

고려홍삼의 당뇨병성 신장병증 개선 효과

김영림 · 정성현*

경희대학교 약학대학 약물학교실
(2004년 2월 25일 접수, 2004년 5월 17일 수리)

Renoprotective Effects of Korean Red Ginseng

Young Lim Kim and Sung Hyun Chung*

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea
(Received February 25, 2003, Accepted May 17, 2004)

Abstract : The renoprotective effects of *Korean Red Ginseng* were examined in STZ-induced diabetic spontaneously hypertensive rats (SHR). After 3 day administration of streptozotocin (STZ), animals were divided into four groups : Group 1, hypertensive rats (H); Group 2, hypertensive rats with diabetes (HD); Group 3, hypertensive rats with diabetes administered with 100 mg/kg of ginseng total saponin(GTS); Group 4, hypertensive rats with diabetes administered with 600 mg/kg of ginseng non-saponin (GNS). After 2 weeks oral administrations of GTS and GNS, body weight, kidney weight, plasma glucose, urinary albumin excretion, serum creatinine, urea nitrogen and blood pressure were examined. After 3, 7 and 21 day of STZ administration, expressions of TGF- β 1 and fibronectin in kidney were analyzed by immunoblotting and/or immunohistochemistry. GTS and GNS treatments slightly decreased blood pressure when compared to H and HD groups. Also, GTS and GNS treatments ameliorated kidney hypertrophy without affecting plasma glucose levels. Meanwhile, GNS treatment increased Cu/Zn-SOD activity in kidney and generally showed more efficient renoprotective effects than GTS. We suggest that the renoprotective effects of ginseng partially result from downregulations of TGF- β 1, fibronectin expressions and anti-oxidative activity of ginseng non-saponin.

Key words : Korean red ginseng, spontaneously hypertensive rat, streptozotocin, ginseng total saponin, ginseng non-saponin, TGF- β 1, fibronectin, SOD

서 론

고려인삼은 동북아시아의 한국에서 자생한 생약으로 4-5 천 년 전부터 지역 민간인들에 의해 약용으로 사용되어 왔고 경험적으로 인정되어 영약시 되어 전승되어 왔다. 인삼에 대한 역사적 첫 기록은 중국 전한 원제시대 사유의[급취장(急就章)]에서 찾아볼 수 있고, 중국 양나라의 도홍경이 저술한 의서[신농본초경(神農本草經)]에는 인삼의 산지, 품질, 약효 및 응용에 관한 구체적 설명과 함께 인삼 중에 가장 품질이 좋은 것은 한국으로부터 도래한다고 기록되어 있다. 인삼의 인공재배는 약 천년 전부터 이루어졌다고 알려져 있으며 반음반양의

일북하에서 4년내지 6년간 자란 후에 채취하여 사용한다. 고려인삼의 학명은 *Panax Ginseng C. A. Meyer*으로[Panax]란 그리스 말의[Panacea] 즉, 만능약이란 뜻에서 유래한 것이다. 이름의 유래에서도 알 수 있듯이 다양하고 강력한 고려인삼의 약리활성은 경험상으로 인정되어 왔을 뿐만 아니라 과학적, 임상적으로도 실증되고 있다.

Sonnenborn 등은¹⁾ 인삼이 피로감을 줄여주고 정서를 개선시키는 강장제로서의 효과를 확인하였고, Han 등은²⁾ 26명의 본태성 고혈압 환자를 대상으로 24시간 동안 30분 간격 혈압을 측정하여 홍삼의 혈압강하 활성을 보고한 바 있다. Sonnenborn 등은 인삼이 당 항상성을 개선시키고, 인슐린의 민감도를 높인다고 보고 하였고, Sontaniemi 등이³⁾ 새롭게 제2형으로 진단된 당뇨 환자를 대상으로 실시한 이중맹검 시험에서는 인삼의 공복시 혈당강하 효과, 체중 감소 효과 및 당화 혈색소 수치 개선 효과 등이 확인되었다.

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-961-0373; (팩스) 02-966-3885
(E-mail) suchung@khu.ac.kr

Anoja 등은⁴⁾ 인삼의 주된 활성성분은 saponin 이며, saponin 성분이 구조적, 기능적 다양성에 따라 기억력, 지각능력의 향상, 허혈에 의한 손상 회복, 항종양 효과, 면역 증강 효과 및 항산화효소에 대한 전사인자로서의 역할을 갖는다고 기술하고 있다. 한편, Hwa 등은⁵⁾ 인삼의 비 saponin 분획이 cGMP를 상승시켜 혈소판 응집을 억제한다고 보고한 바 있고, Kim,⁶⁾ Chang⁷⁾ 등은 인삼의 saponin 성분이 항산화 효소인 SOD 의 전사를 활성화 시킨다고 보고 하였으며, 주 등은^{8,9)} 인삼 saponin 분획의 혈당 강하작용을 확인한 바 있다.

Yokozawa 등은¹⁰⁾ 신장을 절제한 흰 쥐에서 인삼이 뇨중 알부민 배설을 줄이고, mesangium 의 비대 및 사구체 병변을 개선시켰다고 보고하였고, Hattori 등은¹¹⁾ 신장을 절제한 만성 신부전 흰 쥐에서 인삼이 TGF- β 1의 활성화를 억제한다고 보고하였으며, Zhang¹²⁾은 토끼의 신장에서 인삼 saponin이 허혈에 의한 손상을 억제한다고 보고하였다. 또, Han 등은¹³⁾ 인삼 saponin이 흰 쥐의 신장에서 내피세포 유래 이완인자(NO)의 내재적 생산을 촉진하여 신장보호 활성을 갖는다고 보고한 바 있다.

이와 같은 다양한 생리활성 중에서도 인삼이 항당뇨 효과, 항고혈압 효과 및 여러 신장병증 모델에서 보호 활성을 나타낸 것에 근거하여, 본 실험에서는 자연발생적 고혈압 흰쥐(spontaneously hypertensive rat, SHR)에 streptozotocin (STZ)을 투여하여 당뇨를 유발시킨 모델을 이용하여 고려홍삼의 사포닌 및 비사포닌 분획이 신장병변에 미치는 영향을 비교해 보았다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 옹성 SHR은 한림 실험동물로부터 구

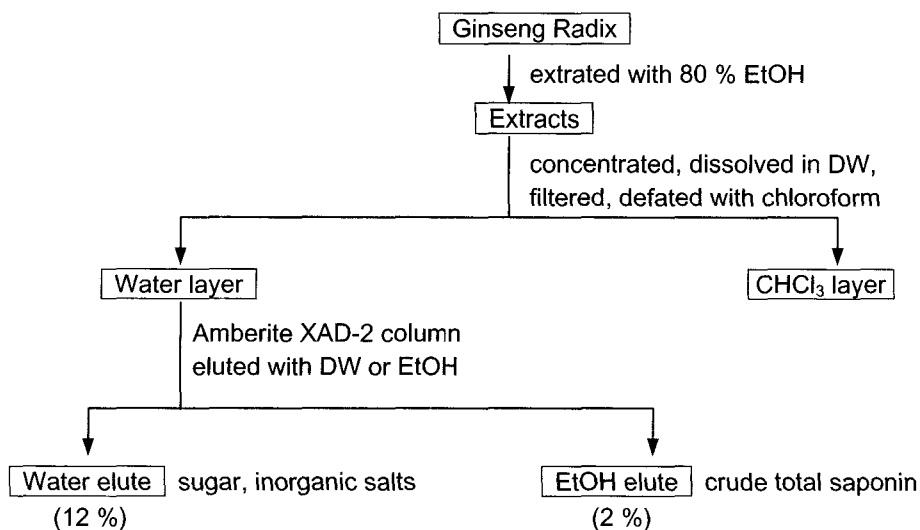
입하였고, 식이는 삼양사로부터 구입하였다. 실험에 사용된 인삼은 한국인삼공사에서 제공한 홍삼을 사용하였다. 시료는 다음과 같이 준비하였다. 먼저 인삼을 80% 에탄올로 3회 추출하여 감압 농축하고 증류수에 녹인 다음, 여과하여 CHCl_3 으로 3회 탈지하였다. 이 추출물을 다시 감압농축하여 amberlite XAD-2를 충전한 open-column에 loading 한 후 물 및 에탄올로 elution 한 분획을 각각 non-saponin 분획(12%) 및 saponin 분획(2%)으로 하였으며, thin layer chromatography 로 확인하였다.

2. 시 약

Trinder는 Sigma chemical Co.로부터 구입하였고, Creatinine kit, Urea N-E kit, 알부스트레이트 용액은 영동제약에서, 중성지방 및 총콜레스테롤 kit는 아산 제약에서 구입하였으며, SOD assay kit는 Calbiochem에서 구입하였다. Polyclonal anti-rabbit TGF- β 1 antibody는 Santacruz에서, polyclonal anti-mouse fibronectin antibody는 Neomarker에서, anti-rabbit phospho-Erk1/2 및 phospho-p38 antibody는 Cell signaling에서 각각 구입하였고, Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit, anti-mouse IgG는 Zymed로부터 구입하였다. Enhanced chemiluminescence substrate는 Pierce로부터, Bionylated secondary antibody는 Burlingame으로부터 구입하였다. Taq DNA polymerase는 TaKaRa, MMR-V reverse transcriptase는 Promega로부터 구입하였고, Easy-Blue는 Intron사에서 구입하였다.

3. 실험개요

6 주령의 SHR 을 구입하여 본 실험실에서 1 주간 적응시



Scheme 1. Separation of ginseng saponin and non-saponin fraction.

킨 후 7 주령 SHR에 시료를 2주간 투여하였다. 실험동물은 습도 50%, 온도 24~26°C로 유지되는 동물사육장에서 사육하였으며 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다. Hypertensive Control(H)군을 제외한 세 그룹에 14시간 절식 후 65 mg/kg 의 STZ를 복강투여 하여 당뇨를 유발하였고, STZ 투여 72시간 후 6시간 절식하여 채취한 혈장에서 포도당 농도를 측정하여 300 mg/dl 인 랫트를 선별하여 다른 세 군으로 나누었다. Hypertensive Control(H)군과 Diabetic Hypertensive Control(HD)군은 증류수를, ginseng total saponin 투여군(GTS)과 ginseng non-saponin 투여군(GNS)은 수득률에 따라 각각 100 mg/kg, 600 mg/kg 을 매일 오전 10시에 경구투여 하였다. STZ 투여 3, 7일 후 각 군의 일부를 희생시켜 신장조직을 적출하였고, 매 3일 마다 체중의 변화를 측정하였다. 주 1회 안와 채혈하여 얻은 혈장으로부터 포도당 농도를 측정하였으며, 투여 2주 후에 같은 방법으로 얻은 혈장으로부터 중성지방, 총 콜레스테롤, 크레아티닌, 요소질소농도를 측정하였다. 또한 투여 2주 후, 흰 쥐를 대사케이지로 옮겨 24시간동안 채뇨하여 뇨중 알부민 배설량 및 뇨중 요소질소 양을 측정하였다. 혈압측정을 위해 전 투여 기간에 걸쳐 흰 쥐를 홀더에 고정시켜 일정 시간동안 warm box (30-33°C)에 적응시켰으며 투여 2주 후에 tail-cuff method로 혈압을 측정하였다.

4. 혈액 채취 및 분석 방법

혈중지표 분석을 위한 혈액 채취는 6시간 절식 후 오후 3시에 실시하였다. 마취 후 안와 정맥을 통해 채혈하여 5,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 얻어진 상등액을 혈장으로 사용하였다. 혈중 포도당 농도는 glucose oxidase method (Trinder 법)¹⁴⁾를 이용하여 측정하였다. 중성지방 및 총콜레스테롤 농도, 크레아티닌, 요소질소, 뇨중 알부민 배설량은 각각 kit를 사용해 정량하였다.

5. SOD assay

SOD 활성을 측정하기 위해 신장 조직을 lysis buffer(50 mM potassium phosphate, 0.1 mM EDTA, 1% Triton-X, pH 7.8)로 균질화 한 후 20,000 g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 사용하였다. Lowry 법¹⁵⁾으로 정량한 후 kit를 사용해 SOD 활성을 측정하였다.

6. RT-PCR

신장으로부터 easy-BLUE를 사용하여 total RNA를 분리하였다. RNA 1 µg을 MMLV-reverse transcriptase를 사용하여 cDNA로 역전사 한 후, 만들어진 cDNA를 template로 하여

TGF-β1 primer를 사용하여 PCR하였다. PCR 조건은 94°C에서 40초, 59°C에서 40초, 72°C에서 40초간 40 cycle 로 반응시켰다. 사용된 primer의 서열은 다음과 같다. TGF-β1: sense primer 5'-TCA CTG GAG TTG TAC GGC AG-3', antisense primer 5'-TCT CTG TGG AGC TGA AGC AA-3'. GAPDH: sense primer 5'-GGA AAG ACA ACG GAC AAA TC-3', antisense primer 5'-GTC ATC TTC TGG AGC ACC TT-3'. 각각의 PCR product는 289 bp, 471 bp의 크기를 가지며, GS-700 imaging densitometer 로 정량하였다. TGF-β1의 mRNA 의 발현은 house keeping gene 인 GAPDH와의 상대적인 비율로 계산하여 비교하였다.

7. Western blotting

단백질 분석을 위해 신장조직을 homogenize buffer(250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 100 mM sodium fluoride, 1% protease inhibitor mixture(Sigma, USA), pH 7.4)로 균질화 한 후, 14,000 rpm, 4°C에서 15 분간 원심분리하여 상등액을 사용하였다. Lowry 법으로 정량 한 후 50 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE로 분리하였다. Gel을 nitrocellulose membrane으로 transfer 한 후 5% non-fat milk로 상온에서 1시간 blocking 하고 TBS/T(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 containing 0.1% tween-20)로 5분간 3번 세척하였다. Membrane 을 1:3,000 비율로 희석된 primary antibody와 상온에서 1.5 시간 반응시키고 같은 방법으로 washing 한 후, 1:5,000 비율로 희석된 secondary antibody와 상온에서 1 시간 반응시켰다. 다시 같은 방법으로 세척한 후, enhanced chemiluminescence(ECL) system으로 band를 확인하였으며, GS-700 imaging densitometer로 정량하였다.

8. Immunohistochemistry

단백질의 면역조직화학 분석을 위해 랫트를 0.1 M PBS 로 perfusion 하여 혈액을 제거한 후, 신장을 적출하여 4% paraformaldehyde에 3주간 고정시켰다. 고정된 조직을 overnight 수세한 후 알코올 농도 차이에 따라 단계별로 탈수 시킨 다음, paraffin block을 만들었다. 만들어진 paraffin block 을 microtome을 이용해 5 µm의 두께로 section하여 xylene 에서 paraffin을 제거한 후 알코올 농도 차이에 따라 단계별로 수화시켰다. 0.01 M Citrate buffer(pH 6.0)에 슬라이드를 넣고 microwave로 10분간 boiling 시키고, PBS로 3회 수세하였다. 슬라이드를 습윤 상자 내에서 anti-rabbit TGF-β1 antibody 및 anti-mouse fibronectin antibody(1:200)와 각각 overnight 반응 시킨 다음, 절편을 PBS로 3회 세척하였

다. 슬라이드를 secondary antibody(1:200)와 1.5시간 반응시킨 다음, 다시 PBS로 3회 수세하였다. ABC 용액과 상에서 1.5시간 반응시킨 후 PBS로 3회 수세한 다음, DAB 및 H₂O₂에 5-6분간 발색시켜 각각 해당하는 단백질을 확인하였다. 슬라이드를 다시 알코올 농도 차이에 따라 단계별로 탈수시킨 후 Neo-mount로 고정하여 관찰하였다.

9. Statistical analysis

모든 실험 결과들은 평균±표준편차(mean±SE)로 나타내었다. 통계처리는 Student's t-test로 검정하였고 대조군과 비교하여 P<0.05 이하의 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

Scheme 1에 따라 고려홍삼 600 g으로 분리를 시작하여, 에탄올 분획(사포닌 분획) 11.8 g 과 물 분획(비사포닌 분획) 72.1 g을 얻었다. 본 수득물의 비율에 따라 투여 용량을 사포닌 100 mg/kg, 비사포닌 600 mg/kg으로 결정하였다.

Table 1은 투여 2주 후 체중, 신장 무게 및 체중 대비 신

장 비율에 근거하여 신장비대에 대한 영향을 살펴본 결과이다. 우선, H 군에 비해 다른 세 군에서 유의적으로 체중이 감소하였다. 특히, 신장비대 수치를 살펴보면, H 군(4.09±0.12)과 비교시 HD군(6.85±0.27)에서 유의적으로 증가한 것을 볼 수 있고, 이에 대해 인삼 saponin(6.03±0.27) 및 non-saponin분획 투여군(5.98±0.27)은 유의적인 감소를 나타내어 신장 비대에 대한 억제 효과를 보여주었으나, GTS 및 GNS 군간에 큰 차이는 볼 수 없었다.

Table 2는 투여 2주 후 혈압을 측정된 결과이다. 8주령에 해당하는 H, HD군의 수축기 혈압은 각각 164±1.7, 163±2.0로 고혈압이 진행되는 단계로 생각되어지며 이와 비교하였을 때, 인삼 saponin 및 non-saponin 분획 투여군의 혈압은 각각 154±2.4, 153±4.5로 약간 감소하였으나 유의적인 차이는 관찰할 수 없었다. 이완기 혈압, 평균 동맥압 및 심박동수 역시 군간의 수축기 혈압과 비슷한 양상을 나타내었다.

Table 3은 투여 2주 후 혈액 및 뇨에서 신장과 관련된 생화학적 지표를 측정된 결과이다. 혈청 크레아티닌 농도 및 혈중 요소 질소 농도는 각 군 간에 유사한 수치를 나타내었다. 뇨 중 알부민 배설량은 H군(17.8±3.6)과 비교했을 때,

Table 1. Effect of GTS and GNS on body and kidney weight after 2 weeks administrations of GTS and GNS

Group	Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Kidney weight (mg)	Index of kidney hypertrophy (mg/g)
H	-	192±5	784±17	4.09±0.12
HD	-	127±11 [†]	868±78	6.85±0.27 ^{††}
GTS	100	118±4	710±42	6.03±0.27*
GNS	600	119±14	701±46	5.98±0.27*

H : hypertensive control; HD : hypertensive diabetic control; GTS : HD+ginseng total saponin; GNS : HD+ginseng non-saponin. Data are the mean±SE of five animals. [†]P<0.05 vs. H, ^{††}P<0.01 vs. H, *P<0.05 vs. HD

Table 2. Effect of GTS and GNS on blood pressure and heart rate

Group	Dose (mg/kg)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	MBP (mmHg)	HR (beats/min)
H	-	164±2	129±7	140±6	406±10
HD	-	163±2	125±4	136±3	369±9
GTS	100	154±2	120±6	131±4	360±9
GNS	600	153±5	123±5	132±4	351±13

H: hypertensive control; HD: hypertensive diabetic control; GTS: HD+ginseng total saponin; GNS: HD+ginseng non-saponin. SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; MBP: mean blood pressure; HR: heart rate. Data are the mean±SE of five animals.

Table 3. Effect of GTS and GNS on urinary albumin excretion, serum creatinine and blood, urine urea nitrogen

Group	Dose (mg/kg)	UAE (g/day)	sCr (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Urine urea nitrogen(mg/dl)
H	-	17.8±3.6	0.51±0.04	22.3±0.5	121.9±1.4
HD	-	45.2±13.5	0.50±0.06	25.0±2.0	25.2±1.4 ^{††}
GTS	100	29.9±5.6	0.52±0.03	24.2±0.9	33.5±5.6
GNS	600	27.3±8.4	0.51±0.11	27.8±0.9	42.5±4.2*

H : hypertensive control; HD : hypertensive diabetic control; GTS : HD+ginseng total saponin; GNS : HD+ginseng non-saponin. Data are the mean±SE of five animals. ^{††}P<0.01 vs. H, *P<0.05 vs. HD

HD군(45.2±13.5)에서 약 3배 가량 증가하였고, HD 군과 비교했을 때 GTS(29.9±5.6)및 GNS군(27.3±8.4)에서는 감소하였으나 통계적으로 유의하지 않았다. 한편, 뇨 중 요소 질소의 양은 H군(121.9±1.4)에 비해 HD군(25.2±1.4)에서 유의적으로 감소하였으며, HD군에 비해 GTS군(33.5±5.6)에서는 약간 상승하였고 GNS군(42.5±4.2)에서는 유의적으로 상승하였다.

Table 4는 투여 2 주 후 혈장에서 포도당 농도 및 신장조직에서 SOD 효소활성을 측정한 결과이다. 포도당 농도는 STZ를 투여한 세 군에서 모두 400 mg/dl 이상의 높은 수치를 나타내어 H 군과 유의적인 차이를 보였으나, GTS 혹은 GNS 투여에 의한 영향은 관찰할 수 없었다. SOD 효소 활성은 H군(0.68±0.18)에 비해 HD군(0.46±0.06)에서 감소하였고, HD군에 비해 GNS군 (0.54±0.07)에서 유의적으로 상승하였다.

다음은 신장비대에 대한 영향과 생화학적 지표들을 통해 살펴본 인삼 투여군의 신장 보호 활성에 대한 기전을 검토한

Table 4. Effect of GTS and GNS on Cu/Zn- SOD activity in kidney and plasma glucose level

Group	Dose (mg/kg)	SOD activity (units/min/mg protein)	glucose (mg/dl)
H	-	0.68±0.18	127± 6
HD	-	0.46±0.06	451±20 [†]
GTS	100	0.46±0.04	482±10
GNS	600	0.54±0.07	466±23

H : hypertensive control; HD : hypertensive diabetic control; GTS : HD+ginseng total saponin; GNS : HD+ginseng non-saponin. SOD : superoxide dismutase. Data are the mean±SE of five animals. [†]P<0.01 vs. H*, P<0.05 vs. HD.

결과이다.

Fig. 1은 STZ 투여 3일, 7일 후에 TGF-β1 단백질 발현을 조사한 결과이다. 먼저, H 및 HD군에서 STZ 투여 후 시간에 따른 TGF-β1의 증가를 확인할 수 있다. STZ 투여 3일 후의 결과를 보면, H군(0.73)에 비해 HD군(24.4)에서 TGF-β1 단백질 발현이 급격하게 상승하였고, 7일 후에는 H군(21.3)에 비해 HD군(34.6)에서 상승한 TGF-β1 단백질 발현이 GTS (12.0) 및 GNS군 (3.06)에서 H군 보다 낮은 수준까지 억제된 것을 볼 수 있었다. 한편, TGF-β1의 mRNA 발현은 각 군간에 큰 차이를 보이지 않았다.

Fig. 2는 STZ 투여 3일, 7일 후에 fibronectin 단백질 발

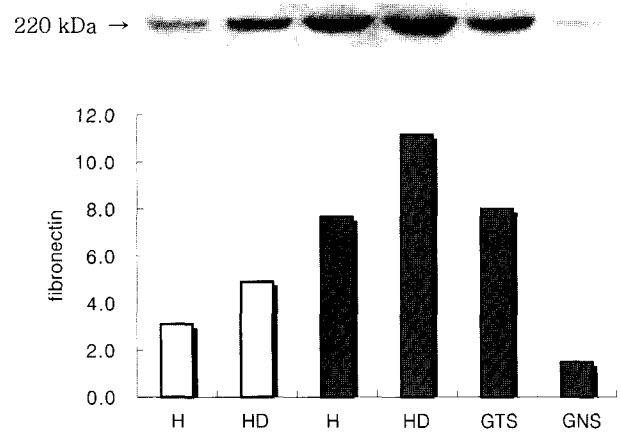


Fig. 2. Expression of fibronectin protein in kidney of SHR treated with GTS or GNS. Open bar: after 3 day administration of STZ, closed bar: after 7 day administration of STZ. H: hypertensive control; HD : hypertensive diabetic control; GTS : HD+ginseng total saponin ; GNS : HD+ginseng non-saponin.

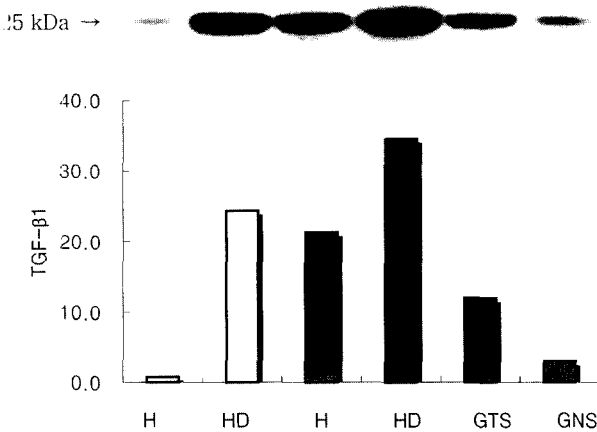


Fig. 1. Expression of TGF-β1 protein in kidney of SHR treated with GTS or GNS. Open bar: after 3 day administration of STZ, closed bar: after 7 day administration of STZ. H: hypertensive control; HD : hypertensive diabetic control; GTS : HD+ginseng total saponin ; GNS : HD+ginseng non-saponin.

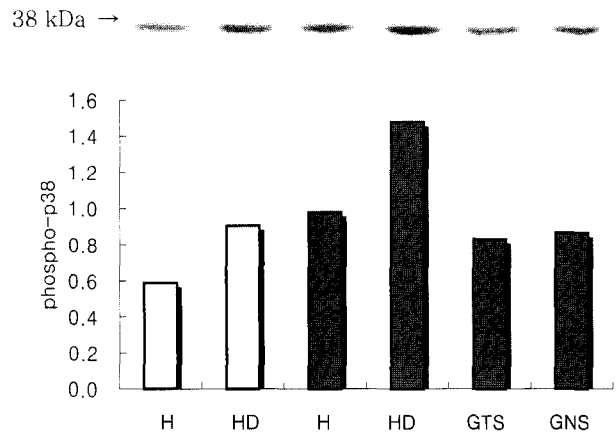


Fig. 3. Expression of phospho-p38 protein in kidney of SHR treated with GTS or GNS. Open bar: after 3 day administration of STZ, closed bar: after 7 day administration of STZ. H: hypertensive control; HD : hypertensive diabetic control; GTS : HD+ginseng total saponin ; GNS : HD+ginseng non-saponin.

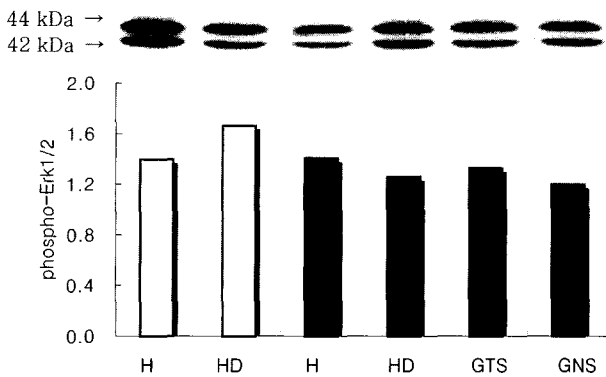


Fig. 4. Expression of phospho-Erk1/2 protein in kidney of SHR treated with GTS or GNS. Open bar: after 3 day administration of STZ, closed bar: after 7 day administration of STZ. H : hypertensive control; HD : hypertensive diabetic control; GTS : HD+ginseng total saponin; GNS : HD+ginseng non-saponin.

현을 조사한 결과이다. 먼저, H 및 HD군에서 STZ 투여 후 시간에 따른 fibronectin의 증가를 확인할 수 있다. STZ 투여 3 일 후의 결과를 보면, H군(3.10)에 비해 HD군 (4.90)에서 fibronectin 단백질 발현이 상승하였고, 7일 후의 결과에서는 H군(7.67)에 비해 HD군(11.2)에서 상승한 fibronectin 단백질 발현이 GTS군(8.01)에서는 H 군의 수준으로, GNS군(1.49)은 이보다 더 낮은 수준으로 억제된 것을 볼 수 있었다.

Fig. 3은 STZ 투여 3일, 7일 후에 인산화 된 p38 단백질 발현을 조사한 결과이다. 먼저, H 및 HD 군에서 STZ 투여 후 시간에 따른 p38의 증가를 확인할 수 있다. STZ 투여 3일 후의 결과를 보면, H군(0.59)에 비해 HD군(0.91)에서 인산화된 p38 단백질 발현이 약간 상승하였고, 7일 후의 결과에서는 H군(0.98)에 비해 상승된 HD군(1.48)의 단백질 발현이 GTS(0.83) 및 GNS군(0.87)에서 유사한 정도로 H군 수준까지 억제된 것을 볼 수 있었다.

Fig. 4는 STZ 투여 3일, 7일 후에 인산화 된 Erk 단백질 발현을 Erk 1과 Erk 2의 상대적인 비율로 표시한 것이다. 3일, 7일 후의 결과에서 모두 각 군간에 큰 차이를 확인할 수 없었다.

Fig. 5는 GTS 및 GNS 투여 2주 후에 TGF-β1의 mRNA 발현을 조사한 결과이다. H군(0.83)에 비해 HD군(1.20)에서 TGF-β1의 mRNA 발현이 증가하였고, GTS군(1.14)은 HD군과 큰 차이를 보이지 않은 반면, GNS군(0.80)은 HD군에 비해 감소하여 H군과 유사한 수준을 나타내었으나 통계적으로 유의하지 않았다.

Fig. 6은 GTS 및 GNS 투여 2 주 후에 TGF-β1의 단백질 발현을 면역조직 화학염색으로 확인한 결과이다. H군(Fig.

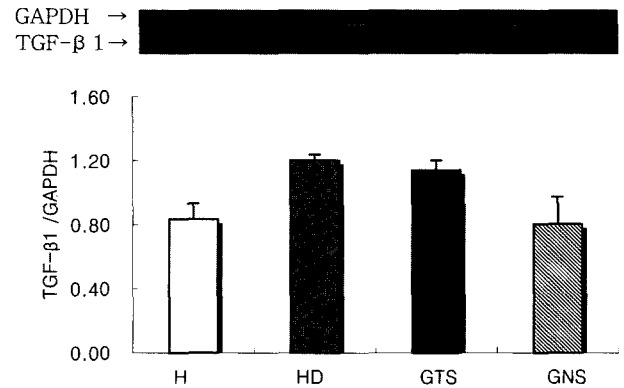


Fig. 5. Expression of TGF-β1 mRNA in kidney of SHR treated with GTS or GNS after 2 weeks administrations GTS and GNS. Bands representing the 289 bp TGF-β1 PCR product and the 471 bp GAPDH PCR product are indicated. Quantification of mRNA was normalized with GAPDH. H: hypertensive control; HD : hypertensive diabetic control; GTS : HD+ginseng total saponin; GNS : HD+ ginseng non-saponin.

6A)에 비해 HD군(Fig. 6B)의 사구체 부위에서 TGF-β1의 발현이 뚜렷이 증가한 것을 볼 수 있고, 이와 비교하였을 때 GTS군(Fig. 6C)에서는 사구체 내의 TGF-β1은 감소하였으나, 세뇨관 부위에서는 증가하였다. 한편, GNS군(Fig. 6D)에서는 거의 H군과 유사한 수준까지 TGF-β1의 발현이 억제되었다.

Fig. 7은 GTS 및 GNS 투여 2주 후에 fibronectin의 단백질 발현을 면역조직 화학염색으로 확인한 결과이다. H군(Fig. 7A)에 비해 HD군(Fig. 7B)의 사구체 부위에서 fibronectin의 발현이 뚜렷이 증가한 것을 볼 수 있고, 이와 비교하였을 때 GTS(Fig. 7C) 및 GNS군(Fig. 7D)에서는 거의 H군과 유사한 수준까지 fibronectin의 발현이 억제되었다.

고 찰

자연 발생적 고혈압 흰쥐(SHR)에 당뇨를 유도하여 나타나는 신장 병변에 대한 인삼의 보호 효과를 살펴보았다. 본 실험에서 SHR을 사용한 이유는 다음과 같다. 임상적으로 고혈압은 당뇨병성 신장병증과 밀접한 관계가 있고¹⁶⁾ SHR은 자연발생적으로 고혈압이 유발되는 모델로 본태성 고혈압 연구에 많이 사용 되어왔다. 또한, SHR에 STZ를 투여한 모델은 고혈압을 나타내면서 당뇨병성 신장병증을 동반하므로 고혈압, 당뇨 및 동맥경화증과 같이 인슐린 저항성을 공통인자로 하는 질병치료 연구에 흔히 사용되어 왔다.^{17,18)} 한편, 인삼은 항당뇨^{1,3)} 및 항고혈압 활성²⁾을 가지는 것으로 수 차례 보고된 바 있고, 몇몇 신장장애를 동반한 동물모델에서 신장 보호 효과를¹⁰⁻¹³⁾ 나타낸 것으로 알려져 있다. 따라서, 당뇨

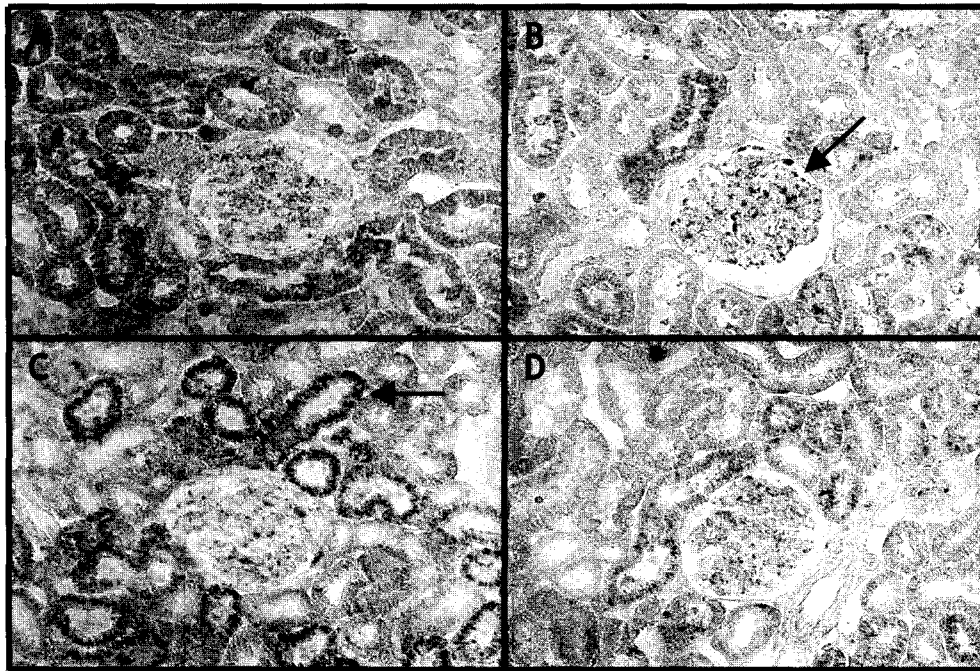


Fig. 6. Immunostaining of TGF-β1 in kidney of SHR treated with GTS or GNS after 2 weeks administrations GTS and GNS. A, hypertensive control(H); B, hypertensive diabetic control(HD); C, HD+ginseng total saponin(GTS); D, HD+ginseng non-saponin (GNS).

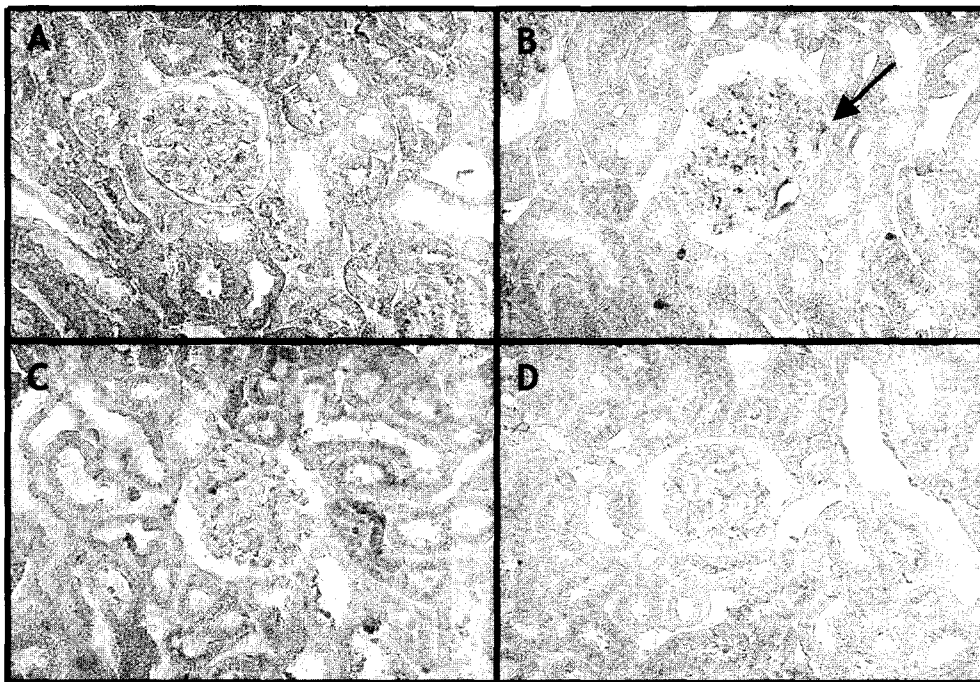


Fig. 7. Immunostaining of fibronectin in kidney of SHR treated with GTS or GNS after 2 weeks administrations GTS and GNS. A, hypertensive control(H); B, hypertensive diabetic control(HD); C, HD+ginseng total saponin(GTS); D, HD+ginseng non-saponin(GNS)

및 고혈압을 동반한 SHR이 인삼의 신장보호 효과를 살펴보기에 매우 적합한 모델이라고 생각되었다.

STZ는 심각한 고혈당을 유발하는 것과 동시에 주로 고혈당

에 기인하는 것으로 보이는 신장병변을 유발한다. 혈중의 높은 포도당 수치는 이러한 병리의 중심에 놓여있는 diacylglycerol(DAG)의 *de novo synthesis*를 증가시키고, 만성적으로

는 단백질 당화를 촉진하기도 하여 중국에는 protein kinase C(PKC)를 활성화시킨다.^{19,20)} 이로 인해 초기에는 TGF- β 1 통한 extracellular matrix(ECM) protein 발현의 증가로 사구체가 비대해지고 사구체 여과속도가 빨라지고 소단백뇨가 나타난다.²¹⁾ STZ를 투여받은 군에서 TGF- β 1 및 ECM protein 중에 하나인 fibronectin의 발현이 증가한 것과 노 중 알부민 배설량이 증가한 것으로 볼 때, 본 실험에서 살펴본 신장병변은 초기 단계로 생각되어진다. 이에 대해 인삼은 saponin 및 non-saponin 분획 모두에서 억제효과를 나타내었다. SOD 활성을 비롯하여, 신장비대 수치 및 혈액, 노 중 지표들을 볼 때 전체적으로 인삼 non-saponin 분획(GNS)의 신장보호 효과가 saponin 분획(GTS)보다 더 큰 것으로 생각되어진다. 한편, 인삼 saponin이 HD 군과 비교하였을 때 TGF- β 1의 mRNA 발현을 감소시키지 못한 것과 세뇨관 부위에서 TGF- β 1의 단백질 발현을 상승시킨 결과는 인삼 saponin 이 glucocorticoid 와의 구조적 유사성에 의해 TGF- β 1을 활성화시키는 작용과 유사한 결과를 나타낸 것으로 추측할 수 있다.²²⁾

본 실험에서 확인한 고려홍삼의 신장 보호 활성은 혈당 조절과는 무관하며 그 기전은 부분적으로 TGF- β 1 및 fibronectin 단백질 발현 억제에 기인하는 것으로 보이며, 그 upstream에는 p38 MAPK가 관여하고 있을 것으로 추측된다. 또한, 산화적 스트레스가 신장 병변과 무관하지 않음을 감안할 때 GNS에 의한 SOD 활성 증가도 인삼의 신장보호 효과에 부분적으로 기여한다고 생각된다.

STZ 투여에 의한 신장장애는 DAG, mitogen-activated protein kinase(MAPK), PKC 등이 여러 경로를 경유하며 복잡하게 관여한다고 보고되고 있으나,^{23,24)} 고혈당에서 사구체 병변에 이르는 경로에는 실로 많은 인자가 직간접적으로 관여하고 있다고 생각된다.

요 약

자연발생적 고혈압 흰쥐에 STZ로 당뇨를 유발한 고혈압-당뇨 질환모델에서 고려홍삼 조사포닌분획과 비사포닌 분획간의 신장보호 활성을 비교해 보았다. STZ 65 mg/kg 용량을 투여한 후 3일에 네 그룹으로 나누어 본 실험에 임하였다.

신장비대에 대한 저해 활성을 비교해 보았을 때 GTS와 GNS 각각 12, 13% 억제 활성을 나타내었고 두 군간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 한편 요 중 요소질소의 배설은 GNS 투여군에서는 69% 증가($p < 0.05$)한 반면 GTS 투여군은 31%만이 증가하였다. 혈중 포도당, 콩 콜레스테롤 및 중성지방의 경우는 고혈압-당뇨 대조군과 비교시 홍삼투여군 두군

모두에서 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 반면 oxidative stress를 저해하는 효소인 SOD 활성화에 있어서는 GNS 투여군에서 대조군에 비해 17% 유의하게 상승하는 활성을 보여주었다.

신장비대의 지표인 TGF- β 1, fibronectin 그리고 upstream의 MEPK인 p-38, ERK 등의 발현을 그룹간 비교해 본 결과 모든 지표에서 비사포닌 분획이 사포닌 분획에 비해 우수한 억제활성을 나타내었다. TGF- β 1의 mRNA 및 단백질의 발현을 살펴보았을 때 GNS 투여군은 33%, 91% 억제활성을 나타낸 반면 GTS 투여군은 각각 5%, 65% 억제활성을 나타내었다. Fibronectin 단백질의 발현에서도 GNS 투여군은 87% 억제 활성을 나타낸 반면 GTS 투여군은 28% 저해활성을 나타내었다.

본 실험의 결과를 종합해보면 고려홍삼의 신장보호 활성은 사포닌 분획보다는 비사포닌 분획에 함유된 성분에 의해 일어나는 효과가 아닌가 추측된다.

감사의 말씀

본 연구는 2002년도 한국인삼공사 출연금으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

인용문헌

1. Sonnenborn, U. and Proppert, Y. : Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Zeitschrift fur Phytotherapie* **11**, 35-49 (1990).
2. Han, K.H., Choe, S.C., Kim, H.S., Shon, D.W., Nam, K.Y., Oh, B.H., Lee, M.M., Park, Y.B., Choi, Y.S., Seo, J.D. and Lee, Y.W. : Effect of red ginseng on blood pressure in patients with essential hypertension and white coat hypertension. *Am. J. Chi. Med.* **26**, 199-209 (1998).
3. Sotaniemi, E.A., Haapakoski, E. and Rautio, A. : Ginseng therapy in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* **18**(10), 1373-1375 (1995).
4. Anoja, S., Attle, J.A W. and Yuan, C.S. : Ginseng pharmacology. *Biochemical Pharmacology* **58**, 1685-1693 (1999).
5. Park, H.J., Rhee, M.H., Park, K.M., Nam, K.Y. and Park, K.H. : Effect of non-saponin fraction from *Panax ginseng* on cGMP and thromboxane A_2 in human platelet aggregation. *Journal of Ethnopharmacology* **49**, 157-162 (1995).
6. Kim, Y.H., Park, K.H. and Rho, H.M. : Transcriptional activation of the Cu,Zn superoxide dismutase gene through the AP2 site by ginsenoside Rb₂ extracted from a medicinal plant, *Panax ginseng*. *The Journal of Biochemical Chemistry* **271**(40), 24539-24534 (1996).
7. Chang, M.S., Lee, S.G. and Rho, H.M. : Transcriptional acti-

- vation of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase genes by panaxadiol ginsenosides extracted from panx ginseng. *Phytotherapy Research* **13**, 641-644 (1999).
8. 주충노, 김주현 : 인삼 saponin 분획의 고혈당 강하작용에 관한 연구(1). *Korean J. Ginseng Sci.* **16(3)**, 190-197 (1992).
 9. 주충노, 윤수희, 이향숙, 김용덕, 이희봉, 구자현 : saponin (2). *Korean J. Ginseng Sci.* **16(3)**, 198-209 (1992).
 10. Yokozawa, T., Zhou, J., Hattori, M., Inaba, S., Okada, T. and Oura, H. : Effects of ginseng in nephrectomized rats. *Biol. Pharm. Bull.* **17(11)**, 1485-1489 (1994).
 11. Hattori, T., Fujitsuka, N., Kurogi, A. and Shindo, S. : Effect of Onpi-to (TJ-8117) on TGF-beta 1 in rat with 5/6 nephrectomized chronic renal failure. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* **38(11)**, 475-483 (1996).
 12. Zhang, Y. : Protective effects of ginsenosides on warm ischemic damages of the rabbit kidney. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **72(2)**, 84-85 (1992).
 13. Han, S.W. and Kim, H. : Ginsenosides stimulate endogenous production of nitric oxide in rat kidney. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **28(5)**, 573-580 (1996).
 14. Trinder, T. : Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annal. Clin. Biochem.* **6**, 24-28 (1969).
 15. Lowry, O.H., Rosebrough, W.L., Farr, A.L. and Randal, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
 16. Kaneko, S., Takizawa, H., Takeda, M., Shou, I. and Tomino, Y. : Effects of the antihypertensive drug nifedipine on albuminuria and renal histopathology in young spontaneously hypertensive rats with diabetes. *General pharmacology* **33**, 363-367 (1999).
 17. Alluru, S., Reddi, V. R., Nimmagadda, A. L., Kuo, H.R. and Bollineni, J.S. : Effect of antihypertensive therapy on renal injury in type 2 diabetic rats with hypertension. *Hypertension* **36**, 233-238 (2000).
 18. Srinivasan, P. S., Hakim, Z. S., Santani, D. D. and Goyal, R. K. : Effects of chronic treatment with amlodipine in streptozotocin diabetic and spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological Research* **35(5)**, 423-428 (1997).
 19. Koya, D. and King, G.L. : Protein kinase C activation and the development of diabetic complication. *Diabetes* **47**, 859-866 (1998).
 20. Isshiki, K., Haneda, M., Koya, D., Maeda, S., Sugimoto, T. and Kikkawa, R. : Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes* **49**, 1022-1032 (2000).
 21. Sharma, K. and Ziyadeh, F.N. : Hyperglycemia and diabetic kidney disease : The case for transforming growth factor-1 α as a key mediator. *Diabetes* **44**, 1139-1146 (1995).
 22. Koli, K., Saharinen, J., Hyytiainen, M., Penttinen, C. and Keski-oja, J. : Latency, activation and binding proteins of TFG-1 α . *Micros. Res. Tech.* **52**, 354-362 (2001).
 23. Awazu, M., Ishikura, K., Hida, M. and Hoshiya, M. : Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation in experimental diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 738-745 (1999).
 24. Isono, M., Iglesia-de la Cruz, M.C., Chen, S., Hong, S.W. and Ziyadeh, F.N. : Extracellular signal-regulated kinase mediates stimulation of TGF- α 1 and matrix by high glucose in mesangial cell. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 2222-2230 (2000).