

## 가시오가피로부터 분리한 단백 다당물질의 경쟁적 ELISA법에 의한 분석

하은숙 · 황수현 · 신흥순 · 유광원<sup>1</sup> · 이경호<sup>2</sup> · 최주선<sup>3</sup> · 박우문<sup>4</sup> · 윤택준\*

경기대학교 식품생물공학과, <sup>1</sup>청주대학교 김치식품과학과,

<sup>2</sup>코오롱 중앙연구소, <sup>3</sup>국립보건원 대사영양질환과, <sup>4</sup>(주)구푸

### Competitive ELISA for the Measurement of Glycoprotein Purified from *Acanthopanax senticosus*

Eun Suk Ha, Soo Hyun Hwang, Kwang-Soon Shin, Kwang-Won Yu<sup>1</sup>, Keyung Ho Lee<sup>2</sup>, Joo Sun Choi<sup>3</sup>, Woo-Mun Park<sup>4</sup> and Taek Joon Yoon\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

<sup>1</sup>Department of Kimchi and Food Science, National College of Science and Technology

<sup>2</sup>Kolon Central Research Park

<sup>3</sup>Division of Metabolic Disease, Department of Biomedical Science, National Institute of Health

<sup>4</sup>Research Team, GOOFOO Inc

This study was carried out to establish a quantitative analysis method of separating immuno-activating substance (EN-SP) from *Acanthopanax senticosus* (*A. senticosus*) by competitive direct ELISA. Mouse antiserum (anti-EN-SP) against EN-SP was generated by immunization (s.c.) of EN-SP purified from *A. senticosus* as an immunogen. The titer of anti-EN-SP was about 1 : 400, and the optimal dilution of EN-SP-HRP conjugate was 1 : 1,000. When the standard curve was constructed by ELISA, its sensitivity was about 0.2 µg/mL. The coefficient variations of intra- and inter-assay were 6.13~8.81% and 6.73~8.60%, respectively. According to the standard curve, the concentration of EN-SP in various *senticosus* extracts was found to be only 59.85 µg in 10 mg of extract from the bark of *A. senticosus*. Similarly, the immunostimulating activity to produce TNF-α or IL-12 among the various extracts of *Acanthopanax* was shown to be correlated with the content of EN-SP. These results demonstrated that competitive ELISA was a convenient, fast, reproducible, and accurate method for the determination of EN-SP as an immunologically active standard substance in extract of *A. senticosus*.

**Key words:** *Acanthopanax senticosus*, competitive ELISA, cytokine

## 서 론

현대의 과학적인 실험결과에 기초하여 전통적으로 사용되어 오던 물질에 대한 활성이 인정되면서 그 사용이 증가되고 있다. 그러나, 이러한 민간요법 혹은 한방에서 사용하여 온 물질들은 다양한 추출방법과 단일 성분이 아닌 여러 복합성분을 갖는 추출물이기에 동일한 활성이 나타나지 않음으로 임상에서 잘 받아들여지지 않는 실정이다. 또한 약재의 활성 성분은 물질의 채취 시기나 지역에 따른 구성물질의 차이도 보고된 바<sup>(1)</sup>, 이러한 천연 약재의 활성을 과학적으로 인정받기 위해서는 물질의 표준화가 선행되어야 할 것이다. 물질의 표준화를 이루하기 위하여 가장 높은 생리활성을 나타내는 지

표물질의 분리 및 선정과 더불어 그의 정량법 개발은 가장 우선적으로 고려되어야 할 사항으로 사료된다<sup>(2)</sup>.

예로부터 우리나라의 한방에서 사용되어져 왔던 약재 중의 하나인 가시오가피의 활성에 대한 검증은 우리나라에서도 항알러지 활성<sup>(3-5)</sup> 및 활성성분<sup>(6,7)</sup>에 대한 연구가 진행되어왔으나, 주로 러시아와 유럽에서 진행되어져 왔고<sup>(8-14)</sup>, 최근에 Davydov<sup>(8)</sup>에 의하여 잘 정리되었다. 즉, 가시오가피의 생리활성이 주로 항피로효과<sup>(8)</sup>, 운동성증진<sup>(9)</sup>, 항스트레스<sup>(10)</sup>, 항알러지효과<sup>(10)</sup>, 항산화작용<sup>(11)</sup>, 항알러지<sup>(12)</sup> 및 독성에 의한 항암작용<sup>(13,14)</sup>에 대한 설명과 함께 대표 활성물질로서 acanthosides, eleutherosides, senticoside, triterpenic saponin, flavone, vitamins and minerals 등의 성분에 대하여 보고되었다<sup>(8)</sup>. 즉, 이 저자들은 가시오가피 추출물을 여러 가지 외부환경에 대하여 잘 적응케 하는 적응력의 증가의 의미를 가지는 adaptogen으로서의 활성 및 성분에 대하여 강조하였다. 따라서 가시오가피 혹은 오가피추출물은 우리나라에서도 이들이 가지는 생리활성을 토대로 기능성 식품으로 개발 혹은 개발 가

\*Corresponding author : Taek Joon Yoon, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Kyonggi-do 442-760, Korea  
 Tel: 82-31-245-7096  
 Fax: 82-31-249-9650  
 E-mail: yoon\_tj@hanmail.net

능한 물질의 하나로 평가받고 있다. 한편, 가시오가피의 여러 생리활성 중에서 면역자극활성 및 그에 의한 항암활성에 대한 보고는 주로 조다당 추출물에 관한 것으로 제한된 수가 발표되었으나<sup>(15-17)</sup>, 최근에 가시오가피의 면역자극활성에 기인되는 종양의 전이억제활성에 관한 보고와 함께 활성물질로서의 단백 다당체에 대한 가능성이 제시되었다<sup>(18,19)</sup>. 그러나 이 경우에서 다른 천연물의 경우와 마찬가지로 가시오가피의 종류와 생산지에 따른 생리활성의 많은 차이가 있을 것으로 사료되는 바<sup>(1)</sup>, 주 활성을 갖는 지표물질의 선정 및 분리가 선행되어야 하겠고, 이를 이용한 과학적인 정량법 개발이 필요하다고 사료된다<sup>(2)</sup>. 더하여 가시오가피와 오가피류의 유사성에 기인하는 약재 사용에 있어서 선별이 어렵고, 혼돈에 의한 사용 가능성도 있다고 생각되며, 따라서 지표물질을 정량 할 수 있는 체계화된 방법의 개발은 중요한 의의가 있다고 생각된다.

Hormone과 같은 미량성분 혹은 생리활성을 가지는 물질 분석에 면역분석법은 널리 이용되어 왔고, 현재 개발된 면역분석법으로는 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA)<sup>(20)</sup>, 효소면역분석법(enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISA)<sup>(21)</sup>, 화학발광면역분석법(chemiluminescence immunoassay; CIA)<sup>(22)</sup>, 형광면역분석법 (fluoroimmunoassay; FIA)<sup>(23)</sup> 등이 있다. 이중에서 방사선 동위원소를 이용한 RIA법은 특이성과 측정감도가 우수한 것으로 인정되고 있으나<sup>(20)</sup>, 방사선동위원소에 의한 유해성, 폐기물의 문제, 짧은 반감기 및 고가의 유지비용의 난점이 있어 그 이용이 제한되어 있다. 이에 비하여 RIA의 특성을 가지면서 그의 단점을 보완 내지 해결할 수 있는 방법이 비방사선 물질을 이용한 면역분석법이다<sup>(24)</sup>. 그중 효소를 지표물질로 이용하는 ELISA법은 RIA에 대한 대체방법으로 가장 널리 이용되고 있다.

본 실험에서는 면역학적 기법을 이용한 효소면역분석(ELISA)법에 의한 대표활성물질의 정량법을 개발하고, 개발된 ELISA에 의한 주 활성물질의 함량과 면역자극활성의 상관관계를 조사함으로서 생리활성을 가지는 가시오가피 추출물의 표준화 작업에 대한 기초 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험의 재료 물질인 가시오가피는(*Acanthopanax senticosus*)는 대효제약(수원) 혹은 삼척에서 구입하여 사용하였으며, 오가피(*Acanthopanax sessiliflorus*)는 강원도 평창에서 구입하였다. 본 실험에서 사용된 RPMI1640 medium, fetal bovine serum (FBS), Freund's Complete Adjuvant(FCA)와 Freund's Incomplete Adjuvant(FIA)는 Gibco사에서 구입하였고, Goat anti-mouse IgG + A + M-HRP, Horseradish Peroxidase Labeling kit은 Zymed사, 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine(TMB solution), thioglycollate 등은 Sigma사 시약을 사용하였다.

### 가시오가피(GF)로부터 단백 다당물 분획의 제조 및 정제

1 L 증류수에 50 g의 분쇄된 가시오가피를 첨가하고 4°C에서 16시간동안 교반 한 후 여과하였다. 추출물은 원심분리

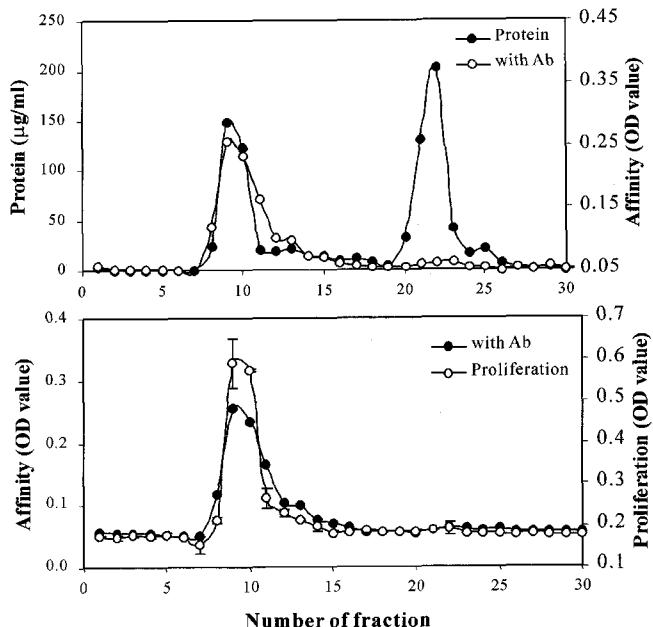


Fig. 1. Gel chromatography of GF-AS was carried out on a 2.5 × 90 cm Sephadex G-100 column with PBS as eluant.

In a typical experiment, 1 mg/mL of GF-AS dissolved in PBS was applied to the column and eluted with a flow rate of 1 mL/min. To determine the elution pattern, each fraction was measured the protein concentration using protein assay kit (Bio-Rad, Ltd) and measured the reaction with anti-GF-AS (A), and assayed the proliferating activity of normal splenocytes (B).

(887×g, 20분, 한일과학산업)를 통하여 상등액을 수집하였고, pore size가 0.2 mm인 filter로 여과하였다. 이 추출물로부터 단백질 분획을 얻기 위하여 ammonium sulphate(AS)를 가하여 70%의 포화용액이 되도록 조정 후, 24시간 교반(4°C) 하고 원심분리(887×g, 20분)통하여 침전물을 회수하였다. 이 침전물은 0.02 M Tris-HCl(pH 7.2)로 용해한 후, 동일한 buffer에서 2일간 투석하여 6.7 mL의 가시오가피 조단백질 성분인 GF-AS을 얻었으며, Bio-Rad 단백질 측정 kit(Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질의 농도를 정량한 결과, 단백질 농도는 768 μg/mL이었다. 이 용액을 Sephadex G-100 column (FPLC system, Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용하여 gel permeation chromatography(2.5×90 cm)를 실시하였으며 각 분획의 농도는 Fig. 1에 표시하였다.

### 단백 다당 분획의 비장세포증식효과

6-8주령의 BALB/C 마우스로부터 멸균적으로 비장을 적출하고, 비장세포(splenocyte)를 준비한 후, 96-well plate의 각 well에  $2.5 \times 10^5$ 의 밀도로 plating하고, GF-AS를 gel filtration 한 각 분획을 첨가하였다. 실험결과 얻은 GF-AS의 각 분획은 10배 희석하여 각 well에 첨가하였으며 3일간 배양함으로서 각 분획에 의한 비장세포 증식 활성을 조사하였다. 분리된 단백질에 의한 비장세포의 증식활성은 MTT assay<sup>(19)</sup>법으로 수행하였다. Gel filtration 결과 GF-AS는 크게 2개의 peak로 구성된 바, 비장세포 증식활성이 유도된 첫 번째 peak를 EN-SP로 명명하였다.

## EN-SP에 대한 항체생산

항체생산을 위한 마우스(BALB/C, 자성, 6주령)는 (주)대한 바이오링크에서 구입하였다. 20 µg의 GF-AS 혹은 EN-SP와 Freund's Complete Adjuvant(FCA)를 같은 부피의 비율로 유화시킨 후, 5마리의 마우스의 피하(100 µL)에 1차 면역하였다. 면역 2주 후에 동량의 GF-AS 혹은 EN-SP와 Freund's Incomplete Adjuvant(FIA)와의 혼합액을 1회 더 면역하였다. 2차 면역 2주 후에 동량의 항원만 복강면역하고, 4일 후에 마우스로부터 혈액을 취하고, 혈청을 분리하여 항체로 사용하였다.

## HRP conjugate 및 항체의 적용 농도 결정

EN-SP에 horseradish Peroxidase(HRP)의 결합은 HRP Labeling kit(Zymed)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 경쟁적 ELISA를 위한 HRP-conjugate의 농도를 결정하기 위하여 EN-SP에 대한 항 혈청을 coating buffer(0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.5)에 400배 희석하여 96 microwell plate에 100 µL씩 분주 후 4°C에서 하룻밤 동안 coating을 시켰다. 각 well은 washing buffer(PBS-0.05% Tween 20; PBS-T)로 3회 세척 후 3% bovine serum albumin(BSA)으로 blocking 시켰다. 여기에 미리 준비한 EN-SP-HRP를 여러 농도로 처리하고, 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 완료 후 plate는 PBS-T를 이용하여 3회 세척하였고, 기질용액(TMB)을 넣고 30분 반응시켰다. 그 후, 각 well에 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 넣어 반응을 정지시킨 후 ELISA reader(Molecular devices, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 경쟁적 ELISA를 위한 항체가의 측정은 여러 농도로 조정된 anti-EN-SP 혈청을 coating 후에 EN-SP-HRP(×1000) conjugate 혹은 20 µg/mL의 EN-SP를 첨가한 후 그 반응성을 조사하였다.

## 가시오가피 항원에 대한 표준곡선의 작성 및 항원의 측정

HRP를 표지 시킨 EN-SP-HRP를 사용하여 경쟁적 ELISA 법을 수행하였다. 약술하면, EN-SP에 대한 항체가 흡착된 ELISA plate를 3% BSA로 blocking 후, 일정농도로 희석된 EN-SP-HRP와 표준물질로서 여러 농도로 조정된 EN-SP를 동시에 첨가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응 완료 후 각 well을 세척하고 발색을 위한 기질로서 TMB를 사용하였고, 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 반응을 정지시킨 후, ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정 후 EN-SP에 대한 표준곡선을 완성하였다. 가시오가피 혹은 오가피 내의 EN-SP의 측정은 동일한 조건으로 추출된 각 시료를 경쟁적 ELISA에 적용한 후, EN-SP에 대한 표준곡선을 기준으로 각 시료에 포함된 EN-SP의 함유량을 계산하였다.

## 반복성(reproductivity) 및 회수율 조사

본 면역 분석법의 정확성을 평가하기 위하여 시료 중 EN-SP의 농도가 높은 것, 중간 것 및 낮은 것의 3개로 구분하여 한 시료 당 10회씩 반복 측정하는 intra-assay와 6회의 다른 시간에 동일한 실험을 행한 inter-assay를 실시하였다. 반복 실험 후, 상기한 면역 분석법의 재현성은 각 농도에 대한 실험결과를 토대로 coefficient variation(C.V.)을 산출함으로 결정하였다. 회수율 조사는 PBS에 각각 200, 1000, 5000 ng/mL

로 EN-SP를 첨가 후 assay 결과에서 얻은 EN-SP의 함량을 조사하여, 첨가 농도에 대한 bias(%)로 표시하였다.

## Macrophage로부터 cytokine의 유도분비 조사

Balb/c 마우스에 3% thioglycollate media를 1 mL 복강주사하고 4일 후에 경추탈골법으로 마우스를 희생시킨 후, 복강에 RPMI-1640 배지 10 mL을 주입하여 복강 내 세포(peritoneal exudative cells; PEC)를 수집하였다. 수획한 PEC을 24 well culture plate의 각 well에 1.5×10<sup>6</sup>/mL의 농도로 조정하여 분주하였다. 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate에 부착 후, 배양액으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 그 후 적정 농도로 조정된 가시오가피와 오가피의 수피, 열매, 및 잎의 4°C의 증류수를 이용한 추출물 시료를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양완료 후, macrophage의 배양 상등액을 회수하였고 배양 상등액에 유도 분비된 TNF-α, IL-1, IL-12등의 cytokine 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit(Pharmingen, USA)을 구입하여 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 가시오가피로부터의 단백 다당체 분리 및 비장세포의 증식활성

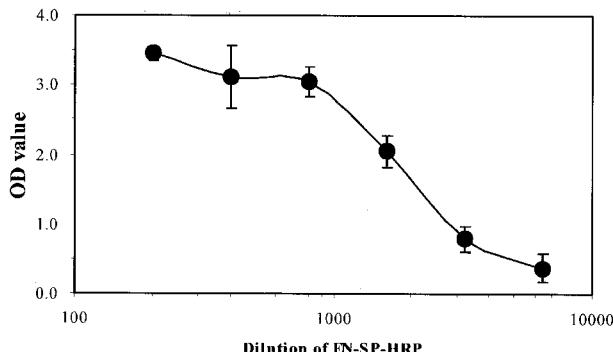
가시오가피로부터의 ammonium sulfate의 침전 분획인 GF-AS을 gel filtration하여 얻은 각 분획의 단백질 농도를 측정한 결과, GF-AS는 9번(peak-I)과 22번(peak-II)을 중심으로 하는 2개의 분획으로 구성되는 결과를 보였다(Fig. 1-A). 또한 gel filtration에 의한 각 분획을 ELISA plate에 coating 후, anti-EN-SP 혹은 anti-GF-AS 혈청과 반응성을 조사한 결과, 두 항체는 주로 peak-I과 반응하는 결과를 보였다. 따라서 GF-AS에서 항체와 반응성을 가지는 성분은 주로 peak-I에 집중되어 있는 결과를 보였고, peak-II는 두 항체와의 반응성이 없었다. 한편 각 분획의 면역자극활성을 비장세포 증식효과로 조사한 결과 peak-I에서만 증식활성이 유도됨으로서 GF-AS를 구성하는 성분에서 면역자극활성을 나타내는 성분인 peak-I을 수집(EN-SP)하였고, peak-II는 실험에서 제외시켰다. 현재 면역자극활성을 나타내는 EN-SP 성분에 대한 화학적 검토를 실시한 결과 단백 다당체로 확인된 바, 현재 자세한 화학적 특성에 대한 연구를 진행 중에 있다.

## HRP-conjugate의 농도 결정

Periodate법으로 접합된 EN-SP-HRP의 적용농도를 결정하기 위하여 항체가 coating된 ELISA plate에 여러 농도로 조정된 conjugate를 반응시켰다. 그 결과 800배까지의 EN-SP-HRP의 첨가는 최고의 흡광도를 유지하였고, 1600배 이하의 흡착 비율부터 흡광도가 감소하는 농도 의존적인 경향을 보였다. 따라서 EN-SP에 대한 경쟁적 ELISA를 위한 EN-SP-HRP conjugate의 흡착농도는 표준곡선의 감도 및 비특이성 반응(non-specific binding; NSB) 등을 고려하여 1,000배로 결정하였다(Fig. 2).

## EN-SP에 대한 항체의 적정곡선(Titration curve)

EN-SP에 대한 표준곡선을 얻기 위한 항체가를 결정하기



**Fig. 2. Determination of EN-SP-HRP conjugate concentration.** Serial diluted EN-SP-HRP conjugate was added to Ab coated ELISA plate and measured the binding activity of the conjugate according to the Material and Methods.

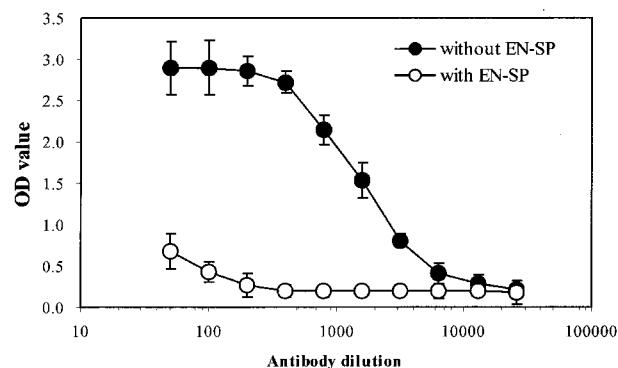
위하여 EN-SP에 대한 항체를 여러 농도(1 : 100~1 : 12,800)로 조정 후, ELISA plate에 고정하고 EN-SP-HRP 접합체와 반응시켰다. 동시에 경쟁성 조사를 위하여 각 항체의 농도마다 20 µg/mL의 EN-SP를 첨가하여 반응성을 조사하여 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다. 그 결과 항체의 400배까지의 coating 조건까지는 최고 O.D. 값을 보였고, 표지물질로서 EN-SP가 첨가된 경우에도 400배의 항체 조건에서 가장 높은 경쟁반응을 보였기에 항체의 적정농도는 1 : 400으로 결정하였다(Fig. 3).

#### EN-SP의 표준곡선의 작성

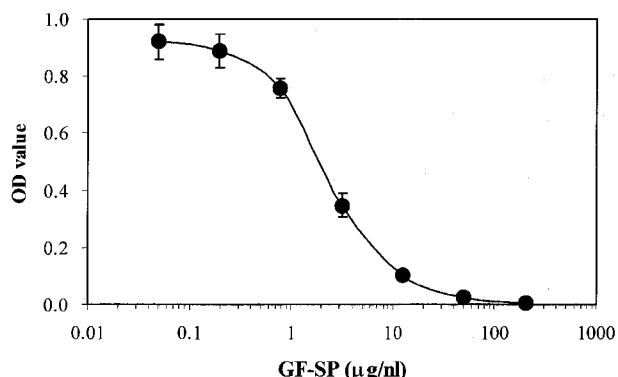
경쟁적 ELISA법에 의한 가시오가피의 EN-SP 성분을 분석하기 위하여, 0.02~200 µg/mL 농도로 조정된 EN-SP를 첨가하여 Fig. 4와 같은 경쟁적 ELISA에 의한 EN-SP 측정을 위한 표준곡선을 얻었다. 결과에 나타난 바와 같이 본 표준곡선에서 EN-SP의 측정범위는 0.2~20 µg/mL였고, 따라서 측정 감도는 0.2 µg/mL까지로 나타났다. 경쟁적 ELISA 혹은 sandwich ELISA에 의한 면역분석법에서 측정 감도는 항체의 특이성 혹은 affinity에 의하여 영향을 받는 것으로 알려져 있고, 실험결과의 경쟁적 ELISA에 의한 분석방법은 일반적으로 단일크론항체에 의한 sandwich ELISA법에 비하여는 낮은 감도를 보여주는 것으로 알려져 있다. 본 실험결과는 EN-SP 성분에 대한 다크론항체를 이용한 경쟁적 ELISA로서 가시오가피의 유효성분에 대한 정량적 의미의 ELISA 방법을 이용한 것은 현재까지 보고된 바가 없는 바, 최초의 면역분석법의 개발이라는 측면에서 의미가 있다고 사료된다.

#### 반복성 및 회수율(Reproducibility) 조사

ELISA로 얻은 표준곡선의 정확도를 검정하기 위하여 EN-SP 정량분석의 재현성 실험을 실시하였다. 재현성 실험은 단백질 정량 kit(Bio-Rad 사)를 이용하여 이미 알고 있는 여러 농도의 EN-SP를 조제하여 경쟁적 ELISA를 실시한 후, 표준곡선 하에서의 EN-SP 농도를 측정한 intra-assay와 동일한 농도를 시간을 달리하여 측정한 후 그 오차를 조사한 inter-assay를 실시하였다(Table 1). Intra-assay는 EN-SP 정량을 위한 범위인 200~20,000 ng/mL에서 임의적으로 비교적 높은 농도인 5,000 ng/mL, 중간농도인 1,000 ng/mL, 그리고 비교적 낮은 농도인 200 ng/mL의 3가지 농도를 정하였다. 분석을 위한 각 농



**Fig. 3. Titration curve of anti-EN-SP polyclonal antibody.** Serial diluted anti-EN-SP antibody coated plate was added to EN-SP-HRP conjugate with or without 20 µg/mL of EN-SP. After washing the plate with PBS-Tween, TMB substrate solution added and measured the O.D. values.



**Fig. 4. Typical standard curve of EN-SP assayed by competitive ELISA.**

Ab coated ELISA plate was added EN-SP-HRP conjugate as a tracer with serial diluted EN-SP as a standard. After incubation, the plate was washed with PBS-Tween and added TMB substrate solution. The O.D. value of each well was measured at 450 nm.

도별 시료는 각각 10개씩 측정하였고 EN-SP 정량을 위한 표준곡선에 적용하여 나온 결과를 Table 1에 제시하였다. 세 가지 농도의 EN-SP에 대한 intra-assay의 결과에서 C.V. 값은 6.13~8.81%로 10%이내에 들었고, bias도 평균 -3.7%를 보임으로서 비교적 우수한 결과를 나타냈다. 또한 inter-assay는 총 6회에 걸쳐서 측정하였으며 실험에 적용한 EN-SP의 측정농도는 intra assay와 동일한 농도로 조사하였다. 그 결과 C.V.값은 실험에 적용한 농도인 20, 5, 1, 0.2 µg/mL 중에서 20 µg/mL를 제외한 5~0.2 µg/mL의 농도에서는 10%이내로 나타났으며 bias의 값도 평균 ±7.5% 정도로 나타났다. 따라서 재현성 실험에서 측정된 Fig. 4의 표준곡선에 대한 C.V.치는 오차 한도가 5 µg/mL 이하의 10%이내의 수용 범위를 나타냄으로서 5 µg/mL 이내의 측정범위 내에서 Fig. 4의 경쟁적 ELISA 방법은 비교적 안정된 방법으로 판단되어 졌다<sup>(25,26)</sup>.

#### 가시오가피와 오가피의 EN-SP 함유량 비교

가시오가피의 외피와 잎, 유사불질인 오가피의 외피, 열매와 잎의 추출물로부터 EN-SP성분을 정량분석하기 위하여 경

**Table 1. Intra- and inter-assay for the measurement of EN-SP by competitive ELISA**

Group	Expected value (ng/mL)	Observed value Mean $\pm$ SD	CV (%)	Recovery (%)	Bias (%)
Intra-assay <sup>1)</sup>	5000	5216 $\pm$ 320	6.13	104.3	+4.3
	1000	965 $\pm$ 85	8.81	96.5	-3.5
	200	191 $\pm$ 14	7.33	95.5	-4.5
Inter-assay <sup>2)</sup>	5000	5302 $\pm$ 456	8.60	106.0	+6.0
	1000	1026 $\pm$ 69	6.73	102.6	+2.6
	200	185 $\pm$ 13	7.02	92.5	-7.5

<sup>1)</sup>Intra-assay imprecision was determined by assaying 20 samples at three concentrations across the calibration range.<sup>2)</sup>Inter-assay imprecision was determined assaying the each concentration of EN-SP in 6 assays within 2 months.**Table 2. Determination of the EN-SP content in the extract of *Acanthopanax senticosus* or *Acanthopanax sessiliflorus***

Sample		Conc. of sample (μg/mL)	Conc. of EN-SP (μg/mL)
<i>Acanthopanax senticosus</i>	bark	1000	59.85 $\pm$ 2.93
	bark	1000	1.56 $\pm$ 0.15
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	fruits	1000	1.33 $\pm$ 0.07
	leave	1000	0.18 $\pm$ 0.02

The 1000 μg/mL of the extract of *Acanthopanax senticosus* or *Acanthopanax sessiliflorus* was added to the well of anti-EN-SP Ab coated plate with EN-SP-HRP conjugate. Finally measured O.D. value was apply to the EN-SP standard curve and calculated the concentrations.

**Table 3. Production of IL-12, TNF-α and IL-1β from peritoneal macrophages stimulated with the extract of *Acanthopanax senticosus* and *Acanthopanax sessiliflorus***

Sample	Concentration (μg/mL)	Cytokines (pg/mL)		
		IL-12	TNF-α	IL-1β
Control	medium	-	18.4 $\pm$ 10.5	36.7 $\pm$ 15.8
	LPS	5	2656.4 $\pm$ 36.3	7648.0 $\pm$ 286.2
<i>Acanthopanax senticosus</i>	bark	5	1663.1 $\pm$ 122.9	1716.0 $\pm$ 56.6
	bark	50	3.9 $\pm$ 1.7	12.9 $\pm$ 9.2
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	fruits	50	5.9 $\pm$ 3.6	0.8 $\pm$ 5.5
	leave	50	4.4 $\pm$ 3.1	1.9 $\pm$ 3.0

Peritoneal macrophages were harvested from 3% thioglycollate-treated mice. The macrophages suspended in culture medium were plated into 24-well culture plates and the non-adherent cells were removed after 2 h-incubation. The macrophages were co-incubated with the each concentration of samples for 24 h. The concentration of each cytokine in the culture supernatant was determined by ELISA.

쟁적 ELISA를 실시하였다. 실험 결과, 각 추출물의 1000 μg/mL 농도일 경우 가시오가피의 외피 추출물에서만 EN-SP 성분이 59.85 μg/mL로 가장 높았으며 오가피의 경우 잎, 줄기, 뿌리 추출물에서는 5 μg/mL 이하로 소량 측정되었다(Table 2). 이 결과로 본 실험에서 분리된 EN-SP 성분은 주로 가시오가피 외피성분에 존재하는 특이물질로 사료되었다. 현재 EN-SP 성분의 생화학적 특성을 조사한 바, 단백질 성분 외에도 당류 성분이 분석되는 바, 이 후 활성성분으로서의 EN-SP의 정확한 분석실험이 요구되었다.

#### 가시오가피와 오가피에 의한 macrophage로 부터 cytokine의 유도활성 비교

활성화된 macrophage는 여러 가지 cytokine을 유도하고 이들은 다양한 면역 반응을 매개하며 특정 자극을 받은 macrophage는 종양세포에 대한 작동세포(killer)로써의 기능을 획득한다고 보고 되고 있다<sup>(18,27)</sup>. 실질적으로 가시오가피 추출물

은 macrophage로부터 cytokine inducer로서의 기능 및 NK-cell을 활성화시키는 면역자극활성에 기인되는 항종양전이 효과를 유도됨을 확인하였다<sup>(18)</sup>. 따라서 면역자극활성의 지표로 macrophage로부터의 cytokine(IL-12, TNF-α와 IL-1β)의 유도능을 본 연구에서 지표물질로 설정된 EN-SP의 함량과 비교하여 분석하였다. 그 결과 가시오가피 혹은 오가피 시료의 macrophage 자극에 의한 cytokine의 유도능은 EN-SP의 함량의존적인 경향을 보였다(Table 3). 따라서 가시오가피와 오가피의 4°C의 조건에서의 추출물의 면역자극활성은 가시오가피만 유효하며, 그 활성은 EN-SP 성분에 기인됨을 확인하였다. 이 결과는 특히 면역자극활성의 측면에서 가시오가피 내의 EN-SP는 지표물질로서 유효함을 제시함으로서, 학명을 달리하는 여러(가시)오가피에 대한 분석 실험 및 활성실험의 측정과 추출물질의 표준화 측면에서 중요한 의미가 있다고 사료되었다.

## 요 약

가시오가피 냉침 추출물에서 면역자극활성을 가지는 지표 물질을 분리하고자, gel chromatography를 수행하여 비장세포에 대한 증식활성을 가지는 EN-SP을 분리하였고, 생화학적 분석 결과 단백 다당 물질임을 확인하였다. 가시오가피 추출물 내에서 지표물질로서 EN-SP 성분을 정량하기 위하여 경쟁적 ELISA법을 개발하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 경쟁적 ELISA법을 이용하여 EN-SP-HRP conjugate의 희석농도를 1000배로 결정하였으며, EN-SP의 표준곡선을 작성한 결과 검출범위는 0.2~20 µg/mL로서 측정감도는 0.2 µg/mL이었다. 이러한 표준곡선의 정당성 평가를 위하여 정량된 EN-SP를 통한 재현성 실험에서 5 µg/mL 이하의 농도에서 intra assay 경우 C.V. 값은 6.13~8.81%, bias는 평균 -3.7%를 보였으며, inter assay에서도 C.V. 값과 bias 모두에서 10%이내로 비교적 우수한 재현성을 보였다. 작성된 표준곡선을 바탕으로 유사물질인 오가피의 4°C 추출물들의 EN-SP의 함유량을 조사한 결과 EN-SP 성분은 주로 가시오가피 외피에서만 높은 함유량을 보였다. 동일한 추출물의 macrophage 자극에 의한 cytokine 유도활성 실험결과, EN-SP 성분을 함유하는 가시오가피의 수피 추출물만 IL-12 및 TNF-α를 생산하는 면역자극활성을 나타냄으로서 EN-SP 성분은 가시오가피에서 면역자극활성을 나타내는 지표물질로의 가능성이 제시되었다.

## 감사의 글

본 연구는 2002년 농림부 농림기술연구개발사업과제(기공-20010284)의 지원에 의하여 이루어진 것이며 연구비 지원에 감사 드립니다.

## 문 헌

- Ohnishi, Y., Fujii, H., Hayakawa, Y., Sakukawa, R., Yamarura, T., Nakamoto, T., Tsukada, K., Fujimaki, M., Nunome, S., Komatsu, Y. and Saiki, I. Oral administration of kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to inhibits liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. *Japan J. Cancer Res.* 89: 206-213 (1998)
- Parhami-Seren, B., Bell, C., Margolies, M.N., and Haupert, G.T. Monoclonal antibodies that distinguish between two related digitals glycosides, Ouabain an Digoxin. *J. Immunol.* 163: 4360-4366 (1999)
- Yi, J.M., Kim, M.S., Seo, S.W., Lee, K.N., Yook, C.S. and Kim, H.M. *Acanthopanax senticosus* root inhibits mast cell-dependent anaphylaxis. *Clin. Chim. Acta* 312: 163-168 (2001)
- Jeong, H.J., Koo, H.N., Myung, N.I., Shin, M.K., Kim, J.W., Kim, D.K., Kim, K.S., Kim, H.M. and Lee, Y.M. Inhibitory effects of mast cell-mediated allergic reactions by cell cultured Siberian ginseng. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 23: 107-117 (2001)
- Yoon, T.J., Lee, S.W., Shin, K.S., Choi, W.H., Hwang, S.H., Seo, S.H., Kim, S.H. and Park, W.M. Effect of hot water extract from *Acanthopanax senticosus* on systemic anaphylaxis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 518-523 (2002)
- Park S.Y., Chang, S.Y., Yook, C.S. and Nohara, T. New 3,4-seco-lupane-type triterpene glycosides from *Acanthopanax senticosus* forma inermis. *J. Nat. Prod.* 63: 1630-1633 (2000)
- Bae, E.A., Yook, C.S., Oh, O.J., Chang, S.Y., Nohara, T. and Kim, D.H. Metabolism of chiisanoside from *Acanthopanax divaricatus var. albofructus* by human intestinal bacteria and its relation to some biological activities. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 582-585 (2001)
- Davydov, M. and Krikorian, A.D. *Eleutherococcus senticosus* Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. *J. Ethnopharmacol.* 72: 345-393 (2000)
- Dowling, E.A., Redondo, D.R., Branch, J.D., Jones, S., McNabb, G. and Williams, M.H. Effect of *Eleutherococcus senticosus* on submaximal and maximal exercise performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* 28: 482-489 (1996)
- Gaffney, B.T., Hugel, H.M. and Rich, P.A. Panax ginseng and *Eleutherococcus senticosus* may exaggerate an already existing biphasic response to stress via inhibition of enzymes which limit the binding of stress hormones to their receptors. *Med. Hypotheses* 56: 567-572 (2001)
- Lin, C.C. and Huang, P.C. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Acathopanax senticosus*. *Phytother. Res.* 14: 489-494 (2000)
- Umeyama, A., Shoji, N., Takei, M., Endo, K. and Arihara, S. Ciwujianosides D1 and C1: powerful inhibitors of histamine release induced by anti-immunoglobulin E from rat peritoneal mast cells. *J. Pharm. Sci.* 81: 661-662 (1992)
- Hacker, B. and Medon, P. Cytotoxic effects of *E. senticosus* aqueous extract against L1210 leukemia cells. *J. Pharm. Sci.* 73: 270-272 (1984)
- Hibasami, H., Fujikawa, T., Takeda, H., Nishibe, S., Satoh, T., Fujisawa, T. and Nakashima, K. Induction of apoptosis by *Acanthopanax senticosus* HARMS and its component, sesamin in human stomach cancer KATO III cells. *Oncol. Rep.* 7: 1213-1216 (2000)
- Schmolz, M.W., Sacher, F. and Aicher, B. The synthesis of Rantes, G-CSF, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12 and IL-13 in human whole-blood cultures is modulated by an extract from *Eleutherococcus senticosus* L. roots. *Phytother. Res.* 15: 268-270 (2001)
- Steinmann, G.G., Esperester, A. and Joller, P. Immunopharmacological *in vitro* effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts. *Arzneimittelforschung* 51: 76-83 (2001)
- Cheng, X.J., Li, P.Z., Sheng, X.H., Li, B.J. and Zhu, C.L. Antitumor and immunological activities of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms polysaccharides. *Chinese J. Cancer* 3: 191-193 (1984)
- Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Lee, S.W., Shin, K.S., Choi, W.H., Hwang, S.H., Ha, E.S., Kim, S.H., Joe, S.K. and Park, W.M. Antitumor activity of *Acanthopanax senticosus* extract and its possible immunological mechanism of action. *J. Ethnopharmacol.* In press (2003)
- Ha, E.S., Hwang, S.H., Yu, K.W., Shin, K.S., Cho, H.M., Kim, C.H., Park, W.M. and Yoon, T.J. Immunostimulation activity of the crude polysaccharides fractionated from *Eleutherococcus senticosus*, and its application to prevent of tumors by combination therapy with cisplatin. *Yakhak Hoeji* 47: 159-166 (2003)
- Ratcliffe, W.A., Challand, G.S. and Ratcliffe, J.G. A critical evaluation of separation methods in radiommunoassay for total triiodothyronine and thyroxine in unextracted human serum. *Ann. Clin. Biochem.* 11: 224-229 (1974)
- Granstrom, M., Wretlind, B., Markman, B., Pavlovskis, O.R. and Vasil, M.L. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exproteins. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 4: 197-200 (1985)
- Kim, J.B., Barnard, G.J., Collins, W.P., Kohen, F., Lindner, H.R. and Eshhar, Z. Measurement of plasma estradiol-17 beta by solid-phase chemiluminescence immunoassay. *Clin. Chem.* 28: 1120-1124 (1982)
- Diamandis, E.P., Bhayana, V., Conway, K. and Reichstein, E. Papapanastasiou-Diamandis, A. Time-resolved fluoroimmunoassay of cortisol in serum with a europium chelate as label. *Clin. Biochem.* 21: 291-296 (1988)
- Izquierdo, J.M., Sotorrio, P. and Quiros, A. Enzyme immunoassay

- of thyroxin with a centrifugal analyzer. *Clin. Chem.* 28: 123-125 (1982)
25. Park, M.L., Kim, Y.K., Kim, C.K. and Kim, J.B. Development of competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of total triiodothyronine in Serum. *J. Korean Soc. Endocrinol.* 11: 447-454 (1996)
26. Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Kang, T.B., Kim, S.H., Kim, K.S. and Kim, J.B. Production of monoclonal antibodies specific to Korean Mistletoe lectin (KML-C) and their characterization. *Yakhak Hoeji* 45: 180-189 (2001)
27. Schantz, S.P., Brown, B.W., Lira, E., Taylor, S.L. and Beddingfield, N. Evidence for the role of natural immunity in the control of metastatic spread of head and neck cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 25: 141-148 (1987)

---

(2003년 7월 28일 접수; 2003년 12월 2일 채택)