J. Ginseng Res.
Vol. 32, No. 3, 264-269 (2008)

Ginsenoside Rg3 및 그 유도체 Ginsenoside Rg3-2H의 NO 생성 및 lymphocyte 분열 억제 효과

조 재 열#
강원대학교 BT 특성화 학부대학 생명공학부
(2008년 9월 3일 접수; 2008년 9월 10일 수리)

Inhibitory Effect of Ginsenoside Rg3 and its derivative Ginsenoside Rg3-2H on NO production and lymphocyte proliferation

Jae Youl Cho#
School of Bioscience and Biotechnology, and Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
(Received September 3, 2008; Accepted September 10, 2008)

Abstract : Ginsenosides are major components in *Panax ginseng* and known to have numerous pharmacological activities such as anti-cancer, anti-diabetes, anti-viral and anti-atherosclerosis effects. In this study, the regulatory activities of G-Rg3 and its derivative 25-hydroxy Rg3 (G-Rg3-2H) on the production of nitric oxide (NO) in macrophages and the proliferation of lymphocytes prepared from spleen and bone marrow under treatment of lipopolysaccharide (LPS) or concanavalin (Con) A were examined. G-Rg3 and G-Rg3-2H dose-dependently inhibited NO production from LPS-activated RAW264.7 cells and in agreement, these compounds protected RAW264.7 cells from LPS-mediated cytotoxicity. In contrast, G-Rg3-2H dose-dependently inhibited lymphocyte proliferation induced by both LPS and Con A, while there was no inhibition by G-Rg3. Therefore, our data suggest that these compounds may be applied for NO-mediated or lymphocyte-mediated immunological diseases.

Keywords : *Panax ginseng*, Ginsenoside Rg3, Ginsenoside Rg3-2H, NO production, lymphocyte proliferation.

서 론

대식세포 및 lymphocyte는 내재성 및 획득성 면역반응을 담당하는 대표적인 면역세포들이다. 이들 세포들은 외부로부터 침입한 세균들이나 바이러스 등의 탐식 후 가공된 항원성 펩타이드를 통해 서로 활성을 유도함으로써 내재성 및 획득성 면역반응을 상호 조절하는 세포군간 네트워크를 형성하고 있다.[1] 활성화된 대식세포는 특별히 일산화질소(nitric oxide : NO) 및 활성산소(reactive oxygen species) 등과 같은 독성물질, 그리고 사이토카인 이나 프로스타그란딘류와 같은 염증 매개물질의 분비를 유도하여 전체적인 면역반응을 조절하는데 있어서 중추적인 역할을 수행하게 된다.[2] 이들 세포로부터 탐식된 면역원을 통해 가공된 펩타이드는 major histocompatibility (MHC) class II 분자와 함께 T lymphocyte의 T cell receptor (TCR)을 자극함으로써 이들 T cell의 활성 및 분열 증식을 유도하게 한다. 결국 활성화된 T lymphocyte는 Th1 type혹은 Th2 type의 T lymphoctyte로 분화되어 B lymphocyte로부터의 항체 생산 및 cytotoxic T lymphocyte의 활성을 조절하게 된다.[3] 이들 세포들의 과도한 활성은 관절염 혹은 알러지/아토피성 피부질환 등과 같은 면역 관련 질병발생과 관련성이 크므로, 효과적인 기능 및 분열저해는 초기 병인제거를 위한 치료적 표적이 되고 있다.[1]

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 수천년 동안 여러 질병의 예방 및 치료에 사용되어온 다년생 초본류이다. 예로부터 원기 회복, 혈압 및 당조절 등에 효과가 있어 널리 복용되어 왔으며, 최근에는 기억력 개선, 동맥경화 및 고지혈증

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 033-250-6562; (팩스) 033-253-6560
(E-mail) jaecho@kangwon.ac.kr

치료 항에이즈 바이러스 증식효과 및 중금속 해독 효과 등이 있는 것으로 확인되었다.[4] 무엇보다 중요한 인삼의 약리작용 중 하나는 면역기능에 미치는 작용으로 알려져 있다. 즉 인삼의 다양한 성분들(다당류 및 ginsenoside (G)류)은 NK 세포의 활성 촉진, 대식세포의 기능 향상 및 lymphocyte의 분열 증식 유도 작용 등이 있는 것으로 확인되었다.[5,6] 그러나, 현재까지 각 인삼 성분들이 보이는 염증관련 면역반응의 억제에 관한 보고들은 매우 제한적이며, 특별히 항암제로 처방되고 있는 G-Rg3의 경우에 관한 연구 결과는 거의 전무한 상태다. 따라서 본 연구에서는 대표적인 그람 음성균 유래 염증 유발 물질인 lipopolysaccharide (LPS)와 이에 반응하는 대식세포의 NO 생성 과정, 그리고 LPS 및 concanavalin A (con A) 에의해 분열되는 B 및 T lymphocyte의 증식에 관한 G-Rg3 및 그 유도체인 25-hydroxy Rg3 (G-Rg3-2H)의 조절작용을 조사하여 보았다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 G-Rg3유도체인 G-Rg3-2H(Fig. 1)는 Ambo 연구소의 박명환 박사로부터 공급 받았으며, 약물의 순도는 97% 이상이었다. Diol type의 ginsenoside류(G-Rb1, G-Rc, G-Rd, G-Rg3) 및 triol type의 ginsenoside류(G-Rg1, G-Rg2, G-Rh1, G-Re)는 KT&G로부터 공급받아 사용하였다. 실험에 사용한 마우스 대식세포주 RAW264.7 세포는 ATCC(Rockville, MD, USA)로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양을 위한 RPMI1640 배지, fetal bovine serum (FBS) 그리고 항생제(penicillin/streptomycin)는 Hyclone (Hyclone, South Logan, UT, USA)사 제품을 사용하였다. Lipopolysaccaride(LPS), concanavalin(Con) A 및 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphinyltetrazolium bromide)를 포함한 화학

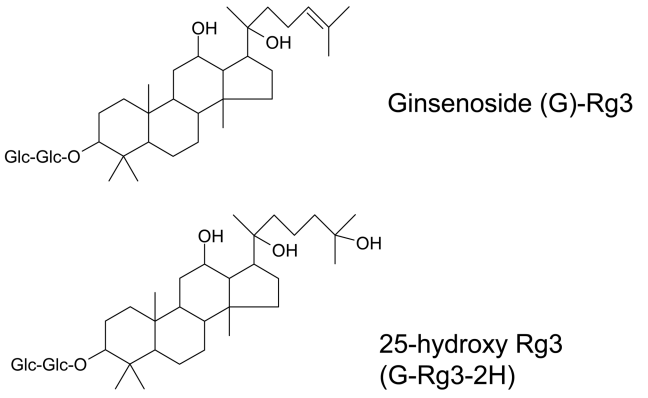

Fig. 1. Chemical structure of G-Rg3 and G-Rg3-2H.

시약은 Sigma 제품(St. Louis, MO, USA)을 이용하였다.

2. 세포배양

RAW 264.7 세포들은 5% CO_2, 37°C incubator에서 배양하였다. 배지는 penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 μg/ml)과 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하였다.

3. 세포 생존율 검정

시험에 사용한 ginsenoside류에 의한 세포생존 영향은 MTT assay법을 이용하여 분석하였다.[7] 96-well plate에 1×10^6 개의 RAW264.7 세포를 plating하고 ginsenoside류를 농도 별로 처리하였다. 37°C에서 각 면역실험 조건에 상응하는 배양시간 동안 CO_2 incubator에서 배양하였다. 이후 10 μl MTT 용액 (stock concentration : 5 mg/ml)을 첨가하고 3시간 동안 추가반응을 유도하였다. 반응 종료 및 formazan crystal의 용해를 위해 각 well에 100 μl MTT stopping solution (10% sodium dodecyl sulfate in 0.01 M HCl)을 분주하였다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출하였다.

4. NO 생성 및 정량

RAW264.7세포를 1×10^6 cell/ml의 농도로 조절한 후, 96 well plate에 100 μl씩 접종하고, 5% CO_2 및 37°C에서 18시간 동안 전배양 하였다.[7] 이후 전배양 배지를 제거하고 4배 농도로 조제된 시험물질 50 μl와 50 μl의 LPS(최종농도 1 μg/ml) 함유 배지를 well에 동시 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3분간)하고, 상층액 100 μl를 취해 정량 전까지 -20°C 이하에서 보관하였다. NO의 정량은 Griess reagent를 이용하여 정량하였다. NO의 정량한계는 0.5 μM이었으며, standard NO (sodium nitrite)에 대한 표준곡선의 r^2값은 0.99 이상이었다.

5. Lymphocyte 증식 정량

G-Rg3 및 G-Rg3-2H 간의 lymphocyte 증식 조절 효과능은 다음의 방법으로 조사하였다. Balb/c 생쥐로부터 무균조작으로 비장 및 골수를 적출하고 주사기을 이용하여 차가운 RPMI1640 배지로 비장세포를 분리하였다.[8] 분리된 비장 및 골수세포를 원심분리로 모은 후 0.83% ammonium chloride-20 mM Tris buffer(pH 7.4)를 이용하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 Hanks' balanced salts solution 및 RPMI1640 배지로 3회 세척 후 10% FBS 함유 RPMI1640 배지를 이용

하여 세포를 5×10^6 cell/ml 농도로 96 well plates에 접종하였다. 여러 농도의 약물을 30분전에 처리하고 이후 LPS (10 μg/ml) 혹은 Con A(10 μg/ml)를 추가 처리하여 48시간 동안 배양하였다. Lymphocyte 분열증식은 MTT assay로 확인하였다.

6. 통계처리

통계처리는 Student's *t*-test를 이용하여 실시하였으며 p값이 0.05미만일 때 유의성 있다고 판정하였다. 각 데이타는 n=3으로 진행한 독립 실험을 세 번 실시하여 얻어진 값을 평균 ± 표준편차 (mean ± SEM)로 나타냈다.

결과 및 고찰

항암효능에 관한 G-Rg3의 조절작용은 여러 논문들을 통해 보고된 바 있지만, 대식세포 및 lymphocyte의 활성 조건하에서 NO 생성 및 증식에 관한 조절 효과에 관한 연구는 체계적으로 진행되어 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 대표적인 대식세포주 인 RAW264.7 세포와 생쥐의 비장 및 골수로부터 분리된 lymphocyte를 이용하여 NO 생성 및 lymphocyte 분열 조건에서 G-Rg3 및 그 유도체인 G-Rg3-2H의 조절 효과를 조사하여 보았다.

1. Ginsenoside류의 NO 분비 조절 효과

NO는 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 대표적인 라디칼이다.[9] 혈관 확장에 관여하는 neurotransmitter로서의 역할 이외에도, NO는 염증상태에서 분비되어 세균을 제거하기 위한 독성물질 역할을 수행하거나, 암세포를 사멸시키기 위한 apoptosis유도 작용을 타나낸다. 이와 같은 이로운 작용 이외에도, 과량의 NO는 정상세포를 죽이거나 염증을 유도하여 급성 또는 만성 염증질환의 원인이 되는 세포내 물질로 작용하기도 한다.[10] 따라서, 효과적인 NO 분비 조절은 염증질환의 제어를 위한 적절한 치료 방법으로 인식되고 있다.

이들 염증물질로서의 NO 억제에 관한 ginsenoside류의 효능을 조사하기 위해 구조적 관점에서 분석하여 보았다. 이를 위해 대표적인 diol type의 ginsenoside류(G-Rb1, G-Rc, G-Rd, G-Rg3) 및 triol type의 ginsenoside류(G-Rg1, G-Rg2, G-Rh1, G-Re)들을 선택하여 LPS로 처리된 RAW264.7 세포를 이용하여 NO 억제능을 비교하였다.

Fig. 2는 대부분의 ginsenoside류가 NO 억제 효능이 없음을 나타낸다. 다만, 50 μM의 농도로 처리된 G-Rg3에서 유의적인 NO 분비 억제효과가 확인되었다. 즉 이는 diol-type의 ginsenoside에서 확인된 TNF-α 억제 효과와 달리, NO 억제는 ginsenoside류의 구조적 특징과는 상관성이 결여되어 있는 것으로 판단된다.[11] 이들 ginsenoside류는 50 μM에서 세포 생존에 영향을 나타내지 않았다(Fig. 2B). 따라서, 본 결과를 통해 효과를 나타낸 G-Rg3 및 그 유도체인 G-Rg3-2H에 관한 NO 억제 효능을 보다 자세하게 조사하였다.

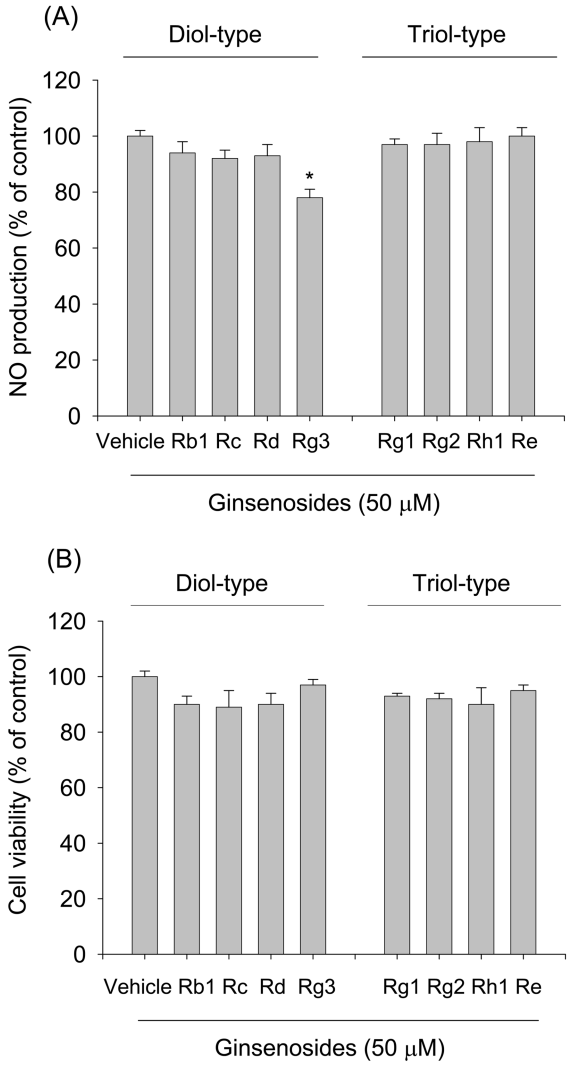

Fig. 2. Effects of ginsenosides on the production of NO in LPS-induced RAW 264.7 cells. (A) RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with diol-type (G-Rb1, G-Rc, G-Rd, G-Rg3) or triol type (G-Rg1, G-Rg2, G-Rh1, G-Re) ginsenosides in the presence or absence of LPS (1 μg/ml) for 24 h. The level of NO was determined by Griess reagent as described in Materials and Methods. (B) RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with diol-type (G-Rb1, G-Rc, G-Rd, G-Rg3) or triol type (G-Rg1, G-Rg2, G-Rh1, G-Re) ginsenosides for 24 h. The viability of cells was measured by MTT assay. *$p<0.05$ represents significant difference compared to control group.

2. G-Rg3 및 G-Rg3-2H의 NO 분비 조절 효과

예상대로, G-Rg3는 농도의존적으로 NO 생성을 억제하였다(Fig. 3A). 특별히, G-Rg3의 유도체인 G-Rg3-2H의 경우는 더 강한 NO 억제 효능을 나타냈다. 반면에, 이들 화합물은 100 μM 농도까지도 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 3B). 이는 이들 화합물의 NO 억제 효능은 세포독성 유도에 기인된 비특이적 반응에서 유도된 것이 아님을 시사한다. 또한, NO 억제 효능과 일치하여, 이들 화합물은 LPS에 의해 유도된 세포독성 작용을 효과적으로 억제하였으며, 이에 따라 LPS 처리 군과 달리, 이들 화합물 처리군에서는 세포의 생존율이 상승되었다(Fig. 3C).

3. G-Rg3 및 G-Rg3-2H의 lymphocyte증식 조절 효과

항원공여 세포에 의해 지나치게 활성화된 Th1 type의 lymphocyte는 B lymphocyte에서 분비되는 IgG type의 자가항체 매개에 의한 관절염과 같은 자가면역질환을 유도하는 것으로 알려져 있다.[12] 반면에, Th2 type의 lymphocyte는 B lymphocyte의 활성에서 유래된 IgE-매개성 알러지나 아토피와 같은 hypersensitivity 질환을 매개하게 된다.[12] 따라서 초기 B 및 T lymphocyte류의 분열증식 조절은 면역관련 질병의 예방과 치료에 매우 중요한 치료 수단이 되고 있다.

따라서 G-Rg3 및 G-Rg3-2H에 의한 lymphocyte 분열 조절 효능을 생쥐 spleen에서 분취한 lymphocyte에 B 및 T cell mitogen인 LPS 및 Con A를 처리한 후 조사하여 보았다. Fig. 4A에서 확인할 수 있듯이, G-Rg3는 50 μM 농도까지 전혀 증식억제 작용을 나타내지 않았다. 그러나, 25 μM 농도에서는 B lymphocyte의 분열능을 통계적으로 유의성있게 증가시켰다(Fig. 4A). 이와는 대조적으로 G-Rg3-2H는 LPS 및 Con A로 유도된 B lymphocyte 및 T lymphocyte의 분열을 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 4B). 현재까지 이들 두 화합물이 보이는 상반된 효과에 관한 자세한 기전적 연구는 진행되어 있지 않으나, 본 결과로 미루어 볼 때, 25번 탄소는 이들 ginsenoside류가 가지는 lymphocyte관련 증식조절 효능 수행시 결정적인 구조적 pharmacophore역할을 담당하는 부위로 판단된다. 이와 같은 가능성은 추가적인 유도체 합성을 통해 보다 자세히 증명될 예정이다.

흥미있게도, 두 약물들은 정상상태의 lymphocyte의 생존율은 억제하지 않았으며, 오히려, 특정 농도(12.5 및 25 μM)에서 유의성 있게 생존율을 증가시킨 것으로 확인되었다(Fig. 4). 그러나 G-Rg3-2H의 분열증식 억제작용은 G-Rb2의 억제 효과(IC50 = 약 25 μM)[13] 보다는 다소 낮은 것으로 판단되었다. 한편 이들 약물들은 75 μM까지도 골수유래 lymphocyte의 정상 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 하지

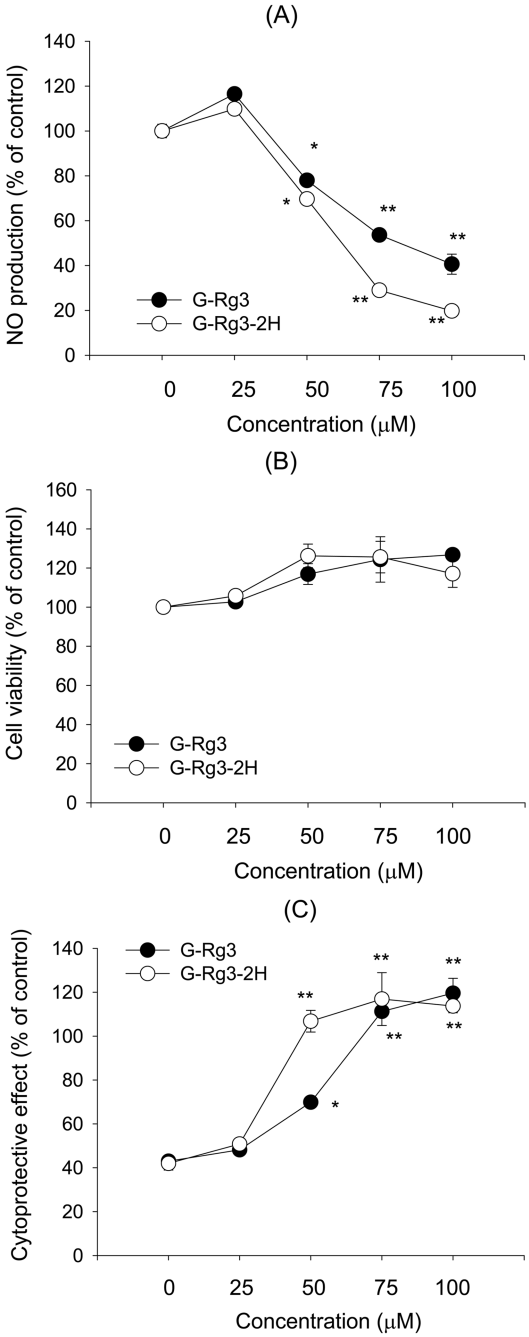

Fig. 3. Effects of G-Rg3 or G-Rg3-2H on the production of NO in LPS-induced RAW 264.7 cells. (A) RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with G-Rg3 or G-Rg3-2H in the presence or absence of LPS (1 μg/ml) for 24 h. The level of NO was determined by Griess reagent as described in Materials and Methods. (B) RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with G-Rg3 or G-Rg3-2H for 24 h. The viability of cells was measured by MTT assay. (C) RAW264.7 cells (1×10^6 cells/ml) were incubated with G-Rg3 or G-Rg3-2H in the presence or absence of LPS (1 μg/ml) for 24 h. The viability of cells was measured by MTT assay. *$p<0.05$ and **$p<0.01$ represent significant difference compared to control or normal group.

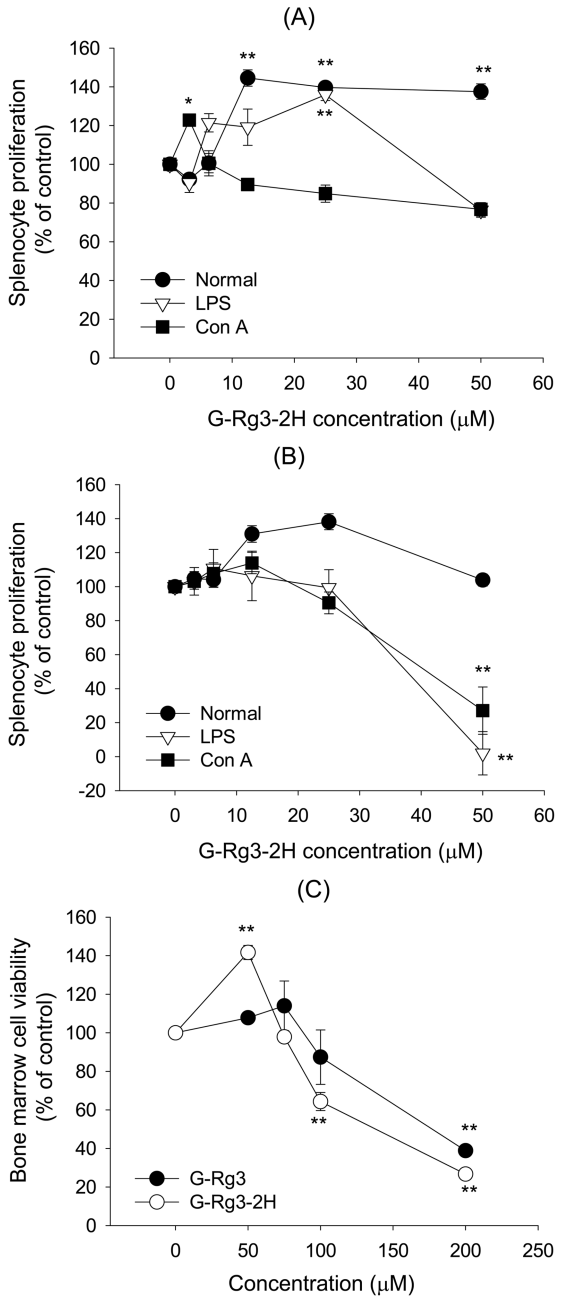

Fig. 4. Effects of G-Rg3 or G-Rg3-2H on the proliferation or viability of lymphocytes from spleen or bone marrow. (A and B) Lymphocytes (5×10^6 cells/ml) were incubated with G-Rg3 (A) or G-Rg3-2H (B) in the presence or absence of LPS (10 μg/ml) or Con A (10 μg/ml) for 48 h. The proliferation was measured by MTT assay. (C) Bone marrow-derived lymphocytes (5×10^6 cells/ml) were incubated with G-Rg3 or G-Rg3-2H for 48 h. The viability of cells was measured by MTT assay. *$p<0.05$ and **$p<0.01$ represent significant difference compared to control or normal group.

만 100 및 200 μM의 농도에서 G-Rg3-2H는 강력한 독성을 나타낸 것으로 보아 고농도의 경우 골수세포의 생존을 저해할 것으로 판단된다.

결 론

G-Rg3 및 G-Rg3-2H가 대식세포의 NO 분비능 및 lymphocyte의 분열능에 미치는 억제능을 조사하여 다음과 같은 결론을 도출하였다. 1. Ginsenoside류의 NO 억제능은 ginsenoside류가 갖는 구조적 상관성과 관련이 적은 것으로 나타났다. 2. G-Rg3 및 그 유도체 G-Rg3-2H는 농도의존적으로 NO 생성을 억제하였다. 3. G-Rg3와 달리, G-Rg3-2H는 LPS 및 Con A로 처리된 비장 유래 B 및 T lymphocyte의 분열능을 농도의존적으로 저해하였다. NO분비 및 lymphocyte 증식과정은 여러가지 염증질환에서 동반되는 주요 면역반응이다.[14] 따라서, 차후에는 이들 매개에 의한 염증질환 모델에서의 치료능 및 억제 기전에 관한 분자수준에서의 연구들이 추가적으로 진행될 예정이다.

감사의 글

본 연구에 기술적 도움을 준 이지연 연구원, 시료를 제공해주신 앰보연구소의 박명환 박사님, 그리고 실험결과에 대한 심도있는 고찰을 해주신 경북대학교 이만휘 박사님에게 감사드린다.

인용문헌

1. Olszewski W. L. : The lymphatic system in body homeostasis: physiological conditions. *Lymphat Res Biol* **1**, 11-21; discussion 21-14 (2003).
2. Tetley T. D. : Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**, 607-618 (2005).
3. Rice A. P. and Herrmann C. H. : Regulation of TAK/P-TEFb in CD4+ T lymphocytes and macrophages. *Curr HIV Res* **1**, 395-404 (2003).
4. Gillis C. N. : Panax ginseng pharmacology: a nitric oxide link? *Biochem Pharmacol* **54**, 1-8 (1997).
5. Sun J. L., Hu Y. L., Wang D. Y., Zhang B. K. and Liu J. G. : Immunologic enhancement of compound Chinese herbal medicinal ingredients and their efficacy comparison with compound Chinese herbal medicines. *Vaccine* **24**, 2343-2348 (2006).
6. Rivera E., Ekholm Pettersson F., Inganas M., Paulie S. and Gronvik K. O. : The Rb1 fraction of ginseng elicits a balanced Th1 and Th2 immune response. *Vaccine* **23**, 5411-

5419 (2005).

7. Cho J. Y., Baik K. U., Jung J. H. and Park M. H. : In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from Saussurea lappa. *Eur J Pharmacol* **398**, 399-407 (2000).
8. Kim B. H. and Cho J. Y. : Anti-inflammatory effect of honokiol is mediated by PI3K/Akt pathway suppression. *Acta Pharmacol Sin* **29**, 113-122 (2008).
9. Palmer R. M. and Eveson J. W. : Chronic sialadenitis. An immunocytochemical study in humans. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **412**, 73-78 (1987).
10. Szabo C. and Ohshima H. : DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* **1**, 373-385 (1997).
11. Cho J. Y., Yoo E. S., Baik K. U., Park M. H. and Han B. H. : In vitro inhibitory effect of protopanaxadiol ginsenosides on tumor necrosis factor (TNF)-alpha production and its modulation by known TNF-alpha antagonists. *Planta Med* **67**, 213-218 (2001).
12. Campbell J. D. and HayGlass K. T. : T cell chemokine receptor expression in human Th1- and Th2-associated diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **48**, 451-456 (2000).
13. Cho J. Y., Kim A. R., Yoo E. S., Baik K. U. and Park M. H. : Ginsenosides from Panax ginseng differentially regulate lymphocyte proliferation. *Planta Med* **68**, 497-500 (2002).
14. Sternberg E. M. : Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *J Endocrinol* **169**, 429-435 (2001).