

인삼 성분이 oxygen radical의 피부 collagen gelation에 대한 작용에 미치는 영향

Effects of ginseng components on the actions of oxygen radicals to gelation of skin collagen.

서울의대 약리학교실

박 찬 응 · 임 정 규 · 이 정 수 · 정 명 희

서 론

oxygen radical 혹은 reactive oxygen species로 불리는 superoxide radical($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical($OH\cdot$) 및 singlet oxygen(1O_2)은 반응성이 매우 높아서 대부분의 생체 세포의 거대 분자에 파괴효과를 나타낸다. 즉 많은 in vitro 실험을 통하여 이들은 단백질(Venkatasubramanian and Joseph, 1977)과 지질(Kellogg and Fridovich, 1977)을 산화시키고, 핵산(Lavelle et al., 1973)을 파괴하고, 다당류(Greenwald and Moy, 1979)를 분해시킴이 관찰되었다.

이들 oxygen radical은 정상세포에서도 소량이지만 oxidative respiration 과정에서 생성될 수 있으나(Boveris and Chance, 1973; Nohl and Jordan, 1980), 특히 병적 상태의 세포대사의 이상으로 생성되며(Klebanoff, 1980; Demopoulos et al., 1980; Weissmann et al., 1980) 그외 radiation(Pryor, 1977; Bodaness and Chan 1977) 및 약물 대사(Trush et al., 1982) 등 여러 과정으로 생성될 수 있다. 따라서 이들의 생체조직의 거대분자에 대한 파괴효과는 여러 병적 상태에서 조직파괴에 중요한 역할을 할 것으로 생각하고 있으며 이 중 염증(Fantone and Ward, 1982; McCord, 1983), 뇌, 심장 및 기타 조직의 ischemia(Demopoulos et al., 1980; Hess and Ward, 1981; Granger and Parks, 1983), 약물중독(Trush et al., 1982)과 hyperoxia(Crapo et al., 1983) 등에서 나타나는 조직파괴와 발암(Pryor, 1977) 및 노쇠현상(Leibovitz and Siegel, 1980) 등에 이들이 중요한 역할을 한다고 시사되고 있다.

병적 상태에 따라서 생체의 여러 조직이 oxygen radical에 의한 유해작용을 받을 수 있지만 특히 피부의 결합조직은 이들에 의한 유해작용의 가능성이 가장 많은 조직이라고 할 수 있다. 즉 세포의 대사결과로 생성되는 oxygen radical 이외에도 항상 radiation에 노출될 기회가 많은 조직이므로 이로 인하여 발생하는 oxygen radical은 이 조직의 노화는 물론 기타 이들에 의한 산화반응으로 야기되는 퇴행성 변화에 중요한 역할을 할 것으로 시사되고 있다. ionizing radiation(Pryor, 1977) 및 sensitizer 존재하에서 UV(Bodaness and Chan, 1977, 1979)에 의하여 oxygen radical이 생성되고 이들에 의한 피부 collagen에 대한 파괴효과(Greenwald and Moy, 1979; Venkatasubramanian and Joseph, 1977)는 이같은 가능성을 뒷받침하는 실험적 증거라고 생각된다.

지금까지 인삼성분의 효능은 여러 각도에서 연구되어 그 약리효과가 점차 밝혀지고 있는데 최근 연구에 의하면 항산화작용이 있다는 흥미있는 결과가 보고되었다. 즉 Han 등(1978)은 홍삼의 메타놀 extract가 급성 알콜 중독에 의해서 생기는 간세포막의 과산화 지질을 제거한다고 보고하였고 Kim 등(1980)은 메타놀 extract에서 얻은 성분이 α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 quenching 효과가 있음을 관찰하였고 Han 등(1978)은 메타놀 extract에서 maltol을 분리하여 이것의 간조직에서의 과산화 억제현상 및 DPPH radical에 대한 quenching 효과를 관찰하였다. 그러나 항산화작용의 검정에 있어서 생체의 free radical 반응에서는 예상되지 않은 radical에 대한 quenching 효과에 그 근거를 두고 있다. 따라서 실제로 조직에서 생성되며 여러가지 병적 상태에서 조직파괴에 직접 관여하는 oxygen radical에 대한 작용을 관찰함에 인삼의 항산화제로서의 약리효과에 대한 기전을 뒷받침할

† 접수일자 : 1983. 12. 21.

본 연구는 1983년도 한국인삼연구초연구 및 서울대학교병원 임상연구 보조로 이루어진 것임.

수 있는 실험적 근거가 될 수 있다고 생각된다.

본 연구에서는 oxygen radical에 의한 유해작용의 위험도가 높은 피부결체 조직의 주요성분인 collagen에 xanthine oxidase에 의하여 생성된 oxygen radical의 파괴 작용을 collagen gelation을 통하여 관찰하였고 이에 인삼성분이 미치는 효과와 그 작용기전을 알아보기 위하여 각 oxygen radical에 대한 quenching 혹은 inactivating 효과를 관찰하여 free radical 반응에 있어서 항산화작용의 기전을 구체적으로 밝힘으로써 피부조직의 노화 및 기타 퇴행성 변화에 대한 인삼의 약리작용의 근거를 마련코저 본 연구를 수행하였다.

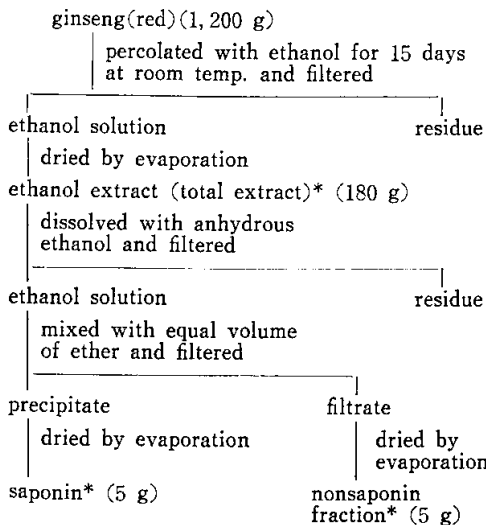
재료 및 방법

1. 재 료

가. Superoxide dismutase, ferricytochrome c, NADPH, hematorphyrin 및 catalase는 Sigma Chemical Co.에서 H₂O₂는 Shinyo Pure Chemical Co.에서 구하였다.

나. 인삼성분 추출

실험에 사용된 인삼성분 즉 total extract, saponin 및 nonsaponin fraction을 Yoo(1971)의 방법에 의하여 추출하였고 그 과정을 요약하면 아래 표와 같다.



Fractions marked with * were used in the experiments

다. 피부 collagen의 추출

체중 100 g 내외의 흰쥐(수컷)에서 피부를 분리한 다음 Oegema 등(1975)의 방법에 의하여 추출하였다. 간단히 그 방법을 기술하면 1회 추출 실험에 50마리에서 얻은 피부조직을 털과 피하지방을 제거한 다음 mincer로 잘게 자른 후 15배 용량의 1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4 용액으로 48시간 세척하고 수술용 gauze

로 걸러 잔사를 얻었다. 잔사는 다시 15배 용량의 0.5 M acetic acid로 72시간 추출하여 수술용 gauze로 상등액을 분리하고 이 상등액은 다시 Büchner funnel을 이용하여 celite층을 통과시켜 여과하여 맑은 용액을 얻었다. 이 용액에 최종농도가 5%가 되게 NaCl을 첨가하여 collagen을 침전시킨 후 원심분리하여 잔사를 분리하고 다시 0.5 M acetic acid에 녹인 다음 0.02 M Na₂HPO₄ 용액에서 투석하여 다시 collagen을 침전시켰다. 침전된 collagen은 0.5 M acetic acid로 녹인 다음 0.1 M acetic acid로 투석한 후 냉동 건조하여 -20°C에 보관하였다. 실험에 사용할 때에는 건조된 collagen의 일부를 0.5 M acetic acid에 녹인 다음 0.005 M acetic acid에 투석하여 최종농도가 약 2 mg/ml이 되도록 하여 사용하였다. collagen농도는 bovine serum albumin을 기준단백질로 하여 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였다.

2. 방 법

가. Collagen gelation 측정

collagen을 0.2 mg/ml이 되도록 4 ml의 0.14 M NaCl, 0.1 mM EDTA 그리고 25 mM sodium phosphate, pH 7.4 및 기타 첨가물을 함유한 반응액과 섞은 다음 4°C에서 12시간 incubation한 후 이 용액 3ml을 cuvette에 옮긴 후 37°C로 항온을 유지하는 cuvette chamber가 부착되어 있는 Unicam SP 1750 spectrophotometer에서 온도를 높임으로써 gelation을 유도하였으며 이때 일어나는 용액의 혼탁도 증가를 400 nm에서 기록하였다. 이때 온도가 올라감에 따라서 발생하는 용액내의 기포를 제거하기 위하여 4°C에서 vacuum pump로 녹아 있는 공기를 미리 제거한 다음 37°C로 온도를 높였다.

나. Collagen의 xanthine과 xanthine oxidase 처리

collagen(0.2 mg/ml)을 상기한 0.14 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 및 25 mM sodium phosphate, pH 7.4 용액에서 xanthine 0.5 mM과 xanthine oxidase 30 munits/ml로 4°C에서 12시간 incubation하였고 이때 반응의 시작은 xanthine oxidase를 첨가함으로써 시행하였다. incubation후 5 mM이 되도록 allopurinol을 반응액에 첨가하여 반응을 종료시켰으며 이 후 gelation 측정은 상기 기술한 방법에 의하여 관찰하였다.

다. Xanthine oxidase활성도 측정

10 µl의 xanthine oxidase를 0.67 mM xanthine, 0.033 mM EDTA와 100mM Tris-HCl, pH 7.4가 함유된 3 ml의 반응액에 첨가한 후 37°C에서 생성되는 urate를 290 nm에서 absorbance의 증가를 Unicam SP 1750 spectrophotometer를 사용해서 1분간 기록하고 얻어진 curve의 처음 직선 부분의 기울기와 urate의 pH

7.4에서의 molar extinction coefficient, 1.24×10^4 (Greenwald and Moy, 1979)을 이용하여 생성된 urate의 양을 계산하였다. 1분에 1 μ mole의 urate를 생성시키는 xanthine oxidase의 양을 1 unit로 정의하였다.

라. $O_2^{\cdot-}$ 의 발생 및 검출

Simon 등(1981)의 방법을 약간 수정하여 xanthine oxidase 활성도 측정에서 사용된 반응조건에 ferricytochrome c 30 μ M을 첨가한 후 10 μ l의 xanthine oxidase(20 munits)에 의하여 반응을 시작하였으며 ferricytochrome c가 반응에서 생성된 $O_2^{\cdot-}$ 에 의하여 환원되어 생긴 ferrocycytochrome c의 absorbance를 550 nm에서 Unicam SP 1750 Spectrophotometer를 이용하여 계속적으로 측정 기록함으로써 $O_2^{\cdot-}$ 의 발생을 추적하였다.

마. OH \cdot 의 발생 및 검출

Beauchamp와 Fridovich(1970) 방법을 사용하여 xanthine과 xanthine oxidase에 의해서 ferrocycytochrome c가 ferricytochrome c로 산화되는 것을 550 nm에서 absorbance의 감소로 OH \cdot 의 생성을 추적하였다. 반응 조건은 타항에서 기술한 $O_2^{\cdot-}$ 생성 측정때와 동일하나 ferricytochrome c 대신 ferrocycytochrome c를 사용하였다. Ferrocycytochrome c는 ferricytochrome c(1 mM)를 $Na_2S_2O_4$ (10 mM)로 환원 시킨 후 4°C에서 N_2 로 bubbling 하면서 1,000배의 완충용액 0.1 mM sodium phosphate, 0.1 mM EDTA, pH 7.0에서 3번 투석하여 만들었다.

바. 1O_2 의 발생 및 검출

Bodaness와 Chan(1977)에 의한 photooxidation 방법을 사용하였다. 7 μ M hematoporphyrin dihydrochloride, 0.4 mM NADPH, 10 mM potassium phosphate, pH 7.4을 포함한 3 ml의 반응액을 quartz cuvette에 넣은 후 UV를 방출하는 bulb 10 cm앞에 놓고 UV를 조사하여 일어나는 NADPH의 산화를 시간에 따라 340 nm에서 absorbance의 변화를 측정하여 1O_2 의 생성을 추적하였다.

사. H_2O_2 측정

H_2O_2 의 측정은 Allen 등(1952)의 방법에 의하여 측정하였다.

실험결과 및 고찰

1. Xanthine과 xanthine oxidase가 collagen gelation에 미치는 영향

피부 collagen을 xanthine과 xanthine oxidase로 처리 하였을 때 그림 1에서 보는 바와 같이 처리하지 않은 control에 비하여 gelation의 현저한 억제에 관찰되었다. 즉 control gelation의 $T_{1/2max}$ (half-maximum tur-

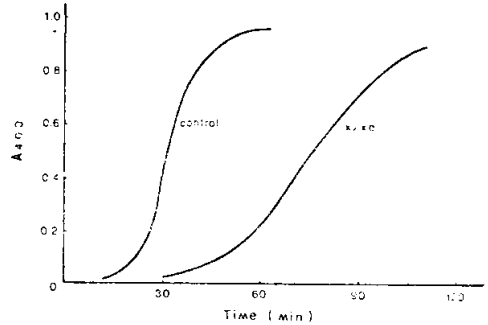


Fig. 1. Effect of xanthine and xanthine oxidase on collagen gelation. Collagen (0.2 mg/ml) was incubated with 0.5 mM xanthine and 30 munits/ml xanthine oxidase in 4ml of reaction medium containing 0.14 M NaCl, 0.1 mM EDTA and 25 mM sodium phosphate, pH 7.4 for 12h at 4°C. Termination of the reaction and gelation were done as described in Materials and Methods. Control; without xanthine and xanthine oxidase, X/XO; with 0.5 mM xanthine and 30 munits/ml xanthine oxidase.

idity에 도달하는데 걸리는 시간)가 30분인데 비하여 85분으로서 상당한 지연을 나타내고 있다. 이와 같은 gelation의 지연은 xanthine이나 xanthine oxidase 단독으로는 일어나지 않았으며 양자가 동시에 존재할 때만 일어날 뿐만 아니라 allopurinol 첨가로 xanthine과 xanthine oxidase에 의한 gelation억제가 회복됨을 관찰하였다. allopurinol이나 urate 그 자체는 gelation에 영향을 미치지 아니하였다(data는 제시하지 않았음).

이상의 결과로 gelation의 억제에 xanthine oxidase 반응계에서 발생된 oxygen radicals (Kellogg and Fridovich, 1977; Greenwald and Moy, 1979; Fee, 1980)에 의한 것이며 collagen gelation의 억제는 collagen의 물리화학적 성질의 변화를 반영한다고 할 때 이는 oxygen radicals에 의한 collagen의 구조적 및 기능적 변화의 결과라고 생각되었다.

2. 인삼 각 성분이 xanthine과 xanthine oxidase에 의한 collagen gelation의 억제에 미치는 영향

인삼의 약리작용이 여러 각도로 연구되고 있지만 아직까지 그 효능을 뒷받침하는 작용기전은 확실히 밝혀져 있지 않다. 그러나 최근 연구에 의하여 인삼 성분이 시험관(Han et al., 1978; Kim et al., 1980) 및 생체 실험(Han et al., 1978)에서 항산화작용이 있다는 결과가 보고되고 있다. 물론 여러 기전에 의하여 항산화작용을 나타낼 수 있지만 그 중 생체의 산화반응에 의한 여러 유해현상을 초래한다고 생각되는

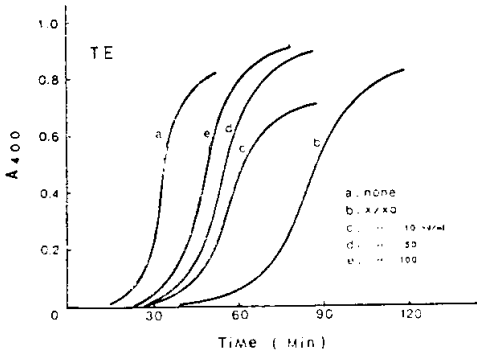


Fig. 2. Effect of ginseng total extract (TE) on the inhibition of collagen gelation by xanthine and xanthine oxidase. Collagen was treated with xanthine (0.5mM) and xanthine oxidase (30 munits/ml) under the same conditions as in Fig. 1. in the presence of ginseng total extract with concentrations as indicated

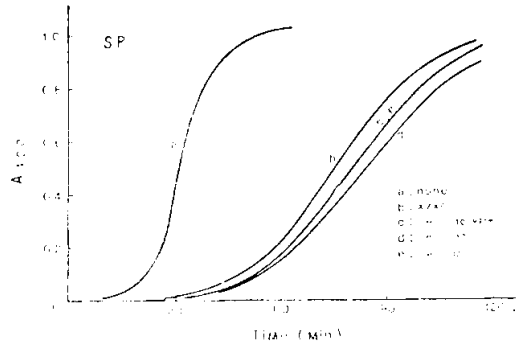


Fig. 3. Effect of ginseng saponin fraction(SP) on the inhibition of collagen gelation. The experiments were done with ginseng saponin fraction with the concentrations as indicated under the same conditions as in Fig. 1.

oxygen radicals와의 상호작용이 그 하나의 가능성으로 생각될 수 있으며 따라서 이를 알아보기 위하여 인삼 각 성분의 xanthine/xanthine oxidase 반응계에서 생성된 oxygen radicals에 의한 영향을 collagen gelation을 이용하여 관찰하였다.

가. 인삼 total extract의 영향

그림 2에서 보는 바와 같이 인삼 total extract는 농도 비례적으로 xanthine/xanthine oxidase에 의하여 억제된 collagen gelation을 회복시켰다. 즉 xanthine/xanthine oxidase에 의하여 $T_{1/2max}$ 가 85분이었던 것이 10, 50 및 100 μ g/ml의 total extract 존재하에서 각각 60, 50, 42분으로 $T_{1/2max}$ 를 단축시킴을 보여주고 있다. 이때 인삼 total extract는 500 μ g/ml의 농도에서도 collagen gelation 자체에 전혀 영향을 나타내지 아니하였고(data는 제시하지 않았음) 뿐만아니라 그림 5(왼쪽 panel)에서 보는 바와 같이 인삼 total extract의 xanthine oxidase 활성도에 미치는 영향을 관찰한 결과 1mg/ml의 고농도에서도 이 효소의 활성도에 별 영향을 미치지 아니하였다. 이상의 결과를 미루어 볼때 인삼 total extract의 xanthine/xanthine oxidase에 의해 억제된 collagen gelation의 회복효과는 xanthine oxidase 반응계에서 생성된 oxygen radicals와의 상호작용에 의한 가능성을 시사하고 있다.

따라서 oxygen radicals와의 상호 작용에 의한 항산화작용이 인삼성분중 어느 부분에 의한 것인가를 규명하기 위하여 크게 인삼성분을 saponin과 nonsaponin분획으로 구분하여 각 분획의 oxygen radicals와의 상호작용을 관찰하였다.

나. 인삼 saponin의 영향

그림 3에서 보는 바와 같이 인삼 saponin은 xanthine/xanthine oxidase에 의한 collagen gelation억제에 별 영향을 미치지 아니하였으며 약간 gelation의 지연을 나타내고 있으나 이같은 효과는 saponin의 농도에 따르는 일관성 있는 결과를 보여주지 않고 있다. 인삼 saponin역시 collagen gelation 자체나(data는 제시하지 않았음) xanthine oxidase 활성도에는 직접적인 영향을 보여주지 아니하였다(그림 5, 가운데 panel).

다. 인삼 nonsaponin분획의 영향

saponin분획의 작용과는 대조적으로 nonsaponin분획은 xanthine/xanthine oxidase의 처리로 억제된 gelation을 농도 비례적으로 회복시켰다(그림 4). 인삼 nonsa-

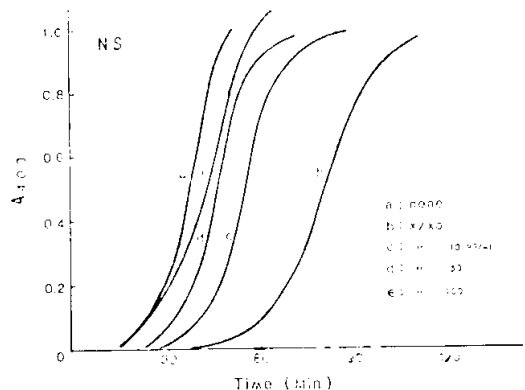


Fig. 4. Effect of ginseng nonsaponin fraction(NS) on the inhibition of collagen gelation by xanthine and xanthine oxidase. The experiments were performed with ginseng nonsaponin fraction with indicated concentrations under the same conditions as in Fig. 1.

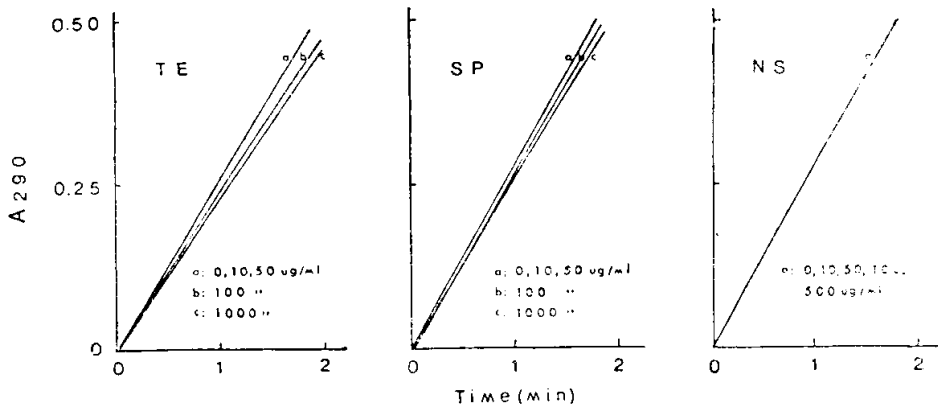


Fig. 5. Effect of ginseng components on xanthine oxidase activity. Three ml of reaction medium containing 0.67 mM xanthine, 0.033 mM EDTA and 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 was preincubated for 10 min at 37°C in the absence and presence of ginseng total extract (TE), saponin fraction (SP) or nonsaponin fraction (NS) with concentrations as indicated, and then 10 μ l of xanthine oxidase (20 munits) was added to start the reaction.

ponin분획 역시 1 mg/ml의 농도에서도 gelation(data는 제시하지 않았음)과 xanthine oxidase 활성도에는 직접적인 영향을 나타내지 아니하였다(그림 5, 오른쪽 panel). 따라서 xanthine/xanthine oxidase 처리에 의한 gelation의 회복은 oxygen radicals와의 상호작용에 의한 가능성을 시사하고 있다.

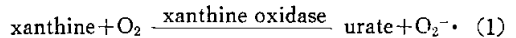
지금까지의 결과로 미루어 볼 때 인삼 성분은 oxygen radicals와 상호작용을 통하여 이들 radical에 의한 산화 효과를 억제할 가능성을 시사하고 있으며 이같은 작용은 인삼성분중 적어도 nonsaponin분획에 있을 것으로 생각되었다.

이상과 같은 결과는 지금까지의 많은 연구들이 인삼의 주 약리효능을 나타내는 성분이 saponin일 것이라는 주장과 대조를 이루고 있으며 따라서 saponin 이외의 성분에 대한 효과에도 관심을 가져야 할 것으로 생각되었다.

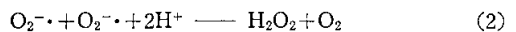
3. 인삼 각 성분의 oxygen radicals에 대한 quenching 효과

xanthine/xanthine oxidase 반응계는 쉽게 그리고 신속히 oxygen radicals을 생성시킬 수 있을 뿐만 아니라 생성양을 조절할 수 있기 때문에 oxygen radicals을 생성시키는 시험관적 방법으로 널리 이용되고 있다. 이 반응계에서 생성되는 oxygen radicals의 종류로는 지금까지의 많은 보고에 의하면 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH\cdot$ 및 1O_2 의 네 가지일 것으로 추측하고 있으며(Beauchamp and Fridovich, 1970; Kellogg and Fridovich, 1977; Greenwald and Moy, 1979; Fee, 1980; Simon et al., 1981) 이들이 생성되는 기전을 요약하면 다음과

같다. 우선 xanthine oxidase에 의해서 일차적 산물인 $O_2^{\cdot-}$ 가 생성된다.

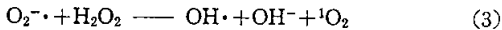


이때 생성된 $O_2^{\cdot-}$ 는 superoxide dismutase에 의해서 신속히 혹은 용액내에서 자발적으로 dismutation이 일어나 H_2O_2 를 생성한다.

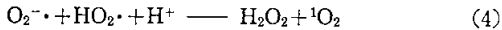


위와 같은 반응은 xanthine/xanthine oxidase 반응계를 포함하여 기타 $O_2^{\cdot-}$ 를 생성하는 반응계(Klebanoff, 1980)에서 $O_2^{\cdot-}$ 는 물론 H_2O_2 를 직접 검출하여 정량할 수 있을 뿐만 아니라 이때 일어나는 여러 물질의 산화 및 이들에 의하여 일어나는 유해작용이 superoxide dismutase나 catalase에 의하여 억제됨으로써 증명되고 있다(Oh et al., 1982; Kim, 1983). 그러나 $O_2^{\cdot-}$ 가 생성되는 반응계에 나타나는 산화현상은 superoxide dismutase나 catalase 단독으로는 부분적으로 억제되고 두 효소가 함께 존재할 때 거의 완전히 억제됨을 관찰할 수 있으며(Fee, 1980) 뿐만 아니라 $O_2^{\cdot-}$ 혹은 H_2O_2 와는 작용하지 않고 $OH\cdot$ 를 제거하는 benzoate, mannitol, formate 및 thiourea(Beauchamp and Fridovich, 1970; McCord, 1974; Chan and Kesner, 1980; Simon et al., 1981)나 1O_2 을 제거하는 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane, dimethylfuran 및 histidine(Bodaness and Chan, 1977; Simon et al., 1981) 등에 의하여 억제효과가 관찰되어서 $O_2^{\cdot-}$ 나 H_2O_2 는 그 자체가 산화에 의한 파괴현상에 참여하기보다는 $OH\cdot$ 나 1O_2 을 발생시키는 물질로 작용하고 이들의 상호작용에 의하여 발생된 보다 반응성이 강한 $OH\cdot$ 나 1O_2 가 직접 파괴현상에 참

여하는 것으로 추측하고 있다. 이때의 반응식은



으로 소위 Haber-Weiss reaction으로 알려져 있다 (Fridovich, 1978; Klebanoff, 1980). 뿐만 아니라 $O_2^{\cdot-}$ 은 superoxide dismutase에 의해서는 ground state의 O_2 를 발생하지만 자발적인 dismutation 때에는 1O_2 을 발생한다는 보고도 있다 (Kahn, 1970; Mayeda and Bard, 1975). 즉,



이상의 oxygen radicals의 상호작용으로 볼 때 본 실험에서 인삼 성분의 xanthine/xanthine oxidase에 의한 gelation 억제에 회복작용은 이 반응계에 생성될 수 있는 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH\cdot$ 및 1O_2 과의 상호작용에 의한 가능성이 높기 때문에 따라서 항산화작용의 작용기전을 밝히하고자 각 인삼성분과 oxygen radicals들과의 상호작용을 관찰하였다.

가. $O_2^{\cdot-}$ 에 대한 quenching 효과

$O_2^{\cdot-}$ 은 이것이 작용하는 물질에 따라서 산화제와 환원제로 작용할 수 있다. 예를 들어 이 radical이 NADH와 반응할 때는 NAD^+ 로 (Bielski and Chan, 1973), epinephrine은 adrenochrome으로 산화시키지만 (Misra and Fridovich, 1972), ferricytochrome c와 반응할 때는 환원제로 작용하여 ferrocycytochrome c로 환원시키고 O_2 로 변화한다 (Klebanoff, 1980; Simon et al., 1981). 이와 같은 반응들은 $O_2^{\cdot-}$ 의 발생을 정량적으로 증명하는데 이용되고 있으며 본 실험에는 보다 보편적

으로 이용되고 있는 후자의 환원 방법을 이용하여 인삼성분의 $O_2^{\cdot-}$ 에 대한 quenching 효과를 관찰하였다. 그림 6에서 보는 바와 같이 ferricytochrome c가 존재하는 반응계에 xanthine/xanthine oxidase에 의해서 A_{550} 의 증가를 나타내고 있다. 이같은 증가는 superoxide dismutase의 첨가로 소실됨을 관찰하므로써 $O_2^{\cdot-}$ 에 의해서 ferricytochrome c가 ferrocycytochrome c로 환원됨을 본 실험에서도 확인하였다 (data는 제시하지 않았음). 그러나 본 실험에서 사용한 인삼성분 즉 total extract 및 saponin은 물론, xanthine/xanthine oxidase에 의한 gelation 억제에 회복효과를 나타내었던 nonsaponin 분획도 광범위한 농도에서 A_{550} 의 증가에 영향을 나타내지 아니하였다 (그림 6). 따라서 실험에서 사용한 인삼성분은 oxygen radical인 $O_2^{\cdot-}$ 에 대한 quenching 효과가 없었으며 이는 인삼의 각 성분은 $O_2^{\cdot-}$ 과 반응하지 않음을 알 수 있었다.

나. $OH\cdot$ 에 대한 quenching 효과

반응식 (3)에서 보는 바와 같이 $O_2^{\cdot-}$ 과 H_2O_2 는 상호작용을 통하여 $OH\cdot$ 를 생성하는데 이는 xanthine oxidase가 ferrocycytochrome c에 대하여 xanthine 존재하에서 peroxidase로 작용하며 이때의 ferrocycytochrome c 산화는 superoxide dismutase와 catalase에 의해서 억제됨은 물론 $OH\cdot$ 의 quencher인 mannitol에 의하여 억제됨으로써 xanthine/xanthine oxidase 반응계에 $OH\cdot$ 의 생성이 증명되고 있다 (Beauchamp and Fridovich, 1970). 따라서 본 실험의 반응계에서도 $OH\cdot$ 의 생성을 기대할

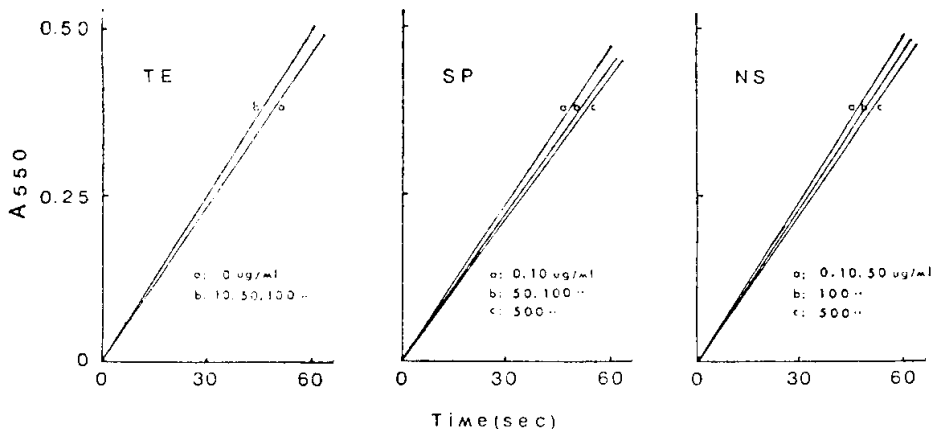


Fig. 6. Effect of ginseng components on ferricytochrome c reduction by superoxide radical. Three ml of reaction medium containing $30 \mu M$ ferricytochrome c, 0.67 mM xanthine, 0.033 mM EDTA and 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 was preincubated for 10 min at $37^\circ C$ in the absence or presence of ginseng components with concentrations as shown, and then $10 \mu l$ of xanthine oxidase (20 munits) was added. Reduction of ferricytochrome c was determined by observing the absorbance increase at 550 nm. TE; total extract, SP; saponin fraction and NS; nonsaponin fraction.

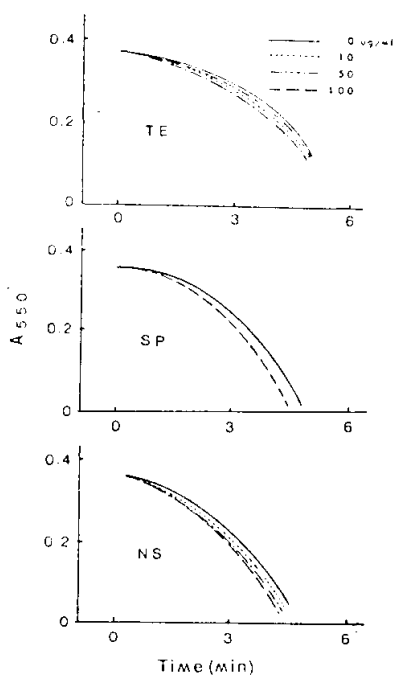


Fig. 7. Effect of ginseng components on the oxidation of ferrocycytochrome c by xanthine and xanthine oxidase. Ferrocycytochrome c (30 μ M) prepared as described in Materials and Methods was preincubated for 10min at 37°C in 3 ml of reaction medium containing 0.67 mM xanthine, 0.033 mM EDTA and 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 in the absence or presence of ginseng total extract (TE), saponin fraction (SP) or nonsaponin fraction (NS) and then 10 μ l xanthine oxidase (20 munits) was added. Oxidation of ferrocycytochrome c was determined by recording the decrease of absorbance at 550 nm.

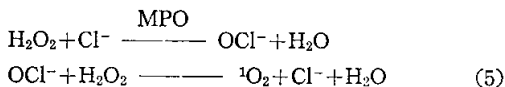
수 있으며 이미 관찰된 인삼성분의 항산화효과는 OH·의 상호작용의 결과일 가능성을 생각할 수 있으며 따라서 OH·에 대한 인삼성분의 효과를 관찰하였다. 그림 7에서 보는 바와 같이 xanthine/xanthine oxidase는 ferrocycytochrome c 존재하에서 그림 6에서의 결과와는 정반대로 A₅₅₀의 감소를 나타내고 있다. 그러나 이와 같은 A₅₅₀의 감소에 인삼성분은 실험에 사용한 농도범위에서 영향을 나타내지 않고 있다(그림 7). 따라서 인삼성분은 OH·에 대한 quenching 효과가 없는 것으로 사료되었다.

이상의 결과는 Han 등(1978) 및 Kim 등(1980)이 관찰한 DPPH radical에 대한 quenching 효과와는 대조를 이루고 있으며 아마도 radical의 종류에 따라서 인

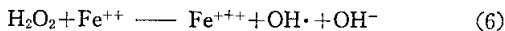
삼성분에 대한 반응성이 다른 것으로 추측되었다.

다. H₂O₂에 대한 quenching 효과

xanthine/xanthine oxidase 반응계나 기타 O₂^{-·}이 생성되는 조건에서는 반응식 (2)에 의하여 H₂O₂가 생성되는 많은 연구에 의하여 보고되었다(Fridovich, 1978; Klebanoff, 1980). 지금까지 oxygen radical의 반응성에 관한 연구결과에 의하면 H₂O₂는 반응성이 OH·나 ¹O₂보다 낮아서 그 자신이 직접 산화반응에 참여하기 보다는 반응성이 강한 OH·, ¹O₂ 혹은 그의 밝혀지지 않은 산물(Chan and Kesner, 1980; Chung et al., 1983)을 생성시키는 전구물질로서 작용할 것으로 생각되고 있으며 이들을 생성시키는 반응기전으로서는 전술한 O₂^{-·}와의 상호작용을 통한 반응식(3), 이외에도 myeloperoxidase(MPO) 효소에 의한 ¹O₂의 생성(Klebanoff, 1980) 즉,



그리고 금속 이온중 Fe⁺⁺에 의하여 일어나는 Fenton 반응(Fee, 1980)



및 아직 그 반응기전이 확실히 밝혀져 있지 않지만 아주 강력한 산화작용을 나타내어 여러 유기물의 파괴효과를 나타내는 Cu⁺⁺-catalyzed peroxidation(Chan and Kesner, 1980; Chung et al., 1981 and 1983) 등을 들 수 있다. 그러나 최근 Simon 등(1981)은 xanthine/xanthine oxidase 반응계에서 산화효과를 나타내는 oxygen radical은 H₂O₂라고 주장하고 있어 H₂O₂는 전구물질로서 뿐만 아니라 직접 산화반응에 참여할 수 있음을 시사하고 있다.

이상에서 보는 바와 같이 H₂O₂는 그 작용기전이야 어쨌든 oxygen radicals에 의한 산화반응에 참여하고 있기 때문에 본 실험에서 관찰된 인삼성분의 항산화효과는 H₂O₂와의 상호작용에 의한 가능성을 시사하므로 H₂O₂와의 상호작용을 관찰하였다. 그러나 xanthine oxidase 반응계에는 여러 oxygen radicals가 함께 존재할 수 있기 때문에 H₂O₂와의 반응을 개별적으로 분리하여 측정하기 곤란하므로 인삼성분과 H₂O₂를 직접 반응시켜 시간에 따르는 H₂O₂의 소실을 측정하였다. 표 1에서 보는 바와 같이 인삼 각 성분은 H₂O₂의 소실에 영향을 미치지 않았으며 이로 미루어 인삼성분은 H₂O₂와 반응을 하지 않았으며 따라서 quenching 효과가 없음을 알 수 있었다.

라. ¹O₂에 대한 효과

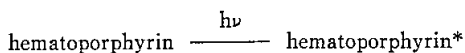
반응성이 강한 oxygen radicals중의 하나인 ¹O₂은

Table 1. Effects of GS components on the decay of H₂O₂

Time(h)	TE		SP		NS	
	none	1 mg/ml	none	1 mg/ml	none	1 mg/ml
0	100	100	100	100	100	100
1	98.2	98.6	99.5	99.8	103	102
3	97.2	97.6	97.2	99.3	98.8	98.3
5	95.1	98.5	97.0	97.0	95.9	94
24	69.2	66.5	96.3	93.7	72.4	70.7

H₂O₂ (0.3 mM) was incubated in 5ml of reaction medium containing 20 mM sodium phosphate, pH 7.4 in the absence or presence of ginseng total extract (TE), saponin fraction (SP) or nonsaponin fraction (NS) at 4°C. At time intervals, 0.5ml of aliquot was taken and assayed for H₂O₂ as described in Materials and Methods.

xanthine/xanthine oxidase나 그의 O₂⁻이 생성되는 반응계에서 반응 (3) 혹은 (4)에 의하여 생성될 수 있다고 보고되었다. 본 실험에서도 xanthine/xanthine oxidase에 의한 collagen gelation의 억제가 ¹O₂의 quencher인 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane에 의해서 회복됨을 관찰함으로써 ¹O₂이 관여함을 알 수 있었다(data는 제시하지 않았음). 따라서 이미 관찰된 인삼성분의 항산화작용은 ¹O₂의 quenching에 의한 가능성을 시사하고 있으므로 이를 증명하기 위하여 Bodaness와 Chan (1977)에 의한 photooxidation 방법으로 ¹O₂을 발생시켜 인삼성분과의 상호작용을 관찰하였다. 즉



hematoporphyrin* + O₂ → hematoporphyrin + ¹O₂ (7)
 와 같이 광 energy(hν)에 의하여 hematoporphyrin이 excitation되어 energy level이 높은 hematoporphyrin*이 되고 이 energy는 다시 용액에 있는 O₂에 전이되어 ¹O₂이 발생되며 ¹O₂의 발생은 용액내에 있는 NADPH의 산화에 의한 A₃₄₀의 감소를 측정하여 관찰하였고, 그림 8은 ¹O₂에 의한 NADPH산화에 인삼성분이 미치는 영향을 보여주고 있다. 실험에서 사용한 인삼성분중 total extract와 nonsaponin 분획은 photooxidation에 의한 NADPH 산화를 억제하였으나 saponin분획은 영향을 보이지 아니하였다. 그러나 그림 8에서 보는 바와 같이 ¹O₂에 quenching 효과는 ¹O₂의 quencher로 알려진 histidine과 dimethylfuran과 같이 뚜렷하지는 않지.

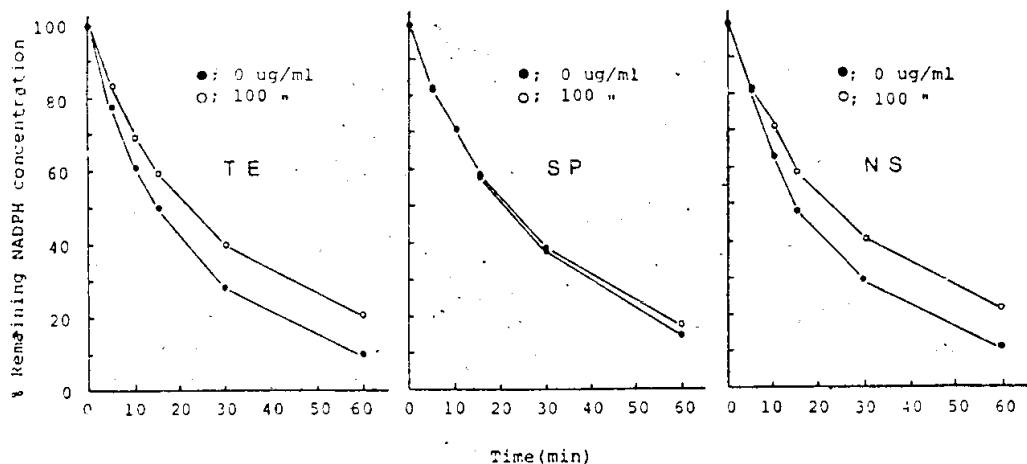


Fig. 8. Effect of ginseng components on the oxidation of NADPH by photooxidation. A quartz cuvette with 3 ml of reaction medium containing 7μM hematoporphyrin dihydrochloride, 0.4 mM NADPH, 10 mM potassium phosphate, pH 7.4 was irradiated to UV as described in Materials and Methods in the absence or presence of ginseng total extract (TE), saponin fraction (SP) or nonsaponin fraction (NS). At time intervals, changes of A₃₄₀ were observed to follow NADPH oxidation.

만 (Bodaness and Chan, 1977) $^1\text{O}_2$ 은 본 실험에서 관찰한 oxygen radicals중 유일하게 인삼성분에 의하여 quenching되는 oxygen radical이었으며 이같은 효과는 xanthine/xanthine oxidase에 의한 gelation의 역제를 회복시켰던 total extract와 nonsaponin 분획에서 관찰되었다. 이상의 결과로 미루어 볼때 본 실험에서 관찰된 oxygen radicals에 대한 인삼성분의 항산화작용은 nonsaponin분획에 의한 것이며 이는 oxygen radical 중 특히 $^1\text{O}_2$ 에 대한 quenching 효과에 의한 것으로 추측되었다.

인삼의 약리작용은 여러 각도에서 연구되고 있지만 현재까지 Brekhman과 Dardymov(1969)가 주장하는 생체의 비특이적 저항을 증가시킨다는 작용이 많은 지지를 받고 있다. 그러나 이같은 작용을 나타내는 약리적 기전은 아직까지 확실히 밝혀져 있지 않다. 생체는 끊임 없이 화학적, 물리적 그리고 생물학적인 자극을 받고 있으며 이로 인한 생체에 미치는 유해작용은 여러 기전으로 일어날 수 있지만 최근에는 산화반응에 의한 손상이 주목을 끌고 있다. 특히 생체에서 여러 요인으로 생성되는 oxygen radicals에 의한 손상은 ischemia(Demopoulos et al., 1980), inflammation(Weissmann et al., 1980), hyperoxia(Crapo et al., 1983), carcinogenesis(Pryor, 1977) 및 약물중독(Trush et al., 1982) 등의 여러 병적 상태에서 입증되고 있으며 생체의 자연현상이라고 할 수 있는 노쇠현상(Pryor, 1977; Leibovitz and Siegel 1980)에도 관여함이 시사되고 있다. 따라서 본 실험에서 관찰된 인삼성분의 oxygen radical에 의한 산화작용의 방지는 Brekhman과 Dardymov(1969)가 주장하는 비특이적 저항을 증가시킨다는 인삼의 작용에 비추어 흥미있는 현상이며 또한 종래의 인삼의 주작용이 saponin이라는 주장과는 달리 nonsaponin분획에 의한 항산화작용은 앞으로의 인삼연구에서 추구되어야 할 문제라고 생각된다.

최근 oxygen radicals에 의한 세포막의 산화현상(Lynch and Fridovich, 1978) 및 피부 조직의 주요 구성 물질인 collagen이 oxygen radical중 $^1\text{O}_2$ 에 의하여 degradation(Venkasubramanian and Joseph, 1977)됨이 보고됨으로써 oxygen radical중 특히 $^1\text{O}_2$ 의 노쇠현상에 대한 역할이 더욱 강조되고 있다. 따라서 본 실험에서 collagen에 대한 $^1\text{O}_2$ 의 작용에 미치는 인삼의 효과는 이런 관점에서 흥미를 끌고 있으며 앞으로 oxygen radicals에 대한 인삼의 효과에 관한 연구는 인삼의 약리기전을 밝히는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

—ABSTRACT—

Effects of ginseng components on the actions of oxygen radicals to gelation of skin collagen

C. W. Park, J.K. Lim, J.S. Lee and M.H. Chung

Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University

Oxygen radicals are highly reactive and can alter most types of cellular macromolecules. These radicals can be formed as products from altered cellular metabolism in certain pathologic states or by radiation energy. Consequently, their destructive action to many biological compounds are suggested to play roles in tissue damage under various pathologic conditions including aging phenomenon.

Cutaneous tissue may be one of the tissues that are constantly subject to attack of the oxygen radicals because it has more chances to be exposed to radiation than others. Recently, degradative action of oxygen radicals have been demonstrated on collagen and proteoglycan which are major components of skin tissue. Thus, the oxygen radicals in this tissue are suggested to participate in aging as well as other degradative changes.

In view of the recent reports showing that ginseng components have antioxidant effect and quenching action to an organic radical, it is of interest to see effects of ginseng components on oxidative process by oxygen radicals to assess their actions with regard to their protective effects on tissue damage.

In the present study, effects of ginseng components were observed on inhibition of gelation of skin collagen by oxygen radicals generated by xanthine and xanthine oxidase, and quenching effects of the components on each oxygen radical were also observed to elucidate their mechanism of antioxidant effect observed in the present study.

The results were as follows.

1. Collagen gelation was inhibited by treatment with xanthine and xanthine oxidase.

2. The inhibited gelation was recovered by total extract of ginseng. The protective effect on gelation was observed with nonsaponin fraction, not with saponin fraction.

3. But collagen gelation and xanthine oxidase by themselves were not affected by ginseng components used.

4. Among the oxygen radicals suggested to be produced in the xanthine oxidase system, total extract showed quenching action to $^1\text{O}_2$, although the action was not so remarkable as that of other $^1\text{O}_2$ quenchers. This effect was observed with nonsaponin fraction.

The results suggest that ginseng components have protective effect on collagen alteration induced by oxygen radicals and this effect may be attributed to $^1\text{O}_2$ quenching action of nonsaponin fraction of ginseng.

REFERENCES

- Allen, A.O., Hochanadel, C.J. and Ghormley, J.A. and Davis, T.W.: *Decomposition of water and aqueous solutions under mixed fast neutron and gamma radiation. J. Phys. Chem.*, 56:575-586, 1952.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I.: *A mechanism for the production of ethylene from methional: the generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. J. Biol. Chem.*, 245:4641-4646, 1970.
- Bielski, B.H.J. and Chan, P.C.: *Enzyme-catalyzed free radical reactions with nicotinamide-adenine nucleotides. 1. Lactate dehydrogenase-catalyzed chain oxidation of bound NADH by superoxide radicals. Arch. Biochem. Biophys.*, 159:873-879, 1973.
- Bodaness, R.S. and Chan, P.C.: *Singlet oxygen as a mediator in hematoporphyrin-catalyzed photooxidation of NADPH to NADP⁺ in deuterium oxide. J. Biol. Chem.*, 252:8554-8560, 1977.
- Bodaness, R.S. and Chan, P.C.: *Singlet oxygen reacts with inhibitors of ultraviolet mediated damage to skin: p-aminobenzoic acid and its derivatives. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 87:1116-1123, 1979.
- Boyeris, A. and Chance, B.: *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem. J.*, 134:707-716, 1973.
- Brekhman, I.I. and Dardymov, I.V.: *New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. Ann. Rev. Pharmacol.*, 9:419-461, 1969.
- Chan, P.C. and Kesner, L.: *Copper(II) complex-catalyzed oxidation of NADH by hydrogen peroxide. Biol. Trace Element Res.*, 2:159-174, 1980.
- Chung, M.H., Kesner, L. and Chan, P.C.: *Degradation of lysozyme by Cu(II) and H₂O₂. Federation Proceedings*, 40:1613, 1981.
- Chung, M.H., Kesner, L. and Chan, P.C.: *Degradation of articular cartilage by Cu(II) and H₂O₂. Agents and Actions in press*, 1983.
- Crapo, J.C., Freeman, B.A., Barry, B.E., Turrens, J.F. and Yong, S.L.: *Mechanisms of hyperoxic injury to the pulmonary microcirculation. The Physiologist*, 26:170-174, 1983.
- Demopoulos, H.B., Flamm, E.S., Pietronigro, D.D. and Seligman, M.L.: *The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 492:91-119, 1980.
- Fantone, J.C. and Ward, P.A.: *Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am. J. Pathol.*, 107:397-418, 1982.
- Fee, J.A.: *Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity in Metal Ion Activation of Dioxxygen*, pp.209-237 (ed. Spiro, J.G.). John Wiley & Sons, INC, 1980.
- Fridovich, I.: *The biology of oxygen radicals. Science*, 201:875-850, 1978.
- Granger, D.N. and Parks, D.A.: *Role of oxygen radicals in the pathogenesis of intestinal ischemia. The Physiologist*, 26:159-164, 1983.
- Greenwald, R.A. and Moy, W.W.: *Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. Arthritis Rheumat.*, 22:251-259, 1979.
- Han, B.H., Park, M.H., Woo, L.K., Woo, W.S. and Han, Y.N.: *Studies of the antioxidant components of Korean Ginseng. Proceedings of the 2nd International Ginseng Symposium*, pp.13-17,

- 1978.
- Hess, M.L., Okabe, E. and Kontos, H.A.: *Proton and free oxygen radical interaction with the calcium transport system of cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 13:767-772, 1981.
- Kahn, A.U.: *Singlet molecular oxygen from superoxide anion and sensitized fluorescence of organic molecules. Science*, 168:476-477, 1970.
- Kellogg, E.W., III and Fridovich, I.: *Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem.*, 252:6721-6728, 1977.
- Kim, H.W.: *Effect of oxygen free radicals on calcium binding of cardiac sarcoplasmic reticulum. Dissertation for Ph.D.*, 1984.
- Kim, M.W., Choi, K.J., Cho, Y.H. and Hong, S.K.: *Study on the components of the anti-oxidant activity of Panax Ginseng. J. Korean Agricul. Chem. Society*, 23:251-255, 1980.
- Klebanoff, S.J.: *Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. Ann. Int. Med.*, 93:480-489, 1980.
- Lavelle, F., Michelson, A.M. and Dimitrijevic, L.: *Biologic protection by superoxide dismutase. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 55:350-357, 1973.
- Leibovitz, B.E. and Siegel, B.V.: *Aspects of free radical reactions in biological systems. J. Gerontol.*, 35:45-56, 1980.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Raudall, R.J.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- Lynch, R.E. and Fridovich, I.: *Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. J. Biol. Chem.*, 253:1838-1845, 1978.
- Mayeda, E.A. and Bard, A.J.: *Singlet Oxygen. The suppression of its production in dismutation of superoxide ion by superoxide dismutase. J. Am. Chem. Soc.*, 96:4023-4024, 1974.
- McCord, J.M.: *Free radical and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. Science*, 185:529-531, 1974.
- McCord, J.M.: *The biochemistry and pathophysiology of superoxide. The Physiologist*, 26:156-158, 1983.
- Misra, H.P. and Fridovich, I.: *The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem.*, 247:3170-3175, 1972.
- Nohl, H. and Jordan, W.: *The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide. Eur. J. Biochem.*, 111:203-210, 1980.
- Oegema, T.R., Laidlaw, J., Hascall, V.C. and Dziewiatkowski, D.D.: *The effect of proteoglycans on the formation of fibrils from collagen solutions. Arch. Biochem. Biophys.*, 170:698-709, 1975.
- Oh, S.M., Son, Y.S., Choi, K.S., Lim, J.K. and Chung, M.H.: *Effect of oxygen-derived free radicals on brain microsomal Na⁺-K⁺-ATPase activity. Korean J. Pharmacol.*, 18:1-14, 1982.
- Pryor, W.A.: *Free radical in biology: involvement of radical reactions in aging and carcinogenesis in Medicinal Chemistry V (Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam)*, pp.331-361, 1977.
- Simon, R.H., Scoggin, C.M. and Patterson, D.: *Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. J. Biol. Chem.*, 266:7181-7186, 1981.
- Trush, A.T., Mimnaugh, E.G. and Gram, T.E.: *Activation of pharmacologic agents to radical intermediates: implications for the role of free radicals in drug action and toxicity*, 31:3335-3346, 1982.
- Venkatasubramanian, K. and Joseph, K.T.: *Action of singlet oxygen on collagen. Indian J. Biochem. Biophys.*, 14:217-220, 1977.
- Weissmann, G., Smolen, J.E. and Korchak, H.M.: *Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. New Engl. J. Med.*, 303:27-34, 1980.
- Yoo, S.Y.: *Effect of ginseng saponin on ATPase activity of mitochondria. The Seoul J. Med.*, 12:165-172, 1971.

