

홍삼에 의한 Caco-2 단세포층 간극의 안정화

손동화* · 김미혜 · 김영찬 · 김성수
한국식품연구원

Effect of Korean Red Ginseng on the Stability of the Tight Junction of Intestinal Epithelial Cells

Dong-Hwa Shon*, Mi-Hye Kim, Young-Chan Kim, and Sung-Soo Kim
Korea Food Research Institute

Abstract Bioactive components involved in the tight junction stabilization of intestinal epithelial cells from Korean red ginseng were studied by analyzing transepithelial electrical resistance (TEER) values of the Caco-2 cell monolayer between the apical and basolateral sides for 96 hr. The treatment with less than 20 µg/mL of the Korean red ginseng extract to the apical side of Caco-2 cell monolayer gave higher TEER values than the control. However, the treatment with more than 130 µg/mL of the Korean red ginseng extract drastically decreased the TEER values, and these effects were not due to its cytotoxicity. When fractions of low molecular weight compounds, polysaccharides, proteins, saponins, and polyphenols derived from Korean ginseng were applied to the apical side of the Caco-2 cell monolayer, polyphenols showed high tight junction stabilizing activity and saponins showed low activity, but the others showed no significant activity. These results suggest that Korean red ginseng might be useful for the prevention of food allergy by stabilizing the tight junction of intestinal epithelial cells leading to hindering absorption of food allergens.

Key words: Korean red ginseng, Caco-2 cell, tight junction, transepithelial electrical resistance (TEER)

서 론

장관은 영양소의 소화흡수를 담당하는 기관일 뿐만 아니라 여러 가지 생체조절에 관여하고 있다. 장관상피는 소화흡수, 방벽(barrier), 식신호의 전달이나 변환 등의 주요 기능을 가지고 있으며 장관에는 독특한 면역시스템(mucosal immunity)이나 신경조직이 발달되어 있는 점을 감안하면, 소화관의 역할을 결코 과소평가할 수 없다. 장관의 기능은 주변의 세포나 조직이 생산하는 사이토카인을 비롯하여 다양한 내재성인자와 장관 관강내에 존재하는 세균류에 의하여 제어된다. 또한, 식품 중의 각종물질도 glycosidase 활성의 조절, 영양소 transporter 활성의 조절, 간극(tight junction)의 기능조절, 이물배출기능의 조절 등과 같이 장관상피의 기능에 다양한 영향을 미치는 가능성이 최근 지적되고 있다(1).

이상과 같이 식품성분이 장관의 기능에 미치는 영향에 대하여는 많은 연구가 진행되어왔으나 알레르기와의 관계에 대해서는 여전히 불분명한 점이 남아있다. 특히 장관상피세포층 tight junction의 개폐는 장관 내부로 식품알레르겐의 이동과도 관련되는 등 그 의의가 클 것으로 생각되며 이에 대한 집중적인 연구가 요구된다(2). 근년 여러 연구에 의하여 비정상적인 장관 barrier를 통해 식품 알레르겐의 통과가 증가되며 이것이 식품 알레르기 질병의

유발과 관련이 있음이 밝혀지고 있다(3,4). 또 다른 보고에 의하면 장 질환, 소아지방변증, 식품알레르기, 급성 췌장염과 같은 환자의 경우 장관피 투과성이 증가되는데 이 때 상피세포의 tight junction의 손상이 장관 내 barrier의 손상을 야기한다고 한다(5-7). 여기에서 tight junction의 안정화를 통해 장관 내 barrier의 기능을 강화시킨다면 식품 알레르기를 예방할 수 있을 것이다(8).

그 중에서도, 통상 경구 섭취하는 인삼은 그 성분이 장관의 기능에도 중요한 역할을 할 것으로 추측되나 이에 관한 연구보고는 거의 없는 편이다. 한편, 인삼의 다른 여러가지 효능들은 이미 많이 보고되었으며 그 중 대표적인 예를 들면 다음과 같다. 우선 면역증강활성을 들 수 있는데, 인삼의 ginsenoside Rg1은 생쥐의 혈중 조력T세포(helper T cell)의 수를 증가시키고 비장 중 NK세포의 활성을 증가시켰으며, 백혈병 치료제인 cyclophosphamide 처리에 의해서 손상된 면역반응을 회복시켰다(9). 또한 삼칠근 당체는 항보체 활성화와 IFN- γ 생산 유도능을 보이며 면역을 증강시켰다(10). 다음으로 항염증 활성을 들 수 있는데, 홍삼 추출물은 장관상피세포에서 *H. pylori*로 유도된 MAPK signaling의 저해와 NF- κ B DNA binding activity의 억제, IL-8과 COX-2의 발현 억제, LOX 활성의 저해 등을 나타냈고(11,12), 백삼 폴리페놀 성분은 nitric oxide(NO)의 생산 저해(13), 인삼 사포닌은 TPA로 유도된 COX-2의 발현 저해 등을 나타내었다(14). 이 밖에도 발효 홍삼을 흰쥐에 경구 투여하였을 때 허혈성 재관류 뇌손상을 예방할 수 있었으며(15), 흰쥐의 호흡기구 입과중 세포주인 RBL-2H3 세포에서는 발효홍삼의 주성분인 compound K가 탈과립 반응을 억제함으로써 항알레르기 활성을 나타낸 바 있다(16).

본 연구에서는 고려인삼의 새로운 기능을 밝히고자, Caco-2 단세포층을 이용하여 홍삼 성분이 소장상피세포 tight junction의 안

*Corresponding author: Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9133
Fax: 82-31-709-9876
E-mail: dhs95@kfri.re.kr
Received September 4, 2009; revised January 12, 2010
accepted January 21, 2010

정화에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

상업적인 홍삼추출물은 인삼공사의 정관장(고형분 65%)을 사용하였고, ovalbumin(OA), β -lactoglobulin(β -LG), ELISA용 일반시약 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. Caco-2 세포주인 HTB-37은 ATCC로부터 구입하였으며, 세포배양을 위한 Ca^{++} , Mg^{++} free Hanks' balanced salt solution(HBSS), Dulbecco's phosphate-buffered saline(D-PBS(+)), Ca와 Mg이 제거된 D-PBS(D-PBS(-)), minimum essential medium Eagle with Earle's salts(MEM), L-glutamine, sodium bicarbonate, non-essential amino acids, sodium pyruvate, fetal bovine serum(FBS), 항생제(10,000 unit/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin) 등은 (주)웰진(Daegu, Korea)의 제품을, 12-well plate용 transwell(#3460) 및 plate(#3513)는 Costar사(Cambridge, MA, USA) 제품을, CO_2 incubator는 Sanyo사(Tokyo, Japan) 제품을 사용하였다. ELISA를 위한 항OA 항체 및 특이항체-효소 결합물은 자체적으로 제작한 것을, microplate는 Nunc사(Roskilde, Denmark)제품을 사용하였다.

인삼성분의 분획 및 성분분리

인삼성분의 추출물 조제를 위하여 증류수 및 에탄올을 대표적인 추출용매로 사용하였다. 인삼분말 일정량에 10배(v/w)의 용매를 첨가하고 환류(reflux)상태로 2시간씩의 추출을 2회 반복하였다. 추출액을 농축하여 조추출물로 준비하였다. 인삼의 용매추출물로부터 비saponon계(다당체, 단백질/펩타이드류, 저분자물질 등)와 polyphenol계(황분(유리형, 에스테르형, 결합형 페놀산), 그리고 단백질계(PG4)와 saponin계(PG7)의 황분을 한국식품연구원의 표준 방법(17)에 준하여 분리하였다(Fig. 1). 그 결과 저분자물질로는 PG1(분자량<3 kDa)과 PG6(분자량<1 kDa), 다당체로는 PG2(분자량>6 kDa)와 PG5(분자량>100 kDa)가 분리되었으며, PG3는 분자량 약 6 kDa의 비당체 황분으로 분리하였다.

Caco-2 세포주를 이용한 tight junction 개폐의 활성시험

Caco-2 세포주는 인공배지(MEM with Earle's salts, 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM non-essential amino acids, 1.0 mM sodium pyruvate)에 20%의 FBS와 항생제(최종농도: 100 unit/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin)를 첨가한 것을 배양배지로 사용하여 37°C, 5% CO_2 하에서 계대하면서 유지하였다.

양호한 상태의 Caco-2 세포를 $1-2 \times 10^5$ cells/mL의 밀도로 조절하고, 그 세포부유액 0.5 mL을 12-well plate의 transwell 상층부(apical side)인 transmembrane 상에 seeding하였으며 하층부(basolateral side)에는 배양배지 1.5 mL을 넣은 후 2-3일에 한번 씩 배양배지를 교환하면서 2-3주일간 배양하였다. 이때 세포의 증식으로 인하여 합류(confluent) 상태가 된 Caco-2 단세포층을 활성시험에 이용하였다.

즉, 상층부를 차가운 D-PBS(-) 0.5 mL로 3회 세척한 후 차가운 HBSS 0.5 mL을 채우고 1.5 mL의 차가운 HBSS를 넣어둔 새로운 well에 옮겼다. 30분간 CO_2 incubator에 방치 후 상층부와 하층부 간의 전기저항치(TEER, transepithelial electrical resistance, $\Omega \cdot \text{cm}^2$)를 Millipore사(Bedford, MA, USA)의 Millicell®-ERS(Electrical Resistance System)장치를 이용하여 측정한다 다음, HBSS에 용

해한 시료를 상층부에 처리하고 다시 한 번 더 TEER수치를 측정하였다. 이후 96시간 배양하면서 매 24시간마다 TEER수치를 측정하였다. 다만, 최종적인 TEER수치는 세포없이 측정된 TEER 수치($100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 가량)를 각 처리시의 측정치에서 감한 값으로 표시하였다. 또한, 모든 처리는 3반복 또는 2반복으로 행하여 평균 및 분산으로 표시하였다.

Caco-2 단세포층의 알레르겐 통과 시험

Caco-2 단세포층의 건전성을 검토할 목적으로, 모델 알레르겐으로써 OA를 Caco-2 단세포층의 상층부에 처리하고 하층부로 통과한 OA의 농도를 측정하였다. 즉, Caco-2 단세포층이 형성된 transmembrane 상하부의 배양매지를 HBSS로 교환한 다음, 여기에 적당한 농도의 OA를 상층부에 처리하고 3시간 배양 후에 하층부에 이동된 OA의 농도를 sandwich ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)로 측정하였다.

아래층에 통과된 OA량으로부터 flux를 구하였다.

$$\text{Flux} = C \text{ ng/H hr/S cm}^2$$

여기에서 C는 ELISA에 의하여 구한 OA의 통과량이고, H는 Caco-2 단세포층의 상층부에 OA 첨가 후 반응시간 (3 hr)을 나타내며, S는 transmembrane의 상층부 표면적(1.1 cm^2)을 나타낸다.

OA 분석을 위한 ELISA

Coating buffer(tris hydroxymethyl) aminomethane 0.05 M, pH 9.0)에 $2 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석한 항OA 항체를 microplate에 각 well 당 $100 \mu\text{L}$ 씩 분주하여 냉장고에서 하룻밤 정치하였다. 각 well을 washing buffer(phosphate buffered saline with Tween 20, PBST; 0.01 M phosphate buffer with 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.05% Tween 20)로 세 번 세척하였다. PBST에 일정한 배수로 희석한 시료(또는 농도별로 희석한 OA 표준품) 용액을 각 well 당 $100 \mu\text{L}$ 씩 첨가한 후 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 washing buffer로 앞에서와 같이 세척한 다음 항OA 항체-효소 결합물(anti-OA antibody-HRP conjugate)을 PBST로 일정농도로 희석하고 well 당 $100 \mu\text{L}$ 를 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 이 후, washing buffer로 앞서 언급한 바와 같이 세척한 다음, well 당 $100 \mu\text{L}$ 의 기질 용액(0.01% TMB in phosphate-citrate buffer pH 5.0, 0.001% H_2O_2 , 사용 직전에 준비)를 넣고 상온에서 30분 동안 발색시킨 후, 2 M H_2SO_4 를 $50 \mu\text{L}$ 씩 각 well에 넣어 발색 반응을 중지시켰다. 발색정도는 microplate reader(Thermomax™, Molecular Devices Co., Palo Alto, CA, USA)로 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이 과정에서 시료는 모두 3 반복 처리하였다.

MTT assay에 의한 홍삼 추출물의 세포독성 시험

Caco-2세포에 대한 홍삼의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다(5). Caco-2세포를 1×10^5 cells/mL의 농도로 96well plate에 $180 \mu\text{L}$ 씩 분주하고 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 홍삼 추출물 농도별(0, 0.2, 2, 20, 200 g/mL)로 첨가하여 3일간 더 배양하였다. 3일째 되는 날 5 mg/mL의 MTT 용액을 well 당 $20 \mu\text{L}$ 씩 첨가하고 37°C에서 4시간 배양한 뒤 $100 \mu\text{L}$ 의 SDS 용액(10% SDS in 0.01 M HCl)을 첨가하였다. 30분간 formazan 결정을 용해시키고 microplate reader(595 nm)로 흡광도를 측정하였다. 홍삼 추출물이 세포생존에 미치는 효과는 추출물 처리시의 흡광치를 대조군 흡광치에 대한 백분율로 표시하였다.

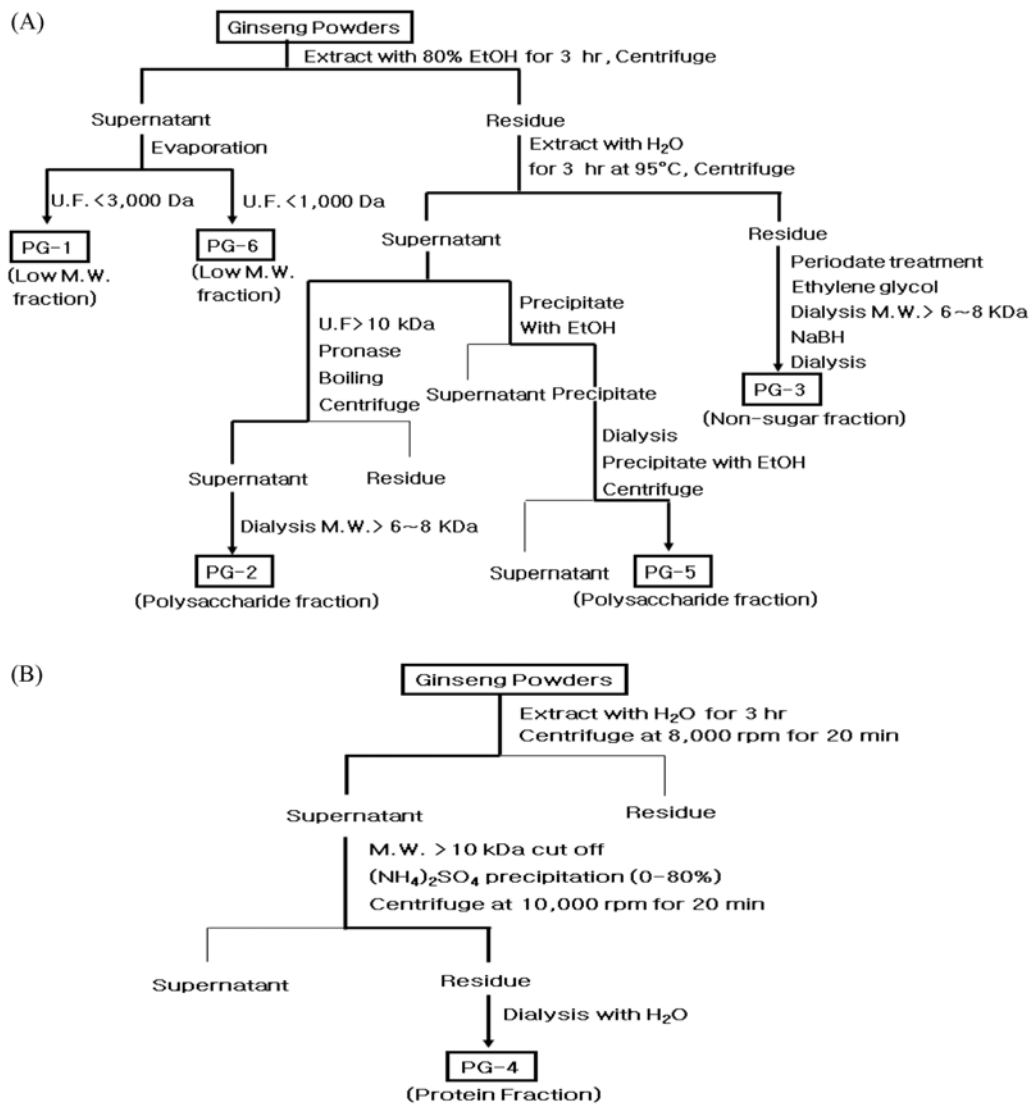


Fig. 1. Schematic procedure for the fractionation of (A) crude polysaccharides and low molecular compounds, (B) crude proteins, (C) crude saponins, (D) crude polyphenol compounds from Korean ginseng.

분석을 위한 시료의 전처리

비사포닌계, 단백질계, 사포닌계는 HBSS에 1 mg/mL의 농도로 희석하여 membrane filter를 이용하여 여과한 후, 적당량 희석하여 세포에 처리하였다. 홍삼추출물과 polyphenol류는 DMSO에 100 µg/mL의 농도로 녹인 후 여과하여 HBSS로 희석하여 실험에 사용하였다.

통계 처리

모든 실험의 결과는 평균치와 표준편차를 산출하고, 시간 당 각 시료간의 차이는 SAS(SAS Instruments Inc., Cary, NC, USA)를 이용한 ANOVA와 Duncan's multiple test를 통해 유의차를 $p < 0.05$ 유의 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

완충액에 따른 Caco-2 단세포층의 TEER수치 안정성 검토

배양배지는 MEM 이외에 아미노산 등의 첨가물과 혈청유래의 여러 가지 성분이 함유되어 있어 세포를 안정화시키고 있으

므로, 시료의 효과를 파악하기 어려운 문제점이 있었다. 그래서 세포 배양이 끝난 후 배양배지를 대신하여 단세포층을 이용한 실험계를 구성하고자, 어떤 완충액 하에서 96시간 유지 보존하여야만 비교적 안정된 높은 TEER수치를 유지할 수 있는지를 검토하였다.

완충액으로 교환하기 이전에 배양배지 하에서 TEER의 평균수치는 300-400 Ω·cm²로써 거의 비슷하였으나, 각 완충액으로 교환한 직후에는 TEER수치가 감소하였으며 그 정도는 완충액의 종류에 따라 차이가 심하였다. 즉, HBSS로 교환한 경우에는 48시간 경과 이후에야 심하게 감소하기 시작하고 96시간 후에는 100 Ω·cm² 가량으로 나타났다. 그러나 D-PBS(-)의 경우는 처리 직후부터 TEER 수치가 100 Ω·cm² 이하로 급격히 감소되었으며 이후에도 계속 낮은 수치를 보였다. 그러나 D-PBS(+)의 경우는 양자의 중간 정도의 TEER수치를 경시적으로 나타내었는데, 이는 D-PBS(+)에는 D-PBS(-)와 비교시 칼슘과 마그네슘 성분을 함유하고 있어 안정성을 높이기 때문으로 생각한다(data 생략).

HBSS는 칼슘과 마그네슘 등 기본적인 염류의 균형을 유지하는 성분 이외에 포도당 성분을 추가로 함유하고 있어 세포의 상

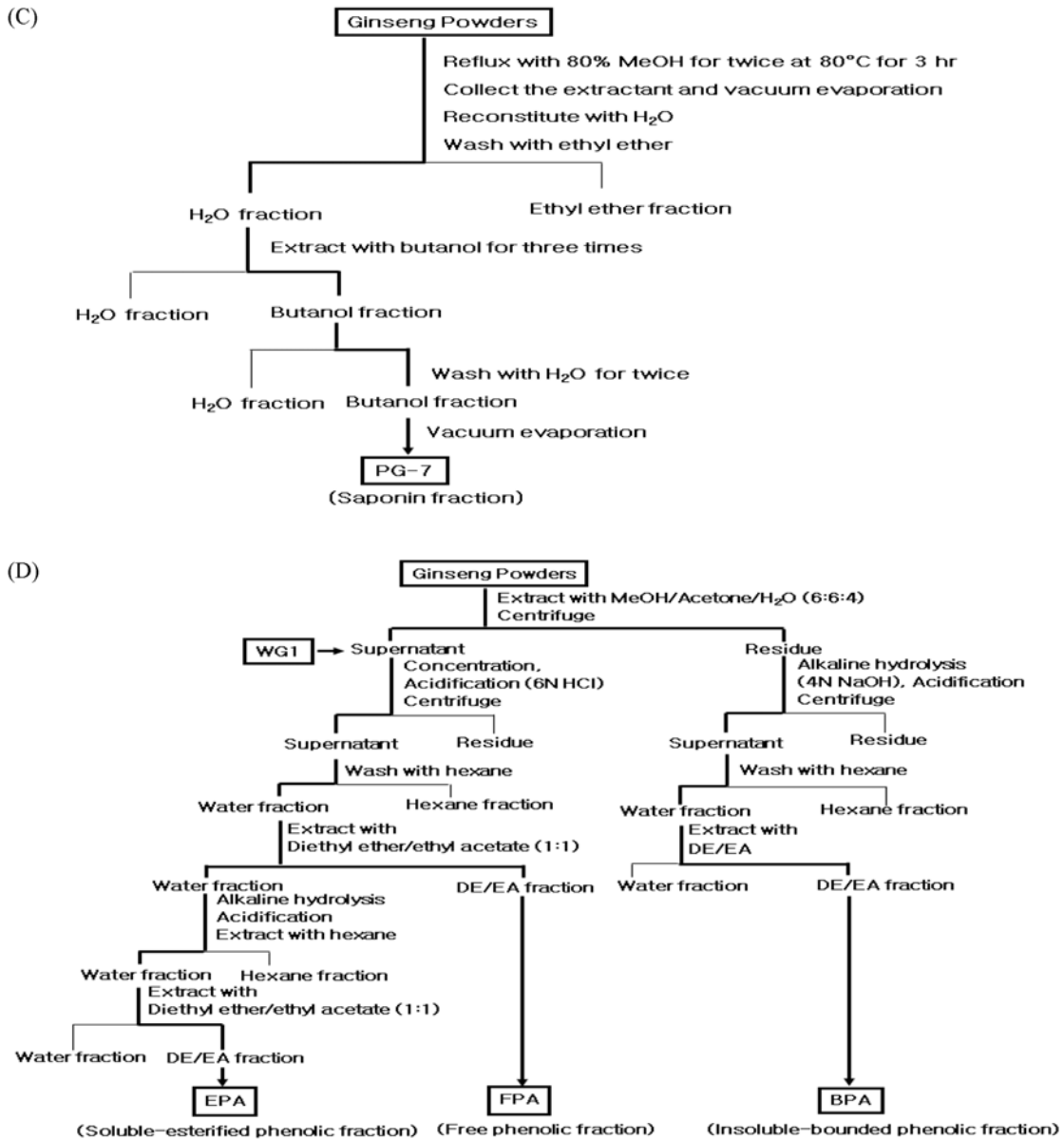


Fig. 1. Continued.

태를 안정되게 유지하는 것으로 생각된다. 따라서, 이후의 실험에서는 활성시험을 위한 Caco-2 단세포층 유지보존용 완충액으로써 HBSS를 사용하였다.

Caco-2 세포의 증식에 따른 단세포층의 건전성 검토

“재료 및 방법”에 명시한 바와 같이 합류 상태의 Caco-2 단세포층의 건전성(건고성)을 나타내는 지표로서 TEER수치를 측정하였다. 이와 함께 알레르겐(OA)과 dye의 통과시험, 그리고 현미경 관찰을 병행하였다. TEER수치가 낮은(<300 Ω·cm²) 경우에는 0.005% phenol red 용액을 상층부에 첨가한 경우 하층부의 dye 통과가 매우 심하게 나타났다. 또한 20 µg/mL의 단백질(OA, β-LG 등)을 처리한 통과시험에서도 통과율(flux)이 200-210,000 ng/hr/cm²으로 매우 높게 나타나 단세포층 tight junction의 건전성이 불량함이 확인되었다(data 생략).

하지만, TEER수치가 >300 Ω·cm²인 경우에는 dye의 통과가 육안으로 관찰되지 않았을 뿐만 아니라, OA의 통과도 매우 낮게

나타나 400 µg/mL로 처리 시 통과율이 10 ng/hr/cm²였다(Fig. 2). 또한 OA의 통과는 농도 의존적으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서는 Caco-2 단세포층의 TEER수치가 300-400 Ω·cm², 또는 그 이상인 경우에 시료의 활성시험을 실시하였다.

한편 홍삼 추출물은 Caco-2 세포에 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 즉, Caco-2 세포에 홍삼 추출물을 0-200 µg/mL의 농도로 72시간 처리한 후 세포생존율을 평가한 결과 대체로 대조군과 비슷하였고 용량 의존적인 관계를 보이지 않아 높은 농도에서도 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 다만 20 µg/mL의 경우 대조군과 유의차가 나타났으나, 양성대조구인 β-LG을 처리한 구와는 유의적인 차이가 없었으므로 세포독성에는 문제가 없는 것으로 생각된다(Fig. 3).

홍삼 추출물에 의한 Caco-2 단세포층 안정화

Caco-2 단세포층의 상층부에 홍삼추출물을 고정분기준으로 20 µg/mL 첨가한 경우, TEER수치의 변화를 96시간동안 경시적으로

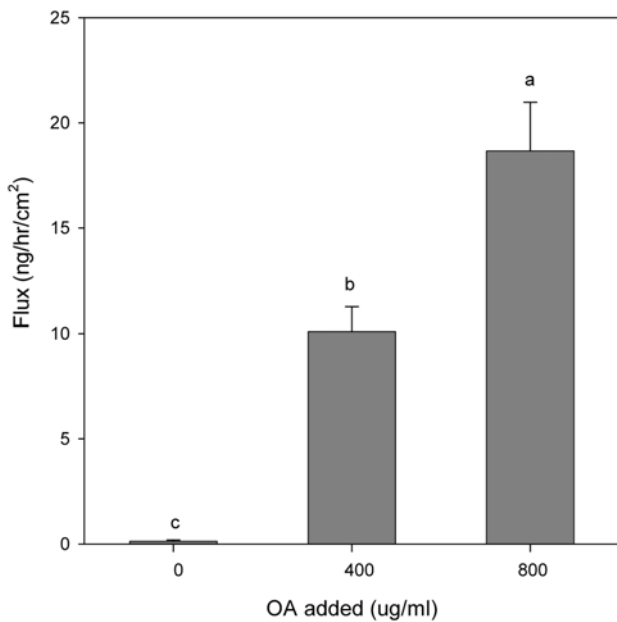


Fig. 2. Transportation of ovalbumin (OA) across Caco-2 cell monolayer. Each bar is the mean±SD for triplication experiment. Different alphabets at each point show statistically difference at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple test.

조사하였다. 처리한지 24시간 이상 경과한 시점에서 홍삼추출물 처리구는 대조구와 비교하면 TEER수치의 감소 정도가 매우 완만하게 나타났고, 시간대별 홍삼추출물의 TEER수치는 대조구에 비하여 50% 가량 높았다(Fig. 4A). 또한, 양성 대조구인 β -LG과 비교하였을 때에도(18) 홍삼추출물은 이보다 높은 활성을 보임으로써, 홍삼추출물이 Caco-2 단세포층을 매우 안정화시키는 작용이 있음을 최초로 확인할 수 있었다. 이 밖에 백삼 추출물은 홍삼 추출물보다는 낮았으나 비슷한 활성을 나타냈다(data 생략).

한편, 용량에 따른 홍삼추출물의 활성을 조사하였을 때, 고형분기준 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리시 단세포층의 TEER수치는 보존 72시간까지 그다지 감소하지 않았으나, 130 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 TEER수치가 오히려 대조구보다 더 많이 감소하였다(Fig. 4B). 이는 Fig. 3에서와 같이 세포독성으로 인한 것은 아니며 인삼 고유의 성분으로 인해 TEER수치가 감소한 것으로 생각되며, 이에 대하여는 추가적인 연구가 필요하다고 생각한다. Fig. 4C는 홍삼추출물을 농도별로 처리하고 24시간 후에 TEER수치를 측정된 결과인데, 0-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지는 활성이 비슷하게 유지되나, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리에서는 급격히 감소하였다. 따라서, 본 실험계에서 홍삼추출물의 활성을 검토하기에 적합한 용량은 대체로 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하로 생각되었다.

저분자물질과 다당류 조획분이 Caco-2 단세포층의 TEER에 미치는 영향

홍삼추출물의 TEER 안정화 활성이 확인되었으므로, 인삼유래의 어떤 성분이 활성을 나타내는지 조사하였다. 백삼과 홍삼은 인삼의 가공방법에 따라 분류되고 그에 따라 구성 성분에 차이가 있게 된다. 그러나 홍삼에 있는 성분이 백삼에도 존재하므로 본 연구에서는 홍삼 성분을 대신하여 백삼 성분을 사용하였다. 실제로 백삼추출물도, 홍삼추출물보다는 약간 못 하지만, TEER 안정화 활성이 있음을 확인하였다(data 생략). 실험방법에 따라 저분자물질과 다당류 조획분(PG1, PG2, PG3, PG5, PG6)을 2 $\mu\text{g}/$

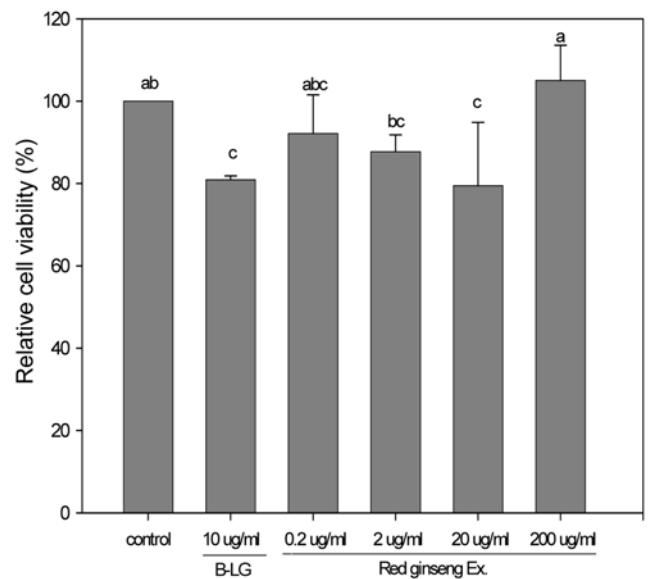


Fig. 3. Effect of Korean red ginseng on Caco-2 cell viability assessed with the MTT assay. After pre-treatment of cells with Korean red ginseng extract for 72 hr, cells were incubated with MTT for 4 hr, solubilized with SDS/HCl and cell viability was measured by microplate reader at 595 nm. Each bar is the mean±SD for triplication experiment. Different alphabets at each point show statistically difference at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple test.

mL의 농도로 Caco-2 단세포층의 상층부에 첨가하였을 때, 그 TEER수치는 대조구보다 약간 낮게 나타났다(Fig. 5A). 따라서, 저분자물질과 다당류에는 활성이 없거나 매우 미약한 것으로 생각되었다.

단백질과 사포닌 조획분이 Caco-2 단세포층의 TEER에 미치는 영향

“재료 및 방법”에 명시한 바와 같이 인삼으로부터 분리한 단백질(PG4)과 사포닌(PG7) 조획분을 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 용량으로 Caco-2 단세포층의 상층부에 첨가하였을 때, 전자는 대조구보다 낮은 TEER수치를 경시적으로 나타내어 활성을 인정하기 어려웠지만, 사포닌 조획분에서는 활성이 인정되는 TEER수치를 96시간 경과시 나타내었다(Fig. 5B). 그 외 인삼사포닌 11종을 처리하였을 때 홍삼추출물의 경우보다 활성이 높지는 않았으나 몇몇 사포닌에서 활성이 관찰되었다. 즉 상대적으로 강한 활성을 나타낸 인삼사포닌은 Re, Rg2이었으며, 다음으로 Rc, Rg1, Rh2이었다(data 생략).

한편 인삼사포닌 중에서도 특히, Rh1, Rh2, compound K 성분이 비만세포의 탈과립 억제를 통해 알레르기를 예방함이 다수 보고된 바 있다(18-20). 그러나 인삼 사포닌 성분이 장상피세포 단세포층의 안정성에 미치는 영향에 관한 보고는 거의 없었다. 그러므로 어떤 인삼 사포닌 성분이 강한 활성을 갖는지에 대하여 좀 더 조사할 필요가 있다.

폴리페놀 조획분이 Caco-2 단세포층의 TEER에 미치는 영향

실험방법에 따라 분리한 폴리페놀 조획분을 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 용량으로 Caco-2 단세포층의 상층부에 첨가하였을 때, 모든 폴리페놀 조획분(FPA, BPA, EPA)에서 매우 높은 활성이 경시적으로 나타났다(Fig. 5C). 그러므로 인삼추출물이 활성을 나타내는 주요성분이 폴리페놀 화합물일 가능성이 매우 높음을 시사하였다. 한편,

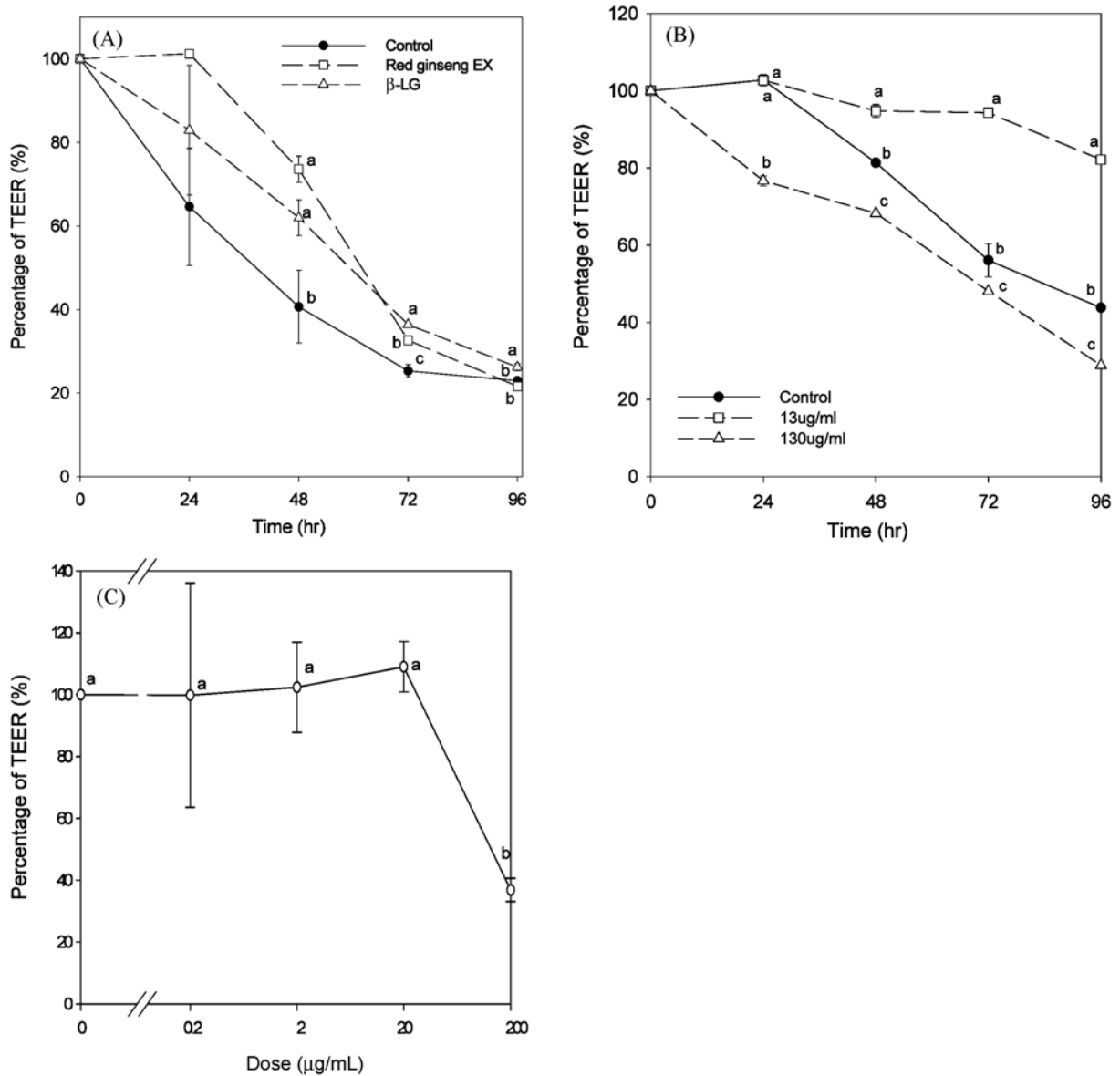


Fig. 4. (A) Effect of Korean red ginseng extract on TEER of Caco-2 cell monolayer. TEER value was monitored for 96 hr after Korean red ginseng extract (20 $\mu\text{g/mL}$) and β -lactoglobulin (20 $\mu\text{g/mL}$) as a control were applied to the apical side of a Caco-2 cell monolayer. (B) Effect of the concentration of Korean red ginseng extract on TEER of Caco-2 cell monolayer. TEER value was monitored for 96 hr after Korean red ginseng extract (13°C, 130 $\mu\text{g/mL}$) were applied to the apical side of a Caco-2 cell monolayer. (C) Dose-response relationship between Korean red ginseng extract and TEER value of Caco-2 cell monolayer. TEER value was monitored at 24 hr after treatment to 0.2-200 $\mu\text{g/mL}$ of Korean red ginseng. Each bar is the mean \pm SD for triplication experiment. Different alphabets at each point show statistically difference at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple test. A statistical analysis among TEER values determined at the same culturing time was performed.

항산화 및 Phospholipase A₂ 및 암세포 증식 억제에 인삼 성분 중 폴리페놀 화분이 효과가 있는 것으로 보고된 적 있으나(21), Caco-2 단세포층의 안정화에 미치는 영향에 관한 보고는 거의 없었다.

본 연구를 통해서 홍삼 성분 중 폴리페놀 및 사포닌 조획분에 의한 Caco-2 단세포층의 TEER 수치 안정화를 확인하였으며, 이는 장상피세포의 tight junction이 안정화됨을 의미한다. 나아가, 홍삼 성분에 의한 식품 알레르겐의 소화관 침투가 억제되어 최종적으로 식품알레르기 저감화에도 효과가 있을 것으로 추측되며 이에 대하여는 추가적인 연구가 요망된다.

요 약

본 연구에서는 홍삼성분에 의한 장상피세포 간극(tight junction)의 안정화에 대해서 조사하였다. Transwell에 배양한 Caco-2 단세포층을 HBSS로 치환한 후 단세포층의 상층부에 홍삼추출물을 처리하고 96시간동안 배양하면서 TEER(trans epithelial electrical resistance)수치의 변화를 조사하였다. 홍삼 추출물을 20 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도로 상층부에 첨가하였을 때에는 시간이 지남에 따라 점차 감소하는 대조구와는 달리 TEER수치가 덜 감소하였다. 한편 130 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도로 처리하였을 때는 TEER수치가 현저히

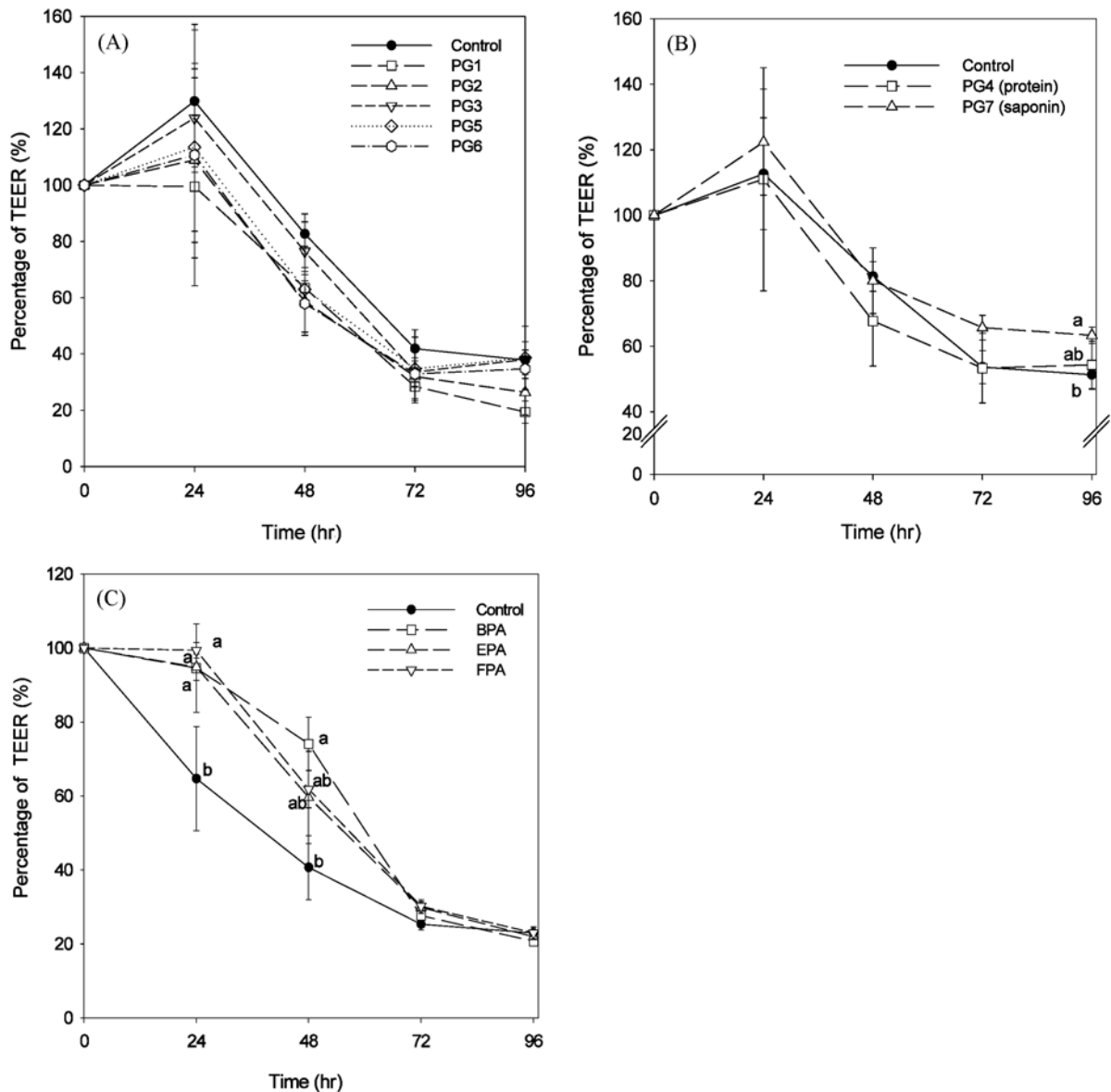


Fig. 5. (A) Effect of fractions for low molecular weight compounds, polysaccharides, and non-sugars on TEER of Caco-2 cell monolayer. PG1 (<1 kDa, low Mw. compound), PG2 (>6 kDa, polysaccharide), PG3 (ca 6 kDa, non-sugar), PG5 (>100 kDa, polysaccharide), PG6 (<3 kDa, low Mw. compound). (B) Effect of fractions for proteins and saponins on TEER of Caco-2 cell monolayer. TEER value was monitored for 96 hr after each fraction (2 µg/mL) was applied to the apical side of the Caco-2 cell monolayer. Each bar is the mean±SD for triplication experiment. Different alphabets at each point show statistically difference at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple test. A statistical analysis among TEER values determined at the same culturing time was performed.

감소하였으나 MTT assay 결과 세포독성에 의한 것은 아니었다. 인삼으로부터 분리한 저분자물질, 다당류, 단백질, 사포닌, 폴리페놀 조획분을 각각 상층부에 첨가하였을 때, 장상피세포 간극의 안정화 활성을 나타내는 성분은 폴리페놀 및 사포닌 조획분이었으며, 전자는 높은 활성을 후자는 낮은 활성을 나타내었다. 이처럼 홍삼추출물의 폴리페놀 조획분과 사포닌 조획분은 장상피세포의 간극을 안정화시킴으로서, 식품 알레르겐의 체내유입을 차단하여 알레르기억제에 기여할 수 있을 것으로 추측된다.

문헌

1. Fasano A, Shea-Donohue T. Mechanisms of Disease: The role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal

autoimmune diseases. *Nat. Clin. Pract. Gastr.* 2: 416-422 (2005)
 2. Lewis SA, Berg JR, Kleine TJ. Modulation of epithelial permeability by extracellular macromolecules. *Physiol. Rev.* 75: 561-589 (1995)
 3. Majamaa H, Isolauri E. Evaluation of the gut mucosal barrier: Evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema. *J. Allergy Clin. Immun.* 97: 985-990 (1996)
 4. Perdue MH. Mucosal immunity and inflammation. III. The mucosal antigen barrier: Cross talk with mucosal cytokines. *Am. J. Physiol.* 277: G1-G5 (1999)
 5. Gu L, Li N, Li Q, Zhang Q, Wang C, Zhu W, Li J. The effect of berberine *in vitro* on tight junctions in human Caco-2 intestinal epithelial cells. *Fitoterapia* 80: 241-248 (2009)
 6. Araki Y, Katoh Y, Ogawa A, Bamba S, Andoh A, Koyama S, Fujiyama Y, Bamba T. Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. *Free Radical Bio. Med.* 39: 769-780 (2005)

7. DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 34: 385-396 (2002)
8. Shoko T, Michiko W. An active compound against allergen absorption in hypoallergenic wheat flour produced by enzymatic modification. *Biosci. Biotech. Bioch.* 66: 1930-1935 (2002)
9. Kenarova B, Neychev H, Hadjiivanova C, Petkov VD. Immunomodulating activity of ginsenoside Rg1 from *Panax ginseng*. *Jpn. J. Pharmacol.* 54: 447-454 (1990)
10. Kang KS, Yokozawa T, Kim HY, Park JH. Study on the nitric oxide scavenging effects of ginseng and its compounds. *J. Agr. Food Chem.* 54: 2558-2562 (2006)
11. Gao H, Wang F, Lien EJ, Trousdale MD. Immunostimulating polysaccharides from *Panax notoginseng*. *Pharm. Res.* 13: 1196-1200 (1996)
12. Park S, Yeo M, Jin JH, Lee KM, Jung JY, Choue R, Cho SW, Hahm KB. Rescue of *Helicobacter pylori*-induced cytotoxicity by red ginseng. *Digest. Dis. Sci.* 50: 1218-1227 (2005)
13. Park S, Yeo M, Jin JH, Lee KM, Kim SS, Chio SY, Hahm KB. Inhibitory activities and attenuated expressions of 5-LOX with red ginseng in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Digest. Dis. Sci.* 52: 973-982 (2007)
14. Lee JY, Shin JW, Chun KS. Antitumor promotional effects of a novel intestinal bacterial metabolite (IH-901) derived from the protopanaxadiol-type ginsenosides in mouse skin. *Carcinogenesis* 26: 359-367 (2005)
15. Bae EA, Hyun YJ, Choo MK, Oh JK. Protective effect of fermented red ginseng on a transient focal ischemic rats. *Arch. Pharm. Res.* 27: 2236-2240 (2004)
16. Choo MK, Park EK, Han MJ, Kim DH. Antiallergic activity of ginseng and its ginsenosides. *Planta Med.* 69: 518-522 (2003)
17. Choi CS, Kim KY, Hong HD, Kim YC. Phenolic acid composition and antioxidative activity of white ginseng (*Panax ginseng*, C.A. Meyer). *J. Ginseng Res.* 30: 22-30 (2006)
18. Hashimoto K, Nakayama T, Shimizu M. Effects of beta-lactoglobulin on the tight-junctional stability of Caco-2-SF monolayer. *Biosci. Biotech. Bioch.* 62: 1819-1821 (1998)
19. Park EK, Choo MK, Kim EJ, Han MJ, Kim DH. Antiallergic activity of ginsenoside Rh2. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 1581-1584 (2003)
20. Park EK, Choo MK, Han MJ, Kim DH. Ginsenoside Rh1 possesses antiallergic and anti-inflammatory activities. *Int. Arch. Allergy Imm.* 133: 113-120 (2004)
21. Choi HJ, Han HS, Choi C. Antioxidative, phospholipase A2 inhibiting, and anticancer effect of polyphenol rich fractions from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 46: 251-256 (2003)