

고콜레스테롤 조건하에 배양된 HepG2에서의 ginsenoside-Rb₂에 의한 LDL receptor 억제 완화 기전

임그리워 · 이현일 · 김은주 · 노영태 · 노연희 · 구자현[#]

건국대학교 의과대학 생화학교실
(2003년 12월 10일 접수, 2004년 4월 12일 수리)

The Mechanism of LDL Receptor Up-regulation by Ginsenoside-Rb₂ in HepG2 Cultured under Enriched Cholesterol Condition

G-Rewo Lim, Hyun-Il Lee, Eun-Ju Kim, Young-Tae Ro, Yun-Hee Noh and Ja-Hyun Koo[#]

Department of Biochemistry, College of Medicine, Konkuk University, Chungju, 380-701, Korea

(Received December 10, 2003, Accepted April 12, 2004)

Abstract : The effect of ginsenoside-Rb₂, one of a major pharmacological component of *Panax ginseng* C.A. Meyer, on low density lipoprotein (LDL) receptor expression was investigated and compared with hypocholesterolemic drug lovastatin. In HepG2 cell, exogenous cholesterol decreased LDL receptor mRNA expression, but ginsenoside-Rb₂ recovered this reduction of LDL receptor mRNA up to normal expression level. Lovastatin also increased LDL receptor mRNA expression as similar as ginsenoside-Rb₂ did. The reduction of sterol regulatory element binding protein (SREBP) transcription by exogenous cholesterol was also similarly recovered by ginsenoside-Rb₂ and lovastatin addition. Compound K, a metabolite of ginsenoside-Rb₂ and -Rb₁ by human intestinal bacteria also increased the SREBP mRNA expression in cholesterol-enriched condition. Ginsenoside-Rb₂ seems to up-regulate LDL receptor mRNA expression through the induction of *de novo* SREBP transcription. Therefore, increased expression of SREBP mRNA by ginsenoside-Rb₂ elevated the LDL receptor mRNA expression in HepG2 cells, and these inductions possibly drop the plasma cholesterol level in hypercholesterolemia patients, *in vivo*, as likely in case of lovastatin.

Key words : Cholesterol, ginsenoside, SREBP, LDL receptor

서 론

인삼은 동양에서 오랜 기간 동안 사용해온 중요한 약재의 하나로 그 약리작용에 대한 연구는 당뇨병 치료, 면역강화, 항암효과 및 지질대사에 미치는 효과 등의 다양한 분야에서 활발히 진행되고 있다.¹⁾ 실험적으로 고콜레스테롤혈증을 유발시킨 동물에 인삼 사포닌 성분을 투여하면 동맥경화증이 억제되었고²⁾ 또한 고콜레스테롤혈증을 유발한 쥐에게 인삼의 ginsenoside 성분을 투여하면 간세포의 low density lipoprotein (LDL) receptor의 활성 증가로 인하여 혈중 콜레스테롤 농도가 감소하였다.³⁾ 한편, 세포배양을 통한 *in vitro* 실험의

경우에서도 인삼의 ginsenoside 성분이 chinese hamster ovary (CHO) 세포의 LDL receptor 활성을 증가시켰으며,⁴⁾ 인간의 간암세포인 HepG2 세포를 이용한 실험에서는 LDL receptor mRNA의 발현이 인삼 사포닌 및 ginsenoside 성분에 의하여 증가하는 것이 확인되었으나 그 자세한 기전은 아직 밝혀지지 않았다.⁵⁾

LDL receptor는 세포막에 존재하는 단백질로 혈중의 LDL-cholesterol을 세포내로 흡수하는 역할을 한다.⁶⁾ 가족성 고콜레스테롤혈증 환자의 경우 LDL receptor의 유전적 결함 때문에 혈중 콜레스테롤이 제거되지 않아 나이와 상관없이 고콜레스테롤혈증이 유발된다고 보고된 바 있다.⁶⁾ 이러한 LDL receptor 유전자의 발현은 세포내의 sterol 함량에 의해 조절되는 데 이는 sterol regulatory element binding protein (SREBP)이라는 전사인자의 활성화와 밀접하게 연관되어 있

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 043-840-3737; (팩스) 043-851-3944
(E-mail) jhkoo@kku.ac.kr

다. 세포내의 콜레스테롤 농도가 낮은 경우 전사인자인 SREBP가 활성화되어 LDL receptor의 발현이 증가하지만 세포내 콜레스테롤 농도가 높아지면 반대로 SREBP의 활성화가 억제되어 LDL receptor의 발현이 감소하게 된다.^{7,8)} 따라서 고지방 식이에 의한 고콜레스테롤혈증은 세포내에도 높은 콜레스테롤 함량을 유도하고 이런 높은 콜레스테롤 함량은 LDL receptor의 발현을 억제하여 결과적으로 혈중의 콜레스테롤이 제거되지 않아 혈중 콜레스테롤치는 더욱 상승하게 된다. 이러한 고콜레스테롤혈증 환자들에게 현재 사용되고 있는 치료제 중 simvastatin 이나 lovastatin 등의 합성약제는 세포내 콜레스테롤 합성의 주효소 중의 하나인 HMG-CoA(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) reductase의 저해제로서 고콜레스테롤혈증 환자의 혈중 LDL 콜레스테롤과 총 콜레스테롤의 농도를 저하시키는 능력이 다른 저해제보다 우수한 제품으로 알려져 있으나⁹⁾ 이들 약제가 간기능장애환자에게는 부작용이 있어 사용할 수 없는 문제점이 있다. 따라서 인삼 등과 같은 천연약용식물을 이용한 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시키는 약제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

본 연구는 사람의 간암세포인 HepG2 세포주를 이용하여 고려인삼추출물의 세포내 콜레스테롤 저하기전을 알아보기 위해 콜레스테롤을 첨가한 배지에 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 사포닌 성분 중 ginsenoside-Rb₂와 ginsenoside-Rb₁ 및 ginsenoside-Rb₂ 같은 protopanaxadiol saponin의 장내세균 대사체로 알려진 compound K¹⁰⁾를 첨가한 후 이들 성분들의 LDL receptor 및 SREBP mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였고 현재 고콜레스테롤혈증의 치료제로 사용되고 있는 lovastatin을 첨가한 그룹을 대조군으로 사용하여 인삼 ginsenoside 성분과 lovastatin의 약리작용 기전을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

사람의 간암세포인 HepG2 세포는 한국세포주은행으로부터 분주 받았으며 배양배지는 RPMI 1640(Gibco BRL)을 사용하였다. 배지에 첨가한 콜레스테롤은 수용성 콜레스테롤(Sigma)을 사용하였고, 사용한 인삼 성분인 ginsenoside-Rb₂와 compound K는 한국인삼연초연구원으로부터 제공받았다. 세포배양에 필요한 fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, sodium bicarbonate, trypsin-EDTA 및 N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES) 등은 Gibco-BRL 제품을 구입하여 사용하였다. 그 외 총 RNA 추출에 사용된 시약은 모두 Sigma에서 구입하였다.

2. 세포배양

세포는 RPMI 1640 배지에 10% heat-inactivated FBS와 penicillin-streptomycin을 첨가하여 95% air/5% CO₂, 37 °C 조건에서 72시간 배양한 후 2% FBS RPMI 1640 배지에서 48시간 배양하였다. 그 후 phosphate-buffered saline (PBS)로 세포를 한번 세척한 후 다음의 실험군에 따른 배지로 8시간 동안 배양하였다. 정상군(normal)은 무혈청 (serum-free) RPMI 1640배지에서 배양하였고 대조군(control)은 무혈청 RPMI 1640배지에 cholesterol(10 µg/ml)을 첨가하여 배양하였다. 그리고 실험군은 무혈청 RPMI 1640 배지에 cholesterol(10 µg/ml)를 전처리한 후 각각의 배지에 ginsenoside-Rb₂(10 µg/ml)나 lovastatin(10 µg/ml)를 첨가하여 세포를 8시간 동안 배양하였으며, 농도에 따른 ginsenoside-Rb₂와 compound K의 영향을 알아보기 위해서는 무혈청 RPMI 1640배지에 cholesterol(10 µg/ml)를 전처리한 배지에 각각의 성분들을 실험에 명시한 농도만큼 첨가하여 8시간 동안 배양하였다. 각 군들의 세포는 ethanol이 1% 첨가된 PBS로 한번 세척하고 다시 PBS만으로 3번 세척한 후 1,000×g에서 15분간 원심분리하여 세포를 수거하여 총 RNA를 추출하였다.

배지에 첨가된 ginsenoside-Rb₂ 및 compound K는 ethanol에 녹여 사용하였으며 세포배양배지에 첨가시 ethanol의 최종농도가 0.1%가 넘지 않도록 조절하였다.

3. 총 RNA의 추출

총 RNA의 추출은 Chomczynski 와 Sachhi(1987)의 방법¹¹⁾을 이용하였다. 원심분리하여 수거한 세포에 GITC용액(4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate, water-saturated phenol)을 5배 부피 이상 첨가하여 23 gauge needle을 사용해 균질화 시켰다. 그 후 여기에 2 M sodium acetate(pH 4.5), water-saturated phenol, 그리고 chloroform/isoamyl alcohol(49:1, v/v)를 첨가한 후 20분간 원심분리(4°C, 10,000×g)한 후 상층액을 취해 phenol/chloroform 추출 1회와 chloroform/isoamyl alcohol 추출을 2회 실시하였다. 그 후 상층액에 0.1배 부피의 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 2.5배 부피의 ethanol을 첨가해 -70°C에서 30분간 둔 후 20분간 원심분리(4°C, 10,000×g)한 다음 생성된 pellet을 70% ethanol로 세척해 공기중에 말렸고 이를 RNase-free water에 다시 녹여 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 총 RNA를 정량하여 Northern blot에 사용하였다.

4. Northern blot

LDL receptor mRNA의 probe는 *pLDLR3*(ATCC 57004)의 1.9 kb BamHI 절편을, SREBP-1 mRNA의 probe는 *pSREBP-1a*

(ATCC 79810)의 4.3 kb BamHI/SalI 절편을, SREBP-2 mRNA의 probe는 pSREBP-2(ATCC 79816)의 1.6 kb EcoRI/SalI 절편을 사용하였다. 그리고 human β-actin cDNA(HHC 189, ATCC 65128)의 1.1 kb EcoRI 절편을 총 RNA 보정용으로 사용하였다. Probe는 각 절편을 digoxigenin (DIG)-high prime labeling Kit II(Roche)을 이용하여 random labeling하였다.

각각 10 μg의 총 RNA를 1% formaldehyde-agarose gel에서 전기영동한 후 Turboblotter(Schleicher & Schuell사)를 이용하여 20X SSC를 사용하여 nytran N⁺ membrane (Schleicher & Schuell사)으로 RNA를 transfer 시킨 후 UV cross-linker(CL-1000, UVP)에서 1200 μJ의 에너지로 crosslinking 하였다. Membrane은 prehybridization 용액 [0.25 M Na₂HPO₄(pH 7.2), 1 mM EDTA, 20% SDS, 0.5% blocking reagent (Roche사)]으로 68°C에서 6시간 동안 prehybridization을 실시하였으며, probe는 10분간 가열하여 변성 시킨 후 hybridization 용액[(0.25 M Na₂HPO₄(pH 7.2), 1 mM EDTA, 2% SDS)]에 첨가하여 68°C에서 24시간 동안 hybridization을 실시하였다. Hybridization 실시 후 세척용액(20 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 1% SDS)으로 68°C에서 20분씩 3회 세척하였다. 세척이 끝난 후 membrane은 blocking 용액 [(0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3% tween 20(pH 8.0), 0.5% blocking reagent)]으로 실온에서 1시간 blocking 시킨 후 DIG-alkaline phosphatase conjugate(1:15,000)를 첨가하여 30분간 실온에서 반응시킨 다음 다시 blocking 용액으로 20분씩 3번 세척한 다음 CSPD(Roche)를 이용하여 chemiluminescent 방법으로 X-ray film에 노출시켰다. 각 mRNA band의 양을 Fluor-STM multiimager(Bio-Rad)로 측정하였고 같은 세포의 β-actin mRNA 값에 의해 보정하였다.

결과 및 고찰

1. Ginsenoside-Rb₂와 lovastatin의 LDL receptor mRNA 발현 증가 효과 비교

인삼 사포닌 성분의 투여에 따른 LDL receptor의 활성증가는 LDL receptor 수의 증가에 의한 것이라는 보고에 따라^{3,4)} LDL receptor 수의 증가가 mRNA의 전사 증가에 의한 것인지를 알아보고 그 효과를 lovastatin과 비교한 결과 1) μg/ml의 콜레스테롤을 HepG2 세포에 첨가한 대조군의 경우 콜레스테롤을 투여하지 않은 정상군에 비해 LDL receptor mRNA의 발현이 감소되었다(Fig. 1). 하지만 콜레스테롤과 함께 10 μg/ml의 ginsenoside-Rb₂나 10 μg/ml lovastatin을 첨가한 실험군의 경우 LDL receptor mRNA의 발현이

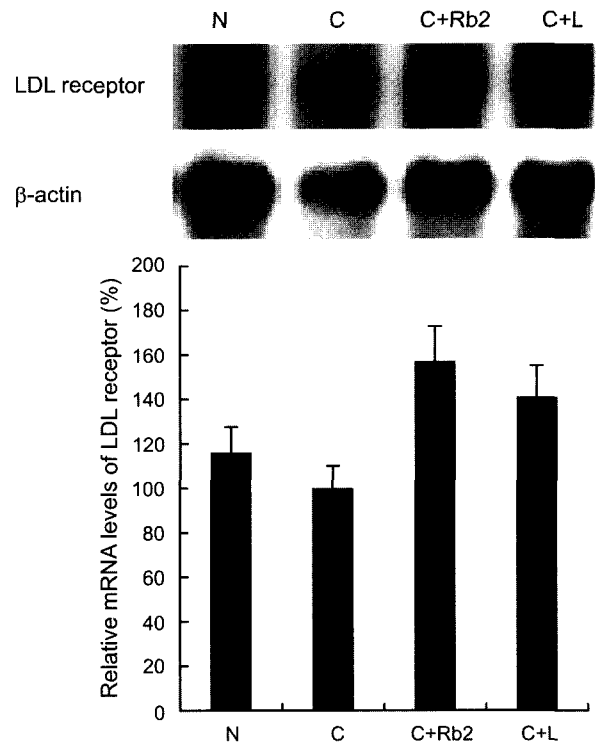


Fig. 1. Northern blot analysis of mRNAs for LDL receptor and β-actin in HepG2 cells cultured in cholesterol-enriched condition with or without ginsenoside-Rb₂ or lovastatin. HepG2 cells were cultured in serum free-RPMI 1640 medium for 8 hours with or without indicated material. N: normal control group, C: 10 μg/ml cholesterol. C+Rb₂: 10 μg/ml cholesterol+10 μg/ml ginsenoside-Rb₂, C+L: 10 μg/ml cholesterol+10 μg/ml lovastatin.

콜레스테롤을 첨가하지 않은 정상군 보다 현저히 증가하였으며 이는 콜레스테롤 투여에 의하여 유발된 LDL receptor 발현억제⁶⁾가 ginsenoside-Rb₂나 lovastatin에 의해 회복될 수 있음을 의미한다. 따라서 세포내 콜레스테롤의 농도가 높을 경우 LDL receptor의 발현이 억제되는데 ginsenoside-Rb₂는 혈중 콜레스테롤강화제로 사용되는 lovastatin과 같이 세포내의 LDL receptor의 발현을 정상 수준으로 회복시켜 혈중 LDL 콜레스테롤을 효과적으로 제거함으로써 고콜레스테롤혈증이 유발된 동물의 혈중 콜레스테롤의 상승을 억제하고 결과적으로 동맥경화를 억제하거나 지연시킬 수 있는 약제로 사용할 수 있는 가능성을 보여주었다.

2. Ginsenoside-Rb₂와 lovastatin의 SREBP mRNA 발현 증가 효과 비교

전사인자의 하나인 SREBP는 SREBP-1a, 1c와 SREBP-2의 3종류의 isoform으로 존재하며¹²⁾ SREBP의 활성화는 LDL receptor의 발현과 밀접하게 연관되어 있기 때문에 먼

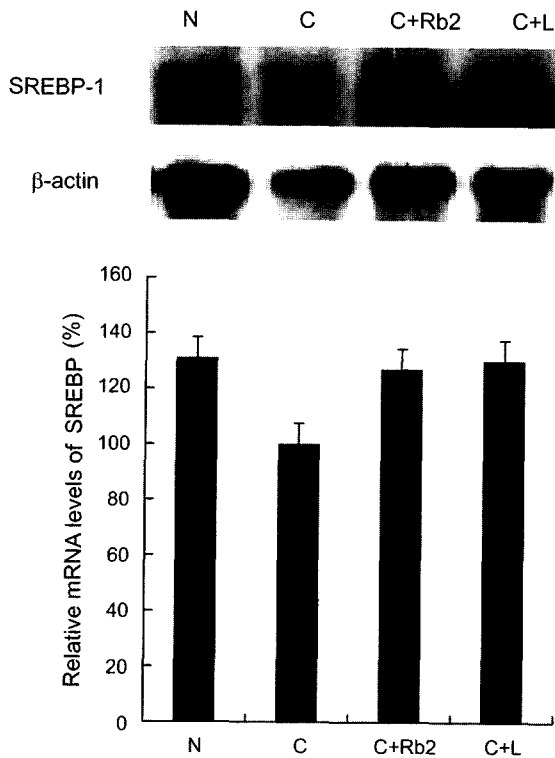


Fig. 2. Northern blot analysis of mRNAs for SREBP-1 and β-actin in HepG2 cells cultured in cholesterol-enriched condition with or without ginsenoside-Rb₂ or lovastatin. HepG2 cells were cultured in serum free-RPMI 1640 medium for 8 hours with or without indicated material. N: normal control group, C: 10 μg/ml cholesterol, C+Rb₂: 10 μg/ml cholesterol+10 μg/ml ginsenoside-Rb₂, C+L: 10 μg/ml cholesterol+10 μg/ml lovastatin.

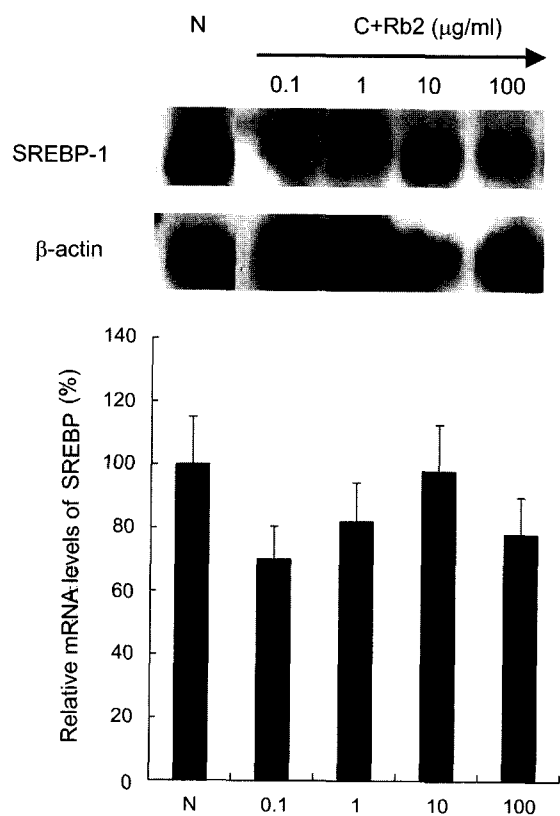


Fig. 3. Ginsenoside-Rb₂ restores SREBP-1 mRNA expression in dose-dependent manner. HepG2 cells were cultured in serum free-RPMI 1640 medium for 8 hours with or without indicated material. N: normal control group, C+Rb₂: 10 μg/ml cholesterol+indicated concentration of ginsenoside-Rb₂.

저 ginsenoside-Rb₂가 SREBP-1 mRNA의 발현에 미치는 영향을 알아보고 그 효과를 lovastatin과 비교하였다(Fig. 2). 10 μg/ml의 콜레스테롤 만을 투여한 대조군의 경우 SREBP-1 mRNA 발현은 정상군에 비하여 감소하였으나 각각 10 μg/ml의 ginsenoside-Rb₂와 lovastatin를 콜레스테롤과 함께 투여한 실험군의 경우 SREBP-1 mRNA의 발현은 정상군의 수준으로 회복되었으며 그 효과는 두성분이 거의 동일하였다. 농도에 따른 ginsenoside-Rb₂의 SREBP-1 mRNA 발현에 대한 효과를 알아보기 위해 ginsenoside-Rb₂를 콜레스테롤과 함께 0.1 μg/ml, 1 μg/ml, 10 μg/ml, 100 μg/ml의 농도로 각각 투여한 경우 10 μg/ml의 농도까지는 투여한 ginsenoside-Rb₂의 농도에 비례하여 SREBP-1 mRNA의 발현이 증가되어 이전 결과처럼(Fig. 2) SREBP-1 mRNA의 발현이 정상군의 수준으로 회복되었으며 고농도(100 μg/ml)의 ginsenoside-Rb₂의 처리는 오히려 SREBP-1 mRNA 발현을 억제시키는 효과를 나타내었다(Fig. 3). 이러한 농도에 비례하여 나타나는 현상은 즉 ginsenoside-Rb₂의 효능을 확인할 수 있는 결과이며

또한 다양한 농도의 ginsenoside-Rb₂의 투여시 농도에 비례하여 세포내 콜레스테롤 함량이 감소하였고 100 μg/ml의 농도보다 10 μg/ml의 농도에서 그 효과가 최대였다는 앞서의 보고와도 일치하였다.¹³⁾

Ginsenoside-Rb₂에 의한 SREBP-1 mRNA의 발현이 정상군의 수준으로 회복된 것이 전사의 증가 때문인지 혹은 이미 발현된 SREBP-1 mRNA의 turnover의 감소 때문인지를 알아보기 위해 위와 동일한 조건하에 전사억제제의 하나인 actinomycin D를 처리한 결과(Fig. 4) actinomycin D의 처리에 의하여 모든 실험군에서 50% 정도의 SREBP-1 mRNA의 발현이 감소됨을 확인하였다. 따라서 ginsenoside-Rb₂에 의한 SREBP-1 mRNA 발현회복은 주로 SREBP-1 mRNA의 새로운 전사의 증가에 의한 것임을 확인하였다.

다른 SREBP mRNA isoform인 SREBP-2 전사에 대한 ginsenoside-Rb₂와 lovastatin의 효과를 비교한 경우(Fig. 5), 10 μg/ml의 콜레스테롤을 첨가한 대조군의 SREBP-2 mRNA의 발현은 정상군에 비하여 감소하였으나 ginsenoside-Rb₂를

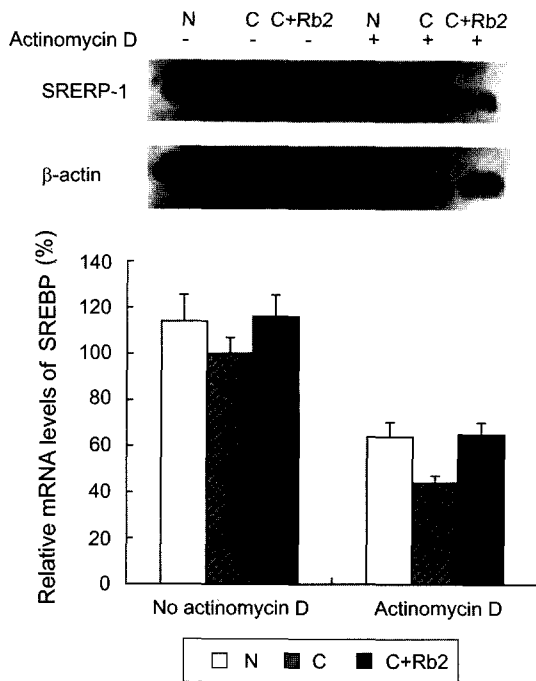


Fig. 4. Transcription of SREBP-1 mRNA is increased by ginsenoside-Rb₂. HepG2 cells were cultured in serum free-RPMI 1640 medium for 8 hours with or without indicated material. N: normal control group, C+Rb₂: 10 µg/ml cholesterol+10 µg/ml ginsenoside-Rb₂. Actinomycin D was added to 5 µg/ml concentration.

동시에 투여하면 정상군 수준으로 회복되었다. 그러나 lovastatin은 SREBP-2 mRNA 발현을 증가시키지 못하였다. SREBP-1a와 SREBP-1c는 같은 유전자에서 다른 promoter 부위를 사용하여 만들어지고 SREBP-2는 다른 유전자에서 만들어진다.^{7,14} 주로 배양된 세포에서는 SREBP-1a와 SREBP-2가 많이 발현되고¹⁵ 각각 지질 대사 관련 유전자와 콜레스테롤 대사 관련 유전자의 promoter 부위에 작용한다.¹² Ginsenoside-Rb₂는 배양한 HepG2 세포에서 SREBP-1과 SREBP-2 mRNA의 발현을 모두 증가시켰고 lovastatin의 경우에는 SREBP-1만을 증가시켰다. 위의 실험결과를 통하여 ginsenoside-Rb₂에 의한 LDL receptor mRNA 발현증가는 LDL receptor의 발현을 조절할 수 있는 SREBP mRNA의 발현증가와 관련이 있음을 확인하였다.

3. Compound K가 SREBP-1 mRNA 발현에 미치는 영향

Ginsenoside-Rb₁과 -Rb₂ 같은 protopanaxadiol saponin의 장내세균 대사체로 알려진 compound K가 SREBP-1 mRNA 발현에 미치는 영향을 ginsenoside-Rb₂와 비교한 결과(Fig. 6). 0.1 µg/ml의 compound K를 세포에 투여하여도 10 µg/ml의 ginsenoside-Rb₂를 투여한 경우와 동일한 정도의

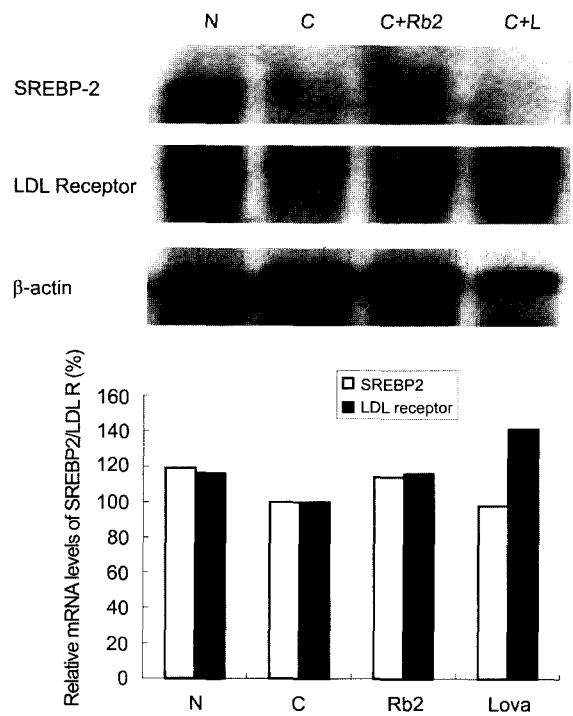


Fig. 5. Northern blot analysis of mRNAs for SREBP-2, LDL receptor and β-actin in HepG2 cells cultured in cholesterol-enriched condition with or without ginsenoside-Rb₂ or lovastatin. HepG2 cells were cultured in serum free-RPMI 1640 medium for 8 hours with or without indicated material. N: normal control group, C: 10 µg/ml cholesterol, C+Rb₂: 10 µg/ml cholesterol+10 µg/ml ginsenoside-Rb₂, C+L: 10 µg/ml cholesterol+10 µg/ml lovastatin.

SREBP-1 mRNA 발현이 증가하였고 1 µg/ml과 10 µg/ml의 compound K의 처리에 의한 SREBP-1 mRNA의 발현은 처리한 농도에 비례하여 증가되었다. 따라서 SREBP-1 mRNA 발현에 대한 효과는 ginsenoside-Rb₂보다 그 장내세균 대사체인 compound K가 뛰어난 것으로 확인되었다. Compound K는 ginsenoside-Rb₁보다 세포나 체내로 더 잘 흡수되기 때문에 이러한 효과를 나타낸 것으로 추정되며 또한 *in vivo* 상에서 보여진 ginsenoside의 혈중 콜레스테롤치 강하와 LDL receptor 활성 증가^{2,3}는 ginsenoside와 대사산물인 compound K의 상승효과일 가능성이 있다.

Ginsenoside-Rb₂가 SREBP mRNA의 발현에 어떻게 영향을 미치는지에 대한 기작은 아직 밝혀지지 않았다. 하지만 현재까지 밝혀진 결과들을 전제로 그 가능한 기작을 제시해보면, 첫째는 ginsenoside-Rb₂가 직접적으로 SREBP mRNA의 발현을 증가시키는 것이다. Ginsenoside는 steroid ring과 유사한 구조를 가지고 있어 steroid hormone인 glucocorticoid나 estrogen과 같은 효과를 나타낼 수 있다는 보고가 있다.¹⁶ 이러한 steroid hormone은 nuclear receptor와 결합

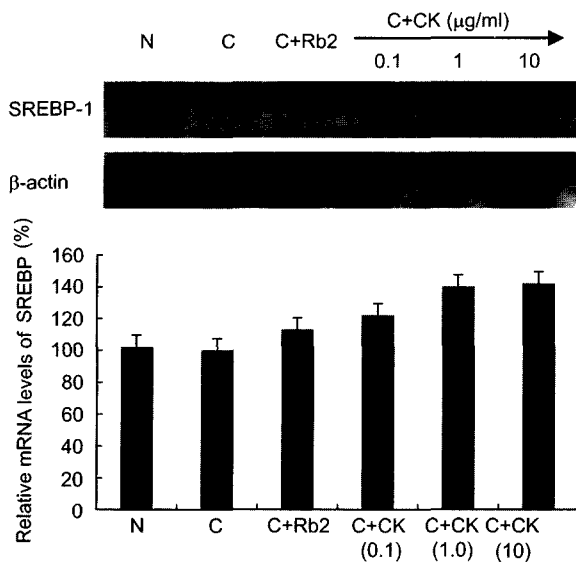


Fig. 6. Northern blot analysis of mRNAs for SREBP-1 and β -actin in HepG2 cells cultured in cholesterol-enriched condition with or without ginsenoside-Rb₂ or compound K. HepG2 cells were cultured in serum free-RPMI 1640 medium for 8 hours with or without indicated material. N: normal control group, C: 10 μ g/ml cholesterol, C+Rb₂: 10 μ g/ml cholesterol+10 μ g/ml ginsenoside-Rb₂, C+CK: 10 μ g/ml cholesterol+indicated concentration of compound K.

하여 다양한 유전자의 전사를 조절하는데 세포내에는 많은 종류의 nuclear receptor가 존재하며 이를 nuclear receptor family라고 부른다.¹⁷⁾ Ginsenoside-Rb₂도 이런 nuclear receptor의 한 종류에 결합하여 SREBP mRNA의 전사를 증가시킬 가능성이 있다. 두번째 가설은 ginsenoside-Rb₂가 세포내 콜레스테롤 함량을 낮추어 이차적으로 SREBP 및 LDL receptor mRNA의 전사를 증가시키는 것이다. 세포내 콜레스테롤 농도가 낮아지면 SREBP 단백질이 증가하고 LDL receptor mRNA의 전사가 증가한다는 것은 이미 알려져 있다.⁸⁾ CHO 세포를 이용한 실험에서 ginsenoside 성분은 LDL receptor 활성을 증가시켰고 이는 세포내 콜레스테롤 함량이 감소하였기 때문으로 보고되었으며⁴⁾ 본 연구진도 이전의 실험에서 ginsenoside-Rb₂에 의하여 acyl CoA: cholesterol acyltransferase(ACAT) 및 cholesterol 7 α -hydroxylase 활성이 증가하고 HMG-CoA reductase 활성이 감소하는 것을 관찰하였다.^{5, 13)} ACAT 및 cholesterol 7 α -hydroxylase 활성이 증가하여 콜레스테롤 배설이 증가하고 HMG-CoA reductase 활성 감소에 의하여 콜레스테롤 생성이 억제되는 것이 세포내 콜레스테롤 함량을 감소시키는 기전으로 생각된다. 따라서 세포내 콜레스테롤 함량의 감소가 LDL receptor의 발현 증가로 이어지고 최종적으로 혈중 콜레스테롤치가 감소되었을 가능성이 있다.

이상의 연구결과를 종합해보면 인삼의 saponin 성분중의 하나인 ginsenoside-Rb₂는 고콜레스테롤 조건하에서도 HepG2 세포내의 LDL receptor mRNA 발현을 증가시켰으며 이는 LDL receptor의 전사조절인자인 SREBP의 발현과 밀접한 연관이 있음을 확인하였다. 또한 ginsenoside-Rb₂는 현재 HMG-CoA reductase inhibitor로 사용되어지는 lovastatin과 비교해 볼 때 상기한 수준이상의 LDL receptor mRNA의 발현을 증가시키는 효과를 나타내었다. 또한 compound K가 ginsenoside-Rb₂보다 적은 농도에서 동등한 SREBP mRNA의 발현 증가 효과를 보였기 때문에 이들 천연성분의 약제들에 대한 보다 정확한 약리기전을 밝힌다면 이들 인삼 saponin 성분들을 간경화환자들에게 심각한 부작용을 초래하는 lovastatin을 대체할 수 있는 고콜레스테롤혈증 치료제로 사용할 수 있으리라 생각된다.

요 약

인삼성분 중 ginsenoside-Rb₂에 의한 LDL receptor 발현 증가의 기전을 HepG₂ 세포에서 관찰하였고 이를 lovastatin과 비교하였다. 콜레스테롤 투여에 의하여 억제된 LDL receptor mRNA 발현이 ginsenoside-Rb₂에 의하여 다시 증가하였고 이는 lovastatin에 의한 증가 효과보다 뛰어났다. SREBP mRNA의 발현 또한 콜레스테롤 투여에 의하여 억제되나 ginsenoside-Rb₂에 의하여 발현이 증가하였고 이는 lovastatin에 의한 효과와 비슷하였다. 세포에 투여한 ginsenoside-Rb₂의 농도에 비례하여 SREBP-1 mRNA의 발현이 증가하였으며 ginsenoside-Rb₂의 대사체인 compound K를 투여한 경우에도 SREBP-1 mRNA가 비슷한 양상으로 혹은 더 많이 발현되었다. 따라서 ginsenoside-Rb₂에 의한 LDL receptor의 발현 증가는 SREBP의 발현 증가 때문이라고 설명할 수 있다. 즉 ginsenoside-Rb₂에 의한 SREBP 발현 증가는 콜레스테롤 투여에 의하여 억제된 LDL receptor 발현을 증가시켜 결과적으로 혈중의 콜레스테롤을 효과적으로 제거하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 건국대학교 학술진흥연구 및 한국인삼공사에서 시행한 2000년도 출연연구사업의 연구로 수행되었으며 그 지원에 감사드립니다.

인용문헌

1. 조영동 : 인삼성분의 임상적 효능과 생화학적 작용기전. 고

- 려인삼학회지. **25**, 19-25 (2001).
2. Joo, C., Kim, D. and Koo, J. : The effect of ginseng saponin on hypercholesterolemia induced by prolonged cholesterol feeding in rabbits. *Korean Biochem. J.* **13**, 51-58 (1980).
 3. 이용우, 구자현, 주충노 : 저밀도 지방단백질 수용체 생합성에 관한 연구: (I) 저밀도 지방단백질 수용체 생합성 억제완화에 미치는 ginsenoside의 영향. *Korean Biochem. J.* **20**, 362-367 (1987).
 4. 주충노, 강인철, 이희봉 : 인삼사포닌(ginsenoside)이 저밀도 지방단백질 수용체 생합성에 미치는 영향. *고려인삼학회지.* **12**, 104-113 (1988).
 5. 노연희, 임그리워, 구자현 : 인삼의 총사포닌, ginsenoside-Rb₁, ginsenoside-Rb₂와 lovastatin에 의한 HepG2 세포의 HMG-CoA reductase 및 LDL 수용체 mRNA 발현 유발 효과의 비교. *고려인삼학회지.* **20**, 241-247 (1996).
 6. Goldstein, J. L. and Brown, M. S. : Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J. Lipid Res.* **25**, 1450-1461 (1984).
 7. Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M. R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. : SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell.* **75**, 187-197 (1993).
 8. Wang, X., Sato, R., Brown, M. S., Hua, X. and Goldstein, J. L. : SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell.* **77**, 53-62 (1994).
 9. Scharnagl, H., Schinker, R., Gierens, H., Nauck, M., Wieland, H. and Marz, W. : Effect of atrovastatin, simvastatin, and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglyceride in HepG2 cells. *Biochemical pharmacology.* **62**, 1545-1555 (2001).
 10. Akao, T., Kida, H., Kanako, M., Hattori, M. and Kobashi, K. : Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb₁ from *Panax ginseng*. *J. Pharm. Pharmacol.* **50**, 1155-1160 (1998).
 11. Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **163**, 156-159 (1987).
 12. Shimano, H. : Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res.* **40**, 439-452 (2001).
 13. 박성출, 노연희, 구자현 : 고콜레스테롤 조건으로 배양한 HepG2 세포의 콜레스테롤 함량변동과 acyl CoA: cholesterol acyltransferase의 활성에 미치는 인삼성분의 영향. *고려인삼학회지.* **19**, 212-218 (1995).
 14. Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M. R., Brown, M. S., Goldstein, J. L. and Wang, X. : SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11603-11607 (1993).
 15. Shinomura, I., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. : Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* **99**, 838-845 (1997).
 16. Yoon, M., Lee, H., Jeong, S., Kim, J., Nicol, C. J., Nam, K. W., Kim, M., Cho, B. G. and Oh, T. G. : Peroxisome proliferator-activated receptor α is involved in the regulation of lipid metabolism by ginseng. *Br. J. Pharmacol.* **138**, 1295-1302 (2003).
 17. Chawla, A., Repa, J. J., Evans, R. M. and Mangelsdorf, D. J. : Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.* **294**, 1866-1870 (2001).