

人蔘 Saponin이 羊腎臟에서 精製한 Na^+ , K^+ -ATPase의 活性, 燐酸化 및 [^3H] Ouabain결합에 미치는 영향

李 神 雄 · 李 正 秀 · 陳 甲 德

嶺南大學校 藥學大學

(Received March 14, 1985)

Effect of Ginseng Saponin on the Activity, Phosphorylation, [^3H] Ouabain Binding of Purified Na^+ , K^+ -ATPase Isolated from the Outer Medulla of Sheep Kidney

Lee, Shin-Woong, Lee, Jeung-Soo, and Jin, Kap-Duck

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 632, Korea

Abstract—The effects of ginseng saponin on the activity, phosphorylation, [^3H] ouabain binding and light scattering (disruption) of purified Na^+ , K^+ -ATPase isolated from the outer medulla of sheep kidney were compared to those of gypsophila saponin, sodium dodecylsulfate (SDS), and Triton X-100 on the same parameters. Na^+ , K^+ -ATPase activity, phosphorylation, and [^3H] ouabain binding were inhibited by ginseng saponin (triol > total > diol), SDS, or Triton X-100, but increased by gypsophila saponin. Low doses of ginseng saponin ($3\mu\text{g}$ saponin/ μg protein) decreased phosphorylation sites and ouabain binding site concentration (B_{max}) without any change of turnover number and affinity for ouabain binding which were decreased by high dose of ginseng saponin (over $10\mu\text{g}$ saponin/ μg protein), SDS or Triton X-100. On the other hand, gypsophila saponin increased the affinity without any change of B_{max} for ouabain binding. Inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity by ginseng saponin and SDS or Triton X-100 appeared before and after decrease in light scattering, respectively. These data suggest that ginseng saponins (total, diol, triol saponin) inhibit Na^+ , K^+ -ATPase activity by specific direct and general detergent action at low and high concentrations, respectively, and this inhibitory action of ginseng saponin to Na^+ , K^+ -ATPase is not general action of all saponins.

Na^+ , K^+ -ATPase는 形質膜을 통한 Na^+ 및 K^+ 의 능동수송에 관여하는 중요한 막효소로서 이 효소활성의 변화는 여러가지 생리적 변화를 초래한다. 특히 Na^+ , K^+ -ATPase의 억제체는 세포내 Na^+ 농도를 증가시키고 이는 Na^+ - Ca^{2+} 교환 기전을 통하여 筋形質 内の Ca^{2+} 농도를 증가시킨다.¹⁻³⁾

인삼 saponin의 여러가지 약리작용 중 Na^+ , K^+ -ATPase에 미치는 영향에 관하여 최근 金등⁴⁾은 총 인삼 saponin과 ginsenoside R_{b_1} 이 rat 심장의 수축력을 증강하고, 심장에서 분리한 microsomal Na^+ , K^+ -ATPase 활성을 억제함을 관찰하여 총 인삼 saponin과 ginsenoside R_{b_1} 의 양성변력 효과의 일부가 Na^+ , K^+ -ATPase 활성 억제와 관련이 있을 것으로 추정하였다. 또한 이들은 rat의 소장 microsomal Na^+ , K^+ -ATPase에 대해서 인삼 총 saponin과 panax saponin C는 그 활성을 증가시키는 반면 ginsenoside R_{b_1} 은 그 활성을 억제시켰다고 보고⁵⁾하였다.

* 본 논문은 1984년도 영남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구된 것임.

이와 같이 인삼 saponin의 종류 및 동일한 saponin이라 하더라도 장기에 따른 Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 작용이 상이하여 실제로 인삼 saponin 작용이 Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 직접작용인지 또는 일반적인 saponin류의 계면활성 작용에 기인하는지 즉 소장에서 분리한 microsome중에 sealed right side-out vesicles가 있다면 이 vesicles가 saponin에 의하여 leaky형으로 전환되면서 인산화 부위가 증가되어 Na⁺, K⁺-ATPase 활성이 증가되었는지를 추정하기 어렵다. 또한 계면활성제의 농도가 증가되면 형질막을 구성하고 있는 지질 뿐 만아니라 Na⁺, K⁺-ATPase 활성화에 필요한 phospholipid까지 제거되어 효소활성이 소실되므로⁶⁻¹²⁾ 인삼 saponin에 의한 rat심장 microsome의 Na⁺, K⁺-ATPase 활성억제작용 역시 인삼 특유의 작용인지 또는 인삼 saponin의 계면활성작용에 기인하는지를 알 수 없다.

인삼 saponin의 Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 직접작용을 추구하기 위해서는 membrane fraction이 아닌 순수한 Na⁺, K⁺-ATPase를 분리하여 이 효소에 대한 인삼 saponin의 효과를 검토함이 바람직하며, 일반적인 계면활성제의 효과와도 비교 검토되어야 할 필요가 있다.

본 실험에서는 羊 신장으로부터 Na⁺, K⁺-ATPase를 분리정제하고, 효소활성, Na⁺의존성 인산화 및 [³H] Ouabain 결합에 미치는 인삼 saponin 및 계면활성제의 영향을 관찰하고 나아가 효소활성 억제작용과 phospholipid 제거작용과의 상관성을 추구함으로써 계면활성작용 외에 인삼 saponin 특유의 Na⁺, K⁺-ATPase 억제작용이 있는지에 관한 지견을 얻고자 하였다.

實驗方法

實驗材料 및 試藥—1) 實驗材料: 羊 신장은 Colorado Monfort로부터 냉동 공수된 것을, 인삼은 시중에서 구입한 금산산 5년생 根을, 銀柴胡(*Gypsophila oldhamiana* Miq.) saponin은 sigma 회사에서 시약용으로 분리 제조한 것을 각각 사용하였다.

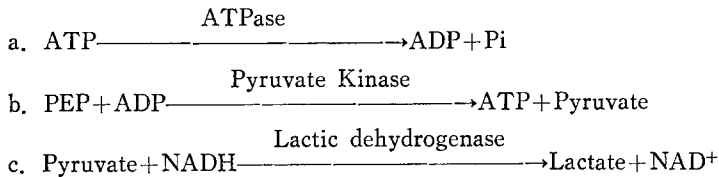
2) 試藥: 사용한 시약은 [³²P] ATP (25~45ci/mmol, New England Nuclear Co., Boston, MA), [³H] Ouabain (19.5ci/mmol, New England Nuclear Co., Boston, MA), Ouabain Octahydrate (Sigma), Na₂N₃ (Sigma), Na₂ATP (Vanadium free, Boehringer), Ethylene glycol-bis-(β-aminoethylether), N, N'-tetraacetic acid (EGTA, Sigma), sodium dodecylsulfate (SDS, Bio-Rad Lab.), Triton X-100 (Sigma), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, sigma), tris (hydroxymethyl) aminomethane (Trizma base, sigma), tetramethylethylenediamine (TEMED, sigma), L-Histidine (sigma), Acrylamide (Bio-Rad Lab.), N, N'-methylene bisacrylamide (Bio-Rad Lab.), Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (NADH, sigma), phosphoenolpyruvate (tricyclohexylamine salt, sigma), pyruvate kinase/lactic dehydrogenase (suspension, sigma) 등 이었다.

人蔘 saponin의 分離—인삼으로부터 Namba등의 방법¹³⁾에 의하여 total saponin을, 韓등의 방법¹⁴⁾으로 diol 및 triol saponin을 각각 분리하였으며, 분리한 saponin의 TLC상의 spot는 서울대학교 생약연구소에서 제공받은 표준품과 일치하였다.

羊 신장으로 부터 Na⁺, K⁺-ATPase의 分離—Na⁺, K⁺-ATPase는 Lane등¹⁵⁾의 방법에 의하여 분리, 정제하였다. 簡略히하면, Colorado Monfort로 부터 냉동 공수된 羊신장 수질을 절취, 세절한 다음 무게의 5배가 되는 0.25M sucrose, 30mM imidazole, 2mM EDTA, pH 7.4 용액중에 가하고 blender 및 polytrone으로 균질화하고 원심분리하여 microsome을 얻었다. Microsome에 0.2배의 7.5mM MgCl₂를 함유하는 6M NaI 용액을 가하고 원심분리한 다음 pellet를 25mM imidazole, 1mM EDTA, 0.4M NaCl, 0.04M KCl 용액에 부유시켜 NaI-microsome을 얻었으며 NaI-

microsome에 5% deoxycholate(DOC) 용액을 최종 단백질 1mg당 DOC 0.1mg이 되도록 20분간 서서히 저으면서 가한 후 원심분리하여 DOC-washed NaI-microsome을 얻었다. 여기에 다시 단백질 mg당 DOC 0.55mg이 되도록 5% DOC-cholate (3:1)를 10분간 서서히 저으면서 가한 다음 100,000×g에서 45분간 원심분리하였다. 상층액에 0.25배 용적의 glycerol을 가하여 15분간 저은 후 동일 용적의 1mM imidazole-EDTA를 가하고 원심분리하였으며, pellet를 세척 및 투석하여 glycerol precipitate를 얻었다. 분리한 효소단백질의 농도는 Lowary등의 방법¹⁶⁾에 準하여 측정하였다.

Na⁺, K⁺-ATPase의 活性 測定—ATPase 활성 측정은 Spectrophotometric coupled-enzyme assay¹⁷⁾에 의하였다. 즉, ATPase의 활성은 100mM NaCl, 10mM KCl, 5mM MgCl₂, 5mM Na₂ATP (Vanadium free; Boeringer), 25mM L-Histidine (pH 7.4), 0.4mM NADH (Sigma), 1mM phosphoenol pyruvate (PEP; tricyclohexylamine Salt, Sigma)를 함유하는 용액 중에 1~2μg의 purified Na⁺, K⁺-ATPase를 가한후 340nm에서 NADH산화에 기인한 흡광도의 감소를 기록함으로써 측정하였으며 반응온도는 37°C로 유지하였고 반응액의 최종용적은 2.5ml로 하였다. NADH의 산화반응을 요약하면 다음과 같다.



上記 반응에서 NADH의 산화는 ATP 가수분해에 직접 비례하게되며, ouabain이 없을 때의 효소활성으로 부터 4×10^{-3} M ouabain 존재하에서 나타나는 효소 활성치를 감한 것을 Na⁺, K⁺-ATPase 활성으로 간주하였다.

Na⁺, K⁺-ATPase의 Na⁺-依存性 磷酸化—Na⁺, K⁺-ATPase의 Na⁺-의존성 인산화를 측정하기 위하여 2mM MgCl₂, 30mM Histidine (pH 7.4), 100mM NaCl, 5mM NaN₃, 100μM EGTA 및 20μg의 효소단백질을 함유하는 반응액 중에 100μM [*r*-³²P] ATP를 가하여 0°C에서 15초 동안 반응시켰으며, 이때 반응액의 전량은 0.5ml되게 하였다. [*r*-³²P] ATP를 가하고 정확히 15초후에 10% trichloroacetic acid, 0.6mM Na₂ ATP, 0.6mM H₃PO₄를 함유하는 빙냉의 세척액 5ml를 시험관에 가하여 반응을 종료시키고, 0.45μm methylcellulose filter (Gelman) 위에서 흡입 여과하였으며, filter를 상기 빙냉의 세척액 5ml로 3회 세척하였다. 세척한 filter를 scintillation vial에 넣고 8ml의 scintillation fluid (Budget Solve)를 가한 다음 12시간 동안 방치후, liquid scintillation counter (Beckman LS 200B)로 그 radioactivity를 측정하였다.上記 반응액 중에 5mM unlabeled ATP를 가했을 때 나타나는 radioactivity를 nonspecific radioactivity로 간주하였으며, total radioactivity에서 이 수치를 감한 값을 specific radioactivity로 하였다.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis 및 Autoradiography—sodium dodecylsulfate (SDS), polyacrylamide slab gel electrophoresis는 Laemmli의 방법¹⁸⁾에 의하여 시행하였다. 0.75M Tris-Cl (pH 7.0)과 0.1% SDS를 함유하는 7.5% polyacrylamide gel에 0.075% ammonium persulfate와 0.067% tetramethylethylenediamine (TEMED)를 가하여 gel을 polymerize시켰으며 0.192M glycine, 0.025M Tris-Cl 및 0.1% SDS를 함유하는 용액을 running buffer로 사용하였다. Slab gel이 고정되었을 때 [*r*-³²P] ATP로 인산화시킨 Na⁺, K⁺-ATPase 25μg을 50mM Tris-Cl (pH 6.9),

5% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 10% glycerol 및 0.001% bromophenol blue에 용해하여, Well에 직접 가하였다. Electrophoresis의 current는 처음 1시간 동안은 40mA, 1시간후 부터는 60mA로 하였다. Electrophoresis후 두 Well은 절단하여 Weber등의 방법¹⁹⁾으로 고정, 염색 및 탈색과정을 거쳐 Na⁺, K⁺-ATPase의 분자량 측정에 이용하고 다른 두 Well은 drying vacuum으로 1시간 동안 건조한 다음 Kodak XAR-5 film에 부착하여 3~5일간 방치한 후 autoradiogram을 제조하는데 이용하였다. Well에 가해진 Na⁺, K⁺-ATPase 표본은 전술한 바와 같은 조건으로 Na⁺, K⁺-ATPase를 [³²P] ATP로 0°C에서 15초간 인산화시키고 10% TCA, 0.6mM Na₂ATP 및 0.6mM H₃PO₄를 함유하는 빙냉의 세척액 5ml로 반응을 종료시킨다음 100,000×g에서 30분간 원심분리하여 제조하였다. Pellet를 다시 빙냉의 세척액 5ml로 세척하고 50mM Tris-Cl (pH 6.9), 5% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 10% glycerol 및 0.001% bromophenol blue로 된 sample buffer에 용해하여 사용하였다. (1mg protein/1ml buffer)

[³H] Ouabain 結合實驗—정제한 Na⁺, K⁺-ATPase의 [³H] Ouabain 결합은 여과법²⁰⁾에 의하였다.

Time course는 50mM Tris-Cl (pH 7.4), 5mM MgCl₂를 함유하는 용액중에 10⁻⁶M [³H] Ouabain과 Na⁺, K⁺-ATPase를 가한 다음 37°C에서 1', 2', 3', 4', 6', 8', 10', 15', 20', 25', 30', 45', 60', 90'. 동안 incubation한 후 0.45 μ m Gelman filter 상에서 여과하였으며, 빙냉한 H₂O 약 10ml씩 가하여 3회 세척한 다음 상술의 phosphorylation 실험시와 같은 방법으로 radioactivity를 측정하였다. Specific ouabain binding은 total 결합에서 10⁻³M unlabeled ouabain 존재 下에서 측정된 nonspecific 결합을 감한 값으로 하였다.

kinetic method에 의한 dissociation constant (K_D)는 dissociation rate constant (K₋₁)와 association rate constant (K₁)로 계산하였다(K_D=K₋₁/K₁). K₋₁은 상술의 medium중에 Na⁺, K⁺-ATPase와 [³H] ouabain (10⁻⁶M)을 가하고 평형에 도달하는 시간(90min)까지 incubation한 후 unlabeled ouabain (10⁻⁴M)을 가한 다음 주어진 시간에 일정량의 medium을 취하고 여과, 세척 및 radioactivity를 측정하여 처음 결합된 [³H] ouabain의 반이 해리되는 시간으로부터 계산하였다(K₋₁=0.693/t_{1/2}). K₁은 K₁=K_{obs}-K₋₁/[I]으로부터 계산하였으며 (K_{obs}=observed first-order rate constant, [I]=[³H] ouabain의 농도) 여기서 K_{obs}는 [³H] ouabain 평형결합의 반이 결합되는 시간으로부터 계산하였다(K_{obs}=0.693/t_{1/2}). 한편 Scatchard analysis를 시행할 때는 50mM Tris-Cl (pH 7.4), 5mM MgCl₂를 함유하는 medium 또는 100mM NaCl, 10mM KCl, 5mM MgCl₂, 5mM Na₂ATP, 25mM Histidine (pH 7.4), 0.4mM NADH 및 1mM Phosphoenolpyruvate를 함유하는 medium중에 [³H] ouabain 1~500nM을 가하고 Na⁺, K⁺-ATPase를 가한 다음 37°C에서 90분간 반응시켰다. 반응을 종료시킨후 전술한 바와 같은 조작으로 [³H] ouabain 각 농도에서의 ouabain 결합을 산출하여 K_D와 Bmax를 구하였다.

Light Scattering 實驗—대조 Na⁺, K⁺-ATPase 또는 saponin, SDS 및 Triton X-100으로 처리한 Na⁺, K⁺-ATPase suspension (0.5mg/ml) 0.2ml를 0.8ml의 증류수에 가하여 최종용적이 정확히 1ml되게하고 증류수를 reference로하여 450nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조군과 처리군에서의 흡광도의 차이를 비교하였다.

Na⁺, K⁺-ATPase의 Saponin, SDS 및 Triton X-100 處理—Saponin, SDS 및 Triton X-100의 영향을 관찰한 실험에서는 Na⁺, K⁺-ATPase를 미리 saponin, SDS 및 Triton X-100으로 37°C에서 10분간 처리한 다음 각 실험에서 사용하였다. 이때 효소단백질의 양과 최종용적은 각각 80

μg 및 0.16ml로 고정하고 농도를 달리하는 saponin, SDS 또는 Triton X-100을 가하였으며 Light scattering 실험시 만은 효소단백질의 양과 최종용적을 2배로 증가시켰다. 약물의 농도는 효소단백질 μg 당 처리된 약물의 (w/w)으로 표시하였다.

實驗結果

Na⁺, K⁺-ATPase의 性質—본 실험에서羊心장에서 최종 분리한 분획의 total ATPase 활성은 $1103.0 \pm 34.7 \mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$ ($n=11$)로서 5mM NaN_3 또는 200 μM EGTA에 의해서 는 영향을 받지 않았으나 ouabain에 의하여 억제되었다. Ouabain ($4 \times 10^{-3}\text{M}$)으로 억제되는 활성은 $1077.3 \pm 40.4 \mu\text{mol Pi/mg protein/hr}$ ($n=11$)로서 분리한 분획중에 함유된 ATPase중 약 98%가 Na^+ , K^+ -ATPase임을 추정할 수 있었다. Na^+ , K^+ -ATPase의 Na^+ -의존성 인산화와 [^3H] ouabain의 결합부위농도(Bmax)는 각각 $1959.1 \pm 18.2 \text{ pmol Pi/mg protein}$ 및 $2231.2 \pm 21.4 \text{ pmol/mg protein}$ 이 있으며 효소활성과 인산화로부터 계산된 turnover number는 $(0.55 \pm 0.006) \times 10^6 \text{ hr}^{-1}$

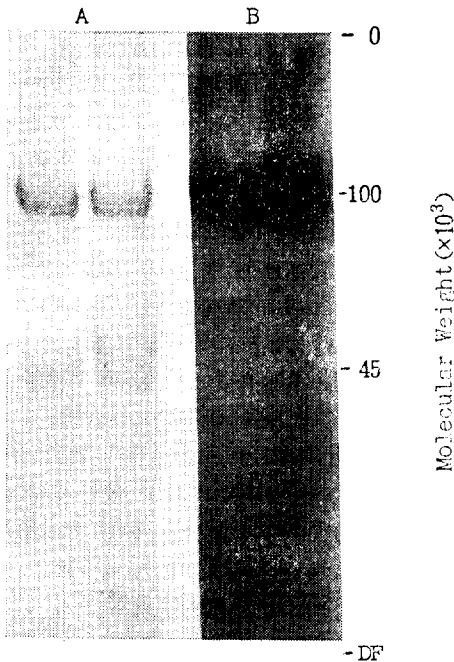


Fig. 1—Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of purified Na^+ , K^+ -ATPase and autoradiogram of ^{32}P -incorporation into Na^+ , K^+ -ATPase.

Phosphorylation of Na^+ , K^+ -ATPase, SDS (0.1%)-polyacrylamide (7.5%) gel electrophoresis and autoradiography were carried out as described in Methods. A: coomassie blue stained gel tracks. B: autoradiogram of gel. O: origin, DF: dye front

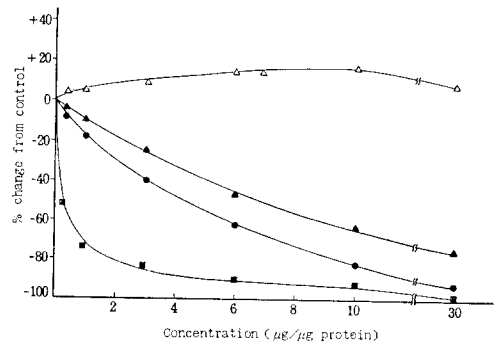


Fig. 2—Effect of ginseng and gypsophila saponin on Na^+ , K^+ -ATPase activity.

Enzyme ($1.5 \mu\text{g}$) was incubated at 37°C with 5mM Na_2ATP , 5mM MgCl_2 , 100mM NaCl , 10mM KCl , 1mM phosphoenolpyruvate (tricyclohexylamine salt), 0.4mM NADH , 25 μl of a combined pyruvate kinase/lactic dehydrogenase suspension, and 25mM histidine-Cl (pH 7.4) in a total volume of 2.5ml. Activity was measured by monitoring the decrease in absorbance at 340nm due to oxidation of NADH .

Na^+ , K^+ -ATPase ($80 \mu\text{g}$) was incubated with adequate concentration of total saponin (●), diol saponin (▲), triol saponin (■), and gypsophila saponin (△) for 10min at 37°C in a final volume of 0.16ml before measurement of enzyme activity. The positive and negative signs indicate percent activation and inhibition, respectively by saponin. Control: $1077.3 \pm 40.4 \mu\text{mol pi/mg protein/hr}$. Mean values for three assays are given.

이었다. 또한 분리한 분획에 대하여 polyacrylamide gel electrophoresis를 시행하고 autoradiogram을 촬영한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 분자량 100,000 부위와 45,000부위에서만 protein band를 나타내었고 분자량 100,000 부위에서 인산화가 일어남을 보여주고 있어 본 실험에서 사용한 분획이 고도로 정제된 Na⁺, K⁺-ATPase임을 확인하였다.

Na⁺, K⁺-ATPase 활성에 미치는 人蔘 Saponin, 銀柴胡 Saponin, Detergent의 影響—Fig. 2는 Na⁺, K⁺-ATPase를 인삼 saponin 또는 은시호 saponin으로 처리한 다음 Na⁺, K⁺-ATPase 활성을 측정된 결과로서 total saponin, panaxadiol saponin, panaxatriol saponin은 Na⁺, K⁺-ATPase의 활성을 억제하였으나 은시호 saponin은 Na⁺, K⁺-ATPase의 활성을 오히려 증가시키는 경향을 보였을 뿐 아니라 효소 단백질 μg 당 은시호 saponin 200 μg 을 처리하여도 Na⁺, K⁺-ATPase 활성 억제 현상은 보이지 않았다. 한편 인삼 saponin에 의한 Na⁺, K⁺-ATPase 활성억제는 용량에 의존하였고 그 억제정도는 triol, total, diol 순으로 強하였다. 인삼 saponin과 은시호 saponin의 Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 작용이 다르게 나타났으므로 detergent로 일반적으로 흔히 사용되는 SDS와 Triton X-100이 Na⁺, K⁺-ATPase 활성에 미치는 영향을 검토하여 보았다(Fig. 3). SDS와 Triton X-100의 용량별로 Na⁺, K⁺-ATPase를 처리하고 효소 활성을 측정할 때 단백질 μg 당 각각 0.3 μg 처리했을 때부터 유의한 억제를 보이기 시작하여 양의 증가에 따라 그 억제의 정도가 증대되어 단백질 μg 당 1.2 μg 을 처리했을 때 Na⁺, K⁺-ATPase 활성이 거의 완전히 소실되었다.

人蔘 Saponin이 Na⁺, K⁺-ATPase의 Na⁺-依存性 磷酸化에 미치는 影響—인삼 Saponin의 Na⁺, K⁺-ATPase 활성 억제 작용이 pump site의 감소에 기인하는지 또는 turnover number의 감소에 기인하는지를 알아보기 위하여 인삼 saponin 각 농도로 Na⁺, K⁺-ATPase를 처리하고 [³²P] ATP를 이용하여 Na⁺, K⁺-ATPase의 Na⁺-의존성 인산화 실험을 시행하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 인삼 saponin은 용량에 의존하여 인산화를 억제시켰으며 그 억제 강도는 triol, total, diol 순이었다. Table I에서는 control과 Na⁺, K⁺-ATPase μg 당 각 인삼 saponin 3 μg 으로 처리한 효소 단백질의 인산화치 및 turnover number를 나타내었다. Total과 diol saponin 처리시에는 turnover

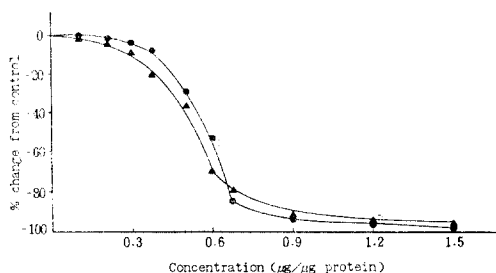


Fig. 3—Effect of SDS and Triton X-100 on Na⁺, K⁺-ATPase activity. Legends are the same as described in Fig. 2. ●: SDS treated enzyme. ▲: Triton X-100 treated enzyme. Control: 1077.3±40.4 $\mu\text{mol pi/mg protein/hr}$.

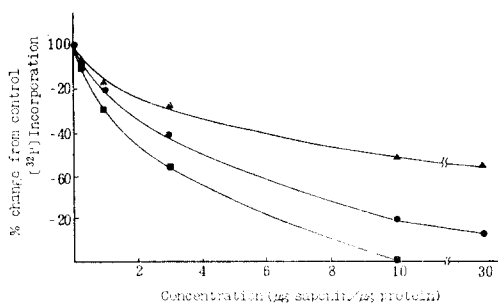


Fig. 4—Effect of ginseng saponin on the Na⁺-dependent Phosphorylation of Na⁺, K⁺-ATPase. Phosphorylation of Na⁺, K⁺-ATPase (20 $\mu\text{g}/0.5\text{ml}$) was carried out at 0°C in the presence of 100 μM [³²P] ATP, as described in Methods. Na⁺, K⁺-ATPase was treated with ginseng saponin as described in Fig. 2. Control: 1959.1±18.2 pmol pi/mg protein.

number에는 변화가 없었으나 인산화 부위의 수가 감소되었고 triol saponin 처리로는 turnover number 및 인산화치가 공히 감소되었다. 한편 Table I에 표기되지 않았으나 효소 단백질 1 μ g당 total 및 diol saponin 6 μ g 처리시는 triol saponin 3 μ g 처리시와 같은 효과를 나타내었으며 triol saponin 1 μ g 처리시는 total 및 diol saponin 3 μ g 처리 시와 같이 turnover number의 변화 없이 인산화치만 감소되었다.

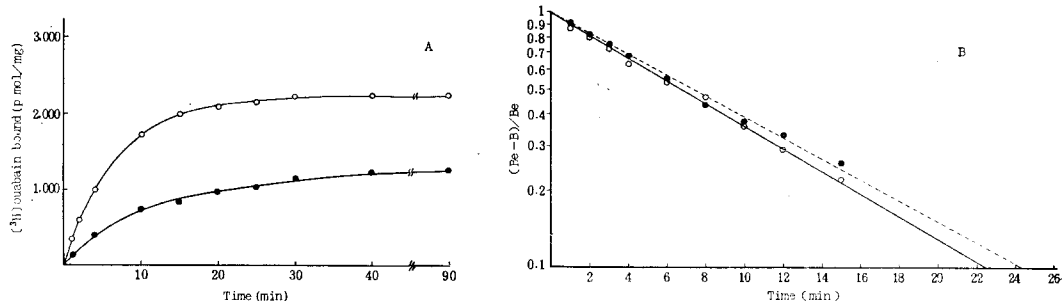


Fig. 5—A: Time course of [3 H] ouabain binding to purified Na^+ , K^+ -ATPase isolated from sheep kidney outer medulla. [3 H] ouabain binding was performed at 37°C in the presence of 50mM Tris-Cl (pH 7.4), 5mM MgCl_2 20 μ g of enzyme protein and 10^{-8} M [3 H] ouabain in a final volume of 1 ml.

B: Pseudo-first-order binding of [3 H] ouabain to Na^+ , K^+ -ATPase replotted from data of Fig. 5A. $(\text{Be}-\text{B})/\text{Be}$ (log scale) versus time is shown, where Be and B are radioligand bound to Na^+ , K^+ -ATPase at equilibrium and at time t, respectively. \circ : control, \bullet : after treatment of total saponin (3 μ g saponin/ μ g NKA).

Table I—Na-dependent phosphorylation of control and ginseng saponin treated Na^+ , K^+ -ATPase.

	[32 P] Bound (pmol Pi/mg)	Turnover number ($\times 10^6 \text{hr}^{-1}$)
Control	1959.1 \pm 18.2	0.55 \pm 0.006
Total	1284.5 \pm 11.7*	0.547 \pm 0.0059
Diol	1453.2 \pm 13.5*	0.586 \pm 0.0063
Triol	854.4 \pm 7.9*	0.220 \pm 0.0024*

Phosphorylation of Na^+ , K^+ -ATPase (20 μ g/0.5 ml) was carried out at 0°C in the presence of 100 μ M [r - 32 P] ATP, as described in Method. Na^+ , K^+ -ATPase was treated with ginseng saponin (3 μ g saponin/ μ g protein) for 10min at 37°C before phosphorylation experiment. Turnover number was calculated by the equation, $v = kE$ (k : turnover number, v : enzyme activity, E : active site concentration). Data were expressed as mean \pm S.E.M. from three different preparations

*: Significantly different ($p < 0.01$) from control value.

Table II—Kinetic constant for [3 H] ouabain binding of purified Na^+ , K^+ -ATPase isolated from sheep kidney.

	K_1^a ($\text{min}^{-1}\text{M}^{-1} \times 10^{-3}$)	K_{-1}^b ($\text{min}^{-1}\text{M}^{-1} \times 10$)	K_D (nM) ^c
Control	101 \pm 2.6	4.13 \pm 0.07	40.9 \pm 6.6
NKA + saponin	108.3 \pm 17.6	4.17 \pm 0.37	38.6 \pm 2.7

a. Calculated from $K_1 = (\text{Kobs} - K_{-1}) / [I]$ where Kobs in the observed first-order approach to equilibrium derived from 3 studies of the type shown in Fig. 5B.

b. Derived from dissociation of [3 H] ouabain.

c. Calculated from $K_D = K_{-1} / K_1$. NKA + saponin: Na^+ , K^+ -ATPase was treated with total saponin (3 μ g saponin/ μ g protein). Values are mean \pm SEM of three assays.

Na⁺, K⁺-ATPase의 [³H] Ouabain 결합에 미치는 人蔘 Saponin, 銀柴胡 Saponin 및 Detergent의 影響—Ouabain이 Na⁺, K⁺-ATPase에 선택적으로 결합하여 효소 활성을 억제한다는 것은 잘 알려져 있다.^{1,12)} 본 실험에서는 인삼 saponin과 detergent가 Na⁺, K⁺-ATPase의 [³H] Ouabain 결합에 미치는 영향을 관찰하고자 Na⁺, K⁺-ATPase를 인삼 saponin 및 detergent로 37°C에서 10분간 처리한후 [³H] Ouabain 결합실험을 시행하였다. Fig. 5-A는 시간 경과에 따른 [³H] Ouabain 결합을 본것으로 control 및 인삼 saponin 3μg을 반응시킨 Na⁺, K⁺-ATPase는 [³H] Ouabain과 빠른 속도로 결합하여 30분에 거의 평형에 이르렀다. 여기서 control의 [³H] Ouabain 평형 결합은 약 2,200pmol/mg이며 total saponin 3μg으로 처리한 Na⁺, K⁺-ATPase의 [³H] Ouabain 평형 결합은 약 1,100pmol/mg으로 total saponin의 처리로 약 50%가 억제되었음을 알 수 있다. Panaxatriol과 panaxadiol saponin으로 처리한 Na⁺, K⁺-ATPase의 [³H] Ouabain 평형 결합도 정도의 차이는 있었으나 total saponin 처리시와 마찬가지로 억제되었다. Fig. 5-B에서 control의 ouabain 결합 부위의 반이 결합되는 시간(t_{1/2})은 약 6.6분이었으며, ouabain 결합의 observed first-order rate constant (Kobs)는 10.6×10⁻² min⁻¹이었고 인삼 saponin 3μg으로 처리하였을 때의 Kobs는 9.12×10⁻² min⁻¹으로서 두군이 유사하였다. Table II는 control과 total saponin 3μg으로 처리한 Na⁺, K⁺-ATPase의 ouabain 결합에 대한 kinetic constant를 표시 한 것으로 Na⁺, K⁺-ATPase μg당 total saponin 3μg 처리로는 association 및 dissociation rate constant에 하등의 영향을 미치지 못하였다.

Toal, diol 및 triol saponin과 은시호 saponin의 농도 변화에 따른 [³H] Ouabain 결합에 미치는 영향을 비교 검토하였던 바(Fig. 6) 3종류의 인삼 saponin은 공히 triol, total, diol 순으로 ouabain 결합을 억제하는 반면 은시호 saponin은 인삼 saponin이 억제하는 농도에서 ouabain 결합을 현저히 증가시켰으며 은시호 saponin의 처리 농도를 Na⁺, K⁺-ATPase μg당 100μg까지 높여도 ouabain 결합 억제 작용은 보이지 않았다. Na⁺, K⁺-ATPase를 SDS나 Triton X-100으로 처리했을 때도 인삼 saponin 처리 시와 마찬가지로 모든 농도에서 ouabain 결합을 억제하였으나 용량반응곡선의 모양이 인삼 saponin 처리시의 모양과 다소 차이가 있었다(Fig. 7).

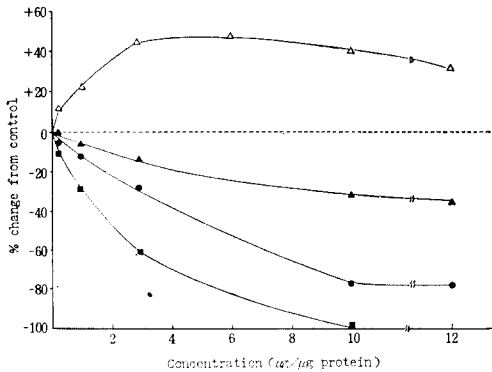


Fig. 6—Effect of ginseng and gypsophila saponin on [³H] ouabain equilibrium binding to Na⁺, K⁺-ATPase.

[³H] ouabain binding was carried out as described in Fig. 5A. Na⁺, K⁺-ATPase was treated with total (●), diol (▲), triol (■), or gypsophila (△) saponin. Each point represents mean value of three different assays. Control value of [³H] ouabain binding: 2200±19.8 pmol/mg.

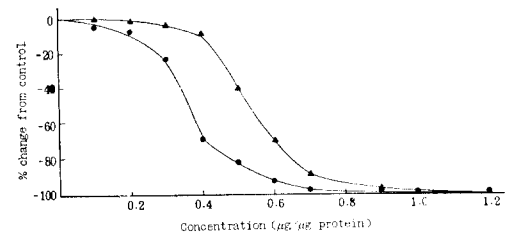


Fig. 7—Effect of SDS and Triton X-100 on [³H] ouabain equilibrium binding to Na⁺, K⁺-ATPase.

Na⁺, K⁺-ATPase was treated with SDS (●) or Triton X-100 (▲). Other legends are the same as described in Fig. 6.

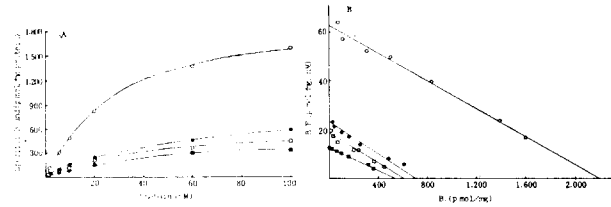


Fig. 8—Equilibrium binding of $[^3\text{H}]$ ouabain to Na^+ , K^+ -ATPase.

Na^+ , K^+ -ATPase ($20\mu\text{g}$) was incubated in the presence of $1\sim 100\text{nM}$ $[^3\text{H}]$ ouabain, 5mM Na_2ATP 5mM MgCl_2 , 100mM NaCl , 10mM KCl , 1mM phosphoenolpyruvate and 25mM histidine- Cl (pH 7.4) in a final volume of 1 ml for 90 min prior to filtering and determination of radioactivity, as described in Methods. A: $[^3\text{H}]$ ouabain binding was plotted as specific bound (pmol/mg protein) as a function of increasing ouabain concentration. B: Scatchard plot of $[^3\text{H}]$ ouabain binding to Na^+ , K^+ -ATPase (data from 8A). Bound $[^3\text{H}]$ ouabain/free $[^3\text{H}]$ ouabain (B/F) is plotted as a function of specific $[^3\text{H}]$ ouabain bound (B) to Na^+ , K^+ -ATPase. \circ : $[^3\text{H}]$ ouabain binding of control. \bullet : Na^+ , K^+ -ATPase was treated with total (\bullet), diol (\square), or triol (\blacksquare) saponin ($3\mu\text{g}$ saponin/ μg enzyme protein).

Na^+ , K^+ -ATPase μg 당 total saponin $3\mu\text{g}$ 처리로 ouabain의 결합 부위 농도는 감소되나 affinity에는 영향을 미치지 못함을 알았으므로 이 점을 diol 및 triol saponin과 비교하여 보았다. Fig. 8-A는 total, diol 및 triol saponin $3\mu\text{g}$ 으로 처리한 Na^+ , K^+ -ATPase를 농도가 다른 $[^3\text{H}]$ ouabain과 90분 간 incubation한후 각 농도에서의 $[^3\text{H}]$ ouabain 결합을 도시한 것으로 세가지 saponin이 공히 ouabain 결합을 현저히 억제하였으며 그 억제 정도는 triol, total, diol순으로 강하게 나타났다. Fig. 8-B에서는 Fig. 8-A 성적을 scatchard analysis한 것으로 대조군의 K_D 와 B_{max} 는 각각 $34.9\pm 2.9\text{ nM}$ ($n=3$) 및 $2198.8\pm 27.5\text{ pmol}/\text{mg}/\text{protein}$ ($n=3$)으로서 인삼 saponin 처리에 의하여 B_{max} 는 대조군에 비하여 현저히 감소되었으나 K_D 는 대조군과 유사하였다. 이러한 ouabain 결합 성적은 50mM Tris-Cl 과 5mM MgCl_2 조건下에서 얻어진 것이어서 인삼 saponin의 Na^+ , K^+ -ATPase 활성 억제 작용과 직접 연관지어 설명하기가 곤란하였으므로 Na^+ , K^+ -ATPase 활성 측정시와 동일한 ligand 조건에서의 ouabain 결합 실험을 수행하였다. Table III에서 보는 바와 같

Table III— K_D and B_{max} of $[^3\text{H}]$ ouabain binding to Na^+ , K^+ -ATPase.

Dose ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ protein)	K_D (nM)	B_{max} (pmol/mg)
Control	176.4 ± 6.6	2231.2 ± 21.4
Total saponin	151.2 ± 9.5	$1358.4\pm 16.7^*$
Panaxadiol saponin	176.5 ± 7.5	$1820.3\pm 22.6^*$
Panaxatriol saponin	142.9 ± 15.7	$999.3\pm 19.5^*$
Gypsophila saponin	$122.3\pm 2.3^*$	2271.8 ± 37.8
SDS	$261.0\pm 4.5^*$	$526.7\pm 16.9^*$
Triton X-100	$215.5\pm 10.7^*$	$1400.2\pm 40.9^*$

Na^+ , K^+ -ATPase was treated with the indicated doses of drugs. K_D and B_{max} were calculated by Scatchard analysis. Other legends are the same as described in Fig 8A and 8B. Values are mean \pm S.E.M of three different assays.

*: Significantly different ($p<0.05$) from control value.

이 Na⁺, K⁺-ATPase 활성 측정시에 이용된 cocktail 조건 下에서 대조군의 K_D는 Tris-Cl, MgCl₂ 조건에서의 대조군의 K_D보다 약 4배 증가되었다. Na⁺, K⁺-ATPase μg당 3μg의 total, diol 및 triol saponin 처리는 ouabain의 K_D에는 영향을 미치지 못하였으나 Bmax를 현저히 감소시켰다. 한편 은시호 Saponin 3μg을 처리했을 때는 Bmax의 변화는 없었으나 K_D의 현저한 감소를 초래하였으며 200μg의 은시호 saponin을 처리하여도 3μg 처리시와 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 Na⁺, K⁺-ATPase를 SDS나 Triton X-100 0.3μg으로 처리했을때는 ouabain의 K_D와 Bmax가 공히 감소되었으며 이러한 현상은 SDS와 Triton X-100이 ouabain 결합을 감소시키는 최소 농도인 0.03μg ~ 0.1μg 처리시부터 나타났다. 또한 Na⁺, K⁺-ATPase를 대량의 인삼 saponin으로 처리했을때도 SDS와 Triton X-100 처리시와 유사하게 K_D와 Bmax가 동시에 감소되었다.

Light Scattering 實驗—인삼 Saponin의 Na⁺, K⁺-ATPase 활성 억제 작용이 SDS와 Triton X-100의 작용과 유사하였으며 [³H] Ouabain 결합 억제 작용 역시 소량의 인삼 saponin은 SDS와 Triton X-100의 작용과는 상이하였으나 대량에서는 이들 detergent와 유사하였으므로 인삼 saponin의 Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 작용이 이들 detergent와 같은 계면활성 작용에 기인하는지 또는 인삼 saponin의 특유한 작용이 있는지를 검토하기 위하여 light scattering 실험을 시행하였다. Fig. 9는 Na⁺, K⁺-ATPase를 여러 농도의 SDS로 37°C에서 10분간 반응시킨 후 각 농도에서의 흡광도를 SDS를 처리하지 않은 대조군의 흡광도로 부터 백분율 변화로 표시하고 아울러 SDS 각 농도에서의 Na⁺, K⁺-ATPase 활성을 대조군 활성으로부터의 백분율 변화로 표시한 것으로서

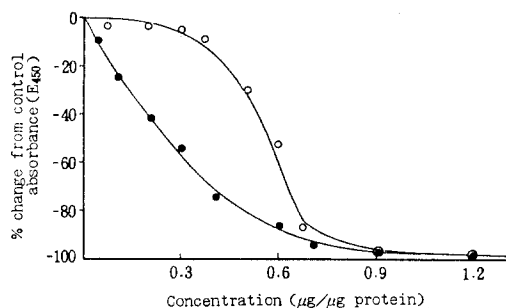


Fig. 9—Relationship between decrease in activity and light scattering of Na⁺, K⁺-ATPase by SDS. Measurement of Na⁺, K⁺-ATPase activity and treatment of SDS to Na⁺, K⁺-ATPase were carried out as described in Fig. 2. Absorbance of suspension containing 0.1mg of control and SDS treated enzyme in final volume of 1 ml was measured at 450 nm. Percent changes from control activity and light scattering (absorbance) were plotted against SDS concentration. Control activity and absorbance were 1077.3 ± 40.4 μmol pi/mg protein/hr and 0.1, respectively. ●: absorbance, ○: Na⁺, K⁺-ATPase activity. Mean values for three assays are given.

SDS 처리에 의한 흡광도 감소는 효소활성 억제작용에 선행하였으며 Triton X-100 처리시에도 유사한 결과를 나타내는 한편 triol saponin 처리시에는 효소활성 억제작용이 흡광도 감소에 선행하여 나타났고 total, diol saponin 처리시에도 동일한 결과를 보였다. 그러나 인삼 saponin의 처리량이 많아졌을 때는 SDS나 Triton X-100 처리시의와 달리 침전현상으로 인해 흡광도가 처리농도에 의존하여 감소되지 않았다(Fig. 10).

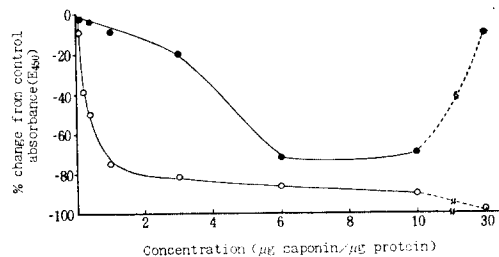


Fig. 10—Relationship between decrease in activity and light scattering of Na⁺, K⁺-ATPase by triol saponin. Legends are the same as described in Fig. 9.

考 察

본 실험결과 인삼 saponin은 Na^+ , K^+ -ATPase 활성을 감소시키며, 소량에서는 이 효소에 대한 [^3H] Ouabain 결합의 affinity에 영향을 주지않고 결합부위 농도를 감소시키나 대량에서는 affinity와 결합부위 농도를 모두 감소시킴을 알 수 있었다.

Na^+ , K^+ -ATPase는 세포막을 통한 이온이동 특히 Na^+ 및 K^+ 이동에 관여하는 중요한 막효소로서²²⁾ 분자량 약 95,000인 α -subunit와 분자량 약 55,000인 β -subunit 및 지질로 구성되어 있고²³⁻²⁵⁾ 특히 지질은 이 효소 활성을 유지 조절하는데 매우 중요하며, detergent로 지질성분을 제거하면 그 활성이 소실되는 것으로 알려져 있다.^{6,7,9,11,26,27)} 인삼 saponin이 rat 심장 및 소장에서 분리한 microsome의 Na^+ , K^+ -ATPase활성에 영향을 미친다는⁴⁵⁾ 보고가 있으나 각각 결과가 상이하여 인삼 saponin의 특수한 작용이 있는지 또는 microsome 분획 중에 있는 형질막의 sidedness의 사이로 인삼 saponin이 가지고 있는 detergent작용에 의하여 다르게 나타났는지를 구별하기가 곤란하다. 본 실험에서 양신장으로부터 분리한 분획의 Na^+ , K^+ -ATPase 활성은 매우 높고 Na_3N 나 EGTA로 그 활성이 영향을 받지 않는 것으로 보아 mitochondria나 근소포체의 오염이 거의 없는 것으로 생각되며 ATPase 활성중 약 98%가 Na^+ , K^+ -ATPase 활성에 기인된 것이었음을 알 수 있었다.

Polyacrylamide gel electrophoresis에 의하여 분자량 100,000 및 45,000인 α 및 β subunit를 확인할 수 있었고 다른 특이한 단백질 band를 인정할 수 없었으며 [$r\text{-}^{32}\text{P}$] ATP에 의하여 α -subunit가 인산화되었다는 점으로 미루어 분리한 분획이 고도로 정제된 Na^+ , K^+ -ATPase임을 추정할 수 있었을 뿐만 아니라 분리한 분획을 저농도에서 고농도로 SDS나 Triton X-100으로 처리하여도 효소활성의 증가는 없었고 억제만 보였으므로 rightside-out의 vesicle형이 없음을 즉, latent ATPase 활성이 없음을 추정할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 분리한 Na^+ , K^+ -ATPase는 인삼 saponin의 Na^+ , K^+ -ATPase에 대한 직접작용 여부를 검토하는데 적합하였다고 생각된다.

Saponin및 기타 detergent는 형질막 구성성분인 지질을 제거하여 형질막을 파괴^{28,29)}하며 고농도에서는 진술한 바와 같이 Na^+ , K^+ -ATPase 활성에 필요한 지질까지도 제거하여 효소활성을 소실케 한다. Detergent의 이러한 성질은 skinned fiber의 제조나 형질막의 기능과 mitochondria 및 endoplasmic reticulum의 기능을 구별하는데 이용하기도 한다. Filo³⁰⁾등은 glycerol을, Gordon²⁹⁾은 Triton X-100을 Endo³¹⁾등은 saponin을 각각 사용하여 skinned fiber를 제조하였으며 kwan²⁸⁾등은 saponin이 형질막을 선택적으로 파괴하므로, 형질막과 endoplasmic reticulum의 ATP 의존성 Ca^{2+} 섭취중 형질막의 ATP 의존성 Ca^{2+} 섭취는 saponin 처리로 소실되었다고 추정하였고 wibo³²⁾등은 이러한 saponin의 계면활성작용을 장평활근에서 분리한 형질막의 sidedness를 결정하는데 이용하였다. 뿐만아니라 Na^+ , K^+ -ATPase를 고농도의 detergent로 처리 용해하여 phospholipid를 제거하고 ATPase의 apoenzyme만을 분리하면 효소활성이 소실되고 이 apoenzyme에 외부로부터 phospholipid를 가함으로써 효소활성이 회복되는 점으로 보아 일반적으로 Na^+ , K^+ -ATPase는 lipid-protein complex로 생각되어지고 있다.²⁷⁾ 또한 인삼 saponin의 효소계에 미치는 효과에 관하여 주³³⁾ 및 주등^{34,35)}은 인삼saponin이 여러가지 효소활성을 소량에서는 촉진시키고 대량에서는 억제시킴을 관찰하고 인삼 saponin의 효소활성화작용이 계면활성에 의한 효소의 conformation 변화에 기인할 것으로 추정하였다. 본 실험결과 인삼 saponin과 SDS 및 Triton X-100이 공히 처리용량에 의존하여 Na^+ , K^+ -ATPase 활성을 억제하였으나 인산화 실험에서 Na^+ , K^+ -ATPase를 SDS나

Triton X-100로 처리했을 때와 고농도의 인삼 Saponin으로 처리했을 때는 인산화 부위의 수 뿐만 아니라 turnover number (molecular activity)가 동시에 감소되는 반면 낮은 농도의 인삼 saponin은 turnover number의 변화없이 인산화 부위의 수만 감소시키는 점으로 보아 저농도의 인삼 saponin은 계면활성 작용과는 다른 Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 직접작용이 있는 것으로 추측된다. 또한 은시호 saponin에 의해서는 효소활성이 증가될 뿐만 아니라 농도를 증가시켜도 억제작용을 나타내지 않아 인삼 saponin의 Na⁺, K⁺-ATPase 억제작용을 일반적인 saponin의 작용으로 간주하기도 곤란하다. 인삼 saponin과 은시호 saponin의 Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 작용의 차이는 이들 saponin이 Na⁺, K⁺-ATPase의 [³H] ouabain 결합에 미치는 영향의 차이에서 더욱 현저하다. 즉 은시호 saponin이 [³H] ouabain 결합의 결합부위농도(Bmax)에는 영향을 미치지 않고 affinity를 증가시키는 반면 소량의 인삼 saponin은 total, diol, triol saponin 공히 affinity 변화없이 Bmax를 감소시켰다. 이점으로부터 은시호 saponin은 Na⁺, K⁺-ATPase에 존재하는 ouabain 결합부위의 affinity를 증가시킴으로써 효소활성의 증가를 야기할 것으로 생각되는 한편 인삼 saponin은 ouabain 결합부위의 affinity 감소나 ouabain 결합부위에 대하여 ouabain과의 상경적 길항작용보다는 ouabain 결합 부위를 ouabain이 결합할 수 없는 상태로 구조적 변화를 일으켜 효소활성을 억제하는 것으로 사료된다. 또한 [³H] ouabain 결합실험에서도 SDS와 Triton X-100은 ouabain 결합의 K_D와 Bmax를 모두 감소시켜 소량의 인삼 Saponin과 그 작용양상이 다름을 시사하고 있다.

인삼 Saponin과 SDS 및 Triton X-100의 Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 작용의 차이는 light scattering 실험으로 더욱 확실히 추정할 수 있었다. 본 실험에서 인삼 Saponin은 탁도 (O. D.)의 감소보다 훨씬 낮은 농도에서 효소활성을 억제한 반면 SDS나 Triton X-100은 탁도의 감소가 효소활성의 감소보다 先行하는 것으로 보아 소량의 인삼 saponin에 의한 Na⁺, K⁺-ATPase 활성억제는 계면활성작용과는 다른 Na⁺, K⁺-ATPase에 대한 직접작용일 것으로 추측된다. 그러나 인삼 Saponin의 양이 증가되었을 때는 SDS와 Triton X-100과 같은 계면활성작용에 의하여 Na⁺, K⁺-ATPase 구조중의 지질이 제거되면서 효소가 분해되어 인산화 부위 및 ouabain 결합부위의 감소 내지 소실이 초래된 것으로 사료된다.

한편, 인삼이 심장수축에 미치는 영향에 관하여 chang³⁶⁾, chun 등³⁷⁾은 심장 수축력의 증가를 Rhim³⁸⁾ 및 Song³⁹⁾은 수축력의 억제를 각각 보고 하였고, Kim^{4,40)} 등은 인삼성분중 총 saponin과 protopanaxadiol계 saponin인 ginsenoside Rb₁이 백서 적출 심장에 대하여 양성변력 효과 및 수축력 퇴화의 지연 효과가 있다고 보고하면서 양성변력 효과의 일부 기전은 Na⁺, K⁺-ATPase 활성 억제와 관련이 있을 것으로 추정하였다. 그러나 이들의 논문에서 ginsenoside Re는 Na⁺, K⁺-ATPase 활성을 억제하나 양성변력 효과나 수축력 퇴화의 지연효과를 보이지 않았고 본 실험의 결과 triol saponin이 가장 강력한 Na⁺, K⁺-ATPase 억제효과를 나타내었다는 점 및 상술한 심장 수축력에 대한 상반된 보고등으로 미루어 인삼 saponin의 근수축에 대한 효과를 Na⁺, K⁺-ATPase 억제효과만으로 추정 설명하기는 어렵다. 그러나 적어도 인삼 saponin이 근수축과정에 미칠 수 있는 다양한 mechanism중에서 Na⁺, K⁺-ATPase 억제에 기인한 근수축력 증가 기전이 내포되어질 것으로 사료된다.

結 論

인삼 saponin이 羊심장에서 분리 정제한 Na⁺, K⁺-ATPase의 활성, Na⁺-의존성 인산화 및 [³H] ouabain 결합에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 인삼 saponin (triol)total)diol)과 SDS 및 Triton X-100은 Na^+ , K^+ -ATPase의 활성, Na^+ -의 존성 인산화 및 [^3H] ouabain 결합을 억제하였으나 은시호 saponin은 효소활성과 [^3H] ouabain 결합을 증가시켰다.

2. 소량의 인삼 saponin ($3\mu\text{g}$ saponin/ μg protein)은 Na^+ , K^+ -ATPase의 turnover number 및 [^3H] ouabain 결합의 K_D 에는 영향을 미치지 않고, 인산화 부위와 B_{max} 를 감소시켰으나 양을 증가했을 때나 SDS, Triton X-100을 처리했을 때는 turnover number, 인산화 부위의 수 뿐만 아니라 ouabain 결합의 affinity와 B_{max} 를 공히 감소시켰다.

3. 은시호 saponin은 [^3H] ouabain 결합의 B_{max} 에는 영향을 미치지 않고 affinity 만을 증가시켰다.

4. 인삼 saponin의 효소활성억제 효과는 light scattering을 감소시키지 않는 농도에서도 나타났으나 SDS나 Triton X-100은 light scattering이 감소된 후 효소활성억제 효과를 나타내었다.

5. 이상 실험성적으로 saponin의 종류에 따라 Na^+ , K^+ -ATPase에 대한 작용이 다르며 인삼 saponin은 저농도에서는 계면활성작용이 아닌 직접작용으로, 고농도에서는 계면활성작용으로 Na^+ , K^+ -ATPase 활성을 억제할 것으로 사료된다.

본 실험중 인삼 saponin의 분리 및 정제에 도움을 주신 충남대학교 약학대학 배기환 교수에게 감사드립니다.

文 獻

1. A Schwartz, G.E. Lindenmayer and J.C. Allen, The sodium-potassium adenosine triphosphatase. Pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* 27, 3 (1975).
2. T. Akera and T.M. Brody, The role of the Na^+ , K^+ -ATPase in the inotropic action of digitalis. *Pharmacol. Rev.* 29, 187 (1977).
3. R.J. Adams and A. Schwartz, Comparative mechanism for contraction of cardiac and skeletal muscle. *Chest* 78 (suppl), 123 (1980).
4. 金洛斗, 金忠奎, 金奉基, 韓秉勳, 李相燮, 人蔘의 强壯效果에 관한 研究, 白鼠 心臟에 대한 人蔘사포닌의 效果. 약학회지 24, 15 (1980).
5. 趙允成, 金洛斗, 權容和, 人蔘사포닌이 白鼠 腸粘膜 Na^+ , K^+ -ATPase에 미치는 影響에 관한 研究. 약학회지 22, 120 (1978).
6. J. Järnefelt, Lipid requirements of functional membrane structures as indicated by the reversible inactivation of (Na^+ + K^+)-activated ATPase from brain microsome. *Biochim. Biophys. Acta* 266, 91 (1972).
7. A. Bruni, A.R. Contessa and P. Palatini, Functions of phospholipids in adenosinetriphosphatase associated with membranes. In Membrane-Bound Enzymes, Vol. 14, pp.195-207, *Advances in Experimental Medicine and Biology* (1971).
8. T. Hexum and L.E. Hokin, Inactivation of beef brain Na^+ , K^+ -ATPase by phspoholipase A and reactivation by inosithin. *Fed. Proc.* 30, 1169 (1971).
9. K.P. Wheeler and R. Whittam, ATPase activity of the sodium pump needs phosphatidylserine. *Nature (London)*, 225, 449 (1970).
10. K. Taniguchi and S. Iida, The role of phospholipids in the binding of ouabain to sodium-and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *Mol. Pharmacol.* 9, 350 (1973).
11. B. Roelofsen and L.L.M. Van Deenen, Lipid requirement of membrane-bound ATPase: Studies on human erythrocyte ghosts. *Eur. J. Biochem.* 40, 245 (1973).
12. R.E. Barnett and J. Palazzotto, Mechanism of the effects of lipid phase transitions on the Na^+ , K^+ -ATPase, and the role of protein conformational changes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 242, 69 (1974).
13. 難波恒雄, 吉崎正雄, 富森毅, 小橋恭一, 三井健一郎, 長谷純一, 藥學雜誌, 94, 252 (1974).
14. 韓秉勳, 人蔘 saponin 成分의 제품제조에 관한 연구, 인삼실험연구용역보고서(고려인삼연구소), 1978.

15. L.K. Lane, J.D. Potter, and J.H. Collins, Large-scale purification of Na⁺, K⁺-ATPase and its protein subunits from lamb kidney medulla. *Prep. Biochem.* **9**, 157 (1979).
16. O.H. Lowry, H.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
17. A. Schwartz, J.C. Allen and S. Harigaya, Possible involvement of cardiac Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase in the mechanism of action of cardiac glycosides. *J. Pharmacol., Exp. Ther.* **168**, 31 (1969).
18. L.K. Laemmli, Cleave of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)*, **227**, 680 (1970).
19. K. Weber and M. Osborn, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **224**, 4406 (1969).
20. E.T. Wallick, B.M. Anner, M.V. Ray and A. Schwartz, Effect of temperature on phosphorylation and ouabain binding to N-ethylmaleimide treated Na⁺, K⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **253**, 8778 (1978).
21. J.H. Dahl and L.E. Hokin, The sodium-potassium adenosine triphosphatase. *Ann. Rev. Biochem.* **43**, 237 (1974).
22. E.T. Wallick, L.K. Lane and A. Schwartz, Biochemical mechanism of the sodium pump. *Annu. Rev. Physiol.* **41**, 397 (1979).
23. L.E. Hokin, J.L. Dahl, J.D. Deupree, J.F. Dixon, J.F. Hackney and J.F. Perdue, Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. X. Purification of the enzyme from the rectal gland of *Squalus acanthias*. *J. Biol. Chem.* **248**, 2593 (1973).
24. J. Kyte, Purification of the sodium-and potassium-dependent adenosine triphosphatase from canine renal medulla. *J. Biol. Chem.* **246**, 4157 (1971).
25. L.K. Lane, J.H. Copenhaver, G.E. JR., Lindenmayer and A. Schwartz, Purification and characterization of and [³H] ouabain binding to the transport adenosine triphosphatase from outer medulla of canine kidney. *J. Biol. Chem.* **248**, 7197 (1973).
26. K.P. Wheeler, J.A. Walker and D.M. Barker, Lipid requirement of the membrane sodium-plus-potassium ion-dependent adenosine triphosphatase system. *Biochem. J.* **146**, 713 (1975).
27. P. Ottolenghi, The reversible delipidation of a solubilized sodium-plus-potassium ion-dependent adenosine triphosphatase from the salt gland of the spiny dogfish. *Biochem. J.* **151**, 61 (1975).
28. C.Y. Kwan and R.M.K.W. Lee, Interaction of saponin with microsomal membrane fraction isolated from the smooth muscle of rat vas deferens. *Mol. Physiol.* **5**, 105 (1984).
29. A.R. Gordon, Contraction of detergent-treated smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 3527 (1978).
30. R.B. Filo, D.F. Bohr and J.C. Ruegg, Glycerinated skeletal and smooth muscle: Calcium and magnesium dependence. *Science*, **147**, 1581 (1965).
31. M. Endo and M. Lino, Specific perforation of muscle cell membranes with preserved SR function by saponin treatment. *J. Muscle Res. Cell Motility*, **1**, 89 (1980).
32. M. Wibo, I. Delfosse and T. Godfraind, Sidedness of plasma membrane vesicles isolated from intestinal smooth muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **258**, 331 (1982).
33. 주충노, 생화학적 측면에서 본 인삼연구. *생화학뉴스* **4**, 5(1984).
34. Chung No Joo and Sang Jik Lee, Biochemical studies on ginseng saponins (IX), *Korean Biochem. J.* **10**, 59 (1977).
35. Chung No Joo and Jae Won Kim, Biochemical studies on ginseng saponins (XXI) Action of the saponin on alcohol dehydrogenase, *Korean Biochem. J.* **17**(4), 431 (1984).
36. P.H. Chang, Actions of ginseng on the cardiovascular system. *Peiking X-Hsiao Hsiao Pao*, **2**, 101 (1959).
37. Y.S. Chun, B.H. Choi, C.E. Kim, K.B. Lim and K.H. Choi, Influence of dichloroisoproterenol and ginseng on the action of some drug. *Korean J. Pharmacol.* **2**, 21 (1966).
38. J.D. Rhim, Experimental studies on ginseng with special reference to the action of ginseng on the panaxcardiovascular system. *Korean Intern. Med. J.* **10**, 401 (1967).
39. S.K. Song, The action of panaxquinone on the isolated clam heart. *Korean J. Pharmacol.* **6**, 9 (1970).
40. N.D. Kim, B.K. Kim and H.S. Lee, Study on the contractile force of the isolated hearts from ginseng components treated rats. *Yakhak Hoeji*, **26**, 239 (1982).