

홍삼 산성 다당체의 마크로파지 및 자연살해세포의 활성화에 의한 항암작용

김영숙 · 박경미 · 신한재 · 송경식* · 남기열 · 박종대#

한국인삼연초연구원, *경북대학교 농과대학

(Received January 8, 2001; Revised February 14, 2002)

Anticancer Activities of Red Ginseng Acidic Polysaccharide by Activation of Macrophages and Natural Killer Cells

Young-Sook Kim, Kyeong-Mee Park, Han-Jae, Shin, Kyung-Sik Song*,
Ki-Yeol Nam and Jong-Dae Park#

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

*College of Agriculture, Kyungbook National University, Taegu 720-701, Korea

Abstract — The composition of monosaccharides of acidic polysaccharide isolated from ethanol-insoluble and water-soluble fractions of red ginseng roots was analysed and its immunological activities were investigated. Red ginseng acidic polysaccharide (RGAP) was composed of glucose (26.1 mole %), arabinose (1.6 mole %), glucuronic acid (51.8 mol %) and galacturonic acid (5.1 mole %) as determined by gas liquid chromatography. Addition of RGAP increased production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor (TNF)- α in the rodent macrophage cultures. Peritoneal macrophages from RGAP-treated mice exhibited potent tumoricidal activities toward P815 and WEHI 164 tumor cells. It was also observed that concentrations of NO and TNF- α were high in the culture medium of macrophages from the mice administered with RGAP. Moreover, treatment of RGAP *in vivo* stimulated tumoricidal activities of natural killer (NK) cells. Treatment with RGAP increased life span of sarcoma 180-bearing mice and decreased tumor weights of B16-tumor-bearing mice. These results suggest that activation of macrophages and NK cells serve to enhance *in vivo* anticancer activities of RGAP.

Keywords □ *Panax ginseng*, red ginseng acidic polysaccharide, macrophage, natural killer cell, anticancer activities.

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)으로부터 분리된 다당성분은 항암작용을 비롯한 다양한 면역 조절작용을 함이 보고되고 있다.^{1,4} 일반적으로 산성다당체는 galacturonic acid, glucuronic acid 및 mannuronic acid가 결합된 분자량이 15,000 이상의 다당체이며 중성다당체에 비해 면역체계에 미치는 영향이 크다.⁵ 백삼으로부터 분리된 저혈당작용을 갖는 21종의 Panaxan A-U 중 산성 다당체는 8종이고 나머지는 중성 다당체로 알려져 있다.⁶⁻⁹ 인삼 뿌리에서도 세망내피계를 활성화시키고 항보체작용을 갖는 수종의 다당체가 분리되었으며 최근 세망내피계를 활성화하는 4종의 ginsenan이 분리되어 일부 그 구조가 밝혀졌다.¹⁰ 인삼 잎으로부터 분리된 세포벽 성분의 rhamnagalacturonan II을 함유하는 다당체는 macrophage의 Fc receptor 발현을 촉진시켜 면

역복합체(immune complex)의 제거를 증강시킴이 보고되었다.¹¹ 백삼의 물 추출물에서 분리된 ginsan은 Th1 세포와 macrophage 유래의 사이토카인을 유도하여 activated killer cell을 생성시켜 암세포를 사멸시킬 수 있음이 보고되었다.¹² 여러 연구를 통하여 인삼에서 분리된 다당체 성분은 인삼의 약리 효능을 나타낼 수 있는 주요한 성분임이 입증되고 있으나 화학적 조성과 구조 및 작용 기작이 아직 정확히 밝혀지지 않고 있다.

면역계에서 macrophage는 선천적 면역을 담당하는 주요한 세포로서 미생물등을 식작용하고 NO, 반응성 산소종 및 효소를 분비하여 미생물과 암세포를 죽이고 감염의 확산을 조절한다.¹³ 또한 antigen-presenting cell(APC)로 작용하여 T세포에 의한 특이적 면역을 개시하고 조절한다. 활성화된 macrophage에서 생성되는 tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 종양세포의 용혈성 괴사를 일으키고 septic shock와 국소 염증 조직에서 병태생리를 매개하는 사이토카인이다. TNF- α 가 표적세포의 표면에 수용체와 결합하면 수용체의 death domain에 TRADD(TNF-R1

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-866-5534 (팩스) 042-861-1949
(E-mail) jdpark@gtr.kgtri.re.kr

associated protein with death domain), FADD(Fas-associated death domain protein) 또는 RIP(Receptor inhibitory protein)과 같은 death factor가 결합하여 일련의 신호전달을 통해서 표적세포를 사멸시킨다.^{14,15)} 한편 natural killer(NK) cell는 major histocompatibility(MHC) antigen의 제한이나 감각 없이도 암세포나 미생물과 같은 표적세포를 죽일 수 있는 임파구의 한 종류로서 말초혈액 임파구의 약 15%를 차지하며 선천적 면역을 매개하는 세포이다.^{16,17)} 또한 NK 세포는 면역반응 초기에 사이토카인을 제공하며 특이적 면역에 영향을 미친다.¹⁸⁾

홍삼은 수삼을 증숙 후 건조하여 제조한 것으로 이 수치과정에서 수삼 또는 백삼과는 다른 성분이 생성됨이 알려져 있다. 그 예로서 백삼에 존재하는 malonyl-ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd는 malonyl기가 떨어져서 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd가 생성되며 ginsenoside의 C-20위에서 glycosyl 잔기가 이탈되거나, C-20위에서 수산기가 이성화되어 20(S)-ginsenoside Rg3, 20(R)-ginsenoside Rg2, 20(S)-ginsenoside Rh2, 20(R)-ginsenoside Rh1로 전환된다.¹⁹⁾ 그러므로 홍삼의 제조과정에서 화학성분의 변화가 일어나 백삼과는 다른 생리적 활성성분의 함량 차이를 나타내고 있다. 다당체의 경우도 백삼에서 분리된 다당체와 홍삼에서 분리되는 다당체는 화학적 성상이 다를 것으로 예상되나 아직 홍삼으로부터 분리된 다당체의 구조 및 활성에 대한 연구는 거의 없다.

저자들은 홍삼으로부터 분리한 15 kDa 이상의 산성 다당체(Red Ginseng Acidic Polysaccharide, RGAP)를 마우스에 투여시 macrophage를 증가시키며 nitric oxide synthase를 유도시킴을 보고하였다. 또한 RGAP의 면역조절 작용이 macrophage에서 유래되는 NO에 의해 매개되어짐을 제시하였다.²⁰⁾

본 연구에서는 RGAP의 이화학적 특성을 알아보기 위해 당조성을 분석하였고 항암작용을 알아보기 위해 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 macrophage와 NK 세포의 암세포 살해능을 조사하였다. 또한 sarcoma 180 이식 쥐에서 수명연장율 및 B16 melanoma 이식 쥐에 RGAP를 투여시 나타나는 항암효과를 관찰하였다.

실험재료 및 방법

실험동물

BALB/c계 마우스 암·수컷과 C57BL/6계 마우스 수컷 및 ICR계 마우스 수컷을 대한바이오링크(충북, 음성)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 4-5주령의 동물을 입수하여 무작위로 폴리카보네이트 cage에 5마리씩 분리 수용하여 최소한 1주 이상 순화시켰으며, 사료(삼육)와 수돗물을 자유로이 섭취시켰다. 동물실의 환경조건은 실내온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도는 40-60%를 유지하였고, 150-300 Lux의 조도로 12시간씩 명암을 조절하였다.

시약

Earle's balanced salt solution(EBSS), RPMI 1640, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), Minimum essential medium(MEM), $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free PBS, penicillin, streptomycin, newborn calf serum 및 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco사(Grand Island, NY, 미국) 제품을 사용하였다. Cytosine β -D-arabino-furanoside(ara-C), actinomycin D, TNF- α , N^G-monomethyl-L-arginine(NMNA), lipopolysaccharide(LPS)은 Sigma(St. Louis, USA)제품을 사용하였다.

RGAP의 분리

6년근 홍삼(양삼 30지) 600 g을 분말로 하여 5배 량의 85% EtOH를 가하고 95°C 에서 5회 추출하여 사포닌등 비수용성 물질을 제거하고 남은 잔사에 물을 가하고 80°C 에서 4회 추출하여 수용성 추출물을 얻었다. 이 추출물을 흐르는 수돗물에서 7일간 투석하여, 15 kDa 이상의 고분자가 함유된 투석 내액을 8000 rpm에서 원심분리하였다. 얻어진 상등액에 EtOH를 가해 생성된 침전을 동결 건조하여 산성다당체(RGAP)를 제조하였다.

산성다당체 분획의 이화학적 특성조사

산성다당체 분획의 중성당, 산성당 및 단백질의 조성비 - 총당은 Phenol-H₂SO₄법²¹⁾으로 glucose를 표준품으로 하여 정량하였으며, 산성당은 Carbazole-H₂SO₄법²¹⁾으로 glucuronic acid를 표준품으로 하여 정량하였다. 단백질은 Lowry 법으로²²⁾ bovine serum albumin을 표준품으로 정량하고, Libermann-Burchard 반응으로 사포닌 함유여부를 조사하였다.

단당류의 물조성비 조사²³⁾

1) 완전 산가수분해 및 단당류의 환원

시료 10 mg을 튜브에 넣고 2N trifluoroacetic acid를 10 ml 가하고 밀봉하여 121°C 에서 1시간 가수분해하였다. 얻어진 가수분해물을 여과하고 농축하였다. 잔사에 NaBH₄ 10 mg 을 함유한 1.0 M NH₄OH 2 ml를 가하고 반응액을 냉장고에서 12시간 반응시켰다. 반응이 끝난후 sodium borohydride를 제거하여 잔사를 얻었다.

2) Alditol과 Aldonic acid의 분리

1)에서 얻어진 잔사를 물 5 ml에 녹이고 IRA-68 음이온교환수지 10 g을 가해 실온에서 30분간 반응한 후 여과지로 여과하고 수지는 물로 2번 세척하였다. 여액과 세척액을 증발건조시켜 alditol을 분리하였다. alditol에 무수초산과 피리딘을 가해 실온에서 하루 동안 방치하여 아세틸화한 후 이로부터 얻은 아세틸화물은 아래의 GLC조건으로 분석하여 중성당의 mole 조성을 측정했다. Aldonic acid는 수지를 1.0 M HCl 10 ml로 분산시켜 실온에서 1시간동안 저으면서 용리시키고 수지는 여과지로 여과하여 여액을 얻었다.

3) Aldonic acid의 유도체화

2에서 얻어진 여액을 농축하여 KOH pellet의 존재하에 진공 농축기에서 방치하고 남은 염산을 제거하였다. 건조시킨 시료는 10 mM sodium borate 에 용해하고 sodium borohydride 20 mg을 첨가하였다. 반응물을 냉장고에서 12시간 반응시키고 증발 농축하였다. 농축후 잔사를 pyridine과 acetic anhydride로 acetylation 시켜 alditol acetate를 얻었다.

4) GLC 분석조건

다음과 같은 조건에서 단당류의 유도체를 분석하였다.

G.L.C 분석 조건	
GC	Varian 3400GC
Column	fused silica capillary column (Supelco, SP-2330, 0.32 mm × 30 m)
Detection	Flame Ionization Detector(FID)
Detector temp.	260°C
Inject.on temp.	250°C
Column temp.	after 2 min of intial heating at 200°C, increased at a rate 4°C/min to 250°C and maintained 10 min
Carrier gas	Nitrogen at a flow rate of 30 ml/min

세포배양

B16-F10 melanoma는 10% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin 및 4.5 g/L glucose가 함유된 DMEM에서 배양하였고 P815 mastocytoma, WEHI 164 fibrinosarcoma 및 YAC-1 lymphoma는 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 µg/ml streptomycin 및 100 U/ml penicillin이 함유된 RPMI complete 배지에서 배양하였다. WEHI 164 fibrinosarcoma는 10% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamin, 100 µg/ml streptomycin 및 100 U/ml penicillin이 함유된 MEM으로 배양하였다.

복강 macrophage의 분리²⁴⁾

5주령의 BALB/c 마우스에 1 ml의 thioglycollate medium (Difco)을 3일전에 복강주사하거나 RGAP를 1일 1회 연속 7일간 복강주사하였다. BALB/c 마우스의 복강으로부터 10 U/ml heparin을 함유하는 RPMI 1640 complete 배지로 복강삼출세포를 회수하고 hemacytometer로 세포수를 측정하여 총 복강 세포수(PEC)로 하였다. Teflon으로 코팅한 plastic dish에서 2시간 배양하여 부착되지 않는 세포를 제거하고 순수한 macrophage를 얻었다. 분리한 macrophage는 phenol red를 함유하지 않는 RPMI 1640 complete 배지에 현탁시켜 다음 실험에 사용했다.

NO 정량 및 NO 매개성 암세포 살해능²⁵⁾

분리 한 macrophage를 96-well 세포배양 dish에 well 당 2 × 10⁵ 개의 세포로 분주하고 37°C의 CO₂ 배양기에서 2시간 동안

배양한 다음, P815 암세포를 well 당 1 × 10⁵ 개의 세포로 분주하여 100 µl의 RPMI complete 배지로 18시간 배양했다. 배양액중의 NO는 70 µl의 배양 상등액을 동량의 Griess 시약과 섞어 550 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량했다. 이때 표준물질로는 sodium nitrite를 사용했다. NO 매개성 암세포의 살해는 macrophage와 암세포를 함께 배양하고, 배양 종료후 20 µl의 PMS/MTS 용액을 배양액에 첨가하고 37°C의 CO₂ 배양기에서 4시간동안 배양하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 정량했다.

TNF-α 정량 및 TNF-α 매개성 암세포 살해능^{26,27)}

배양상등액 중의 TNF-α는 TNF-α 민감성 WEHI 164 세포의 세포사를 이용하는 bioassay방법을 사용하여 정량하였다. WEHI 164 세포를 96-well 세포배양 dish에 well 당 4 × 10⁴ 개의 세포로 분주하고 37°C의 CO₂ 배양기에서 18시간 배양한 다음, macrophage 배양상등액(thioglycollate medium을 주사한 BALB/c 마우스로부터 macrophage를 분리하여 96-well 세포배양 dish에 well 당 2 × 10⁵ 개의 세포로 분주하고 RGAP를 처리하여 24시간 배양하여 얻은) 50 µl, 2 µg/ml actinomycin D 용액 50 µl 와 MEM complete 배지 50 µl를 첨가하여 18시간 배양하였다. 배양종료후 배지를 제거하고 0.05% crystal violet으로 10분간 염색한 후 100% methanol로 세척하고 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 표준물질로써 사람 재조합 TNF-α를 WEHI 164 세포에 첨가하여 18시간 배양하고 crystal violet으로 염색한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다. 처리군의 TNF-α량은 검량곡선에서 구하였고 단위는 pg/10⁶ 세포로 표시하였다. TNF-α 매개성 암세포 살해능은 RGAP를 투여한 BALB/c 마우스로부터 분리한 macrophage를 WEHI 164 세포와 6시간 배양하여 측정했다. 먼저 WEHI 164 암세포를 10⁷ 세포당 100 µCi의 Na₂⁵¹CrO₄를 첨가하여 1시간 배양하여 방사능을 표시시킨 다음 96-well 세포배양 dish에 well 당 1 × 10⁵ 개의 세포로 분주하고 1 µg/ml actinomycin D의 존재하에서 3시간 배양했다. 암세포 : macrophage의 비율이 1 : 1, 1 : 5, 1 : 10되게 macrophage를 첨가하여 1 µg/ml actinomycin D의 존재하에서 총 200 µl의 용적으로 6시간 배양시켰다. 배양종료후 상등액 100 µl를 취해 scintillation vial에 담고 γ-counter로 유출 방사능을 측정하고 활성은 다음의 식을 이용하여 계산했다. % specific lysis = (experimental release cpm-spontaneous release cpm)/(maximum release cpm-spontaneous release cpm) × 100

Natural Killer Cell 활성

Effector cells로서 C57BL/6 마우스 비장세포를 사용하고 target cell로서는 100 µCi의 Na₂⁵¹CrO₄로 1시간 표지한 YAC-1 세포(1 × 10⁴)를 사용하였다. Effector : target 세포의 비율이

100 : 1, 50 : 1, 25 : 1이 되도록 96-well plate에 분주하여 4시간 동안 37°C의 CO₂ incubator에서 반응시켰다. Spontaneous release의 측정은 target cell에 배지만 가한 경우이고, maximum release는 10% NP-40 100 μl를 가한 경우의 cpm이다. 배양종료 후 1000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 100 μl 취하여 γ-counter로 방사능 측정하였고, 활성은 다음과 같은 식으로 계산하였다. % specific lysis=(experimental release cpm-spontaneous release cpm)/(maximum release cpm-spontaneous release cpm)×100

항암활성(수명연장 및 항 종양효과)

Sarcoma 180세포는 ICR 마우스의 복강에서 계대배양하여 유지하였으며 1×10⁶개의 세포를 복강에 이식하고 24시간 후부터 RGAP를 1일 1회 7일간 복강 투여한 후 30일간 수명을 관찰하였다. B16 melanoma는 1×10⁵개의 세포를 C57BL/6 마우스의 등에 피하이식 24시간 후에 RGAP를 1일 1회 7일간 복강 투여하여 생성된 종양의 무게를 측정하였다.

통계분석

실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며 처리에 의한 결과의 유의성 검정은 student's *t*-test로 분석하였다.

실험결과

RGAP의 이화학적 특성

RGAP는 중성당이 28.3%, 산성당이 56.9%, 단백질이 0.1%이하로 함유된 다당분획으로 GLC로 분석한 결과, 중성당은 glucose 92.4%, arabinose 5.53%, rhamnose 1.03%, galactose 1.02%이었다. 산성당의 GLC 분석결과는 glucuronic acid 90.8%,

Table I - Analysis of neutral and acidic sugars of RGAP

Sugar	%	Molar Composition(%)
Neutral sugars	28.3 ^{a)}	
glucose	92.4	26.1
arabinose	5.53	1.6
rhamnose	1.03	-
galactose	1.02	-
Acidic sugars	56.9 ^{b)}	
glucuronic acid	90.8	51.8
galacturonic acid	9.2	5.1
Protein	0.1 ^{c)}	

^{a)}determined by phenol-sulfuric acid assay, ^{b)}determined by carbazol assay, ^{c)}determined by Lowry method. Analytical method and condition for GLC were described in Materials and Methods.

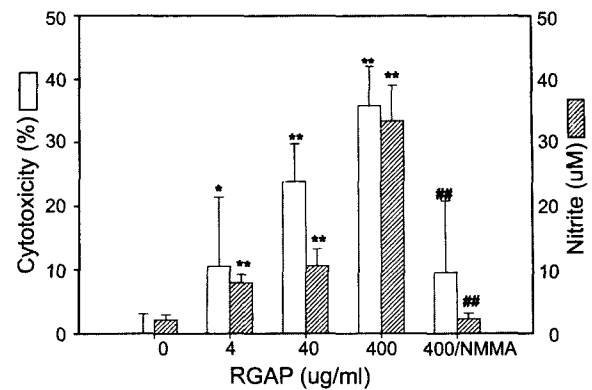


Fig. 1 - Effect of RGAP on killing of P815 cells *in vitro*. Coculture of P815 cells (1 × 10⁵ cells/well) with peritoneal macrophages (2 × 10⁵ cells/well) was performed as described in the materials and methods. RGAP (4~400 μg/ml) with or without NMMA (1 mM) was added at the start of coculture. The proliferation was determined at 18 h absorbances at 490 nm and expressed as cytotoxicity. Nitrite was also determined in the culture supernatant of the respective groups. * and ** indicate the significant differences at *p*<0.05 and *p*<0.01 from zero. ### indicates the value significantly different at *p*<0.01 from RGAP 400 μg/ml.

galacturonic acid 9.2%이었다. RGAP 구성당의 mol%를 종합하면 Table I과 같다.

NO 생성과 암세포 살해에 미치는 영향

NO는 미생물 또는 암세포를 직접적으로 사멸시킬 수 있기 때문에 RGAP에 의한 macrophage의 NO의 생성이 암세포를 사멸시키는가를 *in vitro*와 *in vivo*에서 조사하였다. 복강 macrophage에 RGAP를 첨가하고 P815 비만세포종과 함께 배양했을 때 NO는 RGAP를 0, 4, 40, 400 μg/ml의 농도로 첨가 시 각각 2.2, 7.9, 10.6, 33.4 μM로 증가되었으며, P815 세포의 사멸은 각각 0, 10.5, 23.9, 35.8%로 증가되었다. 또한, RGAP 400 μg/ml과 NO 합성 억제제인 NMMA 1 mM를 동시 처리 시 NO 생성은 2.3 μM로 감소되었으며 P815 세포의 사멸도 현저하게 억제되어(Fig. 1), RGAP에 의한 암세포의 사멸이 NO를 매개로 일어남을 확인하였다. RGAP를 BALB/c 마우스에 복강 투여 후 분리한 복강 macrophage를 P815 암세포와 함께 배양 시 배지내의 NO 농도는 대조군에서 4.6 μM이었으나, RGAP 100, 300 mg/kg투여로 각각 10.3 μM, 26.8 μM로 증가되었고 P815 세포의 사멸도 각 농도에서 15.3%, 25.9%로 유의성 있게 증가하였다(Fig. 2).

TNF-α 생성과 암세포 살해에 미치는 영향

TNF-α의 정량은 복강 macrophage의 배양액에 RGAP를 0, 4, 40, 400 μg/ml의 농도로 처리하고 24시간 배양한 후 배양 상등액을 WEHI 164 세포에 가하여 WEHI 164 세포의 사멸을 정량

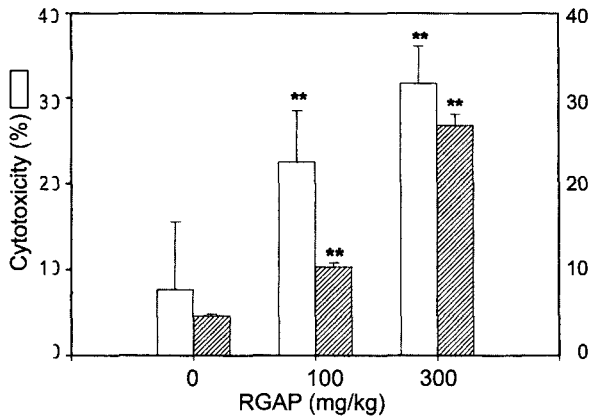


Fig. 2 – Effect of RGAP on killing of P815 cells *in vivo*. Coculture of P815 cells (1×10^5 cells/well) with the RGAP (100 or 300 mg/kg)-administered peritoneal macrophages (2×10^5 cells/well) was performed as described in materials and methods. The proliferation was determined at 18 h absorbances at 490 nm and expressed as cytotoxicity. Nitrite was also determined in the culture supernatant of the respective groups. **indicates the value significantly different at $p < 0.01$ from zero.

Table II – TNF- α levels in the medium of peritoneal macrophages treated with RGAP

Treatment	$\mu\text{g/ml}$	$\text{pg}/10^6$ cells
Control	-	42 ± 28
RGAP	4	347 ± 82
	40	$1,072 \pm 94$
	400	$32,626 \pm 47$
LPS	1	$15,670 \pm 47$

Peritoneal macrophages from BALB/c mice were incubated for 24 h with various concentration of RGAP. TNF- α levels were determined with bioassay using TNF α -sensitive WEHI 164 cells.

Table III – WEHI 164 tumor cell killing of macrophages treated with RGAP

Treatment	Dose (mg/kg)	Tumor Killing (%)
Control	-	9.16 ± 3.3
RGAP	100	19.18 ± 2.9
	300	64.1 ± 4.3

Peritoneal macrophages were isolated from BALB/c mice administered with RGAP for consecutive 7 days. TNF α -sensitive WEHI 164 cells were labeled with ^{51}Cr and cocultured for 6 h under the presence of $1 \mu\text{g/ml}$ actinomycin D. Tumor killing represents specific activities.

하는 bioassay 방법을 사용했다. 양성대조물질로 사용한 LPS는 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리시 TNF- α 생성이 $15,670 \pm 47 \text{ pg}/10^6$ cells 이었으며 RGAP는 농도 의존적으로 TNF- α 의 생성을 현저하게 증가시켰다(Table II). 또한 RGAP를 BALB/c 마우스에 복강투여 하고 복강 macrophage를 분리하여 WEHI 164세포의 사멸을 측정 한 결과, WEHI 164세포의 사멸이 RGAP의 투여 용량 의존적으로 현저히 증가되었다(Table III).

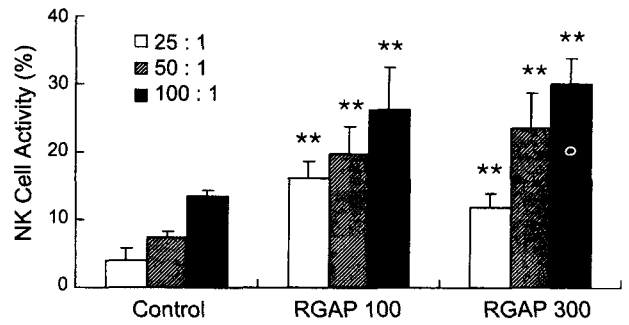


Fig. 3 – Effects of RGAP on natural killer cell activity. C57BL/6 mice were administered intraperitoneally with RGAP 100 or 300 mg/kg for consecutive 7 days. Natural killer cell activities were determined at various ratio of effector cells to target cells (25 : 1, 50 : 1, 100 : 1). ** indicates the value significantly different at $p < 0.01$ from each ratio of control.

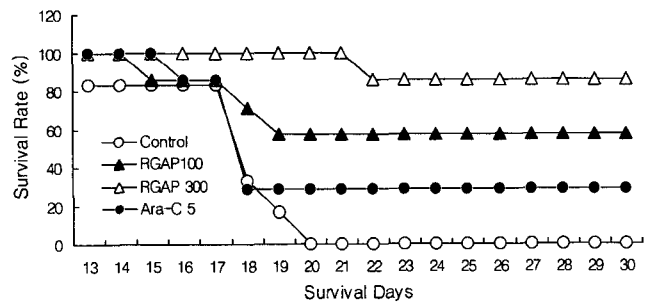


Fig. 4 – Antitumor activity of RGAP in sarcoma 180 tumor-bearing ICR mice. The mice were administered intraperitoneally with RGAP 100 mg/kg, 300 mg/kg or Ara-C 5 mg/kg for consecutive 7 days after the intraperitoneal inoculation of 1×10^6 sarcoma 180 cells. Life span was observed for the next 30 days.

NK 세포활성에 미치는 효과

NK 세포활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 RGAP를 100, 300 mg/kg 용량으로 7일간 C57BL/6 마우스에 복강투여 한 후 비장세포를 effector 세포로 하고 YAC-1 lymphoma 세포를 표적세포로 사용하여 NK 세포의 활성을 측정하였다. RGAP 투여는 effector 세포와 표적세포의 각 비율(25 : 1, 50 : 1, 100 : 1)에서 NK 세포의 활성을 유의적으로 증가시켰다(Fig. 3).

RGAP의 항암효과

RGAP의 항암작용을 알아보기 위해 sarcoma 180 세포를 ICR 마우스에 복강으로 이식한 후 30일간의 생존율을 관찰한 결과, 대조군은 20일 이후에는 생존한 마우스가 없었으나 RGAP 100, 300 mg/kg 투여군에서는 생존율이 각각 57.1%, 85.7% 였으며 ara-C 5 mg/kg 투여군에서는 28.6%였다(Fig. 4). B16 melanoma 세포를 C57BL/6 마우스에 피하 주사하여 고형암의 생성 정도를 조사해 본 결과, RGAP 100 또는 300 mg/kg 투여군에서는 고

Table IV – Antitumor activity of RGAP in B16 melanoma-bearing C57BL/6 mice

Group	Dose (mg/kg)	Tumor Weight (g)	Median	Significance (p)
Control	-	2.82 ± 0.50	3.01	-
RGAP	100	1.75 ± 0.61	1.78	<0.05
	300	1.32 ± 0.98	0.89	<0.05
Ara-C	10	0.95 ± 1.28	0.22	<0.05

C57BL/6 mouse was transplanted subcutaneously with B16 melanoma cells (1×10^5) and administered intraperitoneally with RGAP from the following day to seven days. The tumor weights were determined at the 19th day after tumor inoculation.

항암의 생성이 39%, 53% 억제되었으며 ara-C 10 mg/kg 투여군에서는 67% 억제되었다(Table IV).

고 찰

홍삼에서 분리된 산성 다당체(RGAP)는 glucose 92.4%, arabinose 5.53%, rhamnose 1.03%, galactose 1.02%로 구성된 중성당과 glucuronic acid 90.8%, galacturonic acid 9.2%로 구성된 산성당으로 이루어져 있었으며 mole % 조성비는 glucuronic acid 51.8%, galacturonic acid 5.1%, glucose 26.1%, arabinose 1.6 1% 이었다. 또한 백삼으로부터 면역 증강작용을 갖는 ginsan은 산성당이 43.1% 함유에 비하여 RGAP는 산성당이 56.9%를 함유하고 ginsan의 중성당 조성은 glucose와 galactose였으나,^{3,12)} RGAP는 glucose, arabinose, rhamnose, galactose를 함유하여 ginsan과는 화학적 조성과 구조가 다른 새로운 산성 다당체임을 제시하였다. 본연구 결과, RGAP를 마우스에 투여시 macrophage를 활성화시켜 NO와 TNF- α 의 생성이 증가되고 NK 세포의 활성화가 일어나 암세포를 사멸시킴으로써 항암작용을 나타낼 수 있음을 나타내었다.

NO는 반감기가 매우 짧은 가스로 여러 종류의 세포에서 nitric oxide synthase(NOS)에 의해서 L-arginine으로부터 생성된다. Macrophage에서 분비되는 NO는 inducible NOS에 의해 다량히 합성되며²⁸⁾ 박테리아와 암세포를 파괴시키고 mitogen의 세포증식과 T 세포의 활성을 조절함이 알려져 있다.²⁹⁾ 저자들은 RGAP가 *in vitro*와 *in vivo*에서 NO 생성을 촉진시킴을 밝혔으며, RGAP를 투여한 마우스에서 concanavalin A 유도에 의한 비장 세포의 증식과 면역적혈구에 대한 항체생성 반응이 NO를 매개로 하여 조절되어짐을 보고한 바 있다.²⁰⁾

본 연구에서는 RGAP의 항암활성을 B16 melanoma와 sarcoma 180 세포를 이식한 마우스에서 조사한 결과, 현저하게 종양생성이 억제되고 수명이 연장되어 RGAP가 홍삼을 이용한 새로운 의약품 소재로서의 개발 가능성을 시사하였다. 이러한 RGAP의 항암효과는 macrophage 및 NK 세포의 활성화에 의해 기인됨을 나타내었다. RGAP는 일차적으로 선천적 면역계의 주

요한 세포인 macrophage와 NK 세포에 작용하여 이들 세포로부터 사이토카인을 생성하거나 기능을 활성화시키는 기작을 통해서 항암작용을 나타내고, NK 세포의 활성이 NO에 의해 촉진된다는 보고들은^{30,31)} RGAP에 의한 NO의 생성이 NK 세포의 활성화를 촉진할 가능성을 시사한다.

인삼에서 분리된 다당 성분들의 면역계에 미치는 연구들은 인삼의 면역기능에 대한 약리적 효능이 다당에 기인될 수 있으며 암치료에서 사용되는 화학요법제, 방사선 치료, 수술요법등의 부작용을 감소시키고 치료효과를 높이기 위해 숙주의 면역을 증강시킬 수 있는 치료방법에 기여할 수 있는 유용한 자원임을 제시하고 있다. 버섯류에서 분리된 다당체 성분의 lentinan, polysaccharide K등은 암치료의 보조제로서 활용이 되고 있으며 홍삼으로부터 분리된 산성다당체도 선천적 면역계의 가장 주요한 macrophage와 NK 세포를 활성화시켜서 면역 증강과 항암 효과를 갖는 의약품으로서의 개발가능성을 보이고 있다. 이와 같은 개발을 위하여 RGAP의 지표물질로서 보다 정제된 분획을 분리하여 구조를 연구중에 있으며 아울러 면역 증강과 항암 작용에 관련된 기작을 연구하고자 한다.

문 헌

- 1) Kim, Y. S., Kang, K. S. and Kim, S. I. : Study on antitumor and immunomodulating activities of polysaccharide fractions from *Panax ginseng*: comparison of effects of neutral and acidic polysaccharide fraction. *Arch. Pharm. Res.* **13**, 330 (1990).
- 2) Kim, Y. S., Kang, K. S. and Kim, S. I. : Effects of ginseng components on immunotoxicity of cyclophosphamide. *Korean J. Ginseng Sci.* **15**, 13 (1991).
- 3) Lee, Y. S., Chung, I. S., Lee, I. R., Kim, K. H., Hong, W. S. and Yun, Y. S. : Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginsan isolated from *Panax ginseng*. *Anticancer Res.* **17**, 323 (1997).
- 4) Park, K. M., Jeong, T. C., Kim, Y. S., Shin, H. J., Nam, K. Y. and Park, J. D. : Immunomodulatory effect of acidic polysaccharide fraction from Korean red ginseng (*Panax ginseng*). *Natural product sciences* **6**, 31 (2000).
- 5) Srivastava, R. and Kulshreshtha, D. K. : Bioactive polysaccharides from plants. *Phytochem.* **28**, 2877 (1989).
- 6) Konno, C., Sugiyama, K., Kano, M., Takahashi, M. and Hikino, H. : Isolation and hypoglycemic activity of panaxans A, B, C, D and E, glycans of *Panax ginseng* roots. *Planta Medica* **50**, 443 (1984).
- 7) Hikino, H., Oshima, Y., Suzuki, Y. and Konno, C. : Isolation and hypoglycemic activity of panaxans F, G, H, I, J, K. and L, glycans *Panax ginseng* roots. *Shoyakigaku Zasshi* **39**, 331 (1985).

- 8) Fonno, C. and Hikino, H. : Isolation and hypoglycemic activity of panaxans M, N, O, and P, glycans of *Panax ginseng* roots. *Int. J. Crude Drug. Res.* **25**, 53 (1987).
- 9) Fanno, C., Murakami, M., Oshima, Y. and Hikino, H. : Isolation and hypoglycemic activity of panaxans Q, R, S, T and U, glycans of *Panax ginseng* roots. *J. Ethnopharmacol.* **14**, 69 (1985).
- 10) Sonoda, Y., Kasahara, T., Mukaida, N., Shimizu, N., Tomoda, M. and Takeda, T. : Stimulation of interleukin-8 production by acidic polysaccharides from the root of *Panax ginseng*. *Immunopharmacol.* **38**, 287 (1998).
- 11) Sair, K. S., Kiyohara, H., Matsumoto, T. and Yamada H. : Fhamnogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide. *Carbohydrate Res.* **300**, 239 (1997).
- 12) Kim, K. H., Lee, Y. S., Jung, I. S., Park, S. Y., Chung, H. Y., Lee, I. R. and Yun, Y. S. : Acidic polysaccharide from *Panax ginseng*, ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK Cells in synergy with rIL-2. *Planta Medica* **64**, 110 (1998).
- 13) Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. : Cellular and molecular immunology 3rd ed., W. B. Saunders Co., p.26 (1997).
- 14) Fraser, A. and Evan, G. : A License to kill. *Cell* **85**, 781 (1996).
- 15) Nagata, S. : Apoptosis by Death Factor. *Cell* **88**, 355 (1997).
- 16) Cerwenka, A. and Lanier, L. L. : Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Rev. Immunol.* **1**, 41 (2001).
- 17) Cooper, M. A., Fehniger T. A. and Caligiuri M. A. : The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology.* **22**, 633 (2001).
- 18) Cifone, M. G., Ulisse, S. and Santoni, A. : Natural killer cells and nitric oxide. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1513 (2001).
- 19) Park, J. D. : Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Korean J. Ginseng Sci.* **20**, 389 (1996).
- 20) Park, K. M., Kim, Y. S., Jeong, T. C., Joe, C. O., Shin, H. J., Lee, Y. H., Nam, K. Y. and Park, J. D. : Nitric oxide is involved in the immunomodulating activities of acidic polysaccharide from *Panax ginseng*. *Planta Medica.* **67**, 122 (2001).
- 21) Chaplin, M. J. and Kennedy, J. F. : Carbohydrate Analysis. Oxford: IRL Press, p.2 (1994).
- 22) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 23) Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P. D. and Karr, A. : A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Res.* **5**, 340 (1967).
- 24) Klimetzek, V. and Remold, H. G. : The murine bone marrow macrophage, a sensitive indicator cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. *Cell. Immunol.* **53**, 257 (1980).
- 25) Green, L. C., Wanger, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. : Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131 (1982).
- 26) Garredts, I. M., Zijlstra, F. J., Tak, C. J., Bonta, I. L., Beckmann, I., Ben-Efraim, S. : A comparison between two methods for measuring tumor necrosis factor in biological fluids. *Agents Actions*, **38**, C89 (1993).
- 27) Colotta, F., Peri, G., Villa, A., Mantovani, A. : Rapid killing of actinomycin D-treated tumor cells by human mononuclear cells. I. Effectors belong to the monocyte-macrophage lineage. *J. Immunol.* **132**, 936 (1984).
- 28) Nathan, C. and Xie, Q. W. : Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915 (1994).
- 29) Farias-Eisner, R., Sherman, M. P., Aeberhard, E. and Chaudhuri G. : Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 9407 (1994).
- 30) Park, K. G., Hayes, P. D., Garlick, P. J., Sewell, H. and Eremin, O. : Stimulation of lymphocyte natural cytotoxicity by L-arginine. *Lancet* **337**, 645 (1991).
- 31) Cifon, M. G., Festuccia, C., Cironi, L., Cavallo, G., Chessa, M. A. and Pensa, V. : Induction of the nitric oxide-synthesizing pathway in fresh and interleukin 2-cultured rat natural killer cells. *Cell. Immunol.* **157**, 181 (1994).