

인삼 Saponin 분획의 고혈당강하작용에 관한 연구(II)*

주중노 · 윤수희 · 이향숙 · 김용덕 · 이희봉* · 구자현**

연세대학교 이과대학 생화학과

*강원대학교 자연대학 생화학과

**건국대학교 의과대학 생화학교실

(1992년 11월 22일 접수)

Study on the Hypoglycemic Action of Ginseng Saponin on Streptozotocin Induced Diabetic Rats (II)

Chung-No Joo, Soo-Hee Yoon, Hyang-Sook Lee, Yong-Kuk Kim,
Hee-Bong Lee and Ja-Hyun, Koo

Department of Biochemistry, Yonsei University, Seoul 120-749

**Department of Biochemistry, Kangwon University, Kwangwon*

***Department of Biochemistry, School of Medicine Kyun-Kook University, Seoul*

(Received November 22, 1992)

Abstract □ The decreased activities of liver enzymes relating to carbohydrate metabolism such as glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and acetyl CoA carboxylase of streptozotocin injected rats were significantly modified by the intraperitoneal injection of ginseng saponin mixture and/or purified ginsenosides. However, several enzymes such as pyruvate kinase, malic enzyme and glycogen phosphorylase were not modified appreciably by the saponin administration, suggesting that the effect of ginseng saponin might be depend upon individual enzymes. Examination of liver enzymes by liver perfusing technique using perfusion buffer containing saponin (10⁻³%) showed that the ginseng saponin might stimulate insulin biosynthesis as well as the related enzyme activities.

Key words □ ginsenoside, streptozotocin, insulin

서 론

당뇨병은 고혈당을 초래하는 주요질환이며, insulin 작용의 부족이 주요 원인으로 알려져 있으나 insulin 부족을 초래하는 원인은 여러가지 있으므로 병의 원인에 따라 당뇨병은 여러종류로 분류되고 있다. 또한 insulin 부족은 고혈당과 그것에 기인된 여러가지 증상이 있지만 단백질이나 지질대사의 이상도 초래되고 이와같은 대사 이상이 장기간 지속되면 특유한 혈관

합병증이 발증되고 동맥경화증으로 진전되기도 한다는 것이다.

본 연구실에서는 1차적으로 흰쥐에게 streptozotocin을 투여하여 취장의 L₁₅ β세포의 장애로 인한 insulin 분비의 저해로 야기되는 혈액성분의 변동과 간의 glycogen 함량 및 glucokinase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphatase 등의 활성저하가 홍삼 사포닌의 투여로 유의적인 개선반응이 나타났음을 알 수 있었다.¹⁾

본 연구실에서는 인삼사포닌의 고혈당강하 작용을 생화학적으로 알아보기 위해 앞서 실시한 1차 실험에

*본 연구는 1991년도 한국인삼연구회 연구소의 용역연구비로 이루어진 것임.

이러 당대사와 연관된 효소범위를 확대하여 streptozotocin 투여로 활성이 저하된 쥐의 간 glycogen phosphorylase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, malic enzyme 그리고 acetyl CoA carboxylase 등에 미치는 인삼사포닌 혼합물과 정제된 ginsenoside Rb₁, Rb₂ 등의 영향을 *in vivo* 실험을 통하여 관찰하였고 아울러 몇가지 효소들의 *in vitro* 실험과 insulin receptor 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 인삼사포닌 혼합물과 정제된 ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rg는 한국인삼연조연구소에서 공급받은 고려홍삼에서 추출한 것이다.

제 1실험에서는 백서(Sprague Dawley, 150~170 g. ♂) 5마리씩으로 group을 구성하고 정상사료로 5일간 사육한 정상군, 홍삼사포닌 혼합물 5 mg/kg body weight/day을 catheter로 매일 경구투여하면서 정상사료로 5일간 사육한 사포닌 투여군, streptozotocin 50 mg/kg body weight를 1회 복강투여한 후 정상사료로 5일간 사육한 대조군, streptozotocin 50 mg/kg body weight를 1회 복강투여 직후부터 홍삼사포닌 혼합물 50 mg/kg body weight/day을 매일 catheter로 경구투여하면서 정상사료로 5일간 사육한 시험군의 하동맥에서 각각 혈액을 채취, 혈청을 제조하여 분석하였다. 모든 백서는 streptozotocin 투여전 16시간과 혈액채취 전 16시간을 절식시켰다.

인삼사포닌의 효과를 관찰하기 위한 제 2실험에서는 정상사료만으로 사육한 쥐(정상군)와 streptozotocin 70 mg/kg body weight/day를 1회 복강투여한 후 7일간 사육한 당뇨군 중 혈당치가 500 mg/100 ml 이상인 쥐를 선별하여 인삼사포닌 혼합물 10 mg/rat/day 또는 정제된 ginsenoside 10 mg/rat/day을 매일 3일간 복강투여한 후 간균질액[20%(w/v)]을 얻어 몇가지 당대사 관련 효소의 활성을 분석하였다. 모든 쥐는 streptozotocin 투여전 16시간과 혈액 및 간 절취 전 16시간을 절식시켰다.

Glucose는 glucose oxidase와 peroxidase의 짝지은 효소반응을 이용하여 생성된 산화형의 O-dianisidine의 흡광도를 425 nm에서 측정하여 정량하였고 β-hydroxybutyrate양은 β-hydroxybutyrate dehydro-

genase에 의한 산화반응으로 생성된 NADH를 340 nm에서의 흡광도 증가로 측정하였다.

Acetoacetate양은 3-hydroxybutyrate dehydrogenase의 역반응에 의한 NADH의 감소량을 측정하여 정량하였고 lactate는 lactate dehydrogenase에 의한 NADH의 생성을 340 nm에서의 흡광도 증가를 측정하여 정량하였다. 유리지방산의 양은 Dole의 방법²⁾을 변형하여 측정하였다.

Sigma사 assay kit를 이용하여 Triacyl glycerol양을 정량하였고, 혈청의 cholesterol 정량은 Sigma사 assay kit를 이용하여 정량하였다.

혈청의 insulin 농도는 ¹²⁵I-insulin kit를 이용하여 radioimmuno assay를 실시하였다. 일련의 번호를 붙인 일회용 10×75 mm 유리시험관들을 준비하고 1번 시험관에 0.4 ml diluent buffer, 2번 시험관에는 0.2 ml diluent buffer와 0.2 ml anti-insulin, 3~8번 시험관에는 각각 순서대로 2.5~100 μTU/ml insulin standard solution 0.2 ml과 0.2 ml anti-insulin, 나머지 시험관에는 혈청시료 0.2 ml과 anti-insulin 0.2 ml을 넣고 모든 시험관에 0.2 ml insulin-¹²⁵I를 넣어 섞은 후 37°C에서 1시간 incubation한 다음 0.1 ml second antibody를 넣어 섞은 후에 상온에서 1시간 incubation 직후 15분동안 2300~2500 rpm에서 원심 분리하여 얻은 침전물의 방사능을 gamma counter를 사용하여 측정하였다. 모든 assay를 두번 반복하여 평균치를 구하였다. 시료의 insulin 농도의 계산은 다음식을 이용하여 얻은 insulin standard의 bound percent curve와 시료의 bound percent를 비교하여 구하였다.

$$\text{Bound percent} = \frac{\text{CPM}(\text{insulin standard or sample})}{\text{CPM}(\text{zero standard})} - \frac{\text{CPM}(\text{blank nonspecific binding})}{\text{CPM}(\text{blank nonspecific binding})} \times 100$$

혈청내의 glucagon 농도는 ¹²⁵I-glucagon kit를 사용하여 radioimmuno assay를 실시하였다. Glucagon은 매우 불안정하므로 assay 과정은 0°C~4°C에서 실시하였다. 일련의 번호를 붙인 일회용 유리시험관들을 사용하여 1번 시험관에는 0.2 ml H₂O과 glucagon이 전혀없는 glucagon zero standard solution 0.2 ml을 넣었다. 2번 시험관에는 0.2 ml glucagon zero solution, 0.2 ml anti-glucagon을 넣었으며, 3~7번

시험관에 각각 순서대로 25~500 pg/ml 농도의 glucagon standard solution 0.2 ml씩 넣고 0.2 ml anti-glucagon을 넣었다. 다음 시험관에는 혈청시료를 0.2 ml, anti-glucagon 0.2 ml을 넣었다. 모든 시험관을 4°C에서 6시간 동안 incubation한 다음 0.1 ml glucagon-¹²⁵I-를 넣고 잘 섞은 후 4°C에서 최소한 16시간 incubation하였다. Incubation 직후 0.2 ml second antibody-polyethyglycerol 혼합물을 넣고 즉시 섞어준 다음 찬 증류수를 1 ml씩 가하고 15분간 2500 rpm에서 원심분리하여 얻은 침전물의 방사능을 gamma counter로 측정하였다. 모든 assay를 두번 반복하여 평균치를 구하고 insulin 농도 계산때와 같은 방식으로 얻은 glucagon standard percent curve와 시료의 bound percent를 비교하여 glucagon 농도를 계산하였다.

각 군의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 16시간 절식시킨 후 간문맥에 0.9%(w/v) NaCl 용액을 주사하여 혈액을 제거한 다음 얻은 간을 면도칼로 다진 후 Teflon-pestle Wheaton Elvehjem 조직 파쇄기를 이용하여 100 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol을 함유한 150 mM KCl 용액(pH 7.4)을 사용하여 20%(w/v) 파쇄액을 만든 후 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 cell debris, 핵 미토콘드리아를 제거하고 상층액을 효소원으로 사용하였다.

Pyruvate kinase의 활성은 phosphoenolpyruvate를 기질로 하여 생성된 pyruvate가 lactate dehydrogenase에 의해 환원될 때 소모되는 NADH양을 340 nm에서의 흡광도 감소를 측정하여 정량하였다. 반응액(1 ml)의 조성(최종농도)은 100 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8), 0.6 mM phosphoenolpyruvate, 2.5 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 0.7 mM ADP, 0.15 mM NADH, 8.5 U lactate dehydrogenase 및 효소원이었다.

간의 glycogen phosphorylase 활성측정은 glycogen의 비환원말단의 glucose 잔기의 phosphorylase에 의한 가역적 절단 결합반응을 이용한 Cori와 Green⁴⁾의 방법에 따라 glucose-1-phosphate와 glycogen을 기질로 하여 다음 반응식에서 생성된 Pi를 정량하여 phosphorylase 활성을 측정하였다.

반응액(0.1 ml)의 조성(최종농도)은 0.01 M glucose-1-phosphate, 2% glycogen, 0.2 M NaF(pH 6.1)과 효소원이었다. 반응을 40분간 진행시킨 후 10% TCA

500 μl을 가하여 반응을 중지시키고 생성된 Pi를 다음과 같이 정량하였다. 즉 10% ascorbic acid : 0.42% ammonium molybdate in 1 N H₂SO₄(1/6, v/v)과 반응액을 1 : 4(v/v)로 혼합한 후 상온에서 1시간 반응시킨 다음 820 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

간의 malic enzyme의 활성측정의 반응액(1 ml)의 조성(최종농도)은 250 M glycylglycin buffer(pH 7.4), 50 mM MnCl₂, 0.6 mM NADP⁺, 효소원, 30 mM malat였고 반응생성물인 NADPH를 340 nm에서의 흡광도 증가를 측정하여 효소활성을 측정하였다.

간의 glucose-6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase의 전체활성을 측정하기 위한 반응액(1 ml)의 조성(최종농도)은 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 효소원, 5 mM glucose-6-phosphate, 5 mM 6-phosphogluconate이었고, 빛의 투과길이가 1 cm인 cuvette에 반응액을 넣고(마지막에 기질들을 가하였다) NADPH 생성에 따른 흡광도의 증가를 25°C, 340 nm에서 측정하였다. 또한 간의 6-phosphogluconate dehydrogenase의 활성측정의 반응액(1 ml)의 조성(최종농도)은 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, 효소원, 5 mM 6-phosphogluconate였으며 빛의 투과길이가 1 cm인 cuvette에 반응액을 넣고(최후에 기질을 가함) NADPH 생성에 따른 흡광도의 증가를 25°C, 340 nm에서 측정하였고 두 효소의 전체활성과 6-phosphogluconate dehydrogenase의 활성의 차이값으로 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성을 계산하였다.

간의 acetyl coenzyme A carboxylase의 활성측정은 다음과 같이 행하였다. 세포내재 기질의 제거를 위해 간균질액(효소원)을 10 mM Tris/HCl(pH 7.5), 5 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol 용액으로 평형된 Sephadex G-25 column에 통과시켜 단백질 분획을 얻고 효소원의 활성을 측정하기 직전까지 50 mM Tris/HCl(pH 7.5), 10 mM sodium citrate, 10 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml BSA, 3.75 mM glutathione(reduced)을 함유한 용액에 37°C에서 30분간 incubation하여 acetyl CoA carboxylase를 활성화시킨 후 50 mM Tris/HCl(pH 7.5), 10 mM sodium citrate, 10 mM MgCl₂, 0.5 mg/ml BSA, 3.75 mM glutathion(reduced), 3.75 ATP, 0.125 mM acetyl CoA, 12.5 mM

NaH_2CO_3 (0.1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$)를 함유한 용액에 효소원을 가하여 반응을 시작하였다. 37°C 에서 10분간 반응시킨 후(전체 0.8 ml), 0.2 ml의 5 N HCl을 가하여 중지시켰다. 이를 5분간 5000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 scintillation vial에 옮긴 후, 85°C 에서 가열(45~60)하여 말린 후 1 ml의 증류수에 녹이고 cocktail solution(PPO 10 g, POPOP 0.25 g, naphthalene 100 g, dioxane 1 l) 10 ml를 가하여 Tricarb liquid scintillation counter을 사용하여 방사능을 측정하여 acetyl CoA에 편입된 $^{14}\text{CO}_2$ 을 계산하여 생성된 malonyl CoA를 정량하였다.

Liver perfusion technique를 이용한 간의 당 대사 및 지질대사 관련효소 연구에 앞서 예비 실험으로 정상 간의 균질액을 사용하여 적당량의 인삼 saponin (10⁻⁴) 존재하에서의 acetyl CoA carboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase 및 malic enzyme의 활성을 *in vitro*에서 관찰하였다. Acetyl CoA carboxylase 활성은 백서의 간을 3배 부피의 EDTA/physiological saline 용액으로 균질화한 후 105,000×g로 60분간 원심분리하여 상층액을 Sephadex G-25 column에 통과시켜 세포내에 존재한 기질들을 제거한 후 citrate을 가하여 preincubation하여 충분히 활성화시킨 다음 Nakanishi와 Numa의 방법⁵⁾에 따라 $^{14}\text{CO}_2$ -fixation assay를 행하여 carboxylase 활성을 측정하였다. Phosphofructokinase 활성은 백서의 간 절편을 2배 부피의 0.25 M sucrose를 함유한 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)로 균질화한 후 16,000×g에서 60분간 원심분리하여 상층액을 시료로 사용하여 fructose-6-phosphate가 lactate로 전환될 때 감소되는 NADH양을 340 nm에서의 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. Glucose-6-phosphate dehydrogenase 활성은 간 절편을 EDTA/physiological saline-용액으로 균질화한 후 15,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상층액을 시료로 사용하여 Löhr and Waller의 방법⁶⁾에 따라 측정하였다. Malic enzyme 활성은 간 절편을 19배의 EDTA/physiological saline 용액으로 균질화한 후 105,000×g으로 60분간 원심분리하여 얻은 상층액을 시료로 사용하여 Ochoa의 방법⁷⁾에 따라 생성되는 NADPH의 흡광도(340 nm)을 측정하여 정량하였다.

Perfusions technique을 이용한 간의 당류대사 관련효소 활성에 미치는 인삼 saponin의 영향 연구는

흰쥐(Sprague Dawley, 200~250 g, ♂)를 diethyl ether로 마취한 후 개복하고 간문맥을 통해 혼합기체(조성 95% O₂, 5% CO₂, 온도: 35°C)로 포화된 perfusion buffer[조성(최종농도) 118.5 mM NaCl, 4.74 mM KCl, 1.18 mM NH₂PO₄, 24.9 mM NaHCO₃, 2.54 mM CaCl₂, 1.18 mM MgSO₄, 500 mg/dl glucose]가 간으로 들어갈 수 있도록 pump를 사용하여 일정한 유속(3~3.5 ml/min g wet wt)으로 20분간 흘려, 평형되게 한 다음, glucagon(2.1 mM)과 인삼 saponin 혼합물(10⁻³%)을 가하고 같은 조건하에서 2시간 순환시킨 후 간을 즉시 분쇄하여 당대사에 관련된 효소활성 측정에 사용하였고 간으로부터 배출된 perfusion 용액의 glucose양을 측정하였다.

간의 원형질막은 Goldstein 등의 방법⁸⁾에 따라 퀴블 diethyl ether로 마취하여 간을 절취하고, 완충용액 A[조성(최종농도): 100 mM Tris-HCl, 0.15 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, (pH 7.5)]로 10% 파쇄액을 만들고, 10,000×g에서 60분간 원심분리하여 얻은 상층액을 100,000×g에서 1시간 초원심분리하였다. 이때 얻은 침전물을 Krebs-Ringer phosphate buffer에 최종 농도가 5~10 mg/ml가 되도록 분산하여 insulin-receptor source로 사용하였다.

Insulin receptor의 활성은 4×10⁻⁸ M I¹²⁵-insulin(2 $\mu\text{Ci}/\text{n mole}$)과 1~2 mg/ml 원형질막 조제물을 포함한 KRB-1% albumin 0.5 ml을 24°C 에서 30분 사용하여 다음과 같이 여과하였다. HVLP는 사용하기 전에 KRB-1% albumin에 담가두었다가 filter holder에 넣고 위 반응액 0.5 ml을 주사기로 여과한 후 KRB-1% albumin 용액 10 ml로 세척하였다. 이 filter를 counting vial에 옮겨 10% SDS 1 ml을 가하고 흔들어준 후 cocktail solution을 넣어 Packard Tris-Carb 4530 scintillation counter로 방사능을 측정하였다.

결과 및 고찰

정상간에 홍삼 saponin 혼합물을 5일간 경구투여한 경우에는 혈액의 호르몬(insulin, glucagon) 함량이나 glucose, ketone 체, 유리지방산, 중성지질 등의 함량에 유의적인 변화를 초래하지 않았으나 streptozotocin (50 mg/kg weight) 투여 직후 홍삼의 saponin 혼합물을 5일간 경구투여한 시험군에서는 혈청 glucose 양이 대조군에 비해 약 35% 감소하였고, ketone 체도

Table 1. The effect of panax ginseng saponin on blood serum composition of streptozotocin induced diabetic rats. The rats were injected 50 mg streptozotocin/kg body weight intraperitoneally prior to five days (once a day) oral administration of ginseng saponin mixture (5 mg/kg body weight/day). Numbers in brackets are the number of rats analyzed

Group	Glucose (mg/100 ml)	3-hydroxy butyrate (μ mole/ml)	Acetoacetate (μ mole/ml)	non-Esterified fatty acid (μ eq/l)
Normal (5) (normal group)	100.8 \pm 5.12	0.206 \pm 0.02	0.106 \pm 0.02	490.2 \pm 70.0
Saponin mixture fed rats (5)	115.4 \pm 4.92	0.272 \pm 0.03	0.102 \pm 0.001	505.0 \pm 122.1
Streptozotocin (control group)	338.4 \pm 159.95	0.43 \pm 0.04	0.294 \pm 0.03	860.6 \pm 155.8
Streptozotocin + saponin mixture fed rats (5)(test group)	219.6 \pm 172.31	0.312 \pm 0.03	0.270 \pm 0.03	608.2 \pm 108.7

Group	Triacylglycerol (mg/100 ml)	Total cholesterol (mg/100 ml)	Insulin (μ U/ml)	Glucagon (pg/ml)
Normal (5) (normal group)	97.19 \pm 26.90	55.54 \pm 10.74	48.47 \pm 13.19	528.00 \pm 290.24
Saponin mixture fed rats (5)	86.33 \pm 18.28	61.32 \pm 15.26	43.55 \pm 4.88	492.96 \pm 139.61
Streptozotocin (control group)	178.33 \pm 41.70	42.01 \pm 8.63	19.99 \pm 1.20	621.00 \pm 263.94
Streptozotocin + saponin mixture fed rats (5)(test group)	124.37 \pm 80.02	39.91 \pm 15.24	32.53 \pm 16.42	591.46 \pm 322.83

3-hydroxybutyrate가 27% 감소하였으며, 지방산과 TG도 각각 28%, 30% 감소하였다. 한편 insulin 함량은 대조군보다 63%나 높은 값을 나타내었다(Table 1). 이와 같은 실험결과는 인삼 saponin이 분명히 streptozotocin으로 유발된 당뇨병 쥐에서의 당대사 개선에 효과가 있음을 나타내는 것이다. 그러나 인삼 saponin이 insulin 분비장애를 방어하거나 지연시키는 작용인지 또는 당대사 및 지방대사에 미치는 영향이 크거나 또한 두 가지 작용의 합동작용인지에 대해서는 자세한 연구가 수행되어야 할 것이다.

제2차 실험에서 insulin 결핍으로 인한 당 대사의 변동에 미치는 인삼 사포닌의 영향을 생화학적으로 규명하기 위해 streptozotocin으로 유발시킨 당뇨병 쥐에 인삼 saponin 혼합물 또는 정제된 ginsenoside를 복강투여한 후 간의 당뇨병과 연관된 효소활성에 미치는 영향을 추궁하였다.

간을 중심으로 당대사 메카니즘을 살펴본 연구결과에 의하면 해당계에서는 phosphofructokinase와 pyruvate kinase, 당신생반응에서는 glucose-6-phosphatase, fructose-1,6-bisphosphatase, pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase 등의 활성조절에 따라 대사의 흐름방향이 조절된다는 것이며 효소량이 조절되는 long term control과 효소 활성이 조절되는 short term control이 알려져 있는데 insulin은 간의 해당반응효소의 합성 뿐 아니라 short term control 수단으로 해당효소의 활성화에도 관여한다고 한다.

본 연구실에서 백서에게 streptozotocin(70 mg/kg body weight)을 1회 복강투여하고 7일간 정상사료로 사육하여 당뇨병 유발사항을 조사한 연구결과에 의하면 혈청의 glucose, ketone체, lactate, 유리지방산, TG의 함량이 크게 증가하였고 간의 glycogen 함량과

phosphofructokinase 활성, glucokinase 활성이 저하되었으며 glucose-6-phosphatase 활성은 크게 증가하는 등 당뇨병 증상이 현저하였으나 인삼 saponin 혼합물이나 정제된 ginsenoside Rb₁, 또는 Rb₂를 투여하면 상승된 혈액의 glucose, ketone체, 유리지방산, TG의 함량이 유의적으로 개선되었고 간의 glycogen 함량이 크게 증가하였으며 높아진 간의 glucose-6-phosphatase 활성이 유의적으로 감소하였고 낮아진 phosphofructokinase 활성과 glucokinase 활성은 크게 증가한 것으로 보아 인삼 사포닌이 streptozotocin 유도 당뇨병 증상을 개선하는 효과가 있음을 알 수 있었다.¹⁾

본 연구에서 관찰한 glucose-6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase의 활성도 streptozotocin 투여군의 경우 정상군에 비해 각각 35%, 51%로 저하되었으나 고혈당이 된 쥐에게 saponin 혼합물 또는 ginsenoside Rb₁이나 Rb₂를 투여했을 때는 glucose-6-phosphate dehydrogenase 활성이 각각 대조군의 2.5배, 1.7배, 2.4배 증가하였으며 6-phosphogluconate dehydrogenase 활성도 모두 대조군의 약 1.7~1.9배 증가하였다(Table 2).

Streptozotocin 투여로 인한 glycogen phosphorylase의 활성변동을 보면 크게 저하되었으나 이 효소의 활성은 인삼 saponin을 투여하여도 크게 상승되지 않았다(Table 3). 이것은 고혈당시 활성형의 phosphorylase가 glucose와 결합하여 불활성화되기 때문인 것으로 생각된다.

Streptozotocin을 투여한 대조군의 pyruvate kinase도 정상군의 46%에 불과하였으나 혈당치가 높은 쥐에게 인삼 saponin 혼합물 또는 ginsenoside Rb₁ 또는 Rb₂를 복강 투여하였을 때도 pyruvate kinase 활성에 유의적인 효과가 관찰되지 않았으며 ginsenoside Rb₁의 투여의 경우는 오히려 대조군의 활성보다 저하되었다(Table 4). 간의 pyruvate kinase는 fructose-1,6-biosphate에 의해 활성이 촉진되고 ATP, alanine에 의해 억제되는 것으로 알려져 있는데 기근이나 insulin이 부족한 조건하에서는 당신생기질인 alanine이 glucose-alanine 회로를 통해 근에서 간으로 다량 운반되어 pyruvate kinase의 활성이 저하되는 것으로 생각되는데 인삼 saponin은 alanine의 과다생성을 막기에는 역부족인 것으로 풀이된다.

간의 malic enzyme도 streptozotocin 투여로 활성이

Table 2. The effect of panax ginseng saponin on liver glycogen-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of normal and streptozotocin induced diabetic rats. Both normal and streptozotocin (intraperitoneally) injected rats were fed with ordinary diet for seven days prior to three (once a day) intraperitoneal injections of panax ginseng saponin mixture or purified ginsenoside (10 mg /rat/day). Numbers in brackets are the number of rats analyzed

Group	Glucose-6-p dehydrogenase (unit*/mg protein)	6-Phosphogluconate dehydrogenase (unit*/mg protein)
I Normal rats (normal group)	8.42 ± 2.24	17.76 ± 4.07(6)
I Saponin mixture injected rats	9.70 ± 2.94(4)	19.25 ± 1.04(4)
I Ginsenoside Rg ₁ injected rats	10.96 ± 2.40(3)	23.41 ± 1.33(3)
Streptozotocin injected rat (control group)	2.92 ± 0.08(5)	9.11 ± 1.01(5)
II Streptozotocin + saponin mixture injected rat	7.17 ± 0.99(3) ^{a)}	15.99 ± 0.24(3) ^{b)}
II Streptozotocin + ginsenoside Rb ₁ injected rats	4.82 ± 1.52(3) ^{a)}	15.20 ± 1.36(3) ^{b)}
II Streptozotocin + ginsenoside Rb ₂ injected rats	6.87 ± 1.21 ^{a)}	17.08 ± 3.04(3) ^{b)}

*One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme to produce 1 nmole of NADPH per min under the experimental conditions as described in the text.
^{a)}p<0.05, ^{b)}p<0.01, ^{c)}p<0.005.

정상군의 68%로 감소되었으나 streptozotocin 투여군에게 인삼 saponin을 투여하여도 효소활성에는 별다른 영향이 관찰되지 않았다(Table 5). Malic enzyme은 insulin에 의해 그의 합성이 촉진되는 것으로 알려져 있으므로 streptozotocin 투여로 인하여 insulin 분비가 억제되면 malic enzyme의 합성이 저조하여 그의 활성저하는 쉽게 이해할 수 있다. 그러나 malic enzyme의 활성이 과량의 중성지방으로 억제되므로 streptozotocin 투여조건하에서 과량으로 증가된 중성지방이 malic enzyme의 활성을 크게 억제하고 있는

Table 3. The effect of panax ginseng saponin on liver glycogen phosphorylase of normal and streptozotocin induced diabetic rats. Both normal and streptozotocin (intraperitoneally) injected rats were fed with ordinary diet for seven days prior to three (once a day) intraperitoneal injections of panax ginseng saponin mixture or purified ginsenoside (10 mg/rat/day). Numbers in brackets are the number of rats analyzed

Group	Glycogen phosphorylase (unit*/mg protein)
I	
Normal rats (5) (normal group)	10.35 ± 3.32*
Saponin mixture injected rats (3)	9.9 ± 0.86
Ginsenoside Rg ₁ injected rats (3)	11.1 ± 3.35
II	
Streptozotocin injected rat (control group)	3.1 ± 0.4
Streptozotocin + saponin mixture injected rat (3)	5.96 ± 1.05 ^{ab}
Streptozotocin + ginsenoside Rb ₁ injected rats (3)	3.57 ± 1.16
Streptozotocin + ginsenoside Rb ₂ injected rats (3)	2.17 ± 1.57

*One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme to produce 1 nmole of Pi per minute under the experimental conditions as described in the text.
^{ab}p < 0.0.

것으로 생각된다.

지방산 합성계에서의 조절효소인 acetyl CoA carboxylase는 streptozotocin 투여로 인하여 예상대로 활성이 정상군의 33%로 저하되었다(Table 6). 그러나 인삼 saponin을 투여하면 활성이 정상치로 회복, 또는 정상치보다 상회하는 활성을 나타내었다. 정상군에 인삼 saponin을 투여하였을 때도 acetyl CoA carboxylase 활성이 크게(2~3배) 증가하고 있다. 따라서 인삼 saponin은 지방산 합성에 유리하게 작용하는 것으로 생각된다.

Streptozotocin 투여 직후부터 매일 인삼 saponin 혼합물을 5일간 경구투여했을 경우의 혈청 insulin

Table 4. The effect of panax ginseng saponin on liver pyruvate kinase of normal and streptozotocin induced diabetic rats. Both normal and streptozotocin (intraperitoneally) injected rats were fed with ordinary diet for seven days prior to three (once a day) intraperitoneal injections of panax ginseng saponin mixture or purified ginsenoside (10 mg/rat/day). Numbers in brackets are the number of rats analyzed

Group	Pyruvate kinase (unit*/mg protein)
I	
Normal rats (5) (normal group)	38.47 ± 4.01 (5)
Saponin mixture injected rats (3)	39.92 ± 6.27 (3)
Ginsenoside Rg ₁ injected rats (3)	38.72 ± 3.49 (4)
II	
Streptozotocin injected rat (control group)	17.55 ± 5.21 (6)
Streptozotocin + saponin mixture injected rat (3)	25.54 ± 3.48 (3)
Streptozotocin + ginsenoside Rb ₁ injected rats (3)	15.36 ± 1.99 (3)
Streptozotocin + ginsenoside Rb ₂ injected rats (3)	24.89 ± 4.77 (4)

*One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme to produce 1 nmole of NAD⁺ per minute by lactate dehydrogenase reaction (pyruvate + NADH → lactate + NAD⁺). Pyruvate is formed from phosphoenolpyruvate by pyruvate kinase reaction.

함량과 streptozotocin을 투여한 후 정상사료로 5일간 사육한 쥐의 혈청 insulin 함량을 비교해 보면 Table 1에 표시된 바와 같이 정상군이 48.37 μU/ml인데 비하여 전자는 32.53 μU/ml, 후자는 19.99 μU/ml인 것으로 보아 인삼 saponin 투여가 streptozotocin 투여로 인하여 취장 L-세포의 손상을 치유 또는 방어 또는 insulin 합성의 촉진 가능성을 예측할 수 있을 것이다.

본 연구 결과와 앞서 보고한 본 실험실에서 행한 streptozotocin 투여로 인한 혈액성분의 함량변동, 간의 glycogen 함량 및 당대사 관련 효소활성 등의 변동에 미치는 인삼 saponin의 영향을 종합해 보면 Ta-

Table 5. The effect of panax ginseng saponin on liver malic enzyme of normal and streptozotocin induced diabetic rats. Both normal and streptozotocin (intraperitoneally) injected rats were fed with ordinary diet for seven days prior to three (once a day) intraperitoneal injections of panax ginseng saponin mixture or purified ginsenoside (10 mg/rat/day). Numbers in brackets are the number of rats analyzed

Group	Malic enzyme (unit*/mg protein)	
I	Normal rats (5) (normal group)	12.71 ± 0.35
	Saponin mixture injected rats (3)	11.68 ± 0.81
	Ginsenoside Rg ₁ injected rats (3)	10.93 ± 0.88
II	Streptozotocin injected rat (control group)	8.63 ± 0.80
	Streptozotocin + saponin mixture injected rat (3)	9.98 ± 1.61
	Streptozotocin + ginsenoside Rb ₁ injected rats (3)	8.72 ± 1.14
	Streptozotocin + ginsenoside Rb ₂ injected rats (3)	8.73 ± 1.46

*One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme to produce 1 nmole of NADPH per minute under the experimental condition.

ble 7과 같이 인삼 saponin 혼합물이나 정제된 ginsenoside가 모두 streptozotocin 투여로 인한 혈청성분의 변화를 개선하고, streptozotocin 투여로 활성이 저하된 간의 당대사관련효소들과 acetyl CoA carboxylase의 활성을 유의적으로 증가시키며 상승된 glucose-6-phosphatase의 활성을 낮추는 효과가 있음을 알 수가 있다. 그러나 정상사료로 사육한 정상군에게 인삼 saponin을 투여했을 경우에는 Table 8에 표시한 바와 같이 유의적인 혈청 성분변화는 관찰되지 않았으며 효소활성도 acetyl CoA carboxylase의 활성이 2~3배 증가하였으나 대부분의 당대사 관련효소에는 큰 변화가 관찰되지 않았다.

Table 6. The effect of panax ginseng saponin on liver acetyl CoA carboxylase of normal and streptozotocin induced diabetic rats. Both normal and streptozotocin (intraperitoneally) injected rats were fed with ordinary diet for seven days prior to three (once a day) intraperitoneal injections of panax ginseng saponin mixture or purified ginsenoside (10 mg/rat/day). Numbers in brackets are the number of rats analyzed

Group	Acetyl CoA carboxylase (malonyl CoA n mole/min/mg protein)	
I	Normal rats (4) (normal group)	0.333 ± 0.050
	Saponin mixture injected rats (3)	0.939 ± 0.212 ^{b)}
	Ginsenoside Rg ₁ injected rats (3)	0.781 ± 0.013 ^{c)}
II	Streptozotocin injected rat (control group)	0.111 ± 0.04
	Streptozotocin + saponin mixture injected rat (3)	0.486 ± 0.24 ^{a)}
	Streptozotocin + ginsenoside Rb ₁ injected rats (3)	0.263 ± 0.041 ^{b)}
	Streptozotocin + ginsenoside Rb ₂ injected rats (3)	0.434 ± 0.28 ^{a)}

^{a)}p<0.05, ^{b)}p<0.01, ^{c)}p<0.005.

본 연구에서 얻은 streptozotocin 유발 당뇨병 쥐에 대한 홍삼의 인삼 saponin 개선효과가 인삼 saponin의 직접적인 효소활성에 미치는 영향인지 또는 취장 손상의 개선작용인지를 조사하기 위해 1) 인삼 saponin이 간의 당대사 및 지방산 합성에 관련된 효소에 미치는 영향을 *in vitro*에서 관찰하였고 2) liver perfusion technique을 이용하여 insulin이 없을 때의 간의 효소작용에 미치는 saponin의 영향을 관찰하였으며 3) 간세포막에 존재하는 insulin receptor의 활성에 미치는 인삼 saponin의 영향을 조사하였다.

Table 9는 *in vitro*에서 관찰한 몇가지 당대사 관련효소와 지방산 합성 관련효소에 미치는 인삼 saponin 혼합물의 영향을 나타낸 것이다. 반응액에서의

Table 7. The effect of panax ginseng saponin on blood serum composition and the amount of glycogen and several enzyme activities of the liver of streptozotocin induced diabetic rats. Values are expressed as percent assuming that of the corresponding normal level being 100

Serum composition/ enzymes	Streptozotocin injected	Streptozotocin saponin mixture injected rats	Streptozotocin + ginsenoside Rb ₁ injected rats	Streptozotocin + ginsenoside Rb ₂ injected rats
Phosphofructokinase	64.0	86.7	89.3	98.7
Pyruvate kinase	45.6	66.4	39.9	64.7
G-6-P-dehydrogenase	34.6	85.2	57.2	81.6
6-Phophogluconate dehydrogenase	51.3	90.0	85.6	96.2
Malic enzyme	67.9	78.5	68.6	68.7
Glucokinase	42.6	115.2	107.4	105.3
G-6-phosphatase	195.0	164.2	159.8	163.7
Glycogen phosphorylase	30.0	57.6	34.5	21.0
Glycogen	41.3	78.4	68.8	79.8
Acetyl CoA carboxylase	33.3	146.0	79.0	130.3
Glucose	488.9	122.2	113.6	169.2
β-Hydroxybutyrate	158.0	79.7	59.4	59.4
Acetoacetate	339.8	237.9	228.2	233.0
Lactate	136.4	62.6	87.5	100.3
non-Esterified fatty acid	184.6	149.5	153.2	154.2
Triacylglycerol	244.4	72.3	63.9	117.6

Table 8. The effect of panax ginseng saponin on blood serum compositions and the amount of glycogen and several enzyme activities of the liver of normal rats. Values are expressed as percent assuming that of the corresponding normal level being 100

Serum composition/ enzymes	Saponin mixture injected rats	Ginsenoside Rg ₁ injected rats
Phosphofructokinase	98.7	100.0
Pyruvate kinase	101.2	100.6
G-6-p-dehydrogenase	115.2	130.2
6-Phophogluconate dehydrogenase	108.4	134.5
Malic enzyme	92.0	86.0
Glucokinase	114.3	102.0
G-6-phosphatase	94.2	92.7
Glycogen phosphorylase	95.7	107.2
Glycogen	90.9	82.7
Acetyl CoA	282.0	234.5
Glucose	105.8	113.5
β-Hydroxybutyrate	63.0	80.0
Acetoacetate	165.0	141.7
Lactate	95.0	83.0
Non-esterified fatty acid	102.8	112.1
Triacylglycerol	94.0	11.1

Table 9. The effect of panax ginseng mixture on several enzymes relating carbohydrate metabolism and fatty acid biosynthesis *in vitro*. The concentration of the saponin mixture in the corresponding enzyme assay mixture was 10⁻⁴%. Values are the mean value of three determinations

Enzyme	Relative activity (%)
Glucose-6-phosphatase	113.4 ± 2.38
Glucokinase	111.4 ± 1.50
Phosphofructokinase	128.0 ± 3.09
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	110.8 ± 2.78
Malic enzyme	114.6 ± 2.78
Acetyl CoA carboxylase	135.8 ± 3.51

인삼 saponin mixture의 농도가 10⁻⁴%일 때 glucose-6-phosphatase, glucokinase, glucose-6-dehydrogenase 및 malic enzyme은 10% 정도 활성화되었으나 phosphofructokinase는 28%, acetyl CoA carboxylase는 35.8%의 활성화를 나타낸 것은 특히 주목할만 하며 자세한 연구가 필요하다고 생각된다.

Table 10은 glucose(500 mg/100 ml)와 glucagon(2.1 nM)이 함유된 perfusion buffer에 인삼 saponin 혼합물을 10⁻³%가 되게 한 후 2시간 동안 쥐의 간분

Table 10. Consumption of glucose during liver perfusion by circulation perfusion solution containing glucose (500 mg/100 ml), glucagon (2.1 nM) and saponin mixture ($10^{-3}\%$)

Time (min)		0 min → 1/120 min				total glucose uptake (g/120min)
Glucose uptake		1 st 30 min	2 nd 30 min	3 rd 30 min	4 th 30 min	
Control	mg/30 min	747.07	709.78	83.66	16.56	1.557
(-saponin)	mg/ min	24.90	23.66	2.78	0.55	
Test	mg/30 min	764.35	912.38	780.77	532.80	2,990
(+saponin)	mg/ min	25.48	30.41	26.03	17.76	

Table 11. The effect of panax ginseng saponin on liver enzymes relating glucose metabolism by liver perfusion technique. Perfusion solution contained glucose (500 mg/100 ml) and glucagon (2.1 mM)

Enzyme	Ginseng saponin	
	-	Mixture ($10^{-3}\%$) +
Glycogen (mg/g liver)	7.15	12.50
Phosphofructokinase(unit*/mg protein)	14.15	15.73
Pyruvate kinase(unit**/mg protein)	18.15	19.19
G-6-P dehydrogenase(NADPH n mole/min/mg protein)	7.55	7.22
6-phosphogluconate dehydrogenase(NADPH n mole/min/mg protein)	12.66	16.20
Malic enzyme(NADPH n mole/min/mg protein)	17.53	13.40
Glucose-6-phosphatase(Pi n mole/min/mg protein)	32.47	27.19
Glucokinase(NADH n mole/min/mg protein)	23.63	24.81
Acetyl CoA carboxylase	0.415	0.625
(malonyl CoA n mole/min/mg protein)	0.415	0.625
Glycogen phosphorylase(Pi n mole/min/mg protein)	5.72	2.75

*One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme to produce 1 nmole of NADH per minute under the experiment condition as described in the text.

**One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme to produce 1 nmole of NAD^+ per minute by lactate dehydrogenase reaction (pyruvate + $\text{NADH} \rightarrow \text{lactate} + \text{NAD}^+$). Pyruvate is formed from phosphoenolpyruvate by pyruvate kinase reaction.

맥을 통해 순환시킨 후에 perfusion 용액의 glucose 함량 변화를 시간별로 측정한 결과이며 perfusion 용액의 glucose 감소량으로 보아 인삼 saponin은 glucose 대사를 촉진함이 명백하다. Table 11은 liver perfusion을 수행한 후 간을 분쇄하여 당대사와 관련된 몇가지 효소활성을 분석한 것이며 인삼 saponin은 insulin이 결여되었을 때도 glycogen 함량을 74.8%나 증가시키고 6-phosphogluconate dehydrogenase 활성과 acetyl CoA carboxylase 활성이 각각 28%, 50.6% 증가되었으며 glucose-6-phosphatase 활성의 감소에도 크게 작용하였으나 phosphofructokinase, pyruvate kinase, glucokinase 활성은 각각 8.3%, 6.3%, 5% 정도 증가된 것으로 보면 본 연구에서 행한 streptozotocin 투여후에 인삼 혼합물을 복강 투여했을 때의 당대사

효소활성의 개선이 인삼 saponin의 직접적인 효소활성화 이외에 streptozotocin으로 인한 췌장의 L β 세포의 손상을 완화시켜 insulin 분비기능을 활성화하기 때문인 것으로 생각되지만 자세한 연구가 계속 수행되어야 할 것이다.

Insulin receptor 활성에 미치는 인삼 saponin의 영향을 조사한 결과 Table 12에 표시한 바와같이 streptozotocin을 투여한 대조군의 insulin receptor 활성이 정상군의 2.5배인 것으로 관찰되었다. 그러나 streptozotocin 투여군에게 인삼 saponin 혼합물이나 ginsenoside Rb $_1$ 또는 Rb $_2$ 를 투여하면 insulin receptor 활성이 저하되었으며 특히 ginsenoside Rb $_2$ 의 효과는 현저하였다. Streptozotocin 투여로 인한 insulin 분비의 부족 또는 결핍 상태에서 야기된 대사이

Table 12. The effect of panax ginseng saponin on insulin receptor activity of the liver of streptozotocin induced diabetic rats. Both normal and streptozotocin (intraperitoneally) injected rats were fed with ordinary diet for seven days prior to three (once a day) intraperitoneal injections of panax ginseng saponin mixture or purified ginsenoside (10 mg/rat/day). Numbers in brackets are the number of rats analyzed

Group	Insulin receptor activity mole of bound I ¹²⁵ mg protein ($\times 10^{13}$)
I	
Normal rats (3) (normal group)	2.01 ± 0.47
Saponin mixture injected rats (4)	2.28 ± 0.78
Ginsenoside Rg ₁ injected rats (4)	1.42 ± 0.15
II	
Streptozotocin injected rat (control group)	5.00 ± 1.07
Streptozotocin + saponin mixture injected rat (3)	4.25 ± 1.35
Streptozotocin + ginsenoside Rb ₁ injected rats (3)	1.95 ± 0.08 ^{a)}
Streptozotocin + ginsenoside Rb ₂ injected rats (3)	1.54 ± 0.59 ^{a)}

^{a)} p < 0.05.

상이나 다른 원인으로 insulin receptor가 과다하게 합성되는 것인지 또는 insulin receptor의 insulin과의 결합능이 증가하였는지 또는 미결합상태의 receptor 수가 많은 것인지는 분명치 않으나 인삼 사포닌 투여가 receptor 활성을 정상치로 회복시키는 효과가 있다는 점에서 주목해야 할 것이다.

요 약

쥐에게 streptozocin을 투여하여 활성이 저하되는 몇가지 간의 당대사 관련효소(glycogen phosphorylase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphatase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, malic enzyme) 그리고

acetyl CoA carboxylase에 미치는 인삼사포닌 혼합물 또는 정제된 ginsenoside의 영향을 *in vivo* 실험을 통해 관찰한 결과 glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, acetyl CoA carboxylase의 활성은 전보한 phosphofructokinase, glucokinase 활성 증가와 같이 유의적인 증가를 나타내었으나 glycogen phosphorylase, pyruvate kinase, malic enzyme 등의 활성에는 유의적인 활성 변동을 관찰할 수 없었으며 각 효소특성에 따른 해석이 필요할 것으로 생각된다.

Streptozotocin 투여로 인한 혈액성분의 함량변동, 간의 glycogen 함량 및 당대사 관련효소활성 등의 변동에 미치는 인삼 saponin의 영향을 종합해 보면 인삼 saponin은 streptozotocin 투여로 인한 혈청성분의 변화를 개선하고, streptozotocin 투여로 활성이 저하된 간의 당대사관련효소들과 acetyl CoA carboxylase의 활성을 유의적으로 증가시키며 상승된 glucose-6-phosphatase의 활성을 낮추는 효과가 있음을 알 수가 있다.

Glucose와 glucagon이 함유된 perfusion medium에 인삼 saponin 혼합물을 10⁻³%가 되게 한 후 쥐의 간 문맥을 통해 순환시킨 liver perfusion 실험결과에 의하면 인삼 saponin이 glucose 대사를 촉진함이 명백하다. 그리고 인삼 saponin은 insulin이 결여되었을 때도 glycogen 함량을 증가시키며 6-phosphogluconate dehydrogenase 활성과 acetyl CoA carboxylase 활성을 증가시키고 glucose-6-phosphatase 활성의 감소에도 크게 작용하였으나 phosphofructokinase, pyruvate kinase, glucokinase 활성이 크게 증가되지 않은 것으로 보면 본 연구에서 행한 streptozotocin 투여 후에 인삼 혼합물을 복강투여했을 때의 당대사 효소활성의 개선이 인삼 saponin의 직접적인 효소활성화 작용 이외에도 streptozotocin으로 인한 췌장의 L₁ β 세포의 손상을 완화시켜 insulin 분비기능을 활성화하기 때문인 것으로 생각되지만 자세한 연구가 계속 수행되어야 할 것이다.

인용문헌

1. 주충노, 김주현: 고려인삼학회지, **16**, 190 (1992).
2. Dole, V.P.: *J. Clin. Invest.*, **35**, 150-154 (1956).
3. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamulton, S.K., Rebers, P.A.

- and Smith, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
4. Cori, C.F. and Green, A.A.: *J. Biol. Chem.*, **151**, 39 (1943).
 5. Nakamishi, S. and Numa, S.: *Eur. J. Biochem.*, **16**, 161, ed. H.U. Bergmyer (1970).
 6. Löhr, G.W. and Waller, H.D.: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, pp. 636, ed. H.U. Bergmyer, Academic Press, New York (1974).
 7. Ochoa, S.: *Methods in Enzymology*, Vol. 1, pp. 739, ed S.P., Colowick and Kaplan, N.O.: Academic Press, New York (1955).
 8. Goldstein, J.L., Kovanen, P.T. and Brown, M.S.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 11367 (1979).