

생약복합조성물(HemoHIM)의 수지상세포 활성화 효과

신성해¹ · 김도순¹ · 김성호² · 조성기³ · 변명우³ · 이성태^{1*}

¹순천대학교 생물학과

²전남대학교 수의학과

³한국원자력연구소 방사선연구원 방사선식품생명공학팀

Effects of a Herbal Composition (HemoHIM) on the Activation of Dendritic Cells

Sung-Hae Shin¹, Do-Soon Kim¹, Sung-Ho Kim², Sung-Kee Jo³,
Mung-Woo Byun³ and Sung-Tae Yee^{1*}

¹Dept. of Biology, College of Natural Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

²College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-752, Korea

³Radiation Food and Biotechnology Team, Advanced Radiation Technology Institute, Jeongeup Campus of Korea Atomic Energy Research Institute, Jeonbuk 580-185, Korea

Abstract

In our previous study, a novel herb mixture (HIM-I) of *Angelica gigas radix*, *Cnidium officinale* rhizoma, and *Paeonia japonica* radix was developed to protect the intestinal and immune systems and to promote their recovery from radiation damage. A new herbal composition (HemoHIM) with the high immune modulating activity was developed from HIM-I. In the present study, we examined the effects of HemoHIM on the maturation process of murine bone marrow (BM)-derived dendritic cells (DC). BM cells were cultured in the presence of IL-4 and GM-CSF and the generated immature DC were stimulated with HemoHIM for 24 hours. HemoHIM significantly enhanced the expression of co-stimulatory molecules, CD80 and CD86, especially. The activation capacity of HemoHIM-treated DC was significantly higher than that of immature DC, as analyzed by IL-2 and IFN- γ production and proliferation of the responding T cells in the co-culture with allogeneic T cells. The antigen-presenting capacity of HemoHIM-treated DC was also increased by the co-culture with OVA-specific T cells (HS-1), as analyzed by IL-2 and IFN- γ production and the proliferation. These results indicate that HemoHIM causes the maturation and activation of DC, which may be a part of mechanisms of immunomodulation by HemoHIM.

Key words: a herbal composition, dendritic cells, IL-2, IFN- γ , co-stimulatory molecules

서 론

면역계는 면역기능에 관여하는 세포나 조직이 모여서 이루어진 것으로서 주로 림프구와 보조세포, 그리고 이들이 모여서 만들어진 림프조직으로 구성되어 있다. 면역반응에서 가장 중요한 역할을 하는 세포는 림프구이지만 실제로 면역반응은 림프구에 의해서만 나타나는 것이 아니라, 보조세포라고 부르는 다른 여러 가지 백혈구들과의 상호작용 결과로 나타난다. 이들 보조세포들은 항원을 림프구에 제시하여 면역반응을 일으키고 진행시키기도 하며, 항원을 제거하는데도 중요한 역할을 담당한다(1). 보조세포 중에서 수지상세포(dendritic cells)는 최근에 세포 치료제로서 응용 가능성 때문에 의학적인 주목을 받고 있으며 다양한 기능에 대해

많은 기초적인 연구가 이루어지고 있다(2,3).

특이적 면역반응은 T세포 의존적 면역반응으로 항원제시세포(antigen presenting cells)가 MHC 분자에 결합한 항원 펩티드를 제시하는 것으로 시작한다. 특이적 면역반응을 유도하는 과정에서 중요한 역할을 하는 항원제시세포를 전문적 항원제시세포(professional antigen presenting cells)라고 하며 B세포, 대식세포, 수지상세포를 말한다. 그러나 불활성화 상태의 B세포는 탐식작용이 활발하지 못하고 MHC 분자의 발현양도 많지 않다. 대식세포의 경우 탐식작용은 활발하지만, 면역작용의 결과 생산되는 IFN- γ 와 같은 사이토카인의 도움이 없으면 MHC 분자를 발현하지 못하기 때문에 항원을 제시할 수 없다. 그러나 수지상세포는 생체 내에 널리 분포하고 있으며 성숙하는 과정에서 다양한

*Corresponding author. E-mail: sungtae@suncheon.ac.kr
Phone: 82-61-750-3618, Fax: 82-61-750-3608

면역반응을 조절하는 강력한 전문 항원제시세포로 알려져 있다(4).

수지상세포가 T세포에 항원을 제시하여 면역반응을 유도하는 과정은 크게 세단계로 나눌 수 있다. 즉 수지상세포는 말초 비립프계 기관에서 항원을 섭취하여 처리한 다음, MHC 분자와 복합체를 형성하고, 림프계 조직의 T세포 영역으로 이동하여, 다양한 부착/공동자극 분자와 사이토카인으로 항원 특이적 T세포의 증식/분화를 유도한다(5). 항원 특이적 면역반응은 T세포의 항원 수용체를 통해 CD8⁺ 또는 CD4⁺ T세포의 활성화로 일어난다. 이때 수지상세포는 세포 표면의 MHC I과 MHC II 분자와 결합한 항원 펩티드를 T세포에 제시할 뿐만 아니라, 동시에 다양한 부착/공동자극 분자(CD40, CD80, CD86 등)를 통해 T세포의 CD154, CD28, CTLA-4 분자와 결합하여 보조적인 자극으로 T세포의 활성화를 유도한다(6). 최근 수지상세포는 CD40 분자를 이용해 미경험 B세포의 증식과 IgM 항체 생산도 유도하는 것으로 알려졌다(7).

최근에는 천연 생약재와 생리활성물질 중에서 수지상세포를 활성화시킬 수 있는 성분을 탐색하는 실험이 진행되고 있다. 즉 candida β-D-glucan(8), *Agaricus blazei*의 물추출 성분(9), *Aloe vera*에서 분리한 acemannan(10) 등이 생쥐의 골수에서 분화된 수지상세포의 다양한 공동자극 분자의 발현과 항원섭취기능 등을 증가시키며, IL-12 생산량도 증가시키는 효과가 있다는 보고가 있다. 또한 보중익기탕 추출물(11)과 인삼 사포닌의 성분(12)이 사람 단구세포에서 분화된 수지상세포의 다양한 공동자극 분자의 발현, 항원섭취기능과 동종항원반응 T세포의 증식반응도 증가시키는 효과가 있다고 보고되었다.

본 연구팀은 동양의학에서 사용되고 있는 다양한 생약재 및 한약처방제의 다양한 약리작용에 대한 효과를 보고한 바 있으며(13-20), 최근에 당귀, 천궁, 백작약 등 3종의 생약재를 이용한 새로운 생약복합물 HIM-I을 개발하여 면역세포 활성화 효과, 면역조혈계 회복촉진 효과, 재생조직 및 면역조혈계의 방호 효과, 항산화 효과에 대해 보고하였다(21). 그리고 HIM-I에서 면역 및 조혈기능 활성화 효과가 더욱 강화된 새로운 생약복합조성물을 개발하고자 HIM-I에 그 조다당 분획이 첨가된 HemoHIM을 제조하여 효능을 검증하였다(22). 그 결과 생약복합물 HIM-I에 조다당 분획을 첨가하여 개발한 새로운 생약복합조성물 HemoHIM이 방사선에 의해 유발된 위장관 및 면역계 조직의 손상을 감소시켜 생존을 증가시키는 효과가 있으며, 특히 HemoHIM은 HIM-I과 비교하여 재생조직의 산화적 손상억제 효과는 비슷하게 유지되면서 면역조혈세포 방호 및 회복촉진 효과가 높은 것으로 관찰되었다.

본 실험은 특이적 면역반응을 유도하는 전문 항원제시세포인 수지상세포의 분화와 항원제시기능에 미치는 생약복합조성물 HemoHIM의 면역기능 증강 효과에 대해 알아보았다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 대한실험동물센터(충북 음성, 대한민국)에서 특정병원체부재(specific pathogen free) C57BL/6, Balb/c 생쥐를 공급받아 실험동물 사육실에서 폴리카보네이트 사육상자(18×20 cm) 당 6개체의 밀도를 유지하며 사육하였다. 이들 생쥐는 실온에서 물과 사료를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하여 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하면서, 생후 8~12주 사이의 생쥐를 실험에 사용하였다.

사용시약

세포 배양에 필요한 RPMI-1640, FBS(fetal bovine serum), antibiotic-antimycotic은 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)제품을 사용하였으며, 2ME(2-mercaptoethanol), sodium bicarbonate(NaHCO₃)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였다. 세포 표면 단백질에 대한 특이적 항체(anti-CD40, anti-CD86, anti-MHC class II, anti-CD11c mAb)는 Pharmingen(San Diego, CA, USA) 제품을 사용하였다. 골수세포에 첨가하여 수지상세포로 분화를 유도하기 위한 recombinant mouse GM-CSF와 IL-4는 R&D(Mckinley Place NE, MN, USA)제품을 사용하였다.

생약복합조성물(HemoHIM) 및 분획의 제조

생약복합조성물(HemoHIM)은 아래와 같은 방법으로 제조한 시료를 (주)선바이오텍에서 제공받아 사용하였다. 서울 경동 한약재 시장에서 구입한 생약재 3종, 즉 당귀(*Danggui*, *Angelica gigas* Nakai)의 뿌리, 천궁(*Chuanxiong*, *Cnidium officinale* Makino)의 근경, 백작약(*Baishaoyao*, *Paeonia japonica* Miyabe)의 뿌리를 동일한 무게비율로 혼합한 후, 혼합 생약재 100 g당 증류수 1,000 mL을 가하고 4시간 열탕 추출하였다. 추출물의 고형분을 제거하고 감압농축하여 생약복합물 HIM-I을 얻었다. HIM-I의 일부를 취하여 4배 부피의 100% 에탄올 주정을 첨가하고(최종 에탄올 농도 약 80%), 25°C 이하에서 16시간 정지한 후, 원심분리하여 침전된 조다당 분획(HIM-I-P)과 상층의 에탄올 분획(HIM-I-E)을 수거하였다. 수거한 조다당 분획의 일부를 이에 해당하는 HIM-I에 첨가하여 생약복합조성물 HemoHIM을 제조하였다. 제조한 HemoHIM은 동결건조하여 냉동 저장하였으며, 실험 직전에 증류수에 녹여 사용하였다.

수지상세포 분화 유도 및 배양

수지상세포는 다음과 같은 방법을 이용하여 생쥐 골수에서 분화·유도하여 사용하였다(23). 생쥐(C57BL/6)를 경추 탈골법으로 희생시킨 후, 1 mL 주사기를 이용하여 대퇴골(femur)과 경골(tibia) 안에 있는 골수를 분리한 다음 단일세포로 만들었다. 적혈구 용해 완충액(Tris-buffered ammonium chloride; 90 mL of 0.16 M NH₄Cl, 10 mL of 0.17 M

Tris, pH 7.2)을 처리하여 적혈구를 제거한 후, washing용액으로 1,200 rpm에서 5분간 3회 원심분리하여 충분히 세척한 다음, 혈구계산반을 이용하여 세포수를 계산하였다. GM-CSF(1,000 U/mL)와 IL-4(1,000 U/mL)가 포함된 배지(RPMI 1640, 10% FBS)에 부유된 골수세포(1×10^6 개/5 mL/well)를 6-well cell culture plate에서 배양하였다. 배양 4일 후 새 배지 1 mL와 동량의 GM-CSF(1,000 U/mL), IL-4(1,000 U/mL)를 첨가하고 2일간 더 배양한 다음, 세포를 5분간 shaking하여 가볍게 부착되어 있는 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 washing용액으로 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 충분히 세척한 다음, 세포(2.5×10^6 개/5 mL/well) 배양액에 HemoHIM을 농도별(1, 10, 100 μ g/mL)로 첨가한 후, 24시간 배양하고 회수하여 실험에 사용하였다.

유세포분석기 분석

수지상세포를 washing 용액(PBS, 1% FBS, 0.1% NaN_3)으로 3회 세척한 다음 Trypan blue 시약을 이용해 혈구계산반으로 생세포수를 계산하였다. 먼저 비특이적 결합을 막기 위해 세포($1 \sim 5 \times 10^5$ 개)를 anti-Fc γ R II/III-specific mAb (2.4G2)로 30분간 blocking한 다음 washing하지 않고 바로 PE-conjugated anti-CD40 그리고 anti-MHC class II (M5/114), anti-CD86 mAb로 각각 4°C에서 30분간 결합시켰다. 그 다음 washing용액으로 세척하고, 마지막으로 FITC-conjugated anti-CD11c mAb로 이중결합 시킨 후 유세포분석기(Epics XL, COULTER, USA)로 분석하였다.

동종항원 반응 T세포 분리

분리한 생쥐(BALB/c)의 비장으로부터 단일세포를 준비한 다음, 10% FBS-RPMI 1640 배지에 희석하여 nylon wool column에 넣고 37°C, 5% CO_2 incubator(MCO-17A, SANYO Electric Co., Japan)에 60분간 배양한 후, Nylon wool column를 37°C로 미리 데워진 배지로 세척하고 비부착성인 T 세포만을 순수 분리하여 동종항원반응(alloreactive) T세포로 실험에 사용하였다.

항원 OVA 특이적 T세포주 수립

생쥐(C57BL/6)를 OVA로 2차 면역한 후 비장을 분리하여 OVA에 특이적으로 증식반응을 나타내는 T세포주를 수립하였다. 수립된 세포주는 유세포분석기로 분석하여 CD4^+ / CD8^- T세포이며 항원자극에 대해 IL-2와 IFN- γ 를 생산하는 Type 1 helper T세포인 것을 확인하였고 HS-1으로 명명하였다.

IL-2와 IFN- γ 분비량 측정

동종항원반응(alloreactive) T세포(3×10^5 개/well) 또는 T세포주 HS-1(5×10^4 개/well)과 HemoHIM을 농도별(1~100 μ g/mL)로 처리한 수지상세포를 well당 1×10^4 , 3×10^4 , 1×10^5 개씩 96-well flat-bottomed cell culture plate에 넣고 24시간 배양한 후 배양 상층액을 회수하여 상층액에 포함된

IL-2와 IFN- γ 의 양을 측정하였다. 즉 일차 항체를 coating buffer(0.1 M NaHCO_3)에 희석하여 plate에 적정 양을 넣고 4°C에서 하룻밤 둔 다음 washing용액(0.05% Tween 20/PBS)으로 세척한 후, 소혈청(10% FBS/PBS)으로 blocking하였다. 그리고 배양 상층액을 적절하게 희석하여 넣은 다음, biotin이 부착된 이차 항체를 첨가하였다. 일정한 시간 후에 avidin-peroxidase를 첨가하고, 기질(2,2'-azino-bis, 0.1 M citric acid, H_2O_2)을 넣어 발색시키는 효소항체법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)을 이용해 Microplate Reader(Sunnyvale, CA, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

T세포 증식반응 측정

HemoHIM을 농도별로 처리한 수지상세포를 MMC(mitomycin C)로 처리한 다음, T세포와 함께 3일 또는 4일 배양한 후 세포 증식 정도를 측정하였다. 세포 증식 정도는 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection KitIII (Roche, IN, USA)를 이용하여 측정하였다.

항원제시기능 측정

골수세포에 GM-CSF와 IL-4를 첨가하여 6일간 배양한 수지상세포를 회수하여 HemoHIM을 농도별로 처리하고 동시에 OVA 항원을 처리하여 24시간 배양한 후에 세포를 회수하였다. 회수한 수지상세포를 다시 T세포주(HS-1)와 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 효소항체법을 이용해 IL-2, IFN- γ 를 측정하고, 일부는 3일 또는 4일간 배양한 후 T세포 증식반응을 측정하였다.

통계처리

실험 결과는 평균값 \pm SD로 나타내었고, Student's *t*-test를 이용하여 통계처리한 후에 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

골수세포로부터 수지상세포의 분화 유도 및 형태학적인 특징 확인

생쥐의 골수에서 골수세포를 분리하여 GM-CSF와 IL-4를 첨가하여 7일간 배양하면서 수지상세포의 증식/분화 과정을 관찰하였다. 먼저 배양 2일 후부터 GM-CSF와 IL-4에 반응하는 세포들이 분열하여 덩어리를 형성하며 증식하기 시작하였으며 배양 4일 후까지 약하게 붙어서 증식하던 세포의 덩어리가 배양 후 6일이 지나면서 배지 내로 떨어져 나오기 시작하였고, 이 중 일부는 세포 표면에 돌기를 가진 수지상세포의 형태를 나타내었다(Fig. 1). 그리고 배양 후 7일째는 거의 모든 세포들이 배지 내로 부유하였으며, 전형적인 성숙한 수지상세포의 형태를 보였다(23). 따라서 골수세포에 고농도의 GM-CSF와 IL-4를 공급하면서 7일간 배

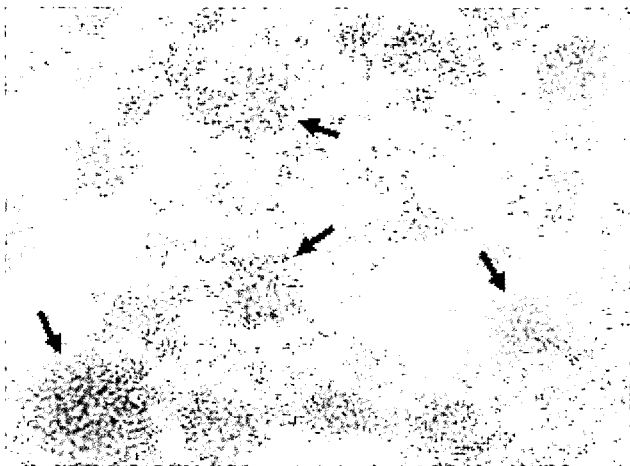


Fig. 1. Phase contrast microscopy of dendritic cell.
Bone marrow cells were cultured in complete RPMI 1640 medium supplemented with 1,000 U/mL of GM-CSF and IL-4 for 7 days. Dendritic cells forms loosely adherent proliferating aggregates in the presence of IL-4 and GM-CSF on day 7. ◀ : aggregate of dendritic cells. (original magnification ×200)

양하여 대량의 수지상세포를 얻을 수 있다는 것을 확인하였다.

수지상세포 표면 단백질 분자 발현 증가 효과

수지상세포가 T세포를 활성화시키는 것은 크게 두 가지 신호전달로 나눌 수 있다. 먼저 수지상세포가 섭취한 항원을 분해하여 자신이 가지고 있는 MHC 분자에 항원 펩티드를 결합시켜 T세포 항원 수용체를 자극하는 신호와 수지상세포의 세포 표면 단백질 분자로 T세포 표면 단백질 분자를 자극하는 신호로 나눌 수 있다.

이번 실험에서는 HemoHIM을 첨가하여 수지상세포를 배양하였을 때, T세포의 세포 표면 분자인 CD28, CD152, CD154와 결합하여 T세포를 활성화시킬 수 있는 MHC II (I-A^b), CD40, CD86(B7-2)과 같은 공동자극 분자를 많이 발현하는 성숙한 수지상세포로 분화가 유도되는지를 알아보기 위해 유세포분석기를 이용하여 조사하였다. 그 결과 HemoHIM을 첨가하지 않고 배양한 대조군의 CD11c/CD86 double positive 세포는 36.9%인데 비해 HemoHIM를 농도 별(1, 10, 100 µg/mL)로 처리하였을 때는 43.1%, 46.4%, 45.8%로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 CD11c/CD40 double positive 세포는 대조군에서 9.4%인데 비해 HemoHIM을 처리하였을 때 16.8%, 15.3%, 20.2%로 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Table 1). 그러나 CD11c/MHC II double positive 세포는 대조군에 비해 HemoHIM을 처리하였을 때 유의하게 증가하지는 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Agaricus blazei*의 물추출 성분(100 µg/mL)이 CD80, CD86, MHC I, MHC II의 발현을 유의하게 증가시킨 결과(9)와 유사하였고, *Aloe vera*의 추출 성분(100 µg/mL)이 CD80, CD86, MHC II, CD40, CD54의 발현을 유의하게 증가시킨 결과(10)와 유사하였다. 그리고 candida β-D-glucan(25 µg/mL)이 CD80과 CD86의 발현을 유의하게 증

Table 1. Effect of HemoHIM on the expression of co-stimulatory molecules in CD11c⁺ dendritic cells (DC)
(% of double positive staining cells)

Surface markers	HemoHIM (µg/mL)			
	0	1	10	100
CD11c/MHC class II	49.4	50.0	37.5	50.0
CD11c/CD86	36.9	43.1	46.4	45.8
CD11c/CD40	9.4	16.8	15.3	20.2

Bone marrow cells were cultured as described in Fig. 1. On day 6, the cells (Day 6 DC) were washed and stimulated with or without HemoHIM from 6 to 7 days. On day 7, the expression of CD40, CD86, MHC class II and CD11c was analyzed by FACS. Two colour flow cytometry was used to determine the expression level of co-stimulatory molecules in CD11c⁺ DC. The results are representative of three independent experiments.

가시키지만 MHC I과 MHC II 발현은 약간 증가시키는 결과(8)와 일치하는 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과, HemoHIM은 T세포를 활성화시킬 수 있는 공동자극 분자를 세포 표면에 많이 발현하여 성숙한 수지상세포로 분화를 유도하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

HemoHIM 처리 수지상세포의 동종항원 반응 T세포 활성화 효과

세포 표면 단백질의 발현을 분석한 결과, HemoHIM에 의해 수지상세포가 성숙한 형태로 분화하는 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 성숙한 수지상세포가 T세포를 활성화시키는 기능을 제대로 수행하는지를 알아보기 위해 HemoHIM을 처리한 수지상세포의 동종항원 반응 T세포 활성화 능력을 조사하였다. 시료의 농도는 앞 실험의 결과에서 세포 표면 공동자극 분자의 발현이 가장 많이 증가하는 100 µg/mL로 결정하였다.

수지상세포는 성숙하게 되면 포식된 항원을 T세포에 제시하고, 항원을 제시 받은 T세포는 분열·증식은 물론 IL-2, IFN-γ와 같은 사이토카인을 분비함으로써 면역 반응을 유도한다. 실험에 사용한 allogeneic T세포는 수지상세포를 분리한 C57BL/6(H-2^b) 생쥐와 MHC 분자가 다른 동종이계인 Balb/c(H-2^d) 생쥐에서 유래한 세포로서 수지상세포 자신의 peptide가 결합한 MHC 분자를 항원으로 인식하여 반응하는 반면, syngeneic T세포는 수지상세포와 기원이 같은 동종동계의 C57BL/6(H-2^b) 생쥐에서 분리한 세포로서, 수지상세포의 MHC 분자에 결합한 OVA 항원 peptide를 인식하여 반응하는 세포주(HS-1)를 분리 배양하여 사용하였다. 즉 allogeneic T세포는 특정항원과 관계없이 수지상세포의 MHC 분자를 인식하여 비특이적으로 반응하는데 비해 다음 실험에 사용한 syngeneic T세포 clone(HS-1)은 수지상세포의 MHC 분자와 결합한 OVA 항원 peptide만을 인식하여 특이적으로 반응한다.

비장세포를 nylon wool column을 통과시켜서 얻은 Balb/c

Table 2. Effect of HemoHIM-stimulated dendritic cells on the IL-2 and IFN- γ production of allogenic T cells

Conditions	IL-2 (pg/mL)		IFN- γ (pg/mL)	
	Control	HemoHIM	Control	HemoHIM
T cell (3×10^5)	<10	<10	<10	<10
DC (1×10^4 , 3×10^4 , 1×10^5)	<10	<10	<10	<10
DC (1×10^4)+T cell	62.0 \pm 0.0	112.2 \pm 3.1**	296.5 \pm 3.5	280.3 \pm 8.8
DC (3×10^4)+T cell	184.7 \pm 7.1	277.1 \pm 0.8**	780.8 \pm 58.3	844.5 \pm 31.8
DC (1×10^5)+T cell	413.0 \pm 4.7	568.0 \pm 2.4**	2633.3 \pm 37.1	3368.3 \pm 15.9**

Day 6 DC were stimulated with or without 100 μ g/mL of HemoHIM from 6 to 7 days. Day 7 DC were cultured with allogenic T cells. IL-2 and IFN- γ levels in the supernatant collected after 24 hr were quantified by ELISA. Data are represented as mean \pm SD of triplicates. *p<0.05, **p<0.01: significant difference between untreated control and experimental group.

생쥐의 T세포와 다양한 수의 수지상세포를 함께 넣고 24시간 배양한 후, 배양 상층액으로 분리된 IL-2와 IFN- γ 의 양을 측정하였다. HemoHIM을 처리하지 않은 수지상세포(1×10^4 개)와 T세포를 넣고 배양한 대조군의 IL-2의 분비량은 62.0 pg/mL인데 비해 HemoHIM을 처리한 실험군은 112.2 pg/mL로 대조군에 비해 IL-2의 분비량이 약 2배로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그리고 함께 배양한 수지상세포(3×10^4 , 1×10^5 개)의 수가 증가할수록 모두 대조군에 비해 IL-2의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Table 2). 또한 IFN- γ 분비량도 함께 배양한 수지상세포의 수가 증가할수록 모두 대조군에 비해 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Table 2). 이러한 결과는 인삼 사포닌의 성분이 사람 단구세포에서 분화한 수지상세포의 IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10 분비량을 증가시킨다는 보고(12)와 *Agaricus blazei*의 물추출 성분(9)이 IL-2 분비량을 증가시키는 결과와 일치한다.

다음으로 수지상세포와 T세포를 3일 또는 4일간 같이 배양한 후 T세포 증식반응에 미치는 효과를 살펴보았다. 그 결과 수지상세포의 수에 비례하여 T세포의 증식반응이 증가하였고, HemoHIM을 첨가하여 배양한 수지상세포를 넣어 주었을 때 T세포 증식반응도 수지상세포의 수가 증가할수록 증가하였다(Fig. 2). HemoHIM의 효과는 배양 후 3일째 수지상세포의 수가 많을수록 확실하게 나타났으며 배양 후 4일째에는 가장 많은 수의 수지상세포와 함께 배양했을 때만 나타났다. 이러한 결과는 보충익기탕 추출물(11)과 인삼 사포닌의 성분(12)에 의해 사람 단구세포에서 분화한 수지상세포가 동중항원 반응 T세포의 증식반응을 증가시킨다는 보고와 일치한다.

이상의 실험 결과로 HemoHIM은 수지상세포의 성숙을 유도해 동중항원 반응 T세포를 활성화시켜 IL-2와 IFN- γ 분비량을 증가시킬 뿐만 아니라 T세포 증식반응을 증가시키는 효과도 있는 것으로 나타났다.

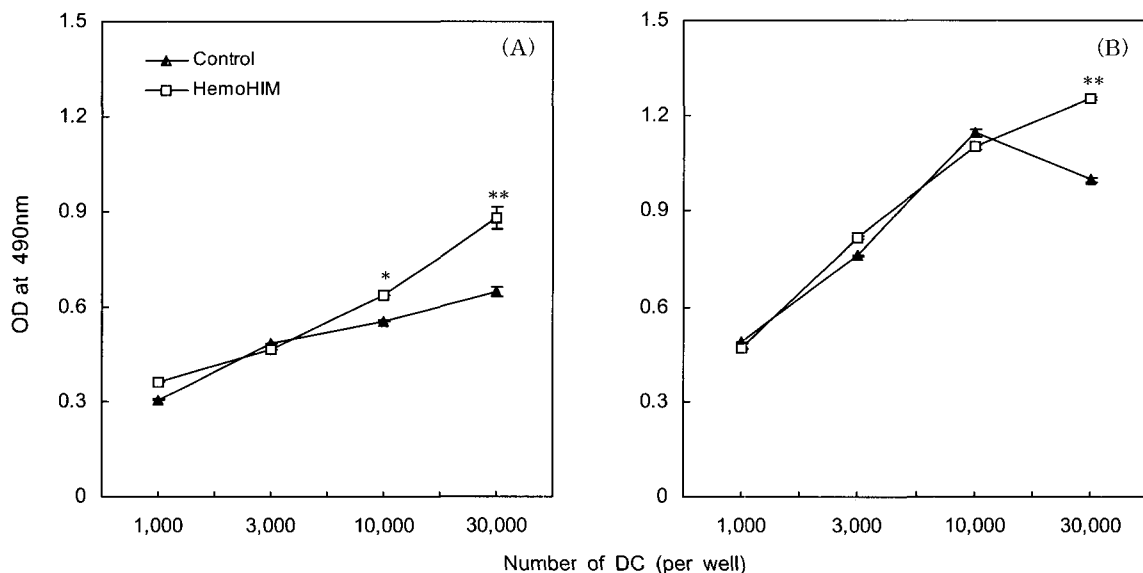


Fig. 2. Allogenic T cells were stimulated with dendritic cells derived in the presence of HemoHIM in the MLR assay for 3 (A) or 4 (B) days.

C57BL/6 (H-2^b) bone marrow-derived DC were generated as described in Material and Methods, harvested on day 7, washed extensively and used as stimulators of naive allogenic Balb/c (H-2^d) T cells (3×10^5 cells/well) in a one-way MLR. Growth of 72 h (A) and 96 h (B) were measured by BrdU assay kit. —□—: stimulated with DC derived in the presence of HemoHIM. Data are represented as mean \pm SD for triplicates. *p<0.05, ** p<0.01: significant difference between untreated control and experimental group.

Table 3. Effect of HemoHIM-stimulated dendritic cells on IL-2 production of OVA-specific T cell clone (pg/mL)

Cell number	HemoHIM (µg/mL)			
	0	1	10	100
DC (1×10 ⁴)+T cell	1,911.8±42.4	5,002.7±145.4**	5,169.8±18.1**	3,601.2±36.3**
DC (3×10 ⁴)+T cell	5,613.4±190.9	11,440.2±136.3**	9,839.5±54.5**	7,805.5±200.0*

Day 6 DC generated from C57BL/6 were stimulated OVA with or without HemoHIM from 6 to 7 days. Day 7 DC were cultured with OVA-specific T cell line (5×10⁴ cells/well). IL-2 levels in the supernatant collected after 24 hours were quantified by ELISA. Data are presented as mean±SD of triplicates.

*p<0.05, **p<0.01: significant difference between untreated control and experimental group.

Table 4. Effect of HemoHIM-stimulated dendritic cells on IFN-γ production of OVA-specific T cell clone (pg/mL)

Conditions	HemoHIM (µg/mL)			
	0	1	10	100
DC (1×10 ⁴)+T cell	113.3±3.8	183.3±6.7**	195.3±0.3**	158.1±2.1**
DC (3×10 ⁴)+T cell	239.1±4.2	337.6±0.0**	367.6±0.0**	326.1±3.5**

Day 6 DC generated from C57BL/6 were stimulated OVA with or without HemoHIM from 6 to 7 days. Day 7 DC were cultured with OVA-specific T cell line (5×10⁴ cell/well). IFN-γ levels in the supernatant collected after 24 hours were quantified by ELISA. Data are presented as mean±SD of triplicates.

*p<0.05, **p<0.01: significant difference between untreated control and experimental group.

HemoHIM 처리 수지상세포의 OVA-specific T세포 활성화 효과

다음은 수지상세포의 항원 전달기능에 미치는 HemoHIM의 영향을 알아보기 위하여 OVA 단백질 항원에 특이적으로 반응하는 T세포주(HS-1)를 수립하여 실험에 사용하였다.

GM-CSF와 IL-4를 첨가하여 6일간 분화를 유도한 수지상세포에 OVA 항원(1 mg/mL)과 HemoHIM을 농도별로 첨가하여 다시 24시간 배양한 수지상세포를 T세포주(HS-1)와 함께 배양하였다. HemoHIM을 처리하지 않은 수지상세포(1×10⁴개)와 HS-1을 함께 넣어 배양한 대조군의 IL-2 분비량 1,911 pg/mL에 비해 HemoHIM(1, 10, 100 µg/mL)을 처리한 실험군은 5,002 pg/mL, 5,169 pg/mL, 3,601 pg/mL로 모두 대조군에 비해 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(Table 3). 그리고 3×10⁴개의 수지상세포와 함께 배양한 경우에도 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 이때 고농도보다 저농도의 HemoHIM을 처리하였을 때 IL-2 분비량이 더 많은 것으로 나타났다. 그리고 IFN-γ 분비량도 대조군에 비해 HemoHIM 처리 실험군에서 증가하였다(Table 4).

다음으로 같은 조건에서 3일 또는 4일간 배양하여 HS-1의 증식반응을 알아본 결과, HemoHIM 처리 시험군에서 HS-1의 증식반응이 대조군에 비해 증가하였고, 수지상세포의 수가 많을수록 증식반응도 크게 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 그리고 수지상세포의 수가 동일한 경우에는 HemoHIM 10 µg/mL을 처리하였을 때 가장 높은 증식반응이 나타났고 최대 증식반응은 배양 후 4일째 관찰되었다.

이상의 실험 결과, HemoHIM을 첨가하여 배양한 수지상세포는 대조군에 비해 T세포를 충분히 활성화시켜 IL-2와 IFN-γ 분비량과 증식반응을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

지금까지의 실험 결과를 종합하면, 특이적 면역반응을 유

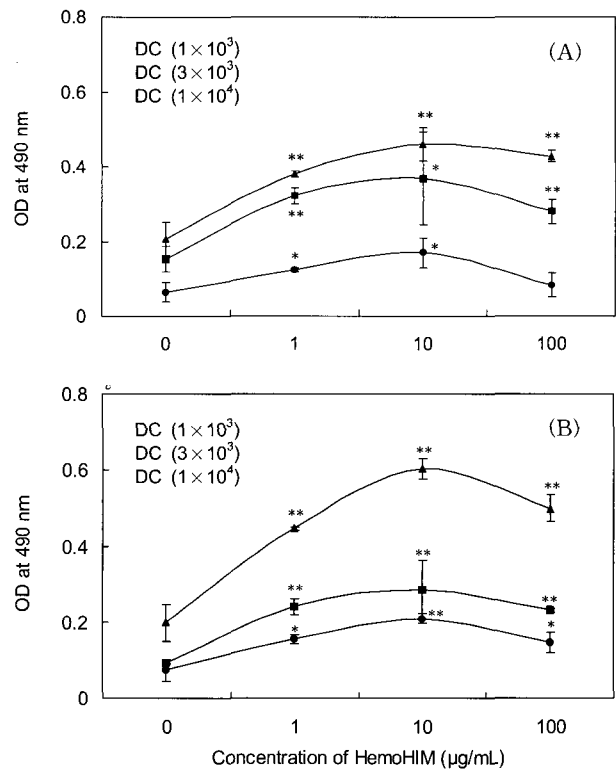


Fig. 3. Effect of HemoHIM-stimulated dendritic cells on the proliferation of OVA-specific T cell clone.

Day 6 DC generated from C57BL/6 were stimulated by OVA with or without HemoHIM from 6 to 7 days. Day 7 DC were cultured with OVA-specific T cells (5×10⁴ cells/well). Cell growth at 72 h (A) and 96 h (B) were measured by BrdU assay kit. Data are presented as mean±SD of triplicates. *p<0.05, **p<0.01: significant difference between untreated control and experimental group.

도하는 전문 항원제시세포인 수지상세포가 T세포의 활성화를 유도하는 과정에서, 생약복합조성물인 HemoHIM이 수지상세포의 분화를 유도하여 T세포의 IL-2와 IFN-γ 생산량을

유의하게 증가시키고, 증식반응 역시 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서 HemoHIM은 생체 내의 특이적 면역반응을 강화하는 면역기능 조절제로서 사용이 가능할 것으로 생각된다.

요 약

특이적 면역반응을 유도하는 전문 항원제시세포인 수지상세포의 분화와 항원제시기능에 미치는 HemoHIM의 면역기능 증강 효과에 대해 알아보았다. HemoHIM은 수지상세포의 분화/증식 과정에 첨가하였을 경우에 공동자극 분자인 CD40, CD86 분자의 세포 표면 발현량을 증가시키는 것으로 나타났다. 이 수지상세포는 동중항원 반응 T세포를 활성화시켜 IL-2, IFN- γ 분비량과 증식반응을 유의하게 증가시켰다. 그리고 HemoHIM을 처리한 수지상세포는 대조군에 비해 OVA 항원을 T세포주에 충분히 전달하여 IL-2와 IFN- γ 의 분비량을 유의하게 증가시켰을 뿐만 아니라 T세포주의 증식반응도 유의하게 증가시켰다. 따라서 HemoHIM은 생체 내의 특이적 면역반응을 유도하는 수지상세포의 기능을 강화하는 면역기능 조절제로서 사용이 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 연구 개발 중장기 계획 사업(M2-0505020002-05A0902-00212)의 지원을 받아 수행하였기에 감사드립니다.

문 헌

- Hart DN. 1997. Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90: 3245-3287.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
- Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. 2003. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 15: 138-147.
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
- Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, Muramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM. 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: Abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vivo. *J Exp Med* 180: 1849-1860.
- Rattis FM, Peguet-Navarro J, Staquet MJ, Dezutter-Dambuyant C, Courtellemont P, Redziniac G, Schmitt D. 1996. Expression and function of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol* 26: 449-453.
- Liu YJ, Arpin C. 1997. Germinal center development. *Immunol Rev* 156: 111-126.
- Kikuchi T, Ohno N, Ohno T. 2002. Maturation of dendritic cells induced by *Candida* beta-D-glucan. *Int Immunopharmacol* 2: 1503-1508.
- Kim GY, Lee MY, Lee HJ, Moon DO, Lee CM, Jin CY, Choi YH, Jeong YK, Chung KT, Lee JY, Choi IH, Park YM. 2005. Effect of water-soluble proteoglycan isolated from *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 5: 1523-1532.
- Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim YS, Kim JS, Kim YS, Kim KJ, Han SS, Lee CK. 2001. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 1: 1275-1284.
- Nabeshima S, Murata M, Hamada M, Chong Y, Yamaji K, Hayashi J. 2004. Maturation of monocyte-derived dendritic cells by Hochu-ekki-to, a traditional Japanese herbal medicine. *Int Immunopharmacol* 4: 37-45.
- Takei M, Tachikawa E, Hasegawa H, Lee JJ. 2004. Dendritic cells maturation promoted by M1 and M4, end products of steroidal ginseng saponins metabolized in digestive tracts, drive a potent Th1 polarization. *Biochem Pharmacol* 68: 441-452.
- Kim SH, Lee SE, Oh H, Kim SR, Yee ST, Yu YB, Byun MW, Jo SK. 2002. The radioprotective effects of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang: A prescription of traditional Chinese medicine. *Am J Chin Med* 30: 127-137.
- Jo SK, Yu YB, Oh H, Kim SR, Kim SH. 2000. The effects of Shi-Quan-Dai-Bu-Tang and its ingredients on the survival of jejunal crypt cells and hematopoietic cells in irradiated mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 93-98.
- Kim SH, Lee SE, Oh H, Yang JA, Chung CY, Jang JS, Yu YB, Jo SK. 1999. The radioprotective effect of Kuei-Pi-Tang as a prescription of traditional Chinese medicine in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 698-704.
- Oh H, Park HR, Jeong IY, Kim SH, Jo SK. 2002. Protective effects of *Paeonia japonica* against radiation-induced damage. *J Korea Asso Radiat Prot* 27: 181-188.
- Kim SH, An MR, Nah SY, Lee JH, Kim JH, Jo SK, Jang SJ, Shin DH. 2001. The effects of herbs on the radiation-induced apoptosis in intestinal crypt cells. *J Korea Asso Radiat Prot* 26: 27-33.
- Kim SH, Oh H, Kim SR, Jo SK, Byun MW, Kim KS, Lee JH, Shin DH. 2001. The radioprotective effects of radices herbs. *Korea J Vet Res* 41: 105-111.
- Lee SE, Oh H, Yang JA, Jo SK, Byun MW, Yee ST, Kim SH. 1999. Radioprotective effects of two traditional Chinese medicine prescriptions: Si-Wu-Tang and Si-Jun-Zi-Tang. *Am J Chin Med* 27: 387-396.
- Kim SH, Oh H, Lee SE, Jo SK, Byun MW. 1998. Effect of Si-Wu-Tang and Si-Jun-Zi-Tang on the survival of jejunal crypt cells and hematopoietic cells in irradiated mice. *Korean J Food Sci Technol* 30: 888-894.
- Park HR, Kim SH, Yee ST, Byun MW, Jo SK. 2005. The effects of a herb mixture (HIM-I) on the protection of the hematopoietic-immune system and self-renewal tissues against radiation damage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 605-612.
- Jo SK, Park HR, Jung UH, Oh H, Kim SH, Lee SE. 2005. Protective effect of a herbal preparation (HemoHIM) on the self-renewal tissues and immune system against γ -irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 805-813.
- Son YI, Egawa S, Tatsumi T, Richard RE Jr, Kalinski P, Kanto T. 2002. A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *J Immunol Methods* 262: 145-157.

(2006년 9월 6일 접수; 2006년 9월 15일 채택)