

백삼성분이 마우스 복강 탐식세포의 증식 및 Nitric Oxide 생성에 미치는 영향

김 주 원 · 배 지 현*

계명대학교 가정대학 식품영양학과

Effect of White Ginseng on the Proliferation of Mouse Peritoneal Macrophages and Their Nitric Oxide Synthesis

Joo-Won Kim and Ji-Hyun Bae*

Department of Food Science and Nutrition,

Keimyung University, Daegu, Korea

ABSTRACT

In an attempt to investigate the effects of white ginseng on the proliferation and the nitric oxide (NO) secretion of mouse peritoneal macrophages, which are the first major defense phagocytes in the immune system, the studies have been carried out. In the macrophage proliferation assay using the ³H-thymidine incorporation, the total saponin or Ginsenoside Rb₂ were added to the medium at the concentration of 0 to 256 μg/ml. DNA synthesis of the macrophage was increased at 64 μg/ml of total saponin and either 16 μg/ml or 64 μg/ml of Ginsenoside Rb₂, respectively. Also, the effect of white ginseng on the nitric oxide secretion of the macrophages was investigated. The addition of either total saponin or Ginsenoside Rb₂ at the concentration of 20 μg/ml significantly increased the secretion of NO from the macrophages. The nitric oxide synthase (NOS) gene expression which is responsible for the synthesis of the nitric oxide has been studied using reverse transcription polymerase chain reaction. In RT-PCR, the β-actin and *nos* gene expression have been analyzed. 20 μg/ml of either total saponin or Ginsenoside Rb₂ increased *nos* gene expression of the macrophages.

Key words: white ginseng, macrophages, nitric oxide, *nos* gene expression.

I. 서 론

면역반응의 초기에 작용하는 식세포 중 탐식세포 (macrophage)는 탐식작용뿐만 아니라 항원을 T-

cell에 제시하는 항원제공세포로서의 역할을 담당하는 중요한 면역세포이다. 즉 B-cell에 의해 생산된 항체에 의해 항원이 항원항체복합체를 형성하게 되면 이는 탐식세포에 의해 보다 효과적으로 인지되어

세포내로 내재화하게 되고 세포내에서 재구성된 항원은 MHC class II (Major histocompatibility complex class II)와 결합되어 탐식세포의 표면에 표현되므로 T-cell에 의해 쉽게 인식된다. 항원과 반응한 T-cell은 여러 가지 lymphokine을 분비하여 탐식세포를 활성화시키게 되고, 활성화된 탐식세포는 다양한 외부항원에 비특이적 반응하여 이들은 탐식하고 nitric oxide(NO)등의 각종 세포독성물질을 분비하여 파괴하므로 항종양, 항미생물능 등의 역할을 수행하게 된다¹⁾. 인삼이 면역계에 미치는 영향에 관한 연구는 주로 T-cell과 B-cell²⁻⁴⁾, natural killer (NK) cell⁵⁻⁷⁾ 및 thymocyte⁸⁾등을 가지고 이들의 분화, 증식 및 기능에 미치는 영향을 중심으로 진행되어 왔다. 인삼은 이들 면역세포를 활성화시켜 세포성 면역반응과 체액성 면역반응 및 natural immunity를 증폭시키는 것으로 보고되고 있으며, 흉선이나 골수 등에서 성숙 중인 세포의 분화에도 영향을 미치는 것으로 드러나고 있다. 그러나 백삼성분이 탐식세포의 증식이나 기능에 미치는 영향을 연구한 보고는 거의 없어 이에 대한 백삼의 효과를 추정할 과학적 자료는 충분치 못하다. 본 연구에서는 백삼의 total saponin과 ginsenoside Rb₂성분이 탐식세포의 분화 증식 및 1차 방어세포로서의 기능을 수행하기 위해 분비하는 nitric oxide(NO)의 생성량에 미치는 영향을 조사해 보았다. 또한 nitric oxide의 합성에 관여하는 효소인 nitric oxide synthase(NOS)의 발현 정도를 유전자 수준에서 검색함으로써 백삼성분이 탐식세포에 미치는 영향을 보다 근원적으로 이해하고 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 백삼 시료

백삼의 total saponin 및 ginsenoside Rb₂성분은 한국인삼연초연구소로부터 제공받아 사용하였으며 인삼의 주요 성분인 saponin은 인삼(ginseng)에 함유된 배당체(glycoside)라는 뜻으로 ginsenoside라고도 명명된다. TLC에 의한 분획 이동거리 순으로 현재까지 구명된 saponin성분은 총 29종으로 특히 ginsenoside Rb₂ 성분은 인삼의 배당체 구조 중 R1

과 R4위치에 당이 결합된 protopanaxadiol의 일종이다⁹⁾. 이들을 각각 10% fetal bovine serum이 들어있는 RPMI 1640(Gibco, BBL)배지에 10mg/ml 농도로 용해하고 filter sterilization한 후 cryo-protective vial (Corning Co.)에 소분하여 -20℃에 냉동 보관하면서 필요시마다 1개씩 취하여 사용하였다.

2. 실험동물

실험에 사용한 마우스는 생후 6~8주 가량된 체중 20~25g의 ICR 마우스로 본교의 의과대학연구소 동물실험사육실에서 기른 후 수컷만을 골라 사용하였다. 사육실 온도는 22℃ 내외, 습도는 55~60%로 유지하고 light dark cycle이 12시간 단위로 조절되게 한 후, 마우스용 고형사료와 물을 제한없이 공급하였다.

3. 마우스 복강 탐식세포의 분리 및 배양

각 실험조건에 따른 마우스의 복강을 약 10ml의 RPMI 1640배지를 넣어 씻어낸 다음 추출된 탐식세포를 두 번 정도 원심 세척하였다. 10% fetal bovine serum(FBS)과 항생제가 첨가된 RPMI 10배지에 2×10^6 cells/ml농도로 조절된 부유세포를 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator에 약 3시간 정도 배양시킨 후, 부착되지 않은 세포를 PBS(phosphate buffered solution)로 씻어버렸다. 부착된 세포에 RPMI10 배지나 total saponin 또는 ginsenoside Rb₂를 넣어주고 실험 목적에 맞게 배양하였다⁹⁾.

4. 세포증식능 측정

백삼성분이 마우스 복강 탐식세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ³H-thymidine incorporation assay를 실시하였다. 배양세포액에 total saponin 또는 ginsenoside Rb₂를 0~256μg/ml농도로 첨가한 뒤 48시간 동안 배양하였으며, 배양 48시간 때 ³H-thymidine을 well당 1μCi씩 첨가하여 12시간 더 배양하였다. 배양종료 후 cell harvester (Dynatech Co.)로 cell을 glass filter paper에 수거한 뒤 1L toluene에 2,5-diphenyl oxazole 4g과 1,4-bis[5-phenyl-2-oxazolyl]benzene; 2,2-phenylene-

bis[5-phenyl]oxazole 0.1g이 들어있는 cocktail solution에 넣어 잘 혼합한 후 β -counter(Packard Co., TRI-CARB 4530)를 사용, cpm을 측정하였다¹⁰⁾.

5. Nitric oxide (NO)분비능 측정

탐식세포에 의해 만들어지는 NO는 약 6~8초 동안 존재하며 그 후 자발적으로 산화되어 NO_2^- 와 NO_3^- 상태로 전환되어 측정된다. 생성되는 reactive nitrogen intermediate (RNI)는 보통 NO_2^- 가 대부분이기 때문에 이를 발색시켜 간접적으로 NO의 생성량을 정량하였다. $200\mu\text{l}$ 의 세포배양액(2×10^5 cells/ml)과 $100\mu\text{l}$ 의 Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride, 2.5% H_3PO_4)를 섞고 실온에서 10분간 반응시킨 후, Microplate reader (Bio Rad Co.)를 이용해 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. NO_2^- 농도는 sodium nitrite를 계대 회색하여 표준곡선을 작성한 후 얻었다¹¹⁾.

6. RNA 분리 및 농도 측정

비교군과 백삼의 total saponin 또는 ginsenoside Rb_2 성분으로 자극한 실험군의 탐식세포(2×10^6 cells/ml)를 scraper로 긁어 수거한 후 RNAzol B (Cinna Co.)를 사용, total RNA를 추출하였다. RNAzol B 1 ml를 첨가하여 15초간 vortexing하고 chloroform $100\mu\text{l}$ 를 첨가, 다시 15초간 vortexing한 뒤 얼음에 10분간 방치하였다. 세포용해액을 원심분리 (12,000 rpm, 15 min, 4°C)한 뒤 상층액을 취하여 새 tube에 옮기고 동량의 ice-cold isopropanol을 첨가, -20°C 에 하룻밤 두어 RNA를 침전시켰다. 원심분리 (12,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 RNA pellet을 수거하고 0.8 ml의 75% ethanol을 첨가, 원심 세척한 뒤 Speed Vac (DNA plus, Heto lab. equipment)으로 건조시켰다. 여기에 $30\mu\text{l}$ nuclease free distilled water를 첨가하고 80°C 에 10분간 두어 RNA pellet을 완전히 녹인 후, UV-spectrophotometer (Beckman Co.)로 RNA 농도와 순도를 측정하였다¹²⁾.

Table 1. Primer sequences used for the detection of gene expression

Primer name	Oligonucleotide sequence
β -actin S ⁽¹⁾	5'-ATGTGGCTGCAG- AGCCTGCTGCTC-3'
β -actin AS ⁽²⁾	5'-ACTCCTGGACTGG- CTCCCAGCAGTC-3'
NOS S	5'-GAGCTCGCTGCGCG- TCCCTGCGCGT-3'
NOS AS	5'-CAGGCAGCTGAGCG- CCGCATCCAG-3'

(1) S: sense primer

(2) AS: antisense primer

7. Genebank search에 의한 primer 제작

본 실험에 사용한 마우스의 β -actin 및 nitric oxide synthase(NOS)유전자 정보를 Genebank database system을 이용하여, 확보하고 단백질 지령 부위의 ATG codon을 중심으로 sense primer를, termination codon을 중심으로 antisense primer를 design하였다(Table 1). Design한 각 primer는 한국생공에 의뢰해 제작하였고, 1.5 ml Eppendorf tube에 50 pmole농도로 희석, 소분하여 -20°C 에 냉동 보관하면서 사용하였다. 산생될 cDNA구조는 DNAsis(Hitachi Co.) computer program을 이용, 분석하였다.

8. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) 및 전기영동

β -actin 및 NOS유전자 발현능을 조사하기 위해 RT-PCR법을 이용하였다. RT-PCR은 Perkin Elmer사의 RT-PCR kit를 이용 RT reaction mixture를 만들고 여기에 80°C 에서 10분간 변성시킨 total RNA를 $200\text{ng}/\mu\text{l}$ 농도로 첨가한 후 mineral oil을 첨가, 실온에 10분간 두었으며 PCR machine(Perkin Elmer Cetus 480)을 이용 역전사 시켰다(42°C , 60min; 95°C , 5min). 생성된 RT product에 PCR mixture를 첨가한 후 94°C , 1 min; 56°C , 1 min; 72°C , 1min을 1 cycle로 하여 총 23~28 cycles를 반응시켰으며, 마지막으로 72°C 에 5분간 두어 cDNA합성을 연장시킨 후 PCR을 종료

하였다. RT-PCR의 정확성을 확인하기 위해 internal standard로 β -actin gene을 동시에 증폭시켰다. 생성된 PCR product 15 μ l에 3 μ l의 6X gel loading buffer를 첨가하고 1.5% agarose gel상에서 100 bp size marker와 함께 100V로 20분간 전기영동시킨 후 각각의 cDNA를 관찰하였다¹³⁾.

III. 결과 및 고찰

1. 마우스 복강 탐식세포의 증식능

백삼성분이 마우스 복강 탐식세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 ³H-thymidine incorporation assay를 실시한 결과 total saponin과 ginsenoside Rb₂성분이 탐식세포의 DNA합성을 증가시키는 것으로 드러났다. 마우스 복강세포를 추출하여 3시간 배양한 후 96 well tissue culture plate 바닥에 부착시킨 탐식세포에 RPMI10배지와 함께 total saponin을 농도별 (0, 16, 64, 256 μ g/ml)로 첨가하여 관찰한 결과 total saponin을 64 μ g/ml농도로 첨가한 실험군에서 cpm값이 유의적으로 증가하였다 (Fig. 1). 한편 ginsenoside Rb₂성분을 가지고 동일한 조건으로 실험한 결과 16 μ g/ml 또는 64 μ g/ml농도에서 유의적으로 cpm값이 증가하였다 (Fi. 2). 256 μ g/ml의 높은 백삼농도에서 세포의 증식 저해가 나타나는 이유는 본 실험의 결과만으로

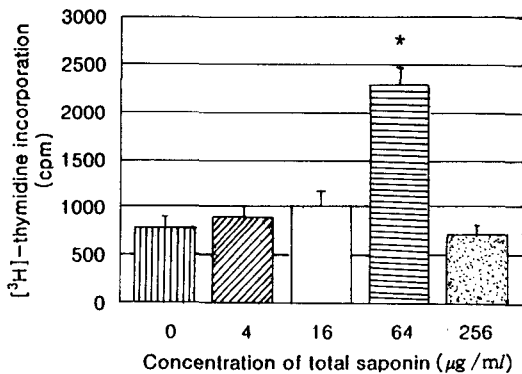


Fig. 1. Effect of total saponin extracted from white ginseng on the DNA synthesis of mouse peritoneal macrophages.

* Significantly different at $p < 0.01$.

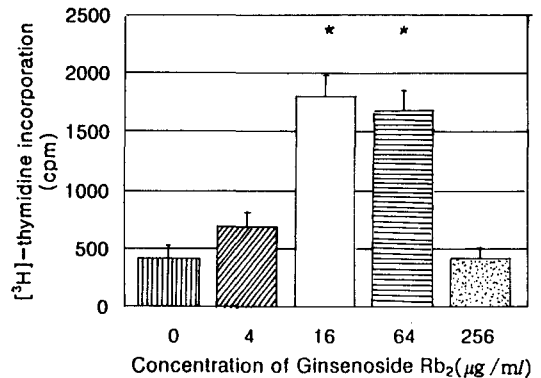


Fig. 2. Effect of ginsenoside Rb₂ extracted from white ginseng on the DNA synthesis of mouse peritoneal macrophages.

* Significantly different at $p < 0.01$

는 알 수 없으나 대조군에 비해 유의한 감소는 보이지 않았다.

2. Nitric oxide 분비능

활성화된 탐식세포는 nitric oxide (NO)를 분비하여 탐식된 세포내 미생물을 효과적으로 사멸시키거나 성장을 억제시킴으로써 세포내 1차 방어기능을 담당하게 된다^{14, 15)}. 백삼성분이 NO 분비능에 미치는 영향을 조사해 본 결과 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 3). Total saponin이나 ginsenoside Rb₂성분을 20 μ g/ml농도로 첨가한 군에서 NO의 분비가 유의적으로 증가하였다. 200 μ g/ml농도로 백삼성분을 첨가했을 경우 NO의 분비가 비교군에 비해 약간 감소하였으나 그 차이는 유의적이지 않았다. 면역계에서 세포독성물질로 작용하는 것 이외에도 NO는 신경전달물질로 작용하여 학습과 기억과정에 관여한다고 보고되고 있고¹⁶⁻¹⁸⁾, 혈관계에서는 혈압을 낮추거나¹⁹⁾ 동맥압의 항상성을 유지한다고 보고되고 있다²⁰⁾. 본 실험결과 백삼성분이 탐식세포의 NO분비를 증가시키는 것으로 나타나 백삼이 NO분비기능에 자극제로 작용할 수 있음을 시사해 주었지만, 과량의 NO가 내독소혈증 (endotoxemia)¹⁶⁾이나 저혈압의 경우 출혈성 쇼크 (hemorrhagic shock)²¹⁾를 유발할 수 있다는 보고

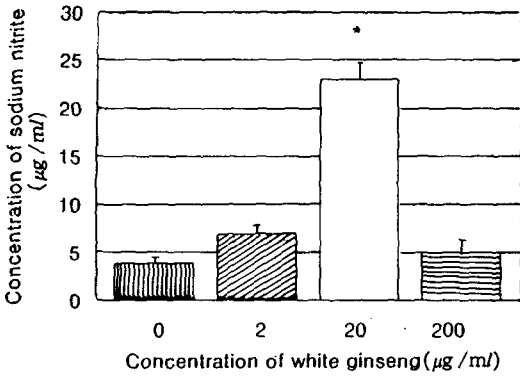


Fig. 3. Effect of white ginseng on the nitric oxide secretion from mouse peritoneal macrophages.
* Significantly different at $p < 0.01$

도 있어 세포보호효과를 가지는 적절한 농도의 NO에 대한 연구가 계속 진행되어야 한다고 사료된다.

3. Nitric oxide synthase (NOS) 유전자 발현능

Nitric oxide는 짧은 수명을 지니는 자유 라디칼 분자로 예전에는 환경오염물질로 간주되어졌다. 그러나 최근에는 NO가 세포내 second messenger나 세포간 intercellular messenger로 작용하여 생체내의 다양한 생화학적 반응에 관여하는 것으로 알려지고 있다¹⁶⁾. NO의 생합성은 한 조직에 국한되어 일어나지 않고 전역에 걸쳐서 일어나게 되는데 특별히 면역계에서 합성된 NO는 감염된 미생물을 죽이거나 종양세포를 파괴하는데 관여한다. 또한 탐식세포가 생산하는 세포독성물질 중 반응산소중간물질에 내성을 보이는 균이나 종양세포에도 유효하게 작용한다¹⁷⁾. 이와 같이 비특이적 숙주 방어기전으로 중요한 역할을 담당하는 NO의 생성은 nitric oxide synthase (NOS)의 발현과 밀접한 관련이 있으므로 NOS 발현의 증가 여부를 RT-PCR기법을 이용, 확인하였다. 백삼의 total saponin 또는 ginsenoside Rb₂ 성분을 농도별(2µg/ml, 20µg/ml, 200µg/ml)로 각각 배지에 첨가한 후 배양 후 2시간, 4시간 및 8시간 때 세포를 각각 수거하여 RT-PCR법으로 β-actin과 NOS등의 cDNA를 증폭시켰다. 이들의

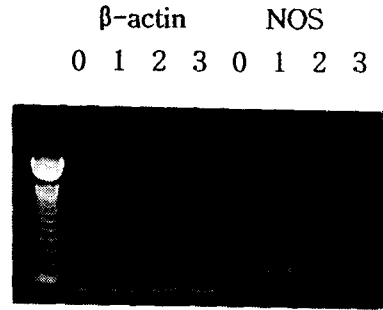


Fig. 4. Effects of white ginseng on the NOS gene expression of mouse peritoneal macrophages. Mouse peritoneal macrophages treated with total saponin at the 2µg/ml(lane 1), 20µg/ml(lane 2), 200µg/ml(lane 3) or control (lane 0) were cultured for 4 hrs. Complementary DNA of β-actin and NOS were amplified from RNA of each sample by RT-PCR.

발현 최적시간은 4시간이었으며 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 세포내 cytoskeleton 구성성분으로 항상 동일한 양이 발현되는 β-actin은 백삼을 투여하지 않은 대조군이나 백삼성분 투여군 모두에서 일정한 양이 발현되었고 NOS의 경우 20µg/ml 농도의 백삼성분을 투여했을 때 대조군에 비해 발현이 증가되었다. NO분비에 미치는 total saponin과 ginsenoside Rb₂성분간의 차이는 검출되지 않았다.

IV. 요약

백삼성분이 탐식세포를 통한 면역반응조절에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해 total saponin이나 ginsenoside Rb₂성분이 마우스 복강 탐식세포의 증식과 nitric oxide(NO)분비 및 NOS 유전자 발현에 미치는 영향을 조사해 보았다. Total saponin 또는 ginsenoside Rb₂성분을 탐식세포 배양액에 0~256µg/ml농도로 첨가하여 배양한 후 ³H-thymidine incorporation법으로 분석을 실시한 결과 total saponin은 64µg/ml 농도에서 세포내 DNA 합성을 증가시켰으며, ginsenoside Rb₂ 성분의 경우 16µg/ml 또는 64µg/ml 농도에서 DNA 합

성이 증가되었다. 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 높은 농도에서 세포의 증식이 약간 저해되었지만 대조군에 비해 유의적인 감소는 보이지 않았다. NO 분비에 미치는 영향을 조사해 본 결과 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 백삼성분을 투여했을 때 NO분비가 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용하여 백삼성분에 의한 NOS 유전자 발현의 정도를 조사한 결과 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 *nos* gene 발현이 대조군보다 증가되었다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. : Immunology 4th ed. p 2.2-2.14, Mosby, Philadelphia, 1996.
2. Liu, J., Wang, S., Liu, H., Yang, L. and Nan, G. : Stimulatory effect of saponin from *Panax ginseng* on immune function of lymphocytes in the elderly. *Mech. Aging Dev.*, 83: 43, 1995.
3. Goodwin, J. S., Mesner, R. P. and Peake, G. T. : Prostaglandin supression of mitogen-stimulated lymphocytes *in vitro*; Changes with mitogen dose and preincubation. *J. Clin. Invest.* 62: 753, 1978.
4. Plaut, M. I. : The role of cyclic AMP in modulating cytotoxic lymphocytes. *J. Immunol.*, 123: 692, 1979.
5. Brunda, M. J., Herberman, R. B. and Holden, H. T. : Inhibition of natural killer cell activity by prostaglandin. *J. Immunol.*, 124: 2682, 1980.
6. Roder, J. C. and Klein, M. : Target effector interaction in the natural killer cell system IV. *J. Immunol.* 123: 2785, 1979.
7. Yun, Y. S., Jo, T. K. and Oh, Y. R. : Effect of Red ginseng on natural killer cell activity in mice with lung adenoma induced by urethan and benzopyrene. *Proceedings of the 4th International Ginseng Symposium.* Korea Ginseng Res. Inst., Daejeon, Korea, p. 75, 1984.
8. Chang, H. R., Dulloo, A. G., Vladoianu, I. R., Piguat, P. F., Arsenijevic, D., Girardier, L. and Pechere, J. : Fish oil decrease natural resistance of mice to infection with *Salmonella typhimurium*. *Metabolism*, 41: 1, 1992.
9. Stuart, A. E., Havesshaw, J. A. and Davidson, A. E. : Phagocytes *in vitro*. p. 24. 4-24.5 in *Handbook of experimental immunology* ed. by D. M. Weir 2nd ed. Blackwell, 1991.
10. 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, 1989.
11. Ding, A., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. : Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407, 1988.
12. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Shinsky, J. J. and White, T. J. : *PCR protocols*, p. 21, Academic press, 1990.
13. McPherson, M. J., Quirke, P. and Taylor, G. R. : *PCR a practical approach*, p. 215, IRL press, 1991.
14. Stuehr, D. J. and Marletta, M. A. : Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection. *lymph-*

- okines, or interferon- γ J. Immunol., 139: 518, 1987.
15. Hibbs, J. B. Jr. : Taintor, R. R. and Vavrin, Z. : Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deaminase and amino nitrogen oxidation to nitrite. Science, 235: 473, 1987.
16. Weissman, B. A., Allon, N. and Shapra, S. : Biochemical pharmacological and clinical aspects of nitric oxide, p. 34-56, Plenum Press, New York and London, 1995.
17. Koprowski, H. and Maeda, H. : Current topics in microbiology and immunology: The role of nitric oxide in physiology and psychology. p. 50-71, Springer-Verlag, 1995.
18. Gally, J. A., Montague, P. R., Reeke, G. N. Jr. and Edelman, G. M. : The NO hypothesis: possible effects of a short-lived rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. Proc. Natl. Sci. USA., 87: 3547, 1990.
19. Rees, D. D., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. : Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86: 3375, 1989.
20. Aisaka, K., Gross, S. S., Griffith, O. W. and Levi, R. : N-methyl-L-arginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressure agent in the guinea pig; Does nitric oxide regulate blood pressure *in vivo*, Bio. Biophys. Res. Comm., 160: 881, 1989.
21. Thiemermann, C., Szabo, C., Mitchell, J. A. and Vane, J. R. : Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90: 267, 1993.

(1997년 12월 10일 접수)