

흰쥐의 염산·에탄올 유발 위염 위조직에서 ginsenoside Rb₁의 항산화 효과

정춘식* · 현진이¹ · 김영식²

¹덕성여자대학교 약학대학, ²서울대학교 천연물과학연구소

Anti-oxidative Effect of Ginsenoside Rb₁ on the HCl · Ethanol-Induced Gastric Tissue in Rats

Choon Sik Jeong, Jin Ee Hyun, and Yeong Shik Kim

¹College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714

²Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460

Abstract – In the previous study, we demonstrated that ginsenoside Rb₁ isolated from the butanol fraction of the head of *Panax ginseng* had significant gastroprotective activity on gastritis and gastric ulcer models in rats. It has been well established that drugs to have capacity of scavenging or inhibiting the generation of reactive oxygen radicals prevent the gastric mucosal injury. Ginsenoside Rb₁ was tested on HCl ethanol-induced gastritis in rats, DPPH-induced free radical scavenging effect, MDA assay, GSH activity, and SOD activity in gastric tissue. It showed significant inhibition in HCl ethanol-induced gastritis, and also significantly increase of GSH activated SOD. We speculate that the protective effect of ginsenoside Rb₁ against HCl ethanol-induced gastric mucosal damage is originated from the increase of GSH and the activation of SOD.

Keywords – Ginsenoside Rb₁, HCl · ethanol-induced gastric lesion, anti-oxidant, GSH, SOD

저자 등은 전보에서 인삼노두 메탄올 추출물 및 부탄올 분획물이 흰쥐의 실험적 위손상 및 궤양에 억제작용이 있음을 보고하였으며,^{1,2)} activity-guided isolation을 통하여 ginsenoside Rb₁, Rc, Re를 분리·동정하였다.

소화성 궤양은 일반적으로 위내의 위산, 펩신, 미주신경의 자극, 가스트린의 분비 및 벽세포 증가 등의 공격인자와 중탄산 이온, 점막 생성력, 점액 생산 및 prostaglandin 등 방어인자의 불균형에서 초래된다고 알려져 있다.³⁾ 동물실험 모델에서 염산과 에탄올을 함께 투여하면, 위벽에 출혈과 같은 손상이 나타나며 위점막의 지질과산화 반응을 촉진시킨다.⁴⁾ 동물 및 사람의 위점막 손상에 영향을 주는 인자로서 산화작용의 관련성이 보고된 바 있으며,⁵⁻⁷⁾ 세포 밖에 존재하는 산소 대사체가 위 점막 세포자체에 영향을 준다는 보고가 있다. 특히 자유유리기는 많은 생명체들에 있어서 세포와 조직손상에 중요한 역할을 담당하며, alcohol, 스트레스, aspirin, 허혈-재관류, 비스테로

이드성 소염진통제 및 *H. pylori*에 의해 유발된 위점막 손상의 주된 원인이라는 보고가 있다.⁸⁾ 또한 세포외에서의 생성된 활성산소 대사산물(reactive oxygen metabolite)은 *in vivo*와 *in vitro*에서 위점막 세포에 직접 독성을 나타낼 수 있다.⁹⁻¹⁰⁾ 산소, superoxide 및 hydroxyl radical의 국소적 생성은 위점막 손상의 초기단계이며 자유 유리기들은 세포막에 손상을 일으켜 세포 내용물을 유리시켜 조직손상을 일으킨다.

인삼노두의 위염 및 위궤양에 대해 보호작용을 갖는 성분을 분리·동정한 ginsenoside Rb₁을 이용하여 항산화작용을 확인하고자 한다. 지금까지 ginsenoside Rb₁에 대한 연구는 주로 신경계 및 항암효과에 국한되어 있으며, 현재로서 위염에 대한 효능은 알려져 있는 바 없다. 따라서 본보에서는 인삼노두에서 분리한 위염 및 위궤양에 대한 효능 성분인 ginsenoside Rb₁의 위 보호작용을 HCl·ethanol 유발 위염과 병리조직학적 검경으로 확인하고, 그에 대한 기전연구의 일환으로 본 시험을 실시하여 보고하는 바이다.

*교신저자(E-mail) : choonsik@center.duksung.ac.kr

실험재료 및 방법

시약 및 기기 - Methanol, ethanol, hydrochloric acid, formalin, sodium hydroxide (Duksan pharmaceutical Co., Korea) 및 sodium potassium tartrate, copper sulfate, sodium bicarbonate, cimetidine, Folin Ciocalteu's phenol, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, L-ascorbic acid, bovine serum albumin, thiobarbituric acid, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, xanthine, cytochrome c, EDTA, Tris-HCl (Sigma Chem. Co.) 등을 사용하였으며, 기타 시약 및 추출용매는 시판 1급을 사용하였다. 기기로서 UV spectrophotometer는 Shimadzu사의 UV-1201을, 원심분리기는 Hanil Co.의 UNION 32R을 사용하였다.

실험동물 - 체중 150~190 g, 5~6주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 삼육실험동물연구소(주)에서 공급받아 실내온도 $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 2주 이상 사육하여 적응시킨 후 실험에 사용하였고, 고형사료(삼양사료) 및 물을 충분히 공급하였다.

노두의 추출, 분획 및 검체 조제 - 인삼노두는 경동시장에서 구입하였으며, 95% methanol로 열탕추출하였고, Hexane, CHCl_3 및 Butanol로 계통분획 하였다. 인삼노두 butanol층에서 CHCl_3 , MeOH, H_2O 및 EtOAc 혼합용매를 이용해 silica gel open column chromatography로 분리·정제하고, GC-MS, H-NMR, C-NMR, HPLC를 통하여 동정한 ginsenoside Rb_1 을 실험에 사용하였다. 검체는 식염수에 용해하여 사용하였으며, 시험 직전에 제조하였다.

HCl·ethanol 유발 위염 - 흰쥐를 24시간 절식시킨 후 Mizui 등¹¹⁾의 방법으로 실험하였다. 즉 검체를 경구투여하고 30분 뒤에 HCl·ethanol (60% ethanol에 150 mM HCl을 함유) 1 ml를 경구투여하였다. 절식, 절수 하에 1시간 방치한 뒤 ether로 치사시켜 적출한 위를 (1) 4% formalin으로 고정된 후, 출혈부위를 산출하여(mm) lesion index를 구하고, (2) phosphate buffered saline (PBS)로 위내 잔류물을 제거한 후 homogenize하여 사용하였다.

병리학적 검경 - Hemorrhage가 발생한 부분의 위조직을 잘라 10% formaline에 48시간동안 고정시키고 50, 80, 95 및 99.9%의 에틸알콜에 순차적으로 담귀 탈수시킨 후, xylene으로 행구고 파라핀에 포매하였다. 4.5 μm 두께로 자르고 hematoxylin-eosin으로 염색한 후, 현미경에서 40 \times 의 배율로 관찰하였다.

DPPH 소거 실험 - 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)을 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 검체에 methanol을 가하여 480, 240, 120, 60, 30, 15, 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 조제하고 4 ml씩 시험관에 취했다. 여기에

1.5×10^{-4} M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl/methanol 용액 1 ml을 가한 다음 잘 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조약물로는 L-ascorbic acid를 사용하였다.⁶⁾

단백 정량 - HCl·ethanol로 위염을 유발하여 제조한 (2)의 위조직 균질액 10 μl 에 0.5 ml Lowry complex (0.2 ml 4% sodium potassium tartrate, 0.2 ml 2% copper sulfate와 10.0 ml의 4% sodium bicarbonate/0.2N sodium hydroxide 용액을 사용 직전에 혼합한 용액)를 가하고 신속하게 혼화하였다. 15분 후 0.1 ml의 Folin Ciocalteu's phenol 시약을 가하고 즉시 섞은 후 30분 간 방치하고, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin을 사용하여 만든 standard curve로부터 얻었다.¹²⁾

지질 과산화물 측정 - 위조직은 0.1 M KCl buffer로 균질액을 제조하여, 이 균질액 0.5 ml에 1% H_3PO_4 , 0.67% thiobarbituric acid 시약을 가한 후 95%에서 45분간 진탕한 후 실온까지 냉각하고 butanol 4.0 ml를 가해서 진탕 추출한 후 원심분리하여 butanol 층을 취해 535 nm와 520에서 흡광도를 측정하였다. 표준액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하여 검체에서의 malondialdehyde 생성량을 계산하고 이를 nmol/mg protein으로 나타내었다.¹³⁾

환원형 Glutathione 함량 - 조직중의 GSH 함량은 0.1 M potassium phosphate buffer로 제조한 위조직 균질액 25 μl 에 6 mM 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB)를 첨가하여 잘 섞고 실온에 3분간 방치 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉 thiol기에 DTNB를 작용시켜 형성된 p-nitrothiophenol anion을 비색정량하는 원리로 Ellman¹⁴⁾의 방법에 따라 실시하였다. GSH 0-20 $\mu\text{g/ml}$ 의 용액을 만들어 standard curve로 이용하였다.

Superoxide dismutase 활성 - Superoxide dismutase는 xanthine-xanthine oxidase assay에 의해 활성도를 측정하였다. 2.9 ml의 혼합용액 (5 μmol xanthine, 2 μmol cytochrome c, 0.1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8)에 50 μl 의 cytosol을 첨가하여 1-2분간 기준선을 설정한 다음 0.1 mM EDTA 용액에 약 0.2 U/ml의 xanthine oxidase를 함유하는 용액 50 μl 을 첨가하여 반응을 시작함과 동시에 550 nm에서 흡광도 증가속도를 측정하여 활성도를 계산하였다. 이 때의 cytochrome c의 분자흡광 계수는 $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 로 환산하여 계산하였다.¹⁵⁾

통계처리 - 모든 실험 결과는 평균치와 표준오차를 계산하고, 각 군간의 차이는 Student's *t*-test를 사용하여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

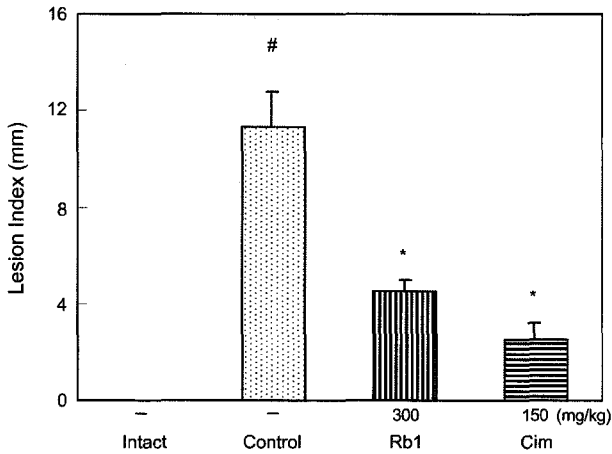


Fig. 1. Effect of ginsenoside Rb₁ on HCl · ethanol-induced gastric lesion in rats (n=8). *P<0.01, Significantly different from the control. Rb₁ : ginsenoside Rb₁, Cim : cimetidine.

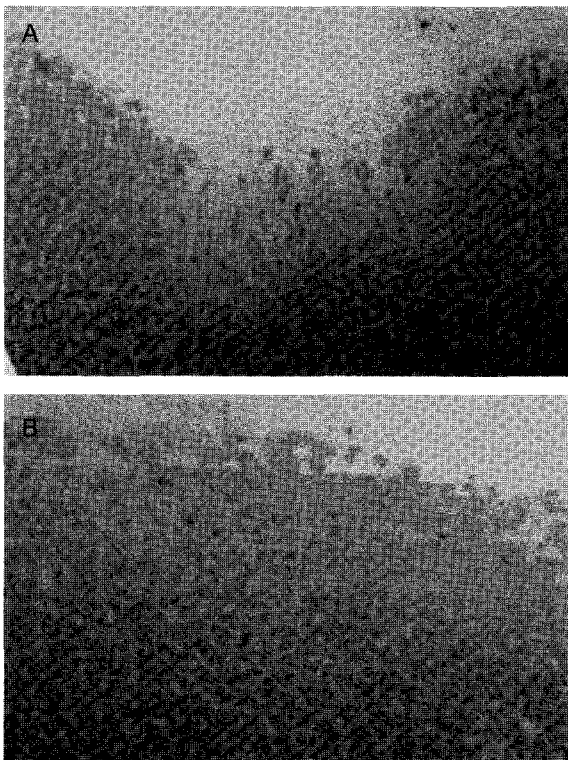


Fig. 2. Histological examination. A: saline, B: ginsenoside Rb₁ group with lesion by HCl · ethanol induction, stained with hematoxylin and eosin. (×100) (A) shows erosion with loosen mucosal cells, and (B) nearly shows normality.

결과 및 고찰

HCl · ethanol 유발 위염 - 흰쥐에 HCl · ethanol을 경구로 투여하면 위 점막에서의 지질과산화 증가 및 병리학적

Table I. Effect of ginsenoside Rb₁ on DPPH elimination

Treatment	Dose (µg/ml)	Inhibition (%)
ginsenoside Rb ₁	15	0
	30	0.6
	60	13.4
	120	10.4
	240	11.9
	480	23.8
ascorbic acid	0.5	18.2
	1	30.1
	2	61.3
	5	91.9
	10	93.2

*p<0.05, significantly different from the control group.

점막 손상을 유발한다¹⁶⁾는 보고에 따라 ginsenoside Rb₁이 HCl · ethanol 유발 위손상에 미치는 영향을 Fig. 1에 나타내었고, 조직학적 검경은 Fig. 2에 나타내었다. 대조군의 위손상 길이는 11.35 mm이었으며, ginsenoside Rb₁은 300 mg/kg용량에서 위손상 억제율이 60.5%로 대조약물 Cimetidine 투여군의 77.8%의 억제율과 유사한 위손상 억제를 보였다. 병리학적 검경에서 ginsenoside Rb₁은 대조군에서 나타난 점막하층의 부종과 erosion이 치유된 것을 확인하였다.

DPPH 소거 실험 - Ginsenoside Rb₁의 DPPH에 대한 소거능을 기준으로 직접적인 free radical scavenging effect를 시험한 결과는 Table I에 나타내었다. Ginsenoside Rb₁ 480 µg/ml에서 23.8%의 DPPH소거효과를 나타내었다. 일반적으로 손상된 염증조직에서 발생하는 free radical을 *in vitro*에서 DPPH를 이용하여 발생시킨 다음 그 효과를 ginsenoside Rb₁으로 확인한 바, 유의성은 없었으므로 직접적인 scavenging effect는 적은 것으로 생각된다.

지질 과산화물 측정 - 세포막의 인지질은 free radical의 공격에 의하여 oxygen centered lipid peroxy radical을 거쳐 carbon centered lipid endoperoxide로 된 후 분해되어 malondialdehyde (MDA)를 생성하므로 지질과산화의 정도를 측정하는 지표가 된다.¹⁷⁾ Ginsenoside Rb₁ 투여군의 위 조직에서는 지질과산화물인 MDA에 대한 억제효과가 나타나지 않았다(Fig. 3).

환원형 Glutathione 함량 - HCl · ethanol을 투여하면 위 점막에서의 지질과산화 증가 및 병리학적 점막 손상을 유발하며, 이 때 지질과산화 작용으로 인한 GSH의 억제작용이 나타난다. 대조군에서는 GSH가 현저하게 감소하였으며, ginsenoside Rb₁ 투여군의 위 조직에서는 97.1%의 회복효과를 나타내었으며, 대조약물인 cimetidine의 97.4%와 유사한

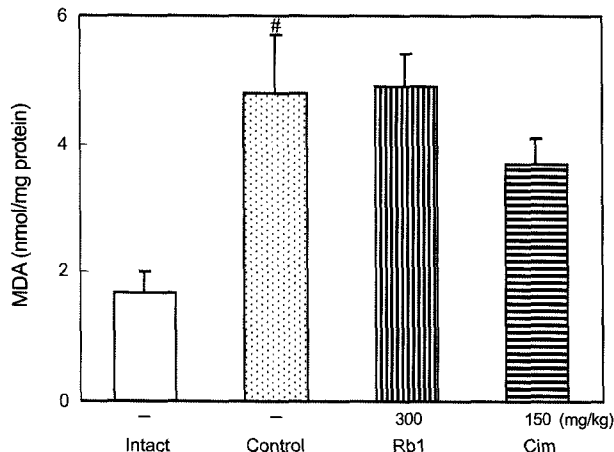


Fig. 3. Effect of ginsenoside Rb₁ on MDA level in HCl-ethanol induced gastritis. Rb₁ : ginsenoside Rb₁, Cim : cimetidine.

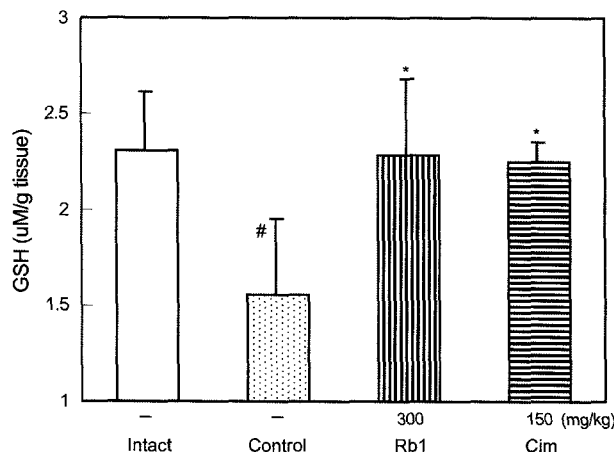


Fig. 4. Effect of ginsenoside Rb₁ on GSH level in HCl · ethanol-induced gastritis. *p<0.05, significantly different from the control group. Rb₁ : ginsenoside Rb₁, Cim : cimetidine.

효과를 나타낸 것이다(Fig. 4). 비효소적 항산화제인 GSH는 여러 세포의 endogenous, exogenous 화합물의 해독에 관여하는 물질로서 GSH의 thiol기에 포함하여 해독화하여¹⁸⁾ 단백질이나 DNA 합성, γ -glutamyl amino acid 등과 같은 물질의 이동, 효소 활성의 조절 및 활성 산소나 유리기에 의한 세포 손상 예방 등 생물학적으로 중요한 여러 반응에 관여한다¹⁹⁾는 이론에 따라, ginsenoside Rb₁가 oxidative stress의 감소를 나타낸 것으로 생각된다.

Superoxide dismutase 활성 - Superoxide dismutase (SOD)는 metalloenzyme로서 함유되어 있는 Cu, Zn, Mn 및 Fe 같은 금속 이온의 종류에 따라 구분하며 superoxide anion radicals에 의해 생기는 산화적 손상에 대한 세포의 방어에 일차적으로 관여하는 효소이며,²⁰⁾ 위점막의 손상에 대

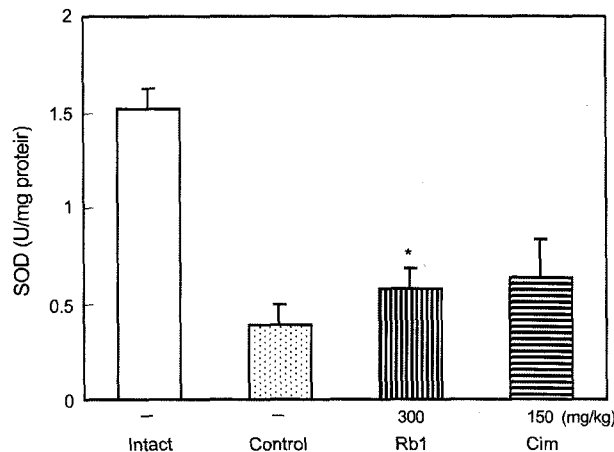


Fig. 5. Effect of ginsenoside Rb₁ on SOD activity in HCl-ethanol induced gastritis tissue. *p<0.05, significantly different from the control group. Rb₁ : ginsenoside Rb₁, Cim : cimetidine.

해 직접적인 억제작용이 있다.²¹⁾ Ginsenoside Rb₁ 투여군의 위 조직에서 SOD의 활성을 대조군에 비하여 33.9%가량 증가시켰다(Fig. 5). 본 실험에서 ginsenoside Rb₁의 SOD 활성도가 대조군과 비교하여 증가한 것은 HCl · ethanol로 인해 손상된 조직에서 생성된 free radical의 지질 과산화에 대한 방어작용으로서 증가된 것으로 생각된다.

흰쥐에 HCl · ethanol을 경구로 투여하면 위 점막에서의 지질과산화 증가 및 병리학적 점막 손상을 유발하는데, 이와 같은 손상에 대한 검체의 항산화 효능을 검토하였다. HCl · ethanol 용액의 투여로 발생한 위손상 부위의 반응성 산소 대사체가 위벽 세포에 유해한 작용이 일어나면 SOD가 GSH의 radical 관련 산화반응을 방지한다. 즉, HCl · ethanol로 유발한 위염에 대해 ginsenoside Rb₁의 위손상 방어효과는 GSH 양의 증가와 SOD활성의 증가를 통한 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 과학재단 목적기초연구지원사업(R04-2000-00056) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Jeong, C. S., Jung, K. H. and Lee, E. B. (1996) Antigastric and antiulcer actions of the extract of head of *Panax Ginseng Radix*. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**(4): 295-300.
2. Jeong C. S. (2002) Effect of butanol fraction of *Panax Ginseng* head on gastric lesion and ulcer. *Arch. Pharm. Res.* **25**(1): 61-65.

3. Shay, H., Komarov, S.A., Fels, S.S. and Meranze, D. A (1945) simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* **5**: 43-61.
4. Ito, M., Shii, D., Segami, T., Kojima, R. and Suzuki, Y. (1992) Preventive actions of N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc (Z-103) through increases in the activities of oxygen-derived free radical scavenging enzymes in the gastric mucosa on ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **59**: 267-274.
5. Itoh, M. and Guth, P. H. (1985) Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology* **88**: 1162-1167.
6. Perry, M. A., Wadhwa, S., Parks, D. A., Pickard, W. and Granger, D. N. (1986) Role of oxygen radical in ischemia-induced lesions in the cat stomach. *Gastroenterology* **90**: 362-367.
7. Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, T. and Okura, T. (1989) Studies in inhibition mechanism of tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 1919-1921.
8. Granger, D. N. and Kubes, P. (1994) The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J. Leukocyte Biol.* **55**: 159-160.
9. Hiraishi, K. O., Terano, A., Ota, S., Ivey, K. J. and Sugimoto, T. (1987) Oxygen metabolite-induced cytotoxicity to cultured rat gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol.* **253**: G40-48.
10. Wadhwa, S. S. and Perry, M. A. (1987) Gastric mucosal injury by hemorrhage, local ischemia and oxygen radical generation. *Am. J. Physiol.* **253**: G129-133.
11. Mizui, T. and Dodeuchi, M. (1983) Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, **33**: 939-945.
12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. R. (1951) Protein measurement with the foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 263-275.
13. Mihara, M. and Uchiyama, M. (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **86**: 271-278.
14. Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 70-77.
15. Fridovich, I. (1985) Xanthine oxidase, CRC handbook of methods for oxygen radical research. New York, CRC Press
16. Ito, M., Shii, D., Segami, T., Kojima, R. and Suzuki, Y. (1992) Preventive actions of N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc (Z-103) through increases in the activities of oxygen-derived free radical scavenging enzymes in the gastric mucosa on ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **59**: 267-74.
17. Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. (1985) Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450, *FEBS Letters*, **183**: 265-269.
18. Parke, D. V. (1993) The importance of diet and nutrition in the detoxification of chemicals. In food, nutrition and chemical toxicity. Smith-Gordon, London, pp. 1-15.
19. Meister, A. and Anderson, M. E. (1983) Glutathione, *Ann. Rev. Biochem.*, **52**: 711-760.
20. Ho, Y. S. and Crapo, J. D. (1988) Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. *FEBS Lett.* **229**: 256-260.
21. Yoshikawa, T., Minamiyama, Y., Ichikawa, H., Takahashi, S., Naito, Y. and Kondo, M. (1997) Role of lipid peroxidation and antioxidants in gastric mucosal injury induced by the hypoxanthine-xanthine oxidase system in rats. *Free. Radic. Biol. Med.* **23**: 243-50.

(2002년 8월 13일 접수)