

## 홍화(*Carthamus tinctorius* L.)잎으로부터 분리한 다당류의 Macrophage 활성화에 대한 연구

곽지은\* · 김경임 · 전 혁 · 홍범식<sup>†</sup> · 조홍연 · 양한철

고려대학교 생명공학원

\*고려대학교 자연자원대학원

### Study of Macrophage Stimulating Activity of the Polysaccharide Isolated from Leaves of *Carthamus tinctorius* L.

Ji-Eun Kwak\*, Kyung-Im Kim, Hyuck Jeon, Bum-Shick Hong<sup>†</sup>, Hong-Yon Cho and Han-Chul Yang

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

\*Graduate School of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea

#### Abstract

In the screening of Korean traditional tea sources for the cellular lysosomal enzyme activity of peritoneal macrophage from mice, CT-0, a cold-water extract from *Carthamus tinctorius* L., showed the highest macrophage-stimulating activity. CT-1-IIa-2-1, a purified macrophage-stimulation polysaccharide was obtained by a series of purification steps such as anion exchange chromatography with DEAE-Toyopearl 650M, gel permeation chromatography with Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200, and HPLC with Superdex G-75. The molecular weight of homogeneous purified polysaccharide was estimated about 68 kDa. CT-1-IIa-2-1 consisted of xylose 27.44%, arabinose 16.14%, mannose 15.92% and glucose 14.47%. To measure acute toxicity, dose of 50, 100, 500, and 1000 mg/kg were intraperitoneally injected to ICR mice. The LD<sub>50</sub> was about 397 mg/kg.

**Key words:** *Carthamus tinctorius*, polysaccharide, macrophage, LD<sub>50</sub>

#### 서 론

식품을 비롯한 천연물질에서 생리활성 조절물질(biological response modifier: BRM)을 찾아내어 이를 인류의 건강 유지와 증진에 활용하고자 하는 연구가 현재 활발히 진행되고 있다(1).

식물성 다당류는 수용성 다당류로서 진해제, 소염제, 피부병 치료제, 식사요법제, 완하제, 건위제, 면역부활제 등으로 다양하게 이용되어 왔다. 최근에는 효소에 비활성을 나타내고 종양이나 알러지를 유발하지 않으며 물리, 화학적으로 안정하고 순수한 다당류가 담자균류를 비롯하여 진균류, 효모류, 세균, 지의류, 해조류, 고등식물 등에서 분리·정제되고 있다(2).

Macrophage는 골수로부터 생산되는 탐식세포로서 체내로 들어온 이물질을 비특이적으로 탐식하고 소화하며, nitric oxide나 hydrogen peroxide와 같은 각종 세포독성물질을 분비하여 이종세포나 암세포를 파괴하는 면역세포이다. 또한 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 IL-1, IL-6, 그

리고 TNF- $\alpha$ 와 같은 여러가지 cytokine과 phosphatase와 같은 enzyme을 분비하여 체내 면역현상을 조절하며 염증반응, 조혈기구 등에도 관여하는 면역계의 주요방어 기구이다(3). Macrophage는 이물질에 대한 직접적인 탐식치사 뿐만 아니라 면역조절 기능과 phagocytic activity를 갖고 있으며 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 oxygen free radical 등을 분비함으로써 종양세포를 제거하는 기능도 가지고 있다(4).

홍화의 약리효과를 나타내는 성분 중 플라보노이드류가 주로 연구되어져 왔으며 최근에는 새로운 몇 개의 플라보노이드(flavonoid)가 새로이 발견되어 홍화의 약리효과를 지속적으로 증명하고 있다(5).

본 실험에서는 홍화로부터 macrophage 활성화 다당체를 분리, 정제하여 면역증강효과를 확인하고 이 물질에 대한 화학적 특성 및 독성을 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 실험재료 및 시약

본 실험에서 사용한 전통차 제조용 식물(63종)은 일부 농

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: bumshik@tiger.korea.ac.kr  
Phone: 82-2-3290-3926, Fax: 82-2-3290-3427

협 중앙연구소에서 공급받았으며 일부는 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 특히 홍화(*Carthamus tinctorius* L.)잎은 원산지가 경북 상주이며 건조된 상태로 구입하여 사용하였다. Macrophage의 활성화 측정시 이용되는 시약인 thio-glycollate medium은 Difco(Difco Laboratories, Detroit, MI)로부터 구입하였고 RPMI 1640 medium과 fetal bovine serum(FBS) 및 DMEM medium은 Gibco BRL(Grand Island Co., NY., USA)로부터 그리고 lypopolysaccharide(*E. coli* O26:86, LPS)와  $\rho$ -nitrophenylphosphate, disodium(PNPP) 및 RAW 264.7 세포주의 분리를 위해 사용하는 1% trypsin은 Sigma(St. Louis MO., USA)사로부터 구입하여 사용하였다.

#### 실험동물

5~8주령의 웅성 ICR mouse를 대한실험동물연구소로부터 분양받아 무균 chamber에서 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 실험동물은 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도 55~60%에서 1일 12시간씩 점등하에 물과 사료를 자유로이 급식시키면서 사육하였다.

#### 검색용 시료의 조제

전통차 제조용 식물 63종에 대하여 7,000 rpm에서 30분간 homogenizer(IKA Labotecnik Co., Ultra-turrax T50)로 분쇄한 후, 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 농축, 동결건조하여 Fr. I을 얻었고, 침전물은 용매의 극성도에 따라 연속적으로 hexane, methanol, 증류수의 순으로 2시간 동안 환류추출한 후 각각의 상등액을 농축, 동결건조하여 Fr. II, III, IV를 얻어 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 macrophage 활성화 측정에 사용하였다.

#### Cell line

Murin macrophage 세포주인 RAW 264.7은 고려대학교 의과대학 손정원 교수님 실험실에서 분양받아 배양하여 nitric oxide의 발생량을 측정하였다.

#### 일반성분 분석

전당 함량은 glucose를 표준 물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(6)으로, 산성당 함량은  $\beta$ -D-galacturonic acid를 표준 물질로 하여 m-hydroxydiphenyl법(7)으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Lowry법(8)으로 각각 정량하였으며 구성당 분석은 Jones와 Albersheim의 방법(9)에 따라 시료(2 mg)를 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography(GC)로 분석하였다.

#### Macrophage lysosomal enzyme activity 측정

Mouse의 복강 내에 1.0 mL의 thio-glycollate medium을 주입한 뒤 48~72시간 내에 복강액을 회수하여  $1 \times 10^6$ 개/mL이 되도록 세포수를 맞춘 후 96-well plate에 200  $\mu\text{L}$ 씩 분주하였다. 계속하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 2시간 동

안 배양하여 얻어진 macrophage monolayer에 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지와 시료를 처리하여  $\text{CO}_2$  incubator에서 24시간 배양하여 macrophage를 활성화시켰다. 활성화된 macrophage의 monolayer에 0.1% triton X-100을 가하여 macrophage의 세포막을 용해시켜 이 때 분비되는 enzyme을  $\rho$ -nitrophenyl phosphate와 citrate buffer를 이용하여 반응시킨 후 borate buffer를 가하여 ELISA reader(Bio-rad 3550-UV)로 405 nm에서 측정하였다(10).

#### Nitric oxide 생성능 측정

Keller 등(11)의 방법에 따라 macrophage의 배양액에 시료를 첨가하여 24시간동안 활성화시키고, 96-well plate에 그 상등액과 Griess reagent를 각각 100  $\mu\text{L}$ 씩 가하여 5분간 방치한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Macrophage 활성화 물질 다당의 정제

건조하여 분쇄한 홍화 1 kg을 7,000 rpm에서 30분간 homogenizer(IKA Labotecnik Co., Ultra-turrax T50)로 균질화한 후, methanol 환류, ethanol 침전을 실시하여 조다당 획분 CT-1을 조제하였다. CT-1을 DEAE-Toyopearl 650M column( $\text{Cl}^-$  form,  $3.5 \times 29$  cm)에 흡착시킨 후 증류수, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 및 2.0 M NaCl 용액으로 차례로 용출시켜 9개의 획분(CT-1-I, CT-1-IIa, CT-1-IIb, CT-1-III, CT-1-IV, CT-1-V, CT-1-VI, CT-1-VII, CT-1-VIII)을 얻었다. 이들 획분 중 주요 활성 획분인 CT-1-IIa를 Sepharose CL-6B column( $1.7 \times 82$  cm)을 통과시켜 CT-1-IIa-1, CT-1-IIa-2, CT-1-IIa-3의 획분을 얻었으며 Sephacryl S-200 column( $1.5 \times 44$  cm)을 적용하여 정제다당 CT-1-IIa-2-1을 얻었다.

#### Macrophage 활성화 물질 본체

Macrophage 활성을 나타낸 조다당 획분인 CT-1(30 mg)을 Yamada 등의 방법(12)에 따라 periodate( $\text{NaIO}_4$ ) oxidation과 pronase digestion을 실시하였다.

#### 정제 다당의 순도 및 분자량 측정

최종 정제 다당인 CT-1-IIa-2-1의 순도는 HPLC(Waters 2690, Superdex 75HR 10/30, GPC type,  $10 \times 310$  mm, RI, 0.2 M NaCl, 0.3 mL/min)를 실시하여 측정하였으며 dextran T-500(MW:  $5 \times 10^5$ ), T-70(MW:  $7 \times 10^4$ ), T-40(MW:  $4 \times 10^4$ ) 및 glucose를 표준물질로 사용하여 비교 측정하였다.

#### 급성 독성 시험

단기 급성 독성을 시험하기 위해 CT-1-IIa 획분을 대조군과 50, 100, 500 및 1,000 mg/kg 투여군으로 분리, 시료용액을 단회 복강투여하였다. 2주간 일반상태 및 체중의 변화, 중독증상 및 사망유무를 관찰하였으며(13,14), 사망한 동물의 사망률과 사망에 이르기까지의 시간과의 상관관계를 이용하여  $\text{LD}_{50}$ 을 측정하였다.

결과 및 고찰

차 제조용 식물로부터의 macrophage 활성화 물질 검색

Table 1에 나타난 바와 같이 전통차 제조용 식물(63종)에 대하여 macrophage lysosomal enzyme 활성을 검색한 결과, 홍화(*Carthamus tinctorius*) 냉수 추출물, 현미(*oryzae sativa*) 냉수추출물, 홍화(*Carthamus tinctorius*) 열수추출물, 녹차(*Cinamonum campora*) 냉수추출물, 잔대(*Adenophora tryphilla var. japonica*) 냉수추출물이 비교적 높은 활성을 보였으며, 이 중 홍화의 냉수 추출물이 가장 높은 macrophage lysosomal enzyme 활성을 나타냈다(Fig. 1).

Macrophage 활성화 본체의 확인

최근 천연물 및 생약의 물 추출물 중 고분자 획분에서 다양한 약리 활성이 보고되고 있는데 특히 펙틴류에 대한 높은 활성이 보고되고 있다(15). 조다당 획분인 CT-1에서 macrophage lysosomal enzyme 활성을 나타내는 물질을 확인하기 위하여 periodate 처리를 한 경우, 8% 정도의 활성 감소를 보인 반면, pronase 처리를 한 시료에서는 8% 정도의 활성이 증가되었다(Fig. 2).

이 결과로 보아 본 실험에서 선택된 홍화에서도 macrophage lysosomal enzyme 활성을 나타내는 주 물질은 다당 부분인 것을 알 수 있지만 단백질 부분도 어느 정도는 macrophage 활성화에 관여하는 것으로 추측된다.

Macrophage 활성화 물질의 정제

추출과정 중에서 초기 냉수 추출물인 CT-0와 ethanol 침전 획분인 CT-1이 각각 205%와 220%의 활성을 나타내어 분획이 진행되면서 그 활성도가 증가함을 보인 반면, 저분자 획분인 CT-M과 CT-E는 활성이 나타나지 않았다. 또한 정제 과정에서 얻은 CT-1-IIa, CT-1-IIa-2, CT-1-IIa-1 획분의 활성은 각각 100 µg/mL의 농도에서 232%, 238%, 243%

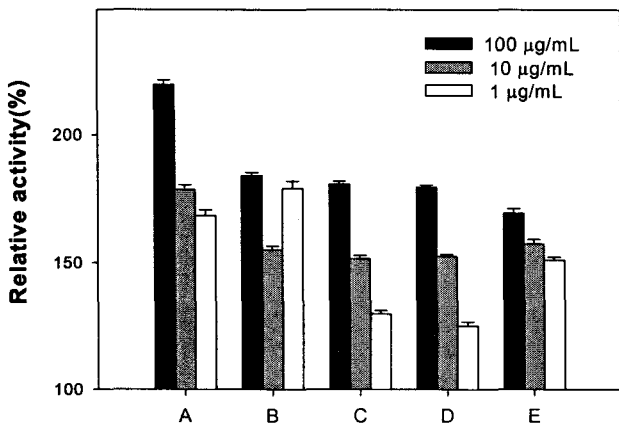


Fig. 1. Macrophage lysosomal enzyme activity of the extracts from various sources.

A: *Carthamus tinctorius* cold-water, B: *Oryzae sativa* cold-water, C: *Carthamus tinctorius* hot-water, D: *Cinamonum campora* cold-water, E: *Adenophora tryphilla var. japonica* cold-water.

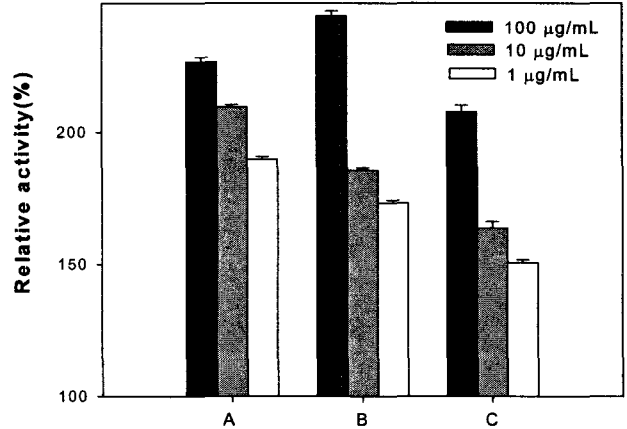


Fig. 2. Macrophage activity of CT-1 by pronase digestion and sodium periodate (NaIO<sub>4</sub>) oxidation.

A: Naive CT-1, B: Pronase digested CT-1, C: NaIO<sub>4</sub> oxidated CT-1.

로 정제가 진행됨에 따라 macrophage lysosomal enzyme 활성이 점차 증가하였다(Fig. 3).

정제 다당의 화학적 특성 및 분자량

정제 과정에 의한 당의 화학적 특성은 Table 2에 나타내었다. 초기 냉수 추출물 획분인 CT-0에 비해 조다당 획분인 CT-1에서 전당 함량이 다소 감소하는 경향을 보이다가 정제가 진행될수록 점차 전당 함량이 증가하여 최종 정제 획분인 CT-1-IIa-2-1에서 가장 높은 당의 함량을 보였다. 또한 단백질 함량은 CT-1 획분에서 가장 높은 값을 보이다가 정제 과정이 진행될수록 당의 함량과는 반대로 감소하는 경향을 나타내었다. 정제 과정에서 macrophage lysosomal enzyme 활성이 증가함과 동시에 전당의 함량이 증가하였으며, 단백질의 함량은 감소하는 경향을 보였다. 구성당 분석에 이

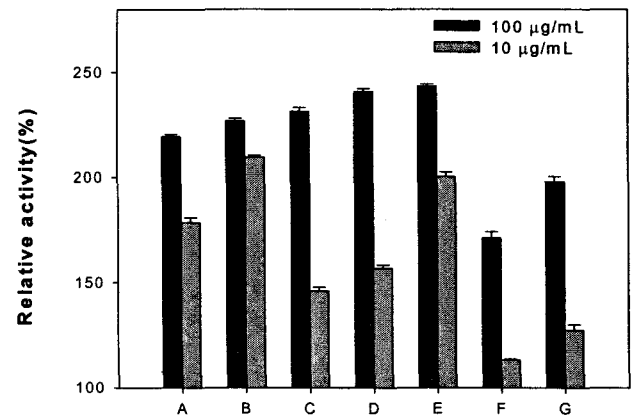


Fig. 3. Macrophage lysosomal enzyme activity of separated fractions.

A: CT-0 (cold water extract), B: CT-1 (crude polysaccharide), C: CT-1-IIa (subfraction obtained from CT-1 on DEAE toyopearl), D: CT-1-IIa-2 (subfraction obtained from CT-1-IIa on Sepharose CL-6B), E: CT-1-IIa-2-1 (subfraction obtained from CT-1-IIa-2 on Sephacryl S-200), F: CT-M (methanol soluble fraction), G: CT-E (ethanol soluble fraction).

Table 1. Macrophage lysosomal enzyme activities of the extracts from traditional tea sources

Korean name	Sample Scientific name	Relative activity (%)		
		Fr. I <sup>1)</sup>	Fr. III <sup>2)</sup>	Fr. IV <sup>3)</sup>
감잎	<i>Diospyros kaki</i>	137.51	102.77	180.00
감초	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	124.14	82.70	158.64
검정콩	<i>Glycine max</i>	127.62	108.99	128.09
결명자	<i>Cassia tora</i>	110.41	107.55	137.41
계피	<i>Cinnamomum loureirii</i>	106.76	120.86	135.71
구기자	<i>Lycium chinense</i>	60.14	101.44	120.07
귤피	<i>Citrus unshiu</i>	99.52	110.43	133.75
냉이	<i>Capsella bursa-Pastoris</i>	114.05	91.37	140.35
녹차잎	<i>Cinamomum camphora</i>	171.75	124.82	153.21
다시마	<i>Laminaria japonica</i>	102.03	90.28	151.80
단더섬(황기)	<i>Astragalus membranaceus</i>	128.31	98.92	139.62
당귀	<i>Angelica gigas</i>	133.74	96.04	121.98
대추	<i>Zizyphus jujuba</i> var. <i>inermis</i>	75.90	117.99	135.45
더덕	<i>Codonosis lanceolata</i>	132.67	121.22	207.87
도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>	113.26	87.74	125.68
두충(겉질)	<i>Eucommia ulmoides</i>	146.30	100.49	131.46
두충(잎)	<i>Eucommia ulmoides</i>	80.18	70.28	150.00
둥글레(잎)	<i>Polygonatum japonicum</i>	108.70	105.19	138.82
둥글레(줄기)	<i>Polygonatum japonicum</i>	112.40	107.80	124.75
들국화	<i>Chrysanthemum motifolium</i>	110.48	82.51	122.94
들깨	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>japonica</i>	134.68	110.36	100.90
모과	<i>Pseudoctdonia sinensis</i>	110.10	86.32	106.34
민들레	<i>Taraxacum platycarpum</i>	119.26	82.55	124.35
박하	<i>Menta arvensis</i> var. <i>japonica</i>	147.42	80.66	116.67
백년초	<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill. <i>saboten</i> Makino	140.67	100.94	154.64
보리	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>hexas tichon</i>	112.63	86.32	175.41
비파잎	<i>Eribotrya japonica</i>	138.61	100.47	121.83
뽕잎	<i>Morus alba</i>	118.46	95.28	131.97
산딸기	<i>Rubus coreanus</i>	171.19	91.98	141.90
산수유	<i>Comus officinalis</i>	98.30	73.11	63.92
음양곽	<i>Epimedium koreanum</i>	111.78	56.60	130.67
창출	<i>Atractylodes japonica</i>	107.67	73.66	91.75
생강	<i>Zingiber officinale</i>	167.81	119.66	112.94
석류	<i>Punica granatum</i>	57.43	70.28	125.61
솔잎	<i>Pinus densiflora</i>	70.50	76.10	120.47
쑥	<i>Artemisia asiatica</i>	117.79	93.27	180.00
연	<i>Nelumbo nucifera</i>	116.19	94.34	116.33
오갈피	<i>Acanthopanax sessiliflorum</i>	128.42	91.55	134.26
오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	75.23	82.93	104.71
옥수수	<i>Zea mays</i>	107.85	114.63	193.93
유자	<i>Citrus junos</i>	133.60	101.46	125.74
율무	<i>Coix lacryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i>	131.15	72.20	133.45
으름덩굴	<i>Akebia quinata</i>	115.13	99.02	145.57
은행	<i>Ginkgo biloba</i>	123.42	108.97	116.44
인삼	<i>Panax ginseng</i>	155.95	118.99	169.72
잇꽃(홍화)	<i>Carthamus tinctorius</i>	213.40	118.54	173.51
잔대	<i>Adenophora tryphilla</i> var. <i>japonica</i>	158.14	66.83	142.55
질경이	<i>Plantago asiatica</i>	139.18	112.20	156.04
치자	<i>Gardenia jasminoides</i>	107.86	89.34	119.60
치커리	<i>Cichorium intybus</i> L.	157.33	47.80	124.65
쑥	<i>Pueraria thunbergiana</i>	130.95	93.17	143.64
탱자	<i>Poncirus trifoliata</i>	162.91	84.56	115.49
하늘타리	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	152.48	115.54	113.55
해당화	<i>Rosa rugosa</i>	128.31	116.19	147.30
해바리기	<i>Helianthus annus</i>	132.53	86.71	178.10
현미	<i>Oryzae sativa</i>	187.47	118.94	118.04
호도	<i>Juglans sinensis</i>	108.30	88.78	106.23
호박	<i>Cucurbita moschata</i>	115.57	100.21	112.46
우리밀	<i>Triticum aestivum</i>	96.65	81.23	152.82
쌍화차	-	119.38	99.64	101.35
가시연밥(검실)	<i>Euryale ferox</i>	55.00	90.00	94.00
고구마	<i>Ipomoea batatas</i> L.	80.00	80.00	105.00
꽃감	<i>Diospyros kaki</i>	130.00	86.00	110.00

<sup>1)</sup>Extracted with cold water.<sup>2)</sup>Extracted with methanol.<sup>3)</sup>Extracted with hot water.

**Table 2. Chemical and sugar content of active fractions obtained from CT-0**

(%)	CT-0	CT-1	CT-1-IIa	CT-1-IIa-2	CT-1-IIa-2-1
Total sugar	47.1	43.3	53.2	64.4	76.5
Uronic acid	10.4	13.9	9.5	44.1	29.3
Protein	51.3	52.5	43.7	30.8	31.1
Component sugar (molar ratio)					
Rhamnose	28.5	14.4	7.8	15.1	0.6
Fucose	2.1	2.3	5.1	2.2	4.4
Arabinose	9.3	21.5	5.1	20.6	16.1
Xylose	trace <sup>1)</sup>	trace	3.0	2.5	27.4
Mannose	39.0	10.7	7.1	3.7	15.9
Galactose	13.6	27.4	42.9	7.0	10.6
Glucose	7.5	23.8	8.9	1.4	14.5
Galacturonic acid	- <sup>2)</sup>	-	-	18.9	4.6
Glucuronic acid	-	-	-	28.8	5.8

<sup>1)</sup>Detected less than 0.10.

<sup>2)</sup>No detected.

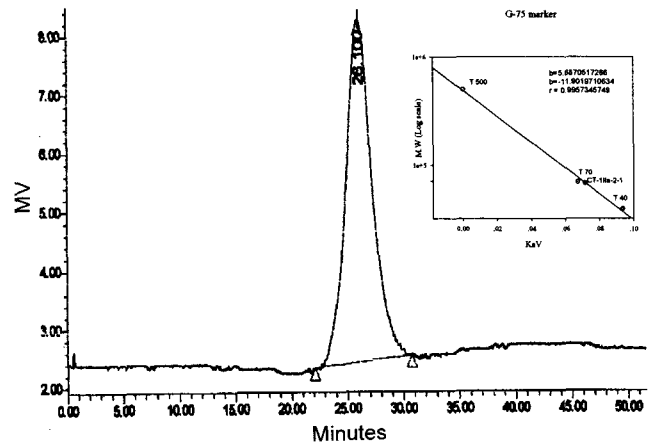
어서, CT-0 획분에서는 mannose와 rhamnose가 각각 39.0%, 28.5%로 높은 비율로 함유되어 있었고 CT-1 획분에서는 galactose가 27.4%로 가장 높았으며, 다음 glucose (23.8%), arabinose(21.5%)의 순이었다. 여기서 mannose 함량은 상당히 줄고 glucose와 arabinose가 증가했음을 알 수 있었다. 구성당의 변화로는 sepharose CL-6B 단계까지는 glucuronic acid(28.8%)가 가장 많은 부분을 차지하여 산성당 함량이 많은 편임을 알 수 있었으나, 마지막 단계에서는 산성당의 비율이 상당히 감소하고 xylose 함량이 27.4%로, mannose 함량이 15.9%로 각각 증가하는 변화를 보였다. 최종적으로 정제된 CT-1-IIa-2-1은 HPLC상에서 단일 peak로 그 순도를 확인하였으며, 약 68 kDa의 분자량을 가지는 다당으로 확인되었다(Fig. 4).

Yamada 등이 밝힌 시호(*Bupleurum falcatum*)로부터의 약리활성 및 당귀(*Angelica acutiloba*), 인삼(*Panax ginseng*)의 뿌리와 잎, 그리고 감초(*Glycyrrhiza uralensis*) 등으로부터의 pectic polysaccharide의 면역과 관련된 생리활성 연구 결과들이 보고되었듯이(16,17) 식물체 기원의 다당물질들의 연구결과에 비추어 볼 때, 본 연구에서의 홍화 면역 분획인 CT-1-IIa-2-1에 대해 당쇄결합 분석 및 효소적 가수분해를 실시해 본다면 좀 더 구체적인 결합양식을 확인할 수 있을 것이며 또한 cellular lysosomal enzyme activity를 나타내는 구체적인 구조를 밝힐 수 있을 것이다.

**NO 생산능**

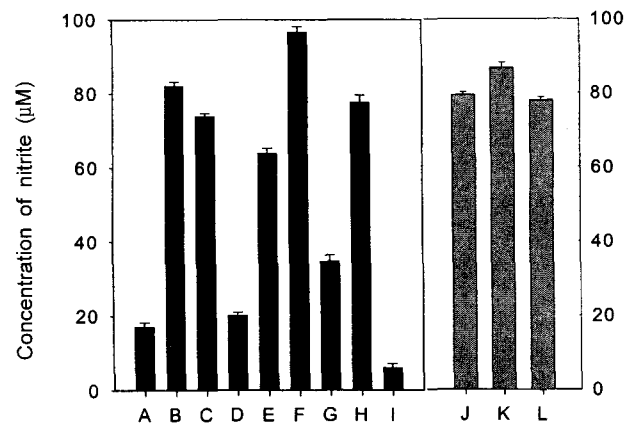
Ion chromatography를 통하여 얻어진 획분들의 NO 생산능은 CT-1-V가 96.6 μM로 가장 높았고, macrophage의 lysosomal enzyme 활성능이 가장 큰 CT-1-IIa는 82.1 μM, CT-1-IIa-2는 86.6 μM로 각각 나타났다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 조다당 CT-1의 NO 생성량은 73.0 μM이었고 각 과정에서 얻어진 획분들이 정제가 진행되면서 macrophage lysosomal enzyme 활성이 증가하는 것과 같은 양상으로 NO 생산량도 역시 증가하는 경향을 나타내었다.

반응질소 대사산물은 macrophage가 활성화될 때 생성되



**Fig. 4. Homogeneity and molecular weight of CT-1-IIa-2-1 on HPLC.**

HPLC was performed on Waters model 2690 equipped with RI detector and column (GPC type, 10×310 mm) of Superdex 75 developed 0.2 M NaCl. T-500, T-70, and T-40 are standard dextrans of 5×10<sup>5</sup>, 7×10<sup>4</sup>, and 4×10<sup>4</sup> molecular weight.



**Fig. 5. Production of nitrite in RAW 253.7 cell line by fractions obtained from CT-1.**

A: CT-1, B: CT-1-I, C: CT-1-IIa, D: CT-1-IIb, E: CT-1-III, F: CT-1-IV, G: CT-1-V, H: CT-1-VI, I: CT-1-VII, J: CT-1-VIII, K: CT-1-IIa-1, L: CT-1-IIa-2, M: CT-IIa-3.

The concentration of each fraction was 1.0 mg/mL.

는 물질로서 nitrogen dioxide로 일차 산화된 후 또다시 산화되어 세포배양액 속에서 아질산이온(NO<sup>2-</sup>) 및 질산 이온(NO<sup>3-</sup>) 형태로 축적되어 존재한다. BCG나 IFN- $\gamma$ 를 단독, 또는 병용하여 macrophage의 반응질소 대사산물이나 IL-1 등의 세포간 물질 분비가 증가되는 효과를 보인 연구 결과(18)를 통해 CT-1 다당획분 또한 IFN- $\gamma$  등의 물질을 함께 반응시킨다면 NO 생성능을 증가시킬 수 있으리라 추측된다.

또한 Nathan 등에 의해 macrophage가 어떤 자극을 받아서 활성화되면 세균 치사작용(microbicidal)과 종양세포 치사작용(tumouricidal)을 가진다는 보고(19)와 같이 macrophage의 또다른 대사산물에 대한 생성능을 측정하거나 그 생성기전을 규명한다면 macrophage lysosomal enzyme activity 이외의 macrophage가 가지는 특이적 면역반응의 효과를 밝힐 수 있을 것으로 생각된다.

**급성 독성 시험**

시료 투여군의 모든 동물에서 투여 직후 활동성 감소가 나타났으며 최고농도 1,000 mg/kg군을 제외하고는 약 24시간 후 활동성을 회복하였다. 체중은 시료 투여량이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 최고농도군인 1,000 mg/kg에서는 투여 후 18시간 이내에 사망률이 60%였고, 40시간 이후에는 100%의 사망률을 나타낸 것으로 보아 식용이기는 하지만 고농도에서 홍화는 독성이 있는

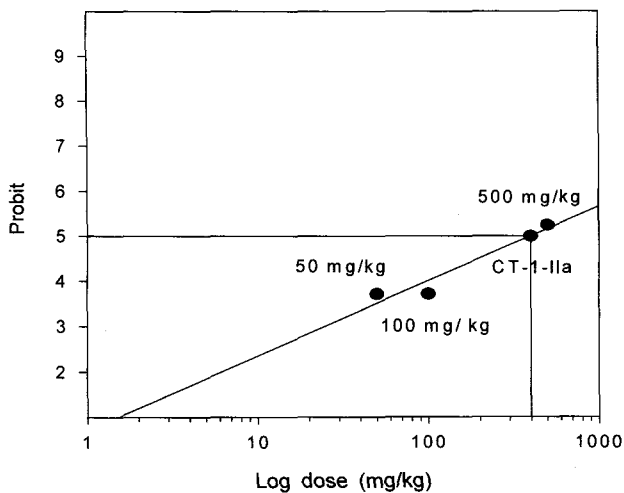
것으로 확인되었다(Table 3). Fig. 6으로부터 산출한 CT-1-IIa의 LD<sub>50</sub> 값은 397 mg/kg으로 나타났다. 급성 단기 독성의 시험에서 얻어낸 CT-1-IIa의 LD<sub>50</sub>값은 이 물질이 속효성과 준속효성의 사망경과를 나타내는 물질로 판단되며 이러한 물질은 일반적으로 저용량에서는 안전성이 높은 편이라고 생각되지만 급성 독성 뿐만 아니라 아만성·만성 독성, 유전 독성, 면역 독성과 같은 좀 더 심오한 독성 연구가 시행되어진다면 홍화의 약리효과를 이용한 약제와 기능성식품의 개발이 가능하리라 사료된다(20).

**요 약**

전통차 제조용 식물 63종을 대상으로 macrophage lysosomal enzyme activity를 검색한 결과, 홍화 냉수 추출물에서 높은 macrophage lysosomal enzyme 활성(219%)을 발견하여 냉수 추출물 CT-0 획분에 대하여 methanol 환류, ethanol 침전, 투석, 동결건조를 실시하여 macrophage lysosomal enzyme 활성이 더욱 증가된(227%) 고분자 획분 CT-1을 얻었다. 이 획분의 macrophage 활성화 성분의 본체를 파악하기 위하여 pronase 처리에 의한 단백질 분해와 periodate를 이용한 당 부위의 선택적 실험 후 활성을 검토한 결과, pronase를 처리한 CT-1에서는 약 8% 정도의 활성 증가를 보인 반면 periodate 산화물에서는 활성이 약 8% 정도 감소되는 것으로 보아 홍화로부터 macrophage 활성을 나타내는 냉수 추출물의 활성 본체는 다당임을 알 수 있었다. 조다당 활성 획분에 대하여 anion exchange column chromatography를 실시하여 9개의 획분(CT-1-I~CT-1-VIII)을 얻었으며 수율과 활성이 가장 높은 CT-1-IIa 획분을 Sepharose CL-6B 및 Sephacryl S-200의 gel permeation chromatography를 수행하여 주요 활성 다당인 CT-1-IIa-2-1을 최종적으로 정제하였다. HPLC상에서 순수한 단일 peak로 확인된 CT-1-IIa-2-1은 분자량이 68 kDa 정도의 다당인 것으로 나타났고 macrophage의 lysosomal enzyme 활성은 대조군을 100%로 비교했을 때 243%를 나타내었다. 또한 구성당의 조성은 xylose(27.4%), arabinose(16.1%), mannose(15.9%), glucose(14.5%)의 순이었다. 본 연구에서 CT-1-IIa-2-1은 macrophage의 면역활성을 증가시키는 물질임이 확인되었으나 mouse를 대상으로 급성독성 검사를 실시한 결과 LD<sub>50</sub>값이 397mg/kg으로 일정 농도 이상의 고농도에서는 독성을 나타냈다. 따라서 본 시료에 대하여 아만성·만성 독성과 유전 및 면역 독성과 같은 구체적인 독성 검사를 실시하여 안전농도를 산출한다면, 면역증강물질로의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

**Table 3. Lethal toxicity by intraperitoneally injection of macrophage-stimulation fraction CT-1-IIa into mice**

Group	No. of mice	Time (hr)					No. of mice survived	Survival (%)
		3	6	18	24	40		
Saline	10	-	-	-	-	-	10	100
50	10	-	-	-	-	1	9	90
100	10	-	-	-	-	1	9	90
500	10	-	-	-	-	6	4	40
1,000	10	-	-	6	2	2	0	0



**Fig. 6. Lethal dose 50% (LD<sub>50</sub>) of the CT-1-IIa by intraperitoneally injection into mice.**

**감사의 글**

본 연구는 1998년도 농림부 농림특정연구개발사업의 연구

비 지원에 의해 수행되었으며, 그 지원에 깊이 감사드립니다.

## 문 헌

- Bae JH. 1997. Effect of *Ganoderma lucidum* on the IL-1, TNF and IL-12 gene expression of macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 978-982.
- Kim SW. 1998. Studies on anti-microbial and anti-cancer functions of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1183-1188.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. 1993. *Immunology*. 3rd ed. Mosby, New York.
- Brattgjerd S, Evensen Q, Lauve A. 1994. Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophage in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., as evaluated by *in vitro* hydrogen peroxide production and phagocytic capacity. *Immunology* 83: 288-294.
- Kim MN, Kim HH. 1995. Analysis of safflower by high-performance liquid chromatography. *J Korean Ind & Eng Chemistry* 6: 238-242.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Reber PA, Smith F. 1956. Colorimeter method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
- Blumenthal N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54: 484-489.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-270.
- 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.
- Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. 1990. Effect of orally administered  $\beta$ -glucan on macrophage function in mice. *Int J Immunopharmac* 12: 675-684.
- Keller R, Keist R, Wechsler H, Leist TP, van der Meide PH. 1990. Mechanisms of macrophage-mediated tumor cell killing : a comparative analysis of the roles of reactive nitrogen intermediates and tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 46: 682-686.
- Yamada H, Kiyohara H, Cyong JC, Takemoto N, Komatsu Y, Kawamura H, Aburada M, Hosoya E. 1993. Fractionation and characterization of mitogenic and anti-complementary active fraction from *Kampo* (Japanese herbal). *Kor J Pharmacog* 13: 62-69.
- Chang IM, Kim JH, Han DS. 1983. Toxicological evaluation of medicinal plants used for herbal drugs (IV) Acute toxicity and antitumor activities. *Kor J Pharmacog* 13: 62-69.
- KFDA. 1983. 독성시험 표준작업지침서. p 218-246.
- Franz G. 1989. Polysaccharides in pharmacy, current applications and future concepts. *Planta Med* 55: 493-497.
- Kiyohara H, Yamada H. 1994. Characterisation of methyl-ester distributions in galacturonan regions of complement activation pectins from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydrate Polymers* 25: 117-122.
- Yamada H, Sun XB, Matsumoto T, Ra KS, Hirano M. 1991. Purification of anti-ulcer polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum*. *Planta Med* 57: 554-559.
- Kim SW. 1993. Effect of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on immunological activities of macrophage. *PhD Thesis*. Dankook University of Korea.
- Nathan CF, Silverstein SC, Brukner LH, Cohn ZA. 1979. Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes. *J Exp Med* 149: 100-113.
- Kim KI, Kim JW, Hong BS, Shin DH, Cho HK, Yang HC. 2000. Antitumor, genotoxicity and anticlastogenic activities of polysaccharide from *Curcuma zedoaria*. *Mol Cells* 10: 392-398.

(2001년 12월 10일 접수; 2002년 5월 7일 채택)