

Liposome의 光酸化反應에 미치는 人蔘抽出物の 影響 제 2보 . 유동성 및 Lysis에 미치는 영향

백태홍 · 이준홍
한양대학교 자연과학대학 화학과
(1990년 11월 6일 접수)

The Effect of Ginseng Extracts on the Photooxidation of Liposome II. The effect on the changes of fluidity and lysis

Tai-Hong Paik and Jun-Heung Yi
Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 136-075, Korea
(Received November 6, 1990)

Abstract □ To investigate the effect of ginseng extracts on the changes of fluidity and lysis of liposome, reverse phase evaporation vesicle (REV) was employed as model membrane and methylene blue was used as photosensitizer. Fluorescence polarization (p value) that represented fluidity of liposome was increased by photooxidation. All of the ginseng saponin inhibited the increasing rate of p value; the order of effect was ginseng water extract > diol saponin > triol saponin > crude saponin. In trapped G-6-P % measurement for lysis of liposome, ginseng water extract and crude saponin promoted the lysis of liposome. Therefore, we thought that ginseng extracts acted as both antioxidant and detergent.

Keywords □ Ginseng extracts, ginseng saponin, fluidity and lysis of liposome, photooxidation

서 론

세포를 구성하고 있는 생체막은 주로 지질 성분으로 구성되어 있으며, 그중에서도 주성분인 phospholipid는 β 위치에 불포화지방산을 다량 함유하고 있어 과산화 반응을 일으키기 쉽다. 노화된 세포는 일반적으로 젊은 세포에 비하여 유동성이 떨어져 있으며 이때 막지질에 cholesterol의 함량이 높아져 있었다. 따라서, 생체막의 유동성과 cholesterol의 역할에 대한 연구는 많이 되어 있으나¹⁾ 노화현상과 관련이 있는 지질과산화 반응이 생체막에서 일어났을 때의 유동성 변화에 대한 연구는 별로 없다. 그러나 실제 생체막은 그 재료를 얻기도 어려울 뿐만 아니라 거기에 포함되어 있는 여러 가지 물질의 작용으로 인하여 정확한 변화를 측정하기 어려운 경우가 많다. 따라서, 생체

막의 유동성이나 파괴와 같은 물리적 성질을 조사하는 데는 model membrane으로 liposome을 사용하는 것이 일반적이다.

생체막의 유동성은 ESR, NMR, fluorescence polarization 등을 이용하여 측정할 수 있으나, fluorescence polarization은 측정하기가 쉬워 가장 많이 이용되고 있는 방법이다. 이때 fluorescence probe로는 형광을 강하게 내면서 수용액 상태에서는 micelle로 존재하여 형광을 내지않는 diphenylhexatriene(DPH)이 많이 이용되고 있다.

Lipid bilayer 구조는 지질 과산화 반응에 의해서도 파괴되지만 triton등의 계면활성제에 의해서도 그 구조가 파괴되어 현탁도가 감소된다.²⁾ 인삼은 여러 가지 질병에 효과가 있음이 알려져 왔으며, 특히 지질과산화 반응에서의 항산화제로 작용한다는 사실도 보

고되었다.³⁾ 또한, 인삼은 계면활성제로 작용하여 생체내 유효한 지질성분의 흡수를 도와준다.⁴⁾

본 연구에서는 생체막에서 광산화가 일어날 때의 유동성 변화를 조사하기 위하여 model membrane으로 REV liposome에 DPH를 표지하여 광증감제로 methylene blue 존재 하에서 광산화시켜 fluorescence polarization을 측정하였고 광산화에 의한 liposome의 파괴는 glucose-6-phosphate를 trap한 liposome을 사용하여 trapped G-6-P%를 측정하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

phosphatidylcholine(PC)은 Sigma제 Type IV-S soybean PC를 Rouser의 방법⁵⁾으로 silicic acid column chromatography로 정제하여 사용하였다.

Silicic acid(for lipid chromatography), 1,2-diphenyl-1,3,5-hexatriene, D-glucose-6-phosphate(monosodium salt), glucose-6-phosphate dehydrogenase(E.C.1.1.1.49) Type VII(from baker yeast), β -NADP(sodium salt N3139), methylene blue 등은 Sigma 제품을 구입하여 사용하였고, 유기 용매등 일반 시약은 주로 Merck제 특급 시약을 사용하였다.

인삼의 물 추출물 및 diol, triol, crude saponin과 liposome은 본지의 제 1보와 같이 추출 또는 제조하여 사용하였으며, 얻어진 saponin류는 HPLC로 분석하였으며, 얻어진 HPLC chromatogram은 전보⁵⁾에 나타낸 바와 같다.

2. 광산화반응 및 oxidation index 측정

광산화반응과 oxidation index 측정의 방법은 본지의 제 1보에 나타낸 바와 같다.

3. Fluorescence Polarization 측정 및 시료의 제조

Fluorescence polarization(p value)의 측정 시료⁶⁾는 fluorescence probe로 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH)를 사용하여 DPH 1.7 mg을 tetrahydrofuran 0.1 ml에 완전히 용해 시킨 후 이 용액 0.02 ml에 PBS 20 ml를 가하여 약 1000배로 희석하여 현탁액으로 만든 용액 0.2 ml와 liposome 0.2 ml에 PBS 5.6 ml를 가하여 37°C에서 약하게 흔들며 주면서 60분간 incubation 하였다.

p value 측정은 DPH를 표지한 liposome 용액 0.1

ml와 methylene blue를 $4.38 \times 10^{-6} M$ 되게 첨가한 후 PBS를 가하여 전체 부피가 3 ml로 되게한 용액을 37°C를 유지시키면서 광조사하였다. p value는 Shimazu RF-510 spectrofluorometer에 excitation light와 emission light에 각각 polarizer를 장치하여 두 개의 polarizer가 모두 수직일 때(I_{VV})와 emission polarizer만을 수평으로 하였을 때(I_{VH}), 두 개의 polarizer가 모두 수평으로 하였을 때(I_{HH}), excitation polarizer만 수평으로 하였을 때(I_{HV})의 형광 강도를 각각 측정하여 다음과 같이 계산하였다.

$$P = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}} \frac{G}{G}$$

여기서 G는 어떤 반사 평면이 그 평면과 평행으로 편광된 빛을 우선적으로 반사하고 또 편광에 따른 렌즈의 투과도 차이 때문에 생기는 오차를 보정해 주기 위한 인자로서 $G = I_{HV}I_{HH}$ 로 계산된 값이다.

4. Trapped G-6-P% 측정 및 시료의 제조

Trap된 glucose-6-phosphate(G-6-P)%를 측정하기 위한 liposome은 PC 24 mg과 cholesterol 12 mg을 diethylether 3.6 ml이 재용해시킨 용액에 0.3 M glucose-6-phosphate PBS용액 0.6 ml와 PBS 0.4 ml를 가하여 sonication하여 reverse phase evaporation method로 제조한 liposome을 cut off range가 MW 12000-14000인 tubing으로 dialysis하여 trap되지 않은 G-6-P를 제거한 후 다시 PBS를 가하여 전체 부피가 10 ml되도록 제조하였다.

Release되지 않고 liposome내에 trap되어 있는 G-6-P의 %는 Olive등의 방법⁷⁾을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 0.1 M tris-HCl buffer(pH 7.4)로 제조한 0.2 mM β -NADP 용액 0.3 ml와 dialysis한 glucose-6-phosphate dehydrogenase 용액 0.1 ml에 시료 liposome 0.2 ml를 가하여 β -NADP 용액 대신 0.1 M tris-HCl buffer(pH 7.4) 0.3 ml와 효소 용액 0.1 ml에 시료 liposome 0.2 ml를 가한 것을 reference로 하여 UV-Visible spectrophotometer(Kontron Co 제)로 340 mm에서의 흡광도를 released G-6-P로 하고 같은 시료에 15% Triton X-100 20 μ l를 가하여 같은 파장에서의 흡광도를 total G-6-P로 하여 그 차이를 trapped G-6-P의 값으로 하여 조사 되지 않은 상태에서의 값에 대한 백분율을 구하였다. 이때 사용된 glucose-6-phosphate dehydrogenase는 dialysis

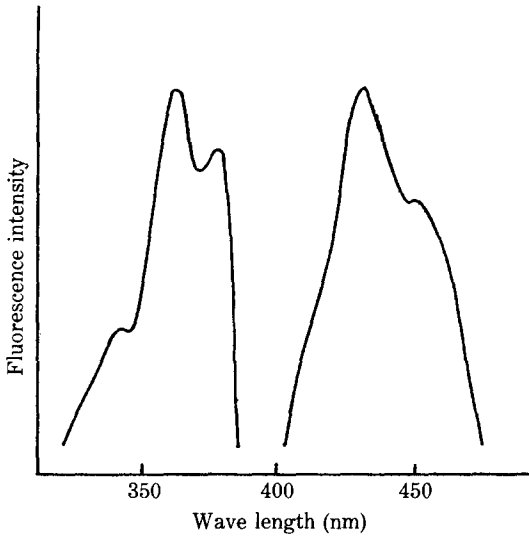


Fig. 1. The excitation and emission spectra of DPH labelled liposome. The liposome solution was incubated at 37°C for 60 min.

하여 ammonium sulfate를 제거한 후 Lowry 법으로 단백질을 정량한 결과 220 µg protein/ml였으며 반응 용액에서의 β-NADP에 대한 activity 가 7.26 unit/m/되도록 1배 희석하여 사용하였다.

결과 및 고찰

DPH를 표지한 liposome 용액의 excitation 및 emission curve는 Fig. 1에서와 같이 excitation 361 nm, emission 428 nm에서 최대 형광 강도를 나타냈으므로 이 파장을 형광 강도 측정 파장으로 하였다.

REV liposome에 DPH를 표지한 liposome용액에서 oxidation index와 p value를 측정한 결과는 Fig. 2에서와 같이 oxidation index가 증가함에 따라 p value도 비례하여 증가하였다. p value는

$$p = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}}$$

로 정의되며 이와 유사한 parameter인 fluorescence anisotropy, r은 다음과 같이 정의된다.

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2 I_{VH}}$$

따라서, 두 parameter사이에는 다음과 같은 관계가

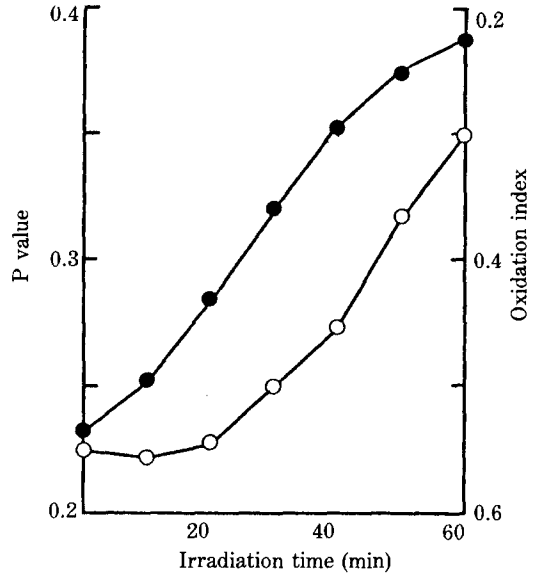


Fig. 2. The relationship between oxidation index and p value. PHD labelled liposome solution irradiation at 37°C in the presence of 4.38 × 10⁻⁶ M methylene blue after incubation for 60 min. ● : oxidation index, ○ : p value.

성립된다.

$$r = \frac{2p}{p-3}$$

Ferrin의 식에 의하면⁹⁾

$$1/r = (1/r_0) \left[1 + \frac{RT\tau}{\eta V_0} \right]$$

$$\eta V_0 = \frac{RT\tau}{r_0/r - 1}$$

여기서 r₀는 fluorescence probe의 움직임이 없을 때의 r값이며, τ는 medium의 종류와 구성에 따라 달라질수 있는 probe의 fluorescence life time이며, R과 T는 각각 기체 상수 및 절대 온도이다. 따라서, fluorescence probe를 포함 하고 있는 medium의 점도 η는 r값에 비례하며 p value와도 같은 관계가 성립 된다. 즉, medium의 유동성은 p value와 반비례한다.

본 실험 결과에서는 liposome의 산화 정도가 커짐에 따라 유동성이 감소되고 있으며, 이것은 lipid bilayer를 형성하고 있는 liposome 내의 phospholipid가

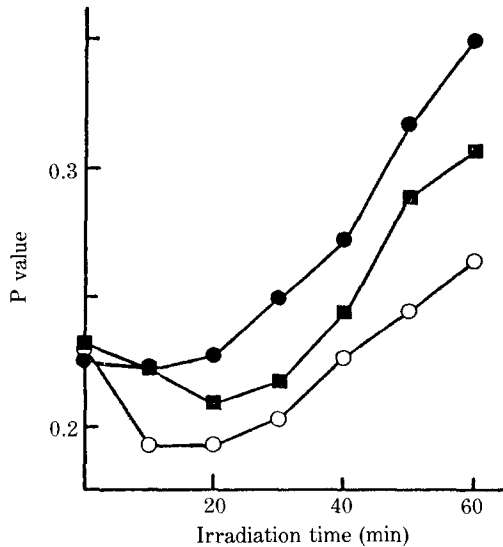


Fig. 3. The effect of ginseng water extract on the change of p value in liposome by photooxidation. The reaction condition was the same as Fig. 2 with the exception that ginseng water extract was added. ● : none, ■ : 10⁻³%, ○ : 10⁻²%.

β위치에 불포화 지방산을 다량 함유하고 있어 여기에 과산화반응이 일어나면 원래 *cis* 형태로 존재하고 있던 이중결합이 *trans* 형태로 바뀔 때 주위의 fatty acid chain과의 packing이 수월해져서 lipid bilayer 내의 phospholipid 간의 비극성 상호 작용이 증가하여 유동성이 감소되는 것으로 생각된다.

인삼 추출물이 광산화에 따른 유동성 감소에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3에서와 같이 유동성의 감소를 억제하는 효과를 나타냈으며 첨가된 인삼의 물 추출물의 농도가 클수록 그 효과가 더 큰 것으로 나타났다.

이것은 인삼 saponin이 지질 과산화반응에서 항산화제로 작용한다는 결과³⁾를 비추어 볼 때 인삼의 물 추출물내의 유효 성분이 지질의 과산화반응을 억제함으로써 liposome의 유동성 감소를 억제하는 것으로 생각된다. 이때 광조사가 시작된 후 10분 동안은 p value가 감소하여 유동성이 증가 하는 경향을 나타내었으나 이것은 표지된 DPH의 움직임이 커져서 광조사시의 조건으로 적응해 가고 있기 때문이라고 생각된다.

Diol계, triol계 및 crude saponin에 대한 실험 결과도 같은 경향을 나타내고 있었으며(Fig. 4, 5, 6) 그 효과는 table 1에서와 같이 인삼의 물 추출물이 가장

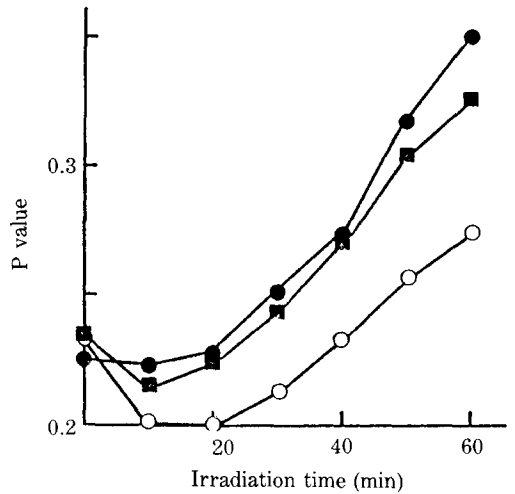


Fig. 4. The effect of diol saponin on the change of p value in liposome by photooxidation. The reaction condition was the same as Fig. 2 with the exception that diol saponin was added. ● : none, ■ : 10⁻³%, ○ : 10⁻²%.

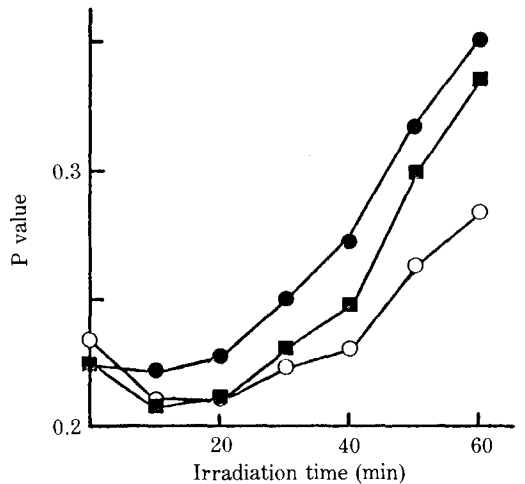


Fig. 5. The effect of triol saponin extract on the change of p value in liposome by photooxidation. The reaction condition was the same as Fig. 2 with the exception that triol saponin was added. ● : none, ■ : 10⁻³%, ○ : 10⁻²%.

컸으며 그 다음은 diol계, triol계, crude saponin순이었다.

Liposome에서 광산화 반응이 일어나는 동안 liposome의 파괴 정도를 조사하기 위하여 table 2와 같이 glucose-6-phosphate(G-6-P)를 포획시킨 liposome을 광조사하여 시간에 따른 340 nm에서의 흡광도를 측

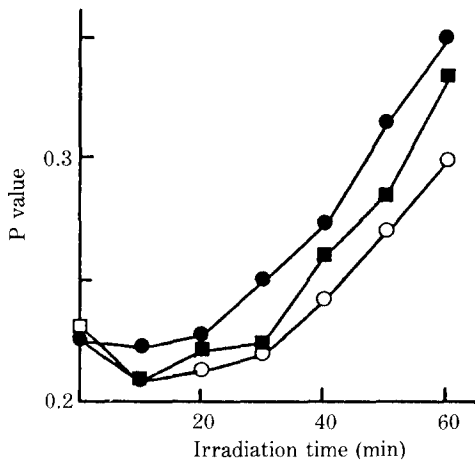


Fig. 6. The effect of crude saponin on the change of p value in liposome by photooxidation. The reaction condition was the same as Fig. 2 with the exception that crude saponin was added, ○: not, □: 10⁻³%, ●: 10⁻².

Table 1. The comparison of the effects of ginseng saponins on the change of p value by photooxidation

Irradiation time (min)	None	Water Extract	Saponin		
			Diol	Triol	Crude
0	0.225	0.230	0.233	0.234	0.226
10	0.222	0.193	0.201	0.211	0.208
20	0.217	0.193	0.200	0.212	0.212
30	0.256	0.202	0.212	0.223	0.219
40	0.273	0.226	0.232	0.231	0.242
50	0.317	0.243	0.256	0.263	0.270
60	0.350	0.264	0.273	0.283	0.298

정하여 이것을 released G-6-P로 하고 Triton X-100을 가하여 모든 liposome을 파괴시킨 상태에서 측정된 흡광도를 total G-6-P로 했을 때 두 값의 차이는 liposome내의 trapped G-6-P의 양에 해당된다. 따라서, 광조사를 하지않았을 때 trapped G-6-P의 값을 100으로 하였을 때 광조사 시간에 따른 trapped G-6-P %는 감소하고 있었으며, 이것은 광조사에 의하여 liposome의 파괴가 촉진되고 있음을 뜻한다.

이러한 결과는 지질 과산화 반응의 결과로 phospholipid의 fatty acid chain에 생성된 lipid hydroperoxide가 2차적인 산화 분해를 일으킴으로써 해서 lipid bilayer 구조에 손상을 주기 때문인 것으로 생각되어,

Table 2. Change of trapped G-6-P % in liposome by photooxidation

Irradiation time (min)	Released* G-6-P	Total* G-6-P	Trapped G-6-P	Trapped G-6-P %
0	0.231	0.351	0.120	100
30	0.310	0.354	0.044	36.7
60	0.336	0.360	0.024	20

*The values are absorbances at 340 nm.

Table 3. The effect of ginseng saponins on lysis of liposome

Irradiation time (min)	Water extract		Crude saponin
	None	Water extract	
30	36.7	32.4	25.0
60	20	16.9	21.4

The values are trapped G-6-P %.

vitamin E를 결핍시킨 erythrocyte에서 hemolysis가 쉽게 일어나는 이유가 지질 과산화 반응 때문인 것으로 설명한 보고¹⁰⁾와 일치한다.

인삼의 물 추출물 및 crude saponin의 광산화에 의한 liposome의 파괴에 미치는 영향을 조사한 결과는 table 3에서와 같이 liposome의 파괴를 촉진시키는 것으로 나타났다.

오래 전부터 crude saponin은 hemolysis를 일으키지 않는다¹¹⁾고 알려져 왔으며 R₀등과 같은 saponin 분획의 일부만이 hemolysis를 일으키는 것으로 보고되고 있어¹²⁾ 본 실험의 결과와 상반되고 있다. 그러나 인삼 saponin류는 항산화 작용과 함께 계면 활성제로서의 작용도 있어¹³⁾ 인삼 saponin이 cholesterol¹⁴⁾이나 vitamin E 등⁴⁾ 지용성 성분과 공존할 때 critical micelle concentration(CMC)이 크게 저하한다고 보고하고 있다.

따라서, 본 실험에서는 지질 과산화 반응의 결과로 liposome 구조에 손상을 받아서 bilayer 내부의 비극성 부분이 드러나면 CMC에 가까운 높은 농도의 saponin류가 2차적으로 작용하여 파괴를 촉진시키는 것으로 생각된다.

요 약

인삼 saponin류가 광산화에 의한 생체막의 유동성

변화 및 파괴에 미치는 영향을 조사하기 위하여 model membrane으로 REV liposome을 사용하여 광증 감제로 methylene blue 존재하에 광조사하여 fluorescence polarization을 측정하여 유동성 변화를 검토한 결과 인삼 saponin류는 과산화에 의한 liposome의 유동성 감소를 억제하였으며 그 효과는 인삼의 물 추출물 <diol계> triol계> crude saponin 순으로 컸으며 이것은 인삼 saponin이 지질 과산화 반응을 억제하기 때문인 것으로 생각되었다.

파괴 정도를 알기 위한 trapped G-6-P%를 측정한 결과는 인삼 saponin이 liposome의 파괴를 촉진시켰으며 이것은 지질 과산화 반응으로 손상을 받은 liposome에 인삼 saponin이 계면 활성제로 작용하였기 때문인 것으로 생각되었다.

인용문헌

1. Dufource, E.J., Parish, E.J., Chitarakorn, S. and Smith, I.C.P.: *Biochem.*, **23**, 6062 (1984).
2. Alonso, A., Urbaneja, M.A., Goni, F.M., Carmona, F.G., Canovas, F.G. and Juan, C.G.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **902**, 237 (1987).
3. Paik, T.H., Hong, J.T. and Hong, S.Y.: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **14**, 130 (1982).
4. Paik, T.H. and Yi, J.H.: *Korean Biochem. J.*, **19**, 199 (1986).
5. Paik, T.H., Chun, H.J., Kang, B.S. and Hong, J.T.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **13**, 234 (1989).
6. McVay, E., Yguerabide, J., Hanson, D.C. and Clark, W.R.: *Biochem.*, **106**, (1981).
7. Olive, C. and Levy, H.R.: *Methods Enzymol.*, **41**, 196 (1975).
8. Vanderkooi, J.H., Stevan, F. Chance, B. and Cooper, R.A.: *Biochem.*, **13**, 1589 (1974).
9. Krishnamurthy, S, Jayanthi Bai, N. and George, T.: *Indian. J. Biochem. Biophys.*, **21**, 361 (1984).
10. Yonegawa, M.: *Keio Igaku*, **6**, 733 (1926).
11. Namba, T., Yoshigaki, M., Tomimori, T., Kohashi, K., Mitsui, K. and Hase, J.: *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 459 (1973).
12. Joo, C.N., Choi, I.S., Lee, S.J., Cho, S.H. and Son, M.H.: *Korean Biochem. J.*, **6**, 185 (1973).
13. Joo, C.N. and Lee, S.J.: *Korean Biochem. J.*, **10**, 59 (1977).