

인삼사포닌 분획이 동물체(쥐)내에서의 에탄올 대사에 미치는 영향

곽한식·주충노

연세대학교 이과대학 생화학과

(1988년 6월 1일 접수)

Effect of Ginseng Saponin Fraction on Ethanol Metabolism in Rat Liver

H.S. Kwak and C.N. Joo

Department of Biochemistry, College of Science Yonsei University

(Received June 1, 1988)

Abstract

The rats were fed with 12% ethanol with and/or without 0.1% ginseng saponin instead of water for 6 days, and the acetaldehyde level of liver and serum, and $[NAD^+]/[NADH]$ and $[NADP^+]/[NADPH]$ ratios of the liver were investigated.

Acetaldehyde level of ethanol fed group (control) in liver and serum was much higher than not-ethanol fed group (normal), but that of ginseng saponin containing ethanol fed group (test) was only slightly higher than that of normal group. Decrease of $[NAD^+]/[NADH]$ ratio of test group was also much greater than that of control group.

Distribution of the radioactivity in hepatic lipids after the $[1-^{14}C]$ -ethanol feeding intraperitoneally was investigated 30 minutes later. It was found that total radioactivity of the hepatic lipids of test group was much lower than that of control group. Analysis of individual lipids such as phospholipids, cholesterol, fatty acid and triglycerides showed that the depression of phospholipid biosynthesis and increase of fatty acid and triglycerides caused by ethanol feeding were significantly recovered by the co-feeding of ginseng saponin.

서 론

Ethanol은 섭취량에 따라 간 대사에 여러가지 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 단시간에 과량의 ethanol을 섭취하면 간의 여러가지 기능 즉 지질 산화나 소포체에서의 약물대사 등이 방해를 받게 되고, 만성적으로 ethanol을 섭취하면 적응성이 생겨 초기에는 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)이 유발되어 ethanol 및 약물의 대사가 증가하고 지단백질의 생성이 가속화되지만, 지속적인 ethanol 섭취는 간 세포의 손상을 가져온다. 과량의

ethanol 섭취가 유해한 것은 ethanol 그 자체보다는 산화과정에서 생성된 acetaldehyde와 과량의 수소(NADH)에 기인한다.

Ethanol 산화로 생성된 대부분의 acetaldehyde는 acetate로 산화되지만 acetaldehyde 농도가 16mM 이상일 때는 생성된 acetaldehyde의 약 60% 정도가 대사되지 못하고 간 세포에 남아있게 된다. Acetaldehyde는 간 세포에 극히 유해한 물질로서 미토콘드리아의 기능을 저해하여 만성적인 ethanol 섭취 시 유발되는 질병인 간염이나 간경변증 등의 근본적인 원인이 될 뿐만 아니라 aldehyde dehydrogenase의 활성을 감소하고 비타민의 활성화를 저해하여 혈중 비타민의 양을 강하시키고 심장의 근육 단백질의 합성도 억제한다¹⁾. 뿐만 아니라 간의 다른 조직 특히 뇌에도 유해한 영향을 미친다고 한다²⁾.

과량의 NADH는 간 세포의 화학적 평형을 저해하고 대사 이상을 초래한다. 예를 들면 pyruvate가 glucose로 합성되는 대신 lactate로 환원되어 혈액내의 당의 농도를 감소시키고(hypoglycemia) lactate 농도가 증가되어 lactic acidosis가 유발되며 이로인해 신장에서의 요산 배출이 억제되어(hyperuricemia) 통풍(gout)의 원인이 되기도 한다. 또한 과량의 수소는 직접 또는 간접적으로 지방산의 합성에 관여하여 지질, 지방 등을 형성함으로써 지방간(fatty liver)이라는 병리적 현상을 초래한다.

따라서 ethanol의 체내 대사에 관한 연구는 ethanol 섭취로 인한 여러가지 대사 이상 및 질병과의 관계를 이해하는데 중요하며 간으로부터 acetaldehyde와 과량의 NADH를 신속히 제거한다는 것은 ethanol의 유독성으로부터 간을 보호한다는 점에서 중요한 의미를 갖는다.

본 연구실에서는 인삼의 주성분인 사포닌에 대한 연구의 일환으로, ethanol 대사에 미치는 인삼사포닌의 영향을 여러 각도로 연구하여 보고한 바 있으며, 적당량의 인삼사포닌은 alcohol dehydrogenase 뿐만 아니라 ALDH 및 microsomal ethanol oxidizing system 등의 활성도 촉진한다는 것을 관찰하였다³⁻⁷⁾.

본 연구에서는 인삼사포닌이 ethanol 대사의 주요 생성물인 acetaldehyde의 간과 혈액에서의 농도 변화에 미치는 영향, $[NAD^+]/[NADH]$ 비에 미치는 영향 및 지질로의 전환에 미치는 영향 등을 조사하였다.

실험재료 및 방법

1. 시 약

lactate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, 소혈청 albumin(BSA), nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form(NAD^+), reduced form(NADH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized form($NADP^+$), reduced form(NADPH), lactate(sodium salt), α -ketoglutarate(sodium salt), glutamate(sodium salt), isocitrate(sodium salt)는 Sigma사 제품, 콜레스테롤은 Merck, 2,5-diphenyloxazol(PPO), 1,4-bis(phenyl-2-oxazole)-benzene(POPOP)는 Fisher, $[1-^{14}C]$ -ethanol은 New England Nuclear사 제품을 사용하였다.

2. 인삼사포닌 분획의 분리

林 등⁸⁾의 방법에 따라 금산産 인삼(4년근, 백삼, 300g당 50편급 뿌리) 분말 100g에 chloroform 500 ml를 가하여 40°C에서 1시간 가열하여 지질을 제거하는 조작을 3회 되풀이하여 얻은 분말에 methanol 500 ml를 가하여 60°C에서 가열 추출하는 조작을 세번 되풀이 한

후 얻은 methanol 용액을 감압농축하여 7g의 methanol 추출물을 얻었다. 이것을 20% methanol 14 ml에 녹여 Amberlite XAD-2 column에 흡착시키고, 용출액의 색이 없어질 때까지 계속 증류수(유속 20 ml/min)를 통과시켜 불순물을 제거한 후 99% methanol 용액(유속 10 ml/min)으로 흡착된 사포닌을 용출하였다. 이 용출액을 감압농축하여 1.6g의 황백색 사포닌 혼합물을 얻었다. 이 사포닌 혼합물의 silica gel thin layer chromatogram[전개용매; chloroform-methanol-H₂O[14:16:1, v/v/v]에서 Rf치가 0.22와 0.27인 것이 가장 많았고, Rf치가 0.43, 0.41, 0.36, 0.34, 0.20, 0.17인 것이 그 다음, Rf치가 0.71, 0.65, 0.59, 0.52인 것이 가장 적었다. 본 실험에서는 이것을 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

3. 실험동물

본 실험에 사용한 흰쥐(Wistar, ♂, 150~250g)는 모두 정상사료[제일 사료사제품, 성분: crude protein above 19.6%, crude cellulose below 7.0%, crude ash below 9.0%, Ca below 0.6%, P below 0.4%, DCP above 16.5%, TDN above 7.3%, 항생물질 below 50 ppm]로 사육하였다.

Wistar계의 쥐 18마리를 6마리씩 세군으로 나누어 제 1군은 정상사료와 물(자유접근), 제 2군은 물대신 12% ethanol, 제 3군은 0.1% 인삼사포닌을 포함한 12% ethanol로 6일간 사육한 후 각 군의 간에서의 [NAD⁺]/[NADH] 비를 측정하였으며 ethanol의 지방질로의 전환에 관한 인삼사포닌의 영향을 조사한 실험에서는 위와같이 6일간 사육한 후 쥐에게 5 μCi의 방사성 [1-¹⁴C]-ethanol을 포함한 10% ethanol(1 ml)을 복강주사하고 30분 후에 간을 채취하였다.

4. 세포 성분의 분리^{9,10)}

실험동물(쥐)의 심장에서 직접 혈액을 채취하고, 간은 가위로 잘게 썰어 10 mM Tris-HCl buffer를 함유한 0.25 M sucrose 용액으로 10% (w/v) 파쇄액을 만든 후 500×g에서 10분간 원심분리하여 핵과 세포 부스러기를 제거하고 상층액을 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 침전물을 일정 부피의 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 함유한 0.25 M sucrose 용액에 분산하여 미토콘드리아 분획을 만들었다. 상층액을 다시 12,000×g에서 15분간 원심분리하여 리소솜을 제거한 후 상층액을 105,000×g에서 30분간 초원심분리하여 세포질 분획(상층액)을 얻었고 침전물은 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 함유한 0.15 M KCl 용액에 분산한 후 다시 초원심분리(105,000×g, 30분)하여 얻은 침전물을 일정부피의 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 함유한 0.15 M KCl 용액에 분산시켜 마이크로솜 분획을 만들었다. 이 모든 과정을 4°C 이하에서 진행하였다.

5. 효소의 활성 측정

1) Alcohol dehydrogenase (E.C. 1.1.1.1)의 활성 측정¹¹⁾

반응액[조성(최종농도): 48 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.6), 0.8 mM NAD⁺, 효소원 0.1 ml]에 3 mM ethanol을 가하여(최종부피 1 ml) NADH 생성에 따른 흡광도의 증가를 340 nm에서 측정하였다.

2) Aldehyde dehydrogenase (E.C. 1.2.1.3)의 활성 측정¹²⁾

반응액[조성(최종농도): 70 mM sodium pyrophosphate buffer (pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 2 mM pyrazole, 효소원 0.1 ml]에 acetaldehyde(최종농도: 효소의 ALDH는 6 mM, 쥐 간의 마이크로솜의 ALDH는 1 mM)를 가하여(최종부피 1 ml) NADH의 생성에 따른 흡광도의

증가를 340 nm에서 측정하였다.

3) Microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)의 활성 측정¹³⁾

Center well에 15 mM semicarbazide-HCl을 함유한 0.16 M phosphate buffer(pH 7.4) 0.6 ml를 넣고 main vessel에는 3 ml의 반응 혼합액[조성(최종농도): 1.0 mM sodium EDTA, 1.0 mM sodium azide, 1.14 M ethanol, 여러가지 농도의 인삼사포닌, 마이크로솜 분획]을 넣어 37°C에서 10분간 preincubation한 후, NADPH를 0.4 mM 되도록 가하고 flask를 밀폐한 다음, 다시 15분간 incubation하였다. side arm에 넣은 70% TCA(0.6 ml)로 반응을 정지시킨 후 12시간 동안 방치한 다음 center well에 흡착된 acetaldehyde의 양을 spectrophotometer(Shimadzu UV-240)을 사용하여 220 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

4) Aldehyde oxidase(E.C 1.2.3.1)의 활성 측정¹⁴⁾

반응액[조성(최종농도): 50 mM pyrophosphate buffer(pH 7.8), $5 \times 10^{-3}\%$ EDTA, 0.04 mM 2,6-dichlorophenol-indophenol, catalase(200 unit), 10 mM allopurinol, 0.3 M ethanol, 효소원 0.1 ml]에 20 mM acetaldehyde를 가하여(최종부피 3 ml) 2,6-dichlorophenol-indophenol의 환원에 따른 흡광도의 감소를 620 nm에서 측정하였다.

6. 간과 혈액에서의 acetaldehyde의 정량

간의 세포 균질액과 각 세포 분획 10 ml에 미리 냉각시킨 0.6 N HClO₄ 6 ml를 가하여 흔들어 주고 30,000×g에서 10분간 원심분리하여 침전된 단백질을 제거하고 상층액에 미리 냉각된 2 N KOH를 가하여 pH 5~6 정도로 조정한 후 KClO₄ 침전물을 원심분리하여 제거한 상층액을 분석시료로 사용하였다. 혈액은 4°C에서 30분 정도 방치한 후 원심분리하여 상층액(serum)을 취하고 이렇게 얻은 serum 1 ml에 미리 냉각시킨 0.6 N HClO₄ 1 ml를 가하여 흔들어 준 후 위와 같은 방법에 의하여 단백질이 제거된 분석용 시료를 얻었다. 이 모든 과정을 4°C 이하에서 진행하였다. 이와같이 조제한 시료를 함유한 반응액[조성(최종농도): 16.7 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2), 0.1 mM NADH, 시료 0.1 ml]의 340 nm에서의 흡광도를 측정하고 이 반응액에 120 units/ml(최종농도)의 효모 ADH를 가하여(최종부피 1.5 ml) 20분간 상온에서 반응시킨 후 340 nm에서의 흡광도의 감소를 측정하여 acetaldehyde의 농도를 계산하였다. 표준용액으로는 여러가지 농도(0 μM, 10 μM, 20 μM, 30 μM, 40 μM, 50 μM)의 acetaldehyde 용액을 사용하였다.

7. 지방질의 추출^{15,16)}

각 세포 분획에 methanol-chloroform(2:1, v/v)을 가하고 흔들어 추출한 후 원심분리하여 얻은 상층액과 이 때 생성된 침전물을 다시 methanol-chloroform-H₂O 혼합액(2:1:0.8, v/v/v)에 분산시켜 흔들어 추출한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 합하여, 이 혼합액의 methanol-chloroform-H₂O의 비율이(1:1:0.9, v/v/v)가 되도록 chloroform과 H₂O를 가한 후 원심분리(또는 장시간 방치)하여 두 층으로 분리한 다음 chloroform 층(하층)을 회수하여 감압농축한 후 일정 부피의 용액을 만들어 지방질 시료로 사용하였다.

8. 지방질의 박층크로마토그래피(TLC)^{17,18)}

지방 시료는 petroleum ether-ethyl ether-acetic acid(70:30:1, v/v/v)을 사용하여 silica gel TLC를 행하였다. I₂ 증기를 사용하여 지방질 분획을 확인한 후 표준물질과 일치하는 부분을 긁어내고 chloroform-methanol(2:1, v/v)로 추출하여 감압농축한 후 일정부피의

chloroform 용액을 만들고 방사능 측정과 각종 지방질의 정량용 시료로 사용하였다. 사용한 TLC 판은 Merck제 precoated TLC plate(5×20)silica gel 60 F-254였다.

9. 중성지방(triglyceride)과 인산지방질의 정량¹⁹⁾

지방질 추출물을 TLC로 분리하여 얻은 triglyceride와 인산지방질 분획을 Biggs 등¹⁹⁾의 방법에 따라 정량하였다. 각 지방질 추출 분획 0.2 ml에 28 mM sodium methoxide-80% isopropanol 용액 2 ml를 가하고 60°C에서 5분간 가온처리한 후 1 M ammonium acetate와 1 M glacial acetic acid를 함유한 3 mM sodium metaperiodate 용액 1 ml와 73 mM acetylacetone-isopropanol 용액 1 ml를 가하여 60°C에서 20분간 가온처리한 다음 410 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Triglyceride 표준용액으로는 여러가지 농도(50 mg%, 100 mg%, 200 mg%, 300 mg%, 400 mg%)의 triolein 용액을 사용하였고, 인산지방질의 표준용액으로는 여러가지 농도(50 mg%, 100 mg%, 150 mg%, 200 mg%)의 lecithin 용액을 사용하였다.

10. 콜레스테롤의 정량²⁰⁾

지방질 추출물을 TLC로 분리하여 얻은 콜레스테롤 분획을 일정량의 chloroform에 녹여 Kenny²⁰⁾의 방법에 따라 정량하였다. 시료 5 ml에 acetic anhydride 1 ml를 가한 후 37°C에서 3분간 방치하고 황산 0.1 ml를 가하여 37°C에서 30분간 가온처리한 다음 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로는 여러가지 농도(1 mg%, 2 mg%, 3 mg%, 4 mg%)의 콜레스테롤 용액을 사용하였다.

11. [NAD⁺]/[NADH]와 [NADP⁺]/[NADPH] 비 측정

1) 간 시료의 제조^{21,22)}

쥐를 목을 조여 죽인 후 신속하게 간을 채취하여 액체질소로 미리 냉각시킨 알루미늄 집게로 눌러^{21,22)} 순간 냉동하였다. 목 조임에서 순간 냉동까지의 평균시간은 10초~20초였다. 순간 냉동시킨 간을 막자사발에 넣고 곱게 빻아(시료가 녹지 않게 가끔 액체 질소를 가해 줌) 냉각된 0.6 N perchloric acid가 담긴 플라스틱 원심분리관에 옮기고, 신속히 무게를 단 후(간조직 1 g당 2~3 ml의 HClO₄를 가함) 즉시 균질액을 만들고 원심분리(30,000×g, 10분)하여 단백질 을 제거하였다. 상층액을 취해서 2 N KOH를 가하여 pH 5~6 정도로 조정한 후 4°C 이하에서 30분간 방치하고 KClO₄ 침전물을 원심분리하여 제거한 상층액을 분석시료로 사용하였다. 이 모든 과정을 4°C 이하에서 진행하였다.

2) Pyruvate의 정량²³⁾

반응액[조성(최종농도) : 3 mM EDTA를 포함한 300 mM triethanolamine buffer(pH 7.6), 0.1 mM NADH, 시료 0.5 ml]에 2.75 units/ml(최종농도)의 lactate dehydrogenase를 가하여(최종부피 1.5 ml) 30분간 상온에서 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 표준용액으로는 여러가지 농도(10 μM, 20 μM, 30 μM, 40 μM, 50 μM, 60 μM)의 pyruvate 용액을 사용하였다.

3) Lactate의 정량²⁴⁾

반응액[조성(최종농도) : 0.34 M hydrazine을 포함한 0.43 M glycine buffer(pH 9.0), 2.75 mM NAD⁺, 시료 0.2 ml]에 19 units/ml(최종농도)의 lactate dehydrogenase를 가하고(최종부피 2.92 ml) 37°C에서 40분간 가온처리한 후 340 nm에서의 흡광도의 증가를 측정하였다. 표준용액으로는 여러가지 농도(0 μM~75 μM)의 L-lactate 용액을 사용하였다.

4) α -Ketoglutarate의 정량^{25,26)}

반응액[조성(최종농도) : 2.5 mM EDTA를 포함한 50 mM triethanolamine buffer(pH 8.0), 100 mM ammonium acetate, 0.1 mM NADH, 시료 1 ml]에 1.8 units/ml(최종농도)의 glutamate dehydrogenase를 가하여(최종부피 2 ml) 상온에서 20분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 표준용액으로는 여러가지 농도($0 \mu\text{M} \sim 60 \mu\text{M}$)의 α -Ketoglutarate 용액을 사용하였다.

5) Glutamate의 정량²⁷⁾

반응액[조성(최종농도) : 250 mM hydrazine을 포함한 300 mM glycine buffer(pH 9.0), 1 mM ADP, 1.6 mM NAD^+ , 시료 0.1 ml]에 4.5 units/ml(최종농도)의 Glutamate dehydrogenase를 가하여 상온에서 60분간 반응시킨 후 340 nm에서의 흡광도의 증가를 측정하였다. 표준용액으로는 여러가지 농도($0 \mu\text{M} \sim 60 \mu\text{M}$)의 L-glutamate 용액을 사용하였다.

6) Ammonia의 정량^{28,29)}

Amberlite IR-120 ion exchange resin으로 만든 column(1 cm \times 5 cm)을 10 ml의 4 M NaCl과 증류수로 미리 세척한 후 시료 2 ml를 통과시키고 약 20 ml의 증류수로 세척한 후 20 ml의 4 M NaCl로 ammonia 분획을 용출하여 시료로 사용하였다. 반응액[조성(최종농도) : 100 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 10 mM α -Ketoglutarate, 0.24 mM NADH, ion exchange resin을 통과시킨 ammonia 분획 시료]에 9 units/ml(최종농도)의 glutamate dehydrogenase를 가하고 상온에서 90분간 반응시킨 후 340 nm에서의 흡광도의 감소를 측정하였다. 표준용액으로는 여러가지 농도($10 \mu\text{M} \sim 80 \mu\text{M}$)의 NH_4Cl 용액을 사용하였다.

7) Isocitrate의 정량^{30,31)}

시료를 Florisil sep-pak을 통과시켜 형광물질을 제거한 후 정량용 시료로 사용하였다. 반응액[조성(최종농도) : 61 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4), 3.3 mM MnSO_4 , 0.15 mM NADP^+ , 시료 2 ml]에 100 m units/ml의 isocitrate dehydrogenase를 가하여 primary wavelength 360 nm, secondary wavelength 460 nm에서의 형광의 차이를 측정하였다. 표준용액으로는 $10 \mu\text{M}$ NADPH 용액을 사용하였다.

8) $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ 와 $[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}]$ 비의 계산

Holzer 등³²⁾의 "metabolite-indicator determination" 방법에 따라 각 세포 분획내에 존재하는 NAD^+ 와 관련된 적당한 탈수소 효소계를 선택하여 그 효소가 작용하는 산화성, 환원성 기질의 농도비를 측정함으로써 그 효소의 평형상수를 이용하여 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ 비를 계산하였다. 효소를 선택함에는 평형유지에 충분한 활성이 있어야 하고 반응물의 농도 측정이 쉬워야 하며 표지효소(marker enzyme)이어야 하므로 본 실험에서는 lactate dehydrogenase (LDH), glutamate dehydrogenase(GLDH), isocitrate dehydrogenase(ICDH)를 선택하여 간에서의 lactate, pyruvate, α -ketoglutarate, isocitrate, ammonia, glutamate 등을 정량하였다.

시토졸의 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ 비는 LDH 반응($\text{lactate} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+$)의 평형상수(1.11×10^{-14})를 사용하여 계산하였고, 미토콘드리아의 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ 비는 GLDH 반응($\text{glutamate} + \text{NAD}^+ \rightarrow \alpha\text{-ketoglutarate} + \text{NH}_4^+ + \text{NADH} + \text{H}^+$)의 평형상수(3.87×10^{-6} M)를 사용하였으며, 시토졸의 $[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}]$ 비는 ICDH 반응($\text{isocitrate} + \text{NADP}^+ \rightarrow \alpha\text{-ketoglutarate} + \text{CO}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+$)의 평형상수(1.17 M)를 사용하여 계산하였다. 각 평형상수는 pH 7.0, 38°C, I 0.25의 조건에서의 값이며 CO_2 의 농도는 1.16 mM로 계산하였다.

실험결과 및 고찰

쥐(Wistar, 150~200g, ♂)를 6마리씩 세군으로 나누어 정상사료로 사육한 정상군, 물 대신 12% ethanol로 사육한 대조군, 물 대신 0.1% 사포닌을 포함한 12% ethanol로 사육한 시험군에게 10%의 ethanol 1m/를 복강주사하고 30분 후에 간과 혈액을 채취하였다. 각 군에서의 $[NAD^+]/[NADH]$ 비를 측정하 결과 정상군의 $[NAD^+]/[NADH]$ 비는 866인데 비해 대조군은 507로 크게 저하되었으나 시험군은 676으로 정상군에 가깝게 회복되었다(Table 1, 2).

이것은 인삼사포닌이 ethanol 산화로 인한 $[NAD^+]/[NADH]$ 비의 저하를 신속히 회복시키고 있음을 나타내는 것이며, 이와같은 인삼사포닌으로 인한 $[NAD^+]/[NADH]$ 비 저하의 회복은 생성된 acetate의 지방산으로의 합성 촉진을 의미하는 것으로 해석된다.

한편 대조군과 시험군의 ADH의 활성은 둘 다 정상군보다는 높으나 시험군의 활성이 대조군보다 감소되었다(Table 3). 이것은 인삼사포닌이 ethanol 섭취로 인한 ADH의 활성 증가를 어느정도 억제하는 것으로 사료되나 그 메카니즘은 분명치 않다.

반면에 대조군과 시험군의 ALDH의 활성은 둘 다 정상군보다 감소되어 있다. Acetaldehyde가 ALDH의 활성을 감소시키는 잘 알려진 사실이나 시험군의 ALDH의 활성은 대조군보다 덜 감소되어 있다.

MEOS는 ethanol 투여로 크게 증가하지만 인삼사포닌을 함께 투여한 시험군에서는 정상군에 비해 2배 이상 증가하였다. ALO 활성은 ethanol 투여로 거의 억제되었고 시험군의 경우도

Table 1. Concentration of the substrates of NAD^+ -and $NADP^+$ -linked dehydrogenase systems in the livers of normal, control and test rats. The control and test rats were fed with 12% ethanol or 12% ethanol containing 0.1% ginseng saponin, respectively, instead of water for 6 days. The concentration of metabolites are expressed as moles/g tissue (mean \pm S.D.)

Metabolites	Normal	Control	Test
Pyruvate	0.126 \pm 0.023	0.116 \pm 0.020	0.096 \pm 0.016
Lactate	1.311 \pm 0.584	2.063 \pm 0.965	1.280 \pm 0.338
α -Ketoglutarate	0.104 \pm 0.019	0.091 \pm 0.022	0.094 \pm 0.013
Glutamate	2.692 \pm 0.193	2.808 \pm 0.383	3.114 \pm 0.394
NH_4^+	0.759 \pm 0.317	0.559 \pm 0.177	0.784 \pm 0.399
Isocitrate	0.035 \pm 0.010	0.028 \pm 0.007	0.037 \pm 0.008

Table 2. $[NAD^+]/[NADH]$ ratio and $[NADP^+]/[NADPH]$ ratio in the liver of rat fed with ordinary diet and 12% ethanol along with (test) and/or without (control) 0.1% ginseng saponin instead of water (free access). Normal group was fed only ordinary diet and water. Calculations of $[NAD^+]/[NADH]$ ratio and $[NADP^+]/[NADPH]$ ratio were described in the text.

		*Normal	Control	Test
$[NAD^+]/[NADH]$	Cytosol	866	507	676
	Mitochondria	7.58	4.68	6.12
$[NADP^+]/[NADPH]$	Cytosol	2.9×10^{-3}	3.2×10^{-3}	2.5×10^{-3}

Table 3. The effect of ginseng saponin on ADH, ALDH, MEOS and ALO in prolonged ethanol fed rats *in vivo*. The rats were fed with 12% ethanol (control) and/or 12% ethanol containing 0.1% ginseng saponin (test) instead of water for 6 days.

Group	(unit ^(a) /mg protein) ADH	(unit ^(a) /mg protein) ALDH	(unit ^(b) /mg protein) MEOS	(unit ^(c) /mg protein) ALO
Normal	8.743 ± 0.159 (100)	3.076 ± 0.600 (100)	3.165 ± 0.472 (100)	2.765 ± 0.059 (100)
Control	10.136 ± 0.221 (116)*	2.303 ± 0.661 (75)*	4.443 ± 0.681 (140)*	0.174 ± 0.087 (6)*
Test	9.242 ± 0.123 (106)	2.678 ± 0.015 (87)*	7.028 ± 0.775 (222)*	0.390 ± 0.057 (14)*

a) One unit of enzyme was defined as one nmole of NADH formed per min.

b) One unit of enzyme was defined as mole of acetaldehyde formed per min.

c) One unit of enzyme was defined as 0.01 increment of optical density per min. at 420 nm.

d) Figures in brackets are relative activities assuming that of control being 100.

* p < 0.05

Table 4. Acetaldehyde level in the liver and serum of the rat fed with 12% ethanol and 0.1% ginseng saponin for 6 days prior to the intraperitoneal injection of 10% ethanol (1 ml). The rats were killed at 30 min. after the ethanol injection.

Group	Liver (nmole/g liver)	Serum (nmole/ml serum)
Normal	210,669 ± 98.611 *(100)	12.139 ± 3.540 (100)
Ethanol fed	304.703 ± 119.506 (145)**	17.594 ± 3.521 (145)**
Ethanol and saponin fed	238.343 ± 24.540 *(113)**	13.297 ± 2.512 (110)

*Numbers in brackets are the relative ratios that were expressed assuming that of normal being 100.

** p < 0.05

그 활성은 회복되지 않았다. ethanol 투여후의 간과 혈청에서의 acetaldehyde 농도를 측정환 결과 (Table 4) 시험군이 대조군보다 상당히 낮으며 비교적 정상군에 가까운 값을 나타내고 있다. 이것은 인삼사포닌이 acetaldehyde의 산화를 촉진하고 있음을 의미하는 것이며 ALDH의 활성이 높은 것으로 추측된다.

5 μ Ci의 방사성을 함유한 10% ethanol 1 ml를 위의 세균에 투여하고 30분 후에 간을 채취하여 간 지방질의 방사능 분포를 조사하였다. Table 5에서의 보는 바와 같이 대조군과 시험군의 전 지방질의 방사능이 정상군보다 많으나 시험군의 방사능이 대조군보다 훨씬 작음을 알 수 있다(대조군은 정상군보다 1.55배로 크게 증가하고 있으나 시험군은 1.25배에 불과하다).

인산지방질, 콜레스테롤, 지방산, 중성지방 등의 각 지방질 분획으로 세분하여 보면 대조군의 경우 인산지방질의 합성이 크게 저하되어 있고 지방산과 중성지방의 합성이 상당히 증가되어 있으나 시험군의 경우 정상군에 가깝게 회복되고 있다. 이것은 인삼사포닌이 ethanol 섭취로 인한 인산지방질 합성의 감소 및 중성지방 합성의 촉진을 막아주고 있음을 의미하며 과량의

Table 5. Distribution of radioactivity (DPM) of hepatic lipids of the rat fed with [1-¹⁴C]-ethanol (5 Ci). The rats were killed at 30 min. after the intraperitoneal injection of ethanol. The control and test groups were fed with 12% ethanol or 12% ethanol containing 0.1% saponin, respectively, instead of water for 6 days prior to the injection of labelled ethanol.

Lipid fraction	Radioactivity (DPM)		
	Normal	Control	Test
Total lipid	114,089(100)	176,867(100)	142,637(100)
Phospholipid fraction	49,045(43.0)	12,407(7.0)	34,322(24.1)
Cholesterol "	10,528(9.2)	10,248(5.8)	10,267(7.2)
Fatty acid "	22,895(20.1)	49,820(28.2)	47,119(33.0)
Triglyceride "	35,817(31.4)	73,141(41.4)	59,326(41.6)

ethanol 흡수로 인해 생길 수 있는 지방간 현상에 대한 인삼사포닌의 보호효과라고 생각된다.

앞에서 논의한 바와 같이 ethanol은 주로 간에서 산화되며, acetaldehyde가 생성되고 이것은 주로 미토콘드리아에서 산화되어 acetate를 생성한다.

Ethanol의 농도가 낮을 때는 시토졸의 ADH로 산화된 후 미토콘드리아의 ALDH에 의해 산화되지만 ethanol의 농도가 높을 때는 MEOS도 이용하여 acetaldehyde가 생성되고 이것이 미크로솜 ALDH에 의해 산화되는 것으로 예측되지만 아직 확실하지는 않다.

한편 ethanol 산화로 인한 acetate 생성과 $[NAD^+]/[NADH]$ 비의 저하는 지방산의 β -산화를 억제하고 지방산 합성을 촉진함으로써 중성지방의 축적을 초래하는 것으로 생각된다.

Ethanol 대사에 미치는 인삼사포닌의 영향은 ethanol 투여에 의해 감소된 $[NAD^+]/[NADH]$ 비를 정상에 가깝게 회복시키고 간과 혈액에서의 acetaldehyde의 농도를 낮추고 한편 ethanol 투여로 인한 인산지방질 합성의 저하 및 중성지방 합성의 증가를 막아 비교적 정상 상태에 가깝게 유지시켜 주며 지방간 현상 유발을 막아주는 효과가 있음을 관찰하였다.

이상과 같은 실험결과들을 종합해 볼 때 인삼사포닌은 간에서의 ethanol 산화에 의해 생기는 두가지 주요 생성물인 acetaldehyde와 NADH의 생성을 감소시킴으로써 이 물질들로 인해 일어나는 대사 이상으로부터 간을 보호해주는 작용이 있는 것으로 사료된다.

사 사

본 연구수행에 있어 곽한식에 대한 대우재단의 1986년도, 1987년도 postgraduate 장학연구 지원에 감사의 뜻을 표하는 바이다.

요 약

쥐에게 물대신 12% 에탄올(대조군) 또는 인삼사포닌 분획을 포함한 12% 에탄올(시험군)을 6일간 투여한 후 간과 혈청에서의 acetaldehyde 농도와 간의 $[NAD^+]/[NADH]$ 및 $[NADP^+]/[NADPH]$ 비율을 조사하였다.

대조군의 간과 혈청의 acetaldehyde 농도는 물로 사육한 정상군에 비해 훨씬 높았으나 물대신 인삼사포닌을 포함한 에탄올을 투여한 시험군의 경우는 정상군에 비해 약간 높았을 뿐이었

으며 $[NAD^+]/[NADH]$ 비의 감소율도 대조군보다는 시험군이 훨씬 작았다.

$1-^{14}C$ -ethanol을 함유한 10% ethanol을 1ml 복강으로 투여하고 30분 후의 간의 지방질의 방사능을 분석한 결과 시험군의 간 지방질의 전체 방사능은 대조군보다 훨씬 낮았고 인산지방질, 콜레스테롤, 지방산, 중성지방과 같은 지방질의 분석결과는 에탄올 투여로 인한 인산지방질 생합성 저하와 지방산 및 중성지방의 생합성 증가현상이 인삼사포닌의 투여로 개선되는 것으로 관찰되었다.

인용문헌

1. Lieber, C.S., *Sci. Amer.*, **234**(3), 25 (1976).
2. Ervoine, V.G. and R.A. Deitrich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 3533 (1966).
3. Joo, C.N. *Surfactants in Solution*, Plenum Press, N.Y. Vol 3, p. 2093 (1984).
4. Tae, G.S. and C.N. Joo, *Korean Biochem. J.*, **17**, 424 (1984).
5. Hyun, H.C. and C.N. Joo, *Korean Biochem. J.*, **19**, 351 (1986).
6. Joo, C.N. In proceedings of 4th International symp. (Taejeon, 1982). pp. 63-74.
7. Joo, C.N., G.S. Tae, S.O. Joo and K.S. Cho, *Korean J. Ginseng Sic.*, **9**, 1 (1985).
8. 林輝明, 足立俊文, 東野正行: 特許出題公開, 昭 53-107185, 日本國特許廳(JP) (1980).
9. Kupfer, D. and Levin, E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **47**, 611 (1972).
10. Schenkman, J.B. and Cinti D.L., In *Methods in Enzymology*, Academic Press, London, vol 52, p. 83 (1978).
11. Bonnichsen, R.K. and N.G. Brink, *Methods in enzymology*, vol 1, p. 495 (1955).
12. Koivula, T. and M. Koivula, *Biochem. Biophys. Acta*, **397**, 9 (1975).
13. Lieber, C.S., L.M. De Carli, S. Matsuzaki, K. Ohnishi and R. Teschke, In *Methods in enzymology*, vol LII, Academic Press, London, pp. 355-367 (1978).
14. Rajagopalan, K.V. and P. Handler, In *Methods in Enzymology*, vol 9, p. 364 (1966).
15. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911 (1959).
16. Work, E. and T.S. Work, *Laboratory Technique*, North Holland Publishing Co. Amsterdam, vol 3, p. 351 (1975).
17. Mangold, M.K. in E. Stahl(ed.) *Thin Layer Chromatography*, Springer-Verlag, New York, pp. 155-200 (1969).
18. Mangold, M.K. in E. Stahl(ed.) *Thin Layer Chromatography*, Springer-Verlag, New York, pp. 363-421 (1969).
19. Biggs, H.G., J.M. Erikson and W.R. Moorehead, *Clin. Chem.*, **21**, 437 (1975).
20. Kenny, A.P., *Biochem. J.*, **52**, 611 (1952).
21. Wollenberger, A., O. Ristau, and G. Schoffa, *Pflug. Arch. ges. Physiol.*, **270**, 399 (1960).
22. Paupel, R.P., H.J. Seitz, W. Tarnowski, V. Thiemann and CH. Weiss, *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**, 509 (1972).
23. Czok, R. and W. Lamprecht, In *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag, Chemie, Weinheim, vol 3, p. 1446 (1974).
24. Gutmann, I. and A.W. Wahlefeld In *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, vol 3, p. 1464 (1974).
25. Burlina, A. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, vol 7, p. 20 (1984).
26. Schmidt, E. In *methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, vol 2, p 650 (1974).
27. Bernt, E. and H.U. Bergmeyer, In *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, vol 4, p. 1704 (1974)

28. Kyn, E. and E.B. Kearney, In *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie Weinheim, vol 4, p. 1802 (1974).
29. Williamson, D.H., P. Lund and H.A. Krebs, *Biochem. J.*, **103**, 514 (1967).
30. Siebert, G. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, vol 3, p. 1570 (1974).
31. Goldberg, N.D. and J.V. Passonneau, In *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, vol 3, p. 1573 (1974).
32. Holzer, H., G. Schultz and F. Lynen, *Biochem. Z.*, **328**, 252 (1956).