

Mitomycin C의 免疫毒性에 미치는 高麗人蔘의 영향

安榮根 · 金周永 · 丁鍾甲 · 金正勳 · 具滋敦

圓光大學校 藥學大學

(Received July 25, 1987)

The Effect of Korean Ginseng on the Immunotoxicity of Mitomycin C

Young Keun Ahn, Joo Young Kim, Jong Gab Chung

Jung Hoon Kim and Ja Don Goo

College of Pharmacy, Won Kwang University, Iri 510, Korea

Abstract—The immunopotentiating effects of ethanol extract, butanol fraction and petroleum ether extract of Korean Ginseng on the immunotoxicity of mitomycin C were investigated in mice. A single administration of mitomycin C induced an apparent but relatively transient reduction of spleen weight, hemagglutination titer, Arthus reaction, RFC and natural killer cell activity. Ethanol extract of Ginseng significantly restored spleen weight, HA titer, RFC and natural killer cell activity. Butanol fraction of Ginseng significantly restored HA titer, RFC and natural killer cell activity. Petroleum ether extract of Ginseng very significantly restored spleen weight, Arthus reaction, DTH, RFC and natural killer cell activity.

藥物, 環境毒性物質 및 virus感染 등은 免疫機能의 低下를 가져올 수 있으며 이러한 免疫機能의 低下는 各種 感染症 및 癌의 發生빈도를 높이고 있는 바 癌과 免疫의 相關性 그리고 癌의 豫防과 治療劑로서 免疫賦活劑의 研究는 상당히 活發하게 進行되고 있다.¹⁻⁶⁾

高麗人蔘(*Panax ginseng*)은 古來로 廣範圍하게 利用되는 補血 強壯劑로서 近來 人蔘의 抗癌作用 및 免疫強化 作用에 關한 報告中에서 黃等⁷⁾은 人蔘의 脂溶性 成分이 生體內 및 試驗管內에서 三種의 癌細胞(Leukemic Cell L5178Y, Hela Cell, Sucoma 180 Cell) 成長을 抑制하여 癌細胞에 對해서만 選擇的으로 作用하고 癌組織을 破壞한다고 하였고 尹等⁸⁾은 紅蔘粉末을 長期間(25~68週) 經口投與하여 各種 化學的 發癌物質에 依한 mouse 및 rat의 腫瘍發生率의 低下와 腫瘍增殖의 抑制效果를 病理組織學的 檢索을 通하여 確認하였으며 張等⁹⁾은 頸部癌 患者의 放射線 照射에 依하여 損傷된 骨髓의 回復效果를 人蔘粉末 投與로 確認하였다는 報告가 있다.

Mitomycin C는 Leukemia 및 Hodgkin's병 등에

반응되고 있는 抗癌劑로 骨髓毒性 및 신장장애 등의 毒性을 갖고 있으며, T lymphocyte 및 B lymphocyte에 細胞毒으로 작용하여 細胞性 및 체액성 免疫을 억제하는 면역억제 물질이다.¹⁰⁾

위와 같은 mitomycin C등 抗癌劑의 免疫毒性은 감염에 대한 감수성을 증가시키며, 癌의 治療를 지연시킬 수 있다. 이에 본 저자는 mitomycin C의 임과구 독성에 의하여 저하된 숙주의 면역기능이 人蔘에 依하여 영향을 받을 것으로 사료되어 人蔘의 ethanol 抽出物, butanol 分劃物과 ether 抽出物을 投與한 後 體液性 및 細胞性 免疫反應, natural killer 細胞의 活性 등을 檢査하여 比較하였으며 이 實驗을 基礎로 mitomycin C와 人蔘을 抗癌劑로써 並用可能性을 檢討하고자 하였다.

實 驗 方 法

實驗動物—生後 7~8 週齡의 體重 17~20g 雌性 ICR mouse 8~10마리를 1群으로 하였으며, Natural Killer Cell의 활성 檢査를 위하여 生後

4 週齡의 S.D rat를 必要에 따라 使用하였다.

Mitomycin C의 調製 및 投與—Mitomycin C (Koywa Hakko Kogyo Co.) 16mg을 Dulbecco phosphate buffered saline (PBS)에 溶解 4mg/kg을 實驗 開始日에 1回 腹腔內 注射하였다.

人蔘成分의 抽出 및 投與—錦山產 4年根 人蔘을 細末로 한다음, 70% ethanol 抽出物을 얻고, Namba¹¹⁾의 方法에 依하여 butanol 分劃物을 얻었으며, 人蔘 細末를 Soxhlet 장치를 利用하여 석유 ether로 15時間 抽出하였다. Ether 抽出物은 N₂ gas 下에서 증발농축한 後 N₂ gas를 충전하여 4°C의 냉장고에 保管 使用하였다. Ethanol 抽出物 및 butanol 分劃은 PBS에 溶解 各各 100 mg/kg 및 50mg/kg을, ether 抽出物은 少量의 무수 alcohol에 溶解 後 PBS에 溶解 5mg/kg을 1日 1回 各 1週 및 2週間 mouse에 腹腔內注射하였다.

抗原 및 感作—緬羊의 頸靜脈에서 採血한 2週 以內의 緬羊 赤血球(S-RBC)를 PBS로 洗滌 浮遊하여 1×10⁷ S-RBC를 mouse의 尾靜脈 注射 感作하였으며, 4日 後에 S-RBC 浮遊液 0.05ml (1×10⁸ S-RBC/mouse)를 左側後肢足趾 皮內 注射하여 惹起시켰다.

足趾腫脹反應 測定—Arthus 및 遲延型過敏反應(delayed type hypersensitivity)은 Yoshikai 등¹²⁾ 및 河等¹³⁾의 方法에 따라 惹起 注射 3時間 後에 arthus 反應을, 24時間 後에 DTH 反應을 microcaliper (0.01mm)로 測定하였다.

赤血球 凝集素價 및 溶血素價 測定—各 mouse 로 부터 얻은 非動化 血清을 Coombs 등¹⁴⁾ 및 Stavitsky¹⁵⁾의 方法에 따라 microtitration tray를 利用 實施하였다.

脾臟細胞 浮遊液의 調製—各 mouse로 부터 無菌의으로 얻은 脾臟을 압착 分碎한 後 nylon mesh로 여과 洗滌하여 必要한 농도로 RPMI 1640 (Gibco Lab. Co.)에 再 浮遊하였으며, 使用時 trypan blue dye exclusion 方法으로 生存率을 檢査하였다.

脾臟細胞의 E-rosette 形成能 檢査—Bach 등¹⁶⁾의 方法에 따라 脾臟細胞 浮遊液 0.25ml(5×10⁶ cell)와 S-RBC 浮遊液 0.25ml(5×10⁷ S-RBC)를

混合 200×g로 10分間 원심 분리한 다음 4°C에서 2時間 放置 後 脾臟細胞에 S-REC가 3個 以上 부착한 細胞를 RFC로 判定하였다.

Natural Killer (N.K)細胞의 活性 檢査—Grimm 등¹⁷⁾이 開發한 single cytotoxicity assay 法을 多少 修正한 宋¹⁸⁾의 方法에 따라 各 mouse 로 부터 얻은 脾臟細胞 浮遊液 0.5ml (2×10⁷ cell/ml)와 S.D rat의 胸腺을 적출하여 얻은 標的細胞 0.5ml(2×10⁷ cell/ml)를 250×g에서 5分間 원심분리하여 그 上清液을 제거한 後 그 殘渣를 再 浮遊시켜 그 1滴을 稍子板에 塗末하여 作動細胞와 標的 細胞의 結合(conjugate) 百分率을 求하였으며, 그 上澄液 0.1ml (2×10⁶ cell)을 미리 45°C로 加溫한 0.5% agarose液 0.7ml에 混合하여 分注 凝固시킨 다음 RPMI 1640 2ml를 넣어 37°C에서 3時間 放置하였다. 그 後 여기에 0.1% trypan blue 液을 加하여 室溫에서 5分間 放置한 다음 RPMI 1640으로 殘餘 trypan blue 液을 除去하고 0.2% formalin 含有 生理 食鹽水로 細胞를 固定, dye exclusion이 되지 않은 標的 細胞를 현미경으로 檢鏡하였다.

통계처리—유의성 檢정은 Student's t-test로 行하였다.

實驗結果 및 考察

脾臟의 重量에 미치는 影響—脾臟의 體重에 대한 百分率은 Table I과 같이 mitomycin C 1週 投與群에서는 0.57±0.03%였으며 2週 投與群은 0.67±0.04%로 正常對照群에 比하여 顯著한 減少가 있었으나 時間의 경과에 따라 回復되었으며, 人蔘 엑기스의 投與에 의하여 增加하는 경향을 보였다. 特히 1週에는 ether 엑기스 投與群에서 0.84±0.05%, 2週는 ethanol 엑기스 投與群에서 0.80±0.12%로 有意하게 增加하여 正常對照群과 差異가 없었다.

赤血球 凝集素 및 溶血素價에 미치는 影響—赤血球 凝集 및 溶血 反應은 感作 抗原에 대한 特異 抗體와의 직접 또는 간접적인 反應으로, 抗原—抗體反應을 定量的으로 判定할 수 있는데, 지연형과민반응 測定 직후 mouse의 頸動脈을

Table I—Effects of ginseng extracts on spleen weight and percentage of spleen weight per body weight in mitomycin C-immunosuppressed mice.

Group	Dose	Spleen weight(mg)		Spleen wt. / Body wt. × 100	
		1 week	2 week	1 week	2 week
Normal		217±30**	215±29**	0.86±0.03**	0.85±0.10*
Mitomycin C (MMC)	4mg/Kg	104±10	142±8	0.57±0.03	0.67±0.04
MMC+Ethanol Ext.	100mg/Kg/day	128±17	174±27	0.66±0.05	0.80±0.12*
MMC+Butanol Frt.	50mg/Kg/day	130±25	150±23	0.54±0.08	0.70±0.03
MMC+Ether Ext.	5mg/Kg/day	159±18*	132±11	0.84±0.04**	0.68±0.04

Each value is the mean±s.e. of 8~9 mice.

Significant difference from the mitomycin C treated group(*, p<0.05, and **, p<0.01)

Table II—Effects of ginseng extracts on antibody production in mitomycin C-immunosuppressed mice.

Group	HA titer (log ₂)		Hy titer (log ₂)	
	1 week	2 week	1 week	2 week
Normal	3.5±0.4**	3.7±0.3	4.0±0.5	3.7±0.3
MMC	1.9±0.3	2.9±0.3	3.1±0.4	2.9±0.3
MMC+Ethanol Ext.	3.1±0.4*	3.9±0.4	4.1±0.5	3.4±0.2
MMC+Butanol Frt.	3.4±0.3**	3.9±0.3	4.0±0.4	3.1±0.2
MMC+Ether Ext.	2.5±0.2*	3.9±0.4	2.7±0.2	2.9±0.4

Mice were challenged with 10⁸ SRBC 4 days after sensitization.

On day 5, the HA and Hy titer were assayed.

Each value is the mean±s.e (log₂) of 8~9 mice.

Significant difference from the mitomycin C treated group (*, p<0.05 and **, p<0.01)

切斷 採血한 非動化 血清의 赤血球 凝集素價 및 溶血素價는 Table II와 같다. 凝集素價는 mitomycin C에 의하여 1週는 1.9±0.3으로 顯著하게 減少하였으나 人蔘엑기스의 投與에 의하여 有意하게 增加하였으며 특히 butanol分劃에서 3.4±0.3으로 매우 有意한 增加가 있었으며, 2週는 mitomycin C에 의하여 2.9±0.3으로 1週에 比하여 回復되었으며, 人蔘엑기스에 의하여 그 回復이 增加되었으나 有意성은 없었다. 溶血素價는 1,2週 모두에서 mitomycin C에 의해서 減少하였으며 人蔘엑기스에 의해서 약간 增加하였으나 有意한 差는 없었다.

Arthus 反應에 미치는 影響—Arthus 反應은 免疫複合體에 의해서 유리된 化學走性 因子에 의한 多核白血球의 침윤 및 組織 障得를 受하는 抗體媒介性 過敏反應으로 本 實驗에서는 Table III에서 보는 바와 같이 mitomycin C의

投與에 의하여 1週에서는 14.68±1.81으로 正常對照群의 18.77±2.41에 比하여 減少하였으나 人蔘의 ether엑기스에 의하여 23.04±1.57로 有意하게 增加하였으며, 2週는 mitomycin C 投與群과 正常對照群 間에 有意한 差가 없었으며, ether엑기스에서 가장 높은 反應値를 나타내었다.

遲延型過敏反應에 미치는 影響—Delayed type hypersensitivity (DTH)는 感作 T-cell에 의한 lymphokines등의 유리에 기인하는 細胞媒介型 過敏反應으로 本 實驗에서는 Table III에서 보는 바와 같이 1,2週 모두에서 mitomycin C의 投與에 의하여 13.24±1.26, 12.58±1.46로 正常對照群에 比하여 DTH 反應이 抑制되었으며, 人蔘엑기스의 投與에 의해서 약간의 增加를 보였으며 특히 ether엑기스에 의하여 16.46±1.24, 16.00±1.57로 有意하게 增加되었으며, 正常群에 比하여도 상당한 增加가 있었다. 그러나

butanol분획 投與群은 mitomycin C 投與群에 比하여 arthus 및 지연형반응이 저하하여 Yeung¹⁹⁾의 報告와 일치하며 이는 saponin의 steroid 類似構造에 기인한 것으로 思料된다.

E-rosette 形成細胞에 미치는 影響—E-rosette는 T-cell과 S-RBC가 結合하는 현상으로 T-cell 뿐만 아니라 大食細胞가 rosette를 形成하는 것으로 알려져 있으며 本 實驗에서는 Table IV에서 보는 바와 같이 mitomycin C에 의하여 8.63±0.61, 11.45±0.94로 正常對照群에 比하여 顯著하게 減少하였으나, 特히 人蔘의 ethanol엑기스 및 ether엑기스의 投與에 의하여 有意한 增加

가 있었다. 이는 Jie²⁰⁾等 및 黃²¹⁾의 報告와 일치하였다.

NK(natural killer) 細胞의 活性에 미치는 影響—NK 細胞는 腫瘍細胞, 組織移植片, virus 感染細胞등의 破壞등과 같은 役割을 하는 細胞로 그 活性은 生體防禦의 重要한 部分을 擔當하는 바 本 實驗에서는 Table IV와 같이 mitomycin C에 의하여 그 活性이 현저히 減少하였으나, 人蔘 ethanol 엑기스 및 ether 엑기스에 의하여 有意하게 增加하였다.

위와 같이 人蔘엑기스는 mitomycin C에 의하여 저하된 體液性 및 細胞性免疫反應의 賦活作

Table III—Effects of ginseng extracts on Arthus and DTH reaction in mitomycin C-immunosuppressed mice

Group	Arthus		DTH	
	1 week	2 week	1 week	2 week
Normal	18.77±2.41	22.06±1.69	15.36±1.11	13.74±1.06
MMC	14.68±1.81	22.95±1.68	13.24±1.26	12.58±1.46
MMC+Ethanol Ext.	15.14±1.61	22.20±1.80	14.65±1.40	12.27±1.58
MMC+Butanol Frt.	13.01±1.15	20.35±0.83	13.75±1.53	11.62±1.14
MMC+Ether Ext.	23.04±1.57*	23.64±1.83	16.46±1.24*	16.00±1.57*

Foot pad swelling was measured after intradermal challenge of 10⁸ SRBC.

FPSI (Foot pad swelling index) = $\frac{\text{Increasing thickness of foot pad}}{\text{Thickness of foot pad before challenge}} \times 100$

At 4 hour FPSI was Arthus reaction and 24 hour FPSI was DTH.

Significant difference from the mitomycin C treated group. (* P<0.05)

Table IV—Effects of ginseng extracts on E. rosette and NK cell activities of spleen cells in mitomycin C immunosuppressed mice.

Group	RFC(%) ^a		NK activity ^b	
	1 week	2 week	1 week	2 week
Normal	20.39±1.17**	17.31±0.87**	23.05±2.34**	23.13±1.76**
MMC	8.63±0.61	11.45±0.94	11.35±0.22	14.88±1.02
MMC+Ethanol Ext.	14.14±1.47**	16.44±1.44**	21.72±1.34**	20.22±1.36**
MMC+Butanol Frt.	18.38±0.98**	11.63±0.98	14.96±1.23*	21.56±0.94**
MMC±Ether Ext.	21.08±1.81**	19.40±1.81**	24.20±0.71**	25.97±2.27**

Mice were challenged with 10⁸ SRBC 4 days after sensitization.

On day 5, RFC and NK cell activity were assayed.

a : % RFC = $\frac{\text{No. of rosette forming cells}}{\text{Total cell counted} \times \text{Viability}} \times 100$

b : % NK activities = $\frac{(\% \text{Conjugated cells}) \times (\% \text{maximal lysed conjugated cell})}{100}$

Each value is the mean±s.e of 8~9 mice.

Significant difference from the mitomycin C treated group (*, p<0.05 and ** p<0.01)

用을 나타냈으며, 特히 ether 엑기스는 NK(natural killer) 細胞의 活性等 細胞性免疫反應을 현저히 增強시켰다.

人蔘엑기스가 抗癌劑의 부작용을 감소시킨다는 報告²¹⁾ 및 免疫과 癌發生의 상관성¹⁻⁴⁾으로 미루어 人蔘엑기스는 mitomycin C의 부작용을 감소시킬 수 있으며, NK 細胞의 活性의 賦活作用을 고려할 때 mitomycin C와 人蔘엑기스 特히 ether 엑기스의 병용투여는 抗癌作用을 增強시킬 것으로 思料된다.

結 論

Mitomycin C는 體液性 및 細胞性免疫, natural killer細胞 活性을 有意하게 減少시켰으며, 이에 대하여 人蔘 ethanol엑기스는 약간의 賦活作用을 butanol 分割는 細胞性免疫을, 石油 ether 엑기스는 體液性 및 細胞性免疫, natural killer 細胞 活性을 顯著히 賦活 내지 增強시켰다.

文 獻

- 1) Prehn, R.T.: Immunomodulation of tumor growth. *Am. J. Pathol.* **77**, 119(1974)
- 2) Elgert, K.D. and Farrar, W.L.: Suppressor cell activity in tumor-bearing mice. *J. Immunol.* **120**, 1345 (1978)
- 3) Gorellk, E. and Herberman, R.B.: Inhibition of the activity of mouse natural killer cell by urethan. *J.N.C.I.* **66**, 543 (1981)
- 4) Hochman, P.S., Cudkowicz, G. and Dousset, S.: Decline of natural killer cell activity in sublethally irradiated mice. *J.N.C.I.* **61**, 265 (1978)
- 5) Yokota, Y. Mine, Y. Wakai, Y. Watanabe, Y. and Nishida, M.: Immunoactive peptides, FK-156 and FK-565. *J. Antibiotics.* **8**, 1051 (1983)
- 6) Herberman, R.B. and Holden, G.T.: Natural killer cells as antitumor effector cell. *J.N.C.I.* **62**, 44 (1979)
- 7) Hwang, W.I.: A cytotoxic activity of extract of Panax ginseng root against some cancer cell in vivo and in-vitro. *Proc. 2nd inter. ginseng symp.* **43** (1978)
- 8) Yun, T.K., Yun, Y.S. and Han, I.W.: An experimental study on tumor inhibitory effect of red ginseng on mice and rat exposed to various chemical carcinogens. *Proc. 3rd inter ginseng symp.* **87** (1980)
- 9) Chang, Y.S. and Park, C.I.: The effect of Panax ginseng on the post operative radiation complication in cervical cancer patients. *Seoul J. Med.* **21**, 187 (1980)
- 10) Okabe, M., Imai, R.I. and Morimoto, M.: The action of 7-N-(p-hydroxyphenyl) mitomycin c in suppressing murine immune response. *J. Antibiotics* **8**, 1055 (1972)
- 11) Namba, T., Yoshizaki, M., Tominari, T. and Hase, J.: Hemolytic and its protective activity of ginseng saponin. *Planta. Medica* **25**, 28 (1974)
- 12) Yoshikai, Y., Miake, S. Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K.: Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed foot pad reaction to SRBC in mice. *Immunol.* **38**, 577 (1979)
- 13) Ha. T.Y. and Rhee, H.K.: Effect of inosiplex on cellular and humoral immunity. *J. Kor. Soc. Micr.* **16**, 57 (1981)
- 14) Coombs, R.R.A. and Fiset, M.L.: Detection of complete and incomplete antibodies to egg albumin by means of a sheep red cell egg albumin antigen unit. *Brit. J. Exp. Path.* **35**, 472 (1954)
- 15) Stavitsky, A.B.: Micro methods for the study of proteins and antibiotics. *J. Immunol.* **72**, 360 (1954)
- 16) Bach, J.F. and Darderne, M.: Antigen recognition by T-lymphocytes. *Cell Immunol.* **3**, 1 (1972)
- 17) Grimm, E. and Bonavida, B.: Mechanism of cell mediated cytotoxicity at the single cell level. *J. Immunol.* **123**, 2861 (1979)
- 18) Song, H.J., Kim, S.H. and Kim, J.M.: Immunobiological studies on mice treated with chemical carcinogen, 3-methylcholanthrene: Rosette formation and natural killing activity of splenic lymphocytes. *Korean J. Vet. Res.* **26**, 117 (1986)
- 19) Yeung, H.W.: Effect of ginseng on the immune responses to influenza virus infection in mice. *Proc. 3rd Inter. Ginseng Symp.* **245** (1980)

- 20) Jie, Y.H., Cammisul, S. and Baggiocini, M.: Immunomodulatory effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer in the mouse. *Agents and Actions*. 15, 386 (1984)
- 21) Hwang, W.I. and Oh, S.K.: A study on the activities of lipid soluble ginseng extract and ginseng saponin derivatives against some cancer cells. *Korean J. Ginseng Sci.* 8, 153 (1984)
- 22) Kim, K.J. and Kim, H.S.: Effects of ginseng on the side effects of anticancer agent. *Chung Nam Medical J.* 9, 37 (1982)