

흰쥐 뇌 소교세포에서 진세노사이드 Rg3의 Type A Macrophage Scavenger Receptor 발현 증진효과

주성수 · 황광우 · 이도익*

중앙대학교 약학대학

(Received January 6, 2005; Revised March 21, 2005)

Enhancement of Type A Macrophage Scavenger Receptor Expression by Ginsenoside Rg3 in Rat Microglia

Seong-Soo Joo, Kwang-Woo Hwang and Do-Ik Lee*

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract — Macrophage scavenger receptors (MSRs) induce microglial interaction with β -amyloid fibrils (fA β) that are associated with Alzheimer's disease (AD). Although microglia are known to have a dual effect on formation of plaque and clearance of fA β in the AD brain, receptor-mediated phagocytosis is a very important tool for preventing amyloid plaque via activated microglia in the early stage of AD. In the study, we examined whether ginsenoside Rg3 enhances the microglial phagocytosis of A β 1-42 through phagocytosis assay, gene expression (RT-PCR) and protein assay (western blots) for the cell responsiveness presented between Rg3-treated and non-treated groups. Fluro-labeled Ac-LDL and *E. coli* particles were used as control proteins for phagocytosis. In previous studies, this was a particularly interesting property of Rg3 in the stimulation and phagocytosis of macrophages in the periphery. We report here that ginsenoside Rg3 increased the expression of type-A MSR (MSR-A) in microglia and thus accelerated the phagocytosis with an effective degradation of engulfed fA β . This result suggests that Rg3 may play an important role in removing fA β by enhancing the receptor-mediated phagocytosis. In addition, Rg3 could be a potential candidate for balancing the rate of production of fA β in AD brain.

Keywords □ β -amyloid, MSR-A, Alzheimer's disease, ginsenoside Rg3, microglia

소교세포(microglia)는 중추신경계(central nervous system, CNS)의 중요한 면역세포로서, 고도로 특화된 형태를 가지며, 정상 성인 뇌에서 ramified 상태로 존재한다.¹⁾ 소교세포는 다양한 면역관련인자들을 분비하여 여러 사이토카인을 통해 염증반응 및 타 아교세포(glial cell)와의 신호전달 과정에 관여하며, 세포 손상을 유발하는 자유기(free radicals) 생성과 아울러, 베타아밀로이드 펩타이드(A β peptide)로부터 유래하는 아밀로이드침착(amyloid deposit)을 사전에 제거하는 주요한 역할을 하기도 한다.²⁾ 더욱이, reactive microglial products는 정상세포(astrocyte)의 활성화 및 신경세포 손상을 유도한다. *In vivo* 상에서 뇌 내의 어느 한부분에서 소교세포의 밀도가 높아질 때 염증성 반응이 일어나고 있음을 예측할 수 있으며, 이러한 것은 퇴행성 뇌질환, 특

히 알츠하이머질환(Alzheimer's disease, AD)의 지표인 노인반(senile plaque)이 고 밀도로 축적이 진행 중임을 반영하는 것이다.³⁾ 소교세포는 AD senile plaque 내 또는 주변에 군집상태로 분포하여 세포활성을 통해 반응을 일으킨다. 아밀로이드반(amyloid plaque)의 중심에서 관찰되는 활성화형 소교세포는 결국 소교세포가 AD에 직간접적으로 관여하고 있음을 의미하는 것이며, 따라서 이러한 현상은 초기 AD 발병 시 질병의 악화를 초래하는 원인이 된다.⁴⁾ 뇌에서 생성되는 A β (i.e. A β 42)에 대한 반응에 있어서 소교세포가 A β 펩타이드의 축적을 차단하는 제거자로서 중요한 역할을 한다는 것이 많은 연구에서 입증되고 있는데, 이는 소교세포 수용체와 응피상태의 A β 의 상호작용이 소교세포를 활성화 상태로 전환시키고 이에 대한 반응의 결과가 A β 펩타이드를 섭취하여 제거하는 일련의 과정을 유도하는 것이다. 이와 같은 수용체들 중 macrophage scavenger receptor(MSR)가 대식세포관련 일련의 과정에 깊은 연계성을 가지며, 숙주방어기전에 중요한 역할을 담당한다.⁵⁾ 이러한 소교세포의 역할에

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5608 (팩스) 02-820-5608
(E-mail) leedi@cau.ac.kr

는 작은 A β fibril(fA β)을 제거하여 없애는 과정이 포함된다. 연구보고에 의하면 MSR에 의해 uptake 되는 단백질(e.g. α 2M, acetylated-LDL)은 소교세포내로 삼켜진 후 4시간 내에 내용물의 70% 이상이 degradation되는 것으로 알려져 있으나,⁴⁾ fA β 의 경우 대부분이 undegraded 상태로 세포내에 잔존한다는 것이 보고되었다.⁶⁾ 만일 이것이 소교세포가 A β 에 대한 대식작용 시 일어나는 일반적인 현상이라면 AD 원인물질인 A β 의 효과적인 제거가 임상적으로 중요한 의미를 가지게 된다.⁷⁾

인삼의 주요 활성분자성분인 ginsenoside는 많은 분야에서 연구가 활발히 수행되고 있으며, 본 연구에서는 CNS에 대한 많은 잠재적 효과^{8,9)}를 배경으로 대식활성 증진효과¹⁰⁾에 대한 관찰하고자 하였다. 그동안 ginsenoside에 대한 연구는 ginsenoside Rb1(panaxadiol)과 Rg1(panaxatriol)에 집중되어 왔으나, 아직 인삼의 약리적 작용기전에 대해 그다지 많은 것이 알려져 있지 않다. 이러한 신비한 효과는 "adaptogenic" 효과⁹⁾로 설명되고 있으나 이 또한 많은 연구를 통한 입증에 필요하며, 이와 같은 인삼의 잠재적 효과에 대한 다양한 적용 중에 면역조절작용이 ginsenoside의 adaptogenic 효과를 잘 설명해 주고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 본 연구에서는 흰쥐소교세포의 1차배양에서 Rg3 처리 시 대식작용을 증진하여 주는 지를 관찰 하였으며, Rg3가 A β 제거를 증진시켜주는 지에 대한 입증에 위해 A β 섭취 및 MSR 유전자 발현을 관찰하였다. 이와 같은 결과는 fluorescent-labeled protein에 의해 확인하였다.

실험방법 및 재료

소교세포는 1일령의 Sprague-Dawley rat brains(♂)으로 부터 획득하여 분리 배양하였다. 즉, 혼합형태의 glial cell을 10% FBS-DMEM에서 10~14일간 배양한 후 소교세포의 성숙형태를 관찰하면서 소교세포를 분리하여 배양하였다.¹⁴⁾ A β 1-42 peptide는 Bachem U.K.사로부터 구입하여 실험목적에 따라 희석하여 사용하였다. 즉, fluorescent A β 는 A β (1 mg/ml)에 Cy3(Amersham, U.S.A.)를 conjugate하여 준비하였고, 소교세포의 uptake 실험을 위해 pre-aggregated A β 를 만들어(37°C, 24시간) 사용하였다. Positive control로서 DiI-labeled acetyl-LDL(Biomedical Technologies, U.S.A.)은 제조사 지침에 따라 제조하였다. MSR ligand인 Fucoidan(Calbiochem, U.S.A.)은 최종 농도로서 5 μ g/ml이 되게 하여 실험에 사용하였다. RT-PCR 실험에 사용된 primer는 MSR-A(485 bp), sense 5'-tag aca cgg gac gct tcc ag-3, anti-sense 5'-tcc tgg agc acc agg tgg ac-3; MSR-BI(655 bp), sense 5'-agg aca agc cca caa gcc tg-3, anti-sense 5'-tcc ttt ggg tca ggg ttc ag-3; β -actin(186 bp), sense, 5'-tga ccg agc gtg gct aca gc-3 anti-sense, 5'-acc gct cat tgc cga tag tg-3. cDNA에 대한 PCR은 60°C에서 20초 동안 annealing

하였으며, 총 30사이클을 수행했다. 단백질 분석을 위해 western blot을 수행하였다. 즉, cell lysate으로부터 추출된 단백질 30 μ g을 10% SDS-PAGE로 분리 후 PVDF membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% nonfat dry milk/TBS-T로 실온에서 1시간 blocking 한 후 TBS-T에 희석된 anti- β -amyloid(SantaCruz, U.S.A.)를 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 1차 항체 처리 후 anti-goat Ig-horse radish peroxidase(Zymed, U.S.A.) 2차 항체를 붙여 ECL(enhanced chemiluminescence luminogram) reagent(Amersham)로 반응시켜 필름에 노출하였다. 또한 시간별 phagocytosis assay에는 Phagocytosis Assay Kit(VybrantTM Molecular Probs, U.S.A.)을 사용하였다. 즉, 각 2, 4, 8시간 반응시간 종료 후 각 fluorescent labeled peptides를 처리하여 2시간 incubation 후 지침서에 따라 excitation wavelenth 535 nm, emission wavelenth 612 nm에서 각 plate well을 측정하여 상대값을 분석하였다. 이 결과는 western blot 및 fluorescent microscope하에서 확인 실험을 하였다. 결과분석은 GraphPad Prizm 4 software를 이용하여 p<0.05일때 통계적 유의성이 있음을 인정하였고, PCR 및 western blot 결과의 분석은 gel/membrane band scanning 후 UVIDocMW program을 통해 band intensity의 상대비교 분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

Rg3가 소교세포의 대식작용에 영향을 주는지 여부를 관찰하기 위해 일차적으로 A β peptide에 대한 MSR의 역할을 확인하였

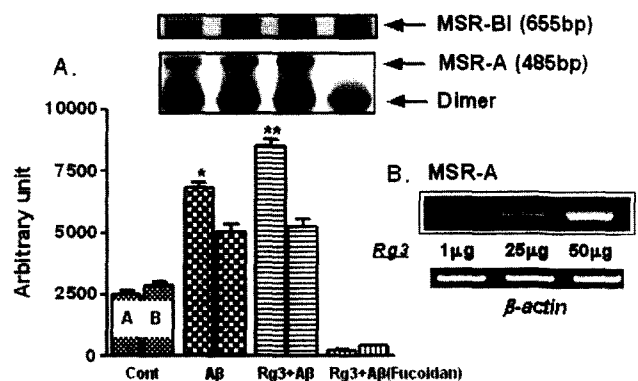


Fig. 1 - RT-PCR analysis of MSR-A and MSR-BI mRNA expression in microglia. One microgram of total RNA was transcribed into cDNA and each PCR assay was electrophoresed on a 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. Band density represents each mRNA level expressed from microglia at 4 h incubation time. Fucoidan, a ligand for MSR-A, was treated to assure the relationship between MSR-A and its expression. A, MSR-A; B, MSR-BI Cont, control (culture media) A β , A β 1-42. Data are presented as mean \pm SD (bars) arbitrary units (n=3). *p<0.05, **p<0.01, vs. control.

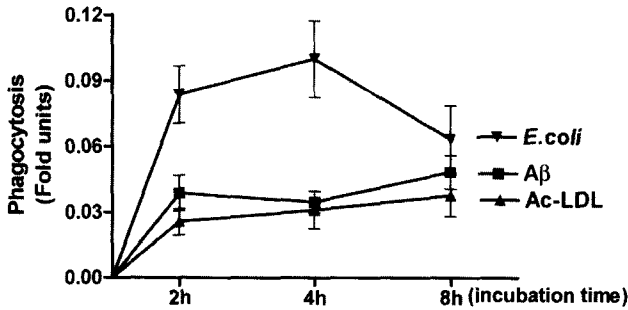


Fig. 2 - Comparison of phagocytosis between Aβ and two other peptides. Absorbance indicated the amount of fluorescent labeled peptides engulfed by microglia at 2, 4, and 8 h incubation time. The values of absorbance were used as baselines to calculate the phagocytosis in the presence of Rg3 as shown in fig. 3A. ODs for each peptide were *E. coli* (480 nm), Aβ1-42 (540 nm), and Ac-LDL (550 nm). Data are presented as mean±SD (n=5).

다(Fig. 1). Fig. 1B에서 Rg3의 용량별 투여 시 소교세포의 MSR type-A(MSRA)의 발현에 영향을 주는 것으로 확인되었고, 따라서 최종 유효용량으로 적용된 50 μg/ml을 Aβ와 복합 투여 시 MSRA의 발현이 증가하여 나타났으며, MSRA ligand인 fucoidan 처리 시 MSRA의 발현이 억제되는 것으로 보아 Rg3가 MSRA의 신호전달 activator로 작용하는 것으로 생각 된다(Fig. 1A). 또한 이와 같은 결과는 Fig. 3에서 MSRA의 발현이 상대적으로 많이 나타남을 형광현미경을 통해 확인할 수 있었으며, 이 때 Rg3에 의한 대식작용은 PCR 결과에서와 같이 증가된 MSRA 발현에 의한 결과임을 추정할 수 있다. Rg3 비처리 상태에서 소교세포에 Cy3-labeled Aβ aggregates를 처리하였을 때 같은 MSRA

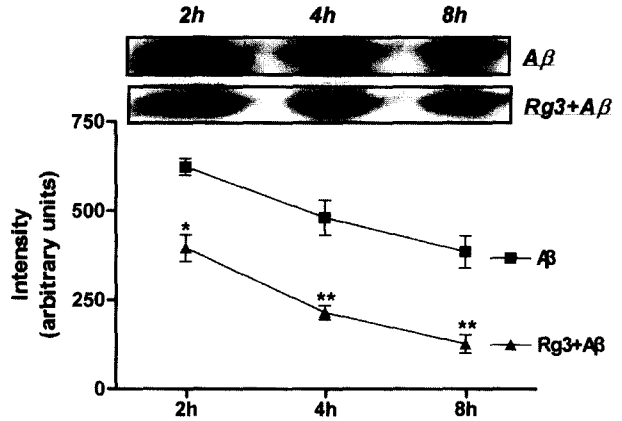


Fig. 4 - Western blot analysis of culture media containing Aβ1-42 peptides. To investigate the effect of Rg3 on phagocytic function, microglia were pretreated with ginsenoside Rg3 for 2, 4, and 8 h, after which Aβ peptides were added for phagocytosis. The developed blots and graphs representing Aβ are gradually decreased in culture media. Moreover, when treated with Rg3, the decrease was faster than that of Aβ single treatment. Data are presented as mean±SD arbitrary unit (n=3). *p < 0.05, **p < 0.01, vs. Aβ single treatment.

수용체를 공유하는 대조군(i.e. Ac-LDL)과 유사한 uptake 패턴을 보였으며, 이와 같은 결과는 시간 비 의존적으로 나타났다(Fig. 2). 반면에, Fig. 3와 같이 Rg3 처리 시 반응 4시간 후에서 대식작용을 의미하는 cell intensity가 가장 높게 나타나 Rg3 투여 시 MSRA 발현증가와 함께 신속한 Aβ uptake가 일어나는 것으로 보이며, 반응 8시간 후에서 cell intensity가 감소하는 것으로 보아 세포내 degradation도 아울러 신속히 일어나는 것으로 판단된다. 일반적으로, AD 뇌에서 고도로 활성화 된 소교세포는 이중효과, 즉 질병의 병리학적측면에서 부정적인 면(e.g. plaque formation, cell injury)과 긍정적인 면(Aβ clearance)이 동시에 존재하고 있으나,¹⁵⁾ AD 발병 초기에서 신속한 Aβ 제거는 AD 질병의 악화를 차단할 수 있을 것이다. 더욱이 panaxadiol계의 세포진정효과를 감안할 때,¹⁰⁾ 동일 계통의 Rg3에 의한 MSRA 증진 및 소교세포 활성화제 등의 이중효과도 기대가 된다(data not shown).

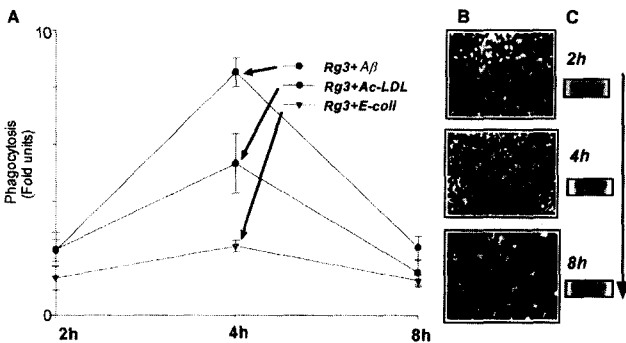


Fig. 3 - (A) Effects of ginsenoside Rg3 on the phagocytic function of microglia. The value in fold units represents phagocytosis in response to Rg3. Rg3 was pretreated for 2, 4, and 8 h before the addition of each peptide. (B) Fluorescent image of microglial cells showing uptake of fluorescent peptides at each incubation time with Rg3. (C) RT-PCR results of MSR-A mRNA. The band density increased during the incubation time that corresponded to the fluorescent images. Data (A) are presented as mean±SD fold units (n=5).

결론

본 연구에서 Rg3가 소교세포에 전 처리 되었을 때, 소교세포의 대식작용이 증진됨을 관찰하였고, 이러한 결과는 다량 발현된 MSRA에 의한 receptor mediated phagocytosis가 주된 역할을 하는 것으로 생각된다. 또한 Rg3가 Aβ의 신속한 세포내 degradation에 효과적인 것으로 사료되며, 이와 같은 결과는 Fig. 4에서 관찰되는 배지내의 Aβ량의 변화 추이에서 확인할 수 있었고, 따라서 Rg3 처리는 정상상태의 소교세포에서 보다 우수한

대식작용의 잠재적 효과를 예측할 수 있다. AD에 있어서 A β 생성과 degradation의 균형이 주요한 병리학적 의미를 가지므로, Rg3에 의한 소교세포의 대식작용 증진과 효율적인 degradation은 A β aggregates의 속도를 늦추어 줄 수 있을 뿐 아니라⁴⁾ 뇌 내에 plaque 형성을 사전에 방지하여 AD의 근본적인 차단하는 후보물질로 가능 할 것이다. 특히 amyloid plaque내에 존재하는 활성화된 소교세포가 섬유성 amyloid 또는 응괴상태의 amyloid를 제거하는 결정적인 역할을 할 수 있으나, AD 뇌에 존재하여 A β 생성, 염증반응, 및 세포독성을 유발하는 부정적인 역할도 예상된다. 하지만 후자의 경우는 소교세포에 의한 A β 의 효과적인 제거가 일어나지 않거나 과량의 A β 가 생성 시 생산-제거의 균형이 깨어질 때 발생될 위험이 매우 높다. 따라서 소교세포의 활성화에 의한 효과적인 A β 의 제거는 AD의 초기 발병에 직간접적으로 영향을 주어 병인원을 제거해주는 중요한 실마리가 될 것이다. 이러한 목적에서, Rg3는 소교세포의 활성화에 따른 MSR-A 발현을 증가시켜 과량의 A β 를 신속히 효과적으로 제거하여 결국 노인반 형성을 차단할 것으로 사료된다. Rg3는 이와 같은 요구 사항을 만족시키는 후보물질로 생각되며, 사전연구에서 panaxadiol계 ginsenoside에서 염증유발인자의 억제가 관찰되어(data in press) Rg3의 향후 AD 치료 및 예방에 많은 과학적 접근이 가능할 것이다. 특히 천연물질의 항알츠하이머 효과는 매우 흥미로운 결과이며, Rg3의 이와 같은 효과에 대한 작용기전에 대해 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Giulian, D., Haverkamp, L. J., Yu, J. H., Karshin, W., Tom, D., Li, J., Kirkpatrick, J., Kuo, Y. M. and Roher, A. E. : Specific domains of β -amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J. Neurosci.* **16**, 6012 (1996).
- Edelstein-keshet, L. and Spiros, A. : Exploring the formation of Alzheimer's disease senile plaques in silico. *J. Theor. Biol.* **216**, 301 (2002).
- Kim, S. H., Lah, J. J., Thinakaran, G., Levey, A. and Sisodia, S. S. : Subcellular localization of presenilin: association with a unique membrane pool in cultured cells. *Neurobiol. Dis.* **7**, 99 (2000).
- Paresce, D. M., Chung, H. and Maxfield, F. R. : Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglia. *J. Biol. Chem.* **272**, 29390 (1997).
- Krieger, M. and Herz, J. : Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 601 (1994).
- Chung, H., Brazil, M. I., Soe, T. T. and Maxfield, F. R. : Uptake, degradation, and release of fibrillar and soluble forms of Alzheimer's amyloid beta-peptide by microglia. *J. Biol. Chem.* **274**, 32301 (1999).
- Rogers, J., Strohmeier, R., Kovelowski, C. J. and Li, R. : Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid peptide. *Glia* **40**, 260 (2002).
- Tsang, D., Yeung, H. W., Tso, W. W. and Peck, H. : Ginseng saponins: Influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. *Planta Med.* **3**, 221224 (1985).
- Wagner, H., Norr, H. and Winterhoff, H. : Plant adaptogens. *Phytomedicine* **1**, 63 (1994).
- Shibata, S. : Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds. *J. Korean Med. Sci.* **16**, S28 (2001).
- Singh, V. K., Agarwal, S. S. and Gupta, B. M. : Immunomodulatory activity of Panax ginseng extract. *Planta Med.* **50**, 462 (1984).
- Oh, G. S., Pae, H. O., Choi, B. M., Seo, E. A., Kim, D. H., Shin, M. K., Kim, J. D., Kim, J. B. and Chung, H. T. : 20(S)-Protopanaxatriol, one of ginsenoside metabolites, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions through inactivation of nuclear factor-kappaB in RAW 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Cancer Lett.* **205**, 23 (2004).
- Kim, D. H., Moon, Y. S., Lee, T. H., Jung, J. S., Suh, H. W. and Song, D. K. : The inhibitory effect of ginseng saponins on the stress-induced plasma interleukin-6 level in mice. *Neurosci Lett.* **353**, 13 (2003).
- Joo, S. S., Kang, H. C., Won, T. J. and Lee, D. I. : Ursodeoxycholic acid inhibits pro-inflammatory repertoires, IL-1 β and nitric oxide in rat microglia. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 1067 (2003).
- Wisniewski, H. M., Vorbrodt, A. W., Wegiel, J., Morys, J. and Lossinsky, A. S. : Ultrastructure of the cells forming amyloid fibers in Alzheimer disease and scrapie. *Am. J. Med. Genet.* **7**, 287 (1990).