

인삼 사포닌이 간세포 독성에 미치는 영향

김선여 · 김영중 · 변순정 · 김 은*

서울대학교 약학대학, 한국인삼연구연구소*

The Effect of Ginsenosides on Galactosamine-induced Hepatotoxicity

Sun Yeou Kim, Young Choong Kim, Soon Jung Byun and Eun Kim*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742 and

*Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Daejeon 305-345, Korea

Abstract—Liver protective effects of ginsenosides as well as fractions of dammarane glycosides of *Panax ginseng* were studied using galactosamine (GalN)—induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Preventing effects on GalN-induced hepatotoxicity were found both microscopic observation and determination of GPT level with total dammarane glycosides fraction and 20(S)-ginsenoside-Rb₁ as well as 20(S)-ginsenoside-Rg₁ at the concentration of 50 µg/ml. The syntheses of both protein and RNA were significantly increased by the treatment of 50 µg/ml of total dammarane glycoside fraction, 20(S)-ginsenoside-Rb₁, -Rc, -Re and -Rg₁, respectively in both normal and GalN-induced cytotoxic hepatocytes.

Keywords—Cytotoxicity · dammarane glycosides · ginsenosides · GalN · hepatocytes

인삼은 기초대사를 항진시키고¹⁾, 생체내에서 단백질의 합성을 촉진하며²⁾, 빈혈, 당뇨병, 고혈압에 대한 저항력을 나타내고³⁾, 또한 피로를 회복시키고^{4,5)}, stress에 대한 방어작용이 있으며⁶⁾, 중추신경계를 강화시키는 등^{7,8)} 다양한 효과가 알려져 강장약으로 옛부터 사용되어 온 것을 과학적으로 뒷받침하고 있다. 그러나 아직도 인삼의 약효에 대해서 체계화된 정설을 제시하지 못하고 있는데 이는 여러가지 문제점들을 생각할 수 있겠으나 우선 인삼의 효과가 비특이적이며, 급성효과를 가지고 있지 않아 장기간에 걸쳐 투여하지 않으면 약효를 나타내지 않으므로 적합한 연구방법을 찾기가 어려운데 그 이유가 있었던 것으로 생각할 수 있다. 이에 본 연구에서는 실험동물을 대신하여 극미량으로 세포 수준에서 그 효과를 찾을 수 있는 방법인 일차 세포 배양법으로 준비한 흰쥐의 간세포를 이용

하여 간에 미치는 인삼의 효과를 알아보았다. 간세포에 미치는 인삼의 작용은 정상적인 간세포에서 보다는 병변을 일으킨 간세포에서 더욱 뚜렷할 것으로 사료되어 감염 발생시에 일어나는 병변과 유사한 병변을 일으키는 것으로 알려진 galctosamine으로 간세포에 인위적으로 손상을 일으키면서 인삼이 이에 어떻게 작용하는 지를 알아보았다. 인삼의 dammarane계 glycosides 분획물은 50 µg/ml의 농도에서 galactosamine에 의하여 손상을 입힌 흰쥐의 간세포로부터 유리되는 GPT값을 감소시키는 경향을 보였으며 또한 단백질 및 RNA합성을 증가시키는 경향을 보였으나, DNA합성에는 아무런 영향을 미치지 못하는 것을 이미 보고한 바 있다.⁹⁾ 이와같이 dammarane계 glycosides 분획물이 손상을 입은 간세포를 회복시키는 경향을 나타내는 점으로 미루어보아 dammarane계 glycosides 분획물에 함유

되어 있는 20여개의 ginsenosides중에는 뚜렷한 간 보호작용을 갖는 ginsenoside가 있을 수 있다고 사료되어 본 연구에서는 순수하게 분리한 20 (S)-ginsenoside-Rb₁, -Rc, -Re 및 -Rg₁의 간보호 작용을 일차배양한 흰쥐의 간세포를 이용하여 알아보았다.

실험방법 및 재료

재료 및 시약—본 실험에 사용한 인삼은 강화산 6년근이며, 흰쥐(Wistar, male, 150~200 g)는 서울대학교 실험동물 사육실에서 공급받았다. 조직배양에 필요한 시약 및 기타 시약들은 Sigma Chem. Co. (USA) 제품을 사용하였다. 방사성 동위원소 및 Aquasol은 NEN Research Products (USA)에서 구입하여 사용하였다.

인삼 dammarane계 glycosides의 제조—인삼 500g의 메탄올추출물(1L×3회)을 감압농축한 후, 농축물을 최소량의 물에 녹이고 ether로 세척하여 유상물질을 제거하였다. 물층을 n-BuOH로 추출하여 총 dammarane계 glycosides 분획물을 얻었으며, n-BuOH층을 5% NaOH로 처리한 후 n-BuOH층을 농축하여 panaxatriol계 glycosides 분획물을 얻고 NaOH층을 1N HCl로 중화하고 중화층을 다시 n-BuOH로 추출 농축하여서 panaxadiol계 glycosides 분획물을 얻었다.^{10,11)} 순수하게 분리한 20(S)-ginsenoside-Rb₁, Rc, -Re 및 -Rg₁은 한국인삼연초연구원으로부터 기증 받았다.

흰쥐의 간세포 배양—간세포는 몸무게 150~200g 되는 음성 흰쥐로부터 Berry의 방법을 약간 수정한 방법¹²⁾으로 Scheme I과 같이 분리하여 5×10^5 cells/ml을 배양용기(Falcon, 15×24 mm)에 이식하였다. 배양액은 Waymouth's MB 751/1 medium, 10% fetal calf serum, 2.0 mg/ml bovine serum albumin(fraction V), 10^{-6} M dexamethasone, 10^{-7} M insulin, 5.32×10^{-2} M L-serine, 4.09×10^{-2} M L-alanine, 2.67×10^{-2} M NaHCO₃, 10,000 IU/100 ml penicillin, 10,000 IU/100 ml streptomycin과 500 μg/100 ml amphotericin B로 구성된 배양액을 사용하였다.

세포의 배양—일정한 습도를 유지하는 37° 배

Wistar male rat, 150-200 g
 injection of urethane by i.p.
 Hepatic portal vein cannulation
 Perfusion of liver and cutting of liver inferior vena cava
 addition of collagenase
 Cannulation of superior vena cava and ligation of inferior vena cava
 Removal of liver from the body and release hepatocytes by gentle swirling of liver capsule
 Filtration of the isolated hepatocytes through 250 μm nylon mesh
 centrifugation at 50 g, 4 min
 Inoculation on collagen-coated dish

Scheme I. Isolation of hepatocytes.

양기에서 공기(95%)와 CO₂(5%)의 혼합 기체를 계속 공급하면서 세포를 배양하였다.

Galactosamine(GalN)에 의해 유도된 간 독성의 측정—간세포를 1.5시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 1.5 mM GalN과 인삼분획물을 함유한 배양액으로 갈아준 다음 간세포를 배양한 지 48시간 후에 그 배양액을 채취하여 glutamic-pyruvic transaminase(GPT)의 활성을 Reitman-Frankel의 방법¹³⁾을 이용하여 측정하였다.

단백질 생합성 측정—단백질의 생합성은 [³H]-leucine을 배양액에 첨가하여 방사성 동위원소로 표지된 leucine이 배양세포의 단백질에 incorporation되는 정도를 측정하였다.¹⁴⁾ 간세포를 1.5시간 동안 배양한 후 배양액을 제거하고 1.5 mM GalN과 인삼분획물을 함유한 배양액으로 갈아준 다음, [³H]-leucine(155 μCi/mM)을 첨가하여 다시 24시간 동안 더 배양하였다. 배양액을 제거한 다음 간세포를 Hank's balanced salt solution으로 3회 세척한 후 10% trichloroacetic acid (TCA) 1 ml로 단백질을 침전시키고 잔존하는 TCA를 ethanol과 ether의 혼합용매(3:1, v/v) 1 ml로 제거하였다. 침전시킨 단백질을 1 N NaOH 200 μl로 용해시킨 다음 100 μl만을 취하여 aquasol 5 ml에 가한 후 방사능을 측정하였다.

DNA 생합성 측정—DNA 생합성의 측정은 [³H]-leucine대신 [³H]-thymidine(6.67 μCi/mM)을 사용하여 단백질 생합성 측정방법과 비슷한

방법으로 수행하였다.¹⁴⁾

RNA 생합성 측정—RNA 생합성의 측정은 [³H]-leucine 대신 [³H]-uridine(37.5 μCi/mM)을 사용하여 단백질 생합성 측정방법과 비슷한 방법으로 수행하였다.¹⁴⁾

통계처리—통계적 유의성 검토는 대조치로부터의 변동을 “ANOVA” test로 하였다. p값이 5% 미만일 때는 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과 및 고찰

인삼 성분이 간에 어떻게 작용하는가를 일차 배양 흰쥐의 간세포를 이용하여 알아 보았다. 간에 대한 인삼의 작용은 정상 간세포에서 보다는 병변을 일으킨 간세포에서 뚜렷하게 나타날 것으로 사료되어 기능면이나 형태에 있어서 바이러스성 간염과 유사한 병변을 일으키는 것으로 알려진 galactosamine¹⁵⁾으로 인위적인 병변을 일으킨 간세포에 인삼의 dammarane계 glycosides 분획물 및 20(S)-ginsenoside-Rb₁, 20(S)-ginsenoside-Rc, 20(S)-ginsenoside-Re 및 20(S)-ginsenoside-Rg₁ 각각을 50 μg/ml씩 투여하여 간세포에서부터 배양액중으로 유리된 GPT값을 측정하여 알아보았다(Table 1). 인삼의 단일 성분들 중의 20(S)-ginsenoside-Rb₁, 20(S)-ginsenoside-Rc, 20(S)-ginsenoside-Re 및 20(S)-ginsenoside-Rg₁은 간세포로부터 유리되는 GPT값을 유의성

있게 감소시킴으로써 간 보호 작용을 나타냈다. 특히 20(S)-ginsenoside-Rb₁과 -Rg₁은 뚜렷한 간 보호 작용을 나타냈다. 20(S)-Ginsenoside-Rb₁이나 -Rg₁이 50 μg/ml의 농도에서 유의성있는 간 보호 작용을 나타내는 것으로 미루어보아 dammarane계 glycosides 분획물의 경우 동등한 수준의 간 보호 효과를 발현시키기 위하여서는 상당한 양이 요구되는 것으로 추정되나 이 경우 다량의 투여에 의한 세포 독성 문제를 고려하지 않을 수 없겠다. 그러나 정상 간세포의 경우 total dammarane glycosides 분획만 유의성있게 GPT 값을 감소시키고, 20(S)-ginsenoside-Re의 경우는 오히려 GPT 값을 증가시키는 경향을 보이는 것으로 미루어 보아, 정상 세포의 경우 20(S)-ginsenoside-Re를 고농도로 투여할 경우 세포독성을 일으킬 수도 있다.

인삼성분, 특히 20(S)-ginsenoside-Rb₁ 및 20(S)-ginsenoside-Rg₁의 간보호 효과는 현미경으로도 관찰할 수 있었다. 배양 후 48시간이 지난 정상 간세포는, 선명한 핵을 가지는 다면체로 배양 용기에 부착되어, 망을 형성하며 단층으로 건강하게 잘 자랐다(Fig. 1A). 그러나 galactosamine으로 병변을 일으킨 간세포의 경우는 핵이 소멸되고 세포의 크기나 모양이 불규칙한 비정상적인 세포 형태를 유지하거나 일단 부착되어 자라던 세포들이 괴사되면서 떨어져나가고 있었다(Fig. 1B). 그러나 20(S)-ginsenoside-Rb₁이나 20(S)-ginsenoside-Rg₁을 50 μg/ml 투여한 경

Table 1. Effects of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on the galactosamine-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes

Substance	Concentration (μg/ml)	GPT(%)	
		GalN(+)	GalN(-)
Control	0	100 ± 5 ^{a)}	100 ± 5 ^{b,c)}
Total dammarane glycosides fraction	50	68 ± 6*	48 ± 2*
Panaxadiol glycosides fraction	50	77 ± 13	66 ± 8
Panaxatriol glycosides fraction	50	76 ± 9	52 ± 3
20(S)-Ginsenoside-Rb ₁	50	43 ± 9**	100 ± 8
20(S)-Ginsenoside-Rc	50	70 ± 6*	108 ± 6
20(S)-Ginsenoside-Re	50	64 ± 7*	124 ± 7
20(S)-Ginsenoside-Rg ₁	50	50 ± 2**	102 ± 8

Control GPT values: a) 84.0 ± 4.00 IU/L; b) 28.3 ± 1.52 IU/L; c) Mean ± standard deviation, Significantly different from control: *p < 0.05, **p < 0.01.

Table II. Effects of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on syntheses of protein, RNA and DNA in galactosamine-induced cytotoxic hepatocytes

Substance(50 μ g/ml)	Protein [3 H]-leucine incorporation (dpm/ 5×10^5 cells)	RNA [3 H]-uridine incorporation (dpm/ 5×10^5 cells)	DNA [3 H]-thymidine incorporation (dpm/ 5×10^5 cells)
Control (-GalN)	1,559 \pm 697	1,935 \pm 180	1,042 \pm 395 ^{a)}
Control (+GalN)	411 \pm 65	620 \pm 150	645 \pm 18
Total dammarane glycosides fraction	588 \pm 136	1,041 \pm 120	986 \pm 36
Panaxadiol glycosides fraction	460 \pm 180	788 \pm 106	860 \pm 112
Panaxatriol glycosides fraction	549 \pm 170	976 \pm 55	949 \pm 27
20(S)-Ginsenoside-Rb ₁	738 \pm 170**	1,921 \pm 62***	887 \pm 24
20(S)-Ginsenoside-Rc	1,099 \pm 156***	1,470 \pm 99**	689 \pm 24
20(S)-Ginsenoside-Re	646 \pm 163*	1,215 \pm 55*	726 \pm 75
20(S)-Ginsenoside-Rg ₁	991 \pm 269**	1,471 \pm 49**	842 \pm 76

a) Mean \pm standard deviation.

Significantly different from control: *p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001.

Table III. Effects of dammarane glycosides of *Panax ginseng* on syntheses of protein, RNA and DNA in primary cultured rat hepatocytes

Substance(50 μ g/ml)	Protein [3 H]-leucine incorporation (dpm/ 5×10^5 cells)	RNA [3 H]-uridine incorporation (dpm/ 5×10^5 cells)	DNA [3 H]-thymidine incorporation (dpm/ 5×10^5 cells)
Control	1,559 \pm 697	1,935 \pm 180	1,042 \pm 395 ^{a)}
Total dammarane glycosides fraction	3,139 \pm 673*	2,928 \pm 180**	1,447 \pm 127
Panaxadiol glycosides fraction	3,306 \pm 168*	2,787 \pm 30**	1,314 \pm 152
Panaxatriol glycosides fraction	3,765 \pm 205**	2,493 \pm 289*	1,043 \pm 112
20(S)-Ginsenoside-Rb ₁	4,163 \pm 422**	3,311 \pm 69***	1,072 \pm 139
20(S)-Ginsenoside-Rc	2,485 \pm 745	2,201 \pm 188	865 \pm 418
20(S)-Ginsenoside-Re	2,305 \pm 740	2,079 \pm 240	978 \pm 256
20(S)-Ginsenoside-Rg ₁	4,235 \pm 220***	2,639 \pm 49**	1,306 \pm 152

a) Mean \pm standard deviation.

Significantly different from control: *p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001.

우에는 정상세포 수준에는 미치지 못하였으나 정상적인 형태를 유지하는 세포들이 생존해 있었다(Fig. 1C). 또한 살아있는 세포와 사멸된 세포를 쉽게 구분할 수 있는 방법인 dye exclusion 검사를 하여보았다. Trypan blue 염색액(0.4%)으로 세포를 염색한 결과, 정상세포의 경우는 극히 일부분을 제외하고는 세포내의 핵이 염색되지 않은 상태로 간세포 특유의 세포형태를 유지하였으나, galactosamine으로 병변을 일으킨 세포의 경우는 핵이 염색되고 거의 간세포 특유의 형태를 찾기 어려웠다. 그러나 20(S)-ginsenoside-Rb₁이나 20(S)-ginsenoside-Rg₁을 50

μ g/ml 투여한 경우에는 정상 수준에는 미치지 못하였으나 세포내의 핵이 염색되지 않은 상태로 간세포 특유의 세포형태를 유지하는 세포들을 확인할 수 있었다.

Galactosamine에 의한 간의 병변은 간에서의 단백질 및 RNA 합성이 galactosamine에 의하여 억제되어 일어나는 것으로 알려져있다.¹⁶⁾ 따라서 20(S)-ginsenoside-Rb₁, -Rc, -Re 및 -Rg₁의 간 보호 작용이 galactosamine에 의하여 억제된 단백질 및 RNA 합성을 회복시키므로서 나타내는 효과인지를 알아 보기 위하여 방사성동위원소로 표지된 전구물질을 간세포 배양액에 첨가하

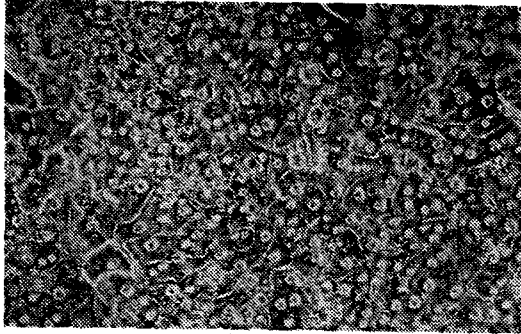


Fig. 1A. Primary cultured rat hepatocytes incubated for 48 hrs. ($\times 200$).

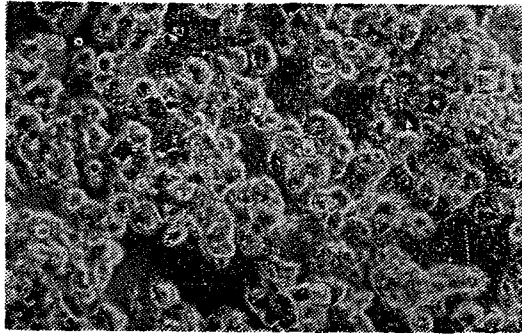


Fig. 1B. Primary cultured rat hepatocytes treated with GalN. After 1.5 hr preincubation, hepatocytes were treated with 1.5 mM GalN and further incubated for 48 hrs. ($\times 200$).

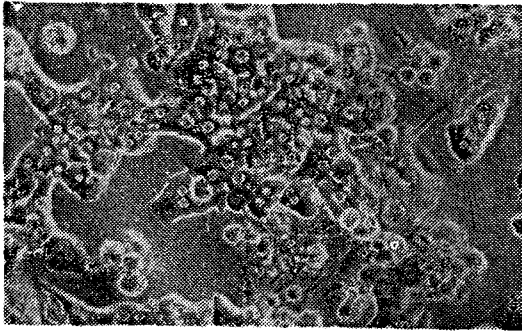


Fig. 1C. Primary cultured rat hepatocytes treated with GalN and 20(s)-ginsenoside-Rb₁. After 1.5 hr preincubation, hepatocytes were treated with 1.5 mM GalN and 50 μ g/ml 20(s)-ginsenoside-Rb₁ and then further incubated for 48 hrs. ($\times 200$).

여 간세포내의 단백질이나 RNA에 incorporation 되는 정도를 측정하였다(Table II). 그 결과 galactosamine으로 병변을 일으킨 간세포에서의

단백질 및 RNA 합성은 20(S)-ginsenoside-Rb₁, -Rc, -Re 및 -Rg₁ 모두에 의하여 유의성있게 증가되었으며 DNA합성은 별다른 영향을 받지 못하는 것으로 나타났다. 이러한 인위적으로 병변을 일으킨 간세포에서의 ginsenosides-Rb₁ 및 -Rg₁의 단백질 및 RNA합성 촉진 효과는 정상 간세포에서도 확인할 수 있었다(Table III). Panaxadiol glycosides 분획물, panaxatriol glycosides 분획물 및 20(S)-ginsenoside-Rb₁과 -Rg₁을 각각 50 μ g/ml씩 투여하였을 경우 단백질 합성은 거의 2배 이상 증가되었으며 RNA 합성도 유의성있게 증가되었다. 그러나 DNA 합성은 정상 간세포에서도 인삼성분에 의하여 아무런 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 인삼의 dammarane계 glycosides가 인위적으로 병변을 일으킨 간세포에서는 물론 정상상태의 간세포에서 단백질 및 RNA 합성을 뚜렷하게 촉진시킨다는 결과는 인삼의 강장작용을 뒷받침하는 것으로 볼 수 있겠다.

결 론

인삼의 20(S)-ginsenoside-Rb₁, -Rc, -Re 및 -Rg₁은 50 μ g/ml의 농도에서 galactosamine으로 인위적인 병변을 일으킨 간세포를 유의성 있게 회복시켰으며 병변을 일으킨 간세포에서는 물론 정상 간세포에서도 단백질 및 RNA 합성을 유의성 있게 증가시켰다.

감사의 말씀—본 연구에 사용된 20(S)-ginsenoside-Rb₁, -Rc, -Re 및 -Rg₁을 기증하여 주신 한국인삼연초연구원에 깊이 감사드리며, 본 연구에 소요된 경비의 일부는 한국과학재단의 연구비로 충당되었으며 이 연구비 지원에 깊이 감사하는 바이다.

〈1991년 2월 11일 접수 : 10월 9일 수리〉

문 헌

1. Yokozawa, T., Semo, H. and Oura, H.: *Chem. Pharm. Bull.* 23, 3095(1975).
2. Oura, H., Nakashima, S. and Tusukada, K.: *Chem. Pharm. Bull.* 20, 980(1972).
3. Korean Ginseng Research Institute, *Korean*

- ~~Ginseng~~, Republic of Korea, p-173(1978).
- ~~Saito~~, H., Yoshida, Y. and Takaki, K.: *Japan J. Pharmacol.* 24, 119(1974).
- ~~Korean~~ Ginseng Research Institute, *Korean Ginseng*, Republic of Korea, p-116(1978).
- ~~Takagi~~, K., Saito, H. and Nabata, H.: *Japan J. Pharmacol.* 22, 245(1972).
- ~~Saito~~, H., Saito, H. and Takagi, K.: *Japan J. Pharmacol.* 23, 29(1973).
- ~~Reitman~~, I.I. and Dardymov, I.V.: *Ann. Rev. Pharmacol.* 9, 419(1969).
- ~~Lee~~ M.J., Song, J.H. and Kim, Y.C.: *Yakhak Gwan* 34, 341(1990).
- ~~Shibata~~ S., Tanaka, O., Soda, M. and Tsushima, S.: *Tetrahedron Lett.* 12, 795(1963).
11. Shibata, S., Tanaka, O., Soda, M. and Tsushima, S.: *Chem. Pharm. Bull.* 11, 759(1963).
12. Berry, M.N. and Friend, D.S.: *J. Cell Biol.* 43, 506(1969).
13. Reitman, S. and Frankel, S.: *Ame. J. Clin. Path.* 28, 56(1957).
14. Markelonis, G., Oh, T.H. and Derr, D.: *Exp. Neurol.* 70, 598(1980).
15. Groot, H. and Nool, T., *Exp. Mol. Pathol.* 100, 25(1980).
16. Scrutton, M.C., Serroni, A., Nicolini, C. and Farber, J.L.: *Amer. J. Path.* 79, 579(1975).