J. Ginseng Res.
Vol. 25, No. 2, 63-67(2001)

인삼 다당체가 생쥐의 조혈과정에 미치는 영향

송지영 · 이세윤 · 정인성 · 윤연숙#
한국원자력병원 면역학연구실
(2001년 1월 3일 접수)

Effect of Polysaccharide Extracted from *Panax ginseng* on Murine Hematopoiesis

Jie-Young Song, Seh-Yoon Yi, In-Sung Jung and Yeon-Sook Yun#
Laboratory of Immunology, Korea Cancer Center Hospital, Seoul 139-706, Korea
(Received January 3, 2001)

Abstract : We previously reported that acidic polysaccharide from *Panax ginseng* induced the proliferation of lymphocytes and the generation of activated killer cells. Here we found that polysaccharide (PG-75) precipitated with 75% EtOH from water extract of *Panax ginseng* also had both in vitro and in vivo hematopoietic activities. In vitro studies with bone marrow cells from BALB/c mouse revealed that PG-75 had direct effect on hematopoietic colony-forming cell(CFC) growth, it increased granulocyte macrophage-colony forming cell numbers by 1.59 fold over than the non-treated. The ability of PG-75 to modulate hematopoiesis in vivo was evaluated the bone marrow and spleen cellularity, granulocyte-macrophage progenitor cells. BALB/c female mice were administered PG-75 intraperitoneally, PG-75 was found to significantly increase the number of BM cells, spleen cells, GM-CFU on 3 hours after injection. PG-75 was also able to induce significant augmentation of GM-CSF and IFN-γ, production in sera. These studies illustrate that PG-75 has hematopoietic activities and that this agent may be useful in the prevention and/or treatment of radio- or chemotherapy-associated myelosuppression.

Key words : BRM, *Panax ginseng*, polysaccharide, hematopoiesis, GM-CFU, GM-CSF, IFN-γ

서 론

대부분의 항암 화학요법제의 부작용은 과립구 감소증(neutropenia)으로 약물의 사용용량이나 치료 횟수의 제한이 되고 있다.[1-6] 과립구 감소증과 같은 골수억제작용은 패혈증을 유발하여 결국은 암 환자에 있어 감염에 의한 사망의 주 원인이 되고 있다. 그러므로 혈구를 증식시킬 수 있는 약물의 개발이 강조되어 왔으며, 최근 골수세포의 증식을 조절하는 colony stimulating factor(CSFs)가 분리 동정되었고, 재조합 단백질이 임상적으로 사용되고 있다.[7-10] 그러나, 이러한 단백질들은 때때로 자체가 암세포의 성장을 증가시키므로, 암 면역치료에 있어서 고전적인 생체 응답 조절제(Biological response modifiers, BRMs)의 응용이 중요시되고 있다.

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-970-1307; (팩스) 02-977-0381
(E-mail) ysyun@kcchsun.kcch.re.kr

면역치료제, 분화유도제, cytokine 등을 포함한 BRM은 숙주의 생체반응을 조절함으로써 항암작용을 나타나게 하는 물질이나 접근방법을 일컫는다. 그러나, BRM의 단독 효과를 보고한 경우는 아주 드물며 작용 기전, 투여방법, 작용점, 부작용에 대한 일반적인 보고가 없다. 그러므로 이런 약물의 평가는 매우 어려우며 효능에 대한 기준이 확립되어 있지 않은 실정이다.[11-12] 현재 생체 응답 조절제가 사용되는 분야는 화학 요법이나 방사선 요법시 나타나는 면역 저하 현상을 회복시켜 효과적으로 암을 치료할 수 있도록 도와주거나, 면역성 저하로 인한 감염 등을 방지하기 위한 분야, 잔존하는 암세포를 완전히 제거하기 위한 분야 및 국소적으로 적용하여 암 퇴치를 유도하는 분야 등이 있다.

본 실험실에서는 생약으로부터 임파구 증식작용 및 자연살해세포의 세포독성을 중심으로 BRM을 탐색하여 왔으며 그 중 효능이 탁월한 인삼 다당체를 발굴하여 보고하였다.[13] 인삼은 옛부터 보혈 및 자양강장의 목적으로 널리 사용되어온

생약으로 주로 사포닌 성분을 중심으로 많은 연구결과가 보고되어 있다. 항암작용은 주로 저분자 물질인 polyacetylene계 화합물에 의한 직접적인 세포독성 효과[14-15]와 고분자 물질인 다당체에 의한 간접적인 면역조절효과로 대별할 수 있으며,[16-18] 인삼의 다당체 성분에 대한 자연살해세포의 활성증가, 임파구 증식작용, 대식세포의 활성화, 감염에의 저항력 증가, 항보체작용 등이 보고되어 있다. 본 연구에서는 인삼 다당체의 임파구 증식능이 T cell mitogen으로 사용되는 concanavalin A와 유사한 정도로 강한 활성을 나타냈으므로, 골수세포에 대한 증식능과 생체내 조혈 작용을 확인하고자 실험에 착수하였다.

실험방법

1. 실험 동물

Charles River Breeding Laboratory에서 구입하여 원자력병원 실험 동물 관리실에서 교배하여 사육한 6-8주령의 웅성 BALB/c 마우스(20±2 g)를 사용하였다. 사육실의 온도는 22±2°C, 습도는 55~60%로 유지시켰으며 명암 순환이 12시간 단위로 조절되게 하였고 고형사료(NIH-7-open formula)와 물을 자유로이 공급하였다.

2. 인삼 다당체의 추출

6년근 백삼을 MeOH로 추출한 다음, 음건하여 3차 증류수로 4°C에서 24시간, 3회 추출하여 동결 건조하였다. EtOH 침전법에 의한 다당체를 추출하는 방법으로 동결 건조된 분말에 증류수를 가해 녹인 다음 60, 65, 70, 75, 80, 90%가 되게 해당하는 양의 에탄올을 가해 에탄올 가용부와 비가용부로 나누었다. EtOH 침전물을 증류수에 녹인 다음 dialysis tube(M.W. cut off 12,000)에 넣고 증류수로 4일간 12시간 단위로 교환하면서 투석시켰으며 투석막 안쪽의 물질을 모아 동결 건조하였다. 추출시에 혼입될 가능성이 있는 endotoxin의 양은 *Limulus amebocyte* lysate assay(Pyrotell, Associate of Cape Code Inc., Woods Hole, MA, USA)을 사용하여 측정하였으며 각 추출물 1 mg당 0.05 ng이하의 양으로 임파구 증식능 실험에 아무런 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

3. 사용배지

임파구 증식능 실험과 세포독성실험에 사용한 세포 배양액은 RPMI 1640에 5% Fetal Bovine Serum, 2×10^{-2} M의 HEPES buffer, 2×10^{-3} M glutamine, 1×10^{-3} M pyruvate, 100 U/ml penicillin과 50 μg/ml streptomycin, 5×10^{-5} M의 2-mercaptoethanol, 1% non-essential amino acid로 구성되었다. 골수 세포 증식능 실험은 DMEM(Dulbecco's minimun essential medium)에 10% FBS, 100U/ml penicillin과 100 μg/ml streptomycin을 첨가하였으며, GM-CFU (granulocyte macrophage-colony forming unit) 측정에는 IMDM(Isacove's modified Dulbecco's medium)에 20% horse serum 및 100 U/ml penicillin과 100 μg/ml streptomycin을 첨가한 배지를 사용하였으며 모두 GIBCO BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. GM-CFU 측정을 위하여 GM-CSF(granulocyte macrophage-colony stimulating factor)의 source로 NIH3T3 세포주에 MFG · Puro · GM-CSF 벡터를 감염시킨 후 그 상층액을 사용하였다.

4. 임파구 및 골수 세포 증식능 실험

마우스를 경추 탈골법으로 희생시킨 뒤 비장을 떼어내어 세분절편한 다음 single cell suspension을 만들었으며, 대퇴골에서 25G의 바늘을 이용하여 골수 세포를 뽑아 1400 rpm에서 10분간 원심분리하여 각각의 세포를 얻었다. 인삼 다당체를 농도별로 처리한 96 well flat-bottom microplate에 비장 및 골수세포를 $1.5\sim2\times10^5$ cells/0.2 ml로 분주한 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 3, 5, 7일간 배양하였다. 세포를 수확하기 18시간 전에 3H-thymidine을 2 μCi/well로 처리하였으며, scintillation cocktail을 3 ml 가한 다음 β-counter로 cpm을 측정하였다.

5. Granulocyte macrophage-colony forming unit측정

35 mm culture dish(with 2 mm grid, Corning, USA)에 인삼 다당체를 농도별로 처리한 다음 0.3%의 agar와 20%의 horse serum, 10%의 GM-CSF 상등액을 함유한 IMDM배지를 사용하여 골수 세포를 1×10^5 cells/ml로 넣고 37°C, 5% CO_2 배양기에서 7일간 배양하였다. 대조군으로는 배지만 가하였으며, 현미경으로 50개 이상의 세포로 구성된 colony만을 세었다.

6. 인삼 다당체 투여 및 채혈

인삼 다당체를 PBS(pH=7.4)에 적정 농도로 녹여 0.45 μm 일회용 여과기(corning, NY)로 여과한 다음 동물에 투여하기 전까지 4°C에서 보관하였다. 대조군은 PBS를 투여하였으며 모두 복강 내 주사로 1회 0.4 ml이 넘지 않도록 조제하였다. 혈청 중 GM-CSF와 IFN-γ량을 측정하기 위하여 마우스의 안구 기저부 정맥총에서 헤파린이 처리된 capillary를 이용하여 신속히 채혈하였다.

7. 통계분석

실험결과는 mean±standard deviation으로 나타내었고 Stu-

dent's t-test를 이용하여 통계처리한 후 신뢰구간(p value)이 0.01 및 0.05보다 작은 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 임파구 및 골수 세포 증식능 효과

에탄올 함량별로 분리된 인삼 다당체의 조성과 비장세포의 증식능을 Table 1에 나타내었다. 당과 단백질, 우론산의 함량은 안트론-황산 발색법,[19] Lowry법,[20] 카바졸-에탄올 발색법[21]에 의해 각각 BSA, 글루코스, 갈락투론산을 표준품으로 정량하였다. 수득율은 에탄올 함량이 증가할수록 늘어났으나 임파구 증식능은 75%에탄올에 침전된 인삼 다당체가 가장 활성이 좋았다. 골수세포의 증식은 비장 세포의 증식에 비해 그 cpm 수치가 상당히 낮기 때문에 성장 인자인 GM-CSF를 10% 가해 증식능을 측정하였다. 3, 5, 7일째 시간별로 증식능을 관찰하였을 때 5일째 증식능이 가장 좋았으며 대조군으로 사용한 LPS(lipopolysaccharide)의 Stimulation Index(S.I.)가 5.56, 인삼 다당체가 500 μg/ml의 농도에서 S.I. 5.84($P<0.01$)로 유의성 있는 골수 세포 증식을 보였다(Fig. 1).

2. Granulocyte macrophage-colony forming unit (GM-CFU)에 대한 영향

골수 세포 중 림프계가 차지하는 비율이 30%내외로 정확히 어느 군이 증식되는지 확인하기 어려우므로 myeloid계의 증식을 볼 수 있는 GM-CFU를 다시 측정하였다. 1×10^5개의 골수세포에 인삼 다당체를 50 μg/ml로 처리하였을 때 대

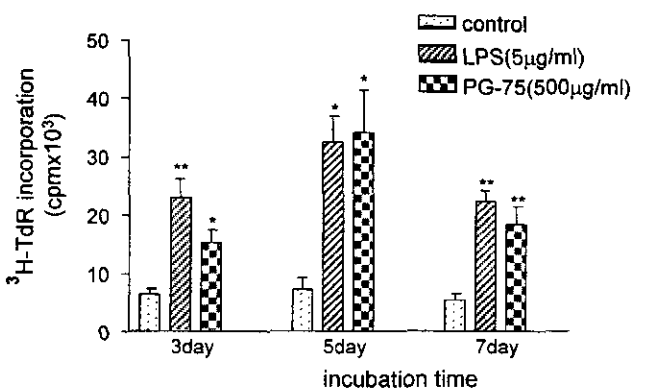

Fig. 1. Proliferation of murine bone marrow cells by culturing with PG-75. BM cell (2×10^6 cells/ml) from BALB/c mouse were cultured with DMEM medium containing 10% GM-CSF supernatants in combination with PG-75. On days 3,5 and 7 after culture, the growth of bone marrow cells was determined by the incorporation of ^{3}H-TdR after 18 h pulsing with 2 μci of ^{3}H-TdR.

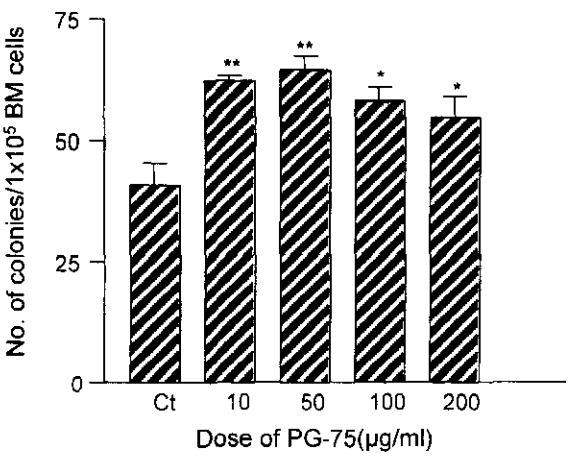

Fig. 2. Increase of the numbers of the GM-CFU in the bone marrow cells cultured with PG-75.BM cells (1×10^5) from BALB/c mouse were seeded in agar culture as described in Material and Methods. After 7 days of incubation at 37 °C, 5% CO_2 in air, the number of colonies that had grown in the soft agar was scored. Resulats represent the mean± S.D.

Table 1. Comparison of chemical composition and mitogenic activity on spleen cells between gradient EtOH precipitation of *Panax ginseng* extracts

Assay Sample	Yield (%)[a]	Sugar content (%)[b]	Protein content (%)[c]	Uronic acid content (%)[d]	Mitogenic activity[e] (mean± S.D)
PG-60%	1.81	23.2	11.2	12.5	57515± 4274
PG-65%	1.88	33.6	10.4	18.5	117968± 4932
PG-70%	2.16	34.6	12.2	22.5	184225± 16947
PG-75%	2.55	38.8	8.0	17.4	203683± 14166
PG-80%	4.57	32.2	9.9	9.7	200769± 16824
PG-90%	7.15	34.9	7.9	5.8	69096± 5561

[a]Calculated from starting material, dried *Panax ginseng* (1 kg).
[b]Determined by the anthrone-sulfuric acid method.[19]
[c]Determined by the Folin method of Lowry *et al.*[20]
[d]Determined by the Carbazole-EtOH method of Chaplin *et al.*[21]
[e]Measured by ^{3}H-TdR incorporation method. Values represent the mean cpm± S.D. of triplicate cultures (dose of sample : 500 μg/ml). The value of splenocytes without sample treatment was 1890± 282, Con A(2.5 μg/ml) 290113± 11977, LPS (10 μg/ml) 103668± 6516 cpm.

조군에 비해 콜로니의 크기가 증가하였으며 콜로니 수도 1.59배 증가하였다(Fig. 2). 5×10^6 cells/ml의 비장 세포에 인삼 다당체를 가해 24시간 배양한 다음 배양 상등액을 취해 실험하였을 때에도 콜로니수가 1.13배 증가하였으므로(data not shown), 골수세포 증식에 있어서 인삼 다당체가 cytokine의 분비(IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF, SCF 등)를 촉진하여 골수 세포를 증식시키는 한편, 직접적으로 골수 주위 환경(예를 들면, stromal cell)에 영향을 줄 수 있는 어떤 작용을 한다고 생각되어진다.

3. 생체내 인삼 다당체의 영향

인삼 다당체를 10, 50, 100, 200 mg/kg의 용량으로 BALB/c 마우스(5마리/군)의 복강 내 1회 투여한 다음 3, 24, 48, 72시간별로 골수 세포와 비장 세포 수의 변화, GM-CFU를 측정하였으며 혈청 중의 IFN-γ와 GM-CSF 분비량을 enzyme-linked immunosorbant assay(R & D system, Min-neapolis, MN)를 이용하여 정량하였다. 골수 세포수의 변화를 보면, 용량별로 모두 3시간째에 14~20%정도 증가하였다가 48시간까지 정상수치보다 감소하였으며 72시간째에 정상으로 회복되는 경향을 보이고 있다. 그러나 200 mg/kg로 투여했을 경우

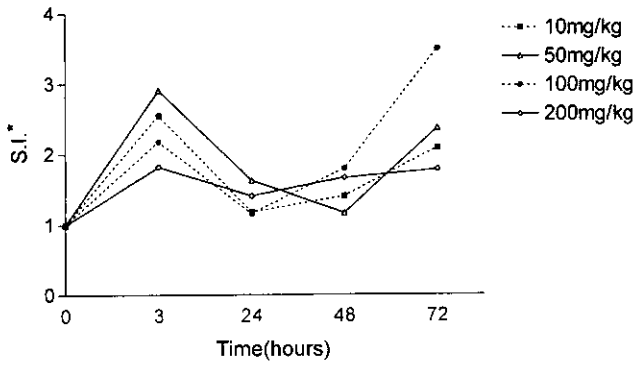

Fig. 4. Kinetics of the changes of the numbers of GM-CFU after treating the mice with PG-75 *in vivo*. PG-75 was administered i.p. into normal mice (5 mice/group) and BM cells were pooled for assay described in *Material and Method*. *Stimulation Index was calculated using the following formula; S.I.=No. of GM-CFU on sample well/No. of GM-CFU on control well.

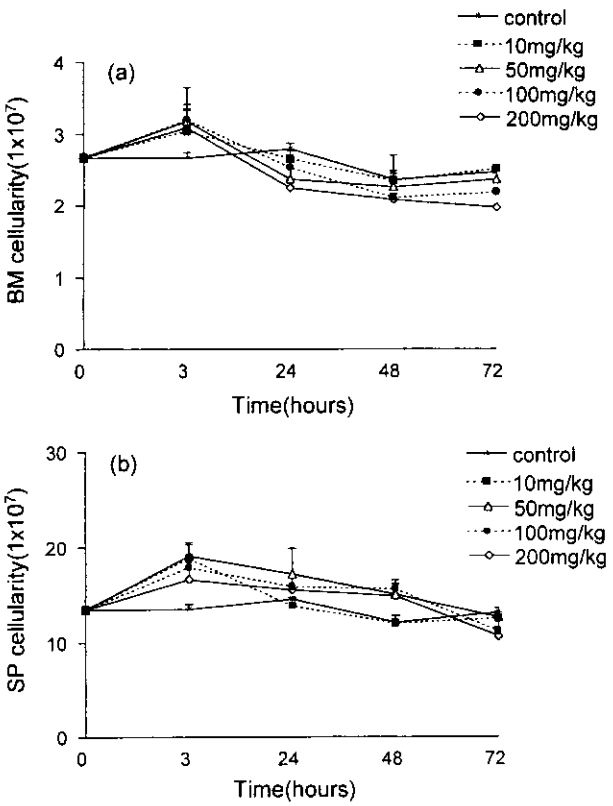

Fig. 3. Kinetics of the changes of BM (a) and SP (b) cellularity in the mice treated with PG-75 *in vivo*. PBS or various doses of PG-75 was administered i.p. into mice. At different time on the above, femurs and spleens were removed and single cells were prepared and counted.

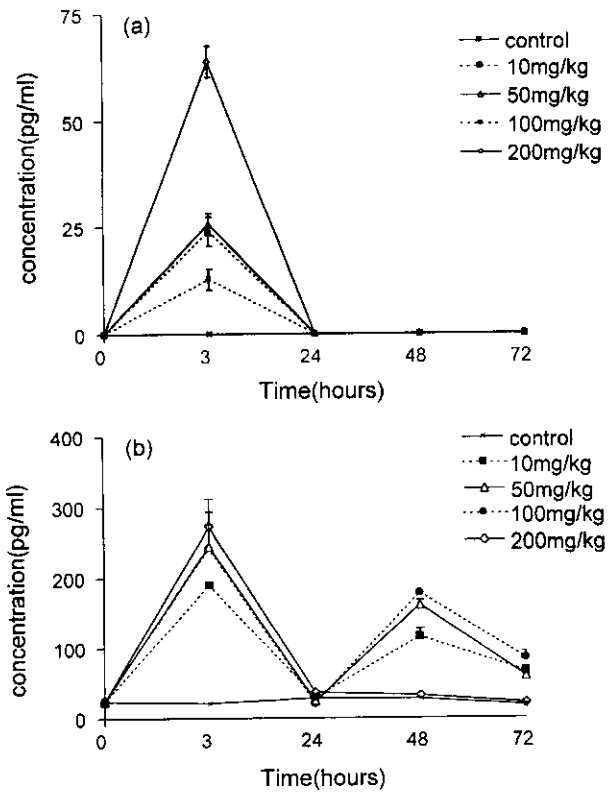

Fig. 5. Induction of cytokines from the sera of the mice that received i.p. injection of PG-75. BALB/c mice received i.p. injections of PBS or PG-75 at the doses indicated. Pooled sera from 5 mice/group were obtained at different times, and assayed for GM-CSF (a) and IFN-γ (b) by enzyme-linked immunosorbent assay.

에는 72시간째에도 회복되는 경향을 볼 수 없었다. 비장 세포는 3시간째에 20~40%정도 증가된 후 서서히 감소되어 72시간째에 정상 수준으로 돌아오는 경향을 보였다(Fig. 3). GM-CFU를 측정한 결과는 Fig. 4에서 보듯이 투여 3시간째에 2-3배 가량 증식되었다가 24, 48시간째에 정상 상태에 머문 다음 72시간째에 다시 2배 가량 증가됨을 알 수 있었다. 화학요법이나 싸이토카인 유도제(IL-1, IL-2, IL-3, G-CSF, GM-CSF, SCF등)의 처리는 골수모세포의 말초혈액으로의 이동을 유발하는 것으로 보고되어 있다.[22-23] 이와 마찬가지로 인삼 다당체의 처리는 여러 가지 싸이토카인의 분비를 상승시킴으로써 골수모세포의 증식을 촉진하였으며 이의 말초혈액 내지는 비장으로의 이동을 촉진한 것으로 해석된다. 또한 GM-CFU의 증가는 골수모세포가 계열로 분화하는 능력 또한 상실하지 않았음을 의미한다고 볼 수 있다. 혈청중의 cytokine량을 immunoassay를 통해 측정하였는데 조혈계의 대표적인 성장 인자인 GM-CSF와 염증반응의 매개물이자 T 임파구의 활성 인자인 IFN-γ를 선택하였다. GM-CSF는 정상 생쥐의 혈청에서는 검출되지 않는 반면, 인삼 다당체 투여군에서 3시간째 용량 의존적으로 증가되었다가 이후 검출되지 않았으므로 초기에 자극된 면역세포들의 활성에 기인한 것으로 생각된다. IFN-γ는 3시간째에 PBS를 주사한 대조군 마우스의 21.3 pg/ml에 비해 11배 가량 높은 평균 238 pg/ml정도가 분비되었다가 24시간째에 정상 상태로 떨어졌으며 48시간째 다시 5.5배정도 증가된 양을 검출할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과는 인삼 다당체가 지속적인 자극이나 저해 작용으로 면역 세포의 고갈을 초래하는 것이 아니라 상황에 따라 능동적으로 생체 조절 능력을 보조해 주는 것으로 생각된다.

요 약

인삼으로부터 면역활성을 지닌 다당체를 효과적으로 추출하기 위해 농도별로 에탄올 침전물을 제조하였으며 이중 75%에탄올에 의해 침전되는 불용 분획에서 가장 높은 임파구 증식활성을 확인하였다. 골수세포에 대한 인삼 다당체의 증식능도 GM-CFU 수가 대조군의 1.59배로 유의적인 결과를 나타냈다. 생쥐를 이용한 생체내 실험 결과, 인삼 다당체 투여 생쥐군에서 정상 생쥐군에 비해 골수 및 비장세포, GM-CFU수가 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며 혈청내 고농도의 GM-CSF와 IFN-γ를 정량할 수 있었다. 결론적으로 인삼 다당체는 여러 종류의 면역 작동세포를 직접적(cytokine-independent)으로나 간접적인 경로(cytokinedependent)를 통해 활성화함으로써 항암 효과를 나타내는 한편 조혈 촉진 능력도 우수하여 화학요법제나 방사선 치료시 보조요법제로 사용할 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

인용문헌

1. Chauvergne, J., Chinet-Charrot, P., Stockle, E., Thomas, L. and Toulouse, C. B. : *Cancer*(Paris) **83**, 315 (1996).
2. Pronk, L. C., Stoter, G. and Verweij, J. : *Cancer Treat. Rev.* **21**, 463 (1995).
3. Cascinu, S. : *Curr. Opin. Oncol.* **7**, 325 (1995).
4. Hochster, H., Wasserheit, C. and Speyer, J. : *Curr. Opin. Oncol.* 7, 304 (1995).
5. McDonald, S., Rubin, P., Philips, T. L, and Marks, L. B. : *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **31**, 1187 (1995).
6. Vijgh, W. J. and Peters, G. J. : *Semin. Oncol.* **21**, 2 (1994).
7. Clark, S. C. and Kamen, R. : *Science* **236**, 1229 (1987).
8. Bociek, R. G. and Armitager, J. O. : *CA Cancer J. Clin.* **46**, 165 (1996).
9. Riikonen, P. : *Stem Cells*(Dayt) **13**, 201 (1995).
10. Bokemeyer, C., Kuczyk, M. A., Kohne, H., Einsele, H., Kynast, B. and Schmoll, H. J. : *Ann Hematol.* **72**, 1 (1996).
11. Sigh, V. K., Agarwall, S. S. and Gupta, B. M. : *Planta Medica* **50**, 462 (1984)
12. Fukazawa, H., Ohashi, Y., Sekiyama, S., Hoshi, H., Abe, M., Takahashi, M. and Sato, T. : *Head and Neck* **16**, 30 (1994).
13. Lee, Y. S., Chung, I. S., Lee, I. R., Kim, K. H., Hong, W. S. and Yun, Y. S. : *Anticancer Res.* **17**, 323 (1997).
14. Kim, S. I., Kang, K. S. and Lee, Y. H. : *Arch. Pharm. Res.* **12**, 48 (1989).
15. Ahn, B. Z., Kim, S. I. and Lee, L. H. : *Arch. Pharm.(Weinheim)*, **322**, 223 (1989).
16. Gao. Q., Kiyohara, H., Cyong, J. and Yamada, H. : *Planta Med.* **55**, 9 (1989).
17. Kim, Y. S., Kang, K. S. and Kim, S. I. : *Arch. Pharm. Res.* **13**, 330 (1990).
18. Sigh, V. K., George, C. X., Singh, N., Agarwall, S. S. and Gupta, B. M. : *Planta Medica* **47**, 234 (1983).
19. Dimler, R. J., Schaefer, W. C., Wise, C. S. and Rist, C. E. : *Anal. Chem.* **24**, 1411 (1952).
20. Lowry, O. H., Rosenberg, N. J., Farr, A. L. and RANdall, R. J. : *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
21. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. : Carbohydrate analysis, 1st ed., IRL press, Oxford, p.5 (1987).
22. Peters, W. P., Rosner, G., Ross, M., Vredenburgh, J., Meisenberg, M., Gilbert, C. and Kurtzberg, J. : *Blood* **81**, 1709 (1993)
23. Bensinger, W., Singer, J., Appelbaum, F., Lilleby, K., Longin, K., Rowley, S., Clarke, E., Clift, R., Hansen, J., Shields, T., Storb, R., Weaver, C., Weiden, P. and Buckner, C. D. : *Blood* **81**, 3158 (1993).