

비뇨생식계를 지배하는 골반신경절
세포에서 진세노사이드에 의한
칼슘통로의 조절

연세대학교 대학원

의 학 과

이 용 수

비뇨생식계를 지배하는 골반신경절
세포에서 진세노사이드에 의한
칼슘통로의 조절

지도 이중우 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의학과

이용수

이용수 석사 학위논문으로 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

부족한 저를 의사와 학문의 길로 인도해주신 하나님께 감사드립니다. 의학과 재학시절부터 열성으로 학문의 자세를 가르쳐 주시고 언제나 격려해주시며 자상하게 지도해 주신 이종우 교수님께 감사드립니다. 또한 본 연구의 처음부터 끝까지 관심을 보여주시고 지도 편달을 아끼지 않으신 김성진 교수님과 본 연구를 처음부터 세심하게 다듬어 주시고 지도해주신 정성우 교수님께도 깊은 감사와 존경을 드립니다. 그리고 연구과정에 여러 가지 도움을 아끼지 않으신 박병곤 선생님께도 깊은 감사를 드립니다. 연구과정 동안 도움을 주신 생리학 교실의 공인덕 교수님, 정해숙 선생님, 차승규 선생님, 그리고 최현경 씨께도 감사의 마음을 드립니다.

저를 사랑하고 저를 위해 항상 기도해주시는 목사님들과 형제 자매님들, 그리고 어머니, 동생들에게 감사의 마음을 드립니다. 항상 저를 위해 기도하시고 노심초사하시는 어머니께 이 작은 결실을 드립니다.

저 자 씬

목 차

국문 요약	1
제1장 서론	3
제2장 재료 및 방법	9
2.1. 실험용액 및 약물	9
2.1.1. 실험 용액	9
2.1.2. 약물	9
2.2. 단일 신경세포 분리 및 유지	10
2.3. 칼슘전류 측정	11
2.4. 데이터 분석 및 통계 처리	12
제3장 결과	17
3.1. 교감 및 부교감 주골반신경절 세포들의 전기생리학적 동정	17
3.2. 교감 주 골반신경절 세포에서 진세노사이드에 의한 칼슘전류 억제 효과	20
3.3. 부교감 신경세포의 칼슘전류에 미치는 PT의 영향	25
3.4. 진세노사이드에 의한 칼슘통로 조절에서 G protein의 역할	25
3.5. 여러 가지 칼슘전류 아형에 미치는 PT의 영향	26
3.6. HVA 칼슘전류에 미치는 PT fraction의 영향	27

3.6. T-형 칼슘통로에 대한 진세노사이드의 영향	28
제4장 고찰	35
제5장 결론	43
참고 문헌	44
영문 요약	51

그림 목차

그림 1. 진세노사이드의 구조	13
그림 2. 수컷 흰쥐의 주 골반신경절의 해부 및 구조	14
그림 3. 주 골반신경절로부터 분리된 신경세포들의 광학현미경적 소견	15
그림 4. 막전압 고정법에 의한 전류측정 장치의 회로 모식도	16
그림 5. 전기생리학적 방법을 통한 교감 및 부교감 주 골반신경절 세포들의 존재 확인	18
그림 6. 교감 및 부교감 주 골반신경절 세포군 간의 세포막 전기용량 및 칼슘전류의 밀도 비교	19
그림 7. 교감 주 골반신경절 세포의 칼슘전류에 미치는 진세노사이드의 영향	22
그림 8. 진세노사이드에 의한 교감 주 골반신경세포의 칼슘전류 조절	23
그림 9. 진세노사이드 PT에 의한 칼슘전류의 농도의존적 억제	24
그림 10. 진세노사이드 PT에 의한 주 골반신경절 부교감 신경세포의 칼슘 전류 억제	29
그림 11. 진세노사이드 PT에 의한 칼슘전류 억제효과에 G protein 매개 확인	30
그림 12. 진세노사이드 PT에 의한 칼슘전류 억제효과에 pertussis toxin 민감 성 G protein($G_{i/o}$) 관여 확인	31
그림 13. 진세노사이드 PT가 HVA 칼슘전류 아형에 미치는 영향	32
그림 14. HVA 칼슘전류에 미치는 PT fraction의 영향	33
그림 15. T-형 칼슘전류에 미치는 진세노사이드 PT fraction의 영향	34

국문 요약

비뇨생식계를 지배하는 골반신경절 세포에서 진세노사이드에 의한 칼슘통로의 조절

골반신경절은 방광, 전립선, 음경과 같은 비뇨생식계를 지배하는 자율신경절로 생리학적으로 배뇨나 발기반사에 중요한 역할을 담당하고 있다. 주골반신경절은 단일 신경절 캡슐내에 교감 및 부교감 신경세포를 모두 가지고 있는 유일한 자율신경절로 알려져 있다. 본 연구의 목적은 첫째, 인삼 사포닌(진세노사이드)이 수컷 쥐 주골반신경절 세포에서 칼슘전류를 조절할 수 있는지, 둘째, 세포 및 분자수준에서 그 조절의 메카니즘이 무엇인지를 확인하는 것이었다. 이를 위해 효소처리에 의해 분리된 주골반신경세포에서 칼슘전류를 전형적인 whole-cell patch clamp 방법으로 측정하였다. 인삼 총 사포닌(GTS, 0.3 mg/mL)을 가하였을 때 높은 막전압에서 활성화되는 (high-voltage activated, HVA) 칼슘전류가 현저하게 억제되었다($43 \pm 5\%$, $n=12$). GTS의 두가지 주요 요소 중 protopanaxatriol(PT, 0.3 mg/mL)은 HVA 칼슘전류를 억제($38 \pm 2\%$, $n=22$)하였으나 protopanaxadiol(PD, 0.3 mg/mL)의 효과는 미미하였다. 진세노사이드에 의한 칼슘전류의 억제정도는 교감 신경세포와 부교감 신경세포사이에 차이가 없었다. PT에 의한 HVA 칼슘전류의 억제는 전압 및 농도 의존적이었다. 또한 전압 의존적 칼슘전류 억제는 GDPβS의 세포 내 투석과 pertussis toxin(PTX, 500 ng/mL)의 전 처치에 의하여 거의 억제되었다. 대조군과 비교하여 칼슘전류에 대한 PT의 억제 효과

는 선택적 N-형 칼슘통로 차단제인 ω -conotoxin GVIA을 전처리한 후 감소되었다. PT는 또한 FPL64176에 의해 선택적으로 증가되는 L-형 tail 전류 (40 ± 5 %, $n=7$)와 nimodipine과 ω -conotoxin GVIA에 민감하지 않은 non-L/non-N형 전류를 억제하였다(26 ± 4 %, $n=4$). PT는 또한 낮은 막전압에서 활성화되는 T-형 칼슘전류를 억제하였다. PT의 여러 성분중에서 Rg_2 가 HVA 및 T-형 칼슘억제를 유발하는 생리활성물질임이 확인되었다. 결론적으로 인삼의 주요한 생리활성 성분인 진세노사이드는 주 골반신경절 세포에 존재하는 HVA 및 T-형 칼슘통로들을 PTX 민감성 $G_{i/o}$ protein을 매개로 하여 전압의존적인 신호전달경로를 통해 조절한다는 사실을 확인하였다. 본 연구에서 얻은 결과는 인삼의 작용을 세포 및 분자수준에서 이해하기 위한 중요한 기초를 제공하였다 할 것이다.

핵심되는 말 : 주골반신경절, 진세노사이드, Protopanaxatriol, Protopanaxadiol, 인삼, GTS, 칼슘전류

비뇨생식계를 지배하는 골반신경절 세포에서
진세노사이드에 의한 칼슘통로의 조절

<지도 교수 이 중 우>

연세대학교 대학원 의학과

이 용 수

제 1 장 서 론

골반총(pelvic plexus)은 비뇨생식계의 자율신경성 조절(autonomic regulation)에 있어 중요한 역할을 담당하고 있다(Langworthy, 1965; Dail 등, 1975). 골반총의 해부 및 조직학적 특징은 종(species)에 따라 많은 차이가 있다. 대부분의 포유류에서는 넓게 산재되어 여러 다발성 연결들로 이루어진 반면, 쥐(rat)에서는 신경세포들이 하나의 큰 신경절을 이루고 있다. 수컷 쥐의 경우 이를 주 골반신경절(major pelvic ganglion, MPG)이라 하며, 암컷의 경우에는 자궁경관 주위신경절(paracervical ganglion)이라 부르고 있다. 특히 수컷 쥐의 MPG는 암컷의 그것에 비해 세배이상 많은 신경절 세포를 가지고 있고, 구조 및 기능 면에서 성(sex)에 따른 차이가 있다(De Groat 및 Booth, 1993a; Keast, 1999).

MPG는 교감신경인 하복신경(hypogastric nerve)과 부교감신경인 골반신경(pelvic nerve)으로부터 구심성 입력을 받아 방광, 전립선 및 음경 등과 같은

비뇨생식계 기관과 일부의 장(bowel)의 신경지배를 한다(Langworthy 1965; Dail 등, 1975; Keast, 1991; De Groat 및 Booth, 1993a). 기능적으로는 배뇨(micturation)나 발기(erection) 현상 등을 조절한다(Zoubek 등, 1993). 특히 방광폐쇄(bladder outlet obstruction)나 발기부전(erecile dysfunction)과 같은 병적 상태에서 MPG의 형태적 및 기능적인 변화가 보고 된 바 있다(Mills 등, 1992). 따라서 골반 장기의 자율신경계 조절에 관한 생리적 혹은 병태 생리적 연구에 있어서 현재까지 MPG는 매우 유용한 모델이라 할 수 있다(Keast, 1999).

MPG는 자율신경계에서 유일하게 한 개의 ganglion capsule내에 교감신경세포와 부교감신경세포의 두 가지 아군(subpopulation)을 함께 가지고 있다. 신경면역화학적 연구의 결과 교감신경세포는 아드레날린성(adrenergic)과 부교감신경은 콜린성(cholinergic)이라는 사실이 확인이 되었다(Zhu 등, 1995, Keast 및 De Groat, 1989; Keast, 1999). 한편 교감신경세포는 세포의 크기가 비교적 크고, 낮은 막전압에서 활성화되는 T-형 칼슘통로를 가지고 있는 반면 부교감신경세포는 세포의 크기가 작고 T-형 칼슘통로를 가지고 있지 않기 때문에 형태적으로나 전기생리학적으로 구별이 가능하다(Zhu 등, 1995; Zhu 및 Yakel, 1997; Park 등, 2001). MPG 신경세포는 고전적인 신경전달물질인 노에피네프린(NE)이나 아세틸콜린(ACh)외에도 neuropeptide Y, vasoactive inhibitory peptide, adenosine triphosphate, nitric oxide등 다양한 신경전달물질들을 발현하는 것으로 알려져 있다(Dail 등, 1975; Keast 및 De Groat, 1989; Keast, 1991; Zhu 등, 1995; Keast, 1999). 따라서 MPG에 의한 비뇨생식계의 지배는 이들 신경전달물질에 의해 다양하게 조절될 것으로 추측되고 있다.

신경세포의 막에 존재하는 칼슘통로는 신경의 흥분성(excitability), 신경전달물질의 방출(neurotransmitter release), 호르몬의 분비, 신경의 가소성(plasticity) 및 유전자의 발현(gene expression) 등 다양한 기능을 조절하는 데 매우 중요한 역할을 담당한다. 이들 칼슘통로는 생물리화학적 특성에 기초하여 낮은 전압에서 활성화되는(low-voltage activated, LVA, 또는 T-형) 칼슘통로와 높은 전압에서 활성화되는(high-voltage activated, HVA) 칼슘통로로 나눌 수 있다. 약리학적으로 HVA 칼슘통로는 크게 dihydropyridine(예, nimodipine)에 민감한 L-형과 민감하지 않은 non-L 형으로 구별할 수 있고, non-L형은 ω -conotoxin GVIA에 민감한 N-형, ω -agatoxin IVA에 민감한 P/Q-형, 그리고 SNX-482에 민감한 R-형으로 나눌 수가 있다(Zhang 등, 1993; Catterall, 1995). 분자생물학적인 연구를 통해 L-형은 $\alpha 1C$, $\alpha 1D$, $\alpha 1F$, 그리고 $\alpha 1S$ 의 네 가지 유전자에 의해 코딩되며, non-L 형 중 에 N-형, P/Q-형, 그리고 R-형은 각각 $\alpha 1B$, $\alpha 1A$, 그리고 $\alpha 1E$ 유전자에 의해 코딩되는 것으로 밝혀졌다. 아주 최근에 LVA 즉, T-형 칼슘통로는 G, H, 그리고 I의 세 가지 아형(subtype)으로 신경세포에 발현된다는 사실이 밝혀졌다(Perez-Reyes, 1998; Perez-Reyes 등, 1999; Lee 등, 1999). 앞서 소개한 MPG 신경세포에는 주로 HVA 칼슘통로인 N-형이 우세하게 발현되며, 일부가 L-형과 nimodipine과 ω -conotoxin GVIA에 민감하지 않은 non-L/non-N-형(R-형으로 추측되어지는)인 것으로 확인되었다(Zhu 등, 1995; Zhu 및 Yakel, 1997; Park 등, 2001). 한편 MPG 중 교감신경세포에 선택적으로 발현되는 T-형 칼슘통로는 주로 H-형이라는 사실이 최근에 밝혀졌다(Lee 등, 2002). 앞서 언급한 여러 다양한 신경전달물질은 세포막에 존재하는 수용체들을 활성화시

켜 칼슘통로를 통한 칼슘의 세포 내 유입을 조절함으로써 신경의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다(Hille, 1994). 예를 들어 MPG에 존재하는 HVA 칼슘통로는 NE, ACh, VIP, 아데노신 등에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다(Zhu 등, 1995; Zhu 및 Yakel, 1997). 이들 신경전달물질들에 의한 칼슘통로의 조절은 수용체에 연결되어 있는 G protein 에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. 한편 T-형 칼슘통로를 조절하는 물질에 대해서는 현재 알려져 있지 않다.

인삼(ginseng)은 동양의 전통 의약품으로 널리 알려져 있으며, 아시아 및 유럽에서 이용되어 왔고, 현재 미국과 캐나다에서도 자연요법(naturopathic treatment)에 이용되고 있다(Nah 등, 1995). 인삼의 주요한 생리활성 물질(physioactive component)은 인삼 사포닌(ginseng saponin)으로 진세노사이드(ginsenoside)라 한다. 진세노사이드는 다른 식물에서 발견되는 사포닌(saponin)과 유사한 구조를 가진 반면에 그 효과가 느리고, 독성(toxicity)이 약한 것이 특징이다(Kaku 등, 1975). 그림 1에서 보는 바와 같이 진세노사이드의 구조는 스테로이드와 유사하며, 30개의 탄소 원자로 구성된 triterpenoid dammarane의 유도체 중 하나이다(Choi 등, 2001). 진세노사이드는 oleanolic acid, protopanaxadiol(PD), protopanaxatriol(PT)의 3가지 주요 형태가 존재하는데 각각 R₁, R₂, R₃라고 하는 당쇄구조(R side chain)를 가지고 있다(Nah, 1997). 이들 당쇄구조는 단당, 이당, 삼당의 구조로 되어 있으며 이들에 의해 각 진세노사이드의 종류가 결정된다. 현재까지 약 30종의 진세노사이드가 알려져 있고, PD(protopanaxadiol)에는 20S-PT, Ra₁, Ra₂, Ra₃, Rb₁, Rb₁-C, Rb₂, Rb₂-C, Rb₃, Rc, Rc-C, Rd, Rd-C, Rg₃, Rh₂, Rs₁, Rs₂등이 알려져

있고, PT(protopanaxatriol)에는 Re, Rf, Rg₁, Rg₂, 20S-Rf, Rh₁, Notoginsenoside R₁ 등이 알려져 있다(Nah 등, 1995). 인삼이 비록 서양 의약품에 비해 약리학적 효과가 느리고, 미묘하지만 항암(anticancer; Zhu 등, 1995; Lee 등, 1996), 항고혈압(antihypertension; Chen 등, 1984), 항혈전(antiplatelet; Teng 등, 1989), 항당뇨(antidiabetes; Yokozawa 등, 1991), 항스트레스(antistress), 간기능 개선, 학습속도 향상과 허약체질 개선 등의 생리작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 그러나 이러한 다양하고 뛰어난 작용에도 불구하고, 90년대 이전까지 인삼추출물에 의한 효과들이 갖는 작용기전이나 작용부위를 정확히 알 수 없었기 때문에 현대 의약품으로의 개발이 사실상 불가능했다. 그러나 90년대 이후 세부물질의 분리기술 발달로 인삼으로부터 위에서 설명한 새로운 약리활성 물질(pharmacological active component)들이 분리됨으로써 더 세분화된 연구가 진행되었다. 또한 전체적인 생체 내 작용에 대한 연구뿐만 아니라 세포 수준의 연구방법, 세포내 신호 전달(signal transduction)의 연구방법과 분자 수준의 연구방법들이 개발됨에 따라 인삼의 생리활성 물질들의 작용기전(action mechanism)이나 작용부위(action site)까지도 밝힐 수 있는 단계에 이르렀다. 그러나 아직까지 연구 인력의 부족과 연구 방법의 독창성 등의 부족으로 세포 수준이나 분자 수준의 연구가 미흡한 실정이고, 이 문제가 해결되지 못한다면 새로운 현대 의약품으로 인삼의 생리활성 물질을 이용하는 것은 요원한 일일 것이다.

따라서 본 연구목적은 인삼의 주성분인 진세노사이드가 쥐 골반신경절 세포에서 발현되는 칼슘통로에 미치는 약리학적 효과를 관찰하여 교감신경과 부교감신경에서 차이가 있는지를 확인하고, 칼슘통로에 대한 진세노사

이드의 작용이 어떠한 신호전달경로를 통해 나타나는 지를 기존에 알려진 신경전달물질에 의한 칼슘통로의 조절기전과 비교하여 규명하는데 있다.

제 2장 재료 및 방법

2.1. 실험용액 및 약물

2.1.1. 실험 용액

칼슘전류 측정을 위해 사용된 전극 내 용액의 조성(mM)은 120 N-methyl-D-glucamine(NMG) methanesulfonate(MS), 20 tetraethylammonium(TEA)-MS, 20 HCl, 11 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 4 MgATP, 0.3 Na₂GTP, 14 Tris-phosphocreatine(pH 7.2, 290 mOsm)으로 하였다. 세포의 관류액의 조성(mM)은 140 MS, 145 TEA-OH, 10 HEPES, 15 glucose, 10 CaCl₂, 0.0003 tetrodotoxin(TTX)(pH 7.4, 320 mOsm)으로 하여 실험하였다.

2.1.2. 약물

Collagenase type D와 trypsin은 Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN, USA)로 부터 구입하였으며, guanosine 5'-O-thiodiphosphate (GDP β S), nimodipine, norepinephrine(NE), DNase type I은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)로부터, ω -conotoxin GVIA(ω -CgTx)는 Alomone(Belmont, CA, USA)로부터, tetrodotoxin(TTX), FPL64176은 Tocris(Avonmouth, Bristol, UK)로부터, pertussis toxin(PTX)는 List Biological Laboratory(Campbell, CA, USA)로부터 구입하였다. Ginseng total saponin(GTS), protopanaxatriol(PT), protopanaxadiol(PD), Re, Rg₁, Rg₂, Rf는 나승열 박사(전북대학교 수의과대학 생리학교실)로부터 기증받았다. 그리고 세포배양과 관계된 모든 배지 및 약물은 GibcoBRL(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. Nimodipine,

FPL64176은 DMSO에 사용 농도의 1000배 이상으로 농축하여 만들었으며, 나머지 약물들은 3차 증류수를 이용하여 만들어 사용하였다. 약물은 polyethylene tube와 연결된 gas chromatography용 capillary tube 끝을 신경세포의 100 μm 이내에 위치하도록 하여 중력에 의해 세포에 가해지도록 하였다.

2.2. 단일 신경세포 분리 및 유지

실험동물로는 250 g 내외의 수컷 쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였다. Pentobarbital sodium(50 mg/kg, *i.p.*)으로 쥐를 마취시킨 뒤, 즉시 개복 하여 전립선(prostate gland)의 외측에 위치한 주 골반신경절을 적출하고(그림 2), 이를 차가운(4 $^{\circ}\text{C}$) Hank's balanced salt 용액(HBSS, GibcoBRL)으로 옮겼다. 신경절을 둘러싸는 connective tissue(연결조직)를 벗기고 예리한 칼로 조심스럽게 작은 틈새를 낸 후, 이를 0.7 mg/mL collagenase(type D), 0.1 mg/mL trypsin과 0.1 mg/mL의 DNase type I이 들어있는 10 mL의 modified Earle's balanced salt 용액(EBSS, pH 7.4, GibcoBRL)에서 1시간 동안 배양(35 $^{\circ}\text{C}$)하였다(Zhu 등, 1995; Lee 등, 2002). 이때 EBSS에는 3.6 g/L의 glucose와 10 mM의 HEPES를 포함시켰다. 배양 후 배양 플라스크를 흔들어 단일 신경세포들로 분리한 후, clinical centrifuge(International Equipment Company, MA, USA)를 이용하여 1000 rpm의 속도로 원심 분리하였다. 분리된 단일 신경세포들을 10 % fetal bovine serum, 1 % glutamine, 1 % penicilin-streptomycin이 포함된 MEM(GibcoBRL)에 재부유(resuspend)시킨 뒤, poly-L-lysine으로 coating되어 있는 polystyrene culture dish(35 mm)에 plating 하였다. 이를 37 $^{\circ}\text{C}$ 세포 배양기(humidified incubator; 95 % air-5 % CO_2)에서 배양하였으며, 분

리한 후 24시간 이내에 실험에 사용하였다. 분리된 세포들의 광학현미경적 소견은 그림 3에 나타내었다.

2.3. 칼슘전류 측정

전압의존적 칼슘전류는 patch clamp amplifier(Axopatch 1D, Axon Instruments, Foster city, CA, USA)를 사용하여, 전형적인 whole-cell patch clamp 방법으로 기록하였다(Hamil 등, 1981; Jeong 및 Ikeda 등, 1998). 전극은 borosilicate glass capillary(외경; 1.65 mm, 내경; 1.2 mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)를 P-97 Flaming-Brown micropipette puller(Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA)를 사용하여 만들었다. 만들어진 전극은 microforge로 열처리하여 다듬었고, 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1~3 M Ω 이 되는 것을 사용하였다. 신경세포가 들어 있는 culture dish를 도립현미경(inverted microscope) 위에 올려 놓고, 세포외액을 중력에 의해 약 1~2 mL/min 속도로 관류되도록 하였다. 세포막의 전기용량(membrane capacitance)과 직렬 저항(series resistance)은 amplifier로 80 % 이상 보정하였다. 전압생성 및 칼슘전류의 기록은 아날로그/디지털 전환기(Digidata 1200, Axon Instruments Co.)가 연결된 맥킨토시 컴퓨터에 장착된 S4(Stephen R. Ikeda 박사제공) software를 이용하였다. 칼슘전류는 2~5 kHz로 low pass filter한 뒤, 맥킨토시 컴퓨터에 저장하였고, IGOR PRO(Wave-Metrics, Lake Oswego, OR, USA)로 분석하였다. 모든 실험은 실온 (20~22 $^{\circ}$ C)에서 시행하였으며, 본 실험에 사용된 전류 측정장치는 그림 4에 도식적으로 나타내었다.

2.4. 데이터 분석 및 통계 처리

모든 전류의 크기는 동일한 시간대(자극 pulse 시작 10 ms 후)에서 비교하였으며, tail 전류는 자극 pulse가 끝난 후 10 ms에 측정하였다. 측정된 전류의 크기는 세포의 크기에 따른 차이를 보정하기 위해서 그 세포막의 전기용량으로 나눈 전류밀도(pA/pF)로 표시하였다. 세포막 전기용량(Cm)은 20 ms, 10 mV 과분극 자극을 가한 뒤 얻은 capacitative current의 면적을 측정하는 IGOR 매크로로 구하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였고 통계적인 의미는 Student t-검정(unpaired)으로 확인하였다. $p < 0.05$ 인 경우 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

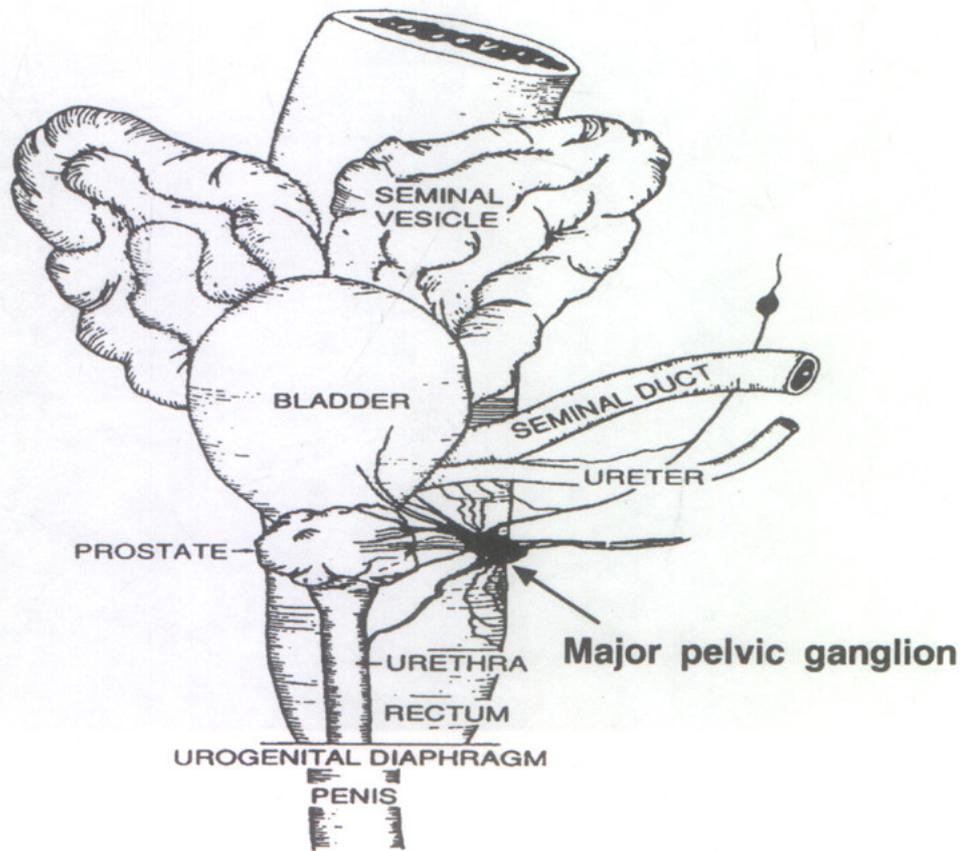


그림 2. 수컷 흰쥐의 주 골반신경절(major pelvic ganglion)의 해부 및 구조

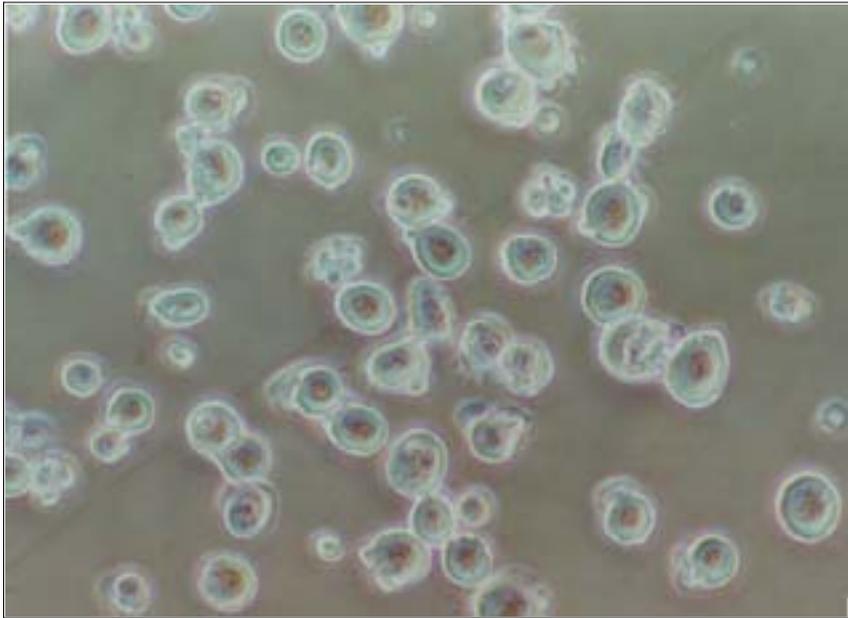


그림 3. 주 골반신경절로부터 분리된 신경세포들의 광학현미경적 소견 (x200)

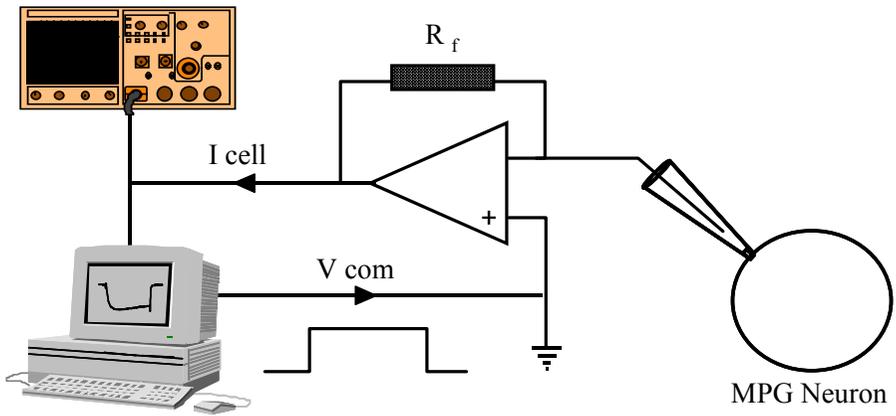
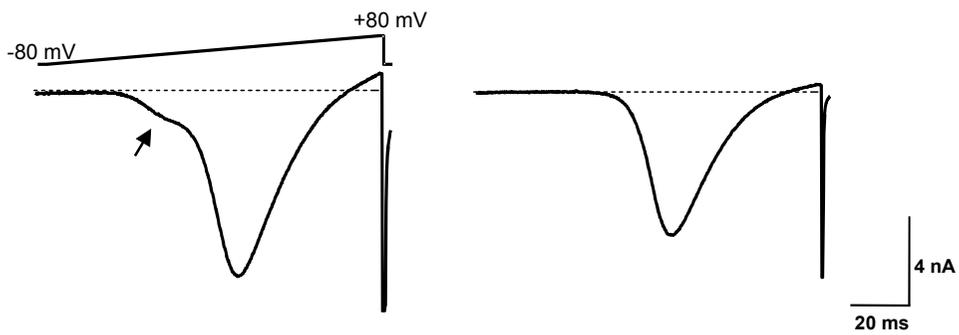


그림 4. 막전압 고정법에 의한 전류 측정 장치의 회로 모식도

제 3장 결 과

3.1. 교감 및 부교감 주골반신경절 세포들의 전기생리학적 동정

분리된 MPG 신경의 막전압을 -80 mV에 고정된 다음 $+80$ mV까지 램프(ramp) 자극을 가하였을 때 나타나는 전압 의존적 칼슘전류를 그림 5에 나타내었다. 이때 전압 의존적 Na^+ 전류는 TTX를 가하여 차단하였고, K^+ 전류는 세포 안과 밖의 모든 K^+ 을 TEA 및 다른 이온으로 치환시킴으로써 제거할 수 있었다. 전체 세포는 낮은 막전압($-50 \sim -20$ mV)에서 활성화되는 T-형 칼슘전류가 나타나는 교감신경세포군과 그렇지 않은 부교감 신경세포군으로 크게 나눌 수 있었다. Zhu 등(1995)의 보고에 의하면 MPG 신경절에서 이러한 T-형 전류를 나타내는 세포는 대부분 tyrosine hydroxylase에 대한 면역-조직학적 염색에서 양성을 보이는 교감 신경세포인 반면, T-형 전류가 없는 세포는 부교감 신경세포라 하였다. 세포막의 면적에 비례하는 평균 세포막 전기용량(capacitance)은 T-형 전류를 가진 교감 신경세포군(82 ± 3 pF, $n=50$)이 부교감 신경세포군(47 ± 3 pF, $n=54$)에 비해 크게 나타났다(그림 6A). 측정된 전류의 크기를 세포의 크기를 반영하는 세포막 전기용량으로 보정할 경우(pA/pF), 이는 전류의 밀도(current density)가 된다. 그림 6B에 나타난 바와 같이 높은 막전압(-10 mV이상)에서 활성화되는 HVA 칼슘전류들의 상대적 밀도는 두 세포군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다($p>0.05$).



Sympathetic

Parasympathetic

그림 5. 전기생리학적 방법을 통한 교감 및 부교감 주 골반신경절 세포들의 존재 확인. 주 골반신경에서 막전압을 -80 mV에 고정된 상태에서 +80 mV까지 램프(ramp) 자극을 가하여 칼슘전류를 기록하였다. 이를 통해 낮은 막전압에서 활성화되어 hump로 나타나는(화살표) T-형 칼슘전류가 존재하는 교감(sympathetic) 신경세포와 존재하지 않는 부교감(parasympathetic) 신경세포로 구분하였다.

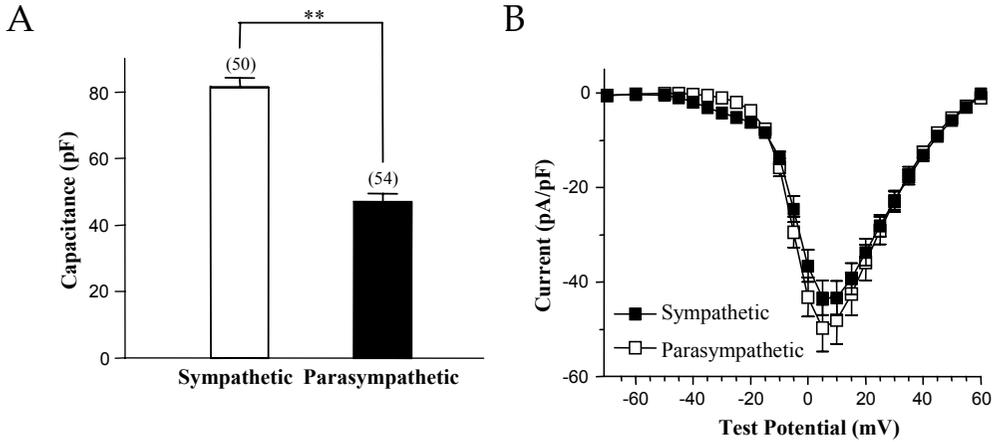


그림 6. 교감 및 부교감 주 골반신경절 세포군 간의 세포막 전기용량 및 칼슘전류의 밀도 비교. A는 T-형 칼슘통로가 존재하는 교감 신경세포와 존재하지 않는 부교감 신경세포의 세포막 전기용량을 비교한 것이다. B는 막전압을 -80 mV로 고정된 후 -70 mV에서 +60 mV까지 5 ~ 10 mV씩 증가하는 탈분극 자극을 가하여 기록된 전류-전압 관계(current-voltage relationship)이다. 이때 칼슘전류의 크기를 세포막 전기용량으로 보정한 전류의 밀도(pA/pF)는 두 군간에 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, **는 $p < 0.005$ 을 의미함.

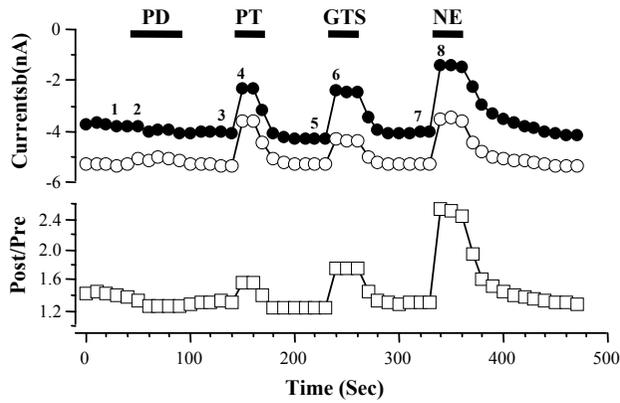
3.2. 교감 주 골반신경절 세포에서 진세노사이드에 의한 칼슘전류 억제 효과

진세노사이드가 교감 주 골반신경절 세포의 칼슘전류에 미치는 효과를 확인하기 위해 두 번의 +10 mV test 자극과 이들 자극 사이의 강한 탈분극(+80 mV) 자극으로 이루어진 double-pulse protocol(그림 7B, inset)로 칼슘전류를 유발하였다. 그림 7A는 여러 가지 종류의 진세노사이드(GTS, PD, 및 PT)를 가하였을 때 시간에 따른 칼슘전류의 변화를 기록한 결과이다. 이때 신경세포의 상태 및 칼슘전류의 조절이 정상적으로 일어나는 지 확인하기 위한 대조군으로 막전압에 의존적(voltage-dependent)으로 칼슘 전류를 억제한다고 알려진 NE(norepinephrine)의 효과도 같이 기록하였다. 앞서 설명한 바와 같이 인삼에서 추출된 진세노사이드를 모두 포함하는 GTS(ginseng total saponin)는 크게 PD(protopanaxadiol)와 PT(prptopana-xatriol)의 두 fraction으로 나눌 수 있다(그림 1 참조). 이중 고농도의 PD(0.3 mg/mL)를 가하였을 때 칼슘 전류에는 변화가 거의 없었다(n=4). 그러나 PT(0.3 mg/mL)와 GTS(0.3 mg/mL)의 경우 칼슘전류를 각각 38 ± 2 %(n=22), 40 ± 5 %(n=10) 억제하는 것으로 나타났다. 대조군인 NE의 경우 칼슘전류를 53 ± 3 %(n=20) 억제하는 것으로 나타났다. 그림 7B에서 첫 번째 test 자극에 의한 칼슘전류의 변화를 관찰하면 칼슘전류의 steady-state(즉, 최대크기)가 될 때까지 걸리는 시간이 GTS와 PT에 의해 길어지는 현상(kinetic slowing)을 볼 수 있는데, 이것은 막전압 의존적 억제(voltage-dependent inhibition; VDI)가 보이는 특징 중 하나라고 알려져 있다(Elmslie 등, 1990; Ikeda, 1991). 이와 함께 VDI의 또 다른 특징 인 prepulse facilitation 현상을 관찰할 수 있었는데, 이는 +80 mV의 강한 탈분극 자극에 의해 칼슘전류가 GTS와 PT에 의한 억제로부터

회복되는 현상이다. 결과에서 보여지는바와 같이 강한 탈분극 자극을 가한 후 주어진 두 번째 test 자극(○)때에는 첫 번째 test 자극(●)때에 비해 GTS와 PT의 억제효과가 뚜렷하게 감소되었다. 그림 8B에서 보여지는바와 같이 강한 탈분극 자극 전·후의 두 test 자극 시 나타나는 칼슘전류의 크기 비(Post/Pre; facilitation 정도)는 전압의존적 억제를 나타내는 대표적인 신경전달물질인 NE의 경우 1.3 ± 0.2 에서 2.1 ± 0.4 (n=20)로 증가하였다. 이와 유사하게 GTS와 PT에 의해서도 각각 1.3 ± 0.1 과 1.3 ± 0.1 에서 1.9 ± 0.2 (n=10)와 1.6 ± 0.1 (n=22)로 증가됨을 확인하였다. 이상의 결과들로부터 GTS와 PT에 의한 칼슘전류의 억제는 주로 막전압 의존적으로 일어남을 확인할 수 있었다.

진세노사이드 PT에 의한 칼슘 전류의 억제가 농도에 비례하여 나타나는지 확인하기 위해 PT를 각각 0.03, 0.1, 0.3, 1 및 3 mg/mL의 농도를 가하였다. 그림 9에 각 PT 농도별 칼슘 전류의 억제 정도가 나타나 있다. PT 0.03, 0.1, 0.3, 1 및 3 mg/mL 농도에서 각각 17 ± 5 , 32 ± 7 , 41 ± 8 , 51 ± 10 , 53 ± 8 %로 칼슘 전류를 억제하는 것으로 나타났다.

A



B

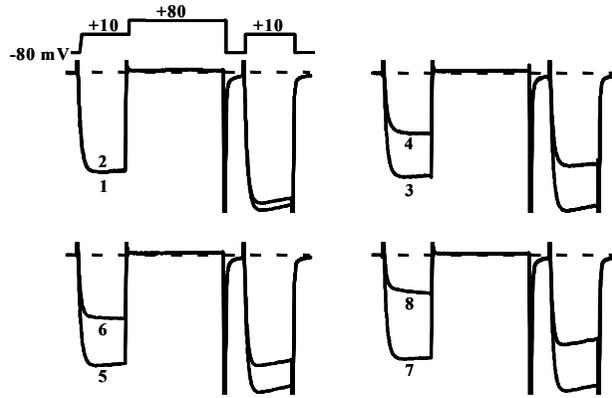


그림 7. 교감 주 골반신경절 세포의 칼슘전류에 미치는 진세노사이드의 영향. A는 약물을 가하였을 때 시간에 따른 칼슘전류의 변화를 나타내었다. 전(●)·후(○) 두 번의 +10 mV test 자극사이에 강한 탈분극(+80 mV) 자극을 가하여 test 자극에 의해 활성화되는 칼슘전류의 크기 및 비(post/pre)를 나타내었다. B는 A결과에서 진세노사이드 GTS(0.3 mg/mL), PT(0.3 mg/mL), PD(0.3 mg/mL)와 NE(10 μ M) 투여 전후의 대표적인 전류기록이다.

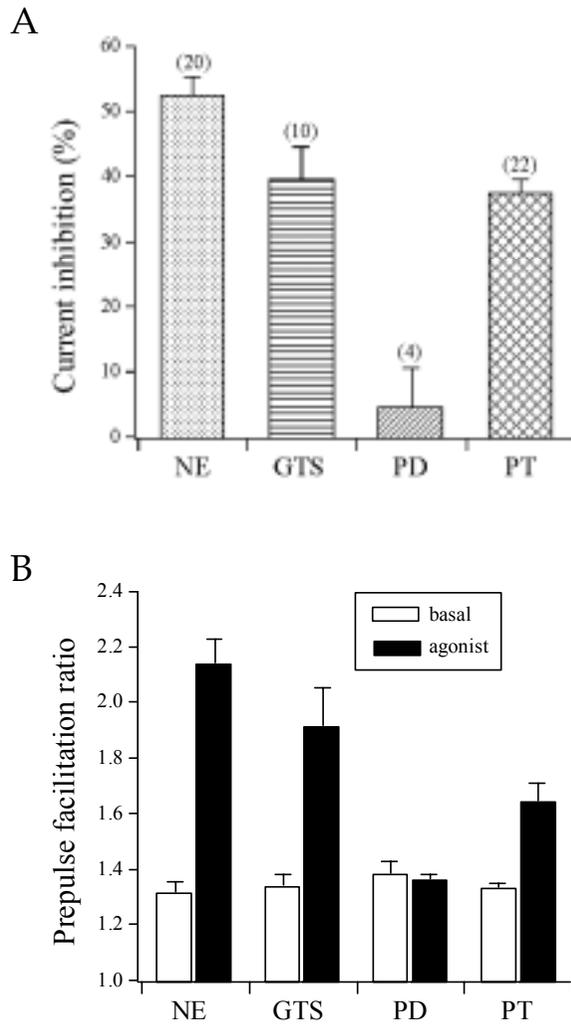


그림 8. 진세노사이드에 의한 교감 주 골반신경세포의 칼슘전류 조절. A는 진세노사이드 GTS(0.3 mg/mL), PT(0.3 mg/mL), PD(0.3 mg/mL)와 NE(10 μ M)에 의한 칼슘전류 억제 요약. B는 각 진세노사이드에 의한 prepulse facilitation 비로 막전압 의존성 확인. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 괄호 안의 숫자는 실험 사례 수(n).

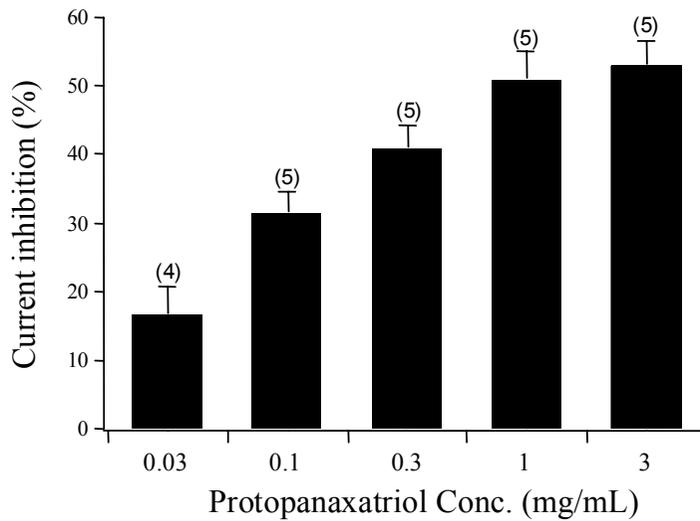


그림 9. 진세노사이드 PT에 의한 칼슘전류의 농도의존적 억제. 진세노사이드 PT를 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/mL 농도로 교감 주 골반신경절 세포에 투여했을 때 칼슘전류 억제의 농도의존성 확인. 모든 결과는 평균 ± 표준오차로 나타내었으며, 괄호 안의 숫자는 실험 사례 수(n).

3.3. 부교감 신경세포의 칼슘전류에 미치는 PT의 영향

진세노사이드 PT가 부교감 주골반 신경세포의 칼슘전류를 억제하는 지를 확인하고 교감신경세포에서 얻은 결과와 비교하였다. 그림 10A는 T-형 칼슘전류가 나타나지 않는 부교감 신경세포에서 PT(0.3 mg/mL), 대조군으로 NE(10 μ M)과 Oxotremorine M(OxoM; 100 μ M)을 각각 처리하였을 경우에 HVA 칼슘전류가 억제되는 것을 보여주는 대표적인 전류기록이다. 그림 10B에 나타난 바와 같이 주 골반신경절 내의 교감 신경세포와 부교감 신경세포에서 진세노사이드 PT에 의한 칼슘전류의 억제 정도는 각각 38 ± 9 % (n=22)와 35 ± 12 % (n=7)로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p > 0.05). 따라서 아래에서 보여주는 일련의 실험들은 모두 교감신경세포에서 이루어졌다.

3.4. 진세노사이드에 의한 칼슘통로의 조절에서 G protein의 역할

신경전달물질에 의한 칼슘전류의 조절은 G protein에 의해 매개된다고 잘 알려져 있다(Hille, 2001). 따라서 진세노사이드에 의한 칼슘전류의 억제가 G protein에 의해 매개되는지를 확인하기 위하여 가수분해되지 않는 (non-hydrolysis) GDP(guanosine diphosphate) 유도체인 GDP β S(2 mM)를 사용하였다. 이를 전극 내 용액에 넣어 세포 내에 가할 경우 G α subunit과 결합하여 GTP의 결합을 경쟁적으로 방해하여 G protein이 활성화되는 것을 억제하여, 결과적으로 G protein을 매개로 하는 효과들을 차단할 수 있다고 알려져 있다(Holz 등, 1986; Ikeda, 1991; Jeong 및 Wurster, 1997). 그림 11B에 나타난 바와 같이 GDP β S에 의해 교감 주골반신경절 세포에서 진세노

사이드 PT(0.3 mg/mL)와 대조군인 NE(10 μ M)에 의한 칼슘전류 억제가 각각 41 \pm 8 %(n=22)에서 18 \pm 4 %(n=4)로, 50 \pm 13 %(n=9)에서 7 \pm 7 %(n=4)로 감소하였고, 처치전과 후의 칼슘전류의 기록이 그림 11A에 나타나 있다.

진세노사이드에 의한 칼슘전류의 억제를 매개하는 G protein의 아형을 확인하기 위해 G protein의 subfamily의 하나인 G_{i/o}를 선택적으로 억제한다고 알려진 pertussis toxin(PTX)을 500 ng/mL의 농도가 포함된 배지에서 14~18시간 배양한 신경세포에서 칼슘전류의 변화를 관찰하였다. 그림 12에 나타난 바와 같이 진세노사이드 PT(0.3 mg/mL)와 NE(10 μ M)에 의한 칼슘전류 억제효과는 PTX 전처치에 의해 각각 38 \pm 5 %(n=4)에서 2 \pm 2 %(n=4)(p<0.001), 50 \pm 13 %(n=8)에서 3 \pm 2 %(n=8)(p<0.001)로 감소함을 확인할 수 있었다. 이상의 결과들로 미루어 볼 때 진세노사이드 PT에 의한 칼슘전류 억제효과는 주로 PTX 민감성 G_{i/o} protein을 매개로 나타난다는 것을 알 수 있다.

3.5. 여러 가지 칼슘전류 아형에 미치는 PT의 영향

교감 주골반신경절 세포에서 칼슘통로의 아형(subtype)에 따른 진세노사이드 PT억제효과를 확인하였다. ω -conotoxin GVIA(ω -CgTx) 민감성 칼슘통로인 N-형, nimodipine 민감성 L-형 칼슘통로와 L-형이나 N-형이 아닌 다른 형(non-L/non-N)을 약물을 사용하여 분리한 후 진세노사이드 PT(0.3 mg/mL)의 영향을 조사하였다. 그림 13C에 나타난 바와 같이 주골반신경절 세포에서 ω -CgTx 민감성 N-형 칼슘통로는 63 \pm 7 %(n=8)로 나타났고, nimodipine 민감성 L-형 칼슘통로는 16 \pm 4 %(n=5), 그리고 나머지 약 20 %는 non-L/non-N 형으로 나타났다. 먼저 ω -CgTx(1 mM)으로 N-형 칼슘통로를 차단시키기

전·후의 진세노사이드 PT 효과를 비교하여, 전체 진세노사이드 PT의 효과 중 N-형 칼슘통로 조절이 기여하는 정도를 알고자 하였다. 그림 13A와 D에 나타난 바와 같이 진세노사이드 PT에 의한 N-형 칼슘전류 억제 효과는 ω -CgTx 처치전 42 ± 6 % (n=22)에서 처치 후 28 ± 4 % (n=4)로 전체 칼슘전류 억제 중 N-형 칼슘전류 억제가 차지하는 비중이 44 % 정도로 나타났다. Nimodipine 민감성 L-형 칼슘통로에 미치는 진세노사이드 PT의 영향을 확인하기 위하여 dihydropyridine 칼슘통로 활성화제(activator)인 FPL64176($1 \mu\text{M}$)에 의해 아주 느리게 나타나는 L-형 tail 전류를 활성화시킨 후 진세노사이드 PT의 효과를 확인하였다. L-형 tail 전류는 막전압을 -80 mV 로 고정된 뒤 $+10 \text{ mV}$ 의 탈분극 자극을 20 ms 동안 가한 뒤 -40 mV 로 탈활성(deactivation)시켜 측정하였다(그림 13B). Tail 전류는 sampling rate를 20 kHz 로 하여 기록하였고, test 자극이 끝난 후 10 ms 에서 순수한 L-형 칼슘전류의 크기를 측정하였다. FPL64176을 가하여 L-형 칼슘전류를 활성화시킨 후 진세노사이드 PT를 가하였을 때 tail 전류는 36 ± 4 % (n=7)의 감소를 확인하였다. 한편 ω -CgTx과 nimodipine을 함께 전처치하여 N-과 L-형의 칼슘전류를 차단하고 난 후에도 PT 처리에 의해 non-L/non-N 형의 칼슘전류를 26 ± 4 % (n=4) 억제하였다(그림 13D Box). 이상의 결과들로부터 진세노사이드 PT는 HVA 칼슘전류의 모든 아형에 영향을 주는 것으로 나타났다.

3.6. HVA 칼슘전류에 대한 PT fraction의 영향

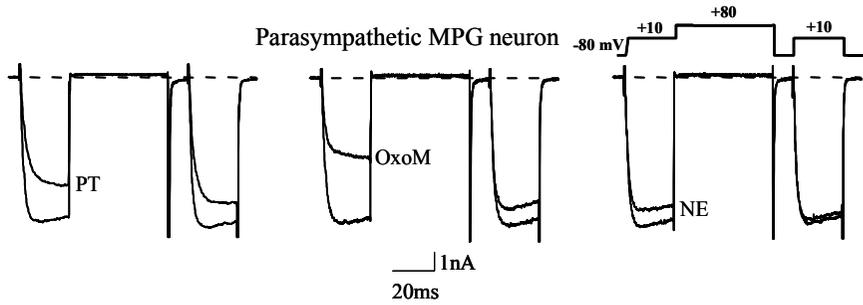
진세노사이드 PT의 여러 fraction(R_{g1} , R_{g2} , R_e , R_f)이 교감 골반신경절 세포에서 높은 막전압에서 활성화되는(high-voltage activated, HVA) 칼슘전류에 미치는 영향을 조사하였다. 칼슘전류는 두 번의 $+10 \text{ mV}$ test 자극과 이들

자극 사이의 강한 탈분극(+80 mV) 자극으로 이루어진 double-pulse protocol로 유발하였다. 진세노사이드 PT의 아형 중 Rg₂만이 유의하게 칼슘전류를 42±2 % (n=5) 억제하였다. Rg₂의 칼슘전류 억제는 부교감 골반신경절 세포에서도 31±8 % (n=3) 억제하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 진세노사이드 PT에 의한 HVA 칼슘전류의 억제에 Rg₂가 가장 큰 작용을 하는 fraction임을 확인하였다.

3.7. T-형 칼슘통로에 대한 진세노사이드의 영향

진세노사이드 GTS, PT, 그리고 여러 가지 PT fraction(Rg₁, Rg₂, Re, Rf)이 교감골반신경절 세포에서 낮은 막전압에서 활성화되는 T-형 칼슘통로에 미치는 영향을 조사하였다. 진세노사이드 GTS와 PT의 영향을 조사하기 위해 막전압을 -80 mV로 고정하고, -80 mV부터 +60 mV까지 ramp 자극(0.875 mV/ms)을 가하여 칼슘 전류를 기록하였다. 진세노사이드 GTS의 경우 그림 14A에서 보는 바와 같이 T-형 칼슘전류에는 뚜렷한 영향을 미치지 않았고, PT(0.1 mg/mL)의 경우 T-형 칼슘전류를 억제하는 것으로 나타났다. 진세노사이드 PT의 각 fraction 중 Rf, Re, Rg₁, Rg₂ 각 100µM을 처치하였을 때 각각 T-형 칼슘전류를 2±2 % (n=4), 2±2 % (n=4), 12±4 % (n=4), 54±6 % (n=5) 억제하였다. 이상의 결과를 보면 진세노사이드 PT fraction 중 Rg₂가 T-형 칼슘전류를 억제하는데 가장 효과가 큰 것을 확인할 수 있었다.

A



B

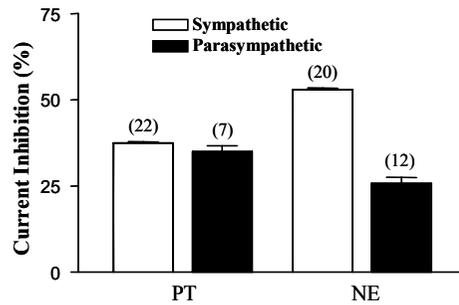


그림 10. 진세노사이드 PT에 의한 주 골반신경절 부교감신경 세포의 칼슘전류 억제. 진세노사이드 PT에 의한 칼슘전류 억제가 교감신경과 부교감신경 세포의 칼슘전류 억제 확인. PT(0.3 mg/mL), NE(10 μ M). 두 번의 +10 mV test 자극사이에 강한 탈분극(+80 mV) 자극을 가하여, 전·후 test 자극에 의해 활성화되는 칼슘전류의 변화를 비교. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 괄호 안은 실험 사례 수(n).

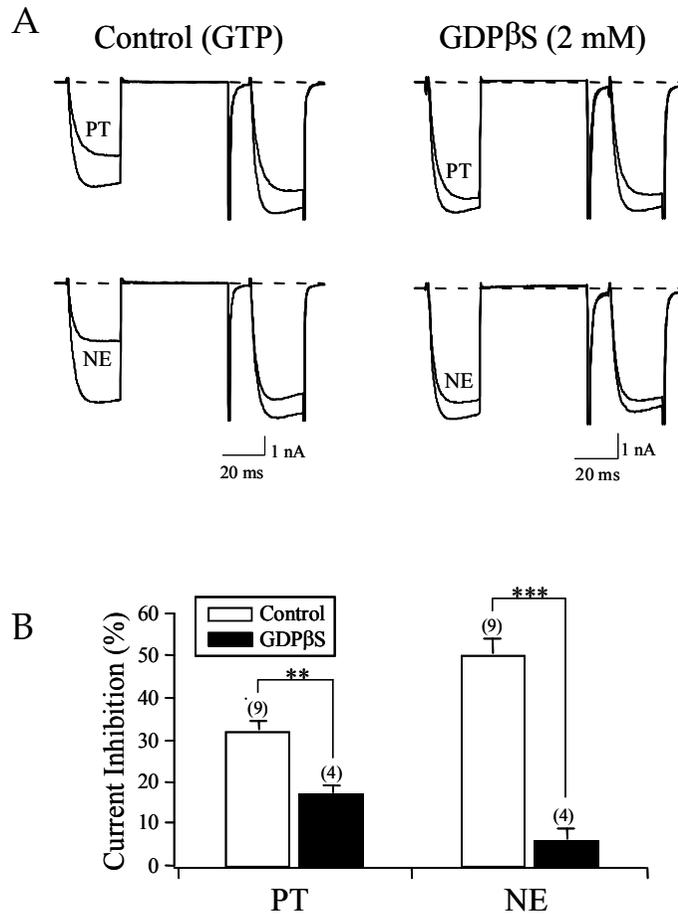


그림 11. 진세노사이드 PT에 의한 칼슘전류 억제효과에 G protein 매개 확인. GTP(0.3 mM) 대신 GDPβS(2 mM)가 포함된 전극용액으로 세포내를 관류시킨 후 5분 이상 지난 다음, NE(10 μM) 및 진세노사이드 PT(0.3 mg/mL)에 의한 칼슘전류 억제효과를 관찰하여 이를 대조군(control)과 비교하였다. 모든 결과는 평균 ± 표준오차로 나타내었으며, 괄호 안은 실험 사례 수(n).

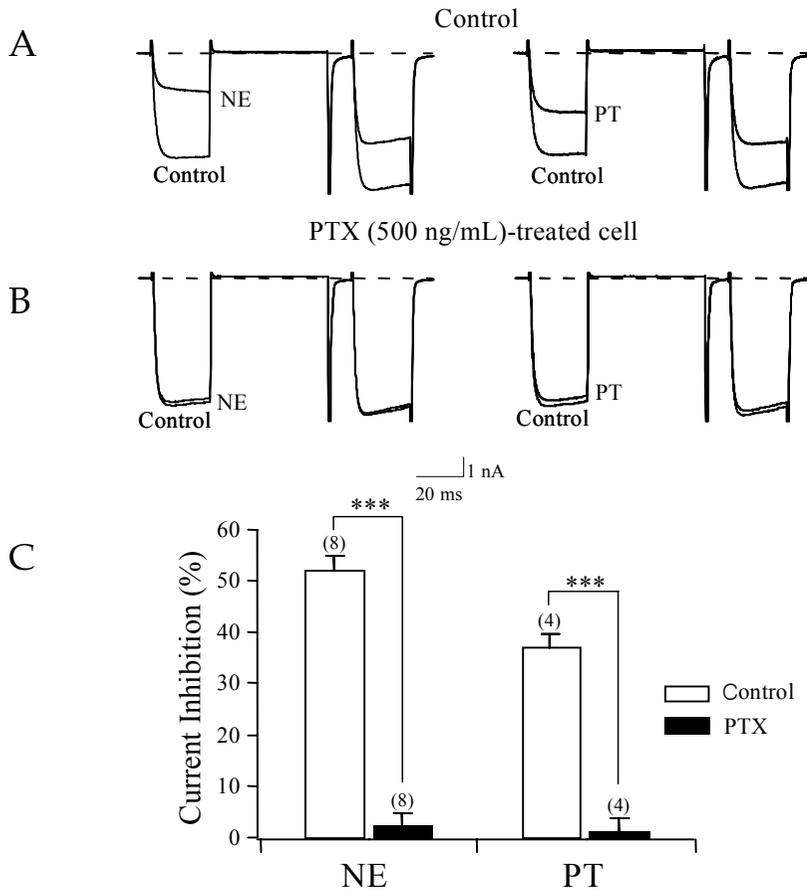


그림 12. 진세노사이드 PT에 의한 칼슘전류 억제효과에 pertussis toxin 민감성 G protein($G_{i/o}$)의 관여 확인. 500 ng/mL의 PTX가 들어있는 배지에서 14~18시간 배양한 신경세포에서 칼슘전류 억제효과를 관찰하여 이를 대조군과 비교하였다. PT 및 NE의 농도는 각각 0.3 mg/mL과 10 μ M로 하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 괄호 안은 실험 사례 수(n).

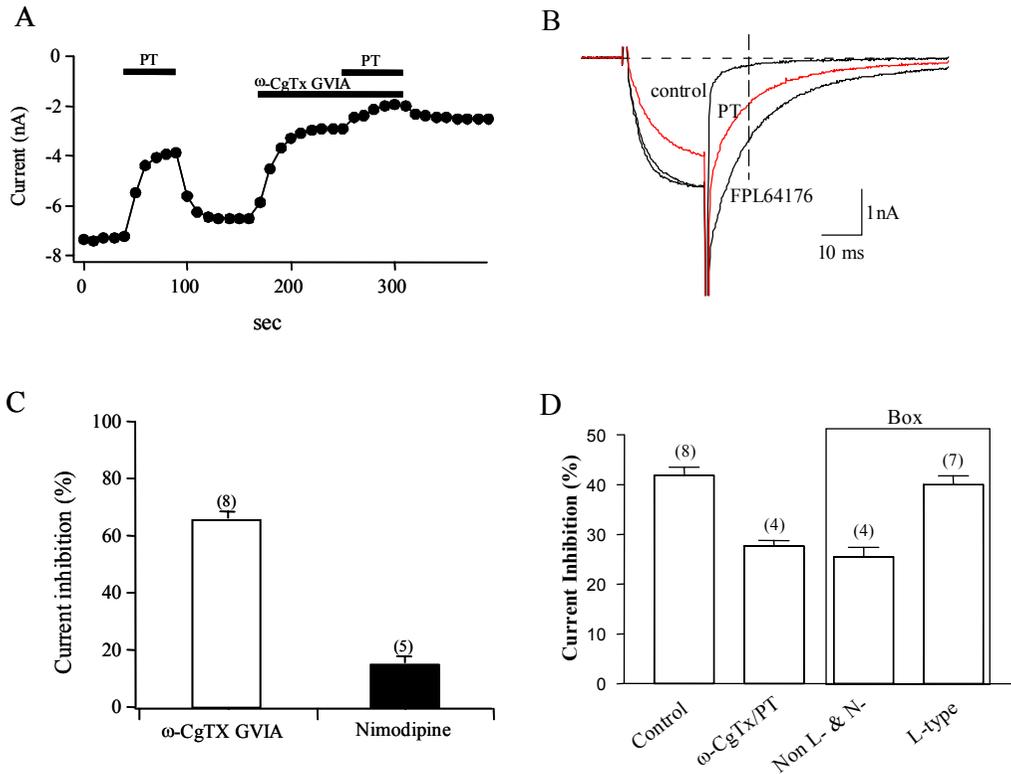


그림 13. 진세노사이드 PT가 HVA 칼슘전류 아형에 미치는 영향. 막전압을 -80 mV로 고정한 상태에서, +10 mV로 탈분극 자극을 가하였을 때 나타나는 칼슘전류의 크기 변화를 기록하였다. A는 HVA 칼슘통로에 대한 PT(0.3 mg/mL)의 효과를 관찰하고, N-형 칼슘통로 차단제인 ω -conotoxin GVIA(ω -CgTx; 10 μ M)에 의한 억제 변화의 기록이다. B는 FPL64176으로 활성화시킨 L-형 칼슘통로의 PT(0.3 mg/mL)에 의한 억제 시 대표적인 이온전류의 기록이다. C는 전체 칼슘전류 중 N-형과 L-형이 차지하는 비율. D는 ω -CgTx 처치 전·후와 FPL64176으로 활성화된 L-형 칼슘통로에 대한 진세노사이드 PT 효과를 비교하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 괄호 안은 실험 사례 수(n).

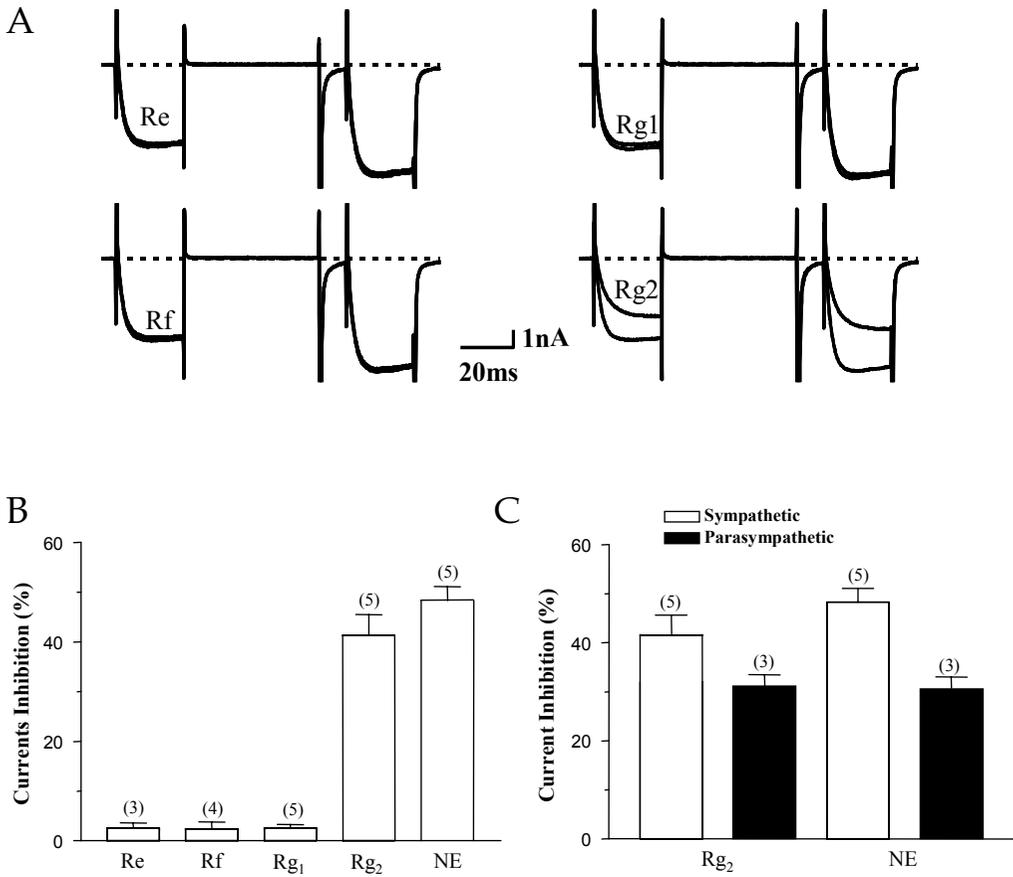


그림 14. HVA 칼슘전류에 미치는 PT fraction의 영향. A와 B는 두 번의 +10 mV test 자극사이에 강한 탈분극(+80 mV) 자극을 가하여, 전·후 test 자극에 의해 활성화되는 칼슘전류 변화의 대표적인 기록과 평균 값. C는 Rg₂ 및 NE에 의한 교감신경 및 부교감 신경세포에서 효과 비교. 진세노 사이드 PT fraction(Rf, Re, Rg₁, Rg₂ all 100 μ M). 모든 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 괄호 안은 실험 사례 수(n).

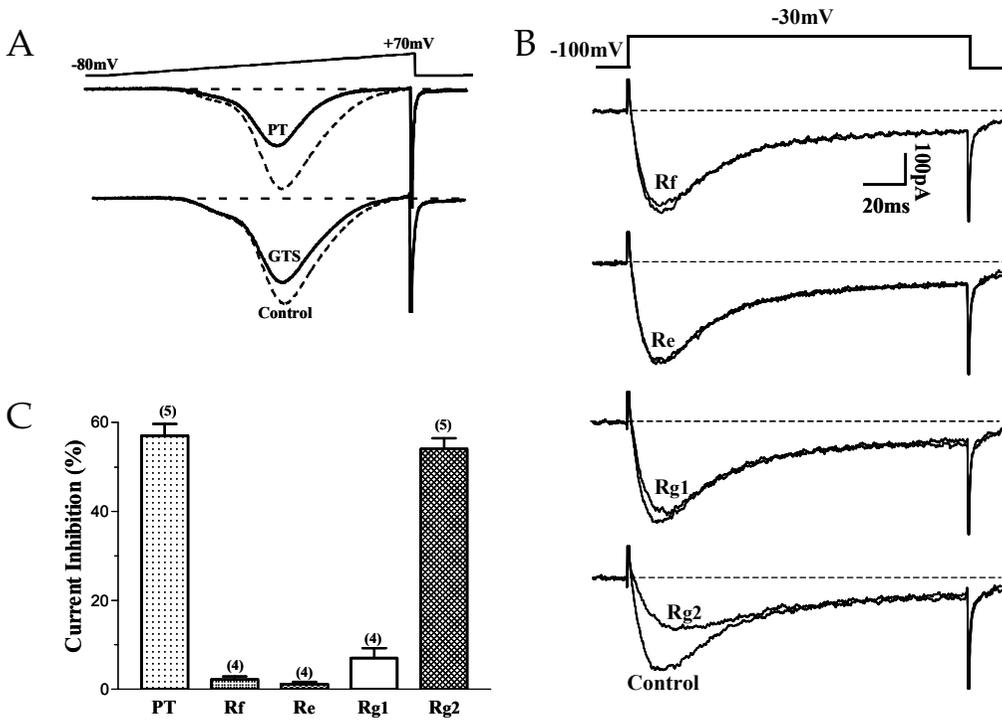


그림 15. T-형 칼슘전류에 미치는 진세노사이드 PT fraction의 영향. A는 막전압을 -100 mV로 고정하고, test 자극을 -30 mV로 200 ms 동안 주었을 때 나타나는 LVA 칼슘전류에 미치는 진세노사이드 GTS와 PT의 영향. B는 LVA 칼슘전류에 미치는 PT fraction(Rf, Re, Rg₁, Rg₂ all 100 μM)의 영향을 조사. C는 LVA 칼슘전류에 미치는 진세노사이드 PT와 PT fraction의 영향을 평균한 값. 모든 결과는 평균 ± 표준오차로 나타내었으며, 괄호 안은 실험 사례 수(n).

제 4장 고찰

인삼의 주요한 생리활성 물질(physioactive component)은 인삼 사포닌(ginseng saponin)으로 진세노사이드(ginsenoside)라 한다. 인삼이 비록 서양의약품에 비해 약리학적 효과가 느리고, 미묘하지만 항암(anticancer; Zhu 등, 1995; Lee 등, 1996), 항고혈압(antihypertension; Chen 등, 1984), 항혈전(antiplatelet; Teng 등, 1989), 항당뇨(antidiabetes; Yokozawa 등, 1991), 항스트레스(antistress), 간기능 개선, 학습속도 향상과 허약체질 개선 등의 생리작용을 나타내는 것으로 보고되었다.

본 연구는 수컷 쥐의 비노생식계를 지배하는 주골반신경절 세포에서 진세노사이드에 의한 칼슘통로의 조절을 관찰하고, 이를 매개하는 G protein 및 세포내 신호 전달과정을 규명하고자 하였다. 이미 서론에서 언급한 바와 같이 주골반신경절은 자율신경계에서 유일하게 한 개의 ganglion capsule 내에 교감 및 부교감 신경세포를 모두 포함하고 있다(Dail, 1992; Keast, 1999). 따라서 단일 신경세포로 분리된 상태에서는 실험에 이용된 개개 세포들의 기능적 실체를 구별하는 것이 중요한 데 다음의 몇 가지 특성들을 바탕으로 교감 신경세포와 부교감 신경세포로 구별할 수 있었다. 첫째, 교감 신경세포는 평균직경과 세포의 크기를 반영하는 parameter인 평균 막용량(mean membrane capacitance; Cm)에 있어 부교감 신경세포보다 뚜렷하게 크기 때문에 이 값들을 측정하여 구별할 수 있다(Zhu 등, 1995). 둘째, 교감 신경세포의 신경전달물질(카테콜아민) 합성에 관여하는 효소인 tyrosine hydroxylase(TH) 존재를 면역화학적(immunohistochemical) 염색(staining)으로 확인하

는 방법이다. 전체 주골반신경절 세포 중에서 TH 염색에 양성인 세포가 40~60 %를 차지함이 보고된 바 있다(Karhula 등, 1993). 셋째, 본 실험에서 측정된 T-형 칼슘전류의 유·무를 확인하는 방법이다. Zhu 등(1995)에 의하면 T-형 칼슘전류를 보이는 세포는 100 % 모두 TH 염색에 양성인 교감 신경세포이고, 반대로 T-형 칼슘전류가 보이지 않는 세포는 모두 TH 염색에 음성인 부교감 신경세포라고 보고하였다. 본 연구에서도 먼저 각 세포군들에 대한 진세노사이드의 영향을 확인하기 위해 주골반신경절 세포들에 대한 동정을 하였다. 전체 세포는 낮은 막전압(-50 mV ~ -20 mV)에서 활성화되는 T-형 칼슘전류가 나타나는 교감신경 세포군과 부교감신경 세포군으로 크게 나눌 수 있었다. 세포막의 넓이에 비례하는 평균 세포막 전기용량(capacitance)은 교감신경 세포군(82 ± 3 pF, n=50)이 부교감신경 세포군(47 ± 3 pF, n=54)에 비해 크게 나타났고(그림 5A), 이는 이미 보고된 결과와 일치하였다(Zhu 등, 1995; Karhula 등, 1993). 측정된 전류의 크기를 세포의 크기를 반영하는 세포막 전기용량으로 보정할 경우(pA/pF), 이는 단위 면적당 그 전류의 밀도(current density)가 된다. 그림 5B에 나타낸 바와 같이 높은 막전압(-10 mV 이상)에서 활성화되는(high-voltage activated, HVA) 칼슘전류들의 상대적 밀도는 두 세포군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$).

MPG 세포에 존재하는 HVA 칼슘전류는 인삼에 들어 있는 모든 진세노사이드를 가지고 있는 추출물인 GTS에 의해 농도의존적으로 억제되었다. 이러한 진세노사이드에 의한 칼슘전류의 억제효과는 adrenal chromaffin 세포에서 보고된 것과 일치하였다(Choi 등, 2001; Kim 등, 1998; Nah, 1994). GTS는 PD와 PT의 두 진세노사이드 fraction으로 분리될 수 있는 데 이중

PT에 의해서만 칼슘전류가 억제되어 칼슘전류를 조절하는 생리활성 물질이 PT에 주로 존재함을 알 수 있었다. 이러한 진세노사이드는 교감 신경세포와 부교감 신경세포 사이에 비슷하게 작용하는 것으로 밝혀졌다. 진세노사이드 PT를 더 분리정제하면 Rg₁, Rg₂, Rg₃, Rf, Re, Rh₁ 등의 fraction을 얻을 수 있는 데 막전압 의존적인 칼슘전류에 미치는 효과가 각 fraction의 종류에 따라 차이가 있음이 보고되었다(Nah 등, 1995; Kim 등, 1998; Choi 등, 2001). 예를 들어 Nah 등(1995)은 진세노사이드 Rf만이 유의하게 DRG(Dorsal Root Ganglion) 신경세포의 막전압 의존적 칼슘전류를 농도 의존적으로 억제한다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 진세노사이드 PT 아형 중에 Rg₂만이 유의하게 막전압 의존적 칼슘전류를 억제하는 것을 확인하였다.

주골반신경절 세포에서 칼슘전류는 NE, Ach, adenosine, 그리고 VIP에 의해 억제된다고 알려져 있다(Zhu 등 1995; Zhu 및 Yakel, 1997; Park 등, 2001). 이들 신경전달물질에 의한 억제는 각각의 선택적 수용체를 활성화시키고 이 수용체에 연결되어있는 여러 신호전달체계를 통해 일어난다고 알려져 있다(Hille, 1994). 그러나 현재까지 진세노사이드가 선택적으로 작용하는 수용체의 존재는 분자수준에서 아직까지 확인되지 않고 있다. 그럼에도 불구하고 본 연구를 통해 얻은 결과들에 대한 다음 두 가지의 고찰은 진세노사이드 수용체가 존재할 것이란 사실을 강력히 시사한다 하겠다. 첫째, 진세노사이드에 의해 칼슘전류가 억제될 때 나타나는 생물리학적 현상들을 보면 신경전달물질 수용체를 활성화시켰을 때와 같았다. 즉, 진세노사이드의 존재 시 이온통로가 완전히 활성화(steady-state activation)되는데 걸리

는 시간이 대조군에 비해 길어지는 현상(kinetic slowing)을 볼 수 있는데, 이것은 실험에서 보여준 NE과 같은 신경전달물질에 의해 수용체가 활성화되어 나타나는 막전압 의존성 억제(voltage-dependent inhibition)가 보이는 특징 중 하나라고 알려져 있다(Elmslie 등, 1990; Ikeda, 1991). 이와 함께 또 다른 특징인 prepulse facilitation 현상을 관찰할 수 있었는데, 이는 강한 탈분극 자극에 의해 GTS와 PT에 의한 칼슘전류의 억제가 회복되는 현상이다. 이러한 결과는 진세노사이드에 의한 칼슘전류의 억제가 막전압 의존적이라고 보고된 Nah 등(1994)의 결과와 일치한다. 둘째, 진세노사이드의 수용체가 존재하여 활성화된다면 반드시 이 수용체에 연결된 G protein이 활성화되어야 한다. 따라서 본 연구에서 진세노사이드에 의한 주골반신경절 세포의 칼슘전류의 억제가 칼슘통로에 직접적인 작용에 의한 것인지 아니면 수용체에 연결되어 있을 heterotrimeric G protein을 매개로 하여 일어나는지를 확인하였다. 이를 위해 가수분해되지 않는(non-hydrolysis) GDP 유도체인 GDPβS(2 mM)를 사용하여 세포내에 투석하였다. 일반적으로 GDPβS는 세포내에 가할 경우 Gα와 Gβ로 이루어진 G protein의 α subunit과 결합하여 GTP의 결합을 경쟁적으로 저해하고, 결과적으로 G protein을 매개로 하는 이온통로의 조절을 차단할 수 있다고 알려져 있다(Holz 등, 1986; Ikeda, 1991; Jeong 및 Wurster, 1997). 본 연구에서도 GDPβS의 세포내 투석에 의해 진세노사이드에 의한 칼슘전류가 의의있게 억제됨을 확인하였다. 이러한 사실로 미루어 진세노사이드에 의한 주골반신경절 세포에서 칼슘통로의 조절은 다른 신경전달물질과 마찬가지로 수용체에 연결된 G protein에 의해 매개된다고 할 수 있다.

일반적으로 신경전달물질에 의한 칼슘전류의 억제에는 G protein의 네 가지 아군들 (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, 그리고 G_{12})들 중 PTX에 민감한 $G_{i/o}$ 이나 PTX에 민감하지 않은 $G_{q/11}$ 에 의해 주로 매개된다고 알려져 있다(Ikeda 등, 1999; Hille, 1992; Jeong 등, 1999). 한편 Nah 등(1994)은 trigeminal ganglion 세포에서 진세노사이드 GTS에 의한 칼슘전류의 억제가 PTX 민감성 G protein에 의해 매개된다고 보고한 바가 있다. 또한 진세노사이드 PT의 아형 중 Rf가 DRG(Dorsal Root Ganglion)에서 PTX 민감성 G protein을 매개로 하여 칼슘전류를 억제한다고 알려져 있다(Nah 등, 1995). 이와 유사하게 본 연구에서도 진세노사이드 PT에 의한 칼슘전류 억제가 PTX 민감성 G protein인 $G_{i/o}$ 를 매개로 하여 일어난다는 사실을 확인하였다. PTX 민감성 $G_{i/o}$ 에 의해 일어나는 칼슘전류의 전압의존적 억제 현상은 G_{α} 와 $G_{\beta\gamma}$ subunit 중에서 $G_{\beta\gamma}$ 가 다른 신호전달물질(second messenger)을 통하지 않고 직접 칼슘통로에 가서 결합함으로써 일어난다고 알려져 있다(Ikeda, 1996; Herlitze 등, 1996; Ikeda 및 Dunlap, 1999). 따라서 진세노사이드에 의한 칼슘전류 억제도 이와같이 세포막에 국한된(membrane-delimited) 메카니즘으로 일어날 것으로 생각된다. 만약 수용체의 활성화 시 방출되는 $G_{\beta\gamma}$ subunit를 완충시켜 칼슘통로에 작용하지 못하도록 하는 단백질, 예를 들어 transducin이나 G protein receptor kinase를 과발현시켰을 때 칼슘전류의 억제가 일어나지 않는다면 $G_{\beta\gamma}$ 가 칼슘통로에 작용한다는 직접적인 증거가 될 것이다(Jeong 등, 1999).

막전압의존적 칼슘통로는 약리학적 및 생물리학적 특성에 따라 N-, L-, P-, Q-, R- 및 T-형 등으로 나누어 진다(Fisher 및 Bourque, 1995; Foehring 및 Armstrong, 1996; Hille, 2001). 각 아형들의 분포는 조직마다 많은 차이가 있

으며, 같은 신경조직 내에서도 부위에 따라 차이가 있다. 이중 ω -CgTx 민감성 N-형 칼슘통로는 중추 및 말초 신경계의 절전 신경말단(presynaptic terminal)으로부터 신경전달물질이 유리되는 과정에 중요한 역할을 담당한다(Hille, 2001; Ikeda 및 Dunlap, 1999; Takahashi 등, 1999). 뿐만 아니라 N-형 칼슘통로를 통한 칼슘유입은 세포내 칼슘에 의해 활성화되는 다른 이온 통로들을 조절하여 막전압 변화 및 신경 흥분성을 조절하는 중요한 역할을 담당한다(Clapham, 1995; Ikeda 및 Dunlap, 1999). Choi 등(2001)은 adrenal chromaffin 세포에서 진세노사이드 GTS가 ω -CgTx GVIA 민감성 N-형 칼슘전류를 억제한다고 보고하였다. 본 연구에서도 ω -CgTx GVIA 민감성 N-형 칼슘전류가 진세노사이드 PT에 의해 막전압 의존적으로 억제된다는 사실을 확인하였다. 이러한 N-형 칼슘전류의 억제는 결과적으로 신경말단에서의 신경전달물질의 유리(secretion)나 세포의 흥분성 등을 조절할 수 있을 것이다(Hille, 2001; Ikeda 등, 1999). L-형 칼슘통로 역시 막전압 의존성(voltage-dependent)으로 골격근, 심장, 뇌, 망막 등에서 발견되어지고, 각각 아형이 존재하는데 $\alpha 1C$, $\alpha 1F$, $\alpha 1D$ 및 $\alpha 1S$ 등이 존재한다. L-형 칼슘통로의 경우 심근이나 평활근, 골격근 등에서 탈분극에 의해 유도되는 칼슘이온의 유입으로 근수축을 일으키는 원동력이 되며(Darrell 및 Nikolai, 2002), 내분비계에서는 신경전달물질의 분비에도 관여하는 것으로 보고되었다(Bell 등, 2001). 본 연구에서 사용된 주 골반신경절 세포에도 결과에서 확인한 바와 같이 nimodipine 민감성 L-형 칼슘통로가 15 % 정도 존재하는 것으로 보고되었다(Park 등, 2001; Zhu 등, 1995). 일반적으로 신경세포는 여러 아형의 칼슘통로들을 발현하기 때문에 FPL 64176이나 BayK 8644와 같은 L-형

칼슘전류 활성화제를 투여하여 L-형 칼슘전류의 tail 전류를 느리게 활성화시킨 후 신경전달물질의 효과를 확인하는 방법이 알려져 있다(Jeong 및 Wurster, 1997; Park 등, 2001; Bell 등, 2001). Choi 등(2001)이 보고한 바와 같이 주골반신경절 세포에서도 진세노사이드 PT가 L-형 칼슘전류 역시 억제한다는 사실을 확인하였다. 한편 실험에서 nimodipine 이나 ω -CgTx GVIA에 의해서도 억제되지 않는 non-L/non-N 형 칼슘전류가 약 20 % 정도 존재하였다. 주골반신경절 세포에는 P/Q-형이 거의 없다고 보고되었기 때문에 아마도 R-형 일 것으로 생각되며 앞으로 R-형 차단제인 SNX-482를 사용하거나 RT-PCR 같은 방법으로 R-형 칼슘통로를 코딩하는 $\alpha 1E$ 유전자의 존재여부를 확인해야 할 것이다. 진세노사이드를 가하였을 때 non-L/non-N 형 칼슘전류도 억제함으로써 진세노사이드가 모든 HVA 칼슘통로에 비선택적으로 작용함을 알 수 있었다.

서론에서 서술한 바와 같이 낮은 막전압에서 활성화되는(low-voltage activated, LVA) T-형 칼슘통로는 안정막전압(resting membrane potential)인 $-60 \sim -50$ mV에서 열리는 상대적으로 낮은 역치를 가지고 있다. 이러한 T-형 칼슘통로의 경우 신경세포에서 심장에서와 마찬가지로 pacemaker로서 과분극(hyperpolarization) 후 나타나는 rebound burst firing, 막전압의 진동(oscillation), 낮은 역치를 가진 활동전압(low threshold spikes)의 생성 등에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Huguenard 등, 1994; Huguenard, 1996; Perez-Reyes 등, 1998). 신경전달물질에 의해 T-형 칼슘전류가 억제된다면 세포의 흥분성의 기능적 변화를 초래할 수 있다(Lee 등, 2002; Kim 등, 2001). 진세노사이드 PT의 각 아형들 중 R_{g2} 만이 유의하게 $\alpha 1H$ 아형이

라고 보고 된(Lee 등, 2002) T-형 칼슘전류를 억제하는 것으로 나타났다.

위의 결과를 종합해보면 진세노사이드는 주 골반신경절 세포에 존재하는 지금까지 알려진 모든 칼슘통로를 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다. 이러한 칼슘전류의 억제는 만약 진세노사이드의 수용체가 신경말단에도 존재한다면 신경전달물질의 유리를 조절할 것이고, 세포체에만 존재한다면 신경의 흥분성을 조절함으로써 주 골반신경절의 기능에 영향을 줄 것이다. 앞으로 이러한 진세노사이드가 작용하는 수용체의 본질이 무엇인지, 또 신경세포의 어느 부분에 발현되는 지를 확인해야 할 것이다. 또한 진세노사이드에 의한 주골반신경절의 기능조절이 방광, 전립선, 및 음경 등과 같은 비뇨생식계의 기능조절에 어떠한 영향을 주는 지 그 생리학적인 의의 및 약리학적 효과를 확인해야 할 것이다. 본 연구에서 확인한 연구결과를 바탕으로 인삼의 효능을 다시 확인한다면 현대의약품으로의 개발도 가능할 것이라 생각한다.

제 5장 결론

수컷 쥐 주골반신경절 세포에서 진세노사이드에 의한 칼슘통로의 조절에 대한 연구결과를 요약하면 다음과 같다. 진세노사이드 GTS, PT가 주 골반 신경절 세포의 칼슘통로를 억제하는 것으로 나타났고, 교감 신경세포군과 부교감 신경세포군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 진세노사이드 GTS와 PT에 의한 칼슘통로의 억제는 막전압 의존적 억제로 나타났고, 진세노사이드 PT에 의한 주 골반신경절 세포에서 칼슘통로 억제는 GDPβS의 투석에 의해 G protein이 관여하고 있음을 확인하였고, 특히 G protein 중 pertussis toxin에 민감한 $G_{i/o}$ 에 의해 매개된다는 사실을 확인하였다. 또한 진세노사이드 PT에 의한 칼슘통로 억제에서 N-형 칼슘통로는 44 %, L-형 칼슘통로는 36 %, 그리고 non-L/non-N 형 칼슘통로는 27 % 억제되었다. 낮은 막전압에서 활성화되는 T-형 칼슘통로의 경우 진세노사이드 PT fraction 중 Rf와 Re는 거의 효과가 없었고, R_{g1} 은 11.9 %, R_{g2} 는 54 % 정도 억제하였다.

결론적으로 본 연구에서는 인삼의 주요한 생리활성 성분인 진세노사이드는 주골반신경절 세포에 존재하는 HVA 및 T-형 칼슘통로들을 PTX 민감성 $G_{i/o}$ protein을 매개로 하여 세포막에 국한된 전압 의존적인 메카니즘을 통해 조절한다는 사실을 확인하였다. 본 연구에서 얻은 결과는 인삼의 효능을 밝히기 위한 세포 및 분자수준에서의 중요한 기초이며 인삼을 현대 의약품으로 개발하는 데 중요한 자료로 이용될 수 있을 것이다.

참고 문헌

1. Bell DC, Butcher AJ, Berrow NS, Page KM, Brust PF, Nesterova A, Stauderman KA, Seabrook GR, Nurnberg B, Dolphin AC. Biophysical properties, pharmacology, and modulation of human, neuronal L-type alpha-1D, Ca_v 1.3 voltage-dependent calcium currents. *J Neurophysiol.* 85(2): 816-827, 2001
2. Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem.* 64: 493-531, 1995
3. Choi S, Rho SH, Jung SY, Kim SC, Park CS, Nah SY. A novel activation of Ca^{2+} -activated Cl^- channel in *Xenopus* oocytes by Ginseng saponins: evidence for the involvement of phospholipase C and intracellular Ca^{2+} mobilization. *Br J Pharmacol.* 132(3): 641-648, 2001
4. Choi S, Jung SY, Kim CH, Kim HS, Rhim HW, Kim SC, Nah SY. Effects of ginsenosides on voltage-dependent Ca^{2+} channel subtypes in bovine chromaffin cells. *J Ethnopharmacol.* 74(1): 75-81, 2001
5. Clapham DE. Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature.* 375(6533): 634-635, 1995
6. Chen X, Gillis CN, Moalli R. Vascular effects of ginsenosides in vitro. *Br J Pharmacol.* 82(2): 485-491, 1984
7. Dail WG, Evan AP, Eason HR. The major ganglion in the pelvic plexus of the male rat: a histochemical and ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 159: 49-62, 1975

8. Dail WG. Autonomic innervation of male reproductive genitalia. In: *The autonomic nervous system. Nervous control of the urogenital system*, edited by Maggi CA. London: Harwood Academic, 1992, vol. 2, p. 69-101
9. Darrell RA, Nikolai MS. Structure-function diversity of human L-type Ca channel: Perspectives for new pharmacological targets. *J Pharm Exp Thera.* 300(3): 724-728, 2002
10. DeGroat WC, Booth AM. Neural control of penile erection. In: *Nervous control of the urogenital system*, edited by Maggi CA, London, Harwood Academic, 1993a, 467-524
11. Elmslie KS, Zhou W, Jones SW. LHRH and GTPγS modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* 5: 75-80, 1990
12. Fisher TE, Bourque CW. Voltage-gated calcium currents in the magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *J Physiol* 486: 571-580, 1995
13. Foehring RC, Armstrong WE. Pharmacological dissection of high-voltage activated Ca²⁺ current types in acutely dissociated rat supraoptic magnocellular neurons. *J Neurophysiol* 76: 977-983, 1996
14. Hamil OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch clamp technique for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85-100, 1981
15. Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA. Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature.* 380(6571): 258-262, 1996

16. Hille BM. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 17: 531-536, 1994
17. Hille B. G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* 9(2): 187-195, 1992
18. Hille B. Voltage-gated Ca²⁺ channels. In: Ion channels of excitable membranes. Sinauer Associates, 2001, 3rd, 95-128
19. Holz GG, Rane SG, Dunlap K: GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature* 319: 670-672, 1986
20. Huguenard JR, Prince DA. Intrathalamic rhythmicity studied in vitro: nominal T currents modulation causes robust anti-oscillatory effects. *J Neurosci* 14: 5485-5502, 1994
21. Huguenard JR. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* 58: 329-348, 1996
22. Ikeda SR. Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J. Physiol* 439: 181-214, 1991
23. Ikeda SR. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 380: 255-258, 1996
24. Ikeda SR, Dunlap K. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33: 131-151, 1999
25. Jeong SW, Wurster RD. Muscarinic receptor activation modulates calcium channels in rat intracardiac neurons via a PTX- and voltage-sensitive pathway. *J Neurophysiol* 78: 1476-1490, 1997

26. Jeong SW, Ikeda SR. G protein alpha subunit G alpha z couples neurotransmitter receptors to ion channels in sympathetic neurons. *Neuron* 21(5): 1201-1212, 1998
27. Jeong SW, Ikeda SR, Wurster RD. Activation of various G-protein coupled receptors modulates Ca²⁺ channel currents via PTX-sensitive and voltage-dependent pathways in rat intracardiac neurons. *J Auton Nerv Syst* 76(1): 68-74, 1999
28. Kaku T, Miyata T, Uruno T, Sako I, Kinoshita A. Chemico-pharmacological studies on saponins of Panax ginseng C. A. Meyer. I. *Chemical part. Arzneimittelforschung* 25(3): 343-347, 1975
29. Karhula T, Soinila S, Häppölä O. Comparison of immunohistochemical localization of [Met⁵] enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, vasoactive intestinal polypeptide and tyrosine hydroxylase in the major pelvic ganglion of the rat. *Neuroscience* 54: 253-261, 1993
30. Keast JR, de Groat WC. Immunohistochemical characterization of pelvic neurons which project to the bladder, colon, or penis in rats. *J Comp Neurol* 288: 387-400, 1989
31. Keast JR. Patterns of co-existence of peptides and differences of nerve fibre types associated with noradrenergic and non-noradrenergic (putative cholinergic) neurons in the major pelvic ganglion of the male rat. *Cell Tissue Res* 266: 405-415, 1991
32. Keast JR. Unusual autonomic ganglia: connections, chemistry, and plasticity of pelvic ganglia. *Int Rev Cytol* 193: 1-69, 1999

33. Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, Mcenery MW, Shin HS. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking $\alpha 1G$ T-type Ca^{2+} channels. *Neuron* 31: 35-45, 2001
34. Kim HS, Lee JH, Goo YS, Nah SY. Effects of ginsenosides on Ca_2+ channels and membrane capacitance in rat adrenal chromaffin cells. *Brain Res Bull* 46(3): 245-251, 1998
35. Langworthy OR. Innervation of the pelvic organs of the rat. *Investig Urol* 2, 491-511, 1965
36. Lee JH, Kim EG, Park BG, Kim KH, Cha SK, Kong ID, Lee JW, Jeong SW. Identification of T-type $\alpha 1H$ Ca^{2+} channels ($Ca_v3.2$) in major pelvic ganglion neurons. *J Neurophysiol* 87: 2844-2850, 2002
37. Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, Perez-Reyes E. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neuroscience* 19(6): 1912-1921, 1999
38. Lee YN, Lee HY, Chung HY, Kim SI, Lee SK, Park BC, Kim KW. In vitro induction of differentiation by ginsenosides in F9 teratocarcinoma cells. *Eur J Cancer* 32A(8): 1420-1428, 1996
39. Mills TM, Wiedmeier VT, Stopper VS. Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod* 46: 342-348, 1992

40. Nah SY, McCleskey EW. Ginseng root extract inhibits calcium channels in rat sensory neurons through a similar path, but different receptor, as μ -type opioids. *J Ethnopharmacol* 42(1): 45-51, 1994
41. Nah SY, Park HJ, McCleskey EW. A trace component of ginseng that inhibits Ca^{2+} channels through a pertussis toxin-sensitive G protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(19): 8739-8743, 1995
42. Nah SY. Ginseng; Recent advances and trends. *K J Ginseng Sci* 21(1): 1-12, 1997
43. Park KS, Jeong SW, Cha SK, Lee BS, Kong ID, Ikeda SR, Lee JW. Modulation of N-type Ca^{2+} currents by A_1 -adenosine receptor activation in male rat pelvic ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 299(2): 501-508, 2001
44. Perez-Reyes E, Lee JH, Cribbs LL. Molecular characterization of two members of the T-type calcium channel family. *Ann N Y Acad Sci* 868: 131-143, 1999
45. Perez-Reyes E. Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*. 30(4): 313-318. 1998
46. Takahashi E, Murata Y, Oki T, Miyamoto N, Mori Y, Takada N, Wanifuchi H, Wanifuchi N, Yagami K, Niidome T, Tanaka I, Katayama K. Isolation and functional characterization of the 5'-upstream region of mouse P/Q-type Ca^{2+} channel $\alpha 1A$ subunit gene. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 54-59, 1999

47. Teng CM, Kuo SC, Ko FN, Lee JC, Lee LG, Chen SC, Huang TF. Antiplatelet actions of panaxynol and ginsenosides isolated from ginseng. *Biochim Biophys Acta* 990(3): 315-320, 1989
48. Yokozawa T, Fujitsuka N, Yasui T, Oura H. Effects of ginsenoside-Rb₂ on adenine nucleotide content of rat hepatic tissue. *J Pharm Pharmacol* 43(4): 290-291, 1991
49. Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacol* 32(11): 1075-1088, 1993
50. Zhu Y, Zboran EL, Ikeda SR. Phenotype-specific expression of T-type calcium channels in neurons of the major pelvic ganglion of the adult male rat. *J Physiol* 489(2): 363-375, 1995
51. Zhu JH, Takeshita T, Kitagawa I, Morimoto K. Suppression of the formation of sister chromatid exchanges by low concentrations of ginsenoside Rh₂ in human blood lymphocytes. *Cancer Res* 55(6): 1221-1223, 1995
52. Zhu JH, Yakel JR. Modulation of Ca²⁺ currents by various G protein-coupled receptors in sympathetic neurons of male rat pelvic ganglia. *J Neurophysiol* 78(2): 780-789, 1997
53. Zoubek J, Somogyi GT, De Groat WC. A comparison of inhibitory effects of neuropeptide Y on rat urinary bladder, urethra, and vas deferens. *Am J Physiol* 265(3): 537-43, 1993

Abstract

Modulation of Calcium Channels by Gensenosides in Pelvic Ganglion Neurons Innervating the Urogenital System

Lee, Young Soo

Dept. of Medicine

The Graduate School Yonsei University

(Directed by Professor jung woo Lee)

Pelvic ganglia, the autonomic ganglia innervating various urogenital organs including the urinary bladder, the prostate, and the penis, play physiologically important roles in autonomic reflexes such as micturition and penile erection. Rat major pelvic ganglia (MPG) are unique among autonomic ganglia in that a single ganglion capsule contains two functionally distinct populations, sympathetic and parasympathetic neurons. The purposes of the present study were i) to investigate whether ginseng saponin (ginsenoside) was capable of modulating Ca^{2+} currents in male rat MPG neurons and ii) to identify cellular and molecular mechanisms underlying modulation of Ca^{2+} currents. In this

regard, Ca^{2+} currents were measured using the whole-cell variant of the patch clamp technique in enzymatically dissociated MPG neurons. Bath application of ginseng total saponin (GTS, 0.3 mg/mL) significantly inhibited high-voltage activated (HVA) Ca^{2+} currents (43 ± 5 %, $n=10$). Of the two main GTS fractions, protopanaxatriol (PT, 0.3 mg/mL) inhibited HVA Ca^{2+} currents (38 ± 2 %, $n=22$), whereas protopanaxadiol (PD, 0.3 mg/mL) exerted negligible effects ($n=12$). There was no significant difference in the effects of PT on HVA Ca^{2+} currents between sympathetic and parasympathetic MPG neurons. The PT-induced Ca^{2+} current inhibition was concentration- and voltage-dependent. Modulation of Ca^{2+} currents by PT was almost completely abolished when MPG neurons were dialyzed with GDP β S (2mM, $n=5$) or pretreated overnight with pertussis toxin (PTX) (500 ng/mL, $n=4$). Compared with controls, the inhibitory effects of PT on Ca^{2+} currents were decreased after application of ω -conotoxin GVIA (ω -CgTx GVIA), a selective N-type Ca^{2+} channel blocker (from 42 ± 6 to 28 ± 4 %, $n=4$). Furthermore, PT inhibited FPL64176-induced L-type tail currents (40 ± 5 %, $n=7$) as well as nimodipine and ω -CgTxGVIA-insensitive non-L/non-N type currents (26 ± 4 %, $n=4$). In sympathetic MPG neurons, PT also inhibited T-type Ca^{2+} currents activated at low-voltages (49 ± 5 %, $n=5$). Among various fractions of the PT, the Rg_2 was an active component in modulating both HVA and T-type Ca^{2+} currents. Taken together these data suggest

that ginsenosides modulate Ca^{2+} currents via voltage-dependent and PTX-sensitive pathways in male rat MPG neurons. These results may provide fundamental basis for understanding action mechanisms of ginsenosides at cellular and molecular levels.

Key words : Major Pelvic Ganglia, Ginsenoside, Protopanaxatriol, Protopanaxadiol, Ginseng, GTS, Ca^{2+} currents