

Multiple Functional Effects of Korea Ginseng on Vascular Endothelial Cells

Young-Myeong Kim¹ and Young-Chul Lee²

¹Department of Molecular and Cellular Biochemistry, College of Medicine, Kangwon National University, Chunchon, Kangwon-do and ²Korea Food Research Institute, Sunnam, Gyeonggi-do

다양한 연구에 따르면, 고려인삼은 허약한 체질, 숙취, 폐경과 월경불순, 초기 당뇨병, 영양실조, 빈혈 및 단백질 부족, 간기능 악화, 각종 독성물질에 기인한 중독, 피로, 추위, 스트레스, 산후조리, 체력쇠퇴 등에 효능이 있음이 알려져 있다. 특히 고려인삼은 혈관 기능을 효과적으로 조절함으로 고혈압, 뇌졸중, 심근경색, 동맥경화, 관절염, 당뇨, 비만 등의 질환을 효과적으로 치료하거나 예방할 수 있는 효능이 있음이 최근 연구에 의하여 밝혀지고 있다. 그러나 고려인삼 약리효능의 표적분자(target molecule)나 생화학적 작용기전(biochemical mechanism)이 세포 및 분자 수준에서 규명되지 못하여 고려인삼의 의약품으로 인정받지 못하고 건강식품으로 분류되고 있어 소비가 한인·흑인·히스패닉 시장에 한정되고 있고, 최근에는 타 경쟁국 인삼에 비해 수출 경쟁력이 약화되고 있는 실정이다. 본 연구에서는 고려인삼 추출물과 효능성분이 혈관내피세포 기능조절에 미치는 효능 및 작용기전을 규명하여 고려인삼이 호발성 혈관질환에 대한 예방 및 치료 효능이 있음을 분자 및 유전자 수준에서 확인하고자 하였다.

1. 고려인삼의 효능 특이 유전자 탐색, 확보 및 기능 분석

고려인삼 추출물에 의해 혈관내피세포에서 특이적으로 발현이 조절되는 유전자를 확보하기 위하여 DNA microarray를 수행한 결과 유전자 발현이 2배 이상 유의성 있게 변화되는 유전자 250여개를 확인하였다. 이들 유전자의 발현 변화를 mRNA 수준에서 확인하기 위하여 RT-PCR를 실시한 결과 HMOX1, EphA7, IGFB6 등의 유전자는 대조군에 비하여 발현이 증가됨을 확인하였다. 한편 유전자의 발현이 유의성 있게 감소되는 군을 조사한 결과 혈관신생 억제 유전자로 알려진 유전자인 TSP-2와 TSP-4 뿐만 아니라 PLA2IB, E-Selectin, Cyclin G1 등의 유전자 발현도 감소하는 것을 볼 수가 있었다. 또한 HUVECs에 TNF- α 처리시 염증관련 유전자인 ICAM-1, 및 VCAM-1의 발현이 증가되는데, 고려인삼 추출물을 처리하였을 때 이들 유전자의 발현이 억제됨을 확인하였다. 이상의 결과로부터 고려인삼 추출물은 혈관내피세포의 생존 및 혈관신생 촉진 유전자 (HMOX1, EphA7, IGFB6 등)의 발현은 증가 시키고, 혈관신생억제 및 염증관련 결착분자의 발현은 감소시킴을 확인할 수 있었다. 이들 유전자 중 혈관내피세포에서 HMOX1 (hemeoxygenase-1, HO-1)의 기능을 분석하기 위하여 혈관내피세포에 heme를 처리하여 HO-1의 발현을 증가 시켰을 때 혈관신생 현상인 내피세포의 증식 (proliferation), 이동 (migration) 및 관형성 (tube-like structure formation)이 증가 되었고, nitric oxide (NO)의 생성도 증가됨을 확인하였다. 이러한 생물학적 현상

은 HO-1 저해제인 SnPP 또는 nitric oxide synthase (NOS) 저해제인 NMA에 의하여 효과적으로 억제함을 확인하였다. 더 나아가서 HO-1 유전자를 내피세포로 도입하여 과 발현하였을 때 NO의 생성이 증가되었고, 이러한 증가는 SnPP 혹은 L-NIO (NOS inhibitor)에 의하여 효과적으로 억제됨을 확인하였다 (그림 1). 이상의 연구결과는 고려인삼 추출물을 허혈질환의 효과적 치료제로 활용할 수 있음을 제시하는 분자수준의 약리기전을 제시하고 있다. 또한 혈관기능 소실로 인하여 NO의 생성이 저하되어 유발되는 고혈압 치료제로써 고려인삼의 약리기전을 정확하게 제시하고 있다.

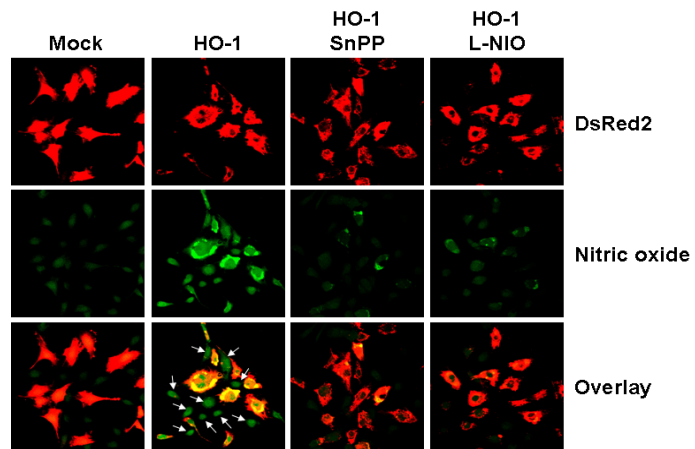


Fig.1. HUVECs were transfected with HO-1 gene inserted into pDsRed2 vector and cultured in the presence or absence of SnPP and L-NIO. NO and HO-1 expression were determined by fluorescence microscopy

2. 인삼의 혈관염증 억제효능 및 작용기전

DNA microarray에서 인삼 추출물은 내피세포의 결착분자인 ICAM-1과 VCAM-1의 발현을 효과적으로 억제함을 확인하였다. 혈관내막에 있는 내피세포에서 이들 결착분자를 발현이 증가되면 혈액에 존재하는 leukocyte와 결합하고, leukocyte는 혈관벽을 용이하게 통과하여 염증부위로 이동하게 된다. 따라서 이 같은 염증관련 유전자의 발현 증가는 동맥경화, 관절염 등과 같은 혈관염증 질병의 주요 원인이 되고 있다. 혈관염증반응의 주된 cytokine인 TNF- α 로 내피세포를 활성화시켰을 때 인간 monocyte 세포주인 U937 세포가 혈관내피세포와 결합하는 것을 고려인삼 추출물이 효과적으로 저해함을 확인하였다. 인삼 추출물은 처리 시간과 농도에 의존적으로 ICAM-1과 VCAM-1의 발현을 억제시킴을 세포 균질액에서 Western blot으로 확인하였고, 이들 유전자 산물이 혈관내피세포의 표면에 존재하는 양도 감소됨을 FACS를 통하여 확인하였다. 고려인삼 추출물은 TNF- α 에 의해 증가된 이들 결착분자 mRNA의 수준을 현저하게 감소시켰다. 이 결과는 고려인삼 추출물에 의한 ICAM-1과 VCAM-1의 발현억제 효과는 전사단계 (transcriptional step)에서 조절되고 있음을 알 수 있다. 따라서 고려인삼의 혈관 염증 억제기전을 분자 수준에서 확인하기 위하여, ICAM-1과 VCAM-1의 promoter 활성에 미치는 인삼추출물의 효과를 수행하였다. 각각의 promoter를 혈관내피세포로 도입하고 TNF- α 를 처리한 결과 ICAM-1과 VCAM-1의 promoter 활성이 각각 2.0와 2.5배 증가하였고, 이러한 증가는 고려인삼 추출물에 의하여 유의성 있게 감소됨을 확인하였다. 이들 유전자의 promoter에는 다양한 전사인

자가 결합 할 수 있는 motif가 있으나 가장 중요하게 인식되고 있는 전사조절 부위는 NF- κ B가 결합하는 DNA sequence이다. 따라서 고려인삼 추출물이 NF- κ B 활성화에 미치는 효과를 EMSA 방법을 이용하여 조사한 결과, TNF- α 를 처리하였을 때 NF- κ B의 활성화가 증가 되었고, 이러한 NF- κ B 활성화 증가는 고려인삼에 의하여 효과적으로 억제됨을 확인할 수 있었다. NF- κ B의 활성화는 I κ B kinase (IKK) 활성화증가로 인하여 I κ B의 인산화 및 분해가 선행되어야 한다. 따라서 고려인삼 추출물이 IKK 활성화조절과 I κ B의 인산화 및 분해에 미치는 효과를 조사한 결과, TNF- α 에 의해 증가된 IKK 활성화도와 I κ B의 인산화 및 분해는 고려인삼 추출물에 의하여 유의성 있게 억제되었다. 최종적으로 혈관내피세포의 세포질에 불활성화 상태로 존재하던 NF- κ B가 TNF- α 의 처리로 활성화되어 핵으로 이동 (nuclear translocation)되는 현상이 고려인삼 추출물을 첨가하였을 때 효과적으로 억제됨을 면역염색법을 이용하여 직접적으로 확인하였다. ICAM-1과 VCAM-1의 발현에 의해 혈관내피세포에 결합된 면역세포는 다양한 염증관련 유전자의 발현을 통하여 혈관염증을 촉진한다. 따라서 고려인삼 추출물에 의한 면역세포의 활성화에 미치는 효과를 연구하였다. 고려인삼 추출물을 LPS로 활성화시킨 대식세포에 처리하였을 때 혈관내피세포에서 결착분자의 발현억제와 동일하게 NF- κ B의 활성을 억제하여 염증유발 인자인 NO, TNF- α , IL-1 β 등의 생성을 효과적으로 억제함을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 고려인삼이 염증 유발에 직접적인 원인인 NF- κ B의 활성화를 억제하여 혈관내피세포에서 ICAM-1과 VCAM-1의 발현을 억제하고, 활성화된 면역세포에서는 다양한 염증성 사이토카인의 생성을 억제하여 동맥경화와 같은 혈관 염증질환을 치료하거나 예방할 수 있음을 분자 및 유전자 발현 수준에서 확인할 수 있었다.

3. 고려인삼이 혈관내피세포 노화 및 NO 생성에 미치는 효과

혈관내피세포의 노화는 영양분과 산소를 원활하게 공급할 수 없을 뿐만 아니라 각 세포로부터 생성되는 대사 부산물을 효과적으로 제거하지 못함으로 노화를 촉진하는 중요한 병리적 요인으로 알려져 있다. HUVECs를 지속적으로 배양하면 P8 (passage 8)부터 세포의 분열 혹은 증식속도가 감소되고 세포는 크기가 커지고, 하나의 세포에 핵이 2개 이상 존재하는 전형적인 노화현상을 보였다. 그러나 고려인삼 추출물을 HUVECs의 배지에 첨가하면 세포의 증식억제를 지연시키고 노화현상은 억제되었다. 이러한 노화억제 효과는 lysosome에 존재하는 β -galactosidase의 활성을 측정함으로써 재확인할 수 있었다 (Fig. 2). 내피세포의 노화는 미토콘드리아에서 생성되는 유해산소 (ROS)의 생성 증가 혹은 eNOS로부터 NO의 생성억제에 의하여 진행되는 것으로 알려져 있다. 내피세포의 passage가 증가함에 따라 미토콘드리아에 존재하는 항산화 효소인 Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD)의 발현은 감소되었고, ROS의 생성은 증가되었다. 이러한 Mn-SOD의 발현과 ROS의 생성 변화는 고려인삼 추출물에 의하여 효과적으로 억제되었으나, 세포질에 존재하는 Zn/Cu-SOD 및 catalase의 발현에 미치는 효과는 미미하였다. 그러나 고려인삼 추출물은 외부에서 세포 배양액에 첨가한 H₂O₂를 효과적으로 제거하는 항산화 효과가 있음을 알 수 있었다. 더 나아가서 고려

인삼 추출물은 혈관내피세포에서 cyclin D의 발현은 증가시키고, 반대로 p21의 발현은 억제하여 세포주기를 효과적으로 진행시켜 세포분열을 촉진함으로써 혈관내피세포의 노화를 억제할 수도 있음을 알 수 있었다. 한편, 내피세포의 배양 passage가 15 이상이 되면 eNOS로부터 NO의 생성이 급격히 감소하게 되지만 고려인삼 추출물과 함께 배양한 내피세포에서는 NO의 생성이 상대적으로 높음을 확인하였다. 한편, 고려인삼 추출물에 의한 NO의 생성 증가가 내피세포의 replicative senescent 억제에 미치는 효과를 확인하고자 telomerase 활성을 측정된 결과, 인삼 추출물을 첨가한 내피세포는 대조군 세포보다 telomerase의 활성이 유의성 있게 높음을 확인하였다. 이러한 연구결과는 고려인삼이 혈관의 내피세포 노화를 억제하는 기능이 있음을 제시하고 있다.

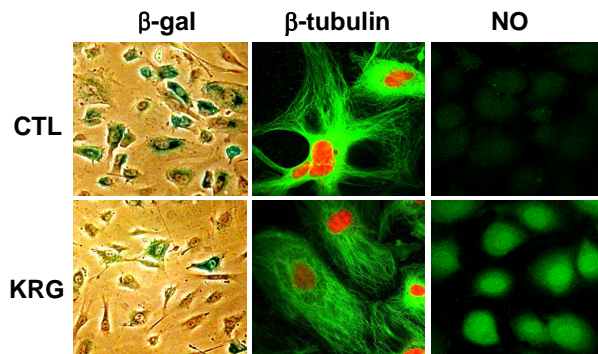


Fig.2. Effect of ginseng extract (KRG) on endothelial cell senescence and NO production

4. 고려인삼이 내피세포 기능소실에 미치는 효과

정상적인 세포배양조건 (10% FBS)에서 고려인삼은 선택적으로 암세포 사멸을 유도하지만, 정상세포인 혈관내피세포에는 독성효과가 없었다. 그러나 세포 성장인자를 제거한 비정상조건 (무혈청 배양)에서 혈관내피세포를 장시간 배양하면 cytochrome c 방출과 함께 caspase-3의 활성화가 유도되어 세포사멸이 일어났다. 이러한 비정상적인 혈관내피세포 배양조건에 고려인삼 추출물을 첨가한 결과 혈관내피세포 사멸을 억제하여 endothelium의 integrity를 유지할 수 있음을 확인하였다. 이러한 세포사멸 억제 효과는 caspase-3의 활성을 부분적으로 저해함에 의하여 나타나는 효과였다. 고려인삼 추출물은 Bcl-2의 발현은 물론 Akt 및 eNOS의 인산화를 유도하였고, NO의 생성을 증가시켰다. Akt의 상부 신호전달 인자인 PI3K의 저해제인 wortmannin과 eNOS 저해제인 L-NIO의 첨가는 고려인삼 추출물에 의한 내피세포 사멸억제 효과를 환원시켰고, NO의 생성도 감소시켰다. 고려인삼 추출물에 의한 caspase-3의 활성억제는 wortmannin과 L-NIO에 의하여 부분적으로 환원되었으며, 더 나아가서 고려인삼 추출물과 함께 배양한 세포의 균질액을 환원제인 dithiothreitol로 10분간 처리한 후 효소활성을 측정된 결과, 억제된 caspase-3의 활성이 부분적으로 증가하였다. 이 같은 결과는 고려인삼 추출물은 PI3K/Akt/eNOS의 신호전달 경로를 활성화하여 NO의 생성을 증가시키고, 이러한 NO는 caspase-3의 활성부위에 있는 thiol group를 부분적으로 S-nitrosylation시켜 효소의 활성을 저해하고, 그 결과 혈관내피세포의 사멸을 억제할 수 있음을 제시하고 있다.

5. 결론

고려인삼은 혈관내피세포의 기능향상 뿐만 아니라 염증관련 유전자 발현저해를 통해

여 내피세포 사멸억제, 혈관염증 억제, 혈관신생 촉진 및 혈관노화 지연 시킬 수 있음을 분자 및 유전자 발현 수준에서 확인 할 수가 있었다. 이러한 결과는 혈관 기능저하로 유발되는 동맥경화, 고혈압, 뇌졸중 등의 혈관질환 예방 및 치료에 고려인삼의 효능이 탁월하다는 것을 보여주고 있다. 더 나아가서 내피세포 기능 조절에 대한 고려인삼의 주된 표적분자 및 효능기전은 eNOS 인산화로 인한 NO의 생성 증가에 기인된 것으로 확인되었다. 따라서 고려인삼의 혈관기능조절에 대한 약리효능의 중심에 NO가 핵심적으로 관여되고 있음을 시사하고 있다.