

人蔘 사포닌이 白鼠 腸粘膜 Na^+, K^+ -ATPase 에 미치는 影響에 관한 研究

趙 允 成 · 金 洛 斗 · 權 容 和

서울대학교 藥學大學

(Received March 2, 1978)

Yun Sung Chough, Nak Doo Kim and Yong Wha Kwon

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151

A Study on the Effect of Ginseng Saponin on Rat Intestinal
Mucosal Na^+, K^+ -ATPase

Abstract—We have studied the effect of ouabain, total ginseng saponin, panax saponin C (protopanaxatriol derivative) and ginsenoside Rb_1 (protopanaxadiol derivative) on Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{++} -ATPase activity in rat intestinal microsomal fraction. Intestinal microsomal fraction was prepared by the method of Robinson and ATPase activities were determined by the method of King.

The Na^+, K^+ -ATPase activities were inhibited by 90.1% and 51.1% respectively at the concentration of 10^{-3}M and 10^{-4}M ouabain. The results are consistent with those of Robinson. The Na^+, K^+ -ATPase activities were increased by 14.3% and 10.0% respectively at the concentration of 10^{-4}g/ml and 10^{-5}g/ml total ginseng saponin. Panax saponin C obtained by the method of Han and ginsenoside Rb_1 obtained by the method of Shibata were used. The Na^+, K^+ -ATPase activities were increased in the presence of panax saponin C and the increased activity with panax saponin C was greater than that with total ginseng saponin. On the other hand ginsenoside Rb_1 showed an inhibitory effect on Na^+, K^+ -ATPase. Total ginseng saponin, panax saponin C and ginsenoside Rb_1 had no effect on Mg^{++} -ATPase.

Therefore, it may be concluded that total ginseng saponin has dual effects on microsomal Na^+, K^+ -ATPase, that is, panax saponin C exhibits stimulatory action, whereas ginsenoside Rb_1 shows inhibitory action.

Na^+, K^+ -ATPase 는 生體膜을 통한 Na^+, K^+ 의 能動的 移動에 관계하는 enzyme 으로 1957 년

Skou¹⁾에 의해 發見된 이래 이에 대한 研究는 많이 이루어 졌다.

1960년 Skou²⁾는 ouabain 이 Na⁺, K⁺-ATPase 를 選擇的으로 抑制함을 밝혔고 1965년 Repke³⁾ 등은 強心配糖體의 心臟에 대한 作用이 Na⁺, K⁺-ATPase 의 抑制에 기인함을 示唆하였다.

小腸內에서 糖의 能動的 吸收 機轉에 있어서 Na⁺, K⁺-ATPase 의 役割에 대해서 報告된 바 있다⁴⁻⁶⁾. 1971년 Leopold^{7,8)} 등은 ouabain 이 rat 및 guinea pig의 小腸의 brush border⁹⁾ Na⁺, K⁺-ATPase 를 抑制하며, Ca²⁺는 Na⁺, K⁺-ATPase 를 抑制하는 반면 Zn²⁺은 影響이 없음을 報告하였다. 1961년 Csáky⁴⁾는 ouabain 이 개구리 小腸內에서의 3-O-methylglucose 의 能動的 吸收를 抑制함을 밝히고 1963년¹⁰⁾에는 小腸內에서 Na⁺依存性인 糖과 아미노산의 能動的 吸收에^{6,11)} Na⁺, K⁺-ATPase 가 作用할것을 示唆하였다. 1968년 Chignell¹²⁾은 phenolphthalein 등의 下劑가 rat 小腸의 microsomal Na⁺, K⁺-ATPase^{13,14)}를 抑制함을 밝히고 phenolphthalein 등의 下劑가 小腸內에서의 Na⁺ 移動을 抑制하는 것은 小腸內 Na⁺, K⁺-ATPase 의 抑制에 의함을 示唆하였다.

反面에 1970년 Robinson¹⁵⁾은 rat 와 다른 實驗動物들의 小腸內 microsomal Na⁺, K⁺-ATPase 의 抑制와 phenylalanine, D-galactose 의 吸收에 관한 研究에서 Na⁺, K⁺-ATPase 와 糖, 아미노산의 能動的 吸收間의 상호관계가 잘 成立되지 않음을 밝히고 Na⁺ 移動에 Na⁺, K⁺-ATPase 이외의 다른 enzyme 도 關係할 것을 示唆하였다.

金¹⁶⁾ 등은 *in vitro* 實驗에서 人蔘 사포닌에 의해 rat 小腸內에서 3-O-methylglucose 의 吸收가 抑制됨을 報告하였으며 本 研究室에서 *in vivo* 實驗에서 protopanaxadiol 系 사포닌인 ginsenoside Rb₁ 이 rat 小腸內에서 3-O-methylglucose 의 吸收를 현저히 抑制시킴을 관찰한 바 있다.

이에 著者들은 人蔘 사포닌의 小腸內 糖吸收 抑制作用이 Na⁺, K⁺-ATPase 와 어떠한 연관성 여부를 알아보기 위해 total ginseng saponin, panax saponin C (protopanaxatriol 系 saponin), ginsenoside Rb₁ (protopanaxadiol 系 saponin) 이 rat 小腸의 microsomal Na⁺, K⁺-ATPase 의 activity 에 미치는 影響을 관찰하였다.

實 驗 方 法

實驗 材料—Total ginseng saponin : 人蔘 사포닌은 錦山産 4年生根을 柴田¹⁷⁾, 難波¹⁸⁾ 등의 方法을 변용하여 抽出하였으며 *n*-부탄올 分割으로 이행된 사포닌 分割을 實驗에 使用하였다.

Panax saponin C (protopanaxatriol 系 saponin): Total ginseng saponin 으로 부터 韓¹⁹⁾ 등의 方法으로 抽出 分離한 백색 결정성 분말을 實驗에 使用하였다.

Ginsenoside Rb₁ (protopanaxadiol 系 saponin): Total ginseng saponin 으로 부터 柴田¹⁷⁾ 등의 方法으로 抽出 分離한 백색 결정성 분말을 實驗에 使用하였다.

Tris-ATP^{20,21)} : 20g 의 A6 50W-X8 resin 을 0.4N HCl 용액 20 ml 에 넣고 5분간 진탕한 다음 上澄液을 따라내고 50 ml 의 증류수로 다시 5분간 진탕하여 상등액의 pH가 5.2가 될 때까지 반복한 다음 resin 을 진공펌프로 흡입하면서 濾過乾燥하였다. Na₂ ATP (Sigma chemical Co.) 4g 을 물에 녹인 다음 마른 resin 에 가하여 15분간 교반한 다음 흡입여과하고 resin 을 다시 2.5 ml 의 증류수로 씻어서 흡입여과하여 여액을 합하였다. 여액의 pH가 6.8이 되도록 tris salt (E. Merck) 로 적정하여 tris-ATP 를 얻었고 spectrophotometer 를 사용하여 259 nm 에서 함량을 측정하여 -20°C 에 보관하였다.

實驗 方法—microsomal fraction의 分離: 體重 200 g 內외의 건강한 Sprague-Dawley系 rat를 一晝夜 絶食 後 頭部에 타격을 加하여 致死시키고 곧 복강을 切開하여 십이지장에서 시작하여 30 cm 길이의 小腸을 취하여 slide glass를 使用하여 粘膜부위를 分離하였다.

여기에 7 배 용량比의 1mM EDTA를 함유하는 0.25 M sucrose 용액을 加하고 Pottor-Elvehjem homogenizer를 使用하여 20 초씩 5回 homogenize 하였다. 이상의 操作은 4°C의 低溫室에서 行하였다.

이 homogenate를 3000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하고 침전을 다시 위와 같은 용량의 0.25 M sucrose 용액에 현탁시켜 3000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻어 위의 상등액과 합하였다. 합한 상등액을 100,000×g에서 1시간 초원심분리하여 얻은 pellet을 microsomal fraction으로 使用하였다.

microsomal fraction은 -20°C에 보관하였으며 使用時에 0.25 M sucrose 용액 4 ml에 현탁시켜 microsomal suspension으로 하여 使用하였다. microsomal fraction은 分離후 2일 이내의 것을 使用하였다(Fig. 1).

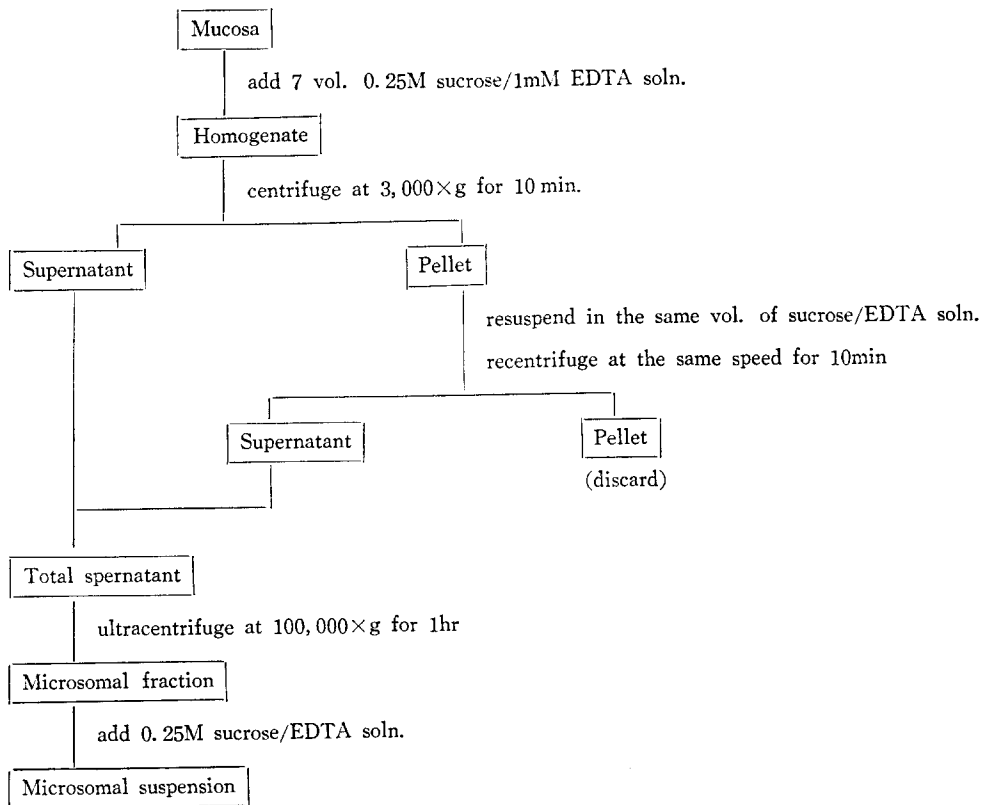


Fig. 1—Preparation of microsomal fraction.

ATPase activity 測定—incubation 용액의 組成은 NaCl 100mM, KCl 10mM, MgCl₂ 5mM,

EDTA-tris 1mM, tris-HCl buffer (pH7.4) 50mM, 효소 500~800 μ g, 시료침가 또는 불침가라고 증류수를 추가하여 最終 용량이 2 ml 가 되게 하였다.

위의 용액을 표준반응액으로 사용하고 Mg⁺⁺-ATPase activity 측정을 위해 NaCl, KCl 을 함유하지 않은 반응액과 blank 로 효소만을 함유하지 않은 반응액을 사용하였다.

위의 반응액들을 37°C 에서 5 분간 preincubation 시킨 후 tris-ATP 를 추가하는 것을 반응의 시작으로 하여 37°C 에서 정확히 10 분간 incubation 시키고 ice-cold 6% perchloric acid 3 ml 를 포함으로써 반응을 終了시켰다.

반응액을 원심분리하여 단백질을 침전시킨 후 상등액 4 ml 를 취하여 여기에 遊離되어 있는 Pi (inorganic phosphate)의 量을 King 의 방법²²⁾에 의하여 測定하였다.

단백질 量은 Lowry 법²³⁾으로 測定하였으며 ATPase activity 는 n moles Pi/mg protein/min (以下 nM 로 表示)로 表示하였다.

實驗 結果

Ouabain 이 ATPase activity 에 미치는 影響—ouabain 10⁻³M, 10⁻⁴M 을 incubation medium 에 含有시키고 ATPase activity 를 測定한 結果 Na⁺, K⁺-ATPase activity 는 각각 4.70 \pm 1.48nM, 23.52 \pm 1.15nM 로 正常值 48.09 \pm 3.62nM 에 비하여 90.2%, 51.1% 의 高度의 有意性있는 減少를 나타내었으며 Mg⁺⁺-ATPase activity 는 각각 113.41 \pm 2.45nM, 110.38 \pm 9.92nM 로서 正常值 113.55 \pm 6.39nM 과 거의 差異가 없었다(Table I).

Table I—The effect of ouabain on Na⁺, K⁺-ATPase and Mg⁺⁺-ATPase activity.

Concentrations	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase			Mg ⁺⁺ -ATPase		
	activity (nM Pi/mg protein/min)	%	changes	activity (nM Pi/mg protein/min)	%	changes
Control	48.09 \pm 3.62 ^a (6) ^b	—	—	113.55 \pm 6.39 (6)	—	—
Ouabain (10 ⁻³ M)	4.70 \pm 1.48** (6)	—90.2	—	113.41 \pm 2.45 (6)	—0.1	—
Ouabain (10 ⁻⁴ M)	23.52 \pm 1.15** (6)	—51.1	—	110.38 \pm 9.92 (6)	—2.8	—

a : Mean \pm S. E.

b : Parentheses indicate the number of experiments

** : Statistically highly significant (P<0.01)

Total ginseng saponin 이 ATPase activity 에 미치는 影響—incubation medium 에 total ginseng saponin 10⁻⁴g/ml, 10⁻⁵g/ml 을 加하고 ATPase activity 를 測定한 結果 Na⁺, K⁺-ATPase activity 는 각각 63.46 \pm 4.03nM, 61.04 \pm 3.83nM 로 正常值 55.50 \pm 4.33nM 에 비하여 14.3%, 10.0% 의 有意性있는 增加를 나타내었으며 Mg⁺⁺-ATPase activity 는 각각 103.74 \pm 8.80nM, 101.86 \pm 10.37nM 로서 正常值 101.87 \pm 9.71nM 과 거의 差異가 없었다(Table II).

Panax saponin C 가 ATPase activity 에 미치는 影響—incubation medium 에 panax saponin C 10⁻⁴g/ml, 10⁻⁵g/ml, 10⁻⁶g/ml 을 含有時 Na⁺, K⁺-ATPase activity 는 각각 80.76 \pm 6.08nM, 65.69 \pm 5.69nM, 65.68 \pm 7.79nM 로 正常值 57.92 \pm 5.80nM 에 비하여 10⁻⁴g/ml 에서는 39.4% 의 高度의 有意性있는 增加를 나타내었으며 10⁻⁵g/ml, 10⁻⁶g/ml 에서는 13.4%, 13.4% 의 有意

Table II—The effect of total ginseng saponin on Na⁺, K⁺-ATPase and Mg⁺⁺-ATPase activity.

Concentrations	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase			Mg ⁺⁺ -ATPase		
	activity (nM Pi/mg protein/min)	%	changes	activity (nM Pi/mg protein/min)	%	changes
Control	55.50±4.33 ^a (5) ^b	—	—	101.87±9.71 (5)	—	—
T. G. S. (10 ⁻⁴ g/ml)	63.46±4.03* (5)	+14.3		103.74±8.80 (5)	+1.8	
T. G. S. (10 ⁻⁵ g/ml)	61.04±3.83* (5)	+10.0		101.87±10.37 (5)	0	

a : Mean±S. E.

b : Parentheses indicates the number of experiments

* : Statistically significant (P<0.05)

性있는 증가를 나타내었다. Mg⁺⁺-ATPase activity는 10⁻⁴g/ml, 10⁻⁵g/ml, 10⁻⁶g/ml에서 각각 119.96±5.40nM, 120.83±6.22nM, 119.48±9.25nM로서 正常値 112.99±6.84nM보다 6.2%, 6.9%, 5.7% 증가하였으나 有意性은 없었다(Table III).

Table III—The effect of panax saponin C on Na⁺, K⁺-ATPase and Mg⁺⁺-ATPase Activity.

Concentrations	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase			Mg ⁺⁺ -ATPase		
	activity (nM Pi/mg protein/min)	%	changes	activity (nM Pi/mg protein/min)	%	Changes
Control	57.92±5.80 ^a (4) ^b	—	—	112.99±6.84 (4)	—	—
PS-C (10 ⁻⁴ g/ml)	80.76±6.08** (4)	+39.4		119.96±5.40 (4)	+6.2	
PS-C (10 ⁻⁵ g/ml)	65.69±5.69* (4)	+13.4		120.83±6.22 (4)	+6.9	
PS-C (10 ⁻⁶ g/ml)	65.68±7.79* (4)	+13.4		119.48±9.25 (4)	+5.7	

a : Mean±S. E.

b : Parentheses indicate the number of experiments

* : Statistically significant (P<0.05)

** : Statistically highly significant (P<0.01)

Ginsenoside Rb₁이 ATPase activity에 미치는影響—incubation medium에 ginsenoside Rb₁ 10⁻⁴g/ml, 10⁻⁵g/ml, 10⁻⁶g/ml을 함유할 때 Na⁺, K⁺-ATPase activity는 10⁻⁴g/ml에서는 47.51±3.46nM로서 正常値 58.66±4.01nM에 비하여 19.0%의 高度의 有意性있는 減少를 나타내었으며 10⁻⁵g/ml, 10⁻⁶g/ml에서는 58.10±3.46nM, 56.38±4.73nM로서 正常値에 비하여 1.0%, 3.9% 減少하였으며 有意性은 없었다. Mg⁺⁺-ATPase activity는 10⁻⁴g/ml에서 101.48±7.43nM로 正常値 111.77±5.92nM에 비하여 9.2%의 有意性있는 減少를 나타내었으며 10⁻⁵g/ml, 10⁻⁶g/ml에서는 112.20±2.70nM, 109.44±6.38nM로서 正常値와 差異가 없었다(Table IV).

考 察

金¹⁶⁾等은 人蔘 總 사포닌이 小腸內에서 糖吸收를 抑制하며 또한 人蔘 總 사포닌에서 分離한 protopanaxadiol系 및 protopanaxatriol系 사포닌이 양 성분간에 程度의 差異는 있으나 역시 小

Table IV—The Effect of Ginsenoside Rb₁ on Na⁺, K⁺-ATPase and Mg⁺⁺-ATPase Activity.

Concentrations	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase			Mg ⁺⁺ -ATPase		
	activity (nM Pi/mg protein/min)	Pi/mg	% changes	activity (nM Pi/mg protein/min)	Pi/mg	% changes
Control	58.66±4.01 ^a (4) ^b		—	111.77±5.92 (4)		—
Rb ₁ (10 ⁻⁴ g/ml)	47.51±3.46** (4)		-19.0	101.48±7.43* (4)		-9.2
Rb ₁ (10 ⁻⁵ g/ml)	58.10±3.46 (4)		-1.0	112.20±2.70 (4)		+0.4
Rb ₁ (10 ⁻⁶ g/ml)	56.38±4.73 (4)		-3.9	109.44±6.38 (4)		-2.1

a : Mean±S. E.

b : Parentheses indicate the number of experiments

* : Statistically significant (P<0.05)

** : Statistically highly significant (P<0.01)

腸內 糖吸收을 抑制한다고 報告한 바 있다. 人蔘에 의한 小腸內 糖吸收 抑制 機轉은 人蔘 配糖體의 糖과의 相競의 抑制일 可能性은 많으나 한편 腸內 糖吸收가 能動的 輸送에 의한 것인 點을 감안하면 人蔘이 糖의 輸送 機構에 抑制의으로 作用할 可能性도 있다.

Csáky는 小腸內에서의 糖의 能動的 輸送機轉에 Na⁺, K⁺-ATPase가 關與하고 있음을 發表한 바 있으며 ouabain이 Na⁺, K⁺-ATPase를 抑制함으로써 糖의 腸內 吸收를 抑制한다고 하였다. 따라서 著者등은 小腸內 糖吸收에 미치는 人蔘의 抑制效果가 腸內 Na⁺, K⁺-ATPase의 抑制에 基因하는지의 如否를 檢討하였다.

Ginsenoside Rb₁은 小腸內 糖吸收를 抑制하며 또한 Na⁺, K⁺-ATPase의 作用을 抑制하였다. 反面에 panaxatriol系 saponin인 panax saponin C는 小腸內 糖吸收에 對해 顯저한 作用은 없으나 Na⁺, K⁺-ATPase의 活性度는 증가하는 結果를 나타내고 있다. 總 人蔘 사포닌의 경우는 양성분의 總합效果로서 糖吸收는 抑制되며 Na⁺, K⁺-ATPase의 活性度는 증가 되었다. 總 人蔘 사포닌의 化學的 成分에 關하여 Shibata 등은 13종의 사포닌을 分離한 바 있으며 이들은 化學的으로 protopanaxatriol系 및 protopanaxadiol系 사포닌이다. 따라서 總 人蔘 사포닌의 作用은 여러가지 사포닌의 複合作用인 것으로 생각되어 총 사포닌에 의한 糖吸收 抑制와 腸內 microsomal Na⁺, K⁺-ATPase 活性度의 抑制作用間에 相關性을 논의하기는 어렵다. 그러나 순수 단일 성분인 ginsenoside Rb₁이 腸內 糖吸收를 抑制하고 또한 Na⁺, K⁺-ATPase 活性度를 抑制하는 事實은 특기할만하다. 뿐만아니라 ginsenoside Rb₁이 흰쥐 심장에 對하여 強力한 強心作用을 나타내는 點으로 보아 ginsenoside Rb₁은 digitalis와 같은 作用이 있는것으로 推測된다. panax saponin C는 Na⁺, K⁺-ATPase 活性度에 對해 ginsenoside Rb₁과 서로 相反된 作用을 나타내는데 이것은 高木^{26,27} 등이 主張하는 의견과 유사성을 인정할 수 있다. 高木 등은 protopanaxadiol系의 ginsenoside Rb₁, Rc는 中樞神經系에 鎮靜作用을 protopanaxatriol系의 ginsenoside Rg는 흥분작용을 나타낸다고 하였다.

人蔘 總 사포닌 중에는 Na⁺, K⁺-ATPase를 증가 또는 抑制시키는 相反된 作用을 가진 成分이 共存하고 있는 것으로 思料된다.

Robinson¹⁵⁾에 依하면 小腸內 microsomal Na⁺, K⁺-ATPase는 aging effect^{15,24,25)}를 나타내어 8日째에 activity가 最高가 되며 처음 2日間은 activity에 변화가 없는것으로 報告되어 있

으므로 이 研究에서는 microsomal fraction 을 分離한 後 2日 이내의 것을 使用하였다.

結 論

total ginseng saponin, panax saponin C, ginsenoside Rb₁ 이 rat 小腸內 microsomal Na⁺, K⁺-ATPase 및 Mg²⁺-ATPase activity 에 미치는 影響을 관찰하였다.

1. 人蔘 총 사포닌은 Na⁺, K⁺-ATPase activity 를 增加시켰다.
2. panax saponin C 는 Na⁺, K⁺-ATPase activity 를 현저히 增加시켰다.
3. 反面에 ginsenoside Rb₁ 은 Na⁺, K⁺-ATPase activity 를 減少시켰다.
4. total ginseng saponin, panax saponin C, ginsenoside Rb₁ 모두 Mg²⁺-ATPase activity 에는 影響이 없었다.

이 實驗을 위해서 ginsenoside Rb₁ 및 panax saponin C 를 提供해주신 서울大學校 生藥研究所 韓秉勳教授에게 感謝를 드립니다.

文 獻

1. J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta.*, **23**, 394(1957).
2. J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta.*, **42**, 6(1960).
3. K. Repke, M. Est, and H. J. Portius, *Biochem. Pharmacol.*, **14**, 1785(1965).
4. T. Z. Csáky, H. G. Hartzog III, and G. W. Fernald, *Am. J. Physiol.*, **200**, 459(1961).
5. R. K. Crane, *Fedn. Proc.*, **21**, 891(1962).
6. P. F. Curran, *Fedn. Proc.*, **24**, 993(1965).
7. G. Leopold, E. Furukawa, W. Forth and W. Rummel, *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1119(1971).
8. G. Leopold, E. Furukawa, W. Forth and W. Rummel, *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1109(1971).
9. G. G. Forstner, S. M. Sabesin and K. J. Isselbacher *Biochem. J.*, **106**, 381(1968).
10. T. Z. Csáky, *Fedn. Proc.*, **21**, 3(1963).
11. R. K. Crane, *Fedn. Proc.*, **21**, 1000(1962).
12. C. F. Chignell, *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 1207(1968).
13. J. W. Porteus, and B. Clark, *Biochem. J.*, **96**, 159(1965).
14. T. Nakao, Y. Tashima, N. Nagano, and N. Nakao, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 755(1965).
15. J. W. L. Robinson, *J. Physiol.*, **206**, 41(1970).
16. N. D. Kim, and J. W. Lee, *J. Pharm. Soc. Korea*, **22**, 109(1978).
17. S. Sanada, N. Kondo, J. Shoji, O. Tanaka, and S. Shibata, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 421(1974).
18. T. Namba, M. Yoshizaki, T. Tomimori, K. Kobashi, K. Mitsui, and J. Hase, *Yakugaku zasshi*, **94**, 252(1974).
19. B. H. Han, Y. N. Han and L. K. Woo, *J. Pharm. Soc. Korea*, **16**, 129(1972),
20. C. W. Park, and J. S. Oh, *Korea J. of Pharmacol.*, **6**, 1(1970).
21. S. Y. Yu, and S. A. Hong, *The Seoul J. of Med.*, **12**, 173(1971).
22. E. J. King, *Biochem. J.*, **26**, 292(1932).

23. O.H. Lowry, N.J., Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
24. J.G. Skou, *Biochem. Biophys. Acta.*, **58**, 314(1962).
25. A. Schwartz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **9**, 301(1962).
26. K. Takagi, H. Saito, and H. Nabata, *Jap. J. Pharmacol.*, **22**, 245(1972) and **22**, 339(1972).
27. H. Nabata, H. Saito, and K. Takagi, *Jap. J. Pharmacol.*, **23**, 29(1973).