

Erythrocyte Ghost의 光酸化反應에 미치는 人蔘抽出物の 影響

백태홍 · 천현자 · 강병수
漢陽大學校 自然科學大學 化學科
(1990년 3월 12일 접수)

Effect of Ginseng Extracts on Photosensitized Peroxidation of Human Erythrocyte Ghosts

Tai Hong Paik, Hyun Ja Chun and Byung Soo Kang

Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

(Received March 12, 1990)

Abstract □ The photooxidation of human erythrocyte ghosts has been studied and the effects of ginseng water extract on it have been investigated. In the presence of photosensitizer, rose bengal, human erythrocyte ghosts have caused photooxidation by 1O_2 and produced lipid hydroperoxides. Ginseng water extract and d- α -tocopherol have inhibited photooxidation, whereas ascorbic acid has developed in low concentrations but inhibited in high concentrations. On the other hand, amounts of lipid hydroperoxide produced by photooxidation were decreased by addition of catalase after irradiation and according to sequential addition of ginseng water extract into it, the formation of lipid hydroperoxide was decreased simultaneously.

Keywords □ *Panax ginseng* C.A. Meyer, photosensitizer, rose bengal, photooxidation, lipid hydroperoxide, erythrocyte ghost.

서 론

생체막을 이루고 있는 지질 중 주성분인 인지질은 linoleic acid 나 arachidonic acid 등과 같은 이중 결합이 많은 고도 불포화 지방산을 함유하고 있으며 생체막 주위에는 산화 촉매제인 철 복합물이 존재하기 때문에 O_2^- 이나 1O_2 와 같은 활성 산소종에 의해 과산화반응을 일으켜 lipid hydroperoxide (LOOH)를 생성하게 된다.^{1,2)} 또한 생성된 lipid hydroperoxide는 쉽게 분해되어 peroxy radical ($LOO\cdot$)이나 alkoxy radical ($LO\cdot$)이 되면서 연쇄반응을 일으켜 생체막의 손상을 야기시키는 것으로 알려져 있다.^{3,4)}

한편, 과산화될 때 광 증감제에 의해 생성되는 1O_2 은 지질 과산화반응을 쉽게 일으켜 lipid hy-

droperoxide를 생성하는 것으로 보고되어 있으며, 이와 같은 광산화반응은 생체막에서도 일어나는 것으로 알려져 있다.⁵⁻⁷⁾

사람의 적혈구막은 구조적으로 간단하고, 시료를 얻기가 쉬워 생체막의 광산화반응 연구에 많이 이용되고 있다.^{8,9)}

따라서, 본 연구에서는 사람의 erythrocyte ghost를 사용하여 *in vitro*에서 지질 광산화반응에 미치는 인삼 추출물과 항산화제로 알려져 있는 d- α -tocopherol 및 ascorbic acid와 효소의 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

1. Erythrocyte ghost의 분리¹⁰⁾

Erythrocyte ghost 는 남부 혈액원에서 B형 혈액을 구입하여 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 침전된 적혈구를 0.172 M Tris-HCl buffer 용액 (pH 7.6)으로 희석하여 50% hematocrit를 만든 다음, 6배 용량의 0.012 M Tris-HCl buffer 용액과 혼합하여 용혈시켰다. 이 용액을 저온 원심분리기로 4°C에서 13,000 rpm으로 40분간 원심분리하고 상층액을 제거하여 적혈구막의 침전물을 얻었다.

이 침전물에 0.012 M Tris-HCl buffer 용액을 다시 넣고 우유 빛이 될 때까지 반복 세척한 후 0.012 M Tris-HCl buffer 용액으로 희석하여 erythrocyte ghost를 얻었다. erythrocyte ghost는 Lowry¹¹⁾ 등의 방법으로 단백질을 정량하여 2 mg protein/ml erythrocyte ghost 현탁액이 되도록 만들어 사용하였다. 이 때 단백질 정량의 표준 용액으로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

2. 시료의 조제

1에서 만든 erythrocyte ghost 현탁액 10 ml를 반응 용기에 넣고, 0.012 M Tris-HCl buffer 용액을 사용하여 만든 1 mM rose bengal 용액을 최종 농도가 5×10^{-2} mM 되도록 첨가하여 광산화반응 시료로 사용하였다.

한편, 시료의 광산화반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 인삼 물추출물은 0.012 M Tris-HCl buffer 용액에 녹여 10% 용액으로 만든 후 위에서 만든 시료 용액에 50 μ l를 첨가하여 최종 농도가 10⁻³%가 되게 하였다. d- α -tocopherol은 10⁻²% ethanol 용액으로 만든 후 최종 농도가 10⁻⁴%되게 첨가하였다. 또한, SDS와 catalase는 0.012 M Tris-HCl buffer 용액에 녹여 2 mg/ml 용액으로 만들어 각각 20 μ l와 50 μ l씩 첨가하여 최종 농도가 50 μ g/ml와 20 μ g/ml가 되도록 하였다.

3. 인삼의 물추출⁶⁾

인삼 분말 100g에 H₂O 500 ml를 가하여 100°C에서 1시간 가열한 후 감압하에서 여과하고, 불용물은 다시 H₂O 300 ml를 가하여 2회 반복 추출하였다. 전 여과액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액은 감압하에서 농축하여 freeze dryer (Mitamura Riken Kogyo Inc.)로 건조시켜 분말을 얻었다.

4. 광산화반응¹²⁾

빛이 고루 조사되도록 양면을 평면으로 만든 반응 용기에 시료 용액 10 ml를 넣은 다음 광원으로는 Video Co.제 projector에 부착된 300 W tungsten lamp를 사용하였으며, 실내 조명과 실온에서 반응 용기로부터 30 cm 거리에서 빛을 조사하였다. 한편, 광원에서 나오는 UV와 열을 제거하고 초점을 맞추기 위하여 한쪽면이 불록렌즈로 되어 있는 수정 유리관에 물을 채워 광원의 초점을 시료 용액에 맞췄다.

5. 지질 과산화물 측정

Lipid hydroperoxide 양은 ferrothiocyanate 법¹³⁾으로 측정하였다. 즉, 시료 용액 0.4 ml를 취하여 Bligh-Dyer 법¹⁴⁾으로 지질을 추출하여 0.2 ml의 ethanol에 녹인 후 95% ethanol 4.6 ml를 가하고, 3.95 M ammonium thiocyanate 용액 0.1 ml와 3.5% HCl 용액에 녹여 만든 0.127 M Mohr 염 용액 0.1 ml를 가하여 혼합하고 정확히 3분간 방치한 후 10초 이내에 UV spectrophotometer (Model UVICON 860 uv/vis, Kontron Co.)로 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

한편, conjugated diene 측정¹⁵⁾은 시료 용액 0.4 ml를 취하여 Bligh-Dyer 법으로 지질을 추출하고 3.0 ml ethanol에 녹인 후 spectrophotometer (Model UVICON 860 uv/vis, Kontron Co.)를 사용하여 233 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Cumene hydroperoxide 용액의 몰 흡광계수

각 농도별 cumene hydroperoxide 용액을 만든 후 ferrothiocyanate 법으로 각 농도에 따른 흡광도를 500 nm에서 측정하였으며 이 값을 사용하여 Lambert-Beers 법칙에 의해 계산한 결과 몰 흡광계수는 $4.769 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었다.

7. 시 약

Rose bengal은 Eastman Kodark Co.제, d- α -tocopherol과 ascorbic acid는 Sigma Co.제 특급시약을 사용하였으며, ammonium thiocyanate 및 Mohr 염은 Merk Co.제를 사용하였고, catalase (2500 units/mg solid)는 bovine liver에서 추출한 것과 superoxide dismutase (3000 units/solid)는 bovine erythrocyte에서 추출한 Sigma 제품을 사용하였다. 그 밖의 유기 용매는 특급 시약을 구입하여 정제하지 않고 사용하였다.

결과 및 고찰

1. Erythrocyte ghost의 광산화반응

Erythrocyte ghost 현탁액 (2 mg protein/ml)에 광 증감제인 rose bengal 을 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때 백색광을 조사시켜 생성된 과산화지질을 ferrothiocyanate 법과 UV 법으로 측정된 결과는 Fig. 1, 2와 같다. Fig. 1, 2에서와 같이 광 증감제가 첨가되지 않았을 때 lipid hydroperoxide와 conjugated diene의 양은 빛의 조사에 의해 거의 변화되지 않았으나 rose bengal 을 첨가했을 때는 빛의 조사 30분 이후부터 lipid hydroperoxide와 conjugated diene의 양은 시간이 경과함에 따라 모두 증가되는 현상을 나타냈다.

따라서, erythrocyte ghost는 광 증감제의 존재 하에서는 광산화반응이 크게 촉진됨을 알 수 있었다. 이 결과는 광 증감제가 존재할 때는 1O_2 의 생성으로 erythrocyte ghost는 쉽게 광산화반응을 일으킬 것으로 생각된다. 한편, 과산화지질의 정량법의 하나인 UV 법은 과산화지질의 간접적인 측정법

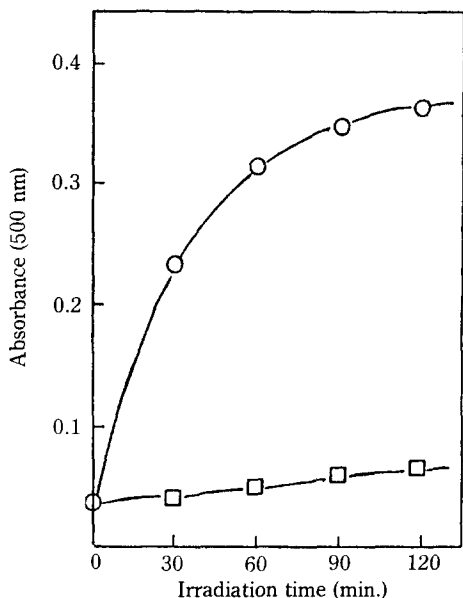


Fig. 1. Change in absorbance on photooxidation of human erythrocyte ghosts in the presence of and in the absence of rose bengal. Absorbance according to lipid hydroperoxides was measured at 500 nm by ferrothiocyanate method. ○-○, Presence of rose bengal; □-□, Absence of rose bengal.

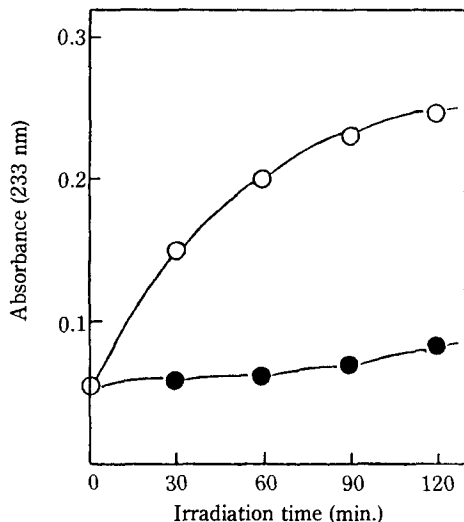


Fig. 2. Change in absorbance on photooxidation of human erythrocyte ghosts in the presence of and in the absence of rose bengal. Absorbance according to conjugated diene was measured at 233 nm by UV method. ○-○, Presence of rose bengal; ●-●, Absence of rose bengal.

이지만 ferrothiocyanate 법은 lipid hydroperoxide 자체를 직접 정량하는 방법이므로 바람직하다.

2. 인삼 물추출물의 영향

Erythrocyte ghost 현탁액의 광산화반응에 미치는 인삼 물추출물의 영향을 알기 위하여 erythrocyte ghost 현탁액에 인삼 물추출물을 첨가한 후 백색광을 조사하여 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 인삼 물추출물을 첨가하였을 때는 첨가하지 않았을 때에 비하여 erythrocyte ghost의 광산화반응이 억제됨을 알 수 있었다. 이것은 인삼 물추출물이 1O_2 와 free radical quencher로 광산화반응을 억제시켜 erythrocyte ghost의 lipid hydroperoxide 생성을 억제하기 때문인 것으로 생각된다. 따라서, 인삼 물추출물은 생체막에서 과산화반응의 억제작용을 나타낼 것으로 생각되나 앞으로 더 많은 연구가 기대된다.

3. d- α -Tocopherol의 영향

1O_2 와 free radical quencher로 알려진 d- α -tocopherol이 광산화반응에 미치는 영향을 알기 위하여 d- α -tocopherol을 첨가한 후 광조사시킨 결과는 Fig. 4와 같이 d- α -tocopherol이 첨가된 경우 광산화반응을 억제시키는 경향을 나타내었다.

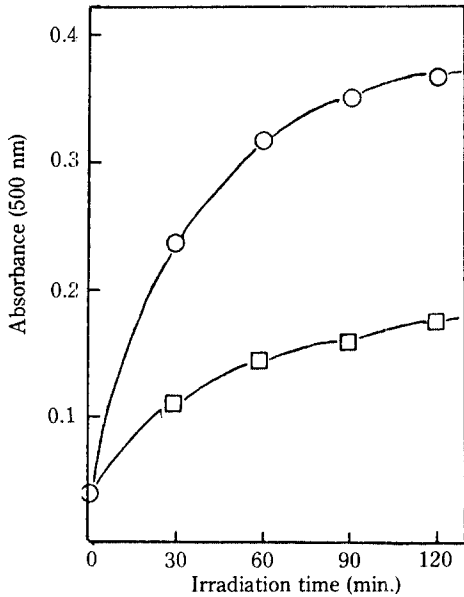


Fig. 3. Change in absorbance on photosensitized peroxidation of human erythrocyte ghosts according to addition of ginseng water extract. Absorbance: refer to Fig. 1. ○-○, None; □-□ Ginseng water extract.

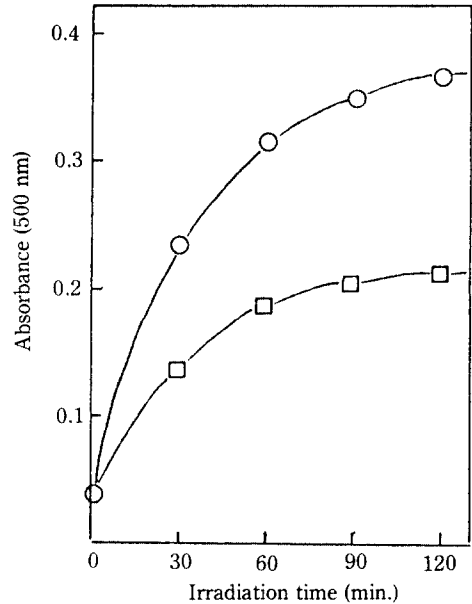


Fig. 4. Change in absorbance on photosensitized peroxidation of human erythrocyte ghosts according to addition of d- tocopherol. Absorbance: refer to Fig. 1. ○-○, None; □-□, d-α-tocopherol.

4. Ascorbic acid 의 영향

생체내에서 발생하는 1O_2 를 H_2O_2 로 환원시키거나 1O_2 의 quencher로 작용하여 산화작용을 억제시키는 것으로 알려져 있는 ascorbic acid를 농도별로 erythrocyte ghost 현탁액에 첨가하여 어두운 곳에서 10분간 incubation 시킨 후 백색광을 조사하여 광산화반응에 미치는 영향을 검토한 결과 Table 1에서와 같이 ascorbic acid는 농도에 따라 산화 촉진작용과 억제작용의 양면적 효과를 나타내었다. 즉, $10^{-3} \sim 5 \times 10^{-2}$ mM 농도 사이에서는 광산화반응이 촉진되었으나, $1 \times 10^{-1} \sim 1$ mM 농도 사이에서는 억제되었다. 이러한 결과는 ascorbic acid의 농도가 0.1 mM에서는 적혈구막에 광산화반응을 촉진시키고 0.5 mM 농도 이상에서는 억제시킨다는 A.W. Girotti¹⁶⁾의 보고와도 일치하고 있었다.

5. 효소의 영향

사람 적혈구막은 SOD, catalase, glutathione peroxidase와 같은 효소를 함유하고 있어 이러한 효소들의 작용에 의해 lipid hydroperoxide의 생

Table 1. The effect of concentration of ascorbic acid on photosensitized peroxidation of human erythrocyte ghosts

Concentration (mM)	Absorbance (A_{500})	LOOH* (nmol)	Relative ratio
0	0.159	20.84	100
1×10^{-3}	0.167	21.89	105
1×10^{-2}	0.172	22.54	108
5×10^{-2}	0.177	23.20	111
1×10^{-1}	0.122	15.99	76
5×10^{-1}	0.069	9.04	43
1.0	0.041	5.37	25

Relative ratio was defined assuming that of none being 100. Absorbance: refer to Fig. 1.

*Amounts of lipid hydroperoxide (LOOH) were calculated with molar coefficient of cumene hydroperoxide.

Irradiation: 300 w tungsten lamp with visible light for 60 min.

성 또는 축적을 억제하는 것으로 알려져 있다.^{17,18)}

광산화반응에서 O_2 의 quencher로 알려진 SOD의 영향을 알기 위하여 erythrocyte ghost 현탁액에 SOD를 첨가하고 30분간 pre-incubation 시킨

Table 2. The effect of superoxide dismutase on photosensitized peroxidation of human erythrocyte ghosts

Irradiation time (min.)	None		Addition	
	Absorbance (A ₅₀₀)	LOOH (nmol)	Absorbance (A ₅₀₀)	LOOH (nmol)
0	0.016	2.1	0.016	2.0
30	0.106	13.89	0.096	12.58
60	0.136	17.82	0.120	15.73

Erythrocyte ghosts were incubated at 37°C for 30 min. under the dark room in the presence of SOD(50 μg/ml) before irradiation. Control(none) was incubated alongside. Absorbance: refer to Fig. 1. LOOH: refer to Table 1.

Table 3. The effect of catalase on photosensitized peroxidation of human erythrocyte ghosts

Irradiation time (min.)	None	Pre-addition	Post-addition
	LOOH(nmol)	LOOH(nmol)	LOOH(nmol)
0	2.1	2.1	2.1
30	14.42	12.45	12.44
60	16.51	15.99	14.28

Pre-addition was incubated at 37°C for 30 min. under the dark room in the presence of catalase (20 μg/ml) before irradiation.

Control(none) was incubated alongside.

Post-addition was incubated at 37°C for 30 min. under the dark room in the presence of catalase after irradiation.

LOOH: refer to Table 1.

후 백색광을 조사한 결과는 Table 2와 같다. Table 2에서 보는 바와 같이 SOD를 첨가하였을 때는 약 12%의 억제 효과를 나타내고 있었다. 이것은 광산화반응에 의해 소량의 O₂⁻이 생성되거나 생성된 ¹O₂의 일부가 O₂⁻의 활성화중으로 변환되어 SOD에 의해 quenching 되어 lipid hydroperoxide 양의 생성을 억제시키기 때문인 것으로 생각되었다.

한편, 광산화반응에서 H₂O₂가 생성되는가를 알기 위하여 H₂O₂의 분해 효소인 catalase를 첨가하고 30분간 pre-incubation 시킨 후 백색광을 조사하였을 때와 광조사 후 post-incubation 시켰을 때 광산화반응에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 3과 같다. Table 3에서와 같이 pre-incubation 시킨 후 광조사를 하였을 때는 별 영향이 없었으나 광조사 후 post-incubation 시켰을 때는 약 14%의 억제 효과를 나타내고 있었다.

Table 4. The effect of catalase and ginseng water extract on photosensitized peroxidation of human erythrocyte ghosts

Treatment	Absorbance (A ₅₀₀)	LOOH (nmol)	Relative ratio
None	0.070	9.17	100
Catalase	0.059	7.73	84.3
Catalase + GWE	0.053	6.95	75.7

Erythrocyte ghosts were incubated at 37°C for 30 min. under the dark room after 1 hr. irradiation.

Control(None) was incubated alongside.

Absorbance: refer to Fig. 1.

LOOH: refer to Table 1.

GWE: ginseng water extract

이것은 광조사 중에는 ¹O₂이 생성되므로 catalase가 quenching을 할 수 없으나 광조사 후에는 생성된 lipid hydroperoxide를 catalase가 분해하여 lipid hydroperoxide 양의 생성을 감소시키는 것으로 생각되었다.

한편, catalase의 작용에 미치는 인삼 물추출물의 영향을 검토하기 위하여 erythrocyte ghost 현탁액에 1시간 동안 광조사시킨 후 catalase와 인삼 물추출물을 동시에 넣고 30분간 post-incubation 시킨 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 약 24%의 억제 효과를 나타내었다. 이것은 인삼 물추출물이 catalase의 활성을 증가시켜 lipid hydroperoxides의 생성을 감소시키는 것으로 생각된다.

요 약

광 증감제인 rose bengal의 존재하에서 erythrocyte ghost의 광산화반응과 광산화반응에 미치는 인삼 물추출물과 tocopherol, ascorbic acid 같은 항산화제 및 효소 등의 광산화반응에 미치는 영향을 검토한 결과는 다음과 같다.

Erythrocyte ghost는 광 증감제의 존재하에서 ¹O₂을 발생하여 과산화반응을 일으켜 lipid hydroperoxide를 생성하였으며, 광산화반응은 인삼 물추출물과 d-α-tocopherol의 첨가에 의해 억제되었다. 또한, ascorbic acid의 경우에는 고농도에서 억제작용을 나타내었다.

한편, 광조사 후 catalase를 작용시켰을 때는

lipid hydroperoxide 양이 감소되었고 여기에 인삼 물추출물을 첨가하였을 때는 더 많이 감소되었다.

인용문헌

1. Trush, M.A. Minmangh, E.C. and Gram, T.E.: *Biochem. Pharmacol.* **31**, 3335 (1982).
2. Yamanchi, R. and Matsushha, S.: *Agric. Biol. Chem.* **43**, 2157 (1979).
3. Drath, D.B. and Karnovsky, M.L.: *J. Exp. Med.* **141**, 257 (1975).
4. Imai, Y.: *Saishim Igaku*, **33**, 654 (1978).
5. Kaneda, T.: *Oil Chem.* **29**, 295 (1980).
6. Paik, T.H., et al.: *Kor. J. Ginseng Sci.* **13**, 234 (1989).
7. Girotti, A.W., et al.: *Arch. Biochem. Biophys.* **236**, 238 (1985).
8. Thomas, C.E., et al.: *J. Biol. chem.*, **260**, 3275 (1985).
9. Girotti, A.W. and Thomas, J.P.: *J. Biol. Chem.* **259**, 1744 (1984).
10. Dodge, J.T., et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **104**, 348 (1965).
11. Lowry, O.H. Rosebrough, N.J., Farr A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
12. Paik, T.H., et al.: *J. Kor. Oil Chem. Soc.*, **4**, 25 (1987).
13. Paik, T.H., et al.: *J. Kor. Oil Chem. Soc.*, **5**, 25 (1988).
14. Bligh, E.C. and Dyer, W.: *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911 (1959).
15. Kaplan, N.O. and Colwick, S.P.: *Method in Enzymology*, Academic Press, New York, Vol. 100, p. 331 (1984).
16. Girotti, A.W., Thomas, J.P. and Jordan, J.E.: *Photochem. Photobiol.*, **41**, 267 (1985).
17. Davies, J.A.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
18. Donald, D.G., et al.: *Lipids*, **20**, 704 (1985).