

조직배양산삼 부정근 메탄올 추출물이 식이성 고지혈증에 미치는 영향

이은정 · 조해림 · 이대위 · 정춘식¹ · 김종훈² · 김영식*
서울대학교 천연물과학연구소, ¹덕성여자대학교 약학대학, ²이우양행

Effect of the MeOH Extract of Adventitious Root Culture of *Panax ginseng* on Hyperlipidemic Rat Induced by High Fat-rich Diet

Eun Jeong Lee, Hai Lin Zhao, Da Wei Li, Choon Sik Jeong¹, Jong Hoon Kim², and Yeong Shik Kim*

Natural Product Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460

¹College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714 ²EE WOO YANG HAENG Co. Ltd.

Abstract – We have investigated the effect of MeOH extract of the adventitious root culture of *Panax ginseng* on hyperlipidemic rats induced by fat-rich diet. We also analyzed and compared the content ginsenosides of the cultured ginsengs by HPLC. After oral administration of the MeOH extract to hyperlipidemic rats for four weeks, the variables including body weight, cholesterol, HDL, LDL, and triglyceride levels in serum were measured. One of the cultured ginseng roots (CBN3) decreased cholesterol and LDL-cholesterol and increased HDL-cholesterol levels in serum. HPLC analysis demonstrated that CBN3 contains more Rb₁ and Rd ginsenosides than any other cultured ginsengs and cultivated ginseng. These results suggest that CBN3 with high contents of Rb₁ and Rd may be useful in lowering blood cholesterol.

Key words – Adventitious root culture, *Panax ginseng*, effects on hyperlipidemia, HPLC analysis, saponins

고지혈증은 소장에서의 중성지질의 흡수와 유미지립(chylomicron)의 분비증가, 간장에서의 중성지방의 합성증가, 초저밀도지방단백질(very low density lipoprotein), 저밀도 지방단백질(low density lipoprotein) 합성 및 분비증가, 고밀도 지방단백질(high density lipoprotein)의 합성 감소 및 리파아제(lipase)의 활성감소로 인한 말초조직에서의 중성지방의 제거 감소에 기인하는 것으로써¹⁾ 치료약으로 colestipol, probucol, nicotinic acid등의 혈장 콜레스테롤을 저하하는 약물과 gemfrozil, clofibrate등의 중성지방을 저하시키는 약물이 사용되고 있다.²⁾

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나무과(Araliaceae)에 속하는 다년생 초본으로 한방에서 빈번히 사용되는 한약재중의 하나로 기미가 달면서 쓴맛이 있고, 따뜻한 기운을 가지고 있으며 원기를 보하고 비장을 좋게 하며, 폐를 튼튼하게 하고, 진액을 생겨나게 하여 구갈을 멈추게 하며 심장을 편안하게 해주는 본초학적 효능을 가지고 있다.³⁾ 인삼의 주성분은 triterpenoid계열의 dammarane

골격을 가진 인삼 saponin으로써 현재, 이들을 위주로 효능을 분석하는 연구가 많이 진행되고 있다. 현재 보고된 사포닌의 약리효능으로는 Rb₁은 중추신경계에 억제적, 진정작용이 있는 반면, Rg₁은 중추신경흥분작용을 한다.⁴⁾ Rc는 혈청단백질합성 촉진작용 및 플라스민 활성화 작용이 있으며, Rf는 통각세포에 존재하는 칼슘 채널을 차단함으로써 통증을 억제하고,⁵⁾ Re는 DNA와 RNA 합성을 하며 촉진, Rh₂는 B16/BL6 melanoma cell의 G1단계에서 cell cycle 진행을 차단시켜 항암작용을 나타낸다. 또한 Rg₁은 항원과 반응하는 T-helper cell, T-lymphocytes, NK-cell의 숫자를 증가시킴으로써 면역기능을 강화시킨다.⁴⁾ 이러한 인삼성분은 사포닌 외에도 항산화 활성을 나타내는 phenol계 화합물, 암세포에 세포독성을 나타내는 polyacetylene계 화합물, 미량의 합질소 성분, 정유성분, alkaloid등이 있으며,⁶⁾ 현재, 여러 가지 생물활성이 있는 것으로 보고되고 있는 인삼의 다당체 중에서 중성 다당체는 항암작용, 산성 다당체는 면역증강 작용을 나타내고 있다.⁷⁾ 지질대사에 관련된 연구로 인삼은 ginsenoside가 혈중 콜레스테롤을 저하시키고 콜레스테롤 식이 투여로 인한 저밀도지방단백질 수용체의 합성억제를 완하시켜 혈액으로부터 초저밀도지

*교신저자(E-mail) : kims@plaza.snu.ac.kr
(FAX) : 02-765-4768

단백질과 저밀도 지방단백을 제거함으로써 고지혈증을 개선시킨다고 보고하였다.⁸⁾ 또한, 혈중콜레스테롤 수치가 약간 높은 환자를 대상으로 한 실험에서 식이요법과 약물투여군 보다는 인삼을 병용시킨 군에서 혈중 콜레스테롤 수치가 낮게 나타났다. 인삼 메탄올 및 물 추출물이 혈중의 총콜레스테롤과 저밀도 지방단백질 및 중성지방의 수준을 낮추고 지방질 생합성(lipogenesis)의 억제를 관찰하였으며 이러한 효과가 인삼분말보다 추출물에서 우수한 효과가 나타났음을 보고하였다.⁹⁾

인삼은 다른 약물에 비하여 생육기간이 길고 재배방법 또한 까다로우며 극히 제한된 환경에서 자라는 재배학적 특성상 많은 공급을 할 수 없기에 따라 근부배양(cell culture)을 이용하여 이러한 재배학적 단점을 극복하고 있다. Alkaloid, triterpenoid와 같은 유용한 2차 대사산물을 유도하고자 사용되는 세포배양 elicitor로써 jasmonic acid가 이용되고 있으며, jasmonic acid가 인삼의 모상근 배양(hairy root culture) 동안에 특정한 ginsenoside를 증가시킨다는 보고가 있다.¹⁰⁾ 본 연구는, 기원이 서로 다른 조직 배양 부정근 산삼 3종과 인삼분말을 고지방식으로 유도된 고지혈증 흰쥐를 이용하여 지질대사에 미치는 영향을 비교하였으며, HPLC를 이용하여 각각의 시료에 들어있는 ginsenoside양을 비교분석하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 추출분획 - Jasmonic acid를 첨가하여 식물 세포배양으로 얻은 기원이 다른 CBN1(충청북도 보은) CBN2(강원도 보은) CBN3(경상도 함안)의 배양산삼 분말을 이우양행으로부터 제공받았으며 분말인삼 (K.G.)은 K회사 제품으로서 시중에서 구입하였다. 각 분말을 95% 메탄올로 환류장치를 한 용기에서 8시간 4회 수욕상에서 추출한 후 여과하고, 여액을 감압 농축하였다.

실험시약 및 기기 - HPLC용 water, acetonitrile, metanol (Fisher Scientific)을 사용하였다. cholic acid (Sigma Chem Co), cholesterol (Yakuri Pure Chem Co), ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁ (Indofine, USA), cholesterol, triglyceride, HDL kit(신양화학)를 사용하였으며, 언급되지 않은 다른 시약들은 특급시약을 사용하였다.

HPLC 검액조제 - Pietta 등의 방법을 변용하여 분석하였다.¹¹⁾ 각 시료의 전처리에는 메탄올 추출물을 Sep-pak cartridge (Millipore)에 loading한 후 물, 30% 메탄올, 100% 메탄올 순으로 흘려보내어 100% 메탄올에서 얻어진 ginsenoside를 농축, 분석 직전에 HPLC용 물 1 ml에 시료 2.5 mg을 녹여 원심분리(8000 rpm, 10 min)를 한 후 상층액을 검액

으로 사용하였다.

HPLC 분석조건 - Synergi 4 μ Hydro-RP C18 column (150 \times 4.6 mm, Phenomenox)을 사용하였고 HPLC는 Amersham Pharmacia Biotech사의 AKTA Purifier를 이용하였다. 이동상은 acetonitrile과 water를 이용하여 초기에 acetonitrile 함량을 18%에서 6분 동안 23%로 상승시키고 다시 42.5분 동안 40%로 올린후 20분 동안 100%로 상승시켰다. 유속은 1 ml/min이며 UV 검출기 203 nm에서 측정하였다.

표준액 조제 및 검량선 작성 - 표준사포닌 7종 (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁) 5 mg을 증류수 1 ml에 녹이고 이것을 stock solution으로 하여 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 mg/ml로 단계적으로 희석하여 검액을 만들어 검량용 표준용액으로 하였다. 각각의 표준용액 50 μ l를 HPLC로 분석하여 chromatogram의 면적을 구하고 이들의 면적과 표준용액의 농도를 변수로 한 검량선을 작성하였다.

실험동물 및 사육조건 - 웅성 흰쥐 (100~120 g)를 서울대학교 천연물과학연구소 실험동물 사육장에서 분양받아 최소 일주일간 실험사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 인공 조명에 의하여 조명시간을 아침 8시부터 저녁 8시까지 12시간으로 조절하였으며 실내온도는 18~23 $^{\circ}$ C로 유지하였다. 급수는 정수된 물을 사용하였으며, 사료와 급수는 제한하지 않았다.

식이성 고지혈증 유도 및 시료투여 - 식이성 고지혈증 유도는 1.5% cholesterol과 0.25% cholic acid를 첨가하여 조제한 식이(Table I)로 10일간 유도하였으며, 고지혈증을 유발시킨 후 평균 270 g의 흰쥐를 선별하여 8마리씩 6그룹으로 나누어 메탄올 추출물을 물에 녹여(100 mg/kg) needle zonde를 이용하여 4주간 하루에 한번씩 경구 투여하였다.

식이성 고지혈증의 측정 - 체중은 4일 간격으로 한번씩

Table I. Composition of basal and hyperlipidemic diet

성분	일반식이(%)	고지방식이(%)
조단백질	20.0	20.0
조지방	3.0	3.0
조섬유	10.0	10.0
조회분	10.0	10.0
칼슘	0.6	0.6
인	0.4	0.4
전분	56.0	29.0
콜레스테롤	-	1.5
Cholic acid	-	0.5
Lard	-	25
합계	100	100

기록하였으며 안와정맥에서 8일 간격으로 채혈하였다. 채혈 시 12시간 동안 금식시키고 눈으로 채혈하여 37°C에서 2시간 응고시킨 후 혈청을 15000 rpm 원심분리 하여 상등액을 사용하였다. 콜레스테롤 측정은 Richmond의 효소법,¹²⁾ Triglyceride 측정은 McGowan등의 효소법,¹³⁾ 고밀도 지질 콜레스테롤 측정은 Noma등의 효소법¹⁴⁾에 의한 시판 Kit를 사용하였으며 UV흡광도 500 nm으로 측정하였다. 저밀도 지질 콜레스테롤은 Friedewald formula¹⁵⁾에 따라 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{LDL-Cholesterol} = \text{Total cholesterol} - [(\text{HDL-Cholesterol}) - (\text{Triglyceride}/5)]$$

통계처리 - 모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 계산하고, 각 군 간의 차이는 Student' t-test를 사용하여 p<0.05 일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

HPLC 분석 - HPLC로 분석하여 얻어진 시료의 chromatogram의 면적과 표준용액의 농도를 변수로 한 검량선에서 Rb₁는 y=5.74x+81.4 r²=0.996, Rb₂는 y=19.81x+53.1 r²=0.991, Rd는 y=11.25x+10.63 r²=0.997, Re는 y=38.31x+77.62 r²=0.9993, Rf는 y=-1.05x+21.21 r²=0.994, Rg₁는 y=41.153x+117.24 r²=0.995, Rc는 1.099x+35.103 r²=0.994 이었다. ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁을 가지고 함량을 비교하였을 때, K.G. 경우 사포닌 7종이 고루 분포되어 있는 반면에 배양삼은 4가지 사포닌(Rb₁, Rc, Rb₂, Rd)에 편중되어 있었다(Fig. 2). 현재, Rf의 존재 유무는 서양삼과 고려인삼을 구별하는데 가장 큰 특징¹⁶⁾이며 배양삼 삼 또한 Rf 함량이 극히 미량이어서 chromatogram상에서는 거의 발견되지 않았다(Fig. 1). 특히 CBN3 경우 다른 실험군보다 Rb₁, Rd의 함량이 두드러지게 많았으며, 다른 배양삼삼과 같이 Rf함량은 적었다. 이는 백¹¹⁾ 등이 인삼의 부정근 유도시 elicitor로써 jasmonic acid를 처리하여 ginsenoside와의 영향을 보고한 바에 의하면 HPLC로 분석시 protopanaxadiol계 ginsenoside인 Rb₁와 Rd가 더 많이 생성된다는 결과와 일치하였다. 인삼사포닌의 구조적인 형태로 볼 때, Rb₁와 Rd는 protopanaxadiol 형태로 Rb₁의 경우 glucose가 C₃ 및 C₂₀에 각각 두 개씩 결합되어 있으며, Rd는 C₃에 glucose 두 개, C₂₀에 glucose 한 개가 결합되어 있다.¹⁷⁾ 따라서 jasmonic acid와 인삼의 protopanaxadiol이 조직내 생합성되는 과정과 밀접한 관계가 있는 것으로 사료되며 이 panaxadiol계 화합물은 *in vivo*실험의 결과처럼 고지혈증에 많은 효과

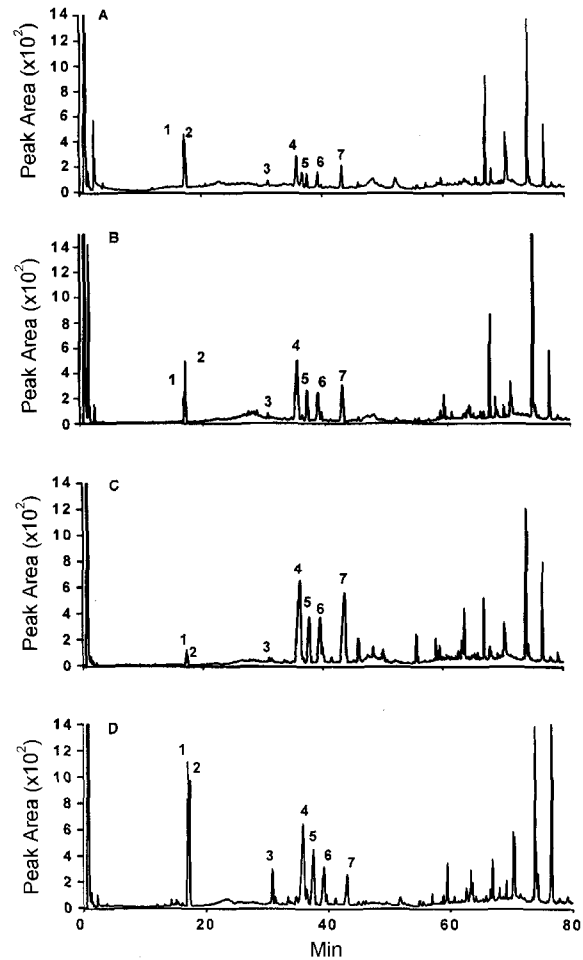


Fig. 1. HPLC analysis of ginsenosides derived from the adventitious root culture of *Panax ginseng*. Analytical conditions are described in Materials and Methods. 1: Rg₁, 2: Re, 3: Rf, 4: Rb₁, 5:Rc, 6:Rb₂, 7:Rd.

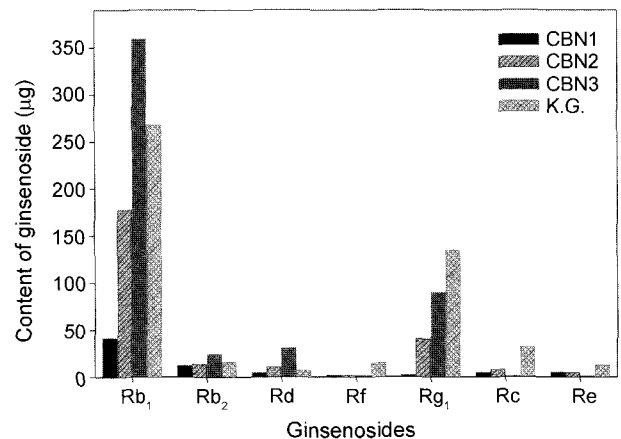


Fig. 2. The comparison of the content of seven ginsenosides in the adventitious root cultured ginseng and dried white ginseng. The y axis represents the amount (µg) in 1 mg of each sample prepared for the HPLC analysis.

를 나타내는 것으로 생각된다.

식이성 고지혈증에 대한 효과 - 본 실험은 1.5% cholesterol 과 0.25% cholic acid, 우지 25%를 첨가한 식이로 고 콜레스테롤혈증을 유발시킨 실험동물을 4주간 경구투여하여 각

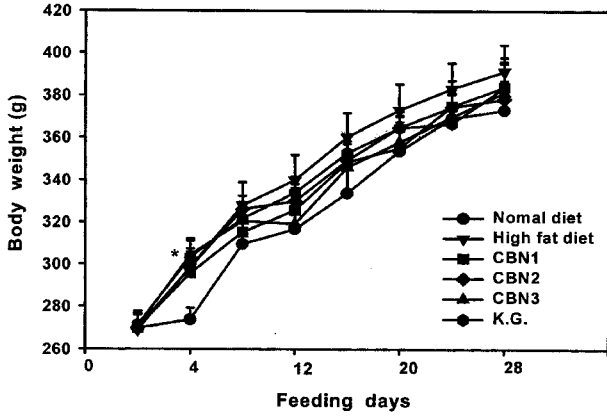


Fig. 3. The change of body weight fed with MeOH extract of the adventitious root culture of *Panax ginseng* on high fat diet induced hyperlipidemic rat. Rats were orally administered daily for 4 weeks after dietary induction of hyperlipidemic state (8 rats/group). Data are expressed as mean \pm S.E. and are significantly different from that of the control at * $p < 0.05$.

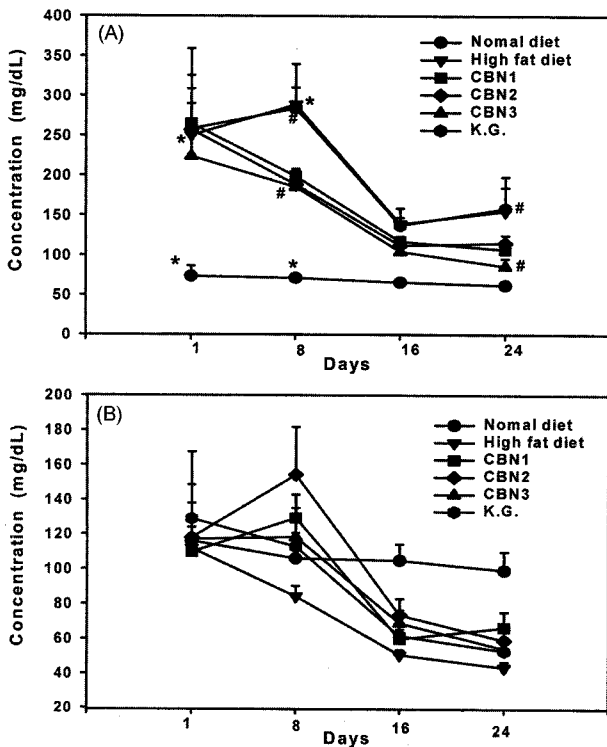


Fig. 4. The effect of the MeOH extract of the adventitious root culture of ginseng on serum total cholesterol (A) and triglycerides (B). Data are expressed as mean \pm S.E. and are significantly different from that of the control at * $p < 0.05$.

군간 비교 실험을 하였다. 먼저, 체중 증가량은 고지방그룹이 정상그룹보다 지속적인 증가를 보였고 각 시료를 투여한 동물군에서는 고지방 그룹보다 체중증가가 둔화되는 경향을 보였다(Fig. 3). 혈중 총 콜레스테롤 경우 정상그룹과 고지방그룹에서 유의성 있는 감소를 보였고 또한, CBN3 그룹과 K.G. 그룹사이에서도 유의성 있는 감소를 나타낸 반면에 triglyceride 측정에서는 시료효과를 확인할 수 없었다(Fig. 4A, 4B). 강¹⁸⁾ 등은 고 콜레스테롤식이 투여한 흰쥐와 콜레스테롤과 함께 ginsenoside를 15일간 병용 투여한 흰쥐에서 지질농도를 측정하여 비교한 결과 ginsenoside의 병용투여로 간 및 혈액에서 콜레스테롤 농도가 25%, 중성지방농도가 20% 감소하였다고 하였다. 이는 약물 투여군이 콜레스테롤 수치를 감소하는 본실험의 결과와 일치하였으나 중성지방을 감소한다는 보고와는 약간의 차이를 보였다. 이것은 고콜레스테롤 유도식이 배합시 동물성지방인 우지의 포화지방산이 간의 LDL 수용체의 합성을 저하시킬뿐 아니라 혈장 내의 남은 저밀도 콜레스테롤 및 혈장지단백을 간

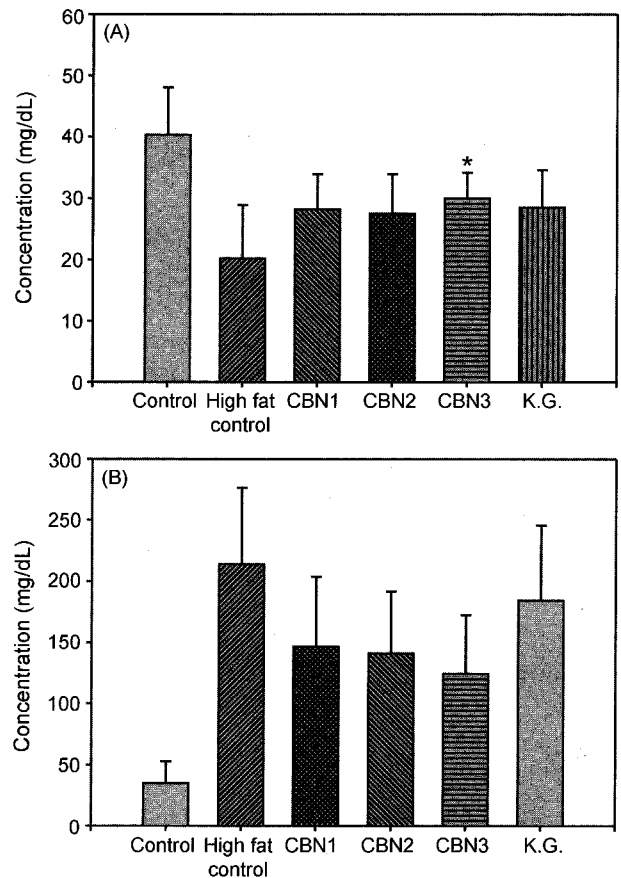


Fig. 5. The effect of the MeOH extract of the adventitious root culture of ginseng on HDL-cholesterol (A) and LDL-cholesterol (B). Data are expressed as mean \pm S.E. and are significantly different from that of the control at * $p < 0.05$.

에서 중성지질로 합성하지 않고 체외로 배설된 것으로 사료된다. 또한, 배양삼 및 재배삼은 고지방식그룹 보다 높은 고밀도 콜레스테롤수치 (Fig. 5A)와 낮은 저밀도 콜레스테롤수치를 보였으며 (Fig. 5B) 그 중에서도 CBN3가 가장 유의성이 있었다. 강과 주 등¹⁹⁾도 고콜레스테롤 식이와 인삼 사포닌을 투여한 토끼의 혈청단백질을 조사한 결과 실험군에서 더높은 고밀도 콜레스테롤수치와 낮은 저밀도 콜레스테롤 수치, 초저밀도 콜레스테롤을 나타냈다고 보고하였다. 또한 현²⁰⁾등은 인삼의 석유 에텔 추출물 및 이 추출물 중 함유성분인 panaxydoin이 고콜레스테롤 식이한 흰쥐와 생쥐의 혈청 및 간 조직중 콜레스테롤 및 지질 성분에 미치는 영향을 조사한 결과 콜레스테롤 흡수를 억제, 고콜레스테롤에 대한 효과를 제시하였다. 따라서, 혈장중 지방단백질의 양상 및 총콜레스테롤의 결과를 통해서 볼때 배양삼과 재배삼의 투여로 고지방식으로 유도된 고지혈증이 다소 개선되고 있음을 보여주고 있으며 그중에서 CBN3가 가장 효과가 있음을 확인하였다.

결 론

본 연구는 기원이 다른 배양산삼 3종과 인삼분말을 MeOH로 추출하여 고 지방식으로 유도된 웅성 흰쥐에 투여하여 각 구간 지질대사에 미치는 영향을 비교하였으며, 인삼의 표준사포닌 7가지 (Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rf, Rg₁)가지고 HPLC 분석을 실시하였다. CBN3는 고지방식으로 유도된 고지혈증 흰쥐에서 가장 낮은 콜레스테롤수치와 LDL-Cholesterol를 나타내었고 높은 HDL-Cholesterol를 나타내었다. HPLC분석에서 CBN3는 다른 배양삼과 재배삼보다 많은 Rb₁과 Rd의 함량을 가지고 있었다. 따라서, 혈중 콜레스테롤을 낮추는 CBN3의 경우 Rb₁과 Rd이 높은 함량이므로 이러한 성분이 보강된 배양삼은 기능적인 역할을 기대할 수 있을 것이다.

인용문헌

- Hayek, T., Masucci-Magoulas, L., Jiang, X., Walsh, A., Rutin, E., Breslow, J. L. and Tall, A. R. (1995) Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transgene. *J. Clin. Invest.*, **96**(4): 2071-2074.
- Joel G. H., Lee E. L., Perry B. M., Raymon W. R. and Alfred G. G. (1995) Good man & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics., McGraw-Hill, 882-894.
- 허준(1989), 동의보감, 민중서원, 서울, 1402.
- Anoja S. Attele, An Wu and Chan-Su Yuan (1999) Ginseng Pharmacology. *Biochem. Pharmacol.*, **58**: 1685-1693.
- Yoon S. R., Nah J. J., Shin Y. H., Nam K. Y., Kim. S. K. and Nah. S. Y., (1997) Ginsenoside Rf induces differential antinociception : from cell to antinociception. *Proceedings of '97 Korea-Japan ginseng symposium.*, 166-180.
- 한대석(1988), 생약학, 동명사, 서울, 221-224.
- Young S. K., Kang K. S. and Kim S. I. (1990) Study on antitumor and immunomodulating activities of polysaccharide fractions from panax ginseng : Comparison of effects of neutral and acidic polysaccharide fraction. *Arch. Pharm. Res.* **13**: 330-337.
- 강방희, 구자현, 주충노(1986) 인삼사포닌 분획이 쥐와 토끼의 간의 저 밀도 지단백질 흡인에 미치는 영향. *Kor. Biochem. J.* **19**: 168-172.
- Qureshi. A. A., N. Abuirmeleh, Z. Z. Din, Y. Ahmad, W. C. Burger and C. E. Elson (1983) Suppression of cholesterogenesis and reduction of LDL cholesterol by dietary ginseng and its fractions in chicken liver. *Atherosclerosis* **48**: 81-94.
- Yu K. W., Gao W., Hahn E. J. and Paek K. Y. (2002) Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of Panax ginseng C.A. Meyer. *Biochem. Eng. J.* **11**: 211-215.
- Piergiorgio Pietta, Pierluigi Marui and Angelo Rava (1986) Improved high-performance liquid chromatographic method for the analysis of ginsenosides in Panax ginseng extracts and products. *J. Chromatogr.* **356**: 212-219.
- Richmond, W. (1976) Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow analysis. *Clin. Chem.* **22**: 1579-1588.
- McGowan, M. W., Artiss, J. D. and Strandbergh, D. R. (1983) A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* **29**: 538-542.
- Noma, A., Nakayama, K.N., Kota, M. and Okabe, H. (1978) Simultaneous determination of serum cholesterol in high and low density lipoprotein with use of heparin, Ca²⁺ and an anion exchange resin. *Clin. Chem.* **24**: 1504-1508.
- Fridewald, W. T., Levy, R. I. and Fedreicson, D. S. (1972) Estimation of concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**: 499-502.
- Yamaguchi H., Kasai R., Matsuura H., Tanaka O. and Fuwa T. (1988) High performance liquid chromatographic analysis of acidic saponin of ginseng and related plant. *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 3468-3473.
- Torben Guldager Petersen and Bent Palmqvist (1990) Utilizing column selectivity in developing a high-performance liquid chromatographic method for ginsenoside assay. *J. Chromatogr.* **504**: 139-149.
- 강방희, 구자현, 주충노(1986) 인삼사포닌 분획이 쥐와 토

- 끼의 간의 저 밀도 지단백질 (LDL-C) 수용체에 미치는 영향. *Kor. Biochem. J.* **19**: 173-178.
19. 윤수희, 주충노(1993) 인삼사포닌의 고 Cholesterol혈증 강 하작용에 관한 연구. *J. Ginseng Res.* **17**: 1-12.
20. Hyun H. C., Park J. K., Nam K. W. and Park K. H. (2001) Hypocholesterolemic effect of panaxydol in high cholesterol diet fed rats and mice. *J. Ginseng Res.* **25**: 162-166.

(2003년 6월 4일 접수)