고려홍삼의 구강악취 억제기능; H₂S 생성에 따른 염증매개 유전자 및 cystathionine γ -lyase의 약화기능

최기석¹ · 이소정² · 이정상¹ · 홍경숙¹ · 김정곤² · 김윤재² · 함기백^{1,2}

¹가천의과학대학교 이길여 암당뇨연구원 중개의학연구실, ²가천의학전문대학원 소화기내과학교실
(2009년 11월 20일 접수; 2009년 12월 9일 수정; 2009년 12월 11일 수리)

Beneficial Effect of Korea Red Ginseng on Halitosis; Attenuation of H₂S Induced Inflammatory Mediators and cystathionine γ -lyase Expression

Ki-Seok Choi¹, So-Jung Lee², Jeong-Sang Lee¹, Kyung-Sook Hong¹,
Jeong-Gon Kim², Yoon-Jae Kim² and Ki-Baik Hahm^{1,2}

¹Laboratory of Translational Medicine, Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Gachon University of Medicine and Science

²Department of Gastroenterology, Gachon Graduate School of Medicine, Incheon, Korea

(Received November 20, 2009; Revised December 9, 2009; Accepted December 11, 2009)

Abstract : Halitosis is a generally accepted marker of diseases in the oral cavity and of systemic and gastrointestinal disorders. Based on these authors' previous findings (that (1) there is a close association between *H. pylori* infection and halitosis; (2) Korea red ginseng may suppress the colonization of *H. pylori*, fight *H. pylori*-induced cytotoxicity, and impose significant anti-inflammatory actions in patients with chronic gastritis; and (3) *H. pylori* infection is linked with the generation of significant levels of volatile sulfur compounds (VSCs), and the levels of VSCs correlate significantly with *H. pylori*-associated mucosal damages), in the current study, the authors documented the molecular mechanisms of Korea red ginseng's efficacy in ameliorating halitosis. When the RAW 264.7 cells were treated with the H₂S releasing compound NaHS, the mRNA expression of cystathionine γ -lyase (CSE), IL-6, COX-2, and iNOS were more significantly induced compared with the vehicle-treated group. The cytoskeletal components of ezrin's and moesin's mRNA expressions were elevated by NaHS treatment accompanied by the activation of MAPK, p38, and ERK. Korea red ginseng pretreatment reduced both the NaHS-induced CSE expression and the proinflammatory genes (e.g., IL-6, COX-2, and iNOS) in a concentration-dependent manner. The ERM expression and the phosphorylation of p38 were also significantly reduced by Korea-red-ginseng pretreatment. Overall, Korea red ginseng pretreatment imposed significant anti-inflammatory effects through the downregulation of the NaHS-triggered proinflammatory gene expression, CSE, and ERM mRNA expression. Korea red ginseng could thus be said to be a key remedy of halitosis and to be effective in relieving gastric inflammation.

Key words : halitosis, H₂S, *H. pylori*, korea red ginseng, inflammation

서 론

구강악취(halitosis, malodor)란 입이나 인접기관에서 나는 불쾌한 냄새를 통칭하는 것으로, 사회적 관계형성이나 대인관계에 있어 자신감을 결여 시키게 하는 등의 간접적 영향을 끼친다.^{1,2)} 이외에도 신체기관의 질환과 연관되어 발생하는데

여기에는 구강질환은 물론 전신질환 및 소화기계 질환을 시사하는 질환 표지자 (biomarker)일 수도 있다.²⁾ 즉, 구강악취는 구강위생 불량이나 잇몸 병 원인으로 생기며, 비염과 인두염 같은 호흡기계질환, 위염 등의 위장관내 질환, 당뇨병으로 인한 합병증, 간 및 신부전으로 인한 합병증,식이습관 등도 원인이 될 수 있다.³⁾ 저자 등은 최근의 연구에서 구강악취가 식도를 포함한 위장관 점막손상을 나타내는 지표일 수 있으며 위장관의 염증 정도와 비례하며, 미란성 위염이나 위궤양

*Corresponding author. E-mail: hahmkb@gachon.ac.kr
Phone: +82-32-899-6055, Fax: +82-32-899-6054

등과 같은 위질환의 경우 위액에 함유되어 있는 구강악취의 원인물질인 volatile sulfur compounds (VSCs)의 양이 구강악취의 정도와 비례함을 보고한 바 있다.⁴⁾ 그리고 특히 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 감염이 VSCs 생성과 직접연관이 됨이 Lee 등⁵⁾에 의하여 보고되었다. 더불어 *H. pylori* 제균이나 *H. pylori* 감염과 연관된 염증을 약화시키면 환자의 구강악취 증상 완화는 물론 객관적인 VSCs의 감소가 초래됨을 규명하여,⁶⁾ 구강악취는 비록 매우 다양한 원인에 의하여 발생되기는 하나 지금까지 뚜렷한 치료방법이나 대책이 없는 상황에서 소화관 염증제거 또는 완화방법이 있다면 이는 구강악취 치료에 하나의 대안이 될 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 구강악취의 치료방법 중에 한가지로 고려홍삼의 효능이 규명되었는데, 이는 저자 등의 과거연구 즉, 고려홍삼의 *H. pylori* 유도 세포사멸이나 항변이 효능, lipooxygenase (LOX) 억제제를 통한 *H. pylori* 유도 leukotriene 생성저해 효능, 위점막세포 재생효능, 항산화효능과 함께 여러 연구자들에 의한 항헬리코박터 효능, 항염증작용, 면역조절기능 등에 기초하여 *H. pylori*에 의한 VSCs 생성 억제 기능에 근거한다.^{7,8)} 그러나 이러한 고려홍삼의 구강악취 개선효능에 대한 구체적인 작용기전은 아직까지 알려져 있지 않다. 최근에 저자 등은 임상연구 및 중개연구를 통하여 *H. pylori* 제균에 무관하게 *H. pylori* 양성인 구강악취 환자에게 10주간의 고려홍삼 투여는 통계적으로 유의한 구강악취 개선효능이 있으며, 이러한 효능은 *H. pylori* 제균 치료 후 고려홍삼 추가 치료군에서 최고의 구강악취 개선효능이 있음을 발표한 바⁶⁾ 있으며, *H. pylori* 감염이 VSCs 발생에 관여하는 효소인 cystathionine γ -lyase (CSE) 나 cystathionine β -synthetase (CBS) 유전자 발현과 연관되며 고려홍삼이 이를 제어해 주는 효능이 있음을 발표한 바 있다.

이러한 배경하에 본 연구에서는 구강악취의 대표적인 원인물질인 hydrogen sulfide (H_2S)의 생성증가가 VSC 생합성에 관여하는 유전자 및 염증매개 cytokines의 생성에 미치는 영향과 고려홍삼투여에 따른 이들 매개 유전자의 억제여부를 규명하였으며 이러한 연구는 구강악취증의 치료에 고려홍삼이 이용될 수 있음을 밝히는데 기여할 것이다.

재료 및 방법

세포배양

Mouse monocyte/macrophage인 RAW 264.7 cell은 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL, NE, USA)과 1% penicillin-streptomycin (GIBCO BRL, NE, USA) 등이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, WelGENE, Daejeon, Korea)을 사용해 37°C, 5% CO_2 세

포 배양기에서 배양하였다.

고려홍삼추출물 세포주처리

본 실험에 사용한 고려홍삼 추출물은 한국인삼공사 (대전, 한국)에서 제공받았다. 고려홍삼 추출물은 3차 증류수에 용해하여 배지에 적정 농도 (50 μ g/ml, 100 μ g/ml)로 1시간 전 처리한 이후 H_2S 생성을 위하여 0.1 mM NaHS를 처리하였다.

RT-PCR에 의한 mRNA 발현의 분석

동일한 조건에서 준비된 세포를 대상으로 RioEX (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후에 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 Accu-POWER PCR PreMix Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 관찰 대상 유전자 (Table 1)를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였으며 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 ultra violet (UV)하에서 확인하였다. 각각의 유전자 결과를 3번의 실험을 반복하여 평균발현을 GAPDH로 보정하여 densitometry도표로 나타내었다.

Western blot 분석에 의한 단백질 발현의 분석

대조 혹은 고려홍삼 추출물이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해시킨 후 초고속 원심분리로 세포내 lysate을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide 전기영동으로 분리하였다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 polyvinylidene fluoride membrane (PVDF, Millipore, Billerica, MA)으로 electroblotting 방법으로 전이시킨 후, 5% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in Phosphate Buffered Saline)에 4°C에서 배양하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 특정 단백질에 대한 항체 [ERK-1 (K-23, sc-94, Santa Cruz Biotechnology), phospho-ERK (E-4, sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), p38 (N-20, sc-728, Santa Cruz Biotechnology), phospho-p38 (Thy180/Tyr 182, D3F9, 4511, Cell Signaling Technology), β -actin (I-19, sc-1616, Santa Cruz Biotechnology)]를 membrane에 적용시켜 전부 1:1000 희석 비율로 4°C overnight 항원항체 반응을 유도하였다. 항원항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham life Science Corp., Arlington Heights,

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene name	Sequence	
GADPH	Sense	5'-AATGTATCCGTTGTGGATCT-3'
	Antisense	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
CBS	Sense	5'-TCATCCTGCCTGACTCTGTG-3'
	Antisense	5'-TTGCAGACTTCGTCTGATGG-3'
CSE	Sense	5'-CGCACAAATTGTCCACAAAC-3'
	Antisense	5'-CTTAGCATGCTGCAGAGCAC-3'
IL-6	Sense	5'-CCGAGAGGAGACTTCACAG-3'
	Antisense	5'-TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC-3'
COX-2	Sense	5'-CATCCTGCCAGCTCCACCGC-3'
	Antisense	5'-GGGAGGAAGGGCCCTGGTGT-3'
iNOS	Sense	5'-AATGGCAACATCAGGTCGGCCATCACT-3'
	Antisense	5'-GCTGTGTGTACAGAAAGTCTCGAACTC-3'
HO-1	Sense	5'-GACAGCATGTCCCAGGATTT-3'
	Antisense	5'-GGTTCTGCTTGTTTCGCTCT-3'
Ezrin	Sense	5'-GACCTGGTGAAGACCAAAGAGG-3'
	Antisense	5'-TGGAACACAGCAAGGGGGTGTG-3'
Moesin	Sense	5'-TTCTTGGACTCATCTCGGGCAT-3'
	Antisense	5'-AGGAAAGTGAGGCTGTGGAATG-3'

IL)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다.

결 과

NaHS (sodium hydrogen sulfide) 투여 후 CSE와 CBS의 발현변화와 고려홍삼 투여에 따른 변화

VSCs 생합성에는 cystathionine γ -lyase (CSE)와 cystathionine β -synthetase (CBS) 유전자가 관여하는 것으로 알려졌다.⁹⁾ 본 연구에서는 대식세포를 대상으로 연구하였기에 murine monocyte/macrophage인 RAW 264.7 세포에 H₂S를 유리하는 물질로 알려진 NaHS (0.1 mM) 처리 후 시간에 따른 CBS와 CSE의 유전자 발현을 살펴본 결과, NaHS 처리 후 2시간 이후부터 24시간까지 CSE의 발현이 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 1a). 그러나 이전의 *H. pylori* 유도 때⁶⁾와는 달리 NaHS로 자극을 한 경우에는 CBS의 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 배경하에 50 μ g/ml 및 100 μ g/ml 고려홍삼 추출물 1시간 전처리 그룹에서 NaHS에 의하여 유도된 CSE mRNA 발현이 농도 의존적인 감소를 보였다. 그러나 고려홍삼 추출물 단독에 의해서는 대조군 대비 CSE 유전자의 발현이 변하지 않았다 (Fig. 1b).

NaHS 투여 후 IL-6, COX-2, iNOS, HO-1의 발현변화와 고려홍삼 투여에 따른 변화

*H. pylori*나 Lipopolysaccharide 와 같은 bacterial component에 의해 노출된 세포는 interleukin-6 (IL-6), cyclooxy-

genase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) 과 같은 염증관련 cytokines의 발현을 유도하며^{10,11)} 동시에 H₂S의 생성이 증가된다.⁵⁾ 그러므로 본 연구에서는 NaHS 투여에 따른 H₂S 증가가 이들 염증매개 cytokines에 미치는 영향을 알아보기 위하여, RAW 264.7 세포에 NaHS 처리 후 시간에 따른 IL-6, iNOS 및 COX-2의 유전자 발현을 살펴보았다. NaHS 처리 후 2시간 이후부터 12시간까지 IL-6 (Fig. 2a), COX-2 (Fig. 2c) 및 iNOS (Fig. 2d)의 발현이 유의하게 증가되었다. 이러한 결과는 NaHS 자극에 따른 H₂S의 생성 증가는 이전의 연구관찰과 같이 염증매개 cytokines의 증가와 연관 됨을 시사한다 하겠다. 이때 50 μ g/ml 또는 100 μ g/ml 농도의 고려홍삼 추출물을 1시간 전처리 그룹에서 농도의존적인 IL-6 및 iNOS 발현 감소를 관찰할 수 있었다. 반면에 고려홍삼 추출물의 전처치는 NaHS 자극에 의한 COX-2 mRNA 발현 이상으로 농도 의존적으로 COX-2 발현을 증가시킴을 알 수 있었다.

인삼 및 고려홍삼은 체내 면역능력을 증강시킴으로써 뛰어난 건강증진효과가 있다는 것이 오래 전부터 알려져 왔다.¹²⁾ 이러한 배경하에 고려홍삼의 투여가 세포내 대표적인 항산화 단백질로 알려진 heamoxxygenase-1 (HO-1)의 발현을 통하여 상기한 항염증작용 및 염증활성 억제효능이 있는지 관찰한 바 NaHS 처리결과나 고려홍삼추출물 각 농도별 처리그룹 간에 유의한 HO-1의 발현차이를 관찰할 수는 없었다 (Fig. 2e).

NaHS 투여 후 ezrin 및 moesin 발현변화와 고려홍삼 투여에 따른 변화

여러 가지 자극에 의한 세포의 염증반응이 유도되는 과정

Fig. 1. Cystathionine γ -lyase (CSE) and cystathionine β -synthetase (CBS) expression after NaHS treatment and their changes after Korea red ginseng treatment. (a) With the treatment of 0.1 mM NaHS, the CSE mRNA expression was notably induced after 2 hr and persisted up to 24 hr. However, the CBS mRNA was not much influenced. (b) 50 μ g/ml or 100 μ g/ml Korea red ginseng extracts pretreated 1 hr before H₂S generation effectively attenuated the expression of CBS in a concentration dependent manner. Korea red ginseng alone did not affect CSE or CBS expression.

중에 ezrin, radixin, 그리고 moesin (ERM으로 약함)과 같은 단백질들은 세포막과 세포골격 성분인 F- 또는 β -actin 같은 세포골격 구성성분들 간의 결합체 역할을 하고, 아울러 세포의 부착, membrane ruffling과 microvilli 형성에 관여한다.¹³⁾ 이러한 기능에 근거하여 *H. pylori* 나 기타의 감염에 따른 백혈구 활성화 및 화학주성에 ERM의 활성화를 통한 백혈구 형태의 변화가 유도되어 백혈구가 혈관내피세포를 비집고 나가 화학주성물질 분비 장소로 이동을 하게 되는 “염증반응”이 완성되게 된다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 이러한 배경으로 상기의 결과로 NaHS 투여는 유의한 화학주성 cytokine의 증가와 연관되므로 H₂S의 생성이 ERM의 활성화와 연관되는 지를 관찰하였다. 실험결과 ezrin의 경우, 0.1 mM NaHS 처리 후 2시간 이후부터 24시간까지 mRNA 발현이 증가되어 있었고 (Fig. 3a), moesin은 2시간부터 12시간까지 그 발현이 증가됨을 확인하였다 (Fig. 3c). 그런데 이러한 ERM 발현증가는 50 μ g/ml 및 100 μ g/ml의 고려홍삼 추출물 전처리 그룹에서 각각 농도 의존적인 발현감소를 보였다 (Fig. 3b 및 3d).

NaHS 투여에 따른 MAPK 인산화에 고려홍삼 투여에 따른 변화

상기의 연구결과에서 밝혀진 H₂S에 의한 염증활성화 기전에 세포내 신호전달 체계가 관여하는 지를 규명하고 고려홍삼에 의한 인산화 억제제를 알아 보았다. 대조군 대비 vehicle 처리그룹에서 NaHS 2시간 처리에 의해 H₂S 생성은 MAPK 구성 중 주로 p38의 활성화에 의하며 일부 ERK-1/2 인산화를 통한 신호전달계로 염증매개 cytokine 이나 ERM 활성화에 관여함을 알 수 있었다. 반면에 JNK 활성화는 전혀 관찰되지 않았다. 또한 고려홍삼 추출물에 의한 CBS 억제 및 염증활성화 억제에 p38 인산화 억제제 및 일부 ERK 인산화 억제제와 연관되어 있다는 것을 확인하였다 (Fig. 4a). 그러나 각각의 MAPK 억제제를 이용한 실험결과 (Fig. 4b), 고려홍삼의 이러한 염증매개 유전자나 ERM의 변화는 주로 ERK 인산화 억제에 의함을 규명할 수 있었다. 이상의 결과로 H₂S 생성에 따른 염증전파에 ERK이 매인으로 관련되는 신호전달계일 수 있으며 고려홍삼은 이를 비활성화함으로써 항염증작용 및 백

Fig. 2. The expressions of inflammatory responsive genes such as IL-6, COX-2, iNOS, and cellular detoxifying enzyme heme oxygenase-1 (HO-1) after H₂S generation and their changes after Korea red ginseng. (a) With the treatment of 0.1 mM NaHS, the IL-6, one of key cytokine engaged in gastric inflammation, mRNA expression was notably induced after 2 hr and persisted up to 12 hr. (b) 50 µg/ml or 100 µg/ml Korea red ginseng extracts pretreated 1 hr before H₂S generation effectively attenuated the expression of IL-6 in a concentration dependent manner. Korea red ginseng alone did not affect CSE or CBS expression. (c & d) Likewise, the COX-2 and iNOS mRNA expression was notably induced after the NaHS treatment, but their levels of expression was efficiently attenuated with Korea red ginseng pretreatment in a concentration dependent manner, whereas (e) in case of the HO-1 mRNA expression, one of the key cellular detoxifying and antioxidative enzymes, slightly increased expression pattern in case of 50 µg Korea red ginseng pretreatment was noted.

Fig. 2. Continued.

혈구 활성 억제 효능을 보이며 궁극적으로는 CBS의 억제는 물론 항염증작용 및 염증세포 비활성화에 기인하여 구강악취 억제 효능을 보임을 알 수 있었다 (Fig. 5).

고 찰

본 연구결과에서 새롭게 확인한 사실은 1) *H. pylori* 감염이 CSE 및 CBS 발현증가를 통하여 H₂S 생성 및 구강악취증과 연관되어 있으며, H₂S는 위장관 점막의 손상 및 염증을 반영해준다는 저자 등의 최근 보고⁴⁾와 유사하게 본 연구에서는 H₂S 생성 증가를 유도하는 NaHS 투여가 CBS 발현증가를 유도하며 고려홍삼 추출물 전처리로 유의하게 CBS 발현을 감소시킬 수 있다는 결과, 2) H₂S의 증가는 IL-6, iNOS와 같은 염증매개 cytokine과 연관이 되어 있으나 고려홍삼 추출물질에 의하여 유의하게 감소시킨다는 결과, 3) H₂S 생성이 ERM 발현을 통한 백혈구 활성화에 관여된다는 결과와 고려홍삼 추출물을 통하여 유의하게 억제시킬 수 있다는 결과, 4) 고려홍삼의 구취관련 유전자들의 발현 억제 효능은

ERK와 p38 인산화를 줄여줌으로써 가능하다는 결과들이다. 이들 결과를 저자 등의 이전의 연구결과와 종합하면 고려홍삼은 구강악취의 치료에 매우 유용할 것이라는 새로운 발견과 이에 관련한 기전으로는 고려홍삼이 직접적으로 구강악취생성에 관련된 CBS 유전자 억제와 항염증 작용에 의함을 밝힐 수 있었다.⁴⁻⁸⁾

본 연구에서는 H₂S의 생성을 위한 방법으로 NaHS 투여를 통한 방법을 사용하였는데 H₂S의 생성의의에 대하여서는 다소 이견이 있다. 이미 잘 알려져 있는 가스성분의 생물학적 활성물질인 nitric oxide (NO)나 carbon monoxide (CO) 다음으로 생물학적 및 질병의 병태생리에 중요한 것으로 알려져 “third gas of interest”로 명명되고 이들 모두는 gasotransmitters로 알려져 있다.¹⁷⁾ 그런데 질환과의 연관에서는 NO와 마찬가지로 양면의 칼날과 같이 우호적인 면과 병인에 관련되는 두 극단이 알려져 있다. 허혈/재관류 손상과 연관된 기능에 따라 심장 또는 신장보호기능, HO-1 유도나 백혈구 이동억제 등과 연관된 항염증작용과 같은 이로인 생물학적 작용¹⁸⁻²⁰⁾이 있는 반면에, 염증 개시 및 악화, 백혈구 활성화

증가 등의 기능에 기초하여 채장염, 위장관 염증 및 압화 등과 같은 해로운 생물학적 작용²¹⁻²²⁾이 있는 것으로 보고되고 있다. 그런데 특기할 것은 유독 소화관 염증 및 위장관 질환에서는 H₂S은 구강악취의 원인과 더불어 염증의 악화에 관련된 것으로 보고되고 있다.¹⁹⁻²¹⁾ 본 연구자 등의 연구에서도 NaHS 투여를 통한 H₂S의 생성증가에 따라 유의한 염증매개유전자의 증가를 관찰 할 수 있었으며 이전의 연구에서도 H₂S의 생성에 관련된 CBS나 CSE 발현증가와 위점막 손상 간에 유

의한 상관관계를 규명한 바 있어 H₂S 생성여부는 위장관에서는 점막손상의 지표로도 활용이 가능할 것으로 사료된다.

향후 좀 더 깊은 조절기능이 규명되어야 하지만 본 연구를 통하여 고려홍삼이 H₂S 생성에 따른 각종 염증매개 관련 유전자의 약화는 물론 H₂S와 같은 VSCs 생성에 관련된 CBS 유전자의 발현을 억제시키는 기능을 규명하였기에 고려홍삼이 구강악취증에 유효하며, 특히 *H. pylori* 감염과 연관된 구강악취 및 염증의 완화에 매우 효능이 있을 수 있음을 뒷

Fig. 3. The expressions of ERM (ezrin/radixin/moesin) after H₂S generation and their changes after Korea red ginseng. (a) With the treatment of 0.1 mM NaHS, the ezrin, important cytoskeletal component in leukocyte extension for extravasation, mRNA expression was notably induced after 2 hr and persisted up to 24 hr. (b) 50 µg/ml or 100 µg/ml Korea red ginseng extracts pretreated 1 hr before H₂S generation effectively attenuated the expression of ezrin in a concentration dependent manner. The 100 µg concentration of Korea red ginseng almost inhibited ezrin expression. (c) With the treatment of 0.1 mM NaHS, the moesin, molecule participated in leukocyte migration and activation in concert with ezrin, mRNA expression was notably induced after 2 hr and persisted up to 12 hr. (d) The 50 µg/ml or 100 µg/ml Korea red ginseng extracts pretreated 1 hr before H₂S generation effectively attenuated the expression of moesin in a concentration dependent manner.

Fig. 3. Continued.

Fig. 4. Changes in the phosphorylation of MAP kinases such as p38 and ERK after NaHS treatment in the presence of Korea red ginseng pretreatment. (a) When we compared between vehicle-treated and NaHS-treated group, there were significant elevated phosphorylation of p38 and ERK at 2hr time point, of which activation was attenuated with pretreatment of 100 µg/ml extract of Korea red ginseng. JNK, another kind of MAP kinases, phosphorylation was not detected. (b) When the inhibitor of each MAPK, ERK, p38, and JNK, respectively, was administered, ERK MAPK seems to be majorly engaged in these actions of Korea red ginseng. Taken together, ERK activation might be the main MAPK engaged in H₂S generation with NaHS treatment and inactivation was induced with Korea red ginseng.

받침해주는 결과라 하겠다. 특히 염증매개물질이나 구강악취 유발물질의 생성에 MAPK 활성화가 관여되며 고려홍삼은 이들 신호전달계를 효율적으로 제어해 줌을 아울러 본 연구에서 규명함으로써 이전의 고려홍삼의 구강악취 개선이라는 임상시험결과를 통합하면, 고려홍삼의 구강악취의 개선효능은 위염증의 효율적 조절과 별도로 *H. pylori* 약화기능 모두를 보장해줄 수 있는 기대가 높은 대표적인 식물유래 유효물질 (phytoceutical)임을 강조하겠다.

특히 본 연구에서는 백혈구 활성화를 통한 염증반응에 중요한 기전중의 하나인 ERM (ezrin-radixin-meosin) 활성화가 H₂S와 연관되며 고려홍삼이 이를 조절함으로써 궁극적으로는 화학주성의 억제에 따른 항염증작용이 아울러 있음을 밝힐 수 있었다. ERM 단백질은 actin 세포 골격계와 세포막간의 linker로서 작용하는 actin binding protein으로서 세포모양변형 및 이동에 관련된 주요한 단백질로서 위장에서는 위벽세포의 활성화에 따른 프로톤 펌프의 벽세포 분비계 활성을

Fig. 5. Proposed molecular mechanism of H₂S and/or *H. pylori*-influenced signal cascades and the preventive effect points of Korea red ginseng treatment. *H. pylori* infection, responsible for H₂S generation through the induction of CSE and CBS, lead to several cellular events, including inflammation, proliferation, apoptosis, and H₂S generation, by which *H. pylori* infection is associated with either gastritis or ulcer in addition to cancer. In the current study, we could add novel evidences that Korea red ginseng was effective in 1) ameliorating gastric inflammation as evidenced with attenuating effects on iNOS, IL-6, COX-2, and ERM, 2) possible anti-tumorigenesis as evidenced with COX-2 decrease, and 3) improving halitosis as evidenced with inhibiting CBS induction.

통한 위산분비에도 관여한다.²³⁾ 특히 백혈구나 대식세포에서는 화학주성에 따른 내피세포 탈출 및 이동에 중요한 역할을 하게 되는데 “uropod 형성”이라는 백혈구 형태변형을 통하여 혈관내 염증연관세포나 조직내 대식세포 등이 염증활성화 부위로 이동을 할 수 있다.^{15,24)} Dewitt와 Mallett²⁵⁾의 연구에 의하면 백혈구막 확장, 즉 uropod 형성과 같은 현상이 백혈구의 extravasation에 중요한 기전인데 이 기전의 중심이 바로 ERM 활성화에 기초하여 *H. pylori* 감염에 의한 cytokine이나 chemokine 등이 중요한 ERM 활성 자극제이며 이의 결과로 세포내 골격계의 재구성에 따라 세포가 이동 및 내피세포 탈출을 유도하는데, H₂S 자극에 따른 ERM 활성화 및 고려홍삼에 의한 제어에 대한 보고는 저자 등이 최초이라 하겠다.

이상의 연구를 요약하면 H₂S 생성의 원인인자중의 하나인 *H. pylori* 감염은 Fig. 5에서와 같이 세포내 신호 전달계를 통한 염증 매개물질증가, 성장증식인자 및 세포사멸 증대인자 등 다양한 경로를 통한 결과로 위염의 발생은 물론, 위궤양이나 십이지장궤양과 같은 소화성 궤양, 암발생에 관여하게 된다. 저자 등의 본 연구와 이전의 연구를 통하여 CBS나 CSE 전사증가를 통한 결과로 구강악취의 원인물질인 H₂S 등과 같은 VSCs의 증가를 초래된다. 그런데 본 연구결과를 통하여 고려홍삼의 투여가 CSE 전사증가에 따른 염증매개

cytokine 약화는 물론 백혈구 활성화에 관련된 ERM의 조절을 억제할 수 있다는 새로운 사실을 규명하여 본 연구를 임상에 접목시키면, 고려홍삼의 투여는 H₂S 생성에 의한 구강악취 개선효과는 물론 *H. pylori*나 기타 염증자극에 대한 항염증 작용을 유도할 수 있다는 분자적 수준의 구체적인 작용기전을 제시하였다. 그러나 본 연구결과와 뚜렷한 임상적응을 위하여 향후 고려홍삼에 대한 좀 더 구체적인 구강악취 및 위염증 관련 유전자에 대한 더 세밀한 분자생물학적 조절기전연구 및 대규모의 임상연구가 필요하리라 생각된다.

요 약

구강악취 원인 물질인 H₂S를 발생시키는 NaHS로 RAW 264.7 세포를 자극시킨 결과, VSCs 생성에 관련된 CSE 유전자 발현증가와 함께 IL-6, COX-2, iNOS와 같은 염증매개 cytokine이 증가하며, 아울러 본 대식세포나 백혈구 활성화에 관련된 세포내 골격단백질인 ERM의 발현증가가 유도되었다. 이러한 사실은 이전의 연구결과인 VSCs의 생성이 위점막 염증 및 손상과 연관되어 있다는 이전의 연구를 증빙해주는 사실인데, 더욱 흥미로운 사실은 고려 홍삼의 전처치를 통하여 CSE의 억제는 물론 염증 연관 cytokine 및 ERM의 발현억제를 유도할 수 있으며, 이는 세포내 신호전달계인 p38 및

ERK의 억제, 주로는 ERK 비활성화를 통하여 작동됨을 규명하였다. 고려홍삼이 구강악취 환자에게서 증상 완화내지는 소멸을 위하여 매우 유용하다는 이전의 연구결과에 본 연구결과가 추가됨으로 고려홍삼에 의한 VSC 생성억제 기전이 관련된 유전자의 약화는 물론 cytokine 억제 및 백혈구 활성화에 관련된 인자억제를 통한 항염증 작용에 근거한다는 기전을 추가할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국인삼공사(2009)의 연구비지원에 의해 수행한 결과이며, 본 연구결과가 기초가 되어 현재 진행중인 임상시험(고려홍삼의 구강악취개선효능 및 *H. pylori* 제균치료에 미치는 영향)에 참여하고 있는 가천의대 소화기내과 박지영 연구간호사 및 가천의대 전문대학원의 이소정 학생에게 아울러 감사사를 드립니다.

인용문헌

- Porter SR, Scully C. Oral malodour (halitosis). *BMJ*. 333 (7569), 632-635 (2006)
- Tangerman A. Halitosis in medicine: a review. *Int Dent J*. 52 Suppl 3: 201-206 (2002)
- Feller L, Blignaut E. Halitosis: a review. *SADJ*. 60(1): 17-19 (2005)
- Yoo SH, Jung HS, Sohn WS, Hahm KB. Volatile sulfur compounds as a predictor for esophagogastrroduodenal mucosal injury. *Gut Liver* 2: 113-118 (2008)
- Lee H, Kho HS, Chung JW, Chung BC, Kim YK. Volatile sulfur compounds produced by *Helicobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol*. 40(5): 421-426 (2006)
- Lee JS, Kwon KA, Jung HS, Kim JH, Hahm KB. Korea red ginseng on *Helicobacter pylori*-induced halitosis: newer therapeutic strategy and a plausible mechanism. *Digestion* 80(3): 192-199 (2009)
- Park S, Yeo M, Jin JH, Lee KM, Jung JY, Choue R, Cho SW, Hahm KB. Rescue of *Helicobacter pylori*-induced cytotoxicity by red ginseng. *Dig Dis Sci*. 50(7): 1218-1227 (2005)
- Park S, Yeo M, Jin JH, Lee KM, Kim SS, Choi SY, Hahm KB. Inhibitory activities and attenuated expressions of 5-LOX with red ginseng in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Dig Dis Sci*. 52(4): 973-982 (2007)
- Tripatara P, Patel NSA, Collino M, Gallicchio M, Kieswich J, Castiglia S, Benetti E, Stewart KN, Brown PY, Yaqoob MM, Fantozzi R, Thiernemann C. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine γ -lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Lab Invest*. 88: 1038-1048 (2008)
- Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Shen BS, Muta T, Inoue H, Chen CC. Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Mol Pharmacol*. 66(6): 1465-1477 (2004)
- Hisatsune J, Yamasaki E, Nakayama M, Shirasaka D, Kurazono H, Katagata Y, Inoue H, Han J, Sap J, Yahiro K, Moss J, Hirayama T. *Helicobacter pylori* VacA enhances prostaglandin E2 production through induction of cyclooxygenase 2 expression via a p38 mitogen-activated protein kinase/activating transcription factor 2 cascade in AZ-521 cells. *Infect Immun*. 75(9): 4472-4481 (2007)
- Kaneko H, Nakanishi K. Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: clinical effects of medical ginseng, Korean red ginseng: specifically, its anti-stress action for prevention of disease. *J Pharmacol Sci*. 95(2): 158-162 (2004)
- Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J. Biol. Chem*. 274(49): 34507-34510 (1999)
- Bhatia M. Hydrogen sulfide and substance P in inflammation. *Antioxid Redox Signal, In press* (2009)
- Sanchez-Madrid F, Angel del Pozo M. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J*. 18: 501-511 (1999)
- Zhang H, Bhatia M. Hydrogen sulfide: a novel mediator of leukocyte activation. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 30: 631-645 (2008)
- Mancardi D, Penna C, Merlino A, Del Soldato P, Wink DA, Pagliaro P. Physiological and pharmacological features of the novel gastrotransmitter: hydrogen sulfide. *Biochim Biophys Acta* 1787: 864-872 (2009)
- Andruski B, McCafferty DM, Ignacy T, Millen B, McDougall JJ. Leukocyte trafficking and pain behavioral responses to a hydrogen sulfide donor in acute monoarthritis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 295: R814-R820 (2008)
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, Zanardo R, Renga B, Di Sanke M, Morelli A, Cirino G, Wallace JL. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* 129: 1210-1224 (2005)
- Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ, Chung HT. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kB via heme oxidase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Rad Biol Med*. 41: 106-119

- (2006)
21. Tamizhselvi R, Moore PK, Bhatia M. Hydrogen sulfide acts as a mediator of inflammation in acute pancreatitis: *in vitro* studies using isolated mouse pancreatic acinar cells. J Cell Mol Med. 11: 315-326 (2007)
22. Zhang H, Zhi L, Mochhala S, Moore PK, Bhatia M. Hydrogen sulfide acts as an inflammatory mediator in cecal ligation and puncture-induced sepsis in mice by upregulating the production of cytokines and chemokines via NF- κ B. Am J Physiol Lung Cell Physiol. 292: L960-L971 (2007)
23. Ivetic A, Ridley AJ. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signaling in leukocytes. Immunology 112: 165-176 (2004)
24. Faiz S, Malomi W. Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions. J Leukoc Biol. 73: 556-563 (2003)
25. Dewitt S, Mallett M. Leukocyte membrane "expansion"; a central mechanism for leukocyte extravasation. J leukoc Biol. 81: 1160-1164 (2007)