

한외거르기(Ultrafiltration)에 의하여 분리된 백수오 고분자 분획물의 면역증진 활성

장 미 · 임태규 · 홍희도 · 이영경 · 김경탁 · 이은정 · 이정훈¹ · 이윤지¹ · 김연복¹ · 조장원*
한국식품연구원 전통식품연구센터, ¹농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부

Immuno-stimulatory Activities of a High Molecular Weight Fraction from *Cynanchum wilfordii* Radix Obtained by Ultrafiltration

Mi Jang, Tae-Gyu Lim, Hee-Do Hong, Young Kyoung Rhee, Kyung-Tack Kim, Eunjung Lee,
Jeong Hoon Lee¹, Yun Ji Lee¹, Yeon Bok Kim¹, and Chang-Won Cho*

Traditional Food Research Center, Korea Food Research Institute

¹Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA

Abstract The purpose of this study was to investigate the immuno-stimulatory activity of the high-molecular-weight fraction (HMWF) of *Cynanchum wilfordii* (CW) extracts obtained by ultrafiltration in murine macrophage RAW 264.7 cells and to assess its immuno-stimulatory effect in mice. Ultrafiltration was performed with polyethersulfone membranes (30 kDa cutoff) in a cross-flow filtration system to obtain the HMWF of CW. The results showed that the HMWF increased the production of various cytokines such as tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and nitric oxide in dose-dependent manners. In addition, HMWF treatment increased the relative spleen weight as well as splenocyte proliferation induced by concanavalin A or bacterial lipopolysaccharide in mice. Natural killer (NK) cell activity in the HMWF-treated group was significantly increased compared to that in the control group. These results suggest that the HMWF of CW can support the immune system through secretion of macrophage cytokines, thereby enhancing NK cell activity and murine splenocyte proliferation.

Keywords: *Cynanchum wilfordii*, ultrafiltration, NK cell activity, macrophage, immuno-stimulatory activity

서 론

「대한민국약전외한약(생약) 규격집(KHP)」에 등재된 백수오(白首烏)는 박주가릿과(Asclepiadaceae)의 덩이 뿌리로서 그 기원을 ‘은조롱(*Cynanchum wilfordii* Hemsley)’으로 구분하고 있다(1). 중국의 중앙대사전과 중앙지에는 은조롱(적산우피소, *C. wilfordii* Hemsley), 이엽우피소(*C. auriculatum* Royle ex Wight) 및 대근우피소(*C. bungei* Dence)로 수록되어 있으나 우리나라와 북한의 공정서에는 은조롱(*Cynanchum wilfordii*)을 기원식물로 규정하고 있다(2,3). 최근에는 우리나라에서 백수오로 널리 재배되고 있는 은조롱을 이엽우피소로 둔갑하거나 혼입하여 사용하면서 국민들의 혼란과 불안감을 고조시켜 건강기능식품 시장을 위축시키는 단초로도 작용하였다. 더구나 우리나라에서 재배된 백수오는 생산성이 낮고 지주설치 비용과 노동력이 많이 소요되어 재배를 기피하면서 국내의 재배와 생산량이 급격히 감소하였다(4). 따라서 백수오의 재배 활성화와 농가소득을 높이기 위해서는 다양한 생리활성 성분과 기능성식품 소재로서의 응용 가능성을 검토할 필

요가 있다. 한방에서 백수오는 피로회복, 조혈기능촉진, 동맥경화 등에 사용하고 있으며(5) 최근에는 불면증, 불안, 빈혈, 노화 그리고 다양한 노인성 질환에 효과가 있다고 보고되었다(6,7). 또한 다른 생약제제를 혼합한 백수오 복합 추출물을 사용하여 난소적출 동물 모델에서의 골밀도 증가효과를 확인한 논문도 보고되어 있다(8).

식품가공 원료로 생약제의 이용이 증가하고 있는 만큼 질병의 치유보다는 건강 유지와 자양강장을 목적으로 섭취하는 경우가 많다. 대표적으로 인삼의 다당류(polysaccharides)의 경우에는 tumor necrosis factor (TNF)- α , 인터루킨(interleukin, IL)-1, 인터루킨-2, 인터루킨-6, 인터루킨-12, 인터페론(interferon, IFN)- γ 와 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)와 같은 다양한 사이토카인(cytokines)의 생산과 림프계 세포를 증식하도록 자극하는 강력한 면역조절 기능(9-12) 등 다양한 효능을 나타낸다고 밝혀져 있다. 최근에는 신체 면역체계의 기능저하가 감기와 같은 바이러스성 호흡기 질환은 물론 대상포진, 갑상선 질환 등에 대한 저항력을 떨어뜨릴 수 있다는 보고가 있어 식품섭취를 통해 인체의 면역반응을 증진시킬 수 있는 다양한 연구가 요구되고 있으며(13,14), 특히 천연물을 대상으로 면역증진에 우수한 건강기능식품의 소재연구도 활발하게 이루어지고 있다(15). 면역반응은 자기성분 이외의 외부 감염물질의 침입으로부터 유도되는 질병 환경을 제거하고 수복하는 중요한 생체적 방어 작용의 하나로 선천성 면역(innate immunity)반응과 후천성 면역(adaptive immunity)반응으로 구분된다(16). 선천 면역계에서 생체 방어 기구의 최전

*Corresponding author: Chang-Won Cho, Traditional Food Research Center, Korea Food Research Institute, Seongnam 13539, Korea
Tel: 82-31-780-9312
Fax: 82-31-709-9876
E-mail: cwcho@kfri.re.kr
Received February 23, 2016; revised April 4, 2016;
accepted April 4, 2016

선을 담당하는 큰포식세포(macrophage)는 체내의 모든 조직에 분포하면서 1차적으로 세균이나 바이러스 등의 감염성 병원체뿐만 아니라 노화된 정상세포와 암세포 등에 대해 탐식작용(phagocytosis)을 일으켜 제거하는 방어능력을 가지고 있다. 활성화된 큰포식세포는 증식과 확산능력의 향상 등과 같은 세포의 형태적 변화뿐만 아니라 대식능력의 증강, 산화질소(II) (nitric oxide, NO)와 인터루킨 계열, TNF- α 등의 다양한 사이토카인 생성의 향상으로 면역반응을 극대화시키는 중요 매개체 역할을 한다(17,18). 또한 암세포에 대하여 살해능력을 가지는 대표적 작동세포로 알려진 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)는 면역에 있어서 숙주를 보호하고, 암이나 감염에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 초기 면역반응에서 감염인자에 대항하는 일차적 방어선을 차지하고 있다(19).

본 연구에서는 국내에서 재배되는 백수오 추출물을 한외거르기하여 얻은 고분자 분획물의 *in vitro* 및 *in vivo*상에서의 면역 자극 활성을 평가하여 면역증진 효과를 가지는 기능성식품소재로서의 활용가능성을 검토함으로써 백수오의 국내 재배활성화와 함께 농가소득을 높이기 위한 이용가능성을 증대시키고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 백수오(*Cynanchum wilfordii*)는 2015년 8월에 강원도 정선에서 채굴된 2년근 백수오를 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 약용작물과(Eumseong, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 분자적 판별을 위하여 샘플의 잎과 뿌리조직으로부터 RBC (Banqiao City, Taiwan)사의 HiYield™ Genomic DNA Mini Kit를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 처리하였으며 추출된 DNA는 Multiskan GO UV/Vis microplate spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 농도 및 순도를 확인 후 20 ng/ μ L로 정량하여 대한민국약전외한약(생약) 규격집 (KHP)(1)에 기재되어있는 공인검정법인 psbA-tmH 구간의 PCR 분석을 통해 시료를 검증하였다.

시료의 제조

백수오 열수추출물 분말 5.0 g을 1 L의 증류수에 용해하여 2시간 교반 추출한 후 원심분리(6,500 \times g, 10분, 4 $^{\circ}$ C)하여 얻은 상층액을 여과하여 냉동건조하였다(CWX). 낮은 온도에서 액체상태의 추출물을 효과적으로 농축하고 정제하기 위하여 비열처리 공정인 한외거르기를 통해 얻은 고분자와 저분자 분획에서의 면역활성을 비교해보기 위해 백수오 열수추출물 분말을 증류수에 용해한 후 원심분리(6,500 \times g, 10분, 4 $^{\circ}$ C)하여 얻은 상층액을 분자량(MWCO; molecular weight cut off)이 30,000인 여과막을 사용한 한외여과장치(Sartoccon-Mini system, Sartorius Co., Göttingen, Germany)를 이용하여 분자량 30 kDa 이상인 고분자 분획물(CWUF>30)과 30 kDa 이하인 저분자 분획물(CWUF<30)로 나누어 냉동건조하였다. 이때 추출에 사용한 시료의 무게와 냉동건조기를 이용하여 완전히 건조시킨 후 잔사의 무게를 측정하여 분말시료의 건조 중량에 대한 가용성 고형물 함량으로 추출 수율을 계산하였다.

일반성분 분석

총당 함량은 페놀-황산법(phenol-sulfuric acid method)(20)으로 측정하였으며, 시험관에 시료분말을 1%(w/v) 농도로 증류수에 녹인 시료용액을 0.45 μ m 막필터로 여과하여 여액을 각각 1 mL씩

취하여 5% 페놀(phenol) 1 mL에 잘 혼합시켰다. 여기에 황산 5 mL를 첨가한 후 30분 반응시키고 490 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 구해진 포도당(glucose)의 함량을 기준으로 총당 함량을 계산하였다. 산성당 함량은 카바졸-황산법(carbazole-sulfuric acid method)(21)으로 측정하였으며, 시료분말을 1%(w/v) 농도로 증류수에 녹인 시료용액을 0.45 μ m 막필터로 여과한 후 여액을 각각 0.5 mL씩 취하고 0.125% 카바졸(carbazole, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.25 mL를 가하여 잘 혼합시켰다. 여기에 진한 황산 3 mL를 가하고 85 $^{\circ}$ C에서 물증탕하여 15분간 발색시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 보정선으로부터 구해진 베타-D-갈락투론산(β -D-galacturonic acid, Sigma-Aldrich)를 표준물질로 하여 그 함량을 계산하였다. 단백질 함량 측정은 브라드포드법(Bradford method)(22)로 측정하였으며 표준물질로는 소혈청알부민(bovine serum albumin, Sigma-Aldrich)을 사용하였다.

세포배양

마우스의 큰포식세포주인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받았으며 세포배양을 위해 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건을 유지하여 배양하였다.

세포 생존율 측정

추출물에 의한 세포독성을 알아보기 위하여 CCK-8 assay (Dojindo Lab., Kumamoto, Japan)를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96-well plate에 1×10^4 cell/well의 농도로 분주하여 24시간 배양한 후 시료를 농도별(0, 30, 50, 150, 200 μ g/mL)로 처리하였다. 양성대조군으로는 1 μ g/mL의 지방질다당류(lipopolysaccharide, LPS)를 처리하였으며 24시간 배양한 후에는 CCK-8 solution (10 μ L/well)을 각 well에 첨가시켜 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 처리하여 450 nm 파장에서 ELISA reader (TECAN, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

산화질소(II) 생성량 측정

면역증진 능력을 확인하기 위하여 griess reagent [1% (w/v) sulfanilamide in 5% (v/v) 인산(phosphoric acid)과 0.1% (w/v) 나프틸에틸렌다이아민-염산(naphtylethylenediamine-HCl)]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 생성농도를 측정하였다. RAW 264.7 세포를 6-well plate에 5×10^5 cell/well의 농도로 분주하여 24시간 배양한 후에 시료는 농도별(0, 30, 50, 150, 200 μ g/mL)로 각각 처리하였으며 양성대조군으로써 지방질다당류는 1 μ g/mL로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 세포배양액의 상층액과 동량의 griess reagent를 혼합하여 상온에서 15분 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 아질산소듐(sodium nitrite)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 산화질소(II) 농도를 구하여 환산하였다.

사이토카인 생성량

세포배양액 내의 TNF- α 및 인터루킨-6의 분비량은 ELISA kit (BD Bioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 capture antibody (anti-mouse TNF- α 및 인터루킨-6)를 각각 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 washing buffer (0.05% Tween-20이 포함된 phosphate-buffered saline (PBS))로 세척한 후 10% FBS가 함유된 PBS으로 1시간 동안 blocking한 뒤 washing buffer로 세척하였다. 각 microplate에는 산화질소(II)를 측정하였던 것과 동일한 세포배양액의 상층액을

100 μ L씩 분주하여 실온에서 2시간 반응시킨 후 washing buffer 로 세척하였다. 희석한 각각의 biotinylated anti-mouse TNF- α 및 인터루킨-6 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate 용액을 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 plate 를 washing buffer로 세척한 후 tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution을 첨가하여 암실에서 30분 동안 발색시킨 다음 1 M 인산을 첨가하여 발색반응을 정지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험동물

동물은 7주령의 암컷 BALB/c 마우스를 코아텍(주)(Pyoungtaek, Korea)로부터 공급받아 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 고형사료와 물은 자유로이 공급하였다. 실험실은 일정한 온도($23\pm 3^{\circ}\text{C}$)와 습도($50\pm 10\%$) 및 12시간 낮과 밤의 주기를 유지하였다. 실험은 한국식품연구원 동물실험윤리위원회의 승인(KFRI-M-15040)을 받았으며 실험동물의 관리 및 사용은 미국국립보건원(NIH)의 지침에 따라 수행하였다.

시험물질 투여

실험용 동물은 체중변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 임의 배치법에 의해 정상대조군과 시료 투여군으로 나누었으며 실험군마다 6마리씩 사용하였다. 실험군은 4군으로 생리식염수를 투여한 정상대조군(CON)과 CVT-E002TM (COLD-FX, Afexa Life Sciences Inc., Edmonton, AB, Canada)를 200 mg/kg body weight (BW)으로 투여한 양성대조군(PC), 백수오의 고분자 분획물(CWUF>30)을 100, 200 mg/kg BW의 농도로 투여한 시료투여군으로 나누었다. 투여는 연속 4주간 매일 1회 경구로 하였으며 실험 종료일에 실험동물의 체중을 측정하고 희생시킨 후 흉선, 비장을 적출하여 체중에 대한 상대장기중량으로 계산하였다.

비장세포 증식능 측정

실험동물을 경추탈골하여 비장을 무균적으로 적출한 후 멸균 유리병으로 가볍게 분쇄하여 유리시켰다. 분리된 세포현탁액은 RPMI 1640 medium (Hyclone, Logan, UT, USA)내에서 200 메시(mesh) 스테인리스 강 체(stainless steel sieve)에 통과시켜 세포를 유리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 100 μ m cell strainers (BD Falcon, Palo Alto, CA, USA)에 통과시켜 배양액으로 2번 세척하고, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 red blood cell lysing buffer (Hybri-MaxTM, Sigma-Aldrich)에 5분간 처리하여 적혈구를 제거하였다. 적혈구가 제거된 비장세포는 다시 RPMI 1640 배양액에 분산시켜 trypan blue solution으로 염색한 후 혈구계수기(hemocytometer)를 이용하여 세포수를 측정하였다. 24-well plate에 3.0×10^6 cell/mL로 분주하였다. 각 군당 mitogen으로 Con A (concanavalin A, 7.5 μ g/mL) 및 지방질다당류(30 μ g/mL)를 첨가하고 37°C , 5% CO_2 배양기에서 72시간 배양한 후 세포증식능을 CCK-8 assay로 측정하였다.

자연살해세포 활성 측정

자연살해세포의 세포독성은 자연살해세포에 의해 파괴되는 종양세포 Yac-1세포로부터 유리되는 젖산 수소제거효소(lactate dehydrogenase, LDH)를 측정하는 방법을 이용하였다. Yac-1 (target cell) 세포는 96-well U-bottom culture plate에 1×10^4 cell/well이 되도록 조정한 후 분리된 비장세포(effector cell)와 같이 배양하였으며 effector-to-target 세포 비가 10:1, 5:1, 2.5:1이 되도록 세포수를 조정하였다. 37°C , 5% CO_2 배양기에서 4시간 배양시킨 후

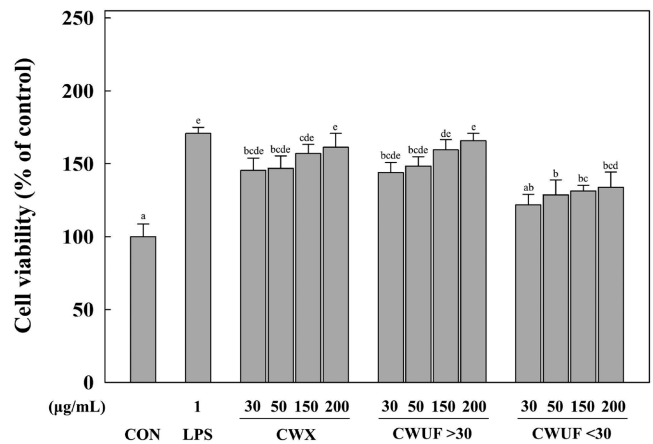


Fig. 1. Effect of various extracts of *Cynanchum wilfordii* on viability of RAW 264.7 cells. Values with the different letters are significantly different ($p < 0.05$). CWX, hot water extract; CWUF >30, a high molecular weight fraction obtained by ultrafiltration; CWUF <30, a low molecular weight fraction obtained by ultrafiltration.

에 자연살해세포의 사멸능에 의해 표적세포로부터 유리되는 젖산 수소제거효소의 발생량을 EZ-LDH Cell Cytotoxicity Assay Kit (DoGen, Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였다.

통계분석

결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며 통계처리는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 one way ANOVA test로 분석하였다. 실험군 간의 유의성은 Scheffe's test로 $p < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

세포독성

백수오 열수추출물(CWX)과 한외거르기를 이용하여 얻은 고분자 분획물(CWUF>30) 및 저분자 분획물(CWUF<30)의 세포독성을 확인하기 위하여 농도별(30, 50, 150, 200 μ g/mL)로 처리한 결과는 Fig. 1과 같았다. 정상 대조군(CON)에 비해 모든 농도에서 100% 이상의 생존율을 나타내어 세포 독성에 큰 영향을 주지 않았다.

산화질소(II) 생성능

큰포식세포가 활성화되면 산화질소(II) 및 TNF- α 등의 사이토카인을 분비하는데 산화질소(II)의 생성은 면역계에서 종양세포나 세포내 감염된 미생물에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호전달 물질로 알려져 있다(23). 정상대조군과 지방질다당류만 처리한 양성대조군, 백수오 열수추출물(CWX), 고분자 분획물(CWUF>30) 및 저분자 분획물(CWUF<30)을 농도별로 처리하였을 때 생성되는 산화질소(II) 양을 측정된 결과는 Fig. 2와 같았다. 고분자 분획물인 CWUF>30의 경우 정상대조군(CON)에 비해 150 μ g/mL와 200 μ g/mL의 농도에서 유의적인 증가가 나타났으며 양성 대조군(지방질다당류)에 비해 23.1% 및 34.9% 수준의 산화질소(II)를 생성하였다. 이는 한외거르기를 통해 고분자의 유효성분이 농축됨으로써 높게 나타나는 것으로 보여진다. 산화질소(II)의 과량 생성은 전신적 염증을 유발하여 생체에 여러 부정적인

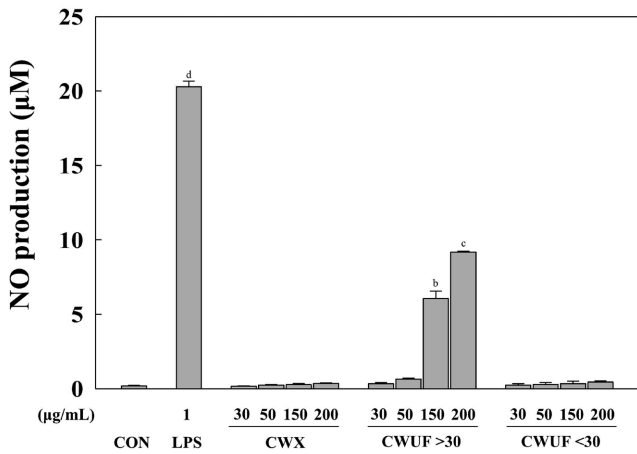


Fig. 2. Effect of various extracts of *Cynanchum wilfordii* on NO production from RAW 264.7 cells. Values with the different letters are significantly different ($p < 0.05$). CWX, hot water extract; CWUF >30, a high molecular weight fraction obtained by ultrafiltration; CWUF <30, a low molecular weight fraction obtained by ultrafiltration.

영향을 미치지만 적정량의 산화질소(II)의 생성은 선천성 면역의 중요한 인자로써 여겨진다(24).

TNF- α 및 인터루킨-6 생성능

염증성 사이토카인인 TNF- α 생성능에 대한 면역활성을 검토한 결과, 열수추출물(CWX) 및 고분자 분획물(CWUF>30)이 큰포식세포(macrophage) 자극에 의한 TNF- α 의 분비를 농도 의존적으로 증가시켰다. 활성화된 큰포식세포는 선천성 면역 반응의 중요 인자로 여겨지는 TNF- α , 인터루킨-6 및 인터루킨-12 등과 같은 사이토카인을 생산함으로써 이후의 면역반응을 유도한다고 알려져 있다(25). 특히, TNF- α 의 경우에는 미성숙 수지상 세포의 표면에 단백질 또는 보조자극인자의 발현을 촉진하고 이는 성숙된 형태의 수지상세포로 전환시켜 T림프구와 상호작용을 통해 T림프구의 활성화와 성장의 조절, 암세포의 세포용해유도 등 직접적인 항암 작용을 나타낸다(26). CWUF>30을 세포에 농도별로 처리한 후 양성대조군(지방질다당류)이 생성한 TNF- α 분비량과 비교했을 때 150 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 63.1, 71.3% 수준의 TNF- α 를 생성하였다(Fig. 3A).

3개의 추출물(CWX, CWUF>30 및 CWUF<30)을 큰포식세포에 농도별로 처리하였을 때의 인터루킨-6 분비량을 측정함으로써 면역반응의 활성화 정도를 확인하고자 하였으며 그 결과는 Fig. 3B에 나타내었다. 활성화된 큰포식세포는 인터루킨-6를 생산함으로써 면역반응을 조절한다고 알려져 있으며 B세포의 항체생성 세포인 형질세포(plasma cell)의 최종 분화를 유도하는 B세포의 자극인자로서 면역글로불린의 합성을 증진하는 등 다양한 작용을 나타낸다(27). CWUF>30의 경우 활성화된 큰포식세포에서 면역매개인자인 인터루킨-6의 생성을 농도 의존적으로 증가시켰으며 150과 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 정상 대조군(CON)에 비해 유의적인 차이를 나타내었다. 이는 CWUF>30이 인터루킨-6의 생성량을 증가시켜 B림프구를 분화시킴으로써 면역반응에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 여겨진다.

백수오 추출물과 고분자 분획물의 화학적 특성

백수오로부터 열수추출물(CWX) 및 한외거르기를 이용하여 얻은 고분자 분획물(CWUF>30)의 일반 화학적 특성을 살펴본 결

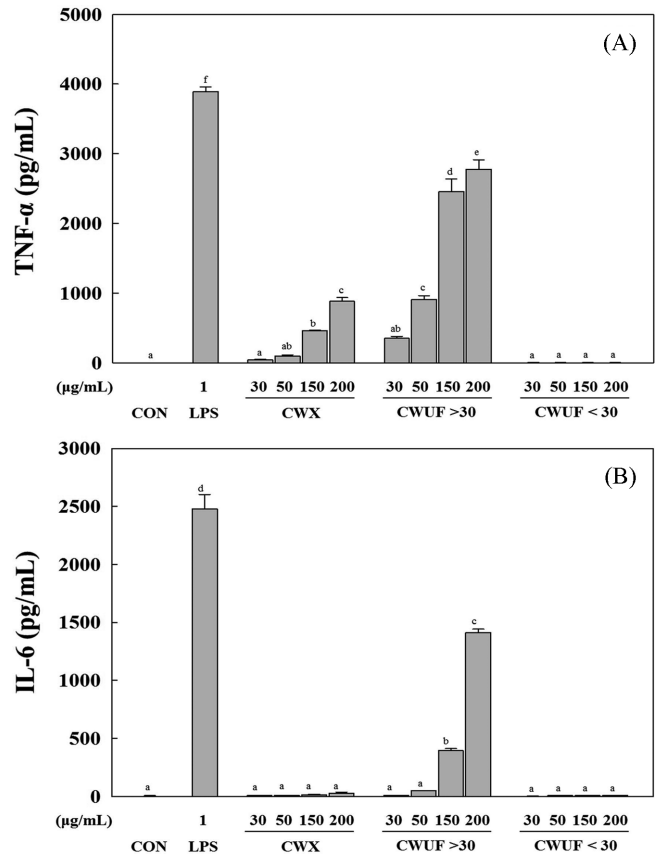


Fig. 3. Effect of various extracts of *Cynanchum wilfordii* on the productions of TNF- α (A) and IL-6 (B) from RAW 264.7 cells. Values with the different letters are significantly different ($p < 0.05$). CWX, hot water extract; CWUF>30, a high molecular weight fraction obtained by ultrafiltration; CWUF<30, a low molecular weight fraction obtained by ultrafiltration.

Table 1. Yield and the compositions of the high molecular weight fraction obtained by ultrafiltration of *Cynanchum wilfordii*

	CWX	CWUF>30
Yield (%)	16.1 \pm 0.2 ^a	4.0 \pm 0.1 ^b
Chemical composition (%)		
Neutral sugar	77.15 \pm 0.43 ^a	57.95 \pm 3.81 ^b
Uronic acid	16.49 \pm 0.35 ^a	34.01 \pm 3.42 ^b
Protein	6.36 \pm 0.10 ^a	8.04 \pm 0.54 ^b

Values represent Mean \pm SD.

^{a,b)} The different superscripts in the same row indicate the significant difference by Scheffe's test ($p < 0.05$).

과는 Table 1과 같다. 한외거르기 공정을 통해 저분자 물질이 분리된 고분자 분획물인 CWUF>30은 CWX보다 추출 수율이 감소하였으며 57.95%의 중성당과 34.01%의 산성당과 8.04%의 단백질로 구성되어 있었다. CWX의 경우, 77.15%의 중성당과 산성당(16.49%)과 단백질(6.36%)을 소량 함유하고 있었다(Table 1). CWUF>30은 CWX보다 중성당은 감소하면서 상대적으로 산성당이 증가되어 다당류의 주성분인 중성당과 산성당 함량에서 CWX와 유의적인 차이를 나타냄으로써 면역활성 증진에 주로 산성다당류가 관여할 가능성을 제시해주었다. 액체상태의 추출물을 효과적으로 농축하고 정제하기 위해 비열처리 공정인 한외거르기가 일반성분인 중성당, 산성당과 단백질 함량에 영향을 미치는

Table 2. Effect of the high molecular weight fraction of *Cynanchum wilfordii* on terminal body weight, absolute, and relative organ weights of mice (mean±SD) (n=6)

Group	Initial body weight (g)	Terminal body weight (g)	Spleen weight		Thymus weight	
			Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
Negative control (saline)	17.42±0.53 ^a	20.58±1.03 ^a	0.095±0.005 ^a	0.447±0.023 ^a	0.043±0.004 ^a	0.207±0.019 ^a
CWUF>30 (100 mg/kg)	17.53±0.60 ^a	21.08±0.98 ^a	0.092±0.002 ^a	0.436±0.024 ^a	0.053±0.006 ^b	0.253±0.026 ^b
CWUF>30 (200 mg/kg)	17.53±0.49 ^a	20.82±0.92 ^a	0.099±0.007 ^a	0.472±0.023 ^a	0.054±0.007 ^b	0.258±0.024 ^b
Positive control (CVT-E002 TM , 200 mg/kg)	17.60±0.51 ^a	21.35±0.97 ^a	0.100±0.010 ^a	0.464±0.033 ^a	0.059±0.003 ^b	0.277±0.011 ^b

^{a,b}Means with different superscripts in the same column are significantly different at $p<0.05$

것으로 보여지며 이러한 화학적 특성의 변화가 면역활성에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 인삼으로부터 분리된 다당류성분이 항암작용을 비롯하여 다양한 면역증강효과를 나타낸다고 보고된 바 있으며, 중성 다당류에 비해 산성 다당류가 면역체계에 미치는 영향이 큰 것으로 나타났다(28-31). 산삼배양근에서 분리된 다당류 분획은 중성당 64.8%, 산성당 34.3%로 구성되어 있어 CWUF>30과 조성이 비슷하였는데, 산삼배양근의 중성당 구성은 포도당 85.5, 갈락토스(galactose) 5.9, 아라비노스(arabinose) 5.4, 람노스(rhamnose) 2.9 Mole%였으며, 산성당은 갈락투론산(galacturonic acid) 71.5, 글루쿠론산(glucuronic acid) 28.5 Mole%로 구성되어 있었다(32).

체중과 면역장기 무게

일차 림프기관인 흉선은 세포매개 면역(cell-mediated immunity)의 중심적인 기관으로 림프구의 성숙이 일어나며 T세포 발생과 성숙장소로 감염으로부터 몸을 보호할 T세포를 생성하고 선택한다. 또한 림프절(lymph node)과 비장은 2차 림프기관으로써 항원이 수집되고 성숙한 림프구가 항원과 함께 작용하게 된다. 비장은 혈류 속의 항원에 대한 면역반응을 유발시키는 데 중요한 역할을 수행하는 곳으로 전신성 감염에 반응하는 기관이다. 이러한 흉선과 비장의 무게 증가는 비특이적인 면역반응과 특이적 면역반응에서 중요한 지표로서 인식되고 있다(33-35). 실험동물의 체중과 면역장기인 흉선과 비장의 무게는 Table 2에 나타내었다. 정상대조군(NC)의 경우 3.16±0.95 g의 체중 증가량이 나타났으며 양성대조군(PC)에서는 3.74±1.08 g, 백수오의 고분자 분획물(CWUF>30)을 100과 200 mg/kg으로 투여한 군에서는 각각 3.55±0.89, 3.30±0.98 g으로 체중에 대한 유의적인 영향은 나타나지 않았다. 비장의 경우, 정상대조군과 비교하여 양성대조군과 200 mg/kg의 용량으로 투여한 CWUF>30에서 무게 증가는 나타났지만 유의적인 차이는 없었다. 흉선무게의 경우, 정상대조군에 비해 양성대조군과 CWUF>30을 투여한 모든 실험군에서 유의적으로 증가하였다($p<0.05$).

Mitogen에 의한 비장세포 증식능

비활성화된 림프구(non-activated lymphocyte)의 경우, 각종 항원이나 mitogen, 사이토카인 등 여러 종류의 자극에 의하여 활성화되는 단계에서 세포증식(proliferation)이 일어나게 되며 활성화 정도는 mitogen-stimulated response에 의하여 쉽게 확인할 수 있어 새로운 면역 조절제를 탐색하는 방법으로 광범위하게 사용되고 있다(36). 백수오의 고분자 분획물(CWUF>30)의 투여가 비장세포의 증식 효과에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 비장으로부터 분리된 비장세포(splenocyte)에 T세포의 mitogen인 Con A와 B세포의 mitogen인 지방질다당류를 이용하여 림프구의 증식 정

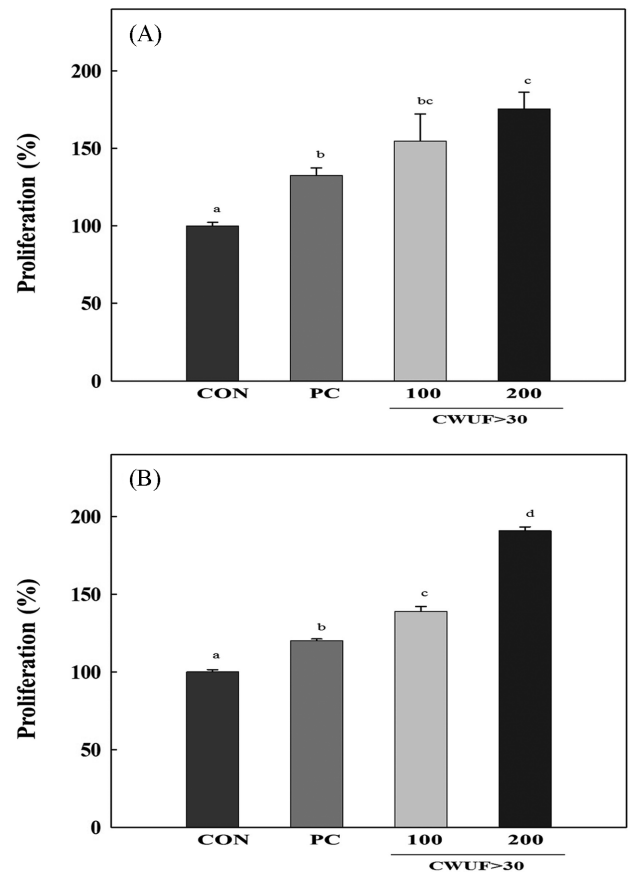


Fig. 4. Effect of orally-administered CWUF>30 on Con A-induced T-lymphocyte (A) or LPS-induced B-lymphocyte (B) proliferation in normal mice. Data were expressed as mean±SD of six mice. CON, saline-treated group; PC, CVT-E002TM (200 mg/kg) treated group (positive control); CWUF>30(100), a high molecular weight fraction of *Cynanchum wilfordii* (100 mg/kg) treated group; CWUF>30(200), a high molecular weight fraction of *Cynanchum wilfordii* (200 mg/kg) treated group. Values with the different letters are significantly different ($p<0.05$).

도를 측정된 결과는 Fig. 4A와 같았다. T 림프구 증식률의 경우, 정상대조군(CON)에 비해 양성대조군(PC) 및 CWUF>30을 투여한 모든 군에서 유의적으로 증가하였으며 B 림프구의 증식능력도 CWUF>30을 100 mg/kg 및 200 mg/kg으로 투여한 모든 군에서 정상대조군 및 양성대조군에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4B). 이러한 결과는 CWUF>30의 투여가 비장세포를 증식시키는 mitogen 활성이 있음을 보여주며 외부의 항원에 노출 시 항원에 대한 면역반응을 유도하는 면역세포의 수를

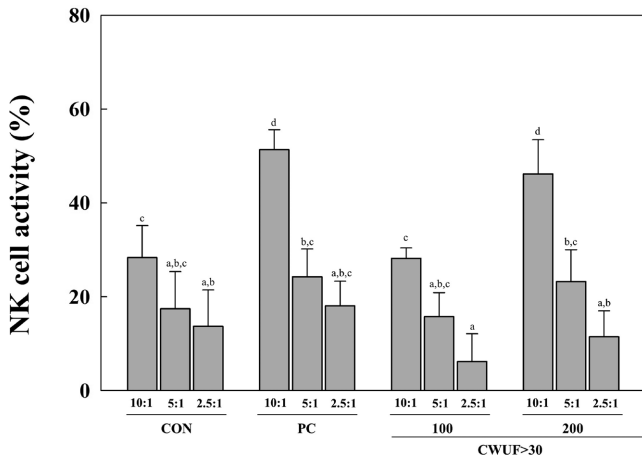


Fig. 5. Effect of orally-administered CWUF>30 on NK cell activity of splenocytes in normal mice. Data were expressed as mean±SD of six mice. CON, saline-treated group; PC, CVT-E002™ (200 mg/kg) treated group (positive control); CWUF >30 (100), a high molecular weight fraction of *Cynanchum wilfordii* (100 mg/kg) treated group; CWUF>30(200), a high molecular weight fraction of *Cynanchum wilfordii* (200 mg/kg) treated group. Values with the different letters are significantly different ($p < 0.05$).

증가시켜 외부감염에 대한 효과적인 방어를 유도할 수 있을 것으로 예측되었다.

자연살해세포의 활성화

자연살해세포는 주로 혈액에 존재하며 내재면역을 담당하는 세포로 암 또는 바이러스 감염 질환에서 생체의 초기 면역방어에 매우 중요하다(37). 감염세포 혹은 암세포 등의 비자기(non-self) 세포를 살해하는 세포성 면역활성을 가지고 있어 표적물질과 접촉하게 되면 활성화되어 표적세포를 파괴하게 된다. 또한 바이러스와 같은 병원균이 체내에 들어와 복제를 위해 숙주세포로 들어가는 것을 막거나 침투된 세포를 선택적으로 찾아 제거하기도 한다(38). 백수오의 고분자 분획물(CWUF>30)에 의한 자연살해세포의 활성화는 마우스의 비장으로부터 분리된 비장세포(splenocyte)와 자연살해세포에 민감한 세포로 알려진 Yac-1 세포를 함께 배양하여 Yac-1 세포의 세포사멸 정도를 측정함으로써 확인하였다. CWUF>30을 200 mg/kg BW의 농도로 경구 투여한 마우스의 비장세포는 정상대조군(CON)에 비하여 effector 세포와 표적세포의 비율이 10:1에서 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$) 양성대조군(PC)과 유사한 수준으로 나타났다. 이는 정상대조군에 비해 YAC-1 세포에 대한 사멸 정도가 양성대조군과 CWUF>30 (200 mg/kg)의 투여군에서 각각 81.2, 63.1% 증진시키는 결과를 나타내었다(Fig. 5). 따라서 백수오의 고분자 분획물인 CWUF>30은 NK세포의 활성 향상에 영향을 미치며 처리농도가 높을수록 자연살해세포의 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 인삼 추출물이 자연살해세포의 활성능에 영향을 미친다는 연구결과(39)에 비추어 볼 때, 백수오는 인삼의 효능과 마찬가지로 자연살해세포의 활성을 증가시킴으로써 종양세포의 제거에 긍정적으로 기여할 것으로 생각된다.

요 약

백수오의 국내 재배활성화와 함께 농가소득을 높이기 위한 기능성 식품소재로서의 우수성을 산업적으로 응용하고자 백수오 추

출물의 면역증진 활성을 평가하였다. 낮은 온도에서 액체상태의 추출물을 효과적으로 농축하고 정제하기 위하여 비열처리 공정인 한외거르기를 통해 분자량(MWCO)이 30 kDa인 여과막을 이용하여 고분자 분획물(CWUF>30) 및 저분자 분획물(CWUF<30)을 얻었으며 이를 큰포식세포 활성화를 통한 면역 증진 효과를 알아보기 위해 RAW 264.7 세포를 이용하여 면역활성의 지표가 되는 산화질소(NO) 생성량 및 사이토카인인 TNF- α , 인터루킨-6의 생성량을 측정된 결과, 정상대조군(CON)에 비해 CWUF>30을 처리하였을 때 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다. 세포실험을 통해 면역증강활성이 높은 CWUF>30은 정상동물모델에서 면역기관인 비장 및 흉선의 무게를 증가시켰고 비장세포 유래 림프구 증식도 유의하게 증가시켰다. 이는 CWUF>30의 투여가 비장세포를 증식시키는 mitogen 활성이 있음을 보여주며 외부의 항원에 노출 시 항원에 대한 면역반응을 유도하는 면역세포의 수를 증가시켜 항원에 대한 효과적인 방어에 도움을 줄 것으로 보여진다. 또한 CWUF>30을 투여한 마우스 비장세포(splenocyte)의 Yac-1 세포 살해 정도를 측정된 결과, 200 mg/kg BW의 농도로 CWUF>30을 투여한 마우스의 비장세포는 정상대조군(CON)에 비하여 effector 세포와 target 세포의 비율이 10:1에서 유의적으로 증가하였으며 이는 양성대조군(PC)과 유사한 높은 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 백수오 고분자 분획물(CWUF>30)이 강력한 면역활성 증진효능을 갖고 있으며 각종 바이러스 등 외부 항원들에 대응하여 초기 면역세포를 자극하고 면역매개물질을 생성함으로써 인체의 비특이적 면역반응을 증가시키는데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 성과물(논문)은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01171602)의 지원에 의해 이루어진 것이다

References

- Ministry of Food and Drug Safety. The Korean Herbal Pharmacopoeia. Available from: <http://www.mfds.go.kr/herbmed/index.do?nMenuCode=7>. Accessed Jan. 29, 2016.
- Kim MJ, Song BH, Nam SY, Kim IJ, Lee CH, Yun T. Effects of nonsupporting methods on growth and yield of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight. Korean J. Medicinal Crop Sci. 13: 268-272 (2005)
- Hwang IS, Yoo JH, Seong ES, Lee JG, Kim HY, Kim NJ, Lim JD, Ham JK, Ahn YS, Kim NY, Yu CY. The Effect of temperature and seed soaking on germination in *Cynanchum wilfordii* (Maxim.) Hemsl. Korean J. Medicinal Crop Sci. 20: 136-139 (2012)
- Lee JH, Kweon KT. Determination of harvest time and nominal origin from *Cynanchi wilfordii* Radix. J. Korean Oriental Med. 33: 160-168 (2012)
- Lee DW, Kim CH, Lee DU. Effect of culture conditions on the biosynthesis of gagamine, a potent antioxidant from the roots of *Cynanchum wilfordii*. Biol. Pharm. Bull. 24: 1451-1453 (2001)
- Yoon DW, Cho SM, Kim SJ, Kim JH, Kim DS, Lee SH, Yun CH, Shin C. Effects of *Cynanchum wilfordii* Hemsley extract on the sleep-wake architectures in rats. Sleep Med. Res. 2: 16-20 (2011)
- Zenk MH, el-Shagi H, Schulte U. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Planta Med. 28: 79-101 (1975)
- Kim SN, Li YC, Xu HD, Yi DG, Kim MS, Lee SP, Yi KT, Lee JK, Kim JS, Kwon MS, Chang PS, Kwak BY. Phytoestrogenic effects of combined plant extracts on the change of bone metabolism of OVX rats. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 316-320

- (2008)
9. Lee YS, Chung IS, Lee IR, Kim KH, Hong WS, Yun YS. Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginsan isolated from *Panax ginseng*. *Anticancer Res.* 17: 323-331 (1997)
 10. Kim KH, Lee YS, Jung IS, Park SY, Chung HY, Lee IR, Yun YS. Acidic polysaccharide from *Panax ginseng*, ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK cells in synergy with rIL-2. *Planta Med.* 64: 110-115 (1998)
 11. Shin JY, Song JY, Yun YS, Yang HO, Rhee DK, Pyo S. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. *Immunopharm. Immunot.* 24: 469-482 (2002)
 12. Song JY, Han SK, Son EH, Pyo SN, Yun YS, Yi SY. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. *Int. Immunopharmacol.* 2: 857-865 (2002)
 13. Cho SH, Yang KM, Bae BS, In SA, Yu RN. Effect of sea tangle intake on cytokine production in macrophage from normal and diabetic mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 952-959 (1998)
 14. Cheng GC, Lee JY, Kim DC, Suh SO, Hwang WI. Inhibitory effects of *Salvia miltiorhiza* extract on growth of some cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 726-731 (2000)
 15. Ji WD, Jeong HC, Lee SJ, Chun YG. Antimicrobial activity and distilled components of garlic and ginger. *J. Agr. Chem. Biotechnol.* 40: 514-518 (1997)
 16. Abo T, Kawamura T, Watanabe H. Immunologic states of autoimmune diseases. *Immunol. Res.* 33: 23-34 (2005)
 17. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin I, Rachlin EM. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 157: 87-94 (1998)
 18. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79: 319-326 (1987)
 19. Herberman RB, Ortaldo JR. Natural killer cell: Their roles in defenses against disease. *Science* 214: 24-30 (1981)
 20. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356 (1956)
 21. Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 4: 330-334 (1962)
 22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
 23. Kim HS, Kang JS. Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulating activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 109-116 (2008)
 24. Kim JJ, Lee SW, Park KW, Seo KI, Yee ST. Effect of *Flammulina velutipes* extracts cultivated with oriental herbal plants on the activation of immune cells. *J. Life Sci.* 22: 828-836 (2012)
 25. Cho CW, Han CJ, Rhee YK, Lee YC, Shin KS, Shin JS, Lee KT, Hong HD. *Cheonggukjang* polysaccharides enhance immune activities and prevent cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Int. J. Biol. Macromol.* 72: 519-525 (2015)
 26. Yu AR, Park HY, Kim YS, Ha SK, Hong HD, Choi HD. Immuno-enhancing effect of seed extracts on a RAW 264.7 macrophage cell line. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 1671-1676 (2012)
 27. Cha JH, Kim YS, Lee EM. Effects of *Prunellae spica* water extract on immune response in macrophage cells. *J. Korean Obstet. Gynecol.* 23: 91-100 (2010)
 28. Kim YS, Kang KS, Kim SI. Study on antitumor and immunomodulating activities of polysaccharide fractions from *Panax ginseng*: Comparison of effects of neutral and acidic polysaccharide fraction. *Arch. Pharm. Res.* 13: 330-337 (1990)
 29. Kim YS, Kang KS, Kim SI. Effects of ginseng components on immunotoxicity of cyclophosphamide. *J. Ginseng Sci.* 15: 13-20 (1991)
 30. Lee YS, Chung IS, Lee IR, Kim KH, Hong WS, Yun YS. Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginsan isolated from *Panax ginseng*. *Anticancer Res.* 17: 323-331 (1997)
 31. Park KM, Jeong TC, Kim YS, Shin HJ, Nam KY, Park JD. Immunomodulatory effect of acidic polysaccharide fraction from Korean red ginseng (*Panax ginseng*). *Nat. Prod. Sci.* 6: 31-35 (2000)
 32. Nam S, YK Rhee, Hong HD, Lee YC, YC Kim, Shin KS, Cho CW. Immuno-modulatory activity of the crude polysaccharide from wild ginseng adventitious root. *Korean J. Food Nutr.* 25: 755-761 (2012)
 33. Gerberick GF, Cruse LW, Ryan CA. Local lymph node assay: Differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry. *Eur. J. Med. Res.* 19: 48-55 (1999)
 34. Sikorski EE, Gerberick GF, Ryan CA, Miller CM, Ridder GM. Phenotypic analysis of lymphocyte subpopulations in lymph nodes draining the ear following exposure to contact allergens and irritants. *Fund. Appl. Toxicol.* 34:25-35 (1996)
 35. Suda A, Yamashita M, Tabei M, Taguchi K, Vohr HW, Tsutsui N, Suzuki R, Kikuchi K, Sakaguchi K, Mochizuki K, Nakamura K. Local lymph node assay with non-radioisotope alternative endpoints. *J. Toxicol. Sci.* 27:204-218 (2002)
 36. Lee YS, Lee GH, Kwon YK, Park JH, Shin SW. Immunomodulatory effect of aqueous extracted *Zingiberis rhizoma* on cyclophosphamide-induced immune suppression. *J. Physiol. Pathol. Korean Med.* 21: 485-490 (2007)
 37. Whiteside TL, Herberman RB. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 704-710 (1995)
 38. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 359-393 (1998)
 39. See DM, Broumand N, Sahl L, Tilles JG. *In vitro* effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients. *Immunopharmacology* 35: 229-235 (1997)