

## 생쥐의 면역계에 미치는 인삼 사포닌의 영향

김미정·정노팔

연세대학교 이과대학 생물학과

(1987년 11월 11일 접수)

### The Effect of Ginseng Saponin on the Mouse Immune System

Mi-Jung Kim and No-Pal Jung

Dept. of Biology, Yonsei University, Seoul 120, Korea

(Received November 11, 1987)

#### Abstract

To detect the effect of ginseng saponin on the immune response, mice were immunized with a protein antigen (gamma-globulin of chick). Blood was then drawn from them twice, after 10 days of the first immunization and after 10 days of the second immunization respectively, and measurements were made by ELISA method of the antibody titer in antiserum. In addition, mice that has been immunized with the same antigen were treated with immunosuppressor to suppress the immune system of the mice. After the immune system was suppressed, the effect of ginseng saponin on the recovery of immune response was measured by the same method. The experimental groups those were given ginseng saponin (10 mg/kg/day) showed a little variance between individuals, however showed much higher antibody titer than the control groups those were given the saline solution. Moreover, there was a little recovery from the immune suppression. Although the mechanism of the effect of ginseng saponin on immune response was not well known, it is believed that ginseng saponin has the effect of increasing the synthesis of serum protein together with its action as one of the immunostimulators.

#### 서 론

인삼의 외적 유해인자들에 대한 방호효과를 연구 보고한 논문들을 보면, 1981년 Otsuka 등<sup>1)</sup>은 인삼의 chloroform 추출물 내에 강력한 항염(anti-inflammation) 성분이 있을 것이라고 주장하였고 세균감염에 대한 영향으로는 일부 항결핵제에 의한 결핵균 증식억제가 인삼에 의하여 증강된다는 보고가 있었으며(경, 1979)<sup>2)</sup>, *Ancylostoma caninuss*로 감염시킨 흰쥐와 개에서 인삼의 투여로 혈중 총단백질량과  $\beta$ 과  $\gamma$ -globulin의 증가를 나타내었으며 구충감염에 대한 저항성이 높아졌다고 보고하였다(소 등, 1976)<sup>3)</sup>.

물리적 자극에 대한 방호효과로는 X-선 조사에 대한 연구 보고들을 들 수 있는데, 생쥐에

X-선을 조사하였을 때 인삼 추출물의 투여군에서 간조직의 non-protein sulfhydryl과 reduced glutathion의 함량이 저하되었으며, X-선 조사로 급격하게 상승되는 non-protein sulfhydryl의 함량도 인삼 투여군에서 정상적으로 유지되어 인삼이 X-선 조사로 인한 조직손상에 대하여 방호작용을 할 것이라고 보고하였으며(오, 1972)<sup>29)</sup>, Takeda 등(1978)<sup>27)</sup>은 인삼이 X-선 조사에 의한 골수사를 방호함을 관찰하고 이와같은 작용은 인삼 추출물이 조혈세포를 직접적으로 부활시킨다기 보다는 간접적인 효과일 것이라고 추론한 바 있다.

면역기능을 통한 인삼의 생체방호작용을 연구한 보고들을 보면(김 등, 1978<sup>25)</sup>; Yeung, 1980<sup>23)</sup>; Singh *et al.*, 1984)<sup>14)</sup> 그 결과가 일부 상반되는 것을 볼 수 있다. 그러나 이 실험에서는 항체가 측정방법으로 예민한 반응을 나타내는 ELISA 방법을 사용하여 생쥐의 체액성 면역에 미치는 인삼 saponin의 영향을 규명하려고 하였으며, 또한 면역억제제(immunosuppressor)를 사용하여 면역계를 억제시킨 후 그 회복에 미치는 영향을 알아보기 위하여 같은 방법으로 항체가를 측정하였다<sup>1,2,3,10,12,19)</sup>.

이러한 실험으로 인삼 saponin의 면역에 대한 영향과 아울러 면역증진 또는 억제된 면역계의 회복에 대한 유효시기 등에 대하여 알아보하고자 하였다.

## 실험재료 및 방법

실험동물로는 생후 4-6주되는 평균 체중 30g의 ICR계 숫생쥐를 사용하였고 saponin은 ethanol과 petroleum ether, butanol을 이용하여 인삼으로 부터 추출하여<sup>28)</sup> 10 mg/ kg의 농도로 실험기간동안 매일 복강내 주사하였다. 항원으로는 닭의  $\gamma$ -globulin을 사용하였고, 1차 면역시에는 항원 150  $\mu$ g과 Freund's complete Adjuvant(Difco Lab, USA)를, 2차 면역시에는 항원 300  $\mu$ g과 incomplete adjuvant를 각각 사용하여 복강내 주사로서 실시하였다. 면역억제제로는 cyclophosphamide를 사용하여 100 mg/ kg의 농도로 면역과 동시에(0 day), 면역 하루 후에(+1 day), 그리고 50 mg/ kg의 농도로 같은 조건하에(0 day, +1 day) 각각 단일 투용량으로 복강내 주사하였다. 채혈은 1차 면역후 10일, 2차 면역후 10일에 하여 혈청을 분리한 다음 이것을 PBS로 50배, 100배, 200배, 400배 순으로 이중 연속희석(two fold serial dilution)하여 그 희석배수로서 항체가를 측정하였고 측정방법은 ELISA system을 사용하였다.

사용효소로는 HRP(Horseradish Peroxidase)와 ALK(Alkaline phosphatase)이며 HRP의 경우는 ABC(Avidin Biotin Complex) system을 이용한(Hsu *et al.*, 1981)<sup>15,16,17)</sup> Vectastain ABC kit와 그 기질로서 ABTs와 OPD를 사용하였고, ALK의 경우에는 ABC system을 사용하지 않고 그 기질로서 P-n, p, p, 를 사용하였다.

ELISA 전개후의 판독은 HRP와 ABTs의 경우에는 육안적 관찰을 하였고, HRP와 OPD의 경우에는 492 nm에서, ALK와 P-n, p, p, 의 경우에는 405 nm에서 각각 흡광도를 측정하였다.

## 실험결과

Table 1에서 항체가의 측량은 ELISA법에 의하였고, 기질로서 ABTs를 사용하여 육안적 관찰을 하였으며 그 항체가를 Table 1에 정리하였다. 1차 면역후 10일의 항체가는 대조군에 비하여 saponin 군이 2배이었으나 2차 면역후 10일은 대조군과 같은 항체가를 나타내었다. 1

**Table 1.** Antibody titers of visible reading by means of ABTs to the ginseng saponin effects on the antibody production and the recovery of immunosuppression

number	immunization	suppressor (mg/kg)	incubation time (day)	control	saponin*
1	1st	—	10	1600	3200
2		—	10	12800	12800
3	1st	100	10(0)	400	400
4	1st	100	10(+1)	400	400
5	1st	50	10(0)	3200	3200
6	1st	50	10(+1)	400	1600
7	2nd	100	10(0)	3200	6400
8	2nd	100	10(+1)	1600	3200
9	2nd	50	10(0)	6400	6400
10	2nd	50	10(+1)	12800	12800

\*Ginseng saponin 10 mg/kg/day

차 면역과 면역억제제 (100 mg) 처리군과 +1 day 억제제 (100 mg) 처리군에서 saponin 효과는 나타나지 않았다. 1차 면역과 억제제 (50 mg) 처리군에서도 saponin 효과가 나타나지 않았으나 +1 day 억제제 (50 mg) 처리군에서 대조군보다 4배 증가하였다. 2차 면역과 억제제 (100 mg) 처리군에서 대조군보다 2배, +1 day 억제제 (100 mg) 처리군에서도 2배 증가하였다. 2차 면역과 억제제 (50 mg) 처리군, 2차 면역과 +1 day 억제제 (50 mg) 모두 saponin의 효과는 관찰되지 않았다.

**Table 2.** Determinations of antibody titers by means of OPD to the ginseng saponin effects on the antibody production and the recovery of immunosuppression

number	immunization	suppressor (mg/kg)	incubation time (day)	control	saponin*
1	1st	—	10	3200	6400
2	2nd	—	10	12800	51200
3	1st	100	10(0)	1600	800
4	1st	100	10(+1)	200	800
5	1st	50	10(0)	1600	3200
6	1st	50	10(+1)	100	800
7	2nd	100	10(0)	3200	3200
8	2nd	100	10(+1)	800	3200
9	2nd	50	10(0)	3200	25600
10	2nd	50	10(+1)	3200	12800

\*Ginseng saponin 10 mg/kg/day

Table 2에서 항체의 측정은 기질로서 OPD를 사용하여 파장 492 nm 범위 0-2에서 각각의 흡광도를 측정하였고, 그 흡광도가 1.0 이상인 것을 항체가로서 정리하였다. Table 2에서 1차 면역후 10일의 항체는 대조군에 비하여 saponin군이 2배, 2차 면역후 10일은 4배를 나타내

었다. 1차 면역과 면역억제제 (100 mg) 처리군에서는 대조군보다 saponin군이 1/2 되었으나 +1 day 억제제 (100 mg) 처리군은 saponin군이 4배의 효과를 나타내었다. 1차 면역과 면역억제제 (50 mg) 처리군에서는 대조군보다 2배, +1 day 억제제 (50 mg) 처리군은 8배의 효과를 나타내었다. 2차 면역과 억제제 (100 mg) 처리군에서는 대조군과 같았으나 +1 day 억제제 (100 mg) 처리군에서는 4배의 효과를 나타내었다. 2차 면역과 억제제 처리군은 8배, +1 day 억제제 (50 mg)은 4배의 효과를 나타내어 전반적으로 인삼 saponin은 회복효과를 나타내었다.

## 고 찰

Oura 등 (1975)<sup>19)</sup>은 인삼 saponin은 *in vivo* 투여시 대사자극 (metabolic stimulation)을 일으키고 혈청 단백질 (albumin, globulin)의 생합성을 자극한다고 보고하였고, saponin이 간과 골수에 있는 DNA, RNA 단백질에 호르몬양 작용을 한다고 보고하였으며, 김 등 (1978)<sup>20)</sup>은 인삼 투여 동물에서 장내 세균 발육과 *Salmonella typhi* 또는 양 (sheep)의 적혈구에 대한 항체생성능을 관찰한 바, 인삼 투여 동물에서 *Escherichia coli* 균주의 감소와 *Lactobacillus* 균주의 증가는 볼 수 있었으나 항체생성능에는 유의할 만한 변화를 없었다고 보고하였다. Yeung (1980)<sup>23)</sup>은 인삼 saponin이 cytotoxic T cell, NK cell 활성화에는 영향을 주지 않았으나 virus와 SRBC에 대한 DTH를 억제하였고, 예방적 항염작용이 관찰되었는데, 이것은 saponin의 스테로이드양 구조와 관련된 것으로 보고하였다. 그러나 Singh (1984)<sup>18)</sup>은 인삼 saponin은 외적 유해인자에 대한 비특이적 생체저항력을 증진시켜주며 물리적, 화학적, 생물학적인 외적 변화에 대해 작용으로 작용하며 말초 혈액 림프구에 대한 면역 IFN 합성을 촉진하고 virus에 감염된 흰쥐에 대해 치료 효과가 뚜렷하며 SFV (Semliki Forest Virus)에 감염된 후 계속 경구 투여하면 30-40%의 보호효과가 있음을 관찰하였고, 또한 SRBC에 대한 혈액 항체가 증가되었고 SFV 항원에 대한 면역성이 높았으며 NK cell 활성의 증가, 6MFA (interferon inducer)의 생성을 증가시킨다고 하였다. 위와 같은 다양한 실험의 보고들을 기초로 하여 본 실험에서 얻은 결과는 1차 면역후 10일의 항체가가 saponin 투여군이 훨씬 높은 것으로 보아 혈청내의  $\gamma$ -globulin 즉 항체의 증가는 saponin의 단백질 합성 촉진의 결과로 사료된다.

일반적으로, 특이약물 유도 면역학적 반응은 항원자극에 반응하여 증식해가는 면역 세포군을 약물이 선택적으로 장애하는 결과 특이적인 불응성이 얻어지는 것으로 생각되고 있다. 면역관용을 유도하는 면역억제제로서는 saponin의 X-선 방호효과와 관련<sup>29)</sup>하여 X-선과 유사한 세포장애성을 나타내는 CY를 사용하였는데, 이것은 약물유도 면역억제에 가장 널리 쓰이는 alkylating agent이며 간에서 활성형태로 바뀌게 된다 (Brock *et al.*, 1971)<sup>6)</sup>. 이것은 다른 억제제와는 달리 항원자극전이나 후에 투여해도 모두 억제작용을 나타내는데 항원자극후 24-48 시간에 투여했을 때 가장 현저하게 억제감수성이 나타난다고 보고되어 있다. (Foley *et al.*, 1961<sup>7)</sup>; Santos, 1967<sup>22)</sup> Frish *et al.*, 1965<sup>8)</sup>; Uy *et al.*, 1966<sup>21)</sup>; Santos *et al.*, 1969<sup>13)</sup>; Berenbaum, 1962)<sup>4,5)</sup>. 따라서 CY는 면역반응의 다른 stage보다도 면역계의 증식과 분화에 영향을 끼치는 것으로 사료된다.

억제제 투여후의 이 실험의 결과들을 볼 때 위의 보고들과 일치하여 saponin 투여군의 회복 정도가 훨씬 높음을 알 수 있었다. 그리고 saponin 투여군에서는 2차 면역후의 항체가보다는 1차 면역후의 항체가 상승이나 회복효과가 높은 것으로 보아 인삼 saponin은 면역계의 발생

기 즉, 항원자극으로 인한 림프구의 분화, 증식을 촉진시켜주는 것으로 사료되며, 이것은 인삼 saponin 성분이 세포의 분열, 증식을 촉진시켜준다는 보고(Sun, 1933<sup>18)</sup>; 정, 1969<sup>30)</sup>; 정, 1973<sup>31)</sup>; Yamada, 1955<sup>22)</sup>; 김과 김, 1969<sup>25)</sup>)와도 일치한다.

이 실험에서는 인삼 saponin이 체액성 면역에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈청 항체가를 측정하였고, 면역억제제를 사용하여 그 면역계를 억제시킨 후 회복에 미치는 영향을 알아보았다. 그러나 saponin이 면역계와 항원, 또는 억제제와 어떠한 화학적 상호작용을 할 것이라는 등의 기작은 규명하지 못하였으므로 이 실험을 기초로 하여 더욱 세부적인 연구 즉, saponin의 적정농도와 분획별 유효성분 확인, 방사성 동위원소 등을 사용한 기작 규명 등의 연구가 계속 되어야 할 것이다.

## 요 약

인삼 saponin이 면역작용에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생쥐에 단백질 항원(암닭의  $\gamma$ -globulin)으로 면역시킨 후 1차 면역후 10일, 2차 면역후 10일에 각각 채혈하여 혈청내의 항체가를 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) method로 측정하였고, 또한 같은 항원으로 면역시킨 생쥐에 면역억제제를 사용하여 생쥐의 면역계를 억제시킨 후 그 회복에 미치는 영향을 알아보기 위하여 같은 방법으로 항체가를 측정하였다.

인삼 saponin을 투여한 실험군(10 mg/ kg/ day)은 개체에 따라 약간의 차이는 있었으나 같은 조건의 생리식염수 투여군보다 각각 훨씬 높은 항체가를 나타내었고, 면역억제제에 의한 면역억제의 회복에 있어서도 유의성있는 회복효과를 나타내었다.

따라서 면역작용에 미치는 인삼 saponin의 영향은 정확한 기작은 밝혀지지 않았으나 인삼 saponin이 혈청단백질 합성을 증가시키는 효과와 함께 일종의 면역자극제(immunostimulator)로 작용하고 있는 것으로 생각된다.

## 인용문헌

1. Amira, M. and Schwartz, R.S.: On the mechanism of immunological tolerance in cyclophosphamide-treated mice. *Clin. Exp. Immunol.* **6**, 87 (1970).
2. Amira M. and Schwartz, R.S.: Drug-induced immunologic tolerance: site of action of cyclophosphamide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **133**, 754 (1970).
3. Andres, G.: Principles of immunopharmacology. *Medical Pharmacology* 11th ed.: 711 (1984).
4. Berenbaum, M.C.: A Screen for agents inhibiting the immune response and the growth of tumors. *Nature* (London) **196**, 384 (1962).
5. Berenbaum, M.C.: The effect of cytotoxic agents on the production of antibodies to TAB vaccine in the mouse. *Biochem. Pharmacology* **11**, 29 (1962).
6. Brock, N., Gross, R. Hohorst, H.J., Klein, H.O. and Schneider, B.: Activation of cyclophosphamide in man and animals. *Cancer*. **27**(6), 1512 (1971).
7. Foley, G.E., Friedman, O.M. and Drolet, B.P.: Studies on the mechanism of cytoxan. Evidence of activation *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res.* **21**, 57 (1961).
8. Frish A.W., and Davis, G.H.: Inhibition of hemagglutinin synthesis by cytoxan. *Cancer Res.* **25**, 745 (1965).
9. Oura, H., Hia, S., Odaka, Y. and Yokozawa, T. : Studies on the Biochemical action of Ginseng Saponin

- I. Purification from ginseng extract of the active component stimulating serum protein biosynthesis. *J. Biochem.* **77**, 1057 (1975).
10. Langrance, P.H., Mackness G.B. and Miller, T.E.: Potentiation of T-cell-mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide. *J. Exp. Med.* **39**, 1529 (1974).
  11. Otsuka, H., Komiya, H., Fujioka, S., Goto, M., Hiramatsu, K. and Fujimura, H.: Studies on anti-inflammatory agents, IV. Anti-inflammatory Constituents from roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer, *Yakugaku Zasshi* **101**(11), 113 (1981).
  12. Santos, G.W.: Immunosuppressive drugs. I. Fed. Proc, **26**, 907 (1967).
  13. Santos, G.W. and Owens, A.H.: Allogenic marrow trans-plantation in cyclophosphamide-treated mice. *Transplantation Proc.* **1**, 44 (1969).
  14. Singh V.K., Agurwal, S.S. and Gupta, B.M.: Immunomodulatory activity of *Panax ginseng* extract. *Pro. 4th INTL Ginseng Symposim.* 225 (1984).
  15. Hsu, S.M. and Raine, L.: Protein A, Avidin and Biotin in Immunohistochemistry. *J. Histochem. cytochem.* **29**(11), 1349 (1981).
  16. Hsu, S.M., Raine L. and Fanger, H.: Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, *J. Histochem. Cytochem.* **29**(4), 577 (1981).
  17. Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H.: A comparative study of the peroxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with RIA antibodies. *Am. J. Pathol.* **75**, 734 (1981).
  18. Sun, I.S.: *Arch. Exp. Path. M. Pharmacol.* **170**, 443 (1933).
  19. Ha, T.Y. and Chung, H.T.: Effect of cyclophosphamide on humoral and cellular immune response in mec. *J. Korean Me. Assoc.* **20**(11), 985 (1977).
  20. Takeda, A. and Yonezawa, M.: Substances stimulating recovery for radiation injury. *Radioisotope* **27**(11), 43 (1978).
  21. Uy, Q.L., Srinivasin, T., Santos, G.W. and Owens, A.H.: Effect of selected cytotoxic agents on the primary immune response in mice. *Exp. Hematol.* **15**, 46 (1966).
  22. Yamyda, M.Y.: Pharmacological studies on *Panax ginseng*. *Folia Phamacol. Jap.* **51**, 390 (1955).
  23. Yeung, H.W.: Effect of ginseng on the immune responses to influenza virus infection in mice. *Proc. The 3rd International Ginseng Symposium.* 245 (1980).
  24. 경용택 : 인삼추출물이 결핵균 감염에 미치는 영향에 관한 연구, 충남의대잡지 **6** (2) : 477(1979).
  25. 김익제, 김학현 : Walker Carcinoma 256 백서 골수 이식에 미치는 고려인삼의 영향에 관한 연구, 카톨릭대학 의학부 논문집 **16**: 161(1969).
  26. 김주덕, 이영남, 이봉기 : 인삼의 약리학적 효능에 관한 연구, 최신의학 **21**(10) : 79(1978).
  27. 소진탁, 이진수, 김상준 : 인삼이 기생충 감염에 미치는 영향에 관한 연구, 연세의대 논문집 **9**(2) : 119(1976).
  28. 원광애, 정도팔 : 인삼 사포닌이 Lysosome의 안정성에 미치는 영향, 고려인삼학회지 **9** (1) : 119(1985).
  29. 오장석 : Reduced glutathione 및 인삼 추출액이 X-선 전신조사를 입은 mouse의 간조직 및 혈중 NP-SH 및 NP-SS에 미치는 영향, 대한생리학회지 **6**(2) : 57(1972).
  30. 정도팔 : 인삼의 효과에 관한 세포생리학적 연구I *Saccharomyces*의 분열에 미치는 영향, 대한생리학회지 **3**(1) : 45(1969).
  31. 정도팔 : 세포노쇠에 미치는 인삼의 영향, 연세논총**10**: 49(1973).