

## 항 방사선 인삼단백분획의 DNA수복능력 증진효과

김춘미\* · 최미경

이화여자대학교 약학대학

(Received August 21, 1992)

### DNA Repair Enhancement by Radioprotective Ginseng Protein Fraction

Choonmi Kim\* and Mi Kyung Choi

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

**Abstract**—The effect of radioprotective ginseng protein fraction on DNA repair capacity was determined by measuring the amount of <sup>3</sup>H-thymidine incorporated into DNA in the process of repair synthesis for UV damaged DNA. CHO-K1 cells were prepared whose semiconservative replication was inhibited by trimethylpsoralen plus near-UV(PUVA) treatment. When the cells were exposed to UV light alone, the DNA repair capacity was increased at first and then decreased as UV dose increased. However, when the ginseng fraction was treated to the cells, the DNA repair capacity was kept increasing regardless of UV dose increment. When the concentration of protein contained in the added fraction was increased gradually, the repair capacity was also increased almost linearly showing dose-response relationship of the effect. These results suggest that the enhancement of DNA repair capacity of the cell can be one of the mechanisms of radioprotection by the ginseng fraction.

**Keywords** □ Radioprotective ginseng fraction, DNA repair capacity, PUVA treatment, <sup>3</sup>H-thymidine incorporation, UV light, DNA damage.

자외선 및 이온화 방사선은 DNA에 강하게 흡수되어 그 분자상에 손상을 초래하며, 특히 자외선에 의한 손상의 대부분은 DNA의 2개의 인접한 pyrimidine 염기 사이에 이중 결합을 형성하여 cyclobutane pyrimidine dimer를 생성함으로써 base modification를 초래하는 것이다.<sup>1,2)</sup> 그러나 이러한 DNA상의 손상은 보통 세포내에 존재하는 다양한 수복기전(repair mechanism)에 의해 수복과정을 거치게 되며, 이 과정에서 완전히 회복되지 못하거나 또는 잘못 수복되어 손상이 남아있는 DNA는 자매염색분체 교환(sister chromatid exchange, SCE)이나 염색체 이상(ch-

romosome aberration, CA)을 유발하게 된다고 한다.<sup>3-6)</sup>

방사선 방어작용을 나타내는 인삼분획이 자외선에 의해 유발된 높은 빈도의 SCE<sup>7)</sup>나 CA<sup>8)</sup>를 유의성있게 감소시킨다는 보고는 이 성분이 자외선에 의해 생긴 DNA의 손상이 회복되는 과정에 작용하여 그 회복을 촉진시킴으로써, 손상된 채 남아있는 DNA의 양을 감소시켜 결과적으로 SCE나 CA의 빈도를 줄이기 때문이라고 가정할 수 있다. 그러나 지금까지의 실험 결과에는 이 성분이 DNA 수복과정에 작용한다는 직접적인 증거가 없어, 본 연구에서는 배양중인 CHO-K1 세포에 자외선을 조사하여 DNA에 손상을 유발시킨 후 인삼분획을 처리하고 DNA 수복능력(repair capacity)을 측정하여<sup>9-13)</sup> 이 분획이 DNA 수복과정에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

**실험방법**

**재료 및 시약**—인삼 단백분획의 분리와 정제를 위해서는 6년근 백삼을 사용하였으며, CM-cellulose cation exchanger 및 Sephadex G-75는 Sigma Chem. Co.의 제품을 사용하였다. Dialysis membrane은 Union Carbide Co.의 제품을 구입하였고, Folin Ciocalteus Phenol reagent와 ammonium sulfate는 Shinyo Pure Chemicals Co. 제품을 사용하였다. DNA 수복능력 측정을 위해서는 Gibco Inc.의 Eagle's minimum essential medium(EMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS) 및 penicillin-streptomycin(penicillin base 5000 u/ml 및 streptomycin base 5000 mcg/ml) solution을 사용하였고, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES)와 trioxalene은 Sigma Co. 제품이였다. [Methyl-<sup>3</sup>H]thymidine, [2-<sup>14</sup>C]thymidine 및 Scint A (cocktail solution)는 Amersham International plc.에서 구입하였다.

**인삼 단백질의 분리 및 정제**—인삼분말을 사용하여 0.05 M-Tris-HCl 완충액(pH 7.6)에 의한 추출, 70%-황산암모늄 분별침전, CM-cellulose 칼람크로마토그래피, 열 불활성화 및 Sephadex-G-75 칼람크로마토그래피의 순으로 정제하였다.<sup>14)</sup>

**DNA 수복능력 측정**—본 실험에서 사용한 세포는 CHO cell line의 subclone인 CHO-K1으로서, 96-well plate를 사용하여 10% FBS와 항생제를 함유하는 EMEM을 배양액으로하여 37°C, humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. Fig. 1과 같이, 먼저 지수함수적 성장상태에 있는 세포에 0.01 µCi의 <sup>14</sup>C-thymidine을 함유하는 배양액을 가하여 24시간 배양함으로써 각 well에 존재하는 세포 수를 확인하였다. 여기에 2×10<sup>-5</sup> M trimethylpsoralen을 함유하는 D-PBS를 가하여 배양한 후 near UV light(300~400 nm)을 조사(PUVA 처리)하여 DNA의 정상적인 반보존적 복제를 저해하였다. 이 세포에 인삼분획을 먼저 처리하고 자외선(254 nm)을 조사하여 DNA에 손상을 유발시킨 전처리군과, 자외선을 먼저 조사하고 인삼분획을 가한 후처리군으로 나누어 실험하였으며, 전처리군의 경우에는 자외선 조사 후에 <sup>3</sup>H-thymidine을 가한 A군과 <sup>3</sup>H-thymidine을 가한 후 자외선을 조사한 B군으로 나누어 그 차이를 관찰하였다. 또 방사선

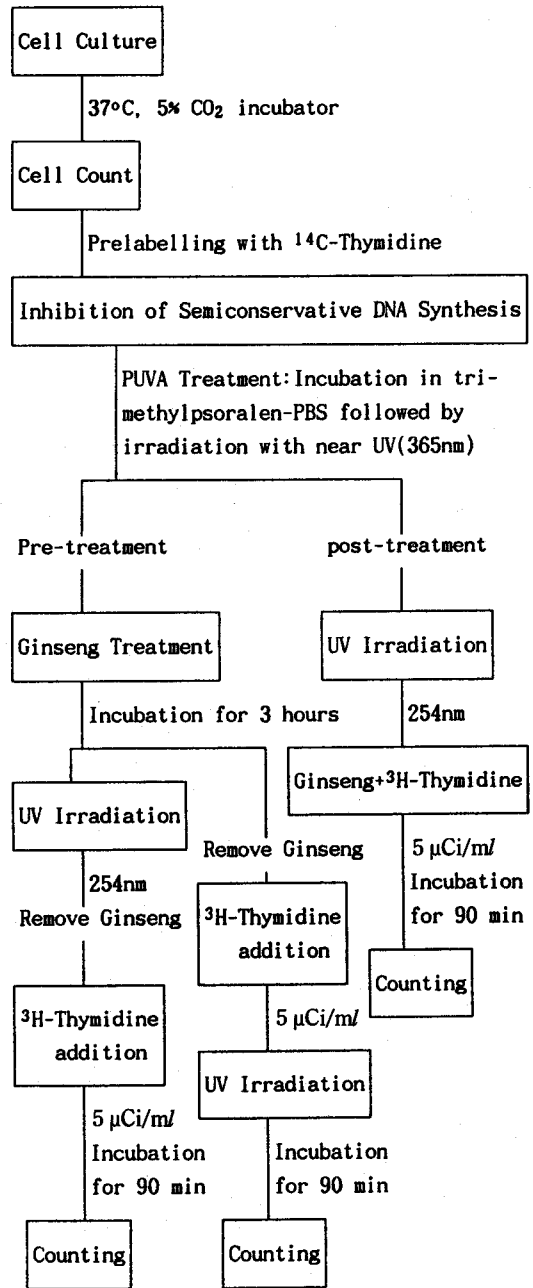
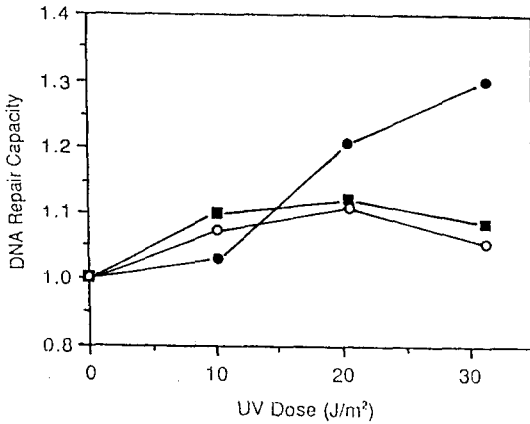


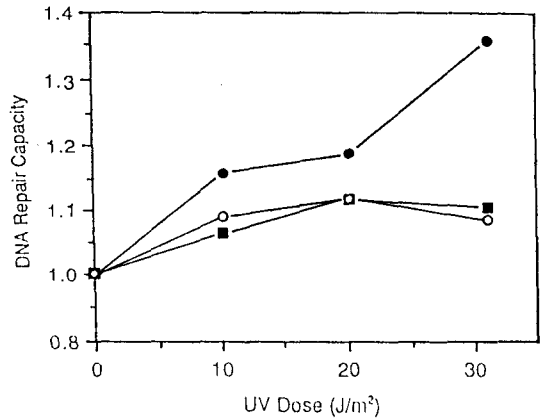
Fig. 1. Procedures for the determination of DNA repair capacity.

방어물질인 인삼분획이 단백질을 함유하고 있기 때문에 이와 비교하기 위하여 단백질인 우혈청 알부민을 같은 조건하에서 처리하여 그 효과를 측정하였다.

자외선에 의해 손상된 DNA를 회복시키기위해 DNA 합성이 일어날 때 결합되는 <sup>3</sup>H-thymidine의



**Fig. 2.** Effect of ginseng protein fraction or BSA on DNA repair synthesis in UV irradiated, pre-treated CHO-K1 cells (A group). Modifiers at the dose of 500 µg/ml were added to the cells 3hrs prior to exposure and <sup>3</sup>H-thymidine was absent during exposure to UV light.  
○ control, ● ginseng, ■ BSA



**Fig. 3.** DNA repair capacity in UV irradiated CHO-K1 cells, pre-treated with 500 µg/ml of ginseng protein or BSA (B group). Modifiers were added to the cells 3hrs prior to exposure and UV light was irradiated in the presence of <sup>3</sup>H-thymidine.  
○ control, ● ginseng, ■ BSA

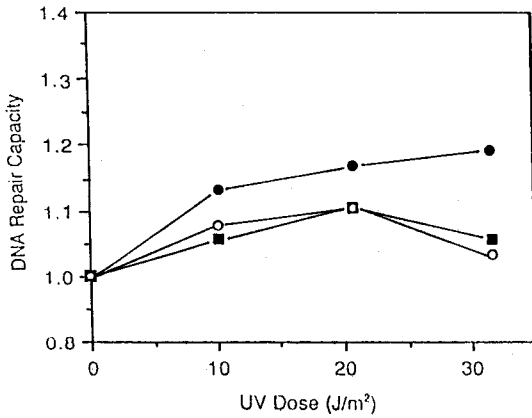
양을 측정하기 위하여, 각 well의 세포를 cell harvester(Nunclon Co.)로 여과하여 얻은 후, Liquid Scintillation Counter(Bechman, model LS-6000)를 사용하여 <sup>14</sup>C와 <sup>3</sup>H의 양을 측정하였다. 한 plate에 3 well씩 3회의 실험을 실시하여 그 결과를 종합한 후 평균을 취하였으며, 이 때 <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C의 비율을 구하여 실험시 각 well에 실재한 세포 수의 차이에 기인하는 오차를 제거하였다. DNA 수복능력 지수(DNA repair capacity number)는 각 용량에서의 <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C의 비율을 control의 비율로 나눔으로써 구하였다.

**실험결과**

**인삼 단백질분획의 정제 및 정량**—다섯 단계의 정제 과정을 거쳐 얻은 분획 중 γ-선을 조사한 마우스에서 현저한 생존율 증가를 나타내는 분획(GI)을 얻었으며, <sup>15)</sup> 이 분획에 함유되어 있는 단백질의 상대적 수득률은 crude extract의 약 2%이었다. 위의 정제 과정을 반복하여 다음 실험을 위한 충분한 양을 확보하였다.

**DNA 수복능력**—PUVA 처리를 하여 정상적인 DNA의 반보존적 복제를 저해시킨 CHO-K1 세포에 인삼을 처리한 후 DNA에 손상을 유발시킨 전처리군의 경우에 있어서, 자외선 조사시 <sup>3</sup>H-thymidine이

존재하지 않은 A군의 DNA 수복능력은 Fig.2와 같았다. 즉 자외선에 의해 손상된 DNA의 수복능력은 처음에는 증가하다가 자외선의 용량이 커짐에 따라 감소하는 양상을 나타내었다. 이는 세포에 손상이 유발됨에 따라 세포 자체의 수복능력이 증가하게 되나, 어느 한계 이상에서는 고유의 수복능력이 포화되거나 파괴되기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 배양 중인 세포에 방사선 방어작용이 있는 인삼 단백질분획(단백질 500 µg/ml)을 처리했을 때에는 자외선 용량이 한계 이상으로 증가했을 때에도 DNA 수복능력이 감소되지 않고 계속 증가함을 발견하였다. 이러한 인삼 단백질분획의 영향이 이 분획 중에 함유되어 있는 단백질성분에 기인하는 것일 수도 있다는 전제하에서 이런 결과가 다른 단백질에서도 나타나지 않을지 확인하기 위하여 같은 조건하에서 인삼분획 대신 우혈청 알부민(BSA)을 가하여 그 영향을 관찰하였다. 그러나 손상된 세포의 DNA 수복능력에는 아무런 변화가 나타나지 않았다. 따라서 인삼 단백질분획의 DNA 수복능력 증진효과는 다른 단백질에 의해서도 일반적으로 나타나는 효과는 아님을 알 수 있었다. 또한 이 결과는 인삼 단백질분획이 나타내는 이 효과가 이 분획이 함유하고 있는 단백질성분의 특수성에 기인하는 것이거나, 아니면 이 분획이 함유

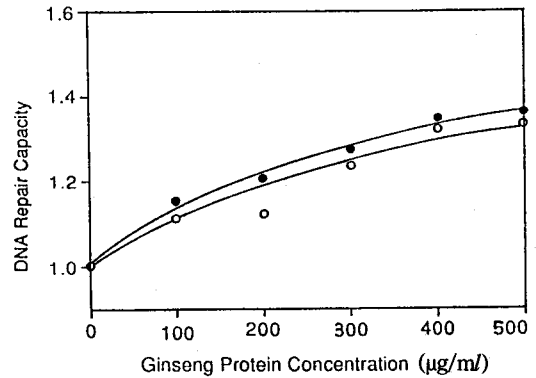


**Fig. 4.** Effect of post-treated ginseng protein fraction or BSA on DNA repair synthesis in UV irradiated CHO-K1 cells. Modifiers (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and  $^3\text{H}$ -thymidine were added to irradiated cells immediately after exposure to UV light.  
○ control, ● ginseng, ■ BSA

하고 있을 수 있는 어떤 다른 성분에 의한 것일 가능성도 있음을 제시한다.

$^3\text{H}$ -thymidine의 존재하에서 자외선을 조사한 B군의 경우에는, A군과 비슷한 양상을 나타내었으나(Fig. 3), 수복능력 지수가 A보다 약간 크게 나타남을 발견하였다. 이 결과는 자외선을 조사하여 DNA에 손상을 유발시킬 때  $^3\text{H}$ -thymidine이 존재하면 자외선을 조사하는 동안에 일어나는 손상 수복과, 자외선 조사 직후부터  $^3\text{H}$ -thymidine 함유배양액으로 바뀌줄 때까지의 동안에 일어나는 수복이 합해지기 때문인 것으로 해석될 수 있다. 이 경우에 있어서도 대조군과 비교군에서 자외선 용량이 증가함에 따라 그 수복능력이 증가하다가 고용량에서 감소했음에 비하여 인삼 단백질분획을 처리한 경우에는 그 수복능력이 계속 증가함을 나타내어, 이 분획의 DNA 수복능력 강화효과를 확인할 수 있었다.

PUVA 처리를 한 세포에 자외선을 조사하여 손상을 유발시킨 후, 인삼과  $^3\text{H}$ -thymidine을 함유하는 배양액을 가하여 배양한 후처리군의 경우에도, Fig. 4와 같이, 인삼분획의 처리는 DNA 수복능력의 증가를 초래하였다. 여기서 전처리군과 비교하면 후처리군에서 수복능력 지수가 약간 낮게 나타남을 알 수 있었다. 만약 전처리군에서 인삼의 존재가 자외선에 의한 손상으로부터 세포를 보호한다면 수복시켜야 할 DNA



**Fig. 5.** Dose-response curve of DNA repair capacity against ginseng protein concentration. Ginseng protein fraction was added to the cells 3 hrs prior to exposure to UV light at the dose of 30  $\text{J}/\text{m}^2$ .

● in the presence of  $^3\text{H}$ -thymidine  
○ in the absence of  $^3\text{H}$ -thymidine

상의 손상이 후처리군에 비해 더 적은 양이 될 것이므로 DNA 수복능력 지수가 오히려 낮게 나올 것으로 예상되나, 실제로는 후처리군보다 높게 나타났으므로 radical scavenging이나 hydrogen atom donation과 같은 chemical repair mechanism에 의한 손상 감소는 일어나지 않는 것으로 추측할 수 있다. 그러나 한편 chemical repair에 의한 손상 감소가 일어났다 하더라도 전처리에 의한 수복능력의 증가가 후처리에 의한 효과보다 더 커서 손상 감소에 의한 영향을 극복할 수 있을 가능성도 배제할 수는 없다. 따라서 이 분획의 chemical repair mechanism에 대한 영향은 별도로 연구되어야 한다.

인삼 단백질분획의 용량을 증가시키면서 전처리한 경우의 수복능력 지수와 용량과의 상관 관계는 Fig. 5와 같다. 인삼 단백질의 용량이 증가함에 따라 수복지수도 계속 증가함이 관찰되어, 단백질의 양과 수복능력과의 사이에 상관관계가 성립함을 알 수 있었다. 여기에서도 자외선 조사시  $^3\text{H}$ -thymidine이 존재한 경우에 부재한 경우보다 그 수복지수가 약간 크게 나타남을 볼 수 있었다.

## 고 찰

방사선 방어작용이 radical scavenging이나 hypoxia

production과 같은 chemical repair mechanism에 의해 나타나는 경우에도 이 방법으로는 방사선이 초래하는 손상의 일부분이 감소되므로, 이미 생성된 lesion을 다루어야 하며, 따라서 손상된 DNA의 biochemical repair 능력이 곧 방사선에 대한 방어작용의 결과를 나타내게 된다고 할 수 있다. 그러므로 방사선에 의해 DNA 분자에 형성되는 손상을 감소시킬 수 있는 물질과 동시에 생성된 손상의 회복을 촉진시키는 물질이 개발되어야 하며, 이런 의미에서 방사선 방어효과를 갖고 있는 인삼분획이 손상된 DNA의 수복능력을 증가시킨다는 본 연구의 결과는 방사선 방어물질의 개발을 위한 매우 중요한 발견이라고 생각된다. 이 실험에서 사용한 DNA 수복능력 측정방법<sup>9)</sup>은 hydroxyurea를 사용하여 DNA 합성을 저해시키던 종전의 방법을 대체한 것이며 더 정확하고 효과적인 것으로 인정되고 있다. 이 방법을 사용하면 손상회복을 위한 DNA 합성(repair synthesis)을 방해하지 않으면서 정상적인 DNA의 반보존적 합성(semiconservative synthesis)을 99.5%까지 저해할 수 있다.<sup>13)</sup> 여기서 측정된 수복능력(repair capacity)은 손상의 양과 그에 대한 수복작용(repair activity)의 정도를 반영한다.

세포에 단과장 자외선을 조사하면 DNA에 염기손상(base damage)과 단일 및 이중사슬의 절단(single and double strand breaks)이 생기며, 특히 인접한 티민(thymine) 사이에 생기는 T-T 이중체(dimer)는 세포 내에 존재하는 절제보수(excision repair) 과정을 거쳐 회복된다고 한다. 그러나 이 보수과정에서 완전히 회복되지 못한 DNA는 손상을 지닌 채 남게 되어 세포에 치명적이거나, 또는 세포의 이상증식을 야기하여 돌연변이를 일으키게 된다. 따라서 이 보수과정에 작용하여 손상된 DNA의 수복을 촉진시키는 물질은 곧 세포를 방사선으로부터 보호하는 방어물질의 역할을 하게 될 것이다. 그 예로 DNA 수복에 직접 영향을 주는 방어물(protector)로 알려진 니코틴산은 이 절제보수 과정의 마지막 단계에 작용하는 효소인 ligase를 활성화시킴으로써 수복능력을 증가시키는 것으로 보고된 바 있다.<sup>9)</sup> 인삼 단백질분획이 이 수복과정의 어느 단계에 작용하는지는 앞으로 연구하여 밝혀야 할 과제이나, 본 연구에서 이 성분이 손상된 DNA의 수복능력을 증가시킨이 발견됨으로써, 이 성분이 지니는 방사선 방어작용의 기전이, 또는

기전 중의 하나가, DNA 수복능력 강화에 있음을 확인하였다.

이 분획에서는 단백질 외의 다른 성분, 즉 핵산이나 인삼에 존재하는 항산화제로 보고된 물질들이, 정량법이나 TLC screening에 의해, 검출되지 않았으며 이 분획을 butanol로 추출하여 butanol 가용성 물질과 침전물에 대해 각각 생존율 실험을 실시한 결과,<sup>16)</sup> 침전물에서 생존율 증가가 나타나고 추출물에서는 그 효과가 나타나지 않아, 이 분획의 방사선 방어작용은 butanol에 침전하는 물질에 기인됨을 알 수 있었다. 이 작용의 유효성분이 단백질인가를 확인하기 위한 연구가 현재 진행되고 있다.

## 결 론

CHO-K1 세포에 PUVA 처리를 하여 DNA의 반보존적 합성을 저해시킨 후 단과장 자외선을 조사하여 DNA에 손상을 유발시키고, 이 손상된 DNA를 회복시키기 위한 수복과정에서 결합되는 <sup>3</sup>H-thymidine의 양을 측정하여 세포의 DNA 수복능력 지수를 계산하였다. 이 때 자외선만을 조사한 경우에는 수복능력이 처음에는 증가하다가 자외선의 용량이 증가함에 따라 감소하였으나, 인삼분획을 처리한 세포에서는 수복능력이 한계용량 이상에서도 계속 증가함을 발견하였다. 또한 인삼분획에 함유되어 있는 단백질의 양을 점차적으로 증가시켰을 때 수복능력도 거의 직선적으로 증가함을 나타내어 용량-반응 상관관계를 보여주었다. 이상의 결과는 인삼 단백질분획이 나타내는 방사선 방어작용의 기전이, 또는 기전중의 하나가, 손상된 DNA의 수복능력 증진에 있음을 제시한다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1990년도 한국 과학재단 연구비(KOSEF 901-0402-028-2)에 의해 수행된 연구의 일부로 이에 감사드린다.

## 문 헌

- 1) Homkalo, B. A.: The effect of UV radiation on bacteria. In *Concepts in Radiation Cell Biology*. G. L. Whitson, ed., Academic Press, pp. 92-123(1972).

- 2) Evans, H. J.: Repair and recovery from chromosome damage after fractionated x-ray damage. In *Genetic Aspects of Radiosensitivity: Mechanism of Repair*, pp. 31-47(1966).
- 3) Evans, H. J.: Molecular mechanism in the induction of chromosome aberrations. In *Progress in Genetic Toxicity*, pp. 51-124(1977).
- 4) Wolff, S., Rodin, B. and Cleaver, J. E.: Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens. *Nature(Lond.)*, **265**, 347-349(1977).
- 5) Cleaver, J. E.: *J. Toxicol. Environ. Health* **2**, 1387-1394(1977).
- 6) Rahn, R. O.: Ultraviolet irradiation of DNA. In *Concepts in Radiation Cell Biology*, G. L. Whitson, ed., Academic Press, pp. 2-57(1972).
- 7) Kim, C. M. and Choi, J. E.: Effects of radioprotective ginseng protein on UV induced sister chromatid exchanges. *Arch. Pharm. Res.*, **11**(2), 93-98(1988).
- 8) Kim, C. M. and Park, S. Y.: Effects of ginseng protein on relative survival and chromosome aberration of UV-irradiated cells. *Arch. Pharm. Res.*, **11**(3), 225-229(1988).
- 9) Riklis, E.: DNA repair as a probe of radiosensitivity and radioprotection. In *Radioprotectors and Anticarcinogens*, Nygaard, O. F. and Simic, M. G., Ed. Academic Press, New York, pp. 363-380(1983).
- 10) Riklis, E., Kol, R., Green, M., Prager, A., Marro, R. and Mintsberg, M.: Increased radioprotection attained by DNA repair enhancement. *Pharm. Ther.*, **39**, 311-322(1988).
- 11) Heimer, Y. M., Ben-Hur, E. and Riklis, E.: Psoralen and near ultraviolet light: A probe for study of control of protein synthesis. *Nature* **26**, 170-171(1977).
- 12) Heimer, Y. M. and Riklis, E.: Inhibition of trioxalen plus near-ultraviolet light of the induction of ornithine decarboxylase in Chinese hamster cells. *Biochem. J.*, **183**, 179-180(1983).
- 13) Heimer, Y. M., Kol, R., Shiloh, Y. and Riklis, E.: Psoralen plus near-ultraviolet light: A possible new method for measuring DNA repair synthesis. *Radiation Research* **95**, 541-549(1983).
- 14) Kim, C. M. and Hwang, J. J.: Polyacrylamide gel electrophoresis on ginseng proteins. *Yakhak Hoeji* **30**, 343-347(1986).
- 15) Kim, C. M. and Han, G. S.: Radioprotective effects of ginseng proteins. *Yakhak Hoeji* **29**, 246-252(1985).
- 16) Kim, C. M. and Choi, H. O.: Effects of butanol extract and water-soluble constituent of radioprotective ginseng fraction on cell survival. *Korean J. Ginseng Sci.*, **15**(3), 167-170(1991).