

인삼의 dammarane 계 glycosides 분획물이 일차 배양한 계배의 근육세포에 미치는 영향

정영경 · 박미정 · 송진호 · 김영중

(Received April 19, 1989)

The Effect of Dammarane Glycosides of *Panax ginseng* on Primary Cultured Chicken Embryonic Muscle Cells

Young Kyeong Jung, Mi Jung Park, Jin Ho Song, and Young Choong Kim
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

Abstract—Effects of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on primary cultured chicken embryonic skeletal muscle cells were studied by microscopic observation and determination of the activity of acetylcholinesterase. Muscle cells were prepared from the breast of 12-day-old chicken embryo and cultured with either a medium consisted of 87.5% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10% horse serum and 2.5% chicken embryonic extract or a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum. It was observed that dammarane glycosides of *Panax ginseng* seemed to show the tendency to stimulate the growth and the differentiation of the muscle cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum under microscopic observation. The activity of acetylcholinesterase in the muscle cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum was increased by dammarane glycosides of *Panax ginseng*.

Keywords □ Dammarane glycosides of *Panax ginseng*, chicken embryo, muscle cell culture, acetylcholinesterase

인삼은 생체내에서 여러 생리작용에 관여하여 다양한 약리효과를 나타낸다고 수많은 학자들이 보고하였다.¹⁻³⁾ 그러나 아직까지도 이를 뒷받침할만한 체계화된 정설을 찾지 못하고 있는데 이는 인삼의 효과가 비특이적이며, 상당히 많은 용량을 장기간에 걸쳐 투여하지 않으면 그 효과를 기대하기 힘들고, 또 인삼의 효과를 체계화하는데 적합한 방법을 찾기가 어렵기 때문이다. 이에 본 연구에서는 인삼의 가장 효과를 체계화하는데 적합한 방법을 찾기 위한 연구의 일환으로 비교적 짧은 시간내에 미량으로 세포 수준에서 그 효과를 검색할 수 있는 일차세포 배양법을 도입하여 우선 근육세포의 성장에 미치는 효과를 알아보았다. 계배의 근육세포를 채외에서 배양하면서 인삼의 총 dammarane 계 glycosides 분획물, panaxadiol 및 panaxatriol 계 glycosides 분획물을 투여하여 그 효과를 현미경으로 관찰하였다. 또한 근육세포의 성장과 분화에 밀접한 관계를 가지

고 있는 acetylcholinesterase의 활성을 측정하여 인삼의 효과를 알아보았다.⁴⁾

실험방법

재료 및 시약—본 실험에 사용한 인삼은 강화산 6년근이며, 계배 (chicken embryo)는 일령 12일된 것을 유일농원 (서울, 오류동)에서 구입하였다. 조직 배양에 필요한 시약은 Grand Island Biological Company (미국) 제품을, 기타 시약은 Sigma Chemical Company (미국), Kanto (일본) 및 Shiny (일본)의 특급시약을 사용하였다.

인삼 dammarane 계 glycosides의 제조^{5,6)}—인삼 500g의 MeOH 추출물 (1×3회)을 감압농축한 후 농축물을 최소량의 물에 녹이고 ether로 세척하여 유상물질을 제거하였다. 물층을 n-BuOH로 추출하여 총 dammarane 계 glycosides 분획물을 얻

었으며, n-BuOH 층을 5% NaOH 로 처리한 후 n-BuOH 층을 농축하여 panaxatriol 계 glycosides 분획물을 얻고 NaOH 층을 1N-HCl 로 중화하고 중화층을 다시 n-BuOH 로 추출 농축하여서 panaxadiol 계 glycosides 분획물을 얻었다.

계배 추출물(chicken embryonic extract)의 제조⁷⁾—일령이 12일된 계배를 적출하여 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 세척한 후, 주사기를 이용하여 원심분리관속에 압출하고, 동량의 HBSS 로 희석하였다. 실온에서 30분간 방치한 후, 4°C에서 18,000 rpm 으로 25분간 원심분리하여서 그 상등액을 취하여 사용하였다.

계배의 근육세포 배양⁸⁾—일령이 12일된 계배의 가슴근육을 적출하여, 결합조직을 제거하고 0.2% trypsin 으로 조직을 연화시킨 후 세포상태로 분리하였다. Fibroblast 를 제거하기 위하여 1×10^6 cells/ml 농도의 세포를 이식시켜 37°C에서 45분간 공기(95%)와 CO₂(5%)의 혼합기체를 공급하면서 배양하였다. 그 후 상등액만을 조심스럽게 취하여 약 5×10^5 cells/ml 농도의 근육세포를 collagen 도포 배양용기에 이식하여 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 87.5%, 말(horse) 혈청 10.0%, 계배 추출물 2.5%, Penicillin 10,000 IU/100 ml, Streptomycin 10,000 µg/100 ml 과 Amphotericin B 500 µg/100 ml 으로 구성된 배양액과 이 배양액에서 세포 성장에 필수물질인 계배 추출물만을 제거한 배양액을 사용하였다. 세포의 배양은 일정한 습도를 유지하는 37°C 배양기에서 공기(95%)와 CO₂(5%)의 혼합기체를 계속 공급시키면서 수행하였다.

인삼 dammarane 계 glycosides 분획물의 투여—인삼 총 dammarane 계 glycosides, panaxadiol 및 panaxatriol 계 glycosides 를 각각 증류수에 용해시킨 후 (1 mg/ml) millipore membrane (0.22 µm, Millex-GV, U.S.A.)를 사용하여 여과 멸균하였다.

단백질의 정량⁹⁾—배양한 세포의 단백질 함량은 Lowry 방법에 의하여 bovine serum albumin 을 표준품으로 하여 500 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

Acetylcholinesterase 의 정량¹⁰⁾—배양한 세포

중에 존재하는 acetylcholinesterase 의 함량은 Ellman 의 방법에 의하여 측정하였다. 인산 원충액 (0.1 M, pH 8.0) 2.6 ml 가 들어있는 photocell 에 단백질 정량이 된 세포균질물 0.4 ml 를 가하고 비특이성 cholinesterase 의 반응 억제제인 tetra-isopropylpyrophosphoramidate 를 반응계의 최종 농도가 1×10^{-4} M 농도가 되도록 가하였다. 여기에 dithiobisnitrobenzoate 100 µl 를 가하고 412 nm 에서 흡광도를 측정하여 흡광도가 안정화되었을 때의 흡광도를 기준으로 하고, 기질로서 acetylthiocholine iodide 20 µl 를 가한 후 1분간의 흡광도 변화를 측정하였다. Acetylcholinesterase 의 특이적 효소활성은 세포균질물의 단백질 1 mg 이 1분당 변화시킨 흡광도 변화량 (ΔA /분/mg protein of tissue homogenate)으로 나타내었다.

결과 및 고찰

인삼이 근육세포의 성장발달에 어떻게 영향을 미치는가를 밝히기 위하여 계배의 가슴근육으로부터 근육세포를 준비하여 정상상태와 비정상상태로 체외에서 배양하면서 인삼의 성분 중에서 총 dammarane 계 glycosides 분획물, panaxadiol 및 panaxatriol 계 glycosides 분획물을 각각 첨가하여 그 효과를 현미경으로 관찰하였으며 또한 근육세포의 성장, 분화에 밀접한 관계가 있는 효소로 알려진 acetylcholinesterase 의 활성을 측정하였다.

인삼성분이 근육세포에 미치는 뚜렷한 효과를 알아보기 위하여서는 정상상태에서 보다는 비정상상태에서 우선 연구하는 것이 바람직하다고 생각되어 세포분화와 성장에 필수물질이라 알려진 계배 추출물을 함유하지 않고 DMEM 90%와 말 혈청 10%만으로 구성된 배양액으로 배양하여 근육세포의 성장을 제한시키고, 총 dammarane 계 glycosides 분획물의 양을 배양액 1 ml 당 10 µg 에서 70 µg 까지 농도를 변화시키면서 현미경하에서 관찰하였다. 이 결과 인삼의 총 dammarane 계 glycosides 분획물은 15 µg/ml 에서 70 µg/ml 의 농도에서 근육세포의 성장을 촉진하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 dammarane 계 glycosides 의 양을 배양액 1 ml 당 50 µg 씩 투여하고 그 효과를 알아

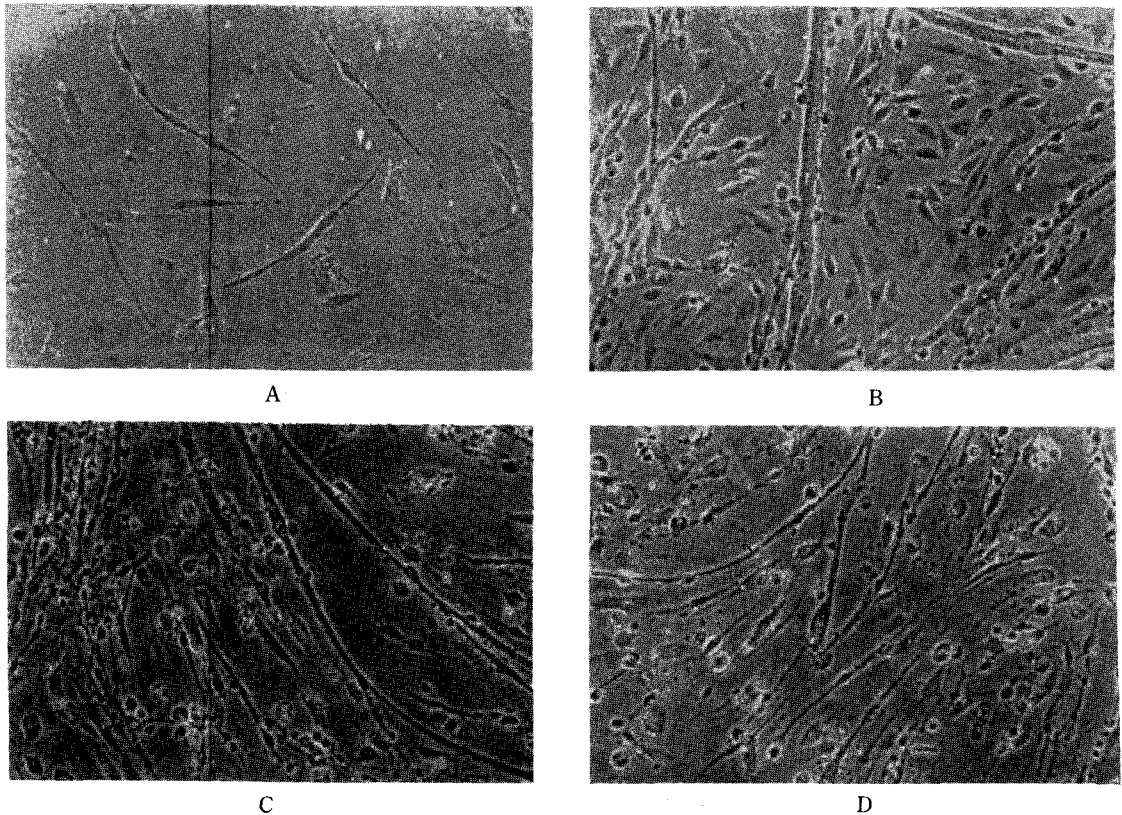


Fig. 1— The effect of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on the growth of chicken embryonic muscle cells with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 4 days ($\times 200$). A: Muscle cells cultured in the absence of dammarane glycosides of *Panax ginseng*. B: Muscle cells cultured in the presence of $50 \mu\text{g/ml}$ total dammarane glycosides. C: Muscle cells cultured in the presence of $50 \mu\text{g/ml}$ panaxadiol glycosides. D: Muscle cells cultured in the presence of $50 \mu\text{g/ml}$ panaxatriol glycosides.

보았다(Fig.1). Dammarane 계 glycosides 분획물을 첨가하지 않은 경우에는 근육세포가 myoblast의 상태에서 성장이 멈추며 myotube 상태로는 거의 발달하지 못하는 것으로 관찰되었으며 단위면적에서 관찰되어지는 생존세포의 수도 현저히 감소하였다. 그러나 dammarane 계 glycosides 분획물을 첨가한 경우에는 가늘고 짧긴하나 myotube 상태로 발달되었으며 단위면적에서 관찰되어지는 근육세포의 수도 dammarane 계 glycosides 분획물을 첨가하지 않은 경우보다 더 많았다(Table I). 따라서 dammarane 계 glycosides 분획물은 체외배양한 계배 근육세포의 생존기간 연장에 영향을 미칠 것이라 사료된다. 그러나, 계배의 근육세포를 DMEM 87.5%, 말 혈청 10%, 계배 추출물 2.5%로 구성된 배양액으로 정상상태로 배양하였을 때는

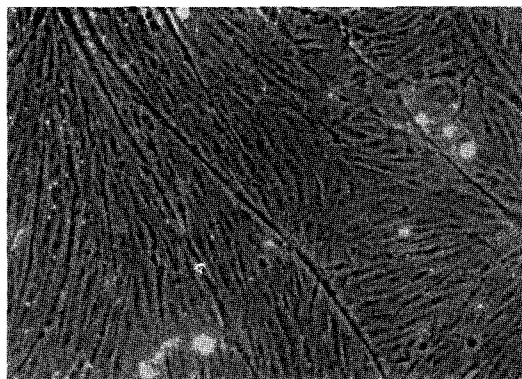
dammarane 계 glycosides 분획물의 첨가와 관계 없이 모두 굵고 길게 잘 발달된 myotube로 자라서 인삼성분에 의한 성장촉진효과를 볼 수 없었다(Fig. 2).

현미경 관찰을 통해서 본 근육세포의 성장에 대한 dammarane 계 glycosides 분획물의 효과는 세포 성장의 필수물질이라 알려진 계배 추출물에 비하면 그 정도가 훨씬 못 미치나, 계배 추출물을 함유하지 않는 배양액으로 배양한 근육세포의 성장 발달에 영향을 미치며, 생존기간도 연장시키는 효과를 나타낼 수 관찰하였다.

이러한 현미경으로 관찰된 인삼의 dammarane 계 glycosides 분획물의 성장촉진효과를 뒷받침하기 위하여 근육세포 중에 존재하는 효소로서 근육세포의 성장, 분화에 척도가 될 수 있는 acetyl-

Table I—The effect of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on the number of chicken skeletal muscle cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM and 10% horse serum for 4 days.

Substance	Concentration of dammarane glycosides of <i>Panax ginseng</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Number of cells
Control	0	2.3 ± 0.4
Total dammarane glycosides	10	22.5 ± 2.1
	20	23.5 ± 1.4
	30	23.3 ± 6.7
	50	18.0 ± 3.5
	70	25.0 ± 0.7
	100	23.3 ± 6.0
Panaxadiol glycosides	10	17.5 ± 2.8
	20	13.8 ± 1.1
	30	17.3 ± 0.4
	50	25.8 ± 4.6
	70	20.0 ± 2.8
	100	23.3 ± 4.6
Panaxatriol glycosides	10	19.3 ± 0.4
	20	27.0 ± 0.7
	30	28.5 ± 2.1
	50	23.5 ± 2.8
	70	22.5 ± 0.7
	100	26.8 ± 0.4



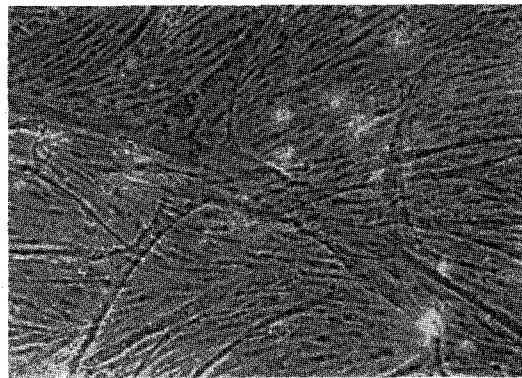
B



C



A



D

Fig. 2—The effect of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on the growth of chicken embryonic muscle cells with a medium consisted of 87.5% DMEM, 10% horse serum and 2.5% chicken embryonic extract for 4 days ($\times 200$). A: Muscle cells cultured in the absence of dammarane glycosides of *Panax ginseng*. B: Muscle cells cultured in the presence of $05 \mu\text{g/ml}$ total dammarane glycosides. C: Muscle cells cultured in the presence of $50 \mu\text{g/ml}$ panaxadiol glycosides. D: Muscle cells cultured in the presence of $50 \mu\text{g/ml}$ panaxatriol glycosides.

Table II—The effect of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on the activity of acetylcholinesterase in chicken embryonic muscle cells cultured with a medium consisted of 87.5% DMEM, 10% horse serum and 2.5% chicken embryonic extract for 4 days.

Substance	Concentration of dammarane glycosides of <i>Panax ginseng</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Activity of acetylcholinesterase	
		Specific activity ($\Delta A/\text{min/mg protein}$) $\times 10^{-3}$	Relative activity (%)
Control	0	0.1572 \pm 0.0253	100
Total dammarane glycosides	50	0.1459 \pm 0.0084	93
Panaxadiol glycosides	50	0.1560 \pm 0.0131	99
Panaxatriol glycosides	50	0.1570 \pm 0.0063	99.9

cholinesterase의 활성에 미치는 인삼 성분의 영향을 알아보았다.

계배의 근육세포를 체외에서 DMEM 87.5%, 말혈청 10%, 계배 추출물 2.5%로 구성된 배양액으로 4일간 배양한 후 acetylcholinesterase의 활성을 측정하였다(Table II). 이 경우 총 dammarane 계 glycosides 분획물을 물론 panaxadiol 및 panaxatriol 계 glycosides 분획물 모두 acetylcholinesterase의 활성에 별다른 영향을 미치지 않았다.

그러나 계배의 근육세포를 똑같은 조건에서 계배 추출물을 함유하지 않는 배양액으로 배양하였을 때는 실험에 사용한 모든 인삼의 dammarane 계 glycosides 분획물이 acetylcholinesterase의 활성을 증가시켰으며, 특히 panaxadiol 계 glycosides 분획물은 약 50%나 증가시켰다(Table III).

이렇게 인삼의 dammarane 계 glycosides 분획물이 그 활성을 촉진시키는 acetylcholinesterase는 근육세포의 분화와 성장에 밀접한 관계를 가지며 또한 특이한 형태의 근무력증의 경우 신경근 종판에서 이 효소가 결핍되어 있는 것으로 보아 근육의 정상적인 기능유지에도 관련성이 있을 것으로 사료된다.¹¹⁾ 본 연구 결과 근육세포의 성장에 필요한 영양분을 결핍시켜 배양세포의 성장을 제한시켰을 때, 인삼의 dammarane 계 glycosides 분획물이

Table III—The effect of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on the activity of acetylcholinesterase in chicken embryonic muscle cells cultured with a medium consisted of 90% DMEM, and 10% horse serum for 4 days.

Substance	Concentration of dammarane glycosides of <i>Panax ginseng</i> ($\mu\text{g/ml}$)	Activity of acetylcholinesterase	
		Specific activity ($\Delta A/\text{min/mg protein}$) $\times 10^{-3}$	Relative activity (%)
Control	0	0.0386 \pm 0.0089	100
Total dammarane glycosides	50	0.0484 \pm 0.0045	125
Panaxadiol glycosides	50	0.0592 \pm 0.0063	153
Panaxatriol glycosides	50	0.0587 \pm 0.0033	152

acetylcholinesterase의 활성을 증가시키고 동시에 근육세포 성장을 촉진, 생존기간을 연장시키는 것으로 보아 근육계통 질환의 예방이나 치료에 인삼의 dammarane 계 glycosides 분획물의 사용 가능성을 부여한다 하겠다.

결 론

인삼의 총 dammarane 계 glycosides 분획물, panaxadiol 및 panaxatriol 계 glycosides 분획물은 모두 비정상상태로 유도배양한 계배의 근육세포의 성장을 촉진시켰으며 근육세포 중에 존재하는 acetylcholinesterase의 활성을 촉진시키는 경향을 나타냈다.

감사의 말씀

본 연구가 진행되게 지원해 준 한국과학재단에 깊이 감사하는 바이다.

문 헌

- 1) Takagi, K., Saito, H. and Nabata, H., Pharmacological studies of *Panax ginseng* root, *Japan. J. Pharmacol.* **22**, 245 (1972).
- 2) Kim, J.Y. and Staba, E.J., *Korean Ginseng Studies.*

- Ilwha Co. Ltd., Seoul Korea, p.1 (1977).
- 3) Han, B.H. and Woo, L.H., *ibid.* p.22.
 - 4) Schubert, D., *Developmental Biology of Cultured Nerve, Muscle, and Glia*, A Wiley-Interscience Publication, New York, p.26 (1984).
 - 5) Shibata, S., Tanaka, O., Soda, M. and Tsushima, S., On Genuine Sapogenin of Ginseng, *Tetrahedron Letters* **12**, 795 (1963).
 - 6) Shibata, S., Tanaka, O., Soda, M. and Tsushima, S., Studies on the Constituents of Japanese and Chinese Crude Drugs XI, *Chem. Pharm. Bull.* **11**, 759 (1963).
 - 7) White, P.R., *The Cultivation of Animal and Plant Cells*, The Ronald Press Company, New York, p.66 (1963).
 - 8) Yaffe, D., Retention of Differentiation Potentialities during Prolonged Cultivation of Myogenic Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**, 477 (1968).
 - 9) Lowry, O.H., Resebrough, N.J., Farr, A.L. and Rondall, R.J., Protein Measurement with the Folin-phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
 - 10) Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andre, J.V. and Featherstone, R.M., A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88 (1961).
 - 11) Engel, A.G., Lambert, E.H. and Gomez, M.R., A New Myasthenic Syndrome with End-plate Acetylcholinesterase Deficiency, Small Nerve Terminals, and Reduced Acetylcholine Release, *Ann. Neurol.* **1**, 4 (1977).