

한라봉 과피 유래 다당의 면역활성 및 항전이 효과

신 광 순 · *박 혜 령*

경기대학교 식품생물공학과 교수, *수원여자대학교 호텔외식조리과 조교수

Immuno-activating and Anti-metastatic Effects of Polysaccharides Isolated from Hallabong Peels

Kwang-Soon Shin and *Hye-Ryung Park*

Professor, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea

*Assistant Professor, Dept. of Hotel Foodservice & Culinary Arts, Suwon Women's University, Hwaseong 18333, Korea

Abstract

This study investigated immunomodulatory and antimetastatic properties of polysaccharides extracted from hallabong (Citrus hybrid) peel, focusing on their effects on macrophage activation. Crude polysaccharides (HPWP) were obtained through hot water extraction and ethanol precipitation from dried hallabong peel powder. Macrophages isolated from mouse peritoneum were used to evaluate cytotoxicity of HPWP against normal cells and Colon 26-M3.1 carcinoma cells. Our findings revealed no cytotoxic effects of HPWP on either normal cells or Colon 26-M3.1 carcinoma cells. Immunoactivity was assessed by measuring cytokine production, specifically IL-6 and IL-12, using ELISA. Results indicated a significant, concentration-dependent increases of cytokine levels. Tumoricidal activity of NK cells was also evaluated, demonstrating enhanced tumor cell killing induced by HPWP, in a concentration-dependent manner. This increased activity was due to HPWP's potent antimetastatic effects, as observed in a mouse model of Colon 26-M3.1 carcinoma. In comparison with a the negative control (NC, 100%), HPWP at concentrations of 10, 100, and 1000 µg/mouse showed antimetastatic effects of 49.4%, 61.3%, and 74.3%, respectively. These effects were attributed to only NK cell activation. These findings suggest that HPWP has potential as a functional ingredient in food products aimed at enhancing immune response and inhibiting cancer metastasis.

Key words: hallabong peel, polysaccharide, macrophage, NK cell, anti-metastasis

서 론

암은 인간의 생명을 위협하는 대표적인 질환으로, 암 환자의 90% 이상이 원발성 종양이 아닌 전이에 의해 사망한다 (Sporn MB 1996). 전이는 악성 종양과 양성 종양을 구분하는 주요 특징 중 하나로 (Weiss L 1990), 전이 과정에서 종양 세포는 면역원성, 성장 속도, 세포 표지자 및 항암제에 대한 감수성 등에서 생물학적 다양성을 나타내게 된다 (Fidler IJ 1987). 따라서, 전이를 억제하는 것은 암 치료에서 가장 중요한 과제 중 하나로 대두되고 있다. 다수의 실험 연구와 임상 시험에서는 선천적 면역계가 원발성 종양의 전이를 차단하

는 데 중요한 역할을 한다는 사실이 입증되었다 (Leyon & Kuttan 2004). 선천성 면역계의 활성화는 종양을 포함한 외부 항원에 대한 방어에 중요한 역할을 하며 (Jakóbiśiak 등 2003), 이 면역 자극의 주요 메커니즘은 대식세포 (macrophages) 및 수지상 세포 (dendritic cell)와 같은 탐식 세포 (phagocytes)의 활성화와 관련이 있다. 또한, 대식세포와 탐식 세포가 분비하는 다양한 사이토카인들 (예: interleukin (IL)-6, IL-12, tumor necrosis factor (TNF)-α, IL-1β)은 자연살해 세포 (natural killer cell, NK cell)의 종양 세포에 대한 세포독성을 유발한다고 알려져 있다 (Azuma & Seya 2001). 이러한 면역 반응은 NK 세포와 대식세포의 기능적 활성화가 종양의 성장과 전이를 억

* Corresponding author: Hye-Ryung Park, Assistant Professor, Dept. of Hotel Foodservice & Culinary Arts, Suwon Women's University, Hwaseong 18333, Korea. Tel: +82-31-290-8967, Fax: +82-31-290-8967, E-mail: hrpark@swc.ac.kr

제하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

한라봉은 귤(*Citrus reticulata*)과 오렌지(*Citrus sinensis*)를 교배하여 개발된 하이브리드 품종으로, 주로 제주도의 한라산에서 그 이름이 유래되었다(Shin 등 2021). 감귤류의 껍질(진피)은 전통 의학에서 복통, 기침, 피부 염증, 근육통, 백선 감염 치료 및 혈압 강하 등의 효능이 있다고 보고되어 왔다(Li 등 2009). 다른 감귤류와 마찬가지로, 한라봉 껍질에도 pectin, flavonoids, carotenoids, limonoids, coumarins과 같은 인간 건강에 유익한 기능성 성분이 풍부한 것으로 알려져 있다(Tatum & Berry 1979; Hasegawa 등 1986; Horie 등 1986). 그러나 한라봉은 주로 주스 제조에만 활용되고, 껍질과 같은 부산물은 대부분 폐기되는 실정이다. 이러한 가공 농산부산물은 환경 문제를 야기할 수 있으므로, 농산부산물에 새로운 부가가치를 부여하는 것은 환경적 부담을 경감할 뿐만 아니라 자원 활용의 효율성을 높이는 데 기여할 수 있다(Jimenez-Lopez 등 2020). 이전 연구에서는 오렌지 껍질 추출물이 항암 효과를 가지며, 암 발생 위험을 줄일 수 있다는 결과가 보고된 바 있으며(Pal 등 2012), 특히 감귤류 껍질에 많이 함유된 polymethoxyflavones가 인간 폐암 세포의 성장을 억제하고 oncogenic protein을 downregulation하며, 세포 사멸(apoptosis)을 유도하는 효과가 입증된 바 있다(Xiao 등 2009). 그러나 한라봉 껍질의 기능성에 대한 연구는 거의 미미한 실정이다.

최근 천연물 유래 다당류는 식품 및 의약품 산업에서 매우 흥미로운 첨가물로 주목받고 있으며, 이는 넓은 치료적 특성과 함께 낮은 독성, 적은 부작용, 독특한 생물학적, 화학적, 물리적 특성 때문에 면역 조절, 항염증 및 항종양 효과가 생화학 및 의학 분야에서 큰 관심을 받고 있다(Schepetkin & Quinn 2006; Wang 등 2010).

따라서 본 연구에서는 농산부산물로 폐기되는 한라봉 껍질의 미가공 부산물에서 열수 추출을 이용하여 기능성 다당 성분을 분리하고, 이를 대식세포의 활성화를 통한 면역 증강 효과와 NK 세포를 통한 항암 및 항전이 효과를 확인하고자 하였다. 이로써 환경 문제를 해결함과 동시에 농산부산물의 부가가치 창출과 더불어 기능성 소재로서의 활용 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 한라봉 과피로부터 다당 추출

본 연구를 진행하기 위해 사용된 한라봉 과피는 2021년에 수확되어 완전건조하였고, 다당 추출을 위해 50~200 mesh의 크기로 분쇄하여 보관하였다. 한라봉 과피로부터 다당을 분리하기 위해 건조된 한라봉 과피 200 g에 20배의 증류수를

가하고, 3시간 열수추출하였다. 이후 거즈를 이용하여 불용성물질을 제거하고 원심분리(4,500×g, 15분, 4℃)하여 상등액을 얻었다. 이후 4배의 에탄올을 첨가하여 12시간 교반한 후 원심분리(4,500×g, 15분, 4℃)를 이용하여 침전물만 회수하였다. 침전물은 다시 소량의 물에 용해하여 투석(Cut-off 12,400, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 4℃에서 3일간 행하였으며, 농축 및 동결건조를 거쳐 한라봉 과피 유래 열수추출 조다당 HPWP를 얻었다.

2. 일반 분석

시료의 중성당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid(Dubois 등 1956)으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl(Blumenkarnitz & Asboe-Hansen 1973)으로, 단백질 함량은 표준물질로 bovine serum albumin (BSA)을 사용하여 Bradford법(Bradford MM 1976) 실험실 여건에 맞게 변형하여 사용하였다.

3. 구성당 분석

구성당 분석은 다당 시료를 2 M trifluoroacetic acid (TFA)로 121℃에 1.5시간 가수분해하여 각각 alditol acetate 유도체(Jones & Albersheim 1972)로 전환시킨 후, gas chromatography (GC)로 분석하였다. GC의 분석은 SP-2380 capillary column (0.2 μm film, 0.25 mm×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 GC ACME-6100(Young-Lin Co. Ltd., Anyang, Korea)을 이용하였으며, 표준온도조건 60℃(1 min), 60℃→220℃(30℃/min), 220℃(12 min), 220℃→250℃(8℃/min), 250℃(15 min)에서 분석을 실시하였다. 구성당 mole%는 peak의 면적비, flame ionization detector(FID)에 대한 반응계수 및 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

4. 실험동물

생후 5~6주령의 BALB/c를 새론바이오(Gyeonggi, Korea)에서 구입하여 3일간 적응을 거친 후 실험에 사용하였다. Mouse는 사육조에 5~10마리씩 넣어 온도 23±3℃, 습도 55~70%에 사육하였으며, 물과 사료는 자유 급식 형태로 유지하였다. 실험은 경기대학교 동물실험윤리위원회(2022-04)의 규정에 따라 실시하였다.

5. 대식세포 및 Colon26-M3.1 암세포에 대한 독성 측정

대식세포에 대한 독성을 확인하기 위하여 6주령 BALB/c 마우스를 thioglycollate (TG) 처리한 3일 후에 복강에서 대식세포(peritoneal macrophages)를 채취하였다. 수집된 세포(2.5×10⁵/well)는 DMEM 배지에 현탁시켜 96-well plate에 100 μL씩 분주하고, 여러 농도의 HPWP를 각 well에 100 μL씩 첨

가하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 3일간 배양하였다.

암세포에 대한 독성을 평가하기 위해 Colon 26-M3.1 세포주(1×10⁵/well)를 각 well에 현탁시킨 후, 5% CO₂ 인큐베이터에서 2시간 동안 배양한 후, 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 세척하여 비부착 세포를 제거한 뒤, 여러 농도로 조종된 HPWP 시료를 200 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 3일간 배양하였다.

대식세포 및 Colon 26-M3.1 종양세포의 세포독성 효과는 cell counting kit(CCK)-8(Ez-cytox, Dogen, Seoul, Korea)를 5배 희석하여 사용하여 30~60분간 반응시키고, 각 well의 흡광도는 450 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 측정하였다.

6. Cytokine 생산능 측정

이전에 보고된 방법(Shin 등 2016)에 따라 TG로 처리된 마우스 복강에서 대식세포를 수집하였고, 수집된 세포(1×10⁵ cells/well)는 DMEM 배지에 현탁시킨 후 96-well plate에 분주한 후, 2시간 동안 배양하였다. PBS로 세척하여 비부착 세포를 제거하였으며, 부착된 대식세포에 다양한 농도의 HPWP를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 배양되었다. 배양 상등액 내 다양한 사이토카인(IL-6 및 IL-12) 측정은 제조사의 지침에 따라 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) kit(BD Biosciences)를 사용하여 측정하였다.

7. NK cell 측정

각 그룹당 5마리의 BALB/c 마우스에 HPWP를 정맥주사(*i.v.*)하였고, 주사 후 3일째에 비장세포(splenocytes)를 채취하였다(Shin 등 2012). 수집된 비장세포(effector cell, E)와 NK cell 감수성으로 알려진 종양세포Yac-1(target cell, T)(1×10⁵ cells/mL)을 U자형 96-well plate에 100:1, 50:1, 25:1의 세포 비율을 갖도록 조정하였으며, 6시간 동안 배양을 진행하였다. 배양 후 원심분리하여 상등액을 lactate dehydrogenase(LDH) 용액과 혼합한 뒤, 각 well의 흡광도를 490 nm에서 CytoTox 96 kit(Promega, Madison, WI, USA)로 측정하였다. NK 세포의 세포독성 비율은 다음 공식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{세포독성(\%)} = \frac{[(\text{실험군 OD 값} - \text{대조군 OD 값}) / (\text{무처리군 OD 값} - \text{대조군 OD 값})] \times 100}$$

8. 항전이 효과 측정

시료의 종양전이 억제 효과를 확인하기 위해 BALB/c 마우스에 Colon 26-M3.1 carcinoma 암세포(3×10⁴ cells/mouse)를 정맥 주사(*i.v.*)하여 종양전이 모델로 유도하였다(Son 등

2021). HPWP 시료는 종양 세포 접종 2일 전에 마우스에 10, 100, 1,000 µg/mouse 농도로 1회 정맥 주사하였다. 종양 접종 후 14일째에 마우스를 희생시키고, 종양 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's solution(Sigma)에 고정시킨 후 종양의 균집수를 현미경을 이용하여 계산하였다. 한편, 시료에 의한 종양 전이 억제 효과는 종양만 접종한 대조군과 비교하여 %로 산출하였다. 또한, 실험기간 동안 마우스의 일반 증상 및 사망 유무와 체중을 확인하였다.

9. NK cell의 기능이 억제된 마우스에서의 항전이 효과 측정

항전이 효과는 주로 NK cell에 의해 나타나는 것으로 알려져 있어 폐에 대한 높은 전이성을 가진 종양세포주인 Colon 26-M3.1 carcinoma 세포주를 이용한 실험동물 종양전이 모델에 NK cell만을 특이적으로 저해하는 rabbit anti-asialo GM1 antibody(Wako Pure Chemicals industries, Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 정맥 투여 후 실험을 진행하였다(Son 등 2021).

마우스는 종양 세포 접종 1일 및 3일 전에 HPWP 시료 100 µg/mouse 농도로 정맥투여하고, 종양 세포 접종 2일 전에는 제조사의 지침에 따라 50배 희석된 rabbit anti-asialo GM1 antibody(500 µL/마우스, 복강 내 주사, Wako)를 정맥투여하였다. 이후 Colon 26-M3.1 carcinoma 암세포(2×10⁴ cells/mouse)를 정맥 주사(*i.v.*)하였고, 종양 접종 후 14일째에 마우스를 희생시키고, 종양세포의 표적기관인 폐를 Bouin's solution(Sigma)에 고정시킨 후 종양의 균집수를 현미경을 이용하여 계수하였다.

10. 통계처리

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, SPSS 통계프로그램을 이용하여 일원배치분산분석(one way ANOVA test) 후 Duncan's multiple range test로 대조군과 각 시험군 간의 유의성을 *p*<0.05 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 한라봉 과피 유래 다당의 일반성분

한라봉 과피로부터 열수추출하여 얻은 조다당 HPWP의 일반분석 및 구성당 분석을 진행한 결과(Table 1), 45.6%의 중성당과 54.4%의 산성당으로 구성되어 있었으며, 단백질은 검출되지 않았다. 그 중 galacturonic acid (53.7%), arabinose (26.0%), 및 galactose (10.4%)로 주로 구성되어 있는 것으로 보아 일반적인 시트러스류에 다량 함유되어 있다고 알려진 pectin을 구성하고 있는 단당 성분이 검출된 것으로 확인되었다.

Table 1. Chemical properties and sugar components of hot water extract crude polysaccharide (HPWP) isolated from hallabong peel

	HPWP
Chemical properties (%)	
Neutral sugar	45.6±0.1
Uronic acid	54.4±0.1
Protein	-
Sugar component (Mole %)	
Rhamnose	2.1±0.0
Fucose	0.4±0.0
Arabinose	26.0±0.1
Xylose	1.4±0.1
Mannose	1.8±0.2
Galactose	10.4±0.2
Glucose	3.5±0.1
Galacturonic acid	53.7±0.3
Glucuronic acid	0.7±0.0

2. 한라봉 과피 유래 다당의 정상세포 및 암세포 독성

Mouse 복강으로부터 분리한 일반 세포인 macrophage와 종양세포주 Colon 26-M3.1 carcinoma를 이용하여 한라봉 과피 유래 다당 HPWP에 대한 직접적인 독성 여부를 측정하였다. 1×10^4 cells/mL로 조정된 종양 세포주에 HPWP 1.6~1,000 µg/mL까지 다양한 농도로 가하여 배양한 후 세포의 생존 여부를 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 결과에서 제시한 바와 같이 정상세포의 경우 뚜렷한 독성은 나타

나지 않았으며, 오히려 모든 농도에서 약간의 증식능을 보여 주었다. 한편, 각 실험 농도에서 Colon 26-M3.1 carcinoma 세포에 대한 세포 독성은 관찰되지 않았지만, 200 µg/mL 이상의 농도에서 세포가 다소 감소하는 경향을 나타내었으나, 이는 직접적인 세포독성에 의한 것이라는 결론을 내리기에는 어려운 수준이었다. 이상의 결과로 한라봉 과피 유래 열수추출 조다당 HPWP는 정상세포 및 암세포에 대한 직접적인 세포 독성은 없음을 확인하였다.

3. 한라봉 과피 유래 다당의 cytokine 생산능

대식세포는 외부에서 침입한 세균이나 이물질을 탐식하고 제거하는 과정에서 다양한 cytokine을 분비해 항원제시 및 비특이적 면역작용에 관여하며 면역체계를 조절하고, 종양 세포에 대한 직접적인 살해능을 나타내고 있는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 toll like receptor(TLR)에 반응하는 LPS와 같은 물질은 macrophage를 활성화함으로써 T cell 및 B cell의 증식, 대식세포의 탐식작용 활성화, 면역반응의 조절에 관여하는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF-α와 같은 다양한 cytokine들을 분비하는 것으로 보고되고 있다(Wang 등 2003). 특히 IL-6는 macrophage가 분비하는 대표적인 multifunctional cytokine으로 염증반응에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 T cell과 B cell를 분화하여 종양세포를 사멸시키는 데 관련이 있다고 알려져 있다(Tanigawa 등 2000; Cheng 등 2008). 또한 IL-12는 NK cell의 활성화 및 TH1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로 종양세포와 같은 감염세포에 대한 반응성을 높이는 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다(Munder 등 1998; Shida 등 2006).

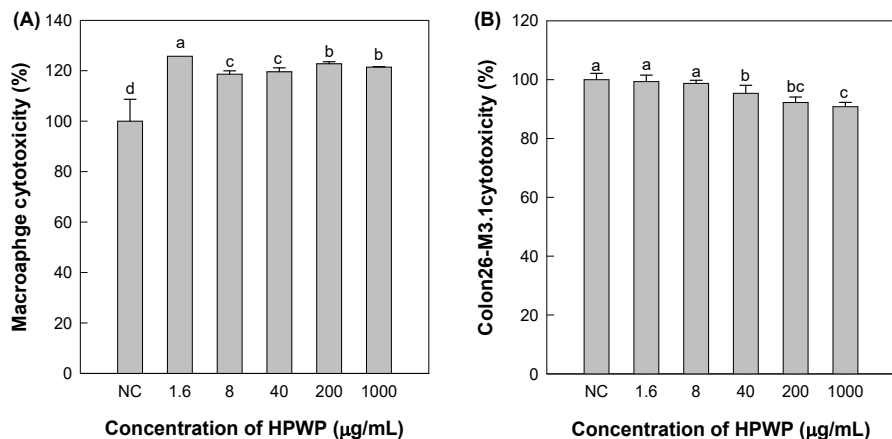


Fig. 1. Cytotoxic effects of crude polysaccharide (HPWP) isolated from hallabong peel on peritoneal macrophages of BALB/c mice (A) and Colon 26-M3.1 carcinoma cells (B). Means with different superscript letters (^{a-d}) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

따라서 한라봉 과피 유래 열수추출 조다당 HPWP의 직접 자극에 의한 mouse 복강 유래 macrophage가 분비하는 multifunctional cytokine IL-6 및 면역증강 및 NK cell 활성화에 중요한 역할을 하는 cytokine IL-12를 측정된 결과(Fig. 2), 두 cytokine 모두 농도의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 1,000 µg/mL의 농도에서는 NC 대비 약 3배 높은 IL-6 및 IL-12 생산능을 보여주었다(Fig. 2). 본 결과를 통해 HPWP는 면역 증진에 효과적인 것으로 사료되었다.

4. 한라봉 과피 유래 다당의 NK cell 활성화

NK cell은 체내 림프구의 약 5~10%를 차지하는 것으로 알려져 있으며 바이러스, 외부 항원과 같은 비자기(non-self) 세포뿐만 아니라 감염세포, 암세포 및 노후세포를 파괴시키는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Funk 등 2003). 또한 NK cell은 세포막에 존재하는 MHC 1형 분자(major histocompatibility complex class I molecule)의 발현이 비정상 세포를 비자기(non-self) 세포로 인식하여 공격하기 때문에 MHC 1형 분자가 제대로 발현되지 않은 상태로 존재하는 종양세포나 감염세포를 제거할 수 있게 된다. 또한, NK cell은 비정상세포일 경우 perforin을 분비해 비정상세포의 세포막에 구멍을 뚫어(Farag 등 2002) granzyme이라는 단백질을 분해 효소를 주입해 세포의 내부를 사멸시키는 것으로 알려져 있다. 또한 interferon(IFN)- γ 등의 cytokine을 분비해 macrophage 및 cytotoxic T lymphocyte(CTL)과 같은 적응면역계 또한 활성화시키는 것으로 밝혀져 있다(Kägi 등 1994; Smyth 등 2005).

따라서 한라봉 과피 유래 열수추출 조다당 HPWP의 NK cell의 활성능을 측정하기 위해 HPWP를 10, 100 및 1,000 µg/mouse의 농도로 실험 3일 전, 1일 전 총 두 번에 걸쳐 BALB/c(6 weeks, ♀) mouse에 정맥 투여한 후 무균적으로 비

장을 적출하여 NK cell을 분리하였으며 이를 effector cell로 하였다. 그 후 혈액암 세포주인 YAC-1을 target cell로 하여 target cell에 대한 effector cell의 비율(E/T ratio)을 100:1, 50:1, 25:1로 조정 후 6시간 동안 co-culture하여 effector cell의 종양세포 살해능에 의해 target cell로부터 유리되어 나오는 lactate dehydrogenase(LDH)를 측정하였다. 실험 결과 농도의존적인 종양 세포 살해능을 확인할 수 있었으며 NC 대비 10, 100 및 1,000 µg/mouse의 모든 농도에서 농도의존적으로 높은 종양 세포 살해능을 나타냄으로써 HPWP 시료가 우수한 항암효과를 가졌다는 것을 확인하였다(Fig. 3). 특히 100:1 ratio에서 HPWP 1,000 µg/mouse의 농도는 약 2.5배에 달하는 가장 높은 종양세포 살해능을 보여주었다.

5. 한라봉 과피 유래 다당의 항전이 효과

앞선 실험에서 NK cell을 활성화시켜 항암 효과에 크게 기여할 것이라 사료된 한라봉 과피 유래 열수추출 조다당 HPWP를 이용하여 *in vivo* 상에서 항전이 효과를 평가하고자 하였다. HPWP를 10, 100 및 1,000 µg/mouse의 농도로 종양세포 접종 2일 전에 BALB/c(6 weeks, ♀) mouse에 정맥 투여한 후 Colon26-M3.1 carcinoma 세포를 정맥투여하고 14일 후 표적 장기인 폐(lung)를 적출하여 종양을 계수하여 항전이 효과를 측정하였다. 항전이 실험이 진행되는 실험기간 동안 대조군을 포함하여 모든 시료 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았으며, 이상증상도 관찰되지 않았다. 또한 마우스의 체중 변화를 알아보기 위해 종양세포 접종 1일과 14일에 체중을 측정된 결과(Fig. 4), 대조군과 시료 투여군 모두 큰 변화가 없는 것으로 관찰되었다.

PBS를 투여한 대조군인 NC의 종양전이 억제효과를 0%로 하여 HPWP의 항전이 활성을 측정된 결과 10, 100 및 1,000

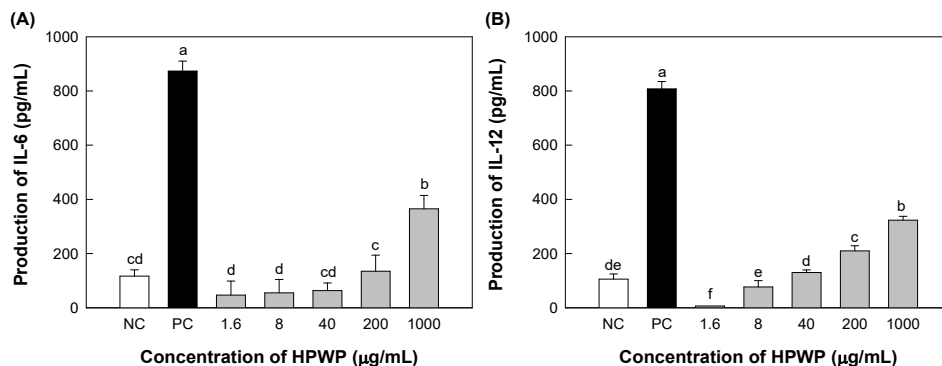


Fig. 2. Effect of HPWP isolated from hallabong peel on cytokine production by murine peritoneal macrophages. Peritoneal macrophage (2.5×10^5 cells/well) were treated with various concentrations of HPWP in 96-well plate for 24 hr. The concentrations of cytokine in the medium were determined by ELISA kits. NC (medium) and PC (LPS, 1 µg/mL) were used as negative and positive control.

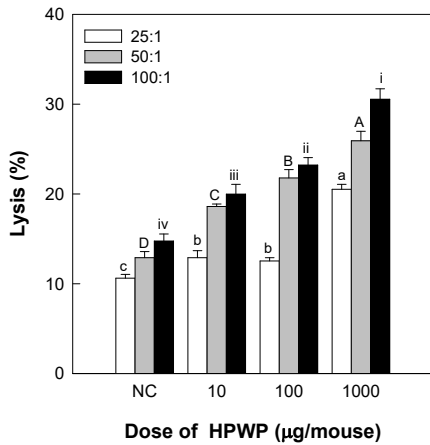


Fig. 3. Effects of *i.v.* administration of HPWP on cytolytic activity of NK cells. NK cell were cultured with Yac-1 target in presence or absence of HPWP for 6 hr at 37°C CO₂ incubator. Means with different superscript letters (A-D,a-c,i-iv) indicate significant differences at *p*<0.05 by Duncan's multiple range test.

µg/mouse의 농도에서 각각 49.4%, 61.3% 및 74.3%의 높은 항전이 효과를 나타냈다(Fig. 5).

이러한 HPWP의 항전이 효과는 앞선 NK cell 활성화를 보였던 시료의 농도와 일치(Fig. 3)하는 결과로서 HPWP의 정맥 투여에 의한 중앙 억제 효과는 NK cell의 활성화로부터 기인한 것임을 예상할 수 있었다. 또한 복강 유래 macrophage cytokine 분비능을 확인한 실험에서 확인했듯 우수한 IL-12 생성능을 확인한 바 있어(Fig. 2B) IL-12에 의한 NK cell의 활성화가 항전이 효과로 이어진 것이라 사료되었다.

6. NK cell이 억제된 마우스에서 한라봉 과피 유래 다당 의 항전이 효과

앞선 정맥 투여에 따른 항전이 효과가 일부 NK cell에 기인한 것이라 확인되었으나, 이 항전이 효과가 NK cell 단독 활성화에 의한 효과인지, macrophage 또는 세포독성 T 림프구(CTL)와 같은 다른 면역세포의 동시 활성화에 의한 효과인지를 확인하고자 rabbit anti-asialo GM1 antibody(Kasai 등 1981)를 사용해 NK cell의 기능을 억제하고 항전이 효과를 확인하고자 하였다. HPWP를 100 µg/mouse의 농도로 실험 3일 전, 1일 전 총 두 번에 걸쳐 정맥 투여하고 2일 전 rabbit anti-asialo GM1 antibody를 정맥 투여하였다. 그 후 Colon26-M3.1 carcinoma 세포를 정맥투여하고 14일 후 적출한 폐의 종양을 계수하여 항전이 효과를 측정하였다. 그 결과(Fig. 6), PBS만을 정맥 주사한 NC군에서는 암세포가 약 67개 정도 전이된 반면 HPWP를 정맥주사한 실험군에서는 약 25개의 암세포가

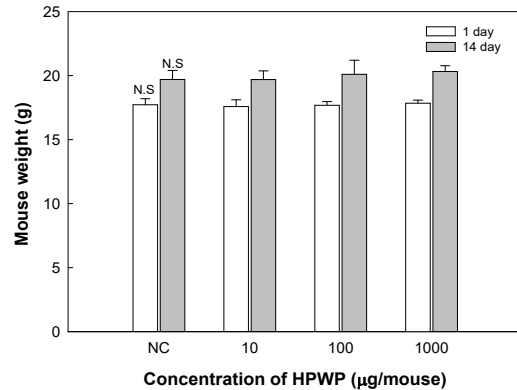


Fig. 4. Effect of HPWP on body weight of BALB/c mouse on lung metastasis produced by *i.v.* inoculation. N.S. means not significantly.

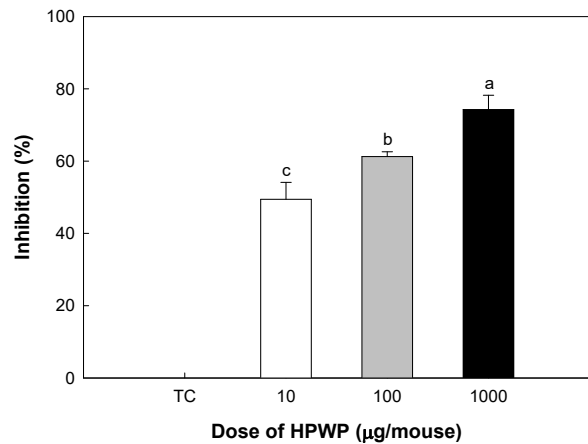


Fig. 5. Inhibitory effect of *i.v.* administration of HPWP on lung metastasis produced by *i.v.* inoculation of Colon26-M3.1 carcinoma cells *in vivo*. BALB/c mice were *i.v.* administrated with the indicated doses of HPWP and then inoculated *i.v.* with 3 × 10⁴ Colon26-M3.1 carcinoma cells. Mice were killed at 14 days after tumor inoculation for evaluation of tumors. Means with different superscript letters (a-c) indicate significant differences at *p*<0.05 by Duncan's multiple range test.

전이된 것이 확인되어 HPWP의 항전이 효과를 확인하였다. 또한 PBS와 rabbit anti-asialo GM1 antibody를 함께 투여한 실험군에서는 NK cell의 기능이 억제되어 암세포가 폭발적으로 증가해 300개 이상의 암세포가 전이되었으며, rabbit anti-asialo GM1 antibody와 RWP를 함께 투여한 실험군에서도 300개 이상의 암세포가 전이된 것으로 보아 HPWP의 항전이 효과는 오직 NK cell 활성화에 의한 억제 효과로 최종 확인되었다.

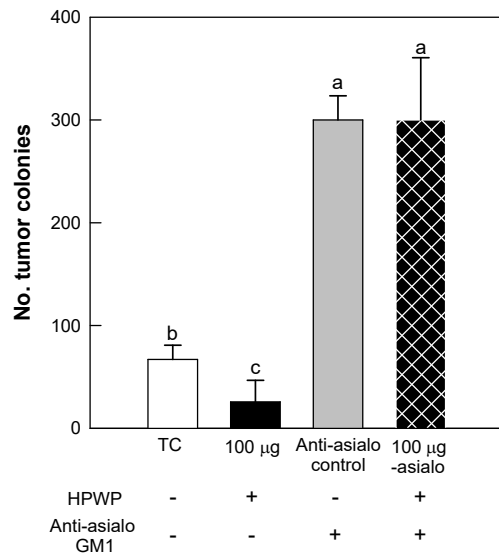
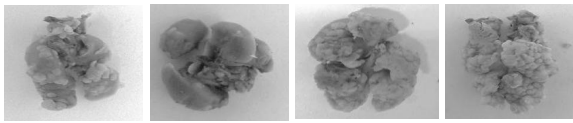


Fig. 6. Effect of NK cell depletion on the anti-metastatic activities of HPWP isolated from hallabong peel at dose of 100 µg/mouse. To deplete NK cells *in vivo*, rabbit anti-asialo GM1 serum was injected into mice at 2 day before inoculation of Colon26-M3.1 carcinoma cells. Mice were administered *i.v.* with sample (100 µg/mouse) 3 day and 1 day before tumor inoculation. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation. Means with different superscript letters (^{a-c}) indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

요약 및 결론

본 연구에서는 한라봉 과피로부터 분리한 다당의 대식세포에 대한 면역활성 및 항전이 효과를 관찰하기 위하여 세포 독성, cytokine 생산능, NK cell 활성 및 항전이 효과 실험을 진행하였다. 건조 분말된 한라봉 과피로부터 열수추출 및 에탄올 침전을 통해 조다당 HPWP를 얻었다. 마우스 복강으로부터 분리한 macrophage를 이용하여 면역활성 및 항전이 효과를 확인하고자, 정상세포 및 암세포 Colon26-M3.1 carcinoma에 대한 세포 독성을 측정된 결과, 정상세포 및 암세포 모두 직접적인 독성을 나타내지 않았다. 면역활성 및 항암활성과 관련된 cytokine IL-6 및 IL-12 생산능을 ELISA를 통해 측정된 결과 농도 의존적으로 우수한 cytokine 생산능을 보여주었다. 또한, NK cell의 종양 세포 살해능을 측정된 결과 농도 의존적으로 높은 종양세포 살해능이 관찰되었으며, 이를 바탕으로

로 Colon 26-M3.1 carcinoma에 대한 HPWP 시료의 항전이 효과를 확인하였다. 그 결과 10, 100 및 1,000 µg/mouse의 농도에서 각각 49.4%, 61.3% 및 74.3%의 높은 항전이 효과를 확인하였으며 이는 오직 NK cell 활성에 의한 종양전이 억제 효과로 확인되었다. 이 결과로부터 본 연구진은 기능성 식품 소재 개발을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

References

- Azuma I, Seya T. 2001. Development of immunoadjuvants for immunotherapy of cancer. *Int Immunopharmacol* 1:1249-1259
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54:484-489
- Bradford MM. 1976. 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
- Cheng A, Wan F, Wang J, Jin Z, Xu X. 2008. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish. *Int Immunopharmacol* 8:43-50
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. 2002. Natural killer cell receptors: New biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100:1935-1947
- Fidler IJ. 1987. Review: Biologic heterogeneity of cancer metastases. *Breast Cancer Res Treat* 9:17-26
- Funk J, Bach U, Failing K, Burkhardt E. 2003. Influence of different tumour types on natural cytotoxicity (NK cell activity) and mitogen-induced lymphocyte proliferation in isolated blood lymphocytes from 110 dogs with tumours. *Res Vet Sci* 74:129-135
- Hasegawa S, Bennett RD, Herman Z. 1986. A limonoid from young calamondin seedlings. *Phytochemistry* 25:1984-1985
- Horie T, Tsukayama M, Yamada T, Miura I, Nakayama M. 1986. Three flavone glycosides from *Citrus sudachi*. *Phytochemistry* 25:2621-2624
- Jakóbiak M, Lasek W, Gołab J. 2003. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* 90:103-122
- Jimenez-Lopez C, Fraga-Corral M, Carpena M, García-Oliveira P, Echave J, Pereira AG, Lourenço-Lopes C, Prieto MA, Simal-Gandara J. 2020. Agriculture waste valorisation as a

- source of antioxidant phenolic compounds within a circular and sustainable bioeconomy. *Food Funct* 11:4853-4877
- Jones TM, 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
- Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 368: 31-37
- Kasai M, Yoneda T, Habu S, Maruyama Y, Okumura K, Tokunaga T. 1981. *In vivo* effect of anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity. *Nature* 291:334-335
- Leyon PV, Kuttan G. 2004. Inhibitory effect of a polysaccharide from *Tinospora cordifolia* on experimental metastasis. *J Ethnopharmacol* 90:233-237
- Li S, Pan MH, Lo CY, Tan D, Wang Y, Shahidi F, Ho CT. 2009. Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones. *J Funct Foods* 1:2-12
- Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. 1998. Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin(IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 187:2103-2108
- Pal D, Banerjee S, Ghosh AK. 2012. Dietary-induced cancer prevention: An expanding research arena of emerging diet related to healthcare system. *J Adv Pharm Technol Res* 3:16-24
- Schepetkin IA, Quinn MT. 2006. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol* 6:317-333
- Shida K, Suzuki T, Kiyoshima-Shibata J, Shimada SI, Nanno M. 2006. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity. *Clin Vaccine Immunol* 13:997-1003
- Shin KO, Ha SY, Shin SB, Kim JY, Yang M. 2021. Manufacturing and quality characteristics analysis of coffee powder with added hallabong extract. *Korean J Food Nutr* 34:593-603
- Shin MS, Lee H, Hong HD, Shin KS. 2016. Characterization of immunostimulatory pectic polysaccharide isolated from leaves of *Diospyros kaki* Thumb. (Persimmon). *J Funct Foods* 26:319-329
- Shin YA, Park HR, Hong HD, Shin KS. 2012. Immunostimulating activities of polysaccharide fractions isolated from persimmon leaves. *Korean J Food Nutr* 25:941-950.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SLH, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42:501-510
- Son SU, Park HY, Suh HJ, Shin KS. 2021. Evaluation of antitumor metastasis via immunostimulating activities of pectic polysaccharides isolated from radish leaves. *J Funct Foods* 85:104639
- Sporn MB. 1996. The war on cancer. *Lancet* 347:1377-1381
- Tanigawa K, Craig RA, Stoolman LM, Chang AE. 2000. Effects of tumor necrosis factor- α on the *in vitro* maturation of tumor-reactive effector T cells. *J Immunother* 23:528-535.
- Tatum JH, Berry RE. 1979. Coumarins and psoralens in grapefruit peel oil. *Phytochemistry* 18:500-502
- Wang H, Actor JK, Indrigo J, Olsen M, Dasgupta A. 2003. Asian and Siberian ginseng as a potential modulator of immune function: An *in vitro* cytokine study using mouse macrophages. *Clin Chim Acta* 327:123-128
- Wang J, Zuo G, Li J, Guan T, Li C, Jiang R, Xie B, Lin X, Li F, Wang Y, Chen D. 2010. Induction of tumoricidal activity in mouse peritoneal macrophages by ginseng polysaccharide. *Int J Biol Macromol* 46:389-395
- Weiss L. 1990. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res* 54:159-211
- Xiao H, Yang CS, Li S, Jin H, Ho CT, Patel T. 2009. Monodemethylated polymethoxyflavones from sweet orange (*Citrus sinensis*) peel inhibit growth of human lung cancer cells by apoptosis. *Mol Nutr Food Res* 53:398-406

Received 18 September, 2024

Revised 14 October, 2024

Accepted 23 October, 2024