

Rat 혈소판의 cGMP생성에 있어서 홍삼 지용성 분획과 단백질 분획의 영향

이만희 · 이정희¹ · 박화진*

한국인삼연구소 연구원 인삼효능부, ¹이화여자대학교 식품영양학과
(1994년 7월 27일 접수)

Effect of Lipophilic Fraction and Protein Fraction of Korean Red Ginseng on the Production of cGMP in Rat Platelets

Man-Hee Rhee, Jung-Hee Lee¹ and Hwa-Jin Park*

Department of Biochemical Pharmacology, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute

¹Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University

(Received July 27, 1994)

Abstract □ Rats (Sprague Dawley, male, 200 g) were fed with 15% corn oil containing a large quantity of 18:2 (linoleic acid) for 3 weeks, and were followed by feeding the petroleum ether extracts from Korean red ginseng for 3 weeks. cGMP was produced more in platelets prepared from both 15% corn oil and petroleum ether extracts-fed group than in platelets only 15% corn oil-fed group, indicating that the production of cGMP is increased by feeding the petroleum ether extracts. When this platelet was stimulated by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), the level of cGMP was decreased. However, the platelets in medium containing protein fraction (200 µg/ml) was stimulated by PMA, the production of cGMP inhibited by PMA was increased by 3 times or more. These results suggest that both the protein fraction and the petroleum ether extracts from Korean red ginseng are synergistic in the production of cGMP, and they may have the antiplatelet effects.

Key words □ Linoleic acid, cGMP, lipophilic and protein fractions, red ginseng, rat platelets.

서 론

홍삼의 석유에테르 추출물은 thrombin에 의해 일어나는 사람 혈소판의 응집반응을 억제하고,¹⁾ 그것은 cAMP생성 촉진에 의한 것이 아니라 혈소판의 응집 촉진물질인 thromboxane A₂(TXA₂)의 생성억제와 cGMP의 생성촉진에 기인하고 있다.^{1,2)} Molsidomine, nitroprusside 및 nitroglycerin과 같은 혈관확장제는 cGMP의 생성을 촉진시킴으로써 항혈소판 작용을 나타낸다.^{3,4)}

한편, 종양촉진 인자로 잘 알려진 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)는 40 KD polypeptide의 인산

화를 촉진시켜 혈소판을 응집시키는데, 이 40 KD polypeptide의 인산화는 PMA에 의한 protein kinase C (C-kinase)의 활성화에 기인한다.⁵⁾ 홍삼의 단백질 분획은 PMA에 의한 40 KD polypeptide의 인산화를 억제시켜 항혈소판 작용과 항종양작용이 있음이 판명되었다.⁶⁾

본 논문에서는 홍삼의 석유에테르 추출물을 식이 시킨 쥐의 혈소판에서 cGMP의 생성이 증가하고, 이 증가는 PMA의 자극에 의해 감소하지만, 홍삼으로부터 제조한 단백질 분획은 PMA에 의해 감소된 cGMP의 생성을 증가시키고 있음을 기술하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약 및 동물사료

*To whom correspondence should be addressed.

Phorbol-12-myristate-13-acetate는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA.)로부터 구입하였고, cGMP측정을 위한 [³H] cGMP radioimmunoassay kit는 Amersham Life Science Co.에서 구입했다. 그외에 실험에 사용한 시약은 특급을 사용하였다. 또한 동물사육을 위한 기초 식이로서는 AIN-76™(NIHON NOSAN KOGYO K.K. : Japan)를 사용하였고, 탄수화물 급원으로는 corn starch[(주)미원]와 sucrose [삼양식품(주)]를, 단백질 급원으로는 milk casein(Sigma Co.)을 사용했고, 지방급원으로는 corn oil[동방유량(주)]을 사용했다.

2. 홍삼으로부터 석유에테르 추출물의 제조

홍삼 1 kg을 cut mill로 분쇄하여 분말로 만든 다음, 삼각플라스크에 4 l의 petroleum ether를 첨가하여 실온에서 7일 동안 침적시켰다. 그후 petroleum ether로 실온에서 3회 추출하여 감압농축하였고 증류수로 3번 세척한 후 감압농축하여 약 6 g의 석유에테르 추출물을 얻었다.

이를 -20°C 냉장고에 보관하였다가, N₂ gas로 용매를 완전히 휘발시키고, corn oil에 녹여 시료로 사용하였다. 석유에테르 추출물과 corn oil의 지방산 조성은 gas chromatography(Hewlett-Packard 5890 series II)를 이용하여 분석하였다.

3. 홍삼으로부터 단백질 분획의 제조

홍삼 2 kg를 cut mill로 분쇄하여 Folch법⁶⁾으로 소수성 단백질을 분리했다. 즉, 분쇄된 홍삼 분말에 2 l의 methanol을 첨가하여 3번 추출해 내고 이것을 감압농축하여 前報^{7,8)}와 같이 분리·정제하였다.

4. 실험동물의 식이

Rat(Sprague Dawley, male, 200 g) 10마리를 한 실험군으로하여 3일간 고형 배합사료(삼양사료)로 적응시킨 후 AIN-76™(American Institute of Nutrition) 식이⁹⁾에 기초하여 Table 1과 같은 조성의 식이에 15% corn oil을 배합하여 일정한 양을 사료그릇에 담아 3주 동안 섭취시켰다. 그후 15% corn oil과 사료 kg당 25 mg의 석유에테르 추출물을 잘 배합하여 3주 동안 섭취시켰다. 식이기간 동안에 매일 깨끗한 식이로 교체하였고, 대조군으로는 corn oil식이군을 사용했다.

Table 1. Composition of diet for feeding rat

Ingredient of diet		%
Casein		20.0
Carbohydrate	Corn starch	45.0
	Sugar	10.0
Fat	Corn oil	15.0
DL-methionine ^a		0.3
AIN mineral-mix ^b		3.5
AIN vitamin-mix ^c		1.0
Choline bitrate ^d		0.2
Fiber ^e		5.0

^aModification of formula AIN-76™ purified diet (Nihon Nosan Kogyo K.K. : Japan).

^bDL-methionine : Sigma M9500.

^cMineral-mix (% of mineral mixture) : AIN-76 by Nihon Nosan Kogyo K.K. CaHPO₄, 50.0; NaCl, 7.4; K citrate, H₂O, 22.0; K₂SO₄, 5.2; MgO, 2.4; MnCO₃, 0.35; Fe-citrate, 0.6; ZnCO₃, 0.16; CuCO₃, 0.03; KIO₃, 0.001; Na₂SeO₃, 0.0007; CrK(SO₄)₂ · 12H₂O, 0.055; Sucrose powdered to make 100%.

^dVitamin-mix (% of vitamin mixture) : AIN-76 by Nihon Kogyo K.K. thiamine·HCl, 0.06; riboflavin, 0.06; pyridoxine·HCl, 0.07; niacin, 0.03; Ca pantothenate, 0.16; folate, 0.02; biotin, 0.002; vit. B₁₂, 0.0001; vit. A, 0.022; vit. E, 0.50; vit. D₃, 0.00025; vit. K, 0.0005; Sucrose powdered to make 100%.

^eCholine bitartrate, Sigma Chemical Co., C1629, St. Louis.

^fFiber, α-cellulose, Sigma Chemical Co., C8002, St. Louis.

5. Rat 혈소판의 제조

혈소판 제조전에 24시간 동안 절식시킨 후 rat를 ethyl ether로 마취하고, 항응고제와 혈액이 1 : 9(v/v)가 되도록 항응고제(0.8% citric acid, 2.2%, 2.45% glucose)를 함유한 주사기로 심장에서 채혈하여 플라스크 원심분리관에 옮겨 저속원심분리기로 125 x g에서 10분간 원심분리하여 platelet rich plasma(PRP)를 얻었고, 계속하여 1,100 x g에서 10분간 원심분리하고, 침전된 혈소판을 washing buffer(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose 및 1 mM EDTA, pH 6.5)로 두번 세척하였다. EDTA는 혈소판 응집반응을 억제시키므로 세척 침전된 혈소판에 잔존할 수도 있는 1 mM

EDTA를 제거하기 위해 혈소판 안정제인 gelatin이 들어있는 suspending buffer(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 0.49 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 0.25% gelatin, pH 7.4)로 두번 세척한 다음 최종적으로 5×10⁹ platelets/ml가 되게 suspending buffer로 조정하였다. 혈소판은 cooling시키면 응집하므로 이상의 실험은 상온에서 실험하였다.

6. cGMP의 측정

10⁹ platelets/ml의 세척한 혈소판 부유액에 2 mM CaCl₂를 넣고 3분간 前배양시킨 후 50 nM의 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)를 첨가하여 5분간 반응시킨 다음 80% ethanol을 첨가하여 반응정지시킨 후, [³H]cGMP의 radioimmunoassay kit로 측정하였다.

결과 및 고찰

혈소판의 응집반응은 thromboxane A₂(TXA₂)의 생성량에 의존한다.¹⁰⁾ 이 TXA₂는 arachidonic acid에 cyclooxygenase가 작용하여 생성되어, 혈소판을 응집시키고 동시에 혈관을 수축시킨다.¹¹⁾ Arachidonic acid는 식품에 존재하는 linoleic acid를 전구물질로 하여 체내에서 elongation과 desaturation 반응을 거쳐 생성되며,¹²⁾ 이 지방산은 세포막 인지질의 C-2에 가장 많이 결합되어 있는 것으로 알려져 있는데,¹³⁾ 세포 외부의 signal(neuro-transmitter, peptide hormone, chemical mediator 등)에 의해 자극을 받으면 phospholipase C와 phospholipase A₂에 의해 분해된다.¹¹⁾

Arachidonic acid로부터 생성되는 prostaglandins는 세포의 종류에 따라 다르며, prostaglandins는 endocrine hormone과 다르게 autacoid적으로 생리활성을 나타내고 있기 때문에, 상술한 바와 같이 혈소판에서 생성되어 유출된 TXA₂는 혈소판을 응집시키고 또한 혈관을 수축시킨다. 혈소판 응집반응은 지혈과 혈전 형성에 필수적인 단계이며,¹⁴⁾ 서론에서 기술했듯이 molsidomine, nitroprusside, nitroglycerin과 같은 혈관확장제는 cGMP의 생성을 촉진시킴과 동시에 막 인지질로부터 arachidonic acid를 분해시키기 위해 phospholipase C 및 A₂가 필요로 하는 세포내 Ca²⁺의 증가를 억제시켜 항혈소판 작용을 나타낸다.^{3,4,15)} 지

Table 2. Fatty acid composition of corn oil and petroleum ether extracts from Korean red ginseng

Fatty acid	Corn oil	PE
14 : 0	—	—
16 : 0	11.49	10.10
18 : 0	2.09	—
18 : 1	30.53	8.30
unknown	6.14	—
18 : 2	48.70	74.83
18 : 3	1.03	6.78

PE : Petroleum ether extracts from Korean red ginseng.

Table 3. cGMP content of platelets obtained from rat fed with corn oil and ginseng petroleum ether extract

cGMP (pmol/10 ⁹ platelets)	
Corn oil	6.90 ± 1.7 (n=3)
Corn oil + PE 50 mg	25.44

*PE : petroleum ether extracts from Korean red ginseng.

방급원으로 쥐에 식이시킨 corn oil에는 arachidonic acid의 전구물질인 linoleic acid(18 : 2)가 48.7% 함유되어 있음에도 불구하고(Table 2), 홍삼 석유에테르 추출물의 식이에 의해 혈소판에서 cGMP의 생성이 25.44 pmol로 약 4배 증가하였다(Table 3). 이것은 석유에테르 추출물이 *in vitro*에서 사람혈소판의 응집반응을 cGMP의 생성을 촉진시켜 항혈소판 작용을 나타낸다는 前報의 결과²⁾를 뒷받침 해주고 있다.

특히 흥미스러운 것은 Table 2에서 나타낸 바와 같이 석유에테르 추출물에 arachidonic acid의 전구체인 linoleic acid(18 : 2)가 74.8% 함유하고 있음에도 불구하고 cGMP의 생성이 현저하게 증가된 것이다(Table 3). 이것은 석유에테르 추출물에는 cGMP의 생성을 촉진하는 물질이 함유되어 있음을 의미한다. 이 석유에테르 추출물에는 항혈소판 작용을 가진다고 알려져 있는 panaxynol¹⁶⁾이 함유되어 있고, 또한 panaxynol이 함유된 석유에테르 추출물의 hexane : diethylether(95 : 5, v/v) subfraction보다 thrombin 유인 혈소판 응집반응을 강하게 억제시키는 chloroform subfraction도 함유되어 있다.¹⁷⁾ Corn oil과 석유에테르 추출물 식이군의 혈소판을 PMA 50 nM로 자극

Table 4. Effects of exogenous ginseng protein fraction on the production of cGMP in PMA-treated platelets obtained from rat fed with corn oil and petroleum ether extract

	cGMP (pmol/10 ⁹ platelets)
Corn oil+PE	25.44
Corn oil+PE+PMA	10.73
Corn oil+PE+PMA+protein fraction	37.43

*PMA : phorbol-12-myristate-13-acetate.

시키면 cGMP는 corn oil과 석유에테르 추출물의 식이군에서 보다(Table 3) 감소하고 있다(Table 4). 그러나 이 cGMP의 양은 TXA₂의 전구물질인 linoleic acid(18:2)가 많이 함유되어 있는 corn oil를 식이시킨 corn oil군만의 혈소판에서 생성된 양(Table 3)보다 높다(Table 4). 한편 corn oil과 석유에테르 추출물 식이군의 혈소판 부유액에 홍삼의 단백질 분획을 첨가하여 3분간 37°C 에서 전배양시킨 다음 PMA로 5분간 자극시키면 cGMP의 생성은 증가하고 있다. 이것은 홍삼 단백질 분획이 석유에테르 추출물과 상승작용으로 cGMP의 생성을 증가시키고 있음을 의미한다. 홍삼의 단백질 분획은 Folch법⁶⁾에 따라 methanol로 추출한 추출액에서 제조한 수용성 물질인 소수성 단백질로써 18 KD이하의 glycoprotein이 함유되어 있다.⁷⁾ 이 단백질 분획은 종양촉진인자인 PMA 유인 혈소판 응집반응에서 40 KD 및 20 KD-polypeptide의 인산화를 억제시켰고,⁷⁾ 동시에 *in vitro*에서 protein kinase C(C-kinase)의 촉매 fragment에 의한 histone III의 인산화를 억제시킴으로써 항암 또는 항혈소판 작용을 갖는다.^{7,8)} 따라서 PMA 유인혈소판 응집반응에서 홍삼 단백질 분획이 cGMP의 생성을 촉진시키고 있는 것은 홍삼의 단백질 분획이 항혈소판작용을 나타낼 수 있음을 시사해 주는 것이다. 이와 같은 작용을 하는 홍삼의 단백질 분획은 현재 확실히 모르지만 coomassie brilliant blue R-120에 의해 염색되지 않았지만, 당단백질의 검색시약인 Schiff's reagent로 염색시켰을 때 18 KD이하의 polypeptide가 붉은색으로 염색되었다.⁷⁾ 그래서 이 단백질 분획은 18 KD polypeptide가 당과 결합된 당단백질이 함유된 것으로 간주할 수 있으나, 이 단백질 분획에는 단백질보다 hexose가 많이 함유되어 있으므로,^{7,8)} cGMP의

생성에 있어서 단백질과 hexose와의 관계를 앞으로 명확히 할 필요성이 있다.

요 약

혈소판의 응집물질인 TXA₂의 전구체 18:2(linoleic acid)를 다량 함유하고 있는 15%의 corn oil(15%/kg-diet)을 rat(SD, male, 200 g)에 3주간 식이시킨 후 계속하여 홍삼 석유에테르 추출물(25 mg/kg diet)을 3주간 식이시켜 제조한 혈소판에서는 15% corn oil만 식이시킨 혈소판에서 보다 cGMP의 양이 증가되었다. 이것은 석유에테르 추출물을 식이시킴으로써 cGMP의 생성이 증가됨을 의미한다. 그러나 이 혈소판은 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)로 자극시키면 cGMP이 생성이 감소하지만, 혈소판 반응액에 홍삼의 단백질 분획(200 µg/ml)을 첨가하여 PMA로 자극시키면 cGMP의 생성이 3배 이상 증가하고 있었다. 이것은 홍삼의 단백질 분획이 cGMP의 생성에 석유에테르 추출물과 상승작용을 하고 있을 뿐만 아니라 석유에테르 추출물과 단백질 분획은 antiplatelet effect를 가지고 있음을 시사하는 것이다.

인 용 문 헌

1. Park, H. J., Rhee, M. H., Park, K. M., Nam, K. Y. and Park, K. H. : *Korean Biochem. J.*, **26**, 681 (1993).
2. Park, H. J., Rhee, M. H., Park, K. M., Nam, K. Y., Lee, J. H. and Park, K. H. : *Proceeding of the 6th Int. Ginseng Symposium*, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, p.94 (1993).
3. Nolte, C., Eigenthaler, M., Schazzenbacher, P. and Walter, U. : *J. Biol. Chem.*, **266**, 14808 (1991).
4. Halbrugge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schazzenbacher, P. and Walter, U. : *Eur. J. Biochem.*, **169**, 441 (1990).
5. Miyamoto, E. and Nishizuka, Y. : *Protein, Nucleic acid and Enzymes*, Gong-Rib Press, Japan, 31, 1818 (1986).
6. Folch, J. and Lee, M. : *J. Biol. Chem.*, **119**, 809 (1951).
7. Park, H. J., Park, K. M., Rhee, M. H. and Park, K. H. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **17**, 135 (1993).
8. Park, H. J., No, Y. H., Rhee, M. H., Park, K. M.

- and Park, K. H. : *Korean Biochem. J.*, **27**, 280 (1994).
9. Harris, W. S., Conner, W. E., Alam, N. and Illingworth, D. R. : *J. Lipid Res.*, **29**, 1451 (1988).
10. Kito, M., Narita, H., Takamura, H., Park, H. J., Matsuura, T. and Tanaka, K. : *J. Biochem.(Tokyo)*, **99**, 1277 (1986).
11. Hamberg, M., Svensson, J. and Samuelsson, B. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 2994 (1975).
12. Sinclair, A. J. : *Lipids*, **10**, 175 (1975).
13. Holub, B. J., Kuksis, A. and Trompson, W. : *J. Lipids Res.*, **11**, 558 (1970).
14. Weiss, H. J. : *N. Engl. J. Med.*, **293**, 531 (1975).
15. Geiger, J., Nolte, C., Butt, E., Sage, S. and Walter, U. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 1031 (1992).
16. Kuo, S. C., Teng, C. M., Lee, J. C., Ko, F. N., Chen, S. C. and Wu, T. S. : *Planta Medica*, **56**, 164 (1990).
17. Park, K. M., Rhee, M. H. and Park, H. J. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **17**, 246 (1993).