

인삼이 생쥐에서 스트레스시에 혈중 Corticosterone 농도에 미치는 영향*

김도훈^{1)†} · 민성길²⁾ · 손봉기¹⁾ · 이상규¹⁾ · 송동근³⁾

Effects of Ginseng Saponin on the Stress-Induced Plasma Corticosterone Levels in Mice*

Do Hoon Kim, M.D.,^{1)†} Sung Kil Min, M.D.,²⁾ Bong Ki Son, M.D.,¹⁾
Sang Kyu Lee, M.D.,¹⁾ Dong Keun Song, M.D.³⁾

국문초록

연구목적

본 연구는 뇌실내 주사 스트레스와 부동 스트레스를 가했을 때 인삼 사포닌 및 그 구성성분이 혈중 corticosterone에 미치는 영향을 알아보고 이런 효과에 nitric oxide가 관련되어 있는지를 조사하고자 하였다.

방 법 :

스트레스를 가했을 때 인삼의 시상하부-뇌하수체-부신(hypothalamo-pituitary-adrenal, HPA) 축에 대한 영향을 조사하기 위해서 다양한 농도의 인삼 총 사포닌과 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg3(S), Rg3(R)을 뇌실내 주사 또는 복강내 주사 하였다. 뇌실내 주사 스트레스를 가했을 때는 스트레스를 준 후에 30분이 지나서 혈액을 채취하여 혈중 corticosterone의 농도를 측정하였다. 부동스트레스시에는 30분 동안 부동스트레스를 준 후 바로 혈액을 채취하였다. 스트레스를 가했을 때에 시상하부-뇌하수체-부신 축에 미치는 인삼의 효과에서 nitric oxide와의 관련 작용을 보기 위하여 L-NAME와 ginsenosides을 동시에 뇌실내 주사 또는 복강내 주사하고 스트레스 가한후 혈중 corticosterone의 농도를 측정하였다.

결 과 :

1) 인삼 총 사포닌, ginsenoside Rg3(S) 및 Rc는 뇌실내 주사시 혈중 corticosterone의 증가를 억제하였고 이러한 효과는 nitric oxide에 의해 상쇄 되었다.

접수일자 : 2002년 2월 7일

심사완료 : 2002년 4월 11일

*본 연구는 1999대한신경정신의학연구재단 지산 이세종 문화정신의학 연구기금의 일부 보조에 의해 수행되었음.

¹⁾한림대학교 의과대학 정신과학교실

Department of Psychiatry, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon

²⁾연세대학교 의과대학 정신과학교실

Department of Psychiatry, College of Medicine, Yonsei University, Seoul

³⁾한림대학교 의과대학 약리학교실

Department of Pharmacology, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon

[†]Corresponding author

2) 인삼 총 사포닌, ginsenoside Rc의 복강내 투여는 부동 스트레스에 의한 혈중 corticosterone의 증가를 억제하였다. 그러나 뇌실내 주사시와는 달리 부동 스트레스시 복강으로 투여된 ginsenoside Rg3(S)은 혈중 corticosterone의 증가를 억제하지 않았다. 복강으로 투여된 인삼 총 사포닌의 부동 스트레스시 혈중 corticosterone 증가억제 작용은 nitric oxide 생성억제제인 N^G -Nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)에 의하여 상쇄되지 않았는데 이는 nitric oxide가 관련되지 않음을 시사한다.

결론:

본 연구의 결과는 인삼 사포닌이 스트레스시에 시상하부-뇌하수체-부신 축을 억제하는 작용이 있고, 인삼 사포닌의 성분 및 스트레스의 종류, 투여 경로에 따라서 그 작용 기전이 다르다는 점을 제시한다.

중심 단어: 인삼사포닌 · Ginsenoside Rg(S) · Ginsenoside Rc · 뇌실내 주사스트레스 · 부동스트레스 · Nitric oxide · Corticosterone · 생쥐.

서론

인삼의 주된 활성물질은 인삼 사포닌(ginseng saponin) 구획으로 부터 추출된 ginsenosides라고 알려져 왔다. Ginsenosides의 화학 구조는 규명되었으며,¹⁻⁵⁾ 크로마토 그래피상의 영상 순서에 따라서 Ginsenoside Rx(x=a, b, c, d, e, 등등)으로 명명된다.

인삼이 신체적, 화학적, 생물학적 요인들의 유해한 영향에 대한 신체의 저항력을 높여주며 비정상적인 생리기능의 방향성과 관계없이 신체의 항상성을 회복시켜 주는 것을 도와주는 adaptogen이라는 물질로서 분류되면서 인삼의 효과에 대해 많은 관심이 있어왔다.⁶⁾ 흰쥐를 강압적으로 달리기와 수영을 시킨 후의 탈진된 상태에서 인삼을 투여하였을때 인삼이 탈진된 쥐의 회복을 촉진시켜 주며,^{7,8)} 추위, 더위, 전기자극 등과 같은 스트레스에 노출되었을때 신체 저항능력을 높여준다고 한다.⁹⁻¹¹⁾ 또한 고혈압, 당뇨병, 위궤양, 불안 신경증, 불면증 같은 스트레스와 관련된 질병에서 임상효과가 있음이 관찰되었다.¹²⁻¹⁴⁾

스트레스시에 생체는 항상성 유지를 위해서 중추 및 말초적 적응반응을 유발시킨다. 시상하부-뇌하수체-부신 축(hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA axis)은 스트레스시에 생체의 적응반응이 일어나는 스트레스와 밀접히 관련있는 가장 중요한 신체체계(body system) 중의 하나이다.¹⁵⁾ 기저상태(basal state)에서 인삼 사포닌이 혈중 corticosterone을 증가시킨다는 보고가 있으나¹⁶⁻¹⁸⁾ 시상하부-뇌하수체-부신 축에 대한

인삼 사포닌의 효과에 대한 기전은 아직 잘 이해되지 못하고 있으며 스트레스시에 인삼이 실제로 시상하부-뇌하수체-부신 축에 어떤 영향을 미치는지는 잘 알려져 있지 않다.

근래에 nitric oxide(NO)는 다양한 생리적 기능을 가지고 있는 중요한 조절인자로서 여겨지고 있다.¹⁹⁻²⁵⁾ 최근에 nitric oxide synthase(NOS)가 시상하부의 핵주위²⁶⁻²⁹⁾ 뿐만 아니라 median eminence와 뇌하수체 자체에도 존재^{26,30)} 하며 내인성 nitric oxide는 염증(inflammation), 감염(infection), 또는 IL-1(beta)와 같은 자극에 있는 동안에 시상하부-뇌하수체-부신 축의 활성화에 억제적 영향을 미치고 있다.^{31,32)} 는 보고는 nitric oxide가 대뇌에서 다양한 자극에 대한 시상하부-뇌하수체-부신 축의 반응을 조절할 수 있는 생리적 역할을 하고 있음을 제시한다.³³⁾ 흥미롭게도, 최근에 ginsenosides가 다양한 조직에서 nitric oxide를 분비한다는 보고가 많이 있다. Ginsenosides가 폐동맥(pulmonary artery)³⁴⁾ 와 corpus cavernosum³⁵⁾을 이완시키며 이러한 현상이 nitric oxide synthase(NOS) inhibitor인 N^G -Nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)에 의해 차단된다고 한다. 또한 ginsenosides가 혈관의 내피세포,³⁴⁾ non-adrenergic, non-cholinergic nerves,³⁶⁾ 그리고 신장³⁷⁾에서 nitric oxide의 생성을 증가시킨다고 한다. 이러한 연구결과는 인삼 사포닌이 스트레스 동안에 nitric oxide를 매개하여 시상하부-뇌하수체-부신 축을 조절하고 있을 가능성을 제시한다.

본 연구는 급성 스트레스 하에서 시상하부-뇌하수체-부신 축에 대한 인삼 사포닌의 효과를 관찰하기 위해서

뇌실내 주사 스트레스와 부동 스트레스를 가했을 때 인삼 사포닌이 혈중 corticosterone에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 아울러 급성 스트레스 시에 인삼 사포닌이 시상하부-뇌하수체-부신 축에 미치는 효과에 대해 nitric oxide가 관련되어 있는지를 알아보기 위해서 뇌실내 주사 스트레스와 부동 스트레스를 가했을 때 인삼 사포닌이 혈중 corticosterone에 미치는 영향이 nitric oxide synthase(NOS) inhibitor인 N^G -Nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)에 의해 차단되는지를 조사해보고자 하였다.

방 법

1. 사용 동물

25~30 그램되는 수컷 ICR 생쥐가 실험에 사용되었다. 동물들은 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지되는 방에서 1통당 5마리씩 사육되었으며 12시간 동안 교대로 빛과 어두움의 주기에 있도록 하였다. 음식과 물은 필요에 따라 섭취할 수 있도록 하였다.

2. 약 물

인삼 총 사포닌(Ginseng total saponin, GTS), ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg3(S form), Rg3(R form)은 고려인삼 연초연구소(대전, 한국)에서 공급하였다. Nitric oxide synthase(NOS) inhibitor인 N^G -Nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)과 corticotropin releasing factor(CRF)의 선택적 길항제(antagonist)인 alpha-helical corticotropin releasing factor(CRF)는 시그마 화학회사에서 구입하였다(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.). Ginsenoside Rg3(S, R form)는 2% dimethylsulfoxide(DMSO)에 용해하였으며, L-NAME, GTS, alpha-helical CRF 및 기타 ginsenosides(Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1)는 뇌실내 주사를 위해 증류수에 용해시켰다. 사전 실험에서 2% DMSO는 혈중 corticosterone에 영향을 주지 않음을 확인하였다.

3. 뇌실내 주사 스트레스(Intracerebroventricular injection stress)와 부동스트레스(Immobilization stress)

Ginsenoside가 급성스트레스시에 HPA 축의 활성화에 미치는 영향을 보기위해 뇌실내 주사 자극 스트레스³⁸⁾와

부동스트레스³⁹⁾를 생쥐에서 급성스트레스 모델로서 사용하였다.

뇌실내 주사 자극의 조작과 뇌실내 약물 투여는 동시에 수행되었다. 뇌실내 주사는 이전에 Lauren과 Belknap⁴⁰⁾에 의해 기술된 방법에 따라 주어졌다. 연구자는 생쥐의 몸통을 부드럽게 쥐고서 생쥐의 입을 작은 시험관에 고정시켰다. 그리고 나서 각각의 생쥐는 의식이 있는 상태에서 26 Gauge 주사바늘을 50ul Hamilton syringe(No. 705)에 고정시킨 후 생쥐의 bregma에 2.4 mm 깊이로 관통하였다. 뇌실내 주사량은 5ul이었으며 주사 위치는 같은 양의 1% methylene blue를 주사한 후 대뇌 절편을 만들어 현미경 상에서 확인하였으며 아울러 뇌실내에 주사된 약물이나 시약이 분포하는 것을 관찰하였다. 뇌실내 주사된 조영제가 뇌실내와 대뇌의 뇌실 표면에 분포하는 것이 관찰되었고 대뇌의 밖에는 존재하지 않음을 확인하였다.

부동 스트레스를 가하기 위해 지름 5cm 되는 Coning tube에 생쥐를 넣은 후 움직이지 못하도록 고정시켰었다. Coning tube의 끝은 생쥐가 숨을 쉴 수 있도록 작은 구멍을 내었다. 부동 스트레스를 30분간 가한 후 혈액을 채취하였다.

4. 혈중 corticosterone의 측정 및 혈액 채취

혈중 corticosterone은 형광결정 방법(fluorometric determination method)으로 측정하였다.⁴¹⁾ 혈액은 후안와 정맥총(retro-orbital venous plexus)을 puncture하여 약 400 μl 의 혈액을 얻었다.

5. 실험 프로토콜

모든 실험동물은 움직임 때 일어날 수 있는 스트레스를 방지하기 위해 실험 전날 스트레스 실험을 위한 조용한 방으로 미리 옮겼다. 스트레스 실험은 생쥐에서 corticosterone의 일주기 변화 때문에 오전 8~11시 사이에 일정하게 수행하였다. 안와 정맥총(retro-orbital venous plexus)으로부터 혈액을 채취한 뒤 생쥐는 희생되었으며, 이때 다른 생쥐들은 시각 및 청각 자극으로 보호하기 위해 격리하였다.

뇌실내 주사 스트레스를 가했을 때 인삼의 시상하부-뇌하수체-부신(hypothalamo-pituitary-adrenal, HPA) 축에 대한 영향을 조사하기 위해서 다양한 농도의 인삼 총 사포닌(ginseng total saponin, GTS) (0.01~1 μg)과 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg3(S

form), Rg3(R form) (0.01~1 μ g)을 뇌실내 주사(i.c.v. injection)하여 뇌실내 주사 스트레스를 가한 후 30분이 지나서 혈액을 채취하여 혈중 corticosterone의 농도를 측정하였다. 뇌실내 주사 스트레스를 가했을 때 시상하부-뇌하수체-부신 축(HPA axis)에 미치는 인삼의 효과에서 nitric oxide와의 관련 작용을 보기 위하여 L-NAME(1.5 μ g)와 인삼 총 사포닌(GTS, 1 μ g) 또는 L-NAME(1.5 μ g)과 ginsenosides(Rc 1 μ g 또는 Rg3(S) 0.3 μ g)을 동시에 뇌실내 주사 한 후에 혈중 corticosterone의 농도를 측정하였다. L-NAME(1.5 μ g)는 예비 실험을 통해서 혈장 corticosterone을 변화시키지 않음을 확인되었다.

부동 스트레스를 가했을 때 인삼의 시상하부-뇌하수체-부신 축에 대한 영향을 조사하기 위해서 다양한 농도의 인삼 총 사포닌(1~20mg/kg)과 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg3(S form), Rg3(R form) (0.1~2mg/kg)을 복강내에 투여한 후에 부동 스트레스를 30분 가한 후 혈액을 채취하여 혈중 corticosterone의 농도를 측정하였다. 부동 스트레스시에 시상하부-뇌하수체-부신 축(HPA axis)에 미치는 인삼의 효과에서 nitric oxide의 관련 작용을 보기 위하여 L-NAME(10 mg/kg)와 인삼 총 사포닌(GTS, 20mg/kg)을 복강내로 함께 투여한 후에 혈중 corticosterone의 농도를 측정하였다. L-NAME(10mg/kg)는 예비실험을 통해서 혈중 corticosterone을 변화시키지 않음을 확인되었다.

6. 통계 분석

통계분석은 ANOVA with post hoc bonferroni 검정을 하였고 통계적 유의성은 p value가 0.05 미만일 때 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 뇌실내 주사 스트레스시에 인삼 사포닌이 혈중 corticosterone에 미치는 영향 및 이에 대한 nitric oxide의 관련성

인삼 총 사포닌(ginseng total saponin)은 농도 의존적으로 뇌실내 주사 스트레스에 의한 혈중 corticosterone의 증가를 억제하였다(Fig. 1A). 혈중 corticosterone 억제에 가장 효과가 있는 농도는 인삼 총 사포닌의 농도는 1 μ g이었다($p < 0.01$).

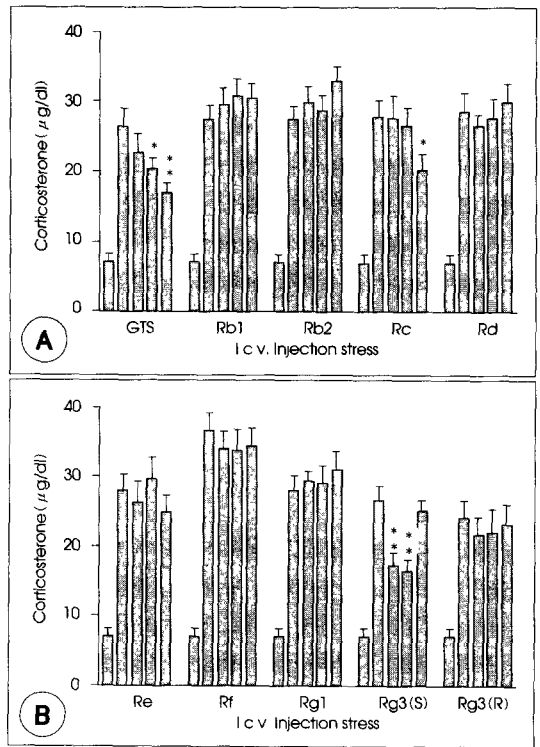


Fig. 1. (A, B) Effect of various doses of ginseng total saponin (GTS) and ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg3(S form), Rg3(R form) on the i.c.v. injection stress induced plasma corticosterone levels at 30 min after the injection. In Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf and Rg1, the columns were normal (basal state), control (i.c.v. saline), 0.01 μ g, 0.1 μ g, 1 μ g, respectively and the columns in Rg3(S form), Rg3(R form) were normal (basal state), control (i.c.v. saline), 0.1 μ g, 0.3 μ g, 1 μ g, respectively. Data were mean \pm S.E.M values ($n=8$ or 16). * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, significantly different from saline treated control animals.

인삼 총 사포닌(ginseng total saponin) 성분중에서 어떤 ginsenoside가 뇌실내 주사 스트레스시에 혈중 corticosterone 증가억제 작용을 일으키는 지를 알아보기 위해 각 ginsenoside(Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, Rg3(S form), Rg3(R form))를 다양한 농도(0.01~1 μ g)로 뇌실내 주사로 투여하였다. Ginsenoside Rc가 1 μ g에서 효과적으로 혈중 corticosterone의 증가를 억제하였고(Fig. 1A) Rg3(S form)는 Rc 보다도 낮은 농도(0.01~0.3 μ g)에서 더욱 강력하게 혈중 corticosterone의 증가를 억제하였다(Fig. 1B). 그러나 ginsenoside Rb1, Rb2, Rd, Re, Rf, Rg1 그리고 Rg3(R form)은 뇌실내 주사 스트레스시에 혈중 corticosterone에 대

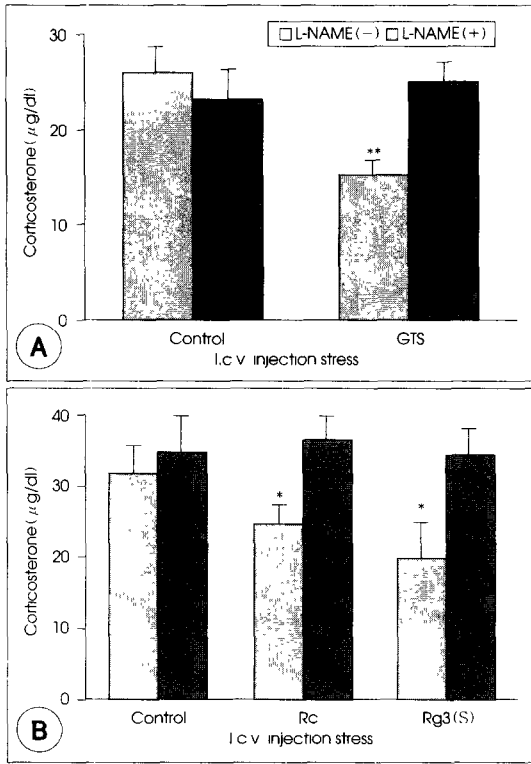


Fig. 2. Effects of L-NAME (N^G -Nitro-L-arginine methylester HCl) on the ginseng total saponin (GTS)-(A), Rc- and Rg3(S)-(B) induced decrease in intracerebroventricular (i.c.v) injection stress-induced plasma corticosterone levels. L-NAME ($1.5 \mu\text{g}$) was co-injected with either saline or GTS ($1 \mu\text{g}$), Rc ($1 \mu\text{g}$), Rg3(S) ($0.3 \mu\text{g}$). Blood samples were obtained 30 min after the injection. The data were means \pm S.E.M. ($n=10$). * $p < 0.05$, * * $p < 0.01$, significantly different from saline treated control animals.

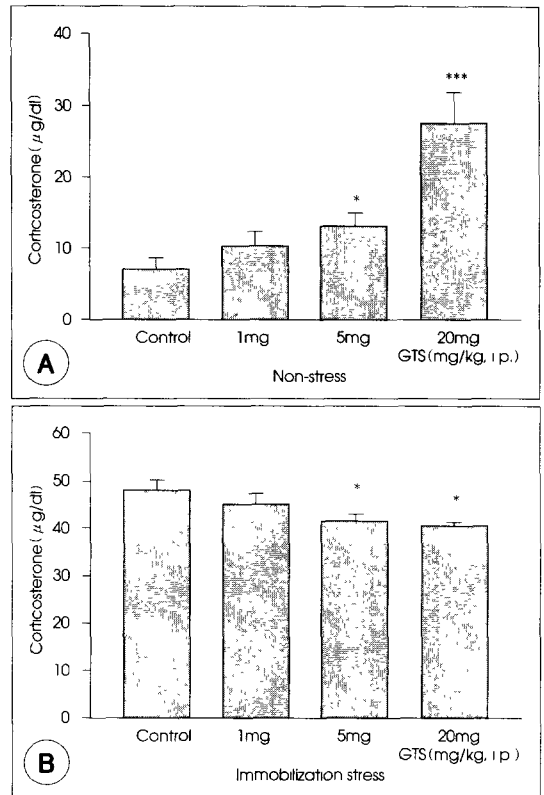


Fig. 3. Effects of various doses of ginseng total saponin (GTS) on the plasma corticosterone levels at 30 min after intraperitoneal injection in non-stressed (A) and immobilization-stressed (B) mice. The mice were immobilized for 30 min and blood samples were obtained immediately after completion of the procedure. Data were mean \pm S.E.M. ($n=8$). * $p < 0.05$, * * $p < 0.001$ significantly different from saline-treated control animals.

한 의미있는 변화를 주지 못했다.

2. 뇌실내 주사 스트레스시 인삼 총 사포닌, ginsenoside Rc, ginsenoside Rg3(S)의 혈중corticosterone 증가억제 효과에 대한 nitric oxide의 관련성

L-NAME ($1.5 \mu\text{g}$)는 뇌실내 주사 스트레스시 인삼 총 사포닌(ginseng total saponin), ginsenoside Rc 및 Rg3(S)의 혈중 corticosterone 증가억제 작용을 상쇄하였다. 그러나 L-NAME ($1.5 \mu\text{g}$) 자체는 뇌실내 주사 스트레스시 혈중 corticosterone에 대한 영향이 없었다(Fig. 2).

3. 인삼 총 사포닌이 기저상태(Basal state)에서 혈중 corticosterone에 미치는 영향

인삼 총 사포닌(ginseng total saponin)이 기저상태

(basal state)에서 혈중 corticosterone 농도에 미치는 영향을 보기위해 다양한 농도($1 \sim 20\text{mg/kg}$)의 인삼 총 사포닌(ginseng total saponin)을 복강내로 투여하고 30분 후에 혈중 corticosterone을 측정 한 결과, 인삼 총 사포닌(ginseng total saponin)은 농도 의존적으로 혈중 corticosterone의 농도를 증가시켰다(Fig. 3A).

4. 인삼 사포닌이 부동 스트레스시 혈중 corticosterone에 미치는 영향

인삼 총 사포닌(ginseng total saponin)이 부동 스트레스시 혈중 corticosterone에 미치는 영향을 보기 위해서 인삼 총 사포닌(ginseng total saponin)을 다양한 농도($1 \sim 20\text{mg/kg}$)로 복강내로 투여하고 부동스트레스를 30분 동안 가한 후에 혈중 corticosterone의 농도를

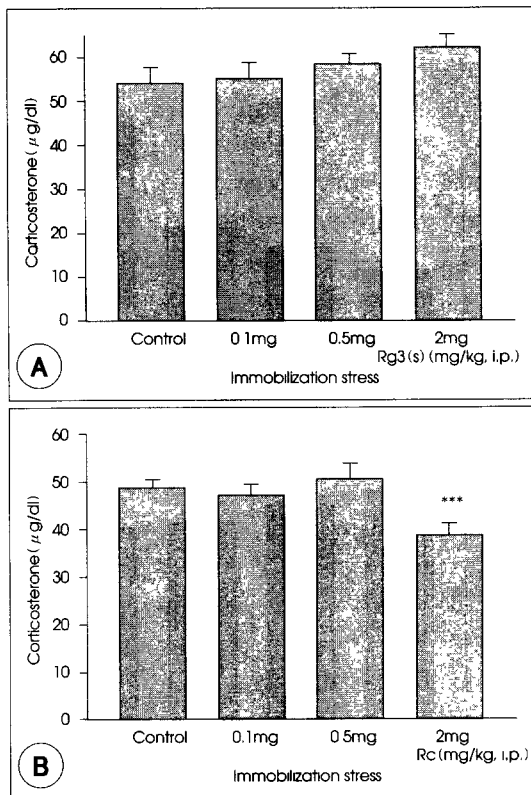


Fig. 4. Effect of various doses of ginsenoside Rg3(S) (A) and Rc(B) on the plasma corticosterone levels at 30 min after intraperitoneal injection in immobilization-stressed mice. The mice were immobilized for 30 min and blood samples were obtained immediately after completion of the procedure. Data were mean \pm S.E.M. (n=8), *** : p<0.001, significantly different from saline-treated control animals.

측정한 결과 인삼 총 사포닌(ginseng total saponin)은 농도 의존적으로 혈중 corticosterone의 농도를 감소시켰다(Fig. 3B).

인삼 총 사포닌(ginseng total saponin) 성분중에서 어떤 ginsenoside가 부동 스트레스시에 혈중 corticosterone 증가억제 작용을 일으키는 지를 알아보기 위해 각 ginsenoside(Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, Rg3(S form), Rg3(R form))를 다양한 농도(1~2mg/kg)로 복강내로 투여하고 부동스트레스를 30분 가한 후에 혈중 corticosterone 농도를 측정하였다. Ginsenoside Rc가 부동 스트레스에 의한 혈중 corticosterone의 증가를 억제시켰으나(Fig. 4B), Rg3(S form)는 뇌실내로 직접 약물을 투여한 뇌실내 주사 자극 스트레스 실험에서와는 달

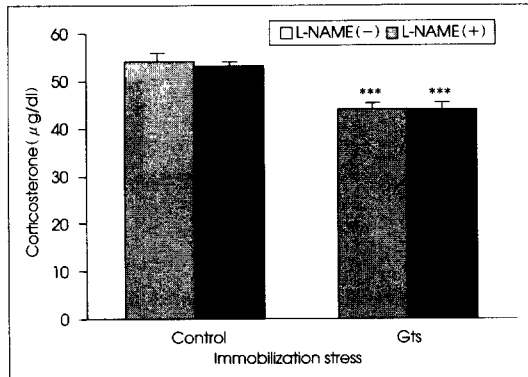


Fig. 5. Effects of L-NAME (N^G-Nitro-L-arginine methyl ester HCl) on the ginseng total saponin(GTS)-induced decrease in immobilization stress-induced plasma corticosterone levels. L-NAME(10mg/kg) was co-injected intraperitoneally with either saline or GTS (20mg/kg). The mice were immobilized for 30 min and blood samples were obtained immediately after completion of the procedure. Data were mean \pm S.E.M.(n=8). *** : p<0.001, significantly different from saline treated control animals.

리 혈중 corticosterone의 증가억제 작용이 없었다(Fig. 4A). 다른ginsenosides(Rb1, Rb2, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg3(R form))는 부동 스트레스시 혈중 corticosterone에 증가억제 작용이 없었다.

5. 부동 스트레스시에 인삼 총 사포닌의 혈중 corticosterone 증가억제 효과에 대한 nitric oxide의 관 련성

인삼 총 사포닌(ginseng total saponin)이 부동 스트레스시 혈중 corticosterone의 증가억제 작용에 nitric oxide가 관여하는 지를 조사하기 위해 nitric oxide synthase (NOS) 억제제인 L-NAME(10mg/kg)과 인삼 총 사포닌(ginseng total saponin) (20 mg/kg)을 복강내에 투여하고 부동 스트레스를 30분간 가한 후에 혈중 corticosterone을 측정한 결과, L-NAME는 부동 스트레스를 가했을 때 인삼 총 사포닌(ginseng total saponin)의 혈중 corticosterone의 증가 억제 작용을 상쇄하지 못하였다. 또한 이때 L-NAME(10mg/kg) 자체는 부동 스트레스시 혈중 corticosterone에 미치는 영향이 없었다(Fig. 5).

고 찰

본 연구에서 인삼 총 사포닌(ginseng total saponin,

GTS), ginsenoside Rg3(S) 및 Rc가 뇌실내 주사 스트레스시 시상하부-뇌하수체-부신 축(HPA axis)을 억제하였고, 이러한 효과는 nitric oxide에 의해 매개되었다. 이 결과는 인삼 총 사포닌, Rg3(S) 및 Rc가 뇌실내 주사 스트레스시 nitric oxide를 생성하고 nitric oxide는 시상하부-뇌하수체-부신 축을 억제한다는 것을 의미한다. 그러나 시상하부-뇌하수체-부신 축에 대한 nitric oxide의 매개기전은 확실치 않다. 최근에 Rivier와 Shen³¹⁾는 IL-1(beta)에 의한 혈장 부신피질 자극 호르몬(ACTH)의 증가가 생체 쥐 실험에서 선택적인 nitric oxide synthase(NOS) 억제제를 말초주사로 투여할 때 더욱 증가하는 것을 보고하면서 이는 adrenocorticotrophic hormone(ACTH) 호르몬에 대한 내인성 nitric oxide의 억제적 효과가 자극 동안에 뇌하수체 전엽의 활성을 감소시켰기 때문이라고 설명하였다. 이들은 또한 nitric oxide 생성 억제제인 L-NAME가 ACTH 호르몬에 대한 vasopressin과 oxytocin의 효과를 강화시켰지만 corticotrophic releasing hormone(CRH)의 ACTH호르몬 분비 자극 효과에 대한 증강작용(potential effect)은 없었다고 보고하였다. 이러한 결과는 nitric oxide가 vasopressin과 oxytocin을 억제함으로써 시상하부-뇌하수체-부신 축의 활성을 감소시킬 수 의미한다. 이러한 가설은 nitric oxide의 생성 억제제가 전해질 부하상태(salt-loading state)에서 vasopressin과 oxytocin의 분비를 촉진시키며⁴²⁾ 그리고 쥐의 시상하부 조직을 적출하여 실시한 생체의 실험에서 nitric oxide 제공체가 vasopressin의 분비자극을 억제한다는 일련의 실험 결과⁴³⁾에 의해 지지된다. 이러한 일련의 실험결과를 종합해 볼때, 인삼 총 사포닌, ginsenoside Rg3(S) 및 Rc가 뇌실내 주사 스트레스시 nitric oxide를 생성하고 nitric oxide는 vasopressin 또는 oxytocin을 억제하여 혈중 corticosterone의 농도를 감소시키는 것으로 추측된다. 그러나 부동 스트레스 시에 복강내로 투여된 인삼 총 사포닌의 시상하부-뇌하수체-부신 축의 억제효과는 nitric oxide의 생성 억제제인 L-NAME에 의해 상쇄되지 않은 것으로 보아 스트레스의 종류, 투여 경로 등에 따라 인삼 사포닌(ginseng saponin)의 작용기전이 다른 것으로 사료된다. 다양한 스트레스시에 인삼의 정확한 작용부위, 인삼이 관여하는 신경회로, 시냅스내의 기전을 규명하기 위한 지속적 추가 실험이 필요할 것으로 사료된다.

Ginsenoside Rg3(S)은 ginsenoside Rc보다 더 낮은 농도에서 강력하게 뇌실내 주사 스트레스에 의한 시상하부-뇌하수체-부신 축의 반응을 억제하였다. 이러한 결과는 ginsenoside Rg3(S)이 인삼 총 사포닌의 스트레스시 혈중 corticosterone의 증가억제 효과를 일으키는 데 기여한 중요한 ginsenoside중의 하나임을 제시한다. Ginsenoside Rg3(S)은 다른 ginsenoside보다 내피 의존적 혈관확장(endothelium dependent vasodilatation) 작용이 더욱 강력하다고 한다. Ginsenoside Rg3(S)은 자연산 인삼 뿌리에는 없고 마른 인삼 뿌리인 백삼(white ginseng)을 삶아 홍삼(red ginseng)을 만드는 과정에서 형성된다. 전통적으로 홍삼은 백삼보다 더 다양한 약리학적 효과를 가지고 있다고 알려져 있다. 따라서 ginsenoside Rg3(S)의 뇌실내 주사 스트레스시 강력한 혈중 corticosterone의 증가억제 작용은 적어도 부분적으로 일련의 약리적 작용에서 백삼보다 홍삼이 더 우월하다는 연구결과 중의 하나인 것으로 사료된다. 그러나 복강내 투여된 ginsenoside Rg3(S)은 부동 스트레스시에는 효과가 없었기 때문에 ginsenoside Rc와 그밖에 다른 ginsenoside 및 아직 밝혀지지 않은 ginsenosides가 스트레스시 혈중 corticosterone에 대한 증가억제 작용에 있어서 상협작용(synergistic effect)을 통해서 주된 역할을 하고 있을 가능성도 배제할 수 없을 것으로 사료된다.

본 연구에서 인삼 사포닌이 스트레스를 가하지 않은 기저상태(basal state)에서 혈중 corticosterone의 농도를 용량 의존적으로 증가시켰는데, 이는 지금까지 몇몇 연구자들의¹⁶⁻¹⁸⁾ 연구결과와 일치된다. 그러나 매우 흥미롭게도 인삼 총 사포닌(GTS)은 뇌실내 주사 스트레스 또는 부동 스트레스에 오히려 혈중 corticosterone의 증가를 억제시켰다는 사실이다. 이는 인삼이 footshock, cold, heat 스트레스와 같은 자극에 의해 유발된 현상을 억제하는 효과가 있다는 연구결과⁹⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾와 유사한 현상으로 생각된다.

Glucocorticoid 분비는 개체를 환경 또는 생리적 변화와 스트레스에 대하여 신체의 적응력을 유지하는 작용을 한다. 그러나 장시간 과도하게 분비된 혈중 corticosterone은 면역기능(immune function)이나 해마 신경(hippocampal neuron)을 손상시킨다고 한다.⁴⁶⁾ 따라서 인삼 사포닌의 스트레스에 의한 혈중 corticosterone의 증가억제 효과는 혈중 corticosterone의 과도한 분비

를 억제함으로써 신체기관에 대한 유해한 효과를 예방 하는데 기여할 가능성이 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Nagai Y, Tanaka O, Shibata S(1971) : Chemical studies on the oriental plant drugs-XXIV. Structure of ginsenoside-Rg1, a neutral saponin of ginseng root. *Terahedron* 27 : 881-892
- 2) Nagai Y, Anda T, Tanaka O, Shibata S(1972) : Chemical studies on the oriental plant drugs-XXVIII. Saponins and sapogenins of ginseng : Stereochemistry of the sapogenin of ginsenosides-Rb1, -Rb2 and -Rc. *Chem Pharm bull* 20 : 1212
- 3) Sanada S, Kondo N, Shoji J, Tanaka O, Shibata S (1974a) : Studies on the Saponins of Ginseng. II. Structures of Ginsenoside-Re, -Rf and -Rg2. *Chem Pharm Bull* 22 : 2407-2412
- 4) Sanada S, Kondo N, Shoji J, Tanaka O, Shibata S (1974b) : Studies on the saponins of Ginseng. I. Structures of Ginsenoside-Ro, -Rb1, -Rc, and -Rd. *Chem Pharm Bull* 22 : 421-428
- 5) Sanada S, Shoji J(1978) : Studies on the saponins of Ginseng. III. Structures of Ginsenoside-Rb3 and 20-Gluco-ginsenoside-Rf. *Chem Pharm Bull* 26 : 1694-1697
- 6) Brekhan I, Dardymov I(1969) : New substances of plant origin which increase non specific resistance. *Ann Rev Pharmacol* 9 : 419-430
- 7) Saito H, Yoshida Y, Takagi K(1974) : Effect of Panax ginseng root on exhaustive exercise in mice. *J. Pharmacol* 24 : 119-127
- 8) Avakian E, Evonuk E(1979) : Effect of Panax ginseng extract on tissue glycogen and adrenal cholesterol depletion during prolonged exercise. *Planta Med* 36 : 43-48
- 9) Kim C, Kim C, Kim M, Hu C, Rhe J(1970) : Influence of ginseng on the stress mechanism. *Lloydia* 33 : 43-48
- 10) 민성길(1975) : 인삼이 경련역가에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 연세의대 논문집 8 : 93-110
- 11) 김정진(1979) : 인삼주정추출액이 스트레스에 폭로된 동물의 생체반응에 미치는 영향. 한국 고려인삼학회지 3 : 168-186
- 12) Bhattacharya S, Tandon R, Mitra S, Bajpai H(1990) : Panax ginseng. A pharmacological and clinical appraisal. *J Intern Med* 2 : 17-21
- 13) Rhee Y, Lee S, Honda K, Inoue S(1990) : Panax ginseng extract modulates sleep in unrestrained rats. *Psychopharmacology* 101 : 486-488
- 14) Bhattacharya S, Mitra S(1991) : Anxiolytic activity of Panax ginseng roots : An experimental study. *J Ethnopharmacol* 34 : 87-92
- 15) Toates F(1994) : Stress-conceptual and biological aspects-. Chichester, John Wiley & Sons, pp33-60
- 16) Hiai S, Yokoyama H, Oura H(1979a) : Features of ginseng saponin-induced corticosterone secretion. *Endocrinol Jpn* 26 : 737-740
- 17) Hiai S, Yokoyama H, Oura H, Yano S(1979b) : Stimulation of pituitary-adrenocortical system by ginseng saponin. *Endocrinol Jpn* 26 : 661-665
- 18) Odani T, Ushio Y, Arichi S(1986) : The effect of ginsenosides on adrenocorticotropin secretion in primary culture of rat pituitary cells. *Planta Med* 3 : 177-179
- 19) Moncada S, Palmer R, Higgs E(1991) : Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43 : 109-142
- 20) Snyder S, Brecht D(1991) : Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci* 12 : 125-128
- 21) Nathan C(1992) : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6 : 3051-3064
- 22) Moncada S, Higgs A(1993) : The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329 : 2002-2012
- 23) Grossman A(1994) : NO news is good news [editorial]. *Endocrinology* 134 : 1003-1005
- 24) Knowles R, Moncada S : Nitric oxide synthases in mammals(1986) : *Biochem J* 298 (Pt 2) : 249-58, 1994
- 25) Iadecola C(1997) : Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 20 : 132-139
- 26) Sagar S, Ferricero D(1987) : NADPH diaphorase activity in the posterior pituitary : relation to neuronal function. *Brain Res* 400 : 348-352
- 27) Arevalo R, Sanchez F, Alonso JR, Carretero J, Vazquez R, Aijon J(1992) : NADPH-diaphorase activity in the hypothalamic magnocellular neurosecretory nuclei of the rat. *Brain Res Bull* 28 : 599-603
- 28) Schmidt H, Gagne G, Nakane M, Pollock J, Miller M, Murad F(1992) : Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem* 40 : 1439-1456
- 29) Vincent S, Kimura H(1992) : Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46 : 755-784

- 30) Brecht D, Hwang P, Snyder S(1990) : Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347 : 768-770
- 31) Rivier C, Shen G(1994) : In the rat, endogenous nitric oxide modulates the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-1 beta, vasopressin, and oxytocin. *J Neurosci* 14 : 1985-1993
- 32) Turnbull A, Rivier C(1996) : Corticotropin-releasing factor, vasopressin, and prostaglandins mediate, and nitric oxide restrains, the hypothalamic-pituitary-adrenal response to acute local inflammation in the rat. *Endocrinology* 137 : 455-463
- 33) Rivier C(1995) : Blockade of nitric oxide formation augments adrenocorticotropin released by blood-borne interleukin-1 beta : role of vasopressin, prostaglandins, and alpha 1-adrenergic receptors. *Endocrinology* 136 : 3597-3603
- 34) Kim H, Chen X, Gillis C(1992) : Ginsenosides protect pulmonary vascular endothelium against free radical-induced injury. *Biochem Biophys Res Commun* 189 : 670-676
- 35) Chen X, Lee T(1995) : Ginsenosides-induced nitric oxide-mediated relaxation of the rabbit corpus cavernosum. *Br J Pharmacol* 115 : 15-18
- 36) Peng C, Li Y, Li Y, Deng H(1995) : Effects of ginsenosides on vasodilator nerve actions in the rat perfused mesentery are mediated by nitric oxide. *J Pharm Pharmacol* 47 : 614-7
- 37) Han S, Kim H(1996) : Ginsenosides stimulate endogenous production of nitric oxide in rat kidney. *Int J Biochem Cell Biol* 28 : 573-580
- 38) Kim DH, Jung JS, Song DK, Suh HW, Huh SO, Kim YH(1998) : Intracerebroventricular injection-induced increase in plasma corticosterone levels in the mouse : A stress model. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 39 : 71-73
- 39) Song DK, Suh HW, Jung JS, Wic MB, Song JH, Kim YH(1996) : Involvement of NMDA receptor in the regulation of plasma interleukin-6 levels in mice. *Eur J Pharmacol*. 316 : 165-169
- 40) Laursen S, Belknap J(1986) : Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods* 16 : 355-357
- 41) Glick D, Redlich D, Levine S(1964) : Fluorometric determination of corticosterone and cortisol in 0.02-0.05 milliliters of plasma or submilligram samples of adrenal tissue. *Endocrinology* 74 : 653-655
- 42) Kadowaki K, Kishimoto J, Leng G, Emson P(1994) : Up-regulation of nitric oxide synthase (NOS) gene expression together with NOS activity in the rat hypothalamo-hypophysial system after chronic salt loading : evidence of a neuromodulatory role of nitric oxide in arginine vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology* 134 : 1011-1017
- 43) Yasin S, Costa A, Trainer P, Windle R, Forsling M, Grossman A(1993) : Nitric oxide modulates the release of vasopressin from rat hypothalamic explants. *Endocrinology* 133 : 1466-1469
- 44) Cheng X, Liu Y, Lin G, Luo X(1987) : Effects of ginseng root saponins on central transmitters and plasma corticosterone in cold stress mice and rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 8 : 486-489
- 45) Takahashi M, Tokuyama S, Kaneto H(1992) : Anti-stress effect of ginseng on the inhibition of the development of morphine tolerance in stressed mice. *Jpn J Pharmacol* 59 : 399-404
- 46) Sapolsky R, Krey L, McEwen B(1985) : Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number : implications for aging. *J Neurosci* 5 : 1222-1227.

Effects of Ginseng Saponin on the Stress-Induced Plasma Corticosterone Levels in Mice

Do Hoon Kim, M.D., Sung Kil Min, M.D., Bong Ki Son, M.D.,
Sang Kyu Lee, M.D., Dong Keun Song, M.D.

Department of Psychiatry, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon

Objectives : The present study was designed to investigate the effect of ginseng saponin and its major active metabolite on the HPA axis under acute stress-i.c.v. injection stress, and immobilization stress, and to examine whether nitric oxide is involved in the mechanism of ginseng saponin on the HPA axis under acute stress.

Methods : In the experiment to study the effect of ginseng on HPA axis during stress, various dose of GTS were injected intracerebroventricularly (i.c.v.) or intraperitoneally (i.p.). Plasma corticosterone levels were measured 30 min after the i.c.v. injection stress. Immobilization stress was applied for 30 min and then blood was collected for the assays of plasma corticosterone levels immediately after the completion of immobilization stress. To determine the active ginsenosides that can affect the stress-induced plasma corticosterone levels, various dose of each ginsenosides (Rb1, Rb2, Rc, Re, Rf, Rg1, 20(S)-Rg3, and 20(R)-Rg3) were injected i.c.v. or i.p.. In the experiment to determine the involvement of the nitric oxide in the inhibitory effect of ginseng on the HPA, NG-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and ginsenosides were coadministered i.c.v. or i.p., and plasma corticosterone levels were measured 30 min after stress was applied.

Results : First, the present study showed that ginseng total saponin, ginsenoside Rg3 (S form), and ginsenoside Rc administered i.c.v. attenuated the intracerebroventricular injection stress-induced increase in plasma corticosterone levels, and these effects were removed by nitric oxide co-injection. Second, ginseng total saponin and ginsenoside Rc administered i.p. attenuated the immobilization stress-induced increase in plasma corticosterone levels, but ginsenoside Rg3 (S form) did not attenuate the immobilization stress-induced increase in plasma corticosterone levels. The attenuative effects of ginseng total saponin and ginsenoside Rc in the immobilization stress-induced increase in plasma corticosterone levels were not affected by L-NAME co-injection.

Conclusion : This study suggests that ginseng saponin attenuated stress-induced increase in plasma corticosterone levels and these effects were mediated by different mechanisms according to the components of ginseng saponin, and routes of administration.

KEY WORDS : Ginseng saponin · Ginsenoside Rg (S) · Ginsenoside Rc · Intracerebroventricular injection stress · Immobilization stress · Nitric oxide · Corticosterone · Mice.