

20(S)-Protopanaxadiol 및 20(S)-Protopanaxatriol이 활성화된 비만세포로부터의 염증 매개체 유리에 미치는 영향

노재열¹ · 한응남² · 최광태³ · 이창호^{4*}

¹성균관대학교 의과대학 약리학 교실, ²서울대학교 약학대학,

³고려인삼학회, ⁴한양대학교 의과대학 약리학 교실

(2009년 9월 16일 접수; 2009년 10월 20일 수정; 2009년 11월 3일 수리)

Effects of 20(S)-Protopanaxadiol and 20(S)-Protopanaxatriol on the Inflammatory Mediators Release from the Activated Mast Cells

Jai Youl Ro¹, Yong Nam Han², Kwang Tae Choi³ and Chang Ho Lee^{4*}

¹Department of Pharmacology, School of Medicine, Sungkyunkwan University, Suwon, 440-746, Korea

²School of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

³The Korean Society of Ginseng, Seoul, 137-070, Korea

⁴Department of Pharmacology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

(Received September 16, 2009; Revised October 20, 2009; Accepted November 3, 2009)

Abstract : Ginseng saponins have various pharmacological effects on the immune system. 20(S)-protopanaxadiol (PPD) and 20(S)-protopanaxatriol (PPT) are the species of ginseng saponin metabolites that are formed by human intestinal bacteria and detected in circulation. The effects of PPD and PPT on the inflammatory mediator release from the activated mast cells were tested. Histamine release was evaluated in activated guinea pig lung mast cells, and the secretion of interleukin-4 (IL-4), interleukin-8 (IL-8), and the tumor necrosis factor- α (TNF- α) was assessed in an HMC-1 cell after treating it with ginseng saponin metabolites. The results are as follows. PPT, at its maximum concentration of 100 μ M, completely abolished the secretion of IL-4 from the PMA-stimulated HMC-1 cell. It also inhibited IL-8 secretion from the same cells by about 40-50% of the PMA-treated DMSO control. PPD, at its maximum concentration of 100 μ M, showed a tendency to induce histamine release from the guinea pig lung mast cells. It inhibited the secretion of IL-4 (by 89% of the PMA-treated DMSO control) in the PMA-stimulated HMC-1 cell, but did not have a significant effect on the IL-8 release from the same cell. Both PPD and PPT showed no effects, however, on the release of TNF- α from the PMA-stimulated HMC-1 cell. These results suggest that PPD and PPT are from the ginseng metabolites that are responsible for the immunomodulating activity of ginseng extracts when they are taken orally.

Key words : 20(S)-protopanaxadiol (PPD), 20(S)-protopanaxatriol (PPT), interleukin-4 (IL-4), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α), mast cell

서 론

인삼이 알러지 및 천식에 효과적이라는 최근의 연구 결과들이 제시되었다. 천식 동물 모델에서 인삼 및 인삼 추출물은 천식 기관지 조직에서 보이는 만성 병변을 효과적으로 개선하였으며,¹⁾ 기관지 과민반응, 기관지 리모델링, 및 호산구증가

증 등을 감소시켰다.²⁾ 알러지 및 천식에 미치는 인삼 성분의 효과에 대한 보고에 의하면, 홍삼 사포닌 중의 하나인 20(S)G-Rg₃는 항원-항체 반응에 기인된 histamine 유리를 억제할 뿐만 아니라 neuropeptide에 의해 유도된 histamine 유리도 억제시키는 것으로 보고되었다.³⁾ 인삼 사포닌 및 그 대사체 compound K는 비만세포의 일종인 RBL-2H3 세포가 면역반응에 의하여 활성화될 때 초래되는 β -hexosaminidase 유리 및 PCA (passive cutaneous anaphylaxis) 반응을 억제

*Corresponding author. E-mail: jennysue@hanyang.ac.kr
Phone: +82-2-2220-0655, Fax: +8231-2292-6686

제하였다.⁴⁾ 또한 Ro 등은 인삼 사포닌은 해명기도 및 폐 조직의 항원-항체 반응 시 histamine 유리감소와, 해명 폐 조직의 비만세포 활성화에 의한 histamine과 leukotrienes 유리를 감소시킨다고 보고하였으며,⁵⁾ 이와 관련하여 몇 가지 인삼 사포닌 단일성분들에 의한 염증 매개체 유리감소 기전도 일부 밝혀졌다. 진세노사이드 Rg1, Rg2, 및 Rc는 활성화된 해명의 폐 비만세포로부터의 histamine과 leukotriene D₄의 유리 및 합성을 억제하였다.^{6,7)}

반면에, 인삼에 의한 천식 유발 작용도 보고되었다. 인삼 유통업 종사자가 인삼 분진에 지속적으로 노출될 경우, 호흡 곤란, 재채기, 및 비루 증상이 악화되었으며, 검사 결과, 인삼 추출물에 대한 기관지 과민반응 등이 양성으로 판정되었으며, 또한 인삼 추출물에 대한 혈 중 IgE 항체 수준의 증가가 관찰되었다.^{8,9,10)}

최근의 연구 결과에 의하면, 인삼추출물을 경구투여 시, 인삼 사포닌은 장내세균에 의하여 분해되며 그 결과 생성되는 대사체가 위장관에서 흡수되어 최종적으로 생리활성을 발휘할 것으로 보고 되었다.^{11,12)} 인삼 사포닌 대사체의 생리활성에 관한 최근의 연구결과들에 의하면, compound K의 항종양 효과^{13,14)}와 세포사멸^{15,16)}에 관한 연구 등이 있다. 본 연구에서는 알러지 반응을 유도하는 매개체인 histamine, interleukin-4 (IL-4), interleukin-8 (IL-8), 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 유리에 미치는 인삼사포닌 장내 대사체인 20(S)-protopanaxadiol 및 20(S)-protopanaxatriol의 효과를 검증하였다 (Fig. 1).

재료 및 방법

해명 (Guinea pig, 체중 250~300g)은 Samtako 바이오 코리아 (오산, 한국)에서 구입하여 성균관대학교 실험동물센터에서 표준 조건 하에 사육되었다. Ovalbumin (OA, fraction V), collagenase (type I), elastase (type I, porcine pancreatic),

및 PMA (phorbol myristate acetate)는 Sigma-Aldrich chemical Co (St. Louis, MO)로부터, percoll 은 Pharmacia Fine Chemicals AB (Uppsala, Sweden)로 부터, Human IL-4, Human IL-8, 및 Human TNF- α 측정용 Kit는 Quanti Glo R&D Systems (Minneapolis, USA)로부터 구입하였으며, 그 외의 시약은 최상급 시료를 사용하였다. 20(S)-protopanaxadiol 및 20(S)-protopanaxatriol은 서울대학교 약학대학 한용남 교수로부터 제공받았다. HMC-1 (human mast cell-1) 세포 및 anti-ovalbumin antibody는 성균관 대학교 의과대학 노재열 교수에 의하여 제공되었다.

해명 폐로부터 비만세포 분리

해명 폐로부터 비만세포 분리는 Undem 등의 방법에 의하여 수행되었다.¹⁷⁾ 간단히 설명하면, 해명의 폐를 적출한 후 적당량의 modified Tyrode buffer (TGCM 완충용액, 137 mM NaCl, 0.36 mM NaH₂PO₄, 2.6 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 119mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, 1 g/L gelatin, pH 7.4)를 기관지로 주입하여 폐의 혈액을 세척한 후, McILWAIN tissue chopper (The Mickle laboratory engineering company)를 사용하여 후 잘게 절단하고, Milipore 여과장치를 사용하여 세척하였다. 절단된 조직에 collagenase (20 mg/4 ml TGCM) 1 ml, elastase (3 units/1마리)를 가하고 15분 동안 흔들어준 후 원심분리 하여 (80-90 rpm, 15 min), 조직을 다시 모아 collagenase 용액과 elastase를 넣고 15분, 25분 동안 다시 흔들어 후, nylon mesh를 사용하여 2회 여과한 후 여과액을 원심 분리 (1400 rpm, 10 분)하여 세포들을 분리하였다. Rough percoll 위에 2 ml씩 올린 후 원심 분리 (1400 rpm, 25분)한 후에 얻어진 세포 함유 분획물을 약 8 ml의 TGCM 용액에 재 현탁하여 nylon mesh로 거른 후, 불연속 percoll 용액 상에 2 ml씩 올린 후 다시 원심 분리하였다 (1400 rpm, 25분). 순도가 50~70% 이상 되는 층만 모아서 TGCM용액 30ml에 현탁시켜 1400

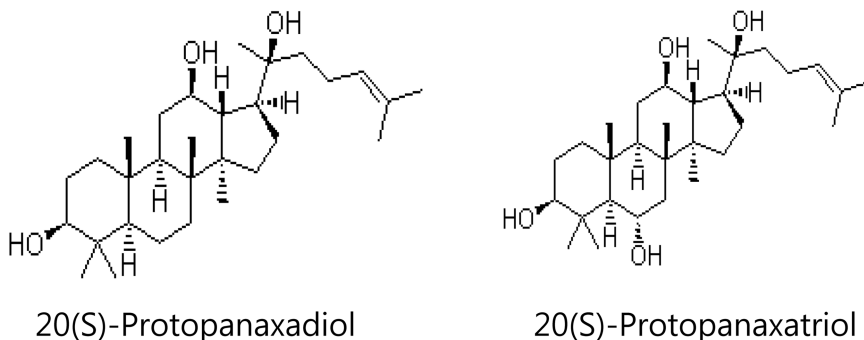


Fig. 1. Structures of 20(S)-Protopanaxadiol and 20(S)-Protopanaxatriol.

rpm에서 10분 동안 원심 분리한다. 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 비만세포를 실험에 사용하였다. 세포 생존율은 Trypan blue exclusion assay 법으로 판정하였으며, 비만세포의 순도는 Alcian blue 염색으로 판별하여 80~90% 였다.

해명 폐 비만세포로부터의 히스타민 유리에 미치는 PPD의 영향

비만세포 1×10^6 개 당 1 ml 정도의 anti-OA 항체를 넣고 37°C 에서 45분 간 배양한 후, TGCM 완충용액을 사용하여 3회 세척하였다. 세포를 $4 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ 정도의 양으로 시험관에 분주한 후 TGCM 용액 800 μl 를 가한 후 PPD를 지정된 농도 (1, 10, 및 100 μM) 만큼 가한 후 5분간 배양하였다. 그 후, OA (0.1 $\mu\text{g/ml}$)를 첨가하여 37°C 에서 10분 간 처치하였다. 반응 후 시험관을 냉각시킨 후, 원심 분리하여 (1400 rpm, 10분) 상층액 중의 히스타민의 양을 측정하였다. 히스타민은 fluorometry 법¹⁸⁾을 이용하여 측정하였으며, 정량의 감도는 5 ng histamine/ml. Triton-100 (0.4%) 용액 1 ml을 넣어 세포를 파괴한 후 유리된 양 히스타민의 양을 비만세포 내의 히스타민 총량으로 정의하며, OA에 의한 자극을 받지 않은 세포에서 유리된 히스타민의 양을 자발적 유리량으로 정의하였다. 유리된 histamine의 양은 비만세포 내의 histamine 총량에 대한 백분율 (%)로 표시하였다.

HMC-1세포 배양 및 시료 처리

Fetal bovine serum (10%) 과 10^{-5}M thioglycerol을 함유한 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)을 사용하여 5% CO_2 배양기에서 배양한 HMC-1 (human mast cell-1) 세포를 IMDM 배양액 1 ml 당 약 4×10^6 개의 밀도로 24 well plate에 접종하고, 여러 농도 (1, 10, 및 100 mM)의 PPT 혹은 PPD 를 첨가하여 5분 간 전 처치한 후, 25 ng/ml의 PMA (phorbol myristate acetate)를 가한 후 일정 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 시험관을 원심분리하여 (1400 rpm, 10분) 상층액 중에 유리된 cytokine의 양을 측정하였다.

Cytokine 측정

IL-4, IL-8, 및 TNF- α 의 양은 각각 human IL-4, human IL-8, 및 human TNF- α Chemiluminescence Immunoassay Kit (Quanti Glo)와 Luminometer (Spectraplus Max, Molecular device)를 사용하여 제시된 표준 프로토콜에 따라서 측정하였다.

통계 분석

각 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며 유의성

검정은 Student's *t*-test를 이용하였다.

결 과

OA로 활성화된 해명 폐 비만세포로부터의 히스타민 유리에 미치는 PPD의 효과: 비만세포를 항체로 자극 시 histamine이 유리된다. OA/anti-OA 항체로 유도되는 항원-항체 반응에 의하여, 자극되지 않은 비만세포 내에 저장된 histamine총량의 약 30% 정도가 유리되었다. PPD는 10 및 100 μM 농도에서, OA에 의하여 유리되는 histamine 유리량과 대비하여, 약간의 histamine 유리 증가를 초래하였으나 통계적 유의성은 없었다 ($p=0.08$) (Fig. 2).

PMA (Phorbol myristate acetate)로 활성화된 HMC-1 세포에서의 IL-4 생성 및 유리에 미치는 PPD와 PPT의 영향: 25ng/ml PMA로 자극된 HMC-1 세포에서의 IL-4 유리는 자극 전의 기저 수준 (3.3 pg/ml)에서 PMA 자극 5시간 후에 정점 수준 (9.9 pg/ml)에 도달 한 후 점차 감소하여 24시간 후에는 5.0 pg/ml 정도의 수준에 도달하였다 (Fig. 3-A). PPT 혹은 PPD (1, 10, 100 μM)와 25 ng/ml PMA를 처치하고 난 5시간 후에 세포로부터 유리된 IL-4의 양을 측정하였다. 최대 농도 100 μM 에서 PPT는 PMA에 의하여 유도된 IL-4의 생성 및 유리를 거의 완전하게 (100%) 억제하였다 ($p<0.05$). PPD의 경우, 최대 농도 100 μM 에서 약

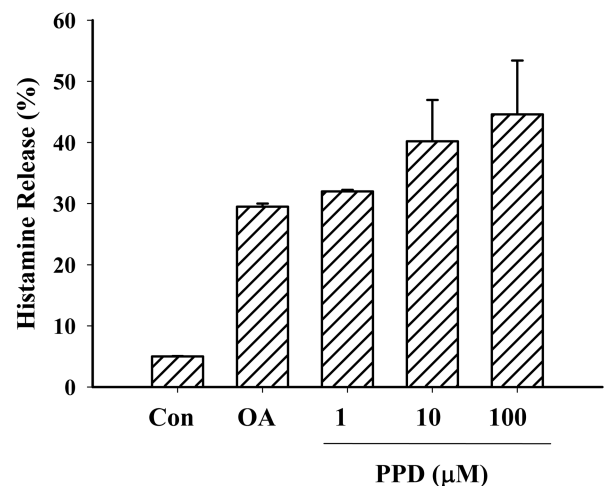


Fig. 2. Effects of 20(S)-protopanaxadiol (PPD) on the histamine release from guinea pig lung mast cells. Various concentration (1, 10, 100 μM) of PPD was added to the anti-OA antibody sensitized mast cell (4×10^5 cells/ml) and followed by 5 min incubation at 37°C . Cells were then stimulated with OA (ovalbumin, 0.1 mg/ml) for 10 min. Amounts of histamine were measured by the fluorometric method described in Materials and Methods. Experiments were repeated three times.

89% 억제하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 3-B).

PMA (Phorbol myristate acetate)로 활성화된 HMC-1 세포에서의 IL-8의 생성에 미치는 PPD와 PPT의 영향: 25ng/ml PMA로 자극된 HMC-1 세포에서의 IL-8 유리는 자극 전의 기저 수준 (0.09×10^3 pg/ml) 에서 PMA 자극 5시간 후에 정점 수준 (6.77×10^3 pg/ml)에 도달 한 후 24시간 동안 지속적으로 유지되었다 (Fig. 4-A). PPT혹은 PPD (1,

10, 100 μ M)와 25ng/ml PMA를 처치하고 난 5시간 후에 세포로부터 유리된 IL-8의 양을 측정 한 결과, 최대 농도 100 μ M에서 PPT는 PMA에 의하여 유도된 IL-8의 생성 및 유리를 약 54% 억제하였다 ($p < 0.05$). PPD의 경우, 최대 농도 100 μ M에서 약 34% 정도 억제하는 경향을 보였다 (Fig. 4-B).

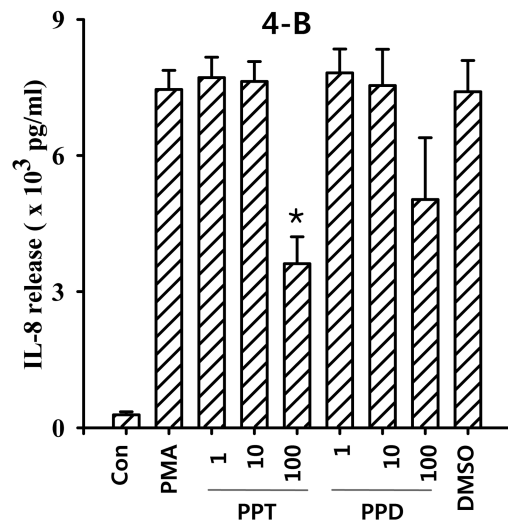
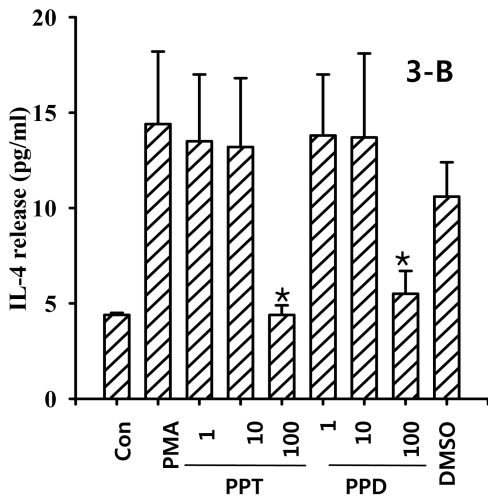
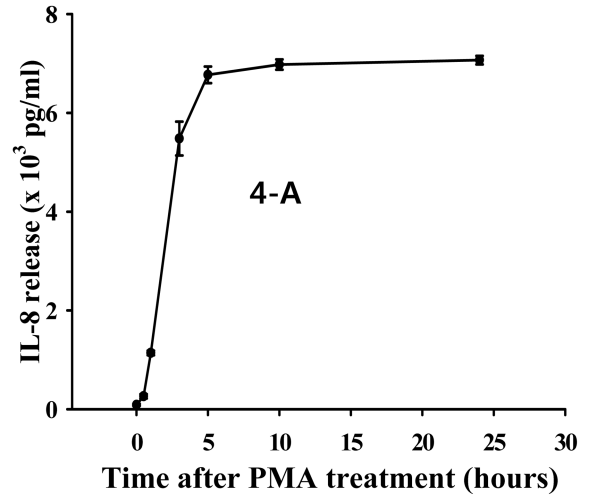
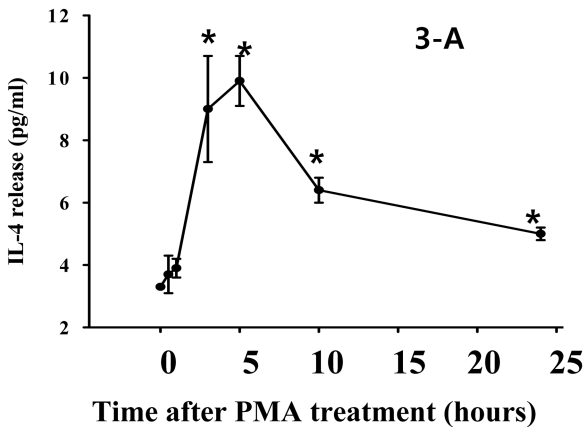


Fig. 3. Effects of 20(S)-protopanaxatriol (PPT) and 20(S)-protopanaxadiol (PPD) on PMA-induced IL-4 release from HMC-1 cells. Amounts of IL-4 released from HMC-1 cells were measured at 0, 0.5, 1, 3, 5, 10, and 24 hours after stimulation with 25ng/ml of PMA (Fig 3-A). Various concentrations (1, 10, and 100 μ M) of PPT and PPD was added to the HMC-1 cells (4×10^6 cells/ml) and followed by 5 min incubation at 37°C. Cells were then stimulated with 25 ng/ml PMA (phorbol myristate acetate) for 5 hours (Fig 3-B). Amounts of IL-4 were measured as described in Materials and Methods. Experiments were repeated three times. * denotes $p < 0.05$ as compared with DMSO treatment.

Fig. 4. Effects of 20(S)-protopanaxatriol (PPT) and 20(S)-protopanaxadiol (PPD) on PMA-induced IL-8 release from HMC-1 cells. Amounts of IL-8 released from HMC-1 cells were measured at 0, 0.5, 1, 3, 5, 10, and 24 hours after stimulation with 25 ng/ml of PMA (Fig. 4-A). Various concentrations (1, 10, and 100 μ M) of PPT and PPD was added to the HMC-1 cells (4×10^6 cells/ml) and followed by 5 min incubation at 37°C. Cells were then stimulated with 25 ng/ml PMA (phorbol myristate acetate) for 5 hours (Fig. 4-B). Amounts of IL-8 were measured as described in Materials and Methods. Experiments were repeated three times. * denotes $p < 0.05$ as compared with DMSO treatment.

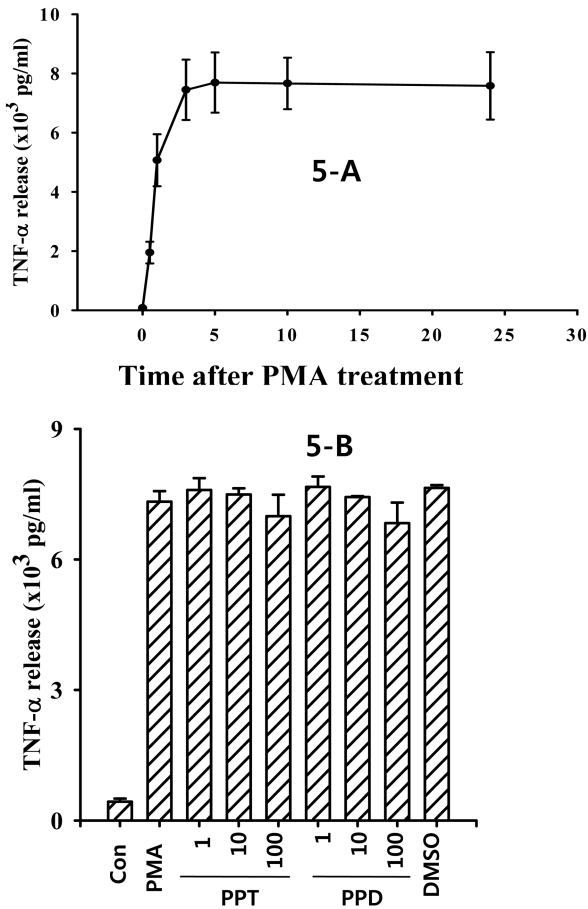


Fig. 5. Effects of 20(S)-protopanaxatriol (PPT) and 20(S)-protopanaxadiol (PPD) on PMA-induced TNF- α release from HMC-1 cells. Amounts of TNF- α released from HMC-1 cells were measured at 0, 0.5, 1, 3, 5, 10, and 24 hours after stimulation with 25ng/ml of PMA (Fig. 5-A). Various concentrations (1, 10, and 100 μ M) of PPT and PPD was added to the HMC-1 cells (4×10^6 cells/ml) and followed by 5 min incubation at 37°C. Cells were then stimulated with 25 ng/ml PMA (phorbol myristate acetate) for 5 hours (Fig. 5-B). Amounts of TNF- α were measured as described in Materials and Methods. Experiments were repeated three times.

PMA (Phorbol myristate acetate)로 활성화된 HMC-1 세포에서의 TNF- α 의 생성에 미치는 PPD와 PPT의 영향: 25 ng/ml PMA로 자극된 HMC-1 세포에서의 TNF- α 유리는 자극 전의 기저 수준 (0.01×10^3 pg/ml)에서 PMA 자극 5시간 후에 정점 수준 (7.69×10^3 pg/ml)에 도달한 후 24시간 동안 지속적으로 유지되었다 (Fig. 5-A). PPT 혹은 PPD (1, 10, 100 μ M)와 25 ng/ml PMA를 처치하고 5시간 후에 세포로부터 유리된 TNF- α 의 양을 측정된 결과, 최대 농도 100 μ M에서 PPT 및 PPD 모두는 PMA에 의하여 유도된 TNF- α 의 생성 및 유리에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 5-B).

고 찰

경구로 복용한 인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 추출물에 함유된 일부 성분은 위장관에 존재하는 세균총으로부터 분비되는 베타-글리코시다제에 의하여 당이 제거된 후, 전신으로 흡수되며 그 결과 몇 가지 주요 대사체는 혈액 및 뇨중에서 검출되었다. 즉, 장내 세균을 사용한 대사경로 연구에 의하면, protopanaxadiol 류에 속하는 진세노사이드 Rb1, Rb2, 및 Rc로 부터 compound K 및 PPD가 최종 대사산물로서 생성되며, protopanaxatriol 류에 속하는 Re와 Rg1로부터 PPT가 대사산물로 생성됨을 보고하였다.¹¹⁾ 또한, 진세노사이드 Rb1, Re, 및 Rg1은 위산에 의하여 분해되며, ginsenoside Rb2는 위액에 의하여 분해되기 어려운 것으로 보고되었다.^{19,20)} 따라서, 인삼 추출물 및 사포닌을 사람과 흰쥐에 경구 투여한 후 뇨 및 혈중 대사체를 분석한 실험 결과는 20(S)-protopanaxadiol (PPD), 20(S)-protopanaxatriol (PPT), 및 compound K 등이 인삼의 주요 장내 대사체 중의 일부를 제시하고 있다.¹¹⁾

다양한 실험모델에서 수행된 여러 가지 진세노사이드의 생리활성에 관한 연구 결과가 발표되었다. 그 중에서, 특정 진세노사이드의 친식과 관련된 염증 및 알러지 조절반응에 관한 연구 결과⁷⁾와 본 연구에서 얻은 결과를 비교할 때, 진세노사이드류와 인삼 장내 대사체의 비만세포에 대한 작용 간에는 현격한 차이가 있음을 알 수 있다. 즉, 진세노사이드 Rg1, Rg2, 및 Rc는 활성화된 해명의 폐 비만세포로부터의 histamine 과 leukotriene D₄의 유리 및 합성을 억제하였다. 그러나, PPD는 고농도에서 histamine 유리를 다소 증가시키는 경향이 있다 (Fig. 2). 진세노사이드 Rb1, Rb2, 및 Rc의 구조를 PPD분자 구조와 비교할 때 C₃과 C₂₀ 위치에 결합된 당 치환체의 종류가 다른 것으로 미루어 보아 이들 당 치환체 부분이 염증매개물질 유리 조절작용에 일정한 역할을 할 것으로 생각된다.

면역반응에 관여하는 몇 가지 중요한 사이토카인 (IL-4, IL-8, 및 TNF- α)들은 후기 면역 반응에 관여하는 염증매개물질로서, 항원-항체 반응으로 비만세포가 활성화된 후 수 시간에 걸쳐 생성되어 유리되며, 이들 사이토카인의 생성 및 유리에 미치는 장내 인삼 대사체들의 효과 간에는 현격한 차이를 보인다. 이를테면, protein kinase C를 활성화시키는 PMA는 HMC-1 세포에서 후기 염증 반응에 관여하는 매개체 생성 및 유리를 촉진하였다 (Fig. 3-A, Fig. 4-A, 및 Fig. 5-A). PMA에 의하여 활성화된 HMC-1세포에 최대농도 100 μ M의 PPD 및 PPT 시료를 처리한 실험에서, PPT는 PMA에 의하여 유도되는 IL-4 및 IL-8의 분비를 매우 효과적으로 억제한 반면 (Fig. 3-B와 Fig. 4-B), PPD는 IL-4의 유

리를 효과적으로 억제하였으나 IL-8 유리에는 영향을 미치지 않았다 (Fig. 3-B와 Fig. 4-B). 그러나, PPD 및 PPT 모두 TNF- α 의 생성 및 유리에는 영향을 미치지 않았다 (Fig. 5-B). 여러 염증 세포에서 IL-4, IL-8, 및 TNF- α 의 생성과 유리 조절에 protein kinase C 활성이 관여하는 것으로 보고되었다.^{21,22,23} 따라서, PPT 및 PPD의 IL-4 유리 억제 효과는 이들이 HMC-1 세포에서 protein kinase C 활성을 억제함에 기인되는 것으로 사료된다. 또한, PPT와 PPD의 TNF- α 및 IL-8의 유리에 미치는 효과가 이들의 IL-4유리에 미치는 효과와 상이한 것으로 미루어 보아, 이들 염증 매개체들의 유리 조절작용에는 PPT 및 PPD에 의하여 조절 되지 않는 특정 protein kinase C 아형이 관여하거나, 혹은 이들 활성 이외의 다른 요소가 관여할 것으로 추정된다. 한편 PPT는 PPD 구조 상의 C₆의 H가 OH기로 치환된 구조를 가진다. 이러한 구조의 차이가 PPT와 PPD의 IL-8의 생성 및 유리에 다소 차별화된 효과를 발휘할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 비만세포에 존재하는 초기 및 후기 염증반응에 관여하는 주요 염증 매개체인 histamine, IL-4, IL-8, 및 TNF- α 의 유리에 관한 상이한 인삼 장내 대사체의 효과를 일차적으로 검정하였다. 고농도의 PPD가 초기 염증 반응에 관여하는 히스타민의 유리를 촉진시키는 경향을 보이는 것으로 미루어 보아, 이것이 인삼에 의한 천식 유발 작용 등^{8,9,10}과 같은 알러지 반응을 유발시키는 일부 원인으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나, 이들 염증 매개체들은 비만세포 외의 다양한 세포에서도 생성 및 유리되며 이들 간의 상호작용을 통하여 생체면역 반응을 조절한다. 히스타민은 비만세포와 호염구의 저장과립 내에 헤파린, 콘도로이틴 황산 및 산성단백질 등과 함께 복합체 형태로 존재하며, 세포표면에 부착한 Ig E 항체에 의하여 감작된 후 적당한 항원에 노출될 때 탈과립하여 유리된다.²⁴ 조직 손상 시 유리된 히스타민은 국소 혈관확장을 유도함으로써, 급성 염증 매개체 (보체, C-반응성 단백질), 항체 및 염증세포 (중성구, 호산구, 호염구, 모노사이트 및 림프구) 등을 함유하는 혈액 삼출물을 유출시키는 작용을 하며 라이소좀 내용물 유리억제와 T- 및 B-림프구의 기능을 억제한다.²⁴ 또한, 비만세포는 물리적으로도 T-림프구와 인접하여 위치하므로 T-림프구에 의하여 유도되는 염증과정에서도 활성화되는 것으로 알려졌다.²⁴

T-림프구와의 상호작용과 관련하여 비만세포에서 분비된 IL-4는 native CD4⁺ T-림프구에 작용하여 Th2 세포로의 분화를 유도하며, 분화된 CD4⁺ Th2 세포에서는 주로 IL-4를 생성한다. 즉, CD4⁺ T-림프구가 Th2 세포로 분화될 때 antigen-priming 과정을 거치며 이때 IL-4의 작용을 필요로 한다. 이러한 분화 초기단계의 IL-4 공급원이 비만세포이다.^{25,26,27} IL-4는

B-림프구에 작용하여 immunoglobulin의 isotype switching에 관여하며, 대식세포의 활성화를 억제한다. 면역반응 시 IL-4는 조직 내의 비만세포에 작용하여 이들 비만세포가 ECM (extracellular matrix) 분자에 부착된 비만세포의 분리를 촉진한다. T-림프구와 비만세포 내의 IL-4 생성과 분비조절 기전은 protein kinase C, Ca²⁺, 및 transcription factor (stat 6) 등이 관여하는 것으로 보고되었다.^{25,28} 그러므로, 인삼 장내 대사체는 비만세포에서의 IL-4 유리조절을 통하여 IL-4의 영향을 받는 다른 면역세포와의 상호작용에 영향을 미침으로써 이들을 통한 면역기능 조절에 어느 정도 관여 할 것으로 사료된다.

염증 및 알러지와 관련된 내인성 싸이토카인의 전형적인 것이 IL-8이며 세균감염에 대한 숙주방어를 위한 granulocyte의 chemotaxis 반응과 자가면역 질환에 의한 손상조직 처리를 위한 phagocytosis 반응에 관여한다. IL-8은 neutrophil 세포막의 구성요소로 발현되어 있는 CXCR-1 및 CXCR-2 수용체에 작용하여 생리활성을 발휘한다.²⁹ TNF- α 는 대식세포, T-림프구, 및 비만세포 등에서 생성되며 neutrophil과 monocyte를 감염부위로 모으는 역할을 하며 이들 세포들을 자극함으로써 염증반응에 관여한다. 또한 TNF- α 는 혈관 내피 세포를 자극하여 새로운 부착분자를 발현시키며, 대식세포와 혈관내피 세포에서의 케모카인의 분비를 자극하며, 표적세포의 세포사멸을 촉진한다.³⁰ 그러므로, 인삼 장내 대사체는 비만세포에서의 TNF- α 의 생성 및 유리와는 무관하나 IL-8의 유리조절을 통하여 IL-8에 의하여 활성화되는 neutrophil에 의하여 매개되는 염증기능 조절에 어느 정도 관여 할 것으로 사료된다.

결론적으로, 인삼 대사체 등은 비교적 고농도에서 약리효능을 나타내는 것으로 관찰되었으며, 이는 지금까지 수행된 인삼의 단일성분 사포닌에서 관찰된 연구 결과와 유사하다. 인삼 복용 시 혈 중 PPD와 PPT의 농도는 단 회 실험에 사용된 농도에 비하여 낮을 것으로 추정되나, 인삼이 장기간 동안 지속적으로 복용함으로써 효과를 얻을 수 있는 약물임을 고려할 때 축적된 혈 중 인삼 대사체의 농도와 실험에 사용된 농도 간의 차이는 현격하게 줄어들 것으로 사료된다. 그러나 인삼 대사체의 생체 내에서의 보다 정확한 농도 의존적 효능을 검정하기 위하여, 인삼을 장기 간 복용 시 생체 내에 축적된 인삼 대사체의 농도 측정에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이러한 사실들을 고려할 때, 인삼 추출물 및 단일성분 사포닌을 경구 투여 시 이들이 장내 세균총에 의하여 PPD 및 PPT등을 포함하는 최종 대사체로 전환되는 정도 및 생체 내에서의 이들의 농도에 따라, 생체조직 중의 비만세포로부터의 히스타민, IL-4, 및 IL-8에 대한 유리 효과가 다를

것으로 추측된다. 따라서, 본 연구 결과는 인삼 추출물을 경구 투여 시, 나타날 수 있는 알러지 및 항알러지 효과를 예측하기 위한 근거 자료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 장내 인삼 대사체를 이용한 약물개발을 위한 효능의 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

인삼 사포닌은 면역계에 다양한 약리 효과를 발휘한다. 20(S)-프로토파낙사다이올 (PPD) 및 20(S)-프로토파낙사트리올 (PPT)은 장내 세균에 의하여 생성되는 인삼 대사체의 일종이며 생체 내 투여 시 순환계에서 탐지된다. 활성화된 비만세포로부터의 염증 매개체 유리에 미치는 20(S)-프로토파낙사다이올 (PPD) 및 20(S)-프로토파낙사트리올 (PPT)의 영향을 평가하였다. 인삼 사포닌 대사체를 처치 후, 히스타민 유리는 활성화된 해명 폐 비만세포에서 평가하였으며, 인터루킨-4, 인터루킨-8, 및 종양괴사인자-알파 유리는 HMC-1 비만세포에서 평가하였다. 결과는 다음과 같다. PPT는 최고 100 μ M 농도에서 PMA에 의하여 자극된 HMC-1 세포로부터의 인터루킨-4 유리를 완전히 차단하였다. 또한, 이는 HMC-1 세포로부터의 인터루킨-8의 유리를, PMA와 DMSO동시 처치 시 얻어진 수치를 기준으로 대략 40-50% 정도 억제하였다. PPD는 최고 100 μ M 농도에서 해명 폐 비만세포로부터의 히스타민 유리를 초래하였으나 통계적 유의성은 없었다. PPD는 HMC-1 세포에 PMA와 DMSO 동시 처치 시 얻어진 수치를 기준으로 할 때, 인터루킨-4의 유리를 대략 89% 정도 억제하였으나, 인터루킨-8의 유리에는 유의적인 효과를 초래하지 않았다. 그러나 PPD 및 PPT 모두, PMA에 의하여 자극된 HMC-1 세포로부터의 종양괴사 인자-알파의 유리에는 전혀 효과를 나타내지 않았다. 그러므로 본 연구 결과는 PPD와 PPT가 경구로 투여된 인삼 추출물의 면역조절 작용을 담당하는 장내 인삼 대사체 중의 한 종류임을 제시한다.

감사의 말씀

이 연구는 2001년도 한국인삼공사 출연 고려인삼학회 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

인용문헌

1. Babayigit A, Olmez D, Karaman O, Bagriyanik HA, Yilmaz O, Kivcak B, Erbil G, Uzuner N. Ginseng ameliorates chronic histopathologic changes in a murine model of

- asthma. *Allergy Asthma Proc.* 29: 493-498 (2008)
2. Lim YJ, Na HS, Yun YS, Choi IS, Oh JS, Rhee JH, Cho BH, Lee HC. Suppressive effects of ginsan on the development of allergic reaction in murine asthmatic model. *Int Arch Allergy Immunol.* 150: 32-42 (2009)
3. Sugiyama S, Shibata T, Uekawa M, Makai Y. Inhibitory effect of red ginseng on chemical mediator release from mast cells in type I allergy. *The Ginseng Rev.* 12: 728-731 (1991)
4. Choo MK, Park EK, Han MJ, Kim DH. Antiallergic activity of ginseng and its ginsenosides. *Planta Med.* 69: 518-522 (2003)
5. Ro JY, Yoon SJ, Lee JW, Kim KH. Effects of Panax Ginseng Saponin on chemical mediator release from airway smooth muscle in actively sensitized guinea pig. *Proc Int Ginseng Symposium.* 84-93 (1993)
6. Ro JY, Kim KH. The effects of single component of ginsenosides on the mechanism of mediator release in the allergic hypersensitivity. *Korean J of Pharmacol.* 30: 243-254 (1994)
7. Ro JY, Ahn YS, Kim KH. Inhibitory effect of ginsenoside on the mediator release in the guinea pig lung mast cells activated by specific antigen-antibody reactions. *Int J Immunopharmacol.* 20: 625-641 (1998)
8. Lee JY, Lee YD, Bahn JW, Park HS. A case of occupational asthma and rhinitis caused by Sanyak and Korean ginseng dusts. *Allergy.* 61: 392-403 (2006)
9. Kim KM, Kwon HS, Jeon SG, Park CH, Sohn SW, Kim DI, Kim SS, Chang YS, Kim YK, Cho SH, Min KU, Kim YY. Korean ginseng-induced occupational asthma and determination of IgE binding components. *J Korean Med Sci.* 23: 232-235 (2008)
10. Subiza J, Subiza JL, Escibano PM, Hinojosa M, Garcia R, Jerez M, Subiza E. Occupational asthma caused by Brazil ginseng dust. *J Allergy Clin Immunol.* 88: 731-736 (1991)
11. Hasegawa H, Sung JH, Matsumiya S, Uchiyama M. Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. *Planta Med.* 62: 453-457 (1996)
12. Bae EA, Park SY, Kim DH. Constitutive beta-glucosidases hydrolyzing ginsenoside Rb1 and Rb2 from human intestinal bacteria. *Biol Pharm Bull.* 23: 1481-1485 (2000)
13. Wakabayashi C, Hasegawa H, Murata J, Saiki I. In vivo antimetastatic action of ginseng protopanaxadiol saponins is based on their intestinal bacterial metabolites after oral administration. *Oncol Res.* 9: 411-417 (1997)
14. Lee SJ, Sung JH, Moon CK, Lee BH. Antitumor activity of a novel ginseng saponin metabolite in human pulmonary adenocarcinoma cells resistant to cisplatin. *Cancer Lett.* 144: 39-43 (1999)

15. Lee SJ, Ko WG, Kim JH, Sung JH, Moon CK, Lee BH. Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease. *Biochem Pharmacol.* 60: 677-685 (2000)
16. Wakabayashi C, Murakami K, Hasegawa H, Murata J, Saiki I. An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 246: 725-730 (1998)
17. Udem B, Green F, Warner T, Buckner C, Graziano FM. A procedure for isolation and partial purification guinea pig lung mast cells. *J Immunol Methods.* 81: 187-197 (1985)
18. Siraganian RP. An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. *Anal Biochem.* 57: 383-394 (1974)
19. Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T, Takino Y. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VI. The decomposition products of ginsenoside Rb2 in the stomach of rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 39: 400-404 (1991)
20. Han BH, Park MH, Han YN, Woo LK, Sankawa U, Yahara S, Tanaka O. Degradation of Ginseng Saponins under Mild Acidic Conditions. *Planta Med.* 44: 146-149 (1982)
21. Sandler C, Ekokoski E, Lindstedt KA, Vainio PJ, Finel M, Sorsa T, Kovanen PT, Golub LM, Eklund KK. Chemically modified tetracycline (CMT)-3 inhibits histamine release and cytokine production in mast cells: possible involvement of protein kinase C. *Inflamm Res.* 54:304-312 (2005)
22. Abdel-Raheem IT, Hide I, Yanase Y, Shigemoto-Mogami Y, Sakai N, Shirai Y, Saito N, Hamada FM, El-Mahdy NA, Elsisy Ael-D, Sokar SS, Nakata Y. Protein kinase C-alpha mediates TNF release process in RBL-2H3 mast cells. *Br J Pharmacol.* 145: 415-423 (2005)
23. Schroeder JT, Howard BP, Jenkins MK, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, MacGlashan DW Jr. IL-4 secretion and histamine release by human basophils are differentially regulated by protein kinase C activation. *J Leukoc Biol.* 63: 692-698 (1998)
24. Hakim-Rad K, Metz M, Maurer M. Mast cells: makers and breakers of allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 9: 427-430 (2009)
25. Weiss DL, Brown MA. Regulation of IL-4 production in mast cells: a paradigm for cell-type-specific gene expression. *Immunol Rev.* 179: 35-47 (2001)
26. Kuperman DA, Schleimer RP. Interleukin-4, interleukin-13, signal transducer and activator of transcription factor 6, and allergic asthma. *Curr Mol Med.* 8: 384-392 (2008)
27. Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy.* 36: 1357-1366 (2006)
28. Savignac M, Badou A, Moreau M, Leclerc C, Guery JC, Paullet P, Druet P, Ragab-Thomas J, Pelletier L. Protein kinase C-mediated calcium entry dependent upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor-coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis. *FASEB J.* 15: 1577-1579 (2001)
29. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.* 177: 195-203 (2000)
30. Bertazza L, Mocellin S. Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death. *Front Biosci.* 13: 2736-2743 (2008)