

## 白鼠에 人蔘 投與時 心筋 小胞體의 Ca<sup>++</sup>-dependent ATPase活性에 미치는 效果

李 英 淑 · 金 洛 斗

서울대학교 藥學大學

The Effect of Ginseng on Ca<sup>++</sup>-dependent ATPase Activity of Sarcoplasmic Reticulum Fragments in Rat Heart

Young Sook LEE and Nak Doo KIM

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

**Abstract**—It was previously reported from our laboratory that the rate of deterioration of contractile force was slower in the heart of the ginseng extract treated rats. It was also found that ginseng may have an ability to sustain the normal function of the heart by sustaining Ca accumulation by sarcoplasmic reticulum. Ca<sup>++</sup>-dependent ATPase plays the central role in movement of Ca<sup>++</sup> ion from sarcoplasm into sarcoplasmic reticulum. In this investigation, the fragment of sarcoplasmic reticulum was prepared from rat heart treated with ginseng water extract orally 100mg/kg/day for 7 to 10 days and from normal rat heart. Ca<sup>++</sup>-dependent ATPase activity was estimated by a modified method of Fiske and Subbarow's procedure. Experimental groups were divided into 6 groups, depending on the preincubation time, 5, 30 and 60 min. at 25°C and 37°C respectively. In both of the groups of 25°C and 37°C, Ca<sup>++</sup>-dependent ATPase activities of the ginseng treated rat hearts were higher than that of normal hearts. Therefore, it can be concluded that Ca<sup>++</sup>-dependent ATPase activities in sarcoplasmic reticulum of rat hearts were increased by the treatment with ginseng extract.

**Keywords**—*Panax ginseng*, Ca-ATPase, rat heart, sarcoplasmic reticulum.

Kim등<sup>1)</sup>, Toh등<sup>2)</sup> 및 Oh등<sup>3)</sup>은 인삼의 총 엑기스, 총 saponin 및 ginsenoside를 경구 투여한 흰쥐의 심장이 정상군에 비해 수축력 마비가 지연되는 현상을 보고한 바 있다.

따라서, 인삼 엑기스 투여군의 심장 수축력의 퇴화 지연기전을 규명하고자 Sung<sup>4)</sup> 등은 인삼을 장기적으로 경구 투여한 흰쥐 심장에서 분리해낸 sarcoplasmic reticulum (S.R.)에 의한 <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> uptake양을 대조군과 비교 측정한 결과, 인삼

처리군이 대조군에 비해 시간 경과에 따른 <sup>45</sup>Ca<sup>++</sup> uptake 기능약화가 월등히 지연됨을 보고하였다.

심장 수축·이완 운동에 sarcoplasmic reticulum 과 Ca<sup>++</sup> ion이 중요한 역할을 하는 것은 주지의 사실이다. 특히 Ca<sup>++</sup>-dependent ATPase는 Ca<sup>++</sup> ion이 S.R. 내외로 이동하는데 중요한 역할을 하는 효소임이 많은 문헌에서 밝혀져 있으며<sup>5)</sup> 심장수축력에 있어서 Ca<sup>++</sup> uptake기능과 Ca<sup>++</sup>-dependent ATPase와의 밀접한 관계에 대한 실험 보

고가 많다<sup>6,7)</sup>. Chidsey<sup>8)</sup> 등은 심부전증을 유도한 송아지의 심장으로 부터 분리한 S.R.기능을 *in vitro*로 실험한 결과 Ca<sup>+</sup>uptake rate와 함께 Ca<sup>+</sup>-activated ATPase 활성이 정상군에 비해 월등히 감소하였음을 보고하였다. 또한, Nayler<sup>9)</sup> 등도 심근 세포막 절편에서 Ca<sup>+</sup> transport와 Ca<sup>+</sup>-dependent ATPase 활성과 밀접한 상관관계가 있음을 보고하였다. 즉, 대표적인 Ca<sup>+</sup>-antagonist인 verapamil을 *in vitro*로 실험한 군은 정상군에 비해 Ca<sup>+</sup>-transport 활성감소와 함께 Ca<sup>+</sup>-activated ATPase의 감소를 보고하였다.

이에 저자는 인삼 수침 엑기스를 장기적으로 경구 투여한 흰쥐심장으로 부터 분리한 S.R.의 Ca<sup>+</sup>-dependent ATPase 활성을 정상군의 것과 비교 관찰하였다.

### 실험 방법

#### 1. 재 료

##### 1) 인삼 수침 엑기스

인삼 연구소에서 구입한 홍삼을 분쇄하여 물 5배를 가하고 75°C에서 8시간씩 5회 추출하였다. 추출액을 감압 농축하여 40%의 수분을 함유하도록 하였다.

##### 2) 실험동물

서울대학교 실험동물 사육장에서 사육한 150g ~ 200g내외의 건강한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 처치군은 인삼 수침 엑기스를 상온에서 생리식염수에 용해하여 7~10일 100mg/kg/day로 경구 투여했으며 정상군은 생리식염수를 體重 200g당 0.5ml/day로 7~10일 경구투여했다.

#### 2. 방 법

##### 1) Sarcoplasmic reticulum의 분리

처치군은 인삼 수침 엑기스를 100mg/kg/day로 7~10일간 경구 투여하고 대조군은 생리식염수를 흰쥐 무게 200g당 0.5ml/day로 7~10일 경구 투여했다. Sarcoplasmic reticulum fragment는 흰쥐 심장으로 부터 Sulakhe and Dhalla<sup>10)</sup>와 Chidsey<sup>8)</sup> 등에 의한 방법을 수정하여 얻었다.

흰쥐 두부를 강타하여 심장을 신속히 적출한

후 병병한 0.9% NaCl을 대동맥을 통해 관류시켜 혈액을 제거하였다. 다음 심실을 취해 심실근을 세절한 후 각각 10배량의 병냉완충액(0.32 M sucrose, 5mM sod. azide, 20mM Tris-HCl, pH 7.4)으로 homogenation시켰다. 이 때 20초 간격으로 15초씩 3회 반복하였다. Homogenate는 10,000g에서 20분 원심분리하고 침전물은 버리고 상등액을 4점의 가아제로 여과하여 부유지질을 제거하였다. 다시 10,000g에서 20분 원심분리하여 mitochondria, nuclei, myofibrils, cell debris등을 완전히 제거하였다. 상등액을 40,000g에서 60분 원심분리하고 침전물을 5배량의 현탁액(0.6M KCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.4)에 teflon pestle을 사용하여 현탁하였다. 이 현탁액을 다시 40,000g에서 30분 원심분리하여 윗층에 녹아있는 actomyosin을 제거하고 침전물은 완충액(0.3M sucrose, 5mM Tris-histidine, pH 7.4)에 teflon pestle로 현탁하였다. 이 모든 조작은 0~4°C에서 행하였다(Fig. 1).

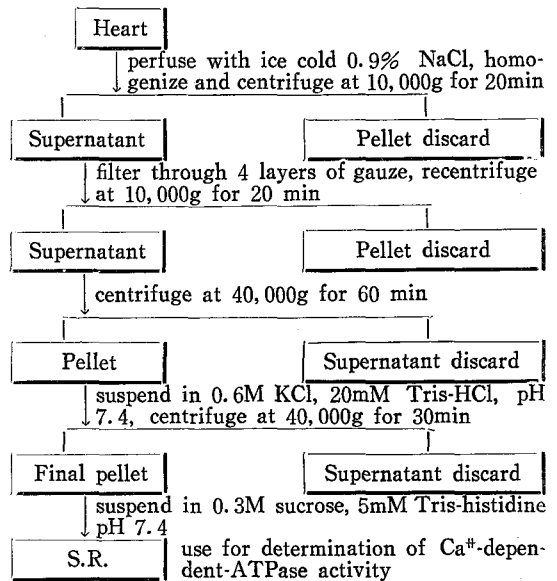


Fig. 1. Scheme of fractionation of S.R. fragment from rat heart.

##### 2) Ca<sup>+</sup>-dependent ATPase활성 측정

이상과 같이 분리한 대조군과 처치군의 S.R. fragments를 incubation시켜 유리되어 나오는 무기 인삼염의 양을 Fiske and Subbarow방법<sup>11)</sup>을

수정한 방법<sup>12)</sup>으로 ATPase활성을 측정하였다.

S.R. fragment를 (0.08~0.1mg/ml) incubation medium에 가하고 전체량이 2.5ml가 되게 하였다. Incubation medium의 조성은 100mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM Na<sub>2</sub>-ATP, 10mM Tris-histidine (pH 7.4), 0.1mM CaCl<sub>2</sub> 또는 1mM EGTA로 하였다. 이 혼합물을 25°C와 37°C에서 각각 incubation했으며 반응의 시작은 ATP를 가하는 시간으로 하였다. 실험은 대조군, 처치군을 각각 3군으로 나누어 ATP를 가하기 전 preincubation시간을 5, 30, 및 60분으로 구분하였다. Ca<sup>#</sup>-dependent ATPase활성은 총 ATPase활성에서 Mg<sup>#</sup>-ATPase활성을 뺀 값으로 하였다. Mg<sup>#</sup>-ATPase활성 측정시에는 Ca<sup>#</sup>ion이 없고 대신 EGTA (ethylene glycol bis ( $\beta$ -aminoethyl ether) N, N'-tetraacetic acid)를 포함하는 incubation medium을 사용하였다.

#### i) Preincubation 5분군

대조군과 처치군의 S.R. fragment를 각각 일정량 취해 (0.08~0.1mg/ml) incubation medium에 가하여 25°C에서 혹은 37°C에서 5분간 preincubation하였다. Tris-ATP 0.1ml를 가해 반응을 시작한 후 1, 2, 3, 5 및 10분마다 각각 0.5ml의 medium을 취해 병냉 10% TCA를 가해 단백질을 응고시켜 반응을 정지시켰다. 튜브를 흔들어 5분간 얼음에 놓아둔 후 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 그 상등액에 유리되어 나온 무기인산염의 양을 측정하였다. Ca<sup>#</sup>-dependent ATPase활성은 전체 ATPase활성에서 Mg<sup>#</sup>-ATPase활성을 뺀 값으로 하였다.

#### ii) Preincubation 30분군

대조군과 처치군의 S.R. fragment를 각각 일정량 취해 25°C에서 30분간 preincubation한 후 Tris-ATP를 0.1ml가해 반응을 시작했다. Incubation시작후 1, 2, 3, 5, 10분마다 0.5ml의 medium을 취해 병냉 10% TCA를 가해 반응을 정지시켰다.

튜브를 흔들어 5분간 얼음에 놓아둔 후 원심분리시켜 단백질을 침전시켰다. 그 상등액에 유리되어 나온 무기인산염의 양을 측정하였다.

#### iii) Preincubation 60분군

Preincubation 5분군과 30분군의 Ca<sup>#</sup>-ATPase 측정방법과 같이, S.R.을 preincubation 60분 한 후 incubation시켜 시간에 따라 Ca<sup>#</sup>-ATPase activity를 측정하였다.

Mg<sup>#</sup>-ATPase활성을 측정하는 incubation medium에는 Ca<sup>#</sup> ion이 없고 1mM-EGTA를 포함하는 medium을 사용하였다.

### 3) 단백질 농도 측정

분리한 S.R. fragments의 단백질 농도는 Lowry<sup>13)</sup> 등의 방법에 의해 측정하였다.

## 실험 결과

### 1. 25°C에서의 Ca<sup>#</sup>-dependent ATPase활성 변화

#### 1) Preincubation 5분군

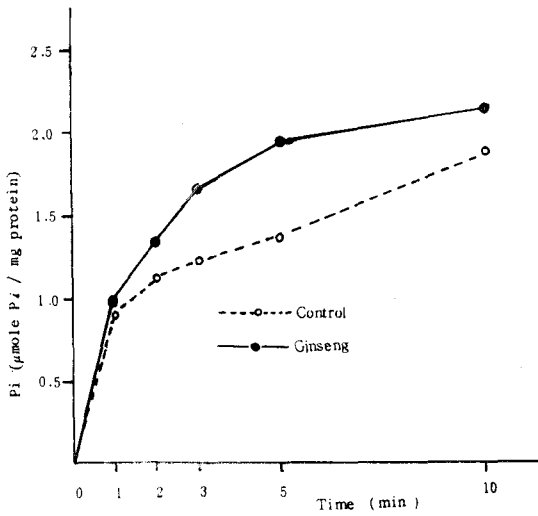
대조군과 처치군을 25°C에서 각각 preincubation 5분 한 후 ATP를 가하고 incubation시간 1, 2, 3, 5 및 10분 마다 효소활성을 측정하였다. 그 결과 incubation시간이 지남에 따라 대조군과 처치군간에 활성에 차이를 보였다. 즉 incubation시간 10분 후에는 대조군은 11.46 $\mu$ mole Pi/mg protein/hr, 처치군은 13.62 $\mu$ mole Pi/mg protein/hr로 대조군에 비해 18.85%의 활성 증가를 나타냈다(Fig. 2).

#### 2) Preincubation 30분군

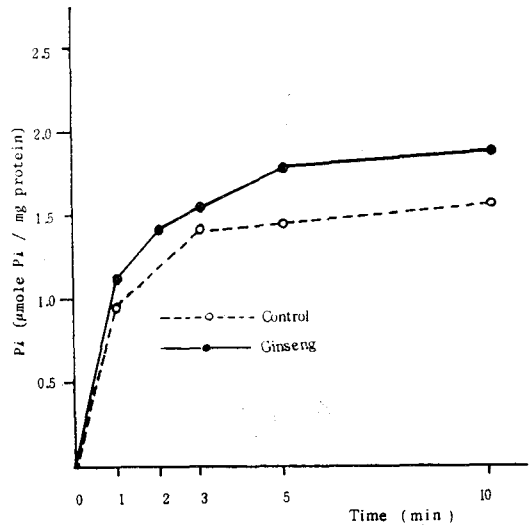
대조군과 처치군을 25°C에서 각각 preincubation 30분 한 후 ATP를 가하고 incubation시간 1, 2, 3, 5 및 10분마다 효소활성을 측정하였다. 그 결과 incubation시간이 5분인 군과 비슷한 경향을 나타내었다. 즉 incubation시간 10분 후에 대조군은 8.58 $\mu$ mole Pi/mg protein/hr, 처치군은 10.20 $\mu$ mole Pi/mg protein/hr로 대조군에 비해 18.88%의 활성증가를 나타내었다(Fig. 3).

#### 3) Preincubation 60분군

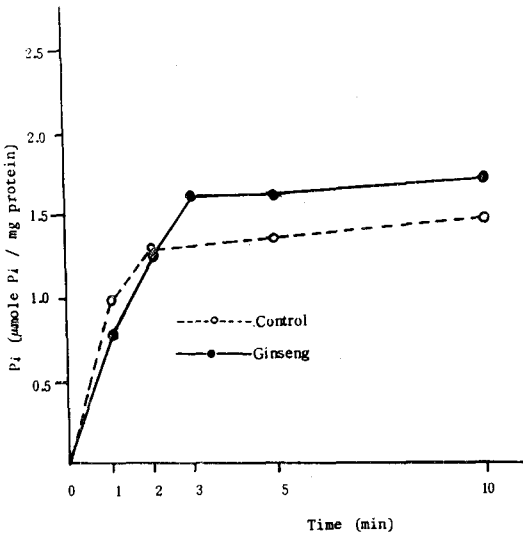
대조군과 처치군을 25°C에서 각각 preincubation 60분 한 후 ATP를 가하고 incubation시간 1, 2, 3, 5 및 10분 마다 효소활성을 측정하였다. 그 결과 incubation시간 10분후에 대조군은 9.66 $\mu$ mole Pi/mg protein/hr, 처치군은 11.40 $\mu$ mole Pi/mg protein/hr로 대조군에 비해 18.01%의



**Fig. 2.** Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase activity by S.R. fragments obtained from Ginseng water extract treated rat heart and control rat heart. (incubated at 25°C, preincubated for 5 min)



**Fig. 4.** Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase activity by S.R. fragments obtained from Ginseng water extract treated rat heart and control rat heart. (incubated at 25°C, preincubated for 60 min)



**Fig. 3.** Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase activity by S.R. fragments obtained from Ginseng water extract treated rat heart and control rat heart. (incubated at 25°C, preincubated for 30 min)

활성증가를 나타내었다(Fig. 4).

**2. 37°C에서의 Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase 활성변화**

**1) Preincubation 5분 군**

대조군과 처치군을 37°C에서 각각 5분동안

preincubation한 후 ATP를 가하고 incubation시간 1, 5, 10 및 20분마다 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 incubation시간이 지남에 따라 대조군과 처치군간에 활성의 차이를 나타내었다. 즉 incubation시간 20분후에 대조군의 효소활성은 5.01 μmole Pi/mg protein/hr, 처치군은 6.45 μmole Pi/mg protein/hr로 대조군에 비해 28.74% 활성증가를 나타내었다(Fig. 5).

**2) Preincubation 30분 군**

대조군과 처치군을 37°C에서 각각 30분 동안 preincubation한 후 ATP를 가하여 반응을 시작하고 incubation시간 1, 5, 10 및 20분마다 효소활성을 측정하였다. 그결과 incubation시간이 지남에 따라 약간의 차이를 나타내었다. 즉 incubation시간 20분 후에 대조군의 효소 활성은 3.72 μmole Pi/mg protein/hr, 처치군의 효소활성은 4.32 μmole Pi/mg protein/hr로 대조군에 비해 13.89% 효소활성 증가 경향을 나타내었다(Fig. 6).

**3) Preincubation 60분 군**

대조군과 처치군을 37°C에서 각각 60분동안 preincubation한 후 ATP를 가하여 반응을 시작했다. incubation시간 1, 5, 10 및 20분마다 효소

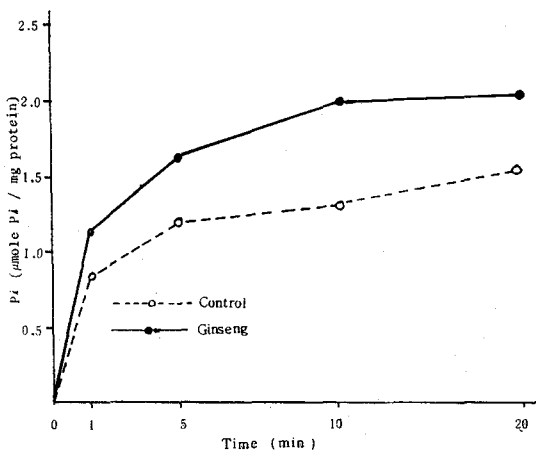


Fig. 5. Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase activity by S.R. fragments obtained from Ginseng water extract treated rat heart and control rat heart. (incubated at 37°C, preincubated for 5 min)

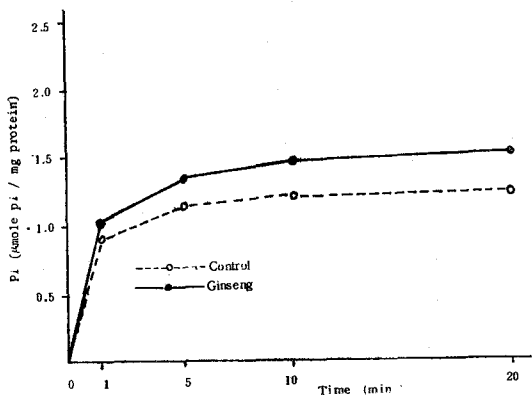


Fig. 6. Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase activity by S.R. fragments obtained from Ginseng water extract rat heart and control rat heart. (incubated at 37°C, preincubated for 30 min)

활성을 측정하였다. 그 결과 incubation 시간이 지남에 따라 활성의 차이를 나타내었다. 즉 incubation시간 20분 후에 대조군의 효소활성은 3.21 μmole Pi/mg protein/hr, 처치군의 효소활성은 4.32 μmole Pi/mg protein/hr로 대조군에 비해 34.58% 효소 활성 증가 경향을 나타내었다(Fig. 7).

### 고 찰

인삼 엑기스를 7~10일간 경구 투여한 처치군

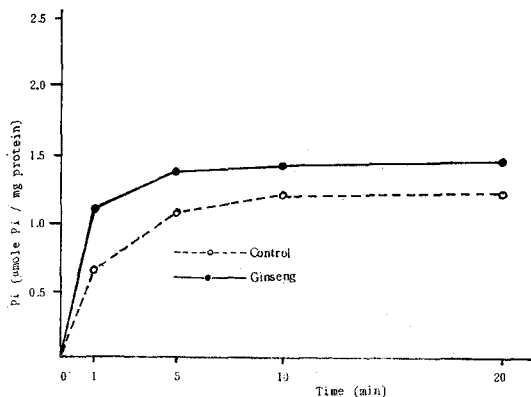


Fig. 7. Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase activity by S.R. fragments obtained from Ginseng extract treated rat heart and control rat heart. (incubated at 37°C, preincubated for 60 min)

의 심장으로 부터 분리해낸 S.R.에 의한 Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase활성을 정상군의 활성과 비교하였다.

Kim<sup>1)</sup> 등은 Langendorff장치를 사용하여 정상 심장인 경우 60분 관류하였을 때 점차 수축력이 약화되어 60분 후에는 초기 수축력의 25%가 약화되는데 비해 인삼 엑기스 전처리로 수축력의 약화가 지연되어 60분 후에는 초기 수축력의 약 90%를 유지하고 있음을 보고하였다. 또한 Sung<sup>4)</sup> 등은 흰쥐의 심근 S.R.에 의한 <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>uptake 기능 측정 실험에서 60분간 preincubation하였을 때 인삼 엑기스 장기 투여군은 정상군에 비해 Ca<sup>2+</sup>uptake 능력이 월등히 유지되어 uptak된 양은 대조군의 2배에 해당함을 보고하였다.

따라서 저자는 인삼 수침엑기스 장기 투여군과 대조군의 심근에서 분리한 S.R.의 기능 퇴화를 유도하기 위해 각각 25°C와 37°C에서 preincubation시간을 5, 30 및 60분으로 하였다.

Incubation 온도가 25°C일때는 preincubation 시간 5분인 신선한 S.R.에서는 incubation시작 직후에는 대조군과 처치군의 차이가 없었으나 incubation시작 10분 후에는 처치군의 활성이 대조군에 비해 18.85%증가했다. S.R.기능을 퇴화시키기 위해 30분 preincubation시켰을 때 incubation시작 직후에는 대조군과 처치군의 효소활성에 차이가 거의 없었으나 incubation시작 10분 후에는 처치군의 활성이 대조군에 비해 18.88%

증가를 보였다. 또한 S.R. 기능을 더욱 퇴화시키기 위해 60분 preincubation시켰을 때 incubation시작 직후 대조군과 투여군의 효소활성에 거의 차이가 없었으나 incubation시작 10분 후 인삼 장기 처치군의 활성이 대조군의 활성에 비해 18.01% 증가를 나타내었다. 그러나 preincubation시간의 증가에 따라 대조군, 처치군 모두 S.R. 기능의 퇴화를 나타내지는 않았다.

Incubation온도가 37°C일때 preincubation시간 5분인 신선한 S.R.에서는 incubation시간 20분 후에 처치군이 대조군에 비해 28.74%의 증가 경향을 나타내었다. S.R. 기능의 퇴화를 위해 preincubation시간을 30분으로 했을때 incubation시간 20분 후에 인삼 장기 처치군이 대조군에 비해 13.89%의 증가를 나타냈다. S.R. 기능을 더욱 퇴화시키기 위해 60분 preincubation시켰을 때 incubation시간 20분 후에 처치군이 대조군에 비해 34.58%의 증가 경향을 나타내었다.

Incubation 온도가 37°C일때도 25°C에서의  $Ca^{2+}$ -ATPase활성변화 경향과 거의 일치하였으며 25°C에서 보다 효과가 현저하였다.

본 실험 결과에 의하면 인삼 처치군이 대조군에 비해  $Ca^{2+}$ -ATPase가 일반적 증가 경향을 나타내었으며 인삼의 만성적 투여는 S.R. membrane의 퇴화를 방지해 주는 효과가 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

인삼 수침 액기스를 경구투여한 흰 쥐의 심근으로부터 분리한 sarcoplasmic reticulum에 있는  $Ca^{2+}$ -dependent ATPase 활성을 정상군의 것과 비교 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

### 1. 25°C에서의 $Ca^{2+}$ -dependent ATPase활성.

Incubation시작 10분후 처치군의 효소활성이 대조군에 비해 5분 preincubation군은 18.85%, 30분 preincubation군은 18.88%, 60분 preincubation군은 18.01% 증가경향을 나타내었다.

### 2. 37°C에서의 $Ca^{2+}$ -dependent ATPase활성

Incubation시작 20분후 처치군의 효소활성이 대조군에 비해 5분 preincubation군은 28.74%, 30분 preincubation군은 13.89%, 60분 preincubation군은 34.58%증가 경향을 나타내었다.

謝辭: 이 연구는 1983년도 서울대학교병원 임상연구 보조로 이루어진 것으로, 이에 감사하는 바임.

〈1984년 2월 5일 접수; 2월 28일 수리〉

## 문 헌

1. Kim, N.D., Kim, B.K. and Lee, H.S.: *Yakhak Hoeji*, 26, 239 (1982).
2. Toh, H.Y., Koh, J.Y. and Ong, K.K.: 4th Asian Symposium on Medicinal Plants and Spices, p.71 (1980).
3. Oh, U.T. and Kim, N.D.: *Yakhak Hoeji*, 37, 155 (1983).
4. Sung, B.Y. and Kim, N.D.: *Arch. Pharmacol. Res.*, 6, 69 (1983).
5. Dhalla, N.S.: Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism, Vol. 4, Myocardial biology, University Park Press (1974).
6. Cha, Y.H., Shin, B.C. and Lee, K.S.: *J. Gen. Physiol.*, 57, 202 (1971).
7. Ebashi, S. and Lipman, F.: *J. Cell Biol.* 14, 389 (1962).
8. Suko, J., Vogel, J.H.K. and Chidsey, C.A.: *Circulation Res.* 27, 235 (1970).
9. Mas-oliva, J. and Naylor, W.G.: *Br. J. Pharmacol.*, 70, 617 (1980).
10. Sulakhe, P.V. and Dhalla, N.S.: *J. Clin. Invest.*, 50, 1019 (1971).
11. Fiske, C.H. and Subbarow, Y.: *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925).
12. Cooper, T.G.: The tools of biochemistry, A Wiley Interscience Publication.
13. Lowry, O.H. Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).