

Peptinogen 分泌에 對한 分泌促進劑 抑制劑 및 人蔘 Saponin 의 相互作用

金世昌·陳承河·鄭魯八
(1986年 5月 26日 接受)

The Interaction of Ginseng Saponin with Secretagogues, Inhibitors and Its Relative Agents on Pepsinogen Secretion in Isolated Rabbit Gastric Glands

Sei Chang Kim, Seung Ha Jin and Noh Pal Jung

Department of Biology, College of Science, Yonsei University
(Received May 26, 1986)

Abstract

The pepsinogen secretion was stimulated by the cholecystokinin, caerulein, isoproterenol, and carbachol, respectively. But it was increased slightly and returned to control level by the combinations of total saponin with each above the agents.

Even though the atropine had the inhibition effect, the pepsinogen secretion was recovered to normal level from depressed condition by the combination of the atropine with total saponin. Propranolol showed the same pattern as atropine, too.

On the other hand, the pepsinogen secretion was stimulated by the DBcAMP alone, but decreased to control level by the combination with the total saponin. In the case of DBcGMP, the pepsinogen secretion was decreased by itself, but stimulated the above control level by the combination with total saponin.

Histamine alone had little effect on the pepsinogen secretion, but when combined with total saponin, the pepsinogen secretion was increased. Serotonin alone and with total saponin, had no effect respectively.

From the above results, the total saponin may have the normalization action stimulating or decreasing the pepsinogen secretion to the control level.

서 론

juice)내에 존재하는 효소를 pepsin 이라 명명하였으며 위액으로부터 pepsin 을 분리하였다. Ebstein 과 Grutzner³⁾는 proenzyme 이 존재함을 암시하였다. Langly 와 그의 제자들¹²⁾이 처음으로 pepsinogen 에 대하여 언급하기 시작하였다.

이러한 pepsinogen 은 주세포(chief cell)에서 분리된다(Heidenhain⁴⁾). Berglinth 와 Obrink¹⁾가 위선을 분리해내는 방법을 보고한 이후로 pepsinogen 의 분비에 대한 세포내 기작에 관한 연구 보고가 나오기 시작하였다.

한편 인삼은 소화기능을 조정하고 위의 식욕을 증진시키고 소화기능을 촉진시킨다고 하며 그리고 鄭등⁷⁾은 인삼성분이 pepsinogen 분비에 효과가 있다고 보고하였다.

본 실험은 단백질 분해 효소인 pepsin 을 선택하여 그 전구물질인 pepsinogen 의 분비를 촉진시키는 cholecystokinin, caerulein, isoproterenol, carbachol 등을 분비촉진제로, 그리고 이와 관련된 약품으로 인삼에 의해 유리 될 수 있는 serotonin, histamine 과 DBcAMP 등을 사용하여 인삼 saponin 과의 상호작용을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

사용한 재래종 흰토끼(*Lepus cuniculus L. Var. Domesticus Gmelin*)는 체중 1.5~2.5kg 을 선별하여 그 위점막층(gastric mucosal layer)을 사용하였다. 인삼(*Panax ginseng C. A.Mayer*)은 금산 인삼(4년근, 60편급)을 사용하였다. 시약은 Sigma 사와 Merck 사의 제품을 그리고 일반 용매는 Wako, Sanyo 의 GR 급 및 특급품을 사용하였다.

2. 방법

1) 인삼성분의 추출

Total saponin 의 추출은 Shibata *et al.*,¹⁷⁾과 Woo *et al.*,²⁰⁾의 방법에 따른 Jung 과 Kim⁷⁾의 방법을 이용하였다.

2) 동물처리

표준사료로 사육한 토끼를 ether 로 마취시킨 뒤 abdomen(복부)를 절개하여 복대동맥에 heparin(250 μ /ml) 5ml 를 혈류의 역방향으로 주사하고 1분후 장간막 혈관(mesenteric vessel)주위에 결찰을 설치하고 흉곽대동맥을 차단시켰다. 곧 바로 문맥을 열어놓고 37°C phosphate buffered saline(PBS)을 장간막 혈관에 흘려 보내어 gastric vessel 로 주입시켰다. 그리고 교환수혈이 다 되었을 때 위를 떼어내어 소만부를 따라 위를 절단한 후 내용물을 버리고 PBS 로 깨끗이 씻어내었다.

위선의 분리는 Berglinth 와 Obrink¹⁾의 방법을 사용하였다. 즉 분문부와 유문부를 버리고 점막층을 떼어내어 50ml collagenase enzyme solution 에 90분간 배양하여 위선을 분리하였다. 이 현탁액을 nylon mesh 로 여과하고 배양액으로 씻어내어 collagenase 를 제거하였으며 현탁액의 양을 1 mg dry wt/ml(30,000cells/ml)가 되게 조정하였다. 본 실험에서 사용한 각 용액의 조성은 다음과 같다.

a) 배양액(Incubation Medium) : pH7.6

132.4mM NaCl, 5.4mM KCl, 5.0mM Na_2HPO_4 , 1.0mM NaH_2PO_4 , 1.2mM MgSO_4 , 1.0mM CaCl_2 , 1.0mM pyruvate, 1.0mM dithiothreitol, 1.0mg/l phenolsulfonphthalein, 2.0mg/ml glucose, 2.0mg/ml bovine serum albumin

b) CES (Collagenase Enzyme Solution): pH 7.4

130.0mM NaCl, 12.0mM NaHCO_3 , 3.0mM NaH_2PO_4 , 3.0mM Na_2HPO_4 , 3.0mM K_2HPO_4 , 3.0mM MgSO_4 , 0.1mM CaCl_2 , 10mg/l phenol red, 1.0mg/ml collagenase type I, 1.0mg/ml rabbit albumin, 20mg/ml glucose

c) PBS (Phosphate Buffered Saline): pH 7.3

149.6 mM NaCl, 3.0mM K_2HPO_4 , 0.64mM NaH_2PO_4 .

3) Pepsinogen의 분비 측정

Hersey와 Schyberg⁶⁾의 방법을 수정하여 사용하였다. 요약하면 4ml 배양액에 1ml의 인삼성분 및 분비촉진제 1ml를 넣고 100% O_2 를 주입시키면서 30분간 37°C에서 배양하였다. 배양후 각 시험관을 10,000rpm에서 30초동안 원심분리하여 상층액 1ml을 0.1M HCl(pH 1.8) 2ml과 1% Hemoglobin 용액 5ml의 혼합액과 30분동안 작용시킨후 10% TCA 10ml로 반응을 정지시키고 10,000rpm에서 3분간 원심분리 한 후 상층액을 취해 spectrophotometer(Hitachi Model 200-20)을 사용하여 275nm에서 pepsin의 OD값을 측정하였으며 배양액으로 방출된 pepsinogen의 양은 배양후 pepsinogen의 양에서 본래의 pepsinogen의 양을 빼어 산출하였다. 시간의 경과는 2.5, 5, 10, 20, 30분으로 나누어 측정하였다.

4) Pepsinogen의 순수분리 검정

Laemmli¹¹⁾의 방법을 변형하여 vertical slab gel 전기영동장치로 polyacrylamide 상에서 전기영동하였다. non-denaturing polyacrylamide gel 전기 영동장치로 실행하였으며 12.5%의 acrylamide(Bio-Red Lab)가 함유된 running gel을 사용하였다.

5) Lactate dehydrogenase 활성 측정

준비된 현탁액에 Bergmeyer *et. al.*²⁾의 방법에 의하여 Pyruvate와 NADH를 기질로 340nm에서 효소활성을 측정하였다. 상층액을 반응액(0.6mM sodium pyruvate, 0.18mM Na_2NADH , 42.5mM K_2HPO_4 , 11.0mM KH_2PO_4 , 2.0mM NaHCO_3)에 첨가하여 5개의 시간대(2.5, 5, 10, 20, 30분)으로 나누어 37.5°C에서 배양후 LDH 활성을 측정하였다.

6) 단백질 정량

Lowry *et. al.*¹⁴⁾의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준시약으로 4개의 각기 다른 농도로 표준곡선을 작성하여 산출하였다.

실험 결과

1. 시간 경과에 따른 pepsinogen의 분비

시간대를 구분하여 total saponin($10^{-3}\%$)이 pepsinogen 분비에 미치는 영향을 관찰하였

는데 5분대에서 51.2%의 증가로 유의성이 있는 최고값을 나타내었다. 인삼을 처리하지 않은 대조군 수준으로 복귀하는 시간은 10분 이후부터인데 30분 이후부터 90분까지는 대조군의 수준과 거의 같았다. 즉 pepsinogen의 분비는 반응초기에 나타났지만 측정치는 5분대를 제외하고는 모두 유의성이 없었다 (Table 1).

Table 1. Effect of total saponin on pepsinogen release as function of time

	Pepsinogen release (mg/ml protein)	% to control	P-value
None	1.68 ± 0.21	100	
2.5 min	2.12 ± 0.35	126.2	P>0.2
5 min	2.54 ± 0.35	151.2	P<0.05
10 min	2.21 ± 0.37	131.5	P>0.2
20 min	2.08 ± 0.37	123.8	P>0.2
30 min	1.84 ± 0.31	109.5	P>0.2
60 min	1.68 ± 0.31	100.6	P>0.2
90 min	1.65 ± 0.22	98.2	P>0.2

Final concentration of total saponin used was $10^{-3}\%$.

2. Total saponin 과 peptide hormone 의 상호작용

Cholecystokinin(3×10^{-6} M), caerulein(10^{-6} M)과 total saponin($10^{-3}\%$)과의 상호작용은 Fig.1에서와 같이 total saponin은 peptide hormone의 작용을 억제하는 것으로 나타났다. 대조군에 비하여 peptide hormone 단독처리일때는 cholecystokinin은 42.5%, caerulein은 100%의 증가현상을 나타내었으나 total saponin을 복합처리하였을 때에는 대조군과 거의 같은 수준을 나타내었다.

3. Total saponin 과 non-peptide hormone 과의 상호작용

Fig.2에서와 같이 isoproterenol 및 carbachol 단독처리시에는 대조군에 비하여 각각 36.9% 및 42.3%까지 pepsinogen의 유의성있는 분비증가를 보였으나 total saponin과의 복합처리때에는 대조군의 분비 수준으로 감소하는 것을 보여 주었다.

4. Total saponin 과 억제제와의 상호작용

Fig.3에서와 같이 propranolol(10^{-5} M)의 경우 단독처리에서 약 100%의 유의성이 있는 pepsinogen의 분비감소를 나타내었다. total saponin과의 복합처리에서는 유의성이 있는 변화를 볼 수 없었다.

Atropine(10^{-5} M)의 경우에는 단독처리에서 약 15%의 유의성이 있는 분비감소를 나타내었다. 그러나 total saponin과의 복합처리에서는 유의성이 있는 변화를 볼 수 없었다.

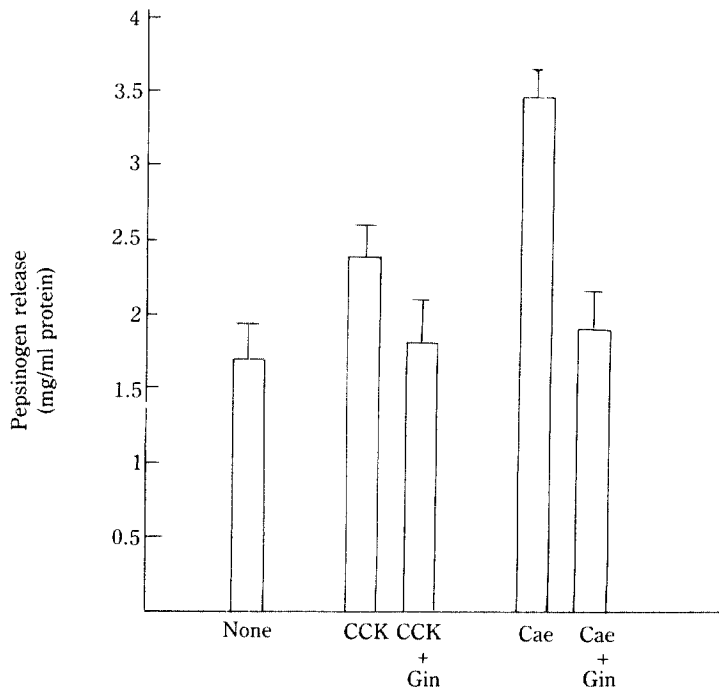


Fig. 1. Interaction of peptide hormones with total saponin. Glands were incubated for 30 min. Concentration of agents used was cholecystokinin (CCK, 3×10^{-6} M), caerulein (Cae, 10^{-8} M) and total saponin (Gin, $10^{-3}\%$).

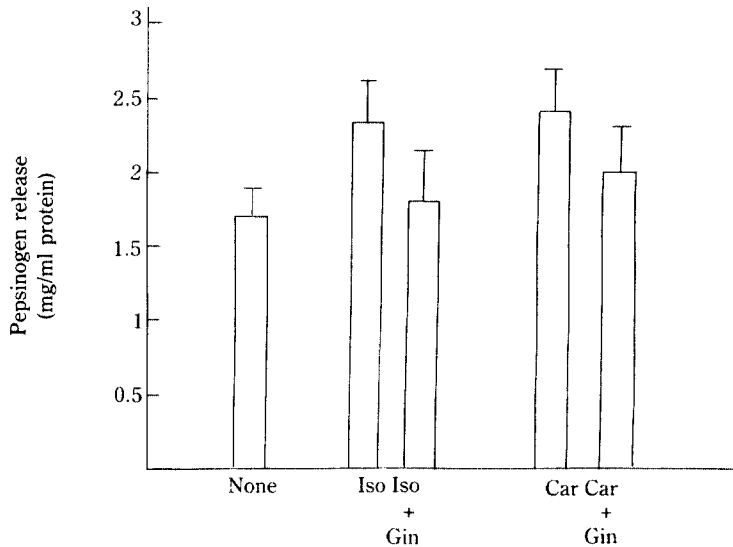


Fig. 2. Interaction of nonpeptide hormones with total saponin. Glands were incubated for 30 min under aeration. Concentration of agents used was isoproterenol (Iso, 10^{-8} M), carbachol (Car, 10^{-8} M) and total saponin (Gin, $10^{-3}\%$).

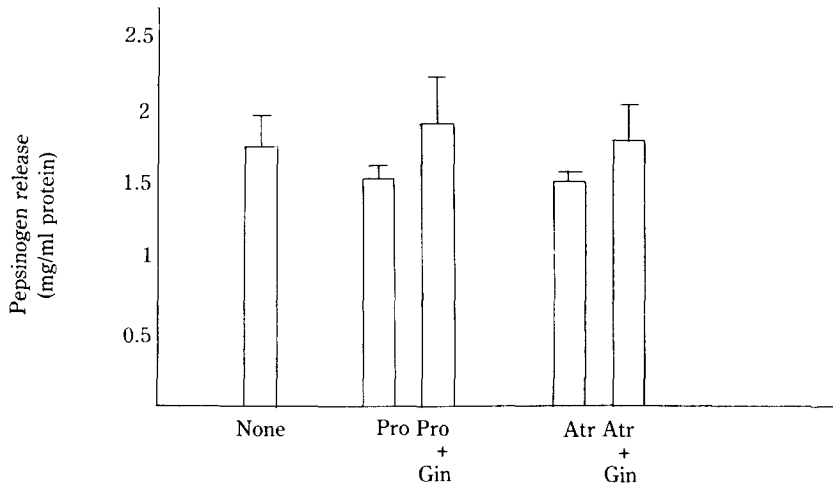


Fig. 3. Interaction of inhibitors with total saponin. Glands were incubated for 30 min in incubation medium containing propranolol (Pro, 10^{-5} M) and atropine (Atr, 10^{-5} M) respectively or combination with total saponin (Gin, 10⁻³%).

5. Total saponin 과 histamine, serotonin 과의 상호작용

Fig. 4와 같이 histamine(10^{-6} M) 단독처리는 대조군의 수준을 나타내었지만 total saponin 과 복합처리하였을 때는 약40%의 유의성이 있는 증가를 나타내었다. Serotonin 의 경우 단독처리 및 total saponin 과의 복합처리는 각각 26.8%, 10.7%의 분비증가를

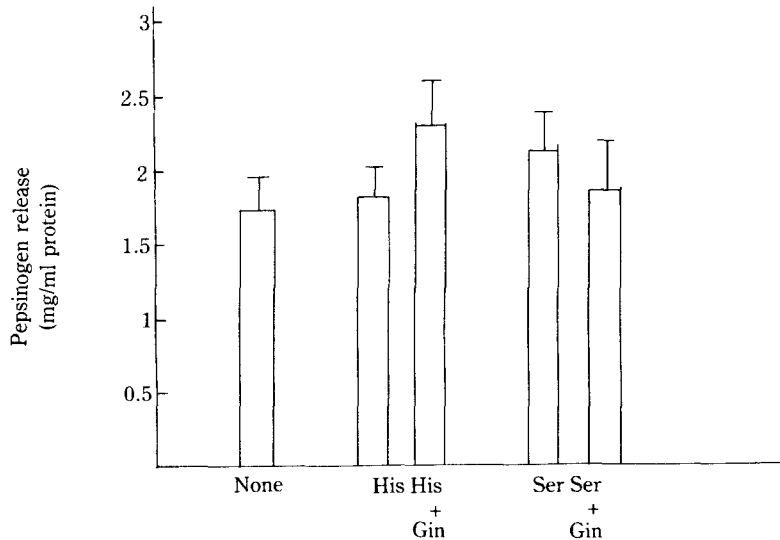


Fig. 4. Interaction of other drugs with total saponin. Glands were incubated for 30 min in incubation medium containing histamine (His, 10^{-6} M) and serotonin (Ser, 10^{-6} M) respectively or combination with total saponin (Gin, 10⁻³%).

나타내었지만 유의성은 없었다.

6. Total saponin 과 nucleotide 와의 상호작용

Fig.5와 같이 약 15%의 분비감소 현상을 일으킨 DBcGMP 의 경우는 대조군에 비하여 total saponin 의 복합처리는 38.1%의 유의성있는 증가현상을 나타내었다. 단독처리에 대한 복합처리의 변화율은 total saponin 처리시 62.2%의 증가현상을 보였다. DBcAMP 는 대조군에 비하여 34.5%의 유의성있는 증가를 나타내었다가 total saponin 을 복합처리하였을 때에는 단독처리의 경우에 비하여 약20%의 유의성 있는 감소현상을 나타내었다.

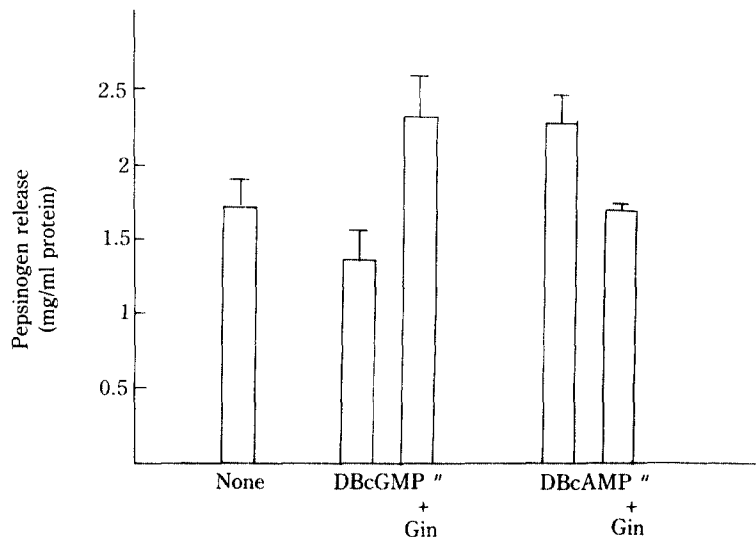


Fig. 5. Interaction of some nucleotides with total saponin. Glands were incubated for 30 min in incubation medium containing DBcAMP (10^{-3} M) and DBcGMP (10^{-3} M) respectively or combinations with total saponin (Gin, 10^{-3} %).

7. Lactate dehydrogenase 의 활성

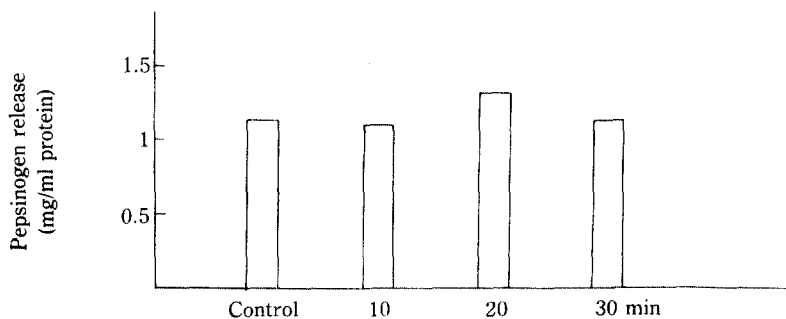


Fig. 6. Latate dehydrogenase (LDH) release by gastric glands. Control was not incubated. Activity of LDH checked at 340nm. n=2.

Peptide들이 손상된 세포에 의하면 비특이적으로 pepsinogen의 분비를 야기시킬 가능성이 있기 때문에 세포의 손상된 정도의 척도로써 lactate dehydrogenase의 방출을 측정하였는데 Fig. 6에서와 같이 10분, 20분, 30분까지 원래 위선세포가 가지고있던 lactate dehydrogenase의 양과 거의 같았다. 즉 세포의 손상으로 인한 간접적인 pepsinogen의 부수적인 방출은 없었다.

8. Pepsinogen의 순수분리 검정

Fig. 7에서와 같이 Sigma 회사에서 구입한 pepsinogen과 본 실험에서 추출된 pepsinogen의 전기영동에 의한 band가 같은 양상으로 나타났다. 이 실험에서 사용한 pepsinogen의 분리방법에는 이상이 없었다.

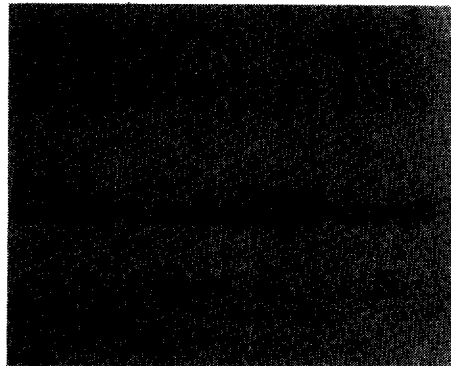


Fig. 7. Electrophoresis pattern of pepsinogen (PNG). After nondenaturing PAGE during purification gels containing 12.5% acrylamide were run according to Laemmli(1970) without sodium dodecyl sulfate and stain with Coomassie Brilliant Blue. 30 μ l for each lane were used. C; control from SIGMA, S; extracted PNG.

고 찰

최종농도 10⁻³%의 total saponin에서 pepsinogen의 분비는 table 1에서 처럼 반응초기에 속하는 5분대에서 최고값을 나타내었고 30분이후부터 90분까지는 대조군에 접근하였으므로 배양기간을 30분으로 결정하였다. 또한 배양 도중에 혹은 실험과정중에 야기될 수 있는 위점막 세포의 손상으로 인한 부수적인 pepsinogen 분비는 없었다(Fig. 6). 그리고 pepsinogen의 분리방법에도 이상이 없었음을 확인하였다(Fig. 7).

Peptide hormone인 cholecystokinin과 caerulein은 위선에서 pepsinogen의 분비에 상당한 효과가 있었는데(Hersey *et, al.*⁵⁾; Kasbekar *et, al.*⁸⁾ 본실험의 결과(Fig. 1)에서도

단독처리시 같은 양상을 나타내었으나 인삼을 복합처리한 경우에는 대조군의 수준으로 복귀현상을 나타내었다. Non-peptide의 경우(Fig. 2)에서도 isoproterenol과 carbachol의 pepsinogen 분비에 대한 효과도 복귀현상을 나타내었다. 일반적으로 isoproterenol은 adrenergic drug이며 carbachol은 cholinergic drug이다. 그러므로 인삼성분은 교감신경계와 부교감신경계에 정상화작용을 나타낼 수 있음을 암시하고 있다. 이것은 인삼이 위장운동의 촉진작용에는 부교감신경이 관여하지 않고 말초조직에 직접 작용한다는 '의 보고와 직접 비교할 수는 없지만 고려인삼 추출물은 토끼의 위편에 대하여 약한 흥분작용 및 억제작용을 일으킨다는 숲의 보고에서 볼 수 있는 인삼의 양면성과 관련을 갖는 작용일 것이다.

Fig. 3에서 isoproterenol의 작용을 차단하는 propranolol에 대하여 인삼성분은 대조군 수준으로 근접시켰으며 carbachol의 작용을 차단하는 atropine에서는 똑같은 대조군의 수준으로 상승작용을 나타내었다. β -adrenergic agonist인 isoproterenol은 효과적으로 위선을 자극시키는데 이 아드레날효능성 자극은 propranolol에는 영향을 받지만 atropine에는 억제받지않고(Hersey *et. al.*⁵⁾ 콜린효능성 약품들의 pepsinogen 분비의 자극은 atropine에 의해 억제를 받으므로(Kasbekar *et. al.*⁸⁾; Koelz *et. al.*; Sanders *et. al.*) 인삼성분들은 교감신경 흥분제는 억제현상을 나타내어 부교감신경 억제제 및 촉진제에 대하여 길항작용을 나타내고 있는 것으로 사료된다. 이것은 그림5에서의 DBcGMP와 DBcAMP에 대한 인삼성분이 같은 양상을 보이고 있다. DBcAMP는 pepsinogen 분비를 자극시키는데(Sanders *et. al.*¹⁵⁾; Soll *et. al.*¹⁶⁾ 인삼성분은 pepsinogen 분비에 한해서 DBcAMP와 DBcGMP, 이 두가지의 nucleotide에 대해서도 길항작용을 하고 있다고 사료된다.

Histamine은 pepsinogen의 분비에 영향이 없는데(Koelz *et. al.*¹⁰⁾ 인삼은 38.1%의 상승작용을 나타내었다. 이것은 인삼성분이 histamine의 유리성분(李 등)이외의 성분이 pepsinogen 분비에 작용하도록 하는 것으로 사료된다. Serotonin은 장의 운동 및 위장관 기관지의 평활근을 자극시키는데 인삼성분에는 기관지의 평활근을 이완시키는 항 histamine의 작용(하 등)이 있으나 pepsinogen의 분비에는 영향이 없으므로(Fig. 4) 인삼성분이 serotonin을 유리시키는 성분(Kim,⁹⁾; Lim,¹³⁾; Song,¹⁹⁾은 pepsinogen 분비에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

이상과같이 pepsinogen 분비를 촉진하는 isoproterenol, carbachol의 단독처리에는 상당히 유의성있게 분비증가를 일으켰지만 total saponin의 복합처리에는 대조군의 수준으로 복귀시켰다. 억제제인 propranolol, atropine은 인삼성분과의 복합처리에서는 역시 대조군의 수준으로 복귀시키는 것으로 보아 인삼성분들이 분리조직에서도 정상화작용이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 DBcGMP 단독처리는 분비를 억제시키지만 인삼성분과의 복합처리는 유의성있는 분비증가를 일으키며 DBcAMP의 단독처리는 유의성 있는 분비증가를 일으키지만 total saponin과의 복합처리는 오히려 대조군의 수준으로 복귀시키는 결과로 미루어 이 실험에서도 정상화작용의 일단을 볼 수 있었다. 단 DBcGMP와 인삼성분의 복합처리는 대조군 수준보다 상회하는 증가를 보이는데 이러한 현상을 일으키는 이유는 다른 연구에서 추구될 수 있으리라 본다.

引用文獻

1. Berglinth, T. and K. J. Obrink : *Acta. Physiol. Second.* **96**, 150 (1976).
2. Bergmeyer, H. U., E. Bernt, and B. Hess : In *Method of Enzymatic Analysis. New York: Academic.* pp. 736 (1965).
3. Ebstein, W. and P. Grutzner : In "Gillespie, A.L. *The natural history of digestion. London: Walter Scott, 1898 (1854).*"
4. Heidenhain, R. : *Arch. Mikroskop. Anat.* **6**, 368 (1870).
5. Hersey, S. J., M. Miller, and D. May : *Fed. Pro.* **41**, 1498 (1982).
6. Hersey, S. J. and D. Schyberg : *Am. J. Physiol.* 244, G192 (1983).
7. Jung, N. P. and S. C. Kim : *Kor. J. Zool.* **21(3)**, 79 (1978).
8. Kasbekar, D. K., R. T. Jensen, and J. D. Gardner : *Am. J. Physiol.* 243, G392 (1983).
9. Kim, Chul : *종합의학* 5, 1011 (1960).
10. Koelz, H. R., S. J. Hersey, G. Sachs, and C. S. Chew : *Am. J. Physiol.* 243, G218 (1982).
11. Laemmli, U. K. : *Nature* **227**, 680 (1970).
12. Langley, J. N. : *Phil. Trans. Roy. Soc., London, Ser. B*172, 664 (1881).
13. Lim, J. K. : *서울의대잡지* **4**, 9 (1863).
14. Lowry, O. H., N. J. Resebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
15. Sanders, M. J., D. A. Amirian, A. Ayalon, and A. H. Soll : *Am. J. Physiol.* 245, G641 (1983).
16. Schwann, T. L. : *Ann. Phys. Chem.* **38**, 358 (1836).
17. Shibata, S., O. Tanaka, T. Ando, M. Sado, S. Tsushima, and T. Oshawa : *Chem. Pharm. Bull.* **14(6)**, 595 (1966).
18. Soll, A. H., D. A. Amirian, L. Thomas, and A. Ayalon : *Gastroenterology* 82, 1184 (1982).
19. Song, W. K. : *대한생화학회지* 1, 93 (1964).
20. Woo, L. K., B. H. Han, D. S. Park, and W. L. Lah : *Kor. J. Pharmacog.* **4(4)**, 181 (1973).
21. Yoon, S. R. : *종합의학* **5(12)**, 73 (1960).
22. 高潤雄 : *大韓內科學會雜誌* **12(3)**, 187 (1969).
23. 金炳洵 : *中央醫學* **1**, 649 (1962).
24. 安光薰 : *中央醫學* **3**, 151 (1962).
25. 李宇柱, 張雲變, 李世珪 : *최신의학* **3**, 37 (1960).
26. 鄭魯八, 金世昌, 趙應行, : *延世論叢* **21**, 151 (1985).
27. 하중식, 이명호, 강두희 : *대한생리학회지* **11(2)**, 33 (1977).