

한국 홍삼사포닌이 배양중인 쥐 조골세포의 염기성 인산분해효소 활성도에 미치는 영향

정진광 · 김정근 · 이재현

단국대학교 치과대학 치주과학교실

I. 서 론

조골세포는 미분화 간엽세포로부터 유래되며 이러한 일차 골형성 세포들은 골표면에 밀접되어 있다. 조골세포에서 골세포로 되는 즉시 석회화된 기질이 주위에 둘러 쌓이게 되며 이를 골세포성 조골세포¹⁾ 혹은, 골양 골세포²⁾라고 한다. 골수가 골형성 세포들의 주근원이라는 것은 의심할 여지가 없으며 골수내에는 두가지 주세포성 요소인 조혈군과 간질군이 있으며 조골세포는 간질군으로부터 유래되어진다^{4,5,6,37)}. 조골세포는 궁극적으로 골수주를 형성하며 골과 연골 두가지를 다 형성한다복 보고된 바 있다⁸⁾.

염기성 인산분해효소 활성도(alkaline phosphatase activity)는 새로운 골형성과 관련된 것으로 여겨져왔다^{9,10)}. 조골세포군내에 염기성 인산분해효소가 존재하는 것이 많은 학자들에 의하여 밝혀져 왔으며^{11,12)} 이 효소의 활성화는 석회화하는 연골과 빠르게 성장하는 골에 있어서의 초기 석회화에 관여하는 기질과립들과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 염기성 인산분해효소는 양전하를 가진 분자에 대한 부착친화성이 있으며 이는 칼슘 수송사이에 중요한 연관이 있는 것으로 보고되었다^{14,15)}. 칼슘수송에 염기성 인산분해효소의 존재가 요구되어 진다면, 골세포 수준에 위치한 ATPase는 칼슘 이온의 존재시 자극을 받는다¹⁶⁾.

그러므로 내피세포 수준에의 칼슘은 유입과 배출은 ATPase에 의하여 조절되어지며 석회화를 위하여 이용되는 칼슘은 조골세포와 관련된 염기성 인산분해효소에 의하여 조절되어진다. 이런 세포들의 명확한 작용은 아직 알려지고 있지 않지만 다음과 같은 석회화에 있어서 ALP의 역할에 대한 몇가지 가설이 이루어져왔는데¹⁷⁾, ALP는 inorganic phosphate의 국소적 농도를 증가시키며, 인산 운반자로서의 역할을하고 Ca^{2+} -binding protein의 기능이 있으며 세포막에서 Ca^{2+} -pump(Ca^{2+} -ATPase)와 세포분열 혹은 분화에서 조절자로서의 역할을 하며 100,000에서 200,000 분자량을 갖는 세포막에 결합된 당단백의 한 종류이다. ALP는 공여물질(일반적으로 R-O- HPO_3^-)로부터 수용물질(R'-OH)까지 인산기를 운반하며^{18,19)} 세포막에 결합된 당단백으로서 인산기¹⁹⁾와의 강한 상호작용에 의해서 세포막에 결합되어 있다. 최근에는 ALP가 chondrocyte-specific phosphoprotein phosphatase 역할을 하는 것이 발견되기도 하였다. 이 효소는 생리학적 혹은 낮은 pH에서 좋은 인산기 결합 단백질이며^{21,22)} de Bernard²³⁾에 의한 최근 연구에 의하면 기질 낭포에서 분리된 ALP는 Ca^{2+} 를 결합할 수 있는 높은 능력을 갖는 당단백질이다^{24,25,26,27)}. 이에 관련된 연구에 의하면 ALP는 Ca^{2+} -ATPase activity 능력을 갖고 있다.

사포닌은 한국 홍삼의 주성분으로 지난 수

년간 많은 학자들에 의해 연구되어져 왔다. 현재까지 알려진 생물학적 효과로는 세포독성 효과^{28,29)}, 종양억제에 대한 활성³⁰⁾, 단백질 합성³¹⁾, 그리고 세포막 수정효과³²⁾ 등이다. 사포닌은 알콜탈수 효소(ADH)뿐만 아니라 알데하이드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase) 및 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)의 활성도를 촉진시키는 물질로 알려진 바 있다. 또한 인삼 사포닌은 과량의 acetaldehyde를 신속히 제거하고 세포내 [NAD⁺][NADH]의 정상치로의 회복을 촉진함으로써 ethanol로 인한 간 손상을 보호하는 것으로도 보고된 바 있다.

본 연구에서는 쥐 조골세포를 배양하여 각 농도별 시간별 사포닌을 투여하여 인산분해효소의 활성도를 측정함으로써 사포닌이 조골세포의 기능에 미치는 영향을 알아보려고 한다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 사포닌이 쥐 조골세포의 세포독성에 미치는 영향

쥐 조골세포를 5% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 항생제가 포함된 Ham's F-12(Gibco)를 사용해서 96-well plate에 배양했다. 조골세포가 plate 전체에서 단일한 세포층을 이룰 때까지 배양한 후, 사포닌 농도 0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml로 각각 처리하였다. 48시간 후에 배양액을 제거한 다음 각 plate에 0.2% trpan blue 50λ를 첨가해서 5분간 염색했다. PBS로 세포를 세척 후에 각 plate에 HBSS(Gibco)를 50λ씩 첨가해서 세포가 탈수되지 않도록 했다. 위상차 현미경하에서 무작위 선택방법으로 염색된 죽은 세포를 계수했다.

2. 사포닌이 쥐 조골세포의 염기성 인산분해효소 활성도에 미치는 영향

쥐 조골세포를 5% fetal bovin serum와 항생제가 포함된 Ham's F-12(Gibco)를 사용해서 96-well plate에 배양했다. 조골세포가 plate 전체에서 단일한 세포층을 이룰 때까지

배양한 후, 사포닌(한국담배인삼공사)을 농도 0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 및 1000 µg/ml로 각각 처리하여 48시간 후에 염기성 인산분해효소 활성도 측정을 시행하였다.

3. 염기성 인산분해효소 활성도(Alkaline Phosphatase Activity) 측정

96-well plate에서 배양액을 제거한 후에 각 plate에 Triton X-100/saline을 20µl씩 넣어서 37°C에서 30분간 배양하여 세포를 용해시켰다. 여기에 완충용액을 0.1N Glycine NaOH 20µl와 기질이 100mM pNPP 20µl를 혼합하여 첨가해서 효소반응을 유도했다. 37°C에서 10분간 배양한 후 0.1N NaOH 200µl를 첨가하여 효소반응을 중지시켰다. 각 plate에서 200µl씩을 ELISA plate로 옮긴 후 blank에는 NaOH와 증류수를 각각 100µl씩 넣어서 파장 405nm에서 흡광도를 측정했다.

4. 쥐 조골세포에서 사포닌의 염기성 인산분해효소 활성도에 대한 시간별 측정

쥐 조골세포를 5% fetal bovine serum과 항생제가 포함된 Ham's F-12배양액을 사용하여 96-well plate에 배양했다. 조골세포가 plate 전체에서 단일한 세포층을 이룰 때까지 배양한 후, 대조군과 사포닌 31.25µg/ml 농도를 각각 처리하였다. 6, 12, 24, 48 시간 후에 각각의 염기성 인산분해효소 활성도를 측정했다.

5. 쥐 조골세포에서 사포닌과 사이클로헥시미드(Cycloheximide)의 염기성 인산분해효소 활성도에 대한 실험

쥐 조골세포를 5% fetal bovine serum (FBS)과 항생제가 포함된 Ham's F-12를 사용해서 96-well plate에 배양했다. 조골세포가 plate 전체에서 단일한 세포층을 이룰 때까지 배양한 후 사포닌(31.25µg/ml)만을 처리한 군과 사이클로헥시미드(2µg/ml)를 같이 처리한 군으로 나누었다. 24, 48 시간후에 각각의 염기성 인산분해효소 활성도를 측정했다.

III. 실험 결과

1. 조골세포에서 사포닌의 세포독성에 대한 실험결과

쥐 조골세포를 배양하여 사포닌의 각 농도 (0~1000 μ g/ml)를 처리하고 0.2% trypan blue로 염색하여 죽은 세포를 계수했다. 사포닌농도 250 μ g/ml에서부터 세포독성이 증가했으며 500, 1000 μ g/ml에서 유의성있게 증가했다. ($P<0.005$)(표1). 반면에 사포닌 농도 625, 125 μ g/ml에서는 오히려 대조군과 비교하여 세포독성이 유의성있게 감소했다. ($P<0.05$) (표1, 그림1)

Table 1. Cytotoxic effect of total saponin in rat osteoblastic cell

Saponin(μ g/ml)	No. of dead cell
0.	91 \pm 11.988
3.9	77.5 \pm 14.517
7.8	83.0 \pm 7.246
15.6	68.0 \pm 9.359
31.25	75.6 \pm 5.125
62.5	66.0 \pm 4.605*
125	61.8 \pm 8.2*
250	122.0 \pm 25.372
500	232.6 \pm 21.082***
1000	258.8 \pm 39.213***

Value are Mean \pm SE

* : $P<0.05$ *** : $P<0.005$

2. 쥐 조골세포에서 사포닌의 염기성 인산 분해효소 활성도에 대한 실험 결과

쥐 조골세포를 배양하여 사포닌의 각 농도 (0~1000 μ g/ml)를 처리하고 염기성 인산분해효소 활성도를 측정했다. 염기성 인산분해효소 활성도는 각 농도에서 대조군에 비해서 증가하다가 사포닌 농도 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 250 μ g/ml에서 유의성있게 증가했다(표2). 반면에 사포닌 농도 500, 1000 μ g/ml에서는 오히려 유의성있게 감소했다. ($P<0.005$)(표2)

Table 2. Effect of total saponin on alkaline phosphatase activity of rat osteoblastic cell

Saponin(μ g/ml)	ALP activity (PNP cleaved μ mole/h)
0.	3.701 \pm 0.171
3.9	3.878 \pm 0.147
7.8	4.240 \pm 0.176*
15.6	6.321 \pm 0.343***
31.25	8.240 \pm 0.945***
62.5	7.452 \pm 1.053***
250	6.267 \pm 0.823**
500	2.330 \pm 0.152***
1000	1.542 \pm 0.078***

Value are Mean \pm SE

* : $P<0.05$ ** : $P<0.01$ *** : $P<0.005$

ALP : Alkaline phosphatase

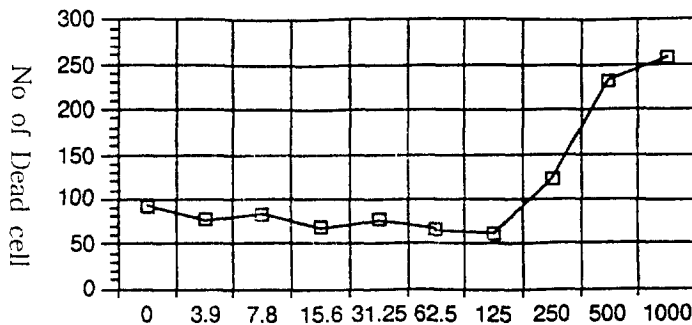


Figure 1. Cytotoxic effect of total saponin in rat osteoblastic cell

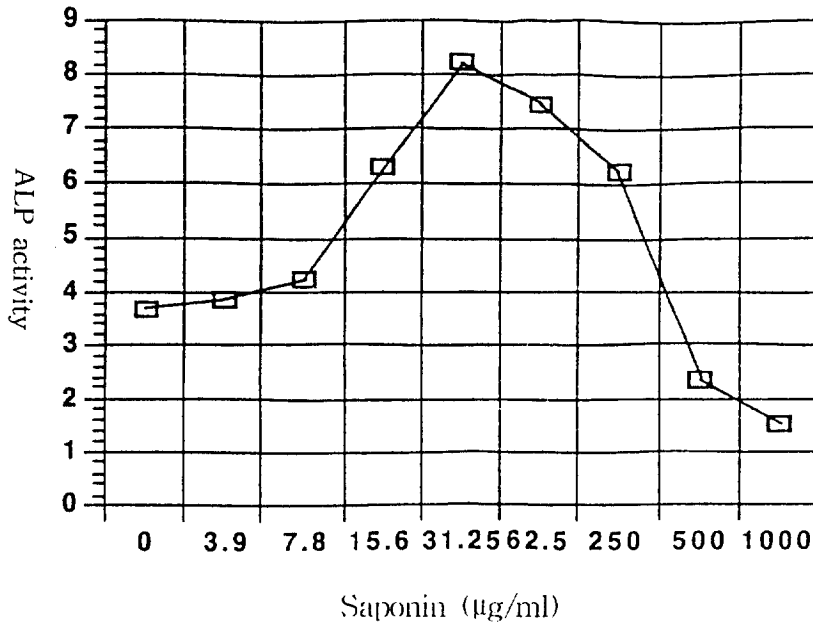


Figure 2. Effect of total saponin on alkaline phosphatase activity of rat osteoblastic cell

3. 쥐 조골세포에서 사포닌의 염기성 인산 분해효소 활성도의 시간별 측정에 대한 결과

쥐 조골세포를 배양하여 사포닌 농도 31.25 µg/ml로 처리한후 시간별로 각각의 염기성 인산분해효소 활성도를 측정하여 대조군과 비교하였다. 사포닌은 대조군에 비해서 염기성 인산분해효소 활성도를 증가시켰으며 특히 12시간 ($P < 0.05$) 48시간 ($p < 0.005$) 후에 유의성을 보였다(표3).

Table. 3. Time course of alkaline phosphatase activity in rat osteoblastic cell

시간	ALP activity (PNP cleaved µ mole/h)	
	Control	Saponin
6	4.240 ± 0.353	4.201 ± 0.235
12	5.934 ± 0.235	6.580 ± 0.215*
24	6.189 ± 0.681	6.703 ± 0.592
48	5.934 ± 0.078	7.657 ± 0.333***

Value are Mean ± SE

* : $P < 0.05$ *** : $P < 0.005$

ALP : alkaline phosphatase

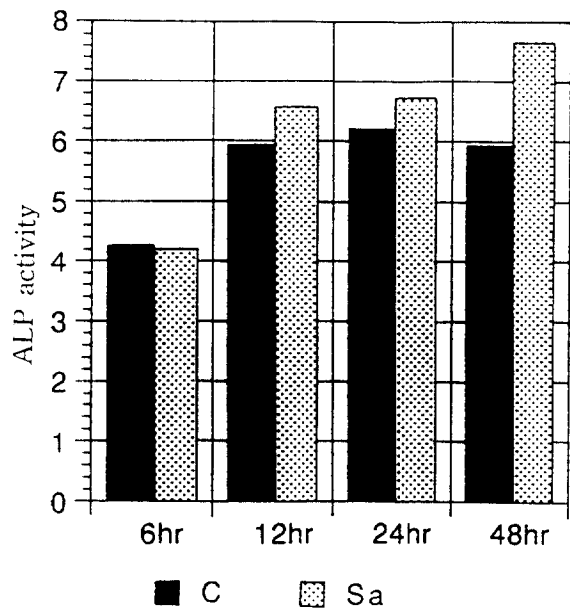


Figure 3. Time course of alkaline phosphatase activity in rat osteoblastic cell

4. 사이클로헥시미드의 염기성 인산분해효소 활성도에 대한 실험 결과

쥐 조골세포를 배양한 후 사포닌만을 처리한 군과 사포닌과 사이클로헥시미드를 같이 처리한 군으로 나누어서 24, 48시간 후에 각각의 염기성 인산분해효소 활성도를 비교했다. 사포닌과 사이클로헥시미드를 복합처리한 군은 사포닌만을 처리한 군에 비해서 염기성 인산분해효소 활성도를 유의성있게 감소시켰다. ($P < 0.05$) (표4)

Table. 4. Effect of cycloheximide on alkaline phosphatase activity in rat osteoblastic cell

시간	ALP activity (PNP cleaved μ mole/h)	
	S.	S.+C.
24	5.136 \pm 0.225	3.052 \pm 0.111***
48	7.736 \pm 0.392	5.072 \pm 0.490***

Value are Mean \pm SE *** : $P < 0.005$

S. : Saponin C. : Cycloheximide

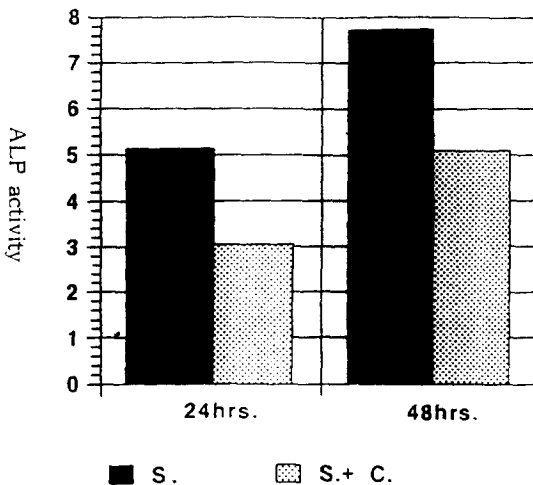


Figure 4. Effect of cycloheximide on alkaline phosphatase activity in rat osteoblastic cell

IV. 총괄 및 고안

염기성 인산분해효소 활성화는 새로운 골형성과 관련이 있는 것으로 예전부터 알려져 왔으며^{9,10} 많은 학자들에 의해서 조골세포내에 다량이 존재한다는 사실이 보고되어졌다^{9,12}. 이 효소의 활성화는 석회화가 진행되는 연골과 급속히 성장하는 골에서 초기의 석회화 과정에서 기질 파괴와 연관된 것으로 알려졌다¹³. 골에서의 염기성 인산분해효소는 많은 기질을 가수분해할 수 있으며 일인산염을 유리시킬 수 있는 것으로 알려졌다. 세포분화에 함유되는 것으로 알려지고 있는 Phosphotyrosine조차도 염기성 인산분해효소에 의하여 탈인산화가 일어나는 것으로 알려지고 있다. 그러므로 이들 효소 활성화의 미세한 구조적 위치는 이들의 정확한 생화학적 기능을 정의하는데는 큰 도움이 되지 못하는 것으로 여겨진다. 골기질의 합성이나 기질 광화에 대한 다른 조건 아래서 세포내에서 염기성 인산분해효소에 대한 논의는 이 효소의 활성화의 중요성을 결정하는데 도움이 될 것으로 여겨진다. 예를 들면 염기성 인산분해효소가 기질형성의 어떤 단계에서 실제로 중요하다면 새로운 기질 합성에 우선하여 조골세포내에서 합성이 이루어져야 할 것으로 사료된다. 효소가 기질 광화의 과정에서 기능적 역할을 갖고 있다면 이같은 논의는 합당하다고 여겨진다. 세포표면에 위치한 염기성 인산분해효소와 중성 인산분해효소는 또한 양전하를 띤 분자에 부착 친화성을 보여주기 때문에 염기성 인산분해효소와 칼슘 운반사이의 관계가 매우 중요한 것으로 여겨진다. 골에서의 칼슘 운반이 염기성 인산분해효소의 존재가 필요하다면 골세포 수준에서 칼슘이동은 없거나 판별하기 어려울 정도의 미세한 양일 것으로 사료되어지고 있다. 다시 말하면 골의 혈관내의 내피세포 수준에 위치한 ATPase는 칼슘 이온의 존재아래서 강하게 자극을 받는 것으로 알려지고 있다¹⁶. 그러므로 혈관내의 칼슘의 유입과 배출에는 내피세포 수준의 ATPase에 의하여 조절되고 반면에 석회화에 이용되는 칼슘은 조골세포와 관련된 염기성 분해효소에 의하여

조절되어지는 것으로 알려지고 있다.

한국산 홍삼은 오갈피 나무과(Araliaceae)의 *Panax ginseng* C.A Meyer로써 한국, 중국 그리고 일본에서 고래로부터 신비한 효과를 가진 뛰어난 약용식물로 인정되어 왔었다. 홍삼에 대한 화학적 연구는 1854년 Garriques가 처음으로 홍삼에서 배당체를 분리해낸 이후로 홍삼의 약리, 생리, 화학적 성분 및 구조 등이 밝혀졌고 근래 이들의 약리효과에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 홍삼은 생체내에서 여러 생리작용에 관여하여 다양한 약리효과를 나타낸다고 수많은 학자들에 의하여 보고되어 왔으나 아직까지도 체계화된 정설을 찾지 못하고 있다. 이는 홍삼의 효과가 비특이적이고, 상당히 많은 용량을 장기적으로 투여하지 않으면 그 효과를 기대하기 힘들고 홍삼의 이러한 점에 착안하여 홍삼의 골 조직의 형성 및 대상에 관한 약효 및 그 작용기전에 대한 연구에 새로운 방법을 모색해 보려는 시도로 세포수준에서 간접적으로 홍삼의 주성분인 사포닌이 조골세포에 어떤 작용을 나타내는지를 규명하기 위해서 본 실험이 시행되었다. 인삼 사포닌에 대한 세포독성 실험으로 과량의 농도(500 μ g/ml, 1000 μ g/ml)에서 염기성 인산분해효소의 활성화가 억제되고 죽은 조골세포의 수가 증가하는 것으로 보아 높은 농도에서 세포독성이 있는 것으로 사료되었다. 쥐 조골세포에 사포닌 농도 0~100 μ g/ml까지 점차적으로 농도를 증가시켜 투여한 결과 사포닌 농도 31.25 μ g/ml에서 염기성 인산분해효소의 활성화가 가장 높게 나타났다. 이는 이 농도에서 쥐 조골세포의 활성화가 가장 높은 것으로 사료되었다. 적절한 농도(31.25 μ g/ml)의 사포닌을 배양 세포에 투여하여 시간별 측정결과 염기성 인산 분해효소의 활성도가 시간이 지남에 따라 증가를 보인 바 이는 시간이 지남에 따라 인삼 사포닌은 조골세포의 활성화에 기여하는 것으로 여겨진다. 특히 DNA에서 m-RNA 과정을 차단하는 cycloheximide가 사포닌으로 부터 유도된 염기성 인산분해효소 활성화를 억제하였다. 이는 사포닌이 염기성 인산분해효소의 활성화가 유전자수준에서 관여되어지는 것으로 추정되어진다.

V. 결 론

이 연구 논문의 목적은 한국 홍삼성분인 Ginseng Saponin의 쥐 조골세포(ROS 17/2.8)의 염기성 인산분해효소의 활성화도에 어떻게 영향을 주는지 규명하기 위함이다.

쥐 조골세포를 96-well plate에 배양한 후 각각의 사포닌 농도(0~1000 μ g/ml)를 처리하고 세포독성과 염기성 인산분해효소 활성도를 측정하였으며, 또한 염기성 인산분해효소 활성화도에 대한 cycloheximide 효과를 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포독성을 알아보기 위해서 사포닌 각 농도를 처리하고 염색한 결과, 500, 1000 μ g/ml의 농도에서 유의성 있게 증가했다($P < 0.005$).
2. 대조군에 비해서 사포닌 농도 62.5, 125 μ g/ml에서는 세포독성이 유의성 있게 감소했다 ($P < 0.05$).
3. 각 사포닌 농도에 따른 염기성 인산분해효소의 활성화도 측정에서는 7.8, 15.6, 21.25, 62.5, 250 μ g/ml의 농도에서 유의성 있게 증가되었으나 대조군에 비해서 사포닌 농도 500, 1000 μ g/ml는 염기성 인산분해효소 활성도를 유의성 있게 감소시켰다($P < 0.01$).
4. 사포닌 농도 31.25 μ g/ml는 염기성 ALP activity를 시간에 따라 증가시켰다.
5. 사포닌과 cycloheximide를 같이 처리하여 대조군에 비해서 염기성 인산분해효소의 활성화도가 유의성 있게 감소했다($P < 0.005$).

이상의 실험결과를 통해서 사포닌은 쥐 조골세포의 염기성 인산분해효소의 활성도를 증가시키며 조골세포의 유전자 단계에서 관여할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. nijweide. P. J., Plas, A. van der, and Scherft. J. P.: Biochemical and histological studies on various bone cell preparations.

- Calcif. Tiss. Int. 33 : 529–540, 1981.
2. Palumbo, C. : A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res.*, 246 : 125–131, 1986.
 3. Owen, M. E. : Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In : *Bone and Mineral Research*(W. A. Peck, ed). Elsevier Science Publisher. Amsterdam : 1–25, 1985.
 4. Owen, M. E. : Histogenesis of bone cells. *Calc. Tissue Res.*, 25 : 205–20, 1978.
 5. Owen, M. E. : The origin of bone cells in the postnatal organisms. *Arthritis & Rheumatism*, 23 : 1073–1080, 1980.
 6. Owen, M. E. : Bone growth at the cellular level : a perspective. In : *Factors and Mechanisms Influencing Bone Growth*(A. D. Dixon and B. G. Sarnat, eds), 19–28. Alan R. Liss Inc., New York., 1982.
 7. Stutzman, J. J., and Petrovic, A. G. : Bone cell histogenesis : the skeletoblast as a stem cell for preosteoblasts and for secondary-type prechondroblasts. In : *Factors and Mechanisms Influencing Bone Growth*(A. D. Dixon and B. G. Sarnat, eds). Alan R. Liss Inc., New York. : 29–45, 1982.
 8. Budenz, R. W., and Bernard, G. W. : Osteogenesis and leukopoiesis within diffusion chamber implants of isolated bone marrow subpopulations. *Amer. J. Anat.*, 159 : 455–474, 1980.
 9. Bourne, G. : The distribution of alkaline phosphatase in various tissues. *Quart. J Exptl. Physiol.*, 32 : 1–20, 1943.
 10. McLean, F. C., and Urist, M. R. : *Bone, an introduction to the physiology of skeletal tissues.* University of Chicago Press, Chicago, Illinois. 226, 1961.
 11. Burstone, M. s. : Hydrolytic enzymes in dentinogenesis and osteogenesis. In : *Calcification in Biological Systems*(R. F. Sognnaes, editor), AAAS, Washington D.C., 217–243, 1960.
 12. Bernard, G. W. : Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in initial intramembraneous osteogenesis. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 135 : 218–225, 1978.
 13. Anderson, H. C. : Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.*, 41 : 59–72, 1969.
 14. Ramp, W. K. : Cellular control of calcium movements in bone. Interrelationships of the bone membrane, parathyroid hormone, and alkaline phosphatase. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 106 : 311–322, 1975.
 15. haiech, J., and Demaille, J. G. : Phosphorylation and the control of calcium fluxes. *Phil. Trans. Royal Soc. Lond., B*, 302 : 91–98, 1983.
 16. Doty, S. B. : Localization of calcium stimulated adenosine triphosphatase activity in blood vessels of the skeleton. *Physiologist*, 28 : 5125–5126, 1985.
 17. Miller, S. C., and Jee, W. S. S. : The bone lining cell : A distinct phenotype ? *Calcif. Tissue Int.*, 41 : 1–5, 1987.
 18. Fernlev H. N. : Mammalian alkaline phosphatases. in Bover PD(ed) : *The enzymes.* vol. 4, New York, Academic Press. : 417–447, 1971.
 19. Fishman W. H. Ghosh N. K. : Isoenzymes of human alkaline phosphatase. *Adv. Clin. Chem.* 10 : 255–370, 1967.
 20. Low M. G. Zilversmit D. B. : Role of phosphatidylinositol in attachment of alkaline phosphatase to membranes. *Biochemistry.* 19 : 3913–3918, 1980.
 21. Doellgast G. J. Fishman W. H. : Purification of human placental alkaline phosphatase : salt effects in affinity chromatography. *Biochem* 141 : 103–112, 1974.
 22. Cyboron G. W. Vejins M. S. Wuthier R.

- E. : Activity of epiphyseal cartilage membrane alkaline phosphatase and the effects of its inhibitors at physiological pH. *J. Biol. Chem* 257 : 4141–4146, 1982.
23. deBernard B : Alkaline phosphatase of matrix vesicles is a Ca^{2+} -binding glycoprotein. in Butler W. Tj. (ed) : *The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues*. Birmingham. Ebsco Media. in press.
 24. Haussler M. R. NagodeL A, Rasmussen H. : Induction of intestinal brush border alkaline phosphatase by vitamin D and identity with Ca-ATPase. *Nature* 228 : 1199–1201, 1970.
 25. Hsu HT Anderson H. G. : A simple and defined method to study calcification by isolated matrix vesicles. Effect of ATP and vesicle phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta* 500 : 162–172, 1977.
 26. Stagni N. Furtan G. Vittur F. et al : Enzymatic properties of the Ca^{2+} -binding glycoprotein isolated from preosseous cartilage. *Calaf. Tis. Int* 29 : 27–32, 1979.
 27. Stagni N. Tavagnacco C. Vittur F. et al : Glycoprotein and phosphatases of calcifying cartilage, in Ascenzi A. Bonucci E, deBernard B. (etd) : *Matrix Vesicles*. Milano, Wichtig Editore. : 149–154, 1981.
 28. Cho, Y. D. Kim, T. U. and Choi, H. G. : A study on the effect of ginseng saponin fraction on cell wall. *Korean J. Ginseng Sci.* 5(1) : 65–72, 1981.
 29. Hwang, W. I., Son, H. S., Ji, R. H. and Baik, N. G. : Effects of panax ginseng and sodium ascorbate(vitamin C) treatment on cancer cell growth *Korean J. Ginseng Sci.* 13(2) : 242–247, 1989.
 30. Kim, K. Y., Lee, H. B. and Joo, C. N. : Biochemical studies on ginseng saponins (XIX). The effect of saponin fraction on the protein biosynthesis of rat reticulocytes. *Korean Biochem. J.* 17(3) : 312–318, 1984.
 31. Hahn. D. R. and Kim, C. J. : Preliminary investigation of membrane modifying effects of ginseng components. *Korean J. Ginseng Sci.* 11(1)1–9, 1987.

THE EFFECT OF KOREAN RED GINSENG SAPONIN ON THE ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY OF RAT OSTEOBLASTIC CELL(ROS17/2.8) IN CULTURE

Jin-Kwang Jung · Jung-Keun Kim · Jae-Hyoun Lee

Dept. of Periodontology, School of Dentistry, Dankook University

Using the Korean red ginseng saponin, which is known to world-wide and thd effects of it have been investigated by many reserachers for years. Ginseng saponin, one of the major components of Korea ginseng root, has many various biologic effects, such as cytotoxic effect, tumorcidal activity, protein biosynthesis and membrane modifying effect.

The purpose of this study was to evaluate effects of ginseng saponin on the alkaline phosphatase activity of ROS cells in culture.

After ROS cells were seeded into a 96-well plate, 96-well plate cultured until confluence was obtained. To evaluate cytotoxic effect of total saponin in cultured ROS cells, the plates were added to each total saponin concentration (0-1mg/ml). After 48hr., cells were counted by stain with 0.2% trypan blue at randomly selected field microscopically. Also, to evaluate alkaline phosphatase(ALP) activity of total saponin in cultured ROS cell, the plate was added to each total saponin concentration (0-1mg/ml) and ALP activity was assayed. To evaluate time-course of ALP activity, 31.25 μ g/ml of saponin added to 96-well plate. After culture of 6, 12, 24 and 48hr., ALP activity test was performed. To evaluate effect of cycloheximide in ALP activity, 96-well plate was added to saponin and cycloheximide. In control group, the plate was added saponin only. The results were as follows.

1. After the various concentration of total saponin was added in the medium, 500 and 1000 μ g/ml of total saponin showed cytotoxic effect of ROS($P < 0.005$).
2. In contrast to control group, 7.6, 15.6, 31.25, 62.5 and 250 μ g/ml of total saponin increased ALP activity significantly.
3. Otherwise, 500 and 1000 μ g/ml of total saponin decreased ALP activity significantly($P < 0.005$).
4. As the time span increases, 31.25 μ g/ml of total saponin increased ALP activity.
5. Cycloheximide decreased saponin-induced ALP activity in ROS($P < 0.005$).

These results suggest that Ginseng total saponin stimulates the ALP activity of rat osteoblastic cells.

Key word : Gingsen saponin, ALP activity, Rat osteoblastic cell