

DNA 와 Benzo(a)pyrene 대사물질 결합형성에 미치는 인삼 추출물의 영향

박진규·고지훈
한국인삼연구초연구소
(1989년 4월 11일 접수)

Effect of Ginseng Extracts on the Binding to DNA of Benzo(a)pyrene Metabolites *in vitro* in Rats

Jin Kyu Park and Ji Hun Ko

Department of Pharmacology, Korea Ginseng & Tobacco Research Institute Daejeon 302-345, Korea

(Received April 11, 1989)

Abstract □ Reactive metabolites generated by benzo(a)pyrene(BP) monooxygenase(AHH) interact with nucleophiles in DNA and cause mutation and carcinogenesis. We studied the effect of *Panax ginseng* C.A. Meyer, which induce epoxide hydratase(EH) activity without concomitant induction of AHH activity, on the binding of BP metabolites to DNA *in vitro* in Sprague Dawley rats. DNA-BP metabolite adducts can be resolved into at least five distinct peaks by elution of a Sephadex LH-20 column with a water-methanol gradient. These peaks are arbitrarily designated A(most polar) through E(least polar). Of the 5 peaks tentatively assigned to 7,8 diol-9,10-oxide(A), 7,8-oxide(B), 4,5-oxide(C), and further metabolites of 9-OH-BP(D & E), peaks A, C, D, and E were reduced to 70, 85, 80, and 30% of controls, respectively, and there was no significant change in peak B. In connection with this DNA binding study, BP metabolizing enzymes including AHH, EH, demethylase(DM) activity and cyt. P-450 contents were also investigated in order to compare the BP treated control with ginseng and BP treated test groups. The results showed that the EH activity was increased by 139% over the BP control, the Cyt. P-450 content was increased by 180% over the control value, and DM and AHH activities were also increased to some degree for the BP test group, but there was no significant effect of the ginseng treatment.

Keywords □ *Panax ginseng* C. A. Meyer, ginseng extract, DNA, benzo[a]pyrene, metabolite binding

서 론

Benzo(a)pyrene(BP)은 돌연변이 및 암을 일으키는 polycyclic aromatic hydrocarbon의 하나로서 환경공해물질 중에 광범위하게 분포되어 있기 때문에 그 화학적인 성질, 대사, 그리고 생물학적인 효과 등이 광범위하게 연구되어 왔다.^{1,2)} BP은 화학적으로는 불활성이나 세포내의 마이크로솜 효소들에 의해 대사적으로 전환되는 동안 친전자성 유도체(electrophilic derivatives)들로 활성화되어 세포

내 거대분자들(macromolecule)에 공유결합으로 결합한다.³⁻⁶⁾ 즉, BP의 대사물질들 중의 하나인 diol epoxide인 r-7, t-8-dihydroxy-t-9, 10-oxy-7, 8, 9, 10-tetrahydro benzo(a)pyrene (BPDE)이 BP의 궁극적인 발암형태로 밝혀져 있다.⁷⁻¹²⁾ 따라서 이러한 궁극적인 발암성 대사물질들의 확인과, 종양(tumor) 형성정도와 서로다른 세포조직, 또는 종(species)간의 암유발의 선택성을 설명해 주는 DNA modification 정도의 특징들이 평가되어 왔다.

또한 BP의 대사에 관련된 여러 효소들의 level의 변화는 생성되는 product들의 성질에 뚜렷이 영향을 미칠 수 있기 때문에 이들 효소들의 활성도 증가 또는 억제와 관련하여 DNA와 BP 대사물질 결합 정도를 관찰함으로써 PAH 화합물들의 발암을 억제시키는 화합물들을 추적할 수 있다. 이 등¹³⁾은 인삼의 알콜 추출물을 투여한 쥐의 간에서 BP monooxygenase(AHH)의 활성도 증가없이 epoxidehydratase(EH)와 glutathione transferase(GSH-T)의 활성도가 선택적으로 증가함을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 인삼 추출물들의 선택적인 BP 대사효소의 증가와 관련하여, DNA와 BP의 반응성 대사물질들과의 공유결합 형성에 미치는 영향을 관찰하고, BP 투여 후 관련 대사효소들의 활성도변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 재료

[³H]-benzo(a)pyrene(BP)(S. A. 40 Ci/mmol)은 New England Nuclear(NEN) 제품을 사용하였고, [³H]-benzo(a)pyrene 4,5-oxide(BP-4,5-oxide)(S. A. 287.5 mCi/nmol)과 3-hydroxy benzo(a)pyrene, benzo(a)pyrene-4,5-diol 등은 Midwest Research Institute로부터 구입하여 사용하였으며 benzo(a)pyrene(BP), LH-20 Sephadex, DNA, DNase I, phosphodiesterase, alkaline phosphatase, NADPH, glucose 6-phosphate 등은 Sigma 제품을 사용하였다.

2. 실험방법

실험동물은 Sprague Dawley rat(200g b. w.)를 사용하여 3일간 인삼의 물 추출물(250mg/kg b. w.)을 경구투여하고 16시간 절식시킨 후 간을 적출하여 20% homogenate(0.25 M sucrose)를 10,000×g에서 20분간(2회) 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 105,000×g에서 1시간 원심분리하여 microsome과 cytosol을 준비하였으며, protein은 Lowry 등의 방법으로 정량하였다.

3. 효소활성도 측정

(yt. P-450 함량은 Omura와 Sato의 방법¹⁴⁾에

따라 CO binding pigment의 환원형의 450 nm와 490 nm에서의 흡광도 차이로 측정하여 extinction coefficient 91 mM⁻¹ cm⁻¹로 계산하였다. 그밖에 AHH의 활성도¹⁵⁾는 BP의 대사물질인 3-OH-BP의 양을 spectrofluorometer를 사용하여(ex. 396 nm, em. 512 nm) 측정하였으며, N-demethylase(DM)¹⁶⁾는 aminopyrine의 산화로 생기는 HCHO를 비색정량방법으로 측정하여 흡광계수 8000 M⁻¹ cm⁻¹로 계산하였다. Epoxide hydratase(EH)는 [³H]-BP-4,5-oxide를 기질로 사용하여 생성된 BP-4,5-diol을 TLC로 분리한 후 방사능량을 scintillation counter로 측정하였다.

4. DNA-BP metabolite 결합

20.6 μM의 [³H]-BP(14.5 μCi/nmol)을 1mg의 변성된 DNA, 0.75 mg의 microsomal protein 및 cofactor들(0.7 mM NADPH, 10 mM glucose-6-phosphate, 0.35 unit/ml의 G-6-PDH, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂)을 포함하는 반응 혼합물을 37°C에서 20분간 incubation시킨 후 반응하지 않은 BP를 에테르로 3번 추출하여 제거하고, ethanol로 침전시킨 다음 Ppt.된 adduct를 benzene, ethanol, ether로 washing하고 Pelkonen 등¹⁷⁾의 방법에 따라 DNase I, phosphodiesterase, alkaline phosphatase 등으로 가수분해시킨 후 hydrolysate를 LH-20 column으로 chromatography하여 DNA-BP metabolite adduct들을 분리하였으며, column을 통하여 나온 fraction들의 radioactivity는 Bray's solution을 첨가하여 counting하였다.

결과 및 고찰

PAH계 화합물들의 돌연변이 및 발암효과는 이들 화합물들의 반응성 대사물질인 diol epoxide가 DNA에 공유결합됨에 기여하므로, DNA에 대한 BP hydrocarbon의 결합 정도를 Sephadex LH-20 column으로부터 용출되는 방사능량으로 비교 관찰하고 BP 투여 후 생체내에서 일어나는 BP 대사효소들의 활성도 변화를 측정함으로써 인삼 추출물의 PAH계 화합물에 대한 발암 억제효과를 관찰하고자 하였다.

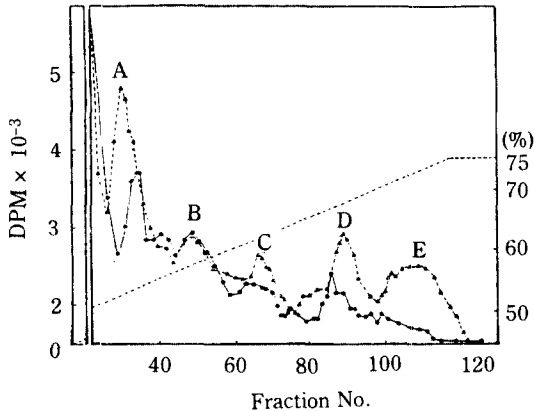


Fig. 1. Effect of total water extract fraction on DNA-BP metabolite adduct formation. The enzyme digest of DNA-BP metabolites was applied to LH column (1.5 × 18 cm) and eluted with linear gradient of 45% to 75% MeOH in H₂O (75 ml/ea). Flow rate 10 ml/hr. Fractions (1.4 ml) were collected, and a portion was counted using 10 ml of Bray's solution. △---△ control ●—● test.

BP의 반응성 대사물질들과 DNA와의 결합물질 생성을 대조군 및 인삼투여 시험군과 비교한 결과 (Fig. 1, Table 1), 인삼 투여군이 대조군보다 adduct들의 형성이 전반적으로 감소되었다. Pelkonen 등의 결과로부터 잠정적으로 확인된 바에 따르면 7,8-diol-9,10-epoxide adduct인 peak A가 인삼 투여군에서 약 30% 감소했고 peak B는 의미있는 감소가 없었으나 4,5-epoxide adduct인 peak C는 약 15%, 그리고 9-hydroxy-BP의 더 진전된 대사물질들인 peak D는 약 20%가 대조군보다 감소했으며 peak E는 대조군의 약 30% 정도로 현저히 감소되었다.

이미 발표된 실험결과¹³⁾에 의하면 인삼의 알콜 추출물을 투여했을 때 AHH를 포함하는 cytochrome P-450 linked monooxygenase들의 유도 없이 EH가 선택적으로 유도되었으며, 또한 인삼 처리군에서 GSH-T의 conjugation이 뚜렷이 증가하였다. 이것은 인삼 추출물의 성분에 의해 polycyclic aromatic hydrocarbon들(PAHs)의 대사가 조절될 수 있다는 것을 암시한다.

특히 conjugation capacity의 증가를 수반하는 EH활성도의 증가는 epoxide들로부터 EH에 의

Table 1. Effect of ginseng on DNA nucleoside-BP binding.

	7,8 diol-9,10-oxide (peak A)	7,8-oxide (peak B)	4,5-oxide (peak C)	Further metabolite of 9 OH-BP (peak D)	(peak E)
Control	72,535	42,976	44,406	56,199	36,711
Test	53,998	40,768	38,639	45,596	10,115
T/C	0.74	0.95	0.87	0.81	0.27

Peaks were detected by measuring radioactivity of column fraction in Bray's scintillant using a Liquid Scintillation Spectrometer.

Values represent the total dpm of the each peak fractions.

해 형성되는 diol 화합물들이 reactivation될 가능성을 감소시켜 줄 수 있어서 BP의 tumor 생성능과 *in vitro*에서의 DNA에 대한 공유결합능 사이에 뚜렷한 상관관계를 나타낼 수 있다.¹⁸⁾ 즉 EH/AHH의 ratio는 PAH 화합물인 BP의 대사경로에 결정적인 영향을 주어 DNA를 modulation시키는 요인이 될 수 있다. BHA의 anticarcinogenic한 효과도 적어도 부분적으로는 DNA-BP-metabolite 결합형성을 감소시키는 데¹⁹⁻²¹⁾ 기여한다.

또한 pyrrolizidine alkaloid인 jacobine은 EH활성도를 증가시키고 AHH활성도를 감소시키며 전체적인 BP대사를 억제시켜 *in vitro* DNA에 대한 BP대사물질 결합을 현저히 낮춰 주었다.²²⁾ 그리고 정제된 EH를 반응 혼합물에 첨가하면 jacobine을 전처리했을 때와 같이 간 마이크로솜들에 의해 total DNA-BP metabolite adduct 형성이 감소하며, jacobine을 전처리한 쥐의 간 마이크로솜에 EH를 첨가하면 더욱 DNA와의 adduct 형성이 감소하였다.²³⁾

그러나 BHA의 경우에는 마이크로솜과 cytosol 효소들의 유도가 BHA의 증가에 따라 cumulative한 효과를 나타내며,²⁴⁾ jacobine의 경우에는 AHH활성도의 억제와 EH활성도의 증가가 jacobine의 투여량에 따라 뚜렷이 변화하였다.²⁵⁾ 담배의 tar에서 발견되는 harman과 norharman²⁶⁾의 경우에는 AHH활성도의 억제와 DNA-BP metabolite 결합감소의 결정적인 요인이었다. 그러나 Table 2의 data에서 보는 바와 같이

Table 2. Effect of repeated administration of ginseng.

Treatment (day)	Specific activity (% control)		
	Cytochrome P-450 (nmoles/mg protein)	Demethylase (nmoles/mg protein/min)	GSH-Transferase (nmoles/mg protein/min)
0	0.61 ± 0.12 (100)	8.20 ± 0.17 (100)	0.79 ± 0.12 (100)
1	0.81 ± 0.09 (132)	9.66 ± 0.30 (118)	1.02 ± 0.15 (129)
3	0.83 ± 0.09 (136)	10.60 ± 0.73 (129)	1.02 ± 0.12 (129)

Ginseng extract was administered orally at a single daily dose of 10 mg/kg b.w. Cytochrome P-450 content and N-demethylase and glutathione transferase activity were determined according to the procedures described in materials and methods and expressed in means ± SD (n = 8). Activity changes expressed as percent of the control are given in parentheses.

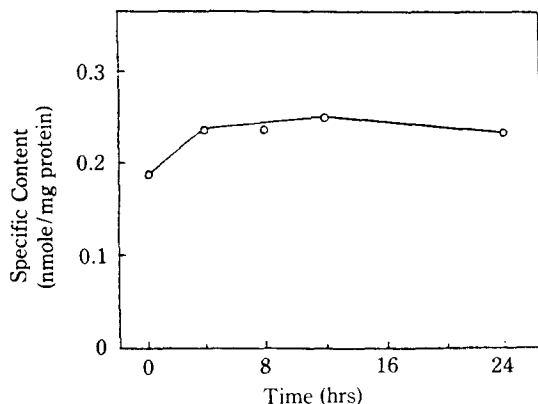


Fig. 2. Time-response curve of cytochrome P-450 after a single oral administration of ginseng extract, 20 mg/kg b.w. Cytochrome P-450 content in 10,000 × g fraction was determined by the method of Omura and Sato and expressed in the means of 8 separate determinations in duplicate. ($p < 0.005$).

인삼 사포닌 분획에 의한 유도수준은 3일간 10 mg/kg b.w.로 반복 투여한 경우에도 cytochrome P-450의 함량, Demethylase (DM), 그리고 GSH-T 활성도의 뚜렷한 축적효과 (cumulative effect)가 나타나지 않았으며 1회 투여로 얻어진 값이 적어도 20시간 이상 유지되었다 (Fig. 2). 따라서 Fig. 1과 같이 DNA-BP metabolite adduct들의 생성이 억제된 결과를 해석하기 위하여 BP 투여 (0.4 mg/day, 1회) 후 관련효소의 활성도 변화와 이에 미치는 인삼 추출물의 효과를 관찰하였다 (Table 3). BP 투여 후 cytochrome P-450의 함량은 대조군의 180% 정도로 증가하였고 DM와 AHH의 활성도도 다소 증가하였으나 인삼 추출물에 의한 변화는 의미있게 나타나지 않았다. 반면에

Table 3. Effects of ginseng treatment on activities of monooxygenase components and EH.

Enzyme activity	Control	BP	BP + G
DM (nmoles/mg protein/min)	0.83 ± 0.20	1.00 ± 0.05	0.94 ± 0.04
Cyt. P-450 (nmoles/mg protein)	0.12 ± 0.02	0.23 ± 0.06	0.24 ± 0.02
AHH (pmoles/mg protein/min)	87.3 ± 14.7	97.5 ± 15.1	99.8 ± 18.7
EH (nmoles/mg protein/min)	1.75 ± 0.43	1.45 ± 0.55	2.0 ± 0.46

A single dose (2 mg/kg b.w.) of BP was administered intraperitoneally 24 hrs before sacrifice. Test animals well allowed to drink water containing 1% TWE (250 mg/kg b.w./day) ad. libitum for 7 days. (n = 7-15).

EH의 활성도는 BP 투여 후 다소 감소 (약 18%) 하였으나 인삼 추출물 투여로 BP 투여 대조군보다 약 38%나 증가하였다. 이와 같은 결과는 *in vitro* BP 대사 실험의 결과¹³⁾와 경향이 일치하였다. 즉 인삼 성분은 BP의 대사 패턴을 변경시켜 *in vitro* DNA-BP adduct 형성을 억제시킴을 강력히 시사한다. 따라서 EH 활성도를 증가시키는 인삼 성분은 동정하고 그 BP 대사물질들을 비교, 확인하기 위한 연구가 차후에 더 진행되어야 할 것이다.

요 약

Benzo(a)pyrene (BP)의 monooxygenase (AHH)에 의해서 생성된 반응성 대사물질들의 *in vitro* DNA와의 결합 및 BP 대사에 관여하는 효소들의 활성도에 미치는 인삼 추출물의 영향을 조

사하였으며, DNA-BP metabolite adduct 들은 Sephadex LH-20 column 으로 chromatography 하여 5개의 major peak 들을 얻었다. 이 peak 들을 극성이 큰 순서대로 A 부터 E 까지 임의로 정하고 5개의 peak 들을 7, 8-diol-9, 10-oxide(A), 7, 8-oxide(B), 4, 5-oxide(C), 9-HO-BP(D & E) adduct 들로 잠정적으로 확인하였다. Peak A, C, D 그리고 E 는 각각 대조군의 30, 15, 20 그리고 30%로 감소되었으며 peak B 는 의미있는 변화를 보이지 않았다.

DNA-BP 결합 억제와 관련하여 *in vivo* BP 투여 후 AHH, EH, DM, 그리고 cytochrome P-450 등의 BP 대사 효소들의 활성도를 조사하였다. 그 결과는 BP 의 *in vitro* 와 *in vivo* 투여시의 경향이 유사하여 EH 의 활성도만 BP 투여 대조군보다 38% 정도 의미있게 유도되었다.

인 용 문 헌

- Freudenthal, R.I. and Jones, P.W.: Polynuclear aromatic hydrocarbons (1976).
- Gelboin, H.V. and T'so, P.O.P.: Polycyclic hydrocarbons and cancer (1978).
- Miller, J.A.: *Cancer Res.* **30**, 559 (1970).
- Heidelberger, C.: *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 79 (1975).
- Miller, E.C.: *Cancer Res.* **39**, 1497 (1978).
- Weisburger, E.K.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **18**, 395 (1978).
- Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K. and Hewer, A.: *Nature* **252**, 326 (1974).
- Huberman, E., Sachs, L., Yang, S.K. and Gelboin, H.V. *Pro. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 607 (1976).
- Newbold, R.F. and Brookes, P.: *Nature* **261**, 52 (1976).
- Wood, A.W., Wislocki, P.G., Chang, R.L., Levin, W., Lu, A.Y.H., Yagi, H., Hernandez, O., Jerina, D.M. and Conney, A.H.: *Cancer Res.* **36**, 3358 (1976).
- Yang, S.K., McCourt, D.W., Roller, P.P. and Gelboin, H.V.: *Pro. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 2594 (1976).
- Kapifuliak, J., Wislocki, P.G., Levin, W., Yagi, H., Jerina, D.M. and Conney, A.H.: *Cancer Res.* **38**, 354 (1978).
- Lee, F.C., Park, J.K., Ko, J.H., Lee, J.S., Kim, K.Y. and Kim, E.K.: *Drug & Chem. Toxicol.* **10**, 227 (1987).
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: *J. Biol. Chem.* **249**, 7130 (1974).
- Nebert, D.W. and Gelboin, H.V.: *J.B.C.* **243**, 6242 (1968).
- Werringloer, J.: *Methods in Enzymology* **52**, 297 (1978).
- Pelkonen, O., Boobis, A.R., Yagi, H., Jerina, D.M. and Nebert, D.W.: *Mol. Pharmacol.* **14**, 306 (1977).
- Slaga, T.J., Berry, D.L., Juchau, N.R., Thompson, S., Buty, S.G. and Viaje, A. (eds): *Carcinogenesis* **1**, 127 (1976).
- Anderson, M.W., Boroujerdi, M. and Wilson, A.G.E.: *Cancer Res.* **41**, 4309 (1981).
- Ioannou, Y.M., Wilson, A.G.E. and Anderson, M.W.: *Carcinogenesis (London)* **3**, 739 (1982).
- Ioannou, Y.M., Wilson, A.G.E. and Anderson, M.W.: *Cancer Res.* **42**, 1199 (1982).
- Miranda, C.L., Cheeke, P.R. and Buhler, D.R.: *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.* **29**, 573 (1980).
- Williams, D.E., Miranda, C.L. and Buhler, D.R.: *Biochem. Pharmacol.* **32**, 2443 (1983).
- Cha, Y.N. and Bueding, E.: *Biochem. Pharmacol.* **28**, 1917 (1979).
- Miranda, C.L., Cheeke, P.R. and Buhler, D.R.: *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* **29**, 573 (1980).
- Levitt, R.C., Legrander, C., Nebert, D.W. and Pelkonen, O.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **79**, 1167 (1977).