

홍삼 추출물에 의한 유전독성

감소효과 (I)

-배양 NIH3T3 세포에서 자외선에
의한 유전독성의 감소에 미치는
홍삼추출물 처리효과

김완주, 유병수, 전병훈, 이정섭¹, 박상대², 김인호³, 최수봉³,
박종균

원광대학교 의약자원 연구센터

1, 조선대학교 유전공학과

2, 서울대학교 분자생물학과

3, 소망화장품

Decrease of genotoxicity by red
ginseng root extract (I)

-Decrease of UV-induced
genotoxicity by red ginseng root
extract in cultured NIH3T3 cells

Wan Ju Kim, Byung Soo Ryu, Byung Hoon Chun, Jung Sup
Lee¹, Sang Dai Park², In Ho Kim³, Soo Bong Choi³, Jong
Kun Park

Medicinal Resources Research Center, Wonkwang University

1, Department of Genetic Engineering, Chosun University

2, Department of Molecular Biology, Seoul National
University

3, Somang Cosmetics

요약

자외선에 의한 유전독성의 감소에 미치는 홍삼추출물의 영향을 배양 NIH3T3 세포계에서 분석하였다. 자외선을 조사한 후 정상 배지에서 배양한 시간간격에 따라 세포의 생존률은 증가하였는데 홍삼추출물이 함유된 배지에서 배양한 경우는 약 15%정도 증가한 생존률을 보였다. 자외선을 조사한 후 감소된 DNA복제가 정상배지 배양시간에 따라 증가하는 정도도 홍삼추출물을 후처리할 경우 현저한 증가를 보였다. 자외선 상해를 회복하기 위한 절제회복능은 홍삼추출물을 처리할 경우 유의미한 증가를 보였다. 이러한 절제회복과정중 효소에 의한 절제단계가 홍삼추출물 처리에 의해 활성화됨을 단사절단 분석을 통하여 규명하였다. 이상의 결과는 홍삼추출물이 자외선 상해의 절제회복에 유의미한 증가를 보이며 따라서 유전독성을 감소시키는 항노화제로써 사용할 수 있음을 시사한다.

Abstract

We have studied the effects of red ginseng root extract on the decrease of UV-induced genotoxicity in cultured NIH3T3 cells. The increase in survival and the recovery from DNA synthesis inhibition in UV-irradiated cells as a function of normal medium incubation time was potentiated by the presence of the ginseng extract. The extract also increased the UV-induced excision repair as determined by unscheduled DNA synthesis. The amount of UV-induced DNA single strand breaks that are accumulated by polymerase inhibitors was significantly increased by the presence of the extract. These results suggest that the red ginseng extract activates the incision/excision step of UV-induced repair and could be used as a reagent for protecting UV-induced genotoxicity and cytotoxicity.

1. 서론

생명체의 유전인자는 항상 자외선이나 방사선등의 물리적 요인과 알킬화제 등의 화학적 요인에 의해 염기부가물(base adduct)등의 형태로 상해받고 이러한 상해가 절제회복 등의 기작에 의해 복구되지 않으면 세포독성, 노화의 증가, 암 유발및 돌연변이 유발의 치명적인 결과를 초래하게 된다는 사실이 정립되어 왔다¹. DNA 상해요인중 자외선에 의한 피리미딘 이량체는 DNA 사에서 인접한 2개의 피리미딘이 부수적인 공유결합에 의해서 이어진 것으로, 이것이 발생되면 염기쌍의 수소결합의 파괴는 물론 DNA나선의 뒤틀림(distortion)이라는 커다란 구조적 변화를 유발한다².

DNA 상해요인에 의한 이러한 구조적인 변화들은 직접적으로는 DNA 복제의 억제를 유발하는데 이는 DNA 복제를 진행하는 효소계가 DNA 상해부위에 대한 적절한 염기를 삽입할 수 없어 일시적으로 정지되기 때문이다³. DNA 상해에 의한 DNA 복제의 억제는 시간경과에 따라 복제후회복과정에 의해 정상적으로 회복된다⁴.

DNA 상해또는 구조변형을 오류없이 제거하는 세포 기구중의 하나는 DNA 절제회복으로 이 과정에는 endonuclease와 exonuclease에 의한 DNA 상해를 포함하는 가닥의 절제, polymerase에 의한 patch 중합(incision/excision), 그리고 ligase에 의한 ligation과정이 포함된다⁵. DNA 절제회복에는 nucleotide 절제 회복과 염기 절제 회복의 두가지 과정이 알려져 있는데⁶, 이중 nucleotide 절제회복은 자외선및 자외선형 상해요인에 의한 거대 염기부가물이나 DNA 나선의 광범위한 뒤틀림에 대해 작동한다^{7,8}. 절제단계 후에는 발생한 gap들을 DNA polymerase에 의해 채우는 중합과정이 일어난다. 포유 동물세포에서는 DNA polymerase α , δ , 및 β 가 이 과정에 포함되는 것으로 알려졌다^{9,10}. DNA polymerase α/δ 의 저해제인 aphidicolin이나 β 의 저해제인 dideoxythymidine등을 이용한 본 연구자들의 연구결과에 의하면, 자

외선형 상해요인인 benzo(a)pyrene과 3-methylcholanthrene등의 상해회복에는 α/δ 의 저해제에 의한 중합저해의 정도가 알킬화제인 MMS에서의 그것보다 현저히 높다¹¹.

이러한 DNA회복과정에 항진을 촉발할 수 있는 물질들은 암, 돌연변이, 그리고 노화등에 대해 보다 유효하고 정확한 대응기구로서 작용한다. 이들 중 홍삼의 saponin은 부신에서 catecholamine의 분비를 촉진하고, 지질의 과산화과정을 저해함으로써 항산화활성을 지니며 이는 다시 radical의 형성을 저해함으로써 생체내에 유익한 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다¹². 또한 홍삼 성분들은 방사선에 대한 방어효과, 알킬화제에 의한 염색체 이상 및 미세핵 방어효과, 배양세포에서 돌연변이 감소 및 세포변형 감소효과등이 보고된 바 있다¹³⁻¹⁵. 이에 본 연구자는 이러한 유전독성감소 현상의 원인이 되는 생명활동인 DNA 회복의 어떤 측면이 홍삼추출물에 의해 활성화되는지를 규명하고자 하였다.

2. 실험

2-1. 세포배양, 자외선 조사 및 추출물 처리

NIH3T3 세포들은 10% fetal calf serum이 존재 하는 MEM으로 37°C CO₂ humidified incubator에서 계대배양하였다. 자외선을 조사할 때는 배양배지를 제거하고 phosphate buffered saline 으로 2번 씻은 후 조사하였다. 자외선은 254 nm의 파장으로 초당 1.42 J/m²의 선량을 내는 멸균등을 이용하여 원하는 선량에 이르기까지의 시간동안 조사하였다. 자외선 조사 시 세포 배양용기는 연속적으로 회전하는 판위에 위치시켰다.

홍삼 추출물은 일반적인 방법을 따라 준비하였고¹⁴, 사용한 농도는 0.5 μ g/ml로 이 농도까지에서 추출물 자체의 세포독성은 세포생존률 분석결과 정상대조군과 유의한 차이가 없었다.

2-2. 세포 생존률 분석

배양세포계에 자외선을 조사하고 정상배지 또는 홍삼추출물 함유배지에서 다양한 시간동안 배양한 후 세포를 수거, 희석한 후 약 1-2주동안 더 배양하여 형성되는 colony의 수를 Giemsa staining하여 정상대조군에 대한 비율로 구하였다.

2-3. DNA 합성을 분석

^{14}C -thymidine으로 선표지한 세포를 자외선에 노출시킨 후 정상배지 또는 홍삼물질을 포함하는 배지에서 배양하며 일정시간마다 10분간 ^3H -thymidine($5 \mu\text{Ci/ml}$)으로 pulse 표지하고 일정수의 세포를 수확하여 2N NaOH 용액에 넣고 48시간 동안 37°C 에서 방치하여 세포와 RNA를 분해하였다. 동량의 2N HCl로 중화한 후 다시 동량의 25% TCA를 첨가하여 4°C 에 4시간 동안 방치시킨 뒤 GF/C filter에 결합시켰다. 10% TCA와 95% ethanol로 세척한 후 liquid scintillation counter로 방사능을 측정 한 후 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 의 비를 구하고 정상배지 배양군에 대한 홍삼처리군의 DNA 합성율의 증가를 백분율로 구하였다.

2-4. 비주기성 DNA 합성 (Unsheduled DNA synthesis)

2-3 일간 ^{14}C -thymidine으로 약하게 선표지한 세포를 가득차게 배양한 후 hydroxyurea 처리에 의한 DNA 합성제해를 유도한 후 자외선을 처리하고, 정상또는 홍삼물질 포함 배지에서 배양하는 3시간동안 hydroxyurea와 ^3H -thymidine($5 \mu\text{Ci/ml}$)으로 표지하고 위에서와 같이 세포를 수거, 용해한 후 방사능을 측정한 후 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 의 비를 구하였다.

2-5. DNA사 단사절단을 위한 alkaline sucrose gradient sedimentation 분석

Tritium thymidine으로 선표지한 세포에 자외선을 처리하고 홍삼물질을 함유한 배지 또는 정상배지에서 3시간 배양할 때 단사절단을 측정하기 위해 hydroxyurea와 araC 를 첨가하였다. 미리 준비한 5-20%의 자당밀도

구배의 상층부에 있는 용해용액에 얹어 4 시간동안 실온에서 녹인 후 250 00 rpm에서 4 시간동안 원심분리하고 분획을 수거하여 GF/C filter에 여과, 건조하여 liquid scintillation counter로 방사능을 측정, DNA 크기의 분포를 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성 감소효과분석

자외선을 20 J/m^2 조사하였을 때의 세포생존률은 정상대조군에 비해 약 18% 정도를 보였다(그림 1). 자외선 조사후 정상 배지에서 배양한 시간간격에 따라 세포의 생존률은 증가하였는데 24 시간의 경우는 약 60% 까지 점진적인 증가를 보였다(그림 1, ○). 한편, 홍삼 추출물이 함유된 배지에서 배양한 경우는 모든 배양시간에 대해 정상배지 배양보다 평균 약 15%씩 더 증가한 생존률을 보였다(그림 1, ●).

3.2. DNA 복제억제 완화효과분석

홍삼의 효과를 DNA복제단계에 대해 조사하기위해 자외선에 의해 감소된 DNA 합성률(DNA synthesis rate)이 홍삼물질의 처리시간에 따라 어떤 변화를 보이는지를 ^3H - thymidine의 삽입률에 의해 조사하였다.

세포에 자외선을 조사한 후 홍삼 추출물을 0 - 24 시간동안 처리할 경우, 홍삼 추출물은 자외선에 의한 DNA 합성율의 감소를 약 30 정도%까지 완화하는 효과를 보였다(Table 1). 이러한 결과는 위의 세포생존률 실험결과와 잘 일치하고 있다. 즉 홍삼추출물은 DNA 복제억제로 부터 완화되는 것을 가속화하여 세포생존률을 증가시키는 것으로 해석된다.

3.3. DNA 절제회복에 대한 효과

유전독성을 알기위하여 배양 세포계에서 자외선을 처리후 전체적인 회

복합성의 지표인 비주기성 DNA합성(Unscheduled DNA synthesis)을 분석하고 홍삼물질의 후처리가 이러한 결과들에 어떠한 영향을 미치는지를 같은 방법으로 분석하였다.

자외선의 선량이 증가할수록 DNA에 생긴 상해는 증가되고 세포는 이를 회복하기 위해 비주기성 DNA 합성을 더 많이 하게 된다(그림 2, ○). 흥미롭게도 자외선 상해를 회복하기 위한 절제회복능은 홍삼추출물을 처리할 경우 2 - 50 J/m²의 선량범위에서 5 - 30%가량의 유의미한 증가를 보였다(그림 2, ●). 이는 앞에서 기술한 홍삼의 DNA 복제억제의 완화현상이 DNA 절제회복의 증가에 의해 상대적으로 빨리 DNA 상해를 제거함에 의해 유도됨을 시사한다.

3.4. DNA사 절단에 대한 효과

위의 홍삼효과가 DNA회복과정중 절단단계에서 발생하는지를 정확히 알기 위해 DNA사 단사절단을 alkaline sucrose gradient sedimentation으로 분석하였다. 먼저 ³H-thymidine으로 선평지한 세포에 자외선을 처리하고 중합단계를 저해하는 조건에서 홍삼추출물을 함유한 배지 또는 정상배지에서 3 시간동안 배양한 후 세포를 수거, 4 시간동안 실온에서 녹인 후, 25000 rpm에서 4 시간동안 원심분리하고 각 분획의 방사능을 측정, DNA 크기의 분포를 구하였다.

자외선을 처리하지 않은 정상대조군은 분획 4-6번 정도에서 peak을 형성하여 상해받지 않은 긴 길이의 DNA 크기분포를 보여주었다(그림 3, ○). 20 J/m²의 자외선을 조사한 후 3 시간 동안 hydroxyurea와 araC에 의한 중합과정 저해한 실험군은 분획 10번 정도에서 peak을 형성하였고(그림 3, ●), 홍삼물질이 중합과정 저해배지에 포함된 경우는 더 작은 크기의 DNA를 보였다(그림 3, ▽). 이 분석의 결과, 홍삼추출물은 자외선에 의한 DNA사의 절단을 평균 25%이상 가량 증가시킴을 알 수 있었다.

홍삼추출물에 의한 DNA사의 절단이 증가되는 현상은 본 연구에서 처음 규명된 것으로 이 과정의 분자생물학적 규명이 앞으로 더 요구된다.

4. 결론

이상의 결과는 홍삼추출물이 자외선 상해의 절제회복의 절제단계를 활성화하여 DNA 회복합성을 증가시키고, 이에 따라 DNA 상해가 감소되어 DNA 복제억제로부터 빨리 정상화되어 세포생존률을 증가시킴을 의미하고, 따라서 홍삼추출물을 유전독성을 감소시키는 항노화제로써 사용할 수 있음을 강하게 시사한다.

* 이 연구의 일부는 한국과학재단 지원 지역협력연구센터의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Friedberg, E.C., G.C. Walker, and W. Siede. (1995) *DNA repair and mutagenesis*. ASM press, pp4-5
2. Roberts, J.J. (1978) *Adv. Radiat. Biol.* 7, 211-435.
3. Livneh, Z., O. Cohen-Fix, R. Skaliter, and T. Elizur. (1993) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 465-513
4. Park, S.D., and J.E. Cleaver (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3927-3931.
5. Friedberg, E.C. (1985) *DNA repair*. W.H.Freeman and Company, pp 5-374.
6. Cleaver, J.E. (1977) *DNA repair mechanisms and the generation of sister chromatid exchanges in human cell lines from xeroderma pigmentosum patients*. Academic Press, Vol. VII. pp 341-354.
7. Cleaver, J.E. (1973) *Cancer Res.* 33, 362-369.
8. Regan, J.E. and R.B. Setlow (1974) *Cancer Res.* 34, 587-590.

9. Miller, M.R. and D.N. Chinault (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 10204-10209.
10. Seki, S., M. Ohashi, H. Ogura, and T. Oda (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 104, 1502-1508.
11. Park, J.K., J.S. Lee, H.H. Lee, I.S. Choi and S.D. Park (1991) *Life Sciences* 48, 1255-1261
12. Kim, H.J., Chun Y.J., Park J.D., Kim S.I., Rho J.K., and Jeong T.C. (1997) *Planta Med.* 63(5), 415-418.
13. Kim, S.H., Ho C.K., Yoo S.Y., Koh K.H., Yun H.G., and Kim T.H. (1993) *In Vivo* 7(5), 467-470
14. Rhee Y.H., Ahn J.H., Choe J., Kang K.W., and Joe C. (1991) *Planta Med* 57(2), 125-128
15. Salikhova R.A., Umnova N.V., Fomina M.M., Poroshenko G.G. (1994) *Izv Akad Nauk Ser Biol* 1, 48-55

Table 1. 자외선(20 J/m^2) 조사후 다양한 시간동안 정상배지로 배양한 NIH3T3 세포에서의 DNA 복제억제로부터의 완화에 대한 홍삼 추출물 후처리의 증진효과

증진효과	MMS 처리 후 배양시간(h)				
	0	2	6	12	24
% \pm S.D.	0	13.5 ± 2.8	23.8 ± 4.5	31.2 ± 5.7	34.2 ± 6.1

그림 설명

Fig. 1. Survival of cells exposed to UV light and then postincubated for various periods in normal medium containing red ginseng extract (closed circle) or not (open circle).

Fig. 2. Unscheduled DNA synthesis of cells exposed to various doses of UV light in the absence (open circle) or presence (closed circle) of ginseng extract.

Fig. 3. DNA single strand breaks of cells nonirradiated (open circle) or irradiated with UV light and then postincubated with polymerase inhibitors in the absence (closed circle) or presence (open triangle) of ginseng extract.

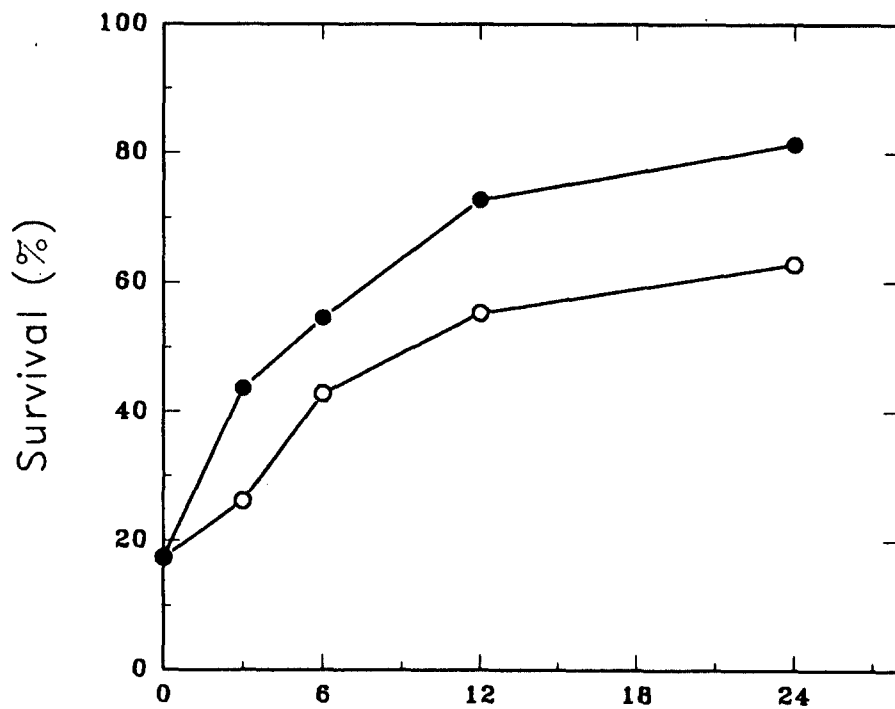


그림 1. Incubation time after UV exposure (hr)

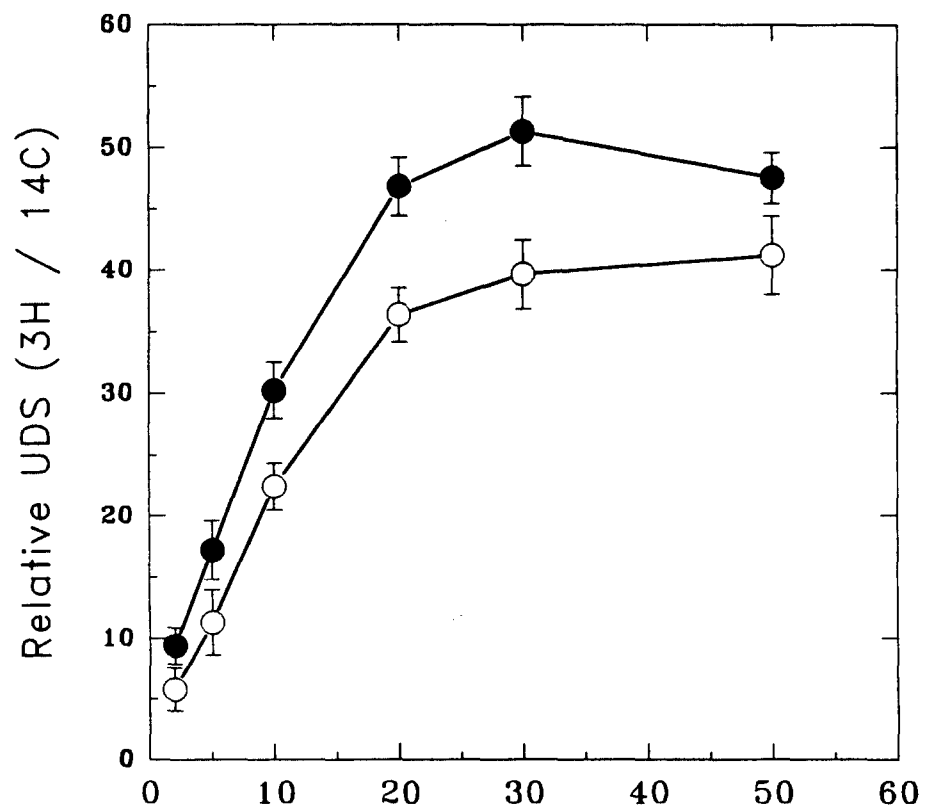


그림 2. UV Dose (J/m²)

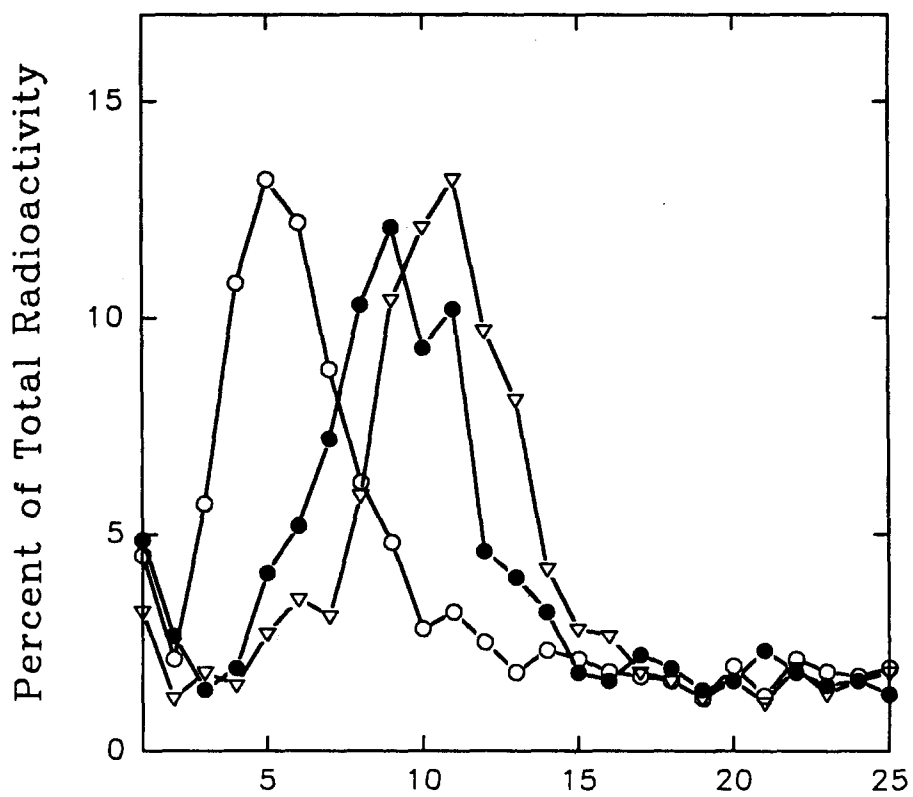


그림3. Fraction Number