

고려인삼의 산성다당체 성분이 암독소 호르몬-L의 지방질 분해작용에 미치는 영향

이성동 · 오구다 히로미찌*

고려대학교 보건전문대학 식품영양과

*일본 에히메대학 의학부 제2생화학교실

Effect of Acidic Polysaccharide of Korean Red Sinseng on Lipolytic Action of Toxohormone-L from Cancerous Ascites Fluid

Sung Dong Lee and Hiromichi Okuda*

Dept. of Food and Nutrition, Junior College of Allied Health Sciences, Korea University, Seoul 136-703, Korea

*2nd Dept. of Medical Biochemistry, School of Medicine, Ehime University, Ehime 791-02, Japan

Abstract □ Toxohormone-L is a lipolytic factor, found in ascites fluid of sarcoma 180-bearing mice and of patients with hepatoma. A substance that inhibited the lipolytic action of Toxohormone-L was isolated from Korean red ginseng powder. This substance had a pectin-like α -1,4-polygalacturonan backbone with some acetoxy groups, and so was an acidic polysaccharide. Acidic polysaccharide was found to inhibit significantly toxohormone-L-induced lipolysis at its concentration of 10 μ g/ml.

Keywords □ *Panax ginseng* C.A. Meyer, toxohormone-L, acidic polysaccharide.

서 론

고려인삼은 동양에서 일찍부터 만병을 예방 및 치료하여 건강을 유지·증진시키는 효험이 크다고 인정되어 영약으로 각광을 받아왔으며, 현재에도 한방, 민간약, 식품재료 등 광범위한 용도로서 이용되고 있다.

한편, 여러 가지 형태의 종양을 가진 환자에 있어서 체중감소가 진행되는 동안에 체내 축적된 지방질의 감소현상을 관찰할 수 있는데, 이는 신생물의 증식에 따라 체지방의 감소가 초래되고 혈장에서는 유리지방산의 농도가 상대적으로 점차 증가하게 된다.

저자는 복수 육종세포인 sarcoma 180의 흰생쥐, 간암 및 난소종양환자 그리고 악성 임파종을 가진 환자의 흰마우스로부터 복수증액을 발전하였고, 시험관내에 쥐의 지방조직 박판으로부터 지방산을 유리시켜 보았다.¹⁾ 그리하여 sarcoma 180에 걸린

생쥐와 간암환자의 복수증액으로부터 지방질 분해인자를 정제하여 독소 호르몬-L이라고 명명했다. 그런데 독소 호르몬-L을 쥐의 뇌실에 주사하면 사료와 물의 섭취량이 유의적으로 감소하게 된다. 따라서 독소호르몬-L은 지방분해와 식욕억제의 두 가지 작용이 있어서 암환자의 체지방을 감소시키는 원인이 된다고 믿는다.

본 연구는 sarcoma 180의 흰생쥐 복수증액 중 독소호르몬-L이 유도하는 지방분해 작용을 저해하는 산성다당체를 홍삼에서 분리하였기에 산성다당체에 관련한 실험결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험동물은 동물실에서 표준실험식이와 물을 자유로이 급식시키면서 키운 웅성 흰쥐로 체중 160-200g 정도의 것을 이용하였다. 지방조직의 절취를

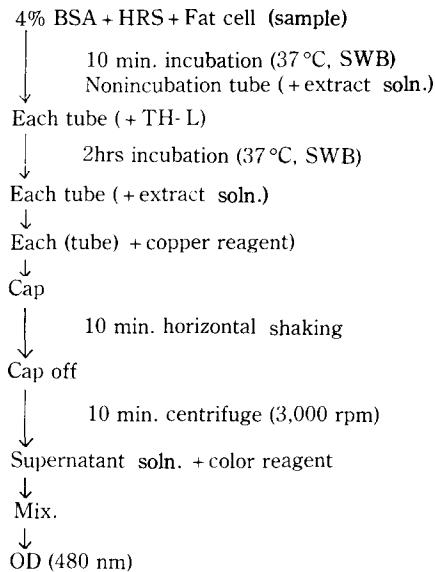


Fig. 1. Experimental procedure of toxohormone-L induced lipolysis.

위해 뇌에 물리적 충격을 주어 도살시킨 후 곧 고환과 신장 주위의 지방조직을 절단해 냈으며, 생쥐는 위와 같은 조건에서 사용한 용성 DDK 중으로서 체중 17-20g 정도의 것을 이용하였다.

홍삼은 고려삼 제품 일본 총대리점인 일한고려인삼주식회사에서 분양받았고, 일부는 한국인삼연초연구소로부터 의뢰받았다.

독소호르몬-L fraction의 제조는 용성 DDK 생쥐에 sarcoma 180 혼탁액(4.5×10^9 cell/두) 0.5 ml를 복강내에 주사하고 10-14 일 후 복수증액을 채취하여 4°C에서 10분간 원침(1,000×g)하여 얻어지는 상청액으로 하였다.

한편, 지방분해 억제능의 측정은, 먼저 지방세포의 분리를 위해 Rodbell²⁾의 방법에 의해 흰쥐의 epididymal adipose tissue와 retroperitoneal adipose tissue로부터 조제하였다. 이후 지방세포(50 μl packed volume)는 4% bovine serum albumin에 25 mM HEPES(N-2-hydroxy ethyl piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid) 등이 함유된 Hanks buffer(pH 7.4) 175 μl, 시료 25 μl 및 독소호르몬-L 50 μl 등 도합 0.30 ml를 37°C에서 2시간 incubation 시킨다. 다음 유리지방산으로 해제된 것을 Zapf³⁾ 등의 방법에 의해 2% (v/v) methanol이 함유된 chloroform과 heptane이 동

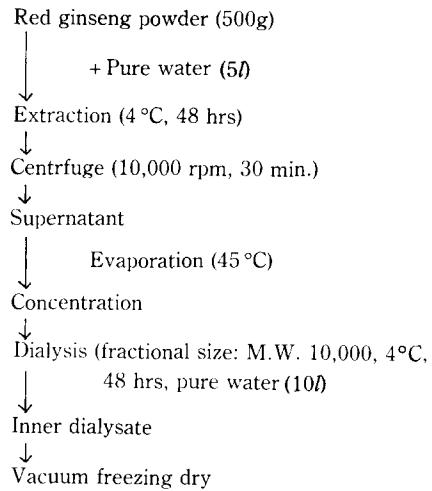


Fig. 2. Flow diagram of fractionation (M.W. 10,000 up) of red ginseng powder.

량을 합니] extract soln. 3ml로 추출하고 copper reagent와 bathocuproine이 함유된 color reagent로 반응시켜 유리된 지방산의 농도를 측정하였다(Fig.1 참조).

끝으로 탄수화물의 정량은 phenol-sulfuric acid 법⁴⁾에 의하여 측정하였다.

결과 및 고찰

홍삼분말은 Fig.2와 같이 순수 10배량으로 48시간 동안 추출하여 원침하였고, 상청액을 농축한 후 48시간 동안 순수에 투석시켜 10,000 dalton 이하의 분자를 투석막을 이용해 제거시켰다. 여기서 얻어진 투석내액을 농축시킨 다음 냉동건조시켜 분밀화하였다.

다음 Fig.3에 나타낸 과정과 같이 냉동건조된 분말을 실온과 55°C에서 각각 methanol로 24시간 처리하여 ginsenoside 성분을 제거하였다. 여기서 생긴 residue는 다시 실온과 55°C에서 각각 순수로 추출하여 추출액을 한데 모아서 1/2 용량으로 농축을 하였다. 이 농축액에 ethanol을 4배 가량 가하여 혼합하고 계속 교반시켜 ethanol에 의한 침전 형성을 조장시킨다. 이 침전 fraction(즉 ginsenoside-free ethanol 침전물임)을 순수에 투석시키고 여기서 얻어지는 투석내액을 또 동결건조시켜 ethanol 침전분말을 얻어냈다. 다음 DEAE-

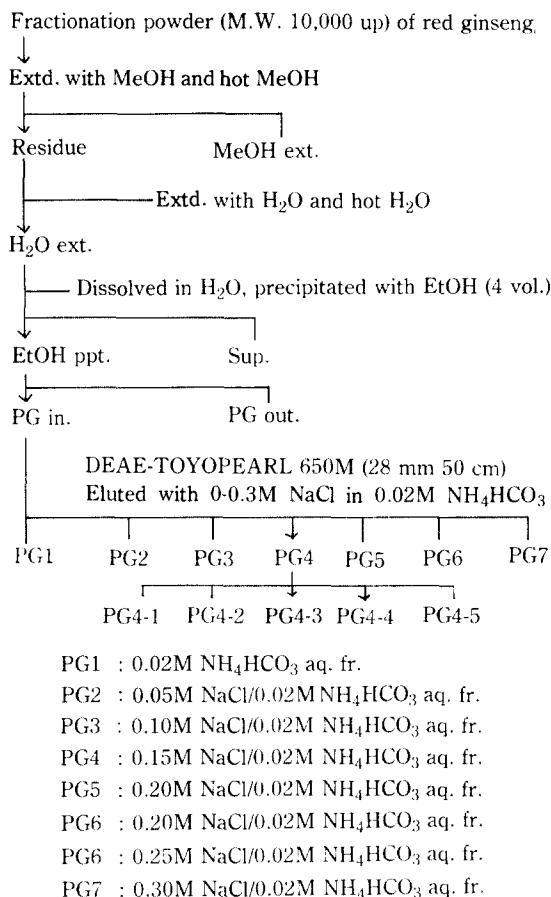


Fig. 3. Schematic flow diagram describing the major step of acidic polysaccharide isolation.

TOYOPEARL 650 M column (28 mm × 50 cm) 을 0.02 M NH₄HCO₃ 용액으로 평형화시킨 후 위의 ethanol 침전분말액을 apply 시켰고, elution은

Table 1. Percent inhibitory effects of purify step materials from red ginseng on lipolysis induced by toxohormone-L.

Final. conc. (mg/ml)	RGIDSP* → MERP** → WEP*** → EPP****	14.3	26.2	29.9	42.4
0.1					

*Red ginseng inner dialysate solution powder.

**Methanol extract residue powder

***Water extract powder

****Ethanol precipitate powder.

0.02 M NH₄HCO₃ 용액내에 각각 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 및 0.30 M 농도의 NaCl이 함유된 용액으로 step by step 으로 수행하였다. 그리하여 각기 얻어진 fraction의 명칭을 PG1, PG2, PG3, PG4, PG5, PG6 및 PG7이라고 하였다. 이를 각 fraction 중 독소호르몬-L에 의한 지방분해 억제효과가 PG4 성분이 가장 강하게 나타났다. 따라서 PG4 fraction을 더 정제할 목적으로 0.02 M NH₄HCO₃ DEAE-TOYOPEARL 650 M column(14 mm × 20 cm)에 gradient elution을 시켜 각 PG4-1, PG4-2, PG4-3, PG4-4 및 PG4-5의 fraction을 얻었다.

한편 Fig.2 및 3과 같이 정제해가는 과정에서 얻은 흥침투석내액분(RGIDSP), methanol로 추출한 후 남은 residue 분(MERP), 다시 물로 용해하여 얻은 extract 분(WEP), 또 ethanol로 침전시켜 얻은 침전분(EPP)들에 대하여 독소호르몬-L 유도 지방분해 저해효과를 실험한 바, Table 1과 같이 각 시료의 최종농도가 0.1 mg/ml 일 때 각기 14.3, 26.2, 29.91 및 42.4%로 정제해 갈수록 저해율

Table 2. Inhibitory effect of PG fractions on lipolysis induced by Toxohormone-L. The rate of Toxohormone-L-induced lipolysis was 2.39 free fatty acid μEq/g cells/2h in the absence of PG fractions.

Concentration (μg/ml)	PG1	PG2	PG3	Fraction			
				PG4	PG5	PG6	PG7
Percent Inhibition							
10	12.2	-1.1	-2.5	-1.7	-1.5	-4.9	-6.6
50	35.8	3.3	9.0	22.0	4.2	13.6	18.4
100	44.4	10.9	24.5	42.7	27.1	25.1	25.0
200	47.3	11.6	25.9	53.2	32.0	28.1	25.9
500	62.3	12.5	35.1	72.2	52.9	42.0	27.4
1000	80.0	19.9	45.0	87.9	77.9	61.6	31.6

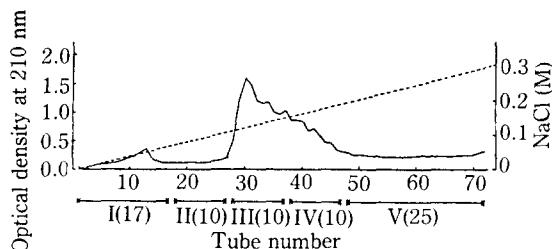


Fig. 4. DEAE-TOYOPEARL column chromatography of PG4 fraction from red ginseng. Gradient elution was carried out with 0 to 0.3 M NaCl in 0.02M NH₄HCO₃. Fractions of 15 ml of effluent were collected.

Table 3. Inhibitory effect of various fractions obtained by gradient elution on lipolysis induced by Toxohormone-L. The rate of Toxohormone-L-induced lipolysis was 2.46 free fatty acid uEq/g cells/2h in the absence of the fractions.

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Fraction				
	PG4-1	PG4-2	PG4-3	PG4-4	PG4-5
Percent Inhibition					
10	13.1	20.3	11.3	26.7	-1.5
50	14.8	31.6	66.7	44.8	7.6
100	40.2	47.6	80.2	65.1	19.6
200	40.6	48.4	82.5	70.5	20.0
500	76.6	52.2	97.7	88.4	76.1
1000	79.1	59.9	98.9	91.3	—

이 높아졌다. 그리하여 다시 더 정제해서 얻은 각 PG1부터 PG7까지의 fraction에 대한 독소호르몬-L 유도지방분해 저해효과는 최종농도가 10, 50, 100, 200, 500 및 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 Table 2에 나타낸 결과와 같다. 여기서 PG1은 unabsorbed fraction이고, 그 외 각 fraction 중에서는 PG4가 가장 저해효과가 높았다. 다음 PG4의 성분을 더욱 정제하기 위해 Fig.4와 같이 gradient elution을 시켜서 얻어진 각 fraction tube의 OD를 210 nm에서 측정하여 나타난 peak를 중심으로 5가지 fraction으로 또 나누었다. 여기서 얻은 5가지 fraction에 대한 독소호르몬-L 유도지방분해 저해효과는 Table 3에 나타낸 바와 같이 PG4-3과 PG4-4 fraction이 높았다.

PG4-3 및 PG4-4의 fraction을 더욱 정제하기

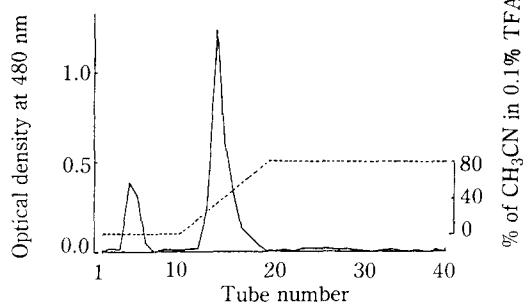


Fig. 5. 1st reverse and phase HPLC of PG4-3 and PG4-4 fractions. The effluent was collected in fractions of 1 mL. —: Carbohydrate determined with phenol-sulfuric acid. ----: Percent of CH₃CN in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA).

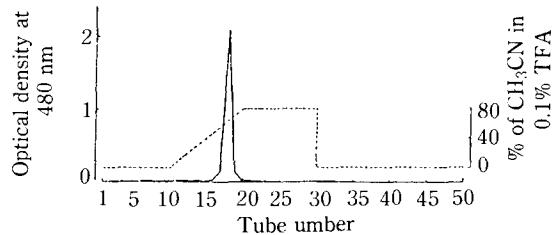


Fig. 6. 2nd reverse phase HPLC of PG4-3 and PG4-4 fractions. The explanation is as for Fig. 5.

위해 두 fraction을 혼합하여 TSK gel ODS-120T column (4.6×250 mm) 1차 역상 HPLC에 걸었다. Fig.5와 같이 0.1% trifluoroacetic acid 함유 acetonitrile로 elution 시켰고, 유속은 0.5 mL/min이었다. 이 때 얻어진 각 fraction 중 당정량을 위해 phenol-sulfuric acid 방법에 따라 480 nm에서 OD를 측정한 결과 2개의 peak를 얻었다.

이 중 큰 peak 부분을 다시 동일조건의 제 2차 역상 HPLC에 걸어본 바 Fig.6과 같은 단일 peak를 얻어냈다. 이 peak 부분을 동결건조시켜 분말화 하였으며 이 분말의 최종농도를 50, 100, 200 및 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 하여 독소호르몬-L 유도 지방분해 저해효과를 관찰한 바 Fig.7과 같이 나타났다.

따라서 이 peak 부분의 물질을 동정하기 위해 다음과 같이 gel permeation HPLC에 걸었다. Pump는 TOSO CCPM, RI detector는 TOSO RI-8,000, UV detector는 203 nm의 TOSO UV-8,000, column은 TSK gel G-3,000 pw (7.5 mm i.d.×30 cm)와 TSK gel G-5,000 pw (7.5 mm

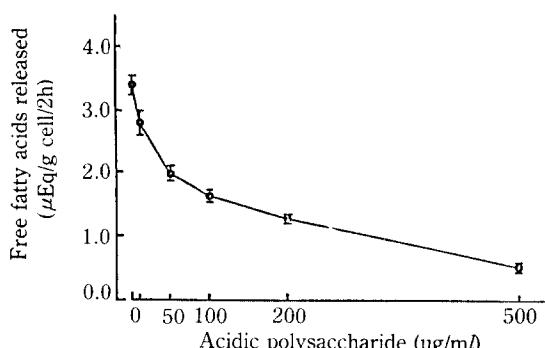


Fig. 7. Inhibitory effect of the acidic polysaccharide purified from red ginseng on Toxohormone-L-induced lipolysis.

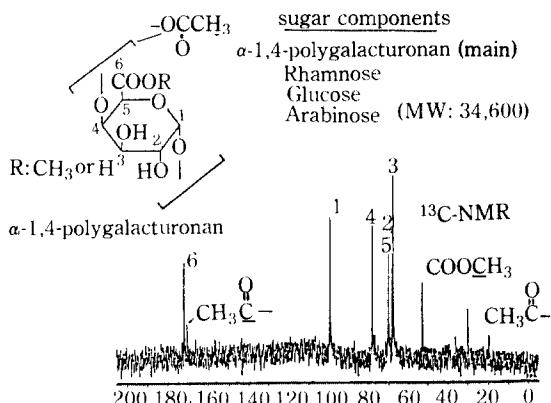


Fig. 8. Chemical structure of acidic polysaccharide from red ginseng.

i.d.×30 cm)의 joint column, column 온도는 80°C, mobile phase는 0.5 M NaCl, 유속은 0.7 ml/min로 하였다. 정제된 물질의 ¹³C-NMR spectrum에 의한 결과는 Fig.8에 나타난 바와 같이 4-linked α -galacturonide의 methyl ester 된 signals로 나타났다. 이 결과들로부터 정제된 물질은 pectin-like α -1,4-polygalacturonan 골격을 갖는 물질로 사료되는 바이다.

분자량은 dextoran(Shodex standard p-82)을 표준으로하여 TSK gel G 3,000 pw-G 6,000 pw column에 의한 gel 여과 고속액체 chromatography(GPC)로 분자량을 결정한 바 3.46×10^4 이었고, 구성당의 정성을 위해 galacturonic acid, rhamnose, glucose arabinose, galactose 등을 산가수분해하여 gas chromatography로써 동정하였고, 각

Table 4. Purified yield of acidic polysaccharide in red ginseng.

Red ginseng powder 500g						
↓						
Inner dialysate powder 69.2g						
↓						
Water ext. powder 44.5g						
↓						
Ethanol ppt. 41.9g						
↓						
PG1 PG2 PG3 PG4 PG5 PG6 PG7						
32.3g 776.9mg 310.5mg 196.8mg 94.3mg 24.8mg 24.6mg						
↓						
PG4-1 PG4-2 PG4-3 PG4-4 PG4-5						
2.1mg 6.0mg 95.1mg 58.7mg 4.4mg						

당의 비율정량은 galacturonic acid를 환원시킨 다음 분석하였다. Methylester 기 정량은 alkali 가 수분해 후 methanol을 gas chromatography로 써 한 바 methoxyl 함량이 3.2%로 나타났다.

다음 Table 4에는 홍삼으로부터 산성다당체를 분리해 가는 과정에 따른 수율을 나타낸 바, 홍삼 500g으로부터 얻을 수 있는 PG₄ fraction은 196.8 mg이고 다시 PG4-3과 PG4-4 fraction의 수율을 합하여 153.8 mg으로 홍삼 100g 당으로 환산하면 30 mg에 불과하였다.

독소호르몬-L 유도지방분해 저해효과에 있어서 산성다당체(AP)의 최소유효농도는 Fig.7에 나타난 바와 같이 10 μ g/ml이었고, 100 및 500 μ g/ml 농도에서는 각 50 및 83%의 저해율을 나타냈다. 그런데 부신수질 호르몬인 epinephrine과 뇌하수체 전엽 호르몬인 부신피질자극 호르몬(ACTH)에 의한(500 μ g/ml 일 때) 지방분해 저해작용에는 Fig.9과 같이 acidic polysaccharide(AP)가 별로 영향을 미치지 못하였다. 그러나 모르모트의 대동맥을 이용하여 AP가 혈관 수축작용에 미치는 실험을 시행한 바 Fig.10과 같이 histidine과 함께 AP를 각 10 μ g/ml 농도로 주입시켰을 때는 별 영향이 없었으나, norepinephrine(NE)과 함께 AP를 각 10 μ g/ml 농도로 주입시킨 경우는 혈관 수축억제작용이 현저하게 나타났다.

다음은 AP가 생체내에서 미치는 영향을 관찰하고자 Fig.11과 같이 crude acidic polysaccharide

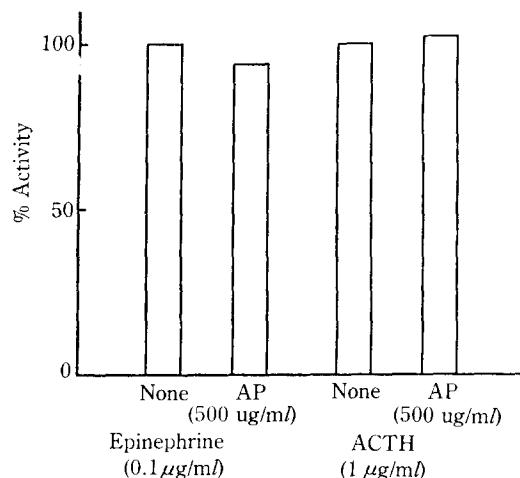


Fig. 9. Effect of acidic polysaccharide from red ginseng on epinephrine- and ACTH-induced lipolysis in fat cells.

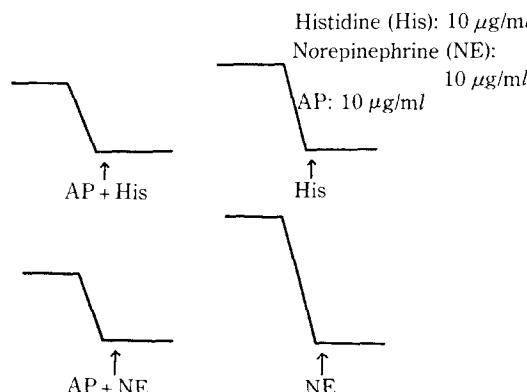


Fig. 10. Effect of acidic polysaccharide from red ginseng on constriction of blood vessel.

를 표준식이에 100 mg/5g of diet/20g fo B.W.로 혼합하여 tumor-bearing mice에 사육시키 본 결과 식이섭취량은 복수증액을 접종한지 1일 후에 AP를 급식한 실험군의 섭식량이 유의하게 높았으나 이후 약 2주 경과하는 동안의 경우는 유의한 차이를 보이지 않았다. Table 5는 위의 섭식량 정도 실험을 끝낸 후 각 생쥐의 복수증액을 가능한한 전액 채취하여 각 군별로 복수증액의 pH와 생암세포수를 측정한 바 pH는 대조군(A)이 7.26 ± 0.03 인데 비하여 B(tumor-bearing+AP)군과 C(tumor-bearing)군은 각 6.8로서 대조군에 비해 낮았다. 그리고 생암세포수는 AP를 혼합하여 급식한 B 군

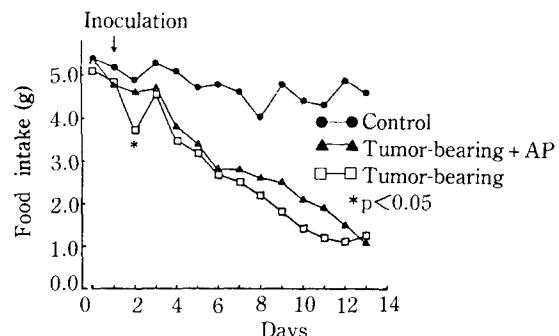


Fig. 11. Effect of crude acidic polysaccharide (AP) from red ginseng on food intake of tumor-bearing mice.

Table 5. Effect of crude acidic polysaccharide on pH and living cancer cell of tumor-bearing group.

Group	pH	Living cancer cell
A (Control)	7.26 ± 0.03	
B (Tumor-bearing + AP)	6.82 ± 0.03	$1.80 \times 10^9 \pm 0.11 \times 10^9$
C (Tumor-bearing)	6.80 ± 0.04	$1.94 \times 10^9 \pm 0.31 \times 10^9$

이 $1.80 \times 10^9 \pm 0.11 \times 10^9$ 인데 비하여 C 군은 $1.94 \times 10^9 \pm 0.31 \times 10^9$ 로 AP를 급식한 군이 적었으나 유의한 차이는 아니었다.

끝으로 소화기관에 악성 tumor를 가진 환자 113명을 대상으로 홍삼분말을 급여시켜 식욕개선 여부를 관찰한 바, Table 6에 나타난 바와 같이 개선된 경우가 68명으로 60.2%를 차지하였다.

한편 저자는 홍삼 중의 다당체 성분이 지방조직에서 독소호르몬-L 유도 지방분해를 억제하리라고 이미 시사한 바 있다.⁵⁾

본 실험에서 저자는 다당체 fraction 중 저해성분을 정제하였고, ^{13}C -NMR spectral analysis에서 약간의 acetoxy group을 갖는 pectin-like α -1, 4-polygalacturonan backbone임을 알았고 이는 산성다당체였다. 이 산성다당체는 독소호르몬-L에 의한 지방조직의 지방분해 유도를 억제하나 epinephrine 또는 ACTH에 의한 지방분해 유도에는 영향을 미치지 못하였다. 우리는 이미 ginsenoside

Table 6. Effect of red ginseng on appetite of patients with malignant tumors in digestive tract.

Appetite	cases (%)
Improved	68 cases (60.2)
Unchanged	38 cases (33.6)
Worse	7 cases (6.2)

Rb₂가 지방조직에 있어서 독소호르몬-L 유도 지방분해를 억제하나 ACTH 유도 지방분해는 억제하지 못함을 밝힌 바 있다.⁶⁾ 홍삼의 대부분 약리학적 효능은 ginsenosides에 의거된다고 사료된다.^{7,8)} Kubo 등은 ginsenosides 존재부위가 인삼근종 주로 표피부분이라고 보고한 바 있다.⁹⁾ 그러므로 ginsenoside 함량은 동체부분보다는 잔뿌리부분에 더 높다할 수 있겠다. 그러나 오래전부터 잔뿌리 인삼보다는 동체부분의 인삼을 더 선호하는 경향이 있어서 이 두 가지 의미에 있어서는 상반된 결과를 초래할 수 있게 되었다.

차제에 본 실험결과로 미루어 볼 때 동체부분이 잔뿌리부분보다 acidic polysaccharide의 함량이 더 많은 것으로 나타나 있어 주목되는 점이라 하겠다.

한편 저자들은 관상의 대상이 되는 인삼의 동체부분과 잔뿌리부분 중의 산성다당체 성분이 암독소호르몬-L의 지방질분해작용에 미치는 영향에 관하여 앞으로 더욱 추구하고자 한다.

요 약

독소호르몬-L은 lipolytic factor로서, sar-

coma 180 bearing mice 및 간암환자의 복수증액에서 발견된다. 독소호르몬-L의 지방질분해작용 억제물질을 홍삼분으로부터 분리하였다. 이 성분물질은 약간의 acetoxy group을 갖는 pectin-like α -1, 4-polygalacturonan을 주체로 하는 acidic polysaccharide이다. 이 물질은 독소호르몬-L 유도지방분해를 10 μ g/ml 농도 이상에서 저해함을 나타냈다.

인용문헌

- Masuno, H., Yoshimura, H., Ogawa, N. and Okuda, H.: Eur. J. Cancer Clin. Oncol., **20**, 1177 (1984).
- Rodbell, M.: J. Biol. Chem., **239**, 375 (1964).
- Zapf, J., Schoenle, E., Waldvogel, M., Sand, M. and Froesch, E.R.: Eur. J. Biochem., **113**, 605 (1981).
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Anal. Chem., **28**, 350 (1956).
- Okuda, H., Masuno, H. and Lee, S.J.: Proc. 4th Internat. Ginseng Symp. p. 145 (1984).
- Okuda, H., Sekiya, K., Masuno, H., Takaku, T. and Kameda, K.: Proc. Korea-Japan Panax Ginseng Symp. p. 1 (1987).
- Yokoyama, T., Kanai, K., Takefuji, M. and Oura, H.: Chem. Pharm. Bull., **24**(12), 3202 (1976).
- Shibata, Y., Nozaki, T., Higashi, T., Sanada, S. and Shoji, J.: Chem. Pharm. Bull., **24**(11), 2818 (1976).
- Kubo, M., Samukawa, K., Tani, T., Katuki, T. and Arichi, S.: Ginseng Review, **2**(1), 33 (1984).