Korean J. Ginseng Sci.
Vol. 18, No. 1, 17~24(1994)

쥐의 간 Glucokinase 활성에 미치는 인삼 성분의 영향

주충노 · 김선진
연세대학교 이과대학 생화학과
(1994년 4월 1일 접수)

Effect of Ginseng Components (Ginsenosides and Fat Soluble Fraction) on Rat Liver Glucokinase Activity

Chung No Joo and Sun Jin Kim
Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
(Received April 1, 1994)

Abstract□Effect of ginsenoside mixture, ginsenoside Rb_1, Rb_2, Rg_1 and the fat soluble fraction of the roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer on the activity of glucokinase (GK) *in vitro* has been observed and found that GK activity was increased about 15% at the concentration of ginsenoside mixture and/or the fat soluble fraction being 10^{-7}~10^{-5}%. It was also observed that glucose uptake by rat liver was increased in the presence of either ginsenoside mixture or the fat soluble fraction by perfusion technique. Ginsenoside mixture stimulated various enzymes related to glucose metabolism, however, both ginsenoside mixture and the fat soluble fraction did not stimulate GK activity as expected. Primary culture of liver cells showed that the ginsenoside mixture and the fat soluble fraction increased GK activity significantly and they stimulated the GK activity synergistically in the co-presence of insulin.

Key words□Glucokinase, ginsenoside.

서 론

간은 당의 항상성 유지에 중심적인 역할을 담당하는 기관이다.[1-3] 음식을 섭취한 이후와 같이 혈당량이 증가하면 간은 일차로 당을 glycogen형으로 저장하며 여분은 다른 에너지 저장 형태인 지방산 합성에 이용한다. 또한 절식이나 당뇨와 같은 때에 간은 glycogen 분해나 당신생반응으로부터 당을 생산하여 혈류로 내보내는 작용을 하므로써 뇌와 적혈구에 계속적인 에너지를 공급하게 된다.

간에서 당대사의 유지는 주로 조절효소에 대한 활성의 조절에 의해서 이루어지는데, 해당 반응에서의 조절단계는 glucokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase의 조절이, 당신생반응에서는 glucose-6-phosphatase, fructose-1,6-bisphosphatase, pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase의 조절이 중심이 되며 단기적으로는 효소의 활성변화에 의해서, 장기적으로는 hormone에 의한 효소의 합성 증감에 의해서 조절이 이루어진다.[1,3]

Streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐에서 인슐린 결핍으로 인한 간에서의 당대사 변화에 대한 연구를 보면 glucokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, acetyl CoA carboxylase 등과 같은 효소들의 활성이 감소하고, glucose-6-phosphatase와 같은 효소의 활성이 증가하는 것을 알 수 있다.[4-6]

당뇨병 치료를 위해 사용되어온 한방 약제 가운데서 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 중심적인 위치에 있으며 Saito[7]가 임상 실험을 시작한 이후로 Lei,[8] Petkov 등[9]에 의해서 인삼의 혈당강하 작용에 대한

본 연구는 1993년도 한국인삼연초연구원 연구 용역비로 이루어진 것임.

연구가 이루어졌다. 특히 Petkov[9]는 인삼이 insulin과 상승적인 작용을 가질 뿐만 아니라 그 자체가 혈당 강하 작용이 있다는 제안을 하였다. Yokozawa 등은 인삼성분 가운데서 ginsenoside Rb_2가 고혈당 개선에 가장 큰 효과를 나타내며[10] 간의 glucose-6-phosphatase나 glucokinase 활성변화에 효과가 있다는 보고를 하였다.[11]

주 등[12-15]은 streptozotocin 유발 당뇨쥐에 ginsenoside 성분과 지용성 성분을 투여했을 때 streptozotocin 투여로 인한 혈청 성분의 변화가 개선되고 활성이 저하된 간의 당대사에 관련된 조절 효소들과 acetyl CoA carboxylase의 활성이 유의적으로 증가하는 한편 활성이 상승된 glucose-6-phosphatase의 활성이 유의적으로 감소하는 것을 관찰하였다. 이들 효소 가운데서도 glucokinase(GK)가 ginsenoside 성분이나 지용성 성분의 투여로 인한 활성변화의 유의적인 효과가 큰 것으로 나타났다. GK는 혈당의 간으로의 흡수를 조절하여 혈당량 유지에 중추적인 역할을 하는 효소로서 glucose에 대한 K_m값이 생리적인 농도에 가까운 10 mM 근방이며 mannose나 fructose와 같은 다른 당에 대한 K_m값은 훨씬 높기 때문에 GK는 glucose의 인산화에 제한되어 있는 것으로 알려져 있다.[16] 또한 GK에 의해서 glucose로부터 생성되는 glucose-6-phosphate는 glycogen 합성이나 해당반응 및 pentose phosphate shunt 경로에 대한 기질이 되기 때문에 더 큰 의미를 갖는다.[17] 간에서 GK의 합성에 대한 연구에 의하면 GK 유전자의 발현은 insulin에 의해서 촉진되고 glucagon에 의해서 억제되는 것으로 밝혀졌다.[2,18]

본 연구에서는 streptozotocin 유발 당뇨쥐에 대한 인삼의 개선효과가 인삼 성분의 직접적인 효소활성에 미치는 영향인지 간접적으로 효소의 합성을 증가시키는 것인지 또는 췌장 손상을 완화시키므로써 일어나는 현상인가 하는 점을 연구하기 위해 인삼 성분이 간의 glucokinase 활성에 미치는 영향을 *in vitro*에서 관찰하였고, liver perfusion technique을 이용하여 glucagon만 존재하고 insulin이 없을 때 간의 glucose 흡수와 당대사 관련 효소활성에 미치는 인삼 성분의 영향을 관찰하였으며 간세포 일차배양 실험을 통하여 insulin이 존재할 때와 존재하지 않을 때에 glucokinase 활성에 미치는 인삼 성분의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

간 perfusion technique을 포함한 모든 실험에 사용된 동물은 Sprague Dawley 계통의 흰쥐(200~250 g, ♂)였으며 25℃에서 물과 먹이를 자유롭게 공급하였고, 실험 전 24시간 동안은 절식시켰다.

2. 인삼 성분

인삼 성분은 한국인삼연초연구원에서 공급받은 *Panax ginseng* C.A. Meyer에서 추출한 ginsenoside 혼합물, 정제된 ginsenoside Rb_1, Rb_2 및 Rg_1 그리고 지용성 분획이었다.

3. Glucokinase 활성에 미치는 ginsenoside 및 지용성 성분의 영향(*in vitro*)

본 실험에 사용한 쥐의 간은 뒤에 설명하게 될 liver perfusion 실험의 대조군, 즉 insulin이나 인삼 성분을 가하지 않고 glucagon (2.1 nM)만을 넣은 perfusion buffer로 perfusion 실험을 한 간을 효소원으로 이용하였다. 먼저 perfusion을 한 후에 간을 떼어내고 Teflon-pestle Wheaton Elvehjem 조직 파쇄기를 이용하여 100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, 50 mM glucose를 함유한 150 mM KCl 용액(pH 7.4) 내에서 세포를 파쇄하여 20%(w/v) 파쇄액을 만든 다음 10,000 x g에서 15분간 원심분리하여 cell debris, 핵, 미토콘드리아를 제거한 상층액을 효소원으로 이용하였다.

Glucokinase 활성[19]은 짝지은 효소반응에 의해 측정하였는데, glucose와 ATP를 기질로 이용하는 GK 반응의 생성물인 glucose-6-phosphate가 과량의 glucose-6-phosphate dehydrogenase 존재하에서 $NADP^+$에 의해 산화될 때 생성되는 NADPH를 340 nm에서의 흡광도 증가로써 측정하고 NADPH의 몰흡광계수인 $\varepsilon = 6{,}220\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$를 이용하여 생성된 양을 계산하였다.

효소반응액(1.0 ml)의 조성(최종농도)은 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5), 50 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 1 mM $NADP^+$, 100 mM glucose, 0.4 U glucose-6-phosphate dehydrogenase였다. 인삼 성분은 ginsenoside 혼합물, ginsenoside Rb_1, Rb_2, Rg_1 및 지용성 성분을 10^{-8}%(w/v)부터 10^{-3}%까지 넣었으며 인삼 성분 대신에 증류수를 넣고 측정한 값을 대조값(cont-

rol)으로 하였다. 지용성 성분의 경우 95%(v/v) ethanol로 희석하였으며 반응액 내에서의 효과적인 분산을 위하여 0.2%(w/v) bovine serum albumin을 함유한 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)를 이용하였다.

간에는 GK 이외에도 glucose를 인산화하는 효소인 hexokinase(HK)가 존재하는데 HK는 glucose에 대한 K_m이 대단히 낮은 효소로서 glucose-ATP phosphotransferase의 전체 활성에서 HK의 활성을 빼줌으로써 GK 활성을 측정하였다. HK의 활성측정은 GK 활성 측정 조건과 동일하고 0.5 mM glucose를 기질로 이용하였다.

3. 쥐의 간 perfusion technique

간의 당대사 관련 효소 및 acetyl CoA의 활성에 미치는 ginsenoside 혼합물 및 지용성 성분의 영향을 연구하기 위한 간 perfusion technique에서는 흰쥐를 24시간 절식시킨 뒤 diethyl ether로 마취하여 개복하고 간문맥을 통해 95% O_2/5% CO_2의 혼합기체로 포화된 perfusion buffer(NaCl 118.5 mM, KCl 4.74 mM, NH_2PO_4 1.18 mM, $NaHCO_3$ 24.9 mM, $CaCl_2$ 2.54 mM, $MgSO_4$ 1.18 mM, glucose 500 mg/dl)를 37℃에서 일정한 유속(3~3.5 ml/min·g wet wt)으로 20분 동안 흘려서 평형이 이루어지게 한 다음 대조군에는 glucagon(2.1 nM)을 넣은 perfusion buffer를, 시험군에는 glucagon(2.1 nM)과 ginsenoside 성분(10^{-3}%) 또는 인삼 지용성 성분(10^{-3}%)을 함께 넣은 perfusion buffer를 같은 조건하에서 순환시키면서 간을 통과하여 배출되는 perfusion 용액을 채취하여 glucose 양을 측정하였으며 2시간 동안 순환시킨 후에 간을 떼어내어 효소의 활성측정에 사용하였다.

Phosphofructokinase, pyruvate kinase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, glucose-6-phosphatase 그리고 acetyl CoA carboxylase의 활성 및 glycogen 함량과 glucose 양은 주 등[12-15]의 논문에 기재된 방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

4. 쥐의 간세포 일차배양 실험

Glucokinase의 활성측정을 위한 쥐의 간세포 일차배양 실험[20]에서는 흰쥐를 24시간 절식시킨 뒤 thiopental(50~75 mg/kg)을 복강내에 주사하여 마취하고 마취된 쥐에 heparin을 복강주사한 다음 멸균된 가위를 사용하여 개복하였다. 멸균된 22-gauge catheter를 간문맥에 꽂고 고무관을 연결하여 perfusion buffer(Hank's Balanced Salt Solution)가 간으로 흐르게 하였다. Perfusion buffer는 37℃에서 95% O_2/5% CO_2의 혼합기체로 포화되었으며 buffer 1 l의 조성은 0.4 g KCl, 0.06 g KH_2PO_4, 8.0 g NaCl, 0.12 g Na_2HPO_4, 1.12 g $NaHCO_3$, 1.0 g glucose, 0.01 g phenol red, 100 nM insulin, 10만 unit penicillin, 0.1 g streptomycin이었다. 간이 부풀기 시작하였을 때 하대정맥을 끊어주고 200 ml 정도의 buffer를 15~20 ml/min의 유속으로 순환시켰으며 perfusion 다음 단계에서는 0.025~0.05%(w/v)의 collagenase가 함유된 perfusion buffer를 같은 조건에서 16 ml/min의 유속으로 순환시켰다.

Perfusion이 끝난 다음 간을 조심스럽게 떼어내어 perfusion buffer에 담그고 멸균된 가위로 간세포를 절단하여 분산시킨 후 250 μm 헝겊으로 여과시켰다. 여과된 용액을 500 x g에서 2분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전된 간세포에 buffer를 가하여 분산시킨 다음 같은 방법으로 1회 반복하였다. 침전된 간세포에 배양배지를 가하여 분산시킨 다음 같은 방법으로 1회 반복하고 침전된 간세포에 배양배지를 가하여 분산시켰다. 배양배지 1 l의 조성은 9.7 g Eagle's Minimal Essential Media, 2.0 g bovine serum albumin, 2.2 g $NaHCO_3$, 0.1 g kanamycin, 25만 unit penicillin, 0.25 g streptomycin, 10%(v/v) fetal bovine serum이었다. 간세포의 수와 생존도는 0.4% trypan blue로 염색하여 hemacytometer로 측정하였다. 세포농도가 1.0×10^6 cell/ml이 되도록 배양배지를 가하여 희석한 다음 미리 collagen을 깔아둔 100×20 mm petri dish를 4군으로 나누어 세포 분산액을 12 ml씩 담고 37℃ CO_2 배양기에 4시간 동안 방치하였다.

간세포가 petri dish에 붙었는지를 확인한 다음 배양배지를 조심스럽게 버리고 새 배양배지를 4개군의 petri dish에 12 ml씩 넣었는데, 대조군에는 배양배지에 glucagon(2.1 nM)만을 가하였고, 3개의 시험군 중에서 1군에는 glucagon(2.1 nM)과 인삼 성분(10^{-4}%의 ginsenoside 또는 10^{-3}%의 지용성 성분)을 가하고, 또다른 군에는 glucagon(2.1 nM)과 insulin(105 nM)을, 나머지 군에는 glucagon(2.1 nM)과 insulin(105 nM) 및 인삼 성분(10^{-4}%의 ginsenoside 또는 10^{-3}%의 지용성 성분)을 가하였다. 처리가 끝난 petri dish를 37℃ 배양기에서 14시간 배양한 후 세포를 수확하여 100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, 50 mM glucose를 함유한 150

mM KCl 용액(pH 7.4)에 분산하고 조직 파쇄기를 이용하여 일차로 세포를 파쇄하고 초음파 발생기를 이용하여 3분 간격으로 15초씩 5회 반복하여 세포를 파쇄한 다음 10,000 x g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 효소원으로 이용하였다.

5. 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry의 방법[21]에 따라서 수행하였으며 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

6. 통계 처리

대조군과 인삼 성분 처리군들 사이의 통계적 유의성은 Student's t-test를 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

Glucokinase(GK)의 발현은 insulin 의존적이며 streptozotocin 유발 당뇨쥐에서 GK 활성은 50% 정도 감소하지만 insulin을 투여하면 정상 수준으로 회복되는 것으로 알려져있다.[4,5] Streptozotocin 유발 당뇨쥐에 ginsenoside 성분이나 지용성 성분을 투여하

Table 1. Effect of ginsenoside mixture on rat liver glucokinase *in vitro*

Ginsenoside mixture (%)	Activity (NADPH nmole/min/mg protein)	Relative activity (%)
Control	6.53± 0.35	100.0
10^{-8}	6.52± 0.27	99.8
10^{-7}	6.86± 0.26	105.1
10^{-6}	7.07± 0.31*	108.3
10^{-5}	7.50± 0.30**	114.9
10^{-4}	6.87± 0.25	105.2
10^{-3}	6.63± 0.21	101.5

Values are Mean± S.E. (n=4).
*p<0.05, **p<0.01, significantly different from the control value.

Table 2. Effect of ginsenoside Rb_1 on rat liver glucokinase *in vitro*

Ginsenoside Rb_1 (%)	Activity (NADPH nmole/min/mg protein)	Relative activity (%)
Control	6.29± 0.51	100.0
10^{-8}	7.01± 0.78	111.4
10^{-7}	7.20± 0.48*	114.5
10^{-6}	7.38± 0.34*	116.7
10^{-5}	7.43± 0.31**	117.2
10^{-4}	6.59± 0.41	104.8
10^{-3}	6.05± 0.38	96.2

Values are Mean± S.E. (n=4).
*p<0.05, **p<0.01, significantly different from the control value.

Table 3. Effect of ginsenoside Rb_2 on rat liver glucokinase *in vitro*

Ginsenoside Rb_2 (%)	Activity (NADH nmole/min/mg protein)	Relative activity (%)
Control	6.35± 0.27	100.0
10^{-8}	6.36± 0.27	100.2
10^{-7}	6.47± 0.28	101.9
10^{-6}	6.51± 0.30	102.5
10^{-5}	6.89± 0.31*	108.5
10^{-4}	7.18± 0.33**	113.1
10^{-3}	6.59± 0.32	103.8

Values are Mean± S.E. (n=4).
*p<0.05, **p<0.01, significantly different from the control value.

Table 4. Effect of ginsenoside Rg_1 on rat liver glucokinase *in vitro*

Ginsenoside Rg_2 (%)	Activity (NADPH nmole/min/mg protein)	Relative activity (%)
Control	6.72± 0.33	100.0
10^{-8}	7.62± 0.64*	113.4
10^{-7}	7.87± 0.33***	117.1
10^{-6}	7.57± 0.55*	112.6
10^{-5}	7.22± 0.40	107.4
10^{-4}	6.74± 0.54	100.3
10^{-3}	6.52± 0.51	97.0

Values are Mean± S.E. (n=4).
*p<0.05, ***p<0.005, significantly different from the control value.

Table 5. Effect of ginsenoside fat soluble fraction on rat liver glucokinase *in vitro*

Fat soluble fraction (%)	Activity (NADPH nmole/min/mg protein)	Relative activity (%)
Control	6.84± 0.38	100.0
10^{-8}	6.93± 0.42	101.3
10^{-7}	7.47± 0.37*	109.2
10^{-6}	7.55± 0.43*	110.4
10^{-5}	7.13± 0.45	104.2
10^{-4}	7.15± 0.29	104.5
10^{-3}	7.13± 0.51	104.2

Values are Mean± S.E. (n=4).
*p<0.05, significantly different from the control value.

였을 때에도 GK의 활성이 향상되는 것을 알 수 있는데,[12-15] GK의 활성에 미치는 인삼 성분의 효과가 직접 효소의 활성변화를 유도하는 조절자로서의 역할에 의한 것인지 또는 insulin과 같이 GK의 합성을 자극하는 hormone과 같은 역할에 의한 것인지를 살펴보기 위하여 먼저 *in vitro*에서 인삼 성분에 의한 GK의 활성 변화를 관찰하였다. 이 실험에서 쥐의 간은 *in vivo* 실험이나 perfusion 실험 등과 조건을 비슷하게 하기 위하여 glucagon(2.1 nM)만을 함유한 perfusion buffer로 perfusion을 하여 insulin이 제거되고 GK의 활성이 감소된 것을 사용하였다.

Table 1에서 5까지의 결과를 보면 대조군에 비하여 인삼 성분의 처리에 의해서 모두 GK의 활성이 증가하였으며, 인삼 성분에 따라 약간의 차이는 있지만 반응액내에서의 농도가 10^{-7}~10^{-5}%일 때 GK의 유의적인 활성 변화가 가장 큰 것으로 나타났다. 인삼 성분 가운데에서는 ginsenoside Rb_1과 Rg_1이 17% 정도로 비교적 높은 증가를 나타내었으며 지용성 성분도 10% 내외의 증가를 보였다. 주 등[12-15]에 의한 streptozotocin 유발 당뇨쥐에 대한 인삼 성분 투여 실험에서는 GK의 활성이 ginsenoside 성분에 의해 100% 가까이 증가하였고 지용성 성분에 의해 약 40% 정도 까지 증가한 것을 고려할 때 *in vivo*에서의 인삼의 작용은 인삼 성분의 직접적인 GK 활성 변화에 의하여 이루어지는 것이라기 보다는 다른 간접적인 영향이 더 크게 작용할 것으로 생각된다.

인삼 성분, 특히 ginsenoside 성분에 의한 직접적인 GK 활성의 증가는 다른 여러 효소의 경우에서와 거의 같은 수준의 변화인데, 이러한 현상은 인삼 saponin의 화학적 특성에 의하기 보다는 계면 활성과 같은 물리적 특성에 기인하는 것으로 파악되며[22] ginsenoside가 효소와 작용하여 비특이적으로 효소의 형태를 변화시키므로써 효소반응이 촉진되는 것으로 해석된다.[23] 인삼에 의한 고혈당 강하 작용에서 ginsenoside의 계면활성에 의한 비특이적인 효소활성화 작용도 부분적으로는 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

Perfusion technique에서는 인삼 성분의 존재 여부에 따른 perfusion 용액의 glucose 함량 변화와 당대사에 관련 효소의 활성변화를 관찰하였다.

Table 6은 glucose(500 mg/100 ml)와 glucagon(2.1 nM)이 함유된 perfusion buffer에 ginsenoside 혼합물(10^{-3}%)을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에 쥐의 간 조직을 통과한 perfusion 용액의 glucose 함량 변화를 시간별로 측정하여 간의 glucose 흡수량을 나타낸 것이며 Table 7은 같은 조건에서 ginsenoside 대신에 지용성 성분(10^{-3}%)을 첨가한 경우의 결과이다. 간에서 인삼 성분의 고혈당 강하작용을 간접적으로 관찰한 이 실험에서는 ginsenoside 혼합물이 지용성 성분보다는 glucose의 흡수를 보다 더 증진시켰으며 두 성분 모두 간에서의 glucose 대사를 촉진하는 것으로 나타났다.

Table 6. Glucose consumption during circulation of the perfusion solution containing glucose (500 mg/100 ml), glucagon (2.1 nM) and ginsenoside mixture (10^{-3}%)

Condition	Glucose uptake (mg/30 min)				Total glucose uptake (g/120 min)
	1st 30 min	2nd 30 min	3rd 30 min	4th 30 min	
Control (−) ginsenoside mixture	747.1	709.8	83.7	16.6	1557.2
Test (+) ginsenoside mixture	764.4	912.4	780.8	532.8	2990.4

Table 7. Glucose consumption during circulation of the perfusion solution containing glucose (500 mg/100 ml), glucagon (2.1 nM) and fat soluble fraction (10^{-3}%)

Condition	Glucose uptake (mg/30 min)			Total glucose uptake (g/90 min)
	1st 30 min	2nd 30 min	3rd 30 min	
Control (−) fat soluble fraction	518.2	703.4	357.1	1578.7
Test (+) fat soluble fraction	454.1	458.3	1064.2	1976.6

Table 8. Effect of ginseng saponin mixture on liver enzymes relating glucose metabolism by liver perfusion technique

Hormone	Ginsenoside mixture (10^{-3}%)	Glycogen (mg/g liver)	Glucokinase (NADPH nmole/ min/mg protein)	Phosphofructokinase (NADH nmole/ min/mg protein)	Pyruvate (NAD^+ nmole/ min/mg protein)
Glucogen (2.1 nM)	(−)	7.15	23.63	14.53	18.05
	(+)	12.50	24.81	15.73	19.19

Hormone	Ginsenoside mixture (10^{-3}%)	Glucose-6-phosphatase (Pi nmol/ min/mg protein)	6-phosphogluconate dehydrogenase (NADPH nmole/ min/mg protein)	Acetyl CoA caboxylase (malonyl CoA nmole/ min/mg protein)
Glucogon (2.1 nM)	(−)	32.47	12.66	0.415
	(+)	27.19	16.20	0.625

Table 9. Effect of fat soluble fraction on liver glucokinase activity relating glucose metabolism by liver perfusion technique

Hormone	Fat soluble fraction (10^{-3}%)	Glucokinase (NADPH nmole/ min/mg protein)	Relative activity (%)
Glucagon (2.1 nM)	(−)	6.29± 0.37	100.0
	(+)	7.08± 0.33**	112.6

Value are Mean± S.E. (n=5).
**p<0.01, significantly different from the control value.

Table 8은 간 perfusion 실험을 행한 후 떼어낸 간에서의 당대사와 관련된 효소 활성을 관찰한 것이다. GK의 활성은 perfusion buffer에 ginsenoside를 첨가했을 경우 첨가하지 않은 대조군에 비해 약 5% 정도의 증가를 나타낸 반면 6-phosphogluconate dehydrogenase와 acetyl CoA carboxylase의 활성은 크게 증가하였고 glucose-6-phosphatase의 활성도 비교적 많이 감소하였다. 또한 간의 glycogen 함량은 75% 정도의 증가를 나타내었다. 이와 같은 결과를 보면 glucose 흡수의 촉진은 ginsenoside의 GK에 대한 직접적인 작용에 의하여 일어난 것 보다는 다른 효소들의 활성을 증가시킴에 따라 당대사가 glucose의 흡수를 촉진하는 방향으로 작용하였기 때문인 것으로 생각된다.

Table 9는 인삼 지용성 성분(10^{-3}%)을 넣고 perfusion 실험을 한 간에서의 GK 활성을 관찰한 것으로 GK의 활성이 대조군에 비해서 112.6%로 유의적인 증가를 나타내었는데, Table 5에 나타난 바와 같이 인삼 지용성 성분의 *in vitro*에서의 직접적인 효소활성화 작용 수준(110%)을 크게 벗어나지 못한 것을 알 수있다. 인삼 성분이 insulin과 같이 GK의 합성을 촉진하는 기능이 있다고 가정할 경우에 perfusion 실험 진행 시간이 2시간을 넘지 않기 때문에 그시간 동안에 GK의 발현이 충분히 이루어졌는지에 대해서 의문점을 가질 수 있다. 당뇨쥐에 insulin을 투여하면 1시간내에 GK 유전자의 전사가 활발히 진행된다는 연구[24]가 있지만 인삼 성분이 insulin과 같은 빠른 효과를 나타내기는 어려울 것으로 생각되기 때문이다. 또한 인삼 성분이 간에만 국한되어 작용하는 이외에 당뇨쥐에서와 같이 손상된 췌장의 세포에서 insulin의 분비를 자극하여 간에서의 당대사를 촉진시키는 역할을 할 가능성이 있으며, perfusion 실험이 insulin이 없는 가운데서 진행되었기 때문에 인삼 성분과 insulin과의 상호작용에 의한 GK 활성 증진이 나타나지 않은 것으로도 생각된다.

간세포의 일차배양 실험에서는 GK의 활성에 미치는 인삼 성분의 영향을 insulin이 존재할 경우와 존재하지 않을 경우로 나누어 조사하였으며 인삼 성분과 insulin의 작용이 상호 연관성을 갖는지에 대해서도 관찰하였다.

Fig. 1은 ginsenoside 혼합물과 insulin의 GK 활성에 미치는 영향을 관찰한 것이다. Ginsenoside 혼합물을 넣고 배양한 시험군에서의 GK 활성이 대조군에 비하여 약 20% 정도 향상되었으며 insulin만을 넣은 경우에는 이보다 약간 더 향상되었지만 insulin과 ginsenoside을 함께 넣고 배양한 시험군에서의 GK 활

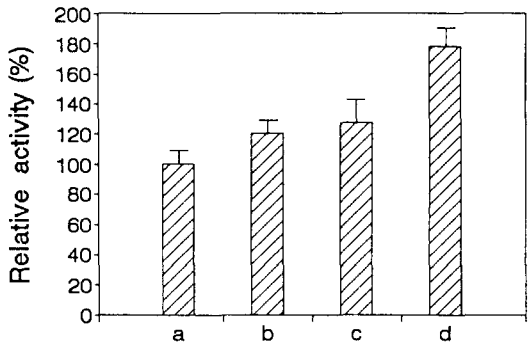

Fig. 1. Effect of ginsenoside mixture and insulin on glucokinase activity in primary cultures of hepatocytes from rats.
Hepatocytes were cultured for 14 h in Eagle's MEM.
a. Control value containing glucagon (2.1 nM), b. Contained glucogon (2.1 nM) and ginsenoside (10^{-4}%), c. Contained glucagon (2.1 nM) and insulin (105 nM), Contained glucagon (2.1 nM) and ginsenoside (10^{-4}%) and insulin (105 nM) Values were Mean± S.E. (n=4).

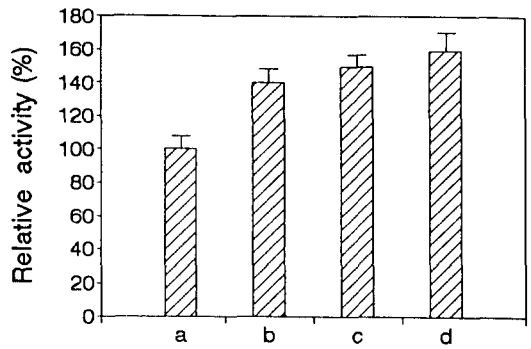

Fig. 2. Effect of ginseng fat soluble fraction and insulin on glucokinase activity in primary cultures of hepatocytes from rats.
Hepatocytes were cultured for 14 h in Eagle's MEM.
a. Control value containing glucagon (2.1 nM), b. Contained glucagon (2.1 nM) and fat soluble (10^{-3}%), c. Contained glucagon (2.1 nM) and insulin (105 nM), d. Contained glucagon (2.1 nM), fat soluble (10^{-3}%) and insulin (105 nM) Vlues were Mean± S.E. (n=4).

성은 대조군에 비하여 80% 가까이 증가하였다. Saponin 자체만으로는 *in vivo* 실험[12]에서와 같은 정도로 GK의 활성을 증가시키지는 못하지만 insulin과 함께 작용할 때에는 어느 정도 *in vivo* 수준으로 GK 활성이 향상되는 것으로 미루어 insulin이 GK 유전자의 발현을 유도할 때 인삼 saponin이 촉진자로서 작용할 수 있다고 생각된다. Glucocorticoid는 GK 유전자의 발현에 직접적인 효과를 나타내지는 않지만 GK 발현을 유도하는 insulin의 효과를 보다 더 증진시키는 작용을 하는데[25,26] glucocorticoid와 기본 골격이 유사한 saponin이 그와 비슷한 기능을 가질 수 있다고 여겨진다. 한편으로 *in vivo*에서는 ginsenoside 혼합물이 streptozotocin으로 손상된 췌장의 세포로부터 insulin의 분비를 자극하므로써 증가된 insulin과 함께 GK의 합성을 촉진할 수 있는 가능성도 배제할 수가 없다.

Fig. 2는 ginsenoside 혼합물 대신에 인삼 지용성 성분을 넣고 관찰한 결과이며 Fig. 1과는 조금 다른 양상을 나타내었다. 지용성 성분을 넣고 배양한 시험군에서의 GK 활성은 대조군에 비하여 약 40%가 증가하였으며 insulin에 의해서는 약 50%, insulin과 지용성 성분을 함께 넣었을 경우에는 약 60% 정도의 활성이 증가하였다. 인삼의 지용성 성분에 의한 GK 활성의 증가는 *in vivo* 실험[15]에서와 거의 같은 수준으로 향상되었으며 ginsenoside의 경우와 같이 insulin과의 커다란 상호작용은 나타내지 않았지만 지용성 성분도 insulin과 함께 GK 활성 증가에 대하여 상승적 효과를 나타내었다. 지용성 성분이 insulin의 기능을 완전하게 충족시키지는 못한다고 하여도 어느 정도 insulin의 작용을 대신할 수 있는 것으로 파악되며 GK의 활성을 향상시키는 mechanism이 insulin과 같은 것인지 아니면 다른 mechanism에 의하여 GK의 발현을 유도하는가에 대해서는 좀 더 깊은 연구가 필요하다고 생각된다. Ginsenoside 성분이나 지용성 성분 모두 간의 고혈당 강하작용에 효과가 있으며 간의 GK의 활성을 직접 또는 간접적으로 증가시키는 작용이 고혈당 강하작용에 중요한 하나의 이유로 설명될 수 있을 것이다.

요 약

Glucokinase(GK) 활성에 대한 인삼 성분(ginsenoside 혼합물, ginsenoside Rb_1, Rb_2, Rg_1 및 지용성 성분)의 영향을 *in vitro*에서 관찰한 결과 ginsenoside 혼합물, ginsenoside Rb_1, Rb_2, Rg_1 또는 지용성 성분 모두 반응액 내에서의 농도가 10^{-7}~10^{-5}%(w/v)에서

15% 내외의 GK 활성 증가를 나타내었다. 간의 perfusion technique으로부터 인삼 성분의 처리에 의하여 간조직의 glucose 흡수작용이 촉진됨을 관찰하였으며 몇 가지 당대사 관련효소의 활성도 증가하였지만 GK의 활성에는 기대할만한 활성화 작용은 없었다. 간세포의 일차배양 실험에서 ginsenoside 혼합물은 GK의 활성을 증가시켰으며 insulin과 함께 작용할때는 상승적으로 GK의 활성을 크게 증가시켰다. 또한 인삼 지용성 성분도 GK의 활성을 증가시켰으며 insulin과 함께 작용할 때도 상승적인 효과를 나타내었다. 결국 인삼 성분은 GK에 대한 직접적인 비특이적 활성화 뿐만 아니라 GK 합성 촉진에도 영향을 미치는 것으로 생각된다.

인 용 문 헌

1. Granner, D.K. and Pilkis, S.J. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 10173 (1990).
2. Hers, H.G. : *J. Inherit. Metab. Dis.*, **13**, 395 (1990).
3. Pilkis, S.J. and Granner, D.K. : *Annu. Rev. Physiol.*, **54**, 885 (1992).
4. Spiro, R.G., Ashmore, J. and Hastings, A.B. : *J. Biol. Chem.*, **230**, 761 (1958).
5. Spence, J.T. : *J. Biol. Chem.*, **258**, 9143 (1983).
6. Colosia, A.D., Marker, A.J., Aange, A.J., EI-Maghrabi, M.R., Granner, D.K., Tauler, A., Pilkis, J. and Pilkis, S.J. : *J. Biol. Chem.*, **263**, 18669 (1988)
7. Saito, I. : *Keio Medicine.*, **2**, 149 (1922).
8. Lei, H.P. and Wang, C.K. : *Chung Hua Neiko Tsa Chih.*, **5**, 861 (1957).
9. Petkov, W. : *Arzneim.-Forsch.*, **11**, 288 (1961).
10. Yokozawa, T., Kobayashi, T., Oura, H. and Kawashima, Y. : *J. Med. Pharm. Soc. for WAKAN-YAKU.*, **1**, 22 (1984).
11. Yokozawa, T., Kobayashi, T., Oura, H. and Kawashima, Y. : *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 869 (1985)
12. 주충노, 김주현 : 고려인삼학회지 **16**, 190 (1992).
13. 주충노, 윤수희, 이향숙, 김용덕, 이희봉, 구자현 : 고려인삼학회지 **16**, 198 (1992).
14. 주충노, 구자현, 이희봉 : 고려인삼학회지 **17**, 13 (1993).
15. 주충노, 김선진 : 고려인삼학회지 **17**, 101 (1993).
16. Sharma, C., Manjeshwar, R. and Weinhouse, S. : *J. Biol. Chem.*, **238**, 3840 (1963).
17. Printz, R.L., Magnuson, M.A. and Granner, D.K. : *Annu. Rev. Nutr.*, **13**, 463 (1993)
18. Iynedjian, P.B., Jotterand, D., Nouspikel, T., Asfari, M. and Pilot, P.R. : *J. Biol. Chem.*, **264**, 21824 (1989).
19. DiPietro, D.L. and Weinhouse, S. : *J. Biol. Chem.*, **235**, 2542 (1960).
20. Seglen, P.O. : *Methods Cell Biol.*, **13**, 29 (1976).
21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.*, **913**, 265 (1951).
22. Joo, C.N. : *Proceedings of 2nd Internation Ginseng Symposium*, p. 27, Korean Ginseng Research Institute (1978)
23. Joo, C.N., Koo, J.D., Kim, D.S. and Lee, S.J. : *Korean Biochem. J.*, **10**, 109 (1977).
24. Iynedjian, P.B., Gjinovei, A. and Renold, A.E. : *J. Biol. Chem.*, **263**, 740 (1988).
25. Granner, D.K. : In *Glucocorticoid Hormone Action.*, **12**, 593 (1979).
26. Narkewicz, M.R., Iynedjian, P.B., Ferre, P. and Girard, J. : *Biochem. J.*, **271**, 585 (1990).