

쥐 간에서의 Ginsenoside의 세포내 분포와 대사

윤수희 · 이희봉* · 김용덕 · 주충노

연세대학교 이과대학 생화학과, *강원대학교 이과대학 생화학과
(1993년 7월 19일 접수)

Cellular Distribution and Metabolism of Ginsenosides in Rat Liver

Soo Hee Yoon, Hee Bong Lee*, Yong Duk Kim and Chung No Joo

Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

*Department of Biochemistry, College of Science, Kang Won University, Chun Cheon

(Received July 19, 1993)

Abstract □ 0.5 mg of natural ginsenoside mixture and 0.8 μ Ci of synthesized 14 C-ginsenosides were administered orally to a rat and killed at one hour after the ginsenoside administration and the liver was fractionated into nuclear fraction, mitochondria, microsomes and cytosol fraction. Radioactivity distribution in subcellular fractions of the liver showed that 32% of total radioactivity absorbed in the liver was in cytosol fraction but a significant portion of the radioactivity was also found in mitochondria (26.6%) and microsomal fraction (18.1%). 5.8% of the total radioactivity was recovered from the nuclear fraction as well. This suggested that ginsenosides might be distributed into all subcellular fractions. Activities of mitochondrial aldehyde dehydrogenase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase of the liver of rat at two hours after the ginsenoside administration were found appreciably stimulated, suggesting that the ginsenoside concentration in the liver might be around 10⁻⁵%, since optimum concentrations for most enzyme catalyzed reactions *in vitro* were known to be 10⁻⁶~10⁻⁴%. A significant portion of the radioactivity recovered from subcellular fractions of the liver was found in protein fractions, suggesting that proteins might interact with ginsenosides. Examination of protein-ginsenoside interaction by gel filtration, equilibrium dialysis and ammonium sulfate precipitation technique suggested that proteins and ginsenosides do not bound covalently but weakly combined. When purified ginsenoside Rb₁ and Rg₁ were incubated with rat liver cytosolic enzymes for 20 min, the above ginsenosides were hydrolyzed quickly, suggesting that ginsenosides might be rapidly hydrolyzed and metabolized in the liver. It was also observed *in vitro* that the ginsenosides such as Rb₁ and Rg₁ were easily hydrolyzed by rat liver cytosol preparation suggesting that absorbed ginsenosides might be quickly hydrolyzed and metabolized in the liver.

Key words □ Ginsenoside, subcellular distribution, ginsenoside-protein interaction, deglycosilation.

서 론

고려인삼의 주요성분의 하나인 ginsenoside분획은 현재까지 많은 연구자들에 의해 연구되어 왔으나 그 대부분이 *in vitro* 실험이거나 동물실험의 경우에도

ginsenoside를 강제적으로 투여한 실험이 많아 실험 결과의 생리적 의미를 포괄적으로 파악하기에는 ginsenoside의 체내동태의 연구가 필요하다.

본 연구에서는 ginsenoside의 체내동태를 이해하기 위해 쥐에게 합성된 14 C-ginsenoside를 함유한 *Panax ginseng* C.A. Meyer에서 추출한 천연 ginsenoside 혼합물을 투여한 후 간세포내에서의 방사능 분포와

*본 연구는 한국과학재단 일반목적기초연구비(1992~1993)로 이루어진 것임.

단백질-ginsenoside 상호작용을 조사하고 정제된 ginsenoside Rb₁과 Rg₁의 간세포의 cytosol 효소군에 의한 변화를 관찰하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

주와 윤¹⁾의 방법에 따라 합성한 ¹⁴C-ginsenoside 혼합물 0.8 μCi을 함유한 0.5 mg의 천연 ginsenoside 혼합물(한국인삼연구소 제조)을 1 ml의 증류수에 녹여 흰쥐(Sprague Dawley, ♂, 180 g)에게 catheter로 경구투여하고 1시간 후에 쥐를 diethyl ether로 마취하여 혈액과 소장내용물, 간을 채취하였다. 혈액(7 ml)을 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청(2.3 ml)을 얻었고 간은 7 g을 잘게 다진 다음, hand homogenizer로 30회 왕복하여 0.32 SMT(0.32 M sucrose, 3 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 25% 파쇄액을 만들어 세겟의 거어크로 여과하고 0.6배의 0.32 SMT와 0.2배의 증류수로 희석하여 균질액을 만들었다. 이 균질액을 700 x g에서 10분간 원심분리한 후 침전물을 0.25 SMT(0.25 M sucrose, 3 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4)에 분산하고 다시 700 x g에서 10분간 원심분리하여 얻은 침전물을 핵 1분획이라고 하였다. 상층액을 모아 10,000 x g에서 15분간 원심분리하여 얻은 침전물은 0.25 SMT에 분산(mitochondria 분획)하였고 상층액은 8 mM CaCl₂ 용액에 30분간 방치한 후 12,000 x g에서 40분간 원심분리하였다. 이때 얻은 상층액을 cytosol 분획, 0.25 SMT에 분산한 침전물은 microsome 분획이라 하였다. 핵1분획의 1/2을 13 ml의 2.3 SMT(2.3 M sucrose, 1 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl pH 7.4)에 분산한 후 50,000 x g에서 65분간 초원심분리하였다. 이때 위에 뜬 부분은 ultra 상층, 밑에 침전된 하얀 침전물을 ultra 핵층이라고 이름 부쳤다.

간 세포분획의 표지효소 검증을 위한 glutamate dehydrogenase(GLDH) 활성측정의 반응액(1 ml)의 조성(최종 농도)은 50 mM phosphate buffer(pH 7.5), 120 mM ammonium acetate, 0.15 mM NADH, 1.5 mM ADP, 효소원과 8 mM α-ketoglutarate(α-KGA)였고 340 nm에서의 흡광도 변화를 25°C에서 측정하였다.²⁾ Lactate dehydrogenase(LDH) 활성측정의 반응액(1 ml)의 조성(최종 농도)은 100 mM phosphate buffer(pH 7.0), 0.2 mM NADH, 효소원과 0.8 mM py-

ruvate 이었고 340 nm에서의 흡광도 변화를 25°C에서 측정하였다.³⁾ Phosphodiesterase(PDE) 활성측정의 반응액(1 ml)의 조성(최종 농도)은 20 mM Tris-HCl buffer(pH 9.0), 10 mM sodium thymidine 5'-monophosphate, p-nitrophenyl ester와 효소원이었고 37°C에서 20분 반응시킨 후 400 nm에서의 blank와의 흡광도 차이를 비교하였다.⁴⁾ Blank에는 효소원 대신 증류수를 가하였다.

혈청과 간 세포분획을 각각 1~2 ml씩 사용하여 방사능을 측정하였다. Liquid scintillation counting cocktail은 PPO 10 g, POPOP 0.25 g, naphthalene 100 g을 dioxane 1 l에 녹인것을 10 ml씩 사용하였다.

DNA의 정량은 각 분획을 Burton⁵⁾ 방법으로 처리한 후 정량하였다. 단백질은 Lowry 등⁶⁾의 방법으로 정량하였다.

Ginsenoside 혼합물을 투여한 쥐 간의 효소활성을 측정하기 위해 흰 쥐(150~200 g, ♂, 각군 3마리)를 하루 밤 굶긴 다음 1 mg의 천연 ginsenoside분획을 1 ml의 물에 녹여 경구투여하고 일정시간(1~5시간) 후에 절두하여 간을 절취하고 0.25 M sucrose-10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) 용액으로 10% 또는 20% 파쇄액을 만들었다. Lactate dehydrogenase(LDH) 활성측정을 위한 반응액(3 ml)의 조성(최종 농도)은 50 mM phosphate buffer(pH 7.4), 0.6 mM Na-pyruvate, 21.3 mM nicotinamide, 0.18 mM NADH와 10% 간 파쇄액 0.1 ml였으며 340 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. Aldehyde dehydrogenase(ALDH) 활성측정을 위한 반응액(1 ml)의 조성(최종 농도)은 70 mM Na-pyrophosphate(pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 2 mM pyrazole, 6 mM propionaldehyde와 10% 간 파쇄액 0.1 ml이었으며 340 nm에서 흡광도 증가를 측정하였다.⁷⁾ Succinate dehydrogenase(SDH) 활성측정을 위한 반응액(3 ml)의 조성(최종 농도)은 50 mM phosphate buffer(pH 7.6), 1 mM KCN, 0.04 mM DICPIP, 20 mM Na-succinate와 10% 간 파쇄액 0.1 ml이었으며 620 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.⁸⁾ 20% 간 파쇄액을 효소원으로 사용할 경우의 반응액(2 ml) 조성(최종 농도)은 25 mM KCN, 1 mM DICPIP, 0.5 M Na-succinate와 20% 간 파쇄액 1 ml이었다. 반응액을 실온에서 30초 방치시킨 후 2 ml의 무수 ethanol을 가하여 반응을 정지시킨 다음 4 ml의 물로 희석한 후 원심분리하여 620 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

Malate dehydrogenase(MDH) 활성측정을 위한 반응액(3 ml) 조성(최종 농도)은 14 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.43 mM NAD^+ , 30 mM nicotinamide, 0.86 mM KCN, 0.034 mM DICPIP, 7.1 mM Na-phosphate와 10% 간 파쇄액 0.1 ml이었으며 620 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.⁹⁾ 20% 간 파쇄액을 효소 원으로 사용한 경우의 반응액(전체부피 2 ml) 조성(최종 농도)은 177.5 mM Na-malate, 10.75 mM NAD^+ , 0.75 M nicotinamide, 21.5 mM KCN, 0.85 mM DICPIP와 20% 간 파쇄액 1 ml이었으며 이 반응액을 실온에서 30초 방치한 후 2 ml의 무수 ethanol을 가하여 반응을 정지시킨 후 물 2 ml를 가하고 원심분리하여 620 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

천연 ginsenoside 혼합물의 미토콘드리아로의 투입을 조사하기 위하여 흰 쥐(200 g, ♂)를 24시간 굶긴 다음 절두하여 얻은 간을 0.025 mM Na-EDTA-15 mM Tris buffer(pH 7.4)를 포함한 330 mM sucrose 용액으로 세척한 후 잘게 썰어 10% 파쇄액을 만든 다음 원심분리(800 x g, 10분)하여 얻은 상층액을 다시 원심분리(8,200 x g)하여 침전물을 얻어 이것을 330 mM sucrose 용액에 분산한 후 원심분리(8,200 x g, 10분)하여 얻은 침전물을 미토콘드리아 조제물로 사용하였다. 이 미토콘드리아 조제물(2.8 mg protein/ml)과 ^{14}C -ginsenoside(0.038 μCi)를 함유한 $10^{-4}\%$ ginsenoside 혼합용액(5 ml)[성분 : 125 mM KCl, 1 mM EDTA(disodium salt), 20 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.4)]을 25°C에서 10분간 방치한 후 이것을 Eppendorf tube(1 ml)에 옮기고 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 침전물을 물에 분산한 후 방사능을 측정하였다.

Ginsenoside의 세포내 분포를 확인하기 위하여 위와 같이 일정농도($10^{-4}\%$)의 ginsenoside 혼합물용액에 방치한 미토콘드리아(시험군)와 대조 미토콘드리아 조제물을 330 mM sucrose 용액에 분산한 다음 초음파로 분쇄하고 외막에 결합된 monoamine oxidase (MAO), 내막에 결합된 succinate dehydrogenase (SDH), matrix에 존재하는 MDH의 활성을 측정하였다. MAO의 활성측정[Schnaitman 등¹⁰⁾의 방법]의 반응액(3 ml)의 조성(최종 농도)은 50 mM phosphate buvver(pH 7.6), 25 mM benzylamine, 미토콘드리아 파쇄액 1 ml(단백질 2.8 mg)이었다. 이 반응액을 37°C에서 10분간 방치한 다음 70% TCA 0.6 ml를 가

하여 반응을 종결시킨 다음 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 얻은 상층액의 생성된 benzylaldehyde의 흡광도의 변화를 250 nm에서 측정하였다. SDH의 활성측정[주 등⁹⁾의 방법]의 반응액(3 ml)의 조성(최종 농도)은 50 mM phosphate buffer(pH 7.6), 1 mM KCN, 0.04 mM DICPIP, 20 mM Na-succinate와 미토콘드리아 파쇄액 2.8 ml이었다. 이 반응액을 실온에서 10분간 방치한 후 무수 ethanol 2 ml를 가하여 반응을 종결시킨 다음 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 상층액을 620 nm에서 환원된 DICPIP의 흡광도를 측정하였다. MDH의 활성측정[주 등⁹⁾의 방법]의 반응액(3 ml)의 조성(최종 농도)은 14 mM phosphate buffer(pH 7.4), 0.43 mM NAD^+ , 30 mM nicotinamide, 0.86 mM KCN, 0.034 mM DICPIP, 7.1 mM Na-malate와 미토콘드리아 파쇄액 1 ml(단백질 2.8 mg)이었다. 이 반응액을 실온에서 5분간 방치한 다음 무수 ethanol 2 ml를 가하여 반응을 종결시킨 다음 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 얻은 상층액의 환원된 DICPIP의 흡광도를 620 nm에서 측정하였다.

단백질과 ginsenoside 사이의 상호작용을 조사하기 위하여 0.5 mg의 천연 ginsenoside 혼합물(0.8 μCi ^{14}C -ginsenoside 포함)을 경구투여한 쥐의 간 mitochondria 분획, microsome 분획을 각각 한번씩 세척하여 혼합된 cytosol 분획을 제거한 후, 3차례에 걸쳐 초음파로 분쇄하고 105,000 x g에서 65분간 원심분리하여 침전물(소량의 0.25 SMT에 분산)과 상층액의 방사능을 측정하였다. 이와같이 얻은 mitochondria와 microsome의 막 분획을 각각 1 M NaCl, 20 mM EDTA 용액과 1 : 1의 비율로 섞어 30분간 방치하여 peripheral protein을 막 구조에서 떨어뜨린 후 10,000 x g에서 30분간 원심분리하여 얻은 침전물(소량의 0.25 SMT에 분산)과 상층액의 방사능을 측정하였다. 한편 cytosol 내의 단백질, mitochondria matrix내의 단백질과 ginsenoside간의 결합 조사를 위하여 cytosol 용액과 matrix 용액을 각각 10 ml씩 취하여 1 ml의 90% TCA로 3회 이상 처리하여 침전이 더 이상 생기지 않음을 확인한 후 3000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액과 침전물(0.25 SMT에 분산)의 방사능을 측정하였다. 또한 cytosol 용액(9 ml)을 0.25 SMT로 미리 평형된 Sephadex G-100 column (35 ml)에 충전하고 6 ml/hr의 유속으로 용출하였다. 용출액은 2 ml씩 받았으며 각 분획의 흡광도(280 nm)측정,

단백질 정량과 그리고 방사능 측정을 행하였다.

또한 평형 투석법으로 ginsenoside과 단백질과의 상호작용을 관찰하였다. 즉 투석막을 증류수에 넣고 2시간 끓인 다음 10 mM Tris buffer(pH 7.3)에 녹인 0.2% BSA 2.5 ml과 ^{14}C -ginsenoside을 함유한 10 $^4\%$ 천연 ginsenoside 혼합물용액 2.5 ml의 혼합용액(5 ml)을 투석막 안쪽에 넣고 이것을 40 ml의 같은 용액[10 mM Tris buffer(pH 7.3)]에 담근 후 평형에 도달하게 한 다음 투석막 안과 밖의 방사능을 측정하였다.

^{14}C -ginsenoside(0.04 μCi)를 함유한 10 $^4\%$ ginsenoside 혼합물용액[10 mM Tris buffer(pH 7.3)에 녹임] 2.5 ml와 0.2% BSA 용액[같은 buffer에 녹임] 2.5 ml를 혼합하여 30분 방치한 후 고체(NH_4) $_2\text{SO}_4$ 를 서서히 가하여 80%가 되도록 가한 다음 원심분리(20,000 x g, 30분)하여 상층액과 침전물을 얻고 침전물은 소량의 80%(NH_4) $_2\text{SO}_4$ 용액으로 2번 세척한 후 각각의 방사능을 측정하였다. 침전물은 다시 10 mM Tris buffer(pH 7.3)로 5 ml용액을 만든 다음 위와 같은 방법으로 BSA를 침전시켜 상층액과 침전물의 방사능을 측정하였다.

정제된 Ginsenoside Rb $_1$ 과 Rg $_1$ 의 쥐간의 cytosol 효소군에 의한 대사를 관찰하기 위해 쥐(Sprague Dawley, 180~200 g, ♂)의 간을 균질화 하여 0.25 M sucrose 용액(10 mM Tris-HCl 포함)으로 20%(w/v) 균질액을 만든 다음 500 x g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 10,000 x g에서 15분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 제거하고, 다시 12,000 x g에서 원심분리하여 얻은 상층액에 CaCl_2 를 8 mM 되도록 가한 후 30분간 잘 혼합하고 12,000 x g에서 80분간 원심분리하여 cytosol 분획을 얻었다. 이 cytosol 분획의 35~70% ammonium sulfate 포함침전물을 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 분산한 후 100배량의 같은 phosphate buffer에 대하여 12시간 투석한 것을 ginsenoside 대사 효소원으로 사용하였다.

위와같이 얻은 효소원 1 ml와 $2 \times 10^2\%$ ginsenoside Rb $_1$ 또는 Rg $_1$ 1 ml를 혼합하고 37°C 에서 20분간 반응시킨 다음 2.2 ml의 MeOH를 가하고 3,000 rpm에서 원심분리하여 침전물을 제거하고 2.2 ml의 chloroform을 가하여 강하게 vortexing한 후 원심분리하여 MeOH-H $_2$ O층을 40°C 에서 감압농축한 후 butanol 100 μl 를 가하여 vortexing한 다음 13,000 rpm에서 원심분리하여 얻은 butanol층을 silica gel thin layer

chromatography (TLC, 전개용매 : CHCl_3 : MeOH : H $_2$ O, 65 : 35 : 5, v/v/v)의 시료로 사용하였고 chloroform층은 질소를 유입시키면서 증발 농축한 다음 silica gel TLC 시료로 사용하였다.

결과 및 고찰

방사성 ^{14}C -ginsenoside 혼합물(0.8 μCi)과 0.5 mg의 고려인삼의 ginsenoside 분획을 흰 쥐에게 경구투여하고 한 시간 후에 채취한 간의 핵 분획, 미토콘드리아 분획, 마이크로솜 분획 및 세포질 분획으로의 방사능 분포를 조사한 결과 간에 흡수된 방사능 중 비교적 많은 방사능이 세포질 분획에서 회수되었으나 미토콘드리아 분획과 마이크로솜 분획에서도 상당량의 방사능이 회수되었고 핵분획에서도 방사능이 탐지되는 것으로 보아 ginsenoside는 세포내로 투과한 후 각 세포분획으로 침투되는 것으로 예상된다. Table 1는 각 세포분획의 순도검사를 이용하여 작성한 방사능의 세포분획 분포를 나타낸 것이다. 이와같은 침투여부를 확인하기 위하여 1mg의 천연 ginsenoside 혼합물을 경구투여하고, 일정시간(1, 2, 3, 5시간) 후 절두하여 얻은 10% 간 파쇄액의 LDH, ALDH, SDH, MDH의 활성을 측정된 결과 Table 2에 표시한 바와 같이 LDH와 ALDH의 활성은 대조군 보다 컸으며 2시간 후 채취한 간의 ALDH와 LDH의 활성증가는 각각 33%, 22%이었다. 그러나 SDH와 MDH의 활성은 대조군 활성과 차이가 없었다. 본 연구실에서 행한 연

Table 1. Radioactivity distribution in subcellular fractions of rat liver at one hour after the oral administration of natural ginsenoside mixture (0.5 mg) and 0.8 μCi (1.783×10^6 cpm) of ^{14}C -ginsenosides

| Subcellular fraction | Radioactivity (cpm) | Relative activity* (%) |
|----------------------|---------------------|------------------------|
| Total liver | 23,364 | 100.0 |
| Cytosol | 7,619 | 39.2 |
| Mitochondria | 6,220 | 32.0 |
| Microsomes | 4,224 | 21.8 |
| Nucleus | 1,350 | 7.0 |
| Ultra nucleus | — | — |
| Ultra sup. | 1,236 | — |

*Relative activities were expressed as percent assuming that of total liver being 100.0.

Table 2. Activities of several enzymes of the liver of albino rats fed orally with 1 mg of natural ginsenoside mixture

| Group | Enzyme activity (unit/g protein) | | | |
|---------|----------------------------------|------------|-----------|-----------|
| | ALDH | SDH | MDH | LDH |
| Control | 4.69(100) | 6.14(100) | 1.10(100) | 40.8(100) |
| 1 | 5.60(119) | 6.12(99.7) | 1.14(104) | 44.2(108) |
| 2 | 6.21(133) | 6.44(105) | 1.07(97) | 49.7(122) |
| 3 | 5.20(111) | 5.78(94) | 1.08(98) | 46.2(113) |
| 5 | 4.87(104) | 5.88(96) | 1.18(107) | 48.3(118) |

Livers were homogenated and made up 10% homogenate. The reaction mixture (1 ml) for ALDH activity contained (final concentration) 70 mM Na-pyrophosphate (pH 8.0), 1 mM NAD⁺, 2 mM pyrazole, 6 mM propionaldehyde and 0.1 ml of the liver homogenate. The reaction mixture (3 ml) for SDH activity contained (final concentration) 50 mM phosphate buffer (pH 7.6), 1 mM KCN, 0.04 mM DICPIP, 20 mM Na-succinate and 0.1 ml of the liver homogenate. The reaction mixture (3 ml) for MDH activity contained (final concentration) 14 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.43 mM NAD⁺, 30 mM nicotinamide, 0.86 mM KCN, 0.034 mM DICPIP, 7.1 mM Na-malate and 0.1 ml of the liver homogenate. The reaction mixture (3 ml) for LDH activity contained (final concentration) 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 0.6 mM Na-pyruvate, 21.3 mM nicotinamide, 0.18 mM NADH and 0.1 ml of the liver homogenate.

Group 1, 2, 3, 5 mean that livers of rats killed at 1, 2, 3 and 5 hours after the saponin administration were used respectively for the enzyme assay. The values are mean values of three rats.

구결과에 의하면 간 내에 흡수된 ginsenoside의 농도가 10⁻⁵로 예상되는데 간에서의 농도를 10⁻⁵로 가정하면 본 실험에서 사용된 효소반응계에서의 ginsenoside의 농도는 10⁻⁷로 희석(300배)된 것으로 생각되며, 이 농도에서는 SDH, MDH의 활성화를 기대하기는 어려운 것이다. 왜냐하면, 각 효소제마다 최고활성에 요구되는 ginsenoside의 농도가 존재하며, ALDH(주 등¹¹)와 LDH(주 등¹²)의 활성화를 위한 적정농도는 10⁻⁸ 수준이지만 SDH와 MDH의 적정농도는 10⁻⁵(김 등¹³)인 것으로 알려져 있기 때문이다. 따라서 반응액에서의 ginsenoside의 농도가 되도록 덜 희석되게 하기 위하여 20% 간 파쇄액을 사용하고 반응액을 2 ml로 하여 ginsenoside의 농도가 10배 이상 희석되지 않도록 한 조건하에서 MDH와 SDH의 활성을 측정된 결과 각각 20%, 40%의 활성 증가가

Table 3. Activity of SDH and MDH of the liver of rats fed orally with 1 mg of natural ginsenoside mixture at 2 hours after the administration

| Group | Enzyme activity (unit/g liver) | |
|---------|--------------------------------|------------|
| | SDH | MDH |
| Control | 1.46(100) | 2.94(2.94) |
| Test | 2.07(142) | 3.54(199) |

The reaction mixture (2 ml) for SDH activity contained (final concentration) 25 mM KCN, 1 mM DICPIP, 0.5 M Na-succinate and 1 ml of 20% liver homogenate. The reaction mixture (2 ml) for MDH activity contained (final concentration) 177.5 mM Na-malate, 10.75 mM NAD⁺, 0.75 M nicotinamide, 21.5 mM KCN, 0.85 mM DICPIP and 1 ml of 20% liver homogenate. The values are mean values of three rats.

Table 4. Uptake of ginsenosides by mitochondria (Unit : DPM)

| Type of ginsenoside in the reaction mixture | Natural ginsenoside mixture fraction extracted from <i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer |
|---|---|
| Total radioactivity in the incubation mixture | 83,596 |
| Radioactivity recovered in mitochondria | 7,231 ± 490 |
| % recovered | 8.6 |

The mitochondrial preparation (2.8 mg protein) was suspended in the reaction mixture (5.6 ml) containing 10⁻⁴% ginsenoside mixture, ¹⁴C-labelled ginsenosides (0.08 µCi), 125 mM KCl, 1 mM EDTA and 20 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.4) and the mixture was incubated at 25°C for 10 minutes. The values are mean S.D.

관찰되었으며(Table 3) ginsenoside가 간으로 침투되었음을 알 수 있었다.

위와같은 *in vivo* 실험과 아울러 간 미토콘드리아 내로의 ginsenoside의 침투여부를 *in vitro*에서 조사하기 위해 방사성 ¹⁴C-ginsenoside를 포함하는 10⁻⁴% 천연 ginsenoside 혼합물용액에 미토콘드리아를 방치한 후 침투된 방사능을 측정된 결과 약 8.6%의 ginsenoside가 미토콘드리아내로 침투되었음을 알 수 있었다(Table 4). 인삼 saponin이 가수분해 되지 않은 상태로 침투되었다고 가정하면 미토콘드리아 내의 인삼 saponin의 농도는 10⁻⁶~10⁻⁵%일 것으로 예측된다.

Table 5. The effect of ginsenosides on mitochondrial monoamine oxidase (MAO), succinate dehydrogenase (SDH) and malate dehydrogenase (MDH) of mitochondria, which have been incubated in the 10⁻⁴% ginsenoside mixture solution. The values are mean ± S.D.

| Group | Enzyme activity** | | |
|----------------------|-------------------|-------------|--------------|
| | MAO | SDH | MDH |
| Control* | 7.32 ± 0.62 | 5.19 ± 0.28 | 9.08 ± 0.14 |
| Test | 10.06 ± 0.52 | 8.01 ± 0.42 | 10.48 ± 0.10 |
| Relative activity*** | 137 | 154 | 115 |

*Control group dose not contain ginsenosides.

**One unit of enzyme activity was defined as a density decrement of 0.01 per min. under the conditions described in the text.

***The relative activities are expressed assuming the activity of control being 100.

Table 6. Radioactivity distribution in the matrix and membrane fraction of mitochondria and microsomes

| Fraction | Radioactivity (cpm) | |
|--|---------------------------|------------------------|
| | Mitochondria (relative %) | Microsome (relative %) |
| Total radioactivity | 6,220 | 4,224 |
| Centrifugation after sonication | | |
| Supernatant (matrix fraction) | 1,706 (48%) | 552 (26%) |
| Precipitate (membrane fraction) | 1,815 (52%) | 1,533 (74%) |
| Centrifugation after salt treatment of the membrane fraction | | |
| Supernatant (peripheral protein) | 135 (7%) | 35 (4%) |
| Precipitate (residual membrane) | 1,900 (93%) | 863 (96%) |

또한 10⁻⁴%의 ginsenoside 혼합물용액에 방치한 미토콘드리아의 외막에 존재하는 MAO, 내막에 존재하는 SDH, 그리고 matrix에 존재하는 MDH의 활성을 조사한 결과 각각 대조군에 비하여 37, 54, 15% 증가하였으며 이것도 ginsenoside가 미토콘드리아내로 침투되었음을 뒷받침하고 있다(Table 5).

Table 6에 표시한 바와 같이 0.5 mg의 천연 ginsenoside 혼합물(0.8 µCi의 ¹⁴C-ginsenoside 포함)을 투

Table 7. Ginsenoside-protein interaction in mitochondrial matrix and cytosol fractions

| | Radioactivity | |
|--|--|-------------------------------|
| | Mitochondrial matrix fraction (relative %) | Cytosol fraction (relative %) |
| Centrifugation after the TCA treatment | | |
| Supernatant | 958 (67%) | 3,595 (78%) |
| Precipitates | 470 (33%) | 988 (22%) |

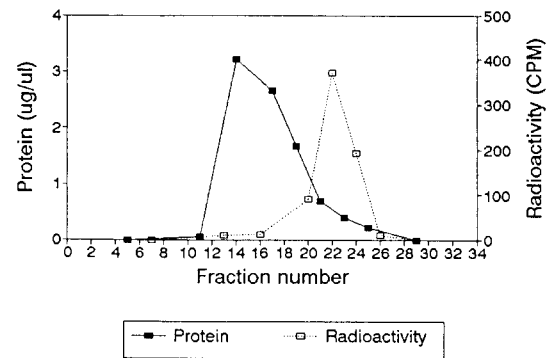


Fig. 1. Radioactivity distribution in cytosol proteins separated by Sephadex G-100 gel chromatography

여한 쥐 간의 미토콘드리아와 미크로솜내에서의 방사능 분포를 조사한 결과 미토콘드리아에서는 방사능이 matrix 분획과 막 분획에 1 : 1 비율로 분포되어 있었고 미크로솜에서는 대부분의 방사능이 막 분획에 편재되어 있었으나 막 분획의 방사능은 미크로솜이나 미토콘드리아에서 모두 막 구조와 연합되어 있는 것으로 관찰되었다. 한편 시토졸 단백질이나 미토콘드리아의 matrix 분획 단백질과 ginsenoside간의 상호작용을 조사한 결과 시토졸에서는 전 방사능의 22%가, 미토콘드리아의 matrix 분획에서는 전 방사능의 33%가 단백질 분획에서 회수되었고(Table 7) Sephadex G-100 gel chromatography 방법으로 분리된 cytosol의 각 단백질 분획의 단백질 양과 방사능을 조사한 결과 대부분의 단백질 분획에서는 방사능이 검출되지 않았으며 방사능이 약 15%에 해당되는 단백질에 집중되어 있었다(Fig. 1). 이와같은 실험결과는 일부 단백질이 ginsenoside와 상호작용을 하고 있음을 시사하는 것이다.

Table 8. Distribution of radioactivity on time course during equilibrium dialysis

| Time (hrs) | Radioactivity | |
|------------|-----------------|------------------|
| | Inside (DPM/ml) | Outside (DPM/ml) |
| 12 | 4,600 | 3,460 |
| 24 | 3,922 | 4,515 |
| 48 | 4,155 | 4,450 |
| 72 | 4,250 | 4,140 |

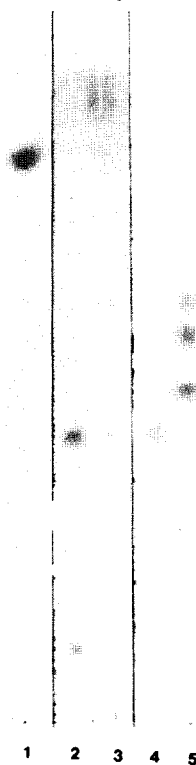
Table 9. Interaction of ginsenosides with bovine serum albumin (BSA)

| Treatment | Radioactivity (DPM) | |
|--------------------|---------------------|------------------|
| | Supernatant | Pellet (protein) |
| 1st Centrifugation | 98,821 | 3,821 |
| 2nd Centrifugation | 2,860 | 1,035 |
| 3rd Centrifugation | 426 | 575 |

BSA was incubated in $10^{-4}\%$ ginsenoside mixture solution containing ^{14}C -ginsenosides ($0.04 \mu\text{Ci}$) for 30 min and the BSA was precipitated by 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation.

단백질-ginsenoside 상호작용을 확인하기 위해 투석막에 2.5 ml의 0.2% BSA Tris buffer 용액과 같은 부피의 ^{14}C -ginsenoside($0.04 \mu\text{Ci}$)가 함유된 $2 \times 10^{-4}\%$ ginsenoside 용액을 넣고 같은 농도의 Tris buffer에 대하여 평형에 도달할 때까지 투석한 후 투석막 안과 밖의 방사능을 측정된 결과 Table 8과 같이 같은 비방사능을 나타내는 것으로 보아 인삼 saponin과 단백질 간에는 공유결합이 형성되는 것은 아닌 것으로 생각된다.

BSA의 Tris buffer 용액 2.5 ml(5 mg 단백질)을 같은 부피의 ^{14}C -ginsenoside($0.04 \mu\text{Ci}$)를 함유한 $2 \times 10^{-4}\%$ ginsenoside 혼합물 용액과 혼합한 후 30분간 방치하고 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 80% 되도록 가한 다음 원심분리(20,000 x g, 30분)하여 침전물과 상층액의 방사능을 측정하면 Table 9와 같이 상당량의 방사능이 침전물 분획에서 확인되지만 이 침전물을 다시 Tris buffer에 녹여 위와 같은 방법으로 얻은 상층액과 침전물의 방사능을 측정해 보면 단백질과 결합한 것으로 예측된 ginsenoside의 상당량이 분리되었다. 이와같은 실험 결과로 미루어 볼 때 ginsenoside가 단백질과 공유 결합하는 것이 아니라 단백질 분자 내부로 확산되거나 그 표면에 흡착되어 있는 것으로 예상된다.

**Fig. 2.** Thin layer chromatogram of the incubation mixture of ginsenoside Rg_1 and rat liver cytosol fraction(Solvent system : CHCl_3 : MeOH : H_2O = 65 : 35 : 5).

1. Sapogenin standard
2. Methanol- H_2O phase of the incubation mixture of Rg_1 ($10^{-2}\%$) and rat liver cytosol fraction
3. Chloroform phase of the incubation mixture of Rg_1 ($10^{-3}\%$) and rat liver cytosol fraction
4. Rg_1 standard
5. Acid hydrolysis product of Rg_1

본 연구실의 연구결과에 의하면 인삼 saponin을 쥐에게 경구투여하면 흡수율은 낮지만 saponin의 일부는 saponin 형태로 흡수됨이 HPLC의 검사로 판명되었고 1 mg의 ginsenoside 혼합물(방사성 동위원소 포함)을 쥐에게 경구투여하고 1시간 후 혈청과 간의 ginsenoside 함량을 HPLC로 분석하면 혈청의 경우 $10^{-4}\%$ 수준, 간의 경우 $10^{-5}\%$ 수준이었다.¹⁴⁾ 또한 최근 방사성 ginsenoside Rg_1 을 생쥐에게 경구 투여하고 간을 조사해 보면 투여 3시간 후에 최고의

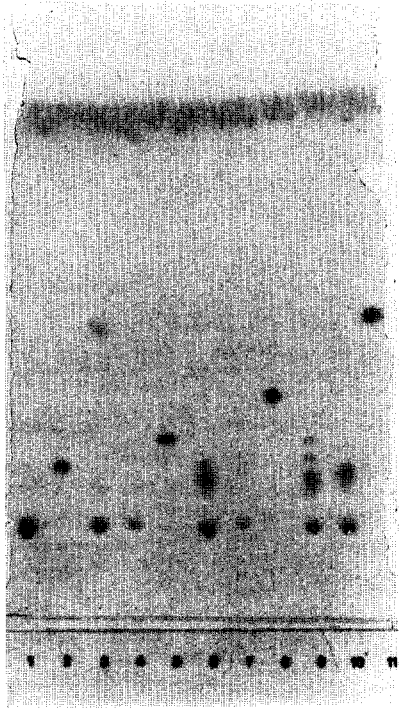


Fig. 3. Thin layer chromatogram of the incubation mixture of ginsenoside Rb₁ and/or Rg₁ and rat liver cytosol (Solvent system: CHCl₃: MeOH: H₂O=65:40:9).

1. Sucrose
2. Rb₁ standard
3. Methanol-H₂O phase of the incubation mixture of Rg₁ (10⁻²%) and rat liver cytosol fraction
4. Methanol-H₂O phase of the incubation mixture of Rg₁ (10⁻³%) and rat liver cytosol fraction
5. Rc standard
6. Methanol-H₂O phase of the incubation mixture of Rg₁ (10⁻²%) and precipitates at 45~65% (NH₄)₂SO₄ saturated cytosol fraction
7. Methanol-H₂O phase of the incubation mixture of Rg₁ (10⁻³%) and precipitates at 45~65% (NH₄)₂SO₄ saturated cytosol fraction
8. Re standard
9. methanol-H₂O phase of Rb₁ (10⁻²%) and rat liver cytosol fraction
10. Methanol-H₂O phase of Rb₁ (10⁻³%) and rat liver cytosol fraction
11. Rg₁ standard

방사능이 검출되었는데 간균질액의 butanol 추출물의 방사능이 시간 경과에 따라 크게 감소하는 것으로

보아 saponin의 대사 또는 배설이 빠른것으로 추정된다.¹⁾

본 연구에서 ginsenoside가 간세포내의 cytosol 부분에서 어느 정도 대사되는가를 조사하기 위해 정제된 ginsenoside Rb₁과 Rg₁을 쥐간의 cytosol 분획에서 얻은 효소균과 반응시켜본 결과 Rb₁, Rg₁ 모두 단시간(20분) 내에 가수분해되어 sapogenin이 생성되는 것을 확인하였다. 즉 흡수된 ginsenoside는 신속히 가수분해되어 대사되는 것으로 생각된다(Fig.2 and 3).

요 약

0.5 mg의 천연 ginsenoside 혼합물과 0.8 μCi의 합성된 ¹⁴C-ginsenoside를 쥐에게 경구투여하고 1시간 후 간을 핵분획, 미토콘드리아분획, 마이크로솜분획, 시토솜 분획으로 분리하였다.

각 간의 세포분획으로의 방사능 분포를 조사한 결과 간에 흡수된 전 방사능의 32%는 시토솜분획에서 발견되었고 미토콘드리아(26.6%)와 마이크로솜분획(18.1%)에도 상당한 방사능이 분포되어 있었으며 핵분획에서도 5.8%의 방사능이 회수되는 것으로 보아 ginsenoside는 간세포내에 고르게 침투되는 것으로 생각된다.

천연 ginsenoside 혼합물 1mg을 쥐에게 투여하고 2시간 후에 채취한 간의 균질액에서 얻은 미토콘드리아 파쇄액 내의 aldehyde dehydrogenase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase의 활성을 측정된 결과 ginsenoside 투여쥐의 간에서의 효소활성이 대조군에 비해 촉진되어 있었으며 대부분의 효소반응에 대한 인삼 saponin의 적정 농도가 10⁻⁶~10⁻⁴%인 것으로 생각할 때 간에 흡수된 ginsenoside의 농도는 10⁻⁵% 내외인 것으로 생각된다.

각 간의 세포분획에서 회수되는 방사능의 상당부분이 각 세포분획의 단백질 부분에서 발견되는 것으로 보아 단백질과 ginsenoside 간에 상호작용이 있을 것으로 예측되어 gel filtration, 평형투석법, (NH₄)₂SO₄ 침전법 등으로 조사한 결과 단백질과 ginsenoside는 공유결합으로 결합되어 있는 것이 아니라 약한 상호작용을 하고 있는 것으로 생각된다.

Ginsenoside가 간세포내의 cytosol 부분에서 어느 정도 대사되는가를 조사하기 위해 정제된 ginsenoside Rb₁과 Rg₁을 쥐간의 cytosol 분획에서 얻은 효소균과

반응시켜 본 결과 Rb₁, Rg₁ 모두 단시간 (20분)내에 가수분해되어 sapogenin이 생성되는 것이 확인되었으며 흡수된 ginsenoside는 신속히 가수분해되어 대사되는 것으로 생각된다.

인 용 문 헌

1. Joo, C.N. and Yoon, J.W. : *Korean Biochem. J.*, **23**, 535 (1990).
2. Bergmeyer, H.U. : *Methods of Enzymatic Analysis* **2**, 650, Academic Press, Inc., New York and London (1974).
3. Bergmeyer, H.U. : *Methods of Enzymatic Analysis*, **1**, 480, Academic Press, Inc., New York and London (1974).
4. Dolapchiev, L.B., Sulkowski, E. and Laskowski, S.R. M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 723 (1974).
5. Burton, K. : *Biochem. J.*, **62**, 315 (1956).
6. Lowry, O.H., Rosebrough, N.T., Farr, A.L. and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
7. Racker, E. : *Methods in Enzymology*, **1**, 514, Academic Press, New York (1955).
8. Joo, C.N., Choi, R.S., Chung, R.P., Lee, S.J. and Kim, O.H. : *Korean Biochem. J.*, **7**, 85 (1974).
9. Joo, C.N. and Han, J.H. : *Korean Biochem. J.*, **9**, 43 (1976).
10. Schnaitman, C., Erwin, V.G. and Greenawalt, J.W. : *J. Cell Biol.*, **32**, 1719 (1967).
11. Joo, C.N., Kim, D.S. and Lee, S.J. : *Korean Biochem. J.*, **10**, 109 (1977).
12. 주충노, 박한식, 이희봉, 이종화 : *고려인삼학회지*, **7**, 108 (1983).
13. Kim, J.W., Lee, H.B. and Joo, C.N. : *Korean Biochem. J.*, **16**, 142 (1983).
14. Joo, C.N., Lee, H.B. and Kim, J.W. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **10**, 108 (1986).