

인삼사포닌의 고 cholesterol 혈증 강화작용에 관한 연구*

윤수희 · 주충노
연세대학교 이과대학 생화학과
(1993년 3월 23일 접수)

Study on The Preventive Effect of Ginsenosides Against Hypercholesterolemia and Its Mechanism

Soo-Hee Yoon and Chung-No Joo
Department of Biochemistry, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
(Received March 23, 1993)

Abstract□The preventive effect of the saponin fraction of *Panax ginseng* C.A. Meyer against hypercholesterolemia was demonstrated by assaying the cholesterol and triacylglyceride level of the blood serum and liver of rats fed high-cholesterol diet with and/or without ginsenoside. To understand the mechanism of the preventive action of ginsenoside, ginsenoside effect on LDL receptor binding ability, cholesterol level, and cAMP level of Chinese hamster ovary (CHO) cells cultured under various conditions were examined. When LDL (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to the culture medium for CHO cell culture, LDL receptor binding activity of the cell was suppressed down to 58% of that of normal group. Ginsenosides at $10^{-2}\%$ and $10^{-3}\%$ level (w/v) were shown to exert an appreciable stimulatory effect on CHO cell LDL receptor activity, which partially overcame the suppression due to the presence of LDL (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the medium. Ginsenosides also reduced the increased cholesterol level of test group almost to that of normal group, and it increased cAMP level, which was usually reduced to 55% of that of the normal group due to the presence of LDL in the medium. Comparison of K_d and B_{max} value of CHO cells cultured under different conditions revealed that this stimulation was due not to the receptor's binding affinity but to its number. Addition of ginsenoside ($10^{-2}\%$) decreased the uptake of taurocholic acid as much as 20% at the actively transporting everted ileal sacs, but it failed to form a large mixed micelles with taurocholic acid, which was one of the proposed mechanisms by which ginsenoside inhibits bile acid reabsorption. From the above results, it seemed likely that ginsenoside prevented hypercholesterolemia by decreasing cholesterol level in cells thereby relieving the inhibition of LDL receptor synthesis by cholesterol and also by inhibiting bile acid reabsorption from the small intestine.

Key words□LDL receptor, cholesterol, bile acid reabsorption

서 론

서구 선진국에서 뿐 아니라 우리나라에서도 높은 사망원인 중의 하나인 동맥경화증의 가장 직접적 원인 중의 하나인 고 cholesterol 혈증은 체내 choleste-

rol의 생성과 소모의 불균형에 기인한다. Cholesterol은 동물세포막에 존재하면서 세포막의 유동성과 물질 투과성을 조절하는 물질이며 steroid 호르몬, 비타민 D, 그리고 담즙산과 같은 생리적으로 중요한 물질의 전구체이지만 혈액내의 cholesterol 함량이 과다하면 atherosclerotic plaque를 형성하여 각종 질환을 유발할 위험성이 있으므로 혈액내에서의 chole-

*본 연구는 한국과학재단일반목적기초 연구비(1992 ~ 1993)로 이루어진 것임.

terol의 안전한 이동과 혈액으로부터의 적절한 제거가 조절되어야 한다.

식이성 지방이나 cholesterol은 장에서 chylomicron으로 합성되어 순환 혈관으로 수송되고 간에서 합성된 very low density lipoprotein(VLDL)은 혈액을 통해 순환되는데 영양을 필요로하는 장기에서 분비되는 lipoprotein lipase에 의해 chylomicron은 remnant로 되어 간으로 흡수되고 VLDL은 intermediate density lipoprotein(IDL)을 거쳐 low density lipoprotein (LDL)로 되어 각 장기에 흡입되어 cholesterol이 이용되는 것이다.

체내에서 합성되는 cholesterol의 90% 가량이 간에서 합성되는데 간에서 합성된 cholesterol과 지방이 VLDL 형태로 배출되며 다른조직들은 주로 LDL 수용체를 통한 LDL의 흡입으로 cholesterol을 이용하게 된다. 또한 말단 조직에서 간으로의 cholesterol 운반은 주로 HDL에 의해 이루어지는데 이것이 역 cholesterol 수송으로 알려져 있다.¹⁾

혈중 LDL 제거속도는 각 장기 세포표면에 존재하는 LDL 수용체에 의해 결정된다고 보고되어 있으며,²⁾ Brown과 Goldstein은 사람의 fibroblast를 사용하여 LDL receptor mediate pathway의 메카니즘과 세포내 대사를 규명하였다.³⁾ 즉, 세포내의 cholesterol 함유량이 저하되어 세포의 cholesterol 수치가 높아지면 세포막에서의 LDL 수용체의 수가 증가하고 여기에 LDL이 결합되어 coated pit를 형성하고 세포내로 들어가게 된다는 것이다. 따라서 LDL 수용체는 대부분의 세포막에 존재하는 glycoprotein으로 LDL을 흡착하여 세포에 필요한 cholesterol을 공급하며 혈액의 LDL을 제거하는 생리적 기능을 갖고 있어 혈중 LDL의 농도 조절이란 관점에서 중요한 연구과제로 되어 있었다.

LDL 수용체의 합성 조절은 주로 sterol에 의한 transcription repression에 의해 일어나는 것으로 알려져 있으며 배양된 세포에서의 LDL 수용체의 합성과 그 mRNA의 양이 free cholesterol이나 LDL 형태의 cholesterol에 의해 저하됨이 밝혀졌으나 이 때 LDL 분해와 LDL의 활성화에는 큰 영향이 없음이 제시되고 있다. 현재까지 밝혀진 바에 의하면 LDL 수용체 promoter의 SRE-1 element에 특정 단백질이 결합하여 Sp1 결합에 의한 전사 촉진을 가능케 해 주는데, 이 단백질의 결합능력을 sterol이 조절해 주는 것으로

생각되고 있다.^{1,4,5)}

Cholesterol은 간에서 담즙산으로 전환되는데 이것이 cholesterol이 몸 밖으로 배설되는 주요 경로이지만 실제적으로는 담즙산의 일부분만이 몸 밖으로 배설될 뿐 대부분의 담즙산은 회장의 말단부분에서 재흡수되어 간으로 되돌아가 다시 이용되는 것으로 알려져 있으며 재흡수된 담즙산은 cholesterol을 담즙산으로 전환시키는 과정의 속도결정단계 효소인 cholesterol 7 α -hydroxylase를 억제하여 cholesterol의 담즙산으로의 전환을 저해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 담즙산의 재흡수가 방해되면 cholesterol의 담즙산으로의 전환이 활발하고 cholesterol 소비가 원만하며 cholesterol 농도 증가가 억제되므로 담즙산의 재흡수를 방해하는 cholestyramin,⁶⁾ chitosan 등⁷⁾의 약제에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 성분도 고혈압이나 고 cholesterol 혈증, 동맥경화증과 같은 지방질대사와 cholesterol 대사이상으로 기인된 질병과 밀접한 관련성이 있다는 보문이 많으며 1941년 Kamai⁸⁾가 인삼이 동맥경화의 발현 억제효과가 있다고 보고한 이후 이 분야의 연구가 여러 연구자들의 관심의 대상이 되어 왔었다.

최근 주 등^{9,10)}은 토끼에게 고 cholesterol 식이를 장기간 투여하여 고 cholesterol 혈증을 유발시켜 혈청 지방단백질의 농도분포 및 LDL과 cholesterol 대사에 미치는 인삼사포닌의 영향을 검토한 결과 인삼사포닌이 간에서 cholesterol로부터의 담즙산 형성을 촉진하며 간의 cholesterol 농도가 저하되고 고 cholesterol 식이 투여로 인한 LDL 수용체의 합성저해도 완화되어 혈액으로부터 VLDL과 LDL 제거가 원활하게 진행되어 고 cholesterol 혈증을 완화시킨다고 주장하였다.

또한 주 등^{11,12)}은 쥐에게 고 cholesterol 식이와 인삼사포닌 분획 또는 정제된 ginsenoside를 함께 투여한 후 혈청 및 각 장기(간, 신장, 부신피질, 정소)의 cholesterol 농도 및 LDL 수용체의 활성을 조사한 결과 인삼사포닌이 혈청 및 각 장기의 cholesterol을 현저히 저하시키며 LDL 수용체의 생합성도 크게 촉진한다는 것을 관찰하였다. 또한 주 등¹²⁾은 Chinese hamster ovary(CHO) 세포에서 ginsenoside가 세포안의 cholesterol로부터 steroid 호르몬으로의 전환을 촉진하여 세포내의 cholesterol 농도를 효과적으로

낮추어 높은 cholesterol 농도로 인한 LDL 수용체 합성억제를 완화시켜 준다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 이상과 같은 연구결과를 토대로 하여 ginsenoside의 cholesterol과 triacylglyceride 농도 저하작용을 *in vivo*에서 관찰하였고, ginsenoside가 CHO 세포에서의 cholesterol 농도를 저하하고 LDL 수용체 합성억제를 완화함을 조사하였으며, 또한 cAMP 농도에 미치는 영향과의 상관관계를 규명하여 세포내에서의 LDL 수용체 합성에 미치는 영향에 관한 작용 메커니즘을 추구하고 있다. 또한, 소장에서의 담즙산 재흡수에 미치는 ginsenoside의 영향을 조사하여 ginsenoside의 고 cholesterol 혈증 완화작용을 이해하는데 노력하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 실험동물들은 모두 실험전에 정상사료(제일사료(주)제품, 성분: crude protein above 10.6%, crude cellulose below 7.0%, crude ash below 9.0%, Ca below 0.6%, P below 0.4%, DCP above 16.5%, TDN above 7.3%, antibiotics below 50 ppm)로 사육하였다.

흰쥐 (Sprague Dawley, 150~200 g, male)을 다섯 마리씩 두 군으로 나누어 제 1군은 매일 쥐 한 마리당 cholesterol 100 mg, corn oil 0.5 g, Na-choleate 10 mg을 투여하면서 정상식으로 사육하였고, 제 2군은 제 1군과 같은 급여조건 외에 인삼 saponin 혼합물을 각기 1 mg/rat/day씩 투여하여 사육하였다. 이와 같은 식이조건으로 15일간 사육한 쥐를 하룻밤 굶긴 후 diethyl ether로 마취하여 동맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 얻었고 같은 Teflon-pestle Wheaton Elvehjem 조직파쇄기를 사용하여 0.25 M sucrose를 함유한 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)으로 20% 파쇄액을 만든 후 cholesterol 및 triacylglyceride 농도에 미치는 인삼 saponin의 영향을 연구하였다.

실험세포주는 5~20회 계대배양한 Chinese hamster ovary(CHO) 세포를 사용하였다. 세포배양을 위한 배지로는 Eagle's minimum essential medium [첨가물: 10%(v/v) Fetal bovine serum, 24 mM NaHCO₃ (pH 7.4), kanamycin(10 µg/ml), Table 1]을 사용하였다. 실험세포의 지수성장을 유지하기 위해 37°C의 humidified CO₂ 배양기(5% CO₂, 95% air)에서 배지

Table 1. Composition of MEM (minimal essential medium)

Ingredient	MEM-10%	MEM-2%	MEM-0%
MEM powder	9.6 g	9.6 g	9.6 g
NaHCO ₃	2.2 g	2.2 g	2.2 g
Kanamycin	10 mg	10 mg	10 mg
FBS	100 ml	20 ml	—
BSA	—	—	2.0 g
Total volume	1000 ml	1000 ml	1000 ml

pH was adjusted to 7.4 with 1 N NaOH.

Media was sterilized by 0.22 µm membrane filtration.

Table 2. Composition of PBS and Krebs-Ringer buffer

Component	PBS	Krebs-Ringer buffer
KCl	2.7 mM	4.7 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM	1.2 mM
NaCl	0.14 M	0.12 M
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM	—
NaHCO ₃	—	25.0 mM
CaCl ₂	—	2.5 mM
MgSO ₄	—	1.2 mM

pH was adjusted to 7.4.

PBS was sterilized by 0.22 µm membrane filtration.

5 ml를 담은 25 cm³ culture flask로 배양하였다. 3일에 한번씩 다음과 같은 방법으로 계대배양 하면서 monolayer로 자라는 CHO 세포의 성장상태를 확인하였다. Tissue culture flask 안의 배지를 모두 털어낸 후, 세포들을 PBS(Table 2)로 씻어주고 0.05% trypsin을 처리하여 세포들을 떼어내고, 이를 다시 성장배지에 희석한 후, 1×10⁵ cells/ml가 되도록 하여 새로운 tissue culture flask에 넣어 주었다. 이 때 세포의 농도는 hemocytometer를 이용하여 측정하였다.

시료를 적당량 취하여 chloroform-methanol-H₂O의 부피 비가 1:2:0.8이 되도록 methanol과 chloroform을 가하여 단일상으로 만든 다음 원심 분리하여 침전물을 제거하고, 상층액에 chloroform과 물을 가하여 chloroform-methanol-H₂O의 부피비가 1:1:0.9가 되도록 한 다음 원심분리하여 chloroform 층과 methanol-H₂O 층으로 분리하였다. 이와 같이 하여 얻은 chloroform층을 말려 지질시료 분석에 사용하였다.¹³⁾

Cholesterol의 양은 Kenny의 방법¹⁴⁾으로 측정하였다. 총 지질 추출물 일정량을 취하여 진공건조한 후 chloroform 2.5 ml에 녹이고 acetic anhydride 1 ml를 가하고 37°C에서 3분간 방치하였다. 여기에 황산 0.1 ml를 가하여 실온에서 30분간 암소에 방치한 후 Shimadzu UV-240 spectrophotometer로 430 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Triacylglyceride는 Biggs의 방법¹⁵⁾에 따라 측정하였다. 진공건조한 총 지질 추출물에 H₂O 0.5 ml, heptane 2 ml, isopropanol 3.5 ml, 40 mM H₂SO₄ 1 ml를 가하여 혼합한 후 실온에서 방치하여 두 층으로 분리한 후 윗층(triacylglyceride층)을 얻었다. 윗층을 0.2 ml 취하여 28 mM sodium methoxide(in isopropanol) 2 ml를 가하여 60°C에서 5분간 반응시킨 후 1 M ammonium acetate와 1 M glacial acetic acid을 함유한 3 mM sodium metaperiodate 용액 1 ml와 73 mM acetylacetone(in isopropanol) 1 ml를 가하여 60°C에서 20분간 반응시킨 다음 Shimadzu UV-240 Spectrophotometer를 사용하여 410 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

정상 쥐의 혈청으로부터 Soutar와 knight¹⁶⁾에 따라 밀도가 1.085 g/ml인 NaCl-KBr 용액을 가하여 밀도를 1.019 g/ml로 맞춘 후에 Kontron 초원심분리기(TST 55.5)로 104,000 x g에서 18시간 원심분리하여 chylomicron과 VLDL(상층)을 분리하고 나머지 분획(infranate)에 다시 밀도가 1.200 g/ml인 NaCl-KBr 용액을 가하여 밀도를 1.064 g/ml로 맞춘 후 위와 같은 방법으로 원심분리하여 LDL(상층)을 분리하였다 (Fig. 1). 분리한 LDL 중 ¹²⁵Iodine 표지 용은 0.1% EDTA를 함유한 0.15 M NaCl(pH 7.4) 용액으로 4°C에서 12시간 투석한 후 사용하였고, 배지에 첨가할 것은 PBS(pH 7.4)로 4°C에서 12시간 투석한 후 cellulose acetate membrane filter(pore size 0.2 µm)로 여과, 멸균하여 사용하였다. 분리한 LDL은 변형된 Lowry 방법을 이용하여 단백질을 정량하였으며, Sigma사의 cholesterol assay kit를 사용하여 cholesterol 농도를 측정하였다.

위에서 분리한 혈청 지방단백질은 Naito의 방법¹⁷⁾에 의해 다음과 같이 polyacrylamide gel electrophoresis를 행하였다(Fig. 1). 시료 0.2 ml와 0.2% sudan black B ethylene glycol 용액 0.2 ml를 혼합하여 암소에서 1시간 실온에 방치하여 미리 염색한 시료를

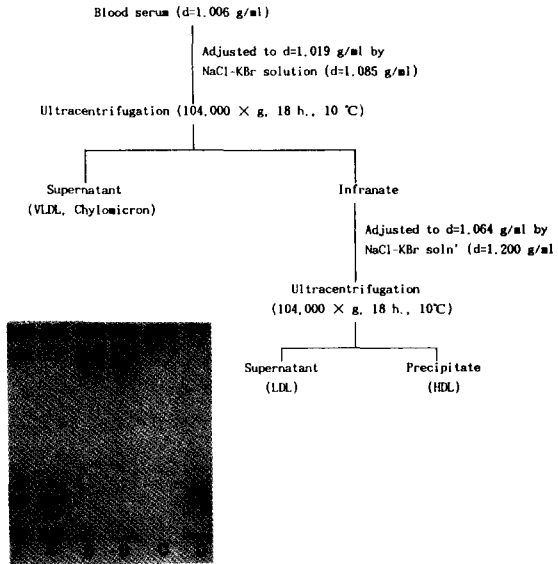


Fig. 1. Schematic diagram for the isolation of LDL from rat blood serum and polyacrylamide gel electrophoresis of blood lipoproteins. A : Serum, B : LDL, C : VLDL, D : HDL.

3.6% acrylamide running gel과 2.5% acrylamide stacking gel이 되도록 만든 slab gel에 부과하고, stacking할 때는 60 volts, 전개할 때는 120 volts의 전위차가 되도록 하여 6시간 전개하였다. Reservoir에 채운 완충용액은 50 mM Tris-glycine(pH 8.3)이었다.

¹²⁵I-LDL은 McFarlane의 iodine monochloride 방법¹⁸⁾을 변형한 Lancer 등의 방법¹⁹⁾에 따라 제조하였다. 정상 쥐의 혈청에서 초원심분리하여 얻은 LDL 용액 3 ml에 1.0 M Gly-NaOH buffer(pH 9.0) 0.5 ml를 가하여 완충화하였다. Na-¹²⁵I(1 mCi)를 3 mM ICl₂용액 0.3 ml에 가하여 혼합한 다음 1.0 M gly-NaOH buffer (pH 9.0) 0.5 ml를 가하고 이 혼합액을 위에서 만든 완충화된 LDL 용액에 가하여 4°C에서 8분간 방치한 후 1.66 M KI용액 0.05 ml를 가하여 다시 4°C에서 15분간 방치하였다. LDL에 결합하지 않고 반응액에 남아있는 free ¹²⁵I를 제거하기 위하여 0.1% EDTA를 함유한 0.15 M NaCl(pH 7.4) 용액으로 1시간 간격으로 투석액을 갈아 주면서 5시간 동안 투석한 후 같은 용액으로 하룻밤 동안 투석하였다. 이와 같은 투석 처리를 한 후에 ¹²⁵I-LDL 용액에 회수된 방사능은 12.0%이었다. ¹²⁵I-LDL 용액 20 µl에 10% trichloroacetic acid 500 µl를 가하고 원심분리하여 얻은 상층액과

단백질 침전물의 방사능을 측정된 결과 전체 방사능 중 1.9%가 상층액에서 검출되었고 나머지 98.1%는 단백질 침전물에서 검출되었다. 따라서 LDL에 결합하지 않고 ^{125}I -LDL 용액에 남아 있는 free ^{125}I 은 1.9% 미만임을 확인하였다.

LDL 수용체의 활성은 ^{125}I -LDL이 세포에 결합량을 정량하는 방법으로 측정하였다.^{20,22)} 앞에서 언급한 방법으로 계대배양하던 CHO 세포를 MEM-2%로 희석하여 tissue culture dish(diameter 60 mm)에 1×10^5 cells/ml의 농도로 넣어 주었다. 그리고 48시간 배양한 후 PBS로 한번 씻어준 뒤 Figure legend와 Table legend에 표기된대로 다양한 농도의 LDL과 ginsenoside의 혼합물을 함께 함유한 MEM-0% 2 ml로 각각 바꾸어 주고 48시간 동안 배양하였다. 이와 같이 다양한 농도에서 성장시킨 CHO 세포를 배지 제거 후 PBS로 두번 세척하고 MEM-0%로 갈아준 후 위에서 제조한 ^{125}I -LDL(10 μg protein/10 μl , 44 cpm/ng protein) 10 μl 를 가하여 37°C에서 rotary shaker(40 oscillations per minute)를 사용하여 2시간 배양하였다. 각 세포층을 그 후 4°C에서 buffer A(50 mM Tris-Cl, pH 7.4; 0.15 M NaCl; 2 mg/ml BSA)로 3회 세척하고, 2회에 걸쳐 buffer A에서 2분간 방치한 후, 마지막으로 buffer B(50 mM Tris-Cl, pH 7.4; 0.15 M NaCl)로 2회 세척한 후 0.1 N NaOH 1 ml로 세포를 용해시켜 0.1 ml은 변형된 Lowry 방법으로 단백질을 정량하는데 사용하였고 나머지는 방사능을 측정하는데 사용하였다. 여기서 가해진 ^{125}I -LDL의 20배가 되는 양의 표지 안된 LDL을 함께 가했을 때의 결합정도를 비특이적 결합으로 정하고, 전체 결합에서 이 값을 빼준 값을 특이적 결합정도로 하였다.

위와 같은 방법으로 다양한 배지에서 48시간 동안 성장시킨 CHO 세포를 1 ml의 0.1 N NaOH로 용해시켜 0.8 ml은 총지질을 추출하여 Kenny의 방법으로 cholesterol을 정량하는데 사용하였으며, 0.1 ml은 변형된 Lowry 방법으로 단백질 정량하는데 사용하였다.

다양한 배지에서 배양한 CHO 세포는 Kirby의 방법²³⁾에 따라 단백질과 지방을 제거하고 cAMP를 추출하였다. 세포층을 buffer A(50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.15 M NaCl; 2 mg/ml BSA)로 1회 세척한 후 0.1 N NaOH 1 ml로 세포를 용해하고 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4) 1 ml를 가하였다. 그 중 400 μl 을 취하여 새 시험관에 옮기고 chloroform 400 μl 와 salt

saturated phenol(ss-phenol) 400 μl 를 가한 후 잘 혼합하고 원심분리하여 상층액(buffer 층)을 취하여 cAMP 정량 시료로 사용하였다.

cAMP 정량은 cAMP assay kit 432(Amersham사 제품)을 사용하였다. 시료의 cAMP와 일정량의 [8- ^3H]-labelled cAMP가 cAMP 특이성 단백질과 결합하는 상대량에 따라 정량하는 방법으로 kit에는 Tris-EDTA buffer(pH 7.5, 4 mM EDTA 포함), 결합단백질(소의 근육에서 정제된 것), [8- ^3H]-cAMP 50 μl , 결합단백질 100 μl 를 넣고 섞어준 후 0~4°C에서 2시간 방치하였다. Charcoal suspension을 첨가한 즉시 10초 동안 섞어주고 15,000 rpm에서 4분간 원심분리한 후 charcoal이 분산되지 않게 상층액을 200 μl 취해서 방사능을 측정하였다.

Bile acid 재흡수에 관한 실험^{24,26)}은 다음과 같이 행하였다. 하룻밤 굶긴 흰쥐(Sprague Dawley, 150~200 mg, female)를 diethyl ether로 마취한 후 소장 전체를 얻어 lumen을 2 mg/ml glucose를 함유하고 있는 Krebs-Ringer bicarbonate 용액(pH 7.4)으로 세척한 후 얇고 기다란 관을 이용하여 소장을 뒤집었다. 뒤집힌 소장 중 공장 부분과 회장 부분을 2~3 cm 길이로 여러 개 잘라내고, 각각의 한쪽 끝을 수술용 실로 묶은 후 다른 쪽 끝으로 2 mg/ml glucose를 함유한 Krebs-Ringer bicarbonate buffer(pH 7.4)를 1 ml 주입한 후 수술용 실로 묶어 주머니를 만들었다.

Bile acid의 재흡수에 미치는 ginsenoside의 영향을 관찰하기 위해 위와 같이 관련된 주머니들을 각각 0.2 mM [carbonyl- ^{14}C]-taurocholic acid (5 nCi/ml)와 2 mg/ml glucose를 함유한 Krebs-Ringer bicarbonate buffer(pH 7.4) 10 ml 또는 여기에 $10^{-2}\%$ ginsenoside 혼합물을 포함한 용액 10 ml안에 넣고, 37°C에서 계속적으로 95% O_2 , 5% CO_2 를 공급해 주면서 배양하였다. 이렇게 2시간 동안 배양한 후 sac을 꺼내 2 mg/ml glucose를 함유한 Krebs-Ringer bicarbonate 용액(pH 7.4)으로 재빨리 세척한 후 주머니 내부의 용액을 털어내 그 중 100 μl 를 취해 방사능을 측정하였다. 주머니는 하룻밤 말린 후 그 무게를 재었다.

Bile acid micelle 형성에 미치는 ginsenoside의 영향을 관찰하기 위해 다양한 농도의 ginsenoside를 함유한 0.2 mM와 2 mM의 [carbonyl- ^{14}C]-taurocholic acid(2 dpm/ μl) 용액 5 ml을 분자량이 6,000~8,000 정도의 물질까지 투석시키는 cellulose membrane을

사용하여 10 ml의 0.9% NaCl 용액에 대해 36시간 동안 37°C 에서 투석한 후 바깥쪽 용액 100 μ l를 취하여 방사능을 측정하였다.

방사능 측정에는 액체 섬광체 No. 6(PPO 10 g, POPOP 0.25 g, naphthalene 100 g을 dioxane 1000 ml에 용해한 혼합액)을 사용하였으며 Packard Tri-Carb 4530 액체섬광흡광계를 사용하였다.

Eagle's minimum essential medium(EMEM), fetal bovine serum은 Gibco 제품, 멸균용 membrane filter는 (주)녹십자 의공과 Costar 제품을 사용하였다. Taurocholic acid, kanamycin, trypsin-EDTA, NaHCO₃, bovine serum albumin(BSA), sodium cholate, trizma base, cholesterol assay kit, choletserol, 2,5-diphenyloxazol(PPO), 1,4-bis(phenyl-2-oxazol)-benzene(POPOP) 등은 Sigma사 제품, Na-¹²⁵I, [carbonyl-¹⁴C]-taurocholic acid, cAMP assay kit는 Amersham 제품, ICI은 Junsei 제품을 사용하였다. 그 밖의 모든 시약은 국내에서 구입하여 사용하였으며 ginsenoside 혼합물은 한국인삼연초연구소로부터 제공받았다.

결과 및 고찰

인삼 saponin이 고 cholesterol 혈증의 혈청 cholesterol 양을 저하시킴으로서 여러 심맥관계 질환에 효과가 있다는 보고는 많으나 그 작용 mechanism은 아직도 분명하지 않다. 그러나 세포내의 cholesterol 농도가 세포내의 cholesterol 합성에 관여하는 효소의 유전자와 세포밖의 cholesterol을 흡수하는 수용체의 유전자가 sterol에 의하여 조절되므로써 균형을 이루며 또한 과량의 cholesterol은 acyl coenzyme A; cholesterol acyltransferase (EC 2.3.1.26; JACAT)의 활성 증가로 인해 저장형인 cholesterol ester로 전환된다는 보고가 있다.¹⁾

본 연구실에서는^{9,10)} 인삼사포닌의 고 cholesterol 혈증의 cholesterol 농도저하 작용의 메카니즘을 규명하기 위해 고 cholesterol 식이로 사육한 토끼 간으로의 ¹²⁵I-LDL 흡인 및 혈액으로부터의 제거속도에 미치는 인삼사포닌의 영향을 검토한 결과 인삼사포닌은 간의 LDL 흡인을 증가시키고 VLDL 및 LDL의 혈액으로부터의 제거속도를 촉진됨을 관찰했으며 인삼사포닌에 의한 혈청 cholesterol 농도감소가 주로 VLDL과 LDL의 농도감소에 기인된 것으로 추정하

Table 3. Cholesterol and triacylglyceride level of the liver and blood serum of rats fed under various conditions

(a) Cholesterol level of the liver and serum

Group	LIVER		SERUM	
	Cholesterol (mg/g liver)	Relative (%)	Cholesterol (mg/dl)	Relative (%)
Control	3.90 ± 0.40	100	55.2 ± 5.0	100
Test	2.78 ± 0.10*	71	40.3 ± 2.9**	73

(b) Triacylglyceride level of the liver and serum

Group	LIVER		SERUM	
	TG (mg/g liver)	Relative (%)	TG (mg/dl)	Relative (%)
Control	2.26 ± 0.11	100	95.7 ± 7.6	100
Test	1.87 ± 0.02**	82	77.9 ± 10.0***	81.4

Control group was administered normal diet with high cholesterol diet, and test group was administered under similar diet condition of control group with 1 mg/rat total saponin per day for 2 weeks. The values are the mean value of five determinants.

*p<0.01, **p<0.01, ***p<0.05.

였다. 또한 고 cholesterol 식이만으로 사육한 실험 동물(토끼, 쥐)에게 고 cholesterol 식이와 함께 ginsenoside를 투여하면 혈액이나 각 기관의 cholesterol 농도가 저하되며 LDL 수용체의 활성이 증가함을 관찰하였고 쥐 간의 파쇄액과 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포를 이용한 실험에서 ginsenoside는 cholesterol로부터의 담즙산이나 steroid hormone의 합성을 촉진함을 입증하였다.^{12,28,29)}

Table 3은 경구로 투여한 ginsenoside가 고 cholesterol 식이로 사육한 쥐의 간과 혈액에서의 cholesterol과 triacylglyceride의 농도에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 간과 혈액의 cholesterol 농도는 ginsenoside 투여시 각각 대조군에 비해 25% 정도 감소하였고 triacylglyceride 농도는 대조군 보다 약 20%의 감소를 나타내었으며 *in vivo*에서의 ginsenoside의 고 cholesterol 혈증 및 hyperlipidemia 완화효과를 알 수 있었다.

Fig. 2는 배지에 첨가된 LDL의 농도에 따른 LDL 수용체 합성 억제작용과 이때의 ginsenoside의 영향을 CHO 세포에서 관찰한 것이다. MEM-10%에서 배양

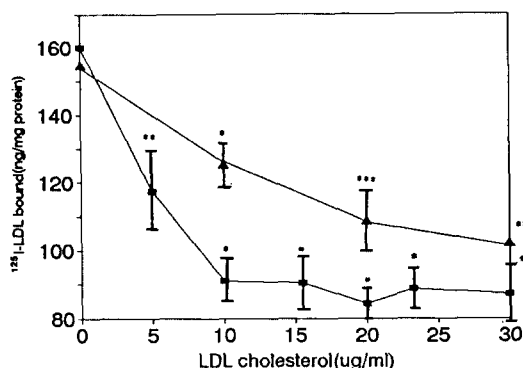


Fig. 2. The effect of various LDL concentration in the medium on LDL receptor activity in CHO cells and the modulatory effect of ginsenoside on the suppression by LDL. CHO cells were cultured for 48 h in serum free medium containing various concentration of LDL cholesterol in the presence (▲) or absence (■) of $10^{-3}\%$ (w/v) ginsenoside. The results are the mean values of five determinants for each point.

* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.02$.

하던 CHO 세포를 cholesterol 농도가 낮은 MEM-2%로 옮겨 48시간 배양한 후 배지에 cholesterol이 전혀 함유되지 않은 MEM-0%로 바꾸고 원하는 cholesterol 양을 LDL의 형태로 넣어주고 48시간 배양후 LDL 수용체의 LDL 결합능력을 비교해 보면 LDL cholesterol을 첨가해서 배양한 것(대조군)은 현저히 그 활성도가 떨어졌다. 즉 cholesterol 농도가 10 g/ml 이상일 때에는 LDL을 첨가 안한 정상군의 LDL 수용체 활성의 53% 정도의 결합정도를 나타냈을 뿐이다. 그러나 배양액에 LDL과 함께 $10^{-3}\%$ 되게 ginsenoside을 가해주고 48시간 배양하였을 때에는 모든 농도에서 억제효과가 유의적으로 완화됨이 관찰되었다.

Table 4는 배지에 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 LDL을 가한 후 여러 가지 농도의 ginsenoside의 첨가했을 때의 LDL에 의한 LDL 수용체 결합능력 억제작용의 변화를 관찰한 결과 ginsenoside의 농도가 $10^{-2}\%$ 일 때와 $10^{-3}\%$ 일 때 정상군의 70% 정도의 활성을 보였으며 시험군(정상군의 활성: 53%) 보다 결합활성이 현저히 증가됨을 알 수 있었으며 이 농도에서의 ginsenoside가 LDL에 의한 LDL 수용체 결합능력 억제의 완화작용이 있음을 알 수 있었다. Ginsenoside의 농도가 높을

Table 4. The effect of various concentrations of ginsenoside on LDL receptor activity in CHO cells

Group	^{125}I -LDL bound (ng/mg protein)	Relative (%)
Normal	159.9 \pm 7.9*	100
Control	86.0 \pm 5.9	52.7
Saponin $10^{-2}\%$	110.1 \pm 12.2**	69.0
Saponin $10^{-3}\%$	105.0 \pm 10.0**	68.2
Saponin $10^{-4}\%$	79.6 \pm 9.2	50.0
Saponin $10^{-5}\%$	94.1 \pm 17.5	59.0
Saponin $10^{-6}\%$	93.7 \pm 25.0	58.7

Normal group was cultured in serum free medium (MEM-0%), and control group was cultured in serum free medium containing 20 $\mu\text{g/ml}$ LDL cholesterol for 48 h.

Test groups were cultured for 48 h in serum free medium containing 20 $\mu\text{g/ml}$ LDL cholesterol and different concentrations of total saponin (w/v). LDL receptor activities were defined as ng LDL bound in 2 h at 37°C by mg protein. The values are the mean value of five determinants.

* $p < 0.001$, ** $p < 0.02$.

Table 5. The effect of ginsenosides on LDL receptor activity in CHO cells cultured under LDL free condition

Group	^{125}I -LDL bound (ng/mg protein)	Relative (%)
Normal	130.4 \pm 7.0*	100
Control	87.8 \pm 8.1	68
Saponin $10^{-2}\%$	155.5 \pm 40.0	120
Saponin $10^{-3}\%$	140.1 \pm 24.1	108
Saponin $10^{-4}\%$	118.0 \pm 12.0	91

Normal group was cultured in MEM-0%, and control group was cultured in MEM-0% containing 20 $\mu\text{g/ml}$, cholesterol for 48 h. Test groups were cultured for 48 h in MEM-0% containing different concentrations of total saponin. LDL receptor activities were defined as ng LDL bound in 2 h at 37°C by mg protein. The values are the mean value of five determinants.

* $p < 0.001$.

때($10^{-1}\%$ 이상)는 ginsenoside의 detergent 성질³⁰⁾ 때문에 세포가 다량 파괴되어 비교할 수가 없었으며 ginsenoside의 농도가 $10^{-4}\sim 10^{-6}\%$ 에서는 활성의 변화가 없었다.

Table 6. The effect of various concentrations of ginsenosides on cholesterol concentration in CHO cells

Group	Cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	Relative (%)
Normal	$59.8 \pm 7.0^*$	100
Control	78.1 ± 8.4	130
Saponin $10^{-2}\%$	74.7 ± 4.4	125
Saponin $10^{-3}\%$	68.6 ± 10.8	115
Saponin $10^{-4}\%$	$61.0 \pm 6.4^*$	102
Saponin $10^{-5}\%$	$68.4 \pm 3.5^{**}$	114

Normal group was cultured in serum free medium, and control group was cultured in serum free medium containing $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ LDL cholesterol for 48 h. Test groups were cultured for 48 h in serum free medium containing $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ LDL cholesterol and different concentrations of total saponin. The values are the mean value of five determinants.

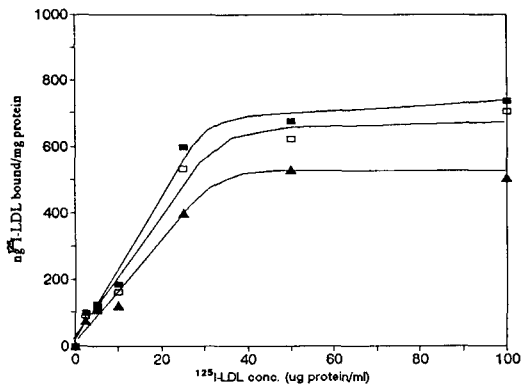


Fig. 3. The dose response curve of LDL binding of CHO cells incubated under different conditions. Normal group (■) was cultured in MEM-0%, control group (▲) was cultured in MEM-0% containing $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ LDL cholesterol, and test group (□) in MEM-0% containing $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ LDL cholesterol with $10^{-2}\%$ ginsenoside.

Table 5는 cholesterol을 함유하지 않은 배지에서 배양한 CHO 세포(정상군)의 LDL 수용체 활성화에 미치는 ginsenoside의 영향을 농도별로 조사한 것이다. Ginsenoside의 농도가 $10^{-2}\%$ 일 때 다소 상승작용을 보였을 뿐 그 밖의 농도에서는 별다른 활성증가 영향이 없는 것으로 보아 ginsenoside는 고농도의 cholesterol 존재하에서 LDL 수용체의 활성이 억제되었을 때에만 수용체의 활성을 증가시키는 것으로 생각

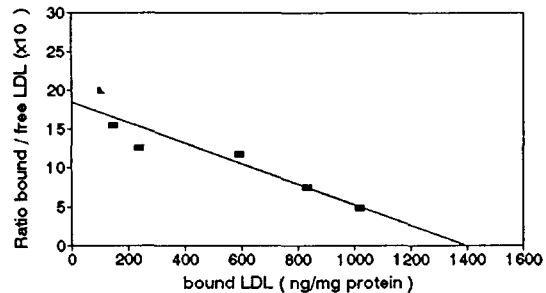
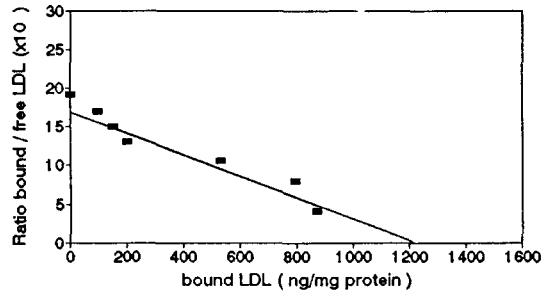
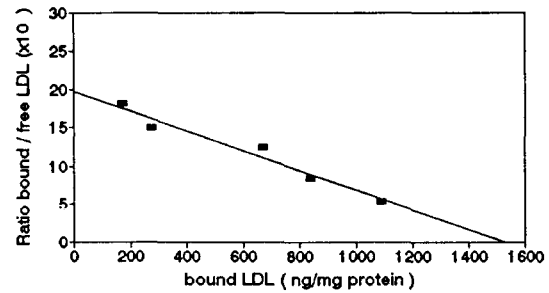


Fig. 4. Scatchard plot of LDL binding of CHO cells cultured under different conditions. The incubation conditions were as in Fig. 2. A: Normal group, B: Control group, C: Test group.

된다. 이와 같은 실험결과는 쥐와 토끼에게 고 cholesterol 식이로 사육한 *in vivo* 실험에서도 대조군에서는 ginsenoside가 LDL 수용체의 결합능력을 증가시켰으나 정상군에서는 별 변화를 보이지 않았던 실험결과와도 일치한다.^{9,10} 한편 각 세포배양군에서의 cholesterol 농도를 조사한 결과 대조군에 비해 ginsenoside를 첨가한 시험군의 경우 cholesterol 농도가 낮아졌음이 관찰되어졌다(Table 6).

이러한 LDL 수용체의 결합능력의 변화가 수용체의 binding affinity의 차이에 의한 것인지 수용체의 양에 의한 것인지를 알아보기 위해 각 세포배양군(정상군, 대조군, 실험군)의 LDL 수용체의 활성을 여러가지

Table 7. The comparison of K_d and B_{max} value

Group	B_{max} ($\mu\text{g LDL bound/mg protein}$)	K_d ($\mu\text{g LDL/ml}$)
Normal	1530	12.9
Control	1210	13.9
Test	1390	13.3

Normal group was cultured in MEM-0%, control group was cultured in MEM-0% containing 20 $\mu\text{g/ml}$ LDL cholesterol, and test group was cultured in MEM-0% containing 20 $\mu\text{g/ml}$ LDL cholesterol plus 10^{-2%} ginsenoside. Their binding abilities were assayed under the different concentration of ¹²⁵I-LDL.

농도의 ¹²⁵I-LDL 존재하에서 배양하여 측정하고 각각의 dose response curve를 그려(Fig. 3) K_d 값과 B_{max} 를 구하여 비교하였다. Scatchard plot에 의하여 계산한 ¹²⁵I-LDL에 대한 K_d 값은 모든 군이 30 $\mu\text{g/ml}$ 근처로서 LDL에 대한 binding site의 친화력은 배양조건에 따라 변하지 않음을 알 수 있었다(Fig. 4, Table 7). 그러나 B_{max} 는 정상군이 1530 $\mu\text{g/mg}$, 대조군이 1210 $\mu\text{g/mg}$ 이고 대조군에 10^{-2%} ginsenoside를 포함한 시험군의 경우 1390 $\mu\text{g/mg}$ 로서 이 값들을 비교해 보면 LDL 수용체의 결합 능력을 비교했을 때와 그 경향이 유사하였으며 결국 LDL과 ginsenoside에 의한 수용체의 결합 능력의 변화는 LDL 수용체의 양의 변화에 의한 것임을 알 수 있었다. LDL에 의한 LDL 수용체의 결합 능력 억제가 수용체의 양의 감소에 의한 것이라는 사실은 이미 ligand blotting, immunoblotting 등을 이용한 방법등으로 밝혀져 있지만^{20,21} 위의 실험결과로서 ginsenoside 역시 수용체의 양을 증가시킴으로서 LDL 결합능력을 상승시킴을 알 수 있다. 이는 ginsenoside가 직접적 또는 간접적으로 LDL에 의해 억제되어 있던 LDL 수용체 합성을 완화시켜줌을 뜻한다.

최근 Golos 등²⁰은 사람의 granulosa cell에서 cAMP가 mRNA의 합성을 증가시킴으로써 LDL 수용체의 합성을 증가시킨다고 보고하였으며 LDL 수용체의 유전자의 promotor에 cAMP response element와 유사한 구역이 있다는 보고도 있다.³¹ 각 세포군의 cAMP 농도를 조사한 결과 ginsenoside는 LDL에 의해 저하되었던 cAMP의 농도를 상당히 높여주었음을 알 수 있었다(Table 8).

Table 8. The effect of ginsenoside on cAMP concentration in CHO cells cultured under various conditions

Group	cAMP (pmole/ng protein)	Relative (%)
Normal	46.5 \pm 9.98	100
Control	25.8 \pm 1.6	55.5
Saponin 10 ^{-2%}	29.0 \pm 4.9	62.4
Saponin 10 ^{-3%}	33.4 \pm 2.5*	71.8
Saponin 10 ^{-4%}	27.7 \pm 1.6	59.6

Normal group was cultured in serum free medium, and control group was cultured in serum free medium containing 20 $\mu\text{g/ml}$ LDL cholesterol for 48 h. Test groups were cultured for 48 h in serum free medium containing 20 $\mu\text{g/ml}$ LDL cholesterol and different concentrations of total saponin. The values are the mean value of four determinants.

* $p < 0.01$.

체내 cholesterol의 주요 배설 통로는 간에서 담즙산으로 전환되어 담즙산이 배설되는 것이며 따라서 소장에서의 담즙산 재흡수의 정도는 체내 cholesterol 농도유지에 매우 중요한 역할을 차지한다. 혈중 cholesterol 농도를 낮추는 약물요법으로 담즙산 sequesterant류인 cholestyramine, cholestipol 등이 많이 연구되는 이유도 여기에 있는 것이다.

대두, 자주개자리 등의 사포닌이 고 cholesterol 혈중 억제작용을 하며 이는 소장에서의 담즙산 재흡수를 억제하기 때문일 것이라는 보고는 Oakenfull 등³²⁻³⁴의 *in vivo* 실험결과를 통해 발표되었다. 한편 주 등³²은 ginsenoside가 고 cholesterol 식이로 사육된 쥐의 담즙산 배설을 1.2~1.3배 가량 촉진시킨다고 보고하였으며 이들²⁸은 간 파쇄액을 사용하여 ginsenoside가 *in vitro*에서 cholesterol의 담즙산으로의 합성을 촉진한다고 보고하였다.

본 연구에서 ginsenoside의 담즙산 배설 촉진 작용이 소장에서의 재흡수 억제에 의한 것인지의 여부를 밝히기 위해 뒤집은 소장 주머니를 사용하여 소장에서의 담즙산 재흡수 정도를 조사하였다. 소장을 공장과 회장 부분에 거쳐 다섯군데로 나누어 각 부위에서 sac를 만들어 taurocholic acid가 안으로 이동한 양을 비교하였는데, 전체 길이의 윗쪽 1/3에 해당하는 부위(공장)에서는 수동적 수송을 하였고, 회장에 해당하는

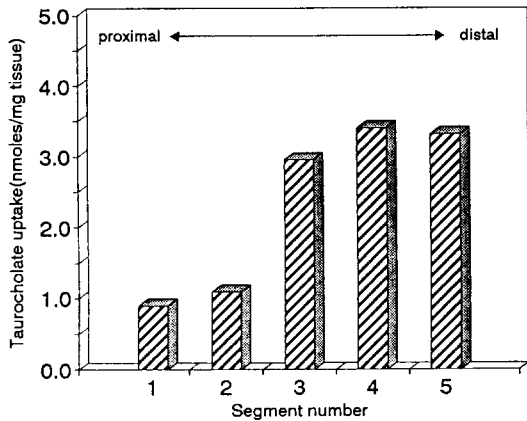


Fig. 5. Transport of taurocholic acid by various segments of the rat small intestine. Everted sacs were incubated in 0.2 mM taurocholic acid in Krebs-Ringer bicarbonate buffer at 37°C for 90 min constantly gassed with 95% O₂, 5% CO₂. Segment 1 and 2 were obtained from jujenum and segment 3, 4 and 5 were from ileum.

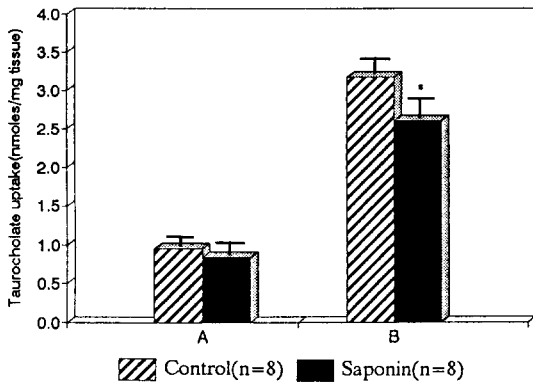


Fig. 6. The effect of ginsenoside (10⁻²%) on taurocholic acid uptake by rat small intestine sacs. The bars represent the mean value of eight determinants. A: everted sacs of rat jujenum, B: everted sacs of rat ileum.

*p<0.01.

나머지 1/3에서는 능동적 수송을 함을 알 수 있었다 (Fig. 5). 공장과 회장에서의 taurocholic acid 재흡수에 미치는 ginsenoside의 영향을 비교하였을 때, ginsenoside(10⁻²%) 첨가시에는 공장에서는 taurocholic acid 재흡수 정도에 큰 차이가 없었으나 회장에서는 재흡수도가 약 20% 감소한 것으로 보아 ginsenoside가 담즙산의 능동적 수송을 다소 억제함을 알 수

Table 9. The effect of ginsenoside on bile acid micelle formation

Group	A (mM)	B (mM)
Normal	0.071	0.57
Saponin 10 ⁻¹ %	0.068	0.55
Saponin 10 ⁻² %	0.067	0.55
Saponin 10 ⁻³ %	0.068	0.54

A: Concentration of taurocholic acid in 10 ml of outer solution after 36 h dialysis of 5 ml of 0.2 mM taurocholic acid solution with stated amount of ginsenoside at 37°C.

B: Concentration of taurocholic acid in 10 ml of outer solution after 36 h dialysis of 5 ml of 2 mM taurocholic acid solution with stated amount of ginsenoside at 37°C.

있었다(Fig. 6).

Oakenfull 등³⁵⁾은 대두 사포닌이 소장에서의 담즙산 재흡수를 억제한다고 보고하고 이것은 사포닌이 담즙산과 작용하여 장막을 통과할 수 없을 정도의 거대한 micelle(10⁵ dalton 이상)을 형성하기 때문이라고 설명하였다. Ginsenoside의 담즙산 재흡수 억제효과 메카니즘도 이와 유사한지를 알아보기 위하여 분자량이 8,000 dalton 까지 투석이 가능한 cellulose membrane을 사용하여 taurocholic acid의 투석 정도에 미치는 ginsenoside의 영향을 살펴본 결과(Table 9), 소장내의 농도와 유사한 농도인 0.2 mM taurocholic acid 용액의 경우 10⁻²%, 10⁻³%, 10⁻⁴%가 되게 ginsenoside를 가했을 때 투과정도에 큰 차이가 없었다. 또한 2 mM taurocholic acid 용액도 각 농도의 ginsenoside에 의해 투과성의 변화를 나타내지 않았다. 이것은 CMC보다 낮은 담즙산의 농도에서는 ginsenoside는 담즙산과 거대한 micelle을 이루지 않으며 ginsenoside의 담즙산 재흡수 억제작용은 Oakenfull이 주장하는 메카니즘에 의한 것이 아님을 간접적으로 알 수가 있었다.

이상과 같은 실험결과로부터 ginsenoside는 세포내의 cholesterol 농도를 효과적으로 낮추어 높은 cholesterol 농도로 인한 cAMP 농도의 저하와 이에 따른 LDL 수용체 유전자의 발현 억제를 완화시켜주는 것으로 해석할 수 있는데 ginsenoside의 LDL 수용체 합성증가 능력이 cholesterol 농도저하에 따른 간접적인 방법에만 의한 것인지 직접적으로 LDL 수용체의 발현에 관여하는지는 아직 미지수이다. 또한 장내에

서는 담즙산 재흡수를 방해하여 세포내에서 cholesterol의 담즙산으로의 전환을 촉진시킴으로서 고 cholesterol 식이로 인한 고 cholesterol 혈증 유발을 억제하는 것으로 해석된다.

요 약

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 사포닌 분획(ginsenoside)의 고 cholesterol 혈증 개선작용 메카니즘을 생화학적으로 규명하기 위하여 고 cholesterol 식이를 투여한 쥐에서의 cholesterol과 triacylglyceride의 농도 저하 작용을 확인하고, chinese hamster ovary(CHO) 세포의 LDL 수용체 합성에 미치는 ginsenoside의 영향을 조사하는 한편 소장막을 통한 담즙산염 재흡수에 미치는 ginsenoside의 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

CHO 세포는 배지내의 LDL cholesterol의 양에 따라 LDL 수용체의 합성이 억제되는데 배지내의 cholesterol의 농도가 10 µg/ml일 때 LDL 수용체의 합성이 53% 정도로 감소하였으나 배지내에 ginsenoside를 가하면 이 억제작용이 완. 되어 정상 세포배양군의 78% 정도의 LDL 수용체 활성이 관찰되었고, 이 때 세포내의 cholesterol 농도도 ginsenoside에 의해 다소 감소되었다. 이와 같은 ginsenoside의 작용은 수용체의 해리상수(K_d)와 최고 결합값(B_{max})을 비교해 보면 ginsenoside가 LDL 수용체의 친화력에 영향을 미치는 것이 아니라 수용체의 양을 증가시키기 때문인 것으로 설명된다. 또한 ginsenoside는 cholesterol로 인하여 저하된 세포내 cAMP의 농도를 높임으로써 LDL 수용체 합성 조절에 직접적으로 관여할 가능성도 생각할 수가 있다.

뒤집은 소장 주머니를 사용하여 소장에서의 담즙산 재흡수에 미치는 ginsenoside의 영향을 조사한 결과 능동적 수송이 일어나는 회장부분에서는 재흡수가 20% 가량 억제되는 것으로 관찰되었다. Ginsenoside가 담즙산과 거대한 mixed micelle을 형성하여 막 투과가 어려워지는 것으로 추측하였으나 cellulose membrane을 사용한 투석 실험을 행한 결과 이와같은 추측이 잘못되었음이 밝혀졌다.

이상과 같은 실험 결과로부터 ginsenoside는 세포내에서의 cholesterol 농도를 낮추므로서 LDL 수용체 생합성의 억제작용을 완화하며 소장에서의 담즙산의

재흡수를 억제함으로써 고 cholesterol 혈증을 개선하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

인용문헌

- Schneider, W.J.: *Biochem. Biophys. Acta.* **988**, 303 (1980).
- Havel, R.J.: *Metabolism.* **10**, 103(1961).
- Brown, M.S. and Glodstein, J.K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **232**, 34(1986).
- Havel, R.J., Eder, H.A. and Bragdon, J.H.: *J. Clin. Invest.* **34**, 1345(1975).
- Myant, N.B.: *Cholesterol Metabolism, LDL and the LDL Receptor*, 1st Ed., Academic Press, Inc., pp. 316-348(1990).
- Erdo, A., Kuroda, M. and Tazawa, K.: *FEBS Lett.* **72**, 323(1976).
- Sugano, M. and Fujikwa, T.: *Amer. J. Clin. Nutri.* **33**, 787(1980).
- Kamai, I.(金井): *日本生理學雜誌, Korean Ginseng Res. Inst.* (1941).
- Kang, B.H. and Joo, C.N.: *Korean Biochem. J.* **19**, 168(1986).
- Kang, B.H. and Joo, C.N.: *Korean Biochem. J.* **19**, 173(1986).
- Joo, C.N., Lee, Y.W. and Koo, J.H.: *Korean Biochem. J.* **20**, 362(1987).
- Joo, C.N., Kang, I.C. and Lee, H.B.: *Korean J. Ginseng. Sci.* **12**, 104(1980).
- Bligh, E.C. and Dyer, W.: *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911(1959).
- Kenny, A.P.: *Biochem. J.* **52**, 611(1952).
- Biggs, H.G., Erikson, J.M. and Moorehead, W.R.: *Clinical Chem.* **21**, 437(1975).
- Soutar, A.K. and Knight, B.L.: *British Medical Bulletin.* **46**, 891(1990).
- Natio, H.K., Wada, M., Ehrhart, L.A. and Lewis, L.A.: *Clinical Chemistry.* **19**, 228(1973).
- McFarlane, A.S.: *Nature* **182**, 53(1958).
- Lancer, T., Strober, W. and Levy, R.I.: *J. Clin. Invest.* **51**, 1528(1972).
- Golos, T.G., August, A.L. and Strauss, J.G.: *J. Lipid Research.* **27**, 1089(1986).
- Wade, D.P., Knkght, B.L. and Soutar, A.K.: *Eur. J. Biochem.* **174**, 213(1988).
- Goldstein, J.L. and Brown, M.S.: *J. Biol. Chem.* **240**,

- 5153(1974).
23. Kirby, K.S.: *Biochem. J.* **64**, 405(1956).
24. Fears, R. and Brown, R.: *Biochemical Pharmacology.* **40**, 2029(1990).
25. Lack, L. and Weiner, I.M.: *Amer. J. Physiol.* **200**, 313(1961).
26. Lack, L. and Tantawi, A.: *Amer. J. Physiol.* **240**, 754 (1984).
27. Wilson, T.H. and Wiseman, G.: *J. Physiol.* **123**, 116 (1954).
28. 이용우: 연세대학교 이학석사학위논문(1987).
29. Joo, C.N., Choi, J.Y. and Lee, Y.W.: *Korean Biochem. J.* **20**, 368(1987).
30. Toshiyuki, A., Takagi, S. and Sankawa, U.: *Amer. Chem. Society.* **1904** (1980).
31. Golos, T.G., Strauss, J.F. and Miller, W.L.: *J. Steroid Biochem.* **27**, 767(1987).
32. Oakenfull, D.G. and Fenwick, D.E.: *Br. J. Nutr.* **42**, 200(1979).
33. Oakenfull, D.G. and Fenwick, D.E.: *Br. J. Nutr.* **40**, 299(1978).
34. Johnson, I.T., Jennifer, M.G. and Price, K.: *J. Nutr.* **116**, 2270(1986).
35. Sidhu, G.S. and Oakenfull, D.G.: *Br. J. Nutr.* **55**, 643(1986).