

생쥐 대식세포의 활성화 신호전달에 미치는 인삼성분들의 영향

신은경 · 박한우 · 김세창* · 정노팔

연세대학교 이과대학 생물학과, *배재대학교 생물학과

(1996년 7월 1일 접수)

The Effects of Ginseng Components on the Signal Transduction in the Activation of Murine Macrophages

Eun-Kyung Shin, Han-Woo Park, Sei-Chang Kim* and Noh-Pal Jung

Dept. of Biology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

**Dept. of Biology, Paichai University, Taejon 302-735, Korea*

(Received July 1, 1996)

Abstract : To study the effects of ginseng saponin components on the signal transduction in the activation of murine macrophages, phagocytosis and intracellular calcium concentration of peritoneal exuded mouse macrophages were examined. The phagocytosis was increased significantly after treatment with total saponin, diol-saponin, Rg₁ and Rg₂, but triol-saponin was unable to increase phagocytosis. The phagocytosis were increased when H7, a PKC inhibitor, was pretreated and increased significantly by saponin fractions except total saponin. Pertussis toxin, which inactivates G-protein, decreased the phagocytosis. But the phagocytosis was restored to the control level by saponin fractions and the phagocytosis was increased significantly by Rg₂ and Rb₂. The triol saponin increased phagocytosis approximately by 2-fold as compared with the TMB-8 treated group. Peritoneal exuded macrophages displayed a prominent rise in cytosolic calcium following treatment with triol-saponin, Rg₁, Rg₂ and Rb₂. Incubation of macrophages with PT resulted in an inhibition of cytosolic calcium mobilization, but increased cytosolic calcium mobilization with saponin fraction.

Key words : phagocytosis, macrophages, ginseng saponin, TMB-8, H7

서 론

대식세포의 중요한 방어능력 중의 하나인 식세포활동은 크게 혈청 옵소닌(opsonin)인 C3b와 C3bi 및 antimicrobial Ab(주로 IgG)에 의한 opsono-phagocytosis, 그리고 미생물의 lectinophagocytosis¹⁾로 나눌 수 있다. 전자는 옵소닌이 대식세포와 미생물의 막 표면 수용체를 모두 인지하여 결합을 하고, 후자는 옵소닌과는 상관없이 일어나는 작용으로, 미생물의 막 표면에는 lectin이 표현되어 있어 대식세포막의 lectin류(lectin-like)의 막수용체와 특이하게 결합한다.^{2,3)}

대식세포의 가압멸균한 효모에 대한 식세포활동은 다양한 막수용체와 결합하며⁴⁾ lectin류의 막수용체 중에서는 mannose 막수용체가 가장 잘 알려져 있다.^{5, 7)}

Protein kinase C(PKC)는 diacylglycerol로 활성화되며 칼슘 의존성 protein kinase family로 신호를 전달해서 여러 다양한 세포내 반응을 조절하는데 중추적인 역할을 하고 있으며,⁸⁾ Monica 등⁹⁾은 쥐의 대식세포에서 식세포활동이 PKC와 관련이 있음을 보고하고 있다. PKC의 활성화 물질은 세포골격 재배열(cytoskeletal rearrangement)을 대단히 효과적으로 일으키며,^{10, 11)} PKC의 주요 기질인 MARCKS

(myristoylated, alanin-rich C kinase substrate)이 PKC 의존적으로 인산화 되어 막골격성분과 결합되어 있는 calmodulin과 결합을 하게되어 사상허족(filopode)의 성장에 영향을 주어 결국 형태형성을 하게된다.^{12,13)} 한편 대식세포의 식세포활동은 세포골격 단백질의 활성화에 의하여 일어나며, 세포골격 단백질인 actin과 gelsolin 등에 의한 허족의 확장은 칼슘의 농도에 의하여 조절된다.^{14,15)}

식세포활동에 미치는 칼슘의 영향중 사람의 중성 백혈구의 Fc 막수용체에 의해 매개되는 식세포활동은 칼슘의 농도에 따라 증가하고,^{16,18)} 생쥐의 대식세포에서는 이러한 결과를 확인할 수 없었다.¹⁹⁾ 그리고 칼슘의 농도가 매우 낮거나(<1 nM) 또는 매우 높으면(>10 μM) Fc 막수용체에 의해 매개되는 식세포활동은 감소하지만 C3b/C3bi 막수용체에 의한 식세포 활동에는 영향을 미치지 않으며,¹⁷⁾ 혈소판활성인자(platelet activating factor)에 의하여 증가된 칼슘을 고갈시키면 식세포활동이 억제된다.^{20,21)} 또한 mannose 막수용체는 기질과 결합하기 위해서 칼슘²²⁾ 이, immunoglobuline에 의하여 매개되는 식세포활동에는 PKC의 활성화²³⁾이 필요하고, PKC의 활성화와 세포내 Ca²⁺ 동원이 대식세포의 중앙치사 활성화에 필요하다.^{24,25)}

인삼의 사포닌 성분중 panaxytriol은 몇 종의 인체 암세포와 악성백혈병 세포의 성장을 억제시키며,²⁶⁾ 인삼제품(ginseng extract and ginseng powder)을 습관적으로 복용하면 복용량에 따라 비례적으로 암을 예방할 수 있다고 알려져있다.²⁷⁾ 또한 대식세포의 중앙치사 활성을 증가시키며 중앙세포 치사활성을 나타내는 인자분비를 자극하는 것이 보고²⁸⁾ 되었지만, 대식세포의 활성화와 신호전달에 관계된 인삼 성분에 대한 연구는 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 생쥐 대식세포의 활성화 신호전달에 미치는 인삼 성분의 영향을 알아보기 위하여 생쥐의 복강 대식세포를 이용하여 lectin-like수용체에 의하여 매개되는 식세포 활동과 세포내 칼슘 농도의 변화에 미치는 여러 가지 인삼사포닌 성분의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 표준 사료로 사육한 생후 8~10주된 C57BL/6계 생쥐를 암수 구별없이 사용하였다. 인삼 사포닌분획물(C.S., D.S., T.S., Rg₁, Rg₂, Rb₂)은 Shibata 등²⁹⁾의 방법에 따라 6년근 백삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 분말로 부터 분리하여 사용하였다. 대식세포의 유도물질로서 thioglycollate medium(3% W/V, Difco)을 사용하였으며 Fura-2AM(Sigma)은 DMSO(Sigma)에 녹여 사용하였고 G-단백질 억제제로 pertussis toxin(Sigma)을 사용하였으며 PKC 억제제로 H7(1-(5-isoquinolylsulfonyl)-2-methylpiperazine;Sigma)은 PBS에 녹여 사용하였다. 또한 calcium-ATPase 억제제로는 TMB-8(3,4,5-trimethoxybenzoic acid 8(octylamino)octylester(Sigma)를 사용하였으며 tannic acid(Sigma)를 제외한 기초 시약들은 특급 및 GR급을 사용하였다.

2. 실험방법

(1) 대식세포의 분리 및 배양

대식세포는 Smith 등³⁰⁾의 방법에 따라 생쥐 복강내에 3% thioglycollate 2 ml를 주사하고 4~5일 후에 생쥐를 경추이탈로 희생시킨 후 복강내에 8 ml의 PBS(pH 7.3)를 주입하여 수초간 흔들어 준 후 주입한 PBS를 회수하여 4°C에서 250×g로 10분간 원심분리하여 침강시켰다. 동일한 방법으로 원심분리를 2회 더 반복 하여 세포를 세척한 다음, 적당량의 배양액(10% FBS가 첨가된 RPMI 1640 배지)을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 세포수가 1 ml당 1×10⁶개가 되도록 배양액을 첨가한후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양하여 배양판에 부착시키고 배양액(FBS가 첨가되지 않은 RPMI 1640배지)으로 2~3회 세척하여 배양판에 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 대식세포의 분리 및 배양은 무균상태로 진행하였다.

(2) 효모의 준비

*Saccharomyces cerevisiae*를 Sabouraud's broth에서 28°C, 48시간 진탕배양한 후 120°C에서 45분간 가압 멸균해서 효모를 죽인 후 Ca²⁺-Mg²⁺-free PBS로 세 번 씻어준 후 1 ml씩 분주하여 사용하였다. 사용시 FBS와 항생제가 없는 RPMI 1640 배지에 희석하여 사용하였다.

(3) 식세포 활동의 측정

식세포 활동의 측정은 Giannis 등³¹⁾의 방법을 이용하여 대식세포를 multiwell plates(24 wells)에 2시간 동안 부착시킨 후 배지를 제거하고 FBS와 항생제

가 없는 배지로 갈아준 후 2시간 더 배양시킨 후 인삼 사포닌 분획물과 효모(100 μ l)를 첨가하고 1시간동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이때 modulating agent(H7, PT) 처리는 효모처리 15분 전에 하였다. 배양이 끝난 후 두번 동일한 배양액으로 조심스럽게 씻어준 후 tannic acid(1%, 1 min)를 처리하고 PBS로 한번 씻어주었다. 그리고 한방울의 FBS를 첨가한 후 Wright-Giemsa로 염색하고 PBS로 씻어준 후 도립 현미경(inverted microscope)으로 관찰하였다. 100 세포 이상을 계수하여 대조군을 지표로 각 사포닌 성분에 대한 식세포활동 정도를 %로 구하였다.

가압멸균효모는 trypsinization에 의해 Wright Giemsa에 염색이 되는 능력을 상실하여 현미경상으로 분홍색(PY) 또는 연분홍색으로 보이지만 tannic acid를 처리하면 염색이 되는 능력을 회복하여 보라(VY) 또는 청색으로 보인다. 따라서 tannic acid 처리 전에 이미 대식세포 내로 섭취된 효모는 tannic acid와 반응을 하지 못하기 때문에 염색을 했을 경우 분홍색 또는 연분홍색으로 보이고, 대식세포의 막에 부착되어 있던 효모는 tannic acid와 반응하여 보라 또는 청색으로 보인다.

Fig. 1에서 PY는 대식세포 내로 섭취된 효모이고, VY는 섭취되지 않고 대식세포의 막수용체와 결합하여 막에 붙어 있는 효모이다.

(4) Ca²⁺의 측정

세포내 칼슘의 양은 기존에 알려진 Ronald 등¹¹⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 대식세포를 FBS가 첨가된 배지에 부유시켜 petri-dish에 2시간 동안 배양

하여 부착시킨 후 FBS가 첨가되지 않은 배지로 씻어 주고, 동일 배지에 최종농도 0.25% trypsin을 2.5시간동안 처리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포를 1% FBS가 첨가된 배지에 2 M Fura-2AM(stock 10 mg/ml in DMSO)을 처리하여 30분간 부하(loading)하였다. 이때 PT, H7은 Fura-2AM으로 부하하기 전에 각각 180분, 15분동안 항온배양한 후 배지로 한번 씻어주고 부하하였다. 부하가 끝난 후 세포를 HBSS로 2번 씻어준 후 HBSS에 부유시켰다. 측정은 dual excitation monochromator를 이용한 F-2000 fluorescence spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 세포내부의 이온화된 free calcium 농도는 다음의 공식에 의하여 계산하였다.

$$Ca^{2+} = K(R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

K : Fura-2에 대한 칼슘결합 분해상수
(dissociation constant, 224 nM)

R : 340 nm과 380 nm excitation일 때 510 nm emission intensity의 비율

R_{max} : 1 mM CaCl₂가 있는 배지에 0.1% Triton X-100을 처리하여 얻은 값

R_{min} : 0.1% Triton X-100을 처리하여 용해된 세포 부유물에 5 mM EGTA를 처리하여 얻은 값

결 과

1. 인삼사포닌 성분이 대식세포의 식세포활동에 미치는 영향

대조군을 지표(100%)로 하여 각 인삼 사포닌 성분

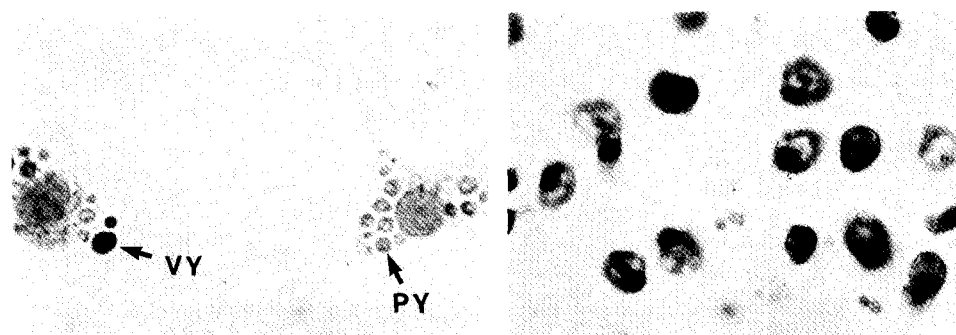


Fig. 1. Phagocytosis of yeasts by peritoneal exuded mouse macrophages. Phagocytosed and associated yeasts are marked as PY (pink yeasts), VY (violet yeasts), respectively. The yeast were applied for 30 min with or without modulating agents, unbound yeasts were washed out by PBS. The right figure is negative control. The phagocytosis was blocked by 10 mM EDTA.

을 처리한후 식세포활동의 값을 얻었다. Table 1에서 보듯이 total saponin을 처리한 경우는 대식세포내로의 섭취된 정도가 대조군에 비해 39~45%로, 막에 부착되어 있는 경우는 10⁻³%와 10⁻⁵% 농도에서 각각 33%와 35%로, 그리고 CAY는 농도가 감소함에 따라 20~40%까지 유의성(p<0.05) 있게 증가하였다. Diol-saponin을 처리한 경우 PY는 10⁻⁴%와 10⁻⁵% 농도에서 각각 36%와 30%로, VY는 10⁻³%와 10⁻⁵% 농도에서 각각 33%와 21%로, 그리고 CAY는 모든 농도에서 26~32%까지 유의성 있게 증가하였다. Triol-saponin을 처리한 경우 PY는 유의성이 없었으며, VY는 10⁻⁵% 농도에서 38%까지, 그리고 CAY는 10⁻⁴%와 10⁻⁵% 농도에서만 각각 24%와 33%까지 유의성 있게 증가하였다. Rg₁의 경우 PY는 10⁻⁴%에서 34%, VY는 10⁻³%부터 10⁻⁵%까지 35~48%, CAY는 모든 농도에서 27~39%까지 유의성 있게 증가하였다. Rg₂는

모든 농도에서 PY는 44~53%로 다른 성분보다 식세포활동에 많은 영향을 미쳤다. 이에 반해 VY는 대조군에 비해서 11~26%로 증가하거나 또는 거의 비슷한 값을 나타내었으나 유의성이 없었고, 10⁻³% 처리군에서는 오히려 감소현상을 보였다. CAY는 19~35%까지 유의성 있게 증가하였다. Rb₂의 경우 PY 값은 유의성이 없었으나 VY는 46~53%, CAY는 30~39%까지 유의성 있게 증가하였다.

2. 식세포활동에 미치는 H7, TMB-8 및 인삼성분들의 영향

Cyclic-nucleotide dependent PKC-inhibitor인 H

Table 1. Effects of saponin on phagocytosis

	% PHagocytosis		
	PY ^a	VY ^b	CAY ^c
Control	100±3.1	100±0.0	100±1.7
C.S.	10 ⁻³ %	139±1.2*	109±0.9
	10 ⁻⁴ %	140±2.3*	133±2.0*
	10 ⁻⁵ %	145±2.0*	135±4.0*
D.S.	10 ⁻³ %	129±3.5	133±3.8*
	10 ⁻⁴ %	136±5.2*	116±4.3
	10 ⁻⁵ %	130±4.2*	121±0.6*
T.S.	10 ⁻³ %	113±0.8	110±4.9
	10 ⁻⁴ %	128±3.2	113±6.3
	10 ⁻⁵ %	128±4.3	138±2.9*
Rg ₁	10 ⁻³ %	129±4.7	135±5.5*
	10 ⁻⁴ %	126±6.2	148±3.5*
	10 ⁻⁵ %	123±5.2	136±5.0*
	10 ⁻⁶ %	134±3.2*	118±3.7
Rg ₂	10 ⁻³ %	144±3.2*	126±8.0
	10 ⁻⁴ %	147±4.6*	111±7.3
	10 ⁻⁵ %	153±0.3*	87±3.0
	10 ⁻⁶ %	146±5.4*	98±7.8

^a Pink Yeast (PY) is inside the cell.

^b Violet Yeast (VY) is outside the cell.

^c CAY is total cell-associated yeasts. The phagocytic index is percentage to control (PY: 3.2±0.1, VY: 2.4, CAY: 5.6±0.1). Three identical experiments were performed. CS: total saponin, DS: diol-saponin, TS: triol-saponin. Values are mean±SE of three successive determinations on a given well. *p<0.05.

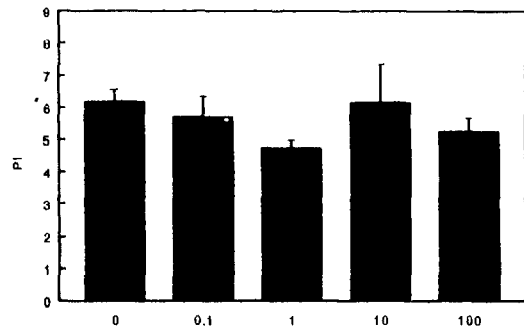


Fig. 2. Effects of H7 on the phagocytosis of peritoneal exuded mouse macrophages. H7 were administrated 30 min before the yeast treatment, and maintained during the phagocytic process. Expressed values are mean±SE of 4 experimental data of phagocytic index (PI: associated or injected yeasts per macrophage).

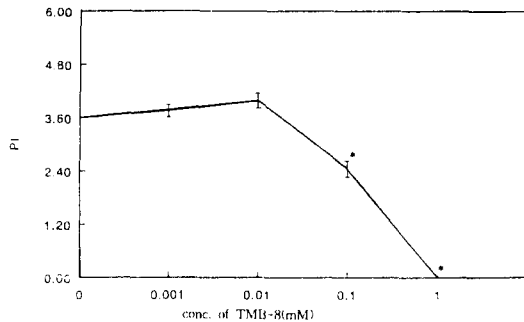


Fig. 3. Effects of TMB-8 on the phagocytosis of peritoneal exuded mouse macrophages. TMB-8 were administrated 30 min before the yeast treatment, and maintained during the phagocytic process. Expressed values are mean±SE of 4 experimental data of phagocytic index (PI: associated or injected yeasts per macrophage). *p<0.001.

7과 TMB-8을 이용하여 이들 약물이 생쥐대식세포의 식세포작용에 미치는 영향과 이들 약물을 이용하여 식세포작용을 억제시킨 후 식세포작용의 회복에 미치는 인삼사포닌 성분의 영향을 알아 보았다. 그 결과는 Fig. 2와 3에서와 같이 H7의 경우는 0.1~100 μ M까지 대조군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않

Table 2. Effects of saponin on phagocytosis in the H7 treated macrophage

	% Phagocytosis		
	PY	VY	CAY
Control	133 \pm 2.3*	108 \pm 4.3	111 \pm 1.0
C.S. 10 ⁵ %	134 \pm 3.2*	129 \pm 5.0*	132 \pm 2.4*
D.S. 10 ⁵ %	147 \pm 4.2*	121 \pm 2.9	136 \pm 2.0*
T.S. 10 ⁵ %	150 \pm 5.2*	142 \pm 0.3*	146 \pm 0.3*
Rg ₁ 10 ⁵ %	147 \pm 0.1*	134 \pm 0.2*	143 \pm 3.4*
Rg ₂ 10 ⁵ %	172 \pm 2.0*	108 \pm 3.0	145 \pm 0.1

Control: Preincubated in medium containing protein kinase inhibitor (H7), 30 mins before yeast treatment. Pink Yeast is inside the cell. Violet Yeast is outside the cell. CAY is total cell-associated yeasts. The phagocytic index is percentage to control. Three identical experiments were performed. CS: total saponin, DS: diol-saponin, TS: triol-saponin. Values are mean \pm SE of three successive determinations on a given well. *p<0.05.

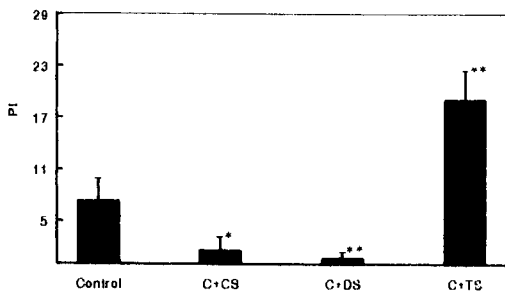


Fig. 4. Effects of ginseng saponin fractions on the phagocytosis of peritoneal exuded mouse macrophages treated with TMB-8. The macrophages were treated with reagent (TMB-8 and/or ginseng saponin fractions) for 30 min before the yeast administration. Phagocytosed yeasts were stained with MG6 and then counted. Control: TMB-8 alone, C+CS: TMB-8+total saponin, C+DS: TMB-8+diol saponin, C+TS: TMB-8+triol saponin. Expressed values are the mean of phagocytosed yeasts per 100 macrophages (phagocytic index: PI). * not significant, **p<0.05.

았는데, TMB-8의 경우는 농도가 증가함에 따라 식세포작용이 감소하였으며 1 mM 농도에서는 식세포작용이 거의 억제되는 것으로 나타났다.

한편 Table 2에서 보듯이 PKC 억제제인 H7을 처리했을 때 PY는 인삼사포닌 성분 처리군(10⁵%)과 처리하지 않은 실험군에서 33~72%까지 유의성 (p<0.05) 있게 증가하였다. VY는 total과 triol-saponin 그리고 Rg₁에서 29~42%까지 유의성 있게 증가하였으며 Rb₂는 대조군보다도 17% 감소하였다. CAY는 인삼성분을 처리한 모든 실험군에서 32~46%까지 유의성 있게 증가하였다.

Fig. 4에서 나타난 바와 같이 TMB-8을 처리하여 식세포 작용을 억제시킨 대식세포에 인삼 사포닌을 투여 하였을 때 total saponin의 경우는 대조군에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았으며 diol-, triol-saponin의 경우는 대조군에 비하여 유의한 변화를 나타냈다. Diol-saponin은 식세포작용이 억제된 상태에서 회복효과를 나타내지 않은 반면 triol-saponin은 대조군에 비하여 2배의 회복 작용을 나타내고 있다.

3. 식세포활동에 미치는 PT의 영향

Table 3에 나타나 있듯이 섭식된 효모(PY)는 PT 처리 대조군에서 28%, total saponin에서 3%, 그리고 triol-saponin에서 34% 감소하였다. 이와 반대로 Rg₂와 Rb₂는 56%로 유의성 있게 증가하였다. 막에 부착된 효모(VY)는 Rg₁의 값이 대조군에 비해 25% 감소

Table 3. Effects of saponin on phagocytosis in the PT-treated macrophage

	% Phagocytosis		
	PY	VY	CAY
Control	72 \pm 3.2	113 \pm 0.2	89 \pm 0.3
C.S. 10 ⁵ %	97 \pm 0.3	129 \pm 0.9*	111 \pm 1.0
D.S. 10 ⁵ %	116 \pm 3.4	138 \pm 2.0*	125 \pm 1.1*
T.S. 10 ⁵ %	66 \pm 5.4	150 \pm 2.4*	102 \pm 1.1
Rg ₁ 10 ⁵ %	125 \pm 3.4	75 \pm 6.0	104 \pm 0.1
Rg ₂ 10 ⁵ %	156 \pm 4.1*	125 \pm 0.5*	143 \pm 0.1*
Rb ₂ 10 ⁵ %	156 \pm 6.4*	129 \pm 2.3*	145 \pm 0.6*

Control: Incubated in pertussis toxin containing medium for 15 min before yeast treatment. CS: total saponin, DS: diol-saponin, TS: triol-saponin. Values are the mean \pm SE of phagocytosed yeasts per 100 macrophages measured at three identical experiments. Compared groups are the most effective concentrations of each agent.

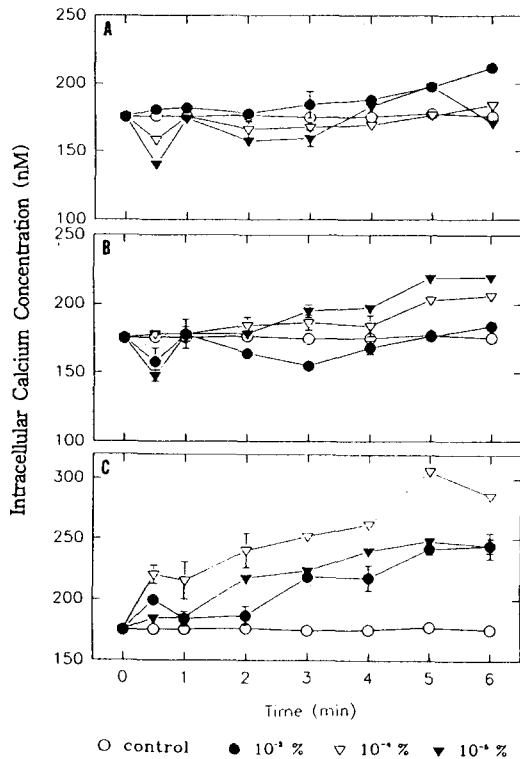


Fig. 5. Effects of ginseng saponin on the generation of $[Ca^{2+}]_i$. Peritoneal exuded mouse macrophages were loaded with Fura-2/AM for 30 min at 37°C. The cells were washed and $[Ca^{2+}]_i$ were assessed spectrophotometrically prior to and following treatment with saponins. Expressed values are mean \pm SE of three measurements. A: total saponin, B: diol-saponin, C: triol-saponin.

하였고 그 이외의 사포닌 성분 처리군은 29%에서 50%까지 유의성 있게 증가하였다. CAY의 값은 PT처리 대조군만이 11% 감소하였고 인삼사포닌 처리군에서는 유사하였다. Diol-saponin, Rg₂ 그리고 Rb₂는 대조군에 비하여 25~45%까지 유의성 있게 증가하였다.

4. 인삼사포닌 성분이 대식세포의 세포내 Ca²⁺ 동원에 미치는 영향

인삼사포닌 성분을 처리했을 때 30초 후에 total과 diol-saponin에서는 칼슘의 농도가 감소하다가 증가하는 경향을 보였다. 6분을 기준으로 할때 total saponin은 10⁻³%에서 칼슘의 농도가 20 nM 증가하였고 다른 농도에서는 유의성이 없었다(Fig. 5A). Diol-saponin에서는 10⁻⁴%와 10⁻⁵%에서 칼슘의 농도가 20~

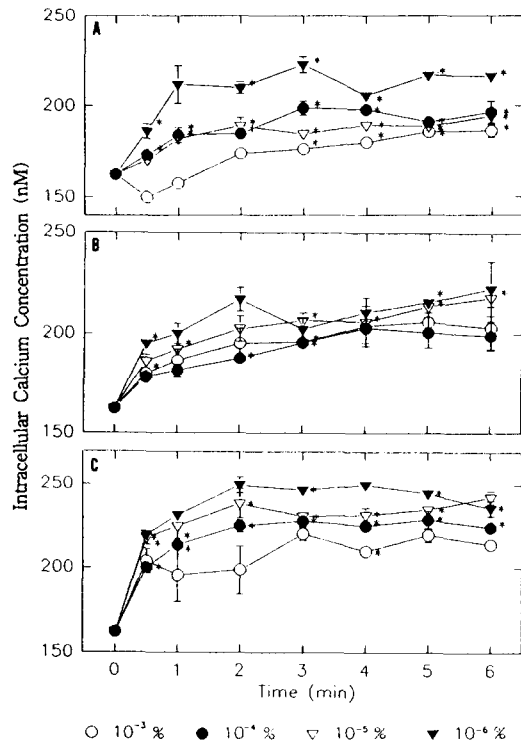


Fig. 6. Effects of ginseng saponin on the generation of $[Ca^{2+}]_i$. Peritoneal exuded mouse macrophages were loaded with Fura-2/AM for 30 min at 37°C. The cells were washed and $[Ca^{2+}]_i$ were assessed spectrophotometrically prior to and following treatment with ginsenosides. Expressed values are mean \pm SE of three measurements. A: Rg₁, B: Rg₂, C: Rb₂. *p < 0.05.

35 nM까지 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5B). 반면에 triol-saponin은 모든 농도에서 칼슘의 양이 70~95 nM까지 유의성 있게 증가하였다(Fig. 5C). 이상의 결과에서는 triol-saponin이 대식세포의 세포내 칼슘을 증가시키는데 가장 효과가 큰 것으로 나타났다.

5. Ginsenoside가 대식세포의 세포내 Ca²⁺ 농도 변화에 미치는 영향

Rg₁, Rg₂, Rb₂ 모두 칼슘의 양이 대조군(time 0)에 비해 약 50~100 nM까지 유의성 있게 증가되었고 Rg₁의 10⁻³%에서는 30초에서 감소하다가 증가하는 경향을 보였다. 모든 ginsenoside에서 6분을 기준으로 볼때 저농도(10⁻⁶ 또는 10⁻⁵%)일 경우 고농도(10⁻³%, 10⁻⁴%)보다 칼슘의 농도가 더 증가하는 경향을 보였

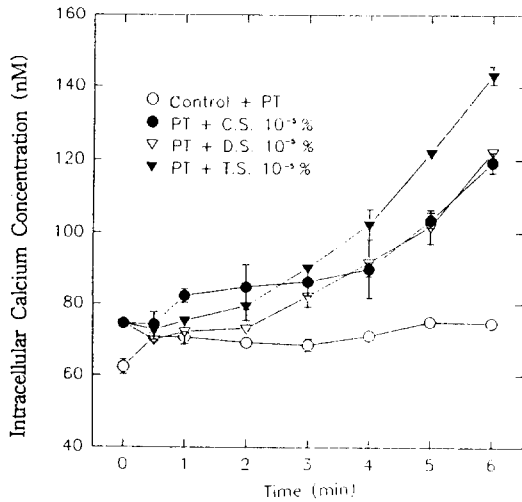


Fig. 7. Effects of ginseng saponin on the generation of $[Ca^{2+}]_i$ in the PT-treated peritoneal exudated mouse macrophages. Macrophages were exposed to 2 $\mu\text{g/ml}$ pertussis toxin (PT) for 180 min at 37°C. Cells were washed and loaded with Fura-2/AM for 30 min. The cells were washed and $[Ca^{2+}]_i$ were measured spectrophotometrically. Expressed values are mean \pm SE of three measurements. CS: total saponin, DS: diol-saponin, TS: triol-saponin.

다(Fig. 6).

6. PT 처리시 인삼사포닌 성분이 세포내 Ca^{2+} 동원에 미치는 영향

PT처리 대식세포의 배지에 total-, diol-, triol-saponin 성분을 넣어 주었을 때 PT처리하지 않은 대조군에 비해 칼슘의 양이 100 nM정도 감소하였다. 그러나 인삼사포닌 성분 처리군은 시간의 흐름에 따라 증가하였으며 triol-saponin에서 증가율이 가장 높았다(Fig. 7).

고 찰

본 실험에서는 대식세포의 활성화시 신호전달에 대한 인삼성분의 영향을 알아보고자 신호전달에 관계하는 몇 가지 약물을 처리한 후 대식세포의 식세포활동과 세포내 칼슘농도를 측정하였다. 이 결과 인삼성분에 의하여 식세포활동이 대조군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.05$) 증가하였다. 따라서 사포닌 성분은 대식세포의 식세포활동에 영향이 있는 것으로 사료된다.

대식세포의 활성화에 중요한 영향을 미치는 PKC를

H7으로 처리하여 억제하였을 경우 식세포활동이 억제되지 않거나 증가하였다(Table 2). 중성백혈구에서 비활성화된 IgG 의존적인 식세포활동은 PKC의 활성화 없이도 일어나지만 더 효율적인 식세포활동을 위해서는 PKC의 활성화가 필요하고,²³⁾ 반대로 PKC의 활성화가 식세포활동을 위해 반드시 필요한 것은 아니라고 한다.¹³⁾ 그러므로 lectin류의 막수용체를 이용한 대식세포의 식세포활동에는 PKC의 활성화가 필요하지 않거나, 또는 PKC의 통상적 억제제인 H7이나 staurosporine에 불감적인 다른 PKC(예를 들어 nPKC)가 작용을 하였을 것으로 사료된다.

가압멸균 효모의 glucan과 mannose 막수용체는 G 단백질 의존적인 신호전달 체계를 이용한다.³²⁾ G-단백질 억제제인 PT를 처리했을 때 세 가지 성분(C.S., D.S., Rg₁)에서 대조군보다도 식세포활동이 감소하였지만 PT처리 대조군과 비교했을 때 거의 같거나 16~25%까지 증가하였다(Table 3). 이것은 G-단백질 의존적인 glucan과 mannose 막수용체 신호전달 체계가 억제되어서 이 두 종류의 신호전달 체계와 경쟁적으로 작용하던 type3 보체계 막수용체를 이용하여 대식세포가 식세포활동을 한 결과로 사료되며, Rg₂와 Rb₂에서 식세포활동이 증가한 것으로 보아 사포닌 성분이 이 식세포활동을 촉진한 것으로 사료된다. 그리고 PT를 처리했을 때 대식세포의 막에 부착되어 있는 VY는 사포닌 성분만 처리했을 때의 VY와 같거나 더 많은 값을 얻었다. 이것은 가압멸균 효모에 대한 대식세포의 중요한 막수용체인 mannose 막수용체가 재순환 막수용체이기 때문에³³⁾ 세포 내로 섭취된 정도가 크면 상대적으로 막에 부착되어 있는 VY가 감소하지만 PT처리 시는 세포 내로의 섭취가 억제되어서 VY가 증가한 것으로 사료된다. 또한 TMB-8을 전처리하여 식세포작용을 억제시킨 후 인삼사포닌성분을 처리한 결과(Fig. 4) total-, diol-saponin은 식세포 작용을 회복시키지 못하는데 반해 triol-saponin의 경우는 대조군에 비하여 2배정도의 높은 phagocytic index를 나타내었다.

Total-saponin과 diol-saponin은 대조군과 비교했을 때 칼슘 농도 변화는 유의성이 없었지만 triol-saponin, Rg₁, Rg₂ 그리고 Rb₂는 대조군 보다 유의성 있게 칼슘의 양을 증가시켰다(Fig. 5와 6). 그리고 PT 처리시 세포내 칼슘농도 변화가 전체적으로 100 nM정도 감소하였지만 사포닌 성분을 처리하지

않은 대조군에 비해 사포닌 처리군은 시간이 흐름에 따라서 칼슘의 농도가 크게 증가하였다. 이상의 결과는 인삼사포닌 성분이 G-단백질 의존적인 신호전달 체계가 아닌 다른 경로를 통하여 대식세포의 세포내 칼슘 증가를 초래했다고 사료되지만 인삼사포닌 성분과 세포막 신호전달 체계에 대한 규명에는 더 많은 연구가 필요하다.

그리고 식세포활동은 actin같은 세포골격의 재배열이 일어나야³⁴⁾하며 이것은 칼슘 농도에 의존적이다.^{14, 15, 35)} 핵은 새로운 섬유의 재배열에 주형으로 작용하는데 이러한 nucleation 활성화에는 5 nM 이상의 유리 칼슘이 필요하고 200 nM 이상의 칼슘이 존재할 때에는 활성이 최대가 된다.^{36, 37)} 본 실험에서도 칼슘의 농도와 식세포활동을 살펴보았다. PT처리 시는 칼슘의 농도가 감소하였지만 식세포활동이 완전히 억제되지 않은 것은 lectin류의 막수용체를 이용하는 식세포활동에 대하여 칼슘이 전적으로 필요한 것은 아니라고 사료되며 칼슘의 농도가 가장 유의성 있게 증가한 triol-saponin에서의 식세포활동이 9~23% 감소한 것으로 보아 칼슘의 농도와 식세포활동과는 관계가 없는 것^{38, 39)}으로 사료된다. Fc 막수용체 매개 식세포활동에서도 세포질내의 칼슘의 증가 없이도 일어났다.⁴⁰⁾ 이것은 식세포활동에 중요한 액틴중합(actin polymerization)을 유도하는데 세포내 칼슘의 증가가 필요하지 않다는 보고¹¹⁾와 일치하기도 한다.

대식세포의 종양치사 활성화에 PKC의 활성화와 칼슘의 증가가 필요²¹⁾하고, 인삼사포닌 성분이 종양치사 활성을 나타내는 인자분비를 자극하여 대식세포의 종양치사활성을 증가시킨다.²⁸⁾ 이것은 사포닌 성분이 대식세포내의 칼슘을 증가시켰기 때문이라고 사료되며, 본 실험에서도 사포닌을 처리했을 때 대식세포내의 칼슘이 유의성 있게 증가되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 인삼사포닌 성분이 대식세포의 식세포활동을 증가시켰고, 세포내의 칼슘의 증가를 촉진했으며, G-단백질 의존적인 식세포활동이 억제되었을 때 다른 막수용체(CR3)를 이용하여 그 억제효과를 상쇄하는 작용이 있다고 사료된다. 대식세포의 lectin류의 막수용체를 이용한 식세포활동은 다른 막수용체의 식세포활동과 같이 칼슘의 증가나 PKC의 활성 없이도 일어난다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 '95년도 고려인삼학회 연구비로 수행된 것이며 이에 감사를 드립니다.

요 약

인삼포닌 성분 중 total saponin, diol-saponin, ginsenoside Rg₂는 대조군에 비해 유의성(p < 0.05)있게 대식세포내의 섭취를 증가시켰으며, 대식세포내로 섭취된 효모와 막에 부착되어 있는 효모를 포함한 식세포활동을 조사했을 때 사포닌 성분처리군 중 triol-saponin(10%)을 제외한 모든 군에서 대조군에 비해 유의성있게 증가하였다.

PKC 억제제인 H7을 처리하였을 때 대조군에 비해 32~46%의 식세포활동이 증가하였으며 H7을 단일처리한 군과 인삼사포닌 병용처리군을 비교하였을 때 병용처리군 모두에서 식세포활동이 더욱 증가하였다. Intracellular Ca²⁺ 억제제인 TMB-8을 전처리하여 식세포작용을 억제시킨 후 인삼사포닌성분을 처리한 결과 total, diol-saponin은 식세포 작용을 회복시키지 못하였는데 triol-saponin의 경우는 대조군에 비하여 2배정도의 높은 phagocytic index를 나타내었다. G-단백질 억제제인 PT를 처리하였을 때 대조군에 비해 식세포활동이 28% 감소하였으며, diol-saponin, Rg₁, Rg₂, Rb₂는 식세포활동을 증가시켰고, PT처리 대조군과 total, diol-saponin 처리군은 식세포활동이 감소하였다. 또한 세포내 칼슘 농도를 측정했을 때 triol-saponin, Rg₁, Rg₂, Rb₂처리군에서 칼슘의 양이 유의성 있게 증가하였다. Total, diol-saponin 처리군의 칼슘 양은 대조군과 비슷하였다. PT 처리시 칼슘 양이 매우 감소하였지만 인삼성분을 처리하였을 때 시간이 흐름에 따라 세포내 칼슘의 양이 회복되었다. 인삼성분은 세포내 칼슘의 농도를 증가시키며 세포내 칼슘의 변화에 의하여 매개되는 세포반응은 인삼성분에 의하여 영향을 받는다.

인 용 문 헌

1. Sharon, N. : *Immunol. Today* **51**, 43 (1984).
2. Perry, A., Keisari, Y. and Ofek, I. : *FEMS Microbiol. Lett.* **27**, 345 (1985).
3. Ofek, I. and Sharon, N. : *Infect. Immunol.* **56**, 539 (1988).

4. Rachel, G. : *Exp. Cell Reser.* **174**, 481 (1988).
5. Stahl, P., Schlesinger P., Sigardson E., Rodman J. and Lee, Y. C. : *Cell* **19**, 207 (1980).
6. Gordon, S. and Mokoena, T. : *Mononucler Phagocytes*. Academic Press, San Diego, CA, p.141 (1989).
7. Stahl, P. : *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* **2**, 317 (1990).
8. Wu, W. S., Walaas, S. I., Nairn, A. C. and Greengard, P. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 5249 (1982).
9. Monica, D. L. F., Delgado, M., Rio, M., Martinez, C. and Gomariz, R. P. : *Regulatory Peptides* **48**, 345 (1993).
10. Thomas, H. H. and Wang, D. : *J. Clin. Invest.* **79**, 1359 (1987).
11. Ronald, L. S., Packman, T. J., Abboud, C. N. and Lichtman, M. A. : *Blood.* **77**, 363 (1993).
12. Graff, J. M., Young, T. M., Johnson, J. D. and Blackshear, P. J. : *J. Biol. Chem.* **264**, 21818 (1989).
13. Antony, R., Karen, K. F., Thelen, M., Nairn, A. C. and Aderem, A. : *J. Exp. Med.* **172**, 1211 (1990).
14. Southwick, L. A. and Stossel, T. P. : *Semin. Hamatol.* **20**, 305 (1983).
15. Stossel, T. P., Chaponnier, C. R., Ezzell, M., Hartwig, J. H., Janmey, P. A., Kwiatkowski, D. J., Lind, S. E., Lind, D. B. Smith, D. B., Southwick, F. S., Yin, H. L. and Zanes, K. S. : *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 353 (1985).
16. Sheterline, P., Richard, J. E. and Richards, R. C. : *Eur. J. Cell Biol.* **34**, 80 (1984).
17. Lew, D. P., Andersson, T., Hed, J., Di Virgilio, F., Pozzan, T. and Stendahl, O. : *Nature (London).* **315**, 509 (1985).
18. Sklar, L. A., Omman, G. M. and Painter, R. G. : *J. Cell. Biol.* **102**, 1161 (1985).
19. Mcneil, P. L., Swanson, J. L., Wright, S. D., Silverstein, S. C. and Taylor, D. L. : *J. Cell Biol.* **102**, 1586 (1986).
20. Gschwendt, M., Leibersperger, H. and Marks, F. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 974 (1989).
21. Mitsuyuki, I., Hara, N., Sawada, M. and Maeno, T. : *Cell. Immunol.* **156**, 508 (1994).
22. Drickamer, K. : *J. Biol. Chem.* **263**, 9557 (1988).
23. Alexander, Z. and Brown, E. J. : *J. Biol. Chem.* **267**, 12042 (1992).
24. Antonio, C. and Schreiber, R. D. : *J. Immunol.* **137**, 2373 (1986).
25. Khadir, R., Berthon, B. and Lemaire, G. : *Cell. Immunol.* **153**, 443 (1993).
26. Katano, M., Yamamoto, H. and Matsunaga, H. : *Pro. 5th Intl. Ginseng Symposium*, p. 33 (1988).
27. Yun, T. K. and Choi, S. Y. : 국제 한국 인삼학술대회 초록, p. 95 (1990).
28. 최상운, 정노팔, 김세창 : *고려인삼학회지* **14**(3), 364 (1990).
29. Shibata, S., Tanaka, S., Tanaka, O., Ando, T., Sado, M., Tsushima, S. and Ohsawa, T. : *Chem. Pharm. Bull.* **14**, 596 (1966).
30. Smith, R. L., Junt N. H., Merritt, J. E., Evans, T. and Weidemann, M. J. : *Biochim. Biochem. Res. Comm.* **96**, 1097 (1980).
31. Giaimis J., Lombard, Y., Makaya-Kumba, M., Fonteneau, P. and Poindron, P. : *J. Immunol. Methods* **154**, 185 (1992).
32. Mark, R. B. : *Molecular Biology of G-protein-coupled Receptors*. In : Edward Brother. Birkauser : p. 121 (1992).
33. Philip, D. S. : *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2**, 317 (1990).
34. Kerri, S. W., Lin, J. L., Wamboldt, D. D. and Lin, J. J. : *J. Cell Biology* **125**, 359 (1994).
35. Hayashi K., Fujio, Y., Kato, I. and Sobue, K. : *J. Biol. Chem.* **266**, 355 (1991).
36. Carson, M., Weber, A. and Zigmond, S. H. : *J. Cell Biol.* **103**, 2707 (1986).
37. Harteig, J. H. and Janmey, P. A. : *Biochem. Biophys. Acta.* **1010**, 64 (1989).
38. Shaafi, R. I, Shefcyk, J., Yassin, R., Molski, T. F. P., Volpi, M., Naccache, H., White, J. R., Fein, M. B. and Becker, E. L. : *J. Cell Biol.* **102**, 1459 (1986).
39. Francesco, D. V., Meyer, B. C., Greenberg, S. and Silverstein, S. C. : *J. Cell Biol.* **106**, 657 (1988).
40. Steven, G., Chang, P. and Silverstein, S. C. : *J. Exp. Med.* **177**, 529 (1993).