

인삼알콜추출물이 쥐간 mitochondria의 산소 소모율에 미치는 영향*

연세대학교 의과대학 생리학교실

이 중 우 · 김 인 교 · 강 두 희

= Abstract =

Effect of Ginseng Alcohol Extract on the Oxygen Consumption of Rat Liver Mitochondria

Joong Woo Lee, In Kyo Kim and Doo Hee Kang

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

The following results were drawn from the experiment conducted to see the effect of ginseng alcohol extract on the mitochondrial oxidation of the rat liver.

1) Mitochondrial oxygen consumption increased in the low concentration and decreased in the high concentration of ginseng alcohol extract.

2) When the mitochondria was destroyed mechanically or was swollen by low concentration of AgNO₃, mitochondrial oxygen consumption was inhibited in all concentration of ginseng alcohol extract.

3) Oxygen consumption of intact mitochondria increased in the low concentration but decreased in the high concentration of sodium deoxycholate.

4) Ginseng alcohol extract inhibited cytochrome oxidase activities of liver mitochondria.

These results suggest that low concentration of ginseng alcohol extract activates the oxygen consumption of liver mitochondria by increasing the permeability of the mitochondrial membrane and high concentration of the extract inhibit the oxygen consumption by inhibiting the enzyme activity related to respiration.

I. 서 론

인삼의 약물 작용에 대해서는 여러 방면에서 연구되고 되고있다. 일반적으로 인삼은 기초대사를 증가시키고(한 및 조 1957; 이 1962), 성장발육을 촉진하며(김 1970; 문 및 박 1970), 지방대사를 촉진하는 것으로 알려졌다(정 1964; 김 1962; 이 및 강 1979). 생체막에 미치는 효과로는 효모세포막이나 lysosome membrane 및 적혈구막에서의 투과도를 증가시킨다고 한다(정 1971; 정 등 1976). 한편 박(1969)은 인삼 saponin이 대뇌피질 절편의 산소소모량을 증가시킨다고 했으며,

하 및 강(1977)은 성장하고 있는 흰쥐에게 인삼을 장기 투여할 때 흰쥐의 산소 소모량이 증가한다고 보고 했다.

따라서 본 실험에서는 분리한 쥐간 mitochondria에서의 산소소모율 및 cytochrome oxidase 활성도를 측정하고 이에 미치는 인삼알콜 추출물의 영향을 관찰 하여 인삼의 산소소모량의 증가원인의 일부를 규명하고자 하였다.

II. 실험 방법

1) 흰쥐 간 mitochondria의 분리

Hogeboom(1955)의 방법에 의하여 흰 쥐의 간으로

* 본 연구는 1978년도 연세대학교 의과대학 통합교수 연구비로 완료되었음.

부터 mitochondria를 분리하였다. 즉 200gm내외의 흰 쥐를 머리를 쳐서 희생시킨 후 바로 간을 적출하여 냉각된 0.32 M sucrose 용액에 담그었다. 이를 같은 sucrose 용액에서 Dounce homogenizer로 homogenate를 만들고 Sorval centrifuge(model RC 2-B)를 사용하여 1,000×g에서 10분간 원심분리한 그 상층액을 다시 8,000×g에서 20분간 원심침전시켜 mitochondria를 분리하였다.

2) 산소소모율의 측정

Mitochondria의 산소소모율은 stationary platinum electrode를 사용한 polarography로 측정하였다. 즉 용적 3ml의 test chamber내에 87mM KCl, 6mM MgCl₂, 12mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄(pH 7.4), 12mM NaF 및 1mM ADP의 incubation mixture를 넣은 다음 mitochondria를 1mg/ml되게 첨가하고 35°C에서 10분간 incubation할때 mitochondria의 산소소모에 의한 용액내의 PO₂의 변화를 oxygen monitor system (Y.S.I. Model 53 SA)에 나타내고 이를 recorder(Sargent SRL)에 기록하였다. 이때 incubation 용액내에 여러가지 농도의 인삼알콜추출액 및 mitochondria의 swelling agent로 알려진 Na-deoxycholate와 AgNO₃를 첨가하여 산소소모율에 미치는 이들 약물의 영향을 비교 관찰하였다.

3) Cytochrome oxidase 활성도 측정

Oser(1965)의 방법에 의하여 cytochrome oxidase 활성도를 측정하였다. 즉 기질로써 0.1% p-phenylene diamine이 들어있는 incubation 용액에 glass-glass homogenizer로 파괴한 mitochondria를 넣고 25°C에서 30분간 incubation한 후 원심 침전하여 상층액의 색깔정도를 spectrophotometer(wave length 440 mμ)로 측정, 그 활성도를 계산하였다. 이때 incubation 용액에 인삼알콜추출물을 5~40mg%되게 첨가하여 cytochrome oxidase 활성도에 미치는 영향을 관찰하였다.

III. 실험 결과

제 1도는 인삼알콜추출물의 농도에 따른 산소소모율을 대조군에 대한 백분비(%)로 나타낸 것으로 인삼알콜추출물의 농도가 20mg%로 증가할 때까지는 산소소모율이 약물농도에 따라 증가하였다. 그러나 20mg%보다 더 높은 농도에서는 감소하기 시작하여 100mg

%에서는 대조군보다 오히려 낮은 값을 나타내어 산소소모율이 억제된 것을 볼 수 있다.

Swelling agent로 알려진 AgNO₃가 mitochondria의 산소소모율에 미치는 영향을 제 2도에 도시하였다. AgNO₃의 농도가 50μM까지는 산소소모율이 계속 증가했으며 그 이상의 농도에서는 산소소모율의 증가효과가 떨어져 75μM에서는 대조군(AgNO₃농도 0)보다 오히려 낮은 값을 나타내었다.

본 논문에는 나타내지 않았으나 light scattering test에서도 50μM의 AgNO₃는 mitochondria를 가장 크게 swelling시켰다.

따라서 제 3도는 50μM의 AgNO₃를 가하여 mito-

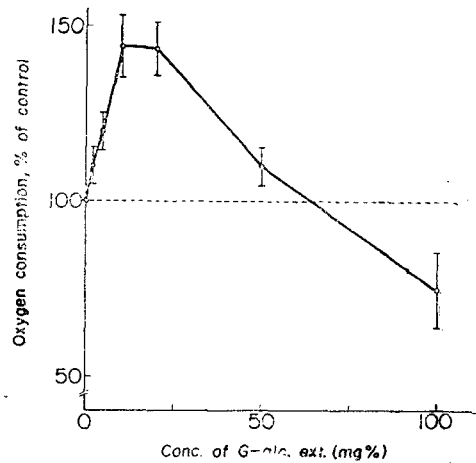


Fig. 1. Effect of ginseng alcohol extract on the mitochondrial oxygen consumption of rat liver.

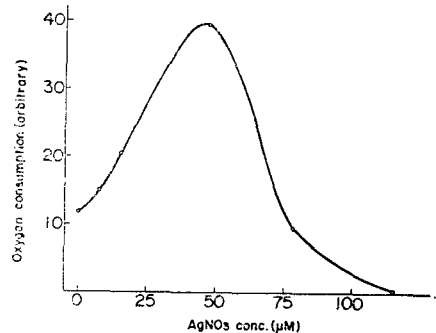


Fig. 2. Effect of AgNO₃ on the mitochondria oxygen consumption.

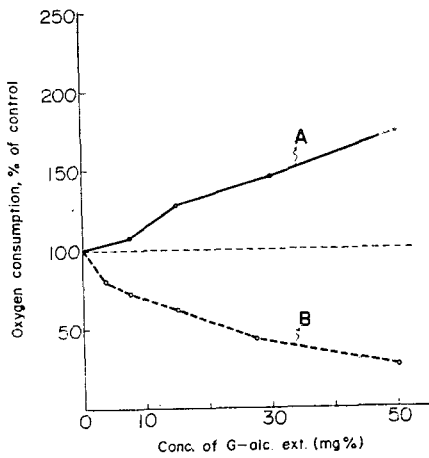


Fig. 3. Effect of ginseng alcohol extract on the oxygen consumption of intact (A) and swollen (B) mitochondria by $AgNO_3$.

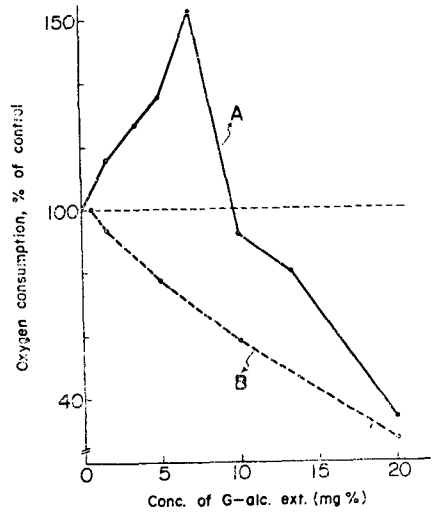


Fig. 5. Effect sodium deoxycholate on the oxygen consumption of intact (A) and mechanically disrupted (B) mitochondria.

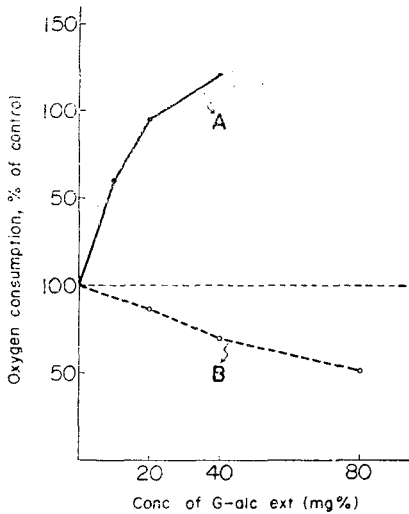


Fig. 4. Effect of ginseng alcohol extract on the oxygen consumption of intact (A) and mechanically disrupted (B) mitochondria.

chondria를 swelling시킨후에 인삼추출물의 효과를 본 것으로 이때 $AgNO_3$ 를 첨가하지 않은 군은 제 1도에 서와 같이 인삼추출물에 의하여 산소소모율이 증가하나 $AgNO_3$ 를 첨가한 것은 반대로 인삼추출물농도에 따라 산소소모율이 감소하여 오히려 억제된 것을 보여 준다.

한편 mitochondria를 glass-glass homogenizer로 충분히 갈아서 mitochondria를 파괴시킨 후 인삼추출물의 효과를 측정비교한 것이 제 4도에 도시되었는

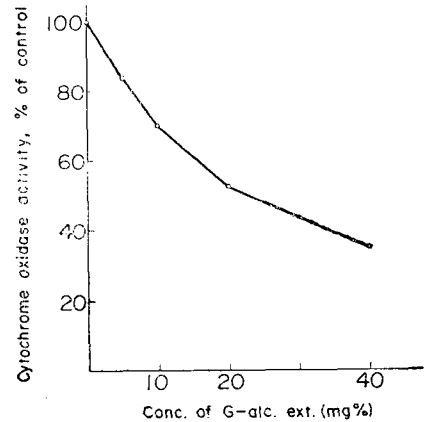


Fig. 6. Effect of ginseng alcohol extract on the cytochrome oxidase activity.

데 여기서도 마찬가지로 손상을 받지 않은 정상 mitochondria는 인삼추출물에 의하여 산소소모율이 증가하나 파괴된 mitochondria는 약물농도가 증가할수록 산소소모율이 억제되었다.

Detergent로 알려진 Na-deoxycholate (DOC)가 mitochondria의 산소소모율에 미치는 영향은 제 5도에 나타나 있다. 정상 mitochondria는 DOC의 농도가 낮을 때 (1.25~7 mg%) 산소소모율이 증가하나 100 mg% 이상에서는 오히려 감소하여 제 1도 즉 인삼추출물 투여시와 아주 유사한 결과를 나타냈다. 그러나 파

괴된 mitochondria는 DOC의 낮은 농도에서부터 산소소모율이 억제되었다. 제 6도는 mitochondria의 cytochrome oxidase에 미치는 인삼추출물의 영향을 나타낸 것으로 인삼추출물농도에 따라 cytochrome oxidase활성도가 억제된 것을 알 수 있다.

IV. 고 찰

정상 mitochondria에서 전자이동 즉 산화과정과 인산화과정(oxidative phosphorylation)은 tight coupling되어 있다. 그러나 이러한 tight coupling은 여러가지 요인에 의하여 영향을 받게된다. 산화과정과 인산화과정을 분리시키는 대표적인 uncoupler로는 2,4-dinitrophenol을 들 수 있는데 이것은 high energy intermediate를 가수분해 하므로서 인산화를 방지한다고도 하며 또 최근의 oxidative phosphorylation의 chemiosmotic theory에 의하면 mitochondrial membrane의 투과도를 증가시켜 mitochondria내부와 외부의 proton의 electrochemical gradient를 감소시킨다고도 제창되었다.

한편 어떤 원인에 의하여 mitochondria가 swelling될 때도 산화과정과 인산화 과정은 서로 분리(uncouple)되는데 mitochondria를 swelling시키는 조건으로는 저장성 용액(Cleland, 1952; Tedeschi & Harris 1958), Ca^{++} , phosphate, $AgNO_3$, $MgCl_2$ 등과 같은 전해질과 thyroxine과 같은 hormone 등을 예로 들 수 있다(Tapley 1956; Tapley and Cooper 1956). 이와 같은 것들에 의하여 mitochondria가 swelling되면 산화과정은 정상적으로 이루어지나 인산화는 억제된다.

일반적으로 mitochondria 외막(outer membrane)은 투과도가 상당히 크나 내막(inner membrane)은 그 투과도가 매우 작기 때문에 matrix 내로 물질이 이동하려면 carrier에 의하거나 또는 매우 느린 확산에 의하게 된다. 따라서 mitochondria의 산화 및 인산화는 mitochondria 내로의 물질의 투과도에 비례하여 이루어진다고 할 수 있다.

제 1도에서 낮은 농도의 인삼 알콜추출물이 산소소모율을 증가시키는 것은 이와같이 인삼 알콜추출물중의 어떤 성분이 mitochondria를 swelling시켜 그 결과 막의 투과도가 증가되어 기질(본 실험에서는 glutamate)을 비롯하여 산화과정에 필요한 여러가지 물질들이 mitochondria 내로 용이하게 들어가게 하므로서 생긴 결과라고 생각된다. $AgNO_3$ 와 같은 물질로 mitochondria를 swelling시키면 산소소모율이 증가되는 것이라든지(제 2도), 본 보고에는 나타나지 않았지만

기질로 첨가한 glutamate를 제거하면 인삼추출물에 의한 증가효과가 나타나지 않는 것 등은 이와같은 인삼 추출물의 효과가 glutamate를 포함한 물질의 이동을 증가시키므로서 이루어진다는 것을 뜻한다고 하겠다. 인삼알콜추출물은 mitochondria 막외에도 개구리 피부나 적혈구막을 통한 Na^+ 이동을 촉진시키고(이등 1976; 이 및 강 1978), lysosome 막의 투과도를 증가시키는 것으로 보고되었다(정등 1976).

또는 mitochondria의 respiration은 extramitochondria의 $[ATP]/[ADP]$ 나 $[ATP]/[ADP] \cdot [Pi]$ 에 의하여 조절되는데 이 비가 크면 산소소모율이 억제되고 작으면 증가된다고 한다(Holian et al 1977). 그렇다면 인삼 알콜추출물이 mitochondria 막의 투과도를 증가시켜 H^+ gradient를 적게하든지 혹은 DNP처럼 mitochondria membrane을 통한 H^+ 의 influx를 감소시켜 phosphorylation site에서의 H^+ 이용도가 줄어들어 ATP형성이 감소되고 결과적으로 $[ATP]/[ADP] \cdot [Pi]$ 가 감소되어 산소소모율이 증가한 것으로 생각할 수도 있다.

인삼의 화학적 구성분으로는 10여개의 saponin 배당체를 비롯하여 정유(panancene), 유기산(palmitic acid, stearic acid 및 linolic acid), 점액질 및 무기질로 되어있다(北川及 岩城 1963). 이들 인삼 성분중의 어떤 성분에 의하여 mitochondria가 swelling되는지에 대해서는 단정하기 어려우나 아마도 saponin 배당체가 아닌가 생각되는데 Triron-X를 비롯한 대부분의 detergent들은 mitochondria 막의 구조적인 변화를 야기시켜 swelling시키는 것으로 알려졌다.

정상 mitochondria와 기계적으로 파괴한 mitochondria에 mitochondria detergent의 하나인 deoxycholate를 투여할 때 정상 mitochondria는 저농도의 DOC에 의하여 산소소모율이 증가하며 고농도에서는 오히려 억제하는 이원적인 효과(dual effect)가 나타나(제 5도) 인삼추출물을 투여한 군과 아주 유사한 결과를 나타내었다. 이것은 mitochondria의 산소소모에 대한 인삼의 효과가 saponin과 같은 detergent 작용에 의하여 나타날 수 있음을 보여준 것이라 하겠다.

Mitochondria를 swelling시키는 물질중의 하나로서 유리지방산을 들 수 있는데(Lehninger and Remmert 1959, Wójtezack and Lehninger 1961) 보고자들은 swelling agent을 가하면 mitochondria내에서 유리지방산이 형성되어 이것이 mitochondria를 swelling시킬 뿐 아니라 산화인산화를 uncoupling시킨다고 하였다. 인삼알콜추출물에도 palmitic acid, stearic acid 및 linolic acid 등과 같은 유리지방산이 상당량 있는

것을 보면(北川及岩城 1963) 본 실험에서 산소소모율의 증가가 saponin 외에 이와같은 지방산에 의해서도 일부 나타났을 가능성도 있다.

한편 인삼알콜추출물의 농도가 어느 이상이 되면 산소소모율이 대조군에 비하여 오히려 억제되는 것을 볼 수 있는데 이것은 인삼알콜추출물이 산화과정의 효소활성도는 오히려 억제시킨 결과가 아닌가 생각된다. 제 3도에서 보면 $50 \mu\text{M}$ AgNO_3 를 가하여 mitochondria를 충분히 swelling시킨 상태에서는 AgNO_3 를 첨가하지 않는 것과는 반대로 낮은 농도의 인삼알콜추출물에서도 산소소모율이 억제되는 점이라든가 제 4도에서와 같이 mitochondria를 기계적으로 파괴하여 만든 mitochondrial fragment에서는 정상 mitochondria와는 달리 인삼추출물의 낮은 농도에서도 산소소모율이 억제되는 것 등을 보면 알 수 있다.

보다 직접적인 증거로는 제 6도에서와 같이 mitochondria에서 산화과정에 중요역할을 하는 cytochrome oxidase 활성도가 인삼 알콜추출물의 모든 농도에서 억제된 점을 들 수 있다. 인삼 알콜추출물이 몇 가지 효소 활성도에 미치는 영향을 보면 적혈구막의 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) - ATPase 나 ($\text{Ca}^{++} + \text{Mg}^{++}$) - ATPase 활성도는 농도에 따라 증가시키나 mitochondria나 sarcoplasmic reticulum 의 ($\text{Ca}^{++} + \text{Mg}^{++}$) - ATPase 활성도는 억제한다고 보고(김등 1977)한 것 등을 볼 때 효소종류에 따라 그 작용양상이 다른 것을 알 수 있는데 본 실험에서의 결과로는 인삼추출물은 적어도 간 mitochondria의 산화과정에 관계하는 효소활성도는 억제하는 것으로 생각된다.

인삼 알콜추출물 농도에 따른 이원적인 효과는 인삼추출물이 mitochondria의 산화과정에 관계하는 효소 자체는 억제하나 저농도에서는 mitochondria막의 투과도를 증가시키므로서 산소소모율을 증가시키고, 반대로 고농도에서는 막투과도를 증가시켜서 생기는 효과보다는 효소억제효과가 더 크게 나타나기 때문에 오히려 산소소모율이 억제되는 것으로 사료된다.

V. 결 론

인삼알콜추출물이 쥐 간 mitochondria에서의 산소소모율에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 인삼추출물은 낮은 농도에서는 산소소모율을 증가시키고 높은 농도에서는 오히려 이를 억제하였다.
2. Mitochondria를 기계적으로 파괴하거나 AgNO_3

로 swelling시킨 후 인삼알콜추출물을 가하면 모든 농도에서 산소소모율이 억제되었다.

3. 정상 mitochondria는 저농도의 Na-deoxycholate에 의하여 산소소모율이 증가하였으며 높은 농도에서는 억제하였다. 그러나 파괴된 mitochondria에서는 낮은 농도에서도 억제되었다.

4. 인삼 알콜추출물은 간 mitochondria cytochrome oxidase 활성도를 억제하였다.

이상의 실험성적을 미루어 보아 인삼 알콜추출물은 저농도에서는 막의 투과도를 증가시키므로서 산소소모율을 증가시키고 고농도에서는 효소작용을 억제하므로서 산소소모율을 억제하는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Cleland, K.W.: *Permeability of isolated rat heart sarcosomes. Nature. 170:497, 1952.*
- 하중식, 강두희 : 인삼이 흰쥐의 질소평형 및 아미노산 이동에 미치는 영향. 보건장학회보연구논문집, 6: 224, 1977.
- 한구동, 조형원 : 대사과정에 미치는 인삼의 영향에 관한 연구. 제1보. Rat의 체중 및 기초대사량에 미치는 영향에 대하여. 서울대학교 논문집(자연과학), 6:124, 1957.
- Hogeboom, G.H.: *Fractionation of cell components of animal tissue. In "Method in Enzymology" Vol. I. Edited by Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., p. 16-19, Academic Press, New York, 1955.*
- Holian, A., C.S. Owen and D.F. Wilson: *Control of respiration in isolated mitochondria: Quantitative evaluation of the dependence of respiratory rates on [ATP], [ADP], and [Pi]. Arch. Biochem. Biophys. 181:164, 1977.*
- 정해원 : 인삼, 도라지 및 *INH*가 가트의 지질대사에 미치는 영향. 대한생화학회지. 1:25, 1964.
- 정노팔 : 인삼의 효과에 관한 세포생리학적 연구. 제IV편. 포도당의 투과에 미치는 영향. 대한생리학회지, 5(1):15, 1971.
- 정윤순, 김희중, 강두희 : 인삼추출액이 lysosomal membrane 안정성에 미치는 영향. 연세의대 논문집, 9(1):20, 1976.
- 김훈창 : *Niacin* 및 인삼이 *cholesterol* 대사에 미치는

- 영향. 한국의학. 5:21, 1962.
- 김주영 : 고려인삼이 흰쥐의 몸무게에 미치는 영향. 대한생리학회지. 4(2):71, 1970.
- 김희중, 이중우, 강두희 : 한국산 인삼 알콜 추출물이 몇가지 생체막에서의 $Na^+ - K^+$ activated ATPase 및 Ca^{++} -activated ATPase 활성도에 미치는 영향. 연세의대 논문집, 10(1):116, 1977.
- 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.
- 이중우, 강두희 : 인삼 알콜 추출물이 지방 분해 효소 (lipase)의 활성도에 미치는 영향. 보건장학회보 연구논문집 7:1, 1979.
- 이중우 · 김희중. 강두희 : 인삼알콜추출물이 개구리 피부를 통한 short circuit current에 미치는 영향. 대한생리학회지 10(1):35, 1976.
- 이명수 : 인삼이 기초대사에 미치는 영향. 중앙의학. 2(5):509, 1962.
- 이승일. 강두희 : 인삼이 적혈구막을 통한 Na^+ 이동에 미치는 영향. 대한생리학회지 12(1):17, 1978
- Lehninger, A.L. and Remmert, L.F.: An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation. J. Biol. Chem. 234:2459, 1959.
- 문영빈, 박원호 : 고려인삼이 흰쥐의 장기 무게에 미치는 영향. 대한생리학회지. 4(2):33, 1970.
- Oser, B.L.: Enzymes and their action. in "Hawk's: physiological chemistry" 14 ed. p. 434, McGraw-Hill Book Comp. 1965.
- 朴贊雄 : 人蔘 saponin이 morphine 에 의한 Rat 대뇌 피질 절편 酸素 消費量 및 $Na^+ - K^+$ 消長에 미치는 영향. 대한약리학잡지 5(1):29, 1969
- Tapley, D.F.: The effect of thyroxine and other substances on the swelling of isolated rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. 222:325, 1956.
- Tapley, D.F. and C. Cooper.: Effect of thyroxine on the swelling of mitochondria isolated from various tissues of the rat. Nature. 178:1, 19, 1956.
- Tedeschi, H. and D.L. Harris: The osmotic behavior and permeability to non-electrolytes of mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 58:52, 1955.
- Wojtezack, L. and Lehninger, A.L.: Formation and disappearance of an endogenous uncoupling factor during swelling and contraction of mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 51:442, 1961.