

알코올 投與後 마우스 肝 크산틴 酸化酵素 活性에 미치는 人蔘의 影響

許 瑾 · 崔 鐘 元

嶺南大學校 藥學大學

(Received July 12, 1979)

Keun Huh and Chong Won Choi

Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyeongsan 632, Korea

Effect of Ginseng Saponins on Xanthine Oxidase Activity after Ethanol
Treatment in Mouse Liver

Abstract—A dose, 1g/kg of ethanol produced experimental hyperuricemia in mouse. Ginseng saponins were tested for their ability to alter the hepatic xanthine oxidase activity and the blood level of uric acid in the ethanol-treated mouse. Intraperitoneal injection of ginseng saponin 4mg/kg markedly decreased the xanthine oxidase activity in the ethanol-treated mouse liver. It was also observed that ginseng saponin reduced the blood concentration of uric acid in experimentally induced hyperuricemia by alcohol treatment. *In vitro*, it was found that a low concentration of ginseng saponin in the reaction mixture increased the hepatic xanthine oxidase activity, while a high concentration inhibited both enzyme preparations of normal and ethanol treated mice. In contrast with the xanthine oxidase, uricase activity was not influenced by ginseng saponin as well as *in vivo*. These results suggest there is a possibility that ginseng saponin may have some therapeutic effect on gout and other hyperuricemia syndrome.

尿酸은 核酸 鹽基의 1種인 purine 體의 末端代謝 過程에서 xanthine oxidase (EC. 1.2.3.2) (以下 XO라 略함)에 의하여 生成되는 最終 代謝產物로 尿中에 排泄되는데^{1~3)}, 어떠한 原因에 의하여 尿酸이 過剩으로 體內에 蓄積되어 尿酸의 血中 濃도가 높아진 狀態를 高尿酸血症라 한다^{4~6)}. 分子病으로 널리 알려진 痛風은 高尿酸血症에 한 症狀으로서 purine 體의 異狀 代謝에 의하여 發生되는 상당한 痛症을 隨伴하는 疾患의 하나이다. 알코올은 生體內에 尿酸을 蓄積시켜 尿酸의 血中濃도를 上昇시키므로 痛風 疾患을 誘發 내지는 惡化시키는 因子가 된다고 하여 오래 前부터 高尿酸血症 患者에는 알코올의 攝取를 禁하고 있다^{7,8)}. 著者들은 알코올의 毒性에 대한 人蔘의 效果를 研究하는 過程에서 人蔘 사포닌이 에탄올의 代謝系에 參與하는 酵素들의 活性을 현저히 增加시켜 生體와 作用하는 알코올 및 이의 中間代謝 產物인 acetaldehyde를 신속히 처리하므로 에탄올의 毒性으로부터 生體를 防禦할 것이라고 報告한 바 있다⁹⁾. 그러므로 에탄올, 尿酸 및 人蔘 사포닌의 相互關係를 追究할 목적으로 에탄올을 投與한후 XO의 活性과 尿酸의 血中濃도의 變化에 人蔘 사포닌이 어떠한 影響을 주는가를 관찰하여 흥미있는 結果를 얻었으므로 이에 報告한다.

材料 및 方法

動物—本 大學의 動物舍에서 일정한 飼料(어린병아리 配合 飼料, 慶北畜産 製品)로 飼育한 25mg 內외의 雜種 雄性 마우스를 使用하였다. 實驗前 24時間 물만 주고 絶食시킨 動物에 에탄올 溶液을 腹腔內에 注射하고, 90分 후에 屠殺하여 實驗을 하였다. 人蔘 粗 사포닌은 屠殺

3時間 前에 투여하였다.

에탄올의 處理——急性 中毒을 일으키는 方法으로 널리 使用되어지는 Cohen¹⁰⁾ 등의 方法에 準하여 25% v/v 에탄올 (1g/kg)을 腹腔內에 注射하였다.

人蔘 成分의 抽出——錦山産 人蔘 粉末을 市中에서 購入하여 Shibata¹¹⁾ 등의 方法에 準하여 再蒸溜한 3倍量으로 60°C에서 24時間씩 3回 抽出한 다음 濾過한 濾液에 ether를 加하여 脂溶性 部分을 에틸층으로 移行시키고, 이것을 分액여두로 分離하여 에테르층을 除去한 殘留部分을 물에 녹인 다음 부탄올층에 옮기고, 물로 數回 洗滌한 後 n-butanol 層을 減壓蒸溜하여 人蔘 抽出物을 얻었다. 人蔘 1g 當 粗 사포닌 20mg을 얻었으며, TLC 법으로 사포닌 分割을 確認하였다¹²⁾. 使用時에는 生理食鹽水에 溶解하여 0.1% 溶液이 되도록 하였다.

酵素의 調製——實驗動物을 斷頭屠殺하고 肝臟을 氷冷生理食鹽水에 담그고 濾紙를 사용하여 血液 및 기타 附着 物質을 除去하고 水分等을 吸着시켰다. 그 肝 組織을 平量한 다음 0.1M phosphate buffer (pH7.5) 5倍量을 가하고 glass teflon homogenizer (Thomas社 製品)로 氷冷下에서 磨碎하였다. 이 homogenate를 4°C에서 4,000×g로 30分間 遠心分離하고 그 上澄液을 取하여 이것을 粗 酵素液으로 사용하였다.

血清中 尿酸의 定量——血清中 尿酸은 Henry¹³⁾의 方法에 의하여 측정하였다. 試驗管에 血清 0.5ml와 除蛋白의 목적으로 10% sodium tungstic acid 4.5ml를 加하여 진탕하였다. 이것을 20分間 放置하고 800×g에서 10分間 遠心分離하였다. 上澄液에 10% Na₂CO₃ 1.0ml를 가하여 10分間 室溫에서 방치하므로써 유리시킨 尿酸을 波長 700nm에서 靑色의 吸光度를 測定하고 標準 曲線에 準하여 血清中 尿酸을 算定하였다.

酵素活性測定——Xanthine oxidase 活性은 Stripe¹⁴⁾ 등의 方法을 약간 변경하여 사용하였다. 反應液의 組成은 0.127M potassium phosphate buffer 2.4ml, 60μM xanthine solium 0.4ml, 13.3mM NAD 0.4ml와 uricase 活性의 抑制劑인 2.8-diazahypoxanthine¹⁵⁾ 5mM 溶液 0.4ml 및 酵素粗品 0.4ml를 加하여 최종容量이 4ml가 되게 하고, 이 反應 混合液을 37°C에서 5分間 反應시킨後, 20% trichloroacetic acid를 加하여 反應을 종료시키고 생성된 uric acid와 NA DH를 각각 波長 292nm와 340nm에서 읽으므로써 XO의 活性을 측정하였으며, 酵素 活性의 單位는 1時間에 生成된 uric acid를 protein 1mg 當 n mole로서 표시하였다.

蛋白質의 定量은 bovine albumin을 標準品으로하여 Biuret 方法¹⁶⁾에 準하여 측정하였다.

Uricase 活性 測定——Uricase의 活性은 Mabler 등¹⁷⁾의 方法에 準하여 0.1M potassium phosphate buffer 중에 400μM uric acid와 酵素 粗品 0.1ml를 37°C에서 10分間 반응시킨 다음 尿酸의 分解速度를 292nm에서 측정하여 allantoin 生成量으로 換算하고 百分率로 그 活性度를 나타내었다.

結 果

에탄올 急性 中毒時 尿酸의 血中 濃도에 미치는 人蔘의 影響——25% v/v 에탄올(1g/kg)을 腹腔內에 注射하여 急性 中毒을 惹起시킨 마우스에서 人蔘 粗 사포닌의 投與가 血液中 尿酸濃度에 어떠한 影響을 주는가를 관찰한 것이 Fig. 1이다.

對照群에서 尿酸의 血中濃도가 1.5±0.05mg/100ml 인데 比해 에탄올을 處理하였을 때는 3.05±0.1mg/100ml로서 約 2.5倍의 增加를 볼 수 있었다. 人蔘 粗 사포닌을 對照群에 투여하였을 때는 尿酸의 血中濃도에 別로 影響을 주지 않았으나 에탄올 처리에 의하여 病的으로 增加된 狀

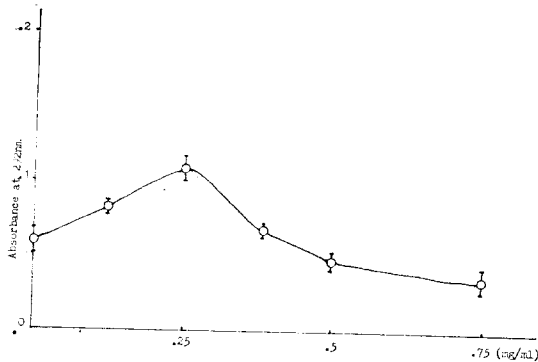


Fig. 3—Changes on the hepatic xanthine oxidase activity in various concentration of ginseng saponins in vitro. Each value represents a mean of three experiments. Vertical bar means standard errors.

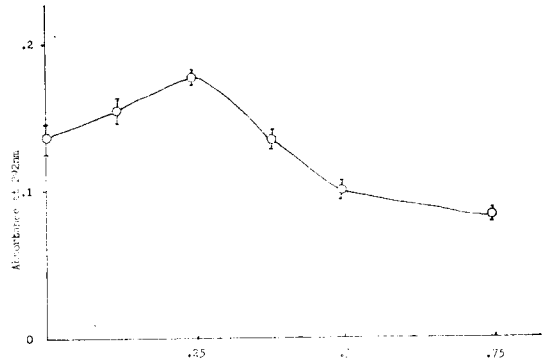


Fig. 4—Changes on the hepatic xanthine oxidase activity in various concentration of ginseng saponin in ethanol-treated mouse. Each mouse received 25% v/v (1g/kg) before 90min sacrificed. Each value represents a mean of three experiments. Vertical bar means standard errors.

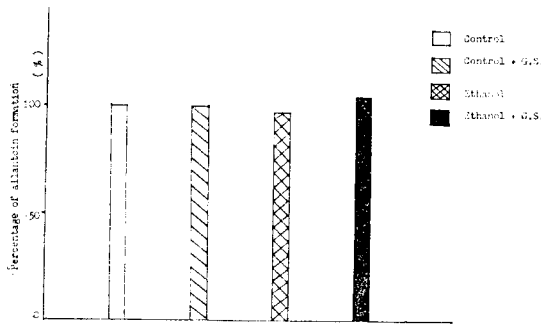


Fig. 5—Effect of ginseng saponin on the hepatic uricase activity in mouse after ethanol treatment.

Ginseng extract (4mg/kg) was injected to mouse 90min before the ethanol treatment. The animals were sacrificed 180min after the ginseng administration. The assay procedure was in the text. Each value represents a mean of four experiments.

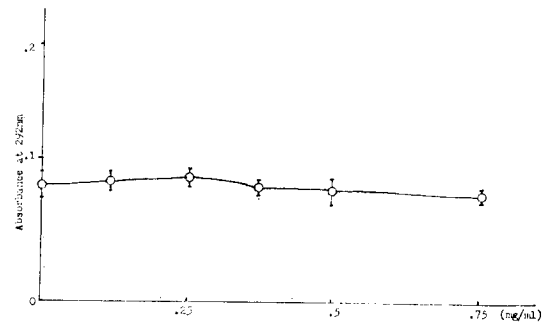


Fig. 6—Changes on the hepatic uricase activities in various concentration of ginseng saponin. Each value represents a mean of three experiments. Vertical bar means standard errors.

찰한 成績은 Fig. 5 에 表示한 바와같다. 人蔘 粗 사포닌 投與는 生理食鹽水를 투여한 對照群이나 에탄올을 投與한 群에서 모두 本 酵素 活性에는 별로 영향을 주지 못하였다. 한편 Fig. 6 에 圖示한 바와같이 試驗管内 實驗에서도 人蔘의 添加量을 增加시킴에 따라 本 酵素 活性에는 아무런 變化를 주지 못하였다.

考 察

섭취된 대부분의 에탄올은 주로 肝臟에서 몇 단계의 酸化過程을 거쳐서 代謝되어 最終적으로

炭酸게스와 물로서 變하는데^{18,19)}, 에탄올의 일련의 代謝過程에서는 NAD가 hydrogen acceptor로 이용되어 NADH를 형성하게 된다^{20~22)}. 에탄올은 다른 藥物과 併用할때 多様な 복합적인 藥理作用^{23~25)}을 나타낼 뿐 아니라 生體의 여러가지 臟器의 機能 및 代謝過程^{26~29)}에도 많은 變化를 가져오게 하므로 에탄올의 代謝에 영향을 미치는 藥物의 研究는 매우 흥미있는 分野의 한 部分이라고 생각되어 진다.

에탄올의 섭취시 나타나는 代謝性 疾患의 하나로서 高尿酸血症의 誘發과 이의 惡化를 들 수 있다^{30,31)}. 著者들은 人蔘 사포닌 分割이 에탄올의 代謝에 관여하는 알코올 및 aldehyde dehydrogenase의 活性을 增加시키므로 生體에서 에탄올의 作用時間을 短縮시킬 것이라는 研究 結果를 報告한바 있다. 이와같은 에탄올 代謝에 대한 人蔘 사포닌의 效果가 高尿酸血症과는 어떠한 相互關係가 있는가를 검토한 本實驗에서도 에탄올 投與에 의해 誘發되어진 高尿酸血症에 현저한 效果가 있음이 밝혀졌다. 人蔘 粗 사포닌의 투여는 에탄올에 의해 增加되었던 尿酸의 血中濃度를 正常動物의 水準으로 減少시키는 作用이 있음을 관찰할 수 있었으며, 또한 尿酸 生合成에 직접 관여하는 酵素인 XO의 活性에 대한 實驗에서도 에탄올 처리에 의해 그 活性이 生理食鹽水를 투여한 對照群에 비해 약 2.5倍 增加되었던 것이 人蔘 粗 사포닌(4mg/kg)의 1회 투여로 對照群의 活性과 비슷한 程度로 減少시키는 현저한 效果가 있음을 알 수 있었다.

尿酸은 人體에서 核酸의 purine 鹽基의 最終代謝產物을 體外로 排池되지만 設치類에서는 肝 mitochondria에 존재하는 uricase에 의해 酸化되어 allantoin³²⁾으로 되기 때문에 人蔘 粗 사포닌이 uricase 活性에는 어떠한 영향을 주는가를 검토하였던바 이 酵素活性에는 별다른 變化를 주지 않음을 관찰할 수 있었다. 이와같이 實驗成績은 人蔘 粗 사포닌 分割이 核酸의 代謝過程에서 尿酸의 生合成에 관여하는 酵素에만 選擇적으로 영향을 주고 있다는 點에서 매우 흥미있는 結果라고 생각된다. 한편 人蔘 粗 사포닌의 藥理作用이 正常的인 조건에서는 나타나지 않고 疾病狀態 내지는 生體內의 代謝的 異常이 초래된 조건에서만 나타나는 人蔘의 特殊한 效果가 이 實驗 結果에서도 나타났는데 이것은 adaptogen³³⁾이라고 까지 불리우는 人蔘의 效果에 또 하나의 神秘스러운 藥理作用을 追加하는 것으로 생각된다.

실제로 XO의 抑制劑인 allopurinol이 臨床적으로 高尿酸血症의 治療 目的으로 널리 이용되고 있는 점을 考慮하면 人蔘이 痛風을 위시한 여러가지 高尿酸血症의 豫防 내지는 治療에 응용될 수 있다는 可能性이 本實驗을 통하여 示唆되고 있다. 한편 XO 活性에 미치는 人蔘 粗 사포닌의 作用機轉을 究明하는 하나의 方法으로 시행한 試驗管内 實驗에서는 正常 및 에탄올 처리群의 肝 XO에 대하여 同一한 樣狀으로 添加되는 人蔘 사포닌의 量에 따라 그 活性이 增加 또는 減少되는 dual action이 나타났다.

上記와 같은 相反된 두가지 作用은 몇가지 酵素에 대하여 共通적으로 나타나는 人蔘의 特異한 反應으로서^{9,34)} 臨床적인 面에서도 考慮되어 져야 할지는 아직 검토된 바 없으며 이것은 研究되어 져야할 課題라 생각되어져 本 研究室에서 계속 追究하고 있다.

結 論

實驗 動物의 高尿酸血症에 人蔘 粗 사포닌이 어떠한 效果를 주는가를 검토할 目的으로 mouse에 에탄올을 투여하여 高尿酸血症 狀態를 誘導시킨후 人蔘 粗 사포닌의 영향을 관찰한 實驗成績은 다음과 같다.

Mouse에 25% v/v 에탄올(1g/kg)을 腹腔內에 注射할때 肝臟中の xanthine oxidase 活性은 약

2배로 증가되는데, 人蔘粗 사포닌(4mg/kg)의一回投與는 酵素活性을 正常群 水準으로 減少시켰다.

에탄올의 急性 中毒 狀態에서는 尿酸에 血中濃度가 對照群에 비해 약 2.5배로 증가되는데 人蔘粗 사포닌(4mg/kg)을 腹腔內에 1回 投與로 對照群에 비슷한 濃度로 되었다. 對照群에 人蔘粗 사포닌을 투여하였을 때에는 尿酸의 血中 濃度나 肝臟中の xanthine oxidase 活性度에 영향을 주지 않았다.

In vitro 實驗에서 첨가되는 人蔘粗 사포닌의 量이 적을때는 酵素活性이 점차적으로 증가하여 0.25mg/ml에서 最高值에 달하였으며 그 以上の 濃度에서는 減少하기 시작하여 0.5mg/ml에서는 對照群보다도 30% 정도 減少하였다.

人蔘粗 사포닌의 투여는 uricase의 活性에는 별로 영향을 주지 못하였다. 또한 試驗管內에서도 uricase 活性에는 變化를 주지 않았다.

本論文은 峨山社會福祉事業財團의 財政的인 補助에 의하여 完遂되었으므로 이에 感謝의 뜻을 表하는 바이다.

文 獻

1. R. Berian, *Z. Physiol. Chem.*, **43**, 497(1905).
2. H. Klenow, *Biochem. J.*, **50**, 404 (1952).
3. F.S. Phillips, J.B. Thiersch and A. Bendech, *J. Pharmacol. Exp., Therap.*, **104**, 20(1952).
4. I.H. Krokoff, *J. Am. M. A.*, **193**, 1(1965).
5. M.A. Ogryzlo, *Am. Rheum. Dis.*, **25**, 673(1966).
6. S. Lindy, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **23**, 52(1966).
7. C.S. Lieber, N. Spritz and L.M. Decarli, *J. Clin. Invest.*, **41**, 1863(1962).
8. M.J. Maclanchlan, *Am. J. Med.*, **42**, 38(1967).
9. 許 堉, 崔鐘元, 嶺南大學校 天然物化學研究所 研究報告, **5**, 10(1978).
10. G. Cohen, D.M. Namec and D. Dehic, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 313(1975).
11. S. Shibata, T. Ando and O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **4**, 1157(1966).
12. T. Namba, M. Yoshizaki, T. Tominari and J. Hase, *Planta Medica*, **25**, 28(1974).
13. R.J. Henry, C. Sobeland and J. Kin, *Am. Clin. Pathol.*, **28**, 152(1957).
14. F. Stripe and E.D. Corte, *J. Biol. Chem.*, **224**, 3855(1969).
15. H. Iwata and I. Yamamoto, *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 2237(1973).
16. G.G. Allen, C.Z. Bardawell and M.M. David, *J. Biol. Chem.*, **177**, 751(1949).
17. H.R. Mabler, P.D. Boyer and H.A. Lardy, *The Enzymes*, Academic Press, N. Y. **1963**, vol. **8**, 285
18. F. Batteri and L. Sterm, *C.R. Clin. Soc. Biol.*, **67**, 419(1969).
19. F. Landquist and H. Wolthers, *Acta Pharmacol.*, **14**, 265(1958).
20. J. Lehmann, *Biochem. Z.*, **272** 144(1934).
21. D. Keilin and E.F. Hartree, *Biochem. J.*, **39**, 293(1951).
22. R.F. Bonnichen and H. Theorell, *Scand. J. Clin. and Lab.*, **3**, 58(1951).
23. R.B. Forney and F.W. Hughes, *Clin. Pharmacol. Therap.*, **5**, 414(1964).
24. U.H. Peter, *Med. Clin.*, **61**, 1455(1966).
25. S.E. Severson and L.E. Gordon, *Curr. Ther. Res.*, **7**, 367(1965).
26. R. Webb and I.U. Degerli, *J. Am. M. A.*, **101**, 1055(1965).
27. E.R. Wist and W.C. Gogel, *Vision Res.*, **6**, 325(1966).

28. C. S. Lieber, D. P. Jones and L. M. Decarli, *J. Clin. Invest.*, **44**, 1009(1965).
29. C. S. Lieber, *Gastroenterology*, **50**, 119(1966).
30. C. S. Lieber and D. P. Jones, *Clin. Invest.*, **41**, 1863(1962).
31. M. J. MacLachlan and L. E. Gordon, *Am. J. Med.*, **42**, 38(1967).
32. A. B. Gutman, *Am. J. Med.*, **37**, 833(1964).
33. I. Brekhman and I. V. Dardymov, *Am. Rev. Pharmacol.*, **9**, 419(1968).
34. C. N. Joo and J. H. Han, *Korean Biochem. J.*, **9**, 1(1976).