

말초 및 중추신경계에서 칼슘채널 및 NMDA 매개 채널의 억제제로의 진세노사이드 Rg₃의 효과

임 혜 원[#]

한국과학기술연구원 (KIST), 의과학연구센터
(2003년 7월 28일 접수, 2003년 8월 27일 수리)

The Effects of Ginsenoside Rg₃ as a Potent Inhibitor of Ca²⁺ Channels and NMDA-gated Channels in the Peripheral and Central Nervous Systems

Hyewhon Rhim[#]

Biomedical Research Center, Korea Institute of Science and Technology (KIST), Seoul 136-791, Korea
(Received July 28, 2003, Accepted August 27, 2003)

Abstract : Alternative medicines such as herbal products are increasingly being used for preventive and therapeutic purposes. Ginseng is the best known and most popular herbal medicine used worldwide. In spite of some beneficial effects of ginseng on the nervous system, little scientific evidence shows at the cellular level. In the present study, I have examined the direct modulation of ginseng total saponins and individual ginsenosides on the activation of Ca²⁺ channels and NMDA-gated channels in cultured rat dorsal root ganglion (DRG) and hippocampal neurons, respectively. In DRG neurons, application of ginseng total saponins suppressed high-voltage-activated Ca²⁺ channel currents and ginsenoside Rg₃, among the 11 ginsenosides tested, produced the strongest inhibition on Ca²⁺ channel currents. Occlusion experiments using selective Ca²⁺ channel blockers revealed that ginsenoside Rg₃ could modulate L-, N-, and P/Q-type currents. In addition, ginsenoside Rg₃ also proved to be an active component of ginseng actions on NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. Application of ginsenoside Rg₃ suppressed NMDA-induced [Ca²⁺]_i increase and -gated channels using fura-2-based digital imaging and patch-clamp techniques, respectively. These results suggest that the modulation of Ca²⁺ channels and NMDA receptors by ginsenoside Rg₃ could be part of the pharmacological basis of ginseng actions in the peripheral and central nervous systems.

Key words : Ginseng total saponins, ginsenoside Rg₃, antinociception, patch-clamp, intracellular Ca²⁺, neurotoxicity, sensory neurons, hippocampal neurons

서 론

전 세계적으로 전통 약초 또는 대체 의약품질로 광범위하게 사용되고 있는 인삼의 다양한 약리효능들은 널리 알려져 왔다.¹⁾ 특히 인삼의 신경계에 대한 효과, 즉 통증억제,²⁾ 기억 및 학습 증진효과³⁻⁵⁾ 및 뇌허혈관련 신경세포 사멸 억제 효과⁶⁻⁷⁾ 들은 최근 관심이 집중되고 있는 인삼의 연구 분야이다.

Formalin test, tail-flick test 등의 통증 동물모델을 이용

한 실험들로부터 인삼 추출물의 통증억제 효과,^{2,8)} 척수수준에서 substance P에 의한 통증억제 효과⁹⁾와 모르핀의 만성적 사용에 의해 발생하는 opioid 내성억제 효과¹⁰⁾가 발표되었다. 특히 세포수준에서의 통증 억제기전은 통증에 관여하는 일차 구심절인 dorsal root ganglion (DRG) 신경세포에서 자세히 연구되었는데, 대표적 진통제인 모르핀의 수용체인 opioid receptor 활성을 통한 그 기전은 통증에 관여하는 글루타메이트 (glutamate), substance P와 같은 신경전달 물질분비를 Ca²⁺ channel 억제를 통하여 억제시키는 것으로 알려지므로 나¹¹⁻¹²⁾ 등은 인삼 추출물 및 진세노사이드 단일성분들의 Ca²⁺ channel에 대한 효과를 알아보았다. 그 결과 인삼은 μ -opioid receptor 효현제인 D-Ala², N-MePhe⁴, Gly⁵-ol-

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-958-5923; (팩스) 02-958-5909
(E-mail) hrhim@kist.re.kr

enkephalin (DAMGO)과 같이 신경전달물질 분비에 관여하는 전압 의존성 (voltage-dependent) Ca^{2+} channel을 pertussis toxin-sensitive G-protein을 매개로 억제함으로써 통증억제 효과의 기전을 단일 세포수준에서 밝혔다.

인삼의 신경계에서 최근 관심이 집중되는 분야로는 뇌허혈이나 글루타메이트 매개 신경독성과 관련된 신경세포 사멸 과정에서 인삼의 억제효과이다. 인삼 추출물의 forebrain 또는 myocardial 허혈 동물모델에서의 투입은 세포사멸을 억제하고⁶⁻⁷⁾ 이러한 인삼의 세포사멸 억제효과는 단일 성분의 진세노사이드를 이용한 연구에서도 알려졌다. 진세노사이드 Rb_1 은 뇌허혈의 동물모델에서 뇌허혈 시 가장 먼저 세포 사멸이 관찰되는 해마(hippocampus) 신경세포에서 그 보호효과가 보고되었으며¹³⁾ 흰쥐의 대뇌피질 배양세포에서도 글루타메이트에 의한 신경독성현상을 진세노사이드 Rb_1 과 Rg_3 가 억제함이 밝혀졌다.¹⁴⁾ 최근 본 연구팀에서도 이러한 인삼의 신경세포 사멸억제의 세부기전으로 인삼 추출물의 NMDA 수용체 활성 억제효과를 배양된 해마세포에서 처음으로 밝혔다.¹⁵⁾

인삼 효능의 주 성분인 인삼사포닌 또는 당을 포함한 triterpene계 유도체인 진세노사이드로 알려진 성분들은 현재 까지 약 30여종이 알려져 왔고, 각 단일성분들은 분리와 함께 그 화학구조도 이미 알려져 왔다.¹⁶⁾ 인삼 사포닌의 신경계에서의 효과는 소량에서 흥분, 대량에서 흥분 억제성을 나타낸다는 보고도 있고 인삼사포닌 성분에 대한 약리효과를 panaxatriol계는 흥분적으로 panaxadiol계는 억제적으로 작용한다는 보고도 있다.¹⁷⁾ 단일성분으로 진세노사이드 Rg계는 중추신경계의 stimulatory action을 보여주는 반면 ginsenoside Rb과 Rc는 sedative effect를 보여준다.¹⁸⁻¹⁹⁾ 이와 같이 단일 진세노사이드의 신경계에서의 그 효능은 상반되는 효과가 보고 되기도 하고 약 30여종으로 알려진 진세노사이드 성분 중 가장 효능이 큰 성분에 대한 총체적인 비교, 검색의 연구는 거의 되어있지 않다.

그러므로 본 연구에서는 위에서 언급한 데로 현재 단일세포 수준에서 인삼의 세부 기전이 이미 알려진 두 모델 시스템 (말초신경계의 DRG 신경세포와 중추신경계의 해마신경세포)^{12,15,20)}에서 인삼의 주 성분인 11종의 진세노사이드의 Ca^{2+} channel과 NMDA 수용체에 대한 효과를 whole-cell patch-clamp 및 세포내 Ca^{2+} 농도 ($[Ca^{2+}]_i$) 측정 imaging 방법들을 사용하여 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

Ginseng total saponins와 11종의 진세노사이드 성분은 한

국인삼공사로부터 제공받았다. Ginseng total saponins는 세포의 용액에 직접 녹였으며 11종의 각 진세노사이드 성분들은 농축 농도(100 mM)로 100% DMSO에 녹인 후 최종 농도로 세포의 용액에 녹여서 중력에 의해 세포에 처리되었고 세포의 용액의 DMSO 최종 농도는 0.1%를 넘지 않게 하였다. N-Methyl-D-aspartate (NMDA)는 컴퓨터로 조절되는 빠른 약물전달 시스템을 이용하여 매 4~5분마다 10초간 세포에 처리하였다. 세포배양에 이용된 모든 실험재료는 Gibco(Grand Island, NY, USA)에서 구입되었고 NMDA, glycine, D(-)-2-amino-5 phosphonopentanoic acid (D-APV), nifedipine은 Tocris (Ellisville, MO, USA)로부터, ω -conotoxin-GVIA (ω -CgTx-GVIA)과 ω -agatoxin-IVA (ω -Aga-IVA)는 Alomone Labs (Jerusalem, Israel)로부터 각각 구입되고 그 외 모든 실험약품은 Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)로부터 구입했다.

2. DRG cell preparation

중량이 100~150 g 정도 되는 Sprague-Dawley계 흰쥐에서 척추를 채취해서 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glucose 조성의 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free HEPES 완충용액 안에 넣는다. 채취된 척추는 반으로 잘라 해부 현미경하에서 요추 및 천골척추에 있는 dorsal root ganglion을 분리하였다. 분리된 ganglia를 37°C 항온조에서 0.15% collagenase로 15분, 0.125% trypsin으로 5분 동안 효소 처리 후 10% fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin을 포함하는 DMEM 배양액에서 fire-polished Pasteur pipette로 ganglia에서부터 DRG 단일 세포들을 분리해냈다. 그 후 분리된 세포를 35 mm culture dish 안에 미리 준비해 둔 poly-L-lysine 처리된 커버슬립위에 $1\sim 2 \times 10^5$ cells/dish가 되게 배양하였다. 37°C, 95% humidity/5% CO_2 atmosphere의 배양기에서 배양된 DRG 세포는 분리된 후 1~2 일 안에 electrophysiological recording을 수행했다.

3. Hippocampal cell preparation

해마신경세포는 생후 1일령 (P1)의 Sprague-Dawley계 흰쥐에서 분리되며 그 자세한 방법으로는 다음과 같다. 분리된 hippocampi는 0.25% trypsin 효소로 15분간 37°C 항온조에서 효소처리 후 fire-polished Pasteur pipette를 이용한 기계적 조작으로 해마 단일세포로 분리했다. 이렇게 분리된 해마세포들은 0.5 mM L-glutamine, 25 μ M glutamate, 25 μ M 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 포함하는 neurobasal/B27 배양액에서 배양되

고, 배양액은 일주일에 두 번씩 glutamate가 없는 배양액으로 새롭게 대체되며, electrophysiological 및 intracellular Ca^{2+} recording 실험은 배양 상태에서 7~15일 지난 세포로 진행되었다.

4. Electrophysiological recordings

DRG 세포에서 high-voltage-activated Ca^{2+} channels 기록을 위한 whole-cell patch-clamp recordings에는 standard technique²¹⁾를 이용하여 수행하였다. 2-4 M Ω 저항 값의 미세 유리전극을 채워주는 세포내 용액은 120 mM CsCl, 10 mM HEPES, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA, 5 mM ATP-Mg, 0.3 mM GTP-Tris, 14 mM Tris-creatine phosphate, 50 U/ml creatine phosphokinase으로 구성되어 있고 pH는 CsOH로 7.2가 되게 했다. 기록용 세포밖 용액은 150 mM TEA-Cl, 2 mM $BaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM glucose로 구성되어 있고 pH는 TEA-OH로 7.4로 맞춘다. High-voltage-activated Ca^{2+} channel current는 세포막 전압을 -80 mV 에서 유지시킨 후 -20 mV 까지 전압 자극을 매 15초마다 200 msec 동안 주어 Ca^{2+} channel을 열리게 한 후, 그 채널을 통해 흐르는 Ba^{2+} 전류에 대한 약물 효과를 측정하고 모든 데이터는 mean \pm S.E.M.으로 나타내었다.

해마 신경세포에서의 NMDA 수용체 매개 이온채널의 측정에는 perforated patch-clamp 방법²²⁾을 사용하였다. Whole-cell patch-clamp recording용 전극의 저항은 3~4 M Ω 이고 120 mM potassium gluconate, 20 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES (pH는 7.4로 NaOH로 조절) 조성의 세포내 용액으로 채웠다. 그러나 미세전극에 이 세포내 용액을 채우기 전에 DMSO에 녹인 250 μ g/ml nystain을 전극 끝에 미리 채워 whole-cell mode 세포막에 전기를 통할 수 있는 미세 구멍을 만들게 했다. NMDA 수용체 매개 이온채널 측정용 세포밖 용액으로는 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 1 μ M glycine으로 구성되어 있고 pH는 NaOH로 7.4로 맞추었다. NMDA 수용체 매개 이온채널은 -60 mV 전압에서 NMDA 처리로 (10초간) 유발되며 일반 생리적 Mg^{2+} 이온 농도에서는 억제되므로 Mg^{2+} -free 세포밖 용액에서 측정되었다.

이러한 high-voltage-activated Ca^{2+} channels 및 NMDA 수용체 매개 channels를 통한 전류들은 EPC-9 amplifier (HEKA, Germany)에 의하여 기록된 후 Pulse/Pulsefit software (HEKA, Germany) 및 Graphpad Prism software (Graphpad Software Inc, USA)에 의하여 그 결과를 분석하였다.

5. Intracellular Ca^{2+} imaging

세포내 Ca^{2+} 농도 ($[Ca^{2+}]_i$) 변화를 측정하는 방법으로는 형광성 Ca^{2+} indicator인 fura-2의 acetoxymethyl-ester form인 fura-2/AM (Molecular probes, OR, USA)을 사용하였다. 그 자세한 방법으로 배양된 세포는 serum-free 배양액으로 2번 씻은 후 5 μ M fura-2/AM과 0.001% Pluronic F-127을 포함하는 HEPES 완충용액에서 실온에서 40~60분 동안 처리하였다. HEPES 완충용액의 조성은 다음과 같다: 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM glucose (pH 7.4). 그 후 다시 세포를 수차례 HEPES 완충용액으로 씻은 후 세포내 Ca^{2+} 농도 측정용 현미경하에 올려놓는다. 세포는 xenon arc lamp에 의하여 빛이 쬐여지고 fura-2/AM으로 측정되는 Ca^{2+} 농도 측정에는 340과 380 nm (by computer-controlled filter wheel, Sutter Instruments, USA)의 excitation wavelengths와 510 nm의 emission wavelength를 이용하였다. 데이터는 매 2초마다 모아졌고 빛 노출사이에는 빛 통로의 셔터를 닫음으로 phototoxicity로부터 세포를 보호하였다. 이렇게 얻어진 515 nm 필터를 통과하여 방출된 형광 빛은 cooled CCD camera로 전달되고 그 신호의 정도는 세포내 Ca^{2+} 농도로 환산하였다. 모든 세포내 Ca^{2+} 농도측정용 imaging data는 Universal Imaging software (West Chester, PA, USA)를 사용하여 모으고 분석하였다.

결 과

1. DRG 신경세포에서 인삼성분의 Ca^{2+} channel currents 억제 효과

신경전달물질 분비에 직접적으로 관여하는 전압 의존성 특히 high-voltage-activated Ca^{2+} channel의 DRG 신경세포에서의 측정 조건은 Ca^{2+} 이온대신 Ba^{2+} 이온을 이용하였고 세포막 전압을 -80 mV 에서 유지시킨 후 -20 mV 까지 전압 자극을 매 15초마다 200 msec 동안 주어 활성화된 Ca^{2+} channel을 통해 흐르는 Ba^{2+} 내향전류에 대한 인삼 성분의 효과를 관찰하였다. Fig. 1A는 ginseng total saponins의 DRG 신경세포의 효과를 나타내는 그림으로 100 μ g/ml 농도에서 처리 후 15~45초안에 peak inward Ca^{2+} current를 억제했으며 (28.5%) 그 효과는 약물제거 후 쉽게 회복되고 여러 번 약물처리에 의해서도 반복적으로 나타났다. 인삼사포닌은 triterpene계 구조의 탄소 3번, 6번 및 20번 위치에 붙는 화학기의 종류에 따라 panaxadiol saponins (PD)와 panaxatriol saponins (PT)로 다시 크게 나뉘는데, 이렇게 나뉜 PD와 PT의 인삼사포닌 혼합성분의 Ca^{2+} current에

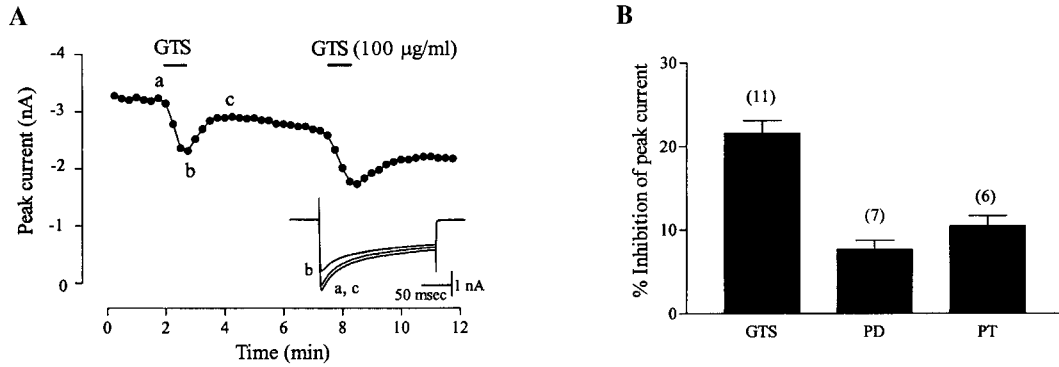


Fig. 1. Ginseng total saponins inhibited high-voltage-activated Ca^{2+} channel currents in rat dorsal root ganglion (DRG) neurons. (A) Time course of peak Ba^{2+} current ($I_{Ba^{2+}}$) showing two exposures to 100 μ g/ml ginseng total saponins (GTS). *Inset*, Leak-subtracted currents at labeled points from the time course of peak currents. Ba^{2+} currents were evoked every 15 s by a 200 ms voltage step from -80 mV to -20 mV using Ba^{2+} (2 mM) as the charge carrier. (B) Comparison of ginseng total saponins-, panaxadiol saponins (PD)-, and panaxatriol saponins (PT)-mediated inhibition on high-voltage-activated Ca^{2+} currents. PD were a mixture of various types of ginsenosides and the percentage of them in PD were as follows: Rb_1 (22.3%), Rb_2 (14.6%), Rc (22.8%), Rd (8.5%) and other uncharacterized components. The composition and percentage of ginsenosides in PT were as follows: Re (30.4%), Rf (8.0%), Rg_1 (24.8%), Rg_2 (7.8%) and other uncharacterized components.

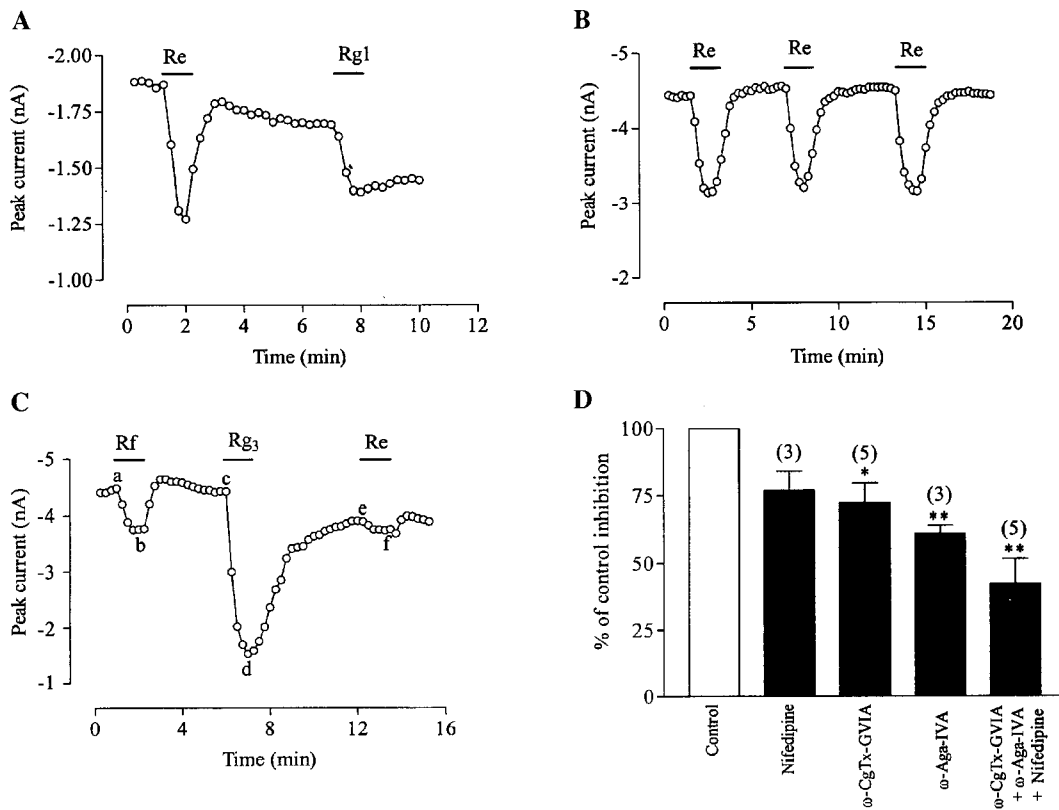


Fig. 2. Effects of individual ginsenosides on high-voltage-activated Ca^{2+} channel currents in rat DRG neurons. (A)-(C) Time course of peak currents illustrating effects of ginsenosides Re , Rf , Rg_1 and Rg_3 in different neurons. Among 11 ginsenosides tested, ginsenoside Rg_3 produced the largest inhibition on high-voltage-activated Ca^{2+} channel currents in rat DRG neurons (summarized in Table 1). (D) Pooled results are shown from Ca^{2+} channel blocker experiments illustrating the percentage of ginsenoside Rg_3 -mediated modulation in the presence of each channel blocker. The suppression of $I_{Ba^{2+}}$ by ginsenoside Rg_3 before the application of toxin was calculated as 100% control for each cell tested. Nifedipine (Nif, 10 μ M), ω -conotoxin-GVIA (ω -CgTx-GVIA, 1 μ M), and ω -agatoxin-IVA (ω -Aga-IVA, 100 nM) occluded about 23.1, 27.7, and 39.0% of the effect of ginsenoside Rg_3 , respectively (* P <0.05 and ** P <0.01, compared with each control value before the application of toxin). Numbers above each point indicate the number of cells tested at each concentration.

대한 효과는 Fig. 1B와 같다. 즉 PD와 PT는 $7.6 \pm 1.1\%$ ($n=7$)과 $10.4 \pm 1.2\%$ ($n=6$)로 DRG 신경세포 Ca^{2+} current를 억제시켰으며, 이 값들은 ginseng total saponins에 의한 억제율 ($21.6 \pm 1.5\%$, $n=11$)보다 현저히 작았다.

PD와 PT에 존재하는 단일 진세노사이드의 성분비는 다음과 같이 알려졌다: PD 성분-진세노사이드 Rb₁ (22.3%), Rb₂ (14.6%), Rc (22.8%), Rd (8.5%), PT 성분-진세노사이드 Re (30.4%), Rf (8.0%), Rg₁ (24.8%), Rg₂ (7.8%). 그러나 여기에 명시된 성분들 이외의 물질들의 규명 및 존재 양은 정확히 알려져 있지 않으므로 인삼의 DRG 신경세포에서 Ca^{2+} current 억제에 주 역할을 하는 성분 분석을 위해 순수 분리, 정제된 단일 진세노사이드 성분, 특히 인삼을 구성하는 주된 진세노사이드 성분들 11종을 선택하였다. 본 연구에서 시도한 PD 성분의 단일 진세노사이드는 ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₃, Rh₂, PT 성분으로는 ginsenosides Re, Rf, Rg₁, Rg₂, Rh₁ 등 총 11종이다. 100 μ M 농도에서 DRG 신경세포에 처리된 진세노사이드 Re는 Rg₁에 비해 Ca^{2+} current의 억제효과가 크고 (32.1%, Fig. 2A), ginseng total saponins의 반응처럼 그 효과가 약물제거 후 쉽게 회복되고 3번에 걸친 연속 처리에도 그 반응이 일정하게 나타났다(Fig. 2B). 그러나 11종의 진세노사이드들을 여러 조합으로 세포에 처리한 결과 세포에 따라 반응 정도는 약간의 차이가 있으나 진세노사이드 Rg₃가 가장 큰 억제율을 나타내었다. 단일 세포의 비교예로 (Fig. 2C) 진세노사이드 Rf, Rg₃, Re의 영향을 테스트한 결과 Rf와 Re는 각각 14.8%와 5.9% 억제율을 나타낸 반면 Rg₃는 약 65.4% 억제율을 나타내었고 본 결과의 종합적인 결과는 Table 1에 요약하였다. 다음 단계로는 진세노사이드 Rg₃가 억제하는 Ca^{2+} channel의

종류를 알아보기 위해 각 채널의 선택적인 차단물질을 이용하였다. 진세노사이드 Rg₃의 반응을 채널 차단제 처리 전, 후로 알아 본 결과 진세노사이드 Rg₃의 반응은 L-형 차단제 nifedipine (10 μ M), N-형 차단제 ω -conotoxin GVIA (ω -CgTx-GVIA, 1 μ M)과 P/Q-형 차단제 ω -agatoxin-IVA (ω -Aga-IVA, 100 nM) 처리로 각각 그 반응이 23.1, 27.7, 39.0% 줄어들었고 세 가지 차단제를 모두 사용한 결과 57.6%의 진세노사이드 Rg₃의 효과가 감소한 결과로부터 진세노사이드 Rg₃는 DRG 신경세포에서 L-, N- 및 P/Q-형 Ca^{2+} channel 모두를 타겟으로 삼고 있음을 알 수 있다.

2. 해마신경세포에서 인삼성분의 NMDA 수용체 억제효과

위와 같이 말초신경계인 DRG 신경세포에서 인삼은 진세노사이드 Rg₃를 통하여 Ca^{2+} currents 억제효과를 나타내며 그 작용이 통증억제의 기전을 제시한다는 사실로부터 대표적인 중추신경계 세포이면서 기억 및 학습에 관여하고 뇌허혈 시 가장 먼저 세포 사멸이 관찰되는 해마신경세포의 배양시스템에서 인삼의 NMDA 수용체에 대한 효과와 그 주 활성성분을 알아보았다.

해마신경세포에서 인삼의 NMDA 수용체에 대한 효과는 NMDA 수용체 활성화 시 수반되는 세포내 Ca^{2+} 유입 및 Na^+/Ca^{2+} 유입으로 인한 내향전류를 나타내는 성질을 이용하여 세포내 Ca^{2+} 농도 ($[Ca^{2+}]_i$) 측정 imaging 방법과 whole-cell patch-clamp 방법을 사용하여 비교 분석하였다. Fig. 3A는 배양된 해마신경세포에서 NMDA의 단기 투여로 (10초) 증가된 $[Ca^{2+}]_i$ 증가를 나타내는 것으로 매 4~5분마다 반복 투여 시 그 증가된 피크 $[Ca^{2+}]_i$ 수준은 1시간여 동안의 반복측정에서도 거의 탈 감각을 일으키지 않아 본 조건

Table 1. The summarized results showing the effects of individual ginsenosides on Ca^{2+} channel currents in DRG neurons and NMDA receptors in hippocampal neurons

Ginsenosides	Subtype of ginsenosides (PD or PT)	% Inhibition of peak Ca^{2+} current in rat DRG neurons	% Inhibition of NMDA-induced $[Ca^{2+}]_i$ in rat hippocampal neurons
Rb ₁	PD	12.0 \pm 2.4	22.2 \pm 2.4
Rb ₂	PD	13.0 \pm 2.1	9.6 \pm 1.5
Rc	PD	22.8 \pm 4.9	21.5 \pm 2.8
Rd	PD	11.2 \pm 3.9	5.8 \pm 0.6
Re	PT	17.2 \pm 3.2	6.8 \pm 1.6
Rf	PT	12.6 \pm 1.6	2.7 \pm 0.9
Rg ₁	PT	13.2 \pm 2.2	ND
Rg ₂	PT	9.1 \pm 1.3	6.1 \pm 1.6
Rg ₃	PD	47.8 \pm 6.0	70.0 \pm 4.5
Rh ₁	PT	9.9 \pm 5.1	26.5 \pm 8.0
Rh ₂	PD	19.0 \pm 3.6	18.6 \pm 2.7

ND: not determined

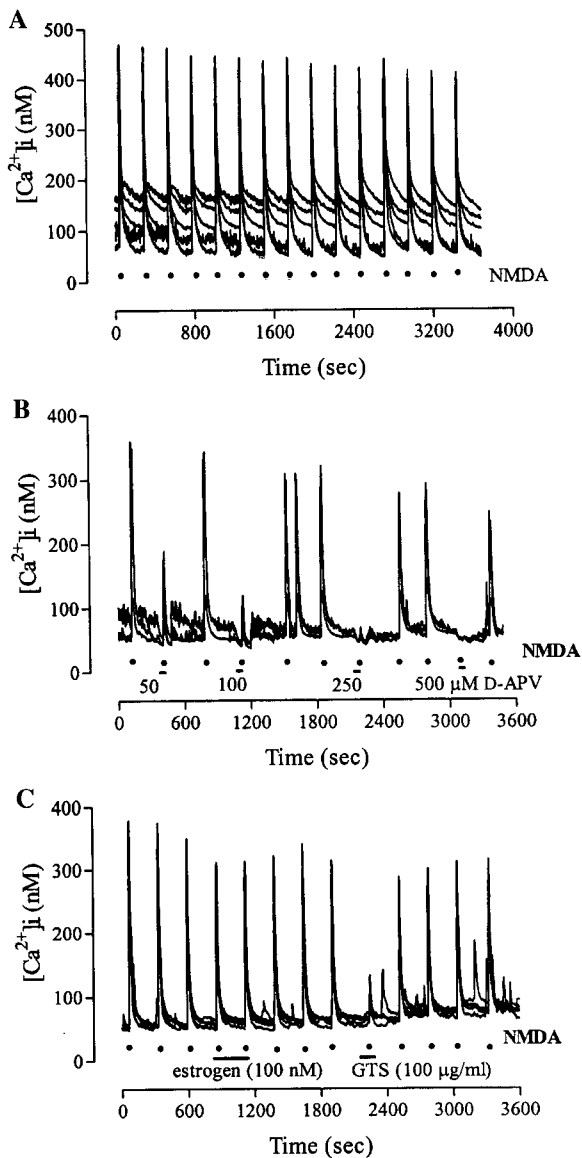


Fig. 3. Effects of ginseng total saponins on NMDA-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in cultured rat hippocampal neurons. (a) Multiple applications of NMDA ($100 \mu M$) on the increases in $[Ca^{2+}]_i$ using fura-2-based digital imaging techniques. In most cultured hippocampal cells, the acute application (10 s) of NMDA produced a rapid increase of $[Ca^{2+}]_i$, which was reproducible by the repeated applications of NMDA in Mg^{2+} -free and $1 \mu M$ glycine-containing recording solution. (B) Dose-dependent inhibition on NMDA-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase by the NMDA receptor antagonist, D(-)-2-amino-5 phosphopentanoic acid (D-APV). (C) Co-application of ginseng total saponins (GTS, $100 \mu g/ml$) with NMDA caused $88.4 \pm 4.0\%$ inhibition of NMDA-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in hippocampal neurons ($n=5$). Ginseng total saponins were pretreated for 2 min in the cell before the application of NMDA. Under the same condition, co-treatment of estrogen ($100 nM$, 5 min) with NMDA produced a mild inhibition on NMDA-mediated response in hippocampal neurons ($26.6 \pm 6.9\%$, $n=5$).

에서 인삼과 NMDA를 동시 투여하여 인삼의 NMDA에 대한 효과를 검사하였다. 본 연구결과들은 CCD 카메라를 이용한 $[Ca^{2+}]_i$ 측정 imaging 방법으로 동시에 여러 세포들을 독립적으로 $[Ca^{2+}]_i$ 측정이 가능하므로 여러 세포들의 결과를 동시에 나타낸 것이다. 첫 번째로 현재 NMDA 수용체의 길항제로 잘 알려진 D(-)-2-amino-5 phosphopentanoic acid (D-APV)를 투여했을 경우 (Fig. 3B) 농도 의존적으로 NMDA 유발 $[Ca^{2+}]_i$ 을 감소시키고 그 IC_{50} 값 ($8.9 \mu M$)은 다른 문헌^{23,24}의 값과 유사하므로 본 연구조건이 NMDA 수용체 억제물질 연구에 합당함을 제시한다. 실제 이러한 조건에서 ginseng total saponins ($100 \mu g/ml$)를 NMDA 투여 2분전에 투여했을 경우 ginseng total saponins는 해마신경세포에서 NMDA 유발 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가를 크게 억제 했다 ($88.4 \pm 4.0\%$, $n=5$). 그러나 신경세포보호 효과가 있는 것으로 알려진 여성호르몬인 에스트로젠 ($100 nM$)의 투여는 NMDA 유발 $[Ca^{2+}]_i$ 에 크게 영향을 주지 않았다. 이러한 결과는 인삼이 흰쥐의 배양 해마신경세포에서 NMDA 수용체의 활성을 억제함을 제시하고 현재 신경세포 보호 효과로 각광받는 에스트로젠의 기전과는 다르게 작용함을 제시한다(Fig. 3C).

DRG 신경세포에서와 같이 해마신경세포의 NMDA 수용체 억제 효과에 대한 인삼의 활성성분을 찾기 위해 순수 분리된 진세노사이드 10종을 테스트했다. DRG 신경세포의 경우보다 10배 낮은 $10 \mu M$ 농도를 사용하였고 PD 성분의 단일 진세노사이드는 ginsenosides Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₃, Rh₂, PT 성분으로는 ginsenosides Re, Rf, Rg₂, Rh₁ 등을 테스트하였다. Fig. 4A는 NMDA 유발 $[Ca^{2+}]_i$ 에 대한 진세노사이드 Rg₃, Rf, Rh₂의 효과를 나타낸 그림으로 4개의 해마 세포에서의 평균 억제율은 진세노사이드 Rf에 의해서는 $4.5 \pm 1.4\%$ 로 거의 영향이 없고 진세노사이드 Rh₂에 의해서는 $23.2 \pm 6.2\%$ 이고 진세노사이드 Rg₃에 의해서는 $79.1 \pm 5.8\%$ 로 가장 큰 억제율을 나타내었다. 이와 같이 10종의 단일 진세노사이드를 단독 혹은 여러 조합으로 해마신경세포에 처리 한 결과 진세노사이드 Rb₂, Rd, Re, Rf, Rg₂는 10% 미만의 억제율을, 진세노사이드 Rb₁, Rc, Rh₁, Rh₂는 20% 내외의 억제율을 나타내고 진세노사이드 Rg₃만이 70%이상의 매우 높은 NMDA 수용체 억제효과를 보여준다. 이상의 종합적인 결과들도 DRG 신경세포의 결과와 함께 Table 1에 요약하였다. 10종의 진세노사이드 성분 중 가장 높은 억제율을 보여주는 진세노사이드 Rg₃의 효과는 농도 의존적으로 나타나고 (Fig. 4B) 그 IC_{50} 값은 $3.8 \mu M$ 이다. 이러한 진세노사이드 Rg₃의 억제 효과는 $[Ca^{2+}]_i$ 을 측정 한 imaging 측정법에서만 관측된 것이 아니었다. NMDA 수용체 활성을 직접 측정하는 perforated whole-cell patch-clamp 법으로 측정했을 때에도

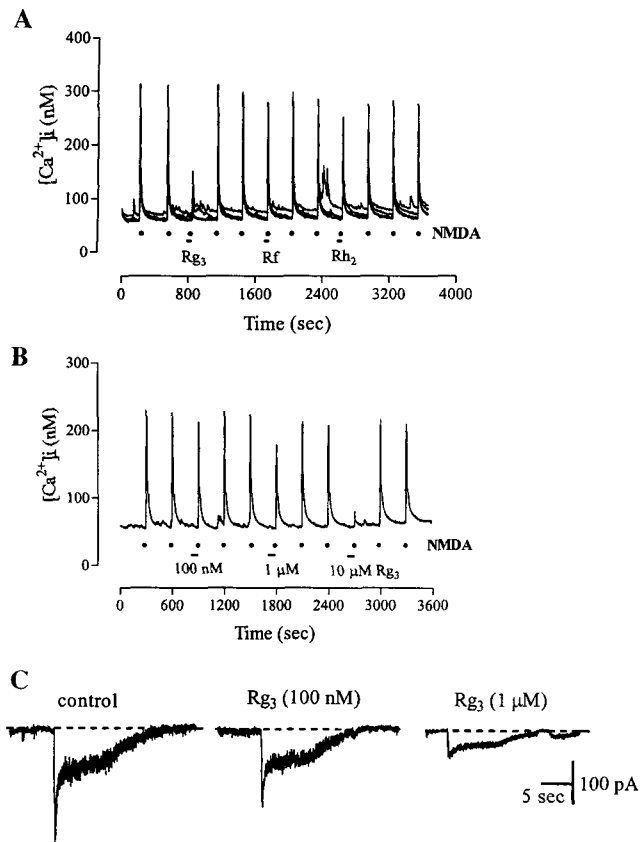


Fig. 4. Identification of active components responsible for ginseng-mediated inhibition on NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. (A) Effects of different ginsenosides Rg_3 , Rf and Rh_2 on NMDA-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase. At 10 μ M concentration, ginsenoside Rg_3 (Rg_3) and ginsenoside Rh_2 (Rh_2) inhibited NMDA-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase by $79.1 \pm 5.8\%$ and $23.3 \pm 6.2\%$, respectively, while ginsenoside Rf (Rf) produced no significant effect on NMDA response in 4 tested cells. Dose-dependent inhibition of ginsenoside Rg_3 on NMDA-mediated $[Ca^{2+}]_i$ increase (B) and NMDA-gated currents (C) in cultured hippocampal neurons. The effect of ginsenoside Rg_3 on current responses induced by application of NMDA (10 s) using perforated whole-cell voltage-clamp recordings. Ginsenoside Rg_3 rapidly and reversibly inhibited NMDA-mediated currents with 1 min pre-treatment. The mean values of NMDA-induced sustained currents were calculated from current values for 1 s at the end of NMDA response.

농도 의존적으로 그 억제 효과가 재확인됨으로써 (Fig. 4C) 인삼의 신경세포 사멸억제의 세부기전으로 인삼 성분 중 특히 진세노사이드 Rg_3 가 NMDA 수용체 활성화 억제작용을 통해서 임을 제시할 수 있다.

고찰

본 연구에서는 생체 내 다양한 약리효능을 나타내는 인삼의

효능 중 신경계에 대한 효과, 즉 통증억제^{2,8-10}, 기억 및 학습 증진효과³⁻⁵ 및 뇌허혈관련 신경세포 사멸 억제 효과^{6-7,13-14}들에 관련된 말초신경계와 중추신경계 세포에서 인삼 작용의 주 성분과 그 세부 기전을 밝히기 위해 whole-cell patch-clamp 및 $[Ca^{2+}]_i$ 측정 imaging 방법들을 사용하여 비교 분석하였다. 그 요약된 결과로 첫 번째로는 말초신경계 DRG 신경세포에서 진세노사이드는 신경전달물질 분비조절에 관여하는 전압의존성 Ca^{2+} channel을 억제하고 그 주 성분으로는 진세노사이드 Rg_3 에 의한 억제율이 가장 뛰어남을 밝혔고, 두 번째로는 중추신경계 해마신경세포에서 가장 주된 흥분성 신경전달물질인 글루타메이트가 작용하는 NMDA 수용체에 인삼이 억제작용을 한다는 것과 그 주요성분으로도 진세노사이드 Rg_3 가 작용함을 밝혔다.

이러한 본 연구결과는 말초 및 중추신경계에서 통합적으로 단일세포 수준에서 Ca^{2+} channel이나 NMDA 수용체와 같은 막 단백질에서 인삼의 작용을 밝히고 11종 이상의 진세노사이드 단일성분들을 비교, 분석하여 그 활성의 주 성분으로 말초 및 중추신경계에서 동일하게 진세노사이드 Rg_3 가 작용한다고 밝힌 점에 그 의의가 크다. 이전 연구에서도 인삼의 효능과 그 주요 활성 성분을 밝힌 연구들이 많이 있으나 신경계에서 단일세포를 이용한 연구의 예는 매우 적다. 말초신경계에서는 인삼 추출물 및 진세노사이드 단일성분들의 Ca^{2+} channel에 대한 효과를 알아 본 결과¹²) 진세노사이드 Rf 가 인삼의 주요 성분으로 보고 되었으나 본 연구에서는 테스트한 진세노사이드 수를 더 확장시키고 Rf 와 Rg_3 의 효과를 단일세포에서 비교 분석한 결과 (Fig. 2) 진세노사이드 Rf 에 비해 진세노사이드 Rg_3 의 효과가 더 탁월함을 알 수 있었다. 중추신경에서 인삼의 효과는 *in vitro* 조건에서 연구된 예는 그 수가 더 적으나 배양된 대뇌피질 신경세포 (cortical neuron)에서 글루타메이트 유발 신경독성 억제에 관한 최근 연구가 있다.¹⁴) 이 대뇌피질 배양 신경세포를 이용한 연구에서도 글루타메이트 매개 신경독성을 진세노사이드 Rb_1 과 Rg_3 가 억제함이 밝혀졌으므로 중추신경계에서 작용하는 인삼의 주 성분이 진세노사이드 Rg_3 라는 사실은 본 연구결과와 일치하고, 본 연구에서는 그들 연구의 진세노사이드 Rg_3 작용의 세부기전이 글루타메이트가 작용하는 NMDA 수용체를 통한 억제 작용이라는 사실을 추가로 밝혔다. 말초 및 중추신경계 두 시스템에서 막 단백질들에 작용하는 인삼의 주요 활성 성분이 진세노사이드 Rg_3 로 일치한다는 사실은 인삼 연구 및 그 응용성에 있어서 매우 고무적이거나 본 연구의 결과로부터 진세노사이드 Rg_3 가 인삼 활성의 유일한 성분이라고는 단언할 수는 없다. 그 첫 번째 이유로 현재까지 주로 많이 존재하는 진세노사이드 11종을 테스트한 것이지 아주 미량 존재

하거나 아직 규명 안 된 성분들을 테스트하지 못했으므로 그 가능성을 배제 할 수 없고, 두 번째로는 본 연구자의 선행 연구에서¹⁶⁾ ginseng total saponins의 Ca²⁺ channel에 대한 효과는 L-, N-, P/Q-형 차단제를 사용했을 때 거의 대부분의 그 효과가 사라지는 반면, 진세노사이드 Rg₃의 효과는 이 세 가지 물질들의 처리에도 불구하고 40% 이상의 활성이 남는 것으로부터 (Fig. 2) 인삼 전체성분의 작용과는 다르게 진세노사이드 Rg₃가 작용하고 진세노사이드 Rg₃ 이외의 주요 성분이 존재할 가능성을 간접적으로 시사하고 있다.

그러나 현재까지는 전압의존성 Ca²⁺ channel과 NMDA 수용체 억제에 관여하는 인삼의 가장 중요한 활성 성분으로 밝혀진 진세노사이드 Rg₃에 관한 본 연구결과는 향후 통증 및 신경세포사멸 억제 관련 분야의 대체 약물로써의 인삼 단일 성분의 효능에 대한 증거를 제시하며 글루타메이트 독성과 관련된 뇌일혈, Alzheimer's disease 등 여러 퇴행성 중추신경 질환의 치료제로 그 기초 기전을 제공하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 뇌신경생물학연구사업 (M1-0108-00-0077)과 KIST 기관고유사업에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Attele, A. S., Wu, J. A. and Yuan, C. S. : Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1685-1693 (1999).
- Kim, H. S., Jang, C. G. and Lee, M. K. : Antinarcotic effects of the standardized ginseng extract G 115 on morphine. *Planta Med.* **56**, 158-163 (1990).
- Hsieh, M. T., Peng, W. H. Wu, C. R. and Wang, W. H. : The ameliorating effects of the cognitive-enhancing Chinese herbs on scopolamine-induced amnesia in rats. *Phytother. Res.* **14**, 375-377 (2000).
- Wesnes, K. A., Ward, T. McGinty, A. and Petrini, O. : The memory enhancing effects of a Ginkgo biloba/Panax ginseng combination in healthy middle-aged volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* **152**, 353-361 (2000).
- Zhong, Y. M., Nishijo, H. Uwano, T. Tamura, R. Kawanishi, K. and Ono, T. : Red ginseng ameliorated place navigation deficits in young rats with hippocampal lesions and aged rats. *Physiol. Behav.* **69**, 511-525 (2000).
- Wen, T. C., Yoshimura, H. Matsuda, S. Lim, J. H. and Sakanaka, M. : Ginseng root prevents learning disability and neuronal loss in gerbils with 5-minute forebrain ischemia. *Acta. Neuropathol. (Berl)* **91**, 15-22 (1996).
- Maffei Facino, R., Carini, M. Aldini, G. Berti, F. and Rossoni, G. : Panax ginseng administration in the rat prevents myocardial ischemia-reperfusion damage induced by hyperbaric oxygen: evidence for an antioxidant intervention. *Planta Med.* **65**, 614-619 (1999).
- Ramarao, P. and Bhargava, H. N. : Antagonism of the acute pharmacological actions of morphine by *Panax ginseng* extract. *Gen. Pharmacol.* **21**, 877-880 (1990).
- Yoon, S. R., Nah, J. J. Shin, Y. H., Kim, S. K. Nam, K. Y. Choi, H. S. and Nah, S. Y. : Ginsenosides induce differential antinociception and inhibit substance P-induced nociceptive response in mice. *Life Sci.* **62**, PL 319-325 (1998).
- Choi, S., Jung, S. Y. Rhim, H. Jeong, S. W. Lee, S. M. and Nah, S. Y. : Evidence that ginsenosides prevent the development of opioid tolerance at the central nervous system. *Life Sci.* **67**, 969-975 (2000).
- Nah, S. Y. and McCleskey, E. W. : Ginseng root extract inhibits calcium channels in rat sensory neurons through a similar path, but different receptor, as mu-type opioids. *J. Ethnopharmacol.* **42**, 45-51 (1994).
- Nah, S. Y., Park, H. J. and McCleskey, E. W. : A trace component of ginseng that inhibits Ca²⁺ channels through a pertussis toxin-sensitive G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 8739-8743 (1995).
- Lim, J. H., Wen, T.C. Matsuda, S. Tanaka, J. Maeda, N. Peng, H. Aburaya, J. Ishihara, K. and Sakanaka, M. : Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb₁, a main ingredient of ginseng root. *Neurosci Res.* **28**, 191-200 (1997).
- Kim, Y. C., Kim, S. R. Markelonis, G. J. and Oh, T. H. : Ginsenosides Rb₁ and Rg₃ protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* **53**, 426-432 (1998).
- Kim, S., Ahn, K. Oh, T. Nah, S. and Rhim, H. : Inhibitory effect of ginsenosides on NMDA receptor-mediated signals in rat hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* **296**, 247-254 (2002).
- Liu, C. X. and Xiao, P. G. : Recent advances on ginseng research in China. *J. Ethnopharmacol.* **36**, 27-38 (1992).
- 박찬웅 : 약리학적 측면에서 본 인삼의 효능연구, 생화학뉴스 **4(1)**, 2477 (1984).
- Takagi, K., Saito, H. and Nabata, H. : Pharmacological studies of *Panax ginseng* root. *Jn J. Pharmacol.* **22**, 245-259 (1972).
- Saito, H., Yoshida, Y. and Takagi, K. : Effect of *Panax ginseng* root on exhaustive in mice. *Jn J. Pharmacol.* **24**, 119-127 (1974).
- Rhim, H., Kim, H. Lee, D. Y. Oh, T. H. and Nah, S. Y. : Ginseng and ginsenoside Rg₃, a newly identified active ingre-

- dient of ginseng, modulate Ca^{2+} channel currents in rat sensory neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **436**, 151-158 (2002).
21. Hamill, O. P., Marty, A. Neher, E. Sakmann, B. and Sigworth, F. J. : Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers. Arch.* **391**, 85-100 (1981).
22. Horn, R. and Marty, A. : Muscarinic activation of ionic current measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.* **92**, 145-159 (1988).
23. Gean, P. W. and Shinnick-Gallagher, P. : Epileptiform activity induced by magnesium-free solution in slices of rat amygdala: antagonism by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Neuropharmacology* **27**, 557-562 (1988).
24. Lodge, D., Davies, S. N. Jones, M. G. Millar, J. Manallack, D. T. Ornstein, P. L. Verberne, A. J. Young, N. and Beart, P. M. : A comparison between the in vivo and in vitro activity of five potent and competitive NMDA antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **95**, 957-965, (1988).