

α -tocopherol의 항산화작용에 미치는 인삼사포닌분획의 영향

주충노 · 곽한식

연세대학교 이과대학 생화학과,
(1988년 12월 2일 접수)

The Effect of Ginseng Saponin Fraction on Antioxidant Activity of α -Tocopherol

Chung No Joo and Han-Shik Kwak

Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University Seoul

(Received December 2, 1988)

Abstract

The effect of the saponin fraction extracted from *Panax ginseng* C.A. Meyer on the antioxidant activity of α -tocopherol was investigated *in vitro* as well as *in vivo*.

Microsomal preparation of rat (Wister, 180-200g) liver was incubated in the mixture containing NADPH, Fe^{3+} , ATP, α -tocopherol with and/or without ginseng saponin fraction for 30 minutes and the malondialdehyde formed was assayed and found that the saponin fraction stimulated the antioxidant activity of α -tocopherol cooperatively. It was also realized that the cooperative stimulation of the antioxidant activity of α -tocopherol was most eminent when the concentration of the saponin fraction was around $10^{-5}\%$ in the reaction mixture.

Alcoholic suspension of α -tocopherol with and/or without ginseng saponin fraction was administered orally to rats in which the lipid peroxidation was induced by ethanol administration and the lipid peroxide contents of the liver were assayed at certain periods of time after α -tocopherol administration in this animal.

From the previous work and present experimental results, it seemed that the saponin fraction accelerated the absorption of α -tocopherol and therefore stimulated the antioxidant activity of α -tocopherol more effectively in the animal body.

서 론

지질의 과산화는 미토콘드리아, 소포체, 적혈구, 혈소판 등 막의 주요성분인 인산지질에 다량 함유되어 있는 불포화지방산에 산소가 첨가되는 현상으로, 불포화지방산의 과산화가 일어나기 위해서는 불포화지방산이나 산소 혹은 양쪽이 활성화되어야 할 것이다. 현재까지의 연구결과에 의하면 불포화지방산의 활성화에 의한 과산화지질 생성반응은 생체내에서는 일반적으로 일어나기 어려우며, 주로 산소의 활성화에 기인되는 것으로 생각되고 있다. 그러나 이러한 활성산소가 어떤 형태로 상호 전환되며 생체내의 과산화반응에 어떻게 직접 작용하는지는 분명하지

않다. 세포가 정상의 기능을 유지하는 경우에는 생체내 구성성분은 정상적으로 배열되어 있고 여러가지 생체반응이 일어나는 장소가 생체막에 의해 구분되어 있으므로 세포의 가용성 부분에서 산소 라디칼이 생성되어도 생체막 내부에 있는 지질을 공격하여 과산화지질을 생성하기는 어렵다. 그러나 생체막에 어떠한 손상이 생긴 경우는 생체막내의 불포화지방산이 산소 라디칼의 공격을 쉽게 받아 과산화되고, 과산화지질은 주변에 존재하는 단백질을 변성시키거나 다른 organelle을 공격하여 세포의 기능을 저하시키는 것으로 생각할 수 있다.

비타민E가 조직 지방질의 불포화지방산의 과산화를 막아줌으로써 지질의 항산화작용이 있음은 잘 알려진 사실이다. 본 실험실에서는 쥐에 α -tocopherol을 인삼 사포닌과 같이경구투여했을 때 인삼 사포닌에 의해 α -tocopherol의 흡수가 촉진됨을 보고한바 있으며¹⁰⁾ 본 논문에서는 쥐 간 미크로솜에 대한 α -tocopherol의 항산화작용에 미치는 인삼 사포닌의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

Wistar계의 쥐(180~200g, ♂)를 6마리씩 5가지 군으로 나누어, 제 1군은 정상사료와 물(자유접근), 제 2군은 물 대신 12% ethanol(자유접근), 제 3군은 물 대신 12% ethanol과 0.1% saponin(자유접근), 제 4군은 12% ethanol과 0.03% α -tocopherol(자유접근), 제 5군은 12% ethanol과 0.1% saponin과 0.03% α -tocopherol(자유접근)로 6일간 사육한 후 각 군의 간을 채취하여 과산화지질의 양 및 효소의 활성을 측정하였다.

2. 과산화지질의 정량

실험동물의 간 파쇄액(10%, w/v) 0.2 ml에 8.1% SDS 2 ml, 20% acetate buffer(pH 3.5) 1.5 ml, 0.8% thiobarbituric acid 1.5 ml, 증류수 0.6 ml를 가하여(최종부피 4 ml) 95°C에서 1시간 반응시킨 후 식히고 증류수 1 ml, n-butanol-pyridine 용액(15:1, v/v) 5 ml를 가하여 원심분리하고(3000 rpm, 15분) 상층액(n-butanol-pyridine층)을 회수하여 532 nm에서 흡광도의 증가를 측정하였다. 표준물질로는 1~5 nmole의 tetraethoxypropane 용액을 사용하였다.

3. Malondialdehyde(MDA)의 시험관내 생성과 2-thiobarbituric acid(TBA) 반응

0.1 mM FeCl₃, 1.7 mM ADP, 0.4 mM NADPH를 포함하는 용액에 미크로솜 분획을 넣어 반응액(최종부피 2.5 ml)을 25°C로 유지하며 세게 흔들어 지질과산화물을 유도하였다²⁾. 30분간의 반응 후 1 ml의 반응액에 30% TCA 2 ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 0.75% TBA 2 ml와 5 M의 HCl 0.2 ml를 가하여 잘 혼합한 것을 100°C에서 15분간 가열한 후 냉각시켰다.

냉각된 반응물을 원심분리(2,000×g, 10분)하여 상층액을 모아 535 nm에서 흡광도의 증가를 측정하였다³⁾.

4. NADPH-cytochrome c reductase(E.C 1.6.2.4)의 활성측정⁴⁾

미크로솜 막에 존재하는 NADPH-cytochrome c reductase의 활성측정은 빛의 통과 길이 1 cm인 cuvette에 반응액[조성(최종농도): 0.33 M phosphate buffer(pH 7.6), 4.2×10⁻⁵ M NADPH, 10⁻³ M KCN, 5×10⁻⁵ M cytochrome c]과 효소원 및 여러가지 농도의 인삼

사포닌과 α -tocopherol을 넣어 반응시키고 cytochrome c의 환원에 따른 흡광도의 증가를 550 nm에서 측정하였다.

5. Microsomal ethanol oxidizing system의 활성 측정⁵⁾

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 인삼 사포닌, 효소원]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 acetaldehyde 양을 220 nm에서의 흡광도의 증가로 측정하였다.

6. Aldehyde dehydrogenase[E.C 1.2.1.3]의 활성 측정⁶⁾

반응액[조성(최종농도: 70 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 2 mM pyrazole, 효소원]에 acetaldehyde(최종농도 1 mM) 혹은 여러가지 농도의 propionaldehyde를 가하여(최종부피 1 ml) NADH의 생성에 따른 흡광도의 증가를 340 nm에서 측정하였다.

7. Microsomal aldehyde dehydrogenase의 부분정제⁶⁾

10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 함유한 0.25 M sucrose 용액과 0.15 M KCl 용액에 2 mM mercaptoethanol을 가한 뒤 세포 성분분리와 같은 방법으로 세척된 미크로솜 분획을 얻어 Triton x-100 (0.7 mg/mg 단백질)을 가해서 10분간 자성막대로 서서히 저어준 뒤 4°C 이하에서 20초씩 6번 초음파 처리하였다. 여기에 ammonium sulfate를 소량씩 가해주면서 자성막대로 서서히 저어주었다. 30% 포화용액이 되면 20분간 방치한 후 25,000×g로 15분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후 상층액에 다시 ammonium sulfate를 가해서 80% 포화용액을 만들고 30분간 방치한 후 다시 25,000×g로 15분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 2 mM mercaptoethanol이 함유된 10 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 균질화시킨 후 80배 부피의 동일한 buffer로 4°C 이하에서 2번 용액을 갈아주면서 16시간 동안 투석하였다. 이렇게 얻은 효소용액을 2 mM mercaptoethanol이 함유된 10 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 미리 평형시킨 DEAE-cellulose column (2.6×30 cm)에 충전시켰다. 단계적인 phosphate 농도 구배를 주어서 흡착된 단백질을 용출시킨 후 (10 mM, 75 mM, 150 mM) 150 mM phosphate buffer (pH 7.4)로 용출한 분획중 가장 큰 활성을 나타내는 부분을 사용하여 효소원으로 사용하였다.

결과 및 고찰

α -tocopherol이 시험관내에서의 지질과산화에 미치는 영향과 인삼 사포닌 분획이 α -tocopherol의 항산화작용에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 Fe³⁺, NADPH, ADP 존재하에서 미크로솜 막의 과산화에 미치는 α -tocopherol의 영향을 살펴보았다. 반응액에서의 최종 농도를 인삼 사포닌은 10⁻⁴%, α -tocopherol은 50 μ M로 하였을 때는 반응액에 α -tocopherol만을 첨가했을 때 보다 malondialdehyde 생성이 9% 억제되었으며 인삼사포닌이 α -tocopherol

Table 1. The effect of ginseng saponin fraction ($10^{-4}\%$) on microsomal lipid peroxidation

Treatment	Lipid peroxidation (n mole malondialdehyde/mg protein/min)	Relative ratio*
None (control)	1.300	100
50uM α -tocopherol	1.118	86
50uM α -tocopherol + $10^{-4}\%$ saponin	1.014	78
100uM α -tocopherol	0.689	53

*Relative ratio was defined assuming that of control being 100.

Table 2. The effect of ginseng saponin and α -tocopherol on the formation of lipid peroxide in the liver of rat fed with ethanol. Rats were fed with 12% ethanol or 12% ethanol containing 0.1% saponin or 12% ethanol containing 0.1% saponin and 0.03% α -tocopherol respectively instead of water for 6 days.

Group	Amount of lipid peroxide formed (n mole/g liver)	Relative ratio
Normal	166 \pm 87	100
Ethanol fed	666 \pm 187	401
Ethanol & saponin fed	378 \pm 70	228
Ethanol & α -tocopherol fed	224 \pm 33	135
Ethanol & saponin & α -tocopherol fed	229 \pm 82	138

의 malondialdehyde 생성억제를 가속시킨 것으로 관찰되었다 (Table 1).

*In vivo*의 실험에서도 정상군에 비해 ethanol 투여군(대조군)은 4 배의 과산화지질의 생성 증가를 나타내고 있으나 α -tocopherol을 ethanol과 같이 투여한 경우는 정상군의 1.3배에 불과하였고 인삼 사포닌을 ethanol과 같이 투여한 경우는 2.3배 정도로 대조군에 비해 많이 감소되어 있어 인삼 사포닌의 과산화방지능을 시사하고 있으나 사포닌과 α -tocopherol을 ethanol과 같이 투여한 경우는 α -tocopherol만 ethanol과 같이 투여한 경우와 흡사한 값을 나타내고 있다.

미크로솜의 NADPH-cytochrome reductase의 활성에 미치는 α -tocopherol과 인삼 사포닌의 영향을 조사한 결과 α -tocopherol(최종농도 $25\mu\text{M}$)을 첨가한 경우에는 대조군에 비해 차이가 없었으나 최종농도가 $50\mu\text{M}$ 의 경우에는 NADPH-cytochrome c reductase의 효소활성이 15% 증가하였다. 또한 인삼 사포닌을 첨가했을 때는 반응액에서의 사포닌의 농도가 $10^{-5}\%$ 일 때 효소활성이 1.2배 증가하였으나 그밖의 사포닌 농도에서는 주목할만한 변화가 관찰되지 않았다 (Table 3).

만성적으로 ethanol을 투여한 쥐 간의 MEOS에 미치는 α -tocopherol과 인삼 사포닌의 효과는, ethanol 투여로 인한 MEOS의 활성 증가를 인삼 사포닌이 더욱 크게 증가시켜 주고 있으나 α -tocopherol의 효과는 ethanol에 의한 활성 증가에 가려 나타나지 않고 있다. 이에 비해 사포닌과 α -tocopherol을 같이 투여한 군에서는 사포닌과 α -tocopherol은 상호보완적 활성촉진작용이 있는 것으로 사료된다 (Table 4).

Table 5의 결과는 Table 4의 *in vivo*에서의 사포닌에 의한 활성 증가를 *in vitro*에서 재확인한 것으로 반응액에서의 $10^{-5}\%$ 일 때 사포닌의 농도가 효소활성이 최대치를 나타내었다.

Table 3. The effect of α -tocopherol and ginseng saponin fraction on microsomal NADPH-cytochrome c reductase *in vitro*

Treatment	Enzyme activity (unit*)	Relative activity**
None (control)	7.1 \pm 0.12	100
50uM α -tocopherol	8.2 \pm 0.30	115
Saponin (W/V %)		
10 ⁻⁸	7.1 \pm 0.38	100
10 ⁻⁷	7.4 \pm 0.70	104
10 ⁻⁶	7.4 \pm 0.80	104
10 ⁻⁵	8.3 \pm 0.25	117
10 ⁻⁴	7.3 \pm 0.66	103

* One unit of enzyme was defined as an optical density increment of 0.01 per min at 550 nm. The values are mean \pm S.D. of three determinations.

** Relative activity was expressed assuming that of control being 100.

Table 4. The effect of ginseng saponin and α -tocopherol on microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) in the liver of rat fed with ethanol. Rats were fed with 12% ethanol or 12% ethanol containing 0.1% saponin or 12% ethanol containing 0.03% α -tocopherol or 12% ethanol containing 0.1% saponin and 0.03% α -tocopherol respectively instead of water for 6 days.

Group	Activity (acetaldehyde μ mole/mg protein)	Relative ratio (%)
Normal	1.755 \pm 0.224	100.0
Ethanol fed	2.430 \pm 0.374	138.5
Ethanol & saponin fed	2.706 \pm 1.632	154.2
Ethanol & α -tocopherol fed	2.409 \pm 0.944	137.3
Ethanol & saponin & α -tocopherol fed	3.314 \pm 0.988	188.8

Table 5. The effect of ginseng saponin on rat hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) *in vitro*.

Added saponin concentration (w/v, %)	Acetaldehyde formed* (μ mole/min/mg protein)	Relative ratio**
0	1.816	100.0
10 ⁻¹⁰	1.823	100.4
10 ⁻⁹	1.879	103.5
10 ⁻⁸	1.835	101.0
10 ⁻⁷	1.973	108.6
10 ⁻⁶	2.186	120.4
10 ⁻⁵	2.587	142.4
10 ⁻⁴	1.998	110.0
10 ⁻³	1.973	108.6
10 ⁻²	1.848	101.8

* The amounts of acetaldehyde adsorbed by the semicarbazide in the center well of warburg manometric flask were spectrophotometrically measured at 220 nm.

** The relative activities were expressed assuming the activity of control being 100.

Table 6. The effect of ginseng saponin on the partially purified rat hepatic microsomal aldehyde dehydrogenase *in vitro*. Assay mixture (1 ml) contained (final concentration) 70 mM sodium pyrophosphate buffer (pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 2 mM pyrazole, 1 mM acetaldehyde and various concentrations of saponin.

Added saponin concentration (%)	Enzyme activity (units*/mg protein)	Relative activity**
0	2.028	100
10 ⁻¹¹	2.072	102.2
10 ⁻¹⁰	2.206	108.8
10 ⁻⁹	2.478	122.2
10 ⁻⁸	2.222	109.6
10 ⁻⁷	2.117	104.4
10 ⁻⁶	2.133	105.2
10 ⁻⁵	2.156	106.3
10 ⁻⁴	1.911	94.2
10 ⁻³	1.983	97.8

* One unit was defined as n optical density increment of 1 per min.

** Relative activity was defined assuming that of control being 100.

또한 부분정제된 마이크로솜의 aldehyde dehydrogenase에 미치는 인삼 사포닌의 효과를 조사한 결과 Table 6 과 같이 반응액에서의 사포닌의 농도가 10⁻⁹%일 때 효소활성이 최대였다.

이상과 같은 실험결과와 앞서 행한 실험 결과¹⁰⁾로 보아 인삼 사포닌은 마이크로솜의 여러가지 효소들을 비특이적으로 활성화하는 동시에 α -tocopherol의 흡수를 촉진하므로써 α -tocopherol의 항산화 작용이 더욱 효율적으로 일어나는 것으로 사료된다.

요 약

인삼 사포닌 분획이 α -tocopherol의 항산화작용에 미치는 영향을 시험관내 실험과 동물실험으로 관찰하였다.

흰쥐 Wister, ♂, 180 ~200g)의 간 마이크로솜 분획을 Fe³⁺, NADPH, ADP, α -tocopherol (50 μ M), 인삼 사포닌 분획(최종농도 10⁻⁴%, 대조군은 사포닌 분획 대신 같은 부피의 물)을 함유한 혼합물에서 반응을 진행시키고 생성된 malondialdehyde를 분석한 결과, 사포닌은 α -tocopherol의 항산화작용을 상승적으로 증가시켰다.

인삼 saponin 분획이 함유된 α -tocopherol의 alcohol 용액을 쥐에게 경구투여한 후 적당 시간 후에 간에서의 과산화수소량을 분석하여 대조군과 비교한 결과, 인삼 saponin은 α -tocopherol의 흡수를 촉진하므로써 α -tocopherol의 항산화활성이 더욱 효율적으로 일어나게 하는 것으로 해석된다.

인용문헌

1. Yagi, K., Y. Goto, Lipid peroxides and allied disease, 1st ed., Igakushoin Ltd., Tokyo, pp 3-11 (1981).

2. Fairhurst, S., D.J. Barber, B. Clark and A.A. Horton, *Toxicology* **23**, 249 (1982).
3. Sinnhuber, R.O. and T.C. Yu, *Food Techn.*, **12**, 9 (1958).
4. Phillips, A.H. and R.G. Langdon, *J. Biol. Chem.*, **237**, 2652 (1962).
5. Lieber, C.S., L.M. DeCarli, S. Matsuzaki, K. Ohnishi and R. Teschke, in *Methods in enzymology*, vol LII, Academic Press, London, pp 355-367 (1978).
6. Kovula, T. and M. Koivula, *Biochem. Biophys. Acta*, **397**, 9 (1975).
7. Tinberg, H.M. and A.A. Barber, *J. Nutr.*, **100**, 413 (1970).
8. Ernster, L. and K. Nordenbrand, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, NY and London, vol 10, pp 574-580 (1967).
9. Reitz, R.C., *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 145 (1975).
10. Thompson, J.A. and R.C. Reitz, *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 159 (1975).
11. Joo, C.N. and J.W. Kim (1987), *Korean J. Ginseng Sci.*, **11**.