

홍삼 사포닌류(Ginsenosides)의 세포 신호 전달계 효소에 미치는 영향

임경택 · 최진성 · 이상민 · 조기승

한양대학교 이과대학 생화학 및 분자생물학과

(1997년 3월 7일 접수)

Effect of Ginsenosides from Red Ginseng on the Enzymes of Cellular Signal Transduction System

Kyung Taek Rim, Jin Sung Choi, Sang Min Lee and Key Seung Cho

Department of Biochemistry and Molecular Biology,

College of Sciences, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea

(Received March 3, 1997)

Abstract : The present study was conducted to assess the effect of total saponins from Korean red ginseng on the biosynthesis of inositol phospholipids *in vivo*, and also effects on the metabolic enzymes, such as phosphatidylinositol-specific phospholipase C(PI-PLC) and PI-kinases. The administration of 1% saponin solution, 0.1 ml 3 times a day intraperitoneally to 5 mice for 30 days has increased a 23% of the body weight when it compared with a control group. The amounts of ³²P-phosphorus radioactivity incorporated into the phosphoinositides from the liver and brain tissues have increased a 310% and 260%, respectively, in the saponin treated mice. The activities of PI-PLC from liver and brain were stimulated in the various amounts by the conditions treated with saponins. The PI-kinases from liver and brain were also activated by saponins, but its effect was lower than that of PI-PLC. From these results, it was confirmed that red ginseng saponins have affected positively not only on the biosynthesis of phosphoinositides but also on the PI-PLC and PI-kinases related to the cellular signal transduction.

Key words : Korean Red Ginseng Saponin, Cellular Signal Transduction, Phosphatidylinositol, PI-Phospholipase C, PI-Kinases.

서 론

과거 십수년 동안에 걸쳐 세포막 수용체에 의해 중개되는 세포 신호전달계 연구가 급속한 발전을 이루면서 inositol 인지방질의 하나인 phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate(PIP₂)가 phosphatidylinositol-specific phospholipase C(PI-PLC)에 의해 가수분해되어 세포 신호전달을 개시하는 second messenger인 diacylglycerol(DG)과 inositol 1, 4, 5-triphosphate(IP₃)가 생성됨이 잘 알려졌다.^{1~4)} 생성된 DG는 여러

protein kinase C를 활성화하고, 한편 IP₃는 소포체로부터 Ca²⁺을 방출시켜 세포내 Ca²⁺ 농도를 상승시킴으로서 궁극적으로 Ca²⁺-calmodulin 의존성 protein kinases를 활성화시켜, 이들은 모든 세포의 생명유지를 위한 세포 성장, 발육, 물질대사, 분비, 수축, 운동, 광전이 및 기억 등에 이르기까지 모든 반응을 활성화시키고 조절한다는 것이 밝혀졌다.^{5~7)} Second messenger를 생성하는 PIP₂는 phosphatidylinositol(PI)로부터 PI-kinases에 의해 생성되며^{8~10)}, 이 inositol 인지방질의 가수분해는 agonist의 수용체 결합에 의한 G-

protein의 매개로 PI-PLC에 의해 이루어지는데, 이 효소의 특성은 Ryu 등(11)에 의해 소 뇌로부터 정제되어 그 특성이 잘 밝혀졌고, 또한 PI-PLC의 isozyme도 5종류나 알려졌는데, 각 조직과 세포에서 분포가 서로 다르며, PLC- β 의 경우는 특히 뇌 조직에 다양 존재하고, PLC- γ 는 거의 모든 조직에서 발견되는 것으로 밝혀졌다.¹²⁾

인지방질의 생합성과 관련된 인삼 사포닌의 영향에 대한 연구는 Lee와 Joo¹³⁾ 및 Park 등¹⁴⁾에 의해서 *in vivo* 및 *in vitro* 실험에서 잘 연구되었는데, 인삼 사포닌 투여군에서 간의 인지방질 함량이 $H_3^{32}PO_4$ 투여 7시간 후에 가장 높은 ^{32}P -방사능 함유율이 나타남을 확인하였고, *in vitro* 실험에서는 사포닌 농도 10⁻⁶~10⁻⁴ 사이에서 최고의 인지방질 합성을 관찰하였고, 한편 10⁻²% 이상의 농도에서는 오히려 인지방질의 생합성을 현저히 억제한다고 보고하였다. 이러한 실험에서 인지방질의 증가 원인으로는 인삼 사포닌이 인지방질의 합성과 관련된 여러 효소계를 활성화 시키기 때문이라고 해석하였다. 이와같이 인삼 사포닌의 인지방질 생합성에 대한 영향에 대해서는 연구된 바가 있으나, 아직까지 세포 신호전달과 연관된 inositol 인지방질의 합성과 가수분해의 관련 효소에 대해서는 연구된 바가 없어, 본 연구에서는 생쥐의 간과 뇌 조직에서 홍삼 사포닌류에 대한 영향을 inositol 인지방질의 생합성, inositol 인지방질의 유도체인 PIP 및 PIP₂를 생산하는 PI-kinases 및 이들 inositol 인지방질로부터 second messengers를 생산하는 PI-PLC의 활성도에 대하여 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 통하여 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료

(1) 홍삼 사포닌의 추출

홍삼정(한국담배인삼공사제품) 30 g을 물 200 ml에 녹이고 200 ml의 diethyl ether를 넣어 두층으로 분리하여 그 하층액을 얻은 후 200 ml의 1-butanol을 넣어 상층인 butanol층을 분리하고 여기에 다시 200 ml의 물을 넣어 씻은 후 상층에 함유된 crude saponin을 동결건조(Freeze dryer, IL SIN Eng. Co., Model No. FD5505)하여 2.32 g의 total saponin을 얻었다.¹⁵⁾

(2) 실험동물

서울대학교 동물실험실에서 분양받은 ICR계 생쥐(연령: 4주)를 사용하면서 암수 구별없이 사포닌에 의한 체중증가 실험, inositol 인지방질 생합성 실험 및 효소조제 실험 등에 사용하였다.

동물 사육실의 온도는 20~25°C로 유지하였고 reverse light cycle (dark cycle: 오전 7시부터 오후 7시까지, light cycle: 오후 7시부터 오전 7시까지)을 가동하여 실험동물을 7~10일동안 이 조건에서 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사료는 혼합사료 [(주) 대한실험동물센터 공급 / 성분: 수분 11.86%이하, 단백질 20.0%이상, 조지방 3.0%이상, 조섬유 10.0%이하, 조회분 10.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상]로 사육하였다.

(3) 시료처리

50 μCi(약 2,295,617,500 cpm)의 $H_3^{32}PO_4$ 를 0.1 ml의 20% glucose 용액에 녹여 생쥐의 복강주사용 시료로 사용하였다. PI-PLC 및 PI-kinases의 기질인 3H -PI는 Bligh & Dyer법¹⁶⁾으로 정제한 후 대두에서 정제한 cold PI와 혼합하여 질소기체 기류하에서 증발시켰다. 증발시킨 3H -PI 기질에 종류수 10 mL을 가한 후 ultrasonic homogenizer(Cole-Parmer instrument Co., Model 4710)를 이용하여 ice bath상에서 1분간 sonication하고 1분간 쉬는 방법으로 10분간 sonication하여 20 μl 3H -PI (0.5 mM)의 방사능량이 50,000 cpm이 되도록 조절한 micelle을 기질로 사용하였다.

2. 실험방법

(1) Thin layer chromatography에 의한 홍삼 사포닌 추출물의 확인

홍삼정으로부터 1-butanol을 사용하여 추출한 사포닌을 TLC법에 의한 chloroform : methanol : water (65:35:10, v/v) 혼합 전개용매로 silica gel 60 F₂₅₄ plate를 사용하여 분리 확인하였고, 발색 방법으로는 I₂ vapour 혹은 5% sulfuric acid를 포함하는 ethanol 용액을 분무하고 100°C에서 가열하여 확인하였다.

(2) 홍삼 사포닌의 복강투여에 의한 생쥐의 체중 변화

홍삼 사포닌에 의한 생쥐의 체중 증가량 변화를 관찰하기 위해 대조군과 실험군으로 나누어 4주령의 평균 체중이 각각 20~25 g인 생쥐 5 마리씩을 사용하면서 대조군에는 마리당 생리식염수(0.85% NaCl 용

액) 0.1 ml을 1일 3회 30일간 복강투여하였고, 같은 용법으로 실험군에는 홍삼 사포닌 추출물을 1% 용액으로 만들어 0.1 ml 복강투여하면서 매 2일마다 체중 변화를 측정하여 체중 증가량을 산출하였다.¹⁷⁾

(3) 사포닌 복강투여에 의한 생쥐 간과 뇌 조직에서 inositol 인지방질의 함량 분석

평균 체중이 20~25 g인 4주령 생쥐를 각각 5 마리씩 대조군과 실험군으로 나누어 사육하면서 상기의 방법으로 생리식염수와 1% 사포닌 용액을 마리당 0.1 ml씩 1일 3회 5일간 복강투여하고 마지막 투여 8시간 후에 마리당 50 μCi의 $H_3^{32}PO_4$ 가 녹아있는 20% glucose-용액 0.1 ml을 복강주사한 다음, 모든 식이와 물의 공급을 중단하였다. 5시간 후 실험 동물의 간과 뇌 조직을 절취하였고, 전체 지방질의 추출은 Bligh & Dyer법¹⁶⁾을 변형하여 사용하였으며, 각 조직에서의 모든 추출 과정들은 4°C 저온실에서 수행하였다. 이 지방질 추출물에 chloroform : methanol (2:1, v/v) 용액 500 μl를 넣어 용해시킨 후 그 일부를 취하여 TLC plate에 점적하고, chloroform : acetone : methanol : glacial acetic acid : water (40:15:13:12:7, v/v) 전개용매로 분리하여 I₂ vapour로 발색하거나 autoradiography로 PI, PIP 및 PIP₂ 분획을 확인하였다. 각각의 분획은 spatula로 긁어모아 10 ml의 scintillation cocktail과 섞어서 그 방사능량을 측정하였다. 한편 autoradiography에서 사용된 X-ray film은 HyperfilmTM (Amersham 회사 제품)을 사용하였으며 X-ray cassette는 Trimax®12 (3M 회사 제품)을 사용하였다. I₂ vapour로 각 분획을 확인한 후 X-ray cassette에 TLC plate를 넣고 X-ray film을 덮은 후 -80°C에서 24시간 exposure 시켰다.

(4) 홍삼 사포닌류의 PI-phospholipase C 활성에 미치는 영향

생리식염수와 홍삼 사포닌 용액을 5일간 복강투여한 대조군과 실험군 각 5 마리로부터 간과 뇌 조직을 절취하여 Hwang 등의 방법¹⁸⁾으로 PI-PLC를 분리하여 홍삼 사포닌의 *in vivo* 효과를 관찰하였고, 또한 대조군과 실험군의 동물에서 분리한 효소원에 홍삼 사포닌 용액을 첨가하여 *in vivo*와 *in vitro*의 혼합효과를 관찰하였다. 이때 사용한 PI-PLC의 활성도는 Ryu 등(11)의 방법으로 측정하였다.

(5) 홍삼 사포닌류의 PI-kinases 활성에 미치는 영향

생리식염수와 홍삼 사포닌 용액을 복강투여한 대조군과 실험군 각 5 마리로부터 간과 뇌 조직을 절취하여 Saltiel 등의 방법¹⁹⁾을 변형하여 PI-kinases를 분리하여 홍삼 사포닌의 *in vivo* 효과와 각각의 *in vitro* 효과를 관찰하였다. 이때 사용한 PI-kinases의 활성도는 Van dongen 등의 방법¹⁹⁾을 일부 변형하여 측정하였다.

(6) 단백질 정량

PI-PLC 및 PI-kinases 효소의 단백질량은 Lowry 등의 방법²⁰⁾에 의하여 정량하였고, 표준곡선을 위한 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

(7) 방사능량의 측정

방사성 동위원소로 표지된 화합물의 방사능량을 측정하는데 사용한 scintillation cocktail은 500 ml의 toluene에 250 ml의 ethanol을 가하고 7.5 g의 PPO 와 0.175 g의 POPOP를 용해시켜 제조한 Cho와 Proulx의 방법²¹⁾을 사용하였다.

결과 및 고찰

(1) Thin layer chromatography에 의한 홍삼 사포닌 추출물의 확인

한국남대인삼공사 제품인 홍삼정(red ginseng extract)으로부터 1-butanol을 사용하여 사포닌을 추출한 후 panaxadiol계 사포닌인 Rb₁과 panaxatriol계 사포닌인 Rg₁(故 주충노 박사로부터 분양받음)과 함께 chloroform : methanol : water (65:35:10, v/v) 전개 용매로 silica gel 60 F₂₅₄ plate를 사용하여 총 사포닌류를 분리한 결과 Rf값은 silica gel G plate에서보다 낮았으나 14개 이상의 복합 사포닌으로 구성되어 있음을 확인하였다(Fig. 1).

(2) 홍삼 사포닌의 복강 투여에 의한 생쥐의 체중 변화 고찰

홍삼 사포닌류의 생체내 흡수에 의한 inositol 인지방질 대사의 고찰에 앞서 사포닌의 복강투여에 의한 생체내 흡수로 생쥐의 체중 변화에 어떤 영향을 주는지를 고찰하였다. 4주령의 생쥐 (평균체중 20~25 g)를 각각 5마리씩 대조군과 실험군으로 나누어 1일 3회 30일간 1% 사포닌 용액 0.1 ml을 복강 투여하면서 자유 식이에 의한 체중변화를 매 2일마다 측정하여 체중 증가량을 산정하였다.¹⁷⁾ 측정 기간동안 체중 증가량은 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 대조군은 13 g의

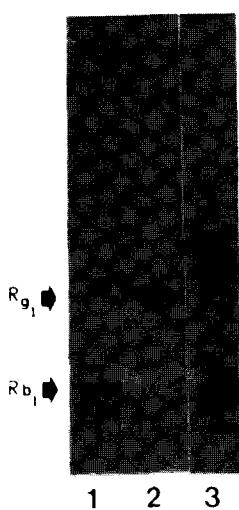


Fig. 1. Separation of red ginseng saponins by thin layer chromatography. The samples spotted on the plate were: lane 1, standard panaxadiol saponin Rb₁; lane 2, standard panaxatriol saponin Rg₁; lane 3, crude saponin from red ginseng extract.

체중 증가를 나타냈고, 실험군은 16 g의 체중 증가를 나타냄으로서 사포닌의 복강투여에 의해 약 23%의 증가율을 나타냈다. 이 결과로 보아 4주령의 생쥐에서 홍삼 사포닌류가 성장을 촉진시키는 것으로 나타났다. 한편 백쥐의 성장과 관련해서 Lee²²⁾와 Kim¹⁷⁾은 각각 탈지 인삼과 2% 인삼분을 첨가한 식이에서 백쥐의 체중이 감소되는 것으로 보고하고 있어, 본 연구 결과와는 상이한 면을 보이고 있는데, 이는 사포닌의 투여 방법이 다르기 때문인 것으로 판단되며, 또한 사포닌 첨가 사료에 의한 식이는 사포닌의 특수한 향과 쓴맛 때문에 동물의 식이 섭취의 감소에서 체중의 감소 효과가 나타날 수 있지 않나 생각된다.

(3) 생쥐의 간과 뇌 조직에서 홍삼 사포닌의 복강 투여에 의한 H₃³PO₄의 inositol 인지방질 합성을 변화

4주령의 생쥐 (평균 체중 20~25 g)를 각각 5 마리씩 사용하여 대조군에는 생리식염수를 실험군에는 1% 사포닌 용액을 0.1 ml씩 1일 3회 5일간 복강투여한 8시간 후 마리당 50 μCi의 H₃³PO₄를 함유한 20% glucose 용액 0.1 ml를 복강투여하고 식이를 중단한 다음, 5시간 후에 간과 뇌 조직을 절취하여 각 1 g 조직에서 전체 지방질을 추출한 후 TLC를 통하여 inositol 인지방질을 분리하였다(Fig. 3). 간과 뇌 조직 1 g당 inositol 인지방질의 합성을 고찰하여 본 결과

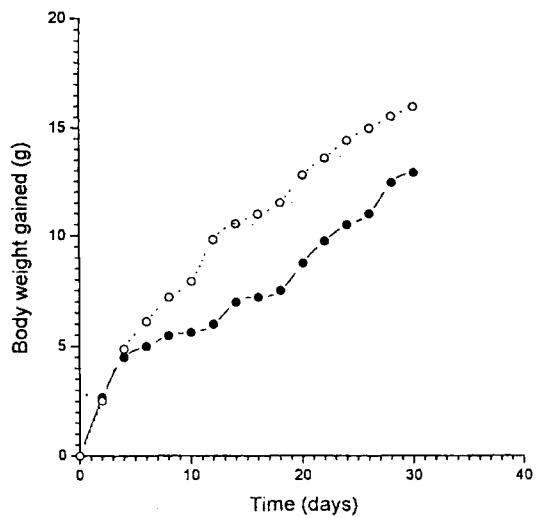


Fig. 2. Effect of red ginseng saponins on the body weight of mouse. In order to examine the effect of red ginseng saponins on the growth of mouse, control and test groups were fed with normal diet in which 0.1 ml of saline was injected intraperitoneally 3 times a day in control group, and 0.1 ml of 1% saponin solution was injected intraperitoneally 3 times a day in test group for 30 days, respectively. ●—●; control group, ○···○; test group

Table 1에서 보는 바와 같이 PI는 간에서 대조군에 비해 약 310%의 증가율을 보였고, PIP + PIP₂는 380%의 증가율을 나타냈다. 또한 뇌 조직에서는 홍삼 사포닌 처리에 의해 PI는 260%, PIP + PIP₂는 292%의 증가율을 보임으로서 홍삼 사포닌이 inositol 인지방질의 생합성에 활성화 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 한편 본 연구에서 뇌 조직에서의 inositol 인지방질의 합성률이 간에서보다 낮은 합성률을 나타내고 있는데 이는 blood brain barrier의 영향으로 사포닌의 효과가 감소되는 것이 아닌가 생각된다. 비슷한 조건 하에서 Park 등¹⁴⁾에 의한 인삼 사포닌의 간 인지방질 생합성에 대한 보고에 의하면 10일간 인삼 식이 백쥐에서 H₃³PO₄ 투여 7시간 후에 전체 인지방질이 최고 450%의 증가율을 나타낸다고 보고하고 있어 본 연구의 결과와 거의 동일함을 보이고 있다. 이러한 인삼이나 홍삼 사포닌에 의한 생체 인지방질의 생합성 촉진은 인지방질이 생체의 여러 기능을 활성화하는 매체인 것을 감안할 때 생체 기능 조절을 위해서 인삼 사포닌이 큰 역할을 하고 있는 것

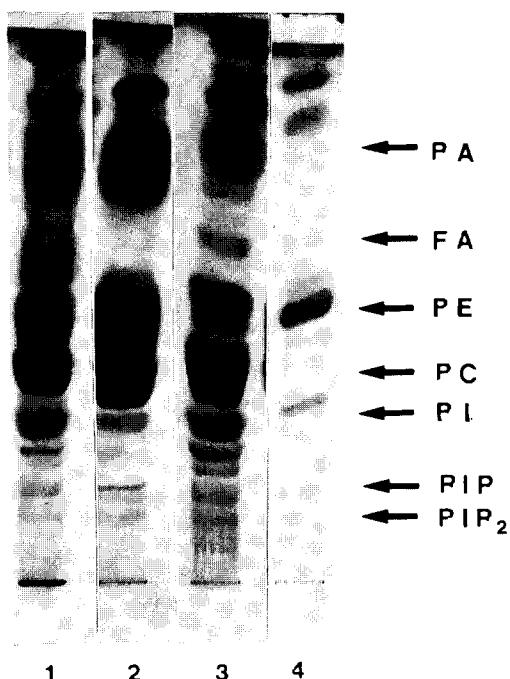


Fig. 3. Separation of phospholipids from mouse organ by thin layer chromatography. The samples spotted on the plate were : lane 1, total lipids from mouse brain; lane 2, total lipids from mouse liver; lane 3, standard PI(50%) + phosphatidylcholine + sphingomyelin; lane 4, standard phosphatidylinositol(50%).

Table 1. Incorporation of ^{32}P -phosphours from $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ into inositol phospholipids of mouse liver and brain

Tissue(g)	control		saponin treated	
	PI	PIP+PIP ₂	PI	PIP+PIP ₂
	(cpm)	(cpm)	(cpm)	(cpm)
Liver	47,700	1,910	147,510(309)	7,250(380)
Brain	7,860	260	20,440(260)	760(292)

Five mice test group were administered 0.1 ml of 1% saponin solution 3 times a day for 5 days via intraperitoneal injection, and other 5 mice control group was administered 0.1 ml saline. Fifty μCi $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ in 20% glucose solution were injected to each mouse after 8 hours of final injection of saponin. Five hours later, mouse liver and brain took out and cleaned by rinsing with 0.85% saline and weighted to 1 g each. The total lipids were extracted by Blight & Dyer method and separated by TLC. The PI and PIP+PIP₂ band visualized by I_2 vapour were scrubbed and mixed with 10 ml of scintillation cocktail and counted radioactivity.

Table 2. Effect of concentrations of red ginseng saponin on phospholipase C from mouse brain

Concentration of red ginseng saponin (%)	Formation of ^3H -IP from ^3H -PI (cpm)	Increase (%)
0	5,510	100
10^{-5}	6,650	121
10^{-4}	8,920	162
10^{-3}	9,050	165
10^{-2}	7,250	132
10^{-1}	5,610	102

Reaction mixture contained ^3H -PI(40,000 cpm, 0.5 mM) as substrate, 0.1 mM EGTA, 1 mM Ca^{2+} , 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2), 70 μg enzyme and increasing amounts of sponin(10^{-5} - 10^{-1} %) in a total volume of 200 μl . Incubation was carried out at 37°C for 10 min.

을 알 수 있다.

(4) 홍삼 사포닌류에 의한 생쥐 간과 뇌의 PI-PLC의 활성도 변화

생쥐 간과 뇌의 PI-PLC 효소 활성도에 대한 홍삼 사포닌의 영향을 고찰하기 위하여 홍삼 사포닌의 농도를 $10^{-5}\%$ 부터 $10^{-1}\%$ 까지 증가하면서 PLC의 활성도를 측정한 결과 $10^{-4}\%$ 와 $10^{-3}\%$ 농도에서 대조군에 비해 각각 162%와 165%의 최고 활성화 효과를 나타냈다(Table 2). 이와 같은 결과는 인삼 사포닌이 백쥐 간에서의 인지방질 생합성에서 보여준 결과¹¹와도 같다. 한편 생체내 많은 효소계는 인삼 사포닌에 의해 활성화 효과를 보여주고 있는데, 주 등의 연구²¹에 의하면 효소에 따라 10%에서 10%에 이르기까지 사포닌의 활성화 농도가 다름을 보여주고 있다. 이와 같은 결과로 보아 인삼 사포닌은 지용성 기질 이외에 수용성 기질 반응에도 관여하며, 이 경우는 효소 분자와 친수 혹은 소수성 결합에 의한 conformation 변화로 효소의 활성화를 촉진시킨 것이라 생각된다. *In vivo* 및 *in vitro* 실험에서 PI-PLC에 대한 홍삼 사포닌의 조절 효과를 고찰하기 위해 여러 조건하에서 PI-PLC의 활성도를 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 사포닌을 처리하지 않은 생쥐 간과 뇌의 PI-PLC는 Ca^{2+} -의존성으로서 Ca^{2+} 이 존재하지 않는 상태에서는 거의 활성을 나타내지 않았으며, Ca^{2+} 존재 하에서 효소량을 0~100 μg 까지 증가함에 따라 거의 직선적인 활성도 증가를 보였다. 간의 PI-PLC(Fig. 4A) 효소에 10% 홍삼 사포닌을 처리하여 활성도를 관찰했을 때 최고 46%의 활성화 효과를 나타냈고,

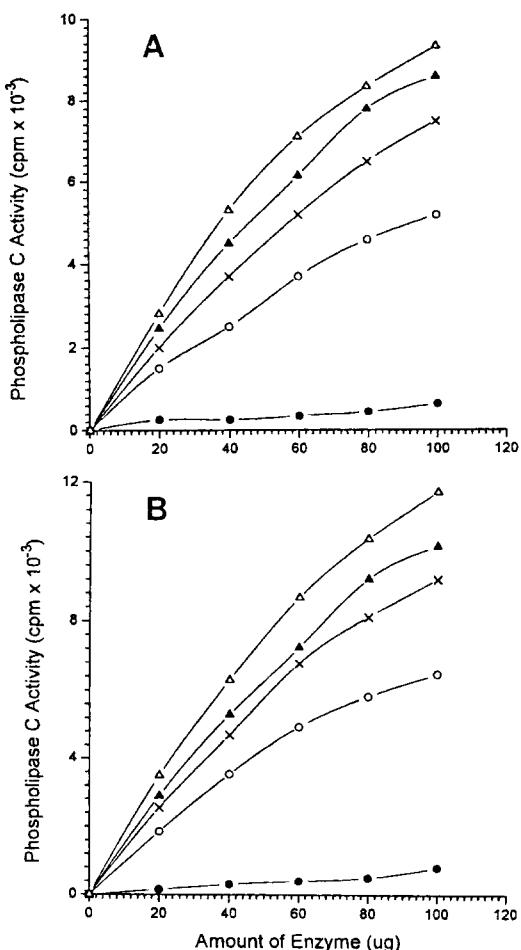


Fig. 4. Effect of red ginseng saponins on the activities of phospholipase C from mouse liver(A) and brain(B). The reaction mixture contained ³H-PI(40,000 cpm, 0.5 mM) as substrate, 0.1 mM EGTA, 1 mM Ca²⁺, 10% saponin, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) and increasing amounts of enzyme (20-100 µg) in total volume of 200 µl. Incubation was carried out at 37°C for 10 min. ● - ●; PI-PLC with no Ca²⁺, ○ - ○; PI-PLC with no saponin, × - ×; PI-PLC with 10% saponin, ▲ - ▲; PI-PLC treated with 0.1 ml of 1% saponins 3 times a day for 5 days and no saponin, △ - △; same PI-PLC(▲ - ▲) with 10% saponins

1% 사포닌을 0.1 ml 씩 5일간 투여한 생쥐 간의 PI-PLC는 처리하지 않은 PI-PLC보다 65%의 활성화 효과를 나타냈으며 이 효소에 10% 농도의 사포닌을 처리했을 때는 81%의 활성도 증가를 나타냈다. 한편 동일한 조건하에서 조제한 생쥐 뇌의 PI-PLC(Fig.

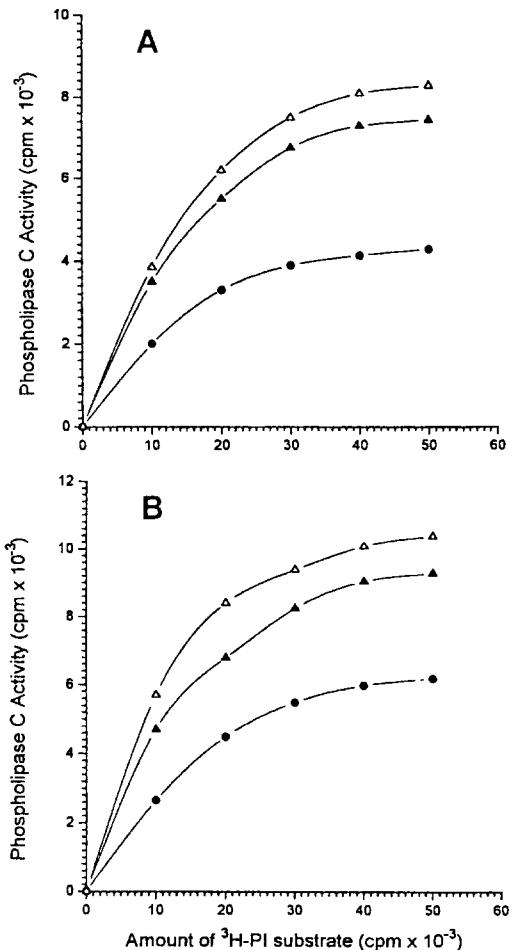


Fig. 5. Effect of the increasing amounts of ³H-PI substrate on phospholipase C from mouse liver(A) and brain(B). The reaction mixture contained 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2), 0.1 mM EGTA, 1 mM Ca²⁺, 10% saponin, 50 µg enzyme and increasing amounts of PI substrate (10,000~50,000 cpm) in a total volume 200 µl. Incubation was carried out at 37°C for 10 min. ● - ●; PI-PLC with no saponin, ▲ - ▲; PI-PLC treated 0.1 ml of 1% saponins 3 times a day for 5 days and no saponin, △ - △; same PI-PLC(▲ - ▲) with 10% saponins

4B)는 비활성도가 생쥐 간의 PI-PLC보다 더 높게 나타났는데, 10% 농도의 사포닌 존재하에서는 최고 43% 증가를 나타냈고, 1일 3회 5일간 1%의 사포닌을 0.1 ml 씩 복강 투여한 뇌의 PI-PLC는 59%를, 여기에 10%의 사포닌을 첨가했을 때는 84%의 활성도 증가를 나타냈다. 이상의 결과로 보아 홍삼 사포닌은 계면활성제로서의 작용 뿐만 아니라 agonist로서 또는

효소 생성단계의 modulator로서 작용할 수 있는 가능성을 보여주었다. 한편 일정량의 간과 뇌의 효소 ($50 \mu\text{g}$) 존재하에서 기질의 양을 증가($1 \times 10^4 - 5 \times 10^4 \text{ cpm}$)시켰을 때 *in vivo* 사포닌 처리와 *in vitro* $10^{-3}\%$ 사포닌 첨가에 의해서 모두 활성도 상승 효과와 전형적인 기질포화 양상을 나타냈다(Fig. 5).

(5) 홍삼 사포닌류에 의한 생쥐 간과 뇌의 PI-kinases의 활성도 변화

홍삼 사포닌이 PI-kinases 활성도에 어떠한 영향을 줄 수 있는지를 조사하기 위하여 대조군 효소와 사포닌 처리군 효소를 비교하여 보았다. Table 3에서 사용한 생쥐 간과 뇌의 PI-kinases 효소는 PI-PLC 효소를 조제한 membrane 분획에서 추출한 것으로, 간의 PI-kinases는 $10^{-3}\%$ 사포닌을 처리한 경우 control에 비해 9%의 활성도 증가를 보였으며, 1%의 사포닌 용액을 $0.1 \text{ ml}/\text{씩} 1\text{일 } 3\text{회 } 5\text{일간 투여한 생쥐 간의 PI-kinases는 } 16\%\text{의 증가를, 여기에 } 10^{-3}\%$ 사포닌을 첨가했을 때는 20%의 활성화를 나타냈다. 또한 동일한 조건하에서 생쥐 뇌의 PI-kinases는 각각 4%, 15% 및 25%의 활성도 증가를 나타냈는데, 이러한 결과는 홍삼 사포닌이 PI-kinases에 대해서도 활성화 효과가 있음을 보여주고 있다. 이 경우 PI-kinases가 PI-PLC 효소에 비하여 활성화 효과가 낮은 이유는 PI-ki-

nases가 crude한 상태로서 조제 과정에서 membrane-bound PI-PLC(약 20%)가 함유되어 있을 가능성과 또한 membrane에 결합된 Ca^{2+} 의 존재로 PI-PLC에 의한 PI 기질의 분해와 생성물인 PIP 및 PIP_2 의 분해 등이 활성도의 저하에 영향을 주었을 것으로 생각된다. 이러한 요인을 제거하기 위해서는 정제된 효소에 의한 연구가 뒤따라야 될 것으로 보인다.

Fig. 6은 PI가 [γ - ^{32}P]ATP로부터 PI-kinases에 의해 γ - ^{32}P -phosphorus가 이전되어 ^{32}P -PIP 및 ^{32}P -

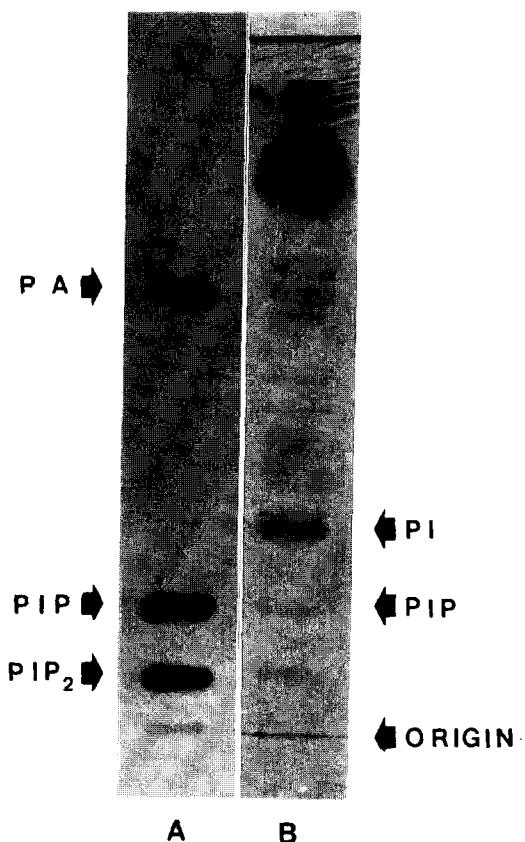


Fig. 6. Formation of PIP and PIP_2 from PI by phosphatidylinositol-kinases from mouse brain. The formation of PIP and PIP_2 from PI by the action of PI-kinases was showed in lane A (autoradiographed) and lane B (I_2 vapour staining). The reaction mixture contained $70 \mu\text{g}$ enzyme, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM MgCl_2 , $1 \mu\text{Ci}$ of [γ - ^{32}P]ATP (1 mM), 1 mM EGTA, 1 mM PI and $10^{-3}\%$ saponin in a total volume of $200 \mu\text{l}$. Incubation was carried out at 37°C for 10 min and the TLC was performed at the same condition as described under experimental procedure.

Table 3. Effect of red ginseng saponin on phosphatidylinositol kinases from mouse liver and brain

Tissue	Enzyme source	Formation of ^{32}P -PIP and PIP_2 (cpm)	Increase (%)
Liver	Control(no saponin)	1,970	100
	PI-kinases(+saponin)	2,150	109
	*S.T-PI-kinases	2,280	116
	S.T-PI-kinases (+saponin)	2,360	120
Brain	Control(no saponin)	3,150	100
	PI-kinases(+saponin)	3,290	104
	S.T-PI-kinases	3,630	115
	S.T-PI-kinases (+saponin)	3,940	125

The reaction mixtures contained $30 \mu\text{g}$ of enzyme, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM MgCl_2 , $1 \mu\text{Ci}$ of [γ - ^{32}P]ATP, 1 mM PI as a substrate and $10^{-3}\%$ saponin in a total volume of $200 \mu\text{l}$ were incubated at 37°C for 10 min. Other procedures of lipid extraction and separation were described in the experimental procedures. *S.T-PI-kinases: Phosphatidylinositol-kinases from tissue treated with red ginseng saponin.

PIP_2 가 생성됨을 보여준 그림이다. Lane A는 기질인 PI와 [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP를 PI-kinases 존재하에서 반응시킨 후 지방질을 추출하여 TLC로 분리한 다음 X-ray film으로 24시간 노출시켜 감광시킨 autoradiogram이고, lane B는 동일한 TLC plate를 I_2 증기하에서 발색시킨 것이다. Lane B에서는 crude enzyme 반응물에서 추출된 여러 인지방질이 PI, PIP 및 PIP_2 와 함께 함유되어 있음을 보이고 있는데, lane A에서는 PI에 $\gamma^{32}\text{P}$ -phosphorus가 incorporation되어 PIP 및 PIP_2 가 생성되었음을 나타냄으로서 crude enzyme에는 PI-kinase 및 PIP-kinase가 모두 함유되어 있음을 보이고 있다. 또한 lane A에서 PA의 생성이 확인되는데, 이는 phosphoinositides로부터 PI-PLC에 의해 가수분해되어 생성된 DG가 DG-kinase에 의해 PA를 생성하였음을 보이고 있어, 본 실험에 사용한 효소원에는 PI-kinases 이외에도 PI-PLC, DG-kinase 등이 함유되어 있음을 보여, 이와같은 다른 효소의 contamination이 홍삼 사포닌의 PI-kinases에 대한 영향을 감소시켰을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 홍삼 사포닌류(ginsenosides)가 동물 생체내에서 inositol 인지방질의 생합성을 이들의 대사에 관여하는 PI-kinases와 PI-PLC 효소 활성에 어떤 영향을 미칠 것인가에 대하여 연구하였다. 생쥐의 체중 변화를 관찰하기 위하여 주령 4주의 생쥐(ICR계, 평균 체중 20~25g) 5마리를 한 군으로하여 1% 사포닌 용액을 0.1 ml씩 1일 3회 복강 투여한 결과 대조군에 비해 1개월간에 약 23%의 체중 증가를 나타냈다. 5 마리 실험군에 1% 사포닌 용액을 0.1 ml씩 1일 3회 5일간 복강 투여한 마지막 투여 8시간 후에 마리당 50 μCi 의 $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ 함유 20% glucose 용액 0.1 ml을 복강 투여하고, 5시간 후에 간과 뇌 조직으로부터 inositol 인지방질을 추출, 분석한 결과 사포닌 처리군의 간과 뇌의 inositol 인지방질이 대조군에 비해 각각 310%와 260%의 증가율을 나타냈다. PI-PLC의 효소 활성에 대한 홍삼 사포닌 농도의 영향을 고찰한 결과 10^{-4} ~ 10^{-3} M 농도에서 최고 활성화 효과를 나타냈다. PI-PLC의 효소 활성은 Ca^{2+} -의존성으로서, 본 실험 조건하의 효소량의 증가에서 간의 PI-PLC는 10% 사포닌 존재하에서 46% 증가를 나타냈고, 5일

간 사포닌을 투여한 간 PI-PLC는 65%를, 또한 이 효소에 10% 사포닌을 첨가했을 때 81%의 증가를 나타냈다. 한편 동일한 조건하에서 뇌의 PI-PLC는 10% 사포닌 존재하에서 최고 43% 증가를 나타냈고, 5일간 사포닌을 투여한 뇌 PI-PLC는 59%를, 여기에 10% 사포닌을 첨가했을 때는 84%의 증가를 나타냈다. 일정량의 효소 존재하에서 기질 농도 증가에 대한 10% 사포닌의 영향을 고찰한 결과 간과 뇌의 PI-PLC에 대해 모두 사포닌에 의한 활성화 효과와 기질 증가에 따른 기질 포화 양상을 나타냈다. 간과 뇌 조직의 PI-kinases에 대한 홍삼 사포닌의 영향을 본 결과, 10% 사포닌 존재하에서 각각 9%와 4%의 증가를 나타냈고, 1% 사포닌을 5일간 투여한 간과 뇌의 효소는 각각 16%와 15%의 증가를, 여기에 10% 사포닌을 첨가한 경우는 각각 20%와 25%의 활성화를 나타냈다.

이상의 결과에서 홍삼 사포닌류는 생체내에서 inositol 인지방질의 생합성을 촉진시키는 영향을 줄 뿐만 아니라, 신호 전달과 관련된 PI-PLC와 PI-kinases 등에 대해서도 활성화시키는 영향을 주는 것으로 나타나 홍삼 사포닌류는 이러한 세포 신호전달 인지방질의 합성과 대사계를 통하여 전반적인 생체기능을 촉진시키는데 기여할 것으로 생각된다. 그러나 PI-kinases의 경우는 PI-PLC에 비해 낮은 활성화 효과를 나타내고 있는데, 이는 이 효소가 membrane bound 효소로서 효소 용해 과정에서 1% Triton X-100이 함유되고, 또한 이 효소액 중에는 membrane bound PI-PLC나 DG-kinase와 같은 효소가 함유되어 있을 가능성이 있어 기질의 감소와 생성물의 분해 등 여러 요소가 영향을 줄 것으로 생각된다.

감사의 말씀

이 연구는 한국담배인삼공사의 1995년도 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 깊은 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

- Hokin, L. E. : *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 205 (1985).
- Berridge, M. J. : *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 159 (1987).

3. Fisher, S. K. and Agranoff, B. W. : *J. Neurobiochem.*, **48**, 999 (1987).
4. Nishizuka, Y. : *Nature* **334**, 661 (1988).
5. Bell, R. M. : *Cell* **45**, 631 (1986).
6. Nishizuka, Y. : *Science* **233**, 305 (1986).
7. Ikebe, M. and Reardon, S. : *J. Biol. Chem.*, **265**, 8975 (1990).
8. Saltiel, A. R., Fox, J. A., Sherline, P., Sahyoun, N. and Cuatrecasas, P. : *Biochem. J.*, **241**, 759 (1987).
9. Porter, F. D., Li, Y. S. and Deuel, T. F. : *J. Biol. Chem.*, **263**, 8989 (1988).
10. Yamakawa, A. and Takenawa, T. : *J. Biol. Chem.*, **263**, 17555 (1988).
11. Ryu, S. H., Suh, P. G., Cho, K. S., Lee, K. Y. and Rhee, S. G. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6649 (1987).
12. Gerfen, C. R., Choi, W. C., Suh, P. G. and Rhee, S. G. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3208 (1988).
13. Lee, S. O., Koo, J. H. and Joo, C. N. : *Korean Biochem. J.*, **14**, 161 (1981).
14. Park, T. K., Joo, C. N. and Cho, K. S. : *Korean Biochem. J.*, **14**, 337 (1981).
15. Yim, M. H., Cho, K. S., Kim, H. J. and Joo, H. K. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **3**, 134 (1979).
16. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. : *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911 (1959).
17. Kim, S. M. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **4**, 40 (1980).
18. Hwang, J. T., Lee, C. H., Lee, Y. S., Rhee, S. G. and Cho, K. S. : *Korean Biochem. J.*, **21**, 453 (1988).
19. Van Dongen, C. J., Kok, J. W., Schrama, L. H., Oestreicher, A. B. and Gispen, W. H. : *Biochem. J.*, **233**, 859 (1986).
20. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
21. Cho, K. S. and Proulx, P. : *Biochim. Biophys. Acta*, **318**, 50 (1973).
22. Lee, S. D. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **4**, 146 (1980).
23. Joo, C. N. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **17**, 250 (1993).