

인삼 분획물이 Galactosamine 에 의하여 손상된 일차배양한 흰쥐의 간세포에 미치는 영향

송진호 · 박미정 · 김 은* · 김영중

서울대학교 약학대학, *한국인삼연초연구소

(Received August 22, 1990)

Effects of *Panax ginseng* on Galactosamine-induced Cytotoxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes

Jin Ho Song, Mi Jung Park, Eun Kim* and Young Choong Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

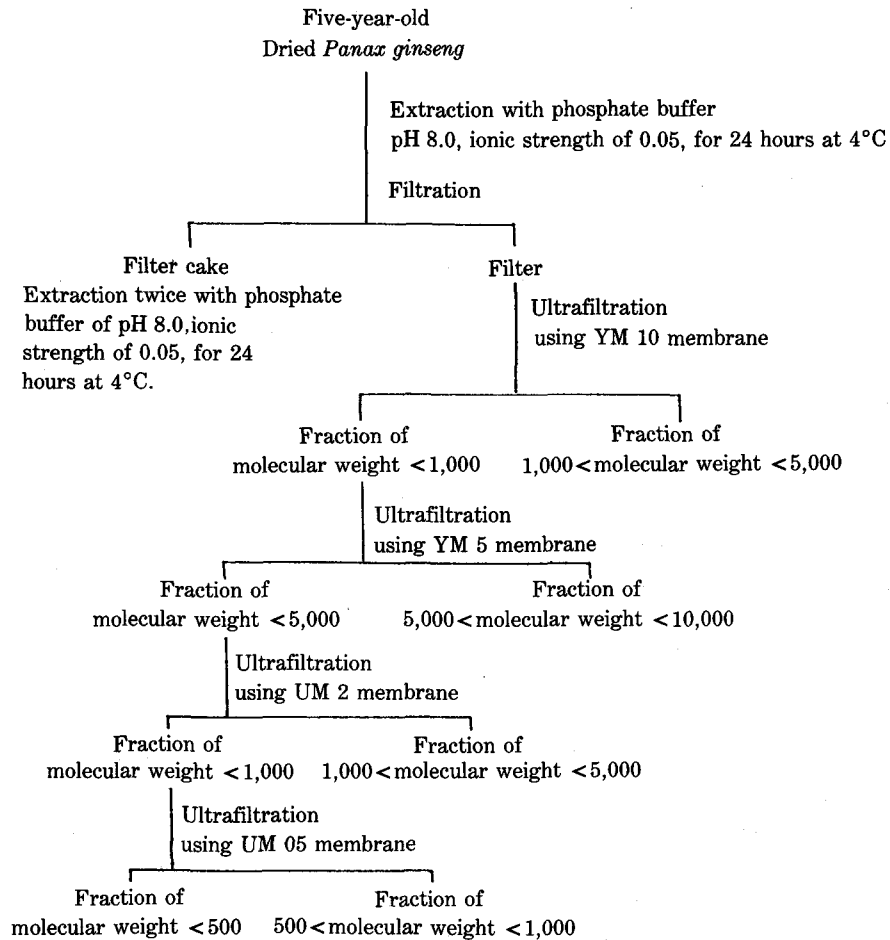
*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon, 305-345, Korea

Abstract—The anti-hepatotoxic activity of *Panax ginseng* was studied using galactosamine (GalN)-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Panax ginseng* was fractionated into dammarane glycosides and protein fractions. The dammarane glycosides was further fractionated into panaxadiol and panaxatriol glycosides fractions. The protein fraction was further fractionated into four groups according to the molecular weight; larger than 10,000 dalton, between 5,000 and 10,000 dalton, between 1,000 and 5,000 dalton and between 500 and 1,000 dalton. A significant lowering action on the elevated glutamic-pyruvic transaminase (GPT) activity in the culture medium of hepatocytes treated with 1.5 mM GalN was noticed with all four protein fractions studied at the concentration of both 50 $\mu\text{g/ml}$ and 100 $\mu\text{g/ml}$. However, the effect of dammarane glycosides fractions was not significant. It was noted that the addition of 100 $\mu\text{g/ml}$ of protein fractions smaller than 5,000 dalton significantly enhanced the syntheses of protein and RNA in the damaged hepatocytes induced by the treatment of 1.5 mM GalN. Dammarane glycosides fractions significantly enhanced protein synthesis at the concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$ in the damaged hepatocytes by treatment of 1.5 mM GalN.

Keywords □ *Panax ginseng*, Dammarane glycosides fraction, Protein fraction, Primary cultured rat hepatocytes, Galactosamine-induced cytotoxicity

인삼은 우리나라의 특산 생약으로 강장, 강정작용이 있다하여 불로장생약으로 약 2천여년 전부터 애용되어 왔으며, 이의 효능을 밝히기 위한 연구가 다각적으로 진행되어 왔다. 인삼은 기초대사를 항진시키고, ¹⁾ 생체내에서 단백질의 합성을 촉진하며, ²⁾ 빈혈, 당뇨병, 고혈압에 대한 저항력을 나타내고, ³⁾ 피로를 회복시키고, ^{4,5)} stress에 대한 방어작용이 있으며, ⁶⁾ 중추신경계를 강화시킨다^{7,8)}는 등 생체내에서 일어나는 여러 생리작용에 관여한다고 알려졌다. 그러나 인삼의 약효에 대해서는 아직도 체계화된 정설을 제시하지 못하고 있는데 이는 여러 가지

문제점들을 생각할 수 있지만 우선 인삼의 효과가 비특이적이며 급성효과를 가지고 있지 않아 장기간에 걸쳐 투여하지 않으면 그 효과를 기대하기 어렵고 많은 양을 투여하지 않으면 독성을 나타내지 않으므로 적합한 연구방법을 찾기가 어려운데 있었던 것으로 생각할 수 있겠다. 또한, 인삼의 유효성분이 분명하게 규명되어 있지 않은 것도 문제점으로 들 수 있겠다. 인삼의 유효성분으로는 dammarane계 glycosides로 20여 종류의 ginsenosides가 분리되었으며, 이들 ginsenosides에 의하여 인삼의 다양한 효과가 나타나는 것으로 간주해왔다. 그러나 최



Scheme I—Procedures for the extraction and fractionation of protein constituents of dried *Panax ginseng* root.

근에는 인삼의 peptide 성분이 anti-lipolytic activity를 가지며,⁹⁾ phenol계 성분이 항산화작용을 나타낸다는 등의 보고로^{10,11)} ginsenosides 이외의 성분에 대한 관심이 높아지고 있다. 이에 본 연구에서는 인삼을 크게 dammarane계 glycosides 분획물과 단백 분획물로 나누어 이들 분획물들이 간에 어떻게 작용하는지를 일차배양한 흰쥐의 간세포를 이용하여 알아보았다.

실험방법 및 재료

재료 및 시약—본 실험에 사용한 인삼은 강화산 6년근이며, 흰쥐(Sprague-Dawley, male, 150~200g)는 서울대학교 실험동물 사육장에서 공급받았다. 조직배양에 필요한 시약 및 기타 시약들은

Sigma Chemical Company(USA) 제품을 사용하였다. 방사성 동위원소 및 Aquasol은 NEN Research Products(USA)에서 구입하여 사용하였다.

인삼 dammarane계 glycosides의 제조—인삼 500g의 메탄올추출물(1/×3회)을 감압농축한 후, 농축물을 최소량의 물에 녹이고 ether로 세척하여 유상물질을 제거하였다. 물층을 n-BuOH로 추출하여 총 dammarane계 glycosides 분획물을 얻었으며, n-BuOH 층을 5% NaOH로 처리한 후 n-BuOH 층을 농축하여 panaxatriol계 glycosides 분획물을 얻고 NaOH 층을 1N HCl로 중화하고 중화층을 다시 n-BuOH로 추출 농축하여서 panaxadiol계 glycosides 분획물을 얻었다.^{12,13)}

인삼단백성분의 추출 및 분획—인삼을 증류수로 세척한 후 잘게 부수어 Okuda 등의 방법¹⁴⁾을 약간 수정하여 4°C 이하에서 인산완충액 (pH 8.0, ionic strength 0.05)을 사용하여 계속 교반하면서 24 시간 동안 추출한 다음 여과하였다. 여과시킨 후의 잔사는 다시 상기와 같은 방법으로 2회 더 추출하여 여과한 다음 여액을 모두 합하였다. 여액은 한외여과장치 (ultrafiltration apparatus: Amicon stirred cells, model 202)를 이용하여 분자량 500 (UM05), 1,000 (UM2), 5,000 (YM5), 10,000 (YM10)을 각각 분획할 수 있는 한외여과막 (ultrafiltration membrane)을 사용하여 질소가스상에서 Scheme 1 과 같이 분획하였다.

흰쥐의 간세포 배양—간세포는 몸무게 150~200g 되는 웅성 흰쥐로부터 Berry의 방법¹⁴⁾을 약간 수정한 방법으로 분리하여 5×10^5 cell/ml의 농도로 collagen이 도포된 배양용기 (Falcon, 15×24 mm)에 이식하였다. 배양액은 Waymouth's MB 571/1 medium, 10% fetal calf serum, 2.0 mg/ml bovine serum albumin (fraction V), 10^{-6} M dexamethasone, 10^{-7} M insulin, 5.32×10^{-2} M L-serin, 4.09×10^{-2} M L-alanine, 2.67×10^{-2} M NaHCO₃, 10,000 IU/100 ml penicillin, 10,000 IU/100 ml streptomycin과 500 µg/100 ml amphotericin B로 구성된 배양액을 사용하였다.

세포의 배양—세포는 일정한 습도를 유지하는 37°C 배양기에서 공기 (95%)와 CO₂ (5%)의 혼합기체를 계속 공급하면서 배양하였다.

Galactosamine (GalN)에 의해 유도된 간독성의 측정—간세포를 1.5 시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 1.5 mM GalN과 인삼 분획물을 함유한 배양액으로 갈아준 다음 간세포를 배양한지 48시간 후에 그 배양액을 채취하여 glutamic-pyruvic transaminase (GPT)의 활성을 Reitman-Frankel의 방법¹⁵⁾을 이용하여 측정하였다.

단백질 생합성 측정—단백질의 생합성은 [³H]-leucine을 배양액에 첨가하여 방사성 동위원소로 표지된 leucine이 배양세포의 단백질에 incorporation되는 정도를 측정하였다.¹⁶⁾ 간세포를 2일간 배양한 다음 배양액에 [³H]-leucine (1 µCi/ml)을 투여하여 2시간 동안 다시 배양하였다. 배양액을 제거한 후 HBSS로 3회 세척하고 10% trichloroacetic acid (TCA)를 1 ml 가하여 단백질을 침전시켰다. Ethanol과 ether의 혼합용액 (3:1) 1 ml로 잔존하는 TCA 용액을 제거한 후 1 N NaOH 200 µl로 단백질을 녹여내었다. 그 중 100 µl를 취하여 scintillation cocktail aquasol 5 ml에 가한 후 방사능을 측정하였다.

DNA 생합성 측정—DNA 생합성의 측정은 [³H]-leucine 대신 [³H]-thymidine을 사용하여 단백질 생합성 측정방법과 비슷한 방법¹⁶⁾으로 수행하였다.

RNA 생합성 측정—RNA 생합성의 측정은 [³H]-leucine 대신 [³H]-uridine을 사용하여 단백질 생합성 측정방법과 비슷한 방법¹⁶⁾으로 수행하였다.

통계처리—통계적 유의성 검토는 대조치로부터의 변동을 "ANOVA" test로 하였다. P 값이 5% 미만일 때는 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

인삼의 dammarane계 glycosides와 단백 분획물이 간에 어떻게 작용하는지를 밝히기 위하여 일차 배양한 흰쥐의 간세포를 galactosamine으로 처리하여 인위적으로 손상상태로 유도한 후 배양액 중으로 유리되는 GPT의 활성과 단백질, RNA 및 DNA 합성에 미치는 효과를 알아보았다.

인삼의 dammarane계 glycosides는 크게 panaxadiol glycosides 및 panaxatriol glycosides 분획물로 나누고 인삼의 단백 분획물은 인삼을 인산완충액 (pH 8.0, ionic strength 0.05)으로 추출한 후 한외여과장치를 이용하여 Scheme 1에서와 같이 분획하였다. 즉, 분자량에 따라 분자량이 500 이상 1,000 이하, 1,000 이상 5,000 이하, 5,000 이상 10,000 이하, 10,000 이상인 분획 등의 4군으로 크게 분획하였다.

이렇게 분리한 인삼의 각각의 분획물 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml 씩을 1.5 mM GalN과 함께 1.5 시간 동안 배양한 간세포에 투여한 다음 48시간 후에 배양액 중으로 유리되는 GPT 값을 측정하였다. 인삼의 dammarane계 glycosides 분획물들은 모두 100 µg/ml의 농도에서 GPT 값을 다소 감소시키는 경향을 보였으며 (Table I), 단백 분획물은 50 µg/ml과 100 µg/ml의 농도에서 GPT 값을 유의성있게 감소시켜 (Table II) GalN에 의한 간상

Table I—The effect of dammarane glycosides fractions of *Panax ginseng* on the GalN-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes.

Substance	GalN Concentration (mM)	($\mu\text{g/ml}$)	GPT (IU/liter)
Control	0	0	38.3 \pm 1.70
	1.5	0	65.7 \pm 6.65
Total dammarane glycosides fraction	1.5	10	59.0 \pm 8.29
		50	60.0 \pm 8.64
		100	53.3 \pm 1.25
Panaxadiol glycosides fraction	1.5	10	52.3 \pm 2.50
		50	52.3 \pm 2.05
		100	51.3 \pm 3.09
Panaxatriol glycosides fraction	1.5	10	63.3 \pm 4.03
		50	56.6 \pm 7.32
		100	57.6 \pm 2.05

Results are expressed as mean \pm S.D. of 3 separate determinations.

해를 어느 정도 회복시켜 줄 수 있었다. 본 연구에서는 인삼의 dammarane 계 glycosides 분획물들을 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 투여하였을 때 GalN으로 유도된 간상해가 어느 정도 회복되는 경향을 보였으나 순수하게 분리한 각각의 ginsenosides들을 10 $\mu\text{g/ml}$ 이나 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 투여하였을 때 오히려 독성을 나타내기도 하였으며 단지 20(S)-ginsenosides-Rs의 prosapogenin 및 20(S)-ginsenosides-Rh₁만이 GalN으로 유도된 간상해를 어느 정도 회복시켜 주었다는 연구보고¹⁷⁾와 비교하여 볼 때, ginsenosides를 함께 투여함으로써 이들 각각의 독성이 상쇄되며 오히려 미약하지만 간상해 회복작용이 나타나는 것으로 추측된다.

본 연구에서 간에 상해를 주기 위하여 사용한 GalN은 간세포에서의 단백질과 RNA 합성을 억제하여 간에 손상을 입히며, GalN에 의하여 손상받은 간세포의 기능과 형태의 변화는 virus 감염성 간염에 의한 것과 유사하다고 보고되고 있다. 또한, 간은 상해를 받았을 때 그 재생능력이 큰 기관이며 이러한 재생능력은 단백질, DNA 및 RNA의 합성이 활발해짐에 의하여 나타나는 결과로 볼 수 있겠다. 그러므로 GalN에 의해 상해를 입은 간세포의

Table II—The effect of protein fractions of *Panax ginseng* on the GalN-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes.

Substance	GalN Concentration (mM)	($\mu\text{g/ml}$)	GPT (IU/liter)
Control	0	0	38.3 \pm 1.70
	1.5	0	65.7 \pm 6.65
Protein fraction larger than 10,000 dalton	1.5	10	50.3 \pm 9.03
		50	49.0 \pm 2.16*
		100	49.0 \pm 2.45*
5,000 dalton < protein fraction < 10,000 dalton	1.5	10	52.6 \pm 4.19
		50	54.7 \pm 9.17
		100	52.0 \pm 4.32
1,000 dalton < protein fraction < 5,000 dalton	1.5	10	51.0 \pm 6.16
		50	52.0 \pm 1.63*
		100	46.6 \pm 5.73*
500 dalton < protein fraction < 1,000 dalton	1.5	10	52.0 \pm 2.16
		50	52.0 \pm 1.41*
		100	45.3 \pm 5.31*

After preincubation (1.5 h), the cells were exposed to the medium (1.0 ml) containing 1.5 mM GalN.

Results are expressed as mean \pm S.D. of 3 separate determinations.

Significantly different with respect to control: $p < 0.05^*$

단백질, DNA 및 RNA의 합성능력을 측정하여 인삼의 간의 재생능력에 미치는 효과를 알아보았다.

총 dammarane 계 glycosides, panaxadiol glycosides 및 panaxatriol glycosides를 각각 100 $\mu\text{g/ml}$ 씩 손상된 간세포에 투여하였을 때 단백질과 RNA의 합성이 모두 증가되는 경향을 보였으나(Table III), DNA 합성에는 아무런 영향도 미치지 않았다(Table IV). 따라서 인삼의 dammarane 계 glycosides는 RNA 및 단백질 합성단계에서 어떠한 작용을 하는 것으로 추측되며 panaxadiol 계 glycosides인 prostisol이 간에서 DNA-dependant RNA polymerase의 활성을 증가시킨다는 보고¹⁸⁾는 이러한 추측을 더욱 뒷받침하나 이에 대한 더 많은 연구가 수행되어야 하겠다.

인삼의 단백질 분획물들 중에서 분자량이 5,000 dalton 이하의 분획물 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 투여하였을 때 손상된 간세포의 단백질과 RNA의 합성이 유의성 있게 회복되었으며, 분자량이 10,000 dalton 이상인

Table III— The effects of dammarane glycosides fractions of *Panax ginseng* on the syntheses of protein, RNA and DNA in GalN-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes.

Substance (100 μ g/ml)	Protein [³ H]-Leucine incorporation (dpm/5 \times 10 ⁵ cells)	RNA [³ H]-Uridine incorporation (dpm/5 \times 10 ⁵ cells)	DNA [³ H]-Thymidine incorporation (dpm/5 \times 10 ⁵ cells)
Normal hepatocytes	5,756 \pm 1,262	4,452 \pm 108	3,672 \pm 200
GalN-treated hepatocytes	254 \pm 28	1,740 \pm 82	708 \pm 80
Total dammarane glycosides fraction	334 \pm 114	2,252 \pm 204	796 \pm 132
Panaxadiol glycosides fraction	532 \pm 100**	2,300 \pm 224**	664 \pm 114
Panaxatriol glycosides fraction	492 \pm 104**	3,282 \pm 424***	916 \pm 218

After preincubation (1.5 h), the cells were exposed to the medium (1.0 ml) containing 1.5 mM GalN.

Results are expressed as mean \pm S.D. of 3 separate determinations.

Significantly different with respect to control: $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

Table IV— The effects of protein fractions of *Panax ginseng* on the syntheses of protein, RNA and DNA in primary cultured rat hepatocytes.

Substance (100 μ g/ml)	Protein [³ H]-Leucine incorporation (dpm/5 \times 10 ⁵ cells)	RNA [³ H]-Uridine incorporation (dpm/5 \times 10 ⁵ cells)	DNA [³ H]-Thymidine incorporation (dpm/5 \times 10 ⁵ cells)
Normal hepatocytes	5,756 \pm 1,262	4,452 \pm 108	3,672 \pm 200
GalN-treated hepatocytes	254 \pm 28	1,740 \pm 82	708 \pm 80
Protein fraction larger than 10,000 dalton	214 \pm 122	1,454 \pm 306	914 \pm 42**
5,000 dalton < protein fraction < 10,000 dalton	252 \pm 62	2,392 \pm 344*	550 \pm 174
1,000 dalton < protein fraction < 5,000 dalton	538 \pm 98**	2,638 \pm 264***	618 \pm 28
500 dalton < protein fraction < 1,000 dalton	446 \pm 66**	3,034 \pm 150***	692 \pm 28

After preincubation (1.5 h), the cells were exposed to the medium (1.0 ml) containing 1.5 mM GalN.

Results are expressed as mean \pm S.D. of 3 separate determinations.

Significantly different with respect to control: $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$

분획물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 투여하였을 때 DNA 합성이 회복되는 경향을 보였다(Table IV). 분자량이 큰 분획물과 분자량이 작은 분획물은 간세포내에서 각기 다르게 작용하는 것으로 추측되며 이를 규명하기 위한 연구는 수행 중에 있다.

이와 같은 인삼의 dammarane계 glycosides 분획물이나 단백질 분획물이 GalN 으로 손상된 간세포에서 회복시킨 단백질, RNA 및 DNA 합성능력은 정상인 간세포의 능력에는 훨씬 미치지 못하였으며 인삼의 간상해에 대한 보호작용을 이들 합성능력의 회복에 의한 것으로 추측하기에는 무리가 있다.

결 론

1. 인삼의 dammarane계 glycosides 분획물은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 손상된 간세포에서 GPT 값을 약간 감소시키는 경향을 보였으며, 단백질 분획물은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 GPT 값을 유의성있게 감소시켜 GalN 에 의한 간상해를 어느 정도 회복시켜 주었다.

2. 인삼의 dammarane계 glycosides 분획물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 손상된 간세포에 투여하였을 때 단백질과 RNA 의 합성이 모두 증가되는 경향을 보였으나 DNA 합성에는 아무런 영향도 미치지 않았다.

3. 인삼의 단백질 분획물 중에서 분자량이 5,000 dalton 이하의 분획물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 투여하였을 때 손상된 간세포의 단백질과 RNA 의 합성이 유의성있게 회복되었으며 분자량이 10,000 dalton 이상인 분획물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 투여하였을 때 DNA 합성이 회복되는 경향을 보였다.

감사의 말씀

본 연구에 소요된 경비의 일부는 한국과학재단의 연구비로 충당되었으며 이 연구비 지원에 깊이 감사하는 바이다.

문 헌

1) Yokozawa, T., Semo, H. and Oura, H., Effect of ginseng extract on lipid and sugar metabolism I. Metabolic correlation between liver and adipose tissue,

- Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3095 (1975).
- 2) Oura, H., Nakashima, S. and Tusukada, K., Effect of *Panax ginseng* extract on serum protein synthesis, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 980 (1972).
- 3) Korean ginseng Research Institute, Korean Ginseng, Republic of Korea, 173 (1978).
- 4) Saito, H., Yoshida, Y. and Takaki, K., Effect of *Panax ginseng* root on exhaustive exercise in mice, *Japan. J. Pharmacol.*, **24**, 119 (1974).
- 5) Korean Ginseng Research Institute, Korean Ginseng, Republic of Korea, 116 (1978).
- 6) Takagi, K., Saito, H. and Nabata, H., Pharmacological studies of *Panax ginseng* root, *Japan. J. Pharmacol.*, **22**, 245 (1972).
- 7) Nabata, H., Saito, H. and Takagi, K., Pharmacological studies of neutral saponin in *Panax ginseng* root, *Japan. J. Pharmacol.*, **23**, 29 (1973).
- 8) Brekhman, I. I. and Dardymov, I. V., New substance of plant origin which increase nonspecific resistance. *Ann. Rev. Pharm.*, **9**, 419 (1969).
- 9) Ando T., Muraoka, T., Yamasaki, N. and Okuda, H., Preparation of anti-lipolytic substance from *Panax ginseng*, *Planta Medica*, **38**, 18 (1980).
- 10) Han, B. H., Park, M.H., Woo, L.K., W.S. and Han Y. N., Studies on the antioxidant components of korean ginseng, *Korean Biochem. J.*, **12**, 33 (1979).
- 11) Han, B.H., Park, M.H. and Han Y.N., Studies on the antioxidant components of korean ginseng (V): The Mechanism of antioxidant activity of maltol and phenolic acid, *Korean Biochem. J.*, **18**, 337 (1985).
- 12) Shibata, S., Tanaka, O., Soda, M. and Tsushima, S., On genuine sapogenin of ginseng, *Tetrahed. Lett.*, **12**, 795 (1963).
- 13) 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).
- 14) M.N. Berry and D. S. Friend, High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells, *J. Cell Biol.*, **43**, 506 (1969).
- 15) R. Reitman and S. Frankel, A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and pyruvic transaminase, *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56 (1957).
- 16) Markelonis, G., Oh, T.H. and Derr, D., Stimulation of protein synthesis in cultured skeletal muscle by a tro-

- phic protein from sciatic nerves, *Exp. Neurol.*, **70**, 598 (1980).
- 17) Hikino, H., Kiso, Y., Kinouchi, J., Sanada, S. and Shoji, J. Antihepatotoxic actions of ginsenosides from *Panax ginseng roots*, *Planta Medica*, **62** (1985).
- 18) Hiai, S., Oura, H., Tsukada, K. and Hirai, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 1656 (1971).
- 19) Han, B.H., Kim, C.H. and Han Y.N., Stimulating effect of panax saponins on the ^{14}C -leucine incorporation, *Korean Biochem. J.*, **6**, 63 (1973).