

홍삼 성분의 혈당강하작용 연구 (II) : 쥐의 배양 간세포의 당대사 관련 효소 활성에 미치는 홍삼 지용성 분획의 영향 조사

이현아 · 심희선 · 최강주¹ · 이희봉

강원대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹한국인삼연초연구원
(1997년 9월 2일 접수)

Hypoglycemic Action of Red Ginseng Components (II) : Investigation of the Effect of Fat Soluble Fraction from Red Ginseng on Enzymes Related to Glucose Metabolism in Cultured Rat Hapatocytes

Hyeon-A Lee, Hee-Sun Sim, Kang-Ju Choi¹, Hee-Bong Lee

Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

¹*Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea*

(Received September 2, 1997)

Abstract : In this study, rat hepatocytes known to have active glucose metabolism were obtained to investigate the hypoglycemic action of fat soluble fraction of red ginseng by using the liver perfusion technique and incubated in two different media—one containing insulin and glucagon (control group), and the other containing glucagon only. The activities of main regulating enzymes, such as glucokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glucose 6-phosphatase, related to metabolic pathways of glucose in these two kinds of hepatocytes were compared between these two groups and the effects of addition of fat soluble fraction (10⁻¹~10⁻⁴%) from red ginseng to these two groups on these enzymes were also detected. The results were as follows. The specific activity of enzymes such as glucokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, and 6-phosphogluconate dehydrogenase related to glucose-consuming pathways of insulin-deficient group was much less than control one. However, their decreased activity was recovered after the addition of fat soluble fraction at all range of concentrations. The specific activity of these enzymes after the addition of ginseng components to the control group was also increased. On the other hand, the specific activity of glucose 6-phosphatase related to glucose-producing pathway of insulin-deficient group was much higher than control one, but their increased activity was decreased obviously after the addition of fat soluble fraction at all range of concentrations. The same results were observed after the addition of fat soluble fraction to the control group. These results suggest that the red ginseng saponin components might be effective on diabetic hyperglycemia by regulating the activity of enzymes related to glucose metabolism directly and/or indirectly. The effects of fat soluble fraction (10⁻²%) and ginsenosides (mixture, Rb₁ and Rg₁, 10⁻⁴%) on hypoglycemic action were compared. As a result, they showed considerable effect on hyperglycemia, but the best effect on the activities of glucokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase was appeared by ginsenoside Rb₁ and that of 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose 6-phosphatase was by ginsenoside mixture.

Key words : Ginseng, fat soluble fraction, perfusion, hypoglycemic action, insulin.

서 론

고등동물의 혈당량은 소장에서 흡수된 glucose 량, 간에 저장되어 있는 glycogen, 근육과 같은 조직에서 산화되는 glucose 량, 지방질이나 단백질로 전환되는 glucose 량 등과 관계가 있으며, 이러한 혈당량은 insulin, glucagon, adrenocorticotrophic hormone, glucocorticoid, adrenaline 등의 hormone 들에 의하여 조절된다. 특히 중추신경계는 glucose 만을 에너지원으로 이용하고 있기 때문에 항상 어느 정도 이상으로 혈중 glucose 치를 유지하는 것은 매우 중요하다. 혈당치는 중추성이나 말초성에서 항상 감지되고 있으며, 혈당이 높아지면 부교감신경이 흥분하여 직접 glycogen 합성효소를 활성화하는 동시에 insulin 분비를 촉진시켜 혈당을 낮추고, 동시에 glucose는 직접 pancreas의 β 세포에 작용하여 insulin 분비를 촉진하고 glucagon 분비를 억제한다. 이와같이 신경이나 hormone의 변화가 간에서의 glycogen의 분해와 당신생을 억제하고 glycolysis와 hexose monophosphate shunt의 활성을 높이고, 근육이 지방조직의 glucose 도입을 촉진하여 혈당을 낮추는 것이다. 반대로 혈당이 저하되면 교감신경이 흥분하여 직접 간의 glycogen phosphorylase를 활성화하는 동시에 insulin 분비를 억제하여 glycogen 분해와 당신생을 높이며 glycolysis와 hexose monophosphate shunt의 활성과 근육이나 지방조직으로의 glucose 도입이 억제되어 혈당을 상승시키는 것이다. 당뇨병의 원인은 매우 다양하지만, 특히 이러한 insulin 부족이나 작용에 이상이 생기면 당뇨병이 유발되는 것이다. 그 결과로 고혈당이 초래되고, 나아가서 뇨당의 출현, 공복감으로 인한 다식, 고삼투압에 따른 탈수 현상 및 그에 따른 수분 섭취 증가 그리고 당 대신에 지질과 단백질을 에너지원으로 사용하므로 체중 감소 등이 결과로 나타나게 된다. 또한 당뇨병이 장기간 지속되면 소혈관(망막, 신장), 신경 및 대혈관(벽)에 장애를 동반하게 된다.

이러한 당뇨병의 개선을 위한 방안으로는, 식이요법, 운동요법을 기본으로, insulin 투입, insulin 작용 이상의 원인제거 등의 연구가 활발히 진행되고 있으나 혈당강하제 등 약물의 사용은 많은 부작용이 따르므로 최근에는 동양을 중심으로 당뇨병 치유에 사용되어온 고려인삼의 연구도 관심을 끌고 있다.

고려인삼의 당뇨병에 대한 실험적 연구는 일찌기 Saito¹⁾에 의한 epinephrine 고혈당, 식이성 고혈당 등에 대한 인삼의 혈당 강하작용이 처음 보고된 이래 Jo등²⁾은 당뇨병 환자를 통한 임상실험에서 홍삼이 insulin 투여량의 감소를 야기시켰다고 보고하였다. 한편 Tsuo등³⁾은 인삼이 실험적으로 유도된 당뇨 쥐의 혈당치를 저하시킴으로 당뇨병에 효과가 있음을 제시하였고, Petkov⁴⁾은 인삼이 고혈당을 억제하는 작용을 하며 insulin의 효과에 상승적으로 작용한다고 보고하였다. Yokozawa⁵⁾는 부분 정제된 사포닌이 정상 쥐에서의 지방질 대사 및 당류대사와 연관된 여러가지 대사반응들을 촉진한다고 보고하였으며, 우등⁶⁾과 김등⁷⁾도 인삼 사포닌의 당뇨 개선 효과를 보고하였다.

저자들은 현재까지 보고된 고려인삼의 혈당 강하작용에 관한 연구 결과를 배경으로 하여 홍삼 사포닌 성분^{8,9)} 및 지용성 분획^{10,11)}의 혈당 강하작용을 조사한 결과 이들 성분이 streptozotocin 투여로 인한 혈청성분의 변화를 개선하고, streptozotocin 투여로 활성이 저하된 간의 glucokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, glycogen synthetase와 acetyl CoA carboxylas의 활성을 유의적으로 증가시키고, 상승된 glucose 6-phosphatase의 활성을 낮추는 효과가 있음을 관찰하였다. 이러한 결과는 이들 성분들이 직접 효소 활성에 관여하였거나 간접적으로 효소량의 조절이나 streptozotocin에 의한 체장 손상의 완화에 관여한 것으로 추정된다.

본 연구에서는 streptozotocin의 영향을 배제하기 위하여 쥐의 일차 배양 간세포를 이용하여 이들 성분 중 세포막을 자유로이 통과할 수 있는 홍삼의 지용성 분획이 insulin이 존재할 때와 존재하지 않을 때 당대사 관련 효소 중 glucokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, glucose 6-phosphatase 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였고, 사포닌 성분 [ginsenoside(mixture, Rb₁, 그리고 Rg₁)]과 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 Sprague Dawley 계통의 흰 쥐(200~250 g, ♂)였으며 25°C에서 물과 정상사료를 자유롭게

공급하였고, 실험 전 24시간 동안은 절식시킨 후 사용하였다.

2. 시료

홍삼 성분은 한국 인삼연초연구소에서 공급받은 Panax ginseng C.A. Meyer 에서 추출한 지용성 분획과 ginsenoside 혼합물과 정제된 ginsenoside Rb₁과 Rg₁ 분획이었다. 시약으로서 Eagle's Minimal Essential Media(MEM)과 Fetal bovine serum (FBS)은 Gibco laboratories사 제품을 구입하여 사용하였고, Glucose 6-phosphate dehydrogenase, 3N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid](HEPES), heparin, collagen, collagenase, trypan blue, Glucose 6-phosphate, 6-phosphogluconate, ATP, NADPH, NADP⁺은 Sigma-Aldrich사 제품이었으며, insulin과 glucagon은 Nordisk Gentofte A/S사 제품을 사용하였으며, 그외 시약들도 특급을 사용하였다.

3. Hepatocyte 분리

Hepatocyte 분리 과정의 모든 기구는 멸균하여 사용하였으며, 또한 perfusion 완충용액은 10 mg/ml Streptomycin과 100,000 U/ml penicillin을 첨가하고 0.22 μ m filter로 멸균하였으며, carbogen gas (95% O₂, 5% CO₂) bubbling으로 포화시켜 37°C에서 수행하였다.

쥐의 복강 내에 nembutal(60 mg/kg)을 주사하여 마취한 후 개복하여 하대정맥에 0.1 ml(500 unit) heparin 을 주사한 다음, 약 20 ml/min 속도로 perfusion 완충용액(Hank's 용액; 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.35 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1 mM MgSO₄ · 7H₂O, 5.56 mM Glucose, 25 mM NaHCO₃ 그리고 20 mM HEPES, pH 7.4)이 흐르는 고무관의 끝에 연결된 얇은 catheter 를 문정맥에 꽂은 후 perfusion의 유속을 40~45 ml/min 속도로 증가시켜, 하대정맥으로 200 ml 정도의 perfusion 완충용액을 흘려주었다. 열은 갈색으로 변화된 간 위의 혈관을 자르고 하대정맥에 준비된 loop를 조여 매듭을 지어 perfusion 용액이 간 위쪽으로 나오게한 후 조심스럽게 간을 떼어, 1.25 mM CaCl₂ · 2H₂O가 함유된 perfusion 완충용액에 collagenase를 0.05% 농도가 되게 첨가한 용액에 담구어, 약 40 ml/min의 속도로 12 min. 정도 순환시켜 주었다. 간을 한번 세척 후 petridish에서 간세포를 유리시키고, 완

충용액을 좀더 가하여 간세포를 분산한 후 5겹의 거즈로 걸러내었다. 걸러진 용액을 50×g에서 3분간 원심분리하여 상층액을 버린 후 2번 더 같은 방법으로 처리하여 분리하였다.

4. 홍삼성분의 영향 조사를 위한 간세포 배양

위에서 얻은 간세포에 배양 배지인 Eagle's MEM (10% FBS 함유)을 가하고 원심분리하여 침전된 간세포에 다시 새 배양배지를 넣어 분산시켰다. 배양배지 1L의 조성은 9.7 g Eagle's MEM, 2.0 g bovine serum albumin, 2.2 g NaHCO₃, 0.1 g kanamycin, 250,000 U penicillin, 0.25 g streptomycin, 10%(V/V) FBS 이었다. 간세포 분산액의 세포 농도는 1.0×10⁶ cells/ml이 되도록 배양액으로 희석한 다음, 하루 전에 collagen(rat tail 2 mg/ml, 0.2% acetatic acid 용액)을 깔아둔 100×20 mm petridish에 세포분산액을 12 ml씩 가하고 나서 37°C, CO₂ 배양기에서 4시간 동안 방치하였다. 간세포가 바닥에 붙어있는지 독립현미경을 이용하여 확인한 다음 배양액을 버리고 PBS(phosphate saline buffer)로 12 ml씩 2회 더 씻어준 후 붙어있는 간세포에 10% FBS를 함유하고 있는 4군으로 나누어진 새 배양액 [glucagon(2.1 nM), glucagon+ginseng component(fat soluble fraction (10⁻¹~10⁻⁴%)과 ginsenosides(mixture, Rb₁ 그리고 Rg₁, 각각 10⁻⁴%)], glucagon(2.1 nM)+insulin(105 nM), glucagon+insulin+ginseng component]을 12 ml씩 가하여 37°C, CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. 배양액을 버리고 homogenation buffer(100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM mercaptoethanol, 5 mM EDTA, 50 mM glucose, 150 mM KCl)로 12 ml씩 2회 더 씻어준 후 일정량의 homogenation buffer를 가한 후 세포를 얻은 다음 파쇄기로 파쇄하고 초음파 발생기를 이용하여 30초씩 30초 간격으로 3번 최대로 하여 파쇄한 후 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 효소원으로 사용하였다.

5. 효소활성 측정

Glucokinase 활성은 glucose와 ATP를 기질로 사용하는 glucokinase 반응의 생성물인 glucose 6-phosphate가 glucose 6-phosphate dehydrogenase에 의해 산화될 때 생성되는 NADPH 양을 340 nm에서의 흡광도 증가로 측정하는 coupled assay 방법을 이용하여 측정하였다. 효소반응액(1 ml)의 조성(최종 농도)은 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5), 100 mM

glucose, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 1 mM NADP⁺, glucose 6-phosphate dehydrogenase 0.4U 였다.

Glucose 6-phosphatase의 활성은 glucose 6-phosphate 를 기질로 사용한 glucose 6-phosphatase 의 반응에 의해 생성된 Pi를 정량하여 측정하였다. 효소 반응액(1 ml)의 조성(최종 농도)은 35 mM histidine buffer(pH 6.5), 30 mM glucose 6-phosphate 와 효소원이었다.

Glucose 6-phosphate dehydrogenase 활성은 glucose 6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase의 전체활성과 6-phosphogluconate dehydrogenase 활성의 차이 값으로 계산하였다. 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-phosphogluconate이었다. 생성되는 NADPH 양을 340 nm에서의 흡광도 증가로서 측정하였다.

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-phosphogluconate 였다. 위에서와 같이 생성되는 NADPH 양을 340 nm에서의 흡광도 증가로서 측정하였다.

6. 단백질 정량 및 인 정량

단백질 정량은 Kaplan과 Pederson 방법¹²⁾에 따라 amido black과 0.45 μm Millipore filter(type HA) 를 사용하여 수행하였으며, 인 정량은 Chen 등의 방법¹³⁾에 의해 행하여 졌다.

결과 및 고찰

사람의 경우 공복시에는 혈당치가 70~100 mg/dl 이고, 식사 후에는 120~180 mg/dl로 상승하지만 2시간 정도 후에는 공복시 혈당치로 다시 회복되며, 심지어는 계속 굶어도 그 수치는 크게 변동이 없이 유지된다. 특히, glucose가 유일한 에너지원으로 이용되는 뇌와 혈구의 경우, 정상적인 기능을 위하여 glucose를 공급하는 혈액내 glucose 농도가 항상 일정한 수준으로 유지되는 것은 매우 중요하다. 이러한 혈당 유지를 위한 대사조절은 신경계나 호르몬에 의하여 일어나는

데, 호르몬 중에서도 당대사 조절에 주로 관여하는 호르몬은 insulin과 glucagon이다. 이 두 호르몬은 서로 길항작용을 하여, insulin은 glycogen 합성 과정, glycolysis 과정, hexose monophosphate shunt, 그리고 근육이나 지방조직으로의 glucose 도입 등 주로 glucose 이용과정을 활성화시키고, 반대로 당의 생성과정인 glycogen 분해와 당신생의 과정은 억제하지만, glucagon은 insulin과 완전히 반대의 작용을 하기 때문에 혈당치 조절에 있어 혈액중에서의 두 호르몬의 비율은 매우 중요하다. 그러므로, pancreas(췌장)의 β 세포에서 분비되는 insulin이 부족(또는)하거나 insulin 표적세포에서 insulin의 생물학적 효과의 감소가 일어나면서 고혈당 상태 및 수반되는 대사 장애가 장기간 지속되는 질환이 당뇨병인 것이다.

저자등⁸⁾과 주등⁹⁾은 streptozotocin으로 유발된 당뇨병 쥐에 10~4% 홍삼 사포닌 혼합물 또는 정제된 ginsenoside Rb₁, Rg₁을 경구 또는 복강투여한 후 혈청성분과 간의 당대사 관련 주요 효소활성에 미치는 영향을 조사한 결과, streptozotocin 투여로 상승된 혈액의 glucose, ketone체, 유리지방산, TG 등의 함량이 유의적으로 개선되고 간의 glycogen 함량도 크게 증가하였으며, 높아진 간의 glucose 6-phosphatase 활성은 유의적으로 감소하였고, 낮아진 phosphofructokinase, glucokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, acetyl CoA carboxylase 등의 활성은 많이 개선되는 효과가 있음을 알게되었다. 또한, 인삼의 지용성 분획을 복강투여하여 활성을 조사한 연구¹⁰⁾에서도 같은 양상을 나타내었으나, 효과는 오히려 사포닌 성분보다 크게 나타남을 보고하였다.

본 연구에서는, 위와같은 배경과 실험 결과를 토대로 하여, 당뇨병 유발을 위한 streptozotocin의 인위적 투여를 배제한 간의 1차 배양 세포를 이용하여, insulin 부족에 의한 당뇨병 상황의 간세포를 대신하여 insulin이 결핍된 glucagon(2.1 nM)만 함유한 배지에서 12시간 CO₂ 배양기에서 배양된 간세포군과 정상조건의 간세포를 대신하여 insulin(105 nM)과 glucagon(2.1 nM)을 모두 함유한 배지에서 12시간 CO₂ 배양기에서 배양된 간세포군(대조군)으로 크게 나누고 이들 각 간세포군에서의 당대사 관련 주 조절 효소들 중에서 glycogen 합성 관련 효소로 glucokinase, glucose 산화과정인 hexose monopho-

sphate shunt 관련 효소로 glucose 6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase, 그리고 gluconeogenesis 관련 효소로 glucose 6-phosphatase 효소들의 활성을 비교하였고, 또한 이들 각 간세포군에 여러가지의 농도(10^{-1} ~ 10^{-4} %)의 홍삼 지용성 분획을 넣고 배양한 후에 이들 각 효소들의 활성에 대한 영향을 조사한 결과와 10^{-4} % 사포닌 성분 [ginsenoside(mixture, Rb₁, 그리고 Rg₁)]의 영향을 비교한 결과는 다음과 같았다. 여기서 인삼 성분의 농도 선택은 지용성 분획의 경우는 흡수 실험을 통한 간세포내 농도를 추론할 수가 없어서 황등¹⁴⁾의 암세포에 대한 영향을 조사한 결과 10^{-3} %에서 억제 효과가 크게 나타났다는 보고로부터 그 주위의 농도가 선택되었고, 인삼 사포닌 경우는 본인의 체내 흡수 실험 결과에서 간에 10^{-5} ~ 10^{-4} % 수준이 존재한다¹⁵⁾는 사실로부터 결정하였다.

우선, glucokinase 활성에 대한 홍삼의 지용성 분획의 영향을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이, insulin이 없는 glucagon만 존재하는 배지에서 배양된 간세포군의 glucokinase 활성이 insulin과 glu-

cagon 모두 존재하는 배지에서 배양된 세포군(대조군)에 비해 17% 정도 활성이 낮았다. 이렇게 감소된 활성은 insulin은 없지만 홍삼의 지용성 분획을 첨가하면 조사된 모든 농도(10^{-1} ~ 10^{-4} %)에서 활성이 증가됨을 나타내고 있으며, 특히 10^{-3} % 농도에서는 최대 대조군의 1.5배 만큼의 활성의 증가를 보였다. 또한 대조군의 배지 조건에 홍삼의 지용성 분획을 가한 배지에서 배양된 세포군의 glucokinase 활성도 대조군의 활성보다 측정된 모든 농도에서 활성 증가를 보였으며, 10^{-1} %에서 대조군의 활성보다 최대 약 2.2배의 활성 증가를 나타내었다. 이러한 결과들을 종합해 보면, insulin이 없고 glucagon만 존재하는 배지에서 배양된 간세포군의 glucokinase 활성이, insulin이 존재하는 대조군의 활성에 비하여, 낮은 결과는 당연하다. 왜냐하면 insulin 결핍은 당의 이용을 어렵게하고, 따라서 glycogen 합성과정의 첫단계 효소이며 중요 조절 효소인 glucokinase 활성이 감소되기 때문이다. 이러한 감소된 활성을 나타내는 간세포군의 배지에 홍삼의 지용성 분획이 첨가되면 이 효소의 활성이 다시 증가된다는 사실은 지용성 분획이 혈당을 크게 떨어뜨릴 수 있음을 나타내는 것이다. 이상의 결과는 주등¹⁶⁾이 10^{-3} %의 지용성 분획을 이용한 같은 실험에서도 유사한 결과를 보고하였다.

또 하나의 glucose 이용 과정으로, glucose 산화과정인 hexose monophosphate shunt의 주요 효소인 glucose 6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase 활성에 대한 홍삼 지용성 분획의 영향을 조사한 결과는 Table 2와 Table 3에서와 같다. Table 2에서 처럼 insulin과 glucagon 모두 함유하는 배지에서 배양된 대조군에 비해 insulin이 결핍된 glucagon만 존재하는 배지에서 배양된 간세포군의 glucose 6-phosphate dehydrogenase 활성이 13% 가량 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 감소된 활성은 홍삼 지용성 분획의 첨가에 의하여 조사된 모든 농도에서 증가되었고, 10^{-3} % 농도에서 60% 정도의 최대 활성 증가를 보였다. 또한 insulin과 glucagon 모두 함유한 대조군의 glucose 6-phosphate dehydrogenase 활성에 비해 홍삼 사포닌 혼합물이 첨가된 세포군의 활성도 증가되어 10^{-1} % 농도에서 최대 2.1배 증가를 보였다. 또 하나의 효소인 6-phosphogluconate dehydrogenase 활성에 대한 홍삼 지용성 분획의 영향 조사에서도 유사한 결과(Table 3)를

Table 1. Effect of fat soluble fraction of ginseng on glucokinase activity in the presence and absence of insulin in primary cultured hepatocytes from rats (n=4)

Hormone	Group	Fat soluble fraction(%)	Activity (NADPH nmole/min/mg protein)	Relative activity (%)
Control (Insulin+ Glucagon)	-	-	7.04±0.43	100
	+	10^{-1}	15.19±1.10*	216
		10^{-2}	10.70±0.83*	152
		10^{-3}	7.77±0.41	110
		10^{-4}	7.26±0.32	103
Insulin deficient (Glucagon)	-	-	5.84±0.29	83
	+	10^{-1}	8.42±0.38**	120
		10^{-2}	10.54±0.48**	150
		10^{-3}	6.97±0.25	99
		10^{-4}	6.43±0.21	91

Hepatocytes were cultured for 12 h at 37°C in a medium (1L) containing 9.7 g, Eagle's minimal essential medium, 2.0 g bovine serum albumin, 2.2 g NaHCO₃, 0.1 g kanamycin, 250,000 U penicillin, 0.25 g streptomycin, 10% (V/V) fetal bovine serum with insulin (105 nM) and glucagon (2.1 nM) or glucagon (2.1 nM) only in a CO₂ incubator.

*p<0.01 comparing with control group.

**p<0.01 comparing with insulin deficient group.

Table 2. Effect of fat soluble fraction of ginseng on glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in the presence and absence of insulin in primary cultured hepatocytes from rats (n=4)

Hormone	Group		Activity (NADPH nmole/min/mg protein)	Relative activity(%)
	Fat soluble fraction(%)			
Control (Insulin+ Glucagon)	-		11.29±0.81	100
	+	10 ⁻¹	23.97±1.17*	212
		10 ⁻²	15.84±0.70*	140
		10 ⁻³	13.28±1.08*	118
		10 ⁻⁴	12.58±1.12	111
Insulin deficient (Glucagon)	-		9.87±0.94	87
	+	10 ⁻¹	10.93±1.02	97
		10 ⁻²	13.15±0.88**	116
		10 ⁻³	15.76±0.93**	140
		10 ⁻⁴	13.80±0.79**	122

Culture conditions were the same as Table 1.

*p<0.01 comparing with control group.

**p<0.01 comparing with insulin deficient group.

얻었다. insulin과 glucagon을 모두 함유한 배지에서 배양된 간세포군(대조군)의 6-phosphogluconate dehydrogenase 활성에 비하여 insulin 결핍 배지에서 배양된 간세포군의 활성이 32% 감소되는 결과를 얻었으며, 이러한 감소된 활성은 사포닌 혼합물이 첨가됨으로서 증가되며, 특히 최대 활성 증가는 10⁻³% 농도에서 25%로 나타났다. 또한 대조군의 활성도 홍삼 사

Table 3. Effect of fat soluble fraction of ginseng on 6-phosphogluconate dehydrogenase activity in the presence and absence of insulin in primary cultured hepatocytes from rats (n=4)

Hormone	Group		Activity (NADPH nmole/min/mg protein)	Relative activity(%)
	Fat soluble fraction(%)			
Control (Insulin+ Glucagon)	-		58.18±1.34	100
	+	10 ⁻¹	67.32±1.77*	116
		10 ⁻²	68.69±1.82*	118
		10 ⁻³	70.81±1.58*	122
		10 ⁻⁴	67.64±1.42*	116
Insulin deficient (Glucagon)	-		39.69±1.39	68
	+	10 ⁻¹	40.45±1.29	70
		10 ⁻²	44.77±1.37**	77
		10 ⁻³	49.44±1.48**	85
		10 ⁻⁴	39.72±1.27	68

Culture conditions were the same as Table 1.

*p<0.05 comparing with control group.

**p<0.05 comparing with insulin deficient group.

포닌 혼합물의 첨가에 의하여 증가되는데 최대활성 증가는 10⁻³% 농도에서 22%로 나타났다. 이러한 결과들은 앞에서 glucokinase에 대하여 얻은 결과와 마찬가지로, 홍삼의 지용성 분획이 또 하나의 glucose 산화과정인 hexose monophosphate shunt의 중요한 두효소인 glucose 6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase 모두의 활성을 증가시킴으로서 당의 이용을 증가시키고, 나아가서는 혈당치를 떨어뜨릴 수 있음을 보여주고 있다.

Table 4는 glucose 6-phosphatase 활성에 대한 홍삼 지용성 분획의 영향을 조사한 결과이다. insulin과 glucagon 모두 함유된 대조군에 비해 insulin이 결핍된 배지에서 배양된 세포군의 glucose 6-phosphatase 활성이 53% 정도 증가됨을 나타내었다. 이러한 증가된 활성이 홍삼 지용성 분획의 첨가에 의하여 감소되어 거의 대조군 상태로 회복되는, 즉 앞에서 조사된 효소들과 반대로 glucose 6-phosphatase 활성을 도리어 억제하는 결과를 나타내었으며, 가장 큰 억제는 10⁻²% 농도에서 관찰되었다. 대조군에 대한 사포닌 혼합물의 영향도 비슷한 억제 양상을 보였고, 10⁻⁴% 농도에서 유의성 있게 나타났다. 이와같이 홍삼 지용성 분획이 간세포의 glucose 6-phosphatase 활성을 억제하였다는 결과들은 홍삼 성분이 gluconeogenesis(당 신생)과정의 주요 효소 중 하나인 glucose 6-phosphatase 활성을 억제함으로써 당의

Table 4. Effect of fat soluble fraction of ginseng on glucose 6-phosphatase activity in the presence and absence of insulin in primary cultured hepatocytes from rats (n=4)

Hormone	Group		Activity (Pi nmole/min/mg protein)	Relative activity(%)
	Fat soluble fraction(%)			
Control (Insulin+ Glucagon)	-		41.94±0.89	100
	+	10 ⁻¹	37.66±0.62*	90
		10 ⁻²	39.59±0.67	94
		10 ⁻³	39.68±0.60	95
		10 ⁻⁴	40.89±0.79	97
Insulin deficient (Glucagon)	-		64.24±1.29	153
	+	10 ⁻¹	42.62±0.58**	102
		10 ⁻²	41.69±0.67**	100
		10 ⁻³	46.32±0.78**	110
		10 ⁻⁴	53.98±0.97**	129

Culture conditions were the same as Table 1.

*p<0.01 comparing with control group.

**p<0.01 comparing with insulin deficient group.

생성을 억제하여 혈당 수준을 낮추고 나아가서는 당뇨를 개선할 수 있음을 제시하고 있다.

이상의 결과에서 보는 바와같이, insulin 결핍에 의하여 간의 glucokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase 활성은 감소하고, glucose 6-phosphatase 활성은 증가되어 고혈당이 유발되는데, 이러한 고혈당의 상황은 홍삼의 지용성 분획의 첨가에 의하여 개선이 되어 높아진 활성은 낮아지고, 낮아진 활성은 높아져, 원래상태로 회복될 수 있음을 보여주고 있다. Table 5에서는 이러한 홍삼의 지용성 분획(10⁻²%)과 같은 효과를 나타내는 인삼 사포닌 성분[ginsenosides (mixture, Rb₁, Rg₁), 10⁻⁴%] 과의 고혈당 저하 효과를 비교한 결과로서 두 성분 모두 전반적으로 유의적인 개선효과를 나타내었으며, glucokinase와 Glucose 6-phosphate dehydrogenase에서는 ginsenoside Rb₁이 그리고 6-phosphogluconate dehydrogenase와 glucose 6-phosphatase에서는 사포닌 혼합물이 더 좋은 회복 효과를 나타내었다.

이상의 결과들을 종합하면, 당 대사가 활발한 간세포를 liver perfusion 방법을 통하여 분리하고, 당뇨병의 원인 중 하나인 insulin 결핍에 의해 유발되는 당 대사의 변화와 거의 같은 상황을 나타내도록 in-

sulin이 존재할 경우와 존재하지 않을 경우의 조건을 조성한 배지에서 배양한 후, 당 대사에 관련된 주요 대사과정 중 주요 효소들-당의 이용과정의 효소로서 glucose의 polymer인 glycogen 합성과정의 주요 효소 glucokinase와 당의 또 하나의 산화과정인 hexose monophosphate shunt의 주요 효소 glucose 6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase, 그리고 당의 생성과정인 gluconeogenesis 과정의 주요 효소인 glucose 6-phosphatase-의 활성을 조사한 결과, 일반적으로 insulin이 간에서 glycogen 합성, glycolysis, hexose monophosphate shunt 등은 활성화시키고 glycogen 분해와 gluconeogenesis는 억제시킨다고 알려져있는 바와 똑같은 결과를 나타내었다. 그러나 이들 배지에 홍삼 지용성 분획을 첨가하여 이들 효소에 대한 지용성 분획의 영향을 조사한 결과, 당의 이용 과정에 관련된 효소들인 glucokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase 그리고 6-phosphogluconate dehydrogenase 경우, insulin 결핍에 의한 감소된 활성이 조사된 모든 농도에서 증가되었으며, 일정 농도에서 활성이 크게 증가되어 대조군의 활성을 훨씬 능가하는 것으로 나타났다. 또한 대조군에서도 홍삼 지용성 분획에 의하여 활성이 크게 증가하였다. 또한, 당의

Table 5. Comparison of restoration effect by between fat soluble fraction (10⁻²%) and ginsenosides (mixture, Rb₁ and Rg₁, each 10⁻⁴%) of red ginseng on the activities of enzymes related to glucose metabolism in the absence of insulin in primary cultured hepatocytes from rats (n=4)

Group	Glucokinase	Glucose 6-phosphate dehydrogenase	6-phosphogluconate dehydrogenase	Glucose 6-phosphatase
Insulin+Glucagon (normal)	7.04±0.43	11.29±0.81	58.18±1.34	41.94±0.89
Glucagon (control)	5.84±0.29(100)	9.87±0.94(100)	39.69±1.39(100)	64.24±1.29(100)
Glucagon+fat soluble fraction	10.54±0.48*(180)	13.15±0.88*(133)	44.77±1.48*(113)	41.69±0.67*(65)
Glucagon+ginsenoside mixture	7.55±0.48*(129)	11.02±0.95*(112)	54.55±1.91*(137)	36.20±0.85*(56)
Glucagon+ginsenoside Rb ₁	12.20±0.28*(209)	16.22±1.19*(164)	51.29±1.48*(129)	49.16±0.76*(77)
Glucagon+ginsenoside Rg ₁	8.22±0.45*(141)	11.64±1.17*(118)	52.30±1.58*(132)	43.95±1.22*(68)

Culture conditions were the same as Table 1. The unit of enzyme activity was expressed as NADPH nmole/min/mg protein for glucokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, and 6-phosphogluconate dehydrogenase, and Pi nmole/min/mg protein for glucose 6-phosphatase. Numbers in parenthesis are relative % of enzyme activity assuming that of control group.

*p<0.01, *p<0.05 comparing with control group.

생성과정에 관련된 효소인 glucose 6-phosphatase 경우, insulin 결핍에 의한 증가된 활성이나 대조군 자체의 활성이 홍삼 지용성 분획의 첨가에 의하여 반대로 억제됨을 나타내었다. 결론적으로 홍삼의 지용성 분획이 간에서 당대사 관련 효소들의 활성을 증가 또는 억제하여 혈당을 낮추어 당뇨를 개선할 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 모든 결과들은 저자등¹⁰⁾과 주등¹¹⁾이 보고한 streptozotocin 유발 당뇨병 쥐에서 이들 효소들에 대한 홍삼 지용성 분획의 영향을 조사한 결과들과 유사하였으며, 또한 이들 효소들 중 glucokinase에 대한 홍삼 지용성 분획의 직접적인 효소 활성에 미치는 영향 조사 및 배양된 1차 간세포를 이용한 insulin 존재 여부에 따른 효소 활성 조사에 의한 실험 결과¹⁶⁾와도 유사한 결과를 나타내었다. 그러나, 이상의 결과들에서, 특히 insulin이 없어도 홍삼 지용성 분획이 대신할 수 있다는 결과에 대하여 구체적 증거는 없지만, 지용성 분획은 세포막을 잘 통과할 수 있으므로 간세포 안으로 들어가서 조사된 이들 효소 활성들에 직접 관여했거나, insulin과 함께 상승 작용 또는 이들 효소들의 발현을 유도하는 mechanism에 간접적으로 작용된 것이 아닌가 추측되며, *in vitro* 효소 활성 조사 또는 mRNA 량의 변화 등 좀 더 자세히 연구되어야 할 과제이다.

요 약

본 연구에서는 홍삼 지용성 분획의 혈당강하 효과를 조사하기 위하여, 당 대사가 활발한 간세포를 liver perfusion 방법을 통하여 분리하고, 당뇨병의 원인 중 하나인 insulin이 존재할 경우와 존재하지 않을 경우의 조건을 조성한 배지에서 배양한 후, 당 대사에 관련된 주요 대사과정 중 주요 효소들인 glucokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase 그리고 glucose 6-phosphatase의 활성을 비교하였고, 이들 배지에 홍삼의 지용성 분획을 농도(10^{-1} ~ 10^{-4} %)별로 첨가하여 이들 효소 활성에 대한 지용성 분획의 영향을 조사한 결과는 다음과 같았다. 당의 이용 과정에 관련된 효소들인 glucokinase, glucose 6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase 경우, insulin 결핍 배지에서 배양된 세포군이 insulin이 존재하는 대조군에 비해 이들 효소 활성이 크게 감소하

였고, 이러한 감소된 활성은 지용성 분획의 첨가에 의하여 조사된 모든 농도에서 다시 회복되어 어느 일정 농도에서는 활성이 크게 증가되는 것으로 나타났으며, 대조군에서도 지용성 분획에 의하여 활성이 크게 증가하는 것으로 관찰되었다. 또한 당의 생성과정의 주요 효소인 glucose 6-phosphatase 경우, glucagon만 존재하는 insulin 결핍 배지에서 배양된 세포군이 insulin이 존재하는 대조군에 비해 이들 효소 활성이 반대로 높은 상태로 나타났으며, 이러한 높은 활성은 홍삼 지용성 분획의 첨가에 의하여 조사된 모든 농도에서 감소되었으며, 일정 농도에서 활성이 크게 감소되어 대조군의 활성 이하로 나타났다. 또한 대조군에서도 지용성 분획에 의하여 glucose 6-phosphatase 활성의 감소가 관찰되었다. 결론적으로 배양된 간세포를 이용한 실험에서 홍삼 지용성 분획은 당의 이용과정의 주요 효소들의 활성을 증가시키고, 당의 생성과정의 주요 효소 활성은 감소시키는 것으로 나타났으며, 이는 홍삼 지용성 분획이 직·간접적으로 관련 효소들의 활성을 조절하여 당뇨병으로 유발되는 높은 당의 수준을 떨어뜨림으로서 당뇨병을 개선할 수도 있음을 제시하고 있다. 홍삼 지용성 분획(10%)과 사포닌 성분[ginsenosides(mixture, Rb₁, Rg₃), 10%]과의 고혈당 저하 효과를 비교한 결과, 전반적으로 유의적인 개선효과를 나타내었으며, glucokinase와 Glucose 6-phosphate dehydrogenase에서는 ginsenoside Rb₁이 그리고 6-phosphogluconate dehydrogenase와 glucose 6-phosphatase에서는 사포닌 혼합물이 가장 좋은 회복 효과를 나타내었다.

감사의 말씀

이 연구는 한국담배인삼공사의 1994년도 용역연구비 지원사업에 의해 수행되었으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. Saito, I. : *Keio Medicine* **2**, 149 (1922).
2. Jo, J. S. and Park, S. H. : *Ann. Rept. Korean Ginseng and Tobacco Research Inst.*, (1979).
3. Tsuo, C. and Yen, C. : *The 1st Conference of Soc. of Chinese Physiol. Sci.*, **35** (1959).
4. Petkov, W. : *Arzneimittelforschung*, **11**, 288 (1961).

5. Yokozawa, T., Seno, H. and Oura, H. : *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3095 (1975).
6. 우교석, 김종만, 구국희 : *한양의대학술지*, **2**, 47 (1980).
7. 김낙두, 이종욱 : *약학회지*, **22**, 115 (1978).
8. 주충노, 윤수희, 이향숙, 김용덕, 이희봉, 구자현 : *고려인삼학회지*, **16**, 198 (1992).
9. 주충노, 김주현 : *고려인삼학회지*, **16**, 190 (1992).
10. 주충노, 구자현, 이희봉 : *고려인삼학회지*, **17**, 13 (1993).
11. 주충노, 김선진 : *고려인삼학회지*, **17**, 101 (1993).
12. Kaplan, R. S., and Pederson, P. L. : *Pharmacol. Rev.*, **21**, 1 (1969).
13. Chen, P. S., Toribara, T. T., and Warner, H. : *Anal. Chem.*, **28**, 1756 (1956).
14. 황우익, 오수경 : *고려인삼학회지*, **10**, 27 (1986).
15. 이희봉, 주충노 : *한국생화학회지*, **16**, 136 (1983).
16. 주충노, 김선진 : *고려인삼학회지*, **18**, 17 (1994).