

## 고려홍삼으로부터 분리한 compound K 함유분획에 의한 대식세포의 toll-like receptor-의존성 신호전달경로 활성조절 분석

양철수\* · 고성룡\*\* · 조병구\*\* · 이지연\* · 김기혜\* · 신동민\* · 육재민\* · 손현주\*\*

김영숙\*\* · 위재준\*\* · 도재호\*\* · 조은경\*,\*\*\*,#

\*충남대학교 의과대학 미생물학교실, \*\*KT&G 중앙연구원

(2007년 9월 10일 접수; 2007년 11월 22일 수리)

### Compound K (CK) Rich Fractions from Korean Red Ginseng Inhibit Toll-like Receptor (TLR) 4- or TLR9-mediated Mitogen-activated Protein Kinases Activation and Pro-inflammatory Responses in Murine Macrophages

Chul-Su Yang\*, Sung-Ryong Ko\*\*, Byung-Goo Cho\*\*, Ji-Yeon Lee\*, Ki-Hye Kim\*,  
Dong-Min Shin\*, Jae-Min Yuk\*, Hyun-Joo Sohn\*\*, Young-Sook Kim\*\*,  
Jae-Joon Wee\*\*, Jae-Ho Do\*\* and Eun-Kyeong Jo\*,\*\*\*,#

*Department of Microbiology\*, and Infection Signaling Network Research Center\*\*\*,  
College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 301-747, Korea;*

*\*\*Ginseng Research Group, KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, S. Korea.*

(Received September 10, 2007; Accepted November 22, 2007)

**Abstract :** Compound K (CK), a protopanaxadiol ginsenoside metabolite, was previously shown to have immunomodulatory effects. In this study, we isolated the CK rich fractions (CKRF) from Korean Red Ginseng and investigated the regulation of CKRF-mediated inflammatory signaling during Toll-like receptor (TLR)-mediated cellular activation. Among various TLR ligands, CKRF considerably abrogated TLR4- or TLR9-induced inflammatory signaling. Both LPS and CpG-containing oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) stimulation rapidly activates mitogen-activated protein kinases [MAPKs; extracellular signal-regulated kinases 1/2 and p38], NF- $\kappa$ B, and expression of pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in murine bone marrow-derived macrophages (BMDMs) in a time- and dose-dependent manner. Of interest, pre-treatment of CKRF in either LPS/TLR4- or CpG-ODN/TLR9-stimulated macrophages substantially attenuated the LPS-induced inflammatory cytokine production and mRNA expressions, as well as MAPK and NF- $\kappa$ B activation. To our knowledge, this is the first description of the inhibitory roles for CKRF in TLR4- or TLR9-associated signaling in BMDMs. Collectively, these results demonstrate that CKRF specifically modulates distinct TLR4- and TLR9-mediated inflammatory responses, and further studies are urgently needed for their *in vivo* roles for potential therapeutic uses, such as in systemic inflammatory syndromes.

**Key Words :** Compound K-rich fractions, Toll-like receptors, Mitogen-activated protein kinases, Inflammation

## 서 론

고려인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer. Ginseng radix)은 오갈피나무과 (*Araliaceae*) 인삼속 (*Panax*)에 속하는 다년생

초본류로서, 오래 전부터 한방에서는 약용으로 사용되어 왔으며, 현대에 이르러서는 자양강장, 노화억제, 항암 등의 각종 약리작용으로 인해 세계적으로 가장 우수한 건강식품 혹은 의약품으로 평가받고 있다. 인삼의 화학성분은 사포닌 성분, 정유 성분, polyacetylene 성분, phenol 성분, 알칼로이드 성분, 다당체, 아미노산, 유기산, 유리당, 비타민 및 무기성분 등으로 이루어져 있다.<sup>1)</sup>

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-580-8243; (팩스) 042-585-3686  
(E-mail) hayoungj@cnu.ac.kr

고려인삼의 주된 약리효능을 나타내는 성분인 사포닌(saponin)은 glycone의 골격구조에 따라 triterpenoid계 사포닌과 steroid계 사포닌 두가지로 크게 분류된다. 고려인삼의 사포닌은 triterpenoid계의 dammarane계 사포닌으로서 구조적으로 비당화합물(aglycone), protopanaxadiol group(ginsenoside Ra, Rb, Rc, Rd, Rg3, Rh2 and Rs) 그리고 protopanaxatriol group(ginsenoside Re, Rf, Rg1, Rg2 and Rh1)으로 분류된다. 이러한 고려인삼 특유의 사포닌들은 약성이 온화하고 과량 투여에 의한 독성이 없을 뿐만 아니라 용혈 작용이 거의 없는 것으로 밝혀져 있다.<sup>2)</sup>

인체의 선천면역반응은 병원균 침입 초기에 병원균을 외부 물질로 인식하고 병원체 및 그 성분에 대한 방어면역을 작동시키는 중요한 기능을 수행한다. 이러한 선천면역체계의 조절은 pattern-recognition receptors (PRRs)라고 불리는 세포 수용체를 통해 유도되며, 그 중에서 toll-like receptor (TLR)은 특정 미생물 성분에 반응하여 직접적으로 면역세포를 활성화시키는 역할을 수행한다. 인체 면역계에서 TLR이 특정 리간드를 인식하게 되면 세포내 정보전달 흐름(intracellular signaling cascades)의 활성이 유도되고 결과적으로 다양하면서도 독특한 염증 및 면역반응 관련 유전자들의 전사합성이 이루어진다.<sup>3)</sup> 현재까지 사람에서 총 13종류의 TLR 유전자가 발견되어 TLR family를 이루고 있으며, TLR10, TLR12, TLR13을 제외하고는 각각 하나 이상의 특이적인 리간드가 밝혀져 있다. 이 중 TLR1과 TLR2는 세균 mycobacterial lipoprotein과 triacylated lipopeptide를 인지하며,<sup>4)</sup> TLR3은 RNA virus 증식 중에 생기는 double-stranded RNA와 dsRNA의 analogue인 polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C)를 인지하는 것으로 알려져 있다.<sup>5)</sup> TLR4는 그람음성세균의 세포막에 발현되는 lipopolysaccharide (LPS)의 수용체로 작용하며,<sup>6)</sup> TLR9는 세균과 바이러스 DNA의 메틸화 되어 있지 않은 CpG sequence 모티브와 결합하여 염증성 정보를 전달한다.<sup>7)</sup>

특히 TLR4 신호전달경로의 활성은 myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-의존성 및 비의존성 경로에 의해 유발되며, MyD88 의존성 경로는 초기에 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)의 활성을 통한 염증성 사이토카인 생성의 촉발을 유도한다. MyD88 비의존성 경로는 interferon (IFN)-regulatory factor (IRF3) 및 후기 NF- $\kappa$ B 활성을 통해 IFN- $\beta$  및 IFN-inducible genes의 활성화를 촉진한다.<sup>8)</sup>

고려홍삼 6년근 추출물은 다양한 화학물질(endotoxin, serotonin) 처리 등으로 유발시킨 여러 가지 위궤양 실험모델 시험에서 위궤양 억제 효과를 나타내며 고려인삼(추출물과 성분)에 의한 항염증 활성 효능이 보고되었다. 특히 proto-

panaxadiol ginsenosides Rb2 및 Rc는 *Bifidobacterium* sp. Int57 및 *Bifidobacterium* sp. SJ32에 의해 compound K (CK; 20-O-(beta-D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol)로 분해 및 변형되며,<sup>9)</sup> CK의 종양세포에 대한 실험결과 사람 astrogloma 암세포의 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 발현의 억제가 보고된 바 있다.<sup>10)</sup> 그러나 CK함유분획의 TLR 신호전달경로의 조절에 대한 연구 보고는 거의 없는 실정이다. TLR을 통한 병원체의 인식과 일련의 신호전달 과정이 효과적인 선천성 및 적응 면역반응을 자극하여 개체를 방어하는 데에 중추적인 역할을 한다는 점에서 CK함유분획의 TLR 반응경로와 그 효능을 검증하는 연구는 장차 홍삼 특정 성분의 기능성 실용화 연구를 도모하는 데 있어서 기초적인 자료가 될 것이다.

따라서 본 연구는 선천면역을 담당하는 중요한 면역세포인 대식세포에 대하여 홍삼 대사산물인 CK 함유분획을 전처리한 후 다양한 TLR 활성인자들을 자극하고 TLR 경로 활성 조절능 측정 및 그 기작을 분석하여 CK 함유분획의 새로운 효능을 구명하였기에 이를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 실험재료

C57/BL6NTacSam mice는 Samtako사(O-San, Korea)로부터 구입하였다. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지는 Cambrex Bio Science (Walkersville, MD, USA)로부터 구입하였다. LPS (TLR4 agonist; InvivoGen, San Diego, CA, USA), peptidoglycan (PGN) from *Staphylococcus aureus* (Fluka, Milwaukee, WI, USA) 및 poly I:C (InvivoGen)을 TLR 리간드로 사용하였다. TLR2 리간드인 synthetic bacterial lipopeptide (Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Lys<sub>4</sub>-OH)은 InvivoGen 사로부터 구입하여 사용하였다. Western blot 분석에 이용되는 anti-phospho-p38, anti-phospho-extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2, anti-p38, anti-ERK 및 anti-I $\kappa$ B- $\alpha$  항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서,  $\alpha$ -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 각각 구입하였다. 2차 항체 반응에 사용되는 anti-rabbit IgG 항체와 anti-mouse IgG 항체는 각각 Amersham Pharmacia Biotech (Little Chalfont, Bucks, UK)와 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였으며 ECL 시약은 Millipore (Billerica, MA USA)사로부터 구입하였다. TNF- $\alpha$  및 IL-6 ELISA kit는 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)사로부터 구입하였다.

**2. 홍삼으로부터 CK 함유분획(CK-RF)의 추출 및 용해**

홍삼 알코올 엑기스 100 g을 증류수 10 L에 녹이고 식용첨가 가능 효소인 cellulase, hemicellulase, pectinase의 혼합 효소 (Shin Nihon Chemical co. Japan) 20 g을 가한 후 56°C에서 디지털 정속 교반기로 교반하면서 48시간동안 효소 반응을 수행하였다. 반응 후 반응 중지 처리 없이 반응액을 꺼내어 식힌 후 반응액을 No2 (whatman 사) 여과지로 여과하여 상등액과 침전물을 분리하였다. 침전물을 주정에 녹이고 3000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 감압농축기 (rotary evaporator) 상에서 60°C이하에서 진공 농축하여 건조시켰다. 건조물을 회수하여 균질화시킨 후 CK 강화 분말을 얻었다.

CK강화소재(분말)의 제조수율 및 지표성분 함량은  $11.6 \pm 0.1\%$  (건조무게 기준)이며 배치별 편차는 RSD로 0.6% 이었다. CK함량은 high-performance liquid chromatography를 이용하여 정량 분석한 바, CK강화소재(분말) 1 g당 CK는  $243.8 \pm 16.1$  mg 이었다 (Fig. 1). CK 강화소재 분말을 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) : polyethylene glycol (PEG; Sigma-Aldrich) 400 : DDW (1 : 4 : 5) 복합체로 용해시켜 적정 농도를 세포에 처리하였다.<sup>11)</sup> DMSO : PEG400 : DDW (1 : 4 : 5) 복합체는 CK 함유분획의 용해제 대조군으로 0.1% (vol/vol) 의 농도로 배양액에 첨가하였다.

**3. 마우스 골수 대식세포(bone marrow derived macrophage, BMDM)의 분리 및 배양**

C57/BL6 mice의 대퇴골로부터 주사기를 이용하여 골수 혈액을 수집하였다. 수집한 골수 혈액은 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 포함된 DMEM 배지로  $1 \times 10^6$  cells/ml 로 부유한 후에 48 well culture plate에 부착시켜 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 4일 동안 분화시켰다. 4일 후에 비대식세포들을 제거하고, 10% 우태아혈청이 포함되지 않은 DMEM 배

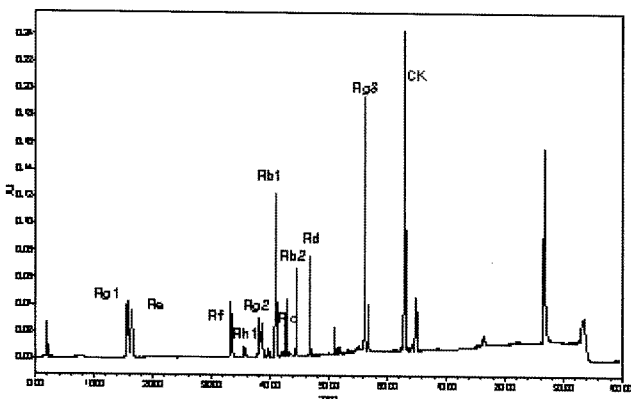


Fig. 1. HPLC profile of CK rich fractions (CK-RF).

지로 교체하여 하루 동안 휴지상태를 만든 후에 CK 함유분획을 45분 동안 전처리 후 LPS 또는 여러 종류의 TLR 리간드 (PGN, BLP, poly(I:C), CpG1668 혹은 CpG1726)로 자극하였다.

**4. 세포 생존율 측정**

고려홍삼으로부터 추출한 CK 함유분획 성분에 대한 세포 독성을 알아보기 위하여 마우스 골수 대식세포에 CK 함유분획을 농도별로 24 시간 동안 처리한 후 cell counting kit (CCK)-8 assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) 방법을 이용하여 살아있는 세포 수를 측정하였다. 약술하면, 96 well plate에 마우스 골수 대식세포 ( $1 \times 10^3$  cells/well)를 부착시켜 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양시켰다. CK 함유분획 (0.1, 1, 5, 10, 20, 50 ug/ml)을 24 시간 동안 처리한 배양액에 CCK-8 용액을 10 ul 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 1 시간 반응시켰다. 반응 종료시점에서 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**5. Western blot analysis를 이용한 MAPKs (mitogen activated protein kinase) 및 NF-κB 활성도 분석**

각 조건에서 배양된 세포를 수집하여, protease inhibitor가 포함된 sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% bromophenol blue)를 가하여 세포를 용해한 후 100°C에서 5분간 가열하여 단백질 시료를 얻었다. 이 단백질 시료는 12% SDS-PAGE로 크기별로 분리한 후에 polyvinyl difluoride (PVDF) 막으로 90 V에서 1시간 동안 이동시켰다. 단백질이 이동된 막은 5% skim milk가 포함된 Tween-20 함유 Tris-buffered saline (TBST)로 1시간 동안 반응시켜 blocking을 수행하였다. 1차 항체는 항체 종류에 따라 500배 혹은 1000배로 희석하여 처리하고 4 내지 18시간 동안 반응시켰으며, 2차 항체 반응은 peroxidase가 표지된 anti-rabbit IgG 항체 혹은 anti-mouse IgG 항체를 5% skim milk가 포함된 TBST로 2000배 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 단백질 발현량의 검출은 검출시약인 ECL 용액으로 상온에서 1분간 반응시킨 후 X-ray 필름에 감광시켜 확인하였다.

**6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용한 사이토카인의 측정**

마우스 골수 대식세포를 분리한 후 홍삼 추출물 CK 함유분획을 농도별로 45분 동안 전처리 후 그람 음성 LPS 1 ug/ml 혹은 각종 TLR 리간드 (PGN, BLP, poly(I:C), CpG1668 혹

은 CpG1726)로 자극하고 18시간 동안 배양 후 상층액을 수집하였다. 각 배양 상층액으로부터 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 생성을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

### 7. 역전사-중합효소 연쇄반응 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)을 이용한 사이토카인 mRNA 발현 분석

Total RNA는 RNAgent kit (Promega, Madison, WI)를 이용하여 분리하였으며, 분리한 total RNA는 prime RT pre-mix kit (Genotech, Daejeon, Korea)를 이용하여 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 PCR pre-mix kit (Genotech)와 mouse TNF- $\alpha$  (sense; CGG ACT CCG CAA AGT CTA AG, antisense; ACG GCA TGG ATC TCA AAG AC), m-IL-6 (sense; GGA AAT TGG GGT AGG AAG GA, antisense; CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG) primer를 이용하여 95°C 5분, 95°C 1분, 58°C 1분, 72°C 1분 30회, 72°C 10분 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 1.0  $\mu$ g/ml ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel 상에서 전기영동하여 DNA 밴드 위치를 자외선 투사기상에서 관찰하였다.

### 8. Nitric oxide (NO) 생성 측정

세포에서 분비되는 NO를 측정하기 위하여 Griess reaction을 수행하였다.<sup>12)</sup> 약술하면 먼저 측정하고자 하는 세포배양 상층액 100  $\mu$ l와 Griess reagent [0.8% sulfanilamide/0.75% N-(naphthylethylene) diamine in 0.5 N HCl, Sigma] 100  $\mu$ l를 혼합하였다. 10 분간 실온에서 반응시킨 후, 541 nm 파장에서 microplate reader (Bio-Rad)을 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다. Sodium nitrate (NaNO<sub>2</sub>)를 nitrite 표준으로 사용하였다.

### 9. 통계학적 처리

실험결과는 평균 표준 오차로 나타냈으며 통계적 유의성은 SPSS 통계 프로그램 (version 11.5, Chicago, IL)으로 Student's T-test 및 Spearman Correlation 방법에 의해 검증하였으며 *p* 값이 0.05 이하를 보이는 경우 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

## 결 과

### 1. CK 함유분획 성분이 세포 생존에 미치는 영향

고려홍삼으로부터 추출한 CK 함유분획 성분의 함유증 효능을 분석하기 위해 이 성분들의 세포에 대한 독성 정도를 알아보기 위하여 마우스 골수유래 대식세포에 CK 함유분획

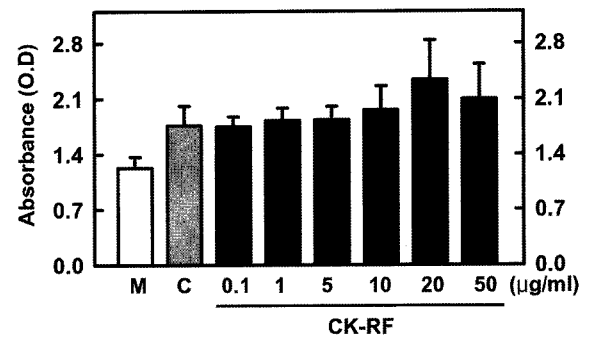
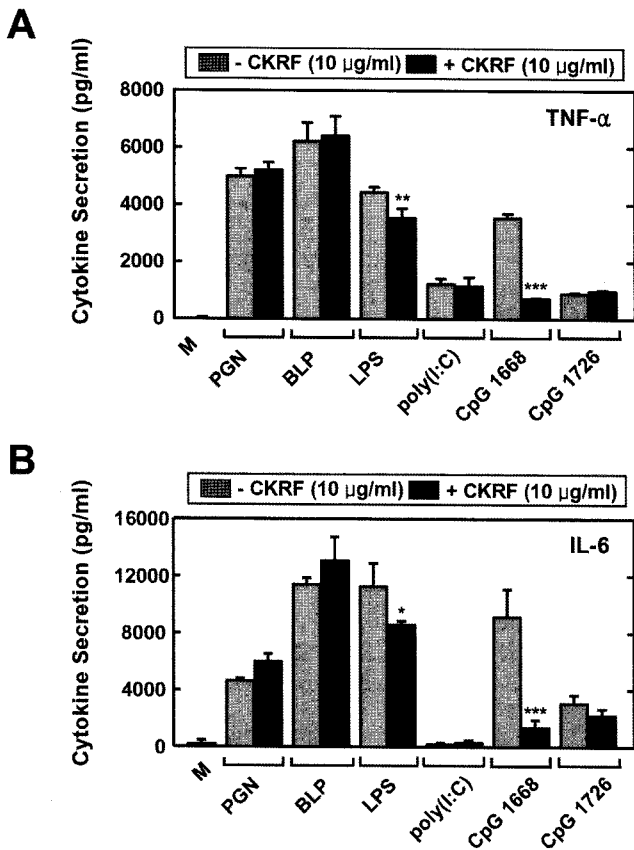


Fig. 2. Cell viability of murine BMDMs treated with CK rich fractions (CK-RF). Primary murine BMDMs were seeded at a density of  $1 \times 10^3$  cells/well. After 3-4 days, cells were treated with CK-RF (0.1, 1, 5, 10, 20, 50  $\mu$ g/ml). Cell viability was assessed after 24 hr incubation in the presence of CCK-8. Data are presented as the means  $\pm$  s.e. of three independent experiments.

을 0.1 부터 50  $\mu$ g/ml의 농도별로 처리하고 24 시간 후에 골수유래 대식세포의 생존율을 측정하였다(Fig. 2). 상관관계 분석 결과 대식세포에 대한 CK 함유분획의 농도별 처리 후 세포의 생존율은 CK 함유분획을 처리하지 않은 대조군과 비교했을 때 유의한 차이를 나타내지 않았다( $p > 0.05$ ). 이 같은 결과를 통해 본 연구에서 사용한 CK 함유분획 성분의 농도는 살아있는 세포에 독성을 거의 나타내지 않음을 알 수 있었다.

### 2. 다양한 TLR-리간드 자극에 대한 CK 함유분획 성분의 조절 기능 비교분석

TLR과 특정 리간드의 인식은 세포내의 신호전달 과정을 활성화시켜 특이적인 염증반응 및 선천 면역반응을 유도하는 첫 단계로서 매우 중요하다.<sup>3)</sup> 저자들은 CK 함유분획 성분에 의해 다양한 TLR 신호전달과정에서 억제 조절이 일어나는지를 조사하였다. 마우스 골수유래 대식세포를 분리한 후 CK 함유분획을 10  $\mu$ g/ml 로 각각 45분 동안 전처리 후 다양한 TLR 리간드들, 즉 PGN, BLP (TLR2 리간드), polyI:C (TLR3 리간드), 혹은 CpG1668 (TLR9 리간드; CpG1726는 TLR9 리간드에 대한 대조 리간드)로 각각 자극하였다. 이를 18 시간 동안 배양 후 각 상층액을 수집하여 전염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 생성을 ELISA assay에 의해 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 그 결과 10  $\mu$ g/ml의 CK 함유분획을 전처리 한 경우 TLR4/LPS자극에 의한 TNF- $\alpha$ 와 IL-6 생성이 유의하게 억제되었으며( $P < 0.01$ , for TNF- $\alpha$ ;  $P < 0.05$ , for IL-6), 흥미롭게도 TLR9 리간드인 CpG 1668 자극에 의한 사이토카인 생성이 매우 유의하게 억제됨을 알 수 있었다( $P < 0.001$ , for TNF- $\alpha$  and IL-6; Fig. 3). 이 같



**Fig. 3. Effects of CK-RF on various TLR agonists-induced cytokine production in murine macrophages.** Murine BMDMs were pre-treated with CK-RF (10 µg/ml) (A, B) or a solvent control for 45 min. The cells were then stimulated with PGN (10 µg/ml), BLP (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml), polyI:C (10 µg/ml), CpG 1668 (1 µM), or CpG 1726 (1 µM), and the supernatants were harvested after 18 hr for TNF-α (A) and IL-6 (B) assessment using ELISA. Significant differences (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ), compared with cultures without CK-RF. Data are representative of three independent experiments with similar results. M, medium control; PGN, peptidoglycan; BLP, bacterial lipoprotein.

은 결과를 통하여 CK 함유분획은 TLR4와 TLR9 매개에 의한 전염증성 사이토카인 발현을 특이적으로 억제시킴을 알 수 있었다.

**3. CK 함유분획 성분이 TLR4 혹은 TLR9 자극에 의한 전염증성 사이토카인 발현에 미치는 영향**

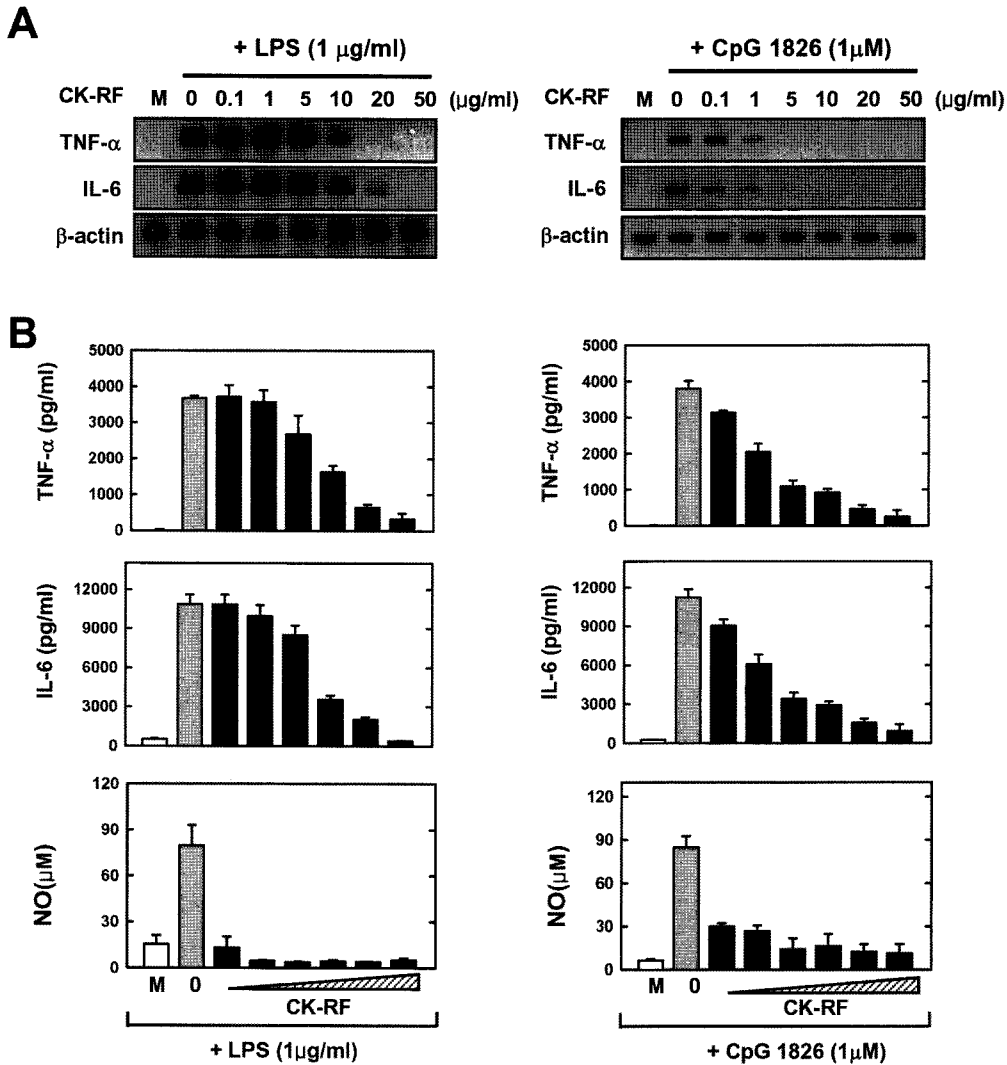
TNF-α나 IL-6와 같은 전염증성 사이토카인은 미생물 혹은 그 성분에 의해 합성, 분비가 유도된다.<sup>4,6)</sup> 저자들은 CK 함유분획 성분의 농도별 전처리에 의해 LPS에 의한 전염증성 사이토카인의 mRNA 발현이 어떻게 조절되는지 조사하였다. 마우스 골수유래 대식세포를 분리한 후 CK 함유분획을 농도

별 (0.1-50 µg/ml)로 45분 동안 전처리 후 LPS (1 µg/ml) 혹은 CpG-containing oligodeoxynucleotides (CpG-ODN; 1 µM)을 각각 4 및 18 시간 동안 배양하였다. 4 시간 배양 후 세포를 용해하여 mRNA를 수집하고 18 시간 배양 조건에서는 배양 상층액을 수집하여 대표적인 전염증성 사이토카인인 TNF-α 및 IL-6의 생성을 RT-PCR 및 ELISA assay에 의해 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 LPS 혹은 CpG-ODN에 의해 유도되는 전염증성 사이토카인 TNF-α와 IL-6의 mRNA 발현 양상은 CK 함유분획 전처리에 의해 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 4A). 또한 CK 함유분획을 전처리한 세포에 대하여 LPS 혹은 CpG-ODN 자극 후 TNF-α, IL-6 및 NO 생성을 조사하였다. 상관관계 분석 결과 CK 함유분획을 농도별 전처리한 경우 무처리 대조군에 비해 LPS 혹은 CpG-ODN 자극에 의한 TNF-α, IL-6 및 NO 생성이 매우 유의하게 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 4B;  $p < 0.001$ ).

**4. CK 함유분획 성분이 TLR4 혹은 TLR9 자극에 의한 염증반응 신호전달 활성화에 미치는 영향**

MAPKs와 NF-κB 신호전달과정은 미생물 감염에 의해서 활성화되며 염증성 사이토카인 생성을 유도하는데 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 LPS 혹은 CpG-ODN 자극에 의한 MAPKs 활성화와 NF-κB의 negative regulator로 알려진 IκB-α의 발현에 있어서 CK 함유분획의 억제 조절 효능을 조사하였다. 마우스 골수유래 대식세포에 CK 함유분획을 농도별(0.1-50 µg/ml)로 전처리 후 LPS (1 µg/ml) 혹은 CpG-ODN (1 µM)을 30분 동안 자극하였다. 그 후 세포를 lysis buffer로 용해하고 MAPKs의 활성화, 특히 p38 MAPK와 ERK1/2의 phosphorylation정도를 각각의 특이항체를 이용하여 Western 분석에 의해 측정하였다(Fig. 5). 그 결과 CK 함유분획을 전처리 하지 않은 골수유래 대식세포에서는 LPS 혹은 CpG-ODN에 의해 p38과 ERK1/2의 phosphorylation이 강하게 유도되는 반면, CK 함유분획을 전처리한 대식세포에서는 이러한 MAPKs 활성을 농도의존적으로 억제함을 알 수 있었다. 이에 반해 TLR3의 리간드인 poly I:C를 전처리한 경우는 p38과 ERK1/2의 활성화에 대한 억제 효과를 전혀 나타내지 않았다(Fig. 5A).

IκB-α는 전사 조절 인자인 NF-κB의 활성도를 조절하는 단백질로서, NF-κB를 세포질에 잔류시켜 DNA binding activity를 억제하는 작용이 있다. 이러한 IκB-α는 골수유래 대식세포에서 무자극 조건하에 강하게 발현되는 반면 TLR 자극에 의해 극감한다. 본 연구에서 CK 함유분획을 전처리한 대식세포에서는 LPS 혹은 CpG-ODN 자극에 의해 감소되었던 IκB-α의 양이 농도의존적으로 회복되는 반면 poly I:C



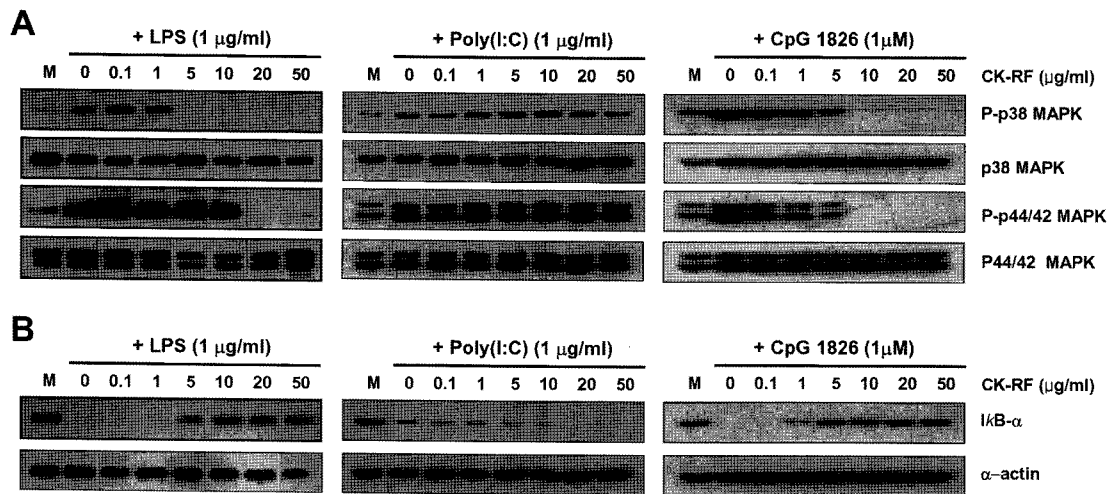
**Fig. 4. Effects of CK-RF on LPS- or CpG-ODN-induced inflammatory cytokine production in murine macrophages.** Murine BMDMs were pre-treated with CK-RF (0.1, 1, 5, 10, 20, 50 μg/ml) for 45 min before LPS (1 μg/ml) or CpG-ODN (1 μM) stimulation. (A) Total RNA was purified after 4 hr stimulation and RT-PCR analysis of TNF-α and IL-6 was performed. Data are representative of three independent experiments with similar results. (B) Supernatants were harvested after 18 hr for cytokine assessment using by ELISA. Significant differences (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ), compared with cultures without CK-RF. One representative experiment performed in triplicate is shown. Similar data were obtained in five independent experiments. M, medium control.

자극에 의한 IκB-α 양의 감소는 CK 함유분획 전처리에 의해 전혀 회복되지 않았다(Fig. 5B). 이상의 결과는 골수유래 대식세포에서 LPS 혹은 CpG-ODN 자극에 의해 유도되는 염증반응 관련 신호전달 과정이 CK 함유분획 전처리에 의해 효과적으로 억제됨을 시사한다.

**고 찰**

본 연구에서는 고려홍삼으로부터 분리한 CK 함유분획에 의한 항염증 효능, 특히 TLR 의존성 신호전달 경로조절에 대

한 효능을 분석하고자 하였다. CK 함유분획은 이를 전처리한 마우스 대식세포에 대하여 그람음성세균의 LPS, 또는 CpG-ODN에 의해 유도되는 NF-κB와 MAPK 활성화 및 전염증성 사이토카인, NO의 분비를 특이적으로 억제하였다. 본 연구에서 사용된 CK 함유분획은 HPLC 결과(Fig. 1)에서 보는 바와 같이 Rb1, Rb2, Rg3 및 Rg2와 같은 다양한 개별 사포닌 성분을 포함하고 있다. 특히 ginsenoside Rg3는 phorbol ester에 의해 유도되는 cyclooxygenase-2 발현 및 NF-κB 활성화 억제에 대한 기능이 보고되었으며,<sup>13)</sup> Lewis lung carcinoma 등 종양 세포에 대한 혈관신생 및 세포증식 억제 효



**Fig. 5. Effect of CK-RF on LPS-, polyI:C- or CpG-ODN-induced MAPK activation in murine macrophages.** Murine BMDMs were pre-treated with CK-RF (0.1, 1, 5, 10, 20, 50 μg/ml) for 45 min. Cell lysates were harvested after 30 min of LPS (1 μg/ml), polyI:C (10 μg/ml) or CpG-ODN (1 μM) stimulation and assessed for the phosphorylation states for p38 MAPK, ERK1/2 (for Panel A) and IκB-α (for Panel B) by immunoblotting. The detection of total p38 MAPK, ERK1/2 and α-actin in each sample serves as a loading control. Results are representative of three independent experiments.

능이 보고된 바 있다.<sup>14)</sup> 또한 microglial cell을 이용한 최근 연구에서 protopanazadiol인 Rd 및 Rb2와 protopanaxatriol인 Rg1 및 Re에 의해 LPS로 자극 후 생성되는 TNF-α 발현이 매우 유의하게 억제되었다고 한다.<sup>15)</sup> 동일 연구에 의하면 protopanaxatriol인 Rg1 및 Re는 LPS 자극 후 생성되는 NO의 발현은 매우 유의하게 억제하였으나 protopanazadiol인 Rd 및 Rb2에 의해서는 이러한 현상이 관찰되지 않았다고 하여,<sup>15)</sup> 개별 사포닌 성분 별로 각각 특이한 항염증 효능을 나타냄을 알 수 있다.

병원체 감염에 의해 개시되는 TLR 신호전달과정은 MAPK를 자극시켜 NF-κB, activator protein-1 (AP-1)과 같은 전사조절인자를 활성화시킨다.<sup>16-18)</sup> NF-κB는 염증에 관여하는 전염증성 사이토카인 및 면역세포 이동에 중요한 세포접합분자 (cell adhesion molecule) 유전자를 발현시키기 때문에 초기 염증 반응 조절에 중요한 전사인자로 알려져 있다. 크게 ERK, c-Jun-N-terminal protein kinase (JNK) 및 p38 MAPK subfamily로 구성되어 있는 MAPK 신호전달 과정은 염증 반응을 유도하는 매개체들의 합성을 유도한다는 점에서 미생물 감염에 의한 발병기전에 결정적인 역할을 한다. 특히 ERK1/2 신호전달 과정은 사람의 대식세포에서 TNF-α의 발현을 증가시키는데 기여한다는 보고가 있으며,<sup>19)</sup> p38 MAPK 신호전달 과정은 미생물 감염에 의한 IL-10 과 기타 여러 종류의 사이토카인을 유도하는 역할을 한다.<sup>20,21)</sup> 본 연구 결과 LPS 혹은 CpG-ODN에 의해 유도되는 마우스 대식세포의 p38 MAPK와 ERK1/2의 활성화는 CK 함유분획의 전처리에 의해 농도의존적으로 감소하는 패턴을 나타내었다. 본 연구자

들의 이전 연구에서 밝힌 바와 같이<sup>21-24)</sup> MAPK 경로 활성화는 LPS나 결핵균 등 세균 성분에 의한 전염증성 사이토카인 발현에 매우 중요하다. 따라서 CK 함유분획에 의한 MAPK 활성화 억제는 이들 효소에 의해 활성화되는 전염증성 사이토카인의 발현에 직접적인 영향을 미칠 것으로 생각된다.

TNF-α와 IL-6는 MAPK 신호전달 과정에 의해서 유도되는 대표적인 전염증성 사이토카인으로 활성화된 면역세포에서 분비되어 미생물감염에 의한 신체 방어 기전에 중요한 역할을 한다. TNF-α는 다양한 질병의 병태 생리적 반응들을 매개하는 세포활성물질로서 생체방어에 필수적이거나 다량 분비될 경우 각종 염증질환을 일으킨다.<sup>25-28)</sup> 그람음성세균의 LPS에 의해 활성화된 림프구에 의해서 만들어지며 자극량이 적을 경우는 생성되는 양이 적어 국소적인 염증반응을 나타내며 항원을 제거하나, 패혈증 (septicemia)과 같이 LPS가 다량 존재하는 경우는 TNF-α가 과량 생성되어 endocrine hormone의 작용을 나타내며, 간세포에 작용하여 급성단계반응 단백질을 혈액 유입하게 한다. 이와 같이 TNF-α가 너무 많이 만들어지는 상태에서는 조직의 손상이 유도되기도 하고 전신혈관응고, 내독소 쇼크 (endotoxin shock) 등으로 사망에 이르게도 한다.<sup>29)</sup> 또한 IL-6도 피부경화증, 건선, 두드러기와 같은 다양한 피부 염증질환 및 간에서 급성단계반응을 일으키는 물질로 알려져 있다.<sup>30,31)</sup>

다양한 세균의 DNA는 LPS와 마찬가지로 염증반응 및 조직 손상을 수반하는 전신적 염증반응의 원인이 된다.<sup>32)</sup> CpG-ODN은 박테리아 DNA처럼 전신적 염증반응을 일으키며<sup>32)</sup> 대식세포에 의해 endocytosis되어 산성화 과정을 거친 후 세포

내에 존재하는 TLR9 분자에 의해 인지되는 것으로 알려져 있다.<sup>8,34)</sup> 이렇게 CpG-ODN을 인지한 TLR9 분자는 MyD88 어댑터 분자로 이끌려 간 후 순차적으로 interleukin-1 receptor-associated kinases 및 TNF- $\alpha$  receptor-associated factor 6 신호전달 활성화를 촉발한다.<sup>8,35)</sup> 이러한 MyD88 의존성 신호전달 경로의 활성화는 CpG ODN에 의해 매개되는 NF $\kappa$ B 및 MAPKs 경로 활성화에 매우 필수적이며,<sup>8,36)</sup> 이같은 일련의 과정을 통해 다양한 종양유전자(oncogene) 및 전염증성 사이토카인의 발현이 유도된다.<sup>34,37)</sup>

한편 CpG-ODN을 실험적으로 주사한 쥐에서 초기에는 간 혈류 장애 및 간기능 장애가 발생하였으나 주사 후 6 일이 지난 후기에는 이러한 현상이 정상으로 회복되었으며 흥미롭게도 CpG-ODN은 오히려 LPS에 의한 염증성 백혈구 침윤이나 caspase-3 의존성 세포의 아포토시스 등을 감소시켰다고 하여 LPS에 의한 간독성에 대하여 장기적으로는 예방적 효과가 있다는 보고도 있다.<sup>38)</sup> 본 연구에서 CK 함유분획에 의해 TLR4- 혹은 TLR9-특이 면역반응이 선택적으로 억제되었으나 향후 질환모델 등을 이용한 *in vivo* 연구 개발이 시급하다고 본다. 본 연구자들의 예비 연구결과에 의하면 LPS 자극에 의한 염증반응 신호전달 활성화, 전염증성 사이토카인의 분비에 미치는 CK 함유분획의 효능은 CK에 비해 그 정도가 낮게 나타나 (결과는 figure로 제시하지 않음) 순수한 CK의 제조공정에 따른 경제성을 고려할 때 앞으로 *in vivo* 연구에서 활용 가치가 증명될 경우 항염증 제제 개발 분야에서 충분한 활용 가치가 기대된다.

## 요 약

본 연구에서는 고려홍삼으로부터 새로 분리한 CK 함유분획을 이용하여 마우스 대식세포에 대한 선천면역반응 조절에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구에서 사용된 농도의 CK 함유분획에서는 세포독성 효과가 관찰되지 않았으며 CK 함유 분획의 전처리에 의하여 그람 음성세균의 LPS, 또는 CpG-ODN에 의해 유도되는 NF- $\kappa$ B와 MAPK 활성화 및 전염증성 사이토카인, NO의 분비가 TLR4 및 TLR9 특이적으로 억제되었다. 이와 같은 결과는 CK 함유분획이 TLR4를 매개로 하는 염증반응뿐만 아니라 TLR9을 통한 염증반응에도 영향을 미치는 것으로 해석된다. 따라서 앞으로 CK 함유 분획에 포함된 개별 사포닌 등 시료 성분에 대한 면밀한 분석, 그리고 이들 개별 물질이 각각의 신호전달 체계에 미치는 영향과 그 기작에 대한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료되며 염증억제제로서의 개발 가능성을 탐구하기 위한 생체 내에서의 효능 및 작용기전 분석이 요구된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 2006년 KT&G 중앙연구소의 위탁과제 지원 및 2005년 고려인삼학회 용역과제 지원에 의해 수행되었음.

## 인용문헌

1. Park, M. G. : Korean ginseng. Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Seoul Korea, p.63 (1994).
2. Park, C. K., Jeon, B. S. and Yang, J. W.: The chemical components of Korean Ginseng. *Korean J. Food & Nutr.* **8**, 10-23 (2003).
3. Kawai, T. and Akira, S.: TLR signaling. *Cell Death Differ.* **13**, 816-25 (2006).
4. Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L. and Akira, S.: Cutting edge: Role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol.* **169**, 10-14 (2002).
5. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A.: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature.* **413**, 732-738 (2001).
6. Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, K., Oqawa, T., Takeda, K. and Akira, S.: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* **11**, 443-451 (1999).
7. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. and Akira, S.: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* **408**, 740-745 (2000).
8. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S. and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. *J. Immunol.* **175**, 6042-6049 (2005).
9. Chi, H., Kim, D. H. and Ji, G. E.: Transformation of Ginsenosides Rb2 and Rc from *Panax ginseng* by Food Microorganisms. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 2102-2105 (2005).
10. Jun, S. H., Woo, M. S., Kim, S. Y., Kim, W. K., Hyun, J. W., Kim, E. J., Kim, D. H. and Kim, H. S.: Ginseng saponin metabolite suppresses phorbol ester-induced matrix metalloproteinase-9 expression through inhibition of activator protein-1 and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in human astrogloma cells. *Int. J. Cancer.* **118**, 490-497 (2006).
11. Paek, I. B., Moon, Y., Kim, J., Ji, H. Y., Kim, S. A., Sohn, D. H.,



- Kim, J.B. and Lee, H.S.: Pharmacokinetics of a ginseng saponin metabolite compound K in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* **27**, 39-45 (2006).
12. Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J.: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **141**, 2407-2412 (1988).
  13. Keum, Y. S., Han, S. S., Chun, K. S., Park, K. K., Park, J. H., Lee, S. K. and Surh, Y. J.: Inhibitory effects of the ginsenoside Rg3 on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF-kappaB activation and tumor promotion. *Mutat. Res.* **523-524**, 75-85 (2003).
  14. Zhang, Q., Kang, X. and Zhao, W.: Antiangiogenic effect of low dose cyclophosphamide combined with ginsenoside Rg3 on Lewis lung carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 824-828 (2006).
  15. Wu, C. F., Bi, X. L., Yang, J. Y., Zhan, J. Y., Dong, Y. X., Wang, J. H., Wang, J. M., Zhang, R. and Li, X.: Differential effects of ginsenosides on NO and TNF-alpha production by LPS-activated N9 microglia. *Int. Immunopharmacol.* **7**, 313-320 (2007).
  16. Wang, T., Lafuse, W. P. and Zwilling, B. S.: NFkappaB and Sp1 elements are necessary for maximal transcription of toll-like receptor 2 induced by *Mycobacterium avium*. *J. Immunol.* **167**, 6924-6932 (2001).
  17. Pathak, S. K., Bhattacharyya, A., Pathak, S., Basak, C., Mandal, D., Kundu, M. and Basu, J.: Toll-like receptor 2 and mitogen- and stress-activated kinase 1 are effectors of *Mycobacterium avium*-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *J. Biol. Chem.* **279**, 55127-55136 (2004).
  18. Pennini, M. E., Pai, R. K., Schultz, D. C., Boom, W. H. and Harding, C. V.: *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein inhibits IFN-gamma-induced chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling. *J. Immunol.* **176**, 4323-4330 (2006).
  19. Surewicz, K., Aung, H., Kanost, R. A., Jones, L., Hejal, R. and Toossi, Z.: The differential interaction of p38 MAP kinase and tumor necrosis factor-alpha in human alveolar macrophages and monocytes induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Immunol.* **228**, 34-41 (2004).
  20. Hasan, Z., Shah, B. H., Mahmood, A., Young, D. B. and Hussain, R.: The effect of mycobacterial virulence and viability on MAP kinase signaling and TNF alpha production by human monocytes. *Tuberculosis (Edinb.)*. **83**, 299-309 (2003).
  21. Song, C. H., Lee, J. S., Lee, S. H., Lim, K., Kim, H. J., Park, J. K., Paik, T.H. and Jo, E. K.: Role of mitogen-activated protein kinase pathways in the production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and monocyte chemotactic protein-1 by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv-infected human monocytes. *J. Clin. Immunol.* **23**, 194-201 (2003).
  22. Yang, C. S., Lee, J. S., Jung, S. B., Oh, J. H., Song, C. H., Kim, H. J., Park, J. K., Paik, T. H. and Jo, E. K.: Differential regulation of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha by phosphatidylinositol 3-kinase and ERK 1/2 pathways during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **143**, 150-160 (2006).
  23. Yang, C. S., Song, C. H., Lee, J. S., Jung, S. B., Oh, J. H., Kim, H. J., Park, J. K., Paik, T. H. and Jo, E. K.: Intracellular network of phosphatidylinositol 3-kinase, mammalian target of the rapamycin/70 kDa ribosomal S6 kinase 1, and mitogen-activated protein kinases pathways for regulating mycobacteria-induced IL-23 expression in human macrophages. *Cell Microbiol.* **8**, 1158-1171 (2006).
  24. Jo, E. K., Yang, C. S., Choi, C. H. and Harding, C. V.: Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cellular Microbiology.* **9**, 1087-1098 (2007).
  25. Balkwill, F. R.: Tumour necrosis factor. *Br. Med. Bull.* **45**, 389-400 (1989).
  26. Flynn, J. L., Goldstein, M. M., Chan, J., Triebold, K. J., Pfeffer, K., Lowenstein, C. J., Schreiber, R., Mak, T. W. and Bloom, B. R.: Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* **2**, 561-572 (1995).
  27. Liew, F. Y., Li, Y. and Millott, S.: Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.* **145**, 4306-4310 (1990).
  28. Kindler, V., Sappino, A. P., Grau, G. E., Piguet, P. F. and Vassalli, P.: The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell.* **56**, 731-740 (1989).
  29. Jones, A. L. and Selby, P.: Clinical applications of tumour necrosis factor. *Prog Growth Factor Res.* **1**, 107-122 (1989).
  30. Paqurt, P. and Pierard, G. E.: Interleukin-6 and the skin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **109**, 308-317 (1996).
  31. Chew, C. H., Chew, G. S., Najimudin, N. and Tengku-Muhammad, T. S.: Interleukin-6 inhibits human peroxisome proliferator activated receptor alpha gene expression via CCAAT/enhancer-binding proteins in hepatocytes. *J. Biochem. Cell Biol.* **In press** (2007).
  32. Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Borschert, K., Hacker, H., Heeg, K. and Wagner, H.: Bacterial DNA causes septic shock. *Nature.* **386**, 336-337 (1997).
  33. Klinman, D. M., Takeshita, F., Gursel, I., Leifer, C., Ishii, K. J., Verthelyi, D. and Gursel, M.: CpG DNA: recognition by and activation of monocytes. *Microbes Infect.* **4**, 897-901

- (2002).
34. Yi, A. K., Tuetken, R., Redford, T., Waldschmidt, M., Kirsch, J. and Krieg, A. M.: CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Immunol.* **160**, 4755-4761 (1998).
35. Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr Medzhitov, R. and Flavell, R. A.: IRAK-M is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Cell.* **110**, 191-202 (2002).
36. Hacker, H., Vabulas, R. M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S. and Wagner, H.: Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6. *J. Exp. Med.* **192**, 595-600 (2000).
37. Chu, W., Gong, X., Li, Z., Takabayashi, K., Ouyang, H., Chen, Y., Lois, A., Chen, D. J., Li, G. C., Karin, M. and Raz, E.: DNA-PKcs is required for activation of innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell.* **103**, 909-918 (2000).
38. Slotta, J. E., Scheuer, C., Menger, M. D. and Vollmar, B.: Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) induce early hepatic injury, but provide a late window for protection against endotoxin-mediated liver damage. *J. Hepatol.* **44**, 576-585 (2006).