

인삼 사포닌이 쥐의 정소에서의 Androgen 생합성에 미치는 영향

홍성렬 · 주충노
연세대학교 이과대학 생화학과
(1985년 9월 6일 접수)

The Effect of Saponin Fraction of *Panax ginseng* C.A.Meyer on the Biosynthesis of Androgens in Rat Testis

Seong Yul Hong and Chung No Joo

Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul 120
(Received Sep. 6, 1985)

Abstract

It was attempted to observe the effects of ginseng saponin, one of the major components of the roots of *Panax ginseng*, on androgen biosynthesis from cholesterol *in vitro* as well as *in vivo* in rat testis.

Ginseng saponin was administered by stomach tubing prior to intraperitoneal injection of cholesterol containing (4-¹⁴C)-cholesterol into adult male rats and the liver, testis and blood serum were analyzed.

The first high radioactivity of the liver and blood serum of test animal was observed at 6 hours after radioactive cholesterol injection, while that of control appeared at 12 hours after the injection.

In the case of testis, the first high radioactivity of test group appeared between 4 and 6 hours after the radioactive cholesterol injection, while that of control appeared at 10-14 hours.

Analysis of radioactivity distribution of cholesterol, androstenedione and testosterone in the testis of rats fed with/without ginseng saponin prior to (4-¹⁴C)-cholesterol injection showed that the saponin stimulated the synthesis of androgens from cholesterol. This was confirmed again by *in vitro* experiment using testis homogenate as an enzyme source.

From the above experimental results, it was suggested that the ginseng saponin stimulates both cholesterol transport and the biosynthesis of androgens from cholesterol in rat testis.

緒 論

과거 수년간 동물체내에서의 지질대사와 관련하여인삼 사포닌 분획의 계면 활성¹⁾과 지질분산에 미치는 영향²⁾을 비롯하여 cholesterol³⁾이나 지용성 vitamin(vit E, vitA)의 흡수 및 이동의 촉진⁴⁾, 지방산의 합성 및 분해의 촉진작용⁵⁾이 있음을 관찰하였고 적당량의 인삼 saponin이 여러가지 효소를 비특이적으로 활성화함으로써 기초대사를 촉진하는 것으로 풀이한 바있다⁶⁾.

본 연구에서는 위와같은 실험결과를 토대로 하여 cholesterol으로부터 생합성되는 것으로 알려진 androstenedione이나 testosterone과 같은 androgen생합성에 미치는 인삼 saponin의 영향을 방사성 동위원소로 표지된 [4-¹⁴C]-cholesterol을 사용하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 검토하였다.

實驗 材料 및 方法

시 약

2, 5-diphenyl-oxazole(PPO)과 cholesterol은 Merck제품을 사용하였고, NAD⁺, NADPH, ATP, 1, 4-bis-2(5-phenyl-oxazolyl)-benzene(POPOP), testosterone, androstenedione은 Sigma제품을 사용하였다. 4-¹⁴C-cholesterol은 Radiochemical Centre, Amersham, England제품을 사용하였고 일반 시약은 일본 Wako사 제품을 사용하였다. 추출용 용매는 국내시판품을 재증류하여 사용하였다.

인삼 saponin의 추출 및 부분정제

금산산 백삼(*Panax ginseng* C.A.Meyer, 4년근, 50편급) 분말 300g에서 주둥의 방법⁷⁾으로 추출하고 부분정제하였다. 이와같이 하여 얻은 saponin혼합물을 박층크로마토그래피로 분리하여 얻은 TLC chromatogram은 주의 saponin⁷⁾과 일치하였다. 본 실험에서는 이 saponin혼합물을 더 이상 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

실험동물

Sprague-Dawley계의 쥐(150g, male) 20마리씩으로 구성된 대조군과 시험군을 정상사료(제일사료사 제 : 조단백 19.6%, 조지방 3.0%, 조섭유 7.0%, 조회분 9.0%)로 계속 사육하면서, 시험군에는 인삼 saponin(0.2%, W/V) 수용액을 25일간 하루 한마리당 1ml씩 위관 크입하였다.

인삼 saponin이 cholesterol로부터 androgen생합성에 미치는 영향에 관한 실험(*in vivo*)

위와 같이 사육한 쥐를 24시간 절식시킨 다음 [4-¹⁴C]-cholesterol(0.2 μ Ci/ml)을 함유한 cholesterol ethanol용액(5 mg/ml)을 한 마리당 0.5ml씩 복강 투여한 후 적당시간(1~14시간) 후에 diethyl ether로 흡입 마취시킨 후 심장으로부터 혈액을 채취한 다음

androstenedione은 UV lamp로 전개위치를 확인한 후 I₂ 증기로 cholesterol의 위치를 확인하였다(Fig. 1). 위치가 확인된 testosterone, androstenedione 및 cholesterol의 전개부위를 긁어내어 시험관에 모으고 CHCl₃-MeOH(50 : 50, v/v)혼합액으로 2회 추출한 다음, 이 추출액을 질소가스를 통하면서 농축한 다음 방사능 측정시료로 사용하였다.

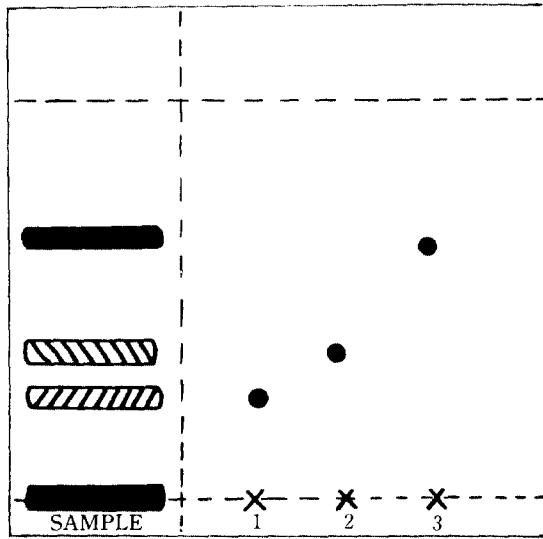


Fig. 1 The chromatogram of rat testis extract.

Rf values: 1. testosterone 0.26
 2. androstenedione 0.36
 3. cholesterol 0.63

Thin layer : silica gel GF254 (Merck), 0.25mm

Solvent : cyclohexane: ethylacetate (50 : 50 V/V)

Detection : UV light -testosterone, androstenedione I² vapour-cholesterol

분석시료의 추출

심장에서 채취한 혈액을 4℃에서 2시간 보관후 3,000xg에서 10분간 원심분리하여 얻은 혈청 1ml에 CHCl₃, MeOH과 물을 CHCl₃-MeOH-water의 부피비가 1 : 2 : 0.8이 되도록 가하여 단일상으로 만든 다음, 3,000xg에서 10분간 원심분리하여 단백질을 제거하고 상층액에 CHCl₃-MeOH-H₂O의 부피비가 1 : 1 : 0.9가 되도록 물과 CHCl₃을 가하여 두 층(상층 : MeOH-water 층, 하층 : CHCl₃층)으로 분리하여 CHCl₃층을 지질 시료로 사용하였다.

동결한 간을 잘게 잘라서 물을 가한 후 Potter-Elvehjem type teflon-glass homogenizer를 사용하여 25ml의 간균질액을 만들었다. 이와같이 얻은 간 균질액 3ml에 CHCl₃과 MeOH을 가하여 CHCl₃-MeOH-water의 부피비가 1 : 2 : 0.8이 되도록하여 단일상을 만든 다음 상온에서 하룻밤 방치한후 3,000xg에서 10분간 원심분리하여 맑은 상층액을 얻어 분석시료로 사용하였다.

정소의 경우는 물을 가하여 간의 경우와 같은 방법으로 불용성 물질을 제거한 후 단일

상을 만든 다음 하룻밤 동안 방치하였고 원삼분리하여 맑은 상층액을 얻어 분석시료로 사용하였다.

방사능의 측정

간과 정소의 경우는 각각의 시료추출물 2 ml씩을 counting vial(20ml 유리제품)에 넣고 scintillation혼합액(PPO 10g+POPOP 0.25g+naphthalene 100g+dioxane 1000 ml) 15ml를 가하여 방사능을 측정하였고 혈청의 경우는 chloroform 추출액 2 ml를 counting vial에 넣고 scintillation혼합액(PPO 4g+POPOP 0.1g+toluene 1000ml)을 가하여 방사능을 측정하였다. 고환조직 추출액의 크로마토그래피분획의 경우는 건조 후 혈청의 경우와 같은 scintillation혼합액 10ml씩을 넣고 방사능을 측정하였다. 측정된 cpm은 DPM으로 환산하여 표시하였다.

實驗 結果 및 考察

Parvinon⁸⁾등은 cholesterol을 투여하였을 때 혈액의 cholesterol농도는 12시간 후 증가하기 시작하고, 양은 극히 적지만 정소의 cholesterol함량도 12시간후부터 증가하기 시작한다는 연구결과를 발표하였고 Setchell^{9,10)}등은 혈액 내에는 생리물질의 정소내 이동을 선택적으로 제한하는 blood-testis barrier가 존재함을 제시하였다.

본 연구의 실험 결과도 대조군의 경우 [4-¹⁴C]-cholesterol투여후 간·혈청·정소에서 추출물을 조사하면 비교적 큰 방사능 peak가 10~16시간후에 나타나는 것을 관찰 즉시 간과 정소를 채취하여 dry ice로 얼리고 분석시까지 -20°C에서 보관후 시료로 사용하였다. 대조군의 경우는 인삼 saponin투여 조건외에는 시험군과 모두 동일하였다.

인삼 saponin이 cholesterol로부터 androgen생합성에 미치는 영향에 관한 실험(*in vitro*)

30마리의 쥐(150 g, male)에서 채취한 정소 73g을 146ml의 냉 0.25M sucrose용액을 사용하여 균질화 한후 1200xg에서 20분간 원삼분리하여 cell debris와 핵을 제거한 상층액을 androgen생합성 효소원으로 사용하였다. 생합성 반응 혼합액(총 20ml)의 조성(최종농도)은 60 μ M NAD⁺, 60 μ M ATP, 4 μ M NADPH, 5 mM glucose, 5 mM fumaric acid, 5 mM nicotinamide, 5 mM MgCl₂, 200mM Tris-HCl buffer(pH 7.4), 2.5 μ M cholesterol, [4-¹⁴C]-cholesterol(108, 225 DPM), 정소 균질액 12ml, 0(대조군) 내지 10⁻⁴% 인삼 saponin이었다. 기질과 모든 cofactor는 0.25M sucrose-Tris-HCl buffer(pH 7.4)에 녹여 사용하였다. 위와같은 반응액을 95% O₂ : 5% CO₂ 존재하에 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 냉 MeOH을 넣어 반응을 중지시킨 다음 cholesterol, testosterone과 androstenedione을 각각 10 μ g씩 넣어 잘 혼합한 후 8000xg로 15분간 원삼분리하여 얻은 상층액을 chloroform-methanol-water(1 : 2 : 0.8, v/v/v)에 녹여 silica gel GF254박층(0.25mm)에 적당량을 바른 다음 cyclohexane과

할 수 있었다.

그러나 장기간(25일간) 인삼 saponin분획을 투여한 후 방사성($4-^{14}\text{C}$)-cholesterol을 투여한 쥐 간의 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ 추출물의 방사능 변동을 시간에 따라 조사한 결과 Fig. 2에 표시한 바와 같이 시험군은 6시간후 큰 방사능 peak가 나타나고 다시 16시간 후에 새로운 큰 방사능 peak를 나타내는데 비하여 대조군은 12시간후에야 큰 peak가 나타나고 16시간 후에 최대 방사능 peak를 나타내었다.

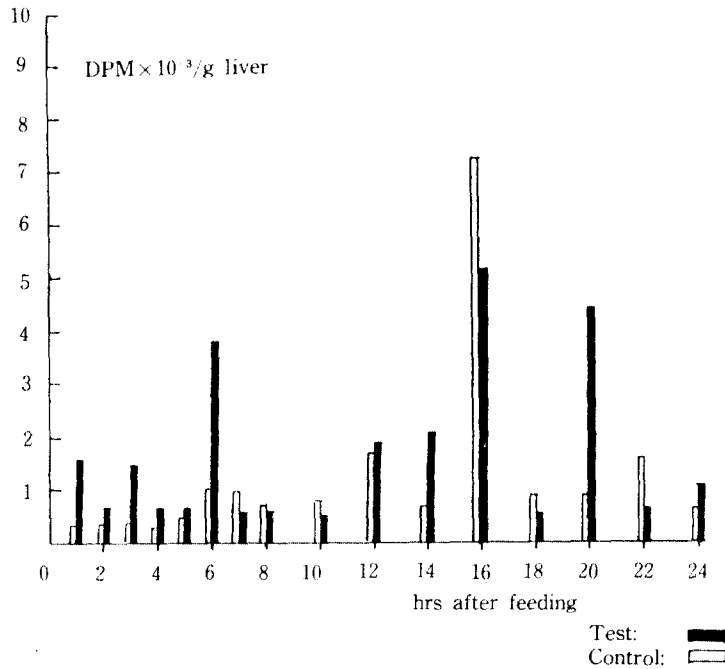


Fig. 2. Radioactivity time course of liver extract of rats fed with ginseng saponin prior to intraperitoneal injection of ($4-^{14}\text{C}$)-cholesterol.

혈청의 경우 (Fig. 3)에도 시험군은 첫번째 방사능 peak가 6시간후에 관찰되었고 최대방사능 peak는 16시간후에 관찰되었는데 비해 대조군은 큰 방사능 peak가 16시간후에 나타났다.

이와 같은 실험 결과는 인삼 saponin이 cholesterol의 이동을 크게 촉진하는 것으로 풀이된다.

그리고 정소의 경우 (Fig. 4)는 시험군의 첫번째 방사능 peak가 4~6시간 사이에 나타나고 최고 방사능 peak가 16시간후에 관찰되는데 비하여 대조군의 경우는 첫번째 비교적 큰 방사능 peak가 10~16시간 후에 관찰되었다. 이것은 인삼 saponin이 cholesterol의 blood-testis barrier 통과를 촉진하는 것으로 추측된다.

장기간(25일간) 인삼 saponin을 투여한 쥐의 정소의 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (1 : 2 : 0.8, v/v/v) 추출액을 silica gel GF254박층 크로마토그래피법으로 cholesterol, testos-

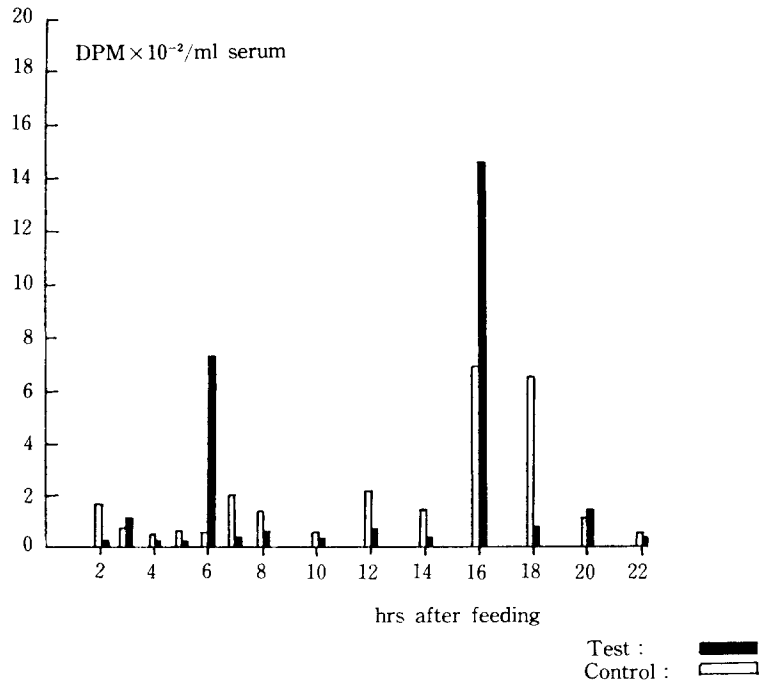


Fig. 3. Radioactivity-time course of blood serum lipid fraction of rats fed with ginseng saponin prior to intraperitoneal injection of ($4\text{-}^{14}\text{C}$)-cholesterol.

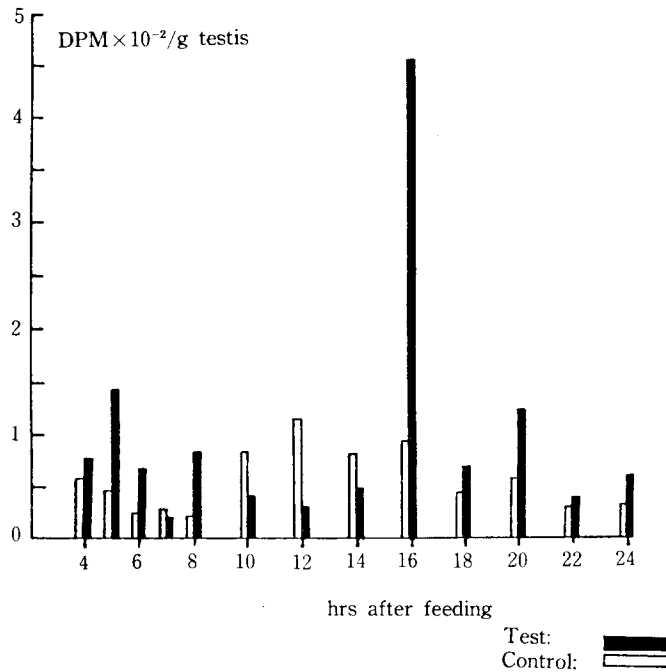


Fig. 4. Radioactivity-time course of testis extract of rats fed with ginseng saponin prior to intraperitoneal injection of ($4\text{-}^{14}\text{C}$)-cholesterol.

terone, androstandione으로 분리하고 각 분획의 방사능과 방사능 비율을 조사한 결과 시험군에서의 cholesterol이나 androstenedione, testosterone의 방사능이 대조군에 비해 각각 1.5배, 2.3배, 2.2배로 더 많은 cholesterol이 정소에 이동되고 cholesterol : androstenedione : testosterone의 비율이 대조군의 경우 57 : 20 : 23인데 비해 시험군은 46 : 26 : 28로 더 많은 cholesterol이 androgen으로 전환된 것으로 생각된다 (Table 1).

Table 1. The effect of ginseng saponin on the biosynthesis of androgens from cholesterol in rat testis

Fractions	Radioactivity (DPM)		Radioactivity ratio of test/control
	Control (%)	Test (%)	
Cholesterol	870 (57)	1301 (46)	1.5
Androstenedione	310 (20)	720 (26)	2.3
Testosterone	360 (23)	780 (28)	2.2

The rats were fed with/without ginseng saponin prior to (4-¹⁴C)-cholesterol administration were killed 16 hours after the cholesterol injection and the testis was homogenized and analyzed.

인삼 saponin이 cholesterol로부터의 androstenedione가 testosterone으로의 전환에 미치는 영향을 시험관에서 관찰하기 위하여 정소 균질물을 효소원으로 사용하여 인삼 saponin(반응액에서의 최종 농도 : 10⁻⁴%)이 함유된 반응액에서의 cholesterol의 androstenedione과 testosterone으로의 전환을 [4-¹⁴C]-cholesterol을 기질로 사용하여 추적한 결과 Table 2에 표시한 바와 같이 cholesterol의 방사능은 대조군보다 시험군이 낮는데 비하여 (85%) androstenedione과 testosterone의 방사능은 각각 1.4배, 1.2배로 더 많은 cholesterol이 androstenedione과 testosterone으로 전환되었으며 적당량의 인삼 saponin이 cholesterol로부터의 androgen의 생성을 촉진하는 것으로 생각된다.

이상과 같은 실험 결과로부터 인삼 saponin은 체내에서의 cholesterol의 이동을 촉진

Table 2. The effect of ginseng saponin on the biosynthesis of androgens from (4-¹⁴C)-cholesterol by rat testis homogenate *in vitro*

Fractions	Radioactivity		Radioactivity ratio of test/control
	Control (%)	Test (%)	
Cholesterol	42301 (60)	36086 (50)	0.9
Androstenedione	12429 (18)	17386 (24)	1.4
Testosterone	15698 (22)	19029 (26)	1.2

The reaction mixture (20ml) contained (final concentration): 60uM NAD⁺, 60uM ATP, 4uM NADPH, 5mM glucose, 5mM fumarate, 5mM nicotinamide, 5mM MgCl₂, 20mM Tris buffer (pH 7.4), 2.5uM cholesterol containing (4-¹⁴C)-cholesterol (108,225 DPM) and 12ml of the testis homogenate. Test group contained 10⁻⁴% ginseng saponin. The reaction mixture was incubated at 37°C for one hour under the mixture of 95% O₂ : 5% CO₂. Following the reaction was terminated, cholesterol, androstenedione and testosterone were chromatographed and the radioactivities of corresponding fractions were counted.

하고, 정소에서 cholesterol로부터의 androgen의 합성을 촉진하는 것으로 풀이되며, 정소 균질물을 효소원으로 사용한 *in vitro* 생합성에 관한 *in vitro* 실험 결과도 이와 같은 인삼 saponin의 androgen 생합성 촉진 작용을 뒷받침하고 있다.

要 約

인삼 saponin이 cholesterol이동과 androgen생합성에 미치는 영향을 *in vivo*와 *in vitro*양면에서 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Sprague-Dawley계의 쥐에 25일간 인삼 saponin(2 mg/day/rat)을 위관 투입한 시험군에 [4-¹⁴C]-cholesterol을 복강 주사하고 간과 혈청에서 시간에 따른 방사능 변화를 측정된 결과 시험군은 [4-¹⁴C]-cholesterol 투여 6시간 후에 큰 방사능 peak가 나타났는데 비해 대조군의 경우는 12시간후에나 비교적 큰 방사능 peak가 관찰되나 대조군, 시험군 모두 최고 방사능 peak가 16시간 후에 관찰되었다. 정소의 경우는 시험군의 경우 4~6시간 사이에 첫번째 방사능 peak가 나타나는데 비해 대조군의 경우는 10~14시간후에 관찰되었다.

장기간(25일간) 인삼 saponin을 투여한 쥐 정소의 cholesterol, testosterone과 androstenedione을 TLC로 분리하여 방사능을 측정된 결과 더 많은 cholesterol이 정소로 이동되고 더 많은 cholesterol이 androgen으로 전환되었고, 쥐의 정소 균질액을 사용하여 cholesterol로부터의 androgen의 생성을 시험관에서 조사한 결과도 인삼 saponin이 cholesterol로부터의 androgen생성을 촉진하는 것으로 관찰되었다.

위와 같은 실험 결과로부터 인삼 saponin은 체내에서의 cholesterol의 이동을 촉진하고 정소에서 cholesterol로부터의 androgen의 합성을 촉진하는 것으로 생각된다.

References

1. 주충노, 최임순, 이상직, 조성희, 손명희 : 한국 생화학회지 **6(3)**, 185(1973),
2. Joo, C. N. and S. J. Lee, : *Korean Biochem. J.* **10(2)**, 59 (1977).
3. Joo, C. N., Y. D. Cho, J. H. Koo, C. W. Kim and S. J. Lee: *Korean Biochem. J.* **13(1)**, 1 (1980).
4. 주충노, 김재원 : 고려인삼학회지 **8(2)**, 75(1984).
5. Joo, C. N., H. B. Lee and D. S. Kim : *Korean Biochem. J.* **10(2)**, 71 (1977).
6. Joo, C. N. : in "Surfactants in solution" vol. 3ed. K. L. Mittal and B. Lindman, pp 2093, Plenum Press, New York (1984).
7. Lee, H. B. and C. N. Joo: *Korean Biochem. J.* **16(2)**, 136 (1983).
8. Parvinon, M., P. Hurme and M. Niemi : *Endocrinol.* **87**, 1082 (1970).
9. Setchell, B. P. : *J. Physiol.* **189**, 63 (1967).
10. Setcheel, B. P., T. K. voglmayr and G. M. H. Waites: *J. Physiol.* **100**, 73 (1969).