



저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

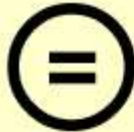
이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

李 名 淑 教授指導
碩士學位 請求論文

Apo E KO 동맥경화 동물 모델을 이용한
인삼의 항동맥경화 및 인슐린 저항성 효과 연구

2008

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

張 秀 貞

Apo E KO 동맥경화 동물 모델을 이용한
인삼의 항동맥경화 및 인슐린 저항성 효과 연구

李名淑 教授指導

이 論文을 碩士學位 論文으로 提出함

2007年 11月

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

張 秀 貞

認 准 書

張 秀 貞 의 碩士學位 論文을 認准함

審査委員 _____ 印

審査委員 _____ 印

審査委員 _____ 印

誠信女子大學校 大學院

감사의 글

짧고 긴 2년 동안의 석사과정을 마치며 새롭고 더 큰 세상으로 나가는 길에 앞서서 지금까지 저의 곁에서 항상 힘이 되주며 큰 보살핌을 받았던 분들에게 감사의 글을 올립니다.

제 석사논문이 완성되기까지 올바른 학문의 길로 나아가기 위해서 항상 아낌없는 독려와 가르침을 주신 이명숙 지도교수님께 먼저 감사의 마음을 드립니다. 아울러 부족함이 많은 논문을 세심하고 자상하게 심사해주신 안명수 교수님과 박현 교수님께도 감사의 마음을 드립니다. 지난 학부와 석사과정 동안 많은 가르침과 함께 커다란 애정을 보여주신 김혜영 교수님, 조은자 교수님, 한영숙 교수님 그리고 이승민 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 논문이 완성되기까지 많은 도움과 격려를 통해서 제게 힘을 주었던 영양생화학 실험실의 선배님과 후배에게도 감사드립니다. 마지막으로 항상 제 의견을 존중해주시며 믿어주시는 부모님에게 진심으로 감사드리며, 남동생 용욱이에게도 고맙다는 말을 전합니다.

가슴속에 희망을 품고, 높이 오르고 멀리 올라 높은 현실의 벽과 마주치더라도 절망하지 않으며 언제나 지금 이 순간의 열정을 기억하며 더 넓은 세상으로 나아가 제 목표에 한걸음씩 다가가도록 노력하겠습니다.

논문개요

인삼은 아시아에서 수천 년 동안 여러 질병을 치료하는데 전통적으로 사용되어왔으며, 인삼에 존재하는 활성성분 중에서 가장 큰 생리활성을 지닌 ginsenoside는 항염증, 항산화, 항암효과와 함께 혈관내피세포에서 NO(nitric acid) 생산을 자극시켜 항동맥경화 효과와 같은 여러 가지 유익한 영향을 다양하게 나타내는 것으로 알려져 있다. 하지만 지금까지 인삼의 생리활성 성분에 대한 연구들은 단일성분 중심으로 이루어져 왔으며, ginsenoside 성분의 혼합효과 및 비율조절에 따른 시너지 효과 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이다. 따라서 인체 생리 전반에 관한 연구의 필요성에 따라 인삼의 특징인 효능의 다양성을 검증하기 위해 인슐린 저항성으로 인한 대사증후군 및 동맥경화증에 대한 약리작용 및 그 기전에 대해서 확인해보고자 한다.

본 연구는 PD:PT 비율 조절에 따른 인삼 투여가 인슐린 저항성 및 동맥경화증에 미치는 영향을 알아보고자, 동맥경화 동물 모델인 apo E KO 마우스를 사용하여 E(+ / +)군을 음성 대조군으로 E(- / -)군을 양성 대조군으로 하였고, 인삼 투여군은 PD:PT=1군(동체 5:세근1)과 PD:PT=2군(지근1:세근5)으로 나누었다. 총 12주간의 실험기간 동안 모든 실험군에게 고콜레스테롤 식이(1.25% 콜레스테롤, 7.5% 코코아 버터)를 주어 동맥경화병변 및 인슐린 저항성 증가를 유도시켰다. 마지막 4주 동안의 실험기간에는 음성 대조군과 양성 대조군에게는 매일 생리식염수를 복강 내(intraperitoneal, i.p.)로 투여하였으며, 인삼 투여군은 인삼추출물을 체중 kg 당 100mg 농도로 매일 복강 내(i.p.)로 투여하였다. 매 주마다 식이섭취량, 체중증가량을 측정하여 평균을 구하고 식이효율을 계산하였다. 12주간의 사육 기간 후 희생시켜 얻은 혈장과 심장, 간, 부고환 지방조직에서 간 효소수치, 지질수치, 지질과산화물, 아디포넥틴 함량을 분석하였고, 심장조직의 괴사정도를 TUNEL 방법을 사용하여 확

인하였다. 각 조직에서 western blot 방법을 이용하여 인슐린 신호전달체계, 염증 기전(COX-1,2 /I κ B- α /p-I κ B- α /NF- κ B) 및 자가 사멸(bcl-2 /caspase-3,8,9 /c-PARP) 작용기전에 대해서 관찰하였다.

본 논문의 실험결과는 다음과 같았다.

1. 체중변화에는 모든 실험군에서 유의한 차이를 나타내지 않았지만, PD:PT=1군이 가장 큰 체중감소효과를 나타냈다. 또한 PD:PT=1군에게서 식이섭취량과 식이효율이 모두 유의적으로 가장 높게 나타났다.
2. 혈장에서의 간 효소 AST, ALT 수치는 E(+ /+)군에 비해서 각 실험군은 유의적인 증가를 나타냈다. 인삼 투여군은 E(-/-)군에 비해 유의적인 감소를 보였으며, 혈장의 결과로는 PD:PT=1군이, 간 조직에서는 PD:PT=2군이 간 조직 손상을 감소시키는 경향을 나타냈다.
3. 혈장, 심장, 간 조직에서의 지질 수치를 살펴보면, 중성지방(TG), 총 콜레스테롤(TC), HDL 콜레스테롤(HDL-C) 수치는 E(+ /+)군에 비해서 각 실험군이 모두 유의적으로 증가하였다. 혈장에서는 PD:PT=1군이, 심장 조직에서는 두 인삼 투여군이 비슷하게 지질 수치 개선 효과를 나타냈다. 간 조직에서는 TC 함량에는 PD:PT 비율에 따른 인삼 투여가 감소 효과를 주지 못하였으나, PD:PT=1군이 지질수치 개선효과를 나타냈다.
4. 지질과산화물(lipid peroxidation, LPO)을 측정한 결과 E(-/-)군은 E(+ /+)군에 비해서 혈장, 심장 간 조직에서 유의적으로 증가하였다. 혈장에서는 PD:PT=1군과 PD:PT=2군이 비슷한 감소효과를 나타냈으며, 심장 조직에서는 PD:PT=2군이, 간 조직에서는 PD:PT=1군이 LPO를 감소시켰다. 즉, LPO 감

소효과는 조직에 따라 PD:PT 비율에 따라 다른 경향을 보였다.

5. 혈장의 아디포넥틴 분비는 E(-/-)군에 비해 각 실험군 모두에서 감소하였으며, 특히 PD:PT=2군이 유의하게 감소하였다. 지방조직에서 아디포넥틴 함량은 E(-/-)군에 비해서 PD:PT=1군이 약 2배로 유의한 증가를 보였으며 PD:PT=2군에서는 유의적인 증가를 나타내지 않았다.

6. 인슐린 저항성 개선효과로써 혈장에서 Insulin Receptor β 의 발현은 E(-/-)군은 E(+/-)군에 비해 0.7배 발현이 감소하였으나 PD:PT=1군과 PD:PT=2군은 각각 2.8배, 1.8배로 증가하였다. Phospho-IRS-1(ser612)의 경우 E(-/-)군은 E(+/-)군에 비해서 1.3배 발현이 증가하였지만 각 인삼 투여군에서 각각 0.8배, 0.9배로 발현이 감소하였다.

7. 염증반응에 미치는 영향을 살펴보면, 성장인자나 발암물질 등에 의해 유도되는 COX-1,2 발현이 PD:PT=2군에서 더 많이 억제되었다. I κ B- α 안정화에는 PD:PT=1군이 효과적으로 작용을 하였으며, I κ B- α 인산화 억제와 NF- κ B p65 발현 억제에는 PD:PT=1군과 PD:PT=2군이 모두 효과적으로 발현을 감소시켜주었다. 또한 세포의 자가사멸 기전에 미치는 영향은 bcl-2의 경우 인삼 투여군에서 모두 발현이 증가되었으며, 특히 PD:PT=1군이 발현을 증가시켰다. 하지만 cytochrome C와 caspase-3의 발현에는 인삼 투여군이 큰 억제효과를 주지 못하였다. 그러나 caspase-8,9의 발현에서는 각 인삼 투여군이 모두 크게 발현을 억제시켰는데, 특히 PD:PT=2군에게서 caspase-8,9의 발현 억제가 크게 나타났다. 자가사멸의 마지막 생성 반응물인 cleaved-PARP의 경우도 인삼 투여군에게서 억제되었으며 PD:PT=2군이 PD:PT=1군 보다 더 크게 발현을 억제시켰다.

8. 심장 조직의 괴사정도는 E(+ / +)군에 비해서 모든 실험군이 유의적으로 증가하였으며, PD:PT=1군은 E(-/-)군에 비해 심장 조직의 괴사가 유의하게 감소한 반면 PD:PT=2군은 유의한 감소를 보이지 않았다. 정상세포의 수준역시 유의하지는 않지만 괴사세포와 같은 경향을 보였으며, PD:PT=1군에게서 정상세포의 생존이 높게 나타나는 것을 통해서 심혈관질환에 보다 유의한 개선 효과를 나타내었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, PD:PT=1군에게서 체중 증가 억제와 식이효율이 유의하게 증가하였으며, PD:PT=2군은 간 보호효과에 유의한 영향을 나타냈다. 고콜레스테롤 식이는 E(-/-)군의 LPO 생성을 유의하게 증가시켰으며, 인삼 투여시 LPO 생성이 모두 감소되었는데, PD:PT=1군은 혈장과 간 조직에서 유의한 감소를 보였으며 PD:PT=2군은 혈장과 심장조직에서 유의한 감소를 나타냈다. 지방조직에서의 아디포넥틴 함량은 PD:PT=1군이 E(+ / +)군에 비해 2배 이상의 증가를 보였지만, 혈장에서는 감소하였다. 인슐린 저항성과 관련되어 PD:PT=1군과 PD:PE=2군은 Insulin Receptor- β 발현을 증가시켜주었고 Phospho-IRS-1(ser612) 발현을 억제시켜주었는데, PD:PT=1군이 인슐린 감수성 증가에 더 효과적임을 알 수 있었다. 친 세포사멸기전에 관여하는 COX-1, COX-2, cytochrome C, caspase-3,8,9, c-PARP의 발현은 cytochrome C와 caspase-3을 제외하고 모두 억제되었으며, PD:PT=2군의 억제효과가 크게 나타났다. 항 세포사멸기전에 관여하는 bcl-2의 경우 PD:PT 비율조절에 의해 발현이 증가하였으며, 특히 PD:PT=1군이 더 큰 증가를 나타냈다. 염증반응에서도 친 염증물질은 NF-kB와 p-IkB-a 발현 억제에는 PD:PT=2군이 효과적이었으며 항 염증물질인 Ikb-a 발현 증가에는 PD:PT=1군이 효과적으로 나타났다. 또한 PD:PT=1군이 심장 조직의 괴사 정도를 유의하게 감소시켰으며, 정상세포의 빈도가 높았음을 통해 PD:PT=1에 의한 bcl-2 발현 증가에 의한 심혈관계개선 효과에 의한 것이라고 생각해 볼 수

있다.

결론적으로 인삼의 ginsenoside의 추출부위에 따라 각기 다른 PD:PT 비율 조절의 작용효과는 작용기관에 따라서 서로 다른 영향을 주며 아울러 항동맥 경화, 항염증 및 자가사멸 억제 기전에도 그 효과가 다르게 나타났다. 따라서 향후연구로써는 ginsenoside의 각각 성분의 효과와 성분 간의 상호작용 등에 대한 기전 여구가 요구되고 아울러 mitochondria damage성 자가사멸 기전과의 상관성 연구가 필요하다.

목 차

논문개요

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	11
1. 실험동물 및 사육	11
2. 실험식이	13
3. 시료의 수집 및 처리	15
4. 식이효율, 체중 증가량 및 식이섭취량	15
5. 중성지방 함량 측정	15
6. 총 콜레스테롤 함량 측정	16
7. High-density lipoprotein(HDL) cholesterol 함량 측정	17
8. 간 효소수치(AST, ALT) 측정	17
1) AST(GOT) 함량 측정	17
2) ALT(GPT) 함량 측정	18
9. 지질과산화물(LPO, MDA, 4-HNE) 함량 측정	18
10. Adiponectin 농도 측정	19
11. TUNEL	20
12. Western blot	20
13. 통계처리	21

III. 연구결과 및 고찰	22
1. 체중 변화량, 식이 섭취량 및 식이효율	22
2. 혈장과 간 조직에서의 간 기능 손상 정도	26
3. 혈장과 심장, 간 조직의 지질 성상	31
4. 혈장과 심장, 간 조직에서의 LPO(4-HNE/MDA) 생성	37
5. PD:PT 인삼 사포닌 비율 조절에 의한 아디포넥틴 분비와 인슐린 저항성 개선효과	44
1) 혈장과 부고환 지방에서의 아디포넥틴 농도	44
2) 인슐린 저항성 개선 효과	47
6. 인삼의 PD:PT 비율조절에 따른 항염증 및 세포사멸에 미치는 영향 ..	52
1) 인삼 사포닌 비율조절이 염증반응에 미치는 영향	52
2) 인삼 사포닌 비율조절이 세포사멸에 미치는 영향	56
7. 인삼 사포닌의 비율조절이 항동맥경화에 미치는 영향	64
IV. 요약 및 결론	67
V. 참고문헌	

ABSTRACT

List of Tables

Table 1. Diet composition of experimental diet	14
Table 2. The mean of body weight gains, food intake and food efficiency in each group for 12 weeks in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	24
Table 3. Effect of PD:PT ratio on the activities of plasma alanine and aspartate aminotransferase in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	29
Table 4. Effect of PD:PT ratio on the activities of plasma alanine and aspartate aminotransferase in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	30
Table 5. Effect of PD:PT ratio on the plasma lipid level in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	34
Table 6. Effect of PD:PT ratio on the liver lipid level in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	35
Table 7. Effect of PD:PT ratio on the heart lipid level in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	36
Table 8. Effects of PD:PT ratio on plasma lipid peroxidation in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	41
Table 9. Effects of PD:PT ratio on hepatic lipid peroxidation in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	42
Table 10. Effects of PD:PT ratio on heart lipid peroxidation in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	43

Table 11. Effect of PD:PT ratio on plasma adiponectin concentration in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	45
Table 12. Effect of PD:PT ratio on fat adiponectin concentration in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	46

List of Figures

Figure 1. Schematic illustration of insulin signalling cascade	2
Figure 2. Potential mechanisms for activation of inflammation in adipose tissue	5
Figure 3. Structures of ginsenosides. Based on chemical structure, there are two major groups: protopanaxadiols (A) and protopanaxatriols (B)	8
Figure 4. Research design in this study	12
Figure 5. Process of extraction of ginseng	13
Figure 6. Body weight (a), Food intake (b) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	25
Figure 7. The difference in plasma concentratin of alanine and asparate aminotrasnferase in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	29
Figure. 8. The difference in plasma concentratin of alanine and asparate aminotrasnferase in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	30
Figur 9. The difference in plasma concentratin of TG, TC and HDL-C in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	34
Figure 10. The difference in liver concentratin of TG and TC in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	35
Figure 11. The difference in heart concentratin of TG and TC in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	36

Figure 12. The changes in plasma lipid peroxidation product in apo E KO mice fed high-cholesterol diet with treated differential PD:PT ratio	41
Figure 13. The changes in hepatic lipid peroxidation product in apo E KO mice fed high-cholesterol diet with treated differential PD:PT ratio	42
Figure 14. The changes in heart lipid peroxidation product in apo E KO mice fed high cholesterol diet with treated differential PD:PT ratio	43
Figure 15. Plasma adiponectin concentration difference PD:PT ratio in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	45
Figure 16. Fat adiponectin concentration difference PD:PT ratio in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	46
Figure 17. Western blotting of the expression of Insulin Receptor β (a) and Phospho-IRS-1(ser612) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	48
Figure 18. Effect of PD:PT ratio on the regulation Insulin Receptor β (a) and Phospho-IRS-1(ser612) (b) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	48
Figure 19. Western blotting of the expression of COX-1(a), COX-2(b), Ikb- α (c), Phospho-IkB- α (d) and NF- κ B p65(e) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	54
Figure 20. Effect of PD:PT ratio on the regulation COX-1(a), COX-2(b), Ikb- α (c), Phospho-IkB- α (d) and NF- κ B p65(e) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	55

Figure 21. Western blotting of the expression of bcl-2(a), cytochrome C(b), caspase-3(c), caspase-8(d), caspase(9)(e) and cleaved-PARP(Asp214)(f) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	58
Figure 22. Effect of PD:PT ratio on the regulation bcl-2(a), cytochrome C(b), caspase-3(c), caspase-8(d), caspase(9)(e) and cleaved-PARP(Asp214)(f) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	59
Figure 23. Effect of PD:PT ratio on the photographs showing TUNEL in apo E KO mice fed high-cholesterol diet	66
Figure 24. Histogram illustrating the expression of necrosis according to the PD:PT ratio in heart tissue	66

I. 서론

1) 질병 사망율과 대사 증후군 발병율

2006년 통계청 '사망원인 통계결과'에 의하면 5세 이상 인구 10만 명당 사망자수 중 암 27%, 뇌혈관질환 12.3%, 심장질환 8.3%, 당뇨병 4.8%로, 10년 전 대비 암과 심장질환의 사망률은 증가하였고, 그 외에 내분비, 영양 및 대사 질환, 호흡기계통 질환도 증가한 반면에 뇌혈관질환의 사망률은 감소하였다 [1]. 또한 '98~'05년까지 3회에 걸친 국민건강영양조사에 따르면 20세 이상 64세 미만의 청장년층의 절반 이상이 고혈압, 당뇨병, 이상지혈증, 비만 중 1가지 이상의 질환을 가지고 있어서 이에 따른 2차적인 만성질환이 우려되고 있는 실정이다. 성인 남녀의 만성질환 유병율은 해마다 점차 증가하는 추세를 나타내고 있다. 이러한 만성질환 유병율 증가에 따른 대사증후군 발병 위험은 성인 남녀의 사망률 증가에 직·간접적인 원인을 제공해주고 있으며, 성인 국민 중 절반 이상이 심뇌혈관 질환에 대하여 고위험군에 속한다고 보고하였다 [2].

2) 인슐린 신호전달체계와 인슐린 저항성

인슐린 저항성이란 인슐린의 양이 정상적으로 분비됨에도 불구하고 그 생리학적 작용이 현저히 감소된 상태로, 대사증후군의 주요 위험요인으로서 최근 주목되고 있다. 이러한 인슐린 저항성을 유발하는 주된 원인은 인슐린 표적세포에서 인슐린 작용의 결함에 기인한다. 이러한 인슐린 저항성은 이상지혈증, 고혈압, 혈당 상승 등의 대사증후군의 표현형을 가져오며, 동맥경화증

(atherosclerosis)을 일으키는 주요 위험요인으로 작용한다[3,4]. 제2형 당뇨병의 대부분의 경우, 수용체 분자의 돌연변이를 증명할 수 없으므로 수용체와 인슐린이 결합하는 과정보다는 수용체와 결합이후의 표적 세포내 인슐린 작용의 장애가 더욱 중요하게 된다. 최근 인슐린이 작용하는 여러 경로에 저항성을 일으키는 국소적이거나 순환하는 요소에 관여하고 있는 생체내에 널리 산재되어 있는 인슐린 수용체 기질인 Insulin Related Substrate-1(IRS-1)이 발견되었으며, 이는 타이로신 인산화에 필요한 요소이며 유전적으로는 인슐린 저항성을 유발하는 인자의 과잉생산이나 돌연변이 등에 의해 생성되는 인자이다[5]. IRS-1의 활성화는 순차적으로 세포질 내의 수많은 단백질과 각종 키나아제를 활성화함으로써 다양한 인슐린 효과를 매개함[6]에 따라서, 이러한 신호전달 과정 중 하나 또는 수개의 복합적인 변화가 인슐린 저항성을 유발할 수 있다는 것이 밝혀지고 있다(Fig. 1.)[7].

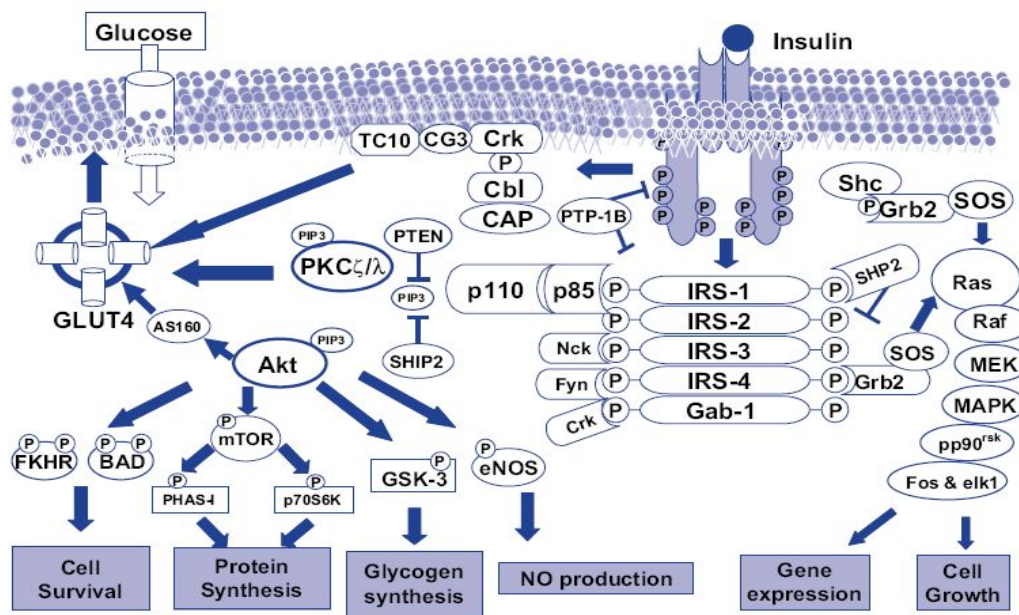


Fig. 1. Schematic illustration of insulin signalling cascade

최근에는 인슐린 수용체의 기능을 억제하는 Rad 단백질(ras associated with diabetes), 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF), 세포막 당단백의 일종인 PC-1 같은 물질들이 세포내에서 발현에 증가되어 인슐린 저항성을 유발할 수 있다는 가능성이 제시되고 있으며[6-9], 만성염증 역시 주요한 유발 원인 중의 하나로 간주되고 있다[10,11].

3) 지방 조직과 Adipokines의 역할

백색지방조직(white adipose tissue, WAT)은 에너지를 저장하는 주요 장소이며 에너지 항상성에 중요한 역할을 수행하지만, 과도한 WAT는 비만과 관련된 문제를 발생시킨다[12-20]. 복부비만은 전신의 만성적인 염증 상태를 유발하여 여러 가지 사이토카인의 생성을 증가시켜, 만성염증이 인슐린 저항성을 유발하여 이로 인해 혈관에 염증 반응을 일으켜 동맥경화증을 유발하게 된다[10,11,21]. 또한 복부비만의 과도한 지방조직에서는 대사증후군의 여러 위험요소들을 악화시키는 nonesterified fatty acid(NEFA), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-6(IL-6), plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) 등의 사이토카인과 아디포넥틴(adiponectin), 렙틴(leptin), 레지스틴(resistin) 등의 아디포카인(adipokines)들을 생산하게 된다. 인슐린 저항성에 관여하는 여러 사이토카인 중에서 염증반응의 주축이 되는 IL-6를 지방세포에서 분비하는데, 이는 동물실험에서 인슐린 신호전달을 직접적으로 방해하여 인슐린 저항성을 유발하며 급성 염증 반응을 일으켜 혈관에 나쁜 영향을 미치게 된다[22]. 또한 TNF- α 는 유리지방산의 유리를 증가시키고 인슐린 신호전달을 감소시켜 포도당 수송을 방해한다[11]. 이외에 지방세포는 아디포넥틴을 분비하는 중요한 내분비 기관이기도하다. 아디포넥틴은

비만과 제2형 당뇨병에서 감소되어 있는데, 근육이나 간의 수용체와 작용하여 TNF- α 등의 작용을 방해하여 인슐린의 작용을 증가시켜 직·간접적으로 인슐린 감수성에 영향을 미친다. 또한 항당뇨 및 항동맥경화 효과를 가지고 있어서 당뇨 및 대사증후군에 대한 새로운 치료방법으로 기대되고 있다[23-26].

4) 세포사멸과 신호단백질

세포사멸(apoptosis)은 염증을 일으키지 않도록 프로그램되어 세포죽음을 유도하는 연속적인 생리과정이다[27-30]. 세포사멸은 형태적 변화과정, 세포 변화, 유해한 세포 제거와 같은 생물학적 현상에 필수적인 역할을 하기 때문에 적절한 세포사멸은 건강에 매우 중요한 역할을 한다. 세포사멸 과정을 통한 세포의 죽음은 'caspase'라 불리는 프로테아제 작용인자의 활성화에 의해 일어나는데 caspase는 세포분해로 종착되는 효소활성전달체계에 관여하고 있다[31,32]. 세포사멸의 최종 단계에 의한 죽음은 세포괴사(necrosis)에 의한 죽음과 비교되는데, 세포사멸은 특정 자극에 의해 유도되는 엄격한 조절과정으로 염증유도체를 방출하지 않고 일어난다는 점에서 세포괴사와 구분된다. 세포괴사에 의한 죽음은 세포가 손상을 입은 후 세포의 항상성 조절에 실패함으로써 나타난다[33]. 그중에서 면역과 염증반응의 주된 조절자인 Nuclear factor- κ B(NF- κ B)는 p50/p105(NF- κ B1), p52/p100(NF- κ B2), c-Rel, Rel A 그리고 Rel B 등 5개의 단백질 패밀리로 존재한다. Inhibitors of κ Bs(I κ Bs)는 세포질에서 NF- κ B와 결합하여 NF- κ B가 핵으로 들어가지 못하도록 방해한다[34]. I κ B의 멤버인 Bcl-3의 경우에는 NF- κ B1과 NF- κ B2와 결합하여 핵으로의 이동을 도와준다. 외부의 자극이 들어오면 I κ B kinase 복합체(IKK)에 의해 I κ B가 인산화된 후 ubiquitin proteasome에 의해 분해된다. 이때

NF- κ B는 핵으로 이동하여 여러 면역반응 관련 유전자들의 전사를 유발한다 [33]. NF- κ B는 CD40 리간드, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, 그리고 cyclin D 등과 같은 세포분열 및 세포주기를 촉진하는 유전자들과 세포이동 및 혈관신생 관련 유전자들을 활성화하여 세포사멸을 억제시킨다(Fig. 2.)[34,35].

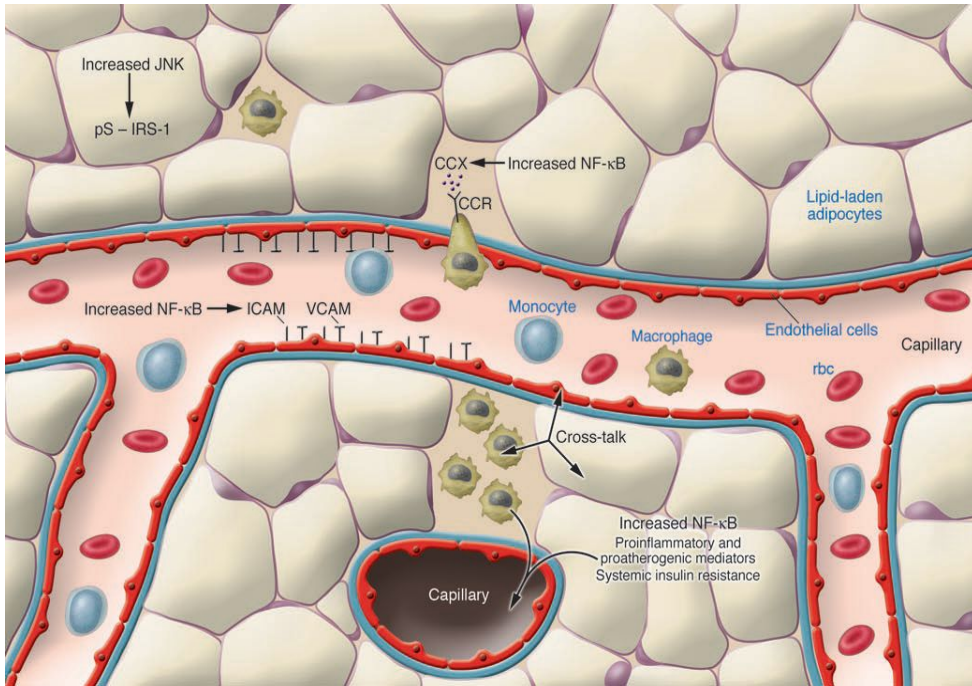


Fig. 2. Potential mechanisms for activation of inflammation in adipose tissue. Dietary excess and obesity cause lipid accumulation in adipocytes, initiating a state of cellular stress and activation of JNK and NF- κ B

5) 혈관내피손상물질과 apo E 지단백질

대사증후군은 여러 가지 기전으로 동맥경화증을 일으킨다.[10,36,37] 동맥경화증은 뇌경색, 협심증, 심근경색증 등 허혈성심질환과 말초혈관 폐쇄를 유

발하는 원인질환으로 알려져 있다. 동맥경화증의 위험인자로는 고콜레스테롤혈증, 고혈압, 흡연, 당뇨병 등이 지적되고 있다. 손상반응설에 의하면 동맥경화증은 고혈압, 고혈당, 저산소증, 산소라디칼, 콜레스테롤 등의 유발인자에 의해 혈관내피세포가 활성화내지 손상을 받아 기능이 변화되면서 시작된다. 내막하로 들어온 low density lipoprotein(LDL)이 산화형 LDL로 변형되고 단핵구(monocyte)가 탐식하여 포말세포로 변화되어 동맥경화증의 초기병변인 지방반(fatty streak)이 형성된다. 이러한 병변은 점차 진행되면서 내피세포, 평활근세포, 거식세포(macrophage), 혈소판 등에서 분비된 성장인자와 사이토카인에 의해 활성화되며 동맥경화증으로 진행된다. 동맥경화증의 초기부터 내피세포의 대사 장애와 기능손상에 의해 혈관내피의존성 확장기능의 장애가 생기는데, 이는 내피의존성 확장물질(endothelial derived relaxing factor, EDGF)인 NO의 생산이 감소하는 반면 혈과 수축성 물질이 분비되는 것으로 설명하고 있다. NO는 생물학적으로 혈관확장성을 유지하고 혈소판응집을 억제하여 내피세포 기능을 유지하며 평활근세포의 증식을 막아 동맥경화증의 진행을 방지한다. 최근 NO는 대사되면서 세포독성의 radical로 전환되어 조직손상을 유발하거나 동맥경화증을 진행시킬 수 있다고 보고되었다[38-40]. 지방음을 섭취하는데 있어서 지방조직의 기능이상은 다른 조직을 향해 지질초과를 이끌 수 있다[41]. 동시에 증가된 유리지방산은 간을 자극시켜 중성지방이 되어 apo B를 포함하는 지질단백질(lipoprotein)으로 방출하게 된다[42]. 이들과 HDL, LDL과의 상호작용은 전형적인 이상지혈증 상태를 초래한다. 반면에 lipoprotein lipase(LPL)에 의해서 방출된 지방산들은 주변 조직에 에너지 유입 경로를 변형시켜 포도당을 사용하지 못하게 한다[43,44]. 이렇게 지나치게 증가된 중성지방은 심혈관질환(cardiovascular disease, CVD)의 독립 위험인자로서 인식되고 있다[45,48]. 지단백질 대사 뿐만 아니라 항산화, 항

염증, 면역조절, 항혈전제(platelet aggregation inhibitor) 기능을 가지고 있는 apo E는 최근에는 세포신호전달에 있어서 Akt/protein kinase B 인산화의 유도제로도 작용한다고 알려졌다. 특히 지질대사에 있어서 중요한 역할을 수행하는 지단백질인 apo E는 E2, E3, E4 3개의 아이소형태를 가지고 있다. 이 중, apo E2와 apoE4는 지질 대사를 변화시키는 기능을 가지고 있다. 이외에 apo E3는 제3형 고질혈증과 관련되며, apo E4는 치매와 같은 신경변성 질환과 관련이 있다. 한편 apo E3은 LDL 수용체나 chylomicron remnant apo E3 수용체와 상호작용을 매개한다. 따라서 apo E3은 여러 지단백질 대사에 중요한 역할을 수행하며 콜레스테롤 대사에 있어서 중심적인 역할을 수행한다 [49].

6) 인삼의 ginsenosides

한국, 중국, 일본에서 2,000년 이상 넘게 수명연장과 만병통치약으로 널리 사용된[50-52] 인삼의 약리 작용은 중추신경계와 심혈관계, 내분비계 그리고 면역계에 유익한 효과가 있음이 밝혀졌다. 이와 같이 인삼의 수많은 활성성분들은 여러 연구를 통해서 그 효과가 밝혀졌다[52,53]. 인삼에 존재하는 활성 성분으로는 인삼 사포닌(ginsenoside), 다당류(polysaccharide), 펩티드(peptides), 지방산(fatty acids)과 폴리아세틸렌 알콜(polyacetylenic alcohols)이 존재한다[52]. 그 중 가장 큰 생리활성을 지닌 인삼 사포닌은 항염증, 항산화, 항암효과와 같은 여러 가지 유익한 영향을 다양하게 나타내는 것으로 알려져 있다[55-57]. 인삼과 관련된 대부분의 연구들은 *Panax ginseng*(Asian ginseng), *Panax quinquefolius*(American ginseng), *Panax Japonicus*(Japanese ginseng)에서 추출한 성분들이 주를 이루고 있다. 인삼

의 주요 활성성분인 ginsenoside는[58] 트리테르페노이드(triterpenoid)계의 담마란(dammarane)계 사포닌으로서 인삼속 식물에만 존재하는 특유의 사포닌이다. 이러한 담마란계 사포닌은 비당부분에 붙어있는 수산기(-OH)의 수에 따라서 protopanaxadiol계 사포닌(PD: Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3, Rh2)과 protopanaxatriol계 사포닌(PT: Rg1, Rg2, Re, Rf, Rh1)으로 분류된다(Fig. 3.)[58].

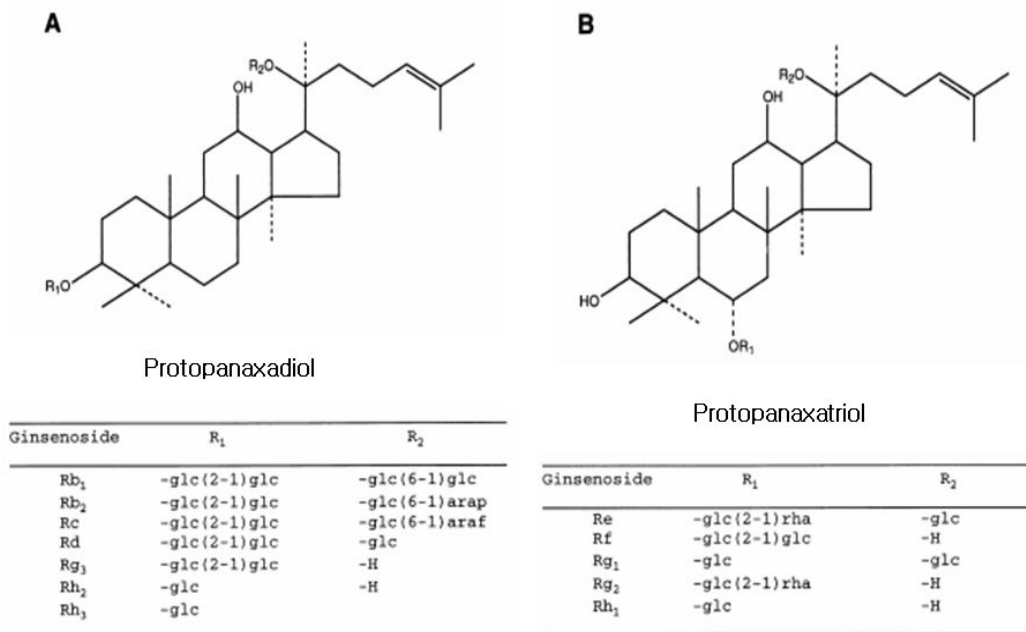


Fig. 3. Structures of ginsenosides. Based on chemical structure, there are two major groups: protopanaxadiols (A) and protopanaxatriols (B). Rh3, as shown in the lower part of (A), differs from other protopanaxadiols at the side chain

인삼의 종류에 따라서 인삼 사포닌의 구성성분은 2~20% 정도 차이가 나타난다. 예를 들면, 고려 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 다른 인삼종 보다 가장 많은 사포닌이 분리되었으며 다른 인삼종 식물과는 사포닌 성분의 함유

조성 패턴에 차이가 있다. 미국삼의 경우 PD계 인삼 사포닌이 현저하게 많고 PT계 인삼 사포닌이 적은 반면에 고려인삼은 미국삼에 비해 이들 인삼 사포닌의 함유조성이 균등한 편이다[57]. 또한 같은 종류의 인삼이라 할지라도 다른 지역에서 재배한 경우에 나타나는 약리작용에 차이가 있다. 고려인삼과 미국삼을 비교해보면, 강력한 암세포 증식 억제작용을 비롯한 항암활성 성분인 ginsenoside Rh2와 최근에 강력한 통증 억제활성을 나타내는 ginsenoside Rf는 미국삼에는 존재하지 않는 것으로 알려지고 있다[60-63]. 따라서 고려인삼과 다른 인삼종을 동절시 할 수 없으며, 중의학에서도 고려인삼 대용이나 혹은 다른 약용목적으로 이용되어져 왔다[64]. 그 외, 지금까지 보고된 인삼이 생체 대사에 미치는 영향을 확인해보면, 산소이용율과 세포내 포도당 이용을 증가시키며 제2형 당뇨병 환자들의 혈당감소에도 효과가 있음이 발견되었고[65-70] 혈소판 응식을 억제하며, ginsenoside에 의한 NO 분비를 증가시켜 심혈관 질환에 대해서 보호 작용을 한다고[71-73] 보고되었다. 이와 같이 인삼은 인삼종류별, 생산지별, 부위별, 연근별, 가공처리방법에 따라 차이가 있으며 생리활성이 서로 다르다. 최근까지의 인삼의 생리활성 성분에 대한 연구들은 단일성분 중심으로 이루어져 왔다. 따라서 각 인삼 사포닌 성분의 혼합효과 또는 시너지효과 및 비율조절에 따른 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이며, 특히 인삼 사포닌의 기전적 연구는 부재하다. 따라서 인체생리 전반의 관한 연구의 필요성에 따라서 인삼의 특징인 효능의 다양성을 검증하기 위해서 인슐린 저항성에 의한 대사 증후군 및 동맥경화증에 대한 약리작용을 확인해보고자 한다.

7) 연구 목적

본 연구에서는 동맥경화 연구모델인 apo E KO 마우스(E(-/-))를 이용하여 고콜레스테롤 식이(1.25% 콜레스테롤, 7.5% 코코아 버터)[74]를 통하여 동맥경화병변 유도 및 인슐린 저항성을 증가시켰다. 음성 대조군 E(+/+), 양성 대조군 E(-/-) 그리고 PD와 PT비율이 각각 1:1과 2:1인 실험군으로, 총 4군으로 나누어 총 12주간의 실험기간 동안 고콜레스테롤 섭취와 함께 마지막 4주간의 실험기간 동안에는 고콜레스테롤 식이와 함께 음성 대조군 E(+/+)와 양성 대조군 E(-/-)에게는 생리 식염수를 매일 복강내(i.p.)로 주사하였고, 실험군(PD:PT=1, PD:PT=2)에게는 체중 kg당 100mg 농도로 매일 복강내(i.p.)로 주사하여 1) 혈장과 간 조직에서의 간 효소수치 분석 2) 혈장과 심장, 간 조직에서의 지질 함량 분석 3) 혈장과 심장, 간 조직에서의 지질과산화물 생성 분석 4) PD계 사포닌과 PT계 사포닌 비율 조절에 따른 아디포넥틴 분비와 인슐린 저항성 개선효과 6) 인삼 사포닌 비율 조절에 따른 대동맥과 심장조직에서의 손상정도 7) 세포의 자가사멸을 유발하는 기전을 확인하기위해 NF- κ B 및 caspase 신호전달의 변화를 관찰하여 PD와 PT의 인삼 사포닌 비율 조절에 따른 항동맥경화 및 항염증효과를 관찰하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육

Apo E 유전자를 가지고 있는 Wild군 C57BL/6J계(E+/+)와 apo E 유전자를 가지고 있지 않은 B6/KOR-Apoe계(E-/-) 수컷 마우스를 Japan SLC, Inc.(3371-8, KOTOH-CHO, HAMAMATSU-SHI)에서 10주령 (25g) 시 공급받아 처음 1주일 동안은 AIN-76(Dyets Inc.)으로 적응 사육하였다. 적응기간 후 무작위로 8마리씩 4군(음성대조군 E+/+, 양성대조군 E-/-, PD:PT=1, PD:PT=2)으로 나누어 총 12주간 사육하였다. 사육 기간 중 처음 8주간은 고콜레스테롤 식이(DYET#102068, Dyets Inc., 2508 Easton A Bethlehem, Pennsylvania 18017)를 제공하였고, 이 후 4주간은 고콜레스테롤 식이와 함께 복강 내로 생리 식염수와 인삼 추출물을 매일 주사하였다. 동물사육실의 조건은 온도 $21.4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 와 습도 $55 \pm 1\%$ 를 유지하였으며, 12시간 dark-light cycle(8:00 ~ 20:00)로 명암을 조절하였다. (Fig. 4.)

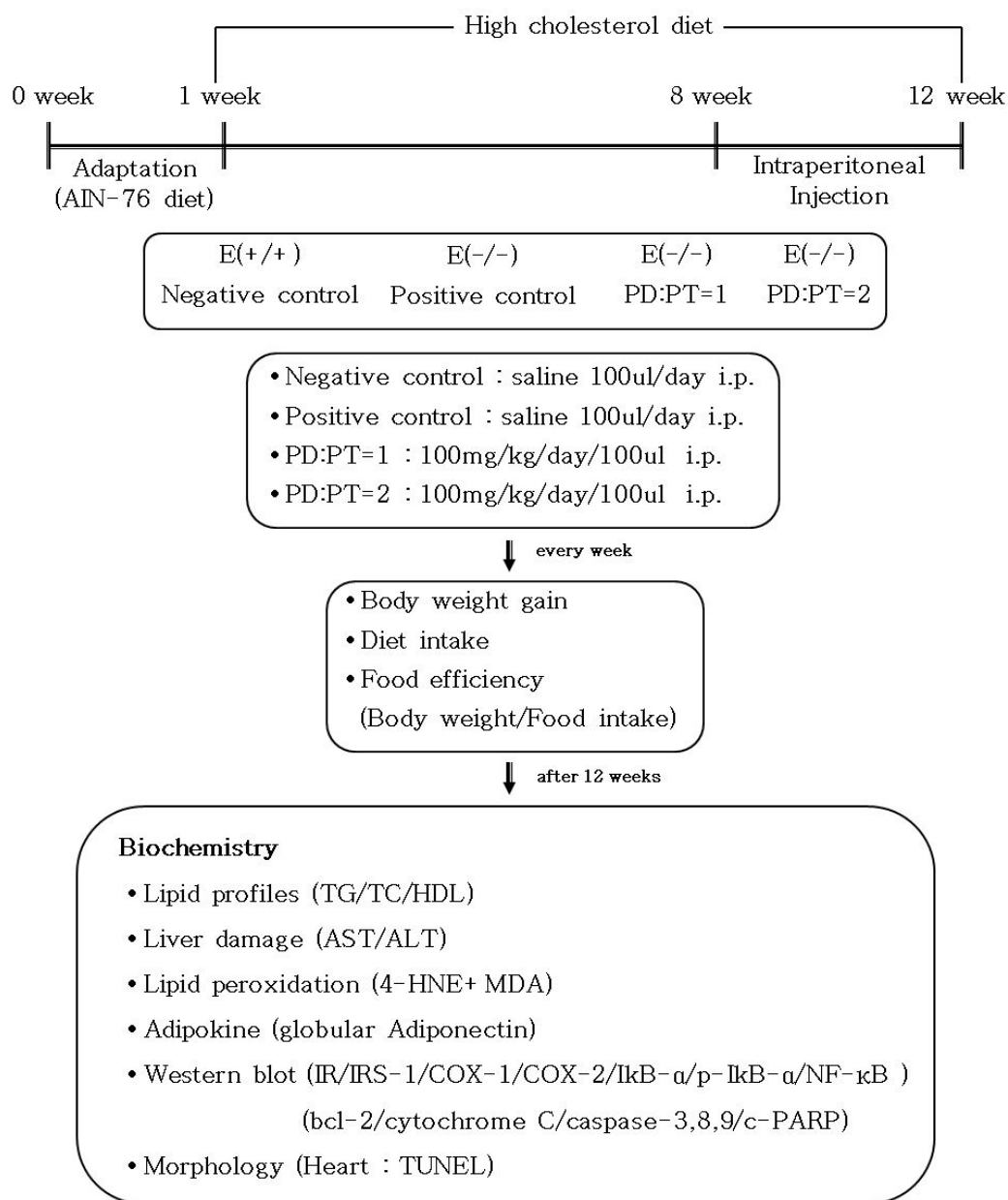


Fig. 4. Research design in this study

2. 실험식이

실험식이의 구성 비율은 Table 1과 같다. 제조한 식이는 1주일 단위로 밀봉하여 -20°C 에서 냉동 저장하였다가 사용하였다. 인삼 추출물은 한국식품연구원에서 제공한 것으로, 4년근 백삼을 부위별로 분류하여, PD:PT=1의 인삼시료는 동체 5 : 세근 1의 비율로, PD:PT=2의 인삼시료는 지근 1 : 세근 5의 비율로 추출된 것을 사용하였다. 각각의 인삼시료를 7일 동안 60°C 에서 열풍 건조하여 Mixer(Gold HM-5000, (주)현대가전업, Incheon, Korea)로 분쇄한 후에 30 mesh 체로 통과 시킨 후에 80% 에탄올을 사용하여 추출한 후, 80°C 에서 3시간 동안 환류냉각추출을 2회 반복한 후, 여과시켜 감압농축 시켰다.(Fig. 5.) 음성대조군과 양성대조군에게는 생리 식염수(pH 7.4)를 복강내로 매일 주사하였으며, PD:PT=1과 PD:PT=2 실험군에는 100mg/kg/100ul씩 매일 복강 내로 주사하였다. 물은 증류수로 공급하였으며, 사료와 물은 자유롭게(ad libitum) 섭취하도록 하였다.

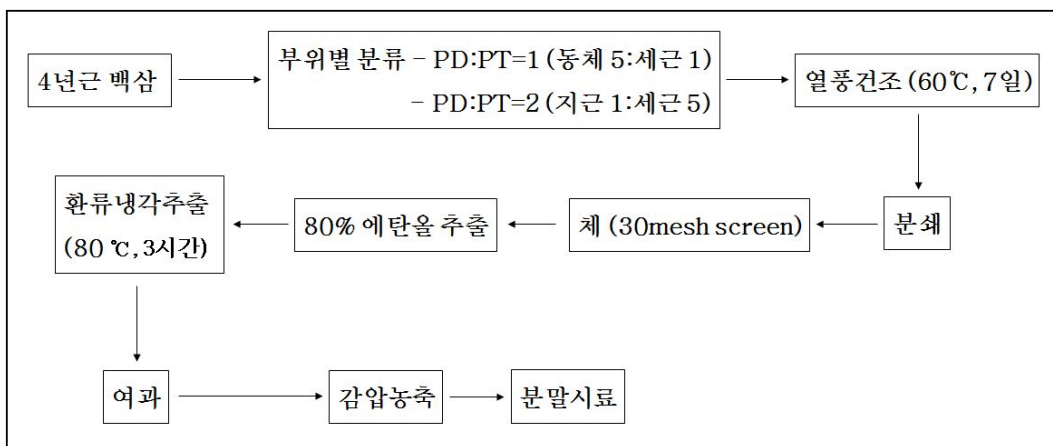


Fig. 5. Process of extraction of ginseng

Table 1. Diet composition of experimental diet

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

¹⁾Dyets #200000 AIN-76A Mineral Mix(g/kg, use at 35g/kg diet)

Calcium Phosphate Dibasic 500.00; Sodium Chloride 74.00; Potassium Citrate H₂O 220.00; Potassium Sulfate 52.00; Magnesium Oxide 24.00; Manganous Carbonate 3.50; Ferric Citrate U.S.P. 6.00; Zinc Carbonate 1.60; Cupric Carbonate 0.30; Potassium Iodate 0.01; Sodium Selenite 0.01; Chromium Potassium Sulfate 12H₂O 0.55; Sucrose, finely powdered 118.03

²⁾Dyets #300050 AIN-76A Vitamin Mixture(g/kg, use at 10g/kg diet)

Thiamine HCl 0.60; Riboflavin 0.60; Pyridoxine HCl 0.70; Niacin 3.00; Calcium Pantothenate 1.60; Folic Acid 0.20; Biotin 0.02; Vitamin B12(0.1%) 1.00; Vitamin A Palmitate (500,000 IU/g) 0.80; Vitamin D3 (400,000 IU/g) 0.25; Vitamin E Acetate (500 IU/g) 10.00; Menadione Sodium Bisulfate 0.08; Sucrose finely powdered 981.15

3. 시료의 수집 및 처리

12주간의 사육 후 12시간 이상 절식시킨 다음 heart puncture로 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 EDTA tube에 담아 2000rpm에서 10분간 원심 분리 시킨 후 혈장을 취하여 -80℃에서 다음 분석 시까지 보관하였다. 심장 조직 일부는 액체 질소 가스로 급속 냉동시킨 후 -80℃에 보관하였고, 나머지 심장은 혈액을 제거(perfusion)한 다음 포르말린을 주입한 후 4℃에서 하루 보관한 후에 주변 근육 및 지방을 제거하고 포르말린에 넣어 4℃에 보관하여 TUNEL 샘플로 사용하였다. 간 조직과 부고환 지방은 액체 질소 가스로 급속 냉동시켜 -80℃에 보관하였다.

4. 식이효율, 체중 증가량 및 식이섭취량

체중은 일주일에 한번 일정한 시간에 측정하였으며, 식이섭취량은 매일 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율은 사육기간 동안의 체중 증가량을 식이섭취량으로 나눈 값으로 계산하였다.

$$\text{식이효율(Food efficiency)} = \frac{\text{체중 증가량 (Body weight, g)}}{\text{식이섭취량 (Food intake, g)}}$$

5. 중성지방 함량 측정

혈장과 간, 심장조직에서 lipoprotein lipase, glycerol chinasi, glycerol-3-phosphate oxidase, peroxidase를 이용한 Enzymatic

colorimetric method(ASSEL S.r.l. 00012 GUIDNA, Italy)로 분석하였다. 간과 심장 조직은 Tris-HCl(154mM KCl, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.4)로 균질화 한 다음, 4℃의 12000 xg 에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 세포조각들을 제거한 후 상층액만 취하여 분석 전까지 -80℃에서 보관하여 두었다. 실험은 시료에 발색시약을 첨가하여 혼합한 후, 37℃ 항온기에서 5분간 발색시킨 후 흡광도계(Pharmacia)를 이용하여 546nm에서 흡광도를 측정하였다. 중성지방 표준용액을 농도별로 준비한 것을 위의 방법과 동일하게 발색시켜 표준곡선을 만든 후, 시료의 흡광도와 비교하여 중성지방 함량을 구하였다.

6. 총 콜레스테롤 함량 측정

혈장과 간, 심장조직에서 총 콜레스테롤 함량을 측정하였다. 총 콜레스테롤 함량은 cholesterol esterase, cholesterol oxidase, peroxidase 등을 이용한 Enzymatic colorimetric method(ASSEL S.r.l. 00012 GUIDNA, Italy)으로 분석하였다. 간과 심장조직을 중성지방 함량 측정과 동일한 방법으로 전처리하여 실험에 사용하였다. 실험은 시료에 발색시약을 첨가하여 혼합한 후 37℃ 항온기에서 5분간 반응시켜 발색시킨 뒤 흡광도계(Pharmacia)를 이용하여 510nm에서 흡광도를 측정하였다. 콜레스테롤 표준용액을 농도별로 준비한 것을 위와 동일한 방법으로 발색시켜 표준곡선을 만든 후, 시료의 흡광도와 비교하여 총 콜레스테롤 함량을 구하였다.

7. High-density lipoprotein(HDL) cholesterol 함량 측정

혈장에서 HDL-cholesterol 함량을 측정하였다. HDL-cholesterol 함량은 N,N-bis(4-sulfobutyl)-m-toluidine disodium salt, cholesterol oxidase, peroxidase 등을 이용한 정량용 시약(DAIICHI PURE CHEMICALS Co., Ltd. Tokyo, Japan)을 사용하여 분석하였다. 시료에 효소시약 1(N,N-bis(4-sulfobutyl)-m-toluidine disodium salt, cholesterol oxidase, peroxidase)을 넣은 후, 37°C 항온기에서 5분간 반응시킨 후, 흡광도계(Multiskan spectrum)를 이용하여 700/600nm에서 1차 흡광도를 측정한 후, 효소시약 2(4-aminoantipyrine, cholesterol esterase)를 다시 37°C 항온기에서 5분간 반응시켜 700/600nm에서 2차 흡광도를 측정하였다. Cholestest N Calibrator를 위와 동일한 방법으로 발색시켜 표준곡선을 만든 후, 1차 흡광도와 2차 흡광도간의 차이를 계산하여 HDL cholesterol 농도를 계산하였다.

8. 간 효소수치(AST, ALT) 측정

1) AST(GOT) 함량 측정

혈장과 간 조직에서의 AST 함량은 L-Asparate, LDH, MDH, α -ketoglutarate 등을 이용한 Kinetic method UV(IFCC, ASSEL S. r. l. 00012 GUIDNA, Italy)를 이용하여 분석하였다. 시료에 효소시약을 넣은 후, 37°C 항온기에서 60분간 반응시킨 후, 0분, 60분, 120분, 180분에서 각각 흡광도계(Multiskan spectrum)를 이용하여 340nm에서 흡광도를 측정하여, $\Delta E/\text{min} \times 1905$ 공식을 사용하여 시료의 AST 농도를 측정하였다.

2) ALT(GPT) 함량 측정

혈장과 간 조직에서의 ALT 함량은 L-Asparate, LDH, α -ketoglutarate 등을 이용한 Kinetic method UV(IFCC, ASSEL S. r. l. 00012 GUIDNA, Italy)를 이용하여 분석하였다. 시료에 효소시약을 넣은 후, 37°C 항온기에서 60분간 반응시킨 후, 0분, 60분, 120분, 180분에서 각각 흡광도계 (Multiskan spectrum)를 이용하여 340nm에서 흡광도를 측정하여, $\Delta E/\text{min} \times 1905$ 공식을 사용하여 시료의 ALT 농도를 측정하였다.

9. 지질과산화물(LPO, MDA, 4-HNE) 함량 측정

혈장과 간, 심장조직의 지질과산화 정도는 lipid peroxidation microplate assay kit(Oxford Biomedical Research, #fr22)를 이용하여 측정하였다. 이는 불포화지방산으로부터 생성되는 최종과산화물 형태인 malondialdehyde(MDA)와 4-hydroxyalkenal(4-HNE)를 동시에 측정하는 방법이다. 간과 심장조직은 20mM phosphate buffer(pH 7.4)와 조직의 산화를 방지하기 위해서 5M BHT(in acetonitrile)을 넣은 후, 3,000 xg, 4°C에서 10분간 원심분리한 후 상층액만 취하여 실험에 사용하였다. MDA 측정은, 시료에 N-methyl-2-phenylindole과 12N HCl을 넣은 후 45°C 항온기에서 60분간 반응시킨 후, 흡광도계(Multiskan spectrum)를 이용하여 586nm에서 흡광도를 측정하였다. LPO 측정은 시료에 N-methyl-2-phenylindole과 methanesulfonic acid를 넣은 후, MDA와 동일한 방법으로 측정하였다. MDA 표준시료(1,1,3,3,-tetramethoxypropane)를 농도별로 희석하여 위와 동일한 방법으로 발색시켜 흡광도를 측정한 후,

시료의 흡광도와 비교하여 MDA, LPO 농도를 측정하였으며, 4-HNE 농도는 LPO 농도와 MDA 농도의 차이를 이용해 값을 구하였다.

10. Adiponectin 농도 측정

혈장과 부고환 지방, 간 조직에서의 adiponectin 농도는 quantitative sandwich enzyme immunoassay(R&D system, Inc., Quantikine, Adiponectin/Acrp30, MRP300)를 이용하여 측정하였다. 부고환 지방과 간 조직은 1X PBS buffer를 사용하여 균질화 시킨 후, -20°C 이상에서 24시간 이상 보관하여 세포막을 파괴한 후, 5000 xg에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 사용하였다. mouse adiponectin에 대한 단일항체(globular domain adiponectin, gAcrp 30)가 미리 코팅되어진 microplate(96 well)에 시료를 넣어서 상온에서 3시간 동안 반응시켜 항체와 결합시킨다. 각 well을 wash buffer를 사용하여 씻어낸 후, mouse adiponectin 단일항체에 특이적인 enzyme-linked polyclonal antibody를 넣어서 상온에서 1시간동안 반응시킨 후, wash buffer를 사용하여 각 well을 깨끗하게 씻어낸다. 각 well에 기질액을 넣고 상온에서 30분간 반응시킨 후, 반응 종료액을 다시 각 well에 넣어서 반응을 정지시킨 후에, 흡광도계(Multiskan spectrum)를 이용하여 450/540nm에서 흡광도를 측정하였다. 농도별로 희석한 표준용액도 위와 동일한 방법으로 발색시켜 흡광도를 측정한 후, 시료의 흡광도와 비교하여 mouse adiponectin 농도를 측정하였다.

11. TUNEL

심장 조직을 파라핀 블록으로 준비하여 8 μ m의 절편으로 만든 후 슬라이드를 만들어서 TUNEL 방법을 이용하여 세포의 괴사정도를 확인하였다.

12. Western blot

간 조직에 100ul lysis buffer(1M Tris, 5M NaCl, 0.1M EDTA, pH 7.4)와 protease inhibitor를 첨가하여 단백질을 분리하여 8%, 10%, 12%, 4~15% gradient 겔에 SDS-PAGE를 실시하였다. 혈장 역시 단백질 농도 (Bradford method)를 측정한 후 4~15% gradient 겔에 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동으로 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell Grr, #401296)으로 12V에서 1시간 30분 동안 transfer한 후, 5% 탈지분유로 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. TBST 용액(20mM tris-HCl, 0.8% NaCl, 0.05% Tween-20)으로 membrane을 10분씩 3차례 씻어 준 후, 일차항체를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 membrane과 3시간 동안 반응시켰다. Membrane를 3차례 씻어준 다음 일차항체에 대한 특이적인 이차항체를 상온에서 1시간 30분 동안 membrane과 반응시켰다. 3차례 membrane을 씻어준 후 ECL 용액(Santa Cruz Biotechnology, Inc. #sc-2048)으로 발색 후 X-선 필름(FUJI medical X-ray film)에 노출시켜 확인한 후, 해당 band를 Image J(NIH) 프로그램을 사용하여 정량하였다.

13. 통계처리

본 실험에서 얻은 모든 결과는 SPSS 14.0K를 이용하여 분석하였다. 평균±표준편차(mean±SD)로 구하였고, t-test와 ANOVA test 후, $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의차를 나타내었다.

Ⅲ. 연구결과 및 고찰

1. 체중 변화량, 식이 섭취량 및 식이효율

B6/KOR-Apo E계와 C57BL/6계 수컷 쥐를 자유 급식법으로 12주간 사육한 체중 증가량은 Table 2와 Fig. 6에 나타내었다. 각 군별 12주간의 체중변화를 살펴보면 E(+ / +)군은 0.38g, E(- / -)군은 0.35g, PD:PT=1군은 0.43g, PD:PT=2군은 0.41g으로 PD:PT=1군이 가장 큰 감소를 보였으나, 통계적으로 유의한 결과를 나타내지 않았다. 모든 실험군에게서 2주차에 가장 큰 체중감소가 나타났는데, 이는 적응기간에 주어졌던 일반 식이에서 실험 시작 후 고콜레스테롤 식이로 바꾸면서 나타난 결과로 생각된다. 4주차 실험기간에서 모든 실험군의 체중이 증가하여서 그 이후에는 점차적인 체중 감소가 나타났는데, E(- / -)군이 가장 큰 체중 감소를 나타냈으며 PD:PT=1군이 PD:PT=2군보다 적은 체중 증가를 나타냈다. E(+ / +)군, PD:PT=1군과 PD:PT=2군은 비슷한 양상의 체중변화를 보인 반면에, E(- / -)군은 불규칙적인 체중변화를 나타냈다.(Fig. 6.)

PD:PT=1군에게서 식이 섭취량과 식이 효율이 유의적으로 가장 높게 나타났다. PD:PT=1군과 PD:PT=2군에서 모두 식이 섭취량이 높게 나타났지만, 인삼의 PD:PT 비율에 따라서 복강내로 주사한 영향에 의해서 체중증가가 낮게 관찰되었다.(Table 2)

Crude saponin(200mg/kg)을 고지방 식이와 함께 3주간 복강내로 투여한 결과, 식이 섭취와 체중 증가가 감소되었으며[75], 당뇨병이 유도된 쥐에게 인삼 추출물(100mg/kg)을 구강으로 투여한 결과 체중 증가가 역시 감소되었다.[76-78] 또한 7% 인삼 추출물 식이를 주었을 때, 인삼 식이가 식

이섭취와 체지방 함량을 감소시켜주었고, 체지방함량은 증가시켜주었다고 보고하였다[79]. 이외에, 고지방식이와 함께 인삼 추출물을 농도별로 4주 동안 투여한 경우[80]와 3주간 3% 인삼 사포닌 추출물이 함유된 식이를 먹었을 때[81]에 식이효율과 체중증가량은 서로 비슷한 경향을 나타냈으며, 인삼 추출물이 고지방 식이로 인하여 야기되는 체중증가를 억제한다고 보고하였다. 이상의 결과들과 함께 PD:PT 비율별로 복강내로 투여한 것이 전체 실험기간 동안에 체중 증가를 억제 시킨다는 결과와 서로 일치하였지만, 식이섭취를 감소시킨다는 결과와는 일치하게 나타나지 않았다. 고지방식이와 함께 인삼 추출물을 준 결과 식이효율이 체중증가량과 함께 감소한다는 연구결과[80,81]와는 다르게 이번 실험에서는 식이효율이 체중증가량과 반대로 증가하였는데, 이는 PD:PT=1군과 PD:PT=2군에서의 식이섭취가 E(+ / +)군과 E(- / -)군에 비해서 유의적으로 높게 나타난 결과에 의하며, 이로 인해서 인삼의 PD:PT 비율별 투여가 식이섭취를 증가시켜도 체중증가량은 감소시켜 체중감소에 효과적이며, 그중에서도 PD:PT=1의 효과가 가장 좋다는 것을 알 수 있다.

Table 2. The mean of body weight gains, food intake and food efficiency in each group for 12 weeks in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

	E(+ /+)	E(-/-)	E(-/-)		p -value
			PD:PT=1	PD:PT=2	
BWG ¹⁾	-0.38±0.26	-0.35±0.08	-0.43±0.12	-0.41±0.14	0.715
FI	2.70±0.36 ^{2)a}	3.11±0.13 ^{a,b}	3.88±0.61 ^c	3.47±0.33 ^{b,c}	0.002
FE	-0.19±0.06 ^a	-0.17±0.06 ^a	-0.08±0.03 ^b	-0.12±0.03 ^{a,b}	0.029

¹⁾ BWG : Body weight gain (g/week)

FI : Food intake (g/week)

FE : Food efficiency (g/week) = Body weight / Food intake

²⁾ values are expressed mean±SD

a, b, c : differences in continuous variables between the groups were tested by ANOVA

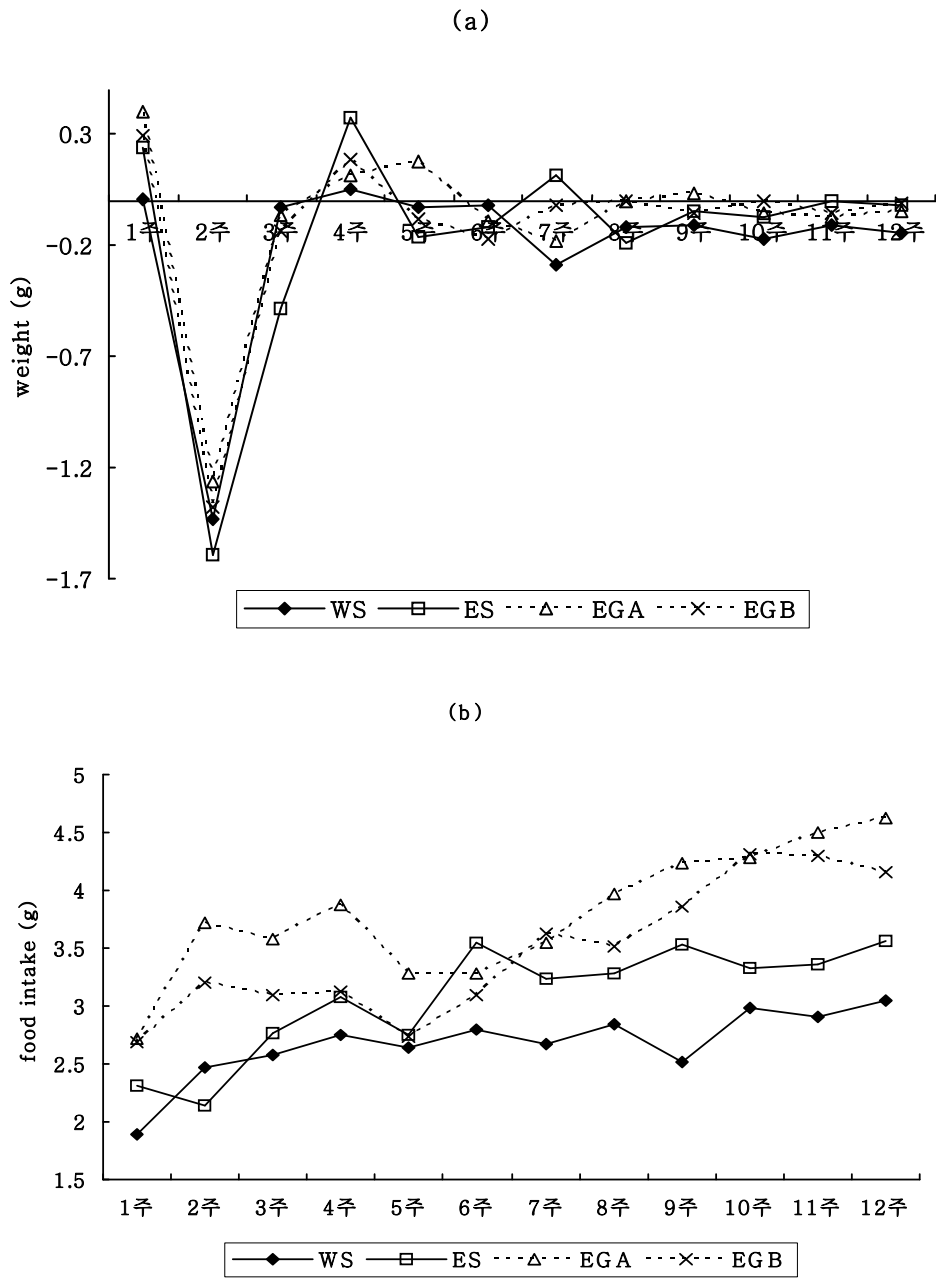


Fig. 6. Body weight (a), Food intake (b) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

2. 혈장과 간 조직에서의 간 기능 손상 정도

혈장과 간 조직에서의 간 기능 손상정도를 측정한 AST(GOT)와 ALT(GPT) 수치는 Table 3,4와 Fig. 7,8에 나타내었다.

혈장에서의 간 기능 손상정도를 살펴보면, E(-/-)군은 E(+ /+)군에 비하여 AST와 ALT 수치가 각각 240%, 233%로 유의적으로 증가하였다.(Table 3, Fig. 7) PD:PT=1군은 E(+ /+)군에 비하여 AST와 ALT 수치가 각각 197%, 206%로 유의적으로 증가하였고, PD:PT=2군은 각각 229%와 226%로 유의적인 증가를 나타냈지만, 두 실험군간에는 유의적인 차이를 나타나지 않았다. 하지만, PD:PT=1군과 E(-/-)군의 AST와 ALT 수치를 비교해보면 각각 82%와 88%로 유의적인 감소를 나타냈으며, PD:PT=2군은 각각 95%와 96%로 감소하였는데 AST 수치는 유의적인 차이를 나타내지 않았지만, ALT 수치는 유의적인 감소를 보였다. 혈장에서의 간 손상 정도는 PD:PT=1군이 PD:PT=2군에 비하여 간 보호효과가 크게 나타난다는 것을 알 수 있었다. 간 조직에서의 간 기능 손상정도를 살펴보면, E(-/-)군은 E(+ /+)군에 비하여 AST와 ALT 수치가 각각 94%와 80% 감소하였다.(Table 4, Fig. 8) PD:PT=1군은 E(+ /+)군에 비하여 AST와 ALT 수치가 각각 112%, 100%로 AST 수치는 증가하였으나, ALT 수치는 E(+ /+)군과 비슷하게 나타났으며, PD:PT=2군은 각각 63%, 58%로 AST 수치는 유의적인 감소를 나타냈으나 ALT 수치는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 PD:PT=1군은 E(-/-)군에 비하여 AST와 ALT 수치가 각각 119%, 125.01%로 증가하였으며, PD:PT=2군은 각각 67%, 44%로 AST 수치는 유의적으로 감소한 반면에 ALT 수치는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 간 조직에서의 간 손상정도는 혈장에서와는 반대로, PD:PT=1군보다

PD:PT=2군이 유의적으로 간에 대한 보호효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

혈청 중 AST 및 ALT의 효소 활성의 상승은 간 독성으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 aminotrasferase가 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타낸다[82]. 인삼의 ginsenoside 성분 간세포의 단백질 합성과 간세포 재생을 촉진하는 작용이 있다고 밝혀졌다. 그 기전으로 확인된 것에 의하면, ginsenoside는 실험적으로 여러 가지 간 독성물질로 야기되는 간세포의 괴사 등 조직학적인 병변을 경감시키고, 간의 독성대사에 관여하는 효소(epoxide hydratase, glutathione transferase, epoxide hydeoxylase)를 활성화시켜 간장 장애를 개선, 예방하는 효과가 있다[82]. 사염화탄소로 간 손상을 일으킨 동물에게서 인삼의 간 보호효과가 우수한 것으로 밝혀졌으며, 인삼의 대표적인 성분인 ginsenoside Rb1, Rb2, Re, Rg1에서도 역시 간 보호효과가 있음[83]이 밝혀졌다는 결과는 PD계 ginsenoside가 간 보호효과에 효과적이라는 것을 알 수 있다는 것을 통해, 이번 실험에서 혈장에서는 PD:PT=1이, 간 조직에서는 PD:PT=2가 간 보호에 효과적인 역할을 나타낸다는 사실과 일치한다. Benzo(a)pyrene[B(a)P]로 간 손상을 유도시킨 동물에게 인삼 분말을 복강내(50mg/kg, 100mg/kg)로 투여한 결과, 혈청내 AST와 ALT 수치가 유의적으로 감소[84]를 보였으며, 이는 사염화탄소를 투여하여 유발된 간독성에 대해 홍삼추출물을 50mg/kg~100mg/kg 농도로 투여하였을 때 AST 및 ALT의 활성이 감소되었다는 보고[85]와 유사한 경향으로, 이번 연구결과와 일치한다. 인삼분말을 투여함으로써 AST와 ALT 활성이 감소하므로, 인삼분말은 aminotrasferase의 활성을 감소시켜 B(a)P에 의한 간 손상에 대한 보호효과가 있음을 암시[84]해 주는 것으로 인해서, 인삼의 PD:PT 비율조절에

따른 복강내 투여 역시 이와 같은 기전으로 간 보호효과를 나타낼 것이라고 여겨진다. Hasegawa et al[86]와 Bae et al[87]에 의하면 PD계 ginsenoside인 Rb1, Rb2, Rc, Rd가 체내에서 장내세균에 의해서 대사되어 compound K를 형성한다고 하였다. 구강으로 Rb1과 compound K를 투여한 결과 간 보호효과가 나타났지만, 이들 물질을 복강으로 투여하였을 때 Rb1의 경우 간 보호효과가 나타나지 않았지만, compound K의 경우에는 간 보호효과[88]가 나타났다는 연구결과와는 일치하지 않았다. 이번 연구에서는 인삼의 PD:PT 비율 조절에 따라서 복강내로 투여하였을 때 간 보호효과가 나타남에 따라서 PD와 PT간의 상호작용이 간 보호효과를 매개할 수 있다는 것을 생각할 수 있다. 또한 compound K의 보호효과는 silybin, DDB, commercial agent보다 더 크게 나타났다[89-91]고 보고되었으며, 이러한 결과들을 미루어 볼 때, 인삼의 PD:PT 비율조절에 따른 투여 역시 간 손상에 대한 보호효과가 매우 크게 나타난다고 생각할 수 있다.

이번 연구결과에서는 고콜레스테롤 식이에 의해 유도된 간 기능 손상에 대해서, 인삼의 PD:PT 비율조절에 따라 복강으로 주사하였을 때, 혈장에서는 PD:PT=1이 AST와 ALT 수치를 모두 유의적으로 감소시켜서 PD:PT=2보다 간 기능 손상에 매우 효과적으로 나타났다. 하지만 간 조직에는 PD:PT=2가 AST 수치를 유의적으로 감소시켜주어서 혈장에서와는 반대로 간 기능 회복에 효과적임이 나타났다. 이러한 결과를 통해서 인삼의 PD:PT 비율조절에 따른 복강내 투여가 그 기전에 대해서는 정확하게 알 수 없지만, 조직에 따라서 다르게 나타난다고 할 수 있다.

Table 3. Effect of PD:PT ratio on the activities of plasma alanine and aspartate aminotransferase in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

	E(+ / +)	E(- / -)	E(- / -)		p -value
			PD:PT=1	PD:PT=2	
AST ²⁾	18.64±1.48 ^{1)a}	44.77±6.35 ^c	36.82±2.73 ^b	42.80±9.71 ^{b,c}	0.000
ALT	17.70±0.78 ^a	41.32±5.95 ^b	36.53±0.54 ^b	40.06±5.44 ^b	0.000

1) values are expressed mean±SD

a, b, c : difference in continuous variables between the group were tested by ANOVA

2) AST : aspartate transaminase

ALT : alanine transaminase

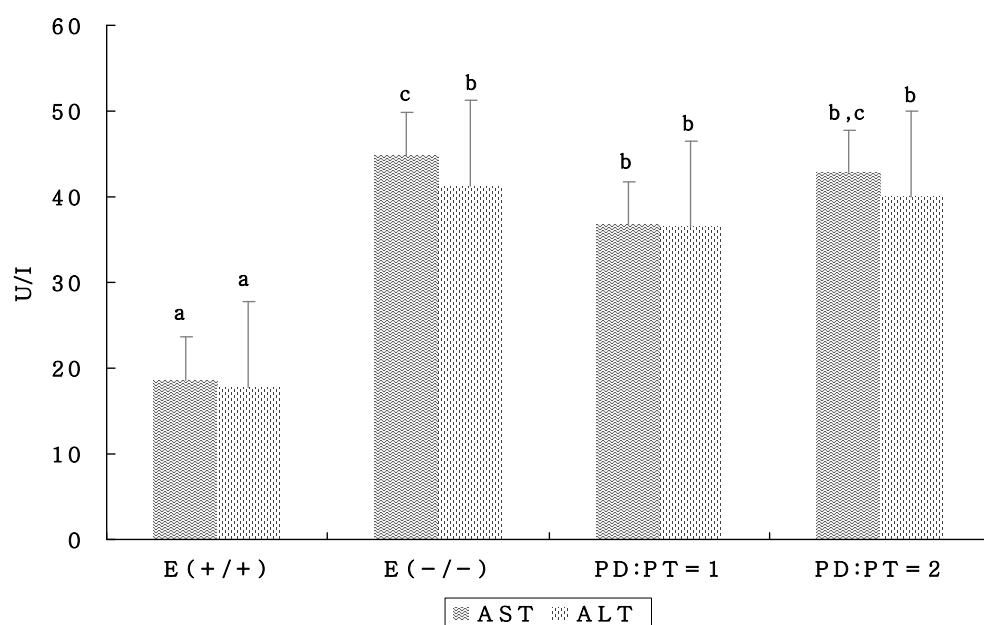


Fig. 7. The difference in plasma concentration of alanine and aspartate aminotransferase in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

Table 4. Effect of PD:PT ratio on the activities of plasma alanine and asparate aminotrasnferase in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

	E(+ / +)	E(- / -)	E(- / -)		p -value
			PD:PT=1	PD:PT=2	
AST ²⁾	1.95±0.63 ^{1)a,b}	1.84±0.49 ^{a,b}	2.20±0.69 ^b	1.23±0.36 ^a	0.142
ALT	2.55±0.97	2.04±0.39	2.55±0.91	1.48±0.45	0.194

1) values are expressed mean±SD

a, b, c : difference in continous variables between the group were tested by ANOVA

2) AST : asparate transminase

ALT : alanine transminase

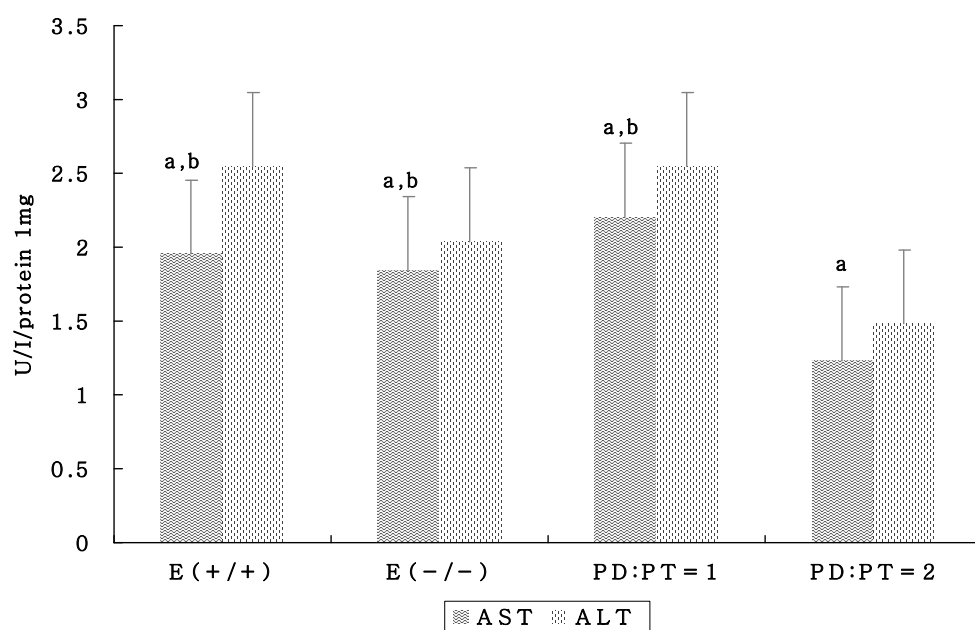


Fig. 8. The difference in plasma concentratin of alanine and asparate aminotrasnferase in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

3. 혈장과 심장, 간 조직의 지질 성상

혈장의 TG, TC와 HDL-C 측정 결과는 Table 4와 Fig. 9에 나타내었고, 심장과 간 조직에서의 TG와 TC 측정결과는 Table 5,6과 Fig. 10,11에 나타내었다.

혈장의 TG, TC와 HDL-C 함량을 살펴보면, E(-/-)군은 E(+ /+)군에 비하여 유의적으로 각각 599%, 498%, 228% 증가하였다. PD:PT=1군은 E(+ /+)군에 비하여 TG는 362%, TC는 365.38%, HDL-C 함량은 323%로 유의적인 증가를 보였으며, PD:PT=2군은 각각 377%, 477%, 315%로 유의적으로 증가하였다. 또한 PD:PT=1군은 E(-/-)에 비하여 TG는 60%, TC는 76%씩 유의적으로 감소하였으며, HDL-C 함량은 141%로 유의적인 증가를 보였다. PD:PT=2군의 경우에는 TG는 62%, TC 함량은 95%씩 유의적으로 감소하였으며, HDL-C 함량은 138%로 유의적으로 증가하였다.

심장 조직에서의 지질 수치를 살펴보면, 먼저 TG 함량은 E(-/-)군은 E(+ /+)군에 비하여 217%, TC 함량은 350%로 각각 유의적인 증가를 보였다. PD:PT=1군은 E(+ /+)군에 비하여 TG는 134%, TC 함량은 195%로 유의적으로 증가하였으며, E(-/-)군에 비해서는 각각 61%, 55%로 유의적인 감소를 보였다. PD:PT=2군은 E(+ /+)군에 비하여 TG는 133%, TC 함량은 22.%로 유의적으로 증가하였고, E(-/-)군에 비해서는 각각 61%, 63%로 유의적으로 감소하였다.

마지막으로, 간 조직에서는 E(-/-)군은 E(+ /+)군에 비하여 TG는 99%, TC 함량은 69%로 감소하였다. PD:PT=1군은 E(+ /+)군에 비하여 TG는 76%, TC 함량은 63%로 감소하였으며, PD:PT=2군은 각각 69%, TC 함량은 61%로 감소하였다. 또한 E(-/-)군과 비교해보면, PD:PT=1군은 TG는

77%, TC 함량은 92% 감소하였으며, PD:PT=2군은 각각 70%, 89%씩 감소하였으며, 간 조직에서 TC 함량 간에는 서로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과를 통해서, 혈장에서는 PD:PT=1이 지질수치 개선에 매우 효과적으로 나타났지만, 간 조직에서는 PD:PT=2가 더 효과적인 영향을 주었으며 심장 조직에서는 PD:PT=1과 PD:PT=2가 서로 비슷한 영향을 주었다. 이를 통해서 인삼의 PD:PT 비율에 따라서 작용하는 기관에서 서로 나타내는 영향이 서로 다를 수 있다.

고려인삼은 혈관 확장작용을 가지고 있어 혈류 순환을 개선시키는 등 동맥경화증의 발생 억제와 혈관 내피세포의 손상을 방어해 주는 효과가 있음이 알려져 있다[92,93]. 즉 인삼 사포닌은 지방, 혈중 콜레스테롤의 지질대사와 관련된 효소활성을 촉진하고 대동맥 조직에서 고지혈증으로 야기되는 죽상 형성을 예방하는 작용이 있고[94], 콜레스테롤의 전환(cholesterol turnover)을 촉진함으로써 동맥경화의 중요한 위험인자인 고지혈증을 개선하는 효과가 있다[95]. 동맥경화증 환자들은 대개 지단백질 농도에 이상이 있다. 이들은 TC, TG, LDL-C 함량을 줄이며 동시에 HDL-C 함량을 증가시키는 것이 동맥경화증 치료에 매우 효과적이다[96]. 동맥경화 식사 시 혈중 TG 농도가 증가되는데, 이는 HDL-C 농도 감소와 sLDL과 LDL-C 증가에 의한 것이다[97]. 그러나 Roche et al[98]에 의하면, 인삼 투여 후 중성지방과 sLDL, LDL 농도가 감소한다는 결과와 일치하는데, 인삼의 이러한 hypoglycemic effect는 endogenous TG-rich lipoprotein(TRL) 합성 저하와 함께 TRL 제거가 증가되었기 때문임을 알 수 있다. Yamamoto et al[99]과 Yokozawa et al[100]에 의하면 콜레스테롤 식이를 한 흰쥐에게서 ginsenoside Rb2가 가장 유의적으로 HDL-C 증가와 함께 LDL-C 및 TG 감소에 매우 효과적이며 이로 인해서, 고지혈증 개선작용에 매우 뛰어

나 고콜레스테롤 혈증으로 인해 야기되는 동맥경화를 개선시킨다고 한 것을 통해서, 간 조직에서 PD:PT=2가 매우 효과적으로 지질 수치를 개선시킨 사실을 설명할 수 있다. S.C. Joshi[101]에 의하면, 인삼 분말을 콜레스테롤 식이를 제공한 토끼에게 투여한 결과 간, 심장 조직과 대동맥에서의 혈중 지질 수치가 유의하게 개선이 되었으며, 대변내로의 콜레스테롤 분비량도 유의적인 증가를 보임과 함께, 콜레스테롤 섭취 후 HDL-C이 유의하게 감소하였으나 인삼 투여 후에 유의하게 증가되었다는 결과와 서로 일치함을 통해서, PD계 ginsenoside와 PT계 ginsenoside에 의해서 콜레스테롤 pool이 감소되어 핵 전사 요소 활성화에 의해 LDL 수용체 발현이 증가되면서, 동맥경화성 지단백질 제거가 증가되어 혈중에서 이들 농도를 감소시키거나[102], 장내 콜레스테롤 재흡수 억제와 대변으로 콜레스테롤 배설을 증가[103]시키는 것을 통해서 지질 대사를 개선시킨다는 것을 알 수 있다. 또한 주 등[104,105]도 인삼사포닌이 고콜레스테롤 혈증 억제효과가 있음을 보고하였으며, 그 작용기전으로 담즙산으로의 콜레스테롤 대사를 촉진시킴으로서, 이로 인해 세포내 콜레스테롤 농도가 감소함에 따라, LDL-C 수용체 합성이 촉진된 결과라고 주장하였다. William J et al[79]에 의하면, 비만한 쥐에게 7% 인삼 추출물이 함유된 식이를 제공하였을 때 중성지방 수치는 감소하지 않았지만 콜레스테롤 농도는 감소하였다고 보고하였는데, 이번 연구결과에서는 TG과 함께 콜레스테롤 농도도 함께 감소한 것을 통해서 인삼 추출물 함유된 PD:PT 비율조절이 지질대사 조절에 중요하다는 것을 알 수 있으며, 이러한 중성지방 감소는 혈중 LPL 활성화증가에 의한 것임을 생각해 볼 수 있다.

Table 5. Effect of PD:PT ratio on the plasma lipid level in apo E KO mice fed high cholesterol diet

	E(+ / +)	E(- / -)	E(- / -)		p-value
			PD:PT=1	PD:PT=2	
TG ²⁾	223.21 ±63.02 ^{1)a}	1337.50 ±249.66 ^c	809.5 ±43.38 ^b	841.87 ±65.80 ^b	0.000
TC	76.38 ±22.11 ^a	380.43 ±65.68 ^c	279.10 ±31.34 ^b	364.60 ±41.38 ^c	0.000
HDL-C	33.80 ±15.80 ^a	77.22 ±5.35 ^b	109.33 ±10.58 ^c	106.66 ±7.07 ^c	0.000

1) values are expressed mean±SD

a, b, c : difference in continuous variables between the group were tested by ANOVA

2) TG : triglyceride

TC : total cholesterol

HDL : high density lipoprotein cholesterol

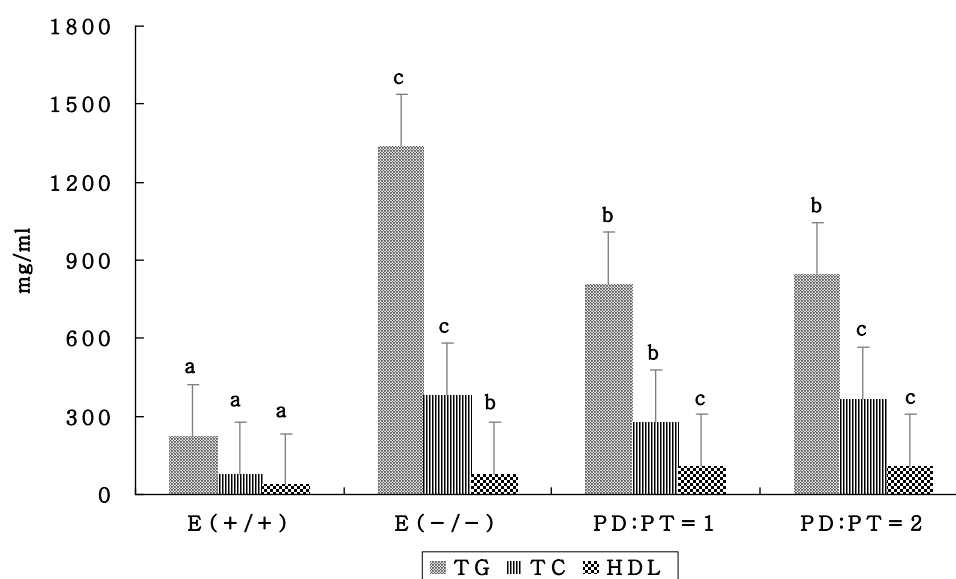


Fig. 9. The difference in plasma concentration of TG, TC and HDL-C in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

Table 6. Effect of PD:PT ratio on the liver lipid level in apo E KO mice fed high cholesterol diet

	E(+ /+)	E(-/-)	E(-/-)		p -value
			PD:PT=1	PD:PT=2	
TG ²⁾	39.89±9.00 ^{1)b}	39.53±5.37 ^b	30.49±5.51 ^{a,b}	27.78±5.48 ^b	0.030
TC	29.59±11.19	20.46±2.15	18.93±5.09	18.29±4.10	0.083

1) values are expressed mean±SD

a, b, c : difference in continuous variables between the group were tested by ANOVA

2) TG : triglyceride

TC : total cholesterol

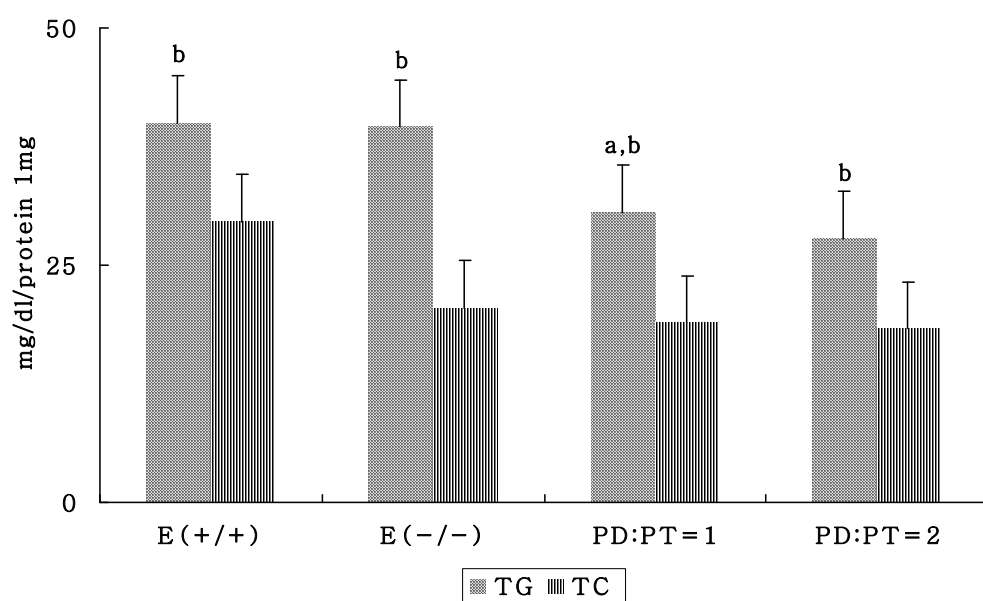


Fig. 10. The difference in liver concentration of TG and TC in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

Table 7. Effect of PD:PT ratio on the heart lipid level in apo E KO mice fed high cholesterol diet

	E(+ / +)	E(- / -)	E(- / -)		p -value
			PD:PT=1	PD:PT=2	
TG ²⁾	9.60±1.69 ^{1)a}	20.90±7.01 ^b	12.93±3.01 ^a	12.77±1.16 ^a	0.005
TC	2.56±0.73 ^a	8.97±2.82 ^c	5.02±1.23 ^b	5.73±1.08 ^b	0.001

1) values are expressed mean±SD

a, b, c : difference in continuous variables between the group were tested by ANOVA

2) TG : triglyceride

TC : total cholesterol

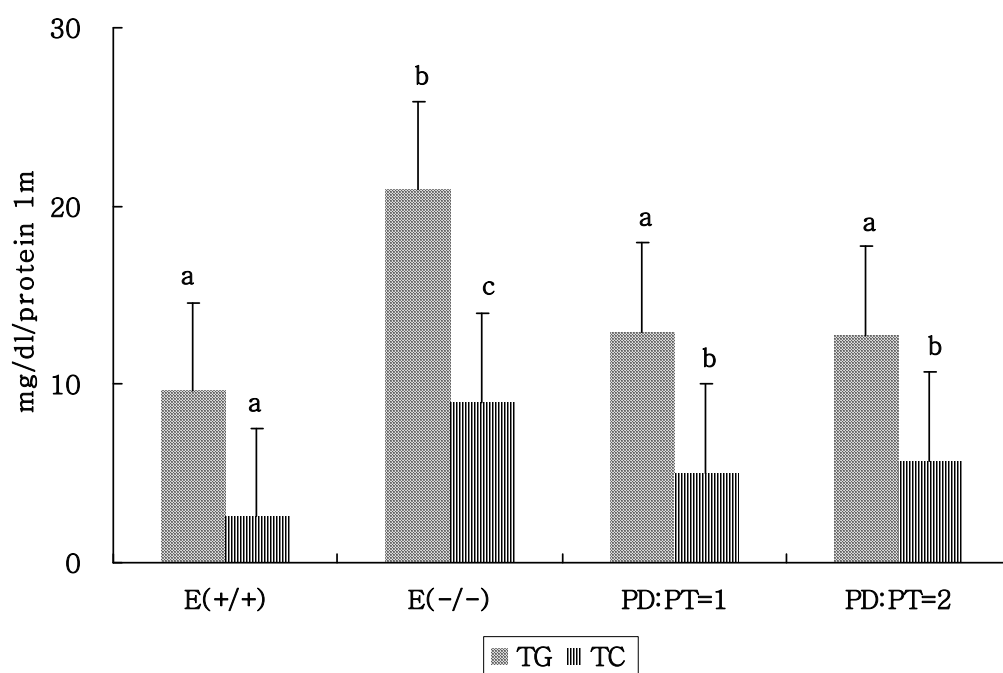


Fig. 11. The difference in heart concentration of TG and TC in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

4. 혈장과 심장, 간 조직에서의 LPO(4-HNE/MDA) 생성

인삼의 비율조절에 따른 지질 과산화물의 생성은 Table 8~11과 Fig. 12~14에 나타내었다.

혈장에서 LPO 생성은 E(-/-)군이 E(+ /+)군과 비교하여 372%로 유의적으로 증가하였고, PD:PT=1군은 312%가 PD:PT=2군은 327%로 각각 유의적인 증가를 나타내었다. 지질 과산화물 형태 중 하나인 MDA 생성량은 E(-/-)군이 E(+ /+)군에 비하여 443%로 유의적으로 증가하였으며, PD:PT=1군과 PD:PT=2군은 각각 382%, 354%로 유의적으로 증가하였다. 혈장에서의 4-HNE 함량은 E(-/-)군은 E(+ /+)군에 비하여 302%로 유의적인 증가를 나타냈으며, PD:PT=1군과 PD:PT=2군 역시 각각 242%, 300%로 유의적인 증가를 보였다. 혈장에서의 E(-/-)군과 인삼의 PD:PT 비율조절에 따른 각 실험군 간의 지질 과산화물 생성을 살펴보면, LPO의 경우 PD:PT=1군의 경우 83%로 유의적으로 감소하였지만, PD:PT=2군의 경우 통계적 유의성을 보이지 않았다. MDA는 PD:PT=1군과 PD:PT=2군에서 모두 각각 86%와 80%로 유의적인 감소를 보였으며, 4-HNE 경우에는 두 실험군에서 모두 유의적인 감소를 보이지 않았다.

간 조직에서 LPO 생성은 E(-/-)군이 E(+ /+)군에 비하여 132%로 증가하였고, PD:PT=1군은 91%로 감소하였으나 모두 통계적 유의성을 보이지 않았고, PD:PT=2군은 130%로 E(+ /+)군에 비하여 유의적인 증가를 나타냈다. MDA 함량을 살펴보면, E(-/-)군은 E(+ /+)군에 비하여 유의적이지는 않지만 97.40%로 감소하였고, PD:PT=1군과 PD:PT=2군에서 모두 E(+ /+)군에 비하여 증가하였는데, PD:PT=2군에서 119%로 유의적인 증가를 보였다. 4-HNE 함량 역시 MDA 함량과 동일한 경향을 보였으며, PD:PT=2군

이 E(+ /+)군에 비하여 146%로 유의적인 증가를 나타냈다. 간 조직에서의 인삼의 PD:PT 비율조절에 따른 효과를 E(-/-)군과 비교해보면, 먼저 LPO 함량은 PD:PT=1군은 59%로 유의적으로 감소한 반면에 PD:PT=2군은 102%로 증가하였다. MDA의 경우 오히려 E(-/-)군보다 증가하는 경향을 보였는데, PD:PT=1군의 경우 유의적인 차이를 보이지 않았지만, PD:PT=2군에서는 126%로 유의적인 증가를 보였다. 4-HNE 함량은 PD:PT=1군이 23%로 유의적으로 감소된 반면에 PD:PT=2군은 통계적 유의성을 나타내지 않았다.

마지막으로 심장 조직에서의 지질과산화물 함량을 살펴보면, 먼저 LPO 함량은 E(-/-)군이 E(+ /+)군에 비하여 114%로 증가하였지만 통계적 유의성을 보이지 않았고, PD:PT=2군은 61%로 감소하여 유의적인 차이를 보였으나 PD:PT=1군은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. MDA 함량은 E(-/-)군이 E(+ /+)군에 비하여 106%, PD:PT=1은 116%로 증가하였으나 두 군 모두 유의적인 차이를 보이지 않았으며, PD:PT=2군에서는 유의적인 차이를 나타내며 68% 감소하였다. 4-HNE 농도는 E(-/-)군이 E(+ /+)에 비하여 117%로 증가하였고, PD:PT=1군은 91%로 감소하였지만 모두 통계적 유의성을 보이지 않았지만 PD:PT=2군은 59%로 감소함과 함께 통계적인 유의성을 나타냈다. 인삼의 PD:PT 비율조절에 따른 투여를 E(-/-)군과 비교해보면, LPO, MDA와 4-HNE 함량이 PD:PT=2군에서 각각 53%, 63%, 50%로 모두 유의적으로 감소되는 것이 확인되었다. 따라서 이상의 실험결과를 종합해보면, 혈장에서는 PD:PT=1과 PD:PT=2가 서로 비슷하게 지질과산화물 감소에 영향을 주었지만, PD:PT=1이 좀 더 효과적이었다. 간 조직에서는 PD:PT=1이 훨씬 더 큰 산화적 손상에 대한 보호효과를 나타낸 반면에 심장 조직에서는 이와 반대로 PD:PT=2가 매우 효과적으로 나타나,

작용하는 조직에 따라서 인삼의 PD:PT 비율별 투여가 다르게 작용한다는 것을 알 수 있었다.

산화 스트레스는 세포막의 불포화 지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질과산화 유발을 촉진하고, 지질과산화의 최종 산물인 MDA의 함량이 증가되어 세포에 산화적 손상이 생리적 기능을 저하시키므로 간 질환 등의 여러 가지 질병을 초래하여 결국 노화와 유전적 장애의 원인이 된다[106,107]. 이러한 환경에 노출된 생명체는 활성 산소종에 의한 조직 손상으로부터 스스로 보호하기 위한 방어체계를 가지고 있다. Fridovich et al[108]은 지질과산화는 활성산소 라디칼 매개체가 세포 자체의 국소적인 방어 기전을 초과함으로써 발생하는 세포손상의 주된 형태로서, $\cdot O_2^-$, H_2O_2 , $\cdot OH$ 등이 지질과산화를 유발시키는 것으로 보고하였다. 콜레스테롤 식이를 섭취한 토끼에게 인삼 분말을 농도별로 투여한 결과 지질 과산화물 생성이 감소하였으며[101], 고지혈증 상태의 동맥경화증은 MDA(LPO), TBARs 농도 증가와 관계가 있다는 보고와 함께[109-111] 정 등은[112]에 의한 인삼 투여 후 TBARs 수치 감소와도 서로 일치하는 실험결과를 보였다. S. C. Joshi[101]에 의하면, 인삼 투여 후 간 조직과 대동맥에서 H_2O_2 와 OH^- 와 같은 산화적 손상으로부터 세포를 보호해주는 catalase가 유의적으로 증가되었는데, 이는 인삼이 LPO를 감소시켜주어서 유리 라디칼을 제거시킨다는 것을 알 수 있음을 통해서, 이를 통해서 이번 실험에서도 인삼의 PD:PT 비율에 따른 투여가 항산화 효소 활성을 증가시켜 지질과산화물 생성을 억제시켰음을 알 수 있다. 김 등[113]에 의하면, 고지방식을 먹인 생쥐에게 백삼 추출물을 농도별로 투여한 결과 지질과산화물 함량이 유의성 있는 감소를 보인 것과 동일한 결과를 나타낸 것을 통해서, 산화적 스트레스 세포 손상에 대한 항산화 활성과 관련이 있다는 사실을 알 수 있다. 김 등[114]과

Yokozawa T et al[115]가 산화적 스트레스로부터 ginsenoside Rd를 투여 하였을 때, SOD 및 CAT 활성을 증가시키고 MDA 함량을 감소시킨다고 보고하였다. 특히 40주령의 생쥐에게 PD계 사포닌과 ginsenoside Rd를 투여한 결과 SOD 활성이 증가한 반면, MDA를 가장 큰 수준으로 감소시켰는데, 이번 연구에서는 PD:PT=2가 심장조직에서만 효과적으로 나타나 PD계 사포닌과 PT계 사포닌내의 ginsenoside의 상호작용에 의해서 항산화효소 활성화와 항산화물질 생성에 대한 감수성을 변화시킬 것으로 생각된다.

Table 8. Effects of PD:PT ratio on plasma lipid peroxidation in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

	E(+ /+)	E(- /-)	E(-/-)		p -value
			PD:PT=1	PD:PT=2	
LPO ²⁾	321.04 ±39.51 ^{1)a}	1197.32 ±134.28 ^c	1003.30 ±97.65 ^b	1051.53 ±224.78 ^{b,c}	0.000
MDA	160.65 ±27.79 ^a	711.85 ±53.18 ^c	614.86 ±45.49 ^b	569.82 ±89.02 ^b	0.000
4-HNE	160.38 ±24.89 ^a	485.46 ±90.98 ^b	388.44 ±63.28 ^b	481.71 ±192.61 ^b	0.000

1) values are expressed mean±SD

a, b, c : difference in continuous variables between the group were tested by ANOVA

2) TG : triglyceride

TC : total cholesterol

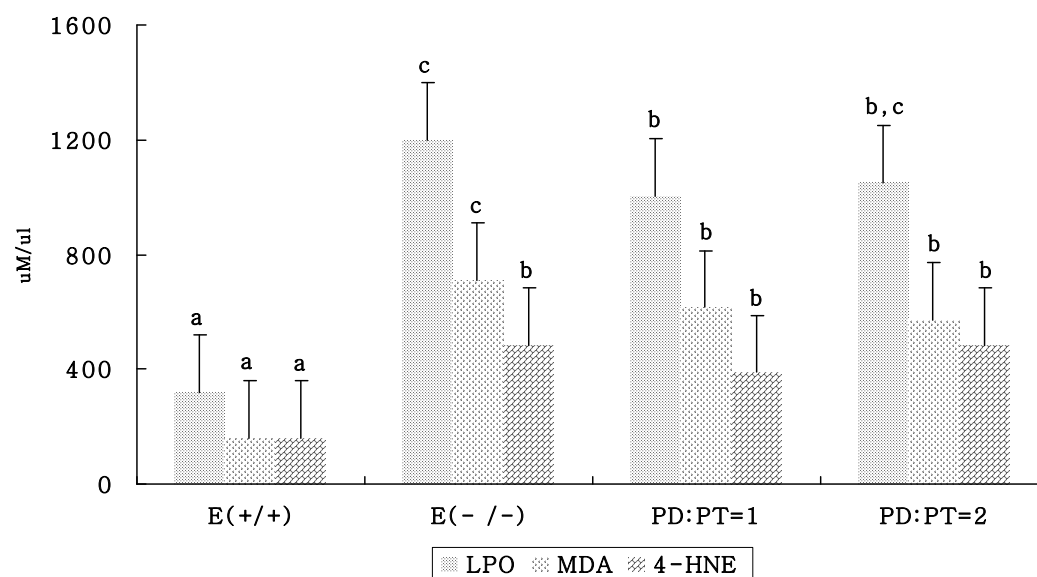


Fig. 12. The changes in plasma lipid peroxidation product in apo E KO mice fed high-cholesterol diet with treated differential PD:PT ratio

Table 9. Effects of PD:PT ratio on hepatic lipid peroxidation in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

	E(+ /+)	E(-/-)	E(-/-)		p -value
			PD:PT=1	PD:PT=2	
LPO ²⁾	1.28±0.32 ^{1)a,b}	1.69±0.36 ^{b,c}	1.00±0.07 ^a	1.73±0.37 ^c	0.008
MDA	0.77±0.03 ^a	0.75±0.02 ^a	0.78±0.03 ^a	0.95±0.10 ^b	0.000
4-HNE	0.50±0.32 ^{a,b}	0.93±0.38 ^b	0.22±0.06 ^a	0.77±0.42 ^b	0.027

1) values are expressed mean±SD

a, b, c : difference in continuous variables between the group were tested by ANOVA

2) TG : triglyceride

TC : total cholesterol

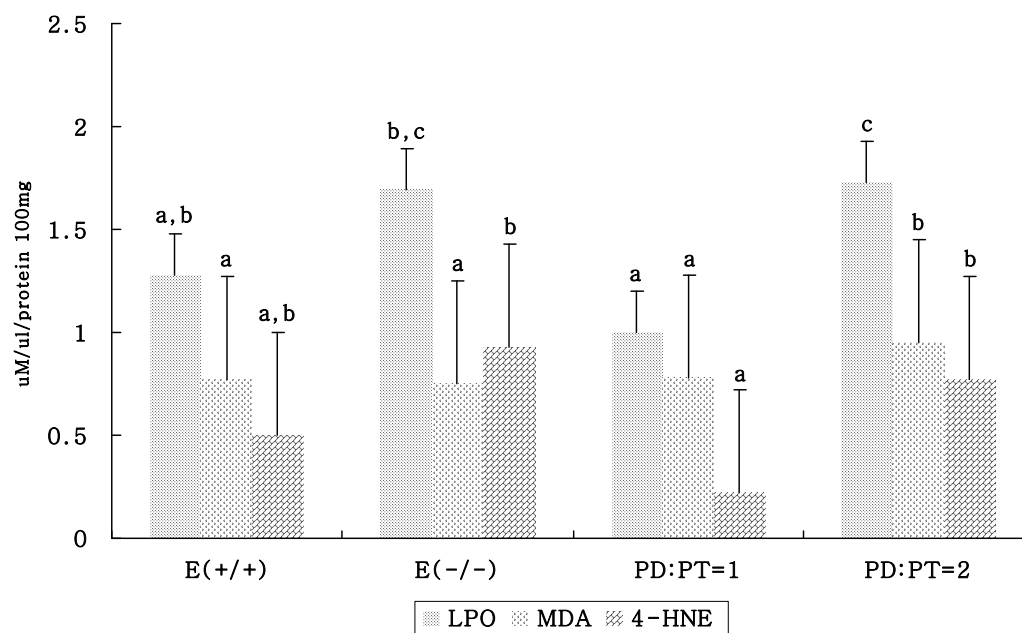


Fig. 13. The changes in hepatic lipid peroxidation product in apo E KO mice fed high-cholesterol diet with treated differential PD:PT ratio

Table 10. Effects of PD:PT ratio on heart lipid peroxidation in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

	E(+ /+)	E(-/-)	E(-/-)		p -value
			PD:PT=1	PD:PT=2	
LPO ²⁾	900.97 ±178.21 ^{1)b}	1035.12 ±267.56 ^b	884.23 ±59.12 ^b	558.47 ±104.31 ^a	0.016
MDA	234.68 ±61.69 ^{a,b}	249.91 ±48.50 ^b	272.45 ±53.35 ^b	159.63 ±34.43 ^a	0.062
4-HNE	666.28 ±142.29 ^b	785.20 ±220.13 ^b	611.77 ±91.99 ^{a,b}	398.83 ±78.28 ^a	0.021

1) values are expressed mean±SD

a, b, c : difference in continuous variables between the group were tested by ANOVA

2) TG : triglyceride

TC : total cholesterol

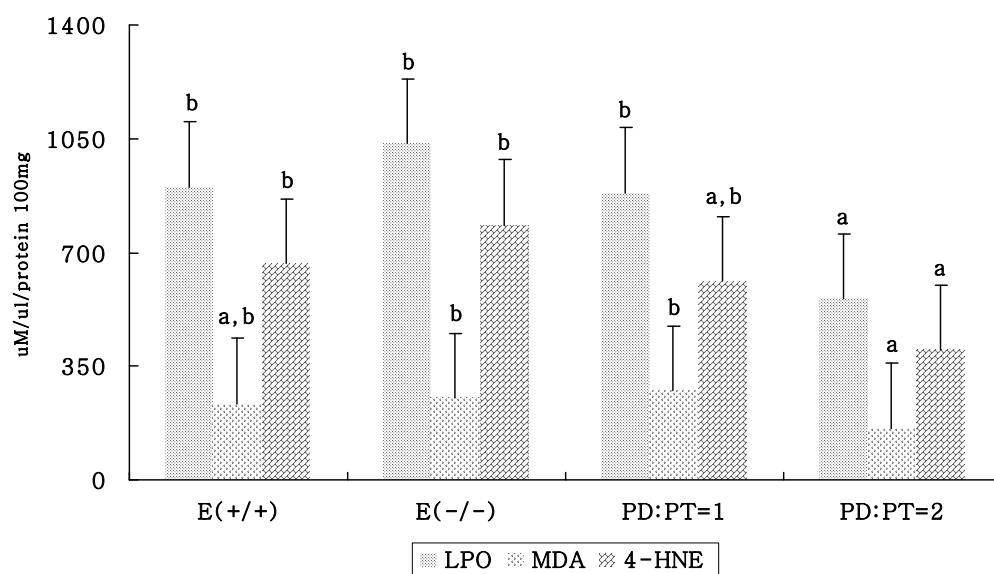


Fig. 14. The changes in heart lipid peroxidation product in apo E KO mice fed high-cholesterol diet with treated differential PD:PT ratio

5. PD:PT 인삼 사포닌 비율 조절에 의한 아디포넥틴 분비와 인슐린 저항성 개선효과

1) 혈장과 부고환 지방에서의 아디포넥틴 농도

인삼의 비율조절에 따른 혈장과 부고환 지방에서의 아디포넥틴 분비는 지질 과산화물의 생성은 Table 11,12과 Fig. 15,16에 나타내었다.

혈장에서의 아디포넥틴 분비를 살펴보면(Table 12, Fig. 15), E(-/-)군은 E(+ /+)군에 비하여 86.76% 감소하였고, PD:PT=1군과 PD:PT=2군도 E(+ /+)군에 비하여 감소하였는데, 특히 PD:PT=2군에게서 64%로 유의적으로 감소하였다. 인삼의 PD:PT 비율별에 따른 투여정도를 E(-/-)군과 비교하여도 각 실험군에서 모두 감소하였는데, 역시 PD:PT=2군에서 74%로 유의적인 감소를 보였다. 부고환 지방에서 분비되는 아디포넥틴 정도를 확인해보면(Table 13, Fig. 16), 먼저 E(-/-)군은 E(+ /+)군에 비하여 59.74%로 유의적인 감소를 보였고, PD:PT=1군은 191%로 유의적으로 증가한 반면에, PD:PT=2군은 유의적인 증가를 보이지는 않았다. 다음으로 PD:PT=1군과 PD:PT=2군에서의 아디포넥틴 분비를 E(-/-)군과 비교해보면, 두 실험군 모두 각각 320%와 153%로 유의적인 증가를 보였는데 특히 PD:PT=1에서 지방조직에서 아디포넥틴 분비를 매우 향상시킨다는 것을 알 수 있었다. 하지만, 인삼의 PD:PT 비율별에 따른 투여가 지방조직에서 아디포넥틴 분비를 향상시켰지만 혈장에서의 농도를 살펴보면 그 농도가 증가되지 않았는데, 이는 지방조직에서 분비된 아디포넥틴이 각 기관으로 이동하면서 다른 외적인 요인에 의해 그 농도가 증가되지 않았을 것이라고 생각된다.

Table 11. Effect of PD:PT ratio on plasma adiponectin concentration in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

	E(+ /+)	E(-/-)	E(-/-)		p -value
			PD:PT=1	PD:PT=2	
Plasma Adiponectin	0.68±0.06 ^{1)b}	0.59±0.06 ^b	0.56±0.15 ^{a,b}	0.43±0.02 ^a	0.006

1) values are expressed mean±SD

^{a, b, c} : difference in continuous variables between the group were tested by ANOVA

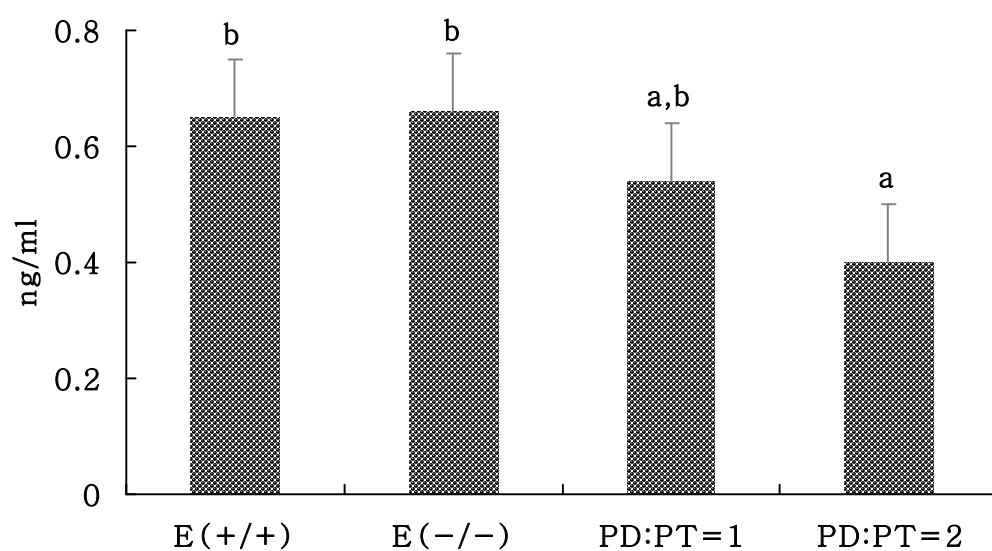


Fig. 15. Plasma adiponectin concentration difference PD:PT ratio in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

Table 12. Effect of PD:PT ratio on fat adiponectin concentration in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

	E(+ /+)	E(-/-)	E(-/-)		p-value
			PD:PT=1	PD:PT=2	
Fat	322.63	192.75	617.36	295.48	0.000
Adiponectin	±19.91 ^{1)b}	±3.80 ^a	±49.37 ^c	±25.47 ^b	

1) values are expressed mean±SD

a, b, c : difference in continuous variables between the group were tested by ANOVA

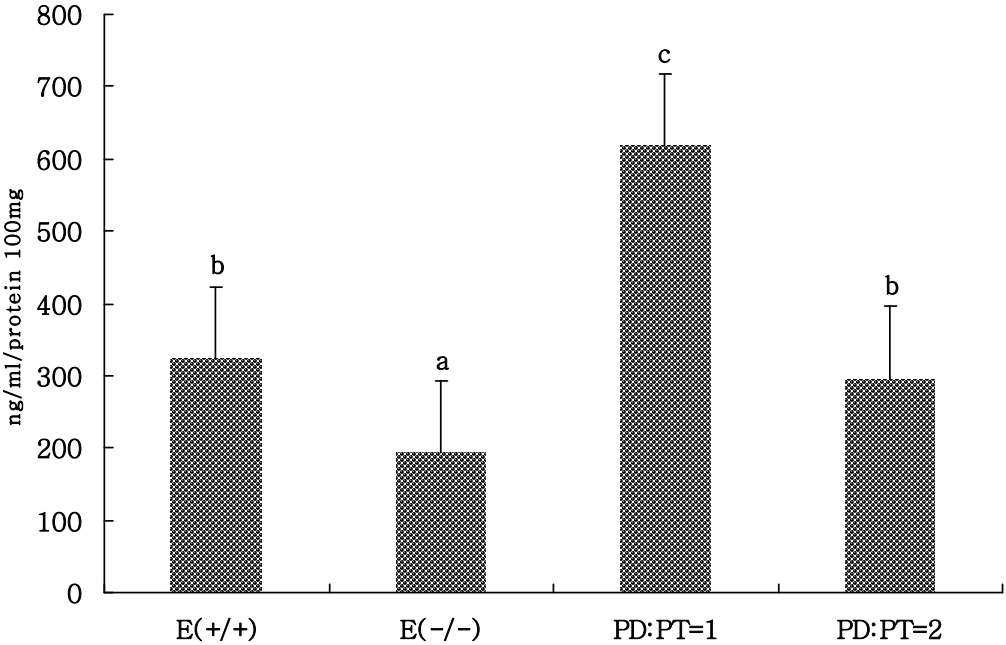


Fig. 16. Fat adiponectin concentration difference PD:PT ratio in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

2) 인슐린 저항성 개선 효과

혈장에서 Insulin Receptor β 와 Phospho-IRS-1(ser612)를 western 분석 방법을 사용하여 살펴보았다.(Fig. 17,18) Insulin Receptor β 의 경우 각 실험군을 E(+ / +)군과 비교하였을 때, E(- / -)군은 발현이 77% 감소하였으며, PD:PT=1군과 PD:PT=2군은 각각 280%, 182%로 발현이 증가하였다. E(- / -)군과 PD:PT=1군과 PD:PT=2군을 각각 비교하면, 365%, 237%로 모두 Insulin Receptor β 발현이 증가하였으며, 특히 PD:PT=1군이 더욱 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 다음으로 Phospho-IRS-1(ser612)를 살펴보면, E(- / -)군은 E(+ / +)군에 비하여 137%로 발현이 증가하였고, PD:PT=1군과 PD:PT=2군은 각각 86%배, 95%로 발현이 감소하였다. PD:PT=1군과 PD:PT=2군을 E(- / -)군과 비교해보면, 각각 63%배, 70%로 모두 감소하였으며 Insulin Receptor β 와는 다르게 두 군이 비슷하게 Phospho-IRS-1(ser612) 발현을 억제시켜주는 것을 알 수 있었다.

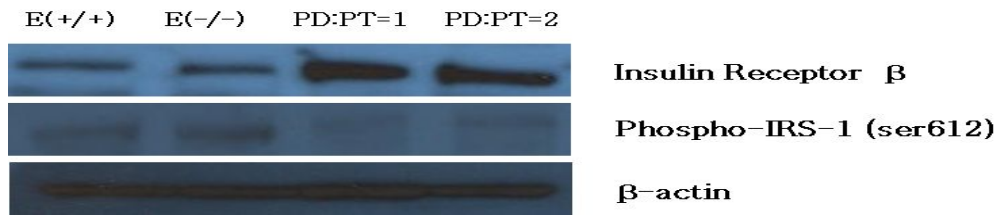


Fig. 17. Western blotting of the expression of Insulin Receptor β (a) and Phospho-IRS-1(ser612) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

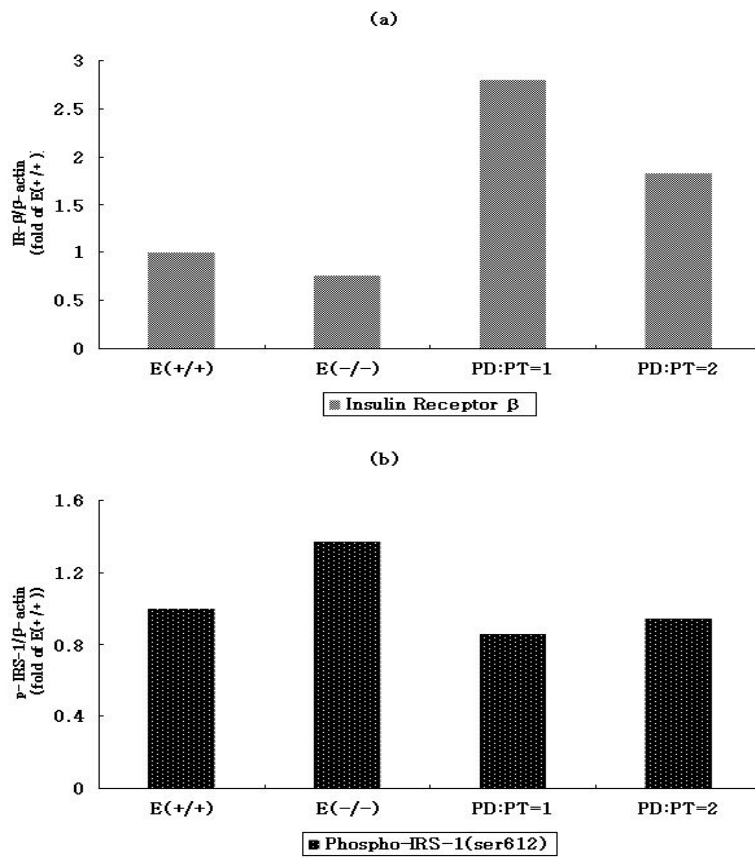


Fig. 18. Effect of PD:PT ratio on the regulation Insulin Receptor β (a) and Phospho-IRS-1(ser612) (b) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

지방조직은 아디포카인이라는 여러 호르몬 유사물질을 분비하는데, 이들 아디포카인은 체내 상태에 따라서 그 발현이 민감하게 조절되며 중추신경계와 주변 기관에 직접 혹은 간접적으로 작용하여 인슐린 민감도, 지방산 산화와 당 대사, 식욕조절이나 염증반응 매개 작용 등을 수행한다[116]. 최근에는 비만과 함께 이상지혈증, 고혈압, 고혈당 및 고인슐린혈증과 같은 일련의 징후가 동시에 수반되는 대사증후군에서 아디포카인의 역할 및 질병 유발 기전에 관한 연구가 주목 받고 있다[116,117]. 아디포넥틴은 지방세포의 분화과정에서 발현이 증가하는 단백질로 정상 쥐의 지방조직에서는 높게 발현되지만, 비만 혹은 당뇨 모델 쥐에서는 그 발현이 현저히 감소하여 비만과 음의 상관관계가 있다[118,119]. 이번 실험에서도 동맥경화 유도모델인 apo E KO mice에게 고콜레스테롤 식이를 주었을 때 E(-/-)군과 E(+/-)군의 지방조직에서 아디포넥틴 발현이 감소됨을 통해서 고콜레스테롤 식이에 의해 당뇨가 유도되었음을 유추해 볼 수 있다. 식사요인 중 콩단백질, 생선 기름, 리놀레산 등은 혈장 아디포넥틴 수준을 증가시킴으로써 당뇨 발생을 억제할 것으로 생각되는 반면[120-122], 탄수화물이 풍부한 식사나 산화 스트레스는 혈장 아디포넥틴 발현을 저해하는 것으로 여겨진다[123,124]. 고지방식을 섭취한 동물에게서 혈장 아디포넥틴이 감소하였고, 부족한 아디포넥틴을 보충해 주었을 때 고지방식에 의한 인슐린 저항성과 고지혈증이 개선되는 결과로부터, 고지방식에 의한 아디포넥틴 감소가 비만 관련 인슐린 저항성과 대사증후군의 원인이 됨을 유추할 수 있었다[125]. 아디포넥틴 농도가 급속하게 증가되면 간에서 당 신생효소의 발현 및 내생적인 당 생산이 모두 억제되어 일시적으로 당 수치를 감소시켜 인슐린 감수성을 증가시킨다고 제안하였다[126]. 아디포넥틴의 인슐린 저항성 극복 기전은 여러 실험결과를 통해서 설명되어졌다. 아디포넥틴은 골격근에서 인슐

린에 의한 인슐린 수용체 티로신 인산화를 증가시키는 것으로 알려졌다. 골격근과 간의 세포 에너지 대사와 포도당과 지방 대사에 중요한 역할을 하는 AMP activated protein kinase(AMPK)를 활성화시켜 지방산 산화를 증가시키고, 이로 인해 근육과 간에서 중성지방의 침착을 줄여 지방 독성을 감소시켜준다. 아디포넥틴은 골격근에서 지방산 수송과 산화에 관련된 유전자인 CD 36, acyl-CoA oxidase, uncoupling protein 표현을 증가시켜 지방 연소와 에너지 발산을 증가시키고, 이는 골격근 내 중성지방 침착을 억제하여 인슐린 저항성을 극복할 가능성이 제시되었다. 또한 지방산 산화 증가는 순환하는 유리지방산을 줄여 간과 다른 인슐린 감수성 조직으로의 유리지방산 유입을 차단함으로써 인슐린 감수성 향상에 도움을 줄 것으로 보고되었다 [127,128]. 이를 통해서 PD:PT=1군에서 유의하게 증가된 아디포넥틴 발현은 globular adiponectin이 AMPK 활성화를 통해서 인슐린 저항성과 부분적인 당뇨를 개선시켜 주었음을 생각해 볼 수 있다.

인슐린은 당 항상성에 중요한 역할을 수행한다. 근육과 지방조직에서 인슐린에 의해서 촉진된 당 이용은 인슐린에 의해 조절되는 GLUT4(glucose transport)가 세포내에서 원형질막으로 이동하는 것과 관련이 있다. 인슐린은 인슐린 수용체와 결합하여 이후의 신호전달반응을 유도한다. 인슐린 수용체 인산화가 촉진되면 IRS 단백질의 티로신 잔기들이 인산화되면서 세포내로 포도당을 운반시킨다[129]. IRS 단백질은 인슐린 및 다양한 자극에 의해 세린 잔기의 인산화를 일으키며, 이 세린 잔기의 인산화는 IRS를 통한 신호전달과정을 억제하는 것으로 보인다. 예를 들어 IRS-1의 세린 인산화는 인슐린 저항성 상태에서 증가되어 있다는 것이 대표적인 증가가 된다. 뿐만 아니라 IRS의 세린 인산화가 NF- κ B가 매개하는 신호전달과정을 활성화시킬 수 있다는 보고에 의해서 IRS의 세린 인산화는 신호전달계 사이에

서 서로를 매개할 수 있는 하나의 기작으로 여겨지고 있다. 특히 IRS-1의 serine 인산화와 인슐린 저항성과의 상관관계가 여러 실험을 통해서 밝혀지고 있으나 그 정확한 기전과 다른 형태의 IRS 단백질의 serine 인산화와 관련된 역할에 대해서는 여전히 모호한 상태이다[130]. 인슐린 수용체의 신호 전달시 인슐린 저항성에 의해서 염증반응을 매개하게 된다. 염증 또는 스트레스 자극(JNK, IKK:inhibitor of NF-Kb kinase)은 세린/트레오닌 잔기가 인산화되어 인슐린 신호전달을 방해하게 된다. JNK는 IRS-1의 Ser307을 인산화시켜 인슐린 저항성을 유발하는 주요물질이다[131]. 세포가 TNF- α 에 노출되면 IRS-1의 티로신 인산화가 저해되어서 인슐린 신호전달이 억제된다[132]. 이번 실험결과를 통해서 PD:PT 비율조절이 IRS-1의 세린 잔기 인산화 억제 감소효과를 보인 것을 통해서, 인삼의 PD:PT 비율조절에 의해서 세린 잔기의 인산화를 억제와 티로신 잔기의 인산화를 촉진시켜 인슐린 저항성 개선에 효과적으로 작용한다고 볼 수 있으며, 염증반응의 주요 원인 물질인 TNF- α 에 의한 JNK와 NF-kB 활성화를 억제시켜서 JNK가 IRS-1의 serine 잔기의 인산화를 억제시킨다고 생각해볼 수 있다[133,134]. Zich[135]와 Attele et al[136]은 ginsenoside Re가 항고혈당 작용을 나타내는 주요물질로서, ob/ob mice의 공복시나 식사시 혈중 인슐린 농도를 감소시켜 말초조직에서의 인슐린 저항성을 예방하는 역할이 있음을 알 수 있다. 이번 실험에서도 인삼의 PD:PT 비율조절이 인슐린 저항성을 개선시켰으며, 인삼 사포닌의 비율조절이 IRS-1의 인산화에 직·간접적으로 작용한다고 볼 수 있다.

6. 인삼의 PD:PT 비율조절에 따른 항염증 및 세포사멸에 미치는 영향

1) 인삼 사포닌 비율조절이 염증반응에 미치는 영향

간 조직의 microsome에서 cyclooxygenase-1(COX-1), cyclooxygenase-2(COX-2), I κ B- α , Phospho-I κ B- α , NF- κ B p65를 western blot 분석 방법을 사용하여 인삼의 PD:PT 비율조절에 따른 항염증 기전에 대하여 확인하였다.(Fig. 19,20) 먼저 각 실험군의 COX-1의 발현정도를 E(+ / +)군과 비교해 보면, E(- / -)군은 125%, PD:PT=1군은 111% 증가한 반면에 PD:PT=2군은 88% 발현이 감소하였다. COX-2의 발현 역시 COX-1과 동일한 경향을 나타냈다. 인삼의 PD:PT 비율조절에 따른 COX-1과 COX-2 발현을 E(- / -)군과 비교해보면 PD:PT=1군은 각각 89%와 70% 감소를 나타냈으며, PD:PT=2군은 각각 70%, 53% 감소하여서, COX-1 발현에는 PD:PT=1군이 COX-2 발현에는 PD:PT=2군이 효과적이라는 것을 알 수 있다. 다음으로 I κ b- α 발현을 확인하면, E(- / -)군은 E(+ / +)군에 비하여 60% 감소하였으며 PD:PT=1군은 115% 증가하였고 PD:PT=2군은 75% 감소하였다. PD:PT=1군과 PD:PT=2군을 E(- / -)군과 비교하여보면, 각각 192%, 125% 증가를 나타냈다. Phospho-I κ B- α 의 경우, E(- / -)군은 E(+ / +)군에 비하여 117% 증가하였고, PD:PT=1군은 77% 감소하였으며 PD:PT=2군은 60% 감소를 보였다. E(- / -)군과 PD:PT 비율 조절에 따른 Phospho-I κ b- α 의 발현정도를 확인해보면, PD:PT=1군은 66%, PD:PT=2군은 51% 감소하였다. Phospho-I κ b- α 에 의해서 활성화되는 염증반응의 주요 신호전달물질인 NF- κ B p65의 발현정도를 확인해보면, 먼저 E(- / -)군은 E(+ / +)군에 비하여 158% 증가하였고, 인삼의 PD:PT를

비율별로 조절하여 투여한 경우에는 NF- κ B p65 발현이 나타나지 않았다. 이를 통해서 I κ b- α 의 안정화에는 PD:PT=1군이 효과적으로 작용을 하며, I κ b- α 의 인산화 억제에는 PD:PT=1과 PD:PT=2가 모두 효과적으로 작용하여, 최종적으로 NF- κ B p65 발현을 PD:PT=1군과 PD:PT=2군에서 모두 효과적으로 억제함으로써, 인삼의 PD:PT 비율조절에 따른 투여가 항염증에 매우 효과적이라는 것을 알 수 있다.

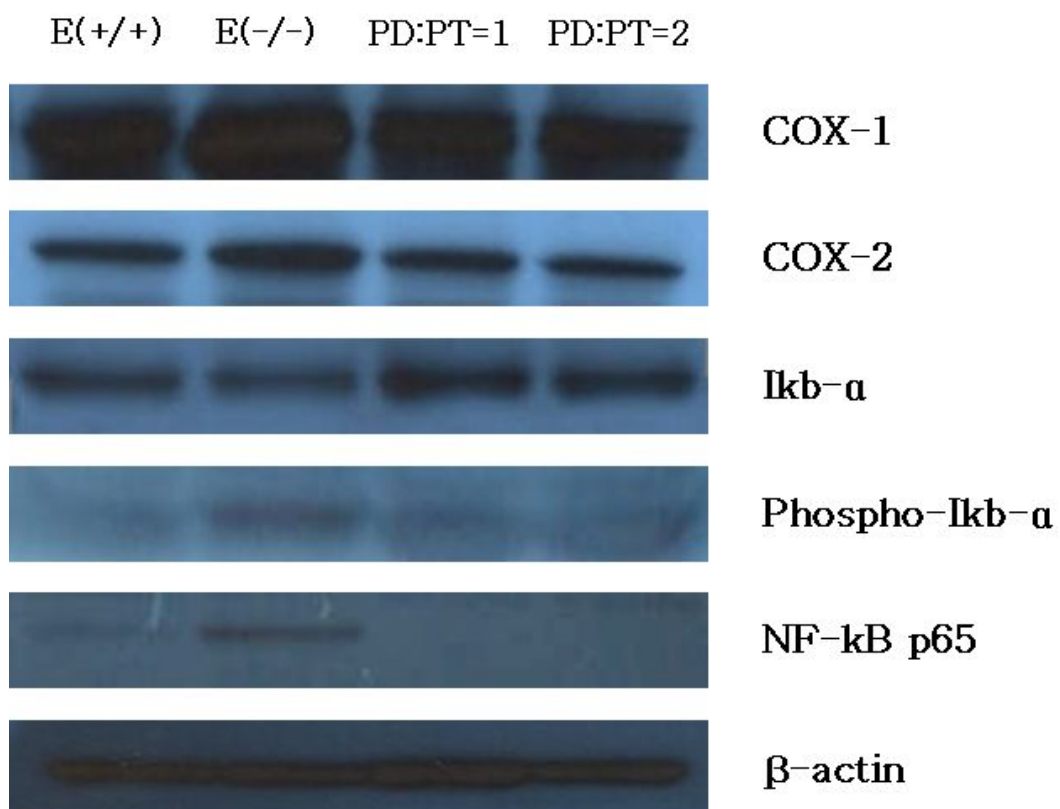


Fig. 19. Western blotting of the expression of COX-1(a), COX-2(b), Ikb-α(c), Phospho-IkB-α(d) and NF-κB p65(e) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

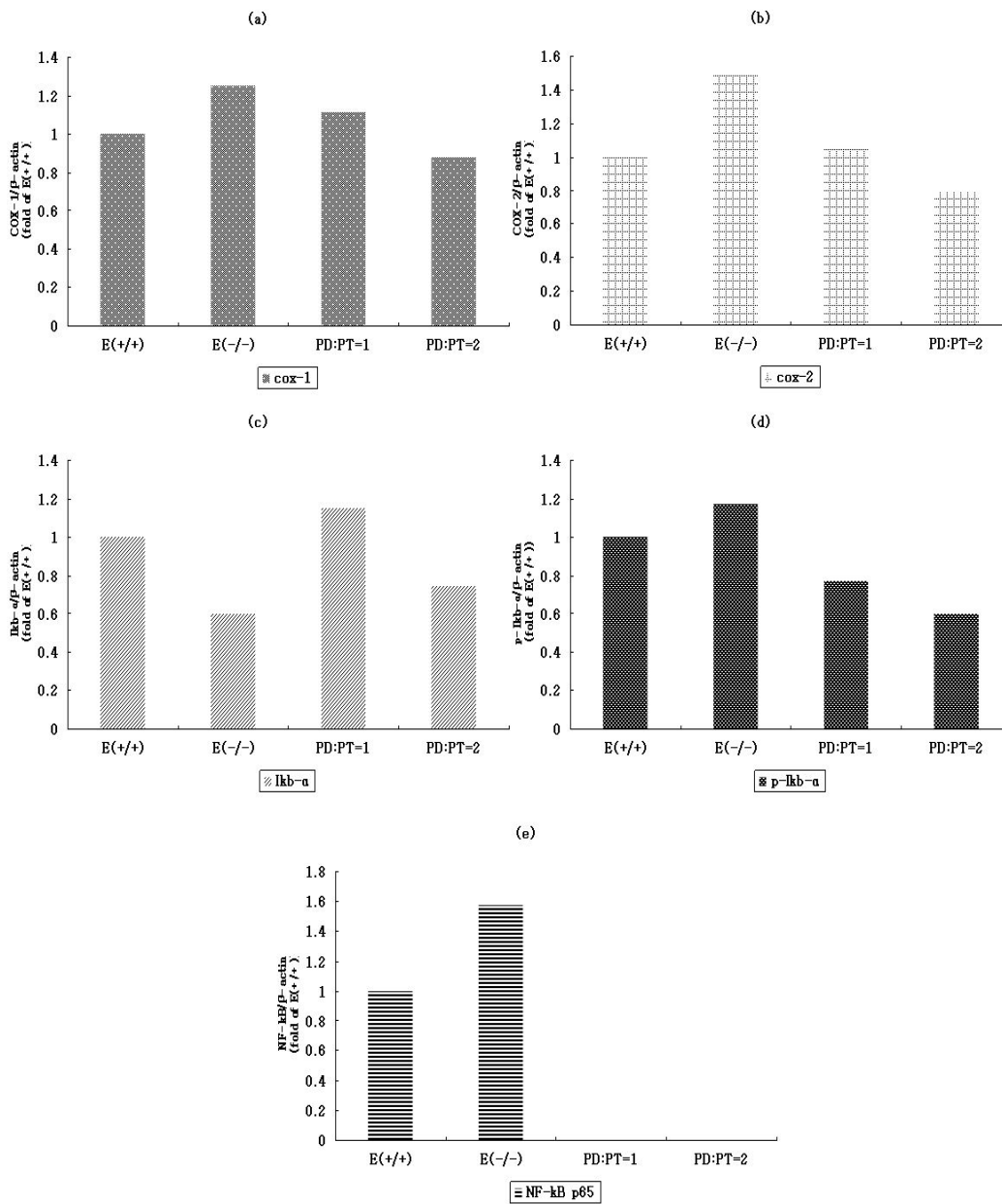


Fig. 20. Effect of PD:PT ratio on the regulation COX-1(a), COX-2(b), Ikb-a(c), Phospho-IkB-a(d) and NF-kB p65(e) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

2) 인삼 사포닌 비율조절이 세포사멸에 미치는 영향

간 조직의 microsome에서 bcl-2, cytochrome C, caspase-3, caspase-8, caspase-9와 cleaved PARP(Asp214)를 western blot 분석 방법을 사용하여 살펴보았다.(Fig. 21,22) 먼저 bcl-2의 발현정도를 확인해보면, E(-/-)군은 E(+ /+)군보다 147% 증가를 보였으며, PD:PT=1군과 PD:PT=2군은 각각 231%와 164% 증가하였다. E(-/-)군과 각 인삼 처치군의 bcl-2 발현정도를 확인해보면 PD:PT=1군이 157%, PD:PT=2군은 111%로 PD:PT=1군이 bcl-2 발현에 좀 더 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 다음으로 cytochrome C의 발현정도는 모든 실험군에서 큰 차이를 보이지 않았지만, PD:PT=2군이 E(+ /+)군과 E(-/-)군에서 모두 90%씩 감소하여 미량이나마 cytochrome C 발현억제에 PD:PT=2가 효과적이라고 생각해 볼 수 있다. 다음으로 caspase-3,8,9 발현을 확인해보면, caspase-3의 경우 모든 실험군에서 비슷한 발현정도를 보였는데 PD:PT=1군은 오히려 caspase-3 발현이 증가한 반면에, PD:PT=2군의 경우 E(+ /+)군에 비하여 67% 감소하였으며, E(-/-)군에 비해서는 83% 감소하였다. caspase-8의 경우에는 PD:PT=1군은 E(+ /+)에 비해서 97%로 약간의 감소를 보인 반면에 PD:PT=2군은 51%로 caspase-8 발현감소에 효과적으로 나타났다. E(-/-)군과 인삼 처치군을 비교하여도 PD:PT=1군은 51%, PD:PT=2군은 27% 감소하여 PD:PT=2군이 더 효과적이라는 것을 알 수 있었다. caspase-9 발현을 확인해보면, E(+ /+)군과 각 인삼 처치군을 비교해보면 PD:PT=1군은 31%, PD:PT=2군은 24%로 매우 효과적인 감소효과를 나타냈으며 E(-/-)군과 비교하여도 각각 20%와 15%로 caspase-9 발현억제에 인삼의 PD:PT 비율조절이 큰 효과를 나타내었다. 마지막으로

cleaved-PARP(Asp214)의 발현을 확인해보면, PD:PT=1군과 PD:PT=2군은 E(+ / +)군과 비교하였을 때 각각 84%, 37% 감소하였고 E(- / -)군과도 비슷한 감소 경향을 보여서 PD:PT=2가 cleaved-PARP(Asp214) 발현억제에 효과적이라는 것을 알 수 있다.

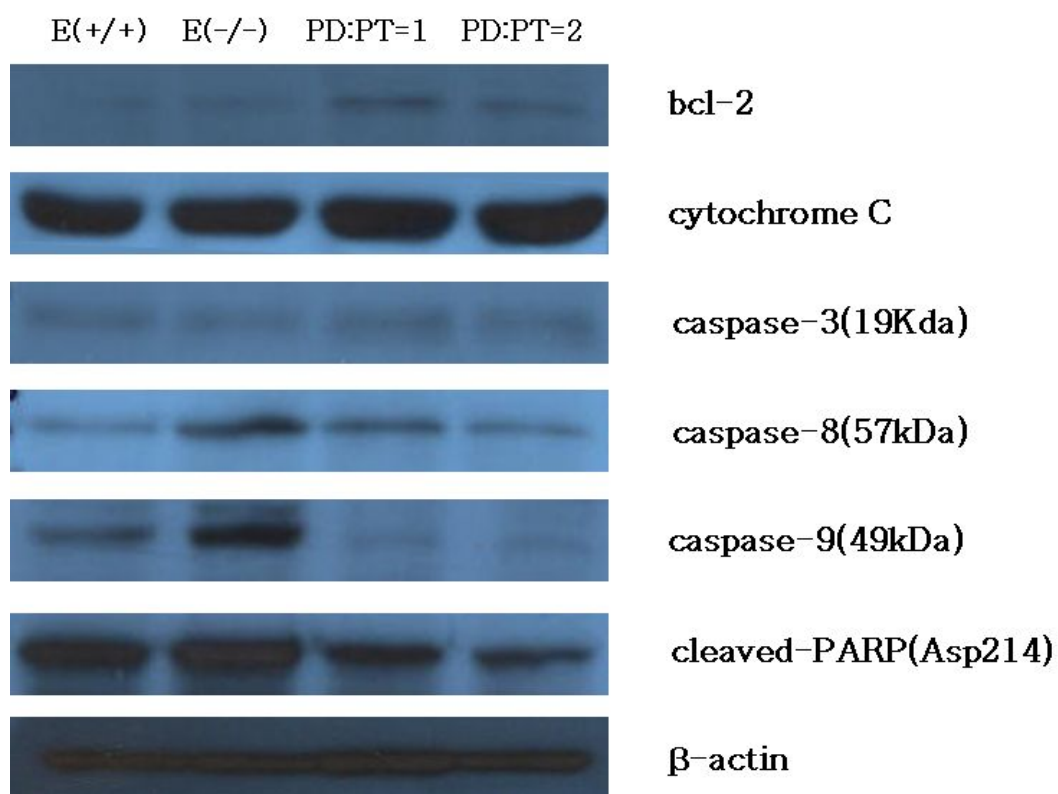


Fig. 21. Western blotting of the expression of bcl-2(a), cytochrome C(b), caspase-3(c), caspase-8(d), caspase(9)(e) and cleaved-PARP(Asp214)(f) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

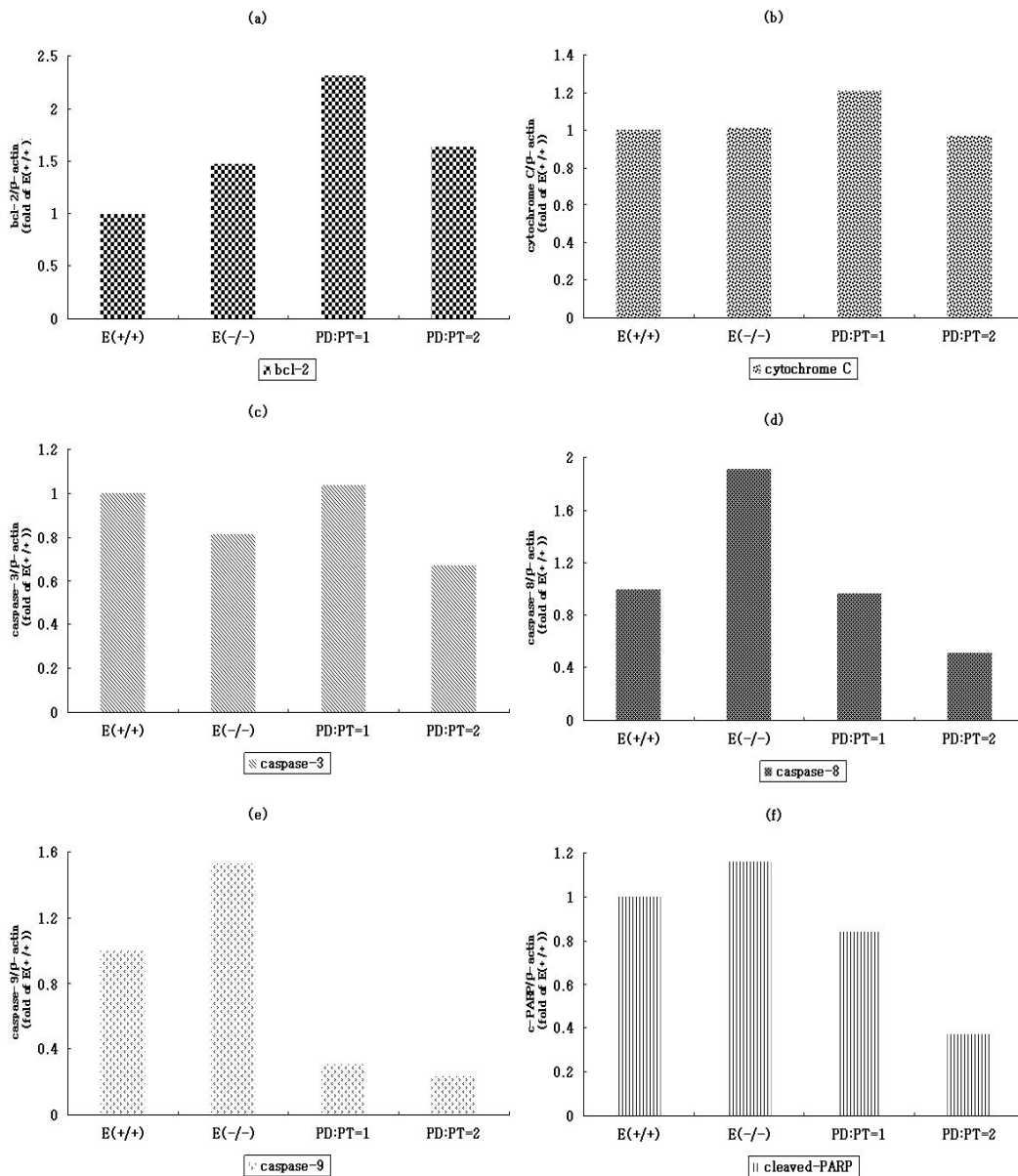


Fig. 22. Effect of PD:PT ratio on the regulation bcl-2(a), cytochrome C(b), caspase-3(c), caspase-8(d), caspase(9)(e) and cleaved-PARP(Asp214)(f) in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

Bcl-2 단백질은 세포내막에서 세포사멸을 촉진시키거나 억제시키는 주요한 단백질이다. 이러한 Bcl-2 단백질에는 세포의 자가사멸을 촉진시키는 Bad, Bax 등과 세포의 자가사멸을 억제시켜주는 Bcl-2와 Bcl-XL 등이 존재한다. 이러한 친 혹은 항 세포사멸작용을 발현하는 단백질 사이의 균형은 미토콘드리아에서 세포 자가사멸 관련 단백질을 분비하는데 매우 중요하게 작용한다[137]. 이번 실험에서는 PD:PT=1과 PD:PT=2에서 모두 bcl-2 발현이 증가되었는데, 특히 PD:PT=1에서 bcl-2 발현 증가가 두드러지게 나타나는 것이 확인 되었다.

인삼과 인삼사포닌은 성장인자, 발암 물질 등에 의해서 유도되는 COX-2 발현을 억제하는 효과가 있다. 특히 protopanaxatriol, ginsenoside Rg3 등은 NF-kB 전사인자를 억제하여 COX-2 발현을 억제하여 항염증 효과를 발휘한다고 보고되었다[138]. 김 등[76]에 의하면 당뇨병이 유도된 쥐에게 인삼을 구강으로 투여한 결과, NF-kB p65, COX-2, iNOS 발현이 감소되었다고 보고하였다. 이번 실험에서도 NF-kB p65와 COX-2 발현에 있어서 임산의 PD:PT 비율조절이 매우 효과적인 영향을 보여주었다. Zhiguo Zhang et al[139]에 의하면 ginsenoside Re가 Ikb- α 발현을 증가시킨다고 하였는데, 이번 실험에서도 Ikb- α 의 안정화에는 PD:PT=1이 매우 효과적이었으며 Phospho-Ikb- α 의 발현 억제에는 PD:PT=2가 효과적인 역할을 보였다. 하지만 NF-kB p65 발현에서는 PD:PT=1과 PD:PT=2군이 모두 뛰어난 억제를 보여서 PD와 PT계 ginsenoside의 상호작용에 의해서 PD:PT=1과 PD:PT=2가 최종적으로 NF-kB p65 발현을 억제시킴으로써 이로 인한 산화환원반응과 관계된 동맥경화 촉진을 진전시키는 주요인자인 mitogen 활성화 단백질인 MAP kinase와 AP-1 전사인자를 활성화를 억제시킬 수 있다고 생각해볼 수 있으며, NF-kB가 bcl-2를 활성화시키는 반면에, bcl-2

가 Ikb-a를 안정화시켜서 RelA 전사능력을 억제시켜 NF-kB 소단위체 핵 축적에 영향을 미쳐 NF-kB 활성을 억제시켜 준다. COX 효소는 염증 반응에서 중요한 역할을 수행한다. COX 효소에는 COX-1과 COX-2의 두 가지 형태가 존재하며 이들은 세포내 기능조절과 prostaglandin 생성에 필요하다 [140]. COX-2는 유발효소로서, 염증시 그 염증 반응에 의해 생성된다 [141]. COX-2발현은 죽상판(atheromatous plaques) 형성과[142,143], 종양 형성[144]에 의해서 증가된다. 동맥경화증이 발병 시 자유 라디칼에 의해서 COX-2 발현이 유도된다[145]. 이러한 연구들은 COX-2 억제가 동맥경화와 여러 종류의 암에서 치료로서 유용하게 사용될 수 있다는 것을 말해 준다. 따라서 COX-2 효소의 선택적인 억제 작용은 COX-1의 부작용인 위궤양을 예방할 수 있어서 매우 바람직하다. 하지만 COX-2 억제제인 rofecoxib는 심혈관질환을 증가시킨다고 보고되었다[146-148]. 따라서, COX-2 효소는 염증 반응 시 정상적으로 유도되는 효소이며, 여러 종양 발생 시 그 농도가 증가된다. 따라서 COX-2 효소 억제제는 이상적인 항염증제일 뿐만 아니라 여러 종양 발생 예방에 효과적이다. COX-1 효소는 많은 조직에서 기본적으로 발현되며[149] 또한 프로스타글란딘 생성에 관여한다. COX-1 효소 억제는 항암효과를 나타낸다[150]. 이번 실험 결과에서는 COX-1과 COX-2 효소 발현 억제에 PD:PT=2가 효과적으로 작용하였는데, 이를 통해서 PD:PT=2를 동맥경화 및 심혈관질환 치료제와 종양발생 억제제의 약제 개발에 사용되어 질 수 있음을 시사해 볼 수 있다. 금 등[151]에 의하면, Ginsenoside Rg3은 PT계 인삼 사포닌으로서 COX-2 발현을 억제시켜 NF-kB 활성을 저해시킨다고 보고하여서 이번 실험에서는 PD:PT=2군이 더 COX-2 발현을 억제시켰으며 NF-Kb 활성을 PD:PT=1과 PD:PT=2 모두 억제시켰다.

Caspase family는 염증반응이나 세포괴사(apoptosis) 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 단백질로서, 세포질에서 불활성화 효소형태로 존재하다가 세포괴사를 유도하는 자극에 의하여 활성화되며 알려진 모든 caspase들은 효소원(zymogen)으로 존재하며 다른 caspase 또는 protease에 의해 잘려진 후 활성화된 형태로 전환된다. 자극과 세포의 종류에 따라서 특정한 caspase들이 각각의 경로를 통해서 활성화되며 또한 몇몇 caspase들의 활성화 경로는 caspase-3을 활성화시키며, 결과적으로 caspase-3의 주요한 기질인 PARP(poly ADP-ribose polymerase)의 분절을 일으켜 염색체의 파괴를 야기시키고 결국 자가 사멸(apoptosis)로 이어지게 된다.[152-155] 그동안의 연구를 통해서 caspase-3 활성화는 미토콘드리아 내부의 세포 자가 사멸 반응인 미토콘드리아에서 세포질로 cytochrome C의 방출과 함께 caspase-9가 활성화됨에 따라서 발생한다[156]. 민 등[157]에 의하면 Rg3이 pro-caspase-3(p32)을 잘라서 17Kda 조각으로 만들어 활성화시키는 것을 억제시켜주었지만, caspase-8의 활성화에는 아무 영향을 주지 못하였다. 이번 실험결과에서는 이와 반대로, caspase-3의 발현에는 PD:PT 비율조절이 큰 영향을 주지 못하였지만 caspase-8에서는 특히 PD:PT=2가 매우 효과적으로 활성화를 억제시켜주었다. 이를 통해서 caspase-8이 IKK를 통한 NF- κ B를 활성화를 억제시켜준다고 볼 수 있다. 또한 민 등[157]은 caspase-9의 활성화와 미토콘드리아에서 분비되는 cytochrome C의 분비에 미치는 Rg3의 효과에 대해서 조사하였는데, caspase-9 활성화는 Rg3 투여에 의해서 억제되었으며, 세포질로의 cytochrome C분비에도 Rg3이 억제시켰다. 이번 실험결과에서도 caspase-9 활성이 PD:PT=1과 PD:PT=2에서 모두 크게 감소되었지만 cytochrome C의 분비에는 큰 영향을 주지 못하였는데, 이를 통해서

PD:PT 비율조절이 미토콘드리아 내에서 일어나는 caspase 활성화를 억제한다고 볼 수 있다.

7. 인삼 사포닌의 비율조절이 항동맥경화에 미치는 영향

심장 조직을 포르말린에 고정한 다음 TUNEL법을 사용하여 세포의 괴사 정도를 확인한 결과는 Fig. 23과 Fig. 24에 나타내었다. 심장 조직의 괴사 정도를 살펴보면, E(-/-)군은 E(+ /+)군에 비해 222%로 유의적인 증가를 보였으며, 각 인삼 투여군인 PD:PT=1군과 PD:PT=2군은 각각 130%, 208%로 유의적으로 증가하였다. 하지만 E(-/-)군을 각 인삼 투여군과 비교해보면 PD:PT=1군은 58%로 유의적인 감소를 나타낸 반면에 PD:PT=2군은 93% 감소로 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았다. 반대로 정상 세포의 수준은 유의적이지는 않지만 E(+ /+)군이 가장 많이 생존하였으며, PD:PT=1군이 그 다음으로 정상 세포의 생존 수준이 높게 나타남을 알 수 있었다.

Guan L et al[158]는 ginsenoside Rb1이 심장조직에서 허혈성 재관류에 의한 세포의 자가 사멸을 억제한다고 보고하였으며, Liu Z et al[159]는 ginsenoside Re가 친 세포 자가 사멸 인자인 Bax 유전자 발현을 억제하면서 bcl-2/Bax 비율을 증가시킴으로서 억제시켜준다고 보고하였다는 결과를 통해서, 인삼의 PD:PT 비율 조절이 caspase-3에 의한 세포의 자가 사멸 억제기전에는 영향을 주지 않지만, 그 중 PD:PT=1군이 bcl-2 유전자 발현을 증가시킴으로서 자가사멸을 억제시킴과 함께 세포 괴사를 감소시켜 심혈관질환에 대한 개선효과를 나타낸다는 사실을 알 수 있다. 또한 S. C. Joshi[101]는 고콜레스테롤 식이를 먹인 토끼에게 인삼을 투여하였을 때 혈중 지질수치를 감소시켜 죽상관 예방에 명백하게 도움을 주어 대동맥의 플라그 형성 감소와 함께 심혈관질환 개선에 직접적인 효과가 있다고 보고하였으며, 인삼이 항산화 상태와 지질대사 개선 항염증 반응을 통해서 이와

같은 항동맥경화 효과를 보인다는 것을 통해서 이번 실험 결과에서도 인삼의 PD:PT 비율 조절이 조직에서의 지질대사 개선 및 지질과산화물 형성을 감소시켜 항동맥경화에 매우 효과적임을 알 수 있다.

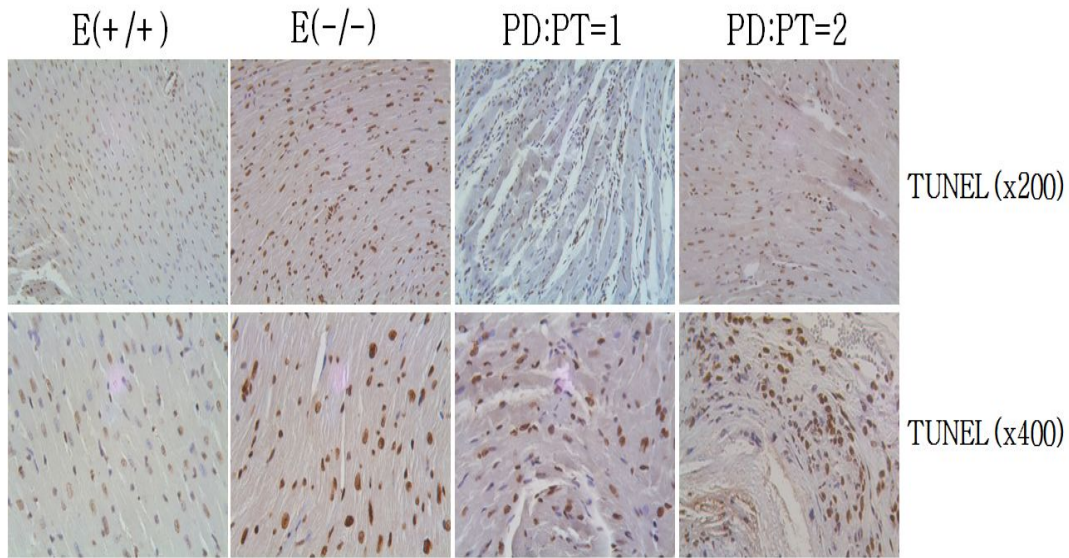


Fig. 23. Effect of PD:PT ratio on the photographs showing TUNEL in apo E KO mice fed high-cholesterol diet

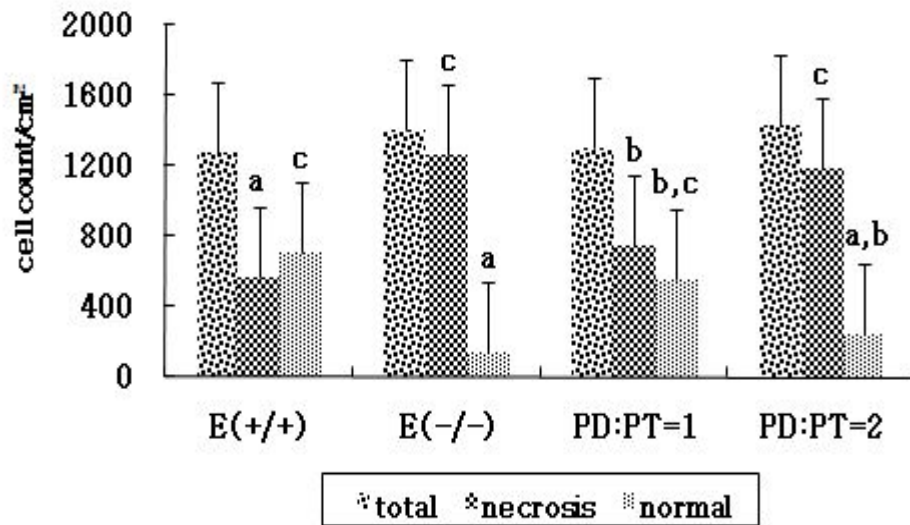


Fig. 24. Histogram illustrating the expression of necrosis according to the PD:PT ratio in heart tissue

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 인삼의 PD계와 PT계 ginsenoside가 항동맥경화 및 인슐린 저항성에 미치는 효과에 대해서 알아보려고 한다. 10주령의 C57BL/6J E(+ /+)와 B6.KOR-Apo E계 E(-/-) 수컷쥐를 이용하여 1주간 적응시킨 후, 총 12주간의 실험기간 동안 고콜레스테롤 식이를 제공하였으며, 마지막 4주간의 실험기간동안에는 E(+ /+)군과 E(-/-)군에게는 생리 식염수를 매일 복강내(i.p.)로 주사하였으며, PD:PT=1군과 PD:PT=2군에게는 체중 kg 당 100mg 농도로 매일 복강내(i.p.)로 주사하였다. 사육기간 동안 식이 섭취량, 체중증가량을 측정하였고, 이를 통해서 식이효율을 계산하였다. 혈장, 심장, 간 조직에서 지질수치와 지질과산화물 함량을 분석과 혈장과 지방조직에서 아디포넥틴 함량을 측정하다. 각 조직에서 인슐린 신호전달과 염증 반응 및 자가사멸에 미치는 영향에 대해서 분석하였다. 대동맥에서는 지질 축적 정도를 관찰하였고 심장 조직에서 자가사멸 정도를 확인하였다.

1. 고콜레스테롤 식이에 의한 체중 증가억제와 식이효율 증가에 있어서 PD:PT=1군이 유의한 영향을 나타냈다.

2. 고콜레스테롤 식이에 의해 발생한 간 손상에 대한 보호효과는 혈장에서는 PD:PT=1군이 AST와 ALT 수치를 유의하게 감소시켜주었지만, 간 조직에서는 PD:PT=2군이 유의한 감소를 나타내었다.

3. 지질수치 개선효과에 있어서 PD:PT 비율조절이 각 조직에서 TG와 TC 함량이 유의적인 감소를 보였으며, 혈장의 HDL-C을 유의하게 증가시켰다.

혈장에는 PD:PT=1군이, 심장 조직에서는 인삼 투여군 모두가, 간 조직에서는 PD:PT=2군이 지질 수치 개선에 효과적인 영향을 보여주었다.

4. 혈장의 LPO 생성물 감소에는 PD:PT=1군과 PD:PT=2군이 비슷한 감소를 보였으며, 심장 조직에서는 PD:PT=2군이 유의한 감소를 보였지만, 간 조직에서는 PD:PT=1군이 LPO 생성을 유의하게 감소시켜주었다.

5. 지방조직에서 분비되는 아디포넥틴 함량은 PD:PT=1군에서 유의적으로 크게 증가되었지만 순환계에는 인삼 투여가 큰 영향을 미치지 못하였다.

6. Insulin Receptor- β 발현은 PD:PT=1군이 약 3배, PD:PT=2군이 약 2배 증가하였으며, Phospho-IRS-1(ser612) 발현은 각각 0.8배, 0.9배로 감소시켜주었다.

7. 염증 반응과 세포사멸에 미치는 영향에서는 친 염증 물질과 친 세포사멸 물질 억제에는 PD:PT=2군이 효과적인 영향을 주었으며, 항염증 물질과 항 세포사멸 물질 발현 증가에는 PD:PT=1군이 효과적인 영향을 나타내었다.

8. PD:PT=1군이 심장 조직 괴사의 유의한 감소와 함께 정상세포의 생존이 높게 나타나 심혈관계질환 개선효과를 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 인삼의 동체, 지근, 세근의 추출부위에 따른 PD:PT 비율조절 효과는 고콜레스테롤 식이에 의한 체중증가 억제와 간 손상에 대한 보호효과를 나타냈다. 혈장, 심장, 간 조직 등 작용 기관에 따

라서 PD:PT=1과 PD:PT=2의 효과가 다르게 나타났지만, 지질 수치 개선 및 LPO 생성 억제 등 체내에 생성된 유리 라디칼을 제거하는 항산화 효소의 활성화에 의한 것으로 생각되어진다. 지방조직에서 분비되는 아디포넥틴은 PD:PT=1군에서 크게 증가하였으나 순환계까지는 영향을 미치지 못하였다. 또한 인삼투여군 모두가 인슐린 수용체 발현을 증가시켰으며 IRS-1의 세린 잔기의 인산화를 억제시켜 인슐린 저항성 개선효과를 나타냈다. 염증반응의 주요 원인 물질인 NF-kB 발현을 PD:PT=1과 PD:PT=2가 모두 크게 억제시킨 것을 통해서 항동맥경화에도 유의한 영향을 줄 것이라 기대되어진다. PD:PT 비율에 따른 인삼 투여가 미토콘드리아 내의 세포 자가 사멸을 억제시켜주지는 못하였으나, caspase-8,9 및 cleave-PARP 발현 억제와 함께 bcl-2 발현을 증가시켜 세포질에서 발생하는 세포의 자가 사멸 억제에 매우 효과적이라는 것을 알 수 있다. 또한 심장 조직의 괴사를 유의하게 억제시켜줌으로써 심혈관계질환 개선효과가 뛰어남을 알 수 있다.

앞으로 ginsenoside 각 성분 효과와 성분 간의 상호작용 등에 대한 기전 연구가 요구되며, 아울러 mitochondria damage성 자가 사멸 기전과의 상관성 연구가 필요하다.

V. 참고문헌

1. 사망원인통계, Korea National Statistical Office, 2006
2. 제1~3기 국민건강영양조사, 보건복지부/질병관리본부
3. 박석원, 윤용석, 송영득, 이현철, 허갑범. 한국인 제2형 당뇨병의 병인론적 이형성. 당뇨병 1999;23:62-69
4. 이현철, 이영식, 박석원, 정윤석, 안광진, 이은직, 임승길, 김경래, 허갑범. 인슐린 비의존형 당뇨병 환자의 직계자식에서 당수송체 유전자의 다형성과 인슐린 분비능 및 말초조직의 포도당 이용을 등의 대사적 측면과 상호연관성에 관한 연구. 대한내과학회지 1993;45:12-24
5. 김진우. 인슐린 저항성의 기전. 당뇨병 1996;20:203-213
6. Michael Stumvoll, Barry J Goldstein, Timon W van Haften. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. Lancet 2005;365:1333-1346
7. Giorgio Sesti, Pathophysiology of insulin resistance. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2006;20(4):665-679
8. Hales CN, Barker DJP. Type 2(non-insulin dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia 1992;35:595-601
9. Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA. Glucose toxicity. Diabetes Care 1990;13:610-630
10. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 1988;37:1495-1607

11. Devaraj S, Rosenson RS, Jialal I. Metabolic syndrome; an appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004;33(2):431-453
12. Kahn. C.R. Triglycerides and toggling the tummy. *Nat. Genet.* 2000;25:6-7
13. Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. Obesity and regulation of energy balance. *Cell* 2001;104:531-543
14. Lowell. B.B. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* 1999;99:239-242
15. Obeici, S., Feng. Z., Arduini, A., Conti, R., and Rossetti, L. Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decrease food intake and glucose production. *Nat. Med.* 2003;9:756-761
16. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91
17. Zhang Y., et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-432
18. Steppan, C.M., et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-312
19. Yang Q., et al. Serum retinal binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005;436:356-362
20. Lazar, M.A. The hormonal side of insulin resistance

2006;12:43-44

21. Reaven GM., Laws A. Insulin resistance, compensatory hyperinsulinemia and coronary heart disease. *Diabetologia* 1994;37:948-952
22. Zimmet P. Genotype, obesity and cardiovascular disease-has technical and social advancement outstripped evolution? *J Int Med* 2003;254:114-125
23. Kershaw, E.E., and Flier, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:2548-2556
24. Kadowaki, T., and Yamanuchi, T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;26:439-451
25. Berg, A.H., and Scherer, P.E. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2005;96:939-949
26. Okamoto, Y., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., and Libby, P. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin. Sci.(Lond.)* 2006;110:267-278
27. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
28. Aupperle KR, Boyle DL, Hendrix M, Seftor EA, Zvaifler NJ, Barbosa M, et al. Regulation of synoviocytes proliferation, apoptosis, and invasion by the p53 tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 1998;152:1091-1098

29. Vaux DL, Flavell RA. Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12:719-724.
30. Fields ML, Sokol CL, Eaton-Bassiri A, Seo S, Madaio MP, Erikson J. Fas/Fas ligand deficiency results in altered localization of anti-double-stranded DNA B cells and dendritic cells. *J Immunol* 2001;167:2370-2378
31. Los M, Stroh C, Rainer U, Engels IH, Schulze-Osthoff K. Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* 2001;22:31-34
32. Green DG, Beere HM. Killers or clean-up crew. How central are the central mechanisms of apoptosis. In: *Apoptosis & Cancer Chemotherapy*, Hickman JA, Dive C, eds. Totowa, NJ, Humana Press 1999;157-74
33. Duane R. Schultz and William J. Harrington, Jr. Apoptosis: Programmed Cell Death at a Molecular Level *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2003;32(6):345-369
34. Silverman N, Maniatis T. NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* 2001;15:2321-42
35. Steven E. Shoelson, Jongsoo Lee, and Allison B. Goldfine. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 2006;116(7):1973-1801
36. Ferrannini E, Haffner SM, Mitchell BD, stern MP. Hyperinsulinemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia* 1991;34(6):416-422

37. Huthe J, Bokema L, Wistrand J, Fagerberg B. The metabolic syndrome, LDL particle size and atherosclerosis: the Atherosclerosis and Insulin Resistance(AIR) study. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2000;20(9):2140-2147
38. Wald N.J. and Law M.R. Serum cholesterol and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 1995;118(1):S1-S5
39. Monty Krieger, Michael S. Brown and Joseph L. Goldstein, Isolation of Chinese hamster cell mutants defective in the receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein. *Journal of Molecular Biology* 1981;150(2):167-184
40. William P. Castelli, Gerald R. Cooper, Joseph T. Doyle, Mario Garcia-Palmieri, Tavia Gordon, Curtis Hames, Steven B. Hulley, Abraham Kagan, Myron Kuchmak, Daniel McGee and William J. Vivic, Distribution of triglyceride and total, LDL and HDL cholesterol in several populations: A cooperative lipoprotein phenotyping study. *Journal of Chronic Diseases* 1977;30(3):147-169
41. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Pavlidis AN, Salpea KD, Iraklianou SA, Sarpalis K. et al. Postprandial lipidemia in men with metabolic syndrome, hypertensives and health subjects. *Health Dis* 2005;4:21
42. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant status. *Clin Chim Acta* 2006;368(1-2):1-19

43. Cahova M, Vavrinkova H, Kazdova L. Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin. *Physiol Res* 2006
44. Storx P, Doppler H, Wernig A, Pfizenmaier K, Muller G. Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells plamitate rather than tumor necrosis factor inhibits insulin-dependent protein kinase B(PKB)/Akt stimulation and glucose uptake. *Eur J Biochem* 1999;266(1):17-25
45. Tseng CH, Tseng CP, Chong CK, Cheng JC, Tai TY. Indenpendent association between triglycerides and coronary artery disease in Taiwabese type 2 diabetic patience. *Int J Cardiol* 2006;111(1):80-85
46. Taskinen MR, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol or triglycerides which is the culprit? *Diabetes Res Clin Pract* 2003;61(1):19-26
47. Miller M. The epidemiology of triglyceride as a coronary artery disease risk factor. *Clin Cardiol* 1999;22(6):1-6
48. Gotto Jr AM. Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998;82(9):22-25
49. Victor Martin Bolanos-Garcia, On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2003;83:47-68
50. Liu CX, Xiao PG. Recent advances on ginseng research in China. *J. Ethnopharmacol* 1992;36:27-38

51. Gillis CN. *Panax ginseng* pharmacology: A nitric acid link? *Biochem. Pharmacol.* 1997;54:1-8
52. Attele AS, Wu JA, Yuan CS. *Ginseng* pharmacology. *Biochem. Pharmacol.* 1999;58:1685-93
53. Lee FC, *Facts about Ginseng, the Elixir of Life.* Hollyn International Corp., Elizabeth, NJ, 1992
54. Gillis CN, *Panax ginseng* pharmacology: A nitric oxide link? *Biochem Pharmacol* 1997;54:1-8
55. MOCHIZUKI, M., YOO, Y.C., MATSUZAWA, K., SATO, K., SAIKI, I., TONO-OKA, S., SAMUKAWA, K.&AZUMA, I. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb₂, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg₃, of red ginseng. *Biol. Pharm. Bull.* 1995;18:197-1202
56. KIM, Y.S., KIM, D.S.&KIM, S.I. Ginsenoside Rh₂ and Rh₃ induce differentiation of HL-60 cells into granulocytes: modulation of protein kinase C isoforms during differentiation by ginsenoside Rh₂. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998;30:327-338
57. WAKABAYASHI, C., MURAKAMI, K., HASEGAWA, H., MURATA, J. & SAIKI, I. An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;246:725-730
58. LIU, C.X. & XIAO, P.G. Recent advances on ginseng research in China. *J. Ethnopharmacol.* 1992;36:27-38
59. Anoja S. Attele, Ji An Wu and Chun-Su Yuan. *Ginseng*

Pharmacology: MULTIPLE CONSTITUENTS AND MULTIPLE ACTIONS. *Biochemical Pharmacology* 1999;58:1685-1693

60. Yuan CS, Wu JA, Lowell T and Gu M, Gut and brain effects of American ginseng root on brainstem neuronal activities in rats. *Am J Chin Med* 1998;26:47-55
61. Seung-Yeol Nah and Edwin W. McCleskey, Ginseng root extract inhibits calcium channels in rat sensory neurons through a similar path, but different receptor, as μ -type opioids. *Journal of Ethnopharmacology* 1994;42(1):45-51
62. Sok Cheon Pak, Sung Chul Lim, Seung-Yeol Nah D.V.M, Jiae Lee, Joseph A. Hill and Chun Sik Bae D.V.M., Role of Korean red ginseng total saponins in rat infertility induced by polycystic ovaries. *Fertility and Sterility* 2005;84(2):1139-1143
63. Ka-Shing Cheung, Hoi-Shan Kwan, Paul Pui-Hay But, and Pang-Chui Shaw, Pharmacognostical identification of American and Oriental ginseng roots by genomic fingerprinting using Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction(AP-PCR). *Journal of Ethnopharmacology* 1994;42(1):67-69
64. H. Yamada, H. Kiyohara, J-C. Cyong and Y. Otsuka, Characterization of an anti-complementary arabinogalactan from a Chinese herb, kitagawa. *International Journal of Immunopharmacology* 1985;7(3):358
65. Brahrke MS, Morgan WP. Evaluation of the ergogenic properties of ginseng. *Sports Med.* 1984;18:229-48

66. Hassan-Samira MM, Attia Attia M, Allam M, Elwan O. Effect of the standardized ginseng extract G115 on the metabolism and electrical activity of the rabbit's brain. *J. Int. Med. Res.* 1985;13:342-348
67. Kirchdorfer AM. Clinical trials with the standardized ginsenoside concentrate G115. In: Chang HN, Yeung HW, Tso WW, Koo A, eds. *Advances in Chinese Medicinal Materials Research*. Singapore: World Scientific Publishers 1985:529-42
68. Engels HJ, Said JM, Wirth JC. Failure of chronic ginseng supplementation to affect work performance and energy metabolism in healthy adult females. *Nutr. Res.* 1996;16:1295-1305
69. Waki I, Kyo H, Yasuda M, Kimura M. Effects of hypoglycemic component of ginseng radix on insulin biosynthesis in normal and diabetic animals. *J. Pharmacobio-dynamics.* 1982;5:547±549
70. Sotaniemi EA, Haapakoski E, Rautio A. Ginseng therapy in non-insulin dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 1995;18:373-375
71. Lee J-H, Park H-J. Effects of lipophilic fraction from Korean red ginseng on platelet aggregation and blood coagulation in rats fed with corn oil and beef tallow diet. *Korean J. Ginseng Sci.* 1995;19:206-211
72. Zhang YG, Liu TP. Protective effects of total saponins of *Panax ginseng* on ischemia-reperfusion injury in rat brains. *Chin. J.*

Pharmacol. Toxicol. 1994;8:7-12

73. Chen X. Cardiovascular protection by ginsenosides and their nitric oxide releasing action. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1996;23:728-732
74. Tomoya Yamashita, Seinosuke Kawashima, Masanori Ozaki, Masayuki Namiki, Nobutaka Inoue, Ken-ichi Hirata, Mitsuhiro Yokoyama Propagermanium reduces atherosclerosis in apolipoprotein E Knockout mice via inhibition of macrophage infiltration, Atherosclerosis Thromb Vasc Biol 2002;22:969-974
75. Ji Hyun Kim, Dae Hyun Hahn, Deck Chun Yang, Jang Hyun Kim, Hye Jung Lee and Insop Shim, Effect of crude saponin of Korean red of ginseng on high-fat diet-induced obesity in the rat. J Pharmacol Sci 2005;97:124-131
76. Hyun Young Kim, Ki Sung Kang, Noriko Yamabe, Ryoji Nagai and Takako Yokozawa, Protective effect of heat-processed American ginseng against diabetic renal damage in rats. J. Agric. Fiid Chem. 2007;55:8491-8497
77. Yokozawa, T., Yamabe, N., Cho, E. J., Nakagawa, T., Oowada, S. A study on the effects to diabetic nephropathy of Hachimijio-gan in rats. Nephron Exp. Nephrol. 2004;97:38-48
78. Yamabe, N.; Yokozawa, T.; Oya, T.; Kim, M. Therapeutic potential of (--epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006;319;228-36

79. William J. Banza, M.J. Iqbal, Michael Bollaert, Nicole Chickris, Bryce James, D. Allan Higginbotham, Richard Pertersonc, Laura Murphy, Ginseng modified the diabetic phenotype and genes associated with diabetes in the male ZDF rat. *Phytomedicine* 2007;14:681-689
80. Jong-Hwan Sung, Nam-Woo So, Bo-Hyun Jeon and Che-Chul Chang, Effect of white and red Panax ginseng extract on serum lipid level in high-fat diet fed rats. *J. Ginseng Res.* 2004;28(1):33-38
81. Naama Karu, Ram Reifen and Zohar Kerem, Weight gain reduction in mice fed Panax ginseng saponin, a pancreatic lipase inhibitor. *J. Agric. Food Chem.* 2007;55:2824-2828
82. Yoon SH, Park EJ, Oh KH, Chung YG, Kwon OJ, the effect of lithospermi radix benzo(a)pyrene-induced hepatotoxicity. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 1980;60:1107-1166
83. Takako Yokozawa and Hikokichi Oura, Increased heparic adenine nucleotide content by ginseng. *Journal of Ethnopharmacology* 1991;34(1):79-82
84. Hyun-Jeong Kim, Mi-Hyang Bo, Ji-Won Lee, Hyo-Gun Im, and In-Seon Lee, Antioxidant effects of ginseng powder on liver on benzo(a)pyrene-treated mice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 2007;39(2):217-221
85. Lee CK, Han YN, Kim NY, Choi JW, The therapeutic effects of Korean ginseng on carbone tetrachloride- and

- galactosamine-induced hepatotoxicity. J. Korean Res. 2003;27:11-16
86. Hasegawa H, sung J H, Benno Y. Role of human intestinal *Prevotella oris* in hydrolyzing Ginseng saponins. *Planta Med* 1997;63:436-440
87. Bae E A, Park S Y, Kim DH. Constitutive β -glucosidases hydrolyzing ginsenoside Rb1 and Rb2 from human intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull* 2000;23:1481-1486
88. Hae-Ung Lee, Eun-ah Bae, Myoung Joo Han, Nam-Jae Kim and Dong-Hyun Kim, Hepatoprotective effect of ginsenoside Rb1 and compound K on tert-butyl hydroxide-induced liver injury. *Liver International* 2005;25:1069-1073
89. Davila J C, Lenherr A, Acosta D, Protective effect of flavonoids on drug-induced hepatotoxicity in vitro. *Toxicology* 1989;57:267-286
90. Ramadan L A, Roushdy H M, Abu Senna G M, Amin N E, El-deshw O A. Radioprotective effect of silymarin against radiation induced hepatotoxicity. *Pharmacol Res* 2002;45:447-454
91. Wang X L. clinical effect of biphenyldimethyl dicarboxylate(DDB) pilules on 56 cases of chronic viral hepatitis B. *New Drugs Clinic* 1984;81:334-341
92. Kim, N. D., Vasorelaxant effect of ginseng and role of endothelium. *J. Ginseng Res.* 1992;16(1):78

93. Nam, K. Y., Sub, J. S., Chang, S. J., Jeon, B. H. and Park, H. K., Vasorelaxant effect by protopanaxatriol and protopanaxadiol of Panax ginseng in the pig coronary artery. *J. Ginseng Res.* 1994;18(2):95-102
94. Joo, C. N., Biochemical studies on ginseng saponins(X VI). The effect of ginseng saponin on hypercholesterolemia induced by prolonged cholesterol feeding in rabbits. *Korean Biochem. J.* 1980;13(1):51-59
95. Yamamoto, M and Uemura, T., Long-term ginseng effects on hyper lipidemia in man with further study of its action on ather-ogenesis and fatty acid liver rats. *Proc. 4th Int Ginseng Symp.* 1984:13-20
96. Mosca, L., Appel L.J., Benjmin, E.J. and Berra, K. et al., American Herat Association. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women. *Circulation.* 2004;109:672-693
97. Bopanna, K.N., Kannan, J., Balarman, R. and Rathod, S.P., Antidiabetic and antihyperlipidaemic effects of neem seed kernel powder on alloxan diabetic rabbits. *Ind. J. Pharmacol.* 1997;29:162-167
98. Roche, H.M. and Grbney, M.J., Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism. *Am. J. Clin. Nuti.* 2000;71(1):232-237
99. Yamamoto, M. and Kumagai, A *Proc, 4th Int. Ginseng*

- Symp.(Seoul), 1984:13
100. Yokozawa, T., Kobayashi, T., Kawai, A., Oura, H, and Kawaxhima, Y. Chem. Pharm. Bull., 1985;33:722
 101. S.C. Joshi, Antiatherogenic and antioxidant status of Panx ginseng in cholesterol fed rabbits. 9th Int Ginseng Symp. 2006
 102. Clearfield, M., Trial report–stain drigs. Curr. Atheroscler. Rep. 2005;7:7–10
 103. Sudhop, T., Lujohann, D., Kodal, A., Igel, M., Trobble, D.L. and Shah, E. et al., Inhibition of intestinal cholestrol absorption by ezetimibe in humans. Circulation. 2002;106:1943–1948
 104. Joo, C. N., Kim, D. S. and Koo, J. H. Kor Biochem. J., 1980;13:51
 105. Joo, C. N., Lee, H. B., Lee, Y. W. and Kang, I. C.Pro. 5th Int Ginseng Symp.(seoul), 1989:7
 106. Scharufastatterm I., Hyslop, P. A., Jackson, J. H. and Chchrane, C. G. J. Clin. Invest. 1988;82:1040
 107. Bartoli, G. M., Giannattasio, B. G., Palozza, P and Cittadini, A. Biochem. Biophys. Acta., 1988;966:214
 108. Frindovich, I. Biology effects of the superoxide radical. Adv. Enzymol., 1986;58:62
 109. Prasad, K., Halra, J., Oxygene free radical and hypercholesterolemic atherosclerosis effect of vitamin E. Am. Heart. J. 2005;125:958–973
 110. Witztum, J. L., Role of oxidized LDL in ahterogenesis. Br. Heart

- J. 1993;69:512-522
111. Chan, P. and Tomlinsos, B., Antioxidant effects of Chinese traditional medicines focus on trilinolin isolated from the Chinese herb sanchi(*Panax pseudoginseng*). *J. Clin. Pharmacol.* 2000;40:457-461
 112. Jung, C.H., Seog H.M., Choi, I. W., Choi, H.D., Cho, H.Y., Effects of wild ginseng(*Panax dingseng* C.A. Meyer) leaves on lipid peroxidation level and antioxidant enzyme activities in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2005;98(3):245-255
 113. Bo Hyun Kim, Geum Su Seong, Seung Gi Chun, Jong Hwan Sung and Che Chul Chang, Antioxidative effects of white ginseng and red ginseng on liver of high fat diet-treated mice. *J. Ginseng Res.* 2005;29(3):138-144
 114. Kim S. I., Kim Y. S., Jeon, B. S. and Lim, C. H. Effect of ginseng on fat accumulation in the obese rats induced by high fat diet. *Korean J. Ginseng. Sci.* 1986;10:2
 115. Yokozawa, T., Liu, Z. W. and Dong, E., A study of ginsenoside-Rd in a renal ischemia-reperfusion model. *Nephron* 1998;78:201
 116. Trayhurn P. Endocrine and signaling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 2005;184:285-293
 117. Fulop T, Tessier D, Carpentier A. The metabolic syndrome. *Pathologie biologique* 2006;54:375-386

118. Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Atheroscler Thromb Vascul Biol* 2004;24(1):29-33
119. Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulation protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:51-19
120. Nagasawa, A., et al. Effects of soy protein diet on the expression of adipose genes and plasma adiponectin. *Horm. Metab. Res.* 2002;34:635-39
121. Flachs, P., et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia.* 2006;49:394-97
122. Nagao, K., et al. Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin level and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;310:562-66
123. Pischon, T., et al. Association between dietary factors and plasma adiponectin concentrations in men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;81:780-786
124. Furukawa, S., et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 2004;114:1752-1761
125. Yamauchi, T., et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and

- obesity. *Nat. Med.* 2001;7:941–946
126. Yamauchi, T., et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 2002;8:1288–1295
 127. Tomas, E., et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;9:16309–16313
 128. Berg, A.H., et al. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.* 2001;7:947–953
 129. Watson RT, Kanzaki M, Pessin JE Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr Rev.* 2004;25:177–204
 130. Cai, D. et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nature Med.* 2005;11:183–190
 131. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307 *J Biol Chem* 2000;275:9047–9054
 132. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action *J. Biol. Chem.*, 2002;277:1531–1537

133. Paz, K., Hemi, R., LeRoith, D., Karasik, A., Elhanany, E., Kanety, H., and Zick, Y. A Molecular basis for insulin resistance: Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation *J Biol Chem.* 1997;272:29911-29918
134. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-68
135. Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE* 2005;268:pe4
136. Attele AS, Zhou YP, Xie JT, Wu JA, Zhang L, Dey L, Pugh, W, Rue, PA, Polonsky, KS, Yuan, CS Antidiabetic Effects of Panax ginseng Berry Extract and the Identification of an Effective Component. *Diabetes* 2002;51:1851-1858
137. Xie JT, Mehendale SR, Li X, Quigg R, Wang X, Wang CZ, Wu JA, Aung HH, A Rue P, Bell GI, Yuan CS. Anti-diabetic effect of ginsenoside Re in ob/ob mice. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005;1740:319-25
138. D.T. Chao, S.J. Korsmeyer, BCL-2 FAMILY: regulators of cell death, *Ann. Rev. Immunol.* 16 1998;395-419
139. Zhiguo Zhang, Xiaoying Li, Wenshan Lv, Yisheng Yang, Hong Gao, Jun Yang, Yun Shen, Guang Ning, Ginsenoside Re reduces

- insulin resistance through inhibition of JNK and NF- κ B
Molecular Endocrinology 2007;20:1210-1225
140. Cryer B, Dubois A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase –a review. Prostaglandins Other Lipid Mediators 1998;56:341-361
 141. Lipisky PE. The clinical potential of cyclooxygenase-2-specific inhibitors. Am J Med 1999;106:51-57
 142. Baker CS, Hall RJ, Evans TJ. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19:646-655
 143. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. Am J Pathol 1999;155:1281-1291
 144. Dannenberg AJ, Subbaramaiah, K. . Targetting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. Cancer Cell 2003;4:431-436
 145. Adderley SR, Fitzgerald DJ. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. J Biol Chem 1999;274:5038-046.
 146. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. JAMA

- 2001;286:954-959
147. Juni P, Nartey L, Reichenback S, Sterchi R, Dieppe PA, Egger M. Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis. *Lancet* 2004;364:2021-2029
 148. Zarraga IG, Schwarz ER. Coxibs and heart disease: What we have learned and what else we need to know. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1-4
 149. Smith WL, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 1996;62:167-172
 150. Hsi LC, Angerman-Stewart J, Eling TE. Introduction of full-length APC modulates cyclooxygenase-2 expression in HT-29 human colorectal carcinoma cells at the translational level. *Carcinogenesis* 1999;20:2045-2049
 151. Keum YS, Han SS, Chun KS, Park KK, Park JH, Lee SK, Surh YJ. Inhibitory effects of the ginsenoside Rg3 on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF-kappaB activation and tumor promotion *Mutat Res.* 2003;523-524:75-85
 152. Thornberry NA., Caspase: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 1998;5:97-103
 153. McLaughlin ME, Ehrhart TL, Bersion EL and Dryja TP., Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3249-3253

154. Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 1997;53:478-490
155. Faraco PR, Lederwood EC, Vandenabeele P, Prins JB and Bradley JR., Tumor necrosis factor induces distinct patterns of caspase activation in WEHI-164 cells associated with apoptosis or necrosis depending on cell cycle stage. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:385-392
156. C. Gentilu, s. Morelli, A. Russo De Boland, Involvement of PI3-kinase and its association with c-Sec in PTH-stimulated rat enterocytes. *J. Cell. Biochem* 2002;86:773-783
157. Jeong-Ki Min, Jung-Ho Kim, Young-Lai Cho, Yong-Sun Maeng, Shin-Jeong Lee, Bo-Jeong Pyun, Young-Myeong Kim, Jeong Hill Park, Young-Guen Kwon., 20(S)-Ginsenoside Rg3 prevents endothelial cell apoptosis via inhibition of a mitochondrial caspase pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006;349:987-994
158. Guan L, Li W, Liu Z., Effect of ginsenoside-Rb1 on cardiomyocyte apoptosis after ischemia and reperfusion in rats. *J Huzhou Univ Sci Tech Med Sci* 2002;22(3):212-215
159. Liu Z, Li Z, Liu X., Effect of ginsenoside Re on cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2/Bax gene after ischemia and reperfusion in rats. *J Huzhou Univ Sci Tech Med Sci* 2002;22(4):305-309

ABSTRACT

Studies on anti-atherosclerosis and insulin resistance effect of ginseng extracts in Apo E KO mice

Soojeong Jang

Department of Food & Nutrition

The Graduate School

Sungshin Women's University

Ginsenosides, the principal active components of ginseng, have been shown to possess a variety of beneficial effects on human health, including anti-inflammatory, antioxidant and anticancer effects. There are two major classes of ginsenosides, namely protopanaxadiol (PD; Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3, Rh2) and protopanaxatriol (PT; Rg1, Rg2, Re, Rf, Rh1). In this study, the atherogenic and insulin resistance effects of PD:PT ratio were examined in atherosclerosis-susceptible C57BL/6J, apolipoprotein E-deficient mice. To test this, 4 group of mle apo E deficiency mice was fed high-cholesterol diet for 12 weeks. Negative and positive control received daily intraperitoneal injection of saline for last 4 weeks. Ginseng treated animal of differential PD:PT ratio injected at an intraperitoneal dose of 100mg/kg for last 4 weeks. Plasma, heart and liver tissue measured lipid profiles and lipid peroxidation(LPO)

products. Also Plasma and fat tissue measured adiponectin concentration. Each tissues investigated insulin signaling, inflammation and apoptosis mechanism through western blot assay. Heart tissue was immunohistochemistry and TUNEL. Aorta tested H&E for lipid accumulation.

The results are summarized as follow;

1. PD:PT=1 was significantly effected that supressed weight gain and increased food efficiency for fed high-cholesterol diet.
2. For liver protective effect of high-cholesterol diet-induced liver damage was that PD:PT=1 significantly decreased in plasma, but PD:PT=2 significantly decreased in liver tissue.
3. Diffrential PD:PT ratio of lipid profile was that TG and TC significantly decreased each tissue and plasma HDL-C was significantly increased. Ginseng treated group shows that lipid profiles improved depend on tissues.
4. The plasma LPO product similar reduced in PD:PT=1 and PD:PT=2. PD:PT=2 significanlty reduced in the heart tissue, but hepatic LPO product reduced in PD:PT=1.

5. Adiponectin released fat tissue was significantly increased in PD:PT=1 but circulated adiponectin concentration was not effective.

6. Insulin Receptor- β expression increased that 3 times in PD:PT=1 and 2 times in PD:PT=2 and Phospho-IRS-1(Ser612) expression suppressed 0.8 times and 0.9 times in each.

7. pro-apoptotic molecular suppression was effected in PD:PT=2 and anti-apoptotic molecular expression was effected in PD:PT=1.

In summary, differential PD:PT ratio has several effects in anti-atherosclerosis and improved insulin resistance. First, PD:PT=1 decreased weight gain cause high-cholesterol diet. Second, differential PD:PT ratio decreased TG and TC level. Also it was increased in plasma HDL-C and reduced LPO product in each tissue. So removed harmful free radical from body and increased activity of antioxidant enzyme. The PD:PT=1 increased anti-apoptotic and anti-inflammation molecular expression. On the other hand the PD:PT=2 suppressed anti-apoptotic and anti-inflammation molecular expression. So differential PD:PT ratio showed that atherosclerosis factor decreased through suppression of COX-1,2, NF- κ B activity and caspase-8,9 and increased insulin sensitivity.