

Compound K의 인슐린분비 및 탄수화물 대사에 미치는 영향

최윤숙* · 한기철* · 한은정* · 박금주* · 성종환** · 정성현*[#]

*경희대학교 약학대학 약물학 · 임상약학 교실, **(주)일화 중앙연구소
(2007년 4월 23일 접수; 2007년 6월 5일 수리)

Effects of Compound K on Insulin Secretion and Carbohydrate Metabolism

Yun Suk Choi*, Gi Cheol Han*, Eun Jung Han*, Kum Ju Park*,
Jong Hwan Sung** and Sung Hyun Chung*[#]

*Pharmacology and Clinical Pharmacy Lab, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

**ILHWA Co. LTD. Central Research Center, Guri 471-711, Korea

(Received April 23, 2007; Accepted June 5, 2007)

Abstracts : Compound K (CK) is a final metabolite of panaxadiol ginsenosides. Although panax ginseng is known to have anti-diabetic activity, the active ingredient is not yet fully identified. Therefore, it would be interesting to know whether and how CK has an anti-diabetic activity. First, insulin secretion-stimulating activity of CK was examined using RIN-m5F cell line and primary cultured islets. CK enhanced the insulin secretion in a concentration dependent manner. This effect, however, was almost completely abolished in the presence of diazoxide, K⁺ channel opener, indicating that the insulin secretion-stimulating activity of CK is presumably due to blockade of ATP sensitive K⁺ channel. In addition, effects of CK on gene expressions of hepatic enzymes (phosphoenolpyruvate carboxykinase[PEPCK], glucose-6-phosphatase[G6Pase]) and on adipocyte differentiation in H4IIE and 3T3-L1 cells, respectively, were examined. CK suppressed the induction of PEPCK and G6Pase mRNA expressions under the dexamethasone/cAMP stimulation condition. CK also reduced the PPAR- γ mRNA expression and triglyceride accumulation in a dose dependent manner as compared to the control. The present study suggests that CK deserves to examine whether it shows an anti-diabetic activity in animal and human studies.

Key words : compound K, anti-diabetic activity, insulin secretion, ATP sensitive K⁺ channel, PEPCK, G6Pase, PPAR- γ

서 론

당뇨병은 전 세계적으로 유병율이 큰 만성적인 대사성 질환이다.¹⁾ 당뇨병은 고혈당이라는 특징적인 증상을 나타내는데, 이는 췌장으로부터 인슐린 분비감소 또는 분비된 인슐린의 각 장기에 대한 작용성 감소에 기인 한다.²⁾ 지금까지의 역학적 연구와 임상 실험 결과에 의하면 고혈당이 망막증, 신경장해, 신장해와 같은 소혈관계 당뇨 합병증과 심장병, 뇌졸중, 사지 절단과 같은 대혈관계 당뇨 합병증을 일으키는 원인으로 밝혀져 있다.³⁾ 결국, 당뇨의 합병증을 예방하고 당뇨 환자의 삶

의 질을 개선하기 위해서는 효과적인 혈당의 조절이 가장 중요하다 할 수 있다.^{4,5)}

인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 저지대와 음지에 서식하는 다년생 초본 식물로서 미국, 캐나다뿐만 아니라 중국, 일본, 한국, 러시아 각지에서 재배된다. 인삼은 2000여 년 전 동양에서 가장 오래된 신농본초경에 상품으로 수재된 이래로 지금까지 중국 전통 의학에서 강장제로서 사용되어 왔다.⁶⁾

인삼의 주요 약리학적 활성성분으로 여러 가지 다른 종의 인삼의 추출물에서 공통적으로 발견되는 성분인 진세노사이드가 있다.⁷⁾ 진세노사이드는 4환성의 dammarane 구조를 갖는 물질 군으로 protopanaxadiol 그룹과 protopanaxatriol 그룹으로 대별할 수 있다. 지금까지의 연구에 의하면 protopanaxadiol 그룹은 주로 중추신경에 억제적으로 작용하여催眠 작용, 진정 작용, 혈압 강하 작용, 혈당강하 작용 등의 약

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-961-0373; (팩스) 02-957-0384
(E-mail) suchung@khu.ac.kr

리 작용이 보고된⁸⁾ 반면 protopanaxatriol 그룹은 주로 중추 신경 흥분작용과 함께 항피로, 두뇌기능 개선 작용 등이 보고되었다.⁹⁾

최근 인삼 사포닌이 인체의 장내에서 대사되어 혈중에 존재하는 활성 본체에 대한 관심이 높아지면서 그 중 protopanaxadiol계 진세노사이드 Rb1의 장내 미생물 최종 대사체인 compound K (20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol)에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. Compound K는 protopanaxadiol 그룹의 prosapogenin으로 항암 및 암 전이 억제 활성이 보고된 바 있다.¹⁰⁻¹⁷⁾

본 연구에서는 compound K가 in vivo에서 혈당강하 활성을 나타낼 수 있는지를 알아보기 위한 예비실험으로 첫째, 췌장베타세포에서 인슐린 분비를 촉진 시키는가? 둘째, 간세포에서 탄수화물 대사에 관여하는 효소들의 전사체 발현에 영향을 미치는가? 셋째, 인슐린 민감성과 관련이 있는 지방분화에 영향을 미치는 지를 각 세포주를 이용하여 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 인슐린 분비 관련 실험

RIN-m5F 세포 배양

RIN-m5F cell line (ATCC, passage number 8-10)을 10% fetal bovine serum과 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI-1640 (2 mM L-glutamine, 1.5 g/l sodium bicarbonate, 10 mM HEPES, 1.0 mM sodium pyruvate) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂/O₂ 조건하에서 배양하였으며 subculture는 4~5일 사이에 시행하였다.

흰쥐 소도세포(islets)의 일차배양

소도세포는 Sprague-Dawley rat의 췌장에 collagenase가 포함된 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)을 주입하여 분리하고 37°C water bath에서 10분 동안 incubation을 시켜준 후 차가운 5%의 FBS가 포함된 HBSS에 옮겨 소도세포를 잘 풀어 주었다. 1.037, 1.069, 1.085, 1.10 Ficoll 농도 기울기에 소도세포를 가하고 2000 rpm/4°C에서 20분 동안 원심분리를 한 후 2와 3번째 층을 분리하여 5%의 FBS가 포함된 HBSS에 옮겨 1500 rpm/4°C에서 1분 동안 원심분리를 하여 최종적으로 소도세포를 얻었다. 10% fetal bovine serum과 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI-1640 배지를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 1~2일 동안 incubation 하였다.

인슐린 분비능 측정

RIN-m5F cell 또는 소도세포를 well당 2×10⁵개로 seeding한 후 24시간 동안 배양하였고 2번 수세한 후 Krebs-Ringer Buffer (KRB) [115 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.56 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 20 mM NaHCO₃, 16 mM HEPES and 0.3% bovine serum albumin, pH 7.4]에서 30분 동안 preincubation 하였다. 다음 11.1 mM (소도세포) 또는 5 mM (RIN-m5F) glucose와 10 μM의 ginsenoside들 또는 농도별 CK (glucose를 포함한 KRB로 희석)을 함께 가한 후 37°C에서 60분 동안 incubation 시켰다. 3,000 rpm (4°C)에서 5분 동안 원심 분리하여 얻은 상등액을 eppendorf tube에 옮겨 rat insulin kit (Shibayagi, Japan)를 이용하여 ELISA reader로 450 nm에서 측정하였다. 한편 CK의 인슐린 분비 촉진 기전을 알아보기 위한 실험에서는 0.5 mM diazoxide를 함유한 KRB 용액에서 1시간 동안 incubation한 후 위와 동일한 방법으로 인슐린 농도를 측정하였다.

2. 탄수화물 대사 관련 효소의 전사 활성

세포배양

간세포인 H4IIE cell line은 2.5% fetal calf serum, 2.5% newborn calf serum과 100 U/ml의 항생제가 포함되어 있는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 37°C 온도 유지와 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포는 24 well plate에 well당 4×10⁴씩 분주하며 CK를 처리하기 16시간 전부터 serum이 들어있지 않은 배지에서 배양하였다. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)와 glucose-6-phosphatase (G6Pase) 유전자의 발현을 유도하기 위하여 0.1 mM cAMP와 500 nM dexamethasone을 처리하였으며, CK는 0.8 혹은 3.2 μM 농도로 cAMP/dex와 함께 처리한 후 4h 동안 incubation한 후 RNA를 아래와 같이 분리하여 두 효소 유전자의 발현에 대한 억제 활성을 측정하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

위의 방법으로 CK를 처리한 후 total RNA는 guanidine thiocyanate-water saturated phenol/chloroform 분리 방법을 이용하였다.¹⁸⁾ 물 층에 있는 total RNA는 이소프로판올을 이용하여 침전시켜 분리한 RNA는 260 nm와 280 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. Total RNA 1 μg을 Moloney murine leukemia virus transcriptase와 random hexamer를 이용하여 역전사하였다. 본 실험에 사용한 primer

종류와 염기서열은 다음과 같다: PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase)의 주형사 서열은 ATG CCT CCT CAG CTG CAT A, 비주형사 서열은 TTA CAT CTG GCT GAT TCT CTG TT, G6Pase (Glucose-6-phosphatase)의 주형사 서열은 ACC CTG GTA GCC CTG TCT TT, 비주형사 서열은 GGG CTT TCT CTT CTG TGT CG, CPN(Cyclophilin)의 주형사 서열은 ATG GTC AAC CCC ACC GTG, 비주형사 서열은 TTA GAG TTG TCC ACA GTC GGA GA 이다. Primer는 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 5 μl cDNA 그리고 2.5 unit의 Taq DNA polymerase가 포함되어 있는 25 μl의 반응 용액에 최종 농도가 0.5 μM이 되도록 첨가하였다. PCR 조건은 95°C에서 1분 동안 변성, 55°C에서 1분 동안 붙임 그리고 72°C에서 2분 동안 연장을 하여 총 30 cycle을 running 하였다. PCR 생성물은 0.5 μg/ml ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel을 이용하여 100V에서 전기영동 하였으며 GS-700 이미지 농도계를 이용하여 발현 정도를 수치화하여 CPN과의 비로 표현하였다.

3. 지방세포 분화 관련 실험

3T3-L1 지방 세포 배양 및 분화 조건

3T3-L1 fibroblast에 항생제인 100 U/ml penicillin A와 streptomycin을 첨가하고 10% heat-inactivated calf serum을 포함한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 5% CO₂와 37°C 조건하에 배양하였다. 분화를 유도시키기 위해서 3T3-L1 preadipocyte는 80% 정도 자라면서 분화 유도 배지 (5% fetal bovine serum, 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 1 mM dexamethasone 그리고 10 μg/ml 인슐린이 포함된 DMEM)로 교환하여 2일 간격으로 교환하고 총 4일 동안 배양한 후 10 μg/ml 인슐린이 포함된 DMEM으로 교환하여 2일을 더 배양하였다. 그 후 FBS만 포함된 DMEM으로 2일 배양하여 총 8일 동안 분화를 유도하였다.

Oil red O stain

분화 유도는 위의 방법과 동일하며 처음 2일 동안 1.6, 8, 16 그리고 32 mM의 CK를 첨가시켜 6 well plate에서 분화를 유도 시켜 총 8일 동안 배양한 세포를 PBS로 2번 세척한 후 10% 포르말린을 포함한 PBS로 1시간 동안 실온에서 세포를 고정시켰다. 그 후 0.3% oil red O가 포함된 60% 이소프로판올을 2시간 동안 실온에서 착색시켰다. 착색 후 3차 증류수로 남은 oil red O 용액을 제거한 후 37°C에서

20분 동안 남아 있는 물기를 제거 한 후 100% 이소프로판올로 탈 염색하여 540 nm에서 triacylglyceride (TG)를 측정하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

RNA 분리는 앞의 방법과 동일하며 본 실험에 사용한 primer 종류와 염기서열은 다음과 같다: peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR- γ)의 주형사 서열은 CCC TGG CAA ACG ATT TGT AT, 비주형사 서열은 AAT CCT TGG CCC TCT GAG AT, β -actin의 주형사 서열은 GTC GTA CCA CTG GCA TTG TG, 비주형사 서열은 GCC ATC TCC TGC TCA AAG TC 이다. Primer는 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTP, 5 μl cDNA 그리고 2.5 unit의 Taq DNA polymerase가 포함되어 있는 25 μl의 반응 용액에 최종 농도가 0.5 mM이 되도록 첨가하였다. PCR 조건은 95°C에서 1분 동안 변성, 57.5°C에서 1분 동안 붙임 그리고 72 °C에서 1분 동안 연장을 하여 총 30 cycle 하였다. PCR 생성물은 0.5 μg/ml ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel을 이용하여 100V에서 전기영동 하였으며 GS-700 이미지 농도계를 이용하여 발현 정도를 수치화하여 β -actin과의 비로 표현하였다.

통계분석

실험 결과는 평균±오차로 나타내었다. 통계처리는 Student's *t*-test로 검정하였고 대조군과 비교하여 $P < 0.05$ 이하의 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 인슐린 분비 관련 실험

1) 진세노사이드의 인슐린 분비 활성

진세노사이드의 인슐린 분비 활성을 알아보기 위해 protopanaxadiol계 진세노사이드 (PPD)와 protopanaxatriol계 진세노사이드 (PPT)의 인슐린 분비량을 RIN-m5F cell line에서 측정하였다 (Fig. 1). 각 진세노사이드의 농도는 10 μM을 사용하였다. PPD의 경우 대부분의 진세노사이드가 대조군에 비해 인슐린의 분비를 유의적으로 증가시킨 가운데 CK의 인슐린 분비량이 대조군에 비해 약 2.1배로 가장 많았다 (Fig. 1A). 반면, PPT 그룹에 속한 진세노사이드는 16.7 mM 포도당만을 투여한 대조군과 비교해 볼 때 인슐린 분비 촉진 활성이 없었다 (Fig. 1B). 이 결과로부터 우리는 인삼 사포닌

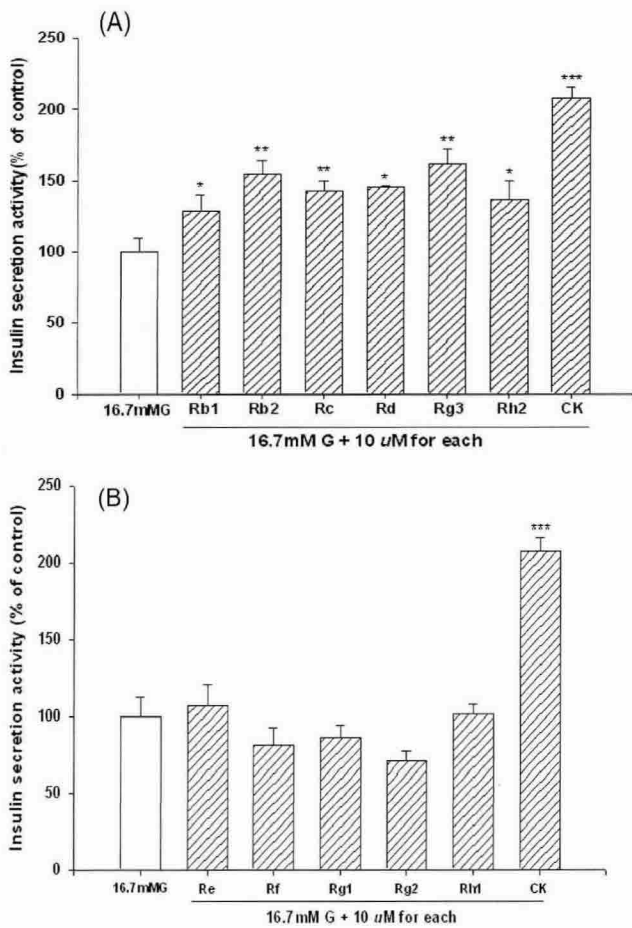


Fig. 1. Comparison of insulin secretory activity between PPD (A) and PPT (B) in RIN-m5F cells. Values are represented as mean±SE. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 16.7 mM glucose alone.

성분중 PPD 계열의 성분이 PPT 계열보다 인슐린 분비를 촉진시키는 활성이 우수함을 알 수 있었고, PPD 계열중에서도 장내 대사체인 CK가 인슐린 분비를 가장 촉진시킴을 알 수 있었다.

2) CK의 인슐린 분비 촉진 활성

CK의 인슐린 분비 촉진 작용을 RIN-m5F cell line (Fig. 2A)과 1차 배양한 췌장 소도세포 (Fig. 2B)에서 확인해 보았다. RIN-m5F cell에서 CK는 용량 의존적으로 인슐린의 분비를 촉진시켰으며, 8 μM농도에서 최대의 인슐린 분비 촉진 효과를 나타내었다 (**p<0.01). 한편 16 μM 농도에서는 대조군과 비교하여 거의 차이가 없음을 알 수 있었다. 또한 췌장 소도세포를 이용한 인슐린 분비 실험에서도 CK는 1에서 8 μM의 농도범위에서 용량 의존적으로 인슐린 분비 촉진 효과를 나타내었으며 16 μM에서도 인슐린 분비가 촉진되었으나 그 효과는 8 μM보다 작았다 (*p<0.05).

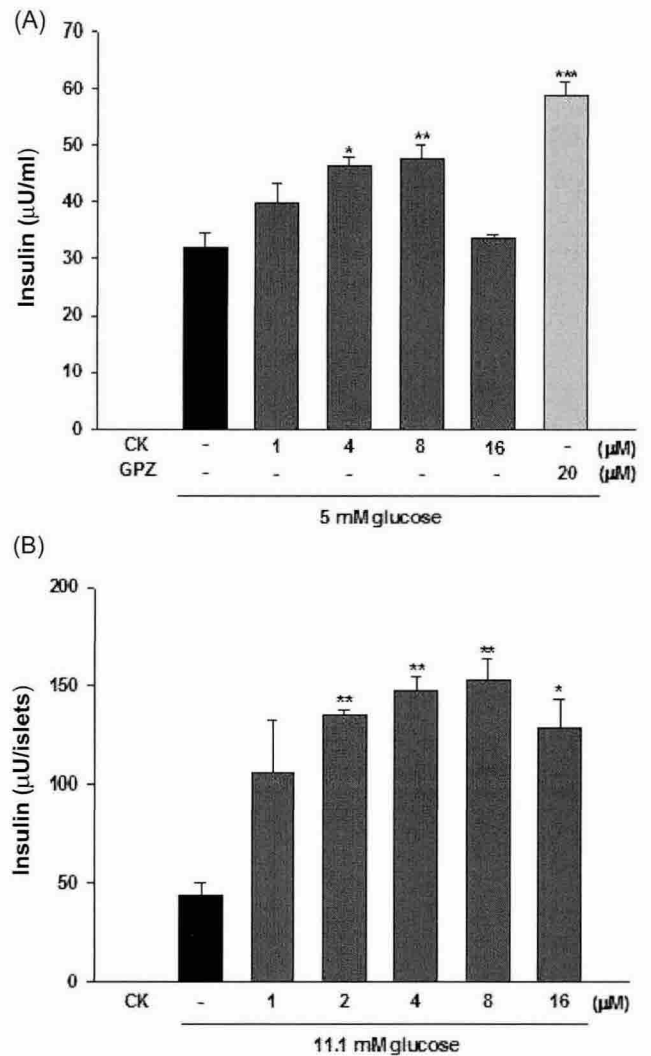


Fig. 2. Effects of CK on glucose-stimulated insulin release from RIN-m5F cells (A) and rat pancreatic islets (B). Values are represented as mean±SE. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to 5 mM glucose alone (A) or 11.1 mM glucose alone (B).

3) CK의 인슐린 분비 촉진 기전

CK의 인슐린 분비 촉진 기전을 일차 배양한 췌장 소도세포에서 0.5 mM의 diazoxide을 이용하여 확인해 보았다 (Fig. 3). 그림에서 보듯이 0.5 mM의 diazoxide는 CK로 인해 촉진된 인슐린의 분비를 약 65% 감소시켰다 (**p<0.01). 이로 미루어보아 CK의 인슐린 분비 촉진 기전은 ATP-sensitive K⁺ 채널의 봉쇄에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

2. 탄수화물 대사 관련 효소의 전사 활성

CK가 간 세포내에서 당 신생경로의 주요 효소인 PEPCK, G6Pase 유전자 발현에 미치는 영향을 H4IIE cell line에서

확인해 보았다. CK는 0.1 mM cAMP와 500 nM dexamethasone으로 유도된 PEPCK 유전자의 발현을 0.8, 3.2 μ M의 농도에서 각각 31%, 40% 억제하였다 (Fig. 4A). 같은 방법으로 유도된 G6Pase 유전자의 발현 역시 0.8, 3.2 μ M의 농도에서 각각 9%, 22% 억제하였다 (Fig. 4B). 이 결과로부터 CK는 간에서 당신생 과정의 주요 효소인 PEPCK와 G6pase 유전자 발현을 억제함으로써 공복시 혈당을 낮추어 줄

수 있을 것으로 사료된다.

3. 지방세포분화 관련 실험

지방세포에서 인슐린 감수성과 관련하여 CK가 3T3-L1 cell line에서 TG의 함량변화와 PPAR- γ 유전자의 발현 정도에 미치는 영향을 살펴보았다 (Fig. 5). 그림 5A에서 보듯이 CK는 16 μ M 농도까지 TG의 함량이 조금씩 용량의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 32 μ M 농도의 경우 세포독성으로 인해 TG량이 급격히 감소된 것으로 판단된다. 또한 CK는 PPAR- γ 유전자 발현을 증가시키지 못하였으며 오히려 용량의존적으로 감소시키는 경향을 보였다. 결론적으로 CK는 PPAR- γ 의 발현을 억제하여 결과 지방세포의 분화를 억제하는 활성이 있음을 알 수 있었다.

요 약

진세노사이드의 인슐린 분비 활성을 비교해 본 결과 PPD 계열 진세노사이드가 인슐린의 분비를 촉진하는 경향을 보였으며, 그 중에서도 CK의 인슐린 분비 촉진 효과가 가장 뛰어났다. CK는 RIN-m5F cell line과 일차 배양한 췌장 소도 세포에서 용량 의존적으로 인슐린의 분비를 촉진하였고 이러한 CK의 인슐린 분비 촉진 기전은 ATP-sensitive K⁺ 채널

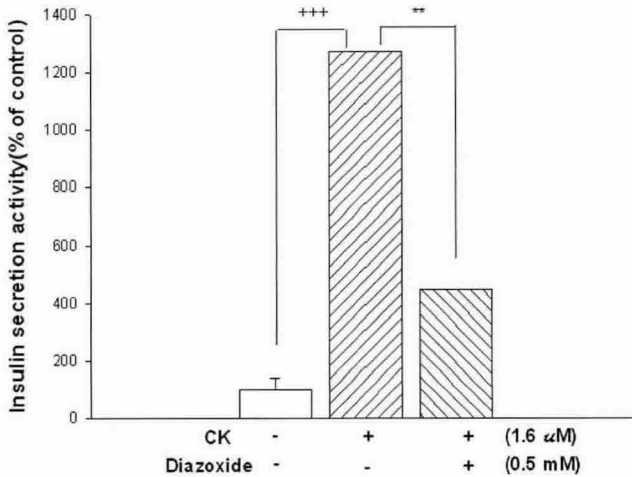


Fig. 3. Effect of CK without or with 0.5 mM diazoxide on glucose-stimulated insulin release from pancreatic islet. ⁺⁺⁺p<0.001 compared to control, ^{**}p<0.01 compared to CK alone.

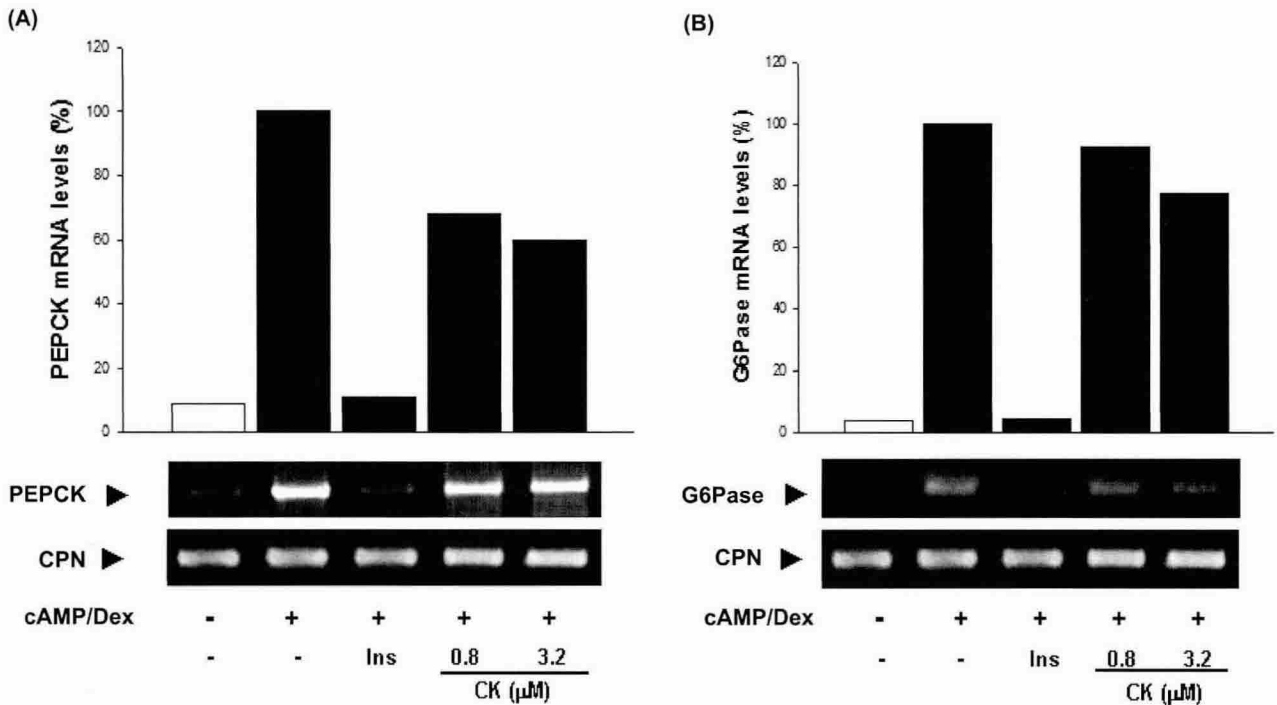


Fig. 4. Effects of CK on dexa-mathasone/cAMP-stimulated PEPCK (A) and G6Pase gene (B) transcription in H4IIE cell lines. H4IIE cells were incubated with 0.8 or 3.2 μ M CK in the presence or absence of 50 nM insulin for 4 hr.

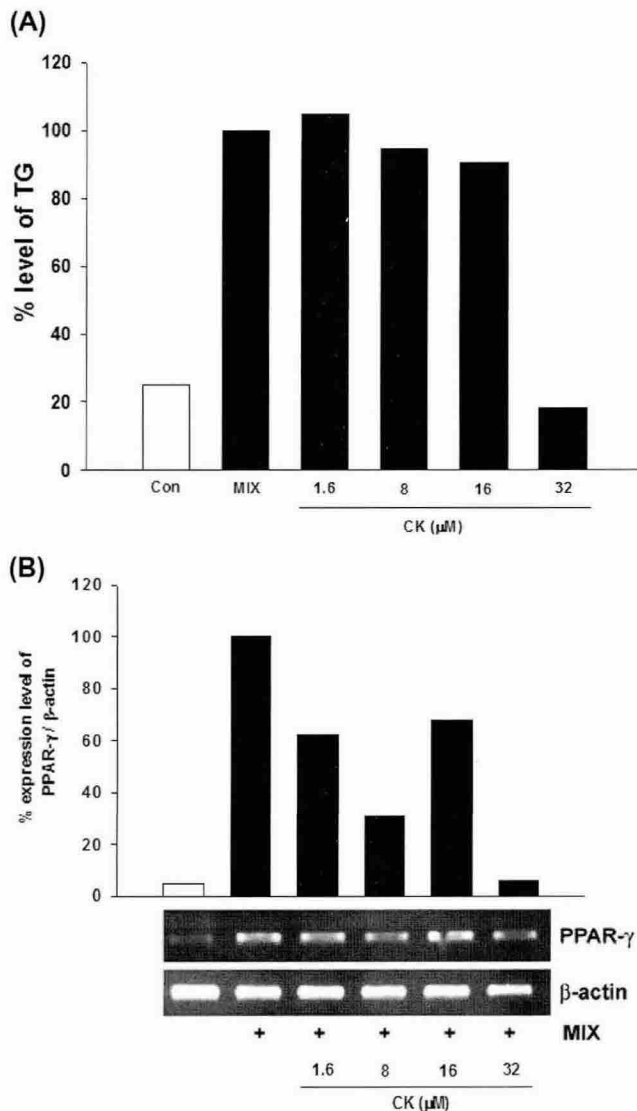


Fig. 5. Effects of CK on TG (A) and PPAR- γ mRNA expression level (B) in 3T3-L1 cell lines. 3T3-L1 preadipocyte was induced by 0.5 mM IBMX, 1 μ M DEX and 10 μ g/ml insulin for 4 days and 10 μ g/ml insulin for another 2 days. At day 8, the cells were stained with oil-red O and measured TG.

의 봉쇄에 의한 것임을 확인하였다. H4IIE cell line에서 간세포내 당신생과 관련된 효소의 발현을 측정된 결과 CK는 dexamethasone/cAMP에 의한 PEPCK와 G6Pase의 발현을 억제하였다. 이로 미루어 볼 때, CK는 간에서 당의 신생을 억제하여 공복 시 혈당을 감소시킬 수 있음을 시사하였다. 또한 3T3-L1 cell line에서 TG의 함량과 PPAR- γ 유전자의 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과 CK는 PPAR- γ 의 발현을 억제하여 결과 지방세포의 분화를 억제하였다. 결론적으로 CK는 췌장에서 ATP-sensitive K⁺ channel을 봉쇄함으로써 인슐린 분비를 촉진시키고 또한 간세포에서 당 신생을 억제함

으로 식후 및 공복 시 혈당을 감소시킬 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 교육인적자원부 주관 POST BK21 프로젝트와 21세기 프론티어 연구개발사업인 자생식물이용기술개발사업단의 연구비 (M106KD010018-07K0401-01810)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Rotshteyn, Y. and Zito, S.W. : Application of modified in vitro screening procedure for identifying herbals possessing sulfonyleurea-like activity, *J. Ethnopharmacol.* **93**, 337-344 (2004).
- Cavaghan, M. A., Ehrmann, D. A. and Polonsky, K. S. : Interaction between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance, *J. Clin. Invest.* **106**, 329-333 (2000).
- Warren, R. E. : The stepwise approach to the management of type 2 diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **65S**, S3-S8 (2004).
- Diabetes Control and Complications Trial Research Group : The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **329**, 977-986 (1993).
- DeFronzo, R. A. : Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* **131**, 281-303 (1999).
- Chevallier, A. : Encyclopedia of herbal medicine, DK Publishing, New York (2000).
- Attele, A. S., Zhou, Y. P., Xie, J. T., Wu, J. A., Zhang, L., Dey, L., Pugh, W., Rue, P. A., Polonsky, K. S. and Yuan, C. S. : Antidiabetic Effects of *Panax ginseng* Berry Extract and the Identification of an Effective Component, *Diabetes* **51**, 1851-1858 (2002).
- 난파항응 : 화학약백과도감, 보육사, 오사카 p.1 (1980)
- Park, J. D. : Recent Studies on the Chemical Constituents of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer), *J. Ginseng Res.* **20**, 389-415 (1996).
- Hasegawa, H., Sung, J. H., Matsumiya, S., Uchiyama, M., Inouye, Y., Kasai, R. and Yamasaki, K. : Reversal of daunomycin and vinblastine resistance in multi drug-resistant P388 leukemia in vitro through enhanced cytotoxicity by triterpenoids. *Planta Med.* **61**, 409-413 (1995).
- Sung, J. H., Hasegawa, H., Matsumiya, S., Uchiyama, M., Ha, J. Y., Lee, M. S. and Huh, J. D. : Metabolism of Ginseng Saponins by Human Intestinal Bacteria, *Kor. J. Pharmacogn.* **26**, 360-367 (1995).

12. Hasegawa, H., Sung, J. H., Matsumiya, S. and Uchiyama, M. : Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria, *Planta Med.* **62**, 453-457, (1996).
13. Sung, J. H., Hasegawa, H., Ha, J. Y., Park, S. H., Matsumiya, S., Uchiyama, M. and Huh, J. D. : Metabolism of Ginseng Saponins by Human intestinal bacteria (Part 2), *Kor. J. Pharmacogn.*, **28**, 35-41 (1997).
14. Hasegawa, H., Sung, J. H. and Huh, J. D. : Ginseng intestinal bacterial metabolite IH901 as a new anti-metastatic agent. *Arch. Pharm. Res.* **20**, 539-544 (1997).
15. Lee, B. H., Lee, S. J., Hui, J. H., Lee, S. Y., Sung, J. H., Hui, J. D. and Moon, C. K. : In vitro antigenotoxic of novel Ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. *Planta Med.* **64**, 500-503 (1998).
16. Lee, S. J., Sung, J. H., Lee, S. J., Moon, C. K. and Lee, B. H. : Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. *Cancer Lett.* **144**, 39-43 (1999).
17. Lee, S. J., Ko, W. G., Kim, J. H., Sung J. H., Lee, S. J., Moon, C. K. and Lee, B. H. : Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of Ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 677-685 (2000).
18. Chomczynski, p. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159(1987).