

홍삼 추출물에 의한 유전독성  
감소효과 (II)

- 배양 NIH3T3 세포에서 MMS에 의한  
유전독성의 감소에 미치는  
홍삼추출물 처리효과

차재영, 유병수, 조철오<sup>1</sup>, 김인호<sup>2</sup>, 박민우<sup>2</sup>, 황재훈<sup>2</sup>, 김주덕<sup>2</sup>,  
박종균

원광대학교 의약자원 연구센터  
1, 한국과학기술원 생물과학과  
2, 소망화장품

Decrease of genotoxicity by red  
ginseng root extract (II)  
-Decrease of MMS-induced  
genotoxicity by red ginseng root  
extract in cultured NIH3T3 cells

Jae Young Cha, Byung Soo Ryu, Cheol O Joe<sup>1</sup>, In Ho  
Kim<sup>2</sup>, Min Woo Park<sup>2</sup>, Jae Hoon Hwang<sup>2</sup>, Ju Duk Kim<sup>2</sup>,  
Jong Kun Park

Department of Life Sciences and Medicinal Resources  
Research Center, Wonkwang University  
1, Department of Biological Sciences, KAIST  
2, Somang Cosmetics

## 요약

알킬화제인 MMS에 의한 유전독성의 감소에 미치는 홍삼추출물의 영향을 배양 NIH3T3 세포계에서 분석하였다. 1mM의 MMS를 30분간 처리한 후 정상 배지에서 배양한 시간간격에 따라 세포의 생존률은 증가하였는데 홍삼추출물이 함유된 배지에서 배양한 경우는 약 17%정도 증가한 생존률을 보였다. MMS 처리 후 감소된 DNA복제가 정상배지 배양시간에 따라 증가하는 정도도 홍삼추출물을 후처리할 경우 현저한 증가를 보였다. MMS 상해를 회복하기 위한 절제회복능은 홍삼추출물을 처리할 경우 유의미한 증가를 보였다. 이러한 절제회복과정중 효소에 의한 절제단계가 홍삼추출물 처리에 의해 활성화됨을 단사절단 분석을 통하여 규명하였다. 자외선 상해의 경우와 비해서 MMS 상해의 절제단계를 활성화하는 홍삼의 효과는 약간 떨어지는 것으로 보이나, MMS 상해회복의 전과정에 대한 홍삼의 효과는 자외선의 경우와 유사하였으며, MMS 상해에 의한 DNA 복제억제의 완화나 세포생존률은 자외선의 그것들보다 홍삼에 의해 더 증가된 측면을 보였다. 이상의 결과는 홍삼추출물이 MMS 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 MMS-induced genotoxicity in cultured NIH3T3 cells. The increase in survival and the recovery from DNA synthesis inhibition in MMS-treated cells as a function of normal medium incubation time was potentiated, at a rate higher than those in UV-irradiated cells, by the presence of the ginseng extract. The extract

also increased the MMS-induced excision repair as determined by unscheduled DNA synthesis. The amount of MMS-induced DNA single strand breaks that are accumulated by polymerase inhibitors was increased, but at a rate lower rate than in UV-induced strand break, by the presence of the extract. These results suggest that the red ginseng extract increase MMS-induced repair and could be used as a reagent for protecting alkylating agent-induced genotoxicity and cytotoxicity.

## 1. 서론

생명체의 유전인자는 항상 자외선이나 방사선등의 물리적 요인과 알킬화제 등의 화학적 요인에 의해 염기부가물등의 형태로 상해받고 이러한 상해가 절제회복 등의 기작에 의해 복구되지 않으면 세포독성, 암 유발및 돌연변이 유발의 치명적인 결과를 초래하게 된다는 사실이 정립되어 왔다<sup>1</sup>. 화학적 DNA 상해요인중 알킬화제들은 DNA를 포함하는 유기분자들의 친핵성 중심(nucleophilic center)에 대한 친화성을 갖는 친전자성(electrophilic) 화합물들이다. 일반적으로 염기들의 고리 질소원자들이 산소원자보다 더 친핵성으로, guanine의 N<sup>7</sup>과 adenine의 N<sup>3</sup>이 가장 반응성이 좋아 쉽게 알킬화되어 염기부가물이 형성되고, 돌연변이및 세포 변형등을 유발하는 것으로 알려져왔다<sup>2,3</sup>.

Methylmethanesulfonate (MMS) 같은 알킬화제에 의해 유발된 상해는 염기 절제회복에 의해 교정된다<sup>4</sup>. 염기상해는 deoxyribose- phosphate backbone에 염기를 연결하는 N-glycosylic bonds를 DNA glycosylase가 가수분해하여 자유염기로 제거하고 결과로 남는 apurinic 또는 apyrimidinic site는 5' apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease와 그 후 5'-> 3' exonuclease또는 3' AP endonuclease에 의해 무염기부위를 제거한다<sup>5</sup>.

절제단계 후에는 발생한 gap들을 DNA polymerase에 의해 채우는 중합과정의 일어난다. 포유동물세포에서는 DNA polymerase  $\alpha$ ,  $\delta$ , 및  $\beta$ 가 이 과정에 포함되는 것으로 알려졌다<sup>3,6</sup>. DNA polymerase  $\alpha/\delta$ 의 저해제인 aphidicolin과,

$\beta$ 의 저해제인 dideoxythymidine triphosphate 등을 이용하여, DNA polymerase들은 DNA 상해의 양이나 유형에 따라 DNA 회복과정에 다르게 기능한다는 것이 알려져 왔다<sup>2,7</sup>. Dimethyl sulfate 등의 알킬화제에 대한 회복 합성에는 polymerase  $\alpha$ 와  $\beta$  두가지가 다 참여된다고 알려져 왔다<sup>7</sup>. 본 연구자들은 알킬화제인 MMS에 의한 DNA 회복 합성의 중합과정에는 DNA polymerase  $\alpha/\delta$ 와  $\beta$ 가 순차적으로 참여함을 보고하였다<sup>8</sup>.

이러한 DNA 회복과정에 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 있다<sup>9</sup>. 또한 홍삼 성분들은 방사선에 대한 방어효과, 알킬화제에 의한 염색체 이상 및 미세핵 방어효과, 배양세포에서 돌연변이 감소 및 세포변형 감소 효과등이 보고된 바 있다<sup>10-12</sup>. 이에 본 연구자는 MMS에 의한 유전독성이 감소되는 현상의 원인이 되는 생명활동인 DNA 회복의 어떤 측면이 홍삼 추출물에 의해 활성화되는지를 규명하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2-1. 세포배양, MMS 처리 및 추출물처리

NIH3T3 세포들은 10% fetal calf serum이 존재 하는 MEM으로 37°C CO<sub>2</sub> humidified incubator에서 계대배양하였다. MMS는 혈청이 없는 배양 배지에 희석하여 처리하고 처리후에는 phosphate buffered saline 으로 2번 씻은 후 다음 분석들을 수행하였다. 홍삼 추출물은 일반적인 방법을 따라 준비하였고<sup>12</sup>, 사용한 농도는 0.5  $\mu$ g/ml로 이 농도까지에서 추출물 자체의 세포독성은 세포생존률 분석결과 정상대조군과 유의한 차이가 없었다.

### 2-2. 세포 생존률 분석

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

### 2-3. DNA 합성을 분석

$^{14}\text{C}$ -thymidine으로 선표지한 세포를 MMS에 노출시킨 후 정상배지 또는 홍삼물질을 포함하는 배지에서 배양하며 일정시간마다 10분간  $^3\text{H}$ -thymidine( $5\ \mu\text{Ci/ml}$ )으로 pulse 표지하고 일정수의 세포를 수확하여 2N NaOH 용액에 넣고 48시간 동안  $37^\circ\text{C}$  에서 방치하여 세포와 RNA를 분해하였다. 동량의 2N HCl로 중화한 후 다시 동량의 25% TCA를 첨가하여  $4^\circ\text{C}$ 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)

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

### 2-5. DNA사 단사절단분석

Tritium thymidine으로 선표지한 세포에 MMS를 처리하고 홍삼물질을 함유한 배지 또는 정상배지에서 다양한 시간 배양한 후 마지막 1시간 동안 단사절단을 축적하기 위해 hydroxyurea와 dideoxythymidine을 첨가하였다. 미리 준비한 5-20%의 자당밀도구배의 상층부에 있는 용해용액에

없이 4 시간동안 실온에서 녹인 후 25000 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

1mM의 MMS를 30분간 처리하였을 때의 세포생존률은 정상대조군에 비해 약 9.4% 정도를 보였다(그림 1). MMS 처리후 정상 배지에서 배양한 시간간격에 따라 세포의 생존률은 증가하였는데 24 시간의 경우는 약 72% 까지 점진적인 증가를 보였다(그림 1, ○). 한편, 홍삼추출물이 함유된 배지에서 배양한 경우는 모든 배양시간에 대해 정상배지 배양보다 평균 약 17%씩 더 증가한 생존률을 보였다(그림 1, ●).

#### 3.2. DNA 복제억제 완화효과분석

MMS에 의해 감소된 DNA 합성률이 홍삼추출물 처리시간에 따라 어떤 변화를 보이는지를  $^3\text{H}$ - thymidine의 삽입률에 의해 조사하였다.

세포에 1mM MMS를 30분간 처리 후 홍삼 추출물을 0 - 24 시간동안 처리할 경우, 홍삼 추출물은 MMS에 의한 DNA 합성율의 감소를 약 38 정도%까지 완화하는 효과를 보였다(Table 1). 흥미로운 사실은 홍삼의 효과가 MMS 처리 후 2-6시간에서는 자외선에 의한 DNA 복제억제의 완화현상보다 낮은데 비해 후기에서는 높다는 것으로 이는 DNA 상해의 종류와 이에 따른 회복의 유형이 달라짐에 따라 홍삼효과가 달리 나타난다는 것이다.

위의 두 결과는 홍삼추출물이 MMS 상해에 의한 DNA 복제억제로 부터 완화되는 것을 가속화하여 세포생존률을 증가시키는 것으로 해석되었고 이를 DNA 회복의 증진에 대해 조사하기 위해 다음의 실험을 수행하였다.

### 3.3. DNA 절제회복에 대한 효과

배양 세포에 다양한 농도의 MMS를 30분간 처리한 후 전체적인 회복합성의 지표인 비주기성 DNA합성(unscheduled DNA synthesis)을 분석하고 홍삼물질의 후처리가 이러한 결과들에 어떠한 영향을 미치는지를 같은 방법으로 분석하였다.

MMS의 농도가 증가할수록 DNA에 생긴 상해는 증가되고 세포는 이를 회복하기 위해 비주기성 DNA 합성을 더 많이 하게 되나 2 mM이상의 고농도에서는 세포의 단백질에 대한 알킬화가 급격히 일어나 비주기성 DNA 합성이 점차 감소된다(그림 2, ○). 홍삼추출물을 처리할 경우 MMS 상해를 회복하기 위한 절제회복능은 모든 MMS 농도범위에서 유의미한 증가를 보였다(그림 2, ●). 그러나 홍삼추출물이 단백질에 대한 알킬화를 효과적으로 방어하지는 않는 것으로 보였다.

이 결과는 자외선의 경우에서와 마찬가지로 MMS의 경우에서도 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 분석하였다. 먼저 <sup>3</sup>H-thymidine으로 선포지한 세포에 1mM MMS를 30분간 처리하고 다양한 시간동안 정상또는 홍삼 함유배지에서 배양한 후 중합단계를 저해하는 조건에서 1 시간동안 더 배양하고 세포를 수거하여 alkaline sucrose gradient sedimentation에 의한 DNA 크기의 분포를 구하였다. DNA 크기의 분포에 의해 100 mega dalton DNA에서의 DNA 절단이 몇번 일어났는지를 나타내는 단사절단빈도를 계산하였다.

이 분석에서 MMS를 처리하지 않은 정상대조군은 분획 5번 정도에서 peak을 형성하여 상해받지 않은 긴 길이의 DNA 크기분포를 보여주었고 평균 분자량은 약 180 mega dalton 정도를 나타내었다. MMS를 처리하고

정상배지에서 배양한 세포는 배양시간 경과에 따라 DNA 상해의 감소에 따른 단사절단 빈도의 감소를 보였는데 약 120시간 정도에서는 정상대조군 정도의 DNA크기를 보였다(그림 3. ○). 한편, 홍삼 함유배지에서 배양한 세포들은 모든 배양시간에서 더 유효한 DNA사의 축적을 유발함을 알 수 있었다(그림 3, ●).

자외선 상해의 경우와 비해서 MMS 상해의 절제단계를 활성화하는 홍삼의 효과는 약간 떨어지는 것으로 보이나, MMS 상해회복의 전과정에 대한 홍삼의 효과는 자외선이 경우와 유사하였으며, MMS 상해에 의한 DNA 복제억제의 완화나 세포생존률은 자외선의 그것들보다 홍삼에 의해 더 증가된 측면을 보였다. 이러한 차이는 홍삼의 다양한 성분들이 서로 다른 세포과정에 작용하기 때문에 발생하는 것으로 해석된다.

#### 4. 결론

이상의 결과는 홍삼추출물이 자외선 상해뿐 아니라 알킬화제인 MMS 상해의 절제회복의 절제단계 및 그외의 단계를 활성화하여 DNA 회복합성을 증가시키고, 이에 따라 DNA 상해가 감소되어 DNA 복제억제로부터 빨리 정상화되어 세포생존률을 증가시킴을 의미한다. 따라서 홍삼추출물은 물리적 요인인 자외선뿐 아니라 알킬화제나 다른 화학물질에 의한 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. Gorbacheva, L.B., G.V. Kukushkina, A.D. Durdeva and N.A. Ponomarenko. (1988) *Neoplasma (BRATISL)* 35(1), 3-14.
3. Miller, M.R. and D.N. Chinault (1982) *J. Biol. Chem.* 257 ; 10204-10209.
4. Regan, J.E. and R.B. Setlow (1974) *Cancer Res.* 34, 587-590.
5. Hanawalt, P.C., P.K. Cooper, A.K. Ganesan, and C.A. Smith (1979) *Annu. Rev. Biochem.* 48, 783-836
6. Seki, S., M. Ohashi, H. Ogura, and T. Oda (1982) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 104, 1502-1508.
7. Yamada, K, F. Hanaoka, and M. Yamada (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 10412-10417.
8. Park, I.S., J.K. Park, H.Y. Koh and S.D. Park (1991) *Cell Biol.Toxicol.* 7(1), 49-58.
9. Kim, H.J., Chun Y.J., Park J.D., Kim S.I., Rho J.K., and Jeong T.C. (1997) *Planta Med.* 1997 63(5) 415-418.
10. 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
11. Salikhova R.A., Umnova N.V., Fomina M.M., Poroshenko G.G. (1994) *Izv Akad Nauk Ser Biol* 1, 48-55
12. Rhee Y.H., Ahn J.H., Choe J., Kang K.W., and Joe C. (1991) *Planta Med* 57(2), 125-128

Table 1. MMS 처리후 다양한 시간동안 정상배지로 배양한 NIH3T3 세포에서  
 의 DNA 복제억제로부터의 완화에 대한 홍삼 추출물 후처리의 증진  
 효과

증진효과	MMS 처리 후 배양시간(h)				
	0	2	6	12	24
% ± S.D.	0	8.1 ± 1.9	19.5 ± 3.9	35.2 ± 6.3	38.4 ± 7.6

## 그림 설명

Fig. 1. Survival of cells treated with MMS 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 treated with various concentrations of MMS in the absence (open circle) or presence (closed circle) of ginseng extract.

Fig. 3. DNA single strand breaks of cells treated with MMS and then incubated for various periods in medium in the presence (open circle) or absence (closed symbol) of ginseng extract. At the end of each incubation, DNA polymerase inhibitors were added for accumulation of strand breaks.

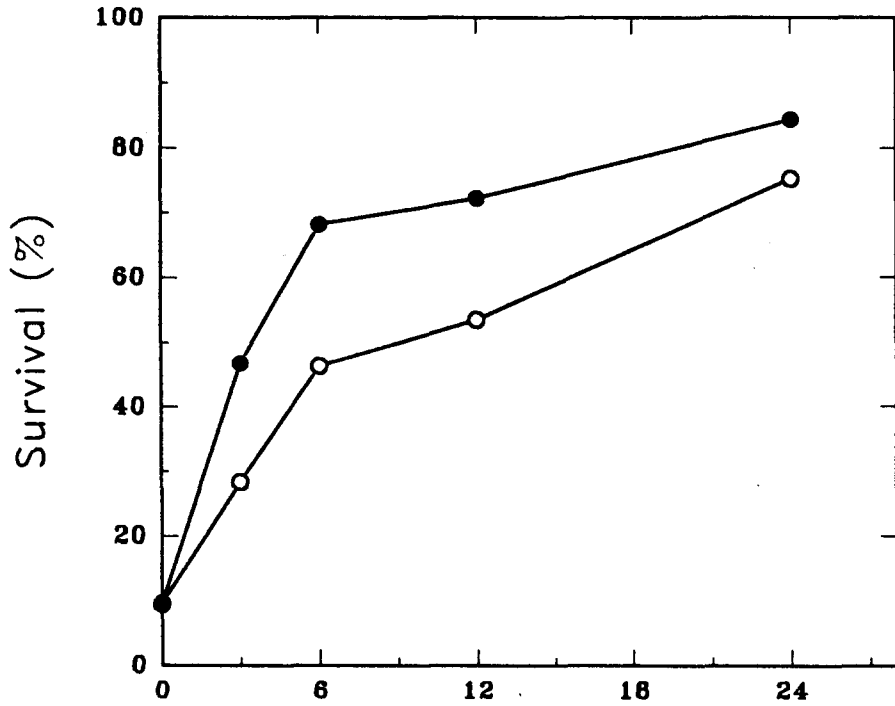


그림 1. Incubation time after MMS treatment (hr)

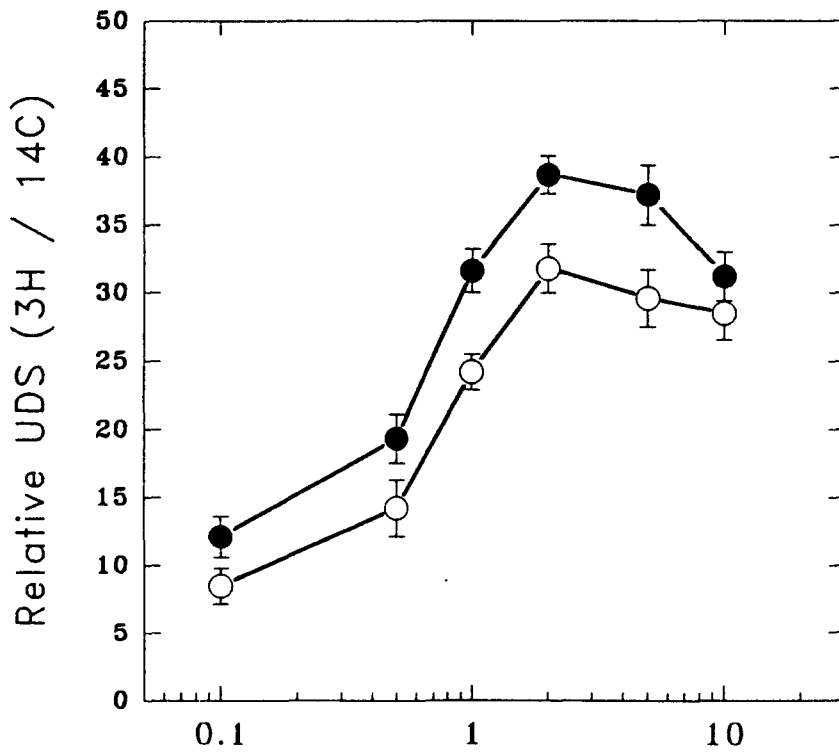


그림 2. MMS Dose (mM)

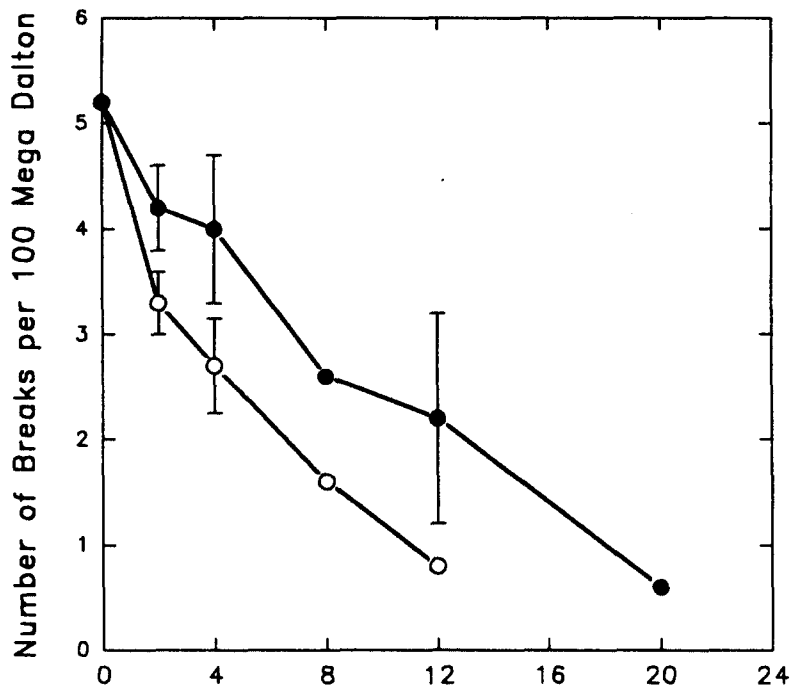


그림3. Time after MMS (hr)