

Lipoprotein Lipase의 활성화에 미치는 인삼 Saponin의 영향

白台鴻·金曉駿

한양대학교 자연과학대학 화학과

The Effect of Ginseng Saponins on the Activity of Lipoprotein Lipase in Vitro

Paik, Tai-Hong · Kim, Hyo-Joon

Dept. of Chemistry, Hanyang University

(Received March 2, 1985)

ABSTRACT

In order to investigate the effect of ginseng saponins on the activity of lipoprotein lipase, it was attempted to conform the enzymatic hydrolysis of chylomicron with post-heparin induced plasma lipoprotein lipase of normal rabbit in vitro. And the activity of lipoprotein lipase was determined by the quantitative determination of liberated free fatty acids on the hydrolysis of chylomicron.

As the result, it was observed that the ginseng saponins accelerated the hydrolysis of chylomicron by post-heparin plasma in vitro. And the optimum concentration of ginseng saponins for the activity of the lipoprotein lipase in the 2% bovine serum albumin was 10^{-4} %.

But ginseng saponins on the hydrolysis of chylomicron was influenced by the presence and the absence of albumin. And the optimum concentration of albumin and Na-cholate on the activity of lipoprotein lipase was each of the 10^{-6} % albumin and 5mM Na-cholate.

From these results, it seems that ginseng saponins might stimulate the intravascular hydrolysis of chylomicron.

I. 서론

고려 인삼의 주성분의 하나인 인삼 saponin 류는 표면 활성 물질로서 cholesterol이나 중성 지질과 같은 비극성 지질들을 효과적으로 분산시키며, 적당량의 인삼 saponin 류는 여러가지 효소 반응을 비특이적으로 촉진한다고 보고되어 있다¹⁻³⁾.

따라서, 인삼 saponin 은 혈액에서 lipoprotein lipase의 활성을 증가시킬 것으로 기대된다.

한편, lipoprotein lipase는 chylomicron이나 very low density lipoprotein에 작용하여 low density lipoprotein으로 전환시켜 각 조직에서의 지질의 이용을 원만하게 하는데 중요한 역할을 한다는 사실은 잘 알려져 있다⁴⁾.

Lipoprotein lipase에 의한 chylomicron 가수 분해

에 대하여 Anfinson⁵⁾ 등은 plasma 와 albumin 을 반응액에 첨가하면 lipoprotein lipase 의 활성이 크게 증가된다는 것을 보고하고 있으며, Fredrickson⁶⁾ 과 Korn 등^{7,8)} 은 heparin 을 정맥 주사하면 lipoprotein lipase 의 분비를 증가시킬 뿐만 아니라, heparin 은 lipoprotein lipase 의 구성 성분이 되기도 한다고 보고하고 있다. 한편, 담즙산은 난수용성 기질의 용해도를 증가시킴으로써 lipoprotein lipase 의 활성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다⁹⁾.

본 연구에서는 토끼 혈장의 chylomicron 가수 분해 정도를 관찰하므로써 인삼 saponin 이 lipoprotein lipase 에 미치는 영향을 *in vitro* 에서 검토하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 재료

(1) 인삼 Saponin 의 추출

금삼 산 백삼(4년근, 50편근) 분말 300g 에 methanol-chloroform-water(2:1:0.8, v/v/v) 혼합 용액 1,520ml 를 넣고 상온에서 2시간 진탕한 후 여과하고, 불용성 침전물을 상기 혼합 용액 320 ml 를 가하여 재 추출해서 얻은 전 추출액을 methanol-chloroform-water의 부피 비가 1:1:0.9가 되도록 chloroform 과 물을 가하여 두 층으로 분리한 후 상층액(methanol-water 층)을 감압 농축하여 methanol 을 제거한 다음, 병동 건조하여 약 70g 의 조 saponin 튜블 얻었다. 이것을 다시 열 methanol 100ml 에 녹인 다음 냉각시키고 methanol 불용성 물질을 원심 분리하였다. 이 methanol 상층액에 300ml 의 chloroform 을 가하여 방치한 후 불용성 물질을 원심 분리한 다음 상층액을 감압 농축하고, 진공으로 건조하여 얻은 saponin 혼합물을 시료로 사용하였다¹⁰⁾.

(2) Lipoprotein lipase 효소원

Giant 계 토끼(체중 1.5~2.0kg, 수컷)를 정상 사료(제일 사료 Co. 제)에 비지와 야채 혼합 사료를 1마리당 하루에 200g 씩 첨가하여 5주간 사육한 후 heparin 400 unit 를 함유한 생리 식염수 0.2ml 를 정맥 주사하고, 15분 후 이 정맥에서 혈액을 채취하여 10분간 3,000 rpm 에서 원심 분리하여 얻은 혈장을 post-heparin plasma 로 하여 lipoprotein lipase 효소원으로 사용하였다.

(3) Chylomicron 의 채취

Sodium pentobarbital 로 마취한 토끼의 좌측 복부를 절개하여 흉관을 노출시키고, 횡경막 바로 아래 위치에서 3.8% sodium citrate 를 함유한 주사기로

chyle 과 3.8% sodium citrate 의 부피 비가 9:1 이 되도록 하여 chyle 을 수집하고, 4,500 rpm 에서 30분 동안 원심 분리한 후 임과구를 제거하여 chylomicron 을 얻었다.

2. 방법

(1) 유리 지방산의 추출 및 정량

모든 시료의 유리 지방산은 다음과 같이 추출하여 정량하였다. 즉, methanol, chloroform 및 물을 시료에 첨가하여 methanol-chloroform-water 의 부피 비가 2:1:0.8 이 되도록하여 단일상으로 하여 15분간 실온에 방치한 후 다시 methanol-chloroform-water 의 부피가 1:1:0.9 가 되도록 chloroform 과 물을 가하여 두 층으로 분리하고, chloroform 층을 다른 시험관에 옮겨 질소 가스로 농축시켜 얻은 추출물을 ethanol 에 다시 녹이고, 불용성 물질을 원심 분리하여 제거한 후 Dole¹¹⁾ 법에 의하여 thymol blue 를 지시약으로 사용하고 0.01N NaOH 알코올 용액으로 적정하여 유리 지방산을 정량하였다.

(2) Lipoprotein lipase 활성도 측정

혈장 lipoprotein lipase 의 활성도는 1.25% chylomicron 0.1ml, 0.2M ammonium buffer(pH 8.5) 0.48ml, 1M CaCl₂ 0.02ml 및 10% bovine serum albumin(pH 8.5) 0.2ml 의 혼합 용액(혼소 반응액)이 들어 있는 3개의 시험관에 1개에는 post-heparin plasma 0.2ml, 나머지 1개에는 plasma 대신 0.2M ammonium buffer(pH 8.5) 0.2ml 를 가하여 전체 부피가 1.0ml 가 되도록 한 후 37°C 에서 1시간 반응시키고, methanol 1.5ml 를 가하여 반응을 정지시킨 후 각 시료로부터 지방산을 추출, 정량하여 유리된 지방산의 양으로 lipoprotein lipase 의 활성도를 비교하였다.

한편, albumin 의 존재 하에서 lipoprotein lipase 의 활성도에 미치는 saponin 의 영향은 위의 효소 반응액 중에서 0.2M ammonium buffer(pH 8.5) 를 0.28ml 로 하고 여러 가지 농도의 인삼 saponin 용액 0.2ml 를 가하고, post-heparin plasma 0.2ml 를 가하여 전체 부피가 1.0ml 가 되도록 하여 위와 같은 방법으로 유리 지방산을 정량하였다.

또한, lipoprotein lipase 의 활성도에 미치는 albumin, Na-cholate 및 saponin 의 2% albumin 대체 효과는 효소 반응액 중에서 10% bovine serum albumin(pH 8.5) 0.2ml 대신에 여러 가지 농도의 albumin, Na-cholate 및 saponin 을 0.2ml 씩 각각 가하고 post-heparin plasma 0.2ml 를 가하여 전체 부

피를 1.0ml로 한 후 동일한 방법으로 유리 지방산을 정량하여 lipoprotein lipase의 활성도를 검토하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Lipoprotein lipase 활성도

post-heparin plasma에 의한 lipoprotein의 활성도를 알아보기 위하여 효소 반응액에 plasma를 가하지 않은 경우와 80°C에서 변성시킨 denaturated post-heparin plasma를 가한 경우의 활성도를 측정하여 비교한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. The Degree of Hydrolysis of Chylomicron by post-heparin Plasma of Normal Rabbit *in vitro*

Treatment	Fatty Acid Released (μ mole)
No plasma	7.08
Denaturated plasma	7.26
Normal plasma	8.07

Table 1에서와 같이 post-heparin plasma를 가했을 때 chylomicron은 lipoprotein lipase에 의해 가수 분해됨을 확인하였다.

2. 인삼 Saponin에 의한 Lipoprotein lipase 활성도 변화

Lipoprotein lipase의 활성화에 미치는 인삼 saponin의 영향을 보기 위하여 post-heparin plasma를 lipoprotein lipase의 효소원으로 사용하고, 2% bovine serum albumin의 존재하에서 여러 가지 농도의 인삼 saponin을 첨가했을 때 chylomicron의 가수 분해도를 측정한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서 보는 바와 같이 2%의 albumin이 존재할 때 chylomicron의 가수 분해도는 인삼 saponin 농도의 증가에 따라 증가하다가 인삼 saponin의 최종 농도가 1×10^{-4} %일 때 효소 반응은 가장 활발하여 가수 분해도는 최대값을 나타내어 saponin을 가하지 않은 것에 비해 32%나 증가되었다. 그러나 인삼 saponin의 농도가 그 이상이면 오히려 감소하는 경향을 볼 수 있었다.

이러한 실험 결과에 따라 적당 농도의 인삼 saponin은 혈액내에서 chylomicron의 가수 분해 반응을 촉진함으로써 중성 지질, cholesterol 등의 원만한 체내

이동 및 대사에 도움이 될 것으로 생각된다.

Table 2. The Effect of Ginseng Saponin on the Hydrolysis of Chylomicrons in the Presence of the Albumin by post-heparin Plasma of Normal Rabbit *in vitro*

Saponin Concentration (%)*	Fatty Acid Released (μ mole)	Relative Degree of Hydrolysis**
0	7.90	100
1×10^{-1}	8.15	103.2
1×10^{-2}	8.77	111.0
1×10^{-4}	10.45	132.3
1×10^{-6}	9.43	119.4
1×10^{-8}	9.27	117.4
1×10^{-10}	9.12	115.5

* Final concentration

** Table is shown assuming the degree of hydrolysis in the absence of the saponin is 100.

한편, 2% albumin이 존재하지 않을 때 lipoprotein lipase의 활성화에 미치는 여러 가지 농도의 인삼 saponin의 영향은 Table 3과 같다.

Table 3과 같이 albumin이 존재하지 않을 때는 여러 가지 농도의 인삼 saponin을 첨가했을 때 chylomicron 가수 분해도는 albumin이 존재할 때와는

Table 3. The Effect of Ginseng Saponin on the Hydrolysis of Chylomicrons in the Absence of the Albumin by post-heparin Plasma of Normal Rabbit *in vitro*

Saponin Concentration (%)*	Fatty Acid Released (μ mole)	Relative Degree of Hydrolysis**
0	7.86	100
1×10^{-1}	7.20	91.6
1×10^{-2}	7.14	90.8
1×10^{-4}	7.47	95.0
1×10^{-6}	7.80	100.3
1×10^{-8}	8.52	108.4
1×10^{-10}	8.88	113.0

* Final concentration

** Table is shown assuming the degree of hydrolysis the 2% albumin concentration is 100.

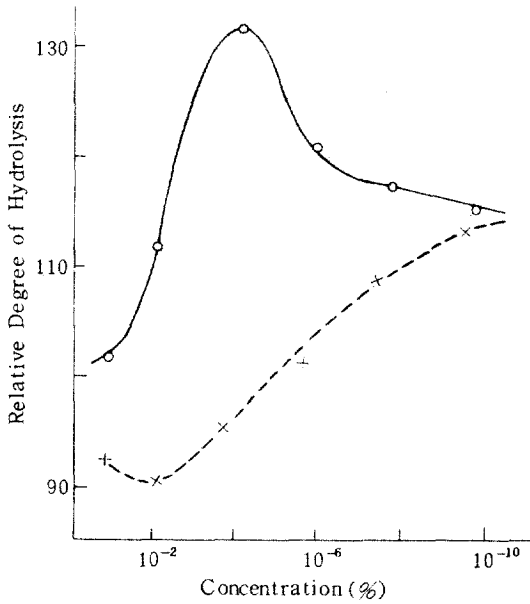


Fig. 1. The effect of ginseng saponin on the hydrolysis of chylomicron in the presence and in the absence of albumin by post-heparin plasma of normal rabbit *in vitro*.
 -○- ; in the presence of albumin
 --x-- ; in the absence of albumin

달리 saponin 의 농도가 감소함에 따라 가수 분해도가 증가하는 경향을 나타내었으며, lipoprotein lipase 에 대한 최적 농도가 나타나지 않는 것으로 보아 lipoprotein lipase 의 활성화에 대한 인삼 saponin 의 영향은 albumin 의 존재에 크게 영향을 받고 있음을 알 수 있었다. 효소 반응액에 albumin 을 첨가했을 때와 첨가하지 않았을 때의 lipoprotein lipase 활성화에 미치는 인삼 saponin 의 영향을 Fig. 1 에 비교하여 나타내었다.

3. Lipoprotein lipase 의 활성화에 미치는 Albumin 과 Na·cholate 의 영향

한편, Lipoprotein lipase 활성화에 미치는 albumin 과 Na·cholate 의 영향을 보기 위하여 효소 반응액 중 10% bovine serum albumin 대신 여러 가지 농도의 bovine serum albumin 과 Na·cholate 를 첨가하여 chylomicron 의 가수 분해도를 측정할 결과 albumin 의 경우에는 Table 4 와 같이 bovine serum albumin 의 최종 농도가 10⁻⁶% 일 때 최대 가수 분해도를 나타내었으나, Na·cholate 의 경우에는 Table 5 와 같이 Na·cholate 의 최종 농도가 5mM 일 때 최대

가수 분해도를 나타내고 있었다.

그러나 인삼 saponin 의 경우에는 Table 3 에서 볼 수 있는 바와 같이 albumin 과 Na·cholate 에 의한 lipoprotein lipase 의 활성화도 증가와는 달리 매우 낮은 농도에서 활성화도가 증가하는 경향을 나타내고 있었으나, 그 이유에 대하여는 더 연구되어야 할 것이다.

Table 4. The Effect of Albumin on the Hydrolysis of Chylomicron by post-heparin Plasma of Normal Rabbit *in vitro*

Albumin Concentration (%)*	Fatty Acid Released (μmole)	Relative Degree of Hydrolysis**
0	7.90	100.0
1 × 10 ⁻¹	8.35	105.7
1 × 10 ⁻²	8.58	108.6
1 × 10 ⁻⁴	9.57	121.1
1 × 10 ⁻⁶	10.38	131.4
1 × 10 ⁻⁸	9.71	122.9
1 × 10 ⁻¹⁰	9.48	120.0

* Final concentration

** Table is shown assuming the degree of hydrolysis the 2% albumin concentration is 100.

Table 5. The Effect of Cholic Acid on the Hydrolysis of Chylomicron by post-heparin Plasma of Normal Rabbit *in vitro*

Na·Cholate Concentration (mM)	Fatty Acid Released (μmole)	Relative Degree of Hydrolysis**
0	7.86	100
1.0	8.34	106.1
2.5	7.83	99.6
5.0	10.23	130.2
7.5	9.63	122.5
10.0	7.80	99.2

* Final concentration

** Table is shown assuming the degree of hydrolysis the 2% albumin concentration is 100.

이상의 결과로부터 적당 농도의 인삼 saponin 류는 혈액내의 lipoprotein lipase 를 활성화하여 chylomicron 이나 very low density lipoprotein 의 가수 분해

를 촉진함으로써 지질 대사를 원활히 진행시킬 것으로 생각된다.

IV. 결 론

인삼 saponin 류가 혈액 lipoprotein lipase의 활성화에 미치는 영향을 구명하기 위하여 heparin을 주사한 토끼에서 채취한 혈장을 효소원으로 하여 chylomicron의 가수 분해 정도를 in vitro에서 검토한 결과는 다음과 같다.

2% bovine serum albumin이 존재할 때 chylomicron의 가수 분해도는 인삼 saponin 농도에 따라 증가하였으며, 인삼 saponin의 최종 농도가 1×10^{-4} %일 때 lipoprotein lipase의 최대 활성도를 나타내었다.

그러나, albumin이 존재하지 않을 때는 인삼 saponin의 농도가 감소함에 따라 가수 분해도가 증가하는 경향을 나타내었다.

lipoprotein lipase의 활성화에 미치는 인삼 saponin의 영향은 albumin의 존재에 크게 영향을 받고 있었다.

한편, lipoprotein lipase의 활성화에 미치는 albumin의 최적 농도는 10^{-6} %일 때이고, Na-cholate의 최적 농도는 5 mM이었다.

문 헌

1. 주 충노, 최 임선, 이 상직, 조 성희, 손 명희, 한국생화학회지, 6, 185(1973).
2. Bligh, E.C. and W.Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911(1959).
3. Joo C. N. and J. H. Han, *Korean Biochem. J.*, **9**, 43(1976).
4. Nilsson-Ehle, P., A.S. Garfinkel and M. C. Schotz, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 667(1980).
5. C.B. Anfinsen, E. Boyle and R.K. Brown, *Science*, **115**, 583(1952).
6. D.S. Fredrickson and R.S. Gordon, *Physiol. Rev.*, **38**, 585(1958).
7. E.D. Korn, *J. Biol. Chem.*, **226**, 841(1957).
8. E.D. Korn, *Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris)*, **99**, 139(1961).
9. Weete, J.D., *Lipid Biochemistry of Fungi and other organisms* p. 146, Plenum Press, N.Y. (1980).
10. C.N. Joo and J.H. Han, *Korean Biochem. J.*, **9**, 237(1976).
11. Dole, V.P., *J. Clin. Invest.*, **35**, 150(1956).