

# 人蔘 Saponin Rg1이 분화된 보조 T cell의 cytokine 분비에 미치는 영향

권홍로<sup>1</sup> · 고은정<sup>1</sup> · 배현수<sup>1,2</sup> · 홍무창<sup>1</sup> · 정승기<sup>3</sup> · 신민규<sup>1\*</sup>

1: 경희대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 퓨리메드(주) 기업부설연구소, 3: 경희대학교 한의과대학 폐계내과학교실

## Panax Ginseng Rg1 Enhances CD4+ T Cell Activities and Modulates Th1/Th2 Differentiation

Hong Rho Kwon<sup>1</sup>, Eun Jung Ko<sup>1</sup>, Hyun Su Bae<sup>1,2</sup>, Moo Chang Hong<sup>1</sup>, Seung Gi Jung<sup>3</sup>, Min Kyu Shin<sup>1\*</sup>

1: Department of Physiology, College of Oriental Medicine, KyungHee University, 2: Purimed R&D Institute, 3: Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Panax ginseng has been used as a typical tonic medicine in Asian countries, such as Korea, China, and Japan. It has been reported that ginsenoside Rg1 in Panax ginseng increases the proportion of T helper cells in the whole T cells and promotes IL-2 gene expression in murine splenocytes. These studies imply that ginsenoside Rg1 increases the immune activity of CD4+ T cell, however the exact mechanism of ginsenoside Rg1 on helper T cell remains to be verified. The present study tried to elucidate the direct effect of Rg1 on helper T cell's activities and its Th1/Th2 lineage development. The results demonstrated that ginsenoside Rg1 had not mitogenic effects on the unstimulated CD4+ T cell, but augmented CD4+ T cell proliferation upon activating with anti-CD3/anti-CD28 antibodies in a dose dependent manner. Rg1 also enhanced the expression of cell surface protein CD69 on CD4+ T cell. In Th0 condition, ginsenoside Rg1 increases the expression of IL-2 mRNA, and enhances the expression of IL-4 mRNA on CD4+ T cells, suggesting Rg1 prefer to induce Th2 lineage development. In addition, ginsenoside Rg1 increases IL-4 secreting CD4+ T cell under Th2 skewed condition, while decreases IFN- $\gamma$  secreting cell in Th1 polarizing condition. Thus, Rg1 enhances Th2 lineage development from naive CD4+ T cell both by increasing Th2 specific cytokine secretion and by repressing Th1 specific cytokine production. Therefore, these results suggest that ginsenoside Rg1 might be desirable agent for enhancing CD4+ T cell's activity, as well as the correction of Th1 dominant pathological disorders.

Key words : Panax ginseng, ginsenoside Rg1, Th1, Th2, IFN- $\gamma$ , IL-4, RT-PCR, cytokine

### 서론

한의학에서는 "이미 병든 것을 치료하지 말고 병들기 전에 치료하라"는 예방의학의 중요성을 강조하며 모든 질환의 치료에 적용하고 있다. 질병의 발생도 정상적인 생리기능을 유지케 하는 正氣와 일체의 질병을 일으키는 邪氣와의 싸움으로 보아 신체의 正氣가 충실하면 外邪나 七情으로부터 초래되는 자극을 방어하여 질병을 예방할 수 있다. 이러한 개념은 自己와 非自己를 식별하여 非自己를 배척하여 自己를 보존하는 현대 면역의 개념과

일치되는 것이다. 치료에 있어서도 正氣를 도와 邪氣를 제거하는 '扶正祛邪의 治法'이 쓰여지며 이는 또 질병 예방의 의미를 갖는다<sup>1)</sup>. 外邪의 침입을 방어하는 正氣를 '衛氣'라고 한다. 衛氣는 皮膚, 分肉사이를 순행하며 汗腺을 조절하고 外邪에 대항하는 작용을 하며 臟腑적으로 보면 腎中陽氣에서 化生되고 中焦 脾胃에서 化生된 水穀精微에 의해 滋養되며 上焦 肺氣의 宣布作用에 의해 布散된다<sup>2)</sup>. 衛氣는 元氣의 一部分으로 肺, 脾, 腎의 三臟과 밀접하고 면역반응의 조절과 주요한 관계가 있다<sup>3)</sup>.

한의학에서 人蔘 (Panax ginseng C.A. Meyer)은 4000년 이상 이용되어 왔으며, 치료약물에서 중요한 위치를 차지하고 있다<sup>4)</sup>. 肺·脾胃에 주로 작용하고 효능은 補氣救脫, 益血復脈, 養心安神, 生津止渴, 健脾止瀉, 補肺定喘, 托毒合瘡 등으로 요약되어진

\* 교신저자 : 신민규, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학  
· E-mail : shinmk@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0323  
· 접수 : 2004/06/12 · 수정 : 2004/07/09 · 채택 : 2004/07/30

다<sup>5-7</sup>). 人蔘은 五臟의 虛勞를 補하며 체력의 저하로 침체된 세포의 기능을 부활, 촉진시키는 작용으로 이용되고 있을 뿐 아니라 항암작용<sup>8</sup>), 항산화작용<sup>9</sup>), 항stress작용<sup>10</sup>), 면역저항능력 증대효과<sup>11</sup>), 신경 내분비 활성화작용<sup>12</sup>) 등이 있다고 알려져 있다. 人蔘의 성분중에 saponin으로 알려진 ginsenosides는 人蔘의 약리작용에 있어서 가장 중요한 요소로서 생물학적인 기능이 많이 연구되어 왔으며<sup>13</sup>), 이 중 ginsenoside Rg1은 적은 양이지만 생물학적 활성이 가장 높은 saponin으로 알려져 있다<sup>14</sup>). 면역기능의 증강이 세포성 면역을 담당하는 T cell의 수나 활성을 증가시키는 것만을 의미하는 것으로 보기는 어렵다. 그러나 면역기능의 과정에서 T cell의 분화는 면역기능의 항진 및 저하 등 정상적인 면역과 병태생리에 중요한 열쇠를 던져주게 되는데, 이러한 분화에 결정적인 역할을 하는 것은 cytokine이다. 주로 IL-1, IL-2, IL-4, IL-12, IFN- $\gamma$ 등으로 이런 cytokine의 영향으로 naive CD4+ T cell은 Th1 cell과 Th2 cell로 분화한다<sup>15-17</sup>). Th1 cell분화와 관련된 IFN- $\gamma$ 분비를 조절하는 transcription factor를 T-bet이라 하며 Th2 cell로 분화할 때 영향을 주는 IL-4의 transcription factor는 GATA-3이다. T cell 분화과정에서 과도한 증식은 병리적인 현상을 유발시켜 자가면역질환이나 알러지 질환을 발생케 하는데 Th1/Th2 분화발달이 중요한 역할을 한다. Th1 cell이 과도하게 많아지면 류마티스 관절염이나 루푸스와 같은 자가면역질환이 발생하며 Th2 cell이 과도하게 많아지면 기관지 천식이나 알러지성 비염과 같은 알러지 질환이 발생하게 된다. 지금까지의 Rg1에 대한 연구는 분리된 CD4+ T cell에서 IFN- $\gamma$  mRNA의 발현을 감소시켜 Th1 cell 주도 면역 반응을 억제하고 Th2 cell주도 면역 반응은 증가시킨다는 것을 확인하였으나<sup>18</sup>), 분화된 Th1/Th2 cell에서의 cytokine 분비양상을 확인한 연구는 없는 실정이다. 이에 Rg1이 T cell의 면역반응 기전에 실제 人蔘의 효능이 어떠한 과정을 통해 면역반응에 관여하는지를 밝혀보고자 한 바 다음과 같은 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에 사용된 실험동물은 생후 8주된 BALB/c 암컷 마우스이며 멸균환경에서 관리되어 온 것을 샐타코 코리아(주)에서 구입하였다. 사료는 방사선 멸균 처리한 실험동물용 사료를 정도산업(주)에서 구입하여 공급하였으며 飲用水는 멸균처리한 증류수를 사용하였다. 사료와 飲用水는 충분히 공급하여 자유롭게 섭취시켰다.

### 2. 시료의 제조

Rg1은 *Panax ginseng*에서 saponin 성분을 추출한 것이며, 한국 담배인삼공사에서 구입하여 사용하였다. Rg1의 화학적 특성은 백색분말로서 순도는 96%이며 용점은 194-196.5°C이다<sup>19,20</sup>).

### 3. Antibody와 medium

본 실험에서는 anti-CD3e (clone:145-2C11), anti-CD28 (clone:37.51), anti-mouse IL-4 (BVD4-1D11), anti-mouse IL-12 (C17.8), FITC-conjugated anti-CD4 antibody, recombinant

Mouse IL-4 (rIL-4), recombinant Mouse IL-12 (rIL-12) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, U.S.A.), Magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads, Mouse IL-4 Secretion Assay Detection Kit, Mouse IFN- $\gamma$  Secretion Assay Detection Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 등이 사용되었다.

본 실험에서 세포배양을 위하여 사용된 media는 10% defined FBS (Hyclone, Logan, U.S.A.), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen Life Technologies, Rorkville, U.S.A.) 10 mM HEPES, 11 mM sodium bicarbonate (JRH Biosciences, Lenexa, U.S.A.)가 포함된 RPMI-1640 (Invitrogen Life Technologies)를 사용하였다.

### 4. 비장 임파구 준비

적출한 BALB/c 마우스의 비장을 멸균된 주사기로 파쇄한 후 cell strainer (BD Biosciences Pharmingen)로 걸러내었다. 균질화된 비장세포에 적혈구 제거를 위하여 5 ml Pharm Lyse (BD Biosciences Pharmingen)를 넣고 5분간 반응시킨 후 세포가 부유되어 있는 tube에 5 ml의 media를 첨가한 후 300  $\times$ g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 남은 세포침전물은 1 ml의 media로 부유한 후 trypan blue로 염색하여 세포수를 측정하였다.

### 5. CD4+ T cell 분리

비장임파구  $1 \times 10^7$  cells/90  $\mu$ l 농도 당 10  $\mu$ l의 magnetic cell sorting CD4 (L3T4) microbeads (Miltenyi Biotec)를 첨가하여 15분간 4°C에서 반응하였다. 300  $\times$ g에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 5 ml의 media로 세척하였다. 남은 세포침전물에  $1 \times 10^8$  cells/500  $\mu$ l의 농도가 되도록 media를 넣고 재현탁하였다. Ls separation column (Miltenyi Biotec)을 varioMACS separator (Miltenyi Biotec)에 장치한 후 3 ml의 buffer (PBS with 2 mM EDTA and 0.5% BSA)로 column을 통과시키고 세포 부유액을 column 안으로 주입하였으며 세포 부유액이 column을 통하여 빠져나가면 다시 2 ml의 buffer로 column을 3번 헹구어 내었다. Column을 분리해 낸 후 5 ml의 buffer를 넣고 plunger를 눌러서 CD4+ T cell을 분리하였다.

### 6. 생존률 및 증식능 측정

Mitogen으로 자극 받지 않은 비장 임파구의 생존율을 측정하기 위해 Cell Titer® 96 TM Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, U.S.A.)의 protocol을 이용하되 5의 방법을 이용하여 CD4+ T cell을 분리한 후  $4 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 100  $\mu$ l씩 flat bottomed 96-well plate에 살포하였다. CD4+ T cell이 살포된 plate에 Rg1을 0, 1, 2, 5  $\mu$ g/ml 농도로 첨가하고 10  $\mu$ g/ml anti-CD3e (clone:145-2C11, BD Bioscience, USA)가 코팅된 plate에서 2 $\mu$ g/ml anti-CD28 (clone:37.51, BD Biosciences Pharmingen)로 co-stimulation하였다. 이상의 혼합물을 48시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (Nuair, Plymouth, U.S.A.)에서 배양하였다.

### 7. CD4+ T cell을 Th1/Th2 cell로 분화

10  $\mu$ g/ml anti-CD3e가 coating된 12-well plates에 CD4+ T cell을  $2 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 살포 후 2  $\mu$ g/ml anti-CD28로

co-stimulation하였다. Rg1을 0, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양한 후 Th1 cell plate는 50 U rIL-2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.)와 10 ng/ml rIL-12, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-IL-4 (BD Biosciences, USA)를, Th2 cell plate에는 50 U rIL-2와 10 ng/ml rIL-4, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-IL-12 (BD Biosciences Pharmingen)를 첨가하고 3일 후에 1:2로 분리하였다. 48시간 후 세포를 PBS로 세척한 후 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD3e와 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-CD28로 re-stimulation한 후 24시간동안 배양처리 하였다.

### 8. Secretion cytokine 측정

CD4+ T cell을 7.의 방법과 같이 분화한 후 채취하기 위하여 wash buffer (PBS/0.5% BSA/2 mM EDTA) 2 ml로 300 ×g에서 5분간 원심분리 한 후 wash buffer로 2번 세척하였다. Cold medium으로 90  $\mu\text{l}/10^6\text{cell}$  이 되도록 세포침전물을 resuspension 하고 catch reagent (Miltenyi Biotec)를 20  $\mu\text{l}/10^6\text{cell}$  을 첨가하여 4°C에서 5분간 배양하고 warm medium으로 세포수가 1×10<sup>5</sup>개가 되도록 희석한 뒤 37°C에서 40분간 배양하였다. Cold buffer 5 ml로 300 ×g에서 10분간 원심 분리하여 세척 후 상층액을 제거하고 cold buffer 90  $\mu\text{l}/10^6\text{cells}$  로 세포침전물을 resuspension하였다. 여기에 PE-conjugated Detection antibody, FITC-conjugated anti-CD4 antibody를 첨가 한 후 4°C에서 10분간 배양하고 cold wash buffer로 2번 세척한 후 FACScan (BD biosciences Becton Dickinson, Franklin Lakes, U.S.A.)으로 분석하였다.

### 9. Real-time RT-PCR을 이용한 cytokine 발현 측정

#### 1) Total RNA 분리

상기 실험에서와 같은 조건으로 CD4+ T cell을 Th1/Th2 cell로 분화한 뒤 세포를 채취하여 PBS로 세척하고 Trizol solution (Invitrogen Life Technologies)을 이용, 제조사의 protocol에 준하여 total RNA를 분리하였다. 세포침전물은 pellet pestle을 이용하여 균질화하였다. 균질화된 용액에 500  $\mu\text{l}$ 의 Trizol solution을 첨가하고 가볍게 선회한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 이 용액에 다시 100  $\mu\text{l}$ 의 chloroform을 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 3분간 반응시킨 다음 4°C에서 12,000 ×g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 여기에 250  $\mu\text{l}$ 의 isopropanol을 첨가하여 10분간 실온에서 반응시켰다가 다시 4°C에서 12,000 ×g로 15분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 pellet을 500  $\mu\text{l}$ 의 75% ethanol로 세척한 후 4°C에서 7,500 ×g로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거한 후 pellet을 건조하여 50  $\mu\text{l}$ 의 diethyl pyrocarbonate (DEPC, Calbiochem, San Diego, U.S.A.) 처리 증류수에 RNA를 녹인 다음 spectrophotometer (DU500, Beckman Instruments Inc., Fullerton, U.S.A.)를 이용하여 정량 하였다.

#### 2) cDNA의 합성

cDNA의 합성은 M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies)을 이용하여 제조사의 protocol에 준하여 실시 하였다. 2.5  $\mu\text{g}$ 의 total RNA에 1.1  $\mu\text{l}$ 의 10× DNase I Reaction buffer, 1  $\mu\text{l}$ 의 1 Unit/ $\mu\text{l}$  DNase I (Invitrogen Life

Technologies)를 첨가한 후 DEPC 처리 증류수를 넣어 반응액이 11  $\mu\text{l}$ 가 되게 한 후 실온에서 15분간 배양하여 오염되었을지 모를 DNA를 제거하였다. 반응 후 1  $\mu\text{l}$ 의 반응액을 따로 분리하여 두고 후에 DNA가 남아있는지 확인하기 위하여 PCR 반응을 하였다. 10  $\mu\text{l}$ 의 반응액에 1  $\mu\text{l}$ 의 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen Life Technologies)를 첨가한 후 70°C에서 15분 동안 반응시킨 후 신속히 얼음에 넣어 RNA의 이차구조를 풀어주었다. 반응액에 4  $\mu\text{l}$ 의 5× first strand buffer, 1  $\mu\text{l}$ 의 10 mM each dNTPs, 2  $\mu\text{l}$ 의 0.1 M Dithiothreitol, 1  $\mu\text{l}$ 의 200 U/ $\mu\text{l}$  M-MLV Reverse Transcriptase, 0.5  $\mu\text{l}$ 의 40 U/ $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (Invitrogen Life Technologies), 5.5  $\mu\text{l}$  DEPC 처리 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20  $\mu\text{l}$ 로 만들고 37°C에서 60분간 배양하여 single strand cDNA를 합성하였다. 반응이 끝난 반응액은 72°C에서 15분간 배양하여 효소를 불활성화 하였다.

#### 3) cDNA의 Real-time PCR 반응

각각의 특이 유전자 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 real-time PCR을 실시하였다. 1  $\mu\text{l}$ 의 cDNA에 12.5  $\mu\text{l}$ 의 2× SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, U.K.), 각각 1.5  $\mu\text{l}$ 의 5  $\mu\text{M}$  sense, antisense primer (Genotech Co., Daejun, Korea), 8.5  $\mu\text{l}$ 의 증류수를 넣어 25  $\mu\text{l}$ 가 되게 한 후 GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Warrington, U.K.)에서 PCR하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분간 최초 denaturation한 후 95°C 15초, 60°C 60초를 40회 반복하였다. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), IL-4 (Interleukin-4) 유전자의 primer sequence는 Table 1과 같다. cDNA는 각각 1, 1/10, 1/100로 serial dilution한 후 각 농도 당 3개씩 PCR 하여 평균값을 사용하였다. 각 반응액의 amplification이 역치에 도달한 Cycle number (Ct)를 기준으로 표준곡선을 그려서 정량하였고, 각 유전자의 발현량은 GAPDH의 발현량을 이용하여 표준화하였다. PCR 반응의 종료 후 60-95°C 사이의 온도별 신호를 측정하여 해리곡선을 작성하였다.

Table 1. Sequences of primer used for real-time RT-PCR

Gene		Oligonucleotide sequence
GAPDH	RV	5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA -3'
	FW	5'- TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC -3'
IL-4	FW	5'- ACA GGA GAA GGG ACG CCA T -3'
	RV	5'- GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA -3'
IFN- $\gamma$	FW	5'- TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA -3'
	RV	5'- TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG -3'
T-bet	FW	5'- GCC AGG GAA CCG CTT ATA TG -3'
	RV	5'- GAC GAT CAT CTG GGT CAC ATT -3'
GATA-3	FW	5'- GAA GGC ATC CAG ACC CGA AAC -3'
	RV	5'- ACC CAT GGC GGT GAC CAT GC -3'

## 결 과

### 1. Rg1이 분리된 CD4+ T cell의 생존에 미치는 영향

Rg1이 주변의 APC (antigen presenting cell)가 없이도 직접적으로 CD4+ T cell 생존에 영향을 미치는지 확인하기 위해

CD4+ T cell을 분리한 후 Rg1을 농도별로 투여하고 48시간동안 배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 다만 anti-CD3e/anti-CD28 antibody로 activation시켰을 때에는 2 µg/ml에서 CD4+ T cell의 생존율이 증가되었다.

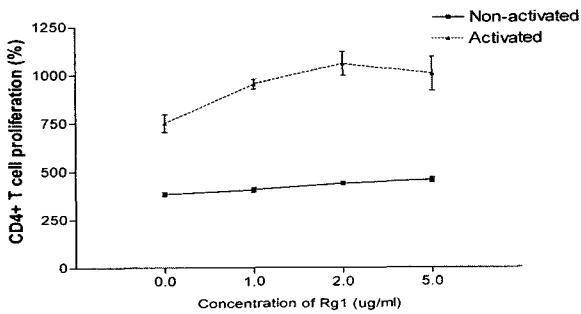


Fig. 1. Proliferation of CD4+ T cell in medium containing various concentration of Rg1 extract after 48 hrs incubation Sorted CD4+ T cell were treated with anti-CD3e/anti-CD28 antibodies to activate T cell, or not. Cell proliferation was quantified by MTS assay. Error bars indicate S.E.M.

2. Rg1이 Th1/Th2 cell skewed 상황에서 secretion cytokine 발현량에 미치는 영향

Naive CD4+ T cell에 2 µg/ml의 Rg1을 투여하고 50 U rIL-2, 10 µg/ml anti-IL-4, 10 µg/ml anti-IL-12, 10 ng/ml rIL-12, 10 ng/ml rIL-4을 이용하여 7일 동안 Th1 cell과 Th2 cell로 polarization 한 후 Th1/Th2 cell 그룹에서 분비되는 secretion cytokine 발현량을 flow cytometry로 확인한 결과 Th1 cell skewed 상황에서 IFN-γ의 발현량이 2.1% 감소되었으며, 또한 Th2 cell skewed 상황에서는 IL-4의 발현량이 18.8% 감소한 것을 확인하였다(Fig. 2).

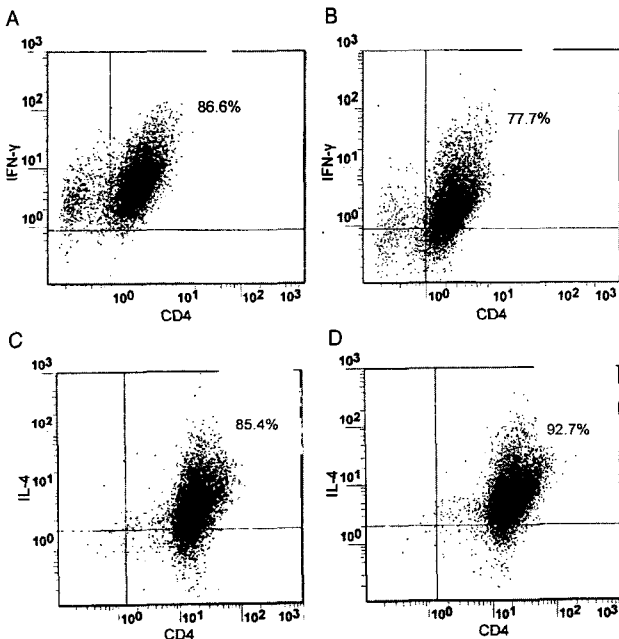


Fig. 2. Secretion cytokine expression of Th1 and Th2 cell polarized from Th0 Sorted CD4+ T cells were treated with rIL-12, rIL-4 antibodies to polarized CD4+ T cell for 7days. Cells were stained with FITC-conjugated anti-IFN-γ, anti-IL-4 and PE-conjugated anti-CD4 antibodies. A, C: Cells were incubated in medium without Rg1 extract as control. B, D: Cells were incubated in medium containing 2 µg/ml Rg1 extract.

3. Rg1이 Th1/Th2 cell skewed 상황에서 IFN-γ, IL-4, T-bet, GATA-3 mRNA 발현량에 미치는 영향

Rg1을 투여하여 7일 동안 배양한 Th1/Th2 cell에서 total RNA를 분리하고 cDNA를 합성하여 real-time PCR함으로써 유전자의 발현량의 평가한 결과는 다음과 같다.

1) GAPDH

각각의 유전자의 발현량을 normalization하기 위하여 internal control로써 사용된 GAPDH의 dissociation curve와 가장 많이 증폭된 sample의 Ct값을 기준으로 작성된 standard curve는 생략하였다. Standard curve를 작성하는데 사용된 data의 선형회귀분석결과 R2는 0.9966로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다.

2) IFN-γ

IFN-γ 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인하였으며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9928로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 IFN-γ 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 3). Th1 skewed 상황에서 Rg1을 2 µg/ml 투여한 군이 대조군과 비교하여 45% 감소하였다.

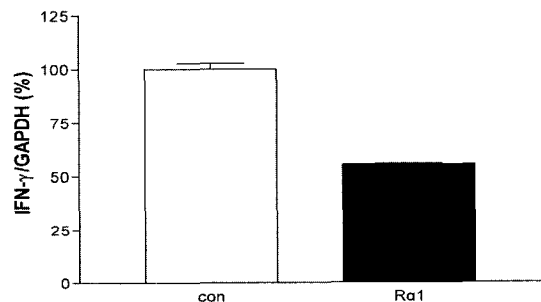


Fig. 3. Expression level of IFN-γ Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

3) IL-4

IL-4 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인하였으며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9992로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 IL-4 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 4). Th2 skewed 상황에서 Rg1을 2 µg/ml 투여한 군이 대조군과 비교하여 13.4% 증가하였다.

4) T-bet

T-bet 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인하였으며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9946로

나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 T-bet 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 5). Th1 skewed 상황에서는 Rg1을 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 투여한 군이 대조군과 비교하여 47.3% 감소하였다.

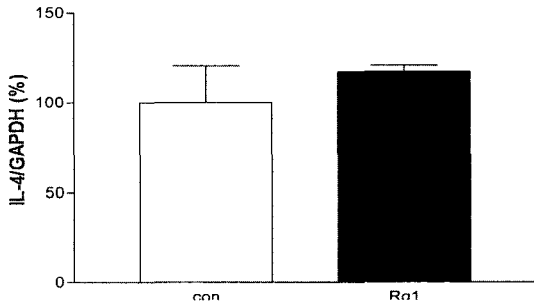


Fig. 4. Expression level of IL-4 Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

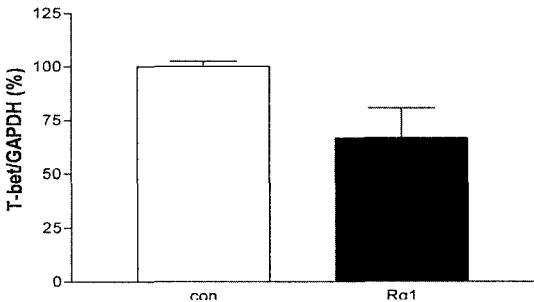


Fig. 5. Expression level of T-bet Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

5) GATA-3

GATA-3 유전자에 대한 real-time PCR 결과 dissociation curve와 standard curve는 생략하였다. Dissociation curve는 nonspecific PCR product나 primer dimer의 형성은 없었던 것을 확인하였으며 농도별 Ct 값의 선형회귀분석결과 R2는 0.9983로 나타나서 standard curve는 적절한 것으로 인정되었다. Standard curve를 이용하여 얻은 sample 별 T-bet 유전자의 상대적인 양은 GAPDH의 발현량을 이용하여 나눔으로써 normalization하였다 (Fig. 6). Th2 skewed 상황에서는 Rg1을 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 투여한 군이 대조군과 비교하여 18.3% 감소하였다.

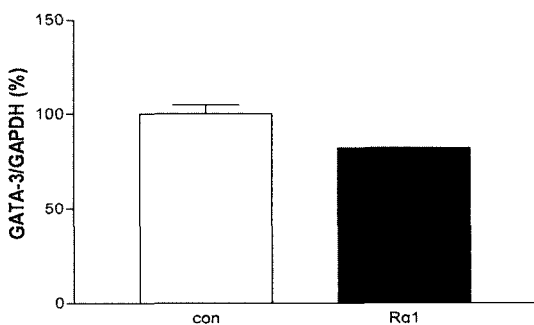


Fig. 6. Expression level of GATA-3 Each amounts of mRNA were normalized with respective amount of GAPDH.

고찰

免疫이란 生體가 自己와 非自己를 식별하는 기구로서 외부로부터 침입하는 미생물, 同種의 조직이나 체내에 생긴 불필요한 產物등과 특이하게 반응하여 抗體를 만들며, 이것을 배제하여 그 개체의 恒常性을 유지하는 현상으로 정의할 수 있다<sup>21</sup>.

韓醫學에서 『免疫類方』에서 ‘免疫’이라는 단어가 처음으로 보이며 역병에서 면제된다는 의미로서 전염성 질환에 대한 초기의 면역개념과 일치하는 부분이 있다<sup>3</sup>. 질병의 발생을 邪氣의 침입과 正氣의 저항사이의 상쟁관계로 보아 防禦機能, 恒常性維持機能, 免疫監視機能 등의 면역기능을 한의학적 관점에서 正氣 또는 衛氣가 수행한다고 표현하고 있다<sup>22</sup>. 즉 防禦機能은 각종 미생물의 감염에 저항하는 것으로 正氣가 外邪의 작용을 방어하는 것으로 이는 正氣 중 衛氣의 작용에 해당된다. 또한 恒常性維持機能은 자기 신체의 항원을 제거하는 것으로 正氣가 침투한 內邪를 없애고 신체의 陰陽平衡을 유지하는 것으로 볼 수 있다. 免疫監視機能은 생체 세포의 돌발적인 변화를 방지하는 것으로 正氣가 臟腑나 經絡의 氣血과 협조하여 상호존 또는 제약하는 것으로 생각할 수 있다<sup>23-25</sup>. 그러므로 正氣의 강약 성쇠에 따라 면역력의 충실 및 저하 여부도 결정된다고 하겠다.

면역체계는 세포성 면역와 체액성 면역으로 분류되며 골수, 흉선, 비장은 중요한 면역기관으로써 골수의 간세포는 흉선으로 이동 분화와 발육과정을 거치면서 성숙하게 되고 말초혈액 림프를 통해 인체의 세포성 면역을 담당한다<sup>26</sup>. 한번도 항원에 감작되지 않은 naive CD4+ T cell이 항원에 자극을 받으면 다양한 cytokine을 분비활성화 시키는데 관여하므로 helper T cell이라 부르며, 활성화된 림프구가 생성 방출하는 물질로서 다른 세포를 작용하게 하는 물질을 cytokine이라고 총칭한다. 말초혈액의 T cell군 중 helper T cell은 CD4+라는 표면단백질을 발현하고 세포용해성 T cell은 CD8+이라는 다른 표면 단백질을 발현한다. 비록 분화과정이 항원의 농도나 상호자극 구조에 영향을 받을 수 있지만, Th Cell의 가장 중요한 역할은 각 반응에 따른 cytokine의 분비활성이다<sup>16,17,27</sup>. Naive CD4+ T cell은 APC의 MHC I 혹은 II와 결합하여 Th1, Th2 림프구로 분화하며<sup>16,28,29</sup>, 이에 따라 cytokine 분비 양상도 다르다. Th1 림프구는 세포성 면역에 기여하는 반면 Th2 cell은 체액성 면역과 관계가 있다<sup>30,31</sup>. 자가면역 질환에서는 Th1/Th2 cell 반응에서 Th1 response로 치우치는 양상을 보이고 그로 인해 Th1의 IFN- $\gamma$ 가 증가하고 알러지 질환에서는 Th2 response로 치우치며 Th2의 IL-4가 증가한다는 것이 증명되었다<sup>32</sup>. IFN- $\gamma$ 는 Th cell이 Th1 cell로의 분화하도록 유도하고 Th2 cell의 감소를 유발하는 반면에 IL-4는 Th2로의 분화를 촉진시키고 Th1 세포를 억제한다는 보고가 있었다<sup>33,34</sup>. Th1/Th2 형태 반응의 불균형은 알러지나 전신성 홍반성 낭창 (SLE), 류마티스 관절염 등의 면역불균형 질환의 발현과 지속에 중요한 역할을 한다<sup>32</sup>.

人蔘 (Panax ginseng)은 오가피나무과 (Araliaceae)에 속하는 다년생 초본식물로서 그 뿌리를 약용으로 사용하며 肺·脾經으로 歸經하며 氣味는 甘苦而溫하고 ‘大補元氣, 固脫生津, 安神’

하는 效能이 있어 單味나 韓方處方中에 加減하여 補益劑로 活用하고 있다<sup>5,7)</sup>. 현재 *Panax ginseng*의 뿌리와 그외의 부분에서 발견된 30가지가 넘는 ginsenosides가 있다. 그 중 Rg1은 macrophage-T-cell lymphokine cascade 반응의 몇몇 단계에서의 활성화를 통하여 면역체계에 대한 자극효과를 가지고 있다는 것이 보고되었다<sup>35,36)</sup>. 지금까지의 연구는 분리된 CD4+ T cell에서 Rg1이 IFN- $\gamma$  mRNA의 발현을 감소시켜 Th1 cell 주도 면역을 억제하고 Th2 cell 주도 면역을 증가시킨다는 것을 확인하였으나<sup>18)</sup>, 각 연구에서의 cytokine 분비 양상이 서로 다를 뿐 아니라 이미 유발, 분화된 Th1/Th2 cell에서의 cytokine 분비양상을 확인한 연구는 없는 실정이다. 이는 결과적으로 Rg1이 T cell의 분화 후 과정에 어떤 방식으로 관여하는지 그 기전이 밝혀져 있지 않다는 것을 의미하므로, 본 연구에서는 실제 人蔘의 효능이 어떠한 과정을 통해 면역반응에 관여하는지를 밝혀보고자 하였다. Th1 cell로 분화된 상태에서는 secretion cytokine assay와 real-time RT-PCR방법을 이용하여 cytokine 발현양상을 확인한 결과, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Rg1 투여군이 대조군에 비교하여 45% 감소한 IFN- $\gamma$  발현량을 보였으며, 이와 반대로 Th2 cell로 분화된 상황에서는 IL-4 발현량을 13.4% 증가시켰다. 또한 real-time RT-PCR상 전사인자인 T-bet이 47.3% 감소하였으나, GATA-3 역시 18.3% 감소하였다. 이는 Rg1이 전사인자인 T-bet의 발현량을 조절함으로써 T-bet에 의해 활성화되는 IFN- $\gamma$  분비에 대한 억제력을 가지고 있는 것을 의미하며, 이를 통해 자가면역질환의 제어효과를 갖는다는 사실을 증명한 것이다. 그러나 Rg1이 IL-4의 분비량을 증가시킨다는 본 연구결과에도 불구하고, 이를 활성화시키는 전사인자인 GATA-3의 발현량은 감소되는 것으로 나타나 Rg1의 Th2 cell에 대한 조절기능을 명확히 밝히기는 어려웠으며, Rg1의 Th2 cell에 대한 조절능의 연구가 지속적으로 이루어져야 하겠다.

본 연구는 人蔘에서 추출한 Rg1이 APCs없이 직접 CD4+ T cell의 면역 활동에 영향을 미치고 IL-4 발현량을 증가시키는 동시에, 전사인자인 T-bet의 발현량을 감소시킴으로서 Th1 cell의 IFN- $\gamma$  분비를 억제하는 방식으로 면역반응을 조절하며, 이는 人蔘의 大補元氣하는 효능이 인체의 精氣를 補益함으로써 외부의 邪氣에 대응하는 면역반응조절에 중요한 역할을 하고 있다는 사실을 유추할 수 있었고, 이후 Th1 분화항진 관련 자가면역질환모델에 대한 人蔘의 억제능의 심도있는 연구가 필요하다고 사료된다.

## 결 론

人蔘에서 추출한 Rg1이 면역기능의 주된 역할을 하는 Helper T cell에 미치는 영향을 알아보기로 CD4+ T cell의 생존률을 측정하고 cytokine 분비량을 secretion cytokine assay를 통하여 알아보고, cytokine 발현량 및 T-bet, GATA-3의 발현량을 real-time RT-PCR를 통하여 측정한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

Rg1은 CD4+ T cell을 분리한 후 추출물을 농도별로 투여하고 48시간동안 배양한 결과 mitogen이 없는 상태에서는 CD4+ T cell의 생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. Rg1이 Th1

cell과 Th2 cell로 분화 후 분비되는 secretion cytokine 발현량에 미치는 영향을 각각 Flow cytometry로 확인한 결과, Th1 cell skewed 상황에서 IFN- $\gamma$ 의 발현량이 2.1% 감소되었으며, 또한 Th2 cell skewed 상황에서는 IL-4의 발현량이 18.8% 감소한 것을 확인하였다. Rg1은 Th1 cell skewed 상황에서 IFN- $\gamma$ 의 발현량을 45% 감소시켰으며, 또한 Th2 cell skewed 상황에서는 IL-4의 발현량을 13.4% 증가시켰다. Rg1은 Th1 skewed 상황에서 전사인자인 T-bet의 발현량을 대조군과 비교하여 47.3% 감소시켰으며, Th2 skewed 상황에서 GATA-3의 발현량을 18.3% 감소시켰다.

이상의 결과로 볼 때, 人蔘에서 추출한 Rg1은 IL-4 발현량을 증가시키는 동시에 전사인자인 T-bet의 발현량을 감소시킴으로서 Th1 cell의 IFN- $\gamma$  분비를 억제하는 방식으로 면역반응을 조절하며, 人蔘의 大補元氣하는 효능이 인체의 精氣를 補益함으로써 면역반응조절에 중요한 역할을 하는 기전으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술 연구개발사업의 지원에 의한 것임 (00-PJ9-PG1-CO02-0003).

## 참고문헌

1. 嚴宗正, 正邪論新釋, 新中醫, 6:5, 1984.
2. 大韓東醫生理學會 編, 東醫生理學, pp.90-91, 慶熙大學校出版局, 서울, 1993.
3. 駱和生, 免疫과 韓方, pp.19-37, 열린책들, 서울, 1994.
4. Xiaoguang C., Hongyan L., Xiaohong L., Zhaodi F., Yan L., Lihua T., Rui H., Cancer chemopreventive and therapeutic activities of red ginseng. J. Ethnopharmacol. 60(1):71-8, 1998.
5. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編, 本草學, pp.531-533, 泳林社, 서울, 1994.
6. 李尙仁, 安德均, 辛民教, 漢藥臨床應用, pp.345-350, 成輔社, 서울, 1982.
7. 陸昌洙, 韓國本草學, pp.291-292, 癸丑文化社, 서울, 1981.
8. Wakabayashi C., Murakami K., Hasegawa H., Murata J. and Saiki I., An intestinal bacterial metabolite of ginseng protopanaxadiol saponins has the ability to induce apoptosis in tumor cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 246(3):725-730, 1998.
9. 김정선, 김규원, 최강주, 곽영규, 임광식, 이경희, 정혜영, 홍삼 사포닌의 항산화 활성성분 screening. 고려인삼학회지 20(2):173-178, 1996.
10. 한용남, 한병훈, 박명환, 人蔘의 항산화 활성성분에 관한 연구 (V): Maltol과 Phenolic acid 류의 항산화 활성의 메커니즘, 한국생화학회지 24(2):337-340, 1991.
11. Takagi K., Saito H. and Nabata H., Pharmacological studies of *Panax ginseng* root: estimation of pharmacological actions of *Panax ginseng* root. Jpn. J. Pharmacol.

- 22(2):245-249, 1972.
12. Benishin C.G., Actions of ginsenoside Rb1 on choline uptake in central cholinergic nerve endings. *Neurochem. Int.* 21(1):1-5, 1992.
  13. Jin S.H., Park J.K., Nam K.Y., Park S.N., Jung N.P., Korean red ginseng saponins with low ratios of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponin improve scopolamine-induced learning disability and spatial working memory in mice. *J. Ethnopharmacol.* 66(2):123-129, 1999.
  14. Nah S.Y., Park H.J. and McCleskey E.W., A trace component of ginseng that inhibits Ca<sup>2+</sup> channels through a pertussis toxin-sensitive G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(19):8739-8743, 1995.
  15. Mosmann T.R. and Sad S., The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17(3):138-146, 1996.
  16. Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A., Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383(6603):787-793, 1996.
  17. O'Garra A., Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8(3):275-283, 1998.
  18. 이의준, The Effect of ginsenoside Rg1 on immune activity of CD4 T-cell, 경희대학교 석사학위논문, 2002.
  19. Liu C.X., Xiao P.G., Recent advances on ginseng research in China. *J. Ethnopharmacol.* 36(1):27-38, 1992.
  20. 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. Ageing Dev.* 83(1):43-53, 1995.
  21. 菊地浩吉, 最新免疫學, pp.31-35, 集文堂, 서울, 1993.
  22. 戴新民, 中醫免疫學, pp.27-30, 啓業書局有限公司, 1982.
  23. 鄭泰浩, 免疫學講義, pp.1-3, 慶北大學校出版部, 대구, 1993.
  24. 孫燕, 扶正中藥的免疫調節作用, 中西醫結合雜誌 4(6):368-370, 1984.
  25. 傅芳, 中醫免疫思想成就, 中醫雜誌 25(11):55, 1984.
  26. 文希柱, 權赫僑, 基本免疫學, pp.49-52, 大學書林, 서울, 1992.
  27. Constant S.L. and Bottomly K., Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15:297-322, 1997.
  28. Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L., Zhang X., Fathman C.G. and Glimcher L.H., A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100(6):655-669, 2000.
  29. Malek T.R., Yu A., Scibelli P., Lichtenheld M.G. and Codias E.K., Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells. *J. Immunol.* 166(3):1675-1683, 2001.
  30. Mullen A.C., High F.A., Hutchins A.S., Lee H.W., Villarino A.V., Livingston D.M., Kung A.L., Cereb N., Yao T.P., Yang S.Y. and Reiner S.L., Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292(5523):1907-1910, 2001.
  31. Das J., Chen C.H., Yang L., Cohn L., Ray P. and Ray A., A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* 2(1):45-50, 2001.
  32. Rao A., Avni O., Molecular aspects of T-cell differentiation. *Br. Med. Bull.* 56(4):969-984, 2000.
  33. Rincon M., Flavell R.A., T-cell subsets: transcriptional control in the Th1/Th2 decision. *Curr. Biol.* 7(11):R729-732, 1997.
  34. Swain S.L., T-cell subsets. Who does the polarizing? *Curr. Biol.* 5(8):849-851, 1995.
  35. Kenarova B., Neychev H., Hadjiivanova C. and Petkov V.D., Immunomodulating activity of ginsenoside Rg1 from *Panax ginseng*. *Jpn. J. Pharmacol.* 54(4):447-454, 1990.
  36. Liu M. and Zhang J.T., Immunoregulatory effects of ginsenoside Rg1 in aged rats. *Yao Xue Xue Bao* 30(11):818-823, 1995.