

## 생쥐 대식세포의 K562 종양세포치사 활성에 미치는 인삼 분획물의 영향

김 응 · 정노팔  
연세대학교 이과대학 생물학과  
(1989년 4월 19일 접수)

### Effects of a Ginseng Saponin Fraction on the Tumoricidal Activity of Murine Macrophage Against K562 Cells

Woong Kim and Noh-Pal Jung

Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

(Received April 8, 1989)

**Abstract** □ The tumoricidal activity of murine macrophage against K562 tumor cells was studied in the presence of lipopolysaccharide(LPS) and ginseng saponin.

1. The tumoricidal activity was increased more by LPS treatment with ginseng saponin (44% in 24 hours) than by LPS only (22% in 24 hours). In the case of diol saponin, the tumoricidal activity was increased as much as 35% at concentrations of  $10^{-3}$  to  $10^{34}\%$ . Triol saponin increased the tumoricidal activity more than LPS only treatment at each concentration.
2. When total, diol and triol saponin were added to K562 tumor cell in various concentration without macrophage, it was found that the ginseng saponin had no tumoricidal effect. This result suggests that ginseng saponin increases the tumoricidal activity of K562 tumor cells through the tumoricidal activity of the macrophage.

**Keywords** □ *Panax ginseng* C.A. Meyer, ginseng saponin, lipopolysaccharide, macrophage, tumor cells, tumoricidal activity

### 서 론

대식세포 (macrophage)는 척추동물의 면역계를 구성하는 세포로서 체액성 면역에서는 항원제공세포 (antigen presenting cell)로서 T 임파구와 B 임파구 활성화에 관여하며,<sup>1)</sup> 세포성 면역에서는 직접 작용하여 감염균이나 종양세포에 대하여 치사활성을 나타낸다.<sup>2)</sup> 이중 종양세포에 대한 치사활성을 대식세포 매개 종양치사 (macrophage-mediated tumor cytotoxicity)라고 한다. 이 대식세포가 종양세포를 치사시키기까지는 여러 단계의 활성화 과정을 필요로 하는데 대식세포 매개 종양치사를 조절하는 시동신호 (priming signal)로서 lymphokine의 일종

인 대식세포 활성화인자 (macrophage activating-factor, MAF)는 대식세포의 활성을 유도한다.<sup>3,4)</sup> MAF는 생화학 및 면역학적 방법에 의하여  $\gamma$ -인터페론 (INF- $\gamma$ )과 동일하다는 것이 밝혀졌으며,<sup>5)</sup> 이 시동신호로 인하여 종양세포와 선택적으로 부착할 수 있다.<sup>6)</sup> 또한, 촉발신호 (triggering signal)로서는 endotoxin이 많이 사용되는데 지질다당류 (lipopolysaccharide, LPS)가 주로 사용된다.<sup>7-10)</sup>

LPS에서도 활성부분은 lipid A 부분으로 밝혀졌으며,<sup>11)</sup> 이 촉발신호로 인하여, 대식세포는 다양한 치사생성물을 방출하는데,<sup>12,13)</sup> 그중에서도 cytolytic protease (CP)가 종양세포를 치사시키는데 데 중요한 역할을 한다.<sup>6)</sup> 한편 인삼성분과 면역계와

의 관련 여부는 혈청내의 albumin,  $\gamma$ -globulin 등의 증가가 일어난다는 보고가 있으며,<sup>14)</sup> *Ancylostoma caninuss* 로 감염시킨 생쥐와 개에서 인삼에 의하여 혈중  $\beta$ ,  $\gamma$ -globulin 의 증가가 일어난다는 보고<sup>15)</sup>와, 결핵균 감염에 대하여 항결핵제에 의한 결핵균의 증식억제가 인삼에 의하여 증가된다는 보고,<sup>16)</sup> 인삼 추출물은 S-RBC 에 대한 혈중항체의 양을 증가시킨다는 보고가 있었다.<sup>17)</sup> 또한 total saponin 은 면역세포간 조절물질인 IL-2 와 같이 처리했을 때 생쥐 흉선세포의 증식에 상승작용(synergy)을 나타낸다고 보고되었으며,<sup>18)</sup> chick- $\gamma$ -globulin 을 주사한 생쥐에서 이 항원에 대한 항체의 생성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 보고하였다.<sup>19)</sup>

본 실험에서는 대식세포의 종양세포 치사활성에 미치는 인삼 분획물(saponin)의 영향을 알아보고자 하였다. 대식세포의 활성유도물질은 thioglycollate 와 LPS 를 사용하였으며, 종양세포는 미리 thymidine-methyl-<sup>3</sup>H (<sup>3</sup>HTdR)로 표지하여 <sup>3</sup>HTdR 의 방출량을 종양세포치사의 지표로 삼았다. 그리고 인삼 분획물만을 종양세포에 처리하여 주었을 때 인삼 분획물이 직접적으로 종양세포에 대하여 치사작용이 있는지도 알아보려고 하였다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

실험동물은 표준사료로 사육한 생후 8-10주된 체중 20-30g 의 C57BL/6 계 생쥐를 암수 구별없이 사용하였다.

표적세포는 K562(human erytroleukemia line) 세포를 연세대학교 의과대학 미생물학연구실로부터 분양받아 사용하였다.

인삼 분획물(saponin)은 5년근 홍삼으로부터 분리한 total, diol 그리고 triol saponin 을 한국인삼연초연구소로부터 분양받아 thin layer chromatography 로 인삼 분획물을 확인하여 사용하였다.

Thioglycollate 는 Difco 제품을, RPMI medium 1640 은 Gibco 제품을 사용하였고 *Salmonella minnesota* 로부터 분리한 LPS-R595, FBS (fetal bovine serum), POPOP, HEPES, SDS 는

Sigma 제품을 사용하였고 thymidine-methyl-<sup>3</sup>H (<sup>3</sup>HTdR)은 Dupont 제품을 사용하였다. L-glutamine, sodium bicarbonate 등은 Wako, Hayashi 의 GR 급 및 특급품을 사용하였으며 penicillin 과 streptomycin 은 국내 시판제품을 사용하였다. Tissue culture flask, dish, 96 well plate, centrifuge tube 등은 Costar 제품을 사용하였다.

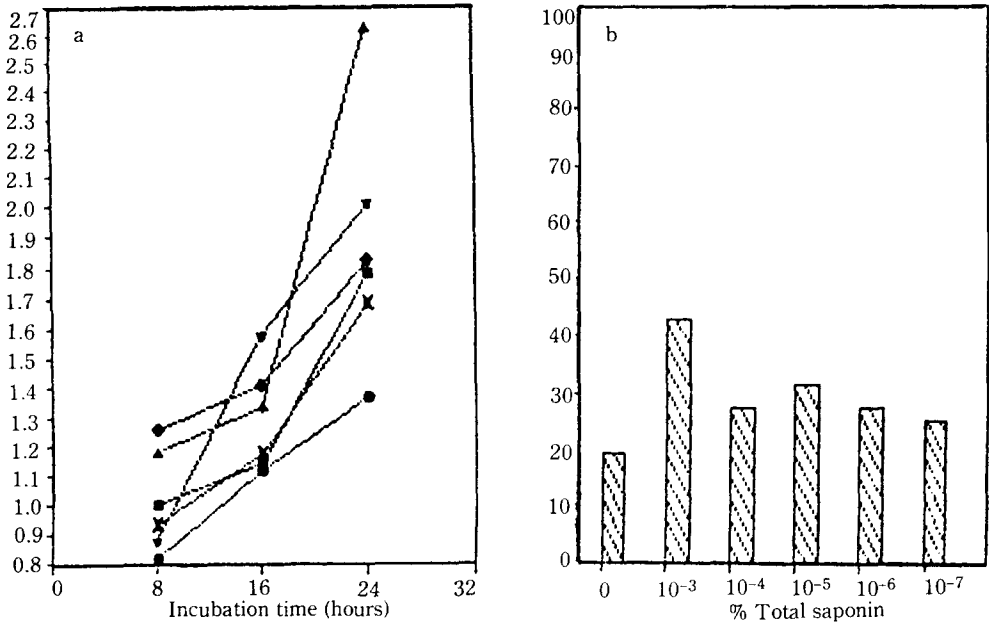
### 2. 실험방법

**세포의 성장배지 :** 주효세포로 사용한 대식세포와 표적세포로 사용한 K562 세포는 RPMI-1640, FBS 10%, HEPES 25 mM, L-glutamine 2 ml, sodium bicarbonate 0.14%, penicillin 10 u/ml, streptomycin 100  $\mu$ g/ml 을 넣어서 만든 배지를 사용하였다.

**세포배양 :** 대식세포는 C57BL/6 생쥐 복강에 thioglycollate 2 ml 을 주사한 5일후에 복강으로부터 얻었다. 먼저, 생쥐를 경추이탈로 희생시키고 복부기증을 벗겨내어 복강벽만을 남긴 후 복강에 혈청을 포함하지 않은 RPMI-1640 을 투여한 주사기로 4°C에서 250g 로 10분간 원심분리하여 세포를 침강시켰다. 상등액을 따라내고 동일한 상태로 원심분리를 2회 반복하여 세포를 씻었다. 그 후에 여기에 소량의 배양액을 넣어 세포수를 계수하고 1 ml 당 세포수가  $5 \times 10^6$  개가 되게 맞춰준 후 2시간이 경과한 후 배양세포를 혈청을 포함하지 않은 배양액으로 3회 강하게 씻어주고 배양판에 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 이때의 대식세포 순도는 90% 이상된 것을 확인한 후 이를 실험재료로 사용하였다. 배양액은 56°C에서 30분간 처리하여 보체(complement)를 불활성화시킨 FBS 를 10% 함유하게 한 후 사용하였다. 대식세포의 종양치사활성을 유도하기 위하여 최적 LPS 농도인 ml 당 25  $\mu$ g 을 배양액에 넣어주어 24시간 배양하였고,<sup>7)</sup> 이때의 대식세포는 단층을 형성하였다.

**LPS 와 인삼처리 :** LPS(25  $\mu$ g/ml)과 함께 total saponin, diol saponin, triol saponin 을  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ % 농도로 함유하게 만든 배양액을 준비하여 각각 8시간, 16시간 24시간 동안 대식세포와 K562 세포를 함께 배양하였다.

**종양세포의 치사활성도 측정 :** K562 세포의 치사 정도는 [<sup>3</sup>H] thymidine(sp. act. Ci/mmole) 방출



**Fig. 1.** Kinetics of cytotoxicity by adherent PC from C57BL/6 mice treated *in vitro* with LPS and various Total saponin. (a) Absolute radioactive counts released <sup>3</sup>H into supernatant by 10<sup>5</sup> labelled K562 cells which added to macrophages preincubated with LPS-R595 at a concentration of 25 μg/ml for 24 hr. LPS alone, ●; LPS + CS 10<sup>-3</sup>%, ▲; LPS + CS 10<sup>-4</sup>%, ■; LPS + CS 10<sup>-5</sup>%, ▼; LPS + CS 10<sup>-6</sup>%, ◆; LPS + CS 10<sup>-7</sup>%, X. (b) The data expressed as percent specific release in 24 hr. Abbreviation: CS, Total saponin; PC, Peritoneal exudate cell; LPS, lipopolysaccharide. Total saponin(%) added to LPS (25 μg/ml).

량을 측정함으로써 치사지표로 삼았다. 먼저 K562 세포를 ml 당 0.5 μCi의 <sup>3</sup>HTdR 을 함유하는 배양액에서 18-20시간 배양함으로써 표지를 하였다. 표지한 후 K562 세포는 24시간 동안 활성화된 단층을 형성한 대식세포에 ml 당 5×10<sup>5</sup>씩 넣어준다(대식세포 : K562 세포 = 10 : 1). K562 세포를 넣어준 후, 8시간, 16시간, 24시간 동안 배양한 후에 배양액을 200g에서 10분간 원심분리하여 상등액 100 μl 를 수집하여 liquid scintillation cocktail solution 에 넣은 후 방출된 방사능을 방사능측정기로 측정하였다. 24시간 동안 배양한 후 %specific release 는 다음 공식에 의해 측정된다.

$$\frac{\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release}}{\text{Total releasable count} - \text{Spontaneous release}} \times 100$$

여기서 total release 는 실험군당 들어있는 K562 세포를 1% SDS 로 전부 파괴하였을 때 <sup>3</sup>HTdR 이 방출된 양이다.

대식세포없이 인삼성분만의 치사효과를 알아보기 위하여 같은 방법으로 total saponin, diol saponin, triol saponin 을 각각 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>% 농도로 함유하는 배양액에 <sup>3</sup>HTdR 로 표지된 K562 세포를 8시간, 16시간, 24시간 동안 배양하여 방출된 <sup>3</sup>HTdR 의 양을 측정하였다.

Liquid scintillation mixture 는 toluene 667 ml, Triton X-100 333 ml, PPO 5.5g, POPOP 0.1g 을 섞어 만든 용액과 EtOH 500 ml, MeOH 500 ml 를 섞어 만든 용액을 1 : 1로 혼합하여 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 인삼 분획물이 대식세포의 K562 종양세포 치사 활성화에 미치는 영향

LPS(25 μg/ml)와 함께 total saponin 을 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>% 각 농도별로 복합 처리해

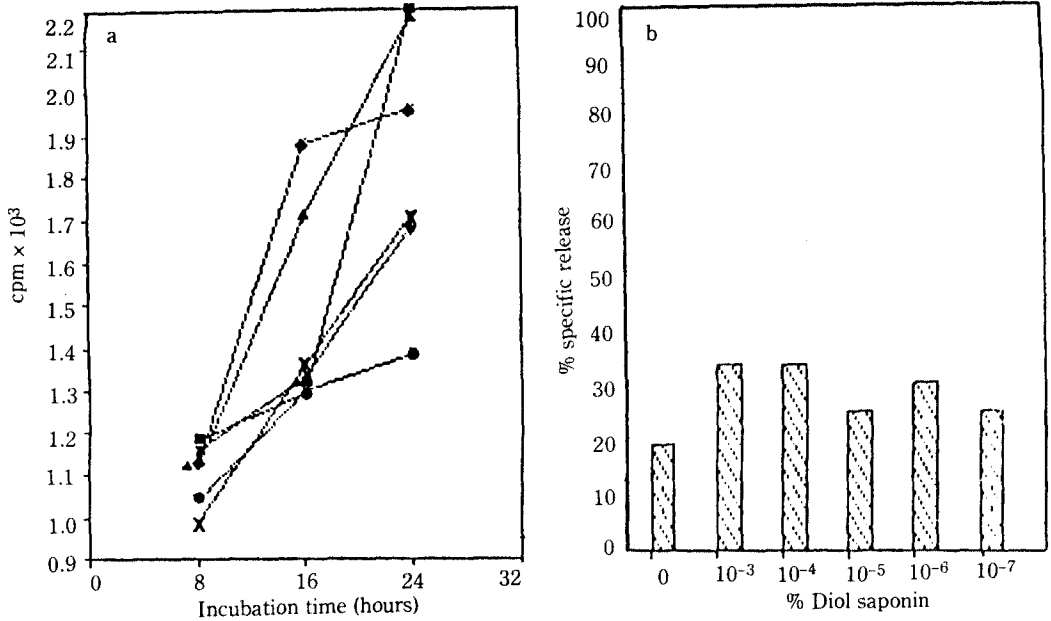


Fig. 2. Kinetics of cytotoxicity by adherent PC from C57BL/6 mice treated *in vitro* with LPS and various Diol saponin.

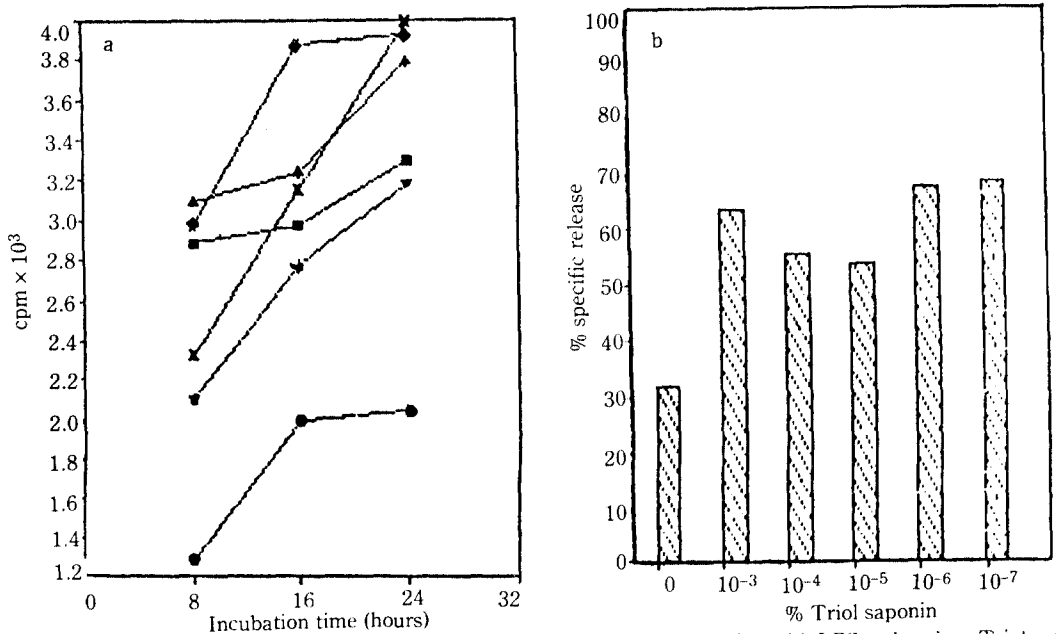


Fig. 3. Kinetics of cytotoxicity by adherent PC from C57BL/6 mice treated *in vitro* with LPS and various Triol saponin.

준 대식세포는, LPS(25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )만을 처리해준 대조군이 24시간 후에 20%의 종양 치사 활성을 나타내는데 비하여 25% 이상의 종양 치사 활성을 나타내었으며 (Fig.1) 같은 농도별로 diol saponin 을 복합 처리해준 대식세포는 LPS(25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )만을 처리해

준 대조군이 24시간 후에 20%의 종양 치사 활성을 나타내는데 비하여 25% 이상의 종양 치사 활성을 나타내었다 (Fig.2). 또한, triol saponin 을 함께 복합 처리해준 대식세포는 LPS(25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )만을 처리해준 대조군이 24시간 후에 32%의 종양 치사 활성

을 나타낸데 비하여 triol saponin 각각의 농도에서 모두 50% 이상의 치사 활성을 나타내었다(Fig.3).

Total, diol, triol saponin 각 농도에서 종양세포 치사 활성이 증가된 것으로 보아, 인삼 분획물들이 LPS와 더불어 대식세포의 중앙 치사 활성에 상승 작용(synergy)을 나타낸다고 생각할 수 있으며, 이러한 상승작용은 MAF와 함께 LPS를 처리하였을 때 나타나며 MAF는 생화학 및 면역학적 방법에 의하여  $\gamma$ -인터페론과 동일하다고 보고되었다.<sup>5)</sup>  $\gamma$ -인터페론은 세포성 면역을 담당하는 세포들의 활성을 높여준다. 이러한 사실에 의거하여 인삼 분획물 중에서  $\gamma$ -인터페론과 같은 물질을 기대할 수 있다.

## 2. 인삼 분획물이 K562 종양세포의 생존력에 미치는 영향

Table 1. Effect of Ginseng Total Saponin fraction on Tumor Cell Viability

K562 Target cells added to	24h incubation	
	<sup>3</sup> HTdR cpm	SR
Control	162 ± 11	0%
CS (10 <sup>-3</sup> %)	282 ± 15	2.2%
CS (10 <sup>-4</sup> %)	237 ± 9	1.4%
CS (10 <sup>-5</sup> %)	268 ± 9	1.9%
CS (10 <sup>-6</sup> %)	215 ± 9	1.0%
CS (10 <sup>-7</sup> %)	300 ± 12	2.5%
SDS total count	5640	100%

All cpm expressed as mean ± SD of triplicates.  
Abbreviations: CS, total saponin; SR, specific release.

Table 2. Effect of Ginseng Diol Saponin fraction on Tumor Cell Viability

K562 Target cells added to	24h incubation	
	<sup>3</sup> HTdR cpm	SR
Control	162 ± 11	0%
DS (10 <sup>-3</sup> %)	201 ± 6	0.7%
DS (10 <sup>-4</sup> %)	186 ± 4	0.4%
DS (10 <sup>-5</sup> %)	192 ± 5	0.5%
DS (10 <sup>-6</sup> %)	159 ± 6	0%
DS (10 <sup>-7</sup> %)	236 ± 14	1.4%
SDS total count	5640	100%

All cpm expressed as mean ± SD of triplicates.  
Abbreviations: DS, diol saponin; SR, specific release.

Table 3. Effect of Ginseng Triol Saponin fraction on Tumor Cell Viability

K562 Target cells added to	24h incubation	
	<sup>3</sup> HTdR cpm	SR
Control	162 ± 11	0%
TS (10 <sup>-3</sup> %)	162 ± 11	0%
TS (10 <sup>-4</sup> %)	185 ± 14	0.4%
TS (10 <sup>-5</sup> %)	148 ± 5	0%
TS (10 <sup>-6</sup> %)	194 ± 14	0.6%
TS (10 <sup>-7</sup> %)	172 ± 12	0.2%
SDS total count	5640	100%

All cpm expressed as mean ± SD of triplicates.  
Abbreviations: TS, triol saponin; SR, specific release.

배양액에 total, diol, triol saponin을 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>% 농도로 각각 넣어 대식세포 없이 K562 세포를 24시간 배양한 결과 인삼 saponin이 K562 종양세포에 대한 치사 활성을 나타내지 않았다(Table 1, 2, 3).

이러한 결과로써 인삼 saponin이 K562 종양세포에 대하여 직접적인 치사 효과는 없지만 대식세포를 통하여 대식세포의 중앙 치사 활성을 증가시킴으로써 K562 세포를 치사시키는 것으로 생각할 수 있다.

## 요 약

본 실험에서는 대식세포에 의한 K562 종양세포의 치사에 미치는 인삼 분획물들의 영향을 알아보기 위하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LPS만을 처리하여 주어 종양세포의 치사 활성을 유도한 대식세포보다도 LPS와 saponin을 복합처리하여준 대식세포가 K562 종양세포에 대하여 더 높은 중앙 치사 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 인삼 분획물 즉, total, diol, triol saponin 모두 같은 양상을 나타내었다.

2. 대식세포 없이 배양액에 인삼 saponin만을 처리하여 주었을 경우, 인삼 saponin이 K562 종양세포에 대한 치사작용을 나타내지 않았다.

3. 이러한 결과로 인삼 saponin이 대식세포를 통하여 K562 세포 치사 활성을 증가시킨다는 것을 확인하였다.

## 인용문헌

1. Unanue, E.R.: *Ann. Rev. Immunol.* **2**, 395 (1984).
2. Adams, D.O. and Hamilton, T.A.: *Ann. Rev. Immunol.* **2**, 283 (1984).
3. Meltzer, M.S.: *J. Immunol.* **127**, 179 (1981).
4. Gemsa, D., Debatin, K., Kramer, W., Kubelka, C., Deiman, W., Kees, U. and Krammer, P.H.: *J. Immunol.* **131**, 833 (1983).
5. Schreiber, R.D., Pace, J.H., Russell, S.W., Altman, A. and Katz, D.H.: *J. Immunol.* **131**, 826 (1983).
6. Johnson, W.J., Somors, S.D. and Adams, D.O.: *Contemp. Top. Immunol.* **14**, 127 (1983).
7. Doe, W.F. and Henson, P.M.: *J. Exp. Med.* **148**, 544 (1978).
8. Weinberg, J.B., Chapman, Jr. H.A. and Hibbs, Jr. J.B.: *J. Immunol.* **121**, 72 (1978).
9. Lansfargues, A., Charon, D., Trigalo, F., Ledur, A., Szabo, L. and Chaby, R.: *C. Immuno.* **98**, 8 (1986).
10. Weiel, J.E., Hamilton, T.A. and Adams, D.O.: *J. Immunol.* **136**, 3012 (1986).
11. Doe, W.F., Yang, S.T., Morrison, D.C., Betz, S.T. and Henson, P.M.: *J. Exp. Med.* **148**, 557 (1979).
12. Melson, H., Kearny, G., Gruca, S. and Seljelid, R.: *J. Exp. Med.* **140**, 1085 (1974).
13. Adams, D.O. and Nathan, C.F.: *Immunol. Today* **4**, 166 (1983).
14. Oura, H.S., Odaka, H.Y. and Yokozawa, T.: *J. Biochem.* **77**, 1057 (1975).
15. 소진탁, 이진수, 김상준: 연대의대 논문집 **9**(2), 119(1976).
16. 경용택: 충남의대 잡지 **6**(2), 477(1979).
17. Singh, V.K., Agurwal, S.S. and Gupta, B.M.: Proc. 4th INTL Ginseng Symp. (1984).
18. 최선경, 정노팔: 고려인삼학회지 **10**(2), 133(1986).
19. 김미정, 정노팔: 고려인삼학회지 **11**(2), 119(1987).