

## 人蔘 Saponin, 銀柴胡 Saponin 및 界面活性劑가 赤血球의 容積變化 및 Fragility에 미치는 影響

李神雄·李正秀·李壽根·玉昌建·金英姬

영남대학교 약학대학

(Received December 20, 1988)

### Effect of Ginseng Saponin, Gypsophila Saponin, and Detergents on Volume Changes and Fragility of Red Blood Cells

Shin-Woong Lee, Jeung-Soo Lee, Soo-Kun Lee, Chang-Kun Ok, and Young-Hie Kim

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 713-749, Korea

**Abstract**—The effects of Gypsophila saponin, sodium dodecylsulfate (SDS) and Triton X-100 on volume changes and fragility of red blood cells were compared to ginseng saponin to elucidate whether there are any difference in their action on membrane lipid. Cell volume was decreased to about 38 % in 1M NaCl and increased to about 20% in 1/10M NaCl. Hematocrit value was decreased by Gypsophila saponin, SDS, and Triton X-100 which caused hemolysis in isotonic NaCl solution. These detergents also inhibited increase of cell volume and accelerated hemolysis in hypotonic solution. However, ginseng saponin did not influence to osmotic volume changes and hemolysis of red blood cells. These results suggest that the disruptive effect of plant saponin on membrane barriers induced by removing membrane lipid is different from their source and ginseng saponin has very low affinity to membrane lipid.

동물세포에서 세포막은 수분을 자유로이 통과시키나 용질을 잘 통과시키지 않는 반투과성 막으로서 용매인 수분은 삼투압차에 의하여 세포막 내외로 수동적으로 이동된다.<sup>1)</sup> 따라서 세포외액의 삼투압이 세포내액의 삼투압보다 높을 경우 수분은 세포내에서 세포외로 이동되고 낮을 경우 이와 반대의 현상이 일어나 이에 따른 세포용적의 변화가 생기며 이 변화정도는 세포내외의 삼투압차에 의존한다.<sup>2,3)</sup>

적혈구는 세포의 용적변화와 깨질성 (fragility) 실험에 널리 이용되고 있으며<sup>4)</sup> 정상조건 하에서는 hemoglobin 분자가 적혈구 막을 통과할 수 없으나 혈장삼투압의 감소나 혈장중에 혈구막의 투과성을 증가시키는 용질이 존재할 경우 용혈 (hemolysis) 이 일어난다.<sup>5)</sup> 일반적으로 계면활성제와 식물 saponin 은 세포막의 구성성분의 하나인 지질을 제거함으로써 막투과성의 증가 내지는 막의 파괴를 유발하여 용혈을 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>6)</sup> 본 실험에서는 적혈구의 용적변화와 깨질성 (fragility)에 미치는 인삼 saponin의 영향을 수중 계면활성제 및 은

시호 saponin의 영향과 비교 검토함으로써 세포막에 대한 인삼 saponin의 작용이 일반 계면활성제의 작용과 차이가 있는지에 관한 지견을 얻고자 하였다.

#### 실험방법

**재료 및 시약**—재료—혈액은 외관상 건강한 20대의 공혈자로부터 실험전 채혈하여 사용하였으며, 인삼 saponin은 Namba 등<sup>7)</sup>과 한 등<sup>8)</sup>의 방법으로 분리 확인한 total saponin을, 은시호 (*Gypsophila oldhamiana* Miq.) saponin은 Sigma사에서 시약용으로 분리 제조한 것을 각각 사용하였다.

시약—Triton X-100은 Sigma사로부터, sodium dodecylsulfate (SDS)는 Bio-Rad Lab. 사로부터 구입하였고, 기타 모든 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

**적혈구 부유액의 제조**—신선한 혈액 10 ml를 채취, 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈장을 제

거한 다음, 혈구에 제거한 혈장용적과 동일한 용적의 등장액(0.15M NaCl)을 가하고 혈구가 파괴되지 않도록 잘 섞어서 같은 방법으로 원심분리 하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 최종 혈구에 생리적 식염수를 가하여 정확히 10ml가 되게한 후 잘 섞어서 적혈구 부유액으로 하였다.

**적혈구의 용적변화 측정**—여러 농도의 NaCl 용액 1ml에 적혈구 부유액 1ml를 가하고 혼합하여 5분간 방치한 후 hematocrit capillary tube에 취한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 원심분리한 후 hematocrit tube 내에서 혈구가 차지한 내부의 용적을 측정하여 혈액이 차지한 부분에 대한 백분율로 표시하였으며 등장액 중에서의 hematocrit치를 기준으로 세포용적의 증가 또는 감소를 판정하였다.

**색도 표준액의 제조**—증류수 7.5ml에 혈액 0.5ml를 가하고 잘 섞은 다음 5분간 방치, 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액의 색을 100% 색도 표준액으로하고 이 용액 4ml에 동량의 증류수(4ml)를 가하여 50% 색도 표준액을 만들었으며 이와같은 방법으로 25%, 12.5%, 6.25%의 색도 표준액을 만들고 560nm에서 각 색도 표준액의 흡광도를 측정하였다.

**용혈(hemolysis)실험**—저장액 또는 등장액에 0.25ml의 혈액을 가하여 최종용적이 4ml되게 한 다음 5분간 방치, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상층액의 흡광도를 색도 표준액과 비교하여 용혈이 일어난 혈구의 %를 산출하였다.

**Saponin, SDS 및 Triton X-100의 영향**—적혈구의 용적변화 측정시에는 적혈구 부유액 1ml에 일정한 농도의 saponin, SDS 또는 Triton X-100을 함유하는 NaCl 용액 1ml를 가하여 최종용적이 2ml되게 하였으며, 용혈 측정시에는 일정한 농도의 saponin, SDS, 또는 Triton X-100을 함유하는 NaCl 용액 3.75ml에 혈액 0.25ml를 가하여 최종용적이 4ml되게 하였다. 처리한 약물의 농도는 혈액 또는 적혈구 부유액 0.25ml당 사용한 약물의 양으로 표시하였다.

### 실험결과 및 고찰

**적혈구의 용적변화**—NaCl 농도변화에 따른 적혈

구의 용적변화—Fig. 1은 1/12~1M NaCl 1ml에 적혈구 부유액 1ml를 가하고 5분간 방치한 다음 각 NaCl 농도에서 hematocrit치를 측정된 것으로 등장액인 0.15M NaCl 용액에서의 hematocrit치는  $45 \pm 2.3$ (3예)이었으며, NaCl 농도를 1/8M로 감소시켰을 때부터 적혈구의 용적 증가가 일어나기 시작하여 1/10M일 때  $22.2 \pm 1.1\%$ (3예)의 최대증가를 보였다. 한편 고장액 중에서는 용적감소가 일어났고 1M NaCl 용액중에서 최대  $38 \pm 1.9\%$ (3예)의 감소를 나타내었다.

등장액 중에서의 saponin 및 detergents에 의한 적혈구의 용적변화—각 농도의 saponin 또는 계면활성제를 함유하는 등장액 1ml중에 적혈구 부유액 1ml를 가하고 15분간 방치한 후, hematocrit치를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. SDS 및 은시호 saponin은 적혈구 부유액 0.25ml당  $10 \mu\text{g}$ 에서부터 hematocrit의 감소를 일으켰고( $p < 0.05$ ), Triton X-100은  $40 \mu\text{g}$ 에서부터 hematocrit의 감소를 일으켰으며( $p < 0.05$ ), 이때 50%의 감소를 일으키는 농도는 SDS와 은시호 saponin의 경우  $35 \pm 2.6 \mu\text{g}$  및  $28 \pm 2.2 \mu\text{g}$ , Triton X-100의 경우  $93 \pm 4.8 \mu\text{g}$ 이었다. 그러나 인삼 saponin은  $150 \mu\text{g}$ 에서도 hematocrit치에 아무런 영향을 미치지 못하였다.

NaCl 농도변화에 따른 적혈구의 용적변화에 미치는 detergents 및 saponin의 영향—등장액에서 약 50% hematocrit치의 감소를 일으키는 SDS( $35 \mu\text{g}/0.25 \text{ml}$ ), Triton X-100( $90 \mu\text{g}/0.25 \text{ml}$ ) 및 은시호( $30 \mu\text{g}/0.25 \text{ml}$ ) saponin을 함유하는 NaCl

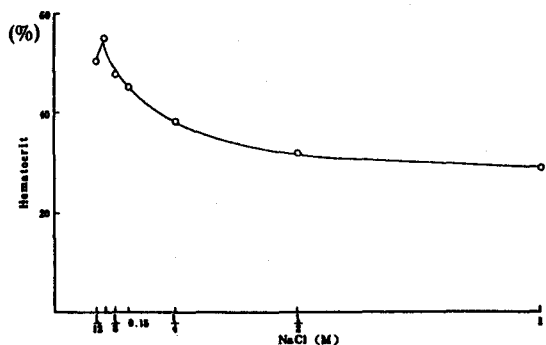


Fig. 1. Volume changes of red blood cell in the various concentrations of NaCl.

Mean values for three assays are given.

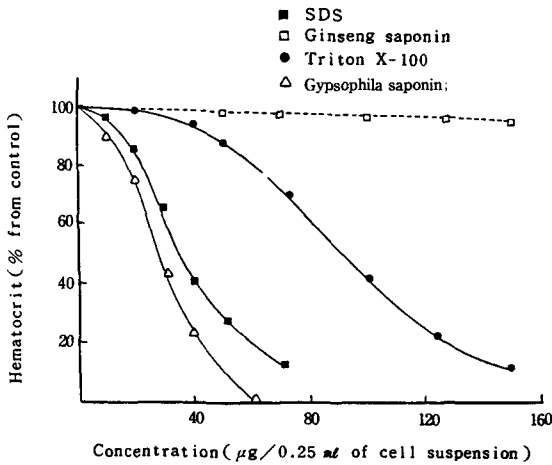


Fig. 2. Effect of saponins and detergents on volume change of red blood cell in isotonic solution. Hematocrit (% from control) was plotted as a function of increasing detergent. Each point represents mean value of three different assays. Control value of hematocrit was  $45 \pm 2.3$ .

각 농도 (1/12 M ~ 1 M)에서 NaCl 농도변화에 따른 용적변화를 관찰하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 고장액 중에서의 세포 용적 감소는 SDS, Triton X-100 및 은시호 saponin으로 영향을 받지 않았으나, 저장액 중에서의 세포용적 증가는 이들 detergent에 의하여 현저히 감소되었을 뿐만 아니라 대조군에서는 1/12 M NaCl 용액에서부터 용혈이 일어나는데 비해 detergent 존재시에는 1/10 M NaCl 용액에서 용혈이 일어났으며 그 용혈의 정도도 훨씬 컸다. 본 실험에서 detergents가 고장액 중으로의 수분이동에 의한 적혈구 용적감소에는 영향을 미치지 못하고, 저장액 중에서의 용적증가에 이어서 나타나는 용적감소를 촉진시켰음은 전술의 등장액 중에서의 detergent에 의한 용적감소가 세포의 액중으로의 수분이동에 의한 것이 아니고 적혈구막의 파괴에 의한 용혈에 기인함을 시사한다. 그러나, 본 실험에서도 인삼 saponin (200 μg/0.25 ml)은 NaCl 농도변화에 따른 적혈구 용적변화에 하등의 영향을 미치지 못하였다.

**용혈실험—삼투적 용혈—**NaCl 각 농도에서 용혈에 의하여 나타나는 색도를 100% 용혈이 일어났을 때의 색도와 비교한 결과 1/10 M NaCl 용액에서 용혈이 일어나기 시작하여 1/20 M NaCl 용액중에

서 100%의 용혈을 보였다. 이때 50% 용혈을 일으키는 NaCl 농도는 약 0.09 M (1/11 M)이었다 (Fig. 5).

등장액중에서 saponin 및 SDS가 적혈구막의 깨질성 (fragility)에 미치는 영향—각 농도의 계면활성제 또는 saponin을 함유하는 등장액 중에 혈액을 가한 다음 각 농도에서의 용혈정도를 탁분율로 환산하여 Fig. 4에 나타내었다. SDS 및 은시호 saponin은 혈액 0.25 ml당 20 μg에서부터 유의한 용혈을 일으키기 시작하여 ( $p < 0.05$ ) 80 μg에서 100% 용혈을 일으켰으며, 50% 용혈을 일으키는 농

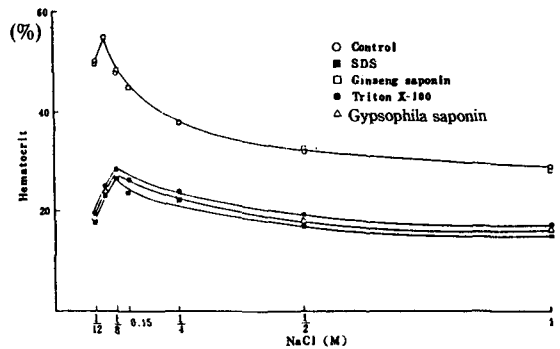


Fig. 3. Effect of saponins and detergents on volume change of red blood cell in the various concentrations of NaCl.

Blood was treated with 35ug of SDS (■), 200ug of ginseng saponin (□), 90ug of Triton X-100 (●), or 30ug of gypsophila saponin (△) per 0.25 ml of cell suspension. Each point denotes the mean of three assays.

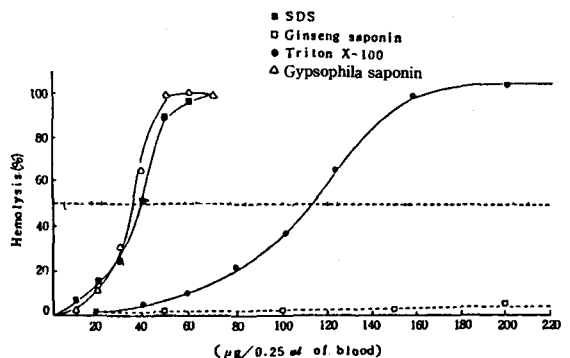


Fig. 4. Effect of saponins and detergents on fragility of red blood cell in isotonic solution. Each point represents mean value of three different assays.

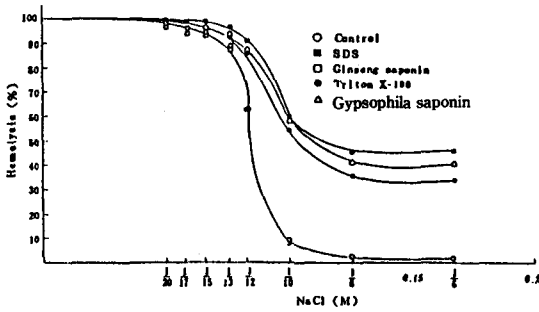


Fig. 5. Effect of saponins and detergents on osmotic hemolysis of red blood cell in the various concentrations of NaCl.

Blood was treated with 40ug of SDS(■), 200ug of ginseng samponin(□), 110ug of Triton X-100(●), or 35ug of gypsophila saponin(△) per 0.25 ml of blood. Each point denotes the mean of three assays.

도는 3예에서 각각 40±3.4 μg 및 35±3.4 μg로서 두 군에서 유사하였다. 한편 Triton X-100은 40 μg에서부터 용혈을 일으키기 시작하여 (p<0.05) 150 μg에서 100% 용혈을 보였으며 50% 용혈을 일으키는 농도는 은시호 saponin이나 SDS보다는 약 3배가 많은 110±10.1 μg이었다. 그러나 인삼 saponin은 200 μg을 가하여도 거의 용혈을 유발하지 않았다.

삼투적 용혈에 미치는 saponin 및 detergents의 영향—Fig. 5에서는 1/20 M~1/6 M의 NaCl 용액 중에 전술의 약 50% 용혈을 일으키는 SDS, Triton X-100 및 은시호 saponin을 가하고 혈액 0.25 ml를 가하였을 때 적혈구의 용혈정도를 detergents를 가하지 않은 대조군 및 인삼 saponin을 가한 실험군과 비교한 것이다. SDS, Triton X-100 및 은시호 saponin은 적혈구의 삼투적 용혈을 현저히 촉진하였으며, 대조군의 경우 1/20 M NaCl에서 100% 용혈을 일으키는데 비해 SDS, 은시호 saponin 및 Triton X-100의 경우 1/15 M-1/13 M NaCl 농도에서 100% 용혈을 일으켰다. 그러나 인삼 saponin의 경우 200 μg에서도 적혈구의 삼투적 용혈에 아무런 영향을 미치지 못하였다.

일반적으로 chemical detergents와 식물 saponin은 세포막을 구성하고 있는 지질을 제거함으로써 세포막을 파괴하며 특히 saponin은 cholesterol에 친화성이 커서 막붕괴를 일으키는 것으로

알려져 있다.<sup>6,9)</sup>

그러나 본 실험에서 인삼 saponin은 은시호 saponin이 용혈을 일으키는 20배의 농도에서도 용혈을 일으키지 않았다. 이는 인삼 saponin의 막지질에 대한 친화성이 은시호 saponin보다 훨씬 약함을 시사하는 것으로서 Lee 등<sup>10)</sup>이 보고한 심장형질막에 대한 이들 saponin의 작용상의 차이와도 매우 연관성이 있는 것으로 사료된다.

결 론

인삼 saponin과 계면활성제로 흔히 사용되고 있는 SDS, Triton X-100 및 은시호 saponin(*Gypsophila oldhamiana* Miq.)의 세포막에 대한 작용을 적혈구의 용적변화와 용혈반응을 지표로 비교 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1. 적혈구의 용적은 1M NaCl 용액중에서 약 38% 감소되었으며 1/10 M NaCl 용액중에서 약 20% 증가되었다.
- 2. 적혈구 부유액 0.25 ml당 은시호 saponin과 SDS는 20 μg에서부터, Triton X-100은 40 μg에서부터 hematocrit치를 감소시켰으나 인삼 saponin은 150 μg에서도 hematocrit치에 영향을 미치지 못하였다.
- 3. 은시호 saponin, SDS 및 Triton X-100은 저장액중에서의 적혈구 용적증가를 현저히 억제하였으나 인삼 saponin은 NaCl 농도변화에 따른 적혈구 용적변화에 아무런 영향을 미치지 못하였다.
- 4. 등장액중에서 50% 용혈을 일으키는 은시호 saponin, SDS 및 Triton X-100의 양은 혈액 0.25 ml당 각각 약 35 μg, 40 μg 및 110 μg이었다.
- 5. 은시호 saponin, SDS 및 Triton X-100은 저장액중에서의 용혈반응을 촉진시켰으나 인삼 saponin은 적혈구의 삼투적 용혈에 영향을 주지 못했다.
- 6. 이상 실험결과 식물 saponin의 막붕괴작용은 saponin의 종류에 따라 현저한 차이가 있으며 인삼 saponin은 막지질에 대한 친화성이 매우 약한 것으로 사료된다.

문 헌

1) Guyton, A.C., Text Book of Medical Physiology, 7th

- Edition, Saunders, p. 95 (1986).
- 2) Kregenow, F.M.: Osmoregulatory salt transporting mechanisms; Control T cell volume in anisotonic media. *Annu. Rev. Physiol.* **43**, 493 (1981).
  - 3) Macknight, A.D.C. and Leaf, A.: Regulation of cellular volume, *Physiol. Rev.* **57**, 510 (1977).
  - 4) Ellory, C. and Lew, V.L.: Membrane transport in red cells, New York, Academic Press (1977).
  - 5) Fettiplace, R., and Haydon, D.A.: Water permeability of lipid membranes. *Physiol. Rev.*, **60**, 510 (1980).
  - 6) Gloxhuber, C.: Anionic surfactants; Biochemistry, toxicology, dermatology, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, p. 41 (1981).
  - 7) Namba, T., Yoshizaki, M., Tomimori, T., Kobashi, K., Mitsui, K., and Huse, J.: Fundamental studies on evaluation of crude drugs. III, Chemical and biochemical evaluation of ginseng and related crude drugs. *Yakugaku Zasshi* **94**, 252 (1974).
  - 8) Han, B.H., Han, Y.N., and Kwon, Y.M.: Studies on the anti-inflammatory glucosides of Panax ginseng. *Yakhak Hoeji* **16**, 129 (1972).
  - 9) Jones, L.R., Maddock, S.W. and Besch, H.R. Jr.; Unmasking effect of alamethicin on the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase,  $\beta$ -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase, and cAMP-dependent protein kinase activities of cardiac sarcolemmal vesicles. *J. Biol. Chem.*, **255**, 9971 (1980).
  - 10) Lee, S.W., Lee, J.S., Kim, Y.H. and Jin, K.P.; Effect of ginseng saponin on the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase of dog cardiac sarcolemma. *Arch. Pharm. Res.*, **9**, 29 (1986).