

인삼의 Ethylacetate 획분 및 Petroleum ether 획분이 토끼간의 몇가지 효소활성에 미치는 영향

權允義 · 鄭魯八

연세대학교 생물학과
(1984년 2월 2일 접수)

Effect of Ethylacetate Fraction and Petroleum Ether Fraction of Ginseng on the Activities of Several Enzymes in Rabbit Liver.

Yun Eui Kwon and Noh Pal Jung

Dept. of Biology, Yonsei University

(Received February 2, 1984)

Abstract

It has been known that ethyl acetate fraction and petroleum ether fraction prepared from ginseng are inhibitory to the L5178Y and sarcoma 180 cell at the concentrations of 0.1mg/ml or 0.2mg/ml. The study was carried out to examine effects of the two fractions on the activities of RNA polymerase, succinate dehydrogenase (SDH) and malate dehydrogenase (MDH) present in normal rabbit liver.

The ethyl acetate fraction did not show any inhibitory effect on the RNA polymerase and SDH activity at the concentrations of 0.1mg/ml and 0.2mg/ml, but inhibited malate dehydrogenase activity by 12.3% and 15.5%, at the same concentrations, respectively. The fraction also inhibited all the three enzymes at higher concentrations tested, but stimulated the succinate dehydrogenase activity at 0.025mg/ml to increase the enzyme activity by 14.6%.

The petroleum ether fraction activated the SDH activity by 12.9% and 20.8%, at the concentration of 0.1mg/ml and 0.2mg/ml respectively. But the fraction did not affect the MDH activity at the same concentrations. The fraction, however, inhibited the MDH activity and activated the SDH activity by 13.5% and 18.2%, at the concentration of 0.8mg/ml respectively.

I. 서 론

인삼의 항암작용에 대한 연구결과 몇가지 분획물이 암세포의 증식을 억제한다고 보고되었다. Woo등¹⁾은 인삼의 alkaloidal compound, Hwang과 Cha²⁾는 petroleum ether 추출물, Lee와 Huemer³⁾는 alcohol 및 ether추출물, 김과 김⁴⁾은 95% 알콜추출물, Yun 등은 alcohol 추출물과 petroleum ether 추출물⁵⁾, ethyl acetate추출물⁶⁾ 및 petroleum ether추출물⁷⁾이 몇가지 암세포에 직접적인 억제작용을 한다고 보고하였다. 이 밖에 간접적인 영향으로는 Murata와 Hirano⁸⁾가 암

환자에 prostisol을 투여한 결과 암환자 자체의 내성강화를 증진시켜 암의 증식을 어느 정도 억제한다고 하였으며, 山本¹⁰도 prostisol에 해당하는 fraction 3 과 4 로 암환자의 대사촉진을 보고하였다.

본 연구에서는 인삼의 암세포 억제성분으로 상당한 효과가 알려진 petroleum ether 추출물과 ethyl acetate추출물이 RNA합성에 관여하는 RNA polymerase와 energy 대사의 주과정인 TCA cycle 효소중 succinate dehydrogenase와 malate dehydrogenase에 어떠한 영향을 미치는가를 규명하기 위하여 정상적인 토끼간을 대상으로 하여 이들 효소활성에 관한 영향을 추구하였다.

II. 재료 및 실험방법

1. 재 료

1) 본 실험에서는 약 25°C의 사육실에서 정상적인 사료(제일사료주식회사, 충남 대전) 로써 사육한 체중 2.5kg 내외의 건강한 암수 집토끼(*Leeus cuniculus* L. var *domesticus* Gmelin)의 간 조직을 실험대상으로 하였다.

인삼은(*Panax ginseng* C. A. Meyer) 금산산 곡삼(4년근, 50편급)을 사용하였다.

2) 실험에 사용된 시약중 ATP, GTP, UTP, Phenazine methosulfate, Dichloro indo phenol, Malate, Succinate, Digitonin, Lubrol WX, HEPES (N-2-hydroxy-ethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acid), BSA(Bovine Serume Albumin), PPO, POPOP, NAD⁺등은 Sigma제를 사용하였고 그 밖의 시약은 Wako, Sanyo의 GR급 및 특급을 사용하였다. [5-³H]-Cytidine 5'-Triphosphate는 New England Nuclear제품을 사용하였고 유기용매는 시판품을 정제하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 인삼획분의 추출

Ethyl acetate획분은 윤등(1980)¹¹의 방법으로 추출하여 Dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하였다.

Petroleum ether획분은 Hwang과 Cha(1978)¹²의 방법으로 추출하여 absolute ethanol에 녹여 사용하였다.

2) 효소추출

RNA polymerase는 Weiss(1968)¹⁰의 방법으로 추출하였다. 모든 과정은 4°C에서 수행하였으며 단백질 함량은 30-35mg/ml로 Biuret방법¹³을 사용하여 정량하였다.

Succinate dehydrogenase 및 malate dehydrogenase는 Greenawalt(1974)¹⁴의 방법을 사용하여 추출한 mitochondria의 inner membrane은 SDH, soluble matrix는 MDH원으로 사용하였다.

3) 효소활성 측정

RNA polymerase는 Weiss(1968)¹⁰ 및 Widnell와 Tata(1964)¹⁵의 방법을 사용하였다. pH 8.1, 50 μ mole Tris buffer, 2.5 μ mole MgCl₂, 3 μ mole NaF, 10 μ mole mercaptoethanol, 0.3 μ mole의 ATP, GTP, UTP, 0.02 μ mole labeled CTP(5 \times 10⁶cpm/ μ mole)을 넣어 최종부피가 0.5ml되게 한 다음 1ml의 효소액과 인삼추출물을 넣어 37°C에서 15분간 반응시켜 생성된 RNA를 Scintillation counter로 측정하였다.

SDH활성은 Singer (1978)¹⁴⁾의 방법을 사용하였다. Potassium phosphate buffer (pH7.5, 200 mM), succinate (pH7.5, 200mM), KCN100mM, 0.05% (w/v) DCIP, 0.33% (w/v) phenazine methosulfate 0.3ml을 넣고 효소액 0.05ml과 인삼추출물을 첨가하여 최종부피가 3ml이 되게 하여 25°C에서 5분간 방치 후 Spectronic 20 620nm에서 15초간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다.

MDH 활성은 주와 한(1976)¹⁵⁾의 방법을 사용하였다. pH7.4, potassium phosphate buffer 0.025M, NAD⁺37.5mM, nicotinamide 1.3M, KCN 100mM, 0.05% (w/v) DCIP, malate 0.35M을 넣고 SDH와 동일한 방법으로 측정하였다.

III. 실험 결과

1. RNA polymerase에 대한 Ethyl acetate획분의 영향

인삼의 ethyl acetate획분의 농도별(0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8mg/ml) 영향은 Fig. 1에 나타난 바와 같이 0.05mg/ml에서는 대조군과 거의 비슷한 효소활성을 나타내었으나 ethyl acetate획분의 농도가 증가함에 따라 억제효과가 나타나 0.4mg/ml에서는 12.1% ($P>0.01$), 0.8mg/ml에서는 20.9% ($P<0.01$)의 유의성있는 억제효과를 나타내었다.

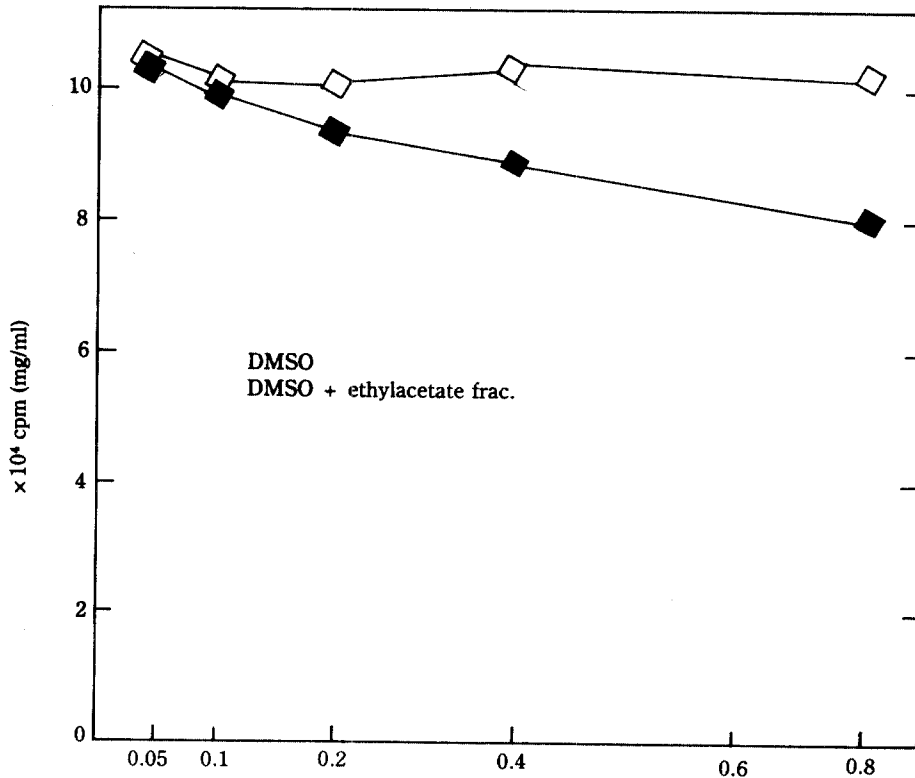


Fig. 1. Effect of ethyl acetate fraction of ginseng extract on the activity of rabbit RNA polymerase. DMSO denote control group.

2. SDH, MDH활성에 대한 분획물의 영향

1) Ethyl acetate 획분의 영향

Table 1에 나타난 바와 같이 SDH는 0.025mg/ml에서는 14.6% ($P < 0.01$)의 증가를 나타내었다. 그러나 농도가 증가함에 따라 억제효과가 나타나 0.4mg/ml에서 38.4% ($P < 0.01$), 0.8mg/ml에서 55.7% ($P < 0.01$)의 유의성 있는 활성억제를 나타내었다.

MDH의 경우는 Table 2에 나타난 바와 같이 0.1mg/ml과 0.2mg/ml에서 12-15% ($P < 0.05$)의 유의성있는 억제효과를 나타내었다.

Table 1. Effect of ethyl acetate fraction of ginseng extract on the activity of mitochondrial succinate dehydrogenase in rabbit liver.

Conc. (mg/ml)	Enzyme activity of control group (units)***	Enzyme activity of experimental group (units)***	Change rate compared with control (100%)
0.025	30.75 ± 0.85	35.25 ± 0.75**	114.6
0.05	33.75 ± 0.68	37.25 ± 1.00*	110.4
0.1	34.00 ± 1.25	34.75 ± 0.73	102.2
0.2	32.25 ± 0.98	32.00 ± 0.83	99.2
0.4	34.50 ± 0.80	21.25 ± 1.83**	61.6
0.8	30.50 ± 1.28	13.50 ± 1.25**	44.3

* p 0.05, ** p 0.01 to control group, *** one unit of enzyme was defined as a change of 1 μ mole of succinate to fumarate per minute.

Table 2. Effect of ethyl acetate fraction of ginseng extract on the activity of mitochondrial malate dehydrogenase in rabbit liver.

Conc. (mg/ml)	Enzyme activity of control group (units)***	Enzyme activity of experimental group (units)***	Change rate compared with control (100%)
0.025	44.52 ± 1.34	47.04 ± 1.65	105.7
0.05	47.32 ± 1.62	41.72 ± 1.06*	88.2
0.1	47.60 ± 1.23	41.72 ± 1.29	87.7
0.2	47.04 ± 1.51	39.76 ± 1.34*	84.5
0.4	45.08 ± 1.20	33.60 ± 1.04**	74.5
0.8	41.72 ± 1.26	24.92 ± 1.06**	59.7

* p 0.05, ** p 0.01 to control group, *** one unit of enzyme was defined as a change of 1 μ mole of malate to oxaloacetate per minute.

2) Petroleum ether 획분의 영향

SDH의 경우는 Table 3에 나타난 바와 같이 농도에 따라 다소 차이가 있지만 12-21%의 증가를 나타냈으며, MDH의 경우는 Table 4에 나타난 바와 같이 0.8mg/ml에서만 13.5% ($P < 0.05$)

Table 3. Effect of petroleum ether fraction of ginseng extract on the activity of mitochondrial succinate dehydrogenase in rabbit liver.

Conc. (mg/ml)	Enzyme activity of control group (units)**	Enzyme activity of experimental group (units)**	Change rate compared with Control (100%)
0.025	30.75 ± 1.10	33.00 ± 1.13	107.3
0.05	30.25 ± 1.15	33.75 ± 0.65*	111.6
0.1	29.00 ± 0.65	32.75 ± 1.03*	112.9
0.2	26.50 ± 1.10	32.00 ± 1.50*	120.8
0.4	26.00 ± 1.43	28.50 ± 1.40	109.6
0.8	24.75 ± 0.93	29.25 ± 0.88**	118.2

* p 0.05, ** p 0.01 to control group, *** one unit of enzyme was defined as a change of 1 μ mole of succinate to fumarate per minute.

Table 4. Effect of petroleum ether fraction of ginseng extract on the activity of mitochondrial malate dehydrogenase in rabbit liver.

Conc. (mg/ml)	Enzyme activity of control group (units)**	Enzyme activity of experimental group (units)**	Change rate compared with control (100%)
0.025	29.68 ± 1.79	28.56 ± 1.57	96.2
0.05	30.24 ± 1.48	29.96 ± 1.34	99.1
0.1	30.80 ± 1.57	31.08 ± 0.98	100.9
0.2	30.52 ± 1.62	29.96 ± 0.98	98.2
0.4	31.92 ± 1.06	28.84 ± 0.81	90.4
0.8	29.12 ± 1.12	25.20 ± 0.95*	86.5

* p 0.05, ** p 0.01 to control group, *** one unit of enzyme was defined as a change of 1 μ mole of malate to oxaloacetate per minute.

Table 5. Effect of mixture of ethyl acetate fraction and petroleum ether fraction on the activity of mitochondrial succinate dehydrogenase in rabbit liver.***

Conc. (mg/ml)	Enzyme activity of control group (units)**	Enzyme activity of experimental group (units)**	Change rate compared with Control (100%)
0.025	31.00 ± 0.75	32.50 ± 1.18*	104.8
0.05	31.50 ± 1.18	33.00 ± 1.00*	104.8
0.1	32.00 ± 0.98	33.00 ± 1.25*	103.1
0.2	35.25 ± 1.25	38.50 ± 1.43*	109.2
0.4	30.50 ± 1.15	32.75 ± 1.23*	108.3
0.8	30.00 ± 1.28	27.25 ± 1.05*	90.8

* Not significant to control group, ** One unit of enzyme was defined as a change of 1 μ mole of succinate to fumarate per minute., *** Each mixture contained equal concentration of ethyl acetate fraction and petroleum ether fraction to give the final concentration tested for this experiment.

의 유의성있는 억제효과를 나타내었을 뿐 그 밖의 농도에서는 별 영향이 없었다.

3) Ethyl acetate획분과 petroleum ether획분의 동량혼합물의 영향

Table 5와 Table 6에 나타난 바와 같이 0.025mg/ml에서 0.8mg/ml에 이르기까지 유의성있는 변화를 나타내지 않았다.

Table 6. Effect of mixture of ethyl acetate fraction and petroleum ether fraction on the activity of mitochondrial malate dehydrogenase in rabbit liver.***

Conc. (mg/ml)	Enzyme activity of control group (units)**	Enzyme activity of experimental group (units)**	Change rate compared with Control (100%)
0.025	31.92 ± 1.43	31.65 ± 0.98*	99.1
0.05	31.08 ± 1.01	31.92 ± 0.62*	102.7
0.1	31.36 ± 1.26	33.04 ± 0.76*	105.4
0.2	31.92 ± 1.15	31.65 ± 0.98*	99.1
0.4	33.32 ± 1.12	32.48 ± 0.70*	97.5
0.8	29.12 ± 1.26	26.88 ± 0.36*	92.3

* Not significant to control group, ** One unit of enzyme was defined as a change of 1 μ mole of succinate to fumarate per minute., *** Each mixture contained equal concentration of ethyl acetate fraction and petroleum ether fraction to give the final concentration tested for this experiment.

IV. 고 찰

Hwang과 Cha (1978)는 petroleum ether추출물이 L5178Y cell에서는 배양액 ml당 8 unit 에서 99.9% 사멸시킬 수 있었으며, sarcoma 180 cell은 L5178Y cell보다 8 배, Hela cell의 경우는 약10배 더 첨가해야 같은 억제효과를 나타낸다고 하였다.⁵⁾ Yun등 (1978)은 이 petroleum ether추출물에 의한 L5178Y cell 50% 성장억제효과는 1 - 2 μ g/ml, DNA, RNA 및 단백질 합성의 50% 억제효과는 각각 55 μ /ml, 80 μ g/ml 및 30 μ g/ml에서 나타내었다.⁶⁾ 고 보고하였다. 윤등 (1980)^{4,7)}은 ethyl acetate획분이 L5178Y cell과 sarcoma 180 cell의 증식을 거의 지수함수적으로 농도 (0.01~0.4mg/ml)에 비례하여 억제하며 0.1mg/ml에서 L5178Y cell은 약 80%, sarcoma 180 cell은 약 70% 억제하였다고 하였다.⁸⁾ 이는 petroleum ether획분의 경우도 같은 결과를 얻었다⁹⁾고 하였다.

이와 같이 petroleum ether획분 또는 ethyl acetate획분이 동일한 억제효과를 나타내는 농도는 암세포의 종류에 따라 다르게 나타난다. 이상의 결과가 자기 실험조건이 같지않아 일률적인 비교는 어렵지만 L5178Y cell의 뚜렷한 증식억제 (50%이상)를 나타내는 농도는 petroleum ether의 경우 1~100 μ g/ml이며,^{5,7)} ethyl acetate는 100 μ g/mg임⁶⁾을 알 수 있다.

본 실험에서 0.1mg/ml의 농도는 ethyl acetate획분이 RNA polymerase, SDH 활성화에 영향을 주지 않았으며 MDH활성만 약12%억제시켰으나, petroleum ether획분은 MDH 활성화에는 영향을 주지 않았으며 SDH활성은 12.9% 증가시켰다. 이는 정상세포인 효모세포에 petroleum ether획분과 ethyl acetate획분을 각각 5~40 μ g/ml 투여한 결과 효모세포의 증식에는 뚜렷한 억제

효과를 보이지 않았을 뿐아니라 오히려 5~10 μ g/ml의 ethyl acetate-분획물은 agar medium 배양에서 약간의 증식촉진을 보였다¹⁴⁾는 보고와 같은 경향임을 볼 수 있다.

또한, 두 분획물의 동량혼합물의 경우 ethyl acetate-획분 단독처리시 고농도(0.4mg/ml, 0.8 mg/ml)에서 나타나던 SDH와 MDH의 활성억제가 나타나지 않은 점은 특이한 사실로서 현재의 연구만으로는 이 현상을 설명하기 어렵다.

이상과 같은 본실험의 결과로 암세포생장을 억제하는 농도에서 ethyl acetate-획분이 정상 토끼간에서 RNA polymerase 및 SDH, MDH의 활성과 petroleum ether-획분이 SDH, MDH 활성에 어떤 뚜렷한 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

V. 요약

인삼의 ethyl acetate-획분과 petroleum ether-획분은 0.1mg/ml의 농도와 0.2mg/ml의 농도에서 유효한 암세포 억제성분으로 알려져 있다.

본 실험의 결과 ethyl acetate-획분은 0.1mg/ml의 농도와 0.2mg/ml의 농도에서 MDH 활성은 각각 12.3%, 15.5%의 억제를 나타내었다. 또한 이-획분은 SDH의 경우 0.025mg/ml의 농도에서 14.6%의 활성증가를 나타내었으나, 고농도(0.4mg/ml, 0.8mg/ml)에서는 세효소의 활성을 모두 억제시켰다.

Petroleum ether-획분은 0.1mg/ml의 농도와 0.2mg/ml의 농도에서 SDH의 활성을 각각 12.9%, 20.8% 증가시켰으나, 같은 농도에서 MDH의 활성에는 영향을 주지 않았다. 그러나, 이-획분은 0.8mg/ml의 농도에서 MDH의 활성을 13.5% 억제시키는 반면, SDH-활성은 18.2% 증가시켰다.

두-획분의 동량혼합물은 0.025mg/ml~0.8mg/ml의 농도에서 SDH와 MDH의 활성에 유의성있는 영향을 나타내지 않았다.

REFERENCES

1. Woo Lin Keun, Y. Nakamura and L. Donat: *Arch. Ital. Patol, Clin, tumori*, **8**, 53, (1965).
2. Hwang woo Ik and S. Cha: Proceedings of The 2nd International Ginseng Symposium, Korea Ginseng Research Institute, Seoul, Korea, (1978).
3. Lee Kyung-Dong and Richar P. Huemer: *Japan, J. Pharmacol*, **21**, 299, (1971).
4. 김익제, 김학현: 카톨릭 대학 의학부 논문집 **16**, 161, (1969).
5. Yun Taik Koo, R.S. Yoon and S.Y. Lee: Proceedings of The 2nd International Ginseng Symposium, Korea Ginseng Research Institute, Seoul, Korea, (1978).
6. 윤연숙, 이세영, 김병수, 윤택구: 한국생화학회지, **13**, (4), 219, (1980).
7. 윤연숙, 이세영, 김병수, 윤택구: 한국생화학회지, **13**, (4), 203, (1980).
8. Murata, I. and Hirono, D.: *Metabolism* **10**, 601, (1973).
9. 山本昌弘: *Metabolism* **10**, 587, (1973).
10. Weiss, S.B.: In *Method in Enzymology*, S.P. Colowick and N.O. Kaplan. A.P. Inc. N.Y., 555, (1968).
11. Allan, G. Gornall, Charles J. Bardawill and Maxima M. David: *J. Biol. Chem.* **177**, 751, (1949).
12. Greenawalt, J.W.: In *Method in Enzymology*, S.P. Colowick and N.O. Kaplan. A.P. Inc. N.Y. **31**, 310, (1974).
13. Widnell, C.C. and J.R. Tata: *Biochem. J.* **92**, 313, (1964).
14. Singer, T.P.: In *Method in Enzymology*, S.P. Colowick and N.O. Kaplan. A.P. Inc. N.Y. **53**, 466, (1978).
15. 주중노, 한정호: 한국생화학회지, **9**, 43, (1976).
16. 정노관, 김세창: 延世論業, 연세대학교대학원, **19**, 275, (1982).