

## 인삼사포닌 분획이 에탄올을 투여한 쥐의 간세포에 미치는 영향

주충노 · 태건식 · 주상옥\* · 조기승\*\*

연세대학교 이과대 생화학과 · 생물학과,\* 한양대학교 자연대 화학과\*\*  
(1985년 2월 6일)

## The Effect of Saponin Fraction of *Panax ginseng* C.A. Meyer on the Liver of Ethanol Administered Rat

Chung No Joo, Gun Sik Tae, Sang Ok Joo\* and Key Seung Cho\*\*

*Department of Biochemistry and Biology, College of Science\*, Yonsei University and  
Department of Chemistry\*\*, College of Natural Science, Hanyang University*  
(Received February 6, 1985)

### Abstract

Preventive effect of ginseng saponin fraction against ethanol intoxication of the liver of rats fed with 12% ethanol instead of water for 6 days was investigated. Control group was dosed 12% ethanol instead of water (free access) for 6 days and test group was dosed 0.1% ginseng saponin fraction in the 12% ethanol instead of water for 6 days. Normal rats was given only water freely. It was observed that the activities of alcohol dehydrogenase (ADH) and Microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) of both control and test groups were higher than those of normal group while the activity of aldehyde dehydrogenase (ALDH) of control and test groups were lower than that of normal rats. However, the ALDH activity decrease of test group was much less than that of control groups. Electron micrograph showed that severely swollen and disrupted mitochondria and dilated and vesiculated ER can be seen in control group while dilated or vesiculated ER are very few and swollen or disrupted mitochondria can not be seen in test group. From the above experimental result, it seems that ginseng saponin might stimulate ethanol oxidation and the removal of acetaldehyde resulting in the decrease of ethanol intoxication of the liver.

### 緒 論

인삼의 유효성분의 하나로 주목<sup>1)</sup>된 saponin 분획에 관한 연구결과에 의하면 인삼 saponin 은 여러가지 효소의 활성을 비특이적으로 촉진<sup>2,3)</sup>하고, ethanol 과 같은 물질 대사를 촉진한다. Ethanol 은 다른 식품과는 달리 체내에는 축적되지 못하고 완전히 대사되는 물질로서 소량의 ethanol 을 섭취하였을 경우에는 간세포의 세포질 분획의 alcohol

dehydrogenas(ADH)에 의해서 acetaldehyde로 산화되지만 과량의 ethanol을 섭취하였을 경우에는 ADH에 의해서 산화되기 보다는 미크로솜 분획에 존재하는 이른바 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 의해서 산화된다는 것이 알려져 있다<sup>4)</sup>.

과량의 ethanol 섭취가 유해한 것은 그 자체뿐 아니라 산화과정에서 생성된 과량의 수소와 acetaldehyde에 기인한다는 것이 알려져 있으며 과량의 수소가 존재할 때에는 pyruvate가 lactate로 환원되어 hypoglycemia와 lactic acidosis를 초래하고 lactic acidosis는 신장에서의 요산 배출을 억제하여 hyperuricemia를 일으켜 통풍의 원인이 되기도 하고 또, 과량의 수소는 직접 또는 간접적으로 지방산의 합성에 관하여 지질이나 지방을 형성함으로써 지방간을 초래하기도 한다. Ethanol 산화로 생성된 대부분의 acetaldehyde는 acetate로 산화되지만 acetaldehyde의 농도가 높을 때에는 생성된 acetaldehyde가 모두 대사되지 못하고 간세포 내에 남아있게 되며 이것은 미토콘드리아의 기능을 저해하고 aldehyde dehydrogenase(ALDH)의 활성을 감소시킬 뿐만 아니라, 비타민의 활성화를 저해하고 심장의 근육 단백질의 합성도 억제하며 또한 간 이외의 다른 조직, 특히 뇌에도 유해한 영향을 미치므로 간으로부터 ethanol 산화 생성물인 acetaldehyde를 신속히 제거한다는 것은 ethanol의 독성으로부터 간을 보호한다는 점에서 중요한 의미를 지닌 것이다<sup>5)</sup>.

생화학적 연구 결과에 의하면 적당량의 인삼 saponin은 ADH 뿐만 아니라 ALDH, MEOS를 다같이 활성화하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 본 연구에서는 이와 같은 연구 결과를 토대로 하여 ethanol 투여로 인한 쥐 간의 MEOS, ALDH, ADH의 활성에 미치는 인삼 saponin의 영향을 규명하고 전자현미경으로 간세포의 미세구조를 관찰함으로써 인삼 saponin 분획이 ethanol 투여로 인한 간의 손상을 예방 내지는 보호하는 가를 조사하였다.

## 實驗材料 및 方法

### 1. 인삼 saponin의 추출 및 정제

금산삼 인삼(4년근, 300g당 50편급) 분말 100g에 chlorlform 500ml을 가하여 1시간 동안 40°C에서 가열, 추출하여 지질을 제거하는 조작을 3회 되풀이한 후 건조한 분말에 500ml의 methanol을 가하고, 60°C에서 가열 추출하는 조작을 3회 되풀이하여 여과액을 모아 40°C에서 감압, 농축한 다음 동결, 건조하여 약 7g의 methanol 추출물을 얻은 후 이 추출물을 20%의 methanol용액 14ml에 녹여 내경 2.5cm의 관에합성수지 흡착제 amberlite XAD-2 100g을 150ml의 물에 분산시켜서 충전한 coulumn 위에 주입하였다. 그리고 증류수를 유속이 20ml/min으로 하여 통과시켜 유출액의 색이 없어질 때까지 계속 주입하여 불순물을 제거한 다음 99% methanol을 유속이 10ml/min이 되도록 흘러 보내어 흡착된 saponin을 용리하였다. 이 용리액을 모아 40°C에서 감압, 농축한 후 동결, 건조하여 1.6g의 황백색의 saponin을 얻었다. 이 과정을 그림 1에 요약하였다. 이 saponin 혼합액의 chromatogram(전개용매: CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 65:40:9, v/v/v)을 보면 R<sub>f</sub>가 0.22와 0.27의 것이 가장 많았고, 0.47, 0.43, 0.36,

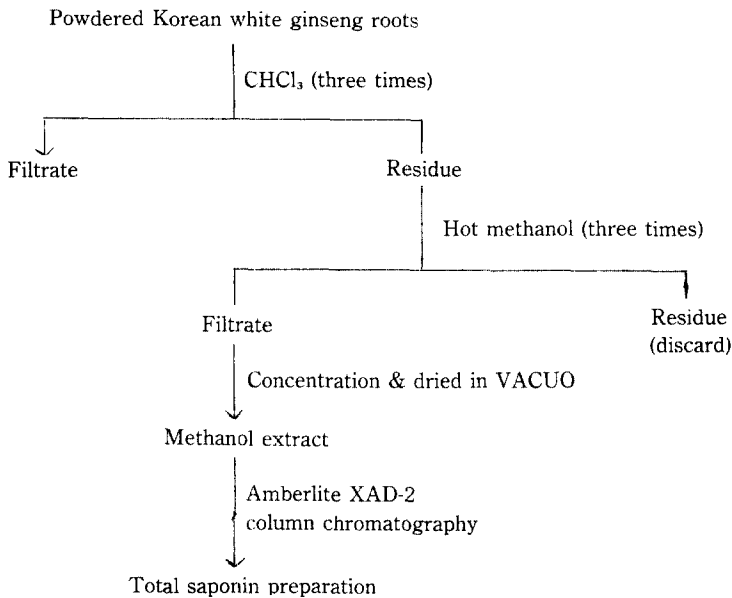


Fig. 1. Preparation scheme of total saponin.

0.34, 0.20, 0.17의 것이 중간정도, 0.71, 0.65, 0.59, 0.52의 것이 가장 적었다.

본연구에서는 이와 같이 얻은 saponin 분획물을 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

## 2. 실험동물

Wistar 계 흰쥐 (200-250 g, ♂)를 군당 5마리씩 3군으로 나누었다. 정상군에는 정상적인 사료와 물을 공급하였고, 대조군에는 물 대신 12% ethanol을 시험군에는 0.1% (w/v)의 인삼 saponin을 함유한 12% ethanol을 공급하였다. 6일 후에 절두하여 일부 간조직을 떼어서 전자현미경용 고정액에 사용하였고, 나머지는 파쇄하여 균질액으로 만든 다음, 일부는 단백질, 지질, 탄수화물을 정량하였고, 나머지는 세포 성분을 분리하여 ALDH (total homogenate), ADH (세포질 분획), MEOS (미크로솜 분획)의 활성을 측정하였다. 간 파쇄액의 일부를 취하여 같은 부피의 methanol을 가한 뒤 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 단백질을 제거한 상층액에 증류수와 chloroform을  $\text{CHCl}_3$ : MeOH:H<sub>2</sub>O의 부피비가 1:1:0.9가 되도록 가했다. MeOH-H<sub>2</sub>O 층인 상층은 탄수화물 정량에 사용하였고, chloroform 층인 하층은 총지질 정량에 사용하였다.

## 3. 전자 현미경 관찰

6일간 위와 같이 처리한 대조군과 실험군 및 정상군의 간조직의 일부를 약 1 mm<sup>3</sup>의 크기로 자른 후 0.1 M 인산 완충액 용액 (pH 7.4)으로 조정된 2.5% glutaraldehyde에서 전고정한 후 동일한 완충액으로 2회 세척한 다음 0.1% 인산 완충액으로 조정된 2.5% osmium tetroxide (pH 7.4)에서 2시간 후 고정하였다. 고정된 사료의 탈수는 ethanol

농도 상승순으로 탈수하고 최종적으로는 propylene oxide 를 사용하여 치환한 다음 epoxy resin 으로 포매하였다. 유리칼을 사용해 초박절편기(Sorvall MT-2B)로  $1\mu$  의 두께로 자르고 염기성 fuchsin toluidine blue 로 염색한 다음 광학현미경으로 부위를 확인한 후  $500\text{-}600\text{\AA}$  의 두께로 초박절편을 만들어 uranyl acetate 와 lead citrate 용액으로 이중염색 후 전자현미경(Hitachi 500)으로 관찰하였다.

#### 4. 세포 성분의 분리

각군(정상군, 대조군, 시험군)를 24 시간 절식시킨 후 절두하여 얻은 간을 가위로 잘게 썬 후, Teflon-pestle Wheaton-Elvehjem 조직 파쇄기를 사용하여 10 mM Tris-chloride buffer(pH 7.4)를 함유한 0.25 M sucrose 용액으로 10%(w/v) 파쇄액(total fraction)으로 만든 후,  $500\times g$  에서 10 분간 원심분리하여 핵과 cell debris 를 제거하고, 상층액을  $10,000\times g$  에서 15 분간 원심분리하여 얻은 침전물을 일정한 부피의 10 mM Tris-chloride buffer(pH 7.4)를 함유한 0.25 M sucrose 용액을 사용하여 미토콘드리아 파쇄액을 얻었다. 상층액은 다시  $12,000\times g$  에서 15 분간 원심분리하여 lysosome 을 제거한 다음, 상층액에 최종 농도가 8 mM 되도록 고체상태의 calcium chloride 를 가해서 수분동양 천천히 저어준 뒤,  $25,000\times g$  에서 15 분간 원심분리하여 상층액(세포질 분획)을 얻었고, 침전물은 10 mM Tris-chloride buffer(pH 7.4)를 함유한 0.15 M KCl 용액에 분산 한 후  $25,000\times g$  에서 15 분간 다시 원심분리하여 얻은 침전물을 일정한 부피의 10 mM Tris-chloride buffer(pH 7.4)를 함유한 0.15 M KCl 용액을 사용하여 미크로솜 분획을 얻었다. 이 모든 과정은  $4^{\circ}\text{C}$  이하에서 진행되었다.

#### 5. Microsomal ethanol oxidizing systme(MEOS)의 활성 측정

Center well 에 15 mM semicarbazide-HCl 을 함유한 0.16 M phosphate buffer(pH 7.4) 0.6 ml 를 넣고 main vessel 에는 3 ml 의 반응 혼합액 [조성(초종농도) : 1.0 mM sodium EDTA, 1.0 mM sodium azide, 1.14 M ethanol, 여러 가지 농도의 인삼 saponin, 미크로솜 분획]을 넣어  $37^{\circ}\text{C}$  에서 10 분간 preincubation 한 후, NADPH 를 0.4 mM 되도록 가하고 flask 를 밀폐한 다음, 다시 15 분간 incubation 하였다. side arm 에 넣은 70% TCA(0.6ml)로 반응을 정지시킨 후 12 시간 동안 방치한 다음 center well 에 흡착된 acetaldehyde 의 양을 spectrophotometer(ShimadzuUV-240-)을 사용하여 깨끗이 220nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

#### 6. Acetaldehyde dehydrogenase (E.C. 1.2.1.3.)의 활성 측정

빛의 통과 길이가 1 cm 인 cuvettes 에 70 mM sodium pyrophosphate buffer (pH 8.0), 1 mM  $\text{NAD}^{+}$ , 2 mM pyrazole, 그리고 효소원을 넣은 후에 6 mM propionaldehyde 를 가하여(전체 부피 1 ml)반응을 시작하였다. Aldehyde dehydrogenase 의 활성은 NADH 생성에 따른 340 nm 에서의 흡광도 증가를  $25^{\circ}\text{C}$  에서 spectrophototometer(Shimadzu UV-240)로 측정하여 정량 하였다.

#### 7. Alcohol dehydrogenase (E.C.1.1.1.1.)의 활성 측정

빛의 통과 길이가 1 cm 인 cuvettes 에 48 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.6), 0.8 mM  $\text{NAD}^{+}$ , 그리고 효소원을 넣은 후에 3 mM ethanol 을 가하여 (전체 부피 1 ml) 반응을

시작하였다. Alcohol dehydrogenase의 활성은 NADH 생성에 따른 340 nm에서의 흡광도 증가를 25°C에서 spectrophotometer(Shimadzu UV-240)로 측정하여 정량하였다.

#### 8. 총지질의 정량

간파쇄물의 chloroform 추출층을 농축한 후 일정부피의 chloroform 용액을 만든다음 0.1 ml를 취해서 진한 황산 5 ml에 넣고 끓는 물중탕에서 10분간 방치한뒤 냉각하였다. 그중 0.3 ml를 취해서 phosphovanillin 시약(vanillin 0.6g, 무수 ethanol 10 ml, 증류수 100 ml, 인산 400 ml) 6 ml를 넣고 잘 섞은 후에 암소에서 45분간 방치하고 Spectrophotometer (Shimadzu UV-240)로 525 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

#### 9. 탄수화물의 정량

Anthrone 시약(0.2%의 진한 황상용액) 4 ml에 시료용액(MeOH-H<sub>2</sub>O 층) 1 ml를 가해서 잘 섞은 후 끓는 물중탕에서 10분간 가열하였다. 냉각된 후 spectrophotometer (Shimadzu UV-240)로 620 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

#### 10. 단백질의 정량

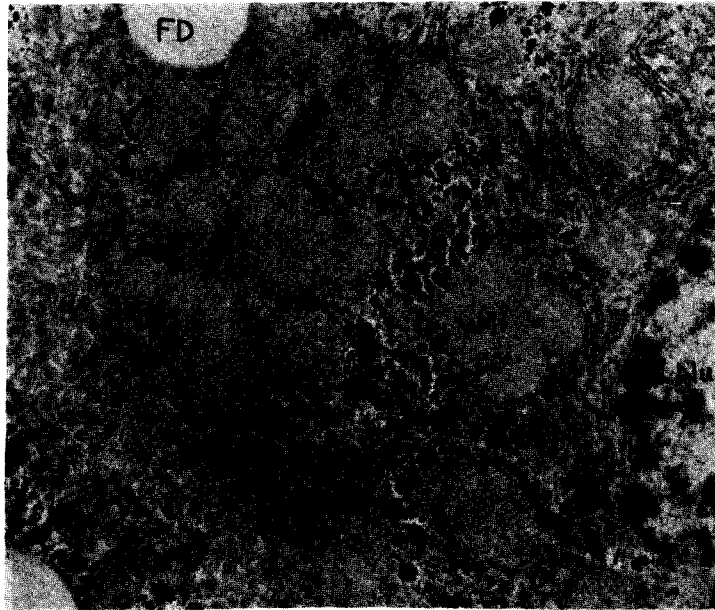
100 mg의 coomassie brilliant blue G-250을 95% ethanol에 녹여 50 ml를 만든다음 85% (w/v)의 인산 100 ml와 증류수를 가해서 최종 부피를 1000 ml로 만들었다. 이 용액 5 ml에 간파쇄액 0.1 ml를 넣고 섞은 다음 상온에서 2분간 방치하고 Spectrophotometer (Shimadzu-VU-240)로 595 nm에서의 흡광도를 측정하여 단백질을 정량하였다.

#### 11. 시약

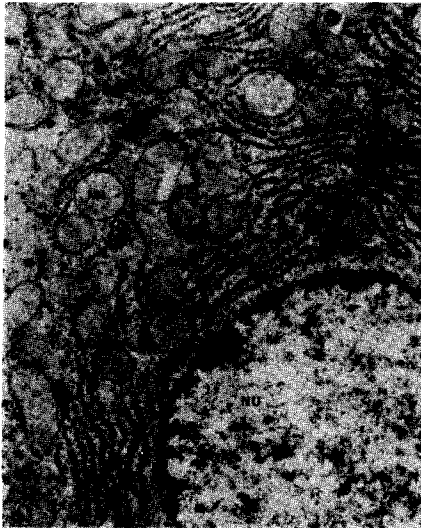
NADPH, NAD<sup>+</sup>, cytochrome C, pyrazole, sodium azide, DEAE-cellulose, semicarbazide-HCl, dithiothreitol, sodium cholate, Trizma base, propionaldehyde는 Sigma 사 공품을 사용하였고, ethanol은 Merck 사 제품, 다른 시약은 Wako 사 제품을 사용하였고, propylene oxide, glutaraldehyde, osmium tetroxide는 Jun Sei Shin Yo 사 제품을 사용하였다.

## 實驗結果 및 考察

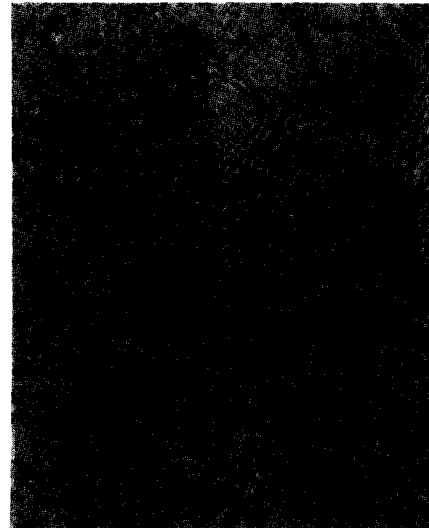
Ethanol 투여로 인한 간세포의 손상에 대한 인삼 saponin의 영향을 알아보기 위해서 정상 사료와 증류수를 공급한 정상군과 증류수 대신 12% ethanol을 공급한 대조군, 그리고 증류수 대신 0.1% (w/v)의 인삼 saponin을 함유한 12% ethanol을 공급한 시험군의 간세포를 전자현미경으로 관찰하였다. 그림에서 보듯이 증류수 대신 12% ethanol을 공급한 대조군의 경우(Fig. 3)는 핵의 농축 현상 일어났고, 미토콘드리아가 종창되거나 융합되어 거대 미토콘드리아가 생겼으며, fat droplet가 생겼다. Rough endoplasmic reticulum도 정상군에 비해 많이 파괴되어 소포화되었다. 그러나 시험군의 경우(Fig. 4)는 핵, 미토콘드리아, rough endoplasmic reticulum의 구조가 정상군(Fig. 2)과 유사하였으며 fat droplet도 생기지 않았다.



**Fig. 2.** Electron micrograph of the hepatocyte of rat of normal group(X 20,000). (Nu, Mi, and RER represent nucleus, mitochondria and rough endoplasmic reticulum, respectively.)



**Fig. 3.** Electron micrograph of the hepatocyte of rats of control group which were dosed with 12% ethanol instead of water for 6 days.(Nu, Mi, and RER represent nucleus, mitochondria, rough endoplasmic reticulum, respectively. Mitochondria are swollen and disrupted severely. The RER are dilated and vesiculated(X 20,000)).



**Fig. 4.** Electron micrograph of rat hepatocyte of test group which were dosed with 12% ethanol containing 0.1%(w/v) ginseng saponin instead of water for 6 days. (Nu, Mi, and ER represent nucleus, mitochondria, and endoplasmic reticulum, respectively. Swollen or distrupte mitochondria can not be seen. Dilated or vesiculated ER are very few(X 20,000).)

Ethanol 대사에 관하여는 ADH, ALDH, MEOS의 활성을 조사한 결과(Table 1)에서 보듯이 ADH와 MEOS의 활성은 정상군에 비해 대조군과 시험군 모두에서 증가하였다. 대조군의 경우는 각각 1.26배, 1.07배 증가하였는데 비해 시험군의 경우는 각각 1.33배, 1.52배 증가하였다. 그러나 ALDH의 경우는 정상군에 비해 대조군이나 시험군의 활성이 모두 감소하였다. 대조군의 경우는 27% 감소하였는데 비해 시험군은 15% 정도 감소하였다. 대조군에 비해 시험군의 활성감소가 적은 것은 인삼 saponin이 간세포 내의 acetaldehyde 제거를 촉진했기 때문일 것이다.

지질의 양은 대조군에서는 크게 증가하고 있었으나 시험군은 정상군에 가까웠다. 탄수화물의 감소도 대조군에 비해 시험군의 경우 훨씬 적었다(Table 2).

**Table 1.** The amount of protein, lipid, and carbohydrate in the liver of normal, control, and test rats

Group	Protein	Carbohydrate	Lipid
Normal	116.7 ± 2.4	788.6 ± 37.5	3.87 ± 0.29
Control	116.8 ± 8.5	685.3 ± 124.9	5.52 ± 0.96
Test	115.9 ± 15.3	750.4 ± 41.7	4.77 ± 0.86

The values were mean ± S.D. and all the quantities of protein, lipid, and carbohydrate were expressed by mg/g of wet liver weight.

**Table 2.** The effect of ginseng saponin on ADH, ALDH, and MEOS *in vivo*

***Group	Alcohol dehydrogenase		Aldehyde dehydrogenase		MEOS	
	*Activity (units/min)	**Relative activity	*Activity (units/min)	**Relative activity	Activity (μmole/15min/mg)	**Relative activity
Normal	2.12	100	9.60	100	5.41	100
Control	2.68	126	6.98	73	5.78	107
Test	2.81	133	8.13	85	8.21	152

\*One unit of enzyme was defined as a density increment of 0.01 per min.

\*\*The relative activities were expressed assuming the activity of control being 100.

\*\*\*Control group was dosed 12% ethanol instead of distilled water (free access) for 6 days and test group was dosed 0.1% ginseng saponin in 12% ethanol instead of distilled water for 6 days. Normal group was dosed distilled water freely.

이상 논한 바와 같이 인삼 saponin은 ethanol을 투여한 쥐간의 ADH, ALDH, MEOS를 모두 활성화시키고 유독한 acetaldehyde를 신속히 제거함으로써 ethanol투여로 인한 간의 손상으로부터 보호하는 것으로 생각된다.

## 要 約

에탄올의 간 독성에 미치는 인삼 사포닌의 효과를 연구하기 위해 6일간, 물대신 12%

에탄올을 투여한 쥐의 간(대조군)과 0.1% 인삼 사포닌을 함유한 12% 에탄올을 투여한 쥐의 간(시험군)에서 alcohol dehydrogenase(ADH), microsomal ethanol oxidizing system(MEOS), aldehyde dehydrogenase(ALDH)의 활성과 간 조직의 전자 현미경적 관찰을 비교한 결과 ADH 와 MEOS 의 활성은 대조군과 시험군 모두 정상군보다 높았고, ALDH 의 활성은 대조군과 시험군 모두 정상군보다 낮았으나 ALDH 활성의 저하는 대조군보다 시험군에서 훨씬 작게 관찰되었으며 ADH, MEOS 활성의 증가는 대조군보다 시험군에서 훨씬 크게 관찰되었다.

전자 현미경적 관찰로 대조군의 간 세포는 미토콘드리아와 소포체가 크게 손상되었는데 시험군의 경우는 손상이 경미하여 정상군의 것과 거의 유사하였다. 이와같은 실험 결과로부터 인삼 사포닌은 에탄올 산화와 아세트알데히드의 제거를 촉진함으로써 알코올로 인한 간 손상을 경감시키는 것으로 생각된다.

### 参 考 文 獻

1. Oura, H., Nakashima, S. and Tsukada, L.: *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 453 (1971).
2. Joo, C.N. and Lee S.J.: *Korean Biochem. J.* **10**, 59 (1977).
3. Joo, C.N.: In preceedings of 2nd International Ginseng Symp. (Seoul) pp. 115(134) (1978):
4. Lieber, C.S. and DeCarli. L.M.: *J. Biol. Chem.* **245**, 2505 (1970).
5. Lieber, C.S.: *Scientific Amer.* **324**, 25 (1979).
6. Joo, C.N.: In Surfactant in Solution. ed. Mittal, K.L. and lindman, B., Plenum Press. Vol 3, pp. 2093-2112 (1984).