

癌毒素(Toxohormone-L)의 作用을 阻害하는 紅蔘酸性多糖體의 分離 및 精製

李成東·黃允敬*·奧田拓道**

高麗大學校 保健專門大學 食品營養科

*高麗大學校 大學院 家政學科

**日本 愛媛大學 獸學部 第2生化學教室

Isolation and Purification of Acidic Polysaccharide of Korean Red Ginseng
Acting against Toxic Action of Toxohormone-L from Cancerous Ascites Fluid

Sung-Dong Lee · Yoon-Kyong Hwang · Hiromichi Okuda

*Dept. of Food and Nutrition, Junior College of Allied Health Sciences, Korea Univeristy,
Seoul, Korea*

**Dept. of Home Economics, Graduate School, Korea Univeristy, Seoul, Korea*

***2nd Dept. of Medical Biochemistry, School of Medicine, Ehime University, Ehime, Japan*

ABSTRACT

Toxohormone-L is a lipolytic factor, found in ascites fluid of sarcoma 180-bearing mice and of patients with hepatoma. A substance that inhibited the lipolytic action of Toxohormone-L was isolated and purified from Korean red ginseng powder. This substance had a pectin-like α -1,4-polygalacturonan backbone with some acetoxyl groups, and so was an acidic polysaccharide.

It inhibited Toxohormone-L induced lipolysis in a dose dependent manner at concentrations higher than 10 μ g/ml. Purified acidic polysaccharide yield(PG₄₋₃ and PG₄₋₄ fraction) was about 0.03%. And also pectic acid that inhibited the lipolytic action of Toxohormone-L.

I. 서 론

인삼은 동양에서 오래전부터 그 효과가 인정되어 오늘에 이르기까지 고품을 받아오고 있으며 근래에는 각종 식품의 재료 또는 첨가품으로서도 활용되어져 가는 추세에 있다. 특히 인삼은 식욕부

진, 두통 그외 어깨가 결리거나 허리가 쭈시든가 또는手足이 차거나 하는 등 뚜렷한 질환이 없으면서 통증을 호소하게 하는 소위 不定愁訴의 개선이나 또 암환자의 쇠약일로로 감퇴되는 체력을 개선하는 등에도 효과가 있음이 알려져 있다.^{1,2)}

한편 저자는 복수 육종세포인 sarcoma 180 환

생쥐의 복수증액을 가지고 시험관내에서 쥐의 지방조직 박편으로부터 지방산을 유리시켜 보았고 다시 복수증액으로부터 지방질 분해인자를 정제하여 독소호르몬-L 이라고 명명했다.³⁾ 그런데 독소호르몬-L 을 쥐의 뇌실에 주사하면 사료와 물의 섭취량이 유의적으로 감소하게 되어 결국 독소호르몬-L 에 의해 지방분해와 식욕억제의 두 가지 작용이 계속되어 암환자의 체지방을 감소시킴과 쇠약의 원인이 된다고 보고된다.⁴⁾

따라서 여러가지 형태의 암환자에 있어서 체중감소가 진행되는 동안에는 체내 축적된 지방질의 감소현상을 관찰할 수가 있으며 한편 신생물의 증식에 따라 유리지방산의 농도가 상대적으로 증가하게 되어 산독증을 병발하게 된다⁵⁾.

이상의 제반 이론적 근거를 중심으로 독소호르몬-L 이 유도하는 지방분해 작용을 저해하는 산성다당체를 홍삼에서 분리 및 정제하였고 또 산성다당체와 관련된 특급의 시약들을 구입하여 실제로 동일조건에서 병행 실험한 결과 시험관내에서 유효한 결과들을 입증하였기에 이에 대한 실험결과들을 보고하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

실험동물은 동물실에서 표준실험식이와 물로 자유로이 급식시키면서 키운 웅성 흰쥐로 체중 160~200 g 정도의 것을 이용하였다.

지방조직의 절취를 위해 뇌에 물리적 충격을 주어 도살시킨 후 곧 고환과 신장 주위의 지방조직을 절단해 냈으며, 생쥐는 위와 같은 조건에서 사육한 웅성 DDK 종으로서 체중 17~20 g 정도의 것을 이용하였다.

시료인 홍삼은 고려인삼제품 일본 총대리점으로 부터 제공받았다.

독소호르몬-L fraction 의 제조는 웅성 DDK 생쥐에 sarcoma 180 현탁액 ($4 \sim 5 \times 10^6$ cell/두) 0.5 ml 를 복강내에 주사하고 10~14 일후 복수증액을 채취하여 4°C에서 10 분간 원침 (1,000×g) 하

여 얻어지는 상청액으로 하였다.

한편 지방분해 억제능의 측정은, 먼저 지방세포의 분리를 위해 Rodbell⁶⁾의 방법에 의해 흰쥐의 epididymal adipose tissue 와 retroperitoneal adipose tissue 로부터 조제하였다. 이후 지방세포 (50 μ l packed volume)는 4% bovine serum albumin 에 25 mM HEPES (N-2-hydroxy ethyl piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid) 등이 함유된 Hanks buffer (pH 7.4) 175 μ l, 시료 25 μ l 및 독소호르몬-L 50 μ l 등 도합 0.30 ml 를 37°C에서 2 시간 incubation 시킨다.

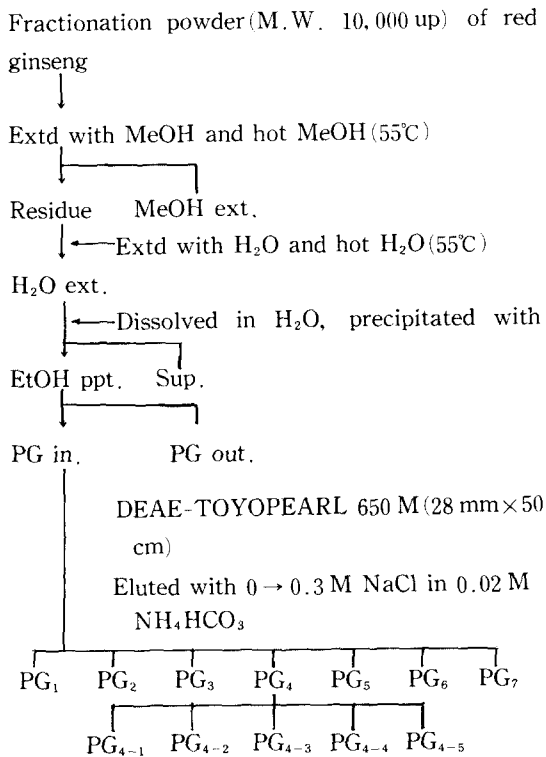
다음 유리지방산으로 해제된 것을 Zapf⁷⁾등의 방법에 의해 2% (v/v) methanol 이 함유된 chloroform 과 heptane 이 동량 혼합된 extract soln. 3 ml 로 추출하고 copper reagent 와 bathocuproine 이 함유된 color reagent 로 반응시켜 유리된 지방산의 농도를 측정하였다.

III. 실험결과 및 고찰

홍삼분말은 증류수 10 배량으로 48 시간동안 추출하여 원침하였고, 상청액을 농축한 후 48 시간동안 증류수에 투석시켜 10,000 dalton 이하의 분자를 투석막을 이용해 제거시켰다. 여기서 얻어진 투석내액을 농축시킨 다음 냉동건조시켜 분말화하였다.

다음 Fig. 1 에 나타낸 과정과 같이 냉동건조된 분말을 실온과 55°C에서 각각 methanol 로 24 시간 처리하여 ginsenoside 성분을 제거하였다. 여기서 생긴 residue 는 다시 실온과 55°C에서 각각 증류수로 추출하여 추출액을 한데 모아서 1/2 용량으로 농축을 하였다. 이 농축액에 ethanol 를 4 배량 가하여 혼합하고 계속 교반시켜 ethanol 에 의한 침전형성을 조장시켰다. 이 침전 fraction (즉 ginsenoside-free ethanol 침전물)을 증류수에다 투석시키고 여기서 얻어지는 투석내액을 또 동결건조시켜 ethanol 침전분말을 얻어냈다.

다음 DEAE-TOYOPEARL 650 M column



- PG₁ : 0.02 M NH₄HCO₃ aq. fr.
 PG₂ : 0.05 M NaCl/0.02 M NH₄HCO₃ aq. fr.
 PG₃ : 0.10 M NaCl/0.02 M NH₄HCO₃ aq. fr.
 PG₄ : 0.15 M NaCl/0.02 M NH₄HCO₃ aq. fr.
 PG₅ : 0.20 M NaCl/0.02 M NH₄HCO₃ aq. fr.
 PG₆ : 0.25 M NaCl/0.02 M NH₄HCO₃ aq. fr.
 PG₇ : 0.30 M NaCl/0.02 M NH₄HCO₃ aq. fr.

Fig. 1. Schematic flow diagram describing the major step of acidic polysaccharide isolation.

(28 mm×50 cm)을 0.02 M NH₄HCO₃ 용액으로 평형화 시킨 후 위의 ethanol 침전분말액을 주입시켰고, elution은 0.02 M NH₄HCO₃ 용액내에 각각 0 M, 0.05 M, 0.10 M, 0.15 M, 0.20 M, 0.25 M 및 0.30 M 농도의 NaCl이 함유된 용액으로 step by step으로 수행하였다. 그리하여 각기 얻어진 fraction의 명칭을 PG₁, PG₂, PG₃,

PG₄, PG₅, PG₆ 및 PG₇이라고 하였다. 이들 각 fraction 중 독소 호르몬-L에 의한 지방분해 억제 효과가 PG₄ 성분이 가장 강하게 나타났다. 따라서 PG₄ fraction을 더 정제할 목적으로 0.02 M NH₄HCO₃ DEAE-TOYOPEARL 650 M column (14 mm×20 cm)에 gradient elution시켜 각 PG₄₋₁, PG₄₋₂, PG₄₋₃, PG₄₋₄ 및 PG₄₋₅의 fraction을 얻었다.

한편 Fig. 1과 같이 정제해가는 과정에서 얻은 홍삼투석내액분, methanol로 추출한 후 남은 residue 분, 다시 물로 용해하여 얻은 extract 분, 또 ethanol로 침전시켜 얻은 침전분들에 대하여 독소 호르몬-L 유도 지방분해 저해효과를 실험한 바, 각 시료의 최종 농도가 0.1 mg/ml일 때 각각 14.3, 26.2, 29.91 및 42.4%로 정제해 갈수록 저해율이 높아졌다. 그리하여 다시 더 정제해서 얻은 각 PG₁ 부터 PG₇까지의 fraction에 대한 독소 호르몬-L 유도 지방분해저해효과는 최종 농도가 10, 50, 100, 200, 500 및 1,000 μg/ml일 때 각 fraction 중에서는 PG₄가 가장 저해효과가 높았다.

다음 PG₄의 성분을 더욱 정제하기 위해 Fig. 1과 같이 gradient elution을 시켜서 얻어진 각 fraction tube의 OD를 210 nm에서 측정하여 나타난 peak를 중심으로 5가지 fraction으로 또 나누었다. 여기서 얻은 5가지 fraction에 대한 독소 호르몬-L 유도 지방분해 저해효과는 PG₄₋₃과 PG₄₋₄ fraction이 높았다.

PG₄₋₃ 및 PG₄₋₄의 fraction을 더욱 정제하기 위해 두 fraction을 혼합하여 TSK gel ODS-120 T column (4.6 mm×250 mm) 1차 역상 HPLC에 걸었다. 0.1% trifluoroacetic acid 함유 acetonitrile로 elution시켰고, 유속은 0.5 ml/min이었다. 이때 얻어진 각 fraction 중 당정량을 위해 phenol-sulfuric acid 방법⁸⁾에 따라 480 nm에서 OD를 측정한 결과 2개의 peak를 얻었다. 이 중 큰 peak부분을 다시 동일조건으로 2차 역상 HPLC에 걸어본 바 단일 peak를 얻어

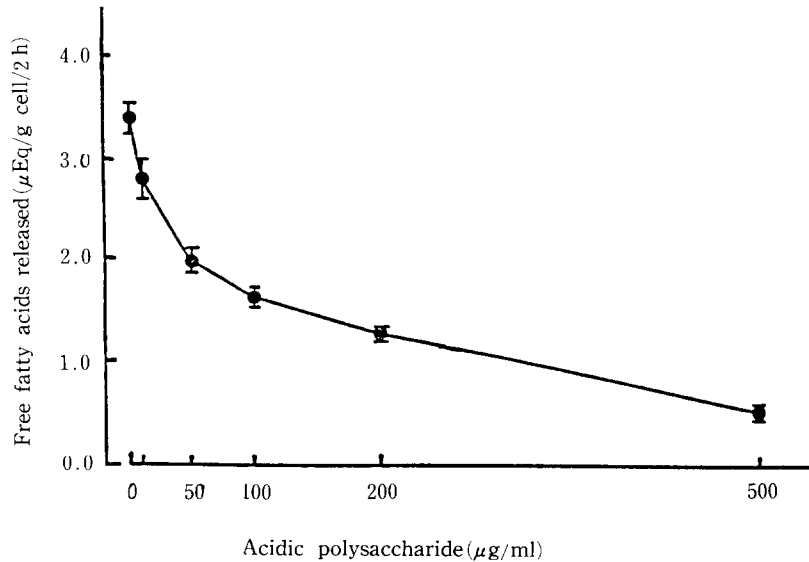


Fig. 2. Inhibitory effect of the acidic polysaccharide purified from red ginseng on Toxohormone-L-induced lipolysis.

났다. 이 peak 부분을 동결건조시켜서 분말화 하였으며 이 분말의 최종농도를 50, 100, 200 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 로 하여 독소 호르몬-L 유도 지방분해 저해효과를 관찰한 바 Fig. 2와 같이 나타났다.

따라서 독소 호르몬-L 유도 지방분해 저해효과에 있어서 산성다당체(AP)의 최소유효농도는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 10 $\mu\text{g/ml}$ 이었고, 100 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 각 50 및 83%의 저해율을 나타냈다.

따라서 이 peak 부분의 물질을 동정하기 위해 다음과 같이 gel permeation HPLC에 걸었다. Pump는 TOSO CCPM, RI detector는 TOSO RI-8,000, UV detector는 203 nm의 TOSO UV-8,000, column은 TSK gel G-3,000 pw (7.5 mm i.d. \times 30 cm)와 TSK gel G-5,000 pw (7.5 mm i.d. \times 30 cm)의 joint column, column 온도는 80°C, mobile phase는 0.5 M NaCl, 유속은 0.7 ml/min로 하였다. 정제된 물질의 ^{13}C -NMR spectrum에 의한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 4-linked α -galacturonide의 methyl ester 된 signals로 나타났다.

이 결과들로부터 정제된 물질은 pectin-like α -1, 4-polygalacturonan 골격을 갖는 물질로 사료되는 바이다.

분자량은 dextoran(Shodex standard p-82)을 표준으로 하여 TSK gel G 3,000 pw-G 6,000 pw column에 의한 gel 여과 고속액체 chromatography(GPC)로 분자량을 결정한 바 3.46×10^4 이었고, 구성당의 정성을 위해 galacturonic acid, rhamnose, glucose, arabinose, galactose 등은 산 가수분해하여 gas chromatography로서 동정하였고, 각 당의 비율 정량은 galacturonic acid를 환원시킨 다음 분석하였다. Methyl ester 기 정량은 alkali 가수분해 후 methanol을 gas chromatography로써 한 바 methoxyl 함량이 3.2%로 나타났다.

다음 Table 1에서는 홍삼으로부터 산성다당체를 분리해 가는 과정에 따른 수율을 나타낸 바, 홍삼 500 g으로부터 얻을 수 있는 PG₄ fraction은 196.8 mg 이고 다시 PG₄₋₃와 PG₄₋₄ fraction의 수율은 합하여 153.8 mg으로, 홍삼 100 g 당으로 환산하면 30 mg(0.03%)에 불과하였다.

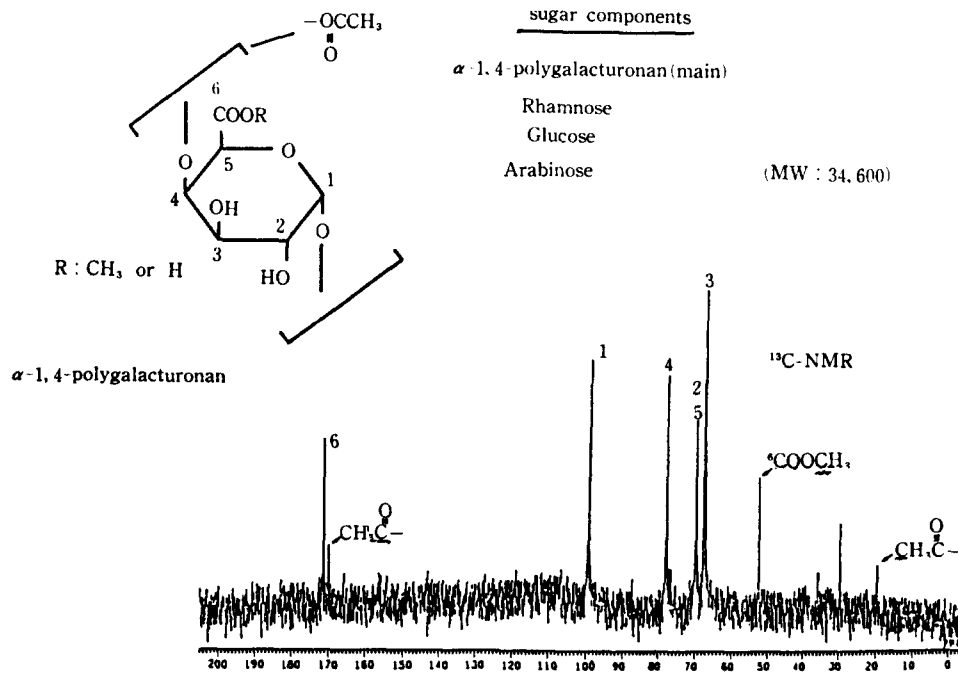


Fig. 3. Chemical structure of acidic polysaccharide from red ginseng.

Red ginseng powder	500 g					
↓						
Inner dialysate powder	69.2 g					
↓						
Water ext. powder	44.5 g					
↓						
Ethanol ppt.	41.9 g					
↓						
PG ₁	PG ₂	PG ₃	PG ₄	PG ₅	PG ₆	PG ₇
32.3 g	776.9 mg	310.5 mg	196.8 mg	94.3 mg	24.8 mg	24.6 mg
			↓			
	PG ₄₋₁	PG ₄₋₂	PG ₄₋₃	PG ₄₋₄	PG ₄₋₅	
	2.1 mg	6.0 mg	95.1 mg	58.7 mg	4.4 mg	

Table. 1. Purified yield of acidic polysaccharide in red ginseng.

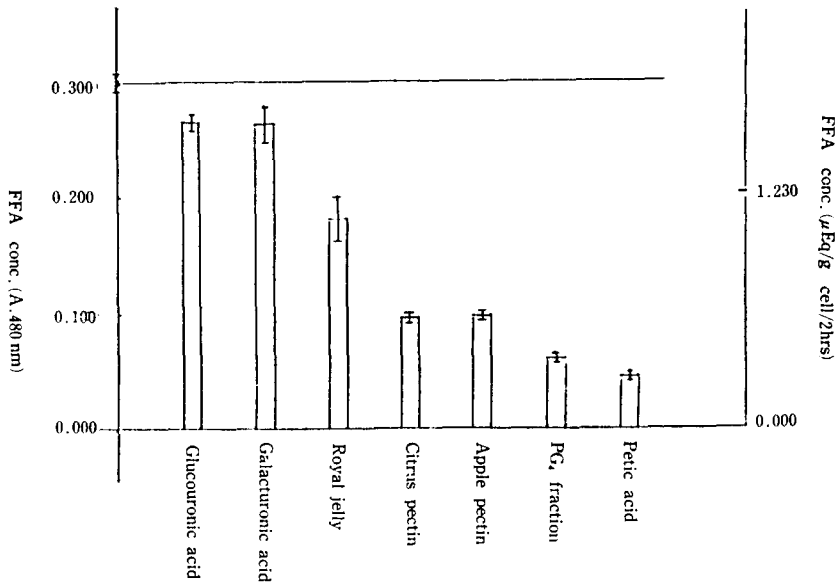


Fig. 4. Comparative inhibitory effect of acidic polysaccharide (PG₄ fraction) and carbohydrate concerned substances on Toxohormone-L induced lipolysis in fat cells (sample contents: 1 mg/ml)

Fig. 4는 산성다당체가 주체인 PG₄ fraction과 다른 탄수화물 관련물질들에 대한 독소 호르몬-L 유도 지방분해 저해능을 관찰한 바 최종농도가 1 mg/ml인 동일농도에 있어서 citrus pectin과 apple pectin이 PG₄ fraction에 미치지 못하였으나 pectic acid는 더욱 양호한 결과를 보였다. 따라서 시험관내에서 독소호르몬-L 유도지방분해의 저해 본체는 polygalacturonic acid의 작용에 의해 이루어짐이 확실하여졌다.

앞으로는 이러한 실험결과를 토대로 생체내 실험을 통하여 어느 정도 독소 호르몬-L 유도 지방분해를 저해하는지에 대하여 밝히고자 한다.

IV. 요약

암독소(독소 호르몬-L)는 체지방질 분해인자로써 복수 육종세포인 사코마-180의 흰생쥐나 간암

환자의 복수증액에서 발견된다.

저자는 암독소에 의한 체지방질 분해억제에 대한 효과적인 물질을 추적 및 스크린해 가는 과정에서 홍삼으로부터 acetoxyyl기를 갖는 펙틴과 유사한 α -1,4-polygalacturonan을 주체로 하는 유용한 산성다당체를 분리·정제하였다. 이 홍삼 산성다당체는 암독소에 의한 체지방분해를 10 μ g/ml 농도 이상에서 억제함을 나타냈다.

한편 산성다당체로서 분리된 PG₄₋₃와 PG₄₋₄분획의 수율은 0.03%에 불과하였으며, 이 홍삼산성다당체에 의한 독소호르몬-L 유도 지방분해 저해효과를 pectic acid를 가지고 시험관내 실험을 통하여 확인하였다.

V. 참고문헌

1. 大浦彦吉, 奥田拓道, 森澤成司, 山本昌弘: 藥

- 用人蔘 '89, 共立出版株式會社, 東京, p.159-172(1989)
2. 崔鎮浩: 人蔘의 神祕, 教文社, p.128-133 (1984)
 3. Masuno, H., Yoshimusa, H., Ogawa, N. and Okuda, H.: *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **20**, 1177(1984)
 4. Okuda, H., Masuno, H. and Lee, S. J.: *Proc. 4th Internat. Ginseng Symp.* 145(1984)
 5. 李成東, 奧田拓道: 高麗人蔘學會誌, **14**(1), 67(1990)
 6. Rodbell, M.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 375(1964)
 7. Zapf, J., Schoenle, E., Waldvogel, M., Sand, M. and Froesch, E.R.: *Eur. J. Biochem.*, **113**, 605(1981)
 8. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350(1956)
-

(1990년 8월 29일 수리)