



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

수지상세포의 항원제시능력에 대한
인삼에서 추출한 다당류인
진산의 면역자극효과

The seal of Cheju National University is a large, faint watermark in the background. It features a central shield with the Korean characters '제주대' (Jeju National University) and an open book below it. The shield is surrounded by a circular border containing the text 'CHEJU NATIONAL UNIVERSITY' and 'SINCE 1952'.

濟州大學校 大學院

獸醫學科

金 美 亨

2007 年 2 月

수지상세포의 항원제시능력에 대한
인삼에서 추출한 다당류인
진산의 면역자극효과

指導教授 朱 洪 球

金 美 亨

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2006 年 12 月

金美亨의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (印)

委 員 _____ (印)

委 員 _____ (印)

濟州大學校 大學院

2006 年 12 月

초 록

수지상세포의 항원제시능력에 대한 인삼에서 추출한 다당류인 진산의 면역자극효과

(지도교수: 주홍구)

김미형

제주대학교 수의학과 대학원

Ginsan은 *Panax ginseng*으로부터 추출한 다당류이며 면역자극효과를 가지고 있는 물질이다. 수지상세포 (dendritic cells)는 가장 강력한 항원제시세포 (antigen-presenting cells)로 면역반응에 있어 중요한 역할을 한다. 하지만, 수지상세포에서 ginsan의 효과는 아직 연구되어 있지 않다. 본 연구에서는 ginsan이 수지상세포의 생존율을 증가시키며 수지상세포의 성숙을 유도하는 것을 관찰하였다. 수지상세포에서 성숙표지자인 MHC class II 분자의 발현과 동시자극분자인 B7-2 (CD86)가 상당히 증가하였다. 수지상세포에서 10 µg/ml ginsan에 의해 nitric oxide (NO)의 생성이 유도되었다. 수지상세포에 ginsan을 처리했을 때 생성된 NO의 양은 대표적인 성숙인자인 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 NO 생성보다는 적은 양이었다. Ginsan에 의해 Interleukin (IL)-12, tumor-necrosis factor (TNF)-alpha, IL-10의 생성이 증가하였다. Ginsan을 처리한 수지상세포는 처리를 하지 않은 미성숙 수지상세포에 비해 allogeneic CD4⁺ T 림프구의 증식을 증가시켰다. Ginsan을 처리한 수지상세포에 의해 활성화된 CD4⁺ T 림프구는 상당량의 interferon-gamma (IFN-γ)를 생성하였다. 유도된 IFN-γ와 함께 IL-4도 생성되었다. 이러한 결과를 바탕으로 ginsan이 수지상세포에 작용하여 면역반응을 자극할 수 있을 것이라고 생각된다. Ginsan이

수지상세포에서 기능변화를 통해 수지상세포와 관련된 면역반응을 증가시킬 것으로 생각된다.

Key words: dendritic cells, ginsan, immunostimulation, antigen-presenting capability



Abstract

Immunostimulatory roles of ginsan, a polysaccharide purified from *Panax ginseng*, on the antigen-presenting capabilities of dendritic cells

Supervised by professor Hong-Gu Joo

Mi-Hyoung Kim

*Department of Veterinary Medicine,
Graduate school,
Cheju National University*

Ginsan is a polysaccharide purified from *Panax ginseng* and has an immunostimulatory effect. Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells (APCs) and play a critical role in immune responses. However, the effect of ginsan on DCs has not been studied yet. In this study, we demonstrated that ginsan increased the viability and induced the maturation of DCs. The expression of maturation markers, major histocompatibility complex (MHC) class II molecules, and a costimulatory molecule, B7-2 (CD86), on DCs were significantly increased. Ginsan with a dose of 10 µg/ml induced the production of nitric oxide (NO) from DCs, but the production of NO from ginsan-treated DCs was profoundly less than that of a representative maturing agent, lipopolysaccharide (LPS). Ginsan

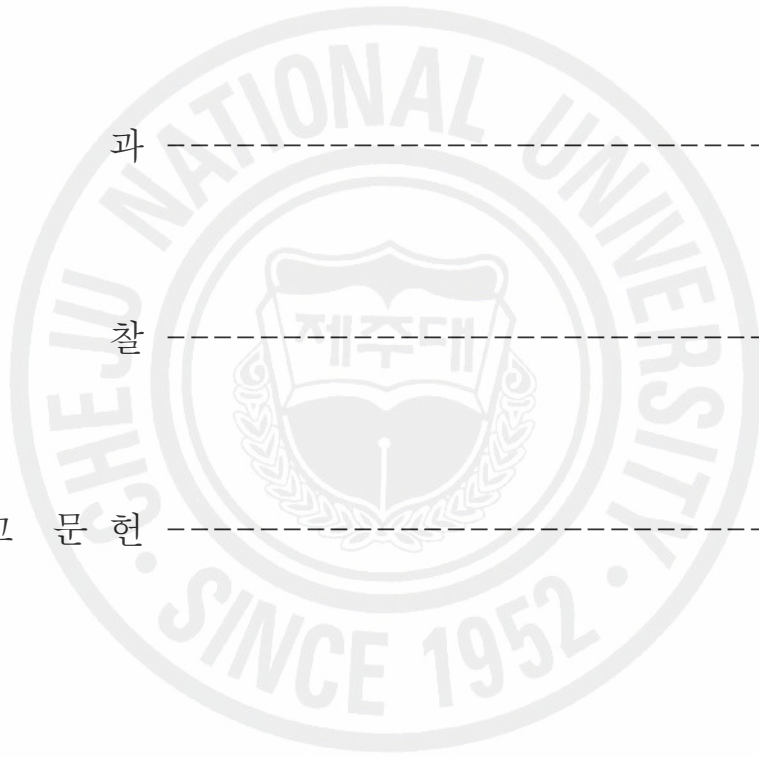
enhanced the production of cytokines such as interleukin (IL)-12, tumor-necrosis factor (TNF)-alpha and IL-10 from DCs. Ginsan-treated DCs increased the proliferation of allogeneic CD4⁺ T lymphocytes compared to control DCs. CD4⁺ T lymphocytes activated by ginsan-treated DCs produced a significant amount of interferon (IFN)-gamma and IL-4 in same experiments. It is thus suggested that ginsan may stimulate immune responses. Taken together, our results suggest that ginsan may enhance the DC-involved immune reactions through modulating the function of DCs.

Key words: dendritic cells, ginsan, immunostimulation, antigen-presenting capability



목 차

I. 서	론	-----	1
II. 재료 및 방법		-----	3
III. 결	과	-----	7
IV. 고	찰	-----	16
V. 참 고	문 헌	-----	17



I. 서 론

수지상세포 (dendritic cells; DCs)는 강력한 항원제시세포 (antigen-presenting cells)로서 미감작 T 림프구를 자극하여 면역반응을 개시하는 역할을 하는 중요한 세포이다. 수지상세포는 단백질항원을 포획하고 처리한 후 펩티드-MHC 복합체를 세포표면에 제시하는데, 미감작 T 림프구는 이에 반응하여 증식한다. 수지상세포는 분화과정에서 크게 미성숙 수지상세포와 성숙 수지상세포로 분류된다. 미성숙 수지상세포는 항원탐식능이 뛰어나고, 성숙 수지상세포는 세포표면 성숙표지자의 발현, interleukin (IL)-12 등의 싸이토카인 분비가 증가되어 항원 제시에 의한 면역자극능력이 증가된다. 수지상세포의 성숙은 interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor (TNF) 등의 염증성 싸이토카인과 T 림프구의 CD40L, lipopolysaccharide (LPS), CpG oligonucleotide 등의 미생물 구성성분 등에 의해 이루어진다. 성숙 수지상세포에서는 많은 특이적인 표지자들을 발현하는데, 항원제시세포와 T 림프구간의 면역반응에 관여하는 분자인 부착분자 (adhesion molecule)와 동시자극분자 (costimulatory molecule) 의 발현이 동시에 증가된다. 수지상세포의 성숙은 면역반응을 일으키는데 있어 중요하다 [1, 2, 8].

Ginsan은 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)에서 추출한 다당류 (polysaccharides)로서, 이전의 실험들에서 ginsan이 면역계의 여러 반응들을 활성화시키는 면역조절제로서 작용한다는 것이 밝혀져 있다. Ginsan은 lymphoid cell을 자극하여 증식을 유도하고 IL-1, IL-2, interferon gamma (IFN- γ), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 등의 싸이토카인을 분비하게 한다. Ginsan은 대식세포의 활성화 능력을 가지고 있는데, 마우스 복강 내 대식세포를 ginsan과 함께 배양했을 때 nitric oxide (NO) 생성이 증가하였으며 이 대식세포를 종양세포와 함께 배양 시 종양세포의 성장억제를 일으켰다 [4, 5, 7].

수지상세포에서의 ginsan의 효과에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다. 본 실험에서는 ginsan이 수지상세포에서 성숙을 일으켜 항원제시능이 증가하고, 수지상세포와 관련된 면역반응을 증가시킴으로써 면역자극을 유도할 수 있는지를 확인하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

수지상세포의 배양

6-7주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 구입하여 실험동물 관리시설에서 사육한 후 7-12주령에 실험에 사용하였다. 세포배양은 이전의 실험방법에 따라 행하였다 [3]. 마우스를 안락사시켜 양쪽 대퇴골과 경골을 분리한 후 Hanks balanced salt solution (HBSS, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 수세하여 골수 세포를 얻어내었다. 먼저 0.83% w/v ammonium chloride potassium (ACK) lysis buffer를 사용하여 실온에서 10분간 반응하여 골수세포 중에 있는 적혈구를 용혈시켰다. 골수세포를 2×10^6 cells/ml의 농도로 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen, Grand islands, NY, USA) 이 첨가된 RPMI-1640 배지 (Invitrogen)에서 6-well culture plate에 배양하였다. 그리고 10 ng/ml recombinant mouse granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF, Biosource, Camarillo, CA, USA)를 배지에 첨가하였다. 수지상세포를 5% CO₂가 공급되는 37°C incubator에서 배양한 후 2일마다 새 배지로 교체하였다. 배양 2일과 4일째에는 상층액에 떠 있는 lymphocyte, granulocyte를 제거하기 위해 전체 배지를 제거하고, GM-CSF가 포함된 새로운 배지로 교체하였다. 배양 6-10일에 70%의 배지를 교체하여 새 배지를 첨가하고, 상층액에 떠 있는 수지상세포를 얻어낸 후 0.4% trypan blue (Invitrogen)로 염색한 후 hemocytometer에서 세포수를 계산하여 실험에 사용하였다.

MTT assay

수지상세포를 5×10^4 cells/well로 96-well culture plate에 넣고 ginsan을 1.6, 8, 40, 200, 1,000 μ g/ml로 처리하여 5% CO₂가 공급되는 37°C incubator에서 48시간 배양하였다. 0.5 mg/ml 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-

tetrazolium bromide (MTT, Sigma) 용액을 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 0.01N HCl이 첨가된 10% sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma) 용액을 100 μ l/well로 첨가하였다. 살아있는 세포에 의한 MTT의 환원에 의해 생성된 불용성의 formazan crystal을 SDS로 용해시킨 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570-650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide 측정

수지상세포를 10×10^4 cells/well로 96-well culture plate에 넣고 1 μ g/ml anti-CD40 단클론항체 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), LPS (*Escherichia coli* O55:B5, Sigma), ginsan을 처리한 후 48시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess reagent (Sigma)를 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 nitrite의 형태로 측정하였다. 40 mg/ml Griess reagent와 세포 배양액을 1:1의 비율로 혼합하여 microplate reader (Molecular Devices)로 570 nm에서 측정하였다.

ELISA

수지상세포를 5×10^5 cells/ml의 세포 농도로 24-well plate에 넣고, ginsan을 처리하여 48시간 배양하였다. 세포 배양액 중에 존재하는 TNF- α , IL-12, IL-10의 양을 확인하기 위해 ELISA kit (Biosource)을 사용하였다. Allogeneic CD4⁺ T cell 과 ginsan을 처리한 수지상세포를 함께 5일 동안 배양한 후 상층액을 이용하여 IFN- γ , IL-4 ELISA (Biosource)를 실시하였다. 흡광도 측정은 microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 450 nm에서 실시하였다.

Flow cytometry

수지상세포에서 성숙표지자인 MHC class II 분자와 CD86가 세포표면에 발현된 양상을 관찰하기 위해 면역형광염색을 하였다. 수지상세포에 purified anti-

mouse CD40 단클론항체 (BD Biosciences) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 ginsan 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하여 2일간 배양한 후에 수거하여 세척한 후 실험에 사용하였다. 수지상세포 표면에 있는 Fc receptor를 차단하여 비특이반응을 최소로 하기 위해, purified anti-mouse CD16/CD32 단클론항체 (BD Biosciences)를 0.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 첨가하여 4°C에서 15분간 반응시켰다. Biotinylated anti-mouse I-A^b 항체 (BD Biosciences)와 biotinylated anti-mouse CD86 항체 (BD Biosciences)를 각각 0.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 첨가하여 4°C에서 30분간 반응하였다. 그 후에 streptavidin-fluorescein isothiocyanate (FITC, BD Biosciences)를 0.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 첨가하여 4°C에서 30분간 반응하였다. 각 항체 반응 후에 wash buffer를 사용하여 세포를 2회 세척하였다. 5% FBS와 0.1% sodium azide가 첨가된 PBS를 staining buffer와 wash buffer로 사용하였다. 세포를 1% paraformaldehyde가 첨가된 staining buffer에 담아 냉장보관한 후에 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences)와 CellQuest software를 이용하여 분석하였다.

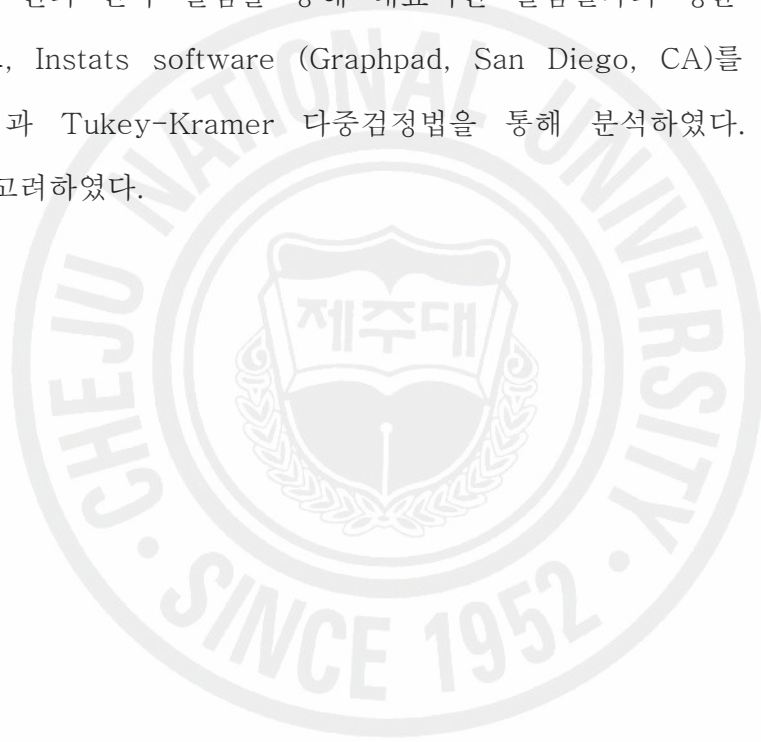
Allogeneic T cell proliferation assay

수지상세포가 allogeneic CD4⁺ T cell을 자극하는 능력을 확인하기 위해 시행하였다. BALB/c 마우스의 비장을 추출하여 T cell을 얻은 후 anti-CD4 (L3T4) microbeads를 이용한 magnetic cell sorting (MACS, Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, Germany)으로 CD4⁺ T cell을 순수분리하였다. 이 실험에서는 RPMI-1640 배지에 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated FBS, 0.1 mM non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 50 μM 2-Mercaptoethanol (Invitrogen)을 첨가하여 사용하였다. 96-well culture plate에 CD4⁺ T cell을 1×10^5 cells/well씩 넣고 여기에 ginsan을 처리한 수지상세포를 5×10^3 cells/well로 첨가하여 5일간 함께 배양하였다. 수지상세포는 ginsan을 처리하여 2일간 배양한 후 회수하여 배지로 2회 세척한 후 사용하였다. 이 때 수지상세포와 CD4⁺ T cell의 비율을 1:20, 1:60, 1:180,

1:540으로 배양하였다. 배양 4일째에 1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ 의 [^3H]thymidine (PerkinElmer, Wellesley, MA, USA)을 첨가하여 18시간 배양한 후 5일 째에 세포를 filtermat (PerkinElmer)에 harvest하여 liquid scintillation counter (PerkinElmer)를 이용하여 분석하였다. 결과는 분당 방출된 방사선량 (counts per minute; c.p.m.)을 평균 \pm 표준편차로 나타내었다.

Statistical analysis

결과는 세 번의 반복 실험을 통해 대표적인 실험결과의 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, Instats software (Graphpad, San Diego, CA)를 이용하여 1원 분산분석법과 Tukey-Kramer 다중검정법을 통해 분석하였다. $p < 0.05$ 의 유의성을 고려하였다.



III. 결 과

수지상세포에 대한 ginsan의 농도 별 처리 후 세포독성 평가

아무런 처리도 하지 않은 미성숙 수지상세포를 대조군 (100%)으로 두고 서로 비교하였다. 1.6 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 95.9%, 8 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 100.5%, 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 95.8%로 세포 독성이 비교적 낮는데 반해, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 79.6%, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 72.6%로 나타났다. 200 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 고농도에서는 유의성 있게 세포독성이 관찰되었다 (Fig. 1).

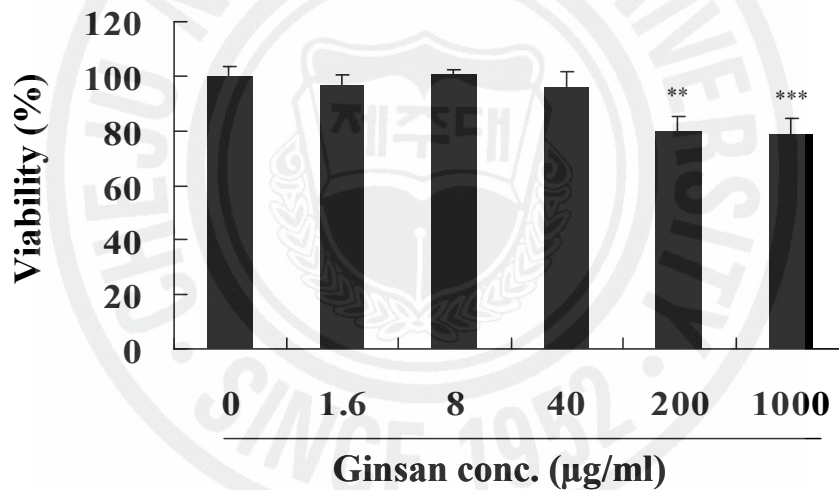


Fig. 1. The viability of DCs was sustained by ginsan. DCs were seeded at a concentration of 5×10^4 cells/well in 96-well culture plates. Cells were treated with ginsan for 48 hr. MTT reagent was added into wells for 24 hr and insoluble crystals were dissolved with 10% SDS solution. The absorbance was measured at 570–650 nm using a microplate reader. The absorbance value of the non-treated cells was set to 100%. Results are means \pm S.D. of three independent wells. Data are representative of three individual experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

수지상세포에 대한 ginsan 처리 후 NO 생성

아무런 처리도 하지 않은 미성숙 수지상세포를 음성대조군 (0.5 μM)으로, LPS을 농도별로 처리한 성숙 수지상세포를 양성대조군으로 두고 ginsan을 투여한 수지상세포에서의 NO 생성량을 비교하였다. LPS를 처리한 수지상세포에서는 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 47.1 μM , 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 60.0 μM , 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 75.1 μM 로 농도의존적으로 NO 생성이 증가되는 경향을 보였다. Ginsan을 처리한 수지상세포에서는 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 0.5 μM 로 음성대조군과 비슷한 수준으로 NO가 거의 생성되지 않았으며, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 10.9 μM 로 미량 생성되었다 (Fig. 2).

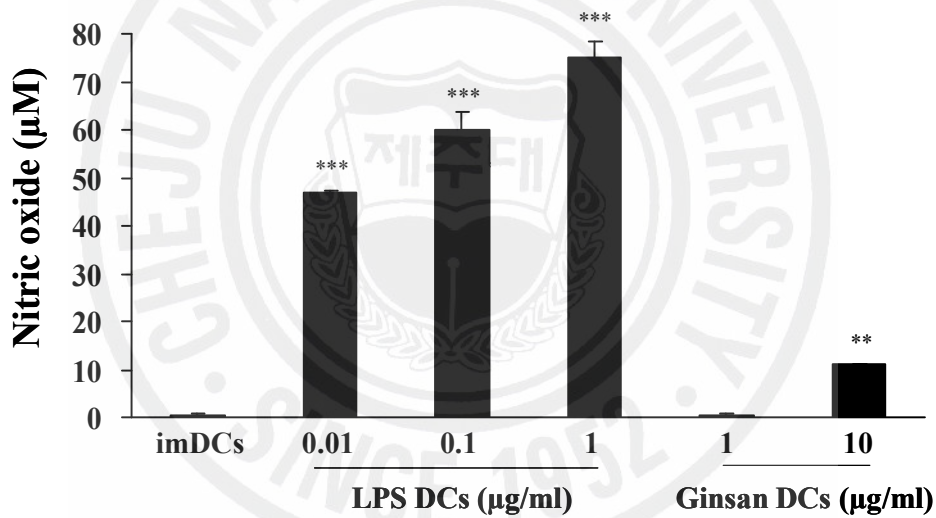
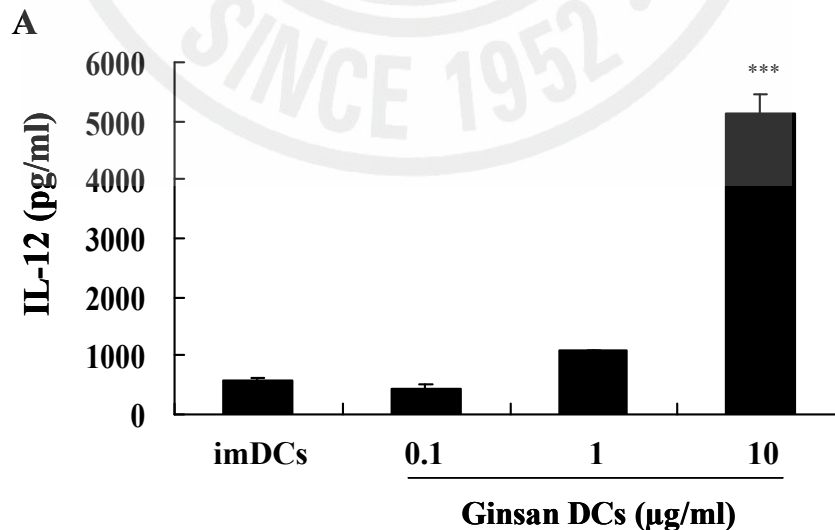


Fig. 2. Ginsan stimulated the production of NO from DCs. DCs were seeded at a concentration of 1×10^5 cells/well in 96-well culture plates. Cells were treated with LPS or ginsan for 48 hr. The NO levels in the supernatants of DC cultures were quantified using Griess reagent. The absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader. Results are means \pm S.D. of three independent wells. Data are the representative of three individual experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

수지상세포에 대한 ginsan 처리 후 IL-12, IL-10, TNF- α 의 생산

아무런 처리도 하지 않은 미성숙 수지상세포를 대조군으로 두고 ginsan을 투여한 수지상세포와 비교하였다. IL-12의 생성은 ginsan 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 441 pg/ml 로 대조군 (576 pg/ml)보다 낮았고, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 1072 pg/ml 로 대조군보다 2배 가량 증가하였으며, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 5151 pg/ml 로 10배 증가하였다 (Fig. 3A). IL-10의 생성은 미성숙 수지상세포에서 31.4 pg/ml , ginsan을 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 별로 처리한 경우 각각 0, 67.2, 129.4 pg/ml 를 나타내었다. 미성숙 수지상세포에 비해 ginsan 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 IL-10의 생성이 4배 증가하였다 (Fig. 3B). 미성숙 수지상세포와 anti-CD40 단클론항체 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 성숙 수지상세포에서 TNF- α 의 생성은 각각 35, 55 pg/ml 로 음성대조군으로 사용되었다. LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 수지상세포는 양성대조군으로 두고, ginsan 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 수지상세포와 비교하였다. 양성대조군에서 1,805 pg/ml , ginsan을 처리한 수지상세포에서는 1,610 pg/ml 의 TNF- α 가 생성되어 미성숙 수지상세포보다 46배 증가하였고, 양성대조군보다는 조금 낮게 생성되었다 (Fig. 3C).



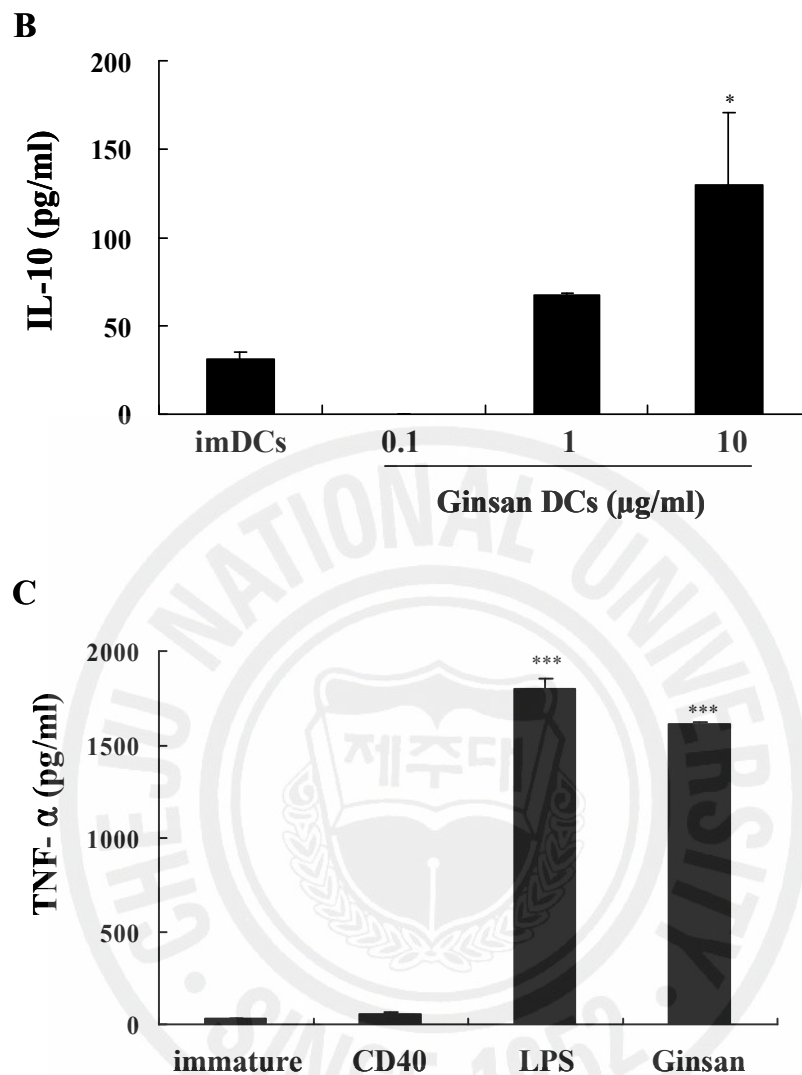


Fig. 3. Ginsan increased the production of IL-12, IL-10 and TNF- α from DCs. DCs were seeded at a concentration of 5×10^5 cells/well in 24-well culture plates. Cells were treated with ginsan for 48 hr. Thereafter, IL-12 (A), IL-10 (B) and TNF- α (C) secretion in culture medium were detected by ELISA. The absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader. Results are means \pm S.D. of three independent wells. Data are the representative of three individual experiments. Immature, non-treated DCs; CD40, DCs exposed to 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-mouse CD40 mAb; LPS, DCs exposed to 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS; Ginsan, DCs exposed to 10 $\mu\text{g/ml}$ ginsan, ***, $p < 0.001$

세포 표면의 MHC class II 분자와 CD86 분자의 발현 관찰

아무런 처리도 하지 않은 미성숙 수지상세포, maturation agent인 anti-CD40 단클론항체 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 성숙 수지상세포를 대조군으로 하여 ginsan 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 경우와 비교하였다. 데이터의 평균형광강도 (mean fluorescence intensity; MFI)를 비교하여 그림에 나타내었다. 이 수치는 streptavidin-FITC만을 반응시킨 수지상세포의 평균형광강도를 전체적으로 제외시킨 값으로 비특이반응에 대한 수치를 배제시켰다. 수지상세포 표면의 MHC class II 분자의 발현은 미성숙 수지상세포에서 305, 성숙 수지상세포에서 1107, ginsan을 처리한 수지상세포에서 430의 값을 나타냈다. Ginsan을 처리한 수지상세포에서 미성숙 수지상세포보다 MHC class II 분자의 발현이 증가하였음을 알 수 있다. CD86의 세포 표면 발현은 미성숙 수지상세포에서 74, 성숙 수지상세포에서 179, ginsan을 처리한 수지상세포에서 342를 나타냈다. CD86의 발현 역시 미성숙 수지상세포보다 증가하였고, 특히, 성숙 수지상세포보다 그 발현이 더 증가하였다 (Fig. 4).

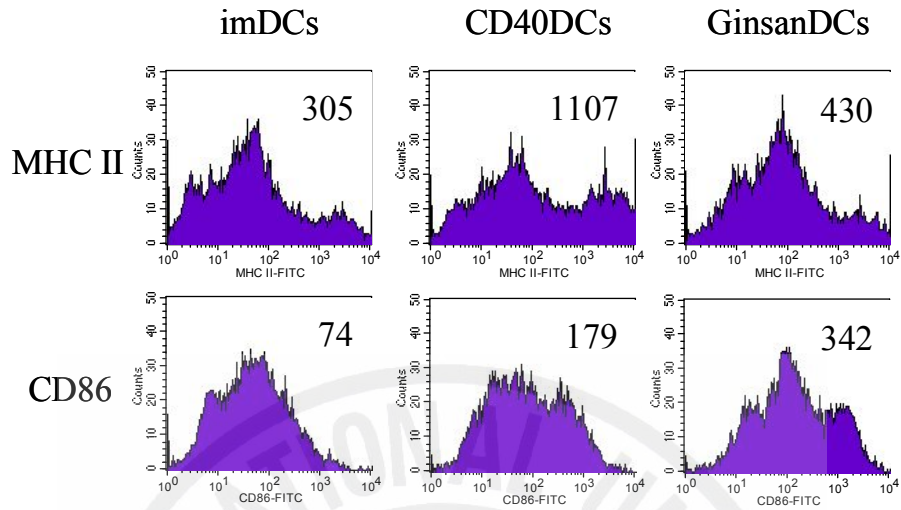


Fig. 4. Ginsan increased the maturation marker, MHC class II molecules, and a costimulatory molecule, B7-2 (CD86), on DCs. DCs were seeded at a concentration of 5×10^5 cells/well in 24-well culture plates. Cells were treated with $1 \mu\text{g/ml}$ anti-CD40 mAb, $10 \mu\text{g/ml}$ ginsan for 48 hr. Cells were stained with biotinylated anti- I-A^b, biotinylated anti-CD86 antibodies and Streptavidin-FITC. Stained cells were analyzed using flow cytometry. Results were expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) calculated according to the formula: mean fluorescence of sample – mean fluorescence of control. Data are the representative of three individual experiments. ImDCs, non-treated DCs; CD40DCs, DCs exposed to $1 \mu\text{g/ml}$ anti-CD40 mAb; GinsansDCs, DCs exposed to $10 \mu\text{g/ml}$ ginsan.

Ginsan 처리에 의한 수지상세포의 alloproliferative capacity 변화

Anti-CD40 단클론항체를 처리한 수지상세포와 ginsan을 처리한 수지상세포는 다양한 비율의 세포배양에서 미성숙 수지상세포에 비해 유의성 있게 allogeneic CD4⁺ T cell의 증식을 일으켰다. 결과는 분당 측정된 방사선량 (c.p.m.)을 평균값±표준편차로 나타내었다 (Fig. 5).

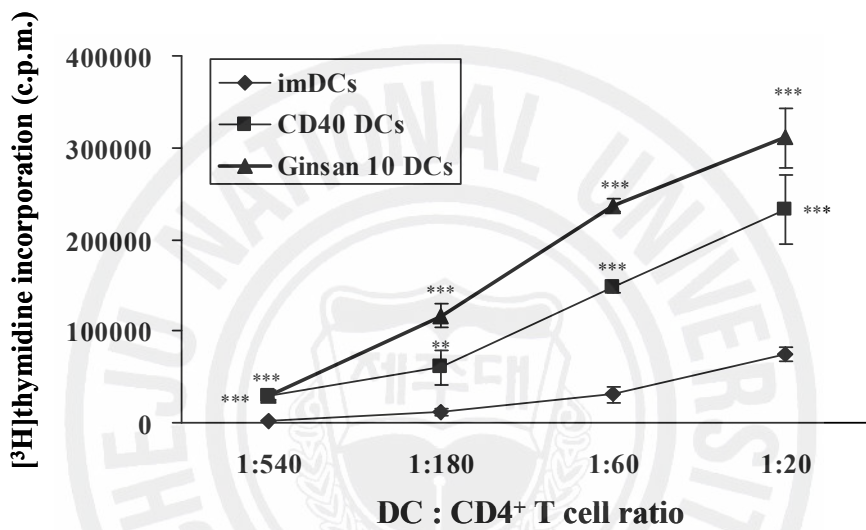


Fig. 5. Ginsan-treated DCs stimulated allogeneic CD4⁺ T cells in mixed leukocyte reactions (MLRs). DCs were treated as described in Fig. 4. DCs were harvested, washed with the media. CD4⁺ T cells were seeded at 1×10^5 cells/well at 96-well plate and then cocultured at a range of concentrations of DCs. In 5-day coculture, cells were pulsed with 1 μ Ci/well of [³H]thymidine for last 18 hr. [³H]thymidine incorporation was determined by liquid scintillation counter. Results are means \pm S.D. of three independent wells and expressed as counts per minute (c.p.m.). Similar results were obtained in three other experiments. ImDCs, control cells; CD40 DCs, DC exposed to 1 μ g/ml anti-CD40 mAb; Ginsan 10 DCs, DC exposed to 10 μ g/ml ginsan. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Ginsan 처리된 수지상세포에 의해 자극된 CD4⁺ T cells의 cytokine 생산

Anti-CD40 단클론항체를 처리한 수지상세포와 ginsan을 처리한 수지상세포는 미성숙 수지상세포에 비해 CD4⁺ T cell로부터 IFN- γ 와 IL-4의 생성을 증가시켰다 (Fig. 6).

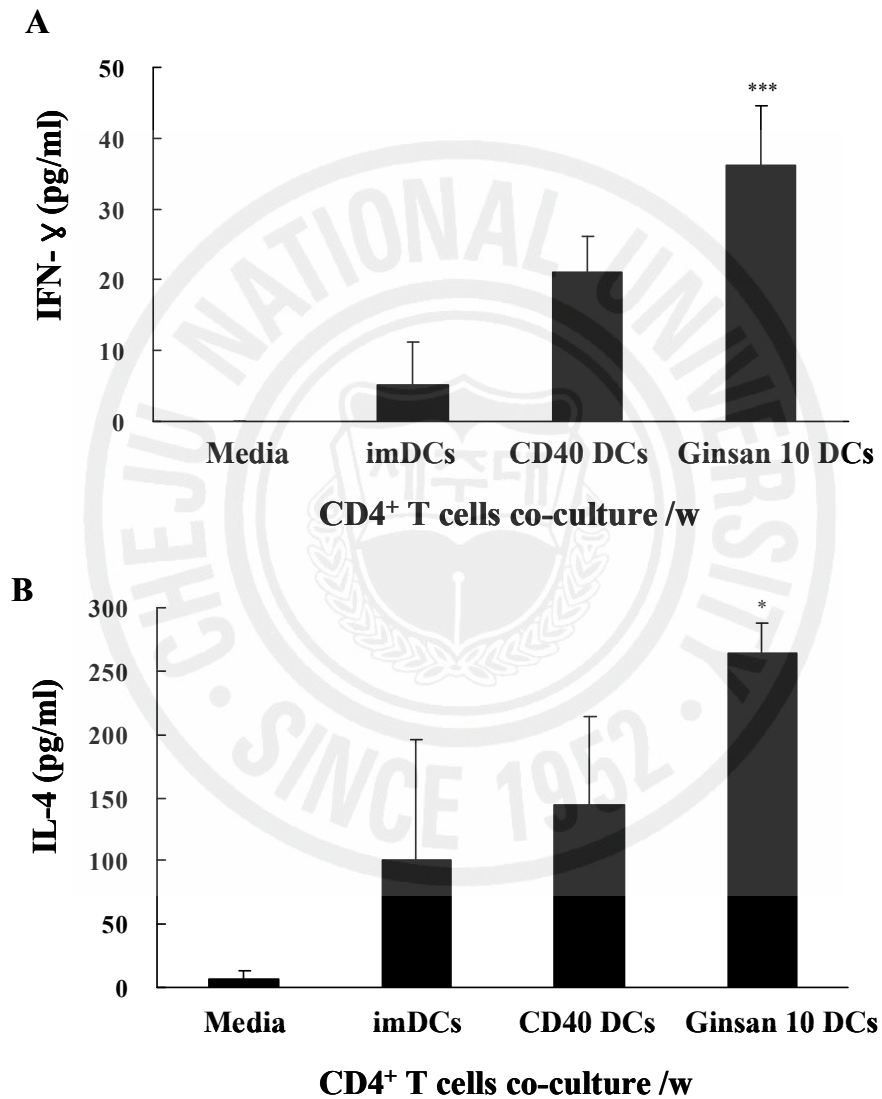


Fig. 6. Ginsan-treated DCs induced IFN- γ and IL-4-producing allogeneic CD4⁺ T cells. DCs and CD4⁺ T cells were cocultured as described in Fig. 5. After 5-day coculture, the level of IFN- γ (A) and IL-4 (B) in culture medium was detected by ELISA. The absorbance was measured at 450 nm using a

microplate reader. Results are means \pm S.D. of three independent wells. Data are the representative of three individual experiments. Media, CD⁺ T cell only; imDCs, control cells; CD40 DCs, DC exposed to 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD40 mAb; Ginsan 10 DCs, DC exposed to 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ginsan. ***, $p < 0.001$



IV. 고 찰

이번 연구에서 ginsan에 의한 미성숙 수지상세포의 성숙 수지상세포로 분화는 면역반응을 활성화시키는데 있어 중요한 의미를 갖는다. 성숙 수지상세포는 세포 표면에 성숙 표지자인 MHC class II 분자, 동시자극분자인 B7-2(CD86)의 발현이 증가되어 항원제시세포로서의 효율이 증가된다. 그리고 활성화된 수지상세포는 싸이토카인을 분비하여 적응면역반응에서 T 림프구의 Th1 또는 Th2 형태로 분화를 유도한다.

Ginsan에 의해 수지상세포에서 IL-12의 증가는 중요한 의미를 갖는다. IL-12는 수지상세포, 단핵구, 대식세포에서 분비되어 선천면역반응에서 초기 미생물에 대한 비특이적인 방어와 항원-특이적인 적응면역반응, 특히 세포-매개 면역 반응 사이에서 기능적인 고리 역할을 하는 사이토카인이다. IL-12는 선천면역반응에서 감염 초기에 NK cell, T cell로부터 IFN- γ 의 생성을 유도하여 포식세포의 활성화와 염증반응에 관여하며, Th1 cell로의 분화에 있어 중요한 사이토카인이다.

실험에서 사용한 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 ginsan은 수지상세포에서 미량의 NO를 생성하였으나, TNF- α 의 생성은 증가시켰다. TNF- α 는 선천면역의 유지에 있어 중요한 사이토카인이다. 특히, *in vitro*에서 수지상세포를 배양할 때 수지상세포의 성숙을 유발시키는 사이토카인이다 [6].

Ginsan에 의해 분화된 성숙 수지상세포는 CD4⁺ T 림프구에 항원을 제시하는 능력이 증가되어 세포매개면역반응을 증가시키는 데 관여할 것이다. 이는 ginsan이 수지상세포의 능력을 향상시켜 CD4⁺ T 림프구를 자극함으로써 IFN- γ 의 분비를 유도하고, 이로 인해 세포독성 T 림프구를 활성화시켜 세포 내 기생 미생물에 감염된 표적세포를 사멸하는 것과 같은 적응면역 반응을 증가시키는 데 관여할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 *Panax ginseng*으로부터 추출한 ginsan이 수지상세포의 항원 제시 능력에 있어서 다양한 기능 변화를 유발하여 면역자극 효과가 있다는 것을 증명하였다.

V. 참고 문헌

1. Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol* 2005, 25, 87-98.
2. Banchereau J and Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392, 245-252.
3. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992, 176, 1693-1702.
4. Lee YS, Chung IS, Lee IR, Kim KH, Hong WS, Yun YS. Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginsan isolated from *Panax ginseng*. *Anticancer Res* 1997, 17, 323-331.
5. Lim DS, Bae KG, Jung IS, Kim CH, Yun YS, Song JY. Anti-septicaemic effect of polysaccharide from *Panax ginseng* by macrophage activation. *J Infect* 2002, 45, 32-38.
6. Santiago-Schwarz F. Positive and negative regulation of the myeloid dendritic cell lineage. *J Leuk Biol* 1999, 66, 209-216.
7. Song JY, Han SK, Son EH, Pyo SN, Yun YS, Yi SY. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. *Int*

Immunopharmacol 2002, 2, 857-865.

8. **Steinman RM.** Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. Mt Sinai J Med 2001, 68, 160-166.



감사의 글

1999년 대학에 입학하여 수의학을 공부하고, 2005년 대학원에 진학하여 생활하는 동안 전문적인 지식 습득 뿐만 아니라 다양한 경험을 할 수 있었던 소중한 시간이었던 것 같습니다.

대학원 석사 과정에 진학하여 생활하는 동안 자상한 지도로 이끌어 주신 주홍구 교수님께 항상 감사드리며, 본 논문을 심사해 주신 이영재 교수님과 의과대학 유은숙 교수님께 감사드립니다.

수의학을 공부하는데 있어 많은 가르침을 주셨던 김희석 교수님, 배종희 교수님, 박전홍 교수님, 신태균 교수님, 이경갑 교수님, 임윤규 교수님, 이두식 교수님, 정종태 교수님, 우호춘 교수님, 손원근 교수님, 지영혼 교수님, 윤영민 교수님, 강태영 교수님, 이주명 교수님, 김재훈 교수님, 황규계 교수님, 박현정 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

여러 도움을 주신 실험실 가족인 변운영 선생님, 제욱오빠, 희원, 수안, 현지, 기호, 민성, 형진, 숙희, 재훈, 복환, 경현, 보은, 은주, 그리고 혜영이에게 감사의 마음을 전합니다. 대학원 생활을 함께 하면서 많은 도움을 주었던 원형오빠, 현호오빠, 보람오빠, 지영, 민희에게 감사의 마음을 전합니다. 수의학을 함께 공부하며 따뜻한 조언과 사랑을 아끼지 않았던 일구오빠에게도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 지금까지 사랑으로 키워주시고 공부할 수 있도록 지원해 주신 부모님과 많은 조언을 주신 언니와 동생 현정, 병찬에게 감사의 마음을 전합니다.

2006년 12월

김 미 형