

## 홍삼 Polyamine 계 성분이 배양한 계배의 근육세포 성장에 미치는 영향

구 향 자 · 김 영 중

서울대학교 약학대학

(Received August 5, 1987)

### A Study on the Effect of Polyamines of Korean Red Ginseng on the Growth of Cultured Chicken Embryonic Muscle Cells

Hyang Ja Koo and Young Choong Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

**Abstract**—Polyamines of Korean red ginseng were extracted with 5% trichloroacetic acid and purified by ion exchange chromatography using Dowex-50Wx8 resin. Four spots having  $R_f$  values of 0.19, 0.28, 0.35, and 0.45 were detected. It was observed under microscopy that those polyamines stimulated the growth and differentiation of chicken embryonic muscle cells. The development of muscle cells from the stage of myoblast to that of myotube was found to be enhanced by those polyamines. It was also observed that those polyamines most likely lengthened the life-span of the cultured chicken embryonic skeletal muscle cells.

인삼은 생체내에서 여러 생리작용에 관여하여 다양한 약리효과를 나타낸다고 수많은 학자들이 보고하였다.<sup>1-4)</sup> 그러나 아직까지도 이를 뒷받침 할만한 체계화된 정설을 찾지 못하고 있는데 이는 인삼의 효과가 비특이적이며, 상당히 많은 용량을 장기간에 걸쳐 투여하지 않으면 그 효과를 기대하기 힘들고, 또 인삼의 효과를 체계화 하는데 적합한 방법을 찾기가 어렵기 때문이다.

Polyamine계 물질은 1970년대 초기까지는 생체대사 최종산물로 밖에는 생각되지 못하였으나 최근에 들어와 세포의 성장과 분열에 있어서 이들 물질의 생화학적 및 생리학적 중요성이 인정되고 있다.<sup>5-10)</sup> Polyamine류는 생리적 pH에서 각각 +2가, +3가, 또는 +4가의 알짜 하전을 갖는 polycation으로 존재한다. 이와 같이 polyamine류는 양이온적 성질을 갖고 형태학적으로 이동성이 커서 세포내의 다양한 음이온으로 하전된 부위와 직접 결합할 수 있어 생체내의 음이온으로 하전된 부위의 구조, 특성, 기능 등에 영향을 미친다고 알려졌다.<sup>11-14)</sup> 즉 polyamine

류는 핵산의 인산기와 결합함으로써 이들을 보호하고 핵산의 이차 및 삼차구조를 안정화시키며, 또한 이들의 함성에 영향을 미친다는 것이 알려졌다. 또한 polyamine류는 polycation으로서 핵산과의 작용뿐만 아니라 세포막과도 결합을 하여 세포막의 붕괴를 막고, 인지질 vesicles의 융합을 촉진시키며, 여러가지 세포대사 과정의 생화학적 조절제로 작용한다고 알려졌다.<sup>15-18)</sup> 이러한 점에 착안하여 본 연구에서는 인삼의 약효 및 그 작용기전을 규명하기 위한 연구의 일환으로 새로운 방법인 일차세포 배양법(primary cell culture method)을 도입하여 홍삼의 polyamine계 성분이 계배(chicken embryo)의 근육세포의 성장 및 발달에 미치는 영향을 우선 현미경하에서 관찰하였다.

#### 실 험 방 법

**재료 및 시약**—실험에 사용한 홍삼은 전매청(서울특별시 관악구 봉천본동 958-14)에서 생산

한 6년근이며, 계배(chicken embryo)는 일령 10일과 12일된 부화란을 유일농원(서울특별시 구로구 오류동 11)에서 구입하여 사용하였고, 조직배양에 필요한 시약은 Grand Island Biological Company (3175 Staley Road, Grand Island, New York 14072, U.S.A.) 제품을, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

**Polyamine계 성분의 추출 및 확인<sup>17,18)</sup>**—홍삼 중의 polyamine계 성분은 홍삼 400g을 세말로 한 다음 Scheme I과 같이 5% trichloroacetic acid (TCA in 0.05M HCl)로 4°C에서 24시간 동안 교반하면서 추출하였다. 추출여액 중의 단백질을 성분은 4°C에서 18시간동안 방치한 다음 5,000g에서 5분간 원심분리하여 제거하였다. 상등액 중의 TCA를 제거하기 위하여 에테르로 3회 세척하였으며, 잔존하는 에테르를 제거하기 위하여 30°C에서 감압증류한 다음 동결건조하여 polyamine계 성분을 얻었다. 동결건조시킨 polyamine계 성분을 증류수에 녹인후 용액의 액성을 pH 5~6이 되도록 2M KOH로 적정한 다음 Dowex-50Wx8 (H<sup>+</sup> form, 200~400 mesh)을 사

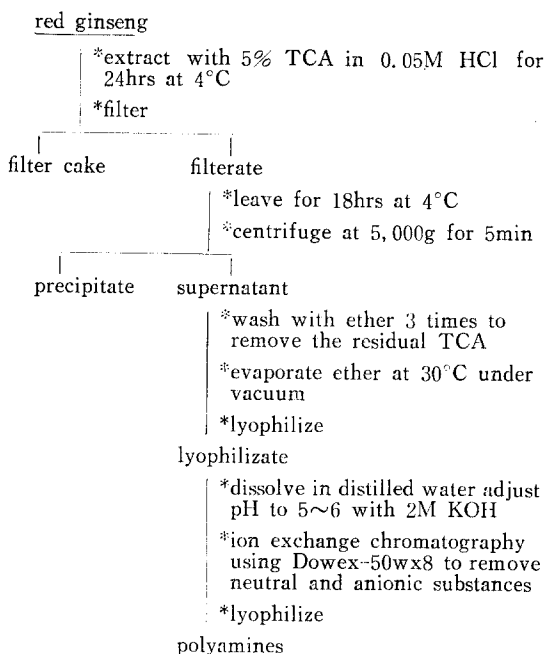
용하여 column chromatography하였다. 즉 먼저 증류수로 용출시켜 Dowex-50Wx8에 흡착되지 않는 물질들을 먼저 유출시킨 후 수지에 부착된 polyamine계 물질을 2.5N HCl~6N HCl까지의 구배를 형성시켜 단계적으로 유출시켰다. 유출액 중의 polyamine 확인은 TLC에 의하였으며, 고정상으로는 Avicel SF (cellulose microcrystalline form TLC)를 사용하였다. 전개용매는 n-butyl alcohol : acetic acid : water (4 : 3 : 2)를, 발색시약으로는 ninhydrin 시약을 사용하였다.

**계배 추출물의 제조<sup>19)</sup>**—일령 10일된 계배를 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)으로 세척한 후 원심분리관 속에 넣고, 동량의 HBSS로 희석하였다. 실온에서 30분간 방치한 다음, 4°C에서 1,900g으로 20분간 원심분리하고, 상등액을 취하여 다시 4°C에서 15,000g으로 1시간동안 원심분리하여 그 상등액을 취하여 제조하였다.

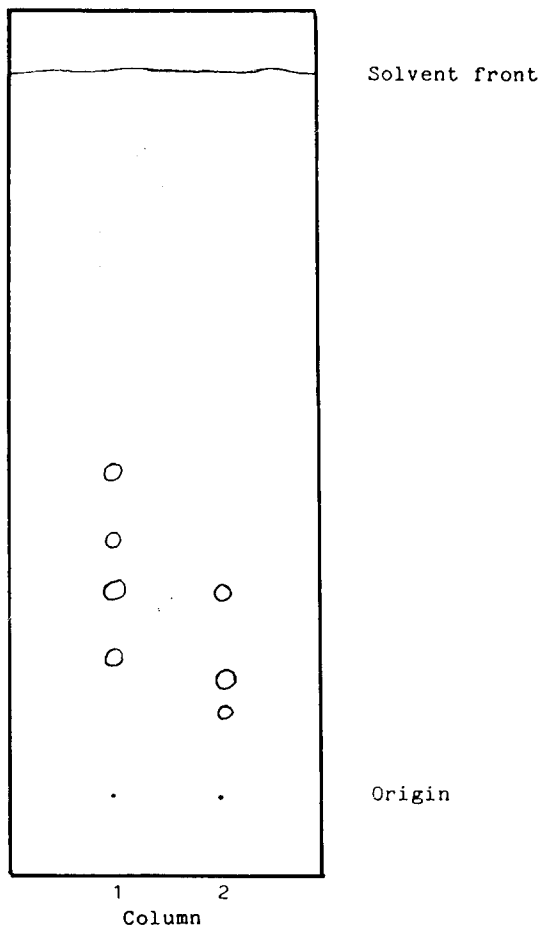
**계배 근육세포의 배양<sup>20,21)</sup>**—일령 12일된 계배의 가슴근육을 적출하여 trypsin으로 조직을 연화시킨 후 근육조직을 세포상태로 분리하였다. fibroblast를 제거하기 위하여 배양용기에 근육세포를 이식하여 37°C에서 45분간 배양하였다. 그 후 배양액만을 취하여 collagen을 도포한 petri-dish에 5×10<sup>5</sup>개 정도의 근육세포를 이식하여 배양하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 173ml, 말혈청 20ml, 계배추출물 5ml, penicillin (10,000 units/ml), streptomycin (10,000mcg/ml), fungizone (25mcg/ml)이 혼합되어 있는 항생제용액 2ml의 비율로 혼합한 표준배양액과 표준배양액에서 계배추출물을 제거한 배양액을 사용하였다.

결과 및 고찰

홍삼 중의 polyamine계 물질을 얻기 위하여 scheme I과 같이 추출한 다음 추출분을 TLC한 결과 홍삼은 R<sub>f</sub>값이 0.19, 0.28, 0.35 및 0.45인 4종류의 polyamine계 물질을 함유하며, 이 중 R<sub>f</sub>값이 0.28인 물질은 표준품 putrescine dihydrochloride와 R<sub>f</sub>값이 일치함을 알 수 있었다 (Fig. 1). Putrescine 이외의 다른 polyamine계

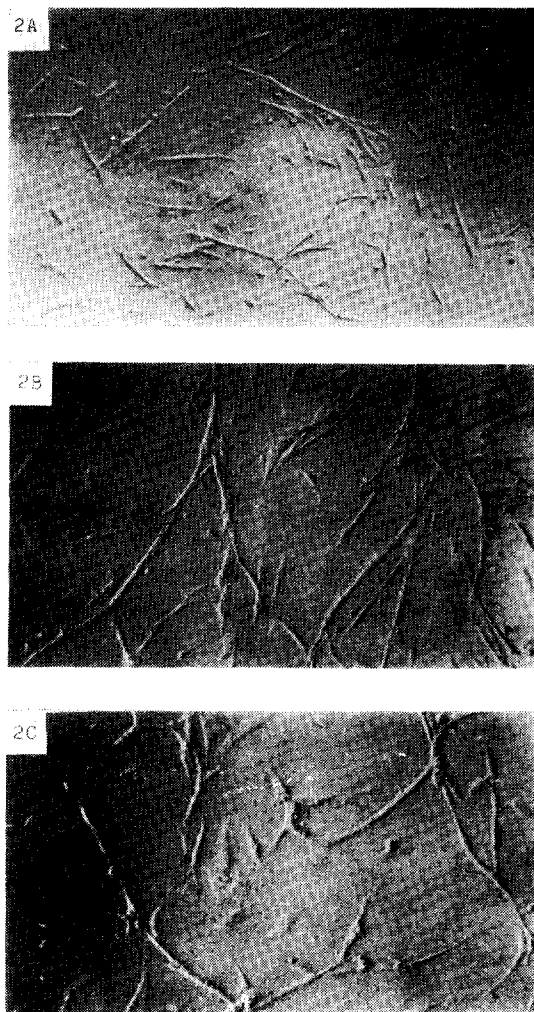


Scheme I—Extraction procedures of polyamines from Korean red ginseng



**Fig. 1**-Thin layer chromatogram of polyamine fraction of Korean red ginseng. Column 1 shows total polyamine fraction of Korean red ginseng column 2 shows polyamine standard mixture and of putrescine (top), spermidine (middle) and spermine (low). TLC was carried out with the developing solvent system of n-butanol : acetic acid : water; 4 : 3 : 2, v/v/v. Spots were visualized by a ninhydrin reagent.

성분에 대한 화학적인 연구는 먼저 이들이 생리 활성이 있는지를 검토한 후에 하고자 우선 홍삼 중의 총 polyamine계 성분이 계배의 근육세포가 성장, 발달하는 데 어떻게 영향을 미치는지를 살펴보았다. 계배의 가슴근육세포를 표준배양액으로 배양하면서(Fig. 2A), 홍삼 총 polyamine 성분과 putrescine을 각기 첨가하여 3일간 배양한 후 비교하였을 때 홍삼 총 polyamine 성분을

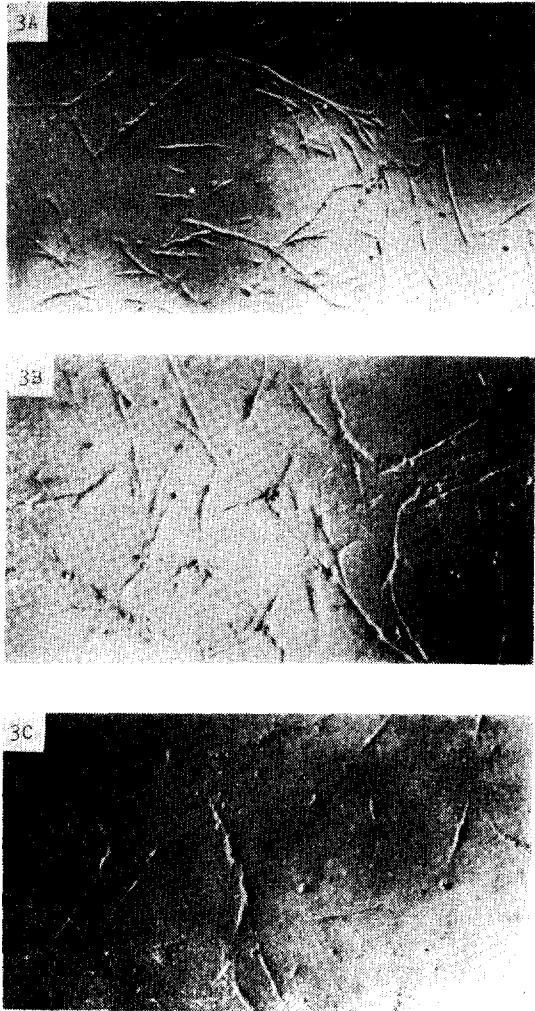


**Fig. 2**-The effect of polyamines of Korean red ginseng and putrescine on the growth of chicken embryonic skeletal muscle cells.  $\times 100$  Picture A shows control skeletal muscle cell culture for 3 days in the standard medium. Pictures B and C show skeletal muscle cell cultures grown for 3 days in the presence of  $10^{-6}M$  polyamines of Korean red ginseng and putrescine, respectively.

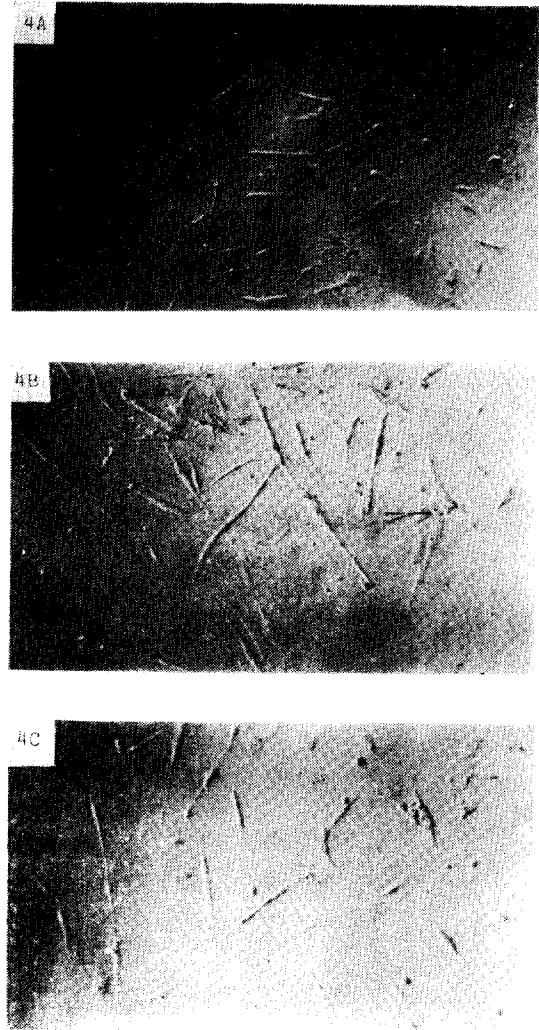
첨가하여 배양한 근육세포가 가장 잘 성장하여 굵고 길게 발달된 myotube 상태가 되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). Putrescine만을 첨가하여 배양한 근육세포에서도 어느 정도 성장이 촉진된 것을 볼 수 있었으나, 그 성장정도는 홍삼 총 polyamine 성분을 첨가하여 배양한 경

우에 미치지 못하였다(Fig. 2C). 홍삼 polyamine 성분의 농도에 따른 근육세포의 성장촉진 효과를 알아보기 위해 홍삼 총 polyamine 성분의 농도를  $10^{-6}M$ 에서  $10^{-3}M$ 로 증가시켰을 때 근육세포의 성장이 더욱 촉진되는 않았지만 여전히 공시험(Fig. 3A)에 비해 성장이 촉진되는 것을 관찰할 수 있었으나(Fig. 3B) putrescine의 경우

에는 농도를 증가시켰을 때 오히려 근육세포의 성장이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3C). 이와 같은 홍삼 polyamine 성분의 근육성장 촉진효과를 좀 더 구체적으로 밝히기 위하여 근육세포를 표준배양액에서 성장에 필수성분인 계

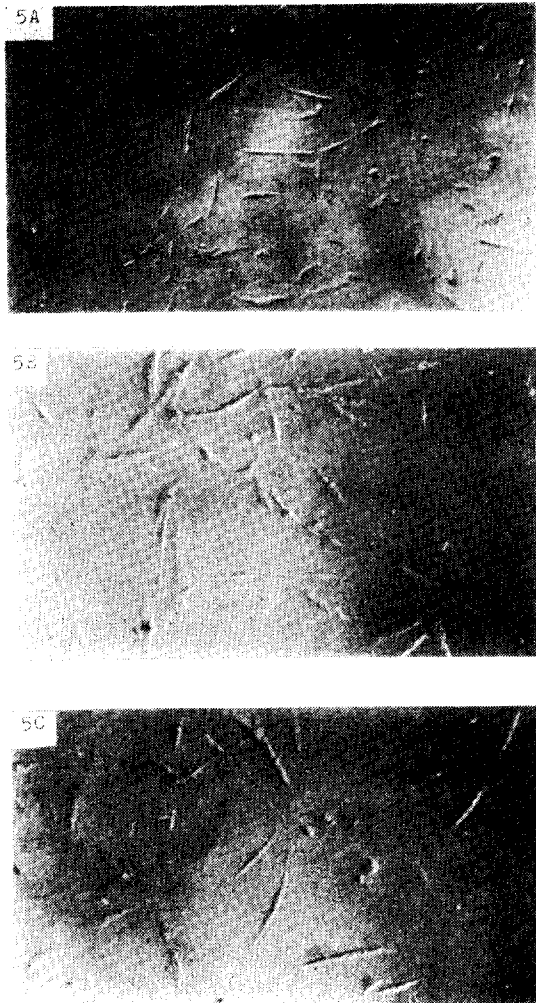


**Fig. 3**-The effect of polyamines of Korean red ginseng and putrescine on the growth of chicken embryonic skeletal muscle cells.  $\times 100$  Picture A shows control skeletal muscle cell culture grown for 3 days in the standard medium. Pictures B and C show skeletal muscle cell cultures grown for 3 days in the presence of  $10^{-6}M$  polyamines of red ginseng and putrescine, respectively.



**Fig. 4**-The effect of polyamines of Korean red ginseng and putrescine on the growth of chicken embryonic skeletal muscle cells.  $\times 100$  Picture A shows control skeletal muscle cell culture grown for 3 days in the medium consisted of DMEM and horse serum by the ratio of 9 : 1 (v/v). Pictures B and C show skeletal muscle cell cultures grown for 3 days in the presence of  $10^{-6}M$  polyamines of Korean red ginseng and putrescine, respectively.

배추출물을 제거한 배양액으로 배양하면서 홍삼 polyamine 성분이 근육세포의 성장발달에 미치는 효과를 관찰하였다. 근육세포를 계배추출물이 함유되어 있지 않은 배양액으로 배양하면, 근육세포는 myoblast 상태에서 더 이상 발달하지 못하며, 생존도 어렵다고 알려져 있다. 근육세포



**Fig. 5**-The effect of polyamines of Korean red ginseng and putrescine on the growth of chicken embryonic skeletal muscle cells.  $\times 100$  Picture A shows control skeletal muscle cell culture grown for 3 days in the medium consisted of DMEM and horse serum by the ratio of 9:1 (v/v). Pictures B and C show skeletal muscle cell cultures grown for 3 days in the presence of  $10^{-6}$ M polyamines of Korean red ginseng and putrescine, respectively.

를 DMEM과 말혈청만으로 조성된 배양액으로 3일간 배양했을 때 근육세포는 myoblast 상태에서 성장이 멈추었으며, 또한 거의 모든 세포가 죽어가고 있었으나(Fig. 4A), 홍삼 polyamine 성분을  $10^{-6}$ M 첨가하여 3일간 배양했을 때는 계배추출물이 존재할 때의 관찰결과와는 미치지 못하였으나 결핍이 어느 정도 극복되어 근육세포가 myotube 상태까지 발달하여 생존하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4B). 또한 putrescine을 동량 첨가하였을 경우에도 계배추출물이 첨가되었을 경우의 결과와는 미치지 못하지만 myotube의 미발달형태인 myoblast 상태로 공시험에 비해서는 좀 더 많은 세포가 생존해 있었으나(Fig. 4C) putrescine의 효과가 홍삼 polyamine 성분의 효과에는 미치지 못하는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 홍삼 중의 polyamine 성분과 putrescine의 효과는 그 농도를  $10^{-3}$ M로 증가시켰을 때도 같은 결과를 나타내었다(Fig. 5A, B, C).

이상의 결과에 의하여 홍삼 polyamine 성분은 체외에서 근육세포를 배양할 때 근육세포의 성장발달을 촉진하는 작용이 있는 것으로 추측되며 생존기간도 연장시키는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 현미경으로 관찰된 홍삼의 polyamine 성분의 효과는 홍삼에 존재하는 putrescine 이외의 3종류의 polyamine 중 어느 단일 성분의 특이한 효과인지, 몇 가지 종류의 polyamine의 혼합효과인지는 계속 연구되어야 할 과제이며, polyamine 성분의 추출시 저분자 peptide나 아미노산이 혼재되어 나타난 결과일 가능성도 배제할 수는 없다. 본 실험에서는 추출하여 얻은 polyamine계 물질의 양이 너무 적어 단일 성분에 대한 연구를 하지 못하였다. 그러므로 이러한 여러가지 물질의 화학구조와 그에 따른 생화학적 특이성, 생체에서의 작용기전등을 밝히려는 연구가 계속 수행 중에 있다.

## 결 론

한국산 홍삼은 TLC 상에서 0.19, 0.28, 0.35, 및 0.45의  $R_f$ 값을 갖는 4종류의 polyamine계 물질을 함유하였으며, 이 중  $R_f$ 치가 0.28인 물질

은 양적으로 주 polyamine계 물질인 putrescine 이었다. 체외에서 배양하는 계배의 근육세포에 홍삼 중의 총 polyamine계 성분을  $10^{-6}M$ 과  $10^{-3}M$ 의 농도로 배양액에 첨가시키면 각각 계배 근육세포에 대해 성장 및 발달 촉진 효과가 있었으며, 생존기간도 연장시키는 것을 현미경하에서 관찰할 수 있었다. 이와 같은 polyamine계 성분의 근육세포 성장촉진 효과는 표준배양액에서는 물론, 표준배양액에서 성장에 필수 성분인 계배 추출물을 제거한 배양액에서도 관찰할 수 있었다.

그러나 putrescine의 경우에는  $10^{-6}M$ 을 배양액에 첨가했을 경우에 홍삼 polyamine계 성분의 효과보다는 미약하지만 근육세포의 성장촉진효과를 관찰할 수 있었으나  $10^{-3}M$ 에서는 오히려 성장을 억제하는 것을 관찰할 수 있었다.

문 헌

- 1) Kim, N.D.: "Pharmacological properties of Ginseng," in Korean Ginseng, ed. by Bae, H.W., 115 (1978).
- 2) Park, C.W.: "Studies on the efficacy of Ginseng in the pharmacological aspect," *Biochem. News (Korean)* **4**, 37 (1984).
- 3) Joo, C.N.: "Studies on Ginseng in the biochemical aspect," *Biochem. News (Korean)* **4**, 5 (1984).
- 4) Han, B.H.: "Studies on the constituent of Ginseng," *Biochem. News (Korean)* **4**, 57 (1984).
- 5) Morris, D.R. and Marton, L.G.: "Polyamines in Biology and Medicine," Marcel Dekker, New York (1981).
- 6) Bachrach, U.: "Function of Naturally occurring polyamines," Academic Press. New York (1973).
- 7) Morris, D.R. and Lockshon, D.: "Advances in Polyamine Research," ed. by C.M. Caldara, Raven Press, New York **3**, 299 (1981).
- 8) Gaugas, J.M.: "Polyamines in Biomedical Research," Wiley, Chichester, Sussex, England (1980).
- 9) Tabor, H. and Tabor, C.W.: "Methods in Enzymology-Polyamines," Academic Press, New York **94**, 140 (1983).
- 10) Tabor, C.W. and Tabor, H.: *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 740 (1984).
- 11) McMahon, M.E. and Erdman, V.A.: *Biochemistry* **21**, 5280 (1982).
- 12) Levy, C.C. Hieter P.A. and Legendre, S.M.: *J. Biol. Chem.* **249**, 6762 (1974).
- 13) Schmukler, M. and Jewett, P.B.: *J. Biol. Chem.* **250**, 2206 (1975).
- 14) Thang, M.N. Dondon L. and Mohier, E.: *FEBS Letter* **61**, 85 (1976).
- 15) Hong, K. Schuber F. and Papahadjopoulos, D.: *Biochem. Biophys. Acta* **732**, 469 (1983).
- 16) Hong, K. Diizgiines N. and Papahadjopoulos, D.: *J. Biol. Chem.* **256**, 3641 (1981).
- 17) Irreverre, F. Tabor H. and Tabor, C.W.: *Ann. Biochem.* **55**, 457 (1973).
- 18) Victor, R. and Ramesh, C.: *Anal. Biochem.* **91**, 264 (1978).
- 19) White, P.R.: "The cultivation of animal and plant cells," The Ronald Press Company, New York, 66 (1963).
- 20) Oh, T.H. and Johnson, D.D.: *Exp. Neurol.* **37**, 360 (1972).
- 21) Richler, C. and Yaffe, D.: *Dev. Biol.* **23**, 1 (1970).