

고사리 열수 추출물로부터 보체계 활성화 산성 다당의 분리 및 특성

오병미 · 권미향* · 나경수**

한국식품개발연구원, *고려대학교 식품공학과, **대구공업전문대학 식품영양과

Isolation and Characterization of Acidic Polysaccharides Activating Complement System from the Hot Water Extracts of *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*

Bung-Mi Oh, Mee-Hyang Kweon*, Kyung-Soo Ra**

Korea Food Research Institute, Sunnam 463-420, Korea

*Dept. of Food Tech., Korea Univ., Seoul 136-705, Korea

**Dept. of Food Nutrition, Taegu Technical Junior College, Taegu 704-305, Korea

Abstract

From the hot water extract of bracken(*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*), a Korean wild edible plant, anti-complementary acidic polysaccharides were isolated. Crude polysaccharide fraction(HPA-1) was obtained by methanol reflux, ethanol precipitation, dialysis, and lyophilization. HPA-1 contained 81.80% of total sugar, 30.40% of uronic acid, and 15.60% of protein. HPA-1 was purified consecutively by cetavlon fractionation and chromatography including ion exchange with DEAE-Sephadex CL-6B and gel permeation with Sephadex G-100 and Sephadex CL-6B. HPA-2-IVa and HPA-2-Va-2 were nearly homogeneous on HPLC and had 500,000 and 560,000 daltons of molecular weights, respectively. HPA-2-IVa consisted of fucose, galacturonic acid, and glucuronic acid at the molar ratio of 1.40:0.97:1.88. HPA-2-Va-2 was composed of rhamnose, galactose, and galacturonic acid at the molar ratio of 1.00:1.38:1.39. The polysaccharides were found to activate the C3 component both in the presence and in the absence of Ca^{2+} through the crossed-immunoelectrophoresis suggesting that those involved in both classical and alternative complement pathway.

Key words : Anti-complementary activity, acidic polysaccharide, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*

서 론

보체계는 혈청단백질로 구성되어 있는 액성면역계로서¹⁾ 항원 의존적 또는 비의존적으로 이물질(antigen)을 인식하여 이물질 표면에 보체성분의 연쇄적인 한정분해와 분자집합반응을 하여 표적세포의 손상, 식작용효과 등을 통해 이물질을 제거하는 동적인 생체방어계라 할 수 있다²⁾. 또한 보체 성분의 활성화 과정에서 생성되는 보체 성분들이 혈액 중에 방출되어 백혈구의 주화,

모세혈관의 투과성 향진 등의 염증반응을 일으키며 항체생성 조절 등 다양한 생리활성을 나타낸다³⁾. 이러한 보체계 활성화는 항체(IgG, IgM)가 관여하여 C1부터 활성화되어 C3b 활성형을 생성하는 고전적 경로(classical pathway)와 혈액 중에 항상 활성형으로 존재하는 D인자에 의해 활성화가 시작되는 부경로(alternative pathway)로 대별된다^{4, 5)}. 항보체 활성화이란 이들 보체계를 활성화시킬 수 있는 활성을 의미하는 것으로 최근 천연물질 중에서 강한 항보체 활성을 나타내는 다당류들이 발견되어지고 있다. 그 예로써 표고버섯(*Lentinus edodes*)⁶⁾, 저령(*Grifora umbellata*)⁷⁾, 복령

(*Portia cocos*)⁸⁾, 구름버섯(*Coriolus versicolor*)⁹⁾, 영지버섯(*Ganoderma lucidium*)¹⁰⁾ 등의 균류에서 추출, 정제된 항종양 활성의 β -glucan, 당귀(*Angelica acutiloba*)의 pectic arabinogalactan^{11, 12)}, 시호(*Bupleurum falcatum*)의 arabinoglucan^{13, 14)}, 자근(*Lithospermum euchromum*)¹⁵⁾과 인삼(*Panax ginseng*)의 acidic heterogalactans¹⁶⁾ 등 한방제재의 다당과 임산재료 및 생강, 고추 등 식품기원의 다당에서 높은 항보체 활성이 있음이 보고되어 있다. 본 연구에서는 국내산 산채류 중 높은 항보체 활성을 나타낸 고사리의 열수 추출물로부터 보체계 활성화 다당을 분리 정제하여 구성당 분석 및 보체계 활성화에 있어서의 작용양식을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

고사리(*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*)는 국내 산지에서 채취하여 물에 데쳐서 건조한 상태의 식용 고사리를 경동시장에서 구입하였다. DEAE-Sepharose CL-6B, Sephadex G-100, Sepharose CL-6B, Sepharose CL-4B는 Pharmacia사 제품을 사용하였으며, 양의 감작 적혈구 (IgM hemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 日本 凍結乾燥研究所로부터, Dowex-1 resin, polymyxin B, standard dextran(T-2000, T-500, T-70, T-40, T-10), goat anti-human C3는 Sigma사로부터 구입하였다. 그 외 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

2. 정량방법

총당 함량은 galactose를 표준물질로 사용하여 phenol-sulfuric acid 방법¹⁷⁾으로 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 사용하여 *m*-hydroxydiphenyl 방법¹⁸⁾, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry법¹⁹⁾으로 각각 정량하였다.

3. 구성당 분석

다당 시료를 2 M trifluoroacetic acid로 121°C에서 1시간 동안 가수분해 후, 중성당은 aldonitrilo

acetate 유도체²⁰⁾로 전환시키고, 산성당은 alditol acetate 유도체^{21~22)}로 전환시켜 3% OV-225 unip-ort HP(225~230°C) 컬럼을 사용한 GLC(FID)를 통하여 분석하였다.

4. 항보체 활성의 측정

항보체 활성은 Mayer법²³⁾에 의하여 측정하였다. 정상인의 혈청, GVB²⁺(gelatin veronal buffered saline, pH 7.2)와 3차 증류수에 용해한 시료를 각각 50 μ l씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시킨 후 이 반응액에 GVB²⁺를 350 μ l 씩 가하고, 이것을 10~100 배로 연속희석하였다. 다시 여기에 750 μ l의 GVB²⁺를 가한 다음 양의 감작 적혈구를 250 μ l 씩 가해 37°C에서 1시간 동안 2차 반응시켜 원심분리하여 얻어진 상등액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 항보체 활성은 총보체 용혈저지율(Inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH50)로 나타내었다.

5. 항보체 활성 다당의 추출

고사리 1.5 kg을 냉수추출 후 얻은 잔사를 3회에 걸쳐 증류수 15 μ l로 열수 추출한 후 동결건조하여 얻은 열수추출물(HPA-0)을 methanol로 5회 환류추출하여 methanol 가용성분(HPA-M)을 제거하였다. Methanol 비가용성 성분에 소량의 증류수를 가해 용해시키고 ethanol을 가하여 4°C에서 24시간 방치하여 ethanol 가용성분(HPA-E)과 침전성분을 분리하였다. Ethanol 침전성분은 투석한 다음 농축, 동결건조시켜 조다당(HPA-1)을 조제하였다.

6. Cetavlon에 의한 HPA-1의 분획

조다당 HPA-1을 이온전하 강도에 의하여 분획하기 위하여 음이온 계면활성제인 cetavlon(cethyltrimethyl ammonium bromide)을 처리하였다²⁴⁾. HPA-1(40.40 g)을 수용액 1,200 ml에 용해시키고, 동량의 8% cetavlon을 첨가하여 20°C에서 20시간 정치시켰을 때 생성된 침전물과 상등액으로부터 0.5% sodium borate 및 acetic acid, ethanol 침전처리하여 최종적으로 4획분(HPA-2, -3, -4, -5)을 조제하였다.

7. 보체계 활성화 다당의 정제

Cetavlon 처리에 의해 얻어진 HPA-2(500 mg)를 증류수로 평형화된 DEAE-Sepharose CL-6B 컬럼(Cl^- form, 3.4×40 cm)에 의하여 이온교환 크로마토그래피를 행하였다. 10 ml의 시료액을 컬럼의 상단에 주입하고 당이 더 용출되지 않을 때까지 증류수로 용출한 후, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 및 2 M NaCl 용액으로 차례로 용출시켰다(HPA-2-I \rightarrow VIII). 주요 항보체 활성획분인 HPA-2-IV, V는 0.2 M NaCl로 평형화된 Sephadex G-100 컬럼(2.6×90 cm)을 사용하여 4°C에서 겔여과 크로마토그래피를 행하여 분획하였다. 분리한 주요 항보체 활성획분인 HPA-2-IVa, Va는 0.2 M NaCl로 평형화된 Sepharose CL-6B 컬럼(2.5×90 cm)을 사용하여 4°C에서 겔여과하여 재분리하였고 주요 활성획분인 HPA-2-Va-2는 0.2 M NaCl로 평형화된 Sepharose CL-4B 컬럼(2.5×100 cm)을 사용하여 재분획하였다.

8. HPLC에 의한 정제 다당들의 순도 검토

정제된 다당의 순도를 알아보기 위하여 HPLC/RI(Waters Model 510)를 행하였다. 분석은 겔여과 컬럼(Shodex inopack S-805)과 이동상으로 유속 1ml/min의 증류수를 사용하였다.

9. 정제 다당의 분자량 측정

정제 다당의 분자량은 dextran T-2000(M.W. : 2×10^6), T-500(M.W. : 5×10^5), T-40 (M.W. : 4×10^4), T-10(M.W. : 1×10^4), 그리고 glucose를 표준물질로 사용하여 Sepharose CL-6B, Sepharose CL-4B 겔여과 크로마토그래피에서 얻어진 각각의 표준곡선과 비교하여 측정하였다.

10. 교차면역 전기 영동

교차면역 전기영동은 GVB²⁺ buffer, 10 mM EDTA와 1 % gelatin을 함유한 veronal buffer (EDTA-GVB²⁻), 그리고 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA와 1 % gelatin을 함유한 veronal buffer (Mg²⁺-EGTA-GVB²⁻)에 정상인의 혈청을 각각 혼합하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 pH 8.6의 barbital buffer에 용해한 1% agarose 상에서 동buffer

를 이용하여 4°C에서 1시간 30분 동안 1차원 전기영동(2.1 mA/cm)을 행하였다. C3의 활성화를 관찰하기 위하여 0.5 % anti-human C3 serum이 함유된 1% agarose상에서 2차 전기영동(1 mA/cm)을 행하였다. 전개된 gel은 bromophenol blue로 염색시킨 후 2% acetic acid로 탈색시키고 C3의 분해산물을 관찰하였다^{25, 26}.

결 과

1. 열수추출물의 항보체 활성과 구성성분

고사리 1.5 kg의 냉수 추출 후의 잔사를 15 l의 증류수로 3회 열수추출하여 추출물 HPA-0(133g)을 얻었고, 조다당의 분리 중 methanol과 ethanol 가용성분인 HPA-M, HPA-E, 그리고 투석과 동결건조를 거친 고분자 획분인 HPA-1(40.40 g)을 얻었다. 각 획분의 항보체 활성을 측정한 결과, 조다당 HPA-0과 HPA-1은 500 μ g/ml의 농도에서 80%이상의 높은 활성을 나타내었다. HPA-M획분은 항보체 활성이 60% 미만으로 비교적 낮은 항보체 활성을 보였다. 총당 및 산성당 함량은 HPA-0의 경우 54.60%, 20.00% 인데 비해 HPA-1은 81.80%, 30.40%로 약 1.5배 증가한

Table 1. Chemical composition of crude extracts from *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*

	HPA-0	HPA-1
		(%)
Total sugar	54.60	81.80
Uronic acid	20.00	30.40
Protein	34.10	15.60
Yield	13.30	30.40
	Component sugar(molar ratio)	
Rhamnose	1.00	1.00
Fucose	0.58	1.17
Arabinose	0.42	0.65
Xylose	0.70	0.25
Mannose	0.70	1.79
Galactose	1.51	1.92
Glucose	0.66	0.44
Mannuronic acid	0.88	—
Galacturonic acid	1.34	1.65
Glucuronic acid	1.44	1.52

Table 2. Chemical composition of polysaccharide fractions obtained by cetavlon treatment of HPA-1

	HPA-2	HPA-3	HPA-4	HPA-5
	(%)			
Total sugar	79.65	83.46	89.04	90.34
Uronic acid	26.15	29.86	12.24	13.44
Protein	14.80	12.40	3.40	5.50
Yield	87.12	5.90	2.30	2.60
	Component sugar(molar ratio)			
Rhamnose	1.00	1.00	1.00	1.00
Fucose	1.18	0.19	0.37	0.35
Arabinose	0.42	1.06	6.55	4.90
Xylose	0.54	0.06	1.26	0.39
Mannose	1.37	0.28	7.34	5.90
Galactose	1.75	2.00	2.63	3.20
Glucose	0.65	—	1.47	2.35
Galacturonic acid	1.22	1.46	0.58	1.65
Glucuronic acid	1.41	1.60	0.34	1.03

HPA-1(40.40g) was dissolved in H₂O(1,200 ml) and treated with an equal volume of 8 % solution of cetavlon at 20°C for 20 hrs.

반면, 단백질의 함량은 약 0.5배 감소하였다. 구성당은

HPA-0과 HPA-1 모두 galactose, galacturonic acid와 glucuronic acid가 높은 비율로 함유되어 있었으나 HPA-1에서는 mannose, fucose의 함량이 크게 증가하였다(Table 1).

2. Cetavlon 분획에서 얻어진 조다당들의 활성과 구성당 조성

고사리의 열수 추출물 HPA-1을 양이온 계면활성제인 cetavlon으로 처리하여 이온 전하 강도에 따라 HPA-2, 3, 4, 5의 4개획분으로 분리하였다. 4개

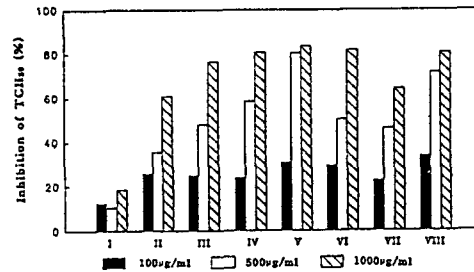


Fig. 1. Anti-complementary activities of HPA-2-subfractions(I → VIII) separated by DEAE-Sephrose CL-6B(Cl⁻).

Table 3. Chemical composition and yields of polysaccharide fractions obtained from IEC with DEAE-Sephrose CL-6B of HPA-2

	HPA-2-I	-II	-III	-IV	-V	-VI	-VII	-VIII
	(%)							
Total sugar	77.18	85.04	95.43	93.62	71.00	75.90	65.40	64.09
Uronic acid	0.00	11.59	27.26	28.19	28.70	3.05	2.22	7.13
Protein	10.50	6.21	0.00	1.93	3.20	4.07	14.79	22.64
Yield	0.75	1.30	2.90	27.40	20.10	12.70	10.90	20.30
	Component sugar(molar ratio)							
Rhamnose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Fucose	2.53	0.33	1.01	3.01	0.28	4.23	10.63	1.47
Arabinose	2.66	1.22	0.73	0.00	0.16	0.00	0.44	0.39
Xylose	0.28	1.99	0.85	1.59	0.15	0.52	1.56	0.78
Mannose	0.00	0.98	0.96	2.11	0.24	0.92	2.15	1.00
Galactose	0.00	1.28	1.54	1.66	0.39	0.47	2.30	1.69
Glucose	0.98	3.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89	0.13
Galacturonic acid	0.00	8.61	0.21	1.19	3.22	0.00	1.99	0.63
Glucuronic acid	0.00	6.53	0.52	2.25	0.00	9.24	1.19	1.08

획분의 항보체 활성은 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시료 농도에서 모두 80%이상의 높은 활성을 나타내었으며 이 중 HPA-2의 수율이 87.1%로 다른 획분들보다 매우 높았다. 총당 함량은 HPA-2 < HPA-3 < HPA-4 < HPA-5순으로 나타났으며, 산성당 함량은 HPA-2와 HPA-3획분이 다른 획분들보다 높았다. HPA-2의 구성당은 fucose, mannose, galactose, glucuronic acid가 높은 비율로 함유되어 있다(Table 2).

3. 이온교환 크로마토그래피에 의한 HPA-2의 분획

Cetavlon 처리로 얻은 4획분 중 HPA-2를 음이온 교환수지인 DEAE-Sephadex CL-6B column(3.4 \times 40 cm)을 이용하여 미흡착부분과 흡착부분으로 분리하였다(크로마토그램 생략). 이들 7개 획분에 대하여 항보체 활성을 측정한 결과, 미흡착획분인 HPA-2-I, 0.1M NaCl에서 용출된 HPA-2-II는 낮은 활성을 보인 반면 나머지 5개 획분은 비교적 높은 항보체 활성을 나타내었다(Fig. 1). 그 중에서 0.2M NaCl에서 용출된 HPA-2-IV와 0.3M NaCl에서 용출된 HPA-2-V가 비교적 높은 수율을 나타내었다. HPA-2-IV와 HPA-2-V는 총당 함량이 각각 93.62%, 71.00%로 다른 획분에 비해 비교적 높았고 산성당 함량도 약 28%로 높게 나타냈다. 그러나 단백질 함량은 두 획분 모두 다른 획분에 비해 비교적 낮았다(Table 3).

4. 겔여과 크로마토그래피에 의한 HPA-2-IVa의 정제

이온교환 크로마토그래피에 의해 분리된 8개의 획분 중 활성과 수율이 높은 HPA-2-IV와 HPA-2-V를 다시 Sephadex G-100 컬럼에서 겔여과를 행하였다. HPA-2-IV는 Fig. 2와 같이 HPA-2-IVa, IVb, 및 IVc의 3개 획분으로 분리하였고, 항보체 활성은 HPA-2-IVa가 가장 높았으며, 주요 구성당으로서 fucose, galacturonic acid, glucuronic acid를 1.40 : 0.97 : 1.88의 몰비율로 함유하였다(Table 4). HPA-2-IVa는 겔여과 컬럼크로마토그래피와 HPLC에서 거의 순수한 단일 획분으로 나타났으며 분자량은 약 500,000으로 추정되었다(Fig. 3).

5. 겔여과 크로마토그래피에 의한 HPA-2-Va-2의

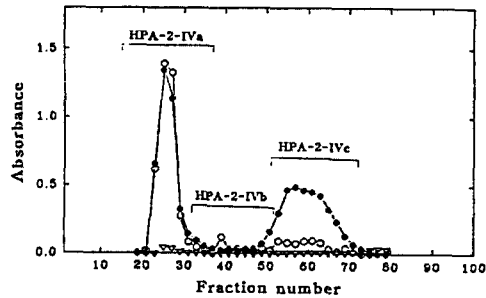


Fig. 2. Chromatographic behavior of HPA-2-IV on GPC with Sephadex G-100. The column(2.5 \times 90 cm) of Sephadex G-100 was eluted with 0.2M NaCl.

- : Total sugar(490 nm)
- : Uronic acid(520 nm)
- △ : Protein(280 nm)

Table 4. Chemical composition of polysaccharide fractions obtained from GPC with Sephadex G-100 of HPA-2-IV

	HPA-2-IVa	-IVb	-IVc
			(%)
Total sugar	81.63	70.56	87.57
Uronic acid	31.61	15.90	42.67
Protein	6.40	3.05	0.95
Yield	56.50	5.75	15.50
	Component sugar(molar ratio)		
Rhamnose	1.00	1.00	1.00
Fucose	1.40	0.26	0.05
Xylose	0.76	0.23	0.00
Mannose	0.45	0.25	0.04
Galactose	0.68	0.49	0.08
Galacturonic acid	0.97	1.33	2.29
Glucuronic acid	1.88	0.74	0.00

정제

HPA-2-V는 Fig. 5와 같이 Sephadex G-100 겔여과에서 HPA-2-Va, Vb 및 Vc의 3개 획분으로 분리되었다. 항보체 활성은 HPA-2-Va가 가장 높았고 구성당은 rhamnose, galactose, galacturonic acid가 각각 높은 비율로 함유되어 있었다(Table 5). HPA-

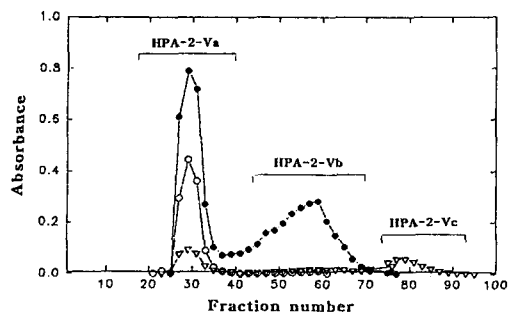


Fig. 3. Chromatographic behavior of HPA-2-V on GPC with Sephadex G-100. The column(2.5 × 90 cm) of Sephadex G-100 was eluted with 0.2M NaCl.

- : Total sugar(490 nm)
- : Uronic acid(520 nm)
- △ : Protein (280 nm)

Table 5. Chemical composition of polysaccharide fractions on Sephadex G-100 of HPA-2-V

	HPA-2-Va	-Vb	-Vc
			(%)
Total sugar	80.24	82.89	12.20
Uronic acid	33.04	60.05	8.74
Protein	2.34	0.83	6.88
Yield	56.00	23.50	0.50
	Component sugar(molar ratio)		
Rhamnose	1.00	1.00	1.00
Fucose	0.54	0.06	4.77
Arabinose	0.35	0.31	0.00
Xylose	0.44	0.00	0.54
Mannose	0.19	0.00	0.61
Galactose	0.99	0.10	1.11
Galacturonic acid	1.66	4.46	0.00

2-Va는 Sepharose CL-6B 겔여과를 통하여 HPA-2-Va-1, HPA-2-Va-2, HPA-2-Va-3의 세획분으로 분리되었으며 항보체 활성화는 HPA-2-Va-1과 Va-2가 비교적 높게 나타났다. 구성당 분석 결과 Va-2는 rhamnose, galactose, galacturonic acid를 1.00 : 1.38 : 1.39의 몰비율로 함유하였으며, 겔여과 및 HPLC에서 더 이상 분획되지 않는 거의 하나의 획분으로서 분자량은 약 560,000으로 추정되었다(Fig. 4).

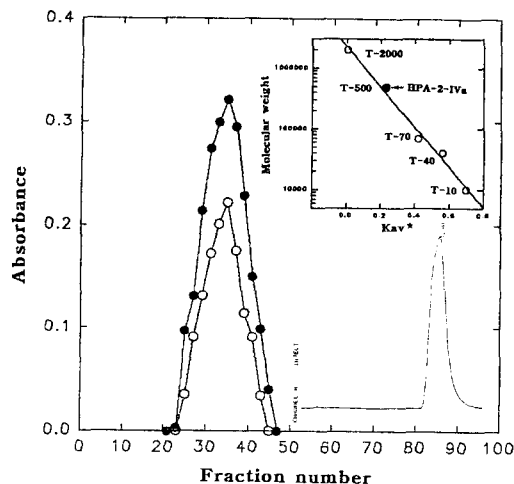


Fig. 4. Purity confirmation and molecular weight of HPA-2-IVa by GPC and HPLC. The column (2.5 × 90cm) of Sepharose CL-6B was eluted with 0.2M NaCl. T-2000, T-500, T-70, T-40, and T-10 are standard dextrans of 2×10^6 , 5×10^5 , 7×10^4 , 4×10^4 , and 1×10^4 molecular weights, respectively.

- : Total sugar(490 nm)
- : Uronic acid(520 nm)

6. 보체계 활성화 경로의 검토

보체계의 활성화는 크게 고전경로(classical pathway)와 부경로(alternative pathway)로 구성되어 있고, 고전경로에서는 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 이온이, 부경로는 Mg^{2+} 이온이 각각 관여하고 있는 것으로 알려져 있다⁴⁾. GVB²⁺ 완충액 및 GVB²⁺에서 Ca^{2+} 이온만을 선택 제거한 Mg^{2+} -EGTA-GVB²⁺를 사용한 경우와, 2가 금속이온을 모두 제거한 10 mM EDTA-GVB²⁺를 사용한 경우의 항보체 활성을 비교한 결과 HPA-2-IVa 및 Va-2가 보체계의 고전경로 뿐만 아니라 부경로를 모두 활성화 시킴에 대해 보고한 바 있다²⁷⁾. 이들 다당들을 처리한 혈청의 교차면역 전기영동을 통하여 C3의 활성화에 따른 C3 산물을 조사하였다. 2가 금속이온 조건을 달리한 완충용액, 정상인의 혈청과 시료를 혼합하여 반응시킨 것을 well에 분주하고 1차원 전기영동 후 goat anti-C3에 대하여 2차원 전기영동한 결과, 대조군에서는 C3의 활성화가 일어나지 않아서 1개

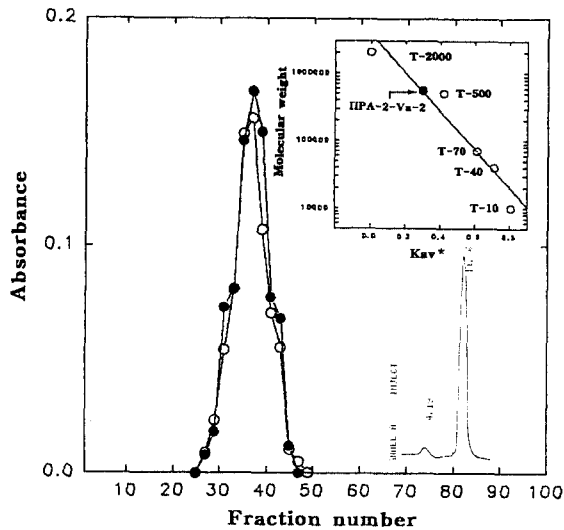


Fig. 5. Purity confirmation and molecular weight of HPA-2-Va-2 by GPC and HPLC. The column(1.5 × 90cm) of Sepharose CL-4B was eluted with 0.2 M NaCl. T-2000, T-500, T-70, T-40, and T-10 are standard dextrans of 2×10^6 , 5×10^5 , 7×10^4 , 4×10^4 , and 1×10^4 molecular weights, respectively.

○: Total sugar(490 nm)

●: Uronic acid(520 nm)

의 피크만이 관찰되었으나, 다당을 처리한 GVB^{2+} 계와 $Mg-EGTA-GVB^{2-}$ 계에서는 C3 활성화에 따라 생

성된 C3a와 C3b에 기인한 2번째 피크도 관찰되었다. 특히 Ca^{2+} 이온이 제거된 $Mg-EGTA-GVB^{2-}$ 계의 경우에도 2번째 침강선이 관찰되므로 부경로로도 보체 활성화가 일어남을 알 수 있었다. 따라서 HPA-2-IVa와 HPA-2-Va-2는 보체계의 활성화과정에서 고전경로와 부경로 모두에 관여함을 알 수 있었다 (Fig. 5).

고찰

생체방어에 있어서 항체와 함께 중요한 역할을 담당하는 보체계를 활성화 하는 물질로는 대부분 한약재, 담자균류 및 고등식물 기원의 다당류와 단백다당체들로 알려져 있으며 저분자 물질로서 식물 호르몬의 일종인 pyosterol류들에서도 항보체 활성화 보고되어 있다¹¹⁻¹⁴⁾. 본 연구에서는 천연 식품소재인 한국산 산채류를 대상으로 항보체 활성화의 검색과정에서 높은 활성을 나타낸 고사리 열수 추출물에서 활성 본체로 확인되었던 다당들을 분리 정제하였다. 현재까지 보고된 보체계 활성화 다당들은 구성당 조성에서 뚜렷한 유의성들이 발견되지는 않았으나 일반적으로 galactose, arabinose, galacturonic acid, rhamnose, glucose 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 고사리 열수 추출물에서의 정제 다당들은 단백질이 거의 함유되지 않은 복합 산성 다당체로서 당귀, 차전자, 쑥, 시호, 자근, 인삼, 지치 등에서 분리되었던 보체계 활성화 다당들과는 달리 특히 fucose와 glucuronic acid가 다

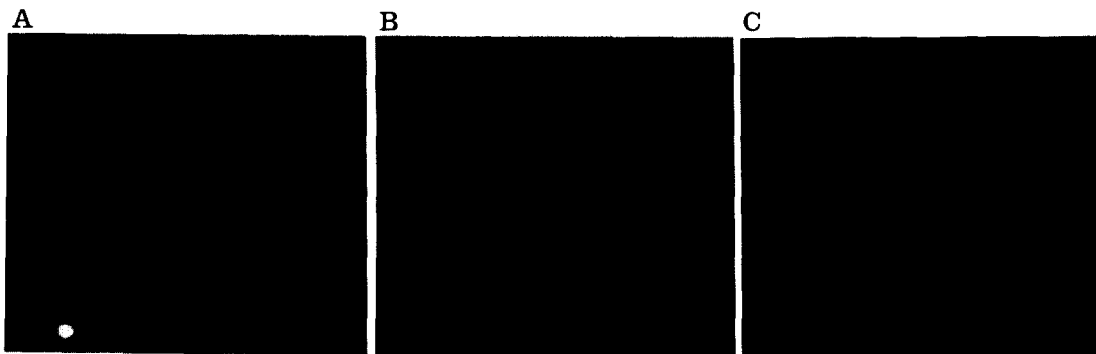


Fig. 6. Two-dimensional immunoelectrophoresis of complement C3 component treated with HPA-IVa in the presence or absence of Ca^{2+} ion. Normal human sera were incubated with PBS(A) or HPA-IVa with GVB^{2+} (B) or HPA-IVa with $Mg^{2+}-EGTA-GVB^{2-}$ (C).

량 함유되어 있었다(Table 4, 5). 이러한 고사리 열수 추출물 중의 항보체 다당체의 당 조성은 고사리 냉수 추출물로부터 분리된 항보체 다당체들과 큰 차이가 없었으며²⁹⁾ 최근 미역이나 다시마 등의 해조류에서 보고된 항암성 다당류인 fucoidan들과 유사성을 보여 주었다³⁰⁾.

최종적으로 정제된 HPA-2-IVa와 HPA-2-Va-2는 분자량이 각각 500,000과 560,000으로서 자근에서 분리된 산성 복합 다당체인 LR-Ⅱa와 표고버섯에서 분리된 lentinan등과 같이 비교적 큰 분자량을 나타내었다. 한약재들로부터 많은 보체계 활성화 다당들을 보고한 Yamada등은 일반적으로 보체계 활성화 다당체들에서 분자량이 클수록 높은 활성을 나타낸다고 하였다. 본 연구의 정제과정에서 이같은 경향이 대체적으로 관찰되었으나 Yanahira³¹⁾, Otani³²⁾등의 보고에서는 분자량과 항보체 활성간의 뚜렷한 유의성이 없는 것으로 나타났다. 또한 이 정제 다당들의 활성이 본 연구실에서 대복피나 고추 등으로부터 분리한 분자량이 적은 다당체들보다 활성이 높지 않는 것으로 보아 보체계 활성화 다당체들에서 분자량은 직접적으로 활성에 관여하지 않는 것으로 사료된다.

자근(*Lithospermum euchromum*)에서 분리된 arabinan, 차전자증의 Plantago mucilage A, 세균 세포벽 중의 lipopolysaccharide등은 보체계 활성화 과정에서 고전경로 및 부경로를 활성화 하며, lentinan, inulin, zymosan, pachyman등의 몇 가지 불용성 다당들은 주로 부경로를 통하여, lipid A 나 penicillatan등은 고전경로를 통하여 보체계 활성화를 일으키는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 본 정제 다당들을 처리한 정상인의 혈청의 교차면역 전기영동 결과에서 HPA-2-IVa와 HPA-2-Va-2는 보체계 활성화 과정에서 고전경로 및 부경로 모두에 관여함이 밝혀졌으나(Fig. 6), 이 다당류들의 항보체 활성의 기작과 활성 부위 등을 해명하기 위해서 다당들의 구조결정과 함께 구조 및 활성간의 상관관계를 검토하는 진전된 연구가 필요 하리라 본다.

요 약

고사리 열수 추출물로부터 보체계 활성화 산성 다당

을 분리하였다. 열수 추출물의 메탄올 환류, 에탄올 침전, 투석 및 동결건조를 통하여 조다당획분인 HPA-1을 분리하였다. HPA-1은 총당 81.80%, 산성당 30.40%, 단백질 15.60%를 함유하였으며, 주요 구성당으로서 rhamnose, galactose, galacturonic acid, glucuronic acid등이 포함되어 있었다. HPA-1을 cetavlon(cethyltrimethyl ammonium bromide)처리 에 의해 HPA-2, 3, 4, 5의 획분들로 분리하였으며, 활성과 수율이 가장 높았던 HPA-2로부터 DEAE-Sephharose CL-6B 이온교환 및 Sephadex G-100, Sepharose CL-6B, Sepharose CL-4B 겔여과 크로마토 그래피를 통하여 두 개의 주요 활성 다당체인 HPA-2-IVa와 HPA-2-Va-2를 정제하였다. 이 다당들은 HPLC에서 단일 획분으로 확인되었으며 분자량은 각각 500,000과 560,000으로 측정되었다. HPA-2-IVa는 총당 81.63%, 산성당 31.61%로 구성되었으며 fucose, galacturonic acid, glucuronic acid를 1.40 : 0.97 : 1.88의 몰비율로 함유하였다. HPA-2-Va-2는 주요 구성당으로서 rhamnose, galactose, galacturonic acid를 1.00 : 1.38 : 139의 몰비율로 함유하였다. 이 다당들의 Ca²⁺존재 유무시의 항보체 활성 측정과 교차면역 전기영동 결과, 고전경로(classical pathway)와 부경로(alternative pathway)를 통한 보체계 활성화함에 관여함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Porter, R. R., Reid, K. B. M. : The biochemistry of complement. *Nature.*, **275**, 699 (1978)
2. Ballanti, T. A. : The complement system. In *Immunology* III, Saunders, Philadelphia, pp. 121(1988)
3. Egwang, T. G., Befus, A. D. : The role of complement in the induction and regulation of immune responses, *Immunology.* **51**, 207 (1984)
4. Benzamini, E., Leskowitz, S. : Complement. In *Immunology : A Short course*. Wiley, New York, pp. 135(1991)

5. Law, S. K. A., Reid, K. B. M. : Complement. In *Complement*. IRL Press, Oxford, pp. 1(1988)
6. Chihar, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y., Fikuoka, F. : Fractionation and purification of the polysaccharides with marked anti-tumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk)(an edible mushroom). *Cancer Res.*, **30**, 2776(1970)
7. Miyazaki, Y., Okigawa, H., Yamada, T., Yamada, H., Yamada, Y. : Relationship between the chemical structure and anti-tumor activity of glucans prepared from *Grifora umbellata*. *Carbohydr. Res.*, **69**, 165(1979)
8. Hamuro, J., Jadding, U., Bitter-Suermann, D. : Solid phase activation of alternative pathway of complement by β -1, 3-glucans and its possible role for tumor regressing activity. *Immunology*, **34**, 695(1978)
9. Hirase, S. : Structural studies on the anti-tumor active polysaccharide from *Corticium versicolor* (Basidiomycetes). II. Structures of β -D glucan moieties of fractionated polysaccharides. *Yakugaku-zasshi.*, **96**, 419(1976)
10. Miyazaki, Y., Nishijima, M. : Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, anti-tumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3611(1981)
11. Kiyohara, H., Yamada, H., Cyong, J. C., Otsuka, Y. : Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. V. Molecular aggregation and anti-complementary activity of arabinogalactan from *Angelica acutiloba*. *J. Pharmacobio. Dyn.*, **9**, 339(1986)
12. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J. C., Otsuka, Y. : Structural characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydr. Res.*, **159**, 275(1987)
13. Yamada, H., Ra, K. S., Kiyohara, H., Cyong, J. C., Yang, H. C., Otsuka, Y. : Characterization of anti-complementary neutral polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum*. *Phytochem.*, **273**, 163(1988)
14. Yamada, H., Ra, K. S., Kiyohara, H., Cyong, J. C., Otsuka, Y. : Structural characterization of anti-complementary pectic polysaccharide from the roots *Bupleurum falcatum*. *Carbohydr. Res.*, **189**, 209(1989)
15. Yamada, H., Cyong, J. C., Otsuka, Y. : Purification and characterization of complement activating-acidic polysaccharides from the roots of *Lithospermum euchromum* Royale. *International J. Immunopharmacology.*, **8**, 71(1986)
16. Gao, Q. P., Kiyohara, H., Cyong, J. C., Yamada, H. : Chemical properties and anti-complementary activities of polysaccharides fractions from roots and leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer, *Planta Med.*, **55**, 9(1989)
17. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350(1956)
18. Blumenkronz, N., Asboe-Hansen, G. : New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, **54**, 484(1973)
19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L., Rindall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256(1951)
20. Chyi, C. C., Gary, D. M. : A use of 1-methylimidazole as a solvent and catalyst for the preparation of aldonitrile acetates of aldoes. *Carbohydr. Res.*, **90**, 127(1981)
21. Albersheim, P., Nerins, D. J., English, P. D., Karr, A. : A new method for the analysis of sugar in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, **5**,

- 340(1967)
22. Jones, T. M., and Albersheim, P. : A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.*, **49**, 926(1972)
 23. Kabat, E. A., Mayer, M. M. : Complement and complement fixation in *Experimental Immunochimistry*, 2nd ed., Charles C. Thomas Publisher, Springfield, pp. 459(1961)
 24. Lloyd, K. O. : Isolation, characterization and partial structure of peptido galactomannans from the yeast from of *Cladosporium wernneckii*. *Biochemistry*, **9**, 3446(1970)
 25. Cyong, J. C., Within, S. S., Rieger, B., Barbarese, E., Good, R. A., Day, N. K. : Antibody-independent complement activation by myelin via the classical complement pathway. *J. Exp. Med.*, **155**, 587(1982)
 26. Hudson, L., Hay, F. C. : Antibody interaction with antigen In *Practical Immunology*, 3rd ed., Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp. 244(1989)
 27. 오병미 : 고사리 열수 추출물로부터 보체계 활성화 다당의 정제 및 특성. 고려대학교 석사학위 논문, (1993)
 28. Yamada, H., Kiyohara, H. : Bioactive polysaccharides from Chinese herbal medicines. *Abstract of Chinese Medicines*, **3**(1), 104 (1989)
 29. Kweon, M. H. : Chemical structure and activation mode of the anti-complementary polysaccharides isolated from bracken(*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*). 고려대학교 박사학위 논문, (1994)
 30. Furusawa, E., Furusawa, S. : Anti-tumor potential of low-dose chemotherapy manifested in combination with immunotherapy of viva-natural, a dietary sea weed extract on Lewis lung carcinoma. *Cancer Letters*, **50**, 71 (1990)
 31. Yanahira, S., Kiyohara, H., Cyong, J. C., Otsuka, Y. : Characterization of anti-complementary acidic heteroglycans from the seed of *Coix lacrym-jobi* var. *ma-yuen*. *Phytochemistry*, **26**, 3269(1987)
 32. Otani, K., Mizutani, K., Hatono, S., Kasai, R., Sumino, R., Tomoko, S., Ushijima, M., Zhou, J., Fuwa, T., Tanaka, O. : Sanchinan-A, a reticuloendothelial system activating arabinogalactan from San chi-ginseng. *Planta Medica*, p. 166 (1986)

(1994년 6월 28일 수리)