

생쥐의 자연살해세포에 미치는 인삼 분획물들의 영향

김미나 · 정노팔

연세대학교 이과대학 생물학과

(1989년 9월 28일 접수)

The Effect of Ginseng Saponin Fractions on NK Activity in Mice

Mina Kim and Noh-Pal Jung

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

(Received September 28, 1989)

Abstract □ Natural killer (NK) cells are a heterogeneous subpopulation of lymphocytes that spontaneously exhibit cytotoxic activity against various virus-infected and neoplastic target cells without prior exposure to a specific antigen. It was thought that NK cells play an important role in immunosurveillance against viral agents and tumors, and in prevention of metastasis. Recently, several reports have indicated evidence that ginseng extracts show a significant stimulatory effect on the humoral and cellular immune responses. This evidence gives support to the suggestion that the anticarcinogenic effect of ginseng may be due to the effect of ginseng on the immunological system. Treatment with total, diol, and triol saponin resulted in an increase in NK cytotoxic activity, but no enhancement of the lytic activity due to the natural killer cytotoxic factor (NKCF). Therefore, these results suggest that the augmentation of NK activity by ginseng saponin fractions may not be due to the activation of NKCF lytic activity.

Keywords □ ginseng saponin, natural killer cell, natural killer cytotoxic factor, large granular lymphocyte.

서 론

선택적 방어기전 특히, 임파구나 대식세포에 의한 자연 항암저항성에 대한 관심이 증가하고 있다. 자연살해(NK)세포는 1970년대 중반 종양세포에 대한 세포매개 독성 연구 중 발견된¹⁾ 이후 활발한 연구가 되어 오고 있는데 형태학적으로 큰 과립상임파구(large granular lymphocyte)에 속하고²⁾ 부유성(non-adherent), 비식작용(non-phagocyte)의 특징을 가지며³⁾ 성숙한 T 임파구와는 달리 기능적으로 재배열된 T 세포 수용기(receptor) 유전자를 가지지 않는다.^{4,5)} 이들은 생체에서 항원에 대한 사전 감작없이 바이러스에 감염된 세포 혹은 종양세포 등을 파괴시키는 능력이 있다.⁶⁾ 또한 NK 세포는 급성조직 이식 거부반응(acute graft rejection), 신형성(neoplasia)과 전이(metastasis)의 저지에 중

요한 조절역할을 하는 등^{8,27)} 숙주의 면역감시 기전에 중요한 역할을 하는 것으로⁹⁾ 추측되고 있다.

자연살해 활성도는 많은 요인에 의해 변화되어지는데 Interferon(IFN), 인터페론 유도체(Interferon-inducer)와 Interleukin-2(IL-2)는 NK 세포독성을 증가시키며^{10,26)} 반대로 prostaglandin E(PGE), glucocorticoid와 같은 면역약리학적(immunopharmacological) 물질들은 NK 세포독성을 억제하는 것으로 보고되었다.¹¹⁾

반면에 NK 세포에 대한 연구가 계속 되어오고 있지만 그 작용기작에 대해서는 부분적으로만 알려져 있다. Roder¹²⁾ 등이 NK 세포가 표적(target)을 인지, 부착하고 난 후에 표적을 파괴하는 세포독성 매개체(mediator)를 분비한다는 자극-분비(stimulation-secretion)설을 제안한 이후 최근에는 몇몇 증거들을 기초로 NK 세포와 NK-감수성 표적세

포 사이의 작용에 대해 몇 가지 단계, (1) 인지/부착(recognition/binding), (2) Programming for lysis, (3) Killer cell-independent cytolysis로 나누고 있다.^{13,14)}

한편, 인삼은 동양에서 가장 널리 쓰이는 자연 강장제로서 Garrigue¹⁵⁾가 북미산 인삼(*Panax quinquefolium* L.) 뿌리에서 panaquilon이라는 saponin 성분을 분리한 이래로 인삼에 대한 화학적, 생화학적 연구와 더불어 약리적, 생리적 효능에 대한 폭넓은 연구가 계속되었다.

특히 Brekman과 Dardymov¹⁶⁾가 인삼이 개체의 비특이적 저항성을 증대시키는 효과가 있다고 보고한 이후 인삼의 방호효과에 대한 연구들이 활발히 되어지고 있다.

Fabio¹⁷⁾는 인삼추출물이 유의성있는 면역촉진작용을 나타낸다고 보고하였는데 면역기능에 관련된 논문들을 보면 Singh¹⁸⁾ 등은 인삼 투여로 세포의 항체 생성능이 증가되었으며 양의 적혈구세포에 대한 혈행항체의 역가가 증진되었고 Semliki forest virus(SFV) 항원에 대한 면역성이 높아지며 NK 세포의 활성화도도 크게 증가된다고 보고하였다. 또한 인삼추출물이 예방적 항염 반응(prophylactic anti-inflammatory action)을 나타낸다는 보고,¹⁹⁾ 인삼이 혈장 단백질의 생합성을 자극시키며, β 및 γ -globulin의 증가를 나타낸다는 보고가 있다.²⁰⁾

근래에 들어 인삼의 항암효과에 대한 연구들이 많이 수행되고 있는데 Katano²¹⁾ 등의 *in vitro* 실험에서 인삼 성분 중 panaxytriol이 몇 가지의 인체 암세포와 악성 백혈병세포의 성장을 억제하였다는 보고, 황우익 등의 인삼의 지용성 성분이 암세포의 증식 억제에 효과가 있다는 보고, Wang 등²²⁾의 인삼 다당류가 항암작용이 있다는 보고들이 있다. 특히 이러한 항암효과가 NK 세포의 활성화도의 증대와 관련이 있다는 보고도²³⁾ 나오고 있다. 하지만 total saponin이 A/W Sn Influenza virus로 감염된 쥐에서 NK 세포 활성화도와 세포독성 임파구(cytotoxic T lymphocyte)의 활성화도에 별 효과를 나타내지 않는다는 상반된 보고도 있다.¹⁸⁾

본 실험에서는 생쥐의 생체에서 종양의 성장에 저항성을 일으킨다고 알려진 NK 세포의 활성화에 인삼추출물이 미치는 영향을 알아보고 특히, 인삼사포닌

제 각 분획물들의 NK 세포 활성화에 대한 작용 양상의 차이를 알아보고자 하였다. 또한 NK 세포의 세포독성 기작 중 자극된 NK 세포가 분비한다고 알려진 NKCF에 대한 인삼 사포닌 분획물들의 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 표준사료로 사육한 체중 20 ± 2 mg의 생후 4-6 주된 C57B1/6 마우스를 암수 구별없이 사용하였다.

NK 세포와 NKCF에 의한 세포독성을 측정하기 위한 표적세포로는 YAC-1 세포를 이용했다. 이 세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 HAM(DME/F12) 배지(Sigma, U.S.A.)에 열불활성화시킨 우태아 혈청, penicillin 100 unit/ml 및 streptomycin $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 첨가된 배지(이하 DME/F12 배지로 약함)를 사용하여 계대배양하였다.

인삼 분획물은 6년근 홍삼으로부터 분리한 total, diol 그리고 triol saponin을 한국인삼연초연구소로부터 분양받아 thin layer chromatography로 인삼 분획물을 확인하여 사용하였다.

2. 실험방법

주효세포(Effector Cell): 생쥐를 Fig.1에서와 같이 각각 시간별로 희생시켜 무균적으로 비장을 채취하였다. 이 비장을 가위로 잘게 자르고 stainless sieve를 통하여 여과시켜 무혈청 DME/F12 배지를 사용하여 단세포 부유액을 만들었다. 그 후 적혈구를 제거하기 위하여 원심침전시켜 세포를 멸균 증류수로 10초간 저장성 쇼크를 하였다. 이를 다시 DME/F12 배지에 부유시킨 다음 plastic dish(복습자, 55×12 mm)에 넣어 37°C , 5% CO_2 항습 항온기에 1시간 배양한 후 가볍게 흔들어 부유된 세포(non-adherent cell)만을 채취하여 Fig.1와 같이 인삼 분획물들을 각기 처리한 후 1×10^6 cells/ $100 \mu\text{l}$ 농도로 DME/F12 배지에 재부유시켜 사용하였다.

표적세포(Target Cell): 표적세포로 사용한 YAC-1 세포 1×10^6 cells/ $200 \mu\text{l}$ 을 $100 \mu\text{Ci}$ Na_2

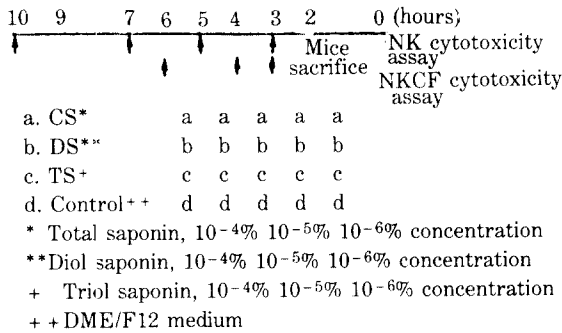


Fig. 1. Experimental scheme for treatment of saponins.

⁵¹CrO₄ (1 mCi/ml, NEZ-0305, New England Nuclear, Boston, MA, U.S.A.)와 37°C 전탕 항온조에서 1시간 표지화 (labelling) 시켰다. 그 후 3회 세척하여 표지화된 세포를 1 × 10⁴ cell/100 μl 되게 DME/F12 배지에 부유시켰다.

NKCF의 생성 : NKCF의 생성방법은 Bon-
 avida²⁵⁾의 방법을 따랐다.

NK세포의 세포독성 : 표지된 YAC-1 세포를 이용하여 4시간 ⁵¹Cr 방출방법 (4h-⁵¹Cr release assay)을 이용하여 수행하였다. 즉, ⁵¹Cr이 표지된 세포를 microplate (Costar, 96 wells, U.S.A.) 각 well 당 10⁴ cells/μl 되게 넣고 주효세포; 표적세포의 비율 (E : T ratio)을 100 : 1 이 되도록 주효세포를 0.1 ml 넣어 37°C, 5% CO₂ 흡습 항온기에서 4시간 작용시켰다. 이 때 최대방출 (maximum release)을 유발시키기 위해서 0.25% Triton X-100 (Sigma)을 가하였고 자연방출 (spontaneous release)을 측정하기 위해서는 ⁵¹Cr이 표지화된 세포만을 DME/F12 배지에 배양시켰다. 작용 4시간 후 50 μl의 상층액을 수거하여 gammacounter로 방사능을 측정하였으며 NK세포의 세포독성은 다음 공식에 의하여 계산하였다.

$$\% \text{cytotoxicity} = \frac{\text{test release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

NKCF에 의한 세포독성 : 표지된 YAC-1 세포로 24시간 ⁵¹Cr 방출방법 (24h-⁵¹Cr release assay)을 이용하였다.²⁴⁾ 우선 ⁵¹Cr이 표지화된 세포를 microplate 각 well 당 10⁴ cell/100 μl 되도록 넣고 NKCF가 포함된 상층액 100 μl/well을 첨가시켰

다. 이 때 최대방출을 유발시키기 위하여 0.25% Triton X-100을 가하였고 자연방출을 측정하기 위해서는 ⁵¹Cr이 표지된 세포만을 DME/F12 배지에 배양시켰다. 24시간 후 50 μl의 상층액을 수거하여 gammacounter로 방사능을 측정하였으며 NKCF에 의한 세포독성은 위와 같은 공식에 의해 측정하였다. 모든 실험에서 자연방출은 10% 미만이었다.

결과 및 고찰

1. 인삼 분획물들이 NK세포의 세포독성에 미치는 영향

Total saponin을 각 시간 동안 처리하였을 때 NK세포독성은 2시간 동안 처리한 경우는 DME/F12 배지에 배양한 대조군에 비해 유의성있는 차이를 나타내지 않았으나 6시간 동안 처리한 군은 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶%, 농도 모두에서 유의성있는 증가가 일어났으며 10⁻⁵% 농도에서 가장 높은 정도의 세포독성을 나타내었다. 반면 9시간 동안 처리한 경우에는 10⁻⁶% 농도에서만 대조군에 비해 유의성있는 약간의 세포독성의 증가가 일어났다 (Table 1, Fig.2).

Diol saponin을 처리했을 때 6시간 동안 처리한 실험군의 10⁻⁵% 농도에서 세포독성의 증가가 일어났으며, 2시간 동안 처리한 군의 10⁻⁴% 농도에서도 대조군에 비해 세포독성이 약간 낮아진 현상을 나타내었다 (Table 1). 또한, triol saponin에서는 10⁻⁵% 농도에서 6시간 동안 처리한 경우에 대조군에 비해 유의성있는 세포독성의 증가를 나타내었으며, 10⁻⁶% 농도에서 9시간 동안 배양한 실험군에서도 세포독성의 증가를 나타내었다 (Table 1). 이러한 결과는 인삼에 의한 NK세포의 활성 증대를 나타내는 Singh 등¹⁸⁾의 보고를 뒷받침하고 있다. 또한 인삼 사포닌 분획들은 서로간에 서로 다른 활성을 나타내어 생리활성의 극단적인 증가와 감소를 보정하는 정상화 작용이 있다는 보고와는 달리 인삼 사포닌 분획이 NK세포 활성도에 미치는 영향에서는 분획간의 상호작용 등은 발견할 수 없었고 다만 농도에 따른 효과만을 볼 수 있었다.

2. 인삼 분획물들이 NKCF에 의한 세포독성에

Table 1. The effect of saponin fractions on NK cytotoxic activity against YAC-1 target cells.

Time (hr)	% Cytotoxicity									
	Control	Total saponin			Diol saponin			Triol saponin		
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
2	4.030 ±0.585	4.048 ±0.680	3.808 ±0.424	4.164 ±0.346	1.987 ^c ±0.560	3.187 ±0.495	4.146 ±0.446	4.007 ±0.458	4.235 ±0.449	3.470 ±0.659
4	2.767 ±0.574	2.640 ±0.191	2.288 ±0.291	2.058 ±0.536	2.402 ±0.765	2.284 ±0.350	3.055 ±0.207	2.953 ±0.348	2.605 ±1.353	2.673 ±0.991
6	1.615 ±0.405	3.580 ^a ±0.144	4.720 ^a ±0.471	3.700 ^a ±0.196	0.923 ±0.536	3.323 ^b ±0.503	2.333 ±0.364	1.427 ±0.159	2.787 ^c ±0.664	2.170 ±0.685
9	0.923 ±0.206	1.210 ±0.377	0.757 ±0.153	1.745 ^b ±0.304	0.780 ±0.407	0.808 ±0.206	0.885 ±0.251	1.375 ±0.310	0.868 ±0.325	1.718 ^d ±0.383

a: p<0.005, b: p<0.025, c: p<0.01, d: p<0.05, vs. control.

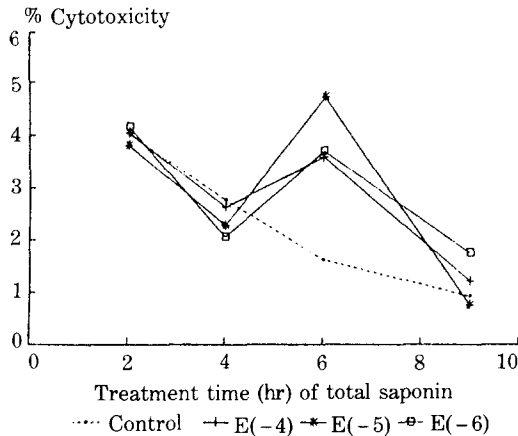


Fig. 2. The effect of total saponin on NK cytotoxic activity against YAC-1 target cells.

미치는 영향

Total, diol, triol saponin을 각기 2, 3, 5 시간 동안 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶% 농도로 처리한 후 주효세포들로부터 얻은 상층액에 의한 세포독성은 배지에서 키운 대조군에 비해 유의성있는 차이를 나타내지 않았다(Table 2-4). 따라서 NKCF 생성증가가 결과적으로 NK 세포독성의 증가를 일으킨다는 보고^{24,25)}와 관련지어 볼 때 인삼처리가 NKCF에 의한 세포독성에는 영향을 끼치지 않으며 NK 세포 활성에 대한 인삼의 증대효과는 NKCF와는 직접 연관이 없는 것으로 생각된다. 그렇지만 인삼의 NKCF의 생성에 대해서 살펴보고 분비된 NKCF가 표적세포에 흡착되는 정도, NKCF의 분비를 일으키게 하는 NK 세포와 표적세포의 부착 정도에 대

Table 2. The effect of total saponin on NKCF lytic activity against YAC-1 target cells.

Time (hr)	% Cytotoxicity*			
	Control	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
2	9.352 ±1.931	N.D.**	7.225 ±1.873	7.390 ±1.207
3	9.650 ±0.414	10.012 ±0.806	10.180 ±0.983	10.038 ±0.817
5	10.658 ±1.728	10.190 ±1.009	12.904 ±1.205	10.232 ±0.091

*Values are percent cytotoxicity. Cytotoxic activity against YAC-1 mediated by 100μl of factor was assessed in a 24-hr ⁵¹Cr-release assay in which the total volume was 200 μl well.

All data were not significant.

**Not determined.

Table 3. The effect of diol saponin on NKCF lytic activity against YAC-1 target cells.

Time (hr)	% Cytotoxicity*			
	Control	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
2	9.352 ±1.931	9.745 ±0.938	8.150 ±0.765	10.253 ±1.221
3	9.650 ±0.414	10.764 ±0.805	8.908 ±1.030	10.280 ±1.136
5	10.658 ±1.728	12.497 ±1.113	9.286 ±0.738	10.506 ±0.339

*Values are percent cytotoxicity. Cytotoxic activity against YAC-1 mediated by 100μl of factor was assessed in a 24-hr ⁵¹Cr-release assay in which the total volume was 200 μl well.

All data were not significant.

Table 4. The effect of triol saponin on NKCF lytic activity against YAC-1 target cells.

Time (hr)	% Cytotoxicity*			
	Control	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
2	9.352 ±1.931	10.082 ±1.422	11.192 ±1.351	10.870 ±0.796
3	9.650 ±0.414	10.228 ±0.559	10.260 ±1.144	10.805 ±0.692
5	10.658 ±1.728	10.228 ±0.559	10.260 ±1.144	10.805 ±0.692

*Values are percent cytotoxicity. Cytotoxic activity against YAC-1 mediated by 100 μ l of factor was assessed in a 24-hr ⁵¹Cr-release assay in which the total volume was 200 μ l well.

All data were not significant.

해서도 살펴보아야 한다고 생각된다. 또한, *in vitro* 실험에서 인삼 성분이 악성 종양세포의 증식을 억제하였다는 보고²¹⁾가 있지만 인삼 성분은 종양 세포에 직접 작용하는 것이 아님을 알 수 있으며, NKCF에 의하여 NK 세포독성이 나타난다고 하는 보고²⁴⁾와 Henkart와 Henkart의 NK 세포독성에 대한 기작²⁵⁾이 보고되어 있지만 인삼 사포닌에 의한 NK 세포독성의 증가는 NKCF와 같은 인자의 증가에 의하지 않고 NK 세포와 표적세포와의 직접적인 접촉에 의한 세포독성 작용의 증가에 의한 것으로 추측된다.

요 약

인삼 분획물들(total saponin, diol saponin, triol saponin)이 생쥐의 NK 세포의 활성화에 미치는 영향에 대해 살펴본 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. NK 세포의 활성화에 있어서 total, diol, triol saponin 모두 유의성있는 세포독성의 증가가 일어나는 적정 처리시간은 6시간으로 나타났으며, 농도별 효과는 total saponin의 경우 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶% 농도 모두에서 증가가 일어났으며 10⁻⁵% 농도에서 가장 유의성있는 세포독성의 증가를 나타내었고 diol과 triol saponin의 경우에는 10⁻⁵% 농도에서 유의성있는 증가를 나타내었다.

2. NK 세포에 의한 세포독성의 기작 중 NKCF

에 대한 효과를 살펴본 결과, 인삼 분획물들을 처리한 NK 세포에서 분비되는 NKCF에 의해서는 유의성있는 세포독성의 증가가 일어나지 않았다.

3. 인삼 사포닌계 각 분획물들의 NK 세포 활성화에 대한 작용양상의 차이는 나타나지 않았으며 농도에 따른 차이를 나타내었다.

4. 따라서 인삼사포닌 분획물들에 의한 NK 세포 활성화의 증가는 NKCF 분비에 의한 독성과는 관련이 없으리라고 생각된다.

인용문헌

- Herberman, R.B. and Holden, H.T.: *Adv. Cancer Res.*, **27**, 305 (1978).
- Timonen, T., Reynolds, C.W., Ortaldo, J.R. and Herberman, R.B.: *J. Immunol. Method*, **51**, 269 (1982).
- Ortaldo, J.R. and Herberman, R.B.: *Adv. Rev. Immunol.*, **2**, 359 (1984).
- Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R. and Phillips, J.H.: *J. Immunol.*, **137**, 4480 (1986a).
- Lanier, L.L., Phillips, J.H., Hackett, J. Jr., Tutt, M. and Kumen, V.: *J. Immunol.*, **137**, 2735 (1986b).
- Bloom, B.R.: *Nature* **300**, 214 (1982).
- Lopez, C.: *Nature* **258**, 152 (1975).
- Talmadge, J.E., Meyers, D.P. and Starkey, J.R.: *Nature* **284**, 622 (1980).
- Warner, J.F. and Dennert, G.: *Nature* **300**, 31 (1982).
- Henny, C.S., Kuribayashi, K., Kern, D.E. and Gillis, S.: *Nature*, **291**, 335 (1981).
- Gatti, G., Cavallo, R., Sartori, M.I., Marinone, C. and Angeli, A.: *Immunopharm.*, **11**, 119 (1986).
- Roder, J.C., Kiessling, R., Biberfeld, P. and Anderson, B.: *J. Immunol.*, **121**, 2509 (1978).
- Hiserodt, J.C., Britvan, L.J. and Targan, S.R.: *J. Immunol.*, **129**, 2266 (1982b).
- Hiserodt, J.C., Britvan, L.J. and Targan, S.R.: *J. Immunol.*, **129**, 1782 (1982a).
- Garrigue, S.S.: *Ann. Chem. Pharm.*, **90**, 231 (1954).
- Brekman, I.I. and Dardymov, I.V.: *The 11th Pacific Science Congress* (abstract) (1966).
- Fabio, S.: *5th Int. Ginseng. Symp.* (Abstract) (1988).
- Singh, V.K., Agarwal, S.S. and Gupta, B.M.: *Proc. 4th Int. Ginseng Symp.*, p. 225 (1984).

19. Yeung, H.W.: *Proc. 3rd Int. Ginseng Symp.*, p. 245 (1980).
20. 소진탁, 이권수, 김상준 : 연대 의대 논문집, 9, 119 (1976).
21. Katano, M., Yamamoto, H. and Matsn aga: *5th Int. Ginseng Symp.* (Abstract) (1988).
22. Wang, B.X., Liu, A.J. and Cui, J.C.: *5th Int. Ginseng Symp.*, (Abstract) (1988).
23. Yun, T.K., Yun, Y.S., Jo, S.K., Moon, H.S. and Kim Y.J.: *Proc. 4th Int. Ginseng Symp.*, p. 27 (1984).
24. Wright, S.C. and Bonavida, B.: *J. Immunol.*, 130, 2960 (1983).
25. Bonavida, B. and Wright, S.C.: *J. Immunol.*, 129, 433 (1982).
26. Trinchieri, G. and Santoli, D.: *J. Exp. Med.*, 147, 1314 (1978).
27. Kasai, M., Leclere, J.C., Mavay-Boudreau, L., Shen, T.W. and Cantor, H.: *J. Exp. Med.*, 149, 1260 (1979).
28. Henkart, M.P. and Hankart, P.A.: *Mechanism in Cell-mediated Cytotoxicity*, E. Clark and P. Goldstein, Eda. Plenum Press, New York, p. 277 (1982).