

인삼 총 사포닌의 에스트로젠, 안드로젠, 레티노익산 호르몬 수용체에 대한 활성

지상미 · 이영주[#]

세종대학교 공과대학 생명공학과
(2003년 4월 29일 접수, 2003년 6월 22일 수리)

Estrogen, Androgen, and Retinoic Acid Hormone Activity of Ginseng Total Saponin

SangMi Ji and YoungJoo Lee[#]

Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, Seoul, Korea
(Received April 29, 2003, Accepted June 22, 2003)

Abstract : Alternative or complementary medicine plays an important role in health care system. Ginseng, being one of the most popular oriental herbs, is believed to contain various steroid hormone activity. Ginseng has been demonstrated pharmacological effect in the cardiovascular, endocrine, central nervous, and immune system. Our objective was to study that total saponin might mediate some of their actions by binding to the steroid hormone receptor, as they share many of the actions of steroid hormone in various physiological system. Using total saponin from Panax Ginseng, we have studied the possibility of total saponin being a potential estrogen receptor, androgen receptor, and retinoic acid receptor ligand. Total saponin activated the transcription of both the estrogen and androgen responsive luciferase reporter plasmids at a concentration of 100 µg/ml in COS cells transiently transfected with the corresponding receptor and hormone responsive receptor plasmids. And total saponin caused a concentration-dependent stimulation of estrogen receptor. Total saponin increased the expression of estrogen responsive c-fos proto-oncogene at the protein level in MCF7 cells at 24 h treatment as examined by Western analysis. The c-fos induction was used as a specific marker of estrogen responsiveness. This activation was inhibited by the specific estrogen receptor antagonist, ICI 182,780. However, total saponin failed to activate the retinoic acid receptor in COS cells transiently transfected with the corresponding receptor and retinoic acid responsive reporter plasmids. These results show that total saponin is capable of activating estrogen and androgen receptors.

Key words : Total saponin, estrogen, androgen

서 론

고려인삼 (*Panax ginseng*)은 약 2000년 전부터 식품으로 뿐만 아니라 약학적으로도 널리 사용되어 왔으며, 현재는 한방, 의학적으로 그 가치를 인정 받고 있다. 인삼에 관한 꾸준한 연구가 이루어져 여러 성분들이 밝혀졌으며 또 현대 약리학에서 특수작용이 있음이 입증되어 근래에는 활발한 연구가 진행되고 있다. 인삼의 약리학적 효능은 중추신경계에서, 심장혈관, 그리고 면역시스템에서 밝혀진 바 있으며, 이 뿐만 아니라 다른 많은 부분에 있어서도 그 약학적 효능이 있는 것으로 발표되고 있다.¹⁾ 이를 근거하여 동양뿐만 아니라 전세계

계에 걸쳐 인삼의 대체의약 활용 가능성에 대한 관심이 증가되고 있다.²⁾ 작용 기전을 좀 더 구체적이고 이론적으로 밝히는 많은 연구가 계속 진행 중에 있다. 인삼에 대한 대부분의 연구들은 인삼을 구성하는 활성 물질들을 가지고 이루어지며 그 활성 물질로는 ginsenoside, polysaccharides, peptides, polyacetylenic alcohols, 그리고 fatty acid등이 있다.³⁾ 그 중에서도 ginsenoside는 total saponin의 구성성분으로 스테로이드성이며, 인삼 활성을 나타내는 주요 성분이다.^{4,5)} 기본구조는 triterpene 스테로이드 골격을 가지고 있는 스테로이드 그룹으로 그 옆 사슬의 구조에 따라 구분되며 현재 약 20여종 알려져 있다. Ginsenoside의 각각의 함량이 2-20%의 다양한 범위로 인삼의 종류마다 다르기 때문에 ginsenoside의 total mixture인 total saponin이 가지는 약학적 활성 또한 인삼 종류마다 다르게 나타난다.⁶⁾ 본 연구에서 사용된 Panax

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-3408-3766; (팩스) 02-3408-3334
(E-mail) yjlee@sejong.ac.kr

ginseng의 ginsenoside는 Rb1 1.47%, Rb2 5.19%, Rc 7.36%, Rd 1.98%, Re 5.88%, Rf 1.63%, Rg1 8.99%, Rg2 0.45%, 그리고 Rg3 0.58%가 포함되어 있다. Ginsenoside 중 일부는 핵 내에서 스테로이드와 유사한 활성을 가지며 이는 스테로이드 대체성 물질로 개발 가능하다고 여겨지고 있다.⁷⁾ Ginsenoside는 단순환산에 의하여 세포막을 통과하고 핵 수용체와 결합해서 전사 조절을 유발하여 유전자발현을 조절할 수 있으며,⁸⁾ ginsenoside가 수용체의 리간드로 작용하여 핵 안에서 전사를 조절한다는 구체적인 연구가 발표된 바 있다.⁹⁾ 예로서, total saponin의 구성성분 중의 하나인 ginsenoside-Rg1이 glucocorticoid 수용체에 기능적인 리간드임이 밝혀진 바 있으며, 또한 ginsenoside-Rg1이 직접적인 리간드로서는 아니지만 간접적인 경로를 통해 에스트로젠과 유사한 전사활성 유도를 한다는 연구도 최근 발표되었다.¹⁰⁾

본 연구에서는 total saponin이 각각 에스트로젠, 테스토스테론, 레티노익산 수용체의 리간드로 작용하는지를 살펴보고 있으며, 에스트로젠 수용체의 표적 유전자 중의 하나인 c-fos를 유도 시키는지를 Western 분석을 통하여 측정하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 시료

Total saponin은 고려인삼연초연구원에서 제공받았고, 17 β -estradiol (E2), testosterone (Tes) 그리고 all-trans retinoic acid (ATRA)는 Sigma에서 구입하였다. Total saponin은 70% ethanol에 50 mg/ml 농도로 녹였으며, E2, Tes 그리고 ATRA는 100% DMSO에 녹여서 모두 -20°C에 보관하였다.

2. 세포배양

Monkey kidney(COS) 세포는 한국 세포 주 은행에서 구입하였다. 이 세포는 Dulbecco's modified Eagle medium 배지에 1xantibiotic/antimycotic mix과 10% calf serum (GIBCO BRL) 또는 10% FBS (fetal bovine serum)를 첨가하여 배양하였다. 시약 첨가 시에는 10% charcoal-dextran stripping calf serum으로 바뀌어 실험하였다. 48 well plate에 3.5x10⁴ cells/well로 seeding 하였으며, 6 well plate에는 MCF 세포를 0.3x10⁶ cells/well 으로 seeding 하여 실험하였다.

3. 플라스미드 DNA의 Transient Transfection

에스트로젠 활성 검색을 위한 플라스미드 DNA로 에스트로젠 수용체 (HEGO/pSG5)와 luciferase reporter 유전자가 달려있는 ERE2-tk81-luc를 사용하였고, 안드로젠 활성 검색을 위해 humanAR/pSG5와 ARE4-luc reporter 유전자를

그리고 레티노익산 활성 검색을 위해 RAR α 와 β RRARE-luc reporter 유전자를 각각 사용하여 calcium phosphate coprecipitation 방법으로 transfection하였다. 상기 플라스미드는 순서대로 각각 Drs. Larry Jameson, Chawshawn Chang, Pierre Chambon으로부터 제공받았다. Transfection하기 전날 seeding한 세포가 50% confluent해졌을 때, 3시간 전에 새로운 배지로 갈아주고, DNA에 2 M CaCl₂와 물을 섞어주며 DNA-CaCl₂ 혼합물을 만들었다. 이 혼합물에 HBS (28 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 12 mM dextrose, 50 mM HEPES)을 bubbling시키면서 한방울씩 넣어주었다.

4. Luciferase 측정

48 well plate에서 transient transfection 8시간~12시간 후 total saponin을 100 μ g/ml, E2와 Tes는 10 nM, 그리고 ATRA는 1 μ M로 24시간 동안 처리한 후 PBS로 세척하고 배지를 교환 후 시약을 24시간 동안 처리해서 실험한 후 lysis buffer (125 mM Tris pH 7.8, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 50% glycerol, 5% Triton X-100)를 넣고 세포를 용해시킨 후 상층액을 채취하여 assay buffer (20 mM Tricine, 1.07 mM (MgCO₃)₄ · Mg (OH)₂ · 5H₂O, 2.67 mM MgSO₄, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 270 M Coenzyme A (lithium salt), 470 M Luciferin, 530 M ATP)를 가한 후 Luminoskan Ascent (Lab systems)를 이용해 luciferase 활성을 측정하였다.

5. Western blotting

MCF7 세포를 6 well plate에 100 μ g/ml total saponin, 10 nM E2 그리고 1 μ M ICI 182,780를 24시간 동안 처리한 후 PBS로 세척하고 radioimmune precipitation buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 1% SDS protease inhibitor cocktail)로 단백질을 분리한 후 Bio-Rad protein assay 방법으로 정량하였다. 정량한 단백질을 20 μ g/ μ l씩 동일하게 5분 동안 샘플을 끓인 후 8% acrylamide gel에서 분리 후 polyvinylidene difluoride membrane에 옮기고 5% dry milk in Tris-buffered saline (TBS)로 blocking 하였다. Rabbit anti-human polyclonal antibody c-fos (Santa Cruz, U.S.A.)를 1:500으로 skim milk에 희석하여 overnight 반응한 후 TBS/1% Tween으로 5분 동안 3번씩 세척하였다. Anti-rabbit horseradish peroxidase secondary antibody를 5% skim milk에 1:5000으로 희석하여 반응한 후 ECL kits (Amersham)으로 처리해서 필름에 현상하였다.

결과 및 고찰

1. COS 세포에서 total saponin의 에스트로젠 수용체에 의한 전사활성 분석

COS 세포를 48 well plate에 3.5×10^4 cells/well로 seeding하고 HEGO/pSG5와 ERE2-tk81-luc를 transfection한 후 10 nM E2, 100 µg/ml total saponin을 처리하여 reporter 유전자 활성을 분석한 결과 E2와 거의 동등한 정도의 활성을 나타냈다(Fig. 1A). 이러한 활성이 농도 의존적으로 일어나는지를 살펴보기 위하여 10 nM E2, 각각 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml 그리고 0.1 µg/ml total saponin을 처리하여 luciferase 활성을 검색하였다(Fig. 1B).

Total saponin 100 µg/ml 농도에서 활성을 나타내었고, 이때의 활성정도는 10 nM E2의 활성도와 유사하였다. 0.1 µg/ml 농도 이하에서는 활성이 나타나지 않았다.

2. c-fos 단백질을 유도 시키는지를 단백질 수준에서 Western blotting으로 검색

6 well plate에 유방암 세포인 MCF7을 0.3×10^6 cells/well로 seeding하고 10 nM E2, 1 µM 에스트로젠 길항제 ICI 182,780, 100 µg/ml total saponin을 각각 또는 함께 처리하여 western blotting로 c-fos를 유도 시키는지를 살펴 보

았다. E2가 c-fos를 유도 시키는 것과 마찬가지로 total saponin은 c-fos를 유도하였고, E2가 ICI 182,780에 의해 증가된 c-fos를 감소시킨 것과 마찬가지로 total saponin에 의해 증가된 c-fos가 다시 감소되었다(Fig. 1C).

3. Total saponin의 안드로젠 수용체에 의한 전사활성 분석

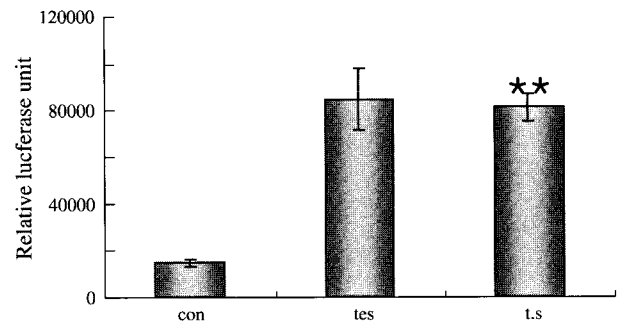


Fig. 2. Ginseng total saponin stimulates androgen responsive luciferase gene activity Cells were treated with ethanol vehicle control, 10 nM Tes, or ginseng total saponin 100 µg/ml, and assayed for luciferase activity after 24 h treatments. Transfections were performed in triplicate more than three times. One representative result is shown in this figure. Data are expressed as the mean ± SEM. P<0.005(**).

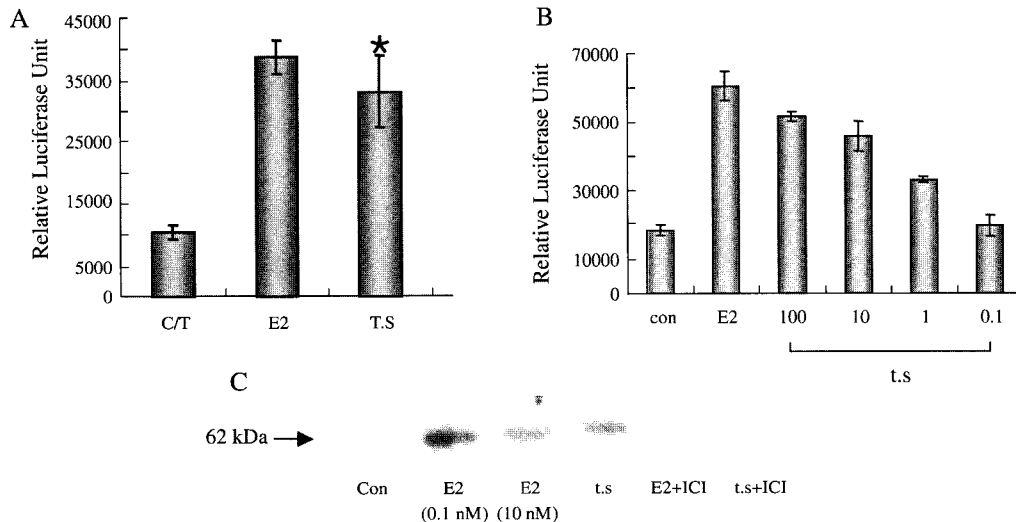


Fig. 1. Ginseng total saponin stimulates estrogen responsive luciferase gene activity and activates the expression of estrogen responsive gene in vitro. (A) Cells were treated with ethanol vehicle control, 10 nM E2, or ginseng total saponin 100 µg/ml in phenol-red free DMEM plus 10% CD-CS, and assayed for luciferase activity after 24 h treatments. Transfections were performed in triplicate more than three times. Total saponin induced luciferase activity to a similar level as seen with 10nM E2. Data are expressed as the mean ± SEM. P<0.05(*); (B) Cells were treated with ethanol vehicle control or different concentrations of ginseng total saponin 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, and 0.1 µg/ml in phenol-red free DMEM plus 10% CD-CS. Transfections were performed in triplicate more than three times. Total saponin showed dose-dependent activation of luciferase expression. (C) MCF7 cells were treated with ethanol vehicle, 10 nM E2, 1 µM ICI 182,780, or 100 µg/ml ginseng total saponin for 24 h as indicated. Protein levels of c-fos were increased with total saponin treatment as compared with controls. A representative pattern is shown from two independent experiments.

COS 세포를 48 well plate에 3.5×10^4 cells/well로 seeding 하고 humanAR/pSG5와 ARE4-luc를 transfection한 후 10 nM Tes, 100 μ g/ml total saponin을 처리한 후 luciferase활성을 검색하였더니 total saponin이 Tes와 유사하게 전사 활성을 나타내었다(Fig. 2). 이 결과는 total saponin이 안드로젠 수용체에 리간드로 작용하는 성분이 함유되어 있음을 의미한다.

4. COS 세포에서 total saponin의 레티노익산 수용체에 의한 전사활성 분석

레티노익산 수용체 (RAR α)와 β RARE-luc를 transfection한 후 1 μ M ATRA, 100 μ g/ml total saponin을 처리한 후 luciferase활성을 검색하였다. Total saponin은 ATRA 활성을 나타내지 않았다(Fig. 3). 이는 total saponin이 E2나 Tes 수용체에 결합하여 전사 활성을 나타내는 것과는 달리 RAR α 수용체에 리간드로 작용하는 성분이 없음을 의미한다.

인삼은 질병 및 각종 질환을 치료하기 위한 목적으로 사용되고 있으며 자연에 존재하는 대체 의약품으로서 그 가치와 기능을 전세계적으로 인정 받고 있다. 그러나 인삼의 기능과 효능이 너무 광범위하여 그것의 특징을 정확히 하기에 어려움이 있다. 인삼의 일부 구성성분은 전립선 암의 증식을 억제시키고,¹¹⁾ 중추 신경계를 자극하여 학습 능력을 향상시키며,¹²⁾ 당뇨병 환자에 있어 포도당 균형을 개선시킨다.¹³⁾ 이러한 작용이외에도 많은 분야에서 광범위한 효능을 나타내고 있다. 본 연구에서는 인삼의 약리작용에 있어 주요 역할을 하는 total saponin이 스테로이드 호르몬의 효능을 나타내는지를 검

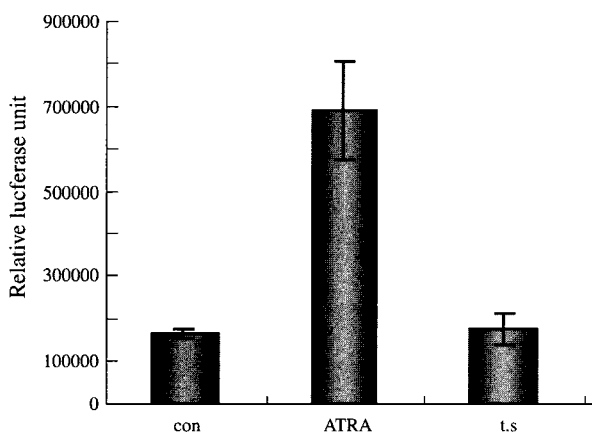


Fig. 3. Ginseng total saponin stimulates retinoic acid responsive luciferase gene activity Cells were treated with ethanol vehicle control, 1 μ M ATRA, or ginseng total saponin 100 μ g/ml, and assayed for luciferase activity after 24 h treatments. Total saponin showed no retinoic acid responsive luciferase activation. Transfections were performed in triplicate more than three times. One representative result is shown in this figure.

색하였다. 본 연구에서, total saponin이 성 호르몬 수용체인 에스트로젠 수용체, 안드로젠 수용체를 활성화함을 증명하였다(Fig. 1,2). 그러나, total saponin은 레티노익산 수용체는 활성화시키지 않았다(Fig. 3). 그리고 total saponin은 농도에 의존적으로 에스트로젠 수용체를 활성화 하였다(Fig. 1). Total saponin은 MCF 유방암 세포에서 c-fos protooncogene이 유도하였고,¹⁴⁾ 이는 항 에스트로젠 ICI 182,780에 의해 억제되었다. 즉, total saponin이 에스트로젠 수용체에 대하여 직접 또는 간접적인 리간드로서 작용하며 항 에스트로젠 ICI 182,780에 의해 억제된다는 것을 알 수 있다.

American ginseng은 에스트로젠 조절 유전자인 pS2의 RNA 발현을 증가시키고 유방암 세포주인 MCF7 cell의 세포 성장을 억제시키는 항 에스트로젠 효과가 있으나,¹⁵⁾ 에스트로젠 수용체에 대한 직접적인 전사활성은 없음이 보고된 바 있다.¹⁶⁾ 하지만, 본 결과에서 Panax ginseng은 핵 내에서 에스트로젠 수용체를 통한 에스트로젠 활성을 나타내었으며, 이는 호르몬 대체요법의 일환으로 약학적으로 충분히 가치가 있는 것으로 여겨진다. 이와 같이 호르몬 대체 요법은 내분비계 장애에 있어 이미 널리 활용되고 있으며,^{17,18)} 현재도 이에 관한 많은 연구가 지속적으로 이루어지고 있고 그 효과와 중요성이 더욱 강조되고 있다. 그러나 폐경기 여성호르몬 결핍 증후군의 예방에 있어 호르몬 대체 요법이 많이 이용되고 있지만 유방암을 더 악화시킬 위험을 가지고 있기 때문에 이러한 부작용의 가능성을 줄이는 방법이 개발되어야 한다.^{19,20)} 본 연구결과는 total saponin이 에스트로젠과 안드로젠 유사 활성을 나타내어 성 호르몬 결핍으로 인해 생기는 여러가지 질병 즉, 폐경기 여성 호르몬 결핍 증후군 치료제와 남성 호르몬 대체 의약품 개발 가치가 있음을 의미한다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 한국담배인삼공사의 연구비와 BK21 program의 지원으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Shibata, S. : Proc. 2nd Int. Ginseng Symp. 93 (1978).
- Smith, M. and Boon, H. S. : *Patient Educ Couns.* **38**, 109 (1999).
- Lee, F. C. : Facts about ginseng, the Elixir of life. Hollyn International Corp., *Elizabeth, NJ.* (1992).
- Soldari, F. and Sticher, O. : *Planta Med.* **39**, 348-357 (1980).
- Ota, T. Fujikawa-Yamamoto, K. Zong, Z. P. Yamazaki, M. Odashima, S. Kitagawa, I. Abe, H. and Arichi, S. : *Cancer*

- Res.* **47**, 3863-3867 (1987).
6. Huang, K. C. : *The pharmacology of Chinese Herbs*. CRC Press Boca Raton, FL. (1999).
 7. Lee, Y. J., Jin, Y. R. Lim, W. C. Park, W. K. Cho, J. Y. Jang, S. Y. and Lee, S. K. : *Arch Pharm Res.* **26**(1), 58-63 (2003).
 8. Lee, Y. J., Jin, Y. R. Lim, W. C. Ji, S. M. Choi, S. H. Jang, S. Y. and Lee, S. K. : *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **84**, 463-468 (2003).
 9. Attele, A. S. Wu, J. A. Yuan, C. S. : *Biochem Pharmacol.* **58**(11), 1685-1693 (1999).
 10. Chan, R. Y. Chen, W. F. Dong, A. Guo, D. and Wong, M. S. : *J. Clin Endocrinol Metab.* **87**(8), 3691-3695 (2002).
 11. Liu, W. K. Xu, S. X. Che, C. T. : *Life Sci.* **4**; **67**(11), 1297-1306 (2000).
 12. Perry, E. K. : *Br Med Bull.* **42**, 63-69 (1995).
 13. Sotaniemi, E. A., Haapakoski, E. and Rautio A. : *Diabetes Care.* **18**(10), 1373-1375 (1995).
 14. Curran, T. : *The Oncogene Handbook, Elsevier Amsterdam.* 307-325 (1988).
 15. Renqin, D., Weston, P. and Stephen, S. : *Endocrinology.* **139**(4), 1981-1990 (1998).
 16. Renqin, D., Weston P. and Stephen, S. : *Endocrinology.* **139**(4), 1981-1990 (1998).
 17. Vassilopoulou-Sellin, R., Cohen, D. Hortobagyi, G. Klein, M. McNeese, M. Singletary, S. Smith, T. and Theriault, R. : *Cancer. I*; **95**, 1817-1826 (2002).
 18. Duda, R. B., Zhong, Y. Navas, V. Li, M. Z. Toy, B. R. and Alvarez, J. G. : *J. Surg Oncol.* **72**, 230-239 (1999).
 19. Davison, S., and Davis, S. : *Clin Endocrinol.* **58**(3), 249-261 (2003).
 20. Henderson, B. E., Ross, R. and Bernstein, L. : *Cancer Res.* **48**, 246-276 (1998).