

30VP1200514281

최 종
연구보고서

인삼잎 추출물을 이용한 면역활성물질의
상품화

Development of Immuno-stimulators Using Extracts
from the Leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer

연구기관
경기대학교

농림부

최 종 보 고 서

1999년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 인삼잎 추출물을 이용한 면역활성물질의 상품화에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2002 년 11 월 일

주관연구기관 : 경 기 대 학 교

총괄연구책임자 : 신 광 순 (인)

주관연구기관장 총 장

직 인

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “인삼잎 추출물을 이용한 면역활성물질의 상품화” 과제의 최종
보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 일

주관연구기관명 : 경기대학교
총괄연구책임자 : 신 광 순
세부연구책임자 : 신 광 순
세부연구책임자 : 이 호
협동연구기관명 : 한국보건산업진흥원
협동연구책임자 : 이 주 돈
참 여 기 업 : (주) 유젠바이오
(구, 나투라)

요 약 문

I. 제 목

인삼잎 추출물을 이용한 면역활성물질의 상품화

II. 연구개발의 목적 및 중요성

인삼은 오갈피나무과의 *Panax ginseng* C.A. Meyer를 기원식물로 하는 다년생 초본류로 중국 남부의 삼칠인삼(*Panax notoginseng*) 일본의 죽절인삼(*Panax japonicus* C.A. Meyer)와 화기삼(서양인삼, *Panax quinquefolia*)등의 인삼의 대응품과는 구분되는 우리나라 전통 생약재이다. 인삼은 전통 한방에서 강장, 강정, 진정, 항피로약, 위장 쇠약에 의한 신진대사 기능저하에 주로 사용되며 이중탕(理中湯), 소시호탕(小柴胡湯), 인삼탕(人蔘湯), 십전대보탕(十全大補湯)등에 포함되어 음용되고 있는데 그 효과가 탁월하다고 세계적으로 인정되고 한국의 대표적 산물이라 할 수 있다. 인삼의 효능은 단지 경험적이고 전통약재로써의 기능뿐만아니라 현대 의학적으로도 상당한 연구가 진척되어 있는데 자양 강장효과, immuno-stimulating activity, antitumor activity, hypoglycemic activity, anti-cholestrolemic activity가 탁월하다고 보고되고 있으며 그외에도 숙취제거효과 및 순환계 질환에도 특별한 효과가 인정되고 있다.

우리나라에서는 98년을 기준으로 할 때 전국적으로 22,170호에서 10,349 ha에 인삼을 경작하여 연간 12,592 MT을 생산하고 3,445억원의 농가 수입을 올리고 있다. 또한 인삼은 그 약리효과에 대한 세계적 선호도 때문에 2,350 MT, 약 1억1천만불의 수출고를 올리고 있는 대표적 농산물이기도 하다. 그러나 인삼의 근부(根部)는 그 효과의 우수성에도 불과하고 파종후 수확까지 최소 4-6년 까지의 장기간이 소요되는 단점을 소유하고 있는 반면, 인삼의 엽부(葉部)의 경우 일년중 내내 수확이 가능하다는 잇점을 소유하고 있으며, 현재 대부분 폐기되고 있는 현실을 고려 할 때, 폐자원 이용이라고 하는 잇점을

소유하고 있다. 따라서 인삼의 엽부로 부터 인삼의 근부에 상당하는 활성 혹은 새로운 활성을 찾아낼 경우 신자원 소재의 개발이라는 측면에서도 그 의의가 깊다고 사료된다.

최근 식품성분에 대해 새로운 관점에서 계통적, 조직적인 연구가 발전함에 따라 식품유래의 특정 성분들이 인체의 신경계, 순환계, 내분비계, 생체방어계, 세포분화 등 각종 생리기능조절계에 작용하여 직·간접으로 생체조절기능 효과를 나타낸다는 사실들이 밝혀지고 있다. 이들 특정성분들에 의한 생체조절계 및 생체방어계에 대한 적절한 조절이 가능하게 된다면 그것은 전인류적 규모의 지속적이고도 가장 자연스러운 건강유지를 위한 강력한 수단이 될 수 있음을 의미한다. 따라서 이들 식품유래의 생체조절 가능성 인자들의 작용기구, 작용부위, 구조해석 등의 해명은 대단히 중요하다고 하겠다.

본 연구그룹이 선정한 인삼잎은 식용식물 중에서 약리 및 생리활성에 대한 구전과 보고가 상당히 제한적이었으며 본격적으로 국내 인삼잎의 생리활성 성분에 대한 체계적인 연구는 거의 없는 실정이었다. 인삼잎을 경쟁력을 갖는 하나의 산업종으로 육성하기 위해서는 이들로 부터 고부가가치성 물질의 개발과 제품화가 전제되어야 한다. 최근에 이르러 식품에 도입되고 있는 3차 기능은 질병을 발병의 전단계에서 식품을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로 향후 고령화 사회에서 기능성식품의 수요가 의약품을 상회할 것으로 예측되고 있다. 뿐만 아니라 WTO 체제의 출범으로 인한 농산물 시장개방 하에서 농업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 농산물을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발하는 일이다. 우리나라는 전통적으로 인삼을 애용해 왔으며 전래되어 오고 있는 민간식이요법이 다양하여 기술 선진국과의 특허문제를 야기시키지 않고 경쟁력 있는 의약품, 식품용 신소재의 창출이 가능하기 때문이다

본 연구는 인삼잎 함유 미량성분 중 주로 면역계에 약리, 생리활성을 갖는 물질을 소재화하고 이들 소재를 주제로 한 기능성식품의 개발로 연결함으로써 국내 농업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고시킴에 두고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

최종목표를 달성하기 위해 소재에 따라 다음과 같이 제 1, 2 및 3(협동) 세부과제로 구성하였다.

제 1 세부과제 : 인삼잎 함유 자기면역질환 치유활성물질의 기능성 소재화

1. 인삼잎으로부터 자기면역 질환 치유 활성물질의 검색
 - 1) 인삼잎의 자기면역 질환 치유활성 검토
 - 2) 추출 용매별 활성 검색
 - 3) 수용성 활성물질 추출 조건 검토 및 설정
2. 자기면역 질환 치유 활성 물질의 본체 분석
3. 자기면역 질환 치유 활성화 다당의 분리 및 정제
4. 자기면역 질환 치유 활성다당의 구조 분석
 - 1) GS-3c-II의 methyl화 및 proton-NMR 분석
 - 2) 선택적 가수분해과정에서 얻어진 oligo당 단편의 구조분석
5. 면역 복합체 제거능의 *in vivo* 실험
 - 1) GS-3c-II의 *in vivo* 투여가 면역복합체 제거능에 미치는 영향
 - 2) *In vivo* 면역 복합체 제거능
6. 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안

제 2 세부과제 : 인삼잎 함유 보체계 활성물질의 기능성 소재화

1. 인삼잎으로부터 항보체 활성화 물질의 검색
 - 1) 인삼잎의 산지별 항보체 활성 검토
 - 2) 추출 용매별 항보체 활성 검색
 - 3) 인삼잎 열수추출 최적 조건 검토
2. 항보체 활성물질의 본체 분석
3. 보체계 활성화 다당의 분리 및 정제
4. 보체계 활성화 다당의 작용 양식
 - 1) GS-4 획분의 보체계 활성화 작용 양식
 - 2) 교차 면역전기영동에 의한 C3 분해 산물의 동정
 - 3) Alternative pathway를 경유한 보체계의 활성화

5. 보체계 활성화 다당의 구조 특성
 - 1) 보체계 활성화 다당의 일반 구조 특성
 - 2) 보체계 활성화 다당의 결합양식
6. 보체계 활성화능의 *in vivo* 실험
 - 1) *In vivo* 투여가 체내 complement 활성화에 미치는 영향
 - 2) Complement C3-positive 형광세포의 유도
7. 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안

제 3 세부과제 : 인삼잎 함유 면역증강 활성화 물질의 기능성 소재화

1. 인삼잎으로부터 mitogen 및 macrophage 활성화 물질의 검색
 - 1) 추출 용매별 mitogen 및 macrophage 활성화능 검색
 - 2) 열수추출 고분자 획분의 조제 및 면역증강 활성 측정
2. Mitogen 및 macrophage 활성물질의 본체 분석
3. 면역 활성화 다당의 분리 및 정제
4. 면역활성 다당의 구조 특성
5. 활성다당의 각종 면역 활성
 - 1) 활성다당이 면역세포의 cytokine 생산에 미치는 영향
 - 2) 활성다당이 장관 면역 활성화에 미치는 효과
 - 3) 정제 획분에 의한 macrophage 기능 항진 효과
6. 면역활성 다당체 GS-1의 독성실험
7. 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

인삼잎 함유 면역활성물질을 규명하고 소재화하기 위한 하고 목적으로 본 과제를 수행한 결과 활성 획분이 다당체임을 확인하고 그 구조의 일부를 규명 하였으며 자기면역 치유활성, 항보체 활성, macrophage활성, mitogen 활성, 장관면역활성 등에 대한 다수의 *in vitro* assay계 및 *in vivo* assay계를 확립 하였다. 또한 각종 추출 및 정제기술을 활용하여 식품유래 면역활성물질의 소재화기술을 확보하였다. 각 세부과제별 연구개발결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 제 1 세부과제 : 인삼잎 함유 자기면역질환 치유활성물질의 기능성 소재화

본 연구는 인삼잎으로부터 자기면역질환에 대해 치유 활성을 갖는 물질을 분리, 정제한 후 그에 대한 구조분석을 행하고 소재화하는 것을 목적으로 하였다. 인삼잎의 산지별, 추출 용매별 자기면역질환 치유활성을 glucose oxidase-anti-glucose oxidase를 이용한 면역 복합체 제거활성(immune complex clearance activity)으로 측정한 결과, 금산산의 인삼잎을 수용계 용매로 추출하였을 때 활성과 수율면에서 가장 우수한 것으로 판단되었다. 인삼잎은 100℃에서 5시간, 3회 연속추출하고, 저분자물질 및 색소를 제거하고 효율적으로 고분자 물질을 회수하기 위해 80% ethanol 침전을 행하여 활성 조당 당 획분(GS-1)의 대량 추출을 행하였다.

GS-1은 Cetavlon에 의해 산성도가 다른 3개 획분 GS-2, GS-3, GS-4를 얻었으며, 이 중 약산성 획분인 GS-3가 농도의존적으로 가장 높은 활성을 나타냈다. GS-3 획분 중에 존재하는 활성 본체를 규명하기 위해 GS-3를 periodate 와 pronase로 처리한 후 활성을 비교한 결과, periodate 산화처리에 의해 활성이 크게 감소한 반면 periodate 분해처리에 의해서는 뚜렷한 활성의 변화가 관찰되지 않음으로써 활성에 관여하는 물질이 다당일 가능성을 시사하였다. GS-3는 DEAE-Sepharose FF, QAE-Sepharose, Bio-gel P-30 column을 이용한 연속적인 3회의 column chromatography를 수행하여 균일한 활성 획분 GS-3c-II를 얻었다. GS-3c-II는 HPLC 상에서 분자량 11,000의 단일획분임이 판명되었으며 중성당, 산성당 및 단백질은 각각 64.1%, 33.7%, 2.2%의 비율로 함유하고 있었다. 한편 구성당 분석을 행한 결과, Apiose, 2-methyl-xylose, 2-methyl fucose, KDO, DHA등의 희귀당을 함유하고 있고 rhamnose, arabinose, galactose, galacturonic acid를 주 구성당으로 하는 총 15개 구성당이 검출되었다.

GS-3c-II의 구조분석을 위해 methyl화 분석을 통한 결합양식을 살펴본 결과, 3,4-branched fucose, 3-linked rhamnose, 2,4 branched rhamnose, 3'-linked Apiose등 총 30여개의 linkage를 소유하고 있었으며, ¹H-NMR(300 MHz) 분석 결과와 조합하여 검토해 볼 때 GS-3c-II는 repeating unit가 극도로 제한되어 있고 많은 분지쇄를 가진 복잡한 구조임을 알 수 있었다. GS-3c-II의 미세 구조를 규명하기 위해 0.1 M TFA로 연속적인 부분 가수

분해를 행하고 이들에서 분리된 oligo 당 단편을 각종 분석 방법을 도입하여 구조 분석을 행하였다. GS-3c-II는 0.1 M TFA용액으로 40°C에서 24시간 가수분해(분해과정 1)하여, 분자량이 서로 다른 3개획분 PH-1, PH-2 및 PH-3을 얻었다. 이 중 PH-3을 구성당 분석, methylation, methylated oligosaccharide의 GC-MS 해석을 행한 결과, 동 획분이 분해과정에서 GS-3c-II의 주쇄에서 분리된 Rhap-(1→5)-Kdo와 Araf-(1→5)-Dha의 구조를 갖는 것이 확인되었다. 한편 가수분해 과정에서 얻어진 중간크기의 oligosaccharide인 PH-2 획분은 2-methylfucose, rhamnose, arabinose, apiose, aceric acid, galactose를 높은 비율로 함유하였으며 methyl화 분석결과에서는 terminal 2-Me-Fuc, Rha, 3-linked Rha, 2,4-branched Gal 및 2-linked AceA 등의 결합양식이 관찰되었으며 terminal Araf, 2,3-branched Arap 와 2-linked Rha등 기존 RG-II에서는 발견되지 않는 별도의 결합양식을 가지고 있었다. 한편 PH-2를 대상으로 negative FAB-MS와 FAB-B/E linked scan을 행하여 결합서열을 살펴본 결과 Aceric acid containing monoacetylated nonasaccharide의 구조를 소유하고 있음을 알 수 있었다. 한편 고분자로 남아 있던 PH-1은 다시 0.1 M TFA용액으로 40°C에서 84시간 가수분해(분해과정 2)하여, Bio-gel P-6 column으로 겔여과 하였으며 분자량이 서로 다른 4개 획분 PH-1a, PH-1b, PH-1c 및 PH-1d 분획하였다. 구조분석 결과 PH-1d는 주쇄에서 잘려나온 단당류가, PH-1c는 Rhap-(1→5)-Kdo가 주로 존재함을 확인할 수 있었다. 또한 PH-1b 획분에서는 2,3,4-full brached rhamnose가 관찰된 점, terminal 2-MeFucose의 존재와 높은비율로 terminal galacturonic acid linkage가 존재하는 점으로 미루어 Uronic acid rich octasaccharide 구조를 함유하는 것으로 판단되었다. 한편 PH-1a는 endo- α (1→4)-polygalacturonase로 가수분해하고 구조 분석을 행하였다. 이상의 결과는 GS-3c-II가 α (1→4) 결합의 oligogalacturonide로 하고 Rhap-(1→5)-Kdo, Araf-(1→5)-Dha, Aceric acid containing nonasaccharide와 Uronic acid rich oligosaccharide가 분지쇄를 이루고 있는 complex polysaccharide임을 알 수 있었다.

인삼잎에서 정제된 GS-3c-II가 *in vitro*에서 강력한 면역 복합체 제거능을 가지고 있는 것으로 나타났으므로 이들이 *in vivo*에서도 동일 경향을 나타내는 지 확인하기 위해 GS-3c-II를 복강 내 주사하여 macrophage를 활성화시키고, 이를 이용하여 면역 복합체 제거능을 측정하였다. 25 mg/kg 처리군에서 유의적으로 활성이 증가하는 양상을 보여 주었으며 활성화된 macrophage는 수용성 및 불용성 면역 복합체에 모두 작용함을 알 수 있었다. 또한 면역

복합체 (GAG)를 꼬리정맥으로 직접 투여하고 이들의 제거능에 미치는 GS-3-c-II의 *in vivo* 효과를 검토한 결과 25 mg/kg과 50 mg/kg 처리군에서는 유의적으로 반감기 감소가 인정됨으로써 GS-3c-II가 체내 면역복합체 제거에 우수한 활성이 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 본 시료는 *in vivo* 상에서 뿐만 아니라 *in vitro* 상에서도 잠재성있는 면역증강제로써 작용할 것으로 사료된 바, 공업적으로 응용가능한 활성 획분 GS-1을 대상으로 기능성 음료를 제조하고 이들의 배합 조성을 결정 하였다.

2) 제 2 세부과제 : 인삼잎 함유 보체계 활성물질의 기능성 소재화

본 연구는 인삼잎으로부터 항보체 활성을 갖는 물질을 분리, 정제한 후 그에 대한 제반 특성을 규명하고, 이를 토대로 기능성 식품 소재화하는 것을 목적으로 하였다. 인삼잎의 산지별, 추출 용매별 항보체 활성을 Ig-M sensitized sheep erythrocyte를 이용 총보체용혈의 저지율(Inhibition of TCH₅₀)로 측정 한 결과, 금산산의 인삼잎의 추출물 1000 µg/ml의 농도에서 ITCH₅₀ 값이 80% 내외의 높은 활성을 보였으며 열수 추출시 활성과 수율면에서 가장 우수한 것으로 판단되었다. 인삼잎은 100℃에서 5시간, 3회 연속추출하고, 80% ethanol 침전을 행하여 고분자물질을 회수하고 투석과 동결건조를 거쳐 활성 조당당 획분(GS-1)의 대량 추출을 행하였다.

GS-1은 Cetavlon을 처리하여 산성도에 따른 3개획분 GS-2, GS-3 및 GS-4로 분획하였으며 이중 GS-4가 활성과 수율의 양호한 결과를 보였다. GS-4의 화학 조성을 분석한 결과 중성당, 산성당 및 단백질의 함량이 각각 68.1%, 21.2%, 10.6%로 나타났으며 이러한 결과는 시료중의 항보체 활성능이 어느 부위에 기인하는 것인지 확실히 구별할 수 없으므로 GS-4의 당 부위를 산화개열 시키는 periodate처리와 단백질부위를 가수분해하는 protease처리 및 polyphenol류를 산화시키는 chlorite처리를 행한 후 활성을 비교하였다. 미처리 GS-4의 활성과 비교했을때 protease, chlorite, polymyxin B 처리시에는 활성 변화에 큰 영향이 없었으나 periodate 처리시에는 급격한 활성의 감소가 인정됨으로써 활성에 주로 기여하는 부위는 다당류 부분임을 알 수 있었다. GS-4는 상세한 특성을 규명하기 위해 DEAE-Sepharose FF(Cl⁻ form)로 anion exchange chromatography를 행하여 분획하였으며 이 중 GS-4a, GS-4b 및 GS-4c가 ITCH₅₀ 값 85%이상의 고도의 활성을 나타냈다. 이들 획분은

Biogel P-30, Biogel P-100을 이용하여 gel filtration을 행하여 GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia 및 GS-4c-IIb를 최종 선택할 수 있었다. 이들은 중성당 함량이 55.4~65.2%, 산성당 함량이 30.3~39.2%로 구성된 다당체였으며, 주로 arabinose(13.6~22.5%)와 galactose(15.3~34.8%)가 높은 비율로 함유하고 그외 rhamnose, fucose, xylose, mannose 및 glucose등이 소량씩 소유함을 알 수 있었다. 한편 GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia 및 GS-4c-IIb의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 HPLC를 행한 결과, 4종의 정제 다당획분은 모두 단일 peak를 나타냈으며(Fig. 3-19) 분자량은 각각 14,400 Da, 31,000 Da, 81,000 Da, 71,000 Da으로 평가되었다.

이들 정제 획분들이 보체계의 classical pathway와 alternative pathway 중 어느 경로를 활성화시키는지 확인하기위해 GVB^{++} 기본 반응계와 2가 금속이온을 모두 제거한 $EDTA-GVB^{--}$ 반응계 및 Ca^{++} 이온을 선택적 제거한 $Mg^{++}-EGTA-GVB^{--}$ 반응계로 나누어 항보체 활성($ITCH_{50}$, %)을 측정하였다. 그 결과, 정제 활성화당들은 모두 기본반응계인 GVB^{++} 에서는 높은 활성을 보인 반면 2가 금속이온을 모두 제거한 $EGTA-GVB^{--}$ 반응계에서는 대조구에 비하여 완전한 활성의 감소를 $Mg^{++}-EGTA-GVB^{--}$ 반응계에서는 20~40%의 활성을 보였다. 또한 GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia 및 GS-4c-IIb를 각각 정상인의 혈청(NHS)을 반응시킨 후 anti-human C3를 이용하여 교차 면역전기영동을 행하여 C3의 분해 산물을 동정한 결과, 활성화당들의 경우 GVB^{++} 기본 반응계에서 C3의 활성화에 기인한 2개의 침강선이 관찰되었으며, alternative pathway만이 작용하도록 고안한 $Mg^{++}-EGTA-GVB^{--}$ 반응계에서는 활성화된 C3a와 C3b에 기인한 침강선이 기본반응계에 비해 상대적으로 작게 나타나 활성화당에 의한 보체계의 활성화에 alternative pathway가 일부분 관여함을 확인할 수 있었다. 한편 감작화되지않은 토끼의 적혈구를 이용한 부경로 활성화 실험에서 GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia 및 GS-4c-IIb는 30-40% 정도의 $IACH_{50}$ 수치를 보였다. 이러한 사실은 인삼잎 활성화 다당들이 보체계의 classical pathway와 alternative pathway 모두를 경유하여 강력한 항보체 활성을 보임을 재차 확인할 수 있었다.

항보체 활성 정제획분 GS-4a-I, GS-4b-I는arabinose와 galactose가 높은 비율로 함유되어 있으므로 arabinogalactan으로 존재할 가능성이 시사되었다. 그러나 β -Glucosyl Yariv antigen과의 무반응성으로 미루어, arabino-3,6-galactan 구조를 소유하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 이들의 상세한 결합양식을 규명하기 위해 methylation analysis를 행한 결과, arabinose 결합 및

galactose 결합이 높은 비율로 존재하였으며 terminal-Ara, 4-linked 및 5-linked Ara 잔기와 4-linked Gal, 6-linked Gal 및 4,6-branched Gal 잔기가 우세하였다. 이러한 사실은 본 다당이 arabino-4-galactan으로 존재할 가능성을 강력히 시사하였으며, terminal 잔기가 많은 결과로부터 본 다당이 고도로 분지된 다당으로 존재함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Clarke가 분류한 바와 같이 arabino-4-galactan을 분지쇄로 갖는 다당체 즉 type-III의 arabinogalactan임을 알 수 있었다.

산업화가 가능하다고 판단된 GS-1획분을 대상으로 *in vivo* 보체계 활성화능이 측정되었다. GS-1은 각각 50 mg/kg과 25 mg/kg, 0 mg/kg씩 각각 복강내에 주사하고, 혈중 보체가를 측정한 결과, 각 투여군에서 대조군에 비하여 보체가의 급격한 감소가 관찰되었다. 보체가는 초기 급격한 감소를 보이다가, 투여 4시간 이후를 경계로 회복되는 양상을 보여주었다. 이러한 결과는 보체의 활성화에 의한 것으로 이들 활성 다당 획분이 체내 보체계를 직접 활성화할 수 있음을 시사하는 것이다. 한편 GS-1의 복강 내 투여가 C3-positive 형광세포의 유도에 미치는 영향을 검토한 결과, 회수된 macrophage 중 complement C3의 분해산물이 결합되어 있어 C3-positive한 형광성 세포는 무투여 대조군이 6.2%인데 반하여 10 mg/kg 투여군에서는 38.4%, 20 mg 투여군에서는 59.0%를 나타냄으로써 급격한 증가를 보였으며 이러한 결과는 GS-1이 complement를 활성화하여 생성된 부산물(C3b)에 의해 macrophage를 활성화할 수 있으며, 특히 활성화된 macrophage에 의해 항암활성까지도 기대할 수 있음을 시사하는 내용으로 흥미로운 결과라 할 수 있다.

이상의 결과로 GS-1은 *in vivo* 상에서 뿐만 아니라 *in vitro* 상에서도 잠재성있는 면역증강제로써 작용할 것으로 사료된 바, 배합조성을 결정하여 대표적인 기능성 식품 형태인 경질캡슐을 제작하였다

제 3 세부과제 : 인삼잎 함유 면역증강 활성화 물질의 기능성 소재화

본 연구는 인삼잎으로부터 면역 증강 물질을 분리, 정제한 후 그에 대한 제반 특성을 살펴보고 구조분석을 규명하고 이를 토대로 기능성 소재화 하는 것을 주 목적으로 하였다. 활성측정은 macrophage 활성화의 경우는 murine peritoneal macrophage를 이용하여 lysosomal phosphatase activity를 측정하였으며, lymphocyte mitogen 활성이 경우 MTT assay 및 alkaline phosphatase 방법을 이용하였다. 추출 적성실험을 통하여 재료는 금산산 인

삼없이 적절한 것으로 나타났으며, 추출 용매로는 열수로 100℃에서 5시간, 3회 연속추출이 수율과 활성면에서 양호하였다. 한편 활성물질의 회수를 위해서는 80% ethanol 침전후, 투석과 동결건조하여 활성 조당당 GS-1획분을 얻을 수 있었다. GS-1은 농도의존적으로 높은 macrophage 활성화와 mitogen 활성을 보였으므로 이 후의 실험에 사용되었다.

GS-1은 Cetavlon을 처리하여 산성도가 다른 3개 획분 GS-2, GS-3 및 GS-4를 얻었으며 그 중 산성다당 획분인 GS-2가 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 공히 최대의 활성을 보여주었다. GS-1 중 실제 면역활성을 책임지는 본질을 확인하기 위해 periodate, pronase 및 chlorite 처리를 행한 후 활성을 비교한 결과, 두활성 공히 periodate산화와 chlorite 처리 시 활성의 현저한 감소가 이루어진 반면 pronase처리에 있어서는 상대적으로 적은 변화나 활성의 증가 양상을 보임으로써 활성화의 본체는 주로 당부위와 약간의 lignin 부위일 가능성이 높은 것으로 판단된다. 활성이 우수했던 GS-2는 DEAE-Sephrose FF (Cl⁻ form)를 이용, 분획하였으며 이중 GS-2a, GS-2b, GS-2c 및 GS-2f가 상대적으로 높은 mitogen 활성화 및 macrophage 활성을 보였으므로 이들 획분을 대상으로 Sepharose CL-6B, Bio gel P-30 및 Bio gel A-0.5m 등을 이용 겔 여과를 행하여 활성과 수율이 우수한 GS-2a-I, -2a-II, -2b로 정제하였다. 이들 고효능 획분에 대한 화학 조성을 분석한 결과 GS-2a-I, GS-2a-II, 및 GS-2b는 중성당 함량이 약 92%, 산성당 함량이 약 7%이고 단백질은 검출되지 않았다. 이들은 주로 galactose (37~40%)와 glucose (13~20%)로 구성되어 있었으며 그 외 rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, glucuronic acid 및 galacturonic acid가 소량씩 함유되어 있음을 알 수 있었다. GS-2a-I, -2a-II 및 -2b 획분은 HPLC상에서 단일 peak로 나타났으며 분자량은 각각 144 kDa, 222 kDa, 90 kDa이었다.

GS-2a-I, GS-2a-II, GS-2b 활성화 다당들은 서로 상이한 분자량을 가진 획분임에도 불구하고 비슷한 화학조성으로 구성되어 있는 사실은 이들의 구조적 유사성을 반증하였다. 한편 이들의 구조해석을 위해 methylation을 행한 결과, Galactose 잔기 중에는 4-linked 결합이 전체의 20%이상을 차지하였으며, 그 외 4,6-branched Gal 및 terminal-Gal이 높은 비율로 함유된 특성을 나타냈다. 이러한 사실은 -4)-Gal-(1→4)-Gal-(1-를 주쇄로 하는 core 부분에 Gal의 C6 위치에서 side chain이 뺀어져 나가는 구조가 주로 존재하며 side chain에는 비교적 짧은 사슬이 고도로 분지되어 있음을 알 수 있었다.

한편 GS-2a-I, GS-2a-II, GS-2b의 각종 면역활성을 측정하기 위해 면역

세포의 활성화, 성장 및 분화를 촉진하는 mediator로서의 기능을 담당하고 있다고 알려져 있는 cytokine 생산능을 측정하였다. 정제다당으로 lymphocyte를 자극한 후 생산되는 각종 cytokine류를 ELISA법으로 측정한 결과, IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF 및 IFN- γ 의 생산량 증가를 유도하였으며, macrophage를 자극한 경우에는 IL-1, IL-6 및 TNF- α 을 생산하는 결과를 보여 주었다. 이러한 사실은 인삼잎 유래 활성화다당이 면역세포를 자극하여 다양한 cytokine의 생산함으로써 복잡한 네트워크를 구성하고 있는 생물체의 면역계에 적용시에도 유효한 효과를 기대할 수 있다고 사료된다. 한편 GS-1이 경우 상품화되어 있는 면역활성소재인 Agaricus, AHCC, Bio-Bran보다 높은 강력한 장관면역활성을 소유한 결과를 보였으며, GS-2a-I, GS-2a-II, GS-2b로 macrophage를 자극하였을 때 탐식활성과, NO 생산능, H₂O₂ 생산능 등을 유의적으로 증가시키미 확인되었다.

자기면역질환 치유활성, 항보체 활성 및 각종 면역활성이 공히 높았던 인삼잎 유래 획분 중 가장 산업화가 가능할 것으로 판단된 GS-1을 대상으로 급성독성 검사를 행하였다. 면역활성 다당체 GS-1을 500, 1000, 2,500 및 5,000 mg/kg 농도로 경구 투여한 결과 모든군에서 생존율이 100%로 확인되었다. 정맥 투여에 대한 급성독성의 경우 100, 250 mg/kg에서는 100%의 생존률을 보였으며 500 mg/kg농도에서만 1마리가 사멸하여 83%의 생존율을 나타내었다. 500 mg/kg이하에서는 정맥 주사하여도 독성이 거의 없는 것으로 판단되었다.

이상의 결과로 GS-1은 각종 면역활성을 공히 소유한 잠재성있는 면역증강제로써 작용할 것으로 사료된 바, 이를 이용 기능성 식품 소재로 사용하기 위해 배합조성을 결정하여 과립차 형태로 제조하였다.

SUMMARY

I. Project Title

Development of Immuno-stimulators Using Extracts from the Leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer

II. Objective and Importance of the Project

The roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer are a known Chinese crude drug widely used clinically for the treatment of gastrointestinal disorders as well as an erythropoietic and a tonic. Several pharmacologically active polysaccharides have been found in the roots of *P. ginseng* as active ingredients. The roots of *P. ginseng* is valuable because it takes 4 - 6 years for growing from the seed, whereas the leaves of *P. ginseng* can be harvested every year. Therefore, if the polysaccharide from the leaves have a similar activity as those from roots, the leaf polysaccharide will be available as well as the roots. As the results of investigation for the clinical value of the leaves of *P. ginseng*,

The purpose of the present studies is 1) to screen the autoimmune disease curing component, complement activator and immuno-modulator from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer, 2) to establish the purification procedure of the active components from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer, 3) to identify the active components and to analyse their structural features, 4) to estimate *in vivo* activity and toxicity, and 5) to develop the functional food materials

III. Scope and Contents of the Project

Following studies were done by three research groups.

Part I. Utilization of Autoimmune Disease Curing Materials from Ginseng Leaves

1. Screening of Autoimmune Disease Curing Materials from from Ginseng Leaves
 - A. Autoimmune Disease Curing Activity of Ginseng Leaves
 - B. Extraction of Autoimmune Disease Curing Active Component
 - C. Extraction Procerure of Water Soluble Active Component
2. Identification of Active Component
3. Purification of Autoimmune Disease Curing Active Component
4. Structural Analysis of Autoimmune Disease Curing Active Component
 - A. Methylation and Proton-NMR of GS-3c-II
 - B. Structural Analysis of Oligosaccharides Obtained by Sequential Hydrolysis Procedures
5. Autoimmune Disease Curing Activity *in vivo*
 - A. Effect of *in vivo* Administration of GS-3c-II on Immune Complex Clearance Activity
 - B. In vivo Immune Complex Clearance Activity
6. Application of Active Fraction as a Functional Food Material

Part II. Utilization of Complement Activator from Ginseng Leaves

1. Screening of Complement Activator from Ginseng Leaves
 - A. Anti-complementary Activity of Ginseng Leaves Harvested at Various Growing Districts
 - B. Anti-complementary Activity of Several Solvent Extracts
 - C. Extraction Procerure of Water Soluble Active Componenty
2. Identification of Active Component
3. Purification of Complement Activating Component
4. Action Mode of Anti-complement Polysaccharide
 - A. Action Mode of GS-4 Subfractions

- B. Identification of C3 Products by Cross Immunoelectrophoresis
- C. Complement Activation *via* Alternative Pathway
- 5. Structural Analysis of Complement Activator
 - A. General Properties about Structure of Complement Activator
 - B. Linkage Analysis of Complement Activator
- 6. Anti-complementary Activity *in vivo*
 - A. Effect of *in vivo* Administration of Active Component on Anti-complementary Activity
 - B. Effect of *in vivo* Administration of Active Component on Induction of Complement C3-positive Fluorescent Cells

Part III. Utilization of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves

- 1. Screening of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves
 - A. Mitogenic Activity and Macrophage Stimulating Activity of Several Solvent Extracts from Ginseng Leaves
 - B. Preparation and Activity of High MW Components from Ginseng Leaves
- 2. Identification of Immuno-stimulating Active Component
- 3. Purification of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves
- 4. Structural Characteristics of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves
- 5. Several Immuno-stimulating Activities of Active Polysaccharide
 - A. Effect of Active Polysaccharide on Cytokine Production of Macrophages and Lymphocytes
 - B. Effect of Active Polysaccharide on Intestinal Immune System Modulating Activity
 - C. Effect of Active Polysaccharide on Phagocytosis, NO and H₂O₂ Production of Macrophages
- 6. Toxicity Test *in vivo*
- 7. Application of Active Fraction as a Functional Food Material

IV. Results and Proposal for Application

A. Utilization of Autoimmune Disease Curing Materials from Ginseng Leaves

The study for extraction, purification, characterization, and industrial application of autoimmune disease curing component from ginseng leaves was attempted. Screening of immune complex clearance activity was performed with the several solvent extracts from ginseng leaves. The hot-water extract from ginseng leaves showed considerably high activity and it was selected as the most potent candidate containing the autoimmune disease curing components. The active polysaccharide fraction, GS-1 was prepared by ethanol precipitation, dialysis and lyophilization from the hot water extracts and then, GS-1 was fractionated by Cetavlon treatment to give the three fractions such as GS-2, GS-3 and GS-4. Of these fractions, GS-3 showed the highest immune complex clearance activity.

GS-3 was purified by three successive column chromatographies using DEAE-Sepharose FF (Cl⁻ form), QAE-Sepharose and Biogel P-30 to give a active polysaccharide, GS-3c-II. The primary structure of GS-3c-II was elucidated by composition, ¹H-NMR, methylation, and oligosaccharide analysis. GS-3c-II consisted of at least 15 different sugars which including the rarely observed sugars, 2-Me-Fuc, 2-Me-Xyl, apiose, 3-C-carboxy-5-deoxy-L-xylose (Aceric acid), 3-deoxy-D-manno-2-octurosonic acid (Kdo), 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid (Dha). Methylation and oligosaccharide structural analysis after sequential selective acid hydrolysis, provided evidence that GS-3c-II comprised of a highly branched α-(1→4)-linked galacturooligosacchride backbone with side chains such as Rhap-(1→5)-Kdo, Araf-(1→5)-Dha, AceA-containing nonasaccharide and uronic acid-rich oligosaccharide. These results suggested that GS-3c-II resembles, in many respects, a typical rhamnogalacturonan II (RG-II), a structurally complex pectic

polysaccharide. The immune complex clearance activity of GS-3c-II from ginseng leaves was examined *in vivo*. The immune complex clearance activity was increased significantly in comparison with the control group by intravenous injection of GS-3c-II at dose of 25 mg/kg and 50 mg/kg. On the other hand, the drink containing the active polysaccharide, GS-1 was developed.

B. Utilization of Complement Activator from Ginseng Leaves

In this study, the leaves of *P. ginseng* were examined for their abilities to activate the complement system which plays important roles in host defense system and extraction, purification, characterization, and industrial application of the complement activating components was performed.

A water soluble crude of polysaccharide fraction (GS-1) with anti-complementary activity has been isolated from the hot water extract of the leaves of *P. ginseng* C.A. Meyer. GS-1 showed relatively potent anti-complementary activity (ITCH₅₀, more than 80% at 1000 $\mu\text{g/ml}$) in a dose-dependent fashion. And then, GS-1 was fractionated by Cetavlon treatment to give the three fractions such as GS-2, GS-3 and GS-4. Of these fractions, GS-4 showed the highest anti-complementary activity and yield. In order to elucidate the real active moiety in GS-4, GS-4 was digested with protease and treated with periodate, chlorite and polymyxin B. The anti-complementary activity of GS-4 was not affected by protease, chlorite and polymyxin B treatment, however, markedly decreased by periodate oxidation. These results suggest that the complement activation by GS-4 is mainly due to polysaccharide moiety. The active fraction GS-4 was successively purified by open column chromatographies on DEAE-Sepharose FF (Cl⁻ form), Biogel P-30 and Biogel P-100 to give the four purified polysaccharides, GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia and GS-4c-IIb which showed higher activities and yields. GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4a-Ia and GS-4c-IIb were eluted as almost single HPLC peaks, and their molecular weights were estimated to be 14,400, 31,000, 71,000 and 81,000 Da, respectively. These active polysaccharides showed similar

monosaccharide compositions, which contained significant portion of arabinose (13.6~22.5%), galactose (15.3~34.8%) and uronic acid (30.4~39.2%) in addition to the small portion of rhamnose, fucose, xylose, mannose and glucose. Particularly the molar ratios of galactose and arabinose in the active polysaccharides were almost same (1.1~1.8). When the cross-immunoelectrophoresis with anti-human C3 serum was carried out after incubation of normal human serum with the active polysaccharides in Ca^{++} -free condition, cleavages of C3 precipitation lines were observed. Also the anti-complementary activities of the active polysaccharides were considerably retained in the absence of Ca^{++} ion. These results suggest that the mode of complement activation by the four active polysaccharides from *P. ginseng* C.A. Meyer can be *via* the alternative pathway as well as the classical pathway. Methylation analysis indicated that the anti complementary polysaccharides GS-4a-I and GS-4b-I, were composed mainly of terminal-Ara, 4-linked Gal and 5-linked Ara as well as 4-linked Gal, 6-linked Gal and 4,6-branched Gal. These results suggested that GS-4a-I and GS-4b-I were the pectic polysaccharides with branched arabino-4-galactans. The effect of complement activation *in vivo* by the active fraction GS-1 was confirmed by TCH_{50} analysis of sera drawn from GS-1 injected guinea pig. And increases in third component of complement (C3)-positive cells in mice treated with GS-1 suggested that GS-1 activated the complement system *in vivo*. On the other hand, the soft capsule containing the active polysaccharide, GS-1 was developed.

C. Utilization of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves

In this study, the leaves of *P. ginseng* were examined for their immuno-stimulating activity and extraction, purification, characterization, and industrial application of the complement activating components was performed.

A water-soluble crude polysaccharide fraction (GS-1), which was prepared from the hot water extracts of the leaves of *P. ginseng*, was

tested for macrophage activation and mitogenic activity. GS-1 showed relatively potent mitogenic and macrophage activating ability in a dose-dependent fashion and its activity at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ showed higher than that of LPS. And then, GS-1 was fractionated by Cetavlon treatment to give the three fractions such as an acidic (GS-2), a weakly acidic (GS-3) and a neutral fraction (GS-4). In order to examine which moiety in GS-2, GS-3 and GS-4 contributed to expression of the activity, the effects of chlorite treatment, periodate oxidation and pronase digestion were tested on the activity of GS-2, GS-3 and GS-4. The immuno-stimulating activity was considerably decreased by periodate oxidation and chlorite treatment but slightly increased or maintained by pronase digestion. These results may indicate that the mitogenic activity and macrophage activation by GS-2, GS-3 and GS-4 mainly due to polysaccharide and lignin moiety. The acidic fraction GS-2, which showed the highest activity at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, was further fractionated by anion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose FF (Cl^- form), and an unabsorbed fraction (GS-2) and nine absorbed fractions (GS-2b~GS-2j) were obtained. Of these fractions, GS-2a, -2b, -2c and -2f showed the most potent immuno-stimulating activity and were purified, respectively by gel filtration on Bio-gel P-30, Bio-gel A-0.5m or Sepharose CL-6B. Among the subfractions obtained by gel filtration, four major purified polysaccharides, GS-2a I, 2a II, -2b and -2f I showed high activity. All the fractions were eluted as almost single HPLC peaks (except GS-2f I), and their molecular weights were estimated to be 144,000, 222,000, 90,000 and 184,000 and 74,000 Da (GS-2f I gave two co-eluted peaks), respectively. Component sugar analysis indicated that these fractions mainly consisted of galactose(35~40%) and glucose(15~20%) in addition to rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, glucuronic acid and galacturonic acid.

Methylation analysis indicated that the anti complementary polysaccharides GS-2a-I, GS-2a-II and GS-2b andnd GS-4b-I, were composed mainly of terminal-Gal, 4-linked Gal and 4,6-branched Gal as well as terminal-Glc. The effect of the polysaccharides from ginseng leaves on the immune cells was investigated. The active fraction GS-1

showed more potent intestinal modulating activity than those of commercially available immuno-stimulating products, Agaricus, AHCC, and Biobran. The purified polysaccharides, GS-2a-I, GS-2a-II and GS-2b potently induced cytokine production (IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF and IFN- γ) in lymphocytes. And they also strongly augmented phagocytosis, NO and H₂O₂ production, and the cytokine release (IL-1, IL-6 and TNF- α) in macrophages. No acute toxicity of GS-1 was detected in mice administered up to 5,000 mg/kg in oral, whereas 83% of survival rate in mice administered by the intravenous injection was found at the dose of 500 mg/kg. On the other hand, the granulated tea containing the active polysaccharide, GS-1 was developed.

Based upon these results, immune response modulating effects by the polysaccharides from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer might effectively enhance the systemic immune system to protect human bodies from several diseases and cancers.

TABLE OF CONTENTS

Cover letter	i
SUMMARY (Korean)	ii
SUMMARY (English)	xiii
TABLE OF CONTENTS (English)	xxi
TABLE OF CONTENTS (Korean)	xxvi
Part I. Introduction	1
Chapter 1. The Purpose for Research and Development	1
Chapter 2. The Need for Research and Development : Technical Aspect	3
Chapter 3. The Need for Research and Development : Economic and Industrial Aspect	6
Chapter 4. The Need for Research and Development : Social and Cultural Aspect	7
Part II. Utilization of Autoimmune Disease Curing Materials from Ginseng Leaves	9
Chapter 1. Introduction	9
Chapter 2. Materials and Methods	12
1. Materials	12
2. Methods	14
A. Selection of Autoimmune Disease Curing Materials	14
B. Extraction of Autoimmune Disease Curing Materials	14
C. General Analysis	14
D. Sugar Composition	15
E. Acetyl Content	17
F. Determination of Autoimmune Disease Curing Activity	17
G. Identification of Autoimmune Disease Curing Component	19
I. Purification of Autoimmune Disease Curing Materials	19
J. Structural Analysis of Active Polysaccharide	23

K. <i>In vivo</i> Test	26
L. Application of Active Fraction as a Functional Food Material	29
Chapter 3. Results	30
1. Screening of Autoimmune Disease Curing Materials from from Ginseng Leaves	30
A. Autoimmune Disease Curing Activity of Ginseng Leaves	30
B. Extraction of Autoimmune Disease Curing Active Component	31
C. Extraction Procedure of Water Soluble Active Component	33
D. Chemical Properties	35
2. Identification of Active Component	36
3. Purification of Autoimmune Disease Curing Active Component	40
A. Anion Exchange Chromatography	40
B. Gel Permeation Chromatography	42
C. Chemical Properties of GS-3c-II	42
4. Structural Analysis of Autoimmune Disease Curing Active Component	46
A. Reactivity with β -Glucosyl Yariv Antigen	46
B. Methylation Analysis	47
C. Proton-NMR	48
D. Structural Analysis of Oligosaccharides Obtained by Hydrolysis Procedure 1)	49
E. Structural Analysis of Oligosaccharides Obtained by Hydrolysis Procedure 2)	56
F. Analysis of Oligosaccharides Obtained by Hydrolysis Procedure 3)	60
5. Autoimmune Disease Curing Activity <i>in vivo</i>	62
A. Effect of <i>in vivo</i> Administration of GS-3c-II on Immune Complex Clearance Activity	62
B. Effect of <i>in vivo</i> Administration of GS-3c-II on Insoluble Immune Complex Clearance Activity	63
C. <i>In vivo</i> Immune Complex Clearance Activity	64
D. <i>In vivo</i> Carbon Clearance Activity	65
6. Application of Active Fraction as a Functional Food Material	66
REFERENCES	68

Part III. Utilization of Complement Activator from Ginseng Leaves	73
Chapter 1. Introduction	73
Chapter 2. Materials and Methods	78
1. Materials	78
2. Methods	79
A. Selection of Complement Activator	79
B. Extraction of Complement Activator	80
C. General Analysis	80
D. Sugar Composition	81
E. Determination of Anti-complementary activity	82
F. Identification of Complement Activator	84
G. Complement Activation Pathway	85
H. Purification of Complement Activator	86
I. Structural Analysis of Active Polysaccharide	89
J. <i>In vivo</i> Test	90
K. Application of Active Fraction as a Functional Food Material	91
Chapter 3. Results	91
1. Screening of Complement Activator from Ginseng Leaves	91
A. Anti-complementary Activity of Ginseng Leaves Harvested at Various Growing Districts	91
B. Anti-complementary Activity of Several Solvent Extracts	93
C. Extraction Procedure of Water Soluble Active Component	95
D. Preparation and Activity of High MW Components from Ginseng Leaves	98
2. Identification of Active Component	100
A. Effect of Active Component on Complement in Human Sera	100
B. Fractionation of GS-4 by Cetavlon Treatment	100
C. Active Residue in GS-4	103
3. Purification of Complement Activating Component	105
A. Anion Exchange Chromatography	105
B. Gel Permeation Chromatography	107
C. Determination of MW and Purity	112
4. Action Mode of Anti-complementary Polysaccharide	114
A. Action Mode of GS-4 Subfractions	114
B. Identification of C3 Products by Cross Immunoelectrophoresis	114
C. Alternative Pathway Activity	117

5. Structural Analysis of Complement Activator	
Active Component	120
A. General Properties about Structure of Complement Activator	120
B. Linkage Analysis of Complement Activator	121
6. Anti-complementary Activity <i>in vivo</i>	123
A. Effect of <i>in vivo</i> Administration of Active Component on Anti-complementary Activity Immune	123
B. Effect of <i>in vivo</i> Administration of Active Component on Induction of Complement C3-positive Fluorescent Cells	124
7. Application of Active Fraction as a Functional Food Material	125
REFERENCES	127

Part IV. Utilization of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves	133
Chapter 1. Introduction	133
Chapter 2. Materials and Methods	137
1. Materials	137
2. Methods	138
A. Selection of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves	138
B. Extraction of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves	140
C. General Analysis	140
D. Component Sugar Analysis	141
E. Determination of Immuno-stimulating Activity	142
F. Identification of Immuno-stimulating Component	145
G. Purification of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves	145
H. Linkage Analysis of Active Polysaccharide by Methylation Analysis	149
I. Determination of Several Immuno-stimulating Activities	150
1) Measurement of Cytokines Produced by Macrophages and Lymphocytes	150
2) Determination of Intestinal Immune System Modulating Activity	151
3) Phagocytic Activity of Macrophage	152
4) NO Production by Macrophage	153
3) H ₂ O ₂ Production by Macrophage	154
J. Toxicity Test <i>in vivo</i>	154
K. Application of Active Fraction as a Functional Food Material	155

Chapter 3. Results	156
1. Screening of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves	156
A. Mitogenic Activity and Macrophage Stimulating Activity of Several Solvent Extracts from Ginseng Leaves	156
B. Preparation and Activity of High MW Components from Ginseng Leaves	158
2. Identification of Immuno-stimulating Active Component	162
A. Fractionation of Immuno-stimulator by Cetavlon Trarment and Their Characteristics	162
B. Identification of Active Component	163
3. Purification of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves	166
A. Anion Exchange Chromatography (AEC)	166
B. Gel Permeation Chromatography (GPC)	171
C. Determination of MW and Purity	177
4. Structural Characteristics of Immuno-stimulator from Ginseng Leaves	180
A. General Properties about Structure of Complement Activator	180
B. Linkage Analysis of Immuno-stimulator	181
5. Several Immuno-stimulating Activities of Active Polysaccharide	182
A. Effect of Active Polysaccharide on Cytokine Production of Macrophages and Lymphocytes	182
B. Effect of Active Polysaccharide on Intestinal Immune System Modulating Activity	190
C. Effect of Active Polysaccharide on Phagocytosis, NO and H ₂ O ₂ Production of Macrophages	192
6. Toxicity Test <i>in vivo</i>	195
A. Acute Toxicity by Oral Administration of GS-1	195
B. Acute Toxicity by Introvenous Injection of GS-1	195
C. Weight Changes of Each Organ in Mice Administered by Intravenous Injection	197
7. Application of Active Fraction as a Functional Food Material	197
REFERENCES	198

목 차

제 출 문	i
요 약 문	ii
SUMMARY	xiii
TABLE OF CONTENTS	xxi
목 차	xxvi

제 1 장 서 론	1
-----------------	---

제 1 절 연구개발의 목적과 범위	1
제 2 절 기술적인 측면에서의 연구개발 필요성	3
제 3 절 경제·산업적 측면에서의 연구개발 필요성	6
제 4 절 사회·문화적 측면에서의 연구개발 필요성	7

제 2 장 인삼잎 함유 자기면역질환 치유 활성물질의 기능성 소재화	9
--	---

제 1 절 서 설	9
제 2 절 재료 및 방법	12
제 1 항 재 료	12
제 2 항 실험방법	14
가. 자기면역 질환 치유 활성보체계 활성화 물질의 선별	14
나. 활성물질의 추출	14
다. 일반 분석 방법	14
라. 구성당 분석	15
마. Acetyl 함량 측정	17
바. 자기면역 질환 치유활성 측정	17
사. 활성화 물질의 본체 규명	19
아. 자기면역 질환 치유활성화 다당의 분리 및 정제	19
자. 활성다당의 구조 분석	23
차. 면역 복합체 제거능의 <i>in vivo</i> 실험	26
카. 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안	29
제 3 절 결 과	30
제 1 항 인삼잎으로부터 자기면역 질환 치유 활성물질의 검색	30

가. 인삼잎의 자기면역 질환 치유활성 검토	30
나. 추출 용매별 항보체 활성 검색	31
다. 수용성 활성물질 추출 조건 검토 및 설정	33
라. 활성 조다당 획분의 화학적 특성	35
제 2 항. 자기면역 질환 치유 활성 물질의 본체 분석	36
가. Cetavlon 처리에 의한 자기면역 질환 치유활성 물질의 분획	36
나. GS-3 획분의 자기면역 질환 활성 본체의 검토	37
다. GS-3 획분의 불용성 면역 복합체 제거능 검토	39
제 3 항 자기면역 질환 치유 활성화 다당의 분리 및 정제	40
가. Anion exchange chromatography	40
나. Gel permeation chromatography	42
다. GS-3c-II의 화학적 특성 및 활성	42
제 4 항 자기면역 질환 치유 활성다당의 구조 분석	46
가. β -Glucosyl Yariv antigen을 이용한 GS-3c-II의 sigle radial gel diffusion	46
나. GS-3c-II의 methyl화 분석	47
다. GS-3c-II의 proton-NMR 분석	48
라. 선택적 가수분해과정에서 얻어진 oligo당단편의 구조분석(분해과정 1)	49
마. 선택적 가수분해과정에서 얻어진 oligo당단편의 구조분석(분해과정 2)	56
바. PH-1a의 endo-PGase 분해산물 분석 (분해과정 3)	60
제 5 항 면역 복합체 제거능의 <i>in vivo</i> 실험	62
가. GS-3c-II의 <i>in vivo</i> 투여가 macrophage의 면역복합체 제거능에 미치는 영향	62
나. GS-3c-II의 <i>in vivo</i> 투여가 불용성 면역복합체 제거능에 미치는 영향	63
다. <i>In vivo</i> 면역 복합체 제거능	64
라. <i>In vivo</i> carbon clearance 활성	65
제 6 항 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안	66
REFERENCES	68

제 3 장 인삼잎 함유 보체계 활성물질의 기능성 소재화	73
--------------------------------------	----

제 1 절 서 설	73
-----------------	----

제 2 절	재료 및 방법	78
제 1 항	재 료	78
제 2 항	실험방법	79
가.	보체계 활성화 물질의 선별	79
나.	항보체 활성 조다당의 추출	80
다.	일반 분석	80
라.	구성당 분석	81
마.	항보체 활성 측정	82
바.	항보체 활성 본질 규명	84
사.	보체계 활성화 경로 검토	85
아.	보체계 활성화 다당의 분리 및 정제	86
자.	보체계 활성화 다당의 구조 특성 실험	89
차.	활성다당의 <i>in vivo</i> 보체계 활성화능 실험	90
카.	활성획분 기능성 소재로의 응용 방안	91
제 3 절	결 과	91
제 1 항	인삼잎으로부터 항보체 활성화 물질의 검색	91
가.	인삼잎의 산지별 항보체 활성 검토	91
나.	추출 용매별 항보체 활성 검색	93
다.	인삼잎 열수추출 최적 조건 검토	95
라.	인삼잎으로부터 열수추출 고분자 획분의 조제 및 활성 측정	98
제 2 항	항보체 활성물질의 본체 분석	100
가.	활성획분이 혈청 중 보체에 미치는 효과	100
나.	Cetavlon 처리에 의한 항보체 활성 물질의 분획	100
다.	GS-4 획분의 보체계 활성 본체의 검토	103
제 3 항	보체계 활성화 다당의 분리 및 정제	105
가.	Anion exchange chromatography	105
나.	Gel permeation chromatography	107
다.	정제 다당의 순도 및 분자량 확인	112
제 4 항	보체계 활성화 다당의 작용 양식	114
가.	GS-4 획분의 보체계 활성화 작용 양식	114
나.	교차 면역전기영동에 의한 C3 분해 산물의 동정	116
다.	Alternative pathway를 경유한 보체계의 활성화	117
제 5 항	보체계 활성화 다당의 구조 특성	120
가.	보체계 활성화 다당의 일반 구조 특성	120
나.	보체계 활성화 다당의 결합양식	121
제 6 항	보체계 활성화능의 <i>in vivo</i> 실험	123

가. 활성 다당의 <i>in vivo</i> 투여가 체내 complement 활성화에 미치는 영향	123
나. Complement C3-positive 형광세포의 유도에 미치는 GS-1의 효과	124
제 7 항 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안	125
REFERENCES	127

제 4 장 인삼잎 함유 면역 증강 활성화 물질의 기능성 소재화 133

제 1 절 서 설 133

제 2 절 재료 및 방법 137

제 1 항 재 료 137

제 2 항 실험방법 138

가. 면역 활성화 물질의 선별 138

나. 면역 활성화 물질의 추출 140

다. 일반 분석 방법 140

라. 구성당 분석 141

마. 면역 증강 활성 측정 142

바. 면역 활성화 물질의 본체 규명 145

사. 면역 활성화 다당의 분리 및 정제 145

아. Methyl화 분석에 의한 다당의 결합위치 결정 149

자. 기타 면역활성 측정 150

1) 면역세포에 의해 생산된 cytokine 측정 150

2) 장관면역 활성측정 151

3) Macrophage의 탐식활성 측정 152

4) Macrophage의 NO 생산능 측정 153

3) Macrophage의 H₂O₂ 생산능 측정 154

차. 면역활성 다당체 GS-1의 독성실험 154

카. 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안 155

제 3 절 결 과 156

제 1 항 인삼잎으로부터 mitogen 및 macrophage 활성화 물질의

검색 156

가. 추출 용매별 mitogen 및 macrophage 활성화능 검색 156

나. 열수추출 고분자 획분의 조제 및 면역증강 활성 측정 158

제 2 항. Mitogen 및 macrophage 활성화물질의 본체 분석	162
가. Cetavlon 처리에 의한 면역증강 활성화물질의 분획 및 특성	162
나. 면역 활성화 본체의 검토	163
제 3 항 면역 활성화 다당의 분리 및 정제	166
가. Anion exchange chromatography (AEC)	166
나. Gel permeation chromatography (GPC)	171
다. 정제 다당의 순도 및 분자량 확인	177
제 4 항 면역활성 다당의 구조 특성	180
가. 면역 활성화 다당의 일반 구조 특성	180
나. 면역 활성화 다당의 결합양식	181
제 5 항 활성화다당의 각종 면역 활성화	182
가. 활성화다당이 면역세포의 cytokine 생산에 미치는 영향	182
나. 활성화다당이 장관 면역 활성화에 미치는 효과	190
다. 정제 획득에 의한 macrophage 기능 향진 효과	192
제 6 항 면역활성 다당체 GS-1의 독성실험	195
가. GS-1의 경구투여 급성독성 실험	195
나. GS-1의 꼬리정맥투여 급성독성 실험	195
다. Macrophage 활성화 물질의 마우스 꼬리정맥 주사시 장기무게변화	197
제 7 항 활성화획분 기능성 소재로의 응용 방안	197
REFERENCES	198

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

인삼은 오갈피나목과(Araliaceae)의 *Panax ginseng* C.A. Meyer (= *Panax schinseng* Nees)를 기원 식물로 하는 다년생 초본류로 중국 남부의 삼칠인삼(*Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen), 일본의 죽절인삼(*Panax japonicus* C.A. Meyer)와 서양인삼이라고 불리우는 북미의 *Panax quinquefolia* L.등의 인삼의 대응품과는 구분되는 우리나라 전통 생약재이다. 인삼은 전통 한방에서 강장(强壯), 강정(强精), 진정, 향피로약, 위장 쇠약에 의한 신진대사 기능 저하에 주로 사용되며 이중탕(理中湯), 소시호탕(小柴胡湯), 인삼탕(人蔘湯), 십전대보탕(十全大補湯)등에 배합되어 응용되고 있는데 그 효과가 탁월하다고 세계적으로 인정되고 한국의 대표적 산물이라 할 수 있다. 인삼의 효능은 단지 경험적이고 전통약재로써의 기능뿐만아니라 현대 의학적으로도 상당한 연구가 진척되어 있는데 자양 강장효과, immuno-stimulating activity, antitumor activity, hypoglycemic activity, anti-cholestrolemic activity가 탁월하다고 보고되고 있으며 그외에도 숙취제거효과 및 순환계 질환에도 특별한 효과가 인정되고 있다.

우리나라에서는 98년을 기준으로 할 때 전국적으로 22,170호에서 10,349 ha에 인삼을 경작하여 연간 12,592MT을 생산하고 3,445억원의 농가 수입을 올리고 있다. 또한 인삼은 그 약리효과에 대한 세계적 선호도 때문에 2,350MT, 약 1억1천만불의 수출고를 올리고 있는 대표적 농산물이기도 하다. 그러나 인삼의 근부(根部)는 그 효과의 우수성에도 불과하고 파종후 수확까지 최소 4-6년 까지의 장기간이 소요되는 단점을 소유하고 있는 반면, 인삼의 엽부(葉部)의 경우 일년중 내내 수확이 가능하다는 잇점을 소유하고 있으며, 현재 대부분 폐기되고 있는 현실을 고려 할 때, 폐자원 이용이라고 하는 잇점을 소유하고 있다. 따라서 인삼의 엽부로 부터 인삼의 근부에 상당하는 활성 혹은

새로운 활성을 찾아낼 경우 신자원 소재의 개발이라는 측면에서도 그 의의가 깊다고 사료된다.

최근 식품성분에 대해 새로운 관점에서 계통적, 조직적인 연구가 발전함에 따라 식품유래의 특정 성분들이 인체의 신경계, 순환계, 내분비계, 생체방어계, 세포분화 등 각종 생리기능조절계에 작용하여 직·간접으로 생체조절기능 효과를 나타낸다는 사실들이 밝혀지고 있다. 이들 특정성분들에 의한 생체조절계 및 생체방어계에 대한 적절한 조절이 가능하게 된다면 그것은 전인류적 규모의 지속적이고도 가장 자연스러운 건강유지를 위한 강력한 수단이 될 수 있음을 의미한다. 따라서 이들 식품유래의 생체조절 기능성 인자들의 작용기구, 작용부위, 구조해석 등의 해명은 대단히 중요하다 하겠으며 이러한 연구들은 하나같이 學際的인 영역의 연계속에서 가능한 것으로 식품을 통한 건강유지 및 질병예방의 새로운 학술체계의 수립을 의미한다 하겠다.

본 연구그룹이 선정한 인삼잎은 식용식물 중에서 약리 및 생리활성에 대한 구전과 보고가 상당히 제한적이었으며 본격적으로 국내 인삼잎의 생리활성 성분에 대한 체계적인 연구는 거의 없는 실정이었다. 인삼잎을 경쟁력을 갖는 하나의 산업종으로 육성하기 위해서는 이들로 부터 고부가가치성 물질의 개발과 제품화가 전제되어야 한다. 최근에 이르러 식품에 도입되고 있는 3차기능은 질병을 발병의 전단계에서 식품을 통하여 예방한다는 적극적인 식품의 개념으로 향후 고령화 사회에서 기능성식품의 수요가 의약품을 상회할 것으로 예측되고 있다.

뿐만 아니라 WTO 체제의 출범으로 인한 농산물 시장개방 하에서 농업을 육성시킬 수 있는 최선의 대안은 우리 고유의 농산물을 대상으로 신물질을 탐색하고 개발하는 일이다. 우리나라는 전통적으로 인삼을 애용해 왔으며 전래되어 오고 있는 민간식이요법이 다양하여 기술 선진국과의 특허문제를 야기시키지 않고 경쟁력 있는 의약품, 식품용 신소재의 창출이 가능하기 때문이다

본 연구는 인삼잎 함유 미량성분 중 주로 면역계에 약리, 생리활성을 갖는 물질을 소재화하고 이들 소재를 주제로 한 기능성식품의 개발로 연결함으로써 국내 농업의 발전모델을 제시하고 국민보건향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제

고시킴에 두고자 하였다.

제 2 절 기술적인 측면에서의 연구개발 필요성

과거 과학적 입증없이 경험적으로 처방, 사용되어 왔던 민간요법 및 생약제제들은 면역계, 내분비계, 순환계등에 중요한 영향을 미치고 있음이 점차 알려지고 있으며 특정재료의 경우 현대의약으로도 그 완전 치유가 어려운 자기면역 질환(auto-immune disease)에 대해서도 임상적으로 그 효과가 인정되고 있어 이들이 면역계에 어떠한 중요한 역할(immunomodulating activity)을 하고 있는 것으로 보고되고 있다.

식품성분과 영양이 면역기능에 깊은 관련이 있다는 사실은 예로부터 잘 알려져 있다. 현재에도 개발도상국에서는 영양불량에 따른 감염증으로 많은 생명을 앓아가고 있으며 고령자, 암환자의 식이 섭취 저하에 따른 면역능력의 저하도 문제가 된지 오래이다. 영양불량이 면역능력의 저하와 밀접하게 관계되어 있다는 사실은 많은 실험에서도 증명되고 있다. 또한 영양과잉이 성인병의 원인이 될 뿐 아니라 관련된 면역기능의 이상을 불러올 수 있으며 따라서 이 같은 사실을 토대로 식이요법에 의한 여러 면역질환의 예방이나 치료가 가능하다는 이론이 크게 대두되고 있다.

전신성 홍반성 낭창(Systemic lupus erythematosus, SLE), 만성간염, 류마치스 관절염(Rheumatoid arthritis), 신염과 같은 자기면역질환에 대한 주요 원인 들은 아직도 불분명한 상태로 남아 있지만 SLE의 자연 발병계인 NZB x NZW F1 (B/W F1) 등의 모델 마우스 계를 이용한 비교적 상세한 면역학적 실험이 결과로 대체적인 원인은 예측되고 있다. 첫째, 연령 증가에 따른 항 DNA항체 생산의 증가, 둘째 혈중 면역복합체 (immune complex)의 증가와 조직에로의 침착, 셋째 complement component의 증가와 그의 hyperreactivity, 넷째 T세포의 유약화 반응 저하와 Interleukin 2의 생산 및 반응성 저하등이 그 주요 원인으로 제시되고 있다.

이중 Immune complex (면역 복합체, IC, Antigen-antibody complex)는

SLE와 류마치스 관절염 등 대부분의 자기면역질환 환자들의 혈청에서 다량으로 검출되고 있고, 그 발병 및 병태 형성원인에 가장 중요한 원인으로 평가되고 있어 이를 제한하기 위한 많은 연구들이 행해지고 있다. 체내에서 면역반응의 결과로 생성된 면역 복합체는 정상적인 경우 혈류 중을 순환하다가 체내 대식세포(mononuclear phagocytic cell)를 비롯한 망내계 (reticuloendothelial system)세포에 의해 제거되지만 비건강체의 경우 이들의 제거가 용이하지 않아 여러반응에 의해 조직에 침착되고 결국, 염증, 과민 반응 (type III) 및 자기면역질환 등을 유발하게 되는 것으로 보고 되고 있다. 이처럼 mononuclear phagocytic cell은 체내에서 생성된 면역 복합체의 제거에 중요한 역할을 담당하고 있는데 이들은 주로 세포 표면에 존재하는 FcR receptor를 통하여 IC를 제거한다고 보고되고 있다. 따라서 따라서 면역관련 세포들의 IC 제거능을 향상시킬 수 있다면 자기면역질환의 효과적인 치유수단을 개발하는 것이 가능하다고 사료된다.

보체계는 감염방어, 염증방어, allergy반응 등에 작용할 뿐만 아니라, 면역응답에도 관련하고 있을 가능성이 높다. 따라서 complement system에 대한 이해는 감염, 알러지성 질환 및 자기면역 질환을 진단 치료하는데 있어 잠재적인 중요성을 가지며 인체의 면역활성에 직접 관여한다는 면에 있어서 주목하지 않을 수 없다.

천연물 중에는 주로 저분자 획분보다 고분자 획분에서 그 활성을 나타내며 특히 천연 고분자 물질 중에는 interferon 유도활성, 항종양활성, 항보체 활성, 항염증 활성, 식작용 증강 활성 및 B 임파구의 활성 작용 등이 밝혀지고 있으며 특히 그 활성성분들이 다당으로 확인되고 있다. Okuda 등은 polysaccharide가 생체내의 보체계(complement system)에 관여하여 macrophage의 활성화, target cell에 대한 cytolysis와 opsonization 기능을 향진시킴으로써 항종양 효과를 나타낸다고 하였으며, polysaccharide에 의한 complement system의 활성화와 항종양 효과의 상관관계를 밝혔다. 항보체 활성이란 이들 보체계를 활성화시킬 수 있는 활성을 의미하는 것으로 천연 물질중에서 보체계 활성화 다당들이 발견되어지고 있다. 보체계를 활성화할 수 있는 다당 혹은 당화합물로는 세균 기원의 endotoxic lipopolysaccharide,

inulin과 균류 유래의 난용성 β -1,3 glucan 및 *Streptococcus mutans* OMZ176 이 생산하는 난용성 glucan 등이 기보고된 바 있다. 최근에는 천연물, 특히 식물체 중의 항보체활성에 대한 연구들이 주로 일본의 Yamada 그룹과 Tomoda 그룹에 의해 활발히 보고되고 있다. Yamada 그룹에 의해 보고된 대표적 항보체 활성다당으로는 한방처방에 넓게 사용되는 생약의 하나인 당귀 (*Angelica acutiloba*)를 들 수 있다. 이는 전통적으로 증혈 및 순환개선에 의해 제장기를 회복 개선하는 약물로서 부인병, 관절염 치료 등에도 사용어 왔 으며 최근 이 당귀의 뿌리로부터 열수 추출한 다당 중에 항보체활성 뿐만 아니라 B 임파구 mitogen 활성, interferone 유도 활성, 항종양 활성 등을 가지고 있음이 발견되었다. 현재 다당성분들에 의한 항종양 활성은 이들이 숙주매개 면역반응(host-mediated immune response)에 관여하여 종양발생에 의해 손상된 면역기능을 회복 또는 증강시켜 줌으로써 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있으므로 면역체계 중의 보체계를 활성화하는 물질을 안전성이 확보된 식품에서 검색할 필요성이 대두되고 있다.

Macrophage(대식세포)는 innate와 adaptive immunity의 두 반응 모두에 관여하는 면역 세포로 bone marrow의 immature pluripotent hematopoietic stem cell로부터 cytokine 인 IL-3(interleukin-3)의 signal에 의해 granulocyte-macrophage progenitor로 분화한 후 IL-3, GM-CSF(granulocyte macrophage-colony stimulating factor)의 signal에 의해 promonocyte가 되며 다시 GM-CSF의 signal에 의해 circulating monocyte가 된다. 그후 M-CSF와 GM-CSF에 의해 tissue(liver, lung, spleen, thymus, lymph node, peritoneum, nervous system, skin)에서 resident macrophage가 된다. Macrophage는 여러 자극물질에 노출되거나 외부 자극 등에 의해 활성화되면 활성화도에 따라 염증 대식세포(inflammatory macrophage)와 활성화된 대식세포(activated macrophage)로 나눌 수 있다. Inflammatory macrophage는 thioglycollate와 같은 염증유발 물질에 노출되었을 경우를 말하며 이때는 phagocytosis, adherence capacity, prostaglandin 분비의 증가, 여러 가지 enzymes 등의 단백질 합성능 증가 그리고 임파구의 면역작용 항진 등의 기능적 변화나 세포의 크기와 여러 가지 세포분비물이 증가하게 된다. Interferon(IFN)과, 그람 음성

균의 세포벽에 존재하는 내독소(endotoxin)는 생체내에서는 발열, 저혈당증, 항LPS항체 및 급성기 반응물의 생성 유발, adjuvant 작용, 방사선조사로부터 보호 등 여러 면역반응과 독소현상을 유발시키는 작용이 있는 lipopolysaccharide(LPS) 등의 면역 조절물질에 의해 분비된 cytokine(TNF- α , IL-1, IL-8, IL-6, IL-12), hydrogen peroxide, nitric oxide(NO), cytolytic protease 등이 암세포에 대한 세포독성을 나타내는 물질로서 제시되어져 왔다. 활성화된 macrophage는 항미생물 작용, 항암작용 그리고 tissue damage의 effector function을 가지게 된다. 또한 macrophage는 이물질을 인식할 수 있는 서로 다른 receptor들을 지니고 있기 때문에 식품이나 천연물이 macrophage의 활성화에 대하여 직접적으로 관여할 수도 있지만 complement나 다른 lymphocyte의 활성을 통한 2차적 작용에 의한 것일 가능성도 있다. 최근 들어 그람 양성균의 세포벽성분인 peptidoglycan과 그 유도체들이 다양한 면역조절작용을 유도 및 cellular immunity와 humoral immunity의 adjuvant로서 역할과 동시에 macrophage를 활성화한다고 보고되고 있다. 또한 *Streptococcus mutans*의 polysaccharide 중 monocyte를 활성화하여 TNF, IL-1의 분비를 유도하는 주된 성분은 rhamnose이고 이것의 receptor도 밝혀졌다. Mannose를 함유한 polysaccharide, β -1,4-linked D-mannuronic acid(D-ManA), β -1,3-glucan(β -1,3-linked D-glucose) 같은 polysaccharide들이 항암작용 및 monocyte와 macrophage의 cytokine 분비를 촉진한다고 보고되고 있다. β -1,4-linked D-mannuronic acid의 다당류는 TNF의 분비를 유도하고 receptor에 결합하는 방식이 LPS와 유사하다고 알려졌다. 이와 같이 면역계의 다양한 구성인자 사이의 상호작용과 관계에 대한 정보는 면역계의 병원체에 대한 방어기능을 이해하는 데 중요한 자료가 될 것이다.

제 3 절 경제·산업적 측면에서의 연구개발 필요성

인삼잎으로 부터 생리활성 물질의 분리 및 이용은 WTO 체제 출범이후 국

내 농업을 유지 발전시킬 수 있는 하나의 적극적인 대처방안임은 물론 국내 농산 자원 중 대부분 폐기 되었던 작물로 기능성 식품 및 식품 가공제조업을 연계시킴으로써, 농가의 영농의욕을 고취시키고 소득을 높이는데 기여도가 클 것으로 예상할 수 있다. 또한 1차 상품인 인삼잎을 고부가가치성 물질로 소재 화합으로써 시장 경쟁성을 높일 수 있고 이는 타 농산물에도 적용 가능한 모델이기 때문에 농촌경제의 발전을 획기적으로 도모할 수 있다. 한편 약리·생리활성 물질의 탐색과 소재화는 기술의존도가 높은 무공해산업종으로 향후 국내산업의 재편과정에서 중추적인 역할을 담당하게 될 것이다. 특히 제조공정 상 하나의 시설로 다양한 제품의 생산이 가능하고 공정이 단순하기 때문에 소량 다품종 생산의 특성을 지니는 중소기업형 산업으로 분류할 수 있다.

우리 고유의 자원으로부터 탐색된 물질은 1차적으로 외국의 기존특허와 마찰을 일으키지 않는 신규후보물질일 가능성이 높고 오랫동안 상식해 온 식품 중에 함유되어 있는 물질로 유기합성에 의한 신규물질들보다 안전성의 확보가 용이하다. 따라서 의약과 식품 용 leading compound의 연구개발과 실용화에 있어 기술선진국보다 비교우위에 있다고 볼 수 있다. 물질에 따라서는 현재 수입되고 있는 유사소재를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 고령화 사회에서 질병 예방용 식품과 의약품의 수요증가와 함께 거대 수출품목이 될 것으로 예측된다. 최근에 이르러 의약품의 판매량 감소와 식품산업의 물류비 증가로 수익악화에 처한 국내 제약과 식품업체들이 식품과 의약품의 특성을 공유하는 새로운 영역의 제품들을 도입하게 됨으로써 다시 경쟁력을 갖게 될 것이며 이는 국내 생물산업 육성이라는 국가정책에 부응하는 계기가 될 것이다.

제 4 절 사회·문화적 측면에서의 연구개발 필요성

현재 우리나라는 고령화 지수면에서 선진국에 비해 아직 낮은 수준에 있지만 평균수명은 73세에 이르렀으며 2,000년에는 고령화인구 비율이 전 인구의 6.8%로 317만명에 달할 것으로 전망되고 있다. 사망원인 또한 감염형 질환의

비율이 감소하면서 대표적인 성인병인 만성질환과 암에 의한 사망비율이 전체의 절반에 가까워지고 있다. 이에 따라 국민들도 고령화 사회를 인식하게 되었고, 건강하게 장수하고자 하는 욕구가 커지면서 “고령화병은 현대의 의료기술로 완치할 수 없다”는 불안감을 갖게 됨과 동시에 일상생활을 통한 예방에 관심이 높아질 것으로 예견되고 있다. 일본의 경우 정부의 의료비 부담이 1993년에는 전년도보다 6.4%가 증가되었고 증가요인의 대부분이 고령화 환자의 의료비에서 기인하였음을 밝힌 바 있다. 후생성이 특정보건용 식품제도를 도입하게 된 배경에는 식품소재를 통하여 고령화병을 예방함으로써 정부의료비 부담을 경감시키고 활동력을 갖는 고령화 노동인력을 확보하자는데 두고 있음은 주목할 필요가 있다.

본 연구과제의 최종목표인 성인병 치료 또는 예방용 소재의 개발과 이를 주성분으로 한 기능성식품화는 micro적으로는 국민 개개인의 건강장수 욕구를, macro적으로는 정부의 의료보건정책을 충족시킬 수 있는 하나의 대안임이 분명하다.

또는 인삼 재배 농가 소득이 보장될 때 농업인구의 이동이 감소되어 농촌의 공동화와 인구의 도시집중화로부터 기인하는 사회적 문제를 완화시킬 수 있을 뿐만 아니라 인삼잎의 폐기로 인해 발생하고 있는 농촌의 환경오염문제의 해결에도 일익을 담당하게 될 것으로 예상되고 있다.

제 2 장 인삼잎 함유 자기면역질환 치유 활성 물질의 기능성 소재화

제 1 절 서 설

사람을 비롯한 모든 동물은 항시 각종 외래 미생물의 침입에 노출되어 있으며, 암세포, 세포과괴에 따른 세포내 성분 등 異物質的 自己物質이 끊임없이 출현하는 조건하에서 생존하고 있다. 이러한 환경하에서 생존하기 위하여 인체에는 세포벽과 같이 단순한 물리적 차단에 의한 비특이적 방법에서부터 면역반응과 같은 특이적 기구를 통한 생체 방어 기구가 갖추어져 있다. 최근 척추 동물 이상의 고등동물 이상의 고등동물의 항상성 유지 기구로써 면역계, 신경계, 내분비계의 유기적인 연결이 주목되고 있으며, 세포내 대사 과정, receptor, mediator의 분자 차원에서의 반응 과정의 해명등 생명체에 들어 있는 각 요소의 역할이 중요시되고 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

특히 면역계의 역할은 생체내에 침입하는 非自己物質 (nonself; bacteria, virus등)의 배제 뿐 아니라 생체 내에서 일어나는 각종 이상 현상을 제거하여 생체의 항상성을 유지시키는 것으로써 항체, 보체 및 세포간 mediator등의 체액성 요소와 림파구, macrophage등의 세포성 요소, 그리고 체액성 요소와 세포성 요소를 연결하는 receptor군으로 구성되어 있다. Receptor의 존재는 반응성 및 효율을 높임으로써 불필요한 energy 소비를 방지하는 것으로 알려져 있다.

자연계에서 수없이 존재하는 천연물질 중에서 생체에 대한 기능이 다양한 물질들을 존재할 것으로 기대되어 이에 대한 관심이 날로 증가하고 있고, 특히 식품재료, 생약(한방제재) 및 균류로부터 면역활성이 존재하는 물질을 얻으려는 노력이 계속되고 있다. 특히 과거 과학적 입증없이 경험적으로 처방, 사용되어 왔던 생약제제들은 면역계, 내분비계, 순환계등에 중요한 영향을 미

치고 있음이 점차 알려지고 있으며 특정 생약재의 경우 만성 감염, rheumatoid arthritis, nephrosis 등과 같이 현대 의약으로도 그 완전 치유가 어려운 자기 면역 질환 (auto-immune disease)에 대해서도 임상적으로 그 효과가 인정되고 있어 이들이 면역계에 어떠한 중요한 역할 (immunomodulating activity)을 하고 있는 것으로 보고되고 있다. 이들은 주로 저분자획분보다는 고분자획분에서 그 활성을 나타내는데 특히, 이들 천연물 유래의 고분자 물질 중에는 inteferone 유도 활성, 항보체 활성, 항종양 활성, 항염증 활성, 임파구 mitogen 활성, polyclonal B cell activating 활성 및 식작용 증강활성등의 면역 조절 활성이 발견되고 있으며, 이들 활성의 일부에 대해서는 그 활성 성분이 다당임이 주목되고 있다.

생약제제를 비롯한 많은 천연물 소재들은 주로 한국을 포함한 극동 지역에서 의약용으로 사용되어 왔으며 현재까지도 전세계 인구의 약 70% 정도가 여전히 건강 유지의 목적으로 천연 식물 및 민간요법 제재들을 사용하고 있는 것으로 나타나고 있다. 이러한 사실은 수많은 감염성 질환들이 양약의 사용으로 감소 추세에 있음에도 불구하고 20세기 후반 무렵부터 각종 만성질환들이 증가 추세에 있다는 사실 때문에 전통 의약품들에 대한 세계적 관심을 일으키게 된 주요 이유라고도 할 수 있다. 생약제제들은 양약으로 치유가 어려운 많은 질환에 효과가 있을 뿐만 아니라 일본의 경우 약 80%이상의 의사들이 이를 사용한 경험이 있다고 보고될 정도로 그 효과가 인정되고 있으며 최근에는 유럽에서도 몇몇 생약 제재들이 사용되기 시작되고 있다.

전술 한 바와 같이 생약 제재들은 신체의 항상성(homeostasis)을 유지시키고 면역계, 내분비계, 신경계 및 순환계에 조절역할을 담당하는 biological response modifier(BRM)로써 작용할 뿐만 아니라 여러 종류의 세포들의 receptor기능을 조절함으로써 치료효과를 낸다고 알려져 있다. 그러나 아직도 과학적 입증없이 경험적으로 처방 사용되고 있으므로 이들의 치료효과 및 작용기구의 과학적 해석과 구조의 판명 등은 시급히 연구되어야 할 과제 중의 하나라고 생각된다. 또한 이들은 비교적 독성의 문제를 초기에 배제할 수 있

고 효과 측면에서 어느 정도 인정되고 있으므로 이들에 대한 정확한 구조 해명 및 작용 기구와의 상관관계 연구는 3차 기능성 식품 내지 신약 개발로의 발전에 중요한 정보를 제공하리라 사료된다.

인삼(인삼 *Panax ginseng* C.A. Meyer)는 우리 나라 및 동양 등의 한방 및 민간요법에서 강장 및 조혈효과의 목적으로 널리 사용되어 왔으며 그 효과가 탁월하다고 인정되고 있는 특히 한국 등지의 대표적 산물이라 할 수 있다. 인삼의 약리작용중 이미 널리 알려져 있는 사포닌을 비롯한 저분자 물질에 대한 연구는 한국, 일본, 중국 등을 중심으로 괄목할 만한 성과를 이루고 있는 반면 분자량 10,000이상의 다당, 단백질 등 고분자 물질에 대한 연구는 상당히 제한되어 있는 것이 사실이다. 그러나 최근 인삼으로 부터 열수추출한 획분중에는 면역증강작용, 항암작용, 혈당강하작용이 있는 다당이 발견된 바 있으며 그 활성 또한 비교적 강력한 것으로 평가받고 있어 주목되고 있다. 특히 생약제재들의 경우 열수추출하여 음용 한다는 점에서 이들의 활성은 상당한 공감성을 갖고 있는 부분이기도 하다. 그러나 인삼의 근부(根部)는 그 효과의 우수성에도 불과하고 파종후 수확까지 최소 4-6년 까지의 장기간이 소요되는 단점을 소유하고 있는 반면 인삼의 엽부(葉部)의 경우 일년중 내내 수확이 가능하다는 잇점을 소유하고 있다. 따라서 인삼의 엽부로 부터 인삼의 근부에 상당하는 활성 혹은 새로운 활성을 찾아낼 경우 신자원 소재의 개발이라는 측면에서도 그 의의가 깊다고 사료된다. 이에 관한 연구는 본인이 소속되어 있는 일본 북리연구소의 Yamada group등에 의하여 인삼엽부 기원의 항보체활성(anti-complementary activity) 및 항괴양 활성 다당등이 기보고된 바 있다.

한편 최근 발병빈도가 증가일로에 있으며 양약으로 그 치유가 어려운 각종 자기면역질환 (rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus등)의 주요 원인으로 Immune complex(면역 복합체 Antigen-antibody complex)가 주목되고 있다. Fig. 2-1에 보는 바와 같이 체내에서 형성된 면역 복합체는 정상적인 경우 혈중을 순환하다가 체내거식세포(mononuclear phagocytic cell)를 비롯한 망내계 (reticuloendothelial system)세포에 의해 제거되지만 비건강체

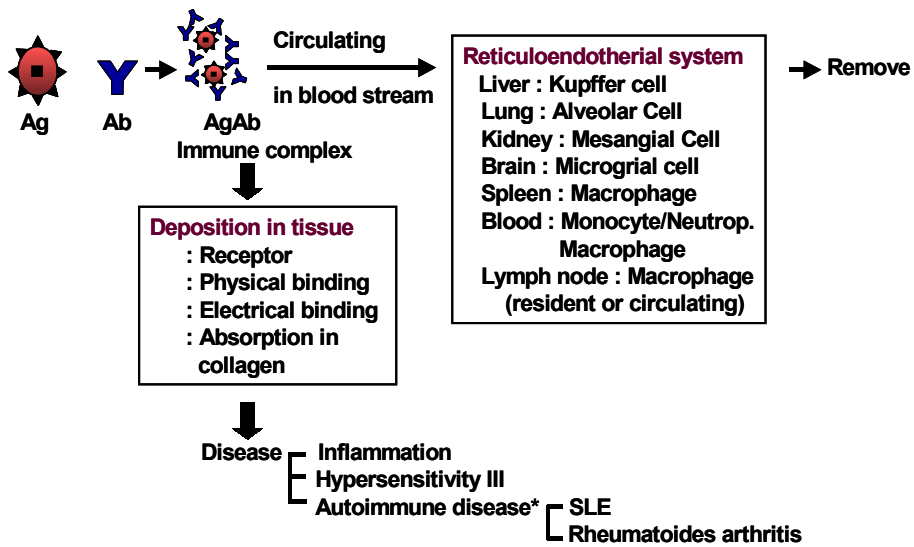


Fig 2-1. Formation of immune complexes in human body and the related diseases (auto-immune disease)

의 경우 이들의 제거가 용이하지 않아 조직에 침착 되고 결국, 염증, 과민 반응 (type III) 및 자기 면역 질환 등을 유발하게 된다. 이처럼 mononuclear phagocytic cell은 체내에서 생성된 면역 복합체의 제거에 중요한 역할을 담당하고 있는데 이들은 주로 세포 표면에 존재하는 FcR receptor를 통하여 제거된다고 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 인삼의 엽부의 다당을 대상으로 자기면역질환에 효과가 있는 활성물질에 대해 검토하고 제반 특성 구조에 대해 살펴봄으로써 이들의 기능성 소재로서의 사용을 모색할 수 있는 기초자료를 제공하고자 한다.

제 2 절 재 료 및 방 법

제 1 항 재 료

가. 재료

본 실험에 사용한 인삼의 엽부(the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer)는 충북 금산에서 1999년 11월에 수확한 것을 건조하여 사용하였다.

나. 시약

Sep-pak C₁₈ cartridge는 Waters로 부터 구입하여 사용하였으며 Deuterium oxide (D₂O), sodium borodeutride (NaBO₄), trimethylmethane 등은 sigma 제품을, NaIO₄ sodium hydride (NaH), methyl iodide (CH₃I), ethyl iodide (C₂H₅I), trideutriomethyl iodide (CD₃I) 및 Super deutride (1M lithium tetra borodeutride)는 Aldrich 제품을 사용하였다.

또한 *Asp. niger* 유래의 Endo- α -(1-4)-polygalacturonase (poly(1,4- α -D-galacturonide) glycanohydrolase : EC 3.2.1.15)는 상용 조효소로 부터 Kiyohara (1988)의 방법에 의해 정제하여 사용하였으며 β -D-glucosyl Yariv antigen은 호주 Melbourne 대학의 A.E. Clarke 박사로부터 제공받았다.

한편 thioglycollate medium은 일본 Eiken사로 부터, Mouse glucose oxidase-anti-glucose oxidase complex (GAG)는 ICN사로 부터 각각 구입하여 사용하였으며 양 적혈구는 일본 Biotest사, rabbit anti-sheep erythrocyte antibody IgG fraction은 일본 JIMRO사로 부터 구입하였다.

분자량 측정에 사용된 표준 pullulan(P400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)은 일본 Showa. Denko사로부터 구입하여 사용하였고, 그 밖의 시약은 시판되는 특급 혹은 1급 분석용 시약을 사용하였다.

다. Resin

활성 물질의 정제에 사용된 DEAE-Sepharose FF (Cl⁻ form), QAE-Sepharose는 Pharmacia Biotech사 제품을, Biogel P-30 및 P-10, P-6는 Bio-Rad사의 제품을 구입하여 사용하였다.

제 2 항 실험방법

가. 자기면역 질환 치유 활성보체계 활성화 물질의 선별

1) 시료의 용매별 추출

인삼 엽부 50 g에 각각 용매 1ℓ를 첨가하고 하룻 밤 교반하여 filtering 후 상등액을 취하여 감압농축시킨 후 동결건조하였다. 이에 사용된 용매는 냉수, acetone, chloroform, ethanol, ethylacetate, methanol, buthanol, 1% NaOH (교반 후 5 M HCl로 중화)이며 열수 추출은 용액 최초 부피의 1/2이 될 때까지 추출하였다.

2) 시료의 단계적 용매 추출

건조된 인삼 엽부 시료 100 g을 Fig. 2-2의 방법에 따라 최초 냉수 2ℓ를 가하여 추출하고, 7000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 농축, 동결건조하여 Fraction A를 얻었다. 이후 그 잔사를 이용하여 hexane, methanol, 열수로 단계적으로 추출하고 동결건조하여 얻은 각각의 획분을 Fraction B, C 및 D로 하였으며 각 추출물은 자기면역 질환 치유활성 측정에 사용하였다.

나. 활성물질의 추출

건조된 인삼 엽부 4 kg은 10배 부피의 열수를 이용, 추출하고 4배 부피의 ethanol을 가하여 침전시킨 후, Fig. 2-3에 나타난 바와 같이 투석 및 동결건조를 거쳐 조다당획분 GS-1을 얻었다.

다. 일반 분석 방법

총당 함량은 galactose를 표준 물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법으로, 산성당 함량은 β -D-galacturonic acid를 표준 물질로 하여 *m*-hydroxy biphenyl

법으로, 단백질 함량은 bovine albumin을 표준 물질로 하여 Lowry법으로 각각 정량 분석하였다.

라. 구성당 분석

Alditol acetate法에 대한 구성당 분석은 Albersheim등의 방법(1972)을 일부 변형하여 사용하였다. 다당 시료를 2M trifluoroacetic acid(TFA)중에서 121℃,

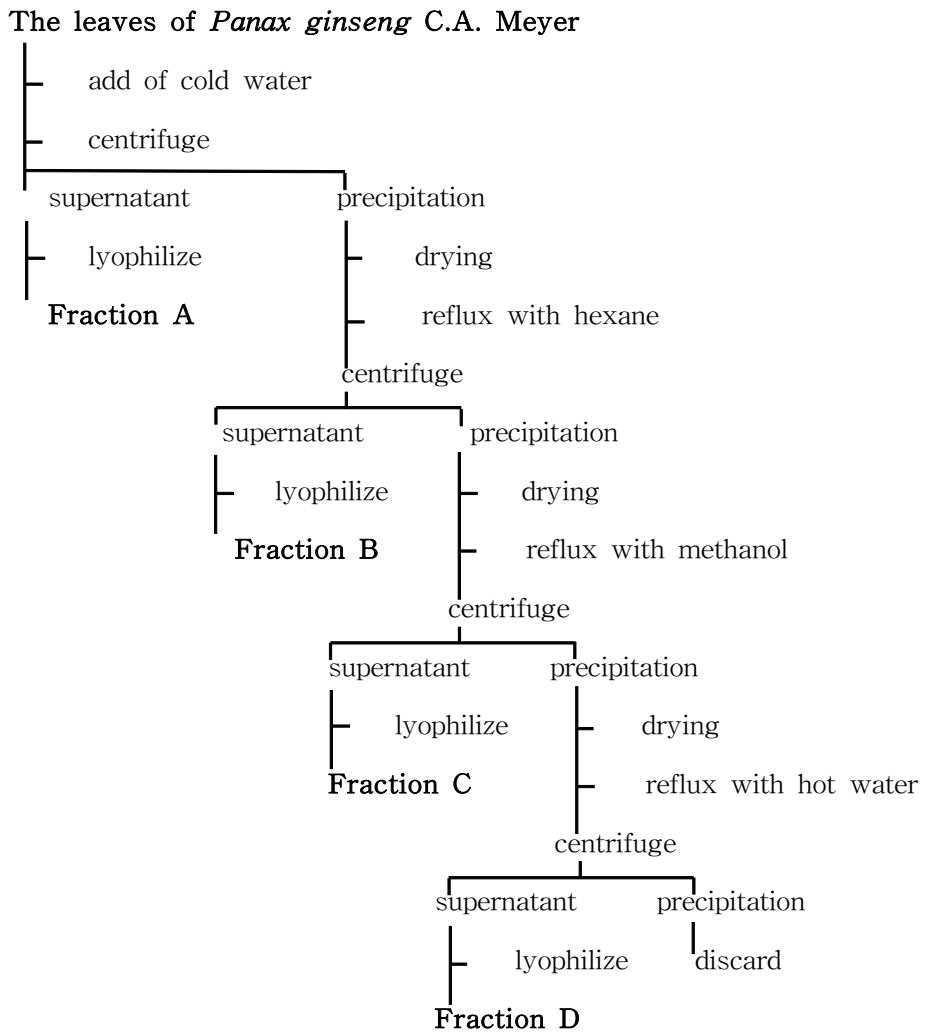


Fig. 2-2. Systemic extraction procedure for isolation of immuno-stimulating materials from ginseng leaves.

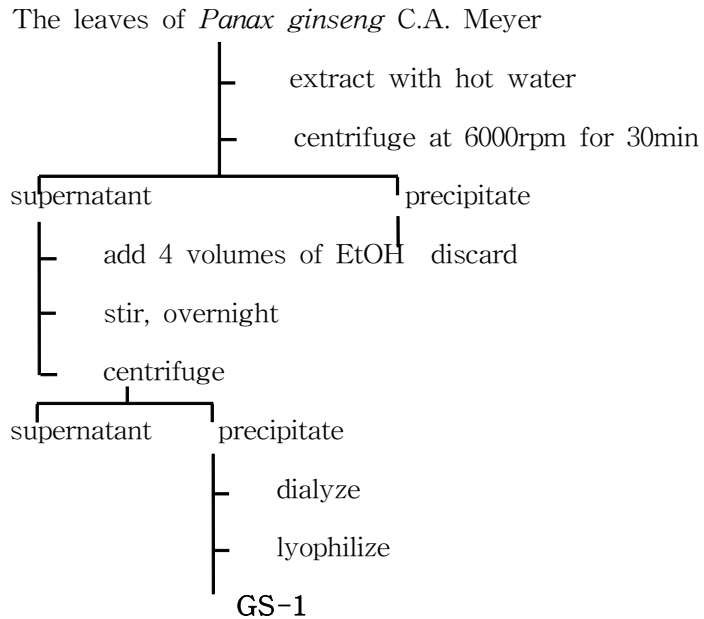


Fig. 2-3. Preparation procedures of crude polysaccharide fraction from ginseng leaves.

1.5시간 반응시켜 가수분해한 후 1ml의 1M NH_4OH 에 용해하여 10mg NaBH_4 로 4시간 환원시킨 후 Acetic acid를 적가, 잔존 NaBH_4 를 제거하고 다시 methanol로 잔존 AcOH를 제거 하여 상당하는 alditol 및 aldonic acid로 전환하였다. 동 혼합물은 적절한 방법(Dower-1 resin, Sep-pak QMA cartridge등)을 이용하여 각각 alditol 및 aldonic acid로 분리하였다. 이중 aldonic acid는 lactonization을 거쳐 10mM Na borate buffer(pH 7.5)에 용해 후 10mM의 NaBH_4 를 첨가하여 실온 1시간 반응시켜 상당하는 alditol로 전환하였다. 그 후 각각의 alditol은 1ml의 acetic anhydride를 가하여 121℃ 3시간 반응시켜 alditol acetate로 전환하였으며, 이 중 per-O-acetylated alditol을 hexane, H_2O 2상 용매계로 추출하여 조제 후 acetone에 용해시켜 GLC 분석용 시료로 사용하였다.

Alditol acetate 유도체의 GC분석은 SP-2380 Capillary column(Supelco사, 0.25mm×30m, 0.2µm film)을 장착한 Hewlet-Packard 5890A GC를 이용하여 Splitless mode 및 다음 온도 program조건에서 분석을 행하였다. [60°C (1min), 60°C→215°C (30°C/min), 215°C (18.8min), 215°C→250°C (80°C/min), 250°C (5min)] 중성당 및 uronic acid의 molar ratio 및 mole %는 상당하는 유도체의 peak면적, 분자량 및, 분자량 및 FID에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

한편 구성당 중 Kdo 및 Dha 함량의 GC 분석을 위해서는 York등과 Stevenson등의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 시료를 약산 조건(1% acetic acid, 100°C, 2 시간)에서 가수분해하여 염기성 NaBD₄로 환원하여 Kdo를 보호하고, 0.1 M TFA로 100°C에서 1시간 재차 처리하고 NaBD₄로 환원하여 Dha부위를 보호하였다. 이때 2 M TFA로 121°C 1시간 가수분해하여 남아 있는 모든 결합을 절단하고 환원과 acetyl화를 거쳐 상기 조건 하에서 분석하였다.

마. Acetyl 함량 측정

시료중의 acetyl함량은 McComb등 (1957)의 방법에 따라 β-D-glucose, pentaacetate를 표준 물질로 하여 정량하였다.

바. 자기면역 질환 치유활성 측정

1) 실험 동물

평균체중 30-35g의 웅성 ICR mouse를 대한 바이오 링크사로 부터 구입하여 항온항습실 (24±1°C, 55% humidity)에서 사육하였으며 사료 및 물은 자유 섭취토록 하였다.

2) Macrophage (Mφ) monolayer조제

Thioglycollate로 복강 macrophage를 세척하여 얻은 후 1×10^6 cell/ml로 조정하고 96 well plate에 0.1ml씩 분주한 후 (1×10^5 cell/well) 37°C 1-2hr incubation하여 M ϕ monolayer를 조제하였다. well에 부착된 M ϕ 는 현미경 검정하여 95%이상 전형적 morphology를 소유하고 있음을 확인하였다.

3) M ϕ 의 FcR을 통한 면역 복합체의 결합도 측정

M ϕ 의 FcR을 통한 면역 복합체의 결합도 측정은 Matsumoto 등 (1990)의 방법에 따라 2.4에서 조제한 M ϕ monolayer에 시료첨가 및 무첨가군으로 나누어 37°C , 15hr 배양하고 1% BSA를 함유한 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 병냉의 glucose oxidase-anti-glucose oxidase (GAG) 100 μ l를 가하고 4°C 에서 240분 배양 후 상등액을 제거하였다. 결합하지 않은 GAG는 PBS-1% BSA로 재차 세척하고 1.0% Nonidet P-40 (NP-40)용액 50 μ l를 가하여 용해시켰다. 여기에 1U/ml horseradish peroxidase, 5mg/ml glucose, 1mg/ml, 2,2'-azinobis-3-ethylbenzthizoline sulfuric acid (ABTS)를 함유한 반응용액을 150 μ l첨가한후 실온에서 30분 이상 배양하여 M ϕ 에 결합된 GAG에 기인한 glucosidase활성을 405nm에서 microplate reader(Biorad사)를 이용하여 측정하였다. (Fig. 2-4 참조)

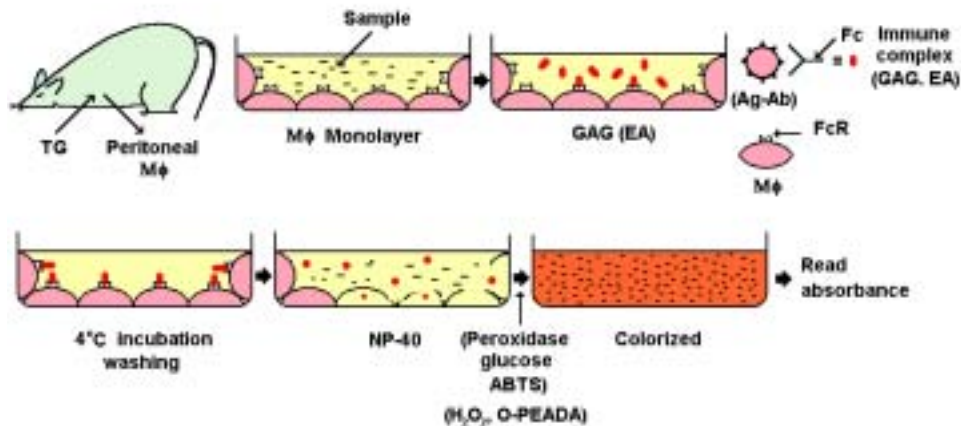


Fig. 2-4. Determination of FcR mediated immune complex binding to macrophage

4) M ϕ 의 FcR에 의한 IgG감작 적혈구의 용혈도 측정

IgG 감작적혈구(EA cell)를 이용하여 불용성 면역 복합체에 대한 M ϕ 의 FcR기능 측정은 Junji등 (1985)의 방법을 적절히 변형하여 사용하였다. EA cell을 M ϕ monolayer와 37°C에서 1시간 반응시킨 후 식균되지 않은 EA cell을 세척 제거하고 M ϕ 를 NP-40용액으로 용해시켰다. 여기에 1mg/ml O-phenylenediamine 및 0.025% H₂O₂를 함유한 반응 용액을 각각 150 μ l씩 첨가하여 상온에서 5분 배양하여 식균된 hemoglobin에 의한 pseudoperoxidase 활성을 492nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

사. 활성화 물질의 본체 규명

1) Periodate oxidation

시료 20 mg을 0.05 M acetate buffer (pH 4.5) 50 ml에 녹인 후, 0.05 M NaIO₄를 5 ml 첨가하고 4°C의 암소에서 72시간 산화시켰다. 이 산화물 중 잔존 NaIO₄를 제거할 목적으로 ethylene glycol을 첨가한 후 투석을 행하고 투석 내액에 NaBH₄ 20mg을 첨가하여 하룻밤 교반시켜 환원시켰다. 반응액은 0.1 M acetic acid로 중화하여 투석 및 동결 건조를 행하여 periodate 산화물을 얻었다.

2) Pronase digestion

시료 20 mg을 0.01 M CaCl₂를 포함한 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 50 mg에 녹인 후 20 mg의 pronase를 첨가하고 37°C incubator에서 48시간 반응시키고 잔존 효소를 불활성화시킬 목적으로 5분간 끓인 후 원심분리하였다. 상등액은 투석과 동결 건조를 행하여 pronase 소화물을 얻었다.

아. 자기면역 질환 치유활성화 다당의 분리 및 정제

1) Cetavlon 처리에 의한 산성다당의 분리

활성 조다당 획분인 GS-1을 증류수에 용해시킨 후 동량의 8% Cetavlon을

가하여 24시간동안 교반시키고 원심분리를 행하였다. 침전물은 10% NaCl에 용해시킨 후 ethanol로 Cetavlon을 제거시키고 동결건조하여 산성다당획분인 GS-2를 얻었고, 상등액은 동량의 1% boric acid를 첨가하여 24시간 동안 교반 후, 원심분리하여 얻은 침전을 ethanol로 회수하고 2% 초산용액으로 수세하여 약산성 다당획분인 GS-3와 상등액 중의 중성다당획분인 GS-4를 얻었다.

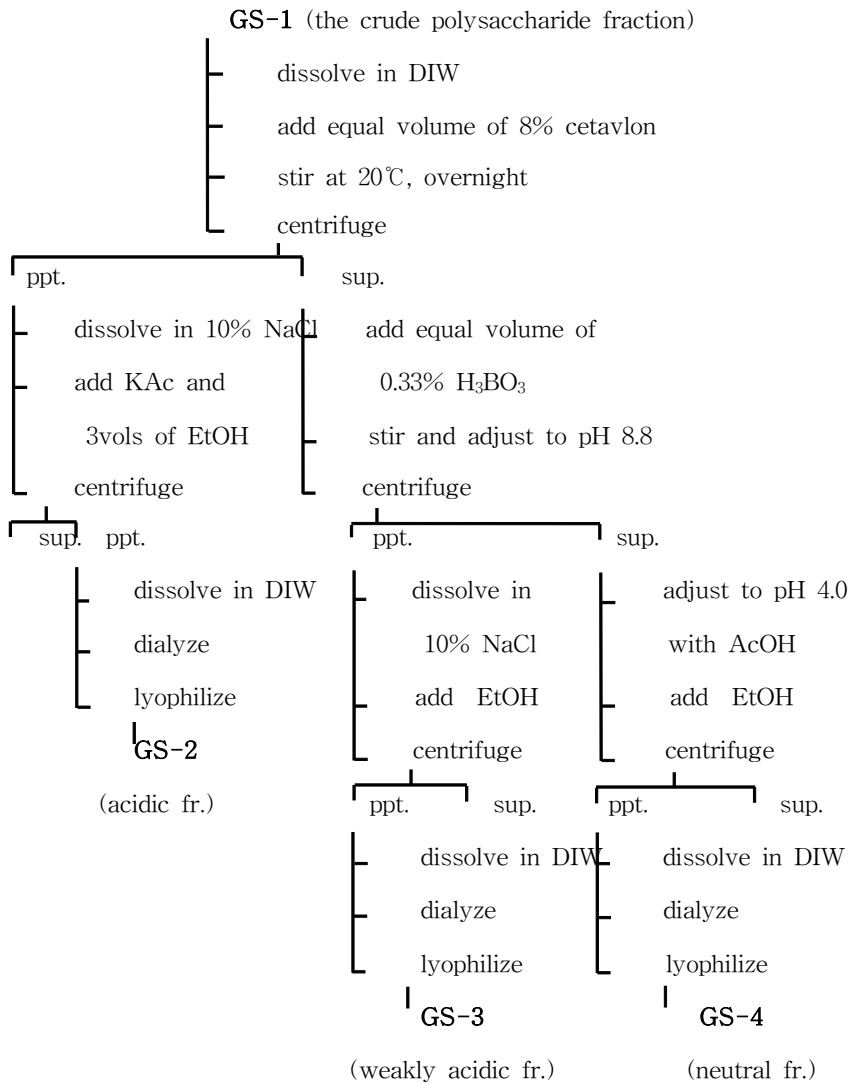


Fig. 2-5. Schematic illustration for Cetavlon treatment of GS-1.

각 획분으로 immune complex clearance activity를 측정하여 높은 활성을 나타낸 GS-3 획분을 대상으로 다음의 정제 과정을 실시하였다.(Fig. 2-5 참조)

2) Anion exchange chromatography(AEC)

자기면역질환 치유면역 활성이 높았던 GS-3를 증류수에 녹인 후, 증류수로 평형화된 DEAE- Sepharose FF (Cl⁻ form)에 흡착시킨 후 증류수, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 M의 NaCl로써 단계적으로 용출시켰다. 이때 얻어진 각 획분은 농축 및 투석 후 동결 건조를 행하여 1개의 비흡착획분(GS-3a)과 8개의 흡착획분(GS-3b~2i)을 얻었다.(Fig. 2-6 참조) 이들은 immune complex clearance activity를 측정하여 가장 높은 활성을 보였던 GS-3c 획분을 선택할 수 있었다. GS-3c는 다시 QAE-Sepharose column에 재차 loading 하고 NaCl 0.2, 0.3 및 1.0 M로 순차적으로 용출시켜 각각 GS-3c-I, GS-3c-II, GS-3c-III로 분획하였다. 이들중 활성과 수율이 우수하였던 GS-3c-II는 이후의 정제 과정에 사용하였다.(Fig. 2-6 참조)

3) Gel permeation chromatography(GPC)

AEC 정제 시료 중 높은 면역 활성을 보인 GS-3c-II를 대상으로 GPC를 행하였다. GS-3c-II는 0.05 acetate buffer (pH 5.2)로 평형화된 Bio-gel P-30을 이용, 겔 여과를 행하였으며 이 중 활성 획분을 감압농축 및 동결건조를 행하여 이후의 실험에 사용하였다. 각 정제과정은 Fig. 2-6에 표시한 바와 같다.

4) HPLC에 의한 분자량 측정 및 순도 확인

GPC 정제 획분의 정제 정도 및 분자량을 예측하기 위하여 Asahipak GS-510 + GS320 및 Asahipak GS-320 + GS220 (각 0.76×30cm)를 장착한 HPLC-9500 (Young-Lin Co. Ltd., Korea)을 사용하여 0.2M NaCl를 용매로

용출을 행하고 상법에 따라 평균 분자량을 산출하였다. 분자량 측정시에는 표

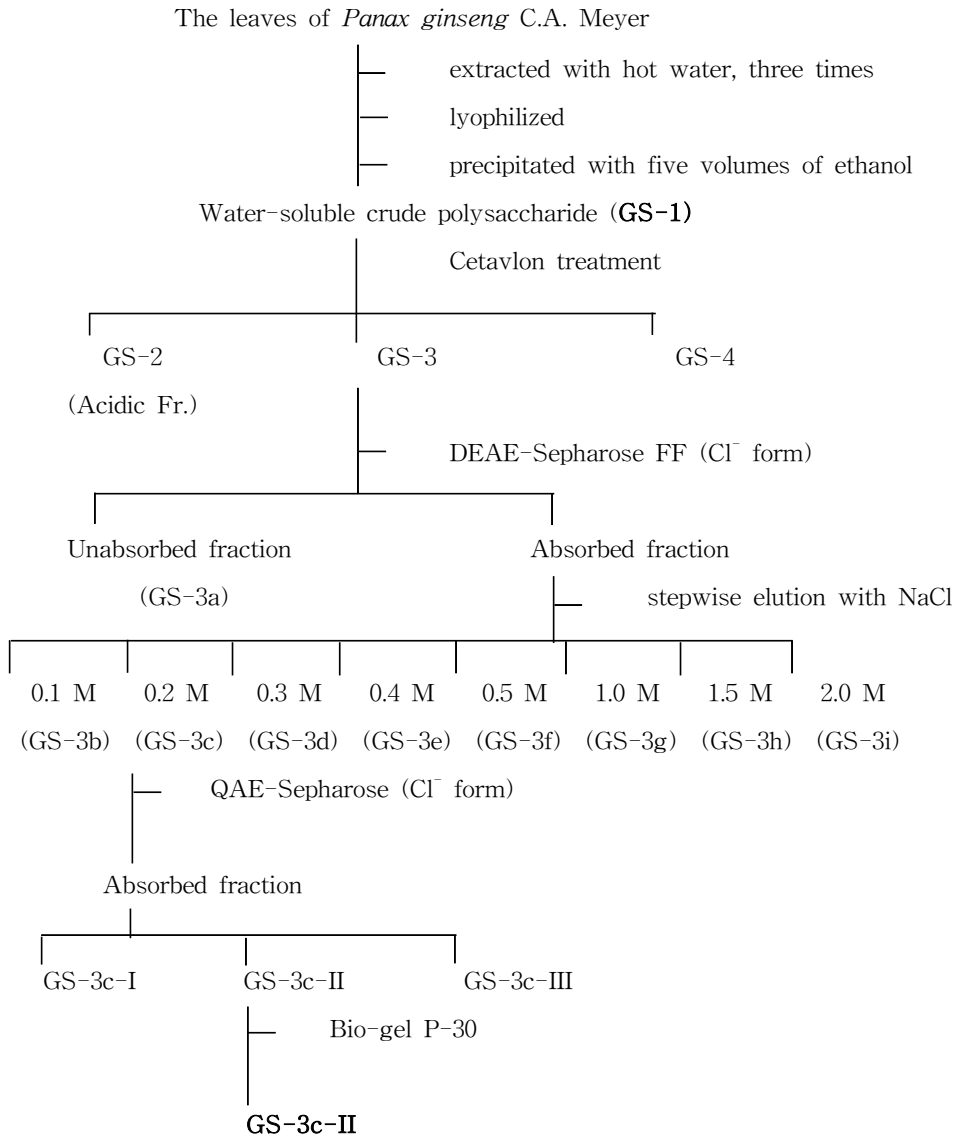


Fig. 2-6. Purification scheme of complex pectic polysaccharide, GS-3c-III from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer.

준 pullulan series (P800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)를 이용하여 각각의

retention time을 구한 후, 분자량에 대한 Kav 값을 산출하여 얻은 표준 곡선으로부터 환산하여 결정하였다.

자. 활성다당의 구조 분석

1) 구조분석을 위한 선택적 가수분해 및 단편 oligo당의 조제

GS-3c-II로 부터 구조분석이 용이한 분자량이 작은 oligo당을 유리시키기 위해 선택적 산 가수분해를 행하였다. 이때 사용한 산은 높은 휘발성으로 가수분해 후 산의 제거가 용이한 0.1 M TFA를 이용하였으며, 처리온도 및 시간을 조정하면서 단편 oligo당의 분리가 용이한 조건을 설정하였다. 이 과정에서 작은 oligo당의 생성이 용이한 2개의 연속 처리조건, 분해과정 1 및 분해과정 2를 결정하였다.

① 분해과정 1 : GS-3c-II 획분은 0.1 M TFA용액으로 40°C에서 24시간 가수분해하였으며, 이 가수분해물은 50 mM acetate buffer (pH 5.2)로 평형화된 Bio-gel P-6 column (2.5×65 cm)으로 겔여과하였다. 이때 분자량이 서로 다른 3개 획분 PH-I, PH-II 및 PH-III를 얻을 수 있었으며 각 획분 저분자 획분인 PH-II 및 PH-III를 탈염 및 동결건조 하여 구조분석에 이용하였다.

② 분해과정 2 : 분해과정 1에서 얻어진 고분자 획분 PH-1은 0.1 M TFA용액으로 40°C에서 84시간 재차 가수분해하여 동일조건에서 Bio-gel P-6 column (2.5×65 cm)으로 겔여과하였다. 이때 분자량이 상이한 3개 획분 PH-1a, PH-1b, PH-1c, PH-1d를 얻을 수 있었으며 저분자 획분들을 대상으로 구조분석에 이용하였다.

③ 분해과정 3 : 분해과정 2에서 얻어진 고분자 획분 PH-1a는 endo- α (1→4)-polygalacturonase 0.1U를 첨가하고 0.05 M acetate buffer (pH 4.2)로 용해하여 37°C에서 4일간 가수분해하였다. 이 가수분해물은 상기 조건에서와 같이 Bio-gel P-6 column (2.5×65 cm)으로 겔여과하여 분자량이 상이한

PH-1a-I, PH-1a-II 및 PH-1a-III로 분획하였다.

2) β -glucosyl Yariv antigen을 이용한 single radial gel diffusion

다당시료(5 μ g)을 β -goucosyl-Yariv antigen [10 μ g/ml, 1.3.5-tri-(4- β -D glucopyranosyl-oxyphenylazo) 2.4.6-trihydroxybenzene]을 함유한 agarose plate상의 well에 첨가후 실온에서 하룻밤 방치하여 반응시키고 형성된 hollow를 분석하였다. 이때 대조군으로 gum arabic을 농도별로 첨가하여 함께 분석하였다.

3) Methyl화 분석에 의한 결합양식 결정

① Methylsufinyl carbanion의 조제

Mineral oil을 함유한 NaH 2g에 ester를 수차례 가하여 oil을 제거한 후 desiccator에서 건조한 후 무수 DMSO 20ml을 첨가하여 질소로 충전하고 70°C oil bath하에서 1시간 반응시켰다. 이때 반응액이 옅은 녹색을 띠는 때를 종말점으로 하여 반응을 종결하고 원심분리하여 상등액을 취한 후 공기의 접촉이 없도록 질소로 치환하여 소량씩 분주한 후 냉동보관하며 사용하였다.

② Methylation

다당시료의 methylation은 Hakomori방법(1964)의 변형법에 의해 수행하였다. 각 다당은 methylation이전에 0.2M NaOH로 실온에서 2시간 처리하여 탈 ester화 하였으며 반응중 β -elimination이 일어나지 않도록 methyl화는 한 차례만을 수행하였다. 그러나 다당이 완전히 polyalkoxide로 전환되도록 methylsufinyl carbanion을 필요한 경우 (triphenylmethane으로 check) 수차례 첨가하였으며 methylation이 완료된 다당은 sep-pak C₁₈ cartridge를 이용하여 회수하였다.

③ Methyl화 다당의 carboxyl-reduction

다당시료중의 uronic acid 부분의 결합구조를 확인하기 위해서는 THF에

용해된 1M lithium tetra hydrodeutride를 이용 C₆위치를 d₂로 표지하여 Mass spectra 분석을 용이하게 하였다.

④ Methyl 잔기를 소유한 당 잔기의 결합구조분석

다당 중에는 상당량의 2-methyl fucosed 및 2-methyl xylose를 소유하므로 이들 당잔기의 결합양식을 구별하기 위해서는 methylation시 CD₃I를 사용하였다.

⑤ Kdo 및 Dha 함유 당쇄를 위한 전처리

Kdo 및 Dha를 함유한 당쇄는 York등의 방법에 의해 NaBD₄에 의해 환원 후, methyl화 시켰다. Methyl한 다당 및 oligo당은 1M TFA로 100°C에서 2시간 가수분해 후, 환원 및 acetyl화 과정을 거쳐 partially methylated alditol acetate로 전환하여 GC 및 GC-MS로 분석하였다.

⑥ Methyl화 다당의 가수분해 및 acetyl화

Methyl화 다당은 acid labile한 당 잔기의 파괴를 막기 위해 1M TFA로 100°C에서 2시간 가수분해하였으며 이 후 환원 및 acetylation과정은 상법을 따라 수행하였다.

⑦ Methylated sugar의 GLL 및 GLS-MS(e.i)분석

상기 방법으로 조제된 methylated alditol acetate는 sp-2380(30m × 0.25mm i.d., 0.2μm film, Supelco) capillary column이 장착된 Hewlett-packard 5890A GC를 사용하여 최적온도 조건 [60°C(1min), 60°C→180°C(30°C/min), 180°C→250°C(1.5°C/min), 250°C(5min)]에서 splitless injection mode로 분석하였으며 이때 carrier gas (He)의 압력은 0.9 ml/min로 조정하였다. 한편 GLS-MS는 SP-2380을 장착한 Hewlett-packard 5890A GC system과 5870 Mass spectrophotometer를 이용하여 최적온도 조건 [60°C(1min), 60°C→150°C(30°C/min), 150°C→250°C(1.5°C/min)]에서 역시 splitless injection mode로 분석하였다. (He pressure : 0.5ml/min) Methylated alditol acetate는 Mass에 의한 fragment ion 분석과 GLC의 relative retention time을 조합하여 동정하였으며 각 peak의 molar ratio는 peak area 및

response factor로 부터 계산하였다.

⑧ Methyl화 oligosaccharide-alditol의 GC-MS 분석

상기 방법으로 조제된 methyl화 oligosaccharide-alditol은 분해 및 acetyl화 과정을 거치지 않은 채 별도로 분석을 행하였다. 시료를 SP-2380 capillary column (0.2 μ m film, 0.25 mm i.d. \times 15 m, Supelco)을 장착한 동일 GC-MS 장치에 on-column 상태로 주입하고 최적온도조건 [100 $^{\circ}$ C (1 min), 100 $^{\circ}$ C \rightarrow 150 $^{\circ}$ C (30 $^{\circ}$ C/min), 150 $^{\circ}$ C \rightarrow 270 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C/min)]에서 분리시켰다. Methyl화 oligosaccharide-alditol의 구조분석은 Kochetkov등의 방법에 의해 MS fragment ion [A, J 및 alditol(ald)]을 분석하여 결정하였다.

4) Nuclear magnetic resonance(NMR) 분석

1 H-NMR(300 MHz) 분석은 시료 10 mg을 0.5 ml의 중수(D₂O)에 용해하여 Varian XL-300 spectrometer를 이용하여 내부온도 50 $^{\circ}$ C에서 실시하였다.

5) Negative-ion fast-atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS)

FAB-MS 분석에는 OA-5000 computer가 장착된 Jeol JMS-AX505 HA (Jeol, Japan) mass spectrometer를 이용하였다. Bombarding gass로는 xenon이 사용되었으며 atom gun은 3 kV, 10 mA에서 작동하였다. M/z 1500에서 m/z 0까지 20 s/decade의 속도로 scan하였으며, matrix로는 glycerol 과 monothioglycerol (50:50, v/v) 혼합액이 사용되었다. 시료는 5 % aqueous acetic acid 용액에 1 mg/ml 농도로 조제하여, 그 중 1 μ L를 matrix와 동량 혼합하여 loading 하였다. B/E (daughter ions) linked scan은 UV oscillograph를 이용하여 120 s/decade의 속도로 검측하였다.

차. 면역 복합체 제거능의 in vivo 실험

1) GS-3c-II의 in vivo 투여에 의한 macrophage의 면역복합체 제거능

본 실험은 in vivo 면역 복합체 제거능을 측정하기 위해 무투여군과 투여군으로 나누어 실험 하였다. 생리 식염수에 녹인 GS-3c-II는 실험 전 3일, 1일째에 각각 25 mg/kg과 12.5 mg/kg 씩 각각 복강내에 주사하고 실험 당일 치사하여 복강 내 macrophage를 분리하여 5×10^5 cells/ml로 조제하여 M ϕ monolayer를 조제하였다. 이들은 37°C, 15hr 배양하고 1% BSA를 함유한 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후 병냉의 GAS 100 μ l (100 μ g/ml)를 가하고 4°C에서 240분 배양 후 상등액을 제거하였다. 결합하지 않은 GAG는 PBS-1% BSA로 재차 세척하고 NP-40 용액 50 μ l를 가하여 용해시켰다. 여기에 1U/ml horseradish peroxidase, 5mg/ml glucose, 1mg/ml, 2,2'-azinobis-3-ethylbenzthizoline sulfuric acid (ABTS)를 함유한 반응용액을 150 μ l첨가한후 실온에서 30분 이상 배양하여 M ϕ 에 결합된 GAG에 기인한 glucosidase활성을 측정하였다.

2) GS-3c-II의 in vivo 투여에 의한 불용성 면역복합체 제거능 측정

생리 식염수에 녹인 GS-3c-II는 실험 전 3일, 1일째에 각각 25 mg/kg과 12.5 mg/kg 씩 각각 복강내에 주사하고 실험 당일 치사하여 복강 내 macrophage를 분리하고 M ϕ monolayer를 조제하였다. IgG 감작적혈구(EA cell)를 M ϕ monolayer와 37°C에서 1시간 반응시킨 후 식균되지 않은 EA cell을 세척 제거하고 M ϕ 를 NP-40용액으로 용해시켰다. 여기에 1 mg/ml O-phenylenediamine 및 0.025% H₂O₂를 함유한 반응 용액을 각각 150 μ l씩 첨가하여 상온에서 5분 배양하여 식균된 적혈구의 hemoglobin에 의한 pseudoperoxidase활성을 492nm에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다.

3) In vivo 면역 복합체 제거능 측정

생체내에서의 면역 복합체 제거능은 in vivo enzyme containing immune

complex clearance assay로 측정하였다. 즉 20 µg/ml 농도의 GAG용액 mouse 체중 gram당 8 µl씩 ICR mouse의 꼬리 정맥에 주사하고 hematocrit capillary pipette을 이용 50 µl의 혈액을 시간 별로 채혈하였다. 채혈은 mouse이 안와 정맥에서 GAG 투여후 각각 6, 10, 14, 18 min에 실시하였다. 채혈된 혈액은 10 U/ml의 heparin이 함유된 동량의 PBS와 혼합후 원심분리 하여 상등액을 회수하고 그중 20 µl를 회수하여 microplate의 well로 옮기고 상기한 바와 같이 glucose oxidase 활성을 측정하였다. 적혈구 용혈에 의한 흡광도의 변화를 보정하기 위하여 각 시료의 glucose activity는 다음식을 이용 표현하였다. $OD_{405\text{ nm}} = (OD_{405\text{ nm}})_{30\text{ min}} - (OD_{405\text{ nm}})_{10\text{ min}}$

In vivo 면역 복합체 제거능은 효소활성의 반감기($T_{1/2}$)로 나타내었다.

4) In vivo carbon clearance 활성 측정

Mononuclear phagocytic system에 의한 비특이적인 탐식활성을 측정하기 위해 carbon 현탁액으로 ink (Fount India Ink, Pelikan AG, Germany)를 이용하였다. 1% gelatin이 함유된 PBS로 ink를 8배 희석하고 mouse 체중 g당10 µl씩 ICR mouse의 꼬리 정맥에 주사한 후, hematocrit capillary pipette을 이용 50 µl의 혈액을 시간 별로 채혈하였다. 채혈은 mouse이 안와 정맥에서 ink 용액 투여 후 각각 4, 7, 10, 13 min에 실시하였다. 채혈된 혈액은 0.1 % sodium carbonate 용액 5 ml에 혼합하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 탐식능은 colloidal carbon의 50% 제거에 소요되는 시간, 즉 반감기($T_{1/2}$)로 나타내었으며 mouse의 체중과 장기의 무게를 고려하여 탐식능을 (corrected phagocytic index, a) 보정하였다.

$$a = \frac{\text{body weight}}{\text{weight of liver+spleen}} \times \sqrt[3]{(\log OD1 - \log OD2) / (T2 - T1)}$$

카. 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안

1) 인삼잎 활성획분 첨가음료 제조

인삼잎 면역 활성성분을 기능성 소재화(산업화)하기 위한 획분은 각 면역 활성성분이 골고루 함유된 다당 획분 GS-1이 가장 적절한 것으로 판명됨에 따라 이에 대한 응용성 실험으로 GS-1을 이용한 음료 제조실험을 행하였다. 관능 특성이 우수한 음료를 제조하기 위하여 인삼잎 중 활성다당 획분 GS-1을 주재료로 하고 당분, 유기산, 및 식미개선용 과일추출물을 활용하여 음료를 제조하였다. GS-1농도, 당농도 및 유기산농도, 및 식미 개선용 부재료의 최적 조건을 설정하기 위해 농도를 변화시켜 (예, 당농도 10%, 12.5% 15%등) 음료를 제조하고 관능 검사를 통해 첨가량을 결정하였다.

2) 관능검사

관능검사는 경기대 식품생물공학과 학생 중 맛의 분별력이 우수한 20명의 panel에 의해 실시하였다. 아래의 표와 같이 향, 맛 및 종합적 기호도에 대해 5점 척도법을 적용, 무작위로 시료를 제공하면서 기호도의 성적을 얻은 후 성적의 평균치에 대해 Duncan 다중 검정법에 따라 통계처리하여 시료간의 통계적 유의성을 조사하였다

Sample No.	Taste	Flavour	Overall acceptance	Score
A				1: very poor 3: moderate 5: very good
B				
C				
D				

제 3 절 결 과

제 1 항 인삼잎으로부터 자기면역 질환 치유 활성물질의 검색

가. 인삼잎의 자기면역 질환 치유활성 검토

인삼잎과 가지부분은 산지별로 금산, 김포 및 강화 등지에서 수확(99년 10월)한 것과 중국산 수입시료를 획득하여 300 g 시료당 열수 3 L를 가하여 추출한뒤 glucose oxidase-antiglucose oxidase를 이용한 자기면역 질환 치유 활성(immune complex clearance activity)을 측정 한 결과(Fig. 2-7), 금산에서 채취한 인삼엽부에서 가장 높은 활성을 보였다. (100 μ g, 204%)

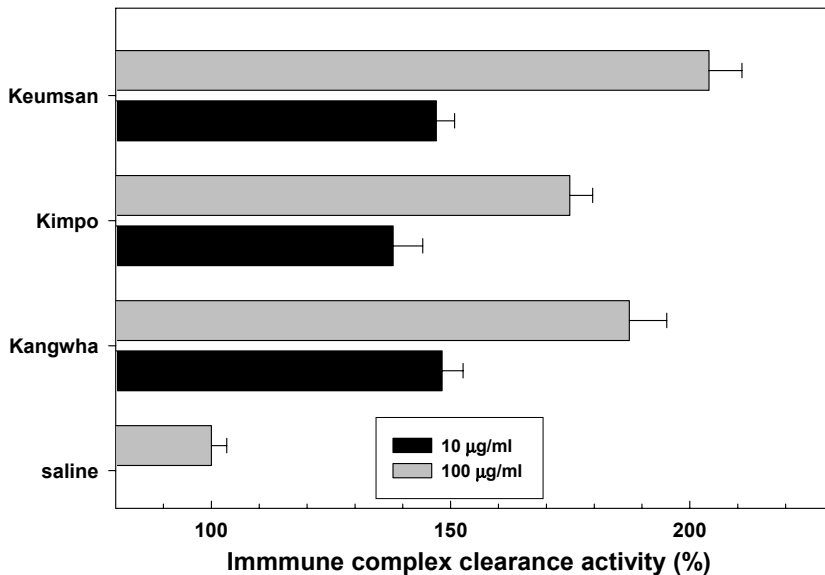


Fig. 2-7. Immune complex clearance activity of the hot water extracts from the ginseng leaves harvested at various growing districts.

타 산지의 시료 추출물의 경우, 금산産 추출물에 비해 72-84%의 활성을 보였으나, 저 농도에서 활성을 측정할 경우 큰 유의차는 없었다. 그러나 재료의 안정적 공급이 가능하고 활성이 다소 우수하였던 금산産 인삼잎을 이후의 실험에 사용하였다.

나. 추출 용매별 항보체 활성 검색

추출 용매에 따른 자기면역질환 치유활성을 검토하기 위해 인삼잎 건조파쇄 시료를 대상으로 각종 용매로 추출하고 추출물의 수율과 100µg/ml에서의 활성을 비교하였다. Table. 2-1에 나타난 바와 같이 물 추출물만이 약 30%에 이르는 높은 추출효율을 보여주었으며 활성이 경우 열수 추출물이 201.8%로 가장 높은 활성을 나타냈다. 본 자기면역질환 치유활성의 대조군이 100%인데 반해 acetone등이 몇몇 추출물의 경우 이보다도 훨씬 낮은 활성을 보임

Table 2-1. Immune complex clearance activities and yields of water and several solvent extracts from ginseng leaves

Solvents	Immune complex clearance activities (%)	Yield(%)
Cold water	160.4	27.4
Hot water	201.8	32.3
Ethyl acetate	100.9	1.0
Chloroform	84.2	1.4
Acetone	56.8	2.9
Ethanol	105.4	7.8
Methanol	80.2	9.7
1% NaOH	123.6	11.8
Buthanol	86.5	3.7

으로써 활성 물질의 추출에는 부적절한 것으로 판단되었으며 이는 추출물중 존재할 수 있는 세포독성 물질에 기인하는 것으로 사료된다.

한편 인삼잎으로 부터 극성이 서로 다른 용매를 이용, Fig. 2-2에서 표시한 것처럼 계통추출하였다. 시료를 먼저 균질기를 이용하여 냉수로 추출한 후 상등액은 동결건조하여 냉수추출획분 (Fr. A)으로 하고 잔사는 헥산으로 환류추출하여 헥산추출획분 (Fr. B)으로 하였다. 잔사는 다시 메탄올로 환류추출하고 상등액은 동결건조하여 메탄올추출획분 (Fr. C)으로 조제하고 마지막으로 잔사를 다시 열수로 환류추출하여 이를 열수추출획분 (Fr. D)으로 하였다. 동 방법으로 조제된 시료의 활성을 측정한 결과(Table 2-2), Fr. B와 C는 거의 활성을 나타내지 않은 반면, Fr. A에서는 중간정도의 활성을, 열수추출 획분인 Fr. D의 경우, 100 µg/ml의 비교적 저농도에서 218%의 높은 활성이 있음을 확인 할 수 있었다. Fr. B와 C의 경우에는 자기면역 질환 치유활성은 세포독성이 심하여 매우 낮은 활성을 나타낸 것으로 판단되었으며 수율도 매우 낮아서 활성검색에 부적당하였다. 또한 열수추출물이 상대적으로 낮은 수율을 보인 것은 계통 추출하였으므로 냉수추출물 조제 후 그 잔사를 이용한 때문인 것으로 판단되었으며, 열수 추출물이 활성이 높음으로 이후 추출시에

Table 2-2. Immune complex clearance activity and yield of water and organic solvent extracts from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer

Sample	Immune complex clearance activity (%, 100µg/ml)	Yield
Control	100	-
Fraction A	168	18.2
Fraction B	54	5.1
Fraction C	89	0.8
Fraction D	218	5.2

는 열수추출이 가장 적당한 것으로 판단되었다. 또한 Table 2-1과 2-2에서의 수율의 차이는 투석유무에 따른 것으로 판단된다.

다. 수용성 활성물질 추출 조건 검토 및 설정

이상의 결과에서 인삼잎 중 면역 복합체 제거 활성은 수용성 물질로 판단 되었으므로 그 조건을 설정하기 위해 열수, 냉수, 산/알카리 용액등의 용매로 추출 후 투석 및 동결건조를 행하고 활성을 비교하였다. Fig. 2-8에 나타난 바와 같이 각종 수용성 용매 중 열수 추출물의 경우가 가장 양호한 활성을 보였으며, 냉수 추출물의 경우 중간 정도의 활성을, 0.1N HCl 및 NaOH 추출물

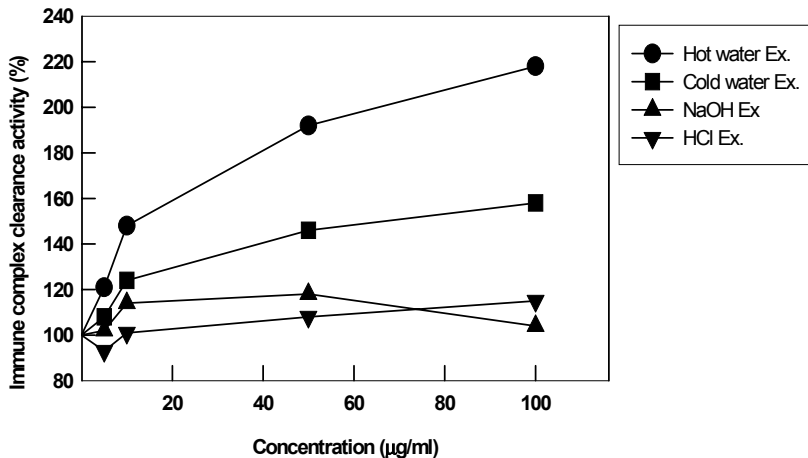


Figure 2-8. Immune complex clearance activity and the several water extracts from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer.

은 활성을 거의 나타내지 않는 특성을 보여주었다. 또한 추출조건은 100℃에서 5시간 처리할 경우, 가장 양호한 수율을 보였으며 수율을 높이기 위해 3회

연속 추출(결과는 제시하지 않았음)이 가능한 것으로 판단되었다.

이상의 결과에서 인삼잎으로 부터 열수추출을 행할 경우 높은 자기면역질환 치유 활성 화분을 얻을 수 있으며, 이 중에는 메탄올 가용 화분이 비교적 높은

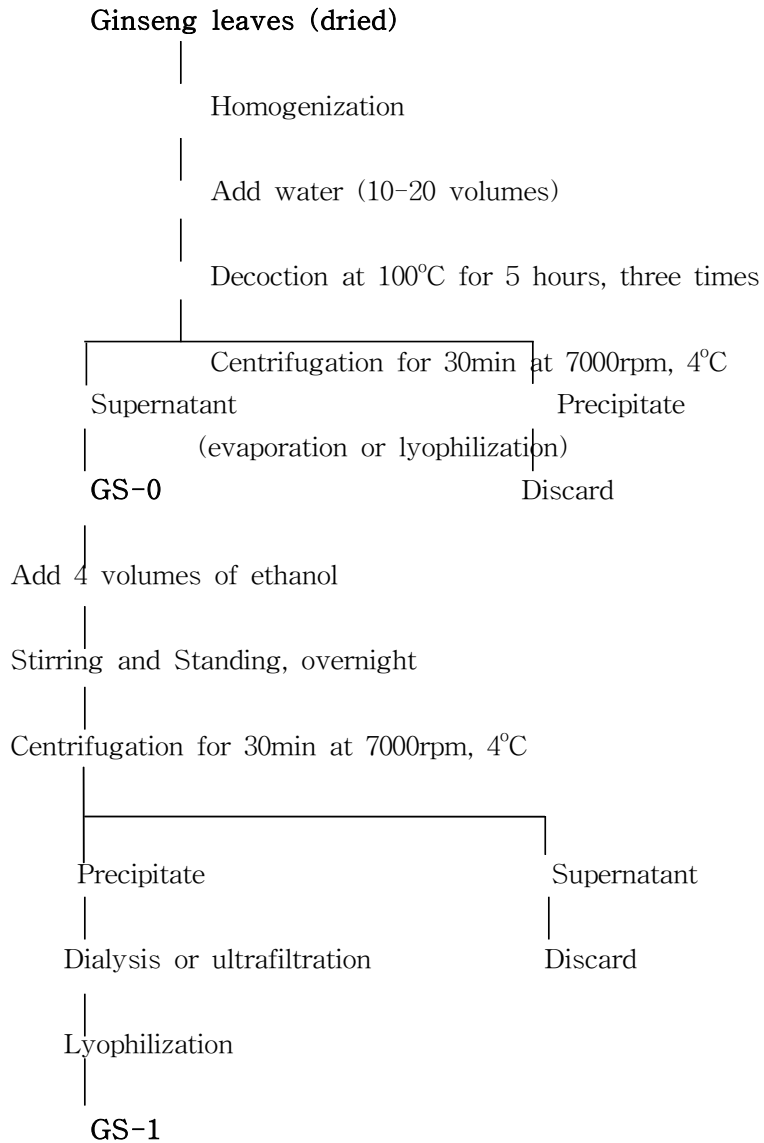


Fig. 2-9. Extraction procedure of biologically active polysaccharide from ginseng leaves.

비율로 존재하고 이들은 또한 세포 독성이 있음을 확인되었다. 그러나 메탄올이 인체에 높은 독성을 나타내므로 비슷한 극성을 소유한 에탄올로 대체 시 활성 물질이 효율적 획득이 가능하다고 판단되었으며 따라서 Fig. 2-9에 제시된 바와 같은 최대 추출 조건을 확립할 수 있었다.

라. 활성 조다당 획분의 화학적 특성

활성 조다당 획분 GS-1의 화학적 성질을 조사하기 위해 전당, uronic acid 및 단백질과 구성당의 함량을 살펴본 결과는 Table 2-3과 같다. GS-1은 중성당 57.8%, 산성당 35.0% 및 미량의 단백질(5.4%)로 구성되어 있었으며 acetyl기를 1.8% 함유하는 다당획분이었다. 구성당은 fucose 1.9%, arabinose 16.5%, xylose 1.0%, rhamnose 15.9%, mannose 4.2%, galactose 16.3%, glucose 5.4%, glucuronic acid 1.8% 및 galacturonic acid 32.4%으로 arabinose, galactose, rhamnose와 galacturonic acid가 특히 높은 비율로 함유되어 있는 pectic polysaccharide로 구성되어 있음을 추정할 수 있었다.

또한 GS-1에는 일반적인 식물 유래의 다당에서는 좀처럼 관찰되지 않는 특이당류인 2-methylfucose, 2-methylxylose, apiose, aceric acid와 팔당당과 칠탄당의 일종인 Kdo(3-deoxy-D-*manno*-2-octurosonic acid) 및 Dha(3-deoxy-D-*lyxo*-2-heptulosaric acid)를 각각 1.6%, 0.8%, 2.5%, 1.2%, 1.7% 및 1.8%의 낮은 비율로 함유되어 있었으며 따라서 총 15종의 구성당으로 이루어진 상당히 복잡한 조성을 추정할 수 있었다. 이러한 특이당을 함유한 다당류는 상당히 드문 예로써 Albersheim등이 무화과(*Acer pseudoplatanus*) 및 벼(*Oryza sativa*)등의 액체 세포 배양액 추출한 rhamnogalacturonan II와 유사한 구조를 포함하고 있음을 시사하는 것이다.

Table 2-3. Chemical property and component sugars of GS-1

Chemical composition	GS-1(%)
Total sugar	57.8
Uronic acid	35.0
Protein	5.4
Acetyl group	1.8
Component sugar	Mole%
2-Methylfucose	1.6
Rhamnose	15.9
Fucose	1.9
2-Methylxylose	0.8
Xylose	1.0
Arabinose	16.5
Apiose	2.5
Mannose	4.2
Aceric acid	1.2
Galactose	16.3
Glucose	5.4
3-deoxy-D- <i>lyxo</i> -2-heptulosaric acid	1.8
3-deoxy-D- <i>manno</i> -2-octurosonic acid	1.7
Galacturonic acid	32.4
Glucuronic acid	1.8

Component sugars of GS-1 was analyzed by the alditol acetate method.

제 2 항. 자기면역 질환 치유 활성 물질의 본체 분석

가. Cetavlon 처리에 의한 자기면역 질환 치유활성 물질의 분석

GS-1은 산성당 함량이 35.0%로 본 획분안에는 산성도가 다양한 다양한 다당이 존재할 것으로 판단되었으므로 양이온 계면활성제인 Cetavlon (cetyltrimethyl ammonium bromide)에 의해 Fig. 2-5와 같이 분석을 행하여

산성도에 따른 3개 획분 GS-2, GS-3, GS-4를 얻을 수 있었다. 이들에 대한 활성을 검토한 결과 약산성 획분인 GS-3가 각농도에서 최대의 활성을 보여주었으며 농도의존적으로 활성이 증가하는 양상을 보여 주었다. (Fig. 2-10) 한편 GS-3는 화학 조성에서 중성당 70.5%, 산성당 21.4%, 단백질 8.1%의 조성을 나타냈다. (Table 2-4)

나. GS-3 획분의 자기면역 질환 활성 본체의 검토

이러한 조성은 실제 자기면역질환 치유활성이 다당 부분과 단백질 중 어느 부분에 존재하는지 모호한 부분이었으므로 GS-3를 periodate 와 pronase로 처리한 후 활성을 비교한 결과 (Fig. 2-11), periodate 산화처리에 의해 활성이

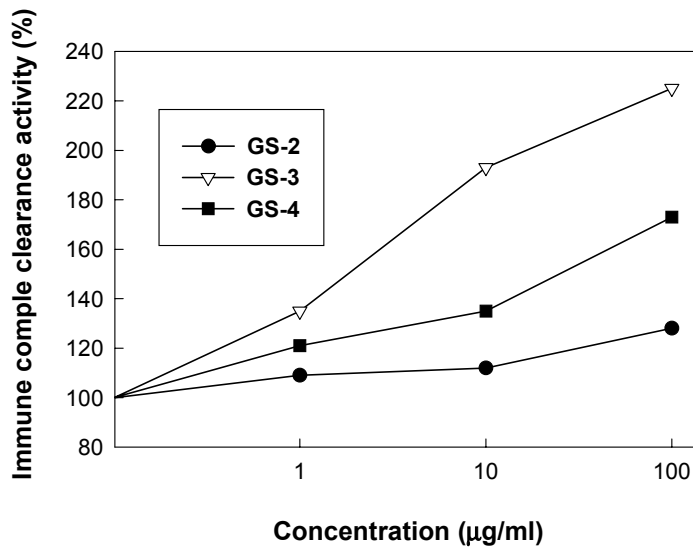


Fig. 2-10. Immune complex clearance activity of GS-2, GS-3 and GS-4 obtained by Cetavlon treatment of fraction GS-1 from the ginseng leaves.

Table 2-4. Chemical compositions and yields of GS-2, GS-3 and G S - 4

Fractions	Neutral sugar (%)	Uronic acid (%)	Protein (%)	Yield (%)
GS-2	77.5	11.4	11.05	7.98
GS-3	70.5	21.4	8.1	16.70
GS-4	68.1	21.2	10.6	21.73

크게 감소한 반면 periodate 분해처리에 의해서는 뚜렷한 활성의 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로부터 활성에 관련되어 있던 다당이 결국 periodate에 의해 파괴되므로서 활성이 저하되는 것으로 예측할 수 있으며 예비적으로 활성에 관여하는 물질이 단백질이 아닌 다당일 가능성을 시사하고 있다.

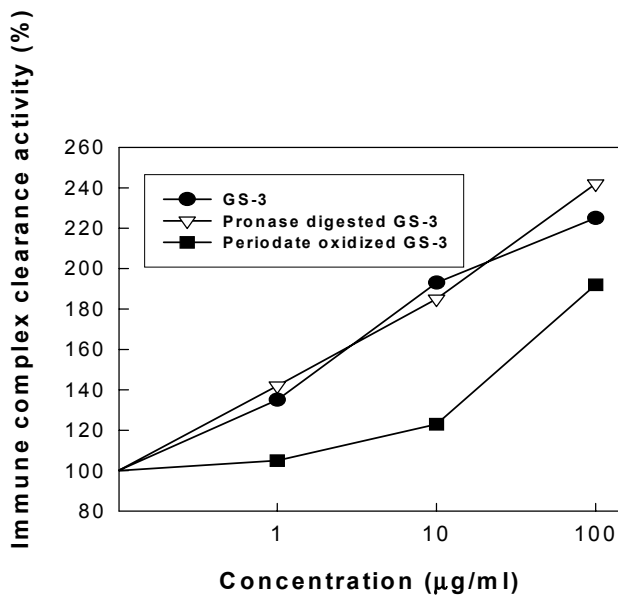


Fig. 2-11. Changes in immune complex clearance activity of GS-3 by treatment of sodium periodate and Pronase.

다. GS-3 획득의 불용성 면역 복합체 제거능 검토

추출 및 분획 과정에서 가장 높은 활성을 나타내었던 GS-3는 활성 측정 시 glucose oxidase-antiglycose oxidase (GAG)를 이용한 model 분석계에서 실행했던 것으로 이 분석계는 water-soluble한 immune complex에 대해서는 높은 활성을 보였지만 생체 내에서는 실제로 insoluble immune complex가 작용할 수 있는 가능성을 배제할 수 없었으므로 Junji 등의 방법에 따라 erythrocyte를 IgG로 감작화 시킨 후 얻어진 이를 대상으로 면역복합체 제거 활성을 측정하였다. 이 분석계는 불용성 면역복합체를 macrophage와 반응시킨 후, 미반응 IgG-sensitized erythrocyte를 제거하고 macrophage의 세포막

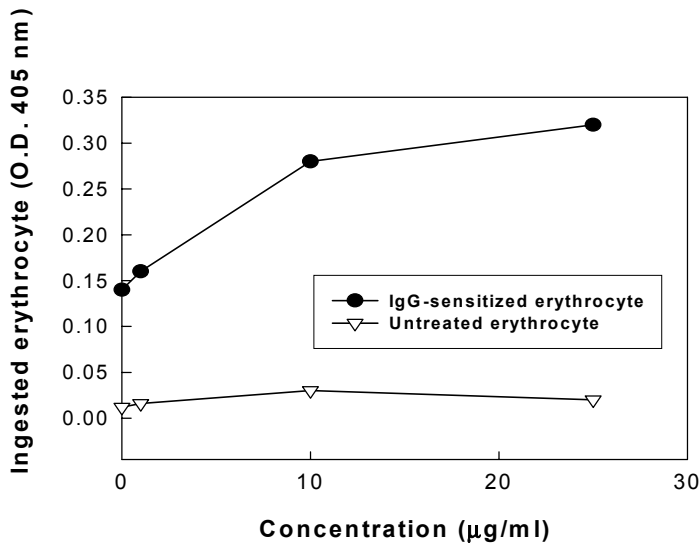


Fig. 2-12. Effect of GS-3 on FcR mediated erythrophagocytosis.

Thioglycollate elicited macrophages were culture with various concentration of GS-3 for 15 hr before assay. Data are representative of four separate experiments.

을 용해하여 적혈구 중 존재하는 pseudoperoxidase를 측정하는 방법으로 불용성 면역 복합체 제거를 비교적 손쉽게 측정 가능하다. GS-3 획분은 Fig. 2-12에 보는 바와 같이 IgG 감작적혈구에 대한 macrophage의 FcR 관련 erythrophagocytosis 실험에 있어서도 농도의존적으로 높은 활성을 보였다. 반면 감작화 하지 않은 적혈구에서는 활성을 나타내지 않음으로써 이러한 결과로부터 본 활성이 macrophage의 표면에 존재하는 Fc receptor의 기능 향진시킴으로써 나타나며 수용성 면역복합체 뿐만 아니라 난용성 면역복합체와의 결합에도 그 기능을 향진 시킬 수 있음을 보여 주는 것으로 면역복합체의 조직침착을 줄이는데 유용하게 사용될 가능성을 제시하였다.

제 3 항 자기면역 질환 치유 활성화 다당의 분리 및 정제

가. Anion exchange chromatography

이상의 실험 결과에서 가장 높은 자기면역질환 치유 활성을 보였던 약산성 다당 획분 GS-3는 제반특성을 검토하고 구조결정을 행할 목적으로 정제를 행하였다. GS-3는 DEAE-Sepharose FF column (4×50cm)을 이용하여 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5, 2M NaCl로 stepwise gradient法 용출에 의해 GS-3a, GS-3b, GS-3c, GS-3d, GS-3e, GS-3f, GS-3g, GS-3h, GS-3i등 9개 획분으로 분획하였다 (Fig 2-13 참조). 이들 중 가장 우수한 활성 (226% at 100μg/ml)을 보였던 GS-3c (Table 2-5 참조)는 수차례의 동일 과정을 거쳐 시료를 조제하였으며 동 획분이 갈색으로 착색되어 있었으므로 strong anionexchanger인 QAE-Sepharose (2.3×14.5cm)를 이용하여 재차 stepwise gradient로 용출시켰다. Fig. 2-14에 나타난 바와 같이 GS-3c는 0.3M NaCl 용출 획분(GS-3c-II)에서 대부분 재회수(72%) 되었으며 시료는 탈색되어 백색 면상 물질이었다.

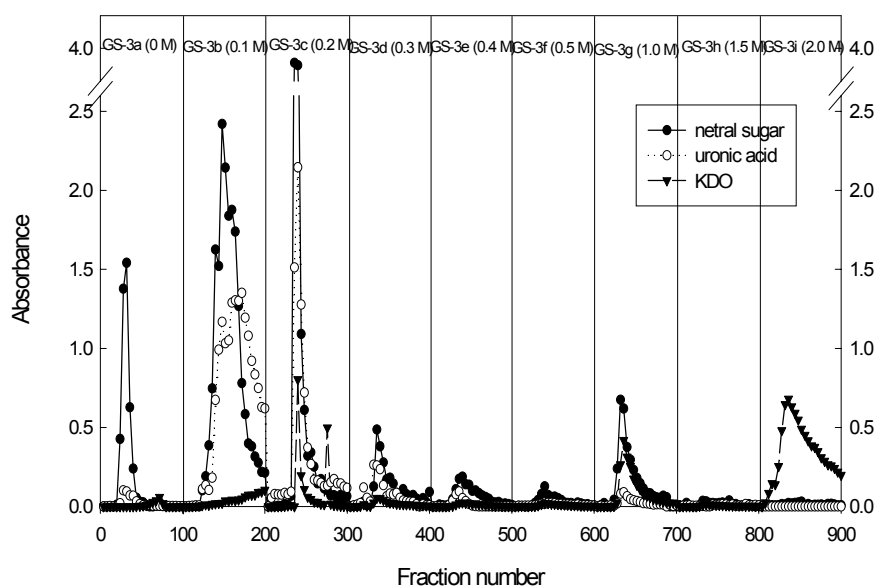


Fig. 2-13. Ion exchange chromatography of GS-3 on the column of DEAE-Sephrose FF.

Table 2-5. Immune complex clearance activities of GS-3 subfractions obtained by ion exchange chromatography using DEAE-Sephrose FF

Subfractions	Immune complex clearance activities (%)
GS-3a	104.8
GS-3b	129.8
GS-3c	226.0
GS-3d	132.4
GS-3e	107.6
GS-3f	121.3
GS-3g	163.2
GS-3h	105.2
GS-3i	178.2

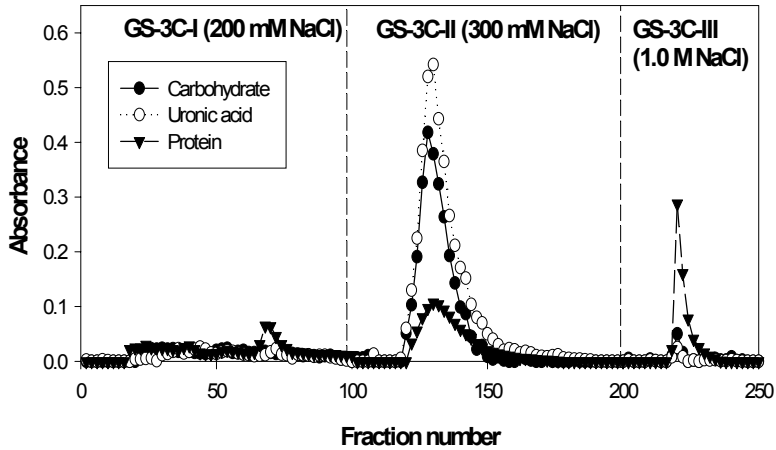


Fig. 2-14. Elution pattern of GS-3c on the column of QAE-Sepharose.

나. Gel permeation chromatography

활성다당 GS-3c-II는 Bio-gel P-30 column을 이용한 gel여과 결과, 단일 peak를 보였으므로(Fig. 2-15 참조) Asahipak GS510 + GS320을 장착한 HPLC에서 순도 및 분자량을 측정하였다. GS-3c-II는 HPLC상에서 단일 peak를 보였으며 분자량 약 11,000으로 판명되었다 (Fig. 2-16 참조).

다. GS-3c-II의 화학적 특성 및 활성

GS-3c-II의 acetyl content는 0.82로 나타났으며 methylester 함량은 DOM value로 32% 이었고 Table 2-6에서 보이는 바와 같이 중성당, 산성당 및 단백질을 각각 64.1%, 33.7%, 2.2%의 비율로 함유하고 있었다. 한편 구성당 분석을 위해 정제다당을 가수분해하고 alditol acetate로 전환, GC로 분석한 결과, Apiose, 2-methyl-xylose, 2-methyl fucose, KDO, DHA등 희귀당이

다수 출현하였다. 특히 이들중 Apiose 및 xylose는 chromatogram이 인접하여 Mass로 확인, 분석하였으며 희귀당(KDO, DHA, 2-methyl sugars, aceric acid)의 peak들은 Mass의 fragment ion을 분석 확인하였다. 구성당의 조성은 Table 2-6와 같으며 rhamnose, arabinose, galactose, galacturonic acid를 높은 비율로 함유하고 있었다. GS-3c-II가 다수의 희귀당(unusual sugar)를 함유하고 있다는 사실은 이들이 가장 복잡한 구성과 구조를 갖는다고 알려진 rhamnogalacturonan II(RGII)와 유사한 구조를 갖고 있음을 시사하는 부분으로써 최근 천연 생약 유래의 RGII 유사 구조를 갖는 다당이 발견 보고(Yamada등 1991~1994)된 바는 있으나 이들은 모두 pectin상 다당으로 본 GS-3c-II는 pectin 구조에 결합없이 단독 존재 점에서 큰 차이를 가지고 있다. 따라서 본 다당의 구조해석과 활성과의 관계가 특히 흥미롭게 요청되는

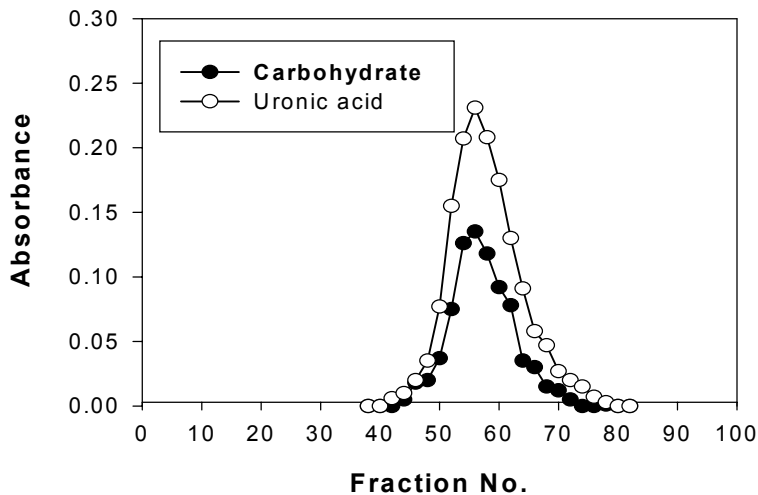


Fig. 2-15. Homogeneity of GS-3c-II on Bio-gel P-30.

The column (2.5X65 cm) of Bio-gel P-30 was eluted with 50 mM acetate buffer(pH 5.2).

부분이었다.

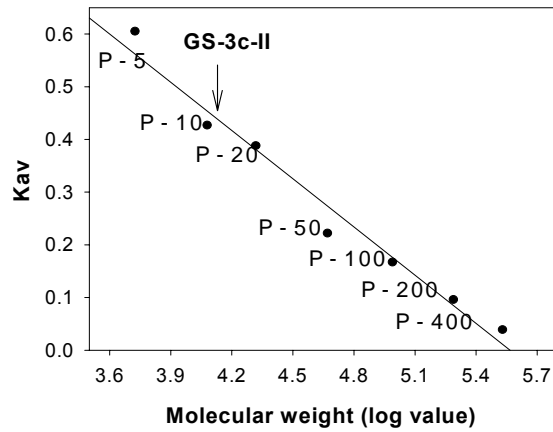


Fig. 2-16. Standard curve for molecular weight determination of the GS-3c-II.

$$[K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)]$$

Table 2-6. Chemical property and component sugars of GS-3c-II

Chemical composition		GS-1(%)	
Total sugar		64.1	
Uronic acid		33.7	
Protein		2.2	
Acetyl group		0.8	
Component sugar	Mole%	Component sugar	Mole%
2-Methylfucose	5.3	Aceric acid	0.6
Rhamnose	20.2	Galactose	11.8
Fucose	4.3	Glucose	2.0
2-Methylxylose	4.2	DHA	0.3
Xylose	0.3	KDO	trace
Arabinose	10.3	Galacturonic acid	25.2
Apiose	3.7	Glucuronic acid	7.8
Mannose	1.6		

GS-3c-II의 자기면역 질환 치유 활성을 macrophage의 FcR에 대한 GAG의 결합을 지표로 측정된 결과는 Fig. 2-16와 같다. macrophage의 GAG 결합능력은 GS-3c-II를 처리하였을 때 농도의존적 경향으로 강력한 활성을 보였으며(10 µg/ml에서 250%이상) 따라서 면역복합체의 조직침착을 줄이는데 유용하게 사용될 가능성을 제시하였다. 한편 GS-3c-II는 다량의 다당과 소량의 protein으로 구성되어 있는 바 활성이 어느 부분에 존재하는지 여부를 확인하기 위하여 GS-3c-II를 pronase 처리 및 periodate oxidation 시켰다. Periodate 산화로 당쇄를 개열시킨 GS-3c-II의 경우 급격한 활성의 감소를 보임으로써(Fig. 2-16) 활성의 본체는 다당임이 확인되었다.

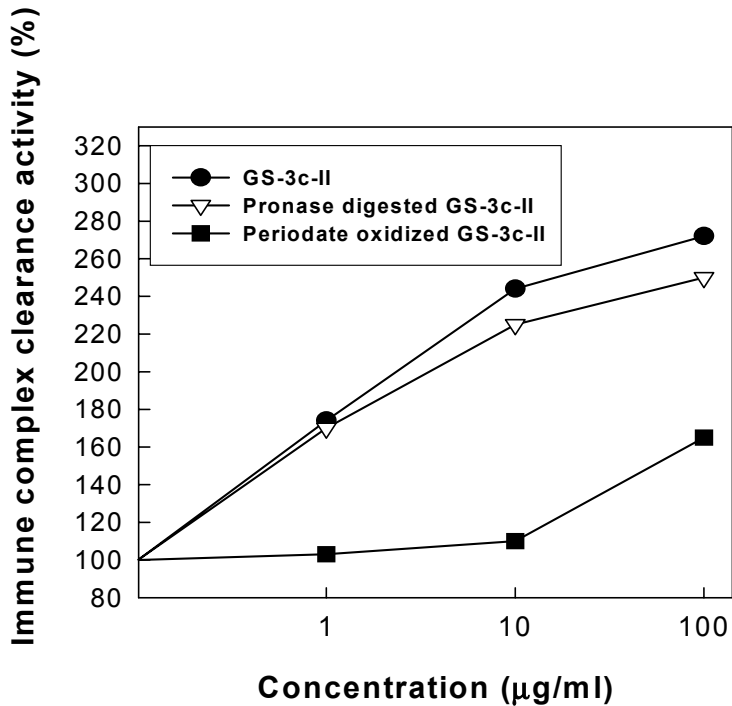


Fig. 2-16. Effect of native, pronase digested and periodate oxidized GS-3c-II on immune complex binding to macrophage.

제 4 항 자기면역 질환 치유 활성다당의 구조 분석

가. β -Glucosyl Yariv antigen을 이용한 GS-3c-II의 sigle radial gel diffusion

β -Glucosyl Yariv antigen[1.3.5-tri-(4- β -glucopyranosyl-oxyphenylazo)-2.4.6-trihydroxybenzene]은 arabinogalactan 중의 arabino-3.6-galactan과 특이적으로 반응하여 침전을 형성하는 것으로 알려져 있는 바 GS-3c-II가 arabinose 및 galactose 함량이 비교적 높으므로 동구조의 존재 유무를 판단

하기 위해 single radial gel diffusion을 행하였다. Positive control로 gum arabic을 사용하여 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3105 μg 을 각각 loading하고 결과를 관찰하였으며 GS-3c-II는 각각 5, 2.5, 1 μg 양을 loading 하였다. Fig 2-17에서 보는 바와 같이 gum arabic은 halo의 지름의 제곱에 직선적으로 반응한 반면 GS-3c-II는 전혀 halo를 형성하지 않음으로써(사진 밑부분) arabino-3,6-galactan 구조를 소유하지 않음을 알 수 있었다.



Fig. 2-17. Single radial gel diffusion of GS-3c-II with β -Glucosyl Yariv antigen.

Upper line: gum arabic 0.62, 5.00, 0.31 μg , Middle line: gum arabic 1.25, 2.50 μg , Lower line: GS-3c-II 5.00, 2.50, 1.00 μg

나. GS-3c-II의 methyl화 분석

Methyl화 분석을 통한 GS-3c-II의 결합 구조 분포는 Table 2-7에 나타난 바와 같다. 본 실험에 있어서는 특히 GS-3c-II가 2-methyl xylose 및 2-methyl xylose 및 2-methyl fucose를 함유함으로 CH_3I 를 이용하여 methyl化 하면 그 결합 양식이 xylose 및 fucose와 동일하게 나옴으로 완전 해명을 위해 CD_3I 로 trideutromethylation하였으며 uron산 부분의 결합 구조를 위해

서는 NaBD₄를 이용하여 carboxyl group을 deuterium으로 환원시켜 분석하였다. 결과에서 보는 바와 같이 약 30여개의 복잡한 결합 양식을 소유하고 있었으며 지금까지 가장 복잡한 구조의 다당으로 알려진 RG-II와 유사한 분포를 보였다. 특히 RG-II에서만 발견된다고 알려진 3,4-branched fucose, 3-linked rhamnose, 2,4 branched rhamnose를 소유하고 있었으며 희귀당 3'-linked Apiose를 높은 비율로 함유함으로써 본 다당이 거의 완전하게 RG-II와 유사 구조로 구성되어 있을 가능성을 강력히 시사하였다.

한편 terminal arabinose, terminal xylose, 2-Me-xylose, 2-Me-fucose, rhamnose, galactose, galacturonic acid를 높은 비율로 소유하고 있음이 밝혀졌다. 는 극도로 분지된 복잡 구조를 소유하고 있음을 암시하고 있으며 본 다당이 분자량 12,000정도이므로 repeating unit도 극도로 제한되어 있는 복잡한 구조임을 알 수 있었다.

다. GS-3c-II의 proton-NMR 분석

GS-3c-II의 ¹H-NMR(300 MHz) 분석은 Varian XL-300 spectrometer를 이용하여 행하였다. Fig. 2-18에 나타난 바와 같이 GS-3c-II는 전체적으로 상당히 복잡한 signal을 보임으로써 이 다당이 다양한 구성당과 복잡한 결합양식을 소유한 구조로 존재함을 알 수 있었다. ¹H-NMR 분석 결과, δ1.2 - 1.3 p.p.m 부근에 강력한 double signal을 보였는데 이는 당쇄 C6의 methyl group에 기인한 것으로 methyl pentose인 rhamnose나 fucose가 높은 비율로 존재함을 알 수 있었다. 또 δ5.0 - 5.3 부근에 β-anomeric proton (H-1 ax)에 기인한 다양한 peak가 관찰된 점, δ4.3 - 4.5 부근에 α-anomeric proton (H-1 eq)에 기인한 복잡한 signal을 보인 점 등으로 미루어 다양한 결합양식을 소유한 다당임을 알 수 있었다. 한편 δ5.63 부근에 산성당 기원의 carboxyl group signal이, δ2.1 - 2.4 부근에 산성당 의 H-6가 methyl esterification됨에 기인한 signal이 관찰된 점으로 미루어 산성당의 carboxyl기의 일부는 methyl기로 치환되어 있음을 알 수 있었다.

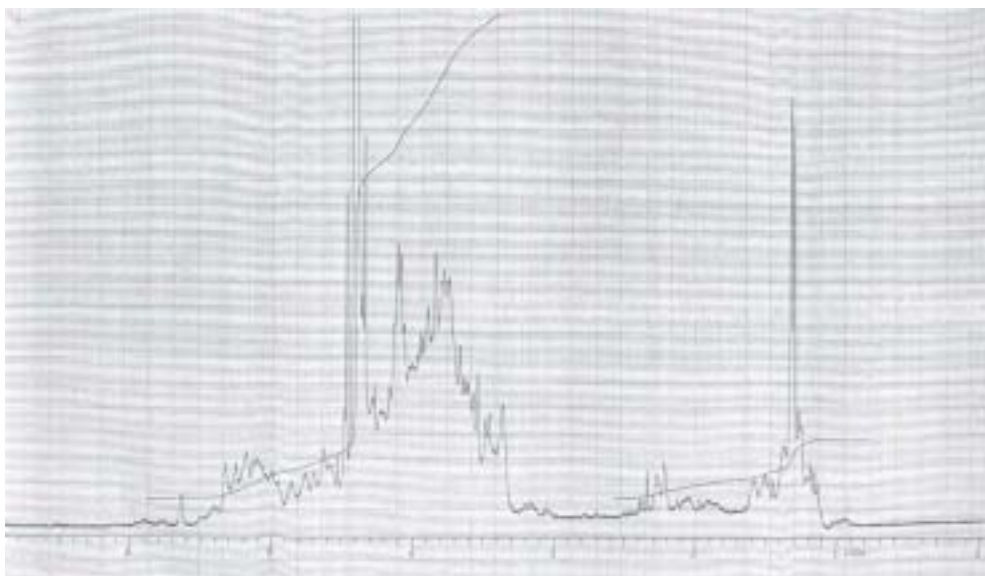


Fig. 2-18. $^1\text{H-NMR}$ spectra of the reduced product from GS-3c-II.
 $^1\text{H-NMR}$ spectra of reduced product from GS-3c-II were recorded for solutions in D_2O with Varian XL-300 spectrometer, at 300 MHz and 50°C . Arrowed peaks include anomeric and reporter groups.

라. 선택적 가수분해과정에서 얻어진 oligo당단편의 구조분석(분해과정 1)

1) GS-3c-II의 선택적 가수분해

GS-3c-II는 구조분석이 용이한 분자량이 작은 oligo당을 유리시키기 위해 0.1 M TFA용액으로 40°C 에서 24시간 가수분해하여, 동일 조건에서 Bio-gel P-6 column (2.5×65 cm)으로 겔여과하였다. 이때 분자량이 서로 다른 3개 획분 PH-1, PH-2 및 PH-3 (Fig. 2-19)를 얻을 수 있었으며 저분자 획분 PH-3을 동결건조하여 구조분석에 이용하였다.

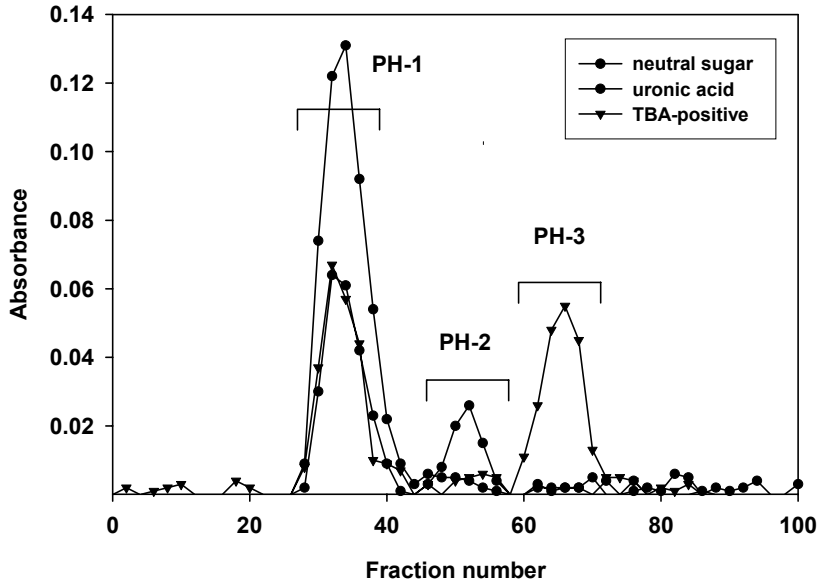


Fig. 2-19. Bio-gel P-6 chromatography of the products derived from GS-3c-II by partial acid hydrolysis.

Samples were applied to a column (2.5×65 cm) of Bio-gel P-6 and eluted with 50 mM acetate buffer (pH 5.2).

2) PH-3의 구조 분석

PH-3는 Rha(37.6%), Ara(4.8%), Kdo(30.8%) 및 Dha(1.4%)를 비롯한 8종의 구성당을 함유하고 있었으며(Table 2-7), linkage analysis를 위해 NaBD₄로 환원하고 methyl화 과정을 행하여 permethylated oligosaccharide alditol을 조제하고 GC-MS를 통해 결합양식을 추정하였다. Fig. 2-20과 Table 2-8에서 보여 주는 바와 같이 3개의 disaccharide-alditol peak (1P, 2P 및 3P)를 얻을 수 있었으며 주된 peak 1P에 대한 mass fragment ion을 분석한 결과, permethylated 6-deoxyhexose를 의미하는 m/z 189 (bA₁) ion과

permethylated Kdo를 지적하는 m/z 308 (aJ_2)의 대표적인 ion이 관찰되었으며, PA-2'의 aJ_1 fragment가 m/z 368 위치에서 관찰되었다. 또한 m/z 162 peak의 존재로부터, Kdo는 C5 위치에서 다른 당 잔기로 치환되어 있음을 추론할 수 있었다. 이 결과는 구성당 결과와 비교하여 1P가 Rhap-(1→5)-Kdo의 이당류임을 알 수 있었다. 한편 2P의 MS spectrum은 비환원말단의 permethylated Ara 단편에 기인하는 m/z 175 ion과 환원말단 permethylated Dha 잔기에 기인하는 m/z 278 ion이 검출되었으며 m/z 162 이온의 존재로부터 Dha는 C5 위치에서 다른 당 잔기로 치환되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 3P의 MS 분석 결과는 2P의 결과와 완전히 일치하였는데, 이는 oligo당의 환원말단에 존재하는 Dha의 carbonyl기 환원과정 중 유도된 2개의 이성체(epimer)로 판단되었다. 이상의 결과로부터 2P 및 3P는 Araf-(1→5)-Dha의 구조를 갖는 것으로 확인되었다.

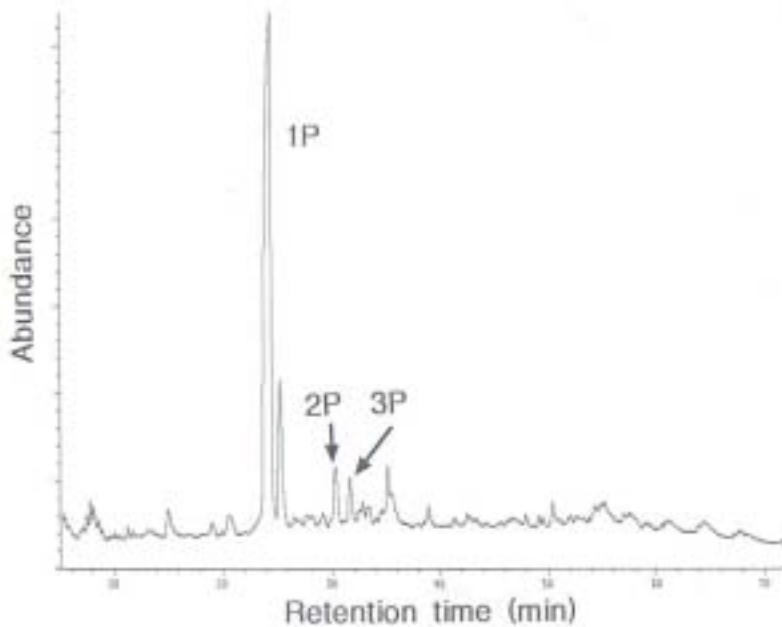


Fig. 2-20. Total ion chromatogram on GC-MS of permethylated oligosaccharide-alditols derived from PH-3 .

Table 2-7. Component sugars of PH-3 obtained by partial hydrolysis of GS-3c-II

Component sugar	PH-3 (Mol%)
2-Methyl-fucose	4.8
Rhamnose	37.6
Arabinose	4.8
Apiose	1.2
Dha	1.4
Kdo	30.8
Galactose + Galacturonic acid	12.4
Glucose + Glucuronic acid	4.9

Table 2-8. Total ion chromatogram on GC-MS of permethylated oligosaccharide-alditols derived from PH-3

Peak	Retention time (min)	Fragment ions [m/z, relative abundance]							Structure inferred
		aJ1	aJ0	aJ2	bA1	bA2	bA3	ald	
1P	25.07	364 (4.6)	354 (1.3)	308 (23.8)	189 (48.7)	157 (15.7)	125 (12.2)	162 (19.2)	<i>Rhap-(1→5)-Kdo-ol-2-d</i>
2P	30.74	338 (2.3)		278 (2.5)	175 (10.6)	143 (16.2)	111 (7.2)	162 308 366 (7.8) (0.4) (0.5)	<i>Araf-(1→5)-Dha-ol-2-d</i>
3P	32.15	338 (1.9)		278 (2.7)	175 (11.7)	143 (15.8)	111 (9.1)	162 308 366 (7.2) (1.3) (0.5)	<i>Araf-(1→5)-Dha-ol-2-d</i>

2) PH-2의 구조 분석

GS-3c-II의 부분 가수분해 과정에서 얻어진 중간크기의 oligosaccharide인 PH-2 획분(Fig. 2-19 참조)은 구조분석을 위해 구성당 분석 및 methylation analysis를 행하였다. Table 2-9에 나타난 바와 같이 PH-2은 2-methylfucose, rhamnose, arabinose, apiose, aceric acid, galactose가 비교적 높은 비율로 관찰되었다. Apiose와 aceric acid의 경우 산에 매우 불안정한 것으로 알려져

있는데 본 구성당 분석결과에서도 실제로는 분석치보다 높은 비율로 존재할 가능성이 있음을 시사하였다. Methyl화 분석결과에서는 terminal 2-Me-Fuc, Rha, 3-linked Rha, 2,4-branched Gal 및 2-linked AceA 등 총 14종의 결합양식이 관찰되었으며 이러한 결과는 Albersheim이 보고한 rhamnogalacturonan II (RG-II)의 aceric acid 함유 dligo당과 유사한 조성으로 판단되었다. 그러나 PH-2은 terminal Araf, 2,3-branched Arap 와 2-linked Rha등 기존 RG-II에서는 발견되지 않는 별도의 결합양식을 가지고 있었다.

PH-2 중에 존재하는 oligo당의 종류를 규명하기 위하여 negative FAB-MS를 행하였다. Fig. 2-21에 보는 바와 같이 m/z 1055, 1097 및 1201에서 pseudo-molecular ion $[(M-H)^-]$ 이 검출되었으며 이는 non-acetylated

Table 2-9. Sugar and glycosyl linkage composition of PH-2 obtained by partial acid hydrolysis of GS-3c-II

Component sugar	Sugar composition	Position of methyl group	Deduced glycosidic linkage	PH-2 (Mole %)
Arabinose	13.6	2,3,4	Araf-(1→	2.38
		3,4	→2)-Arap-(1→	7.12
		3	→2,3)-Arap-(1→	5.98
2-Methylxylose	1.7	3,4	2-Me-Xylf-(1→	1.73
2-Methylfucose	19.5	3,4	2-Me-Fucp-(1→	25.27
Fucose	2.3	2	→3,4)-Arap-(1→	0.92
Rhamnose	36.1	2,3,4	Rhap-(1→	9.79
		2,4	→3)-Rhap-(1→	17.94
		3,4	→2)-Rhap-(1→	2.77
Apiose	7.8	2,3	→3')-Apif-(1→	6.60
Aceric acid	4.2	3	→2)-AceA-(1→	3.05
Galactose	14.8	2,3,4,6	Galp-(1→	2.75
		3,4,6	→2)-Galp-(1→	0.64
		3,6	→2,3)-Galp-(1→	13.07

hepta 및 octasaccharide에 해당하는 ion이었다. 또한 PH-2는 monoacetylated heptasaccharide (m/z 1097)와 octasaccharide (m/z 1229 및 1243) 및 diacetylated heptasaccharide (m/z 1139) 와 octasaccharide (m/z 1271 and 1285) ion도 함유하고 있었다. 특히 PH-2는 non-, mono- 및 diacetylated nonasaccharide에 해당하는 m/z 1333, 1375, 1417 ion 이 검출되었는데 이러한 사실은 PH-2는 nonasaccharide unit로 존재함을 의미한다.

PH-2는 당쇄결합의 sequence와 acetyl group의 위치를 규명하기 위하여 FAB-B/E linked scans mass spectrometry를 행하였다. Fig. 2-22에 nonasaccharide로 추정되는 m/z 1375 ion을 대상으로 B/E-linked scan (MS/MS)를 행한 결과 monoacetylated nonasaccharide로부터 연속적으로 당

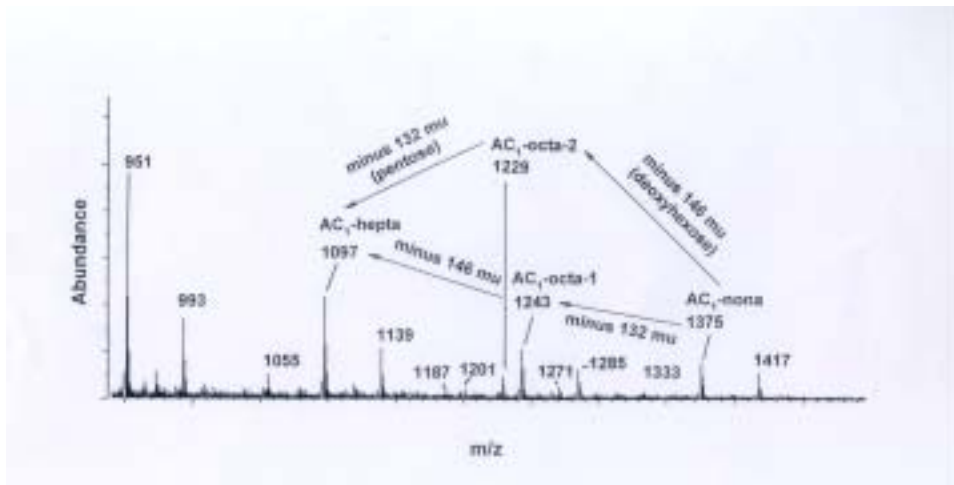


Fig. 2-21. Negative-ion FAB-MS of PH-2 derived from GS-3c-II.

A Jeol JMS-AX505 HA (Jeol, Japan) mass spectrometer interfaced with an OA-5000 computer was used. The instrument was scanned from m/z 1500 to m/z 0, with a scan rate of 20 s/decade.

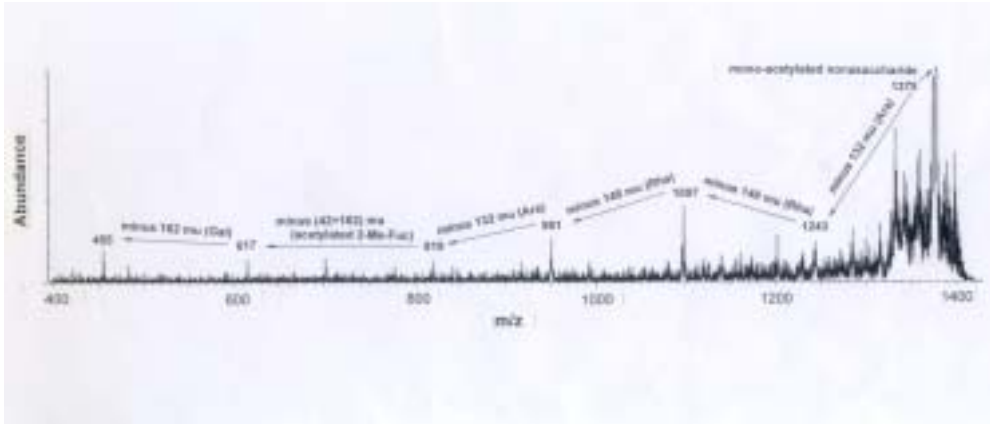


Fig. 2-22. Collisional activated dissociation spectrum using a B/E-linked scan of a monoacetylated nonasaccharide unit.

B/E (daughter ions) linked scans were performed by using a linked scan unit at a scan rate of 120 s/decade and registered on an UV oscillograph.

잔기가 제거된 fragment ion들을 관찰할 수 있었다. M/z 1375로 부터 Ara (132 mu), Rha (146 mu), Rha (146 mu), Ara (132 mu), mono-O-acetylated 2-Me-Fuc residue (160 mu + 42 mu), Gal (162 mu) 가 연속적으로 제거된 m/z 1243, 1097, 951, 819, 617, 455 ion이 관찰되었으며 m/z 455는 AceA, a Rha 및 Api로 구성된 이온임을 알 수 있었다. 이상의 결과를 methylation 결과와 함께 분석한 결과 PH-2가 2-Me-Fuc에 acetyl화 되어 있는 Fig 2-23 구조의 nonasaccharide 구조로 존재함을 결론내릴 수 있었다.

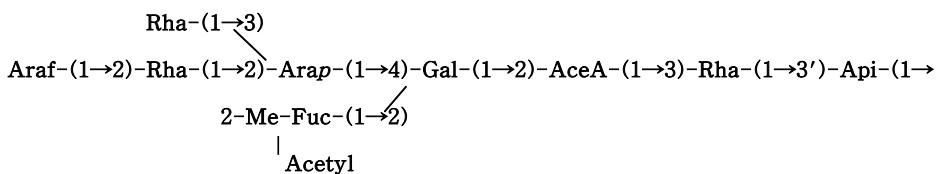


Fig. 2-23. A proposed structure of nonasaccharide in PH-2 fraction.

마. 선택적 가수분해과정에서 얻어진 oligo당단편의 구조분석(분해과정 2)

1) PH-1의 선택적 가수분해

분해과정 (1)에 의해 유도된 PH-1, PH-2 및 PH-3 중 비교적 고분자로 남아 있던 PH-1은 다시 구조분석이 용이한 분자량이 작은 oligo당을 유리시키기 위해 0.1 M TFA용액으로 40°C에서 84시간 가수분해하여, Bio-gel P-6 column (2.5×65 cm)으로 겔여과하였다. 이때 분자량이 서로 다른 4개획분 PH-1a, PH-1b, PH-1c 및 PH-1d (Fig. 2-24)로 분획하였으며 이들 각 획분을 대상으로 구성당 분석 및 당쇄 결합양식을 위한 methyl화 분석을 행하였

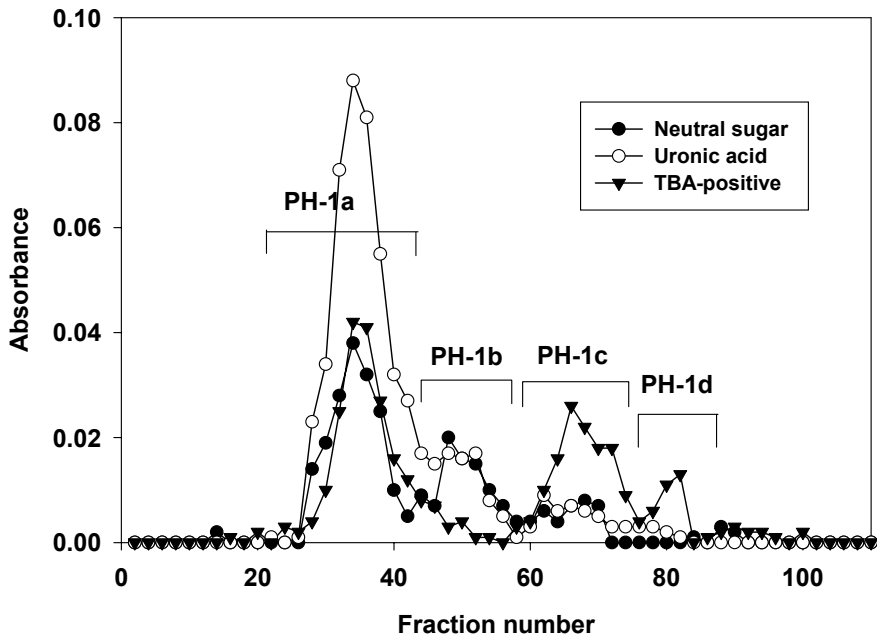


Fig. 2-24. Bio-gel P-6 chromatography of the products derived from PH-1 by partial acid hydrolysis.

Samples were applied to a column (2.5×65 cm) of Bio-gel P-6 and eluted with 50 mM acetate buffer (pH 5.2). ●-●: Total sugar (490 nm), ○-○: Uronic acid (520 nm), ▼-▼: TBA-positive material (548 nm).

다.

2) PH-1의 분해 산물이 구조해석

Fig. 2-24에 나타난 바와 같이 PH-1에 존재하는 TBA-positive material의 약 50%는 PH-1c 및 PH-1d에서 분리되어 나왔으며 구성당 분석 결과, PH-1c는 Rhamnose와 KDO가 거의 일정 비율로 높게 존재하고 있었으며, 그 외 glucose와 galactose가 일정량 존재하고 있었다.(Table 2-10) PH-1c의 methyl화 분석에서는 Terminal rhamnose와 5-linked KDO가 높은 비율로 존재함으로써 이획분이 분해과정에서 분리된 Rhap-(1→5)-Kdo가 주로 존재함을 확인할 수 있었다. (Table 2-11)

한편 PH-1d는 구성당이 Rhamnose, 2-Me-Fucose, 2-Me-Xylose 및 Glucose등 11종에 달하는 다양한 종류가 검출되었지만, methyl화 분석에서는 별다른 linkage가 관찰되지 않는 결과를 보여 줌으로써 이들이 획분이 주쇄에서 잘려져 나온 단당류로 구성되어 있음을 확인 할 수 있었다.(Table 2-10, 2-11)

PH-1b 획분은 비교적 dp가 큰 oligosaccharide로 구성당 분석 결과, KDO와 DHA를 제외한 모든 구성당이 검출되었다. 특히 PH-2를 구성하는 Aceric acid를 함유하는 nonasaccharide의 구성당이 모두 검출되었으며, 2-methyl Xylose, Fucose, Galacturonic acid등이 높은 비율로 존재함으로써 미루어, 이 획분에는 Aceric acid containing nonasaccharide와 Uronic acid rich oligosaccharide의 혼합물로 구성되어 있음을 추론할 수 있었다.

이상의 결과는 Table 2-11의 결합양식과 미루어 타당한 결과임이 확인되었으며, 특히 PH-1b 획분에 특이적으로 2,3,4-full brached rhamnose가 관찰된 점, terminal 2-MeFucose의 존재와 높은비율로 terminal galacturonic acid linkage가 존재하는 점으로 미루어 Albersheim이 제안한 rhamnagalacturonan II의 Uonic acid rich octasaccharide의 구조를 함유하는 것으로 추론할 수 있었다. (Fig. 2-25)

Table 2-10. Sugar composition of subfractions obtained by partial acid hydrolysis of PH-1

Component sugar	PH-1a	PH-1b	PH-1c	PH-1d
2-Me-Fucose	0.00	7.43	3.48	13.24
Rhamnose	12.11	25.36	26.32	31.28
Fucose	7.84	10.23	3.29	2.89
2-Me-Xylose	6.47	9.37	1.51	12.97
Arabinose	10.11	5.94	3.52	9.90
Xylose	0.00	0.27	0.00	0.00
Apiose	3.23	6.45	0.00	8.88
Mannose	0.84	0.43	4.18	2.47
Galactose	6.73	13.90	15.50	3.67
Glucose	2.61	2.24	17.47	10.23
DHA	1.21	0.00	0.00	0.00
KDO	0.00	0.00	27.74	0.00
AceA	0.00	1.54	0.00	0.00
Galacturonic acid	31.20	9.60	0.00	1.64
Glucuronic acid	17.65	7.23	0.00	2.83

한편 PH-1a는 주로 Rha, Ara, GalA, GlcA로 구성 되어 있었으며 소량의 Fuc, 2-Me-Xyl, Api, Man, Gal, Glc 및 Dha를 함유하고 있었다. (Table 2-10) PH-1a의 methyl화 분석 결과는 terminal Araf, 3,4-linked Fuc, 2,3,4-linked Rha, Terminal Gal, 2-linked GlcA, 3'linked Api 및 terminal GalA가 관찰됨으로써 이들은 주로 주쇄부분에 UroA rich oligosaccharide와 Araf-(1→5)-DHA가 side chain으로 남아있는 구조임을 알 수 있었다. (Table 2-11)

Table 2-11. Glycosidic linkage composition of subfractions obtained by partial acid hydrolysis of PH-1

Glycosyl residue	Deduced glycosidic linkage	PH-1a	PH-1b	PH-1c	PH-1d
Arabinose	terminal (f)	4.47	trace		
	2 (p)		1.66		
	2,3 (p)		2.81		
Xylose	terminal (p)	4.56	3.59		
	2 (f)		trace		
2-Me-Xylose	terminal (p)	4.70	3.70		
Fucose	3,4		9.18		
2-Me-Fucose	terminal (p)	7.56	4.74		
Rhamnose	terminal		3.96	46.74	100.00
	3		6.97	2.13	
	2	2.43			
	2,3,4	12.68	13.31		
Galactose	terminal	8.44	10.65	8.89	
	2	0.42			
	2,4	0.35	6.43		
Glucose	4	1.96			
Mannose	3,4		trace		
Apiose	3	8.33	1.57		
Glucuronic acid	2	7.34	9.45	trace	
KDO	5			42.24	
Galacturonic acid	terminal	20.27	21.48		
	4	9.97	0.49		
	2	0.42			
	2,4	1.27			
	3,4	4.83	trace		

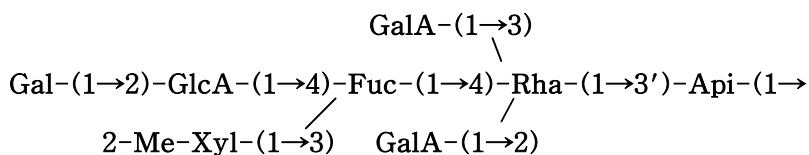


Fig. 2-25. A proposed structure of uronic acid rich octasaccharide in PH-1b fraction.

바. PH-1a의 endo-PGase 분해산물 분석 (분해과정 3)

이전의 과정에서 고분자로 남아있었던 PH-1a는 endo- $\alpha(1\rightarrow4)$ -polygalacturonase 로 가수분해하고 Bio-gel P-6 column으로 겔여과하여 분자량이 상이한 PH-1a-I, PH-1a-II 및 PH-1a-III로 분획하였다. 이 중 저분자 획분인 PH-1a-III는 GalA만을 유일한 구성당으로 하고 있었으며 이러한 결과로부터 주로 효소처리에 의해 주쇄에서 잘려져 나온 oligogalacturonide로 구성된 획분을 알 수 있었다.

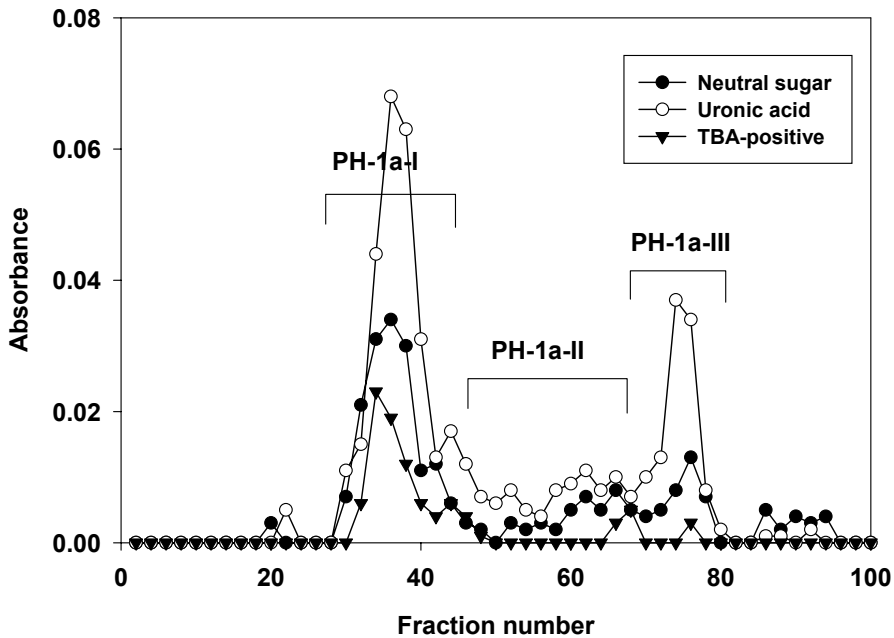


Fig. 2-26. Bio-gel P-6 chromatography of the products derived from PH-1a by endo-polygalacturonase.

Samples were applied to a column (2.5×65 cm) of Bio-gel P-6 and eluted with 50 mM acetate buffer (pH 5.2). ●-●: Total sugar (490 nm), ○-○: Uronic acid (520 nm), ▼-▼: TBA-positive material (548 nm).

또한 중간 크기의 획분인 PH-1a-II는 GalA를 주구성당으로 하고 미량의 Rha, Ara, 2-Me-Xyl, Ara, Gal, GlcA를 함유함으로써 주쇄 부분에서 효소처리로 분해된 짧은 분지쇄를 갖는 oligo당 단편으로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 GS-3c-II 전체구조의 주쇄는 α(1→4) 결합의 GalA로 구성되어 있음을 알 수 있으며 연속적인 분해과정을 통해 분지쇄들이 잘려 나가면서 endo-PGase가 작용할 수 있는 주쇄의 결합 부위가 노출됨을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 GS-3c-II 는 Fig. 2-27에 제안한 바와 같이 주쇄를 α(1→4) 결합의 oligogalacturonide로 하고 Rhap-(1→5)-Kdo, Araf-(1→5)-Dha, Aceric acid containing nonasaccharide와 Uronic acid rich oligosaccharide가 분지쇄를 이루고 있는 complex polysaccharide임을 알 수 있었다.

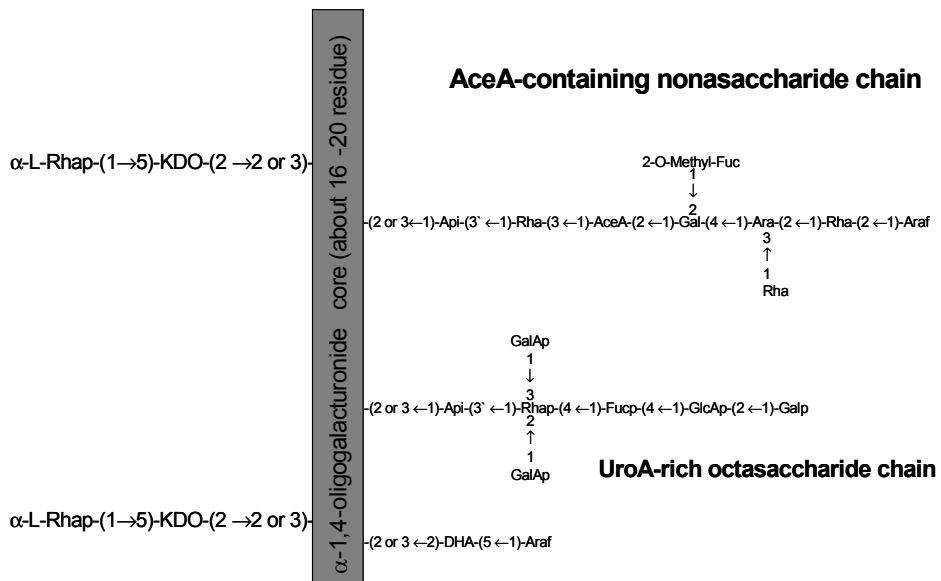


Fig. 2-27. A proposed structure of GS-3c-II.

제 5 항 면역 복합체 제거능의 in vivo 실험

가. GS-3c-II의 in vivo 투여가 macrophage의 면역복합체 제거능에 미치는 영향

GS-3c-II는 실험 전 3일, 1일째에 각각 25 mg/kg과 12.5 mg/kg 씩 각각 복강내에 주사하여 macrophage를 활성화시키고, 활성화된 macrophage를 회수하여 동일 세포수 (1×10^5 cells/well)로 조제하여 GAG를 이용한 면역 복합체 제거능을 측정하였다. Fig. 2-28에 나타난 바와 같이 무처리 대조군의 활성을 100으로 하였을 때, 25 mg/kg과 12.5 mg/kg처리하여 활성화시킨

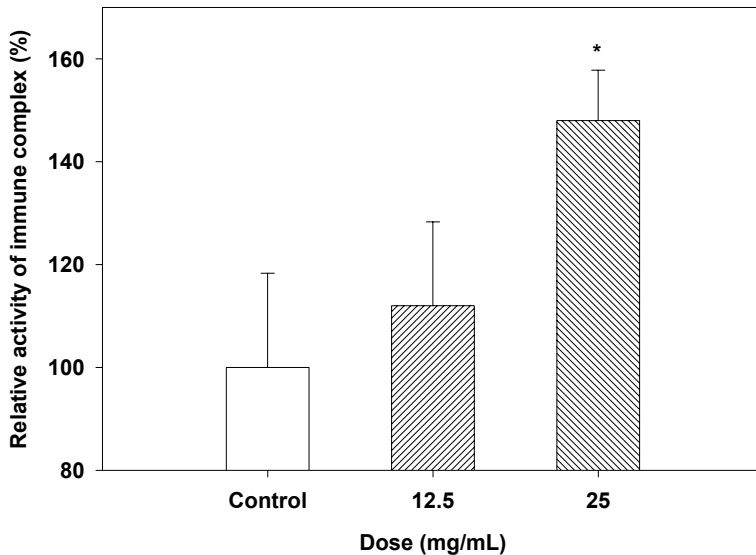


Fig. 2-28. Effect of intraperitoneal administration of GS-3c-II on immune complex binding to macrophages.

Each group was pretreated with intraperitoneal injection of GS-3c-II at 3 and 1 day before assay. Activated peritoneal macrophages were prepared for immune complex binding assay. * $p < 0.01$

macrophage의 면역 복합체 제거능은 148과 112 %를 나타내었다. 12.5 mg/kg 처리군이 경우 편차가 심하여 유의적인 결과를 보여 주지는 못하였지만 25 mg/kg의 경우는 유의적으로 활성이 증가하는 양상을 보여 주었다. 절대값으로 비교할 경우 투여량에 의존적으로 활성이 증가하는 양상을 보였으며 이러한 결과는 GS-3c-II에 의해 활성화된 체내 macrophage가 면역 복합체를 효율적으로 제거함을 보여주는 결과이다.

나. GS-3c-II의 in vivo 투여가 불용성 면역복합체 제거능에 미치는 영향

GS-3c-II로 활성화된 macrophage가 GAG를 이용한 assay계에서는 비교적 양호한 결과를 보여 주었지만 GAG를 통한 assay는 수용성 면역 복합체를 이용한 assay이므로, 이들이 체내에서 형성될수 있는 불용성 면역 복합체에도

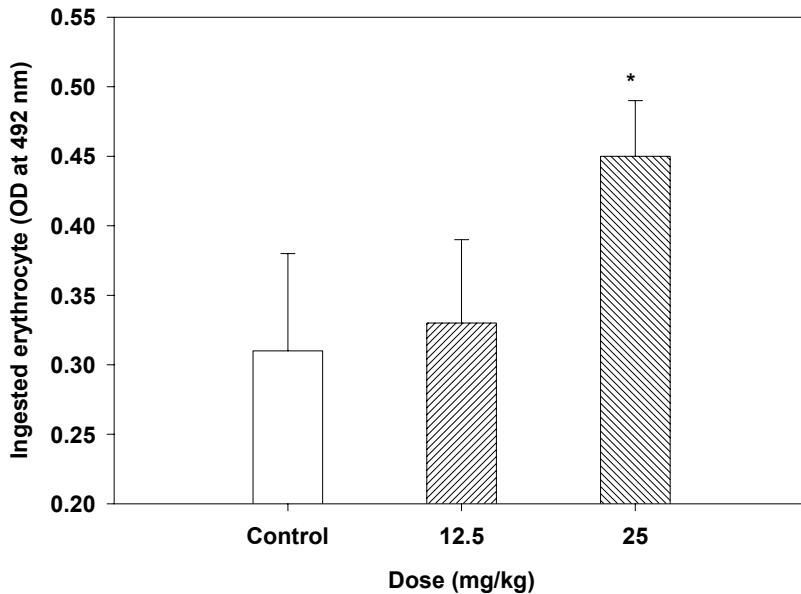


Fig. 2-29. Effect of intraperitoneal administration of GS-3c-II on erythrophagocytosis of macrophages.

Each group was pretreated with intraperitoneal injection of GS-3c-II at 3 and 1 day before assay. Activated peritoneal macrophages were prepared for insoluble immune complex binding assay. * $p < 0.01$

동일하게 반응하는 지 여부를 관찰하기 위해 IgG 감작적혈구를 이용, 활성을 측정하였다.(Fig. 2-30) 활성화된 macrophage의 EA cell 탐식능에 기초하여 탐식된 적혈구의 pseudoperoxidase활성을 측정한 결과 하였다. 무처리군에 비해 12.5 mg/kg 투여군은 별다른 변화를 보이지 않았으나 25 mg/kg 투여군에서는 유의적으로 불용성 면역 복합체 제거능의 증가가 관찰되었다. 이러한 사실은 GS-3c_II에 의해 활성화된 macrophage는 수용성 및 불용성 면역 복합체에 모두 작용함을 설명해 주고 있다.

다. In vivo 면역 복합체 제거능

생체 내에서의 직접 복합체 제거능을 측정하기 위해 실험전 5. 3 및 1일째 GS-3c-II를 복강내 투여하고, GAG를 꼬리정맥으로 투여하여 이들의 제거능

Table 2-12. Effect of GS-3c-II treatment on the immune complex clearance from circulation in mice

GS-3-II (mg/kg, i.p.)	N ^a	Body weight (g)	Weight of organ (g)		Half life (T _{1/2} , min)
			Liver	Spleen	
Control ^b	6	35.45±2.85	2.29±0.30	0.12±0.02	8.34±0.70
12.5	5	35.21±2.06	2.34±0.20	0.13±0.03	7.68±0.64
25	5	34.34±1.83	2.17±0.25	0.12±0.03	6.64±0.33 ^c
50	5	34.03±1.45	2.26±0.28	0.13±0.02	6.28±0.56 ^c

Each group was pretreated with intraperitoneal injection of GS-3c-II at 5, 3, 1 day and 1 h before assay.

^aNumber of mice.

^bSaline alone was administered for normal control. control

Express as mean±SD, ^cp<0.01 compare with control mice.

을 시간별로 측정하였다. Table 2-12에 나타낸 바와 같이 12.5 mg/kg 처리군, 25 mg/kg 및 50 mg/kg 처리군으로 나누어 실험한 결과, Mouse의 체중 및 면역 관련 장기의 무게에는 별다른 영향을 주지 않았다. 그러나 면역 복합체의 제거능을 반감기로 표시한 결과 농도에 따라 반감기가 감소하는 결과를 얻을 수 있었다. 특히 25 mg/kg과 50 mg/kg 처리군에서는 유의적으로 반감기 감소가 인정됨으로써 GS-3c-II가 체내 면역복합체 제거에 우수한 활성이 있음을 알 수 있었다.

라. In vivo carbon clearance 활성

GS-3c-II 투여에 의한 체내 면역복합체 제거활성은 macrophage가 immune complex의 선택적 제거(FcR을 경유)에 기초한 것이나 이들은 또한 체내 mononuclear phagocytic system에 의한 비특이적인 탐식작용에 의해서도 활성이 나타날 수 있으므로 비특이적 탐식능의 정도를 carbon clearance 방법으로 측정하고자 하였다. 체내 면역 복합체 제거능과 동일한 방법으로 시료를 복강내 투여하고 체중 및 주요 장기관의 무게를 측정하였다. 체중과 장기관에는 유의적 변화는 관찰되지 않았지만, 이들에 따라 carbon clearance의 단순반감기는 영향을 받을 것이므로 보정된 탐식지수(α)로 활성을 비교 하였다. Table 2-13에 나타난 바와 같이 를 측정한 결과, 12.5 mg/kg 처리군, 25 mg/kg 및 50 mg/kg 처리군의 α 수치는 무처리 대조군과 유의적 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 GS-3c-II의 면역 복합체 제거능이 면역 복합체를 macrophage가 선택적으로 제거함에 의한 것이며 mononuclear phagocytic system의 비특이적 활성화에 기초한 것이 아님을 확인해 주었다. 따라서 GS-3c-II는 체내에서 면역 복합체의 효율적 제거에 의해 자기면역 질환의 원인 치료가 가능한 물질임을 확인할 수 있었다.

Table 2-13. Effect of GS-3c-II treatment on carbon clearance from circulation in mice

GS-3-II (mg/kg, i.p.)	N ^a	Body weight (g)	Weight of organ (g)		Corrected phagocytic index (a)
			Liver	Spleen	
Control ^b	6	35.02±1.45	1.84±0.59	0.14±0.02	4.85±0.37
12.5	5	35.20±2.00	1.89±0.10	0.14±0.03	5.02±0.28
25	5	35.08±1.82	1.92±0.26	0.15±0.02	4.90±0.43
50	5	35.68±1.99	1.97±0.26	0.16±0.03	4.85±0.62

Each group was pretreated with intraperitoneal injection of GS-3c-II at 5, 3, 1 day and 1 h before assay.

^aNumber of mice.

^bSaline alone was administered for normal control.

Express as mean±SD

제 6 항 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안

활성획분의 응용시 요구되는 공정연구는 각 면역활성성분이 골고루 함유된 다당 획분 GS-1이 가장 적절한 것으로 판명됨에 따라 응용성 실험으로 GS-1을 이용한 음료 제조실험을 실행하였다. 활성 다당체 GS-1 2% 용액을 기본 base로 하였으며 이때 용액은 옅은 갈색을 띠는 무미 무취의 상태였다.

Table 2-14에 나타난 바와 같이 당과 산 및 식미 개선용 부재료의 최적 조건을 설정하기 위해 각 성분의 농도를 변화시켜 음료를 제조하고 관능 검사를 행하였다. 이때 각 단계에서는 이전 단계에서 최적화된 조건을 이용 농도별 실험을 실시하였다. 관능검사 결과 당 농도는 12.5%(설탕 10%, xylitol 2.5%, xylitol은 소비자 선호도를 고려하여 첨가하였음), 산미제는 0.15%, 오렌지 농

축액 0.5%가 우수하게 나타났으며 동 결과에 따라 최종 조성 배합비를 결정하였다. (Table 2-15)

Table 2-14. Sensory evaluation of GS-1 containing drink

	Flavor	Taste	Overall acceptance
Sugar content			
10%	3.4 ^a	2.8 ^a	3.2 ^a
12.5%	3.5 ^a	3.4 ^b	3.6 ^b
15%	3.4 ^a	2.9 ^a	3.2 ^a
Citric acid content			
0.1%	3.4 ^a	2.6 ^a	3.2 ^a
0.15%	3.5 ^a	3.4 ^b	3.6 ^b
0.2%	3.4 ^a	3.4 ^b	3.3 ^a
Fruit concentrate			
Orange	4.1 ^a	3.8 ^a	4.0 ^c
Tomato	2.6 ^b	2.5 ^b	2.2 ^a
Grape	3.2 ^c	3.3 ^c	3.5 ^b

Table 2-15. Formula of GS-1 containing drink

Ingredients	Contents (%)
Bio-active polysaccharide GS-1 sol.	2
Sugar	10
Xylitol	2.5
Citric acid	0.15
Orange concentrate	0.5

REFERENCES

- Albersheim, P., An, J., Freshour, G., Fuller, M.S., Guillen, R., Ham, K.S., Hahn, M.G., Huang, J., O'Neill, M., Whitcombe, A., Williams, M.V., York, W.S. and Darvill, A.G.: Structure and function studies of plant cell wall polysaccharide. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 374 (1994)
- Aspinall, G.O.: Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In *The Polysaccharides*, Aspinall, G.O. (Ed.), Academic Press, New York, Vol. 1, p.35 (1982)
- Aspinall, G.O.: Chemical modification and selective fragmentation of polysaccharide. *Acc. Chem. Res.*, 20, 114 (1987)
- Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G.: New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484 (1973)
- Bosso, C. and Domard, A.: Characterization of glucosamine and N-acetylglucosamine oligomers by fast atom bombardment mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* 27: 799 (1992)
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoka, F.: Fractionation and purification of the polysaccharides with marked anti-tumor activity from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* 30: 2776 (1970)
- Darvill, A., McNeill, M. and Albersheim, P.: Structure of plant cell walls. VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiol.* 62: 418 (1978)
- Doco, T. and Brillouet, J.-M.: Isolation and structural characterization of a rhamnogalacturonan II from red wine. *Carbohydr. Res.* 243: 333 (1993)
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350 (1956)
- Gerozzo, D., Giuffrida, M., Impallomeni, G., Ballisteri, A. and Montando, G.: Determination of linkage position and identification of the reducing end in linear oligosaccharides by negative ion fast atom bombardment

- mass spectrometry. *Anal. Chem.* 62: 279 (1990)
- Hakomori, S.: A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulphonyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem. (Tokyo)* 55: 205 (1964)
- Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y. and Hayashi, T.: Isolation and hypoglycemic activity of Ganoderan A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Medica*, **51**, 339 (1985)
- Iino, K., Ohno, N., Suzuki, I., Miyazaki, T. and Yadomae, T.: Structural characterization of a neutral anti-tumor β -D-glucan extracted with hot sodium hydroxide from cultured fruit bodied of *Grifora frondosa*. *Carbohydr. Res.*, **141**, 111 (1985)
- Jones, T.M. and Albersheim, P.: A gas chromatographic method for the determination of aldose and aldonic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol.* 49: 926 (1972)
- Kochetkov, N.K. and Chizhov, O.S.: Mass spectrometry of carbohydrate derivatives. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **21**, 39 (1966)
- Lee, C.K. and Gray, G.R.: A general strategy for the chemical sequencing of polysaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 1292 (1988)
- Lee, H.S., Kweon, M.H., Lim, W.J., Sung H.C. and Yang, H.C.: An anticoagulant polysaccharide isolated from the alkali extracts of *Coriolus versicolor*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 369 (1997)
- Li, D.T. and Her, G.R.: Linkage analysis of chromophore labeled disaccharides and linear oligosaccharides by negative ion fast atom bombardment ionization and collisional induced dissociation with B/E scanning. *Anal. Biochem.* 211: 250 (1993)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randoll, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265 (1951)
- McCleary, B.V. and Matheson, M.K.: Enzymatic analysis of polysaccharide structure. *Carbohydr. Chem. Biochem.*, **44**, 147 (1986)
- Ohtani, K., Mizutani, K., Hatono, C., Kasai, R., Sumino, R., Shiota, T., Ushijima, M., Zhou, J., Fuwa, T. and Tanaka, O.: Sanchinan A, a reticuloendothelial system activating arabinogalactan from

- sanchi-ginseng (roots of *Panax notoginseng*). *Planta Medica*, **53**, 166 (1987)
- Paulson, J.C.: Glycoprotein: What are the sugar chains for ? *Trends Biochem. Sci.* 14: 272 (1989)
- Pazur, J.H.: Neutral polysaccharide: a practical approach. In *Carbohydrate Analysis*, IRL Press, Washington, p.55 (1987)
- Ruoslahti, E.: Proteoglycans in cell regulation. *J. Biol. Chem.* 264: 13369 (1989)
- Russa, R., Urbanik-Sypniewska, T., Choma, A. and Mayer, H.: Identification of 3-deoxy-lyxo-2-heptulosaric acid in the core region of lipopolysaccharides from Rhizobiaceae. *FEMS Microbiol. Lett.*, **84**, 337 (1991)
- Schmidt, M.A. and Jann, K.: Structure of the 2-keto-3-deoxy-D-manno-octonic-acid-containing capsular polysaccharide (K12 antigen) of the urinary tract infective *Escherichia coli* O4:K12:H⁻. *Eur. J. Biochem.*, **131**, 509 (1983)
- Shin, K.S., Kiyohara, H., Matsumoto, T. and Yamada, H.: Rhamnogalacturonan II like polysaccharides in leaves of *Panax ginseng*, C.A. Meyer and their pharmacological activity. Abstract No. A3-04 presented at 18th Japanese Carbohydrate Symposium, Tokyo, Japan (1996)
- Shin, K.S., Kiyohara, H., Matsumoto, T. and Yamada, H.: Structural characterization of a novel rhamnogalacturonan II with macrophage Fc receptor expression enhancing activity from the leaves of *Panax ginseng*, C.A. Meyer. In *Pectins and Pectinases*, Visser, J. and Voragen, A.G.J. (Ed.), Elsevier Science, Amsterdam, p.623 (1996)
- Shin, K.S., Ra, K.S., Sung H.C. and Yang, H.C.: Screening of complement-system activating polysaccharide from edible plants and its action mode. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 197 (1993)
- Spellman, M.W., McNeill, M., Darvill, A.G., Albersheim, P. and Dell, A.: Characterization of a structurally complex heptasaccharide isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan-II. *Carbohydr. Res.* 122: 131 (1983)

- Spellman, M.W., McNeill, M., Darvill, A.G., Albersheim, P. and Henrick, K.: Isolation and characterization of 3-*C*-carboxy-5-deoxy-*L*-xylose, a naturally occurring, branched chain, acidic monosaccharide. *Carbohydr. Res.* 122: 115 (1983)
- Stevenson, T.T., Darvill, A.G. and Albersheim, P.: 3-Deoxy-*D*-lyxo-2-heptulosaric acid, a component of the plant cell wall rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.* 179: 269 (1988)
- Stevenson, T.T., McNeill, M., Darvill, A.G. and Albersheim, P.: Structure of plant cell walls. XVIII. An analysis of the extracellular polysaccharides of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.*, 80: 1012 (1986)
- Sun, X.-B., Matsumoto, T. and Yamada, H.: Purification of an anti-ulcer polysaccharide from the leaves of *Panax. ginseng*. *Planta Med.* 55: 9 (1989)
- Sun, X.B., Matsumoto, T. and Yamada, H.: Purification of immune complex clearance enhancing polysaccharide from the leaves of *Panax ginseng*, and its biological activities. *Phytomedicine*, 1, 225 (1994)
- Sweet, D.P., Shapiro, R.H. and Albersheim, P.: Quantitative analysis by various g.l.c. response factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.* 40: 217 (1975)
- Thomas, J.R., Darvill, A.G. and Albersheim, P.: Isolation and structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II from the walls of suspension-cultured rice cells. *Carbohydr. Res.* 185: 261 (1989)
- Thomas, J.R., McNeill, M., Darvill, A.G. and Albersheim, P.: Structure of plant cell walls. XIX. Isolation and characterization of wall polysaccharides from suspension-cultured Douglas fir cells. *Plant Physiol.*, 83: 659 (1987)
- Whitcombe, A. J., O'Neill, M. A., Steelman, W., Albersheim, P. and Darvill, A.G.: Structural characterization of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.* 271: 15 (1995)
- Yamada, H., Hirano, M. and Kiyohara, H.: Partial structure of anti-ulcer polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Carbohydr.*

Res. 219: 173 (1992)

Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J-C., Kojima, Y., Kumazawa, Y. and Otsuka, Y.: Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. Part I. Fractionation and biological properties of polysaccharides. *Planta Medica*, **50**, 163 (1984)

York, W.S., Darvill, A.G., McNeill, M. and Albersheim, P.: 3-Deoxy-D-*manno*-2-octurosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydr. Res.* 138: 109 (1985)

York, W.S., Darvill, A.G., McNeill, M., Stevenson, T.T. and Albersheim, P.: Isolation and characteristics of plant cell walls and cell wall components. *Methods Enzymol.* 118: 33 (1986)

신광순, 라경수, 성하진, 양한철 : 식물성 식품재료로 부터 보체계 활성화 다당의 검색 및 그 활성검토. *한국식품과학회지*, **25**, 197 (1993)

이현순, 권미향, 임왕진, 성하진, 양한철 : 구름버섯 알카리 추출물에서 분리한 항응고성 다당류. *한국식품과학회지*, **29**, 369 (1997)

제 3 장 인삼외 함유 보체계 활성물질의 기능 성 소재화

제 1 절 서 설

예로부터 인간들이 이용해 왔던 천연물 중에는 생체에 대하여 다양한 생리 기능을 수행하는 물질이 함유되어 있다고 알려져 왔으며 실제로 이를 응용하여 건강유지를 위해 사용해 왔던 많은 예들이 있다. 이러한 생리활성 물질들을 생체반응조절제(biological response modifiers, BRM)라 하는데 이는 생체 내 생물반응을 조절하여 항상성을 유지시켜 주는 기능을 한다고 보고되고 있다(4,15). 현재까지도 전 인류의 75%가 건강유지 및 질병방지의 목적으로 천연물을 이용하고 있다고 보고되어 있는데, 이는 최근 현대의약으로 치료가 어려운 성인병군 및 암과 같은 만성 난치성질환의 급증과 합성의약품에 의한 심각한 부작용 및 현대의약에 대한 저항성 증가 때문에 새로운 의약 소재에 대한 관심 대상이 전환되었기 때문이라고 할 수 있다. 따라서 천연물, 특히 식품이나 전통 생약제로 부터 새로운 약리활성 물질을 선별하여 대체 의약품 또는 기능성 식품으로 이용하고자 하는 연구가 계속되고 있다. 특히 오랫동안 식용이나 약용으로 이용되어온 담자균류(16,22), 한약재(61,63), 향신료(27,59) 및 여러 식품소재(59)에는 유래한 항암 활성(anti-tumor activity)(21,22,28), 항염증 활성(anti-inflammatory)(55), 대식세포 활성화능(macrophage activation)(29,35), 인터페론 유도활성(interferon inducing activity)(37) 및 보체계 활성화능(anti-complementary activity)(1,5,35,68)등의 다양한 면역 증강물질이 존재한다고 보고되고 있다. 이들 중 비교적 상세한 연구가 진행된 부분에는 상황버섯(*Phelinus linteus*)(56), 저령(*Grifora umbellata*)(50), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)(13,49), 송이버섯(*Tricholima matsutake*)(63), 당귀(*Angelica acutiloba*)(38,39,64,65), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)(48), 구름버섯(*Doriols versico-*

lor)(30) 및 양송이(*Agaricus bisporus*)(35)등이 있으며, 이들은 대부분 오랫동안 식용 내지는 약용으로 사용되었던 소재로써 인체에 대한 안정성이 확보된 물질들이라 하겠다. 이중 특히 표고버섯(*Leutinus edodes*)(12,54)으로부터 분리된 β -1,3-glucan 다당체인 Lentinan은 현재 일본에서 항암보조제로 시판되고 있으며, 부작용이 거의 나타나지 않아 종양치료의 어려움을 해소하는데 이용되고 있다.

면역계(immune system)의 역할은 인체를 공격하는 각종 감염성 미생물(pathogenic bacteria, virus 등), 이물질 및 변형된 자기세포(transformed self cells, malignant cells)의 위협으로부터 생체를 보호하여 항상성(homeostasis)을 유지하게 하는 숙주의 기관, 조직, 세포 및 각종물질을 총칭하는데 기능적으로는 선천적 면역(innate immunity, nonspecific immunity)과 후천적 면역(adaptive immunity, specific immunity)으로 분리된다. 감염원에 대하여 비특이적으로 최초의 방어를 담당하는 선천성 면역계는 macrophage, natural killer cell (NK-cell)과 같은 세포와 complement, interferon, tumor necrosis factor (NGF- α)로 구성되며, 항원 특이적인 반응을 담당하는 후천적 면역계는 T-lymphocyte 및 B-lymphocyte 등이 관여하게 된다. 또한 이들 각 면역구성요소 사이에는 다양한 종류의 cytokine류가 존재하여 긴밀한 상호 활성화와 엄밀한 제어(cytokine network)가 이루어지고 있으며, 따라서 이상의 면역성분들이 복잡하게 연계되어 전체 면역반응의 활성화와 효율화를 담당하게 된다(19).

보체계(complement system)는 고등동물에서 체액성 면역계의 일부를 담당하는 인자로서 C1부터 C9까지의 기본성분을 포함하는 약 20여종의 혈중 순환 단백질로 구성되어 있다(44). 보체계는 항원 침입시 비 특이적으로 활성화되어 세균이나 virus 등의 표적세포를 분해하고, 대식세포와 림프구의 활성화, 화학 주화능 및 opsonization 등을 통해 체내 병원균을 제거하는 생체방어기구이다. 특히 이들은 숙주가 면역화 되기 이전에 즉각 반응한다는 점에서 중요한 방어기구라 할 수 있다(26,43). 보체계의 활성화는 가장 중요한 역할을

한다고 알려져 있는 C3 활성화에 이르는 경로에 따라 고전경로(classical pathway), lectin경로(lectin pathway)와 부경로(alternative pathway)로 나누어진다(Fig. 3-1). 고전경로에 의한 C3의 활성화는 항원과 IgM 및 IgG의 immune complex에 의해 C1부터 차례로 활성화되어 C3활성체인 C3b가 생성되는 경로이며, lectin경로는 mannan-binding lectin인 혈청 lectin이 세균과 virus의 mannose를 포함한 탄수화물에 결합함으로써 활성화를 시작한다(32,43). 또한 부경로에서 C3의 활성화는 면역 복합체 없이 bacteria, fungi, plant 유래의 polysaccharide, endotoxin등의 활성인자에 의해 비특이적으로 활성화되어 혈액 중에 존재하는 활성화형 D factor와 B factor에 의해 C3b가 유리됨으로써 활성화가 시작되는 경로이다. C3가 활성화되면 다음단계의 보체 성분인 C5가 C5b로 활성화되며 이후 C6~C9가 순차적으로 결합하여 membrane attack complex (MAC)를 형성하고 결국 병원체의 lipid bilayer에 손상을 주어 살균작용을 나타낸다(24). 따라서 lectin 경로와 부경로는 항체에 의한 특이적 면역반응 이전에 활성화되어 항원에 의해 감작되지 않은 숙주에 있어 중요한 방어기작이라 할 수 있다. 또한 고전경로에는 Ca^{++} 과 Mg^{++} 이온이, 부경로에서는 Mg^{++} 이온이 각각 선택적으로 관여하고 있음이 보고되어 있다. 이러한 보체 성분중 일부가 결손된 유전적 질환자의 경우, 자기면역질환의 발병률이 높다는 사실에서 보체계가 건강유지에 필수적이라는 사실을 추측할 수 있다(31).

최근 보체계를 활성화하는 물질(혹은 항보체 활성물질)들이 생체의 면역 부전 상태를 개선하거나 치료하는 면역 요법제로 개발되어 질병의 예방과 치료에 효과적으로 이용될 수 있는 가능성이 제시되고 있으며 항보체 활성물질이 생체내 대식세포 등의 면역세포들을 자극하여 임파구의 증식 및 활성화에 필요한 cytokine의 분비를 유도하여 암 치료에 도움이 될 수 있다는 가능성도 제시되고 있다(16,51). 현재까지 알려진 항보체 활성 물질들은 주로 식물체에서 분리한 당귀(*Angelica acutiloba*)의 pectic arabinogalactan(38,39,65), 시호(*Bupleurum falcatum*)의 arabinan, arabinogalactan, glucan(61,66), 대북피

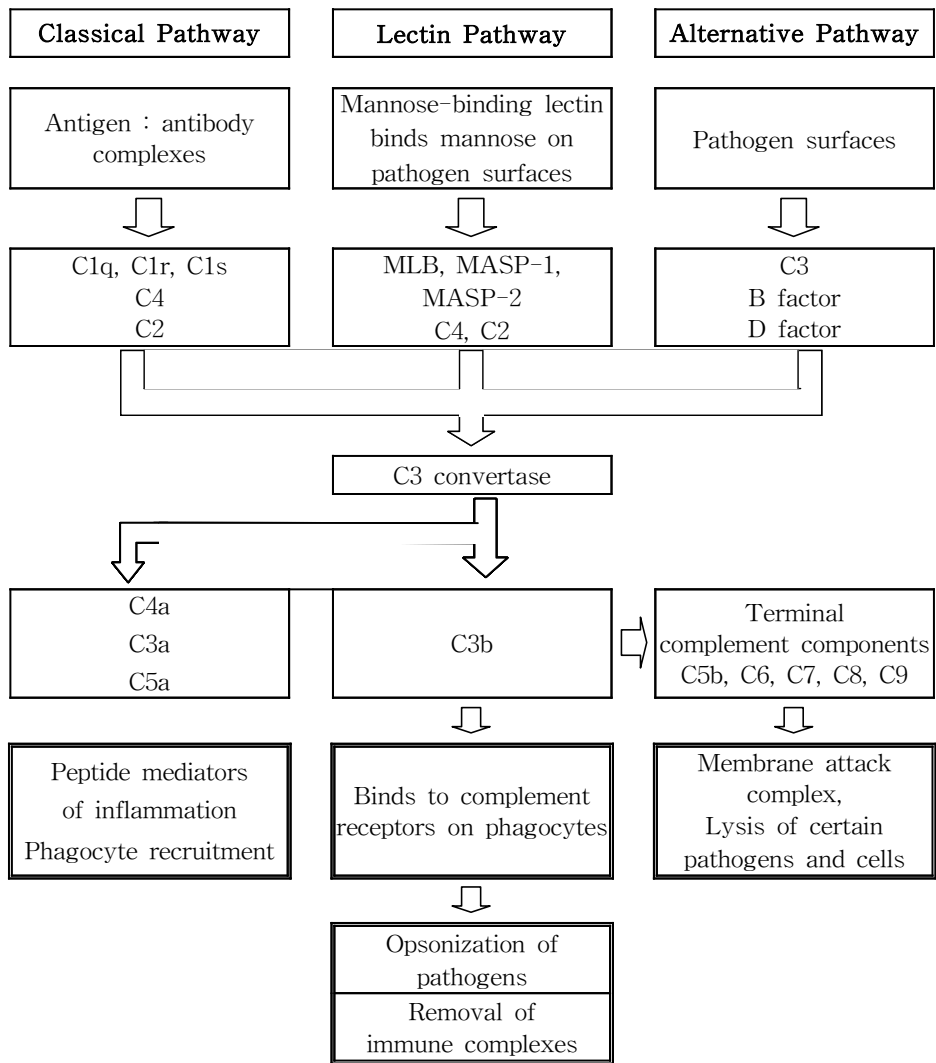


Fig. 2-1. Overview of the main components and effector actions of complement.

(*Arcae pericarpium*)의 heterogalactan(57), 인삼(*Panax ginseng*)의 acidic heteroglucan(25,47,58,69), 계지(*Cinnamomum cassia*)(4), 고사리(*Ptidium aguilinum*)의 α -(1-2)-glucuronomannan back bone(42) 등이 보고되고 있으며 이외에도 달래(*Allium monanthum*), 생강(*Zingiber officinale*), 토란대

(*Colocasia antiquorum*), 은행잎(*Ginkgo biloba*), 냉이(*Capsella bursapastoris*)(59)등의 식품재료에서도 높은 보체계 활성이 보고되고 있다.

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나무과(Araliaceae)에 속하는 다년생 초본류로서(10) 아시아의 극동 지방(북위 30°~48°)에서만 자생하는 약용식물이다. 미국의 서양인삼(*Panax quiquefolia* L.), 일본의 죽절인삼(*Panax japonicus* C.A. Meyer) 그리고 중국의 삼칠인삼(*Panax notoginseng* F.H. Chen)등의 인삼 대응품과는 구분되는 약리효능을 가진 우리나라 전통 생약재이다. 인삼은 전통 한방에서 강장(强壯), 강정(强精), 항피로 및 신진대사의 증진 목적으로 인삼탕(人蔘湯), 십전대보탕(十全大補湯)등에 배합되어 이용되고 있는데 그 효과가 우수한 것으로 알려져 있다. 인삼의 효능은 민간의 경험적 측면뿐만 아니라 현대의학으로도 그 효과가 증명되고 있는데 특히 강장 효과(33), 뇌신경 기능 향진, 조혈기능 향진 및 혈당강화 작용(8), 항염증 작용(40), 위기능 회복작용(41), 노화 방지 작용(14), 방사선에 대한 방어작용(6), 면역능 향진 작용(3,7)등이 알려져 있다.

인삼의 주요 화학적 성분은 dammarane glycoside 계열의 사포닌(saponin)과 지용성 성분, 당류, 유기산 및 함 질소 화합물 등으로 구성되어 있으며, 지금까지는 사포닌에 대한 연구가 가장 많이 진행되어 있다(2). 사포닌은 인삼 중 존재하는 유용한 2차 대사산물로써 이는 인체의 면역기능과 대사를 조절하고 사람과 실험동물에 있어서 간세포 독성물질을 방어하는 효과가 보고되어 있다(47). 또한 panaxytol 1을 포함한 polyacetylene 화합물은 새로운 항종양 물질로서 주목받고 있으며(69), 1차 대사 산물로서 존재하는 pectin (polysaccharide)은 항종양 효과와 림프구(44) 및 대식세포 등을 자극하는 면역활성을 가지고 있다고 보고되었다.

인삼은 우리 나라에서 1999년을 기준으로 11,561 ha에서 재배되어 14,500 MT을 생산하고 있으며 약리효과가 우수하다고 증명되어 세계적으로 선호도가 높은 한국의 대표적 특산물이기도 한다. 이러한 이유로 인삼에 대한 연구와 이용은 이제까지 대부분 인삼의 근부(根部)에만 집중되어 왔다. 그러나

인삼의 근부는 그 가격이 비싸고, 성체까지 재배를 위해서는 4~6년의 시간이 필요하다는 단점이 있으나 인삼 엽부의 경우는 연중 수확이 가능하다는 잇점이 있다. 따라서 인삼의 엽부에서 인삼의 근부에 상응하는 생리활성 또는 새로운 활성이 발견된다면 이는 폐자원 활용이라는 측면과 더불어 신 자원 소재의 개발의 측면에서도 의의가 높다고 사료된다. 또한 현재까지 인삼의 엽부는 재배농가에서 별다른 이용 없이 대부분 폐기되고 있는 실정이며 인삼 엽부의 각종 활성에 대한 연구(17)도 상당히 제한적으로 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 인삼의 엽부의 다당을 대상으로 보체계 활성화능에 대해 검토하고 제반 특성 및 활성화 양식을 살펴봄으로써 이들의 기능성 소재로서의 사용을 모색할 수 있는 기초자료를 제공하고자 한다.

제 2 절 재 료 및 방 법

제 1 항 재 료

가. 재 료

본 실험에 사용한 인삼의 엽부(the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer)는 충북 금산에서 1999년 11월에 수확한 것을 건조하여 사용하였다.

나. 시 약

실험에 사용된 양의 감작적혈구(IgM-hemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본의 Biotest사로부터 구입하여 사용하였고, goat anti-human C3, anti-human complement C4, ethyleneglycol-bis-(amino ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA), polymyxin B sulfate, protease (from *Streptomyces griseus*), NaIO₄, *m*-hydroxybiphenyl, cetyltrimethyl ammonium bromide (Cetavlon) 등

은 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였으며 5,5-diethylbabituric acid sodium salt는 Daiichi pure chemicals사 제품을 사용하였다.

분자량 측정에 사용된 표준 pullulan(P400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)은 일본 Showa. Denko사로부터 구입하여 사용하였고, 그 밖의 시약은 시판되는 특급 혹은 1급 분석용 시약을 사용하였다.

다. 완충용액

항보체 활성의 측정에 사용한 gelatin-veronal buffered saline (pH 7.4, $\mu=0.147$, GVB^{++})는 Kabat등의 방법(36)에 따라 $500\mu M$ 의 Ca^{++} 및 2 mM의 Mg^{++} 이온이 함유되도록 조제하였고, EDTA- GVB^{-} 용액은 GVB^{-} 용액에 10 mM ethylene-diamine tetraacetic acid, disodium salt(EDTA)가 함유 되도록 조제하였으며, Mg^{++} -EGTA- GVB^{-} 는 Platt과 Ishizaaka 의 방법(52)에 따라 GVB^{-} 용액에 10 mM 의 EGTA와 2 mM $MgCl_2$ 가 함유되도록 조제하여 사용하였다. 또한 phosphate-buffered saline (pH 7.2, 0.15 M, PBS)과 전기영동에 사용되는 pH 8.6의 barbital-buffer는 상법에 따라 조제(11)하여 사용하였다.

라. Resin

활성 물질의 정제에 사용된 DEAE-Sepharose FF (Cl^{-} form) Pharmacia Biotech사 제품을, Biogel P-30 및 P-100은 Bio-Rad사의 제품을 구입하여 사용하였다.

제 2 항 실험방법

가. 보체계 활성화 물질의 선별

1) 용매별 추출물 조제

인삼엽부 50 g에 각각 10배 부피의 각종 용매를 이용, 하룻 밤 추출하고 여과후 상등액을 감압농축시킨 후 건조하였다. 이때 사용된 용매는 냉수, acetone, chloroform, ethanol, ethylacetate, methanol, buhanol, 1% NaOH (교반 후 5M HCl로 중화)이었으며 열수추출은 용액 최초 부피의 1/2이 될 때까지 추출하였다.

2) 단계적 계통 추출물 조제

추출용매에 따른 항보체 활성을 검토하기 위해 인삼잎 건조과쇄 시료를 대상으로 Fig. 2-2에서 표시한 것처럼 계통추출하였다. 시료를 먼저 균질기를 이용하여 냉수로 추출한 후 상등액을 동결건조하여 냉수추출획분(Fraction A)로 하고 잔사는 헥산으로 환류추출하여 헥산추출획분(Fraction B)로 하였다. 잔사는 다시 메탄올로 환류추출하고 상등액은 동결건조하여 메탄올추출물획분(Fraction C)로 조제하고 마지막으로 잔사를 다시 열수로 추출하여 이를 열수추출획분(Fraction D)로 하였다.

나. 항보체 활성 조다당의 추출

건조된 인삼 엽부 4 kg을 10배 부피의 열수를 이용하여 추출하고 4배 부피의 ethanol을 가하여 침전시킨 후, 차례로 투석 및 동결건조의 과정을 거쳐 조다당 획분 GS-1을 얻었다(Fig. 2-3참조).

다. 일반 분석

총당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(23)으로, 산성당 함량은 β -D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybenzyl-phenyl법(20)으로, 단백질 함량은 bovine albumin을 표준 물질로 하여 Lowry법(46)으로 KDO 상 물질은 thiobabituric acid법을 이용하여 각각 정량 분석 하였다.

라. 구성당 분석

구성당 분석은 Jones법(34)에 따라 alditol acetate 유도체화 하여 분석하였다. 즉, 시료(1 mg)는 2 M의 trifluoroacetic acid (TFA)로 121 °C에서 1.5시간 동안 가수분해하였으며 잔존 TFA는 50 °C에서 휘발시켜 제거하였다. 잔사에 1M NH₄OH 용액 1ml을 첨가한 후 sodium borohydride (NaBH₄)를 이용하여 alditol로 환원시키고, 과잉의 sodium borohydride는 acetic acid로 분해시킨 후 50 °C에서 건조 시켰다. Methanol을 첨가하여 교반후 건조시키는 조작을 3회 반복하여 잔존하는 boric acid를 제거하고 acetic anhydride [(CH₃CO)₂O]를 첨가하여 121 °C에서 3시간 처리하고 각각 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas-liquid chromatography (GLC)법으로 구성당을 분석하였다. GLC의 분석 조건은 Table 3-1과 같으며 표준 구성당들의 retention time과 비교하여 시료 중 의 구성당을 분석하였으며 구성당의 mole %는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로 부터 환산하였다.

Table 3-1. Analytical condition of gas-liquid chromatography for component sugar

Apparatus	GC M600D (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Detector	Flame ionization detector (FID) (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Column	SP-2380 capillary column (Supelco, USA)
Column size	0.25 mm×30 m×0.2 μm film thickness
Oven temp.	60°C(1 min) → 220°C(12 min) → 250°C(15 min) 30°C/min 8°C/min
Injector temp.	250 °C
Detector temp.	250 °C
Carrier gas	N ₂ (1.5 ml/min)
Intergrator	D520B Intergrator (Young-Lin Co. Ltd., Korea)

마. 항보체 활성 측정

1) 정상인 혈청(normal human serum, NHS)의 제조

실험실의 건강한 성인의 혈액을 채취하여 실온 및 4°C에서 각각 30분씩 방치하여 응고시킨 후, 원심분리(3000 rpm, 20 min)하여 혈청을 분리한 뒤 미량 원심분리용 튜브에 1 ml씩 분주하여 -70°C에서 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 항보체 활성의 측정

항보체 활성은 Mayer법(36)을 이용하여 시료에 의한 보체 소비(complement consumption) 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test로 측정하였다. 즉, 여러 농도(100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$)로 증류수에 녹인 시료에 정상인의 혈청과 2% gelatin, 500 μM Ca^{++} , 2 mM Mg^{++} 이 함유된 GVB⁺⁺ (gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 완충액을 각각 50 μl 씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시키고 GVB⁺⁺를 350 μl 를 가한 후 이를 10-160배로 연속 희석하였다. 여기에 다시 750 μl 의 GVB⁺⁺를 가한 후 양의 감작적혈구(IgM-sensitization sheep erythrocyte, EA Cell, 1×10^8 cell/ml)를 250 μl 를 가해 37°C에서 60분간 2차 반응시키고 PBS 2.5 ml를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액을 2500 rpm에서 약 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정하였다. 항보체 활성은 NHS와 buffer, 증류수만을 반응시킨 대조군의 총보체 용혈(50% total complement hemolysis, TCH₅₀, %)에 대한 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH₅₀, %)로서 나타내었다(Fig. 3-2 참조).

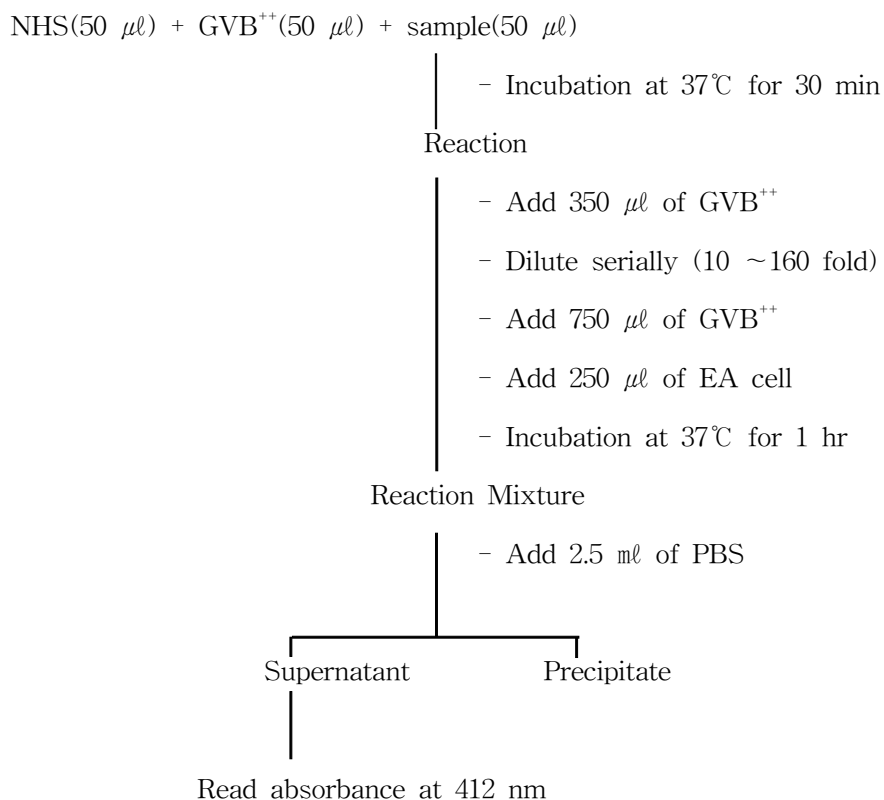


Fig. 3-2. Assay procedure for the anti-complementary activity.

$$\text{ITCH}_{50} (\%) = \frac{\text{TCH}_{50} \text{ of control} - \text{TCH}_{50} \text{ of sample}}{\text{TCH}_{50} \text{ of control}} \times 100$$

NHS : Normal human serum

GVB⁺⁺ : Gelatin veronal buffered saline

PBS : Phosphate buffered saline

TCH₅₀ : 50% total complement hemolysis

ITCH₅₀ : Inhibition of 50% total complement hemolysis

EA cell : IgM-hemolysin sensitized sheep erythrocyte (1×10^8 cell/ml)

바. 항보체 활성 본질 규명

1) Pronase digestion

시료(GS-4) 20 mg을 10 mM CaCl₂를 함유한 50 mM Tris-HCl Buffer (pH 7.5) 50 ml에 녹인 후 20 mg의 protease를 첨가하고, 37°C incubator에서 48시간 반응시켰다. 이후 잔존 효소를 불활성화 시키기 위해 100°C에서 5분간 가열하고 원심분리하였으며, 얻어진 상등액을 투석과 동결건조를 행하여 조다당의 pronase 분해물을 얻었다(57).

2) Periodate oxidation

시료 20 mg을 0.05 M acetate buffer (pH 4.5) 50 ml에 녹인 후, 0.05 M NaIO₄를 5 mg 첨가하고 4°C의 암소에서 72시간 산화시켰다. 이 산화물 중 잔존 NaIO₄를 제거할 목적으로 ethylene glycol을 첨가한 후 투석을 행하고 투석액내에 NaBH₄ 20 mg을 첨가하여 하룻밤 교반시켜 환원시켰다. 반응액은 0.1 M acetic acid로 중화하여 투석 및 동결 건조를 행하여 periodate 산화물을 얻었다(57).

3) Chlorite treatment

시료 20 mg 4% acetic acid 50 ml에 녹인 뒤 NaClO₂ 100 mg을 첨가하고 색이 변할 때까지 70°C에서 교반시켰다. 이후 4°C에서 3 N NaOH를 첨가하여 중화한 후 투석 및 동결건조의 과정을 거쳐서 chlorite처리 획분을 얻었다(67).

4) Polymyxin B treatment

시료를 2 mg/ml의 농도로 제조한 뒤 같은 농도의 polymyxin B sulfate를 동량 섞어 최종농도 1 mg/ml의 polymyxin B sulfate 처리 획분을 얻었다.

사. 보체계 활성화 경로 검토

1) 교차 면역 전기영동 (Cross-immunoelectrophoresis)

GVB⁺⁺ buffer, 10 mM EDTA가 함유된 EDTA-GVB⁻⁻ buffer, 2 mM MgCl₂ 및 10 mM EGTA가 함유된 MG⁺⁺-EGTA-GVB⁻⁻ buffer에 정상인의 혈청과 시료를 각각 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후, pH 8.6인 barbital buffer (ionic strength, $\mu=0.025$)를 사용하여 조제한 1% agarose gel 상에서 1차원 전기영동(3 mM/cm)을 행하였다. 이후 0.5% anti-human C3 serum을 함유한 1% agarose gel 상에서 약 15시간 동안 2차 전기영동(1 mM/cm)을 행하였다. 전개된 gel을 bromophenol blue로 염색시켜 C3의 분해 산물과 anti-human C3의 결합에 의한 침전 형성을 관찰하였다(60).

2) 보체계 활성화 측정

보체계 활성화 경로를 조사하기 위하여 GVB⁺⁺ buffer, Ca⁺⁺ 이온이 제거된 MG⁺⁺-EGTA-GVB⁻⁻ buffer 그리고 Ca⁺⁺와 Mg⁺⁺이 모두 제거된 EDTA-GVB⁻⁻ buffer를 사용하여 보체계 활성화능을 측정 한 뒤 그 활성을 비교하였다.

3) Alternative pathway를 통한 보체계 활성화의 측정

부경로를 통한 보체계의 활성화는 토끼의 적혈구를 이용 Platt와 Ishizaka의 방법에 따라 실시하였다. 시료에 정상인의 혈청과 MG⁺⁺-EGTA-GVB⁻⁻ buffer를 각각 250 μ l씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시키고 MG⁺⁺-EGTA-GVB⁻⁻ buffer를 3.0 mL가 한 후 이를 15-60배로 연속 희석하였다. 여기에 다시 200 μ l의 감작화 되지 않은 토끼의 적혈구(rabbit erythrocyte, 1×10^8 cell/ml)를 가해 37°C에서 30분간 2차 반응시키고 PBS 2.0 ml을 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액을 2500 rpm에서 약 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 414 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정하

였다. 부경로를 경유한 항보체 활성은 NHS 와 buffer, 증류수만을 반응시킨 대조군의 부경로 보체 용혈(50% alternative complement hemolysis, ACH₅₀, %)에 대한 저지율(inhibition of 50% alternative complement hemolysis, IACH₅₀, %)로서 나타내었다.

아. 보체계 활성화 다당의 분리 및 정제

1) Cetavlon 처리에 의한 중성 다당의 분리

항보체 활성이 있는 조다당 획분 GS-1을 증류수에 용해시킨 후 동량의 8% Cetavlon을 가하여 24시간 교반시킨 뒤 6000 rpm에서 15분간 원심분리를 행하였다. 침전물은 10% NaCl에 용해시킨 뒤 ethanol을 첨가하여 Cetavlon을 제거하고 동결건조하여 산성다당획분이 GS-2을 얻었다. 침전물을 분리한 후 얻어진 상등액은 동량의 1% boric acid를 첨가하여 24시간 동안 교반 후, 원심 분리하여 얻은 침전을 ethanol로 회수하고 2% acetic acid 용액으로 수세하여 약산성 다당 획분인 GS-3와 상등액을 동 과정으로 처리하여 중성 다당 획분인 GS-4를 얻었다(Fig. 2-5 참조). 획분들 중 높은 항보체 활성과 수율을 보였던 GS-4를 대상으로 다음 정제과정을 행하였다.

2) Anion exchange chromatography

활성과 수율이 높았던 GS-4를 증류수에 녹인 후, 증류수로 평형화시킨 DEAE-Sepharose FF (Cl⁻ form)에 흡착시킨 후, 증류수, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 M의 NaCl용액으로 단계적으로 용출시켰다. 이 때 얻어진 각각의 획분은 농축, 투석 및 동결 건조를 행하여 1개의 비흡착 획분(GS-4a)과 8개의 비흡착 획분(GS-4b~4i)을 얻을 수 있었다(Fig. 3-3 참조).

3) Gel permeation chromatography

Anion exchange chromatography 정제 획분 중 높은 항보체 활성을 보인

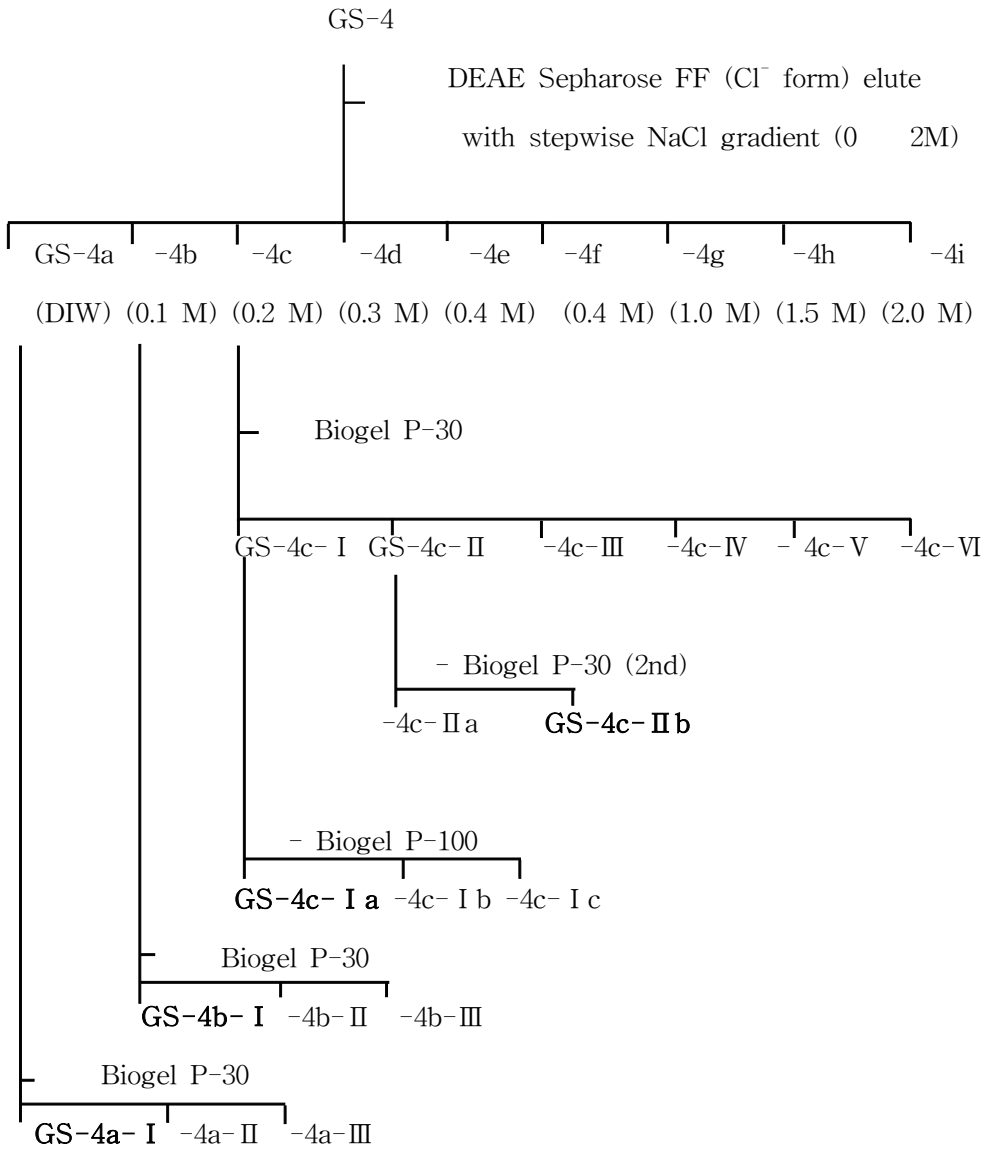


Fig. 3-3. Purification scheme of GS-4 by anion exchange and gel permeation chromatography.

GS-4a, -4b를 대상으로 Biogel P-30을 이용하여 겔 여과를 행하여 GS-4a-I, -4a-II, -4a-III 및 GS-4b-I, -4b-II, -4b-III로 각각 분획하였다. GS-4c는 Biogel P-30에 의해 GS-4c-I, -4c-II ~ -4c-VI 등의 6개의 획분을 얻었으며 이중 활성이 높은 GS-4c-I 과 -4c-II는 각각 Biogel P-100과 P-30을 행하여 이용한 겔여과를 행하여 3개 획분과 2개 획분으로 정제하였다. 이들을 투석, 감압 농축 및 동결 건조를 행하여 이후의 실험이 사용하였다(Fig. 3-3 참조).

4) HPLC에 의한 분자량 측정 및 순도 확인

Gel permeation chromatography 정제 획분의 정제도 및 분자량을 예측하기 위하여 Table 3-2의 분석 조건으로 high performance liquid chromatography (HPLC)를 행하였다. 분자량 측정시에는 표준 pullulan series(P400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)를 이용하여 각각의 retention time를 구한 후, 분자량에 대한 Kav 값을 산출하여 얻은 표준 곡선으로 부터 환산하여 결정하였다.

Table 3-2. Analytical condition of HPLC for the purified polysaccharides

Apparatus	HPLC-9500 (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Detector	Refractive index (RI, Waters, USA)
Column	Shodex GS-520 + GS-320 + GS-220 packed column (Asahi Chemical Industry Co, Ltd., Japan)
Column size	φ7.6×300 mm
Flow rate	0.5 ml/min
Eluent	0.2 M NaCl
Integrator	Autochro data module (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Injection vol.	10 μl

자. 보체계 활성화 다당의 구조 특성 실험

1) β -glucosyl Yariv antigen을 이용한 single radial gel diffusion

다당시료(5 μ g)을 β -goucosyl-Yariv antigen [10 μ g/ml, 1.3.5-tri-(4- β -D glucopyranosyl-oxyphenylazo) 2.4.6-trihydroxybenzene]을 함유한 agarose plate상의 well에 첨가후 실온에서 하룻밤 방치하여 반응시키고 형성된 hollow를 분석하였다. 이때 대조군으로 gum arabic을 농도별로 첨가하여 함께 분석하였다.

2) Methyl화 분석에 의한 결합위치 결정

다당시료의 결합위치 결정을 위한 methyl화는 Hakomori 방법에 따라 실시하였다. 각 다당은 methyl화 이전에 0.2 M NaOH로 실온에서 2시간 처리하여 탈 ester화 하고, 반응중 β -elimination이 일어나지 않도록 methyl화는 한 차례만을 수행하였다. 그러나 다당이 완전히 polyalkoxide로 전환되도록, 필요한 경우 methylsufinyl carbanion을 수차례 첨가하였고 잔존량은 triphenylmethane으로 확인하였다. Methyl화 다당은 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용, 회수하였다. Methyl한 다당 및 oligo당은 1M TFA로 100 $^{\circ}$ C에서 2시간 가수분해 후, 환원 및 acetyl화 과정을 거쳐 partially methylated alditol acetate로 전환하여 GC 및 GC-MS로 분석하였다. GC 분석은 SP-2380 (0.2 μ m film, 0.25 mm i.d. \times 30 m, Supelco) capillary column이 장착된 Hewlett-Packard 5890A GC를 사용하여 최적온도조건 [60 $^{\circ}$ C (1 min), 60 $^{\circ}$ C \rightarrow 180 $^{\circ}$ C (30 $^{\circ}$ C/min), 180 $^{\circ}$ C \rightarrow 250 $^{\circ}$ C (1.5 $^{\circ}$ C/min), 250 $^{\circ}$ C (5 min)]에서 splitless injection mode로 분석하였으며, 한편 GC-MS는 동일 column을 장치한 Hewlett-Packard 5890A GC system과 5970 mass selective detector를 이용하여 최적온도조건 [60 $^{\circ}$ C (1 min), 60 $^{\circ}$ C \rightarrow 150 $^{\circ}$ C (30 $^{\circ}$ C/min), 150 $^{\circ}$ C \rightarrow 250 $^{\circ}$ C (1.5 $^{\circ}$ C/min)]에서 분석하였다. (He 압력 : 0.5 ml/min) 각 peak는 MS에 의한 fragment ion 분석과 GC의 relative retention time을 조합하여 동정하였으며, 각 화합물의 mole %는 peak 면적과 응답계수로 부터 산출하였다.

차. 활성다당의 in vivo 보체계 활성화능 실험

1) 활성 다당의 in vivo 항보체 활성화

활성 다당의 in vivo 보체계 활성화능을 측정하기 위해 guinea pig (150 - 200 g)를 이용 무투여군과 투여군으로 나누어 실험하였다. 멸균 생리식염수에 활성 다당을 용해시킨 후, 실험 당일 각각 50 mg/kg과 25 mg/kg 씩 각각 복강내에 주사하였으며 대조군은 생리식염수만을 투여하였다. 보체계 활성화능을 측정하기 위해 시료 투여 후 각각 2, 4, 8, 12, 24시간 쯤에 hematocrit capillary pipette을 이용 guinea pig의 안와정맥으로부터 채혈되었다. 각각 시간별로 채취한 혈액은 상온에서 30분이상 방치하여 응고시키고, 원심분리를 실시하여 혈청을 얻었으며 이를 대상으로 총보체 용혈(50% total complement hemolysis, TCH₅₀, %)을 측정하였다.

2) Complement C3의 분해산물의 결합활성 측정

5주령의 ICR mouse에 세포수를 2×10^6 cell/ml로 조정된 Sarcoma-180을 복강에 이식하고, 생리 식염수에 녹인 활성시료를 처치 1일째 부터 3일간 , 20 mg/ml 및 10 mg/mL 씩 1일 1회 복강 주사하였다. 실험 6일째 치사하여 복강 macrophage를 회수하고 세척 후, 2×10^6 cell/ml로 조정하여 macrophage 부유액을 조제하였다. 동 부유액은 살 균 petridish에 놓여진 현미경 검경용 cover glass에 0.2 ml씩 분주하고, 5% CO₂ incubator에서 37°C, 30 min간 방치하여 glass 표면에 macrophage를 부착 시켰다. Cover glass에 부착된 cell은 풍건하고 95% ethanol로 고정한 후, anti-mouse C3 rabbit IgG를 처리하여 37°C, 60 min간 재배양하였다. 이후 각 Cover glass는 PBS로 수차례 세척한 후, goat에서 유도된 FITC-anti-rabbit IgG (Miles Yeda Ltd., IL, USA)를 처리하고 상온에서 1시간 방치하였다. 이 후 수차례 세척하고 현미경을 이용 검경하였다. 각 cover glass에 결합된 200개의 세포 중 형광성을 띄는

C3-positive cell의 수를 세어 활성 cell로 표시하였다.

카. 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안

(인삼잎 활성획분 경질 캡슐 제조)

인삼잎 면역 활성성분을 기능성 소재화(산업화)하기 위한 획분은 각 면역 활성성분이 골고루 함유된 다당 획분 GS-1이 가장 적절한 것으로 판명됨에 따라 이에 대한 응용성 실험으로 GS-1을 이용한 경질 캡슐 제조실험을 행하였다. GS-1 100 mg에 부형제로서 유당 100 mg 및 옥수수 전분 40 mg, 산미제로서 구연산 10 mg을 혼합하여 함량 250 mg의 경질캡슐을 제작하였다. 본 제품은 생약 추출물 함유 제제의 적용범위에 속한다. 따라서 외관검사는 6개월, 유효사용기간은 2년이므로 이에 준하는 가속실험(고온, 고압)을 실시하여 제품의 안정성 및 미생물 검사를 실시하였다.

제 3 절 결 과

제 1 항 인삼잎으로부터 항보체 활성화 물질의 검색

가. 인삼잎의 산지별 항보체 활성 검토

인삼 엽부의 산지별 활성을 검토하기 위하여 우리나라의 대표적 인삼재배지인 금산, 김포 및 강화도에서 1999년 가을 채취한 인삼 엽부를 사용하여 활성을 측정하였다. 각 산지별 인삼잎 50 g 시료당 열수 500 ml을 가하여 추출한 뒤 Kabat과 Mayer의 방법에 따라 항보체 활성을 측정한 결과, Fig. 3-4에 나타난 바와 같이 산지별 인삼잎의 추출물은 대부분 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서

ITCH₅₀ 값이 80% 내외의 높은 활성을 보였다. 그러나 산지별 시료에 대한 활성의 차이는 그다지 변화가 없었으므로 반복실험에서 활성이 안정적인 결과를 나타내고 시료의 다량 획득이 가능한 금산상의 시료를 이후의 실험에 사용하였다.

항보체 활성의 측정결과를 나타낸 Fig. 2-6에서 DIW라 함은 시료를 첨가하지 않고 증류수만 첨가한 음성 대조군이며, CAP-0는 항보체 활성이 우수하다고 알려진 고추 (*Capsicum annuum*)의 다당(53), PSK는 구름버섯 (*Clitopilus versicolor*) 유래의 면역활성다당(62)으로 양성 표준물질로 사용하였으며 이들은 이후의 실험에 대조군으로 사용하였다.

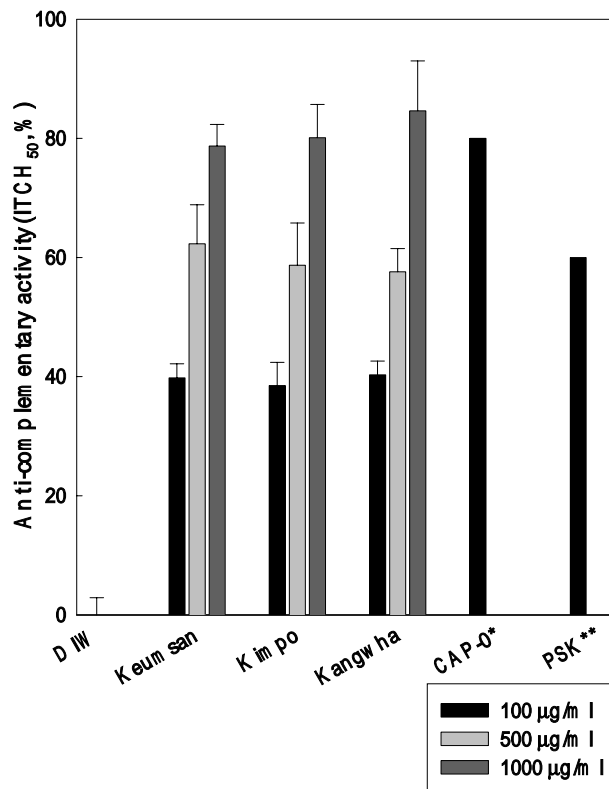


Fig. 3-4. Anti-complementary activity of the hot water extracts from

the ginseng leaves harvested at various growing districts.

나. 추출 용매별 항보체 활성 검색

추출 용매에 따른 금산산 인삼잎의 항보체 활성을 검토하기 위해 극성이 상이한 각종 용매로 인삼잎을 추출하고 추출물의 수율과 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서의 활성을 비교한 결과는 Table. 3-3에 나타난 바와 같이 수 추출물의 경우 활성과 수율 모두에서 양호한 결과를 보였다. 한편 기타 용매계에서는 상대적으로 미미한 수율과 낮은 활성을 보여줌으로써 활성물질 추출에는 부적절한 것으로 판단되었다. 그러나 열수추출을 행한다고 하여도 그 추출물 중에는 활성을 저해하거나 erythrocyte에 독성을 부여하는 물질이 함유되어 있을 가능성이 있으므로 인삼잎을 대상으로 Fig. 2-2에서 표시한 것처럼 계통추출하고 활성을 측정된 결과(Table 3-4), methanol과 hexane 추출물인 Fraction B와 C는 거의 활성을 나타내지 않는 반면, 냉수추출 획분 Fraction A에서는 상당한 활성(72.3%)을, 열수추출 획분인 Fraction D의 경우는 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 최대 85.3%의 높은 활성을 보였으며 농도 의존적으로 활성이 증가하는 경향을 보였다. 이는 기존에 높은 보체계 활성화능을 소유하고 있다고 보고된 CAP-0(고추, *Capsicum annuum* 유래의 다당)보다도 높은 활성을 나타낸 결과이며 따라서 위 결과를 미루어 볼때 주로 인삼잎 중 수 가용획분이 높은 활성을 소유한 것으로 판단되었다. Table. 3-3에 비해 상대적으로 낮은 수율(Table. 3-4)을 보인 것은 계통 추출하여 냉수추출물 조제 후 남은 잔사를 이용한 때문인 것으로 판단되었으며 따라서 이후 추출시에는 열수를 이용하는 것이 가장 적절한 것으로 사료되었다.

Table 3-3. Anti-complementary activities and yields of several organic solvent extracts from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer

Solvent	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , %)	Yield(%)
Cold water	78.2	27.4
Hot water	80.5	32.3
Ethyl acetate	24.4	1.0
Chloroform	6.8	1.4
Acetone	11.8	2.9
Ethanol	5.6	7.8
Mathanol	4.7	9.7
1% NaOH	48.5	11.8
Buthanol	13.1	3.7

Table 3-4. Anti-complementary activities and yields of the fractions obtained by systemic extraction procedure of the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer

Fraction	Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ %)			Yield(%)
	1000 $\mu\text{g/ml}$	500 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	
Cold water (Fraction A)	72.3	42.2	17.3	18.2
Methanol (Fraction B)	5.4	4.2	6.3	5.1
Hexane (Fraction C)	15.3	7.2	5.4	0.8
Hot water (Fraction D)	85.3	68.2	43.4	5.2

다. 인삼잎 열수추출 최적 조건 검토

인삼잎의 수용성 항보체 활성 물질을 최적 추출 조건을 검토하기 위해 추출 온도에 따른 활성과 수율의 변화 및 추출시간 및 추출횟수에 따른 효과를 검토하였다. Fig. 3-5에 보는 바와 같이 20, 50, 80 및 100℃에서 10시간 물추출을 행하고 단위 시료 중량당 활성을 비교한 결과, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 활성이 큰 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 온도가 증가할수록 수율이 증가하는 경향을 나타내었으므로 이후의 실험은 100℃에서 실행하였다.

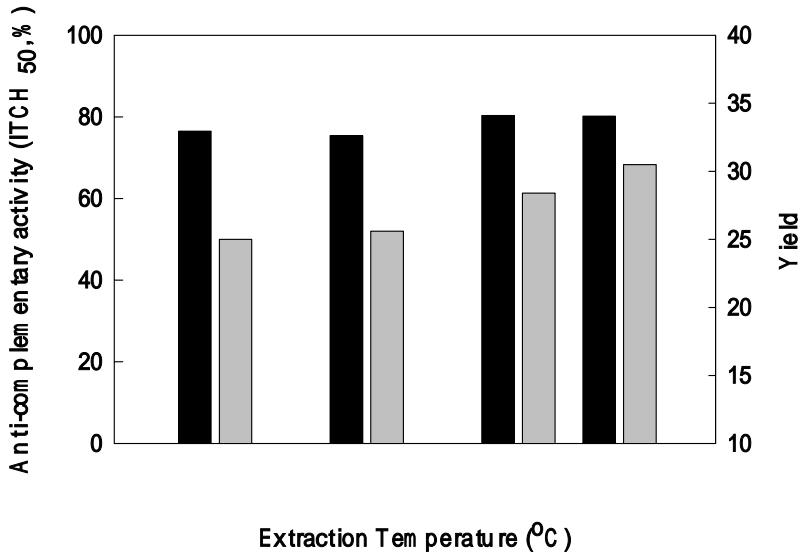


Fig. 3-5. Effect of extraction temperature on the activity and the yield of hot water extracts from ginseng leaves.

Fig. 3-6는 100°C에서 시간별로 추출을 행한 결과로써 추출시간에 따른 동일 농도에서의 활성의 변화는 거의 없었으나 추출 5시간 이후에는 수율이 급격히 감소하였다. 따라서 산업응용을 감안할 때 5시간 이상의 추출은 비경제적인 것으로 판단된다. 한편 동일 시료를 대상으로 100°C에서 5시간 추출을 10회 까지 재 반복하면서 각 추출물의 활성과 추출 효율을 검토한 결과는 Fig. 3-7 과 같다. 추출 횟수가 증가함에 따라 활성은 감소하였으며 특히 4회 이상의 추출시에는 활성의 큰 감소가 관찰되었으며 수율의 경우에는 추출 횟수를 거듭할수록 급격한 감소를 보였으므로 경제성을 고려, 3회 재반복 추출이 적당 하다고 판단하였다. 따라서 이상의 결과로 부터 열수 추출의 경우 100°C에서 5시간 처리하여 3회 연속추출할 경우 최대 활성 획득의 추출이 가능할 것으로

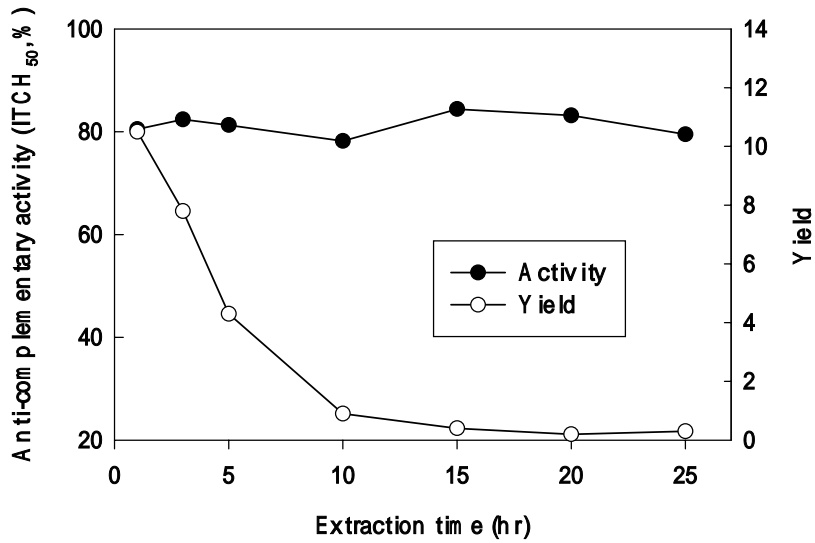


Fig. 3-6. Effect of extraction time on the activity and the yield of hot water extracts from ginseng leaves.

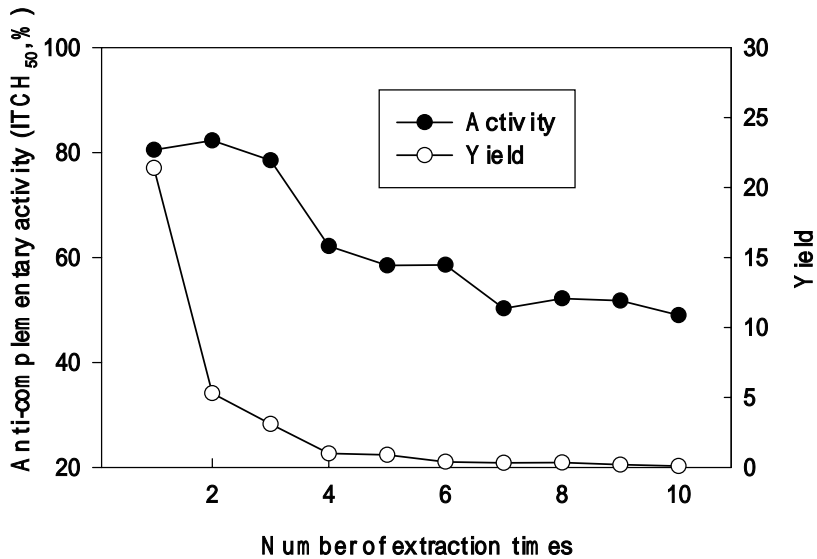


Fig. 3-7. Effect of number of extraction times on the activity and the yield of hot water extracts from ginseng leaves.

라. 인삼잎으로 부터 열수추출 고분자 획분의 조제 및 활성 측정

이상의 결과에서 인삼 엽부로부터 열수추출을 행할 경우, 높은 면역증강 활성 획분을 얻을 수 있으며, 이중에는 메탄올 가용획분이 비교적 높은 비율로 존재하고 이들은 활성이 거의 없음이 확인되었다. 그러나 메탄올이 인체에 높은 독성을 나타내므로 비슷한 극성을 소유한 ethanol로 대체시 활성물질의 효율적 획득이 가능하다고 판단되었다. 따라서 인삼잎을 직접 열수추출한 후, ethanol의 가용획분을 제거하고, 투석 및 동결건조를 행하여 열수추출 고분자 획분(GS-1)을 조제하여(Fig. 2-3) 항보체 활성능을 측정하였다.(Fig. 3-8) GS-1의 항보체 활성은 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 알려진 면역증강 β -glucan인 PSK 보다도 높은 89%의 활성을 나타냈으며, 강력한 항보체 다당인 CAP-0

보다도 높은 활성을 소유한 것으로 판단되었다. 또한 GS-1은 농도증가에 따라 활성이 증가하는 농도 의존적 경향을 보였다. 한편 GS-1의 화학조성을 살펴본 결과, 중성다당의 함량이 68.9%, 산성당 함량이 15.9% 그리고 단백질 함량이 8.7%로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

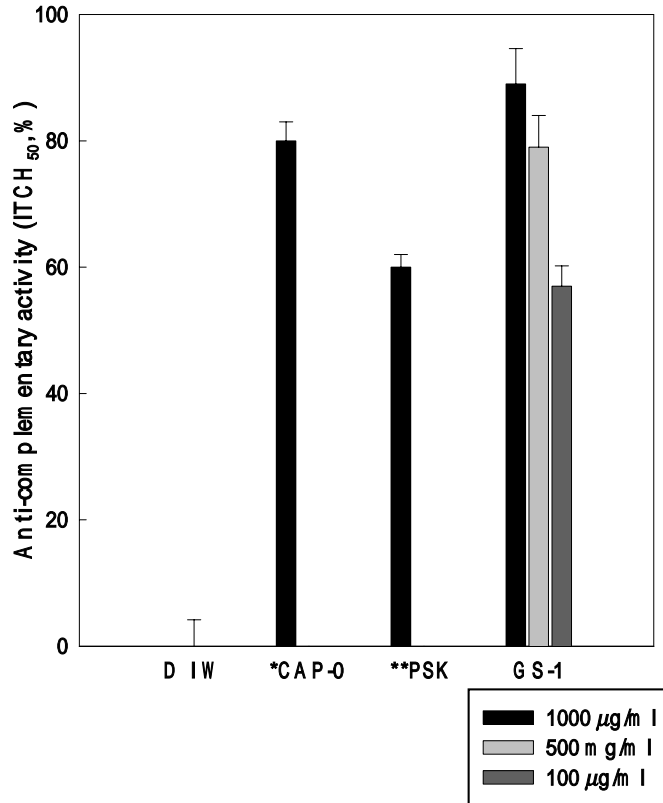


Fig. 3-8. Anti-complementary activity of the crude polysaccharide fraction, GS-1 from *Panax ginseng* C.A. Meyer.

* CAP-0 : anti-complement polysaccharide from the *Capsicum annum*

**PSK : immuno active polysaccharide from *Coliulus versicolor* (구름버섯)

제 2 항. 항보체 활성화물질의 본체 분석

가. 활성획분이 혈청 중 보체에 미치는 효과

GS-1획분이 정상인의 혈청 중에 존재하는 보체에 대하여 미치는 효과를 알아보기 위해 용혈현상에 의해 투명환을 형성하는 실험을 실시한 결과, GS-1을 첨가하지 않은 경우는 보체가 활성화가 일어나지 않아 투명환(clear zone)을 형성하였지만 농도별로 GS-1획분을 첨가한 경우는 농도에 반비례적으로 투명환이 감소하였다. 이것은 GS-1 획분의 첨가로서 보체의 활성화가 이미 완료됨에 기인하는 현상으로 본 획분이 보체계 활성화능을 보유하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3-9).

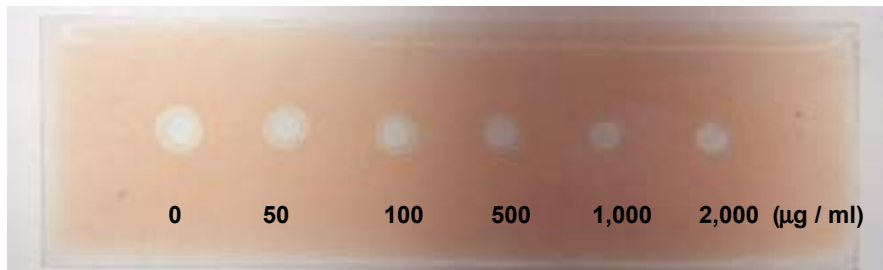


Fig. 3-9. Effect of the active polysaccharide fraction, GS-1 from ginseng leaves on complement in a normal human serum.

나. Cetavlon 처리에 의한 항보체 활성화 물질의 분획

GS-1은 산성당 및 단백질을 각각 15.9% 및 8.7% 함유하고 있어 본 획분안에는 산성도가 서로 다른 다양한 물질이 있을 것으로 판단되었으므로 양이온 계면 활성제인 Cetavlon을 처리하여 산성도에 따른 서로 다른 3개 획분 GS-2, GS-3 및 GS-4로 분획하였다. GS-2, GS-3 GS-4의 항보체 활성화는 Fig. 3-10

나타난 바와 같이 88.4%, 52.3% 및 85.6%로 GS-2와 GS-4는 유사한 활성을 보여 주었으며, 수울의 경우는 각각 8.0%, 16.7% 및 21.7%로 나타났다. 따라서 이중 활성과 수울에서 양호한 결과를 보였던 중성다당획분 GS-4를 대상으로 이후 실험을 진행하였다. 한편 GS-2, -3 및 -4의 화학 조성을 분석한 결과(Table. 3-5) 중성당, 산성당 및 단백질의 함량이 GS-2는 77.5%, 11.4%, 11.1% 이고, GS-3는 70.5%, 21.4%, 8.1% 이며 GS-4는 68.1%, 21.2%, 10.6%로 나타났다. 또한 GS-3와 -4에서는 3-deoxy-D-*manno*-2-octubsonic acic

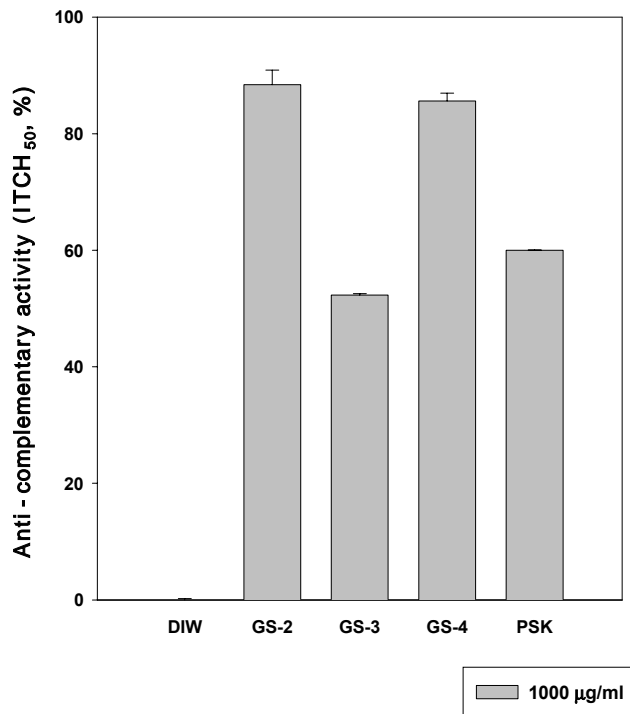


Fig. 3-10. Anti-complementary activities of subfractions obtained by Cetavlon treatment of GS-1.

DIW : negative control

PSK : positive control

(KDO)가 3.98%, 8.79% 함유되어 있었다. 이러한 특이당을 함유한 다당류는 상당히 드문 예로써 Albersheim 등이 무화과(*Acer pseudoplatanus*)(18) 및 벼(*oryzesativa*)(18)등의 액체 세포 배양액 추출한 rhamnogalacturonan II와 구조를 포함하고 있음을 시사하는 것이다.

Table 3-5. Anti-complementary activities and chemical properties of subfractions obtained by Cetavlon treatment of GS-1 (Unit : %)

	GS-2	GS-3	GS-4
Anti-complementary activity (ITCH ₅₀ , at 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	88.4	52.3	85.6
Yield	8.0	16.7	21.7
Chemical composition			
Neutral sugar	77.5	70.5	68.1
Uronic acid	11.4	21.4	21.2
Protein	1.1	8.1	10.6
KDO	-	3.98	8.79

다. GS-4 획분의 보체계 활성 본체의 검토

GS-4의 획분은 화학 조성 분석상 다당 성분 이외에 단백질 성분을 약 10.6% 함유하고 있었고 KDO 또한 8.79% 함유되어 있었다. 이러한 조성으로 판단할 때 시료중의 항보체 활성능이 다당부위에 기인하는 것인지, 그 외의 성분에 의한 것인지 확실히 구별할 수 없으므로 GS-4의 당 부위를 산화개열시키는 periodate처리와 단백질부위를 가수분해하는 protease처리 및 polyphenol류를 산화시키는 chlorite처리를 행한 후 활성을 비교하였다.(Fig. 3-11) 미처리 GS-4의 활성과 비교했을때 protease의 처리한 GS-4에서는 약

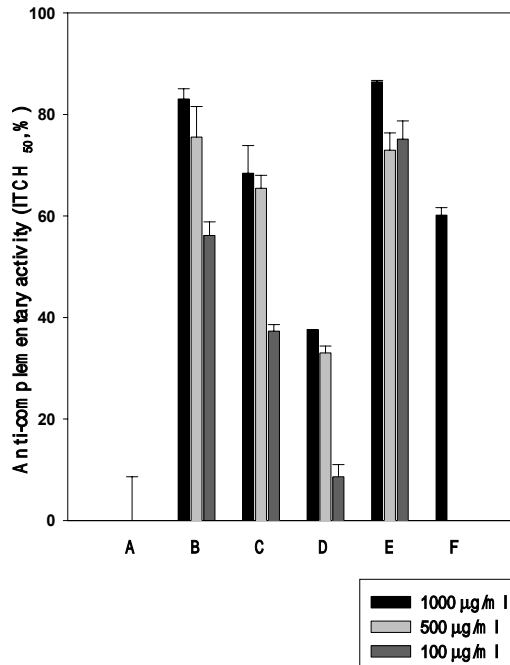


Fig. 3-11. Change in anti-complementary activity of GS-4 by treatment of protease, periodate, chlorite.

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| A : DIW | B : Native GS-4 |
| C : Protease treatment | D : Periodate oxidase |
| E : Chlorite treatment | F : PSK |

간의 활성 감소경향을 보인 반면, periodate 산화물에서는 급격한 활성의 감소가 나타났으며 chlorite 처리시에는 약간의 활성증가가 인정되었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 활성에 주요 기여하는 부위는 다당류 부분이며, 단백질은 약하게 활성에 기여할 가능성이 있음을 알 수 있었다. 한편 chlorite 처리로 활성이 다소 증가한 것은 polyphenol류의 분해에 의해 전체적으로 다당의 농도가 높아진 것으로 판단되었다.

또한 lipopolysaccharide (LPS)의 활성을 저해한다고 알려진 polymyxin B를 처리하여 미처리 GS-4와의 항보체 활성을 비교한 결과 Fig. 3-12에 나타난 바와 같이 활성의 저하는 거의 나타나지 않았다. 반면에 LPS에 polymyxin B 처리시에는 급격한 활성 감소를 보였는데 이러한 결과로 부터 GS-4의 항보체 활성은 LPS의 혼입에 의한 것이 아니며 LPS와는 다른 활성 기작을 소유하고 있음을 알 수 있었다.

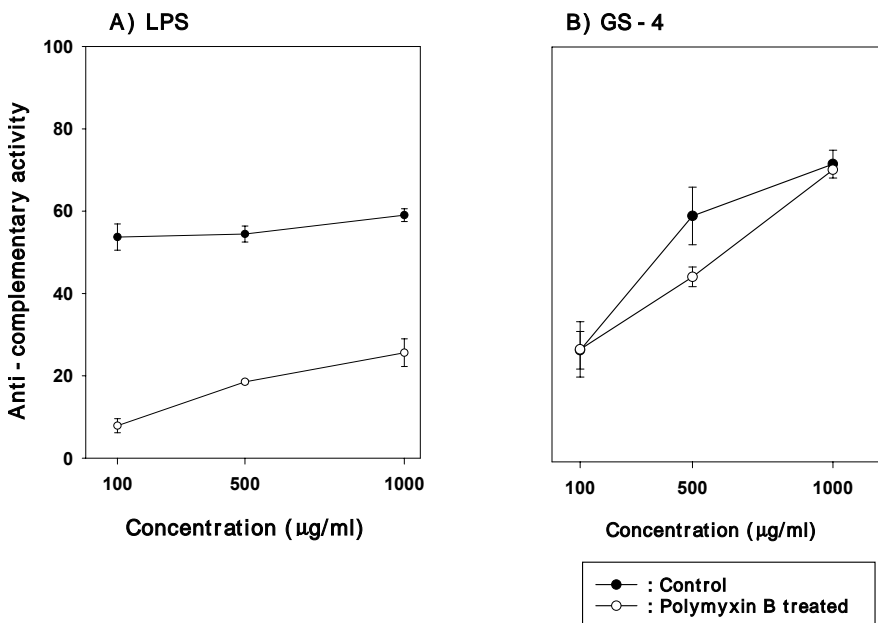


Fig. 3-12. Effect of polymyxin B on anti-complementary activity of GS-4.

제 3 항 보체계 활성화 다당의 분리 및 정제

가. Anion exchange chromatography

Cetavlon 처리에 의해 활성과 수율이 높은 GS-4를 DEAE-Sephrose FF(Cl⁻ form)로 anion exchange chromatography를 시행한 결과, 1개의 흡착 획분(GS-4a)과 8개의 비흡착 획분(GS-4b~4i)을 얻을 수 있었다.(Fig. 3-13) 이들의 chromatogram을 조사한 결과 이온강도가 높은 용매로 용출할수록 단백질 또는 색소물질(갈색)이 다량으로 용출되어 나오는 특성을 보여 주었다. 이들의 chromatogram을 조사한 결과 이온강도가 높은 용매로 용출할수록 단

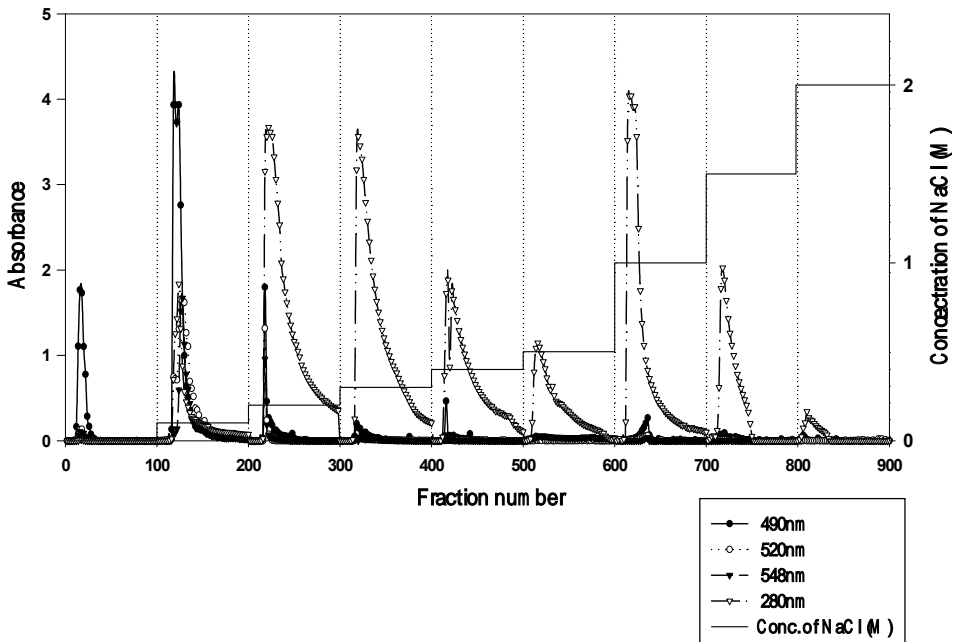


Fig. 3-13. Anion-exchange chromatography of GS-4 on the column of DEAE-Sephrose FF (Cl⁻ form)

The column (3.3 × 27 cm) was elute with DIW until sugar was no longer detected and then elute stepwise elevated 0.1 M ~ 2.0 M NaCl solution.

백질 또는 색소물질(갈색)이 다량으로 용출되어 나오는 특성을 보여 주었다.

이들의 항보체 활성을 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 검토한 결과, NaCl의 농도가 낮은 0 M, 0.1 M, 0.2 M의 용출부분인 GS-4a, GS-4b 및 GS-4c가 ITCH50 값 85%이상의 고도의 활성을 나타냈으며 나머지 획분에서는 상대적으로 낮은 수치를 보여 주었다.(Fig. 3-14) 또한 이들의 화학적 조성은 Table 3-6에 표시

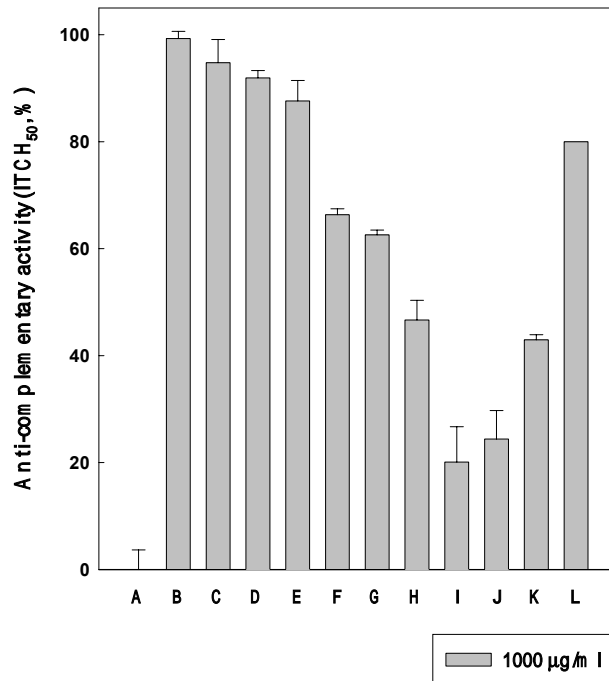


Fig. 3-14. Anti-complementary activities of GS-4 subfractions obtained by anion exchange chromatography

A : DIW	B : GS-4a	C : GS-4b	D : GS-4c
E : GS-4d	F : GS-4e	G : GS-4f	H : GS-4g
I : GS-4h	J : GS-4i	K : PSK	

된 바와 같은 조성을 보였다. 이온교환 chromatogram 분석 시 단백질로 분석되었던 물질은 본 실험 결과 각 획분에서 단백질 함량이 미미한 것으로 나타남으로써 실제로는 갈색색소물질이 상당량 함유되어 있고 이들이 자외영역에서 검출되었던 때문임을 추론할 수 있었다. 이상의 결과에 의하여, GS-4a, GS-4b 및 GS-4c 획분을 대상으로 지속적인 정제 과정을 수행하였다.

Table 3-6. Chemical compositions of GS-4 subfractions

Fraction	Neutral sugar (%)	Uronic acid (%)	Protein (%)	KDO-like material (%)
GS-4a	73.5	9.2	0.02	17.3
GS-4b	75.6	16.6	0.01	7.8
GS-4c	74.9	25.1	0.02	0.0
GS-4d	67.7	30.3	0.02	0.0
GS-4e	66.8	26.3	0.02	6.9
GS-4f	67.9	32.1	0.01	0.0
GS-4g	61.1	38.9	0.00	0.0
GS-4h	63.1	36.9	0.00	0.0
GS-4i	50.0	49.9	0.03	0.0

나. Gel permeation chromatography

상기 정제과정에서 높은 활성을 보였던 GS-4a, GS-4b 및 GS-4c는 HPLC에 의해 대략적인 분자량을 검측한 뒤, Biogel P-30을 이용하여 gel permeation chromatography를 행하였다. GS-4a의 경우는 GS-4a-I, GS-4a-II, GS-4a-III의 획분을, GS-4b의 경우는 GS-4b-I, GS-4b-II, -4b-III의 3

개 획분으로(Fig. 3-15) GS-4c의 경우는 GS-4c-I~GS-4c-VI의 6개의 획분을 얻을 수 있었다.(data는 제시하지 않았음) 이들을 대상으로 항보체 활성화 수율을 검토한 결과, 모두 양호한 결과(Fig. 3-16)를 보였던 4개의 획분 GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-I 및 GS-4c-II를 선별할 수 있었으며, 이중 정제가 완료되지 않은(HPLC로 확인) GS-4c-I과 GS-4c-II의 경우는 각각의 분자

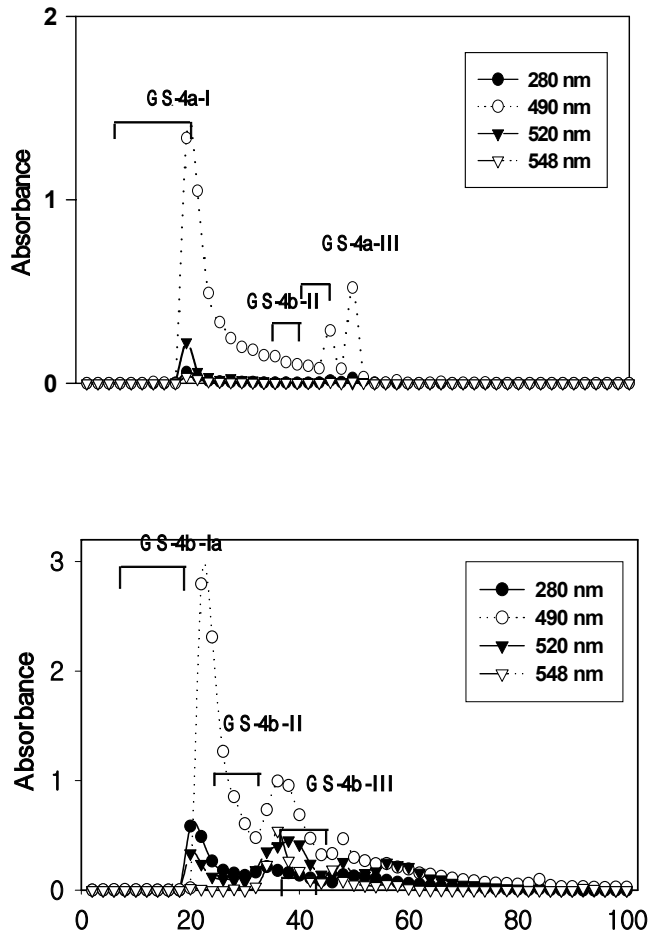


Fig. 3-15. Gel permeation chromatographs of GS-4a and GS-4b on the column of Biogel P-30.

The column (1.25 × 89 cm) was eluted with 0.05 M acetate buffer (pH 5.2)

량에 맞는 resin을 이용해 2차 gel permeation chromatography를 시행했다.(Fig. 3-17)

그 결과 GS-4c-I의 경우는 Biogel P-100을 이용하여 GS-4c-Ia, -4c-Ib, -4c-Ic로 분리되었고, GS-4c-II의 경우는 Biogel P-30에 의해 GS-4c-IIa와 -4c-IIb로 분리되었다. 상기 과정에서 얻어진 획분들의 항보체 활성은 Fig. 3-18에 나타난 바와 같으며, 따라서 이상의 결과를 종합하여 활성과 수율이 우수한 정제획분 GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia 및 GS-4c-IIb를 최종 선택할 수 있었다. 이들 고효율 정제획분 GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia 및

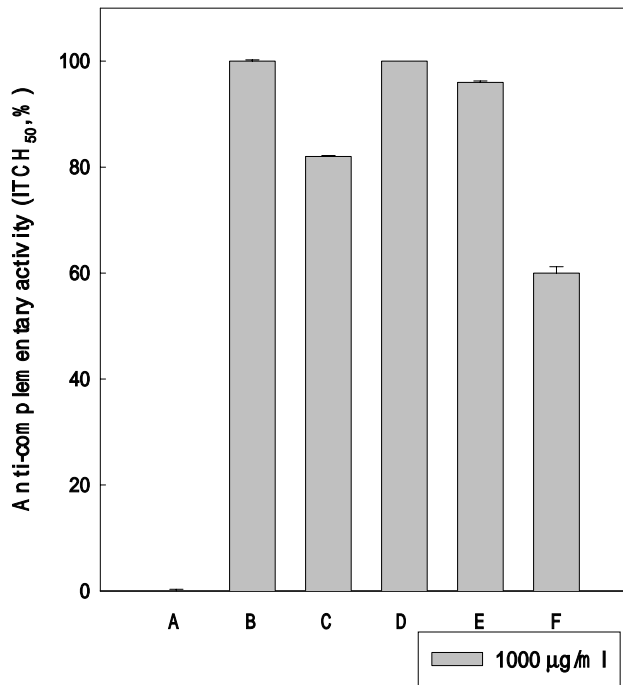


Fig. 3-16. Anti-complementary activities of GS-4a, Gs-4b and and GS-4c subfractions obtained by gel permeation chromatography.

A : DIW B : GS-4a-I C : GS-4b-I
 D : GS-4c-Ia E : GS-4c-IIb F : PSK

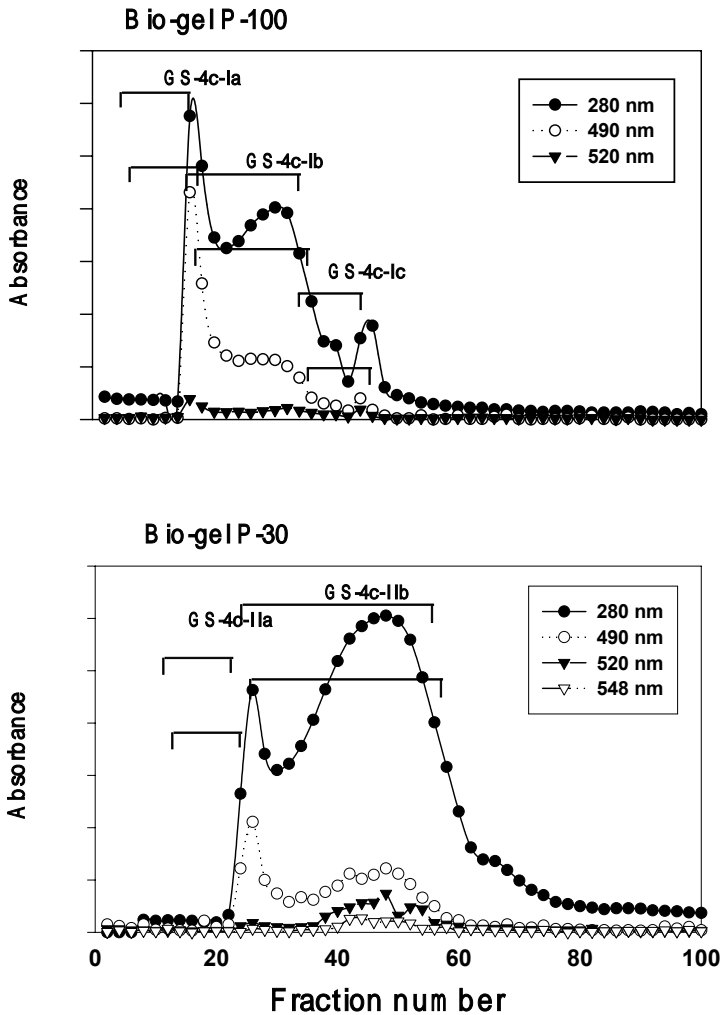


Fig. 3-17. Gel permeation chromatographs of GS-4c-I and GS-4c-II on column of Biogel P-100 and Biogel P-30.

The columns(GS-4c-I : 0.88×69 and GS-4c-II : 0.88×75) were elute with 0.05 M acetate buffer (pH 5.2)

GS-4c-IIb에 대한 화학 조성을 분석한 결과, 중성당 함량이 55.4~65.2%, 산성당 함량이 30.3~39.2%이고 단백질은 검출되지 않았다. 단백질이 검출되지 않은 것은 GPC 정제 과정 중 당의 분자량에 합당한 resin을 선택했기 때문

에 정제과정 중 제거된 것으로 추측된다. 구성당 분석을 한 결과 이들은 주로 arabinose(13.6~22.5%)와 galactose(15.3~34.8%)가 높은 비율로 함유되어 있었으며 그외 rhamnose, fucose, xylose, mannose 및 glucose등이 소량씩 함유되어 있음을 알 수 있었다.(Table. 3-7) 이를 구성당 조성으로 판단할 때 인삼잎 중 항보체 활성 다당류는 arabinogalactan 단위를 많이 소유한 pectic polysaccharide 계열로 사료되었으며 앞으로 상세한 구조연구가 필요할 것으로 판단되었다.

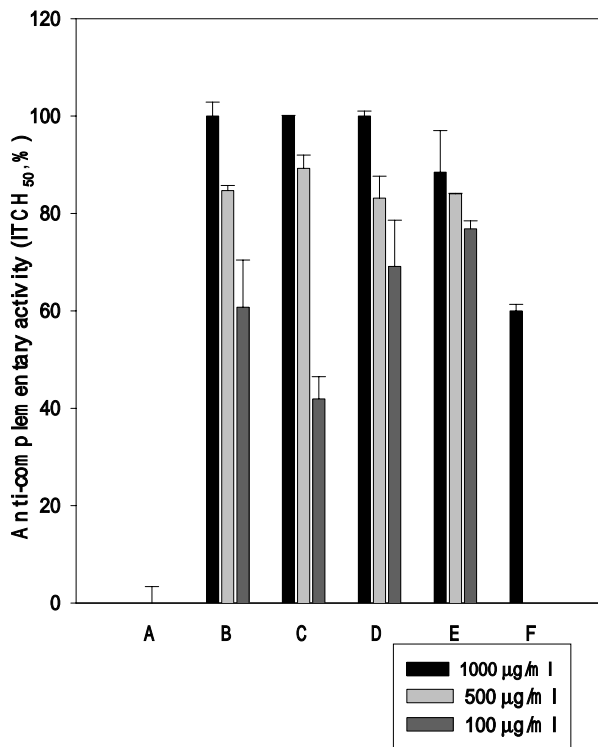


Fig. 3-18. Anti-complementary activity of GS-4cI and GS-4cII subfractions obtained by gel permeation chromatography.

A : DIW B : GS-4c-Ia C : GS-4c-Ib
D : GS-4c-Ic E : GS-4c-IIa F : GS-4c-IIb

Table 3-7. Chemical properties of the purified anti-complementary polysaccharide, GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia and GS-4c-IIb

(%)

Chemical composition	GS-4a-I	GS-4b-I	GS-4c-Ia	GS-4c-IIb
Molecular weight (Da)	14,400	31,000	81,000	71,000
Neutral sugar	60.82	65.26	55.46	62.22
Uronic acid	36.29	30.28	39.17	35.18
Protein	0	0	0	0
KDO	2.89	4.47	5.37	2.59
Component sugar				(mol %)
Rhamnose	1.0	3.23	4.0	14.1
Fucose	0.31	0.32	0.58	2.43
Arabinose	22.47	19.47	14.28	13.63
Xylose	0.35	0.45	0.77	1.39
Mannose	4.66	5.19	0.75	6.88
Glucose	1.30	1.82	4.18	8.47
Galactose	30.74	34.77	25.91	15.33
Glucuronic acid +Galacturonic acid	36.29	30.28	39.17	35.18

다. 정제 다당의 순도 및 분자량 확인

정제된 GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia 및 GS-4c-IIb의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 분자량 분석범위가 상이한 Asahipak GS-520, GS-320과 GS-220 column을 차례로 연결하여 HPLC를 수행하였다. 4종의 정제 다당획

분은 모두 단일 peak를 나타냈으며(Fig. 3-19) 이들의 분자량을 측정하기 위하여 표준 물질로서 pullulan series를 사용하여 표준곡선을 작성하고(Fig. 3-20) 분자량을 추정한 결과, GS-4a-I은 14,400 Da, GS-4b-I은 31,000 Da, GS-4c-Ia는 81,000 Da, GS-4c-IIb는 71,000 Da의 분자량 가진(Table 3-7참조) 다당체임을 알 수 있었다. 본 결과를 미루어 볼 때 인삼잎의 항보체 다당의 경우 Yanahira와 Otani등(53)의 주장대로 다당의 분자량과 활성간에는 뚜렷한 유의성이 없는 것으로 판단된다.

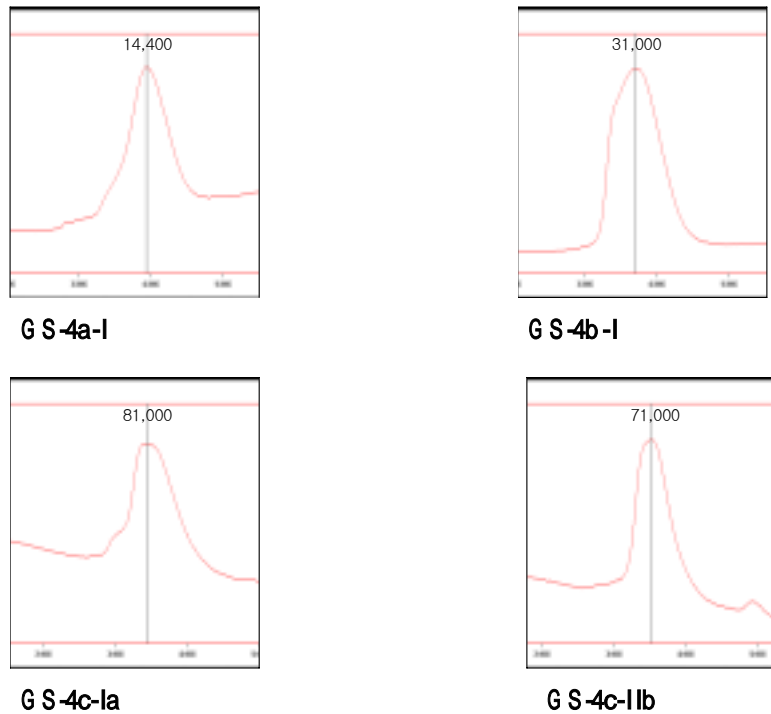


Fig. 3-19. HPLC chromatographs of the anti-complementary polysaccharides, GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia and GS-4c-IIb

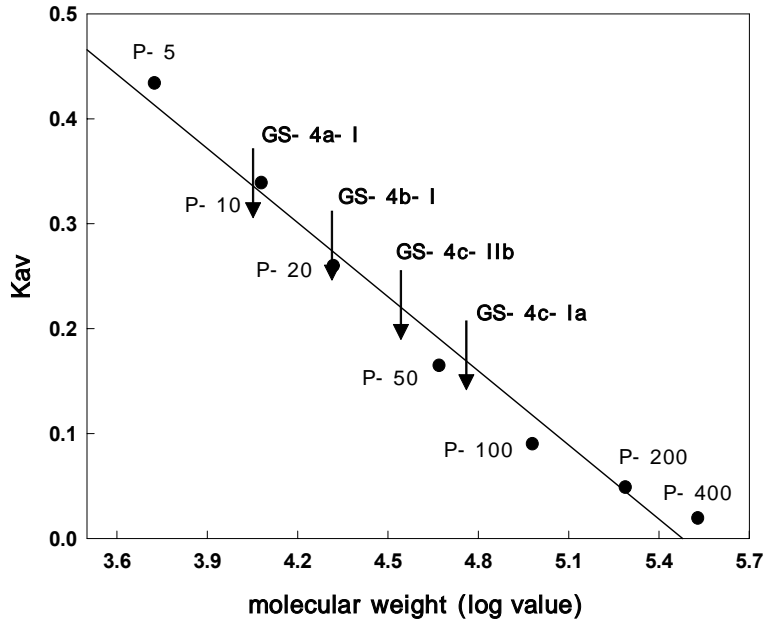


Fig. 3-20. Standard curve for molecular weight determination of the purified polysaccharides.

$$[K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)]$$

제 4 항 보체계 활성화 다당의 작용 양식

가. GS-4 획득의 보체계 활성화 작용 양식

보체계의 활성화 경로는 크게 classical pathway와 alternative pathway로 구성되어 있는데(Fig. 3-1), classical pathway의 활성화에는 Ca^{++} 및 Mg^{++} 이온이, alternative pathway에는 Mg^{++} 이온만이 선택적으로 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.(35) 따라서 GS-4의 각 획득을 대상으로 이 두 경로 중 어느 경로를 통하여 보체계를 활성화시키는지를 알아보기 위해 GVB^{++} 기본 반응계와 2가 금속이온을 모두 제거한 $EDTA-GVB^-$ 반응계 및 Ca^{++} 이온을 선택적으로 제

거한 Mg^{++} -EGTA-GVB $^{-}$ 반응계로 나누어 항보체 활성(ITCH $_{50}$, %)을 측정하였다. Fig. 3-21과 Fig. 3-22에 표시한 바와 같이 인삼잎으로부터 정제한 활성다당들은 모두 기본반응계인 GVB $^{++}$ 에서는 높은 활성을 보인 반면 2가 금속 이온을 모두 제거한 EGTA-GVB $^{-}$ 반응계에서는 대조구에 비하여 완전한 활성의 감소를 나타냈다. 그러나 Mg^{++} -EGTA-GVB $^{-}$ 반응계에서는 정제다당의 종류에 따라 약산의 차이는 있으나 GVB $^{++}$ 에 비해 약 20~40%의 활성을 보였다. 이러한 사실은 인삼잎에서 정제한 항보체 활성다당이 보체계의 classical pathway와 alternative pathway를 모두 활성화 시킬수 있음을 나타내는 것이다.

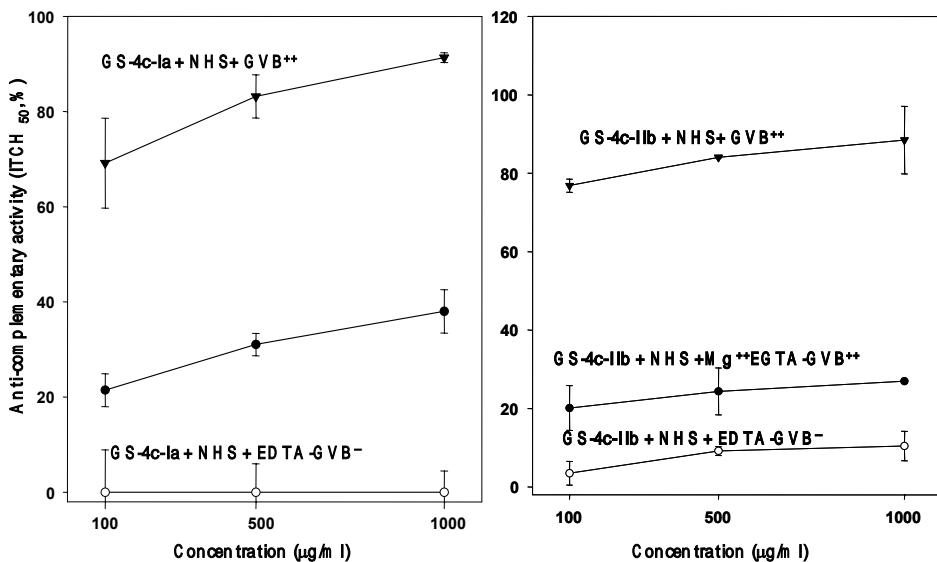


Fig. 3-21. Effect of Ca^{++} and Mg^{++} ions on the anti-complementary activities of GS-4c-Ia and GS-4c-IIb from *Panax ginseng* C.A. Meyer.

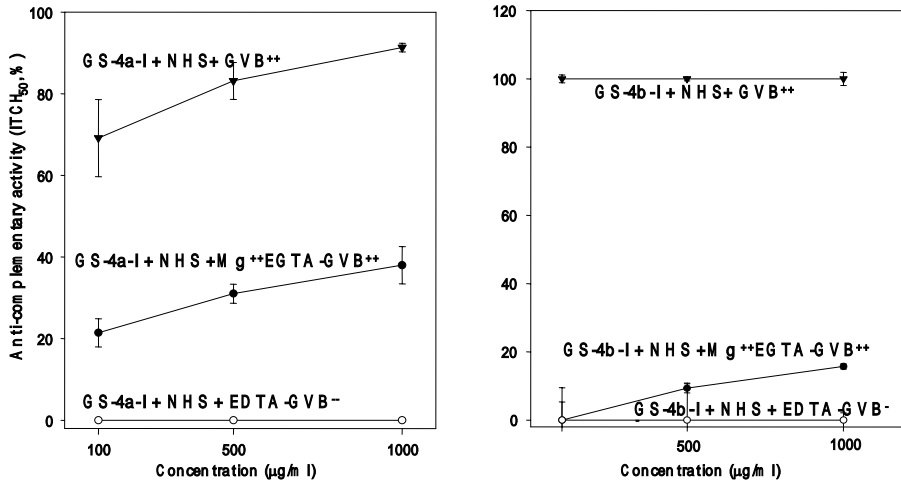


Fig. 3-22. Effect of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ ions on the anti-complementary activity of GS-4a-I and GS-4b-I from *Panax ginseng* C.A. Meyer.

나. 교차 면역전기영동에 의한 C3 분해 산물의 동정

정상인의 혈청을 활성성분과 반응시켰을 때 보체물질의 저해 정도를 항보체활성(anti-complementary activity)이라 하며, 항보체 활성은 1차 반응 단계(preincubation)에서 시료에 의해 보체 활성화에 따른 보체 성분의 소모(activation)와 활성 저해에 의한 보체 성분의 소모(inhibition)를 모두 포함할 수 있다. 그러므로 총보체 용혈법(ITCH₅₀)으로 측정된 항보체 활성은 보체계(complement system)의 활성화 및 저해를 모두 나타내는 것이다.

따라서 인삼잎에서 정제한 활성다당 각획분의 항보체 활성이 활성화에 의한 것인지 저해에 의한 것인지 알아보기 위하여 보체계 활성화의 가장 중요한 성분으로 알려진 C3의 활성화 여부를 교차 면역전기영동을 통하여 검토하였다. 활성다당들에 의해 보체계가 활성화되면 C3가 C3a와 C3b로 분해되므로 GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia 및 GS-4c-IIb를 각각 정상인의 혈청(NHS)을

반응시킨 후 anti-human C3를 이용하여 교차 면역전기영동을 행하여 C3의 분해 산물을 동정하였다.

Fig. 3-23와 24의 (A)항목에 나타난 바와 같이 각 활성화다당들은 GVB^{++} 기본 반응계에서 혈청중의 보체와 반응시킨 후, 활성화다당에 의한 보체성분 C3의 활성화가 진행되며 2개의 침강선이 형성됨을 관찰할 수 있었다.

교차 면역전기영동의 결과에서 well로부터 첫 번째 침강선이 C3를, 두 번째 침강선이 활성화된 C3a 및 C3b의 존재임을 고려할 때 활성화가 진행되지 않은 (B)항목(EDTA-GVB--, 2가 금속이온 제거군)과 분명한 차이를 보였다. 따라서 인삼잎에서 정제한 활성화다당 획분들은 모두 보체계의 활성화에 직접 공헌함을 알 수 있었다. 한편 Ca^{++} ion 만을 선택적으로 제거하여 alternative pathway만이 작용하도록 고안한 Mg^{++} -EGTA-GVB⁻반응계[Fig. 3-23 및 24의 (C)]에서는 C3활성화에 의해 2개의 침강선이 관찰되었지만 활성화된 C3a와 C3b에 기인한 2번째 침강선이 기본반응계에 비해 상대적으로 작게 나타나 활성화다당에 의한 보체계의 활성화에 alternative pathway가 일부분 관여함을 확인할 수 있었다.

다. Alternative pathway를 경유한 보체계의 활성화

총보체 용혈법(ITCH₅₀)으로 측정된 항보체 활성은 classical 과 alternative pathway 모두를 경유한 활성화로 정확히 alternative pathway에 의한 활성이 어느 정도인가를 평가하기 위해 감작화하지 않은 토끼 적혈구를 이용, 활성을 측정하였다. Fig. 3-25에 나타난 바와 같이 인삼잎에서 정제한 항보체 다당 GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia 및 GS-4c-IIb는 최대농도에서 30-40% 정도의 IACH50 수치를 보였으며 농도 의존적인 경향을 보였다. 이러한 사실은 인삼잎 활성 다당들이 보체계의 어느 한 경로가 아니라 classical pathway와 alternative pathway 모두를 경유하여 강력한 항보체 활성을 보임을 재차 확인할 수 있었다.

GS-4a-I



(A)

(B)

(C)

GS-4b-I



(A)

(B)

(C)

Fig. 3-23. Cross-immunoelectrophoretic patterns of C_3 converted by GS-4b-I and GS-4b-I in the presence or absence of Ca^{++} ion.

(A) : In GVB^{++} (Ca^{++} and Mg^{++})

(B) : In $EDTA-GVB^{--}$ (divalent metal ion free)

(C) : In $Mg^{++}-EGTA-GVB^{--}$ (Mg^{++} only)

GS-4c-Ia



(A)

(B)

(C)

GS-4c-IIb



(A)

(B)

(C)

Fig. 3-24. Cross-immunoelectrophoretic patterns of C_3 converted by GS-4c-Ia and GS-4c-IIb in the presence or absence of Ca^{++} ion.

(A) : In GVB^{++} (Ca^{++} and Mg^{++})

(B) : In $EDTA-GVB^{--}$ (divalent metal ion free)

(C) : In $Mg^{++}-EGTA-GVB^{--}$ (Mg^{++} only)

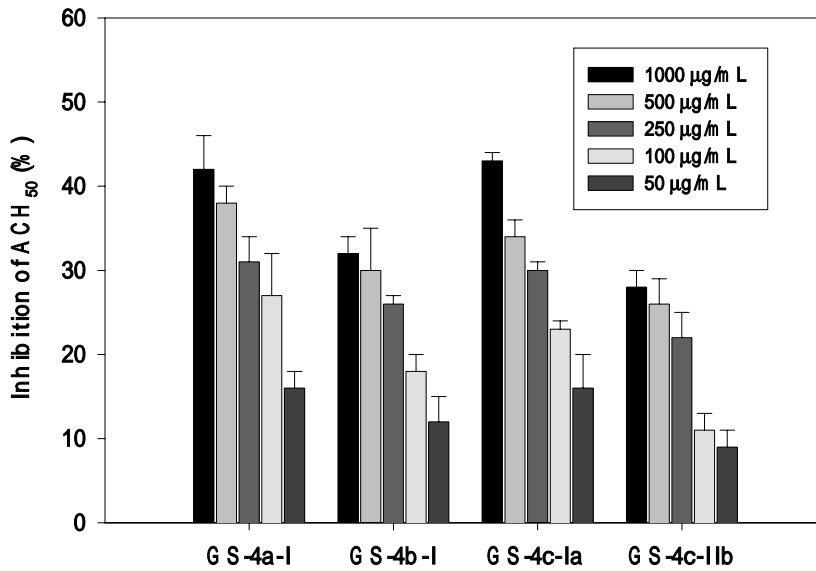


Fig. 3-25. Anti-complementary activity of the purified polysaccharides from *Panax ginseng* C.A. Meyer via alternative pathway

Data are presented as mean±SD.

제 5 항 보체계 활성화 다당의 구조 특성

가. 보체계 활성화 다당의 일반 구조 특성

실험 결과 제 3항에서 언급한 바와 같이 항보체 활성 정제획분 GS-4a-I, GS-4b-I, GS-4c-Ia 및 GS-4c-IIb는 구조분석을 위한 예비실험으로 분자량을 추정한 결과, GS-4a-I은 14,400 Da, GS-4b-I은 31,000 Da, GS-4c-Ia는 81,000 Da, GS-4c-IIb는 71,000 Da의 분자량 가진 단백질을 함유하지 않은 다당체임을 알 수 있었다. 또한 이들의 화학 조성 결과로부터 uronic acid를 약

30-40% 함유한 pectic polysaccharide임을 알수 있었으며 Yanahira와 Otani 등의 주장대로 다당의 분자량과 활성간에는 뚜렷한 유의성이 없는 것으로 판단된다. 한편 구성당 조성의 실험 결과는 이들 활성 획분은 특히 arabinose와 galactose가 높은 비율로 함유되어 있으므로 arabinogalactan으로 존재할 가능성이 시사되었다. 따라서 β -Glucosyl Yariv antigen을 이용 반응성 실험을 행하였다. β -Glucosyl Yariv antigen은 arabinogalactan 중의 arabino-3,6-galactan과 특이적으로 반응하여 침전을 형성하는 것으로 알려져 있는 바 이들과의 반응성을 나타낼 경우 적어도 전체 구조안에 주쇄가 3-linked Gal로 구성되고 C6위치에서 분지쇄를 갖는 arabinogalactan을 함유하고 있음을 알 수 있다. 이를 정제 획분들과 single radial gel diffusion을 행한 결과, 각 다당들은 전혀 halo를 형성하지 않음으로써(자료는 제시하지 않았음) arabino-3,6-galactan 구조를 소유하지 않음을 알 수 있었다.

Clarke는 자연계에 존재하는 arabinogalactan을 크게 3개 group로 분류한 바 있는데 type I은 arabino-4-galactan, type II는 arabino-3,6-galactan, type III는 arabinogalactan side chain을 가진 다당체로 보고한 바 있다. 활성 다당들이 β -glucosyl-Yariv antigen과 반응성을 나타내지 않았다는 사실은 이들이 type II의 arabinogalactan은 아님을 알 수 있다.

나. 보체계 활성화 다당의 결합양식

항보체 활성 정제다당 중 GS-4a-I와 GS-4b-I는, 활성과 수율 면에서 모두 양호한 활성다당으로 판단되었으므로 구조분석의 일환으로 methylation에 의한 결합양식의 해석을 행하였다. Methylation법은 전체 다당을 DMSO에 녹인 후, 결합에 참여하지 않은 OH group을 methyl화 시키고, 가수분해하고 환원한 후, 결합에 참여한 나머지 OH group을 acetylation하여 유도체화한 후, GC-MS로 분석하였다. Table 3-8에 보는 바 와 같이 GS-4a-I는 arabinose 결합 및 galactose 결합이 많았으며 terminal-Ara, 4-linked 및 5-linked Ara 잔기와 4-linked Gal, 6-linked Gal 및 4,6-branched Gal 잔기가 우세하였다.

이러한 사실은 본 다당이 arabino-4-galactan으로 존재할 가능성을 강력히 시사하였으며, terminal 잔기가 많은 결과로부터 본 다당이 고도로 분지된 다당으로 존재함을 알 수 있었다. 한편 GS-4b-I의 경우도 GS-4a-I와 유사한 결과를 보였으며 특히 4-linked 및 5-linked Ara 잔기에 terminal Ara가 붙어 있는 고도의 분지다당으로 존재할 가능성을 시사하였다. 이러한 결과는 Clarke가 분류한 type I arabino-4-galactan으로 분류될 수 있으나, 구성당분석에서 높은 galacturonic acid 함량으로 미루어 type I arabinogalactan을 분지쇄로 갖는 다당체 즉 type-III의 arabinogalactan임을 알 수 있었다. (Fig. 3-26 참조)

Table 3-8. Methylation analysis of GS-4a-I and GS-4b-I from ginseng leaves

Glycosyl residue	Deduced glycosidic linkage	GS-4a-I	GS-4b-I
Ara	terminal(f)	18.01	27.49
	4 or 5	37.34	28.21
Xyl	terminal(p)	2.17	2.92
Rha	terminal(p)	6.44	5.75
	2,4 or 2,5		1.36
Man	3	3.76	6.96
Gal	terminal	4.47	8.24
	4	5.00	5.94
	6	14.28	7.61
	4,6	2.05	1.52
Glc	terminal(f)	5.60	3.13
	terminal	0.88	0.87
	3	0.28	

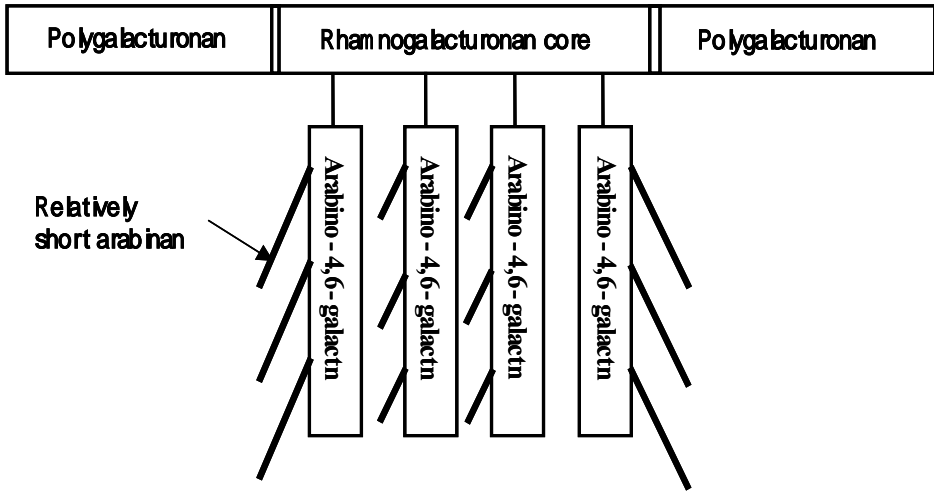


Fig. 3-26. A proposed common structure of GS-4a-I and GS-4b-I.

제 6 항 보체계 활성화능의 in vivo 실험

가. 활성 다당의 in vivo 투여가 체내 complement 활성화에 미치는 영향

활성 다당의 in vivo 보체계 활성화능은 직접 산입화가 가능하다고 판단되는 GS-1 다당획분을 대상으로 실시하였다. GS-1은 생리식염수에 용해시킨 후, 각각 50 mg/kg과 25 mg/kg, 0 mg/kg씩 각각 복강내에 주사하고, 시료 투여 후 각각 2, 4, 8, 12, 24시간 제에 채혈하여 혈청을 대상으로 총보체 용혈(50% total complement hemolysis, TCH₅₀, %)을 측정하였다. Fig. 3-27에 나타난 바와 같이 고농도(50 mg/kg) 투여군에서는 무투여 대조군에 비하여 보체계의 급격한 감소가 관찰되었다. 보체가는 초기 급격한 감소를 보이다가, 투여 4시간 이후를 경계로 회복되는 양상을 보여주었다. 대조군의 경우는 절대 값으로 비교할 때 보체가의 감소가 있는 것으로 인정 되었지만 이는 오차 범

위내로 판단되었다. 한편 저농도(25 mg/kg) 투여군에서도 비슷한 양상을 보였으며, 초기 급격한 감소를 보이다가 회복되는 특성은 고농도 투여군과 유사하였다. 이러한 결과는 보체의 활성화에 의한 것으로 이들 활성 다당 획득이 체내 보체계를 직접 활성화 할 수 있음을 시사하는 것이다. 특히 보체계가 활성화 되면 면역계 전반의 활성화도 유도한다고 보고되어 있으므로 상기 결과는 큰 의미가 있다고 사료된다.

나. Complement C3-positive 형광세포의 유도에 미치는 GS-1의 효과

GS-1이 복강 내 투여가 C3-positive 형광세포의 유도에 미치는 영향을 검

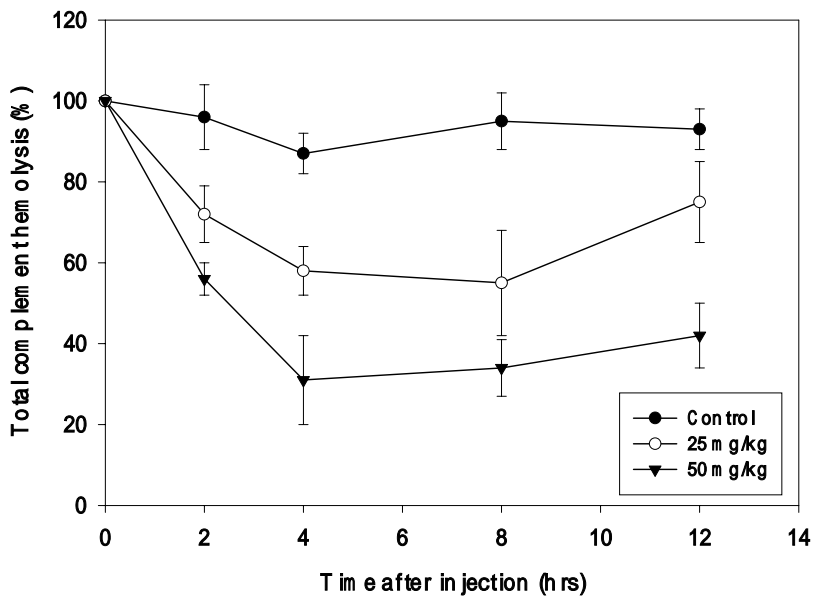


Fig. 3-27. Effect of GS-1 on complement in vivo.

GS-1 or saline was injected i.p. into guinea pigs and blood for complement assay was drawn from orbital sinus. Each value represents the mean of three animals.

토하기 위하여 5주령의 ICR mouse에 Sarcoma-180을 복강에 이식하고, GS-1을 20 mg/ml 및 10 mg/mL 씩 1일 1회 3일간 투여하여, 복강 내 macrophage 중 C3-positive 형광세포의 변화를 측정하였다. Table 3-9에 제시된 바와 같이 GS-1 최초 투여 5일 후, 회수된 macrophage 중 complement C3의 분해산물이 결합되어 있어 C3-positive한 형광성 세포는 무투여 대조군이 6.2%인데 반하여 10 mg/kg 투여군에서는 38.4%, 20 mg 투여군에서는 59.0%를 나타냄으로써 급격한 증가를 보였으며 이들은 유의적인 차이($p < 0.05$)를 나타냈다. 이러한 결과는 GS-1이 complement를 활성화하여 생성된 부산물(C3b)에 의해 macrophage를 활성화할 수 있으며, 특히 활성화된 macrophage에 의해 항암활성까지도 기대할 수 있음을 시사하는 내용으로 흥미로운 결과라 하겠다.

Mouse 복강 내 macrophage의 세포표면에는 complement C3의 분해산물과 특이적으로 반응하는 C3b receptor가 존재하고, 이들의 결합이 이루어질 경우 macrophage는 표적세포의 인식이 가능해 진다고 알려져 있다. 따라서 C3의 활성화 산물인 C3b는 C3b receptor를 경유하여 면역응답에 중요한 역할을 할 수 있다고 보고되어 있다. GS-1의 복강내 투여는 C3의 활성화를 유도하여 그 결과 C3-positive 형광 세포의 증가를 유도한 것으로 판단된다. 한편 버섯유래의 다양한 항암 활성다당(β -glucan)들이 경우, 탐식능의 증가와 함께 macrophage에 C3 분해산물이 결합한다는 기존의 보고로 미루어 아마도 GS-1이 숙주 방어기능을 증강시켜 종양에도 유효한 저해효과를 가질 가능성이 높다고 판단된다. 이들에 관한 실험은 지속적인 연구가 이루어져야 한다고 판단된다.

제 7 항 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안

Table 3-10과 같이 경질캡슐제를 제작하였다. GS-1 함유 기능성 경질캡슐에 대한 보관시 일반세균 및 대장균의 증식정도를 확인한 결과(Table 3-11)

유통시 미생물에 의한 변질의 우려는 없는 것으로 나타났다.

Table 3-9. Effect of GS-1 on the third component of complement (C3)-positive fluorescent cells in mice

Experimental group	Percentage of C3-positive fluorescent cell (%)
Control	6.2±2.1
GS-1 10 mg/kg	38.4±6.2 ^a
20 mg/kg	59.0±12.1 ^a

ICR Female mice were injected i.p. with GS-1 for 3 days. After 3days, peritoneal macrophages were obtained from the mice. The percentage of C3-positive fluorescent cells were calculated among 200 cells. Each value represent mean±SD. ^aP<0.05, significantly different from control group.

Table 3-10. GS-1 함유 기능성 경질캡슐의 배합예

<p>단위: 1캡(250 mg) 제품유형: 건강보조식품(경질캡슐제)</p> <p>성분:</p> <ul style="list-style-type: none"> · 인삼잎 다당체(GS-1) : 100 mg · 옥수수 전분(부형제) : 40 mg · 유당(부형제) : 100 mg · 구연산(산미제) : 10 mg <p>권장섭취량 및 섭취방법</p> <ul style="list-style-type: none"> · 1일 3회, 1회 1-2 캡셀씩 식전 또는 식후에 섭취 · 필요에 따라 증감 가능
--

Table 3-11. 제품의 미생물검사

	세균	진균	대장균	황색포도상구균
37℃, 1개월	1×10 ² 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출
50℃, 1주일	1×10 ² 개 이하	1×10 ² 개 이하	불검출	불검출

REFERENCES

1. 강경진 : 미숙 과실의 보체계 활성화능 검토 및 화학적 특성. 석사 학위 논문, 경기대학교. (1999)
2. 강삼식 : 트리테르페노이드 사포닌. 서울대학교 출판부 (1996)
3. 고병희 : 월간 한국 인삼. 62 (1984)
4. 권미향, 성하진 : 보체계 활성화 다당에 의한 면역기능 조절. 식품과학과 산업. 30: 30 (1997)
5. 권미향, 안현정, 신광순, 나경수, 성하진, 양한철 : 계지(桂枝) 열수추출물로 부터 보체계 활성화 다당의 정제. 한국식품과학회지. 29: 1 (1997)
6. 김난옥, 최강주, 조영현, 홍순근 : 인삼 연구 논문집. 251 (1980)
7. 木寸田勇. 인삼 연구. 2: 55
8. 山本昌弘. 인삼 연구. 1: 33
9. 신광순 : 식품소재 중의 면역 조절물질 및 활성 측정 방법. 한국 과학회 Workshop 26 (2001)
10. 심상용 : 한방 식용 사진. 775 (1976)
11. 오세량, 정근영, 이황규 : 천연 유래의 항보체 활성화물질 선별을 위한 미량 탐색법. 한국농화학회지. 39: 147 (1996)
12. 이준우, 정천희, 정훈, 이권행 : *Lentinus edodes* IY 105 알칼리 추출물의 보체계 활성화 및 항 종양 효과. 한국균학회지. 18 : 571 (1990)
13. 이준우, 정훈, 이권행 : 영지 균사체의 알칼리 추출물의 보체계와 망내계

- 미치는 영향. 한국균학회지. 18 : 137 (1990)
14. 최강주. 인삼연구소. 34 (1989)
 15. 한방과 건강 2001. 10 (128)
 16. 한덕용 : 現代 生藥學. 學院社, 서울, 214 (1989)
 17. 황수현 : 인삼잎 유래의 mitogen 및 macrophage 활성화 다당의 정제 및 특성, 석사 학위 논문, 경기대학교. (2000)
 18. Albersheim, P., An, J., Freshour, G., Fuller, M.S., Guillen, R., Ham, K.S., Hahn, M.G., Huang, J., O' Neill, M., Whitcombe, A., Williams, M.V., York, W.S. and Darvill, A.G.: Structure and function studies of plant cell wall polysaccharide. *Biochem. soc. Trans.*, 22: 374 (1994)
 19. Benjamini, E., Immunology a short course. WILEYLISS (1996)
 20. Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen G. : New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.*, 54: 484 (1973)
 21. Chihara, G. : Potentiation of host resistance against cancer and immunostimulants, *Proc. Symp. WAKAN-YAKU.*, 16: 44 (1983)
 22. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity especially *Lentinus edodes*(Berk) sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.*, 30: 2,776 (1970)
 23. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28 : 350 (1956)
 24. Egwang, T.G. and Befus, A.D. : *Immunology.* 51: 207 (1984)
 25. Gao, Q.P., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Yamada, H. : Chemical properties and anti-complementary activities of polysaccharide fractions from roots and leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Planta. Med.*, 55: 9 (1989)
 26. Hames, B.D. and Glover, D.M. : The complement System, In Molecular Immunology. IRL Press, Oxford. 189 (1983)
 27. Hiroshi, H. and Chohachi, K. : Anti-complementary principle of Ephedra herbs. *Chem. harm. Bull.*, 28: 2900 (1980)
 28. Hamuro, J. and Chihara, G. : Effect of anti-tumor polysaccharides on the higher structure of serum protein. *Nature.*, 7: 245 (1973)

29. Hugi-hara, M. and Nagumo, T. : An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophage and the anti-tumor activity. *Carbohydr. Res.*, 243: 211 (1993)
30. Hirase, S. : Structural studies on the anti-tumor active polysaccharides from *Doriols versicolor*(Basidiomycetes). II. Structures of β -D-glucan moieties of fractionated polysaccharides. *藥學雜誌*, 96: 419 (1976)
31. Janeway, C.A. : Progress in immunology. Syndromes of diminished resistance to infection. *J. Pediatr.*, 72: 885 (1968)
32. Janeway, C.A.: Immunology. Life science (2000)
33. Oh, J.S. : Pharmacology of ginseng. *Korea. J. Ginseng Sci.*, 1: 1 (1976)
34. Jones, T.M. and Albersheim, P.O. : A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol.*, 49: 926 (1972)
35. Kim, B.H., Kweon, M.H., Lim, W.J., Song, H.C. and Yang, H.C. : Structural characterization of the anti-complementary and macrophage activating polysaccharides isolated from *Agaricus bispororus*. *Korea. J. Food Sci. Technol.*, 30: 709 (1998)
36. Kabat, E.E. and Meyer, M.M. : Complement and complement fixation, Chales, C. *In experimental Immunolochemistry*. Thomas Publisher, Illinois. pp. 138 (1964)
37. Kiyohara, H. and Yamada, H. : Characterization of vitro IL-2 production enhancing and anti-complementary pectic polysaccharides from Kampo(Japanese herbal) medicine 'Zuzen-Taiho-To'. *Phytochem. Res.*, 7: 367 (1993)
38. Kiyohara, H., and Yamada, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y. : Studies on polysaccharide from *Angelica acutiloba*. V. Molecular aggregation and anti-complementary activity of abinogalactan from *angelica acutiloba*. *J. Phamacobio. Dyn.*, 9: 339 (1986)
39. Kiyohara, H., Zhang, Y.W. and Yamada, H. : Effect of exo- β -D-(1-3)-galactanase digestion on complement activating activity of neutral arabinogalactan unit in a pectic arabinogalactan from roots of *angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydrate Polymers.*, 32 (1997)

40. Karzel K. : 월간 한국 인삼, 1월호. (1987)
41. Kasaki K. : 월간 한국 인삼, 4월호 (1987)
42. Kweon, M.H. : Chemical structure and activation mode of the anti-complementary polysaccharides isolated from Bracken (*Pteridium aquilinum* var. *Latiusculum*). Ph.D. thesis, Korea Univ. of seoul, Korea. (1994)
43. Kim, Z.Y. : Activations of the complement system. *Allergy.*, 6 : 61~66 (1986)
44. Lee, H.Y. and Lee, H.S. : stimulatory effect of Korean red-ginseng extract on the proliferation and cellular activity of lymphocytes. *Korean. J. Ginseng Sci.*, 22: 60 (1998)
45. Low, S.K.A. and Reid, K.B.M. : In complement. IRL and press, Oxford, 1, (1998)
46. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randoll, R.J. : protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.*, 193: 265 (1951)
47. Lu, W., Zheng, G. and Cai, J. : Frist total synthesis of panaxitol, a potent antitumor agent isolated from *Panax ginseng*, 737 (1998)
48. Mitsuhiro, N., Kiyoshi, T., Kannayo, O., Yukio, O., Kayo, Y. and Koichiro, S. : Activation of macrophages by crude polysaccharide fractions obtained from shoots of *Glycyrrhiza glabra* and hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis* in vitro. *Bio. Pharm. Bull.*, 21: 1110~1112 (1998)
49. Miyazaki, Y. and Nishijima, M. : Studies on fungal polyanions. X X VII. Structural examination of a water-soluble anti-tumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 29: 3611
50. Miyazaki, Y., Yamada, T., Tamada, H. and Yamada, Y. : Relationship between the chemical structure and anti-tumor activity of glucans prepared from *Grifolra umbellela*. *Carbohydr. Res.*, 69: 165 (1979)
51. Okuda, T., Yoshioka, Y. Ikekawa, T. Vhihara, G. and Nishioka, K. : Anti-complementary activity of anti tumor polysaccharides. *Nature New Biol.*, 238: 59~60 (1972)
52. Platt, M.T. and Ishizaka, K. : Activation of alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.*, 113: 348 (1974)
53. Ra, K.S. : Purification and chemical properties of anti-complementary

- polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum* L. and the fruits of *Capsicum annuum* L. Ph. D. Thesis. Korea University, Seoul. (1990)
54. Song, H.C., Jeon, Y.J., Yang, B.K., Ra, K.S., and Kim, H.I. : Anti-complementary activity of endopolymers produced from submerged mycelial culture of higher fungi with particular reference to *Lentinus edodes*. *Biotechnol. Lett.*, 20 : 741 (1998)
55. Sendl, A., Mulinacci, N., Vincieri, F.F. and Wanger, H. : Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharide of *Sedum telephium*. *Phytochem.*, 34: 135 (1993)
56. Song, K.S., Cho, S.M., Lee, T.H., Kim, H.M. Han, S.B. Ko, K.S. and Yoo, I.D. : B-lymphocytestimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.*, 43 : 2105 (1995)
57. Shin, K.S. : Studies on selection, Purification and action modes of anti-omplementary polysaccharides from *Arecae pericarpium*. Ph.D. thesis, Korea Univ. of seoul, Korea. (1992)
58. Shin, K.S., Kiyohara, H., Matsumoto, T. and Yamada, H.: Rhamnogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide. *Charbohydr. Res.* 300: 239 (1997)
59. Shin, K.S., Ra, K.S., Sung, H.C. and Yang, H.C.: Screening of complementsystem activating polysaccharide from edible plants and its action mode. *Food Sci. technol.*, 25: 197 (1993)
60. Shimura. K., Ito, H. and Hibasami, H., : Screening of host mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoeletrop- horesis using fresh human serum. *Jap. J Phamacol.*, 33: 43 (1993)
61. Sakurai, M.H., Matsumoto, T., Kiyohara, H. and Yamada, H. : B-cell proliferation activity of pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. and its structural requirement. *Immunol.*, 97: 540 (1999)
62. Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K. and Orita, K. : Krestin (PSK), *Cancer Treat. Rev.*, 11: 131 (1984)
63. Wang, H.X. and Liu, W.K. : Immunomodulatory and antitumor activities of polysaccharides complex from a mycelial culture of *Tricholoma*

- S.P.A local edible mushroom. *Life Science*, 57: 269 (1995)
64. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Kojina, Y.J. Kumazawa, Y. and Otsuka, Y. : Studies on polysaccharides from *angelica acutiloba*. Part 1. Fractionation and biological properties of polysaccharide. *Planta Med.*, 50: 163 (1984)
65. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y.: Structural characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* KITAGAWA. *Chrbohydr., Res.* 159: 275 (1987)
66. Yamada, H., Ra, K.S., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y. : Characterization of anti-complementary neutral polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum*. *Phytochem.*, 27: 3,163 (1988)
67. Yu, K.W. : Structural and functional studies of polysaccharides with intestinal immune modulating activity of *Atractylodes lancea* DC. Rhizomes, Ph.D. Thesis, Korea University, Seoul (2000)
68. Yanahira, S., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y. : Characterization of anti-complementary acidic heteroglycan from the seed of *Coix lacrymajobi* var. *Ma-Yuen*. *Pytochem.*, 26: 3269 (1987)
69. Zhong, J.J. : Production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax notoginseng* and *Panax ginseng* effects of plant growth regulators. *Appl. Biochem. Biotech.*, 75: 261 (1998)

제 4 장 인삼외 함유 면역 증강 활성화 물질의 기능성 소재화

제 1 절 서 설

옛부터 자연계에 존재하는 여러 식물체에는 인간의 질병에 대하여 치유효과를 갖는 활성성분이 존재한다고 알려져 왔고 또한 실제로 한방 및 민간에서 이를 이용해 온 것이 사실이다. 현재까지도 전 인류의 75%가 건강유지의 목적으로 여전히 이를 사용하고 있다고 알려져 있는데 이는 20세기에 들어 항생물질과 같은 현대의약의 개발로 많은 감염성질환이 감소된 반면, 20세기 후반에 들어 현대의약으로 그 치료가 어려운 암, 순환기계 질환 및 자기 면역 질환과 같은 만성 질환이 증가 일로에 있다는 사실과 특히 체질성(constitutional)질환이나 심인성(psychosomatic)질환의 급증 및 합성의약품의 심각한 부작용 등으로 인하여 식물체 유래의 약리 활성물질에 대한 많은 관심과 연구가 물리게 된 때문이라 할 수 있다.(62) 이에 따라 항암작용을 위시한 면역계 활성화 작용에 집중되고 있으며, 특히 식품이나 전통 생약재로부터 생체 반응 조절제(biological response modifier)를 선별하여 이를 의약품 내지는 기능성 식품으로 이용하고자하는 시도가 계속되고 있다. 이들 중 비교적 상세한 연구가 진행된 부분은 상황버섯(*Phelinus linteus*)(46), 시호(*Bupleurum falcatam*)(55)로부터 mitogen 활성화 물질, 양송이버섯(*Agaricus bispours*)(17), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)(51), 운지버섯(*Coriolus versicolor*)의 krestin(32)으로부터 macrophage 활성화, 당귀(*Angelica acutiloba*)(40), 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 lentinan(20)으로부터 항보체 활성화 및 항암 활성화 물질들이 발견되어 보고되어 있다. 이들은 대부분 옛부터 식품이나 약용으로 널리 사용되어왔던 재료로서 인체에 대한 안정성이 확보된 물질들이라 할 수 있다.

면역계는 외부 물질(항원)에 대한 생체의 방어뿐만 아니라 생체내에서 일어

나는 각종 이상현상을 제거하여 항상성(homeostasis)을 유지시켜주는 생물현상으로 ①특이성(specificity), ②적응성(adaptation), ③자기(self)와 비자기(non-self)의 구별, ④방어했던 항원을 기억(memory)하는 특징을 갖고 있으며 항원에 대한 특이성에 따라 선천적 면역(innate immunity)과 후천적 면역(acquired immunity)으로 구분될 수 있다. 선천적 면역은 항원에 대해 비특이적으로 작용하는 면역체계로 피부나 점막과 같은 물리적 방어막 이외에도 macrophage(대식 세포), granulocyte(과립구), reticuloendothelial system(망상내피계), inteferon등의 면역세포 및 물질이 관여한다. 이에 반하여 후천적 면역은 항원에 노출된 후에 특이적으로 발달하게 되는 면역 체계로 lymphocyte의 발달 장소에 따라 B 및 T lymphocyte로 구분한다. B lymphocyte는 포유류의 경우 골수(Born marrow)에서, 조류의 경우 fabricius낭에서 성숙되고 T lymphocyte는 흉선(Thymus)에서 성숙되어 세포성 면역에 관여한다. 항원에 의해 자극되면 B lymphocyte는 분열하고 분열된 자세포는 항체를 합성하며 이는 체액성 면역에 관여하게 된다.(23)

Macrophage는 골수로부터 혈류로 들어간 단핵구(monocyte)가 신체의 곳곳에 분포하는 망상 내피계 같은 조직 구조 형성부에서 성숙되어 생성된다.(53) 망상 내피계의 주요 기능은 혈류와 다양한 조직에 침입한 외부물질을 포획하여 식작용 세포에게 노출시키는 것이다. 단핵구 자체는 작고 약간의 돌기를 갖은 구형이며 원형질과 과립은 풍부하지만 내질 망상조직은 적은 것이 특징이다. 이러한 단핵구가 특별한 조직에 정착하게 되면 kupffer cell, alveolar macrophage, splenic macrophage, peritoneal macrophage, microglial cell 등으로 분화하게 된다. 비록 정착 위치에 따라 명명은 다르지만 항원을 포획하여 탐식작용을 일으키는 기능은 동일하며, 이는 항원 침입시 항체 형성 이전의 단계에서 즉시 반응할 수 있는 주요 방어기구이다.(54) 이러한 macrophage는 탐식작용 뿐만 아니라 내화한 항원을 부분적으로 소화해서(processing) 그것을 자신의 표면에 점착(presentation)시켜 후천적 면역계 세포가 항원을 인식할 수 있도록 antigen-presenting cell(APC)로서의 역할을 수행하며(23) 중앙 세포에 대한 상해능을 갖고 있다.(28, 58) 결과적으로 macrophage는 후천

적 면역계의 effector로서 병원체의 치사율을 증강시키고 항종양 효과를 나타낸다.(24)

비장(spleen)은 면역계에서 중추적 역할을 하는 B 및 T lymphocyte의 성숙과 항원(antigen)에 의해 자극을 받은 후 분열과 분화가 이루어지는 주요 임파기관이다.(23) B cell은 stem cell에서 분화하여 성숙된 B cell이 되며 최초에는 항체(antibody)를 분비하는 세포는 아니지만 항원의 자극에 의해 항체 생산세포로 쉽게 분화 된다고 알려져 있다. 항원 자극에 의한 분화과정의 마지막 단계는 plasma cell인데 이는 소포체 안에 많은 세포질을 함유하고 있으며, 약 2~3일 동안 생존 가능한 것으로 알려져 있다. 한편 T cell은 기능에 따라 cytotoxic T cell (T_C), helper T cell (T_H), suppressor T cell (T_S)로 구분할 수 있는데 T_C 는 표면 항원과 결합한 이후 lymphokine을 방출하여 다른 T cell의 작용을 활성화하거나 macrophage를 유인하게된다. 또한 T_H 는 plasma cell의 분화와 성숙에 도움을 주고, T_S 는 면역 반응을 억제시키는 주요 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

B cell이 자극을 받게 되면 항원에 특이적인 immunoglobulin(Ig)을 생산하여 혈류로 방출하게 되며, 이러한 기능을 보조해 주는 여러 분자들을 B cell의 표면에 갖고 있다. $Ig\alpha$ 와 $Ig\beta$ 는 항원이 Ig에 결합하게 되면 그 신호를 전달받아서 B cell 내부의 kinase를 자극하는 signal transduction의 역할을 하며 CD19, CD20, CD21도 유사한 역할을 수행하게 된다. 또한 CD40은 T cell이 분비한 cytokine의 자극을 받아 Ig의 isotype swiching에 관여한다. 그리고 B cell은 MHC (major histocompatibility complex)에 내화한 항원의 일부를 결합시켜 T cell의 cytokine 유출을 증가시키며 그 외에 IgG를 위한 Fc receptor로서의 CD32 등이 있다. T cell 표면은 항원과 결합할 수 있는 $\alpha\beta$ 를 갖고 있으며 그 주변에 signal transduction complex인 $CD3+\zeta$ 를 갖고 있다. 또한 CD4 혹은 CD8은 표적세포나 APC의 MHC분자와 결합하는 보조 수용체이며, 이 또한 signal transduction분자로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.(21)

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나목과(*Araliaceae*)에 속하는 다

년생 초본류로서(13) 아시아의 극동 지방(북위 30°~ 48°)에서만 자생하는 약용식물이다. 미국의 서양인삼(*Panax quiquefolia* L.), 일본의 죽절인삼(*Panax japonicus* C.A. Meyer) 그리고 중국의 삼칠인삼(*Panax notoginseng* F.H. Chen)등의 인삼 대용품과는 구분되는 약리 효능을 가진 우리나라 전통 생약재이다(3). 인삼은 전통 한방에서 강장(强壯), 강정(强精), 향피로 및 신진 대사의 증진 목적으로 인삼탕(人蔘湯), 십전대보탕(十全大補湯)등에 배합되어 이용되고 있는데 그 효과가 우수한 것으로 알려져 있다. 인삼의 효능은 민간의 경험적 측면뿐만 아니라 현대의학으로도 그 효과가 증명되고 있는데 특히 강장 효과(36), 뇌신경 기능 향진, 조혈기능 향진 및 혈당강하 작용(11), 항염증 작용(37), 위기능 회복작용(38), 노화 방지 작용(15), 방사선에 대한 방어작용(8), 면역능 향진 작용(4, 10)등이 알려져 있다.

인삼의 주요 화학적 성분은 dammarane glycoside 계열의 사포닌(saponin)과 지용성 성분, 당류, 유기산 및 합질소화합물 등으로 구성되어 있으며, 지금까지는 사포닌에 대한 연구가 가장 많이 진행되어 있다(2). 사포닌은 인삼중 존재하는 유용한 주요 2차 대사산물로써 이는 인체의 면역기능과 대사를 조절하고 사람과 실험동물에 있어서 간세포 독성물질을 방어하는 효과가 보고되어 있다(50). 또한 panaxytol 1을 포함한 polyacetylene 화합물은 새로운 항종양 물질로서 주목받고 있으며(65), 1차 대사 산물로서 존재하는 pectin (polysaccharide)은 항종양 효과와 림프구(33) 및 대식세포(59) 등을 자극하는 면역활성을 가지고 있다고 보고되었다.

인삼은 우리 나라에서 1999년을 기준으로 11,561 ha에서 재배되어 14,500 MT을 생산하고 있으며 약리효과가 우수하다고 증명되어 세계적으로도 선호도가 높은 농작물이기도 하다. 이러한 이유로 인삼에 대한 연구와 그 이용은 이제까지 대부분 인삼의 근부에만 국한되어 왔다. 그러나 인삼의 근부(根部)는 그 효과의 우수성에도 불구하고 파종 후 수확까지 최소 4~6년 까지의 장기간이 소요되는 단점을 갖고있는 반면 인삼의 엽부(葉部)의 경우 일년 중 내내 수확이 가능하다는 잇점을 갖고 있다. 하지만 인삼 엽부는 별 이용방안의 모색없이 대부분의 농가에서 폐기되고 있는 실정이다. 따라서 인삼의 엽부로부터 근

부에 상당하는 면역활성 혹은 새로운 활성을 찾아낸다면 신자원 소재의 개발이라는 측면에서도 그 의의가 높다고 사료된다.

이러한 이유로 본 연구에서는 인삼의 엽부를 대상으로 macrophage의 활성화를 유도하고 lymphocyte의 증식을 촉진하는 물질의 존재 여부를 검토하였으며 이들에 대한 정제를 행하고 그 화학적 특성을 살펴봄으로써 인삼 엽부를 기능성 소재로 이용할 수 있는 자료를 제공하고자 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

제 1 항 재 료

가. 재 료

본 실험에 사용한 인삼의 엽부(the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer)는 충남 금산지역에서 1999년 11월에 수확한 것을 구입하여 건조시켜 사용하였다.

나. 실험 동물

실험동물은 ICR계 mouse (6~8주령의 웅성)를 삼육 실험동물연구소로부터 구입하여 실험실환경에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 실험동물은 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도 55~70%조건에서 물과 사료를 자유 급식하며 사육하였다.

다. 시약

Mitogen과 macrophage의 활성능을 측정하기 위한 시약으로서 RPMI medium 1640, Penicillin/Streptomycin, Fungizone[®]은 Gibco BRL사(Grand Island Co., NY., USA)로 부터 구입하였고 HEPES powder, fetal calf

serum(FCS), *p*-nitrophenylphosphate disodium salt (*p*-NPP) 및 MTT (Tiazolyl blue)는 Sigma사(St. louis MO., U.S.A.)로 부터 구입하여 사용하였다. 그리고 lipopolysaccharide(LPS; from *Escherichia coli* Serotype O127:B8) 과 concanavalin A(conA) 또한 Sigma사로부터 구입하였다.

분자량 측정에 사용된 표준 pullulan series (P800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)는 일본 Showa Denko사로 부터 구입하였다. 또한 시료 추출 및 분석용 시약으로써 cetyltrimethyl ammonium bromide (Cetavlon), NaIO₄, protease(from *Streptomyces griseus*), NaClO₂, trifluoroacetic acid, NaBH₄는 Sigma사로 부터 구입하였으며, 그 밖의 시약은 시판되는 1급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

라. Resin

활성 물질의 정제에 사용된 DEAE Sepharose FF (Cl⁻ form)와 Sepharose CL-6B는 Pharmacia Biotech사(Sweden) 제품을, Bio gel P-30 및 Bio gel A-0.5m은 Bio-Rad사의 제품을 각각 구입하여 사용하였다.

제 2 항 실험방법

가. 면역 활성화 물질의 선별

1) 시료의 용매별 추출

인삼 엽부 50 g에 각각 용매 1ℓ를 첨가하고 하룻 밤 교반하여 filtering 후 상등액을 취하여 감압농축시킨 후 동결건조하였다. 이에 사용된 용매는 냉수, acetone, chloroform, ethanol, ethylacetate, methanol, buthanol, 1% NaOH (교반 후 5 M HCl로 중화)이며 열수 추출은 용액 최초 부피의 1/2이 될 때까지 추출하였다.

2) 시료의 단계적 용매 추출

건조된 인삼 엽부 시료 100 g을 Fig. 4-1의 방법에 따라 최초 냉수 2ℓ를 가하여 추출하고, 7000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 농축, 동결건조하여 Fraction A를 얻었다. 이후 그 잔사를 이용하여 hexane, methanol, 열수로 단계적으로 추출하고 동결건조하여 얻은 각각의 획분을

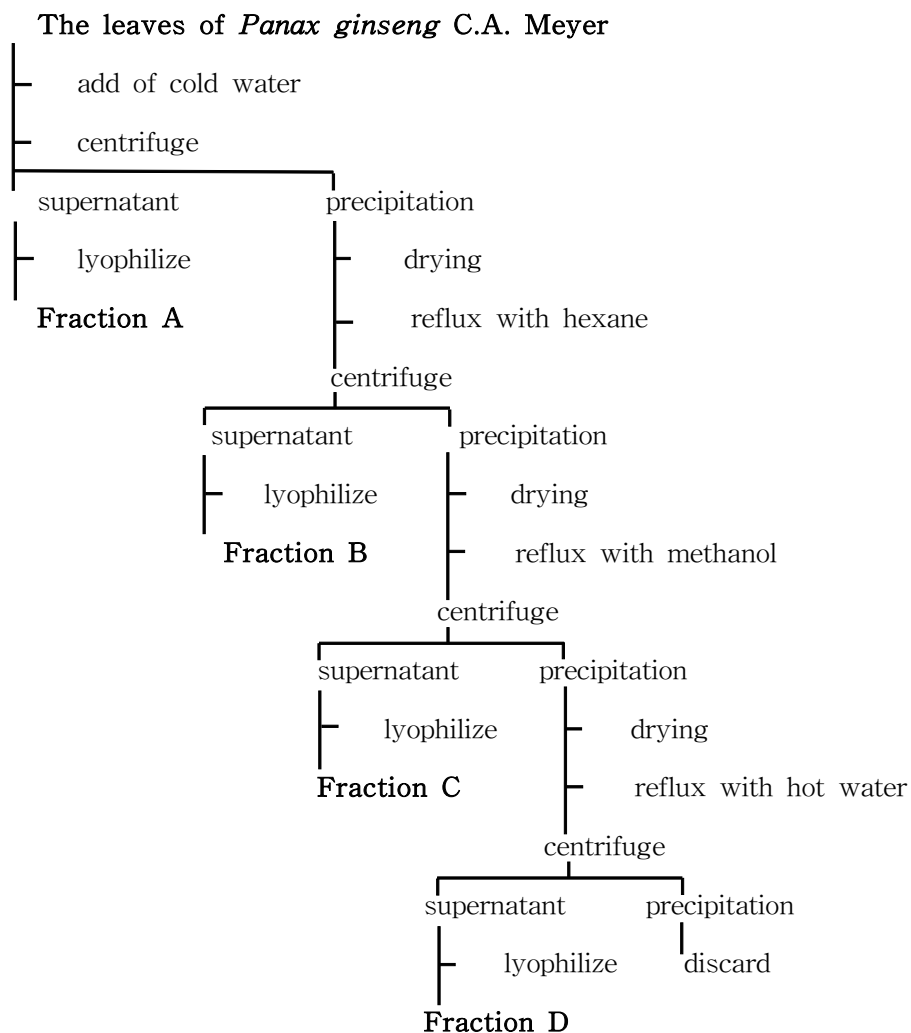


Fig. 4-1. Systemic extraction procedure for isolation of immuno-stimulating materials from ginseng leaves.

Fraction B, C 및 D로 하였으며 각 추출물은 mitogen과 macrophage의 활성 측정에 사용하였다.

나. 면역 활성화 물질의 추출

건조된 인삼 엽부 4 kg은 10배 부피의 열수를 이용, 추출하고 4배 부피의 ethanol을 가하여 침전시킨 후, Fig. 4-2에 나타난 바와 같이 투석 및 동결건조를 거쳐 조다당획분 GS-1을 얻었다.

다. 일반 분석 방법

총당 함량은 galactose를 표준 물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법(22)으로, 산성당 함량은 β -D-galacturonic acid를 표준 물질로 하여 *m*-hydroxy

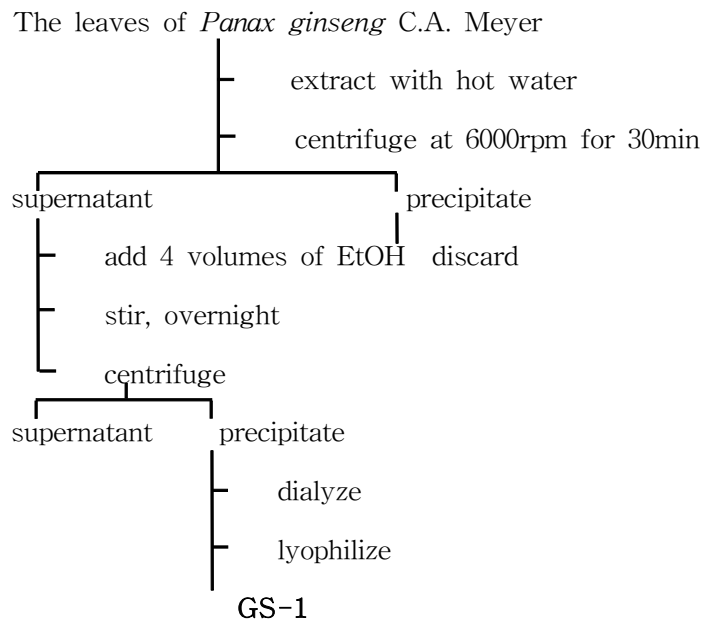


Fig. 4-2. Preparation procedures of crude polysaccharide fraction from ginseng leaves.

마. 면역 증강 활성 측정

1) Mitogen 활성 측정 (Splenic lymphocyte proliferation)

ICR mouse에서 비장을 적출하여 lymphocyte를 획득한 후 적혈구를 제거하고 RPMI 1640으로 2~3회 세척하여 세포수를 5×10^6 cell/ml이 되도록 조정하였다. 이때 얻어진 세포 부유액은 96 well plate에 90 μ l씩 분주하고 10 μ l의 시료용액을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양하였으며 그 증식 정도를 MTT (RPMI 1640 with 10% FCS) 및 alkaline phosphatase (RPMI 1640 with 10% FCS or without FCS이용)방법을 통하여 mitogen 활성화능을 측정하였다. MTT법은 각 well에 MTT용액을 첨가하여 5시간 배양 후, 형성된 MTT formazan의 양을 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 alkaline phosphatase법은 각 well의 lymphocyte를 0.1% Triton X-100으로 용해한 후 알칼리 조건에서 p-NPP용액과 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.(Fig. 4-3 참조)

2) Macrophage 활성화능 측정 (Macrophage lysosomal enzyme activity)

6~8주령의 ICR mouse의 복강에 5% thioglycollate medium을 2.5 ml 주사한 후 72~96시간 내에 유도된 복강 macrophage를 회수하여 RPMI 1640으로 2~3회 세척하고 세포 수를 1×10^6 cell/ml로 조정하여 96 well plate에 200 μ l씩 분주하였다. 이들은 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양하여 macrophage monolayer를 형성시키고 각 well에 시료를 첨가하여 24시간 배양하였다. 활성화된 macrophage monolayer는 RPMI 1640으로 세척한 후, Triton X-100을 가하여 세포막을 용해한다. 유리된 lysosomal phosphatase를 기질인 p-NPP와 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.(Fig. 4-4 참조)

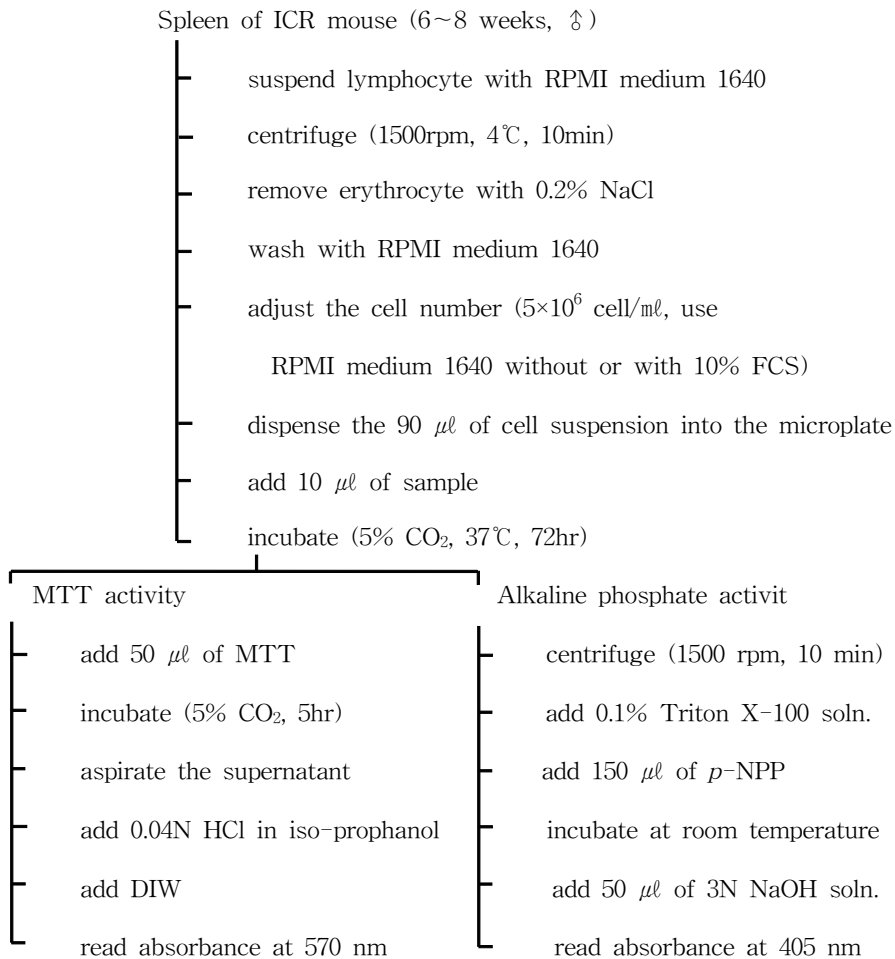


Fig. 4-3. Procedure for the assay of mitogenic activity.

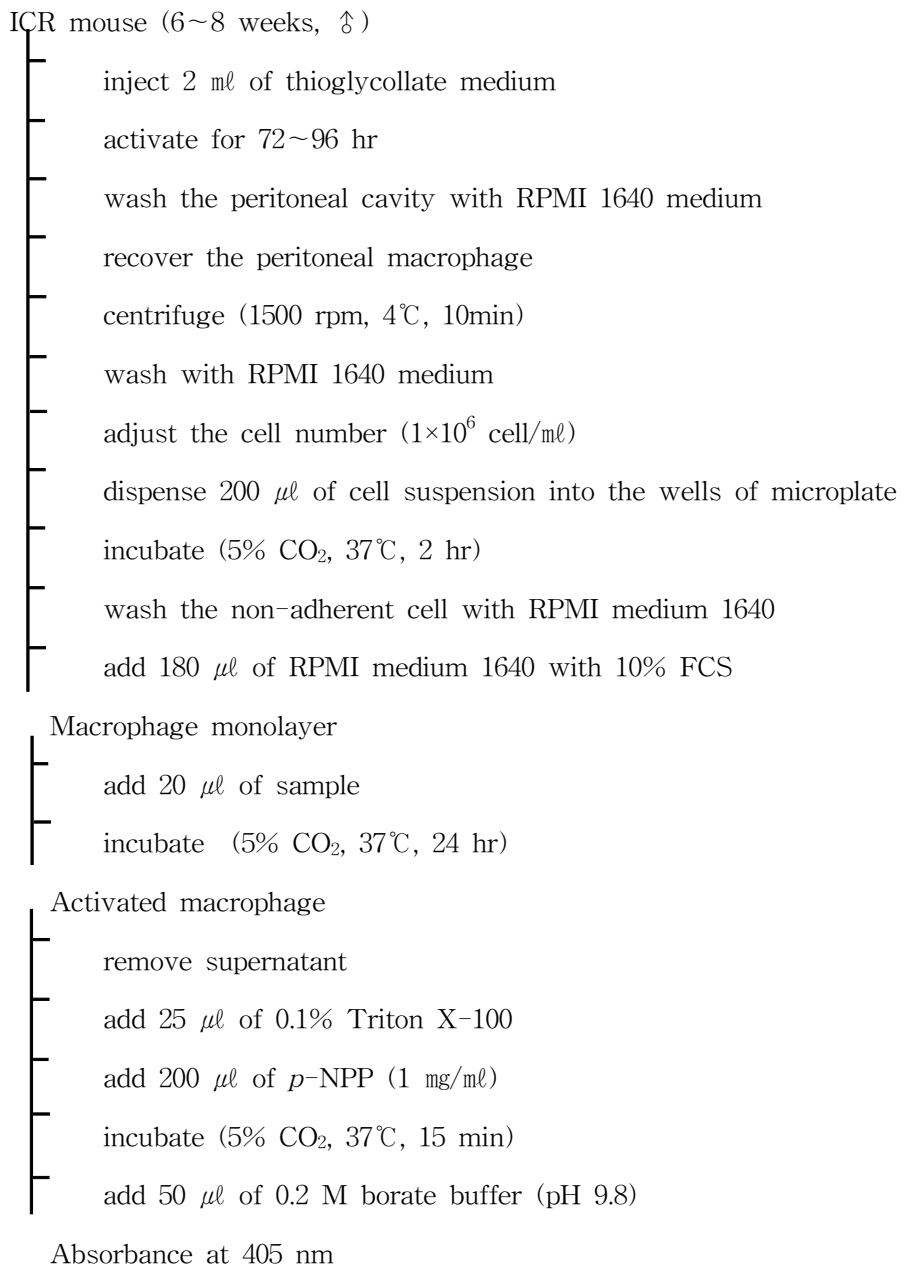


Fig. 4-4. Procedure for the assay of macrophage lysosomal enzyme activity.

바. 면역 활성화 물질의 본체 규명

1) Periodate oxidation

시료(GS-2, -3, -4) 20 mg을 0.05 M acetate buffer (pH 4.5) 50 ml에 녹인 후, 0.05 M NaIO₄를 5 ml 첨가하고 4℃의 암소에서 72시간 산화시켰다. 이 산화물 중 잔존 NaIO₄를 제거할 목적으로 ethylene glycol을 첨가한 후 투석을 행하고 투석 내액에 NaBH₄ 20mg을 첨가하여 하룻밤 교반시켜 환원시켰다. 반응액은 0.1 M acetic acid로 중화하여 투석 및 동결 건조를 행하여 periodate 산화물을 얻었다.(42)

2) Pronase digestion

시료 20 mg을 0.01 M CaCl₂를 포함한 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) 50 mg에 녹인 후 20 mg의 pronase를 첨가하고 37℃ incubator에서 48시간 반응시키고 잔존 효소를 불활성화시킬 목적으로 5분간 끓인 후 원심분리하였다. 상등액은 투석과 동결 건조를 행하여 pronase 소화물을 얻었다.(42)

3) Chlorite treatment

시료 20 mg을 4% acetic acid 50 mg에 녹인 후 NaClO₂ 100 mg을 첨가하고 색이 변할 때까지 70℃에서 교반시켰다. 이후 4℃를 유지한 상태에서 3 N NaOH를 첨가하여 중화시키고 투석 및 동결 건조를 거쳐서 chlorite 처리획분을 얻었다.(47)

사. 면역 활성화 다당의 분리 및 정제

1) Cetavlon 처리에 의한 산성다당의 분리

면역활성 조다당 획분인 GS-1을 증류수에 용해시킨 후 동량의 8% Cetavlon을 가하여 24시간동안 교반시키고 원심분리를 행하였다. 침전물은 10% NaCl

에 용해시킨 후 ethanol로 Cetavlon을 제거시키고 동결건조하여 산성다당획분인 GS-2를 얻었고, 상등액은 동량의 1% boric acid를 첨가하여 24시간 동안 교반 후, 원심분리하여 얻은 침전을 ethanol로 회수하고 2% 초산용액으로 수세하여 약산성 다당획분인 GS-3와 상등액 중의 중성다당획분인 GS-4를 얻었다. 각 획분으로 mitogen 및 macrophage 활성을 측정하여 높은 활성을 나타

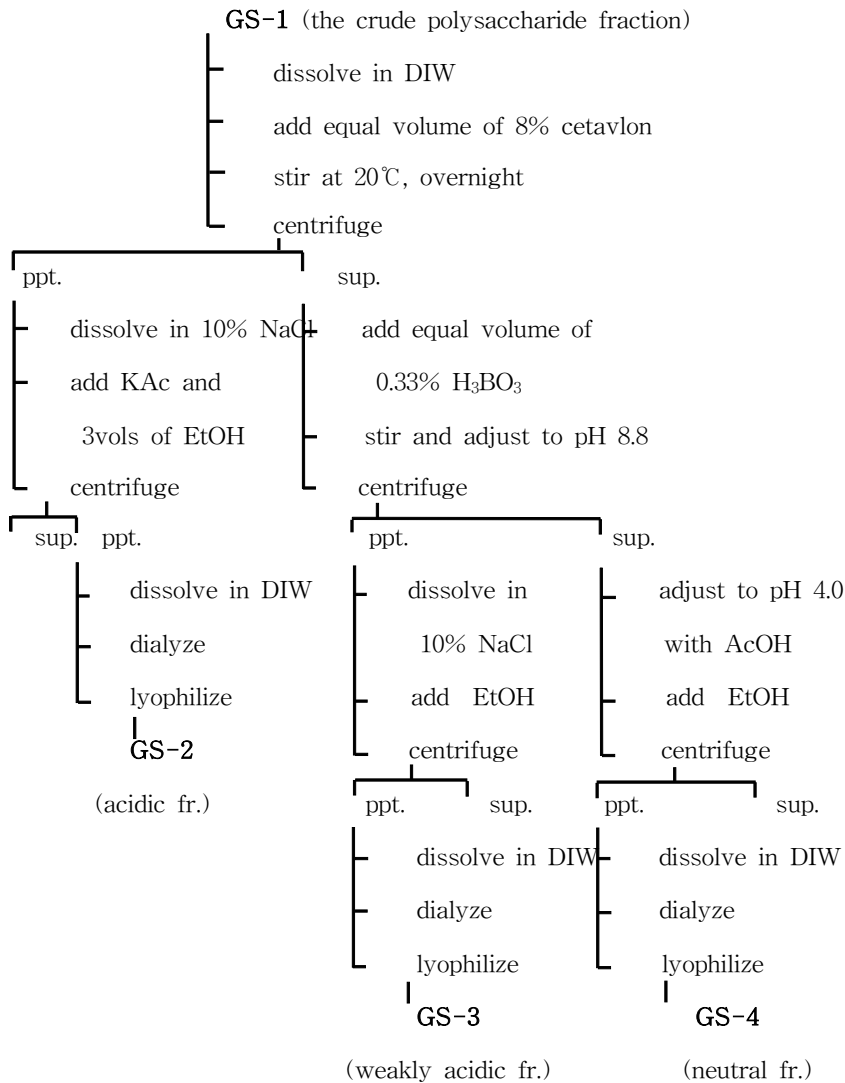


Fig. 4-5. Schematic illustration for Cetavlon treatment of GS-1.

내는 GS-2 획분을 대상으로 다음의 정제 과정을 실시하였다.(Fig. 4-5 참조)

2) Anion exchange chromatography(AEC)

면역 활성이 높았던 GS-2를 증류수에 녹인 후, 증류수로 평형화된 DEAE-Sephacrose FF (Cl⁻ form)에 흡착시킨 후 증류수, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 M의 NaCl로써 단계적으로 용출시켰다. 이때 얻어진 각 획분은 농축

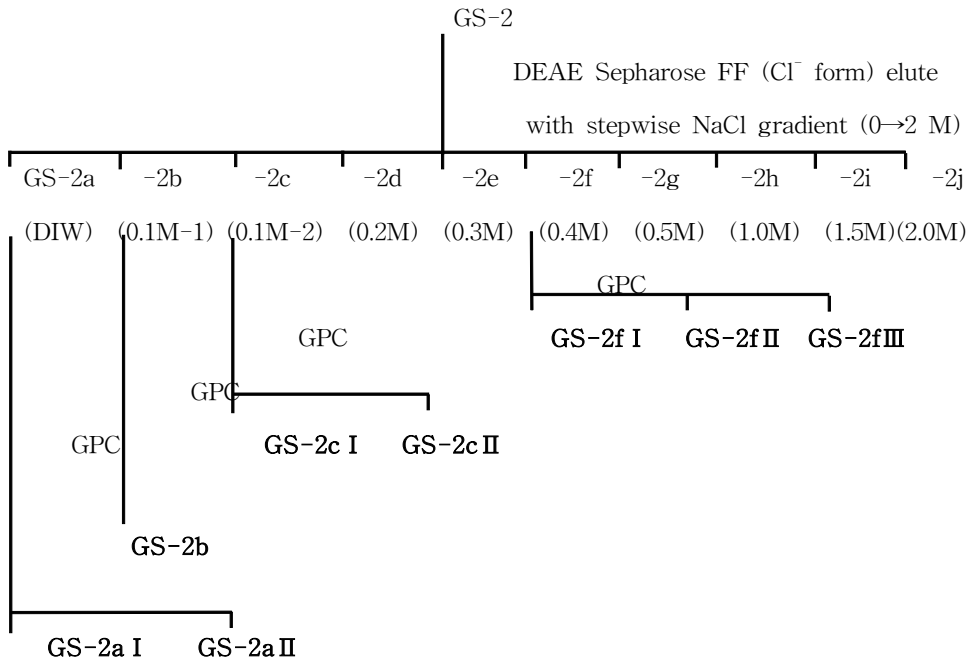


Fig. 4-6. Scheme for purification procedure of GS-2.

GPC of GS-2a : Bio-gel P-30 (elute with 0.05 M acetate buffer, pH5.2)

GPC of GS-2b : Bio-gel P-30, Bio-gel A-0.5m Gel

(elute with 0.05 M acetate buffer, pH5.2)

GPC of GS-2c : Sepharose CL-6B (elute with 0.2 M NaCl)

GPC of GS-2f : Bio-gel P-30 (elute with 0.05 M acetate buffer, pH5.2)

및 투석 후 동결 건조를 행하여 1개의 비흡착획분(GS-2a)과 9개의 흡착획분(GS-2b~2j)을 얻었으며 0.1 M NaCl로 용출시에는 2개의 다른 획분(GS-2b 및 GS-2c)을 얻을 수 있었다.(fig. 4-6 참조)

3) Gel permeation chromatography(GPC)

AEC 정제 시료 중 높은 면역 활성을 보인 GS-2a, -2b, -2c, -2f를 대상으로 GPC를 행하였다. GS-2a 및 -2f는 Bio gel P-30을 이용, 겔 여과를 행하여 GS-2a I, -2aII 및 GS-2f I, -2fII, -2fIII로 각각 분획되었다. GS-2b는 Bio gel P-30과 A-0.5m을 이용하여 단일 획분을 나타내었다. 한편 GS-2c는 Sepharose CL-6B을 이용하여 GS-2c와 -2cII로 정제할 수 있었으며 이들은 투석, 감압농축 및 동결건조를 행하여 이후의 실험에 사용하였다. 각 정제과정은 Fig. 4-6에 표시한 바와 같다.

4) HPLC에 의한 분자량 측정 및 순도 확인

GPC 정제 획분의 정제 정도 및 분자량을 예측하기 위하여 Table 4-2의 분석 조건으로 HPLC (high performance liquid chromatography)를 행하였다. 분자량 측정시에는 표준 pullulan series (P800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)를 이용하여 각각의 retention time을 구한 후, 분자량에 대한 K_{av} 값을 산출하여 얻은 표준 곡선으로부터 환산하여 결정하였다.

Table 4-2. Analytical condition of HPLC for the purified polysaccharides

Apparatus	HPLC-9500 (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Detector	Refractive Index (RI, Waters, USA)
Column	Shodex GS520+GS320+GS220 Packed Column (Asahi Chemical Industry Co. Ltd., Japan)
Column size	Φ7.6×300 mm
Flow rate	0.5 ml/min
Eluent	0.2 M NaCl
Intergrator	Autochro data module (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Injection vol.	10 μl

아. Methyl화 분석에 의한 다당의 결합위치 결정

다당시료의 결합위치 결정을 위한 methyl화는 Hakomori 방법에 따라 실시하였다. 각 다당은 methyl화 이전에 0.2 M NaOH로 실온에서 2시간 처리하여 탈 ester화 하고, 반응중 β-elimination이 일어나지 않도록 methyl화는 한차례만을 수행하였다. 그러나 다당이 완전히 polyalkoxide로 전환되도록, 필요한 경우 methylsufinyl carbanion을 수차례 첨가하였고 잔존량은 triphenylmethane으로 확인하였다. Methyl화 다당은 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용, 회수하였다. Methyl한 다당 및 oligo당은 1M TFA로 100℃에서 2시간 가수분해 후, 환원 및 acetyl화 과정을 거쳐 partially methylated alditol acetate로 전환하여 GC 및 GC-MS로 분석하였다. GC 분석은 SP-2380 (0.2 μm film, 0.25 mm i.d.×30 m, Supelco) capillary column이 장착된 Hewlett-Packard 5890A GC를 사용하여 최적온도조건 [60℃ (1 min), 60℃→180℃ (30℃/min), 180℃→250℃ (1.5℃/min), 250℃ (5 min)]에서 splitless injection mode로 분석하였으며, 한편 GC-MS는 동일 column을 장치한

Hewlett-Packard 5890A GC system과 5970 mass selective detector를 이용하여 최적온도조건 [60°C (1 min), 60°C→150°C (30°C/min), 150°C→250°C (1.5°C/min)]에서 분석하였다. (He 압력 : 0.5 ml/min) 각 peak는 MS에 의한 fragment ion 분석과 GC의 relative retention time을 조합하여 동정하였으며, 각 화합물의 mole %는 peak 면적과 응답계수로 부터 산출하였다.

자. 기타 면역활성 측정

1) 면역세포에 의해 생산된 cytokine 측정

Cytokine 측정은 sandwich ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)법을 이용하였다. 분석 하루 전, anti-cytokine mAb(anti-mouse cytokine monoclonal-antibody)를 coating buffer(0.1 M Carbonate, pH 9.5)에 섞어 96 well ELISA plate(NuncTM immuno plate)에 100 μ l 씩 분주하고 4°C에서 하루밤 반응시켜 well 표면에 부착시켰다. 다음 날 plate를 PBST(PBS with 0.05% Tween 20)로 3회 세척 후, assay diluent(PBS with 10% FBS)를 200 μ l 씩 분주하고 실온에서 1시간 방치하여 항체가 붙지 않은 well 표면을 blocking하였다. 이후 PBST로 각 well을 3회 세척하고 표준물질인 recombinant mouse cytokine를 연속 희석한 용액 또는 5일 간 배양한 Peyer's patch 반응 상등액인 시료를 50 μ l 씩 분주하고 assay diluent를 50 μ l 분주하여 실온에서 90분 동안 배양시켰다. 반응 상등액을 제거하고 assay diluent를 50 μ l 씩 분주하여 well 표면을 30분 동안 blocking 시킨 후, PBST로 5회 세척하였다. 이렇게 처리된 plate에 biotinylated anti-cytokine mAb와 avidin-horseradish peroxidase의 conjugate를 assay diluent에 희석하여 분주하고 1시간 동안 반응시켰다. 이후 각 well에 존재하는 상등액을 제거하고 PBST로 7회 세척한 후 TMB substrate (3, 3',5, 5' tetramethylbenzidine 와 hydrogen peroxide, Pharmingen) 첨가하여 30분 배양하였으며, 50 μ l 2 N

H₂SO₄를 첨가하여 반응을 중지하고 405 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN- γ 및 TNF- α 함량 측정은 모두 위와 동일한 방법으로 측정하였다(Fig. 4-7).

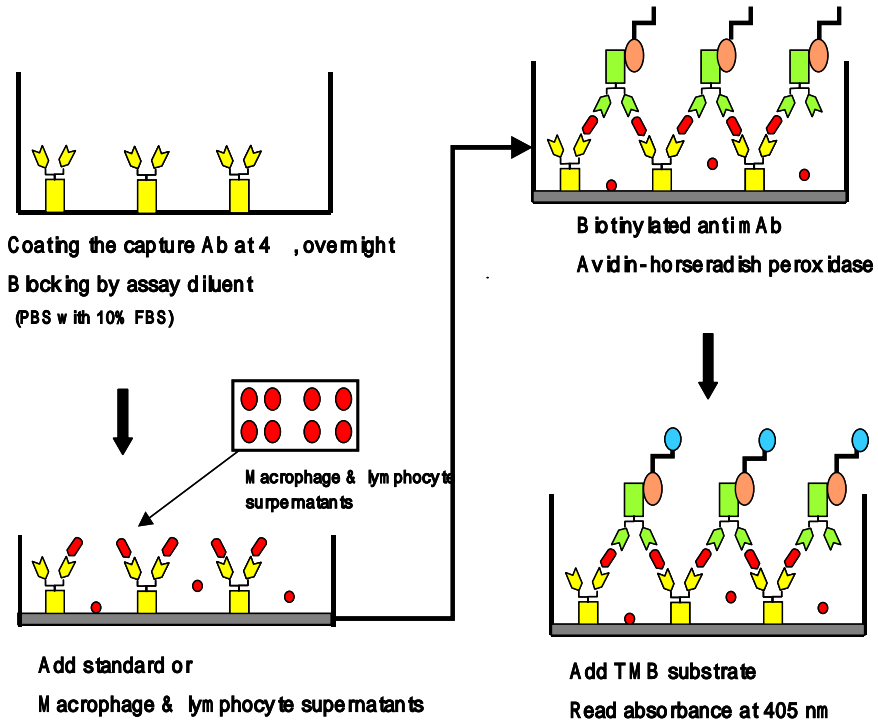


Figure 4-7. Sandwich enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) for the determination of cytokine content

2) 장관면역 활성 측정

① 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응

장관면역 활성은 Hong 등의 방법에 따라 측정하였다. 즉 C3H/HeN 마우스(5-7주, 암컷)의 소장벽 상에 존재하는 Peyer's patch를 조심스럽게 잘라내어 Hank's balanced salt solution(HBSS)이 담겨진 petri dish에 옮기고 금속체(No. 100)를 patch 위에 올려놓은 다음, 주사기 고무마개로 눌러 조직을 파

피하여 Peyer's patch로부터 세포를 방출시킨다. 세포현탁액을 금속체(No. 200)로 여과한 후 RPMI 1640-FBS(5% FBS 함유된 RPMI-1640)로 세척하고 2×10^6 cells/mL RPMI 1640-FBS로 세포농도를 조정 한 후 96-well plate에 180 μ L씩 분주하고 활성을 측정하고자 하는 시료를 적당한 농도로 희석하여 20 μ L씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 5일간 배양한 후 상등액을 회수하여 골수세포 증식활성 측정용으로 사용한다.

② 회수한 Peyer's patch 세포 배양액과 골수세포와의 반응

동일종 마우스의 대퇴부 뼈를 이용하여 골수세포를 회수하는데, 즉 주사기를 이용하여 뼈 속으로 HBSS를 주입하여 골수세포를 시험관에 받은 후 상기와 같이 여과, 세척하여 2.5×10^5 cells/mL RPMI 1640-FBS로 세포농도를 조정하고 96-well plate에 100 μ L씩 분주한다. 다음으로 위에서 얻은 골수세포 증식활성 측정용 상등액과 RPMI 1640-FBS를 각각 50 μ L씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6일간 배양한다.

③ 장관면역 활성화 측정

장관면역의 활성화는 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응 후 회수한 상등액을 골수세포와 반응시켜 골수세포가 증식되는 정도로서 나타내는데, 증식도 측정은 Alamar Blue™ 의 형광시약이 살아 있는 골수세포의 전자전달계에서 방출되는 전자에 의해 환원되어 발색되는 측정법을 사용하였다. 즉, 골수세포와 위의 배양 상등액과의 배양종료 12시간 전에 Alamar Blue™ 20 μ L를 첨가한 다음 형광도를 SPECTRAFluor Plus(TECAN Co. Ltd., Austria)을 이용하여 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 측정하여, 생리식염수를 시료 대신 사용한 대조구와 골수세포의 증식도를 비교하여 정량화하였다.

3) Macrophage의 탐식활성 측정

① Fluorescein-conjugated zymosan(FC zymosan)의 조제

Macrophage의 탐식능은 Suzuki등의 방법을 변형하여 fluorescein로 표지한 zymosan에 대한 탐식능으로 측정하였다. Zymosan A 100 mg에 100 ml의

증류수를 가하여 1.5 시간 가열한 후 방냉하고 여기에 3 mL의 증류수에 용해된 75 mg의 cyanogen bromide를 넣고 0.2 N NaOH를 이용 pH 11로 조정하여 zymosan 표면을 활성화하였다. 이들은 3000 rpm 5분간 원심분리하여 침전을 회수하고 pH 8.0의 0.2 M sodium borate buffer 200 ml을 가하여 현탁한 후 100 mg의 fluoresceinamine을 가하여 24시간 동안 stirring 하였다. 이후 원심분리하여 fluorescein conjugated zymosan을 회수하고 증류수로 3회 세척 후 재현탁하여 10분간 초음파 처리하였다. 이들은 500 rpm에서 5분간 원심분리하여 큰입자로 구성된 침전물을 제거하고 그 상등액을 100 ml로 정용하여 실험에 사용하였다.

② FC-zymosan을 이용한 탐식능 측정

Well 당 1.0×10^5 개로 조정된 peritoneal macrophage를 부착시켜 macrophage monolayer를 만들고 여기에 180 μ l의 10% FCS가 함유된 RPMI1640과 각 농도로 조제된 시료를 20 μ l 첨가하여 24시간 배양하였다. 여기에 100 μ l의 FC-zymosan (1.0×10^8 particles/ml)을 가하고 40 min간 37°C의 CO₂ incubator에서 배양하였다. 이후 10% FCS가 함유된 RPMI1640로 2회 세척하고 50 mM sodium cholate 0.1 ml을 가하여 FC-zymosan을 탐식한 세포를 용해시키고 형광도를 excitation 544 nm와 emission 590 nm에서 측정하여 시료 무첨가 대조군에 대한 탐식능 증가를 비교하여 정량화하였다.

4) Macrophage의 NO 생산능 측정

Macrophage의 NO 생산능은 Keller 등의 방법을 이용한 발색법으로 측정하였으며 이때 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였다. macrophage monolayer(1.0×10^5 cells/well)에 180 μ l의 10% FCS가 함유된 RPMI1640과 각 농도로 조제된 시료를 20 μ l 첨가하여 24시간 배양하고 배양 상등액 100 μ l를 새로운 microplate에 옮겼다. 여기에 5% phosphoric acid에 용해된 1% sulfonylamide와 5%phosphoric acid에 용해된 naphthylethylenediamine 용액을 동량 희석한 Griess reagent를 100 μ l 가하고 상온에서 10분 배양 후 550

nm에서 흡광도를 측정하여 그 함량을 계산하였다.

3) Macrophage의 H₂O₂ 생산능 측정

Macrophage의 H₂O₂ 생산능은 Jon과 Carl의 방법에 따라 실시하였다. macrophage monolayer(2.0 x 10⁵ cells/well)에 90 µl의 10% FCS가 함유된 RPMI1640과 각 농도로 조제된 시료를 10 µl 첨가하여 24시간 배양하였다 여기에 30 µM scopoletin, 1 mM NaN₃, horseradish peroxidase 1U/ml, 5.5 M glucose와 PMA 100 ng/ml이 함유된 Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) 100 µl를 가하고 2시간 동안 37°C의 CO₂ incubator에서 배양하였다. 이를 fluorescence microplate reader를 이용하여 excitation 365 nm와 emission 450 nm에서 형광도를 측정하였다.

차. 면역활성 다당체 GS-1의 독성실험

산업적으로 응용 가능한 것으로 판단된 면역활성 소재 GS-1의 급성독성 (acute toxicity)을 확인하기 위하여 경구 및 꼬리정맥을 통해 투여하여 실시하였다. 경구 투여의 경우는 ICR계 mouse (♂, 5주령)를 1주간 적응시킨 후, 각 군당 6마리씩 총 30마리를 이용하였으며 생리식염수에 녹인 시료를 500 mg/kg, 1,000 mg/kg, 2,500 mg/kg, 5,000 mg/kg 농도로 1회 경구 투여하였다. 이때 대조군은 생리식염수만을 투여하였으며, 투여후 14일까지 관찰하고 생존한 마리 수를 측정하여 백분율로 표시하였다.

GS-1의 정맥 투여시의 독성검사를 위하여 ICR계 mouse(♂, 5주령)를 1주간 적응시킨 후 각 군당 6 마리씩 시료(GS-1)를 100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg 농도로 1회 꼬리정맥에 주사하였고 대조군은 saline을 사용하였으며 48시간 동안 생존율을 관찰하였다. 이들은 7일 후 치사하여 각종 장기를 적출하고 중량을 측정하였다.

카. 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안

(인삼잎 활성획분 함유 과립차 제조)

인삼잎 면역 활성성분을 기능성 소재화(산업화)하기 위한 획분은 각 면역 활성성분이 골고루 함유된 다당 획분 GS-1 내지는 GS-0(열수추출물)이 가장 적절한 것으로 판명됨에 따라 이에 대한 응용성 실험으로 GS-0을 이용한 과립차 제조실험을 행하였다. GS-0은 60 Brix가 되도록 농축하거나, 인삼잎 활성획분 첨가음료의 배합비를 이용 음료를 제조하고 회전감압 농축기로 약 60°Bx가 되도록 농축하여 농도별로 glucose와 혼합하고 15 - 20 mesh 크기로 과립화한 후 55℃에서 건조하였다.

제 3 절 결 과

제 1 항 인삼잎으로부터 mitogen 및 macrophage 활성화 물질의 검색

가. 추출 용매별 mitogen 및 macrophage 활성화능 검색

인삼 엽부에 존재하는 면역증강 활성능을 검토히기 위해 금산産 인삼 잎을 각종 용매(냉수, 열수, acetone, chloroform, ethanol, ethylacetate, methanol, buthanol 및 1% NaOH)용액으로 각각 추출한 뒤, mouse macrophage의 lysosomal phosphatase activity를 측정하였다. 그 결과 물추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 LPS (lipopolysaccharide)와 유사한 정도의 높은 활성이 관찰되었으며 기타 용매획분에서는 상대적으로 낮은 활성과 수율을 나타내어 유기용매는 부적절한 것으로 판단되었다. 한편 lymphocyte mitogen 활성을 MTT assay 및 alkialine phosphatase 방법을 이용, 측정한 결과 수용성 추출물에서 상대적으로 높은 활성이 관찰되었다.(Table 4-3 참조) 이는 인삼 잎의 냉수나 열수의 추출조건이 다당이나 단백질 및 고분자류의 추출에 적합한 조건이기 때문에 macrophage의 활성을 자극하는 것은 주로 이러한 고분자일 것으로 생각된다.

면역 활성의 검색 결과를 나타낸 Table 4-3에서, 'cell free'라함은 시료와 면역 세포현탁액을 모두 첨가하지 않은 blank값이며 'saline'은 면역 세포현탁

Table 4-3. Mitogenic and macrophage-phosphatase activity of each organic solvent from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer

	Mitogenic activity (MTT assay, %)	Mitogenic activity (A-P assay <FCS>,%)	Mitogenic activity (A-P assay, %)	Macrophagephosphatase activity (%)	Yield (%)
Cell free	0±3	0±26	0±3	0±1	
Saline	100±10	100±18	100±3	100±11	
LPS(100 µg/ml)				316±19	
LPS(10 µg/ml)	517±57	207±26	516±10	338±33	
ConA(5 µg/ml)	1012±105	274±37	110±6		
Cold water	284±31	822±104	281±45	331±17	32.3
Hot water	293±19	748±93	319±10	204±20	27.4
Acetone	202±38	596±63	226±16	188±23	1.0
Ethanol	97±12	240±37	135± 6	139±14	3.4
Ethylactate	178±21	363±37	119±10	199±15	2.9
Buthanol	133±3	270±59	139±16	154±20	7.8
Chloroform	133±14	178±19	126±6	118±14	9.7
1% NaOH	353±16	667±48	213±13	145±6	1.8

액에 시료대신 생리식염수만을 첨가한 음성 대조군이다. 한편 양성 대조군으로 사용한 LPS는 mouse B-cell의 mitogen으로(52), conA (concanavalin A)는 T cell의 mitogen으로(33) 알려진 물질로서 시료의 mitogen 활성화 측정을 위한 표준물질로 사용되었다. LPS는 또한 macrophage 활성화 측정의 표준물질로 사용하기도 하였다.

한편 인삼 잎으로부터 극성이 서로 다른 용매를 이용, Table 4-1에서 표시한 것처럼 단계적으로 계통추출하고 macrophage 활성을 측정한 결과(Table 4-4), Fr. B(methanol 추출 획분)와 C(hexane 추출 획분)는 낮은 활성을 보인 반면 Fr. A에서는 그 보다 높은 활성이, 열수 추출 획분인 Fr. D의 경우, 100

Table 4-4. Mitogenic and macrophage-phosphatase activity of the fractions obtained by systemic extraction procedure of the leaves of *P. ginseng*

	Mitogenic activity (MTT assay, %)	Mitogenic activity (A-P assay <FCS>,%)	Mitogenic activity (A-P assay, %)	Macrophage phosphatase activity (%)	Yield (%)
Cell free	0±3	0±26	0±3	0±1	
Saline	100±10	100±18	100±3	100±11	
LPS(100 µg/ml)				316±19	
LPS(10 µg/ml)	517±57	207±26	516±10	338±33	
ConA(5 µg/ml)	1012±105	274±37	110±6		
Cold water (Fraction A)	392±45	1511±156	1008±72	245±21	18.2
Methanol (Fraction B)	107±9	211±33	100±17	158±14	5.1
Hexane (Fraction C)	48±7	72±33	87±21	139±6	0.8
Hot water (Fraction D)	529±19	3161±72	1287±83	308±13	5.2

µg/ml의 비교적 저농도에서 LPS에 상당하는 높은 활성이 있음을 확인할 수 있었다. Fr. B와 C의 경우에는 활성뿐 아니라 수율도 매우 낮아서 활성검색에는 부적당하였다. 한편 lymphocyte mitogen 활성의 경우에도 공히 열수추출물에서 높은 활성이 나타났다. 본 실험에서 열수 추출물이 상대적으로 낮은 수율을 보인 것은 단계적 계통추출을 행한 결과때문으로 냉수 추출물 조제후 그 잔사를 이용하였기 때문으로 판단되었으므로, 따라서 향후 추출 시에는 열수 추출이 가장 적절한 것으로 판단되었다.

나. 열수추출 고분자획분의 조제 및 면역증강 활성 측정

이상의 결과에서 인삼 엽부로부터 열수추출을 행할 경우, 높은 면역증강 활성 획분을 얻을 수 있으며, 이 중에는 메탄올 가용획분이 비교적 높은 비율로 존재하고 이들은 활성이 거의 없음이 확인되었다. 그러므로 메탄올 가용획분은 열수추출물에서 제거 할 경우, 활성이 양호한 수용획분을 얻을 수 있음이 기대되었다. 그러나 메탄올이 인체에 높은 독성을 나타내므로 비슷한 극성을 소유한 ethanol로 대체시 활성 물질의 효율적 획득이 가능하다고 판단되었다. 따라서 인삼 잎을 직접 열수추출한 후, ethanol의 가용획분을 제거하고, 투석 및 동결건조를 행하여 열수추출 고분자 획분(GS-1)을 조제하여(Fig. 4-2) 이들의 면역증강능에 대해 검토하였다. GS-1의 lymphocyte mitogen 활성은 Fig. 4-8, 9에서 보는 바와 같이 MTT assay나 alkaline phosphatase assay를 이용한 경우에서, 강력한 immune modulator로 알려진 LPS보다 공히 높은 활성을 나타내었으며 농도의 증가에 따라 활성이 증가하는 농도의존적 경향을 보였다. 또한 GS-1을 대상으로 macrophage 활성화능을 검토한 결과 Fig. 4-9에서 보는 바와 같이 LPS에 버금가는 높은 활성을 보였다. 특히 macrophage 활성화에 있어서 LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 검색 수치가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다 높게 나타났는데 이는 고농도의 LPS가 오히려 macrophage 활성을 저해하기 때문으로 판단되었다. 그리고 시료의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 이상에서는 활성의 차이가 별로 없이, LPS와 유사한 정도의 높은 활성을 보였으며 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도부터는 농도의존적 경향을 보여주었다.

한편 GS-1의 화학 조성을 살펴본 결과 중성당 함량은 68.9%, 산성당 함량은 15.9% 그리고 단백질 함량은 8.7%로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

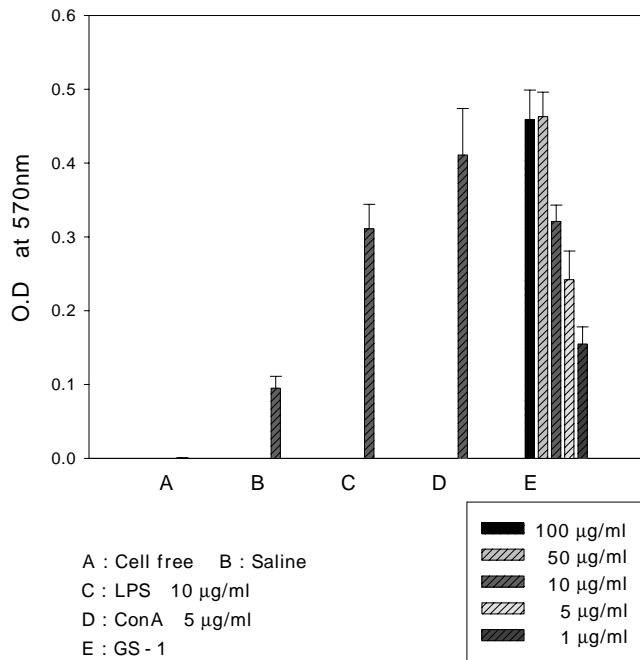


Fig. 3 - 7. Mitogenic activity of GS - 1 obtained from the hot water extracts of leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer. (Assayed by MTT method)

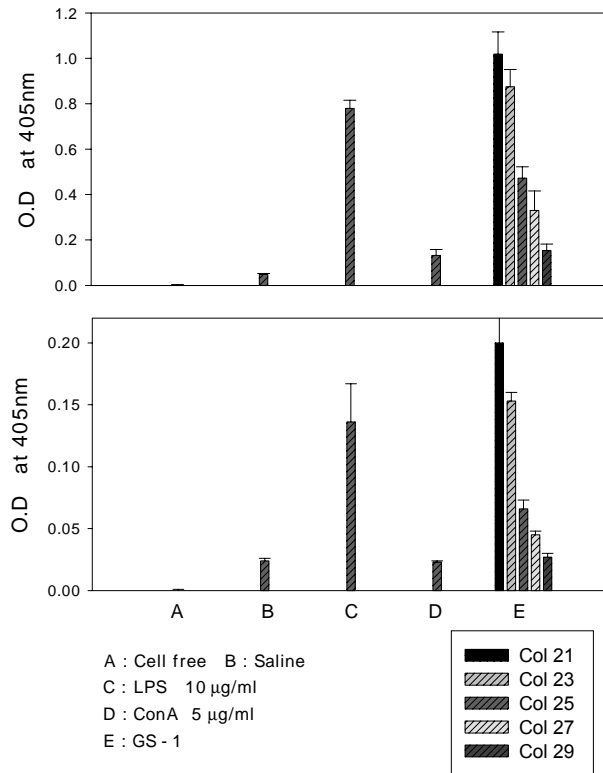


Fig. 4 - 8. Mitogenic activity of GS - 1 obtained from the hot water extracts of the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer.
 (Assayed by alkaline phosphatase method, up : with 10% FCS, down : without FCS)

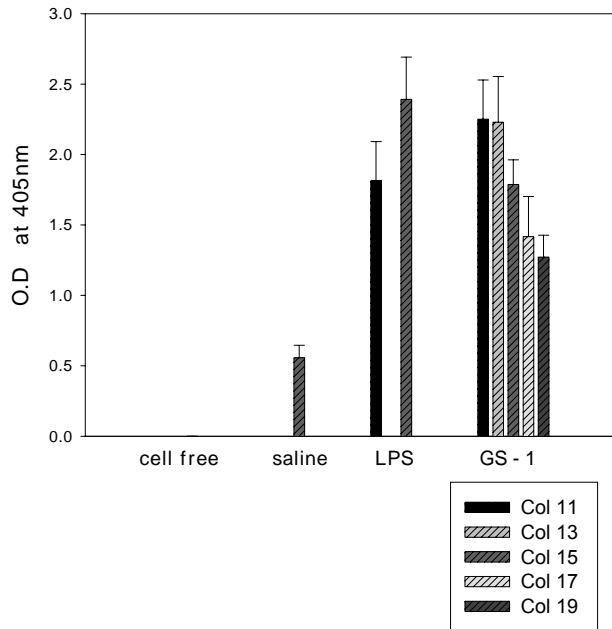


Fig. 4 - 9. Macrophage phosphatase activity of GS - 1 obtained from the hot water extract of the leaves of the *Panax ginseng* C.A. Meyer.

제 2 항. Mitogen 및 macrophage 활성물질의 본체 분석

가. Cetavlon 처리에 의한 면역증강 활성물질의 분획 및 특성

GS-1은 산성당 함량이 15.92%로 본 획분안에는 산성도가 다양한 다당이 존재할 것으로 판단되었으므로 Fig. 4-5에서와 같이 양이온 계면 활성제인 Cetavlon을 처리하여 산성도가 다른 3개 획분 GS-2, GS-3 및 GS-4를 얻을 수 있었다. 이들의 활성을 측정한 결과, 산성다당 획분인 GS-2가 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의

농도에서 공히 최대의 활성을 보여주었다.(Fig. 4-10~12 참조)

또한 GS-2, -3 및 -4의 화학 조성을 분석 검토한 결과 중성당, 산성당 및 단백질의 함량이 GS-2는 각각 77.5%, 11.4%, 11.1%이고, GS-3는 70.5%, 21.4%, 8.1% 이며 GS-4는 68.1%, 21.2%, 10.6%로 나타났다.

나. 면역 활성 본체의 검토

이상에서 얻어진 GS-2, -3 및 -4획분은 화학조성상 다당 성분외에 단백질을 약 8~11% 함유하고 있었다. 이러한 조성은 면역증강 활성이 다당부분과 단백질 그외 타 성분의 부위에 존재하는지가 모호한 부분이었으므로 각 획분을 periodate, pronase 및 chlorite 처리를 행한 후 활성을 비교하였다.(Fig. 4-10~12 참조) Mitogen 활성능의 경우 각 획분에서 모두 periodate산화를 통해 당부위를 개열시킨 획분과 chlorite 처리를 통해 lignin부위를 산화시킨 획분은 미처리군에 비해 활성의 현저한 감소가 이루어진 반면 pronase처리에 있어서는 상대적으로 적은 변화나 활성의 증가 양상을 보였다. Macrophage 활성화능의 경우 periodate나 chlorite 처리군은 전반적으로 활성의 감소 경향을 보였으며 pronase digestion을 하여 단백질을 제거한 획분은 오히려 활성이 높아짐을 알 수 있었다. 이는 면역활성에 관여하지 않는 단백질 부분이 제거됨으로써 면역 자극에 관여하는 당과 lignin의 농도가 높아졌기 때문으로 판단된다. 따라서 mitogen이나 macrophage 활성화의 본체는 단백질이 아닌 당과 약간의 lignin 부위일 가능성이 높은 것으로 판단된다.

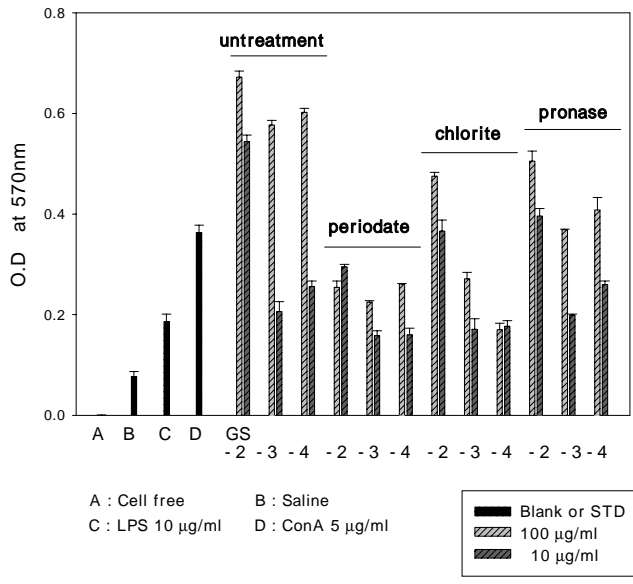


Fig. 4 - 10. Change in mitogenic activity of GS - 2, GS - 3 and GS - 4 by treatment of periodate, chlorite and pronase.
 (Assayed by MTT method)

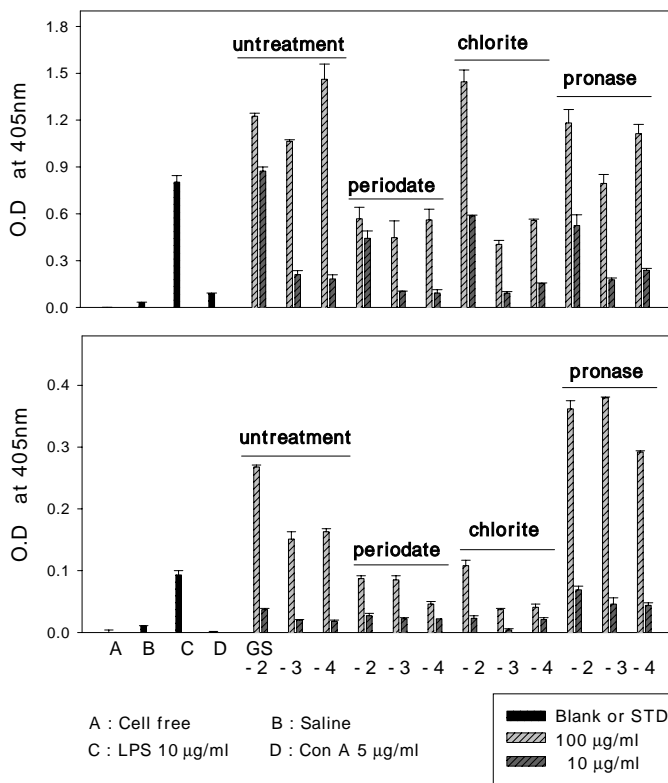


Fig. 4 - 11. Change in mitogenic activity of GS - 2, GS - 3 and GS - 4 by treatment of periodate, chlorite and pronase.

(Assayed by Alkaline phosphatase method, up : with 10% FCS, down : without FCS)

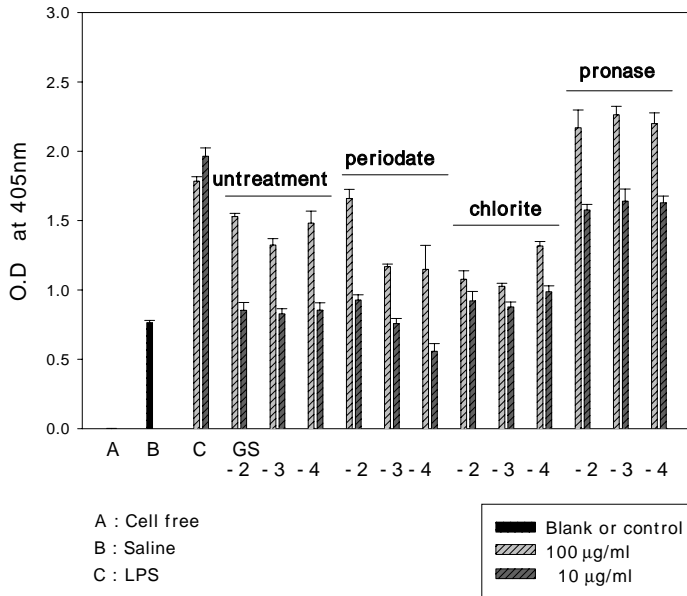


Fig. 4 - 12. Change in macrophage phosphatase activity of GS - 2, GS - 3 and GS - 4 by treatment of periodate, chlorite and pronase.

제 3 항 면역 활성화 다당의 분리 및 정제

가. Anion exchange chromatography (AEC)

Cetavlon 처리에 의해 활성이 우수했던 GS-2는 DEAE-Sepharose FF (Cl⁻ form)로 AEC를 행한 결과, 비흡착 1개 획분(GS-2a)과 9개의 흡착획분(GS-2b~2j)을 얻을 수 있었고, 이 획분들로 화학 조성 분석을 해본 결과 용출 용액인 NaCl의 농도가 높아질수록 중성당과 산성당의 함량은 감소하고 단백질

및 색소의 함량이 증가됨을 알 수 있었다.(Fig. 4-13 참조) 이들의 면역증강 활성을 검토한 결과 Fig. 4-14~16에 나타난 바와 같이 대체로 고르게 활성이 높게 나타나는 경향을 보였다. macrophage 활성의 경우 (Fig. 3-16) 0.1 M NaCl 용출분획 (GS-2b와 GS-2c)이 활성이 가장 양호하였다. 그러나 이들의 수율은 상대적으로 낮았다.(Table 4-5) 수율이 양호하였던 0 M (31.7%), 0.3 M (22.5%) 및 1.0 M (12.4%) 용출분획 GS-2a, GS-2e 및 GS-h의 경우 100 µg/ml의 농도에서 대체로 활성이 양호한 경향을 보였다. 한편 mitogenic activity의 경우(Fig. 4-14~15) 방법에 따른 차이는 인정되지만 고농도의 염으로 용출한 획분이 대체로 활성이 양호한 경향을 보였으며 1.0 M 용출획분인 GS-2h가 100 µg/ml의 농도에서 가장 활성이 높았다. 그러나 10 µg/ml이 저농도의 경우, 0 M 또는 0.1 M 용출 획분인 GS-2a, GS-2b 및 GS-2c가 양호하였다. 이상의 결과를 종합할 때 10 µg/ml 의 농도에서 비흡착획분과 0.1 M 및 0.4 M 용출획분인 GS-2a, GS-2b, GS-2c 및 GS-2f가 상대적으로 높은 mitogen 활성 및 macrophage 활성을 보였으므로 이들 획분을 대상으로 지속적인 정제 과정을 수행하였다.

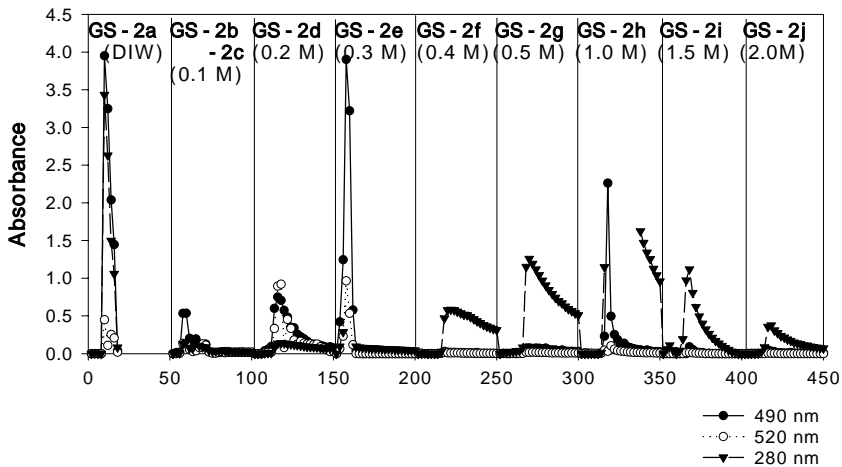


Fig. 4 - 13. Anion exchange chromatographs of GS - 2 on DEAE - Sephrose FF. The column (3.3 x 27 cm) was eluted with DIW until sugar was no longer detected and then eluted stepwise elevated 0.1M~2.0 M NaCl solution.

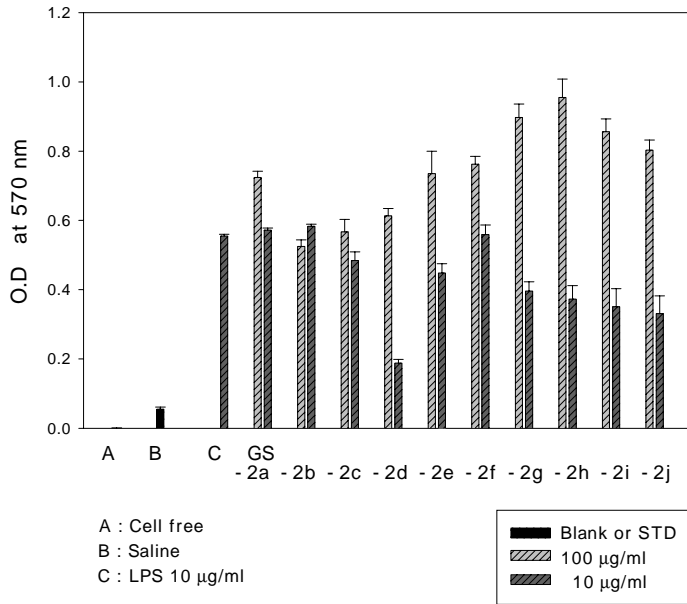


Fig. 4 - 14. Mitogenic activity of the polysaccharide fractions obtained by anion exchange chromatography using DEAE - Sepharose FF of GS - 2.

(Assayed by MTT method)

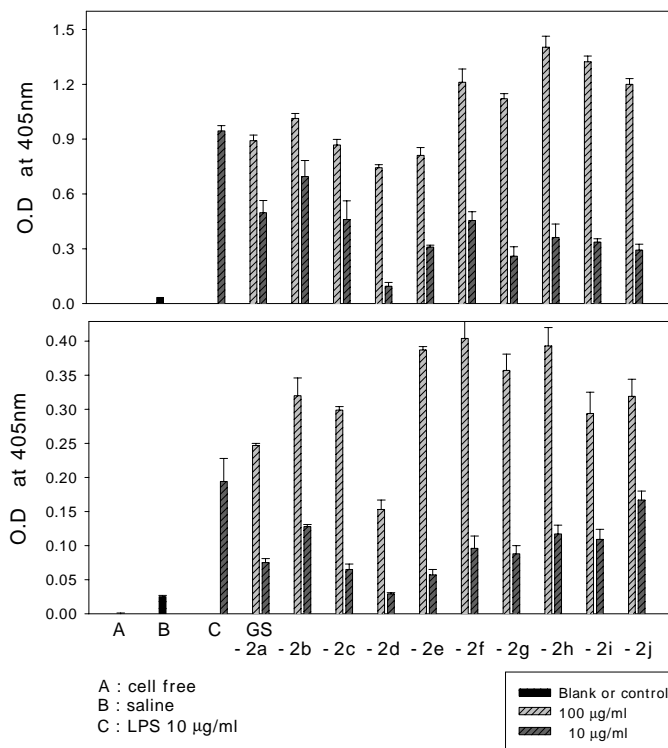


Fig. 4 - 15. Mitogenic activity of the polysaccharide fractions obtained by anion exchange chromatography using DEAE - Sepharose FF of GS - 2.

(Assayed by alkaline phosphatase activity, up : with 10% FCS, down : without FCS)

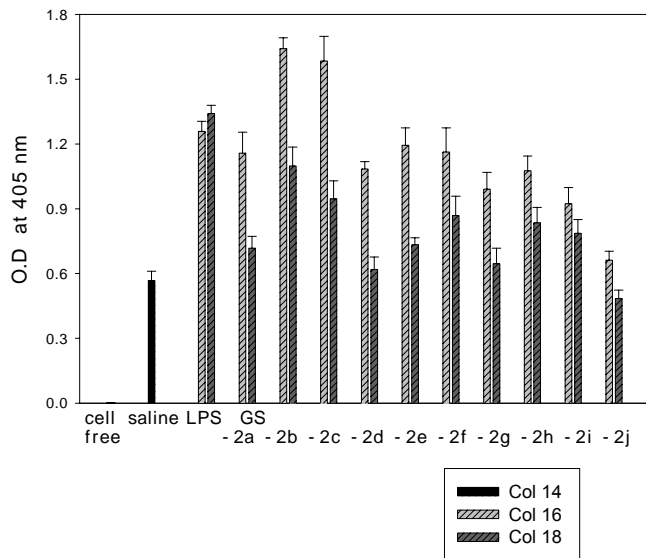


Fig. 4 - 16. Macrophage phosphatase activity of the polysaccharide fractions obtained by anion exchange chromatography using DEAE - Sepharose FF of GS - 2.

Table 4-5. Yields of subfractions obtained by ion exchange chromatography of GS-2

Subfraction	Yield (%)	Subfraction	Yield(%)
GS-2a(0 M)	31.7	GS-2f(0.4 M)	1.9
GS-2b(0.1 M-1)	1.7	GS-2g(0.5 M)	2.9
GS-2c(0.1 M-2)	2.0	GS-2h(1.0 M)	12.4
GS-2d(0.2 M)	12.8	GS-2i(1.5 M)	2.8
GS-2e(0.3 M)	22.5	GS-2j(2.0 M)	1.3
Total			92.0

나. Gel permeation chromatography (GPC)

AEC 정제과정중 높은 활성을 보였던 GS-2a, GS-2b, GS-2c 및 GS-2f는 HPLC로써 대략적인 분자량을 검측한 후, Sepharose CL-6B, Bio gel P-30 및 Bio gel A-0.5m 중 분자량에 합당한 resin을 선택하여 GPC를 수행하였다. GS-2a와 GS-2f는 Bio gel P-30 resin을 이용하여 각각 GS-2a I 과 -2aII 및 GS-2f I, -2fII, -2fIII를 얻을 수 있었으며(Fig. 4-17) GS-2b는 Bio gel P-30 과 Bio gel A-0.5m을 이용하여 GPC를 행한 결과 단일 획분으로 나타났다. 또한 GS-2c는 Sepharose CL-6B를 이용하여 GS-2c I 과 -2cII를 얻을 수 있었다.(Fig. 3-18) 이들로부터 면역증강 활성을 측정 한 결과(Fig. 4-19~21), 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 GS-2a I, -2aII, -2b 및 -2f I 이 타 획분에 비하여 mitogen 및 macrophage phosphatase의 활성화능이 모두 높게 나타났다. 이들 고효성 획분에 대한 화학 조성을 분석한 결과 GS-2a I, GS-2aII, 및 GS-2b는 중성당 함량이 약 92%, 산성당 함량이 약 7%이고 단백질은 검출되지 않았다. 단백질이 검출되지 않은 것은 GPC 정제 과정 중 당의 분자량에 합당한 resin을 선택했기 때문에 정제과정 중 제거된 것으로 추측된다. 구성당 분석을 한 결과 이들은 주로 galactose (37~40%)와 glucose (13~20%)로 구성되어 있었으며 그 외 rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, glucuronic acid 및 galacturonic acid가 소량씩 함유되어 있음을 알 수 있었다.(Table 4-6) 한편 GS-2f I 의 경우에는 중성당 및 산성당 이외에 착색물질로 판단되는 미지 성분이 함유되어 있었다.

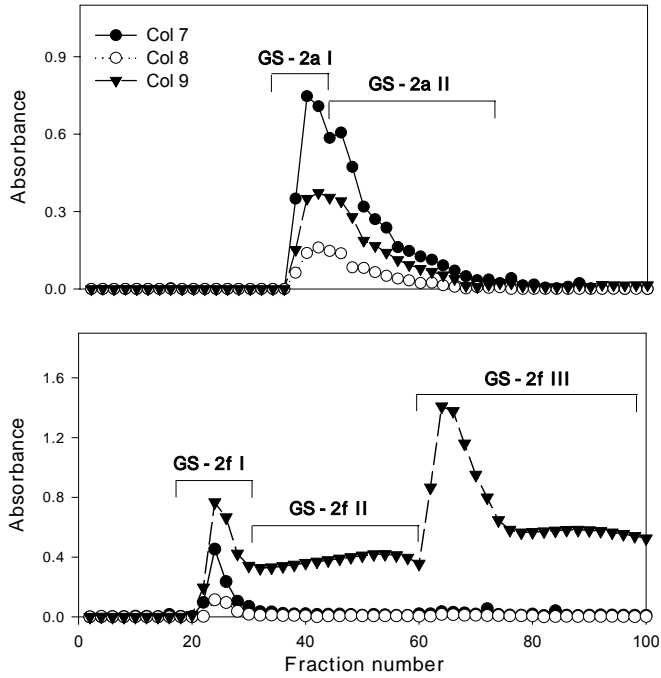


Fig. 4 - 17. Gel permeation chromatographs of GS - 2a and GS - 2f on the column of Bio gel P - 30.

The column(GS - 2a : 1.25 x 89 cm and GS - 2f : 0.88 x 69 cm) was eluted with 0.05 M acetate buffer (pH 5.2)

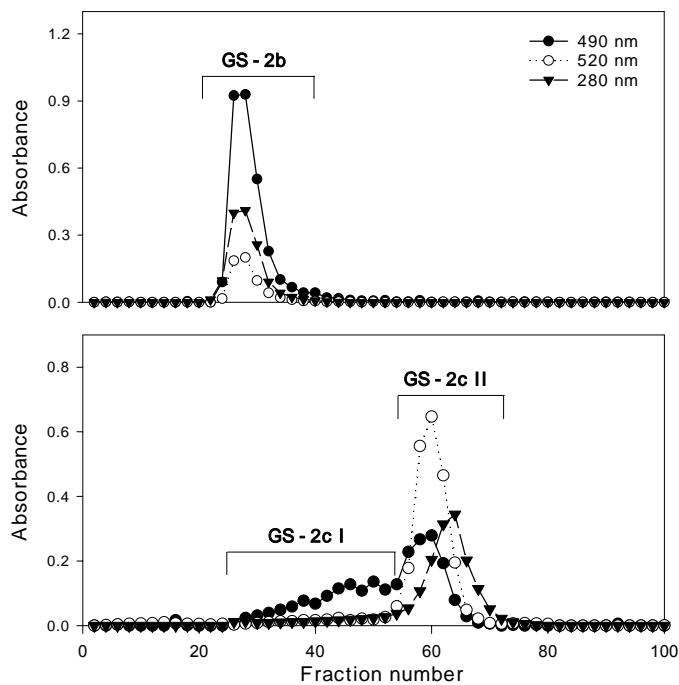


Fig. 4 - 18. Gel permeation chromatographs of GS - 2b and GS - 2c.

Up : GS - 2b fraction was purified by Bio gel A - 0.5m column (column size : 0.88 x 69 cm)

Down : GS - 2c fraction was purified by Sepharose CL - 6B (column size : 0.85 x 74 cm)

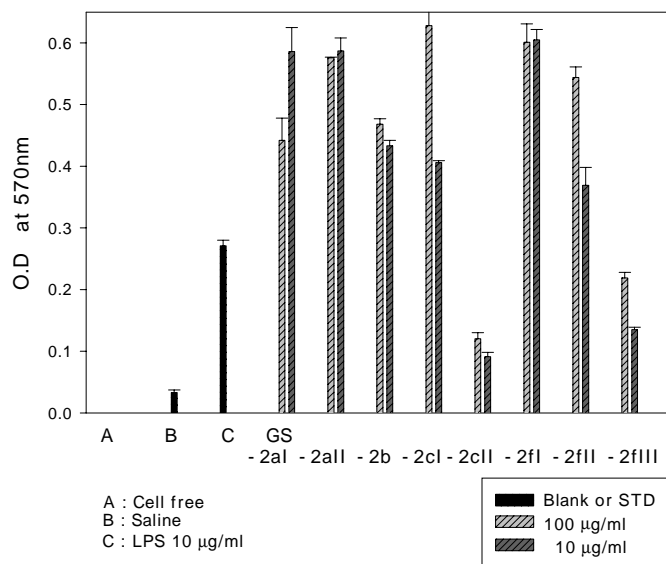


Fig. 4 - 19. Mitogenic activity of GS - 2a, GS - 2b, GS - 2c and GS - 2f subfractions obtained by gel permeation chromatography.
(Assayed by MTT method)

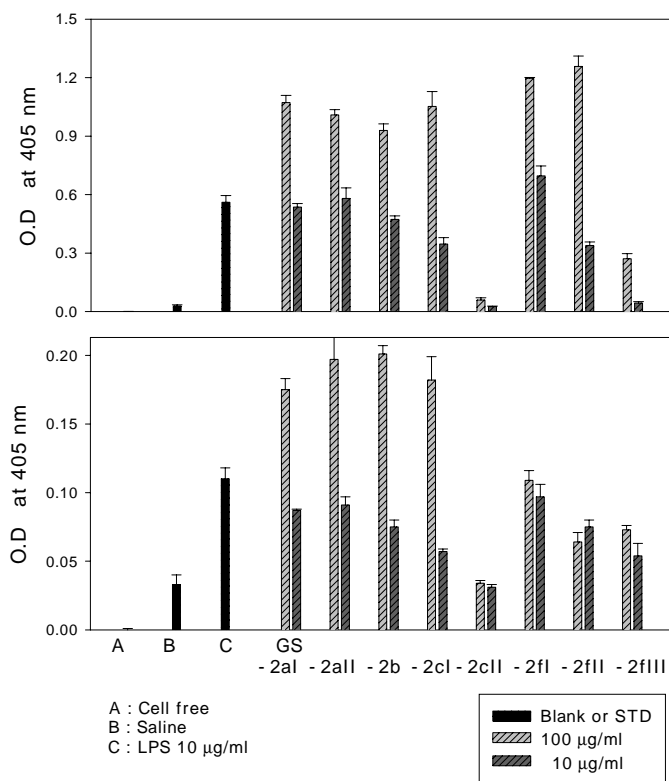


Fig. 4 - 20. Mitogenic activity of GS - 2a, GS - 2b, GS - 2c and GS - 2f subfractions obtained by gel permeation chromatography. (Assayed by alkaline phosphatase method, up : with 10% FCS, down : without FCS)

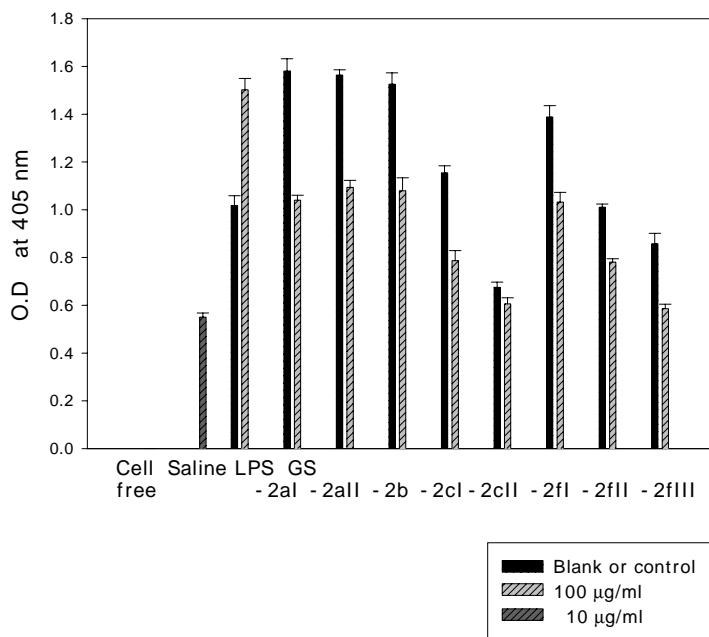


Fig. 4 - 21. Macrophage phosphatase activity of GS - 2a, GS - 2b, GS - 2c and GS - 2f subfractions obtained by gel permeation chromatography.

Table 4-6. Chemical compositions of the purified immuno-stimulating polysaccharides, GS-2a I, GS-2a II, GS-2b and GS-2f I (%)

Chemical composition	GS-2a I	GS-2a II	GS-2b	GS-2f I
Neutral sugar	92.5	92.6	92.4	88.8
Uronic acid	7.5	7.4	7.6	11.2
Protein	0.0	0.0	0.0	0.0
Component sugar	(mol%)			
Ramnose	5.9	5.6	7.0	7.0
Fucose	7.8	8.6	9.0	3.5
Arabinose	7.6	9.1	8.3	11.3
Xylose	5.0	5.1	3.7	4.3
Mannose	9.0	7.5	6.7	10.1
Glucose	19.7	18.5	17.3	13.1
Galactose	37.5	38.2	40.4	39.5
Glucuronic acid +Galacturonic acid	7.5	7.4	7.6	11.2

다. 정제 다당의 순도 및 분자량 확인

정제된 GS-2a I, -2aII, -2b 및 -2f I의 순도 및 분자량을 확인하기 위하여 Asahipak GS-520, GS-320과 GS-220 column을 차례대로 연결하여 HPLC를 수행하였다. GS-2a I, -2aII 및 -2b 획분의 경우 좌우 대칭의 단일 peak로 나타나 순수하게 정제된 것을 확인할 수 있었지만(Fig. 4-22), GS-2f I 획분의 경우는 2개의 peak가 겹쳐져 나타난 것으로 보아 부분 정제됨을 확인할 수 있었다. 이들의 분자량을 측정하기 위하여 표준 물질로서 pullulan series를 사용하여 표준곡선을 작성하고(Fig. 4-23) 그 분자량을 추정한 결과, GS-2a I은 144 KDa, GS-2aII는 222 KDa, GS-2b는 90 KDa, GS-2f I은 184와 74 KDa의 다당체임을 확인할 수 있었다.(Table 4-7)

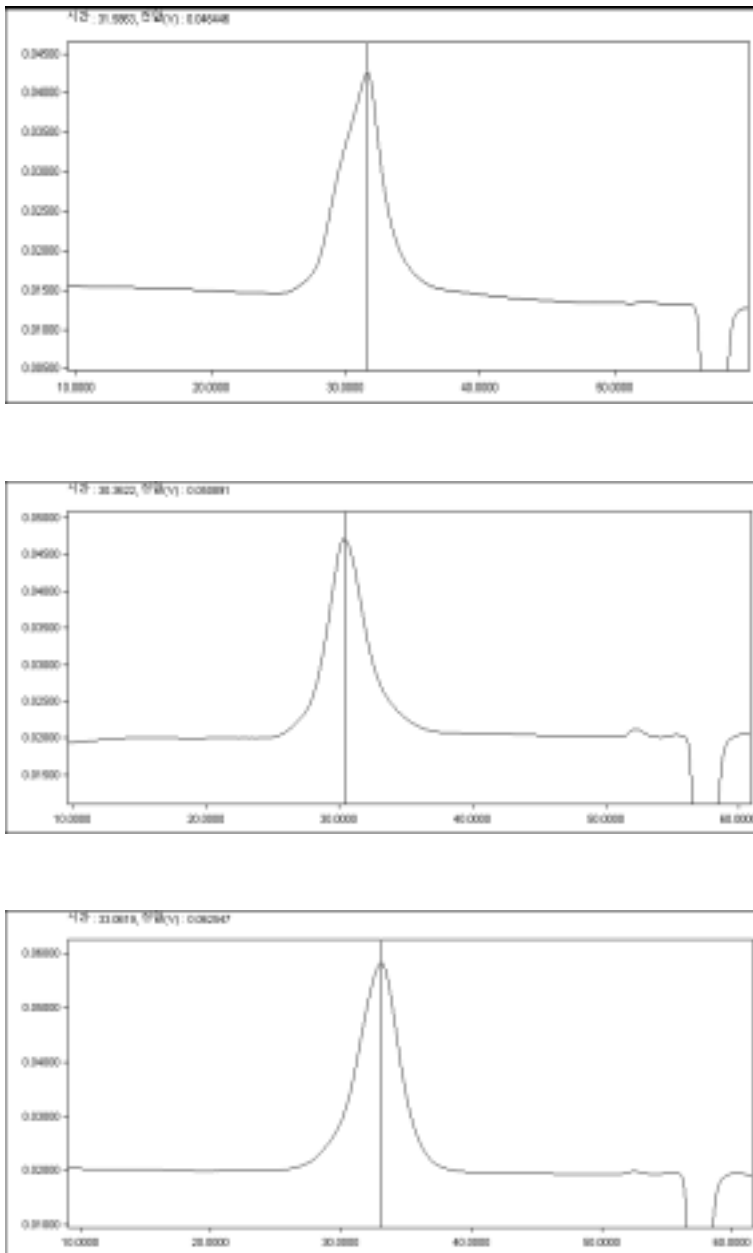


Fig. 4-22. HPLC chromatographs of the immuno-stimulating polysaccharides, GS-2a I, GS-2aII and GS-2b from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer.

(Top : GS-2a I, Middle : GS-2aII, Bottom : GS-2b)

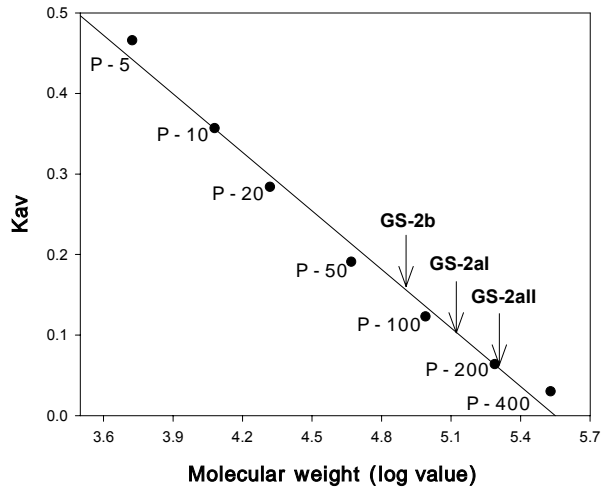


Fig. 4 - 23. Standard curve for molecular weight determination of the purified polysaccharides.

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

Table 4-7. Molecular weights of the immuno-stimulating polysaccharides purified from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer

Sample	Molecular weight (Da)
GS-2a I	143,000
GS-2a II	222,000
GS-2b	90,000
GS-2c I	82,000
GS-2c II	5,700
GS-2f I	184,000
	74,000
GS-2f II	19,000
GS-2f III	9,000

제 4 항 면역활성 다당의 구조 특성

가. 면역 활성화 다당의 일반 구조 특성

제 3항에서 언급한 바와 같이 높은 macrophage 활성화능과 mitogen 활성을 보였던 GS-2a-I, GS-2a-II, GS-2b 및 GS-2f-I 정제 획분 중 화학 조성이 상이하고 많은 색소물질로 착색되어 있는 GS-2f-I을 제외한 3개 획분은 모두 중성당 함량 92% 수준, 산성당함량 7% 수준으로 함유한 다당류로써 단백질은 각 획분에서 전혀 검출되지 않은 특성을 보여 주었다. 한편 구성당 분석의 결과, 이들 획분은 공히 galactose (37-40%)와 glucose(13-20%)를 높은 비율로 함유한 중성당의 성격을 띠었으며 그 외 arabinose, fucose, mannose 등이 함유되어 있었다. 이들 정제 다당이 상이한 획분에서 정제된 다당임에도 불구하고 비슷한 화학조성으로 구성되어 있는 사실은 이들이 구조적으로 매우

유사함을 반증한다고 사료되었다. 그러나 이들은 Table 4-7에 나타난 바와 같이 분자량이 서로 매우 상이하므로 아마도 비슷한 구조를 가진 크기가 서로 다른 다당들일 것으로 사료되었다. 한편 이들 시료는 arabinose가 상대적으로 낮은 함량을 보인 점과 β -Glucosyl Yariv antigen을 이용한 반응성 실험에서 모두 halo를 형성하지 않은 점(자료는 제시하지 않았음) 등으로 미루어 arabino-3,6-galactan 구조를 소유하지 않음을 추정 할 수 있었다.

나. 면역 활성 다당의 결합양식

면역활성능이 우수했던 GS-2a-I, GS-2a-II, GS-2b의 3개 다당은 구조해석을 위해 sodium carbanion과 methyl iodide를 이용하여 methylation을 행하였으며 GC-MS의 fragment 이온을 분석하여 결합양식을 규명한 결과는 Table 4-8에 표시한 바와 같다. 이들 3개 다당은 높은 비율의 galactose 및 glucose 잔기들을 함유하고 있었으며, 이는 구성당 분석결과와 일치하였다. Galactose 잔기 중에는 4-linked 결합이 전체의 20%이상을 차지하였으며, 그 외 4,6-branched Gal 및 terminal-Gal이 높은 비율로 함유되어 있었다. 이러한 사실은 -4)-Gal-(1→4)-Gal-(1-를 주쇄로 하는 core 부분에 Gal의 C6 위치에서 side chain이 뺏어져 나가는 구조임을 추론할 수 있었으며, 각 당에서 모두 말단 잔기가 높은 비율을 나타낸 결과로 미루어, side chain에는 비교적 짧은 사슬이 고도로 분지되어 있음을 알 수 있었다.

Table 4-8 Methylation analysis of GS-2a-I, GS-2a-II and GS-2b' from ginseng leaves

Glycosyl residue	Deduced glycosidic linkage	GS-2a- I	GS-2a- II	GS-2b'
Ara	terminal(f)	8.51	6.41	5.55
	4 or 5			8.54
Xyl	terminal(p)		10.18	5.25
Rha	terminal(p)	6.22	4.12	4.32
Fuc	3,4 or 3,5	4.80	3.79	2.82
Man	3	8.56	5.79	1.24
Gal	terminal	10.63	7.41	6.40
	3			6.45
	4	23.52	22.50	24.78
	6	3.80	3.41	1.89
	3,6		8.74	2.09
Glc	4,6	11.17	8.77	9.08
	terminal(f)	5.30	5.28	10.83
	terminal	7.33	6.20	4.01
	3	5.53	4.05	3.75
	4	4.63	3.35	2.99

제 5 항 활성다당의 각종 면역 활성화

가. 활성다당이 면역세포의 cytokine 생산에 미치는 영향

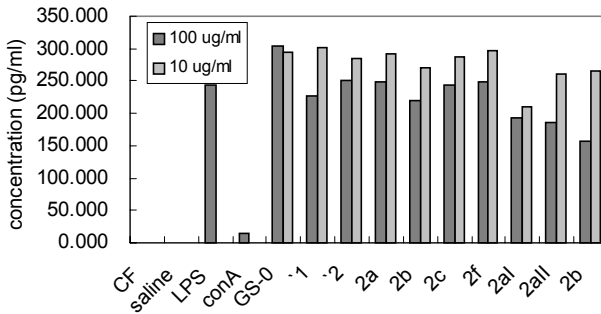
1) 활성다당 자극에 의한 splenocyte의 cytokine 생산

면역계에 관련된 세포에서는 개개 세포의 활성화도 중요한 의미를 갖지만 각 면역세포들 상호간에 긴밀한 협조하에 숙주방어라는 목표를 수행하는데, 이들 사이에는 각 면역세포들이 분비하는 cytokine류들이 자신의 세포나 타 면역세포의 활성화, 성장 및 분화를 촉진하는 mediator로써의 기능을 담당하

고 있다고 알려져 있다. 따라서 높은 lymphocyte mitogen 활성을 보였던 정제다당 GS-2a-I, GS-2a-II, GS-2b을 이용, lymphocyte를 자극한 후 생산되는 각종 cytokine류를 측정하였다. Anti-cytokine과 peroxidase conjugated anti-cytokine을 이용한 sandwich ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)를 이용하여 활성다당에 의해 유도된 IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF (granulocyte-monocyte-stimulating factor) 및 IFN- γ (interferon- γ)의 생산량을 측정한 결과, 알려지 반응에 관여하는 IL-4를 제외한 나머지 cytokine류의 생산을 모두 자극하는 경향을 보여 주었다. (Fig. 4-24 - 4-26) 특히 T lymphocyte의 성장인자인 IL-2의 경우 양성 대조군인 LPS에 버금가는 높은 생산 증가를 보였다. 그러나 IL-2의 생산은 72시간 배양한 splenocyte의 상등액의 경우 고농도 처리군 보다 저농도의 시료 첨가군에서 더 높게 나타났는데, 이는 IL-2가 T lymphocyte의 분화초기에 관여하는 cytokine이지만 T lymphocyte의 자살인자로도 작용하기 때문으로 추정되었다. Mmicroplates내에서 배양 후기에 접어든 72시간 배양상등액을 대상으로 측정했으므로 ConA (T cell 의 mitogen) 자극의 경우 이미 T cell 자살이 일어났으므로 IL-2의 생산량이 적어진 반면 B-cell의 mitogen인 LPS 자극의 경우 상대적으로 늦게 활성화된 T cell에 의해서 그 생산량이 높게 측정된 것으로 사료되었다. (Fig 4-24) T cell의 생산과 macrophage의 기능을 억제한다고 알려진 IL-10과 B cell 분화의 후기단계에서 활성화된 B cell의 성장인자로 작용하는 IL-6의 경우, conA보다 LPS와 배양한 splenocyte 상등액에서 매우 높게 나타났으며, 정제가 진행된 횡분일수록 cytokine 생산량이 증가하는 결과를 보여 주었다. (Fig. 4-25) 글수에 작용하여 각종 granulocyte와 macrophage의 성장을 자극한다고 알려져 있어 담암환자의 화학요법 이후 감소된 면역세포의 증가 목적으로 이용되는 GM-CSF의 생산은 Anion exchange chromatography를 거친 GS-2a, -2b, -2c, -2f에서 가장 높게 측정되었고 대체적으로 양성 대조군보다 많은 양을 생산하였다. natural killer cell과 lymphocyte와 macrophage 등의 면역세포를 활성화시키는 IFN- γ 는 활성 다당에 의해 상당히 높은 생산을 보였는데 비교적 정제도가 낮은 GS-1, -2, -3 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)획분에 의

해 자극된 splenocyte의 상등액에서 양성대조군 이상으로 고생산량을 보여 주었다. 따라서 인삼잎 유래 활성다당이 면역세포를 자극하여 다양한 cytokine의 생산 증가를 유도한 사실은 복잡한 네트워크를 구성하고 있는 생물체의 면역계에 적용시에도 유효한 효과를 기대할 수 있다고 사료된다.

IL-2



IL-4

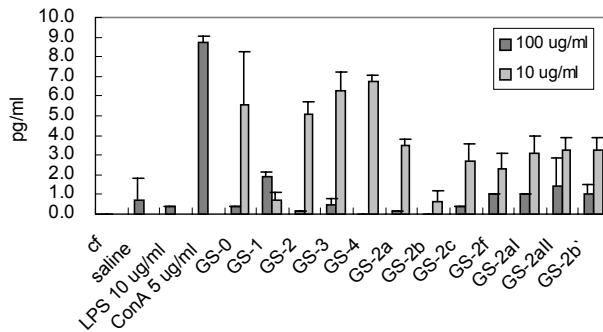
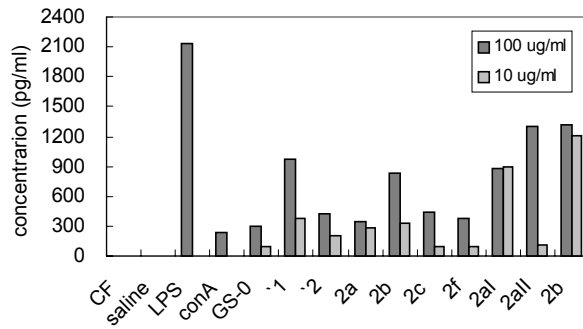


Fig. 4-24. IL-2 and IL-4 production of splenocytes stimulated by immuno-active polysaccharides from ginseng leaves.

IL-6



IL-10

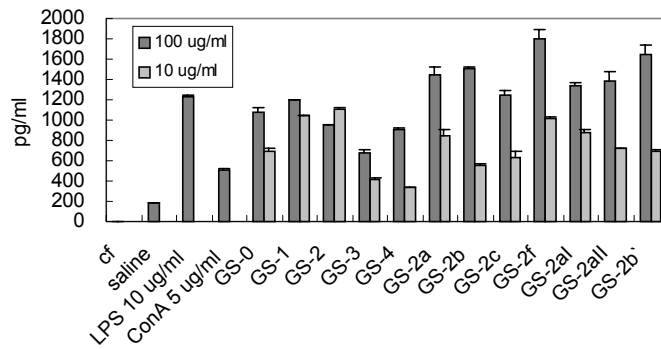


Fig. 4-25. IL-6 and IL-10 production of splenocytes stimulated by immuno-active polysaccharides from ginseng leaves.

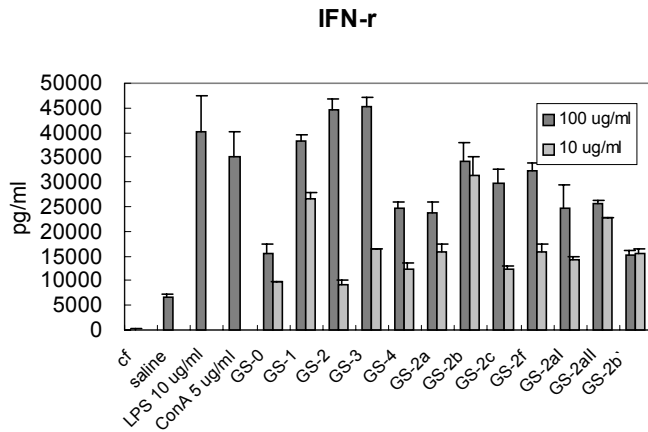
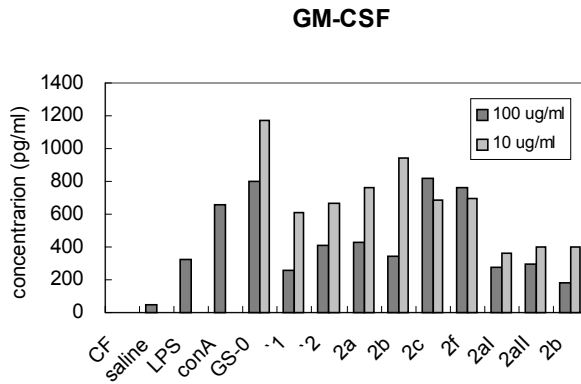


Fig. 4-26. IL-6 and IL-10 production of splenocytes stimulated by immuno-active polysaccharides from ginseng leaves.

2) 활성다당 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산

Macrophage의 활성이 높았던 GS-2a-I, GS-2a-II, GS-2b는 macrophage 배양 시 첨가하여 생산되는 각종 cytokine류를 측정하였다. Fig. 4-2과 4-28에 나타난 바와 같이 ELISA 법에 의해 IL-1, IL-4, IL-6, IL-12 alc TNF- α 의 생산량을 측정한 결과, IL-4와 IL-12 생산은 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. IL-1, IL-6 및 TNF- α 의 경우 정제된 획분일수록 생산 증가를 나타내는 경향을 보여 주었으며 그 생산량도 양성 대조군인 LPS로 자극했을때와 유사한

정도로 높게 나타났다. 그 중 TNF- α 의 생산 자극 활성이 가장높은 결과를 얻었는데 이는 종양세포의 세포괴사를 유발하며, 단핵구나 혈관내피 세포에 작용하며 혈관내 IL-1과 IL-6의 분비를 자극한다고 알려져 있다. 또한 cytokine의 생산량은 macrophage 증식 활성도와 유사한 양상을 나타냈다.

대식세포는 항원을 탐식, 처리하여 T 및 B 임파구에 전달하므로써 T 임파구에 의한 일련의 세포성 면역반응과 B 임파구에 의한 항체 매개성 면역반응을 유도함과 동시에 IL-1, IL-6, TNF 등의 세포간 물질을 분비하여 세포성 면역반응 및 항체 매개성 면역반응을 조절한다고 알려져 있으므로 이상의 결과는 인삼잎에서 분리한 면역활성 다당들이 macrophage의 활성화를 통한 전체 면역계의 증강에도 기여할 수 있음을 시사하는 내용이다.

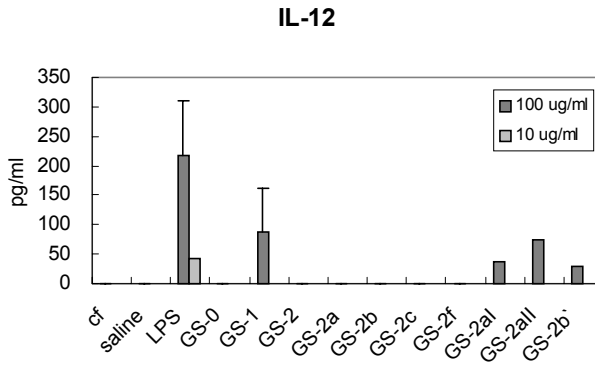
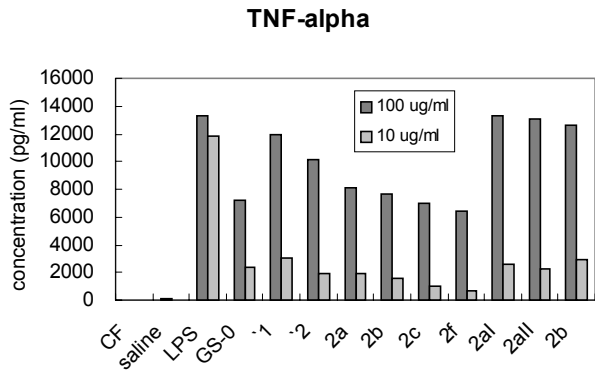


Fig. 4-27. TNF- α and IL-12 production of macrophages stimulated by immuno-active polysaccharides from ginseng leaves.

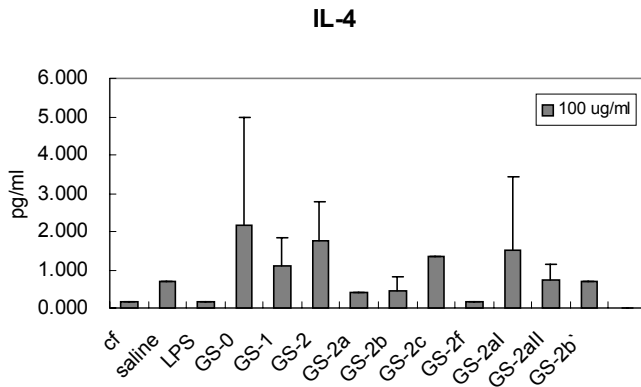
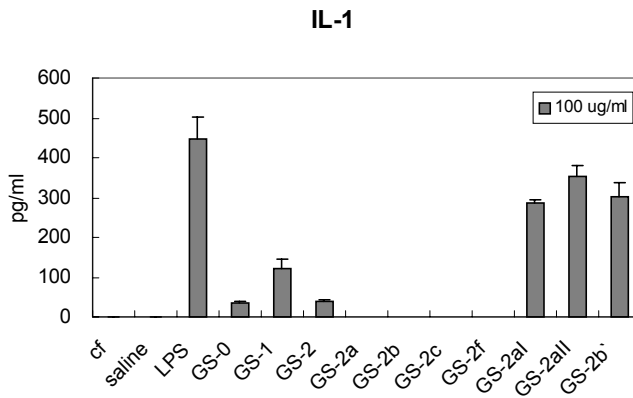
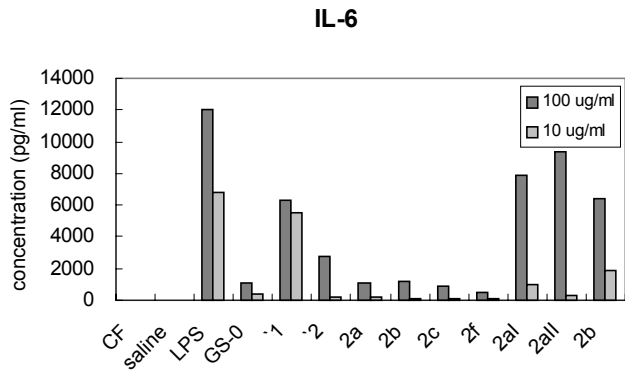


Fig. 4-28. IL-6, IL-1 and IL-4 production of macrophages stimulated by immuno-active polysaccharides from ginseng leaves.

나. 활성화당이 장관 면역 활성화에 미치는 효과

면역반응에 관여하는 세포들은 기능의 효과적인 수행을 위해 조직이나 기관을 구성하게 되는데, 이를 림프계(lymphoid system)라 한다. 림프계는 실질적으로 림프구를 생산하고 분화시키는 1차(혹은 중추) 림프 조직계(흉선, 골수)와, 림프구와 항원과의 접촉 또는 림프구간의 상호작용을 돕는 2차(혹은 말초) 림프 조직계(비장, 림프절 및 점막림프기관 등)로 분류된다. 2차 림프 조직계 중 생체림프조직의 1/3 이상을 차지하는 점막림프기관은 수많은 필수 영양소들의 소화와 흡수의 중추적인 장소이면서 유해한 이물질들과 병원성 미생물들에 대한 물리적인 장벽 역할을 수행할 뿐만 아니라 면역 방어계에서 중요한 면역학적 barrier 기능을 담당하고 있다. 이러한 점막림프기관은 크게 기도에서의 폐조직과 폐포세포에 관련된 호흡 림프상 조직기관인 BALT(Bronchous Associated Lymphoid Tissue), 입천장과 코가 연결되는 부위의 비강관련 림프상 조직인 NALT(Nasal Associated Lymphoid Tissue) 및 장관 림프상 조직으로서의 GALT(Gut Associated Lymphoid Tissue)로 구분할 수 있다. 특히 GALT는 생체 내에서 가장 큰 림프상 조직으로 장관의 점막부위에 존재하며 장관면역계 내 IgA 면역반응을 비롯하여 생체방어에서 대단히 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 한편, GALT에서의 여러 면역기관 중 Peyer's patch는 장관 내 핵심적인 림프기관일 뿐만 아니라 IgA 생산을 위한 inductive site로 알려져 있으며, lumen dome은 항원의 흡수에 중요한 specialized M cell로 구성된 flattered epithelium으로 덮여있다. 이와 같은 M cell은 lumen으로부터 가용성 항원, 세균과 바이러스 등을 pinocytosis나 phagocytosis에 의해 engulfment하여 림프세포에 이동 시킴으로써 세포의 활성화에 기여하는데 즉, 장관 내에 있는 Peyer's patch의 림프구들은 M cell에 의해 섭취된 항원과 반응하여 활성화된 후, 림프소절의 germinal center에서 분화하고 성숙하게 되며, 장으로부터 빠르게 이동하여 MLN(Mesenteric Lymph Node, 장관막 림프절)을 거쳐 체내를 순환하게

된다. 따라서 면역활성화 물질을 소재화하기 이해선 섭취 후, 제일 먼저 접촉이 이루어지는 장관면역계의 활성화가 중요한 의미를 갖게된다. 인삼잎 활성다당 중 산업화에 가장 적절한 분획으로 판단되는 GS-1을 대상으로 peyer's patch cell을 통한 장관 면역활성화 실험을 행하였다. Fig. 4-29에 나타난 바와 같이 무첨가 대조군에 비해 GS-1 처리군은 높은 장관면역계를 통한 골수세포 증식활성을 보여 주었다. 이러한 결과는 현재 상품화되어 시판되고 있는 면역활성소재인 Agaricus (Oubiken, Japan, 버섯류인 Agaricus blezai의 β -glucan), AHCC (active hexose correlated compound, Amino-Up, Japan, 표고), Bio-Bran (미강중 존재하는 arabinoxylan 성분)과 비교했을 때 보다 높은 수치로 GS-1이 강력한 장관면역활성을 소유하고 있음을 알 수 있었다.

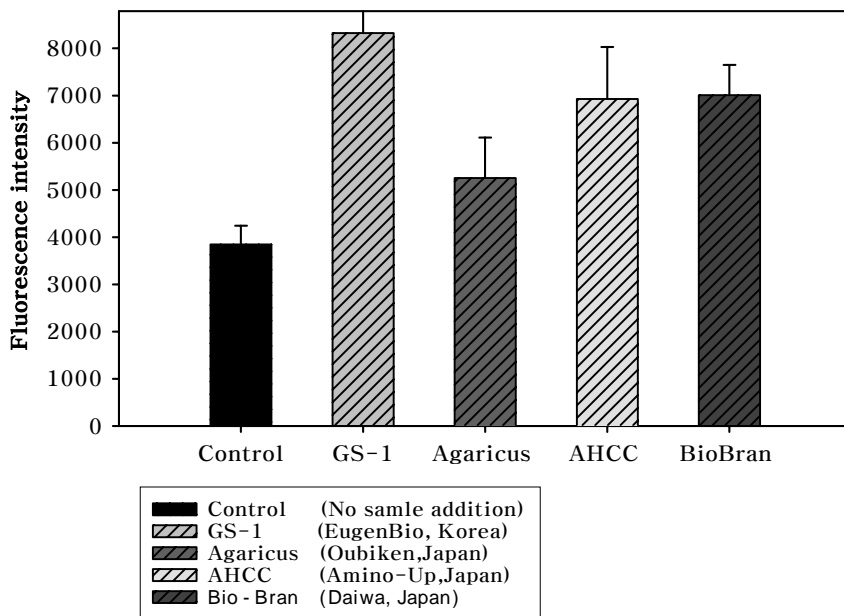


Fig. 4-29. Intestinal immune system modulating activity of GS-1 obtained from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer.

다. 정제 획분에 의한 기능 항진 효과

1) 정제 획분이 macrophage 탐식활성에 미치는 효과

Macrophage는 조직이나 간, 비장, 임파선, 혈액 등에 널리 분포하고 있어 혈액을 통해 전달되는 미생물 등의 외부물질을 파괴하는 phagocytic activity를 갖고 있으며 H_2O_2 나 $\cdot OH$ 등과 NO등을 분비함으로써 체내에 침입한 외래세포(bacteria, virus 등)와 종양세포를 제거하는 기능을 가지고 있다고 알려져 있다. 따라서 인삼잎 유래 정제 다당이 macrophage의 탐식활성에 미치는 효과를 fluorescein conjugated zymosan(FC-zymosan)에 대한 탐식능을 이용, 측정하였다. Fig. 4-30에 나타난 바와 같이 면역활성 정제다당인 GS-2a-I, GS-2a-II, GS-2b는 활성의 차이는 인정되었지만 모두 대조군에 비해 유의적인 활성의 증가를 나타내었으며, 양성 대조군인 LPS와 유사한 정도의 활성을 보였다. 또한 이들은 농도의존적으로 활성이 증가하는 경향을 보였다.

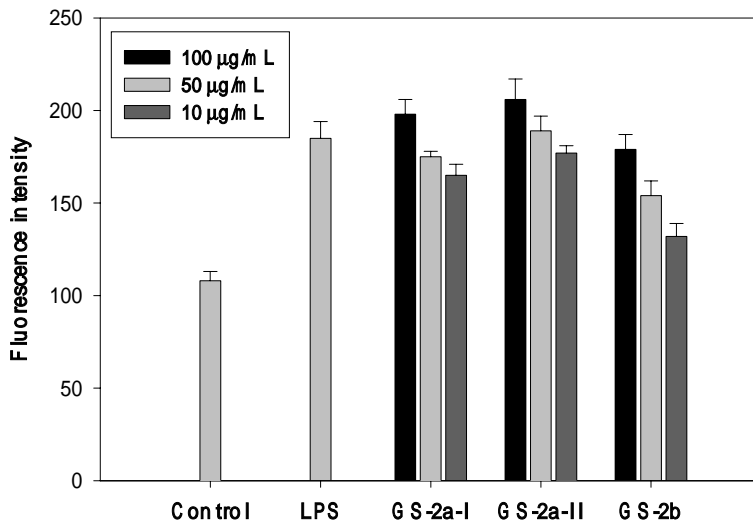


Fig. 4-30. Phagocytic activity of mouse peritoneal macrophages stimulated by immuno-active polysaccharides from ginseng leaves

2) 정제 획분이 macrophage의 NO 생산에 미치는 효과

Macrophage의 주요기능은 외래세포나 종양세포에 직접 작용하여 세포를 탐식, 치사케 하거나 용해성 치사인자를 분비함에 있다. 치사물질로는 β -galactosidase, β -glucuronidase, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, lysosomal hydrolase, arginase, tumor necrosis factor(TNF), cytotoxic factor 및 활성산소 중간체(reactive oxygen intermediates: ROI)와 활성질소 중간체(reactive nitrogen intermediates: RNI)등이 있다고 알려져 있는데 이중 활성질소 중간체(reactive nitrogen intermediates:RNI)인 NO^{\cdot} , NO_2^{-} , NO_3^{-} 등은 매우 정밀한 면역기능의 조절하에서 생성되는 물질로써 특히 체세포 특유의 효소생성을 매개하며 이물질의 침입 또는 종양의 발생시, 항종양 활성과 항미생물 활성을 나타내어 생체방어기전의 매우 중요한 역할을 한다. GS-2a-I, GS-2a-II, GS-2b 다당들을 대상으로 macrophage 자극에 의한 NO 생산량을 측정한 결과는 Fig. 4-31과 같다. 양성 대조군인 LPS로 자극한 경우 NO 생산량은 최대 약 50 mM 정도 였으며 10 $\mu\text{g.mL}$ 이상의 농도에서는 별다른 차이가 없었다. GS-2a-I, GS-2a-II, GS-2b 다당들은 무침가 대조군에 비해 농도의존적으로 높은 NO 생산 자극활성을 보여 주었으며 활성의 GS-2a-II가 가장 높게 나타났으며 GS-2a-I, GS-2b의 순이었다. 그러나 이들은 전체적으로 LPS보다는 다소 못미치는 결과였다.

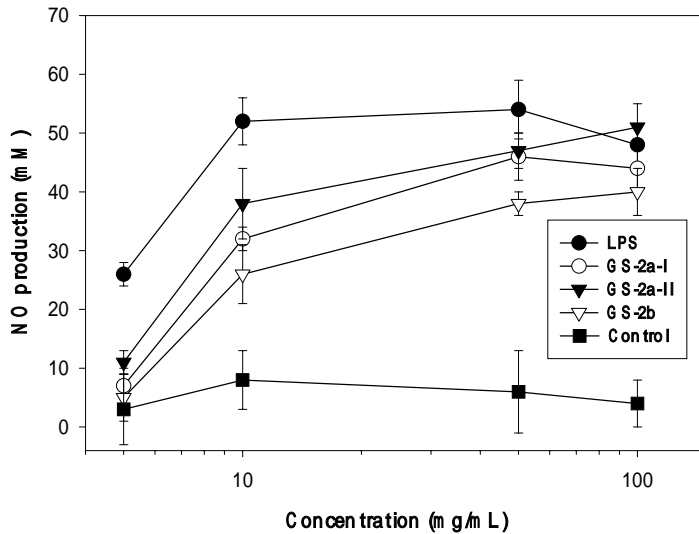


Fig. 4-31. NO production of mouse peritoneal macrophages stimulated by immuno-active polysaccharides from ginseng leaves

3) 정제 획분이 macrophage의 H₂O₂ 생산에 미치는 효과

Macrophage에 의해 생산되는 O₂[·], H₂O₂, ·OH등의 활성산소 중간체는 호흡(respiratory burst)을 통해 발생되어 숙주 방어 초기단계에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다. 따라서 정제 활성획분이 macrophage의 H₂O₂ 생산에 미치는 효과를 검토한 결과, Fig. 4-32에 나타난 바와 같이 모두 농도 의존적으로 높은 H₂O₂생산 증가를 보였다. 활성은 5 µg/mL의 비교적 저농도에서도 활성의 증가를 나타내었으며 이러한 결과는 인삼잎 유래 정제 다당이 macrophage의 활성화에 직접 관여함을 시사하는 내용이다.

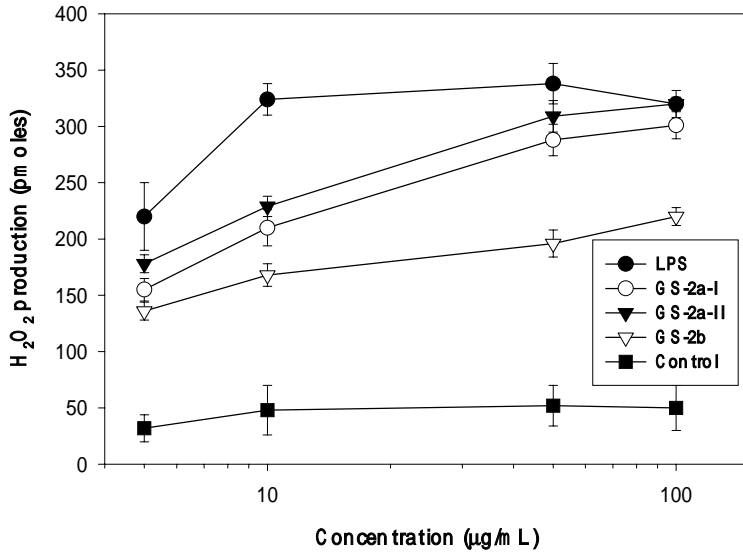


Fig. 4-32. H_2O_2 production of mouse peritoneal macrophages stimulated by immuno-active polysaccharides from ginseng leaves

제 6 항 면역활성 다당체 GS-1의 독성실험

가. GS-1의 경구투여 급성독성 실험

각 세부과제의 실험 결과, 자기면역질환 치유활성, 항보체 활성 및 각종 면역활성이 공히 높았던 인삼잎 유래 획분 중 가장 산업화가 가능할 것으로 판단된 GS-1을 대상으로 급성독성 검사를 행하였다. 면역활성 다당체 GS-1을 500, 1000, 2,500 및 5,000 mg/kg 농도로 경구 투여하고, 14일간 관찰하며 체중의 변화와 생존율을 측정하였다. 그 결과 Table 4-9에 나타난 바와 같이 각 처리군에서 체중은 점차로 증가하였으며 모든군에서 생존율이 100%로 확인되었다. 따라서 GS-1은 경구투여에 의한 독성이 없는 것으로 판단되었다.

나. GS-1의 꼬리정맥투여 급성독성 실험

GS-1의 정맥 투여에 대한 급성독성을 조사하기 위하여 GS-1을 100, 250, 500 mg/kg 농도로 생리식염수에 녹여 꼬리정맥에 주사한 후, 48시간 동안 관찰하였다. 그 결과 Table 4-10에 나타난 바와 같이 100, 250 mg/kg에서는 100%의 생존률을 보였으며 500 mg/kg농도에서만 1마리가 사멸하여 83%의 생존율을 나타내었다. 따라서 GS-1의 LD₅₀은 500 mg/kg이상의 용량에서 나타날 것으로 추정되었으며 500 mg/kg이하에서는 정맥 주사하여도 독성이 거의 없는 것으로 판단되었다.

Table 4-9. Acute toxicity of GS-1 fraction administered by oral into mice

Group	No. of mouse	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	No. of mouse survived	Survival rate(%)
Saline	6	30.6±2.72	37.2±2.95	6	100
500 mg/kg	6	29.3±2.14	36.5±3.21	6	100
1,000 mg/kg	6	31.2±2.63	37.1±5.23	6	100
2,500 mg/kg	6	29.8±2.84	37.4±3.65	6	100
2,000 mg/kg	6	30.6±2.62	37.9±2.43	6	100

Table 4-10. Acute toxicity of GS-1 fraction by intravenous injection in mice

Group	No. of mouse	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Time (hr)		Survival rate (%)
				Death		
				1	48	
saline	6	30.4±2.1	31.0±2.3	0	0	100
100 mg/kg	6	31.2±1.9	31.6±2.0	0	0	100
250 mg/kg	6	31.4±2.1	32.2±3.1	0	0	100
500 mg/kg	6	31.3±2.5	30.1±2.5	0	1	83

다. Macrophage 활성 물질의 마우스 꼬리정맥 주사시 장기무게변화

GS-1 획분을 100 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg의 농도별로 꼬리정맥에 주사한 후 7일간 각 처리군의 체중의 변화를 측정하였으며, 7일째 치사하여 독성 관련장기인 비장, 흉선, 간, 신장을 적출하고 그 무게를 측정하였다. Table 4-11에서 나타난 바와 같이 장기무게는 대조군에 비하여 100, 250 mg/kg 농도에서는 거의 변화가 없었다. 그러나 500 mg/kg 농도 투여시 1간과 신장의 무게가 증가하는 양상을 보였지만 유의적인 차이는 없는 것으로 판단되었다. 따라서 면역 활성 다당체 GS-1은 별다른 독성이 없음이 확인되었다.

Table 4-11. Acute toxicity of GS-1 fraction by intravenous injection in mice

Group	Final body weight(g)	Spleen weight(g)	Liver weight(g)	Thymus weight(g)
Saline	33.2±2.6	0.10±0.05	1.68±0.33	0.05±0.01
100 mg/Kg	33.6±2.1	0.09±0.03	1.67±0.22	0.06±0.01
300 mg/Kg	34.1±3.2	0.11±0.02	2.02±0.25	0.05±0.01
500 mg/Kg	33.8±2.0	0.16±0.03	2.19±0.20	0.06±0.01

제 7 항 활성획분 기능성 소재로의 응용 방안

인삼잎 열수 추출획분인 GS-0과 활성 다당체 GS-1을 이용한 과립차 제조실험을 행하였다. Fig. 4-33에 나타난 바와 같이, GS-0는 60 Brix가 되도록 농축하고, 인삼잎 활성획분 첨가음료의 배합비대로 음료를 제조한 후 회전감압농축기로 약 60°Bx가 되도록 농축한 후, glucose와 혼합하여 과립차를 제조하였다.

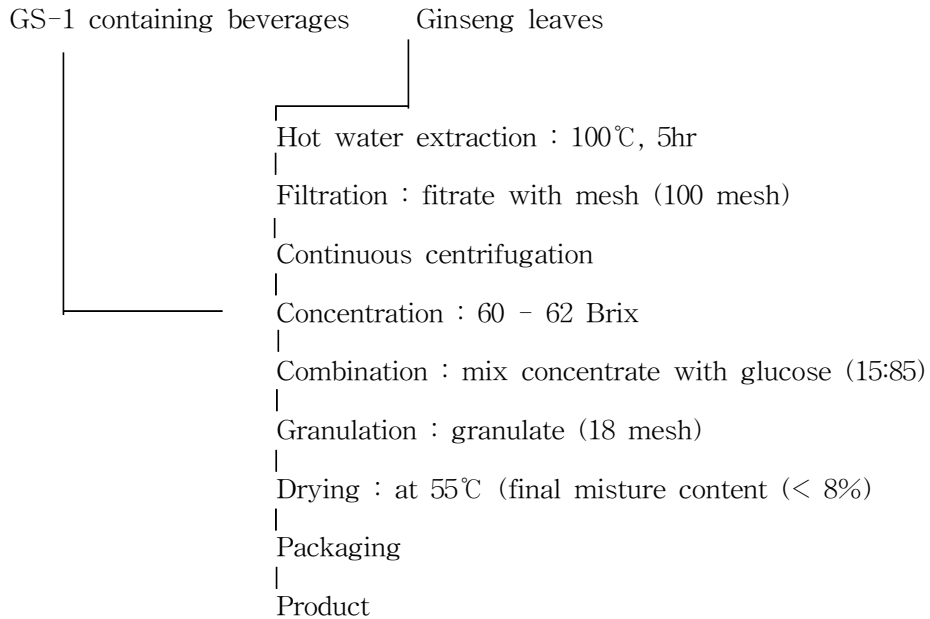


Fig. 4-33. Preparation process for granulated teas of herbs.

REFERENCES

1. 강경진. 1999. 미숙 과실의 보체계 활성화능 검토 및 화학적 특성. 석사 학위 논문, 경기대학교
2. 강삼식. 1996. 트리테르페노이드 사포닌. 서울대학교 출판부
3. 고려 인삼 연구소. 1978. 고려 인삼
4. 고병희. 1984. 월간 한국 인삼 . 62
5. 광지은. 2000. 홍화 잎으로부터 분리한 다당류의 macrophage 활성화에 대한 연구. 석사학위 논문, 고려대학교
6. 권미향, 성하진. 1997. 보체계 활성화 다당에 의한 면역 기능 조절. 식품 과학 산업, 30(1) : 30~43
7. 김경임, 신광순. 1997. 식품 유래 Macrophage 활성화 다당의 검색 및 특성

- 연구. 경기대학교 기초과학 논문집 제 10권 제 2호
8. 김만옥, 최강주, 조영현, 홍순근. 1980. 인삼 연구 논문집. 251
 9. 김하원, 우낙식. 1985. 한국산 고등 균류의 성분 연구 : 들 버섯 배양균종의 항암 성분. *한국 균학회지* 13(3) : 131
 10. 木寸田勇. 1980 인삼 연구 2 : 55
 11. 山本昌弘. 1979. 인삼 연구 1 : 33
 12. 신광순. 1999. 펙틴의 다양한 약리 활성과 그 잠재적 이용성. *식품 과학과 산업*, 32(2)
 13. 심상용. 1976. 한방식료 사전. 775~782
 14. 우낙식. 1983. 팽나무 버섯(*Flammulina velutipes*)의 항암 성분에 관한 연구. *한국 균학회지* 11(4) : 147
 15. 최강주. 1989. 인삼 연구소. 34
 16. Andresson J., Sjoberg O. and Moller G. 1972. Induction of immunoglobulin and antibody synthesis *in vitro* by lipopolysaccharide. *Eur. J. Immunol.* 2 : 349
 17. B. H. Kim, M. H. Kweon, W. J. Lim, H. C. Sung and H. C. Yang. 1998. Structural characterization of the anti-complementary and macrophage activating polysaccharides isolated from *Agaricus bisporus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30(3) : 709~716
 18. Blumenkrantz N. and Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.* 54 : 484~489
 19. Burg D. L. and Feldbush T. L. 1989. Late events in B cell activation, expression of membrane alkaline phosphatase activity. *J. Immunol.* 142(2) : 381~387
 20. C. H. Song, Y. J. Jeon, B. K. Yang, K. S. Ra and H. I. Kim. 1998. Anti-complementary activity of endopolymers produced from submerged mycelial culture of higher fungi with particular reference to *Lentinus edodes*. *Biotechnology Letters*, 20(8) : 741~744
 21. Coimbra M. A., Waldron K. W. and Selvendran R. R. 1995. Isolation and characterization of cell wall polymers from the heavily lignified tissues of olive(*Olea europaea*) seed hull. *Carbohydrate Polymers.* 27 : 285~294
 22. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. and Smith F.

1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 : 350~356
23. Eli Benjamini. 1996. Immunology a short course. WILEYLISS
24. Evans R. and Alexander P. In immunology of the Macrophage. Nelson D.S ed. Academic Press. 355
25. Gao H., Wang F., Lien E. J. and Trousdale m. D. 1996. immuno-stimulating polysaccharides from *Panax notoginseng*. *Pharmaceutical research.* 13(8) : 1196~1200
26. Hakomori S. 1964. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbonion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem(Tokyo).* 55 : 205~208
27. H. A. Park, M. H. Kweon, H. M. Han, H. C. Sung and H. C. Yang. 1998. Effect of the Glycoprotein isolated from *Pteridium aquilinum* on the immune function of mice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30(4) : 976~982
28. Hibbs J. B., Taintor R. R., Vavrin I. and Rachlin E. M. 1988. A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 87
29. H. K. Jeon, S. C. Kim and N. P. Jung. 1991. Effect of ginseng saponin fraction and cyclophosphamide on the tumoricidal activity of mouse macrophage and the antitumor effect. *Korean J. Ginseng Sci.* 15(2) : 99~105
30. Hsu H. C., Hsu C. I., Lin R. H., Kao C. L. and Lin J. Y. 1997. *Fip-vo*, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. *Biochem. J.* 323 : 557~565
31. H. X. Wang, T. B. Ng, V. E. C. Ooi, W. K. Liu and S. T. Chang. 1996. A polysaccharide-peptide complex from cultured mycelia of the mushroom *Trichoroma mongolicum* with immunoenhancing and antitumor activities. *Biochem. Cell Biolo.* 74 : 95~100
32. H. X. Wang, T. B. NG, W. K. Liu, V. E. C. Ooi and S. T. Chang. 1996. Polysaccharide-peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28(5) : 601~

33. H. Y. Lee and H. S. Lee. 1998. Stimulatory effect of korean red-ginseng extract on the proliferation and cellular activity of lymphocytes. *Korean J. Ginseng Sci.* 22(1) : 60~65
34. John E. C. et al. 1991. Current protocols in immunology. A.2.1~A.2.5 and 2.1.19~2.1.22
35. Jones T. M. and Albersheim P. 1972. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 49 : 926~936
36. J. S. Oh. 1976. Pharmacology of ginseng. *Korean J. Ginseng Sci.* 1 : 1~11
37. Karzel K. 1987. 월간 한국 인삼. 1월호
38. Kisaki K. 1987. 월간 한국 인삼. 4월호
39. Kiyohara H., Hirano M., Wen X. G., Matsumoto T., Sun X. B. and Yamada H. 1994. Characterization of an anti-ulcer pectic polysaccharide from leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Carbohydrate Research* 265 : 89~101
40. Kiyohara H. Zhang Y. W. and Yamada H. 1997. Effect of exo- β -D-(1-3)galactanase digestion on complement activating activity of neutral arabinogalactan unit in a pectic arabinogalactan from roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydrate Polymers* 32(3)
41. Klostergaard J., Leroux M. E. and Hung M. M. 1991. *J. Immunol.* 147
42. K. S Shin. 1992. Studies on selection, purification and action modes of anti-complementary polysaccharides from *Arecae pericarpium*. Ph. D. thesis, Korea Univ. of Seoul, Korea
43. K. S. Shin, Kitohara H., Matsumoto T. and Yamada H. 1997. Rhamnogalacturonan II from the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer as a macrophage Fc receptor expression-enhancing polysaccharide. *Carbohydrate research.* 300 : 239~249
44. K. S. Shin, Kitohara H., Matsumoto T. and Yamada H. 1998. Rhamnogalacturonan II dimers cross-linked by borate diesters from the leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer are responsible for expression of their IL-6 production enhancing activities. *Carbohydrate research.* 307 : 97~

45. K. S. Shin, K. S. Ra, H. C. Sung and H. C. Yang. 1993. Screening of complement-system activating polysaccharide from edible plants and its action mode. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25(3) : 197~203
46. K. S. Song, S. M. Cho, T. H. Lee, H. M. Kim, S. B. Han, K. S. Ko and I. D. Yoo. 1995. B-lymphocyte-stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull* 43(12) : 2105~2108
47. K. W. Yu. 2000. Structural and functional studies of polysacchrides with intestinal immune modulating activity of *Atractylodes lancea* DC. RIZOMES
48. Libido R. P. 1993. Bioactive natural products : detection, isolation and structural determination. *CRC Press.* 279~317
49. Lowry O. H., rosebrough N. J., Farr A. L and Randoll R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265~275
50. Lu W., Zheng G. and Cai J. 1998. First total synthesis of panaxitrial, a potent antitumor agent isolated from *Panax ginseng*. 737~738
51. Mitsuhiro N., Kiyoshi T., Kanayo O., Yukio O, Kayo Y. and Koichiro S. 1998. Activation of macrophages by crude polysaccharide fractions obtained from shoots of *Glycyrrhiza glabra* and hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis in vitro*. *Bio. Pharm. Bull.* 21(109) : 1110~1112
52. Peter A., Donald J. N. and Patricia D. E. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas- liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 5 : 340~345
53. Playfair J. H. L. 1992. Immunology at a glance 5th ed. Blackwell scietific publications.
54. Roitt L., Brostoff J. and Male D. 1993. Immunology. 3rd ed. Mosby
55. Sakurai M. H., Matsumoto T., Kiyohara H. and Yamada H. 1999. B-cell proliferation activity of pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. and its structural requirement. *Immunol.* 97(3) : 540~547
56. S. K. Jang, J. K. Kim, Y. S. Chung, D. C. Ahn, M. J. Kang, d. G. Lee and S. H. Kim. 1994. An experimental study on the effect of

- imunopotential and the anticancer effect of red ginseng extract. *Korea J. Ginseng Sci.* 18(3) : 151~159
57. Stavy L., Treves A. J. and Feldman M. 1971. Effect of concanavalin A on lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Nature* 232
58. Takahashi K., Yamazaki M. and Abe S. 1988. local induction of a tumor necrosis factor (TNF) like cytotoxic factor in murin tissues with tumorous and nontumorous inflammation after systemic administration of antitumor polysaccharides. *J. Pharmacobio-Dyn.* 11 : 472~478
59. W. Kim and N. P. Jung. 1989. Effects of a ginseng saponin fraction on the tumoricidal activity of murine macrophage against K562 cells. *Korean J. Ginseng Sci.* 13(1) : 24~29
60. Weir D. M. 1996. Handbook of experimental immunology volume 2. Cellular Immunology. Chap. 45, 48 and 63
61. Yamada H. 1988. Anti-complementary polysaccharides from chinese herbs. *J. of Chinese Medicine* (review)
62. Yamada H. 1992. Chemical and pharmacological stucies on effecacy of Japanese and Chinese herbal medicines. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 65 : 1~22
63. Yamada H. and Kiyohara H. 1989. Bioactive polysaccharides from chines herbal medicines. *Abstract of Chinese Medicines* 3 : 104~124
64. Yariv J., Rappont M. M. and Graf L. 1962. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochem. J.* 85 : 383~388
65. Zhong J. J. 1998. Production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax notoginseng* and *Panax ginseng* effcets of plant growth regulators. *Appl. Biochem. & Biotech.* 75 : 261~268