

고사리 단백질(Pteridium aquilinum Glycoprotein, PAG)이 마우스 면역활성에 미치는 영향

박현애 · 권미향* · 한형미** · 성하진 · 양한철

고려대학교 생명공학원

*고려대학교 생명공학연구소, **식품·의약품 안전청

Effects of the Glycoprotein Isolated from *Pteridium aquilinum* on the Immune Function of Mice

Hyeon-Ae Park, Mee-Hyang Kweon*, Hyung-Mee Han**, Ha-Chin Sung and Han-Chul Yang

Graduate School of Biotechnology, Korea University

*Institute of Biotechnology, Korea University, **Korea Food and Drug Administration

Abstract

The effects of the glycoprotein (PAG) isolated from *Pteridium aquilinum* on the immune function was examined in mice. PAG was intraperitoneally administered into BALB/C mice for 14 days and the antibody forming ability to hen egg lysozyme (HEL) and the blastogenic responses of splenocytes were measured. PAG treatment significantly increased antibody formation to HEL in a dose-dependent manner. Blastogenesis of splenocytes in response to lipopolysaccharide (LPS, B-cell specific mitogen) or phytohemagglutinin (PHA, T-cell specific mitogen) was also increased after treatment with PAG, indicating that the PAG increases both humoral and cellular immunities. To examine whether the immune function of PAG was *via* a direct effect on the lymphocytes, splenocytes were isolated from BALB/C mice, exposed to various concentrations of PAG *in vitro* and the blastogenic responses were measured. *In vitro* exposure to PAG significantly increased blastogenesis of splenocytes to LPS up to 50 µg/mL, whereas the blastogenic response to PHA was not altered by PAG treatment. To identify the fraction responsible for the increase in the immune function, the effect of periodate digest, pronase digest or purified polysaccharide on the antibody production to HEL was examined. Crude protein fraction of PAG significantly increased the antibody formation to HEL. On the other hand, both crude and purified polysaccharide fractions did not have any effects on the antibody production ability. These data indicated that 1) PAG increased both humoral and cellular immune functions, 2) the increase in humoral immunity was probably *via* a direct action of PAG on lymphocytes and 3) the protein portion of PAG was responsible for the increase in humoral immunity.

Key words: *Pteridium aquilinum*, glycoprotein, immune function, antibody formation, blastogenesis

서 론

고사리는 어린순을 삶아서 말린 상태로 나물로 식용되고 있으며, 뿌리는 해열, 이뇨, 설사, 황달, 대하증 치료제로 사용되어 왔고, 땅속줄기에 저장된 전립분은 풀이나 약용으로 이용되어 왔다. 특히 뿌리줄기는 한방에서 외용약으로 가피(딱지), 고름집, 습진 및 종양의 치료에, 전초는 상처 및 치질성출혈의 치료에 사용되어 왔다⁽¹⁾. 생고사리의 경우 돌연변이 유발성분과

티아민 분해인자의 존재가 문제가 되어 이에 대한 보고들이 알려져 있으나, 이들 성분 모두 열에 약하여 표백, 가공조리 등에 의하여 파괴되거나 제거됨으로써 식용시 문제가 되지 않는 것으로 알려져 있다^(2,3). 따라서 고사리는 티아민, 리보플라빈, 아스כול빈산과 무기질을 다량 함유하는 고영양질 식품이라 할 수 있겠다.

최근 식품성분에 대해 새로운 관점에서 계통적·조직적인 연구가 발전함에 따라 식품기원의 특정성분들이 인체의 신경계, 순환계, 내분비계, 생체방어계, 세포분화 등에 직·간접적으로 작용하여 생체조절기능의 효과를 나타낸다는 사실들이 밝혀지고 있다. 이러

Corresponding author: Han-Chul Yang, Graduate School of Biotechnology, Korea University, 5-1 Anam-Dong, Seungbuk-Ku, Seoul 136-701, Korea

한 관점에서 본 연구자들도 국내 전통 산채류들을 대상으로 생체조절성 기능성분들을 탐색하던 중 고사리로부터 면역계의 일부분인 보체계(complement system)를 활성화하는 기능성 다당류들을 분리하여⁽⁴⁾ 그 구조와 작용기전^(5,7)을 밝힌 바 있다.

보체계는 주요 면역세포들의 면역반응에 직접적으로 관여하고 있는데, 그 예로서 림프구, 대식세포 등의 면역세포에 보체계 활성화 분해산물들의 수용체가 존재하는 것과, 주요 보체 분해산물들(C3a, C4a, C5a)이 백혈구에 대하여 화학주화능(chemotaxis)을 나타내고, 호염구, 비만세포의 분화 및 호르몬과 유사한 생물활성을 나타내는 것을 들 수 있다⁽⁶⁾. 또한 보체 분해산물인 C4b와 C3b는 항원에 부착한 후 호중구, 자연살해세포 및 대식세포 등에 존재하는 수용체를 매개로 하여 항원을 제거시키는 opsonin으로 작용하는 것으로 알려져 있다⁽⁶⁾.

일반적으로 고사리 섭취에 있어서 부정적인 측면이 더 강하게 인식되어져 왔으나 최근 저자들의 연구결과들^(4,7)에 의하면 고사리 다당류들은 인체 보체계와 대식세포의 활성화에 관여하고 있음이 확인되었다. 이 중 고사리 냉수 추출물에서 분리한 보체계 활성화 성분인 단백다당획분(*Pteridium aquilinum* glycoprotein, PAG)은 단백질과 당이 약 4:6 정도로 구성되어 있으며 보체계 양경로를 모두 활성화시키는 것으로 밝힌 바 있다⁽⁴⁾. 본 연구에서는 기 보고한 바 있는 고사리 기원 보체계 활성화 성분들^(4,7)의 면역조절기능을 검토하고자 하였다. 즉 PAG가 보체계 활성화 작용이외에 면역조절기능도 있는지를 시험하고자 하였고, 또한 PAG의 단백질성과 다당성분중 어떤 성분이 면역조절기능에 관련이 있는지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

고사리(*Pteridium aquilinum*)의 단백다당획분(PAG)은 설악산 건조 고사리의 수추출물로부터 정제한 것을 실험에 사용하였다. 단백다당획분(PAG)으로부터 조다당획분(crude polysaccharide fraction)과 조단백획분(crude protein fraction)은 다음과 같은 방법으로 조제하였다. 단백다당획분(PAG) 50 mg을 10 mM CaCl₂가 함유된 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.9) 50 mL에 용해시킨 후 10 mg의 pronase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.)를 가하여 37°C에서 48시간 동안 반응시킨 후 원심분리, 중화, 투석, 동결건조 시킴으로써 pronase소화물을 조제하여 조다당획분으로 사

용하였다. 조단백획분의 제조에 있어서는 단백다당획분(PAG) 50 mg을 50 mM acetate buffer (pH 4.5) 50 mL에 용해시킨 다음 50 mM sodium periodate (NaIO₃)를 가하여 혼합물을 4°C 암소에서 3일간 반응시킨 후 periodate 산화물을 얻어 조단백획분으로 사용하였다. 한편 정제다당획분(purified polysaccharide fraction)은 고사리 단백다당획분(PAG)로부터 본 연구자들의 이전의 연구논문에서 서술되어 있는 방법⁽⁴⁾에 의거하여 조제하였다.

항체생성능 및 비장세포 증식능 측정에 쓰인 HEL (hen egg lysozyme), normal goat serum, goat anti-mouse IgG, o-phenylenediamine, PHA (phytohemagglutinin) 및 LPS (lipopolysaccharide) 등은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였으며 [³H]-thymidine은 New England Nuclear Co. (5 Ci/mmol, Boston, MA, U.S.A.)로부터 구입하였다. 그 외 다른 시약들은 표준시약 제조회사로부터 reagent grade의 시약을 구입하여 사용하였다.

실험동물 및 시험물질 투여

8~10주령(25~30 g)의 웅성 BALB/C 마우스를 대조군(생리식염수 투여군), PAG 50, 100, 500 µg/kg 투여군으로 분리하여 1주일간 순화시킨 다음 시험을 실시하였으며, 시험물질은 마우스 복강내로 1주일에 1회씩 총 2회 투여하거나 1일 1회 총 14일간 투여하였다. HEL 2 mg/body를 시험물질투여 1일과 8일째에 복강내 투여하여 HEL에 대한 항체생성을 유도하였다. 시험시작시와 종료시 각 군의 마우스의 체중을 측정한다. 다음, 마우스를 에테르 마취시켜 심장채혈하고 비장 및 흉선을 적출하여 무게를 측정하였다. 비장세포 증식능 측정시험을 위한 동물에는 HEL을 투여하지 않고 시험물질로만 투여하였다.

항체생성능 측정

감작항원 HEL에 대한 마우스 IgG 항체가는 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)시험법으로 측정하였다. 먼저 HEL을 carbonate buffer (pH 9.6)에 50 µg/mL로 용해시킨 다음 96-well plate의 각 well당 100 µL씩 가한 후 4°C에서 24시간 반응시켜 HEL을 plate에 부착시켰다. 0.05% Tween 20이 함유된 인산완충생리식염수(PBST)로 각 well을 세척한 후 5% normal goat serum이 함유된 PBST를 각 well당 200 µL씩 넣고 37°C에서 60분간 방치하여 비특이적 결합부위를 차단하였다. PBST로 plate를 세척한 후 마우스에서 얻어진 항혈청을 5% normal goat serum이 함유된 PBST에 1:100으로 희석한 후 100 µL씩 가하고 37°C에서

90분간 방치하였다. 그 후 peroxidase가 결합된 goat anti-mouse IgG를 각 well에 가하여 반응시킨 다음 5% normal goat serum이 함유된 PBST로 세척하였다. 각 well에 *O*-phenylenediamine용액 100 μ L를 가하여 암소에서 15분간 반응시켰으며 반응정지후의 각 well에서의 발색정도를 490 nm의 파장에서 ELISA reader (Molecular Devices, U.S.A.)로 측정하였다⁽¹⁰⁾.

비장세포 증식능 측정

PAG가 투여된 마우스로부터 얻은 비장세포를 RPMI-1640 배지⁽¹¹⁾에 현탁시켜 1×10^6 cells/mL로 조정된 후 96 well plate의 각 well에 200 μ L씩 분주한 다음 mitogen으로 PHA와 LPS를 10 μ g/mL이 되도록 첨가하고 3일간 배양하였다. 그 후 ³H-thymidine을 각 well당 1 μ Ci씩 첨가하여 18시간 더 배양한 다음, -70°C deep freezer에 넣어 성장을 정지시켰다. 동결된 plate를 녹인 후 cell harvester (Inotech, Switzerland)를 이용하여 glassfiber용지에 수확한 후, liquid scintillation counter를 사용하여 incorporation된 [³H]-thymidine의 양을 측정하였다. *In vitro* 실험의 경우에는 마우스로부터 비장세포를 분리하여 2×10^6 cells/mL가 되도록 조정된 후 96 well plate의 각 well에 100 μ L씩 분주하고 0.45 μ m의 Nalgene syringe filter를 이용하여 여과한 각 시험물질 100 μ L로 처리하였다. 그 후 앞에 서술한 바와 같은 방법으로 mitogen을 가하여 배양한 다음 incorporation된 [³H]-thymidine의 양을 측정하였다⁽¹¹⁾.

통계처리

모든 실험결과를 mean+standard deviation으로 나타

내었고 one way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 통계처리 하였으며, 각 군간의 차이는 Bonferonni의 modified t-test를 사용하여 P<0.05 혹은 P<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다⁽¹²⁾.

결과 및 고찰

PAG의 마우스 체중 및 면역장기의 무게에 미치는 영향

PAG가 50~500 μ g/kg을 1주일 간격으로 2회 투여한 군과 14일간 매일 투여한 군의 체중을 관찰한 결과는 Table 1에 기재되어 있다. PAG를 1주일간격으로 2회 투여한 군에 있어서는 대조군과 비교하여 체중, 상대적 비장 및 흉선무게에 있어서 아무런 영향을 미치지 않았다. 한편 14일간 매일 투여한 군에 있어서도 체중, 상대적 비장 및 흉선무게에 있어서 통계적인 유의성이 있는 변화를 관찰할 수 없었다. 다만 500 μ g/kg 투여군에 있어서 체중이 약간 감소하는 경향을 나타내었고, 상대적 비장무게가 약간 증가하는 경향을 나타내었다.

PAG가 항체생성능에 미치는 영향

PAG가 항체생성능에 미치는 영향에 대하여 시험하고자 세포의존성 항원으로 알려진 HEL을 사용하여 1주일 간격으로 두 차례 면역시키면서 PAG를 1주일 간격으로 2회 투여하거나 14일간 매일 투여하였다. Fig. 1A에 나타난 바와 같이 단백당화획분(PAG)을 1주일 간격으로 2회 투여한 경우 용량 의존적으로 항체생성능이 증가되는 것을 알 수 있었으며, 500 μ g/

Table 1. Effects of PAG administration on body, thymus and spleen weights

Treatment protocol	Group	% Change of ³⁾ body weight	Relative spleen ⁴⁾ weight	Relative thymus ⁵⁾ weight
A ¹⁾	Control	103.47 \pm 4.58 ⁶⁾	4.91 \pm 1.19	1.44 \pm 0.03
	PAG 50 μ g/kg	106.72 \pm 4.68	4.42 \pm 0.93	1.49 \pm 0.40
	PAG 100 μ g/kg	105.55 \pm 5.88	4.71 \pm 0.80	1.58 \pm 0.48
	PAG 500 μ g/kg	107.69 \pm 6.23	4.80 \pm 1.01	1.49 \pm 0.37
B ²⁾	Control	103.25 \pm 3.35	4.93 \pm 2.32	1.44 \pm 0.07
	PAG 50 μ g/kg	104.48 \pm 7.25	5.15 \pm 0.86	1.44 \pm 0.35
	PAG 100 μ g/kg	105.45 \pm 6.39	5.04 \pm 1.13	1.50 \pm 0.35
	PAG 500 μ g/kg	101.57 \pm 3.21	5.53 \pm 0.71	1.39 \pm 0.42

¹⁾BALB/C mice were intraperitoneally immunized with HEL (2 mg/mouse, on day 1 and day 8) and injected with PAG (50, 100, 500 μ g/kg, on day 1 and day 8) or saline.

²⁾BALB/C mice were intraperitoneally immunized with HEL (2 mg/mouse, on day 1 and day 8) and injected with PAG (50, 100, 500 μ g/kg, on 14 consecutive days) or saline.

³⁾% change of body weight=(final body weight/initial body weight) \times 100

⁴⁾Relative spleen weight=spleen weight (mg)/body weight (g)

⁵⁾Relative thymus weight=thymus weight (mg)/body weight (g)

⁶⁾Data is presented as a mean \pm standard deviation (n=10 in each group).

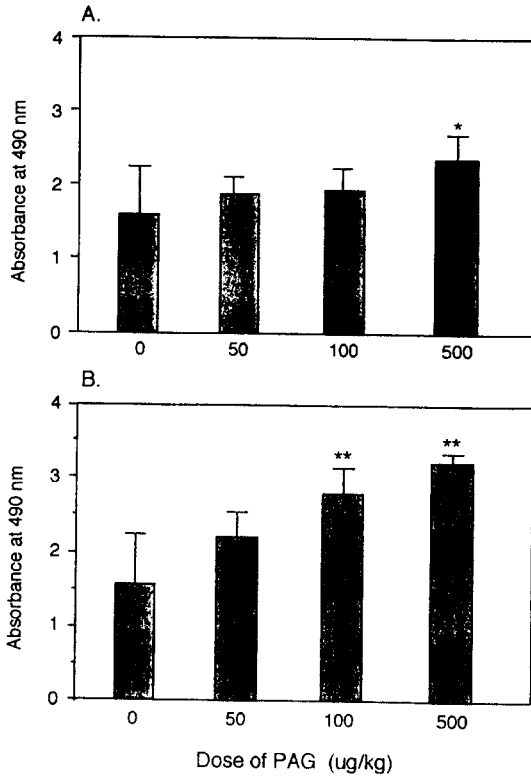


Fig. 1. Effect of PAG administration on the humoral immune response to HEL in BALB/C mice. Panel A. BALB/C mice were intraperitoneally immunized with HEL (2 mg/mouse, on day 1 and day 8) and injected with PAG (50, 100, 500 µg/kg, on day 1 and 8). The ELISA was performed on the 15th day as described in "Materials and Methods". Data shown are the mean \pm standard deviation (n=10 in each group). *: significantly different from the value in the control group at P<0.05. Panel B. BALB/C mice were intraperitoneally immunized with HEL (2 mg/mouse, on day 1 and day 8) and injected with PAG (50, 100, 500 µg/kg, on 14 consecutive days). The ELISA was performed on the 15th day as described in "Materials and Methods". Data shown are the mean \pm standard deviation (n=10 in each group). **: significantly different from the value in the control group at P<0.01.

kg을 투여했을 경우에는 대조군과 비교하여 항체생성 능이 약 53.4% 증가하였다(P<0.05). PAG를 14일간 연속 투여했을 경우에도 투여용량에 비례하여 HEL에 대한 항체생성능이 증가하였으며(Fig. 1B), 100 µg/kg 과 500 µg/kg 투여군에서는 대조군과 비교시 각각 82.8%, 109.7% 증가하여 유의적인 증가를 보였다 (P<0.01). 이 실험으로부터 PAG가 항체생성능을 증가 시키며, 1주일 간격으로 2회 투여시보다 14일간 매일 투여시 항체생성능 증가에 대한 효과를 더 크게 나타 내었음을 알 수 있었다. 이 실험에 근거하여 이후의

실험에 있어서는 시험물질 투여에 있어서 14일간 매일 투여하는 protocol을 채택하여 사용하였다.

PAG가 비장세포 증식능에 미치는 영향

PAG가 비장세포 증식능에 미치는 영향에 대하여 시험하기 위하여 용량별로(50, 100, 500 µg/kg) 14일간 투여한 후 비장세포를 분리하여 B cell specific mitogen인 LPS와 T cell specific mitogen인 PHA에 대한 비장세포 증식능을 측정하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 PAG은 대조군과 비교하여 B cell specific mitogen인 LPS에 대한 비장세포의 증식능을 크게 증가시킴을 알 수 있었다(control: 11384 \pm 2742 cpm; 50 µg/kg: 21475 \pm 4684 cpm, P<0.01; 100 µg/kg: 29076 \pm 4903 cpm, P<0.01; 500 µg/kg: 26128 \pm 3348 cpm, P<0.01). 한편 PHA에 대한 반응도 LPS에 대한 반응만큼 크지는 않지만 용량의존적으로 증가시킴을 알 수 있었다(control: 4900 \pm 405 cpm; 50 µg/kg: 5326 \pm 724 cpm; 100 µg/kg: 6651 \pm 1007 cpm, P<0.01; 500 µg/kg: 10188 \pm 1970 cpm, P<0.01). 이상의 실험결과 HEL에 대한 항체가를 측정 한 시험에서의 결과와 마찬가지로 단백질다당화분(PAG)은 체액성 면역능을 크게 증가시킴을 알 수 있었고 또한 세포성 면역능도 증가시킴을 알 수 있었다.

이와 같은 PAG에 의한 비장세포 증식능 증가가 비장임파구에 대한 직접적인 작용인지의 여부를 시험하기 위하여 마우스로부터 비장세포를 분리한 후 *in vitro*상에서 여러 가지 농도의 PAG로 처치한 다음 LPS와 PHA에 대한 분열능을 측정하였다. Fig. 3에 나

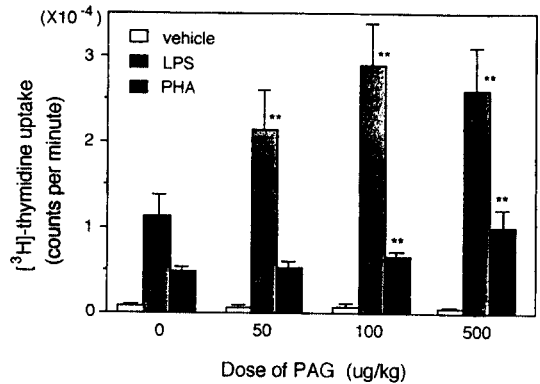


Fig. 2. Effect of PAG administration on the blastogenic responses of splenocytes. BALB/C mice were injected with PAG (50, 100, 500 µg/kg, on 14 consecutive days) or saline. The splenocytes were isolated, stimulated with LPS or PHA for 72 hours and pulsed with [³H]-thymidine for 18 hours. Data shown are the mean \pm standard deviation (n=10 in each group). **: significantly different from the value in the control group at P<0.01.

타난 바와 같이 PAG는 6.25~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 B-cell specific mitogen인 LPS에 대한 비장세포의 증식 반응을 농도 의존적으로 증가시켰다(control: 22732 ± 4533 cpm; 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 39082 ± 2612 cpm, $P < 0.01$; 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 41325 ± 4408 cpm, $P < 0.01$; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 43020 ± 4530 cpm, $P < 0.01$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$: 52652 ± 9012 cpm, $P < 0.01$). 한편 이와는 대조적으로 단백다당획분(PAG)은 *in vitro*상에서 T cell specific mitogen인 PHA에 대하여는 증식효과를 나타내지 않았다. 또한 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 PAG로 처치시에는 mitogen처리시 뿐만 아니라 basal한 상태에서도 약간의 분열능 증가가 관찰되었다. 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 PAG로 처치한 경우에는 오히려 분열능에 크게 감소하는 현상이 관찰되었는데 이는 고농도의 PAG에 의한 세포독성때문인 것으로 사료된다(data not shown). 이상의 실험결과 마우스에 PAG 투여시 관찰되는 체액성 면역능 증가는 고사리 단백다당획분(PAG)의 비장세포에 대한 직접적인 작용과 관련이 있을 것으로 생각된다. 한편 PAG 투여에 의한 세포성 면역능의 증가는 T cell에 대한 직접적인 작용이 아닌 체내의 다른 경로를 통한 작용으로 생각된다.

조단백획분, 조다당획분 및 정제다당획분이 항체생성 등에 미치는 영향

PAG의 단백성분과 다당성분중 어떤 성분이 면역능

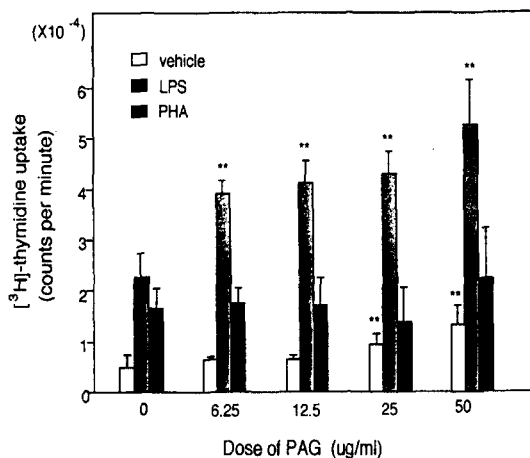


Fig. 3. Effect of *in vitro* exposure to PAG on the blastogenic responses of splenocytes. Splenocytes were isolated from BALB/C mice and exposed to PAG *in vitro*. The splenocytes were stimulated with PHA or LPS for 72 hours and pulsed with [³H]-thymidine for 18 hours. Data shown are the mean \pm standard deviation (n=10 in each group). **: significantly different from the value in the control group at $P < 0.01$.

증가에 관련이 있는 가를 시험하기 위하여 PAG를 periodate로 산화시킨 조단백획분 및 pronase로 소화시킨 조다당획분을 조제하였다. PAG의 pronase소화 후의 화학적 조성을 분석한 결과 모다당에 비하여 약 80%의 단백질이 제거되었으며 periodate 산화후의 PAG는 단백질은 거의 잔존하였으나 60% 당부분을 제거할수 있었다(결과생략). 단백질과 다당류를 선택적으로 분해함으로써 나타나는 면역활성의 변화는 이들의 역할을 예견하는데 큰 무리가 없다고 판단되었으므로 조단백획분(500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 및 조다당획분(500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)을 마우스에 14일간 매일 투여한 후 면역장기 및 HEL에 대한 항체 생성능에 미치는 영향에 대하여 시험하였다. 또한 본 연구자들의 이전의 연구⁽⁴⁾에서 보체를 활성화시키는 것으로 알려져 있는 고사리의 정제다당획분(500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)에 대하여도 시험하였다.

Table 2에 나타난 바와 같이 정제다당 투여군에서는 대조군과 비교하여 체중에 있어서 아무런 차이가 관찰되지 않았으나 조단백 및 조다당 투여군에 있어서는 대조군과 비교하여 약간의 체중감소가 관찰되었다. 한편 상대적 비장무게에 있어서는 대조군과 비교하여 조단백, 조다당 및 정제다당 투여군 모두에서 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적인 유의성은 없었으며, 상대적 흉선무게에 있어서는 별다른 변화가 관찰되지 않았다. HEL에 대한 항체 생성능에 미치는 영향에 있어서는 대조군과 비교하여 조단백투여군에서 유의성 있는 증가가 관찰된 반면, 조다당 및 정제다당 투여군에 있어서는 아무런 변화가 관찰되지 않았다 (Fig. 4). 이상의 실험결과 고사리 단백다당획분(PAG)에 의한 항체생성능 증가는 다당부위보다는 단백질부위에 의한 것임을 알 수 있었다. 이와 같이 고사리추출물의 단백질성분이 면역활성 증대효과를 나타내는 활성분체라는 시험결과는 일반적으로 식물유래성분의 면역활성 증강효과가 다당성분에 의한 경우가 많은 것^(13,14)을 고려해 볼 때 주목할 만한 결과라고 생각된다.

이상의 실험결과들은 고사리추출물의 면역조절작용을 면역계를 구성하고 있는 주요세포인 B 및 T 림프구에 대하여 세포수준에서 일차적으로 시험한 것이다. 고사리중의 단백다당류를 정구섭취시의 임상효과에 관한 가능성은 지금 단계에서는 명확하게 예견이 불가능하지만 장관에 존재하는 면역계에 접촉하여 활성을 나타낼 가능성이 있다고 생각된다. 향후 고사리의 각 분획 특히 조단백분획으로부터 분리 정제된 특정 물질에 대하여 면역활성을 촉진하는 효과를 확인하게 되면 이는 인체 면역기능 강화 물질의 개발이라는 점에서 큰 의의가 있을 것으로 사료된다.

Table 2. Effects of crude protein fraction, crude polysaccharide fraction and purified polysaccharide fraction of PAG on body, thymus and spleen weights

Group ¹⁾	% Change of body weight ²⁾	Relative spleen weight ³⁾	Relative thymus ⁴⁾ weight
Control	112.66 ± 1.47 ⁵⁾	4.55 ± 0.53	1.46 ± 0.28
Crude protein 500 µg/kg	103.14 ± 3.28**	5.25 ± 0.42	1.52 ± 0.19
Crude polysaccharide 500 µg/kg	105.93 ± 2.62**	4.85 ± 0.62	1.38 ± 0.12
Purified polysaccharide 500 µg/kg	111.85 ± 2.71	5.19 ± 0.76	1.57 ± 0.26

¹⁾BALB/C mice were intraperitoneally injected with crude protein fraction, crude polysaccharide fraction or purified polysaccharide fraction of PAG (500 µg/kg, on 14 consecutive days) or saline.

²⁾% change of body weight=(final body weight/initial body weight) × 100

³⁾Relative spleen weight=spleen weight (mg)/body weight (g)

⁴⁾Relative thymus weight=thymus weight (mg)/body weight (g)

⁵⁾Data is presented as a mean ± standard deviation (n=10 in each group).

** : significantly different from control at P<0.01

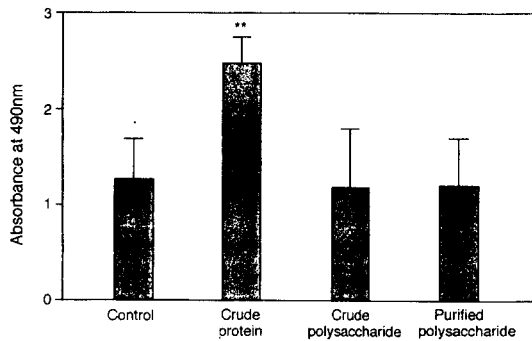


Fig. 4. Effect of crude protein fraction, crude polysaccharide fraction and purified polysaccharide fraction of PAG on the humoral response to HEL in BALB/C mice. BALB/C mice were intraperitoneally immunized with HEL (2 mg/mouse, on day 1 and day 8) and injected with crude protein fraction, crude polysaccharide fraction or purified polysaccharide fraction of PAG (500 µg/kg, on 14 consecutive days), respectively. The ELISA was performed on the 15th day as described in "Materials and Methods". Data shown are the mean ± standard deviation (n=10 in each group). **: significantly different from the value in the control group at P<0.01.

장세포를 분리하여 phytohemagglutinin (PHA) 혹은 lipopolysaccharide (LPS)에 대한 비장세포 증식능을 측정된 결과, PAG 투여군에 있어서는 PHA와 LPS유도 비장세포 증식능이 용량 의존적으로 증가되었음이 관찰되었다. 비장세포 증식능에 대한 *in vitro* 시험결과 LPS에 대한 반응증가는 단백질당획분(PAG)의 세포에 대한 직접적인 작용에 의하며, PHA에 대한 반응증가는 세포에 대한 직접적인 작용은 아님을 알 수 있었다. PAG의 항체생성능 증가에 기여하는 활성부위를 규명하기 위하여 periodate산화 및 pronase소화를 실시하여 얻어진 각각의 조단백, 조다당획분들과 고사리 수추출물에서 정제된 정제다당획분이 항체생성능에 미치는 영향에 대하여 시험하였다. 시험결과 조다당투여군과 정제다당 투여군에서는 항체생성능 증가가 관찰되지 않았으나 periodate 산화물인 조단백 투여군에서 뚜렷한 항체생성능을 확인할 수 있었으며, 이와 같은 실험결과 PAG의 단백질분이 항체생성능 증가에 있어서 주요 활성분체임을 알 수 있었다.

요 약

고사리 수추출물에서 분리된 단백질당획분(*Pteridium aquilinum* glycoprotein, PAG)이 마우스 면역계에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BALB/C 마우스의 복강내에 14일간 반복 투여한 후 마우스의 체중 및 면역장기의 무게변화를 관찰하면서 마우스 항체생성능과 비장세포 증식능에 대하여 조사하였다. PAG를 용량별(0~500 µg/kg)로 투여한 결과 마우스 체중변화와 면역장기에는 커다란 효과를 관찰할 수 없었으나, HEL에 대한 항체생성능에 있어서는 500 µg/kg 투여시 뚜렷한 증가를 보였다. 시험물질을 투여한 마우스로부터 비

감사의 글

본 연구는 1996년도 농림수산특정연구과제 첨단기술개발사업 가공분야 연구비에 의해 수행된 연구결과 의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Youk, C.S.: Source Book of Korean Medicinal Plant (in Korean). Academic Press, Seoul, Korea, p. 28-30 (1989)
2. Takauki, N., Kimiaki, S., Emiko, H., Kumi, U., Kiyotaka, K., Shinsaku, N., Naoko, M., Shigeo, I. and Taijiro, M.: Mutagenicity of ptaquilosid, the carcinogen in barcken and its related illudane-type sesquiterpense, *Mutation Res.*, 173, 215-220 (1989)

3. Hirono, I., Shibuya, C., Fushimi, K. and Haga, M.: Studies on carcinogenic properties of bracken, *Pteridium aquilinum*, *J. Nat'l Cancer Inst.*, **45**, 179-183 (1970)
4. Kweon, M.H., Sung, H.C. and Yang, H.C.: Acidic heteroglycans with anti-complementary activity from the water extract of *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. *Foods Biotechnol.*, **3**, 83-88 (1994)
5. Kweon, M.H., Kim, H.I., Sung, H.C. and Yang, H.C.: Core structure of the anti-complementary acidic polysaccharide (PA-IIa-1) from water extract of *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. *Foods Biotechnol.*, **3**, 137-143 (1994)
6. Kweon, M.H., Ra, K.S. and Yang, H.C.: Partial structure of the neutral side chains of PA-IIa-1, an anti-complementary polysaccharide isolated from bracken. *Foods Biotechnol.*, **4**, 101-107 (1995)
7. Kweon, M.H. and Sung, H.C.: Structural comparison in the four anti-complementary polysaccharides isolated from *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* (bracken), *Foods Biotechnol.*, **5**, 136-141 (1996)
8. Sim, R.N., Malhotra, V., Ripoche, J., Day, A.J. and Sim, E.: Complement receptors and related complement control proteins. *Biochem. Soc. Symp.*, **51**, 83-87 (1986)
9. Marcus, R.L., Shin, H.S. and Mayer, M.M.: An alternate complement pathway. C3 cleaving activity, not due to C42a, on endotoxic lipopolysaccharide after treatment with guinea pig serum. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**, 1351-1357 (1971)
10. Yoon, E.Y., Shin, J.S., Park, H.A., Kim, M.Y., Sunwoo, Y. and Han, H.M.: The effect of methamphetamine on the immune organs and the antibody production. *The J. Applied Pharmacology*, **2**, 54-58 (1994)
11. Shin, J.S., Park, H.A., Chung, T.C., Kim, P.S., Shon, H. S., Sunwoo, Y. and Han, H.M.: The effect of methamphetamine on the pulmonary metastasis of B16 melanoma cells. *The J. Applied Pharmacology*, **3**, 273-278 (1995)
12. Wallenstein, S., Zucker, C.L. and Fleiss, J.L.: Some statistical methods useful in circulation research. *Circ. Res.*, **47**, 1-9 (1980)
13. Kiyohara, H., Yamada, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y.: Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba* and molecular aggregation and anti-complementary activity of arabinogalactan from *Angelica acutiloba*. *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, 339-347 (1986)
14. Yamada, H., Nagai, T., Cyong, J.C. and Otsuka, Y.: Mode of complement activation by acidic heteroglycans from the leaves of *Artemisia princeps* PAMP. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2077-2081 (1991)
15. Delvin, R.G., Schwartz, N.L., Mackey, H.K. and Baronwsky, P.E.: The effect of cyclophosphamide and cyclophosphamid plus acetylcysteine on the *in vivo* and *in vitro* mixed lymphocyte reaction. *Transplant*, **17**, 70-75 (1974)

(1998년 4월 13일 접수)