

인삼이 칼륨결핍 흰쥐골격근의 소포체에 의한 칼슘 Uptake에 미치는 영향

金 洛 均·金 洛 斗·李 鍾 郁*

서울대학교 약학대학·*柳韓洋行 中央研究所

(Received May 25, 1986)

The Effect of Ginseng on the Calcium Uptake by Sarcoplasmic Reticulum Fragments Isolated from Potassium Deficient Rat Skeletal Muscles

Nak Kyun Kim, Nak Doo Kim and Jong Wook Lee*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151 and

*Yuhan Research Center, Yuhan Corp., 171, Korea

Abstract—The effect of orally administered ginseng ethanol extract on potassium deficient and normal rat skeletal muscles was investigated in terms of Ca uptake by sarcoplasmic reticulum fragments. The ginseng ethanol extract (100mg/kg/day) was administered orally to Sprague-Dawley rats for 21 days and their changes of body weights, K⁺ content in skeletal muscles, and calcium uptake capacity of sarcoplasmic reticulum of each groups were measured. The growth rate of rats fed with the potassium deficient diet was significantly decreased compared to that of normal rats. Ginseng components did not show any effect on the decreased growth rate of the potassium deficient rats. Potassium content in skeletal muscle from potassium deficient rats was significantly reduced compared to that of normal rats. Ginseng components showed the tendency to prevent the reduction in potassium content of potassium deficient rats, but differences were not statistically significant. Calcium uptake of SR prepared from skeletal muscles of potassium deficient rats was increased significantly compared to that of normal rats. Ginseng components prevented such increase of calcium uptake by 30%. In summary, it can be concluded that ginseng may prevent the increase in Ca uptake of SR obtained from potassium deficient rats.

인삼이 피로회복 및 운동능력 향상에 효과가 있다는 것은 오래전부터 알려져 있다.

Brekhman¹⁾ 등은 인삼을 투여한 흰쥐를 완전히 피로할 때까지 수영시켰을 때 대조군에 비해 수영시간이 연장되었으며 노동능력에 미치는 영향을 실험한 결과 인삼 투여군이 대조군보다 피로가 출현하는 시간이 확실히 연장되었다고 보고하였다.

Kim^{2,3)} 등은 인삼엑기스를 흰쥐에 경구투여한 후 이 흰쥐로부터 적출한 심장의 수축력을 관찰한 결과 인삼 투여군이 대조군에 비해 시간경과에 따른 수축력의 퇴화가 지연됨을 보고하였으며 Toh⁴⁾ 등도 유사한 결과를 보고한 바 있다.

일반적으로 인삼의 효과는 정상상태에서 보다 병적상태에서 보다 뚜렷한 효과를 나타내는

것으로 사료되고 있으므로 저자는 인위적으로 유발시킨 병태동물을 사용하여 인삼의 효과를 규명코자 하였다. 병적상태를 유발시키기 위한 방법으로는 칼륨 결핍을 택하였으며 체내 칼륨이 결핍되면 심근의 수축력이 약화되고 심박출량이 감소되어 울혈성심마비나 체위성 저혈압을 일으키며 골격근에서는 근육약화를 초래하여 건반사가 억제되고 피로성이 증대되는 것으로 알려져 있다.

한편 심근이나 골격근의 수축운동 시 Ca²⁺ 이온이 중요한 역할을 한다는 것은 이미 잘 알려져 있으며 sarcoplasmic reticulum은 Ca²⁺의 저장, 세포질 내로의 유리 및 회수에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{5,6,7)}

Lee⁸⁾ 등은 칼륨결핍 흰쥐의 심실근으로부터

분리한 SR에 의한 Ca-uptake량 증가가 인삼성분에 의해 억제되었다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 칼륨 결핍사료를 장기간 흰쥐에 섭취시켜 만성 칼륨결핍을 유발시키면서 동시에 인삼에탄올 엑기스를 경구투여하여 인삼이 칼륨결핍 골격근에 미치는 영향을 Ca-uptake 능력을 중심으로 관찰하고자 하였다.

실험 방법

실험재료—1) 정상사료—The Council of the American Institutes of Nutrition (AIN)의 ad hoc Committee에서 실험용 흰쥐 또는 마우스의 사료로 추천한 AIN-76TM purified diet (for rats and mice)의 처방^{8,9)}에 따라 조제하여 pelleter를 이용하여 직경 11mm의 pellet를 성형하여 사용하였다. 정상사료의 처방은 Table I과 같다.

2) 칼륨 결핍사료—정상사료와 동일한 처방으로 조제하되 칼륨원은 모두 옥수수 전분으로 대체하여 조제한 후 pellet로 하였다.

3) 인삼에탄올 엑기스—시중에서 구입한 금산산 4~5년근 백삼을 분쇄하여 70% 에탄올로 70°C에서 추출하고 이 추출액을 rotary evaporator에서 감압농축하여 분말상태로 조제한 것을

Table I—Formular of purified diet for rats and mice^a.

Ingredient	%
Casein ^b	20.0
DL-Methionine	0.3
Corn starch	15.0
Sucrose	50.0
Fiber ^c	5.0
Soy bean oil	5.0
AIN Mineral mixture ^d	3.5
AIN Vitamin mixture ^e	1.0
Choline bitartrate	0.2
	100.0

a; AIN-76 formular (the Council of American Institute of Nutrition), b; Feed grade casein containing at least 85% protein, c; cellulose type fiber, d; refer Table II, e; refer Table III.

Table II—Formular of vitamin mixture^a.

Vitamin source	per kg. mixture
Thiamine hydrochloride	600mg
Riboflavin	600mg
Pyridoxine hydrochloride	700mg
Nicotine amide	3g
D-Calcium pantothenate	1.6g
Folic acid	200mg
D-Biotin	20mg
Cyanocobalamin	1mg
Vitamin A	400,000I.U.
Vitamin E	5,000I.U.
Vitamin D ₃	100,000I.U.
Vitamin K (menadione)	5mg
Sucrose, finely powdered	to make 1.0kg

a; Based on the NAS-NRC recommended levels for rats* to be used at 1% of diet. *National Research Council (1972), Nutrient Requirements of Laboratory Animals No. 10, 2nd revised ed. National Academy of Sciences, Washington D.C., USA.

Table III—Formular of mineral mixture^a.

Mineral source	g/kg mixture
Calcium phosphate, dibasic (CaHPO ₄)	500.0
Sodium chloride	74.0
Potassium citrate, monohydrate ^b	220.0
Potassium sulfate ^c	52.0
Magnesium oxide (MgO)	24.0
Manganous carbonate (43~48% Mn)	3.5
Ferric citrate (16~17% Fe)	6.0
Zinc carbonate (70% ZnO)	1.6
Cupric sulfate	0.3
Postassium iodate (KIO ₃) ^d	0.01
Sodium selenite (Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O)	0.01
Chromium potassium sulfate ^e	0.55
Sucrose, finely powdered	to make 1.0kg

a; Based on the NAS-NRC requirements for rats. To be used at 3.5% of diet, b,c; Replaced by corn starch in the case of potassium deficient diet, d; Replaced by NaIO₃ in the case of K-deficient diet, e; Replaced by CrO₃ in the K-deficient diet

사용하였다.

4) 실험동물—체중이 150g 내외에 도달할 때까지 정상사료로 사육한 건강한 음성 Sprague-Dawley계 rat를 실험목적에 따라 다음과 같은 4개 군으로 나누어 사육한 후 실험에 사용하였다.

① 정상사료 투여군

정상사료를 3주동안 급식하였다.

② 정상사료+인삼엑기스 투여군

정상사료와 함께 인삼 에탄올 엑기스를 100mg/kg의 용량으로 3주동안 1일 1회 경구투여하였다.

③ 칼륨결핍사료 투여군

칼륨결핍사료를 3주 동안 급식하였다.

④ 칼륨결핍사료+인삼엑기스 투여군

칼륨결핍사료와 함께 인삼엑기스를 100mg/kg의 용량으로 3주동안 1일 1회 경구투여하였다.

실험방법—1) 체중에 미치는 영향실험—각 실험군의 흰쥐 체중을 3주동안 1주일 간격으로 측정하였다.

2) 골격근내 칼륨 함량에 미치는 영향실험—각 실험군의 흰쥐를 우레탄으로 마취시킨 다음 hind leg의 골격근을 700~1,000mg 정도 채취하여 항량이 될 때까지 105°C의 오븐에서 24시간 동안 건조시켰다. 건조된 조직시료를 유발과 유봉으로 분쇄하여 분말로 만든 다음 10배 용량의 에텔로 12시간 동안 지방을 추출해 냈으며 이 조작을 2회 반복하였다. 조직시료를 다시 건조시킨 다음 중량을 측정하여 fat free dry solids(FFDS)의 중량을 얻었다. 잔류물을 20ml의 0.75N-HNO₃에 넣고 24시간 동안 진탕한 후 상정액을 원심분리해 내었다.

각 시료로부터 3배의 시료를 만들어 시료 칼륨을 Atomic absorption flame photometer로 분석하였다.

3) 골격근에 의한 Ca-uptake에 미치는 영향실험—① Sarcoplasmic reticulum(SR)의 분리

각 실험군의 sarcoplasmic reticulum fragment는 Harigawa¹⁰ 등에 의한 방법과 Martonosi¹¹ 등에 의한 방법 및 Sulakhe¹² 등에 의한 방법을 참고로 하여 분리하였다.

흰쥐를 頭打하여 경동맥을 통해 혈액을 제거한

후 hind leg의 white muscle을 4g정도 채취하여 10배 량의 homogenization medium(10mM sodium bicarbonate, 5mM sodium azide, 15mM Tris-HCl buffer, pH6.9)에 넣고 가위로 잘게 썬 후 polytron(Type BT10)을 사용하여 20초 간격으로 20초씩 3회 homogenize 하였다. Homogenate를 10,000g에서 20분간 원심분리하여 미토콘드리아, 핵, 근원섬유, 세포파괴물을 제거하고 여기서 얻은 상정액을 네 점의 거어즈로 여과한 후 40,000g에서 45분간 원심분리하였다.

Pellet를 5배 량의 0.6M KCl을 함유하는 Tris-HCl(pH6.9) 용액에 테프론 유발로 현탁시켜 악토미오신을 용해시킨 뒤 이 현탁액을 다시 40,000g에서 45분간 원심분리하였다. 이렇게 하여 얻은 pellet를 0.6배 량의 50mM KCl을 함유하는 Tris-HCl(pH6.9) 용액에 현탁시키고 이 현탁액을 sarcoplasmic reticulum 분획으로 하였으며 이

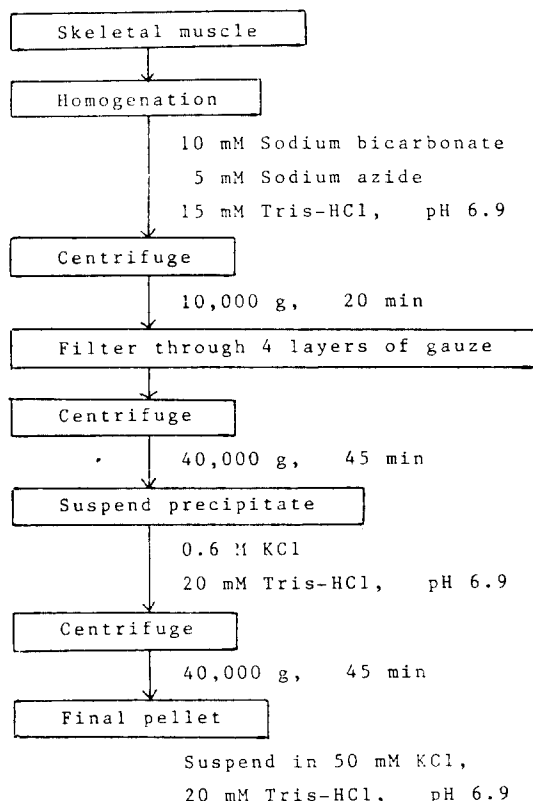


Fig. 1—Fractionation of sarcoplasmic reticulum fragments from rat skeletal muscle.

분획의 단백질 농도는 소 혈청 알부민을 표준으로 사용하여 Lowry¹³⁾법에 의해 측정하였다.

② SR 분획의 Ca-uptake 능력 측정실험 각 실험군에서 분리한 SR 분획의 Ca-uptake 능력은 분리 당일에 Schwarz¹⁰⁾ 및 Sulakhe¹²⁾의 방법으로 milipore filter(pore size 0.45 μ m)를 이용하여 측정하였다.

즉 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 5mM Sodium oxalate, 20mM Tris-HCl buffer(pH6.9), 4mM Tris-ATP, 0.1mM CaCl₂(⁴⁵CaCl₂, 0.03 μ Ci/ml) 조성의 medium에 SR-protein(30~60 μ g/ml)을 가하고 전체 용량을 5ml가 되게 하였다.

Tris-ATP를 제외한 나머지 반응 media를 시험관에 넣고 37°C 수욕 상에서 1분간 前배양한 다음, Tris-ATP를 가하여 반응을 시작시키고 계속 배양하면서 Tris-ATP를 가한 시간으로부터 1, 5, 10 및 20분 후에 각각 1ml의 medium을 autopipette으로 취하여 멤브레인 필터를 통과시켰다. 여지 위의 단백질에 uptake되지 않고 결합되어 있는 Ca²⁺를 제거하기 위하여 1mM EGTA 용액으로 2~3차례 세척해 준 후 여지위의 단백질에 uptake된 ⁴⁵Ca²⁺의 방사능을 liquid scintillation counter(Packard Model 3255)로 측정하였으며 이때 Bray's soln을 scintillation cocktail로 사용하였다.

Ca-uptake량은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{Ca-uptake}(\mu\text{mol/mg protein}) \\ &= \frac{\text{Control cpm} - \text{experiment cpm}}{\text{Control cpm} - \text{background}} \\ & \times \frac{\text{media중 Ca량}}{\text{media중 protein량}} \end{aligned}$$

Table IV—Body weights of normal and treated rats.

Experimental groups	No. of Animals	Changes of Body weight			
		0	1	2	3(Week)
Normal diet	12	150.1 \pm 6.5	186.5 \pm 8.9	206.3 \pm 9.7	223.5 \pm 11.1
Normal diet + Ginseng ethanol extract	8	151.5 \pm 5.3	188.4 \pm 7.6	209.1 \pm 8.8	238.3 \pm 9.7
K-deficient diet	10	158.5 \pm 6.0	160.1 \pm 7.2	162.7 \pm 8.6	**166.6 \pm 8.9
K-deficient diet + Ginseng ethanol extract	8	156.4 \pm 5.5	161.2 \pm 6.1	168.7 \pm 6.9	**177.3 \pm 7.4

*Data are given as Mean \pm S.D., **p<0.001(Compared with normal diet group)

실험 결과

체중에 미치는 영향—각 실험군의 체중은 Table IV와 같다. 정상사료를 투여한 군은 계속 성장하는 데 반하여 칼륨결핍사료를 투여한 군은 극히 완만한 체중증가를 보였으며 정상사료와 인삼엑기스 투여군은 정상군과 비슷한 양상을 보였고 칼륨결핍사료와 인삼엑기스 투여군은 칼륨결핍사료 투여군에 비해 약간 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. 3주 후의 체중증가를 보면 정상사료 투여군은 48.9%가 증가하는데 비해 칼륨결핍사료 투여군은 4.8% 증가하여 정상군에 비해 현저한 차이를 보였으며 이 두 군에 인삼엑기스를 투여한 군은 각각 57.3%와 13.4%로 증가했으나 유의성은 없었다.

골격근 내 칼륨 함량에 미치는 영향—각 실험군의 골격근내 칼륨함량은 Table V에서 보는 바와 같이 정상사료 투여군이 491 \pm 11mmol/kg·FFDS인데 비해 칼륨 결핍사료 투여군의 경우는 375 \pm 21mmol/kg·FFDS로 정상군보다 24% 정도 낮은 수준을 보였으며 칼륨결핍사료+인삼엑기스 투여군은 390 \pm 14mmol/kg·FFDS로 칼륨결핍사료 투여군에 비해 약간 높은 수준을 보였으나 유의성은 없었다. 정상사료+인삼엑기스 투여군은 495 \pm 18 mol/kg·FFDS로 정상사료 투여군과 비슷한 수준을 보였다.

골격근의 SR에 의한 Ca-uptake에 미치는 영향—각 실험군의 골격근으로부터 분리한 SR의 Ca-uptake 능력을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

정상사료 투여군의 SR Ca-uptake량은 1, 5,

Table V—Potassium content of skeletal muscle from normal and treated rats.

Experimental groups	No. of animals	Potassium concentration (mmol/kg of fat-free dry solid)
Normal diet	10	491±11
Normal diet+Ginseng ethanol extract	8	495±18
K ⁺ -deficient diet	10	**375±21
K ⁺ -deficient diet+Ginseng ethanol extract	8	**390±14

*Data are given as Mean±S.D., **p<0.005

10 및 20분 경과 후에 각각 304.3±19.5, 361.8±17.8, 360.1±20.8, 427.5±18.0nmole/mg protein이었으며 칼륨결핍사료 투여군의 경우는 각각 607.1±30.8, 666.2±30.0, 685.9±35.5, 730.6±46.8n mole/mg·protein으로서 정상사료 투여군에 비해서 유의성(p<0.001)있는 증가를 보였다.

칼륨결핍사료+인삼메탄올 엑기스 투여군의 SR Ca-uptake량은 각각 468.7±33.3, 520.5±34.4, 592.±36.0, 629.7±38.6nmole/mg·protein

으로 정상 수준에는 미치지 못했지만 칼륨결핍을 투여한 군에 비해서는 30%정도 감소를 보였다. 정상사료+인삼엑기스 투여군은 각각 317.9±22.6, 372.1±22.4, 435.7±25.4, 447.7±21.6nmole/mg·protein으로서 정상사료 섭취군과 비슷한 양상을 보였다.

고 찰

Irvine¹⁴⁾ 등은 흰쥐에 칼륨결핍사료를 만성적으로 섭취시켰을 때 심근의 조직내 칼륨농도는 5% 정도 감소한데 비해 골격근의 칼륨농도는 31.7%가 감소했다고 보고하였으며 Hall¹⁵⁾ 등도 토끼에 칼륨결핍사료를 3주간 투여했을때 골격근의 조직내 칼륨농도는 20%정도 감소했으나 심근의 조직내 칼륨농도는 거의 정상유지한다고 보고하였다. 본 실험결과에서도 골격근의 조직내 칼륨농도는 칼륨결핍사료 투여군이 정상사료 투여군에 비해 24%정도 감소하였으며 칼륨결핍사료와 인삼엑기스를 병용투여한 군은 칼륨결핍사료만을 투여한 군에 비해서 약간 증가하였으나 유의성은 없었다. 이 점으로 보아 인삼성분이 칼륨원은 될 수 없다고 일단 추정할 수 있을 것이다.

한편 SR에 의한 Ca-uptake 능력에 있어서는 칼륨결핍사료 투여군이 정상사료 투여군에 비해서 현저히 증가하였는데 골격근에 있어서 세포내 K⁺ 레벨이 떨어지면 상대적으로 Na⁺ 이온의 농도가 증가하므로 이때 증가된 Na⁺ 이온에 의해서 Ca²⁺-Na⁺ carrier를 통한 교환 메카니즘¹⁶⁻¹⁸⁾이 더욱 활발해져 세포내로의 Ca-유입이 증가하고 이러한 세포질내의 Ca농도 증가에 대한 보상반응으로 SR에 의한 Ca-uptake가 증가하였

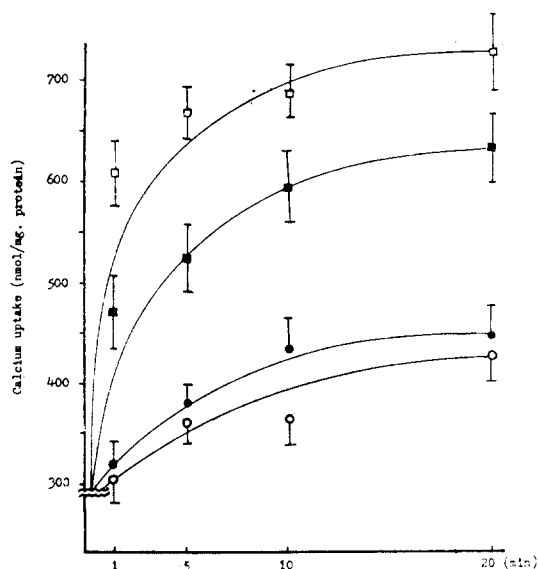


Fig. 2—Calcium uptake by skeletal sarcoplasmic reticulum prepared from control and treated rats.

- : K-deficient diet,
- : K-deficient diet+Ginseng ethanol extract,
- : Normal diet+Ginseng ethanol extract,
- : Normal diet

다고 추측할 수 있다. 또 칼륨 결핍시 세포내의 pH가 감소하므로 이때 증가된 H^+ 과 Ca^{2+} 과의 교환이 증가될 것으로 생각할 수도 있겠지만 세포막을 통해 이동되는 Na^+ 과 K^+ 의 양에 비해 H^+ 의 이동은 극히 적은 양에 불과하고 세포내 pH변동의 원인이 아직 분명히 밝혀지지 않았기 때문에 이점에 관해서는 단언하기 어렵다.

세포막 당단백질 기질의 말단 당류인 sialic acid는 그 side chain이 Ca^{2+} 이온과의 결합에 관여하여 세포내외로의 Ca의 수송에 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 시사되고 있는데¹⁴⁻²¹⁾ Lee⁶⁾는 칼륨결핍사료를 섭취한 흰쥐에서 심실근 세포막의 sialic acid 함량이 대조군에 비해 감소되었다고 보고한 바 있다. 이러한 결과로 미루어 볼때 칼륨결핍으로 인한 근섬유막의 기능저하로 다량의 Ca^{2+} 이 세포내로 유입되어 세포질내의 Ca의 농도가 높은 상태로 유지되고 결과적으로 SR의 Ca-uptake가 증가한 것으로 추측할 수 있다. 그러나 이 결과는 심근막을 대상으로 한 것이고 심근의 경우 칼륨결핍시 Ca-uptake 능력이 오히려 저하되었다는 보고도 있으므로 명확하지 않다.

한편, 인삼성분에 의해 Ca-uptake양의 증가가 억제되는 점으로 미루어 볼 때 인삼은 세포막을 통한 이러한 이온들의 이동에 어떠한 영향을 미칠 것으로 여겨지는데 이 점에 관해서는 앞으로 좀더 많은 연구가 필요할 것이다.

결 론

흰쥐에 칼륨결핍사료를 투여하여 칼륨결핍을 유발시키면서 동시에 인삼에탄을 엑기스를 경구 투여하여 체중증가에 미치는 영향, 골격근내 칼륨농도, sarcoplasmic reticulum의 calcium uptake에 미치는 영향등을 관찰하였다.

1. 칼륨결핍사료 투여군의 체중증가는 정상외의 경우에 비해 현저히 감소하였으며 인삼성분은 체중증가에 별 영향을 미치지 못했다.

2. 칼륨결핍사료 투여군의 골격근내 칼륨 농도는 정상외의 경우에 비해 현저하게 감소하였으며 인삼성분은 칼륨농도 감소를 약간 억제하였으나 유의성은 없었다.

3. 칼륨결핍사료 투여군의 골격근으로부터 분리한 sarcoplasmic reticulum의 calcium uptake량은

정상외의 경우에 비해 유의성있게 증가하였으며 인삼성분은 calcium uptake량의 증가를 억제하였다.

문 헌

- 1) Brekhman: 중앙전매기술연구소, 인삼문헌특집 4, 165(1971).
- 2) Kim, N.D., Kim, C.K. and Kim, B.K.: *Yakhak Hoeji*, 21, 15 (1980).
- 3) Kim, N.D., Kim, B.K. and Lee, H.S.: *Yakhak Hoeji*, 26, 239 (1982).
- 4) Toh, H.Y., Koh, T.Y. and Ong, K.K.: 4th Asian Symposium on Medicinal Plants and Species, 971 (1980).
- 5) Pitts, P.J.R. *J. Biol. Chem.* 254, 6232 (1979).
- 6) Drummond, G.E.: *Recent Adv. Stud. Card. Struct. Metab.* 4, 195 (1974).
- 7) Tada, M., Yamamoto, T., Tonomura, Y.: *Physiol. Rev.* 58, 1 (1978).
- 8) Lee, J.W. and Kim N.D.: Effect of Ginseng Components on the Potassium Depleted Cardiomyopathic Rats and It's mechanism of action. *Arch Pharm. Res.* 8, 49 (1985).
- 9) Anonymus: *J. Nutr.* 107, 1340 (1977).
- 10) Schwarz, A. and Harigaya, S. *Circ. Res.* 25, 781 (1969).
- 11) Martonosi, A. and Feretos, R.: *J. Biol. Chem.* 239, 648 (1964).
- 12) Sulakhe, P.V. and Dhalla, N.S.: *J. Clin. Invest.* 50, 1019 (1971).
- 13) Lowry, O.H., Rosebrough, N.I., Farr, A.L. and Randal, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- 14) Irvine R.O. and Dow, J.W.: *Austral. Annal. Med.* 17, 206 (1978).
- 15) Hall, R.J.C. and Cameron, I.R.: *Clinical Science*, 60, 441 (1981).
- 16) Feldman, O.A. and Weinhold, P.A.: *Biochem.* 16, 3470 (1977).
- 17) Amand, M.B., Chauhan, M.S. and Dhalla, N.S.: *J. Biochem.* 82, 1731 (1977).
- 18) Dhalla, N.S., Amand, M.B. and Harrow, J.A.C.: *J. Biochem.* 79, 1345 (1976).
- 19) Shea, S.M.: *J. Cell. Biol.* 51, 611 (1971).
- 20) Shlatz, L. and Marinetti, G.V.: *Biochim. Biophys. Acta*, 290, 70 (1972).
- 21) Ishiyama, Y., Yabu, H. and Miyazaki, E.: *Jap. J. Physiol.* 25, 719 (1975).