

Xenopus oocytes에서 발현된 유전자재조합 세로토닌 제3형 수용체에 대한 한국산 홍삼 사포닌의 효과

구본너 · 강정완* · 배선준 · 김미경 · 고성룡** · 민경태#

연세대학교 의과대학 마취과학교실, *연세대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, **고려인삼연초연구소
(2001년 1월 14일 접수)

The Effect of Korean Red Ginseng Saponins on the Recombinant Serotonin Type 3 Receptor Expressed in Xenopus Oocytes

Bon Nyeo Koo, Jeong Wan Kang*, Sun Joon Bai, Mi Kyung Kim,
Sung Ryong Ko** and Kyeong Tae Min#

Department of Anesthesiology, Yonsei University College of Medicine,

*Department of Oral & maxillofacial surgery, Yonsei University of Dentistry, Seoul, Korea,

**Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon, Korea

(Received January 14, 2001)

Abstract : The effect of Korean Ginseng saponins (total saponin, PD saponin and PT saponin) on the serotonin type 3 receptor, which is known to be involved in nausea and vomiting following anticancer chemotherapy or the general anesthesia, was investigated. After *in vitro* transcribed recombinant serotonin type 3 receptor in the *Xenopus laevis* oocyte, classic two electrodes voltage clamp technique was used. All of ginseng saponins inhibited the response of the agonist, serotonin, on the serotonin type 3 receptor in a dose-dependent manner. PT saponin showed to have the inhibitory effect more than 2 times as potent as PD saponin. Total saponin shifted the serotonin dose response plot to the right (EC_{50} , $0.70 \pm 0.17 \mu\text{M}$ into $3.57 \pm 1.42 \mu\text{M}$, and Hill coefficient, 2.14 ± 0.60 into 1.52 ± 1.00). Ginseng saponin did not change the reversal potential ($\sim 0 \text{ mV}$) of serotonin type 3 receptor. These results suggest that Korean ginseng saponin may have the inhibitory effect on serotonin type 3 receptor.

Key words : Ginseng saponin, xenopus oocytes, recombinant serotonin type 3 receptor, voltage clamp technique

서 론

인삼(*Panax ginseng*)의 약효는 이미 2000년 전부터 현재에 이르기까지 민간, 한방 의학의 한 부류를 형성하며 널리 사용되어 오면서 천연 생약으로서 전세계에 걸쳐 널리 인정받고 있다. 그러나 식품으로서 뿐 아니라 약품으로서 인삼의 작용 기전은 아직 만족스러운 상태에까지 이르지 않고 있다. 인삼에는 배당체 성분인 saponin을 비롯하여 단백질, 아미노산, 핵산, 알칼로이드 등의 질소화합물과 지방산, 정유, 페놀화합물 등의 지용성 성분과, 여러 가지 당류 외에도 비타민과 무기질 등이 함유되어 있다. 오래 전부터 인삼은 피로 회복이

나 활력 증강에 유효하다고 알려져 있으며¹⁾ 널리 사용되어 오고 있다. 1957년 소련의 과학자인 Brekhman은²⁾ 인삼의 유효성분으로 saponin 성분(ginsenosides)의 효능을 주장한 이래 이에 대한 연구가 이루어져 왔다. 인삼의 약리효과, 특히 중추신경에 대한 효과는 보고자에 따라 다양하게 보고되는데, 홍 등은³⁾ 인삼이 중추흥분작용이 있다고 한 반면, 오 등은⁴⁾ 중추억제효과가 있다고 하였다. 다른 연구에 의하면^{5,6)} 인삼 saponin은 소량에서는 흥분, 대량에서는 억제 효과를 보인다는 연구 결과가 있어 중추신경계에 대한 작용기전은 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과들은 인삼의 사포닌의 성분에 따라 달리 나타나는 것으로 알려져 있다. 인삼의 ginsenosides는 비당부의 화학구조에 따라 dammarane 형의 triterpenoid saponin인 protopanaxadiol-형의 ginsenoside(PD)와 protopanaxatriol-형의 ginsenoside(PT)로 크

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-361-5847; (팩스) 02-312-7185
(E-mail) ktmin501@yumc.yonsei.ac.kr

게 나눌 수 있다.⁷⁾ PD계와 PT계의 ginsenoside들은 30여종이 분리되어 보고되어 있고 이러한 사포닌의 구조는 기본적으로 스테로이드 구조를 띠고 있으며 매우 다양한 약리작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 인삼은 학습, 기억, 신경보호 및 신경전달물질에 대한 조절작용 등 중추신경계에 대한 작용 외에도 종양세포 성장억제나 세포의 계획사멸(apoptosis), 면역조절작용 등 매우 다양한 부위에 때로는 상이한 반응을 보이는 것으로 알려져 있을 뿐 아니라 단일 ginsenoside 조차도 같은 조직에 대하여 다중반응을 보이기도 한다.⁸⁾ Tasaki 등은⁶⁾ 인삼 saponin을 성분구획에 따라 다른 약리작용을 관찰하였는데 Rb, Rc를 함유하는 분획은 중추신경억제제, Rg2, Rg3를 함유하는 분획은 중추신경 흥분, 억제작용을 모두 가지고 있다고 하였다. 한편 Katu등은⁹⁾ Rf, Rd, Re등은 뇌파 활성의 억제제를 보인다고 하였으나, 石川은¹⁰⁾ total saponin, Ro, Re, Rf, Rg1은 전기 생리적 실험을 통하여 거의 영향을 미치지 않는다는 상반된 결과를 보이고 있다. Tachikawa 등과¹¹⁾ Kudo 등은¹²⁾ PT 계열의 사포닌이 PD 계열의 사포닌에 비해 아세틸콜린 수용체에 대하여 보다 강력한 억제작용이 있으며, 다른 식물 배당체인 saikosaponin-a, glycyrrhizin 및 심근 배당체인 digitoxin이나 digoxin은 아무런 작용을 보이지 않음을 밝혀 PT, PD 계열의 인삼 사포닌은 아세틸콜린 수용체에 대해 고유의 약리작용을 가진다고 하였다. 또한 최근 Tachikawa 등은¹³⁾ ginsenoside-Rg2와 -Rg3 는 ionotropic 수용체인 니코틴 아세틸콜린(nicotinic acetylcholine)과 가바(GABA) 수용체에 대하여 선택적인 억제작용이 있는 반면, ginsenoside- Rb1과 -Ro는 ionotropic 수용체에 대하여 아무런 영향이 없다고 하여 사포닌 성분에 따라 고유의 약리작용이 있을 것임을 시사한 바 있다. 한편, 1980년에 이르러 분자생물학 영역의 급진적인 발전에 힘입어 각종 약물들의 세포막의 수용체에 대한 정확한 작용기전에 대한 연구가 가능해지고 이를 통하여 보다 과학적인 약리작용의 기전들이 규명됨에 따라 지금까지 신비에 부쳐진 많은 약물들의 효능의 규명에 새로운 방향을 제시하고 있다.

Serotonin(5-hydroxytryptamine, 5HT) type 3 receptor는 Na^+ , K^+ 등 일가 양이온을 선택적으로 통과시킴으로써 빠른 신경전달을 특징으로 하는, 아세틸콜린, 가바, 글라이신(Glycine) 수용체 등과 같이 ligand-gated ion channel superfamily에 속하며, 중추 및 말초 신경계에 널리 분포하고 있다.¹⁴⁾ 이 수용체는 구역, 구토작용에 관여 할 뿐 아니라 중추 및 말초에 연관된 통증기전과 불안, 진정 등의 생리적 반응에도 관여한다. 전신마취가 요구되는 환자에서 수술 후 구역, 구토 등의 부작용이 10~40%의 빈도로 발생하고 있으며, 이러한 부작용을 예방 또는 치료의 목적으로 serotonin type 3 receptor 억제제(inhibitor)로 알려진 ondansetron이 임상에서 효과

적으로 사용되고 있다.^{15,16)} 그러나 세로토닌 3형 수용체의 길항제는 임상적으로 높은 효용성에도 불구하고 경제적으로 고가로서 많은 환자들에게 어려움이 따르고 있는 실정이다.¹⁷⁾ 현재까지 Maricq 등이¹⁸⁾ serotonin type 3 receptor cDNA를 cloning 하여 염기배열의 구조를 밝혔는데 이는 nicotinic acetylcholine receptor와 함께 ligand-gated ion channel의 superfamily에 속하여 구조적으로 약 30-40%의 homology를 보이고 있으므로 홍삼 사포닌은 세로토닌 제3형 수용체에 억제작용이 있을 것임을 예상할 수 있다.

본 연구의 목적은 한국산 홍삼이 ligand-gated 이온 통로의 하나인 세로토닌 제3형 수용체에 대하여 어떠한 작용을 하는가를 규명하여 홍삼이 생체에 미치는 다양한 생리작용이 있음에도 불구하고 아직까지 만족스럽지 못한 과학적인 작용기전을 밝혀 전문의약품으로서 세로토닌 3형 수용체의 선택적 길항제의 대치약품로서의 의의를 관찰하고자 하였다.

실험방법

1. 세로토닌 3형 수용체 유전자 재조합 cDNA의 준비 및 cRNA의 합성

Fig. 1에 대략적인 실험방법에 대한 모식도를 나타내었는데, oocyte 발현 vector(pCR-Script SK(+))내에 subcloning 되어 있는 사람의 세로토닌 제3형 수용체의 cDNA 수용체(Yamanouchi Pharmaceutical Co., Japan 제공)를 E-coli (XL1-blue competent cell)내로 transformation 시키고 LB/Ampicilline agar plate에 도포하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 배양된 균주 몇 개를 채취하여 ampicilline이 첨가된 약 50 cc의 LB 배양액에서 다시 배양시키고 Qiaex miniprep kit(Qiagen, USA)을 사용하여 plasmid DNA를 분리하였다. Plasmid vector와 세로토닌3형 유전자의 핵산 절단효소지도를 이용하여 적절한 핵산 절단효소들을 선택 처리하여 agarose gel 전기영동을 시행 후 restriction map과 핵산염기배열을 통해 올바른 DNA를 확인, 선택하였다. 선택된 plasmid DNA로 부터 Qiaex maxiprep kit(Qiagen, USA)을 이용하여 제조 회사의 지시된 protocol에 따라 시행하여 많은 양의 cDNA를 얻었다. cDNA로부터 cRNA의 합성은 전과정동안 RNase의 오염을 피하도록 하여 원형의 plasmid DNA를 Sal I(BM, USA) 절단효소로 잘라 선행으로 만든 후 proteinase K와 SDS를 처리하여 RNase가 없는 template를 준비하고 T3 message machine kit(Ambion, USA)을 이용하여 제조회사의 설명서에 따라 cRNA를 합성하였다. LiCl precipitation을 통해 얻은 정제된 cRNA는 optiodensity (AD260)를 측정하여 0.5-1 µg/ml의 농도로 만든 후 -70°C에 보관하여 필요시 사용하였다.

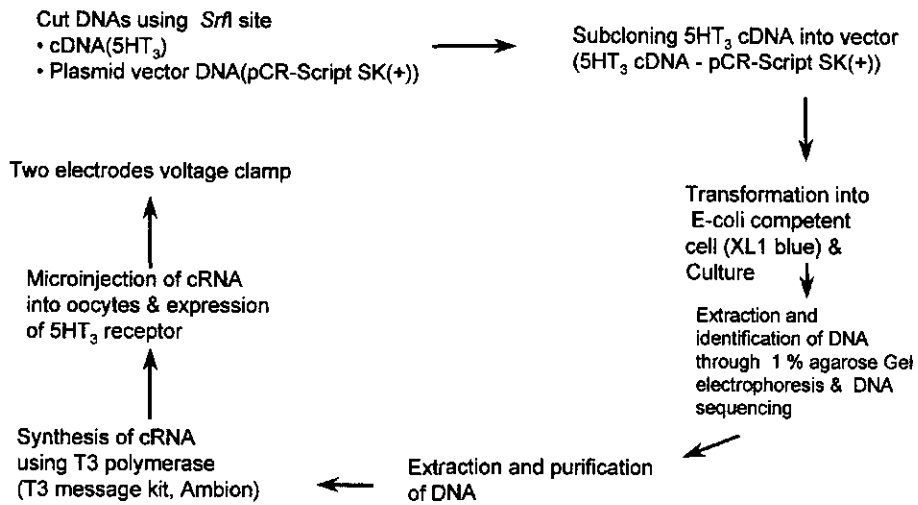


Fig. 1. Schematic diagram of molecular biology works.

2. Xenopus oocyte의 분리 및 microinjection

연세대학교 의과대학 의학연구소의 동물 실험 윤리기준에 따라 oocyte를 갖고있는 암컷의 *Xenopus laevis*(푸른나무, 용인)를 0.15%의 3-p-aminobenzoic acid(Sigma, USA) 용액에 약 30분간 두어 마취시킨 후 외과적 방법으로 oocyte를 꺼내고 Ca^{2+} free ND96 용액(구성 mM: NaCl 96, KCl_2 , $MgCl_2$ 1, HEPES 5, pyruvate 2.5)에 두고 collagenase IA(Sigma)로 약 1 시간동안 조심스레 처리 시켜 follicular layer를 제거하였다. 그후 Modified Barth saline solution(MBS 용액, 구성 mM, Penicillin, streptomycin 예외: NaCl 88, KCl 1, $CaCl_2$ 0.41, $Ca(NO_3)_2$ 0.33, $NaHCO_3$ 2.4, HEPES 5, pH 7.4, Aminophylline 0.5, Penicillin 10U/ml, Streptomycin 10 μ M/ml)으로 충분히 씻은 후 현미경하에서 stage V-VI의 성숙한 oocyte를 골랐다. 당일 또는 다음날 Narishige puller pp-83(Japan)를 사용하여 glass microelectrode의 끝을 6~8 μ m 크기로 만들어 현미경하에서 microinjector (Nanojector, Drummond사)를 통하여 oocyte당 50 nl의 cRNA를 주입하고 이때 oocyte가 약간 부풀어 오르는 것으로 확인했다. 세로토닌 3형 수용체의 발현을 위해 MBS 용액 속에서 48-96 시간 동안 18°C하에서 배양시켜 수용체를 발현시킨 후 전기생리실험을 하였다. Oocyte의 배양용액은 매일 교환하였다.

3. 전기생리 실험

Two electrode voltage clamp(OC 725C, Warner Instrument, USA) technique과 pClamp v5.7.1 software(Axon Instrument, USA)를 사용하여 세로토닌 제3형 수용체를 통한 Na^+ , K^+ 이온의 이동에 따른 전류변화를 관찰 및 결과분석하였다. 실험 전과정에서 holding voltage는 -40 또는

-50 mV로 하였다. Glass microelectrode를 puller로 적당한 크기의 끝으로 만든 후 3M KCl로 채우고 microforcep으로 말단부를 3~5 μ M의 크기로 자른 후 저항을 1-3 Mohm으로 하여 holding current가 0.2 μ A 이내의 oocyte를 골라 실험하였다. Oocyte를 50 μ l 크기의 recording chamber에 놓고 분당 3~7 ml의 속도로 Mg^{2+} -free, Ca^{2+} -free, 1.8 mM Ba^{2+} frog Ringer's 용액으로 관류시켰다. 약물의 관류는 pClamp 프로그램에 의해 컴퓨터로 작동되는 2개의 solenoid valve를 통하여 이루어 졌으며, 세로토닌 제3형 수용체의 발현의 확인을 위하여 선택적인 세로토닌 1, 2, 및 3형의 길항제에 대한 반응으로 3형 수용체의 발현을 확인하였다. 각종 반응약물에 대한 최대 반응이 날 때까지 충분히 관류시켰다.

(1) 세로토닌 3형 수용체에 대한 세로토닌의 용량-반응 곡선에 미치는 영향

홍삼 사포닌의 세로토닌 3형 수용체에 대한 억제작용이 세로토닌과 경쟁적 길항제로 작용하는지, 비경쟁적으로 작용하는지 관찰하기 위해 우선 세로토닌 3형 수용체에 대한 세로토닌 단독의 용량-반응 곡선을 구하고, 세로토닌 단독에 의한 최대 반응을 보이는 46 μ M 세로토닌에 대하여 사포닌 0.5 mg/ml의 농도를 일련의 희석된 농도의 세로토닌(1~100 μ M)의 반응을 통하여 세로토닌 3형 수용체에 대한 세로토닌의 용량-반응 곡선에 미치는 영향을 관찰하였다.

(2) 사포닌 조성에 따른 세로토닌 제3형 수용체에 대한 억제효과의 비교

세로토닌의 1 μ M 단독 또는 조사포닌, PT 및 PD 사포닌을 병용 관류하여 사포닌의 억제반응을 비교 관찰하였다. 즉, 조사포닌(0.13, 0.25 및 0.5 mg/ml), PT(0.06, 0.13 및 0.25 mg/ml) 및 PD 사포닌(0.06, 0.13 및 0.25 mg/ml)을 frog's Ringer's 용액에 녹인 후 일련의 연속된 농도로 희석하여 만

들었다. 억제효과는 세로토닌 1 μM에 대한 반응에 대하여 억제 정도를 백분율로 나타내었다.

(3) 이온 선택적 투로(ion selectivity)에 미치는 효과

세로토닌 0.5 μM 단독 및 조사포닌 0.1 mg/ml 농도와 병합 관류시 얻어지는 최대 반응동안 holding current를 -80 mV에서 +30 mV를 500 ms 동안 변화시키는 ramp test를 통하여 I-V 관계(current-voltage relationship)를 얻도록 하였다. 이를 통하여 역전전압(reversal potential)의 변화 여부를 관찰하였다.

실험 전과정을 통하여 투여된 세로토닌과 홍삼의 성분에 의한 탈감작 효과(desensitization)를 피하기 위하여 실험약물의 종류와 농도에 따라 약물의 투여는 5-30분의 간격을 두었다. 모든 실험은 실온 하에서 시행한다. 각종 홍삼 사포닌은 한국인삼연초연구원으로부터 공급받아 실험에 임하며, 구입이 언급되지 않은 약물은 Tocris(영국) 또는 Sigma사(미국)로부터 구입하였다.

4. 결과처리

세로토닌에 대한 농도-반응 곡선은 sigma plot v.3.00 software(Jandel Scientific co.)를 이용하여 다음의 공식에 따라 best-fitting function을 통하여 얻었다.

$$I/I_{max} = C^n / (C^n + EC_{50}^n)$$

- I : 세로토닌에 의한 normalized peak current
- I_{max} : maximal normalized peak current
- C : 세로토닌 농도
- n : Hill coefficient
- EC_{50} : half-maximal current를 보이는 약물 농도

조사포닌, PT 및 PD 사포닌의 억제효과는 세로토닌 1 μM 단독 반응에 대한 억제 정도를 백분율로 표시하였고, 결과의 비교는 평균과 표준편차로 표시하며 통계적 처리는 동일 홍삼 사포닌의 용량에 따른 반응은 repeated measured ANOVA를 시행하고 다중비교는 Tukey 방법을 취하였다. 용량 대비에 사포닌 별 비교는 ANOVA를 시행하고 p<0.001의 유의수준으로 하였다.

결 과

1. 세로토닌 3형 수용체에 대한 세로토닌의 용량-반응 곡선에 미치는 영향

조사포닌, PD 및 PT 사포닌 모두 세로토닌에 의한 반응(peak response)을 억제하였으며, 또한 모든 종류의 사포닌들은 세로토닌의 최대 반응(maximal response)을 억제하였으며,

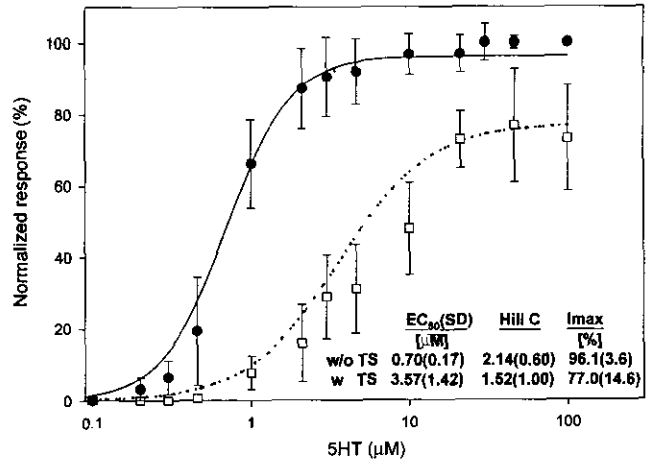


Fig. 2. 5HT dose-response plot in recombinant 5HT₃ receptor expressed in Xenopus oocytes. EC₅₀ and Hill coefficient of the dose-response plot of 5HT alone (solid line and circle) was changed by co-application of 5HT with ginseng total saponin, 0.5 mg/ml (dot line and box). TS, ginseng total saponin. Data show Mean(SD). Bars represent SD. Each data were obtained from 6~10 oocytes.

세로토닌에 의한 탈감작반응을 항진시켰다. 이러한 사포닌의 억제 반응은 세척 후 5 분에는 완전히 회복되었다. 세로토닌 3형 수용체에 대하여 세로토닌 용량-반응 곡선상 EC₅₀과 Hill coefficient는 각각 0.70±0.17 μM 및 2.14±0.60였다. 이러한 반응은 조사포닌 0.5 mg/ml를 함께 관류함으로써 EC₅₀와 Hill Coefficient 가 각각 3.57±1.42 μM 및 1.52±1.00으로 변화하였다. 또한 조사포닌 0.5 mg/ml을 함께 반응시 100 μM 세로토닌에 의한 반응은 46 μM 세로토닌 단독에 의한 최대 반응의 77.0±14.6% 정도로 억제되었으며(n=6) 이러한 현상은 조사포닌이 세로토닌 3형 수용체에 대하여 비경쟁적인 억제작용을 보이고 있음을 암시하고 있다(Fig. 2).

2. 사포닌 조성에 따른 세로토닌 제3형 수용체에 대한 억제효과의 비교

세로토닌 1 μM 단독에 대한 조사포닌, PD 및 PT 사포닌은 농도에 비례하여 세로토닌 3형 수용체에 대하여 억제작용이 있음을 알 수 있었으며, 즉, 조사포닌 0.5, 0.25, and 0.13 mg/ml 농도는 세로토닌 1 μM 단독에 대한 반응의 각각 30.1±9.5, 43.0±10.7, 58.4±11.7%를 보이는데 반하여, PD 및 PT 사포닌 각각 0.25, 0.13 및 0.06 mg/ml의 농도는 세로토닌 1 μM 단독에 대한 반응의 62.9±8.4, 73.6±7.6, 83.4±5.6% 및 26.2±5.7, 41.2±5.1, 60.1±5.5%를 보였다(n=6) (Fig. 3, 4 and Table 1).

3. 이온 선택적 투로(ion selectivity)에 미치는 효과

Holding potential -80~+30 mV까지의 500 ms 동안 시행

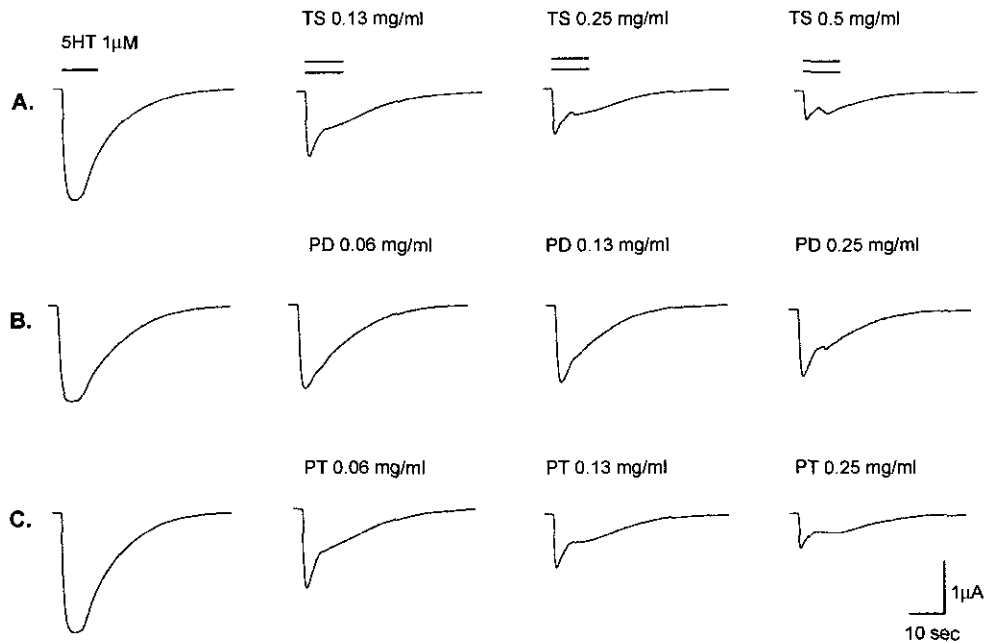


Fig. 3. Traces of 1 μ M 5HT alone or co-application of 1 μ M 5HT with various concentrations of ginseng saponins Ginseng total saponin (TS, 0.13, 0.25, and 0.5 mg/ml) in column A, panaxadiol saponin (PD, 0.06, 0.13, and 0.25 mg/ml) in column B, and panaxatriol saponin (PT, 0.06, 0.13, and 0.25 mg/ml) in column C on 5HT₃ receptor expressed in *Xenopus oocytes* inhibited the response induced by 1 μ M 5HT in a manner of dose-dependence. Traces of each column were obtained from single oocyte under voltage clamped at -50 mV. Scale bars represent 10 sec. and 1 μ A, respectively.

Table 1. Inhibitory Effects of TS, PD, and PT Saponin on the 5HT₃ receptor

| Type of saponin | N | Concentration (mg/ml) | Normalized response to 1 μ M 5HT (%) |
|-----------------|---|-----------------------|--|
| TS | 6 | 0.13 | 58.41 \pm 1.7 |
| | | 0.25 | 43.0 \pm 10.7 |
| | | 0.5 | 30.1 \pm 9.5 |
| PD | 6 | 0.06 | 83.4 \pm 5.6* |
| | | 0.13 | 73.6 \pm 7.6* |
| | | 0.25 | 62.9 \pm 8.4* |
| PT | 6 | 0.06 | 60.1 \pm 5.5 |
| | | 0.13 | 41.2 \pm 5.1 |
| | | 0.25 | 26.2 \pm 5.7 |

TS, ginseng total saponin; PD, panaxadiol; PT, panaxatriol. All the responses within the same saponin differ significantly ($p < 0.001$). *vs. TS and PT, $p < 0.001$.

된 ramp test상 세로토닌 단독에 의한 반응은 역전전압이 -0 mV이었으며, 조사포닌 0.1 mg/ml의 농도를 함께 투여하였을 때에도 serotonin 0.5 μ M 단독에 의한 역전전압은 변화되지 않았다(Fig. 5).

고찰

본 연구에서 홍삼의 사포닌 성분들은 세로토닌 제3형 수용

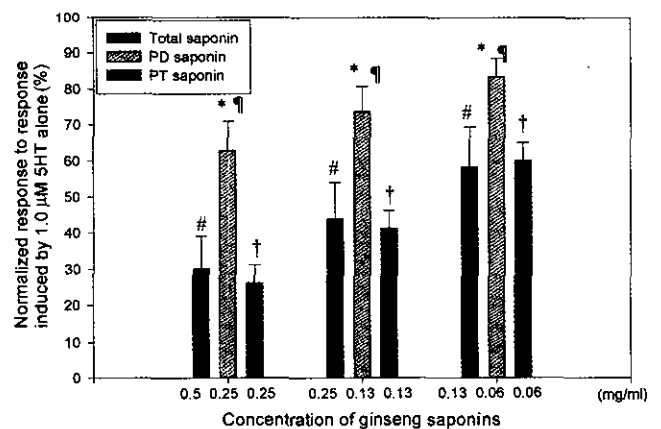


Fig. 4. Comparison of the inhibitory effects of ginseng total saponin (TS), panaxadiol saponin (PD), and panaxatriol saponin (PT) on the 5HT₃ receptor. Normalized responses of various concentrations of ginseng saponins with co-application with 1 μ M 5HT to the response induced by 1 μ M 5HT alone. Corresponding inhibiting concentrations of each ginseng saponins were selected on the basis of ginseng saponin composition. *, vs. TS and PT by ANOVA with Tukey multiple comparison, $p < 0.001$. #, ¶, †; comparison between responses of concentration within type of saponin, by repeated measured ANOVA, $p < 0.001$. Data were obtained from 6 oocytes. Error bars show SD.

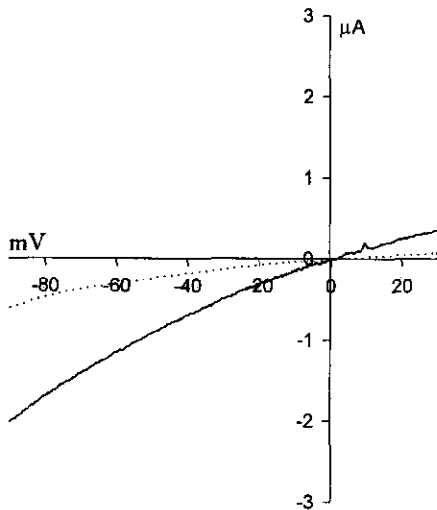


Fig. 5. Current-voltage plots obtained by 500 ms ramp voltage commands from -80 to +30 mV during 0.5 μ M 5HT application (solid), co-application with 0.1 mg/ml ginseng total saponin (dot). The I-V curves demonstrate the lack of voltage-dependence in ginseng total saponin inhibition. The point intersection of the traces is an estimate of the reversal potential.

체에 대한 세로토닌의 반응을 억제시키는 작용이 있었으며, 본 연구진들의 관찰에 의하면 홍삼의 비사포닌 성분은 0.5 mg/ml의 고농도에서 세로토닌 제3형 수용체에 대한 세로토닌의 반응을 미미하게나마 억제시켰으나 이는 홍삼성분 추출시 사용되는 알코올 또는 질소화합물, 지질 및 탄수화물등 비사포닌 고유의 작용에 의함도 배제 할 수는 없었다. 반면, 홍삼 조사포닌은 세로토닌 제3형 수용체에 대하여 세로토닌의 농도-반응 곡선을 우측으로 이동시키는 결과를 관찰 할 수 있었으며, 조사포닌은 세로토닌의 최대 반응의 77% 정도로 억제시키는 양상을 관찰할 수 있었는데, 이런 결과는 홍삼 조사포닌이 세로토닌 제3형 수용체에 대하여 비경쟁적으로 억제작용을 할 것으로 생각할 수 있다. 다만, 본 연구에서 홍삼 조사포닌의 비경쟁적인 억제 반응을 보다 명확하게 규명하기 위해서는 일정 농도의 세로토닌에 대하여 일련된 농도의 조사포닌 반응을 관찰하여 비교하여야 하나 본 실험장비의 특성상 0.5 mg/ml 이상의 조사포닌을 투여는 solenoid valve의 기계적 유량의 속도를 저하시킬 수 있기 때문에 더 이상 고용량의 조사포닌에 대한 실험을 할 수 없었던 제약이 있었다. 이에 대한 보완적인 실험으로 조사포닌, PD, 및 PT 사포닌을 홍삼의 사포닌 구성비에 근거를 하여 여러 가지 농도에 따른 억제정도를 관찰하였는데 세 가지 사포닌 모두 농도에 비례하여 억제반응을 보였으며, PT 사포닌이 PD 사포닌에 비해 동일 농도에서 2~3배 정도 억제반응을 크게 나타냈다. 홍삼부위에 따라 즉, 세근이 지근이나 주근에 비해 조사

포닌의 함량이 많을 뿐 아니라 PD/PT 사포닌의 성분비도 커지지만, 홍삼의 PD/PT 사포닌의 성분비가 1.15~2.3정도임을¹⁹⁾ 감안하면, 조사포닌의 억제효과는 주로 PT 사포닌에 의한 작용함을 예상할 수 있었으며 사포닌 종류에 따라 선택적인 역할이 있는 것으로 생각된다. 이러한 연구결과는 홍삼 추출물들이 쥐뇌의 synaptosome에서 GABA, glutamate, dopamine, noradrenaline등의 uptake를 농도에 비례하여 억제시키거나²⁰⁾ GABA_A 수용체에서 ligand의 결합을 억제시키는 등²¹⁾ 신경전달에 홍삼이 관여하고 있다는 연구결과에 미루어 신경근 전달물질의 하나인 세로토닌에 대하여도 영향을 미치고 있을 수 있다고 추측할 수 있다. 한편 Tachikawa등은¹³⁾ PT 성분의 Rg2 ginsenoside는 PD 성분의 Rg3에 비해 nicotinic acetylcholine 수용체와 GABA 수용체에 대하여 2.5배 정도 선택적인 억제작용이 있는 반면, Rg3 ginsenoside는 이들 수용체 뿐 아니라 muscarine 및 histamine 수용체에 대하여도 억제 작용이 있었던 결과는, 본 연구의 사포닌 종류에 따른 고유의 작용이 있을 것으로 예상되는 결과와 상응하였다. 다만 본 연구에서는 사포닌 종류에 따른 ginsenosides의 반응을 관찰하지 않았고 여러 가지 ginsenosides가 함유된 crude saponin인 조사포닌, PD 및 PT 사포닌에 대한 결과를 얻었기 때문에 보다 구체적인 홍삼 사포닌별 특성을 규명할 수는 없었다. 따라서 각 사포닌의 ginsenoside 고유의 특성을 규명하기 위한 실험이 앞으로 시행되어야 할 것으로 생각된다.

세로토닌 제3형 수용체, acetylcholine 수용체 및 GABA 수용체는 모두 pentamer 구조를 하는 ligand-gated ion channel로서 유전자 배열의 구조는 30~40%의 homology를 보이고 있으며,²²⁾ agonist와 antagonist가 작용하는 부위 외에도 다른 반응물질이 작용하여 수용체의 기능을 조절시키는 또 다른 부위가 있는 구조생리적 공통점이 있다.²³⁾ 알코홀이나 여러가지 마취제들은²⁴⁾ 세로토닌 제3형 수용체의 agonist가 작용하는 부위가 아닌 다른 조절 부위에 작용을 하여 agonist의 작용을 항진 또는 억제시키는 작용이 있는데 홍삼 사포닌이 세로토닌 3형 수용체에 대하여 어떤 부위를 통하여 억제시키는지는 본 연구에서는 알 수 없었지만 이 수용체가 세포막의 인지질 부위에 위치하는 ligand-gated ion channel임을 감안하면, ginsenosides는 세포막의 인지질 부분의 극성 부분과 작용하여 OH기는 세포막의 cholesterol의 OH기와 작용하여 cholesterol이 많은 ligand-gated ion channel에 작용을 하지만 cholesterol이 적은 세포질 내의 sarcoplasmic Ca^{2+} -ATPase에는 작용이 적은 것이 예상된다.²⁵⁾ 또한 ginsenosides는 세포막으로 침윤하여 막구조를 변형시키는 fluidity를 변형시킴으로써 작용을 하였을 수도 있다.²⁶⁾ 특히 홍삼 사포닌은 구조적으로 스테로이드 구조를 가지고 있기 때문에

세포막내로 유입되어 이차적인 조절작용을 하였을 가능성이 있다. 그러나 fluidity 변화에 의한 설명은 Leung등이²⁷⁾ 홍삼 사포닌 100 µg/ml의 용량에서 leukemic HL-60 cell에서 세포막의 투과성을 야기하지 않은 것을 미루어 본 연구에서의 60 µg/ml용량의 PD, PT 사포닌이 보인 억제작용과는 연관성이 적어 보인다. Yekel과 Jackson은 adenylate cyclase activator를 bath내로 관류시 세로토닌 제3형 수용체에 대한 탈감작반응을 더욱 빠르게 증가시킴을 관찰하고 이를 탈감작반응의 acceleration 현상이라고 하였다.²⁸⁾ 홍삼 사포닌도 세로토닌 제3형 수용체에 대하여 탈감작 반응의 acceleration을 증가시키는 양상을 보였는데 이는 홍삼 사포닌이 세포내 secondary messenger나 phosphorylation에 관여하는 조절작용을 통하여 세로토닌 3형 수용체에 작용을 하였을 가능성이 있다. 본 연구에서 발견된 세로토닌 수용체는 연구결과에는 나타내지 않았지만 세로토닌 제1/2형 선택적인 길항제에 대하여는 억제 반응을 보이지 않았고 제3형 수용체의 길항제에 대하여 억제반응을 보이는 것으로 미루어 세로토닌 제3형 수용체가 발견되었음을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 5에서 보인 세로토닌 3형 수용체의 역전압은 0 mV로 이미 다른 보고에 의한 값과 일치하였으며, 홍삼 사포닌은 세로토닌 수용체에 대한 역전압의 변화를 초래시키지 않으면서 관찰 전압의 범주 내에서 세로토닌에 대한 반응을 억제하였다. 전류-전압 반응곡선의 양상으로 미루어 홍삼 사포닌은 막전압에 비의존적으로 반응하는 것을 알 수 있었으며, 이는 홍삼 사포닌이 세로토닌 3형 수용체에 대하여 이온 통로의 구조적인 변형은 초래하지 않았을 것으로 해석된다.

항암치료시 발생하는 부작용인 구토, 구역은²⁹⁾ 환자들이 항암치료를 수용하는데 심한 고통으로 작용하고 있다. 이에 대한 불편함은 항암치료 자체의 접근을 어렵게 할 뿐 아니라 생활의 질을 저하시키게 되고 환자로 하여금 정신적인 우울을 초래하게 한다. 또한 전신마취 후 발생하는 구토는 10~40%의 빈도로 발생하며, 전신마취 후 의식이 완전히 명료하지 않은 상태의 구토증은 폐흡인으로 인한 폐렴 등의 합병증을 야기하여 환자의 건강을 심각하게 위태롭게 할 뿐 아니라 재원기간의 연장과 아울러 사회적, 경제적 손실을 초래할 수 있다.³⁰⁾ 이러한 부작용에 세로토닌 제3형 수용체가 관련되는 것으로 알려진 후 최근 이 수용체의 길항제는 항암치료나 전신 마취 후 발생하는 심각한 부작용인 구역, 구토의 치료제로 각광을 받고 있다. 그러나 아직 이 제제는 경제적으로 환자들에게 부담이 많은 약물로서 보편적으로 사용되지 못하고 있으며 그 자체로서 부작용이 수반된다. 그러나 생약으로서의 홍삼 사포닌은 이러한 부작용이 적기 때문에 세로토닌 3형 수용체가 관여하는 증상의 치료에 대치될 수 있는 근거를 제공한다. 따라서 홍삼 사포닌의 세로토닌 3형 수용

체에 대한 억제작용은 과민성대장증후군의 치료제나, 구토 증상의 예방, 치료의 관점에 관심을 유발시키게 된다. 본 연구의 결과는 홍삼 사포닌이 세로토닌 제3형 수용체의 억제작용이 있음을 알 수 있었는데 특히 PT 사포닌은 큰 억제효과가 있음을 알 수 있었지만 아직 우리나라에서는 홍삼이 의약품으로 선정되지 않고 있으며, 건강보조제로서 역할을 담당하고 있는 상황에서 본 연구 결과는 홍삼의 의약품 개발에 대한 새로운 계기의 과학적 근거를 제시 할 수 있을 것으로 사료된다. 하지만 아직 본 연구결과만으로 PT ginsenosides중에 어떤 ginsenosides가 주된 작용을 가지고 있는지는 불분명하며, 이러한 작용이 홍삼 사포닌 성분의 고유의 작용인지 보다 구체적인 규명이 수행되어야 할 것이며, 동시에 생체실험과 생체 외 수용체-결합에 관한 연구를 통하여 보다 정확한 연구결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

항암요법이나 전신마취를 이용한 수술 후 흔히 발생하게 되는 구역, 구토 등의 부작용에 관계하는 것으로 알려진 사람의 유전자 재조합 세로토닌 제3형 수용체를 *Xenopus oocyte*에 *in vitro* transcription 시킨 후 two electrode voltage clamp 방법을 이용하여 조사포닌, PD 및 PT 사포닌이 미치는 영향을 관찰한 결과, 홍삼의 사포닌들은 농도에 비례하여 세로토닌 제3형 수용체를 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었으며, PD 사포닌보다는 PT 사포닌이 더욱 크게 억제하는 것을 관찰하였다. 이 결과는 홍삼 사포닌이 최근 구토 등의 치료제로 각광받고 있는 세로토닌 3형 수용체의 길항제에 대한 새로운 대체약물로서의 과학적 근거를 제시 할 것으로 생각되며, 이 수용체에 대하여 보다 선택적인 억제작용이 있는 ginsenosides를 규명하는 것이 요구됨과 동시에 이에 대한 기전의 연구가 차후에 필요할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 2000년도 고려인삼연구비지원에 의하여 수행되었으며, 실험에 사용되었던 사포닌 시료는 고려인삼학회에서 공급되었기에 감사드립니다.

인용문헌

1. 고려인삼효능 : 한국인삼연구소. 19-22 (1985).
2. Brekhaman II, Gosudarst Isdat et. Med. Lit. Leningrad 1-181 (1957).
3. 홍사악, 장현갑, 홍순근 : 최신의학 15, 87 (1985).

4. 오진섭, 홍사악, 박찬웅, 노기석 : 서울의대 잡지 **14**, 31 (1973).
5. 박찬웅 : 생화학 뉴스 **4**, 2477 (1984).
6. Tasaki, K., Saito, H. and Nabata, H. : *Jpn J. Pharmacol.* **22**, 245 (1972).
7. Otsuka, H., Morita, Y., Ogihara, Y. and Shibata, S. : *Planta Medica* **32**, 9 (1977).
8. Attele, A. S., Wu, J. A. and Yuan, C. S. : *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1685 (1999).
9. Katu, Y., Miyata, T., Urono, T., Sato, I. and Kinoshita, A. : *Arzneim-forsch (Drug res)* **25**, 4 (1975).
10. 石川 : 藥用人蔘 **89**, 37 (1989).
11. Tachikawa, E., Kudo, K., Kashimoto, T. and Tahashi, E. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **273**, 629 (1995).
12. Kudo, K., Tachikawa, E., Kashimoto, T. and Tahahashi, E. : *Eur. J. Pharmacol.* **341**, 139 (1998).
13. Tachikawa, E., Kudo, K., Harada, K., Kashimoto, T., Miyate, Y., Kakizaki, A. and Tahahashi, E. : *Eur. J. Pharmacol.* **369**, 23 (1999).
14. Miyake, A., Mochizuki, S., Takemoto, Y. and Akuzawa, S. : *Mol. Pharmacol.* **48**, 407 (1995).
15. Polati, E., Verlato, G., Finco, G., Mosaner, W., Grosso, S., Götting, L., Pinaroli, A. M. and Ischia, S. : *Anesth. Analg.* **85**, 395 (1997).
16. Fortney, J. T., Gan, T. J., Graczyk, S., Wetchler, B., Melson, T., Khalil, S., McKenzie, R., Pamillo, S., Glass, P. S., Moote, C., Wermeling, D., Parasuraman, T. V., Duncan, B. and Creed, M. R. : *Anesth. Analg.* **86**, 731 (1998).
17. Grunberg, S. M. : *Supportive Care in Cancer* **5**, 9 (1997).
18. Maricq, A. V., Peterson, A. S., Brake, A. J., Myers, R. M. and Julius, D. : *Science* **254**, 432 (1991).
19. 남기열, 고성룡, 최강주 : 고려인삼학회지 **22**, 274 (1998).
20. Tsang, D., Yeung, H. W., Tso, W. W. and Peck, H. : *Planta Medica* **3**, 221 (1985).
21. Yuan, C. S., Attele, A. S., Wu, J. A. and Liu, D. : *J. Ethnopharmacol.* **62**, 215 (1998).
22. Derkach, V., Surprenant, A. and North, R. A. : *Nature* **339**, 706 (1988).
23. Boess, F. G. and Martin, I. L. : *Neuropharmacology* **33**, 275 (1994).
24. Machu, T. K. and Harris, R. A. : *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 898 (1994).
25. Schroeder, F., Jefferson, J. R., Kier, A. B., Knittel, J., Scallen, T. J., Wood, W. G. and Hapala, I. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **196**, 235 (1991).
26. Fukuda, K., Utsumi, H., Shoji, J. and Hamada, A. : *Biochem. Biophys. Acta.* **820**, 199 (1985).
27. Leung, Y. M., Ou, Y. J., Kwanm, C. Y. and Loh, T. T. : *Biochem. Biophys. Acta.* **1325**, 318 (1997).
28. Yakel, J. L. and Jackson, M. B. : *Neuron* **1**, 615 (1988).
29. Gale, J. D. : *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **21**, S28 (1995).
30. Sung, Y. F. : *Drug Saf* **14**, 181 (1996).