

## 인삼성분의 Rat Lens Aldose Reductase 활성에 대한 억제효과

김학성 · 박용양 · 성연희<sup>1</sup>

충북대학교 약학대학, <sup>1</sup>충북대학교 수의과대학

(1996년 3월 5일 접수)

### Inhibitory Effects of Ginseng Components on Rat Lens Aldose Reductase Activities

Hack Seang Kim, Ung Yang Park and Yeon Hee Seong<sup>1</sup>

College of Pharmacy, <sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

(Received March 5, 1996)

**Abstract :** The present study was undertaken to elucidate the effects of ginseng components on rat lens aldose reductase activity. Ginseng total saponin (GTS) exhibited inhibitory activities on rat lens aldose reductase in a dose-dependent manner. Among ginsenosides, Rf and Rg1 showed potent inhibitory activities on rat lens aldose reductase. Lipid soluble fraction also inhibited rat lens aldose reductase activities. These data suggest that ginseng components inhibit rat lens aldose reductase activity *in vitro*.

**Key words :** ginseng components, aldose reductase inhibitor

## 서 론

당뇨성합병증의 병태는 다양하며, 직접 고혈당에 기인하는 것으로서 말초신경장해, 망막증, 신증, 백내장, 각막증등이 있으며,<sup>1-4</sup> 그 발증기전의 하나로 polyol대사이상을 들수 있다.<sup>5,6</sup> Polyol pathway는 glucose대사경로의 하나로 glucose는 aldose reductase에 의하여 sorbitol로 전환된다.<sup>7</sup> 정상상태에서의 aldose reductase의 glucose에 대한 기질친화성은 매우 낮아 sorbitol형성은 거의 일어나지 않는다.<sup>8</sup> 그러나 당뇨병상태에서는 lens, 말초신경, 망막과 같은 insulin-비감수성의 조직에서의 glucose농도가 상승하면 위의 경로에 의하여 대량의 sorbitol을 생성하게 되며,<sup>8,9</sup> 이러한 각 조직에서의 sorbitol축적이 당뇨성 백내장,<sup>1,22</sup> 말초신경장해,<sup>3</sup> 망막증<sup>4</sup> 등의 원인으로 증명되고 있다. 그리하여 백내장 등의 당뇨성합병증 예방 및 치료제로서 aldose reductase 억제제가 주목을 받고 있으며, 몇몇 aldose reductase억제제가 동물실험

및 임상시험에서 당뇨성합병증을 개선함이 보고되는 등 합성물질 뿐 아니라 천연물질로부터 aldose reductase억제성분을 규명하려는 활발한 연구가 이루어지고 있다. 그리하여 flavonoid, tannin, coumarin, essential oil등이 소나 rat, 또는 사람의 여러 조직으로부터 조제된 aldose reductase활성에 대한 억제효과가 있음이 보고되었다.<sup>10-18</sup>

한편, 인삼은 다양한 약리작용이 보고되어 있으며,<sup>19-22</sup> 당뇨병동물에 대한 실험도 다양하게 이루어지고 있다. Saito<sup>23</sup>는 epinephrine고혈당, 식이성고혈당에 대한 인삼의 혈당강하작용을 보고하였고, 김<sup>24</sup>은 epinephrine고혈당에 대한 인삼saponin의 억제작용에 대하여 인삼saponin이 간과 근육에서의 glycogen분해작용을 억제하는 결과라고 보고하였다. Yokozawa 등<sup>25</sup>은 부분정제된 saponin이 정상쥐에서의 지방질대사 및 당류대사와 연관된 여러가지 대사반응들을 촉진한다고 보고하였다. 최근 주 등<sup>26</sup>은 인삼 saponin과 지용성분획의 혈당강하작용에 대하여, 이

들이 streptozotocin투여로 인한 혈청성분의 변화를 개선하고, streptozotocin투여로 활성이 저하된 간의 당대사관련효소들(phosphofructokinase, gluco-kinase, glucose-6-phosphat dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase)와 acetyl CoA carboxylase의 활성을 유의적으로 증가시키며 상승된 glucose-6-phosphatase의 효소활성을 낮추는 효과가 있음을 보고하였다.

그러나, 아직까지 인삼성분의 당뇨성합병증의 원인이 되는 aldose reductase에 대한 활성억제작용에 대한 연구는 보고되지 않았으며, 그러므로 본연구에서는 인삼의 활성성분인 total saponin(GTS) 및 수종의 ginsenosides 그리고 lipid soluble fraction에 대하여, rat lens의 aldose reductase 활성의 억제작용에 대하여 보고한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험동물로는 rat(Sprague-Dawley, 웅성, 200~250 g)를 사용하였다. 사용약물로서, NADPH, DL-glyceraldehyde, phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF), mercaptoethanol은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였고, 인삼 total saponin[GTS; R<sub>m</sub>(18.26%), R<sub>b2</sub>(9.07%), R<sub>c</sub>(9.65%), R<sub>d</sub>(8.24%), R<sub>e</sub>(9.28%), R<sub>f</sub>(3.48%), R<sub>g1</sub>(6.42%), R<sub>g2</sub>(3.62%), R<sub>g3</sub>(4.7%), R<sub>h</sub>(3.82%), R<sub>i</sub>(2.91%) 그리고 minor components로서 다른 ginsenosides를 20.55% 함유]와 각 ginsenosides, 인삼 지용성분획은 한국인삼연구원(대전)에서 분양받아 사용하였다. Ginsenosides R<sub>c</sub>, R<sub>f</sub>와 지용성분획은 ethanol에 용해하였으며, 효소반응액중의 ethanol농도는 0.5% 이하로 하였으며, vehicle로서 같은 농도의 ethanol을 사용하였다. 그 외의 약물은 증류수에 용해하였다.

### 2. Aldose reductase조제

Rat lens의 aldose reductase효소표품은 Aida 등<sup>29)</sup>의 방법에 준하여 제조하였다. 즉, Rat lens를 적출하여 0.5 mM PMSF, 10 mM mercaptoethanol을 함유하는 ice-cold 135 mM phosphate buffer(pH 7.4)의 12배량에 homogenization한 후, 105,000 g에서 30분간 초원심분리하여 얻은 상등액을 효소표품으로

서 사용하였다. 모든 조작은 빙냉하에서 실시하였다.

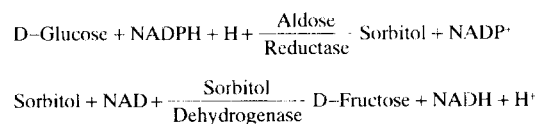
### 3. Aldose reductase의 활성측정

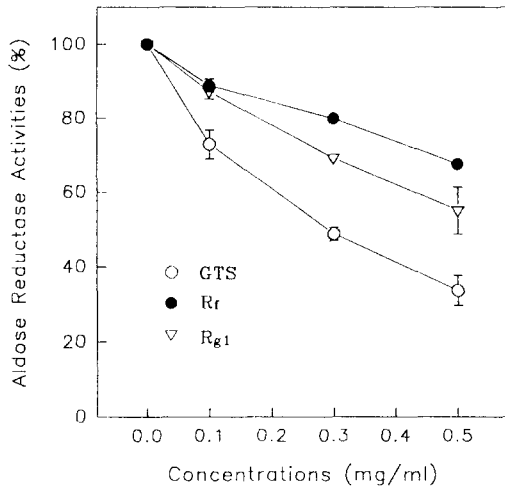
Aldose reductase활성은 Shin 등<sup>30)</sup>의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 기질로서 10 mM DL-glyceraldehyde를 사용하고, 기질을 포함하여 0.16 mM NADPH 및 각 인삼성분과 효소액을 혼합하여 반응액이 1 ml가 되게 하며, 효소반응은 기질첨가후 5분간 실시하며, 340 nm에서 흡광도의 감소를 측정한다. 대조군(인삼성분을 함유하지 않은 효소반응액)의 흡광도 감소를 100%로 하여 각 인삼성분의 억제정도를 산출하였다. 이때 기질만을 제거하고 반응시킨 공시험군의 값을 각각 공제하였다. 흡광도의 변화는  $0.100 \pm 0.005$  absorbance unit/min가 되도록 효소량을 조절하였다. 반응은  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 실시하였고, 각 반응은 duplicate로 하여 각 인삼성분에 대하여 3회 이상 실험을 반복하였다.

## 결과 및 고찰

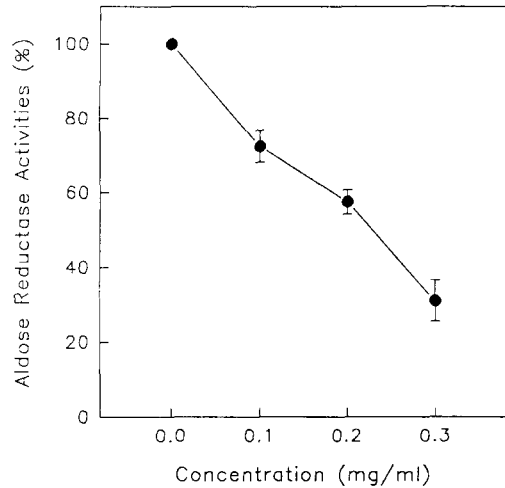
본 실험에서 여러 가지 인삼성분의 rat lens aldose reductase활성에 대한 억제효과를 검토한 결과, GTS는 용량의존적으로 aldose reductase활성을 억제하여 0.5 mg/ml에서 66%의 억제율을 나타내었다(Fig. 1). 다음으로 각 ginsenosides의 aldose reductase에 대한 억제활성을 비교하였다. 사용된 ginsenosides(0.5 mg/ml)중 panaxadiol인 R<sub>m</sub>과 R<sub>c</sub>는 억제활성이 미약하였으며, panaxatriol인 R<sub>f</sub>와 R<sub>h</sub>에 의하여 비교적 강한 억제활성을 나타내었다(Fig. 2). 또한 Fig. 1에 R<sub>c</sub>와 R<sub>h</sub>의 용량반응곡선을 나타냈듯이 R<sub>c</sub>와 R<sub>h</sub>은 용량의존적으로 aldose reductase활성을 억제하였으며, 0.5 mg/ml의 농도에서 R<sub>c</sub>는 약 33%, R<sub>h</sub>은 45%의 억제활성을 나타내었다. 한편 지용성분획도 강한 억제활성을 나타내어 0.3 mg/ml에서 69%의 억제율을 나타내었다(Fig. 3).

Polyol pathway는 glucose대사경로의 하나로, 이는 glucose가 sorbitol을 거쳐 fructose로 변환되는 경로로 2개의 반응계로 구성되며, 2종의 효소가 관여한다.<sup>7-9)</sup>

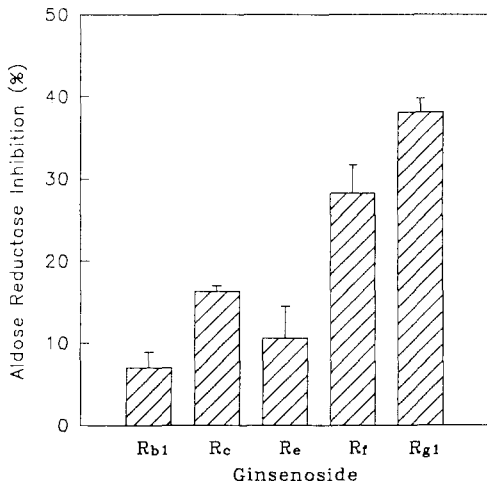




**Fig. 1.** Inhibition of rat lens aldose reductase by GTS, R<sub>r</sub> and R<sub>g1</sub>. The abscissa represents the concentration of ginseng saponins, and the ordinate the activity of aldose reductase relative to its activity in the absence of ginseng saponins. The data shown are the results of a representative study of three to four different enzyme sources.



**Fig. 3.** Inhibition of rat lens aldose reductase by lipid soluble fraction (LSF). The abscissa represents the concentration of LSF, and the ordinate the activity of aldose reductase relative to its activity in the absence of LSF. The data shown are the results of a representative study of three to four different enzyme sources.



**Fig. 2.** Inhibition of rat lens aldose reductase by ginsenosides. Percent inhibition of enzyme activity by ginsenosides (0.5 mg/ml) was calculated by comparing with the enzyme activity in the absence of ginsenosides. The data shown are the results of a representative study of three to four different enzyme sources.

Glucose는 energy원으로서 중요한 물질로서 정상 시에는 세포내에 흡수된 후에 대부분이 hexokinase

에 의하여 glucose-6-phosphate로 되어 해당계에서 대사되고, polyol경로를 거쳐 대사되는 것은 불과 수 %에 지나지 않는다.<sup>3)</sup> 그러나 세포내로의 glucose의 uptake가 insulin에 의존하지 않는 조직에서는 glucose의 세포막투과는 세포외의 glucose농도에 의존하므로 당뇨병에서 고혈당상태가 되면 수정체, 망막, 각막, 말초신경, 혈관, 신사구체, 적혈구등의 insulin非의존성조직의 세포내 glucose농도는 상승하고, 이들 조직의 세포내에 특히 다량 존재하는 polyol경로의 율속효소인 aldose reductase에 의하여 glucose대사가 향진되어 sorbitol의 과잉생성이 인정되고,<sup>8,9)</sup> 그 결과 sorbitol이 축적되는 부위의 발병증상에 따라서 당뇨병성백내장, 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 각막증, 당뇨병성 신경장해, 당뇨병성 신증등의 당뇨병성 합병증을 일으키게 된다.<sup>1-4)</sup>

Aldose reductase가 촉매하는 glucose의 sorbitol로의 환원반응은 그 평형에서 역반응을 일으키지 않는다. 더욱기, sorbitol dehydrogenase의 활성이 aldose reductase의 활성보다 낮기 때문에 sorbitol에서 fructose로의 변환량은 약간이며, 결과적으로 polyol경로의 향진은 sorbitol을 축적시킨다.<sup>8)</sup> 또, 다당 alcohol인 sorbitol은 극성이 높아 세포막외로 확산이

어려워 이것도 sorbitol의 세포내축적의 원인이 된다. 즉, 당뇨병에 의하여 수정체내의 glucose농도가 상승하면 aldose reductase에 의하여 sorbitol의 생성이 향진하고, sorbitol의 축적은 세포내 삼투압을 상승시키고, 수정체내로의 수분유입을 촉진하여 세포의 팽화를 일으킨다.<sup>7-9)</sup> 이 팽화는 수정체섬유세포의 투과성을 향진하고, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>의 유입과 K<sup>+</sup>, amino acid, peptide, ATP, myo-inositol등의 유출을 일으킨다. Na<sup>+</sup>이나 K<sup>+</sup> 등의 전해질의 평형과피는 더욱 삼투압을 상승시키고, 세포의 팽화를 한층 촉진하여 세포막은 정상유지할 수 없게 된다. 그와 동시에 세포내 단백질변성이 진행하여 수정체가 혼탁하게 되는데 이와 같이 수정체가 혼탁하여져서 나타나는 백내장 증상을 당뇨병진행과정의 한 지표로 사용한다. 따라서 sorbitol의 산생을 억제하는 물질이 당뇨병백내장의 발증을 저지하게 된다는 것이며, 이론적으로는 sorbitol을 산생하는 효소 aldose reductase를 저해하므로써, 이것이 가능하게 된다는 것이다. 실제로, 많은 보고들에 의하여, *in vitro* 실험에 있어서 aldose reductase를 억제하는 물질이 실험적 당뇨병백내장의 병태모델인 galactosemic rat에서 백내장의 형성을 억제함이 밝혀져 있다. Okuda 등<sup>31)</sup>은 aldose reductase에 대한 억제활성을 가지는 1-(p-bromophenyl)-sulfonyl lhydantoin이 galactosemic rat에서의 백내장형성을 억제함을 보고하였고, lens aldose reductase억제활성을 가지는 flavonoids의 당뇨병백내장억제와의 관련성을 제시한 보고도 있다.<sup>14,32)</sup> 또, Shin 등<sup>30)</sup>은 rat lens로부터 crude한 aldose reductase표품을 이용한 실험에서 황금에 함유된 flavonoid성분이 이 효소활성을 억제하며 동시에 galactosemic rat의 백내장형성을 억제함을 보고하였다. Aida 등<sup>29)</sup>은 오랜동안 일본에서 당뇨병 신경증치료에 사용되었던 한방약에 대하여 이들 추출물이 *in vitro* 실험에서 crude한 rat lens aldose reductase활성을 억제함을 보고하였고, 그 성분으로서 isoliquiritigenin이 aldose reductase에 대한 강력한 억제활성을 가짐을 보고하였다.<sup>33)</sup> 이와 같이 aldose reductase inhibitor의 당뇨병합병증에 대한 예방 또는 치료효과에 큰 기대가 모아지고, 그 개발이 적극적으로 검토되고 있다.

본 실험의 결과는 *in vitro* level에서 인삼성분이 lens의 aldose reductase에 대한 억제활성을 가짐을

구명한 새로운 결과로서, 앞으로 *in vivo* level에서의 당뇨병합병증에 대한 효과에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

당뇨성합병증 발증에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 glucose대사경로인 polyol pathway의 촉매 효소인 aldose reductase활성에 대한 인삼성분의 효과를 확인하기 위하여, rat lens로부터 crude한 aldose reductase를 조제하여 각 인삼성분의 이 효소에 대한 억제효과를 검토하였다. 인삼 total saponin을 비롯하여 ginsenosides R<sub>1</sub>과 R<sub>2</sub>이 aldose reductase를 현저히 억제 하였으며, 또한 lipid soluble fraction도 aldose reductase에 대한 억제활성을 나타내었다.

이와 같은 결과는 당뇨병합병증에 대한 인삼성분의 효과에 대한 연구의 필요성을 제시하는 새로운 결과라고 사료된다.

## 인 용 문 헌

1. Pirie, A. and van Heyningen, R. : *Exp. Eye. Res.* **3**, 124 (1964).
2. Varma, S. D., Schocket, S. S. and Richards, R. D. : *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **18**, 237 (1979).
3. Ward, J. D. : *Advances in Metabolic Disorders*, Camerini-Davalos, R. A. and Cole, H.S., ed., Academic Press, New York, p. 425 (1973).
4. Heath, H. and Hamlett, Y. C. : *Diabetologia* **12**, 43 (1976).
5. van Heyningen, R. : *Nature* **184**, 194 (1959).
6. Kinoshita, J. H. : *Invest. Ophthalmol.* **13**, 713 (1974).
7. Gabbay, K. H. and O'Sullivan, J. B. : *Diabetes* **17**(5), 239 (1968).
8. Collins, J. G. and Corder, C. N. : *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **16**(3), 242 (1977).
9. Dvornik, D., Gabbay, K. H. and Kinoshita, J. H. : *Science* **182**, 1146 (1973).
10. Varma, S. D., Mizuno, A. and Kinoshita, J. H. : *Science* **195**, 205 (1977).
11. Peterson, M. J., Sarges, L., Aldinger, C. E. and Macdonald, D. P. : *Metabolism* **28**, 456 (1979).
12. Gabbay, K. H., Spack, N. and Loo, S. : *Meta-*

- bolism* **28**, 471 (1979).
13. Handelsman, D. J. and Turtle, J. R. : *Diabetes* **30**, 459 (1981).
  14. Varma, S. D. and Kinoshit, J. H. : *Biochem. Pharmacol.* **25**, 2505 (1976).
  15. Okuda, J., Miwa, I., Inagaki, K., Horie, T. and Nakayama, M. : *Biochem. Pharmacol.* **31**, 3807 (1982).
  16. Sestanji, K. and Bellini, F. : *J. Med. Chem.* **27**, 255 (1984).
  17. Moon, C. K., Lee, S. C., Yun, Y. P., Ha, B. J. and Yook, C. S. : *Arch. Pharm. Res.* **11**(4), 308 (1988).
  18. Sawada, H., Hamatake, M., Hara, A., Nakagawa, M. and Nakayama, T. : *Chem. Pharm. Bull.* **37**(6), 1662 (1989).
  19. Takagi, K. and Tsuchiya, M. : *Jpn J. Pharmacol.* **24**, 41 (1974).
  20. Saito, H., Tsuchiya, M., Naka, S. and Takagi, K. : *Jpn J. Pharmacol.* **229**, 319 (1979).
  21. Kim, H. S., Oh, K. W., Rhee, H. M. and Kim, S. H. : *Pharmacol. Biochem. Behav.* **42**, 587 (1992).
  22. Kim, H. S., Kang, J. G., Seong, Y. H., Nam, K. Y. and Oh, K. W. : *Pharmacol. Biochem. Behav.* **50**, 23 (1995).
  23. Saito, H. : *臨床醫學* **8**, 822 (1916).
  24. 김하근 : *朝鮮醫學會誌* **22**, 221 (1932).
  25. Yokozawa, T., Seno, H. and Oura, H. : *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 3095 (1975).
  26. Joo, C. N. and Kim, J. H. : *Korean J. Ginseng Sci.* **16**(3), 190 (1992).
  27. Joo, C. N., Yoon, S. H., Lee, H. S., Kim, Y. K., Lee, H. B. and Koo, J. H. : *Korean J. Ginseng Sci.* **16**(3), 198 (1992).
  28. Joo, C. N., Koo, J. H. and Lee, H. B. : *Korean J. Ginseng Sci.* **17**(1), 13 (1993).
  29. Aida, K., Shindo, H., Tawata, M. and Onaya, T. : *Planta Med.* **53**, 121 (1987).
  30. Shin, K. H., Chae, Y. J., Chung, M. S. and Lee, H. J. : *Kor. J. Pharmacogn.* **25**(1), 41 (1994).
  31. Okuda, J., Yashima, K., Inagaki, K. and Miwa, I. : *Chem. Pharm. Bull.* **33**(7), 2990 (1985).
  32. Parmar, N. S. and Ghosh, M. N. : *Exp. Eye. Res.* **29**, 229 (1979).
  33. Aida, K., Tawata, M., Shindo, H., Onaya, T., Sasaki, H., Yamaguchi, T., Chin, M. and Mitsuhashi, H. : *Planta Med.* **56**, 254 (1989).