

산삼 배양근에서 분리한 다당의 면역자극 활성화에 미치는 효과

남소현 · 이영경 · 홍희도 · 이영철 · 김영찬 · 신광순* · †조장원
한국식품연구원, *경기대학교 식품생물공학과

Immuno-Modulatory Activity of the Crude Polysaccharide from Wild Ginseng Adventitious Root

Sohyun Nam, Young Kyoung Rhee, Hee-Do Hong, Young-Chul Lee,
Young-Chan Kim, Kwang-Soon Shin* and †Chang-Won Cho

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

**Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea*

Abstract

In this study, we examined immuno-modulatory activities of crude polysaccharides from wild ginseng adventitious roots (WGAR). The crude polysaccharide (WGAR-CP) was isolated from WGAR by hot water extraction, ethanol precipitation, and dialysis. The major constituents in WGAR-CP were neutral sugar (64.77%), and uronic acid (34.32%). WGAR-CP demonstrated anti-complementary activity dose-dependently. The immuno-modulatory effects of WGAR-CP were also analyzed by measuring nitric oxide and cytokines in the supernatants of mouse peritoneal macrophages. Mouse peritoneal macrophages stimulated with WGAR-CP produced nitric oxide and various cytokines such as interleukin (IL)-6 and IL-12 in a dose-dependent manner. In conclusion, WGAR-CP may have immuno-modulatory activities by activating a complementary system and macrophages, which produces cytokines.

Key words: wild ginseng adventitious root, polysaccharide, anti-complementary, macrophage, cytokine

서 론

산삼은 야생(특히 산)에서 자연발생적으로 발아하여 성장한 삼을 말한다. 일반적으로 약효 면에서 인삼보다는 장뇌삼이, 장뇌삼보다는 산삼이 강한 것으로 알려져 있으며, 민간이나 임상에서 질병 치료에 활용되고 있다. 하지만 산삼은 시중에서 구하기가 어렵고, 고가의 가격 때문에 산업적으로 응용하기에는 어려움이 따른다. 최근 실험실에서 산삼의 배양근을 재배하는 기술이 개발되어 많은 연구가 진행 중이다. 산삼 배양근은 천연 야생 산삼으로부터 조직을 분리하여 세포괴(cellus)와 부정근을 단계별로 유도하고, 이들 뿌리 중에서 건실한 것을 선별한 후, 생물반응기를 이용하여 45~60일 가량 배양하여 생산되고 있다(Son 등 1999). 이렇게 생산된 산삼 배양근은 야생 산삼과 매우 유사한 성분을 함유하고, 대체로 인삼보다 사포닌 함

량이 높고, 인삼에서는 볼 수 없는 다양한 약리성분을 함유하고 있다고 보고되었다(Jeong 등 2005). 또 면역활성 증강(Kwon 등 2004) 및 당뇨병 개선 효과(Kim 등 2012), 항산화 효과(Kim 등 2010) 등이 보고된 바 있으나, 산삼 배양근에서 유래된 다당체의 활성 효과에 대한 연구는 미미한 실정이다.

식물체로부터 유래된 다당체(polysaccharides)는 면역증강 인자로 잘 알려져 있으며, 인삼에서 정제된 다당체는 tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-1, IL-2, IL-6, IL-12, interferon(IFN)- γ 및 granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)와 같은 다양한 cytokine들의 생산과 림프계 세포가 증식하도록 자극하는 강력한 면역조절 기능도 가지고 있다(Lee 등 1997; Kim 등 1998; Shin 등 2002; Song 등 2003).

최근 많은 연구들이 질병이 발생한 이후가 아니라, 이에 대처한 예방 전략의 개발이 장기적으로 건강 유지라는 측면에

† Corresponding author: Chang-Won Cho, Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea. Tel: +82-31-780-9312, Fax: +82-31-709-9876, E-mail: cwcho@kfri.re.kr

서 보다 효과적이며 유익하다고 제안하고 있다(Shin KS 2012). 따라서 인체의 면역계를 활성화 시킬 수 있는 새로운 면역증강제의 개발은 기존의 병원체에 효과적으로 대처할 수 있는 방법으로 중요시 되고 있다.

인삼에서 분리된 다당체가 강력한 면역자극활성이 있다는 이전 연구들을 고려해 보았을 때, 산삼 배양근 다당체 역시 면역자극활성이 있을 것으로 추론되었다. 따라서 본 연구에서는 산삼 배양근의 다당체를 분리하여, 성분분석 및 각종 면역자극 활성 특히 자연면역계를 구성하고 있는 보체계 및 macrophage에 대한 영향을 평가함으로써, 면역자극활성제로서의 산삼 배양근 다당체의 가능성을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 산삼 배양근 시료 및 조다당 분리

본 연구에서 사용된 산삼 배양근은 (주)바이오벨류(Jeju, Korea)에서 제공받은 것을 사용하였다. 산삼 배양근을 1 cm 이하로 절단하여 환류추출기에 10배의 D.W.와 함께 넣은 뒤 90°C에서 3시간 동안 가열하여 나온 추출액을 4°C로 조절된 원심분리기(Mega 17R, Hanil Science Industrial Co. Ltd., Inchun, Korea)에서 분리하였다. 분리한 상등액은 최종농도가 80%가 되도록 ethanol을 첨가하여 하룻밤 방치한 후, 발생한 침전물을 회수하였다. 침전물을 소량의 증류수에 용해하여 Spectra/Por 투석막(MWCO; 6,000~8,000, Spectrum Medical Industries Inc., Laguna Hills, CA, USA)을 이용하여 2~3일간 투석을 행하고 동결건조를 행하여 조다당 시료(WGAR-CP)를 얻었다.

2. 일반 성분 분석 방법

총 당 함량은 phenol-sulfuric acid법(Dubois 등 1956)으로 측정하였다. 즉, 시험관에 시료의 조다당체 분말을 1%(w/v)로 증류수에 녹인 시료용액을 0.45 μ m 막필터로 여과하여 여액을 각각 1 ml씩 취하여 5% phenol 1 ml에 잘 혼합시켰다. 여기에 황산 5 ml를 첨가한 후 30분 반응시키고, 490 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 구해진 glucose의 함량으로 총 당 함량을 계산하였다. 산성당 함량은 carbazole-sulfuric acid법(Bitter 등 1962)으로 측정하였다. 시료분말을 1%(w/v) 농도로 증류수에 용해한 시료용액을 0.45 μ m 막필터로 여과한 후 여액을 각각 0.5 ml씩 취하고, 0.125% carbazole 0.25 ml를 가하여 잘 혼합시켰다. 여기에 진한 황산 3 ml를 가하고, 85°C water bath에서 15 min간 발색시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 구해진 β -D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 함량을 계산하였다. 단백질 함량 측정은 Lowry method(Lowry 등 1951)으로 측정하였으며, 표준물질로는 BSA를 사용하였다.

3. 구성당 분석 방법

구성당 분석은 Albersheim 등의 방법(Thomas & Albersheim 1972)을 일부 변형하여 가수분해 후 각 구성당을 alditol acetate와 aldono-lactone로 유도체화 하였고, gas chromatography(GC ACME-6100, Young-Lin Co. Ltd. Anyang, Korea)를 이용하여 분석하였다. 다당 시료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA) 중에서 121°C, 1.5 hr 반응시켜 가수분해 후, 1 ml의 1 M NH₄OH (ammonia solution)에 용해하여 10 mg의 NaBH₄로 4 hr 환원시켰다. Acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH₄를 제거한 후 methanol을 가하며, 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하여 각 구성당에 상당하는 alditol로 전환하였다. 중성당의 구성을 알기 위해 각각의 alditol을 1 ml의 acetic anhydride를 가하여 121°C에서 30 min 동안 반응시켜 alditol acetate로 전환시켰으며, 이를 chloroform/H₂O 2상 용매계로 분리하여 추출하고, 추출물은 건조 후 소량의 acetone에 용해하여 GC 분석용 시료로 사용하였다. 또 산성당의 구성을 분석하기 위하여 전환된 alditol을 증류수에 녹인 뒤, Sep-pak QMA Cartridge(Waters, Milford, MA, USA)에 전개하고, 1 M HCl로 aldonic acid를 분리하였다. 분리한 용액에 2 M TFA를 가하여 100°C에서 5 min간 반응시켜 aldono-lactone으로 전환시켰다. 그 후 chloroform/H₂O 2상 용매계로 분리하여 추출하고, 건조하여 GC 분석 시료로 사용하였다. GC column은 SP-2380 capillary column(0.25 mm \times 30 m, 0.2 μ m film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을, detector는 Flame ionization detector(FID, Young-Lin Co. Ltd.)를 사용하였고, carrier gas로서 N₂를 1.5 ml/min으로 흘렸다. Injection 온도 250°C, detector 온도 270°C, 컬럼 온도는 60°C에서 220°C까지 30°C/min, 220°C에서 250°C까지 8°C/min의 조건하에서 실험하였다. 각 구성당의 mole%는 각 유도체의 peak 면적, 분자량 및 FID에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

4. 항보체활성평가

항보체활성은 Mayer 방법(Kabat & Mayer 1965)을 이용하여 시료에 의한 보체소비(complement consumption) 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test로 측정하였다. 즉, 여러 농도(250, 500, 1,000 μ g/ml)로 증류수에 녹인 시료에 정상인의 혈청과 GVB⁺⁺(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4, 2% gelatin, 500 μ M Ca²⁺, 2 mM Mg²⁺ 함유) 완충액을 각각 50 μ l씩 혼합하여 37°C에서 30 min간 1차 반응시키고, GVB⁺⁺를 350 μ l를 가한 후 이를 10~160배로 연속 희석하였다. 여기에 다시 750 μ l의 GVB⁺⁺를 가한 후 양의 감작적혈구(IgM-sensitization sheep erythrocyte, EA Cell, 1 \times 10⁸ cells/ml) 250 μ l를 가해 37°C에서 60 min간 2차 반응시키고, PBS 2.5 ml를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액을

2,500 rpm에서 약 10 min간 원심분리하여 얻어진 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈 활성을 측정하였다. 다당체의 항보체 활성은 대조군의 총 보체용혈(50% total complement hemolysis, TCH₅₀, %)에 대한 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH₅₀, %)로서 나타내었다.

5. 면역계 관련 세포에 대한 독성 측정

C57BL/6 mouse(웅성, 5주령, 한림)의 복강에 5% thioglycollate 배지(Sigma, St Louis, MO, USA)를 1 ml 주입하고, 72~96 hr내에 유도된 macrophage를 PBS를 이용하여 회수하였다. 그 후 RPMI 1640 medium(Gibco™, Grand Island, NY, USA)으로 2~3회 세척하고, 세포수를 2.5×10⁶ cells/ml로 조정하여 96-well plate에 배양하였다. 배지는 RPMI 1640에 10%(v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco™)과 1%(v/v) penicillin-streptomycin을 가한 배지를 사용하였다. C57BL/6 mouse에서 비장을 적출하여 마쇄 및 여과를 거쳐 비장세포를 획득하였다. 이 후 0.2% 식염수를 이용하여 적혈구를 제거하고, RPMI 1640(with 10% FBS)로 2~3회 세척하여 세포수를 2.5×10⁶ cells/ml가 되도록 조정하였다. 이때 얻어진 세포 부유액은 96 well plate에 100 μl씩 분주하였다. 다양한 농도로 희석된 시료를 100 μl씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72 hr 배양하였다. 각 세포에 대한 독성은 MIT assay 방법에 따라 측정하였다. 96 well-plate의 상등액을 조심스럽게 제거한 후, MIT 0.5 mg/ml [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MIT, Sigma)] 용액을 200 μl씩 첨가하여 4 hr 동안 배양하여 formazan을 형성시켰다. 그 후, 상등액을 제거하고 DMSO 200 μl를 각 well에 첨가하여 formazan을 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Nitric oxide 생산량 측정

활성화된 macrophage가 분비하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO)의 생성량을 측정하였다. NO의 생성은 비색법으로 세포 상등액에 축적되는 nitrite양을 측정하였다. 100 μl의 세포배양 상등액을 취하여 동량의 Griess reagent(Sigma)을 가하여 상온에서 15 min 반응시켰다. NO의 활성 정도는 ELISA 판독기(Infinite M200 Pro, TECAN, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

7. Cytokine 생산량 측정

배지로 희석시킨 고분자 분획물을 농도 별로 세포에 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24 hr 배양한 후, 상등액으로 분비된 IL-6, IL-12의 양을 ELISA kit(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 즉, anti-cytokine capture antibody를 coating buffer(0.2 M sodium phosphate, pH 6.5)에 희석하여 96 well plate(NUNC Co., Roskilde, Denmark)

에 100 μl/well 씩 넣은 후, 4°C에서 하룻밤 방치하여 coating하였다. Tween 20(Sigma)을 phosphate buffered saline(PBS)에 0.05% (v/v)가 되도록 가한 PBS/Tween 용액으로 plate를 3회 세척한다. Assay diluent(PBS with 10% FBS)를 plate에 200 μl/well 씩 넣은 후 상온에서 1시간 방치하였다. PBS/Tween으로 3회 세척 후, 배양 상등액을 각 well에 100 μl씩 넣어준 뒤 2시간 상온에서 방치하였다. PBS/Tween으로 5회 세척 후, detection antibody인 biotinylated antibody와 enzyme reagent인 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 assay diluent(PBS with 10% FBS)에 희석하여 plate에 100 μl/well씩 넣은 후 상온에서 1 hr 방치하였다. PBS/Tween으로 7회 세척 후, substrate solution(TMB substrate reagent Set, BD Biosciences)를 100 μl/well 씩 넣은 후 암소에서 30 min 방치하였다. Stop solution인 2 M 황산용액을 well 당 50 μl 씩 넣어 반응을 중지시키고, 96 well plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. 통계처리

실험에서 얻은 모든 data는 SAS(Statistical Analysis System 1996) 8.0 프로그램을 이용하여 ANOVA 분산분석과 Duncan의 다중범위 검정법으로 시행하였다.

결과 및 고찰

1. 산삼 배양근 유래 다당체의 화학적 특성

산삼 배양근으로부터 열수추출 및 ethanol 침전에 의해 분

Table 1. Chemical properties of WGAR-CP

	WGAR-CP
Chemical composition (%)	
Neutral sugar	64.77±0.49 ¹⁾
Uronic acid	34.32±0.42
Protein	0.91±0.17
Component of neutral sugar (Mole%)	
Rhamnose	2.9±0.85
Fucose	0.1±0.09
Arabinose	5.4±0.92
Xylose	0.0±0.05
Mannose	0.2±0.23
Galactose	5.9±0.81
Glucose	85.5±2.36
Component of uronic acid (Mole%)	
Galacturonic acid	71.5±0.13
Glucuronic acid	28.5±0.14

¹⁾ Mean±S.D. (n=3).

리한 산삼 배양근 다당체(WGAR-CP)의 일반 화학특성을 살펴본 결과는 Table 1과 같다. WGAR-CP는 중성당 64.77%, 산성당 34.32%로 구성되어 있었으며, 단백질은 0.91%로 미량 존재하였다. 한편, WGAR-CP를 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을 분석한 결과, glucose가 85.5%로 가장 높았으며, 그 외 rhamnose 2.9%, arabinose 5.4%, galactose 5.9%를 함유하고 있었다. 또 uronic acid는 galacturonic acid가 71.5%, glucuronic acid가 28.5%로 대부분 galacturonic acid로 밝혀졌다. 이는 Min 등(1984)이 인삼의 pectin을 구성하고 있는 성분을 galacturonic acid, glucose, galactose, arabinose, rhamnose 및 xylose로 밝힌 점과 비슷하였다. 또한 홍삼의 산성다당체 성분 구조를 동정한 연구(Lee & Okuda 1990; Okuda H 1992)에서 구성성분을 galacturonic acid, arabinose, rhamnose, glucose, galactose로 밝힌 것과도 유사하였다.

2. 산삼 배양근 유래 다당체의 보체계 활성화능

보체계(complement system)는 C1~C9의 활성단백질과 조절인자를 포함하여 약 20여 종의 혈중 순환 단백질들로 구성되어 있으며, 외부 감염 병원체 등 침입인자를 항체의 존재 또는 비존재 하에 비특이적으로 제거하는 생체의 주요 방어 기구이다(Kwon & Sung 1997). 산삼 배양근 유래 다당에 의한 보체계 활성화능을 측정된 결과, WGAR-CP는 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 ITCH_{50} 값이 약 44%에 이르는 보체계 활성화능을 보였으며, 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1).

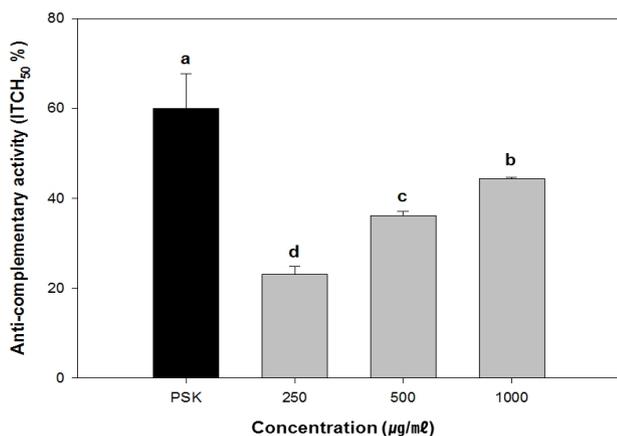


Fig. 1. Anti-complementary activities of WGAR-CP. The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. PSK, a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control. The data were expressed as mean \pm S.D. of three separate experiments. Different corresponding letters indicate significant differences at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

이는 보체계의 강력한 활성인자로 알려져 있는 면역활성 다당체인 구름버섯(*Coriolus versicolor*, 운지) 유래 PSK(Satio 등 1988)보다는 상대적으로 낮은 활성이나 WGAR-CP가 보체계의 활성인자임을 확인할 수 있었다. 식물유래 다당체에선 천년초 (Seo & Shin 2012), 감잎(Jung 등 2002), 고사리(Oh 등 1994) 등의 다당체가 항보체 활성을 가지고 있다고 보고되었다.

3. 산삼 배양근 유래 다당체의 면역세포에 대한 세포독성

면역계 세포인 mouse peritoneal macrophage와 spleen cell에 대한 WGAR-CP의 독성을 확인하였다. WGAR-CP를 0.1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 peritoneal macrophage와 spleen cell에 처리한 후 세포의 생존율을 측정하였다. Peritoneal macrophage cell에

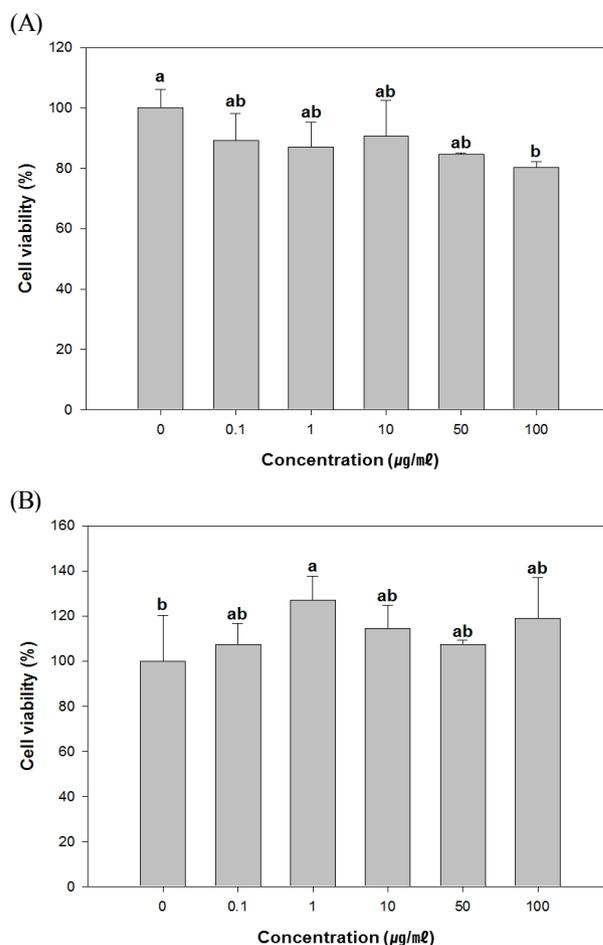


Fig. 2. Cell cytotoxicity of WGAR-CP on mouse peritoneal macrophage (A), and spleen cells (B). All cells were incubated with various concentrations of WGAR-CP for 24 hr (macrophage) and 72 hr (spleen cells). The data were expressed as mean \pm S.D. of five separate experiments. Different corresponding letters indicate significant differences at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

서는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 제외한 모든 농도에서 유의적인 세포사멸이 나타나지 않아 세포독성이 낮음을 확인할 수 있었고, spleen cell에서는 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 2). 특히 spleen cell의 경우, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의적인 세포 증식을 확인할 수 있었다. 일반적으로 식품 유래 다당체의 경우, 면역계 세포에 대해 독성을 나타내지 않는 것으로 알려져 있다. 양조 및 조건간장으로부터 분리한 다당체를 이용한 이전 연구에서도 분리된 다당체가 mouse peritoneal macrophage 및 spleen cell에 대해 세포독성을 나타내지 않았으며, mouse leukaemic monocyte macrophage 유래 RAW 264.7 cell에 대해서는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서 세포증식 효과를 보인 바 있다(Park 등 2012).

4. Peritoneal macrophage의 nitric oxide 생산에 미치는 산삼 배양근 유래 다당체의 효과

활성화된 macrophage에서 생산되는 NO는 비특이적 숙주 방어 기작인 대식작용(Phagocytosis)을 증대시키고, 세균 및 암세포의 증식 억제 활성을 보여 생체방어기전의 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Sorimachi 등 2001). WGAR-CP 자극에 의한 NO 생성은 저농도에서는 유의적인 활성을 보이지 않았으나, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 농도별로 유의적인 차이를 보였다(Fig. 3). Hong 등(2008)은 산삼 배양근 열수 추출물이 내피 세포에서 농도 의존적으로 NO의 생산을 증가시킨다고 보고

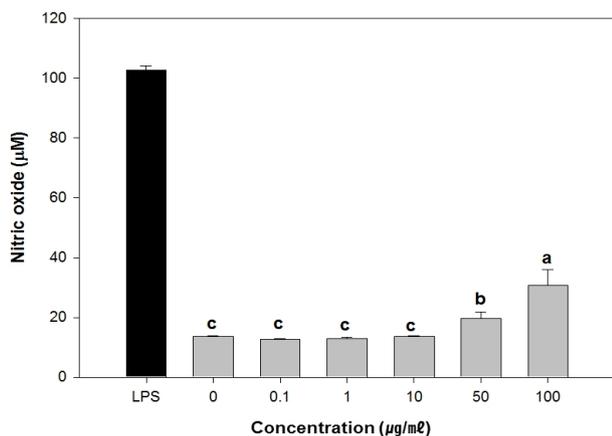


Fig. 3. Effect of WGAR-CP on NO synthesis in mouse peritoneal macrophage. Peritoneal macrophage cells were treated with various concentrations of WGAR-CP for 24 hr. Supernatants were collected and NO concentration was determined using the Griess reagent. Lipopolysaccharide (LPS: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as the positive control. The data were expressed as mean \pm S.D. of five separate experiments. Different corresponding letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

하였고, Kim 등(2002)은 홍삼 다당체에 의해 자극된 peritoneal macrophage가 NO 생성을 증가시키고, 증가된 NO에 의해 암 세포 사멸도가 유의성 있게 증가함을 밝힌 바 있다.

5. Peritoneal macrophage의 cytokine(IL-6, IL-12) 생산에 미치는 산삼 배양근 유래 다당체의 효과

Cytokine은 면역세포에서 생성되는 단백질 중재자로 외부 항원에 대한 여러 면역세포간의 협력을 중재하므로, 이들의 생성과 분비는 면역반응조절에 있어서 매우 중요하다. 현재 12가지 이상의 cytokine들이 규명되었으나, 그들의 기능이 모

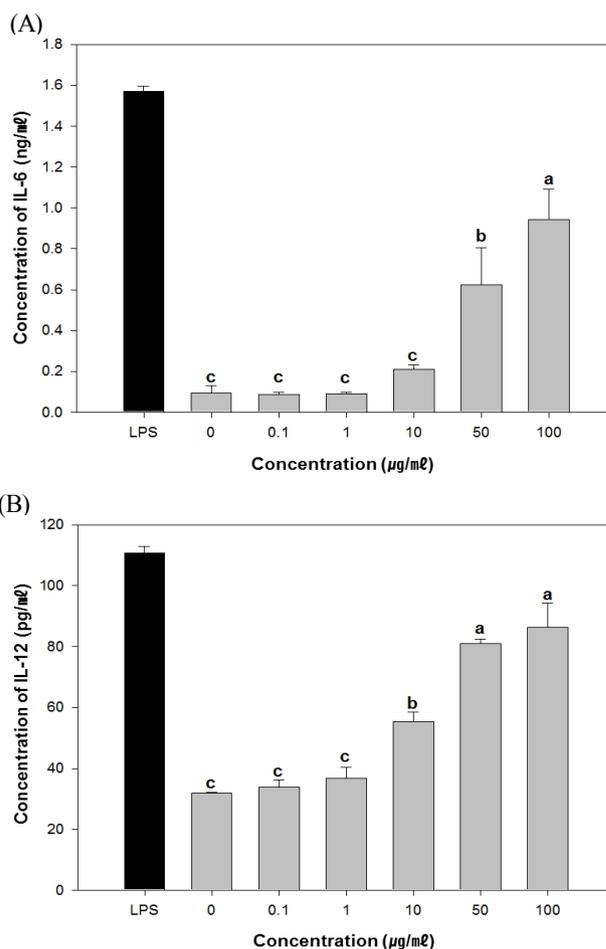


Fig. 4. Effect of WGAR-CP on induction of IL-6 (A) and IL-12(B) from activated peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were treated with the indicated concentrations of samples for 24 hr. The level of each cytokine in the supernatants of the cultures was determined by ELISA kits. Lipopolysaccharide (LPS: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used as the positive control. The data were expressed as mean \pm S.D. of five separate experiments. Different corresponding letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

두 밝혀져 있지는 않다. Macrophage가 분비하는 대표적인 면역 유도 사이토카인에는 IL-6, IL-12, TNF- α 등이 있다(Wang 등 2003). 산삼 배양근 유래 활성 다당 WGAR-CP의 자극에 의한 peritoneal macrophage의 cytokine 생산을 ELISA 방법으로 측정된 결과, IL-6, IL-12의 분비를 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 확인되었다(Fig. 4). IL-6는 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 WGAR-CP 농도에서 각각 0.62, 0.94 ng/ml의 분비농을 보였는데, 저농도에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 유의적인 차이를 보였다. 반면, IL-12는 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의적 차이를 보였으나, 그 이상의 농도에서는 증가를 보이지 않았다. 활성화된 macrophage가 생성하는 IL-12는 T 세포와 natural killer(NK) 세포를 자극시키는데, 이렇게 자극된 T 세포는 IFN- γ 를 생성하여 T cell의 helper T cell 1(Th1) 세포응답의 중요한 역할을 한다. 따라서 IL-12에 의한 면역조절은 병원체 및 종양에 대한 세포매개 면역의 중요한 역할을 담당하고 있다(Sundquist 등 2003). Kwon & Chung(2004)은 산삼, 장뇌삼, 인삼의 면역효능 비교연구에서 산삼, 장뇌삼, 인삼이 활성화된 macrophage에서 IL-12의 생성을 촉진하여 Th1 세포응답 활성 물질의 생성을 강하게 증가시킴을 밝힌바 있는데, 산삼 배양근 다당체에 의한 IL-12의 분비 증가는 이러한 연구결과와 일치한다. 초기 염증단계에서 세포 간 신호전달을 수행함으로써 면역반응에 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있는 IL-6(Ryu HS 2011) 역시 WGAR-CP에 의해 분비량이 현저히 증가되었는데, Jang & Shin(2010)은 Raw 264.7 macrophage를 이용한 산삼의 면역증강효과 연구에서 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 증가시킨다고 밝힌 바 있다.

Macrophage로부터 분비되는 IL-6, IL-12, TNF- α 와 같은 염증성 cytokine들은 NO와 함께 인체에 침입한 병원체 및 종양세포들에 대한 제거활성을 증진시킨다는 이전의 연구결과들을 고려해 보았을 때(Yoon 등 2008), 산삼 배양근 다당체가 macrophage의 NO 및 염증성 cytokine들의 생성을 촉진하여 인체의 면역력을 증진시킬 것으로 사료되었다.

요 약

최근 산삼근의 배양이 실험실에서 가능해짐에 따라 산삼에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 산삼 배양근으로부터 다당을 분리하여 보체계 및 macrophage에 대한 면역자극활성을 측정하였다. 산삼 배양근을 열수 추출한 뒤, 80% ethanol 침전을 통하여 조다당을 추출하여 특성을 검토한 결과, 산삼 배양근 조다당체(WGAR-CP)의 neutral sugar 함량은 64.77%였고, uronic acid 함량은 34.32%이었다. WGAR-CP의 구성당 조성을 확인한 결과, glucose를 높은 비율로 함유하고 있었으며, rhamnose, arabinose, galactose, glucose를 미량 함

유하고 있었다. Uronic acid에서는 galacturonic acid를 높은 비율로 함유하고 있었다. 한편, WGAR-CP는 인체 초기 면역반응에 있어 중요한 역할을 담당하는 보체계에 대하여 농도 의존적인 활성을 나타냈다. WGAR-CP를 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 mouse peritoneal macrophage에 처리하여 면역자극을 유도한 후, NO 생성 및 cytokine 분비활성을 평가하였다. 그 결과 WGAR-CP의 NO 생성은 저농도에서는 유의적인 활성을 보이지 않았으나, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도별로 유의적인 차이를 보였다. 또한 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 용량에서 IL-6 생성을 농도 유의적으로 증가시켰고, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 유의적으로 IL-12의 생성을 증가시켰다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, WGAR-CP는 자연면역계를 구성하고 있는 보체계와 macrophage의 활성인자로 작용할 수 있음이 확인되었고, WGAR-CP에 의해 활성화된 macrophage는 NO 및 IL-6, IL-12와 같은 염증성 cytokine의 분비를 유도함으로써 체내 면역기능을 증강시킬 수 있는 가능성이 있을 것으로 사료되었다.

참고문헌

- Bitter T, Muir HM. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 4:330-334
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Robers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Hong MH, Lim HK, Park JE, Jun NJ, Lee YJ, Cho MJ, Cho SK. 2008. The antihypertensive and vasodilating effects of adventitious root extracts of wild ginseng. *J Korean Soc Appl Chem* 51:102-107
- Jang HI, Shin HM. 2010. Wild *Panax ginseng* (*Panax ginseng* C. A. Meyer) protects against methotrexate-induced cell regression by enhancing the immune response in RAW 264.7 macrophages. *Am J Chin Med* 38:949-960
- Jeong HS, Kang TS, Woo KS, Paek KY, Yu KW, Yang SJ. 2005. Effects of cultured wild ginseng roots on the alcoholic fermentation. *Korean J Food Preserv* 12:402-410
- Jung YJ, Chun H, Kim KI, An JH, Shin DH, Hong BS, Cho HY, Yang HC. 2002. Purified polysaccharide activating the complement system from leaves of *Diospyros kaki* L. *Korean J Food Sci Technol* 34:879-884
- Kabat EA, Mayer MM. 1965. Experimental Immunochemistry. 2nd ed. pp. 133-240. Thomas Publisher. Springfield, IL, USA
- Kim EL, Kim CS, Lee HY, Lee HR, Kim EY, Yoon MC, Shin SS. 2012. Mountain cultivated ginseng water boiled extract decrease blood glucose level and improves lipid metabolism

- in male *db/db* mice. *Kor J Herbology* 27:69-75
- Kim JW, Lee SH, No HK, Hong JH, Youn KS. 2010. Antioxidant properties of cultured wild ginseng roots extracts. *Korean J Food Preserv* 17:861-866
- Kim KH, Lee YS, Jung IS, Park SY, Chung HY, Lee IR, Yun YS. 1998. Acidic polysaccharide from *Panax ginseng*, ginsan, induces Th1 cell and macrophage cytokines and generates LAK cells in synergy with rIL-2. *Planta Med* 64: 110-115
- Kim YS, Park KM, Shin HJ, Song KS, Nam KY, Park JD. 2002. Anticancer activities of red ginseng acidic polysaccharide by activation of macrophages and natural killer cells. *Yakhak Hoeji* 46:113-119
- Kwon MH, Sung HJ. 1997. Characteristics of immune response by polysaccharides with complement system activity. *Food Sci Ind* 30:30-43
- Kwon SJ, Chung DK. 2004. The immune-enhancing effect of mountain grown ginseng, mountain cultivated ginseng, and *Panax ginseng*. *J Oriental Neuropsychiatry* 15:89-102
- Lee SD, Okuda H. 1990. Effect of acidic polysaccharide of Korean red ginseng on lipolytic action of toxohormone-L from cancerous ascites fluid. *Korean J Ginseng Sci* 14:67-73
- Lee YS, Chung IS, Lee IR, Kim KH, Hong WS, Yun YS. 1997. Activation of multiple effector pathways of immune system by the antineoplastic immunostimulator acidic polysaccharide ginsan isolated from *Panax ginseng*. *Anticancer Res* 17:323-331
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biochem* 193:265
- Min KC, Jo JS, Kim ES. 1984. Studies on the nonstarchy polysaccharides of Korean ginseng, *Panax ginseng* C. A. Meyer: II. Physico-chemical properties of petic substances. *Korean J Ginseng Sci* 8:105-113
- Oh BM, Kweon MH, Ra KS. 1994. Isolation and characterization of acidic polysaccharides activating complement system from the hot water extracts of *Pteridium aquilinum* var. *latisculum*. *Korean J Food & Nutrition* 7:159-168
- Okuda H. 1992. Inhibitory substances in Korean red ginseng toward toxohormone-L— a toxic substance secreted from tumor cell. *The ginseng review* 15:34-37
- Park HR, Lee MS, Jo SY, Won HJ, Lee HS, Lee H, Shin KS. 2012. Immuno-stimulating activities of polysaccharide isolated from commercial soy sauce and traditional Korean soy sauce. *Korean J Food Sci Technol* 44:228-234
- Ryu HS. 2011. Effects of a corn extract on mouse splenocyte and cytokine production by peritoneal macrophages. *Korean J Food & Nutr* 24:65-70
- Satio H, Tomioka H, Sato K. 1998. PSK, a polysaccharide from *Coriolus versicolor*, enhances oxygen metabolism of murine peritoneal macrophages and the host resistance to listerial infection. *J Gen Microbiol* 134:1029-1035
- Seo YS, Shin KS. 2012. Immune system-stimulating activities of mucilage polysaccharides isolated from *Opuntia humifusa*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:95-102
- Shin JY, Song JY, Yun YS, Yang HO, Rhee DK, Pyo S. 2002. Immunostimulating effects of acidic polysaccharides extract of *Panax ginseng* on macrophage function. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 24:469-482
- Shin KS. 2012. Immunostimulating plant polysaccharides: Macrophage immunomodulation and its possible mechanism. *Food Sci Ind* 45:12-22
- Son SH, Choi SM, Hyung SJ, Yun S, Choi MS, Shin EM, Hong YP. 1999. Induction and culture of mountain ginseng adventitious roots and AFLP analysis for identifying mountain ginseng. *Biotechnol Bioprocess Eng* 4:119-123
- Song JY, Han SK, Son EH, Pyo SN, Yun YS, Yi SY. 2002. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. *Int Immunopharmacol* 2:857-865
- Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okudo A, Yamazaki S. 2001. Secretion of TNF- α , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Aguricus blazei* Murill fraction *in vitro*. *Cell Structure and Function* 26:103-108
- Sundquist M, Johansson C, Wick MJ. 2003. Dendritic cells as inducers of antimicrobial immunity *in vivo*. *Apmsis* 111:715-724
- Thomas MJ, 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
- Wang H, Actor JK, Indrigo J, Olsen M, Dasgupta A. 2003. Asian and Siberian ginseng as a potential modulator of immune function: An *in vitro* cytokine study using mouse macrophage. *Clin Chim Acta* 327:123-128
- Yoon TJ, Yu KW, Shin KS, Suh HJ. 2008. Innate immune stimulation of exo-polymers prepared from *Cordyceps sinensis* by submerged culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:1087-1093

접 수 : 2012년 9월 11일
 최종수정 : 2012년 10월 5일
 채 택 : 2012년 10월 18일