

상백피로부터 분리한 면역세포 증식작용을 지닌 다당체

김철영 · 이은주 · 김환목* · 허 훈#

서울대학교 약학대학, *생명공학연구소

(Received June 19, 1998)

Isolation of Lymphocyte Proliferating Polysaccharide from Mori Cortex Radicis

Chul Young Kim, Eun Ju Lee, Hwan Mook Kim* and Hoon Huh#

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,

KIST, PO box 115, Yusung, Taejon 305-600, Korea

Abstract—Numerous efforts have been made to isolate immunologically active component from Mori Cortex Radicis, since it has been used in the treatment of bronchial asthma, and immune disorder in human. Recently, we reported the purification of an anti-allergic component of the Mori Cortex Radicis. Among the fractions we prepared in the previous study, a fraction was active in the proliferation of murine lymphocytes. The active component (HHM 3-1) was elucidated as a polysaccharide with a small amount of lignin. When it was subjected to MALDI-MS by using 3-hydroxypicolinic acid as a matrix, the molecular weight of the component was estimated as 792688.2 dalton. Total hexose and protein content of the component were estimated as 62.6% and 0.51%, respectively and it was composed mainly of glucose, galactose and mannose. The remaining part of the component was estimated as lignin because of the characteristic functional groups in IR and UV spectra. Concomitant treatment of HHM 3-1 with known mitogens synergistically increased the proliferation of B-cells and T-cells.

Keywords □ Mori Cortex Radicis, the proliferation of murine lymphocytes, polysaccharide (HHM 3-1).

상백피의 활성성분의 연구는 주로 유기용매 추출물을 대상으로 하여 여러 가지 flavonoid 등 주로 폐놀성 화합물들이 분리되고 되었으나 이들이 면역계에 작용한다는 보고는 없었다.¹⁻⁷⁾ 한편 상백피의 물 추출물에 대한 연구도 상당히 진척되어 물 추출물이 비만세포의 탈과립을 억제하고 anaphylactic shock을 지지하는 등의 효과가 보고된 바 있다.⁸⁾ 최근 우리는 상백피의 물 추출물로부터 lignin-carbohydrate complex를 분리하여 이것이 항 알러지 활성 성분임을 밝힌바 있다.⁹⁾

또한 여러 가지 식물이나 균류의 물 추출물이 면역에 대한 조절기능들이 보고되었으며,¹⁰⁻¹¹⁾ Yoshida 등¹²⁾에 의하면 fungus에서 분리된 다당체는 interleukin-

1이나 tumor necrosis factor같은 cytokine들을 유도하여 항암효과를 나타낸다. 이러한 보고들을 참조하여 상백피에서 분리된 다당체의 면역조절작용을 검색하였다. 이들 중 한 분획에서 면역세포의 증식작용을 촉진하는 활성이 확인되어 이 활성성분을 분리한 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

사용기기 - 원소분석기로는 EA 1110(CE instrument, Italy)를 사용하여 측정하였으며, IR은 FT-IR (Perkin Elmer 1710 spectrophotometer, U.S.A.)를 사용하여 KBr 법으로 측정하였다.

재료 및 시약 - 상백피(*Morus alba* L.)는 농촌진흥청 잠사곤충연구소 이완주 박사로부터 얻어 잘게 썰어

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7859 (팩스) 02-884-6086

사용하였다. 추출에 사용된 유기용매는 1급 시약을, 기타 시약은 특급 시약을 덕산약품(서울)으로부터 구입하였으며 TLC plate는 Kiesel gel 60 F₂₅₄(Art. 5715, Merck)를 사용하였고, 당 표준품 및 Sigma Sil-A 등은 Sigma Co.에서 구입하였고, 칼럼크로마토그래피용 충전제인 DEAE Sephadex A-25, Sephadex G-75, G-100은 Pharmacia Co.에서 구입하였다. 이외의 시약은 모두 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다.

실험동물 - SPF female B6C3F1 mouse는 생명공학연구소, KIST(대전)에서 무게가 20~25 g 되는 것을 구입하여 사용하였으며, RPMI 1640 medium, fetal calf serum(FCS) 및 기타 세포배양용 시약은 GIBCO BRL에서 구입하여 사용하였다.

분리 및 정제 - 상백피의 분리, 정제는 Lee⁹⁾ 등의 방법에 따라 행하였다. 상백피를 탈이온수로 열탕 추출한 후 여과하여 여액을 감압농축하였다. 80% MeOH와 75% EtOH로 연속침전시켜 얻어진 부분을 동결 건조한 후 50 mM tris buffer(pH 8.2)로 평형시킨 DEAE Sephadex A-25 ion exchange 칼럼크로마토그래피(8 cm ID×30 cm, NaCl 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 M로 step gradient로 용출) ultrafiltration (Amicon Ultrafiltration kit using a Diaflo YM10 membran) 및 Sephadex G-75 칼럼크로마토그래피(2.5 cm ID×92 cm)를 실시하여 최종 4개의 분획으로 나누었다. 그 중 첫 번째 분획(이를 HHM 3-1이라함)을 면역세포 증식작용을 검색하였다.

분자량 측정 - 분자량 측정에는 matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (Perseptive Biosystems Co. Voyager, RP Model)를 사용하였다. Sample은 AcCN:H₂O(1:1)에 1 mg/ml의 농도로 녹여 RP mode로 측정하였다. Matrix는 3-hydroxypicolinic acid(Fluka)를 사용하여 AcCN:H₂O(1:1)에 50 µg/ml의 농도로 녹여 sample 용액 10 µl와 matrix 100 µl를 혼합하여 측정하였다.

조성 분석 - 시료를 6 N trifluoroacetic acid (TFA)로 121°C에서 6시간 가수분해하여 당 표준품과 함께 TLC를 전개하여 anisaldehyde-H₂SO₄ 시약, AgNO₃ 시약, α-naphthol 시약 등의 발색시약으로 확인하였다. Total hexoses의 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법¹³⁾에 따라 490 nm에서 측정하였으며, 단백질의 함량은 bovine

serum albumin 용액을 표준물질로 하여 Bradford¹⁴⁾의 방법에 따라 595 nm에서 측정하였다. 중성당의 조성은 GC를 이용하여 확인하였다. 시료를 6 N TFA로 121°C에서 6 시간 동안 가수분해한 후 여과하여 여액을 농축하였다.¹⁵⁾ 여액의 물을 제거한 후 100 µl의 Sigma Sil-A를 넣어서 중성당을 TMS화 하였다. GC는 다음과 같은 조건 하에서 실시하였다. He를 carrier gas로 사용하고 유속을 30 ml/min(split ratio=1/100)로 하였으며, DB-1(0.25 mm ID×30 m, J & W Scientific, U.S.A.) capillary column 상에서 180°C에서 5 min 동안 유지시킨 후 250°C까지 5°C/min로 온도를 올려 측정하였다. 당 표준품 또한 6 N TFA로 121°C에서 6 시간 동안 반응후 TMS화 하여 GC로 분석하였다.

Spleen 세포의 분리 및 면역세포 증식 검색 - Spleen lymphocytes는 Kim¹⁶⁻¹⁸⁾ 등의 방법에 따라 분리하였다. Mouse로부터 분리한 spleen을 syringe plunger를 사용하여 세포를 분리하고 이를 RPMI media로 현탁시킨 후 1×10⁶ cells/ml의 농도로 96 well micro plate에 분주하였다. Lipopolysaccharide(LPS), pokeweed mitogen(PWM), phytohemagglutinine(PHA) 및 concanavalin A(Con A)를 각각 1 µg/ml로 첨가한 다음 HHM3-1을 0.1에서 100 µg/ml로 첨가하여 54시간 동안 배양하였다. [³H]-thymidine을 1 µCi/well의 농도로 첨가하여 18시간 후에 thymidine uptake를 측정하였다.^{17, 19-20)}

결과 및 고찰

다당체의 분리 및 조성분석 - MALDI-MS상에서 분자량은 792688.2 [M+1]로 확인되었으며, [2M+1], [2(2M)+1]의 peak의 존재로 분자량은 79만 dalton 정도로 추정가능하였다(Fig. 1). 가수분해 후 TLC 상에서 anis-H₂SO₄ 시약, AgNO₃ 시약, α-naphthol 시약으로 발색시켰을 때 당부의 존재를 추정할 수 있었으며, phloroglucinol-HCl 시약에 양성으로 반응하여 lignin 부위의 존재를 추정할 수 있었다. 원소분석 결과 HHM 3-1은 C: 25.0% H: 45.5% O: 28.4% N: 1.06% 구성되어 있었으며, total hexose와 단백질의 함량을 측정한 결과 각각 62.6%, 0.51% 였다. 구성당을 알아보기 위하여 산 가수분해 후 TMS화하여 GC로 표준품과 비교한 결과 glucose, galactose, mannose로 이루어져 있음을

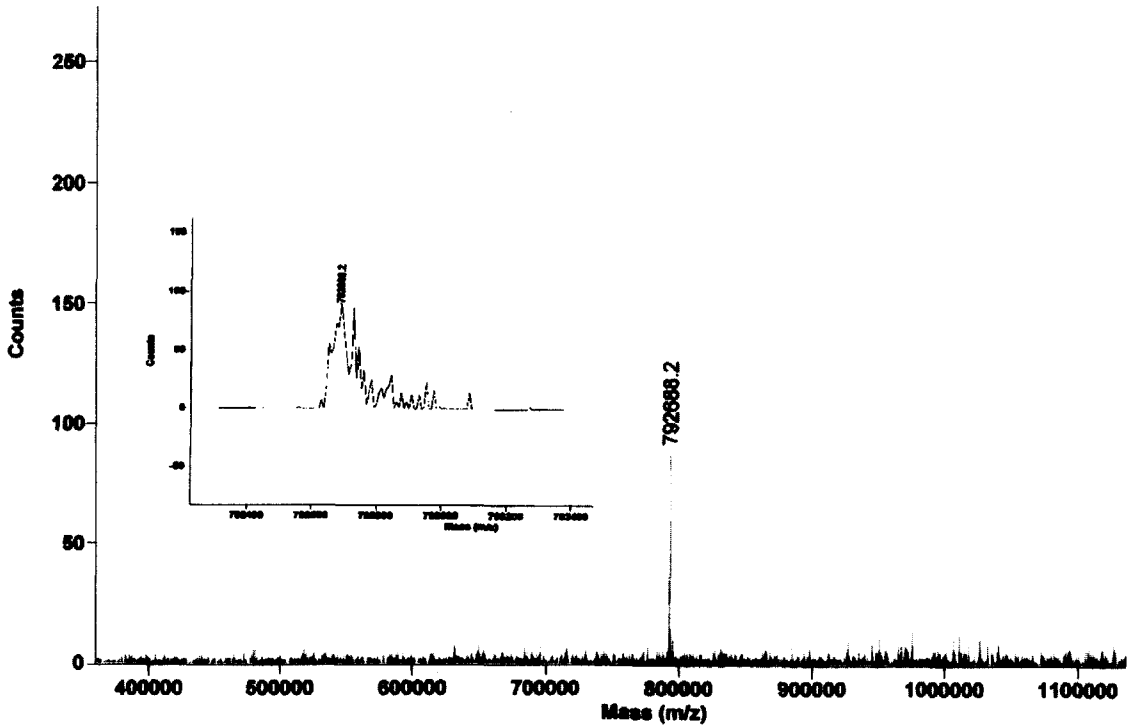


Fig. 1 — MALDI-MS spectrum of HHM 3-1 obtained with use of 3-hydroxypicolinic acid as a matrix. The inset shows enlarged spectrum.

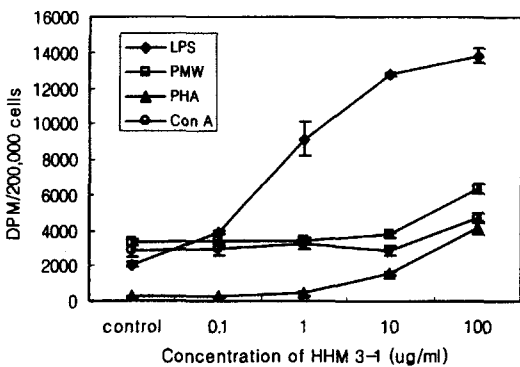


Fig. 2 — Synergistic effect of HHM 3-1 on the proliferation of B cells activated by lipopolysaccharide (LPS), of B/T cells activated by pokeweed mitogen (PWM), and on the proliferation T cells activated by concanavalin A (Con A) or phytohemagglutinin (PHA). HHM 3-1 was added at the start of culture concentration ranging from 0.1 to 100 $\mu\text{g/ml}$ and mitogens such as LPS, PWM, Con A and PHA were also added at a concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$. After incubation for 72 hours, the proliferation of cells was measured by the incorporation of 1 $\mu\text{Ci/well}$ [^3H]-thymidine for the last 18 hours.

확인하였다. IR spectrum에서 3447 cm^{-1} 근처에서 hydroxy기를 1654 cm^{-1} 에서 carbonyl기를 1500 cm^{-1} 근처와 1016 cm^{-1} 에서 aromatic기를 확인하였으며 UV에서 280 nm의 강한 흡수를 나타내어, HHM 3-1의 나머지 부분이 lignin임을 예측하였다.²¹⁻²⁴ 이상의 결과로 HHM 3-1은 주로 다당체로 이루어진 carbohydrate-lignin 복합체로 예상된다.

면역세포 증식에 대한 HHM-3의 효과 - HHM 3-1의 B 및 T lymphocytes의 증식에 대한 효과는 mitogenicity assay로 측정하였다. B cell에 특이적인 mitogen인 LPS를 HHM 3-1과 동시에 투여하였을 때 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 mitogen 단독투여에 비해 6.7배로 면역세포가 증식하였으며(Fig. 2), B 및 T cell에 대한 mitogen인 PWM의 경우에는 1.9배 증가하였다. 또한 Con A 및 PHA로 유도된 T cell의 증식에 대하여도 HHM 3-1을 mitogen과 동시에 투여하였을 때 mitogen 단독투여에 비해 각각 1.7, 17.8배 증가하였다(Fig. 2). 이상의 결과로부터 HHM 3-1은 면역세포인 B cell 및 T cell의 증식을 촉진시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

결 론

1. 상백피의 추출물로부터 면역세포 증식작용을 나타내는 고분자 물질 HHM 3-1을 분리하였다.
2. HHM 3-1은 MALDI-MS 및 여러 가지 크기분석 결과로부터 분자량 792,688.2 [M+1]인 carbohydrate와 lignin으로 이루어진 단일물질로 확인하였다.
3. HHM 3-1은 면역세포인 B cell 및 T cell의 증식을 촉진시키는 효과를 나타내었다.

감사의 말씀

본 실험의 실험재료인 상백피를 제공해 주신 농촌진흥청 잠사곤충 연구소 이완주 박사와 분자량 측정에도움을 주신 성균관대학교 약학대학 이강노 교수께 감사드립니다.

문 헌

- 1) Nomura, T. and Fukai, T. : Kuwanon G, a new flavone derivatives form the root barks of the cultivated mulberry tree (*Morus alba* L.). *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2548 (1980).
- 2) Nomura, T., Fukai, T. and Narita, T. : Hypotensive constituent, kuwanon H, a new flavone derivative from root barks of the cultivated mulberry tree (*Morus alba* L.). *Heterocycles* **14**, 1943 (1980).
- 3) Nomura, T., Fukai, T., Hamo, Y. and Ikuta, H. : Kuwanon M, a new Diels-Alder adduct from the root barks of the cultivated mulberry tree (*Morus ihou* Koidz). *Heterocycles* **20**, 585 (1983).
- 4) Nomura, T., Fukai, T., Matsomoto, J. and Ohmori, T. : Constituents of the cultivated mulberry tree. III. Components of root barks of *Morus bombycis*. *Planta Medica* **46**, 28 (1982).
- 5) Nomura, T. : Phenolic constituents of the root barks of the mulberry tree. 28th Symposium on Phytochemistry, Abstract paper, p 1, Tokyo, Japan (1984).
- 6) Kimura, Y., Okuda, T., Nomura, T., Fukai, T. and Arichi, S. : Effects of flavonoids and related compounds from mulberry tree on arachidonate metabolism in rat platelet homogenates. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 1223 (1986).
- 7) Fujika, H., Horiuchi, T., Yamashita, K., Haki, H., Sukanuma, M., Nishino, H., Iwashima, A., Hirata, Y. and Sugimura, T., Inhibition of tumor promotion by flavonoids. *in Plant flavonoids in biology and medicine-Biochemical pharmacological and structure-activity relationships*. Cody, V., Middleton, Jr., E., Harborne, J. B. (eds.). Alan R. Liss, Inc., New York, p. 429 (1986).
- 8) 전병득, 송창호, 최영숙, 박병건, 이무삼 : 상백피가 compound 48/80에 의해 유도된 anaphylactic shock와 비만세포의 히스타민 유리에 미치는 영향. 대한 해부학회지 **24**, 193 (1991).
- 9) Lee, E. J., Chae, O. K., Lee, M. S., Lee, H. and Huh, H. : Purification of anti-allergic compound from Mori Cortex Radicis extract. *Yakhakhoeji*, in press.
- 10) Benencia, F., Courreges, M. C., Nores, M. M. and Coulombie, F. C. : Immunomodulatory activities of Cedrela tubiflora leaf aqueous extracts. *J. Ethnopharm.* **49**, 133 (1995).
- 11) Benencia, F., Courreges, M. C., Massouh, E. J. and Coulombie, F. C. : Effect of *Melia azedarach* L. leaf extracts on human complement and polymorphonuclear leukocytes. *J. Ethnopharm.* **49**, 133 (1995).
- 12) Yoshida, I., Kiho, T., Sakushima, M. and Ukai, S. : Polysaccharides in fungi. XXXVII. Immunomodulating activity of carboxymethylated derivatives of linear (1→3)- α -D-glucans extracted from the fruiting bodies of *Agrocybe cylindracea* and *Amanita muscaria*. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 114 (1996).
- 13) 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).
- 14) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 15) Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G. and Strecker, G., Chapter 5. Glycoproteins. *in Carbohydrate Analysis-A practical approach*. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. (eds), IRL press, Oxford, England,

- p. 175 (1986).
- 16) Kim, H. M., Han, S. B., Chang, W. I., Hyun, B. H., Oh, G. T., Ahn, C. J. and Cha, Y. N. : Selective suppression of in vitro T-dependent humoral immunity by synthetic food additive antioxidants. *J. Toxicol. Sci.* **21**, 41 (1996).
 - 17) Kim H. M., Oh, G. T., Hong, D. H., Hyun, B. H., Cha, Y. N., Yoo, B. S. and Han, S. B. : Facilitation of apoptosis by autologous serum and related immunosuppression in the splenocyte culture. *Immunopharmacol.* **34**, 39 (1996).
 - 18) Kim H. M., Han, S. B., Oh, G. T., Kim, Y. H., Hong, D. H., Hong, N. D. and Yoo, I. D. : Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmacol.* **18**, 295 (1996).
 - 19) O'Mahony, A. M., O'Sullivan, G. C., O'Connell, J., Cotter, T. G. and Collins, J. K. : An immune suppressive factor derived from esophageal squamous carcinoma induces apoptosis in normal and transformed cells of lymphoid lineage. *J. Immunol.* **151**, 4847 (1993).
 - 20) Kaldjian, E. P., Chen, G. H. and Cease, K. B. : Enrichment of lymphocyte proliferation assays by use of serum free medium. *J. Immunol.* **147**, 189 (1992).
 - 21) Uchiyama, T. Sato J. and Ogasawara, N. : Lignification and qualitative changes of phenolic compound in rice callus tissue inoculated with plant pathogenic fungi. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1 (1983).
 - 22) Suzuki, H. Okubo, A., Yazaki, S. Suzuki, K., Mitsuya, H. and Toda, S. : Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in and extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycella (LCM). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 367 (1989).
 - 23) Lin, S. Y., Chapter 5.1 Ultraviolet spectrophotometry. in *Methods in Lignin Chemistry*. Lin, S. Y. and Dence C. W. (eds), Springer-Verlag, New York, p. 217 (1992).
 - 24) Faix, O., Chapter 4.1 Fourier transform Infrared spectroscopy. in *Methods in Lignin Chemistry*. Lin, S. Y. and Dence C. W. (eds), Springer-Verlag, New York, p. 83 (1992).