

RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 염증에 대한 백삼, 홍삼, 발효홍삼의 항염효과에 대한 비교 연구

현미선¹ · 허정무² · 신용서² · 손봉준² · 문연자¹ · 우원홍^{1*}

¹원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, ²종근당건강(주)

Comparison Study of White Ginseng, Red Ginseng, and Fermented Red Ginseng on the Protective Effect of LPS-induced Inflammation in RAW 264.7 Cells

Mee-Sun Hyun¹, Jung-Mu Hur², Yong-Seo Shin², Bong-Joon Song², Yeun-Ja Mun¹, and Won-Hong Woo^{1*}

¹Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

²Chong Kun Dang Healthcare Crop. Research Center, Dangjin-gun, Chungnam 343-827, Korea

Received January 14, 2009; Accepted February 9, 2009

Red ginseng (RG) and fermented red ginseng (FRG) are produced from ginseng (GS) via certain biological processes. The main difference between three ginsengs is the composition of ginsenosides known as major metabolites having several biological activities. The concentration of the metabolites has been known to be dependent on the methods which make RG and FRG. In this study, we investigated the effects of WG, RG and FRG on the productions of inflammatory proteins (NF-κB, iNOS, COX-2) and cytokines (TNF-α, INF-γ) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The levels of NO production and iNOS expression were suppressed by the treatment of white ginseng (WG), RG and FRG in LPS-stimulated cells. Also, the production of TNF-α and INF-γ was decreased in the cells by all of them. It was indicated that the inhibition of NF-κB activation in LPS-stimulated cells treated with three kinds of ginsengs was resulted from the suppression of the level of COX-2 expression and the phosphorylation of IκB by LPS. The present study indicated that RG showed the best biological activity among them and FRG was better than WG. The better activity of RG on the inhibition of NO production is considered to be caused by the difference of ginsenoside composition produced during their preparations. In order to elucidate the mechanism, animal test should be performed with three ginsengs.

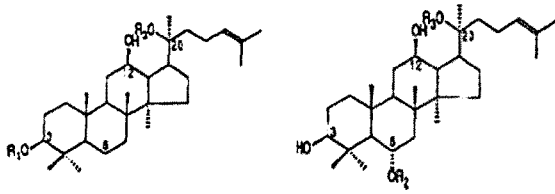
Key words: cytokine, fermented red ginseng, inflammation, red ginseng, white ginseng

서 론

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 오가피나무과 인삼속에 속하는 다년생 초본류로서, 우리나라를 비롯하여 동아시아 권역에서 4,000년 이상 사용되어 왔으며, 여러 질병을 치료하는데 사용되었다. 백삼은 원료 수삼의 표피를 벗기거나 그대로 일광 건조 또는 열풍 건조하여 제조한 것이며, 홍삼은 일반삼의 저장기간을 늘리기 위해서 일반적으로 양질의 6년근 인삼을 증숙한 뒤에 말리는 과정을 거친 것으로 이 과정 중 수삼 또는 백삼과는 다른 유효성분들이 생성된다고 알려져 있다[Kong 등,

2008]. 인삼의 효능을 나타내는데 있어서 사람마다 각각의 차이가 있는데 이는 사람마다 대장세균의 충수 및 활성의 차이에 의해서 나타나는 것으로 이러한 차이를 줄이기 위해서 인삼을 미생물에 의해서 분해를 시킨 것을 발효인삼이라고 하며, 최근에는 미생물을 이용하여 홍삼으로부터 발효홍삼을 제조하고 있다. 무엇보다 중요한 인삼의 약리작용 중 하나는 면역기능에 미치는 작용으로 알려져 있다. 즉 인삼의 다양한 성분인 다당류와 ginsenoside는 NK 세포의 활성 촉진, 대식세포의 기능 향상 및 lymphocyte의 분열증식 유도 작용이 있는 것으로 확인되었다[Sun 등, 2006]. 사포닌은 그 기본 구조에 따라 PPD (protopanaxadiol) 및 PPT (protophanaxatriol)계 사포닌으로 나뉘어지는데 Fig. 1에서 보는 바와 같이 PPD계 사포닌에는 ginsenoside-Rb₁, -Rb₂, -Rc, -Rd 등이 포함되고 PPT계 사포닌에는 ginsenoside-Re, -Rg, 등이 포함된다. PPD계 사포닌은 대체적으로 중추신경계의 안정, 억제 효능이 있다고 알려져 있

*Corresponding author
Phone: +82-63-850-5963, Fax: +82-63-850-5195
E-mail: whwoo@wonkwang.ac.kr



20(S)-protopanaxadiol	20(S)-protopanaxatriol
Type	Compound
Protopanaxadiol (PPD)	Rb ₁
	Rb ₂
	Rc
	Rd
	Rg ₃
	Rh ₂
Protopanaxatriol (PPT)	Compound K (C-K)
	20(S)-protopanaxatriol
	Re
	Rg ₁
	Rg ₂
	Rh ₁
	20(S)-protopanaxatriol

Fig. 1. Chemical structures of ginsenosides and their related compounds.

는 반면 PPT계 사포닌은 중추신경계 흥분작용을 가지는 등 서로 상반된 약리효능이 있는 것으로 알려져 있다[Choi 등, 2008].

선천면역은 박테리아나 바이러스 감염, 스트레스에 대해 방어할 수 있도록 다양한 작용기전을 통해 빠르게 활성화 되는 고전적 숙주방어 형태이다. 그러나 지속적이며 과도한 면역반응은 도리어 조직손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 패혈증과 만성염증을 유발하게 된다[Brown 등, 2007]. 염증과정 중 염증유도 사이토카인(pro-inflammatory cytokines), nitric oxide(NO)와 prostaglandin E₂(PGE₂)가 inducible NO synthase(iNOS)와 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해 다량 생성된다[Posadas 등, 2000]. 동물세포에서 NO는 neuronal NOS(nNOS), endothelial NOS(eNOS) 그리고 inducible NOS(iNOS) 세가지 형태의 NOS에 의해 합성된다. nNOS와 eNOS는 세포내에 항상 존재하지만 iNOS는 interferon- γ , lipopolysaccharide(LPS) 그리고 다양한 염증 유도 사이토카인에 노출되는 경우에만 발현된다[Moncada 등, 1991; Yun 등, 1996]. 혈관 내피로부터 유래된 NO는 강력한 혈관 확장제로 작용함으로써 혈관항상성을 유지시키고 반면, 염증상태에서의 과도한 NO의 생성은 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 급성과 만성염증에 대한 반응으로 조직의 손상 및 유전자 변이 등을 일으킬 수 있다[Mu 등, 2001; Stokes 등, 2002; Ryu 등, 2003]. PGE₂는 COX에 의해 arachidonic acid로부터 생성되며, COX의 2가지 동종효소는 1990년대 초에 존재가 확인되었고, COX-1은 거의 모든 조직(위장관, 신장 혈소판, 혈관내피세포 등)에 항상 내재적으로 존재하며, PG를 생성하여 생리적 기능을 유지시킨다[Vane 등,

1998; Stokes 등, 2002]. 반면, COX-2는 정상적인 상태에서는 발현되지 않고 염증자극, cytokine(IL-1), Growth factors 등의 자극에 의하여 대식세포와 활막세포와 같은 염증세포에서 발현되는 조기 면역 유전자로 주로 조직에서 다량의 PG를 생성하여 염증상태로 유도한다[Needleman과 Isakson, 1997; Seybold 등, 2003].

내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성균의 세포외막에 존재하여, RAW 264.7 세포와 같은 대식세포 또는 단핵세포에서 tumor necrosis factor-alpha(TNF- α), Interleukin-6(IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β)와 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다[Lazarov 등, 2000; Scott과 Hancock, 2000; Axtelle과 Pribble, 2001].

Nuclear transcription factor-kappa B(NF- κ B)는 사이토카인, 케모카인, 성장인자 그리고 세포부착분자 등에 관련된 여러 유전자들의 발현에 중요한 역할을 하는 전사인자로[Baldwin, 1996; Chen 등, 1999] 활성화된 NF- κ B는 iNOS, COX-2, TNF- α 그리고 IL-6 등 여러 염증 매개물질들의 전사를 촉진한다[Kaltschmidt 등, 1999; Straus 등, 2000]. 최근 인삼과 홍삼의 면역에 대한 연구는 한국산 홍삼이 T 세포에 의한 세포매개성 면역 반응과 자연살해세포의 활성도를 증가시켜 면역활성 유도 및 항암효과가 있다는 보고가 있었으며[Jang 등, 1994; Lee와 Lee, 1998], 인삼 추출물의 자연살해세포(이하 NK 세포)의 증강을 통한 면역증강효과 그리고 인삼의 사포닌 및 다당체를 중심으로 면역조절 및 증강작용에 관한 연구들이 보고되었다[Cho 등, 2002; Lee 등, 2004]. 현재까지 인삼의 가공처리에 따른 염증관련 면역반응 억제효과의 차이에 대한 연구는 거의 미비한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 백삼, 홍삼 그리고 발효홍삼이 LPS에 의해 유도된 대식세포 염증모델에서의 항염효과의 차이와 그 기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에 사용된 백삼, 홍삼 및 발효홍삼분말은 H&BT(주)로부터 공급받아 사용하였다. 실험에 사용한 마우스 대식세포주 RAW 264.7 세포는 ATCC(Rockville, MD, USA)로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양을 위한 RPMI 1640 배지, 항생제, trypsin 및 fetal bovine serum(FBS)는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기는 Falcon(Becton Dickinson, San Jose, CA) 제품을 사용하였다. Lipopolysaccharide(LPS), methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma 제품(ST. Louis, MO, USA)을 구입하였으며, COX-2, iNOS, NF- κ B, I κ B, p-I κ B 등의 항체는 Santa Cruz(San Diego, CA), anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Amersham(Buckinghamshire, England)에서 구입하였다. 시료의 HPLC 분석을 위한 ginsenoside 표준시약은 AMBO institute(Seoul, Korea)에서 TNF- α 와 IFN- γ 의 측정을 위한 kit는 R&D systems(MN, USA)에서 구입하여 실험에 이용하였다.

세포배양. RAW 264.7 세포는 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 세포배양을 위한 배지는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하였다.

진세노사이드 조성분석. 사포닌 함량 측정시 백삼, 홍삼, 발효홍삼 분말을 5g을 50 mL HPLC용 메탄올로 녹여낸 후 0.45 µm의 필터로 여과하여 HPLC를 이용하여 사포닌 조성을 분석하였다. 이때 컬럼은 µ-Bondapak C18 Column(10 µm, 3.9×300 cm, Waters)을 이용하였으며 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 검출기는 Jasco UV detector(203 nm)를 사용하였다. 이동상으로는 물 (A)과 acetonitrile (B)의 gradient system을 사용하였으며 A를 기준으로 80%(0분), 80%(20분), 70%(40분), 55%(60분), 20%(80분), 0%(90분), 20%(100분)이었다. 이동상의 유속은 분당 1.8 mL이었으며 시료주입량은 10 µL, 분석온도는 30°C이었다.

세포 생존율 측정. 시험에 사용한 시료들에 의한 세포독성은 MTT assay를 이용하여 분석하였다. 24 well plate에 2×10⁵ cells/mL로 세포를 분주하고 24시간 동안 세포를 안정시킨 후 각각의 시료(50 µg/mL)와 LPS(10 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 상층액을 제거하고 1/10 MTT 용액(5 mg/mL)이 첨가된 배지로 교체하였다. 3시간 후 배양액을 제거하고 DMSO(1 mL)을 첨가하여 세포를 용해시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices Co., CA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 얻어진 absorbance(OD) 값을 통해 산출하였다.

Western blotting. RAW 264.7 세포에 각각의 시료를 처리하고 일정시간 후 수거하여, PBS로 2회 세척한 후 각각의 세포에 세포용해 완충용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/mL aprotinin)을 첨가하여, 4°C에서 30분간 반응시키고 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 얻은 세포 용해액은 Bradford 방법을 이용하여 단백질정량을 하였다. 동량의 세포 용해액은 2X sample buffer와 혼합하여 98°C에서 5분간 끓인 후에 SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 2시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 억제시켰다. COX-2, IκB, p-IκB, iNOS, NF-κB(p50 subunit) 항체는 PBS에 1:1,000으로 희석하여 4°C

에서 12시간 반응 후 0.05%(v/v)의 Tween-20이 포함된 PBS (PBST)로 3회 세척 후 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 PBST로 3회 세척 후 ECL kit(Amersham, England)를 사용하여 X-ray 필름에 감광시켰다.

Nitric oxide (NO) 생성 및 정량. RAW 264.7 세포를 24 well plate에 2×10⁵ cells/mL로 세포를 분주하고 24시간 동안 세포를 안정시킨 후 시료(50 µg/mL)와 LPS(10 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 배양액을 수집하여 배양배지를 원심분리(12,000 rpm, 3 min)하고, 상층액 500 µL를 취해 정량 전까지 -20°C 이하에서 보관하였다. NO의 정량은 Gress reagent를 이용하여 정량하였다. 96 well plate에 배양액 100 µL와 Gress reagent(1% sulphanilamide와 0.1% naphthylethylenediamide를 포함한 5%(v/v) phosphoric acid) 100 µL를 분주하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard NO(sodium nitrite)에 대한 표준곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다.

TNF-α와 IFN-γ의 생성 평가. RAW 264.7 세포를 24 well plate에 2×10⁵ cells/mL로 세포를 분주하고 24시간 동안 세포를 안정시킨 후 시료(50 µg/mL)와 LPS(10 µg/mL)를 동시 처리하여 24시간 배양한 후 TNF-α, IFN-γ를 측정하기 위해 배양 배지를 원심분리(12,000 rpm, 3 min)하여 상층액을 얻었다. TNF-α, IFN-γ의 측정은 TNF-α, IFN-γ 각각의 ELISA kit(R&D Systems INC., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 정량하였으며 standard에 대한 표준곡선의 r² 값은 0.99 이상이었다.

통계적 분석 방법. 모든 실험의 표시된 결과는 3번 수행하였으며, 통계분석은 mean±S.D로 표시하였고, ANOVA에 의해 분석하였다. 통계적 유의성은 p<0.05로 판정하였다.

결 과

사포닌 조성 분석. Fig. 2는 HPLC로 확인한 사포닌 표준품 11종의 크로마토그램 프로 파일이다. 백삼, 홍삼 및 홍삼분말 추출물의 사포닌 조성을 HPLC로 분석한 결과는 Table 1과 같다. 결과에서 알 수 있듯이 백삼에 비해 홍삼과 발효홍삼에서 Rg₁, Rh₁, Rb₁, Rb₂등과 같은 고분자의 일반사포닌들은 감소하

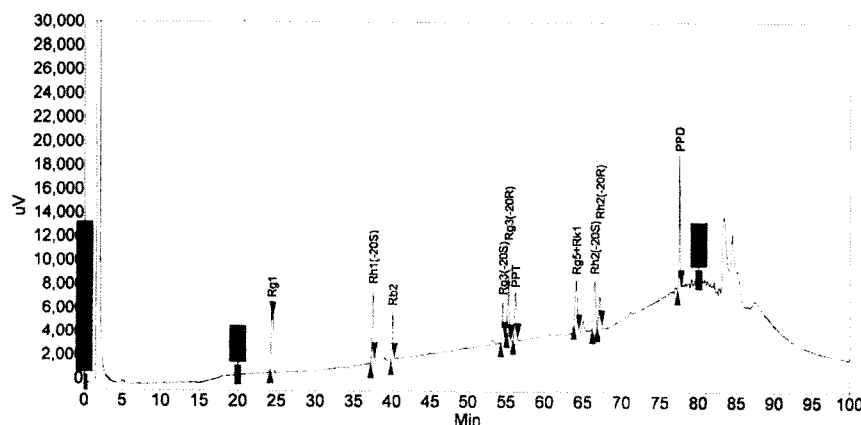


Fig. 2. HPLC chromatogram of the ginsenoside standards.

Table 1. The change of content ginsenoside in WG, RG and FRG

Saponin	Area [$\mu\text{V} \cdot \text{Min}$]		
	WG	RG	FRG
Rg ₁	5739.6	583.4	ND
Rg ₇ (20S)	674.5	3123.6	2219.8
Rb ₁	2698.1	1627.7	948.8
Rb ₂	1022.6	157.6	150.6
Rg ₃ (20S)	912.6	117.5	3643.9
Rg ₃ (20R)	ND	ND	3346.4
PPT	ND	ND	ND
Rg ₅ +Rk ₁	3532.6	5331.5	11695.5
Rh ₂ (20S)	ND	ND	ND
Rh ₂ (20R)	ND	ND	ND
PPD	16807.4	4244.5	7052.6

WG: white ginseng, RG: red ginseng, FRG: fermented red ginseng, ND: not detected

였고, Rh₁(20S), Rg₃(20S), Rg₃(20SR), Rg₅+Rk₁, PPD 등 저분자의 특이사포닌은 증가함을 확인하였다.

NO 생성과 세포 생존율. iNOS에 의한 NO 생성은 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 존재하는 nitrite(NO₂⁻)의 양을 측정하였다. 그 결과 LPS에 의한 NO의 생성을 백삼, 홍삼, 발효홍삼 세 그룹 모두 억제하였으며, 홍삼이 NO생성을 가장 효과적으로 억제시켰음을 알 수 있었다(Fig. 3A). 이러한 NO 생성 저해가 세포독성에 기인하는 것인지를 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포독성을 관찰하였으나 생존율이 모두 95% 이상으로 RAW 264.7 세포에 독성을

나타내지 않은 것을 확인하였다(Fig. 3B).

iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과. 각 시료에 의한 염증인자(NO)의 억제와 iNOS 단백질 발현과 상관성을 알아보기 위해 RAW 264.7 세포에 LPS(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 사용하여 iNOS의 발현을 유도한 후 백삼, 홍삼, 발효홍삼을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 iNOS 발현에 대한 억제 정도를 Western blot을 통해 알아보았다. LPS에 의해 iNOS 단백질은 뚜렷하게 증가하였으며, 홍삼과 발효홍삼을 처리한 군에서 iNOS의 발현을 강하게 저해하였다(Fig. 4).

또한 RAW 264.7 세포에 LPS(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 사용하여 COX-2의 발현을 유도한 후 백삼, 홍삼, 발효홍삼을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 COX-2 발현에 대한 억제 정도를 조사한 결과, iNOS의 발현 양상과 마찬가지로 LPS에 의한 COX-2의 발현은 백삼, 홍삼, 발효홍삼 세 그룹에서 억제하였으며 특히 홍삼과 발효홍삼을 처리한 군에서 백삼을 처리한 군보다 강한 억제효과를 나타내었다(Fig. 4).

NF- κ B 활성 억제 효과. LPS에 의해 유도되는 iNOS, COX-2, TNF- α , 그리고 IL-6 등의 유전자 촉발부위에 결합하는 전사인자인 NF- κ B가 이들의 유전자 발현에 중요한 역할을 한다 [Surh 등, 2001]. 백삼, 홍삼, 그리고 발효홍삼이 염증유발유전자들을 조절하는 NF- κ B의 활성을 억제하는지 조사한 결과, NF- κ B (p50 subunit)는 LPS 처리군에서 발현이 증가하였으며 각각의 시료를 처리한 세 군 모두에서 LPS 처리군에 비하여 NF- κ B의 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 5). NF- κ B는 세포질에서 I κ B와 복합체 상태로 존재하며 I κ B kinase에 의한 I κ B의 인산화와 분해에 의해 활성화된다[Kaltschmidt 등, 1999; Straus

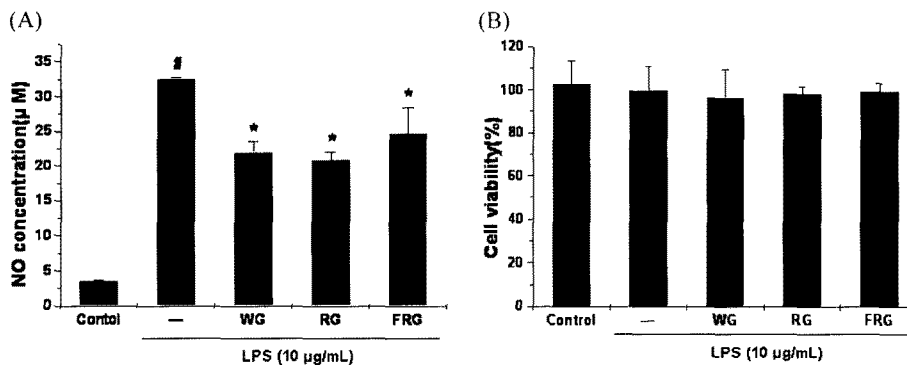


Fig. 3. The effect of WG, RG and FRG on LPS-induced NO production and cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/mL) were treated with LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and combined with WG, RG and FRG (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Nitrite was measured by Griss reagent (A). Cytotoxicity was measured by MTT assay (B). Data presented as means \pm S.D. of three independent experiments. WG: white ginseng, RG: red ginseng, FRG: fermented red ginseng. The values are the mean \pm S.D. of three independent experiments. # $p \leq 0.01$ compared with control. * $p \leq 0.05$ compared with LPS-treated group.

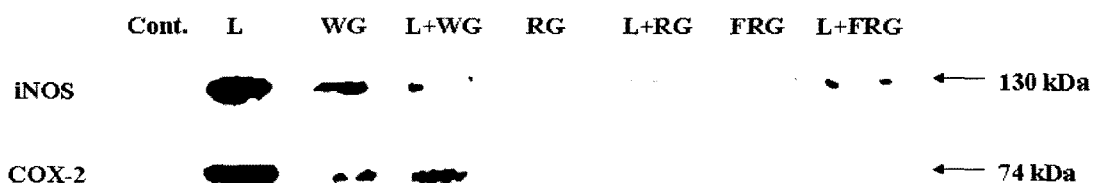


Fig. 4. The effects of WG, RG and FRG on iNOS and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/mL) are treated with LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and combined with WG, RG and FRG (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. The protein levels of iNOS and COX-2 were determined using immunoblotting method. L: LPS, WG: white ginseng, RG: red ginseng, FRG: fermented red ginseng.

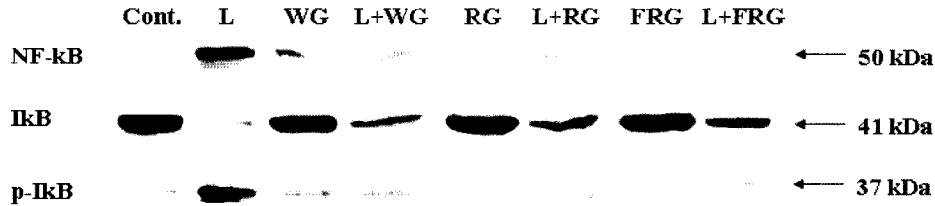


Fig. 5. The effects of WG, RG and FRG on the inhibition of NF- κ B expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^6 cells/mL) are treated with LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) and combined with WG, RG and FRG ($50 \mu\text{g/mL}$) for 24 h. NF- κ B protein levels were determined using immunoblotting method. I κ B and p-I κ B protein levels were determined using immunoblotting method. L: LPS, WG: white ginseng, RG: red ginseng, FRG: fermented red ginseng.

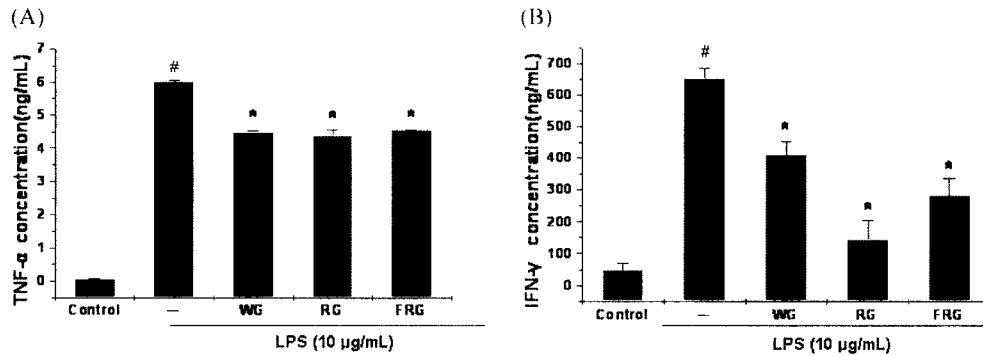


Fig. 6. The Effect of WG, RG and FRG on LPS-induced TNF- α (ng/mL) (A) IFN- γ (ng/mL) (B) in RAW 264.7 cells. Cells (2×10^5 cells/mL) treated with LPS ($10 \mu\text{g/mL}$) and combined with WG, RG and FRG ($50 \mu\text{g/mL}$) for 24 h. And then supernatants were harvested and assayed by ELISA for TNF- α and IFN- γ kit, respectively. L: LPS, WG: white ginseng, RG: red ginseng, FRG: fermented red ginseng. The values are the mean \pm S.D. of three independent experiments. # $p \leq 0.01$ compared with control, * $p \leq 0.05$ compared with LPS-treated group.

등, 2000]. 본 실험에서 I κ B의 인산화를 조사한 결과, 세 군 모두 I κ B의 인산화를 억제시키는 것을 확인 하였다(Fig. 5).

TNF- α 와 IFN- γ 의 생성억제 효과. LPS에 의해 유도되는 염증사이토카인인 TNF- α 와 IFN- γ 의 생성을 억제 시키는지 조사하기 위해서 시료와 LPS를 RAW 264.7 세포에 각각 처리한 다음 24시간 배양 후 LPS에 의해 활성화된 세포로부터 분비되는 사이토카인의 양을 측정하였다. 그 결과, LPS 단독처리군에서의 TNF- α 는 6.002 ng/mL 로 높은 증가를 보였으며, 백삼, 홍삼 및 발효홍삼 처리군에서는 각각 4.521 , 4.380 , 4.478 ng/mL 로 TNF- α 의 생성을 억제하였다(Fig. 6A). 또한 IFN- γ 는 LPS를 단독 처리하였을 때 651.25 ng/mL 로 높은 증가를 보였으나, 각각의 처리군에서 280 , 143.5 , 407 ng/mL 으로 IFN- γ 의 생성을 억제하였다(Fig. 6B).

백삼, 홍삼 및 발효홍삼 모두 TNF- α 와 IFN- γ 의 생성을 억제하는 경향을 나타냈고 특히 IFN- γ 억제효과는 홍삼과 발효홍삼이 백삼에 비해 높게 나타났다.

고 찰

염증반응은 외부항원에 의해 활성화된 다양한 면역세포들에 의해 매개되는 복잡한 과정이며, 대식세포는 LPS와 같은 염증유발물질에 의해 활성화되어 TLR-4(toll-like receptor-4)의 발현을 자극한다[Palmer와 Eveson, 1987; Iontcheva 등, 2004]. TLR-4는 LPS/CD-14 복합체에 대한 막 투과성 수용체로서 NF- κ B를 통해 염증유도의 단계적 과정(cascade)을 활성화한다[Chow 등, 1999; Means 등, 2000]. 이러한 기전을 통해 NO, PGs,

염증유도 사이토카인 TNF- α , IL-1 β 등의 다양한 염증매개물질이 유도된다[Gomez 등, 2000].

본 실험에서는 대식세포인 RAW 264.7 세포를 LPS에 24시간 노출시키게 되면 뚜렷한 NO의 생성을 확인 할 수 있는데 홍삼, 발효홍삼 및 인삼은 이러한 NO의 생성억제를 세포독성이 없는 농도에서 억제하였다. 위의 사실에 기초하여 NO 생성 저해의 기전을 알아보기 위하여 Western blot으로 iNOS의 발현을 분석한 결과 각각의 시료에 의한 iNOS의 발현 억제가 NO 생성억제와 유사한 경향을 나타냄으로써 NO생성 억제는 iNOS의 발현저해를 경유한 것임을 알 수 있었다. 인삼사포닌은 PPD와 PPT의 구조로 나눌 수 있다. 이 중에서 PPD 구조를 이루는 사포닌 중 Rb₁, Rc 그리고 Rd 보다는 Rg₃에 의해 염증억제효과를 나타내며, 특히 염증을 매개시키는 NO의 생성을 억제하여 효과를 나타낸다고 하였다[Lee 등, 2006]. 홍삼은 인삼에 비하여 Rg₃의 함량이 높아진다는 보고와 이를 통해서 LPS에 의한 NO의 생성억제는 Rg₃의 함량에 따라 차이가 나타나는 것임을 유추할 수 있다.

또한 다수의 항염증 약물들의 작용기전이 되는 COX-2의 생성 억제가 각각의 시료에 의해서 나타나는지 조사하였다. 각각의 시료는 LPS에 의해 발현되는 COX-2 단백질의 발현을 유의성 있게 억제하였음을 확인할 수 있었다. 염증매개물질인 TNF- α 와 IFN- γ 는 *in vivo*, *in vitro* 모두에서 염증반응을 조절하는 물질로 알려져 있다. 이러한 사이토카인들은 상호작용이 있는 것으로 알려져 있으며 LPS와 같은 염증자극물질에 의해 생성이 유도된다[Feldmann 등, 2006]. 본 실험 결과, LPS에 의해 유도된 TNF- α 와 IFN- γ 는 시료에 의해 생성이 저해되었고,

특히 홍삼과 발효홍삼이 IFN- γ 의 생성을 억제효과가 백삼보다 뛰어난 것을 확인 할 수 있었다.

이러한 COX-2, iNOS 그리고 염증유도 사이토카인들의 발현에 있어서 NF- κ B가 promoter에 작용하여 중요한 조절인자로 작용한다[Karin 와 Ben-Neriah, 2000]. 세포질내의 NF- κ B는 세포막으로부터의 면역 활성화 신호에 의해 핵 내로 이동하여 면역 활성화에 관여하는 여러 유전자를 촉진하는데 이에는 세포질내 NF- κ B의 억제인자인 I κ B 단백질의 분해가 요구된다[Baeuerle, 1998]. 본 실험에서는 Western blot을 이용하여 NF- κ B와 I κ B의 발현을 확인하였으며, 각각의 시료에 의해 NF- κ B의 발현의 억제와 I κ B의 인산화가 억제되었다.

이상의 결과들을 요약하면 백삼, 홍삼 및 발효홍삼 모두 염증의 주체가 되는 대식세포계열인 RAW 264.7 세포에서 NF- κ B의 전사 작용을 억제함으로써 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 와 IFN- γ 와 같은 pro-inflammatory cytokine 생성 억제 및 NO의 생성억제와 iNOS, COX-2 유전자 발현을 효과적으로 저해하였다. 전체적으로 세 시료 중 홍삼의 효과가 가장 좋았으며, 발효홍삼, 백삼의 순서로 염증인자를 억제하였으며, 특히 홍삼과 발효홍삼의 경우 백삼보다 IFN- γ 생성억제 효과가 우수하였다. 이러한 결과들은 백삼, 홍삼과 발효홍삼 모두를 이용하여 염증성 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 약물로서 개발될 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 식물성인 인삼은 부작용이 거의 나타나지 않으며, 또한 오랜 기간의 사용경험을 통해서 비교적 안전한 물질로 확인되어 있으므로 새로운 면역조절제로서의 개발 가치가 충분한 것으로 판단되어진다. 하지만 백삼이나 홍삼, 발효홍삼을 복용 하였을 때에 장내세균에 의하여 성분이 변화하며, 변화한 성분의 약리효능 효과가 달라진다. 따라서 *in vitro* 실험에 있어서의 결과와 *in vivo* 실험의 결과가 같을지는 추후 실험을 통해서 더욱 더 확인해 봐야 할 것이다.

초 록

인삼은 가공처리방법에 따라 홍삼과 발효홍삼으로 구분된다. 또한, 이들의 가공처리방법에 따라 인삼의 효능을 나타내는 사포닌의 함량이 차이가 있다. 따라서, 본 연구에서 인삼, 홍삼 및 발효홍삼이 대식세포에서 LPS에 의한 염증에 대한 항염효과 및 그 기전을 규명하고자 하였다. 마우스의 대식세포인 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 염증관련인자인 NO 및 COX-2의 발현 및 TNF- α , INF- γ 그리고 NF- κ B의 활성을 인삼, 홍삼 그리고 발효홍삼에 의한 항염효과 차이를 비교 하였다. 그 결과, 인삼 및 홍삼 그리고 발효홍삼 모두에서 LPS에 의한 NO의 생성을 억제시키는 것을 확인하였으며, TNF- α 및 INF- γ 의 생성 또한 억제시키는 것을 알 수 있었다. 또한, 인삼 및 홍삼 그리고 발효홍삼 모두 COX-2의 발현 및 LPS에 의한 I κ B의 인산화를 억제시킴으로써 NF- κ B의 활성을 억제시키는 것임을 알 수 있었다. 홍삼이 인삼과 발효홍삼에 비하여 NO의 생성을 더 효과적으로 억제시키는 것은 각각의 제조과정에서 나타나는 인삼사포닌의 조성의 차이에 따른 것으로 추정된다. 본 연구는 단순한 동물세포 수준에서의 비교 차이이며 좀 더 정확한 기전의 규명을 위해서는 향후 동물실험을 통한 비교 실험

험이 수행되어야 할 것이다.

Key words: 발효홍삼, 백삼, 사이토카인, 염증, 홍삼

감사의 글

본 연구는 2008년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 지원되었음.

참고문헌

- Axtelle T and Pribble J (2001) IC14, a CD14 specific monoclonal antibody, is a potential treatment for patients with severe sepsis. *J Endotoxin Res* 7, 310-314.
- Baeuerle PA (1998) I kappa B - NF-kappa B structures: at the interface of inflammation control. *Cell* 95, 729-731.
- Baldwin AS Jr (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14, 649-683.
- Brown KL, Cosseau C, Gardy JL, and Hancock RE (2007) Complexities of targeting innate immunity to treat infection. *Trends Immunol* 28, 260-266.
- Chen F, Castranova V, Shi X, and Demers LM (1999) New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 45, 7-17.
- Cho JY, Kim AR, Yoo ES, Baik KU, and Park MH (2002) Ginsenosides from Panax ginseng differentially regulate lymphocyte proliferation. *Planta Med* 68, 497-500.
- Choi KH, Kwak YS, Rhee MH, Hwang MS, Kim SC, Park CK, Han GH, and Song KB (2008) Effects of pH and high temperature treatment on the changes of major ginsenosides composition in korean red ginseng water extract. *J Ginseng Res* 32, 127-134.
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, and Gusovsky F (1999) Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 274, 10689-10692.
- Feldmann M, Brennan FM, and Maini RN (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14, 397-440.
- Jang SK, Kim JH, Chung YS, Ahn DC, Kang MJ, Lee DG, and Kim SH (1994) An experimental study on the effect of Immunopotential and the Anticancer Effect of Red Ginseng Extract. *J Ginseng Res* 18, 151-159.
- Gomez PF, Pillinger MH, Attur M, Marjanovic N, Dave M, Park J, Bingham CO 3rd, Al-Mussawir H, and Abramson SB (2005) Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappa B subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* 175, 6924-6930.
- Iontcheva I, Amar S, Zawawi KH, Kantarci A, and Van Dyke TE (2004) Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. *Infect Immun* 72, 2312-2320.
- Kaltschmidt B, Sparna T, and Kaltschmidt C (1999) Activation of NF-kappa B by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal* 1, 129-144.
- Kong BM, Park MJ, Min JW, Kim HB, Kim SH, Kim SY, and

- Yang DC (2008) Physico-chemical characteristics of White, Fermented and Red Ginseng Extracts. *J Ginseng Res* **32**, 238-243.
- Karin M and Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-663.
- Lazarov S, Balutsov M, and Ianev E (2000) The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic (endotoxin) shock. *Vutr Boles* **32**, 33-40.
- Lee EJ, Ko E, Lee J, Rho S, Ko S, Shin MK, Min BI, Hong MC, Kim SY, and Bae H (2004) Ginsenoside Rg1 enhances CD4(+) T-cell activities and modulates Th1/Th2 differentiation. *Int J Immunopharmacol* **4**, 235-244.
- Lee HY and Lee HS (1998) Stimulatory effect of korean red-ginseng extract on the proliferation and cellular activity of lymphocytes. *J Ginseng Res* **22**, 60-65.
- Lee WM, Kim SD, Kim KS, Song YB, Kwak YS, Cho JY, Park HJ, Oh JW, and Rhee MH (2006) Protopanaxadiol modulates LPS-induced inflammatory activity in murine macrophage RAW264.7 cells. *J Ginseng Res* **30**, 181-187.
- Means TK, Golenbock DT, and Fenton MJ (2000) The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 219-232.
- Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-142.
- Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T, and Yokochi T (2001) The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *J Endotoxin Res* **7**, 431-438.
- Needleman P and Isakson PC (1997) The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol Suppl* **49**, 6-8.
- Palmer RM and Eveson JW (1987) Chronic sialadenitis. An immunocytochemical study in humans. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **412**, 73-78.
- Posadas I, Terencio MC, Guilln I, Ferrndiz ML, Coloma J, PayM, and Alcaraz MJ (2000) Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **361**, 98-106.
- Ryu JH, Ahn H, Kim JY, and Kim YK (2003) Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytother Res* **17**, 485-489.
- Scott MG and Hancock RE (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol* **20**, 407-431.
- Seybold VS, Jia YP, and Abrahams LG (2003) Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. *Pain* **105**, 47-55.
- Stokes KY, Cooper D, Tailor A, and Granger DN (2002) Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radical Biol Med* **33**, 1026-1036.
- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, and Glass CK (2000) 5-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4844-4849.
- Sun JL, Hu YL, Wang DY, Zhang BK, and Liu JG (2006) Immunologic enhancement of compound Chinese herbal medicinal ingredients and their efficacy comparison with compound Chinese herbal medicines. *Vaccine* **24**, 2343-2348.
- Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, and Lee SS (2001) Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res* **480-481**, 243-268.
- Yun HY, Dawson VL, and Dawson TM (1996) Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* **10**, 291-316.
- Vane JR, Bakhle YS, and Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 97-120.