

Enhanced macrophage function of red ginseng acidic polysaccharide (RGAP) in combination with IFN- γ

Hye-Sook Choi¹, Yi-Seong Kwak², Jong-Dae Park², Suhkneung Pyo¹

¹School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon, Kyunggi-do, ²KT&G Central Research Institute, Daejeon, Korea

In this study we examined the potential for the synergistic augmentation of the activity of inflammatory mouse peritoneal macrophages by stimulation with RGAP combined with IFN- γ . The moderate augmentative effect induced by preincubation with RGAP was observed in the production of IL-1, IL-6 and NO but not TNF- α . In addition, IFN- γ had a low activating effect. Following preincubation with both RGAP A and IFN- γ , a marked enhancement of secretory activity and tumoricidal activity was noted in mouse peritoneal macrophages. Treatment of peritoneal macrophage with combination increased the generation of IL-1, IL-6, TNF- α and NO, whereas the production of reactive oxygen species were not altered. These results demonstrate the synergistic effects on macrophage function of RGAP in combination with IFN- γ and suggest that the ability of IFN- γ to prime macrophages to produce secretory molecules in response to RGAP may have implications for immunotherapy with this combination.

1. 서론

면역작용을 증강시키기 위해서 오래전부터 면역활성화 물질을 사용해 왔다. 면역작용의 조절은 자가 면역 질환, 조직이식 및 암치료 등 다양한 질병에 적용할 수 있다 (1). 면역활성화 물질의 투여는 면역기능의 상승을 통해 암세포의 성장과 변형을 감소시키거나 변형된 암세포에 대한 면역기능을 증가 시켰으며, 특히 면역활성화 물질은 세포독성 치료(cytotoxic therapy)에 대한 내성능력을 조절하고, 방사선 또는 세포독성 화합물에 대한 감응성을 증가하고, 암전이를 감소 시키며, 간접적으로 면역반응을 일으킬 수 있는 물질로서 간주되어 왔다 (2). 유전공학의 발달, 대량의 세포배양, protein과 nucleic acid sequencing의 개선된 기술 등으로 인하여 면역 조절제에 대한 관심이 높아지고 있으며 새로운 기술에 의해서 interferon, interleukin, tumor necrosis factor와 growth factor 등을 포함한 순도가 높은 물질의 생산이 가능하게 되어 면역작용의 조절에 대한 연구가 빠르게 진행되고 있다. 이외의 새로운 물질, 특히 천연물질로부터 새로운 면역조절제의 탐색에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 이와 같이 다양하게 응용되는 면역조절물질의 생물학적 특성 및 작용기전을 이해하는 것은 효율적인 생체 반응조절제로서 새로운 면역조절제의 개발에 도움을 줄 것이다. 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 면역작용에 관해서는 사포닌 및 다당체를 중심으로 면역조절 작용에 관해 연구가 이루어져 왔다. 특히 홍삼 추출물은 비특이적 면역 및 특이적 면역계의 활성을 증가시킨다고 알려져 있으나 홍삼 성분의 면역세포 기능에 대한 구체적인 작용기전은 아직도 연구 중이다.

대식세포는 세포성 면역에서 가장 중요한 역할을 하는데 대식세포는 virus가 감염된 세포를 사멸하거나 감염된 세포내에서 virus의 복제를 억제함으로써 virus감염에 대한 방어 및 암에 대한 숙주 방어에서 중요한 역할을 하는 면역세포이다 (5-7). 대식세포는 다양한 물질에 의해 활성화 될 수 있는데 이러한 물질중에서 어떤 물질은 생체내에 투여 됐을 때 virus에 대해 저항성을 증가시킨다는 실험결과가 보고되었고 또한 세균의 생성물과 같은 물질이 비선택적으로 대식세포를 활성화하여 암의 증식을 억제하였음을 보고하였다 (8-14, 15-20). 이러한 대식세포의 작용은 독성물질이 생성되는 대사 경로가 자극되어 TNF- α , IL-1, hydrogen peroxide, NO, cytolytic protease 등과 같은 독성물질에 의해 바이러스 감염세포 및 암세포가 파괴된다고 보고되었다 (21-25).

현재 홍삼으로부터 홍삼추출물을 제조하고 부산물로 생성된 홍삼잔사물의 대부분은 폐기하고 있는 실정이다. 홍삼추출물을 제조할 때 부산물로 생성된 홍삼알콜추출잔사에는 면역계를 활성화한다고 보고된 glucuronic anid 및 galacturonic acid등의 상당한 양의 산성다당체가 용출되지 않고 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 홍삼으로부터 홍삼추출물을

제조하고 부산물로 생성되는 홍삼추출잔사의 산업적 활용성을 제고하고자 홍삼의 추출잔사로부터 분리한 홍삼산성다당체의 면역활성 연구도 매우 중요하리라고 사료된다. 그러므로 본 연구에서는 홍삼산성다당체를 대식세포에 단독 처리하거나 항암작용을 비롯한 다양한 기능을 증가시키기 위해 대식세포를 prime하는 IFN- γ 와 함께 처리하여 대식세포의 기능에 미치는 영향을 측정하였다

2. 재료 및 실험 방법

홍삼 부산물

홍삼(6년근, 양삼 30지, 한국인삼공사) 600g을 세절하여 5배량(v/w)의 80% EtOH을 가하고 80°C에서 3시간씩 4회 추출하여 사포닌등 비수용성 성분을 제거하였고, 추출후 생성된 홍삼추출잔사를 시료로 사용하였다.

실험동물과 시약

일본 Charles River Breeding Laboratories 사의 C57BL/6 생쥐(6주-8주)를 중앙동물로부터 공급받아 사용하였다. 모든 시약은 특별한 언급이 없는 한 미국은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. RPMI1640는 미국 GIBCO (Grand Island, NY)사에서 Fetal bovine serum (FBS)는 미국 Hyclone (Logan, Utah)사에서 각각 구입하여 사용하였다.

홍삼산성다당체의 대량분리및 정제

홍삼 부산물을 60°C에서 2일 동안 열풍건조 한 후 조분쇄하여 300g을 열수(95~100°C에서 3시간씩 4회반복)로 추출하여 이를 한외여과기(Ultrafiltration kit, Millipore, Pellicon 2, Cedford, MA, USA)를 이용하여 분자량 10 KD 이상과 이하로 나누었다. 이중 분자량 10 KD이상의 고분자량 화합물에 95%의 에탄올을 5배 (v/v)가하여 4°C에서 24시간 방치후한 후 열풍건조하여 황갈색의 홍삼산성다당체(RGAP, red ginseng acidic polysacch)를 대량분리하였다.

홍삼산성다당체로부터 활성성분의 분리 및 정제

홍삼산성 다당체 2g을 10mM Tris-HCl buffer(pH8.0) dir 70mL에 용해 한 후 여과 (3 μ m)하여 칼럼에 loading 하였다. 칼럼은 DEAE-Sepharose CL-6B 수지를 50mL 충진하였고, bed volum(100mL)의 5배인 500mL의 10mM Tris-HCl buffer(pH8.0)로 washing 한 후 0.5M NaCl이 함유된 동일한 buffer로 용출한 후 하기에 서술한 면역활성 측정방법에 의해 측정된 후 면역활성이 확인된 활성 성분을 RGAP로 명명하였다. 용출된 RGAP는 저온실에서 2~3일 동안 증류수로 투석하여 염을 제거한 후 동결건조하여 활성성분으로 사용하였다.

복강대식세포의 분리와 배양

Thioglycollate (Difco Labs, Detroit, MI) 1ml를 흰쥐의 복강에 투여하고 3-4일 후 각각 ether로 안락사 시킨 후 복강세포 중의 대식세포의 분리를 위하여 5 ml의 RPMI1640 배지를 복강에 주사하고 잘 흔든 다음 다시 주사기를 사용하여 유출하여서 1000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 침전된 세포를 10% FBS 함유 RPMI1640 지에 현탁시킨 후 세포 현탁액을 Teflon-coated petridish에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하고 2회 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거한 후 0.1M EDTA 300 ul 와 1.5% FBS 함유 D-PBS 용액 15 ml로 plate에 부착된 세포를 분리시킨 다음 1x10⁶ cells/ml의 농도로 희석시켜서 실험에 사용하였다.

암세포 사멸능력 측정

B16 흑색종암세포에 대한 대식세포의 항암효과를 측정하기 위해 96 well에 대식세포를 1 x 10⁵ cells/well의 농도로 넣고 RGAP, IFN- γ , RGAP+ IFN- γ 및 LPS+IFN- γ (양성대조군)등으로 각각 처리한 후 B16 을 1 x 10⁴ cells/well이 되도록 가하고 18시간동안 배양하였다. MTT (2 ug/ml) 25 μ l 를 가하고 4시간 더 배양한 후 생성된 formazan을 DMSO로 녹인 후 Microplate reader로 540 nm에서 측정하여 암세포 사멸능은 다음과 같이 계산하였다.

% of control = 100-[(OD macrophage + tumor target OD macrophage)/OD tumor target]x 100

NO의 생성도 측정

대식세포를 RGAP, IFN- γ , RGAP+ IFN- γ 및 LPS+IFN- γ 를 각각 18시간동안 배양한 후 상등액중의 NO 생성농도를 다음 방법에 따라 측정하였다. 100 ul 상등액을 취하여 96 well

plate에 옮긴 후 각각의 well에 100 ul의 Griess 시약을 가하여 Microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO농도는 NaNO₂를 사용하여 작성한 표준 곡선으로부터 계산하였다. Griess 시약은 증류수에 녹인 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride,와 5% H₃PO₄용액에 녹인 1% sulfanilamide를 동량씩 혼합한 것으로 사용직전에 만들어 사용하였다.

TNF- α , IL-1, IL-6 생성측정

TNF- α , IL-1, IL-6은 ELISA Kit를 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 홍삼추출물 (RGAP)에 의한 대식세포의 cytotoxicity 증강 및 분비성 효과

본 연구는 생쥐 복강내에서 추출한 대식세포(peritoneal macrophage)와 대식세포주(raw264.7와 IC21) 그리고 신경계에 존재하는 대식세포(microglia, C6) 등 다양한 환경에서의 대식세포를 이용하여 RGAP의 항암효과, NO, IL-1, IL-6 분비능에 대한 직접적인 효능을 측정하였다. RGAP를 0.1, 1, 10, 100 ug/ml 단독으로 처리했을 때 대식세포의 암세포사멸효과는 나타나지 않았다 (저농도의 RGAP 1, 10, 50 ng/ml에서도 암세포사멸효과가 없음을 확인). 같은 농도에서 NO와 TNF- α 는 분비가 증가되지 않았고, RGAP 1, 10 ug/ml에서 각각 IL-1과 IL-6 분비가 약간 증가하였다. 대식세포의 항암작용에 있어서 NO와 TNF- α 의 역할이 매우 중요한 것으로 알려져 있는데, RGAP가 직접적으로 대식세포의 항암작용을 증가시키지 못하는 것은 이러한 주요 항암매개물질 분비를 증가시키지 못하는데 있는 것으로 해석된다. 그러나 RGAP가 IL-1과 IL-6의 분비를 직접적으로 증가시키고 있는 것은 대식세포의 활성화에 분명히 관련되어 있다는 것이다.

나. RGAP/IFN- γ 에 의한 대식세포 활성화 효과

RGAP가 단독으로는 대식세포를 활성화하여 면역기능을 증강시키는데 미약하지만, 다른 물질과 함께 처리되었을 때, 즉 adjuvant로 처리되었을 때 대식세포의 활성화에 크게 영향을 미칠 것으로 기대하고, 주로 polysaccharide류 (예, LPS)와 함께 처리되어 항암효과를 극대화 시키고 있는 IFN- γ 와 함께 처리함으로써 그 효능을 재평가하였다. 연구 결과 RGAP 단독으로 대식세포에 처리했을 때 증가하지 않았던 항암작용과 NO와 TNF- α 생성이 IFN- γ 와 RGAP를 함께 처리 했을 때 유의성 있게 증가하였으며, 또한 IL-1과 IL-6의 분비는 매우 크게 증가하였다 (Fig. 1 & 2). 이러한 결과는 Han 등(26)이 RGAP를 Taxol(paclitaxel) 항암제와 함께 투여했을 때 synergic 효과를 나타내며, RGAP가 cancer therapy의 adjuvant로 사용될 가능성을 제시했던 결과와 흡사하다.

홍삼추출물에 대한 면역조절작용에 대한 연구결과들을 종합해보면, 동물실험에 있어서 대식세포의 항암효과를 보고하고 있다. 즉, RGAP를 투여한 동물에서 분리한 대식세포에서 NO에 민감하게 작용하는 P815 mastocytoma에 대한 항암효과를 보고하였고, 또한 대식세포에서의 NO 분비도 확인하였다. 이는 분명히 임상적으로 RGAP를 투여하였을 때 대식세포의 NO 분비 증가를 나타내는 것이다. 그러나 본 연구팀에서 수행한 in vitro system에서는 RGAP가 직접적으로 대식세포의 NO 분비를 증가하지 않았고, IFN- γ 와의 조합처리에 의해서만 NO 분비를 일으켰다. 이러한 결과는 생체내로 투여된 RGAP는 대식세포에 근접해 있는 다른 면역세포(주로 T-cell과 여겨짐)에 영향을 미치고, 다른 면역세포에서 분비되는 IFN- γ 등의 cytokine이 RGAP와 함께 대식세포에 영향을 미침으로써 NO, TNF- α 등의 분비를 증가시켜 대식세포의 항암활성을 증가시켰다는 해석을 가능하게 해준다. 이는 2002년 Choi 등 (27)이 발표한 생체내 연구에서 홍삼추출물은 세포성 면역 기능을 증가시키지만, 홍삼추출물에 의한 대식세포의 항암작용 및 탐식능의 증가는 주로 (또는 부분적으로) 세포성 면역 등의 다른 면역시스템의 활성화에 기인한다고 설명한 내용과 일치한다. 2004년 Suh 등 (28)이 발표한 위암환자 수술 후 RGAP를 처리했을 때 위암발생에 의해 감소되었던 IL-2 분비가 다시 증가하였다는 보고도 RGAP에 의한 T 세포의 활성화를 의미한다고 할 수 있다. 따라서 RGAP에 대한 in vitro system에서의 면역조절작용은 T-세포나 NK세포에서의 기전 연구가 필요하다고 사료된다.

참고문헌

1. Georgiev V: New synthetic immunomodulating agents. *Trends Pharmacol Sci.* 9:446, 1988.
2. Georgiev V: Synthetic immunomodulating agents. *Med Res Rev* 10:371, 1990.
3. Georgiev V: Immunomodulating activity of small peptides. *Trends Pharmacol Sci.* 11:373, 1990.
4. Georgiev V: Immunomodulating peptides of natural and synthetic origin. *Med Res Rev* 11:81, 1991.
5. Allison AC: On the role of mononuclear phagocytes in immunity. *Prog Med Virol.* 18:15, 1974.
6. Mims CA: Aspects of the pathogenesis of virus diseases. *Bact. Rev.* 28:30, 1964.
7. Mogensen SC: Role of macrophage in natural resistance to virus infections. *Microbiol. Rev.* 43:1, 1979.
8. Gangemi D, Nachtigal M, Barnhart D, Krech L, and Jani PJ: Theapeutic efficacy of liposome-encapsulated ribavirin and muramyl tripeptide in experimental infection with influenza and herpes simplex virus. *Infect. Dis.* 135:763, 1987.
9. Glasgow LA, Fischbach J, Bryant SM, and Kern ER: Immunomodulation of host resistance to experimental viral infections in mice. *J. Infect. Dis.* 135:763, 1977.
10. Kirchner H, Hirt HM, and Munk K: Protection against herpes simplex infection in mice by *Corynebacterium parvum*. *Infect. Immun.* 16:9, 1977.
11. McGeoch DJ: The genomes of the human herpesviruses: Contents, relationships and evolution. *Ann. Rev. Microbiol.* 43:235, 1989.
12. Morahan PS, Kern ER, and Glasgow LA: Immunomodulator-induced resistance against herpes simplex virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 154:615, 1977.
13. Sarzotti M, Copenhaver DH, Singh IP, Poast J, and Baron S: The in vivo antiviral effect of CL26,738 is mediated by the independent induction of interferon-alpha and interferon-beta. *J. Interferon. Res.* 9:265, 1989.
14. Singh IP, Copenhaver DH, Sarzotti M, Sryuktasuth P, Poast J, Levy HB, and Baron S: Postinfection therapy of arbovirus infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:2126, 1989.
15. Johnson RJ, Pasternack GR, and Shin HS. Antibody-mediated suppression of tumor. II. Macrophages and platelet cooperation with murine IG G1 isolated from alloantiserum. *J. Immunol.* 118:494, 1977.
16. Shin HS, Johnson RJ, Pasternack GR, and Economou S. Mechanisms of tumor immunity: The role of antibody and nonimmune effectors. *Prog. Allergy* 25:163, 1978.
17. Shin HS, Hayden M, Langley S, Kaliss N, and Smith MR. Antibody-mediated suppression of grafted lymphoma. *J. Immunol.* 114:1255, 1975.
18. Hibbs JB, Lambert LH, and Remington JS. Possible role of macrophage-mediated nonspecific cytotoxicity in tumor resistance. *Nature New Biol.* 235:48, 1972.
19. Ziegler-Hertbrock HW, Moller LA, Linke RP, Haas JG, Rieber EP, and Riethmuller LG. Tumor necrosis factor as effector and molecule in monocyte mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 46:5847, 1986.
20. Zarling JM, Schlais J, Eskra L, Greene JJ, Tso P, and Carter WA. Augmentation of human natural killer cell activity by polyinosinic acid-polycytidylic acid and its nontoxic mismatched analogues. *J. Immunol.* 124:1852, 1980.
21. Decker T, Lohmann-Mathes ML, and Gifford G. Cell associated tumor necrosis factor as killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J. Immunol.* 138:957, 1987.
22. Harrington DL, Crabbs CL, Hilmas DE, Brown JR, Higbee CA, Cole F, and Levy HB. Adjuvant effects of low dose of a nuclease resistant derivative of polyinosinic polycytidylic acid on antibody responses of monkeys to inactivated Venezuelan equine

- encephalomyelitis virus vaccine. *Infect. Immun.* 24:160 1979.
23. Mavrier P and Edgington TS. Human monocyte-mediated tumor cytotoxicity. I. Demonstration of an oxygen-dependent myeloperoxidase-independent mechanism. *J.Immunol.* 132:1980, 1984.
24. Hibbs JB, Vavrin Z, and Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cell. *J.Immunol.* 138:550, 1987.
25. Adams DO. Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages. I. Secretion of neutral proteases and effect of protease inhibitor. *J.Immunol.* 124:286, 1980.
26. Shin HJ, Kim YS, Kwak YS, Song YB, Kim YS, Park JD. Enhancement of antitumor effects of paclitaxel (Taxol) in combination with red ginseng acidic polysaccharide (RGAP). *Planta Med.* 70:1033-1038, 2004.
27. Choi MS, Kim YH, and Jang CC. Effect of red ginseng extracts on the immune response in mouse. *J Basic and Life Res. Sci.* 2(2):47, 2002.
28. Suh SO, Kim J, and MY Cho. Prospective study for Korean red ginseng extract as an immune modulator following a curative gastric resection in patients with advance gastric cancer. *J. Ginseng Res.* 28(2):104-110, 2004.

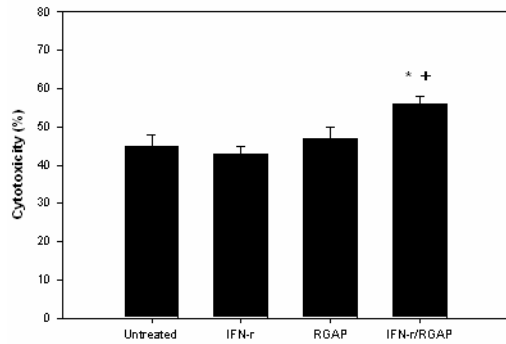


Figure 1. Tumoricidal activity of RGAP/IFN- γ -stimulated macrophages against B16 melanoma cells. Macrophages were treated with RGAP/IFN- γ and co-cultured with target cells for 18 hrs. MTT assay was performed as described in materials and methods. ⁺Significantly different from the group treated with RGAP or IFN- γ alone; P<0.05, ^{*}Significantly different from control (no treatment); P<0.05.

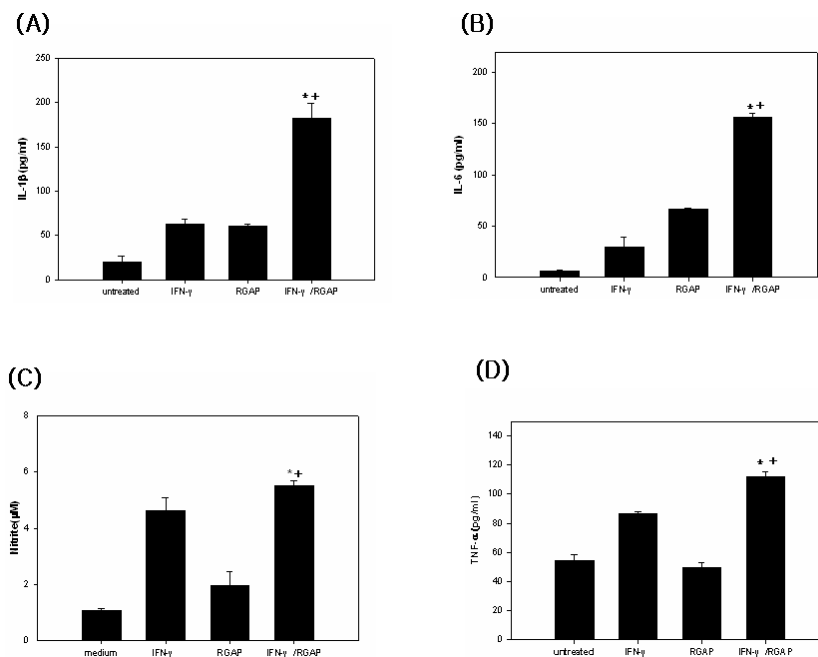


Figure 2. The effect of RGAP/IFN- γ on production of IL-1 (a), IL-6 (b), nitrite(c) and TNF- α (d) by macrophages.

Macrophages were treated with RGAP/IFN- γ for 18 hrs. Culture supernatants were collected and the levels of cytokines and nitrite were measured as described in materials and methods. ⁺Significantly different from the group treated with RGAP or IFN- γ alone; P<0.05, ^{*}Significantly different from control (no treatment); P<0.05.