

## 고려홍삼의 수지상세포 활성화 효과

김도순 · 박정은 · 서권일\* · 고성룡\*\* · 이종원\*\* · 도재호\*\* · 이성태#

순천대학교 생물학과, \*식품영양학과, \*\*KT&G 중앙연구원 인삼과학연구소  
(2006년 7월 7일 접수; 2006년 8월 26일 수리)

## Effects of Red-ginseng Extracts on the Activation of Dendritic Cells

Do-Soon Kim, Jueng-Eun Park, Kwon-Il Seo\*, Sung-Ryong Ko\*\*,  
Jong-Won Lee\*\*, Jae-Ho Do\*\* and Sung-Tae Yee#

Department of Biology, \*Department of Food and Nutrition, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea,  
\*\*KT&G Central Research Institute, Yuseong-gu, Daejeon 305-345, Korea

(Received July 7, 2006; Accepted August 26, 2006)

**Abstract :** Ginseng is a medicinal herb widely used in Asian countries. Dendritic cells(DCs) play a pivotal role in the initiation of T cell-mediated immune responses, making them an attractive cellular adjuvant for use in cancer vaccines. In this study, we examined the effects of Red-ginseng(water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract, crude saponin) on the DCs phenotypic and functional maturation. Immature DCs were cultured in the presence of GM-CSF and IL-4, and the generated immature DCs were stimulated by water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract, crude saponin and LPS, respectively, for 24hours. The expression of surface co-stimulatory molecules, including MHC(major histocompatibility complex) class II, CD40, CD80 and CD86, was increased on DCs that were stimulated with crude saponin, but antigen-uptake capacity was decreased. The antigen-presenting capacity of Red-ginseng extracts-treated DCs as analyzed by allogeneic T cells proliferation and IL-2, IFN- $\gamma$  production was increased. Furthermore, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> syngeneic T cell(OVA-specific) proliferation and IFN- $\gamma$  production was significantly increased. However, CD4<sup>+</sup> syngeneic T cell secreted higher levels of IL-2 in responding but not CD8<sup>+</sup> syngeneic T cell. These results indicate the immunomodulatory properties of Red-ginseng extracts, which might be therapeutically useful in the control of cancers and immunodeficient diseases through the up-regulation of DCs maturation.

**Key words :** *Panax ginseng*, red ginseng, dendritic cells, T cells, co-stimulatory molecules

## 서 론

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나무과(*Araliaceae*) 인삼속(*Panax*)에 속하는 다년생 초본으로 여러 약리작용으로 인해 세계적으로 가장 우수한 건강식품 혹은 의약품으로 평가받고 있다<sup>1)</sup>. 인삼의 화학성분은 사포닌, 정유, polyacetylene, phenol, 알칼로이드, 다당체, 아미노산, 유기산, 유리당, 비타민 및 무기성분 등으로 이루어져 있다<sup>2)</sup>. 이 중 Brekhman<sup>3)</sup>에 의해 인삼 내 유효성분이 사포닌 성분임이 제시된 이후 사포닌을 중심으로 많은 연구들이 이루어지고

있으며, 각종 스트레스<sup>4)</sup>, 간 기능 강화작용<sup>5)</sup>, 항당뇨작용<sup>6)</sup>, 중추신경계<sup>7)</sup>, 심혈관계 장애 개선작용<sup>8)</sup> 등에 관한 약리작용이 밝혀졌다. 특히 항염(抗炎) 및 항종양작용(抗腫瘍作用)이 과학적으로 입증됨에 따라 인삼의 항암 활성화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

외부로부터의 병원체에 의한 감염이나 암의 발생에 대항하는 인체의 면역체계는 크게 자연면역(innate immunity)과 획득면역(acquired immunity)으로 구분할 수 있다<sup>9)</sup>. 자연면역은 병원체나 조직의 손상을 빠르게 인식하여 획득면역에 관여하는 세포에 위험을 알리는 신호를 보내는 능력을 지니고 있다. 이때 탐식세포나 자연살해세포와 같은 다양한 세포 집단과 보체, 인터페론 등이 관여한다고 알려져 있다<sup>10,11)</sup>. 반면, 획득면역은 항원을 재인식하여 효과적으로 대처하는 면

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 061-750-3618; (팩스) 061-750-3608  
(E-mail) sungtae@sunchon.ac.kr

역기억 능력에서 비롯되며 이러한 정교하고 강력한 면역시스템이 잘 작동하기 위해서는 항원을 제시해주는 세포에 의한 면역세포의 기능 조절이 필수적이다. 이러한 역할을 하는 면역세포가 오래 전부터 알려져 왔으나, 최근 90년대 들어 이제까지 알려진 어떤 세포보다 더 전문적으로 이러한 역할을 수행하는 세포, 즉 수지상세포(dendritic cells)가 존재한다는 것이 알려지고 있다<sup>2)</sup>. 수지상세포는 항원을 집합 적인 없는 미경험(naive) T세포를 자극하여 획득면역반응을 유도하는 능력이 있는 독특하고 유일한 면역세포이다<sup>13,14)</sup>.

수지상세포는 조혈모세포(hematopoietic stem cell)에서 분화하는 것으로 생각되고 있으며<sup>15)</sup>, 항원을 받아들여서 이를 가공하여 표면에 제시하는 능력이 뛰어나다. 또한, 림프구를 활성화시키는데 관여하는 다양한 공동자극분자(co-stimulatory molecular)들이나 세포간의 접촉에 관여하는 여러 종류의 부착분자를 표면에 많이 발현하고 있어 다른 면역세포들과 구분하여 전문적인 항원제시세포(professional antigen presenting cell)라고 한다. 최근에는 골수성(myeloid) 수지상세포와 달리 림프성(lymphoid) 수지상세포는 면역억제에 관여한다는 연구 결과들이 활발히 보고되고 있어 면역자극뿐만 아니라 면역기능의 전반적인 조절에 관여하는 것으로 생각되고 있다<sup>16,17)</sup>.

암의 발생을 체내 면역계가 인지한다는 사실은 다양한 실험적 증거를 통해서 오래 전부터 잘 알려져 있다. 그러나 여러 가지 원인으로 암세포를 인식하는 면역기능이 약화되는데 이러한 여러 원인 중 하나는 면역세포인 림프구가 종양세포에 특이적인 항원을 효과적으로 인식하도록 하는 항원제시능력이 감소되어 일어나는 것으로 알려지고 있다<sup>18)</sup>. 면역계는 종양을 인식하는 자연살해세포나 종양세포에 특이적으로 반응하여 증식된 종양 특이적 세포독성 T세포를 활성화시켜 이들 세포가 최종적인 효과세포로서 종양세포를 제거하는 기능을 갖도록 되어있다. 따라서 앞서 기술한 대로 강력하게 T세포에 항원을 제시할 수 있는 능력을 가진 수지상세포는 림프구로 하여금 종양의 존재를 알리고 이를 제거하도록 도울 수 있다. 실제로 수지상세포가 강력한 항암 면역반응을 유도할 수 있다는 사실은 동물모델을 통한 여러 연구에서 입증되고 있다. 이들 대부분의 실험은 수지상세포를 시험관내에서 분리한 후, 종양 항원을 수지상세포에 처리하여 항원을 함유한 수지상세포를 종양백신으로서 동물에 투여하는 방법을 이용하고 있다<sup>19)</sup>. 또 다른 연구결과들은 종양세포의 DNA나 RNA를 이용하여 수지상세포를 변형시킨 경우나, 종양세포와 암세포를 시험관내에서 융합하거나 동시 배양을 통하여 변형시킨 경우도 종양세포 특이적 T세포의 활성화로 대표되는 항 종양 면역반응을 유도할 수 있음을 보여주고 있다<sup>20)</sup>. 종양의

예방을 위한 면역성의 획득뿐만 아니라 이미 종양이 발생한 경우에도 이러한 형태의 백신은 훌륭한 치료 효과를 보이는 치료용 백신으로 기능하는 것으로 보고 되고 있다<sup>21)</sup>. 현재에는 미국과 유럽 등 여러 연구기관에서 다양하게 얻은 수지상세포를 이용하여 임상적으로 종양을 치료하는 백신으로 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>22,23)</sup>. 또한 이제까지 적절한 백신이 개발되지 않고 있는 일부 감염질환의 경우에도 예방 또는 치료용 면역백신으로 개발될 수 있을 것으로 생각된다. 특히 바이러스 감염에 대항하기 위하여 염증성 면역반응과 같은 세포성 면역반응의 유도가 필수적인 경우에는 특정 cytokine을 다량 발현하도록 변형시킨 수지상세포를 이용했을 때 항바이러스 면역반응이 강하게 유도될 수 있다<sup>24)</sup>. 일부 바이러스들의 경우는 수지상세포에 감염시킨 상태로 투여되었을 때 CD8 양성인 세포독성 림프구가 활성화되어 감염세포를 제거할 뿐만 아니라 면역기억을 유도하여 지속적인 백신의 효과가 얻어지는 것으로 알려지고 있다<sup>25)</sup>.

따라서 본 실험에서는 시험관내의 골수세포에 cytokine을 처리함으로써 수지상세포로 분화시키는 기술을 이용하여<sup>26)</sup> 고려홍삼이 각종 감염질환과 암에 대한 유용한 백신으로 이용될 수 있는지를 알아보았다. 즉, 고려홍삼이 수지상세포의 분화와 증식에 미치는 효과를 밝힘으로써 항암 치료제로서 새로운 의약품 개발 가능성을 찾는 것을 목표로 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용시약

세포 배양에 필요한 RPMI1640, FBS(Fetal Bovine Serum), antibiotic-antimycotic은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였으며, 2-mercaptoethanol, LPS(lipopolysaccharide), MMC(mitomycin C), sodium bicarbonate(NaHCO<sub>3</sub>), FITC-dextran, OVA(ovalbumin)은 Sigma chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 세포표면분자에 대한 특이적 항체(anti-MHC class II, anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD11c mAb)는 Pharmingen(San Diego, CA, USA) 제품을 사용하였고, 골수세포에 첨가하여 수지상세포로 분화를 유도하기 위한 recombinant mouse GM-CSF와 IL-4는 R&D(Mckinley Place NE, MN, USA) 제품을 사용하였다.

### 시료제조

한국인삼공사 고려인삼창에서 홍삼제조 GMP 기준서에 준하여 제조한 정관장 홍삼의 물(water) extract, 식용발효주정 extract 및 홍삼 추출물로부터 분리 제조한 crude saponin을 공급받아 사용하였다. 시료의 농도는 각 시료를 20 mg/ml이

되도록 PBS에 녹인 다음, 4°C에서 3000 rpm으로 30분간 원심침전한 후 수거한 상층액을 0.45 µm filter로 여과멸균하고, 그 중 일부를 건조 시킨 다음 건조중량을 측정하여 최종 농도를 정하였다.

#### 수지상세포 배양

생쥐(C57BL/6)의 대퇴골에서 골수세포를 얻어 적혈구용해 완충액을 처리하여 적혈구를 제거한 후, 골수세포  $1 \times 10^6$ 개를 GM-CSF(1,000 U/ml)와 IL-4(1,000 U/ml)가 포함된 완전배지(10% FBS · RPMI1640)로 6 well micro-plate에서 배양하였다. 배양 4일 후에 1 ml의 완전배지와 동량의 GM-CSF와 IL-4를 첨가하고, 배양 6일째 홍삼시료(물 extract, 식용발효주정 extract, crude saponin)를 농도 별로 처리한 다음, 24시간 동안 37°C · 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 수거하여 실험을 진행하였다. 이 때, syngeneic T세포(OVA-specific)를 이용한 실험에서는 6일째 홍삼시료와 OVA(1 mg/ml) 항원을 동시에 처리하여 24시간 배양하였다.

#### Cell surface markers

세균의 다당질인 LPS와 각 홍삼시료를 배양 6일째의 미성숙한 수지상세포에 처리하였다. 그 후, 회수한 수지상세포( $5 \times 10^5$ 개)를 anti-CD16/CD32(FcγIII/IIReceptor) mAb로 4°C에서 30분 동안 blocking하고 washing 용액(1% FBS 0.1% NaN<sub>3</sub>/PBS)으로 세척하였다. 다음 PE-conjugated anti-CD40, anti-MHC class II, anti-CD80, anti-CD86 mAb로 4°C에서 30분 동안 염색하였고, washing 용액으로 세척한 후, FITC-conjugated anti-CD11c mAb로 4°C에서 30분 동안 염색하였다. 염색된 세포는 다시 washing 용액으로 세척한 후, 인산완충용액에 현탁하여 유세포분석기(COULTER, Epics XL, USA)로 분석하였다.

#### Phagocytosis

LPS와 각 홍삼시료를 처리하여 회수한 수지상세포에 FITC-dextran 1 mg/ml을 처리하여 37°C · 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 60분 또는 120분 동안 배양하였다. 그 후, cold washing 용액(1% FBS · 0.1% NaN<sub>3</sub>/PBS)으로 세척하고, PE-conjugated anti-MHC class II를 이용하여 4°C에서 30분 동안 염색하였고, washing 용액으로 세척한 다음, 인산완충용액에 현탁하여 유세포분석기로 분석하였다.

#### Allogeneic T cell purification

분리한 생쥐(BALB/c)의 비장을 단일세포로 만든 다음, 10% FBS · RPMI1640 배지에 희석하여 nylon wool col-

umn에 넣고 37°C · 5% CO<sub>2</sub> incubator에 60분간 배양하였다. 그 후 nylon wool column을 37°C로 데워진 배지로 세척하여 비부착성인 T세포만을 순수 분리한 다음, T세포 표면 특이 분자인 anti-CD3 mAb로 염색한 후 유세포분석기를 이용하여 97% 이상이 CD3<sup>+</sup> T세포인 것을 확인하고 동종항원 반응(alloreactive) T세포 실험에 사용하였다.

#### OVA-specific T cell clone

생쥐(C57BL/6)의 foot-pad에 OVA(1 mg/ml)와 complete adjuvant를 충분히 섞어 주사하여 1차 면역하였고, 2주 후 OVA(1 mg/ml)와 incomplete adjuvant를 충분히 섞어 주사하여 2차 면역하였다. 2차 면역 1주 후, 비장을 분리하여 96 well micro-plate에 limiting dilution 한 다음, 2주 간격으로 OVA(1 mg/ml)와 mitomycin C(50 µg/ml)를 처리한 비장세포로 재자극하여 OVA에 특이적으로 반응하는 T세포 clone을 배양하였다. 배양한 T세포를 유세포분석기로 분석한 결과 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> T세포와 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T세포로 확인되었으며 각각 HS-1과 4H-1로 명명하였다. 그리고 수립된 세포주 HS-1과 4H-1은 항원(OVA) 자극에 의해 IL-2와 IFN-γ를 생산하는 것을 확인하였다.

#### T cells proliferation

홍삼시료 처리 후 회수한 수지상세포에 MMC를 처리한 다음, 96 well micro-plate에  $3 \times 10^4$ 개가 되도록 분주하고, 여기에 CD4<sup>+</sup> syngeneic T세포주(HS-1)  $5 \times 10^4$ 개, CD8<sup>+</sup> syngeneic T세포주(4H-1)  $1 \times 10^5$ 개와 allogeneic T세포  $3 \times 10^5$ 개를 각각 분주하여 72시간 배양한 후, 세포증식 정도를 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection KitIII (Roche, IN, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### IL-2, IFN-γ production

회수한 수지상세포에 MMC를 처리한 후, 96 well micro-plate에  $3 \times 10^4$ 개가 되도록 분주하고, 여기에 CD4<sup>+</sup> syngeneic T세포주(HS-1)  $5 \times 10^4$ 개, CD8<sup>+</sup> syngeneic T세포주(4H-1)  $1 \times 10^5$ 개와 allogeneic T세포  $3 \times 10^5$ 개를 각각 분주하여 배양하였다. 배양 24시간 후, 배양 상층액을 수거하여 상층액에 포함된 IL-2, IFN-γ의 양을 효소항체법(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)으로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

#### Cell surface markers

수지상세포는 T세포에 항원을 제시할 수 있는 세포표면분

**Table 1.** Effect of Red-ginseng water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract and crude saponin on the expression of cell surface markers (%)

Conditions	Conc. (µg/ml)	CD11c/MHC II	CD11c/CD40	CD11c/CD80	CD11c/CD86
LPS	0	24.8	16.5	28.8	19.4
	1	36.3	52.6	34.9	33.4
Water extract	1	28.0	12.9	27.1	15.5
	10	22.9	13.3	23.6	16.7
	100	23.4	14.0	23.0	15.6
Edible and fermented ethyl alcohol extract	1	25.9	18.0	53.3	20.8
	10	23.8	14.6	24.8	17.3
	100	25.4	17.4	21.3	17.4
Crude saponin	1	24.5	13.4	22.9	15.6
	10	23.5	13.0	22.8	14.9
	100	37.6	38.4	39.1	31.7

Day 6 DC were stimulated with or without water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract, crude saponin(1, 10 and 100 µg/ml) and LPS(1 µg/ml), respectively, for 24 hours. On day 7, surface expression of MHC class II, CD40, CD80, CD86 and CD11c were analyzed by two colour flow cytometry. Numbers represent the percentage of double positive cells. The results are representative of three independent experiments.

자로 MHC class II 분자를 다량으로 발현하고 있으며, T세포를 더욱 활성화 시킬 수 있는 CD80, CD86과 같은 공동 자극분자(co-stimulatory molecule)는 물론, 부착분자(adhesion molecule)인 CD11c를 발현하고 있다. 뿐만 아니라, 이러한 공동자극분자와 부착분자의 발현을 증가시키는 CD40을 발현하고 있어 수지상세포에 의한 T세포의 면역 활성을 더욱 증진시킬 수 있다. 따라서 홍삼시료를 처리하였을 때 수지상세포의 세포표면분자의 발현 증가를 관찰하기 위하여 각 분자에 특이적인 단클론항체를 이용하여 double staining한 후 유세포분석기로 분석하였다.

그 결과 물 extract를 처리한 실험군의 경우, 관찰한 모든 세포표면분자, 즉 CD11c/MHC class II, CD11c/CD40, CD11c/CD80, CD11c/CD86의 발현이 증가하지 않았으며, 식용발효주정 extract를 처리한 경우에는 100 µg/ml에서 CD11c/CD80만이 홍삼시료를 처리하지 않은 대조군 28.8%에 비해 53.3%로 증가하였다(Table 1). Crude saponin을 처리한 실험군 또한, 1 µg/ml과 10 µg/ml에서는 세포표면분자의 발현이 증가하지 않았으나, 100 µg/ml에서는 CD11c/MHC class II, CD11c/CD40, CD11c/CD80, CD11c/CD86 모두 대조군 24.8%, 16.5%, 28.8%, 19.4%에 비해 각각 37.6%, 38.4%, 39.1%, 31.7%로 증가하였다. 특히, CD11c/MHC class II, CD11c/CD80, CD11c/CD86은 이미 수지상세포의 성숙을 자극하는 물질로 알려진 LPS를 처리한 대조군과 유사한 정도로 발현이 증가하는 것을 관찰하였다.

발현되는 세포표면분자를 mean fluorescence intensity로 관찰한 결과, LPS를 처리한 대조군의 경우 무처리 대조군에 비하여 MHC class II, CD40, CD80, CD86 모두 109.2,

5.5, 68.6, 54.1에서 196.8, 24.2, 216.3, 200.1로 fluorescence intensity가 증가하였으나 물 extract를 처리한 실험군에서는 이러한 발현이 유도되지 않는 것으로 나타났으며 식용발효주정 extract의 경우 모든 농도에서 CD86만 약간 증가하는 경향을 보였다. 반면 crude saponin을 처리한 실험군은 100 µg/ml에서 MHC class II, CD40, CD80, CD86 모두 158.7, 10.1, 139.8, 145.7로 증가하였다(Fig. 1A, B, C). 즉 홍삼 추출물 중에서 crude saponin이 수지상세포의 세포표면분자의 발현을 증가시키는데 가장 효과적인 것으로 나타났다.

### Phagocytosis

미성숙 수지상세포와 성숙한 수지상세포는 기능적인 면에서 큰 차이가 있다. 즉, 미성숙 수지상세포는 비특이적 phagocytosis인 macro-pinocytosis를 수행하는 반면, 성숙한 수지상세포는 포식된 항원을 처리 가공하여 MHC 분자/peptide complex 상태로 T세포에 제시하는 기능을 가진다. 따라서 T세포의 활성을 유도할 수 있는 항원 제시 능력을 알아보기 위해 수지상세포의 phagocytosis를 분석하여 분화 정도를 관찰하였다.

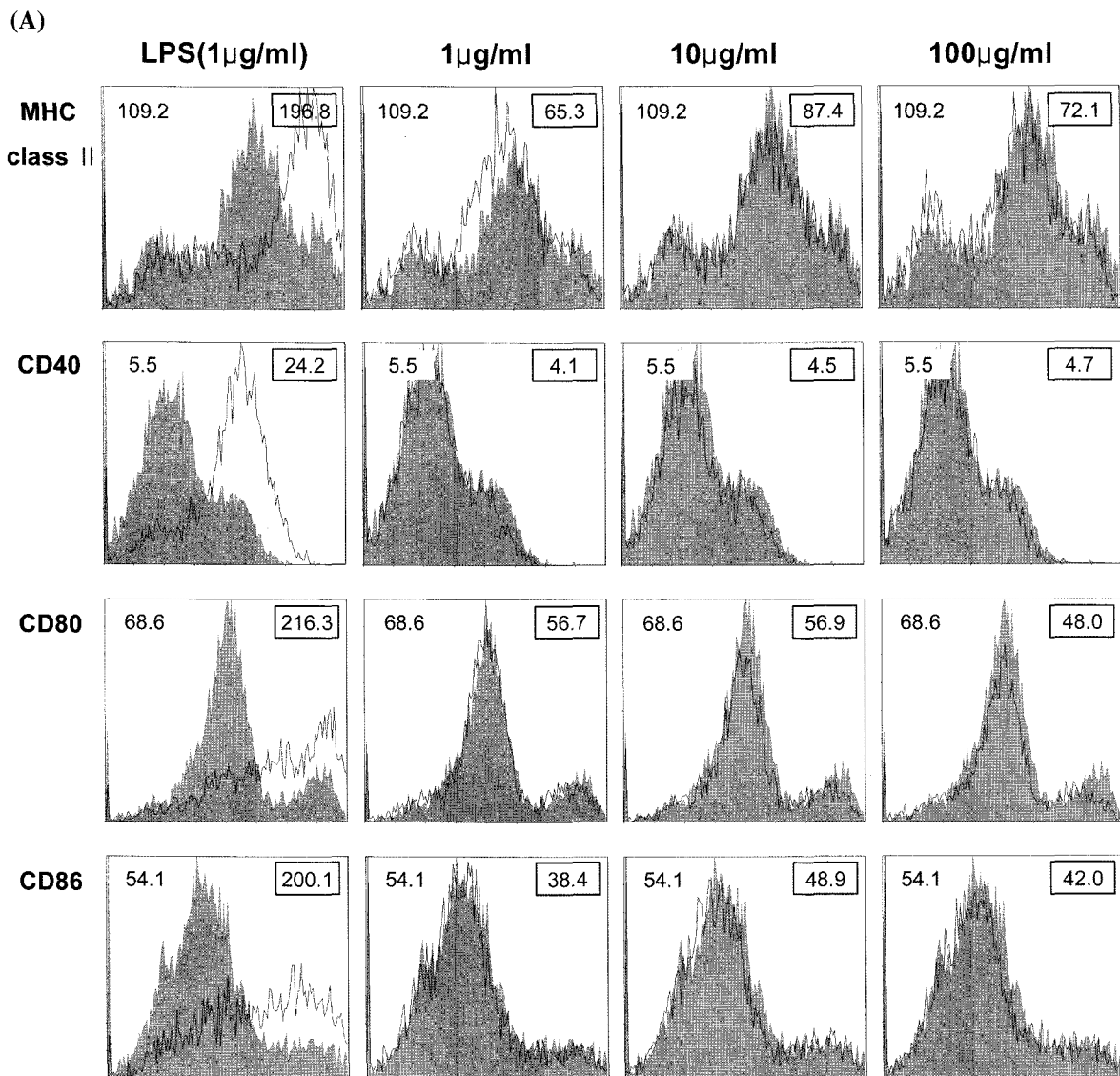
그 결과, FITC-dextran을 60분 처리했을 때, 미성숙 수지상세포의 phagocytosis는 33.5%, LPS를 처리해 성숙을 유도한 수지상세포는 23.9%로 phagocytosis가 감소하였으며 이것으로 LPS에 의해 효과적으로 수지상세포의 성숙이 유도되었음을 알 수 있었다(Table 2). 이러한 대조군과 각 홍삼시료를 처리한 실험군을 비교한 결과 crude saponin 100 µg/ml에서 LPS를 처리한 대조군보다 낮은 수치인 9%를 나타낸 것으로 보아 crude saponin을 처리하였을 때 수지상세

포의 성숙이 유도됨을 확인할 수 있었고, FITC-dextran을 120분 처리하였을 때, LPS로 성숙을 유도한 수지상세포 26.9%에 비해 crude saponin 100 µg/ml을 처리하였을 때 13.6%로 나타났으며 이것은 crude saponin이 세포표면분자의 발현을 증가시키는 결과와 일치하는 것으로 생각된다.

**T cells proliferation**

수지상세포는 성숙하게 되면 포식된 항원을 T세포에 제시하고, 항원을 제시 받은 T세포는 분열증식은 물론 IL-2, IFN-γ와 같은 cytokine을 분비함으로써 면역 반응을 유도한

다. 실험에 사용한 allogeneic T세포는 수지상세포를 분리한 C57BL/6(H-2<sup>b</sup>) 생쥐와 MHC 분자가 다른 동종이계인 Balb/c(H-2<sup>d</sup>) 생쥐에서 유래한 세포로서 수지상세포 자신의 peptide가 결합한 MHC 분자를 항원으로 인식하여 반응하는 반면, syngeneic T세포는 수지상세포와 기원이 같은 동종동계의 C57BL/6(H-2<sup>b</sup>) 생쥐에서 분리한 세포로서, 본 실험에서는 수지상세포의 MHC 분자에 결합한 OVA 항원 peptide를 인식하여 반응하는 세포만을 분리 배양하여 사용하였다. 즉 allogeneic T세포는 특정항원과 관계없이 수지상세포의 MHC 분자를 인식하여 비특이적으로 반응하는데 비해 실험



**Fig. 1.** Effect of Red-ginseng water extract(A), edible and fermented ethyl alcohol extract(B) and crude saponin(C) on the expression of co-stimulatory molecules. On day 6 DC were stimulated with or without water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract, crude saponin(1, 10 and 100 µg/ml) and LPS(1 µg/ml), respectively, for 24 hours. On day 7, surface expression of MHC class II, CD40, CD80, CD86 and CD11c were analyzed by two colour flow cytometry. Cells were gated on CD11c<sup>+</sup>. The numbers indicate the mean fluorescence intensity. The grey histograms represent the negative control staining.

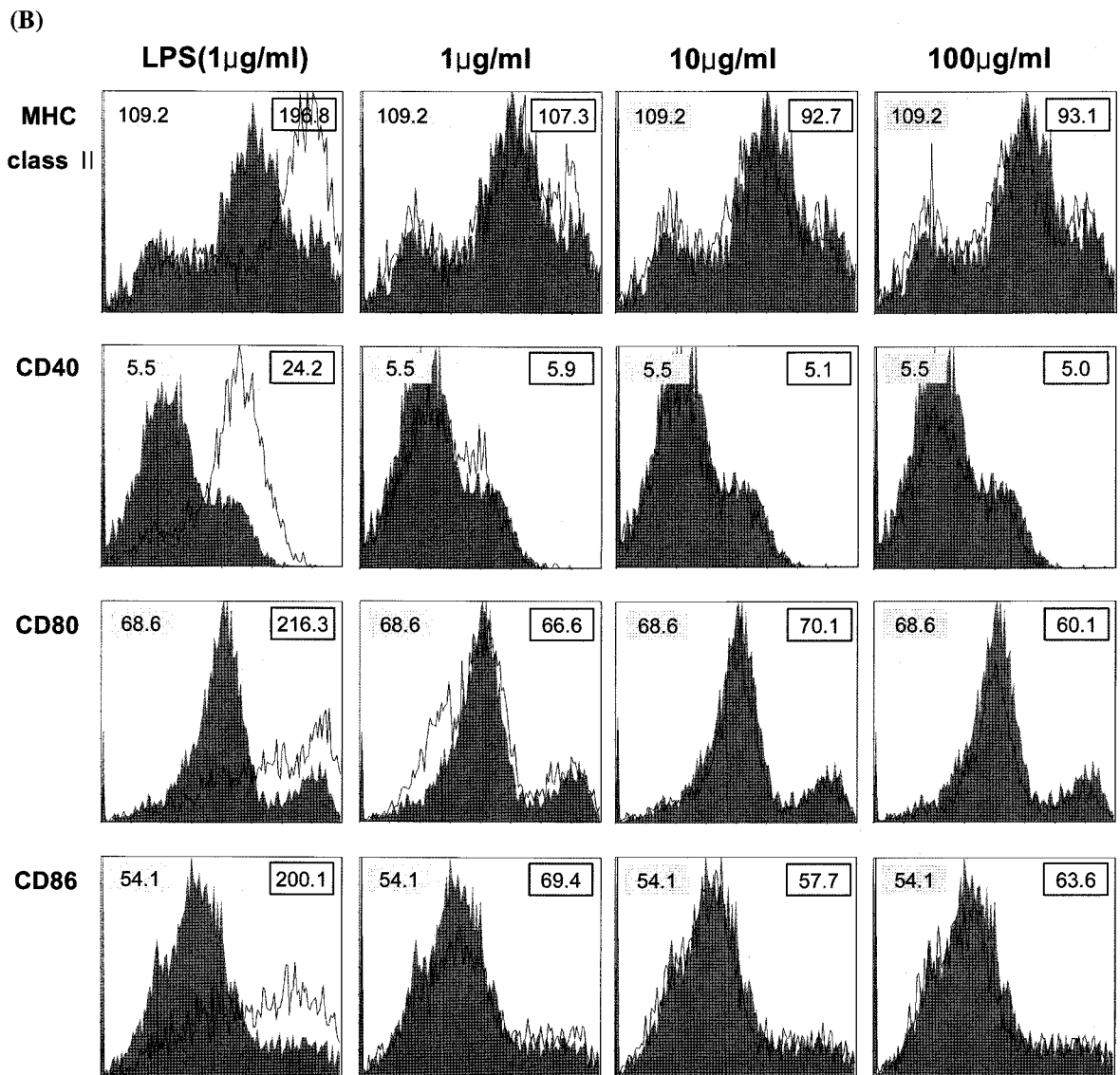


Fig. 1. Continued.

에 사용한 syngeneic T세포 clone은 수지상세포의 MHC 분자와 결합한 OVA 항원 peptide만을 인식하여 특이적으로 반응한다.

T세포에 의한 면역반응을 확인하기 위해 홍삼시료 처리 후 회수한 수지상세포에 MMC를 처리하여 증식을 억제 시킨 후 실험을 진행하였다. 먼저 allogeneic T세포 증식을 관찰한 결과, 물 extract와 식용발효주정 extract를 처리한 실험군의 경우 대조군에 비해 T세포의 증식이 유도되었고, 특히 두 홍삼시료 모두 1 µg/ml에서 가장 활발한 증식이 일어남을 확인하였다(Table 3). 반면 crude saponin은 물 extract, 식용발효주정 extract와는 달리 100 µg/ml에서 가장 활발한 T세포 증식이 유도되었다.

CD4<sup>+</sup> syngeneic T세포의 경우, 항원인 OVA를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 OVA를 처리하였을 때 T세포의 증식이 유도되었다(Table 5). 물 extract와 식용발효주정 extract를 처리하였을 때는 1 µg/ml과 10 µg/ml에서 대조군 보다 높은 T세포 증식이 유도되었고, 특히 10 µg/ml에서 가장 활발한 반응이 일어남을 관찰하였다. Crude saponin의 경우 1 µg/ml에서 가장 활발한 T세포 증식이 유도되었으며 10 µg/ml에서 또한 활발한 T세포 증식이 유도됨을 확인하였다.

종양에 직접적으로 작용하여 암세포를 파괴시키는 CD8<sup>+</sup> syngeneic T세포의 경우 물 extract는 1 µg/ml에서 가장 높은 T세포 증식을 유도하였고, 식용발효주정 extract를 처리한 실험군은 모든 농도에서 높은 반응이 나타났다(Table 7). Crude

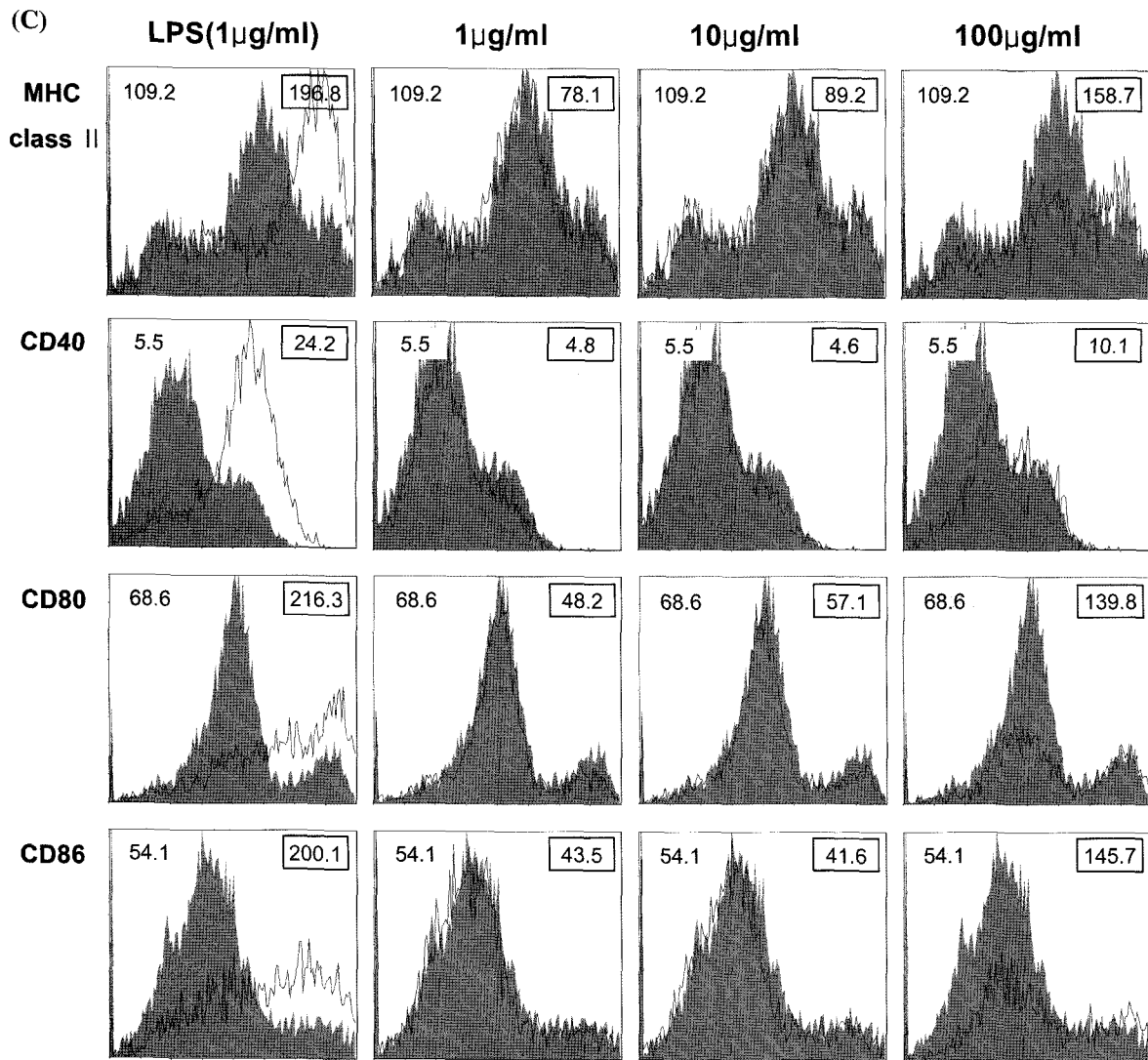


Fig. 1. Continued.

Table 2. Effect of Red-ginseng water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract and crude saponin on the endocytotic activity

Conditions	Conc.(µg/ml)	Times	
		60 min	120 min
LPS	0	33.5%	33.3%
	1	23.9%	26.9%
Water extract	1	28.2%	36.1%
	10	27.8%	35.3%
	100	32.0%	32.3%
Edible and fermented ethyl alcohol extract	1	33.8%	40.2%
	10	31.4%	33.5%
	100	34.4%	30.6%
Crude saponin	1	36.7%	35.2%
	10	29.7%	28.9%
	100	9.0%	13.6%

BM-derived DC were generated as described in Materials and methods. On day 7, receptor-mediated endocytosis(FITC-dextran) was analyzed on MHC class II-PE-positive DC by two colour flow cytometry. The numbers indicate the percentage of MHC class II<sup>+</sup> cells that were positive for FITC-dextran. The results are representative of two separate experiments that yielded similar results.

saponin 또한 모든 농도에서 높은 T세포 증식을 유도하였으며 특히 100 µg/ml에서 OVA를 처리한 대조군보다 약 3배 정도의 높은 증식 반응을 유도하였다. 즉 홍삼시료 세 가지 추출물 모두 수지상세포를 활성화시켜 T세포의 증식반응을 유도하는 것으로 나타났다.

### IL-2, IFN-γ 생산

항원을 인지한 T세포가 활성화 될 때 분비하는 cytokine 인 IL-2와 IFN-γ를 관찰하였다. 즉 allogeneic T세포가 분비하는 cytokine을 관찰한 결과, IL-2는 무처리 대조군 290 pg/ml과 비교하여 물 extract 1 µg/ml, 식용발효주정 extract 10 µg/ml, 100 µg/ml, crude saponin 100 µg/ml에서 각각 653 pg/ml, 357 pg/ml, 440 pg/ml, 589 pg/ml로 모두 대조군

보다 많은 양의 IL-2분비가 유도되었고, IFN-γ의 경우 물 extract 1 µg/ml에서만 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Table 4). CD4<sup>+</sup> syngeneic T세포에서는 IL-2와 IFN-γ 모두 대조군은 측정 한계치인 10 pg/ml 이하로 측정되었다. 반면 항원인 OVA를 처리한 실험군의 경우 IL-2와 IFN-γ 생산량이 각각 79.58 pg/ml과 117.15 pg/ml로 분비량이 증가하였다 (Table 6). 그리고 홍삼시료를 처리한 실험군의 경우 IL-2는 물 extract 모든 농도와 식용발효주정 extract 1 µg/ml 과 10 µg/ml, crude saponin 1 µg/ml과 10 µg/ml에서 분비량이 증가하였고, IFN-γ는 물 extract 10 µg/ml, 100 µg/ml, 식용발효주정 extract 1 µg/ml과 10 µg/ml에서 생산량이 증가하였으며, crude saponin은 농도 10 µg/ml과 100 µg/ml에서 IFN-γ의 생산이 증가하는 것을 확인하였다. 그리고 CD8<sup>+</sup>

**Table 3.** Effect of Red-ginseng water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract and crude saponin are poor stimulators on the growth of naive allogeneic T cells

Conditions	Conc.(µg/ml)	Growth(O. D. at 405 nm/490 nm)
	0	0.264±0.041
Water extract	1	0.421±0.013
	10	0.365±0.070
	100	0.281±0.039
Edible and fermented ethyl alcohol extract	1	0.466±0.023
	10	0.381±0.090
	100	0.381±0.055
Crude saponin	1	0.335±0.102
	10	0.460±0.141
	100	0.575±0.053

C57BL/6(H2<sup>b</sup>) BM-derived DC were generated as described in Materials and methods, harvested on day 7. DC(3×10<sup>4</sup> cells/well) were treated with mitomycin C(50 µg/ml) for 25 min, washed, and then used as stimulators in allogeneic T cells(5×10<sup>5</sup> cells/well). Naive allogeneic BALB/c(H-2<sup>d</sup>) T cells purified by nylon wool column, and used in the allogeneic MLR. Proliferation of allogeneic T cell was measured by a 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection KitIII. Data are represented as mean ± SD for triplicates. The results are representative of two separate experiments that yielded similar results.

**Table 4.** Effect of Red-ginseng H<sub>2</sub>O extract, edible and fermented ethyl alcohol extract and crude saponin on the IL-2 and IFN-γ production of allogeneic T cells

Conditions	Conc.(µg/ml)	Cytokines	
		IL-2(pg/ml)	IFN-γ(pg/ml)
	0	290.67±2.36	45.50±12.37
Water extract	1	653.67±18.86	90.50±8.84
	10	276.67±6.13	41.75±0.00
	100	201.00±4.71	40.50±8.84
Edible and fermented ethyl alcohol extract	1	262.67±6.13	26.75±3.54
	10	357.67±1.89	45.50±5.30
	100	440.67±5.19	46.75±3.54
Crude saponin	1	142.67±6.13	30.50±5.30
	10	222.67±7.07	39.25±7.07
	100	589.67±5.66	49.25±10.61

IL-2 and IFN-γ levels in 24-h allogeneic MLR supernatants analyzed by ELISA. The IL-2 and IFN-γ contents were calculated using recombinant standards ranging from 10 pg/ml to 2430 pg/ml. Data are represented the mean ± SD for triplicates. The results are representative of two separate experiments that yielded similar results.



**Table 5.** Effect of Red-ginseng water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract and crude saponin on the growth of CD4<sup>+</sup> syngeneic T cell clone

Conditions	Conc.( $\mu\text{g/ml}$ )	OVA	Growth(O.D. at 405 nm/490 nm)
	0	-	0.093 $\pm$ 0.016
		+	0.115 $\pm$ 0.003
	1	+	0.187 $\pm$ 0.015
			10
Water extract	100		0.118 $\pm$ 0.033
	1	+	0.167 $\pm$ 0.035
10	0.273 $\pm$ 0.050		
100	0.088 $\pm$ 0.016		
Edible and fermented ethyl alcohol extract	1	+	0.171 $\pm$ 0.026
	10		0.165 $\pm$ 0.008
	100		0.091 $\pm$ 0.017
Crude saponin	1	+	0.171 $\pm$ 0.026
	10		0.165 $\pm$ 0.008
	100		0.091 $\pm$ 0.017

Day 6 DC were stimulated OVA(1 mg/ml) with or without water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract and crude saponin(1, 10 and 100  $\mu\text{g/ml}$ ), respectively, for 24 hours. On day 7, DC( $3\times 10^4$  cells/well) were treated with mitomycin C(50  $\mu\text{g/ml}$ ) for 25 min, washed, and then used as stimulators in CD4<sup>+</sup> syngeneic( $5\times 10^4$  cells/well) MLR. Proliferation of CD4<sup>+</sup> syngeneic T cell was measured by a 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection KitIII. Data are represented as mean $\pm$ SD for triplicates. The results are representative of two separate experiments that yielded similar results.

**Table 6.** Effect of Red-ginseng water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract and crude saponin on the IL-2 and IFN- $\gamma$  production of CD4<sup>+</sup> syngeneic T cell clone

Conditions	Conc.( $\mu\text{g/ml}$ )	OVA	Cytokines	
			IL-2(pg/ml)	IFN- $\gamma$ (ng/ml)
	0	-	<10	0.05 $\pm$ 0.00
		+	79.58 $\pm$ 12.96	117.15 $\pm$ 7.07
	1	+	106.75 $\pm$ 1.77	87.00 $\pm$ 12.37
			10	241.75 $\pm$ 5.30
Water extract	100		126.75 $\pm$ 12.37	130.75 $\pm$ 14.14
	1	+	131.75 $\pm$ 1.77	135.75 $\pm$ 3.54
10	491.75 $\pm$ 19.45		194.50 $\pm$ 12.37	
100	59.17 $\pm$ 2.95		87.00 $\pm$ 8.84	
Edible and fermented ethyl alcohol extract	1	+	130.50 $\pm$ 7.07	99.50 $\pm$ 19.45
	10		98.00 $\pm$ 7.07	123.25 $\pm$ 10.61
	100		54.17 $\pm$ 0.59	197.90 $\pm$ 3.18
Crude saponin	1	+	130.50 $\pm$ 7.07	99.50 $\pm$ 19.45
	10		98.00 $\pm$ 7.07	123.25 $\pm$ 10.61
	100		54.17 $\pm$ 0.59	197.90 $\pm$ 3.18

IL-2 and IFN- $\gamma$  levels in 24-h CD4<sup>+</sup> syngeneic MLR supernatants analyzed by ELISA. The IL-2 and IFN- $\gamma$  contents were calculated using recombinant standards ranging from 10 pg/ml to 2430 pg/ml. Data are represented the mean $\pm$ SD for triplicates. The results are representative of two separate experiments that yielded similar results.

**Table 7.** Effect of Red-ginseng water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract and crude saponin on the growth of CD8<sup>+</sup> syngeneic T cell clone

Conditions	Conc.( $\mu\text{g/ml}$ )	OVA	Growth(O.D. at 405 nm/490 nm)
	0	-	0.094 $\pm$ 0.0247
		+	0.101 $\pm$ 0.0530
	1	+	0.186 $\pm$ 0.0205
			10
Water extract	100		0.105 $\pm$ 0.0622
	1	+	0.161 $\pm$ 0.0064
10	0.159 $\pm$ 0.0028		
100	0.182 $\pm$ 0.0014		
Edible and fermented ethyl alcohol extract	1	+	0.176 $\pm$ 0.0170
	10		0.174 $\pm$ 0.0141
	100		0.277 $\pm$ 0.0092
Crude saponin	1	+	0.176 $\pm$ 0.0170
	10		0.174 $\pm$ 0.0141
	100		0.277 $\pm$ 0.0092

Day 6 DC were stimulated as described in CD4<sup>+</sup> syngeneic MLR. On day 7, DC( $3\times 10^4$  cells/well) were treated with mitomycin C(50  $\mu\text{g/ml}$ ) for 25 min, washed, and then used as stimulators in CD8<sup>+</sup> syngeneic( $1\times 10^5$  cells/well) MLR. Proliferation of CD8<sup>+</sup> syngeneic T cell was measured by a 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection KitIII. Data are represented as mean $\pm$ SD for triplicates. The results are representative of two separate experiments that yielded similar results.

**Table 8.** Effect of Red-ginseng water extract, edible and fermented ethyl alcohol extract and crude saponin on the IL-2 and IFN- $\gamma$  production of CD8<sup>+</sup> syngeneic T cell clone

Conditions	Conc.( $\mu$ g/ml)	OVA	Cytokines	
			IL-2(pg/ml)	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
	0	-	<10	<10
		+	<10	739.00 $\pm$ 28.28
Water extract	1		<10	1069.00 $\pm$ 106.07
	10	+	<10	909.00 $\pm$ 98.99
	100		<10	909.00 $\pm$ 49.50
Edible and fermented ethyl alcohol extract	1		<10	1754.00 $\pm$ 219.20
	10	+	<10	1734.00 $\pm$ 374.77
	100		<10	1734.00 $\pm$ 28.28
Crude saponin	1		<10	1659.00 $\pm$ 226.27
	10	+	<10	3424.00 $\pm$ 289.91
	100		<10	9649.00 $\pm$ 212.13

IL-2 and IFN- $\gamma$  levels in 24-h CD8<sup>+</sup> syngeneic MLR supernatants analyzed by ELISA. The IL-2 and IFN- $\gamma$  contents were calculated using recombinant standards ranging from 10 pg/ml to 2430 pg/ml. Data are represented the mean $\pm$ SD for triplicates. The results are representative of two separate experiments that yielded similar results.

syngeneic T세포 또한 물 extract, 식용발효주정 extract, crude saponin을 처리하였을 때 모든 농도에서 IFN- $\gamma$ 의 분비를 유의하게 증가시켰으며, 특히 crude saponin 100  $\mu$ g/ml에서 12배 이상의 IFN- $\gamma$  분비량이 증가하였다(Table 8). 하지만 allogeneic T세포와 CD4<sup>+</sup> syngeneic T세포 반응과는 달리 IL-2의 분비는 유도되지 않는 것으로 나타났다. 즉 세 가지 종류의 홍삼 추출물이 모두 수지상세포의 활성을 유도하여 T세포의 사이토카인 분비량을 증가시키는 것으로 나타났다.

## 요 약

본 연구에서는 정관장 홍삼의 물(water) extract, 식용발효주정 extract 및 홍삼 추출물로부터 분리 제조한 crude saponin을 이용하여 면역반응을 매개하는 수지상세포의 활성화 효과에 대하여 알아보았다. 그 결과 홍삼시료 중, crude saponin 100  $\mu$ g/ml을 처리하였을 때 수지상세포의 세포표면 분자인 MHC class II, CD40, CD80, CD86의 발현이 증가하였으며, phagocytosis는 감소하였다. 또한 홍삼시료를 처리한 수지상세포와 allogeneic T세포를 함께 배양하였을 때, 홍삼시료의 물 extract, 식용발효주정 extract, crude saponin 모두 allogeneic T세포의 증식반응을 유도하였고, IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 생산량을 증가시키는 것을 확인하였다. 또한 CD4<sup>+</sup> syngeneic T세포와 CD8<sup>+</sup> syngeneic T세포의 반응에서도 T세포의 증식반응을 높게 유도하였으며, CD4<sup>+</sup> syngeneic T세포에서 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 생산량을 증가시키고, CD8<sup>+</sup> syngeneic T세포에서는 IFN- $\gamma$  생산량을 증가시키는 것을 확

인하였다. 이상의 결과로 crude saponin의 경우 수지상세포의 세포표면 공동자극분자의 발현을 유도하고 성숙을 유도함으로써 T세포의 활성을 증진시키는 것으로 생각되며, 물 extract와 식용발효주정 extract는 crude saponin과는 다른 기작으로 T세포 활성화를 유도하는 것을 알 수 있었다. 따라서 실험에 사용한 홍삼시료, 즉 물 extract, 식용발효주정 extract, crude saponin 모두 수지상세포의 활성을 유도하는 물질로써 암항원 특이적 T세포 활성화를 이용한 항암치료에 이용할 수 있는 가능성이 있다고 사료된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2005년도 KT&G 출연 고려인삼학회 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Chang, Y. S., Chang, Y. H. and Sung, J. H. : The effect of ginseng and caffeine products on the antioxidative activities of mouse kidney. *J. Ginseng Res.* **30**, 15-21 (2006).
2. Park, M. G. : Korean ginseng. Korea Ginseng and Tobacco Research institute, Seoul Korea, p.63 (1994).
3. Brekhman, I. I. : Gosudarst Isdat et Med. Lit. Leningrad. 1-18 (1957).
4. Kim, N. D., Han, B. H., Lee, E. B. and Kang, J. Y. : Studies on ginseng on antistress effects. *Kor. J. Pharmacog.* **10**, 61-67 (1979).
5. Joo, C. N. : The preventive effect on the saponin fraction of

- Panax ginseng* C. A. Meyer against ethanol intoxication of rat liver. *Proc. 4th Int'l. Ginseng Symp.* 63-74 (1984).
6. Elma, Z. T., Ilian, E. Z. and Christina, I. H. : Effect of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on insulin binding in mice liver and brain membrane. *Phytotherapy Res.* 5, 46-48 (1991).
  7. Henishin, C. C., Lee, R., Wang, L. C. and Liu, H. J. : Effect of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on central cholinergic metabolism. *Pharmacology.* 42, 223-229 (1991).
  8. Kang, S. Y., Kim, S. H., Schini, V. B. and Kim, N. D. : Dietary ginsenosides endothelium dependent relaxation in the thoracic aorta of hypercholesterolemic rabbit. *Gen. Pharmac.* 26, 483-487 (1995).
  9. Fearon, D. T., and Locksley, R. M. : The instructive role of innate immunity in the acquired immune responses. *Science.* 272, 50-53 (1996).
  10. Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J. and Modlin, R. L. : Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 285, 732-736 (1999).
  11. Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P. and Zychlinsky, A. : Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science.* 285, 736-739 (1999).
  12. Steinman, R. M. : The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271-296 (1991).
  13. Hart, D. N. : Dendritic cells : unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood.* 90, 3245-3287 (1997).
  14. Bell, D., Young, J. W. and Banchereau, J. : Dendritic cells. *Adv. Immunol.* 72, 232-255 (1999).
  15. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. and Plaucka, K. : Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767-811 (2000).
  16. Kronin, V., Winkel, K., Suss, G., Kelso, A., Heath, W., Kirberg, J., Von Boehmer, H. and Shortman, K. : A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J. Immunol.* 157, 3819-3827 (1996).
  17. Suss, G. and Shortman, K. : A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 183, 1789-1796 (1996).
  18. Baskar, S., Clemens, V., Glimcher, L., Nabavi, N. and Ostrand-Rosenberg, S. : Rejection of MHC class II-transduced tumor cells requires induction of tumor-encoded B7-1 and/or B7-2 costimulatory molecules. *J. Immunol.* 156, 3821-3827 (1996).
  19. Fields, R. C., Shimizu, K. and Mule, J. J. : Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent anti-tumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 9482-9487 (1998).
  20. Boczkowski, D., Nair, S.K., Snyder, D. and Gilboa, E. : Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 184, 465-472 (1996).
  21. Zitvogel, L., Mayordomo, J. I., Tjandrawan, T., DeLeo, A. B., Clarke, M. R., Lotze, M. T. and Storkus, W. J. : Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulse dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 183, 87-97 (1996).
  22. Fong, L. and Engleman, E. G. : Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 245-273 (2000).
  23. Timmerman, J. M. and Levy, R. : Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Med.* 50, 507-529 (1999).
  24. Ahuja, S. S., Reddick, R. L., Sato, N., Montalbo, E., Kostecky, V., Zhao, W., Dolan, M. J., Melby, P. C. and Ahuja, S. K. : Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. *J. Immunol.* 163, 3890-3897 (1999).
  25. Zheng, L., Hung, X. L., Fan, Z., Borowski, L., Wilson, C. C. and Rinaldo, C. R. : Delivery of liposome-incapsulated HIV type 1 proteins to human dendritic cells for stimulation of HIV type1-specific memory cytotoxic T lymphocyte responses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 15, 1011-1020 (1999).
  26. Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. and Steinman, R. M. : Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176, 1693-1702 (1992).