

홍삼다당체의 항암면역증강작용 연구

김기환¹ · 정인성 · 정희용 · 조성기² · 윤연숙

이화여자 대학교 약학 대학¹, 한국원자력연구소 방사선 식품 저장 연구팀²

한국원자력연구소 부설 원자력병원 면역학연구실

(1997년 5월 13일)

Preclinical Evaluation of Polysaccharides Extracted from Korean Red-ginseng as an Antineoplastic Immunostimulator

Ki-Hwan Kim¹, In-sung Jung, Hee-Yong Chung, Sung-kee Jo² and Yeon-Sook Yun

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea¹

Laboratory of food irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea²

Laboratory of Immunology Korea Cancer Center Hospital, Seoul 139-706, Korea

(Received May 13, 1997)

Abstract : As a part of our ongoing effort to develop new antineoplastic immunostimulator from natural sources, bioassay-directed fractionation of polysaccharides from Korean red ginseng was carried out by observing the proliferation of murine spleen cells and the generation of lymphokine activated killer (LAK) cells. The acidic polysaccharide fractions proliferated spleen cells and generated LAK cells in proportion to their acidity *in vitro*. The LAK cell which was induced by ginsan showed tumoricidal activity against both NK cell sensitive and insensitive tumor target cells without major histocompatibility (MHC) restriction. Adherent macrophages and CD4⁺ helper T cells were involved in the generation of the LAK cells. The acidic polysaccharide from Korean red ginseng synergized with recombinant IL-2 (rIL-2) at lower than 3 U/ml. The optimal doses of the acidic polysaccharide from Korean red ginseng for the proliferation of spleen cells and for the generation of LAK cells were 1 mg/ml and 100 µg/ml, respectively; this means that the mechanisms for the both activities may be different from each other.

Key words : Immunostimulator, *Panax ginseng*, polysaccharide, tumor.

서 론

말초혈액 임파구를 고농도의 유전자 재조합 IL-2와 함께 3~5일 배양하면 natural killer(NK) 세포에 살해되지 않는 암세포를 살해하는 lymphokine activated killer(LAK) 세포가 생성된다.^{1, 3)} 이와같이 하여 생성된 LAK세포를 고농도의 유전자 재조합 IL-2와 함께 사용하는 입양면역요법이 암환자의 치료에 연구, 이용되고 있다.^{4, 5)} 이 경우 고농도의 IL-2투여에 따른 심한독성이 LAK세포를 이용한 입양면역

요법을 쉽게 임상에 사용하는데 제한점이 되고 있으므로 고농도의 IL-2에 의한 독성을 줄이기 위하여 interferon(IFN), interleukin-1(IL-1)과 같은 여러 종류의 사이토카인 병용요법이 연구되고 있으며, 상승적인 치료효과를 보이고 있다.^{4, 6, 12)} 그러나 현재 20여종의 사이토카인이 분리되었으며 앞으로 200여종의 사이토카인이 더 분리될 것으로 전망되어 이들 수많은 사이토카인의 병용요법을 임상에 적용하기는 실제로 불가능하다. 따라서 숙주에 투여하여 생체내에서 이들 여러종류의 사이토카인을 동시에 생성시

킬 수 있는 비특이적 항암면역증강제가 개발된다면 암환자에 대한 이상적인 면역요법제로 이용될 가능성이 있다. 한편 인삼의 물추출물이 항암작용을 나타내고 있으나^{13, 15)} 활성성분에 대한 규명이 불충분한 것으로 사료되어 인삼물추출물을 75% ethanol에 대한 용해도로 분획하여 각분획에 대한 임파구증식능 및 LAK세포 생성능을 측정된 결과 75% ethanol 불용분이 양성반응을 보였으므로 홍삼다당체에 대한 항암면역증강작용을 평가하고자 한다.

실험방법

1. 실험 재료

(1) 홍삼다당체

홍삼으로부터 추출된 홍삼 총 중성다당체 (korea red ginseng neutral polyaccharide, KRNP) 홍삼 총 산성다당체 (korea red ginseng acidic polysaccharide, KRAP) 및 산성도에 따라 분획된 홍삼 산성다당체 각분획 (KRAP1, KRAP2, KRAP3, KRAP4, KRAP7)을 천연물과학연구소 한용남 박사팀으로부터 공급받았다.

(2) 실험동물

미국 국립암연구소에서 분양받아 원자력병원 실험관리실에서 사육한 비근교계 N:GP(S) 마우스를 사용하였다. 동물은 실험에서 사용하기 전까지 사육실의 온도는 22±1°C, 습도는 55~60%로 유지시켰으며 명암순환이 12시간 단위로 조절되게 하였고 고형사료 (NIH-7-open formula)와 물을 자유로이 공급하였다.

(3) 사용 배지

실험에 사용한 세포 배양액은 RPMI1640 (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA)에 10% fetal bovine serum (Hyclon, Utah, USA, FBS), 2×10⁻² M의 HEPES (4-[2-hydroxyethyl]-1-piper-azine-ethane-sulfonic acid) buffer, 2×10⁻³ M의 glutamine, 1×10⁻³ M의 pyruvate, 100 U/ml의 penicillin, 50 µg/ml의 streptomycin, 5×10⁻⁵ M의 2-mercaptoethanol, 1% non-essential amino acid로 이루어져 있으며 (Complete Media, CM) 모두 GIBCO에서 구입하였다. 비장세포의 세척은 Hank's balanced salt solution (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA, HBSS)로 하였고 표적세포의 세척은 HBSS에 5% FBS가 함유된 balanced salt solution (BSS)로 하였다.

2. 실험 방법

(1) 마우스 비장세포 (Spleen cells, SC)의 조제

N:GP(S) 마우스를 경추 탈구법으로 희생시킨 후 복부를 절개하여 비장을 무균적으로 적출하고 멸균된 1 ml 주사기 뒷부분을 이용하여 세분 절편하였다. 세포를 HBSS에 부유시킨후 6겹의 가아제를 통과시킨 후 50 ml 원심용 시험관 (Falcon, New Jersey, USA)에 옮겨 1,500 rpm에서 10분간 원심 침전시켰다. Cell pellet을 ACK buffer (Tris-buffered ammonium chloride : 0.16 M NH₄Cl, 0.17 M Tris, pH 7.2)에 현탁하여 ice-box에서 30초간 방치한 후 HBSS로 2회 세척하여 적혈구를 제거하였다. Trypan blue 염색약으로 세포를 회색하여 세포수를 측정할 후 CM으로 1.5×10⁶ cells/ml의 농도로 조정하였다.

(2) 임파구 증식능 실험

홍삼산성다당체 각 분획물에 대하여 마우스 임파구 증식능을 관찰하였다. N:GP(S) 마우스의 비장세포가 96 well flat bottomed microplate (Corning, New York, USA)의 well당 1×10⁶개가 되도록 CM으로 희석하고 또는 인삼 분획물들을 6.3 µg/ml에서 1.6 µg/ml의 농도로 2배수씩 순차적으로 희석 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 후 well당 2 µCi의 ³H-thymidine을 가한후 4시간 더 배양하였고 cell harvester를 이용하여 glass fiber filter strip에 세포를 수거하였다. Scintillation cocktail를 3 ml씩 넣고 β-counter로 ³H-thymidine의 세포 내 포함 정도를 CPM으로 측정하였다. 각 실험은 3배수(triplicate)로 하였고 같은 실험을 5회 이상 하였다.

(3) LAK 세포 생성능 측정

임파구의 암 세포 살해능 실험은 4시간 ⁵¹Cr 유리법을 이용하였다. 작동 세포는, 비장 세포를 24 well plate(Corning, New York, USA)에 비장 세포가 1.5×10⁶ cells/ml이 되도록 CM으로 희석한 후 100 U/ml의 IL-2 및 홍삼 분획물을 넣고 총 2 ml 씩 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일 동안 배양하였다. 5일 후 배양액 2 ml을 15 ml tube에 옮겨 담고 원심 분리하여 세포를 침전시킨 후 HBSS로 2회 세척 하였다. 세포의 농도는 5×10⁶ cells/ml로 조정하였다. 표적 세포는, 방사선 동위원소인 Na₂CrO₄를 200 µci를 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 60분간 배양하였고, 1500 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 BSS로 세척하는것을 3회 반복

하였으며 5×10^4 cells/ml로 농도를 조정하였다. 이미 준비해 놓은 작동 세포와 ^{51}Cr 으로 표지된 표적 세포를 100:1, 30:1 또는 10:1의 비율이 되도록 U-bottomed microplate (Corning, New York, USA)에 넣고 37°C, 5% CO_2 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 2,200 rpm에서 5분간 원심 분리하고 상층액을 0.1 ml씩 취해 γ -counter로 상층액에 유리된 ^{51}Cr 에 의한 γ 선의 강도를 측정하여 % 세포 독성 (cytotoxicity)을 산출하였다. 각 실험은 2배수(duplicate)로 하였으며 같은 실험을 5회 이상 하였다.

다음의 식에 의해 % 세포독성 (cytotoxicity)을 산출하였다.

$$\% \text{ Cytotoxicity} = \frac{E-S}{M-S} \times 100$$

E : Experimental release count

S : Spontaneous release count

M : Maximun incorporation count

표적 세포로 사용한 암세포는 YAC-1, P815, EL-4 또는 HFL/b 등이었다.

(4) Negative selection에 의한 LAK 세포의 전구 세포 표면 항원 검증 실험

비장세포 (3×10^7 개)에 T 세포, cytotoxic/suppress T 세포, helper T 세포, NK cell의 marker인 Thy1, CD8, CD4, AsGM₁에 대한 항체를 처리하여 negative selection을 실시하였다. 즉 일정수의 비장 세포에 각각의 antibody를 처리하고 실온에서 30분간 반응시켰다. HBSS로 1회 세척한 후 complement (C') (Low-tox rabbit complement, Cederlane, Canada)를 처리하여 37°C 수욕상에서 30분간 반응시키고 이 조작을 다시 한번 반복하였다. HBSS로 세척한 후 세포 수를 다시 측정하고 LAK 세포 생성능 실험과 동일한 방법으로 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 홍삼산성다당체 또는 300 U/ml의 IL-2와 함께 37°C, 5% CO_2 배양기에서 5일간 배양하였다. Complement는 1 바이알을 1 ml의 물에 녹인후 CM 9 ml을 가해 filter하여 사용하였고 1회 사용한 것은 재 사용하지 않았다. 각 실험은 2배수로 하였고 같은 실험을 5회 이상 하였다.

(5) 비장세포에서 Non-adherent cell (SC_{nad}) 및 Adherent cell (SC_{ad})의 분리

비장세포를 분리한후 4×10^6 cells/ml의 농도가 되도록 CM으로 50 ml T30 flask (Corning, New York,

USA)에 넣어 37°C, 5% CO_2 배양기에서 뉘어서 5시간 배양하였다. Flask 바닥에 붙어있는 adherent cell이 떨어지지 않도록 주의해서 상층액만 모아 HBSS로 2회 세척하였고 (SC_{nad}) flask 바닥에 붙어 있는 세포는 강하게 흔들어 바닥에서 떨어뜨린 후 HBSS로 2회 세척하여 따로 모았다 (SC_{ad}). 이들 SC_{nad} 및 SC_{ad}의 수를 다시 측정하여, CM으로 농도를 맞추어 사용하였다. SC_{nad} 및 SC_{ad}의 비율을 100:1, 10:1 및 1:1로 조절하여 24 well plate에 넣은 후 인삼 분획물에 대한 LAK 세포 생성능의 변화를 관찰하였다.

결 과

1. KRAP에 의한 임파구증식능 효과

홍삼다당체를 중성다당체(KRNP)와 산성다당체(KRAP)로 분획한 후 임파구증식능을 관찰한 결과 KRNP는 임파구증식능을 보이지 않았으나 KRAP는 1 mg/ml에서 최대의 임파구증식능을 보였다. KRAP를 산성도에 따라 KRAP1-KRAP7으로 분획하여 각분획에 대한 임파구증식능을 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 다당체의 산성도가 증가함에

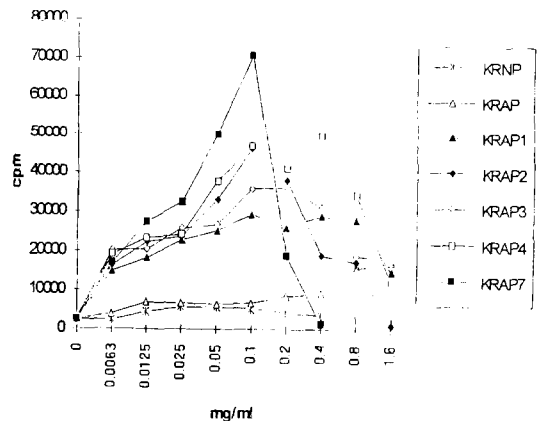


Fig. 1. Proliferation of splenocytes by culturing with Korean red ginseng polysaccharides. N : GP mice splenocytes were cultured with Korean red ginseng polysaccharide fractions for 48 hrs on microtiter plates and then the growth of splenocytes was determined by the incorporation of ^3H -thymidine after 4hr pulsing with 2 μCi of ^3H -thymidine: Korean red ginseng total neutral polysaccharide (KRNP), total acidic polysaccharide (KRAP), acidic polysaccharide fraction 1, 2, 3, 4, 7(KRAP1, 2, 3, 4, 7).

Table 1. Generation of LAK cells by culturing murine splenocytes with Korean red ginseng acidic polysaccharide

Culture ^a	Concentration	% Cytotoxicity against YAC-1		
		100:1	30:1	10:1
SC		0.7	0.2	0.1
SC+KRAP	100 µg/ml	9.31	3.15	1.34
SC+KRAP	100 µg/ml	30.21	18.23	9.78
	50 µg/ml	8.48	2.79	0.58
	12.5 µg/ml	1.03	0	0

^a Spleen cell (SC, 1.5×10^6 cells/ml) from N:GP mice were cultured with various doses of Korean red ginseng acidic polysaccharide(KRAP) and neutral polysaccharide(KRNP) on 24 well plates. On day 5 after culture, the viable cells were counted and coincubated with ⁵¹Cr labeled YAC-1 cells (5×10^3 cells/well). After additive 4hr incubation, cytotoxicity was determined by counting γ -ray in culture supernatant. The experiment was performed more than 5 times with similar results.

따라 임파구증식이 증가하여 산성도가 가장높은 KRAP7의 경우 대조군에 비하여 100배 이상의 ³H-thymidine incorporation (CPM)을 나타냈다.

2. KRAP에 의한 LAK cell 생성능 효과

말초혈액임파구를 rIL-2와 함께 5일 동안 배양시 NK세포로부터 LAK세포가 생성되므로 마우스 비장 세포를 KRAP와 함께 5일 동안 배양후 LAK세포 생성능 여부를 관찰하였다. Table 1에서 보는바와 같이 KRAP에 의해 용량 의존적으로 LAK세포가 생성되었으며 100 µg/ml에서 최대치를 보여 Effector: Target cells이 100:1, 30:1, 10:1 일때 Yac-1 암세포를 30.21%, 18.23%, 9.78% 살해하였다.

3. KRAP에 의하여 생성된 LAK 세포의 major histocompatibility (MHC)에 관계 없는 암세포 살해능

KRAP에 의해 생성된 LAK 세포가 MHC에 상관없이 암세포를 살해하는가를 관찰하기 위하여 NK-cell에 민감하게 살해되는 H-2^b형인 YAC-1 암세포, NK 세포에는 살해되지 않지만 LAK 세포에는 살해되는 H-2^d형인 P815, H-2^b형인 EL-4, H-2^b형의 HFL/b 암세포에 대한 살해능을 측정하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 KRAP 100 µg/ml의 농도에서 작동 세포와 표적 세포의 비율 (E:T)을 100:1로 했을때, YAC-1 암세포에 대해서는 31.2%, P-815 암세포에 대해서는 21.3%, HFL/b 암세포에 대해서는 23.4%, EL-4 암세포

Table 2. Promiscuous cytotoxicity of splenocytes cultured with KRAP

Culture ^a	Concentration	% Cytotoxicity (E:T=100:1)			
		YAC-1	P815	HFL/	EL-4
SC		6.9	6.8	3.4	5.4
SC+IL-2	100 U/ml	56.7	38.9	39.1	43.4
SC+KRAP	100 µg/ml	31.2	21.3	23.4	21.4

^a Spleen cells (SC, 1.5×10^6 cells/ml) from N:GP(S) mice were cultured with IL-2 or KRAP on 24 well plates in duplicate at 37°C in a CO₂ incubator. On day 5 after culture, the viable effector cells were counted and coincubated with ⁵¹Cr labeled YAC-1, P815, EL-4 or HFL/b cells (E:T=100:1). After additive 4hr incubation, cytotoxicity was determined by counting γ -ray in culture supernatant. The experiment was performed more than 5 times with similar results.

포에 대해서는 21.4%의 살해능을 보여주어 MHC에 상관없이 광범위한 암세포 살해능을 보여주었다. 양성 대조군으로 사용한 IL-2의 경우에도 MHC에 상관없는 광범위한 암세포 살해능을 보여주었다.

4. KRAP에 의해 생성되는 LAK 세포의 전구세포 표면 항원 검증

KRAP에 의해 생성되는 LAK 세포의 전구세포가 무엇인가를 알아보기 위한 실험을 시도하였다. 배양하기 전에 각 임파구 표면항원에 대한 항체 및 보체를 사용하여 총 T세포, CD4⁺ 세포, CD8⁺ 세포 및 NK 세포를 제거하였다. LAK 세포 생성시와 마찬가지로 KRAP와 5일간 배양하고 표적 세포에 대한 암세포 살해능을 관찰하였다. Table 3에서 보는 바와같이 IL-2를 300 U/ml의 농도로 배양했을 때는 NK 세포를 제거했을 때에만 암세포 살해능이 저하되었지만 KRAP의 경우에는 총 T세포, CD4⁺ 세포, CD8⁺ 세포 및 NK 세포를 각각 제거했을때 모두에서 암세포 살해능이 저하되었다. 따라서 고농도의 IL-2와 함께 배양했을 때는 NK 세포가 LAK 세포의 전구세포로 작용하나 KRAP의 경우에는 NK 세포 및 CD8⁺ 세포가 LAK 세포 생성의 전구 세포로 작용하며 CD4⁺ 세포는 helper T 세포로 작용하는 것으로 관찰되었다.

5. KRAP에 의한 LAK 세포 생성시 macrophage의 필요성 규명

KRAP가 LAK 세포를 생성하는데 macrophage가 accessory cell로써 어떠한 역할을 하는가를 관찰하

Table 3. Surface phenotype of the precursors of LAK cells generated by KRAP

Responder treatment ^a	Stimulus	% Cytotoxicity (E : T=100:1)	
		YAC-1	P815
Complement (C')	IL-2	49.4	26.6
	KRAP	40.4	26.5
C'+anti-Thy1.2	IL-2	48.1	28.2
	KRAP	14.1	9.6
C'+anti-CD4	IL-2	41.1	23.4
	KRAP	21.2	9.6
C'+anti-CD8	IL-2	47.7	24.7
	KRAP	26.3	9.7
C'+anti-AsGM1	IL-2	20.5	14.1
	KRAP	7.3	5.8

^a Spleen cells (SC, 1.5×10^6 cells/ml) from N:GP(S) mice were treated with or without antibodies, anti-Thy1.2, anti-CD4, anti-CD8 or anti-AsGM₁, and lysed with complements. After recounting, antibody treated cells (1.5×10^6 cells/ml) were cultured with IL-2 (300 U/μg) or KRAP (100 μg/ml) on 24 well plates in duplicate at 37°C in CO₂ incubator. Five days later, the viable effector cells were counted and coincubated with ⁵¹Cr labeled YAC-1 or P815 cells (5×10^3 cells/well). After additive 4hr incubation, cytotoxicity was determined by counting γ-ray in culture supernatant. The experiment was performed more than 5 times with similar results.

기 위하여 비장세포에서 adherent cell (SC_{ad})을 제거한 후 LAK 세포 생성을 관찰하였다. Table 4에서 보듯이 비장세포에 KRAP를 함께 배양시 34.6%의 P815 암세포를 살해하였다. 반면, SC_{nad}, 즉 비장세포에서 adherent cell (macrophage)를 제거한 후 KRAP와 함께 배양했을 때는 6.6%로 저하되었다. 그러나 SC_{nad}에 adherent cell (SC_{ad})를 10:1, 2:1 또는 1:1 비율로 첨가해 주면 암세포 살해능이 16.6%, 26.6% 및 30.6%로 회복됨을 관찰할 수 있었다. 한편, IL-2의 경우에는 adherent cell을 제거하면 암세포 살해능이 상승되는데 이는 macrophage에서 분비되는 prostaglandin E₂가 IL-2의 작용을 저하시키는 것이기 때문일 것으로 사료된다. 이로써, KRAP가 LAK 세포를 생성시키는데는 macrophage가 accessory 세포로 작용 하는 것으로 사료되었다.

6. AK 세포 생성에 있어서 KRAP와 IL-2의 상승 효과

RAP에 의해 LAK 세포가 생성될 때 macrophage 및 CD4⁺ T세포가 accessory 세포로 작용함을 알았고 이들 accessory 세포는 싸이토카인을 분비하는 주요 세

Table 4. Requirement of macrophages in the generation of LAK cells by KRAP

Culture ^a	Concentration	% Cytotoxicity against P815
		E : T=100:1
SC		7.8
SC+IL-2	100 U/ml	40.5
SC+KRAP	100 μg/ml	34.6
SC _{nad}		0
SC _{nad} +IL-2	100 U/ml	76.4
SC _{nad} +KRAP	100 μg/ml	6.6
SC _{nad} /SC _{ad} (10:1)		0
SC _{nad} /SC _{ad} +KRAP	100 μg/ml	16.6
SC _{ad} /SC _{ad} (2:1)		0
SC _{ad} /SC _{ad} +KRAP	100 μg/ml	26.6
SC _{ad} /SC _{ad} (1:1)		0
SC _{ad} /SC _{ad} +KRAP	100 μg/ml	30.6

^a Spleen cells (SC, 1.5×10^6 cells/ml) from N:GP(S) mice were cultured with IL-2 or KRAP on 24 well plates in duplicate. SC were incubated at 37°C in 5% CO₂ incubator for 3 hrs in T₃₀ culture flask and then the nonadherent spleen cells(SC_{nad}) and adherent spleen cells (SC_{ad}) were separated. Five days later, the viable effector cells were counted and coincubated with ⁵¹Cr labeled YAC-1 cells (5×10^3 cells/well). After additive 4 hrs incubation, cytotoxicity was determined by counting γ-ray in culture supernatant. The experiment was performed more than 5 times with similar results.

포로 작용하였을 것으로 생각되어, KRAP가 IL-2에 의한 LAK 세포 생성에 어떠한 영향을 미치는가를 관찰하였다. Table 5에서 보듯이 IL-2 단독으로 배양했을 때는 100 U/ml에서 37.1%, 6 U/ml에서 35.9%, 3 U/ml에서 12.2% 및 1 U/ml에서 1.1% 및 0.3 U/ml에서 0.1%의 암세포 살해능을 나타내었다. 그러나 KRAP와 함께 배양했을 때는 IL-2 각각의 농도에서 36.4%, 40.6%, 36.7%, 17.9% 및 20.6%로 IL-2농도 3 U/ml이하의 농도를 KRAP와 함께 배양했을 때는 100 μg/ml의 KRAP 단독 배양시보다 상승적인 암세포 살해능을 보여주었다. 따라서 고용량의 IL-2에서는 IL-2 자체만으로 LAK 세포의 생성을 유도할 수 있으므로 KRAP의 역할이 불필요 했으나 저용량의 IL-2와 함께 배양했을 때는 KRAP에 의해 생성된 IL-2, IFN γ, IL-1 및 TNFα 등이 역할을 하여 상승적인 암세포 살해능을 보여주는 것으로 사료되었다.

Table 5. Synergistic effect of KRAP and IL-2 on the generation of LAK cells

Concentration of IL-2*	% Cytotoxicity against YAC-1	
	SC+IL-2	SC+IL-2+KRAP
0	-	10.1
0.3 U/ml	0.1	20.6
1 U/ml	1.1	17.9
3 U/ml	12.2	36.6
6 U/ml	35.9	40.6
100 U/ml	37.1	36.4

* Spleen cells (SC, 1.5×10^6 cells/ml) from N:GP(S) mice were cultured with IL-2, KRAP or IL-2 plus KRAP on 24 well plate in duplicate at 37°C in 5% CO₂ incubator. Five days later, the viable effector cells were counted and coincubated with ⁵¹Cr labeled YAC-1 cells (5×10^4 cells/well). After additive 4 hr incubation, cytotoxicity was determined by counting γ -ray in culture supernatant. The experiment was performed more than 5 times with similar results.

고 찰

이상적인 항암면역증강제는 NK세포, T세포, 거식세포를 포함한 여러종류의 면역세포를 활성화시켜 암세포를 살해시키고 동시에 이를 여러종류의 암세포살해 면역세포를 증식시키는 물질이라고 사료된다.

인삼 물 추출물로부터 75% 에탄올에 침전되는 다당체는 실험관내 배양에서 비장세포를 증식시켰으며 (Fig. 1), LAK 세포를 생성 시켰다 (Table 1, Table 2). LAK 세포는 NK 세포 및 T 세포로부터 생성되는데 NK 세포는 IL-2만으로도 활성화되며, T 세포의 경우는 IL-2 이외에 TNF α , IFN γ 등 다른 사이토카인 및 대식 세포와 같은 보조 세포의 도움이 필요한 것으로 알려져 있다.^{2,3,16-18)} 인삼 다당체에 의한 LAK 세포 생성 기전을 파악하기 위해 IL-2에 의해 활성화되는 세포 및 인삼 다당체에 의해 활성화되는 세포를 분석한 결과 IL-2에 의해 활성화되는 세포는 AsGM1⁺인 NK 세포였고, 인삼 다당체에 의해 활성화 되는 세포는 AsGM1⁺인 NK 세포 및 CD8⁺인 T 세포 였으며, CD4⁺인 T 세포 (Table 3)와 대식 세포 (Table 4)의 도움을 필요로 하였다.

인삼 다당체는 낮은 농도의 IL-2와 함께 상승적으로 작용하였으며 (Table 5), 인삼 다당체에 의한 임파구 증식능은 산성도가 증가함에 따라 증가하였다 (Fig. 1). 따라서 인삼 다당체는 여러 종류의 항암 면

역세포를 동시에 활성화시키는 이상적인 항암 면역증강제로 개발될 가능성이 있다.

요 약

홍삼다당체를 산성도에 따라 분획한 후 각분획에 대한 실험관내 마우스 임파구 증식능 및 LAK 세포 생성능을 관찰하였다. 홍삼산성다당체는 실험관내 임파구를 증식시켰으며 홍삼다당체가 함유된 배지에서 5일간 배양된 비장세포는 자연살해세포에 의해 살해되는 Yac-1 암세포 및 자연살해세포에 살해되지 않은 P815, HFL/b 암세포를 조직적합성 항원의 제한없이 살해하였다. 이와같은 홍삼다당체에 의한 실험관내 항암면역증강작용은 산성도가 높은 분획일수록 증가하였다. 홍삼다당체에 의해 활성화되는 면역세포는 AsGM1⁺인 자연살해세포와 CD8⁺인 T세포였으며 이들 세포가 활성화되는 데는 대식세포 및 CD4⁺ helper T세포를 필요로 하고 저농도의 interleukin 2 (IL-2)와 상승작용을 나타내었다. 홍삼다당체에 의한 임파구 증식능은 1 mg/ml에서 최대반응을 보인 반면 AK 세포 생성능은 100 μ g/ml에서 최대반응을 보인 것으로 보아 홍삼다당체에 의한 임파구증식능 및 AK 세포 생성능의 작용기전이 다를 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국담배인삼공사에서 시행한 출연연구사업의 연구 결과입니다.

인 용 문 헌

1. Lotze, M. T., Grimm, E. A., Mazumder, A., Strausser, J. L., Rosenberg, S. A. : *Cancer Res.* **41**, 4420-4425 (1981).
2. Grimm, E. A., Mazumder, A., Zhang, H. Z., Rosenberg, S. A. : *J. Exp. Med.* **155**, 1823-1841 (1982).
3. Rosenstein, M., Yron, I., Kaufman, Y., Rosenberg, S. A. : *Cancer Res.* **44**, 1946-1953 (1984).
4. Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C., Reichert, C. M. : *N. Engl. J. Med.* **313**, 1485-1492 (1985).

5. West, W. H., Tauer, K. W., Yannelli, J. R., Marshall, G. D., Orr, D. W., Thurman, G. B., Oldham, R. K. : *N. Engl. J. Med.* **316**, 898-905 (1987).
6. Rosenstein, M., Ettinghaussen, S. E., Rosenberg, S. A. : *J. Immunol.* **137**, 1735-1742 (1986).
7. Lotze, M. T., Matory, L., Rayner, A. A., Ettinghausen, S. E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., Rosenberg, S. A. : *Cancer Res.* **58**, 2764-2772 (1986).
8. Itoh, K., Shiba, K., Shimizu, Y., Suzuki, R., Kumagai, K. : *J. Immunol.* **134**, 3124-3129 (1985).
9. Owen-Schaub, L. B., Gutterman, J. U., Grimm, E. A. : *Cancer Res.* **48**, 788-792 (1989).
10. Crump, W. L., Owen-Schaub, L. B., Grimm, E. A. : *Cancer Res.* **49**, 149-153 (1988).
11. Cameron, R. J., McIntosh, J. K., Rosenberg, S. A. : *Cancer Res.* **48**, 5810-5817 (1988).
12. von Rohr, A., Ghose, A. K., Thatcher, N., Stern, P. L. : *Br. J. Cancer* **67**, 163-171 (1993).
13. Mironova, A. I. : *Vopr. Onkol.* **9**, 42-44. (1963)
14. Lee, K. D., Huemer, R. P. *Jpn. J. Pharmacol.* **21**, 299-301 (1971).
15. Yun, T. K., Yun, Y. S., Han, I. W. : *Cancer. Detct. Prev.* **6**, 515-525 (1983).
16. Lanier L. L, Benike C. J, Philips J. H and Engleman E. G. : *J. Immunol.* **134**, 794-801 (1985).
17. Ortaldo J. R, Mason A and Overton R. : *J Exp. Medcin* **164**, 1193-1205 (1986).
18. Yang, J. C., Mule J. J. and Rosenberg S. A. : *J Immunol.* **137**, 715-722 (1986).
19. Silvennoinen O, Vakkila J and Hurmen M : *J Immunol.* **141**, 1404-1409 (1988).