

인삼사포닌에 의한 대식세포 일산화질소 생성 유도

김지연 · 이화진 · 김지선 · 안한나 · 류재하[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received January 6, 2005; Revised February 14, 2005)

A Ginseng Saponin Induces Production of Nitric Oxide in Macrophages

Ji Yeon Kim, Hwa Jin Lee, Ji Sun Kim, Hanna Ahn and Jae-Ha Ryu[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — Ginseng root is an important remedy in oriental countries, which has been used for thousands of years. Saponins of ginseng root has been known to be the major component which mediate diverse pharmacological actions of the ginseng. Heat processing of ginseng root potentiates its biological activity such as anti-tumor and anti-oxidative activities. The butanol fraction of heat-processed ginseng (HGB) induced the production of nitric oxide in macrophages in a dose-dependent manner with IFN- γ (30 U/ml) priming. The active component was identified as ginsenoside-Rg₅ from the activity-guided purification. Ginsenoside Rg₅ is one of major components of heat-processed ginseng and red ginseng that is responsible for the potentiated biological activities of processed ginseng. The induction of NO production by heat-processed ginseng might contribute to the potentiated biological activity of heat-processed ginseng.

Keywords □ nitric oxide, heat processing, ginseng, saponin

인삼(*Panax ginseng*)은 수 천년 동안 사용되어 온 대표적인 한 약제의 하나이다. 다양한 약리학적 연구를 통하여 인삼의 생리 활성과 그 기전이 연구되어 보고 되고 있다. 일반적으로 인삼의 약리활성을 나타내는 대표적인 성분은 인삼사포닌으로 알려져 있으며, 이들의 생리활성은 항염활성, 항산화활성, 항암활성, 항알러지활성 및 항위궤양활성 등으로 보고 되었다.¹⁻³⁾ 최근 수삼에서는 발견되지 않는 홍삼의 특이 성분들의 약리활성이 알려지면서 홍삼과 유사한 약리활성을 가지는 인삼을 제조하기 위한 다양한 가공 방법이 개발되고 있다. 열처리 또는 발효 등의 가공 과정을 통하여 인삼사포닌 구조에서 당의 일부가 가수분해 되어 제거 되거나, 탈수반응에 의해 이중결합이 추가로 생성된 새로운 구조의 사포닌이 다수 보고 되고 있다.^{4,5)} 인삼의 열처리에 의하여 강화된 대표적인 생리활성은 내피의존성 relaxation,⁴⁾ 항산화 및 항암활성 등이며,⁶⁾ 이들 활성의 강화는 열에 의하여 구조가 변형된 사포닌에 의한 것으로 알려졌다. 인삼의 열처리에 의해 강화된 항암활성의 기전 및 활성의 본체를 확인하기 위하여,

본 연구에서는 열처리 인삼의 사포닌이 대식세포를 활성화함으로써 일산화질소(nitric oxide, NO)의 생성을 유도하여 면역활성에 영향을 미칠 수 있을 가능성을 검토하였다.

일산화질소(NO)는 저분자 라디칼로서 신경신호전달기능, 혈액응고 및 혈압조절기능 및 암세포에 대항하는 면역기능 등의 역할이 알려지고 있다. NO는 일산화질소생성효소(nitric oxide synthase; NOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성되며 세 가지 종류의 NOS가 알려져있다. 정상적인 생리적 기능을 위한 NO 생성을 담당하는 constitutive NOS(cNOS)는 신경조직(type I, neuronal NOS: nNOS)과 내피세포(type III, endothelial NOS: eNOS)에서 발현되며, 이들은 Ca²⁺ 의존성이고 비교적 소량의 NO를 생성하는 효소이다.⁷⁾ 한편, 유도형 NOS(type II, inducible NOS: iNOS)는 Ca²⁺ 의존성이 없으며, 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 일단 유도되면 장시간 동안 대량의 NO를 생성한다.⁸⁾ 이와 같은 iNOS는 외부상처에 대한 반응 및 염증 같은 면역방어기전의 다양한 과정을 매개하는 사이토카인인 interleukin 1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α) 또는 염증원인 내독소(lipopolysaccharide: LPS) 등에 의해 유도되고 glucocorticoid류에 의해 그 효소의 유도가 저해되는 것으로 알려져있다. 이와 같이 활성화된 대식세포에 의해 합성되는 NO는 면역계를 활성화

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9568 (팩스) 02-714-0745
(E-mail) ryuha@sookmyung.ac.kr

하고 항바이러스 및 항암활성을 발휘하는 중요한 신호물질의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{9,10)}

최근 식물에서 분리된 저분자 유기화합물들이 NO를 생성하는 신호전달과정에 관여한다는 다양한 예들이 보고 되었다.¹¹⁾ 대식세포 배양계에서 NO 합성효소를 유도하는 물질로는 다양한 식물의 다당체와 glycyrrhetic acid 또는 ursolic acid와 같은 terpene 구조를 가진 화합물들이 알려져 있다.^{12,13)} 인삼의 다당체도 대식세포에서 nuclear factor kappaB(NF- κ B)의 활성화를 통하여 NO 합성을 유도함으로써 면역증강작용을 나타내는 것이 보고 되었다.¹⁴⁾ 인삼사포닌은 ursolic acid처럼 스테로이드 모핵과 유사한 구조를 가지고 있으므로, 열처리 인삼에 의한 항암활성의 강도가 인삼사포닌에 의한 NO 생성의 유도에 기인할 가능성이 있을 것으로 가정하고 본 연구를 수행하였다.

실험 방법

실험기기 및 시약

추출물의 제조 및 성분분리를 위한 용매들은 시약용을, HPLC를 위해서는 HPLC용 용매를 각각 사용하였다. 성분분리를 위해서 사용한 TLC판은 Kieselgel F₂₅₄(ART 5715, Merck)를 컬럼 크로마토그래피를 위해서는 Kieselgel 60(particle size 230~400 mesh ASTM, Merck)을 사용하였다. HPLC는 Jasco사의 PU-986 모델과 UV-975 검출기를 사용하였다. 핵자기공명스펙트럼은 Varian INOVA 400(400 MHz)에서 tetramethylsilane을 내부 표준물질로, pyridine-*d*₅를 용매로 사용하여 측정하였으며, chemical shift는 δ 단위로, coupling constant는 Hz 단위로 각각 표시하였다. 적외선스펙트럼은 Jasco FT/IR-430을 사용하여 측정하였고, frequency는 cm⁻¹로 표시하였다. 질량스펙트럼은 JMS AX505WA를 사용하여 EI 및 FAB mode로 측정하였다. 용점은 Buchi 사의 B-545를 사용하여 측정하였으며 보정하지 않았다.

세포배양 및 nitric oxide(NO) 측정실험에서는, 배양액으로 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)은 Gibco Laboratories(Detroit, MI)에서, LPS(*Escherichia coli*, 0127:B8), bovine serum albumin, sodium nitrite, N-(1-naphthyl) ethylenediamine, polymyxin B, pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC)은 Sigma사(St. Louis, MO)에서 구입하였다. ELISA 판독기는 Dynatech사의 MR 5000 모델을 사용하였다.

추출 및 분리

실험에 사용한 인삼은 서울 경동시장에서 구입한 수삼(2.5 kg)을 120°C에서 2시간씩 2회 열처리 하여 공기 중에서 건조하였다. 열처리 인삼(266 g)을 메탄올로 환류냉각하면서 3회 추출하고 감압 하에서 농축하여 추출물(145 g)을 얻었다. 메탄올 추출물을 물에 분산하고 ether 로 추출하여 ether 가용분획(76 g)을

얻고, 계속하여 물층을 물로 포화된 *n*-BuOH을 이용하여 추출하여 BuOH 가용분획(총사포닌분획, 45 g)과 최종 물분획으로 나누어 각각에 대한 NO 생성활성을 검정하였다.

NO 생성유도활성이 관찰된 BuOH 가용분획(HGB) 20 g에 대하여 CH₂Cl₂ : MeOH (7 : 1→5 : 1→3 : 1) 을 이동상으로 극성을 증가시키면서 실리카겔 컬럼크로마토그래피하여 4개의 분획(F1: 3.8 g, F2: 2.9 g, F3: 8.1 g, F4: 1.8 g)을 얻었다. 그 중 활성이 강한 F2 분획을 CH₃CN-H₂O의 이동상 조건으로 역상 컬럼크로마토그래피(RP-18, 13~40 μ m particle size)한 후, CH₃CN-H₂O(51 : 49)를 이동상으로 semi-preparative HPLC(μ -Bondapak C18 컬럼, Waters, 10×300 mm, 204 nm UV 검출)를 이용하여 활성성분 compound 1(18 mg)을 분리하였다.

Compound 1 [ginsenoside-Rg₅, (20*E*)-3 β ,12 β -dihydroxydammar-20(22), 24-diene-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1→2)- β -D-glucopyranoside], white powder(MeOH); mp 189°C~192°C; $[\alpha]_D^{22} + 6.09^\circ$ (c=0.43, MeOH); FAB MASS(m/z) 789[M+Na]⁺; IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹ 3400(OH), 2900(CH), 1630(C=C), 1080(C-O); ¹H-NMR(400 MHz, pyridine-*d*₅) δ 0.88~1.81(8×CH₃), 2.79(2H, dd, *J*=7.1, 6.9 Hz, H-23), 3.27(1H, dd, *J*=11.9, 4.6 Hz, H-3), 3.90(1H, brs, H-12), 4.10(1H, dd like, H-2"), 4.21(1H, dd like, H-2'), 4.90(1H, d, *J*=7.8 Hz, H-1'), 5.21(1H, tq, *J*=7.1, 1.4 Hz, H-24), 5.33(1H, d, *J*=7.5 Hz, H-1"), 5.49(1H, t, *J*=6.9 Hz, H-22); ¹³C-NMR(100 MHz, pyridine-*d*₅) δ 13.15(C-21), 15.79(C-29), 16.43(C-18), 16.58(C-19), 16.70(C-30), 17.70(C-27), 18.41(C-6), 25.68(C-26), 26.73(C-16), 27.44(C-23), 28.10(C-2), 28.82(C-28), 32.22(C-11), 32.61(C-15), 35.31(C-7), 37.00(C-10), 39.24(C-1), 39.69(C-8), 40.22(C-4), 50.43(C-13), 50.74(C-9), 50.88(C-17), 51.00(C-14), 56.36(C-5), 62.67(C-6"), 62.83(C-6'), 71.61(C-4', 4"), 72.55(C-12), 77.16(C-5'), 77.95(C-2"), 78.13(C-5"), 78.28(C-3"), 78.33(C-3'), 83.45(C-2'), 88.89(C-3), 105.13(C-1"), 106.06(C-1'), 123.89(C-22), 124.95(C-24), 131.24(C-25), 140.12(C-20).

RAW 264.7 세포의 배양 및 시료의 처리

대식세포계열의 RAW 264.7 세포주는 American Type Culture Collection(Rockville, Maryland, USA)에서 구입하여 사용하였으며, DMEM을 배양액(10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, penicillin 100 U/ml 및 streptomycin 10 μ g/ml 포함)으로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고 1주일에 2번 세대 배양하여 유지하였다. RAW 264.7 세포주를 10% FBS DMEM으로 2×10⁵ cell/ml로 하여 24 well plate에 1 ml씩 분주하여 2시간 동안 부착시키고 FBS가 함유되지 않은 새로운 DMEM 배지로 교환한 다음 시료를 처리하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 20시간 배양한 후 각 well의 배양액으로 유리된 NO

를 측정하였다.

Griess 시약을 이용한 NO의 정량

RAW 264.7 세포주의 배양액 100 μ l를 96 well plate에 취하고 Griess 시약(2.5% H_3PO_4 , 1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylenediamine 용액) 150 μ l를 가하고 10분 동안 반응시킨 다음 ELISA 판독기로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁵⁾ 표준 검량선을 작성하기 위하여 sodium nitrite를 NO_2 의 표준품으로 사용하였다.

결과 및 고찰

대식세포는 염증 등과 같은 상태에서 T 세포에 의해 생성된 IFN- γ 의 priming 신호에 의해 휴지상태에서 활성화된 상태로 전환된다. 이 과정은 NO 또는 각종 염증성 사이토카인들의 생성을 매개하여 항균 및 항암활성을 발휘할 수 있도록 한다.¹⁶⁾ 그런데 대식세포의 완전한 활성화를 위해서는 IFN- γ 에 의한 priming에 이어서 lipopolysaccharide(LPS) 또는 TNF- α 에 의한 triggering이 뒤따라야한다. 예비실험에서 IFN- γ 의 농도를 고정하고 LPS의 농도를 변화시키거나, LPS의 농도를 고정하고 IFN- γ 의 농도를 변화시키면서, LPS와 IFN- γ 를 단독 및 병용하여 대식세포에 처리하여 20시간 배양한 후 NO의 생성량을 평가하였다. 그 결과 LPS 또는 IFN- γ 의 단독 처리에 의한 NO 생성농도가 낮고,

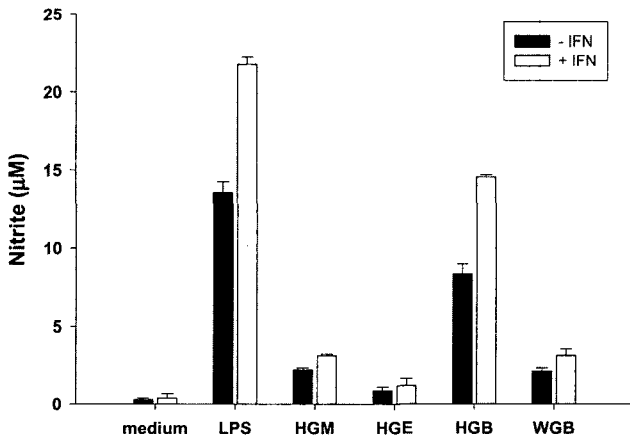


Fig. 1 – Effects of solvent fractions of heat-processed ginseng on the NO synthesis. RAW 264.7 cells (2×10^5 /well) were treated for 20 h with solvent fractions prepared from the extracts of heat-processed ginseng (100 μ g/ml) with or without IFN- γ priming (30 U/ml). NO released into cell culture medium was measured by Griess reagent as nitrite form. Data represents the mean \pm SD of three independent treatments. Medium: medium control, LPS: lipopolysaccharide (10 ng/ml), HGM, HGE, HGB: methanol, ether, butanol fraction of heat-processed ginseng, WGB: butanol fraction of white ginseng, respectively.

병용 투여 시 NO 생성농도가 높은 조건인 10 ng/ml LPS 및 30 U/ml IFN- γ 를 가장 적합한 대식세포의 NO 생성유도를 위한 실험조건으로 본 연구에 적용하였다.

열처리 인삼으로부터 얻은 메탄올추출물과 ether 및 BuOH 가용분획의 NO 생성유도활성을 평가하기 위하여 분획 단독 또는 IFN- γ 와 병용처리 한 후, 대식세포로부터 생성된 NO의 생성량을 Fig. 1에 나타내었다. 대부분의 인삼사포닌이 포함된 BuOH 분획(HGB)으로 NO 생성유도활성이 집중되었으며, 100 μ g/ml의 농도에서 BuOH 가용분획 단독의 경우 8.32 ± 0.65 μ M의 NO가 생성된 반면, IFN- γ (30 U/ml)와 병용처리하였을 때 14.54 ± 0.12 μ M의 NO가 생성되었다. 한편 백삼으로부터 제조한 BuOH 가용분획(WGB)은 100 μ g/ml 농도에서 NO 생성을 유도하는 활성이 관찰되지 않았다. HGB는 열처리에 의해 구조가 변화되어 생성되는 사포닌으로 알려진 ginsenoside-F₄, Rg₃, Rg₅ 및 Rk₁ 등을 함유하는 것을 HPLC 분석으로 확인하였다. RAW 264.7 세포에서 IFN- γ 와 병용처리에 의한 HGB의 NO 생성유도활성은 10, 50, 100 μ g/ml 농도범위에서 농도 의존적으로 증가하였으며 (Fig. 2), MTT법으로 평가한 결과 이 농도에서 사용한 RAW 264.7 세포에 대한 독성은 관찰되지 않았다.

HGB에 의한 NO 생성유도에 대한 시간 의존성을 Fig. 3에 나타내었다. 10시간 처리 시점부터 급격하게 NO 생성이 증가되어 18시간에 최대점에 이르고 더 이상 증가하지 않았다. NO의 양은 시료와 IFN- γ 에 의해 자극된 세포에 의해 생성되어 세포배양액에 축적된 양을 측정된 것이다. Fig. 4는 HGB와 LPS를 각각 IFN- γ 와 동시에 처리하면서 RAW 264.7 세포를 활성화시킬 때, pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC, 100 μ M)와 polymyxin B

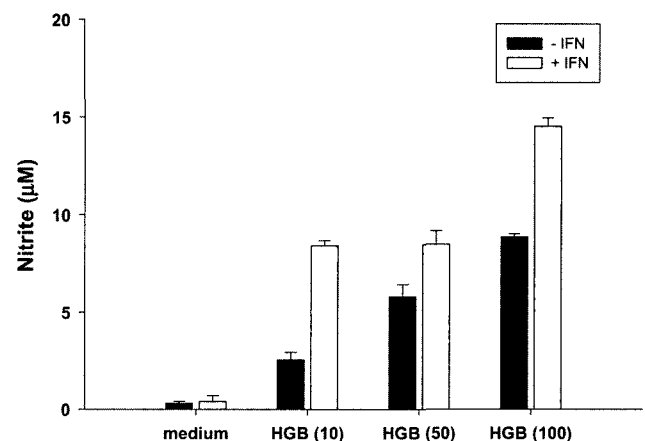


Fig. 2 – Dose dependent induction of NO synthesis by butanol fraction of heat-processed ginseng. RAW 264.7 cells (2×10^5 /well) were treated for 20 h with butanol fraction of heat-processed ginseng (HGB in μ g/ml) with or without IFN- γ priming (30 U/ml). NO released into cell culture medium was measured by Griess reagent as nitrite form. Data represents the mean \pm SD of three independent treatments.

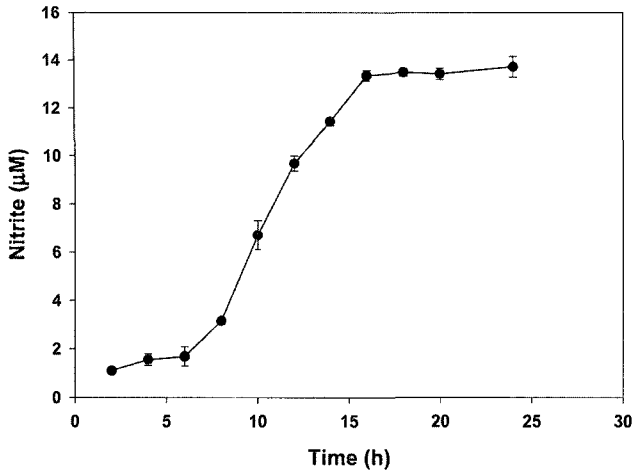


Fig. 3 – Time dependent induction of NO synthesis by butanol fraction of heat-processed ginseng. RAW 264.7 cells (2×10^5 /well) were treated for 20 h with butanol fraction of heat-processed ginseng (HGB, 100 µg/ml) with IFN- γ priming (30 U/ml). NO released into cell culture medium was measured by Griess reagent as nitrite form. Data represents the mean \pm SD of three independent treatments.

(PMX, 1 µM)의 영향을 나타내고 있다. PDTc는 HGB와 LPS에 의한 NO 생성유도를 모두 강력하게 억제하였으며, polymyxin B는 LPS에 의한 NO 생성유도는 50% 정도 억제하였으나 HGB에 의한 NO 생성유도활성에 대해서는 유의성 있는 저해를 하지 못하였다. 이와 같은 결과로부터 인삼의 NO 생성 유도활성은 NF- κ B를 경유할 것으로 예상되며, LPS와는 다른 기전일 것으로

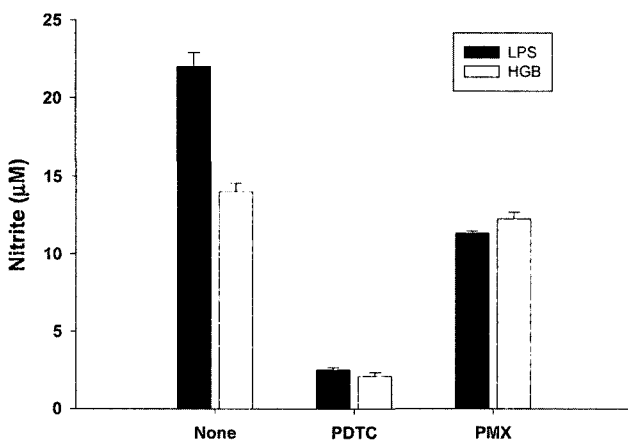


Fig. 4 – The effects of NO synthesis by butanol fraction of heat-processed ginseng by the treatment of PDTc and polymyxin B. RAW 264.7 cells (2×10^5 /well) were treated for 20 h with butanol fraction of heat-processed ginseng (HGB, 100 µg/ml) or LPS (10 ng/ml) with IFN- γ priming (30 U/ml) in the presence of PDTc (100 µM) or polymyxin B (PMX, 1 µM). NO released into cell culture medium was measured by Griess reagent as nitrite form. Data represents the mean \pm SD of three independent treatments.

사료된다.

열처리 인삼으로 부터 NO 생성유도활성을 가진 성분을 확인하기 위하여 활성을 추적하면서 성분분리를 시도하여 세 개의 활성분획을 확인하였으며, 그 중 활성이 가장 우수한 분획으로부터 활성성분 하나를 분리하였다. 분리된 compound 1은 실리카겔 TLC상에서 10% 황산에 의해 자색으로 발색이 되는 물질로써, FAB MASS 스펙트럼에서 m/z 789 $[M+Na]^+$ 로서 분자량을 766으로 확인하였다. 1H -NMR 스펙트럼에서 δ 3.27(dd, $J=11.9, 4.6$ Hz)에서 H-3이 관찰되는 전형적인 diol계 사포닌으로 추정되었다. 또한 δ 4.90(d, $J=7.8$ Hz)과 δ 5.33(d, $J=7.5$ Hz)에서 두 개의 anomeric 수소 피크가 관찰됨으로써 이 화합물의 구조는 두 개의 당이 결합된 diol계 사포닌으로 추정할 수 있었고 8개의 메틸기들은 δ 0.88과 δ 1.81 사이에서 관찰되었다. 그러나 일반적으로 두 분자의 당이 결합된 diol계 사포닌의 분자량이 784인 반면 compound 1은 MASS 스펙트럼결과로 보아 그 분자량이 766으로서 물이 한 분자 탈수되어, 일반적인 인삼사포닌의 이중결합 위치인 C-24와 C-25 사이의 위치 이외에 또 다른 이중결합이 존재할 것으로 추정할 수 있었다. 1H -NMR 스펙트럼에서 이중결합성 수소들의 유형이 일반적인 diol계 사포닌과는 다른 것을 관찰할 수 있었는데, δ 5.49(t, $J=6.9$ Hz, H-22)와 δ 5.21(tq, $J=7.1, 1.4$ Hz, H-24)에서 이중결합성 수소피크가 관찰되었고, H-23에 해당하는 피크가 δ 2.79에서 관찰되었다. 이것은 김 등이¹⁷⁾ 제시한 20번과 22번 사이에 이중결합이 추가로 존재하는 ginsenoside-Rh₃의 페턴과 매우 유사하였다. 또한 이중결합 주위

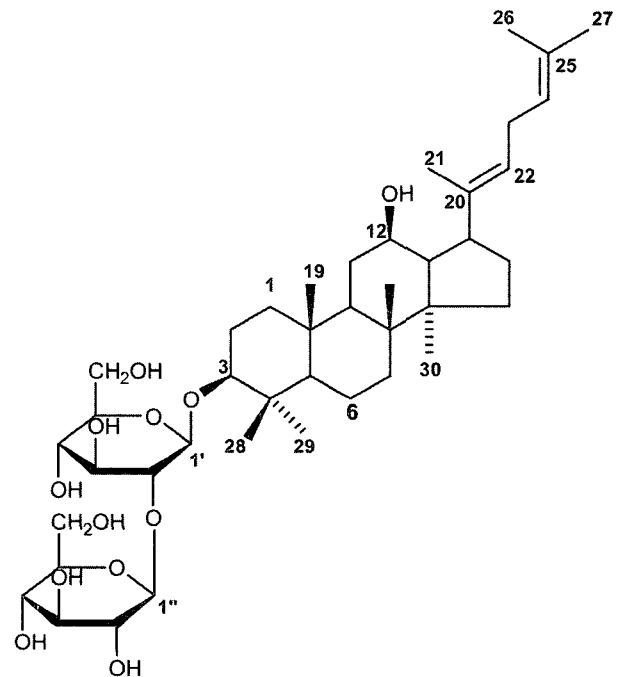


Fig. 5 – Chemical structure of ginsenoside-Rg₅.

의 입체구조가 Zusammen인 경우에는 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 H-22와 H-24의 피크가 각각 δ 5.14 및 δ 5.12 에서 관찰되는 반면, compound 1은 δ 5.49 및 δ 5.21에서 각각 관찰됨으로서 이중결합 주위의 입체구조가 Entgegen으로 추정되었다.¹⁷⁾ H-23의 피크(δ 2.79)가 δ 5.49(H-22) 및 δ 5.22(H-24)와 동시에 coupling 하는 것을 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 스펙트럼에서도 확인하였다. $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 δ 106.06과 δ 105.13에서 두 개의 anomeric 탄소와 δ 88.89에서 C-3을 확인함으로써 3번에 당이 두 분자 결합된 전형적인 diol계 사포닌임을 확인할 수 있었다. 또한 전반적인 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼이 diol계 사포닌인 ginsenoside-Rg₃와 유사하였으나, DEPT 스펙트럼에서 관찰한 두 개의 이중결합성 methine성 탄소(δ 123.89과 δ 124.95)를 포함한 4개의 이중결합성 탄소를 확인함으로써 20번과 22번 사이에 이중결합을 가지는 ginsenoside-Rh₃의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼 양상과 매우 유사하였다. 한편 20번과 22번 사이의 이중결합 주변의 입체구조역시 ginsenoside-Rh₃와 같이 Entgegen인 것을 δ 13.15(C-21) 위치의 메틸기의 탄소로부터 확인할 수 있었다. 이상의 NMR 스펙트럼의 분석 결과 compound 1은 ginsenoside-Rg₅에서 C-20과 C-22 사이에서 물이 한 분자 탈수되어 생긴 화합물로 인 ginsenoside-Rg₅ [(20E)-3 β ,12 β -dihydroxy-dammar-20(22),24-diene-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside]로 최종 확인하였다. Compound 1을 IFN- γ (30 U/ml)와 같이 대식세포에 20시간 처리한 결과 0.1~100 μM 까지의 농도범위에서 농도의존적으로 NO 합성이 유도되었다(Fig. 6). 이 처리한 농도에서 compound 1은 세포에 대한 독성이 없음을 MTT 결과로부터 확인하였다. 열처리 인삼으로 부터 ginsenoside-Rg₅의 존재가 보고 된 바 있으

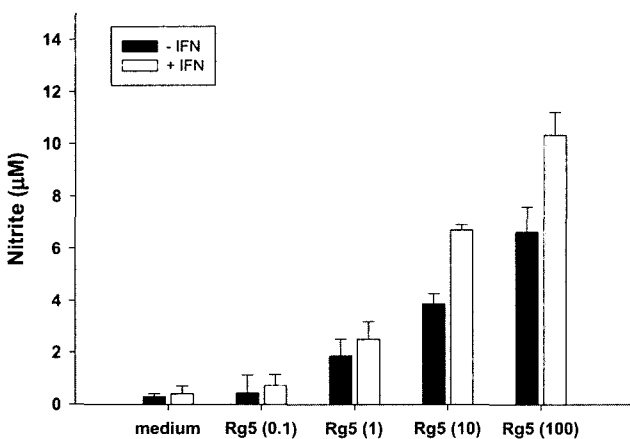


Fig. 6 - Dose dependent induction of NO synthesis by ginsenoside-Rg₅ purified from heat-processed ginseng. RAW 264.7 cells (2×10^5 /well) were treated for 20 h with ginsenoside-Rg₅ (Rg₅ in μM) with or without IFN- γ priming (30 U/ml). NO released into cell culture medium was measured by Griess reagent as nitrite form. Data represents the mean \pm SD of three independent treatments.

며¹⁸⁾ 이 화합물은 항암활성,¹⁹⁾ 간암세포의 세포주기를 정지하는 활성이 있는 것으로 보고 되었다.²⁰⁾ 열처리에 의하여 인삼은 항암 활성 및 항산화 활성이 강화되는 것으로 연구 보고 되었으며,^{6,21)} 본 연구에서의 결과와 같이 NO 생성유도활성이 열처리 인삼에 의한 강화된 항암활성을 설명할 수 있는 하나의 기전이 될 수 있을 것으로 사료된다. NO 생성의 유도가 암의 치료에 유용한 방편이 된다는 다양한 증거가 제시되어 보고 되었다. 채장암의 경우 암세포에서 iNOS의 발현정도와 암세포의 사멸 및 환자의 생존율과 밀접한 관련성이 있으며,²²⁾ taxol도 IFN- γ 와 같이 처리할 때 대식세포를 활성화하여 iNOS를 유도하고, 합성된 NO가 암세포를 사멸하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.²³⁾ 최근 특별하게 고안된 promotor를 이용하여 iNOS의 발현을 조절하거나,²⁴⁾ iNOS 표현형 세포를 마이크로 캡슐형태로 암세포에 송달하는 기법²⁵⁾ 등이 개발되고 있다.

결론적으로 열처리 인삼의 사포닌은 IFN- γ 에 의해 priming된 대식세포에서 NO 합성을 유도하며, 이 과정은 PDTC에 의해 저해되고 LPS와는 다르게 polymyxin B에 의해서는 영향을 받지 않았다. 이와 같은 열처리 인삼사포닌에 의한 NO 합성유도는 백삼에는 존재하지 않는 고유한 성분에 의한 효과이며, 그 대표적인 성분으로 ginsenoside-Rg₅에 의한 활성임을 확인하였다. NO 생성유도활성은 열처리 인삼의 항암효과를 강화시킬 수 있는 기전의 하나일 수 있으며 그 자세한 작용 기전에 대한 연구는 앞으로 계속 진행되어야 할 것이다.

결론

인삼을 열처리하여 알코올 추출한 후 제조한 사포닌 분획은 항암활성 및 항산화활성 등이 강화되는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 강화된 생리활성은 열처리에 의해 새롭게 생성되는 사포닌 성분에 의한 것이다. 열처리 인삼의 사포닌분획을 IFN- γ 와 함께 대식세포에 처리한 결과 10~100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위에서 농도 의존적으로 nitric oxide의 생성이 유도되었다. 활성성분을 확인한 결과 열처리에 의해 새롭게 생성되는 인삼사포닌의 일종인 ginsenoside-Rg₅에 의한 것임을 확인하였다. Ginsenoside-Rg₅를 100 μM 농도로 30 U/ml의 IFN- γ 와 같이 대식세포에 20시간 처리하였을 때 세포배양액에 측정된 nitric oxide의 농도는 $10.03 \pm 0.88 \mu\text{M}$ 이었다. 열처리 인삼의 사포닌이 대식세포를 활성화하고, 이에 따른 nitric oxide의 생성유도는 강화된 항암활성에 기여하는 하나의 작용 기전일 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2004년도 교비연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

문헌

- 1) Otsuka, H., Komiya, T., Fujioka, S., Goto, M., Hiramatsu, Y. and Fujimura, H. : Studies on anti-inflammatory agents. IV. Anti-inflammatory constituents from roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Yakugaku Zasshi* (in Japanese) **101**, 1113 (1981).
- 2) Chang, Y. S., Seo, E. K., Gyllenhaal, C. and Block, K. I. : *Panax ginseng*: a role in cancer therapy? *Integr. Cancer. Ther.* **2**, 13 (2003).
- 3) Park, E. K., Choo, M. K., Kim, E. J., Han, M. J. and Kim, D. H. : Antiallergic activity of ginsenoside Rh₂. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 1581 (2003).
- 4) Kim, W. Y., Kim, J. M., Han, S. B., Lee, S. K., Kim, N. D., Park, M. K., Kim, C. K. and Park, J. H. : Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J. Nat. Prod.* **63**, 1702 (2000).
- 5) Ryu, J.-H., Park, J.-H., Eun, J.-H., Jung, J.-H. and Sohn, D. H. : A dammarane glycoside from Korean red ginseng. *Phytochemistry* **44**, 931 (1997).
- 6) Keum, Y. S., Park, K. K., Lee, J. M., Chun, K. S., Park, J. H., Lee, S. K., Kwon, H. and Surh, Y. J. : Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol extract of heat-processed ginseng. *Cancer Lett.* **150**, 41 (2000).
- 7) Bredt, D. S. and Snyder, S. H. : Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 682 (1990).
- 8) Lowenstein, C. J., Glatt, C. S., Bredt, D. S. and Snyder, S. H. : Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6711 (1992).
- 9) Knowles, R. G., Salter, M., Brooks, S. L. and Moncada, S. : Anti-inflammatory glucocorticoids induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 1042 (1990).
- 10) Rees, D. D., Cellek, S., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. : Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effect on vascular tone: an insight into endotoxic shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 541 (1990).
- 11) Achike, F. I. and Kwan, C. Y. : Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signaling pathway. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **30**, 605 (2003).
- 12) Jeong, H. G. and Kim, J. Y. : Induction of inducible nitric oxide synthase expression by 18 β -glycyrrhetic acid in macrophages. *FEBS Lett.* **513**, 208 (2002).
- 13) You, H. J., Choi, C. Y., Kim, J. Y., Park, S. J., Hahm, K. S. and Jeong, H. G. : Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor- κ B activation in the resting macrophages. *FEBS Lett.* **509**, 156 (2001).
- 14) Shin, J. Y., Song, J. Y., Yun, Y. S., Yang, H. O., Rhee, D. K. and Pyo, S. : Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **24**, 469 (2002).
- 15) Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. : Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131 (1982).
- 16) Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. : Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109 (1991).
- 17) Kim, D. S., Baek, N. I., Park, D. J., Lee, Y. H., Jeong, S. Y., Lee, B. C. and Kim, S. I. : Preparation and structure determination of a new glycoside, (20E)-ginsenoside Rh₃, and its isomer from diol-type ginseng saponins. *Yakhak Hoeji* **39**, 85 (1995).
- 18) Kim, S. I., Park, J. H., Ryu, J.-H., Park, J. D., Lee, Y. H., Park, J. H., Kim, T. H., Kim, J. M. and Baek, N. I. : Ginsenoside Rg₅, A genuine dammarane glycoside from Korean red ginseng. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 551 (1996).
- 19) Yun, T. K., Lee, Y. S., Lee, Y. H., Kim, S. I. and Yun, H. Y. : Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C.A. Meyer and identification of active compounds. *J. Korean Med. Sci.* **16**, S6 (2001).
- 20) Lee, K. Y., Lee, Y. H., Kim, S. I., Park, J. H. and Lee, S. K. : Ginsenoside-Rg₅ suppresses cyclin E-dependent protein kinase activity via up-regulating p21Cip/WAF1 and down-regulating cyclin E in SK-HEP-1 cells. *Anticancer Res.* **17**, 1067 (1997).
- 21) Surh, Y. J., Na, H. K., Lee, J. Y. and Keum, Y. S. : Molecular mechanisms underlying anti-tumor promoting activities of heat-processed *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J. Korean Med. Sci.* **16**, S38 (2001).
- 22) Kong, G., Kim, E. K., Kim, W. S., Lee, Y. W., Lee, J. K., Paik, S. W., Rhee, J. C., Choi, K. W. and Lee, K. T. : Inducible nitric oxide synthase (iNOS) immunoreactivity and its relationship to cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, clinicopathologic characteristics, and patient survival in pancreatic cancer. *Int. J. Pancreatol.* **29**, 133 (2001).
- 23) Manthey, C. L., Perera, P. Y., Salkowski, C. A. and Vogel, S. N. : Taxol provides a second signal for murine macrophage tumoricidal activity. *J. Immunol.* **152**, 825 (1994).
- 24) Worthington, J., McCarthy, H. O., Barrett, E., Adams, C., Robson, T. and Hirst, D. G. : Use of the radiation-inducible WAF1 promoter to drive iNOS gene therapy as a novel anti-cancer treatment. *J. Gene Med.* **6**, 673 (2004).
- 25) Xu, W., Liu, L. and Charles, I. G. : Microencapsulated iNOS-expressing cells cause tumor suppression in mice. *FASEB J.* **16**, 213 (2002).