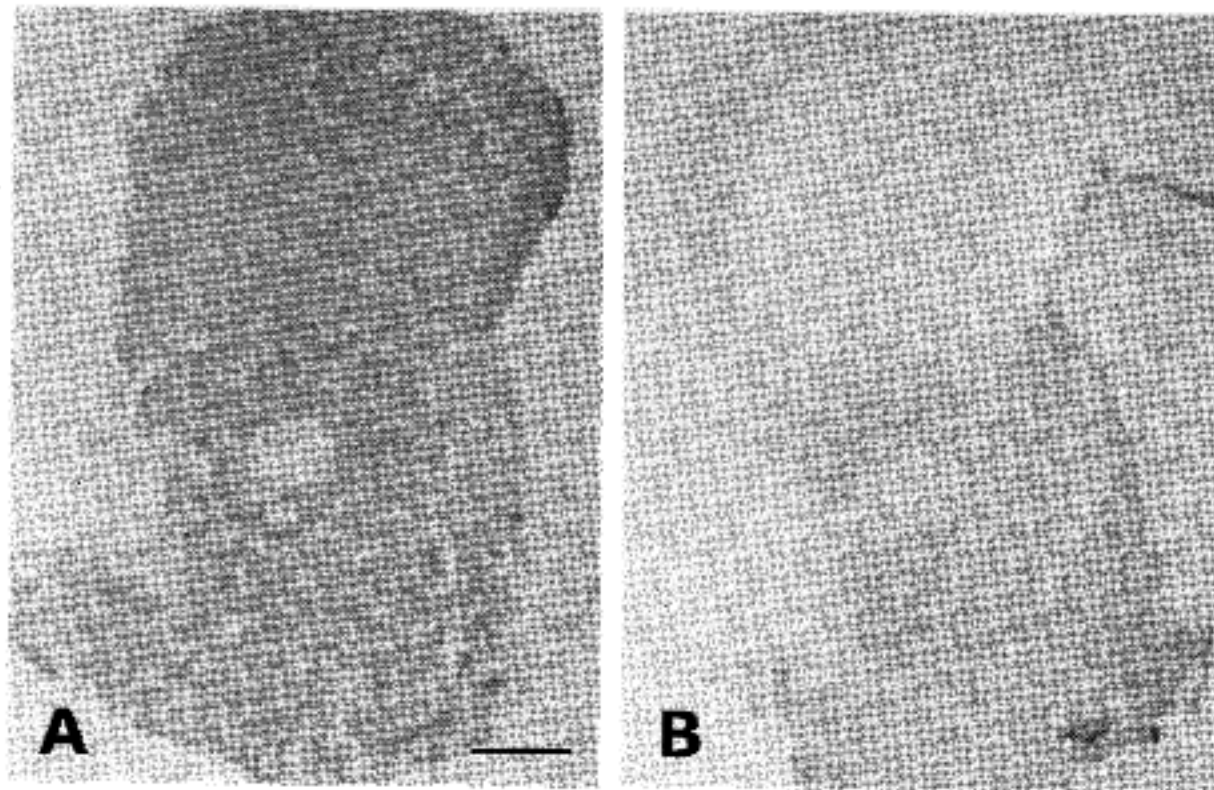


Fig. 2. Photomicrograph of TH-immunoreactivity in the mouse striatum. A. Control group. B. MPTP injected group. The intensity of TH-ir neuropils is decreased as compared with control group. Scale bar=100 μ m.

Table 2. Gray scale of TH-ir neuropils in the striatum

Group	Gray scale of TH-ir neuropils
Control	110.6 \pm 1.5
MPTP (30 mg/kg) injected	156.5 \pm 2.4
Low-dose ginseng saponin (Saponin (0.1 mg/kg) and MPTP (30 mg/kg) injection)	126.9 \pm 1.9*
High-dose ginseng saponin (Saponin (0.46 mg/kg) and MPTP (30 mg/kg) injection)	107.0 \pm 1.7*

Values represent mean \pm S.E.M. Gray scales are measured by image analyzer. Gray scale 0 is black, 255 is white. Statistical analysis is carried out one-way ANOVA and Student's t-test. *P < 0.01, compared with MPTP injected group.

고 찰

원발성 파킨슨병은 감수성이 있는 개체가 여러가지 유발요인에 의해 가속화된 세포노화를 일으키는 경우에 초래되고, 이들 유발요인은 카테콜라민 생성 신경세포내에서 대사율을 증가시켜 신경세포내에

산소대사물을 축적시키며 세포막과 세포내 기관에 손상을 주어 결국 세포소실이 온다고 생각되어지며, 특히 흑질부위 도파민성 신경세포의 변성 및 세포소실을 보이는 전환으로 알려져 있다⁶.

한편 도파민은 도파민성 신경세포의 신경접합부위에서 티로신 (tyrosine)이 티로신가수분해 (tyrosine hydroxylase, TH)효소에 의해 도파 (DOPA)가 되고 도파는 도파탈탄산효소 (DOPA decarboxylase)에 의해 도파민이 되며 도파민은 노르에피네프린으로, 노르에피네프린은 다시 에피네프린으로 변환하게 된다. 이때 티로신에 작용하는 TH는 도파민 합성에 있어서 속도결정효소 (rate limiting enzyme)로 알려져 있다¹⁹.

MPTP에 의한 신경독성은 합성 heroin을 만들어 복용하던 사람들이 파킨슨 증후군의 증상을 보이면서 알려지기 시작하였는데, Davis¹⁸이 PPMP를 복용한 23세 환자의 부검소견에서 흑질의 도파민성 신경세포에 손상을 보인다고 보고한 이래로 많은 연구가 이루어졌다. MPTP는 주로 원숭이 등의 영장류에 가장 민감하게 독성을 살 일으키지만²⁰ 설치류에 있어서도 고령화된 생쥐와 쥐에서 신경독성을 유발하여²¹ 흑질전초체 도파민 재계를 선택적으로 파괴하여²² 흑질의 도파민성 신경세포에 손상을 주어 신경세포 수를 감소시키고 전초체에 있어서도 도파민 농도를 감소시킨다^{23,24}. 따라서 흑질에서 TH 양성

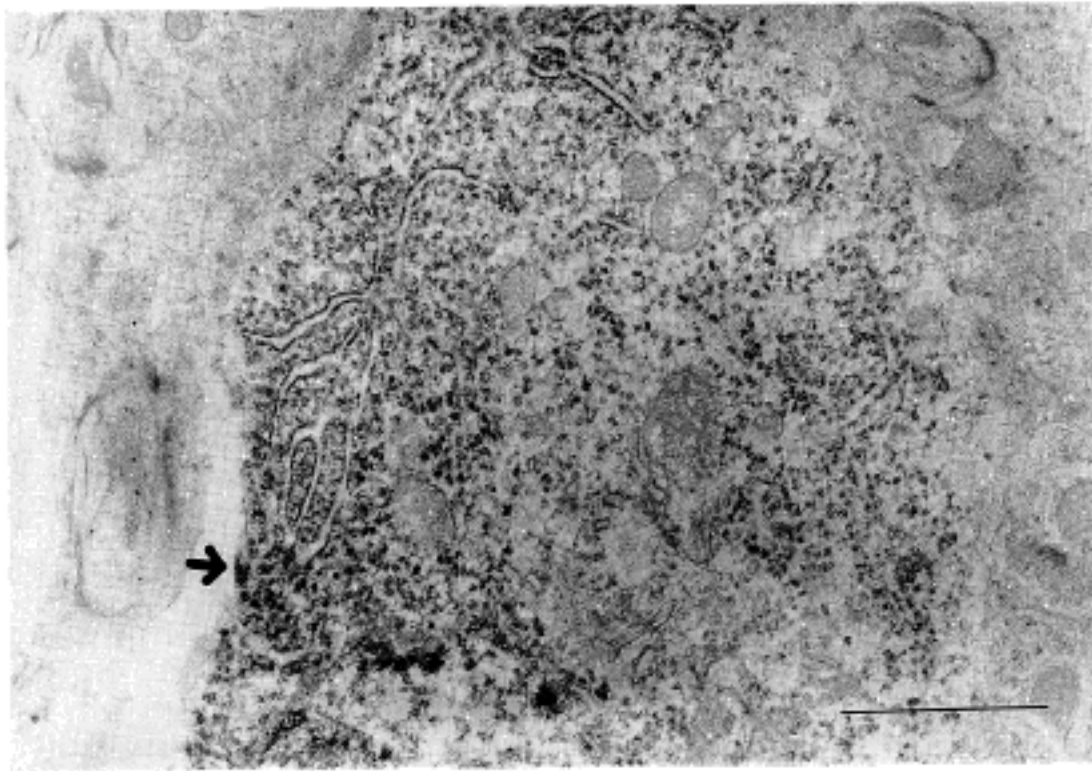


Fig. 3. Immunoelectron microscopic findings of low-dose ginseng saponin group. TH-ir neurons in substantia nigra show well preserved rough endoplasmic reticulum, ribosomes, and mitochondria. Scale bar=2 μ m.

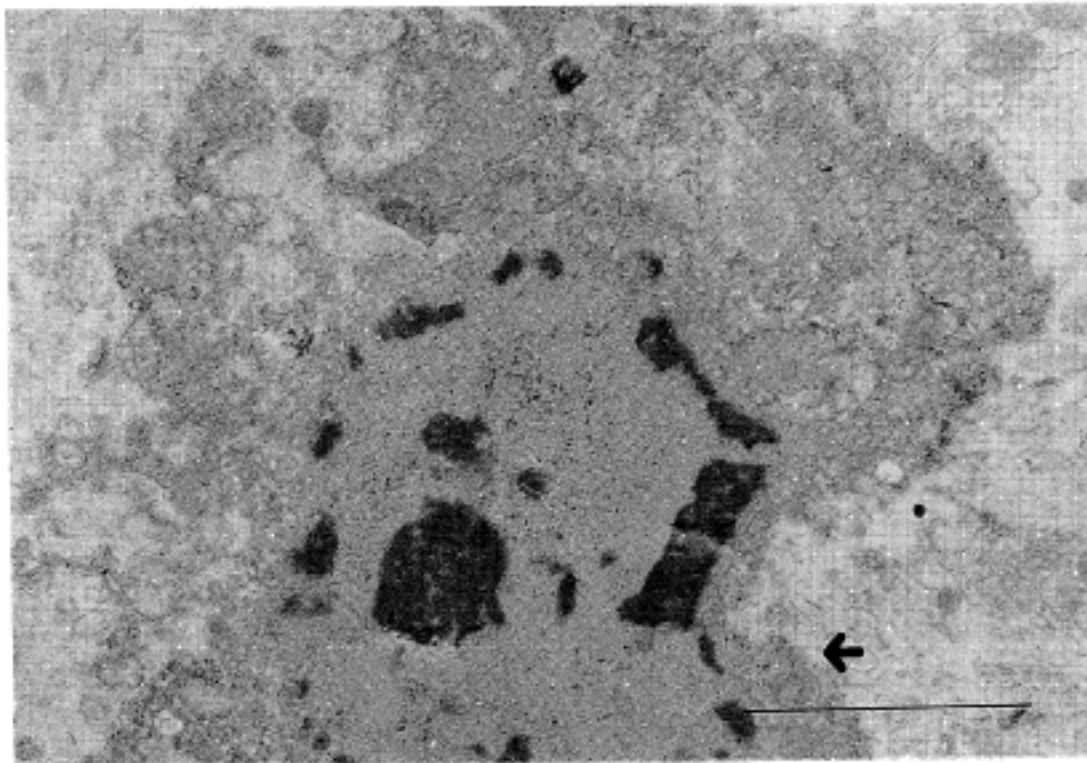


Fig. 4. Immunoelectron microscopic finding of MPTP injected group. The dark cell shows nearly destroyed intracytoplasmic organelles, indented nuclear membrane, and chromatin clumping, which represents dying dopaminergic neuron. Scale bar=2 μ m.

신경세포의 수가 감소되며 선조체의 신경망에 TH 면역염색성이 감소된다고 알려졌다²⁵. MPTP의 독성 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않고 있으나 지금까지 알려진 중요한 독성기전으로는 먼저 뇌 미토콘드리아에서의 NADH와 관련된 산화 반응과 NADH dehydrogenase 활성도가 MPTP또는 MPP⁺에 의해서

억제되어 그 결과 ATP결핍을 초래하게 되므로 독성을 나타낸다는 보고가 있다^{26,27}. 다른 하나는 MPTP 또는 MPTP의 대사물이 반응성이 높은 전자친화성 매개체로 생체의 각종 중요한 거대분자 (macromolecule)와 작용을 갖게 되거나²⁸ 또는 생체내에서 반응성 산소 대사물의 생성을 초래하여 세포내 지질을

포함한 중요 거대분자에 손상을 주게 됨으로 MPTP의 독성을 나타낸다는 것이다^{29,30}. 김등³¹은 MPP⁺가 미토콘드리아의 전자전달계를 억제함으로써 에너지 대사에 영향을 미쳐서 세포독성을 가져온다고 하였다. 그러나 항산화효소이며 항산화 반응의 초기단계를 담당하는 superoxide dismutase의 억제제인 diethyl-dithiocarbamate를 처리하였을 때 MPTP의 독성이 더욱 증가한다는 보고가 있다³². 따라서 아직도 MPTP의 선택적인 신경세포 독성기전을 제대로 설명할 수 없는 상태이다.

인삼의 효능으로 혈압조절과 조혈작용, 체내 기능 대사 항진 효과가 보고 되었고³³, 인삼의 중추신경계에 대한 작용으로는 중추신경계의 강화와 스트레스에 대한 방어작용이 있다고 알려져 있다⁸. 또한 인삼함유 처방은 신경증등 정신증상의 개선에도 적용되어 왔으며 노화와 관련된 정신기능의 감퇴 특히 건망증, 치매에도 효과가 있는 것으로 알려지고 있다⁹. 인삼사포닌은 인삼의 중요 성분 중의 하나로서 중추신경계에 억제작용 또는 흥분작용을 나타낸다고 하였고^{10,11}, 이러한 양면적인 작용은 사포닌의 분획에 따른 것으로 생각되어졌다¹². 인삼사포닌의 용량에 따라 소량 투여에서는 중추신경계에 흥분성으로 작용하고 대량투여에서는 억제성으로 작용한다고 하였다¹². 인삼의 성분중의 하나인 maltol, salicylic acid와 vanilic acid와 함께 항산화력을 갖고 있어서¹³ 여러가지 산소대사물에 대하여 보호작용이 있다고 하였다¹⁴. 김등¹⁵은 이러한 항산화 기능은 superoxide dismutase의 유전자 전사를 활성화 시키기 때문이라고 하였다. 인삼사포닌은 신경세포 배양에서 축삭의 성장을 촉진하였으며^{34,35} 신경세포 성장기간을 연장시켰다³⁶. 그리고 일산화탄소에 의한 뇌 손상에 대해서도 보호효과가 있어서^{16,37} ATP량의 감소를 개선시킨다고 하였다³⁸. 인삼사포닌은 학습 기억에 크게 관련되는 것으로 알려진 아세틸콜린 신경계에 작용하여^{39,40} 학습및 기억유지능⁴¹, 공간인지능³⁹에 효과가 있다는 보고가 있었다⁴². 항콜린성 약품에 의한 기억소실에도 개선효과가 있었다고 하며^{43,44} 이러한 것은 콜린 전구체의 흡수능을 증가시키기 때문이라고 하였다^{44,45}. 또한 인삼사포닌은 중추신경계의 도파민 신경활성에 작용하는 것으로 알려져 있는데 선조체에서 도파민과 도파민의 대사체인 DOPAC의 농도를 증가시키고¹⁶ 자발운동량의 증가를 보였다¹⁷.

본 실험 결과 MPTP 투여군의 흑질에서는 TH 양성 신경세포 수가 대조군에 비해 감소된 양상이었다. 저용량 인삼사포닌 투여군에서는 MPTP투여군에

비해 TH양성 신경세포 수가 통계학적으로 유의성 있는 차이가 없었으나 고용량 인삼사포닌 투여군에서는 MPTP 투여군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다. 따라서 고용량 인삼사포닌 투여군에서는 MPTP에 의한 신경독성에 대하여 방어작용이 있는 것으로 생각되었다. 선조체부위의 면역염색성을 영상분석기의 densitometry로 측정된 결과 MPTP 투여군이 대조군에 비해 TH 면역염색성이 감소하였으나 저용량 및 고용량 인삼사포닌 투여군에서는 TH 면역염색성이 대조군과 유사한 정도의 gray scale 수치를 나타내었다. MPTP에 의한 TH 면역염색성의 감소정도가 내측 미상피각핵과, 측좌핵, 및 후결절에서는 비교적 적었다는 보고가 있었는데^{25,46} 본 연구에서는 MPTP 투여군의 대부분의 영역에서 비슷한 결과를 내었다. 그러나 내측과 외측 미상피각핵에서는 TH 면역염색성의 감소가 현저하지 않았지만 중심부 미상피각핵의 TH 면역염색성의 감소가 가장 현저해서 이전의 결과와는 다른 양상이었다. 또한 두 가지 용량별 인삼사포닌 투여군 모두에서는 양성대조군과 같이 측좌핵과 후결절의 TH 면역염색성의 분명한 감소가 관찰되지 않았으며 미상 피각핵에서도 MPTP 투여군과 달리 TH 면역염색성의 부위별 차이가 거의 관찰되지 않고 고른 면역염색성을 보였다. MPTP에 의한 도파민성 신경세포에 대한 손상은 흑질부위보다는 도파민성 신경세포의 축삭말단부위인 선조체에 먼저 온다고 하였고⁴⁷ 또한 흑질의 도파민성 신경세포 수의 측정은 모든 개체간의 측정 절편의 일치성 여부, 측정자의 오차를 감안해 볼때 본 연구에서와 같이 선조체에서 영상분석기를 이용한 TH에 대한 면역염색성의 측정이 MPTP에 의한 도파민성 신경세포의 손상정도를 아는데 유용하리라 생각된다.

면역투과전자현미경 관찰에서 대조군 및 두가지 용량의 인삼사포닌 투여군 모두에서 강한 TH 면역반응성을 보이는 신경세포는 핵이 둥글고 미세한 염색질을 보여 신경세포의 미세구조 변성등의 이상 소견은 관찰되지 않았다. 그러나 MPTP 투여군에서는 죽어가고 있는 도파민 신경세포로 세포구조물이 모두 파괴되어 거의 관찰할수 없는 dark cell이 보였다. TH 면역염색성이 거의 없는 dark cell에서는 신경세포내 미세구조의 변성이 많이 진행된 양상이었다. 그러므로 dark cell에서는 도파민 합성이 거의 이루어지지 않는 것으로 판단하였다.

이상의 결과로 보아 인삼사포닌은 MPTP의 독성기전중의 하나인 도파민성 신경세포의 변성을 억제하는 효과가 있을 것으로 생각되었다.

결 론

생쥐의 파킨슨병 모델에서 인삼사포닌의 영향을 병리학적인 방법을 통해 알아보고자 MPTP와 인삼사포닌을 C57Bl/6 생쥐에 투여하여 흑질 선조체 부위의 TH에 대한 면역조직화학 염색과 영상분석기를 이용하여 TH 양성반응을 보이는 신경세포수와 TH 면역염색성의 상대적 감소를 측정하고 면역투과전자현미경 방법을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 흑질부위의 TH 양성 신경세포의 수를 흑질 망상부위와 치밀부위에서 관찰한 결과 저용량 인삼사포닌 투여군에서는 MPTP 투여군에 비해 유의성 있는 차이가 없었으나 고용량 인삼사포닌 투여군에서는 MPTP 투여군에 비해 유의성 있게 증가하였다.

2) 선조체부위의 TH 면역염색성을 영상분석기로 측정하였을 때 두가지 용량별 인삼사포닌 투여군 모두에서 MPTP 투여군에 비해 면역염색성이 강했으며, 특히 고용량 인삼사포닌 투여군에서 저용량 인삼사포닌 투여군보다 더 강한 면역염색성을 보였다.

3) 흑질 치밀부위를 면역투과전자현미경기법으로 관찰하였을 때 MPTP 투여군에서 죽어가는 도파민 신경세포인 dark cell이 관찰되었으며, 대조군과 인삼사포닌 투여군에서는 도파민 신경세포의 미세기관의 변성을 관찰할 수 없었다.

따라서 MPTP의 독성기전중의 하나인 산소대사물에 의해 유발되는 신경세포의 변성에 대하여 인삼사포닌이 MPTP의 신경세포독성에 대해 방어작용을 할 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Saitoh T, Nijima K, Mizuno Y. Long-term effect of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) on striatal dopamine content in young and mature mice. *J Neurol Sci* 1987; 77: 229-35.
2. Gupta M, Gupta BK, Thomas R, Bruemmer V, Sladek JR Jr, Felten DL. Aged mice are more sensitive to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine treatment than young adults. *Neurosci Lett* 1986; 70: 326-31.
3. Irwin I, Wu EY, Delanney LE, Trevor A, Langston W. The effect of diethyldithiocarbamate on the bi-disposition of MPTP: an explanation for enhanced neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 1987; 141: 209-17.
4. Ricaurte GA, Irwin I, Forno LS, DeLanney LE, Langston E, Langston JW. Aging and 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Brain Res* 1987; 403: 43-51.
5. Davis GC, Williams AC, Markey SP, et al. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1979; 1: 249-55.
6. WHO drug information. *Essential Drugs*. 1990; 4: 131-4.
7. 오진섭, 홍사악, 박찬웅, 노기석. 인삼의 중추신경계에 대한 작용-인삼의 항정신작용에 관한 연구. *서울의대잡지* 1973; 14: 15-8.
8. Saito H, Yoshida Y, Takagi K. Effect of panax ginseng root on exhaustive in mice. *Jpn J Pharmacol* 1974; 24: 119-24.
9. Saito H, Nishiyama N, Himi T. Brain and Ginseng. *Proceedings of second international symposium of natural product research* 1989: 14-7.
10. Nabata H, Saito H, Takagi K. Pharmacological studies of neural saponins (GNS) of panax ginseng root. *Jpn J Pharmacol* 1973; 23: 29-41.
11. 홍사악, 박찬웅, 김재훈, 홍순금, 장현갑. 인삼사포닌의 동물행동에 대한 작용. *대한약리학회지* 1974; 10: 1-5.
12. Park JK, Chepurnov SA, Chepurnova NE, Nam KY. Effects of Korea red ginseng on memory deficit and seizure susceptibility following hyperthermia-induced seizures in the rat pups. *Proceedings of Korea-Japan Ginseng Symposium* 1995: 89-102.
13. Chang HM, Yeung HW, Tso WW, Koo A. Advances in chinese medicinal materials research. chemical and biochemical studies on antioxidant components of ginseng. 1st. ed. Singapore: World Scientific Publ Co., 1985: 485-97.
14. Chung HY, Kim KW, Oura H, Yokozawa T. Effects of ginsenoside Rb2 on the antioxidants in senescence accelerated mice (SAM-R/1). *Proceeding of 6th International Ginseng Symposium* 1993: 30-2.
15. 김영호, 노현모. 인삼성분이 superoxide dismutase 유전자 발현조절에 미치는 영향. *Proceedings of Korea-Japan Ginseng Symposium* 1995: 16-26.
16. 박혜영, 김춘미, 주지연, 최현진. 인삼사포닌이 일산화탄소 중독 및 노화과정에서 흰쥐의 신경전달물질 함량 변화에 미치는 영향. *약학회지* 1992; 36: 285-90.
17. 이순철. 뇌기능 개선 작용과 인삼의 작용, 중추 monoamine신경활성에 영향을 미치는 인삼사포닌 성분의 작용. *4th Neuroscience Symposium* 1993: 105-37.
18. Barbeau A. Etiology of Parkinson's disease: a research strategy. *Can J Neurol Sci* 1984; 11: 24-8.

19. 서유현. 신경전달물질. 초판. 서울: 민음사, 1992: 106-19.
20. Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Maikey SP. Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. *Life Sci* 1985; 36: 219-24.
21. Date I, Felten DL, Felten SY. Long-term effect of MPTP in the mouse brain in relation to aging neurochemical and immunocytochemical analysis. *Brain Res* 1990; 519: 266-76.
22. Sundstrom E, Fredriksson A, Archer T. Chronic neurochemical and behavioral changes in MPTP-lesioned C₅₇BL/6 mice: a model for Parkinson's disease. *Brain Res* 1990; 528: 181-8.
23. Elsworth JD, Deutch AY. Differential responsiveness to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine toxicity in sub-regions of the primate substantia nigra and striatum. *Life Sci* 1986; 40: 193-202.
24. Heikkila R. Differential neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) in Swiss-Webster mice from different sources. *Eur J Pharmacol* 1985; 117: 131-3.
25. Donnan GA, Kaczmarczyk SJ, McKenzie JS, Rowe PJ, Kalnins RM, Mendelsohn FAO. Regional and temporal effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine on dopamine uptake sites in mouse brain. *J Neurol Sci* 1987; 81: 261-71.
26. Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 1985; 36: 2503-8.
27. Ramsay RR, Salach JI, Dadgar J. Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic parkinsonism. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 135: 269-331.
28. Corsini GU, Pintus S, Bocchetta A. A reactive metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine is formed in rat brain in vitro by B monoamine oxidase. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 238: 648-52.
29. Demopoulos HB, Flamin ES, Pietronigro DD. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand* 1980; 492: 91-119.
30. Trush MA, Mimuaugh EG, Gram TE. Activation of pharmacological agents to radical intermediates: Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 3335-46.
31. 김용식, 박찬웅, 윤영란, 윤용하. MPTP와 대사물인 MPP⁺의 도파민 신경 세포에 대한 독성효과에 관한 연구. *대한약리학회지* 1995; 31: 165-77.
32. Corsini GU, Pintus S, Chiueh CC, Weiss JF, Kopin IJ. 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in mice is enhanced by pre-treatment with diethyldithiocarbamate. *Eur J Pharmacol* 1985; 119: 127-8.
33. Yokozawa T, Semo H, Oura H. Effect of ginseng extract on lipid and sugar metabolism: I. Metabolic correlation between liver and adipose tissue. *Chem Pharmacol Bull* 1975; 23: 3095-9.
34. 박미정, 송진호, 김영중. 인삼 Demmarane glycoside류 분획물이 일차 배양한 계배의 뇌세포에 미치는 영향. *약학회지* 1989; 33: 39-45.
35. Mohri T, Chiba K, Yamazaki M, Shimizu M, Morita N. Activation of PC12 cells by lipophilic components of panax ginseng. *Plant Med* 1992; 58: 321-3.
36. Himi T, Saito H, Nishiyama N. Effect of ginseng saponins on the survival cerebral cortex neurons in cell cultures. *Chem Pharmacol Bull* 1989; 37: 481-4.
37. 신정희, 이인란, 조급희, 윤재순. 인삼사포닌이 일산화탄소 중독 및 노화과정에서 생쥐의 뇌신경세포 분포에 미치는 영향. *약학회지* 1992; 36: 269-77.
38. 신정희, 최현진, 강지원, 박혜영, 윤재순. 인삼사포닌이 일산화탄소 중독 및 노화과정에서 생쥐의 뇌에너지 대사물 함량 변화에 미치는 영향. *약학회지* 1992; 36: 278-84.
39. 남기열, 박진규, 진승하등. 인삼성분이 동물의 행동발현에 미치는 영향연구: 모리스 미로 시험에 의한 공간인지능시험. *인삼연초연구원 연구보고서* 1994; 139-52.
40. 김소라, 박미정, 허훈, 이흥숙, 김영중. 일차 배양한 계배 뇌세포 내의 콜린신경에 대한 인삼 Dammarane계 Glycosides의 작용. *약학회지* 1994; 38: 401-9.
41. 남기열, 박진규, 진승하등. 인삼성분이 동물의 행동발현에 미치는 영향연구: 조건 회피반응에 의한 기억유지능 시험. *인삼연초연구원 연구보고서* 1994; 124-8.
42. Zhang JT, Yang Y, Qu ZW, Liu JM. Study on the nootropic mechanism of ginsenoside Rg1 and Rb1. *Proceedings of 6th International Ginseng Symposium* 1993; 69-73.
43. 남기열, 박진규, 진승하등. 인삼성분이 동물의 행동발현에 미치는 영향연구, E-maze를 이용한 홍삼의 예기스와 조사포닌의 항건망증 효과조사. *인삼연초연구원 연구보고서* 1994; 153-9.
44. Benishin CG. Actions of ginsenoside Rb1 on choline uptake in central cholinergic nerve endings. *Neurochem Int* 1992; 21: 1-5.
45. 남기열, 박진규, 진승하등. 인삼성분이 동물의 행동발현에 미치는 영향 연구: 아세틸콜린대사에 미치는 홍삼성분의 in vitro효과. *인삼연초연구원 연구보고서* 1994;

160-6.

46. Yamada T, McGeer PL, Baimbridge KG, Mcgeer EG. Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28k.

Brain Res 1990; 526: 303-7.

47. Willis GL, Donnan GA. Histochemical, biochemical and behavioural consequences of MPTP treatment in C-57 black mice. Brain Res 1987; 402: 269-74.
-