

인삼 사포닌 단일물질이 알러지 과민반응의 매개체 유리기전에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 약리학교실

노 재 열 · 김 경 환

= Abstract =

The Effects of Single Component of Ginsenosides on the Mechanism of Mediator Release in the Allergic Hypersensitivity

Jai Youl Ro and Kyung Hwan Kim

Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine

Inflammatory diseases, allergic and asthmatic disorders are caused by the mediator release from the activation of the phospholipase C (PLC), phospholipase D (PLD), methyltransferase or adenylyl cyclase etc. during IgG or IgE cross-linking of high affinity receptors on mast cells or basophil surface. One important enzyme activated after IgG or IgE receptor cross-linking is PLD, the enzyme which converts phosphatidylcholine (PC) to phosphatidic acid (PA). Under the hypothesis that these may be some differences in mediator release according to the difference in PLD activity, we attempted to confirm the ginseng saponin effects on the PLD activity. We examined the PLD activity during the passively sensitized mast cell activation in the presence of single component of ginsenosides (Rc, Rg₁, Rg₂, Rg₃). We also measured the amount of mediators (histamine and leukotrienes) released by stimulating with ovalbumin (OA) or calcium ionophore (CaI). Guinea Pig lung mast cells were purified using enzyme digestion, count current elutriation, and discontinuous Percoll density gradient. In purified mast cells prelabeled with [³H] arachidonic acid or [³H] palmitic acid, PLD activity was assessed more directly by the production of labeled PEt by PLD-mediated transphosphatidylation in the presence of ethanol. Histamine release was determined by Spectrophotofluorometry, and leukotrienes by radioimmunoassay.

The PLD activity during the passively sensitized mast cell activation is increased up to 3~5 times. The PLD activity during the passively sensitized mast cell activation in the presence of all ginsenosides is decreased up to 4~11 times. Rg₁ and Rg₂ ginsenoside pretreatment decreased histamine and leukotrienes by 50% in the OA-induced or by 40% in the CaI-induced mast cell after passively sensitization. Rc pretreatment poorly decreased histamine but leukotrienes decreased by 70% in the OA-induced or by 35% in the CaI-induced mast cell. Rg₃ ginsenoside pretreatment increased histamine release without challenging OA or CaI but leukotrienes decreased.

These observations indicate that single unit of ginsenosides may be an important contributor to

*이 논문은 1993년도 한국 인삼연초 연구원 프로젝트 연구비로 이루어졌음.

inhibit the release of histamine and leukotrienes in the guinea pig lung mast cells, that inhibits the PLD-mediated formation of DAG evoked by mast cell activation.

Key Words: 인삼사포닌, 알러지 과민반응, 비만세포, Histamine, Leukotrienes, Phospholipase D.

서 론

인삼 사포닌에 관한 여러 연구가 보고되고 있으나 알러지 과민 반응시 유리되는 매개체 유리에 대한 기전을 연구한 보고는 아직 없다. 본 교실에서 인삼 사포닌이 알러지 과민반응에 미치는 효능을 연구한 결과 인삼 사포닌은 항원-항체 반응시 유리되는 histamine의 유리량을 기도 및 폐 조직에서 현저히 감소시켰으나 leukotrienes 유리량은 별 영향을 주지 못했다(Ro등, 1993).

비만세포의 수용체가 활성화되면 이미 만들어져서 저장되어 있던 염증성 매개체들(histamine 등)의 유리와 새로운 매개체들(leukotrienes, PAF등)의 합성이 일어나게 된다. 이런 일련의 과정은 궁극적으로 여러 지질대사가 활성화되어 제 2전령물질(second messenger)의 생성과 연관이 있다. 이 제 2전령물질 생성에 인삼 사포닌이 관여할 것으로 추정할 수 있다.

즉 비만세포의 수용체가 항원과 교차결합이 일어나서 세포가 활성화되면 phospholipase C(PLC) 효소에 의해서 phosphatidylinositol (PI)이 가수분해되어서 신호 변환(signal transduction)에 중요한 역할을 하는 1, 2-diacylglycerol(DAG)과 inositol 1, 4, 5-triphosphate(IP₃)가 생성된다(Berridge와 Irvine, 1984; Berridge, 1987). IP₃는 세포내에 저장된 칼슘을 유리시켜 세포질내에 칼슘농도를 증가시킨다(Rossier, 1989). 또한 IP₃은 IP₄로 더 대사되어서 세포질내의 칼슘의 농도를 조절하는데 참여(signal transduction으로서)하는 것으로 보고되고 있다(Berridge, 1987). 세포질내의 칼슘의 증가는 calcium/calmodulin 의존성 경로와 protein kinase C(PKC) 의존성 경로의 활성화에 중요한 역할을 한다. DAG은 PKC를 적절한

부위로 이동하는 것을 촉진하며 또한 PKC를 활성화 시켜서 유리된 Ca⁺⁺과의 친화성을 증가시켜서 myosin light chain을 인산화 시킨다. 인산화된 단백질은 microtubule에 작용하여 과립의 이동을 촉진하여 비만세포막과 융합하여 저장된 과립의 매개체 유리를 촉진하는 제 2전령물질의 기능을 한다고 알려져 있다(Berridge, 1987). 그런데 비만세포 활성화시 DAG의 형성은 phosphatidylcholine(PC)의 가수분해에 의해서도 일어난다는 것이 보고 되었다(Besterman 등, 1986; Daniel 등, 1986; Cabot등, 1988). 즉 DAG생성은 PC-specific phospholipase C(PLC)에 의해 만들어지는 직접적인 경로와(Besterman등, 1986; Daniel등, 1986; Irving과 Exton, 1987), phospholipase D(PLD)의 활성화로 인하여 인지질이 대사되어 phosphatidic acid(PA)를 거쳐 phosphatidic acid phosphohydrolase의 촉매작용으로 DAG를 얻는 간접적인 경로가 보고 되었다(Regal, 1984; Yang 등, 1967; Satio와 Kanfer, 1975; Kater등, 1976; Taki와 Kanfer, 1979; Chali-four와 Kanfer, 1980; Pai등, 1988; Billah등, 1989). PLD activity는 식물조직(Yang등, 1967), 포유동물(Satio와 Kanfer, 1975; Kater등, 1976; Taki와 Kanfer, 1979; Chalifour와 Kanfer, 1980), HL-60 granulocytes(Pai등, 1988; Billah등, 1989)등에 존재하는 것이 입증되었으며 최근에 Gruchalla등(1990)등 비만세포에서 DAG형성 기전의 일반적인 가설에 수정을 가했다. 비록 PI의 가수분해가 비만세포 활성화시에 일어난다는 사실이 알려져 있지만(Berridge와 Irvine, 1984; Berridge, 1987; Wolf등, 1985; White등, 1985) 비만세포 활성화 동안에 PLC에 의한 PI의 가수분해로 인해 생성되는 DAG량 보다 PC가 PLD에 의해 분해되어 PA를 거친다음 생성되는 DAG의

량이 더 많다고 보고하였다(Gruchalla 등, 1990). 더욱이 에타놀 존재하에서 비만세포가 활성화되면 PC가 transphosphatidylation이 되어 phosphatidylethanol(PEt)이 생성되므로 에타놀을 PLD activity 평가의 지표로 삼을 수 있게 되었다(Gruchalla 등, 1990).

여러종(species)의 비만세포 활성화시에 직접, 간접적으로 형성되는 DAG의 세포내 축적에 관한 연구가 있지만 해명 비만세포 활성화시에 DAG의 형성에 관한 연구는 아직 밝혀지지 않았으며, 더욱이 인삼 사포닌(total saponin, panaxadiol, panaxatriol)이 leukotrienes 유리량에는 영향을 미치지 않았으나 histamine 유리는 현저히 감소시킨다는 본 교실의 연구 보고를 토대로 하여 인삼 사포닌의 매개체 유리기전이 PA를 통한 제 2전령물질인 DAG와 연관이 있을 것으로 가정하였으며 또한 PA 그 자체가 제 2전령물질로 생각되어 지고 있는 중요한 물질이기 때문이다. 그러므로 본 연구에서는 인삼 사포닌의 단일성분이 과민반응 매개체 유리기전에 미치는 영향을 연구하기 위해 해명 폐 조직의 비만세포를 순수 분리하여 인삼 사포닌으로 전투여한 후 피동적으로 IgG 항체로 감작시킨 후 항원으로 자극시 phospholipase D의 활성도를 측정하고자 하였다. 이와 동시에 유리되는 매개체(histamine과 leukotrienes) 유리량을 측정하였다.

해명의 비만세포를 피동적으로 감작시켰을 때 PLD활성을 매개로 하여 생성되는 DAG 생성에 대해 대조군과 인삼 사포닌 처치군과 비교 연구하므로써 인삼 사포닌의 비만세포내의 신호변환을 부분적으로 이해하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물: 250 g 내외의 해명(Hartley albino female guinea pig)을 사용하였다. 피동적 감작을 위하여 동물은 구입 후 일정 조건하에서 1~2일 동안 사육하였다.

2) 인삼 사포닌: 한국인삼 연초연구원에서 추출 정제한 Rc, Rg₁, Rg₂, Rg₃을 제공받아서 실험에 사용하였다.

3) 그외 시약: [9, 10-³H(N)] palmitic acid (specific activity, 47.0 Ci/mmol, PIA), ³H-LTD₄ (specific activity, 39.0 Ci/mmol); [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H(N)] arachidonic acid (specific activity, 100Ci/mmol, AA), ³²Pi(specific activity, 3,000 Ci/mmol), En³HanceR(New England Nuclear, Boston, MA); 10×10 cm and 20×20 precoated silica gel G plates (Brinkman, Instrument, Westburg, NY); phosphatidylserine, phospholipase D, collagenase, elastase, pure ethanol, ovalbumin, complete Freund's Adjuvant, alcian blue, trypan blue(Sigma, St. Louis, MO); Kodax AR-film(Eastman Kodak, Rochester, NY); Percoll(Pharmacia fine chemicals AB, Uppsala, Sweden); Anti-OA 항체(본실험실 제조); Anti-LTD₄ 항체(UW-Madison, 면역알러지 실험실 제공); 그외 시료는 실험실 사용 등급을 사용하였다.

2. 방법

1) 피동적으로 감작된 비만세포로부터의 phospholipase D 활성도 측정

a) 항 OA항체 생성(anti-OA antibody): 피동적 감작을 위한 항체를 얻기 위해 CFA에 혼합된 50 μg OA를 해명 발바닥에 주사하였다. 일주일 후에 100 μg OA를 해명의 한쪽 등에, 200 μg OA를 다른쪽 등에 각각 두 곳에 피내 주사하였다. 다시 일주일 후에 해명의 혈청을 얻어 -90°C에 저장하여 실험에 사용하였다. 항체의 titer은 PCA 방법(Ro 등, 1993)에 의해 측정하였다.

b) 해명 폐조직으로부터 비만세포의 순수정제: 8마리의 정상 해명 폐조직으로부터(각 3g으로 전체 24g 정도) 비만세포를 순수 분리 정제하였다(Ro 등, 1993). 먼저 폐조직을 McIlwain tissue chopper로 잘게 쪼갬다. Tyrode buffer plus

gelatin(TG) 으로 세척된 tissue fragment는 조직 gram당 125 units의 collagenase(in 4 ml of TG) 와 5 units의 elastase를 처치하여 25°C에서 15분 동안 digestion을 시키는 과정을 2번 되풀이하며, 3번째는 25분동안 digestion시켰다. 2번과 3번째 digestion으로 부터 얻은 monodispersed lung cells 을 합하여 Rough Percoll gradient(density, 1.045)에가해서 1500 rpm에서 20분 동안 원심분리 하여 세포를 모아서 세척한 후 count current elutriation에 가하여 속도차에 의해서 비만세포를 분리하였다. 보통 5~7분획에 가장 많은 비만세포가 존재하며 이 분획을 모아서 discontinuous percoll density gradient(1.06~1.10 g/ml)에 의해서 다시 비만세포를 순수분리하였다. 대개 90~95% 순수도를 얻었다. 이 순수분리된 비만세포를 이용하여 phospholipase D 활성도 측정에 사용하였다(Gruchalla 등, 1990).

c) phospholipase D 활성도 측정:

i) 비만세포의 prelabeling; 순수분리된 비만세포의 인지질(phospholipid)을 labeling하기 위해서 Gruchalla 등(1990)의 방법을 수정하여 사용하였다. 순수분리된 세포(1.2×10^7 cells)를 TG buffer로 세 번 세척한 후 다시 세포를 부유시킨 다음 [^3H]PIA(최종농도 $3.3 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{Ci/ml}$), 혹은 [^3H]arachidonic acid(최종농도 $0.5 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{Ci/ml}$)와 세포를 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다(최종 volume은 2 ml). 반응이 끝난 세포는 두 번 세척한 후 다시 buffer에 부유시켰다.

ii) 피종적 감작; Prelabel 된 비만세포(1.2×10^7 cells)에 약 10 ml의 항-OA 항체(titer 1,600; 10^6 cells/1ml of anti-OA)와 각 ginsenoside Rc, Rg₁, Rg₂은 $300 \mu\text{g/ml}$, Rg₃은 $150 \mu\text{g/ml}$ 을 가하여 37°C에서 45분 동안 반응시킨 후 TG buffer로 세척하였다(prelabel 되고 감작된 비만세포이다).

iii) 비만세포 자극(challenge)과 지질 추출; Prelabel되고 감작된 세포($0.75 - 1.25 \times 10^6$ cells)를 PS(phosphatidylserine, $15 \mu\text{g/ml}$) 단독 또는 특수항원($0.1 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ OA)과 PS를 동시 투여하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. PLD 활성도

측정의 지표인 에타놀은 항원으로 자극하기전과 후에 여러 시간별로 가하였다. 비만세포 자극시에도 비만세포를 감작시킬때와 같은 농도의 인삼 사포닌을 각각 가하였다. 반응은 cold buffer 2 ml을 가해서 정지하여 300 xg에서 원심분리하여 pellet에서 세포의 지질을 추출하였다. 지질 추출은 Bligh and Dyer(1959)방법을 수정한 Gruchalla 등(1990)의 방법을 사용하였다.

iv) TLC에 의한 인지질의 분리; 10×10 cm precoated silica gel G plates (Brinkmanm Instruments, Westburg, NY)에 추출된 지질 sample을 spot(duplicate)해서 chloroform/methanol/29.3% ammonium hydroxide(65 : 35 : 7.5, v/v)로 전개한 후 말려서 plate는 En³HanceR(Dupont, NEN)를 뿌려서 하나는 Kodax AR film(Eastman Kodak, Rochester, NY)을 사용하여 12~24시간 autoradiography를 행하였다. 다른 하나는 iodine으로 염색하여 각 band를 확인한 후 각 bands의 silica plates를 잘라 counting vial에서 chloroform 100 μl 를 가하여 추출한 다음 liquid scintillation spectrometry로 측정하였다

d) 표준물질 합성: 순수분리된 비만세포와 ^{32}P i ($100 \mu\text{Ci}$)를 반응시켜서 얻은 [^{32}P] PC를 에타놀 존재하에서 PLD 활성을 통한 transphosphatidylatation에 의해 [^{32}P] PEt를 얻었다(Yang 등, 1967).

2) 매개체(Histamine & Leukotrienes) 유리 실험

순수분리된 비만세포(0.25×10^6 cells)에 항 OA 항체(10^6 cells/ml of antibody)를 가하여 37°C에서 45분 동안 흔들며 주면서 감작을 시켰다. 이때 각 인삼 사포닌의 단일 성분인 Rc, Rg₁, Rg₂, Rg₃를 각각 가하였다(단 농도는 PLD 활성도 측정시와 같다). 감작 후 세포를 세척하여 CaCl₂와 MgCl₂를 포함하는 TG완충액 1 ml에 부유시킨 후 0.1, 1.0 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ OA 혹은 0.01, 0.1, 1.0 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ calcium ionophore(CaI)를 가하여 37°C에서 10분 동안 자극한 후 얼음물에 넣어 반응을 정지시켰

다. 원심분리 후 상층액을 취하여 유리된 histamine량과 leukotriejes량을 측정하였다(Ro등, 1993).

a) Histamine측정: Siragamian(1974)의 방법에 따라 서술된 automated continuous flow extraction 및 fluorometric analyzer로 측정하였다. Histamine 측정의 민감도는 약 5 ng/ml이었다. 각 sample에서 유리된 histamine량은 전체 비만세포가 함유하는 histamine의 총량에 대한 %로 환산하였다.

b) Leukotrienes측정: 방사면역법(radioimmunoassay, RIA)으로 측정하였다(Aha-rony등, 1983; Mathews등, 1981; Ro등, 1993). 표준곡

선은 LTD₄ 항원에 의해서 행해졌으며 측정곡선의 민감도는 0.045 pmol이 LTD₄였다. 유리된 LT의량은 pmole/10⁶cell로 설명되었다.

결 과

1. phospholipase D(PLD)활성도 측정

1) 피동적으로 감각된 비만세포의 PLD활성도 측정에 관한 실험: Ginsenosides(Rc, Rg₁, Rg₂, Rg₃)단독은 정상 비만세포에 처치후 PLD 활성도에 영향을 미치지 않았다.

PLD 활성도를 측정하기 위해서 에타놀 존재시와 부재시 PLD에 의해 transphosphatidylation이

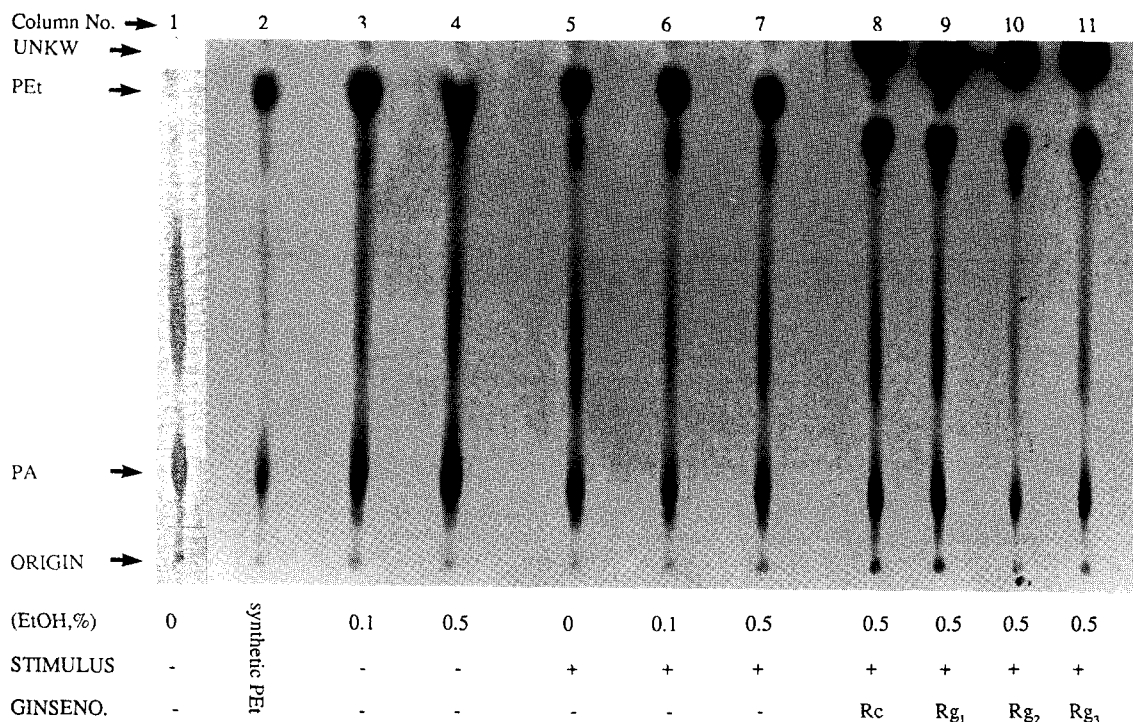


Fig. 1. Ethanol-dependent PEt formation in stimulated mast cell. Purified mast cells (1 to 2×10^7) were prelabeled with [³H] PIA, and washed extensively. Cells were sensitized with anti-OA antibody (1 ml/ 10^6 cells) and single ginsenosides, respectively for 45 min. Five minutes before OA challenge, each concentration on ethanol indicated or medium was added. Ten minutes after stimulation, lipids were extracted and chromatographically separated by TLC. Autoradiography was performed. The abbreviations used in this are: Ginseno, Ginsenosides; PA, phosphatidic acid; PEt, phosphatidylethanol; UNKW, Unkown material.

되면 phosphatidylethanol(PEt)이 생성되는데 이 PEt 생성을 prelabel되고 자극된 비만세포에서 조사하였다. Prelabel된 비만세포($1-2 \times 10^7$ cells)에 항원(OA)-항체(α -OA) 반응 5분전 0.05, 0.1, 0.5, 0.8, 1.0% 에타놀 각농도 범위로 가하여 PEt의 생성을 조사한 결과 생성된 PEt의 양은 에타놀 농도에 비례하였으며 최대 PEt 생성은 0.5% 에타놀 농도에서 일어났다(0.1%와 0.5%에타놀의 data만 Fig. 1에 나타냄). 그러므로 이 에타놀 농

도(0.5%)를 보통 실험에 사용하였으며 최대 PLD 활성도는 3~5배 이상 증가 하였다(Table 1). 비자극 비만세포에 에타놀 부재시에는 PEt 생성을 볼 수 없었다(Fig. 1의 Column 1). 그러나 에타놀 농도 증가로 PEt 생성이 증가되었다(Fig. 1의 Column 3~4). 또한 자극된 비만세포에 에타놀부재시에는 PEt 생성을 볼 수 있었으며 에타놀 농도 증가로 PEt 생성이 증가되었다(Fig. 1의 Column 5~7). 이런 PEt로 추정되는 spot은 1)

Table 1. Phospholipid labeling by using different labeled precursors[®]

Phospholipid	Label	Unstim [®] (-)	Unstim(+)	Stim(-)	Stim(+)
PA	[³ H] PIA	10532 ± 250 [®]	7099 ± 155	12846 ± 351	3451 ± 96
	[³ H] AA	3208 ± 95	2280 ± 101	9823 ± 251	4540 ± 121
PEt	[³ H] PIA	1480 ± 87	3198 ± 165	2138 ± 116	11098 ± 323
	[³ H] AA	430 ± 45	1101 ± 81	892 ± 25	6050 ± 176

[®] Mast cells (1 to 2×10^7) were prelabelled with either [³H] PIA or [³H] AA, and washed extensively. Cells were sensitized with anti-OA antibody for 45 min. Five minutes before OA challenge, ethanol (0.5%) or medium was added. Ten minutes after stimulation, lipids were extracted and chromatographically separated by TLC. Autoradiography was performed and radioactivity incorporated into individual lipids determined by liquid scintillation spectrophotometry.

[®] Four conditions examined are indicated in the table unstim=no antigenic stimulation; stim=stimulation by anti-OA receptor cross-linking; (-)=without ethanol; (+)=with 0.5% ethanol.

[®] Data represent mean+SEM of 5 observations

Table 2. Effects of ginsenoside pretreatment on phospholipid labeling by using [³H]-PIA labeled precursors[®]

Ginsenosides	Phospholipid		
	PA	PEt	Unknown [®]
None	3532 ± 88 [®]	11258 ± 235	—
RC	2315 ± 46	2250 ± 62*	61625 ± 425
Rg ₁	2410 ± 65	2401 ± 85*	35835 ± 329
Rg ₂	1890 ± 41	959 ± 57*	25534 ± 286
Rg ₃	2001 ± 55	1406 ± 60*	58755 ± 388

[®] Mast cells(1 to 2×10^7 cells) were prelabelled with [³H] PIA, and washed extensively. Cells were sensitized with anti-OA antibody and single ginsenoside for 45 min. Five minutes before OA challenge, ethanol (0.5%) or medium was added. Ten minutes after stimulation, lipids were extracted and chromatographically separated by TLC. Autoradiography was performed and radioactivity incorporated into individual lipids determined by liquid scintillation spectrophotometry.

[®] spot (not confirmed).

[®] Data represent mean+SEM of 5 observations.

* A values that is statistically decreased($p < 0.01$) from the value obtained with the highly purified mast cell in the presence of ginsenosides.

에타놀 농도에 비례해서 자극된 세포에서 이 spot 이 증가로 나타나는 것과 2) 메틸화된 합성 PEt 와 동일한 Rf치를 나타내는 것으로 확인하였다 (Fig. 1의 Column 2).

서로 다른 label 전구체를 사용하므로써 자극된 비만세포에서 생성되는 phosphatidic acid(PA)와

PEt의 생성을 비교 조사하였다(Table 1). 두전구체 ($^3\text{H-AA}$ 와 $^3\text{H PIA}$) 사용시 자극된 세포에 에타놀 존재시 현저한 PEt 생성이 증가되었으며 이에 반해서 PA의 양은 감소하였다. 또한 두 label 전구체 사이에는 서로 유사한 양상을 나타냈다.

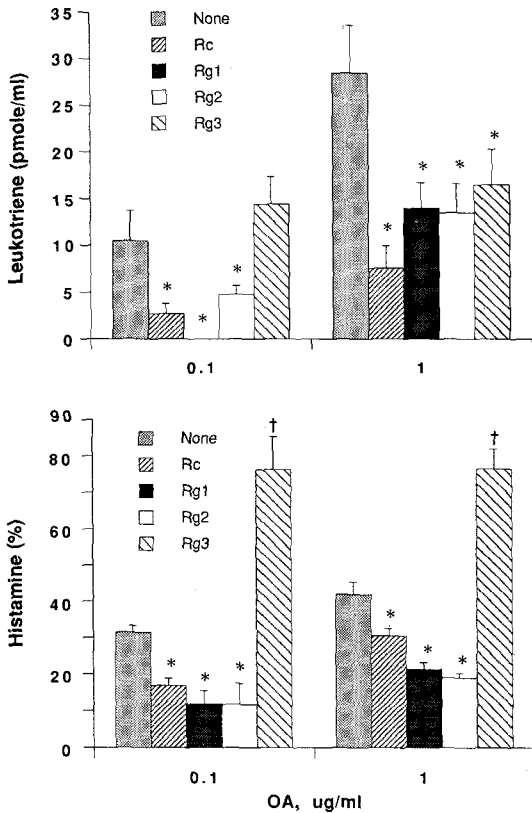


Fig. 2. Effects of ginsenosides on the histamine and leukotriene release from passively sensitized (anti-OA antibody) highly purified mast cell evoked by OA. Purified mast cells (0.25×10^6 cells) were passively sensitized by anti-OA antibody and challenged by varying concentration of OA after ginsenoside pretreatment. Histamine and LT represent total amounts found in all cell (0.25×10^6 cells) after OA challenge. *, values decreased by ginsenosides; †, values increased by ginsenosides.

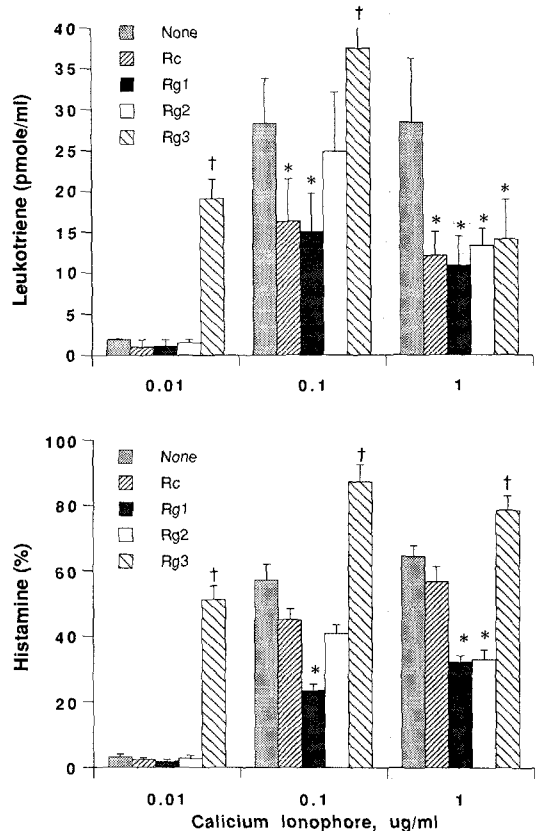


Fig. 3. Effects of ginsenosides on the histamine and leukotriene release from passively sensitized (anti-OA antibody) highly purified lung mast cell evoked by calcium ionophore (CaI). Purified mast cells were passively sensitized by anti-OA antibody and challenged by varying concentration of OA after each ginsenoside pretreatment. Histamine and LT represent total amounts found in all cell (0.25×10^6 cells) after CaI challenge. *, values decreased by ginsenosides; †, values increased by ginsenosides.

2) 피동적으로 감각된 비만세포의 PLD 활성도에 미치는 ginsenosides의 효과: Prelabel(³H-PIA) 된 비만세포를 항원-항체로 자극시 각각의 ginsenosides와 함께 반응시켰을 때 모든 ginsenosides에서 PEt 생성을 4~11배까지 감소시켰다(Fig. 1의 Column 8~11, Table 2). 가장 강한 PLD활성도 억제효과를 나타낸 ginsenoside은 Rg₂였다(Fig. 1 Column 10). 그리고 모든 ginsenosides은 아주 다량의 unknown spot을 얻었다. 이 spot은 확인되지 않았으며 앞으로 조사되어야 할 것으로 사료된다(Fig. 1, Table 2).

2. 매개체 유리량 측정

1) 피동적으로 감각된 비만세포의 매개체 유리량에 미치는 ginsenosides의 효과: 정상비만세포(0.25 × 10⁶ cells/ml)에 300 μg/ml의 Rc, Rg₁, Rg₂와 150 μg/ml Rg₃를 일정시간 반응시켰을 때 Rg₃를 제외한 다른 ginsenosides은 모두 비만세포 탈과립에 영향을 미치지 않았으나 Rg₃ 그 자체는

정상 비만세포의 탈과립현상을 나타냈다(50% 이상, data 나타내지 않았음).

피동적으로 감각된 비만세포에 300 μg/ml의 Rc, Rg₁, Rg₂와 150 μg/ml Rg₃를 각각 반응시킨 후 0.1, 1.0 μg/ml OA(면역자극)와 0.01, 0.1, 1.0 μg/ml CaI(비면역자극)로 자극하였을 때 유리되는 histamine(hist)과 leukotrienes(LT)의 양을 측정하였다. Rg₁과 Rg₂ 처치는 면역자극에 의한 hist과 LT 유리량을 40%까지 감소시켰으며 비면역자극(CaI)에 의해서는 두 매개체를 40%까지 감소시켰다. Rc은 면역 혹은 비면역자극시 모두 hist 유리 감소 효과는 다른 ginsenosides에 비해 약하나, 면역자극시 LT 유리는 70%까지 감소, 비면역자극시 LT 유리는 35%까지 감소시켰다. 그러나 Rg₃은 OA 혹은 CaI 자극없이 그 자체에 의해 hist을 유리시켰으며 LT유리량은 감소시켰다(Fig. 2~3, Table 3~4).

Table 3. Effects of Ginsenosides on the histamine and leukotrienes release from passively sensitized (anti-OA antibody) highly purified lung mast cells evoked by OA[®]

	Ovalbumin			
	0.1 mg/ml		1.0 mg/ml	
	Hist(%) [®]	LT(pmole/ml) [®]	Hist(%)	LT(pmole/ml)
None	31.5 ± 1.8	10.5 ± 3.2	41.9 ± 3.5	28.5 ± 5.1
Rc	16.8 ± 2.0*	2.7 ± 1.1*	30.5 ± 2.0*	7.6 ± 2.4*
Rg ₁	11.9 ± 3.6*	0*	21.4 ± 1.9*	14.0 ± 2.7*
Rg ₂	11.7 ± 5.8*	4.8 ± 0.9*	19.0 ± 1.3*	13.5 ± 3.1*
Rg ₃	76.3 ± 9.1 ⁺	14.4 ± 2.9	76.6 ± 5.4 ⁺	16.5 ± 3.8*

[®] Guinea pig lung mast cells were isolated and purified by digestion and count current electriation method. Mast cells (0.25 × 10⁶ cells) were passively sensitized by anti-OA antibody and challenged by varying concentration of OA after each ginsenoside pretreatment.

[®] Values represent total histamine found in all cells (0.25 × 10⁶ cells) after OA challenge.

[®] Values represent total leukotrienes found in all cells (0.25 × 10⁶ cells) after OA challenge.

* A value that is statistically decreased (p < 0.05) from the value obtained with the highly purified mast cell in the presence of ginsenosides.

⁺ a value that is statistically increased (p < 0.05) from the value obtained with the highly purified mast cell in the presence of ginsenosides.

Table 4. Effects of ginsenosides on the histamine and leukotriene release from passively sensitized(anti-OA antibody) highly purified lung mast cells evoked by calcium ionophore[®]

N	Calcium Ionophore						
	0.01 $\mu\text{g/ml}$		0.1 $\mu\text{g/ml}$		1.0 $\mu\text{g/ml}$		
	Hist(%) [®]	LT(pmole/ml) [®]	Hist(%)	LT(pmole/ml)	Hist(%)	LT(pmole/ml)	
none	6	3.2±0.8	1.9±0.1	57.2±4.8	28.3±5.5	64.5±3.3	28.4±7.8
RC	6	2.4±0.5	1.0±0.9	45.1±3.3	16.3±5.2*	56.8±4.6	12.1±2.9*
Rg ₁	6	1.8±0.7	1.1±0.8	23.5±2.1*	15.1±4.7*	32.3±1.9*	10.9±3.6*
Rg ₂	6	2.8±0.8	1.5±0.4	40.9±2.7	24.9±7.2	33.0±3.0*	13.3±2.1*
Rg ₃	6	51.2±4.2 ⁺	19.1±2.4 ⁺	87.4±5.2 ⁺	37.5±2.6 ⁺	78.7±4.4 ⁺	14.1±4.8*

[®] Guinea pig lung mast cells were isolated and purified by digestion and count current electriation method. Mast cells (0.25×10^6 cells) were passively sensitized by anti-OA antibody and challenged by varying concentration of CaI after each ginsenoside pretreatmnt.

[®] Values represent total histamine found in all cells (0.25×10^6 cells) after CaI challenge.

[®] Values represent total leukotrienes found in all cells (0.25×10^6 cells) after CaI challenge.

* A value that is statistically decreased ($p < 0.05$) from the value obtained with the highly purified mast cell in the presence of ginsenosides.

+ A value that is statistically increased ($p < 0.05$) from the value obtained with the highly purified mast cell in the presence of ginsenosides.

고 찰

해명 폐조직의 비만세포의 수용체가 항원-항체 반응시 활성화되면 세포막에 존재하는 여러 효소계가 활성화 된다. 이때 여러 제 2전령물질이 생성되어 궁극적으로는 세포의 탈과립과 인지질대사산물들이 유리되어 알려지 및 천식을 유발하게 된다. 수용체 매개 효소활성화에 의해 생성되는 제 2전령물질인 DAG 생성은 두 과정에 의해서이다.

① PLC 활성화에 의해 PI가 가수분해되어서 DAG 와 IP₃가 생성되는 과정과, ② PLD가 활성화되어 PC의 마지막 phosphodiester bond를 잘라서 phosphatidic acid(PA)를 생성하는 과정이다. 생성된 PA은 다시 PA phosphohydrolase 효소에 의해서 DAG를 생성하게 된다. 생성된 DAG은 비만세포와 과립과의 융합을 촉진하여 탈과립현상을 나타낸다. 최근에는 흰쥐의 복강내 비만세포 활성화시에 생성되는 DAG의 양이 PLC 효소활성에 의한 것보다 PLD 효소활성에 의한 생성이 훨

씬 많다고 알려 졌다(Gruchalla등, 1990). 그리고 인삼사포닌이 LT 유리에는 영향을 미치지 않았으나 histamine 유리는 억제시키므로(Ro등, 1993) histamine 유리 억제기전이 PLD 활성을 억제하여 제 2전령물질인 DAG 생성을 감소시키므로서 탈과립을 방지할 것이라는 가정하에 본 연구를 행하였다. 그래서 본 실험에서는 해명의 비만세포 활성화시에 PLD가 활성화 되는지를 먼저 조사한후 인삼성분이 PLD 활성화에 미치는 영향을 조사하였다.

해명의 비만세포 활성화시에 PLD 활성화도 측정의 지표인 에타놀 존재하에서 PET가 생성되었다. 또한 에타놀 농도에 비례해서 PET 생성이 증가하며 부가적으로 PA 생성이 감소되는 것으로 보아 해명의 비만세포 활성화시에 PLD 효소가 활성화 되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1의 column 5~7). 이는 흰쥐 복강내 비만세포 활성화시 PLD 효소가 활성화된다는 보고(Gruchalla등, 1990)와 유사한 것으로 보아 두종(species)간의 차이는 없을 뿐만아니라 비만세포 서로 간의 이질성도 없다는

것을 알 수 있다.

비감작된 비만세포에 의해서도 에타놀 농도에 비례해서 PEt가 생성되었다(Fig. 1의 column 3~4). 또한 비감작, 비활성 그리고 무 에타놀 상태의 prelabel 된 비만세포에서도 PA가 생성되는 것으로 보아 해명의 비만세포는 자발적으로 적은량의 PLD가 활성화되어 DAG 생성을 조절하는 것으로 추측된다(Fig. 1의 column 1). 그러나 감작된 비만세포에 에타놀을 가하지 않았으나 PEt가 생성됨은 설명될 수 없는 부분으로 남는다(Fig. 1의 Column 5).

인삼성분이 PLD 활성화에 미치는 영향을 연구한 결과 본 실험에 사용된 모든 ginsenosides은 PLD 효소활성단계를 억제하여(Fig. 1 Column 8~11) 결과적으로 histamine 유리량을 감소시키는 것(Fig. 2~3, Table 3~4)으로 사료된다. 그러나 비만세포 활성화시에 Rg₃은 PLD 효소활성은 억제하나 histamine 유리량을 증가시킨 것은 이미 연구보고된 것과 차이를 나타내었다(Sagiyma 등, 1991). 이들이 사용한 Rg₃은 20(S)-G-Rg₃로서 본 실험에 사용된 Rg₃와 구조적인 차이에 의한 것인지 규명되어야 할 부분이다. 그러나 본 실험에서 나타난 비만세포 활성화시 Rg₃가 histamine 유리를 증가시킨 것은 비만세포막에 존재하는 다른 효소계가 관여하리라 추정할 수 있다. 즉 PLD 효소활성보다 훨씬 우세하게 PLC 효소가 활성화되면 DAG가 생성되어 탈과립이 촉진될 수 있다. 이런 탈과립은 histamine 유리량을 증가시킬 것이다. 또한 Rg₃ 그자체가 histamine을 유리시키는 작용은 사포닌 성분인 Rg₃가 비만세포막 지질(예를 들면 cholesterol)과 복합체를 형성하여 세포막에 pore를 만들어(Doutmashkin 등, 1962; Bangham과 Home, 1962; Glaudrt 등, 1962) 세포속으로 Ca⁺⁺유입이 증가되어 탈과립을 촉진할 수 있을 것으로 추측이 된다. 그러나 더 많은 연구가 필요한 부분으로 남는다.

Prelabeling에 사용된 전구체로서 AA와 PIA가 선택된 이유는 비만세포막 지질의 대부분이 이들 전구체로 이루어져 있기 때문이다. 이들 전구체에

의해서 생성된 PEt와 PA의 양은 서로 유사하였으며(Table 1) 항원-항체 반응시(비만세포 활성화) PLD효소가 활성화되는 것을 알 수 있으며 이는 흰쥐 복강내 비만세포에서와 유사성을 나타내었다(Gruchalla, 1990). 또한 [³H]-PIA 전구체에 의해 생성되는 PEt에 미치는 각 ginsenoside의 효과를 Table 2에 나타내었다. 각 ginsenoside에 대한 PEt 생성감소와 더불어 PA 생성도 감소됨을 나타내었다. 그리고 확인되지 않는 물질(unknown)에 많은 양의 labeling을 볼 수 있었다. 이 또한 확인되어야 할 문제로 남는다.

해명조직의 비만세포에서 인삼사포닌(PD와 PT)이 LT 유리량을 감소시키지 못하였으나(Ro 등, 1993) 단일 ginsenoside를 순수분리된 해명 비만세포에 처치시 histamine 뿐만아니라 LT의 유리량도 현저히 감소시켰다(Fig. 2~3, Table 3~4). 이는 인삼 saponin이 순수분리되지 않았을 경우에 항체 생성이나 다른 작용에 독작용 혹은 복합작용을 나타낼 수 있다고 보고(Kensil 등, 1991; Wu 등, 1992) 된 것과 같이 인삼 saponin의 순수도의 차이에서 오는 것으로 생각된다. 또한 사용된 모든 ginsenoside가 LT유리량을 감소(Fig. 2~3, Table 3~4)시킨 기전으로 생각할 수 있는 것은 비만세포막의 수용체 매개 효소활성시 ① 세포질내의 Ca⁺⁺ 농도증가에 의해 phospholipase A₂가 활성화되어 arachidonic acid 생성을 증가시키는 경로와, ② PLC 효소 활성으로 인한 PI 가수분해로 생성된 DAG가 DAG lipase활성에 의해 arachidonic acid 생성을 증가시키는 경로를 차단 하므로써 일어날 수 있다. 즉 두 경로에 의해서 생성된 arachidonic acid는 급히 대사되어 leukotrienes 등의 대사산물을 유리시킨다. 그러나 더 많은 연구가 필요하다.

또한 면역자극(OA자극)과 비면역자극(CAI자극)에 의한 매개체 유리에 ginsenosides(Rg₃ 제외)는 모두 억제 효과를 나타내었다(Table 3~4). 그러므로 ginsenosides은 항원에 대해 비특이성을 가지는 것으로 사료된다.

Ginsenosides(Rc, Rg₁, Rg₂)은 해명 폐조직의

비만세포 활성화시 야기되는 PLD 활성을 억제시킴으로써 결과적으로 DAG 생성을 감소시켜 매개체인 histamine 유리를 감소시키는 것으로 사료된다.

결 론

인삼 사포닌 존재하에서 해명 폐조직 비만세포의 항원-항체 반응시(피동적 감각) 야기되는 PLD 활성도와 유리된 매개체량을 측정된 후 대조군과 비교하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1) 피동적으로 감각된 비만세포의 활성화시 PLD 활성도는 3~5배 이상 증가 되었다.

2) 모든 단일 ginsenosides(Rc, Rg₁, Rg₂, Rg₃) 전처치는 감각된 비만세포의 활성화시 증가된 PLD 활성도를 4~11배 감소시켰다.

3) Rg₁과 Rg₂ 전처치는 감각된 비만세포에서 면역자극(OA)에서 50%까지, 비면역자극(CaI)에서 40%까지 histamine과 LT 유리량을 감소시켰다.

4) Rc 전처치는 감각된 비만세포에서 histamine 유리감소는 미약하나 LT유리는 현저히 감소하였다.

5) Rg₃ 전처치는 항원의 특이성에 무관하게 histamine 유리를 현저히 증가하였으나 LT 유리는 감소시켰다.

이상의 성적으로 보아 인삼사포닌의 단일성분인 Rc, Rg₁, 그리고 Rg₂은 해명 폐조직의 비만세포 활성화시 야기되는 PLD를 매개하여 생성되는 DAG 생성을 억제하므로써 histamine 유리를 억제하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Aharony D, Dobson P, Bernstein P, Kusner E, Krell R and JB Smith: *Determination of SRS-A release from guinea-pig lungs by a radioimmunoassay. Biochem Biophys Res Commun* 117: 574-579, 1983
 Bangham AD and Horne RW: *Action of saponin on*

biological cell membranes. Nature, Lond 196: 952, 1962
 Befus AD, Goodacre R, Dyck R and J Bienenstock: *Mast cell heterogeneity in man. Int Arch Allergy Appl Immunol* 76: 232-236, 1985
 Berridge MJ and Irvine RF: *Inositol trisphosphate a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature* 312: 315-321, 1984
 Berridge MJ: *Inositol trisphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. Annu Rev Biochem* 56: 159-193, 1987
 Besterman JM, Duronio V and Cuatrecasas P: *Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: A pathway for generation of a second messenger. Proc Natl Acad Sci* 83: 6785-6789, 1986
 Billah MM, Pai JK, Mullmann TJ, Egan RW and Siegel MI: *Regulation of phospholipase D in LH-60 granulocytes. J Biol Chem* 264: 9096-9076, 1989
 Bligh EG and Dyer WJ: *A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol* 37: 911-918, 1950
 Cabot MC, Welsh CJ, Zhang Z-c, Cao H-t, Chabbott H and Lebowitz M: *Vasopressin, phorbol diesters and serum elicit choline glycerophospholipid hydrolysis and diacylglycerol formation in nontransformed cells: transformed derivatives do not respond. Biochim Biophys Acta* 959: 46-55, 1988
 Chgalifour RJ and Kanfer JN: *Microsomal phospholipase D of rat brain and lung tissues. Biochem Biophys Res Commun* 96: 742-747, 1980
 Daniel LW, Waite M and Wykle RL: *A novel mechanism of diglyceride formation. 12-O-tertradecanoylphorbol-13-acetate stimulates the cycle breakdown and resynthesis of phosphatidylcholine. J Biol Chem* 261: 9128-9132, 1986
 Dourmashkin RR, Dougherty RM and Harris RJC: *Electron microscopic observations on Rous sarcoma virus and cell membranes. Nature, Lond* 194: 1116-1119, 1962
 Glauert AM, Dingle JT and Lucy JA: *Action of sap-*

- onin on biological cell membranes. *Nature, Lond* 196: 953, 1962
- Gruchalla RD, Dinh TT and Kennerly DA: *An indirect pathway of receptor-mediated 1, 2-diacylglycerol formation in mast cells. I. IgE receptor-mediated activation of phospholipase D. J Immunol* 144: 2334-2342, 1990
- Irving HR and Exton JH: *Phosphatidylcholine breakdown in rat liver plasma membranes. Roles of guanine nucleotides and P2-purineric agonists. J Biol Chem* 262: 3440-3443, 1987
- Kater LA, Goetzl EJ and Austen KF: *Isolation of human eosinophil phospholipase D. J Clin Invest* 57: 1173-1180, 1976
- Kensil CR, Patel U, Lennick M and Marciani D: *Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria Molina Cortex. J Immunol* 146: 431-437, 1991
- Mathews WR, Joshua R and CM Robet: *Analysis of leukotrienes by high-pressure liquid chromatography. Anal Biochem* 118: 96-101, 1981
- Pai JK, Siegel MI, Egan RW and Billah MM: *Phospholipase D catalyzes phospholipid metabolism in chemotactic peptide-stimulated HL-60 granulocytes. J Biol Chem* 263: 12472-12477, 1988
- Regal J: *Immunoglobulin G- and immunoglobulin E-mediated airway smooth muscle contraction in the guinea pig. J Pharmacol Exp Ther* 228: 116-120, 1984
- Ro JY, Yoon SJ, Lee JW and Kim KH: *Effects of panax ginseng saponins on chemical mediator release from airway smooth muscle in actively sensitized guinea pig. Proc the 6th Int'l Ginseng Symp* 84-91, 1993
- Rossier MF, Capponi AM and Vallotton MB: *The inositol 1, 4, 5-trisphosphate-binding site in adrenal cortical cells is distinct from the endoplasmic reticulum. J Biol Chem* 264: 14078-14084, 1989
- Sagiyma M, Shibata T, Uekawa M and Nakai Y: *Inhibitory effect of Red Ginseng on chemical mediator Release from mast cells in Type I Allergy. The Ginseng Review* 12: 728-731, 1991
- Satio M and Kanfer J: *Phosphatidohydrolase activity in a solubilized preparation from rat brain particulate fraction. Arch Biochem Biophys* 169: 318-323, 1975
- Siraganian RP: *An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. Anal Biochem* 57: 383-394, 1974
- Taki T and Kanfer JN: *Partial purification and properties of a rat brain phospholipase D. J Biol Chem* 254: 9761-9765, 1979
- White JR, Pluznik DH, Ishizaka K and Ishizaka T: *Antigen-induced increase in protein kinase C activity in plasma membrane of mast cells. Proc Natl Acad Sci* 82: 8193, 1985
- Wolf M, Levine H, ay WS, Cuatrecasas P and Sahoun N: *A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca²⁺ and phorbol esters. Nature* 317: 546-549, 1985
- Wu JY, Gardner BH, Murphy CI, Seals JR, Kensil CR, Recchia J and Belt GAL: *Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. J Immunol* 148: 1519-1525, 1992
- Yang SF, Freer FS and Benson AA: *Transphosphatidylation by phospholipase D. J Biol Chem* 242: 477-484, 1967