

牡丹皮가 손상된 정상신경세포의 CD81 및 GFAP의 발현에 미치는 영향

문성진, 성기문, 임진영*, 송봉근
원광대학교 한의과대학 내과학교실, *원광대학교광주병원 재활의학과

The Effect of the *Moutan Radicis Cortex* on Expression of CD81 and GFAP in Injured Astrocyte

Sung-jin Moon, Ki-moon Seon, Jin-young Lim*, Bong-keun Song
Dept. of Internal Medicine, Wonk-wang University Oriental Medical School
*Dept. of Rehabilitation, Wonk-wang University Medical Center

ABSTRACT

Object : In conditions of brain infarction, irreversible axon damage occurs in the central nerve system (CNS), because gliosis makes physical and mechanical barriers. If gliosis formation could be suppressed, irreversible axon damage would be reduced. This could mean that an injured CNS could be regenerated. CD81 and GFAP have close relationships to gliosis. The increase in glial cells at CNS injury gives rise to the expression of CD81 and GFAP. CD81 was postulated to play a central role in the process of CNS scar formation.

Method : In this study, the author investigated the effect of the water extract of the *Moutan Radicis Cortex* on regulation of CD81 and GFAP expression in injured CNS cells.

MTT assay was used to examine cell viability, while RT-PCR and ELISA methods were carried out to measure the expression of CD81 and GFAP in the astrocyte.

Results : We observed that water extract of the *Moutan Radicis Cortex* increased cell viability under hypoxia induced by $CoCl_2$ and suppressed the expression of CD81 and GFAP up-regulated by hypoxia.

Conclusion : These results suggest that the *Moutan Radicis Cortex* could promote neural regeneration as a consequence of protecting CNS cells from hypoxia and suppressing the reactive gliosis following CNS injury

Key words : gliosis, CD81, GFAP, CNS injury, hypoxia, *Moutan Radicis Cortex*

1. 서 론

망막이나 척수 및 뇌와 같은 중추신경계의 세포

- 교신저자: 송봉근 광주광역시 남구 주월동 543-8
원광대학교한방병원 6내과
TEL: 062-670-6422 FAX: 062-670-6767
E-mail: songbk@wonkwang.ac.kr
- 이 논문은 2005년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2005-E00198)
This work was supported by Korea Research Foundation Grant (KRF-2005-E00198)

손상 후에는 미세아교세포와 대식세포가 손상 후 짧은 기간 동안 증식하며 astrocyte의 활성화가 나타나게 된다¹. 활성화된 astrocyte는 결과적으로 손상된 세포 주변에 glial scar를 형성하게 하는 주요한 역할을 하며², 치밀한 내부 형성작용으로 인하여 axon의 재생에 대한 물리적인 장벽으로 작용하게 된다³. 이러한 반응의 결과로 glial fibrillary acidic protein(GFAP)이 높게 발현되며⁴ 이와 더불어 CD81의 발현도 증가 한다⁵. CD81은 tetraspanin

계열의 단백질의 일원으로 CD81은 반응성 astrocyte와 소교세포와 대식세포에 의하여 뇌와 척수의 자상 손상 시 높게 조절된다는 것이 보고되었으며^{2,5,6}, CD81은 성숙 생쥐 뇌 및 망막에서 손상 후 교세포 반응(glial response)에 관여하여 세포의 증식과 흔 형성 조절함이 밝혀졌다⁷.

현재 중추신경계 회복을 위한 방법으로 소염제나 cytokine을 사용하거나⁸, astrocyte의 gliosis 반응을 억제하기 위한 protease를 사용하거나⁹, pyrogen을 사용하거나¹⁰, hydroxycholesterol 유도체를¹¹ 실험적으로 사용하는 방법이 시도되고 있다. 또한 방사선을 이용하여 glial cell을 제거하는 방법을 사용하기도 하였으며¹², 손상 부위에 미분화된 조직을 이식하기도 하였다^{13,14}.

최근 연구에 의하면 astrocyte에서 GFAP를 제거한 결과 신경의 성장 및 재생이 촉진되었고¹⁵, 실험적으로 척수손상을 가한 쥐에 항 CD81 항체를 투여한 결과 신경이 회복되었다¹⁶고 보고 되었다.

목단피(*Moutan Radicis Cortex*)는 毛茛科(미나리아재비과: Ranunculaceae)에 속한 다년생 낙엽 소관목인 모란(*Paeonia Suffruticosa*)의 根皮이다. 목단피의 주성분은 paeonol, paeonoside, paeonolide, paeoniflorin 등으로 중추신경계에 대해서는 鎮靜, 催眠, 鎮痛 작용이 있으며 항산화작용, 항염, 항당뇨, 항암 작용 등이 보고되었으며¹⁷⁻²⁰ 허혈성 뇌손상에 대한 방어효과를 가지고 있음도 보고되었다²¹.

그러나 목단피의 중추신경 손상 후 신경세포의 보호와 재생의 촉진에 관한 연구는 활발하지 않다. 이에 저자는 이번 연구에서 허혈성 신경세포 손상 후에 astrocyte에 나타나는 CD81 및 GFAP의 발현에 대한 목단피의 조절효과에 대해서 조사하였고 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 실험 재료

1) 약재 및 검액 조제

본 실험에 사용한 목단피는 원광대학교 본초학 교실에서 구입한 후 정선하여 실험에 사용하였다. 목단피 200g을 증류수 2,000ml에 넣고 3시간 동안 가열하여 추출한 다음 추출물을 Whatman 필터로 여과한 후 감압기로 농축하였다. 감압 농축한 추출물은 동결 건조하였으며 동결 건조한 추출물(수득률 9.8%)은 0.9% 식염수에 녹여 실험에 사용하였다.

2) 실험 동물

본 실험에 primary astrocyte의 배양을 위하여 사용한 Sprague-Dawley계 생후 4일된 신생 흰쥐를 다물 사이언스(대전)에서 구입하였으며 생후 8일째 성상 신경세포 배양에 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포 배양

생후 8일된 Sprague-Dawley계 흰쥐를 저온 마취시킨 후에 뇌를 꺼내서 1×HBSS를 넣고 수막을 제거하여 대뇌 피질을 잘게 부순 다음 75cm² flask에 총량이 10ml이 되도록 1×HBSS를 넣고 80rpm, 10분 동안 교반하였다. 여기에 0.1% trypsin이 포함된 20ml 1×HBSS를 첨가해서 조직이 서로 엉길 때까지 약 10-20분 교반하였다. 다음 10ml pipet을 이용해서 분리시킨 후 70µm strainer를 이용하여 여과하였다.

Filter를 통과한 primary cell media를 800rpm, 5분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 하여 가라앉은 cell은 30ml astrocyte media(20% FBS, 100unit/ml penicillin/ streptomycin, 2mM glutamin)에 풀어서 75cm² flask에 세포를 seeding 하였다. 그리고 3-4일에 한번씩 media를 바꾸어 주면서 세포의 상태를 관찰하여 flask에 세포가 90~100% 자랐을 경우에 0.25% trypsin/EDTA(Hyclon)으로 계대 배양하였다. 계대배양은 세포를 1x10⁷⁻⁸씩 100mm cell culture dish에 seeding하고 3-4일에 한 번씩 cell culture용 media(10% FBS, 100unit streptomycin/penicillin, DMEM)로 계대 배양하였으며 5-6 passage 이내의

세포들을 실험에 사용하였다.

2) CoCl₂에 의한 저산소증 세포 손상

배양된 세포에 CoCl₂를 가하여 저산소증(hypoxia)에 의한 세포 손상을 유발하였다. hypoxia 유발은 0.5 mM 와 1mM CoCl₂ 용액을 세포에 가한 다음 4, 8, 16 및 24 시간 처리하였다. 목단피에 의한 세포 손상 억제 작용을 관찰하기 위하여 CoCl₂ 투여 전 목단피를 8시간 전처리 하였다.

3) MTT assay

목단피의 astrocytes에 대한 세포독성을 조사하기 위하여 MTT assay를 실시하였다.

목단피 추출액을 10% FBS의 media에 0.05%, 0.1%, 1%, 5%, 10% 농도별로 녹인 후에 0.45 μ m filter를 이용해서 여과하였다. 다음 96well plate의 한 well당 1x10⁴개의 astrocyte 를 seeding한 후에 준비된 약제들을 농도별로 처리하고 16시간 배양하였다. 배양 후 media를 제거하고, PBS로 한번 씻어준 다음에 0.5mM의 CoCl₂를 처리하고 8시간 배양하였다. 8시간 후 CoCl₂를 제거하고 PBS로 한번 씻어준 다음 5mg/ml 10x 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 l씩 넣고 5분간 흔들여 준 다음에 UVM-340 microplate reader(Asys Hitech, Austria)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

목단피가 astrocytes에서 CD81, GFAP 그리고 MAG 발현에 미치는 영향을 알아 보기위해 cell-based ELISA를 실시하였다.

먼저 96well plate의 한 well당 1x10⁴ astrocyte cell을 seeding 하였다. 세포가 plate에 붙으면 목단피를 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% 농도별로 10% FBS의 media에 녹인 후에, 0.45 μ m filter를 이용해서 filtration하여 세포에 처리한 다음 16시간 배양하였다. 16시간 후 media를 제거하고, PBS로 한번 씻어준 다음에 100 μ l 3.7% formaldehyde로 상온에서

10분 세포를 고정하였다. 고정한 후에 PBS+0.1% Triton X-100(PBST)으로 5분씩 세 번 세척하였다. PBST+1%BSA 로 상온에서 1시간 locking한 뒤에 1차 항체(1:100)를 PBST+1%BSA에 희석하여 상온에서 2시간 반응시키고 PBST로 5분씩 세 번 씻어준 후에 2차 항체를(1:1000)를 동일하게 PBST-1%BSA에 희석하여 상온에서 2시간 반응시키고 PBST로 두번 씻고 PBS로 한번 세척하였다. 1차 항체로 CD81(H121)과 GFAP(2E1)은 Santa Cruz Biothecnology (USA) 제품을 사용하였고 MAG는 Chemicon (USA) 제품을 사용하였으며 2차 항체는 Chemicon 제품을 사용하였다. 세척한 후 TMB (Sigma)용액을 각 well 당 100 μ l씩 넣고 5분정도 반응 시킨 후에 TMB stop solution(Sigma) 100 μ l로 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 용액을 microplate reader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Western blot

100mm dish에 배양된 세포를 PBS로 한 번 씻은 후에, 1ml PBS를 넣고, cell scraper를 이용하여 세포를 수거하여 1.5ml tube에 옮긴 후에, 5000~6000 rpm, 10초간 원심 분리하였다. 다음 상층액은 버리고, 가라앉은 세포에 2x protein sample buffer를 넣고, 98 $^{\circ}$ C에서 약 10분간 끓이고, 5000-6000 rpm, 10초간 원심분리 하였다. 그리고 상층액을 12%~15% SDS-PAGE gel에 loading하여 전개시킨 다음 nitrocellulose membrane에 transfer system(Bio-Rad)을 이용하여 gel에 있는 단백질을 전이시켰다 (100volt 0.35A, 1hr.). 그리고 nitrocellulose membrane에 1차 antibody를 실온에서 2시간 반응시키고, 10분씩 두 번 TBS-T로 씻고, HRP가 결합 되어 있는 2차 antibody를 실온에서 1시간 반응 시켰다. 2차 antibody를 붙인 후에 TBS-T로 10분씩 세번 씻고, HRP와 반응하는 DAB solution(0.6mg/ml, pH 7.6 Tris-Cl, 3 μ l/ml H₂O₂) 또는 ECL solution에 nitrocellulose membrane을 반응 시켰다.

6) RT-PCR

배양된 세포를 Trisol (MRC) 1ml을 넣어서 lysis하였다. 그리고 4°C, 13000rpm으로 5분 원심분리 한 다음 상층액만 취해서 새 튜브에 옮기고, 옮겨진 상층액에 0.2ml의 chloroform을 넣고 15초 정도 잘 섞이게 흔들어준 다음, 상온에서 15분 반응시켰다. 반응 시킨 후 4°C, 13000rpm으로 15분 원심분리 후 상층액 만을 취해서 새 튜브에 옮긴 다음 0.5ml의 isopropanol을 넣고 잘 섞이도록 한 후 같은 방법으로 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 pellet의 양을 확인하고 10분간 말린 후 DEPC를 처리한 물을 적당량 넣어 55도에서 15분간 녹여 -20°C에서 보관하였다.

RT-PCR의 수행은 얻어진 RNA를 가지고 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)을 이용해서 RT-PCR을 수행 (70°C 5분, 4°C 10분, 25°C 5분, 42°C 1시간, 70°C 15분)하였다. 얻어진 cDNA와 아래와 같은 sequence primer를 사용하여 2X PCR Master mix(Solgent)로 PCR을 수행 (30 cycle, 94°C 15초, 60°C 1분, 72°C 1분)하였다.

PCR 수행 시 사용되어지는 gene들의 primer sequence들은 CD81(5'-CTG TTTGCCTGTGAGG TAGC-3', 5'-TCAGTGTGGTCAGCGTATTG-3'), GFAP(5'-AGGGACAATCTCACACAGGAC-3', 5'-CTCCAGCGACTCAACCTTC-3'), GAPDH(5'-ATGGTGGAAGGTCGGTGTGAACG-3', 5'-GTTGTC ATGGATGACCTTGCC-3')이었다. 그리고 얻어진 PCR product들은 1x TBE buffer에서 0.1 µg/ml ethidium bromide이 포함된 1% agarose gel에 전기영동 시켰다. 전기영동 후 자외선 발광 장치에서 사진을 찍어 발현도를 관찰하였다.

7) 통계분석

모든 결과는 평균값±표준오차로 나타냈으며, 대조군과의 평균값 비교를 위해서 one way ANOVA를 실시하였으며 통계적 유의성을 위한 유의수준은 p<0.05로 판정하였다.

III. 결 과

1. 저산소증에 의한 세포 변화

저산소증으로 유발된 세포 손상에 대하여 목단피가 손상 억제에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 각 농도별로 CoCl₂를 투여하고 5% CO₂ incubator에서 37°C로 8시간 배양하였다. 그 다음 현미경하에서 형태 변화를 관찰한 결과 CoCl₂로 유도된 저산소증 하에서 세포들은 세포막의 파괴가 나타났으며 농도가 증가할수록 세포의 파괴도 현저하였다(Fig. 1).

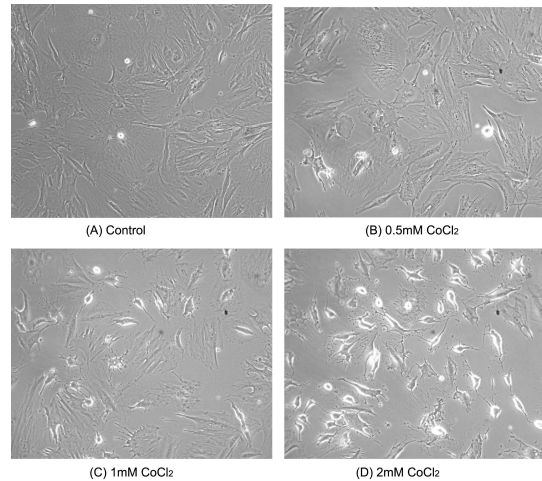


Fig. 1. The destructive effects of astrocyte cells in hypoxia induced by CoCl₂.

The cells were incubated for 8 hours under condition of each 0.5mM, 1mM, 2mM CoCl₂ exposure. Note cell bodies and nuclei are destroyed more as concentration of CoCl₂ increases. At higher concentration of 2mM, most of cell bodies and nuclei are destroyed (D), while most cells are preserved at lower-concentration of 0.5mM (B).

2. 저산소증 손상 후 시간에 따른 CD81 및 GFAP의 발현 변화

저산소증에 의한 성상세포의 손상 시간에 따른

HIF-1, CD81과 GFAP의 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 세포에 0.5mM CoCl₂를 투여하고 각각 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 그 결과 CoCl₂로 유도된 저산소증에 의한 손상 후 CD81의 발현은 시간이 증가함에 따라 발현이 증가하다가 24시간 이후에는 감소하는 양상을 보였다. GFAP 및 HIF-1의 발현 양상도 CD81의 발현 변화와 일치하였다(Fig. 2).

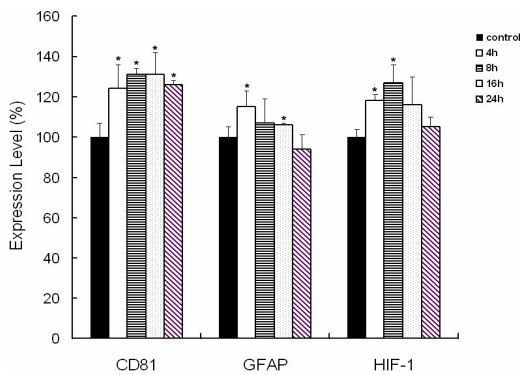


Fig. 2. The expression of CD81, GFAP and HIF-1 following hypoxic injury induced by CoCl₂.

Protein expression in the astrocyte cell line was analyzed by ELISA at periods of 4h, 8h, 16h and 24h. The protein expression was significantly increased after hypoxic exposure. Especially the up regulation of GFAP expression was accompanied with increased CD81 expression. *p<0.05 compared with control

3. CoCl₂ 농도에 따른 CD81 및 GFAP의 발현

저산소증에 의한 성상세포의 손상 후 CD81의 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 CoCl₂를 각 농도별로 투여하고 24시간 동안 37°C에서 incubation 시켰다. 저산소증에 의한 손상 결과 세포는 0.5mM CoCl₂농도 투여 시 CD81과 GFAP의 발현 증가를 보였다. 그러나 1mM의 고농도 투여 시에는 모든 단백질의 발현 감소가 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 과농도에 따른 세포사멸과 관련된 것으로 나타났다(data not shown). 따라서 본 실험에서 저산소증의 유발은 0.5mM농도의 투여로 유도되었다.

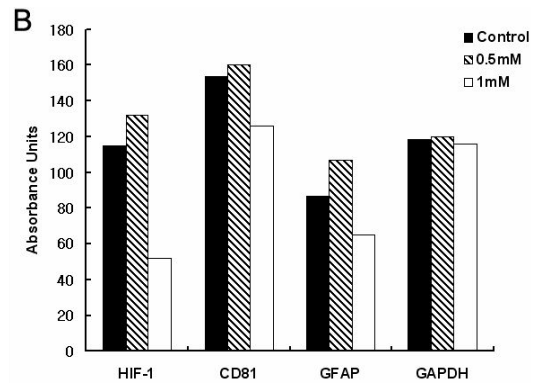
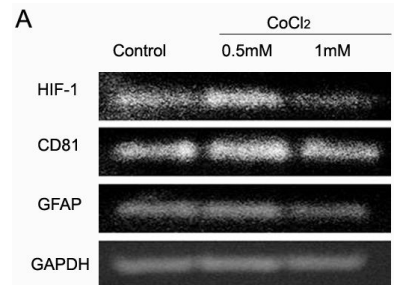


Fig. 3. The expression of HIF-1, CD81, GFAP and GAPDH following hypoxic injury induced by CoCl₂.

All the proteins by using PCR showed up-regulation after injury at the concentration of 0.5mM CoCl₂ (A). The level of protein expression was compared using ImageJ and documented into graph (B).

4. 세포 생존율에 미치는 목단피의 영향

목단피 물추출액을 각 농도별로 배양된 세포에 투여하고 37°C에서 16시간 처리하였다. 그 결과 0.1% 농도 이하에서는 세포생존에 큰 영향을 미치지 않았으므로 본 실험에서의 농도로 사용하였다(Fig. 4).

5. 저산소증에 대한 목단피의 손상 억제 반응

저산소증에 의한 손상에 대한 목단피의 억제 효과를 관찰하기 위하여 0.1% 농도의 목단피 추출액을 16시간 전처리하고 0.5mM CoCl₂를 투여하고 8시간 37°C에서 배양하였다. 실험결과 CoCl₂로 유발

된 저산소증에 의한 세포의 손상을 목단피 물추출액은 유의하게 억제하였다(Fig. 5).

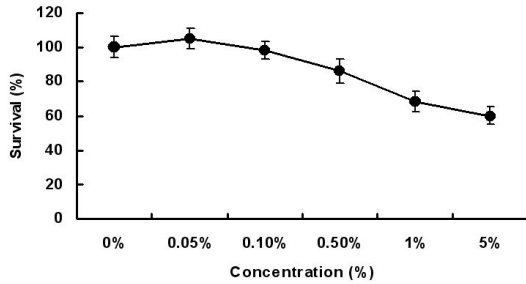


Fig. 4. Effect of *Moutan Radicis Cortex* on the cell viability in the astrocyte cell lines.

The cells were pretreated with the different concentration of water extracts for 16 hours. Cell survival rates were determined using MTT assay.

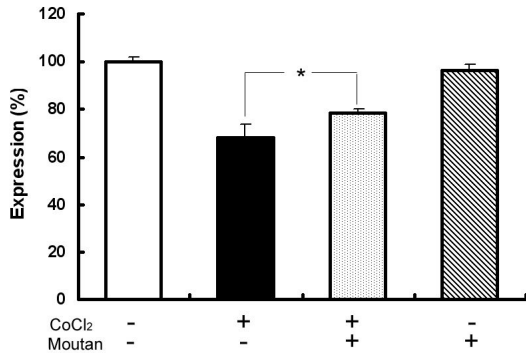


Fig. 5. The effect on the inhibition of cell death. Cells were pretreated with the water extract of *Moutan Radicis Cortex* for 16 hours before incubation with 0.5mM CoCl₂ for 8 hours.

Cells showed increased cell viability with the administration of water extract of *Moutan Radicis Cortex* compared with hypoxic injured cells. * p<0.05 between groups.

6. 목단피의 저산소증에 대한 세포손상 억제 효과
저산소증으로 유발된 세포손상의 억제 효과를 관찰하기 위하여 0.1%농도의 목단피 추출액을 16

시간 전처리한 후 1mM CoCl₂를 투여하고 8시간 37°C에서 배양하였다. 세포 관찰결과 목단피는 CoCl₂로 유발된 저산소증에 의한 세포막의 파괴를 억제하였다(Fig. 6).

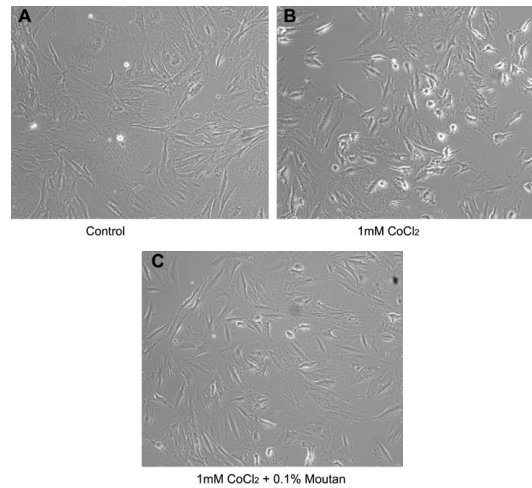


Fig. 6. The cell protective effects of *Moutan Radicis Cortex* in hypoxic injured astrocyte cells by CoCl₂.

The cells were pretreated with 0.1% the water extracts of *Moutan Radicis Cortex* and incubated 8 hours followed by 1mM CoCl₂ exposure. Note cell bodies and nuclei are well preserved in the *Moutan Radicis Cortex* group (C) compared with hypoxic group (B).

7. 목단피의 CD81 및 GFAP 발현 억제 효과

저산소증으로 유발된 배양세포에서 발현이 증가된 CD81과 GFAP에 대한 목단피의 조절 효과를 관찰하기 위하여 0.1%목단피 물추출액을 투여하고 16시간 배양한 다음 0.5mM CoCl₂를 투여하고 8시간 37°C에서 배양하였다. 실험 결과 목단피는 저산소증으로 증가된 단백질의 발현을 억제하였다(Fig. 7).

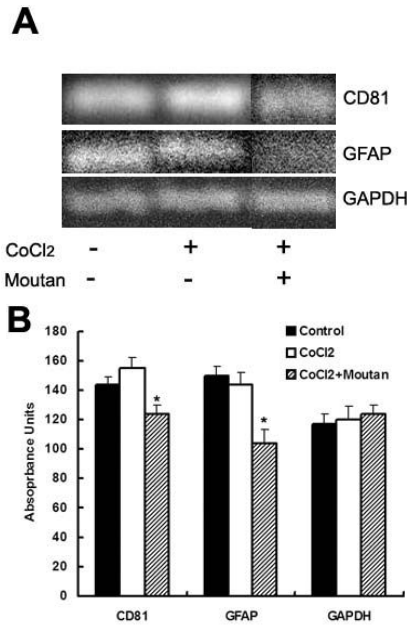


Fig. 7. The effects on the inhibition of the expression of CD81 and GFAP.

CD81 expression was down regulated by PCR (A) and ELISA (B) after the administration of water extract of *Moutan Radicis Cortex* on the hypoxic injured cells. CD81 and GFAP showed significant increased expression following the incubation with water extracts of *Moutan Radicis Cortex*. *p<0.05

IV. 고찰

망막이나 뇌혈관 및 척수에서의 중추신경계 손상 후 재생과정에 관여하는 glial cell의 반응 및 증식의 역할에 대하여 많은 것이 밝혀져 왔다. 뇌피질 및 척수 또는 망막의 손상이 일어나면 손상 받은 부위에서는 공통적으로 비뉴론성 세포의 증식 즉 교세포화가 일어난다²². 만일 이 증식 반응이 제어되지 못하게 되면 중추신경계의 기능 상실에 이르게 된다. glial scar tissue는 반응성 astrocyte와 세포외 세포간질 요소로 가득차게 되고 내부로부터의 axon의 재생시도를 방해하게 된다^{23,24}.

중추신경계의 axon 재생 결여의 주원인은 신경

교 세포의 억제성 특성에 기인한다. 특히 중추신경계 손상 시 glial scar tissue의 생성으로 축삭 성장체(axonal growth cone)의 성장이 좌절되고 신경교반흔 자체가 구조적 장벽을 형성하여 성장억제 요인으로 작용한다. astrocyte는 다른 환경적 조건과 자극에 반응하여 성장 촉진 요인 또는 성장 억제 요인으로 작용하여 중추신경계 손상 시 주위 세포의 물질들과 치밀하게 결합하여 신경교증(gliosis)을 생성하고²⁵ 결과적으로 신경재생을 억제함이 확인되었다²⁶. 또한 치밀한 결합구조를 지닌 신경교반흔의 조직 배양 실험을 통한 연구에서도 이들 구조에 의한 중추신경계 축삭 재생 억제 현상이 확인 되었다^{27,28}.

실제로 중추신경계에서 직접적인 외상, 질환, 유전자에 혹은 화학적 손상 후에 astrocyte는 특징적으로 GFAP의 빠른 합성을 보인다²⁹. 또한 GFAP와 CD81은 척수손상 후에 나타나는 scar안에서 같은 부위에 나타나는 colocalization현상이 관찰되었다³⁰. 즉, GFAP와 CD81은 시간적, 공간적으로 매우 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 나타났다⁵.

CD81은 tetraspanin계열의 단백질의 일원이며 tetraspanin계열 단백질은 세포막에 있는 분자 복합체로서 세포들로 하여금 세포막에서부터 2차 전달 시스템으로 상호작용을 유도하는 역할을 한다⁵. CD81은 신호전달계와 관련이 있으며³¹, 세포 성장의 조절에 있어서 필요한 단백질로 보고되었다³².

이제까지 CD81은 뇌⁵, 척추¹ 및 망막³² 등에서 발현되는 것으로 보고되었으며, 중추신경계의 glial cell과 leukocyte에서 높은 정도로 발현 된다³³. 또한 CD81은 성숙 생쥐 뇌 및 망막에서 손상 후 교세포반응(glial response)에 관여하여 세포의 증식과 반흔 형성을 조절함이 밝혀졌다⁷.

또한 태생 후 발달과정 중에 외상으로 유도된 CD81의 고조절상태는 astrocyte의 scar형성을 하는 능력과 함께 연관되어 증가된다는 것도 보고되었다³⁴. 따라서 astrocyte에서의 CD81의 작용은 glial scar에서의 astrocytic process들의 관계 사이에 결

합의 상호작용을 안정화하는 것으로 추측되어진다.

최근 anti-CD81 항체와 함께 배양된 astrocyte를 처리한 실험에서는 융합성 단층과 변형된 조직형태가 붕괴되었고 증식이 감소하였다⁵. 또한 항 CD81 항체 AMP1은 microglial cell과 astrocyte의 증식작용과 결합작용을 억제하였다고 보고³⁵되었고, 실험적으로 척추손상을 가한 흰쥐에 항CD81 항체를 투여한 결과 신경이 회복되고 운동 능력이 향상되었다¹⁶고 보고 되었다. 이상의 연구를 종합하여 보면 CD81은 세포손상 후 염증반응조절과 glial scar의 형성 또한 재생에 중심적 역할을 하는 인자라고 볼 수 있으므로, 세포손상 시 CD81을 억제할 수 있을 경우는 염증 반응을 조절할 수 있고 glial scar 형성을 억제하여 재생을 촉진할 수 있을 것이다.

GFAP에 대한 실험적 결과로는 GFAP knock-out 쥐를 통한 척수 손상실험에서 척수손상시 neuron의 밀도가 높게 나타나서 GFAP를 억제할 경우 scar formation을 억제하여 axon의 재생을 촉진할 수 있다는 보고가 있었고¹⁵, GFAP null astrocyte 모델 실험에서 neuron의 생존과 신경돌기의 성장에 더 나은 결과를 보인다는 결과가 보고되었다³⁶. 따라서 중추신경계 손상시 GFAP를 억제할 수 있다면 신경세포의 생존율을 높일 수 있을 것이다.

목단피는 모란, 단피, 모란근피 등으로 불리어지고 있다. 우리나라에서는 전 지역에서 재배되고 있고, 재배 후 3-5 년 된 뿌리를 가을과 겨울에 채취하여 속의 심을 뽑아서 제거하고 햇볕에 말린 것이 사용되고 있다.

藥性은 味는 辛苦, 性은 涼 無毒하며 心, 肝, 腎의 3經에 작용하며, 淸熱養血작용을 하므로 血分熱證에 사용하고, 活血行瘀하는 작용이 있기 때문에 瘀血積聚血滯에 사용하였다. 또한 神農本草經에 '味辛寒, 主寒熱, 中風癱瘓, 驚癇邪氣, 除堅瘀血留舍腸胃, 安五臟, 療癰瘡'이라고 기록되어 있고, 名醫別錄에는 '除時氣頭痛 客熱 五勞勞氣 頭腰痛 風噤

癰疾'라고 기록³⁷되어 있는 것으로 보아 중추신경계에 약물이 작용하는 것으로 보고 있음을 알 수 있다.

최근까지 알려진 성분으로는 pentagalloyl glucose (PGG), paeoniflorin, oxypaeonifloein, paeonol, paeonoside, paeonolide, apio paeonoside, benzoylpaeoniflorin, benzoyloxypaeoniflorin, oxypaeoniflorin, 2,3-dihydroxy-4-methoxyacetophenone, 3-hydroxy-4-methoxyacetophenone 등이 함유된 것으로 조사되었으며³⁸ 약리작용 중 중추신경계에 작용하기도 하는데 중추에 작용하여 鎮靜, 催眠, 鎮痛 작용이 있을 뿐 아니라 인위적으로 유발시킨 痙攣에도 길항하는 작용이 있다³⁷.

최근 연구에서는 일산화질소(nitric oxide)의 주입에 의해 뇌허혈상태를 유도한 상태에서 목단피, 계지, 백작약 추출물을 처리한 결과 소뇌과립세포의 신경세포 손상을 감소시킨다는 것이 보고되었다³⁹. 또한, 총경동맥과 우측중대뇌동맥을 압박하여 만들어진 뇌경색으로 인한 허혈성 뇌손상 모델에서 목단피의 추출물이 활성산소를 배출하고 microglia의 활성화를 억제하여 대뇌손상을 줄일 수 있다는 보고가 있었다²¹.

이에 저자는 CoCl₂를 이용하여 저산소증을 유발하여 뇌신경세포의 허혈상태를 유도하여 인위적인 뇌허혈성 손상상태를 유발시켰을 경우 세포손상에 대한 효능과 세포손상에 관여하는 CD81 및 GFAP의 발현 조절에 대한 효능을 실험을 통하여 확인해보고자 하였다.

결과적으로 목단피 추출물은 in vitro 실험에서 세포손상을 억제하였고 세포손상과 함께 발현하는 CD81 및 GFAP을 억제하였다. 세포손상을 억제하는 것으로 보아서 뇌세포의 저산소성 허혈상태에서 뇌세포에 대한 보호작용이 있는 것으로 볼 수 있다. 또한 뇌신경손상 시에 나타나는 CNS scar 형성 과정에 중요한 작용을 하는 것으로 알려진 CD81 및 GFAP를 억제하는 것은 뇌신경세포 손상 후 scar 형성을 억제하여 재생을 촉진할 것이라는

것을 기대할 수 있게 하였다.

이번 연구의 결과는 목단피를 중추신경계질환의 예방과 치료에 사용할 수 있는 이론적 증거를 제시하였고, 임상에서의 중추신경계 손상 질환에서의 다양한 활용의 계기를 마련해주었다고 생각된다.

V. 결 론

허혈성 중추신경계 손상 시 나타나는 CD81 및 GFAP 발현에 대하여 목단피가 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 신경세포에 목단피를 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Astrocyte에 각각 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM의 농도의 CoCl_2 를 투여하여 저산소증을 유도하고 현미경하에서 관찰한 결과, 세포들은 세포막의 파괴가 나타났으며 농도가 증가할수록 세포의 파괴도 현저하였다.
2. Astrocyte에 0.5mM의 CoCl_2 를 투여하여 저산소증을 유도하고 각각 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 동안 CD81, GFAP, HIF-1의 발현양상을 관찰한 결과, 시간이 증가함에 따라 증가하다가 24시간 이후에는 감소하였다.
3. Astrocyte에 각각 0.5mM, 1mM의 CoCl_2 를 투여하고 CD81과 GFAP의 발현을 관찰한 결과 0.5mM의 농도에서는 발현이 증가되었고 1mM의 농도에서는 발현이 모두 감소하였다.
4. Astrocyte에 0.1% 목단피 추출액을 투여하고 0.5mM CoCl_2 로 저산소증을 유발한 결과 목단피 추출액은 세포손상을 억제하였다.
5. Astrocyte에 0.1% 목단피 추출액을 투여하고 0.5mM CoCl_2 로 저산소증을 유발하여 CD81과 GFAP의 발현을 관찰한 결과 발현을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 목단피는 허혈성 중추신경 손상 시 세포보호효과가 있으며 중추신경

손상 후 나타나는 gliosis에 관여하는 CD81 및 GFAP 발현을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 목단피는 향후 허혈성 신경손상 시 중추신경손상의 보호와 재생에 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

참고문헌

1. Dijkstra, S., Geisert, E.E., Gispén, W.H., Bär, P.R., Joosten, E.A., Upregulation of CD81 (target of the antiproliferative antibody, TAPA) by reactive microglia and astrocytes after spinal cord injury in the rat. *J. Comp. Neurol.* 2000;428:266-77.
2. Stichel CC, Muller HW. The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res.* 1998;294:1-9.
3. Reier PJ, Houle JD. The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. *Adv Neurol.* 1988;47:87-138.
4. Dusart I, Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci.* 1994;6:712-24.
5. Geisert EE Jr, Yang L, Irwin MH. Astrocyte growth, reactivity, and the target of the antiproliferative antibody, TAPA. *J Neurosci.* 1996;16:5478-87.
6. Irwin, M.H., Geisert, E.E., The upregulation of a glial cell surface antigen at the astrocytic scar in the rat. *Neurosci. Lett.* 1993;154:57-60.
7. Song BK, Geisert GR, Vazquez-Chona F, Geisert EE Jr. Temporal regulation of CD81 following retinal injury in the rat. *Neurosci Lett.* 2003;338(1):29-32.
8. Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno

- C, Gomez F, Marcillo AE, Loor K, Green J, Dietrich WD. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor- α production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 1999;16(10):851-63.
9. Guth L, Albuquerque EX, Deshpande SS, Barrett CP, Donati EJ, Warnick JE. Ineffectiveness of enzyme therapy on regeneration in the transected spinal cord of the rat. *J Neurosurg*. 1980;52(1):73-86.
 10. Puchala E, Windle WF. The possibility of structural and functional restitution after spinal cord injury. A review. *Exp Neurol*. 1977;55(1):1-42.
 11. Gimenez y Ribotta M, Rajaofetra N, Morin-Richaud C, Alonso G, Bochelen D, Sandillon F, Legrand A, Mersel M, Privat A. Oxysterol (7 beta-hydroxycholesteryl-3-oleate) promotes serotonergic reinnervation in the lesioned rat spinal cord by reducing glial reaction. *J Neurosci Res*. 1995;41(1):79-95.
 12. Zhang SX, Geddes JW, Owens JL, Holmberg EG. X-irradiation reduces lesion scarring at the contusion site of adult rat spinal cord. *Histol Histopathol*. 2005;20(2):519-30.
 13. Broude E, McAtee M, Kelley MS, Bregman BS. Fetal spinal cord transplants and exogenous neurotrophic support enhance c-Jun expression in mature axotomized neurons after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 1999;155(1):65-78.
 14. Lee IW. Stem cells and Neurosurgery. *J Korean neurosurgery soc*. 2003;33:1-12.
 15. Menet V, Gimenez Y, Ribotta M, Sandillon F, Privat A. GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia*. 2000;31(3):267-72.
 16. Dijkstra S, Duis S, Pans IM, Lankhorst AJ, Hamers FP, Veldman H, Bar PR, Gispen WH, Joosten EA, Geisert EE Jr. Intraspinal administration of an antibody against CD81 enhances functional recovery and tissue sparing after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2006;202(1):57-66.
 17. Lau CH, Chan CM, Chan YW, Lau KM, Lau TW, Lam FC, Law WT, Che CT, Leung PC, Fung KP, Ho YY, Lau CB. Pharmacological investigations of the anti-diabetic effect of Cortex Moutan an ditsactive component paeonol. *Phytomedicine*. 2007 Nov;14(11):778-84.
 18. Jung CH, Zhou S, Ding GX, Kim JH, Hong MH, Shin YC, Kim GJ, Ko SG. Antihyperglycemic activity of herb extracts on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006 Oct;70(10):2556-9.
 19. Kang DG, Moon MK, Choi DH, Lee JK, Kwon TO, Lee HS. Vasodilatory and anti-inflammatory effects of the 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose (PGG) via a nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol*. 2005 Nov 7;524(1-3):111-9.
 20. Lee SJ, Lee IS, Mar W. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose in murine macrophage cells. *Arch Pharm Res*. 2003 Oct;26(10):832-9.
 21. Hsieh CL, Cheng CY, Tsai TH, Lin IH, Liu CH, Chiang SY, Lin JG, Lao CJ, Tang NY. Paeonol reduced cerebral infarction involving the superoxide anion and microglia activation in ischemia-reperfusion injured rats. *J Ethnopharmacol*. 2006 Jun 30;106(2):208-15.
 22. Humphrey MF, Chu Y, Mann K, Rakoczy P.

- Retinal GFAP and bFGF expression after multiple argon laser photocoagulation injuries assessed by both immunoreactivity and mRNA levels. *Exp Eye Res.* 1997;64:361-9.
23. Silver, J, Miller, J.H, Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004;5:146-56.
 24. Stichel, C.C, Muller, H.W, The CNS lesion scar. new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res.* 1998;294:1-9.
 25. Eng LF, Reier PJ, Houle JD. Astrocyte activation and fibrous gliosis. glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. *Prog Brain Res.* 1987;71:439-55.
 26. Bahr M, Przyrembel C, Bastmeyer M. Astrocytes from adult rat optic nerves are nonpermissive for regenerating retinal ganglion cell axons. *Exp Neurol.* 1995;131(2):211-20.
 27. Fawcett JW, Housden E, Smith-Thomas L, Meyer RL. The growth of axons in three-dimensional astrocyte cultures. *Dev Biol.* 1989;135(2):449-58.
 28. McKeon RJ, Hoke A, Silver J. Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol.* 1995;136(1):32-43.
 29. Eng LF, Ghimikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein : GFAP-thirty-one-years(1969-2000). *Neurochemical Research.* 2000;25:1439-51.
 30. Brook GA, Plate D, Franzen R, Martin D, Moonen G, Schoenen J, Schmitt AB, Noth J, Nacimiento W. Spontaneous longitudinally orientated axonal regeneration is associated with the Schwann cell framework within the lesion site following spinal cord compression injury of the rat. *J Neurosci Res.* 1998;53:51-65.
 31. Berditchevski F, Toliaas KF, Wong K, Carpenter CL, Hemler ME. A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem.* 1997;272:2595-8.
 32. Geisert EE, Jr, Abel HJ, Fan L, Geisert GR. Retinal pigment epithelium of the rat express CD81, the target of the anti-proliferative antibody (TAPA). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:274-80.
 32. Peduzzi, J.D., Grayson, T.B., Fischer, F.R., Geisert, E.E., The expression of TAPA (CD81) correlates with the reactive response of astrocytes in the developing rat CNS. *Exp. Neurol.* 1999;160:460-8.
 33. Dijkstra, S., Geisert, E.E., Dijkstra, C.D., Bär, P.R., Joosten, E.A., CD81 and microglial activation in vitro: proliferation, phagocytosis and nitric oxide production. *J. Neuroimmunol.* 2001;114:151-9.
 33. Sullivan CD, Geisert EE, Jr. Expression of rat target of the antiproliferative antibody (TAPA) in the developing brain. *J Comp Neurol.* 1998;396:366-80.
 34. Ribotta MG, Menet V, Privat A. Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice. *Acta Neurochir Suppl.* 2004;89:87-92.
 35. Shin MK. *Clinical Herbalogy*, Younglim Publishing Co: Seoul: 2002, p. 385-7.
 36. Guo BL, Basang D, Xiao PG, Hong DY. Research on the quality of original plants and material medicine of Cortex Paeoniae. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2002;27:654-7.
 37. Shimada Y, Yokoyama K, Goto H, Sekiya N, Mantani N, Tahara E, Hikiami H, Terasawa K. Protective effect of keishi-bukuryo-gan and

its constituent medicinal plants against nitric oxide donor-induced neuronal death in cultured

cerebellar granule cells. *Phytomedicine*. 2004 Jul;11(5):404-10.