KOR. J. ENVIRON. TOXICOL.
Vol. 6, No. 1~2, 39~57 (1991)

마우스에 있어서 Diethylstilbestrol의 免疫毒性에 미치는 紅蔘 Ethanol 抽出物의 影響

이　덕　행·안　영　근*

서울시 보건환경연구원, *원광대학교 약학대학

The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Immunotoxicity of Diethylstilbestrol in ICR Mice

Lee, Duk-Heung and Ahn, Young-Keun*

Seoul Metrolpolitan Government Institute of Health and Environmental Research

**College of Pharm., Won Kwang Univ.*

ABSTRACT

The effect of red ginseng ethanol extract on the immunotoxicity of diethylstilbestrol (DES) was studied in ICR mice.

ICR male mice were divided into 5 groups (10 mice/group), and red ginseng ethanol extract (50, 100 and 200 mg/kg body wt., respectively) and DES (1 mg/kg body wt.) were injected intraperitoneally (i.p.) to ICR mice once a day for 2 weeks. Mice were sensitized and challenged with sheep red blood cells (S-RBC). Immune response were evaluated by humoral immunity, cell-mediated immunity, non-specific immunity, and circulating leukocyte counts.

The results of this study were summarized as followings:

1. The DES-treated control group as compared with normal group showed the tendency to decrease body weight rate and relative liver weight, decreased both humoral and cellular immune responses, phagocyte activity, and circulating leukocyte counts, but increased the natural killer (NK) cell activity.

2. Compared with the DES-treated control group, DES plus red ginseng ethanol extract-treated groups significantly decreased the body weight rate ($P<0.01$). Relative liver weight was significantly decreased in DES plus red ginseng ethanol extract (50 mg/kg)-treated group ($P<0.01$), but significantly increased in DES plus red ginseng ethanol extract (100 mg/kg)-treated group ($P<0.01$). Relative spleen and thymus

weights were significantly enhanced in DES plus red ginseng ethanol extract (100 mg/kg)-treated group ($P<0.01$), but significantly decreased in DES plus red ginseng ethanol extract (200 mg/kg)-treated group ($P<0.01$).

3. Both humoral and cellular immune responses were significantly decreased in DES plus red ginseng ethanol extract-treated groups rather than in the DES-treated control group ($P<0.01$). Especially, it weakened the decrease in DES plus red ginseng ethanol extract (100 mg/kg)-treated group.

4. Phagocyte activity and circulating leukocyte counts were significantly decreased in DES plus red ginseng ethanol extract-treated groups rather than in the DES-treated control group ($P<0.01$). Especially, it weakened the decrease in DES plus red ginseng ethanol extract (100 mg/kg)-treated group. NK cell activity was significantly enhanced in DES plus red ginseng ethanol extract (100 mg/kg)-treated group ($P<0.01$), but significantly decreased in DES plus red ginseng ethanol extract (50 and 200 mg/kg)-treated groups ($P<0.01$).

緖 論

Diethylstilbestrol(以下 : DES)는 stilbene 誘導體로서[1] 合成 estrogen의 하나이다[2,3]. DES는 皮膚, 粘膜 및 消化器官을 通하여 迅速히 吸收되어 主로 肝臟에서 代謝되며 蛋白合成을 促進하고 女性卵胞 hormone 作用에 依해 更年期障碍, 多毛症, 前立腺癌, 月經困難症, 卵巢發育不全 및 乳汁分泌抑制 等에 有効하다[4,6]. DES는 組織內에서 대부분 破壞되며 肝臟에서 不活性化되어 主로 glucuronide가 되며 一部는 non-conjugate form으로 다같이 尿로 排泄된다[7].

DES의 長期間 또는 過量投與에 있어서는 食慾不振, 惡心, 嘔吐, 頭痛, 水分貯溜 및 血栓性 靜脈炎 等의 毒性이 나타난다[8,9].

Kennedy 等은 DES가 女性에 있어서 乳房癌發生을 抑制한다고 하였으며, Flocks 等은 DES가 男性에 있어서 前立腺癌發生에 對한 抑制效果를 報告하였다[10,11]. 이와는 反對로 Gass 等은 DES가 mouse에 있어서 乳房癌의 發生率을 增加시킨다고 報告하였으며[12,13], Herbst 等은 사람에게 DES에 依한 發癌性이 있다 하였고[14,15], Vorherr 等은 rat에 있어서는 發癌性과 더불어 畸形發生頻度率을 增加시킨다고 하였다[16].

DES는 Althaus, Martin 및 Tsutsui 等에 依한 rat에 있어서의 實驗에서 肝細胞와 Hela 細胞 및 Hamster 胎兒細胞에 DNA 合成을 誘發함에 依해 變異原性을 가져 온다고 報告하였고[17~19], Hill 等과 Rüdiger 等은 姉妹染色分體交換法(sister chromatid exchange)에 依한 追究에서 DES의 變異原性을 檢出하였다[20,21].

免疫毒性에 關하여는 Kalland 等과 Luster 等이 mouse를 利用한 實驗에서 DES가 mitogen에 對한 抗體反應, 遲延型過敏反應(以下 : DTH) 및 淋巴球의 反應을 抑制시켜 體液性免疫과 細胞性免疫을 低下시킨다는 것을 報告하였으며[22,23], Greenman 等은 mouse에 있어서 DES의 急性毒性은 胸腺의 萎縮을 招來한다 하였고[24], Luster 等과 Kalland 等은 mouse에 있어서 DES를 短期間 過量을 急性投與했을 때 抗體反應, DTH 및 mitogen에 對한 淋巴球의 反應 等을 抑制한다고 報告하였다[25,26]. 한편 Hosapple 等은 mouse에 있어서 慢性毒性은 混合淋巴球反應과 DTH를 抑制시켜 細胞性免疫을 低下시킨다고 報告하였다[27].

人蔘(Panax ginseng)은 神農本草經에 上藥으로 수록되어 있으며[28], 東洋에서는 重要한 藥材로서 알려져 왔으며[29], 1920年代 以後 人蔘의 藥理作用

에 關한 數多한 硏究가 遂行되었다[30~40]. Cha 等은 人蔘의 石油 ether 抽出物分劃의 polyacetylene 系列의 成分이 in vitro에서 L5178 Y cell과 sarcoma 180 cell 等에 對하여 强力한 抗癌效果가 있음을 報告하였으며[41], 그 後 Hwang 等과 Yun 等에 依하여 追試되어 같은 結果를 얻었다[42,43]. Yun 等은 여러가지 化學的 發癌劑에 依한 肝癌과 肺癌의 誘發이 紅蔘의 投與로 抑制되었다고 報告하였다[44]. Han 等은 N-methyl-N-nitroso-N-nitroguanidine에 依한 胃, 十二指腸癌의 發生이 白參의 石油 ether 抽出物 投與로 抑制되었다고 報告하였고[45], Ha 等은 人蔘의 ethanol 抽出物을 0.5 mg/day씩 15日間 前處置한 mouse에서 methylcholanthrane을 2個月 以上 塗布하였을 때 평편상피癌의 發生이 對照群에 比해 有意하게 抑制됨을 報告하였고[46], Murata 等은 人蔘部分 精製物인 prostisol을 3個月 以上 長期間 服用시킨 結果 胃癌, 大腸癌 및 膵腸癌 患者에서 約 70%의 改善效果를[48], Im 等은 人蔘의 石油 ether 抽出物에 依해 核酸代謝에 關與하는 NDP_{ase}(Nucleoside diphosphatase) 活性이 正常細胞에서 보다 癌細胞에서 더욱 選擇的으로 抑制된다는 것을 報告하였다[49].

人蔘의 免疫機能에 關한 硏究로는 Jie 等이 人蔘의 水浸液이 抗體生産을 亢進시켰으며, 特히 natural killer cell(NK cell)의 活性에 顯著한 影響을 미친다고 하였고[50], Ahn 等은 mitomycin C와 benzo(a)pyrene에 依한 免疫機能抑制作用에 對하여 人蔘의 n-butanol 分劃이 體液性免疫修飾作用이 있다 하였으며, 人蔘의 ethanol 抽出物은 體液性 및 細胞性免疫修飾作用이 있는데, 特히 人蔘의 石油 ether 抽出物은 體液性 및 細胞性免疫修飾作用이 顯著하다고 報告하였다[51,52]. Ha 等은 15日間 人蔘의 ethanol 抽出物로 前處置한 mouse의 脾臟細胞를 여러 濃度의 人蔘抽出物로 in vitro에서 자극시킨 後 標的細胞에 對한 NK cell의 活性을 測定한 바, 有意한 增加가 있다 하였으며[46], Kim 等은 人蔘과 抗癌劑의 併用投與로 mouse의 免疫機能回復效果가 있음을 報告하였다[53]. Hong 等은 adjuvant 관절염에 對한 人蔘의 saponin의 影響을 調査한 結果 DTH 反應을 促進시킨다고 하였으나[54], 林 等은 sarcoma 180 cell로 移植된 mouse에서 人蔘의 saponin에 依해 picryl chloride에 對한 DTH 反應에 미치는 影響을 調査한 바 아무런 影響을 發見할 수 없었다고 하여 否定適인 見解를 把握한 바 있고[55], Yeung 等은 人蔘의 total saponin이 Influenza virus에 感染된 mouse에 있어서 NK cell의 活性에는 影響이 없었으나 virus 感染前에 投與하였을 때는 오히려 DTH 反應을 抑制한다고 報告하였다[56].

앞에서 본 바와 같이 DES의 生體機能 및 免疫反應에 對한 毒性硏究는 많이 進行되어 왔으나, 紅蔘抽出物과 聯關시킨 免疫影響에 關한 硏究는 報告된 바 없다.

따라서 著者 等은 DES를 長期間 投與한 者나 DES를 製造하는 化學工場 勤務者 및 動物飼育者에 있어서 DES 暴露로 惹起되는 免疫抑制作用에 對한 紅蔘抽出物의 免疫修飾效果가 期待되어, 本 實驗을 實施하여 몇가지 知見을 얻었기에 報告하는 바이다.

實驗 材料 및 方法

1. 實驗 動物

生後 5~6週齡, 體重 17~21 g의 ICR 雄性의 mouse를 慶南畜産(京畿道 花城郡 所在)에서 分讓을 받아 市販飼料(第一飼料 Co. : 粗蛋白質 22.5% 以上, 粗脂肪 35% 以上, 粗纖維 7.0% 以下, 粗凶分 10.0% 以下, 칼슘 0.7% 以上)로 1週間 給食시켜 適應시킨 後에 10마리를 1群으로 하고, 全體를 5群으로 分離하여 溫度 23±2度, 濕度 50~60%의 飼育室에서 2週間 飼育하였다.

2. 供試藥物의 調製 및 投與

① DES 溶液의 調製 및 投與

DES(Sigma Co. LTD)를 olive oil에 溶解하여 1 mg/kg씩을 對照群 및 實驗群에 2週間 1日, 1回 一定한 時刻에 腹腔內 注射하였다. 그리고 正常群은 olive oil 10 *ml*/kg을 同一한 方法으로 投與하였다.

② 紅蔘의 ethanol 抽出物의 調製 및 投與

70% ethanol(Merk pharmaceutical Co. LTD)에 紅蔘細末(天參) 50 g을 넣고 70度의 水溶上에서 3時間 抽出하고 이를 濾過한 다음, 그 濾液을 徐徐히 減壓濃縮하여 紅蔘의 Ethanol 抽出物을 얻고, 이것을 phosphate buffered saline(以下 PBS ; Gibco Laboratories Co., pH 7.4)에 현탁시켜 各各 50, 100 및 200 mg/kg의 濃度로 하여 各 實驗群에 2週間 1日, 1回 一定한 時刻에 腹腔內 注射하였다.

3. 體重 및 臟器의 重量計測

① 體重 : 實驗動物의 體重은 藥物投與 開始日과 最終日 約 24時間 前에 切食시킨 後, 同一한 時間에 測定하였다.

② 臟器의 重量 : 藥物投與 2日 後에 實驗動物의 頸動脈을 切斷 採血한 後 肝臟, 脾臟 및 胸腺을 各各 適出하여 그 重量을 測定하여 對 體重 百分比를 求하였다.

4. 抗原의 調製 및 免疫

① 抗原 : 本 實驗에서는 緬羊 赤血球(Sheep Red Blood Cell 以下 S-RBC)를 使用하였다. 卽 雄性緬羊의 頸動脈으로부터 heparin 處理注射器로 採血한 後, 同量의 Alsever's 液(pH 6.1)을 加하여 4℃에서 保存하여 2週日 以內에 使用하였다. 保存中인 S-RBC를 使用할 때에는 使用 直前 PBS로 3回 遠心洗滌한 後, 적절한 濃度를 Hanks Balanced Salt Solution(以下 HBSS : Gibco laboratories co.)에 浮遊하여 使用하였다.

② 免疫 : 遠心洗滌한 S-RBC를 Reed 等의 方法에 따라[57] HBSS에 1×10^8 S-RBC/ml의 濃度를 浮遊하고, 浮遊液 0.1 ml(1×10^7 S-RBC)를 最終日 5日前에 mouse의 尾靜脈에 注射하여 1次免疫을 實施하였다. 2次免疫을 1次免疫 4日 後에 mouse의 左側後肢足蹠皮內에 2×10^9 S-RBC/ml 浮遊液 0.05 ml(1×10^8 S-RBC)를 注射하여 免疫을 實施하였다.

5. 血淸의 分離 및 非動化

mouse의 頸動脈을 切斷하여 血液을 採血 凝固시킨 後, 遠心分離하여 血淸을 分離하고 56℃에서 30分間 非動化시킨 後, 4℃에서 保存하여 使用하였다.

6. 赤血球凝集素價(Hemagglutination titer 以下 ; HA titer) 및 2-mercaptoethanol (以下 ; 2-ME) 耐性凝集素價의 測定[58,59]

① HA titer의 測定

S-RBC의 凝集素價를 microtitration tray(Nuclon micro test tray)를 使用하여 다음과 같이 實施하였다. 卽 各 實驗動物로부터 얻은 各 非動化血淸을 各 well culture plate에 HBSS로 2倍 系列로 稀釋한 後 HBSS에 浮遊한 0.5% S-RBC 0.05 ml를 잘 混合한 다음 37℃에서 18時間 靜置하여 赤血球의 凝集類型을 觀察하였으며, 凝集을 일으키는 血淸의 最高 稀釋度를 그 血淸의 凝集素價로 하였다.

② 2-ME耐性凝集素價의 測定

各 血淸의 2-ME 耐性凝集素價를 判定하기 爲하여, 0.15 N 2-ME(Eastman Kodak Co.)로 血淸을 處理하여 2-ME 耐性抗體를 immunoglobulin G (IgG) 抗體로, 2-ME로 處理하기 前의 抗體를 2-ME 感受性 抗體 또는 IgM 抗體로 判讀하는데, 判讀方法은 다음과 같이 實施하였다. 즉 血淸의 2-ME 處理는 0.15 N 2-ME가 含有된 HBSS로 血淸을 稀釋하고 蒸發하지 않도록 tray를 密封하여 37℃에서 30分間 放置한 後, S-RBC를 加하여 凝集素價를 上記한 方法으로 檢査하였다.

7. 足蹠腫脹反應 檢査(Foot pad swelling test)

antibody-mediated hypersensitivity(以下 ; Arthus) 및 遲延型過敏反應(Delayed Type Hypersensitivity 以下 ; DTH)을 測定하기 위하여 Yoshikai 等의 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다[60]. 卽 1次免疫 4日 後에 S-RBC 0.05 ml(1×10^8)를 mouse의 左側後肢足蹠에 皮內注射하였다.

注射後 一定時間 經過한 後, 腫脹의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper(Mitutoyo mfg. co. ltd)로 測定하였으며, 腫脹程度의 測定價는 測定에 따른 誤差를 피하기 위하여 2回 測定한 數値를 平均하였다. 判讀基準은 Sugimoto의 判讀基準에 따라[61] 3時間 經過 後의 反應을 Arthus 反應, 24時間 經過後의 反應을 遲延型過敏反應(DTH)으로 看做하였으며 足蹠腫脹指數는 다음과 같이 計算하였다.

$$\text{Foot pad swelling index (FPSI)} = \frac{\text{腫脹두께} - \text{正常두께}}{\text{正常두께}} \times 100$$

8. 脾臟細胞 浮遊液의 調製[57]

脾臟을 mouse로부터 無菌的으로 適出하여 Minimum Essential Medium(以下 MEM : Gibco laboratories co.)에서 조심스럽게 粉碎한 後 nylon mesh로 濾過하여 死細胞塊를 除去하였으며, 寒冷 MEM으로 4℃에서 3回 遠心洗滌한 後, 脾臟細胞數가 2×10^7 cells/ml가 되도록 HBSS에 浮遊시켰으며, 每 實驗때마다 脾臟細胞의 生存率 檢査를 trypan blue exclusion method로 다음과 같이 實施하였다. 卽 試驗管에 0.3 ml의 細胞 浮遊液을 넣은 後, 0.1 ml의 trypan blue dye 溶液을 加하여 5分 經過 後 血球計算板에서 無色 生細胞와 赤色으로 染色된 死細胞의 數를 測定한 後, 그 百分率을 計算하였다. 이때 細胞生存率이 95% 以上 되게끔 조정하여 計算하였다.

9. 脾臟細胞의 Rosette 形成細胞(以下 RFC)의 檢出

脾臟細胞의 rosette 形成細胞의 檢査는 Garvey 等 및 Elliot 等이 記述한 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다[52,63]. 卽 脾臟細胞 浮遊液(2×10^7 cells/ml) 0.025 ml를 試驗管에 넣은 後, HBSS에 浮遊한 S-RBC(2×10^8/ml) 0.025 ml를 넣고 混合하여, 200×g에서 12分間 遠心分離한 後, 4℃에서 2時間 放置하였다. 그 後 조심스럽게 흔들어 再浮遊시킨 後, 이 再浮遊液 1適을 血球計算板에 點適하고 RFC를 檢鏡 觀察하였다. 檢鏡時 脾臟細胞에 S-RBC가 3個以下 부착한 細胞를 RFC로 判定하여 다음 式에 依하여 計算하였다.

$$\text{Rosette forming cell \%} = \frac{\text{No. of rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \text{\% Viability}} \times 100$$

10. 脾臟細胞의 溶血斑形成細胞數에 미치는 影響 (Plaque forming cell 以下 ; PFC)

① 脾臟細胞의 溶血斑形成細胞數의 測定은 Cunningham의 方法을 利用하여 다음과 같이 行하였다[64]. 適出한 脾臟을 水冷시킨 HBSS와 함께 粉碎하여 脾臟細胞를 遊離시키고, 400×g에서 5分間 遠心分離하여 上澄液을 除去 後 37℃의 0.83% NH_4Cl 溶液에 浮遊시켜, 3分間 靜置하여 赤血球를 溶解시켜 遠心分離하여 水冷시킨 HBSS에 浮遊시켜 赤血球를 除去, 脾臟細胞數를 血球計算板에서 檢鏡觀察하였다.

② S-RBC를 PBS로 4回 洗滌하고(400×g, 5分), 마지막 洗滌 後 PBS에 4×10^9 S-RBC/ml의 濃度로 浮遊시켰다.

③ 4×10^9 S-RBC를 250 μl로 guinea pig complement(Gibco lab. co. ltd) 500 μl로 混合하여, ice bath 上에서 30分間 靜置 後 使用하였다.

④ 上記 guinea pig complement와 4×10^9 S-RBC 混合液 150 μl, 脾臟細胞 浮遊液 650 μl를 잘 混合하여 microchamber(Takhashi, Gikon glass 76×26 mm)에 100 μl씩 注入하고, wax-vaseline(1 : 1)으로 밀봉하여 CO_2 incubator (37℃)에서 1時間 培養 後, 形成된 溶血斑(plaque forming cell) 數를 間接光線下에서 測定하였다.

⑤ 百萬個의 脾臟細胞中 溶血斑形成細胞數 (RFC/10^6 spleen cell) 및 全脾臟細胞中의 溶血斑形成細胞(PFC/total spleen cell)를 다음 式에 따라 計算하였다.

$$\text{PFC}/10^6 \text{ spleen cell} = \frac{N}{C \cdot V_m \cdot a} \times 10^6$$

$$\text{PFC/total spleen cell} = \frac{\text{PFC}}{10^6 \text{ spleen cell}} \cdot C \cdot V_s$$

단, $a=\frac{650}{800}$(培養混合液中의 脾臟細胞 浮遊液의 比率)

N : The number of plaque observed in micro-chamber.

C : The count of spleen cell in 1 *ml* of spleen cell suspension.

V_s : Total volume of spleen cell suspension (*ml*).

V_m : Volume of incubation mixture filled into a microchamber (*ml*).

11. Natural killer cell activity에 미치는 影響

藥物投與 最終日로부터 2日後에 mouse를 致死시켜, 前述한 方法으로 脾臟細胞를 分離하여 RPMI 1640 培地에 $2\times10^7/ml$의 濃度로 현탁시켜 effector cell로서 利用하였다. 標的細胞로는 YAC-I cell을 利用하였으며, Kiesseling 等의 方法으로[65] 放射線 同位元素 sodium chromate(에너지 硏究所에서 分讓)를 labeling한 後, 2×10^5 cell/*ml*의 濃度로 浮遊시켜 使用하였다. 이때 細胞生存率이 95% 以上 되게 하였다. 作動細胞(淋巴球)와 標的細胞의 比率은 100 : 1 및 50 : 1로 하였다. ^{51}Cr이 標識된 標的細胞(2×10^5 cells/*ml*) 100 μl와 作動細胞(1×10^7 cells/*ml*) 100 μl를 各 96 well tissue culture plate(Flow-Lab., U.S.A.)에 잘 混合한 後, 37℃ 5% CO_2 incubator(Forma, U.S.A.)에서 5時間 incubation하였다. 이 tissue culture plate를 500×g에서 10分間 遠心分離한 後, 上澄液 100 μl씩을 取하여 gamma counter(Beckman, U.S.A.)로 radioactivity를 測定하였다. 各 實驗은 3倍數(triplicate)로 實施하였으며, percent specific lysis를 다음의 式에 依하여 算出하였다.

$$\%\ \text{Specific lysis}=\frac{\text{c.p.m. in experiment}-\text{c.p.m. spontaneous release}}{\text{c.p.m. maximal release}-\text{c.p.m. spontaneous release}}$$

여기에서

c.p.m. in experiment : 實驗群의 上澄液 100 μl의 放射線量

c.p.m. spontaneous release : 作動細胞가 들어 있지 않고 標的細胞만 들어 있는 對照群의 上澄液 100 μl의 放射線量

c.p.m. maximal release : 標的細胞(10^4 cells in 100 μl)에 triton x-100 1% 溶液 100 μl를 加하여 얻었으며 標識된 放射能의 95% 以上이 되게 하였다.

c.p.m. spontaneous release : c.p.m. maximal release의 10% 以內 되게 하였다.

12. 大食細胞의 活性檢査

大食細胞의 貪食能力 測定은 Biozzi 等의 方法에 準하여 다음과 같이 實施하였다[66]. 卽 最終藥物投與 2日後에 rotring ink를 滅菌蒸溜水에 녹인 1% gelatin液으로 6倍 稀釋한 懸濁液을 調製하여 37℃에 保管하였다. 調製한 colloid狀의 炭素懸濁液을 mouse 體重 g當 0.01*ml*씩 mouse의 尾靜脈內로 注射하였다. 그 後 mouse의 眼窩後部靜脈血管叢(retro-orbital plexus)을 calibrated heparinized capillary tube(20 μl ; micro hemorit)로 穿刺하여 20 μl의 血液을 10分, 20分 및 30分 間隔으로 各各 採血하여, 0.1% sodium carbonate 溶液 2 *ml*가 든 vial에 넣어서 赤血球가 溶解되도록 잘 混和하였다. 이어서 吸光度를 600 nm에서 測定하고 다음의 公式으로 計算하였다. 實驗動物의 體重, 肝臟 및 脾臟의 무게를 測定하고, 이들로부터 phagocytic coefficient 및 corrected phagocytic index를 計算하였다.

$$\text{Corrected phagocytic index}=\frac{W}{L+S}\times\sqrt[3]{K}$$

W : Body weight

L : Liver weight

S : Spleen weight

K : Phagocytic coefficient(測定濃度의 10倍數를 log로 轉換하고, 時間에 對하여 plot한 graph 曲線)

13. 末梢循環白血球數의 測定

mouse의 眼球靜脈叢으로부터 末梢循環을 採血하여 Türk 液으로 稀釋하여 血球計算板上에 適下한 後, 白血球總數를 測定하였다.

14. 統計學的 分析

모든 資料는 mean±standard deviation로 나타내었으며, 有意性檢定은 student's t-test로 行하였다[67].

實驗 結果

mouse에 있어서 DES의 免疫毒性에 미치는 紅蔘의 ethanol 抽出物의 影響을 究明하고자 實施한 本實驗의 結果는 다음과 같다.

1. 體重, 肝臟, 脾臟 및 胸腺의 重量變化

① 體重의 變化

各 群의 體重 變化는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 正常群이 11.81±0.03%의 增加率을 보인 반면 DES를 單獨投與한 對照群에서는 25.44±0.03% 增加率을 보였고, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50, 100 및 200 mg/kg 併用投與한 群에서는 各各 17.82±5.03(P<0.01), 11.77±0.55(P<0.01) 및 6.02±0.12(P<0.01)의 增加率을 보여 對照 群에 比하여 用量 依存的으로 體重增加率의 有意한 減少를 나타내었다.

② 肝臟의 體重變化

各 群의 肝臟의 重量變化와 肝臟重量 對 體重比는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 肝臟 對 體重重量比는 正常群이 5.33±0.77%의 增加率을 보였으며, 對照群에서는 7.01±1.39%의 增加率을 보였다. 그러나 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 mg/kg 併用投與群은 6.06±0.71%(P<0.01)로 對照群에 比하여 有意한 減少를 보였으나, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 9.73±1.84(P<0.01) 및 7.20±0.68로 增加를 보였으며, 特히 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群은 有意한 增加를 나타내었다.

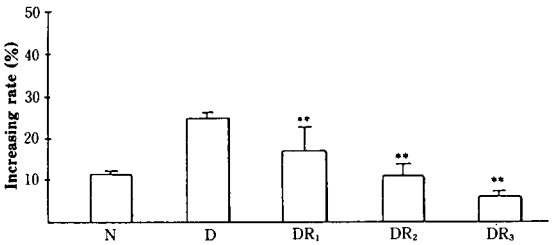

Fig. 1. The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Influence of Diethylstilbestrol (DES) on the Body Weight in ICR Mice.

N : Normal (Vehicle) D : DES 1 mg/kg (control)

DR_1 : DES 1 mg/kg+Red ginseng ethanol extract 50 mg/kg

DR_2 : DES 1 mg/kg+Red ginseng ethanol extract 100 mg/kg

DR_3 : DES 1 mg/kg+Red ginseng ethanol extract 200 mg/kg

Diethylstilbestrol (DES ; 1 mg/kg) and red ginseng ethanol extract (50, 100 and 200 mg/kg, respectively) were injected intraperitoneally to ICR mice once a day for 2 weeks.

Each value is the mean±S.D. of results obtained from 10 mice.

Asterisks denote the significances of the difference between DES-treated control group and DES plus red ginseng ethanol extract-treated groups (* *, P<0.01).

Histogram denote diethylstilbestrol-treated group and diethylstilbestrol plus red ginseng ethanol extract-treated groups.

Ordinate : increasing rate in percentages.

Abscissa : drug-treated group.

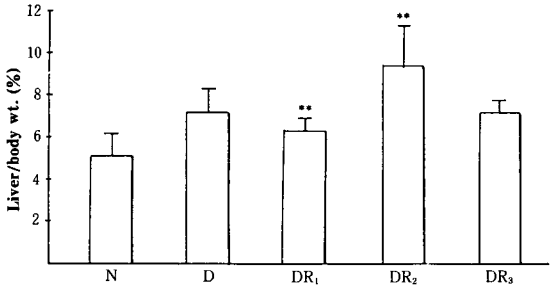

Fig. 2. The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Influence of Diethylstilbestrol (DES) on the Liver Weight in ICR Mice.

Other legends and methods are the same as described in Fig. 1.

③ 脾臟 및 胸腺의 重量變化

脾臟의 重量變化는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 脾臟 對 體重 重量比가 正常群이 0.66±0.12이고, 對照群이 0.65±0.13인데 比해 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 100 mg/kg 併用投與群은 各各 0.70±0.20 및 0.88±0.43(P<0.01)로 增加를 보였으며, 特히 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群에서 有意性 있는 增加를 나타냈으나, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 200 mg/kg 併用投與群에서는 0.54±0.15(P<0.01)로 有意한 減少를 보였다.

또한 胸腺 對 體重 重量比는 正常群과 對照群에서 各各 0.07±0.73 및 0.05±0.02로 差異가 있었다. DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 100 mg/kg 併用投與群 은 對照群에 比해 各各 0.08±0.05(P<0.01) 및 0.09±0.02(P<0.01)로 有意한 增加를 보였으나, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 200 mg/kg 併用投與群은 0.02±0.01(P<0.01)로 對照群에 比해 有意한 減少를 보였다.

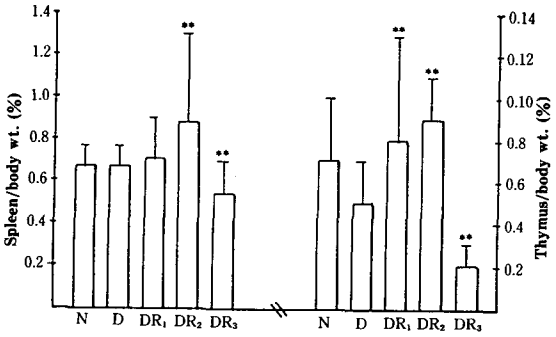

Fig. 3. The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Influence of Diethylstilbestrol (DES) on the Lymphoid Organ Weight in ICR Mice.

Other legends and methods are the same as described in Fig. 1.

2. 體液性免疫에 미치는 影響

① 赤血球 凝集素價와 2-mercaptoethanol(2-ME) 耐性凝集素價

供試 藥物을 2週間 投與한 後, 緬羊赤血球로 免疫하여 測定한 赤血球 凝集素價 즉 總抗體價와 2-ME 耐性凝集素價 즉 IgG 抗體價는 Fig. 4와 같다.

赤血球凝集素價는 正常群이 8.97±0.89이고, 對照群은 8.71±0.69인데 比하여 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50, 100 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 7.00±0.21(P<0.01), 8.00±0.71(P<0.01) 및 0.65±0.76(P<0.01)으로 有意한 減少를 보였다.

또한 2-ME 耐性凝集素價는 正常群이 6.50±1.12이고, 對照群은 6.30±1.15인데 比하여 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50, 100 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 6.25±0.43, 6.25±0.43 및 5.33±0.47(P<0.01)로 減少를 보였으며, 特히 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 200 mg/kg 併用投與群에서는 有意性있는 減少를 나타내었다.

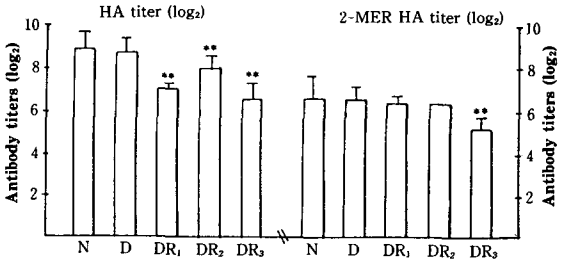

Fig. 4. The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Influence of Diethylstilbestrol (DES) on the Antibody Production in ICR Mice.

Other legends and methods are the same as described in Fig. 1.

② Arthus 反應(Antibody-mediated hypersensitivity)

Arthus 反應의 結果는 Fig. 5에서 보는 바와 같으며, 足蹠腫脹의 두께는 正常群이 17.96±1.74이고, 對照群이 5.67±1.77인데 比해 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50, 100 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 5.48±3.43, 4.29±2.85(P<0.01) 및 2.82±0.14(P<0.01)로 用量依存的인 有意한 減少를 보였고, 特히 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 및 200 mg/kg 併用投與群에서 有意한 減少를 보였다.

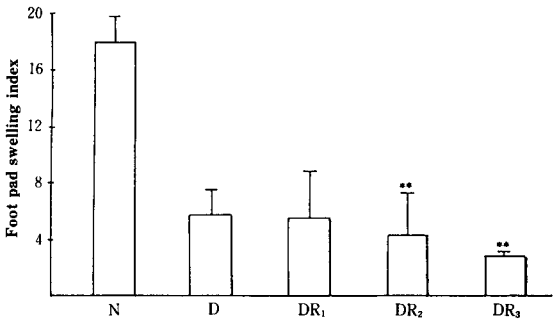

Fig. 5. The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Influence of Diethylstilbestrol (DES) on the Arthus Reaction in ICR Mice.

Other legends and methods are the same as described in Fig. 1.

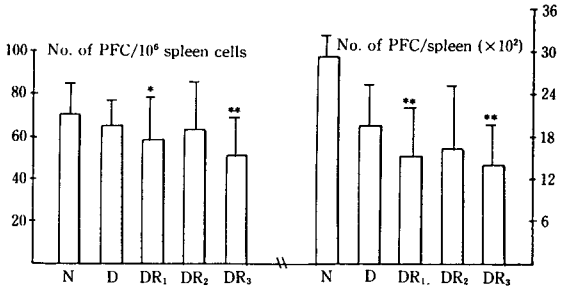

Fig. 6. The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Influence of Diethylstilbestrol (DES) on the Hemolytic Plaque Forming Cell (PFC) in ICR Mice.

Other legends and methods are the same as described in Fig. 1 (*, $P<0.05$).

③ 脾臟細胞의 溶血斑形成細胞數에 미치는 影響

脾臟細胞의 溶血斑形成細胞數에 對한 結果는 Fig. 6에서 보는 바와 같이, 10^6 濃度의 脾臟細胞에서는 正常群이 71.00±13.02이고, 對照群은 64.80±12.12인데 比해 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50, 100 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 59.29±19.50($P<0.01$), 62.00±23.64 및 51.04±17.26($P<0.01$)으로 減少를 보였는데, 特히 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 200 mg/kg 併用投與群에서 역시 有意한 減少를 나타내었다.

또한 10^2 濃度의 脾臟細胞에서는 正常群이 29.11±4.08이고, 對照群인 DES 單獨投與群은 18.44±7.21인데 比하여 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50, 100 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 14.46±7.22($P<0.01$), 16.21±8.26 및 12.67±6.67($P<0.01$)로 減少를 보였는데, 特히 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 200 mg/kg 併用投與群에서 有意性이 있었다.

3. 細胞性免疫에 미치는 影響

① 遲延型過敏反應(Delayed type hypersensitivity)

遲延型過敏反應의 結果는 Fig. 7에서 보는 바와 같다. 正常群이 4.69±0.54이고, 對照群은 4.25±0.45이었으며, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50, 100 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 2.05±1.04($P<0.01$), 2.14±0.94($P<0.01$) 및 1.04±0.37($P<0.01$)로 對照群에 比하여 모두 有意한 減少를 보였다.

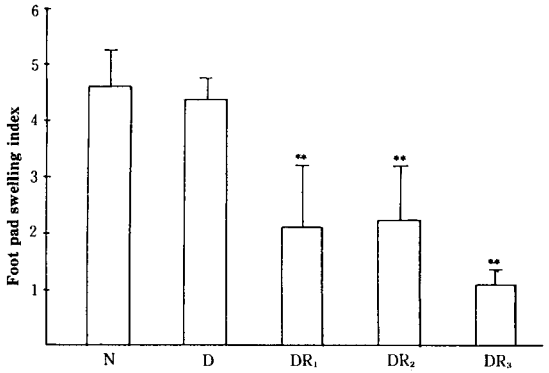

Fig. 7. The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Influence of Diethylstilbestrol (DES) on the Delayed Type Hypersensitivity (DTH) in ICR Mice.

Other legends and methods are the same as described in Fig. 1.

② 脾臟細胞의 rosette 形成能(RFC)

各 群에서 觀察한 脾臟細胞의 RFC를 %로 換算測定한 結果는 Fig. 8에서 보는 바와 같다.

正常群이 5.83±2.91%이고, 對照群은 4.00±

3.00%였으며, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50, 100 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 1.25±5.00(P<0.01), 2.23±0.12(P<0.01) 및 1.02±0.03(P<0.01)로 對照群에 比하여 모두 有意한 減少를 보였다.

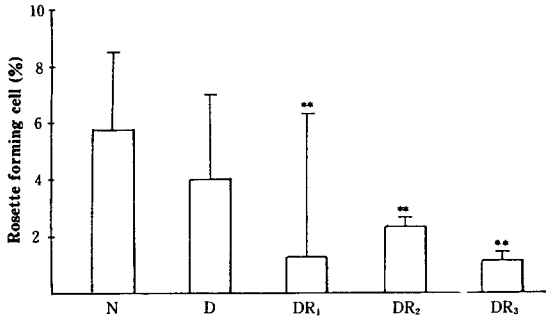

Fig. 8. The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Influence of Diethylstilbestrol (DES) on the Rosette Forming Cell (RFC) in ICR Mice.

Other legends and methods are the same as described in Fig. 1.

4. Natural killer cell activity에 미치는 影響

NK cell의 活性測定度의 結果는 Fig. 9에서 보는 바와 같다. effector cell과 target cell이 100 : 1일 때는 正常群이 32.33±13.47%이고 對照群은 63.67±2.36%이였으며, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 40.67±5.31(P<0.01) 및 48.33±2.05(P<0.01)로 對照群에 比하여 有意한 減少를 보였으나, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群은 72.00±2.45(P<0.01)로 有意한 增加를 보였다.

또한 effector cell과 target cell이 50 : 1일 때는 正常群이 18.00±4.55이고, 對照群은 49.00±9.09%인데 比해 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 35.00±6.82(P<0.01) 및 40.00±6.82(P<0.01)로 모두 有意한 減少를 보였으나, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群은 54.67±12.68(P<0.01)로 有意한 增加를 보였다.

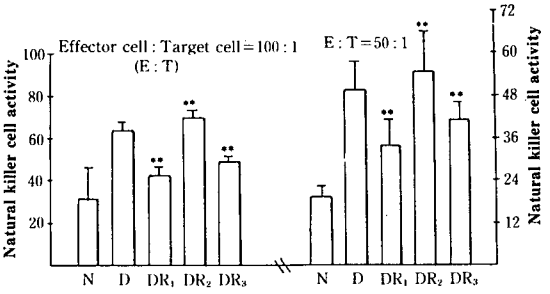

Fig. 9. The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Influence of Diethylstilbestrol (DES) on the Natural Killer Cell Activity in ICR Mice.

Other legends and methods are the same as described in Fig. 1.

5. 大食細胞의 活性 檢査所見

大食細胞의 貪食能을 測定하여 corrected phagocytic index로 換算한 結果는 Fig. 10에서 보는 바와 같다. 正常群이 39.08±18.69이고, 對照群은 27.42±10.20이었으며, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50, 100 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 21.94±5.53(P<0.01), 25.85±6.76 및 20.67±10.09(P<0.01)로 對照群에 比하여 모두 減少를 보였는데, 特히 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 200 mg/kg 併用投與群에서 역시 有意한 減少를 나타내었다.

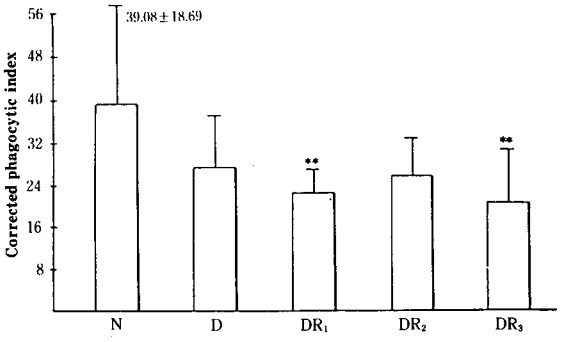

Fig. 10. The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Influence of Diethylstilbestrol (DES) on the Phagocyte Activity in ICR Mice.

Other legends and methods are the same as described in Fig. 1.

6. 末梢循環白血球數에 미치는 影響

末梢循環白血球數에 미치는 影響은 Fig. 11에서 보는 바와 같다.

正常群이 7,600±3,443이고, 對照群은 5,020±2,994이었으며, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50, 100 및 200 mg/kg 併用投與群은 各各 1,220±796(P<0.01), 3,300±1,450(P<0.01) 및 2,380±863(P<0.01)로 對照群에 比하여 모두 有意한 減少를 보였다.

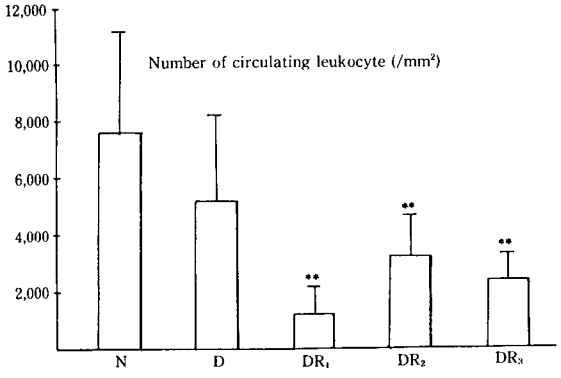

Fig. 11. The Effect of Red Ginseng Ethanol Extract on the Influence of Diethylstilbestrol (DES) on the Number of Circulating Leukocyte in ICR Mice.

Other legends and methods are the same as described in Fig. 1.

考　　察

Herbst 等은 姙娠前에 DES를 長期間 過量 投與한 後 女兒가 태어날 경우 腺癌發生率이 높다고 報告하였으며[68], 사람[69], mouse[70] 및 rat[71]에 있어서 姙娠中에 DES를 投與한 結果 發癌性과 畸形發生頻度率을 增加시킴이 報告되었다. Kalland 等은 mouse에 있어서 DES가 抗體反應과 淋巴球反應을 抑制시켜 體液性免疫과 細胞性免疫을 低下시킴을 報告하였다[72].

人蔘의 抗癌 및 免疫效果에 關한 硏究報告로서 Lee 等이 人蔘의 ether 抽出物과 ethanol 抽出物을 ICR mouse에 投與하여 sarcoma 180과 adenocarcinoma 755의 腫瘍무게를 減少시킨다고 報告하였으며[73], Gong 等은 人蔘의 alkaloid 分劃投與로 sarcoma 180 cell을 移植한 mouse의 壽命延長 및 여러가지 生化學的 檢査를 綜合해서 抗癌效果에 對하여 報告했고[74], Ryu 等은 人蔘의 石油 ether 抽出物이 L1210과 P388 leukemia에 對해서 細胞增殖을 抑制한다고 報告하였다[75]. 또한 Yu 等은 人蔘의 水浸液 抽出物이 mouse에 있어서 免疫修飾 效果가 있음을 報告하였으며[76], Kim 等은 人蔘의 石油 ether 抽出物이 鉛의 免疫抑制作用에 對하여 體液性 및 細胞性免疫 回復效果가 있다고 報告하였고[77,78], Ahn 等은 ethanol의 免疫機能 抑制作用에 對하여 人蔘의 ethanol 抽出物이 體液性 및 細胞性免疫作用이 있다고 報告하였다[79].

따라서 DES의 免疫作用에 對한 紅蔘의 ethanol 抽出物의 免疫效果가 期待되어 實施한 本 實驗의 結果에 對하여 考察하면 다음과 같다.

1. 各 臟器에 미치는 影響

肝臟의 對體重比는 對照群에서 增加하였으나, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 mg/kg 併用投與群에서는 對照群에 比해 有意性있는 減少를 보였으나, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群에서는 有意性 있는 增加를 보였다(Fig. 2). 이러한 肝臟의 重量增加는 DES를 投與한 後, 肝臟의 過多食作用과 reticuloendothelial(RES)에 對한 顯著한 刺戟誘發로 肝臟이 肥大했다는 Loose 等의 報告[80]와 一致하는 것으로 미루어, 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 및 200 mg/kg 投與群의 肝臟의 重量의 增加는 紅蔘의 ethanol 抽出物의 用量效果에 依한 것으로 思料된다.

免疫臟器에 있어서 脾臟의 對 體重比는 對照群에 比해 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群에서는 有意한 增加를 보였으나, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 200 mg/kg 併用投與群에서는 有意한 減少를 보였다(Fig. 3). 이와같은 脾臟對 體重比의 減少 역시 紅蔘의 ethanol 抽出物의 用量에 依한 效果로 思料된다.

胸腺의 對體重比는 對照群에 比해 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 100 mg/kg 併用投與群에서는 有意한 增加를 보였으나, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 200 mg/kg 併用投與群에서는 有意한 減少를 보였다(Fig. 3).

이는 mouse에 DES를 投與한 結果, 50% 以上 胸腺의 減少에 依해 淋巴球가 減少되었다는 Highman 等과 Kalland 等의 報告[81,82]와 細網皮系에 影響을 미친다는 Boorman 等의 報告[83]로 보아, 胸腺 및 脾臟의 重量의 增加 또는 減少는 免疫反應에 影響이 있는 것으로 思料된다.

2. 體液性免疫에 미치는 影響

① 赤血球凝集素價 및 2-ME 耐性凝集素價는 緬羊 赤血球에 對한 抗體와 抗原과의 反應으로서 T-dependent antigen에 對한 免疫抗體의 量을 나타내는 指標이다[59]. 赤血球 凝集素價는 對照群에서 低下되었고, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 併用投與群에서 有意性 있는 減少를 보였다. 또한 2-ME 耐性凝集素價는 對照群에서 低下되었고, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 200 mg/kg 併用投與群에서는 對照群에 比해 有意性 있는 減少를 보였다(Fig. 5). 이는 紅蔘의 ethanol 抽出物이 DES의 抗體生産 抑制作用을 强化한 것으로 생각된다.

② Arthus 反應은 感作宿主에 注入된 抗原이 抗原-抗體 免疫複合體를 形成하여 組織에 沈着하고 補體를 活性化시키며, 抗原에 依해 刺戟된 mast cell로부터 遊離된 histamine 및 leukotriene이 多形核 白血球의 遊走作用을 增加시키고, 遊走하여온 多形核 白血球가 lysosomal enzyme을 遊離하여 炎症反應을 促進시키는 現象으로[60], 對照群에 比해 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 併用投與群에서 用量依存的으로 有意性 있는 減少를 보였다($P<0.01$) (Fig. 6).

이는 DES의 抗體生産 抑制作用을 紅蔘의 ethanol 抽出物이 相加的으로 影響을 미쳤기 때문이며, 또한 紅蔘 ethanol 抽出物이 mast cell의 膜에 安定劑로 作用하였기 때문으로 생각된다.

③ 脾臟細胞의 溶血斑 形成細胞(PFC)는 對照群에 比해 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 200 mg/kg 併用投與群에서 有意性 있는 減少를 보였다($P<0.01$) (Fig. 7).

體液性免疫反應인 Arthus 反應, 赤血球凝集素價 및 脾臟細胞의 溶血斑形成細胞에 對한 結果로 보아, DES에 依한 體液性免疫反應의 低下는 脾臟의 大食細胞活性의 低下와 關聯된다는 Slijivic 等과 Toivanen 等의 報告[84,85], DES를 投與한 mouse에 있어서 抗體反應을 抑制시켰다는 Luster 等의 報告[86] 및 脾臟에서 DES에 依한 T-helper cell이 不足되었다는 Kalland 等의 報告[22]로 미루어, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 併用投與群에서 紅蔘의 ethanol 抽出物의 用量이 增加할수록 DES 單獨投與群보다 Immunoglobulin 合成抑制 및 T-helper cell 機能보다는 T-suppressor cell 機能을 亢進시켜 體液性 免疫을 더욱 抑制시킨 것으로 思料된다.

3. 細胞性免疫에 미치는 影響

① 遲延型過敏反應(DTH)은 感作 淋巴球에 依한 lymphokines의 化學的 傳達因子의 遊離에 依해서 成立되며, 特히 大食細胞가 깊이 關與하는 것으로 알려져 있는 바[61], DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 併用投與群은 對照群에 비해 有意性 있는 低下를 보였다($P<0.01$) (Fig. 8).

② 脾臟細胞의 RFC는 T-cell 및 大食細胞가 모두 rosette cell을 形成할 수 있으나 大部分 T cell이 깊이 關與한다고 하였는데[87], DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 併用投與群은 對照群에 比해 有意性 있는 脾臟細胞의 RFC의 低下를 보였다($P<0.01$) (Fig. 9).

이러한 DTH 結果를 脾臟細胞의 RFC 結果와 함께 생각할 때, DES를 投與한 mouse에 있어서 胸腺萎縮과 DTH 反應 및 淋巴球反應을 抑制한다는 Luster 等의 報告[25]와 DES는 cyclic AMP 濃度를 增加시킨다는 Weissman 等의 報告[88]로 미루어, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 併用投與群은 紅蔘의 ethanol 抽出物이 相加的으로 作用하여 對照群보다 細胞內 cyclic AMP를 增加시켜 淋巴球의 mitogenesis를 沮害하고 lymphokines 生成을 抑制

하여 脾臟의 rosette 形成을 抑制시켰을 可能性과 T-suppressor cell의 誘導를 亢進시켜 細胞性免疫을 더욱 低下시킨 것으로 思料된다.

4. 非特異的 免疫에 미치는 影響

① Natural killer cell의 活性은 腫瘍의 成長[89~94]과 轉移[95~97]에 對해 抵抗하는 大顆粒性 淋巴球(Large Granular Lymphocyte; LGL)의 一種으로 腫瘍免疫機轉에 重要하며, 宿主의 非特異性 免疫反應을 測定하기 爲하여 實施하는 바, 對照群에서 NK cell의 活性이 增加하였으며, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群에서는 對照群에 比해 有意性 있는 增加를 보여 紅蔘에 依한 DES의 抗癌效果의 增强이 期待되고, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 200 mg/kg 併用投與群에서는 DES인 對照群에 比해 有意性 있는 減少를 보였다(Fig. 9).

DES만을 投與한 對照群의 NK cell 活性의 增加는 DES를 投與한 mouse에 있어서 NK cell의 活性이 減少되었다는 Kalland의 報告[98]와는 相反된 結果를 보였는데, 이는 實驗動物의 性差, 種差, 實驗期間 및 投與量 等의 差異에 起因되는 것이 아닌가 思料되고, 또한 NK cell 活性의 增加는 in vivo에서 癌細胞에 對하여 抵抗한다는 Haller 等과 Kasai 等의 報告[99,100]로 보아, 紅蔘의 ethanol 抽出物 投與量에 依한 DES의 NK cell activity의 增減效果는 紅蔘의 ethanol 抽出物과 DES의 併用投與時에는 注目을 要하는 部分으로 抗癌效果가 期待되며, 이에 對한 正確한 mechanism에 關해서는 더 많은 硏究가 進行되어야 할 것이다.

② 大食細胞의 活性은 抗原에 依한 免疫能의 發顯 및 interleukines의 分泌에 重要한 役割을 하여, 그 貪食能이 網狀組織內皮系에 影響을 끼쳤는가를 測定하는 指標로서 利用되고 있는 바, DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 併用投與群은 對照群에 比해 有意性 있는 減少를 보였다($P<0.01$) (Fig. 10).

이는 DES를 急性投與한 mouse에 있어서 增加된 食作用, 增殖能力 및 腫瘍細胞의 細胞性塞栓에 對한 硏究에서 大食細胞의 活性이 增加되었다는 Boorman 等의 報告[83]와는 相反된 結果를 보였음은 아마도 投與期間 等의 差異에 起因된 것이 아닌가 思料된다. 또한 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 200 mg/kg이 DES에 依한 lymphokines의 形成抑制를 促進함으로써 大食細胞의 活性을 더욱 低下시킨 것으로 思料된다.

5. 末梢循環의 白血球數에 미치는 影響

對照群에 比해 DES와 紅蔘의 ethanol 抽出物 併用投與群에서 有意性 있는 減少를 보였다(Fig. 11). 이는 DES를 急性投與한 mouse에 있어서 phytohemagglutinin(PHA)과 con. A에 對한 淋巴球反應을 抑制시킨다는 Luster 等의 報告[102]로 미루어, 紅蔘의 ethanol 抽出物이 DES에 依해 抑制된 淋巴球의 活性에 影響을 미쳐, 白血球의 生産을 抑制하여 白血球가 減少된 것으로 思料된다.

結　論

Mouse에 있어서 DES의 免疫毒性에 미치는 紅蔘의 ethanol 抽出物의 影響은 다음과 같다.

1. DES 單獨投與群은 正常群에 比해 體重增加率과 肝臟의 對 體重比는 減少하는 傾向을 보였고, 體液性 및 細胞性免疫反應은 低下시켰으며, 大食細胞의 活性의 低下와 末梢循環白血球數의 減少를 招來하였으나, natural killer cell의 活性은 增加시켰다.

2. 紅蔘의 ethanol 抽出物 併用投與群은 對照群인 DES 單獨投與群에 比해 體重增加率은 有意한 減少를 보였고, 肝臟의 對 體重比는 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 mg/kg 併用投與群에서는 有意한 減少를 보였으나, 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群에서는 有意한 增加를 보였고, 脾臟 및 胸腺의 對 體重比는 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群에서는 有意한 增加를 보였으나, 紅蔘의 ethanol 抽出物 200 mg/kg 併用投與群에서는 有意한 減少를 보였다.

3. 紅蔘의 ethanol 抽出物 併用投與群은 對照群인 DES 單獨投與群에 比해 體液性免疫反應과 細胞

性免疫反應은 有意한 減少를 보였는데, 特히 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群에서는 低下를 둔화시켰다.

4. 紅蔘의 ethanol 抽出物 併用投與群은 對照群인 DES 單獨投與群에 比해 natural killer cell의 活性이 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群에서는 有意한 增加를 보였으나, 紅蔘의 ethanol 抽出物 50 및 200 mg/kg 併用投與群에서는 有意한 低下를 보였고, 大食細胞의 活性과 末梢循環白血球數는 有意한 低下를 보였는데, 特히 紅蔘의 ethanol 抽出物 100 mg/kg 併用投與群에서는 低下를 둔화시켰다.

REFERENCES

1. Dodds, E.C., Goldberg, L., Lawson, W. and Robinson, R.; Oestrogenic activity of certain synthetic compounds, Nature, **141**, 247 (1938)
2. HcLachlan, J.A. and Dixon, R.L.; Transplacental toxicity of diethylstilbestrol: a special problem in safety evaluation, In Advances in Modern Toxicology (M. Mehlman and R.E. Shapiro, eds.), Hemisphere, New York, NY, 423 (1976)
3. Heinonen, O.P.; Diethylstilbestrol in pregnancy, Cancer, **31**, 573 (1973)
4. Noller, K.L. and Fish, C.R.; Diethylstilbestrol usage: its interesting past, important present, and questionable future, Med. Clin. North. Am., **58**, 793 (1974)
5. King, D.T., Frenning, D.H., Goldman, A.I., Ascensao, V.F. and Kennedy, B.J.; Estrogen receptors and responses to chemotherapy and hormonal therapy in advanced breast cancer, N. Engl. J. Med., **299**, 1330 (1978)
6. Sturgis, S.H. and Albright, F.; The mechanism of estrin therapy in the relief of dysmenorrhea, Endocrinology, **26**, 68 (1940)
7. Fortherby, K. and James, F.; Metabolism of synthetic steroids, Adv. Steroid Biochem. Pharmacol., **3**, 67 (1972)
8. Inman, W.H.W., Vessey, M.P., Westerholm, B. and Engelund, Q.; Thromboembolic disease and the steroidal content of oral contraceptives, Br. Med. J., **2**, 203 (1970)
9. Meade, T.W.; Oral contraceptives, clotting factors, and thrombosis, Am. J. Obstet. Gynecol., **142**, 758 (1982a)
10. Kennedy, B.J. and Nathanson, I.T.; J. Am. Md. Ass., **152**, 1135 (1953)
11. Flocks, R.H., Marberger, H., Begley, G.J. and Prendergast, L.J.; J. Urol., **74**, 549 (1955)
12. Gass, G.H., Brown, J. and Okey, A.; Carcinogenic effects of oral diethylstilbestrol on C_3H male mice with and without mammary tumor virus I, Natl. Cancer Inst., **53**, 1369 (1974)
13. Gass, G.H., Coats, D. and Graham, N.; Carcinogenic dose response curve to oral diethylstilbestrol, J. Natl. Cancer Inst., **33**, 971 (1964)
14. Herbst, A.L., Ulfelder, H. and Poskanzer, D.C.; Adenocarcinoma of the vagina: Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women, N. Engl. J. Med., **284**, 878 (1971)
15. Herbst, A.L., Cole, P., Colton, T., Robby, S.J. and Swlly, R.E.; Age-incidence and risk of diethylstilbestrol-related clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix, Am. J. Obstet. Gynecol., **128**, 43 (1977)
16. Vorherr, H., Messer, R.H., Vorherr, U.F., Jordan, S.W. and Kornfeld, M.; Teratogenesis and carcinogenesis in rat off spring after transplacental and transmammary exposure to diethylstilbestrol, Biochem. Pharmacol. **28**, 1865 (1979)
17. Althaus, F., Lawrence, S.D., Sattler, F.L., Longfellow, D.G. and Pitot, H.C.; Cancer Res., **42**, 3010 (1982)
18. Martin, C.N., McDermid, A.C. and Garner, R. C.; Cancer Res., **38**, 2621 (1978)

19. Tsutsui, T., Degen, G.H., Schiffmann, D., Wong, A., Maizumi, H., McLachlan, J.A. and Barrett, J.C.; Cancer Res., **44**, 184 (1984)
20. Hill, A. and Wolff, S.; Cancer Res., **43**, 4114 (1983)
21. Rudiger, H.W., Haenisch, F., Metzler, M., Glatt, H.R. and Oesch, F.; Activation of diethylstilbestrol to metabolites which induce sister chromatid exchanges in human cultured fibroblasts, submitted to science, Nature, Lond., **281**, 392 (1979)
22. Kalland, T., Strand, O. and Forsberg, J.G.; Long-term effects of neonatal estrogen treatment on mitogen responsiveness of mouse spleen lymphocytes, J. Natl. Cancer. Inst., **63**, 413 (1979)
23. Luster, M.I., Faith, R.E. and McLachlon, J.A.; Alterations of the antibody response following in vitro exposure to diethylstilbestrol, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **20**, 433 (1978)
24. Greenman, D.L., Dooley, K. and Breeden, C.R.; Strain differences in the response of the mouse to diethylstilbestrol, J. Toxicol. Environ. Health., **3**, 589 (1977)
25. Luster, M.I., Boorman, G.A., Dean, J.H., Luebke, R.W. and Lawson, L.D.; The effect of adult exposure to diethylstilbestrol in the mouse: Alterations in immunological functions, J. Reticuloendothel. Soc., **28**, 561 (1980)
26. Kalland, T.; Decreased and disproportionate T-cell population in adult mice after neonatal exposure to diethylstilbestrol, Cell. Immunol., **51**, 55 (1980)
27. Holsapple, M.P., Munson, A.E., Munson, J.A. and Bick, P.H.; Suppression of cell-mediated immunocompetence after subchronic exposure to diethylstilbestrol in female B_6C_3F mice, J. Pharmacol. Exp. Ther. Copy., **227**, 130 (1983)
28. 한국인삼연초연구소 ; 고려인삼, 삼화인쇄소, 서울, 21 (1983)
29. 한국인삼경작조합연합회 ; 한국인삼사 하권, 삼화인쇄소, 서울, 16 (1980)
30. Hong, S.A., Park, C.W., Kim, J.H. and Chang, Y.K.; The effect of ginseng saponin on animal behavior, Proc. 1st Int. Ginseng Symp., 33 (1974)
31. Takagi, K.; Pharmacological studies on ginseng, Proc. 1st Int. Ginseng Symp., 119 (1974)
32. Yokozawa, T., Kobayashi, T., Oura, H. and Kawashima, Y.; Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb_2 in streptozotocin-diabetic rats, Chem. Pharm. Bull., **33**, 869 (1985)
33. Yokozawa, T., Kobayashi, T., Oura, H. and Kawashima, Y.; Hyperlipidemia-improving effects of ginsenoside-Rb_2 in streptozotocin-diabetic rats, Chem. Pharm. Bull., **33**, 3893 (1985)
34. Yamamoto, M. and Kumagai, A.; Long term ginseng effects on hyperlipidemia in man with further study of its action on atherogenesis and fatty liver in rats, Proc. 4th Int. Ginseng Symp., 13 (1984)
35. Joo, C.N.; The preventive effect of Korean ginseng saponins on aortic atheroma formation in prolonged cholesterol fed rabbits, Proc. 3rd Int. Ginseng Symp., 27 (1980)
36. Oura, H., Nakashima, S., Tsukuda, D. and Ohta, Y.; Effect of radix ginseng extract on serum protein synthesis, Chem. Pharm. Bull., **20**, 980 (1972)
37. Hahn, D.R.; Pharmaco-biological effects of the ginsenosides Rb 1, Rg 1 and Re, Proc. 2nd Int. Ginseng Symp., 135 (1978)
38. Hiai, S., Sasaki, S. and Oura, H.; Effect of ginseng saponin on rat adrenal cyclic AMP, Planta Medica, **37**, 15 (1979)
39. Hong, S.D. and Koo, J.D.; The effect of the saponin fraction of *Panax ginseng* C.S. Meyer on the antioxidant activity of α-tocopherol,

Proc. 4th Int. Ginseng Symp., 113 (1984)

40. Yonezawa, M., Takeda, A. and Katoh, N.; Restoration of radiation injury by ginseng extract 1, Proc. 4th Int. Ginseng Symp., 133 (1984)
41. Cha, S.M. and Hwang, W.I.; Federation proceedings., **34**, 3315 (1975)
42. Hwang, W.I. and Cha, S.M.; A cytotoxic activity of extract of *Panax ginseng* root against cancer cells in vitro and in vivo, Proc. 2nd Int. Ginseng Symp., 43 (1978)
43. 윤연숙, 이세영, 김병수, 윤택구 ; 인삼의 세포독성 분획의 작용기작에 관한 연구(Ⅰ) — 인삼중의 Petroleum ether 분획이 동물암세포에서 고분자 물질의 합성에 미치는 영향, 한국생화학회지, **13**, 203 (1980)
44. Yun, T.K., Yun, Y.S. and Han, I.W.; Study of tumor inhibitory effect of red ginseng in mice and rat exposed to various chemical carcinogens, Proc. 3rd Int. Ginseng Symp., 87 (1980)
45. Han, M.D. and Kim, J.P.; An experimental study of the effect of ginseng extract on the development of stomach cancer in wister rats induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, J. Kor. Med. Assoc., **26**, 1126 (1983)
46. 하대유, 이정호, 이헌구 ; 고려인삼이 3-methylcholanthrene의 발암능에 미치는 영향, 인삼시험용역보고서, 한국인삼연초연구소 발행, (1982)
47. 之山健, 田邊廣已, 有地滋, 久保道德, 阿部傳子, 谿忠人 ; Ginsenosides (saponin of ginseng root)による 推展癌治療に關する, 臨床經驗 現代の 診療, **21**, 117 (1979)
48. Murta, I. and Hirono, T.; Clinical and immunological observation of prostisol for cancer patient, Metabolism and Diseases Proc. Symp. Wakan Yakuio (extraned), 601 (1973)
49. Im, M.J., Min, I.S., Lim, K.H. and Hwang, W. I.; The effect of *Panax ginseng* extract on the anticancer activity and NDPase activity of the cancer cells and normal cells
50. Jie, Y.H., Cammisuli, S. and Baggiolini, M.; Immunomodulatory effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer in the mouse, Agents and Actions, **15** (3/4), 386 (1984)
51. Ahn, Y.K., Kim, J.Y., Chung, J.H. and Goo, J. D.; The effect of Korean ginseng on immunotoxicity of mitomycin C, Yakhak Hoe Ji, **31**(6), 355 (1987)
52. Ahn, Y.K., Kim, J.Y., Shin, H.G. and Chung, J. G.; The effect of ginseng on the immunotoxicity of benzo(a)pyrene, Kor. J. Environ. Toxicol., **1**, 47 (1986)
53. 김병수, 이원영, 김주덕, 조영동 ; 인삼 특수성분에 대한 항암요법의 복합적인 효능점검, 인삼연구보고서, 한국인삼연초연구소, (1984)
54. 홍기환, 유태현, 임정규 ; 인삼 사포닌의 면역학적 작용에 대한 실험적 고찰, 제3회 고려인삼학술대회, 1978. 11. 1 : 한국인삼경작 조합연합회 발행, 753 (1980)
55. 林輝明, 有地滋, 久保道德, 阿部展子, 谿忠人, 久山健, 小園島肅夫 ; In vitroにおするマウスのsarcoma 180に對する ginsenosidesの抗腫瘍効果, 金醫大誌, **3**, 171 (1978)
56. Yeung, H.W.; Effect of ginseng on the immune response to influenza virus infection in mice, Proc. of the International Ginseng Symposium, **8**, 254 (1980)
57. Reed, N.D., Crowle, P.K. and Ha, T.; Use of mast cell deficient mice to study host parasite relationships in immuno-deficient animals, B. Ssordeted., Karger Basel Ip., 184 (1984)
58. Coombs, R.R.A. and Fiset, M.L.; Detection of complete antibodies to egg albumin by means of a sheep red cell egg albumin antigen unit, Brit. J. Exp. Path., **35**, 472 (1954)
59. Stavistsky, A.B.; Micro methods for the study of proteins and antibiotics, J. Immunol., **72**, 360 (1954)

60. Yoshikai, Y., Maike, S., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K.; Effect of stimulation and blokade of mononuclear phagocyte system on the delayed foot pad reaction to SRBC in mice, Immunol., **38** 577 (1979)
61. Sugimoto, Kojima, A.M., Yaginuma, K., Gashira, Y.E.; Cell-mediated and humoral immunity in mice, JPN. J. Med. Sci. Biol., **28**, 23 (1975)
62. Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussclorf, D.H.; Methods in Immunology, 3rd, 449 (1980)
63. Elliott, B.E. and J.S. Haskill; Characteristics of thymus-derived bonemarrow-derived rosette forming lymphocytes, Eur. J. Immunol., **3**, 68 (1973)
64. Cunningham, A.; Plaque assay for antibody producing cells, Allergy, **17**, 5 (1973)
65. Kiesseling *et al.*; Eur. J. Immunol., **5**, 112 (1975)
66. Biozzi, G., Benacerraf, B., Stiffel, C. and Halpern, B.N.; Etude quantitative du *l'*activite granulopexique du systeme reticuloentherial chezla souris, C.R. Soc. Biol. Paris., **148**, 43 (1954)
67. Snedecorm, G.W. and Cochrane, W.G.; Statistical methods, 6th ed, Iowa State University Press, Iowa., 1 (1967)
68. Herbst, A.L., Ulfelder, H. and Poskanzer, D.C.; Adenocarcinoma of the vagina association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women, N. Engl. J. Med., **284**, 878 (1971)
69. Kaufman, R.H., Adam, E., Binder, G.L. and Gerthoffer, E.; Upper genital tract changes in pregnancy outcome in off spring exposed in utero to diethyl-stilbestrol, Am. J. Bostet. Gynecol., **139**, 299 (1980)
70. McLachilan, J.A., Newbold, R.R. and Bullock, B.C.; Long-term effects on the female genital tract associated Loith prenatal exposure to diethylstilbestrol, Cancer Res., **40**, 3988 (1980)
71. Baggs, R.B., Miller, R.K., Garmah, R. and Mckenzie, R.C.; Teratogenic and neoplastic lesions of the genitourinary system in wistar rats exposed in utero to diethylstibestrol, Teratology, **21**, 266 (1980)
72. Kalland, T. and Forsberg, J.G.; Delayed hypersensitivity response to oxazolone in neonatally estrogenized mice, Cancer Lett., **4**, 141 (1978)
73. Lee, S.H. and Hwang, W.I.; Inhibitory effect of petroleum ether extract of *Panax ginseng* root against growth of human cancer cells, Korean J. Ginseng Sci., **8**, 141 (1986)
74. Gong, T.H. and Lee, W.Y.; Effect of anticancer of Korean ginseng ext. prep. on mice sarcoma 180, Proc. Jap. Med. Symp., (1979)
75. Ryu, S.H., Moon, K.H. and Park, M.Y.; Primary screening for growth inhibition of L1210 cells from oriental heros, Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., **10**, 53 (1982)
76. Yu, J.J., Salvatore, C. and Marco, B.; Immunomodulatory effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer in the mouse, Agents and Actions, **15**, 314 (1984)
77. Kim, H.B., Ahn, Y.K., Kim, J.Y. and Kim, J.H.; The effect of ginseng petroleum ether fraction on immunosuppressed mice by lead acetate (I), Kor. J. Environ. Toxicol., **1**, 27 (1986)
78. Kim, H.B., Ahn, Y.K., Kim, J.Y. and Moon, J. K.; The effect of ginseng petroleum ether fraction on immunosuppressed mice by Lead acetate (II), Kor. J. Environ. Toxicol., **1**, 37 (1986)
79. Ahn, Y.K., Kim, J.H. and Lee, B.Z.; Effect of *Panax ginseng* extracts on the immunotoxicity of ethanol, Kor. J. Environ. Toxicol., **3**(3/4), 29 (1988)
80. Losse, L.D. and Diluzio, N.R.; Dose-related reticuloendothelial system stimulation by diethylstilbestrol, J. Reticuloendothel. Soc., **20**, 457 (1976)
81. Highman, B., Norvell, T.M. and Schellenber-

ger, T.D.; Pathological changes in female C_3H mice continuously fed diets containing diethylstilbestrol or 17 beta-estradiol, J. Environ. Pathol. Toxicol., 1 (1977)

82. Kallend, T., Fossberg, T.M. and Forsberg, J. G.; Effect of estrogen and corticosterone on the lymphoid system in neonatal mice, Exp. Mol. Pathol., **28**, 76 (1978)
83. Boorman, G.A., Luster, M.I., Dean, J.H. and Wilson, R.D.; The effect of adult exposure to diethylstilbestrol in the mouse on macrophage function and numbers, J. Reticuloendothel. Soc., **28**, 547 (1980)
84. Sljivic, V.S. and Warr, G.W.; Activity of the reticuloendothelial system and the antibody response I: effect of stilbestrol on the immune response to sheep erythrocytes in the mouse, Brit. J. Exp. Pathol., **54**, 69 (1973)
85. Toivanen, P.; Effect of estrogens on the humoral antibody response in guinea pigs, Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., **45**, 152 (1967)
86. Luster, M.I., Faith, R.E. and McLahlan, J.A.; Modulation of the antibody response following in utero exposure to diethylstilbestrol, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **20**, 433 (1978)
87. Back, J.E. and Dardenne, M.; Antigen recognition by T-lymphocytes, Cell Immunol., **3**, 1 (1972)
88. Weissman, B.A., Daly, J.W. and Skolnick, P.; Diethylstilbestrol, Endocrinology, **97**, 1559 (1975)
89. Haller, O., Hansson, M., Kiessling, R. and Wigzell, H.; Role of nonconventional killer cells in resistance against syngenic tumor cells in vivo, Nature, **270**, 601 (1977)
90. Hanna, N. and Filder, I.J.; Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli, J. Natl. Cancer Inst., **65**, 801 (1980)
91. Harmoon, R.C., Clark, E.A., O'Toole, G. *et al.*; Resistance of H-2 heterozygous mice to parental tumors I: hybrid resistance and natural cytotoxicity to EL-4 are controlled by the H-2D-Hh-1 region, Immunogenetics, **4**, 601 (1977)
92. Kiessling, R., Petrany, G., Klein, G., Klein, G. *et al.*; Non-T-cell resistance against a mouse Moloney lymphoma, Int. J. Cancer, **17**, 272 (1976)
93. Petrany, G., Kiessling, R., Povey, S. *et al.*; The genetic control of natural killer cell activity and its association with in vivo resistance against a Moloney lymphoma isograft, Immunogenetics, **3**, 15 (1976)
94. Kiessling, R., Petrang, G., Klein, G. *et al.*; Genetic variation of in vitro cytolytic activity and in vivo rejection potential of nonimmunized semi-syngenic mice against a mouse lymphoma line, Int. J. Cancer, 151 (1975)
95. Hanna, N.; Expression of metastatic potential of tumor cells in young nude mice is correlated with low levels of natural killer cell-mediated cytotoxicity, Int. J. Cancer, **26**, 675 (1980)
96. Hanna, N. and Burton, R.C.; Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo, J. Immunol., **127**, 1754 (1981)
97. Talmadge, J.D., Meyers, K.M., Prieur, D.J. and Starkey, J.R.; Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice, Nature, **284**, 622 (1980)
98. Killand, T.; Reduced natural killer activity in female mice after neonatal exposure to diethylstilbestrol, J. Immunol., **124**, 1297 (1980)
99. Haller, O., Hunsson, M., Kiessling, R. and Wigzell, H.; Non-conventional natural killer cells may play a decisive role in providing resistance against syngenic tumor cells in vivo, Nature, **270**, 609 (1977)
100. Kasai, M., Leclerc, J.C., McVay-Boudrau, F.

W., Shen, F.W. and Cantor, H.; Direct evidence that natural killer cells in non-immune spleen cell populations prevent tumor growth in vivo, J. Exp. Med., **149**, 1260 (1979)

101. Hambach, A., Stiller-Winkler, R., Oberbarnscheidt, J. and Ewers, N.; Sind suppressor T-zellen die primaren ziellen der immunotoxischen wirkungen von blei, Zbl. Bart. Hyg., 1. Abt. Orig. B., **178**, 361 (1983)
102. Luster, M.I., Boorman, G.A., Harris, M.W., Luebke, R.W., Thigpen, J.E., Padarathsingh, M.L. and Moore, J.A.; Examination of bone marrow: immunological and host susceptibility parameters following pre-and postnatal exposure to TCDD, Int. J. Immunopharm. (in press)