

음나무 수피로 부터 보체계 활성화 다당의 정제 및 특성*1

申 金*2 · 羅 炅 洙*3 · 白 起 鉉*2

Purification and Characterization of Complement System Activating Polysaccharide from the Bark of *Kalopanax pictus* N.*1

Keum Shin*2 · Kyung-Soo Ra*3 · Ki-Hyon Paik*2

ABSTRACT

It was observed that the hot-water extract of the bark of *Kalopanax pictus* N. had the highest anti-complementary activity among the 11 kinds of forest materials. Methanol and ethanol-soluble portions had low anti-complementary activities, but crude polysaccharide, HKP-0 had a high activity of 80%. HKP-0 contained 54.8% of total sugar and 27.9% of protein. The neutral sugars of HKP-0 consisted of mainly arabinose, galactose and glucose. HKP-4 fraction obtained by cetavlon treatment of HKP-0 showed the highest anti-complementary activity of 90%. The activity was not changed by pronase digestion but decreased greatly by periodate oxidation. HKP-4 consisted of mainly arabinose and glucose with molar ratio of 1.0 : 22.4. HKP-4-I, an unabsorbed fraction from HKP-4 on DEAE Sepharose CL-6B column showed higher yield and activity than those of absorbed fractions. HKP-4-I was homogeneous, and its molecular weight was about 25,000. HKP-4-I contained 84.0% of neutral sugar and consisted of arabinose and glucose with molar ratio of 1.0 : 11.2. The anti-complementary activity of HKP-4-I was not decreased by the treatment of polymyxin B, and the polysaccharide activated both classical and alternative pathway in complement system. Void volume fraction obtained from HKP-4-I hydrolyzed with α -amylase on Sephadex G-25 column only had a high anti-complementary activity.

Keywords : anti-complementary activity, *Kalopanax pictus* N., polysaccharide, arabinoglucon

*1. 接受 1992年 12月 20日 Received December 20, 1992

*2. 고려대학교 자연자원대학, College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea

*3. 고려대학교 생물공학연구소, Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

1. 서 론

자연계에 존재하는 천연물질 중 생체에 대해 생리활성을 갖는 물질들이 발견되어 이에 대한 관심이 증가하고 있으며, 특히 식품재료, 생약재, 균류 및 각종 입산재료로부터 면역활성을 증진시키는 물질을 얻으려는 노력이 계속되고 있다. 전통적으로 사용되어 온 각종 생약재 및 입산재료를 포함 한 한방재제들은 생체의 항상성(homeostasis)을 일정하게 유지시킴으로써, 치유가 비교적 어려운 자기 면역질환 및 알러지등의 질병 치료에 효과가 있음이 보고되고 있다. 면역계의 역할은 생체내에 침입하는 비자기(non-self) 물질의 제거 뿐 아니라 생체내에서 일어나는 각종 이상현상을 탐지하여 생체의 항상성을 유지시키는 것으로서 항체, 보체, 세포간 mediator 등의 체액성 요소와 림파구, 대식세포(macrophage)등의 세포성 요소, 그리고 체액성 요소와 세포성 요소를 연결하는 receptor군으로 구성되어 있다¹⁾. 보체(complement)는 혈장중에 비활성 상태로 존재하는 단백질로서 C1-C9까지 9개의 보체성분을 포함, 조절자등 약 20여종의 성분으로 구성되어 있으며²⁾ 보체계(complement system)는 미생물 감염으로부터 숙주를 방어하는 기능과 그 반응산물이 식작용을 돕고 염증반응 및 과민반응³⁾등 중요한 역할을 담당하고 있다. 보체계는 C3의 활성화에 이르는 경로에 따라서 classical pathway와 alternative pathway로 나뉘어진다. Classical pathway는 IgM, IgG등의 항체와 결합한 면역 복합체(immune complex)가 C1부터 차례로 활성화되고, alternative pathway는 lipopolysaccharide⁴⁾, endotoxin⁵⁾, zymosan 등⁶⁾의 activator에 의해 비특이적으로 C3로 부터 활성화된다. C3가 활성화되면 다음 단계의 보체단백질이 결합되어 세포막을 공격하는 복합물질(membrane attack complex)을 형성하고 병원체의 지질막을 파괴하여 살균 작용을 나타낸다. 따라서 alternative pathway는 항체에 의한 특이적 면역반응이 일어나기 이전에 활성화되기 때문에 항원에 의해 감작 되지 않은 숙주에 있어 중요한 방어기작이라 할 수 있다.

천연물질 중에는 interferon 유도 활성, 항암 활성, mitogen 활성, 보체계를 활성화 하는 항보체 활성(anti-complementary activity), 항염증 활성물질들이 있음이 보고되어 있고 활성성분의 본

체가 다당체로 구성되어 있음이 밝혀져 주목되고 있다. 예로써 표고버섯(*Lentinus edodes*)⁷⁾, 저령(*Grifora umbellata*)⁸⁾, 복령(*Poria cocos*)⁹⁾, 구름버섯(*Coriolus versicolor*)¹⁰⁾, 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 등¹¹⁾의 균류에서 추출, 정제된 항종양 활성의 β -glucan, 당귀(*Angelica acutiloba*)의 뿌리로 부터 열수추출한 다당 중에 항보체 활성, B-lymphocyte mitogen 활성, interferon 유도 활성, 항암 활성 등¹²⁾이 있음이 발견되었고, 이들 성분의 주 구조는 (1 \rightarrow 6) 결합의 galactose로 되어 있으며, 측쇄로서 α -L-arabinose, (1 \rightarrow 3)-결합의 galactose 구조로 되어 있음이 알려져 있다. 또한, 자근(the root of *Lithospermum euchromum* L.)유래의 산성다당인 LR-polysaccharide IIa¹³⁾, 쑥(*Artemisia princeps*)유래의 AAF II b-2 및 AA-F II b-3¹⁴⁾, 울무(*Coix lachryma-jobi* Var. *ma-yuen*)유래의 산성 heteroglycan CA-1과 CA-2 및 중성 glucan¹⁵⁾에서도 항보체 활성이 있는 것으로 보고되고 있다. 이외에도 대추(*Zizyphus jujuba* Var. *inermis*)¹⁶⁾ 및 시호(*Bupleurum falcatum*)¹⁷⁾, 대복피(*Arecae Pericarpium*) 등¹⁸⁾,의 생약재료 및 입산재료 기원의 다당의 항보체 활성과 생강, 고추 등¹⁹⁾ 식품기원의 다당에서의 항보체 활성과 구조에 대해 보고되어 있다.

본 연구에서는 천연물, 특히 전통적으로 면역활성 증진 제재로 처방빈도가 높은 여러 종류의 입산재료를 선택하여 면역계에서 중요한 역할을 담당하는 보체계를 활성화하는 항보체 활성 물질에 대하여 검색하였다. 그 결과, 한방 및 민간 요법에서 기침, 가래, 신경통, 류마티스에 쓰이고, 특히 수피와 잎은 피부병, 궤양, 전염성 상처등의 치료에 약효가 있으며, 항염증작용, 강장작용 및 혈당강하 작용등의 약리작용이 있는 음나무의 수피(*Kalopanax pictus* N. 해동피)²⁰⁾의 열수추출물에 높은 항보체 활성이 있음을 발견하였다. 따라서 음나무의 수피인 해동피에서 항보체 활성이 높은 다당을 추출, 분리, 정제하여, 제반특성 및 작용기구에 대해 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

본 실험에 사용한 재료 중 음나무 수피, 잎, 심재 및 변재, 층층나무 수피, 물푸레나무 수피는 양

평 연습림에서 채취하였고 소태나무 수피, 자귀나무 수피, 황백나무 수피, 느릅나무 수피, 측백나무 수피, 회화나무의 열매, 오동나무 가지, 향나무 심재는 경동시장에서 구입하였다.

2. 2 시약

DEAE-Sephrose CL-6B, Sephadex G-25, Sepharose CL-6B는 Pharmacia사의 제품을, 양의 감작 적혈구(IgM haemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본 동결건조연구소로부터 구입하여 사용하였다. Dowex 1×8 resin, pronase, polymyxin B, lipopolysaccharide, standard dextran, rabbit anti-human C3 및 α -amylase는 Sigma사 제품을, 5, 5'-diethylbarbituric acid는 Merck사 제품을, 그의 기타 시약은 일급시약을 사용하였다.

2. 3 방법

2. 3. 1 정량방법

총 당함량은 glucose를 표준물질로 사용하여 phenol-sulfuric acid 방법²¹⁾으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 사용하여 *m*-hydroxydiphenyl방법²²⁾으로, 그리고 pentose함량은 arabinose를 표준물질로 사용하여 phloroglucin-acetic acid 방법²³⁾으로 측정하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry법²⁴⁾으로 측정하였다.

2. 3. 2 구성당의 분석

다당의 구성당 종류는 2M trifluoroacetic acid로 121℃에서 1.5시간 동안 다당을 가수분해한 후 thin layer chromatography로 분석하였다. Thin layer chromatography는 ethyl acetate/pyridine/acetic acid/H₂O (5/5/1/3, v/v)를 전개용매로 사용하여 cellulose coated plastic sheet (Merck 5577)에서 행하였다. 환원당은 alkaline silver nitrate²⁵⁾, 산성당은 *p*-anisidine hydrochloride²⁶⁾, amino acid는 ninhydrin²⁷⁾을 각각 발색제로 사용하였다. 가수분해물의 중성당과 산성당은 NaBH₄로 alditol 및 aldonic acid로 환원하여 Dowex-1(acetate form) column에서 분리한 후 각각 alditol acetate 유도체로 전환시켜

gas chromatography로 구성당을 분석하였다. Gas chromatography 분석은 3% silicon OV-225 stainless column을 사용하여 210℃에서 FID (flame ionization detector)에 의해 표준물질의 retention time과 비교하여 시료 중의 구성당을 동정하였다.

구성당의 molar ratio는 peak 면적과 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

2. 3. 3 항보체 활성의 측정

항보체 활성의 측정은 Mayer법²⁸⁾에 의하여 측정하였다. NHS(normal human serum), GVB⁺⁺(gelatin veronal buffered saline, pH 7.2)와 시료를 각각 50 μ l 씩 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 반응액에 GVB⁺⁺를 350 μ l 씩 가하고, 이를 10배에서 160배 까지 연속 희석하였다. 여기에 750 μ l의 GVB⁺⁺와 양의 감작 적혈구 (10⁸ cells/ml)를 250 μ l 씩 가하여 1시간 반응시킨 후, PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)를 2.5ml 씩 가하여 원심 분리 후 상등액의 흡광도를 412nm에서 측정하였다. 항보체 활성은 ITCH₅₀, 즉 총보체 용혈 저지율 (Inhibition of Total Complement Haemolysis of 50%)로 나타내었다.

2. 3. 4 항보체 활성다당의 추출

음나무 수피 (bark of *Kalopanax pictus* N, 해동피) 1kg을 3회에 걸쳐 증류수 18l로 열수추출한 후 동결건조하여 얻은 열수추출물 (HKP)을 methanol로 5회 환류하여 methanol 가용성분 (HKP-M)을 얻었다. 이때 생긴 침전에 소량의 증류수를 가해 용해시키고 ethanol (5배)을 가하여 4℃에서 24시간 방치하여 ethanol 가용성분 (HKP-E)과 불용성분으로 분리하였다. 불용성분은 증류수에 재용해하여 3일간 증류수에 대하여 투석한 후 농축, 동결건조하여 조다당 (HKP-0)을 조제하였다.

2. 3. 5 항보체 활성다당의 분리 및 정제

2. 3. 5. 1 Cetavlon에 의한 HKP-0의 분획

조다당 HKP-0을 cetavlon처리에 의해 다음과 같이 4분류로 분획하였다. HKP-0 12.22g을 증류

$$\text{ITCH}_{50}(\%) = \frac{\text{TCH}_{50} \text{ of control} - \text{TCH}_{50} \text{ treated with smpl.}}{\text{ITCH}_{50} \text{ of control}} \times 100$$

수 610ml에 용해시키고 동량의 8% cetyltrimethylammonium bromide (cetavlon)을 첨가하여 20℃에서 20시간 정치시켰다. 이때 20℃에서 30분간 원심분리 (12,000 rpm)하여 침전물을 수거한 후 10% NaCl용액에 재용해시키고 5배 부피의 ethanol을 첨가하여 생성된 침전물을 증류수에 용해시켜 4℃에서 3일간 증류수에 대하여 투석을 행하고 비투석획분을 동결건조하여 HKP-1을 조제하였다. Cetavlon이 첨가된 상등액은 동량의 1% H₃BO₄을 첨가하고 2M NaOH로 pH를 8.8로 조정한 후 24시간 동안 교반하여 침전을 형성시키고 6000 rpm에서 30분간 원심분리한 후, pH 8.8 의 0.5% borate buffer로 세척하여 2% acetic acid 용액에 용해시켰다. 여기에 5배 부피의 ethanol을 가하여 생긴 침전물을 증류수에 재용해시키고 동일 조건으로 투석하여 비투석분획 HKP-2를 얻었다.

상등액은 2M NaOH로 pH 9.5로 조정한 후 생성된 침전물을 동일처리하여 HKP-3을 얻었다. Cetavlon분획의 최종 상등액은 acetic acid로 산성화하여 5배 부피의 ethanol을 가하여 얻은 침전물을 증류수에 재용해하여 비투석 분획 HKP-4를 얻었다.

2. 3. 5. 2 Ion-exchange chromatography

Cetavlon처리에 의해 얻어진 HKP-4 (500mg)을 증류수로 평형화한 DEAE-Sephrose CL-6B (Cl⁻ form) column (3.2×40cm)에서 ion-exchange chromatography를 행하였다. H₂O로 용출되는 미흡착분획과 0.1M~2M NaCl에서 용출되는 6개의 흡착분획(HKP-4-Ⅱ~Ⅶ)을 얻었다.

2. 3. 5. 3 Gel filtration

DEAE-Sephrose CL-6B의 ion-exchange chromatography에 의해 얻어진 주요 활성분인 HKP-4-I은 0.2M NaCl로 평형화된 Sephrose CL-6B 또는 CL-4B column (2.6×90cm)을 사용하여 gel filtration을 행하였다.

2. 3. 6. Pronase 처리

HKP-4 20mg을 10mM CaCl₂가 함유된 Tris-HCl buffer (pH 7.9) 20ml에 용해시킨 후 pronase 20mg을 가하여 37℃에서 48시간 반응시켰다. 이 반응액을 5분간 끓여 반응을 정지시킨 후, 원심분리하여 얻은 상등액을 2일간 투석 및 동결건조를 행하여 HKP-4의 pronase 분해물을 얻었다.

2. 3. 7. Periodate 산화

HKP-4 20mg을 50mM acetate buffer (pH 4.5) 10ml에 용해시킨 후, 50mM NaIO₄ 5ml을 가해 암실 (4℃)에서 3일간 산화시켰다. 이 반응액에 ethylene glycol을 5ml 가해 1시간 동안 실온에 방치한 후 2일간 투석하여 얻은 투석 내액을 20ml로 농축하였다. 이 농축액에 NaBH₄ 20mg을 가하여 실온에서 1시간 교반하여 0.1M acetic acid로 중화한 후 투석 및 동결건조를 행하여 HKP-4의 과산화물 (periodate oxidate)을 얻었다.

2. 3. 8. 분자량 측정

다당의 분자량은 Sephrose CL-6B column (2.6×90cm)에서 dextran T-2000 (MW 2×10⁶), T-500 (MW 5×10⁵), T-70 (MW 7×10⁴), T-10 (MW 1×10⁴) 및 glucose를 사용하여 얻어진 표준곡선에서 구하였다.

2. 3. 9 Polymyxin B의 영향

Lipopolysaccharide 및 정제한 다당을 1% gelatin을 함유한 GVB⁺⁺에 용해시키고 polymyxin B를 동량 가하여 polymyxin B를 처리하지 않은 대조구와 비교하여 측정하였다.

2. 3. 10 보체계 활성경로의 검토

2. 3. 10. 1 교차면역전기영동

교차면역전기영동은 GVB⁺⁺ buffer, 10mM EDTA와 1% gelatin을 함유한 veronal buffer (EDTA-GVB⁻⁻), 그리고 2mM MgCl₂, 10mM EGTA와 1% gelatin을 함유한 veronal buffer (Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁻⁻)에 정상인의 혈청을 각각 혼합하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 pH 8.6의 barbital buffer에 용해한 1% agarose 상에서 동buffer를 이용 1차원 전기영동 (2.1 mA/cm)을 하고 0.5% anti-human C3 serum이 함유된 1% agarose상에서 2차 전기영동을 행하였다. 전개된 gel은 bromophenol blue로 염색시켜 C3의 분해산물을 관찰하였다.

2. 3. 10. 2 각 반응계에서의 ITCH₅₀ 측정

정제된 다당의 보체계 활성경로를 파악하기 위해 GVB⁺⁺, Ca⁺⁺이온만을 제거한 Mg⁺⁺-EGTA-GVB⁻⁻를 사용한 경우의 항보체 활성과 2가 금속이온을 모두 제거한 10mM EDTA-GVB⁻⁻에서의 항보체 활성의 ITCH₅₀을 비교하였다.

2. 3. 11. α-amylase 처리에 의한 항보체 활성다당의 검토

HKP-4-I 60mg을 50mM acetate buffer

(pH 6.0)에 용해시키고 α -amylase를 녹인 2mM Ca(OAc)₂를 첨가하여 3일동안 40℃에서 반응시켰다. 반응액을 중성화시키고, 100℃에서 5분 동안 끓인 후 원심분리하여 상등액을 동결건조시켜 Sephadex G-25 column (2.6×90cm)을 행하여 분획하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1 임산재료 중의 항보체 활성물질 조사

항암, 항염증등의 면역증진 효과가 있어 한방이나 민간요법에 사용되는 임산재료 중 11종을 선택하여 각각의 열수추출물의 항보체 활성을 측정하였다. 그 결과 음나무의 수피(*Kalopanax pictus* N. 해동피)와 물푸레나무의 수피(*Fraxinus rhynchophylla* H.)로 부터 얻은 열수추출물의 항보체 활성이 1000 μ g/ml의 농도에서 각각 75.14%, 65.34%의 비교적 높은 활성을 나타내었으며 기타 9종은 60%이하의 활성을 나타내었다(Table 1). 가장 높은 활성을 나타낸 음나무의 부위별, 수령별에 따른 항보체 활성은 수피가 다른 부위보다 활성이 높았으며 40년생이 20년생보다 모든 부위에 있어서, 특히 수피부위의 활성이 높았다. 또한 해동피의 추출용매를 달리하여 제조한 추출물의 항보체 활성은 열수추출물이 여러 유기

용매추출물들 그리고 알칼리추출물보다 높은 항보체 활성을 나타내었으며 각각의 수율은 4~6% 정도로 비슷하였다.

3. 2 조다당 HKP-0의 조제

해동피 1kg을 18l의 증류수로 3회에 걸쳐 열수추출하여 추출물 HKP를 얻었으며, HKP의 methanol 환류, ethanol에 의한 침전, 침전물의 용해, 투석 및 동결건조를 하여 수율 6.9%의 조다당 HKP-0를 얻었다. 조다당 HKP-0는 500 μ g/ml의 농도에서 80%이상의 높은 항보체 활성을 나타내었으나 methanol 가용성물질(HKP-M), ethanol 가용성물질(HKP-E)의 항보체 활성은 30%미만의 낮은 활성을 나타내었다(Fig. 1). HKP-0는 중성당 54.8%, 산성당 29%, 단백질 27.91%로써 주 구성당의 조성은 Ara : Gal : Glc의 비가 1.0 : 1.13 : 2.0으로 그중 glucose의 비가 가장 높았다.

3. 3 항보체 활성 다당의 분리 및 정제

3. 3. 1 Cetavlon 처리에 의한 분획

해동피의 열수추출물로부터 얻은 HKP-0를 양이온 계면 활성제인 cetavlon으로 처리하여 이온전하강도에 따라 HKP-1, 2, 3, 4의 4개 분획으로

Table 1. Anti-complementary activities of hot water extracts from the forest products.

Scientific name	Parts	ITCH ₅₀ (%)
<i>Picrasma quassioides</i> BENN. ^{a)}	bark	33.19
<i>Albizia julibrissin</i> DURAZZ. ^{b)}	bark	32.45
<i>Phellodendron amurense</i> RUPR. ^{c)}	bark	1.28
<i>Kalopanax pictus</i> NAKAI. ^{d)}	bark	75.14
<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i> NAKAI. ^{e)}	bark	30.37
<i>Thuja orientalis</i> LINN. ^{f)}	bark	39.29
<i>Sophora japonica</i> LINN. ^{g)}	seed	15.98
<i>Paulownia coreana</i> UYEKI. ^{h)}	bark	15.03
<i>Juniperus chinensis</i> LINN. ⁱ⁾	xylem	32.98
<i>Cornus controversa</i> HEMSLE. ^{j)}	bark	58.50
<i>Fraxinus rhynchophylla</i> HANCE. ^{k)}	bark	65.34

a) 소태나무(고련피); b) 자귀나무(합반피); c) 황백나무(황백); d) 음나무(해동피); e) 느릅나무(유근피); f) 측백나무(측백); g) 회화나무(괴화); h) 오동나무; i) 향나무; j) 총총나무; k) 물푸레나무

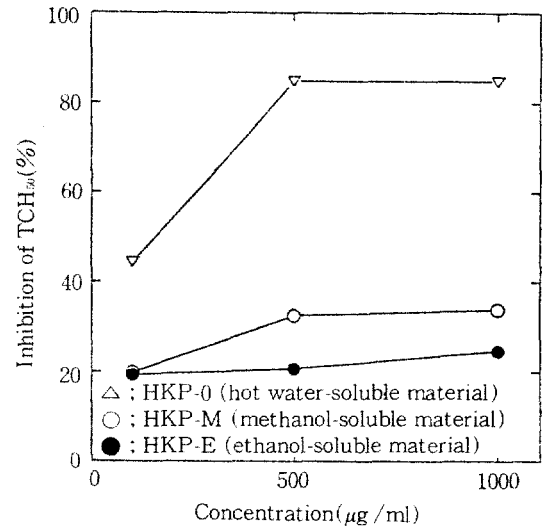


Fig. 1. Anti-complementary activities of crude extracts from the bark of *Kalopanax pictus* N.

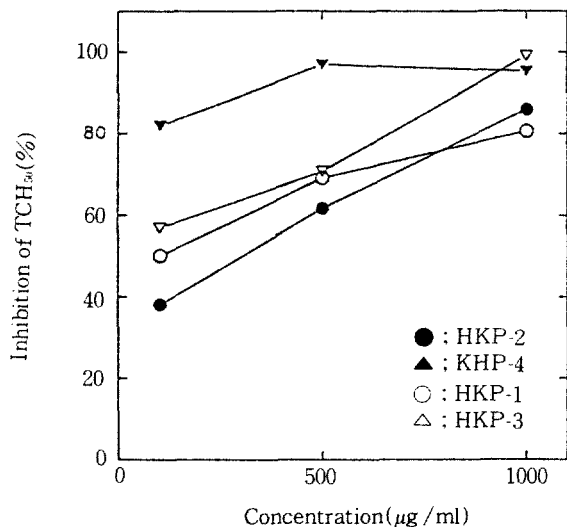


Fig. 2. Anti-complementary activities of polysaccharide fractions on cetavlon treatment of HKP-0.

분리하였다. 4개 분획의 항보체 활성은 시료 1000 μ g/ml의 농도에서 모두 80%이상의 높은 활성을 나타내었으며, 이 중 HKP-4는 수율이 10.85%로 다른 분획들 보다 낮았으나 100 μ g/ml의 낮은 시료농도에서도 높은 항보체 활성을 나타내었다(Fig. 2). Gas chromatography 분석 결과 중성당의 조성은 4개 분획 모두 Rha, Ara, Xyl, Man 및 Gal 또는 Glc가 각각 다른 비율로 구성되

Table 2. Chemical properties of polysaccharide fractions on cetavlon treatment of HKP-0.

	HKP-1	HKP-2	HKP-3	HKP-4
Total sugar(as Glc)	57.79	74.81	87.95	83.60 ^(*)
Uronic acid(as GalA)	10.43	13.59	3.35	6.19
Protein(BSA)	31.78	11.60	8.70	10.21
Yield	28.50	24.80	10.85	10.85
Component sugars (molar ratio)				
Rhamnose	0.74	0.65	0.40	0.26
Arabinose	1.00	1.00	1.00	1.00
Xylose	0.58	0.21	0.20	0.31
Mannose	0.77	0.92	1.59	-
Galactose	2.01	2.75	2.19	-
Glucose	1.14	-	1.86	22.43

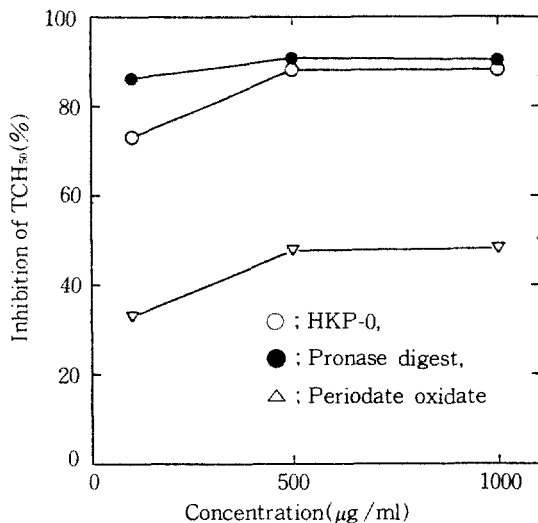


Fig. 3. Anti-complementary activities of pronase digest and periodate oxidate of HKP-4.

었으나 HKP-4는 다른 분획들보다 총당함량이 61.96%로 가장 많았고 Ara에 대한 Glc의 molar ratio가 1.0 : 22.43으로 glucose 함량이 다른 분획들보다 매우 높음을 보여주었다(Table 2).

3. 3. 2 HKP-4의 pronase처리 및 periodate산화

HKP-4의 항보체 활성물질의 본체를 파악하기 위하여 pronase처리와 periodate 산화를 행한 결과, pronase로 처리한 HKP-4에서는 항보체 활성의 변화가 없는 반면 HKP-4의 산화물은 활성이 50% 감소하였다(Fig. 3). 따라서 해동피로 부터 추출한 물질의 항보체 활성 본체는 다당에 기인함을 알수 있었으며 α -(1 \rightarrow 4) 또는 α -(1 \rightarrow 6) glucose 결합의 존재 추정되었다.

3. 3. 3 Ion-exchange chromatography

Cetavlon처리로 얻은 4분획 가장 높은 활성을 나타낸 HKP-4를 음이온 교환 수지인 DE-AE-Sepharose CL-6B column (3.2 \times 40cm)을 이용하여 미흡착부분과 흡착부분으로 분리하였다. 증류수로 용출된 미흡착분획 HKP-4-I과 0.1 \rightarrow 2M의 NaCl에서 용출된 6개의 흡착분획들의 항보체 활성은 2M NaCl에서 용출된 HKP-4-VI 분획이 다른 분획들보다 다소 활성이 낮았으나 다른 분획들은 75~80%로 비슷한 정도의 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4). 특히 미흡착분획 HKP-4-I은 높은 항보체 활성과 함께 다른 분획들보다 수

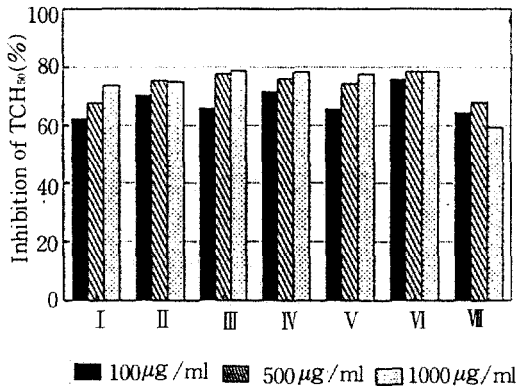
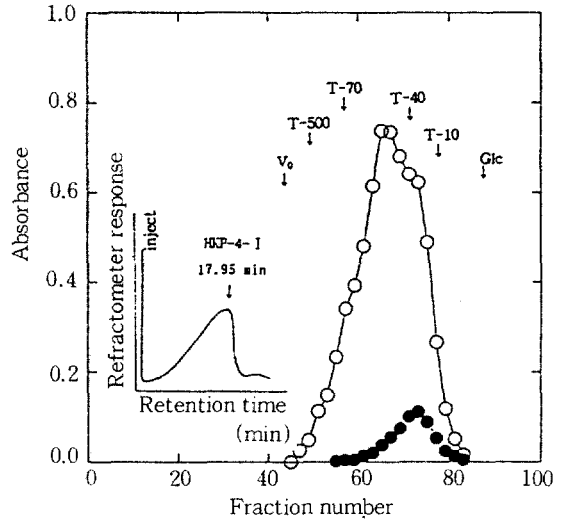


Fig. 4. Anti-complementary activities of polysaccharide fractions on DEAE-Sepharose CL-6B (Cl⁻) of HKP-4.

을 34.6%로 가장 높았다. HKP-4-I은 중성당 함량이 83.99%였고, Ara와 Glc의 비가 1.0 : 11.17로 다른 산성 분획들 보다 glucose의 비율이 매우 높았다(Table 3).

3. 3. 4. Gel filtration & HPLC

HKP-0의 ion-exchange chromatography에서 높은 수율과 항보체 활성을 나타낸 HKP-4-I을 Sepharose CL-4B, CL-6B등의 gel filtration과 Shodex inopack S-805 (GFC type) column을 사용하여 HPLC를 행한 결과, Sepharose CL-4B, CL-6B에서 더 이상 분획되지 않는 단일 peak가 나타났으며, HPLC에서도 단일 peak가 나타나 HKP-4-I이 정제된 다당임을 알수 있었다(Fig. 5). 분자량 측정 결과 HKP-4-I은 약 25,000정도의 분자량을 가지고 있었다.



○ : total sugar (490nm), ● : pentose (552-510nm)

Fig. 5. Gel filtration of HKP-4-I on Sepharose CL-6B. The column was eluted with 0.2 M NaCl.

3. 5 Polymyxin B의 영향

Polymyxin B가 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 보체 활성을 저지시킨다는 보고²⁰⁾에 따라 해동피로부터 추출한 활성다당에 대한 polymyxin B의 영향을 검토하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 LPS의 경우 polymyxin B처리로 활성의 감소를 보인 반면 HKP-4-I는 polymyxin B처리에 의해 활성이 감소되지 않아 해동피의 열수추출물로부터 정제된 다당 HKP-4-I의 항보체 활성은 다당에 있음이 재확인 되었다.

Table 3. Chemical properties of polysaccharide fractions on DEAE Sepharose CL-6B of HKP-4-I.

	HKP-4-I	II	III	IV	V	VI	VII
Neutral sugar (as Glc)	83.99	82.44	75.67	63.22	70.81	68.14	66.14 ^(%)
Uronic acid (as GalA)	-	4.96	12.22	21.26	7.32	5.60	6.62
Protein (BSA)	16.01	12.60	12.11	15.52	21.87	26.26	27.24
Yields	34.60	19.74	9.08	2.25	2.25	2.83	7.77
Component sugar (molar ratio)							
Rhamnose	0.24	-	0.44	0.26	0.33	0.22	0.20
Arabinose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Xylose	-	0.41	0.29	0.20	0.32	0.22	0.23
Mannose	-	0.22	-	-	-	-	-
Galactose	0.32	-	0.51	1.83	0.25	1.78	-
Glucose	11.17	2.34	0.85	-	1.87	-	2.05

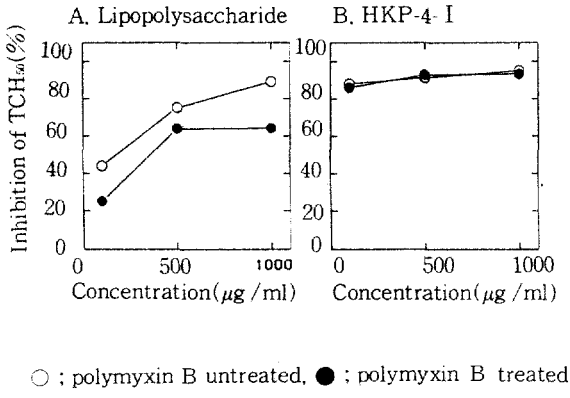


Fig. 6. Effect of polymyxin B on the anti-complementary activity of lipopolysaccharide or HKP-4-I from the bark of *Kalopanax pictus* N.

3. 6 보체계 활성화경로의 검토

보체계의 활성화는 크게 classical pathway와 alternative pathway로 구성되어 있고, classical pathway에서는 Ca^{++} 과 Mg^{++} 이온이, alternative pathway에서는 Mg^{++} 이온이 각각 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 GVB⁺⁺ 및 GVB⁺⁺에서 Ca^{++} 이온만을 선택제거한 Mg^{++} -EGTA-GVB⁻⁻를 사용한 경우의 항보체 활성화, 2가 금속이온을 모두 제거한 10mM EDTA-GVB⁻⁻를 사용한 경우의 항보체 활성을 비교한 결과, Fig. 7과 같이 Mg^{++} -EGTA-GVB⁻⁻계에서는 1000µg/ml 농도의 대조군(GVB⁺⁺계)에 비해 약 20%의 활성화만을 나타내었고, 10mM EDTA-GVB⁻⁻계에서는 활성이 나타나지 않음을 알 수 있었다. 따라서 해동피로부터 추출, 정제한 다당 HKP-4-I은 보체계의 classical pathway 뿐만 아니라 alternative pathway를 모두 활성화함을 알 수 있었다. 또한 교차 면역전기영동에 의한 C3의 산물을 조사하여 classical pathway와 alternative pathway 활성계를 알아 보았다. 각각의 완충용액, NHS와 시료를 혼합, 반응시켜 1차원 및 2차원 전기영동 후 rabbit anti-human C3에 기인한 침강선을 관찰한 결과, 대조군과 EDTA처리로 2가 금속이온을 모두 제거한 군에서는 C3가 활성화되지 않아 1개의 peak만이 관찰되었으나 (Fig. 8. A, D), GVB⁺⁺계와 Mg^{++} -EGTA-GVB⁻⁻계에서는 C3a와 C3b에 기인한 2

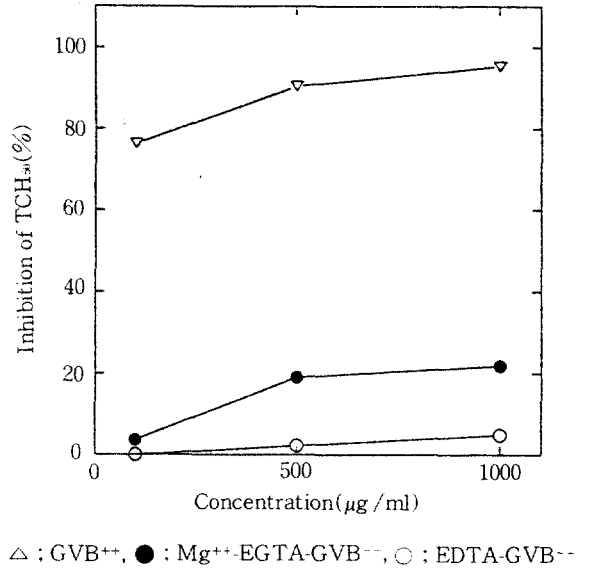


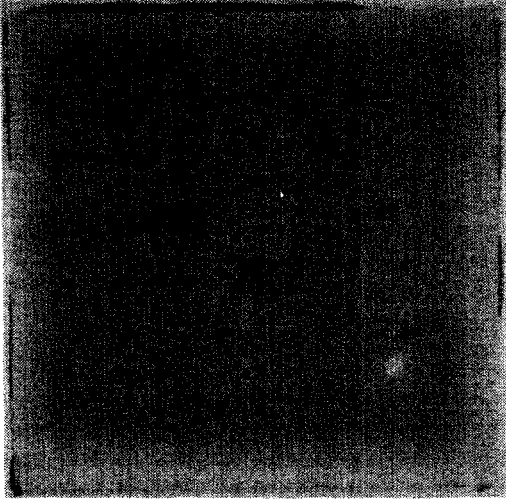
Fig. 7. Changes of anti-complementary activities by incubation with HKP-4-I in the presence or absence of Ca^{2+} ion.

번째 peak도 관찰되었다 (Fig. 8. B, C). 특히 Mg^{++} -EGTA-GVB⁻⁻계의 경우, 2번째 침강선의 크기가 GVB⁺⁺계의 침강선보다 작음을 확인함으로써 alternative pathway 활성화가 상대적으로 낮음을 알 수 있었다. 따라서 해동피로부터 추출한 다당이 classical pathway와 alternative pathway를 통한 보체계의 활성화에 관여함을 알 수 있었다.

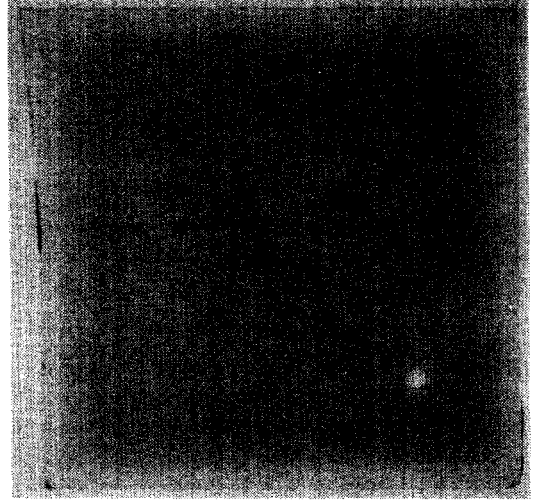
3. 7 α-amylase 처리에 의한 항보체 활성화다당의 검토

해동피로부터 추출, 정제하여 얻은 항보체 활성화다당의 당결합의 검토를 위해 glucose 함량이 많은 HKP-4-I를 α-amylase로 분해한 후, Sephadex G-25 column에 의해 분획하였다(Fig. 9). 그 결과 void volume에서 용출되는 희분 E-7, 5이상 10 이하의 소당류 희분 E-6과 E-5, 4당류 희분 E-4, 3당류 희분 E-3, 2당류 희분 E-2, 단당류 희분 E-1이 얻어졌으며 E-7 희분은 높은 항보체 활성을 보여주었으나 당결합수가 작아질수록 점차 활성이 매우 낮아지는 경향을 나타내었다. α-amylase에 의해 분리된 각 분획의 당조성을 gas chromatography에 의해 조사한 결과 모든 희분

(A)



(B)



(C)



(D)

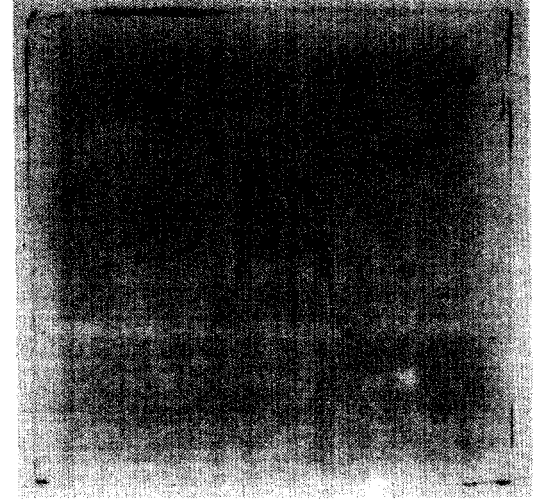


Fig. 8. C3 activation by HKP-4-1. NHS was incubated with equal volumes of (A) GVB⁺⁺+DIW, (B) GVB⁺, (C) EDTA or (D) Mg⁺⁺-EGTA at 37°C for 30 min.

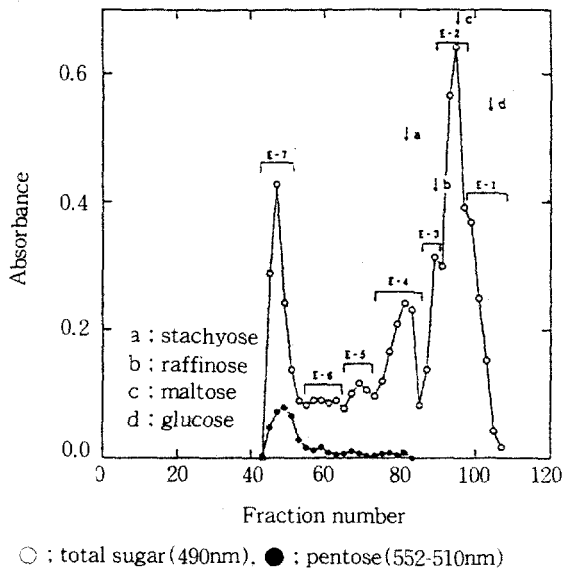


Fig. 9. Gel filtration of HKP-4-I digested by α -amylase on Sephadex G-25. The column was eluted with H₂O.

에 glucose가 함유되어 있었으나 E-7획분은 소량의 arabinose를 함유하고 있었다. 따라서 HKP-4-I은 주로 α -(1→4) 결합의 glucose와 소량의 arabinose가 함유된 arabinoglucan의 구조를 이루고 있음을 추정할 수 있었으나, 소량의 arabinan과 다량의 α -(1→4)결합의 glucan이 한 물질임을 이루고 있는 혼합물의 가능성도 추측되었다.

4. 결 론

11종의 임산재료 중 읍나무 수피의 열수추출물이 높은 항보체 활성을 나타내었다. 조다당 HKP-0는 80%의 높은 활성을 가졌으며, 총당함량이 54.8%이었으며 주 구성당은 arabinose, galactose, glucose였다.

조다당 HKP-0의 cetavlon 처리에 의해 얻어진 분획중 HKP-4는 90%의 높은 항보체 활성을 가졌고 단백질가수분해효소에 의해 활성의 감소가 없었으나 과요오드산 산화에 의해 50%의 활성의 감소가 있었다. HKP-4는 arabinose와 glucose가 몰비 1.0 : 22.4로 구성되어 있었다.

HKP-4의 DEAE-Sepharose CL-6B column에서 얻은 미흡착분획 HKP-4-I은 다른 흡착분획들보다 높은 수율과 항보체 활성을 나타내었고 분자량 25,000인 단일물질이었다. HKP-4-I은 84.0%의 중성당을 가지고 있었으며 arabinose와 glucose가 1.0 : 11.2의 몰비로 구성되어 있었다. HKP-4-I의 항보체 활성은 polymyxin B 처리에 의해 감소하지 않았으며 classical pathway와 alternative pathway를 모두 활성화하였다.

HKP-4-I의 α -amylase처리에 의해 Sephadex G-25 column에서 얻은 void volume 분획만이 높은 항보체 활성을 나타내었고 상당량의 glucose와 소량의 arabinose를 함유하고 있었다. 따라서 HKP-4-I은 α -(1→4)-glucose 결합으로 구성된 arabinoglucan구조 또는 미량의 arabinan과 다량의 glucan의 혼합물로 구성되어 있음이 추정되었다.

참 고 문 헌

1. Roitt, I. 1988. The basis of immunology In *Essential Immunology*, 6th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford. : 7
2. Benzamini, E. and S. Leskowitz. 1988. Complement. In *Immunology*. Alan R. Liss, New York. : 121
3. Tizard, I. R. 1988. The complement system In *Immunology*, 2nd ed. Saunders College Publishing, Philadelphia. : 284
4. Gewurz, H., H. S. Shin. and S. E. Mergenhagen. 1968. Interaction of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide ; Consumption of each of the six terminal complement components, *J. Exp. Med.* 128 : 1049
5. Muschel, L. H., K. Schmocker. and P. M. Webb. 1964. Anti-complementary action of endotoxin, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117 : 639
6. Fearon, D. T. and K. F. Austen. 1977. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound ampicillin convertase to endogenous regulatory mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 : 1683

7. Chihara G., J. Hamuro., Y. Y. Maeda. and F. Fukuoka. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom), *Cancer Res.* 30 : 2776
8. Miyazaki. Y., H. Okigawa., T. Yamada., H. Yamada. and Y. Yamada. 1979. Relationship between the chemical structure and anti-tumor activity of glucans prepared from *Grifora umbellata*, *Carbohydr. Res.* 69 : 165
9. Hamuro. J., U. Jadding. and D. Bitter-Suermann. 1978. Solid phase activation of alternative pathway of complement by β -1,3-glucans and its possible role for tumor regressing activity, *Immunology.* 34. : 695
10. Hirase. S. 1976. Structural studies on the anti-tumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes). II. Structures of β -D-glucan moieties of fractionated polysaccharides, *Yakugaku-Zasshi.* 96 : 419
11. Miyazaki. Y. and M. Nishijima. 1981. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, anti-tumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 29. : 3611
12. Kumazawa. Y., K. Mizunoe. and Y. Otsuka. 1982. Immunostimulating polysaccharide separated from hot water extract of *Angelica acutiloba* Kitagawa (Yamato-Yohki), *Immunology.* 47 : 75
13. Yamada. H., J. C. Cyong. and Y. Otsuka. 1986. Purification and characterization of complement activating-acidic polysaccharides from the roots of *Lithospermum euchromum royale*, *International J. Immunopharmacology.* 8 : 71
14. Yamada. H., K. Otani., H. Kiyohara., J. C. Cyong., Y. Otsuka., Y. Uneo. and S. Omura. 1985. Purification and chemical properties of anti-complementary activi-
ties of polysaccharides from the leaves of *Artemisia princeps*, *Planta Med.* 81 : 121
15. Yamada. H., S. Yanahira., H. Kiyohara., J. C. Cyong. and Y. Otsuka. 1986. Water-soluble glucans from the seed of *Coix lacrymajobi* Var. *Ma-Yuen*, *Phytochemistry.* 25 : 129
16. Tomoda. M., M. Takahashi. and S. Nakatsuka. 1973. Water-soluble carbohydrates of *Ziziphi Fructus*. II. Isolation of two polysaccharides and structure of an arabinan, *Chem. Pharm. Bull.* 21 : 707
17. Yamada. H., K. S. Ra., H. Kiyohara., J. C. Cyong., H. C. Yang. and Y. Otsuka. 1988. Characterization of anti-complementary neutral polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum*, *Phytochemistry.* 27 : 3163
18. Kwon K. S., K. S. Shin., H. Y. Cho. and H. C. Yang. 1992. Extraction, purification and properties of anti-complementary polysaccharide from *Arecae pericarpium*, *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 35 : 308
19. Ra, K. S., H. Yamada., H. J. Sung., J. C. Cyong. and H. C. Yang. 1989. Purification and chemical properties of anti-complementary polysaccharide from *Capsi Fructus*, *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 32 : 378
20. 육창수. 1989. 원색한국약용식물도감. 아카데미서적. : 380
21. Dubois. M., K. A. Gilles., J. K. Hamilton., P. A. Rebers. and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 : 350
22. Blumenkranz. N. and G. Asboe-Hansen. 1973. New method for quantitative determination fo uronic acids, *Anal. Biochem.* 54 : 484
23. Dische. Z. and E. A. Borenfereund. 1957. A new color reaction for the determination of aldopentose in presence of other saccharides, *Biochem. Biophys. Acta.* 23 :

24. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough., L. Farr. and R. J. Rindall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 : 265
25. Trevelyan, W. E., D. P. Procter. and J. S. Harrison. 1950. Detection of sugars on paper chromatograms, *Nature.* 166 : 444
26. Hough. L., J. F. N. Jones. and W. H. Wadman. 1950. Quantitative analysis of mixture of sugars by the method of partition chromatography. Part. V. Improved methods for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on paper chromatogram, *J. Chem. Soc.* : 1702
27. Partridge. S. M. 1948. Thin layer chromatography of amino acids, *J. Biochem.* 42 : 238
28. Kabat. E. A. and M. M. Mayer. 1964. Complement and complement fixation In *Experimental Immunochimistry*, 2nd ed., Charles C. Thomas Publisher, Illinois. : 133
29. Wilson. M. E. and D. C. Morrison. 1982. Evidence for different requirements in physical state for the interaction of lipopolysaccfharides with the classical and alternative pathways of complement, *Eur. J. Biochem.* 128 : 137