

## 홍삼 사포닌이 랫드의 다낭성난소에 미치는 영향

<sup>1</sup>이지애 · <sup>2,3</sup>임성철 · <sup>4</sup>류애란 · <sup>4</sup>배진규 · <sup>4</sup>강성수 · <sup>4</sup>김종춘  
<sup>4</sup>김성호 · <sup>1</sup>김정옥 · <sup>1</sup>최범채 · <sup>4,5</sup>† 배춘식

<sup>1</sup>시엘병원, <sup>2</sup>조선대학교 의과대학 및 <sup>3</sup>내성세포연구센터, <sup>4</sup>전남대학교 수의과대학 및 <sup>5</sup>생물공학연구소  
(접수 : 2004. 11. 13., 게재승인 : 2004. 12. 24.)

## Effects of Red Ginseng Total Saponin on the Polycystic Ovaries in Rats

Jiae Lee<sup>1</sup>, Sung-Chul Lim<sup>2,3</sup>, Ae-Ran Lyu<sup>4</sup>, Jin-Gyu Bae<sup>4</sup>, Seong-Soo Kang<sup>4</sup>, Jong-Choon Kim<sup>4</sup>, Sung-Ho Kim<sup>4</sup>,  
Jeong-Wook Kim<sup>1</sup>, Bum-Chae Choi<sup>1</sup>, and Chun-Sik Bae<sup>4,5</sup>†

<sup>1</sup>Creation and Love Women's Hospital, Gwangju 502-210, Korea

<sup>2</sup>Department of Pathology and <sup>3</sup>Research Center for Resistant Cells, Chosun University,  
Medical School, Gwangju 501-759, Korea

<sup>4</sup>College of Veterinary Medicine, <sup>5</sup>Biotechnology Research Institute,  
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2004. 11. 13., Accepted : 2004. 12. 24.)

Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a very common endocrine disorder in women of reproductive age. There are some evidences that nerve growth factor (NGF) is involved in the pathogenesis of PCOS. In this study, we investigated the effect of Korean red ginseng total saponin (GTS) on the ovarian morphology and NGF expressions in the ovaries, pituitary and hippocampus. The oil control animals were injected with 0.2 ml oil/rat. Animals in estradiol valerate (EV) control group were injected i.m. with 4 mg EV in 0.2 ml oil/rat. The GTS was administered (100 mg/kg) i.p. every other day for 60 days, beginning 1 day after the EV injection. PCO was induced by a single injection of EV (4 mg, i.m.). At day 60, the expressions of NGF were examined by immunohistochemistry. The main findings were as follows; PCO was fully developed with a single i.m. injection of EV, and PCO showed the increased expression of NGF, and GTS administration decreased NGF expressions in the ovaries without affecting pituitary and hippocampus significantly. The present results demonstrate that GTS attenuates PCOS by the stimulation of NGF expression.

**Key Words** : PCO, nerve growth factor, estradiol valerate, saponin, rat

### 서론

다낭성난소 증후군 (polycystic ovarian syndrome, PCOS)은 가임기 여성에게서 가장 일반적으로 볼 수 있는 내분비질환이다(1). 1990년대에는 PCOS의 진단에 생리불순 및 남성 호르몬과다증이 포함이 되었으며(2), 최근에 와서 다낭성난소의 형태가 진단 기준에 추가로 포함되었다(3). 비록 정의가 불완전해 보이지만 PCOS의 병태생리적 이해와 치료의

발전은 비약적으로 이루어졌다. 이러한 성과는 어느 정도는 실험동물 모델의 성과이다. 적절한 실험동물 모델의 필수 조건으로는 인간의 상황과 유사한 내분비학적 및 형태학적인 소견이다. PCOS는 다양한 원인에 의해 기인되므로, 모든 조건에 부합하는 동물 모델을 만드는 것은 거의 불가능하다. 그러나, estradiol valerate (EV) 주입(4), 신생아에게 안드로겐 투여(5), 저감상선 기능 동물들에게 human chorionic gonadotropin 투여(6), 지속적인 빛 조사(7)를 포함한 여러 시도가 랫드 모델에서 이루어져왔다. Nerve growth factor (NGF)를 포함하는 neurotrophin family가 난소에 분포하는 신경에서 발현되어지며, 특히 NGF 수용체(8)와 NGF mRNA(9)가 배란 과정동안 현저히 촉진된다. 배란은 기본적인 면에서 생물학적으로 중요한 과정인데, 이는 조직손상에 따른 난포파열이 선행되며 과정이 염증반응과

† Corresponding Author : College of Veterinary Medicine, Biotechnology Research Institute, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Buk-gu, Gwangju 500-757, Korea  
Tel : +82-62-530-2876, Fax : +82-62-530-2809  
E-mail : csbae210@chonnam.ac.kr

비슷한데, NGF는 수정을 위한 난소 방출을 돕는 과정에 한 요소로 관여된다.

한편, 다낭성난소는 난소 내에 과밀의 신경다발이 존재하며, 이들의 교감신경이 과민 반응하는 걸로 보고되어져 왔다(9). 랫드의 난소 내에서 NGF는 난포막 세포에서 주로 생성되어지며(10), NGF의 활성은 EV로 유발된 다낭성난소에서 노르에피네프린의 유출을 항진시키는데 관여하는 요소일 것이다(8).

본 연구는 자율신경계에서 NGF의 neurotrophin으로서의 역할을 기초로 하고, 다낭성난소의 구조가 현재 연구의 주요 관심사이므로, EV로 유발한 랫드의 PCO 모델을 통해, 뇌와 난소의 NGF 단백질 발현을 분석하여, 홍삼 사포닌이 랫드의 불임에 미치는 효과를 알아보려고 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

4일 간격의 성주기를 보이며 체중이 190-210 g인 7주령의 암컷 Sprague-Dawley 랫드 30마리를 분양받아 실험실 환경적응을 위하여 1주간 예비사육 후 실험을 실시하였다. 사육실 조건은  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 와 12시간의 명암주기를 유지하며 물과 사료는 자유롭게 섭취하게 한다. 실험동물은 oil 대조군, EV 대조군 및 홍삼사포닌 투여군으로 나누고 각 군마다 10마리씩 배치를 하였다. Oil 대조군은 sesame oil을 0.2 ml 근육주사를 하고, EV 대조군은 estradiol valerate (EV)를 4 mg 근육주사하며, 홍삼사포닌 투여군은 4 mg의 EV를 근육주사한 다음 9주 동안 홍삼사포닌 100 mg/kg을 2일 간격으로 복강내 주입하였다.

### 다낭성 난소 유발

Stener-Victorin 등의 방법에 준하여 EV (Sigma, USA)를 benzyl alcohol (Sigma, USA)과 sesame oil (Sigma, USA)에 용해시켜 4 mg의 농도로 각 동물에 1회 근육주사를 실시하였다(9).

### 홍삼사포닌의 투여

KT&G 중앙연구원 (대전, 한국)에서 제공받은 홍삼사포닌을 생리식염수에 용해시켜서 1 ml/kg의 용적으로 복강내에 투여하였다.

### 광학현미경적 관찰

양측 난소, 뇌하수체 및 해마체를 적출하여 10% 중성 포르말린에 12시간 이상 충분히 고정한 다음, 파라핀 포매에 의해 4  $\mu\text{m}$  두께의 절편으로 제작하여 hematoxylin-eosin 이중 염색을 실시하여 관찰하였다.

### 면역조직화학적 검사

10% 완충 중성 포르말린에 고정 후 제작한 파라핀 포매 조직을 4  $\mu\text{m}$  두께로 박절하여 X-tra<sup>TM</sup>슬라이드에 부착하여 xylene에 탈파라핀한 뒤 무수 알코올, 90%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 2분씩 처리하여 함수시켰다. 항원성 회복을 위하여 citrate 완충액 (10 mM, pH 6.0)에 슬라이드를 담가 전자오븐에 15분간 끓인 후 실온에 방치시켜 20분간 식힌 후 50 mM Tris 완충용액 (TBS, pH7.5)으로 수세하였다. 조직절편 내의 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위하여 0.3% hydrogen peroxide-methanol에 10분간 처리 후 증류수로 세척하고 차단항체를 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 일차항체인 rabbit anti-mouse NGF monoclonal antibody (clone 2.5s, Serotec, Kidlington, Oxford, UK)를 4 $^\circ\text{C}$ 에서 24시간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척하고 Histostain-Plus kits, broad spectrum (Zymed, San Francisco, CA, USA)을 이용하여 비오틴이 함유된 이차항체를 실온에서 10분간 반응시킨 후 tris 완충액으로 수세하고, peroxidase가 결합된 streptavidin 용액을 10분간 반응시켰다. Tris 완충액으로 세척 후 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC) kit, SK-4200 (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 발색하였다. Mayor's hematoxylin으로 대조염색을 시행하였고, universal mount로 봉입하였다.

대조군으로 부신 수질이 포함된 조직을 양성대조로 삼았으며, 음성대조군으로 일차항체 대신 tris 완충액을 썼다.

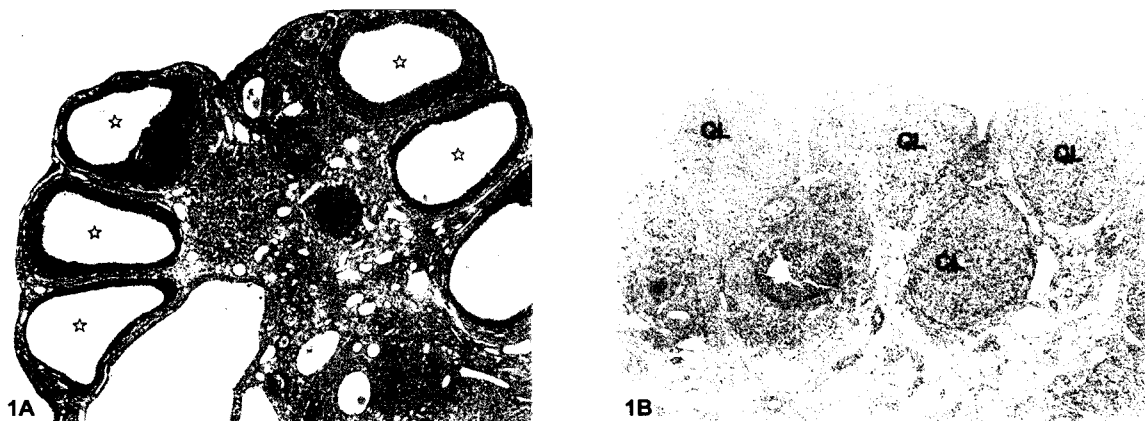


Figure 1. Morphological changes in estradiol valerate- (A) and estradiol valerate plus ginseng total saponin-treated ovary (B). Note many cystic follicles (asterisks) in estradiol valerate-treated ovary. CL, Corpus luteum. x 40.

결 과

난소 형태

Oil 대조군의 난소에서는 난포동을 지닌 난포와 퇴축난포들이 드물게 관찰되었고, 세포가 충실한 간질 내에 수많은 일·이차난포와 성장하는 난포들이 나타나 비교적 정상적인 난소의 외형을 보여주었다. 그리고 EV 대조군의 난소는 전형적인 PCOS의 형태를 보이는 낭성 난포들이 관찰되었는데, 다수의 난포낭, 퇴축난포, 풍부한 피질 간질(cortical stroma), 잘 발달된 내협막이 관찰되었다. 그리고 국소적인 간질세포 과난포막화가 관찰되었다(Fig. 1A). 홍삼사포닌 투여군은 EV 대조군에 비해 낭성 난포가 현저히 감소하는 반면 황체와 백체는 현저히 그 수가 증가하였다(Fig. 1B). 그리고 EV 대조군에 비해 성장 중인 이차난포의 수가 증가된 소견을 보였다.

NGF의 발현 변화

Oil 대조군의 경우 난소의 간질세포 및 협막세포에 약한 NGF 양성소견을 보이는 세포가 관찰되었다. 그러나, EV 대조군의 경우 많은 황체세포, 난포막세포 및 간질세포가 강한 NGF 양성소견을 보였다(Fig. 2A). 홍삼사포닌 투여군의 경우 난포 및 간질에 존재하는 협막세포의 NGF 발현이 감소하여 oil 대조군의 경우와 유사하여졌으나, 황체세포에서는 EV 대조군과 차이를 보이지 않았다(Fig. 2B).

Oil 대조군의 경우 뇌하수체에서 약한 NGF 양성소견을 보이는 세포가 일부 관찰되었다. 그러나, EV 대조군의 경우에 NGF가 미만성으로 중등도 또는 강한 양성을 보였다. 한편, 홍삼사포닌 투여군의 경우 EV 대조군에 비하여 NGF 발현이 감소하였으나, 유의한 정도는 아니었다.

Oil 대조군의 경우 해마체의 신경원세포에서 약한 NGF 양성소견을 보이는 세포가 관찰되었다. 그러나, EV 대조군의 경우 신경원세포에 NGF가 미만성으로 중등도 또는 강한 양성을 보였다. 한편, 홍삼사포닌 투여군의 경우 EV 대조군에 비하여 NGF 발현이 감소하였으나, 유의한 정도는 아니었다(Table 1).

Table 1. Immunohistochemical profiles for NGF in the various experimental groups

| Experimental group | Ovary         |               |               | Pituitary | Hippocampus |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|-----------|-------------|
|                    | Theca interna | Stromal cells | Corpus luteum |           |             |
| Oil control        | -             | ±             | -             | -         | +           |
| EV control         | +++           | +++           | +             | +         | +           |
| EV+GTS             | +             | +             | +             | +         | +           |

Oil control (0.2 ml/rat, n = 10); EV control (4 mg of estradiol valerate injected, n = 10); EV + GTS (estradiol valerate plus ginseng total saponins, n = 10)

-, negative; ±, a few positive staining; +, diffuse weakly positive staining; ++, moderately positive staining; +++, strongly positive staining

고 찰

인삼 (the roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer, Araliaceae)은 옛부터 강장제 (tonics)로 널리 이용되었으며, 홍삼사포닌은 인삼의 주요한 생물학적 유효 성분으로 알려져 있다. 그동안 많은 연구를 통하여 홍삼사포닌은 스테로이드와 유사한 dammarane 계통의 물질로 糖이 부착된 위치에 따라 구분되어 지금은 약 30여종이 분리 확인되었다(11, 12). 본 연구 결과 GTS를 투여한 실험군의 경우 난소에서 NGF의 발현이 감소한다는 것을 보여주었지만, 뇌하수체와 해마체 같은 뇌쪽은 GTS 투여에 영향을 받지 않았다. 이러한 결과는 홍삼 사포닌의 NGF 발현조절에 있어서 작용지점이 중추보다는 말초영역이라는 것을 시사한다. 말초 노르아드레날린과 peptidergic 성질은 고도로 조직화된 난소 기능과 연관이 있다(13). 난소와 뇌의 조직에 다량의 NGF가 있다는 것은 실험적으로 유도된 다낭성난소 모델에서 NGF의 농도가 이들 장기에서 증가되었다는 최근 논문들이 이를 뒷받침한다(8, 14). 즉, EV 투여를 통해 교감신경의 지나친 과민반응과 연관이 있는 NGF를 과잉 생산할 수 있는 것으로 잘 알려져 있다. 고혈압 모델을 이용한 GTS 효능 연구의 경우 효과적인 혈압강하 효과가 보고되고 있는데, 이는 GTS가 자율신경계에 영향을 미쳐 교감신

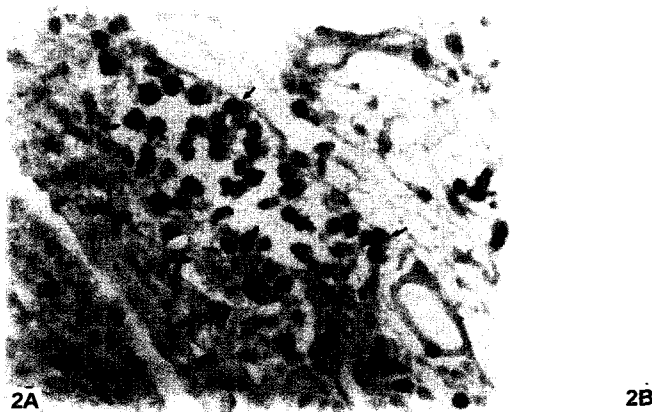


Figure 2. Immunohistochemical study showing the expression of NGF in estradiol valerate- (A) and estradiol valerate plus ginseng total saponin-treated ovary (B). Arrows indicate the positive immunoreactivity for NGF. x 200.

경을 억제하여 이와 같은 효과가 초래되는 것으로 밝혀졌다(15).

Neurotrophic-neurogenic control system의 이러한 항진된 반응은 랫드에서 EV가 난소 낭종을 유발하고 배란을 방해하여 결과적으로 불임을 초래하는 과정에 기여한다. 난소로 도달하는 교감신경이 superior ovarian nerves를 거치기 때문에, GTS는 난소형태 변화의 초기 단계에서 난소와 관련된 신경계를 방해하는 것으로 보인다. 왜냐하면, 다낭성 난소가 있는 랫드에서 난소내의 NGF 농도의 증가가 형태학적인 변화에 앞서서 선행되어지기 때문이다(8). 게다가 EV로 처리된 랫드에서 superior ovarian nerve가 잘렸을 경우, 생리 및 배란능력이 회복되었다(16). 이것이 이번 연구에서 EV 주입 하루 후 가능한 빨리 GTS를 복용시키는 주요한 이유이다. GTS 복용에 따른 면역조직화학적 반응의 변화는 랫드에서 NGF 단백질의 발현이 홍삼 사포닌에 의해 조절되어질 수 있다는 것을 보여준다. 이러한 결과들은 또한 EV 근육주사 한번으로 랫드 모델에서 PCO를 유발할 수 있다는 것을 증명한다. PCO를 유도하는데 있어서의 전달자는 난소와 중추신경계에서 NGF의 과발현이라는 형태로 보여지는 교감 신경계의 과민반응이다. PCO의 실험 모델에서, GTS는 EV로 처리된 랫드의 NGF의 양을 효과적으로 감소시킬 수는 있었지만, 완전히 정상화시키지는 못했다.

## 요 약

홍삼 사포닌이 estradiol valerate로 유발된 랫드의 다낭성 난소에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 홍삼 사포닌을 투여한 실험군의 난소형태는 퇴축난포, 정상발달을 보이는 이차난포 및 황체형성 등 비교적 정상화된 난소의 소견이 관찰되어 다낭성난소의 현저한 치료 효과를 보였다.
2. 홍삼 사포닌을 투여한 실험군의 신경성장인자 염색은 대조군에 비해 난소조직에서 내협막 세포들과 간질 세포들이 현저하게 감소된 현상을 보였으나, 뇌하수체 및 해마체에서는 뚜렷한 차이가 없는 것으로 관찰되었다.

이상의 결과를 종합해보면 홍삼 사포닌은 다낭성난소 증후군의 예방 및 치료에 효과가 있을 것으로 사료된다.

## 감 사

이 논문은 2003년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었습니다. 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Carmina, E. and R. A. Lobo (1999), Polycystic ovary syndrome (PCOS): arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 1897-1899.
2. Zawadzki, J. K. and A. Dunaif (1992), Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach, In *Polycystic ovary syndrome: current issues in endocrinology and metabolism* Vol. 4, A. Dunaif, J. R. Givens, and G. R. Merriam, eds., p377-384, Blackwell Scientific, Boston.
3. Chang, R. (2002), Polycystic ovary syndrome: diagnostic criteria, In *Polycystic ovary syndrome*. R. Chang, J. Heinder and A. Dunaif, eds., p361-365, Marcel Dekker, New York.
4. Bai, Y. H., S. C. Lim, C. H. Song, C. S. Bae, B. C. Choi, and S. C. Pak (2004), Electro-acupuncture reverses nerve growth factor abundance in experimental polycystic ovaries in the rat, *Gynecol. Obstet. Invest.* **57**, 80-85.
5. Barraclough, C. A. and R. A. Gorski (1961), Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat, *Endocrinology* **68**, 68-79.
6. Bagavandoss, P., B. England, and B. C. Bruot (1998), Transient induction of polycystic ovary-like syndrome in immature hypothyroid rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **219**, 77-84.
7. Campbell, C. S. and N. B. Schwartz (1980), The impact of constant light on the estrous cycle of the rat, *Endocrinology* **106**, 1230-1238.
8. Lara, H. E., G. A. Dissen, H. Fuenzalida, J. L. Fiedler, and S. R. Ojeda (2000), An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat, *Endocrinology* **141**, 1059-1072.
9. Stener-Victorin, E., T. Lundeberg, S. Cajander, and P. O. Janson (2003), Steroid-induced polycystic ovaries in rats: effect of electro-acupuncture on concentrations of endothelin-1 and nerve growth factor (NGF), and expression of NGF mRNA in the ovaries, the adrenal glands, and the central nervous system, *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 33.
10. Dissen, G. A., D. F. Hill, M. E. Costa, and S. R. Ojeda (1996), A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation, *Endocrinology* **137**, 198-209.
11. Kim, D. H., Y. S. Moon, H. W. Suh, and D. K. Song (2003), The inhibitory effect of ginseng saponins on the stress-induced plasma interleukin-6 level in mice, *Neurosci. Lett.* **353**, 13-16.
12. Tachikawa, E., K. Kudo, T. Kashimoto, H. Taira, and J. M. Lindstrom (2003), *Biochem. Pharmacol.* **66**, 2213-2221.
13. Lara, H. E., J. K. McDonald, and S. R. Ojeda (1990), Involvement of nerve growth factor in female sexual development, *Endocrinology* **126**, 364-375.
14. Stener-Victorin, E., T. Lundeberg, L. Aloe, and P. O. Janson (2000), Effects of electro-acupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries, *Biol. Reprod.* **63**, 1497-1503.
15. Jeon, B. H., C. S. Kim, K. S. Park, J. W. Lee, J. B. Park, K. J. Kim, S. H. Kim, S. J. Chang, and K. Y. Nam (2000), Effect of Korea red ginseng on the blood pressure in conscious hypertensive rats, *Gen. Pharmacol.* **35**, 135-141.
16. Barria, A., V. Leyton, and H. E. Lara (1993), Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovarian syndrome: role of the sympathetic innervation, *Endocrinology* **133**, 2696-2703.