

# Ginsenoside Rg3이 Lipopolysaccharide에 의한 생쥐 뇌조직의 Cyclooxygenase-2 발현에 미치는 영향

최원익<sup>#</sup>, 조용덕, 이준석, 신정원, 김성준, 손낙원<sup>\*</sup>

경희대학교 동서의학대학원 한의과학전공

## Effect of Ginsenoside Rg3 on COX-2 Expression in Brain Tissue of Lipopolysaccharide-Treated Mice

Wonik Choi<sup>#</sup>, Yong-Deok Cho, Joon-Seok Lee, Jung-Won Shin,  
Seong-Joon Kim, Nak-Won Sohn<sup>\*</sup>

Department of Oriental Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University

### ABSTRACT

**Objectives** : Cyclooxygenase (COX) plays a central role in the inflammatory cascade by converting arachidonic acid into prostaglandin. COX-2 is typically induced by inflammatory stimuli in the majority of tissues, it is responsible for propagating the inflammatory response and thus, considered as the best target for anti-inflammatory drugs. The present study investigated the modulatory effect of ginsenoside Rg3, a principle active ingredient in Panax ginseng, on COX-2 expression in the brain tissue induced by systemic lipopolysaccharide (LPS) treatment in C57BL/6 mice.

**Methods** : Because systemic LPS treatment induces COX-2 expression immediately in the brain, ginsenoside Rg3 was treated orally with doses of 10, 20, and 30 mg/kg at 1 hour before the LPS (3 mg/kg, i.p.) injection. At 4 hours after the LPS injection, COX-2 mRNA was measured by real-time polymerase chain reaction method, COX-2 protein levels were measured by Western blotting. In addition, COX-2 expressions in brain tissue were observed with immunohistochemistry and double immunofluorescence labeling.

**Results** : Ginsenoside Rg3 (20 and 30 mg/kg) significantly attenuates up-regulation of COX-2 mRNA and protein expression in brain tissue at 4 hours after the LPS injection. Moreover, ginsenoside Rg3 (20 mg/kg) significantly reduced the number of COX-2 positive neurons in the cerebral cortex and amygdala.

**Conclusion** : These results indicate that ginsenoside Rg3 plays a modulatory role in neuroinflammation through the inhibition of COX-2 expression in the brain and suggest that ginsenoside Rg3 and ginseng may be effective on neurodegenerative diseases caused by neuroinflammation.

**Key words** : Ginsenoside Rg3, COX-2, LPS, neuroinflammation, neurodegenerative disease.

### 서 론

Ginsenoside, 일명 인삼사포닌은 人蔘 (Panax ginseng C.A. Meyer, Araliaceae)의 유효성분으로 중추신경계 질환은 물론 다양한 질환에 유의한 효능을 나타낸다<sup>1,2)</sup>. 그 중에

서 특히 ginsenoside Rg3은 신경손상보호효능과 항염증효능이 있는 것으로 보고되어 있다. Ginsenoside Rg3은 흰쥐의 뇌허혈 손상에 대해 보호효능을 발휘한다고 하였고<sup>3)</sup>, 이러한 신경손상보호효능은 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체 억제<sup>4,5)</sup>, 세포내 Ca<sup>2+</sup> 과유입의 억제<sup>6)</sup> 및 mitochondrial

\*교신저자 : 손낙원, 경기도 용인시 기흥구 서천동 1번지 경희대학교 전자정보관 444호

· Tel : 031-201-2747 · Fax : 031-204-6832 · E-mail : sohnnw@khu.ac.kr

#제1저자 : 최원익, 경기도 용인시 기흥구 서천동 1번지 경희대학교 전자정보관 444호

· Tel : 031-201-2747 · Fax : 031-204-6832 · E-mail : nickchoi@hanmail.net

· 접수 : 2012년 9월 10일 · 수정 : 2012년 11월 3일 · 채택 : 2012년 11월 8일

permeability transition pore (MPTP)의 억제<sup>7)</sup> 등의 기전에 의해 작용한다고 하였다. 또한 항염증효능과 관련하여, ginsenoside Rg3은 BV2 미세아교세포 배양실험에서 lipopolysaccharide (LPS)나 amyloid beta peptide ( $A\beta$ ) 자극에 의해 유도된 cyclooxygenase (COX)-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  와 interleukin (IL)-1 $\beta$  를 포함한 염증유발 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine) 발현을 억제한다고 보고되었다<sup>8,9)</sup>.

한편으로, COX-2는 급성염증반응을 조절하는 주요인자로서, 다양한 조직에서 발현되고 염증반응을 확장시키는 역할을 하므로 항염증효능 약물개발에서 가장 많이 주목받는 효소단백질이다<sup>10,11)</sup>. 또한 COX-2는 중추신경계의 염증과 퇴행성 변화에도 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>11,12)</sup>. Ginsenoside Rg3의 신경세포손상 보호효능과 항염증효능들에 근거할 때, ginsenoside Rg3은 뇌조직의 COX-2 발현에 대해서도 유의한 영향을 미칠 것으로 추정된다. 하지만 COX-2 발현 억제에 대한 효능은 항종양효능에 대한 연구들<sup>13,14)</sup>, 항피부염증에 대한 연구<sup>15)</sup>, 간과 신장손상에 대한 연구<sup>16)</sup> 등에서 ginsenoside Rg3이 COX-2 발현을 억제하였다고 보고되었고, LPS 자극의 BV2 미세아교세포 배양실험에서 그 효능이 보고되었을 뿐<sup>9)</sup> 신경세포나 뇌조직에서 ginsenoside Rg3의 COX-2 발현에 대한 영향을 연구한 보고는 없었다. 그러므로 본 연구에서는 LPS의 복강주사로 중추신경계염증을 유발한 C57BL/6 생쥐의 뇌조직에서 COX-2 mRNA와 단백질 발현량 및 뇌조직의 COX-2 발현세포들을 관찰한바 유의한 결과를 얻어 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

실험동물은 나라바이오텍 (Nara Biotechnology, Korea)에서 구입한 25-28 g의 수컷 C57BL/6 생쥐를 사용하였다. 실험동물의 사육과 처치는 경희대학교 실험동물윤리위원회의 방침과 동물실험관련 규정을 따랐으며, 실험에 사용한 생쥐는 온도 (21-23°C), 습도 (40-60%)와 조명 (12시간 명/암)이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균음수와 사료를 자유롭게 공급하며 사육되었고, 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

### 2. 약물 및 시약

본 실험에 사용한 ginsenoside Rg3 ( $C_{42}H_{72}O_{13}$ ; F.W. 785.01)은 LKT Laboratories (Saint Paul, MN, USA)에서 구입하였고, LPS (from *Escherichia coli* O55:B5)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 면역조직화학염색용 rabbit anti-COX-2 antibody는 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서, Western blotting 용 goat anti-COX-2 antibody는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. Mouse anti-actin antibody는 Chemicon International (Temecula, CA, USA), mouse anti-NeuN antibody와 secondary antibody들은 Millipore (Temecula, CA, USA)에서 구입하였고, Cy2-conjugated

donkey anti-mouse 또는 donkey anti-rabbit IgG와 Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG는 Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA)에서 구입하였다. 그 이외의 시약들은 전문제조회사의 실험실용 최고 품질의 시약을 구입하여 사용하였다.

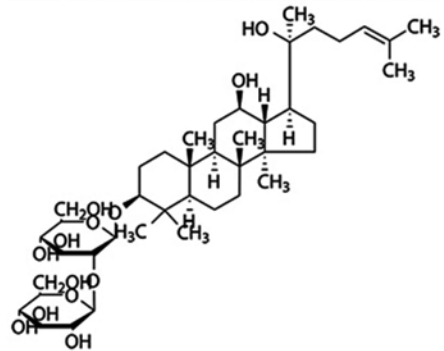


Fig. 1. Chemical structure of ginsenoside Rg3

### 3. 실험군의 구분 및 처치

생쥐를 무작위로 5개 군으로 구분하였다. 정상군 (Normal 군)은 약물처치 없이 통상적으로 사육하였으며, 대조군 (LPS 군)은 LPS 3 mg/kg을 복강주사 하였다. Ginsenoside Rg3을 투여한 군은 투여용량에 따라 10 mg/kg 투여군 [LPS+Rg3(10)], 20 mg/kg 투여군 [LPS+Rg3(20)] 및 30 mg/kg 투여군 [LPS+Rg3(30)]으로 구분하였으며, 각각의 용량을 생리식염수에 녹여 LPS의 복강주사 1시간 전에 1회 경구투여하였다. 실험에는 총 48마리의 생쥐가 사용되었다.

### 4. COX-2 mRNA의 real-time PCR 측정

COX-2 mRNA 발현을 뇌조직에서 정량적인 real-time polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 측정하였다. Ginsenoside Rg3 처치 후 LPS 복강주사 4시간 후에 생쥐를 단두로 희생시키고 뇌를 적출한 다음, 뇌조직으로부터 Trizol (Qiagen, Germany)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 이후 1  $\mu$ g의 total RNA와 Script cDNA synthesis Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 DNA로 역전사 하였으며, 정량적 real-time PCR은 CFX 96 REAL-TIME PCR Detection System (Bio-Rad, USA)에서 iQ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad, USA)와 preoptimized primer/probe mixture를 사용하여 측정하였다. Housekeeping gene으로는  $\beta$ -actin을 사용하였으며, 측정에 사용된 gene의 primer sequence는 아래 Table 1과 같다. 이외 측정방법은 제조사의 사용설명서에 따랐으며, 각 시료로부터 측정된 mRNA 발현량은 Normal군의 측정치를 1로 하여 그 배수 (fold change)를 자료로 사용하였다.

Table 1. Primer Sequences

COX-2	forward	5' -GCT GGC CTG GTA CTC AGT AGG TT-3'
	reverse	5' -OGA GGC CAC TGA TAC CTA TTG C-3'
$\beta$ -actin	forward	5' -TTT CCA GOC TTC CTT GGG TAT G-3'
	reverse	5' -CAC TGT GTT GGC ATA GAG GTC TTT AC-3'

## 5. COX-2 단백질 발현의 western blotting 측정

뇌조직을 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail; Sigma, USA)에 넣고 얼음으로 냉장상태를 유지한 상태에서 균질화한 다음 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 단백질 총량은 Bradford 방법을 사용하여 정량하였으며, 50  $\mu$ g의 단백질을 포함한 용해물을 SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 세분하고, western blotting을 시행하였다. 일차항체는 goat anti-COX-2 antibody (ab23672, Santa Cruz, USA)과 mouse anti- $\beta$ -actin antibody (MAB1501, Millipore, USA)를 사용하였다.

## 6. 뇌조직의 처리

뇌조직의 면역조직화학염색은 COX-2 mRNA와 단백질 발현 측정과는 별도의 생쥐를 사용하였다. Ginsenoside Rg3 처치 후, LPS 복강주사 4시간 후에 tiletamine과 zolazepam (50:50, 18 mg/kg, Zoletil, Virbac Laboratoris, Carros, France)으로 깊게 마취한 다음 개흉하고, 심장을 통하여 0.05 M phosphate buffered saline (PBS)과 4% paraformaldehyde로 충분히 관류하였다. 이후 뇌를 적출하여 24시간 정도 post-fixation하고, sucrose 용액에 담귀 침전시킨 다음 뇌조직을 -40°C의 dry ice-isophentane 용액으로 동결시켰다. 동결조직은 cryocut으로 30  $\mu$ m 두께의 횡단절편으로 제작하여 조직염색에 사용하였다.

## 7. COX-2의 면역조직화학염색

뇌조직 절편을 0.05 M PBS로 5분간 3회 씻어내고, 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 10분간 반응시킨 다음 다시 3회 씻어낸 뒤 10% normal horse serum (Vectastain, USA)과 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)를 PBS에 섞은 blocking solution에 한 시간 정도 반응시켰다. 이후 PBS로 3회 씻어낸 후, anti-COX-2 (#160106, Cayman, USA)를 일차항체로 사용하여, PBS와 Triton X-100을 섞은 용액으로 희석한 후 4°C에서 반응시켰다. 이후 biotinylated secondary antibody (Vectastain, USA)를 이차항체로 반응시키고, avidin-biotin complex (Vector Laboratories, USA) 방법에 따라 0.05% DAB (Sigma-Aldrich, USA)로 발색하였다. 이중면역형광염색은 anti-COX-2 (#160106, Cayman, USA)와 anti-NeuN (MAB377, Cayman, USA)을 일차항체로 사용하였으며, 이차항체로는 Cy2-(#711-225-152, Jackson ImmunoResearch, USA)와 Cy3-conjugated IgG(#715-165-152, Jackson ImmunoResearch, USA)를 사용하여 형광발색 시켰다.

## 8. COX-2 양성반응 세포의 관찰

DAB로 발색시킨 COX-2 발현은 CCD camera (DP70, Olympus, Japan)가 장착된 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)으로, Cy2와 Cy3로 형광발색된 COX-2와 신경세포는 confocal laser-scanning microscopy (Carl Zeiss, LSM

510 META, Germany)를 사용하여 관찰하였다. DAB로 발색된 COX-2 발현은 양성반응 세포 수를 측정하여 비교하였다. 양성반응 세포 수 측정을 위해서 각각의 영상을 영상분석 시스템에 저장하고, ImageJ software (ver. 1.41, NIH, USA)를 사용하여 수를 측정하였으며, 일정면적 (10<sup>5</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup>)으로 보정하여 자료로 사용하였다.

## 9. 통계처리

본 연구에서 제시된 자료들은 Mean  $\pm$  Standard error로 표시되었으며, 각 자료의 통계적 유의성 검증은 Student's *t*-test와 ANOVA 분산분석을 사용하여 LPS군과 LPS+Rg3 군들 사이에서 *p*<0.05 이상의 유의수준으로 검정하였다.

# 결 과

## 1. COX-2 mRNA 발현의 변화

LPS 복강주사 4시간 후에 real-time PCR 방법으로 뇌조직에서 COX-2 mRNA를 측정된 결과, LPS군은 정상군의 1.2 $\pm$ 0.1 배에 비해 6.1 $\pm$ 0.9 배로 증가하였다. 이에 비하여 ginsenoside Rg3 투여군은 10 mg/kg 투여의 경우 4.1 $\pm$ 0.6 배, 20 mg/kg 투여에서는 3.8 $\pm$ 0.2 배, 30 mg/kg 투여에서는 3.6 $\pm$ 0.2 배로 감소되어, LPS군에 비해 20과 30 mg/kg 투여에서 유의성 (*p*<0.05) 있는 억제효능을 나타내었다 (Fig. 2).

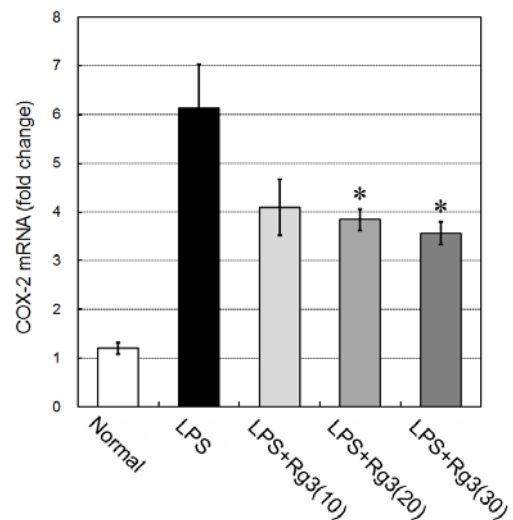


Fig. 2. Effect of ginsenoside Rg3 on COX-2 mRNA in the brain tissue. Male C57BL/6 mice were treated with LPS (3 mg/kg) i.p. injection and ginsenoside Rg3 (10, 20, or 30 mg/kg, respectively) oral administration. At 4 hours after the LPS injection, COX-2 mRNA in the brain tissue was measured with quantitative real-time PCR. LPS increases brain COX-2 mRNA, while ginsenoside Rg3 treatment attenuates brain COX-2 mRNA at doses of 20 and 30 mg/kg administration. Data are represented by mean  $\pm$  SEM (n=6 in each group). Statistical significances are compared to LPS group, respectively (\*, *p*<0.05).

## 2. COX-2 단백질 발현의 변화

LPS 복강주사 4시간 후에 Western blotting 방법으로 뇌

조직에서 COX-2 단백질 발현량을 측정된 결과, LPS군은 정상군의 100%에 비해 185.7±8.8%로 증가하였다. 이에 비하여 ginsenoside Rg3 투여군은 10 mg/kg 투여의 경우 168.1±8.5%로 감소하였으나 유의성이 없었고, 20 mg/kg 투여에서는 141.0±8.3%, 30 mg/kg 투여에서는 138.9±7.8%로 감소되어, LPS군에 비해 유의성 (p<0.01) 있는 억제효능을 나타내었다 (Fig. 3).

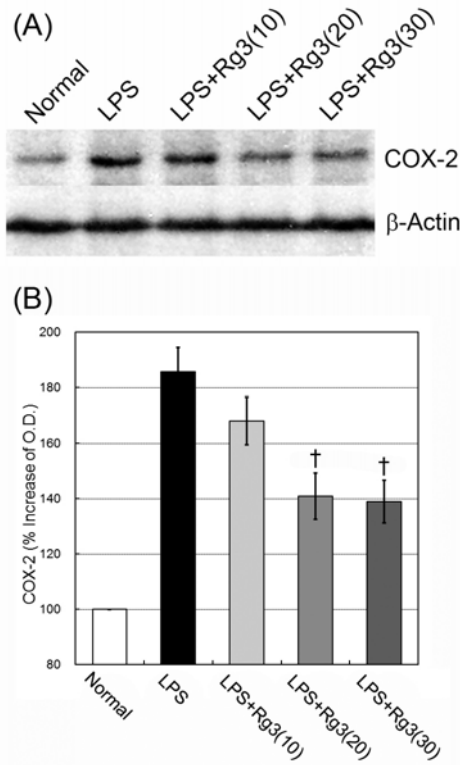


Fig. 3. Effect of ginsenoside Rg3 on COX-2 protein in the brain. Male C57BL/6 mice were treated with LPS (3 mg/kg) i.p. injection and ginsenoside Rg3 (10, 20 or 30 mg/kg, respectively) oral administration. At 4 hours after the LPS injection, COX-2 protein in the brain tissue was measured with western blotting. (A) Representative western blots illustrating differences in the bands of COX-2. (B) Ginsenoside Rg3 attenuated up-regulation of COX-2 protein at doses of 20 and 30 mg/kg administration. Data are represented by mean ± SEM (n=6 in each group). Statistical significances are compared to the LPS, respectively (†, p<0.01).

### 3. COX-2 양성반응 세포의 변화

면역조직화학염색을 통한 ginsenoside Rg3의 COX-2 발현 억제효능은 COX-2 mRNA와 단백질 발현 억제효능을 나타낸 최소 용량인 20 mg/kg 투여군에서 관찰하였다. 그 결과, 정상군의 뇌조직에서도 대뇌피질과 해마 (hippocampus) 및 편도체 (amygdala) 부위에서 COX-2 양성반응 세포들이 일부 관찰되었다 (Fig. 3, A-1,4,7). 특징적으로 해마의 CA3 부위에서는 강한 COX-2 면역염색 강도가 관찰되었으며, 이러한 CA3의 COX-2 면역염색 강도는 LPS군과 LPS+Rg3군에서도 변화가 없었다 (Fig. 3, A-4,5,6). LPS군은 대뇌피질과 편도체에서 현저한 COX-2 양성반응 세포의 증가를 나타내었고 (Fig. 3, A-2,8), 이에 비하여 LPS+Rg3군은 대뇌피질과 편도체 모두에서 COX-2 양성반응 세포 수

가 감소된 것이 관찰되었다 (Fig. 3, A-3,9). 그러므로 대뇌 피질과 편도체에서 COX-2 양성반응 세포 수를 측정하여 비교한 결과, 대뇌피질에서는 정상군의 6.8±1.0 개에 비해 LPS군은 31.8±3.8 개로 현저한 증가를 나타내었고, LPS+Rg3군은 19.7±2.2 개로 LPS군에 비해 유의성 (p<0.05) 있게 감소하였다. 편도체에서도 정상군의 6.3±1.7 개에 비해 LPS군은 15.8±1.6 개로 증가를 나타내었고, LPS+Rg3군은 10.7±1.4 개로 LPS군에 비해 유의성 (p<0.05) 있게 감소하였다 (Fig. 3, B).

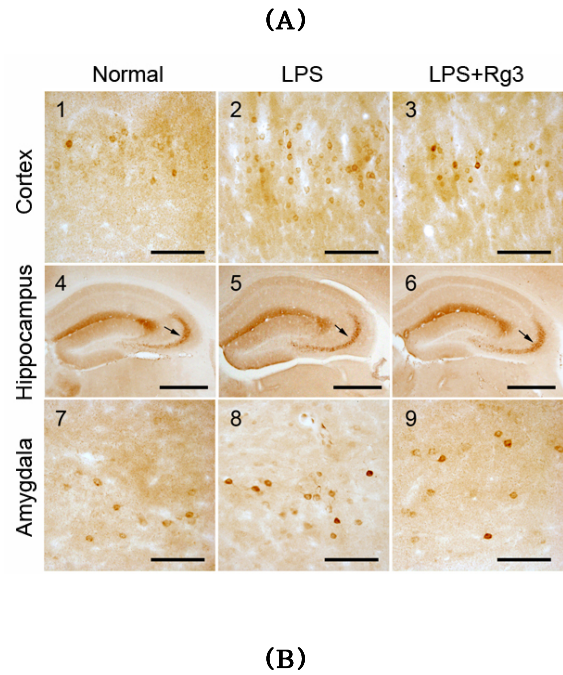


Fig. 4. Effect of ginsenoside Rg3 on COX-2 positive cells in the brain. Male C57BL/6 mice were treated with LPS (3 mg/kg) i.p. injection and ginsenoside Rg3 (20 mg/kg) oral administration. COX-2 immunohistochemistry was performed at 4 hours after the LPS injection. (A) Representative photographs showing COX-2 immuno-stained cells in the mouse brain. Scale bars are 100 μm in sections 1-3, 7-9 and 500 μm in sections 4-6. (B) LPS increased robustly the number of COX-2 positive cells in the cortex and the amygdala, while ginsenoside Rg3 treatment significantly reduced the number of COX-2 positive cells in the cortex and the amygdala. Data are represented by mean ± SEM (n=6 in each group). Statistical significances are compared to the LPS (\*, p<0.05).

#### 4. COX-2 발현세포의 특성

추가적으로, LPS 처리된 생쥐의 대뇌피질에서 COX-2를 발현한 세포들이 신경세포인지를 확인하기 위해 COX-2와 신경세포 표식자인 NeuN에 대해 이중면역형광염색을 실시하여 관찰한 결과, COX-2를 발현한 세포들이 거의 모두 신경세포인 것을 확인할 수 있었으며, 또한 NeuN에 양성반응을 보인 신경세포들 중에서 약 25%가 COX-2를 발현하고 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5. arrows).

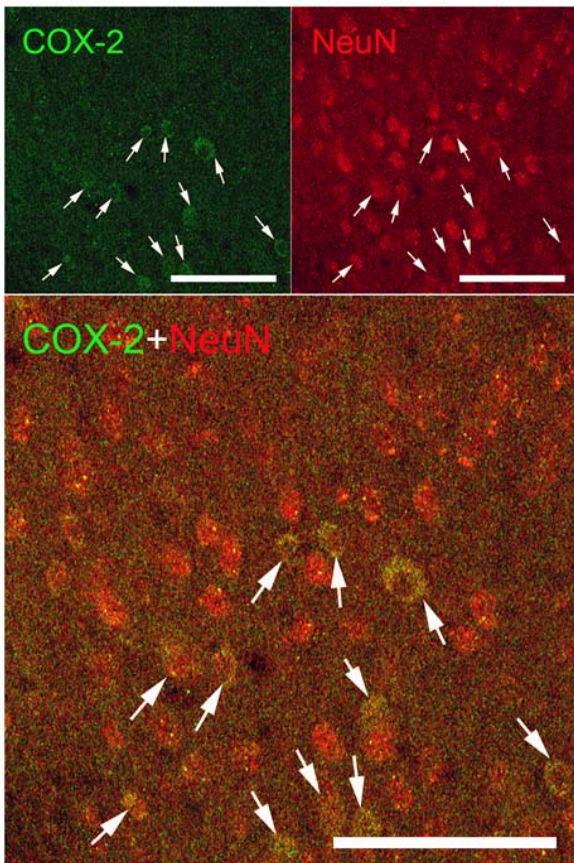


Fig. 5. Representative photographs showing double-immunofluorescent labeling against COX-2 and NeuN in the brain tissue. The most COX-2 expressed cells coincide with NeuN labeled neurons (arrows). On the other hand, approximately 25% of NeuN labeled neurons express COX-2 (arrows and arrowheads). Scale bars are 100  $\mu$ m.

### 고찰

Ginsenoside Rg3의 COX-2 발현에 미치는 영향을 LPS를 복강주사한 C57BL/6 생쥐에서 관찰하였다. LPS는 Gram-negative 박테리아의 세포벽 구성성분으로 endotoxin으로 작용하며, 복강에 투여된 LPS는 뇌조직에서 미세아교세포의 활성화와 염증유발 사이토카인과 COX-2 발현을 증가시키고, 결과적으로 신경세포의 손상과 중추신경계염증을 유발시킨다<sup>17,18</sup>. 급성적으로 LPS를 처리한 경우 4-8시간 사이에 뇌조직에서 미세아교세포가 활성화되고 각종 염증관련 인자들의 mRNA와 단백질 발현이 나타나고, 약 1-3일간 그 상태가 유지된다고 하였다<sup>19</sup>. 또 다른 연구에서는 LPS 복강주사 후 신경세포에서는 1-2.5 시간 사이에, 다른 뇌조직 세포들에서는 2.5-4 시간 사이에 COX-2 mRNA가 발현된다고 하였다

<sup>20</sup>. 그러므로 본 연구에서는 ginsenoside Rg3를 10, 20 및 30 mg/kg의 용량으로 LPS 복강주사 1 시간 전에 경구투여하고, LPS 복강주사 4 시간 후에 뇌조직에서 COX-2 mRNA와 단백질 발현을 관찰하였다. Ginsenoside Rg3의 투여용량은 기존의 연구보고에서 유의한 효능을 나타낸 용량으로 결정하였다. 그 결과, ginsenoside Rg3 20과 30 mg/kg 투여가 뇌조직에서 COX-2 mRNA와 단백질 발현량 모두를 유의하게 억제하는 것이 관찰되었다.

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 염증반응에 관여하는 prostaglandin으로 변환시키는 효소단백질로 염증반응 조절에 중추적인 역할을 하며, COX 발현의 억제는 염증과 통증을 완화시키는 효능을 나타낸다<sup>21</sup>. COX에는 두 가지 종류의 isoform이 존재한다. COX-1은 본질적인 constitutive isoform으로 거의 모든 세포들에 존재하며 생리적 작용에 관여하고 있다. 이에 비하여 COX-2는 유도되는 inducible isoform으로 염증유발 관련인자들에 의해 즉각적으로 발현되며, 급성과 만성 염증상태에서 prostaglandin을 포함한 각종 prostanoid들을 생산하는 작용을 한다<sup>22,23</sup>. 본 연구의 결과, ginsenoside Rg3은 중추신경계염증이 유발된 뇌조직에서 COX-2의 mRNA와 단백질 발현을 유의하게 억제하였다.

면역조직화학염색을 통해 COX-2 발현을 관찰한 결과에서, COX-2 양성반응 세포들이 대뇌피질과 해마 및 편도체 부위에서 관찰되었다 (Fig. 4, A). 대뇌피질에서는 LPS에 의해 COX-2 양성반응 세포들이 현저하게 증가하였으며, ginsenoside Rg3의 20 mg/kg 투여에 의해 유의하게 그 수가 감소되었다 (Fig. 4, A-1,2,3). 또한 대뇌피질에서 COX-2를 발현한 세포들은 주로 신경세포라는 것을 COX-2와 신경세포 표식자인 NeuN에 대해 이중면역형광염색의 결과로 확인하였다 (Fig. 5). 특징적으로 해마의 CA3 부위에서는 정상군에서도 강한 COX-2 면역염색 강도가 관찰되었으며, 이러한 CA3의 COX-2 면역염색 강도는 LPS군과 LPS+Rg3군에서도 변화가 없었다 (Fig. 4, A-4,5,6). 이러한 결과는 CA3의 COX-2 발현은 본질적이라는 것을 보여주는 것이다<sup>24</sup>. 이에 대해서는 뇌조직에서의 COX-2는 염증반응의 조절작용 이외에 신경연접의 활성화, 신경연접의 장기강화 기전 (long-term potentiation)과 장기억제기전 (long-term depression) 및 기능적 충혈상태에서의 신경-혈관 상호작용 등에도 작용한다고 보고된바 있다<sup>25,26</sup>. 또한 본 연구에서 LPS의 복강주사는 편도체에서 COX-2 발현에 양성반응을 보인 신경세포 수를 증가시켰으며, ginsenoside Rg3의 20 mg/kg 투여에 의해 유의하게 그 수가 감소되었다 (Fig. 4, A-7,8,9). 최근의 연구보고에서 편도체는 변연계 (limbic system)를 구성하는 뇌부위 중 하나로 공포 등의 감정학습 (emotional learning)과 기억조절 (memory modulation)에 관여하며<sup>27,28</sup>, 실험적으로 편도체의 COX-2 발현과 prostaglandin 분비는 간질 발생과 관련이 있다고 하였다<sup>29</sup>. 또한 LPS에 의해 유발되는 편도체의 COX-2 발현은 발열반응과도 관계가 있다고 하였다<sup>30,31</sup>. 이런 연구들을 살펴볼 때, 본 연구에서 LPS에 의하여 편도체의 COX-2 발현이 증가하고 ginsenoside Rg3 투여에 의해 감소된 것은 ginsenoside Rg3의 항염증작용에 의해 염증의 발열반응이 억제된 결과로 생각된다.

본 연구의 결과들을 총괄하면, ginsenoside Rg3이 뇌조직

의 COX-2 mRNA와 단백질 발현을 조절하는 작용이 있다는 것으로 이러한 결과는 나아가 ginsenoside Rg3 또는 인삼이 중추신경계염증에 의한 퇴행성 뇌질환에 유의한 약물로 활용될 수 있음을 보여주는 결과로 생각된다.

## 결론

인삼 사포닌의 일종인 ginsenoside Rg3이 뇌조직의 COX-2 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, C57BL/6 생쥐에 ginsenoside Rg3을 10, 20 및 30 mg/kg 투여하고, LPS를 3 mg/kg 용량으로 복강주사한 다음 4시간 후에 뇌조직에서 COX-2 mRNA 발현을 real-time PCR 방법으로, COX-2 단백질 발현은 western blotting 방법으로 측정된 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Ginsenoside Rg3은 20과 30 mg/kg의 용량에서 뇌조직의 COX-2 mRNA와 단백질 발현 모두를 유의하게 억제하였다.
2. Ginsenoside Rg3 20 mg/kg은 LPS에 의한 대뇌피질과 편도체의 신경세포에서 발현된 COX-2 양성반응 세포 수를 유의하게 억제하였다.

이러한 결과는 ginsenoside Rg3이 COX-2 발현을 억제하는 작용에 의해 중추신경계염증을 조절하는 작용이 있다는 것을 보여주는 것이다.

## 참고문헌

1. Qi LW, Wang CZ, Yuan CS. Isolation and analysis of ginseng: advances and challenges. *Nat Prod Rep*. 2011 ; 28(3) : 467-95.
2. Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol*. 1999 ; 58 : 1685-93.
3. Tian J, Fu F, Geng M, Jiang Y, Yang J, Jiang W, Wang C, Liu K. Neuroprotective effect of 20(S)-ginsenoside Rg3 on cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 2005 ; 374(2) : 92-97.
4. Kim JH, Cho SY, Lee JH, Jeong SM, Yoon IS, Lee BH, Lee JH, Pyo MK, Lee SM, Chung JM, Kim S, Rhim H, Oh JW, Nah SY. Neuroprotective effects of ginsenoside Rg3 against homocysteine-induced excitotoxicity in rat hippocampus. *Brain Res*. 2007 ; 1136(1) : 190-9.
5. Kim S, Kim T, Ahn K, Park WK, Nah SY, Rhim H. Ginsenoside Rg3 antagonizes NMDA receptors through a glycine modulatory site in rat cultured hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 ; 323(2) : 416-24.
6. Kim S, Nah SY, Rhim H. Neuroprotective effects of ginseng saponins against L-type Ca<sup>2+</sup> channel-mediated cell death in rat cortical neurons. *Biochem Biophys*

- Res Commun. 2008 ; 365(3) : 399-405.
7. Tian J, Zhang S, Li G, Liu Z, Xu B. 20(S)-ginsenoside Rg3, a neuroprotective agent, inhibits mitochondrial permeability transition pores in rat brain. *Phytother Res*. 2009 ; 23(4) : 486-91.
8. Joo SS, Yoo YM, Ahn BW, Nam SY, Kim YB, Hwang KW, Lee do I. Prevention of inflammation-mediated neurotoxicity by Rg3 and its role in microglial activation. *Biol Pharm Bull*. 2008 ; 31(7) : 1392-6.
9. Bae EA, Kim EJ, Park JS, Kim HS, Ryu JH, Kim DH. Ginsenosides Rg3 and Rh2 inhibit the activation of AP-1 and protein kinase A pathway in lipopolysaccharide/interferon-gamma-stimulated BV-2 microglial cells. *Planta Med*. 2006 ; 72(7) : 627-33.
10. O'Banion MK. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*. 1999 ; 13(1) : 45-82.
11. Choi SH, Aid S, Bosetti F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 ; 30(4) : 174-81.
12. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 ; 63(9) : 901-10.
13. Chen QJ, Zhang MZ, Wang LX. Ginsenoside Rg3 inhibits hypoxia-induced VEGF expression in human cancer cells. *Cell Physiol Biochem*. 2010 ; 26(6) : 849-58.
14. Kim SM, Lee SY, Yuk DY, Moon DC, Choi SS, Kim Y, Han SB, Oh KW, Hong JT. Inhibition of NF-kappaB by ginsenoside Rg3 enhances the susceptibility of colon cancer cells to docetaxel. *Arch Pharm Res*. 2009 ; 32(5) : 755-65.
15. Bae EA, Han MJ, Shin YW, Kim DH. Inhibitory effects of Korean red ginseng and its genuine constituents ginsenosides Rg3, Rf, and Rh2 in mouse passive cutaneous anaphylaxis reaction and contact dermatitis models. *Biol Pharm Bull*. 2006 ; 29(9) : 1862-7.
16. Kang KS, Kim HY, Yamabe N, Park JH, Yokozawa T. Preventive effect of 20(S)-ginsenoside Rg3 against lipopolysaccharide-induced hepatic and renal injury in rats. *Free Radic Res*. 2007 ; 41(10) : 1181-8.
17. Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun*. 2009 ; 23(3)

- : 309-17.
18. Chung DW, Yoo KY, Hwang IK, Kim DW, Chung JY, Lee CH, Choi JH, Choi SY, Youn HY, Lee IS, Won MH, Systemic administration of lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 immunoreactivity in endothelium and increases microglia in the mouse hippocampus. *Cell Mol Neurobiol.* 2010 ; 30(4) : 531-41.
  19. Jeong HK, Jou I, Joe EH, Systemic LPS administration induces brain inflammation but not dopaminergic neuronal death in the substantia nigra. *Exp Mol Med.* 2010 ; 42(12) : 823-32.
  20. Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y, Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. *Brain Res.* 1995 ; 697(1-2) : 187-96.
  21. Aid S, Bosetti F, Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie.* 2011 ; 93(1) : 46-51.
  22. Hinz B, Brune K, Cyclooxygenase-2-10 years later. *J Pharm Exp Ther.* 2002 ; 300 : 367-75.
  23. Minghetti L, Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004 ; 63(9) : 901-10.
  24. Wang H, Hitron IM, Iadecola C, Pickel VM, Synaptic and vascular associations of neurons containing cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase in rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex.* 2005 ; 15(8) : 1250-60.
  25. Stefanovic B, Bosetti F, Silva AC, Modulatory role of cyclooxygenase-2 in cerebrovascular coupling. *Neuroimage.* 2006 ; 32(1) : 23-32.
  26. Hewett SJ, Bell SC, Hewett JA, Contributions of cyclooxygenase-2 to neuroplasticity and neuropathology of the central nervous system. *Pharmacol Ther.* 2006 ; 112(2) : 335-57.
  27. Lee EJ, Son GH, Chung S, Lee S, Kim J, Choi S, Kim K, Impairment of fear memory consolidation in maternally stressed male mouse offspring: evidence for nongenomic glucocorticoid action on the amygdala. *J Neurosci.* 2011 ; 31(19) : 7131-40.
  28. Tan H, Lauzon NM, Bishop SF, Chi N, Bechara M, Laviolette SR, Cannabinoid transmission in the basolateral amygdala modulates fear memory formation via functional inputs to the prelimbic cortex. *J Neurosci.* 2011 ; 31(14) : 5300-12.
  29. Fischborn SV, Soerensen J, Potschka H, Targeting the prostaglandin E2 EP1 receptor and cyclooxygenase-2 in the amygdala kindling model in mice. *Epilepsy Res.* 2010 ; 91(1) : 57-65.
  30. Vidensky S, Zhang Y, Hand T, Goellner J, Shaffer A, Isakson P, Andreasson K, Neuronal overexpression of COX-2 results in dominant production of PGE2 and altered fever response. *Neuromolecular Med.* 2003 ; 3(1) : 15-28.
  31. Quan N, Whiteside M, Herkenham M, Cyclooxygenase 2 mRNA expression in rat brain after peripheral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res.* 1998 ; 802(1-2) : 189-97.