

Ginsenoside Rb1이 C6 Glioma 세포주의 Nitric Oxide 생성과 세포자멸사에 미치는 효과

박주현 · 이윤희 · 강구성 · 이수경
김선주 · 박지영 · 박은경¹ · 손윤경

경북대학교 의과대학 병리학교실
치과대학 구강병리학교실

접 수 : 2003년 6월 16일
게재승인 : 2003년 12월 26일

책임저자 : 손 윤 경
우 700-721 대구광역시 중구 삼덕 2가 50
경북대학교 의과대학 병리학교실
전화: 053-420-6943
Fax: 053-422-9774
E-mail: yksohn@knu.ac.kr

The Effects of Ginsenoside Rb1 on the Apoptosis and the Production of Nitric Oxide in Rat C6 Glioma Cells

Joo-Hyeon Park, Yoon-Hee Lee, Ku-Seong Kang, Soo-Kyoung Lee, Sun-Zoo Kim, Ji-Young Park, Eun-Kyoung Kwak¹ and Yoon-Kyung Sohn

Department of Pathology, School of Medicine, and ¹Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Background : Ginsenosides, the extract of *Panax ginseng*, exert various pharmacological effects such as anticancer activity by the mechanism that is not yet defined. In this study, we proposed that the anticancer effect of ginsenoside Rb1 is related to tumor cell apoptosis and ginsenoside Rb1 induces the tumor cell apoptosis via the nitric oxide (NO) production. **Methods :** Rat C6 glioma cells were activated by treating with lipopolysaccharide (LPS), interferon (IFN)- γ , and tumor necrosis factor (TNF)- α on the culture medium to investigate the effects of ginsenoside Rb1. **Results :** Compared with C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α , C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α /ginsenoside Rb1 showed marked increase in the NO production and apoptosis. Ginsenoside Rb1 induces the NO production in C6 glioma cells in dose-dependent manner. When C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α /ginsenoside Rb1 were incubated with the specific inhibitor of iNOS, S-Methyl-2-thiopseudourea-sulfate (SMT), both NO production and apoptosis in C6 glioma cells was significantly decreased. Ginsenoside Rb1 induced the expression of iNOS mRNA and iNOS protein in C6 glioma cells. **Conclusions :** These results suggest that the induction of iNOS expression and subsequent

인삼은 '파낙스 진생(*Panax ginseng* C. A. Meyer)'이라는 학명을 가진 다년생 식물이다. 학명 파낙스(*Panax*)는 그리스어의 pan과 axos가 결합된 복합어인데 만병통치약이라는 의미를 나타내고, 학명이 시사하는 바대로 인삼은 옛날부터 각종 질병에 대한 약제나 건강증진제로 널리 사용되어 왔다. 생화학적 분석 결과 인삼에서 ginsenoside, 다당류, 펩타이드, 지질 등이 추출되었는데, 이 중 ginsenoside는 인삼의 생물학적 효과를 나타내는 주성분으로 알려져 있다.¹ Ginsenoside는 현재까지 약 20여종이 밝혀져 있는데, 화학적으로 당이 결합된 4개의 환으로 구성되어 있어 스테로이드와 구조적으로 유사한 양상을 띠고 있다.²

중추신경계에 대한 인삼의 작용은 학습과 기억,³ 신경전달 물질 조절,⁴ 그리고 면역조절⁵ 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 신경세포의 세포자멸사를 억제하고 신경세포 보호작용을 나타내는 것으로 알려져 있는데, 신경세포에 대한 인삼의 작용은

ginsenoside Rb1과 Rg1의 연구에서 특히 많이 검토되었다.⁴ 동물실험에서 ginsenoside Rb1은 해마 신경세포의 허혈 손상을 경감시켰으며,⁶ 쥐의 전두엽에서 일시적인 허혈에 의한 신경세포의 세포자멸사를 지연시키는 효과가 있다고 보고되었다.¹ 그리고 인삼 추출액은 쥐 해마의 kanic acid에 의한 신경독성작용을 경감시키고 신경보호효과가 있다는 연구가 있다.⁷ 세포배양 실험에서도 ginsenoside가 각종 자극에 의한 손상으로부터 신경세포를 보호한다고 보고되고 있는데, 척수의 신경세포 배양실험에서 흥분 독소에 의한 신경세포 손상이 ginsenoside Rb1과 Rg1에 의해 감소되었다는 연구가 있다.⁸ 그리고 Rb1과 Rg3이 배양된 쥐의 대뇌피질 신경세포의 glutamate에 의한 신경세포 손상을 감소시켰다는 보고도 있다.⁹ 또한 ginsenoside Rg1은 대뇌피질 신경세포 배양 시 배양액에서 혈청을 제거하였을 때 유발되는 세포자멸사를 억제하였고,¹⁰ dopamine에 의한 PC12 세포의 세포자

멸사를 억제하였다.¹¹

앞에서 언급한 ginsenoside의 기능은 손상에 대한 세포보호효과 또는 세포자멸사 억제 효과로 요약될 수 있다. 한편 ginsenoside의 또 다른 효과 중의 하나로 항암작용이 알려져 있는데, 이때는 ginsenoside가 세포자멸사를 유도해서 항암작용을 나타내는 것으로 생각된다. B6 melanoma 세포배양 실험에서 ginsenoside Rh2는 세포분화를 억제하여 멜라닌 색소 합성을 억제하였고,¹² 세포주기를 G1 단계에서 멈추게 하여 세포분열 억제효과를 나타내었다.¹³ Ginsenoside Rh3은 배양된 사람의 전립선 암 세포에서 caspase-3 매개에 의한 세포자멸사를 유도하였다.¹⁴ 또한 장내 세균에 의한 인삼 분해산물인 IH-901 (20-O-(β -D-Glucopyranosyl)-20-(S)-protopanaxadiol)은 caspase-3 매개기전의 활성화에 의해서 HL-60 세포의 세포자멸사를 유도하였다.¹⁵ Ginsenoside Rh2는 실험동물에 이식된 사람 난소암 세포의 성장을 억제하였고,¹⁶ ginsenoside Rg3는 이식된 B16-BL6 melanoma 세포의 폐전이 감소 효과를 나타내었다는 보고가 있다.¹⁷ 최근에 발표된 일련의 연구에서 인삼과 인삼 추출물 특히 ginsenoside의 암 성장 억제효과와 예방효과 등이 알려졌다.¹⁸ 이 물질의 항암기전은 아직 규명되지 않았다.

염증매개물질로 잘 알려진 nitric oxide (NO)는 신경전달작용과 혈관확장작용 및 세포독성 작용 등 생체내에서 다양한 생물학적 작용을 나타내는 물질이다. 최근의 연구에 따르면 ginsenoside가 NO의 생성에 관여할 것으로 보고되었는데,² Yun 등¹⁹은 ginsenoside가 NO의 생성을 억제하여 유리기에 의한 폐손상을 억제하는 효과가 있을 것으로 보고하였다. Zhang 등²⁰은 인삼추출액이 철에 의한 아라키돈산의 과산화를 억제한다고 보고하였으며, protopanaxadiols Rb1과 Rb2가 항산화 효소인 superoxide dismutase의 발현을 증가시킨다는 보고도 있다.²¹ 이러한 인삼추출액의 항산화작용 외에 신장에서 NO의 생성을 증가시켜 신장 혈류를 증가시킴으로써 신장의 허혈성 손상을 억제하거나,²² 자율신경계 말신경에서 생성된 NO가 대뇌동맥과 해면체의 혈관 이완작용을 나타낸다는 보고도 있다.²³ 이와 같이 ginsenoside가 NO 생성과 관련이 있다는 것은 여러 보고를 통해 입증되었으나 그 기전은 아직 규명되지 않았다. 특히 NO 생성과 관련하여 NO 생성효소인 nitric oxide synthase (NOS) 동종효소에 대한 ginsenoside의 작용은 아직 알려져 있지 않다. NOS는 3가지의 동종효소가 있다는 것이 현재까지 밝혀졌다. 그 중 정상 세포에서는 발현되지 않으나 염증이나 각종의 유해인자에 의한 조직손상이 발생할 경우에 세포에서 발현되는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)는, 정상세포에서 항상 발현되는 neuronal nitric oxide synthase (nNOS)나 endothelial nitric oxide synthase (eNOS)에 비하여 대량의 NO를 생성한다. 이때 iNOS에 의해 대량 생산된 NO는 여러 가지 질소화합물을 만들어 매우 강력한 세포독성 작용을 나타내는데,²⁴ 세포괴사 뿐 아니라 세포자멸사를 유도한다고 알려져 있다.²⁵

저자들은 중앙세포에 대한 ginsenoside의 증식억제작용이 세포

자멸사의 유도에 의한 것이며, 여기에는 ginsenoside에 의한 중앙세포의 iNOS 발현과 이에 따른 NO 발생이 관여할 것이라는 가설을 수립하고 다음의 실험을 하였다. 쥐의 정상교세포종 세포주인 C6 세포에 LPS, IFN- γ 및 TNF- α 를 투여하여 활성화시키고 ginsenoside Rb1을 병합투여하여 활성화된 C6 세포에서 NO 생성의 변화와 세포자멸사의 양상을 관찰함으로써, ginsenoside가 별아교세포종양 세포의 자멸사에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료와 방법

재료

IFN- γ 는 R&D (Minneapolis, MN, USA)에서, TNF- α 와 SMT는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하였다. In Situ Cell Death Detection Kit와 TaqMan Reverse Transcription Reagent는 Roche (Indianapolis, IN, USA)로부터, Caspase 3 antibody는 Cell Signaling (Veverly, MA, USA)으로부터, iNOS antibody는 BD Bioscience Pharmingen (San Diego, CA, USA)으로부터, AlexFluor goat anti-rabbit 또는 goat anti-mouse 488은 Molecular Probe (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였다. TRIzol은 Life Technologies (Rockville, MA, USA)로부터 구입하였으며, Taq Polymerase는 PE Biosystems (Foster City, CA, USA)로부터 구입하였다. LPS (*E. coli* 0127:B8), Ginsenoside Rb1, Griess reagent, FBS, DMEM 등은 Sigma (St. Louis, USA)로부터 구입하였다. Oligonucleotide 합성은 Bioneer (Chungpook, Rep. Korea)로부터 합성하였다.

방법

세포주 배양

C6 세포주(한국 세포주 은행, Seoul, Rep. Korea) 배양을 위해서 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)이 첨가된 DMEM 배지를 사용하였고, 배양기간 동안 37°C, 5% CO₂ 상태를 유지하였다. 배양세포가 배양 용기 바닥 면적의 90% 가량 자랐을 때 6 well plate에 계대 배양을 하였다. 1개의 well당 신선한 DMEM 1 mL와 C6 세포주 배양액 1 mL을 합하여 총 부피 2 mL로 만들어 배양하였다.

세포자멸사 유도

C6 세포의 세포자멸사를 유도하기 위해서 배양액에 LPS (10 μ g/mL, *E. coli* 0127:B8), IFN- γ (10 ng/mL), TNF- α (10 ng/mL)을 첨가하여 24시간 동안 배양하였으며, ginsenoside의 세포자멸사에 대한 효과를 알아보기 위해서 농도별(0, 0.1, 1, 2

μM)로 배양액에 첨가하였다.

TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 검사

커버 글라스 위에 키운 세포를 4% paraformaldehyde에 30분 간 상온에서 고정한 후, phosphate buffered saline (0.1 M, pH 7.4, PBS)으로 세척하였다. 투과성을 높이기 위하여 0.1% Triton X-100이 함유된 0.1% sodium citrate (pH 6.0) 용액을 2분간 반응시킨 후, PBS로 세척하고 in situ cell death detection kit를 사용하여 enzyme solution과 label solution을 혼합한 용액에 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 다음 PBS로 충분히 수세한 후 수용성 봉입액으로 봉입하였다.

Caspase-3의 면역형광염색

위와 동일하게 Triton X-100까지 처리한 다음 1차 항체인 caspase-3 (1:50)를 60분 동안 상온에서 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 2차 항체로는 AlexFluor goat anti-rabbit 488 (1:200)을 50분 동안 상온에서 반응시킨 후 PBS로 수세하고 수용성 봉입액으로 봉입하였다.

iNOS의 면역세포화학검사

위와 동일한 방법으로 Triton X-100 과정까지 처리한 후 goat normal serum으로 40분 동안 상온에서 반응시켰다. 1차 항체로 FITC가 결합된 iNOS (1:300)를 60분간 상온에서 반응시킨 다음 PBS로 수세한 후 봉입하였다.

Nitric Oxide 측정

NO 대사과정에서 발생하는 여러 가지 질소 화합물 중 안정된 형태의 최종 산물인 nitrite (NO_2^-)를 측정함으로써 NO의 양을 결정하였다. LPS, IFN- γ , TNF- α , ginsenoside Rb-1를 농도별 처리한 후 세포 배양액 100 μL 와 동량의 griess reagent (40 mg/mL)를 잘 섞은 다음 96 well plate에서 15분간 반응시켰다. 그 후 microtiter plate reader를 이용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하고 sodium nitrite standard curve로부터 nitrite의 농도를 결정하였다.

RNA의 분리

6 well plate내의 세포 배양액을 제거한 후 PBS로 수세하였다. 그 후 Trizol 1 mL를 넣어 세포를 용해시킨 후 이를 1.5 mL 튜브로 옮겨 여기에 200 μL 의 chloroform를 넣어 잘 섞어준 후 3분간 상온에서 반응시켰다. 12,000 \times g에서 7분간 원심분리하여 생긴 상층액을 새 튜브로 옮겨 isopropyl alcohol을 500 μL 첨가하여 흔들어 준 후 10분간 상온에서 반응시켰다. 그 후 12,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 생긴 침전물에 75% 알코올 1 mL을 넣어 vortex 한 후 7,500 \times g에서 5분간 원심분리하여 알코올을 제거시키고 공기 중에 건조시켰다. 각 튜브에 30 μL 의 RNase free water를 첨가하여 항온수조에서 녹인 후 원액을 100배 희

석하여 260 nm 파장에서 정량을 하였다.

cDNA의 합성

각 튜브에 전체 RNA 4 μg 과 10 \times Taqman RT buffer 2 μL , 25 mM MgCl $_2$ 4.4 μL , deoxy NTP mix 4 μL , random hexamers 1 μL , RNase inhibitor 0.4 μL , multiscriptase reverse transcriptase (50 U/ μL) 0.5 μL 를 포함하는 reverse transcription reagents를 넣어 총 부피 15 μL 되도록 만들었다. 이를 25°C에서 10분, 48°C에서 30분, 95°C에서 5분 동안 반응시켜 first strand cDNA를 만들었다.

iNOS PCR

PCR에 사용된 각각의 primer 서열은 다음과 같다.

β -actin sense primer : 5'-TTG TAA CCA CCT GGG
ACG ATA TGG-3'

β -actin antisense primer : 5'-GAT CTT GAT CTT
CAT GGT GCT AG-3'

iNOS sense primer : 5'-GAT CAA TAA CCT GAA
GCC CG-3'

iNOS antisense primer : 5'-GCC CTT TTT TGC
TCCATA GC-3'

각각의 PCR 산물의 크기는 β -actin은 764 bp, iNOS는 576 bp이다. PCR 반응액 조성은 β -actin의 경우는 다음과 같다. 10 \times Taq buffer 5 μL , 25 mM MgCl $_2$ 5 μL , 10 mM dNTP 1 μL , β -actin sense primer (10 μM) 0.5 μL , β -actin antisense primer (10 μM) 0.5 μL , Taq polymerase (5 unit/ μL) 0.5 μL , cDNA 2 μL 를 넣고 dH $_2$ O로 최종부피가 50 μL 가 되도록 하였다. iNOS의 경우는 10 \times Taq buffer 2.5 μL , 25 mM MgCl $_2$ 2.5 μL , 10 mM dNTP 0.5 μL , iNOS sense primer (10 μM) 2 μL , iNOS antisense primer (10 μM) 2 μL , Taq polymerase (5 unit/ μL) 0.25 μL , cDNA 2 μL 를 넣고 dH $_2$ O로 최종부피가 25 μL 가 되도록 하였다.

위의 반응액을 95°C에서 5분간 반응시키고, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 26 cycle을 수행하였다. 그 다음 72°C에서 5분간 반응시키고 2% agarose gel에서 전기영동하여 자외선 하에서 사진을 찍었다.

iNOS 억제제 처리

iNOS에 대한 특이적 억제제인 s-methyl-2-thiopseudourea, sulfate (SMT)를 배양매지 2 mL에 최종 농도가 400 μM 가 되도록 처리하였다.

통계 처리

통계 처리는 SPSS (Version 10.1, SPSS Inc., Chicago,

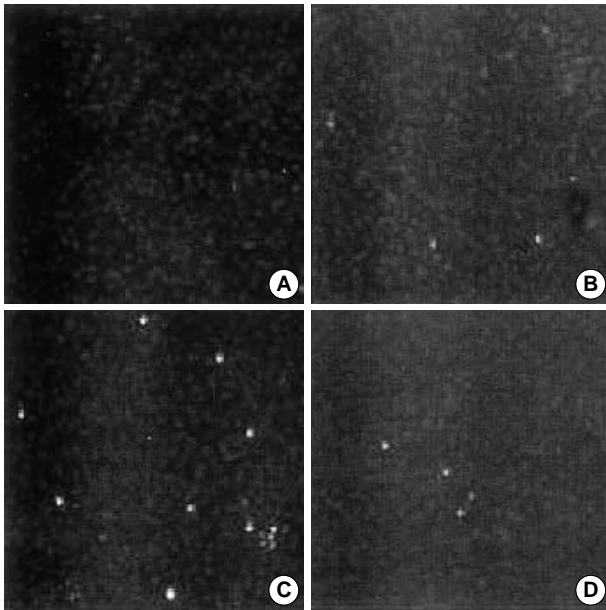


Fig. 1. Apoptosis increased in C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α and ginsenoside Rb1. S-Methyl-2 thiopseudourea-sulfate (SMT) decreased the pro-apoptotic effect of ginsenoside Rb1. (A) Non-treated C6 glioma cells, (B, C) C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α for 24 h without (B) or with (C) ginsenoside Rb1 for 24 h, (D) C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α , 1 μ M ginsenoside Rb1 and 400 μ M SMT for 24 h.

USA)를 이용하였다. C6 glioma 세포주에 LPS/IFN- γ /TNF- α 를 처리하였을 때 그렇지 않은 대조군과 비교하여 유의하게 NO 생성량이 증가하는지, 그리고 LPS/IFN- γ /TNF- α 와 iNOS 저해제를 병합 처리하였을 때 LPS/IFN- γ /TNF- α 를 단독 처리할 때보다 NO 생성량이 감소하는지를 검증하기 위해 비모수 방법인 two-independent sample test를 이용하였다. Ginsenoside의 농도와 작용 시간이 NO의 생성량에 미치는 영향을 분석하기 위해 bivariate correlations을 이용하였다. 각 군 간의 비교는 p값이 0.05 미만인 경우에만 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

C6 glioma 세포의 세포자멸사(TUNEL 검사) 소견

C6 glioma 배양배지에 LPS (10 μ g/mL), IFN- γ (10 ng/mL), TNF- α (10 ng/mL)만을 처리한 대조군과 여기에 ginsenoside Rb1을 1 μ M 병합 처리한 실험군에서, 24시간이 경과한 후 세포자멸사 양상이 어떠한지를 TUNEL 방법으로 관찰하였다(Fig. 1). Ginsenoside Rb1을 처리한 실험군(Fig. 1C), ginsenoside Rb1을 처리하지 않은 대조군(Fig. 1B)보다 TUNEL 양성세포수가 증가하였다.

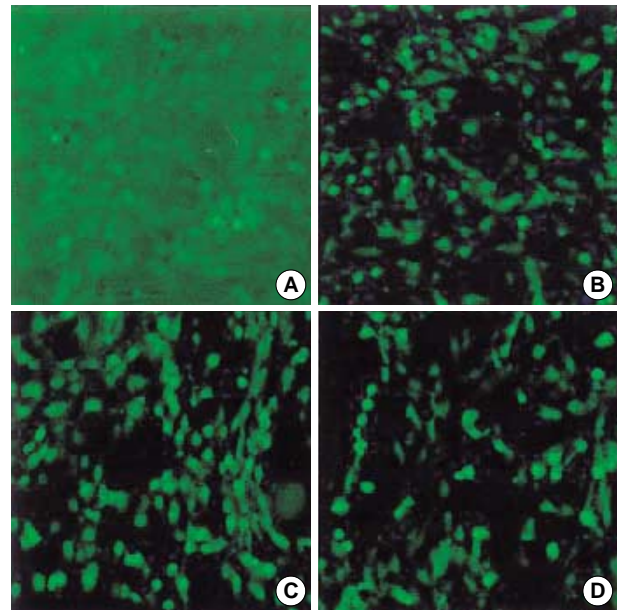


Fig. 2. Caspase 3 immunoreactivity increased in C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α and ginsenoside Rb1 and SMT decreased the caspase 3 immunoreactivity. (A) Non-treated C6 glioma cells, (B, C) C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α for 24 h without ginsenoside Rb1 (B) or with 1 μ M ginsenoside Rb1 (C, D) C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α , 1 μ M ginsenoside Rb1 and 400 μ M SMT for 24 h.

Activated caspase-3의 발현

세포자멸사가 caspase-3의 매개에 의해서 일어나는지를 알아보기 위해서 caspase-3의 활성화된 형태를 인식하는 cleaved caspase-3 항체로 면역형광 검사를 하였다(Fig. 2). LPS, IFN- γ , TNF- α 만을 처리한 대조군(Fig. 2B)에 비해서 ginsenoside를 병합처리한 실험군에서 activated caspase-3 양성세포수가 현저하게 증가하였다(Fig. 2C).

Nitric Oxide (NO)의 생성

C6 glioma 세포에 LPS, IFN- γ , TNF- α 처리 후의 세포자멸사가 NO의 생성과 관련이 있는지를 알아보기 위해서 ginsenoside Rb1의 농도에 따른 NO의 생성량을 관찰하였다(Fig. 3A). LPS, IFN- γ , TNF- α 을 투여하고 여기에 0, 0.1, 1, 2 μ M의 ginsenoside Rb1을 함께 처리한 후 24시간과 48시간이 지난 후의 NO의 생성량을 관찰하였다. 그 결과 LPS, IFN- γ , TNF- α 를 처리하였을 때 NO의 생성량은 4.05 ± 0.33 μ M와 4.40 ± 0.09 μ M이고 아무것도 처리하지 않았을 때는 모두 0.9 ± 0.09 μ M로 나타났다. 그리고 ginsenoside Rb-1을 농도별로 LPS, IFN- γ , TNF- α 와 함께 처리하였을 때, 24시간 후에는 NO의 농도가 4.44 ± 0.44 μ M, 6.74 ± 1.16 μ M, 8.19 ± 1.22 μ M였으며, 48시간 후에는 NO의 농도가 4.40 ± 0.50 μ M, 5.45 ± 0.11 μ M, 7.29

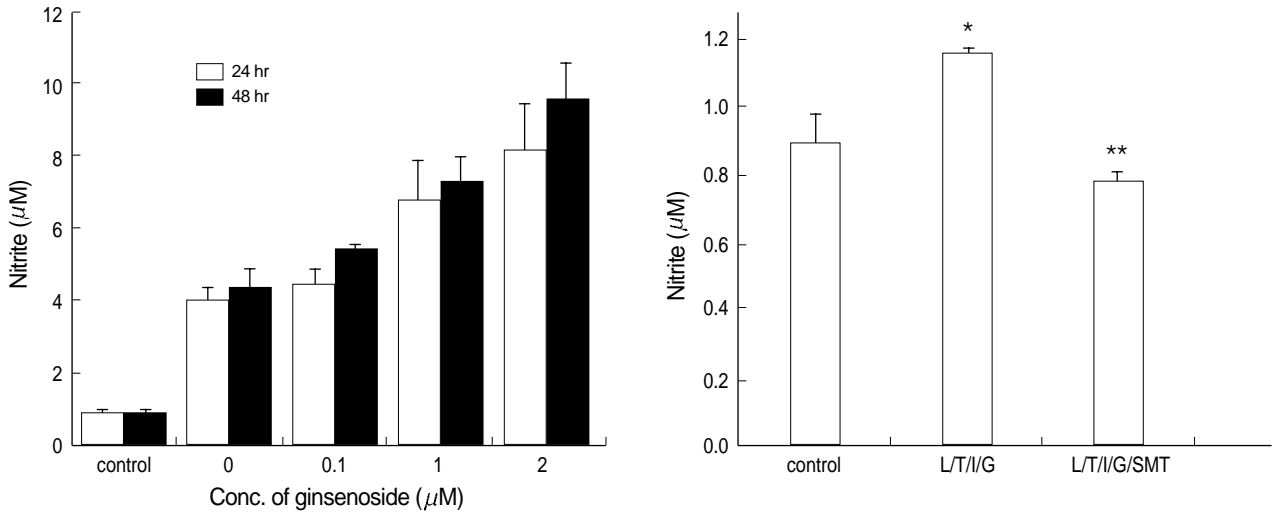


Fig. 3. Ginsenoside Rb1 increased the nitrite production of C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α in proportion to its concentration and time course. SMT decreased the nitrite production of C6 glioma cells with same condition. (A) Graph illustrated the nitrite concentration from the culture media of C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α and ginsenoside Rb1 (0, 0.1, 1, 2 μ M) for 24 and 48 h. (B) Graph illustrated the difference of nitrite concentration from the culture media of C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α , 1 μ M ginsenoside Rb1 and 400 μ M SMT. Cont; control, L//T//G; LPS/IFN- γ /TNF- α /Ginsenoside Rb1. *A significant difference compared with the control group ($p < 0.05$); **A significant difference compared with the L//T//G group ($p < 0.05$).

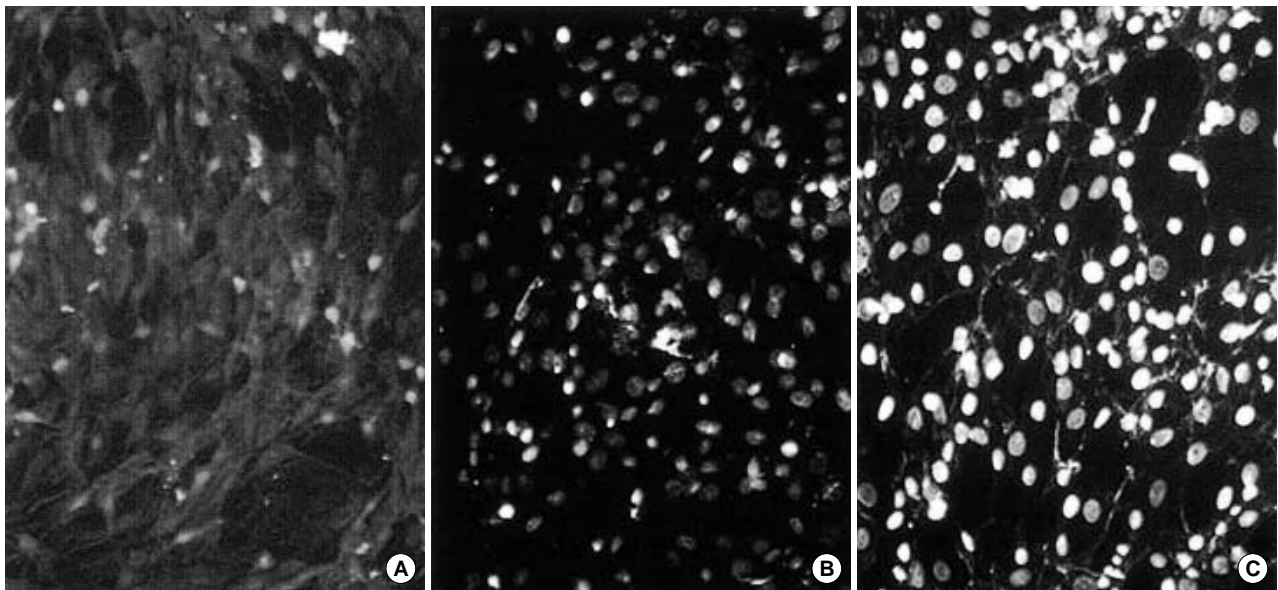


Fig. 4. Ginsenoside Rb1 treatment increased the number of iNOS immunopositive cells. (A) Non-treated C6 glioma cells, (B) C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α , (C) C6 glioma cells treated with LPS/IFN- γ /TNF- α and 1 μ M ginsenoside Rb1.

$\pm 0.72 \mu$ M, $9.52 \pm 0.99 \mu$ M로 나타났다. 이것은 1 μ M과 2 μ M의 ginsenoside Rb1을 처리한 후 24시간대에 LPS, IFN- γ , TNF- α 만을 처리한 군에 비해서 NO의 생성량이 각각 1.7배와 2배 증가한 것이며, 24시간대보다 48시간대에서 NO의 생성량이 증가한 것이다($p < 0.05$). 그리고 ginsenoside 단독으로 NO의 생성을 유도할 수 있는지를 알아보기 위해서 ginsenoside Rb1 1 μ M을 C6 세포배양매지에 첨가한 후 48시간 후의 NO의 생성

량을 알아본 결과, ginsenoside Rb1 단독으로는 NO의 생성을 유도할 수 없었다(data not shown).

iNOS 단백질 발현양상

Ginsenoside Rb1을 처리한 C6 세포의 iNOS 단백질 발현양상을 알아보기 위해서 iNOS 면역형광 검사를 시행하였다(Fig.

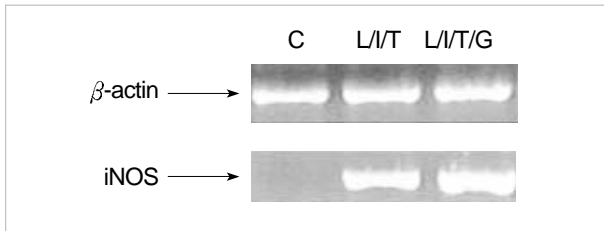


Fig. 5. Ginsenoside Rb1 increased the expression of iNOS mRNA. C; control, L/I/T; LPS/IFN- γ /TNF- α , L/I/T/G; LPS/IFN- γ /TNF- α /Ginsenoside Rb1.

4). Ginsenoside Rb1을 처리한 경우(Fig. 4C)가 LPS, TNF- α , IFN- γ 만을 처리한 대조군(Fig. 4B)보다 iNOS에 대한 양성세포수가 현저히 증가하였다.

iNOS mRNA의 발현양상

iNOS의 mRNA의 발현양상을 알아보기 위해서 iNOS mRNA의 RT-PCR을 수행하였다(Fig. 5). LPS, IFN- γ , TNF- α 를 처리하지 않았을 때는 iNOS mRNA가 발현되지 않았으며, LPS, IFN- γ , TNF- α 를 처리하였을 때는 iNOS mRNA가 증가하였다. 그리고 LPS, IFN- γ , TNF- α 와 ginsenoside Rb1을 함께 처리하였을 때는 iNOS mRNA의 발현량이 조금 더 증가하였다.

iNOS 특이 억제제인 SMT의 효과

LPS/IFN- γ /TNF- α /ginsenoside Rb-1과 함께 SMT를 처리하였을 때 LPS/IFN- γ /TNF- α 와 ginsenoside Rb1을 처리한 군(Fig. 1C)에 비해서 TUNEL 양성세포수가 감소하였다(Fig. 1D). Ginsenoside Rb1의 처리에 의해서 caspase-3 양성세포수는 감소하였으며(Fig. 2D), SMT의 투여에 의한 nitrite의 생성량은 $0.79 \pm 0.03 \mu\text{M}$ 으로 SMT를 처리하지 않았을 때의 nitrite의 생성량인 $1.17 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 보다 32% 감소하였다(Fig. 3B) ($p=0.009$).

고 찰

인삼은 오랜 옛날부터 약으로 사용되었으나 인삼의 효능에 관한 연구는 근래에 들어 활발히 이루어져 인삼의 다양한 약리 작용이 국내외에서 과학적으로 밝혀지고 있다.¹⁻⁵ 현재까지 보고된 인삼의 약리 작용은 대부분 ginsenosides에 의해서 나타나는 것으로 알려져 있는데,^{4,6-24} 특히 ginsenoside의 항암효과에 대한 관심이 높아지고 있다. Ginsenosides가 항암효과를 나타내는 기전으로 암세포의 세포자멸사 유도가 관여할 것이라는 논문들이 발표되었으나,¹³⁻¹⁹ 아직까지 ginsenosides가 암세포의 세포자멸사를 유도하는 정확한 기전이 무엇인지에 대해서는 자세히 알려져 있

지 않다. 본 연구는 ginsenosides 중 하나인 ginsenoside Rb1이 암세포자멸사를 유도하는 데 NO의 생성이 중요한 역할을 할 것이라는 가설 하에, LPS, INF- γ , TNF- α 로 활성화시킨 C6 glioma 세포에 ginsenoside Rb1을 처리하여 ginsenoside Rb1이 C6 glioma 세포의 NO 생성과 세포자멸사에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

C6 glioma 세포에 LPS, INF- γ , TNF- α 를 처리하였을 때 NO의 생성이 증가되었다. 또한 TUNEL 검사 결과 양성세포수가 증가하는 것으로 보아 세포자멸사가 유도됨을 알 수 있었다. Ginsenoside Rb1이 세포자멸사에 미치는 영향을 알아보기 위해서 LPS, INF- γ , TNF- α 와 함께 ginsenoside Rb1을 병합처리하였는데, 이때 LPS, INF- γ , TNF- α 단독 처리한 군보다 NO의 생성량과 TUNEL 양성세포수가 증가하는 것으로 보아 ginsenoside Rb-1이 NO 생성과 세포자멸사를 증가시킴을 알 수 있었다. 또한 활성화된 caspase-3을 인식하는 cleaved caspase-3의 면역세포화학 검사를 시행하였을 때, ginsenoside Rb-1을 병합처리한 군에서 LPS, INF- γ , TNF- α 단독 처리한 군보다 caspase-3 양성세포수가 증가하였다. 그리고 ginsenoside Rb1 단독으로는 C6 glioma 세포에서 NO의 생성을 유도할 수 없었다. Kim 등²⁶은 ginsenoside Rh2가 C6 glioma 세포에서 활성산소와 caspase-3 매개에 의한 세포자멸사를 유도한다고 보고하였고, Park 등²⁷은 ginsenoside Rh2가 사람의 SK-HEP-1 hepatoma 세포에서 caspase-3 매개에 의한 세포자멸사를 유도한다고 보고하였다. 이와 같이 ginsenoside는 여러 종양세포에서 caspase-3 매개에 의한 세포자멸사를 유도하는 것으로 보인다.

Ginsenoside Rb1에 의한 NO의 생성이 iNOS에 의한 것인지를 알아보기 위해서 iNOS RT-PCR을 시행한 결과, ginsenoside Rb1을 병합처리한 군에서 LPS, INF- γ , TNF- α 단독 처리한 군보다 iNOS mRNA의 발현이 증가하였고 iNOS 양성세포수도 증가하였다. 따라서 ginsenoside Rb1을 처리하면 iNOS mRNA의 양과 iNOS 단백질의 양이 증가하는 것을 알 수 있었다. 특히 iNOS의 특이적인 저해제인 SMT를 처리하였을 때, NO의 생성이 감소하였으며 caspase-3 양성세포수도 감소하였다.

이러한 결과들로 볼 때 ginsenoside Rb1은 iNOS에 의한 NO의 생성을 야기하고 caspase-3가 중간 매개체로 작용하여 C6 glioma 세포의 세포자멸사를 유도하는 것으로 보인다. 또한 C6 glioma 세포 외에 다른 암세포종에서도 ginsenoside Rb1을 처리하였을 때 iNOS에 의한 NO의 생성으로 세포자멸사가 유도되는지 알아볼 필요가 있으며, ginsenoside Rb1 외에 다른 ginsenoside와 병합투여 하였을 때의 효과도 검정해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다. 그리고 nude 마우스를 이용한 생체내 실험을 통해서 본 실험에서 검증된 가설이 생체에서도 성립하는지 알아볼 필요가 있다고 생각한다. 이러한 일련의 연구들은 지금까지 잘 알려지지 않았던 ginsenoside가 암세포 자멸사를 유도하는 기전을 연구하는 데 있어서 중요한 자료를 제공할 것이며 암 치료에도 활용될 수 있을 것으로 생각한다.

참고문헌

1. Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 1685-93.
2. Gillis CN. Panax ginseng pharmacology: a nitric oxide link? *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 1-8.
3. Yamaguchi Y, Higashi M, Kobayashi H. Effects of ginsenosides on impaired performance caused by scopolamine in rats. *Eur J Pharmacol* 1996; 312: 149-51.
4. Tsang D, Yeung HW, Tso WW, Peck H. Ginseng saponins: influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. *Planta Med* 1985; 3: 221-4.
5. Hu S, Concha C, Lin F, Persson Waller K. Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 91: 29-37.
6. Lim JH, Wen TC, Matsuda S, *et al.* Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb1, a main ingredient of ginseng root. *Neurosci Res* 1997; 28: 191-200.
7. Lee JH, Kim SR, Bae CS, Kim D, Hong HN, Nah SY. Protective effect of ginsenosides, active ingredients of Panax ginseng, on kainic acid-induced neurotoxicity in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2002; 325: 129-33.
8. Liao B, Newmark H, Zhou R. Neuroprotective effects of ginseng total saponin and ginsenosides Rb1 and Rg1 on spinal cord neurons in vitro. *Exp Neurol* 2002; 173: 224-34.
9. Kim YC, Kim SR, Markelonis GJ, Oh TH. Ginsenosides Rb1 and Rg3 protect cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurodegeneration. *J Neurosci Res* 1998; 53: 426-32.
10. Li J, Zhang J. Inhibition of apoptosis by ginsenoside Rg1 in cultured cortical neurons. *Chin Med J* 1997; 110: 535-9.
11. Chen XC, Zhu YG, Wang XZ, Zhu LA, Huang C. Protective effect of ginsenoside Rg1 on dopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 673-8.
12. Ota T, Fujikawa-yamamoto K, Zong ZP, *et al.* Plant-glycoside modulation of cell surface related to control of differentiation in cultured B16 melanoma cells. *Cancer Res* 1987; 47: 3863-7.
13. Ota T, Maeda M, Odashima S, Ninomiya-Tsuji J, Tatsuka M. G1 phase-specific suppression of the Cdk2 activity by ginsenoside Rh2 in cultured murine cells. *Life Sci* 1997; 60: 39-44.
14. Liu WK, Xu SX, Che CT. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci* 2000; 67: 1297-306.
15. Lee SJ, Ko WG, Kim JH, Sung JH, Moon CK, Lee BH. Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 677-85.
16. Tode T, Kikuchi Y, Kita T, Hirata J, Imaizumi E, Nagata I. Inhibitory effects by oral administration of ginsenoside Rh2 on the growth of human ovarian cancer cells in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993; 120: 24-6.
17. Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, *et al.* Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2 20(R)-and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of red ginseng. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 1197-202.
18. Yun TK. Experimental and epidemiological evidence of the cancer-preventive effects of Panax ginseng C.A. Meyer. *Nutr Rev* 1996; 54: S71-81.
19. Yun TK, Kim SH, Lee YS. Trial of a new medium-term model using benzo(a)pyrene induced lung tumor in newborn mice. *Anticancer Res* 1995; 15: 839-45.
20. Zhang D, Yasuda T, Yu Y, *et al.* Ginseng extract scavenges hydroxyl radical and protects unsaturated fatty acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 145-50.
21. Kim YH, Park KH, Rho HM. Transcriptional activation of the Cu, Zn-superoxide dismutase gene through the AP2 site by ginsenoside Rb2 extracted from a medicinal plant, Panax ginseng. *J Biol Chem* 1996; 271: 24539-43.
22. Han SW, Kim H. Ginsenosides stimulate endogenous production of nitric oxide in rat kidney. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; 28: 573-80.
23. Toda, N, Tanaka T, Ayajiki K, Okamura T. Cerebral vasodilation induced by stimulation of the pterygopalatine ganglion and greater petrosal nerve in anesthetized monkeys. *Neuroscience* 2000; 96: 393-8.
24. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996; 12: 274-7.
25. Suk K, Lee J, Hur J, *et al.* Activation-induced cell death of rat astrocytes. *Brain Res* 2001; 900: 342-7.
26. Kim HE, Oh JH, Lee SK, Oh YJ. Ginsenoside RH-2 induces apoptotic cell death in rat C6 glioma via a reactive oxygen- and caspase-dependent but BCL-X(L)-independent pathway. *Life Sci* 1999; 65: 33-40.
27. Park JA, Lee KY, Oh YJ, Kim KW, Lee SK. Activation of caspase-3 protease via a Bcl-2-insensitive pathway during the process of ginsenoside Rh2-induced apoptosis. *Cancer Lett* 1997; 121: 73-81.