

人蔘 蛋白成分이 培養한 Chick Embryo의 腦, 脊髓, 筋肉細胞에 미치는 效果에 관한 研究

金榮中 · 韓大錫 · 許 燾 · 安尙美 · 具香子

서울대학교 藥學大學

(Received December 26, 1982)

Young Choong Kim, Dae Suk Han, Hoon Huh, Sang Mee Ahn and Hyang Ja Koo
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Studies on the Effect of the Protein Constituents of *Panax ginseng* Root on Cultured Chick Embryonic Brain, Spinal Cord and Skeletal Muscle Cells

Abstract—The effect of protein constituents of six-year old fresh *Panax ginseng* root on chick embryonic brain, spinal cord and skeletal muscle dissociation cultures was studied. The protein constituents showed the enhancing effect on cultured brain, spinal cord and skeletal muscle cells. The neurite formation from brain and spinal cord cells and the outgrowth of neurite seemed to be enhanced by almost all of the protein constituents employed for this study. The maturation of skeletal muscle cells was stimulated by the protein constituents. This enhancing effect of the protein constituents was more vivid when brain, spinal cord and skeletal muscle cells were cultured with a medium which did not contain chick embryonic extracts known as an essential component for primary cell culture. The protein fraction having molecular weight range of 1,000 to 5,000 out of all the protein fractions employed for this study showed the most stimulatory effect on cultured brain, spinal cord and skeletal muscle cells.

人蔘은 古來로부터 東洋民俗醫學에서는 靈藥, 또는 神祕의 藥으로 알려져 왔다. 最近에는 東洋은 물론 西洋에서도 그 藥效를 認定받기에 이르러, 人蔘의 有效成分을 分離하고 各成分의 效果를 밝히려는 努力이 여러 학자들에 의해 계속되어 왔다.¹⁻⁵⁾ 生體에 미치는 人蔘의 藥理作用은 多樣하여 生體內의 여러 生理作用에 관련한다고 報告되었으나,⁶⁻¹¹⁾ 그 作用機轉에 대하여 정확히 밝혀진 바는 없다.

人蔘의 有效成分으로는 dammarane系 glycosides가 알려졌으며,¹⁻⁵⁾ dammarane系 glycosides이 외의 成分에 대하여는 最近까지 거의 研究되어 있지 않았다. 人蔘의 多樣的 效果를 고려할 때 단지 dammarane系 glycosides만이 有效成分이라고 생각하기에는 무리가 있으며 最近에는 人蔘 中の peptide成分이 antilipolytic activity를 갖는다는 報告도 있다.¹²⁾

그러므로 本 研究은 人蔘의 蛋白成分이 腦, 脊髓 및 筋肉細胞에 미치는 效果를 糾明하기 위하여, 比較的 짧은 時間內에 細胞水準에서 藥物의 效果를 밝힐 수 있는 primary cell culture法을 利用하여 수행하였다.

實 驗 方 法

本 實驗에서 사용한 人蔘은 따로 기술하지 않는 한 강화산 6年根 水蔘이며 chick embryo는 푸

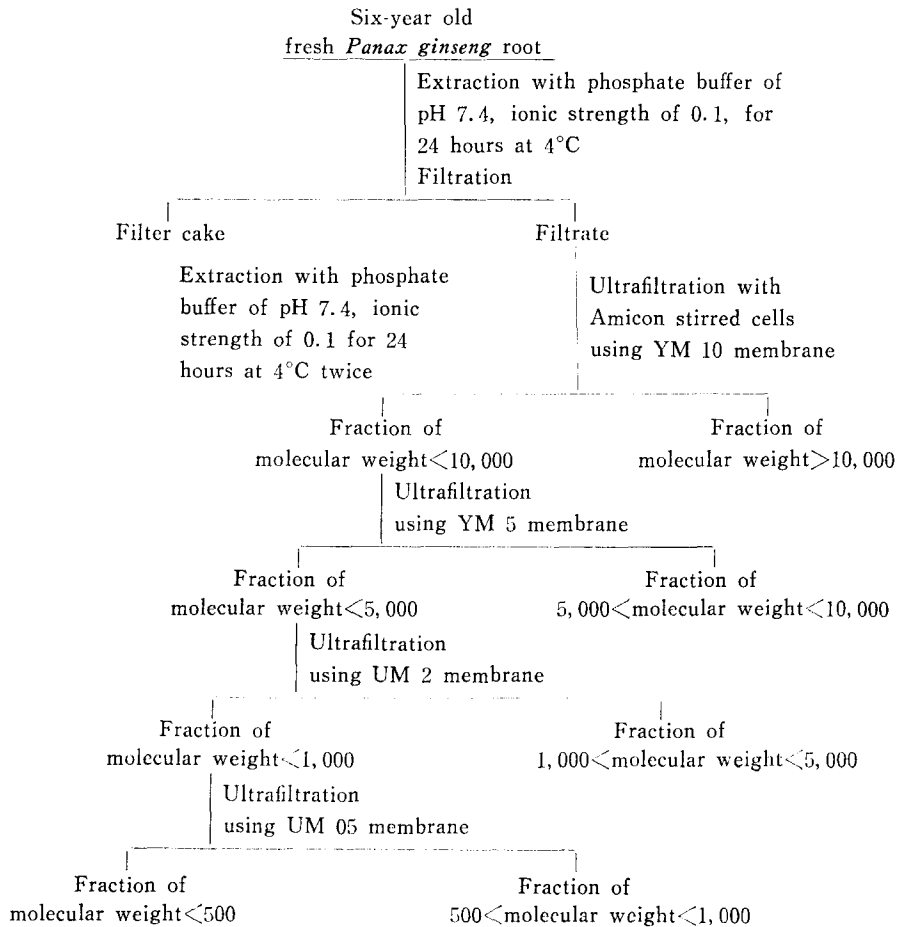
리나 코리아 회사(부평)에서 구입한 日齡 8~12日 된 부화란이다. 組織培養에 必要한 試藥은 Grand Island Biochemical Company(U.S.A.) 제품을, 기타 試藥은 日本의 Wako, Kanto, Hanawa 회사의 특급시약과 Sigma chemical company 제품을 사용하였다.

蛋白質 定量—蛋白質 含量은 Lowry方法¹⁴⁾에 의하여 bovine serum albumin을 標準品으로 하여 定量하였다.

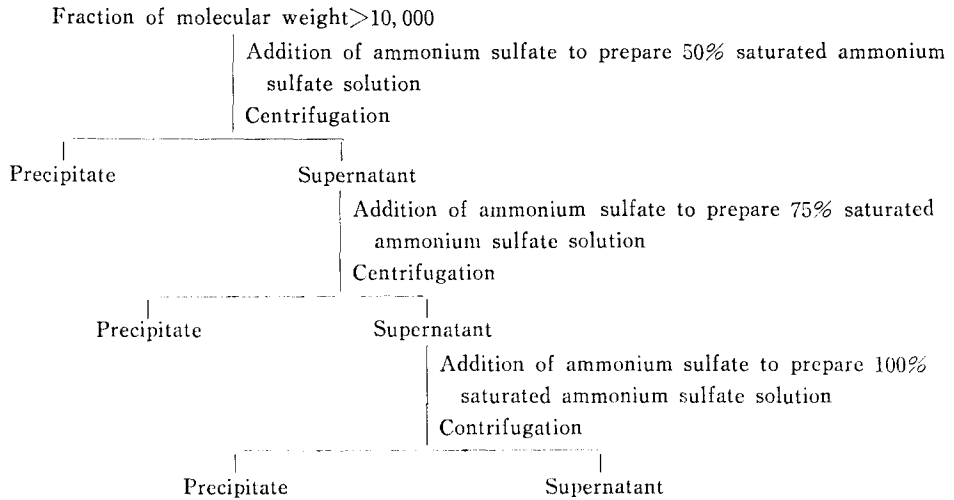
水蔘 蛋白質成分의 抽出·分割—1) 蛋白質成分의 抽出: 水蔘을 증류수로 3회 잘 세척한 후 잘게 부순 다음 Okuda 등의 方法¹²⁾을 약간 수정하여 다음과 같이 행하였다. 4°C 이하에서 인산 완충액 (pH=7.4, ionic strength=0.1)을 사용하여 계속 교반하면서 24時間 동안 抽出한 후 濾過하고, 그 淺渣는 다시 위의 같은 方法으로 2회 더 抽出하여 濾過한 다음 濾液을 모두 합하였다.

2) 限外濾過法에 의한 總 蛋白質成分의 分割: 水蔘 抽出液을 限外濾過裝置(Amicon stirred cells, model 202)를 利用하여 分子量 500 (UM 05), 1,000(UM 2), 5,000(YM 5), 10,000(YM 10)을 分割할 수 있는 各各의 限外濾過膜을 사용하여 질소가스상에서 分割하였다. (Scheme I)

分子量 10,000 이상의 fraction은 ammonium sulfate 沈澱法에 의하여 分離하였다. (Scheme II)



Scheme I—Extraction and fractionation of the protein constituents of fresh *Panax ginseng* root.



Scheme II—Ammonium sulfate fractionation of the protein constituents of fresh *Panax ginseng* root having molecular weight larger than 10,000.

Chick Embryo 抽出物의 제조¹⁵⁾—日齡이 10日된 chick embryo를 摘出하여 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)으로써 세척한 후 주사기를 利用하여 遠心分離管속에 壓出하고 同量의 HBSS로 희석하였다. 실온에서 30分間 放置한 다음 4°C에서 3,600rpm으로 20分間 遠心分離하고 上澄液단을 取하여 다시 4°C에서 10,000 rpm으로 1時間동안 遠心分離하여 그 上澄液을 取하여 제조하였다.

Chick Embryo의 腦, 脊髓 및 筋肉細胞의 培養條件—모든 操作은 laminar flow에서 無菌狀態로 行하여졌으며 培養液은 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM) 173ml, horse serum 20ml, chick embryo抽出物 5ml, antibiotics(GIBCO 600—5240) 2ml의 비율로 混合한 標準培養液(培養液 A)과 標準培養液에서 chick embryo 抽出物을 除去한 培養液(培養液 B)의 2가지를 使用하였다. 培養容器는 35×10mm크기의 plastic petri dish(Falcon, U.S.A.)에 collagen을 입힌 것을 使用하였다. 組織 및 細胞의 培養은 一定한 濕度를 維持하는 37°C의 培養基에서 공기(95%)와 CO₂(5%)의 혼합기체를 계속 供給하고 培養液을 3日마다 교환해 주면서 行하였다.

腦 및 脊髓細胞의 培養—日齡이 10日된 chick embryo에서 腦와 脊髓를 各各 摘出한 후 結合組織을 除去하고 trypsin으로 組織을 軟化시킨 후 細胞狀態로 分離하여 5×10⁶개 정도의 細胞를 培養容器에 移植하여 培養하였다.¹⁶⁾

筋肉細胞의 培養—日齡이 12日된 chick embryo의 가슴근육을 摘出하여 trypsin으로 組織을 軟化시킨 후 細胞狀態로 分離하였다. Fibroblast를 除去하기 위하여 200×15mm크기의 培養容器에 약 1×10⁶개의 細胞를 移植하여 37°C에서 45分間 培養하였다.¹⁷⁾ 그후 培養液만을 取하여 collagen을 入힌 35×10mm크기의 petri dish에 5×10⁵개 정도의 筋肉細胞를 移植하여 培養하였다.¹⁸⁾

結果 및 考察

Chick embryo의 腦, 脊髓 및 筋肉細胞를 體外에서 各各 培養시키면서 人蔘 蛋白成分의 效果를 顯微鏡으로 觀察하였다. 試料로 使用한 人蔘 蛋白成分은 分子量 <500, 500<분자량 <1,000, 1,000<분자량 <5,000, 5,000<분자량 <10,000인 分劃物과 分子量 10,000이상인 分劃物을 다시

ammonium sulfate 염석법에 의하여 50% 포화, 75%포화 및 100% 포화용액에서 沈澱된 各各의 蛋白 分劃物이다.

개개의 人蔘 蛋白 分劃物은 증류수에 溶解시킨 후(蛋白成分 100 μ g/ml), pore size가 0.2 μ m인 mili pore membrane을 사용하여 滅菌시킨 것을 實驗에 사용하였다. 腦, 脊髓 및 筋肉細胞는 앞에서 제조한 培養液 A와 培養液 B에 各各 人蔘 蛋白成分을 培養液 1ml당 5 μ g씩 함유하도록 添加한 후 배양시키면서 그 效果를 觀察하였다.

培養液 A로 培養시킨 腦와 脊髓細胞는 分子量 10,000이하의 人蔘 蛋白成分에 의하여 神經纖維의 生成이 促進되었을 뿐만 아니라, 神經細胞 軸索突起 자체를 더욱 굵고 길게 발달시키고 神經纖維의 數도 增加되어 密集된 神經纖維群을 形成함을 觀察할 수 있었다. (Fig. 1, 2)

이러한 人蔘 蛋白成分 效果는 培養液 B로 腦와 脊髓細胞를 培養시켰을 때 더욱 뚜렷이 觀察할 수 있었다. (Fig. 3, 4) 즉, 細胞成長에 必須成分인 chick embryo 抽出物을 除去한 培養液 B로 腦와 脊髓細胞를 培養시켰을 때 培養液 A로 培養시킨 경우와는 대조적으로 神經纖維의 生成 및 成長이 현저히 低下되었다. 그러나, 人蔘 蛋白成分을 添加한 경우에는 培養液 B로 腦와 脊髓細胞를 培養하여도 神經細胞가 發達하고 神經纖維가 生成되는 것을 觀察할 수 있었다. 특히 이러한 人蔘 蛋白成分의 效果는 分子量 1,000에서 5,000사이인 蛋白 分劃物과 500에서 1,000사이의 蛋白 分劃物에서 뚜렷하여, 현저히 細胞의 성장을 促進하고 神經細胞 軸索突起가 매우 길고 굵게 發達하는 것을 觀察할 수 있다. (Fig. 1, 3)

分子量 10,000이상인 蛋白 分劃物의 경우에는 腦細胞를 標準培養液으로 培養하였을 때 뚜렷한 神經세포의 成長促進은 觀察할 수 없었으나 對照群보다는 比較的 神經細胞의 成長이 促進된 듯 하였다. 그러나 分子量 10,000이상인 蛋白 分劃物 中에서도 100% 포화 ammonium sulfate 溶液에서 沈澱된 蛋白 分劃物은 腦細胞의 成長을 월등히 促進함을 알 수 있었다(Fig. 5). 이러한 結果는 培養液 B로 腦細胞를 培養시켰을 때에도 얻을 수 있었다. (Fig. 6)

모든 人蔘 蛋白 分劃物은 筋肉細胞의 成長을 促進시키는 것을 觀察할 수 있었다. 筋肉細胞를 培養液 A로 培養하였을 때 分子量 5,000이하의 蛋白 分劃物은 筋肉細胞의 成長을 현저히 促進시켜 筋肉細胞가 굵고 길게 발달하는 것을 볼 수 있었다. (Fig. 7) 培養液 B로 筋肉細胞를 培養한 경우에는 人蔘 蛋白成分을 添加하였을 때 myotube 狀態로 發達하는 것을 觀察할 수 있었다. (Fig. 8) 筋肉細胞의 경우에도 특히 分子量 500에서 1,000사이인 蛋白 分劃物과 1,000에서 5,000사이인 蛋白 分劃物이 細胞의 成長을 월등히 促進하여 筋肉細胞가 매우 굵고 길게 뻗어나간 것을 觀察할 수 있었다.

以上の 結果를 綜合하여 보면 人蔘 中에 含有되어 있는 蛋白成分은 腦, 脊髓 및 筋肉細胞의 成長, 發達을 促進시키며 특히 低分子量的 蛋白 分劃物이 큰 效果를 나타내는 것을 알 수 있었다. 이러한 人蔘 蛋白成分의 細胞成長 促進效果는 人蔘 saponin이 培養된 腦, 脊髓 및 筋肉細胞의 成長에 별다른 效果를 나타내지 않았다는 보고¹³⁾와 比較할 때 注目할 만하다 하겠다. 그러나 현미경 관찰에 의한 人蔘 蛋白成分의 腦, 脊髓 및 筋肉細胞에 미치는 成長促進效果를 더욱 정확히 糾明하기 위하여서는 이에 대한 體系의인 研究는 물론 培養細胞에 存在하는 酵素의 活性, 蛋白質과 核酸合成 및 細胞成長에 關與하는 物質에 대한 一連의 生化學的 研究가 뒤따라야 하겠다. 本 研究室에서는 이에 대한 研究가 수행 中에 있다.

結 論

人蔘의 蛋白質成分은 培養된 chick embryo의 腦, 脊髓 및 筋肉細胞의 成長을 促進시키는 것을 현미경하에서 觀察할 수 있었다. 本研究에 사용된 거의 모든 人蔘 蛋白質成分은 腦와 脊髓細胞에서 神經細胞 軸索突起의 生成 및 成長을 促進시키는 것은 물론, 筋肉細胞의 成長도 促進시켜 筋肉細胞가 굵고 길게 자라는 것을 볼 수 있었다. 이러한 人蔘 蛋白質成分의 細胞成長 促進效果는 특히 分子量이 500에서 5,000사이인 蛋白質成分에서 뚜렷하게 나타났다.

이 研究은 大宇文化福祉財團의 學術研究費에 의해 수행된 것이며 이에 同財團에 깊이 감사한다. 또한 本研究에 소요된 경비의 일부는 서울大學校 藥學大學附設 研究所의 補助에 의한 것이며 이에 깊이 감사하는 바이다.

文 獻

1. I.M. Popov and W.J. Coldwag, *Korean Ginseng Studies*, Ilwha Co., Ltd, Seoul Korea, vol. 1, pp. 328 (1977).
2. J.Y. Kim and E.J. Staba, *ibid.*, vol. 1, pp.1 (1977).
3. B.H. Han and L.K. Woo, *ibid.*, vol. 1, pp.22 (1977).
4. K. Takagi, H. Saito and H. Nabata, *Japan J. Pharmacol.*, **22**, 245 (1972).
5. K. Takagi, H. Saito and M. Tsuchiya, *ibid.*, **22**, 339 (1972).
6. T. Yokozawa, H. Semo and H. Oura, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3095 (1975).
7. T. Yokozawa, H. Oura, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 987 (1976).
8. H. Oura, S. Nakashima, K. Tsukada and Y. Ohta, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 980 (1972).
9. Korean Ginseng Research Institute, Republic of Korea, *Korean Ginseng*, pp.173 (1978).
10. Korean Ginseng Research Institute, Republic of Korea, *Korean Ginseng*, pp.116 (1978).
11. H. Saito, Y. Yoshida and K. Takagi, *Japan J. Pharmacol.*, **24**, 119 (1974).
12. T. Ando, T. Muraoka, N. Yamasaki and H. Okuda, *Plan. Medi.*, **38**, 18 (1980).
13. Y.C. Kim E.K. Kim, *Yakhak Hoeji*, **24**, 143 (1980).
14. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Rondall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1964)
15. P.R. White, *The cultivation of animal and plant cells*, The Ronald Press Company, New York, pp.66 (1963).
16. Y. Shimada, D.A. Fischman and A.A. Moscona, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **62**, 715 (1969).
17. T.H. Oh and D.D. Johnson, *Exp. Neurol.*, **37**, 360 (1972).
18. C. Richler and D. Yaffe, *Dev. Biol.*, **23**, 1 (1970).

Fig. 1—The effect of the protein constituents of fresh *Panax ginseng* root on the chick embryonic brain cell culture. $\times 100$

Control brain cell culture grown for 5 days in the standard medium (=medium A) is shown in picture A. Pictures shown in B, C, D and E are brain cell cultures grown for 5 days in the presence of the fractions of protein constituents, mol. wt. <500 , $500 < \text{mol. wt.} < 1,000$, $1,000 < \text{mol. wt.} < 5,000$, $5,000 < \text{mol. wt.} < 10,000$ of *Panax ginseng* root, respectively.

Fig. 2—The effect of the protein constituents of fresh *Panax ginseng* root on the chick embryonic spinal cord culture. $\times 100$

Control spinal cord culture grown for 5 days in the standard medium (=medium A) is shown in picture A. Picture B shows the spinal cord culture grown for 5 days in the presence of the protein constituents having molecular weight range of 1,000 to 5,000.

Fig. 3—The effect of the protein constituents of fresh *Panax ginseng* root on the chick embryonic brain cell culture. $\times 100$

Control brain cell culture grown for 5 days in the medium B (DMEM: horse serum; 9:1, v/v) is shown in picture A. Pictures shown in B, C, D and E are brain cell cultures grown for 5 days in the presence of the fractions of protein constituents, mol. wt. <500 , $500 < \text{mol. wt.} < 1,000$, $1,000 < \text{mol. wt.} < 5,000$, $5,000 < \text{mol. wt.} < 10,000$ of fresh *Panax ginseng* root, respectively.

Fig. 4—The effect of the protein constituents of fresh *Panax ginseng* root on the chick embryonic spinal cord culture. $\times 100$

Control spinal cord culture grown for 5 days in the medium B (DMEM: horse serum; 9:1, v/v) is shown in picture A. Picture B shows the spinal cord culture grown for 5 days in the presence of the protein constituents having molecular weight range of 1,000 to 5,000.

Fig. 5—The effect of the protein constituents of fresh *Panax ginseng* root having molecular weight larger than 10,000 on the chick embryonic brain cell culture. $\times 100$

The brain cell cultures are grown for 5 days in the standard medium. Pictures shown in A, B, and C are brain cell cultures grown for 5 days in the presence of the fractions of protein constituents which are precipitated at the 50%, 75%, 100% saturated ammonium sulfate solution, respectively.

Fig. 6—The effect of the protein constituents of fresh *Panax ginseng* root having molecular weight larger than 10,000 on the chick embryonic brain cell culture. $\times 100$

The brain cell cultures are grown for 5 days in the medium B (=DMEM: horse serum; 9:1, v/v). Pictures shown in A, B, and C are brain cell cultures grown for 5 days in the presence of the fractions of protein constituents which are precipitated at the 50%, 75%, 100% saturated ammonium sulfate solution, respectively.

Fig. 7—The effect of the protein constituents of fresh *Panax ginseng* root on the chick embryonic skeletal muscle cell culture. $\times 100$

Control skeletal muscle cell culture grown for 5 days in the standard medium is shown in picture A. Pictures shown in B, C, and D are skeletal muscle cell cultures grown for 5 days in the presence of the fractions of protein constituents, mol. wt. <500 , $500 < \text{mol. wt.} < 1,000$, $1,000 < \text{mol. wt.} < 5,000$ of fresh *Panax ginseng* root, respectively.

Fig. 8—The effect of the protein constituents of fresh *Panax ginseng* root on the chick embryonic skeletal muscle cell culture. $\times 100$

Control skeletal muscle cell culture grown for 5 days in the medium B (DMEM: horse; 9:1, v/v) is shown in picture A. Pictures shown in B, C, and D are skeletal muscle cell cultures grown for 5 days in the presence of the fractions of protein constituents, mol. wt. <500 , $500 < \text{mol. wt.} < 1,000$, $1,000 < \text{mol. wt.} < 5,000$ of fresh *Panax ginseng* root, respectively.

