

## 방사선 방어작용이 있는 인삼 단백질의 CHO-KI 세포에 대한 세포 독성

김 춘 미 · 윤 석 란  
이화여자대학교 약학대학  
(Received August 4, 1988)

Cytotoxic Effect of Radioprotective Ginseng Protein Fraction on CHO-KI Cells.

Choonmi Kim and Suk Ran Yoon  
College of Pharmacy, Ewha Womans University,  
Seoul 120-750, Korea.

**Abstract**—Radioprotective ginseng protein fraction was isolated from Korean white ginseng and its cytotoxic effect on CHO-K1 cells was studied by the method of measuring the relative cell survival and total cellular protein content (FRAME method). When ginseng protein at the dose of 300, 600, 900, 1200 $\mu$ g/ml was treated to cells for 24 hrs, the relative survival was significantly decreased at the concentration of above 600 $\mu$ g/ml, indicating the presence of cytotoxic effect of the protein at certain concentration. When cellular protein content was measured after ginseng protein at the dose of 300, 600, 900, 1200  $\mu$ g/ml was treated, the amount of cellular protein was significantly reduced at the concentration above 600 $\mu$ g/ml in the case of 24 hr treatment and at all concentrations including 300 $\mu$ g/ml in the case of 72 hr treatment. The data suggest that the protein may inhibit cell growth, resulting in the reduction of live cells in culture. ID<sub>50</sub> value which is the concentration of ginseng protein that reduces the total cellular protein content to 50% of the control was calculated as 2276.86 and 1323.32  $\mu$ g/ml in groups treated for 24 and 72 hr, respectively. Since ID<sub>50</sub> value of above 1000 $\mu$ g/ml indicates very weak cytotoxicity, the ginseng protein seems to exert very weak cytotoxic effect on CHO-K1 cells.

수 천년 전부터 보혈, 강장제로 널리 사용되어 온 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 중추 신경계에 대한 흥분 및 억제작용,<sup>1)</sup> 기초대사 촉진작용,<sup>2)</sup> stress에 대한 방어작용,<sup>3)</sup> 피로회복,<sup>4)</sup> 혈압강하, 항당뇨작용 등의 약리활성을 갖는 것으로 보고되어 왔으며, 이러한 종합적 효과들은 Brekman<sup>5)</sup>이 주장한, 비 특이적으로 생체의 저항성을 증진시킨다는 adaptogen 설을 뒷받침 해 주고 있다. 또한 최근에는 인삼에 항암 및 항방사선 작용이 있다는 보고가 있어,<sup>6-13)</sup> 부작용 적은 항암제의 개발을 위한 관심의 대상이 되고 있다.

이와 같이 인삼의 많은 약효들이 보고되면서 그 사용도 세계적으로 확산되고 있으나, 부작용

에 의해 인삼을 투여할 수 없는 경우 또한 발견되고 있으며, 세포수준에서 함유성분의 약리작용 및 그 작용기전을 연구하는 과정에서, 이들 성분의 세포독성이 의심되는 경우도 나타나고 있다. 인삼의 독성에 대한 종래의 연구를 살펴보면, Hong 등<sup>14)</sup>은 인삼 saponin의 어혈작용이 길경 saponin에 비해 약하고, LD<sub>50</sub>량이 275mg/kg으로 독성이 낮다고 보고하였고, Kim 등<sup>15)</sup>은 각종 중추신경 흥분제의 LD<sub>50</sub>에 미치는 인삼 ethanol 추출물의 영향을 조사하여, 각 약물만을 단독 투여했을 때보다 인삼을 동시 투여했을 때 투여약물의 LD<sub>50</sub>량이 증가하였다고 보고하였다. 또 Shoji<sup>16)</sup> 등은 인삼근을 열수로 추출하여 가열농축한 분말을 mouse에 경구투여했을

때 LD<sub>50</sub>량이 10g/kg이므로 독성이 거의 없다고 하였다. 1979년 Siegel<sup>17)</sup>, Palmer<sup>18,19)</sup> 등 유럽의 몇몇 학자들은 인삼을 장기간 복용하였을 때의 부작용으로 euphoria, hypertension, estrogen-like effect를 보고한 바 있는데, 이에 대해 Soldati<sup>20)</sup>는 인삼추출물 G115를 가지고 mouse, rat 등에 행한 in vitro 실험에서 아무런 급·만성 독성효과가 나타나지 않았으며 경구투여의 LD<sub>50</sub>량이 5g/kg으로 임상적으로는 안전하다고 주장하였다. Hwang과 Cha<sup>9)</sup>는 인삼의 petroleum ether 추출물이 L5178Y, HeLa cell 등 종양세포에 대해서는 세포 독성을 가지나, 정상세포인 mouse embryo에서는 항암작용을 나타내는 양의 10배의 용량에서도 아무런 독성을 나타내지 않았다고 보고하였으며, Yun과 Lee<sup>21)</sup>는 홍삼의 증류수 추출물이 0.04g 수준에서 V79 세포에 대해 세포 독성을 나타내나 이것은 생리학적으로 매우 높은 용량이므로 인체에는 안전하다고 하였다.

본 연구에서는 방사선 방어작용이 있는 인삼 단백질분획의 작용기전을 연구하는 과정에서, 이 분획이 CHO-KI 세포에 대해 나타내는 독성효과를 규명하여야 할 필요를 느끼게 되어 세포 생존율과 FRAME법에 의해 세포독성을 측정하였다.

### 실 험 방 법

시료 및 시약—인삼단백질의 분리, 정제를 위해서는 6년근 백삼을 사용하였다. CM-Cellulose, Sephadex G-75, bovine serum albumin(BSA)은 Sigma Chem. Co. 제품을 사용하였고, Folin C-phenol reagent는 Shinyo Pure Chemicals Co. 제품을 사용하였다. 세포배양을 위한 Eagle's minimum essential medium (EMEM), fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) 및 penicillin streptomycin solution은 Gibco Inc. 제품을 사용하였고, N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid(HEPES)와 Giemsa stain은 Sigma Chem. Co. 제품을, 그리고 2,4-dinitrophenol은 Junsei Chem. Co. 제품을 사용하였다.

인삼단백질의 분리, 정제—방사선 방어작용이 있는 인삼단백질의 분리, 정제는 Kim과 Hwang<sup>22)</sup>의 방법을 적용하여 시행하였다. 즉 0.05M-Tris-HCl buffer(PH 7.6) extraction, 70%-ammonium sulfate fractionation, CM-cellulose column chromatography, heat inactivation 및 Sephadex G-75 column chromatography의 순으로 정제하여 GI과 GII의 두 분획을 얻었다. 이중 방사선 방어작용을 나타내는<sup>13)</sup> GI 분획을 사용하여 다음 실험을 시행하였으며, 각 정제단계에서 얻은 분획들의 단백질 함량은 Lowry 법에 의해 측정하였다.

세포배양—Chinese hamster ovary(CHO) cell line의 subclone인 CHO-KI 세포를 10% FBS와 항생제(penicillin 50 unit/ml과 streptomycin 50 µg/ml)를 함유하는 EMEM을 배양액으로 37°C, humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 세포의 지수함수적 성장을 유지하기 위하여 약 3일 간격으로 0.05% Trypsin-EDTA를 사용하여 계대배양하였다.

인삼단백질 처리—냉동 건조된 GI 분획 분말 일정량을 증류수에 녹이고 멤브레인 필터(membrane filter) (0.22µm)로 여과하여 제공한 후, 배양액을 가하여 각 농도로 희석하여 세포에 가하였다.

세포 생존율 측정 실험<sup>23,24)</sup>—Petri dish (60 mm)에 100~300개의 CHO-KI 세포를 심고, 각각 인삼단백질 0, 300, 600, 900, 1200µg/ml을 함유하는 배양액을 가하여 24시간동안 배양하였다. 인삼을 함유하는 배양액을 제거하고 신선한 배양액을 가한 후 10일간 계속 배양하여 형성된 colony를 methanol로 고정시키고 Giemsa 용액으로 염색하였다. 염색된 colony의 수를 세어 아래 식에 의하여 세포생존율을 계산하였다.

$$\text{세포 생존율} = \frac{\text{인삼단백질을 처리한 세포의 plating efficiency}}{\text{대조군의 plating efficiency}}$$

여기서

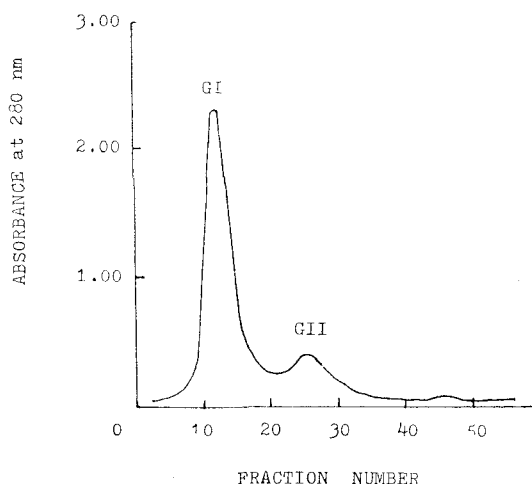
$$\text{plating efficiency} = \frac{\text{형성된 colony 수}}{\text{dish에 심은 세포수}}$$

**FRAME** 법에 의한 세포 특성 실험<sup>25,26</sup>-CHO-KI 세포를 24-well plate의 각각의 well에  $2 \times 10^4$  세포씩 심고  $37^\circ\text{C}$ 에서 24시간동안 배양하였다. 배양액을 제거하고 인삼단백질 0, 300, 600, 900,  $1200\mu\text{g/ml}$ 을 함유하는 신선한 배양액을 가하여 24시간(I군) 및 72시간(II군)동안 배양한 후, 수정된 Lowry법<sup>27</sup>에 의하여 세포내 단백질 함량을 측정하였다. 표준 단백질로는 BSA를 사용하였고, 세포독성을 나타내는 positive control로는 2,4-dinitrophenol ( $35\mu\text{g/ml}$ )을 사용하였다

### 실험 결과

인삼단백질의 분리, 정제—최종단계인 Sephadex G-75 column chromatography에 의해 Fig. 1과 같이 G I 및 G II의 두 분획을 얻었으며, 이중 방사선 방어작용이 있는 G I 분획은 Tris-HCl buffer 추출물의 단백질 양을 100%로 하였을 때 2.17%의 단백질을 함유하였다(Table I).

세포 생존율—인삼단백질분획 G I을 24시간동안 세포에 처리한 실험군과 G I을 처리하지 않은



**Fig. 1**—Sephadex G-75 column chromatography of CM-B fraction. The column( $2.5 \times 35$  cm) was eluted with 0.05M phosphate buffer (pH 7.2) and the fractions of 5ml were collected at a flow rate of 15ml/hr.

**Table I.** Relative yields of the protein purified from ginseng extract

Components	Protein* (mg)	Relative Yields(%)
Crude extract	7930.50	100.00
70% Ammonium sulfate fraction	4529.93	57.12
CM-Cellulose column chromatography		
CM-A	1859.12	23.44
CM-B	1331.45	16.79
Heat inactivation	1254.66	15.82
Sephadex G-75 column chromatography		
G-I	172.34	2.17
G-II	1.49	0.02

\* The amount of protein obtained from 150g of ginseng powder.

**Table II.** The effect of ginseng protein on the survival of CHO-KI cells

Protein (G I) ( $\mu\text{g/ml}$ )	Plating efficiency	Relative Survival(%)
0 (Control)	$0.947 \pm 0.025$	100.00
300	$0.913 \pm 0.019$	$96.53 \pm 3.47$
600	$0.807 \pm 0.037$	$85.57 \pm 2.40^*$
900	$0.723 \pm 0.049$	$76.87 \pm 3.10^*$
1200	$0.612 \pm 0.027$	$64.99 \pm 4.33^*$

\* Statistically significant ( $p < 0.01$ ) as compared to the control.

대조군의 생존율은 Table II와 같다. 즉 CHO-KI 세포에 인삼단백질 300, 600, 900,  $1200\mu\text{g/ml}$ 을 가하여 관찰한 결과,  $300\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조군과 비교할 때 유의적인 생존율의 감소가 나타나지 않았으나,  $600\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 생존율이 유의적으로 감소하였고( $p < 0.01$ ), 인삼단백질 용량이 증가함에 따라 생존율은 더욱 크게 감소하여  $1200\mu\text{g/ml}$ 에서는 약 65%의 생존율을 나타내었다. 이러한 결과는 인삼 단백질분획이 일정용량 이상에서는 배양세포에 유독하여 세포를 치사시킬음 의미한다.

**FRAME** 법에 의한 세포 특성—인삼단백질 300, 600, 900,  $1200\mu\text{g/ml}$ 을 가하여 24시간동안 처리한 I군의 경우에는,  $300\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 세포내 단백질 함량이 유의적으로 감소하지 않았으나  $600\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 유의적인

**Table III.** The effect of ginseng protein on cellular protein content in CHO-K1 cells

Protein (GI) concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Relative cellular protein content(%)	
	I	II
Solvent control (D.W.)	100.00	100.00
0	102.70 $\pm$ 5.07	103.83 $\pm$ 1.78
300	97.84 $\pm$ 3.64	91.00 $\pm$ 5.71**
600	89.13 $\pm$ 6.18*	74.20 $\pm$ 2.59**
900	80.88 $\pm$ 1.60*	66.30 $\pm$ 4.55**
1200	74.15 $\pm$ 3.53*	55.57 $\pm$ 2.60**
Positive control (2,4-D.N.P. 35 $\mu\text{g/ml}$ )	66.89 $\pm$ 2.87	47.17 $\pm$ 3.07
ID <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	2276.86	1323.32

\*,\*\* Statistically significant( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ) as compared to the control.

I: Group treated with ginseng protein for 24 hrs.

II: Group treated with ginseng protein for 72 hrs.

감소가 관찰되었다( $p < 0.05$ ). 또한 인삼을 72시간 처리한 II군의 경우에는, 모든 농도에서 세포내 단백질 함량이 유의적으로 감소하였으며( $p < 0.01$ ), 같은 농도에서 I군보다 더 크게 감소함을 알 수 있었다(Table II). 이는 인삼단백질이 세포의 증식을 억제하여 생존세포의 수가 감소함으로써 초래되는 결과라고 생각된다. FRAME에서 확립한 cytotoxicity protocol에 따라 세포내단백질 함량이 대조군의 50%로 감소되는 인삼단백질의 농도(ID<sub>50</sub>)를 구한 결과 I군은 2276.86 $\mu\text{g/ml}$ , II군은 1323.32  $\mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다. FRAME의 blind test에 의하면 ID<sub>50</sub>가 1000 $\mu\text{g/ml}$  이상이면 독성이 매우 약한 것으로 보고되어 있으므로,<sup>26)</sup> 인삼단백질의 세포독성은 mutagen 및 carcinogen 등과 같은 다른 화학물질과 비교할 때 매우 약한 것으로 관찰되었다.

## 고 찰

세포독성을 측정하는 방법<sup>28)</sup>에는 여러가지가 있으나 본 실험에서는 세포의 생존율과 세포내 단백질 함량을 측정하는 방법을 사용하였다. 세포의 생존율<sup>29)</sup>은 세포의 colony 형성능력에 의해

생존능력을 측정하는 것이고, 세포내 단백질함량의 측정은 세포의 수에 따른 단백질 함량의 변화에 의해 세포의 증식억제도를 평가하는 것이다. 본 실험에서는 1982년 FRAME(the Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiment)에서 확립한 Cytotoxicity protocol에 따라, 세포내 단백질 함량이 대조군에 비해 50%로 감소되는 인삼단백질의 농도(ID<sub>50</sub>)를 구하여 독성의 정도를 비교하였다. in vitro 세포독성 실험은<sup>30)</sup> 흡수, 대사, 배설 등의 변수가 작용하는 in vivo 실험에 비해 간단하고 경제적이며 원하는 세포의 homologous population을 얻을수 있는 장점이 있으며, 어떤 경우에는 사실상 in vivo 실험보다 더 예민하여 결과해석이 용이하므로 많이 이용되고 있다. 그러나 실험실간의 오차가 크고 적당한 기준이 없어 독성의 절대적인 평가가 곤란하다는 단점이 있어 Balls와 Bridge 등<sup>31)</sup>은 FRAME 세포독성 실험법을 확립하였으며, 여기서는 4개의 실험실이 공동으로 연구하여 얻은 평균치를 제시하고 있다.

문헌<sup>25)</sup>에 의하면, ID<sub>50</sub>치가 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 보다 적게 나타나 그 독성이 매우 강한 것으로는 colchicine과 vincristine이 있고, aspirine은 366 $\pm$ 38 $\mu\text{g/ml}$ , L-ascorbic acid는 391 $\pm$ 101 $\mu\text{g/ml}$ 로 어느 정도의 독성을 나타내고 있으며, 그 값이 1000 $\mu\text{g/ml}$  이상인 것으로는 ethanol, D-fructose, D-glucose, sodium chloride 등이 있다. 이 실험에서 positive control로 사용한 2,4-dinitrophenol의 ID<sub>50</sub>치는 35 $\pm$ 8 $\mu\text{g/ml}$ 로 제시되고 있어, 이 실험결과(1군 : 46.8 $\mu\text{g/ml}$ , 2군 : 33.0 $\mu\text{g/ml}$ )와 유사한 것으로 판단되었다.

본 실험 결과를 종합해보면, 인삼단백질 GI분획은 일정농도 이상에서는 세포독성을 나타내나, ID<sub>50</sub> 값을 고려해 볼 때 그 정도가 매우 약한 것으로 평가된다. 여기서 가해진 인삼단백질 자체가 세포내 단백질함량 측정시 함께 정량될 수도 있다는 점을 감안한다면 실제의 인삼단백질의 독성은 본 실험결과가 제시하는 것보다 더 클수도 있을 것이다. 또한 본 실험은 세포배양법에 의한 in vitro 실험이므로 종합적인 요인이 존재하는 in vivo 상태에서 임상적으로 적용시키

기 위해서는 해당조건들이 면밀히 검토되어야 할 것이다.

## 결 론

방사선 방어작용이 있는 인삼단백질을 분리, 정제하여 세포생존율과 세포내 단백질 함량을 측정함으로써 CHO-KI 세포에 대한 세포독성을 연구하였다. 그 결과 인삼단백질 600 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서는 세포생존율이 유의적으로 감소하여 세포독성이 있음을 나타내었고, 세포내 단백질함량측정 실험에서는 24시간 처리한 경우에는 600 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서, 72시간 처리한 경우에는 300 $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 단백질함량이 유의적으로 감소하였으므로 역시 세포독성이 존재함을 알 수 있었다. 그러나 ID<sub>50</sub>량을 구하여 다른 화학물질과 비교했을 때 그 독성의 정도는 매우 약한 것으로 관찰되었다.

## 문 헌

- 1) Brekhman, I.I. and Dardymov, I.V.: On the pharmacology of individual panax ginseng and eleutherococuss saponins. *The 11th Pacific Science Congress*, 8, 11 (1966).
- 2) Yokozawa, J. and Oura, H.: *Chem. Pharm. Bull.*, 24(5), 987 (1976).
- 3) Kim, C., Kim, C.C., Kim, M.S. and Chang, Y.H.: *Korean Ginseng Studies*, pp.442-449 (1977).
- 4) Roh, J.W.: *Korean Ginseng Science Symposium*, pp.169-182 (1974).
- 5) Brekhman I.I. and Dardymov, I.V.: New substances of plant origin which increase non specific resistance. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 9, 419 (1969).
- 6) Lazarev, N.V.: The non-specific resistance of the body and the neoplastic process. *Mezhdumatt Protivorakovyi Kongress*, 3, 383 (1962).
- 7) Woo, L.K., Nakamura, Y. and Donat, L.: Effect of ginseng on the growth rate of cells. *Arch. Ital. Patol. Clin. Tumori.*, 8, 53 (1965).
- 8) Murata, I. and Hirono, D.: Clinical and immunological observation of protostizol for cancer patients. *Metabolism*, 10, 601 (1973).
- 9) Hwang, W.I. and Cha, S.M.: A cytotoxic activity of extract of Panax Ginseng root against some cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Proc. 2nd Inter. Ginseng Symp.*, pp.43-49(1978).
- 10) Yun, T.K., Yoon, R.S. and Lee, S.Y.: Effect of cytotoxic fractions of Korean ginseng roots on macromolecular synthesis in cancer cells. *Proc. 2nd Inter. Ginseng Symp.*, pp.51-54 (1978).
- 11) Yonezawa, M., Takeda, A. and Katoh, N.: Restoration of radiation injury by ginseng extract II. *Proc. 4th Inter. Ginseng Symp.*, pp. 133-139 (1982).
- 12) Takeda, A., Katoh, N. and Yonezawa, M.: Restoration of radiation injury by ginseng. III. Radioprotective effect of thermostable fraction of ginseng extract on mice, rat and guinea pigs. *J. Radiat. Res.*, 23, 150 (1982).
- 13) Kim, C.M. and Han, G.S.: Antiradiation effect and restoration of radiation injury by ginseng protein. *J. Pharm. Soc. Korea*, 29, 246 (1985).
- 14) Hong, S.A., Kim, J.H. and Kim, H.J.: 인삼, 길경 및 원지 saponin에 대한 독성 비교, *중양의학*, 5, 609 (1963).
- 15) Kim, Y.S.: Influence of Panax ginseng on the hypothermia in rats elicited by various drugs. *Insam Munhun Teukjip*, 3, 81(1967).
- 16) Shoji, J. and Kisara, K.: *Oyo Yakuri*, 10, 3 (1975).
- 17) Siegel, R.K.: Ginseng abuse syndrome. *JAMA*, 241, 1614 (1979).
- 18) Palmer, B.V., Montgomery, A.C.V. and Monteiro, J.C.: Ginseng and mastalgia. *Brit. Med. J.*, 279, 1248 (1978).
- 19) Punnonen, R. and Lakola, A.: Oestrogen-like effect of ginseng. *Brit. Med. J.*, 281, 1110 (1980).
- 20) Soldati, F.: Toxicological studies on ginseng. *Proc. 3rd Inter. Ginseng Symp.*, pp.119-126 (1980).
- 21) Lee, I.P., Yun, H.C., Stammer, N. and Langenbach, R.: Safety evaluation of Panax ginseng extracts. *Proc. 4th Inter. Ginseng Symp.*, pp.

- 75-82 (1984).
- 22) Kim, C. and Hwang, J.J.: Polyacrylamide gel electrophoresis on ginseng proteins. *J. Pharm. Soc. Korea*, 36 (6), 343 (1986).
- 23) Pattern, M.K. Jr.: Measurement of growth and viability of cells in culture. *Method. in Enzymology*, 58, 141 (1979).
- 24) Bhayan, B.K., Loughan, B.E., Fraser, T.J. and Day, K.J.: Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exp. Cell Res.*, 97, 275 (1976).
- 25) Knox, P., Uphill, P.F., Fry, J.R., Benford, J. and Balls, M.: The FRAME multicentre project on *in vitro* cytotoxicology. *Fd. Chem. Toxic.*, 24, 457 (1986).
- 26) Balls, M. and Horner, S.A.: The FRAME inter-laboratory program on *in vitro* cytotoxicology. *Fd. Chem. Toxic.*, 23, 209 (1985).
- 27) Tsuboi, A., Kurotsu, T. and Terasima, T.: Changes in protein content per cell during growth of mouse L cells. *Exp. Cell Res.*, 103, 257 (1976).
- 28) Bridges, J.W., Benford, D.J. and Hubbard, S.A.: Cellular system for toxicity testing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 407, 42 (1983).
- 29) Macdonald, K.B. and Brulge, W.R.: A microcolony assay for the viability of mammalian cells *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, 50, 471 (1967).
- 30) Riddell, R.J., Clothier, R.H. and Balls, M.: An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays. *Fd. Chem. Toxic.*, 24, 469 (1986).
- 31) Balls, M. and Bridges, J.W.: *Alternative method in Toxicology*. 2, 63 (1984).