

Apo E Null mice에서 인삼 Ginsenosides (PD : PT = 1) 추출물의 지질개선 및 항산화 효과*

장수정** · 김성수*** · 이명숙***§

성신여자대학교 식품영양학과, ** 한국식품연구원***

Hypolipidemic and Antioxidant Effects to Ginseng Extract (PD : PT = 1) in Apo E Null Mice*

Jang, Soojeong** · Kim, Sung-Soo*** · Lee, Myoungsook***§

Department of Food and Nutrition, ** Sungshin Women's University, Seoul, 136-742, Korea
Korean Food Research Institute, *** Sungnam, 463-746, Korea

ABSTRACT

Panax ginseng C.A. Meyer (Panax ginseng) has been used for several thousand years to prolong longevity in Asian countries. Ginsenosides are the most active components isolated from ginseng and belong to damarane saponin which are separated into protopanaxadiol and protopanaxtriol. To evaluate the complex effect of ginsenoside in apo E null mice, ginseng extract were intraperitoneally (i.p.) injected and provided high-cholesterol diet for 12 weeks. Ginseng extract came from were i.p. injected with dose of 100 mg/kg/day for 4 weeks in the last experimental duration. Ginseng extract used experiment was abundant Rb1, Rc, Re, and Rg1 and PD : PT ratio was 1.2. The high-cholesterol diet induced liver damage was significantly reduced by ginseng extract. Results from plasma lipid profiles and atherogenic index were improved by ginseng extracts. The GE group significantly decreased plasma TG and TC by 73% and 61% compared to apo E (-/-) group. Also ginseng extract tend to decrease lipid profiles and lipidperoxidation contents in liver and heart. Ginseng extract with an abundant amount of Rg1 significantly suppressed the apoptosis induction of cardiac tissue. In conclusion, ginseng extract (PD : PT = 1) was improved lipid profiles and anti-oxidant effects. (Korean J Nutr 2008; 41(7): 594~601)

KEY WORDS : panax ginseng, ginsenoside, PD : PT ratio, lipidperoxidation, lipid profile.

서 론

심혈관 질환 (cardiovascular disease, CVD)은 당뇨와 관련된 사망률과 이환율의 주요 원인이며, 이상지혈증은 심혈관 질환의 주요 위험요인 중 하나이다.¹⁾ 우리나라에서도 산업화로 인한 전반적인 생활수준 향상과 함께 식습관의 서구화와 생활양식 변화로 인해 체내 대사 이상으로 인한 만성질환 (고혈압, 비만, 당뇨, 이상지혈증) 발병률이 증가함에 따라서 건강 향상을 목적으로 기능성 식품에 대한 관심이 급증하고 있다.

접수일 : 2008년 8월 14일 / 수정일 : 2008년 9월 9일

채택일 : 2008년 10월 5일

*This work was supported by the Sungshin Women's University Research Grant of 2006.

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : mlee@sungshin.ac.kr

Panax ginseng C.A. Meyer (Panax ginseng, Korean ginseng)는 아시아에서 수 천 년 이상 수명연장과 만병통치약으로 사용되었다.²⁾ 서양에서도 인삼은 신체기능 증강, 생리적 스트레스 반응에 대한 적응력 향상 등 면역반응을 증가시켜주는 자양강장제로써 건강을 향상시키기 위한 보조식품으로 많이 사용된다.^{3,4)} 인삼은 단백질과 혼합 합성을 촉진시키고 간 기능 회복 및 항진, 운동수행력 증대, 항피로 작용, 면역 증강, 항암 및 항산화 효과가 있으며, 체내 지방 대사를 촉진시키는 기능성 식품으로 잘 알려져 있다.^{5,6)} Panax ginseng은 종양억제 및 혈관계 질환 등에 다른 인삼종과는 다른 기전으로 생리활성에 차이를 나타낸다.^{7,8)} 이와 같이 인삼은 종류별, 생산지별, 부위별, 연근별, 가공처리 방법에 따라서 생리활성이 다르게 나타난다. 인삼에 존재하는 활성성분 중에서 가장 큰 생리활성을 지닌 ginsenoside는 항염증, 항산화, 항암효과 등 여러 가지 유익한 영향을 다양하게 나타내는 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹¹⁾ Ginsenoside

는 인삼속 식물에만 존재하는 특유의 트리테르페노이드 계열의 담마란계 사포닌으로, 비당부분에 붙어있는 수산기의 수에 따라서 protopanaxadiols (PDs; Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3, Rh2)와 protopanaxatriols (PTs; Rg1, Rg2, Re, Rf, Rh1)로 분류되며, 지금까지 약 30여종의 ginsenoside가 분리되었다. Rb1과 Rb2는 세포내 콜레스테롤 감소효과 및 간 손상에 대한 보호 작용,¹²⁾ Rd의 경우에는 항암 및 항비만 작용과 부신피질호르몬 촉진작용,¹³⁾ Rg1의 경우 NO와 NOS 생성을 통해 심혈관계질환에 대한 보호효과 및 항노화 효과와 기억력 향상에 효과적이라는 연구들이 발표되었다.¹⁴⁾ 이처럼 최근까지 연구된 인삼의 생리활성은 대부분 단일 ginsenoside 중심으로, 인삼에 존재하는 ginsenoside의 혼합효과에 관한 연구는 거의 이루어 지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 동맥경화 동물 모델인 apo E null mice에게 고콜레스테롤 식이를 공급한 뒤 인삼추출물 (PD : PT = 1)을 복강 내로 투여하여 ginsenoside의 혼합효과가 체내에 미치는 지질수치 개선 및 항산화 효과와 같은 생리활성 효과에 대해서 알아보고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 및 식이

실험동물은 apo E 유전자를 가지고 있는 C57BL/6계와 apo E 유전자를 가지고 있지 않은 apo E null mice를 Japan SLC Inc.에서 10주령 (25 g)을 공급받아 처음 1주일 동안은 AIN-76 diet (Dyets Inc)로 적응 사육하였다. Apo E null mice는 저지방 식이를 공급하여도 동맥경화 발병과 함께 중증의 고콜레스테롤 혈증이 나타나는 동물모델이다.¹⁵⁾ 적응기간 후 무작위로 8마리씩 wild-type 대조군 (C57BL/6계), apo E(-/-)군, apo E(-/-) + ginseng extract (GE)군, 총 3군으로 나누어 12주간 고콜레스테롤 식이(1.25% cholesterol, 7.5% cocoa butter)¹⁶⁾를 공급하여 사육하였다 (Table 1). 사육기간의 마지막 4주 동안은 wild-type 대조군과 apo E(-/-)군에게는 생리식염수를 복강으로 투여하였고, GE군은 100 mg/kg/day 농도로 인삼추출물을 복강 투여하였다. 동물사육실의 조건은 온도 21.4 ± 1°C와 습도 55 ± 1%를 유지하였으며, 12시간 dark-light cycle (8 : 00~20 : 00)으로 명암을 조절하였다.

시료의 수집 및 처리

12주간의 사육기간 후 12시간 이상 절식시킨 다음 carotid artery에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 EDTA tube에 담아 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을

취한 후 -80°C에서 보관하면서 분석용으로 사용하였다. 채혈 후 개복한 뒤에, 심장 조직과 간 조직을 적출하였다. 심장 조직은 혈액을 제거한 뒤, 포르말린을 주입하여 4°C에서 하루 보관한 후에 주변 근육 및 지방조직을 제거하여 TUNEL assay에 필요한 시료로 사용하였다. 간 조직은 액체 질소가 스스로 급속 냉동시켜 -80°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

인삼추출물 준비

인삼추출물은 한국식품연구원에서 제공받아 사용하였다. 추출방법은 4년근 백삼을 부위별로 분류하여 60°C에서 7일간 열풍 건조하여 mixer (Gold HM-5000, (주)현대가전업)로 분쇄한 다음 30 mesh 체에 통과시킨 후, 80% 에탄올을 사용하여 추출한 뒤, 65 brix 이상을 시료로 사용하였다.¹⁷⁾ 실험에 사용된 인삼추출물의 성분 분석을 위해서 건조 인삼분말 2 g에 80% methanol을 100 mL를 첨가하고, 환류냉각 추출기로 추출하여 감압농축 하였다. 농축물을 물포화 n-부탄을 20 mL을 이용하여 추출한 뒤 5 mL methanol로 녹여 0.45 μm membrane filter (MFS-13, advantec MFS, Inc. Tokyo, Japan)로 여과시켜 HPLC 분석에 시료로 사용하였다 (Table 2, 3, Fig. 1).

Table 1. The composition of ingredients in high-cholesterol diet used for this study

Ingredients	Grams/kg	Kcal/kg
Casein	75.00	268.50
Sucrose	579.35	2371.40
Cornstarch	150.00	540.00
DL-Methionine	1.15	4.60
Cellulose	50.00	0.00
Cocoa Butter	75.00	675.00
Corn Oil	5.00	45.00
Mineral Mix #200000 ¹⁾	35.00	16.45
Vitamin Mix #300050 ²⁾	10.00	39.20
Cholesterol	12.50	0.00
Sodium Cholate	5.00	0.00
Choline Bitrate	2.00	0.00
Total	1000.00	3906.15

¹⁾Dyets #200000 AIN-76A Mineral Mix (g/kg, use at 35g/kg diet) Calcium Phosphate Dibasic 500.00; Sodium Chloride 74.00; Potassium Citrate H2O 220.00; Potassium Sulfate 52.00; Magnesium Oxide 24.00; Manganous Carbonate 3.50; Ferric Citrate U.S.P. 6.00; Zinc Carbonate 1.60; Cupric Carbonate 0.30; Potassium Iodate 0.01; Sodium Selenite 0.01; Chromium Potassium Sulfate 12H2O 0.55; Sucrose, finely powdered 118.03

²⁾Dyets #300050 AIN-76A Vitamin Mixture (g/kg, use at 10 g/kg diet) Thiamine HCl 0.60; Riboflavin 0.60; Pyridoxine HCl 0.70; Niacin 3.00; Calcium Pantothenate 1.60; Folic Acid 0.20; Biotin 0.02; Vitamin B₁₂ (0.1%) 1.00; Vitamin A Palmitate (500,000 IU/g) 0.80; Vitamin D3 (400,000 IU/g) 0.25; Vitamin E Acetate (500 IU/g) 10.00; Menadione Sodium Bisulfate 0.08; Sucrose finely powdered 981.15

생화학적 분석

간 기능 정도를 측정하기 위해서 혈청에서 glutamate pyruvate transaminase (GPT)와 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 효소활성을 decreasing kinetic method (IFCC, ASSEL S.r.l., Guidna, Italy)를 사용하여 확인하였다. 각 조직에서 지질 수치와 지질과산화물 함량을 측정하였다. Total cholesterol (TC), triglyceride (TG) 농도 (ASSEL S.r.l., Guidna, Italy)¹⁸⁾와 high density lipoprotein cholesterol (HDL) 농도 (Daiichi Pure Chemicals Co.,

Table 2. HPLC condition for the analysis of ginsenosides in Ginseng extract

Instrument	JASCO HPLC system
Column oven	CO-965 (temp. 25~30°C)
Detector	Intelligent UV/VIS Detector : UV-975 (abs 203 nm)
Pump	Intellugent HPLC Pump: PU-980
Detection	LC - Net II / ADC
Column	μ-Bondapak C ₁₈ 300 mm × 3.9 mm I.D. Waters
Mobile phase	(A) Water (B) Acetonitrile
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volumn	20 μL

Table 3. Distribution of ginsenosides in ginseng extract using HPLC analysis (%)

PD ginsenosides	% GE	PT ginsenosides	% GE
Rb1	22.73	Re	18.79
Rb2+Rb3	9.59	Rf	5.55
Rc	17.57	Rg1	18.54
Rd	4.98	Rg2+Rh1	1.67
Rg3 (S+R)	0.11		
Rh2	0.46		
Total	55.44	Total	44.56

PD/PT ratio = 1.2

Ltd. Tokyo, Japan)¹⁹⁾는 효소비색법을 사용하여 측정하였다. 지질과산화물 (lipidperoxidation, LPO) 함량은 microplate assay kit (# fr22; Oxford Biochemical Research, Oxford, MI, USA)로 측정하였으며, 4-hydroxynonenal (4-HNE) 함량은 total LPO 함량에서 malondialdehyde (MDA) 함량의 차이로 계산하였다.²⁰⁾

TUNEL assay

심장 조직을 파라핀 블록으로 준비하여 8 μm의 절편으로 만들어 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 검사로 apoptosis 유도를 관찰하였다. TUNEL 염색은 In situ Apoptosis Detection Kit (TaKaRa Shuzo Co., Ltd. Japan)을 사용하였다. 4% paraformaldehyde로 고정한 심장절편을 슬라이드 글라스에 부착시키고 1주일간 실온에서 건조시켰다. 심장절편을 세척액 (0.1 M PBS, pH 7.4)으로 세척하고 실온에서 20분간 proteinase K (20 μg/mL) 처리 후 다시 PBS으로 세척 후 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 실온에서 5분간 3% H₂O₂로 내인성 peroxidase 활성을 차단하였다. 세척 후 얼음 위에서 2~5분간 세포막 투과 완충액 (permeabilisation buffer)을 처리한 후 Fluorescein-dUTP (TdT+ Labeling safe buffer)로 37°C 배양기에서 90분간 labeling 하였다. 세척 후 Anti-FITC HRP conjugate를 37°C 배양기에서 30분간 항체 반응 후 DAB (5 mg/mL, in Tris buffer, pH 7.0)로 실온에서 10~15분간 발색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

통계분석

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 14.0을 이용하여 분석하였다. 각 군의 % of wild-type 대조군 값의 평균과 표준편차를 구하였으며 군 간의 통계적 유의성은 t-test로 분석하였다.

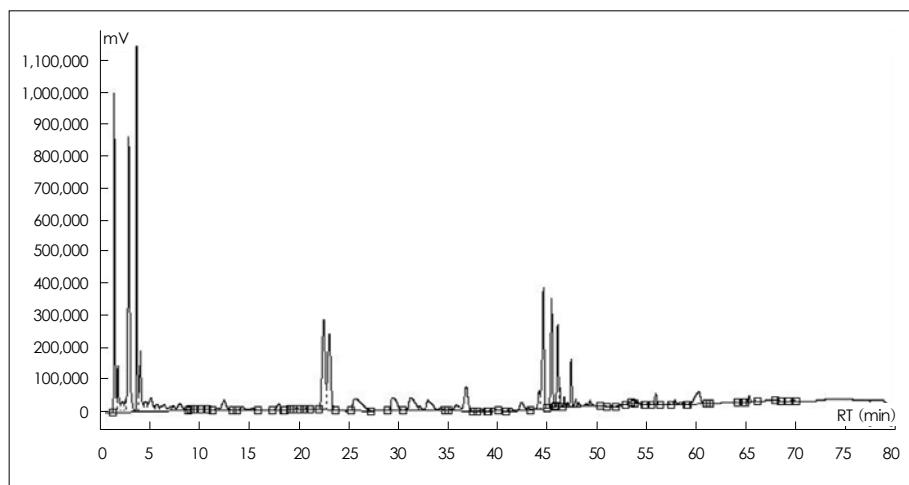


Fig. 1. Ginsenosides profiles of the ginseng extract used in this study.

결 과

간 기능 개선 효과

고콜레스테롤 식이는 apo E (-/-)군의 GPT와 GOT 활성을 증가시켰지만 GE군에서는 증가된 효소 활성을 감소시켜 주었고, 특히 GOT 효소활성을 apo E (-/-)군 보다 GE군이 82% 수준까지 감소시켜 ($p < 0.05$) 간 손상에 대한 보호효과를 나타낸 것을 확인하였다 (Table 4).

혈청 지질수치와 과산화물 함량

본 연구에서 사용한 고콜레스테롤 식이는 apo E (-/-)군과 GE군의 혈중 지질수치를 증가시켰다 (Table 4). GE 군은 apo E (-/-)군보다 혈중 TG와 TC 농도를 73%와 61% 수준까지 감소시켰다 ($p < 0.05$).

HDL 농도는 apo E (-/-)군 보다 GE군이 142% 수준 까지 증가시켰으며 ($p < 0.001$), 동백경화지수와 TG/HDL, TC/HDL 비율 역시 모두 유의하게 감소시켜주어서 혈중 지질수치 개선에 인삼추출물 투여가 효과적임을 확인하였다. 조직과 세포에서 산화 스트레스 지표로 사용되는 지질과

산화물 (lipid peroxidation, LPO)을 혈장에서 측정하였다 (Table 4). 지질과산화물 함량 역시 고콜레스테롤 식이에 의해 증가되는 것을 확인하였다. 인삼추출물 투여는 고콜레스테롤 식이에 의해 증가된 지질과산화물 함량을 감소시켜주는 경향을 나타냈으며, 특히 total LPO와 MDA 함량은 apo E (-/-)군에 보다 GE군이 84%와 86% 수준까지 감소시켜 ($p < 0.05$) 인삼추출물이 지질과산화물에 의한 산화적 손상에 대한 보호효과를 나타내는 것을 확인하였다.

조직의 지질수치와 과산화물 함량

간 조직과 심장 조직에서도 지질수치와 지질과산화물 생성을 측정하였다 (Fig. 2). 혈청에서의 결과와 마찬가지로 고콜레스테롤 식이에 의해서 조직의 지질 수치 및 지질과산화물은 증가하는 경향을 나타냈으며, 인삼추출물 투여는 이렇게 증가된 각 수치들을 감소시키는 경향을 보였다. 하지만 간 조직의 TC 농도는 고콜레스테롤 식이와 인삼추출물 투여에 큰 영향을 보이지 않았으나, TG 농도를 GE군이 apo E (-/-)군 보다 77% 수준까지 감소시켰다 ($p < 0.05$). 심장 조직의 TG와 TC 농도는 각각 apo E (-/-)군 보다 GE군이 62%와 56% 수준으로 감소시키는 경향이 나타났지만 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 조직에서 측정한 MDA 함량을 확인해보면, 간 조직에서는 인삼추출물 투여의 큰 영향을 보이지 않았으며 심장 조직에서는 오히려 인삼추출물 투여 시 증가되는 것을 확인하였다. 간 조직의 total LPO와 4-HNE 함량은 apo E (-/-)군 보다 GE군이 55%와 22% 수준으로 감소시켰으며, 심장 조직에서는 85%와 78% 수준으로 감소시켰으나 표준편차 범위가 매우 커서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 지질과산화물 생성을 측정하는 sensitive biomarker가 필요할 것으로 생각된다.

심장 조직에서 인삼추출물의 TUNEL 양성세포 발현에 미치는 효과

인삼추출물이 고콜레스테롤 식이를 제공한 apo E null mice에서의 TUNEL 양성 세포 발현에 미치는 효과를 확인하였다 (Fig. 3A, B).

이때 TUNEL 양성세포는 진한 암갈색의 핵을 갖고 있는 것으로 관찰되었으며, apoptosis를 나타낸다. 이번 실험에 사용된 apo E null mice는 일반적으로 동백경화동물 모델로 사용되어지는데, 12주간의 고콜레스테롤 식이는 대조군 보다 apo E (-/-)군에서 심장세포에 apoptosis 유도를 현저히 증가시켰다. GE군은 apo E (-/-)군보다 심장세포의 apoptosis 유도를 억제시켜 정상세포 수준을 증가시키는

Table 4. Changes in plasma lipid profiles and lipid peroxides contents in high-cholesterol diet fed apo E null mice

	% of wild-type control (C57BL/6) ¹⁾		p-value
	apo E(-/-)	apo E(-/-) + GE	
Liver function			
GPT	233.4 ± 33.6 ²⁾	206.4 ± 3.1	NS ³⁾
GOT	240.2 ± 34.1	197.5 ± 14.7	* ⁴⁾
Lipid profile			
TG	498.0 ± 86.0	365.4 ± 41.0	*
TC	599.2 ± 111.8	362.7 ± 19.4	*
HDL	228.4 ± 15.8	323.4 ± 31.3	**
Atherogenic indices			
AI	264.3 ± 66.8	103.6 ± 14.9	*
TC/HDL	241.6 ± 57.6	103.1 ± 12.9	*
TG/HDL	185.0 ± 26.8	96.8 ± 14.3	**
Lipidperoxidation			
Total LPO	373.0 ± 41.8	312.5 ± 30.4	*
MDA	443.1 ± 33.1	382.7 ± 28.3	*
4-HNE	302.7 ± 33.0	242.2 ± 39.5	NS

¹⁾Wild-type control: saline injection, apo E(-/-): saline injection, apo E(-/-) + GE: ginseng injection (100 mg/kg/day), GPT: glutamate pyruvate transaminase, GOT: glutamic oxaloacetic transaminase, TG: triglyceride, TC: total cholesterol, HDL: high-density cholesterol, AI: (TC-HDL)/HDL, total LPO: total lipid peroxidation, MDA: malondialdehyde, 4-HNE: 4-hydroxyneonenal

²⁾Values are expressed as means ± SD

³⁾NS: not significant

⁴⁾Statistical significance, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ compare with apo E(-/-) group

데 효과적인 것을 확인하여, 인삼추출물이 지질개선 및 항산화 효과를 통해 심혈관질환에 대해서도 예방작용을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

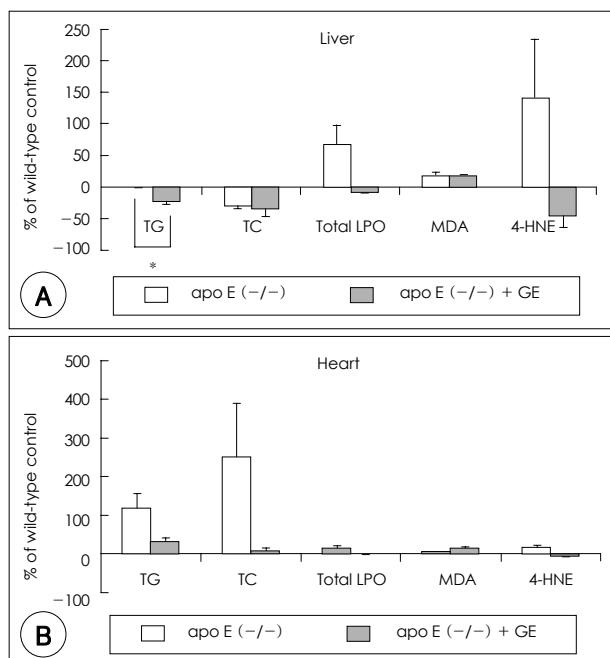


Fig. 2. The changes in lipid profile and lipid peroxides (MDA, 4-HNE) contents in liver (A) and heart (B) after ginseng extract was injected in apo E null mice. Statistical significance, *: $p < 0.05$ compare with apo E (-/-) group. (wild-type control: saline injection, apo E (-/-): saline injection, apo E (-/-) + GE: ginseng injection (100 mg/kg/day), TG: triglyceride, TC: total cholesterol, HDL: high-density cholesterol, total LPO: total lipid peroxidation, MDA: malondialdehyde, 4-HNE: 4-hydroxynonenal).

고 칠

전 세계적으로 매년 17만 명의 사람들이 심장병이나 뇌졸중과 같은 심혈관 질환 (cardiovascular disease, CVD)로 인해 사망하며, 당뇨병 역시 빠르게 발병률이 증가하고 있다. 심장병이나 뇌졸중은 당뇨와 관련된 사망률과 이환율의 주요 원인이며, 이상지혈증은 주요한 CVD의 위험요인이다.²¹⁾

인삼에 존재하는 활성성분 중에서 가장 큰 생리활성을 지닌 ginsenoside는 항염증, 항산화, 항암효과와 같은 여러 가지 유익한 영향을 다양하게 나타낸다.⁹⁻¹¹⁾ Ginsenoside는 인삼속 식물에만 존재하는 특유의 사포닌으로 protopanaxadiols (PDs; Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3, Rh2)과 protopanaxtriols (PTs; Rg1, Rg2, Re, Rf, Rh1)로 계열로 분류되며, 인삼의 종류에 따라서 ginsenoside는 구성성분은 2~20% 정도 차이가 나타난다.

본 연구에서는 동맥경화 동물 모델인 apo E null mice에게 고콜레스테롤 식이를 공급한 뒤 인삼추출물 (PD : PT = 1)을 복강내로 투여하여 ginsenoside 혼합효과가 체내에 미치는 지질수치 개선 및 항산화 효과와 같은 생리활성 효과에 대해서 확인하였다.

실험에 사용된 인삼추출물의 성분을 분석한 HPLC 결과를 확인해보면, PD계열에서는 Rb1과 Rc 함량이 높았으며 PT계열에서는 Re와 Rg1의 함량이 높게 나타났고 PD와

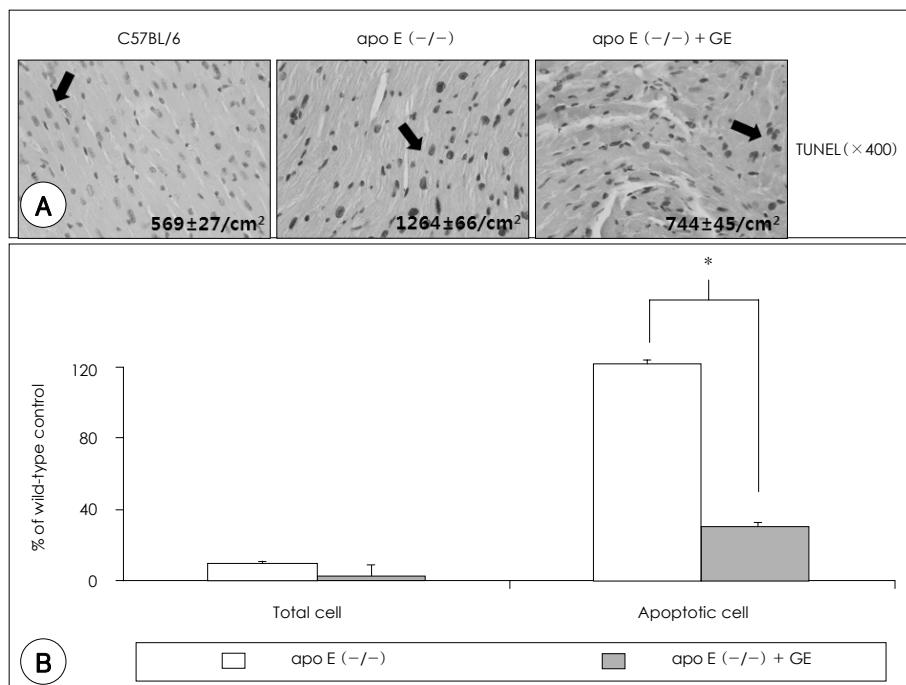


Fig. 3. The effect of ginseng extract (GE) on expression of TUNEL-induced apoptotic cells (arrow) (A) and histogram illustrating the expression of necrosis (B) in the cardiomyocyte of high-cholesterol fed apo E null mice. [wild-type control: saline injection, apo E (-/-): saline injection, apo E (-/-) + GE: ginseng injection (100 mg/kg/day)].

PT 비율은 1.2 정도로 나타났다 (Table 3). 일반적으로 herbal plant에서 추출한 사포닌 종류는 용혈작용을 촉진시키거나 간 독성을 나타내지만,²²⁾ 이번 실험에서 사용된 100 mg/kg 농도의 인삼추출물의 복강내 투여는 간 독성이나 용혈작용을 일으키지 않는 것을 알 수 있었다. Gum 등은²³⁾ benzo[α]pyrene (BP)로 간 손상을 유도시키기 전에 50 mg/kg 농도의 인삼추출물을 위 장관으로 투여한 결과 혈중 GPT와 GOT 활성을 유의하게 감소시켰으며 간에 독성효과를 나타내지 않았다고 하였다. 그러나 25 mg/kg 농도의 Rb1을 구강으로 투여시 t-BHT로 유도시킨 간 독성을 효과적으로 감소시켰으나, 복강으로 투여시에는 변화가 나타나지 않았다고 보고하여,²⁴⁾ 본 연구에서 나타난 간 보호효과는 인삼추출물에 높은 함량으로 존재하였던 Rb1과 Rc의 효과라고 생각된다.

고콜레스테롤혈증과 고증성지방혈증은 심장질환에 영향을 주는 독립적인 위험요인으로 혈중 지질 수치는 지질 대사를 나타내는 좋은 지표이다. 이번 연구에서 인삼추출물은 조직과 혈중 지질수치 개선에 효과적인 영향을 보여주었으며, HDL 농도를 유의하게 증가시켰고 심혈관질환의 위험도를 판정하는 동맥경화지수를 유의하게 감소시켰다. Cho 등은²⁵⁾ STZ로 유도시킨 당뇨쥐에게 Re를 구강으로 투여하였을 때 콜레스테롤 저하효과가 농도에 의존해서 나타났으며, 콜레스테롤 대사 이상과 함께 나타나는 혈중 TG 농도 증가는 단기간 투여 시에는 감소효과가 없었으나 장기간 투여 시에는 감소효과가 나타났다고 보고하여서 4 주 이상의 인삼추출물 투여 시 TG 농도를 더 효과적으로 감소시킬 수 있을 것이라 생각된다. 또한 Rb1을 10 mg/kg 농도로 복강 투여 시, 간의 TG 농도는 유의하게 감소시켜 준 반면에 혈중 지질수치에는 영향을 미치지 않았고 TG/HDL 비율을 감소시키는 경향을 나타냈다고 보고하였다.²²⁾ 이번 연구에서는 인삼추출물이 간의 TG 농도뿐만 아니라 혈중지질수치와 AI를 유의하게 감소시켰는데, 인삼추출물에 존재하는 다른 ginsenoside의 상호작용에 의한 것이라 생각된다. Sung 등은 인삼추출물을 농도별로 경구 투여하였을 때, TC 농도가 투여농도에 의존하여 감소하는 경향을 나타냈으며, TG 농도는 1,000 mg/kg 농도에서 가장 큰 감소효과를 나타냈다고 보고하였고,²⁶⁾ 고지방-고콜레스테롤 식이를 먹인 쥐에게 n-부탄올로 추출한 인삼추출물을 농도별로 구강으로 투여한 결과, 간조직과 혈중 지질수치를 농도에 의존하여 감소시켰다는²⁷⁾ 연구결과를 통해서 조직의 지질수치를 감소시키는 데에는 고농도의 인삼추출물 투여가 효과적임을 알 수 있다.

지질과산화물은 활성산소 (reactive oxygen species,

ROS)에 의해 일어나는 생체 구성분자의 변화나 세포막의 불포화 지방산과 일련의 연쇄반응을 일으켜 촉진된다. 지질과산화물의 최종 산물인 MDA 함량 증가는 세포에 산화적 손상을 가해 생리적 기능을 저하시켜 여러 질병의 원인으로 작용하며, 내인성 LPO 지표로 사용된다.^{28~30)} 이번 연구에서 인삼추출물 투여는 조직과 혈중의 지질과산화물 생성을 감소시켜주는 경향을 보여주었다. BP 투여는 혈중 지질과산화물 함량을 유의하게 증가시키는데, 인삼추출물 투여는 혈중 total LPO 함량을 유의하게 감소시켜서 BP에 의한 산화적인 손상에 보호효과가 나타낸다고 하였다.²³⁾ 이번 연구에서도 고콜레스테롤 식이에 의해 증가된 혈중 total LPO와 MDA 함량을 인삼추출물이 유의하게 감소시켜 산화스트레스에 대한 보호효과를 나타낸 것을 확인하였다. 고지방식이와 함께 인삼 추출물을 농도별로 구강으로 투여시, 간 조직의 MDA 함량은 가장 낮은 투여 농도인 500 mg/kg을 제외하고 모두 감소시켰으며 특히 3,000 mg/kg 농도의 가장 높은 농도에서 유의하게 감소시킨다고 보고되었다.³¹⁾ 이를 통해서 지질수치와 마찬가지로 조직의 지질과산화물 감소에도 고농도의 인삼추출물 투여가 더 효과적이라는 것을 알 수 있으며, 향후 sensitive biomarker를 사용한 연구가 필요할 것이라 생각된다.

심장에서 발생하는 apoptosis는 ischemia나 ischemia-reperfusion 과정동안 발생되며,^{32~37)} ischemia 시작 후 2~3시간 내에 일어나는 심장세포의 사멸에 대한 주요 개시형태로 necrotic 세포사멸과 더불어 심근경색을 유리시킨다.³⁸⁾ 이처럼 심장세포에서 발생하는 apoptosis의 주요 원인물질로는 ROS로 여겨지며,^{39~41)} 세포지질막의 과산화를 초래한다.⁴¹⁾ 본 연구에서 apo E null mice에게 제공한 12주간의 고콜레스테롤 식이는 심장 조직에 산화적 스트레스를 야기시켜 ROS에 대한 노출이 증가되어 심장세포의 apoptosis를 유도시켰다. 인삼추출물은 심장세포를 산화적 스트레스로부터 보호하여 apoptosis를 효과적으로 억제시켰다. 인삼의 항염증 작용은 잘 알려져 있으며,⁴²⁾ CVD에서도 효과적인 영향을 나타낸다.⁴³⁾ 고콜레스테롤 식이를 먹인 토끼에게 인삼을 투여하였을 때 혈중 지질수치를 감소시켜 죽상판 예방에 명백한 도움을 주어 대동맥의 플라그 형성 감소와 함께 심혈관질환 개선에 직접적인 효과가 있다고 보고하였다.⁴⁴⁾ 인삼에 풍부하게 존재하는 Rg1은 NO 분비를 증가시켜 대동맥과 폐동맥을 이완시켜주며, 이에 따른 심혈관 보호효과는 중요한 항산화제인 NO를 분비시킴으로써 발생한다.⁴⁵⁾ 이번 연구에서도 Rb1, Rc, Re, Rg1이 풍부했던 인삼 추출물은 혈중 지질수치를 개선과 항산화 효과를 나타내 심혈관계 질환에 효과적인 영향을 나타낼 것이라 생각된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 C57BL/6계열과 apo E null mice 수컷 쥐에게 고콜레스테롤 식이 (1.25% cholesterol, 7.5% cocoa butter)를 총 12주간 공급한 후, 마지막 실험 4주간은 wild-type 대조군과 apo E (-/-)군에게는 생리식염수를 GE군에게는 100 mg/kg 농도의 인삼추출물을 복강내로 투여하여, 인삼추출물에 존재하는 여러 종류의 ginsenoside가 체내 지질조성과 항산화 효과에 미치는 영향에 대해서 알아보았다.

1) 본 실험에서 사용한 인삼추출물은 PD계열의 Rb1과 Rc 함량이 높았으며 PT계열에서는 Re와 Rg1 함량이 높게 나타났으며, PD와 PT의 비율은 1.2정도로 나타났다.

2) 12주간의 고콜레스테롤 식이는 GPT와 GOT 효소활성을 증가시켰고, GE군은 GOT 활성을 82% 수준으로 감소시켰다 ($p < 0.05$).

3) 각 조직에서 측정한 지질수치와 지질과산화물 함량 역시 고콜레스테롤 식이에 의해서 증가되었다. GE군은 증가된 지질수치와 지질과산화물 함량을 감소시키는 경향을 보였으며, 특히 혈중 TC농도, 동맥경화지수와 total LPO, MDA 함량을 apo E (-/-)군보다 유의하게 감소시켰으며, HDL 농도는 유의하게 증가시켰다.

4) apo E (-/-)군은 고콜레스테롤 식이에 의해서 심장세포의 apoptosis를 유도시켰지만, Rg1 함량이 풍부한 인삼추출물을 투여한 GE군에서는 고콜레스테롤 식이에 의한 산화적 스트레스에 대한 보호하여 심장세포의 apoptosis를 효과적으로 억제시켰다.

전체적으로, 100 mg/kg 농도의 PD : PT = 1인 인삼추출물을 apo E KO mice에게 복강투여는 간에 독성효과를 나타내지 않았으며, 혈중 지질수치 개선 및 지질과산화물 함량을 감소시키는데 효과적이었다. 그러나 조직의 지질수치와 지질과산화물 감소에는 통계적으로 유의한 영향을 보이지 않았는데, 이는 본 실험에서 사용한 인삼추출물의 투여농도보다 더 높은 고농도의 투여와 4주 이상의 장기간 투여 시 더욱 효과적인 영향을 나타낼 것이라고 생각된다. 하지만, 인삼추출물 투여는 심장세포의 apoptosis를 효과적으로 억제시켜 심혈관질환에 대한 보호 작용을 나타내는 것을 확인하였다.

Literature cited

- 1) Ancion A, Lancellotti P, Prerard LA. Congestive heart failure and

- diabetes mellitus. *Rev Med Liege* 2005; 60 (5-6) : 536-540
 2) Liu CX, Xiao PG. Recent advances on ginseng research in China. *J Ethnopharmacol* 1992; 36 (1) : 27-38
 3) Xie JT, Mehendale SR, Li X, Quigg R, Wang X, Wang CZ, Wu JA, Aung HH, Rue PA, Bell GI, Yuan CS. Anti-diabetic effect of ginsenoside Re in ob/ob mice. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1740 (3) : 319-325
 4) Mayr M, Mayr U, Chung YL, Yin X, Griffiths JR, Xu Q. Vascular proteomics: linking proteomic and metabolomic changes. *Proteomics* 2004; 4 (12) : 3751-3761
 5) Jung NP, Jin SH. Studies on the physiological and biochemical effects of Korean ginseng. *Korean J Ginseng Sci* 1996; 20 (4) : 431-471
 6) Kim SS, Park HY, Byun YH, Hwang BG, Lee JH. The effects on the blood lipid profiles and body fat by long term administration of red ginseng product. *J Ginseng Res* 2002; 26 (2) : 67-73
 7) Sengupta S, Toh SA, Sellers LA, Skepper JN, Koolwijk P, Leung HW, Yeung HW, Wong RNS, Sasisekharan R, Fan TPD. Modulating angiogenesis: the yin and the yang in ginseng. *Circulation* 2004; 110 (10) : 1219-1225
 8) Sievenpiper JL, Arnason JT, Leiter LA, Vuksan V. Decreasing, null and increasing effects of eight popular types of ginseng on acute postprandial glycemic indices in healthy humans: the role of ginsenosides. *J Am Coll Nutr* 2004; 23 (3) : 248-258
 9) Kim YS, Kim DS, Kim SI. Ginsenoside Rh2 and Rh3 induce differentiation of HL-60 cells into granulocytes: modulation of protein kinase C isoforms during differentiation by ginsenoside Rh2. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30 (3) : 327-338
 10) Wakabayashi C, Murakami K, Hasegawa H, Murata J and Saiki I. An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246 (3) : 725-730
 11) Liu CX, Xiao PG. Recent advances on ginseng research in China. *J Ethnopharmacol* 1992; 36 (1) : 27-38
 12) Noh YH, Lim GR, Koo JH. Comparison of the effects of ginseng total saponin, ginsenoside-Rb1, ginsenoside-Rb2 and lovastatin on the expression of mRNAs for HMG CoA reductase and LDL receptor. *Korean J Ginseng Sci* 1996; 20 (3) : 241-247
 13) Kim MS, Lee MS, Kim SH, Kim SH, Kim HJ, Sung MJ, Kim HY, Kwon DY, Hwang JT. Anti-obesity effects of ginsenoside Rd via AMPK and PPAR gamma. *Korean J Biotechnol Bioeng* 2007; 22 (5) : 341-344
 14) Zhang JT. Improvement of learning and memory and biphasic regulation of body temperature in mice induced by ginsenoside Rg1 and Rb. Proceedings of the 4th of China-Japan Symposium on Drug. Aug; 1991
 15) Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, and Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; 258 (5081) : 468-471
 16) Guo Y, Zhang C, Du X, Nair U, Yoo TJ. Morphological and functional alterations of the cochlea in apolipoprotein E gene deficient mice. *Hear Res* 2005; 208 (1-2) : 54-67
 17) Shibata S, Tanaka O, Ando T, Sado M, Tsushima S, Ohsawa T. Chemical studies on oriental plant drugs. XIV. Protopanaxadiol, a genuine sapogenin of ginseng saponins. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1966; 14 (6) : 595-600

- 18) Vassault A, Sebille L, Bailly M. Evaluation according to the NC-CLS protocol of the Kodak-Ektachem procedure applied to the estimation of glucose and urea in plasma (author's transl). *Ann Biol Clin (Paris)* 1981; 39 (1): 17-28
- 19) Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62 (5): 707-714
- 20) Lee MS, Bae MA. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in CYP2E1-containing HepG2 cells by activating the c-Jun N-terminal protein kinase related mitochondrial damage. *J Nutr Biochem* 2007; 18 (5): 348-354
- 21) Ancion A, Lancellotti P, Prerard LA. Congestive heart failure and diabetes mellitus. *Rev Med Liege* 2005; 60 (5-6): 536-540
- 22) Yoon SH, Park EJ, Oh KH, Chung YG, Kwon OJ. The effect of lithosperomi radixon benzo(a)pyrene-induced hepatotoxicity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1993; 22 (2): 144-148
- 23) Gum SI, Jo SJ, Ahn SH, Kim SG, Kim JT, Shin HM, Cho MK. The potent protective effect of wild ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer) against benzo[α]pyrene-induced toxicity through metabolic regulation of CYP1A1 and GSTs the potent protective effect of wild ginseng. *J Ethnopharmacol* 2007; 112 (3): 568-576
- 24) Lee HU, Bae EA, Han MJ, Jae N, Kim DH. Hepatoprotective effect of ginsenside Rb1 and compound K on tert-butyl hydroperoxide-induced liver injury. *Liver Int* 2005; 25 (5): 1069-1073
- 25) Cho WC, Chung WS, Lee SK, Leung AW, Cheng CH, Yue KK. Ginsenoside Re of Panax ginseng possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 550 (1-3): 173-179
- 26) Sung JH, So NW, Jeon BH, Chang CC. Effect of white and red Panax ginseng extract on serum lipids level in high-fat-diet fed rats. *J Ginseng Res* 2004; 28 (1): 33-38
- 27) W Ji, BQ Gong. Hypolipidemic effects and mechanisms of Panax notoginseng on lipid profile in hyperlipidemic rats. *J Ethnopharmacol* 2007; 113 (2): 318-324
- 28) Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1986; 247 (1): 1-11
- 29) Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG. Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest* 1988; 82 (3): 1040-1050
- 30) Bartoli GM, Giannattasio B, Palozza P, Cittadini A. Superoxide dismutase depletion and lipid peroxidation in rat liver microsomal membranes: correlation with liver carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1988; 966 (2): 214-221
- 31) Jeon BH, Seong GS, Chun SG, Sung JH, Chang CC. Antioxidant effects of white and red ginseng on liver of high fat diet-treated mice. *J Ginseng Res* 2005; 29 (3): 138-144
- 32) J Searle, JF Kerr, CJ Bishop. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982; 17 (2): 229-259
- 33) Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; 75 (3): 426-433
- 34) Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; 94 (4): 1621-1628
- 35) Bardales RH, Hailey LS, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM. In situ apoptosis assay for the detection of early acute myocardial infarction. *Am J Pathol* 1996; 149 (3): 821-829
- 36) Gupta RK, Schuster R, Christian WD. A comparative immunohistochemical study of splenic arterial hyalinosis in health and disease. *Am J Pathol* 1972; 69 (1): 79-88
- 37) J kajstura, W Cheng, K Reiss, AW Clark, EH Sonnenblick, S Krajewski, CJ Reed, G Olivetti, P Anversa. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74 (1): 86-107
- 38) Hockenberry DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251
- 39) Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993; 262 (5137): 1274 - 1277
- 40) Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379 (6560): 88-91
- 41) Sandstrom PA, Mannie MD, Buttke TM. Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. *J Leukocyte Biol* 1994; 55 (2): 221-226
- 42) Cabral de Oliveira AC, Perez AC, Merino G, Prieto JG, Alvarez AI. Protective effects of panax ginseng on muscle injury and inflammation after eccentric exercise. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001; 130 (3): 369-377
- 43) Zhou W, Chai H, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen CJ. Molecular mechanisms and clinical applications of ginseng root for cardiovascular disease. *Med Sci Monit* 2004; 10 (8): RA187-192
- 44) SC Joshi. Antiatherogenic and antioxidant status of Panax ginseng in cholesterol fed rabbits. Proceedings of the 9th Int Ginseng Symposium. 2006 Sep 25-28, Keumsan, Republic of Koorea
- 45) Lu JP, Ma ZC, Yang J, Huang J, Wang SR, Wang SQ. Ginsenoside Rg1-induced alterations in gene expression in TNF- α stimulated endothelial cells. *Chinas Med* 2004; 117 (6): 871-876