

## 항방사선 인삼분획의 butanol 추출물과 수용성 성분이 세포 생존율에 미치는 영향

김춘미 · 최향옥  
이화여자대학교 약학대학  
(1991년 9월 20일 접수)

### Effects of Butanol Extract and Water-Soluble Constituent of Radioprotective Ginseng Fraction on Cell Survival

Choonmi Kim and Hyang-Ok Choi

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea  
(Received September 20, 1991)

**Abstract** □ Radiation protective fraction was isolated and partially purified from Korean white ginseng. The effect of the fraction was studied on the cell survival of UV-damaged CHO-K1 cells. As a result, it was found that the fraction increased the survival rate of damaged cells significantly within the dose range of which cytotoxicity did not appear. This fraction was separated into two parts by adding butanol, namely the precipitated protein component and the butanol extract. Damaged cells were treated with each of these components and their survival rates were measured. The protein component demonstrated significant increase in the survival rates, while the butanol extract showed no such increment. These results suggest that the radiation protective effect of the ginseng fraction is originated from the butanol-precipitated protein component, not from the butanol-soluble compounds.

**Keywords** □ radiation protective ginseng fraction, cell survival, UV-damage, butanol extract, protein component.

### 서 론

1980년대 초, Yonezawa<sup>1,2)</sup>와 Takeda 등<sup>3,4)</sup>에 의해 인삼에 방사선 방어작용을 가진 물질이 존재함이 발표되었으며, 그 활성분획의 주성분은 단백질임이 제시되었다. 그 후 Kim과 Han<sup>5)</sup>은 인삼에서 추출하여 부분 정제한 단백질 분획을  $\gamma$ -선을 조사한 ICR 마우스에 투여하여 현저한 생존율 증가를 관찰함으로써, 이 분획의 방사선 방어작용을 확인하였다. 이 분획이 자외선이나 methylmethane sulfonate에 의해 유도된 고빈도의 자매염색분체 교환(sister chromatid ex-

change)과 염색체 이상(chromosome aberration)을 유의적으로 감소시킴이 보고되었으며,<sup>6-8)</sup> 이는 이 성분이 자외선이나 돌연변이원에 의해 세포에 유발되는 손상을 감소시키거나 또는 손상된 세포의 회복을 촉진시킴으로써 그 작용을 나타내는 것으로 설명되었다.

이 활성분획의 성분을 규명하기 위한 연구에서 이 분획에 함유된 단백질들의 분자량이 polyacrylamide gel electrophoresis<sup>9)</sup>와 HPLC<sup>10)</sup>에 의해 추정되었으며, 함유된 성분을 분리하여 항방사선 작용이 있는 순수물질을 밝히기 위한 연구가 계속되고 있다. 이 과정에서 이 분획이 나타내는 방사선 방어작용이 이 분획의 주성분인 단백질에 의한 것이 아니고, 혼재

본 연구는 1990년도 이화여자대학교 교수연구기금 연구비 지원에 의한 것임

되어 있을 수도 있는 캐놀성 물질의 항산화 작용에 기인된 것일 수도 있다는 의문이 제기되었다. 인삼에는 약 10종의 phenolic acid가 함유되어 있는 것으로 보고되었으며,<sup>11)</sup> 이 중에는 항산화 효과를 가진 salicylic acid, vanillic acid, p-hydroxy-cinnamic acid 등이 있다. 방사선 방어작용을 나타내는 인삼분획에 만약 이러한 물질들이 함유되어 있다면 이들은 butanol에 의해 추출될 것이므로, 본 연구에서는 butanol을 사용하여 활성분획 중에서 단백질성과 butanol 가용성분을 분리한 후, 각 성분의 자외선에 의해 손상된 세포에 대한 생존율을 측정하였다. 방사선 방어작용이 있는 성분이 손상된 세포의 생존율을 증가시킨다면, 활성분획에서 분리된 두 성분 중 손상된 세포의 생존율을 증가시키는 성분이 이 작용의 원인이 되는 성분일 것이므로 이를 밝히고자 시도하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

인삼은 한국산 6년근 백삼을 사용하였으며, CM-cellulose, Sephadex G-75, N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES) 및 Giemsa stain은 Sigma Chem. Co.에서 구입하였다. 한편 Eagle's minimum essential medium(EMEM), Fetal bovine serum(FBS), Trypsin-EDTA, Dulbecco's phosphate buffered saline(PBS), Penicillin-streptomycin 용액 및 Colcemid는 Gibco Inc.의 제품을 사용하였다.

### 2. 실험방법

**인삼 단백질분획의 분리 및 정제** : 이 과정은 Kim과 Hwang<sup>9)</sup>의 방법을 적용하여 시행하였으며 방사선 방어작용을 나타내는 분획(GI)의 단백질 양은 Lowry법<sup>12)</sup>으로 정량하였다.

**단백질성과 butanol 추출물의 분리**<sup>13)</sup> : GI 용액에 butanol을 가하면서 이 분획에 함유되어 있는 단백질을 침전시켰다. 이때 단백질의 변성을 방지하기 위하여 실험에 사용한 모든 액은 0°C로 차게 하였으며, butanol을 가하는 동안 온도가 상승하는 것을 막기 위하여 얼음용기에 dry ice를 가하면서 0°C 이하에서 조작하였다. Butanol을 가하고 약 20분간 방치한 후 5000g로 15분간, 0°C에서 원심분리하였으며, 생성된 단백질 침전은 증류수에 녹여 소량 남아 있을 수 있는

butanol을 제거하기 위해 freeze dry하였으며, 단백질의 수화물을 다시 증류수에 녹여 생존율 실험에 사용하였다. 이 때 사용한 단백질의 양은 GI 분획의 경우와 동일한 양이었다. 한편 상등액에는 butanol을 첨가하여 수회 추출하였으며, butanol층을 모아 여기서 butanol을 제거한 다음 잔사를 물에 녹여 생존율 측정실험에 사용하였다. 여기서 세포에 처리한 양은 위의 실험에서 사용한 단백질의 양에 상당하는 양으로 하였다.

**세포 배양** : 본 실험에 사용한 세포는 Adult Chinese Hamster의 ovary 생검에서 유래된 CHO cell line의 subclone인 CHO-K1이었다. 배양액은 EMEM과 10% FBS 그리고 항생제를 함유하였으며, 세포의 지수함수적 성장을 유지하기 위하여 일정간격으로 계대배양하였다.

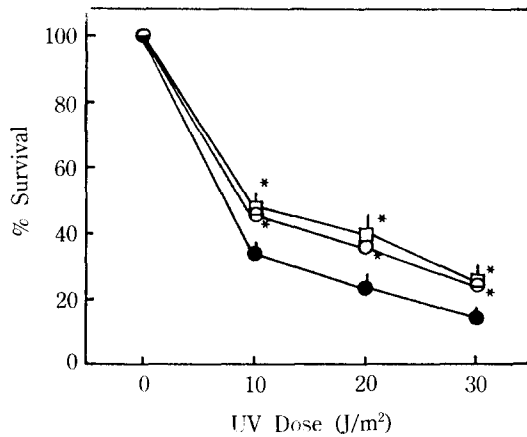
**세포에 대한 인삼성분의 처리** : 먼저 GI 분획의 경우, 지수함수적 성장상태에 있는  $2-3 \times 10^4$  cells/ml을 24-well plate에 심고 24시간 배양한 후, 전처리된 경우에는 GI 분획을 함유하는 배양액을, 후처리의 경우에는 일반 배양액을 가하고 다시 24시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 PBS로 수회 세척한 후 자외선을 조사하였으며, 전처리 군에는 일반 배양액을, 후처리 군에는 GI 분획 함유 배양액을 가하여 배양하였다.

위의 실험을 통하여 전처리 군에서 더 뚜렷한 결과가 나타남을 발견하였으므로, 분리한 두 성분에 대해서는 전처리만 시행하였다. 처리방법은 GI 분획의 경우와 동일하였다.

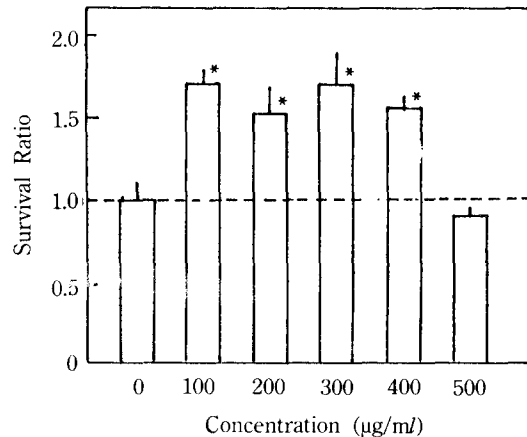
**세포 생존율 측정** : Trypan-blue dye exclusion method<sup>14)</sup>를 적용하여 측정하였으며, 인삼성분을 처리한 군과 대조군의 결과를 비교하였다. 즉 24-well plate에서 배양중인 세포를 trypsin-EDTA로 처리하여 얻은 다음, 이 일정량에 동량의 0.4% trypan blue 용액을 가하여 약 2분간 방치한 후 연색되지 않은 살아있는 세포의 수를 Hemacytometer로 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

## 결과 및 고찰

이미 보고된 바와 같이,<sup>6,15)</sup> 인삼 단백질분획의 분리 과정 중 마지막 단계에서 얻은 두 분획을 GI 및 GII라 명명하였으며, 이 중 GI 분획에서 방사선 방어작용이



**Fig. 1.** Survival rates of CHO-K1 cells irradiated with UV light.  
 ●—●; Control, □—□; Cells treated with GI fraction (300 µg/ml protein) before UV irradiation, ○—○; cells treated with GI fraction (300 µg/ml protein) after UV irradiation.  
 \*statistically significant  $p < 0.01$



**Fig. 2.** Survival ratio of CHO-K1 cells treated with GI fraction.  
 Increasing concentrations of GI protein were treated to cells before UV irradiation at the dose of 20 J/m<sup>2</sup>.  
 \*statistically significant ( $p < 0.01$ )

나타났으므로 이 분획을 사용하여 다음 단계의 실험을 시행하였다.

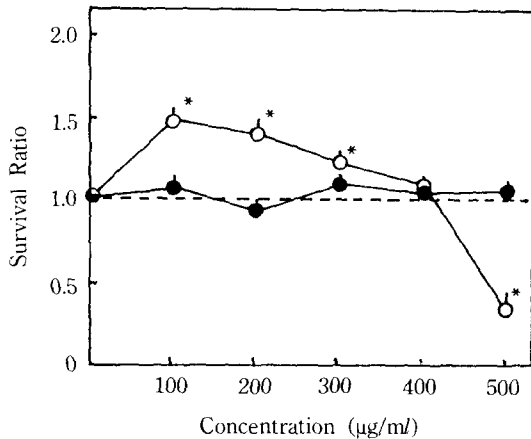
GI 분획 일정량(단백질 300 µg/ml 함유)을 세포에 처리하였을 때 나타나는 생존율 변화를 측정할 결과는 그림 1과 같다. 즉 자외선 용량을 증가시키에 따라 생존율은 점점 감소하였으나, 이 때 GI 분획을 처리한 군의 생존율이 대조군보다 현저히 크게 나타남을 알 수 있었다( $p < 0.01$ ). 이러한 결과는 인삼분획의 방사선 방어작용이 손상된 세포의 생존율 증가로 나타남을 제시하고 있다. 여기서 GI 분획을 자외선을 조사하기 전에 처리한 군(전처리 군)에서 후처리 군에 비해 생존율 증가 효과가 더 크게 나타났으며, 20 J/m<sup>2</sup>의 자외선 용량에서 그 효과가 가장 컸으므로, 이 후의 연구에서는 자외선 20 J/m<sup>2</sup>을 조사한 전처리 군에 대한 실험만 시행하였다.

GI 분획의 양을 증가시켜가면서 전처리한 후, 20 J/m<sup>2</sup>의 자외선을 조사한 세포의 생존율을 측정할 결과(그림 2), 400 µg/ml까지의 용량에서는 그 생존율이 대조군보다 유의적으로 크게 나타나, 방어작용이 있는 인삼 분획이 자외선에 의해 손상된 세포의 생존율을 증가시킬 수 있었다. 그러나 500 µg/ml의 용량에서는 오히려 그 생존율이 감소하였으며, 이는 이 용량이 세포에 대해 독성을 나타내기 때문인 것

으로 생각된다.

GI 분획에 butanol을 가하여 분리한 단백질분과 butanol 추출물을 각각 세포에 처리하고 20 J/m<sup>2</sup>의 자외선을 조사한 다음 그 생존율을 측정할 결과는 그림 3과 같다. 여기서 단백질을 처리하였을 때에는 용량이 증가함에 따라 자외선에 의해 손상된 세포의 생존율이 증가하다가 세포독성이 나타나는 용량에서 감소하는 것을 볼 수 있는 반면, butanol 추출물을 처리하였을 때에는 용량과 관계없이 그 생존율이 대조군과 같은 수준에서 나타남을 알 수 있었다. 즉 GI 분획이 나타내는 생존율 증가는 그 분획에 함유되어 있는 단백질, 즉 butanol에 침전하는 성분에 기인하는 것이며 butanol에 추출되는 성분에 의한 것이 아님을 발견하였다.

이로써 GI 분획이 갖는 방사선 방어작용이 그 분획에 혼재되어 있을 수도 있다는 의문이 제기된 butanol 추출물 물질에 기인하는 것이 아님을 확인할 수 있었다. 특히 butanol 추출물에서 TLC법을 이용하여 phenolic 항산화제의 존재를 확인하고자 시도하였으나 전혀 검출되지 않아, GI 분획에는 인삼에 존재하는 것으로 보고된 항산화제가 함유되어 있지 않거나, 또는 검출할 수 없을 정도의 극미량이 존재하여 그 분획의 항방사선 작용에는 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다.



**Fig. 3.** Dose response of CHO-K1 cells to protein component or butanol extract.

Increasing concentrations of protein or butanol extract corresponding to the amount of protein designated were treated to cells before UV irradiation at the dose of  $20 \text{ J/m}^2$ . Here, ○—○; protein component, ●—●; butanol extract.

\*statistically significant ( $p < 0.01$ )

자외선에 의해 손상된 세포의 생존율 증가를 나타내며 본 실험에서 butanol에 침전된 단백질함유 성분은 단일 성분이 아닐 가능성이 크므로, 이들 성분을 분리하여 순수 활성성분을 얻기위한 연구가 계속되고 있으며 또한 이 성분이 나타내는 방어작용의 기전을 규명하기 위한 연구도 아울러 진행되고 있다.

### 요 약

인삼에서 방사선 방어작용이 있는 분획을 분리, 정제하여 자외선에 의해 손상된 세포의 생존율에 미치는 영향을 연구하였다. 그 결과, 이 분획이 세포독성을 나타내지 않는 용량범위내에서 손상된 세포의 생존율을 현저히 증가시킴을 발견하였다. 또한 이 분획에 butanol을 가하여 침전하는 단백질성분과 추출되는 가용성분을 분리한 후, 각각을 손상된 세포에 처리한 결과, 단백질성분은 생존율을 증가시키는 반면,

butanol 추출물은 생존율을 증가시키지 못하고 대조군과 같은 수준을 나타냄을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 인삼에서 나타나는 방사선 방어작용은 butanol에 의해 침전되는 단백질성분에 기인하는 것이며, butanol 추출물에 기인하는 것이 아님을 확인하였다.

### 인용문헌

1. Yonezawa, M., Takeda, A. and Katoh, N.: *Proc 3rd Inter Ginseng Symp.* p. 17 (1980).
2. Yonezawa, M., Takeda, A. and Katoh, N.: *J. Radiat. Res.* **22**, 336 (1981).
3. Takeda, A., Yonezawa, M. and Katoh, N.: *J. Radiat. Res.* **22**, 323 (1981).
4. Takeda, A., Katoh, N. and Yonezawa, M.: *J. Radiat. Res.* **23**, 150 (1982).
5. Kim, C. and Han, G.S.: *Yakhak Hoeji* **29**, 246 (1985).
6. Kim, C. and Choi, J.E.: *Arch. Pharm. Res.* **11**(2), 93 (1988).
7. Kim, C. and Park, H.S.: *Korean Biochem. J.* **21**(4), 525 (1988).
8. Kim, C. and Park, S.Y.: *Arch. Pharm. Res.* **11**(3), 225 (1988).
9. Kim, C. and Hwang, J.J.: *Yakhak Hoeji* **30**, 343 (1986).
10. Kim, C. and Kim, H.L.: *Arch. Pharm. Res.* **9**(1), 5 (1986).
11. Park, C.W. and Lee, S.H.: *Proc. Inter. Symp. Korean Ginseng* P. 27 (1990).
12. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
13. Deutcher, M.P., Ed.: *Methods in Enzymology* Vol. **182**, Guide to Protein Purification, Academic Press, New York, p. 296 (1990).
14. Kaltenbach, J.P., Kaltenbach, M.H. and Lyons, W.B.: *Exp. Cell Res.* **15**, 112 (1958).
15. Kim, C. and Yoon, S.R.: *Yakhak Hoeji* **32**(5), 11 (1988).