

인삼 사포닌과 다당류 혼합물의 활성화된 RAW264.7 세포주에 대한 염증조절 효과

이 도 익[#]

중앙대학교 약학대학 면역학교실

(Received September 16, 2009; Revised February 26, 2010; Accepted February 26, 2010)

The Inflammation-modulatory Effects of Ginseng Saponin and Polysaccharide on Activated RAW264.7 Cell-line

Lee Do Ik[#]

Department of Immunology, College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 000-000, Korea

Abstract — It is well known that the numbers and functions of immune-associated cells are increased by saponins and polysaccharides in ginseng. In this study, the mixture of polysaccharide and saponin (MPS) from *Panax ginseng* is applied to LPS- activated RAW 264.7 cells. The production of NO and the gene expression of IL-6 and TNF- α are decreased in LPS-activated RAW 264.7 cells and the expression of arginase II and PD-1L genes is decreased in LPS-untreated macrophages. Therefore, the mixture of saponin and polysaccharide from *Panax ginseng* could be used in order to regulate immune responses.

Keywords □ saponin, Polysaccharide, mixture, inflammation, immunosuppression

인삼은 세계적으로 널리 이용되는 천연 약으로 많은 효과가 있다고 알려져 왔다. 그 중 가장 큰 비중을 차지하는 성분은 사포닌과 다당체(진산)로 이들에 대한 연구는 현재 꾸준히 진행되고 있다. 인삼에서 정제된 다당체(polysaccharides)는 생쥐를 이용한 생체 내 실험 결과 인삼 다당체 투여 생쥐군에서 정상생쥐군에 비해 골수 및 비장세포가 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 인삼 다당체는 TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ 및 GM-CSF와 같은 다양한 cytokines의 생산과 림프계세포가 증식하도록 자극하는 강력한 면역조절 기능도 가지고 있었다.¹⁾ 그러나 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.²⁾ 또한, 인삼 다당체에 의해 증가된 임파구의 subset을 flow

cytometry로 분석한 결과, 배양 3일째에 IgM+ 세포의 수가 증가하고, NK활성은 2.4배, T세포에 대한 반응은 2.1배가 증가됐고 방사선 방어효과도 7.46 Gy에서 10.96 Gy로 크게 늘어나는 효과가 있었다.¹⁾ 인삼 다당체는 암세포의 전이를 44% 억제하였고 골수모세포의 경우 4.7배, 백혈구 수치는 2배 증가하는 등의 효능을 보였으며 암세포살해 면역세포 생성작용 3.5배, 방사선 민감 작용에서 일반대조군에 비해 45%의 방사선 감소 수치를 나타냈다. 배양 5일째에 Thy 1.2⁺ 세포와 CD4⁺ 세포, CD8⁺ 세포의 수가 증가하였다. 하지만, 감마 방사선에 의해 오히려 면역반응 억제가 상쇄될 수 있다는 연구 또한 있다.³⁾ 사포닌(ginsenoside)은 인삼에서 가장 많이 들어있는 구성물로 4개의 steroid 유사체(4개의 고리 구조)로 되어있고 이는 타 식물에서 발견되는 사포닌과 다른 구조를 지니고 있다. 화학구조의 특성에 따라 protopanaxadiol(PD)계, protopanaxatrol(PT)계, oleanane계 사포닌으로 구분되며⁴⁾ 항산화 효과, 암세포 억제효과, 항염 작용이 뛰어나다고 알려져 있다.⁵⁾ 염화탄소로 간 손상을 일으킨 모델 동물에서 인삼의 간 보호효과는 우수한 것으로 밝혀졌고, 인삼의 대표적인 성분인 ginsenoside Rb1, Rb2, Re, Rg1에 대해 간 보호효과를 실험한 결과 역시 모두 간 보호효과가 있었다.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5608 (팩스) 02-820-5608
(E-mail) leedi@cau.ac.kr

또한, Macrophage 세포의 cyclooxygenase(COX)-2의 발현을 억제하고 prostaglandin E2의 생합성을 억제하는 효과와 함께 유도형 NO 합성효소(iNOS)의 활성을 억제하여 NO의 생합성을 억제하는 효과가 있었다. 이러한 효과는 인삼 사포닌들이 이 효소들을 직접 저해하기 보다는 NF- κ B 등의 전사인자를 조절하는 양식으로 prostaglandin E2와 NO의 생합성을 억제하였다.

한편 활성화된 macrophage는 외부 항원에 대한 방어에 중요한 역할을 하며 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등의 cytokine을 생성하여 비정상 세포를 파괴한다. 특히 IL-6는 활성화된 macrophage가 항암효과를 나타내는데 중요한 인자로 알려져 있다.⁶⁻⁸⁾ NO 또한 활성화된 macrophage에 의해 생성되어, 바이러스 제거 등 면역 반응에 중요한 역할을 하지만 염증반응이나 조직 손상등을 일으킬 수 있다. 본 실험에서는 다당체와 사포닌의 혼합물(mixture of Polysaccharides and saponin, MPS)을 비활성 및 활성화된 RAW264.7에 처리하여 면역 증강 및 활성 억제 효과를 pro-inflammatory cytokine과 NO 생성 변화 및 arinase, PD-L1 발현 변화를 통해 확인하였고 polysaccharides(PS)와 비교 평가하였다.

실험방법

Mixture of Saponin and Polysaccharide(MPS)와 Polysaccharide(PS) 제조

인삼 분말 100 g에 1%(W/W) 염기성 용액 1500 ml를 가하고 잘 혼든 뒤 80°C에서 12시간 동안 추출하고 여과하여 여액을 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 다음, 상등액 200 ml를 취하여 시료를 만들고 순수 알콜 1000 ml를 가하여 혼합한다. 생성된 침전물은 필터처리한 후 Ultra filtration을 이용하여 염과 저분자 물질은 제거하고 다당체를 얻었으며 상등액은 농축한 후 HP20 컬럼에 통과시켜 사포닌을 흡착한 후 알콜로 탈착시켜 사포닌을 얻어 두 액을 동결 건조하여 인삼추출분말 12.5 g(다당체 10 g, 사포닌 2.5 g)을 만들었다. 인삼추출물은 솔밭 P&F에서 제공하였다.

세포배양

RAW264.7은 macrophage like cell line으로 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였다, 실험시에는 동결되었던 세포를 해동하여 10% FBS(Cellgro, U.S.A) DMEM 배지에서 5일 동안 배양하여 5 \times 10⁵개의 세포를 well에 부착시켜 안정화시킨 후에 사용하였다. 10% FBS DMEM 배지에는 100 U/ml의 penicillin, streptomycin(Cellgro, U.S.A), 2 mM L-glutamine이 첨가되었으며, 세포는 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양되었다. FBS는 55°C에서 30분간 비활성 시킴으로써 세포 활성화에 영향을 주지 않게 하였다. RAW264.7 활성화 시키기 위해 LPS

(lipololysaccharide, sigma, U.S.A) 을 사용하였으며 LPS 원액은 마이크로필터(0.2 μ m)를 통과한 배지에 녹여 준비했다. 농도가 1 mg/ml로 원액을 준비하여 사용을 위해 4°C에서 보관하거나 세포 배양 실험을 위해 배지에 직접 희석했다.

MTT assay

RAW264.7 세포는 24 well plate에 5 \times 10⁵ cells/well의 분포가 되도록 하였으며 각각의 농도별로 MPS, PS 또는 LPS를 처리하였다. 24시간 배양 후 10 μ l의 MTT 용액을(5 mg/ml, Sigma-Aldrich) 각각의 well에 첨가하였고, 4시간 동안 배양되었다. 배양 후 100 μ l의 solubilization solution(0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가하여 생성된 결정을 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 대조군에 대한 백분율로 표현하여 독성 평가에 이용되었다.

NO측정

NO는 Griess reagent(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in distilled water, sigma)을 이용하여 측정하였다. 즉 NO 측정을 위해 각 군의 상등액 100 μ l을 취하여 96 well plate로 옮긴 후 Griess reagent 100 μ l을 첨가하고 차광하여 10분 동안 실온에서 반응시켰다. 이후 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 표준검량곡선을 통해 농도를 계산하였다.

RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

각 군의 5 \times 10⁵ 세포로부터 Trizol Reagent(Invitrogen, U.S.A.)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. Trizol reagent 1 ml를 첨가하여 세포를 용해 시키고 실온에서 5분 동안 방치 후 chloroform 200 μ l를 첨가하여 13500 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 투명한 상층액을 취하여 새로운 tube로 옮기고 동량의 isopropyl alcohol을 첨가한 후 13500 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 RNA를 침강 시켰다. RNA 침전을 75% EtOH in DEPC 1 ml로 세척한 후 공기 중에서 건조시켰다. RT-PCR 반응용량은 20 μ l가 되도록 하였고 ethidium bromide로 염색된 1.0% agarose gel에서 전기영동 하였다.

ELISA(Enzyme-linked immunosorbant assay)

AW264.7 세포는 24 well plate에 5 \times 10⁵ cells/well의 분포가 되도록 하고, 각 농도별로 MPS, PS 또는 LPS를 처리하였다. 각 군에서 cytokine의 생성량을 측정하기 위하여 세포 배양 24시간 후 상층액을 취하였고, 다음의 ELISA 방법을 사용하였다. Microplate를 IL-1 β (eBioscience, San Diego, CA, USA), IL-6(BD Biosciences, San Jose, CA, USA), TNF- α (BD Biosciences)

capture antibody로 4°C에서 밤새 코팅한 후 0.05% Tween 20이 포함된 PBS(PBS-T)로 세척하고, 3% bovine serum albumin (BSA)가 포함된 PBS로 blocking 하였다. 1시간 후 세척하고 상층액과 표준액을 well에 넣어 4°C에서 밤새 배양하였고, 세척 후 biotinylated antibody를 넣어 실온에서 45분 동안 반응시켰다. 이어서 세척하고 streptavidin-alkaline phosphatase를 넣은 후 실온에서 30분 동안 배양하였고, 세척 후 각 well에 기질 p-nitrophenyl phosphate(Sigma) 용액을 넣어 발색시켰다. 흡광도는 microplate reader의 405 nm 파장에서 측정했으며, cytokine의 농도는 표준검량곡선으로 계산하였다.

실험결과 및 고찰

RAW264.7 세포에 대한 MPS와 PS의 세포 독성 평가

RAW264.7에 대한 세포 독성은 MTT assay를 통해 측정되었으며, 이는 대조군에 대한 백분율로 값을 평가하였다. MPS와 PS 모두 세포에 대한 독성이 적으며 이는 앞으로 비교실험에 크게 영향을 주지 않을 것으로 보인다(Fig. 1A). LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포 또한 크게 영향을 받지 않지만 LPS의 영향에 의해 활성화 되지 않은 세포보다는 생존성이 떨어지는 것으로 보인다(Fig. 1B). 활성화된 RAW264.7 세포에 비해 비활성화

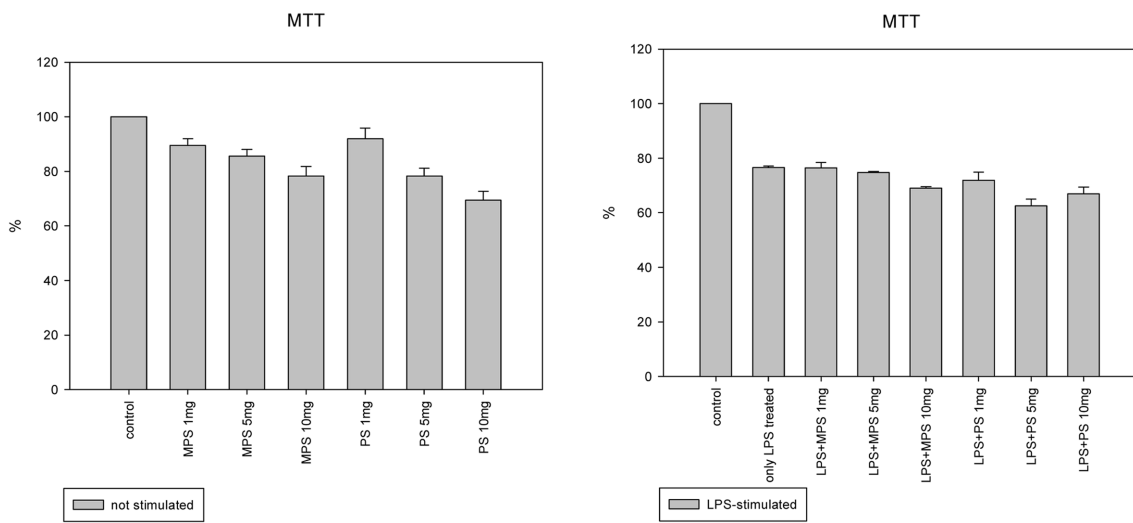


Fig. 1 – Effect of MPS and PS from Ginseng on the viability of RAW274 cells. RAW 274 cells were incubated with or without LPS and MPS or PS. Cytotoxicity of these mixture was determined by MTT assay as described in Materials and Methods.

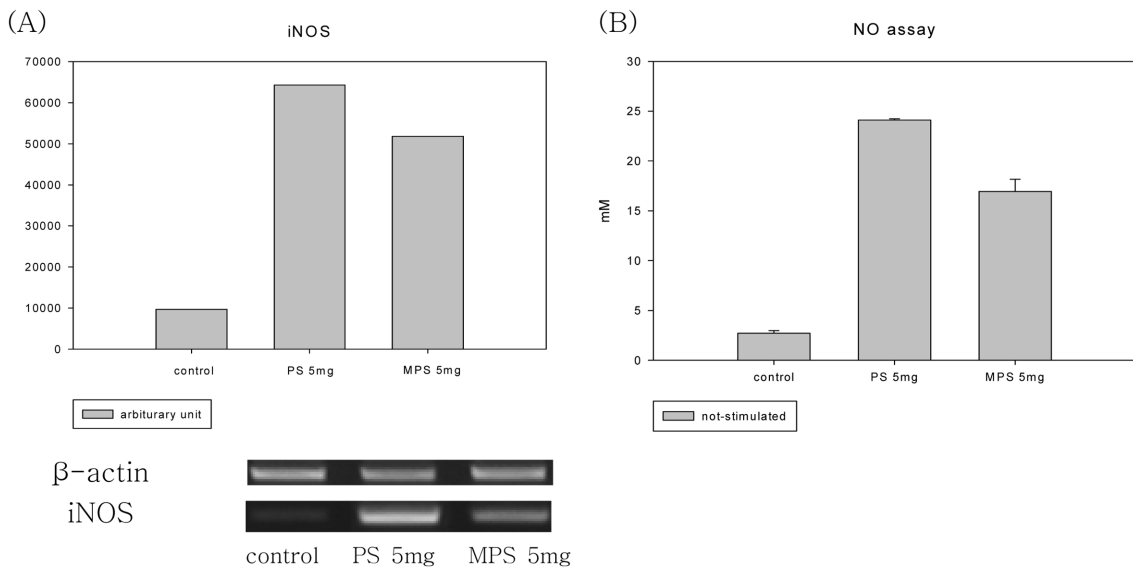


Fig. 2 – Effect of NO production by RAW264.7 in the presence of MPS and PS 5×10^5 RAW264.7 cells were incubated with MPS or PS for 24 hr and then NO assay was performed and expression level of iNOS was measured by RT-PCR. RT-PCR products were electrophoresed in 1% agarose gel and the bands were analyzed by UVIDoc Mw program.

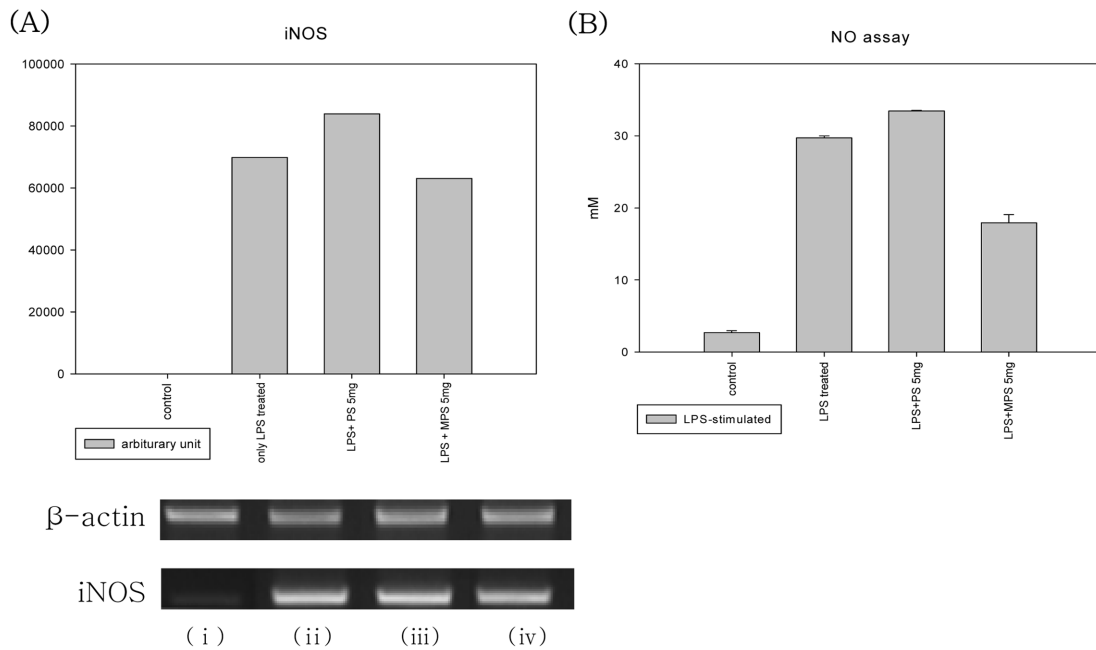


Fig. 3 – Effect of NO production by LPS-activated RAW264.7 in the presence of MPS and PS. 5×10^5 RAW264.7 cells were incubated with MPS or PS for 24 hr after activation of cells with 10 LPS for hr RT-PCR products were electrophorased in 1% agarose gel and the bands were analyzed by UVIDoc Mw program. (i); control, (ii); only LPS treated, (iii); LPS+PS 5 mg, (iv); LPS+MPS 5 mg.

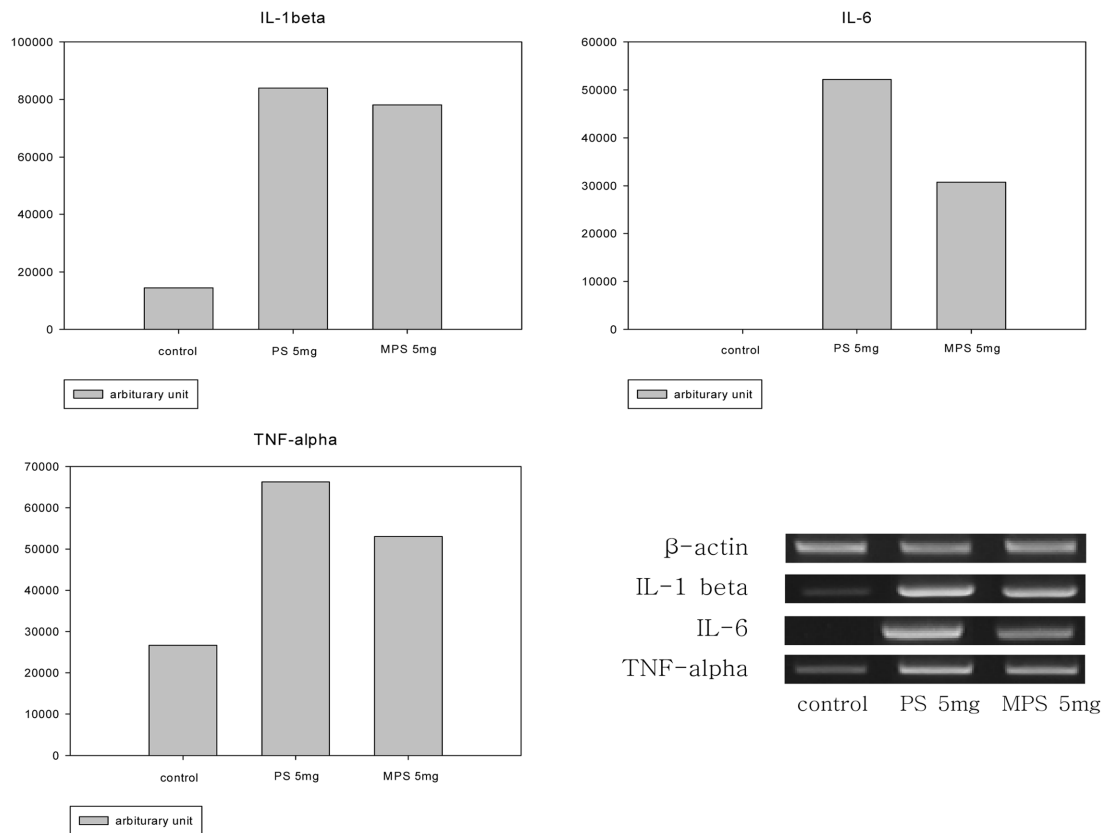


Fig. 4 – Comparison for genes expression of pro-inflammatory cytokines by MPS and PS. 5×10^5 RAW264.7 cells were incubated with MPS or PS for 24 hr and then the gene expression of pro-inflammatory cytokines were measured by RT-PCR. RT-PCR products were electrophorased in 1% agarose gel and the bands were analyzed by UVIDoc Mw program.

된 RAW264.7 세포에서 농도 의존적으로 세포에 대한 독성이 증가함을 알 수 있었다.

MPS와 PS가 NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 영향

NO는 pro-inflammatory cytokines와 더불어 macrophage가 활성화 되었을 때 생성되는 인자이다. iNOS에 의해 양적 증가가 일어나며 이들의 증가는 macrophage가 항원을 제거하는데 도움을 주어 면역력을 증강시켜 준다고 볼 수 있다. iNOS의 발현변화는 PCR을 통해 확인하였고, 결과물을 arbitrary unit으로 환산하여 그 값의 변화를 관찰하였다. Fig. 2A와 같이 MPS 처리군은 iNOS의 생성이 증가되며, 이는 PS에 의한 것 보다는 적게 일어남을 알 수 있다. iNOS의 증가는 Fig. 2B와 같이 NO의 증가로 바로 이어지며, NO 또한 PS보다 MPS에서 약간 적은 양으로 증가함을 보였다. 이와 같이 MPS는 PS와 마찬가지로 iNOS gene expression 및 NO 생성을 모두 증가시킨다는 것을 통해 macrophage의 활성화에 영향을 미친다는 것을 알 수

있었다.

Macrophage는 항원에 의해 활성화 되어 NO 등의 인자를 생성하여 면역력을 증강시키는 반면, 지나친 활성화에 의해 세포 손상을 일으키는 원인이 되기도 한다. 고농도의 NO가 존재하게 되면 만성염증 및 세포사멸과 관련된 질환을 야기한다. LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 세포는 control 군에 비해 현저하게 높은 NO 생성 증가를 보이며, PS와는 달리 MPS 처리군에서 LPS에 의해 증가된 NO 생성이 감소함을 보였다(Fig. 3B). NO를 생성하는 iNOS의 gene expression 또한 LPS에 의해 증가되었다가 MPS 처리에 의해 약간의 감소가 있는것이 확인되었다(Fig. 3A).

MPS와 PS가 RAW264.7 세포주의 pro-inflammatory cytokines 관련 gene expression에 미치는 영향

Pro-inflammatory cytokine은 염증을 매개하는 cytokine으로 NO와 함께 macrophage가 활성화 되었을때 생성이 증가되는 대

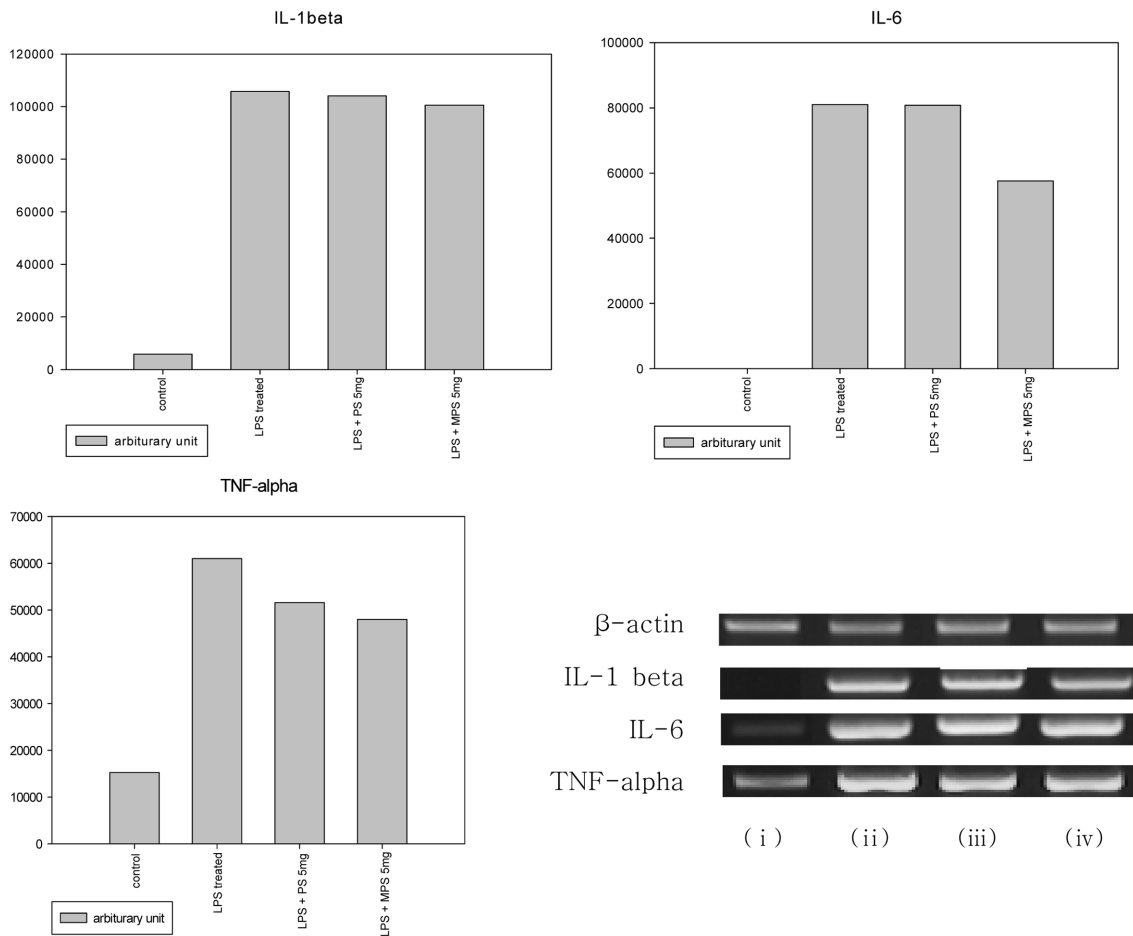


Fig. 5 – Comparison for genes expression of pro-inflammatory cytokines by MPS and PS. 5×10^5 RAW264.7 cells were incubated with MPS or PS for 24 hr and then the gene expression of pro-inflammatory cytokines were measured by RT-PCR. RT-PCR products were electrophorased in 1% agarose gel and the bands were analyzed by UVIDoc Mw program. (i); control, (ii); only LPS treated, (iii); LPS+PS 5 mg, (iv); LPS+MPS 5 mg.

표적 물질이다. 대표적인 pro-inflammatory cytokine으로는 IL-1 β , TNF- α , IL-6 등이 있으며 PCR을 통해 이들의 gene expression 변화를 확인하였다. PCR 생성물은 arbitrary unit으로 환산하여 그 값을 비교하였다. MPS와 PS는 control군에 비해 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 생성이 증가시킴을 알 수 있었으며, MPS보다 PS를 통해 증가가 더 크게 일어 난다는 것이 확인되었다(Fig. 4).

LPS에 의해 활성화 된 RAW264.7에 PS를 처리시 IL-1 β , TNF- α 는 크게 변화가 일어나지 않았고, IL-6의 gene expression만 약

간의 감소를 보였다. 이와 달리 MPS를 처리하였을 때 IL-1 β 에서는 약간의 감소가 보였고, TNF- α , IL-6은 PS 를 처리하였을 때 보다 발현이 감소됨을 관찰하였다(Fig. 5). Gene expression은 세포에 LPS와 동시에 PS, MPS를 처리하여 24시간 배양 후 RT-PCR 결과를 arbitrary unit으로 환산하여 비교하였다.

MPS는 PS와 달리 Arginase II, PD-L1의 gene expression에 영향

Arginase II는 macrophage에서 생성되는 또 하나의 enzyme으

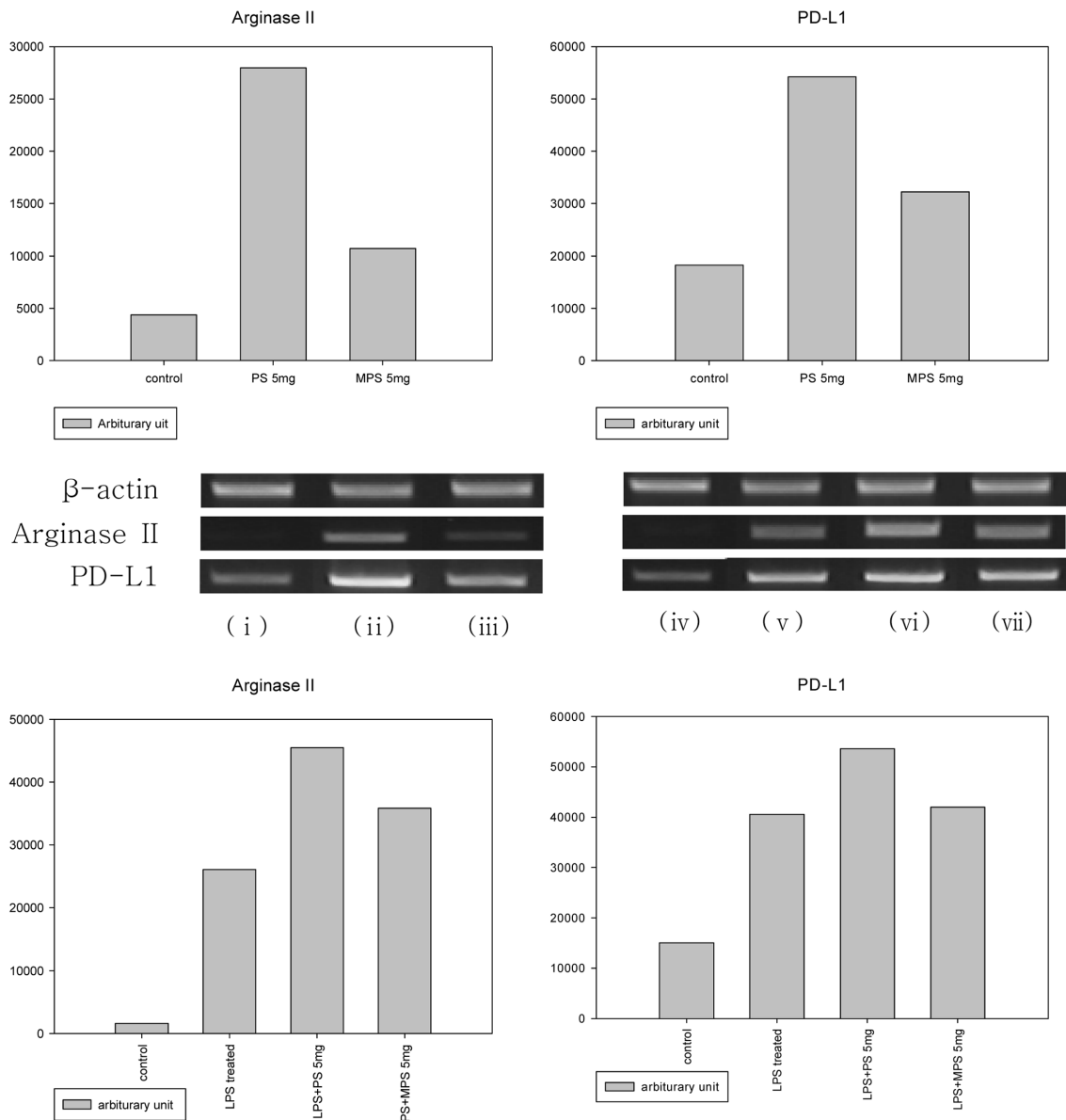


Fig. 6 – Effect of Arginase II, PD-L1 gene expression on macrophagec by LPS, MPS and PS. 5×10^5 RAW264.7 cells were incubated with MPS or PS for 24 hr and then the gene expression of Arginase II and PD-1L were measured by RT-PCR. RT-PCR products were electrophorased in 1% agarose gel and the bands were analyzed by UVIDoc Mw program. (i) control, (ii) PS 5 mg, (iii) MPS 5 mg, (iv) control, (v) only LPS-treated, (vi) LPS+PS 5 mg, (vii) LPS+MPS 5 mg.

로, NOS와 기질 경쟁적으로 작용하여 NO의 생성을 막고 proline 전구체를 생성하여 조직 회복에 도움을 주는 것으로 알려져있다. PD-L1은 macrophage를 포함한 antigen presenting cell(APC)에 발현하는 surface molecule로 costimulatory signal을 생성하여 T cell에 inhibition signal을 전달하는 것으로 알려져 있으나 아직 그 기전에 대해서는 정확하게 밝혀진 바가 없다. RT-PCR을 수행하여 그 발현 정도를 측정하였으며, Arginase II, PD-L1 모두 MPS 처리 군에서는 거의 발현의 변화가 없는 반면 PS 처리 군에서는 발현이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 6).

결 론

Macrophage는 백혈구(Neutrophils), 자연살해세포(Natural Killer cells)와 더불어 외부의 병원균에 대해서 host defence의 제1선에서 중요한 역할을 한다. 감염과 염증이 생성 되면 (L)-arginine는 nitric oxide synthase(iNOS)에 의해 NO로 생산되는데 활성화된 macrophage는 NO와 pro-inflammatory cytokine을 분비하여 다른 면역세포와 조직에 영향을 준다.¹⁶⁾ iNOS에 의해 생성된 적은농도의 NO는 항미생물 작용을 나타내나 고농도의 NO는 inflammation과 carcinogenesis에 중요한 역할을 하며¹⁷⁾ 세포사멸 및 조직 손상 또한 유발 한다.⁷⁾ 따라서 이러한 인자의 생성을 조절 할 수 있는 물질은 immune tolerance를 유도함으로써 질병에 대한 방어 능력을 키울 수 있을 것이다. 본 연구에서는 면역 세포의 활성을 효과적으로 증가시키는 PS와 항염 및 항암 작용을 하는 것으로 알려진 사포닌의 혼합물(MPS)을 처리하여 각각의 효능을 비교 평가하였다. MPS는 macrophage의 NO, IL-1 β , TNF- α , IL-6의 생성을 증가시켰는데 이는 MPS가 macrophage 활성을 증가시켜 면역력을 증가 시켰음을 추측할 수 있다. 그러나, PS에 의한 macrophage의 NO, IL-1 β , TNF- α , IL-6의 증가비율은 크지 않았다. 반면 LPS에 의 이미 활성화된 macrophage에 PS를 처리한 경우 NO와 pro-inflammatory cytokines 증감이 나타나지 않았으나 MPS를 처리한 경우 IL-6의 생성이 감소되었다. 이는 MPS가 지나치게 활성화된 macrophage를 근절함으로써 정상세포에 대한 손상을 억제하는 효과를 나타낼 것으로 추측된다. Arginase 효소는 iNOS와 기질 경쟁적으로 작용하여 NO의 생성을 억제하는 효소이다. PD-L1(programed death-ligand 1)은 항원제시세포에서 발현하여 활성화된 T 림프구에서 발현하는 PD-1(programed death-1)과 결합하여 T 림프구의 inhibitory signal을 전달하는 것으로 알려져 있는데, LPS로 활성화된 macrophage에서는 Arginase와 PD-L1의 발현이 MPS의해서는 크게 변하지 않으나 PS에 의해 발현이 증가되었으며 이는 saponin의 영향인 것으로 추측된다. 이런 면역 조절 능력에 대한 기전적 연구가 앞으로 더 수행되어야 할 것이다.

감사의 말씀

이 논문은 2006년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

참고문헌

- 1) Jung, I. S., Chung, H. Y., Yun, Y. S., Kim, K. H. and Lee, I. R. : The pattern of cytokine mRNA expression induced by polysaccharide from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *J. Ginseng Res.* **22**(4), 324 (1998).
- 2) Kim, M. H., Byon, Y. Y., Ko, E. J., Song, J. Y., Yun, Y. S., Shin, T. K. and Joo, H. G. : Immunomodulatory activity of ginsan, a polysaccharede of *Panax ginseng*, on dendritic cells. *Korean J. Physiol. Pharm.* **13**(3), 169 (2009).
- 3) Han, S. K., Song, J. Y., Yun, Y. S. and Yi, S. Y. : Ginsan improved Th1 immune response inhibited by gamma radiation. *Arch. Pharm. Res.* **28**(3), 343 (2005).
- 4) Nah, S. Y., Bhatia, K. S., Lyles, J., Ellinwood, E. H. and Lee, T. H. : Effects of ginseng saponin on acute cocaine-induced alterations in evoked dopamine release and uptake in rat brain nucleus accumbens. *Brain Res.* **1248**, 184 (2009).
- 5) Shine, H. J., Kwon, Y. M., Jung, Y. E., Lee, D. H., Lee, J. C., Han, S. S., Kim, H. T., Park, J. H., Sung, E. G. and Lee, Y. C. : Antioxidative effect of ginseng saponin on cardiac endothelial cells in culture. *Kor. J. Anat.* **33**(1), 77 (2000).
- 6) Hamilton, T. A. and Adams, D. O. : Molecular mechanisms of signal transduction in macrophage activation. *Immunol. Today* **8**, 151 (1987).
- 7) Lewis, C. E. and McGee, J. O. D. : The natural immune system: the macrophage. Oxford. UK:IRS Press. (1992).
- 8) Paulnock, D. M. : Macrophage activation by T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 344 (1992).
- 9) Furge, L. L., Fields, P. R., Goode, W. E., Konwinski, R. R., Tressler, M. C. and Stevens-Truss, R. : Oltipraz inhibits inducible nitric oxide synthase in vitro and inhibits nitric oxide production in activated microglial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **424**, 163 (2004).
- 10) Son, H. J., Shim, J. Y., Ahn, J. Y., Yun, Y. S. and Song, J. Y. : Representative parameter of immunostimulatory ginseng polysaccharide to predict radioprotection. *J. Radiation. Protection.* **33**(3), 99 (2008).
- 11) Song, J. Y., Yi, S. Y., Jung, I. S. and Yun, Y. S. : Effect of polysaccharide extracted from *Panax ginseng* on murine hematopoiesis. *J. Ginseng Res.* **25**(2), 63 (2001).
- 12) Shim, J. Y., Jung, I. S., Kim, C. W., Yun, Y. S. and Song, J. Y. : Comparison between immunostimulatory activity and molecular structure of different polysaccharides. *Immune Network* **4**(2), 94 (2004).
- 13) Ahn, J. Y., Choi, I. S., Shim, J. Y., Yun, E. K., Yun, Y. S., Jeong,

- G. J. and Song, J. Y. : The immunomodulator ginsan induces resistance to experimental sepsis by inhibiting Toll-like receptor-mediated inflammatory signals. *Eur. J. Immunol.* **36**, 37 (2006).
- 14) Lim, Y. J., Na, H. S., Yun, Y. S., Choi, I. S., Oh, J. S., Rhee, J. H., Cho, B. H. and Lee, H. C. : Suppressive effects of ginsan on the development of allergic reaction in murine asthmatic model. *Arch. Allergy. Immunol.* **150**, 32 (2009).
- 15) Song, J. Y., Akhalaia, M., Platonov, A., Kim, H. D., Jung, I. S., Han, Y. S. and Yun, Y. S. : Effects of polysaccharide ginsan from Panax ginseng on liver function. *Arch. Pharm. Res.* **27**(5), 320 (2004).
- 16) Nathan, C. and Xie, Q. W. : Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915 (1994).
- 17) Ohshima, H. and Bartsch, H. : Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* **305**, 253 (1994).