

반복 스트레스에 의한 흰쥐 해마조직내 신경전구세포의 생성과 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA 발현 변동에 미치는 고려홍삼 사포닌의 반복 투여 효과

김동훈 · 객규환* · 이금주 · 김성진 · 신유찬 · 전보권 · 신경호[#]

고려의대 약리학교실, *제주의대 신경과학교실
(2003년 12월 18일 접수, 2004년 4월 2일 수리)

Effects of Korea Red Ginseng Total Saponin on Repeated Unpredictable Stress-induced Changes of Proliferation of Neural Progenitor Cells and BDNF mRNA Expression in Adult Rat Hippocampus

Dong-Hoon Kim, Kyu-Hwan Kwak*, Kuem Ju Lee, Sung Jin Kim
You Chan Shin, Boe-Gwun Chun and Kyung-Ho Shir[#]

Department of Pharmacology, College of Medicine, Korea University, Seoul, South Korea, 136-705

**Department of Neurology, College of Medicine, Cheju National University, Cheju, South Korea, 690-716*

(Received December 18, 2003, Accepted April 2, 2004)

Abstract : Korean red ginseng is known to have anti-stress and memory enhancing effects. Recent studies suggested that stress-induced inhibition of adult neurogenesis in hippocampus may contribute, in part, to decreased negative feedback inhibition of HPA axis. In order to elucidate the mechanism of Korean red ginseng in anti-stress and memory enhancing effects, we observed the effects of repeated treatment of Korean red ginseng total saponin (GTS, 50 mg/kg, i.p.) in response to repeated unpredictable stress for 10 days. Male Sprague-Dawley rats (230 - 260 g) received with either GTS (50 mg/kg, i.p.) or vehicle (1 ml/kg, i.p.) 1 h before stress for 10 days. Rats were injected with bromodeoxyuridine (BrdU, 50 mg/kg, i.p.) 16-18 hr after last stress procedure, and were sacrificed 2 hr later by perfusion. Immunohistochemistry of BrdU was done to measure proliferation of neural progenitor cells in hippocampus, which was used as an index of neurogenesis. Repeated GTS treatment for 10 days increased neurogenesis in subgranular zone area of dentate gyrus (SGZ), but not hilus, compared with vehicle-treated rats. Repeated unpredictable stress did not affect the neurogenesis compared with controls, while repeated GTS treatment increased neurogenesis in SGZ in repeated unpredictable stress-exposed group. BDNF mRNA was also measured in subregions of hippocampus by in situ hybridization. BDNF mRNA expression in CA3 and CA1 pyramidal cell layer was increased by repeated GTS treatment but not in dentate granule cell layer. Repeated unpredictable stresses significantly decreased BDNF mRNA expression in all subregions of hippocampus, but repeated GTS treatment did not prevent stress-induced BDNF mRNA downregulation. Given that repeated GTS treatment increased proliferation of neural progenitor cells in repeated unpredictable stress-exposed rats in the presence of decreased BDNF mRNA expression in dentate granule cell layer, it raise the possibility that BDNF may not play a significant role in GTS-mediated increase of neurogenesis in adult rat hippocampus. Also, these results suggest that repeated GTS treatment increased neurogenesis of SGZ and BDNF mRNA expression, which may account for memory enhancing effect of Korean red ginseng. In addition, repeated GTS treatment appears not to have anti-stress effects in terms of neurotrophin, but GTS-mediated increase of neurogenesis in hippocampus may contribute to increase negative feedback inhibition of HPA axis.

Key words : Korea red ginseng, stress, hippocampus, neurogenesis, BDNF

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-920-6195; (팩스) 02-927-0824
(E-mail) kyungho@korea.ac.kr

서 론

홍삼이 항스트레스 효과와 기억과 학습의 증진작용이 있음¹⁾은 널리 알려져 있으나 그 기전에 관한 연구는 그리 많지 않은 실정이다. 최근 해마의 과립세포층 밑(subgranular zone, SGZ)에서 새로운 신경전구세포(neural progenitor cell)가 생성되며,^{2,3)} 스트레스에 노출되거나 노화와 같이 뇌내 부신피질 호르몬이 증가되는 경우 해마부위에서 신경전구세포의 생성 감소⁴⁾와 해마의존성 기억과 학습이 저하된다고 보고된 바 있다.^{5,6)} 또한 풍요한 환경에 노출된 생쥐에서 생성된 신경전구세포의 생존이 증가되고, 수중 미로찾기 검사(water maze test)에서 공간학습능력이 향상되었다는 보고⁷⁾등에 미루어, 해마-신경전구세포의 생성이 해마와 관련된 기억과 학습에 관여할 것으로 추정되고 있다.

해마는 기억과 학습에서의 역할 외에 스트레스에 의한 hypothalamic-pituitary-adrenal axis(HPA) 활성화에 가장 중요한 음성 되먹이기 기전(negative feedback mechanism)에 관여하는 부위로 알려져 있다.^{8,9)} 예를 들어 반복적인 스트레스에 노출될 경우 해마의 용적이 감소되며¹⁰⁾ 이로 인한 해마의 기능 저하는 결과적으로 HPA 활성화를 유발하여 스트레스 반응이 증가될 수 있다는 여러 가설들이 최근 제기되고 있다.^{11,12)} 반복적인 스트레스에 의하여 관찰되는 해마 용적의 감소는 해마에서 신경전구세포의 생성저하나, CA3 부위의 apical dendrite remodeling에 의하여 유발되는 것으로 추정되고 있다.¹³⁻¹⁵⁾

반복적인 스트레스로 인한 기억과 학습 감퇴 및 해마 신경전구세포의 생성 저하에 여러 인자가 관여하지만, 그 중에서도 brain-derived neurotrophic factor(BDNF)가 중요한 역할을 할 것으로 추정되고 있다. 이는 BDNF가 해마부위에 다량 존재하는 신경성장인자로,¹⁶⁾ 신경전구세포의 생성에 관여하며,¹⁷⁻²⁰⁾ 스트레스를 가할 경우 BDNF의 발현이 감소되는 것으로 알려져 있기 때문이다.²¹⁾ 현재까지의 여러 실험 결과 등을 고려할 때 해마 부위에서의 신경전구세포의 생성과

BDNF의 발현에 관한 연구는 홍삼에 의한 항스트레스 효과나 기억 및 학습 증진작용을 이해하는데 매우 중요할 것으로 생각되지만, 이에 관한 연구는 그리 많지 않은 실정이다. 본 연구에서는 반복적 스트레스를 가하면서 고려홍삼 사포닌을 전처치시 해마조직내 신경전구세포의 생성과 BDNF mRNA의 변동에 미치는 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 고려 홍삼 사포닌 재료

고려홍삼 사포닌은 한국인삼공사에서 제공한 시료를 이용하여 실험에 사용하였다.

2. 실험동물과 고려홍삼 사포닌의 투여

실험은 230~260 g 내외의 흰쥐 수컷 (Sprague-Dawley)을 사용하여 시작하며, 실험 1주일 전에 삼육 실험동물에서 받아 이 곳 환경에 적응기간을 거쳤다. 실험동물은 light dark cycle (light 07 AM-07 PM)에 맞추어 조절하였고, 먹이와 물은 마음대로 먹게 하였다. 고려홍삼 사포닌은 50 mg/kg의 용량으로 증류수에 녹여 매일 첫 번째 스트레스 1시간 전에 투여하였으며, 오전에 스트레스가 없는 경우 오전 10시경에 복강내로 주사하였다. 대조군은 증류수(1 ml/kg)를 주사하여 비교하였다. 실험군은 스트레스에 노출시키지 않은 대조군(n=6)과 반복스트레스에 노출 시킨 반복 스트레스군(n=6)으로 구분하여 실험하였으며, 반복 스트레스는 아래와 같이 부하하였다.

3. 반복 스트레스군(Repeated Unpredictable Stress, 10xUS)

아래의 스케줄과 같이 스트레스를 종류를 달리해서 하루 2번씩 10일간 스트레스를 가하며 이들 스트레스 방법의 효용성은 이미 다른 논문에서 보고된 바 있다.^{22, 23)}

Day	Time	Type of Stress	Duration	Time	Type of Stress	Duration
Day 1	12:00 PM	Cage rotation	50 min	1:00 PM	Swim stress (28~32°C)	4 min
Day 2	11:00 AM	Cold (4°C) isolation	60 min	7:00 PM	Lights on (overnight)	19 hours
Day 3	12:00 PM	Lights off	3 hours	3:00 PM	Cold isolation	15 min
Day 4	7:00 PM	Cage rotation	50 min	7:00 PM	Food/water deprivation	overnight
Day 5	1:00 PM	Swim stress (28~32°C)	3 min	7:00 PM	Isolation housing	overnight
Day 6	11:00 AM	Restraint stress	60 min	3:00 PM	Lights off	2 hours
Day 7	10:00 AM	Swim stress (28~32°C)	4 min	4:00 PM	Restraint stress	60 min
Day 8	7:00 PM	Lights on	overnight	7:00 PM	Food/water deprivation	overnight
Day 9	10:00 AM	Cage rotation	20 min	7:00 PM	Lights on	overnight
Day 10	7:00 PM	Isolation housing	overnight	7:00 PM	Food/water deprivation	overnight

4. 뇌조직의 고정

서로 다른 스트레스와 함께 10일 동안 증류수, 고려홍삼 사포닌등을 투여하고 16-18시간후 흰쥐에 bromodeoxyuridine(BrdU, 50 mg/kg, Boehringer Mannheim, DRG)를 0.1 M phosphate buffered saline(PBS)에 녹여 복강내로 주사하고 2시간 후에 pentobarbital sodium(100 mg/kg)을 주사하여 마취시켰다. 생리식염수, 4.0% paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffer(PPB)를 각각 3분, 20~30 분간 관류하고 뇌를 적출하여 관류액 (PPB)과 20% sucrose/PPB에 각각 12시간, 24시간씩 후고정 시킨 다음 microtome (Microm International GMBH, DRG)을 사용하여 30 μ m 두께의 조직 절편을 얻었다. BrdU주사 2시간 후에 흰쥐를 고정한 것은 BrdU를 섭취한 신경전구세포가 새로 체세포분열을 시작하는데 최소 2시간 이상 소요되기 때문에 BrdU 주사하고 2 시간 후에 흰쥐를 고정하는 것은 신경전구세포의 증식 (proliferation)을 측정하는데 적절한 시간으로 보고된 바 있다.²⁴⁾

5. BrdU 면역조직염색

조직절편을 0.5% (v/v) Triton X-100/PBS에 1시간 동안 처리하고, pronase E (3 μ g/ml)/PBS 용액에 37°C에서 20분, 실온에서 다시 2 N HCl로 20분 반응시킨 다음 PBS로 10분씩 두번 세척하였다. 1% H₂O₂/PBS용액에 반응시켜 내인성 페록시다제(endogenous peroxidase)를 차단시키고, PBS-T(PBS/0.1% Triton X-100) 용액으로 10분씩 세번 세척한 다음 10% normal horse serum/PBS-T 용액에 1시간 반응시켜 비특이적 염색을 감소시켰다. 조직절편을 일차항체 (PBS-T, 0.05% bovine serum albumin, mouse monoclonal 1:1000, Boehringer Mannheim)로 4°C에서 36시간, biotin으로 label 된 이차항체 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, 1:200 in PBS)로 1시간 처리한 다음 avidin-biotin-horseradish peroxidase(Vectastain Elite ABC, Vector) 용액에 1시간 동안 반응시켰다. PBS 용액으로 5분씩 세번 세척하고 3,3-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) 용액과 H₂O₂ 용액에 반응시켜 발색을 유도하였다. PBS로 세척한 다음 gelatinized glass slide에 조직을 부착시키고 cresyl violet으로 다시 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

6. 정량과 통계적 처리

해마부위의 전 부위를 360 μ m 간격으로 자르고 BrdU 조직면역염색을 시행한 다음 실험 동물당 최소한 6 - 9 개의 조직절편(각 12~18개의 해마조직)을 얻었다. 각 실험 동물에서 신경교세포의 전구세포(precursor)로 추정되는 세포나 endothelial cell로 추정되는 세포는 제외하고 BrdU에 염색된

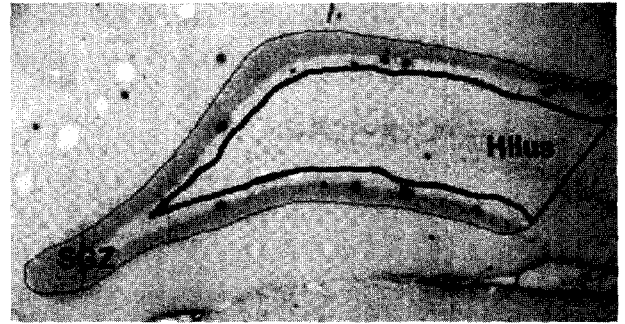


Fig. 1. BrdU-immunostaining in the dentate gyrus of hippocampus. SGZ, subgranular zone of hippocampus; Hilus; hilus area of hippocampus.

세포의 수를 우측과 좌측 해마 부위를 따로 나누어 측정하였으며, 이를 NIH image analysis program(version 1.6)를 사용하여 구한 해마부위의 면적으로 나누어 그 밀도(BrdU-immunolabeled cells/mm²)를 구하였다. 이때 SGZ 부위는 dentate granule cell layer와 동일한 두께의 SGZ를 포함한 면적을 구하고 hilus 부위는 해마의 superior blade와 inferior blade가 만나는 가상선을 긋고 SGZ 부위 안쪽의 면적을 구하였다(Fig. 1). 각 처치군 간의 통계처리는 SPSS program(SPSS, Inc., Chicago, USA)을 사용하여 Student's t-test나 two-way ANOVA test를 시행하였다. Two-way ANOVA test에서 유의한 경우 one-way ANOVA test와 Tukey-HSD test를 수행하여 사후 검정하였으며, p<0.05를 유의한 결과로 산정하였다.

7. In Situ Hybridization

흰쥐를 단두하고 뇌를 적출한 다음 dry ice로 미리 냉각한 isopentane에 담겨 얼린후 cryostat으로 12 μ m 절편을 만들어 젤라틴 슬라이드에 붙였다. 이렇게 준비된 조직절편들을 phosphate-buffered saline(PBS)로 두차례 헹군 다음 acetylation 용액(0.25% acetic anhydride/0.1 M triethanolamine, pH 8.0)에 10분간 처리한 후 탈수 및 탈지과정[70% ethanol(1분), 80% ethanol(1분), 95% ethanol(2분), 100% ethanol(1분), chloroform(5분), 100% ethanol(1분), 95% ethanol (1분)]을 거쳐 공기 중에서 말린 후 -70°C 냉동고에 보관하였다. DNA template에 promoter에 특이적으로 작용하는 RNA polymerase와 ³⁵S 표지된 UTP(Uridine 5'-triphosphate, Amersham Biosciences, Piscataway, USA)를 이용해 in vitro transcription을 시행한 다음 riboprobe를 얻었다. 표지된 probe가 1 \times 10⁷cpm/ml 함유된 hybridization 완충액을 각 slide당 100 μ l씩 부하한 다음 coverglass로 덮고 55°C에서 16시간 반응시켰다. Hybridization이 끝난 후

상온에서 2×SSC 용액에 담귀 coverglass를 제거하고 2×SSC 용액에 5분씩 4번 세척한 다음 42°C에서 RNase 용액(20 µg/ml RNase A, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 30분간 반응시켰다. RNase 용액에 2×SSC 용액에 5분간 두 번 행구고 1×SSC와 2×SSC로 한번씩 행구 후 60°C에서 0.1×SSC 용액으로 30분간 수세하였다. 수세가 끝난 조직 절편들은 ethanol로 탈수시키고 건조시킨 다음 β-max hyperfilm(Amersham Biosciences, Piscataway, USA)에 C¹⁴-standard slide와 함께 5일간 노출시켰다. 실험결과는 autoradiogram을 CCD카메라로 이미지를 잡은 다음 NIH image analysis program(version 1.60)을 사용하여 분석하였다. 각 처치군 간의 통계처리는 SPSS program(SPSS, Inc., Chicago, USA)을 사용하여 Student's t-test나 two-way ANOVA test를 시행하였다. Two-way ANOVA test에서 유의한 경우 one-way ANOVA test와 Tukey-HSD test를 수행하여 사후 검정하였으며, p<0.05를 유의한 결과로 인정하였다.

결 과

1. 해마 신경전구세포의 생성에 미치는 고려홍삼 사포닌의 반복 투여 효과

고려홍삼 사포닌의 반복 투여시 해마의 부위별 신경전구세포의 생성에 미치는 효과를 살펴보기 위하여, 스트레스에 노출되지 않은 실험군에서 고려홍삼 사포닌(50 mg/kg)과 매개체인 증류수(2 ml/kg)를 매일 1 회씩 복강내로 10일간 투여한

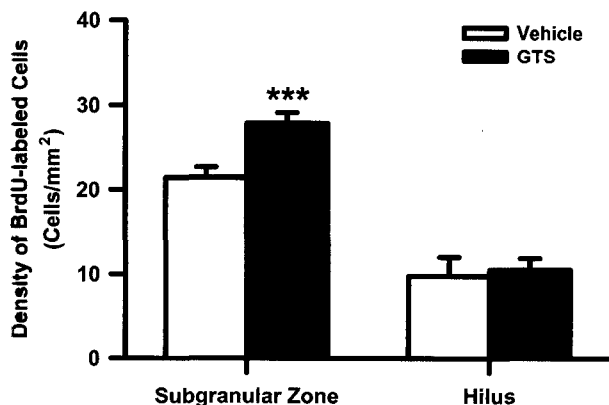


Fig. 2. The mean density of BrdU-stained cells in subgranular zone (SGZ) and hilus of rats treated with either ginseng total saponin (GTS, solid bars) or vehicle (open bars). Results are expressed as the density of BrdU-labeled cells and are mean (\pm SEM in the each hippocampus area (n=12 hippocampi per group)). ***p<0.01 compared with vehicle-treated control (Student's *t*-test)

다음 해마 조직의 SGZ와 hilus 부위에서 신경전구세포의 생성을 관찰하였다. 관찰 결과 고려홍삼 사포닌 반복 처치시 SGZ 부위에서 증류수를 반복 투여한 대조군에 비하여 유의하게 증가되었으나(29.9%, p<0.01), hilus 부위에서는 유의한 변동을 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 따라서 고려홍삼 사포닌의 반복투여나 반복 스트레스에 의한 해마 신경전구세포의 변동은 주로 해마의 SGZ 부위에서 관찰하였다.

2. 반복 스트레스에 의한 해마 신경전구세포의 변동에 미치는 고려홍삼 사포닌의 반복 투여 효과

고려홍삼 사포닌과 증류수를 스트레스 전에 주사하고 스트레스에 노출되지 않은 대조군과 서로 다른 종류의 스트레스를 10일간 가한 반복 스트레스 실험군(10×US)의 SGZ 부위에서 신경전구세포의 생성을 반복 스트레스와 고려홍삼 사포닌 전처치를 주효과로 하여 two way ANOVA(스트레스×고려홍삼 사포닌 처치) 방법을 사용하여 분석하였다. 고려홍삼 사포닌 전처치시 증류수 투여 대조군에 비하여 신경전구세포의 생성이 유의하게 증가되었으나($F_{(1,44)}=30.93$, p<0.01), 반복 스트레스에 의하여 유의한 변동은 관찰할 수 없었다. 또한 반복 스트레스와 고려홍삼 사포닌 전처치 유형간에 유의미한 상호작용(interaction)은 관찰할 수 없었다. One-way ANOVA와 Tukey HSD 방법을 사용한 사후검정에서 스트레스에 노출되지 않은 실험군과 반복 스트레스에 노출된 실험군에서 증류수 투여 대조군에 비하여 고려홍삼 사포닌 반복 처치시 각각 29.9% (p<0.01)와 29.6%(p<0.01)씩 유의하게 증가되었다 ($F_{(3,44)}=10.34$, p<0.01, Fig. 3).

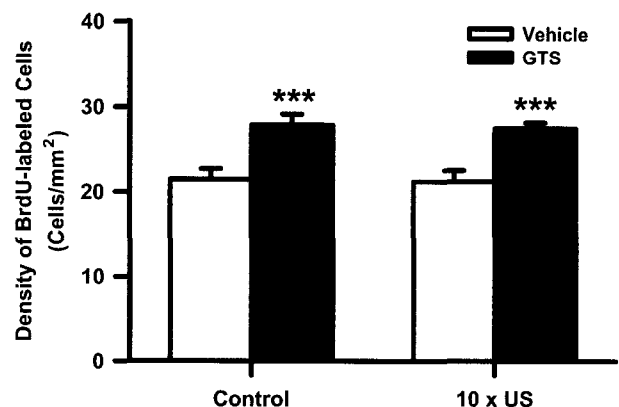


Fig. 3. The mean density of BrdU-stained cells in subgranular zone area of rats after repeated unpredictable stress (10 x US) treated with either GTS (solid bars) or vehicle (open bars). Results are expressed as the density of BrdU-labeled cells in SGZ and are mean (\pm SEM (n=12 hippocampi per group)). ***p<0.01 compared with vehicle-treated control (two-way ANOVA with Tukey HSD *post hoc* test)

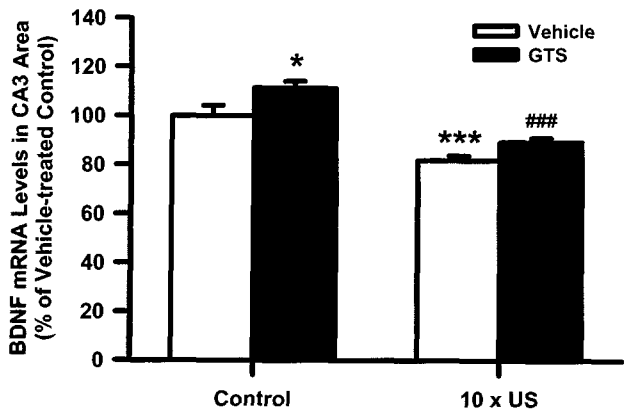


Fig. 4. In situ hybridization analysis of BDNF mRNA in CA3 of hippocampus. The results are expressed as percent of vehicle-treated control and are the mean (\pm S.E.M. of 6 separate animals treated with GTS (solid bars) or vehicle (open bars). * $p < 0.05$ and *** $p < 0.01$ compared with vehicle-treated control (two-way ANOVA with Tukey HSD post hoc test). ### $p < 0.01$ compared with GTS-treated control (two-way ANOVA with Tukey HSD post hoc test)

3. 해마 CA3 부위내 BDNF mRNA의 발현에 미치는 고려홍삼 사포닌 및 반복 스트레스의 효과

고려홍삼 사포닌과 증류수를 스트레스 전에 주사하고 스트레스에 노출되지 않은 대조군과 반복 스트레스 실험군(10x US)에서 해마 CA3 부위의 BDNF mRNA의 변동을 관찰하였다. 고려홍삼 사포닌 전처치와 반복 스트레스를 주효과로 하여 two way ANOVA 방법을 사용하여 관찰한 결과, 고려홍삼 사포닌 전처치($F_{(1,42)} = 55.33, p < 0.01$)와 반복 스트레스($F_{(1,42)} = 11.98, p < 0.01$)에 의하여 해마 CA3 부위의 BDNF mRNA는 유의하게 변동되었으나, 고려홍삼 사포닌과 반복 스트레스 유형간 유의한 상호작용은 관찰할 수 없었다(Fig. 4). One-way ANOVA와 Tukey-HSD 사후검정을 시행한 결과 스트레스에 노출되지 않은 대조군의 경우 고려홍삼 사포닌 반복 처치시 증류수 투여 대조군에 비하여 BDNF mRNA가 적지만 유의하게 증가되었으나(11.4%, $p < 0.05$), 반복 스트레스 실험군에서는 증가되는 경향만을 관찰하였다(8.98%, $p > 0.05$). 스트레스에 노출되지 않은 대조군에 비하여 반복 스트레스에 노출된 실험군의 경우 BDNF mRNA가 유의하게 감소되었으나(-18.1%, $p < 0.01$), 이와 같은 결과는 고려홍삼 사포닌 반복 전처치에 의하여 크게 영향 받지 않았다(Fig. 4).

4. 해마 CA1 부위내 BDNF mRNA의 발현에 미치는 고려홍삼 사포닌 및 반복 스트레스의 효과

고려홍삼 사포닌과 증류수를 스트레스 전에 주사하고 스트레스에 노출되지 않은 대조군과 반복 스트레스 실험군(10x US)에서 해마 CA1 부위의 BDNF mRNA의 변동을 관찰하

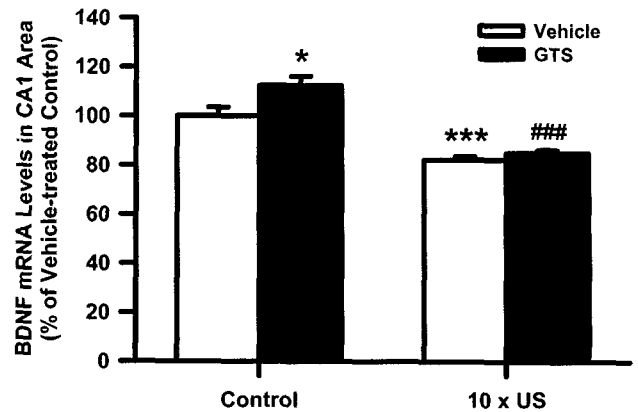


Fig. 5. In situ hybridization analysis of BDNF mRNA in CA1 of hippocampus. The results are expressed as percent of vehicle-treated control and are the mean (\pm S.E.M. of 6 separate animals treated with GTS (solid bars) or vehicle (open bars). * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ compared with vehicle-treated control and ### $p < 0.01$ compared with GTS-treated control, respectively (two-way ANOVA with Tukey HSD post hoc test)

였다. 고려홍삼 사포닌 전처치와 반복 스트레스를 주효과로 하여 two way ANOVA 방법을 사용하여 관찰한 결과 고려홍삼 사포닌 전처치($F_{(1,42)} = 8.16, p < 0.01$)와 반복 스트레스($F_{(1,42)} = 73.61, p < 0.01$)에 의하여 해마 CA1 부위의 BDNF mRNA는 유의하게 변동되었으나 고려홍삼 사포닌과 반복 스트레스 유형간 유의한 상호작용은 관찰할 수 없었다(Fig. 5). One-way ANOVA와 Tukey-HSD 사후검정을 시행한 결과 스트레스에 노출되지 않은 대조군의 경우 고려홍삼 사포닌 반복 처치시 증류수 투여 대조군에 비하여 BDNF mRNA가 유의하게 증가되었으나(12.4%, $p < 0.05$), 반복 스트레스 실험군에서는 큰 변동을 관찰할 수 없었다. 스트레스에 노출되지 않은 대조군에 비하여 반복 스트레스에 노출된 실험군의 경우 BDNF mRNA가 유의하게 감소되었으며(-17.7%, $p < 0.01$), 이와 같은 결과는 고려홍삼 사포닌 반복 전처치에 의하여 크게 영향 받지 않았다(Fig. 5).

5. 해마 granule cell layer (GCL) 부위내 BDNF mRNA의 발현에 미치는 고려홍삼 사포닌 및 반복 스트레스의 효과

고려홍삼 사포닌과 증류수를 스트레스 전에 주사하고 스트레스에 노출되지 않은 대조군과 반복 스트레스 실험군(10x US)에서 해마 과립세포층 부위의 BDNF mRNA의 변동을 관찰하였다. 고려홍삼 사포닌 전처치와 반복 스트레스를 주효과로 하여 two way ANOVA 방법을 사용하여 관찰한 결과 고려홍삼 사포닌 전처치에 의하여 유의한 변동을 관찰할 수 없었으나 반복 스트레스에 의하여 해마 GCL 부위의 BDNF

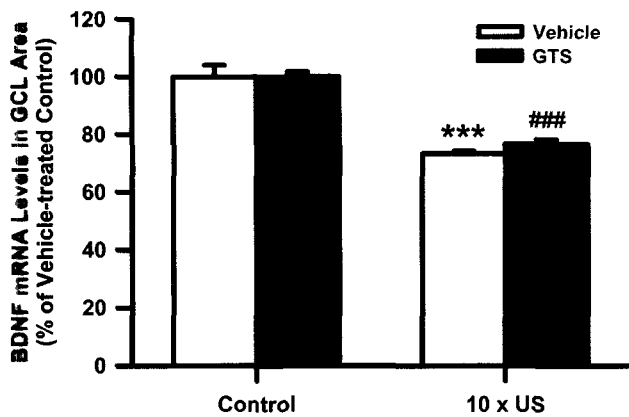


Fig. 6. In situ hybridization analysis of BDNF mRNA in granule cell layer (GCL) of hippocampus. The results are expressed as percent of vehicle-treated control and are the mean (\pm S.E.M. of 6 separate animals treated with GTS (solid bars) or vehicle (open bars). *** $p < 0.01$ and ### $p < 0.01$ compared with vehicle-treated control and GTS-treated control, respectively (two-way ANOVA with Tukey HSD *post hoc* test)

mRNA는 유의하게 변동되었다($F_{(1,42)} = 128.17$, $p < 0.01$, Fig. 6). One-way ANOVA와 Tukey-HSD 사후검정을 시행한 결과 증류수 투여 군에서 반복 스트레스에 노출시 스트레스 노출 전에 비하여 BDNF mRNA의 발현이 유의하게 감소되었다 (-26.5%, $p < 0.01$). 또한 고려홍삼 사포닌 처치군에서도 반복 스트레스에 노출시 BDNF mRNA의 발현이 스트레스에 노출되지 않은 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다(-23.2%, $p < 0.01$). 이와 같은 결과들은 반복 스트레스에 의하여 해마 과립세포층 부위에서의 BDNF mRNA 발현 저하에 고려홍삼 사포닌 전처치가 큰 영향을 미치지 않는 것으로 추정된다.

고 찰

홍삼이 항스트레스 효과 기역과 학습의 증진작용이 있음은 널리 알려져 있으나 그 기전은 확실하지 않은 실정이다. 본 연구에서는 홍삼의 주요 성분 중 하나인 고려홍삼 사포닌 반복 투여후 흰쥐의 해마조직내 신경전구세포의 생성에 미치는 효과와 신경전구세포의 생성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 BDNF mRNA의 변동을 관찰하였다. 또한 반복적 스트레스를 가하면서 고려홍삼 사포닌을 전처치시 해마조직내 신경전구세포의 생성과 BDNF mRNA의 변동에 미치는 효과를 관찰하였다.

해마에서의 신경전구세포의 생성은 스트레스에 노출되거나 노화에 의하여 감소되며, 이는 혈중 부신피질호르몬의 상승과 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되고 있다. 예를 들어 포유

동물에 심리적인 스트레스를 주었을 경우 혈중 부신피질호르몬이 증가되고, 아울러 신경전구세포의 생성이 감소된다.²⁵⁻²⁷ 부신을 제거하여 부신피질호르몬의 유리를 차단할 경우 신경전구세포의 생성이 증가되며,²⁸ 부신피질호르몬을 생체리듬과 동일하게 투여시 신경전구세포의 생성은 정상 수준으로 회복되는 것으로 알려져 있다.²⁹ 또한 노화에 따른 신경전구세포의 생성저하³⁰⁻³²에 부신피질호르몬이 관여하는 것으로 추정되고 있는데, 이는 노화에 의한 신경전구세포의 감소가 부신을 절제시 정상화된다는 연구 보고 등에 의하여 뒷받침되고 있다.^{33,34} 그러나 새로 생성되는 신경전구세포에 부신피질호르몬의 수용체인 glucocorticoid receptor(GR)나 mineralocorticoid receptor(MR)을 가지고 있지 않아 직접적으로 부신피질호르몬과 결합하여 세포 분화나 성장에 영향을 줄 수 없기 때문에,³⁵ 다른 요소들이 관여하는 것으로 추정되고 있다.

본 연구에서 흰쥐에 고려홍삼 사포닌을 반복 투여시 증류수 반복 투여군에 비하여 해마 SGZ 부위에서 신경전구세포의 생성을 유의하게 상승시켰다. 고려홍삼 사포닌 반복 처치시의 신경전구세포의 생성에 미치는 효과는 hilus 부위보다 주로 SGZ 부위에서 선택적으로 유발되었다. 또한 반복 스트레스에 노출시 해마 SGZ 부위에서 신경전구세포의 생성은 스트레스에 노출되지 않은 실험군에 비하여 감소되지 않았다. 이와 같은 결과는 최근 Ginseng radix를 흰쥐에 10일 동안 투여시 해마내 신경전구세포의 생성이 대조군에 비하여 유의한 변동이 없었다는 Lim 등의 보고³⁶와는 다소 상이한 결과이다. 본 실험결과와의 차이점은 확실하지 않지만 홍삼 성분의 분획 성분이나, 실험 동물의 무게의 차이에 기인된 것으로 생각된다. 또한 본 실험의 경우 해마 부위 중 hilus를 제외하고, 주로 신경전구세포의 생성이 유발되는 과립세포층과 그 밑의 부위를 포함한 SGZ 부위에서 측정하였으나 Lim 등의 보고에서는 전체 dentate gyrus를 측정하였기 때문에 결과가 다소 다르게 나올 가능성을 배제할 수 없다. 한편 본 연구에서는 기존에 보고된 단기간 스트레스에 의하여 해마 신경전구세포의 생성 억제와 달리 매개체인 증류수를 투여한 실험군에서 반복 스트레스에 노출시 SGZ 부위에서 신경전구세포의 생성이 감소되지 않았다. 이와 같은 결과는 흰쥐를 반복 스트레스에 노출시 스트레스 반응에 익숙해져서 혈중 부신피질호르몬의 상승이 약화되거나 또는 증류수 반복 투여에 의하여 혈중 부신피질호르몬이 증가되어 반복 스트레스 실험군과 차이가 없는 지 확실하지 않다.

고려홍삼과 부신피질호르몬과 연관된 논문을 살펴보면, 생쥐에 고려홍삼 사포닌 투여시 혈중 부신피질호르몬은 일시적으로 상승되지만, 스트레스에 의한 혈중 부신피질호르몬의 상승을 차단한다고 알려져 있다.³⁷ 또한 외부 스트레스에 의한

혈중 부신피질호르몬의 증가도 고려홍삼 사포닌에 의하여 억제되는 것으로 보고된 바 있다.³⁸⁾ 고려홍삼 사포닌 투여시 스트레스에 의한 혈중 부신피질호르몬의 상승을 차단하는 기전은 확실하지는 않지만 고려홍삼 사포닌이 ACTH의 분비를 감소시켜 부신피질호르몬의 분비를 억제하는 것보다는 분비된 ACTH에 의한 부신에서의 부신피질호르몬의 생성과 유리를 차단하여 작용이 나타나는 것으로 추정되고 있다.³⁷⁾

본 실험에서 고려홍삼 사포닌을 반복 투여시 SGZ 부위내 신경전구세포의 생성을 촉진하는데, 그 기전은 확실하지 않은 실정이다. 또한 고려홍삼 사포닌을 전처치하면서 반복스트레스에 노출시 SGZ 부위내 신경전구세포의 생성이 유의하게 증가되는데, 현재까지의 연구결과와 같이 스트레스에 의한 혈중 부신피질호르몬의 증가가 고려홍삼 사포닌 반복 처치에 의하여 억제되더라도 정상치 이하로 내려갈 가능성은 적기 때문에 신경전구세포의 생성에 부신피질호르몬 외에 다른 요인들이 관여할 가능성을 시사한다. 예를 들어, 반복적인 스트레스와 병행하여 항우울효과가 관찰되는 transcranial magnetic stimulation(TMS)을 처치시 혈중 부신피질호르몬의 증가를 억제하여 정상치를 유지하였으나 신경전구세포의 생성은 감소되는 것으로 보고된 바 있다.³⁹⁾ 또한 노화가 진행되면서 혈중 부신피질호르몬은 서서히 증가되지만 신경세포의 생성은 한 순간에 급격히 감소하게 되므로 반응 시간면에서 다소 차이가 있는 것으로 보고되고 있다.⁴⁰⁾ 이와 같은 결과들을 고려해볼 때 혈중 부신피질호르몬이 신경전구세포의 생성에 중요한 역할을 하지만 스트레스에 의한 신경전구세포의 생성 감소에 혈중 부신피질호르몬 외에 다른 요소들이 관여할 가능성이 커지고 있다. 한편, 흰쥐의 해마 신경세포를 배양하여 고려홍삼 사포닌을 처치하였을 경우, NMDA에 의한 calcium ion의 유입을 억제하여 NMDA 수용체의 활성이 저하될 수 있음이 보고되었다.⁴¹⁾ 고려홍삼 사포닌에 의한 NMDA 수용체의 차단 효과 또한 신경 세포의 생성을 증가시킬 수 있으며, 고려홍삼 사포닌에 의한 해마 부위의 신경전구세포의 생성증가는 홍삼에 의한 기억과 학습 증진 작용¹⁾에 기여할 것으로 추정된다.

BDNF는 해마부위에 다량 존재하는 신경성장인자로,¹⁶⁾ 신경전구세포의 생성에 관여하며,¹⁷⁻²⁰⁾ 신경 세포의 생존과 분화를 증가시키는 것으로 알려져 있다.^{42, 43)} 본 연구에서 해마 부위의 CA3와 CA1 부위에서 고려홍삼 사포닌의 반복 처치에 의하여 BDNF mRNA가 유의하게 증가되었다. 또한 반복 스트레스에 노출시 해마의 CA3, CA1, 과립세포층 부위에서 BDNF mRNA가 유의하게 감소되었으나, 그 경향은 고려홍삼 사포닌 반복 처치에 의하여 차단되지 않았다. 고려홍삼 사포닌 반복 투여에 의하여 해마의 CA3, CA1 부위에서 선택적

으로 BDNF mRNA가 증가되는 기전은 아직 확실하지 않다. 본 연구에서 반복적 고려홍삼 사포닌 투여에 의하여 과립세포층 부위에서 BDNF mRNA의 발현이 증가되지 않았음에도 불구하고, SGZ 부위에서 신경전구세포의 생성이 증가된 것을 미루어 볼 때 고려홍삼 사포닌에 의한 신경전구세포의 생성 증가에 BDNF 외에 다른 신경성장인자가 관여할 가능성이 크다. 특히 홍삼 성분내 basic fibroblast growth factor (bFGF)와 유사한 화합물이 발견되고 있고,⁴⁴⁾ 피하로 bFGF를 투여하여도 소뇌에서 경전구세포의 생성을 촉진하는 점에 미루어 bFGF는 혈뇌장벽 (blood brain barrier)를 통과하는 것으로 추정된다.⁴⁵⁾ bFGF는 흰쥐에서 생후 초기에는 피하로 주사시 해마에서 신경전구세포의 생성을 촉진시키지만 성숙한 흰쥐에서는 이 같은 경향이 관찰되지 않는 것으로 알려져 있다⁴⁶⁾ 그러나 bFGF가 결손된 생쥐에서 해마의 과립세포층의 신경세포가 30% 이상 감소된 결과는 bFGF가 해마 신경전구세포의 생성에 필요한 성장인자로 추정되고 있기 때문에,⁴⁷⁾ 앞으로 홍삼의 bFGF의 성분과 신경세포의 성장에 관하여 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다. 한편, 해마 조직의 SGZ에서 생성된 전구 세포들은 과립세포층으로 이동하여 신경세포와 신경교세포로 분화된다. 이러한 과정 중에 새로이 생성된 세포들은 신경 연결과 수지상 돌기를 발생시키며 CA3 지역으로 축색돌기를 확장하여 활동 전위를 가지게 된다. 고려홍삼 사포닌에 의하여 BDNF mRNA가 해마 CA3와 CA1 부위에서 선택적으로 증가한 결과는, BDNF가 이끼섬유(mossy fiber) sprouting에 관여한다는 보고⁴⁸⁾ 등에 미루어, CA3 부위에서의 축색돌기의 증가에 BDNF가 관여할 수 있음을 시사하고 있다. 또한 CA1 부위에서의 BDNF의 증가는 long term potentiation(LTP)에 관여하여,⁴⁹⁻⁵¹⁾ 기억 및 학습증진 작용에 BDNF가 관여할 가능성을 제기하고 있다. 그러나 고려홍삼 사포닌 전처치시 반복 스트레스에 의한 BDNF mRNA의 발현 감소를 차단하지 못하기 때문에 반복 스트레스에 의한 기억 및 학습 저하를 홍삼 성분이 억제할 수 있는지는 확실하지 않다.

요 약

본 연구 결과를 통하여 홍삼 성분인 고려홍삼 사포닌을 반복 투여시 흰쥐 해마 SGZ 부위의 신경전구세포 생성이 유의하게 증가되었으며, 이와 같은 경향은 반복 스트레스에 노출되어도 유지되었다. 또한 스트레스를 가하지 않은 흰쥐에서 고려홍삼 사포닌 반복 투여시 해마 CA3와 CA1 부위에서 BDNF mRNA의 발현이 증가되었으나, 반복 스트레스를 가한 흰쥐의 CA3와 CA1 부위에서 BDNF mRNA의 감소를 차단

하지는 못하였다. 따라서 고려홍삼 사포닌 반복 처치에 의한 해마 신경전구세포의 생성에 BDNF 보다는 다른 요인이 관여할 가능성이 클 것으로 추정된다.

감사의 말씀

본 연구는 1999년도 한국인삼공사의 고려인삼연구과제 연구비로 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Petkov, V. D. and Mosharrof, A. H. : Effects of standardized ginseng extract on learning, memory and physical capabilities. *Am J Chin Med.* **15**(1-2), 19-29 (1987).
2. Altman, J. and Das, G. D. : Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* **124**(3), 319-335 (1965).
3. Gould, E. and McEwen, B. S. : Neuronal birth and death. *Curr Opin Neurobiol.* **3**(5), 676-682 (1993).
4. Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A. and Fuchs, E. : Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* **17**(7), 2492-2498 (1997).
5. Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M. and Abrous, D. N. : Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**(20), 11032-11037 (2000).
6. Fuchs, E., Flugge, G., Ohl, F., Lucassen, P., Vollmann-Honsdorf, G. K. and Michaelis, T. : Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus. *Physiol Behav.* **73**(3), 285-291 (2001).
7. Kempermann, G., Kuhn, H. G. and Gage, F. H. : More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* **386**(6624), 493-495 (1997).
8. Herman, J. P. and Cullinan, W. E. : Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* **20**(2), 78-84 (1997).
9. Jacobson, L. and Sapolsky, R. : The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev.* **12**(2), 118-134 (1991).
10. Arango, C., Breier, A., McMahon, R., Carpenter, W. T., Jr. and Buchanan, R. W. : The relationship of clozapine and haloperidol treatment response to prefrontal, hippocampal, and caudate brain volumes. *Am J Psychiatry.* **160**(8), 1421-1427 (2003).
11. Duman, R. S., Heninger, G. R. and Nestler, E. J. : A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.* **54**(7), 597-606 (1997).
12. McEwen, B. S., Magarinos, A. M. and Reagan, L. P. : Studies of hormone action in the hippocampal formation: possible relevance to depression and diabetes. *J Psychosom Res.* **53**(4), 883-890 (2002).
13. Jacobs, B. L., Praag, H. and Gage, F. H. : Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry.* **5**(3), 262-269 (2000).
14. Duman, R. S., Malberg, J., Nakagawa, S. and D'Sa, C. : Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry.* **48**(8), 732-739 (2000).
15. Duman, R. S., Malberg, J. and Thome, J. : Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biological Psychiatry.* **46**(9), 1181-1191 (1999).
16. Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M. and Varon, S. : Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci.* **17**(7), 2295-2313 (1997).
17. Kitamura, T., Mishina, M. and Sugiyama, H. : Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Neurosci Res.* **47**(1), 55-63 (2003).
18. Lee, J., Duan, W. and Mattson, M. P. : Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem.* **82**(6), 1367-1375 (2002).
19. Katoh-Semba, R., Asano, T., Ueda, H., Morishita, R., Takeuchi, I. K., Inaguma, Y. and Kato, K. : Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *Faseb J.* **16**(10), 1328-1330 (2002).
20. Kirschenbaum, B. and Goldman, S. A. : Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**(1), 210-214 (1995).
21. Smith, M. A., Makino, S., Kvetnansky, R. and Post, R. M. : Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann NY Acad Sci.* **771**, 234-239 (1995).
22. Ortiz, J., Fitzgerald, L. W., Lane, S., Terwilliger, R. and Nestler, E. J. : Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. *Neuropsychopharmacology.* **14**(6), 443-452 (1996).
23. Ni, Y. G., Gold, S. J., Iredale, P. A., Terwilliger, R. Z., Duman, R. S. and Nestler, E. J. : Region-specific regulation of RGS4 (Regulator of G-protein-signaling protein type 4) in brain by stress and glucocorticoids: in vivo and in vitro studies. *J Neurosci.* **19**(10), 3674-3680 (1999).

24. Eisch, A. J. and Nestler, E. J. : To be or not to be: adult neurogenesis and psychiatry. *Clinical Neuroscience Research*. **2**(1-2), 93-108 (2002).
25. Tanapat, P., Galea, L. A. and Gould, E. : Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int J Dev Neurosci*. **16**(3-4), 235-239 (1998).
26. Cameron, H. A., Tanapat, P. and Gould, E. : Adrenal steroids and N-methyl-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience*. **82**(2), 349-354 (1997).
27. Tanapat, P., Hastings, N. B., Rydel, T. A., Galea, L. A. and Gould, E. : Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J. Comp Neurol*. **437**(4), 496-504 (2001).
28. Cameron, H. A. and Gould, E. : Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*. **61**(2), 203-209 (1994).
29. Nacher, J., Alonso-Llosa, G., Rosell, D. R. and McEwen, B. S. : NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus. *Neurobiology of Aging*. **24**(2), 273-284 (2003).
30. Kempermann, G., Kuhn, H. G. and Gage, F. H. : Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neurosci*. **18**(9), 3206-3212 (1998).
31. Kempermann, G., Gast, D. and Gage, F. H. : Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol*. **52**(2), 135-143 (2002).
32. Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. and Gage, F. H. : Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci*. **16**(6), 2027-2033 (1996).
33. Cameron, H. A. and McKay, R. D. : Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci*. **2**(10), 894-897 (1999).
34. Montaron, M. F., Petry, K. G., Rodriguez, J. J., Marinelli, M., Arousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M. and Abrous, D. N. : Adrenalectomy increases neurogenesis but not PSA-NCAM expression in aged dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. **11**(4), 1479-1485 (1999).
35. Cameron, H. A., Woolley, C. S. and Gould, E. : Adrenal steroid receptor immunoreactivity in cells born in the adult rat dentate gyrus. *Brain Res*. **611**(2), 342-346 (1993).
36. Lim, B. V., Shin, M. C., Jang, M. H., Lee, T. H., Kim, Y. P., Kim, H. B., Lee, K. S., Kim, H., Kim, E. H. and Kim, C. J. : Ginseng radix increases cell proliferation in dentate gyrus of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Biol Pharm Bull*. **25**(12), 1550-1554 (2002).
37. Kim, D. H., Moon, Y. S., Jung, J. S., Min, S. K., Son, B. K., Suh, H. W. and Song, D. K. : Effects of ginseng saponin administered intraperitoneally on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in mice. *Neurosci Lett*. **343**(1), 62-66 (2003).
38. Yuan, W. X., Wu, X. J., Yang, F. X., Shang, X. H. and Zhang, L. L. : Effects of ginseng root saponins on brain monoamines and serum corticosterone in heat-stressed mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. **10**(6), 492-496 (1989).
39. Czeh, B., Welt, T., Fischer, A. K., Erhardt, A., Schmitt, W., Muller, M. B., Toschi, N., Fuchs, E. and Keck, M. E. : Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*. **52**(11), 1057-1065 (2002).
40. Issa, A. M., Rowe, W., Gauthier, S. and Meaney, M. J. : Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *J. Neurosci*. **10**(10), 3247-3254 (1990).
41. Rhim, H. : The Effects of Ginsenoside Rg3 as a Potent Inhibitor of Ca²⁺ Channels and NMDA-gated Channels in the Peripheral and Central Nervous Systems. *J. Ginseng Res*. **27**, 120-128 (2003).
42. Takahashi, J., Palmer, T. D. and Gage, F. H. : Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J. Neurobiol*. **38**(1), 65-81 (1999).
43. Memberg, S. P. and Hall, A. K. : Proliferation, differentiation, and survival of rat sensory neuron precursors in vitro require specific trophic factors. *Mol Cell Neurosci*. **6**(4), 323-335 (1995).
44. Takei, Y., Yamamoto, T., Higashira, H. and Hayashi, K. : Identification of basic fibroblast growth factor-like immunoreactivity in panax ginseng extract: investigation of its molecular properties. *Biosci Biotechnol Biochem*. **60**(4), 584-588 (1996).
45. Tao, Y., Black, I. B. and DiCicco-Bloom, E. : Neurogenesis in neonatal rat brain is regulated by peripheral injection of basic fibroblast growth factor (bFGF). *J. Comp Neurol*. **376**(4), 653-663 (1996).
46. Wagner, J. P., Black, I. B. and DiCicco-Bloom, E. : Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci*. **19**(14), 6006-6016 (1999).
47. Cheng, Y., Black, I. B. and DiCicco-Bloom, E. : Hippocampal granule neuron production and population size are regulated by levels of bFGF. *Eur. J. Neurosci*. **15**(1), 3-12 (2002).
48. Zhao, S., Jiang, Y. and Luo, Q. : [Relation between BDNF and synaptic reorganization of hippocampal mossy fibers].

- Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* **81**(5), 283-287 (2001).
49. Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H. and Bonhoeffer, T.: Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**(19), 8856-8860 (1995).
50. Korte, M., Griesbeck, O., Gravel, C., Carroll, P., Staiger, V., Thoenen, H. and Bonhoeffer, T.: Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**(22), 12547-12552 (1996).
51. Patterson, S. L., Abel, T., Deuel, T. A., Martin, K. C., Rose, J. C. and Kandel, E. R.: Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron.* **16**(6), 1137-1145 (1996).