

## 생쥐 대식세포의 종양세포 치사활성에 미치는 인삼분획물과 지방다당류의 영향

최상운 · 정노팔\* · 김세창\*\*

한국화학연구소 의약활성연구실

\*연세대학교 이과대학 생물학과

\*\*배재대학교 생물학과

(1990년 10월 20일)

## Effects of Ginseng Saponin Fractions and Lipopolisaccharide on the Tumoricidal Activity of Mouse Macrophage

Sang-Un Choi, Noh-Pal Jung\* and Se-Chang Kim\*\*

Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O.Box 9, Daedeog Science Town, 305-606

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

\*\*Department of Biology, Paichai University, Daejeon 302-735 Korea

(Received October 20, 1990)

**Abstract** □ This experiment was performed to investigate the effects of ginseng saponin fractions (total saponin, triol saponin, diol saponin) and lipopolysaccharide (LPS) on the tumoricidal activity of macrophage. The ginseng saponin fractions had little effect on the tumoricidal activity of macrophage (less than 10%). When the ginseng saponin fractions were treated with LPS, the effects of tumoricidal activation of macrophage increased a relatively high percent, and the total saponin and triol saponin (20-35%) were more effectual than diol saponin (15-25%). The effects of ginseng saponin and LPS on the tumoricidal activity of macrophage were mediated by the induction of macrophage-release factor(s) which has(have) the capacity of tumor cell killing. And the quantity of the factor(s) was(were) increased by the contact of macrophage with tumor cell.

**Keywords** □ Total ginseng saponin, triol saponin, diol saponin, lipopolysaccharide, macrophage, macrophage-released factor(s), tumoricidal activity.

### 서 론

척추동물은 이물질의 침입에 대한 자기보호수단으로 면역현상을 나타내며, 이러한 면역현상은 크게 체액성 면역과 세포성 면역으로 구분된다. 대식세포(macrophage)는 체액성 면역계에서는 침입한 이물질을 최초로 인지하여 B 임파구와 T 임파구에 항원을 제공하여 주는 항원제공세포(antigen presenting cell)로서 작용하며,<sup>1)</sup> 세포성 면역계에서는 침입한

감염균이나 종양세포에 대하여 직접 작용하여 치사활성을 나타낸다.<sup>2)</sup> 이 중 특히 대식세포의 종양세포에 대한 치사활성을 대식세포 매개 종양치사라고 하는데, 대식세포가 이러한 종양치사활성을 나타내기 위해서는 여러 단계의 활성화 과정을 거쳐 완전히 활성화된 상태인 최대활성 대식세포(fully activated macrophage)로 되어야 한다. 이때 대식세포 매개 종양치사활성을 조절하는 시동신호(priming signal) 전달물질로는 lymphokine의 일종인 대식세포 활성화인자(mac-

rophage activating factor : MAF)가 작용하며,<sup>3,4)</sup> 이 대식세포 활성화인자는 생화학적 및 면역학적 방법을 이용한 연구에서  $\gamma$ -인터페론(INF- $\gamma$ )과 동일한 물질임이 밝혀졌다.<sup>5)</sup> 이러한  $\gamma$ -인터페론의 자극에 의하여 대식세포는 종양세포와 선택적으로 부착할 수 있으며,<sup>6-8)</sup> 또한  $\gamma$ -인터페론의 농도가 높은 경우에는 다른 자극물질의 도움이 없이도 대식세포 매개 종양치사 활성이 나타난다. 그러나  $\gamma$ -인터페론의 농도가 낮은 경우에는 촉발신호(triggering signal) 물질로서 endotoxin의 자극을 필요로 하는데, 특히 지방다당류(lipopolysaccharide : LPS)가 주로 사용된다.<sup>9-13)</sup>

관련 인삼성분과 면역계와의 관련성에 대한 연구로는 인삼이 개체의 비특이적 저항성을 증대시키는 효과가 있다는 보고 이후로 활발히 진행되고 있다. 또한 최근에는 인삼의 항암 효과에 대한 연구들도 많이 수행되고 있으며, *in vitro* 실험에서 인삼 성분중 Panaxtriol이 몇 종의 인체 암세포와 악성 백혈병 세포의 성장을 억제 시킨다는 보고가 있었으며,<sup>15)</sup> 인삼의 지용성 성분이 암세포에 대한 증식 억제 작용을 나타낸다는 보고<sup>16)</sup>와 인삼의 다당류 성분이 항암효과가 있다는 보고 등<sup>17)</sup>이 있다.

따라서 본 실험에서는 대식세포의 종양세포 치사 활성에 미치는 인삼분획물(saponin)의 영향과 LPS의 작용을 알아보려 하였으며, 특히 LPS와 인삼분획물에 의한 대식세포의 종양세포 치사 활성의 증가가 대식세포로부터 분리되는 물질에 의한 것인지와 종양세포의 종류에 따른 특이성이 있는가에 대하여 알아보려 고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료와 시약

실험동물은 표준사료로 사육한 생후 10주된 체중  $25 \pm 3$ g의 C57BL/6J계 수컷쥐를 사용하였고, 표적세포로는 L929(murine-transformed fibroblast cell line) 세포와 EL4(murine-lymphosarcoma cell line) 세포를 연세대학교 의과대학 미생물학연구실로부터 분양받아 사용하였다.

인삼분획물(saponin)은 5년근 홍삼으로부터 분리한 total, diol 및 triol saponin을 한국인삼연초연구소로부터 분양받아 thin layer chromatography로 확인한 후 사용하였다. Thioglycollate는 Difco 제품을,

RPMI 1640 medium은 Gibco 제품을 사용하였고, *Salmonella minnesota*로 부터 분리한 LPS-R595와 fetal bovine serum, POPOP, PPO, SDS등은 Sigma제품을 사용하였으며, thymidine-methyl-<sup>3</sup>H(<sup>3</sup>HTdR)은 Dupont제품을 사용하였다. 또한, penicillin과 streptomycin은 국내 녹십자(주) 제품을 사용하였고, 세포배양용 flask와 96-Well plate, centrifuge tube등은 Costar제품을 사용하였다.

### 2. 실험 방법

**세포의 배양액** : 대식세포의 배양액은 0.14% sodium bicarbonate와 penicillin 100 U/ml, streptomycin 100  $\mu$ M/l 및 25mM HEPES를 첨가한 RPMI 1640 medium을 사용하였고, 표적세포들의 배양은 대식세포용 배양액을 10% fetal bovine serum(FBS)으로 보강한 배양액을 사용하였다. 또한, 종양세포 치사활성을 측정할 때에는 FBS를 넣지 않은 배양액을 사용하였다.

**대식세포의 분리 및 배양** : 대식세포는 C57BL/6J 수컷쥐 복강으로부터 Michele(1988)등의 방법을 응용하여 추출하였다. 생쥐 복강내에 3%Thioglycollate 2ml를 주사하고 4-5일 후에 생쥐를 경추이탈로 희생시킨 후 복강에 혈청을 포함하지 않은 RPMI 1640 배양액을 10ml 주입하여 수 초간 방치한 후 다시 주입한 배양액을 회수하여 4°C에서 250g로 10분간 원심분리하여 세포를 침강시켰다.

원심분리 후 상등액을 따라내고 동일한 방법으로 원심분리를 2회 더 반복하여 세포를 세척한 후 여기에 소량의 배양액을 넣어 세포수를 계수하고 1ml당 세포수가  $5 \times 10^6$ 개가 되도록 배양액을 첨가한 후에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기구에서 2시간 배양하여 대식세포를 배양판에 부착시키고 동일한 배양액으로 2-3회 씻어 주어 배양판에 부착하지 않는 세포들을 제거하여 대식세포의 비율이 95% 이상인 것을 확인한 후 실험 재료로 사용하였다. 대식세포의 분리와 배양은 모두 무균상태로 진행하였으며 배양액은 혈청을 첨가하지 않은 RPMI 1640 배양액을 사용하였다.

**LPS와 인삼분획물의 처리** : LPS는 2, 5, 10, 25, 50  $\mu$ g/ml의 농도로, total saponin과 triol saponin, diol saponin은 각각  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ % 농도로 8시간, 16시간, 24시간 동안 대식세포에 처리하여 배양한 후 최적 농도와 배양시간을 측정하였다. LPS와 인삼분획물과의 복합처리는 인삼분획물들의 농도는

위와 동일하게 하였고 LPS의 농도는 10과 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 택하여 동시에 16시간 동안 대식세포에 처리하였다. 대식세포배양액의 상등액을 분리하여 상등액에 의한 종양치사활성을 측정하는 실험에서는, LPS는 10과 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도를 그리고 total saponin은  $10^{-4}\%$ , triol saponin과 diol saponin은 각각  $10^{-5}\%$  농도를 선택하여 16시간동안 단독 또는 복합처리 하였다.

**표적세포에 의한 대식세포 1차 자극 처리:** 대식세포에 대한 표적세포의 1차 자극 처리는 대식세포 배양액의 상등액에 의한 종양치사 활성도 측정시와 같은 농도와 시간으로 LPS와 인삼분획물을 처리하여준 후, 다시 대식세포와 표적세포의 비율이 50 : 1이 되도록 하여 표적세포를 16-18시간 동안 대식세포에 처리하여 1차 자극을 주었다.

**종양세포의 치사 활성도 측정:** 표적세포로 사용한 L929 세포와 EL4세포의 치사 정도는 표지된 [ $^3\text{H}$ ] thymidine(sp. act. Ci/mM)의 방출량을 측정하여 치사지표로 삼았다.

표적세포를  $\text{mL}$ 당 0.5  $\mu\text{Ci}$ 의  $^3\text{HTdR}$ 을 포함하고 있는 배양액에서 20-24시간 배양하여 방사능 표지를 한 후 일정시간 LPS와 인삼분획물로 전처리한 대식세포에  $\text{mL}$ 당  $5 \times 10^5$ 개(대식세포 : 표적세포 = 10 : 1)의 세포를 처리하여 24시간 배양시킨 후 200 g에서 10분간 원심분리하여 상등액 150  $\mu\text{l}$ 를 채취하여 liquid scintillation cocktail solution 10 ml에 넣은 후 암소(dark condition)에서 24시간 방치하였다가 방사능 측정기를 이용하여 방출된 방사능을 측정하였다.

대식세포 배양액의 상등액에 의한 종양치사 활성도의 측정 실험시에는 배양용기에  $^3\text{HTdR}$ 로 표지된 표적세포를  $2 \times 10^6$ 개/ $\text{mL}$ 로 배양시킨 후 앞에서와 같은 방법으로 처리한 대식세포 배양액을 250 g에서 10분간 원심분리한 후 상등액 150  $\mu\text{l}$ 를 채취하여 표적세포 배양액에 넣어 주고 24시간 배양 후 위와 동일한 방법으로 방출된 방사능을 측정하였다. 측정된 방사능의 유의방출율(% specific release)은 다음 공식에 의해 산출하였다.

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

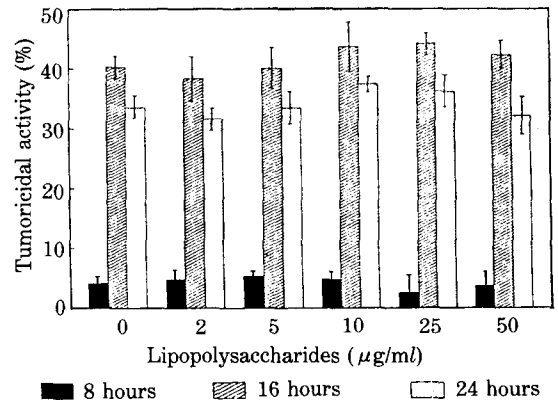
위의 식에서 total release는 실험군당 들어있는 표적세포를 1% SDS로 모두 파괴시켰을 때 방출되는

방사능 값이다. Liquid scintillation cocktail solution은 toluen 667ml, triton X-100 333ml, PPO 5.5 g, POPOP 0.1 g을 혼합한 용액과 순수 에탄올과 순수 메탄올 500 ml 씩을 혼합한 용액을 1 : 1의 비율로 섞어서 사용하였다.

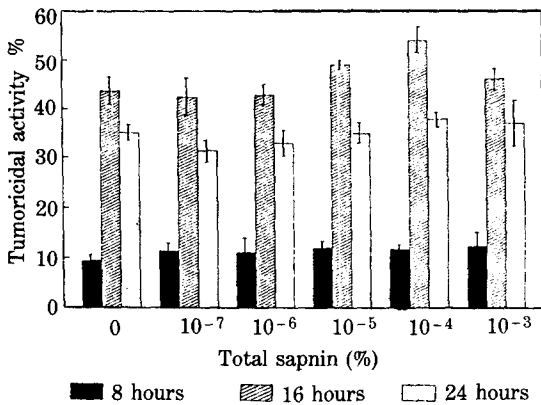
## 결과 및 고찰

### 1. LPS가 대식세포의 종양세포 치사 활성에 미치는 영향

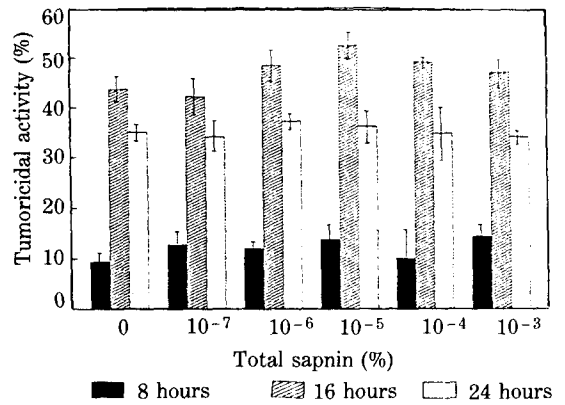
대식세포에 LPS를 단독으로 전처리하여 8시간, 16시간, 24시간 배양한 후 L929 종양세포에 대한 치사 활성도를 측정한 결과 거의 모든 경우에서 치사활성도에 유의성 있는 변화가 일어나지 않았다. 그러나 LPS를 16시간 전처리한 경우에서 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 전처리가 대식세포의 종양세포 치사 활성도를 5%정도 증가시키는 것으로 나타났다. 또한 24시간 전처리한 결과의 종양세포 치사율이 16시간 전처리군에 비해 감소하는 이유는 대식세포의 총 배양시간이 50시간이 넘어 생존율이 70% 이하로(trypan blue로 염색하여 확인)떨어지기 때문이다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Effects of lipopolysaccharide on the L929 tumoricidal activity of macrophage from C57BL/6J mouse. Macrophages were incubated with 0-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS for 8-24 hours. After these incubations, thymidine-methyl- $^3\text{H}$ -labelled L929 tumor cells were added to the macrophages and incubated for 24 hours. Tumoricidal activity was measured by the scintillations of radioactivity of released  $^3\text{H}$  from the tumor cells. The data is mean  $\pm$  standard error of four assays.



**Fig. 2.** Effects of total saponin on the L929 tumoricidal activity of macrophage from C57BL/6J mouse. Macrophages were incubated with 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup>% total saponin for 8-24 hours. After these incubations, thymidine-methyl-<sup>3</sup>H-labelled L929 tumor cells were added to the macrophages and incubated for 24 hours. Tumoricidal activity was measured by the scintillations of radioactivity of released <sup>3</sup>H from the tumor cells. The data is mean ± standard error of four assays.



**Fig. 3.** Effects of triol saponin on the L929 tumoricidal activity of macrophage from C57BL/6J mouse. Macrophages were incubated with 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup>% triol saponin for 8-24 hours. After these incubations, thymidine-methyl-<sup>3</sup>H-labelled L929 tumor cells were added to the macrophages and incubated for 24 hours. Tumoricidal activity was measured by the scintillations of radioactivity of released <sup>3</sup>H from the tumor cells. The data is mean ± standard error of four assays.

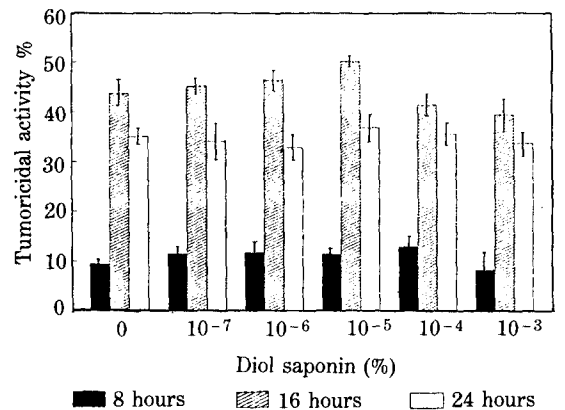
**2. 인삼분획물이 대식세포의 종양세포 치사 활성에 미치는 영향**

**Total saponin의 영향 :** 대식세포에 total saponin을 전처리하여 L929 종양세포에 대한 치사활성도를 측정할 경우 16시간 동안 10<sup>-4</sup>% 농도로 전처리한 실험군에서 대조군에 비하여 10% 정도의 종양세포 치사활성 증가가 일어났으며, 10<sup>-5</sup>% 농도 전처리군에서도 5%의 종양세포 치사 활성도의 증가가 일어났다.

그러나 다른 실험군들에서는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다(Fig. 2).

**Triol saponin의 경우 :** 대식세포에 triol saponin을 단독으로 전처리하여 L929종양세포에 대한 치사 활성도를 측정할 경우에서는 10<sup>-5</sup>%로 16시간동안 전처리한 실험군에서 대조군에 비해 9%의 활성도 증가가 나타났으며 10<sup>-4</sup>% 16시간 전처리한 경우에도 5% 정도의 치사 활성도 증가가 나타났다. 그러나 역시 다른 실험군들에서는 치사 활성도의 유의성 있는 증가가 나타나지 않았다(Fig. 3).

**Diol saponin의 경우 :** Diol saponin을 대식세포에 전처리하여 L929 종양세포에 대한 치사활성도를 측정할 결과 10<sup>-5</sup>% 농도로 16시간 동안 전처리한 실험군에서 대조군에 비해 약 6%의 종양치사 활성도의 증가가 일어났으며, 다른 전처리 실험군들에서는 유



**Fig. 4.** Effects of diol saponin on the L929 tumoricidal activity of macrophage from C57BL/6J mouse. Macrophages were incubated with 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup>% diol saponin for 8-24 hours. After these incubations, thymidine-methyl-<sup>3</sup>H-labelled L929 tumor cells were added to the macrophages and incubated for 24 hours. Tumoricidal activity was measured by the scintillations of radioactivity of released <sup>3</sup>H from the tumor cells. The data is mean ± standard error of four assays.

의성 있는 증가가 나타나지 않았다(Fig. 4).

**3. LPS와 인삼분획물의 복합처리가 대식세포의 종양세포 치사 활성에 미치는 영향**

**Total saponin의 경우 :** LPS와 total saponin을 대

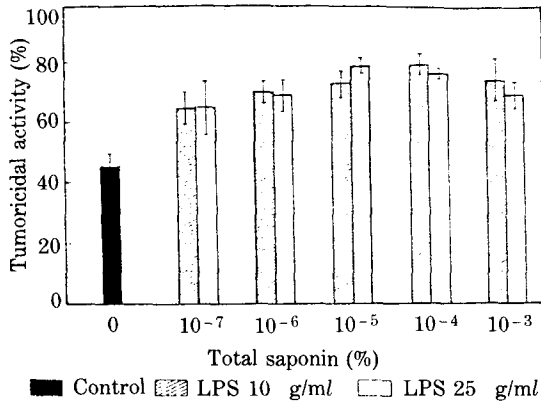


Fig. 5. Effects of total saponin and lipopolysaccharide on the L929 tumoricidal activity of macrophage from C57-BL/6J Macrophages were incubated with 10 or 25 µg/ml LPS and 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup>% total saponin for 16 hours. After these incubations, thymidine-methyl-<sup>3</sup>H-labelled L929 tumor cells were added to the macrophages and incubated for 24 hours. Tumoricidal activity was measured by the scintillations of radioactivity of released <sup>3</sup>H from the tumor cells. The data is mean ± standard error of four assays.

식세포에 16시간 동안 복합 전처리한 경우에 L929 종양세포에 대한 치사 활성도가 모든 경우에서 20% 이상 증가하였으며, 특히 LPS 10 µg/ml 농도와 total saponin 10<sup>-4</sup>% 농도의 복합처리 경우와 LPS 25 µg/ml 농도와 total saponin 10<sup>-5</sup>% 농도를 복합처리한 경우의 실험군에서 35% 정도의 치사 활성도 증가가 일어났다(Fig. 5).

**Triol saponin의 경우 :** LPS와 triol saponin을 대식세포에 16시간 동안 복합 전처리한 경우에도 L929 종양세포에 대한 치사 활성도가 모든 경우의 실험군들에서 대조군에 비해 20% 이상 증가하였으며, 10<sup>-5</sup>% 농도의 triol saponin과 10 µg/ml 농도 및 25 µg/ml 농도의 LPS와 복합처리한 실험군에서 각각 대조군에 비해 30%와 27%로 최고의 증가를 나타내었다(Fig. 6).

**Diol saponin의 경우 :** LPS와 diol saponin을 대식세포에 16시간 동안 복합 전처리한 경우에는, L929 종양세포에 대한 치사 활성도의 증가가 total saponin 및 triol saponin의 경우 보다는 적지만, 모든 실험군들에서 대조군에 비해 15% 이상의 증가가 나타났으며 특히 10 µg/ml 농도의 LPS와 10<sup>-6</sup>% 농도와 10<sup>-5</sup>% 농도의 diol saponin을 각각 복합 전처리한 경우의

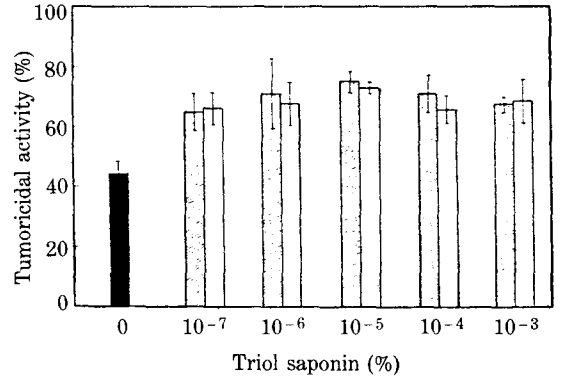


Fig. 6. Effects of triol saponin and lipopolysaccharide on the L929 tumoricidal activity of macrophage from C57-BL/6J Macrophages were incubated with 10 or 25 µg/ml LPS and 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup>% triol saponin for 16 hours. After these incubations, thymidine-methyl-<sup>3</sup>H-labelled L929 tumor cells were added to the macrophages and incubated for 24 hours. Tumoricidal activity was measured by the scintillations of radioactivity of released <sup>3</sup>H from the tumor cells. The data is mean ± standard error of four assays.

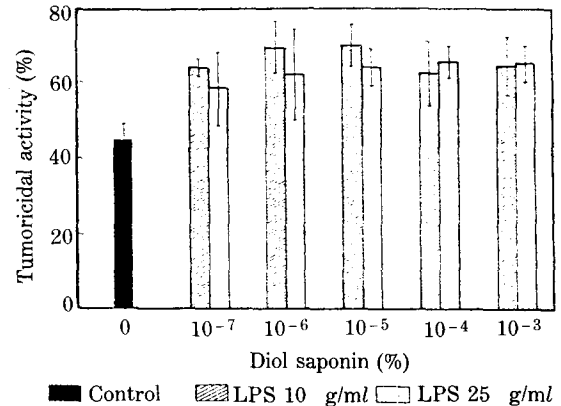


Fig. 7. Effects of diol saponin and lipopolysaccharide on the L929 tumoricidal activity of macrophage from C57BL/6J Macrophages were incubated with 10 or 25 µg/ml LPS and 10<sup>-7</sup>-10<sup>-3</sup>% diol saponin for 16 hours. After these incubations, thymidine-methyl-<sup>3</sup>H-labelled L929 tumor cells were added to the macrophages and incubated for 24 hours. Tumoricidal activity was measured by the scintillations of radioactivity of released <sup>3</sup>H from the tumor cells. The data is mean ± standard error of four assays.

실험군에서 25% 정도의 치사 활성도 증가가 나타났다 (Fig. 7).

#### 4. 대식세포 배양액의 상등액에 의한 종양세포 치사 활성도의 영향

**L929 종양세포에 대한 경우 :** LPS와 인삼분획물을 전처리한 경우, 대조군에 비해 30% 이상의 치사 활성도 증가가 나타났으며, 특히 LPS의 농도가 10 µg/ml인 경우가 25 µg/ml인 경우보다 치사활성도의 증가가 더욱 크게 나타났다(Table 1).

**EL4 종양세포에 대한 경우 :** EL4 종양세포의 경우도 L929와 비슷한 양상으로 치사 활성도의 증가가 나타났다. 그러나 증가되는 정도는 LPS의 농도가 10 µg/ml인 경우와 25 µg/ml인 경우가 모두 대조군에 비해 33-67% 정도의 증가로 비슷하게 나타났다(Table 2).

#### 5. 종양세포로 1차 자극한 대식세포 배양액의 상등액에 의한 종양세포 치사 활성도의 영향

**L929 종양세포에 대한 경우 :** L929종양세포로 대식세포에 1차 자극을 준 후 상등액에 의한 종양세포 치사 활성도를 측정된 결과 LPS와 인삼분획물을 복합

전처리한 실험군 모두에서 종양세포를 처리하지 않은 대조군에 비하여 뚜렷한 치사 활성도의 증가가 나타났다. 또한 L929 종양세포로 1차 자극을 준 실험군들 중에서 LPS와 인삼분획물로 자극을 주지 않은 대조군에 비해 복합 처리하여 준 실험군에서 LPS의 농도가 10 µg/ml인 경우에는 모두 100%이상, 그리고 25 µg/ml인 경우에는 total saponin과 triol saponin에서 각각 83%와 70%의 증가가 나타났다(Table 1).

**EL4 종양세포에 대한 경우 :** EL4 종양세포의 경우도 종양세포로 1차 자극을 받은 대식세포가 자극을 받지 않은 대식세포 실험군에 비하여 모든 경우에서 유의성 있는 증가가 일어났다. 종양세포로 자극을 준 실험군들 중에서는 LPS와 인삼분획물을 복합처리하여 준 경우 종양세포만으로 자극한 경우에 비하여 LPS의 농도가 10 µg/ml인 경우에는 53-64%, 25 µg/ml인 경우에는 31-40% 정도의 치사활성도의 증가가 나타났다(Table 2).

#### EL4로 1차 자극을 준 대식세포 배양액의 상등액에

**Table 1.** The L929 tumoricidal activity of supernatants of macrophage cultivated media

Treated with LPS and/or Saponin		Treated without L929 (A)		Treated with L929 (B)	
LPS (µg/ml)	saponin (%)	cpm of S.R.	% of cpm	cpm of S.R.	% of cpm
Non (control)		1455 ± 44	100	1473 ± 18	100
	C.S. (10 <sup>-4</sup> )	1854 ± 37	127	1993 ± 32	135
	T.S. (10 <sup>-5</sup> )	1710 ± 51	117	1775 ± 16	121
	D.S. (10 <sup>-5</sup> )	1473 ± 58	101	1525 ± 24	104
10		1546 ± 17	106	1686 ± 40	114
10	C.S. (10 <sup>-4</sup> )	2672 ± 25	183	3453 ± 33	234
10	T.S. (10 <sup>-5</sup> )	2337 ± 29	161	3288 ± 36	223
10	D.S. (10 <sup>-5</sup> )	2034 ± 34	140	3047 ± 21	207
25		1293 ± 55	89	2014 ± 11	137
25	C.S. (10 <sup>-4</sup> )	1910 ± 11	131	2703 ± 46	183
25	T.S. (10 <sup>-5</sup> )	1946 ± 17	134	2505 ± 23	170
25	D.S. (10 <sup>-5</sup> )	1712 ± 35	118	1797 ± 27	122
Total release		7688 ± 12			

Macrophages were cultivated with various concentrations of ginseng saponin and/or lipopolysaccharide.

Group A was cultivated with only ginseng saponin and/or LPS for 28-32 hours.

Group B was cultivated with ginseng saponin and/or LPS for 16 hours, and after this cultivation, L929 tumor cells were added to the macrophage for 12-16 hours.

After these cultivations, the supernatants of macrophage cultivated media were treated to the thymidine-methyl-<sup>3</sup>H labeled L929 tumor cells.

Tumoricidal activity was measured by the scintillations of radioactivity of released <sup>3</sup>H from the tumor cells. The data are mean ± standard error of six assays.

C.S.: Total Saponin, T.S.: Triol Saponin, D.S.: Diol Saponin S.R.: Specific Release.

Table 2. The EL4 tumoricidal activity of supernatants of macrophage cultivated media

Treated with LPS and/or Saponin		Treated without EL4 (A)		Treated with EL4 (B)	
LPS ( $\mu\text{g/ml}$ )	saponin (%)	cpm of S.R.	% of cpm	cpm of S.R.	% of cpm
Non (control)		1350 $\pm$ 27	100	1805 $\pm$ 32	100
C.S. ( $10^{-4}$ )		1972 $\pm$ 16	146	2234 $\pm$ 27	124
T.S. ( $10^{-5}$ )		1850 $\pm$ 34	137	2320 $\pm$ 43	129
D.S. ( $10^{-5}$ )		1725 $\pm$ 36	128	2200 $\pm$ 22	121
10		1319 $\pm$ 47	98	2194 $\pm$ 39	122
10	C.S. ( $10^{-4}$ )	2232 $\pm$ 22	165	2905 $\pm$ 34	161
10	T.S. ( $10^{-5}$ )	2045 $\pm$ 17	151	2968 $\pm$ 27	164
10	D.S. ( $10^{-5}$ )	1920 $\pm$ 17	142	2761 $\pm$ 44	153
25		1449 $\pm$ 32	109	1889 $\pm$ 31	105
25	C.S. ( $10^{-4}$ )	2471 $\pm$ 39	183	2531 $\pm$ 57	140
25	T.S. ( $10^{-5}$ )	2085 $\pm$ 18	154	2373 $\pm$ 21	131
25	D.S. ( $10^{-5}$ )	1937 $\pm$ 27	143	2472 $\pm$ 40	137
Total release		6992 $\pm$ 24			

Macrophages were cultivated with various concentrations of ginseng saponin and/or lipopolysaccharide.

Group A was cultivated with only ginseng saponin and/or LPS for 28-32 hours.

Group B was cultivated with ginseng saponin and/or LPS for 16 hours, and after this cultivation, EL4 tumor cells were added to the macrophage for 12-16 hours.

After these cultivations, the supernatants of macrophage cultivated media were treated to the thymide-methyl- $^3\text{H}$  labeled EL4 tumor cells.

Tumoricidal activity was measured by the scintillations of radioactivity of released  $^3\text{H}$  from the tumor cells. The data are mean  $\pm$  standard error of six assays.

C.S.: Total Saponin, T.S.: Triol Saponin, D.S.: Diol Saponin S.R.: Specific Release.

의한 L929 종양세포 치사 활성도에 대한 경우 : EL4 종양세포로 1차 자극을 준 대식세포의 배양액중 상등액만을 L929종양세포에 처리하여 준 경우 모든 경우의 실험군에서 종양세포로 1차 자극을 주지 않은 대조군에 비해 종양치사활성도의 유의성 있는 증가가 나타났다. 또한 대식세포에 종양세포만으로 1차 자극을 준 경우에 비하여 종양세포에 의한 1차 자극과 LPS 및 인삼분획물을 함께 처리한 경우에, 종양세포 치사 활성도 증가가 나타났다(Table 3).

본 실험에서는 생쥐 복강으로부터 얻은 대식세포에 LPS와 인삼분획물을 단독 또는 복합 처리하여 대식세포의 종양세포 치사활성도를 측정된 결과, 단독 처리한 경우보다 LPS와 인삼분획물을 복합처리한 경우에 그 증가 양상이 더욱 뚜렷하게 나타났다. 또한 triol saponin에서 total saponin과 비슷한 정도로 증가가 나타나는 것으로 보아 인삼분획물에 의한 대식세포의 자극 현상은 diol saponin 보다는 triol saponin에 의한 것으로 생각된다. 또한 이러한 대식세포에

의한 종양세포 치사활성의 증가가 대식세포로부터 분비되는 물질에 의한 것인지를 알아보기 위한 대식세포 배양액의 상등액에 의한 종양세포 치사 활성도의 측정 실험에서도 치사 활성도의 유의성 있는 증가가 나타났으며, 그 증가 양상이 종양세포를 직접 대식세포에 처리하여 준 것과 비슷하게 증가하였다. 따라서 위의 실험에서 치사 활성도의 증가가 나타나는 것이 대식세포로부터 분비되는 인자(factor)에 의한 것으로 생각되며, 이러한 치사활성 물질의 분비는 LPS와 인삼분획물의 처리만으로도 가능하지만 종양세포로 대식세포를 1차 자극 처리 하면 그 증가가 더욱 뚜렷하게 나타나는 것으로 보아 대식세포가 종양세포와 접촉하는 것이 이러한 치사 활성물질 분비에 또하나의 주요한 요소가 되리라 생각된다. 한편 EL4 종양세포로 자극을 준 후 상등액을 추출하여 L929 종양세포에 처리하여도 종양 치사활성이 나타나는 것으로 보아 대식세포로부터 분비되는 종양세포 치사 활성물질이 종양세포의 종류에 특이적으로 반응하지

**Table 3.** The L929 tumoricidal activity of supernatants of EL4 activated macrophage cultivated media

Treated with LPS and/or Saponin		Treated without L929 (A)		Treated with L929 (B)	
LPS ( $\mu\text{g/ml}$ )	saponin (%)	cpm of S.R.	% of cpm	cpm of S.R.	% of cpm
Non (control)		564 $\pm$ 32	100	801 $\pm$ 22	100
	C.S. ( $10^{-4}$ )	740 $\pm$ 17	131	1162 $\pm$ 16	145
	T.S. ( $10^{-5}$ )	616 $\pm$ 13	109	1066 $\pm$ 19	133
	D.S. ( $10^{-5}$ )	592 $\pm$ 14	105	732 $\pm$ 98	91
10		608 $\pm$ 26	108	1226 $\pm$ 21	153
10	C.S. ( $10^{-4}$ )	818 $\pm$ 17	145	1314 $\pm$ 24	164
10	T.S. ( $10^{-5}$ )	892 $\pm$ 34	158	1373 $\pm$ 12	171
10	D.S. ( $10^{-5}$ )	752 $\pm$ 21	133	1114 $\pm$ 18	139
25		615 $\pm$ 20	109	904 $\pm$ 27	113
25	C.S. ( $10^{-4}$ )	942 $\pm$ 8	167	1332 $\pm$ 32	166
25	T.S. ( $10^{-5}$ )	830 $\pm$ 24	147	1153 $\pm$ 15	144
25	D.S. ( $10^{-5}$ )	799 $\pm$ 19	142	1016 $\pm$ 43	127
Total release		3547 $\pm$ 22			

Macrophages were cultivated with various concentrations of ginseng saponin and/or lipopolysaccharide.

Group A was cultivated with only ginseng saponin and/or LPS for 28-32 hours.

Group B was cultivated with ginseng saponin and/or LPS for 16 hours, and after this cultivation, EL4 tumor cells were added to the macrophage for 12-16 hours.

After these cultivations, the supernatants of macrophage cultivated media were treated to the thymide-methyl- $^3\text{H}$  labeled L929 tumor cells.

Tumoricidal activity was measured by the scintillations of radioactivity of released  $^3\text{H}$  from the tumor cells. The data are mean  $\pm$  standard error of six assays.

C.S.: Total Saponin, T.S.: Triol Saponin, D.S.: Diol Saponin S.R.: Specific Release.

는 않는 것으로 나타났다. 한편 이러한 실험의 결과는 대식세포가 종양괴사인자나 다른 단백질을 분비하여 종양세포를 파괴시키며 대식세포와 종양세포의 접촉이 이런 단백질의 분비에 중요하다는 연구들과도 일치한다.<sup>18-20)</sup> 따라서 위의 실험결과들로 보아, 인삼분획물이 대식세포를 활성화시켜 종양세포 치사활성을 나타낼 수 있는 단백질의 분비를 촉진시킨다고 생각되며, 인삼분획물에 의한 종양세포 치사활성의 증가는 단순한 화학적 작용이 아닌 세포 수준에 작용되는 생화학적 혹은 생리적 영향의 결과임을 알 수 있다. 앞으로는 이러한 대식세포 자극물질에 의한 대식세포 활성화작용의 규명과 대식세포로부터 분비된 물질들의 정확한 작용 기작을 밝히기 위한 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 요 약

인삼분획물(total saponin, diol saponin, triol saponin)과 LPS의 복합처리가 생쥐 대식세포의 종양세포 치사 활성에 미치는 영향과 그 기작에 대하여 실험한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다. 인삼분획물 및 LPS를 단독처리 하여도 대식세포의 종양세포 치사 활성이 약간 증가되는 것으로 나타났다.

인삼분획물과 LPS를 복합처리 하면 대식세포의 종양세포치사 활성도가 대조군에 비해 뚜렷한 증가를 나타내었으며 total saponin과 triol saponin을 처리한 실험군에서 diol saponin을 처리한 실험군보다 현저한 치사 활성도 증가가 나타났다.

인삼분획물과 LPS만의 처리로도 대식세포로부터 종양세포 치사 활성을 갖는 물질이 분비되지만, 종양세포와의 접촉도 종양세포 치사활성 물질의 분비에 중요한 요인이 되는 것으로 나타났다. 위의 결과로부터 인삼분획물이 대식세포가 종양세포 치사활성을 갖는 인자를 분비하도록 유도하는 대식세포 자극물질로 작용할 수 있다는 것을 알 수 있다.



## 인용문헌

1. Unanue, E.R.: Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann. Rev. Immunol.*, **2**, 395 (1984).
2. Adams, D.O. and Hamilton, T.A.: The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.*, **2**, 283 (1984).
3. Gemsa, D., Debatin, K., Krammer, W., Kubelka, C., Deiman, W., Kees, U. and Krammer, P.H.: Macrophage-activating factors from different T cell clones induce distinct macrophage functions. *J. Immunol.*, **131**, 833 (1983).
4. Meltzer, M.S.: Macrophage activation for tumor cytotoxicity; Characterization of priming and trigger signals during lymphokine activation. *J. Immunol.*, **127**, 179 (1981).
5. Sevedersky, L.P., Benton, C.V., Berger, W.H., R.N., Rinderknecht, Harkins, R.N. and Palladino, M.A.: Biological and antigenic similarities of murine INR- and macrophage-activating factor. *J. Exp. Med.*, **159**, 812 (1984).
6. Johnson, W.J., Somors, S.D. and Adams, D.O.: Activation of macrophages for tumor cytotoxicity. *Contemp. Top. Immunol.*, **14**, 127 (1983).
7. Robinson, M.K. and Wheelock, E.F.: Identification of macrophage mediated cytolytic activity as a tumor suppressive mechanism during maintenance of the L5178Y-tumor dormant state in DBA/2 mice. *J. Immunol.*, **126**, 673 (1981).
8. Ruco, L.P., Meltzer, M.S. and Rosenstreich, D.L.: Macrophage activation for tumor cytotoxicity; Control of macrophage tumoricidal capacity by the LPS gene. *J. Immunol.*, **121**, 543 (1978).
9. Doe, W.F. and Henson, P.M.: Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides; Cytolytic effect on tumor target cells. *J. Exp. Med.*, **148**, 544 (1978).
10. Doe, W.F., Yang, S.T., Morrison, D.C., Betz, S.T. and Henson, P.M.: Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides; II. Evidence for differentiation signals delivered by lipid A and by a protein rich fraction of LPSs. *J. Exp. Med.*, **148**, 557 (1979).
11. Lansfargues, A., Charon, D., Trigalo, F., Ledur, A., Szabo, L. and Chaby, R.: Analysis of the lipopolysaccharide-induced cytostatic activity of macrophage by the use of synthetic (1986).
12. Weiel, J.E., Hamilton, T.A. and Adams, D.O.: LPS induces altered phosphate labelling of proteins in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, **136**, 3012 (1986).
13. Weinberg, J.B., Chapman Jr., H.A. and Hibbs Jr., J.B.: Characterization of the effects of endotoxin on macrophage tumor cell killing. *J. Immunol.*, **121**, 72 (1978).
14. Brekhman, I.I. and Dardymov, I.V.: On the pharmacology of individual panax ginseng and eleuthero-cocuss saponins. *The 11th Pacific Science Congress (Abstract)* (1966).
15. Katano, M., Yamamoto, H. and Matsunaga, H.: Antitumor substance from Korean red ginseng powder. *Pro. & Abs. 5th Intl. Ginseng Symposium* (1988).
16. Soldati, F.: Immunological studies of ginseng. *Proc. & Abs. 5th Ginseng symposium* (1988).
17. Wang, B.X., Liu, A.J. and Cui, J.C.: Study on the antitumor activity of ginseng polysaccharides. *5th Intl. Ginseng Symposium* (1988).
18. Somors, S.D., Mastin, J.P. and Adams, D.O.: The binding of tumor cells by murine mononuclear phagocytes can be divided into two qualitatively distinct types. *J. Immunol.*, **131**, 2086 (1983).
19. Somors, S.D., Wisnant, C.C. and Adams, D.O.: Quantification of the strength of cell-cell adhesion; The capture of tumor distinct staged. *J. Immunol.*, **136**, 1490 (1986).
20. Strassmann, G., Springer, T.A., Somers, S.D. and Adams, D.O.: Mechanisms of tumor cell capture by activated macrophages; Evidence for involvement of lymphocyte function associated [LFA]-1 antigen. *J. Immunol.*, **136**, 4328 (1986).