

식물성 식품재료로부터 보체계 활성화 다당의 검색 및 그 활성화검토

신광순 · 라경수* · 성하진** · 양한철

고려대학교 식품공학과, *생물공학연구소, **유전공학과

Screening of Complement-System Activating Polysaccharide from Edible Plants and Its Action Mode

Kwang-Soon Shin, Kyung-Soo Ra*, Ha-Chin Sung** and Han-Chul Yang

Department of Food Technology, *Institute of Biotechnology

**Department of Genetic Engineering, Korea University, Seoul

Abstract

Screenings were performed on edible plants to examine their complement-system activating ability (anti-complementary activity) by hemolytic complement assay (TCH_{50}). Among 38 kinds of plant extracts, 5 kinds showed relatively strong anti-complementary activity which decreased TCH_{50} more than 60% comparison with control and the order of activity was *Zingiber officinale* > *Colocasia antiquorum* > *Capsella bursapastoris* > *Ginkgo biloba* > *Alium monanthum* in 1000 $\mu\text{g/ml}$. The anti-complementary activity of ZR-1 prepared from the root of *Zingiber officinale* which was showed the most potent activity, did not change by pronase treatment, but decreased greatly by periodate oxidation. These results indicate that not protein moiety but carbohydrate moiety in ZR-1 fraction may also contribute to the anti-complementary activity. Also, the anti-complementary activity of ZR-1 was reduced partially in the absence of the Ca^{2+} ion. When crossed immunoelectrophoresis using anti-human C3 serum was carried out after incubation of normal human serum with the ZR-1 in Ca^{2+} free condition, a cleavage of C3 precipitin line was observed. Furthermore this polysaccharide fraction considerably inhibited ACH_{50} . These results also indicate that the mode of complement activation by polysaccharide from *Zingiber officinale* is via not only the classical pathway but also the alternative pathway.

Key words: complement system, anti-complementary activity, edible plants, polysaccharide, *Zingiber officinale*.

서 론

면역계 중에서 보체계(complement system)⁽¹⁻³⁾의 역할은 미생물 감염으로부터 숙주를 방어하는 기능을 가진 이외에도 염증, 과민반응, 화학주성 등의 중요한 역할을 담당하고 있다고 알려져 있으며, 현재 C1-C9까지 9개의 보체 성분과 조절인자 등 약 20여종의 단백질로 구성되어 있음이 밝혀져 있다. 또한 보체계는 classical pathway와 alternative pathway로 구성되어 있는데 이중 alternative pathway는 효모나 세균세포벽 기원의 다당류 등⁽⁴⁻⁶⁾ activator에 의해 혈중 미량존재하는 C3b부터 비특이적으로 활성화되어 membrane attack complex를 형성하고 결국 병원체의 lipid bilayer에 손상을 주어 살균작용을 나타낸다. 따라서 alternative pathway는 항체에 의한 특이적 면역반응이 일어나기 이전에 활성화되기 때문에 항원에

의해 감작되지 않은 숙주에 있어 중요한 방어기작이라 할 수 있다⁽⁷⁾.

한편 자연계에 존재하는 천연다당 중에는 생체에 대한 기능이 다양한 물질들이 존재할 것으로 기대되고 있는데 이중에서도 당귀(*Angelica acutiloba*) 유래의 AR-arabogalactan IIb-1⁽⁸⁾, 紫根(*Lithospermum euchromum*) 유래의 산성다당인 LR-polysaccharide IIa⁽⁹⁾, 쑥(*Artemisia princeps*) 유래의 산성 heteroglycan인 AAFIIb-2 및 AAFIIb-3⁽¹⁰⁾, 울무(*Coix lachryma-jobi* Var. ma-yuen) 유래의 산성 heteroglycan CA-1과 CA-2 및 중성 glucan⁽¹¹⁾에서 보체계를 활성화시키는 항보체 활성(anti-complementary activity)이 있는 것으로 보고되고 있다. 그외에도 人蔘葉 기원의 산성다당 GL-PI, GL-PII 및 GL-PIII⁽¹²⁾과 대추(*Zizyphus jujuba* Var. *inermis*)⁽¹³⁾ 및 차전자(질경이, *Plantago asiatica*)⁽¹⁴⁾ 등의 한약재 및 식품기원 다당에서도 항보체 활성이 확인됨으로써 이들의 보체계 조절기능에 대한 해석이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 자연계에 많이 존재하는 천연물, 특히 다량으로 반복 섭취하므로써 그 효과가 기대되는

Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Department of Food Technology, Korea University, 5-1, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea

각종 식물성 식품재료를 대상으로 면역계에 중요한 역할을 담당하고 있는 보체계를 활성화시키는 물질을 선별하고, 이들에 대한 기본적인 성질 및 보체계 활성화 작용 기구에 대한 기초자료를 얻기 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 식물성 식품재료들은 서울 경동시장에서 구입하였다. Pronase, rabbit anti-human C3는 Sigma사 제품을, 5,5'-diethylbabituric acid sodium salt는 Merck사 제품을 각각 사용하였다. 양의 감작적혈구(IgM hemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본 Biotest 연구소로부터 구입하여 사용하였으며, 그외 기타 시약은 시판 일급 혹은 특급 분석용 시약을 사용하였다. 또한 정상인의 혈청(Normal human serum, NHS)⁽¹⁵⁾ 및 토끼적혈구(Rabbit red blood cell, RRBC)⁽¹⁶⁾는 실험실에서 직접 신선한 상태로 조제하여 사용하였다.

정량 방법

중성당 함량은 arabinose를 표준물질로 사용하여 phenol-sulfuric acid 방법⁽¹⁷⁾에 의해 측정하였고, uronic acid 함량은 galacturonic acid를 사용하여 m-hydroxydiphenyl 방법⁽¹⁸⁾에 의해 측정하였으며, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowery법⁽¹⁹⁾으로 측정하였다.

항보체 활성물질 검색을 위한 시료제조

식물성 식품재료 50g(건조중량)을 적절한 크기로 절단하여 10배의 증류수를 가하고 부피가 절반이 될 때까지 끓인 후 원심분리하고 그 상등액을 동결건조하여 열수추출물을 얻었다. 동 열수추출물은 1000 µg/ml의 농도로 조제하여 항보체 활성을 측정하였다.

항보체 활성의 측정

항보체 활성의 측정은 Mayer 방법⁽²⁰⁾에 의해 측정하였다. 즉 NHS, GVB²⁺(gelatin veronal buffered saline, pH 7.5)와 시료용액을 각각 50 µl씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 연속 희석하고 EA cell(1×10^6 cells/ml)를 이용, 잔존용혈활성을 측정하였다. 한편 대조구는 동일조건에서 시료를 함유하지 않은 채 측정하였으며, 항보체 활성은 대조구 대비 총보체용혈(TCH₅₀, 50% of total complement hemolysis)의 저지율(ITCH₅₀, inhibition of 50% of total complement hemolysis)로서 나타내었다.

ITCH₅₀(%)

$$= \frac{\text{TCH}_{50} \text{ of control} - \text{TCH}_{50} \text{ treated with sample}}{\text{TCH}_{50} \text{ of control}} \times 100$$

Alternative complement hemolytic activity(ACH₅₀)의 측정

ACH₅₀은 Platts과 Ishizaka의 방법⁽¹⁶⁾을 변형하여 측정하였다. 즉 4 mM MgCl₂와 10 mM ethylene glycol-bis(β-aminoethylether) N,N,N',N'-tetra acetic acid(EGTA)를 함유한 Ca²⁺ free GVB²⁺ buffer(Mg²⁺-EGTA-GVB²⁺), NHS 및 시료 300 µl를 각각 혼합하여 37°C에서 30분 반응시킨 후 Mg²⁺-EGTA-GVB²⁺를 3.6 ml 가하여 적절히 연속 희석하고, 5×10^7 cell/ml의 감작화되지 않은 신선한 토끼 적혈구를 200 µl 가하여 37°C에서 60분간 반응한 후 원심분리하여 상등액의 흡광도를 414 nm에서 측정하였다. Alternative pathway에 의한 보체용혈활성은 대조군의 ACH₅₀에 대한 저지율(Inhibition of ACH₅₀, %)로 표시하였다.

생강(*Zingiber officinale*)으로부터 활성 조다당의 추출 및 분리

생강(*Zingiber officinale*) 1 kg에 5 l의 물을 가해 열수추출한 후 동결건조하여 열수추출물을 얻고, 이를 methanol로 10회 reflux하여 methanol 가용성 물질을 제거한 후 침전물을 물에 용해하여 ethanol(5배)을 가하고 4°C에서 24시간 교반하였다. 여기서 얻은 침전물을 물에 재 용해한 후 3일간 투석 및 동결건조하여 조다당획분 ZR-1을 얻었다.

조다당의 Pronase 처리

조다당 20 mg을 10 mM CaCl₂가 함유한 20 ml의 Tris-HCl buffer(pH 7.9)에 용해시킨 후 20 mg의 pronase를 가하여 37°C에서 48시간 반응시켰다. 이 반응액을 5분간 끓여 반응을 정지시킨 후 원심분리하여 얻은 상등액을 4°C에서 3일간 투석하고 동결건조하여 조다당의 pronase 분해물을 얻었다.

조다당의 과요오드산 산화

조다당 20 mg을 10 ml의 50 mM acetate buffer(pH 4.5)에 용해시킨 후 50 mM NaIO₄ 5 ml를 가하여 4°C 암실에서 3일간 산화시켰다. 이 반응액에 ethylene glycol 5 ml를 가하여 잔존 과요오드산을 제거하고 1시간 동안 실온에서 방치한 후 3일간 투석을 행하여 얻은 투석내액을 20 ml로 농축하였다. 농축액에 NaBH₄ 20 mg를 가하여 실온에서 1시간 교반하였으며, 0.1 M acetic acid로 중화한 후 methanol의 첨가와 증발을 반복하여 잔존 boric acid를 제거하고 투석 및 동결건조하여 조다당의 산화물(periodate oxidate)를 얻었다.

정상인 보체에 미치는 항보체 활성 다당의 효과

3×10^6 cell의 EA cell을 함유한 0.8% agarose 용액을 slide glass 평판위에 가하여 상온에서 굳힌 후 직경 2.5 mm의 well을 만들고 여기에 각 농도(0, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/ml)로 조제된 활성다당의 수용액을 정상

인의 혈청과 GVB²⁻ buffer와 동량 혼합하여 37°C에서 30분간 배양하여 얻은 시료를 각각 분주하였다. 이 평판은 4°C에서 15시간 방치하여 혈청성분을 충분히 확산시키고, 37°C에서 배양하여 보체에 의한 적혈구 세포의 용혈현상을 관찰하였다.

1차원 면역전기영동⁽²¹⁾

GVB²⁺로 희석한 시료액과 정상인의 혈청을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 barbital buffer(pH 8.6, $\mu=0.025$)를 이용하여 1% agarose 상에서 3 mA/cm로 2시간 전기영동을 행하고, rabbit anti-human C3 serum을 이용하여 4°C에서 24시간 반응시켜 침강선을 관찰하였다.

교차 면역전기영동⁽²¹⁾

GVB²⁺ buffer, 10 mM EDTA 및 1% gelatin을 함유한 veronal buffer(EDTA-GVB²⁻) 및 Mg⁺²-EGTA-GVB²⁻ buffer에 각각 희석된 시료액에 정상인의 혈청을 혼합하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 barbital buffer(pH 8.6, $\mu=0.025$)에 용해한 1% agarose 상에서 동 완충용액을 이용하여 1차원 전기영동(2.1 mA/cm)을 시키고 0.5% anti-human C3 serum이 함유된 1% agarose 상에서 2차 전기영동(1 mA/cm)을 행하였다. 전개된 gel은 고정 및 탈 단백과정을 거친 후 bromophenol blue로 염색시켜 C₃의 분해산물을 관찰하였다.

결과 및 고찰

식물성 식품재료로부터 항보체 활성물질의 검색

식물성 식품재료 총 38종을 대상으로 그 열수추출물에 대한 항보체활성 존재여부를 검색하였다. 이들 식품재료를 검색 대상으로 선택한 것은 식품은 그 자체가 다량으로 반복 섭취된다는 특성을 가짐으로써 이들중 우수한 활성물질이 존재시 그 효과가 기대되지 때문이었으며, 이들을 대상으로 할 때 비교적 독성 문제를 배제할 수 있다는 가능성에 기인하였다. 식품재료의 열수추출물에 대한 항보체 활성의 결과는 Table 1과 같다. 이중 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 60% 이상의 높은 항보체활성을 나타낸 것으로서는 달래(*Allium monanthum*, 60.1%), 생강(*Zingiber officinale*, 92.9%), 토란대(*Colocasia antiquorum*, 72.7%), 은행잎(*Ginkgo biloba*, 60.7%), 냉이(*Capsella bursapastoris*, 72.1%)로 나타났으며 이는 전체 시료 대비 13.2%에 해당하는 양이었다. 한편 높은 활성을 나타낸 5종의 열수추출물을 대상으로 보다 정확한 항보체 활성도를 측정하기 위해 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 각 농도에서 4회 반복하여 재측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉 생강 추출물이 각 농도에서 활성이 가장 높았으며, 다음으로는 토란대, 냉이, 은행잎, 달래의 순으로 나타났다.

C3 성분의 활성화 여부의 결정

Table 1. Anti-complementary activities of hot water extracts from edible plants

Samples*	Inhibition of TCH ₅₀ (%)
약쑥	<i>Artemisia</i> spp. 46.2
양파	<i>Allium cepa</i> 16.0
달래	<i>Allium monanthum</i> 60.1
고추잎	<i>Capsicum annuum</i> 31.8
돌나물	<i>Sedum makinoimento</i> 33.2
생강	<i>Zingiber officinale</i> 92.9
토란	<i>Colocasia antiquorum</i> 39.3
토란대	<i>Colocasia antiquorum</i> 72.2
표고버섯	<i>Lentinus eodes</i> 34.4
노타리버섯	<i>Pleuotus ostreanus</i> 32.5
고구마순	<i>Ipomoea batatas</i> 25.8
도라지	<i>Platycodon grandifolrum</i> 27.4
시금치	<i>Spinacia oleracea</i> 18.6
쑥	<i>Artemisia princeps</i> 14.5
미나리	<i>Nasturtium officinale</i> 44.1
가지	<i>Solanum melongena</i> 0.3
부추	<i>Allium odorum</i> 14.4
두충잎	<i>Eucommia ulmoides</i> 17.5
마늘	<i>Allium sativum</i> 12.0
취	<i>Pueraria thunbergiana</i> 39.8
도토리	<i>Quercus acutissima</i> 45.5
구기자	<i>Lycium chinense</i> 41.7
은행잎	<i>Ginkgo biloba</i> 60.7
감잎	<i>Diodpitod kaki</i> 54.1
고사리	<i>Pteridium aquilinum</i> 44.9
냉이	<i>Capsella bursapastoris</i> 72.1
연근	<i>Nelumbo nucifera</i> 14.7
쑥갓	<i>Chrysathemum</i> spp. 53.9
근대	<i>Beta vulgaris</i> 4.5
호박	<i>Cucurbita mochata</i> 21.8
오미자	<i>Schizandra chinensis</i> 19.6
취나물	<i>Pueraria thunbergiana</i> 10.6
양송이버섯	<i>Cagricus campestris</i> 54.7
쑥바귀	<i>Ixeris dentata</i> 36.4
결명자	<i>Cassia tora</i> 18.7
갯	<i>Bassia juncea</i> 48.9
더덕	<i>Codonopsis lanceolata</i> 22.4
들깨잎	<i>Sesamum indicum</i> 12.3

*The concentration of each sample was 1000 $\mu\text{g/ml}$.

정상인의 혈청을 면역복합체로써 양의 감작적혈구(EA cell)와 반응시켰을 때 보체의 저해정도를 항보체 활성(anti-complementary activity)이라 하며, 따라서 항보체 활성은 보체계를 활성화 혹은 저해하는 활성을 의미하게 된다⁽²²⁾. 따라서 본 검색과정시 높은 활성을 보였던 신타시료들이 진정으로 보체계를 활성화시키는 지 여부를 판명하기 위해 보체 활성화에서 중추적 역할을 하는 C3의 활성화 여부를 검토하였다. 일반적으로 보체계가 활성화되면 C3는 C3a와 C3b로 분해되므로 본 실험에서는 선별된 5종의 시료와 정상인의 혈청을 반응시킨 후 그 반응산물을 토끼기원의 anti-human C3 serum을 이용하여 면역 전기영동을 행함으로써 C3의 분해산물을 동

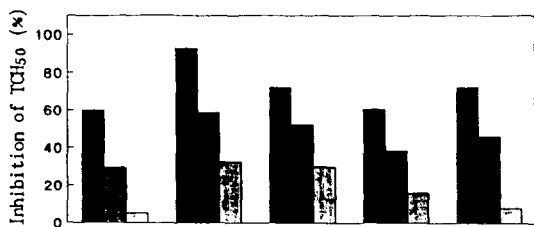


Fig. 1. Anti-complementary activities of hot water extracts from selected edible plants

a; *Allium monanthum*, b; *Zingiber officinale*, c; *Colocasia antiquorum*, d; *Ginkgo biloba*, e; *Capsella bursapastoris*
 ■; 1000 µg/ml, ▨; 500 µg/ml, ▩; 100 µg/ml



Fig. 2. C3 activation by anti-complementary polysaccharides from selected edible plants

Normal human serum was incubated with GVB²⁺ and plant-extracts at 37°C for 30 min. The sera were then subjected to immuno-electrophoresis using anti-human C3 to located C3 cleavage products. The anode is to the right.

A; NHS only, B; *Zingiber officinale*, C; *Allium monanthum*, D; *Capsella bursapastoris*, E; *Colocasia antiquorum*, F; *Ginkgo biloba*

정코자 하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 정상인 혈청을 단독으로 면역 전기영동한 결과는 C3의 활성화가 이루어지지 않아 단일 침강선을 보인 반면에 선별된 활성시료(생강, 달래, 냉이, 토란대, 은행잎)로 처리한 정상혈청에서는 C3가 C3a 및 C3b로 한정분해에 의해 활성화됨에 따라 2개의 침강선이 관찰되었다. 이상의 결과는 저지⁽²³⁾ 등이 보고한 한약재 대상의 결과와도 일치하여 선별된 시료 모두는 보체계를 직접 활성화시키고 있음을 알 수 있었다.

항보체 활성성분의 성질

식물성 식품재료를 대상으로 검색시 가장 높은 활성을 보였던 생강(roots of *Zingiber officinale*, *Zingiberis Rhi-*

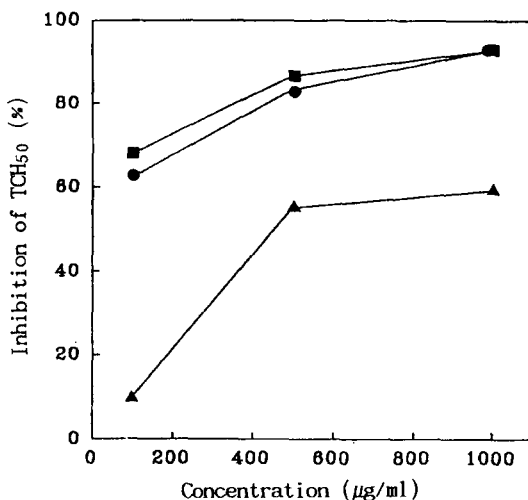


Fig. 3. Anti-complementary activities on periodate oxidation and pronase treatment of ZR-1

■—■; Pronase digest, ●—●; ZR-1, ▲—▲; Periodate oxidate

zoma)에 대하여 열수추출을 행하고 methanol, ethanol 가용성 획분 및 저분자 물질을 제거한 활성 조다당 획분 ZR-1을 얻었으며 이들의 화학적 조성은 중성당 함량 64.6%, 산성당 17.3%, 단백질 18.1%이었다. 한편 이들의 활성의 본체를 규명하기 위해 pronase 처리로 단백질 부분을 가수분해한 획분과 periodate로 당부분을 산화시킨 각각의 획분을 얻고 이들의 항보체 활성을 비교한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 pronase 처리한 ZR-1 획분은 무처리 대조군에 비해 활성의 큰 변화가 없는 반면, periodate로 산화시킨 획분은 활성의 급격한 감소가 인정되었다. 따라서 동 선별시료의 항보체 활성부위는 단백질이 아니라 다당에 기인함을 알 수 있었으며, 이와 같은 결과는 당귀⁽⁸⁾, 자근⁽⁹⁾ 및 쑥⁽¹⁰⁾ 등으로부터 추출된 항보체 물질이 다당이라는 사실과 일치하였다.

정상인 혈청중의 보체에 미치는 활성다당의 효과

생강에서 얻은 열수추출 다당(ZR-1)이 정상인의 혈청 중에 존재하는 보체에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위해 용혈현상에 의한 투명한 형성실험을 행한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 활성 획분을 첨가한 후 배양하지 않은 경우는 보체의 활성화가 일어나지 않아 투명환(clear zone)을 형성한 반면, 배양군에서는 보체 활성화가 기원료됨에 기인하여 투명환의 관찰을 인지할 수 없었다. 특히 Fig. 4에서 보여주는 바와 같이 활성다당이 농도가 증가할수록 투명환의 크기가 크게 감소하고, 시료 250 µg/ml의 농도에서는 거의 환을 형성치 않음으로써 생강에서 추출한 활성다당이 강력한 항보체 활성을 소유하고 있음을 알 수 있었다.

not incubated



incubated

0 50 100 250 500 1000



Fig. 4. Effect of ZR-1 from *Zingiber officinale* on complement in a normal human serum

IgM-hemolysin-sensitized sheep erythrocytes were into 0.8% molten agarose and the mixture allowed to set. Wells were cut in the agar plates and filled with the incubated or not-incubated sera. These plates were incubated at 37°C for 2 hours

항보체 활성화다당의 작용양식의 해석

각종 반응계에서의 TCH₅₀ 비교 : 전술한 바와 같이 보체계의 활성화 경로는 크게 classical pathway와 alternative pathway로 구성되어 있는 바, 그 활성화에는 classical pathway에는 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 이온이, alternative pathway에는 Mg²⁺ 이온만이 각각 관여하고 있는 것으로 알려져 있다^(1,2). 따라서 높은 활성이 인지되었던 ZR-1을 대상으로 이들이 양 경로중 어느 경로를 통하여 보체계를 활성화시키는지를 알아보기 위해 GVB²⁻ 기본반응계와 2가 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB²⁻ 반응계 및 Ca²⁺ 이온을 선택적으로 제거한 Mg²⁺-EGTA-GVB²⁻ 반응계로 나누어 항보체 활성(TCH₅₀)을 비교 측정하였다. Fig. 5에서와 같이 EDTA-GVB²⁻ 반응계에서는 대조구에 비해 거의 완전하게 활성의 감소를 관찰할 수 있었으나 Mg²⁺-EGTA-GVB²⁻ 반응계에서는 활성이 상당량 유지됨(20% 수준)을 알 수 있었다. 따라서 생강으로부터 추출한 열수추출 다당 ZR-1은 보체계의 classical pathway 뿐만 아니라 alternative pathway도 활성화시킬 수 있음을 추측할 수 있었다.

ACH₅₀(Alternative Complement Hemolytic activity)의 비교

생강의 활성화다당 ZR-1의 alternative complement pathway의 활성화 정도를 측정하기 위해 Platts 등⁽¹⁶⁾의 방법에 따라 alternative pathway만이 작용하도록 Mg²⁺-EGTA-GVB²⁻ 반응계에서 항원으로 RRBC를 이용하여 ACH₅₀값을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 6과 같이 농도의 존적 활성화 경향을 보였으며, 1000 µg/ml의 농도하에서 최대 22.82%의 IACH₅₀값을 나타내었다.

교차 면역전기영동에 의한 C₃ 산물의 동정

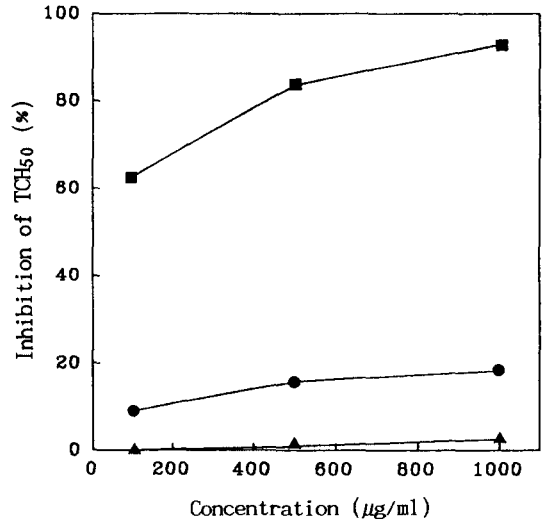


Fig. 5. Changes of TCH₅₀ by incubation with the polysaccharide from *Zingiber officinale* in the presence or absence of Ca²⁺ and Mg²⁺

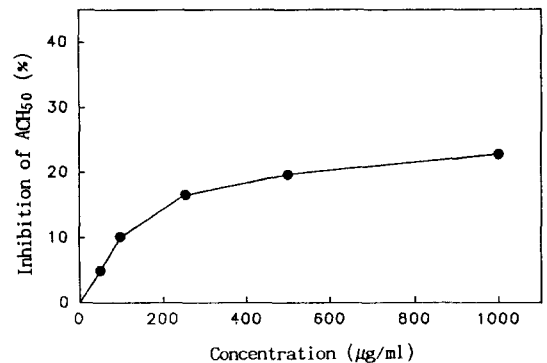


Fig. 6. Alternative complement pathway activity of ZR-1 from *Zingiber officinale*

상술한 바와 같이 생강의 추출물(ZR-1)이 보체계의 classical pathway 및 alternative pathway의 양경로를 모두 활성화시킬 수 있다는 사실을 확인하기 위해 교차면역전기영동에 의한 C₃의 분해산물 생성여부를 관찰하였다. ZR-1을 정상인의 혈청과 혼합하고 GVB²⁻, EDTA-GVB²⁻ 및 Mg²⁺-EGTA-GVB²⁻ 반응계에서 반응시킨 후 보체 활성화에 중요한 역할을 담당하고 있는 C₃의 반응산물을 확인한 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 정상인 혈청만을 반응시킨 경우와 2가 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB²⁻에서는 C₃의 활성화가 이루어지지 않음에 기인한 1개의 침강선만이 관찰된 반면 GVB²⁻와 Ca²⁺ 이온만 선택 제거한 Mg²⁺-EGTA-GVB²⁻에서는 각각 2개씩의 침강선을 관찰할 수 있었다. 특히 Mg²⁺-EGTA-GVB²⁻ 반응계에서는 well로부터의 두번째

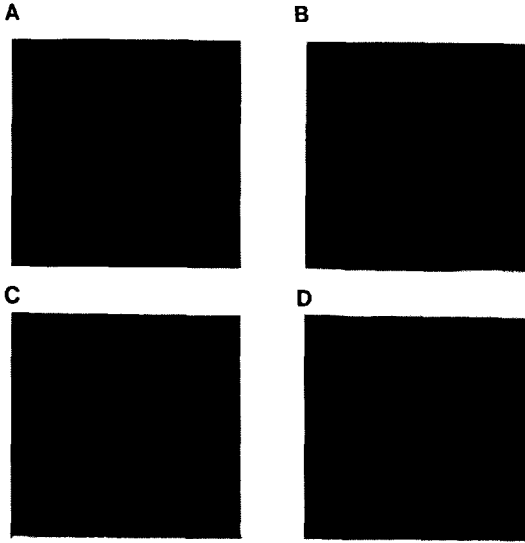


Fig. 7. Crossed immunoelectrophoresis of C3 with ZR-1 of *Zingiber officinale* with or without Ca^{2+} ion and Mg^{2+} ion

Normal human serum was incubated with ZR-1 and GVB^{2+} or Mg^{2+} -EGTA- GVB^{2-} or EDTA- GVB^{2-} , respectively. The sera were then subjected to immunoelectrophoresis using anti-human C3 sera to locate C3 cleavage products. The anode is to the left
A; GVB^{2+} + PBS^- , B; GVB^{2+} + *Zingiber officinale*, C; EDTA- GVB^{2-} + *Zingiber officinale*, D; Mg^{2+} -EGTA- GVB^{2-} + *Zingiber officinale*

peak가 GVB^{2-} 반응계에서 보다 작게 나타났는데 이는 well로부터 첫번째 peak는 C3에, 두번째 peak는 C3a 및 C3b에 기인한 침강선⁽²⁴⁾임을 고려할 때 alternative pathway 활성화가 상대적으로 낮음을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 생강의 활성 조다당 획분 ZR-1의 작용양식은 classical pathway 뿐만 아니라 alternative pathway도 공히 활성화시킬 수 있음을 알 수 있었다.

요 약

식물성 식품재료를 대상으로 보체 용혈분석법(TCH₅₀)을 이용하여 보체 활성화능(항보체 활성)에 대한 검색을 실시하였다. 총 38종의 식용 식물추출물 중 5종의 시료에서 대조구에 비해 60% 이상의 TCH₅₀의 감소를 일으키는 비교적 높은 활성을 나타냈으며 그 활성의 순서는 1000 µg/ml 시료 농도에서 생강>토란대>냉이>은행잎>달래이었다. 한편 가장 높은 활성을 보였던 생강에서 조제된 ZR-1의 경우 pronase 소화 후에는 활성의 변화가 없는 반면에 과요오드산 산화에 의해서는 급격한 활성의 감소를 나타냄으로써 ZR-1의 단백질 부위가 아닌 다당 부위가 활성에 기여함을 알 수 있었다. 또한 ZR-1의 항보체 활성은 Ca^{2+} 이온 부재시 부분적인 감소현상을 보였으며, ZR-1을 정상인의 혈청과 반응 후 anti-human

C3를 이용하여 2차원 면역 전기영동을 행한 결과 C3의 분해산물을 관찰할 수 있었다. 또한 이들 획분은 ACH₅₀의 저해를 일으켰다. 동 결과로부터 ZR-1의 보체 활성화 양식은 classical pathway 뿐만 아니라 alternative pathway도 경유함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처 특정연구 개발사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- Bellanti, T.A.: The complement system. In *Immunology III*. Saunders, Philadelphia, p.106(1985)
- Bezamini, E. and Leskowitz, S.: Complement. In *Immunology*. Alan R. Liss, New York, p.121(1988)
- Fearon, D.T. and Austin, K.F.: The alternative pathway of complement - a system for host resistance to microbial infection. *N. Engl. J. Med.*, 303, 259(1980)
- Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I.H., Ross, O.A., Todd, E.W. and Wardlaw, A.C.: The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* (Washington), 120, 279(1954)
- Morrisson, D.C. and Kline, L.F.: Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides(LPS). *J. Immunol.*, 118, 362(1977)
- Schultz, D.R., Arnold, P.I., Wu, M-C., Lo, T.M., Volanakis, J.E. and Loos, M.: Isolation and partial characterization of a polysaccharide in ant venom (*Pseudomyrmex* sp.) that activates the classical complement pathway. *Mol. Immunol.*, 16, 253(1979)
- Alper, C.A., Abramson, N., Johnston, R.B., Jandl, J.H. and Rosen, F.S.: Increased susceptibility to infection associated with abnormalities of complement mediated functions and of the third component of complement(C3). *N. Engl. J. Med.*, 282, 349(1970)
- Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y.: Structural characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba*. *Carbohydr. Res.*, 159, 275(1987)
- Yamada, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y.: Purification and characterization of complement activating acidic polysaccharides from the roots of *Lithospermum euchromum* royale. *International J. Immunopharmacology*, 8, 71(1986)
- Yamada, H., Ohtani, K., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Otsuka, Y., Ueno, Y. and Omura, S.: Purification and chemical properties of anti-complementary polysaccharide from the leaves of *Artemisia princeps*. *Planta Med.*, 51, 121(1985)
- Yamada, H., Yanahira, S., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y.: Water-soluble glucans from the seed of *Coix lacrymajobi* Var. *Ma-Yuen*. *Phytochemistry*, 25, 129(1986)
- Gao, Q.P., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Yamada, H.:

- Characterization of anti-complementary acidic heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng* C.A. MEYER. *Carbohydr. Res.*, **181**, 175(1988)
13. Tomoda, M., Takahashi, M. and Nakatsuka, S.: Water-soluble carbohydrates of *Zizyphi Fructus*. II. Isolation of two polysaccharides and structure of an arabinan. *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 707(1973)
 14. Tomoda, M., Shimizu, N., Shimada, K., Gonda, R. and Sakabe, H.: Plant mucilages. XXXIV. The location of O-acetyl groups and the structural features of *Plantago-Mucilage A*, the mucous polysaccharide from the seeds of *Plantago major* var. *asiatica*. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2182(1984)
 15. Campbell, D.H., Garvey, F.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H.: Preparation and preservation of serum. In *Methods in immunology*. W.A. Benjamin Inc., Massachusetts, p.28(1974)
 16. Platt, M.T. and Ishizaka, K.: Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.*, **113**, 348(1974)
 17. 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)
 18. Blumenkrantz, N. and Asboe-Hasen, G.: New method for quantitative determination of uronic acids. *Analyt. Chem.*, **54**, 484(1973)
 19. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.K. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
 20. Kabat, E.E. and Meyer, M.M.: Complement and complement fixation. In *Experimental Immunochemistry*, Charles C. Thomas, Illinois, p.133(1964)
 21. Cyong, J.C., Witkin, S.S., Rieger, B., Barbarese, E., Good, R.A. and Day, N.K.: Antibody independent complement activation by myelin *via* classical complement pathway. *J. Exp. Med.*, **155**, 587(1982)
 22. Yamada, H. and Kiyohara, H.: Bioactive polysaccharide from Chinese herbal medicines, *Abstracts of Chinese Medicine*, **3**, 104(1989)
 23. Shin, K.S., Kwon, K.S. and Yang, H.C.: Screening and characteristics of anti-complementary polysaccharides from Chinese medicinal herbs. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **35**, 42(1992)
 24. Hudson, L. and Hay, F.C.: Antibody interaction with antigen. In *Practical Immunology*, 3rd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, p.244(1989)

(1992년 8월 28일 접수)