

인삼 사포닌이 인간면역계 사이토카인 유전자의 발현에 미치는 영향

박종욱^{1,3} · 한인숙^{1,3} · 서성일^{2,3} · 백원기^{2,3} · 서민호^{2,3} · 배지현^{3,4} · 최병길^{1,3}

계명대학교 의과대학 ¹면역학교실, ²미생물학교실, ³의과학연구소, ⁴계명대학교 가정대학 식생활학과
(1996년 3월 3일 접수)

Effects of Ginseng Saponin on the Cytokine Gene Expression in Human Immune System

Jong-Wook Park^{1,3}, In-Sook Han^{1,3}, Seong-Il Suh^{2,3}, Won-Ki Baek^{2,3}, Min-Ho Suh^{2,3},
Ji-Hyun Bae⁴ and Byung-Kil Choe^{1,3}

¹Department of Immunology, ²Department of Microbiology and ³Institute of Medical Science,
Keimyung University School of Medicine, Korea

⁴Department of Food & Nutrition, Keimyung University College of Home Economics, Korea
(Received March 3, 1996)

Abstract : In order to investigate the immunomodulatory effects of ginseng, we have studied the effects of ginseng saponin on the proliferation and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cell (PBMC). In the PBMC proliferation assay, total saponin exhibited proliferation inhibition on the PBMC or phytohemagglutinin(PHA)-stimulated PBMC in a dose-dependent fashion. Immunomodulatory effects of ginseng were further investigated using the cytokine gene expression as the indicators. In the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) test, interleukin (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, granulocyte macrophage-colony stimulating factor, tumor necrosis factor (TNF), migration inhibitory factor and transforming growth factor genes were expressed in the PHA-stimulated PBMC 48 hrs after cell culture. Among expressed cytokines, total saponin could increase the expression of IL-1 and TNF of PBMC without stimulation of PHA. All of ginsenosides, Rb₁, Rb₂, Rg₁, Rc, Re, increased TNF gene expression. Especially, Rb₂ (20 g/ml) showed most prominent effect on TNF gene expression and it also slightly increased IL-1 gene expression of PBMC.

Key words : *Panax ginseng*, ginsenoside, cytokine, gene expression.

서 론

인삼(ginseng)은 중추신경계, 심장혈관계, 내분비계 등에 다양한 기능을 나타내고 있으며 특히 면역계의 기능을 증가시키고 항스트레스나 anti-aging activity 등이 있어 예로부터 널리 사용되어온 보약이다.¹⁾

인삼 및 그 추출액이 면역계에 미치는 영향을 크게 대별하면 면역계 세포의 분화 및 증식에 미치는 영향

과 면역계세포의 기능에 미치는 영향으로 나눌수 있다. 세포의 분화와 증식에 미치는 영향으로서 인삼은 T세포와 흉선세포, B세포, killer cell 및 hematopoietic progenitor cell(HPC)의 증식을 유도하고 각종면역세포를 활성화시킨다.^{2, 4)} 이것은 인삼이 생물학적 반응 조절제로서 세포성면역반응과 체액성 면역반응 및 자연 면역성을 증폭시키는 작용이 있음을 나타내며, 인삼의 thymocyte mitogenic effect나

HPC의 증식을 야기하는 것은 인삼이 흉선이나 골수 등에서 성숙 중인 세포의 분화에 까지 영향을 미칠수 있음을 추측할 수 있다. 인삼이 세포기능에 미치는 영향으로서 인삼은 자연살해세포(NK cell)의 활성,^{2,3,5,8)} plaque 형성세포의 증식능,⁹⁾ 탐식세포의 화학주성과 탐식능을 증가시키며,¹⁰⁾ interleukin 2와 더불어 lymphokine activated killer(LAK) cell의 활성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다.⁷⁾ 인삼의 NK cell 및 LAK cell활성을 증가시키는 기능, 즉 인삼의 항암효과는 매우 흥미로운 사실이며,^{8,9)} 향후 이러한 효과를 입증할 수 있는 구체적인 연구가 절실히 필요하다고 사료된다.

이러한 인삼의 다양한 작용의 기전을 추측해보면, 인삼이 mitogen처럼 각각의 세포에 직접 작용할 수도 있으나, T세포와 같은 면역계 증추세포를 활성화시키고 이 세포에서 분비된 cytokine이 각종 면역반응을 매개했을 가능성을 배제할 수 없다. Cytokine은 T세포 등의 많은 세포에서 분비되어 면역세포간의 상호작용을 매개하는 면역계의 messenger로서,^{10,11)} 인삼이 면역세포의 cytokine 유전자발현에 미치는 영향을 조사함으로써 면역계 세포의 분화 및 증식에 미치는 영향 및 면역계 세포의 기능에 미치는 영향을 보다 상세히 알 수 있을것으로 생각한다.

본 연구에서는 인삼이 면역계세포의 증식과 cytokine 유전자발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, ³H-thymidine incorporation법으로 인삼이 사람 말초혈액단핵구의 증식에 미치는 영향을 조사한 후, 각종 cytokine primer와 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) 기법을 이용하여 인삼으로 자극한 면역세포에서 각종 cytokine의 mRNA 발현의 증가여부를 검색하였다.

재료 및 방법

1. 인삼

Total saponin, ginsenoside Rb₁, Rb₂, Rg₃은 한국인삼연초원에서 공급받아 사용하였으며, ginsenoside Re(Sigma G0902) 및 Re(Sigma G1027)은 Sigma회사제품을 구입하여 사용하였다. Total saponin 및 각 ginsenoside를 10% fetal bovine serum이 들어있는 RPMI 1640 배지(RPMI 10)에 적정농도로 용해하고 여과멸균한 후 소분하여 -20°C에 보관하면서 필요

시마다 1개씩 취하여 사용하였다.

2. 말초혈액 단핵구 분리 및 배양

건강한 사람의 말초혈액을 헤파린을 처리하여 뽑은 뒤 Hank's balanced salt solution(HBSS)과 동량 혼합하여 원심분리(1600 rpm, 15분, 실온)한 뒤 상층을 제거하였다. 세포 pellet에 HBSS를 넣어 세포를 재부유 시켰으며 Ficoll/Hypaque solution 15 ml를 세포부유액 하부에 주입하고 2600 rpm에서 25분간 원심분리한 뒤 말초혈액단핵구(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 수거하였다. PBMC를 HBSS로 2회, RPMI 10으로 1회 세척하고 trypan blue dye exclusion 법으로 cell의 viability가 95% 이상임을 확인한 뒤 세포배양에 사용하였다. PBMC를 RPMI 10 배지에 1×10^6 cell/ml농도로 부유시켜 배양세포액을 만들었으며 배양은 기습한 4.5% CO₂ 배양기에서 실시하였다.¹²⁾

3. PBMC proliferation assay

인삼이 PBMC의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ³H-thymidine incorporation assay를 실시하였다. 배양세포액에 total saponin을 0.25~512 µg/ml농도로 첨가한 뒤 60시간 동안 배양하였으며, 배양 60시간때 ³H-thymidine을 well당 1 µCi씩 첨가하여 16시간 더 배양하였다. 배양 종료후 cell harvester (Dynatech Co.)로 세포를 glass 여과막에 수거한 뒤 1 l toluene에 2,5-dimethyl oxazole 4 g, 1,4-bis[5-phenyl-2-oxazolyl] benzene, 2,2'-p-phenylene-bis[5-phenyloxazole] 0.1 g이 들어 있는 cocktail solution에 넣어 beta-counter(Packard Co., TRI-CARB 4530)로 cpm을 측정하였다.¹³⁾

인삼이 mitogen으로 자극된 PBMC의 증식에 미치는 영향을 알아보기로 배양세포액에 phytohemagglutinin(PHA)을 1 µg/ml 농도로 첨가하여 1일간 배양한 뒤 cell을 수거하여 원심분리법으로 3회 세척한 후 RPMI 10 배지에 재 부유시키고 total saponin을 첨가하여 상기한 방법으로 세포배양 및 ³H-thymidine incorporation assay를 실시하였다.

4. Primer design 및 cDNA 구조 분석

각 cytokine cDNA 산생에 사용할 primer를 디자인하기 위하여, Gene bank로부터 인간의 beta-actin, interleukin(IL)-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, interferon alpha(IFN-α), tumor necrosis factor(TNF), migration inhibitory factor

(MIF), granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF) 및 transforming growth factor(TGF)-beta의 유전자 정보를 확보하였다. 각 유전자의 단백질 지령부위의 시작 코돈(codon)을 중심으로 sense primer를 만들고 종료 코돈을 중심으로 antisense primer를 만들었으며(Table 1), 상기한 primer와 RT-PCR법을 이용하여 산생될 cDNA의 구조를 DNAsis(Hitachi사) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 디자인 한 각 primer의 산생은 한국생공에 의뢰하였다.

5. 사포닌 또는 mitogen으로 자극된 말초혈액 단핵구로부터 총 RNA 분리

PHA 또는 인삼으로 자극된 세포를 수거하여 RNAzol B(Cinna Co.)를 사용하여 total RNA를 추

출 하였다. 세포부유액 10 ml를 원심분리하여 세포를 수거하고 HBSS로 2회 세척한 뒤 cell pellet에 RNAzol B를 1 ml 첨가하여 15초간 진탕혼합하고 chloroform을 100 µl첨가하여 15초간 진탕혼합한 뒤 얼음에 10분간 방치하였다. 세포용해액을 원심분리(9500 g, 15분, 4°C)한 뒤 상층을 취하여 새 시험관에 옮기고 동량의 ice-cold isopropanol을 첨가하여 -20°C 냉동고에 2시간 이상 두어 RNA를 침전시켰다. 원심분리(9500 g, 15분, 4°C)하여 RNA 침전물을 만든후 상층액은 버리고 1 ml의 75% ethanol을 첨가하여 RNA 침전물을 원심세척한 뒤 Speed Vac(Savante Co.)으로 건조시켰다. RNA pellet에 20~30 µl의 nuclease-free DW를 첨가하여 80°C 수조에 10분간 두어 RNA를 녹였으며, UV-spectrophotometer로

Table 1. Cytokine primers that were used in RT-PCR

Primer name	cNDA size (bp)	Primer sequence
IL-1 S ^a	810	5'-CCATGGCAGAAGTACCTGAGTCTGCC-3'
IL-1 AS ^a		5'-TTAGGAAGACACAAATTGCATGGT-3'
IL-2 S	462	5'-ATGTACAGGATGCAACTCCTCCTG-3'
IL-2 AS		5'-TCAAGTCAGTGTGAGATGATGCT-3'
IL-3 S	459	5'-TCATGAGCCGCTGCCCGTCTGCTC
IL-3 AS		5'-CTAAAAGATCGCGAGGCTCAAAGT-3'
IL-4 S	462	5'-ATGGGTCTCACCTCCCAACTG-3'
IL-4 AS		5'-TCAGCTCGAACACTTTGAATATTT-3'
IL-6 S	639	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGC-3'
IL-6 AS		5'-CTACATTTGCCGAAGAGCCCTCAGG-3'
IL-7 S	534	5'-ACATGTTCCATGTTTCTTTTAGGTAT-3'
IL-7 AS		5'-TCAGTGTCTTTAGTGCCCATCAAAAAT-3'
IL-10 S	537	5'-GCATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGT-3'
IL-10 AS		5'-TCAGTTTCGTATCTTCATTGTCATGTA-3'
IL-12 S	987	5'-ATGTGTCACCAGCAGTTGGCTATC-3'
IL-12 AS		5'-CTAACTGCAGGGCACAGATGCCCA-3'
IL-13 S	441	5'-CTATGCATCCGCTCCTCAATCCTCTC-3'
IL-13 AS		5'-TCAGTTGAACCGTCCCTCGCGAAAAA-3'
IFNa S	560	5'-CCATGTCCTCGCCCTTTGCTTTACTG-3'
IFNa AS		5'-TTATTCCTTCTCCTTAATCTTTCTT-3'
GM-CSFS	435	5'-ACATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTC-3'
GM-CSFAS		5'-TCACTCCTGGACTGGCTCCAGCAGTC-3'
TNF S	702	5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATC-3'
TNF AS		5'-TCACAGGGCAATGATCCCAAAAGTA-3'
MIF S	371	5'-CTCCTGGTCTTCTGCCATCATG-3'
MIFAS		5'-CGTGGGTCCCTGCGGCTCTTAGG-3'
TGF S	1176	5'-CCATGCCGCCCTCCGGGCTGCGGCTG-3'
TGF As		5'-TCAGCTGCACTTGCAGGAGCGCACGA-3'

^aS : Sense primer, AS : Antisense primer.

RNA의 순도와 농도를 측정후 역전사-중합효소연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 실험에 사용하였다.

6. 역전사-중합효소연쇄반응

RT-PCR은 Perkin Elmer사의 RNA PCR kit(N 808-0017)를 이용하였다. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)용 시험관에 25 mM MgCl₂를 4 μ l, 10 \times PCR buffer를 2 μ l, 10 mM dNTPs를 각 2 μ l, 20 U/ μ l RNase inhibitor를 1 μ l, 50 U/ μ l의 역전사효소(reverse transcriptase, RT)를 1 μ l, 15 μ M oligo dT primer를 1 μ l 첨가하여 혼합하고 여기에 80°C에서 10 분간 변성시킨 총 RNA 2 μ g을 혼합하고 증류수로 최종 용량을 20 μ l로 맞추어 역전사반응 혼합물을 제작하였다. 여기에 mineral oil을 첨가한 후 실온에 10분간 두었으며, PCR machine(Perkin Elmer Cetus 480)에 넣어 42°C에서 60분, 99°C에서 5분, 4°C에서 5분간 반응시켜 역전사효소반응을 완료하였다. 역전사효소반응이 끝난 시험관에 25 mM MgCl₂를 4 μ l, 10 \times PCR buffer를 8 μ l, 증류수를 65.5 μ l, Ampli taq DNA polymerase(5 U/ μ l)를 0.5 μ l, sense 및 antisense primer(15 μ M)를 각각 1 μ l를 첨가하여 혼합하여 중합효소연쇄반응 혼합물을 제작한 후 상기한 PCR machine에 넣어 중합효소연쇄반응을 실시하였다. PCR의 조건은 95°C에서 3분간 1회 반응시켜 DNA를 변성시킨 뒤, 95°C 1분, 56°C 1분, 72°C 40초~1분 30초를 1 cycle로 하여 총 23~30회 반응시켜 각 사이토카인의 cDNA를 증폭시켰으며, 최종적으로 72°C에서 7분간 DNA 합성을 연장시킨 후 PCR을 종료하였다. PCR 산물을 1~2% agarose gel상에서 전기영동하여 산생된 cDNA를 관찰하였다. RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다.^{14,15)}

7. PCR cycle, 배양시간 및 사포닌과 mitogen 처리가 말초혈액 단핵구의 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향

세포배양법과 RT-PCR법을 이용하여 PCR cycle 증가와 이에 따른 유전자 증폭의 증가정도를 비교하고, 사이토카인 유전자 표현이 가장 잘되는 최적시간을 정하였으며, 배양세포액에 PHA, 총조 사포닌 및 각 ginsenoside를 여러 농도로 첨가한 뒤 상기실험에서 얻어진 조건들을 이용하여 RT-PCR을 실시하고

이들이 말초혈액단핵구의 cytokine 유전자발현에 미치는 영향을 분석하였다.

결과 및 고찰

인삼의 면역계에 대한 작용기전을 알아보기 위하여 인삼이 인간의 말초혈액 단핵구의 증식에 미치는 영향과 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Total saponin이 말초혈액단핵구의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 말초혈액단핵구에 0.25~512 μ g/ml 농도로 총조 사포닌을 첨가하여 배양한후 ³H-thymidine incorporation assay를 실시한 결과 세포의 증식은 사포닌의 농도가 증가될수록 감소하였으며(Fig. 1-A). 말초혈액 단핵구의 활성화 여부에 따라 사포닌에 대한 반응이 다른가를 검정하기 위하여, 세포를 PHA로 1일간 자극하여 T세포를 활

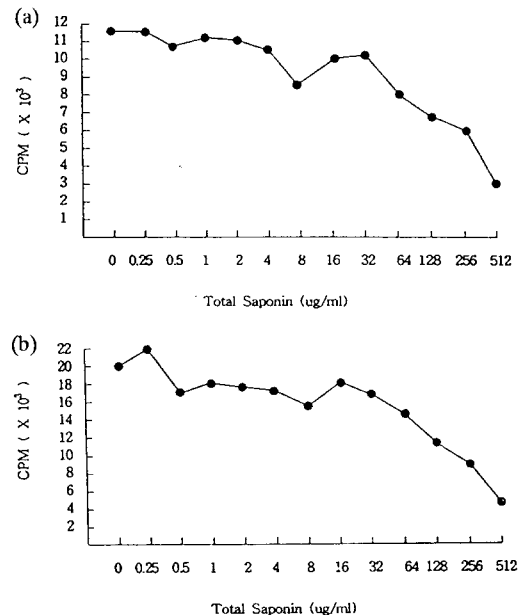


Fig. 1. Effect of total saponin on the proliferation of human PBMCs (A) or PBMCs primed with PHA (B). For priming (B), human PBMCs treated with PHA (5 μ g/ml) were cultured for 24 hrs and they were washed to remove PHA. PBMCs or PBMCs primed with PHA were treated with each concentration of total saponin for 60 hrs. The cells were pulsed with ³H-thymidine for 16 hrs and were harvested for their measurement of incorporated amounts of ³H-thymidine into DNA of PBMCs.

성화 시킨후 총조 사포닌을 첨가하여 동일한 실험을 실시하였다(Fig. 1-B). 세포의 증식 양은 PHA로 자극치 않았을 때보다 모두 증가하였으나 사포닌 첨가에 따라 세포증식이 억제되는 경향은 Fig. 1-A의 결과와 유사하였다. 이것은 Jie 등¹⁶⁾의 보고와 유사하게 인삼이 생체외에서는 T cell 활성화에 관계 없이 말초혈액단핵구의 증식을 억제함을 나타내며, Chong 등¹⁷⁾은 이러한 현상을 인삼이 steroid와 유사한 기능을 하기 때문이라고 추정하였다. 그러나 Yong 등²⁾은 인삼이 mitogen에 의해 prime된 임파구의 분화증식을 증가시킨다고 보고하였으므로 인삼에 의한 말초혈액단핵구의 증식능 변화는 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

인삼이 말초혈액단핵구의 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 우선 RT-PCR 및 최적 배양조건 등을 조사하였다. RT-PCR이 유전자 발현 변화를 감지할 수 있는가를 확인하기 위하여 동일한 양의 RNA를 oligo dT primer를 사용하여 역전사한 후 PCR cycle 수를 달리하여 beta-actin cDNA를 합성한 결과 PCR cycle이 증가함에 따라 beta-actin cDNA 양이 비례적으로 증가함을 보였다(성적생략). 최적 cytokine gene 발현시간을 검색하기 위하여 배양후 24시간, 48시간 및 72시간 때 세포를 각각 수거

하여 RT-PCR법으로 IL-2, IL-4, MIF 및 TNF의 cDNA를 증폭시켰다. IL-2는 PHA로 자극한 군을 48시간 배양했을 때 가장 발현이 많았으며, IL-4도 48시간때 PHA로 자극한 군에서만 미약하게 검출되었다. MIF와 TNF는 대조군과 total saponin을 처치한 군 및 PHA를 처치한군 모두에서 발현되었으며 이들의 발현 최적시간도 48시간 이었다(Fig. 2).

상기한 결과를 토대로 saponin 및 PHA 자극에 의해 발현이 유도되는 cytokine 유전자를 알아보기 위하여 total saponin 및 PHA넣어 48시간 배양한후 각 군의 RNA로부터 beta-actin, IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IFN, TNF, MIF, GM-

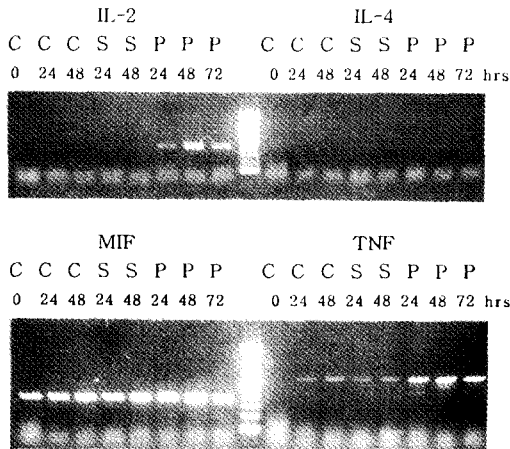


Fig. 2. Determination of optimal incubation period for maximum cytokine gene expression of PBMCs. Human PBMCs treated with 2 µg/ml of total saponin (S), 10 µg/ml of PIIA (P) or none (C, control) were cultured for 0, 24, 48 and 72 hrs. Complementary DNA of MIF, TNF, IL-2, IL-4 genes were amplified from total RNA of cultured PBMCs by RT-PCR.

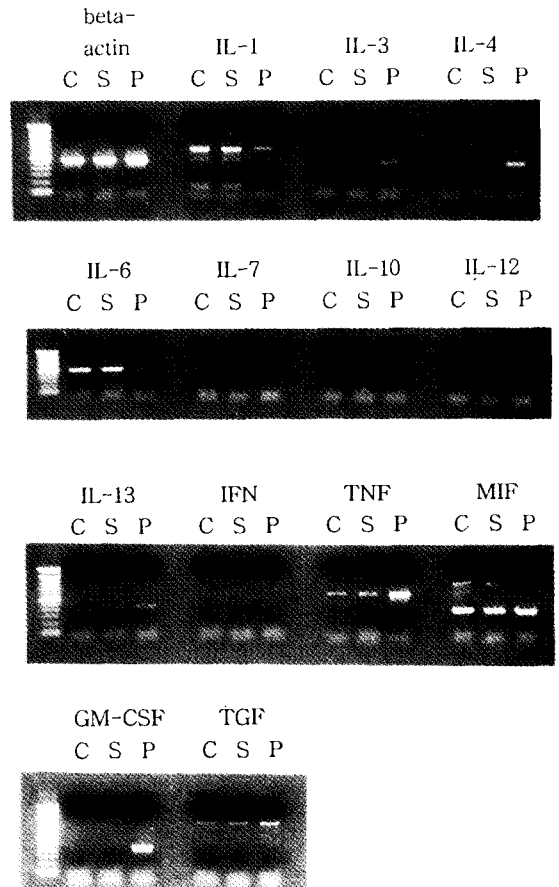


Fig. 3. Screening of cytokines that were expressed in the PBMCs stimulated with PHA or total saponin. PBMCs treated PHA (5 µg/ml, P), total saponin (2 µg/ml, S) or control (C) were cultured for 48 hours. Cytokine messages were amplified from total RNA of each samples by RT-PCR.

CSF 및 TGF의 cDNA를 RT-PCR법으로 합성하였다. IL-7, IL-10, IL-12, IFN은 모든군에서 합성되지 않았으며, IL-3, IL-4, IL-13, GM-CSF는 PHA를 자극한 군에서만 발현이 되었고, beta-actin, IL-1, IL-6, TNF, MIF 및 TGF 발현 정도의 차이는 있으나 대조군, saponin 투여군 및 PHA자극군 모두에서 발

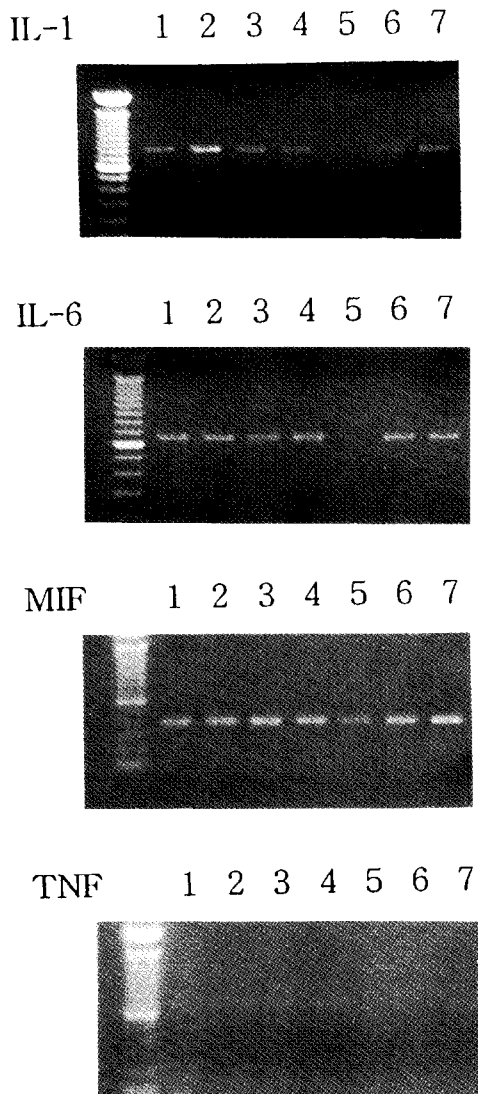


Fig. 4. Effects of total saponin on the cytokine gene expression of human PBMC. Human PBMCs treated with 0.2 (lane 1), 2 (lane 2), 20 (lane 3), 200 (lane 4), 1000 (lane 5), or 0 (lane 6) $\mu\text{g}/\text{ml}$ of total saponin or 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PHA (lane 7) were cultured for 48 hrs. Expressed amount of cytokine genes of each samples were measured by RT-PCR.

현이 되었다(Fig. 3).

Fig. 3의 결과에서 대조군 및 total saponin 처치군에서 발현을 보인 사이토카인을 대상으로 total saponin이 이들의 발현에 미치는 영향을 실험하였다. 말초혈액단핵구에 total saponin을 각 농도로 첨가하여 48시간 배양한후 RT-PCR을 실시한 결과 IL-1이 total saponin 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 증가되었으며, TNF가 20~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 증가함을 보였으며, IL-2, IL-4, IL-6 및 MIF는 대조군군 saponin 처치군간 차이가 없었다(Fig. 2, 4). 인삼은 IL-2와 더불어 lymphokine activated killer

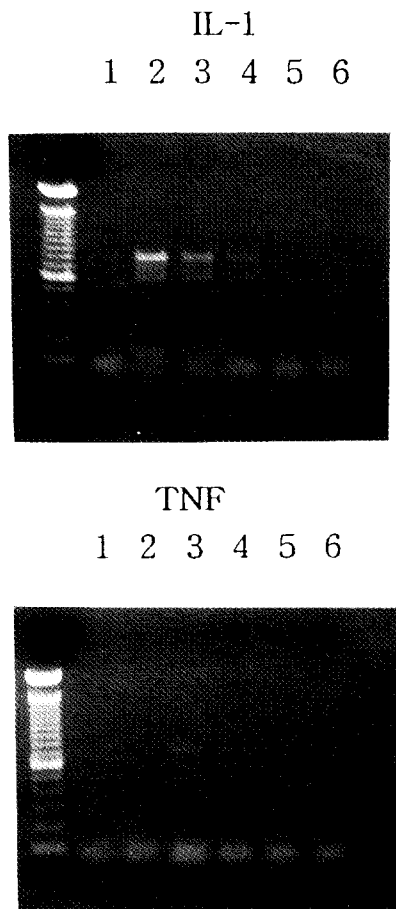


Fig. 5. Effect of total saponin on the expression of IL-1 and TNF genes of PBMC. Human PBMCs treated with 0.2 (lane 1), 2 (lane 2), 20 (lane 3), 200 (lane 4), 1000 (lane 5) $\mu\text{g}/\text{ml}$ of total saponin or control (lanem 6) were cultured for 48 hours. Complementary DNA of IL-1 and TNF were amplified from RNA of each sample by RT-PCR.

(LAK) cell의 활성을 증가시키는 것으로 보고되었으나⁷⁾ LAK cell의 활성증가 기전이 인삼에 의한 autocrine IL-2의 산생증가 때문은 아닌 것으로 생각되며(Fig. 4), 기타 plaque forming cell의 증가 등 생체 내에서의 인삼의 작용도 관련된 cytokine의 직접 증가에 의한것으로는 보이지 않는다. 인삼에 의해 발현이 증가된 IL-1과 TNF는 둘다 면역계에 의한 염증 반응을 매개하는 cytokine으로서, IL-1은 다양한 pro-inflammatory effect를 가지며 면역학적으로는 IL-6와 더불어 T cell 및 B cell활성화를 유도하며 IL-2 및 IFN과 더불어 NK cell의 기능을 증가시키는 등 다양한 기능을 보이는 단백질로 알려져 있다. TNF는 발현초기에는 내독소에 의하여 유도되며 여

러 가지 암세포의 괴사에 관여하는 단백질로 알려졌으며, IL-1과 같이 면역계와 염증계를 연결시키는 주요 cytokine으로 분류되고 있는 바,^{18, 20)} 본실험의 성적과 생체 내에서의 인삼이 면역계에 미치는 영향을 연구한 보고들과의 연관성을 더욱 규명해야할 필요가 있다고 사료된다.

총조사포닌의 ginsenoside 성분중 IL-1과 TNF의 발현증가에 관여하는 것을 검색하기 위하여 말초혈액단핵구 배양액에 0.2~20 µg/ml 농도의 Rb₁, Rb₂, Rg₁, Rc 및 Re를 각각 첨가하여 48시간 배양하고 각 실험군으로 부터 RNA를 추출한 뒤 RT-PCR법으로 IL-1, TNF 및 beta-actin의 cDNA를 증폭시켜 보았다. 모든 실험군에서 beta-actin의 cDNA가 비슷하게 증폭됨을 보아 실험에 사용한 RNA량은 실험군간 유의한 차가 없음을 확인할 수 있었다. Ginsenoside 중에서 말초혈액단핵구에 작용하여 IL-1의 발현을 증가시키는 것은 Rb₂(20 µg/ml)이었으나 발현유도능은 크지 않았으며, TNF의 발현을 증가시키는 것은 Rb₁(0.2~2 µg/ml), Rb₂(20 µg/ml), Rg₁(0.2 µg/ml), Rc(20 µg/ml) 및 Re들이었으며 특히 Rb₂의 작용이 가장 강하게 나타났다(Fig. 6). 총조사포닌에 비해 각 ginsenoside의 IL-1 gene 발현유도가 적은 이유는 본 실험의 결과만으로는 알수가 없으며 ginsenoside간의 병용효과 또는 total saponin내 기타 성분의 효과 등을 조사하는 등의 작업이 필요하다고 생각된다. 인삼에 의한 말초혈액 단핵구의 기능변화를 보다 근원적으로 알아보기 위해서는 향후 인삼 처치군과 대조군 간의 발현되는 유전자의 차이를 분별분석 PCR(differential display PCR) 법으로 조사하거나 또는 두군의 전체 mRNA 발현양상을 알아 볼 수 있는 유전자발현 연차분석법(serial analysis of gene expression)을 실시하는 등의 작업이 필요하다고 사료된다.

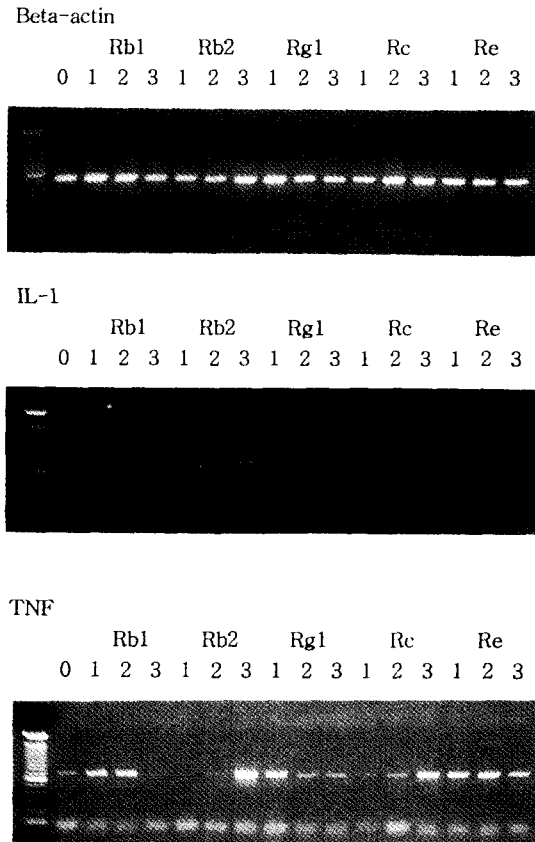


Fig. 6. Effects of ginsenosides on the IL-1 and TNF gene expression of human PBMC. Human PBMC treated with Rb₁, Rb₂, Rg₁, Rc, Re at the 0.2 (lane 1), 2 (lane 2), 20 (lane 3) µg/ml of ginsenoside or control(lane 0) were cultured for 48 hrs. The messages of beta-actin, IL-1, TNF were amplified from total RNA of each samples by RT-PCR.

요 약

인삼의 면역계에 대한 작용기전을 알아보기 위하여 인삼이 인간의 peripheral blood mononuclear cell(PBMC)의 증식에 미치는 영향과 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

총조사포닌을 PBMC 배양액에 0.25~512 µg/ml 농도로 첨가하여 배양한후 ³H-thymidine incor-

poration assay를 실시한 결과 세포의 증식은 phytohemagglutini(PHA) 자극여부에 상관없이 첨가된 사포닌의 농도가 증가될수록 감소하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 이용한 cytokine gene 발현 실험에서 cytokine gene의 최적발현시간은 48시간이었으며, 인간 PBMC의 RNA로 부터 IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, GM-CSF, TNF, MIF 및 TGF cDNA를 합성할 수 있었다.

RT-PCR을 이용하여 인삼에 의해 발현이 증가되는 사이토카인 유전자를 조사한 결과에서 총조 사포닌에 의해 IL-1과 TNF유전자의 발현이 대조군에 비해 증가되었다. Ginsenosides 중 TNF 유전자의 발현을 증가시키는 것은 Rb₁(0.2~2 µg/ml), Rb₂(20 µg/ml), Rg₁(0.2 µg/ml), Rc(20 µg/ml) 및 Re였으며 특히 Rb₂의 작용이 가장 강하게 나타났다. Rb₂(20 µg/ml)는 IL-1의 발현도 대조군에 비해 다소 증가시켰다.

감사의 말씀

본연구는 담배인삼공사 공익사업단의 고려인삼효능연구비로 진행되었으며 이에 감사를 드립니다. 본 연구를 위해 인삼시료를 제공해 주신 한국인삼연조연구원의 최강주 박사님께 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Lie, C. X. and Xiao, P. G. : *J. Ethnopharmacol.* **36**, 27 (1992).
- Yong, G. and Yu, Y. : *Proc. Chin. Acad. Med. Sci. Peking Union Med. Coll.* **5**, 188 (1990).
- Kenarova, B., Neychev, H., Hadjiivanova, C. and Petkov, V. D. : *Jpn. J. Pharmacol.* **54**, 447 (1990).
- Gao, R. L., Xu, C. L. and Jin, J. M. : *Chung Kuo Chung Hsi. I. Chieh Ho Tsa. Chin.* **12**, 285 (1992).
- Kim, J. Y., Germolec, D. R. and Luster, M. I. : *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **12**, 257 (1990).
- Scaglione, F., Ferrara, F., Dugnani, S., Falchi, M., Santoro, G. and Frascini, F. : *Meyer Drugs Exp. Clin. Res.* **16**, 537 (1990).
- 김윤경, 이윤실, 정인성, 임숙자, 윤연숙 : *Korea J. BRM* **4**, 75 (1994).
- Yun, Y. S., Lee, Y. S., Jo, S. K. and Jung, I. S. : *Planta. Med.* **59**, 521 (1993).
- Saita, T., Katano, M., Matsunaga, H., Yamamoto, H., Fujito, H. and Mori, M. : *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* **42**, 549 (1993).
- Abbas, A. K., Lichman, A. H. and Pober, J. S. : *Cellular and Molecular Immunology*, W.B. Saunders Co., p. 239 (1994).
- Kuby, J. : *Immunology*, W. H. Freeman Co., p. 245 (1992).
- Michell, B. B. and Shiigi, S. M. : *Selected Methods in Cellular Immunology*, Freeman Co., p. 200 (1980).
- Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W. : *Current Protocols in Immunology*, Wiley interscience, NIH., p. 7.10.1.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Shinsky, J. J. and White, T. J. : *PCR Protocols*, Academic Press, p. 21 (1990).
- McPherson, M. J., Quirke, P. and Taylor, G. R. : *PCR a Practical Approach*, IRL Press, p. 215 (1991).
- Jie, Y. H., Cammisuli, S. and Baggiolini, M. : *Agents Actions*, **15**, 386 (1984).
- Chong, S. K., Brown, H. A., Rimmer, E., Oberholzer, V., Hindochu, P. and Walker-Smith, J. A. : *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **73**, 216 (1984).
- Thomson, A. : *The Cytokine Handbook*, Academic Press, p. 47, 257 (1994).
- Aggarwar, B. B. and Gutterman, J. U. : *Human Cytokines*, Blackwel Scientific Pub., p. 46, 270 (1991).
- Callard, R. and Gearing, A. : *The Cytokine Facts Book*, p. 31, 241 (1994).