

일부 한약재의 수지상세포 활성화 효과

김도순 · 박정은 · 조현욱 · 주우홍¹ · 이성태*

순천대학교 생물학과, ¹창원대학교 생물학과

Received January 30, 2007 / Accepted February 20, 2007

Effect of Some Herbal Plant Extracts on the Activation of Dendritic Cells. Do-Soon Kim, Jung-Eun Park, Hyun-Wook Cho, Woo-Hong Joo¹ and Sung-Tae Yee*. *Department of Biology, College of Natural Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea, ¹Department of Biology, College of Natural Science, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea* - Dendritic cells (DCs) play a pivotal roles in the initiation of T cell-mediated immune responses, making them an attractive in immuno vaccines. *Angelica gigas* and *Cnidium officinale* were a medicinal herb widely used in Asian countries. In this study, we examined the effects of *A. gigas* and *C. officinale* extracts on the DCs functional maturation and pheno-type. Immature DCs were cultured in the presence of GM-CSF and IL-4, and the generated immature DCs were stimulated with OVA in the presence or absence *A. gigas* and *C. officinale* extracts, respectively, for 24 hours. The antigen-presenting capacity of *A. gigas* and *C. officinale* extracts-treated DCs as analyzed by CD4⁺ helper T cell clone (OVA-specific) proliferation and cytokines (IL-2 and IFN- γ) production were significantly increased. But *A. gigas* and *C. officinale* extracts were not directly effected CD4⁺ helper T cell clone function. Also, the expression of surface co-stimulatory molecules, including major histocompatibility complex (MHC) class II, CD86 and CD11c, is increased on DCs that were stimulated with *A. gigas* and *C. officinale* extracts. These results indicate the immunomodulatory properties of *A. gigas* and *C. officinale* extracts, which might be medical supplies or health foods.

Key words – dendritic cells, *Angelica gigas*, *Cnidium officinale*, co-stimulatory molecules, cytokines

서 론

면역계는 면역기능에 관여하는 세포나 조직이 모여서 이루어진 것으로서 주로 림프구와 보조세포, 그리고 이들이 모여서 만들어진 림프조직으로 이루어져 있다. 면역반응에서 가장 중요한 역할을 하는 세포는 림프구이지만 실제로 면역반응은 림프구에 의해서만 나타나는 것이 아니라, 보조세포라고 부르는 다른 여러 가지 백혈구와의 상호작용 결과로 나타난다. 이들 보조세포는 항원을 림프구에 제시하여 면역반응을 유발하고 진행시키기도 하며, 항원 제거에도 중요 역할을 담당한다[12].

이러한 보조세포 중 하나인 수지상세포는 그 이름에서 알 수 있듯이 표면에 불규칙한 나뭇가지 모양의 돌기를 가지며 덩개가 씌워진 모양을 하고 있는 비교적 크기가 큰 면역세포의 일종이다. 이 세포는 그 기원이 완전히 밝혀지지 않았지만 조혈 간세포(hematopoietic stem cell)에서 유래하는 것으로 생각되고 있다[2]. 흥미로운 것은 분화과정에 따라 여러 종류의 수지상세포가 만들어지며, 그 특성도 조금씩 차이를 보이고 있다. 그러나 공통적으로 항원을 받아들여 이를 가공하여 표면에 제시하는 능력이 뛰어나다는 특성을 지니며, 그

외에도 림프구를 활성화시키는데 관여하는 다양한 보조자극(co-stimulatory)분자들이나, 세포간의 접촉에 관여하는 여러 종류의 분자를 표면에 많이 발현하고 있어서, 다른 면역세포와 구분하여 전문적인 항원 제시세포(professional antigen presenting cells)라고 한다[7]. 또한 이 세포는 단구세포(monocyte)나 대식세포(macrophage)와 유사한 점을 가지지만, 표면항원의 발현양상으로 구분되며 항원의 전달 및 제시 능력이 훨씬 뛰어나다는 차이가 있다[18].

수지상세포는 매우 효율적으로 항원을 포획하여 표지한다. 그리고 매우 낮은 농도로 존재하는 항원도 잡아낼 수 있다. 항원을 섭취, 가공해서 표면에 제시하는 동안 수지상세포는 혈액을 통해 비장으로 이동하거나 림프액을 통해 림프절로 이동한다. 목적지에 도달하면, 수지상세포는 성숙되어 이전에 항원을 접한 일이 없는 미경험 T세포에 항원 펩티드와 결합한 MHC분자를 제시한다[4,6]. MHC 분자는 class I 과 class II로 나누어지며 세포에 따라 다르게 분포하므로, 각 경우에 따라 이들을 인지하는 T세포의 효과기능이 달라진다. MHC class I의 경우 바이러스와 같은 감염원에서 유래한 항원 펩티드를 감염된 특정세포를 죽이도록 설계되어 있는 세포독성(CD8⁺) T세포에 제공한다. 바이러스는 어떤 종류의 유핵세포라도 감염시킬 수 있기 때문에, 거의 모든 유핵세포는 비록 지속적인 발현정도는 세포에 따라 서로 다르지만, 모두 MHC class I 분자를 발현한다. 반면 MHC class II 분자

*Corresponding author

Tel : +82-61-750-3618, Fax : +82-61-750-3608

E-mail : sungtae@sunchon.ac.kr

는 이를 인지하는 보조(CD4⁺) T세포에 항원을 제시하여 면역계의 다른 효과 세포를 활성화 하도록 한다. 따라서 MHC class II 분자는 모든 세포에서 발현되는 것이 아니라, 보통 면역반응에 관여하는 B세포나 수지상세포, 대식세포 등에서 발견된다[19,16]. 이처럼 MHC class I 과 MHC class II 분자의 발현은 면역반응 과정에서 분비된 싸이토카인, 특히 인터페론(interferons)에 의하여 조절된다. 예를 들면 IFN- γ 는 MHC class I 과 MHC class II 분자의 발현을 증가시키고 정상적으로는 MHC class II 분자를 발현하지 않는 몇몇 세포에서 MHC class II 분자의 발현을 유도할 수 있다. 뿐만 아니라 T세포에 의한 항원 인지는 T세포 자체에서 생산되는 몇 가지 단백질 성장인자의 합성을 유도하는데, 그 중 대표적인 것이 인터루킨-2(interleukin-2)라고 불리는 싸이토카인이다[10]. T세포가 공동자극 신호에 의해 활성화 되면 세포 주기 G1상태로 들어가게 되고, 동시에 IL-2 수용체의 α 사슬과 함께 IL-2 합성이 유도된다. IL-2 수용체는 α , β , γ 의 3개 사슬로 구성되어 있으며 휴지기 상태의 T세포는 IL-2에 대하여 중 정도의 친화력을 갖는 β 와 γ 사슬로 수용체를 형성하고, 매우 높은 농도의 IL-2에서만 반응하게 된다. 하지만 β 와 γ 사슬이 α 사슬과 결합하게 되면 IL-2에 대한 친화력이 높은 수용체를 형성하게 되고 매우 낮은 농도의 IL-2에 대해서도 반응을 하게 된다[15]. 이러한 방법으로 활성화된 T세포는 수일간 하루에 2-3배로 분열하며, 하나의 세포로부터 항원에 대하여 동일한 수용체를 갖는 수천 개의 자손세포(progeny)로 구성된 클론이 생성된다.

최근 생물체로부터 추출된 천연 산물(natural product)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데 이들은 생물학적인 반응조절제로서 생체에 투여했을 때 부작용이 거의 없을 뿐만 아니라, 세포의 기능을 변화시키거나 조절하는데 큰 효과를 나타내는 새로운 물질원이 된다는 점에서 높이 평가되고 있다. 또한 최근까지 분리된 많은 천연 산물이 생물학적 반응조절제 효과를 보인다고 밝혀져 있다. 따라서 다양한 종류의 생약제도 이런 조절제로서 역할이 기대되기 때문에 본 실험에서는 한방에서 보편적으로 사용되는 6가지 생약제의 추출물을 재료로 하여 수지상세포의 항원제시 능력과 이에 따른 T세포의 증식과 싸이토카인의 분비에 어떠한 영향을 주는지 알아보았다.

본 실험에서 사용된 약제는 황기, 백작약, 천궁, 가자, 당귀, 여성초이고 일반적으로 한방에서 쓰이는 효능은 다음과 같다[22].

황기(*Astragalus membranaceus*)는 콩과(Lefuminosae)에 속하는 다년생 식물인 단너삼(*A. membranaceus*)의 뿌리로서 생체능력을 보강하고 이노작용과 혈압강하작용, 혈관확장으로 피부의 혈액순환과 영양작용개선 심장쇠약에 대한 강심작용이 뛰어나다.

백작약(*Paeonia japonica*)은 작약과 (Paeoniaceae)에 속하는

다년생의 초본으로 주로 산한 진경, 진통, 어혈, 월경 불순, 세균성 감염 및 지한, 조경 등에 유효하며 동통이나 하리복통, 산후어체, 이질, 근육의 경련 등의 약제로 쓰인다.

천궁(*Cnidium officinale*)은 미나리과의 다년생초본으로 피를 맑게 하며, 고혈압 등의 성인병 예방에 특효이며 비만에도 좋다. 진정 진통 강장제로 사용되며 부인병에도 좋은 효과를 가지는 것으로 알려져 있고 뿌리줄기는 한방에서 생약으로 주로 사용된다.

가자(*Terminoria chebula*)는 가자나무(*T. chebula*)로 사군자과(Combretaceae)에 속하는 인도 북부산의 교목인 가자나무의 과실로서 주로 인도, 히말라야가 원산지이고 7월에서 9월경 채집이 되며 맛은 쓰고 시며 약성은 따뜻하고 독이 없다. 주로 한방에서 미고, 수, 담, 천, 황폐화, 복창, 거담, 소화불량, 하혈, 진해약으로 후두염, 대하, 구도, 자궁출혈, 자궁염, 장출혈, 이질, 과란, 천식 후종, 해열, 빈갈, 해수, 진해 등에 유용하게 쓰인다.

당귀(*Angelica gigas*)는 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 다년생 초본으로써 산에 자생 하나 주로 재배하는 참 당귀의 뿌리를 꽃이 피기 전 채취한 것을 사용하며 성질은 따뜻하고 독이 없으며, 맛은 맵고 달면서 쓰다. 당귀는 임상에서 가장 많이 쓰이는 약물 중 하나로 혈액순환불량, 신체 허약, 관절통, 두통, 복통, 어지러움, 변비, 소화기능 소약으로 인해 수척할 때, 출혈 등에 주로 사용된다.

여성초(*Houttuymia cordata*)는 약모밀(*H. cordata*) 삼백초과(Saururceae)에 속하는 다년생 초본인 약모밀의 전초로서 뿌리, 잎, 줄기, 풀 전체를 사용하며, 체내의 독소와 노폐물을 배출하여 피를 맑게 하며, 고혈압, 당뇨치료 등 각종 질환에 탁월한 효능이 있고 그 외 예도 호흡기계통, 심장, 혈관, 위장, 간장계통을 비롯하여 피부질환 등에도 매우 높은 효과를 지니고 있다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 대한실험동물센터(충북 음성)에서 공급받은 특정병원체무재(specific pathogen free) 생쥐(C57BL/6)로 생후 6~8주된 암컷을 사용하였고, 실험 전 까지 고형사료와 1차 증류수를 공급하면서 사육실에서 사육하였다.

사용시약

세포배양에 필요한 배지 RPMI 1640과 배지에 첨가하는 항생제(antibiotic-antimycotic), fetal calf serum (FCS)는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였으며, 2-mercaptoethanol (2-ME), sodium bicarbonate (NaHCO₃), Mitomycin C (MMC)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 또한 세포증식을 측정하는데

사용한 Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay은 Promega (Madison, WI, USA) 제품을 사용하였고, 세포표면 단백질에 대한 특이항체(anti-CD11c, CD40, CD86, MHC class II mAb)는 Pharmingen (San Diego, CA, USA) 제품을 사용하였다. 골수세포를 수지상세포로 분화 유도하기 위해 사용한 GM-CSF와 IL-4는 R&D (Mckinley Place NE, MN, USA) 제품을 사용하였다.

한약재 추출법

한약재(황기, 백작약, 천궁, 가자, 당귀, 어성초)의 열수 추출물은 다음과 같은 방법에 따라 실시하였다. 즉, 건조된 시료 50 g을 분쇄하여 3차 증류수 500 ml을 가한 뒤 rotary evaporator (BUCHI RE121, Switzerland)에서 3시간 전탕하여 추출하고 여과한 후에 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 감압 농축하였다. 그리고 저온에서 24시간 방치한 후에 membrane filter (0.22 µm, Whatman, Germany)로 여과하고, 여과된 생약재 열수 추출액을 freezer dryer를 이용하여 완전 건조시킨 후 건조중량을 측정하였다. 건조된 시료를 PBS로 50 mg/ml로 희석하여 냉장 보존하면서 사용하였다.

수지상세포 배양

수지상세포는 다음과 같은 방법을 이용하여 생쥐 골수에서 분화 유도하여 사용하였다. 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; 0.16 M NH₄Cl:0.17 M Tris = 9:1)을 처리하여 적혈구를 제거한 후, washing용액으로 1,200 rpm에서 5분간 3회 원심분리하여 충분히 세척한 다음, GM-CSF (1,000 U/ml)와 IL-4 (1,000 U/ml)가 포함된 배지(RPMI 1640, 10% FBS)에 골수세포(1×10^6 cells/5 ml/well)를 6 well cell culture plate에서 배양하였다. 배양 4일 후에 1 ml의 배지와 동량의 GM-CSF (1,000 U/ml)와 IL-4 (1,000 U/ml)를 첨가하고, 6일 후 분화된 수지상세포를 회수하여 실험에 사용하였다.

Ovalbumin(OVA) 특이적 T세포주 배양

OVA로 면역한 생쥐(C57BL/6)의 비장을 분리하여 OVA 항원에 특이적으로 반응하는 T세포주를 수립하였다. 수립된 세포주는 유세포분석기로 분석하여 CD4⁺/CD8⁻ T세포이며 항원자극에 대해 IL-2와 IFN-γ를 생산하는 Type 1 helper T 세포인 것을 확인하였고 HS-1으로 명명하였다. 세포주를 계속 유지하기 위해 정기적으로 항원과 항원 제시세포를 첨가하여 활성화시켰다. 즉 HS-1을 24 well micro-plate에서 배양하면서 2주 간격으로 항원인 OVA (1 mg/ml)와 MMC (50 µg/ml)로 처리한 C57BL/6 비장세포(5×10^6 cells/well)를 항원

제시세포로 첨가하여 세포주를 활성화시키면서 배양하였다.

세포증식 측정

수지상세포를 6일 동안 배양한 다음, OVA (1 mg/ml)와 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 회수하였다. 세포증식 정도를 알아보기 위해 96 well micro-plate에 회수한 수지상세포 1×10^4 개와 T세포주(HS-1) 5×10^4 개를 분주하여 3일 동안 배양한 다음, Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay를 이용해 Microplate Reader (Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cytokine 측정

수지상세포를 6일 동안 배양한 다음, 시료를 농도별로 처리하고 동시에 OVA (1 mg/ml)를 처리하여 24시간 배양한 후 회수하였다. T세포가 분비하는 cytokine의 양을 알아보기 위해 회수한 수지상세포를 96 well micro-plate에 1×10^4 개와 HS-1 5×10^4 개를 분주하여 24시간 배양 한 후, 배양 상층액을 수거하여, 상층액에 포함된 IL-2와 IFN-γ의 양을 효소항체법(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA)을 이용해 Microplate Reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

유세포분석기(Fluorescence Activated Cell Sorter) 분석

수지상세포를 6일 동안 배양한 다음, OVA (1 mg/ml)와 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 회수하였다. 회수한 모든 수지상세포(5×10^5 개)는 anti-CD16/CD32 (FcγIII/II Receptor; 2.4G2)로 4°C에서 30분간 blocking하고 washing 용액(1% FCS와 0.1% NaN₃/PBS)으로 세척한 다음, CD40은 PE-conjugated anti-CD40 mAb로 4°C에서 30분간 염색하였고, MHC class II와 CD86은 anti-MHC class II, anti-CD86 mAb로 먼저 처리한 다음, 다시 anti-rat IgG-PE로 4°C에서 30분 염색한 후 washing 용액으로 세척하였다. 일차 항체로 처리한 모든 세포는 마지막으로 FITC-conjugated anti-CD11c mAb로 4°C에서 30분간 염색한 후 세척한 다음에 유세포분석기(Epics XL, COULTER, USA)로 분석하였다.

결 과

여섯 가지 한약재가 수지상세포의 항원제시 능력에 미치는 영향

수지상세포는 항원을 섭취하여 T세포에 제시함으로써 T세포의 증식을 유도한다. 따라서 6가지 한약재인 황기, 백작약, 천궁, 가자, 당귀, 어성초 열수 추출물이 수지상세포의 항원제시 능력에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 T세포주의 증식 반응을 측정하였다.

먼저, 6일간 배양한 수지상세포를 96 well micro-plate에

1×10⁴ cells/well로 분주하고 대조군과 항원인 OVA(1 mg/ml), 그리고 황기, 백작약, 천궁, 가자, 당귀, 어성초(1, 10, 100 µg/ml)를 첨가하여 24시간 배양한 다음, T세포가 한약재에 의한 직접적인 영향을 받지 않도록 plate를 원심 침전시켜 washing한 후, T세포주를 5×10⁴ cells/well로 분주하여 72시간 배양한 후 증식 반응을 측정하였다. 실험 결과, 6가지 한약재 중 천궁과 당귀 열수 추출물이 수지상세포의 항원 제시 능력에 영향을 미쳐 T세포의 증식을 유도하는 것으로 나타났다. 천궁과 당귀는 1 µg/ml과 100 µg/ml에서는 수지상세포의 항원제시 능력에 영향을 미치지 않아 T세포의 증식을 유도하지 않았지만, 10 µg/ml의 농도에서는 OVA만 첨가한 대조군에 비해 T세포의 증식 반응을 유도하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

이상의 실험 결과로, 6가지 한약재인 황기, 백작약, 천궁, 가자, 당귀, 어성초 중, 수지상세포의 항원 제시 능력에 영향을 미치는 물질이 포함되어 있는 것으로 생각되는 천궁과 당귀를 선별하여 본 실험에서 사용하였다.

천궁, 당귀가 수지상세포의 항원제시 능력에 미치는 영향

앞 실험에서 선별된 천궁과 당귀가 1 µg/ml과 100 µg/ml에서 효과가 없는 것으로 나타나 수지상세포의 항원제시 능력에 영향을 미치는 최적 농도를 알아보기 위해 다양한 농도에서의 T세포의 증식 반응과 이 때 T세포 면역 반응 매개 물질로서 분비되는 IL-2와 IFN-γ의 분비량을 알아보았다.

먼저, 6일간 배양한 수지상세포를 96 well micro-plate에 1×10⁴ cells/well로 분주하고 대조군과 항원인 OVA(1 mg/ml), 그리고 천궁과 당귀를 농도별(1, 3, 10, 30, 100 µg/ml)로 첨가하여 24시간 배양한 다음, T세포가 한약재에 의한 직접

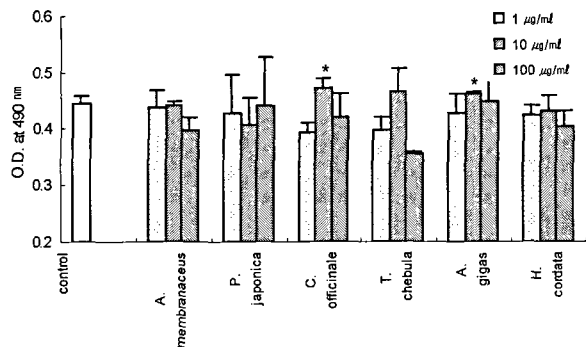


Fig. 1. Effect of various herbal plant extracts on T cell growth in the presence of ovalbumin antigen. Day 6 DCs generated from C57BL/6 were stimulated with OVA in the presence or absence various herbal plant extracts from 6 to 7 days. Day 7 DCs were washed, and then cultured with OVA-specific T cell (5×10⁴ cells) line. Growth of 72 h were measured by Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Data are presented as mean±standard deviations for triplicates.

적인 영향을 받지 않도록 plate를 원심 침전시켜 washing하였다. 그 다음 T세포주를 5×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후, IL-2와 IFN-γ의 측정을 위한 배양 상층액을 회수하였고 72시간 후에는 T세포의 증식 반응을 측정하였다. 수지상세포의 항원 제시에 의한 T세포의 증식 반응은 두 시료 모두 1 µg/ml에서는 효과가 없었으나 천궁의 경우 30 µg/ml에서 최대 증식 반응이 나타났으며 10, µg/ml 에서도 이에 상응하는 증식 반응이 유도되었다(Fig. 2). 당귀는 3, 10, 30 µg/ml에서 높은 증식 반응이 유도되었으며, 10 µg/ml에서 최대 증식 반응이 나타났다. 또한, 회수한 배양 상층액에 포함되어 있는 IL-2와 IFN-γ의 농도는 ELISA로 측정하였다. 즉, IL-2의 경우, 천궁은 1, 3, 10, 30 µg/ml에서 비교적 많은 양의 IL-2가 분비되는 것으로 나타났으며, 특히 3 µg/ml과 10 µg/ml에서 OVA만 첨가한 대조군에 비해 약 2배의 많은 양을 분비하였다(Table 1). 뿐만 아니라 당귀에서도 농도에 상관없이 많은 양의 IL-2 생산이 유도되었으며, 3 µg/ml과 10 µg/ml에서 OVA만 첨가한 대조군에 비해 1.5배 정도의 IL-2가 분비되었다. IFN-γ 또한 천궁과 당귀 모두 대조군에 비해 많은 양이 분비 되었으며, IL-2와 달리 100 µg/ml에서는 1.2배 이상이, 3 µg/ml에서는 1.3배 이상의 많은 양이 분비되었다(Table 2).

이상의 결과로, 천궁과 당귀는 수지상세포의 항원 제시 능력을 향상 시켜 T세포에 효율적으로 항원을 제시해 줌으로써 IL-2, IFN-γ의 분비를 촉진함은 물론, T세포의 증식 반응을 유도하는 것으로 나타났다.

천궁, 당귀가 T세포의 항원 인지 능력에 미치는 영향

앞 실험에서 천궁, 당귀에 의한 수지상세포의 항원 제시

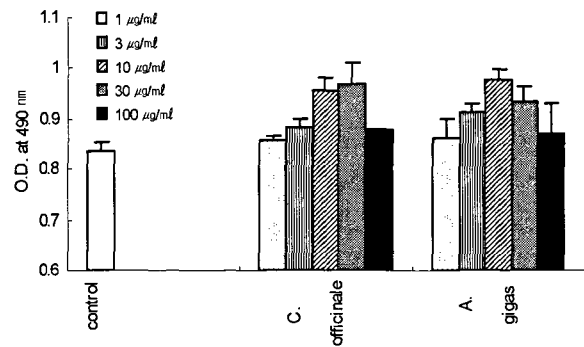


Fig. 2. Effect of herbal plant extracts on T cell growth in the presence of ovalbumin antigen. Day 6 DCs generated from C57BL/6 were stimulated with OVA in the presence or absence C. officinale and A. gigas from 6 to 7 days. Day 7 DCs were washed, and then cultured with OVA-specific T cell (5×10⁴ cells) line. Growth of 72 h were measured by Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Data are presented as mean±standard deviations for triplicates.

Table 1. Effect of herbal plant extracts on the production of IL-2

Concentration (µg/ml)	IL-2(pg/ml)	
	<i>C. officinale</i>	<i>A. gigas</i>
0	90.7±0.7	90.7±0.7
1	129.7±0.7	113.2±18.4
3	173.7±5.0	134.7±3.5
10	168.2±1.4	135.7±0.7
30	142.7±5.0	104.7±2.1
100	90.7±12.0	104.2±4.2

Day 6 DCs generated from C57BL/6 were stimulated with OVA in the presence or absence *C. officinale* and *A. gigas* from 6 to 7 days. Day 7 DCs were washed, and then cultured with OVA-specific T cell line. IL-2 levels in the supernatant collected of 24 h were quantified by ELISA. Data are presented as mean±standard deviations for triplicates.

Table 2. Effect of herbal plant extracts on the production of IFN-γ

Concentration (µg/ml)	IFN-γ(ng/ml)	
	<i>C. officinale</i>	<i>A. gigas</i>
0	76.9±2.1	76.9±2.1
1	91.5±3.9	87.6±0.7
3	97.3±11.0	102.6±1.0
10	93.3±0.7	95.7±2.5
30	95.5±0.3	96.2±0.7
100	89.9±2.7	93.7±1.7

Day 6 DCs generated from C57BL/6 were stimulated with OVA in the presence or absence *C. officinale* and *A. gigas* from 6 to 7 days. Day 7 DCs were washed, and then cultured with OVA-specific T cell line. IFN-γ levels in the supernatant collected of 24 h were quantified by ELISA. Data are presented as mean±standard deviations for triplicates.

능력에 대하여 알아보았다. 하지만 T세포 첨가 후에도 약제와 함께 배양되었기 때문에 천궁, 당귀가 수지상세포와 T세포 어느 쪽에 영향을 미치는지 확인하기 위해 T세포와 함께 약제를 동시에 첨가하여 T세포 증식 반응과 T세포 면역 반응 매개 물질로서 분비되는 IL-2와 IFN-γ의 분비량을 알아보았다.

먼저, 6일 배양한 수지상세포를 96 well micro-plate에 1×10^4 cells/well로 분주하고 대조군과 항원인 OVA (1 mg/ml) 첨가하여 24시간 배양 후, 천궁과 당귀를 농도별(1, 3, 10, 30, 100 µg/ml)로 첨가하고 동시에 T세포를 5×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후에 IL-2와 IFN-γ의 측정을 위한 배양 상층액을 회수하였고 72시간 후에는 T세포의 증식 반응을 측정하였다. 수지상세포의 항원 제시에 의한 T세포의 증식 반응을 알아본 결과, OVA만 첨가한 대조군에 비해 어떠한 증식 효과도 없는 것으로 나타났다(Fig. 3). 또한, IL-2의

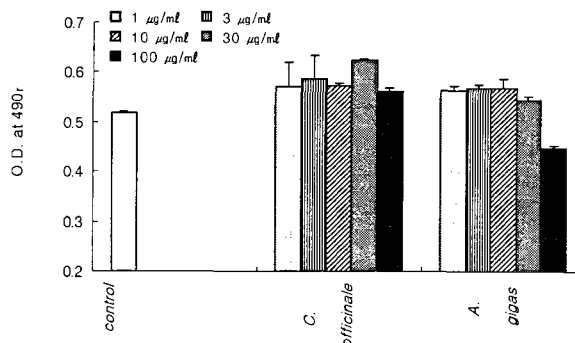


Fig. 3. Effect of herbal plant extracts on T cell growth in the presence of OVA antigen. Day 6 DCs generated from C57BL/6 were stimulated with OVA from 6 to 7 days. Day 7 DCs were cultured with OVA-specific T cell line and, with or without *C. officinale* and *A. gigas*. Growth of 72 h were measured by Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Data are presented as mean±standard deviations for triplicates.

경우, 천궁 3 µg/ml에서 OVA만 첨가한 대조군에 비해 소량의 분비가 유도되었으며, 당귀는 어느 농도에서도 OVA만 첨가한 대조군에 비해 IL-2 분비가 유도되지 않은 것으로 나타났다(Table 3). IFN-γ의 경우, IL-2와 유사하게 천궁과 당귀의 어느 농도에서도 OVA만 첨가한 대조군에 비해 IFN-γ의 생성이 유도되지 않았다(Table 4).

이상의 결과, 실험에 사용한 약재인 천궁과 당귀는 T세포의 항원 인지 능력이 아닌, 수지상세포의 항원 제시 능력에 효과적으로 작용함을 알 수 있다.

천궁, 당귀가 수지상세포의 세포표면 단백질 발현에 미치는 영향

미경험 T세포가 활성화되기 위해서는 수지상세포의 MHC

Table 3. Effect of herbal plant extracts on the production of IL-2

Concentration (µg/ml)	IL-2(pg/ml)	
	<i>C. officinale</i>	<i>A. gigas</i>
0	312.9±56.6	312.9±56.6
1	317.3±0.9	289.1±1.8
3	394.1±5.3	313.5±2.7
10	326.6±8.8	354.8±4.4
30	362.3±4.4	285.4±7.1
100	220.4±8.8	177.9±1.8

Day 6 DCs generated from C57BL/6 were stimulated with OVA from 6 to 7 days. Day 7 DCs were cultured with OVA-specific T cell line and, with or without *C. officinale* and *A. gigas*. IL-2 levels in the supernatant collected of 24 h were quantified by ELISA. Data are presented as mean±standard deviations for triplicates.

Table 4. Effect of herbal plant extracts on the production of IFN- γ

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	IFN- γ (ng/ml)	
	<i>C. officinale</i>	<i>A. gigas</i>
0	49.3 \pm 0.3	49.3 \pm 0.3
1	48.4 \pm 0.7	41.8 \pm 1.2
3	44.4 \pm 1.4	43.4 \pm 1.6
10	50.6 \pm 0.1	40.6 \pm 0.8
30	51.3 \pm 1.2	37.0 \pm 1.4
100	36.0 \pm 0.1	34.6 \pm 1.8

Day 6 DCs generated from C57BL/6 were stimulated OVA from 6 to 7 days. Day 7 DCs were cultured with OVA-specific T cell line and, with or without *C. officinale* and *A. gigas*. IFN- γ levels in the supernatant collected of 24 h were quantified by ELISA. Data are presented as mean \pm standard deviations for triplicates.

class II 분자와 결합한 항원펩티드를 인지하여야만 한다. 그러나 T세포를 활성화시키기 위해서는 수지상세포의 항원 제시만으로 충분하지 않으며, 공동자극신호(co-stimulatory signal)가 동시에 전달되어야 한다. 이러한 공동자극 신호에 관여하는 수지상세포의 공동자극분자 단백질로는 T세포의 CD40 리간드(ligand)에 결합하는 CD40이 있으며, 이 CD40과 CD40리간드의 상호작용에 의해 T세포에 활성화 신호가 전달되고 수지상세포는 자신의 세포표면에 CD86(B7)분자를 발현하도록 활성화된다. 또한 수지상세포의 CD86과 T세포의 CD86리간드가 결합하게 되면 T세포의 증식을 자극하는 신호를 전달하게 된다. 따라서, 앞 실험에서 효과가 있다고 생각되는 천궁과 당귀의 최적 농도인 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 수지상세포가 T세포 구역으로 이동하기 위해 필요한 부착 분자인 CD11c와 T세포의 증식을 유도할 수 있는 공동자극 분자인 MHC class II와 CD40, CD86의 발현 정도를 알아보았다.

먼저, 6일간 배양한 수지상세포에 천궁과 당귀 열수 추출물 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하여 24시간 배양한 후 회수하였다. 세포 표면 단백질의 발현 정도를 알아보기 위해 회수한 모든 수지상세포(5×10^5 개)는 anti-CD16/CD32 (Fc γ III/II Receptor; 2A2G2)로 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 blocking하고 washing 용액(1% FCS와 0.1% NaN $_3$ /PBS)으로 세척한 다음, CD40은 PE-conjugated anti-CD40 mAb로 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 염색하였고, MHC class II와 CD86은 anti-MHC class II, anti-CD86 mAb로 먼저 처리한 다음, 다시 anti-rat IgG-PE로 4 $^{\circ}$ C에서 30분 염색한 후 washing 용액으로 세척하였다. 일차 항체를 처리한 모든 세포는 마지막으로 FITC-conjugated anti-CD11c mAb로 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 염색한 후 세척한 다음에 유세포분석기로 분석하였다.

그 결과, 천궁을 처리한 수지상세포를 CD11c와 MHC class II로 double staining 한 경우, 대조군 23%에 비해 27.6%

로 그 발현이 증가하였으며, CD11c와 CD86의 double staining 또한, 26.5%에서 30.6%로 증가하였다(Fig. 4). 하지만 CD11c와 CD40을 staining 한 경우, 그 차이가 적은 것으로 나타났다. 당귀 또한 대조군과 비교해 보면, CD11c와 MHC class II를 double staining 한 경우, 대조군 23%에 비해 29.6%로 그 발현이 현저히 증가하였으며, CD11c와 CD86의 double staining은 26.5%에서 30.5%로 증가하였지만, CD11c와 CD40을 staining 한 경우에는 대조군 27%에 비해 28.6%로 약간 증가하는 것으로 나타났다. 그 결과, 천궁과 당귀의 열수 추출물은 수지상세포의 공동자극분자인 MHC class II와 CD86 발현을 증가시켜 T세포를 활성화시키는 것으로 생각된다.

고 찰

면역계에서 림프구는 기능에 따라 일반적으로 B세포, T세포, NK세포의 세 가지 집단으로 나뉘며, B세포는 항체를 생산하기 때문에 체액성 면역반응에 중요한 기능을 나타내고, T세포는 면역 반응을 조절하는 기능을 가지고 있으며 일부의 T세포들은 직접 세포를 파괴하는 작용을 나타내기 때문에, 세포매개성 면역반응에서도 중요하다. B세포 및 T세포가 면역작용을 나타내기 위해서는 보조세포로 수지상세포의 조절이 필요하다. 보조세포들은 항원을 림프구에 제시하기도 하고, 면역반응을 진행시키기도 하며, 항원을 제거하는 데에도 중요한 역할을 한다. 그러므로 면역조직은 이들 다양한 세포들이 상호작용을 용이하게 할 수 있도록 구성되어 있으며, 결과적으로 이들 조직에는 면역세포들이 많이 존재한다 [1,3,9,21].

골수의 전구세포로부터 기원하는 수지상세포는 뇌를 제외한 거의 모든 조직에 산재하며 말초혈액의 단핵구 중 1% 미만에 해당한다[8,5]. 수지상세포의 계통은 그들이 상주하는 해부학적인 구획에 따라 4가지 단계로 구분할 수 있다. 첫째 전구세포는 골수와 혈액, 둘째 미성숙 수지상세포는 말초의 림프조직이 아닌 곳, 셋째 성숙단계 과정의 이동중인 수지상세포는 유입성 림프액과 혈액, 넷째 성숙한 수지상세포는 2차 림프조직에 존재한다.

최근에는 천연 생약재와 생리활성물질 중에서 수지상세포를 활성화시킬 수 있는 성분을 탐색하는 실험이 진행되고 있다. 즉 *Candida* β -D-glucan(11), *Agaricus blazei*의 물추출 성분(13), *Aloe vera*에서 분리한 acemannan(14) 등이 생쥐의 골수에서 분화된 수지상세포의 다양한 공동자극 분자의 발현과 항원섭취 기능 등을 증가시키며, IL-12 생산량도 증가시키는 효과가 있다는 보고가 있다. 또한 보중익기탕 추출물(17)과 인삼 사포닌의 성분(20)이 사람 단구세포에서 분화된 수지상세포의 다양한 공동자극 분자의 발현, 항원섭취 기능과 동종항원 반응 T세포의 증식반응도 증가시키는 효과가 있다고 보고되었다.

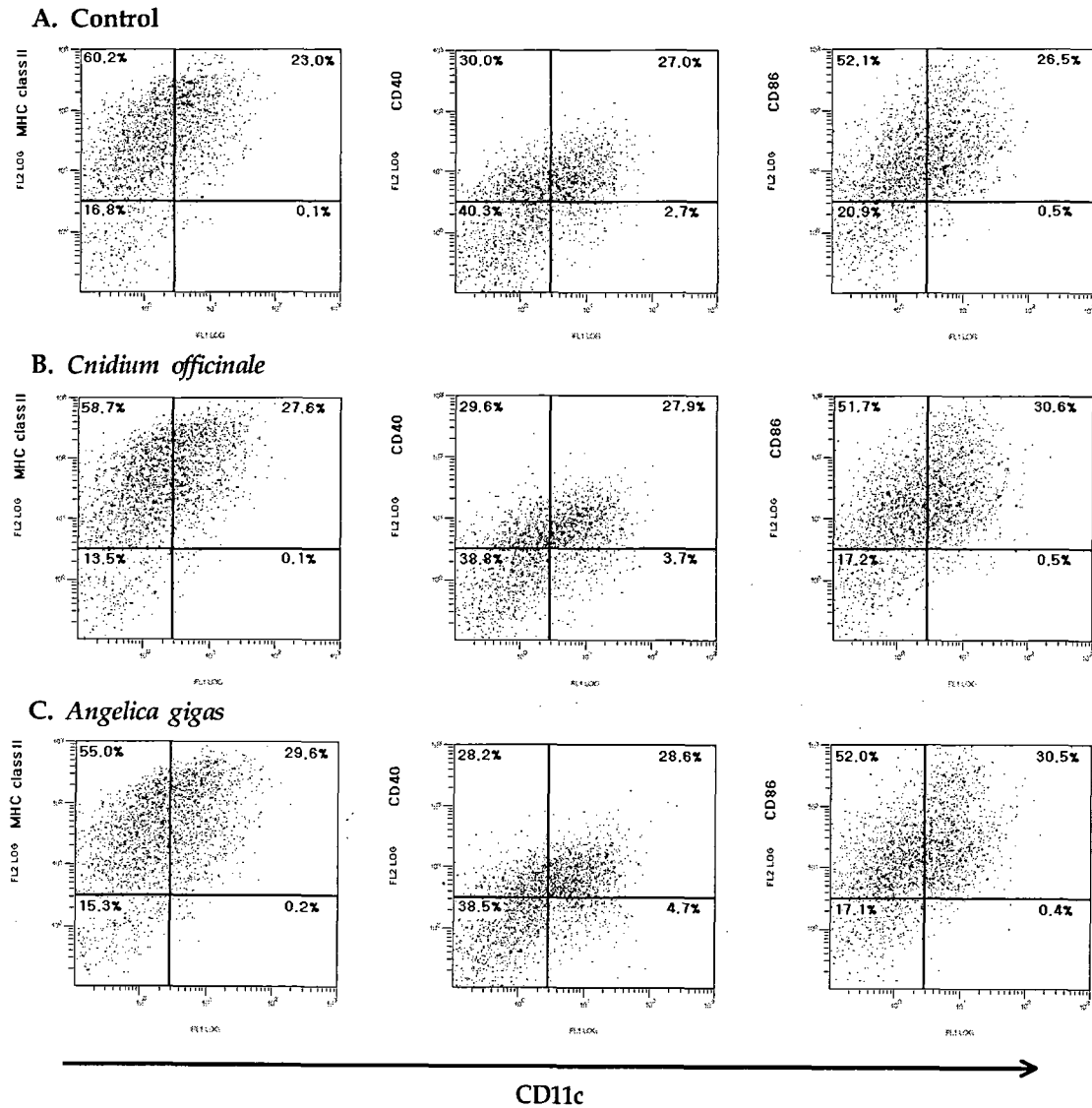


Fig. 4. Effect of herbal plant extracts on the expression of co-stimulatory molecules. Day 6 DCs were stimulated with or without with or without *C. officinale*(10 µg/ml) and *A. gigas*(10 µg/ml), respectively, for 24 hours. At day 7, surface expression of MHC class II, CD40, CD86 and CD11c were analyzed by two colour flow cytometry. Numbers represent the percentage of double positive cells. The results are representative of two independent experiments.

본 실험에서는 이러한 수지상세포를 이용한 면역 증진법의 연구가 질병의 치료에 있어 매우 중요하다고 생각하여 생체기능을 조절하는 효과가 있다고 알려진 일부 한약재를 이용하여 수지상세포의 항원 제시 능력에 어떤 효과가 있는지를 확인하였다. 그 결과 실험에 사용한 여섯 가지 한약재(황기, 백작약, 천궁, 가자, 당귀, 어성초) 중 천궁과 당귀가 수지상세포의 항원 제시 능력에 가장 효과가 있었으며, 이렇게 선별된 천궁과 당귀는 수지상세포에 작용하여 T세포의 세포 증식 반응뿐만 아니라, IL-2와 IFN-γ의 분비를 증가 시키는 것으로 나타났다.

지금까지의 결과로 천궁과 당귀는 건강식품이나 의약품으

로 이용 가능한 면역기능 조절물질로 사용할 수 있는 가능성을 확보하였다고 생각되며 지속적인 연구와 임상실험을 통하여 효용가치를 높이는 것이 필요하다고 생각된다.

요 약

본 실험에서는 일부 한약재를 이용하여 수지상세포의 활성화에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과, 실험에 사용한 여섯 가지 한약재 중 선별된 천궁과 당귀는 수지상세포의 항원 제시 능력에 영향을 미쳐, T 세포 증식 반응을 증가시켰고, IL-2와 IFN-γ의 분비를 증가시키는 것으로 나타났다. 또

한 이러한 T 세포의 활성화는 수지상세포의 세포표면 단백질인 MHC class II와 CD86, 그리고 CD11c의 발현 증가에 의한 것임을 확인 할 수 있었다. 이상의 실험 결과, 본 실험에서 선별된 천궁과 당귀는 수지상세포를 활성화시키는 효과가 있는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 순천대학교 학술연구비 공모과제의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Avigan, D. 1999. Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy. *Blood reviews* **13**, 51-64.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767-811.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-52.
- Bell, D., J. W. Young and J. Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Adv. Immunol.* **72**, 255-232.
- Fearnley, D. B., L. F. Whyte, S. A. Carnoutsos, A. H. Cook and D. N. J. Hart. 1999. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* **93**: 728-36.
- Hart, D. N. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**, 3245-3287.
- Inaba, K., M. Witmer-Pack, M. Inaba, K. S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P. S. Linsley, S. Ikehara, S. Muramatsu, R. J. Hodes and R. M. Steinman. 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.
- Inaba, M., Inaba, N., Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu and R. M. Steinman. 1992. 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.
- Jacques B. and M. Ralph. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- Jain, J., C. Loh and A. Rao. 1995. Transcription regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 333-342.
- T. Kikuchi, N. Ohno and T. Ohno. 2002. Maturation of dendritic cells induced by Candida beta-D-glucan. *International Immunopharmacology* **2**, 1503-1508.
- E. S. Kim, C. S. Kim, M. H. Li, H. S. Bom, J. J. Min, H. J. Jeong, S. M. Kim, H. C. Song and J. J. Lee. 2003. Radioresistance of Dendritic Cells. *Korean J. Nucl. Med.* **9**, 190-195.
- Kim, G. Y., M. Y. Lee, H. J. Lee, D. O. Moon, C. M. Lee, C. Y. Jin, Y. H. Choi, Y. K. Jeong, K. T. Chung, J. Y. Lee, I. H. Choi and Y. M. Park. 2005. Effect of water-soluble proteoglycan isolated from *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *International Immunopharmacology* **5**, 1523-1532.
- Lee, J. K., M. K. Lee, Y. P. Yun, Y. S. Kim, J. S. Kim, Y. S. Kim, K. J. Kim, S. S. Han and C. K. Lee. 2001. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *International Immunopharmacology* **1**, 1275-1284.
- Minami, Y., T. Kono, T. Miyazaki and T. Taniguchi. 1993. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 245-267.
- Morrison, L. A., A. E. Lukacher, V. L. Braciale, D. P. Fan and T. J. Braciale. 1986. Differences in antigen presentation to MHC class I-and MHC class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T-lymphocyte clones. *J. Exp. Med.* **163**, 903-910.
- Nabeshima, S., M. Murata, M. Hamada, Y. Chong, K. Yamaji and J. Hayashi. 2004. Maturation of monocyte-derived dendritic cells by Hochu-ekki-to, a traditional Japanese herbal medicine. *International Immunopharmacology* **4**, 37-45.
- Rattis, F. M., J. Peguet-Navarro, M. J. Staquet, C. Dezutter-Dambuyant, P. Courtellemont, G. Redziniac and D. Schmitt. 1996. Expression and function of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human epidermal Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* **26**, 449-453.
- Steimle, V., C. A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre and B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon- γ mediated by the trans-activator gene CIITA. *Science* **265**, 106-109.
- Takei, M., E. Tachikawa, H. Hasegawa and J. J. Lee. 2004. Dendritic cells maturation promoted by M1 and M4, end products of steroidal ginseng saponins metabolized in digestive tracts, drive a potent Th1 polarization. *Biochemical Pharmacology* **68**, 441-452.
- Tarte, K. and B. Klein. 1999. Dendritic cell-based vaccine: a promising approach for cancer immunotherapy. *Leukemia* **13**, 653-63
- Shin, M. K. 1997. *Clinical Traditional Herbalogy*. 2nd eds., Yeong Lim's Publisher. Seoul, Korea.