

항암 면역 증강 작용이 있는 인삼 다당체에 의한 cytokine mRNA의 발현

김기환¹ · 이인란¹ · 정인성 · 정희용 · 윤연숙

¹이화여자대학교 약학대학, 한국 원자력 연구소 부설 원자력병원 면역학 연구실
(1998년 4월 2일 접수)

The Pattern of Cytokine mRNA Expression Induced by Polysaccharide from *Panax ginseng* C. A. Meyer

Ki-Hwan Kim¹, Ihn-Rhan Lee¹, In-Sung Jung, Hee-Yong Chung and Yeon-Sook Yun

¹College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Laboratory of Immunology, Korea Cancer Center Hospital, Seoul 139-706, Korea

(Received April 2, 1998)

Abstract : We previously reported that polysaccharide isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer, stimulates murine splenocytes to proliferate and to be cytotoxic against a wide range of tumor cells in MHC non-restricted manner.¹⁾ Therefore, we examined the cytokine mRNA expression induced by the ginseng polysaccharide in this paper. This study demonstrates that the ginseng polysaccharide stimulates Th1 type cytokine expression such as IL-2 and IFN γ , and macrophage type cytokine expression such as IL-1 α and GM-CSF in a dose-dependent manner at different time: IL-2 mRNA was induced at 30 min, IL-1 α , GM-CSF mRNA at 3 hr, IFN γ at 6 hr after the ginseng polysaccharide treatment. In contrast with these, Th2 type cytokine expression such as IL-4 and IL-5 was not induced. The generation of the ginseng polysaccharide-activated killer cells which was induced at the optimal doses of 50 μ g/ml was neutralized in the presence of anti-IL-2, anti-IFN γ , anti-IL-1 α antibodies, showing the importance of these cytokines produced by the ginseng polysaccharide. In flow cytometry analysis, the blastogenesis of IgM⁺ cells was induced on day 3 and the number of Thy 1.2⁺ cells, CD4⁺ and CD8⁺ cells was increased on day 5. The ginseng polysaccharide also induced blastogenesis of T cells. In conclusion, the ginseng polysaccharide may have considerable antitumor immunotherapeutic modality by stimulating the cytokine production from Th1 cells and macrophage and by proliferating lymphocytes.

Key words : *Panax ginseng*, polysaccharide, cytokine, mRNA, tumor.

서 론

암 치료에 있어서 면역계의 반응을 조절하여 암에 대한 치료효과를 유도하는 방법은 많이 보고되어 왔다.²⁾ 이를테면, IL-2 혹은 IL-3를 이용하여 암을 살해하는 lymphokine-activated killer(LAK) 세포나 cytotoxic T 세포(CTL)를 생성시키는 방법,^{3,4)} NK 세포에 의하여 MHC에 제한 없이 암세포 살해 효과를 유

발시키는 방법,^{5,7)} macrophage에 의한 암세포 살해 작용,⁸⁾ 환자에게 암세포에 대한 단일 클론 항체를 투여했을 때 보여지는 치료 효과 등이 그것이다.⁹⁾ 그런데 보통의 생리적인 상태에서는, 암세포의 빠른 성장과 면역계에 대한 억제 인자 분비 등으로 인하여 면역반응을 이용한 치료 효과를 나타내기 어렵다. 따라서, 암세포에 대한 면역 반응을 조절하는 기본적인 기전과 조절요소를 이용하여 숙주의 항암 면역능력을 높

여주는 암 면역요법의 개선이 필요하다.¹⁰⁰

이와 같은 목적의 일환으로, 인삼 다당체의 생체 응답 조절제(BRM)로서의 작용기전 및 활성 성분 연구를 수행하여, 백삼의 물 추출물에서 분리한 다당체 분획(Ginsan)이 T 세포 및 B 세포에 mitogen으로 작용하며, MHC에 관계없이 암세포를 살해하는 *in vitro* activated killer cell(AK cell)을 생성한다고 보고한 바 있다.¹¹¹ 비특이적으로 암세포를 살해하는 세포는 IL-2, IFN- γ 등의 Th1 type cytokine 및 IL-1 α , GM-CSF, TNF α 등의 macrophage cytokine에 의하여 활성화 되므로, 본 연구에서는 인삼 다당체에 의한 암세포를 살해하는 AK세포의 생성과 관련하여 항암 면역 반응을 활성화시키는 인자로서 cytokine mRNA의 발현 유도를 관찰하였고, cytokine에 대한 항체를 이용한 중화 실험을 통해 인삼 다당체에 의한 cytokine 생성이 임파구의 증식 및 암세포를 살해하는 세포의 생성에 미치는 영향을 연구 하였다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

(1) 실험 동물

미국 NCI(National Cancer Institute, NIH)에서 분양 받아 원자력병원 실험동물 관리실에서 사육한 5~8 주령의 비근교계 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 사육실의 온도는 22 $^{\circ}$ C, 습도는 55~60%로 유지하였고, 12시간 단위의 명암주기로 고형 사료(NIH-7-open formula)와 물을 자유로이 공급하였다.

(2) 인삼

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 금산산 백삼(직삼) 6년근을 사용하였다.

(3) 시약

인삼 물 추출물의 고분자 및 저분자 분리에 사용된 dialysis tube는 Sigma (ST.Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, FCS(Fetal Calf Serum)는 Hyclone(Utah, USA)에서, ConA(Concanavalin A), BSA(Bovine serum albumin)는 Boehringer Mannheim(Mannheim, Germany)으로부터, LPS(Lipopolysaccharide), polymixin B sulfate, chloroform, isopropanol, formaldehyde, mineral oil은 Sigma(ST. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. [3 H]-Thymidine은 NEN(Boston, MA, USA)에서, RNAzol TMB는 Biotex Laboratories, INC.

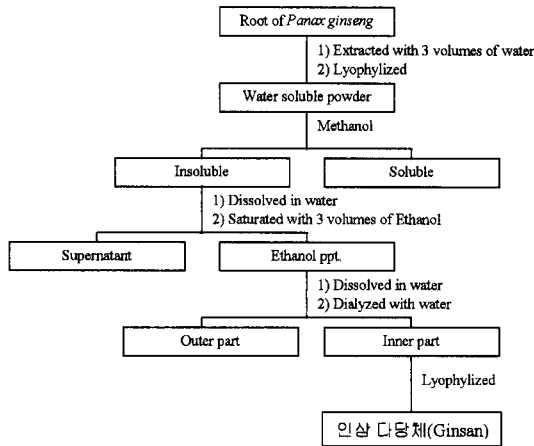
(Friendswood, Texas, USA)에서, Ethanol은 Hayman Limited(Witham, England)에서, S_{EA} K_{EM} ME Agarose는 FMC Bioproducts(Rockland, Maine, USA)에서, size marker인 PBR322-*Msp* I Digest는 New England Biolab, Inc.(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. RT-PCR에 사용한 MLV, DTT는 Gibco BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서, RNasin은 Promega(Madison, WI, USA)에서, pd(N)₆ primer, Ultrapure dNTP(2'-Deoxynucleoside-5'-Triphosphate) set은 Pharmacia(Uppsala, Sweden)에서 구입하였다. PCR에 사용한 cytokine primer는 interleukin 1, interleukin 2, interleukin 4, interleukin 5, granulocyte macrophage-colony stimulating factor, interferon γ , β -actin primer로써 Stratagene(La Jolla, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, Ampli *Taq*[®] DNA polymerase는 Boehringer Mannheim(Mannheim, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 중화 실험에 사용한 anti-IL-2, anti-IFN γ , anti-IL-1, anti-IL-4, anti-TNF α antibody는 Genzyme(Cambridge, MA, USA)으로부터 구입하였으며, FACS analysis에 사용한 anti-CD4-FITC antibody, anti-CD8a-R-PE-antibody는 GIBCO BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서, anti-IgM-FITC antibody는 Vector Laboratories, Inc(Burlingame, LA, USA)에서, anti-Thy1.2-FITC antibody는 Sigma(ST. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험 방법

(1) 인삼 분획물의 조제

백삼 6년근 1.2 kg을 세분 절편하여 5배량의 3차 증류수를 가하여 팽윤시켰다. 4 $^{\circ}$ C에서 팽윤된 백삼 절편을 3배량의 3차 증류수로 3~5회 추출하여 동결 건조 하였다. 동결 건조 분말용 200~300 ml의 3차 증류수에 녹이고 3배량의 에탄올을 가하여 약 10분간 세게 흔들어 주었다. 잠시 방치하여 에탄올 가용부와 비가용부로 나누고 에탄올 비가용부를 취하여 3차 증류수 약 300 ml에 재용해시켰다. 용액을 미리 팽윤시켜 놓은 cellulose dialysis tube에 약 3~4 ml 씩 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 저어주면서 3차 증류수를 12시간 단위로 교환하여 투석시켰다. Dialysis tube 내부의 용액을 모아 동결 건조 시키고 건조 분말의 양을 측정하여 적당량의 배지에 용해 시켰다 (Scheme 1).

(2) 마우스 비장 세포의 조제



Scheme 1. Extraction of polysaccharide from *Panax ginseng* C. A. Meyer.

C57BL/6 마우스를 경추 탈골법으로 희생시켜 75% 에탄올을 분사한 뒤 무균 벤치에서 복부를 절개하여 비장을 적출하였다. 패트리디쉬에 소량의 HBSS를 넣고 적출한 비장을 1 ml 주사기 뒷부분으로 세분 절편하고, 50 ml 원심용 시험관에 6점의 가아제를 놓고 비장 세포 현탁액을 통과 시킨 후, 1400 rpm에서 7분간 원심분리 하였다. 여액을 제거하고 세포 침전물에 0.5 ml FCS와 4.5 ml 1X ACK buffer를 가하여 세포를 부유시켜 얼음에 30초간 방치하여 적혈구를 파괴한 후 30 ml의 HBSS를 가하여 현탁시켜 1400 rpm에서 7분간 원심분리 하였다. HBSS로 2회 세척한 뒤 LCM에 현탁시켜 세포수를 측정하여, 1.5 ± 10^7 cells/ml로 조제하였다.

(3) 세포 배양

시간경과에 따른 cytokine mRNA 발현의 변화 관찰시는 임파구를 1.5×10^6 cells/ml의 농도로 하여 500 mg/ml의 인삼 다당체 추출물을 처리한 것과 처리하지 않은 것으로 나누어 25 cm³ flask에 10 ml 되도록 2 flask씩 37°C, 5% CO₂에서 30분, 3시간, 6시간, 24시간 동안 배양하였고, 인삼 다당체 추출물을 처리하지 않은 임파구 중 2.5×10^7 개는 배양 시간 없이 cytokine mRNA 발현을 관찰하기 위하여 total RNA를 분리하는데 사용하였다.

인삼 다당체 추출물의 용량에 따른 cytokine mRNA 변화 관찰시는 임파구를 1.5×10^6 cells/ml의 농도로 맞추어 아무 것도 처리하지 않거나 각 10 µg/ml, 50 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml의 인삼 다당체

추출물을 처리하여 25 cm³ flask에 10 ml씩 2개의 flask를 37°C, 5% CO₂에서 6시간 동안 배양하였다.

(4) Total RNA isolation

배양한 임파구 2.5×10^7 개를 취한 뒤, 1400 rpm에서 7분간 원심 분리하여 배지를 제거하고 침점된 세포를 1X PBS로 3회 세척한 뒤, 1.5 ml eppendorf tube에 옮겨, PBS를 제거하고 각 tube에 RNAzol™B 500 µl을 넣어 잔사가 없도록 세포를 완전히 파괴시킨 후 phenol-chloroform 추출법으로 총 RNA를 분리하였다. 분리한 총 RNA는 DEPC(Diethylpyrocarbonate)를 처리한 적정량의 증류수에 용해시키고, 용액 중 그 일정량을 취하여 spectrophotometer의 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 바탕으로 RNA의 농도를 산출하고, RNA 500 ng을 1% agarose gel에 전기영동시켜 total RNA의 분리 상태를 확인하였다.

(5) Semiquantitative RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

1) Reverse Transcription

RNA sample 1 µg을 65°C에서 가열한 후, 신속히 얼음상에서 냉각시킨 후 다른 tube에 5X PCR buffer와 dNTPs(10 mM), MLV(2u), DTT(100 mM), RNasin(1~2 u/ml), pd(N)₆ primer(0.002 µg/µl)를 넣어 혼합액을 만들고, RNA sample에 혼합액 10 ml씩을 가하여 37°C에서 60분간 반응시켜, first-strand cDNA를 합성하였다.

2) Polymerase Chain Reaction에 의한 첫번째 상보적인 DNA 사슬(first-strand cDNA)의 증폭

PCR 혼합액을 아래의 조성과 같이 증류수와 5X PCR buffer, cytokine primer(1 µM), BSA, dNTPs(40 µM)를 섞어 조제 하였다. 만들어진 cDNA에 95°C에서 5분간 가열시킨 후, 혼합액 28 µl와 Tag polymerase 2 µl(2.5 µM)를 넣어 잘 섞어서, 94°C에서 사슬의 분리(denaturing) 1분, 60°C에서 primer 부착(annealing) 1분, 72°C에서 사슬의 합성 및 연장(extension) 1분을 1 cycle로 27 내지 35 cycle을 반복하였다. 마지막에 72°C에서 10분간 더 반응시켰다(final extension). 전체 PCR 반응액 50 µl 중 15 µl을 취하여 2% agarose gel에서 size marker인 PBR322-Msp I Digest와 함께 전기영동하여 증폭된 cytokine mRNA의 발현을 확인하였다.

(6) Flow Cytometry를 이용한 임파구의 pheno-

type 분석

비장세포로부터 분리한 임파구를 1.5×10^6 cells/ml의 농도로 24 well flat bottomed plate에 부유시키고, ConA $1 \mu\text{g/ml}$, LPS $10 \mu\text{g/ml}$, 인삼 다당체 추출물 500 mg/ml 을 처리한 것과 처리하지 않은 것을 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 에서 3일, 5일간 배양하였다. 배양 후 각 sample당 1×10^6 개를 취하여, 2×10^6 개의 세포씩 5개의 tube에 분주하였다. 염색용 완충액(PBS, $2\% \text{ FBS}$, $0.05\% \text{ Sodium azide}$)을 1 ml 씩 가하여 1400 rpm 에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 남겨진 세포 침전물에 $1/100$ 으로 희석하여 조제해 놓은 anti-CD4-FITC antibody, anti-CD8a-PE antibody, anti-IgM-FITC antibody, anti-Thy 1.2-FITC antibody를 $45 \sim 50 \mu\text{l}$ 씩 가하고 세포와 현탁시킨 후 얼음에서 15분간 방치하였다. 염색용 완충액으로 4회 세척한 후 상층액을 깨끗이 제거하고 완충액 1 ml 에 현탁시켜 놓았다. Phenotype의 분석시 Cell Quest software program에 따라 죽은 세포는 배제되었으며, 단일 항체의 염색에 의해 표면 항원이 양성반응을 보인 세포에 대하여 그 비율을 표시하였다.

(7) Activated Killer (AK) cell 생성능 측정

임파구 활성화 실험은 4시간 ^{51}Cr 유리법을 이용하였다. 작동 세포는, 비장 세포를 24 well plate(Corning, New York, USA)에 비장 세포가 1.5×10^6 cells/ml이 되도록 희석한 후 30 U/ml 의 IL-2 및 인삼 분획물을 넣고 총 2 ml 씩 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 배양기에서 5일 동안 배양하였다. 5일 후 배양액 2 ml 을 15 ml tube에 옮겨 HBSS로 2회 세척 하고 세포의 농도는 5×10^6 cells/ml로 고정하였다. 표적 세포는, 방사선 동위 원소인 Na_2CrO_4 를 $200 \mu\text{Ci}$ 를 가하여 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 배양기에서 60분간 배양하였고, 3회 세척하여 5×10^4 cells/ml로 농도를 고정하였다. 이미 준비해 놓은 작동 세포와 ^{51}Cr 으로 표지된 표적 세포를 $100:1$, $30:1$ 또는 $10:1$ 의 비율이 되도록 U-bottomed microplate(Corning, New York, USA)에 넣고 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 $2,200 \text{ rpm}$ 에서 5분간 원심 분리하고 상층액을 0.1 ml 씩 취해 γ -counter로 상층액에 유리된 ^{51}Cr 에 의한 γ 선의 강도를 측정하여, 다음의 식에 의해 % 세포 독성(cytotoxicity)을 산출하였다. 각 실험은 2배수(duplicate)로 하였으며 표적 세포로는 murine leukemia cell line인 YAC-1을 사용하였고, 같

은 실험을 5회 이상 하였다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{E-S}{E-S} \times 100$$

E : Experimental release (cpm)

S : Spontaneous release (cpm)

M : Maximum release (cpm)

결 과

1. 시간경과에 따른 cytokine mRNA 발현의 변화 관찰

인삼 다당체를 임파구와 배양시, Th1 세포에서 분비되는 IL-2 mRNA는 배양한지 30분만에 발현되어서 24 시간까지 발현이 지속되었으며, macrophage에

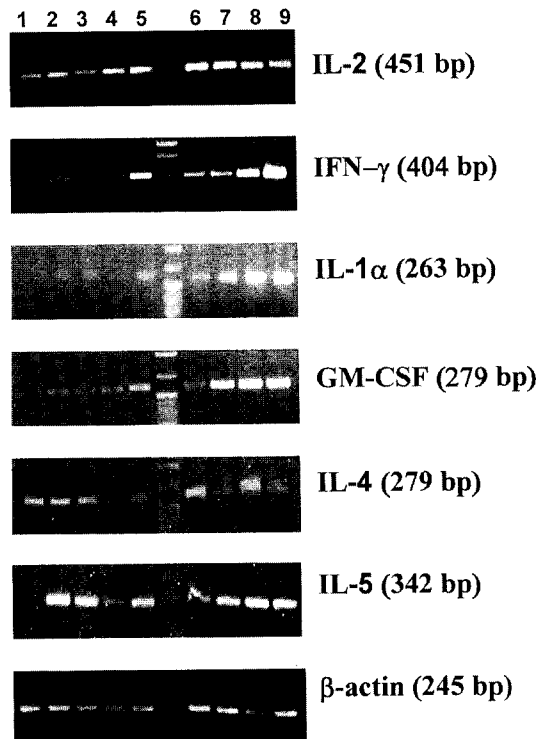


Fig. 1. Photographs of representative RNA-polymerase chain reaction products electrophoresed on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Lane 1 through 5 are normal spleen cells which is incubated for 0, 0.5, 3, 6, and 24 hours, respectively, and lane 6 through 9 are spleen cells which is incubated with Ginsan ($500 \mu\text{g/ml}$) for 0.5, 3, 6 and 24 hours, respectively.

서 분비되는 IL-1 α , GM-CSF mRNA는 배양한 지 3시간 이후부터 발현이 유도되었다. Th1 세포에서 분비되는 IFN γ mRNA는 6시간 이후부터 24시간까지 지속적으로 현저한 발현이 유도되었다. Th2 세포에서 분비되는 IL-4, IL-5 mRNA는 인삼 다당체를 처리하지 않은 경우와 비교하여 유의성 있는 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

2. 인삼 polysaccharide의 용량에 따른 cytokine mRNA 발현의 변화 관찰

인삼 다당체의 용량 변화에 의한 임파구의 cytokine mRNA 발현을 관찰한 결과, Th1 세포에서 분비되는 IFN γ mRNA의 경우 10 μ g/ml에서 발현이 포화상태를 나타내었으며, Th1 세포에서 분비되는 IL-2 mRNA와 macrophage에서 분비되는 IL-1 α , GM-CSF mRNA의 경우 10 μ g/ml에서 250 μ g/ml

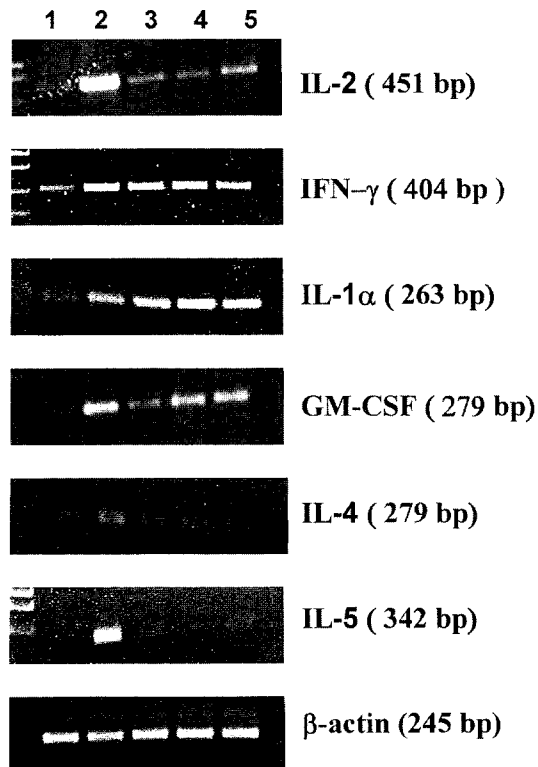


Fig. 2. Photographs of representative RNA-polymerase chain reaction products electrophoresed on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Lane 1 through 5 are normal spleen cells, ConA-treated, doses of 10, 50, 250 μ g/ml of Ginsan-treated spleen cell, respectively. The spleen cells are stimulated for 6 hours.

사이에서 용량 의존적으로 발현되었다. 그러나, Th2 세포에서 분비되는 IL-4, IL-5에 있어서는 아무 것도 처리하지 않은 경우에 비하여 유의성 있는 증가를 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

3. Flow Cytometry를 이용한 임파구의 phenotype 분석

비장으로부터 분리하여 인삼 다당체와 함께 3일간 배양한 임파구 중의 IgM $^{+}$ 세포는 전체 세포 중 62.3% 인데, 같은 조건에서 아무 것도 처리하지 않은 임파구와 비교시 세포 수의 증가는 크지 않으나, blastogenesis가 현저히 일어났음을 알 수 있었다. 배양한 뒤 3일째에 아무 것도 처리하지 않은 임파구 중 Thy 1.2 $^{+}$ 세포는 37.9% 이나 인삼 다당체와 함께 배

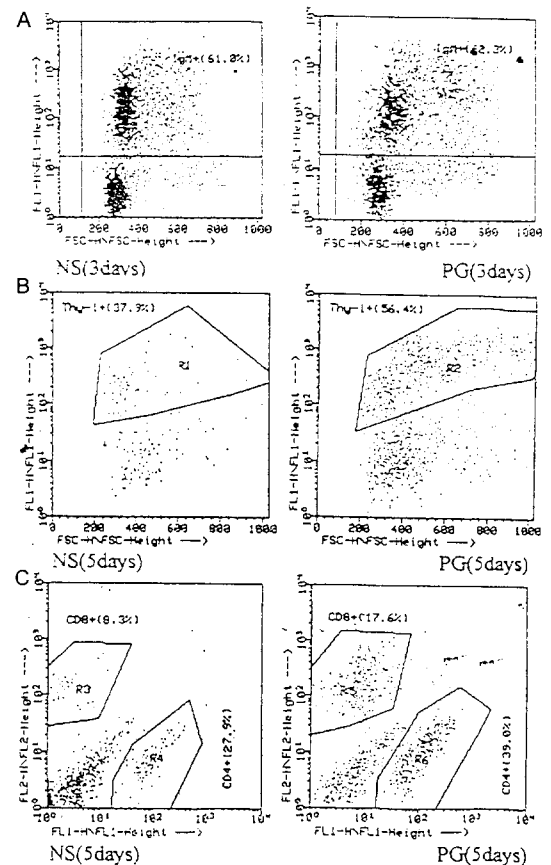


Fig. 3. Representative fluorescence histograms of splenocytes stained with (a) α -IgM antibodies or (b) α -Thy 1.2 antibodies or (c) α -CD4 and α -CD8 antibodies. In this experiment, 2×10^5 cells were used for one staining and dead cells were excluded by Cell Quest software program.

Table 1. Neutralization of the generation of ginsan induced cytotoxic cells by anti-IL-1 α , anti-IL-2, or anti-IFN γ antibodies

Culture	% Cytotoxicity at E:T=100:1
SC+IL-2	76.3 \pm 9.8
SC+IL-2+ α IL-1 α	75.7 \pm 8.7
SC+IL-2+ α IL-2	28.4 \pm 5.2*
SC+IL-2+ α IFN- γ	77.0 \pm 10.0
SC+IL-2+ α IL-4	75.7 \pm 11.1
SC+ginsan	64.9 \pm 6.8
SC+ginsan+ α IL-1 α	31.5 \pm 8.6 [†]
SC+ginsan+ α IL-2	6.5 \pm 0.6 [†]
SC+ginsan+ α IFN- γ	6.0 \pm 1.2 [†]
SC+ginsan+ α IL-4	60.5 \pm 9.0

Spleen cells (SC, 3×10^6 cells/well) from C57BL/6 mice were cultured with rhIL-2 (30 U/ml) or ginsan (50 μ g/ml) in the presence of anti-IL-1 α (10 μ g/ml), anti-IL-2 (10 μ g/ml), anti-IFN- γ (8 μ g/ml), or anti-IL-4 antibodies (8 μ g/ml) on 24 well culture plates in triplicates at 37°C in 5% CO₂ incubator. The cytotoxicity against Yac-1 was measured on day five of culture as described in Table 1. Triplicate wells were performed in each culture. Experiment was performed more than twice. In each experiment, the cytotoxicity of the cultured splenocytes showed almost similar patterns.

* Significantly ($P < 0.01$) lower than controls with IL-2.

[†] Significantly ($P < 0.01$) lower than controls with ginsan.

양한 경우 세포의 수가 56.4%까지 증가하였으며, blastogenesis가 일어났음을 알 수 있었다. 배양한 뒤 5일째에는 CD4+세포 및 CD8+ 세포가 인삼 다당체를 처리하지 않은 대조군에서는 각각 27.9%, 8.3%였으나, 인삼 다당체를 처리한 군에서는 각각 39.0%, 17.6%로 증가하였다(Fig. 3).

4. 중화 실험

비장 세포를 rhIL-2 혹은 인삼 다당체 존재 하에서 anti-IL-1 α , anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IFN γ antibody와 함께 5일간 배양하였다. IL-2에 의하여 유도되는 LAK 세포는 anti-IL-2 antibody 존재하에서 현저히 감소되나, anti-IL-1 α , anti-IL-4, anti-IFN γ antibody 존재하에서 감소되지 않았다. 반면, 인삼 다당체에 의해 유도되는 AK 세포는 anti-IL-4 antibody를 제외한 anti-IL-1 α , anti-IL-2, anti-IFN γ antibody 존재하에서 모두 현저히 감소 하였다. 따라서, AK 세포 생성에 가담하는 cytokine은 IL-1 α , IL-2, IFN- γ 이며, IL-4는 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다(Table 1).

고 찰

Th1 세포 및 macrophage로부터 생성되는 cytokine은 암세포에 대한 세포성 면역 반응을 증가시켜 항암 작용을 나타내며, Th2 세포로부터 생성되는 cytokine은 세포성 면역을 저해하는 것으로 알려져 있다.^{12,13} 따라서, 인삼 다당체는 Th1 세포 및 macrophage로부터 생성되는 IL-2, IFN γ , IL-1 α , GM-CSF의 mRNA 발현을 증가 시켰으며, Th2 세포로부터 생성되는 IL-4, IL-5 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았으므로, 항암 면역 증강 작용이 기대된다(Fig. 1, 2).

인삼 다당체는 항암 작용을 나타내는 AK세포를 생성하는데, anti-IL-1 α , anti-IL-2, anti-IFN γ 항체 존재하에서 암세포 살해능이 저해되었으므로, AK 세포의 생성은 이들 cytokine에 의하여 이루어졌음을 확인하였다(Table 1). 그러나, 인삼 다당체에 의한 임파구 증식능은 anti-IL-1 α , anti-IL-2, anti-IFN γ 항체에 의하여 영향을 받지 않았으므로(data not shown), 인삼 다당체 분획에 의한 AK 세포 생성 및 임파구 증식 작용은, 작용 기전과 활성 물질이 서로 다를 것으로 판단된다.

인삼 다당체에 의하여 증식되는 임파구 subset을 측정한 결과, 인삼 다당체는 IgM+ 세포를 활성 세포형으로 변화시키는 blastogenesis를 유도하며, Thy-1.2+ 세포, CD4+세포, CD8+세포를 증식시키고 또한 blastogenesis를 유도하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

시료 중 혼입되었을 가능성이 있는 LPS에 의한 영향을 알기 위하여, Polymixin B 처리에 의한 임파구 증식능에 미치는 영향을 관찰하였다. LPS와 polymixin B를 함께 처리한 경우는 LPS에 의한 임파구 증식을 현저히 억제하나, ConA 혹은 인삼 다당체 추출물을 가한 비장 임파구에서는 polymixin B의 존재 하에서도 증식은 억제되지 않았으므로, 인삼 다당체 추출물의 임파구에 대한 작용은 LPS에서 유래된 것이 아님을 확인할 수 있었다(data not shown).

이상적인 항암 면역 증강제는 T 세포 및 NK세포, macrophage와 같은 모든 활성 세포를 정상 조직에 대한 독성 및 부작용 없이 균형 있게 활성화시킬 수 있는 능력을 가진 것을 의미한다.²¹ 따라서, Th1세포 및 macrophage로부터 cytokine의 생성을 유도하며, 암세포를 살해하는 AK세포를 생성시킨 인삼 다당체는

이상적인 항암 면역 증강제로 개발될 가능성이 있다고 사료된다.

요 약

인삼 다당체에 의하여 유도되는 cytokine mRNA를 관찰한 결과, Th1 세포에서 분비되는 것으로 알려진 IL-2와 IFN- γ mRNA, macrophage로부터 분비되는 것으로 알려진 IL-1 α 와 GM-CSF mRNA의 발현을 용량 의존적으로 증가 시켰으나, Th2 세포에서 분비되는 것으로 알려진 IL-4와 IL-5 mRNA의 발현은 차이가 없었다. 또한, 중화실험에 의하여 AK 세포의 생성에는 IL-1 α , IL-2, IFN γ 가 필요하다. 인삼 다당체에 의해 증가된 임파구의 subset을 flow cytometry로 분석한 결과, 배양 3일째에 IgM+ 세포의 수가 증가하고, 배양 5일째에 Thy 1.2+ 세포와 CD 4+ 세포, CD8+ 세포의 수가 증가하며, blastogenesis가 일어났음을 확인하였다. 이와 같이, 인삼 다당체는 임파구를 증식 시키며, Th1 세포 및 macrophage로부터 cytokine을 유도하여 AK 세포를 생성함으로써, 암 세포 독성을 유발하는 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- 이윤실 : 인삼으로부터 항암작용이 있는 면역조절 물질의 분리 및 작용기전에 관한 연구, 이화여자대학교 박사학위논문 (1993).
- Wimer B. M : The ideal biological response modifier. *Mol. Biother.*, **1**, 311-317 (1989).
- Beth A. Pulaski, Alexander J. McAdam, Elizabeth K. Hutter, Stephen Bigger, Edith M. Lord and John G. Frelinger : Interleukin 3 Enhances Development of Tumor-reactive Cytotoxic Cells by a CD4-dependent Mechanism. *Cancer Research*, **53**, 2112-2117 (1993).
- Geimm E. A, A. Mazumder, II. Z. Zhang : Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukine 2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **155**, 1823 (1982).
- Chu D. T, Josc L. Z, Wong W. L, Pushin R. L, Mavligit G. M : Fractionated extract of *Astragalus membranaceus*, A chinese medicinal herb, potentiates LAK cell cytotoxicity generated at a low dose of recombinant interleukine-2. *J. Clin. Lab. Immunol.*, **26**, 183-187 (1988).
- Esumi H, Hunt B, Itaya T and Frost P : Reduced tumorigenicity of murine tumor cells secreting γ -interferone is due to nonspecific host responses and is unrelated to class I major histocompatibility complex expression. *Cancer Res.*, **51**, 1185-1189 (1991).
- Ljunggren H. G and Karre K. : In search of the "missing self" MHC molecules and NK cells recognition. *Immunol. Today*, **11**, 237-240 (1990).
- Urban J. L. Shepard H. M, Rothstein J. L, Sugarman B. J and Schreiber H : Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 5233-5247 (1986).
- Miller R. A, Maloney D. G, Warnke R and Levy R : Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N. Engl. J. Med.*, **306**, 517-522 (1982).
- Talmadge J. E, Fidler I. J, Oldham R. K : The NCI preclinical screen of biological response modifiers. *Behring Inst. Mitt.*, **74**, 189-194 (1984).
- Lee Yun-Sil, In-Sung Jung, Ihn-Rhan Lee, Ki-Wan Kim, Weon-Sun Hong and Yeon-Sook Yun. : Activation of Multiple Effector Pathway of Immune System by the Antineoplastic Immunostimulator Acidic Polysaccharide Ginsan Isolated from Panax Ginseng. *Anticancer Research*, **17**, 323-332 (1997).
- Sheng-Yuan Wang, Ming-Ling Hsu, Chi-Kuan Ho : The Anti-tumor effect of Ganoderma lucidum is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int. J. Cancer*, **70**, 699-705 (1997)
- Thomas F, Gajewski F and Frank W Fitch : Antiproliferative effect of IFN γ in immune rerulation. I. Ifng inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte. *J. Immunol.*, **140**(2), 4245-4252 (1988).