

人蔘蛋白質의 放射線 防禦作用

金 春 美 · 韓 圭 宣

梨花女子大學校 藥學大學

(Received September 26, 1985)

Radioprotective Effects of Ginseng Proteins

Choon Mi Kim and Gyu Sun Han

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120, Korea

Abstract—Ginseng proteins were isolated and partially purified to obtain two fractions, namely GI and GII. Radioprotective effects of these fractions were examined on γ -ray irradiated ICR mice by observing 30-day survival rates after irradiation. Also investigated were the effects of GI fraction on the recovery of radiation damage. As the results, the GI fraction showed strong protection against radiation indicated by the increment of 30-day survival rates, while the GII fraction did not. The GI fraction enhanced the recovery of body and splenic weights and increased the amount of DNA in liver significantly. It also helped to recover the damage done on erythrocytes by increasing the number to normal in short period, however, it had no effect on the recovery of leukocyte counts.

방사선이 세포에 미치는 손상을 제거 내지는 감소시킬 수 있는 약물의 개발은 1940년대 유황합유화합물이 방사선에 의한 손상으로부터 생체기관을 보호한다는 사실이 발견된 이후^{1,2)} 꾸준히 지속되어 왔다. cysteine이나 2-mercaptopropylamine과 같은 thiol화합물의 방사선 방어효과가 밝혀짐에 따라 여러가지 aminothiol유도체에 대한 합성과 그 방어작용에 대한 연구가 이루어졌으며 또한 이들 화합물의 작용기전에 대한 연구도 활발하였다.^{3,4,5,6)} 그러나 이런 화합물들 자체가 생체에 불리한 생물학적 효과를 초래함이 밝혀져, 부작용을 유발시키지 않으면서 방사선에 의한 손상만을 제거시켜주는 약물의 개발은 아직도 중요한 과제로 남아있다.

최근 인삼이 방사선 방어효과를 나타낸다는 실험적, 그리고 임상적 연구발표가 있었고,^{7,8)} 특히 Yonezawa등은⁷⁾ 이 작용을 나타내는 물질이 인삼에 다량 함유되어 있는 사포닌이 아니고 Biuret test에 양성이며 UV 280nm에서 최대 흡광도를 나타내는 단백성 물질임을 보고한 바 있어 인삼으로부터 이 활성단백성분을 분리하려는 연구를 시도하게 되었다.

본 논문에서는 이 물질의 순수분리를 시도하는 과정에서 얻은 부분정제물에 대해 방사선 방어효과를 검정할 수 있는 방법을 설립하였기에 보고하고자 한다. 특히 현재 원자력병원에서 암환자의 치료에 사용하고 있는 Co-60 원격치료기에서 방출되는 γ -선에 대한 방어효과를 실험하였으며 동시에 방사선에 의한 손상에 대해 이 물질이 나타내는 회복효과도 관찰하였다.

實驗方法

實驗材料—인삼은 풍기산 적년 백삼을 사용하였다. CM-cellulose, Sephadex G-75, DNA, 해파린 처리된 모세관등은 Sigma chem. Co. 제품을, diphenylamine은 BDH Chem. Ltd. 제품을, 그리고 cellulose dialysis membrane과 EDTA는 Fischer scientific Co.의 제품을 사용하였다. 그 외 사

용된 모든 시약은 일제 특급 및 일급시약이었다.

實驗動物—생후 4주된 ICR계 마우스(암컷)를 대한 실험동물 연구소에서 구입하여 삼양유지의 고형사료와 물을 마음대로 먹도록 하였다. 물은 *pseudomonas bacteria*에 의한 감염을 방지하기 위하여 산성인 물(pH 3 with HCl)을 공급하였다. 동물실의 온도는 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였으며 6주가 되었을 때 실험에 사용하였다.

實驗方法—1) 인삼단백질의 분리 및 정제—인삼단백질은 주로 Yonezawa 등⁹⁾과 Kim 등^{10,11)}의 방법을 적용하여 분리, 정제하였다. 즉 인삼을 분말로 하여 0.05M-Tris-HCl 완충액으로 추출한 후 여기에 황산암모늄을 가하여 70%로 포화, 염석시킨 후, 비등수육상에서 15분간 가열하여 열에 불안정한 물질을 제거하였다. 이 상등액을 농축하여 CM-cellulose 칼람에 주입하고 먼저 0.02 M-KH₂PO₄ 960ml를 통하여 CM-cellulose에 결합되지 않은 물질을 유출시켜 제거하였다(CM-A). 다음 0.05M-KH₂PO₄와 0.05M-phosphate 완충액(pH 7.4), 각각 500ml를 linear gradient로 유출시켜 얻은 분획(CM-B)을 농축하여 Sephadex G-75 칼람 크로마토그라피를 시행하였다. 여기서 두개의 큰 피이크와 한개의 작은 피이크를 얻었으며 각 분획이 함유하는 단백질의 양은 Lowry法에 의해 측정하였다.

2) 방사선 방어작용—위에서 큰 피이크로 나타난 두 분획 G I과 G II를 각각 0.2mg protein/0.2ml 식염수가 되게 하여 마우스의 복강내에 투여하였다. 마우스는 각 군을 20마리로 하여 네 군으로 나누었다. 제 1군은 방사선을 조사하기 24시간 전에 인삼단백질을 투여한 군, 제 2군은 방사선 조사 직후에 인삼단백질을 투여한 군, 제 3군은 방사선 조사 직후에 생리식염수만을 투여한 군, 그리고 제 4군은 생리식염수만을 투여한 군이었다. 방사선은 암치료에 사용되는 Co-60 원격 치료기(Theratron-780)에서 방출되는 γ -선(13.3 Mev., 1.77 Mev.)을 사용하였으며 650 rad(45.6rad/min.)를 전신에 1회 조사하였다. 30일간 각군의 생존율을 관찰하여 그 결과를 Chi-Square test로 검정하였다.

3) 손상 회복—방사선 방어작용을 나타낸 G I 분획에 대하여 그 회복작용을 관찰하기 위하여 3mg protein/0.3ml 식염수를 마우스의 복강내에 투여하였으며 방사선은 400 rad를 전신에 1회 조사하였다. 체중은 매 2일마다 측정하였고, 방사선 조사 후 일정간격으로 척추탈구에 의해 매번 3~5 마리의 마우스를 치사시킨 후 대뇌, 비장, 간등을 적출하여 평량하였다. 또한 이들 장기에서 DNA를 추출하여^{12,13)} 그 양을 Diphenylamine법으로 측정하였으며 방사선 조사 후 일정간격으로 마우스의 안구에서 혈액을 채취하여 적혈구의 수와 백혈구의 수를 Hemacytometer로 측정하였다.^{14,15)}

實驗結果 및 考察

인삼단백질의 분리 및 정제—이 과정에서 시행한 CM-cellulose 칼람크로마토그라피는 Fig. 1과 같은 2개의 피이크를 나타내었으며, 이 중 CM-B는 Lieberman-Burchard반응에서 음성을 나타내어 사포닌을 함유하지 않는 반면, Biuret test에는 양성이었고 UV 276nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. 이 분획을 농축하여 Sephadex G-75 칼람 크로마토그라피를 한 결과는 Fig. 2와 같다. 여기서 얻은 세 분획을 G I, G II, 그리고 G III라 하였다. Lowry법에 의해 단백질 양을 측정한 결과 G I은 4.52%, G II는 0.42%, 그리고 G III는 0.22%가 회수되었다.

방사선 방어작용—인삼분획 G I을 투여한 후의 30일 생존율은 Table I과 같다. 방사선을 조사하지 않은 4군은 전부 생존하였고, 방사선만을 조사한 3군은 전부 사망한데 비하여 G I 분획을 투여한 1군과 2군의 생존율은 각각 45%이었다. 이는 방사선만 조사한 3군과 비교할 때 통계적으

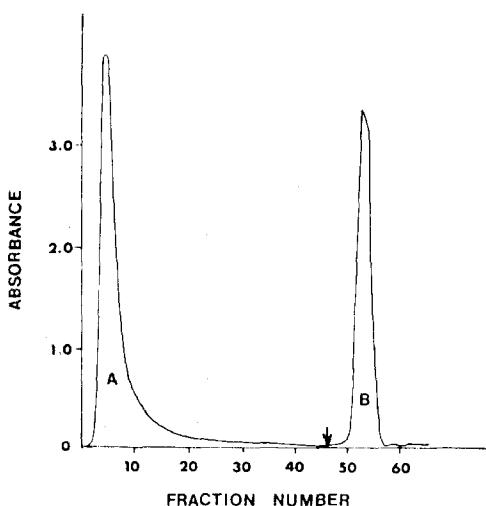


Fig. 1-CM-cellulose column chromatography of ginseng extract. Wavelength: 280nm, Column: 2.5×23cm, Flow rate: 170ml/hr at 4°C,
↓ : starting point of a linear gradient elution with 0.05M KH₂PO₄ and 0.05M-phosphate buffer (pH 7.4).

로 유의성 있는 증가를 나타내고 있다($P<0.05$). 한편 인삼분획 G II를 투여한 후의 결과는 Table II와 같다. 역시 4군은 전부 생존하였다.

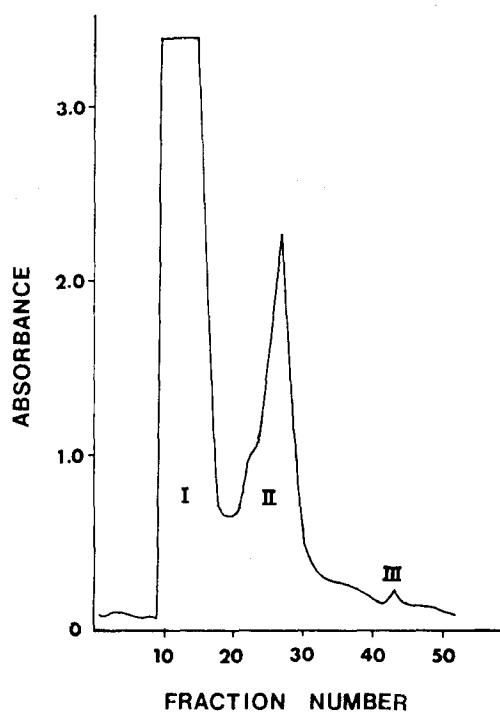


Fig. 2-Gel chromatography of CM-B fraction on Sephadex G-75. Wavelength: 280nm, Column: 2.5×35cm, Flow rate: 15ml/hr.

Table I-Survival rates of irradiated mice injected with GI fraction(0.2mg protein).

Group	Treatment	Injection time	Radiation(rad)	Number of mice	Survival rate(%)
1	GI	24hr before exposure	650	20	45.0*
2	GI	immediately after	650	20	45.0*
3	Saline	immediately after	650	20	0.0
4	Saline	same time as gp. 3	—	20	100.0

* Significantly different from group 3 by $P<0.05$.

Table II-Survival rates of irradiated mice injected with GII fraction(0.2mg protein).

Group	Treatment	Injection time	Radiation(rad)	Number of mice	Survival rate(%)
1	GII	24hr before exposure	650	20	30.0@
2	GII	immediately after	650	20	25.0@
3	Saline	immediately after	650	20	15.0
4	Saline	same time as gp. 3	—	20	100.0

@ Statistically not significant when compared with group 3.

고 방사선만을 조사한 3군은 15%의 생존율을 나타내었으며, G II 분획을 투여한 1군과 2군의 생존율은 각각 30%와 25%이었다. 그러나 이 결과는 방사선만 조사한 3군과 비교할 때 통계적으로 유의성을 나타내지 않았다($p>0.05$). 인삼분획을 방사선을 조사하기 24시간전에 투여한 1군과 조사 직후에 투여한 2군과의 사이에는 30일 생존율에 유의성 있는 차이가 없었다.

손상회복—체중에 대한 실험결과는 Fig. 3과 같다. 방사선을 조사하지 않은 4군의 체중과 비교할 때, 방사선만 조사한 3군의 체중은 하루 만에 현저하게 감소하기 시작하여 6일에는 16%까지 감소하였다. 그리고 곧 회복하는 듯 하였으나 결국 30일까지도 정상을 되찾지 못하였다. 반면, G I 분획을 투여한 1군과 2군은 4일 후에 각각 7%와 12%의 감소로, 3군보다 체중의 감소가 적었으며 또한 곧 회복되기 시작하여 1군은 7일, 2군은 8일에 정상으로 회복되었다.

간, 비장 그리고 대뇌의 무게는 방사선 조사 후 현저히 감소하였는데 그 중 간과 대뇌의 무게 변화에는 인삼분획의 영향이 별로 미치지 못하였으나, 비장의 무게는 Fig. 4와 같이 방사선만 조

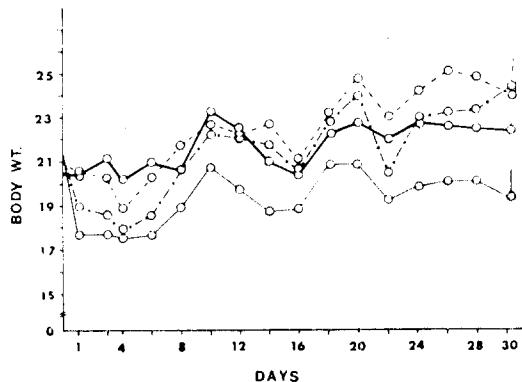


Fig. 3-Body weight (g) of irradiated mice injected with GI fraction (0.3mg protein).

Key: R-G I (24hr. before),
- - - R-G I (1min. after),
— R-Saline, — Saline.

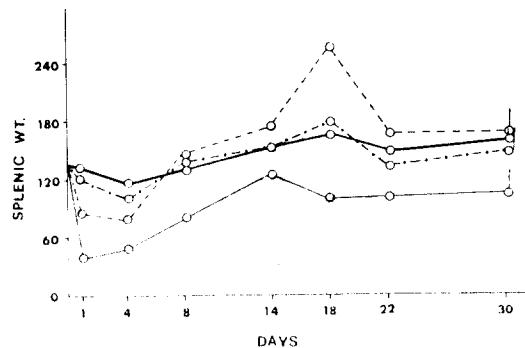


Fig. 4-Splenic weight(mg) of irradiated mice injected with GI fraction (0.3mg protein).

Key: R-G I (24hr. before),
- - - R-G I (1min. after),
— R-Saline, — Saline.

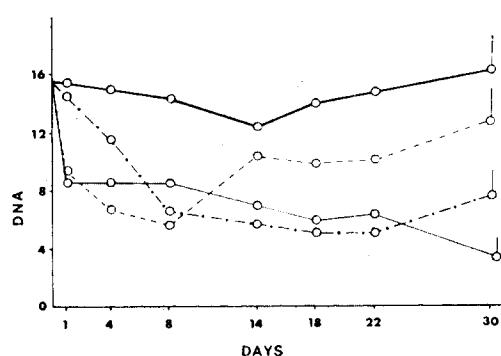


Fig. 5-Liver DNA($\mu\text{g}/\text{ml}$) of irradiated mice injected with GI fraction (0.3mg protein).

Key: R-G I (24hr. before),
- - - R-G I (1min. after),
— R-Saline, — Saline.

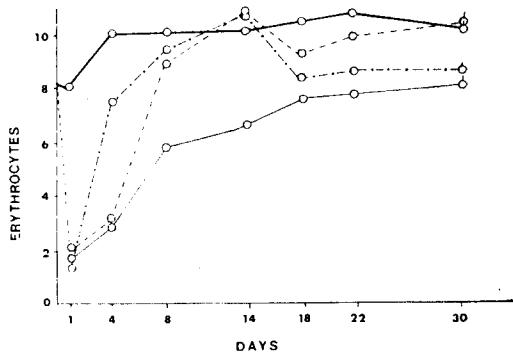


Fig. 6-Erythrocyte counts($\times 10^{12} \text{ cell/l}$) of irradiated mice injected with GI fraction (0.3mg protein).

Key: R-G I (24hr. before),
- - - R-G I (1min. after),
— R-Saline, — Saline.

사한 3군이 하루만에 53%까지 감소한 후 약간의 회복세를 보였으나 끝까지 정상으로 회복되지 못한 반면, 4일후에 GI을 24시간 전에 투여한 1군은 25%까지, 직후에 투여한 2군은 4%까지 감소하였다가 두군 다 7일에 정상으로 회복되었다. 이는 GI분획이 마우스의 조혈기관인 비장의 회복에 기여함을 의미한다고 하겠다.

각 장기의 DNA함유량은 방사선에 의해 급격히 저하되었는데 이는 본 실험에서 사용한 γ -선과 같은 ionizing radiation이 DNA의 합성을 저해하기 때문인 것으로 생각된다. 비장과 대뇌의 DNA함유량의 회복에는 GI분획이 의미있는 효과를 나타내지 못한 반면, 간에서는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 방사선만 조사한 3군이 하루만에 42%까지 감소된 후 계속 저하된 반면, 1군은 8일에 39%까지 저하되었다가 회복하기 시작되었고, 2군은 22일까지 계속 하강하여 36%까지 감소된 후 회복하기 시작하였으나 30일에도 정상에 미치지 못하였다. 여기서 방사선을 조사하기 24시간 전에 GI분획을 투여한 1군이 조사직후에 투여한 2군보다 현저한 회복작용을 나타냄을 알 수 있었다. 적혈구의 수는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 방사선을 조사한 각 군에서 하루 만에 모두 75%이상 감소하였다가 곧 회복하기 시작하여 GI분획을 투여한 1군과 2군은 12일에 정상으로 회복되었다. 그러나 방사선만 조사한 3군은 30일까지도 정상치에 도달하지 못하였다.

백혈구의 수는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 각 군 모두 계속 감소하여 14일에는 25%이상 감소하였다가, 약간 회복하는 듯 하였으나, 결국 30일까지도 정상치에 도달하지 못하였다. 따라서 GI분획이 적혈구의 회복은 촉진시켰으나, 백혈구의 회복에는 영향을 미치지 못하였음을 알 수 있었다. 1981년 Takeda 등¹⁶⁾은 Oura¹⁷⁾의 fraction 3(70% 황산 암모늄 분획)이 X-선을 조사한 ICR마우스의 30일 생존율을 증가시키고 동시에 X-선에 의해 감소되었던 비장의 무게와 DNA양의 회복을 촉진시켰으며, 적혈구와 혈소판 수의 회복도 촉진시켰으나 백혈구 수의 회복에는 아무런 영향이 없었음을 보고하였다. 다음해에 Takeda 등¹⁸⁾은 Oura의 fraction 3을 비등수육상에서 15분간 가열하여 얻은 열에 안정한 분획이 ICR마우스 뿐 아니라 Wistar rats와 Harteley guinea pig에 대해서도 30일 생존율을 증가시킴을 발표하였다. 그리고 마우스에서는 인삼분획에 의해 회복되지 않았던 백혈구 수가 rat와 guinea pig에서는 회복되었음을 보고하고 있다.

방사선은 특히 조혈조직의 세포분열을 저해한다고 한다.¹⁹⁾ 따라서 백혈구의 수가 감소되어 감염에 대한 방어능력이 약화될 뿐 아니라 적혈구 수의 감소로 인하여 빈혈이 초래되며, 또한 혈소판의 합성이 감소됨으로 해서 혈액응고가 저해되어 내출혈을 일으키기도 한다. Yonezawa 등²⁰⁾은 인삼이 골수에서의 조혈기능을 회복시키고 내출혈을 방지한다고 설명하였으며, Oura 등^{21, 22, 23)}은 인삼 추출물이 골수 세포와 적혈구 세포의 有絲分裂을 증가시키고, 또한 혈청 알부민, γ -글로불린, DNA, RNA 및 단백질의 합성을 증가시킨다고 보고하였다. 그리고 Kim과 Lee는¹⁰⁾ 방사선 방어작용을 나타내는 인삼분획이 catalase의 활성을 저해함을 발견하여, 이는 곧 인삼성분이

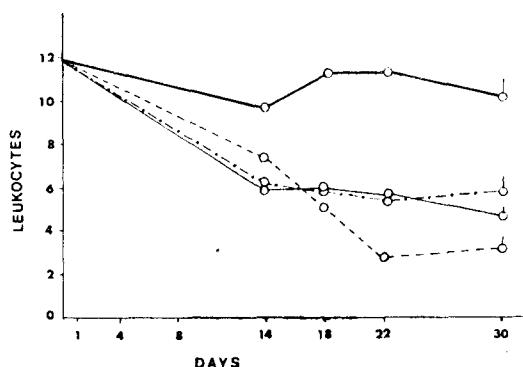


Fig. 7-Leukocyte counts ($\times 10^6$ cell/l) of irradiated mice injected with GI fraction (0.3mg protein).

Key: R-G I (24hr. before),
- - - R-G I (1min. after),
— R-Saline, — Saline.

catalase와 같은 metalloenzyme의 금속과 복합체를 이루기 때문이며, 세포내에서의 이러한 복합체의 형성은 방사선에 의한 효소단백질의 손상을 막아주고 동시에 metalloenzyme의 금속이온에 의해 촉매되는 세포에 불리한 산화반응을 막아줌으로써 그 작용을 나타낸다는 기전을 발표한 바 있다.

따라서 부분정제된 인삼분획 G I은 방사선에 의해 손상된 조혈조직의 기능을 회복시켜 골수조직괴사를 방지하고 DNA나 단백질등의 합성을 촉진시키며, metalloenzyme과 복합체를 이루어 효소를 보호하고 불필요한 산화를 막아주어, 세포의 기능을 정상화시키고, 장에서의 내출혈을 방지하는 등 여러가지 효과가 복합적으로 작용하여 생체를 방사선으로부터 방어하는 것으로 사료된다.

結論

인삼에서 단백질을 분리, 정제하여 얻은 분획중 G I과 G II에 대하여 γ -선에 대한 방어작용을 검사하였다. 그 결과 방사선만을 조사한 군의 30일 생존율이 0%인데 비하여 G I 분획 투여군은 45%의 생존율을 나타내었으므로 G I 분획이 방사선 방어작용을 나타냄을 확인하였다. 한편 G II 분획 투여군은 각각 30%와 25%의 30일 생존율을 나타내었으나 방사선만 조사한 군이 15%의 생존율을 나타내어 그 차이에 유의성이 없으므로 G II 분획은 방사선 방어작용이 없는 것으로 판명되었다.

G I 분획이 방사선에 의한 손상을 회복시키는 효과를 측정한 결과, 감소된 체중의 회복이 촉진됨을 발견하였고, 비장의 무게도 회복되었으며, 간에서는 DNA양의 회복을 촉진시켰다. 또한 적혈구의 수도 G I 분획에 의해 빠른 회복을 보였으며, 반면 백혈구 수의 감소는 회복시키지 못함을 발견하였다.

이는 G I 분획에 함유된 인삼성분이 방사선에 의해 손상된 세포의 기능을 정상화시키는데 중요한 역할을 담당함을 의미하며, 백혈구에 대한 영향은 좀 더 연구되어야 할 과제라고 생각된다.

文獻

- W.M. Dale, L.H. Gray and W.J. Meredith, The inactivation of an enzyme by x- and γ -radiation. *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. A* 242, 33 (1949).
- R. Latarjet and E. Ephrati, Protective action of certain substances against inactivation of a bacteriophage by x-rays. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 142, 497 (1948).
- L. Eldjarn and A. Pihl, The mode of action of x-ray protective agents. *J. Biol. Chem.* 225, 499 (1957).
- G.G. Jayson, T.C. Owen and A.C. Wilbraham, The radiation chemistry of cystamine sulfate. *J. Chem. Soc. B* 944 (1969).
- W.O. Foye and M.C.M. Solis, Inhibition of catalase and lactate dehydrogenase by radiation protective thiols and thiol derivatives. *J. Pharm. Sci.* 58, 352 (1969).
- Z.M. Bacq, Chemical protection against ionizing radiations in mammals. *Bull. Acad. Roy. Med. Belg.* 6, 115 (1966).
- M. Yonezawa, Restoration of radiation injury by intraperitoneal injection of ginseng extract in mice. *J. Radiat. Res.* 17, 111 (1976).
- Y.S. Chang, C.I. Park and H.I. Noh, The effect of *Panax ginseng* on the postoperative radiation complication in cervical cancer patients. *Proc. 3rd Inter. Ginseng Symp.* pp 197 (1980).
- M. Yonezawa, N. Katoh and A. Takeda, Restoration of radiation injury by ginseng. II. Some properties of the radioprotective substances. *J. Rad. Res.* 22, 336 (1981).
- C. Kim and S.J. Lee, Metal-binding abilities of radioprotective ginseng components. *J. Kor. Res. Inst. Better Living* 31, 169 (1983).

11. C. Kim, SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis on partially purified ginseng proteins. *Yakhak Hoeji* 27, 315 (1983).
12. G. Schmidt and S.T. Thanhauser, *J. Biol.* 161, 83 (1945).
13. W.C. Schneider, *J. Biol. Chem.* 164, 747 (1946).
14. M.B. Waynforth, *Experimental and surgical technique in the rat*, Academic Press, pp 232.
15. B. Barbara, S. Mischell and M. Shiigi, *Selected methods in cellular immunology*, Freeman, pp 14.
16. A. Takeda, M. Yonezawa and N. Katoh, Restoration of radiation injury by ginseng. I. Responses of x-irradiated mice to ginseng extract. *J. Radiat. Res.* 22, 323 (1981).
17. H. Oura, S. Hiai, Y. Odaka and T. Yokozawa, Studies on the biochemical action of ginseng saponin. *J. Biochem.* 77, 1057 (1975).
18. A. Takeda, N. Katoh and M. Yonezawa, Restoration of radiation injury by ginseng. III. Radioprotective effect of thermostable fraction of ginseng extract on mice, rats and guinea pigs. *J. Radiat. Res.* 23, 150 (1982).
19. L.G. Lajtha, *Current topics in radiation research*, Vol. 1, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp 141 (1965).
20. M. Yonezawa, A. Takeda and N. Katoh, Restoration of radiation injury by ginseng extract. *Proc. 4th Inter. Ginseng Symp.* pp 133 (1984).
21. H. Oura, S. Nakashima, K. Tsukuda and Y. Ohta, Effect of *radix ginseng* extract on serum protein synthesis. *Chem. Pharm. Bull.* 20, 980 (1970).
22. H. Oura, K. Tsukada and H. Nakagawa, Effect of *radix ginseng* extract on cytoplasmic polysome in rat liver. *Chem. Pharm. Bull.* 20, 219 (1972).
23. H. Oura, S. Hiai, S. Nakashima and K. Tsukada, Stimulating effect of the roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer on the incorporation of labeled precursors into rat liver RNA. *Chem. Pharm. Bull.* 19, 453 (1971).