J. Fd Hyg. Safety 13(3), 243 - 251(1998)

인삼 지용성성분의 유전독성억제효과와 작용기전

허문영†
강원대학교 약학대학

Antigenotoxicity of Ginseng Petroleum Ether Extract and its Action Mechanism

Moon Young Heo†
Kangwon National University, College of Pharmacy, Chunchon 200-701,Korea

ABSTRACT—*Panax ginseng* C.A. Meyer has been extensively used in the traditional oriental medicine as a restorative, tonic and prophylatic agent. Petroleum ether extract of *panax ginseng* C.A. Meyer (GPE) and its several fractions (P1-P5) were tested for the evaluation of antigenotoxicity against N-methyl-N-nitrosourea (MNU) and benzo(a)pyrene [B(a)P]-induced micronucleated reticulocytes in mouse peripheral blood. GPE and P2 showed more significant anticlastogenicity than other fractions did. To elucidate the anticlastogenic action mechanism of GPE and P2 against B(a)P, the alteration of B(a)P metabolism was studied. GPE and P2 inhibited B(a)P metabolism in the presence of S-9 mix and decreased B(a)P-DNA binding in calf thymus DNA with S-9 mix. They also decreased [^{3}H] MNU induced DNA binding and methylation to 7-methyl guanine and O^6-methyl guanine adducts in calf thymus DNA by HPLC analysis. These results suggest that the anticlastogenicity of GPE and P2 on the B(a)P or MNU-induced clastogenicity is due to decrease of DNA binding with B(a)P or MNU, the inhibition of metabolism with B(a)P and the inhibition of methylation in DNA. Therefore, GPE and P2 may be useful chemopreventive agents of alkylating agent like MNU and secondary carcinogen like B(a)P.

Key words □ Ginseng, Peripheral blood micronucleus assay, DNA binding, DNA methylation, Inhibition of Metabolism, Alkylating agent, N-nitro-N-nitrosourea (MNU), Benzo(a) pyrene, Cancer chemopreventive agent

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer, 이하 인삼이라 칭함)은 오래 전부터 동양의학에서 인체기능의 복원제, 강장제 및 예방제로서 널리 사용되어 왔다.[1] 최근에 인삼의 지용성 성분들이 동물이나 사람의 암세포에 뚜렷한 세포독성을 일으키고 있음이 밝혀졌는데,[2] 이러한 항암활성은 panaxydol, panaxynol과 같은 polyacetylene 화합물에 의한 것이라고 알려졌다.[3] 한편, 인삼이 사람에 있어서 위, 간 및 폐암과 같은 환경인자와 밀접하게 관련된 암을 예방하고 있다고 밝혀졌다.[4] 이 같은 사실로 미루어 볼 때 인삼은 항암활성과 함께 암예방활성을 모두 갖고있는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 인삼의 암예방활성에 초점을 맞추어 N-methyl-N-nitrosourea(MNU) 및 Benzo(a)pyrene [B(a)P] 등에 의해 일어나는 유전독성에 대하여 인삼의 억제효과를 밝히고자 한다. 이를 위하여, 인삼의 지용성성분인 석유에텔추출물의 세부분획과 이들 분획으로부터 분리된 순수물질들의 유전독성억제효과를 평가하고자 한다. 또한, 이러한 결과를 바탕으로 인삼석유에텔추출물로부터 유래된 항돌연변이, 암예방 기능성식품(functional food)과 나아가 의약품으로서의 암예방제를 개발에 기초자료를 제공하고자 본 연구를 실시하였다.

한편, 전보에서 인삼의 지용성성분을 대상으로 하여 *in vitro*에서의 antioxidant effect와 free radical 소거작용, H_2O_2 및 KO_2의 DNA에 대한 산화적 손상 및 세포독성에 미치는 영향을 연구하여 인삼의 지용성성분인 석유에텔추출물이 강한 항산화효과에 의한 산화적 DNA 손상에 억제효과를 보고한 바있다.[5] 이에 본 연구에서는 염색체손상을 지표로 하는 유전독성시험인 소핵시험을 이용하여 인삼석유에텔추출물과 그 분획들을 대상으로하여 이들의 유전독성억제

† Author to whom correspondence should be addressed.

활성을 검정하여 비교하고, MNU와 B(a)P에 의한 DNA손상을 규명할 수 있는 DNA binding과 methylated DNA 및 B(a)P metabolites 분석을 통하여 작용기전을 연구하였기에 보고하는 바이다.

실험방법

인삼 지용성 성분의 제조와 세부분획의 제조

백삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer, 4년근)을 가루로 한 다음 petroleum ether로 24시간 추출후 감압농축시켜 인삼석유에텔추출물(GPE)로 하였다. 이때 GPE의 수율은 평균 2.24%였다. 또한 GPE를 petroleum ether 소량에 녹이고 petroleum ether:ether 용매계열 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5순으로 용출시키는 silicagel column chromatography에 의한 partition을 실시하여 P1, P2, P3, P4, P5의 5개의 분획을 얻었다.

시약 및 재료

N-methyl-N-nitrosourea(MNU), benzo(a)pyrene[B(a)P] 및 7-methyl guanine[7-mG) 등 기타 시약들은 Sigma사에서 구입하였다. [^{3}H]N-nitro-N-nitrosourea(1.7 Ci/mmol; 1 Ci=62.9 GBq)은 Du Pont사로 부터 구입하여 사용하였다. 한편 O^6-methylguanine(O^6-mG)은 한림대 화학과 전종갑교수가 합성한 것을 사용하였다. FBS 등 세포배양에 필요한 시약들은 GIBCO사에서 구입하여 사용하였다.

실험동물

본 실험에서 사용되는 ICR mice는 (주)대한실험동물에서 공급받아 강원대 약대 동물사육실내에 있는 양압의 무균동물챔버에서 23±1°C 및 상대습도 55±7%의 조건으로 7~10일 동안 적응시킨 후 사용하였다. 사료는 (주)삼양유지의 마우스용 pellet 사료를 주었으며 물은 자유롭게 먹게하고, 12h/12h(L/D) cycle의 조건에서 실험하였다.

마우스 소핵시험(*in vivo* micronucleus test)[6]

In vivo micronucleus 시험을 ICR mice(♂, 25~30 g)를 사용하여 실시하였으며 실험군당 마우스는 5마리로 하였다. 양성대조물질로서는 MNU와 B(a)P를 사용하였다. 마우스의 말초혈액중 reticulocyte를 이용하는 소핵실험을 실시하였다. 시험의 개요는 B(a)P를 투여하고 48시간후 꼬리정맥에서 말초혈액을 채취하여 이를 acridine orange가 coating 되어있는 슬라이드 상에 떨어뜨리고 커버슬라이드를 덮은 다음 형광현미경으로 망상적혈구(reticulocytes, RETs) 중 소핵을 가진 망상적혈구(micronucleated reticulocytes, MNRETs)의 빈도를 관찰하였으며 이때 마우스 한마리당 1,000개의 RETs를 관찰하였다.

한편, 유전독성억제실험을 위해서는 양성대조물질인 MNU(40 mg/kg, i.p.) 및 B(a)P(150 mg/kg, i.p.)와 인삼석유에텔추출물 및 분획성분(0, 0.1, 1, 10, 100 mg/kg)을 각각 경구투여한 후 처음 투여 48시간후 말초혈액을 채취하여 소핵시험을 실시하였다. 본 실험에서 사용한 소핵유발 물질 중 MNU는 1차 발암물질인 alkylating agent로서 DNA에 작용하며, B(a)P는 2차 발암물질로서 대사활성후 DNA에 작용하는 물질이다.

MNU/DNA binding 정량[7]

Calf thymus DNA 100 μg에 [^{3}H]-MNU 10 μ Ci, MNU 2.5×10^{-6} M을 Tris/HCl(pH 7.4)에 녹이고, 인삼석유에텔추출물 및 분획성분을 소정농도가 되도록 가하여 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양후 2 M $Na(Ac)_2$:EtOH(1:50) 4.5 m*l*을 가하여 3,000 rpm에서 원심분리하고, DNA pellet에 95% EtOH 4.5 m*l*을 가하여 세척하고 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. DNA pellet은 N_2 gas중에서 건조하였다. N_2 gas로 건조시킨 DNA pellet을 50 mM EDTA/0.1 M NaCl 100 μ*l*로 녹인후 DNA 용액으로 하였으며, 이용액 10 μ*l*를 증류수 2.99 m*l*과 섞어 260 nm에서 UV 측정하여 DNA양을 계산하였다. 이 DNA용액 10 μ*l*를 cocktail 5 m*l*가 들어있는 glass vial에 넣고 현탁한 후 liquid scintillation counter(LSC)로 측정하였다.

Methylated DNA 정량[8]

상기 50 mM EDTA/0.1 M NaCl 100 μ*l*중에 녹아있는 DNA 용액 80 μ*l*를 따로 취하여 1 N-HCl 50 μ*l*를 가하고, 70°C에서 1시간 배양하여 가수분해시켰다. 2 N-NaOH 20 μ*l*를 가하여 중화시킨 후, 총량이 150 μ*l*가 된 검체를 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 80 μ*l*를 취하여 혼합표준액 16 μ*l*를 가해 검액으로 하였다.

HPLC 분석은 standard base들인 adenine, 1-methyladenine, guanine, 7-methylguanine(7-meG), O^6-methylguanine(O^6-meG), cytosine, thymine들과 용해시키는데 사용한 methanol, DMSO, free MNU들을 injection하여 peak를 확인 및 분리한 다음, 모두 합쳐 각각 20 μg/m*l*이 되게 표준액으로 제조하였다. 검체 20 μ*l*를 injection하여 7-meG와 O^6-meG의 용출액을 받아 cocktail과 혼합한 후, LSC로 측정하였다. HPLC는 Shimadzu 9A, column은 shimadzu C-18(ODS, 4.6 mm×20 cm)을 사용하였고, mobile phase는 10% citrate buffer(pH 3.8)를 사용하였다. 유속은 1 m*l*/min, 검출기의 흡광도는 254 nm로 하였다.

S-9 mix의 조제

S-9은 강원대학교 함승시교수로부터 분양받았다. 모든 실험 조작은 0~4°C의 냉동실에서 무균적으로 행하였고 유도물질로는 phenobarbital(PB)와 5,6-benzoflavone(BF)를 사용하였다. 멸균 생리식염수 1 m*l*당 20 mg의 PB를 용해하였고, corn oil 1 m*l*당 10 mg의 BF을 용해하여 유도물질로 사용하였다. 실험용 동물로는 체중이 198±6.2 g의 7주령된 흰 쥐(SD, male)를 사용하였으며 1일째는 30 mg/kg의 PB를, 2일째는 60 mg/kg의 PB를, 3일째는 60 mg/kg의 PB와 60 mg/kg의 BF를, 4일째는 60 mg/kg의 PB를 복강내에 투여한 후 5일째 단두 도살하여 충분히 방혈시켰다. 도살된 흰 쥐의 간에 냉생리 식염수를 혈관에 가하여 혈액을 제거하였으며 이것을 미리 칭량한 용액에 넣어 중량을 달고 세절하여 3배 중량의 냉각된 0.15 M KCl 용액을 가한 다음 teflon pestle로 homogenize 하였다. Homogenate를 9,000× g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액이 S9 fraction이며 이것을 1 m*l*씩 microbial centrifuge tube에 담아 dry ice bed 중에서 급속 동결한 후 -80°C deep freezer에 보존하면서 실험에 사용하였다. S9-mix는 실험 직전에 얼음상에서 시험관에 탈이온수 251 μ*l*, 0.2 M $NaHPO_4$ buffer(pH 7.4) 2.5 m*l*, 0.04 M NADP 0.5 m*l*, 0.2 M glucose-6-phosphate 125 μ*l*, Mg-K salt solution(1.65 M KCl+0.4 M $MgCl_2$) 144 μ*l*, S-9 1.48 m*l*의 순서로 가하여 잘 혼합하여 총 부피가 5 m*l*가 되도록 조제하였다.

B(a)P에 의한 DNA binding effect[9]

Calf thymus DNA 100 μg에 10^{-3} M의 B(a)P/DMSO 100 μ*l*, Tris/HCl buffer(pH 7.4) 100 μ*l*, S-9 mix 100 μ*l*, 인삼석유에텔추출물 및 분획성분의 시험용액 100 μ*l*를 가하고 37°C에서 6시간 동안 배양한 후 cold acetone 1 m*l*을 가하여 반응을 정지 시킨후, 2 M $Na(Ac)_2$:EtOH(1:50) 4.5 m*l*을 가하여 3,000 rpm에서 원심분리하고, DNA pellet에 95% EtOH 4.5 m*l*을 가하여 세척하고 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. 이 때 생긴 DNA pellet을 N_2-gas 중에서 건조한 후 50 mM EDTA/0.1 M NaCl 100 μ*l*에 녹여 DNA 용액으로 하였으며, 이 용액 10 μ*l*를 증류수 2.99 m*l*과 섞어 260 nm에서 UV 측정하여 DNA 양을 계산하였다. 남은 90 μ*l*에 1 N-HCl 100 μ*l*를 가하여 75°C에서 1시간 동안 가수분해를 한 후 2 N-NaOH 50 μ*l*를 넣어 중화시켰다. 3,000 rpm에서 원심분리하여 얻은 상등액 150 μ*l*을 DMSO 2.85 m*l*에 현탁하여 Perkin Elmer Fluorescence Spectrophotometer(Model LS-3)로 Excitation 370 nm, Emission 407 nm에서 형광을 측정하였다.

Benzo(a)pyrene metabolites 정량[10]

Tris/HCl buffer(pH 7.4) 280 μ*l*에 B(a)P 10^{-3} M 10 μ*l*(최종농도는 2×10^{-5} M)에 인삼석유에텔추출물 및 분획성분을 10 μ*l*, S-9 mix 200 μ*l*로 반응을 개시하여 6시간 동안 배양한 후 cold acetone 1 m*l*을 가하여 반응을 정지 시킨후, ethyl acetate 3 m*l* 가하여 미반응 B(a)P 및 대사물들을 추출하여 상온에서 감압농축한 후, methanol 2 m*l*에 용해시켜 HPLC(Shimadzu 9A)와 fluorescence detector(Ex. 370 nm, Em. 407 nm)를 사용하여 미반응 B(a)P를 분석하였다. 이때 사용한 HPLC 고정상은 Shimadzu C-18이고, 이동상은 75% acetonitrile을 사용하였다.

통계처리

실험을 통해 얻어지는 data들은 Student's t-test를 사용하여 유의성 검정을 하였다.

실험결과

소핵생성에 대한 효과

마우스에서 MNU 및 B(a)P유도 MNRET에 대한 석유에텔추출물과 분획성분들의 효과를 Table 1에 나타내었다. MNU유도 MNRET에 대하여 검체 중에서 GPE, P1, P2와 P4가 비교적 소핵생성억제효과를 뚜렷하게 나타내었다. B(a)P 유도 MNRET에 대해서는 GPE, P1-P5 모두 억제효과를 나타내었으나 GPE와 P2가 비교적 용량의존적인 억제경향을 나타내었다. Fig. 1에 GPE와 P2에 대하여 MNU 또는 B(a)P유도 소핵생성에 대한 억제효과를 비교하였는 바 GPE와 P2는 유사한 억제경향을 나타내는 것으로 보아서 GPE의 억제효과는 그 중에 함유되어 있는 P2의 억제활성과 관련이 큰 것으로 판단되었다.

인삼석유에텔추출물 및 분획들의 소핵생성효과

한편, 인삼석유에텔추출물과 분획성분들의 염색체 손상성을 알기위하여 각각의 시료를 100 mg/kg 경구투여했을 때의 소핵유발능을 Table 2에 나타내었다. GPE를 비롯한 P1-P5 모두 용매대조군에 비하여 전혀 유의성있는 증가를 나타내지 않았다. 따라서 본 시험에 사용한 인삼석유에텔추출물들은 투여용량 이내에서는 염색체손상성(clastogenicity)가 없는 유전적으로 안전한 물질로 판단되었다.

MNU에 의한 DNA binding 및 methylated DNA 생성에 미치는 효과

Table 3에서 나타낸 것처럼 calf thymus DNA에 MNU 2.5×10^{-6} M과 [^{3}H]-MNU 10 μ Ci 및 인삼석유에텔추출물을 처리하였을 때 DNA와 [^{3}H]-MNU의 binding이 GPE의 경

Table 1. Effect of ginseng petroleum ether extract and its fractions on the frequency of MNRETs by MNU or B(a)P

Treatment[1] (mg/kg, p.o.)		MNRETs/1,000 RETs (Mean±S.E.)[2]	
		MNU (40 mg/kg)	B(a)P (150 mg/kg)
GPE	0	37.4±2.80	7.4±0.24
	0.1	33.2±2.87	7.8±0.48
	1	29.0±1.38*	6.5±0.65
	10	27.0±3.99**	5.2±0.58
	100	21.8±2.96*	3.4±0.51**
P1	0	24.0±0.71	8.8±0.86
	0.1	21.4±1.29	4.8±0.37*
	1	21.0±1.14	5.0±0.71*
	10	19.0±0.95*	4.4±0.68*
	100	12.4±1.69**	5.8±0.80*
P2	0	25.2±1.66	8.8±0.86
	0.1	22.4±0.68	6.8±1.02*
	1	22.0±1.34	6.0±0.45**
	10	18.3±4.50*	4.0±0.55*
	100	11.4±1.03**	2.8±0.58**
P3	0	20.8±2.65	7.4±0.24
	0.1	18.2±2.33	7.6±1.36
	1	20.0±3.03	6.4±0.75
	10	16.8±2.59	5.8±0.58*
	100	21.0±3.16	4.4±0.60*
P4	0	28.6±1.50	9.6±1.03
	0.1	20.0±2.84*	8.6±0.24
	1	19.0±1.64*	5.0±0.63*
	10	19.4±2.62**	7.8±0.58
	100	26.2±3.06b	7.2±0.58*
P5	0	23.6±2.11	9.6±1.03
	0.1	19.6±1.63	7.4±0.87
	1	24.0±1.05	6.8±0.86*
	10	21.0±0.63	8.6±0.75
	100	23.8±3.64	4.2±0.37**

[1]Mice (n=5) were treated with MNU (40mg/kg, i.p.) or B(a)P (150mg/kg, i.p.) and sample (p.o.), simultaneously, and then peripheral blood was collected from tail after 48h.
[2]1,000 reticulocytes (RETs) per animal were examined and the frequency of MNRETs was scored.
Significantly different from the control group at *p<0.05 and **p<0.01 (Student's t-test).

Table 2. The clastogenicity of fractions of ginseng petroleum extract

Treatment[1] (100 mg/kg, p.o.)	MNRETs/1,000 RETs[4]					
	individual value					Mean±S.E.
Mitomycin C[2]	29	28	30	29	30	29.2±0.37**
Corn oil[3]	0	1	0	1	3	1.0±0.55
GPE	3	1	0	2	0	1.2±0.58
P1	0	1	1	0	0	0.4±0.25
P2	0	0	0	0	0	0.0±0.00
P3	1	0	0	0	0	0.2±0.20
P4	1	1	0	0	0	0.4±0.25
P5	0	1	0	1	0	0.4±0.25

[1]Pheripheral blood was collected 48h after treatment.
[2]Mitomycin C was administered intraperitoneally (1 mg/kg).
[3]Corn oil was administered orally (0.1 m*l*/25 g).
[4]1,000 reticulocytes (RETs) per animal were examined and the frequency of MNRETs was scored.
**Significantly different from the solvent control group at p <0.01 (Student's t-test).

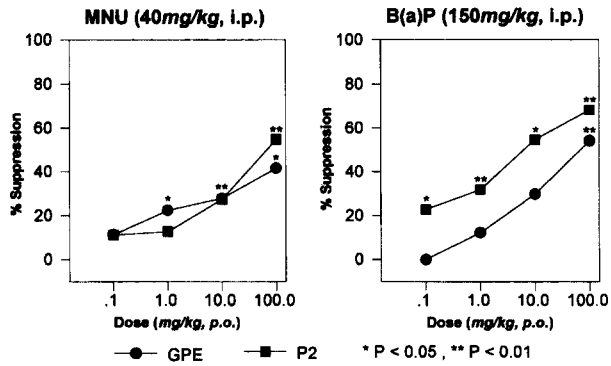

Fig. 1. Suppression of GPE and P2 on MNU or B(a)P-induced micronuclei formation in mouse reticulocytes. Mice (n=5) were treated with MNU (40 mg/kg, i.p.) or B(a)P (150 mg/kg, i.p.) and sample (p.o.), simultaneously, and then peripheral blood was collected from tail after 48h. 1,000 type I and II reticulocytes (RETs) per animal were examined and the frequency of MNRETs was scored.
Significantly different from the control group at *p< 0.05 and **p<0.01 (Student's t-test).

우 2×10^{-3} M에서 12.2%, 2×10^{-2} M에서 26.4%, 2×10^{-1} M에서 24.9%의 억제효과를 나타내었으며, P2의 경우 2×10^{-1} M에서 86.4%의 억제효과를 나타내었으나 농도의존적 억제경향은 작았다.

한편, Table 4에서 나타낸 것처럼 calf thymus DNA에 MNU 2.5×10^{-6} M과 [^{3}H]-MNU 10 μ Ci 및 인삼석유에텔추출물을 처리하였을 때 7-methyl guanine생성이 GPE의 경우 2×10^{-1} M에서 13.5%의 억제경향을 나타내었으며 P2의 경우 2×10^{-1} M에서 67.2%의 억제경향을 나타내었다. O^6-methyl guanine생성도 GPE의 경우 2×10^{-1} M에서 11.6%의 억제경향을 나타내었으며 P2의 경우 2×10^{-1} M에서 31.8%의 억제경향을 나타내었으나 농도의존적 억제경향은 작았다.

Benzo(a)pyrene의 DNA binding에 미치는 영향

Table 4에 나타낸 것처럼 calf thymus DNA에 B(a)P를 10^{-3} M이 되도록 가하고 여기에 S-9 mix를 20%가 되도록 가한 후 인삼석유에텔추출물을 농도별로 첨가하여 배양하

Table 3. The effect of GPE and P2 on MNU-induced the DNA adducts of nucleotide and DNA binding

Treatment[1] (μg/ml)		% Suppression[2,3] 7-methyl guanine	O^6-methyl guanine	Total DNA binding
GPE	2×10^{-3}	0	0	12.2
	2×10^{-2}	3.6	30.3	26.4
	2×10^{-1}	13.5	11.6	24.9
P2	2×10^{-3}	0	0	0
	2×10^{-2}	0	0	0
	2×10^{-1}	67.2	31.8	86.4

[1]DNA was incubated with MNU (2.5×10^{-6} M) and [^{3}H]-MNU with sample for 24h at 37°C in Tris buffer (pH 7.4).

[2]% suppression =

$$100-\frac{\text{DPM}/\mu g \text{ of DNA in the presence of sample}}{\text{DPM}/\mu g \text{ of DNA in the absence of sample}}\times 100$$

[3]% suppression from duplicate experiments.

Table 4. Suppressive effects of GPE and P2 on DNA binding effect by benzo(a)pyrene with S-9 mix

Treatment[1] (μg/ml)	Fluorescence intensity (Ex. 370 nm, Em. 407 nm) Mean±S.D.[2] GPE	P2
0	55.0±5.56	56.6±3.51
2×10^{-3}	56.0±6.08	57.6±3.78
2×10^{-2}	16.6±3.51**	49.3±5.13*
2×10^{-1}	6.6±1.15**	41.3±7.63*

[1]DNA was incubated with 10^{-3} M B(a)P, 20% S-9 mix and GPE and P2 for 6h at 37°C in Tris buffer (pH 7.4).

[2]Triplicate experiments

*,**Significantly different from the control group at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively (Student's t-test).

였을 때 DNA와 결합된 B(a)P 화합물을 분석한 결과, 인삼석유에텔추출물 투여농도증가에 따라 DNA binding 효과는 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 GPE와 P2는 B(a)P metabolite들과 DNA와의 결합을 억제하거나 또는 DNA와의 결합형태인 ultimate form으로의 대사를 억제하는 기전등으로 DNA binding을 감소시키는 것으로 판단된다.

Benzo(a)pyrene 대사억제효과

Table 5에 나타낸 것처럼 calf thymus DNA에 B(a)P를 20 μM이 되도록 가하고 여기에 S-9 mix를 20%되도록 가한 후 인삼석유에텔추출물을 농도별로 첨가하여 배양하였을 때 DNA와 결합하지 않고 잔류하고 있는 미대사체 B(a)P 화합물을 ethyl acetate로 추출하여 HPLC로 분석한 결과, 인삼석유에텔추출물 투여농도증가에 따라 미대사체 B(a)P

Table 5. The suppressive effects on benzo(a)pyrene metabolism with S-9 mix by GPE and P2.

Treatment[1] (μg/ml)	Residual B(a)P (μM)[2] Mean±S.D.[3] GPE	P2
0	1.73±0.057	1.73±0.057
2×10^{-3}	1.76±0.057	1.66±0.115
2×10^{-2}	2.53±0.057**	2.26±0.115*
2×10^{-1}	2.90±0.100**	2.50±0.200*

[1]20 μM B(a)P was incubated with GPE and P2 for 6h at 37°C in Tris buffer (pH 7.4)

[2]The residual B(a)P was analyzed by reversed-phase HPLC.

[3]Triplicate experiments.

*,**Significantly different from the control group at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively (Student's t-test).

의 양은 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 GPE와 P2는 B(a)P의 대사를 억제하여 DNA와의 결합형태인 ultimate form으로의 변화를 억제하는 기전으로 Table 4에서 나타난 결과인 DNA binding을 감소시키는 것으로 판단된다.

고 찰

백삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer, 4년근)을 가루로 한 다음 petroleum ether로 24시간 추출후 감압농축시켜 인삼석유에텔추출물(GPE)로 하였다. GPE를 petroleum ether 소량에 녹이고 petroleum ether:ether 용매계열로 용출시켜 P1-P5의 5개의 분획을 얻었다. 여러가지 활성을 보인 분획 중에서 양성대조물질들에 대해서 가장 두드러져 보이는 것은 P2였다. P2는 MNU, B(a)P 모두에 대해서 GPE와 유사한 억제경향을 보이면서 억제활성을 크게 나타났다. 따라서 P2가 GPE가 보이는 소핵생성억제효과에 깊은 관련이 있는 물질로 판단되었다.

이와 같은 유전독성억제효과의 작용기전을 알기 위하여 실시한 MNU에 의한 DNA binding과 O_6-methyl guanine 및 7-methyl guanine생성에 있어서도 억제적인 경향을 나타내었다. 한편, B(a)P의 대사에 미치는 영향을 연구한 결과 GPE와 P2는 S-9 mix에 의해 유도된 B(a)P대사를 억제시켰다. 따라서, GPE와 P2는 MNU와 같은 알킬화제에 의한 DNA alkylation 억제, B(a)P와 같은 2차발암물질이 활성대사억제를 통한 DNA binding 억제 등의 기전으로 소핵생성 등의 유전독성을 감소시키고 있는 것으로 판단되었다.

그동안 인삼의 petroleum ether 분획이 암세포의 증식을 억제한다는 것이 발표되어,[11] 그후 인삼의 항암성분에 관한 연구가 많이 진행되어 왔다. 항암성 석유에텔분획에서 polyacetylene 화합물이 분리되어 구조가 밝혀지고 세포독성

이 확인된 바있다.[12] 황 등의 연구에 의하면 물, 알콜(95%), 클로로포름, 에텔, 석유에텔 등의 추출물이 L1210 배양액에서 나타내는 세포증식억제율은 석유에텔과 같은 비극성이 큰 용매의 추출물에서 컸다. 이에 따라 석유에텔에서 추출되는 조추출물과 부분정제한 성분(7:3 GX)의 암세포증식억제효과를 인삼 saponin계 성분과 polyacetylene계 화합물인 panaxydol, panaxynol과 비교실험한 결과, 석유에텔조추출물보다 부분정제한 성분의 효과가 컸으며, saponin계열 화합물은 효과가 없었으나, panaxydol, panaxynol은 부분정제된 성분보다 낮은 농도에서 증식억제효과가 있었다. 또한 sarcoma 180이 접종된 담암동물에서도 부분정제된 성분이 대조군 보다 수명연장효과가 컸음이 밝혀졌다.[13] 이러한 polyacetylene물질들의 세포독성은 김등에 의해 DNA, RNA, protein 합성저해에 의한 것이라고 보고되었다.[14,15]

인삼성분에 의한 암예방작용과 성인병예방효과에 대한 관심이 커지고 있다. 암환자와 정상인을 대상으로 하여 조사한 결과, 인삼제제의 섭취는 각종 암을 예방하며, 인삼엑기스나 분말을 복용한 경우 인삼쥬스나 차를 음용한 경우보다 훨씬 예방효과가 컸음을 밝혔다.[5] 한편, 인삼의 암예방효과는 유방암, 자궁암, 갑상선암 등 호르몬 관련암 보다 위암, 폐암, 간암 등 환경요인과 관련된 암에 대하여 효과적이라고 보고하였다.[5] 암의 발병원인 중 70~80%가 환경인자들, 즉 방사선, 화학물질 등에 의한 것이라는 사실에 비추어 볼 때 인삼중에는 nitrosoamine, benzo(a)pyrene, aflatoxin, 방사선 등의 환경발암인자에 보호작용을 하는 물질들이 들어있다고 보여진다.

인삼성분에 의한 방사선 보호작용도 광범위하게 연구되고 있다. 방사선은 생체내의 물이나 물질들에 대한 전리작용을 통해서 각종 유해라디칼이 생성되어 세포독작용, 돌연변이, 노화, 암 등을 유발하고있다.[16] 따라서 인삼의 방사선 보호작용은 암예방제의 효과와 밀접한 관련이 있을 수 있다. Zhang 등은 인삼의 수용성성분이 γ선에 대하여 보호효과가 컸으며, protein이나 carbohydrate 분획은 효과가 약했으며 saponin 분획은 효과가 없었다고 보고하였다.[17] 한편, 인삼의 단백분획정제물이 마우스에서 γ선에 대한 방어작용, CHO 세포에서의 자외선이나 알킬화제에 의한 자매염색분체교환 및 염색체이상억제효과, 자외선에 의한 DNA repair 손상보호작용 등을 보고하였다.[18-20]

또한, 공 등에 의하면 X선 및 중성자 방사선에 폭로된 마우스에 대하여 인삼엑기스, 인삼분말, 아답토겐^{R}(인삼알카로이드성분과 인삼분말 및 일부생약제제 혼합)을 먹인 군에서 생존율이 높았으며, 아답토겐^{R}을 먹인 군은 특히 효과가 컸으며, 간세포의 정상화 및 혈청학적개선효과가 컸다.[21,22] 인삼성분에 의한 유전독성억제작용에 관한 연구는 별로 많지 않다.

정 등은 인삼엑기스가 Ames 돌연변이시험에서 그자체로는 변이원성이 없음을 보고한 바있다.[23] 강력한 환경발암물질인 benzo(a)pyrene에 대해서 인삼의 물 추출물, 75% 에탄올 추출물과 panxynol, panaxydol이 benzo(a)pyrene의 활성대사에 관여하는 enzyme modulation과 metabolite생성에 관여하여 발암성이 큰 대사산물의 생성을 억제시키는 한편, 해독대사를 증가시켜 DNA와의 부가체생성도 억제하고있다고 밝힌 바있다.[24-29] 이러한 사실은 benzo(a)pyrene에 의한 유전독성이 cytochrome P450에 의한 활성대사산물인 benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide가 DNA와 비가역적 결합을 통하여 돌연변이, 암을 일으키는 기전을 고려해볼 때 인삼의 특정성분들이 이들 발암기전을 blocking하여 암예방효과를 나타낼 수 있다고 보여진다.

한편, 항암작용이 보고된 polyacetylene 물질(panaxydol, panaxynol)들이 benzo(a)pyrene 유전독성의 예방효과에도 관여하고 있음이 나타났는데,[27] 일반적으로 세포독성이 있는 항암제들은 정상세포에서는 발암제로 작용하는 사실에 비추어 이들의 유전독성 억제효과는 흥미있는 연구대상이 된다고 보여진다. 박 등은 CHO세포에서 benzo(a)pyrene에 유도된 DNA strand break와 replication inhibition에 대하여 panaxadiol saponin과 panaxatriol saponin이 억제효과가 있었고, DNA adduct 생성도 감소되었음을 보고한 바있다.[24]

또한, 심 등에 의하면 홍삼엑기스:증류수(1:1)을 3일 동안 7번 연속투여한 결과 cyclophosphamide에 의한 마우스골수소핵생성이 억제되었으며, urethane과 ethylmethane sulfonate에 의한 소핵생성은 유의성있게 억제되지 않았음을 보고하였다.[30] 본 저자 등은 인삼추출물의 소핵생성억제효과에서도 인삼의 에탄올, 사포닌, 석유에테르추출물중 석유에테르추출물이 B(a)P, cyclophosphamide에 대하여 억제효과가 가장 컸다고 보고한 바있다.[31,32] 한편, calf thymus DNA를 이용한 DNA binding 실험에서는 GPE와 P2 같은 인삼석유에텔추출물들이 MNU에 의한 DNA binding을 저해하고 있는 것으로 나타났으며, 이로 인해 7-methyl guanine과 O^6-methyl guanine의 생성도 감소되었다. 이러한 억제효과들은 GPE와 P2 같은 인삼석유에텔추출물들이 DNA 보호작용을 함으로서 소핵생성을 억제하는 것과 직접 관련이 있을 것으로 추정된다. B(a)P는 간내 CYPs 효소들에 의해 B(a)P-7,8-diol-9,10-epoxide 같은 ultimate forms이 생성되어 이들이 DNA와의 비가역적 결합을 함으로써 mutation이 일어나는 것으로 잘 알려져있다.[33] B(a)P 유전독성억제효과의 작용기전을 규명하기위하여 DNA level에서 B(a)P에 대한 calf thymus DNA와의 binding 효과를 시험하였는바 cytochrome p450 1A2 inducer인 β-naphtoflavone은 B(a)

P와 DNA와의 binding을 농도의존적으로 증가시키나 quercetin 및 그 배당체들은 농도의존적으로 감소시켰다.[10] 따라서 본 실험대상 GPE와 P2와 같은 인삼석유에텔추출물들은 CYPs inhibitor로서 작용하는 것으로 판단된다. 이 같은 결과는 여러 연구자들이 보고한 바 있는 인삼 등이 CYPs 관련 효소들의 저해효과를 갖고 있다는 사실과 일치한다.[25,27-29] 따라서 본 연구에서는 GPE와 P2와 같은 인삼석유에텔추출물들이 나타내는 유전독성억제작용이 또다른 작용기전일 수 있는 DNA repair modulation효과를 전혀 배제할 수 없지만, 적어도 B(a)P metabolism을 억제하여 DNA와의 adduct 형성을 감소시켜 일어나는 것으로 추정된다.[25]

한편, 분획물들의 NMR구조분석 결과 P1과 P5는 혼합물이었고, P3는 panaxydol, P4는 panaxynol로 추정되었다. 가장 활성이 좋게 나타났던 P2는 NMR과 GC/MS결과 aliphatic ketone류의 혼합물로서 $C_{22}H_{28}O_2$, $C_{23}H_{31}O_2$ 및 $C_{24}H_{33}O_2$ 등이 함유된 유사화합물의 혼합물(Data not shown)로 추정되어 향후 분리를 통한 단일물질구조규명을 실시할 예정이다.

발암의 전단계에서 일어나는 돌연변이(mutation)나 염색체 손상(chromosome aberration) 등의 유전독성(genotoxicity)에 대한 억제물질들은 암의 initiation, promotion 및 progression 단계에서 세포내 대사의 modulation, DNA 반응성 물질들의 blocking, DNA replication이나 DNA repair modulation 작용과 같은 기전으로 돌연변이나 염색체 손상 및 암을 예방할 수 있는 것으로 기대되고 있다. 또한, 이러한 유전독성 억제제들은 세포독성을 근거로 한 항암제와는 달리, 그 자체로서는 세포독성 및 유전독성이 거의 없기 때문에 인체에 안전하게 사용될 가능성이 높으며, cell transformation이나 cell proliferation 등에도 억제적으로 작용하여 항암제의 보조요법제나 2차 암의 예방등에도 사용가능성을 보여주고 있다. 따라서 본 시험에서 사용하고 있는 GPE와 P2와 같은 인삼 지용성성분들은 각종 환경으로부터 수시로 체내에 들어오는 각종 발암인자들에 대한 보호작용과 암의 예방요법제로서의 응용가능성이 크다고 보여진다.

결 론

백삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer, 4년근)을 가루로 한 다음 petroleum ether로 24시간 추출후 감압농축시켜 인삼석유에텔추출물(GPE)로 하였다. GPE를 petroleum ether 소량에 녹이고 petroleum ether:ether 용매계열로 용출시켜 P1~P5의 5개의 분획을 얻었다. 여러가지 활성을 보인 분획 중에서 양성대조물질들에 대해서 가장 두드러져 보이는 것은 P2였다. P2는 MNU, B(a)P 모두에 대해서 GPE와 유사한 억제경향을 보이면서 억제활성은 크게 나타났다. 따라서 P2가 GPE가 보이는 소핵생성억제효과에 깊은 관련이 있는 물질로 판단되었다.

이와 같은 유전독성억제효과의 작용기전을 알기 위하여 실시한 MNU에 의한 DNA binding과 O^6-methyl guanine 및 7-methyl guanine생성에 있어서도 억제적인 경향을 나타내었다. 한편, B(a)P의 대사에 미치는 영향을 연구한 결과 GPE와 P2는 S-9 mix에 의해 유도된 B(a)P대사를 억제시켰다. 따라서, GPE와 P2는 MNU와 같은 알킬화제에 의한 DNA alkylation 억제, B(a)P와 같은 2차발암물질이 활성대사억제를 통한 DNA binding 억제 등의 기전으로 소핵생성 등의 유전독성을 감소시키고 있는 것으로 판단되었다. 따라서 GPE와 P2와 같은 인삼 지용성성분들은 각종 환경으로부터 수시로 체내에 들어오는 각종 발암인자들에 대한 보호작용과 암의 예방요법제(cancer chemopreventive agent)로서의 응용가능성이 크다고 보여진다.

감사의 말씀

본 논문은 한국과학재단 핵심전문연구비(과제번호 951-0711-063-2)지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

국문요약

백삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer, 4년근)을 가루로 한 다음 petroleum ether로 24시간 추출후 감압농축시켜 인삼석유에텔추출물(GPE)로 하였다. 이때 GPE의 수율은 평균 2.24%였다. 또한 GPE를 petroleum ether 소량에 녹이고 petroleum ether:ether 용매계열로 silicagel column chromatography에 의한 partition을 실시하여 P1, P2, P3, P4, P5의 5개의 분획을 얻었다. 본 실험에서는 소핵생성 물질인 N-methyl-N-nitrosourea(MNU) 및 benzo(a)pyrene[B(a)P]를 이용하여 소핵생성억제실험을 하였다. 상기의 5가지 분획 중에서 MNU에 대해서는 GPE, P1, P2에서 억제효과가 나타났다. 한편, B(a)P에 대해서는 GPE, P1, P2, P3, P4, P5 모두에서 억제효과를 나타내었

다. 그러나 여러 가지 활성을 보인 분획 중에서 여러 가지 양성대조물질들에 대해서 가장 두드러져보이는 것은 P2였다. P2는 MNU, B(a)P 모두에 대해서 GPE와 유사한 억제경향을 보이면서 억제활성은 크게 나타났다. 따라서 P2가 GPE가 보이는 소핵생성억제효과에 깊은 관련이 있는 물질로 판단되었다. 이와 같은 유전독성억제효과의 작용기전을 알기 위하여 B(a)P의 대사에 미치는 영향을 연구한 결과 GPE와 P2는 S-9 mix에 의해 유도된 B(a)P 대사를 억제시켰으며, DNA-B(a)P binding도 감소시켰다. 한편, MNU에 의한 DNA binding과 O^6-methyl guanine 및 7-methyl guanine 생성에 있어서도 억제적인 경향을 나타내었다. 따라서, GPE와 P2는 B(a)P와 같은 2차발암물질과 MNU와 같은 알킬화제에 의한 유전독성을 활성대사억제 및 methylation억제, DNA binding 억제 등의 기전으로 감소시키고 있는 것으로 판단되었다. 한편, 소핵생성억제효과에서 가장활성이 좋았던 P2를 NMR과 GC/MS결과, aliphatic ketone류의 혼합물로서 주성분은 분자량 330과 386의 두 개물질이 함유되어있는 혼합물이었으며 향후 계속적으로 분리동정이 필요한 물질이다.

참고문헌

1. 한국인삼연초연구원: 고려인삼. 한국인삼연초연구원 (1994).
2. Hwang, W.I., Park, G.H. and Paik, J.-M.: A cytotoxic activity of Panax Ginseng extract against some cancer cells *in vivo* and *in vitro*. *Korean J. Ginseng Sci.,* **11**, 173-181 (1987).
3. Hwang, W.I.: A study on the antitumor activity of Panax Ginseng. *Korean J. Ginseng Sci.,* **17**, 52-60 (1993).
4. Yun, T.K. and Choi, S.Y.: Preventive effect of Ginseng intake on various human cancers; a case-control study. *Korean J. Ginseng Sciences,* **14**, 237-237 (1990).
5. 허문영: 인삼지용성성분의 지질과산화 및 산화적 DNA 손상에 대한 억제효과. 식품위생안전성학회지, **12**(4), 315-320 (1997).
6. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, Jr., M.: The micronucleus assay with peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation. Res.,* **278**, 209-213 (1990).
7. Dixit, R. and Gold, B.: Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA,* **83**, 8039-? (1986).
8. 손수정, 김정한, 김영진, 허인회, 허문영: N-Methyl-N-nitrosourea 유도 자매염색분체교환생성과 DNA 메칠화에 대한 galangin의 억제효과. 약학회지, **39**, 94-101 (1995).
9. 허문영, 김정한, 김영진, 류재천: Galangin의 유전독성억제효과와 작용기전. 한국환경성돌연변이. 발암원학회지, in press (1998).
10. 김정한, 허문영: Quercetin 및 Quercetin 배당체들의 Benzo(a)pyrene에 대한 유전독성억제효과. 약학회지, in press (1998).
11. Hwang, W.I. and Oh, S.K.: A study on the anticancer activities of lipid soluble ginseng extract and ginseng sapongin derivatives against some cancer cells. *Korean J. Ginseng Sci.,* **8**(2), 153-166 (1984).
12. Ahn, B.Z. and Kim, S.I.: Panaxydol, the cytotoxic principle of the Panax ginseng root against L1210 cell. *Arch. Pharm. Res.,* **8**, 283-284 (1985).
13. 황우익: 인삼의 항암작용, 고려인삼학회지, **16**, 170-171 (1992).
14. 김영숙, 김신일, 한덕용: 인삼 포리아세틸렌 화합물이 Lymphiod lukemia L1210의 고분자물질 합성에 미치는 영향. 약학회지, **32**, 137-140 (1988).
15. 김신일, 이유희, 강규상: 인삼 중의 세포독성물질 10-acetyl panaxytriol의 분리. 약학회지, **33**(2), 118-123 (1989).
16. Ward, J.F.: Progress in nucleic acid research and molecular biology. Vol. 35, Academic Press, pp.95 (1988).
17. Zhang, J.S., Sigdestad, C.P., Gemmell, M.A. and Grdina, D.J.: Modification of radiation response in mice by fractionated extracts of Panax ginseng. *Radiation Research,* **112**, 156-163 (1987).
18. 김춘미, 박경애: Gel filtration에 의한 항방사선 인삼단백 분획의 정제. 고려인삼학회지, **13**, 254-259 (1989).
19. 김춘미: Mechanisms of the radioprotective activity of ginseng protein fraction. 고려인삼학회지, **14**, 279-283 (1990).
20. 김춘미, 최향옥: 항방사선 인삼분획의 butanol 추출물과 수용성 성분이 세포 생존율에 미치는 영향. 고려인삼학회지, **15**, 167-170 (1991).
21. 공태훈, 유성렬, 윤주억, 유영조, 노정미, 김선희, 김희정, 박수청, 이동화: X-방사선(^{60}Co)에 조사된 생쥐의 상해에 대한 「아답태겐」®의 효과에 관한 연구. 고려인삼학회지, **15**, 171-178 (1991).
22. 공태훈, 유성렬, 윤주억, 유영상, 이용민, 박찬원, 김철규, 노정미, 김선희, 정해경: 중성자방사선에 피폭된 생쥐에 대한 인삼제제의 효과에 관하여. 고려인삼학회지, **14**, 357-363 (1990).
23. 정호권, 조창숙, 김정효: 인삼추출성분의 항변이원성 연

구. 고려인삼학회지, **8**(1), 1-7(1984).
24. 박진규, 박기현: Effects of Ginseng saponin on DNA strand breaks and replication inhibition by benzo(a)pyrene in CHO-K1 cells. 고려인삼학회지, **16**, 210-216 (1992).
25. Lee, F.C., Park, J.K., Ko, J.H., Lee, J.S., Kim, K.Y. and Kim, E.K.: Effects of panax ginseng extract on the benzo (a)pyrene metabolizing enzyme system. *Drug and chemical Toxicology*, **10**, 227-236 (1987).
26. 박진규, 진승하: Polyacetylene 화합물들이 투여량에 따른 독성. 고려인삼학회지, **13**, 49-55 (1989).
27. 박진규, 김신일: Benzo(a)pyrene 대사물질들의 DNA에 대한 adduct형성억제에 미치는 panaxydol의 효과. 고려인삼학회지, **13**, 42-48 (1989).
28. Park, J.K., Kim, S.I. and Lee, C.B.: Polyacetylene induced alterations in benzo(a)pyrene metabolism and reduction of total DNA-BP metabolites binding. *Korean Biochem. J.*, **22**, 133-139 (1989).
29. 박진규, 고지훈: DNA와 benzo(a)pyrene 대사물질 결합형성에 미치는 인삼 추출물의 영향. 고려인삼학회지, **13**, 37-41 (1989).
30. Shim, J.S.: *Env. Mutagens and carcinogens*, **8**, 135 (1988).
31. 최성규, 허문영: 인삼석유 에텔 추출물이 흰쥐에서 여러 발암성물질에 의해 유도된 소핵생성의 억제효과. 약학회지, **36**, 334-340 (1992).
32. 최성규, 김천호, 허문영: 인삼석유 에텔 추출물이 benzo (a)pyrene에 의해 유도된 소핵생성 억제효과. 약학회지, **35**, 466-472 (1991).
33. Wiloski, P.G., Wood, A.W., Chang, R.L., Levin, W., Yagi, H., Hernandez, O., Jerina, D.M. and Conney, A.H.: High mutagnicity and toxicity of diol epoxide derived from benzo(a)pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 1006-1012(1987).