

DNA 합성관련 효소 억제제 및 인삼 Saponin이 Chinese Hamster Ovary(CHO) 세포손상에 미치는 영향

고신대학교 의학부 해부학교실

김영진, 김강련

동아대학교 생물학과

선우양일

Effects of DNA synthesis related enzyme inhibitors and ginseng saponin on the Chinese Hamster Ovary(CHO) cell damage

Yeong Jin Kim, Kang Ryune Kim

Department of Anatomy, Kosin Medical College

Yangil Sunwoo

Department of Biology, Dong-A University

— Abstract —

The physiological activity of adriamycin(ADR) is related to its ability to bind specifically with DNA by intercalation between adjacent base pairs of the double helical structure and ADR induce DNA damage, chromosome aberrations and sister chromatid exchange in mammalian cell as the inhibitors of DNA synthesis related enzyme such as the aphidicolin(APC), novobiocin(Novo) and ginseng saponin(GS) on the frequencies of chromosome aberration, sister chromatid exchanges(SCEs), we treated ADR in CHO cells and post-treated APC, Novo and GS.

1. CHO cell viability by ADR was 60% in 1ng/ml and 0% 1 μ g/ml concentration.
2. When we treated ADR, APC, Novo and GS separately, only ADR increased chromosome aberrations and SCEs frequency. In proportion to the concentration of ADR increased, the aberration frequency was also increased. The more the concentration of ADR went up, the better the frequency of aberration rose.
3. In the group treated with ADR+APC or ADR+Novo, the frequency of the chromosome aberration and sister chromatid exchange were higher than the group treated with ADR

alone, but decreased by post-treated ginseng saponin. The group treated with ADR, Novo and GS inhibited SCEs frequency significantly among the groups.

These results suggest that GS can inhibit chromosome aberration and sister chromatid exchange induced by ADR, APC or ADRNovo.

*** Key Words :** Chinese Hamster Ovary, Adriamycin, ginseng saponin

서 론

여러 종류의 DNA 상해 물질들은 절단, 염기 상해, 교차-연관과 삽입 등의 다양한 DNA 상해의 형태들을 야기한다.¹⁾ 또한 이들 상해 물질들은 염색체 이상의 빈도를 증가시키는데, 이러한 약물에 의해 DNA가 상해를 받으므로 염색체 이상이 유발되며^{2,3,4)} 손상된 DNA의 회복 과정을 저해하여 염색체 이상의 결과를 초래하기도 한다.^{5,6)} 그러나 이들 DNA 상해 물질들에 의한 DNA 상해와 염색체 이상의 정확한 발생 기전과 DNA 상해와 염색체 이상 사이의 연관성은 아직 확실히 밝혀져 있지 않다.

Adriamycin(ADR)은 *Streptomyces peucetius caesi*를 무기적 조건에서 배양하여 분리한 anthracycline 계열의 항생제로,⁷⁾ 생체내 성분 중 DNA와 결합친화력이 강하여 DNA 염기 사이에 쉽게 삽입되므로 다양한 생물학적 활성의 변화를 보인다.⁸⁾ DNA 중합효소 저해제인 Aphidicolin(APC)은 DNA 회복 합성에 DNA 중합효소가 관여하는가를 조사하기 위해 이용되고 있는데 APC는 dCTP와 길항하여 DNA 중합효소의 작용을 저해하나 dATP, dGTP 및 dTTP와는 길항하지 않는다.^{9,10)} 이들 약물들은 생체에서 자매 염색분체 교환율을 높이는 것으로 알려져 있는데, Pommier 등¹¹⁾에 의하면 이러한 자매 염색분체 교환은 topoisomerase II의 잘못된 기질 교환의 결과로 염색분체나 염색체가 절단되어 생성된다고 하였다. 한편 novobiocin(Novo)은 ATPase의 작용을 저해하여 topoisomerase II의 활성을 억제시킨다고 알려져 있으며¹²⁾ anthracycline 계열 화합물인 4-(9-acridinylamino)-methanesulfon-*m*-

anisidine(*m*AMSA)에 의해 유발된 세포 상해에 미치는 Novo의 영향을 조사한 결과 Novo는 *m*AMSA에 의해 유발된 DNA 사슬 절단율의 증가를 억제하였고 자매 염색분체 교환 유발율의 증가도 억제한다고 하였다.^{13,14,15,16)}

인삼 추출물인 saponin의 약리 작용은 중추신경 억제 및 흥분 작용,^{17,18)} 단백질 및 핵산 생합성 촉진 작용,^{19,20)} 간기능 회복 작용,^{21,22)} 동맥경화 예방,²³⁾ 항스트레스 작용^{24,25)} 등이 알려져 있으며, 인삼의 비 saponin 성분에 의한 약리 작용으로는 암세포증식 억제 효과,^{26,27)} 방사선 손상 회복 효과,^{28,29)} 노화 억제^{30,31)} 등이 보고되고 있다. 이러한 saponin의 효과는 saponin이 DNA 회복 과정에 직접 관여하지 않고 간접적으로 세포의 생리 활성에 영향을 주어 생체내 거대분자의 생합성을 촉진시키므로 세포분열을 증가시키고 세포의 생존율을 높여준 결과라고 보고되어 있다.³²⁾ Saponin이 생물체의 대사 과정중 효소계에 영향을 미쳐 생물체의 생존이나 돌연변이의 유발에 관여한다고 보고된 바 있으나, 배양한 포유동물 세포에서 돌연변이 유발 인자들에 의해 유발된 세포 상해에 미치는 영향에 대해서는 아직 연구가 미흡한 실정이다.

이에 저자는 수종의 DNA 중합효소와 DNA topoisomerase의 저해제들이 염색체 수준과 DNA 수준의 상해에 각각 미치는 영향을 알아봄으로써 DNA 상해 물질에 의한 두가지 서로 다른 생물학적 현상 즉 DNA 상해와 염색체 이상의 기전을 일부 규명할 수 있을 것으로 생각하고 수종의 DNA 합성관련효소 억제제들을 배양된 CHO세포에 단독 혹은 병용 투여하여 염색체 이상, 자매 염색분체 교환에 미치는 영향을 각각 조사하였다.

더불어 생리 활성 물질인 saponin이 이들 DNA 합성관련 효소 억제제에 의해 유발된 세포 상해를 회복시킬 수 있는지 여부를 알아봄으로써 현재 항암제로 많이 사용되고 있는 이들 DNA 대사 억제제를 인체에 투여시 유발될 수 있는 여러 부작용을 방지하거나 호전시킬 수 있는 약제로서의 임상적 적용 가능성 여부에 대한 기초 자료로 활용코자하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포

Chinese hamster ovary (CHO) 세포

2) DNA 상해물질, DNA 합성관련효소 억제제 및 Saponin

(1) DNA 상해물질 - Adriamycin

Adriamycin(Farmitalia, Milan, Italy)을 멸균시킨 증류수에 녹여 배양된 CHO 세포에 처리하기 직전에 각 실험 방법에 따라 적절한 농도가 되도록 혈청을 첨가하지 않은 배양액에 투여하였으며 37°C 배양기에서 2시간 동안 배양하였다.

(2) DNA 합성관련효소 억제제 - Aphidicolin 및 Novobiocin 처리

Aphidicolin(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.)은 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 다음 적절한 농도가 되도록 혈청을 첨가하지 않은 배양액에 투여하였으며 novobiocin(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.)은 혈청을 첨가하지 않은 배양액에 직접 투여하였다. 37°C 배양기에서 1시간 동안 배양하여 약물 처리하였으며 약물 처리후 인산 완충 용액(PBS; phosphate buffered solution)으로 3회 세척하여 약물을 제거하고 새로운 배양액으로 계속 배양하였다.

(3) Saponin 처리

Saponin(한국인삼연초연구소, 대전)은 각 실험 방법에 따라 적절한 농도가 되도록 혈청을 첨가하지 않은 배양액에 직접 투여하였으며 37°C

배양기에서 1시간 동안 배양하여 처리하였다.

2. 방법

1) 세포배양

실험에 사용한 세포는 chinese hamster ovary (CHO)세포이며, 배양액은 membrane filter로 멸균한 Eagle's minimum essential medium(Gibco, U.S.A.)에 10% fetal bovine serum(FBS: CSL, Poplar Road Parkville, U.S.A.)과 50 μ g/ml의 gentamicin(Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.)을 첨가하여 사용하였다. CHO 세포를 milk dilution bottle(Pyrex, New York, U.S.A.)안에 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 단층 배양하였으며 2~3일 마다 배양액을 교환하였다.

2) 세포 생존율 측정

Adriamycin(ADR)이 CHO 세포의 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ADR을 1, 10, 100, 500 및 1,000 ng/ml의 농도가 되도록 배양된 CHO 세포에 투여하였다. 세포생존율은 세포의 colony 형성을 계수하여 측정하는 Sariban 등³³⁾의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 약술하면 계대배양중인 세포를 분리하여 plastic petri dish에 5 $\times$ 10⁵ 개의 세포가 되도록 넣어 24시간 동안 단층배양한 후 ADR를 투여하였다. PBS로 3회 세척한 후 trypsin으로 세포를 분리한 다음 CHO 세포 배양액을 적당량 첨가해 각 plastic petri dish (60 $\times$ 15mm)에 300~1,000개의 세포가 들어가도록 하여 배양하였다. 37°C 배양기에서 6~8일 동안 배양시킨후 생성된 colony를 methanol: glacial acetic acid(3:1)용액으로 고정하고 4% Giemsa로 염색하여 계수하였다.

3) 염색체 이상 측정

ADR, saponin, APC 및 Novo를 단독처리시 염색체 이상에 미치는 영향을 알아보기 위해 ADR은 50, 100 및 150ng/ml의 농도로, saponin은 10⁻¹, 10⁻² 및 10⁻³% 농도로, APC는 5, 10 및 20 μ g/ml의 농도로, Novo는 100, 400 및 800 μ M 농도로 각각 처리하였다. DNA 합성관련효소 억제제와 saponin

nin이 ADR에 의해 유발된 염색체 이상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ADR을 100 μ g/ml을 2시간 동안 처리한 후 APC는 5 μ g/ml, Novo는 400 μ M, saponin은 10⁻³% 농도로 각각 1시간 동안 처리하였다.

CHO 세포를 24시간 이상 배양한후 ADR을 단독처리하거나, ADR 처리후 합성관련효소 억제제 또는 saponin으로 다시 처리한 다음 PBS로 3번 세척하고 새로운 배양액으로 6시간 동안 배양하였다. 세포를 수확하기 2시간 전에 colchicine(0.04%, wt/vol)을 첨가 하였다. 배양용기에 약하게 부착되어 있는 중기(mid S phase)의 세포들을 가볍게 흔들어 모은후 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기에서 0.05 M KCl을 8분 동안 처리하였다. 그후 사용직전에 제조된 4 $^{\circ}$ C의 methanol-glacial acetic acid(3:1)용액으로 고정 시켰다. 염색체 표본은 공기건조법으로 제작하였으며 4% Giemsa로 염색하여 광학현미경으로 1,000배 시야에서 관찰하였다.

4) 자매 염색분체 교환을 측정

ADR과 saponin을 단독처리시 자매 염색분체 교환에 미치는 영향을 알아보기 위해 ADR은 10, 30 및 50 ng/ml의 농도로, saponin은 10⁻²와 10⁻³% 농도로 각각 처리하였으며, DNA 합성관련효소 억제제나 saponin이 ADR에 의해 유발된 자매 염색분체 교환에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ADR을 30ng/ml을 2시간 동안 처리한 후 APC는 5 μ g/ml, Novo는 300 μ M, saponin은 10⁻³% 농도로 각각 1시간 동안 처리하였다.

염색분체의 염색은 Perry와 Wolff의 방법³⁴⁾을 약간 변형하여 수행하였다. 단층배양한 CHO 세포에 약물을 처리하고 PBS로 3번 세척하여 제거한 다음 5-bromodeoxyuridine(BUDR; Sigma)이 들어있는 배지를 첨가한 후 암상자에서 두 세포주기 동안 배양하였다. 염색체 표본은 염색체 이상 실험과 같은 방법으로 제작하였다. 염색체 표본 slide는 Hoechst 33258(0.5 μ g/ml in sorenson buffer)로 15분간 염색하고 증류수로 가볍게 세

척한후 slide 위에 PBS(pH 6.8)를 한 방울 떨어뜨린 다음 덮개 유리를 덮고 형광빛을 4~5시간 조사 하였다. 그 다음 덮개 유리를 제거하고 증류수로 세척한 다음 공기중에 건조시킨 slide를 4% Giemsa로 30분간 염색한뒤 염색체당 자매 염색분체 교환율을 측정하였다.

결 과

1) ADR에 의한 세포생존율의 변화

배양된 CHO 세포에 ADR을 1~1000ng/ml의 각 농도별로 2시간 동안 처리한 후 측정된 세포생존율의 변화는 ADR의 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 감소하였고 1000ng/ml 이상의 농도에서는 세포의 생존을 볼 수 없었다(Table 1).

Table 1. Cell viability of CHO cells treated with ADR, at various concentration

concentration survival rate(%)		
ADR*	0	100
(ng/ml)	1	60
	10	50
	100	20
	500	2
	1000	0

* ADR : Adriamycin

2) DNA 합성관련 효소 억제제와 Saponin이 ADR에 의한 염색체 이상에 미치는 영향

단층배양한 CHO 세포에 ADR과 saponin을 농도별로 각각 2시간, 1시간 동안 단독처리한 경우 세포당 발생한 염색체 이상율은 ADR을 처리한 경우는 모두 대조군의 0.02 $\pm$ 0.02 보다 현저하게 증가하였고 ADR의 농도가 높을수록 더욱 많이 증가하였으나 saponin을 처리한 경우는 모두 대조군과 차이가 없었다(Table 2). 본 실험에서 조사한 염색체의 이상형은 gap(열극), break(절단), deletion(결실), dicentric(이중심절), ring(환상), exchange(교환)이었다.

Table 2. Adriamycin and saponin-induced chromosome aberrations in CHO cells

ADR* (ng/ml)	Saponin (%)	Counted Metaphase Cells	Aberration Cells	Chromosome aberration						Frequency of Chr.Ab**/Cell (mean±S.E.)
				Gap	Bre.	Del.	Dic.	Ri.	Exc.	
0	0	100	2	2	0	0	0	0	0	0.02±0.02
50	0	100	18	14	2	0	2	1	0	0.19±0.06
100	0	100	34	33	3	0	0	0	2	0.38±0.08
150	0	100	36	37	4	1	0	0	4	0.046±0.11
0	10 ⁻¹	100	2	1	1	0	0	0	0	0.02±0.01
0	10 ⁻²	100	3	3	0	0	0	0	0	0.03±0.02
0	10 ⁻³	100	3	3	0	0	0	0	0	0.03±0.02

Bre. : Break, Del. : Deletion, Dic. : Dientric, Ri. : Ring, Exc. : Exchange

*ADR ; Adriamycin

**Chr, Ab. : Chromosome Aberration

CHO 세포에 ADR 처리후 APC를 처리한 다음 6시간 동안 배양한 후 유발된 염색체 이상을의 결과를 보면 APC 5, 10, 20 μ g/ml 농도의 단독처리군들은 염색체 이상율이 각각 0.04 ± 0.02 , 0.09 ± 0.03 , 0.10 ± 0.03 으로 대조군의 0.02 ± 0.02 와 큰 차이가 없었다. ADR 처리후 APC 후처리군의 염색체 이상율은 0.42 ± 0.09 로 ADR 단독처리군 0.37 ± 0.09 보다 높았으며, APC 처리후 saponin의 후처리군은 염색체 이상율이 0.39 ± 0.09 로 ADR 처리후 APC 후처리군의 염색체 이상율보다 낮았다.(Table 3).

Table 3. The effects of aphidicolin and saponin on the induction of chromosome aberrations in CHO cells treated with adriamycin.

ADR* (ng/ml)	APC** (μ g/ml)	Saponin (%)	Counted Metaphase Cells	Aberration Cells	Chromosome aberration						Frequency of Chr.Ab***/Cell (mean±S.E.)
					Gap	Bre.	Del.	Dic.	Ri.	Exc.	
0	0	0	100	2	2	0	0	0	0	0	0.02±0.02
0	5	0	100	4	4	0	0	0	0	0	0.04±0.02
0	10	0	100	9	4	3	0	1	0	1	0.09±0.03
0	20	0	100	10	10	0	0	0	0	0	0.10±0.03
100	0	0	100	30	31	4	1	0	1	0	0.37±0.09
100	5	0	100	35	36	3	0	0	0	3	0.42±0.09
100	5	10 ⁻³	100	32	33	2	1	0	0	3	0.39±0.09

*ADR ; Adriamycin

**APC ; Aphidicolin

***Chr. Ab. : Chromosome Aberration

ADR 처리후 topoisomerase II 저해제인 Novo 후처리시의 영향과 saponin의 효과를 살펴보면, Novo 100, 400, 800 μ M의 단독처리군은 대조군에 비해 염색체 이상율에 영향을 주지 않았으며, ADR 처리후 Novo 400 μ M 후처리군은 ADR 100 ng/ml 단독 처리군보다 높았으며 saponin을 10⁻³% 농도로 후처리한 군은 ADR 처리후 Novo 후처리군의 염색체 이상율보다 낮았다.(Table 4).

Table 4. The effects of novobiocin and saponin on the chromosome aberrations in CHO cells treated with adriamycin.

ADR* (ng/ml)	Novo** (μ M)	Saponin (%)	Counted Metaphase Cells	Aberration Cells	Chromosome aberration						Frequency of Chr.Ab***/Cell (mean±S.E.)
					Gap	Bre.	Del.	Dic.	Ri.	Exc.	
0	0	0	100	3	3	0	0	0	0	0	0.03±0.02
0	100	0	100	1	0	0	0	1	0	0	0.01±0.01
0	400	0	100	1	1	0	0	0	0	0	0.01±0.01
0	800	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0.00±0.00
100	0	0	100	22	31	1	3	1	2	4	0.42±0.06
100	400	0	100	32	43	2	0	1	0	2	0.48±0.07
100	400	10 ⁻³	100	25	35	2	1	0	0	2	0.40±0.08

*ADR ; Adriamycin

**Novo ; Novobiocin

***Chr. Ab. : Chromosome Aberration

3) DNA 합성관련효소 억제제와 Saponin이 ADR에 의한 자매 염색분체 교환율에 미치는 영향

배양한 CHO 세포에 ADR과 saponin을 농도별로 각각 2시간, 1시간 동안 단독 처리하여 유발된 자매 염색분체 교환율의 결과를 보면, ADR 처리군은 모두 대조군에 비해 유의한 증가를 보였으나 saponin을 단독 처리한 경우는 모두 대조군과 차이가 없었다(Table 5).

Table 5. Adriamycin and saponin-induced sister chromatid exchange in CHO cells

ADR* (ng/ml)	Saponin (%)	Counted Metaphase	No. of SCE**s/ No. of Chromosome	SCE**s per Cell (mean± S.E.***)
0	0	50	435/940	8.70± 0.50
10	0	50	634/939	12.68± 0.58
30	0	50	603/934	12.06± 0.52
50	0	50	748/949	14.96± 0.79
0	10 ⁻²	50	418/976	8.36± 0.43
0	10 ⁻³	50	412/968	8.24± 0.45

*ADR ; Adriamycin

**SCE ; Sister chromatid exchange

***S.E. ; Standard error

ADR에 의해 유발된 CHO 세포의 자매 염색 분체 교환율에 대한 APC의 영향과 saponin의 후처리에 따른 효과를 보면 ADR 단독처리군의 자매 염색분체 교환율은 12.74 ± 0.45 이었고 APC 5 μ g/ml와 saponin 10⁻³% 농도의 단독처리군들은 각각 9.84 ± 0.40 , 8.24 ± 0.45 였다. ADR 처리후 APC 5 μ g/ml 후처리군은 ADR 30 ng/ml 단독 처리군보다 자매 염색분체 교환율이 높았으며, saponin 10⁻³% 농도의 후처리군은 ADR 처리후 APC 후처리군보다 자매 염색분체 교환율은 낮았다(Table 6).

Table 6. The effects of aphidicolin and saponin on the induction of sister chromatid exchange in CHO cells treated with adriamycin.

ADR* (ng/ml)	APC** (μ g/ml)	Saponin (%)	Counted Metaphase	No. of SCE***s/ No. of Chromosome	SCE***s per Cell (mean± S.E.****)
0	0	0	50	423/946	8.46± 0.44
0	5	0	50	492/958	9.84± 0.40
0	0	10 ⁻³	50	412/968	8.24± 0.45
30	0	0	50	635/935	12.74± 0.45
30	5	0	50	680/935	13.60± 0.62
30	5	10 ⁻³	50	618/940	12.36± 0.48

*ADR ; Adriamycin

**APC ; Aphidicolin

***SCE ; Sister chromatid exchange

****S.E. ; Standard error

Novo와 saponin의 영향을 살펴보면 ADR 단독처리군의 값은 12.40 ± 0.43 이고 Novo의 후처리에 따른 자매 염색분체 교환율은 13.18 ± 0.55 로 높게 나타났다. Saponin의 후처리시 자매 염색 분체의 교환율은 9.92 ± 0.65 로 ADR 처리후 Novo 후처리에 의한 저해에 saponin이 자매 염색분체 교환율의 회복과정에 영향을 나타내었다($P < 0.05$) (Table 7)

Table 7. The effects of novobiocin and saponin on the induction of sister chromatid exchange in CHO cells treated with adriamycin.

ADR* (ng/ml)	Novo** (μ M)	Saponin (%)	Counted Metaphase	No. of SCE***s/ No. of Chromosome	SCE***s per Cell (mean± S.E.****)
0	0	0	50	423/929	8.46± 0.34
0	300	0	50	446/940	8.92± 0.43
0	0	10 ⁻³	50	412/968	8.24± 0.45
30	0	0	50	620/934	12.40± 0.43
30	300	0	50	659/950	13.18± 0.55
30	300	10 ⁻³	50	486/933	9.92± 0.65 ⁺

*ADR ; Adriamycin

**Novo ; Novobiocin

***SCE ; Sister chromatid exchange

****S.E. ; Standard error

+ $P < 0.01$ vs. ADR 30 ng/ml + Novo 300 μ M treatment group

고 찰

세포의 생존율 측정은 세포가 독성 환경에 노출되었을 때 받은 세포의 대사 활성이나 증식 능력에 미치는 영향을 규명하기 위해 수행되어진다. Kimler와 Chang³⁵⁾은 100ng/ml의 ADR을 1 시간 동안 처리했을 때 V79 세포의 생존율이 70%였다고 하였다. 본 연구에서는 100ng/ml의 ADR을 1시간 동안 처리했을 때 세포생존율이 40%로 이들의 결과와 약간의 차이를 보였다. Eichholtz-Wirth³⁶⁾은 CHO 세포에서 ADR이 유발한 세포독성에 대한 처리 농도별 효과와 경시적 효과를 검토하였는데 ADR의 세포독성은 처리농도에 따라 증감했으며 세포속에 축적되는 ADR의

양이 처리후 2시간~4시간후에는 일정하게 높은 수치를 나타내었다고 하였다. 본 연구에서도 ADR을 농도별로 투여시 농도가 증가할수록 세포생존율이 감소되었다. Barranco등³⁷⁾은 ADR이 비교적 낮은 농도에서도 높은 독성효과를 나타내었으며, 500ng/ml의 ADR을 1시간 동안 처리했을때 생존율은 3%였다고 하였다.

Singh와 Gupta³⁸⁾는 64ng/ml 및 128ng/ml의 ADR을 처리한 세포에서 자매 염색분체 교환의 빈도는 각각 11.20, 12.40이었다고 하였고, Chung 등³⁹⁾은 사람의 백혈구 세포에서는 1~200ng/ml의 ADR이 자매 염색분체 교환을 유발한다고 보고 하였으며 Perry와 Evans⁴⁰⁾는 ADR의 3×10^{-7} M 농도에서 많은 자매 염색분체 교환을 유발시켰다고 하였다. 본 연구에서는 ADR을 10, 30, 50 ng/ml의 농도로 처리시 모두 많은 자매 염색분체 교환을 유발하였다. Chung 등³⁹⁾은 100ng/ml ADR에 의해 유발된 자매 염색분체 교환과 염색체 이상빈도는 각각 15.22와 0.34로서 같은 농도의 ADR에서 유발된 자매 염색분체 교환 빈도가 염색체 이상율보다 훨씬 높다고 보고 하였으며, 이러한 경향은 다른 연구자들에 의해서도 보고된 바 있다.^{41,42,43,44)} 본 연구결과도 같은 농도의 ADR에 의해 유발된 자매염색분체 교환 빈도가 염색체 이상율보다 높게 나타나 자매 염색분체 교환과 염색체 이상이 여러점에서 다른 것을 알수있었다.

본 실험에서 인삼 saponin은 CHO 세포에 염색체 이상과 자매 염색분체 교환을 전혀 유발하지 않았고 ADR, APC, 인삼 saponin 처리군과 ADR, Novo, 인삼 saponin 처리군에서는 염색체 이상과 자매염색분체교환을 감소시켰음을 보였다.

Chinese hamster V79 세포에서 γ -선을 조사한 후 Novo^{45,46)}를 후처리하면 염색분체 이상율이 증가한다.^{47,48,49)} 이러한 현상은 Novo가 방사선 조사후 염색체 응축이나 고차원적 DNA 구조의 회복을 방해함으로써 염색분체의 이상형태인 염색분체의 열극이나 절단단을 증가시킨 결과라고 하였다.⁴⁹⁾ 그러나 Takahashi등⁴⁷⁾은 Chinese

hamster V79 세포에서 γ -선에 의해 유발된 자매 염색분체의 교환율에 아무런 영향을 주지 않았음을 보고했다. 그러나 Dillehay 등¹⁰⁾은 chinese hamster V79 세포에서 ADR과 유사한 작용을 갖는 intercalating agent인 mAMSA에 의해 유발된 자매 염색분체 교환율을 Novo가 감소시킨다고 보고하였다. 본 연구에서는 ADR에 의해 유발된 자매 염색분체 교환에 대해 Novo는 아무런 영향을 미치지 않았으나 Novo를 처리한 후에 saponin을 처리하면 ADR에 의해 유발된 자매 염색분체 교환율이 감소되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 ADR에 의해 유발된 자매 염색분체 교환에 대한 Novo의 작용을 saponin이 증폭시켰거나 혹은 오히려 감소시켰을 가능성을 추정케 하나 확실치 않으므로 Novo와 saponin이 topoisomerase II의 활성도에 미치는 영향에 대한 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되며 또한 topoisomerase II가 자매 염색분체 교환에 관여하는 기전에 대해서도 보다 많은 연구가 필요하다.

결 론

ADR은 DNA 이중나선구조의 인접한 염기쌍 사이에 삽입됨으로써 DNA와 특이하게 결합하여 DNA 복제와 전사에 관련된 효소의 작용을 저해함으로써 배양세포에서 DNA 상해를 유발하고 염색체 이상과 자매 염색분체 교환을 유발하는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 APC, Novo 와 같은 DNA 합성관련 저해제와 인삼 saponin과 같은 생리활성물질이 ADR에 의해 유발된 염색체 이상, 자매 염색분체 교환에 미치는 효과를 알아보기 위하여 CHO 세포에 ADR을 처리하고 DNA 합성 효소 저해제들과 saponin을 후처리하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. ADR이 CHO 세포의 세포생존율에 미치는 영향은 1ng/ml에서 60%, 1 μ g/ml에서 0%의 세

포생존율을 나타내었다.

2. ADR, APC, Novo, 인삼 saponin을 각각 단독으로 처리하였을 때 ADR만이 염색체 이상과 자매 염색분체의 증가를 보였으며 ADR의 농도가 높을수록 그 이상율도 증가하였다.
3. ADR과 APC 그리고 ADR과 Novo를 처리한 군은 ADR 단독처리한 군에 비해 염색체 이상과 자매 염색분체 교환이 증가 되었으나 여기에 인삼 saponin을 후처리한 군들에서는 염색체 이상과 자매 염색분체 교환이 감소 되었다. 이중에서 ADR, Novo, 인삼 saponin 군에서 자매 염색분체 교환이 유의하게 감소되었다.

이상의 연구 결과로부터 인삼 saponin이 ADR과 APC, ADR과 Novo에 의해서 유발된 염색체 이상과 자매 염색분체 교환을 감소 시키는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Cleaver JE : Methods for studying repair of DNA damaged by physical and chemical carcinogens. *Cancer Res* 11 : 123-165, 1975
2. Gebhart E : Chromosomal aberrations in lymphocytes of patients under chemotherapy. *Mutation in man*(Ed. G. Obe)Springer, Berlin pp198-222, 1984
3. Sognier MA, Hittelman WN : Mitomycin-induced chromatid break in HeLa cells : A consequence of incomplete DNA replication. *Cancer Res* 46 : 4032-4040, 1986
4. Evans HJ : Mutation Cytogenetics : Past, present and future. *Mutation Res* 204 : 355-363, 1988
5. Wolff S : Relation between DNA repair, chromosome aberrations and sister chromatid exchange. *Friedberg E.C ed. Academic Press* pp 751-760, 1978
6. Preston JR : The effect of cytosine arabinoside on the frequency of x-ray induced chromosome aberrations in normal human leukocytes. *Mutation Res* 69 : 71-79, 1980
7. Carter SK : Adriamycin-a review. *J Natl Cancer Inst* 55 : 1265-1274, 1975
8. Quigley GJ, Wang AH-J, Ughetto G, et al : Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex : Daunomycin plusd. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol 77(12) : 7204-7208, 1980
9. Oguro MC, Szuk-Hori H, Nagano YM, et al : The mode of inhibitory action by aphidicolin on eukaryotic DNA polymerase. *Eur J Biochem* 97 : 603-608, 1979
10. Hanoka FH, Kato S, Ikegami S, et al : Aphidicolin does not inhibit repair replication in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 87 : 575-580, 1979
11. Pommier Y, Zwelling LA, KAO-ShAn CS, et al : Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutation and cytotoxicity in chinese hamster cells. *Cancer Res* 45 : 3143-3149, 1985
12. Gellert M : DNA topoisomerase. *Annu Review Biochem* 50 : 879-885, 1981
13. Suzuki H, Nakane S : Differential induction of chromosomal aberration by topoisomerase inhibitors in cultured chinese hamster cells. *Biol Pharm Bull* 17 : 222-226, 1994
14. Marsall B, Darkin S, Ralph RK : Evidence that mAMSA induces topoisomerase action. *FEBS Lett* 161 : 75-78, 1983
15. Yang L, Rowe TC, Liu LF : Identification of DNA topoisomerase II as an intracellular target of antitumor epipodophyllotoxins in simian virus 40-infected monkey cell. *Cancer Res* 45 : 5872, 1985
16. Dillehay LE, Denstman SC, Williams JR : Cell cycle dependence of sister chromatid exchange

- nge inductors in chinese hamster V79 cells. Cancer Res 47 : 206-209, 1987
17. Takagi K : Pharmacological studies ginseng. Proc 1st Intl Ginseng Symp Seoul Korea p119, 1974
18. Saito H, Lee YM : Pharmacological properties of panax ginseng root. Proc 2nd Intl Ginseng Symp Seoul Korea p109, 1978
19. Lee KS : Effect of ginseng saponin on protein synthesis in heart muscle. Proc 2nd Intl Ginseng Symp Seoul Korea p93, 1978
20. Iijima M, Higashi T, Sanada S, et al : Effect of ginseng saponin on nuclear ribonucleic acid (DNA) metabolism. I. RNA synthesis in rats treated with ginsenosides. Chem Pharm Bull 24 : 2400, 1976
21. Hahn DR : Pharmacobiological action of the ginsenoside Rb1, Rg and Re. Proc 2nd Intl Ginseng Symp Seoul Korea p135, 1978
22. Joo CN : The preventive effect of the saponin fraction of panax ginseng C.A. Meyer against ethanol intoxication of the liver. Proc 4th Intl Ginseng Symp Seoul Korea p63, 1984
23. Yamamoto M, Urmura T : Endocrinological and metabolic action of ginseng principles. Proc 3rd Intl Ginseng Symp Seoul Korea p115, 1980
24. Hiai S, Yokoyama H and Oura H : Adrenocorticotropin and corticosterone secretion by ginseng saponin. Proc 3rd Intl Ginseng Symp Seoul Korea p77, 1980
25. Brekehmman II, Dardymov IV : Pharmacological investigation of glycosides from ginseng and eleutherococcus. Lloydia 32 : 46, 1969
26. Hwang WI, Cha SM : A cytotoxic activity of extract of panax ginseng root against some cancer cells. Proc 2nd Intl Ginseng Symp Seoul Korea p43, 1978
27. Lee SH, Hwang WI : Inhibitory effect of petroleum ether extract of panax ginseng root against growth of human cancer cells. Korean J Ginseng Sci 10 : 141, 1978
28. Yonezawa M, Katoh N, Takeda A : Restoration of radiation injury by ginseng. II. Some properties of the radioprotective substance. J Radiat Res 22 : 336, 1981
29. Takeda A, Katoh N, Yonezawa M : Restoration of radiation injury by ginseng. III. Radioprotective effect of thermostable fraction of ginseng extract on mice, rats and guinea pigs. J Radiat Res 23 : 150, 1982
30. Cho YD, Koo BS, See SJ : Studies of ginseng extract on age-related enzymes. Proc 4th Intl Ginseng Symp Seoul Korea p37, 1984
31. Lee DW, Sohn HO, Lim HB, et al : Influence of chronic administration of Koreanred ginseng on some biochemical parameters related to aging in rat. Proc 6th Intl Ginseng Symp Seoul Korea p17, 1993
32. Ben-Hur E and Fulder S : Effect of panax ginseng saponins and eleutherococcus senticosus on survival of cultured mammalian cells after ionizing radiation. American J C M 9 : 48-56, 1981
33. Sariban E, Erickson LC, Kohn KW : Effects of carbamoylation on cell survival and DNA repair in normal human embryo cells(IMR-90) treated with various 1-(2-chloroethyl)-1-nitrosoureas. Cancer Res 44 : 1357, 1984
34. Perry P, Wolff S : New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature 251 : 156-158, 1974
35. Kimler BF, Chang CC : Comparison of the effects of dihydroxyanthraquinone and adriamycin on the survival of cultured chinese hamster cells. Cancer Res 42 : 3631-3636, 1982
36. Eichholtz-Wirth H : Dependence of the cytostatic effect of adriamycin on drug concentration

- ration and exposure time in vitro. *Br J cancer* 41 : 886-891, 1980
37. Barranco SC, Gerner EW, Burk KH, et al : Survival and cell kinetics of adriamycin on mammalian cells. *Cancer Res* 33 : 11-16, 1973
38. Singh B, Gupta RS : Mutagenic responses of thirteen anticancer drugs on mutation induction at multiple genetic loci and on sister chromatid exchanges in chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 43 : 577-584, 1983
39. Chung YJ, Yang YH, Park HJ : A study on chromosome aberrations and sister chromatid exchanges induced by adriamycin in human leukocytes. *Korean J Genetics* 4 : 33-45, 1982
40. Perry P, Evans HJ : Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchanges. *Nature* 258 : 121-125, 1975
41. Pommier Y, Zwelling LA, Kao-Shan CS, et al : Correlations between intercalator-induced DNA strand breaks and sister chromatid exchanges, mutations, and cytotoxicity in chinese hamster cells. *Cancer Res* 45 : 3143-3149, 1985
42. Banerjee A, Benedict WF : Production of sister chromatid exchanges by various cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 39 : 797-799, 1979
43. Raj AS, Heddle JA : Simultaneous detection of chromosomal aberration and sister chromatid exchange. *Cancer Res* 78 : 253-260, 1980
44. Wolff SB, Rodian B, Clever JE : Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens in normal and xeroderma pigmentosum cells. *Nature* 265 : 347-349, 1977
45. Liu LF, Liu CC, alberts BM : Type II DNA topoisomerase : Enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecules via a reversible double-strand break. *Cell* 19 : 697-707, 1980
46. Miller KG, Liu LF, England PT : A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* 256 : 9334-9339, 1981
47. Takahashi K, Kaneko I : Changes in nuclease sensitivity of mammalian cells after irradiation with ⁶⁰Co d-rays. *Int J Radiat Biol* 48 : 389-395, 1985
48. Takahashi K, Kaneko I, Nishiyama C, et al : Effect of novobiocin on the frequencies of chromatid-type aberrations and sister-chromatid exchanges following d-irradiation. *Mutation Res* 144 : 265-270, 1985
49. Takahashi K, Kaneko I, Nishi Y, et al : Chromatid aberrations in novobiocin-resistant subline of chinese hamster V79 cells after exposure to novobiocin. *Mutation Res* 174 : 279-284, 1986