

# 인삼 알콜 추출물이 개구리 피부를 통한 short circuit current 에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 생리학 교실

이종우 · 김희중 · 강두희

=Abstract=

## Effect of Ginseng Alcohol Extract on Short-Circuit Current Across the Frog Skin

Joong Woo Lee, Hee Joong Kim and Doo Hee Kang

Department of Physiology, College of Medicine, Yonsei University Seoul, Korea

In an attempt to examine the effect of ginseng on sodium transport across the biological membrane, we have studied effects of ginseng alcohol extract on the short-circuit current(SCC) and the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-activated ATPase activity in isolated frog skin preparations.

1. Ginseng alcohol extract applied to the mucosal surface of the frog skin significantly increased SCC at low concentration(1~10mg%) but decreased SCC at higher concentration(50~250 mg%).

2. Similarly, when the drug was added to the serosal bathing medium, the SCC was stimulated at low doses(5~25mg%) and inhibited at high doses(50~250mg%).

3. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> activated ATPase activity of the frog skin epidermal homogenate was significantly inhibited by ginseng alcohol extract, the effect being proportional to the concentration of the drug in the incubation mixture.

These results may suggest that a low dose of ginseng alcohol extract enhances the transepithelial sodium transport probably by increasing the permeability of outer membrane of the transporting cell to sodium ion, whereas a high dose of drug reduces the sodium transport primarily by inhibiting Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase mediated active transport step.

### I. 서 론

지난 수년 동안 인삼의 약효에 대한 연구가 여러 방면에서 많이 이루어지고 있다. 인삼의 구성 성분은 주로 10여개의 saponin 배당체, 유기산, 정유, 점액질 및 무기질로 되어 있는데(北川及 岩城 1963) 이들 중 어떤 것이 인삼의 유효성분인지는 밝혀지지 않은 가운데 이들 각 성분의 단독 혹은 복합된 형태로 실험에 이용되고 있다.

인삼의 작용은 주로 대사, 호흡, 발육 및 중추신경 등에 영향을 주는 것으로 보고되었으며 [李(1962), 漢 및 趙(1957), 朴(1969), 金(1970)], 그 외에도 각종 생체막의 투과에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다

즉 인삼의 알콜 추출물은 백혈구에서의 histamine의 유리를 증가시키고, lysosomal membrane의 투과도를 변화시키며, mitochondria에서의 Ca<sup>++</sup> uptake를 감소시킨다고 한다[백 등(1976), 정 및 강(1976) 김 및 강 미발표].

본 실험에서는 인삼 알콜 추출물이 개구리 피부의 상피세포막을 통한 Na<sup>+</sup> 이동에 어떤 영향을 미치는지를 규명하고자 개구리 피부에서 short circuit current(SCC) 및 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도를 측정하고 이에 미치는 인삼 추출물의 영향을 관찰하였다.

### II. 실험재료 및 방법

#### 1. 실험동물

서울 근교에서 잡은 20~30 gm 정도 되는 개구리

\* 본 연구는 1975년도 연세대학교 의과대학 의학 학술 연구비 및 교수연구비의 지원으로 이루어졌음.

(*Rana nigromaculata*)를 실험실의 수조에 두면서 잡은지 2주 이내의 것을 사용하였다.

2. 인삼 알콜 추출물(ginseng alc. ext.)의 제조

오 등(1969)의 방법에 따라 인삼(한국산 백삼) 300gm을 잘게 부순 다음 ethyl alcohol 1.5l를 가하여 72시간 85°C에서 역류증류장치(reflux distiller)에서 증발하여 이를 여과하고 그 여과액을 같은 온도에서 증발시켜 20 gm 정도의 반고형 인삼 알콜 추출물을 얻었다.

3. 분리된 개구리 피부에서의 SCC 측정

개구리 피부를 통한 Na<sup>+</sup>의 능동적 이동량은 Ussing 및 Zerahn(1951)의 short circuit 방법에 의하여 측정되었다.

즉 개구리 복부피부를 분리하여 lucite chamber의 가운데 고정시키고 양쪽 chamber에 115 mM NaCl, 2.5 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> 및 10 mM glucose(pH 7.5)로 된 frog Ringer로 채우고 양쪽 용액에 산소를 공급하였다

개구리 피부 내외의 전위차는 calomel전극과 연결된 Boonton differential DC voltmeter amplifier (Model 98A)로 측정하고 chamber 내에 있는 Ag-AgCl 전극을 통하여 외부에서 직류 전류를 보내어 양측 전위차(p.d.)를 0으로 만들때의 short circuit current (SCC)를 측정하였다. SCC가 일정해지면 개구리 피부 점막측 혹은 장막측 용액에 인삼 추출물을 1~250 mg%가 되게 넣고 이 약물로 인한 SCC의 변화를 20분까지 측정 한 다음 약물이 들어 있지 않은 frog Ringer로 세척하여 원상태로 회복여부를 보고 회복시에는 다시 약물을 가하여 그 영향을 관찰하였다.

4. 개구리 피부 epithelium에서의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도 측정

Kawada 등 (1969)방법에 의하여 개구리 복부 피부로부터 epidermis를 분리하고 이를 glass-glass homogenizer로 homogenate를 만든 다음 Lowry 방법(1951)으로 단백질 농도를 측정하였다. ATPase 활성도를 측정하기 위하여는 100 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub> 및 50 mM Tris(pH 7.4)로 된 incubation 용액에 개구리 피부 homogenate를 0.2 mg/ml 되게 넣고, 5분간 preincubation 하다가 3 mM ATP를 가하여 30°C에서 30분간 incubation 한 후 trichloroacetic acid로 반응을 정지시켰다. 다음 3000×g로 10분간 원심분리하여 상층액내에 유리된 inorganic phosphoric acid의 양을 Fiske-Subbarow (1929)의 비색법으로 측정하였으며 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 활성도는 용액내에 5×10<sup>-4</sup>M의 ouabain을 첨가했을

때와 첨가하지 않았을 때의 효소활성도의 차로써 산출했으며, 이때 incubation 용액내에 인삼 추출물을 2~100 mg% 농도로 넣고 그 영향을 관찰 하였다.

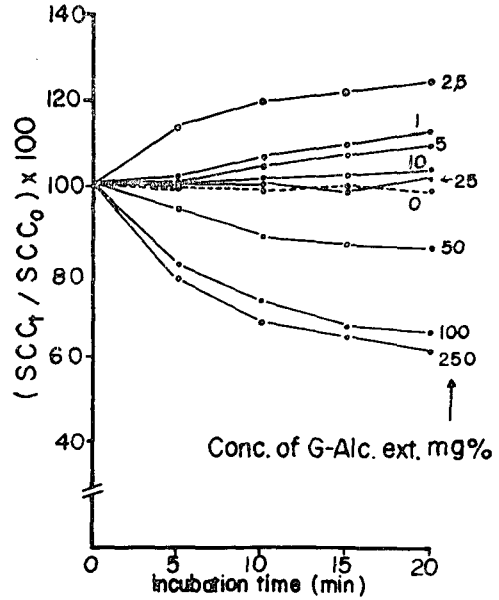


Fig. 1. Effects of ginseng alcohol extract on SCC across the frog skin exposed on its mucosal side. Each point represents a mean of 6 different experiments.

III. 실험성적

1. 인삼 알콜 추출물을 점막측 용액에 가했을 때 SCC의 변화

개구리 피부를 chamber에 고정시키고 5분마다 SCC를 측정하여 그 값이 일정해질 때 점막측 용액에 인삼 추출물을 가한 후 시간에 따른 SCC의 변화를 관찰하였다.

제 1도에 도시된 바와 같이 약물을 가하지 않은 대조군에서는 20분동안 SCC의 변화가 거의 없었으나 인삼추출물의 농도가 1 mg% 혹은 2.5 mg%일 때는 SCC도 약물의 농도에 따라 유의있게 증가하였으며(p<0.01), 5 mg% 및 10 mg% 일 때는 증가도가 감소하였으나 대조군 보다는 높은 값을 보였다. 25 mg%에서는 대조군과 차이가 없었으며, 50 mg% 이상의 농도에서는 SCC가 유의있게 억제되었다(p<0.01).

2. 인삼 알콜 추출물을 장막측 용액에 가했을 때 SCC의 변화

인삼 추출물을 장막측 용액에 첨가했을 때도 낮은농

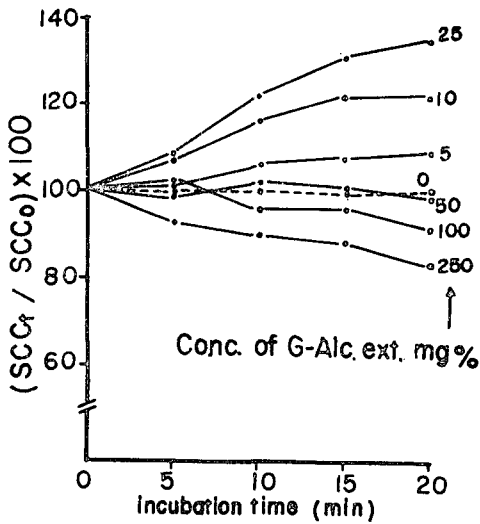


Fig. 2. Effects of ginseng alcohol extract on SCC across the frog skin exposed on its serosal side. Each point represents a mean of 6 different experiments.

도에서는 SCC를 증가시켰으나, 높은 농도에서는 억제하는 경향을 보였다. 제 2도를 보면 첨가한 인삼 추출물의 농도가 5, 10 및 25 mg%로 증가됨에 따라 SCC도 점차 증가되었으나 ( $p < 0.05 \sim 0.001$ ) 50 mg%에서

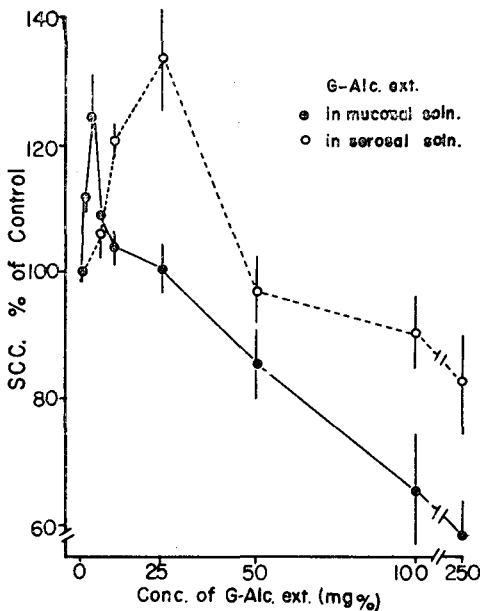


Fig. 3. Effects of different concentrations of ginseng alcohol extract after 20 min exposure on the SCC across the frog skin.

는 대조군과 별 차이가 없었으며, 100mg% 이상에서는 SCC가 의의 있게 감소되었다( $p < 0.01$ ).

인삼 추출물을 개구리 피부 점막측 혹은 장막측에 가한 후 20분대의 SCC의 값을 인삼 추출물 농도에 대한 함수로 나타내면 제 3도에 도시한 것과 같다. 인삼 추출물을 어느 쪽에 첨가하든지 낮은 농도에서는 SCC를 증가시키고 높은 농도에서는 억제시키는 이중효과를 볼 수 있는데 점막측에 가했을 때는 장막측에 가했을 때 보다 낮은 농도(2.5 mg%)에서 SCC의 최고치를 나타냈다.

고농도에서의 SCC 억제효과 역시 점막측에 가했을 때 더 뚜렷하게 나타났다.

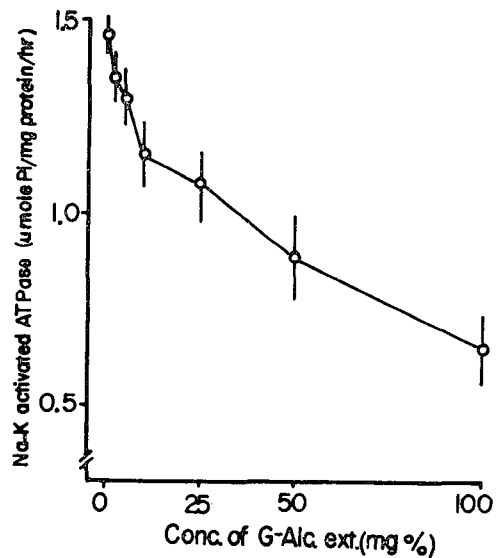


Fig. 4. Effect of ginseng alcohol extract on the activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  activated ATPase of frog skin epidermal homogenate. Each point represents a mean with  $\pm$ S.E. of 12 experiments

### 3. 인삼 알콜 추출물이 개구리 상피세포에서의 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 활성도에 미치는 영향

$\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 활성도는 total ATPase와 ouabain-resistant ATPase( $\text{Mg}^{++}\text{-ATPase}$ )와의 차이로 구하였는데 약물이 들어 있지 않은 대조군의 값이  $1.455 \pm 0.046 \mu\text{mole Pi/mg protein}$ 인 것에 비하여 인삼 추출물이 2, 5, 10, 25, 50 및 100 mg%가 들어있을 때에는 각각  $1.351 \pm 0.066$ ,  $1.303 \pm 0.076$ ,  $1.144 \pm 0.085$ ,  $1.029 \pm 0.108$ ,  $0.888 \pm 0.110$ ,  $0.649 \pm 0.0927$ 로써 인삼추출물의 농도가 증가함에 따라  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 활성도가 억제 되었다.

인삼 추출물은  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 활성도 뿐만 아니라  $\text{Mg}^{++}$  activated ATPase 활성도도 일부 억제시켰는데 상대적으로 볼 때  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 활성도의 억제가 더욱 현저하였다.

#### IV. 고 찰

개구리 피부를 통한  $\text{Na}^+$  이동은 상피세포의 외측막(mucosal border)을 통한 수동적 이동과 내측막(serosal surface)을 통한 능동적 이동에 의하여 이루어진다고 한다(Koefoed-Johnsen and Ussing 1958, Leaf 1965). 따라서  $\text{Na}^+$  이동의 변화는 먼저 점막세포막에서의  $\text{Na}^+$ 에 대한 투과도와 [장막측에서의  $\text{Na}^+$  pump]의 활성도에 의하여 결정된다고 할 수 있다. 개구리 피부에서  $\text{Na}^+$  이동을 증가시키는 물질로는 ADH, c-AMP, theophyllin 및 Amphotericin B 등을 들 수 있는데 이들은 그 작용하는 양상이 각각 다르기는 하지만 일반적으로 점막측 세포막의  $\text{Na}^+$ 에 대한 투과도를 변화시키므로써 SCC를 증가시키는 것으로 알려졌다(Bentley 1960, Bentley and Heller 1964, Orloff and Handler 1962, Lichterstein and Leaf 1965, Singer et al. 1969).

제 1도에서 낮은 농도의 인삼 추출물을 점막측에 가할 때 SCC가 증가되는 것은 인삼 추출물중의 어떤 성분들에 의하여 점막측의  $\text{Na}^+$ 에 대한 투과도가 변화하므로써 세포내로의  $\text{Na}^+$  influx가 증가된 결과라고 생각된다. 이러한 투과도의 변화는 인삼 추출물 속에 포함되어 있는 saponin과 같은 성분들에 의하여 이루어지리라 생각되는데 일반적으로 saponin은 적혈구 막을 비롯한 여러가지 생체막에서 막구성 요소의 일부를 파괴시키므로써 투과도의 변화나 막구조상의 변화를 야기시킨다고 알려졌다(Seufert 1965, Bangham et al. 1962, Husson and Luzzati 1963).

또한 saponin을 개구리 피부 점막측 용액에 투여했을 때 개구리 피부 d.c. 저항이 감소되었으며 inulin 분포용적(penetrable space)이 증가되었다는 보고도 있다(Brash and Cuthbert 1971).

이와같이 인삼 추출물 중의 saponin이 세포막 구조를 변형시킨다면 고농도의 인삼 추출물이 첨가될때 인삼 추출의 일부가 세포막을 통하여 세포 내부로 들어갈 수 있겠고, 세포내로 들어간 인삼 추출물은 장막측 세포막에 있는  $\text{Na}^+\text{-pump}$ 에 영향을 줄 것으로 생각된다.

제 4도에 나타난 것 같이 인삼 추출물은 개구리 피부의  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 활성도를 의의있게 억제하였는

데, 고농도의 인삼 추출물이 점막측에 첨가 되었을 때 오히려 SCC가 감소되는 것은 인삼 추출물로 인한 투과도 증가에 비하여  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 활성도가 더 크게 억제 당하기 때문이라 생각된다. 점막측 용액에 10mg%를 첨가했을 때 대조군과 별 차이가 없는 것은 이러한 서로 상반된 효과가 균형을 이루고 있기 때문이라 하겠다.

인삼 추출물이  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase 활성도를 의의있게 억제 함에도 불구하고 장막측에 낮은 농도로 첨가될 때 SCC를 증가시키는 인삼 추출물 중의 어느 성분이 ADH나 c-AMP와 같이 점막측 세포막의  $\text{Na}^+$  투과도를 증가시키기 때문에 생긴 결과로 사료된다. Dunick 등 (1972)은 쥐의 간세포막에서 detergent의 일종인 Na-dodecylsulfate가 ATPase는 억제하지만 adenyl cyclase 활성도는 증가시킨다고 보고했다. Adenyl cyclase 활성도가 커지면 세포내의 c-AMP의 농도가 증가하게 되는데 이러한 c-AMP는 개구리 피부 및 두꺼비 방광 점막측 세포막의 투과도를 변화시키므로써  $\text{Na}^+$  이동을 증가시킨다고 보고되었다(Orloff and Handler 1962).

인삼 추출물 특히 detergent로 알려진 인삼 saponin 같은 성분이 개구리 피부 상피세포막에서 이와같은 adenyl cyclase 활성도를 증가시키고 또 이로 인하여 세포내 c-AMP 농도를 높이므로써 SCC가 증가되는지의 여부는 추이를 해야겠지만 Park 등 (1971)이 보고한 바 detergent의 일종인 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 개구리 피부 장막측에 첨가했을 때 SCC가 증가하는 사실은 본 실험의 결과와 일치한다.

그러나 장막측에 고농도의 인삼추출물이 투여되면 외측막의 투과도 증가보다  $\text{Na}^+\text{-pump}$ 의 억제가 더욱 현저하므로 그 결과 SCC가 억제되는 것으로 생각된다. 인삼 추출물을 개구리 피부 점막측 용액에 가한 것이 장막측에 가한 것 보다 더 낮은 농도에서 SCC를 증가시켰는데 이는 개구리 피부 구조를 볼 때 점막측에 가한 인삼추출물이  $\text{Na}^+$  이동에 중요한 부분인 상피세포층에 보다 빨리 분포(distribution)되기 때문이며 고농도의 인삼추출물을 가했을 때도 20분까지는 점막측에 첨가했을 때가 SCC를 더 억제했는데 그러나 보다 오랜 시간 후에서의 효과를 비교하든지 혹은 더 고농도의 인삼추출물을 가하면 이런 차이는 없어지리라 생각된다.

또한 고농도의 인삼 추출물을 첨가할 때  $\text{Na}^+$ 의 out-flux가 증가하므로써 SCC가 감소할 가능성이 있는데 이는 방사선 동위원소  $\text{Na}^{22}$  및  $\text{Na}^{24}$ 를 이용하여

Na<sup>+</sup>의 influx 및 outflux를 동시에 측정하므로써 밝혀 줄 수 있을 것으로 생각된다.

### V. 결 론

인삼 알콜 추출물의 세포막에서의 Na<sup>+</sup> 이동에 미치는 영향을 규명하고자 개구리 피부에서 SCC 및 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 인삼 추출물을 점막측 용액에 가하였을 때 낮은 농도에서는 SCC를 증가시켰으며, 높은 농도에서는 감소시켰다.

2. 인삼 추출물을 장막측 용액에 가하였을 때도 역시 낮은 농도에서는 SCC를 증가시켰으며, 높은 농도에서는 감소시켰다.

3. 인삼 추출물은 개구리 상피세포막에서의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도를 농도에 따라 의의있게 억제하였다.

이상의 실험 결과로 인삼 추출물은 저농도에서는 개구리 피부 상피세포막의 Na<sup>+</sup> 투과도를 증가시키므로써 SCC를 증가시키고, 고농도에서는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 활성도를 억제하므로써 SCC를 감소시킨다고 생각된다.

### REFERENCES

- 1) Bangham, A. D., R. W. Horne, A. M. Glauert, J. T. Dingle, and J. A. Lucy: *Action of saponin on biological cell membranes. Nature.* 196:952, 1962.
- 2) Bentley, P. J.: *The effects of vasopressin on the short-circuit current across the wall of the isolated bladder of the toad, Bufo marinus. J. Endocrin.* 21:95, 1960.
- 3) Bentley, P. J. and H. Heller: *The action of neurohypophysial hormones on the water and sodium metabolism of urodele amphibians. J. Physiol.* 171:434, 1964.
- 4) Brash, A. R. and A. W. Cuthbert: *The effects of saponins on the transporting epithelium of isolated frog skin. Br. J. Pharmac.* 40: 544, 1971.
- 5) 北川晴雄, 岩城利一郎: 藥用人蔘의 藥理學的 研究. 日藥理誌. 59:348, 1963.
- 6) Dunnick, J.K., G. V. Marinetti and P. Greenland: *Effect of detergents and sodium fluoride on the enzyme activities of the rat liver*

- plasma membrane. Biochem. Biophys. Acta.* 266:684, 1972.
- 7) Fiske, E. H. and Y. Subbarow: *Phosphocreatine. J. Biol. Chem.* 8:629, 1929.
- 8) 韓龜東·趙馨遠: 대사과정에 미치는 인삼의 영향에 관한 연구. 제1보, rat의 체중 및 기초대사량에 미치는 영향에 대하여. 서울대학교 논문집(자연과학). 6:124, 1957.
- 9) Husson, F. and V. Luzzati: *Structure of red cell ghosts and the effect of saponin treatment. Nature.* 197:822, 1963.
- 10) Kawada, J., R. E. Taylor Jr. and S. B. Barker: *Measurement of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase in the separated epidermis of Rana Catesbeiana frogs and Tadpoles. Comp. Biochem. Physiol.* 30: 965, 1969.
- 11) 김희중·강두희: 인삼알콜 추출물이 몇 가지 생체막에서의 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase 및 Ca<sup>++</sup>-ATPase 활성도에 미치는 영향(미발표).
- 12) 김주영: 고려인삼이 흰쥐의 몸무게에 미치는 영향 대한생리학회지. 4(2):71, 1970.
- 13) Koefoed-Johnsen, V. and H. H. Ussing: *The nature of the frog skin potential. Acta. Physiol. Scand.* 28:60, 1958.
- 14) 정을순·강두희: 인삼추출액이 lysosomal membrane 안정성에 미치는 영향. 연세의대논문집. (inpress) 1976.
- 15) Leaf, A.: *Transepithelial transport and its hormonal control in toad bladder. Ergebn. Physiol.* 56:216, 1965.
- 16) 李明秀: 인삼이 기초대사에 미치는 영향. 중양의학. 2(5):509, 1962.
- 17) Lichtenstein, N. S. and A. Leaf: *Effect of Amphotericin B on the permeability of the toad bladder. J. Clin. Invest.* 44: 1328, 1965.
- 18) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr, and R. J. Randal: *Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.* 193: 265, 1951.
- 19) 오진섭·박찬용·문동연: 인삼의 중추신경에 대한 작용. 대한약리학회지. 5(1):23, 1969.
- 20) Orloff, J. and J. S. Handler: *The similarity effect of vasopressin, adenarsine 3'5' phos-*

- phate(cyclic AMP) and theophylline on the toad bladder. *J. Clin. Invest.* 41:702, 1962.
- 21) 백광세 · 이철영 · 이경남 · 송선옥 · 강무희 : 인삼추출물이 생체세포막 및 *artificial lipid monolayer*에 미치는 영향. *대한생리학회지*. 9:1, 1976.
- 22) 박찬웅 : 인삼 *saponin*이 *morphine*에 의한 *rat* 대뇌피질 절편 산소 소비량 및  $Na^+ K^+$  消長에 미치는 영향. *대한 약리학 잡지*. 5(1): 29 1969.
- 23) Park, W. H., T. H. Woo, and S. K. Hong: *Effect of DMSO on the active sodium transport across frog skin. Korean J. Derm.* 9:39, 1971.
- 24) Seufert, W. D.: *Induced permeability changes in reconstituted cell membrane structure. Nature.* 207:174, 1965.
- 25) Singer, I., M. M. Civan, R. F. Baddour, and A. Leaf: *Interactions of amphotericin B, vasopressin, and calcium in toad urinary bladder. Am. J. Physiol.* 217(4):938, 1969.
- 26) Ussing, H. H. and K. Zerahn: *Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin Acta. Physiol. Scand.* 23:110, 1951.