

## Trimethyltin으로 유도된 기억장애 흰쥐에서 백삼의 신경보호효과

이승은<sup>†</sup> · 심인섭<sup>\*\*</sup> · 김금숙<sup>\*</sup> · 임성빈<sup>\*\*\*</sup> · 박현정<sup>\*\*</sup> · 심현수<sup>\*\*</sup> · 예민숙<sup>\*\*</sup> · 김승유<sup>\*</sup>

\*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, \*\*경희대학교 한의과대학 기초한의과학과  
\*\*\*경희대학교 의학전문대학원 임상약리학교실

## The Neuroprotective Effect of White Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) on the Trimethyltin (TMT)-Induced Memory Deficit Rats

Seung Eun Lee<sup>†</sup>, Insop Shim<sup>\*\*</sup>, Geum Soog Kim<sup>\*</sup>, Sung Vin Yim<sup>\*\*\*</sup>, Hyun Jung Park<sup>\*\*</sup>,  
Hyun Soo Shim<sup>\*\*</sup>, Min Sook Ye<sup>\*\*</sup> and Seung Yu Kim<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumsung 369-873, Korea.

<sup>\*\*</sup>Acupuncture and Meridian Science Research Center, College of Oriental Medicine,  
Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea.

<sup>\*\*\*</sup>Department of Clinical Pharmacology, School of Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea.

**ABSTRACT:** The present study examined the effects of Korean white ginseng (WG, *Panax ginseng* C. A. Meyer) on the learning and memory function and the neural activity in rats with trimethyltin (TMT)-induced memory deficits. The rats were administered with saline or WG (WG 100 or 300 mg/kg, *p.o.*) daily for 21 days. The cognitive improving efficacy of WG on the amnesic rats, which was induced by TMT, was investigated by assessing the Morris water maze test and by performing immunohistochemistries on choline acetyltransferase (ChAT), acetylcholinesterase (AChE), cAMP responsive element binding protein (CREB) and brain derived neurotrophic factor (BDNF). The rats treated with TMT injection (control group) showed impaired learning and memory of the tasks, but the rats treated with TMT injection and WG administration produced significant improvement of the escape latency to find the platform in the Morris water maze at the 2nd and 4th days compared to that of the control group. In the retention test, the WG 100 and WG 300 groups showed significantly increased crossing number around the platform compared to that of the control group ( $p < 0.001$ ). Consistently with the behavioral data, result of immunohistochemistry analysis showed that WG 100 mg/kg significantly alleviated the loss of BDNF-ir neurons in the hippocampus compared to that of the control group ( $p < 0.01$ ). Also, treatment with WG has a trend to be increased the cholinergic neurons in the hippocampal CA1 and CA3 areas as compared to that of the control group. These results suggest that WG may be useful for improving the cognitive function via regulation of neurotrophic activity.

**Key Words :** Trimethyltin (TMT), Choline Acetyltransferase (ChAT), Water Maze, Acetylcholinesterase, Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), cAMP Responsive Element Binding Protein (CREB), White Ginseng

## 서 언

기억 관련 현상을 탐구하려는 연구가 동물은 물론 정상인 및 기억장애를 보이는 임상 환자들을 대상으로 오랫동안 이루어져 왔다. 기억력, 인지능력 감퇴와 심한 우울증을 동반하며, 병이 진행될수록 인지력을 완전히 상실하여 정서적 안정감을 잃고 난폭해지며, 인간성을 유지하지 못하게 되는 초로성 치매병 즉, 알츠하이머형 치매병 (Alzheimer's disease)은 연령에 관계없이 발병하는 치명적인 뇌질환 중 하나이다 (Balin *et*

*al.*, 2011; Gray, 2011).

또한, 국민건강 보험공단에 의하면 노인성질환자는 2002년 49만 9천명에서 2009년 102만 7천명으로 205.7%나 증가한 것으로 나타났다. 실제로 국민건강보험공단은 2010년 47만명을 기록했던 치매환자수가 오는 2030년에는 100만명에 육박할 것이라고 전망한 바 있다. 이와 같이 몇 년 내로 치매 노인 환자의 급증과 이로 인한 사회적 부담의 증가가 우리나라 보건의료계의 가장 큰 현안 중의 하나가 될 것으로 예상된다. 그리고 이러한 추세라면 현재 45%인 90세 이상의 생존율이

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5586 (E-mail) lse1003@korea.kr

Received 2011 October 13 / 1st Revised 2011 November 23 / 2nd Revised 2011 November 30 / Accepted 2011 December 1

21세기 중반에는 65%로 50% 이상 증가할 것으로 보이며, 90세 이상에서 알츠하이머 질환의 발생률이 60% 이상인 점을 고려할 때 이로 인한 개인과 환자의 고통과 경제적 생산성의 손실은 매우 클 뿐만 아니라 이로부터 파생하는 사회적 문제 또한 매우 심각해질 것으로 전망된다.

치매는 기질적인 정신기능장애로 의식의 장애가 없이 기억력, 집중력, 지남력, 판단력, 지적 기능, 운동 기술, 일상생활 수행의 장애로 특징 지워지는 전반적인 인지능력의 저하를 나타내는 임상증후군으로 기억력 상실 특히 최근 사건에 대한 기억력 상실이 알츠하이머형 치매 초기의 가장 특징적인 증상이다 (Davinelli *et al.*, 2011; Robins *et al.*, 2010). 치매는 특성상 비가역적이고, 명확한 병인이 밝혀져 있지 않아 원인적 치료가 어려우므로 종합적인 치료적 접근이 필요하다. 치매의 의학적 치료로는 우선적으로 약물치료를 들 수 있는데 인지기능 개선제와 우울, 불안, 수면장애와 같은 증상조절을 위한 약물 등이 사용되고 있으나, 그 효과가 입증된 약물은 드물다. 이러한 치매를 연구하기 위한 scopolamine, ibotenic acid, amyloid beta, trimethyltin (TMT) 등의 신경독소를 주입에 의한 치매동물모델이 이용되고 있다. 특히, 치매동물모델의 수립이 간단하여 trimethyltin (TMT)를 이용한 동물모델에 대한 연구가 많이 되고 있다. Trimethyltin (organotin compound, 8 mg/kg, single dose)은 복강 내 투여에 의한 변연계 손상을 시사하는 이상 신경행동 유발과 신경병리학적으로 해마의 과립세포, 아몬각의 추체세포, 신피질, 편도핵 등 특정부위 신경세포의 선택적 손상을 통한 기억 손상 동물 모델이다. 또한 이러한 신경세포의 손상으로 인해 TMT의 투여는 passive avoidance task, Morris water maze에서 기억행동이 정상군에 비해 유의하게 감소하고, elevated plus maze test에서는 불안행동 역시 증가하였다고 보고된 바 있다 (Balaban *et al.*, 1988; Dyer, 1982; Ishida *et al.*, 1997; Fortemps *et al.*, 1978; Chang and Dyer, 1983).

수 천년 동안 사용되어 온 대표적인 약용식물인 고려인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 오갈피나무과 (Araliaceae) 인삼속 (*Panax*)에 속하는 다년생 초본류로, 수삼, 백삼 그리고 홍삼의 형태로 유통되고 있는 데, 수삼은 흙에서 캐낸 그대로의 인삼으로 70~80%의 수분을 함유하는 것을 일컬으며, 백삼은 수삼의 표피를 벗기거나 일광 건조 또는 열풍 건조하여 수분함량을 15% 이하가 되도록 가공한 것을 말한다. 인삼의 효능에 대해서는 사상체질별로 인삼의 다양한 형태에서 면역력에 미치는 효과에 대해 임상연구 (Choi and Oh, 2009; Liu *et al.*, 2011)가 이루어졌고, 백삼에서 높은 함량을 보이는 cinnamic acid는 멜라닌 색소의 침착을 저해하는 효과를 나타내는 것으로 보고 (Hwang *et al.*, 2006)되었으며, Lee 등 (2009)은 홍삼을 투여한 마우스에서 학습장애가 감소하는 효과가 있다고 밝힌 바 있다.

또한, 인삼은 증상하는 과정에서 성분의 변화가 일어나는데 백삼에는 malonyl-ginsenoside-Rb<sub>1</sub>, -Rb<sub>2</sub>, -Rc, Rd가, 홍삼에는 ginsenoside-Rh<sub>2</sub>, -Rs, -Rs<sub>2</sub>, 20(S)-ginsenoside-Rg<sub>1</sub>, 20(R)-ginsenoside-Rg<sub>3</sub>, 20(R)-ginsenoside Rh<sub>1</sub>, notoginsenoside-R<sub>4</sub>, ginsenoside Rh<sub>4</sub>, ginsenoside Rg<sub>5</sub>가 포함된 것으로 알려져 있다. 또한 ginsenoside 함유조성은 가공방법에 따라 달라지는 등 홍삼과 백삼의 성분조성에 차이 (Park, 1996; Choi *et al.*, 2010)가 있으므로 효능에도 차이가 있을 것으로 예상된다. 한편, 홍삼에서 분리한 ginsenoside Rg<sub>3</sub>는 신경세포의 손상을 막아준다고 보고 (Joo *et al.*, 2006)되어 있는 등 홍삼의 기억력개선 효과에 관련한 연구가 이루어져 있으나, 가공 처리되어 홍삼으로 만들어지기 전의 인삼이 기억력개선 효과를 나타내는지에 대한 연구는 미흡하다.

이에 본 연구팀은 기억장애 동물모델에서 백삼분말의 기억력 개선 효능을 검증함으로써 치매개선, 인지능력 및 기억력 개선에 유효한 소재로의 활용성을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험에 사용된 재료는 4년근 백삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 주근의 분말로서 2009년 GMP 시설인 충북인삼농협고려인삼창에서 구입하여 시료의 적합성, 잔류농약 불검출성분의 함량 및 사포닌 조성을 다음과 같이 분석하였다. 먼저 분석 및 수입식품 등 검사지침 중 별표 3의 정밀검사 대상 잔류농약 검사항목 (동시다분석 검사대상 50종)의 분석은 한국 기능식품연구원에 의뢰하여 수행하였으며 그 결과 시료의 적합성 및 잔류농약 불검출이 확인되었다 (데이터는 나타내지 않았음). 또한, 백삼분말에 함유된 사포닌의 함량은 Kim 등 (2010)의 방법에 따라 분석용 시료를 조제한 후 HPLC (겔럼; YMC-Pack ODS-AM, 4.6 × 250 mm, 5 μm at 40°C, Water & ACN gradient)로 분석하였는데 그 결과, Choi 등 (2010)이 보고한 백삼 주근의 ginsenosides 함량과 비교 시 Rg<sub>1</sub>, Rf, Rg<sub>2</sub>는 다소 낮았고 Re, Rc, Rb<sub>2</sub>, Rd의 함량은 각각 2.6, 1.6, 1.26 및 3.5배 더 높았으며, Rb<sub>1</sub>는 비슷한 수치를 나타내었는데 (Table 1), 이는 재배조건 및 산지 등의 차이에서 연유한 것으로 사료되었다.

### 2. 기기

백삼의 ginsenoside 함량 분석에는 HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies, USA)를, 그 외 실험에 사용된 기기로는 Microtome (CM 1850, Leica, USA) 및 Water maze (Rat water maze, S-mart, USA) 등이 있으며 그 외의 기기 및 실험에 사용된 시약은 각 실험방법에 명기하였다.

**Table 1.** Ginsenoside contents of the white ginseng powder.

Compound	Mean(%)	SD	RSD
Rg <sub>1</sub>	0.145	0.003	1.927
R <sub>e</sub>	0.416	0.008	1.882
R <sub>f</sub>	0.061	0.002	3.009
Rb <sub>1</sub>	0.196	0.004	1.957
Rg <sub>2</sub>	0.015	0.001	5.918
R <sub>c</sub>	0.100	0.003	2.884
Rb <sub>2</sub>	0.063	0.002	2.558
Rb <sub>3</sub>	0.010	0.000	2.038
R <sub>d</sub>	0.035	0.001	1.855
Total	1.044	0.019	1.834
PD/PT*	0.641	0.002	0.265

\*PD and PT mean protopanaxadiol and protopanaxatriol, respectively.

### 3. 실험동물 및 TMT를 이용한 기억손상 동물모델

체중 230~250 g의 Sprague-Dawley rat (샘타코, 한국)를 고형사료 (삼양사, 서울)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경에 1주일간 적응시킨 후 각 실험군으로 구분하였다. 실험동물은 온도 (20~25°C)와 습도 (30~35%)가 조절된 사육실에서 rat cage에 수용하여 사육하며, 환기횟수는 11~12 회/hr, 조명은 12 hr/day를 유지시켰다. 실험 시작 시의 체중은 270~300 g으로 맞추었다. 사육환경에 대한 적응 기간이 끝난 후 control group과 백삼 분말 투여군에는 trimethyltin (8 mg/kg, Sigma, CA, USA)(Balaban *et al.*, 1988; Koczyk, 1979; Chang and Dyer, 1983; Chang and Dyer, 1985a~d)을 복강 내 투여하여 기억 손상을 유발하였다. TMT의 투여는 예비실험의 바탕으로 6, 7, 8 mg/kg를 투여 후 뇌 조직 및 행동을 관찰하였으나, 뇌 조직 및 행동이 8 mg/kg 투여 군에서 유의하게 손상이 나타났으므로 본 연구에서는 TMT를 8 mg/kg 투여하였다 (데이터는 나타내지 않았음). 투여 다음 날 부터 control group에는 식염수를 그리고 백삼 분말 투여군에는 100 및 300 mg/kg을 식염수에 현탁시켜 3주간 매일 1회씩 경구투여 [이하 각각 WG (white ginseng) 100, WG 300으로 함]한 후 투여 17일째~21일째 기억 행동 검사를 실시하였으며, normal group은 TMT의 복강투여 없이 식염수만을 경구투여하였다.

### 4. Morris water maze (수중미로검사)를 이용한 공간학습능력 측정

수중미로 (직경 2 m)를 균등하게 4등분하고 한 구역 중간에 2 cm 정도 수면 아래에 원형 플랫폼 (12 cm diam.)이 위치하게 하였다. 수중미로의 주변은 비디오 카메라 그리고 공간단서들을 일정하게 유지하였다. 행동검사 1주일 중 4일 동안은 획득시행 (acquisition test)을 실시하여 하루에 3시행씩 최대 180초 동안 훈련을 하고 학습능력을 평가하였으며, 5일째는 파지시행 (60초, retention test)을 실시하여 자유 수영 검사를 통

해 실험동물의 학습능력과 기억력을 테스트하였다. 모든 동물들의 행동은 훈련 시행에서는 출발에서부터 도피대로 올라가는데 걸린 시간을 측정하고, 60초간의 자유 수영 검사 시행에서는 훈련 시에 도피대가 있었던 사분원에 머문 시간을 측정하여 분석하였다.

## 5. 기억장애 동물 모델에서의 신경 화학적 변화에 관한 연구

### 5.1 연역조직화학을 이용하여 acetylcholine성 신경세포 활성 관찰

모든 행동 실험이 끝난 직후 실험동물들을 sodium pentobarbital (엔도발, 한림제약, 한국, 50 mg/kg, i.p.)로 마취시키고 saline 100 ml에 이어 phosphate buffer로 준비한 4% formaline 용액 (fixative) 900 ml로 심장을 통해 관류하였다. 처음 고정액 200 ml은 5분간 빠른 유속으로, 그리고 나머지 700 ml은 25분간에 걸쳐 천천히 관류하였다. 그 다음 뇌를 꺼내 같은 고정액으로 2~3 시간 동안 고정시키고 20% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)에 넣어 4°C에서 하루 동안 고정하였다. 다음날 뇌를 급속 냉동한 후, 뇌 조직을 몇 차례 PBS에 0.3% Triton X-100 첨가한 PBST에서 씻고 primary sheep polyclonal ChAT antibody (AB1582, Chemicon, USA), primary rabbit polyclonal AchE antibody (Santacruz, CA, USA)를 1차 항체로 사용하였다. 1차 항체는 PBS에 0.3% Triton X-100 첨가한 PBST에서 2% fetal bovine serum과 0.01% sodium azide (Sigma, St. Louis, MO)으로 2,000배 희석하여 준비한 후 4°C에서 72시간 동안 지속적으로 흔들어주며 배양하였다. 그 후 뇌 조직을 PBST로 씻은 다음, 2시간 동안 실온에서 2% fetal bovine serum을 함유하는 PBST에서 200배로 희석한 biotinylated anti-sheep serum 또는 anti-rabbit serum (PK 4001, PK4006, Vector Laboratories, USA)에 반응시켰다. 다시 PBST로 씻은 다음, 뇌 조직은 실온에서 1시간 동안 Vectastain Elite ABC reagent (Vector)에 담구어 반응시켰다. PBST로 세척한 뒤 뇌 조직을 nickel chloride로 강화시키고 착색제인 diaminobenzidine을 사용하여 발색시켰다. 발색이 끝난 뇌 조직은 gelatine으로 도포된 슬라이드에 부착한 뒤 2시간동안 실온에서 건조시켰으며, xylene으로 투명화시켜 polymount로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다. 뇌의 각 부위의 위치와 명칭은 Paxinos와 Watson (Paxinos and Watson, 1986)의 뇌 도감을 참고하였으며, 100배로 현상된 사진에서 격자 (2×2 cm)를 이용하여 동일한 지역에서 일정한 영역에 반응되어 나타난 염색성의 정도를 계산하였다.

### 5.2 cAMP responsive element binding protein (CREB)의 활성 관찰

뇌 조직의 CREB 활성을 관찰하기 위해 1차 항체로 PBS에

0.3% Triton X-100 첨가한 PBST에서 0.01% sodium azide (Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 2,000배 희석하여 준비한 primary rabbit polyclonal CREB antibody (#9197, Cell Signaling, USA)를 사용하였으며 2차 항체로 2% fetal bovine serum을 함유하는 PBST에서 200배로 희석한 biotinylated rabbit anti-rabbit serum (PK 4001, Vector Laboratories, USA)를 사용하였고, Vectastain Elite ABC reagent (Vector)와의 반응, nickel chloride로의 강화, diaminobenzidine를 사용한 발색 및 발색이 끝난 조직의 gelatine 도포, 슬라이드 부착, 봉입, 현미경관찰, 뇌의 각 부위의 위치와 명칭 그리고 염색성 정도의 계산 등은 5.1의 acetylcholine 성 신경세포 활성 관찰 방법과 동일하게 수행하였다.

### 5.3 Brain derived neurotrophic factor (BDNF)의 활성 관찰

뇌조직의 BDNF 활성을 관찰하기 위해 1차 항체로 primary rabbit polyclonal BDNF antibody (#9197, Cell Signaling, USA)를 PBS에 0.3% Triton X-100 첨가한 PBST에서 2% fetal bovine serum과 0.01% sodium azide (Sigma, St. Louis, MO)으로 2,000배 희석하여 사용하였으며, 2차 항체로 2% fetal bovine serum을 함유하는 PBST에서 200배로 희석한 biotinylated rabbit anti-rabbit serum (PK 4001, Vector Laboratories, USA)을 처리하였으며 이후의 실험과정은 5.1의 acetylcholine성 신경세포 활성 관찰법과 동일하게 수행하였다.

### 6. 통계분석

모든 측정값은 평균값 ± 표준오차 (mean ± S.E.)로 표시하였고, 각 실험군간의 통계적 분석은 Windows용 SPSS 15.0를 이용하였다. 행동실험 및 면역조직화학적 측정치의 비교는 one-way ANOVA를 시행하였으며, 사후검증은 LSD를 이용하였다. 전체 실험의 통계적인 유의성은 신뢰구간  $P < 0.05$ 에서 의미를 부여하였다.

## 결 과

### 1. 기억장애 동물모델에서 Morris water maze를 이용한 공간지각능력의 획득시행 측정결과

Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 TMT (8 mg/kg, i.p)투여로 흰쥐에서 기억장애를 유발하고 백삼 분말 (WG 100 or WG 300 mg/kg) 현탁액을 흰쥐에 구강투여 후 공간지각능력을 시험한 결과, 획득시행의 2 ( $p < 0.05$ ), 4 ( $p < 0.001$ )일째 normal군에 비해 control군은 도피대를 찾는데 걸리는 시간이 약 2배 증가되는 경향을 보였으나, 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.

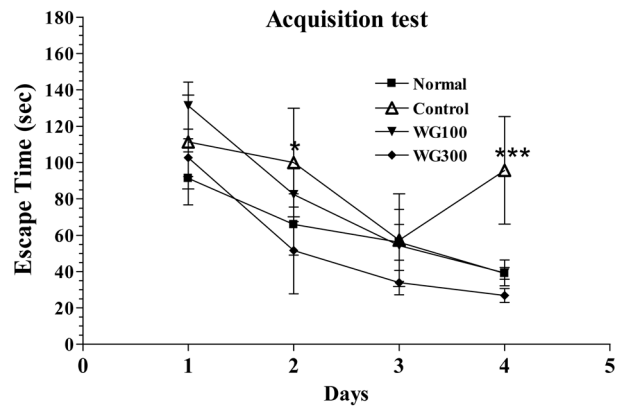


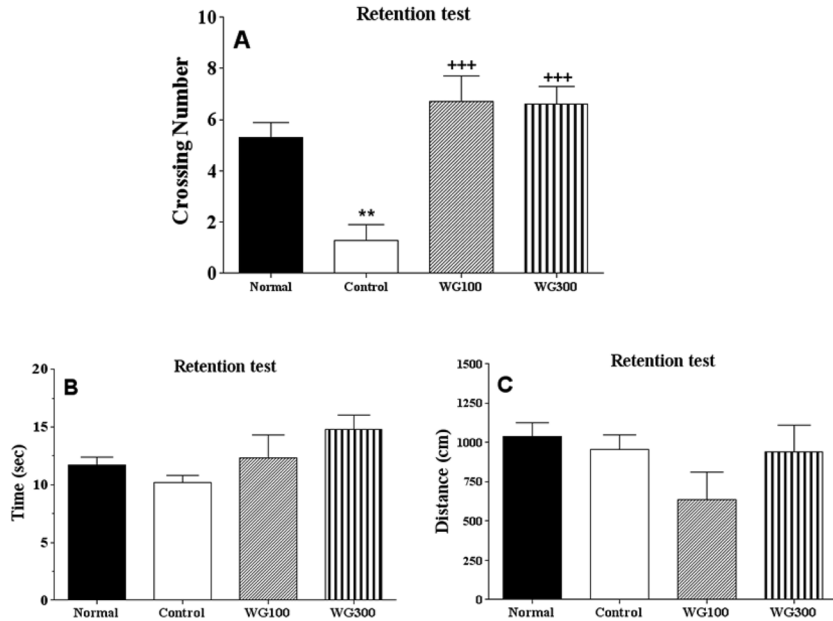
Fig. 1. The latency to escape onto the hidden platform during the Morris water maze. The task was performed with 3 trials per day during 5 days for the acquisition test. The values are presented as means ± S.E.M. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. Normal.

### 2. 기억장애 동물모델에서 Morris water maze를 이용한 공간지각능력의 검사시행 측정결과

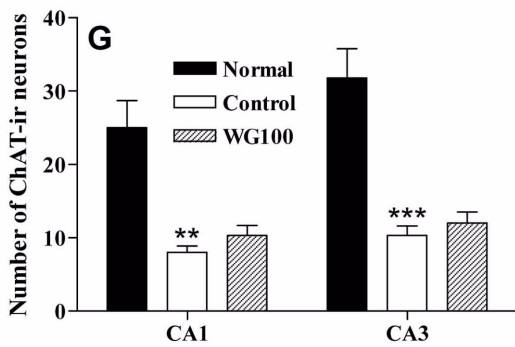
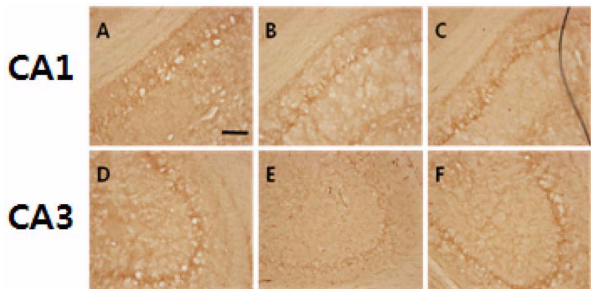
Fig. 2에서 나타낸 바와 같이, 5일째 도피대를 제거한 후 도피대 근처에 있는 시간 및 거리를 측정된 결과 normal군에 비해 control 군은 도피대 근처에서 머문 시간과 거리가 줄어드는 경향이 나타났다. 그러나, 도피대를 가로지르는 횟수 (crossing number)를 측정된 결과 normal군  $5.3 \pm 0.6$ , control군  $6 \pm 0.5$ , WG 100군  $6.76 \pm 1.0$  그리고 WG 300군이  $6.6 \pm 0.7$ 로 나타났다. 또한, normal군에 비해 control군이 도피대를 가로지르는 횟수가 유의하게 감소 [ $F_{3,19} = 14.1$ ,  $P < 0.001$ ]하였으나, 백삼 투여 후에는 WG 100 및 WG 300군 모두에서 crossing number가 3배 이상 증가된 것으로 확인되었다.

### 3. 기억장애 동물모델에서 백삼 투여 후 Choline acetyltransferase (ChAT)의 발현 비교

기억장애 흰쥐에 백삼을 투여한 후 ChAT의 발현을 염색을 이용하여 분석하였으며 그 결과를 Fig. 3에 나타내었는데, 뇌조직의 choline acetyltransferase (ChAT)는 해마의 CA1부위와 CA3부위에서도 normal군에 비해 control군에서의 발현이 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). CA1부위에서 ChAT의 발현은, normal군  $25 \pm 3.7$ , control군  $8 \pm 0.9$  그리고 WG 100군에서  $10.3 \pm 1.4$ 개 발현하였다. 또한 CA3 부위에서는 normal군  $31.8 \pm 4.0$ , control군  $10.3 \pm 1.3$  그리고 WG 100군에서  $12.0 \pm 1.5$ 개 발현하였다. 해마 내 ChAT의 발현을 비교한 결과 WG 100군은 control군에 비해 ChAT의 발현이 증가되는 경향을 보였다.



**Fig. 2. Retention test in the Morris water maze.** Retention performance was tested on 5th day. The rats received a 1 min probe trial in which the platform was removed from the pool for retention testing. Crossing number (A), spent time in the platform (B) and swim distance on the platform (C). The values are presented as means  $\pm$  S.E.M. \*\* $P < 0.01$  vs. Normal group & +++ $P < 0.001$  vs. Control group, respectively.



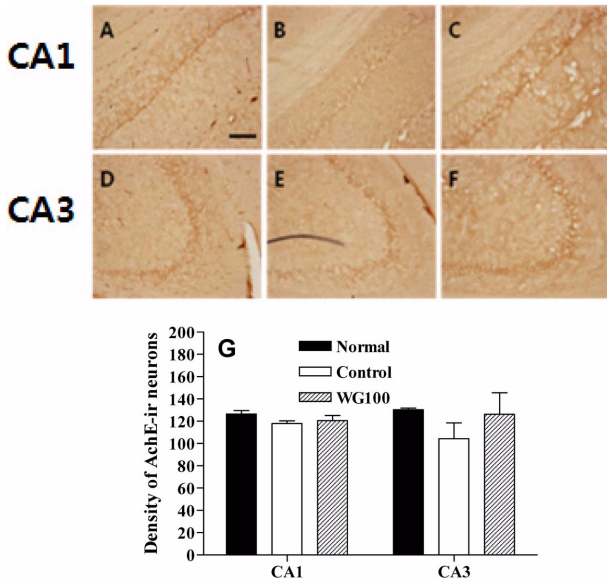
**Fig. 3. The number of choline acetyltransferase (ChAT) immunostained nuclei in different hippocampal CA1 and CA3 of the experimental groups (G).** Sections were cut coronally at  $30 \mu\text{m}$  and the scale bar represents  $200 \mu\text{m}$ . A,D: Normal; B,E: Control; C,F: WG 300. Each values represents the  $\pm$  S.E.M. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. Normal group.

#### 4. 기억장애 동물모델에서 백삼 투여 후 acetylcholinesterase의 발현 비교

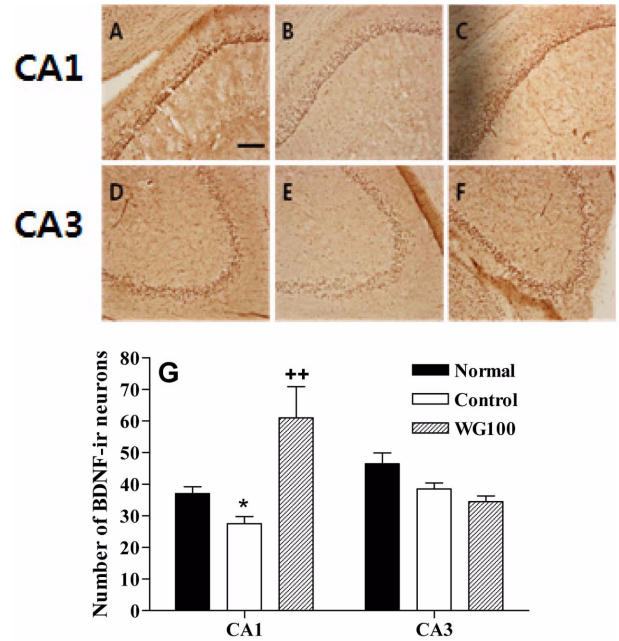
Acetylcholinesterase를 이용하여 뇌조직의 분석결과를 Fig. 4에 나타내었는 바, 해마의 CA1 부위와 CA3 부위에서 normal군에 비해 control군에서 AchE의 발현이 감소하였다 (하지만, 그룹간의 통계적인 유의성은 나타나지 않았다). CA1부위에서 AchE의 background density는 normal군  $126.4 \pm 3.2$ , control군  $117.9 \pm 2.3$  그리고 WG 100군에서  $120.5 \pm 4.5$ 였고, CA3 부위에서는 normal군  $130.2 \pm 1.5$ , control군  $104.3 \pm 14.1$  그리고 WG 100군에서  $126.3 \pm 19.2$ 개 발현하였다. 따라서, 해마 내 AchE의 발현을 비교한 결과 WG 100군은 control군에 비해 AchE의 발현이 약간 증가되는 경향을 보였다.

#### 5. 기억장애 동물모델에서 백삼 투여 후 cAMP responsive element binding protein (CREB)의 발현 비교

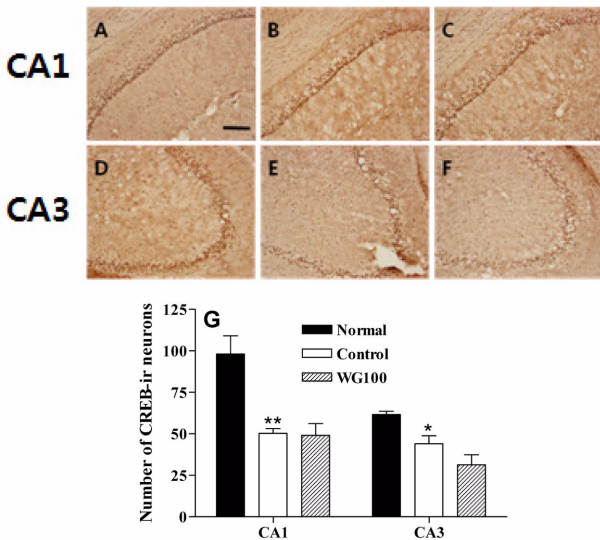
CREB에 대한 면역조직 화학법을 이용한 뇌조직의 분석결과를 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 해마의 CA3부위에서 normal군에 비해 control군에서 CREB의 발현이 감소하였으나, 그룹간의 통계적인 차이는 보이지 않았다. CA1부위에서 CREB는 normal군  $98.0 \pm 10.9$ , control군  $50.3 \pm 2.8$  그리고 WG 100군에서  $49.0 \pm 7.1$ 이었고, CA3 부위에서는 normal군  $46.5 \pm 3.4$ , control군  $38.5 \pm 1.9$  그리고 WG 100군에서  $34.5 \pm 1.8$ 개 발현하였다.



**Fig. 4.** The number of acetylcholinesterase (AchE) immunostained nuclei in different hippocampal CA1 and CA3 of the experimental groups (G). Sections were cut coronally at 30  $\mu\text{m}$  and the scale bar represents 200  $\mu\text{m}$ . A,D: Normal; B,E: Control; C,F: WG 300. Each values represents the  $\pm$  S.E.M.



**Fig. 6.** The number of brain derived neurotrophic factor (BDNF) immunostained nuclei in different hippocampal CA1 and CA3 of the experimental groups (G). Sections were cut coronally at 30  $\mu\text{m}$  and the scale bar represents 200  $\mu\text{m}$ . A,D: Normal; B,E: Control; C,F: WG 300. Each values represents the  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs. Normal group & ++ $P < 0.01$  vs. Control group, respectively.



**Fig. 5.** The number of cAMP responsive element binding protein (CREB) immunostained nuclei in different hippocampal CA1 and CA3 of the experimental groups (G). Sections were cut coronally at 30  $\mu\text{m}$  and the scale bar represents 200  $\mu\text{m}$ . A,D: Normal; B,E: Control; C,F: WG 300. Each values represents the  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Normal group.

6. 기억장애 동물모델에서 백삼 투여 후 brain derived neurotrophic factor (BDNF)의 발현 비교

BDNF 면역조직화학법을 이용한 뇌조직의 분석결과 (Fig.

6), CA1부위에서 normal군  $37.0 \pm 2.2$ , control군  $27.5 \pm 2.3$  그리고 WG 100군에서  $61.0 \pm 9.9$ 이었고, CA3 부위에서는 normal군  $61.5 \pm 2.1$ , control군  $44 \pm 4.8$  그리고 WG 100군에서  $31.3 \pm 6.0$ 개 발현하였다. 뇌조직에 대한 분석결과는 해마의 CA1과 CA3 부위에서 normal군에 비해 control군에서 BDNF의 발현이 감소 ( $F_{2,11} = 8.2, p < 0.01$ )하였으나 WG 100군의 hippocampal CA1에서는 control군에 비해 BDNF의 발현이 유의하게 증가하였다. 그러나, hippocampal CA3에서는 그룹 간의 통계적인 차이는 보이지 않았다.

고 찰

본 연구는 TMT로 기억장애를 유발한 동물모델에서 백삼이 기억행동증진 효과를 나타내는 지를 확인하기 위해 Morris water maze를 이용한 획득시행 및 검사시행을 분석하였고 immunohistochemistry를 이용하여 뇌조직의 choline acetyltransferase (ChAT), acetylcholinesterase, cAMP responsive element binding protein (CREB), brain derived neurotrophic factor (BDNF)의 발현을 비교하였다.

Morris water maze test에서, 마지막 5일째 도피대를 제거한 후 행한 검사시행에서 도피대를 횡단하는 횟수를 측정된 결



과, 백삼 투여군 (WG 100 과 WG 300)에서는 control군에 비해 도파대를 횡단하는 횡수가 3배 이상 증가하였다. 행동 결과와 마찬가지로 뇌 내의 BDNF의 발현이 control군에 비해 WG 100군에서 유의하게 증가되는 것이 확인되었으며, cholinergic neurons의 발현이 control군에 비해 증가되는 경향을 나타냈다. TMT로 유도된 기억장애 모델에서 WG 100군이 WG 300군과 control군에 비해 학습 및 기억행동이 유의하게 증가됨을 보였으므로, WG 100군의 결과를 바탕으로 뇌조직에 대한 관찰을 살펴보았다. TMT에 의한 기억장애 동물모델은 이전 연구들 (Ishida *et al.*, 1997; Dyer, 1982) 에서도 이미 인지행동장애의 동물모델로서 많이 사용되고 있는데 특히, 흰쥐에서는 해마 내 pyramidal neurons의 발현을 저해하고, TMT로 인한 학습 및 기억장애가 보고되고 있다 (Balaban *et al.*, 1988; Koczyk., 1996; Chang and Dyer, 1983, 1985a, b, c, d; Fortemps *et al.*, 1978). 수중미로시험의 획득시행에서 기억력 장애가 나타나고, 해마에 의한 기억행동을 측정하기 위한 동물모델로 자주 사용 (Stewart *et al.*, 2011; Hamilton *et al.*, 2009)되고 있어 본 연구에서도 이러한 보고를 근거로 기억장애 동물모델을 만들고 백삼을 투여하고 수중미로 테스트를 한 결과, 백삼 투여군이 획득시행 중에서 TMT만 투여한 control 군에 비해 도파대를 찾아가는 시간이 줄어드는 경향을 보였고, 검사시행에서도 도파대를 가로지르는 횡수가 control 군에 비해 300% 증가하였다. 이러한 결과는 TMT로 유도된 기억장애 동물에 백삼을 투여할 때 TMT로 인해 감소된 기억능력이 증가되는 것을 시사하며 이는 백삼의 투여가 TMT로 인한 기억장애행동을 감소시키는 것으로 사료된다.

BDNF (brain-derived neurotrophic factor)는 신경성장인자 (neurotrophic growth factor)의 하나로 성숙한 포유류의 뇌에서 광범위하게 발현되며, 혈관-뇌 장벽 (blood brain barrier)을 통과하고 말초조직에도 많이 분포 (Castren *et al.*, 1995; Radka *et al.*, 1996)하고 있으며, 태생기에 중추신경계의 전 영역에서 성장과 분화에 관여하고 성인기에는 신경전달물질을 조절하고 기억과 학습을 통한 신경가소성 (neural plasticity)에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Karege *et al.*, 2005; Kang and Schuman, 1996). 지금까지 보고된 여러 연구 결과에 의하면 BDNF는 여러 중추신경계 질환과 연관이 있어 간질 발작이나 뇌 외상과 같은 뇌 손상 (brain insults)이 있으면 신경 손상에 대한 보호와 신경조직의 재생산을 위해 BDNF의 발현이 증가 (Castren *et al.*, 1995; Radka *et al.*, 1996)하며, 강박장애, 알츠하이머병, 파킨슨병에도 BDNF가 관여한다고 알려져 있다. 그러나, BDNF의 발현에 대한 연구에서 농도 (Kang and Schuman, 1996; Karege *et al.*, 2005; Davinelli *et al.*, 2011; Castren *et al.*, 1995)에 따라 그 결과가 항상 일치하지는 않았다. 본 연구에서는 TMT의 투여는 오히려 BDNF의 발현을 저해했으며, 이것은 TMT의 독성이 neuro-

trophic factor의 발현을 억제하는 것으로 보였다. 하지만, 백삼을 21일간 투여한 후에는 control군에 비해 BDNF의 발현이 유의하게 증가되었다. 이는 백삼의 투여가 neurotrophic factor를 증가시킴으로서 신경세포 보호 효과를 나타내는 데 기인하는 것으로 사료된다.

이상과 같은 결과를 종합할 때, 백삼의 투여는 기억능력 및 neurotrophic factor의 발현을 조절함으로써 신경보호효과 및 기억증진효과를 나타낸다고 생각되며, 백삼이 어떠한 기전에 의해 이러한 효과를 나타내는 지에 대해서 추가적인 연구를 통해 명확한 분석이 필요하다고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 시험연구사업 (PJ006605012011)의 연구비로 수행된 결과로 이에 감사를 드립니다.

## LITERATURE CITED

- Balaban CD, O'callaghan JP and Billingsley ML.** (1988). Trimethyltin-induced neuronal damage in the rat brain: comparative studies using silver degeneration strains, immunocytochemistry and immune-assay for neuronotypic and gliotypic proteins. *Neuroscience*. 26:337-61.
- Balin B, Abrams JT and Schrogie J.** (2011). Toward a unifying hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 17:587-589.
- Castren E, Thoenen H and Lindholm D.** (1995). Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus. *Neuroscience*. 64:71-80.
- Chang LW and Dyer RS.** (1983). A time-course study of trimethyltin induced neuropathology in rats. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. 5:43-9.
- Chang LW and Dyer RS.** (1985a). Septotemporal gradients of trimethyltin-induced hippocampal lesions. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. 7:43-9.
- Chang LW and Dyer RS.** (1985b). Trimethyltin induced pathology in sensory neurons. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. 5:673-96.
- Chang LW and Dyer RS.** (1985c). Species and strain comparison of acute neurotoxic effects of trimethyltin in mice and rats. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. 5:337-50.
- Chang LW and Dyer RS.** (1985d). Neuropathology of trimethyltin intoxication. III. Changes in the brain stem neurons. *Environmental Research*. 30:399-411.
- Choi JE, Nam KY, Kim BY, Cho HS and Hwang KB.** (2010). Changes of chemical compositions and ginsenoside contents of different root parts of ginsengs with processing method. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:118-125.
- Choi JH and Oh DH.** (2009). Effect of white and red ginseng extracts on the immunological activities in lymphocytes isolated

- from Sasang constitution blood cells. *Journal of Ginseng Research*. 33:33-39.
- Davinelli S, Intrieri M, Russo C, Di Costanzo A, Zella D, Bosco P and Scapagnini G.** (2011). The "Alzheimer's disease signature": potential perspectives for novel biomarkers. *Immunity & Ageing*. 8:7-12.
- Dyer RS.** (1982). Physiological methods for assessment of trimethyltin exposure. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. 4:659-64.
- Fortemps E, Amand G, Bomboir A, Lauwerys R and Laterre EC.** (1978). Trimethyltin poisoning: report of two cases. *Environmental Health : A Global Access Science Source*. 41:1-6.
- Gray SG.** (2011). Epigenetic treatment of neurological disease. *Epigenomics*. 3:431-450.
- Hamilton DA, Johnson TE, Redhead ES and Verney SP.** (2009). Control of rodent and human spatial navigation by room and apparatus cues. *Behavioral Processes*. 81:154-169.
- Hwang EY, Kong YH, Lee YC, Kim YC, Yoo KM, Jo YO and Choi SY.** (2006). Comparison of phenolic compounds contents between white and red ginseng and their inhibitory effect on melanin and biosynthesis. *Journal of Ginseng Research*. 30:82-87.
- Ishida N, Akaike M, Tsutsumi S, Kanai H, Masui A, Sadamatsu M, Kuroda Y, Watanabe Y, Mxewen BS and Kato N.** (1997). Trimethyltin syndrome as a hippocampal degeneration model: temporal changes and neurochemical features of seizure susceptibility and learning impairment. *Neuroscience*. 81:1183-1191.
- Joo SS, Won TJ, Lee YJ, Hwang KW, Lee SG, Yoo YM and Lee DI.** (2006). Ginsenoside Rg<sub>3</sub> from red ginseng prevents damage of neuronal cells through the phosphorylation of the cell survival protein Akt. *Food Science and Biotechnology*. 15:244-247.
- Kang H and Schuman EM.** (1996). A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science*. 274:1402-1406.
- Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM and Bertschy G.** (2005). Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet activity. *Biological Psychiatry*. 57:1068-1072.
- Kim GS, Hyun DY, Kim YO, Lee SE, Kwon H, Cha SW, Park CB and Kim YB.** (2010). Investigation of ginsenosides in different parts of *Panax ginseng* cultures by hydroponics. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*. 28: 216-226.
- Koczyk D.** (1996). How does trimethyltin affect the brain: facts and hypotheses. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 56:587-96.
- Lee HJ, Kim JS, Moon C, Kim JC, Jo SK, Jang JS and Kim SH.** (2009). Effect of red ginseng on radiation-induced learning and memory impairment in mouse. *Journal of Ginseng Research*. 33:132-138.
- Liu XL, Xi QY, Yang L, Li HY, Jiang QY, Shu G, Wang SB, Gao P, Zhu XT and Zhang YL.** (2011). The effect of dietary *Panax ginseng* polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shelfish Immunology*. 30:495-500.
- Park JD.** (1996). Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Journal of Ginseng Research*. 30:389-415.
- Paxinos G and Watson C.** (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. (2nd ed). Academic Press. New York, USA. p1-59.
- Radka SF, Holst PA, Fritsche M and Altar CA.** (1996). Presence of brain derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Research*. 709:122-130.
- Robins Wahlin TB and Byrne GJ.** (2010). Personality changes in Alzheimer's disease: a systematic review. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 26:1019-29.
- Stewart S, Cacucci F and Lever C.** (2011). Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the tg2576 Alzheimer's mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease*. 26:105-26.