Korean J. Food & Nutr. Vol. 25. No. 4, 941～950 (2012)
http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2012.25.4.941

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

감잎에서 분리한 다당의 면역자극 활성

신영아 · 박혜령* · 홍희도** · †신광순*
경기대학교 대학원 대체의학과, *경기대학교 식품생물공학과, **한국식품연구원

Immuno-stimulating Activities of Polysaccharide Fractions Isolated from Persimmon Leaves

Young-A Shin, Hye-Ryung Park*, Hee-Do Hong** and †Kwang-Soon Shin*
Dept. of Alternative Medicine, Graduate School, Kyonggi University, Seoul 120-837, Korea
**Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea*
***Korea Food Research Institute, Sungnam 463-746, Korea*

Abstract

In order to develop new physiologically active polysaccharides from persimmon leaves, two different crude polysaccharides were prepared using hot water (PLW-0) and pectinase digestion (PLE-0) and their immuno-stimulating activities were estimated. PLW-0 and PLE-0 showed similar sugar compositions with 15 different sugars, including rarely observed sugars in general polysaccharides such as 2-O-methyl-fucose, 2-O-methyl-xylose, apiose, aceric acid, 3-deoxy-D-*manno*-2-octulosonic acid, and 3-deoxy-D-*lyxo*-2-heptulosaric acid, but the uronic acid content of PLE-0 was lower than that of PLW-0 caused by pectinase treatment. Both PLW-0 and PLE-0 showed potent anti-complementary activity in a dose-dependent manner which was similar to a known immuno-stimulating polysaccharide, PSK, from *Coriolus versicolor*. The activity of PLE-0 at a low concentration (100 ㎍/㎖) was higher than that of PLW-0. In an *in vitro* cytotoxicity analysis, PLW-0 and PLE-0 (up to 1,000 ㎍/㎖) did not affect the growth of peritoneal macrophages and Colon 26-M3.1 carcinoma cells. In contrast, they enhanced lymphocyte proliferation activity. Peritoneal macrophages stimulated with PLW-0 and PLE-0 produced various cytokines, such as IL-6 and IL-12. However, PLE-0 was more effective on the cytokine production. Intravenous administration of PLW-0 and PLE-0 significantly augmented natural killer (NK) cell cytotoxicity against Yac-1 tumor cells 3 days after the treatment of polysaccharide fractions. But NK cells obtained from the PLE-treated group showed higher tumoricidal activity even at a low dose of 40 ㎍/mouse. In experimental lung metastasis of Colon 26-M3.1 carcinoma cells, prophylactic administration of PLW-0 and PLE-0 significantly inhibited lung metastasis in a dose-dependent manner and PLE-0 was more effective on the inhibition of cancer metasasis. The results lead us to conclude that the pectinase-treated process is indispensable to preparing polysaccharides with higher immune-stimulating activity from persimmon leaves.

Key words: persimmon leaves, polysaccharide, immune-stimulating activity, anti-metastatic activity

서 론

한국인의 사망 원인 1위를 기록하고 있는 암(cancer)을 극복하기 위해서 전통적으로 수술요법(surgery), 방사선요법(radiation therapy) 및 약물요법 (chemotherapy)을 이용하고 있으나, 현재까지 1차 암으로부터 전이를 일으킨 종양세포에 대하여 완벽한 치료 효과를 기대하기는 어려운 실정이다(Kadhim 등 2000; Strome 등 2002; Rosenberg 등 2004). 현재 항암 치료의 대부분은 항암제 투여에 의존하고 있으나, 항암제의 대다수가 합성 화학약품으로 조혈기능 및 면역기능 이상 등의 부작용을 나타내고 있어, 암세포만을 선택적으로 사멸시키는 치료제의 개발이 시급한 실정이다(Jeong 등 2009). 이에 많은 학

† Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea. Tel: +82-31-249-9655, Fax: +82-31-249-9655, E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr

자들은 항암제의 부작용을 감소시키고, 항암효능을 증가시키는 대안으로 기존의 치료 방법에 면역요법(immunotherapy) 등을 도입한 병용요법(combination therapy)을 시도하고 있다(Kadhim 등 2000). 이러한 관점에서 종양에 대한 숙주의 방어기전을 향상시키는 생물반응조절제(BRM, biological response modifier)의 사용은 부작용이 심각한 약물요법의 대체 수단이 될 수 있다는 점에서 많은 연구가 집중되고 있는데(Ko 등 2010), 특히 내성이나 독성이 없으며, 숙주의 면역력을 자극할 수 있는 천연물에서 추출한 면역반응조절제에 대한 관심이 높아지고 있다. 최근 고등식물, 곰팡이, 이끼류, 조류, 동물 및 박테리아 등 천연소재에서 분리한 다당체에서 다양한 활성이 보고되고 있으며, 특히 이들은 T와 B림프구, 대식세포, NK cell, LAK 세포 및 수지상 세포 등 면역세포의 활성화시켜 체내 면역능을 증진시키고, BRM으로써의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 버섯으로부터 유래된 lentinan 및 Polysaccharide-K (PSK) 등과 같이 이미 잘 알려진 다당체(β-glucan)의 경우, 이들이 갖는 안전성, 비교적 양호한 효능 및 낮은 독성 등의 특징으로 인하여 다양한 항암 치료제의 보조제로서 활용되고 있다(Hong HD 2011).

감(persimmon, *Diospyros kaki* Thumb)은 우리나라를 비롯한 동북아시아에서 널리 재배되고 있으며, carotenoid, pectin, polyphenol과 같은 영양 및 건강 성분(Gorinstein 등 1994; Gorinstein 등 2001)들에 대한 인식으로, 최근 남부 유럽에서도 재배가 확산되고 있는 과실이다. 그러나 감잎은 제한된 양만이 차 등으로 가공될 뿐 대부분 낙엽 형태로 폐기되며, 이용도가 매우 낮은 농산 부산물이다. 따라서 감잎을 이용하여 고부가가치 기능성 소재로의 개발은 부산물 활용 및 농가소득 증대라는 측면에서 큰 의의가 있다고 할 수 있다. 최근 감잎에 관한 생리활성 연구로 항산화 및 아토피성 피부염 개선 효과(Jung & Jeong 2012), 체지방 감량 및 지질대사 조절 효과(Jung 등 2011), 미백 및 항노화 효과(An 등 2005), 항고혈압 및 혈관이완(Kawakami 등 2011) 등이 보고된 바 있으며, 감잎의 Sarcoma-180에 대한 항암효과(Moon 등 1996), 돌연변이 유발 억제 및 암세포 증식 억제 효과(Moon SH 2002), 위암 세포주(SUN16)에서 항암효과(Kim & Kim 2003) 등도 보고된 바 있다. 하지만 감잎의 생리활성에 대한 연구는 대부분 flavonoid나 tannin을 대상으로 진행되어 왔으며, 감잎에 존재하는 다당류에 대한 연구나 그들이 갖는 기능성에 관한 연구는 극히 미진한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 감잎을 대상으로 열수 추출 및 효소처리를 행하고, 이로부터 다당류를 분리하여 제반 화학 특성에 대해 검토하였으며, 각종 면역자극 활성을 평가함으로써 감잎을 고부가가치의 생리기능성 소재로 개발하기 위한 기초자료로 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 감잎(persimmon leaves)은 2011년 경남 거창군에서 생산되어 건조된 감잎을 구입하여 실험재료로 사용하였다.

2. 일반 분석 및 구성당 분석

시료의 중성당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(Dubois 등 1956)으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl법(Blumenkarntz & Asboe-Hansen 1973)으로, TBA-positive material의 함량은 2-keto-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid(KDO)를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid법(Karkhanis 등 1978)으로, 단백질 함량은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Bradford법(Bradford MM 1976)을 실험실 여건에 맞게 변형하여 사용하였다.

구성당 분석은 다당 시료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA)로 121℃에서 1.5시간 가수분해하여 각각 alditol acetate 유도체(Jones & Albersheim 1972)로 전환시킨 후, GC로 분석하였다. GC의 분석은 SP-2380 capillary column(0.2 ㎛ film, 0.25 ㎜×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 GC ACME-6100(Young-Lin Co. Ltd., Anyang, Korea)을 이용하였으며, 표준온도조건 60℃(1 min), 60℃→220℃(30℃/min), 220℃(12 min), 220℃→250℃(8℃/min), 250℃(15 min)에서 분석을 실시하였다. 구성당의 mole%는 peak의 면적비, flame ionization detector(FID)에 대한 반응계수 및 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다. 한편, 구성당 중 KDO 및 3-deoxy-D-*lyxo*-2-heptulosaric acid(DHA) 함량의 GC 분석을 위해서는 York 등(1985)과 Stevenson 등(1988)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 시료를 약산 조건(1% acetic acid, 100℃, 2시간)에서 가수분해하여 염기성 $NaBD_4$로 환원하여 KDO를 보호하고, 0.1 M TFA로 100℃에서 재차 처리하고, $NaBD_4$로 환원하여 DHA 부위를 보호하였다. 이때 2 M TFA 121℃ 1시간 가수분해하여 남아있는 모든 결합을 절단하고, 환원과 acetyl화를 거쳐 상기 조건하에서 분석하였다.

3. 감잎 다당의 분리 및 정제

감잎으로부터 다당을 분리하기 위하여 두 가지 방법을 이용하였다. 단순 열수추출물은 감잎 분말 100 g에 20배 부피의 증류수를 가하여 100℃에서 추출하였다. 감잎 열수추출물에 4배 부피의 95% ethanol를 가하고, 침전물은 소량의 증류수에 용해하여 24시간 동안 투석(MWCO; 12,000～14,000, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)을 진행하여, 저분자물질을 선택적으로 제거하였다. 이를 회전감압 농축장

치를 이용하여 농축한 후, 동결건조(FreeZone, Labconco, Kansas City, MO, USA)하여 조다당 시료인 PLW-0 획분을 얻었다.

이와 별도로 2 ℓ 의 0.05 M acetate buffer(pH 5.0)에 감잎시료 100 g을 현탁시킨 후, 시료의 1% 함량의 pectinase(from *Aspergillus niger*, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 가하여 50℃, 3일간 효소처리를 행하였다. Pectinase 처리물은 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 잔사를 제거하고, 상등액에 4배 부피의 95% ethanol을 가하여 하룻밤 방치한 후, 이때 발생한 침전물을 소량 증류수에 용해시켜 2～3일간 투석을 행하고, 이를 동결 건조하여 효소처리 조다당 획분, PLE-0를 얻었다.

4. 보체계의 활성화능

보체계의 활성(anti-complementary activity)은 Mayer법(Kabat & Mayer 1971)을 이용하여 시료에 의한 보체 활성화 후, 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈활성에 근거를 둔 complement fixation test로 측정하였다. 즉, 정상인의 혈청과 2% gelatin, 3 mM Ca^{2+}, 10 mM Mg^{2+}이 함유된 GVB^{2+} 완충용액(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 및 시료를 혼합하여 1차 반응시킨 후, 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocytes, EA Cell, Biotest Co., Tokyo, Japan)를 넣어 2차 반응을 시킨 다음 4℃의 PBS(phophate buffered saline)를 가하여 반응을 정지시켰다. 각 반응액을 4℃, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하였으며, 상등액의 흡광도를 412 ㎚에서 측정하였다. 항보체 활성은 총보체 용혈 저지율($ITCH_{50}$: Inhibition of 50% total complement hemolysis)로 나타낸 후, 양성대조군인 PSK(polysaccharide-K)의 활성을 사용하여 보정 후 나타내었다(Yamada 등 1989).

5. 실험동물

생후 5～6주령의 웅성 BALB/c를 G-Bio(Seoul, Korea)에서 구입하여 3일간 적응을 거친 후 실험에 사용하였다. Mouse는 사육조에 5～10마리씩 넣어 온도 23±3℃, 습도 55～70%에서 사육하였으며, 물과 사료는 자유 급식 형태로 유지하였다. 실험은 경기대학교 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 실시하였다.

6. 감잎 유래 조다당의 정상세포와 암세포에 대한 세포독성 측정

종양세포 및 일반 세포에 대한 시료의 세포 독성 여부를 확인하고자 mouse 복강에서 획득한 정상세포인 macrophage와 종양세포주인 Colon 26-M3.1 carcinoma cell을 각각 1×10^4 cells/㎖의 농도로 계수한 후 flat-bottomed 96-well microplate에 100 ㎕씩 분주하고, 여러 농도로 조종된 시료를 각 well에 100 ㎕씩 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 3일간 배양하였다. 각 시료 농도에 따른 세포 독성의 효과는 CCK-8(cell counting kit-8, Dojindo Co. Ltd., Kumamoto, Japan)를 5배 희석하여 well당 50 ㎕씩 가한 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 30～60분간 반응시키고 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

7. 감잎 유래 다당의 림프구 증식활성 측정

6주령 female BALB/c mouse를 경구 탈추법으로 치사시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 stainless steel mesh를 이용, PBS 상에서 마쇄(100 mesh) 및 여과(200 mesh)하여 림프구 세포를 획득하였다. 0.2% NaCl 5 ㎖를 이용, 혼합된 적혈구를 파괴하고, RPMI 1640-FBS 배지(with 10% FBS, Gibco BRL Co, Grand Islane, NY, USA)로 2～3회 세척 후 세포수를 5×10^6 되도록 조정하였다.

이때 얻어진 세포 부유액은 96-well plate에 180 ㎕씩 분주하고, 배지로 연속 희석된 시료용액 20 ㎕를 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 72시간 배양한 후, 각 well당 20 ㎕의 CCK-8 kit(Dojindo) 용액을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 3시간 배양하고, microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용, 450 ㎚에서 흡광도을 측정하여 활성을 비교하였다.

8. 감잎 유래 조다당의 Macrophage Cytokine 생산자극 활성 측정

BALB/c mouse의 복강에 5% thioglycollate 배지(Sigma)를 1 ㎖ 주입하고 72시간 내에 유도된 macrophage를 회수한 후, RPMI 1640으로 2～3회 세척하고, 세포수를 2×10^6 cell/㎖로 조정하여 96 well plate에 100 ㎕씩 분주하였다. 이를 5% CO_2 incubator에서 배양(37℃, 24 hr)하여 macrophage monolayer를 형성시키고 상등액을 제거한 후, 미부착 macrophage RPMI 1640-FBS 배지를 이용하여 세척하였다. 여기에 RPMI 1640-FBS 배지를 각 well당 100 ㎕를 분주하고, 다양한 농도로 희석된 시료를 100 ㎕씩 첨가하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. Macrophage에 의해 유도, 분비된 배양 상등액 중의 cytokine(IL-6, IL-12) 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(BD Bio-sciences, San Diego, CA, USA)를 이용, 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

9. 감잎 유래 다당의 자연 살해세포(NK cell)의 사멸능 측정

감잎 유래 다당 시료를 6주령의 웅성 BALB/c 마우스에 정맥주사하고, 3일 후에 비장을 적출하여 비장세포를 조제하였다. 96-well plate에 마우스로부터 얻은 비장세포(effector cell, E)와 NK cell 감수성으로 알려진 종양세포 YAC-1(target cell, T)을, E/T의 비율이 100:1, 50:1, 25:1이 되도록 조정하여 6시간 동안 배양하였다. 이때 비장의 NK cell의 사멸능에 의해 표적세포로부터 유리되는 lactate dehydrogenase(LDH)의 발생

량을 CytoTox 96 kit(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다.

10. 항전이 활성

시료의 항전이 활성은 폐(lung)에 대한 고전이성 종양세포주인 Colon 26-M3.1 carcinoma를 이용하는 실험동물 종양전이 모델을 이용하였다(Yoo 등 1994). 실험동물로 각각 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 종양의 접종을 위해 Colon 26-M3.1 carcinoma cell(4×10^4)을 정맥주사(*i.v.*)하였고, 시료는 종양 접종 2일 전에 각 농도별로 1회 미정맥을 통하여 주사하였다. 종양 접종 14일 후에 마우스를 희생시키고, 종양의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's 용액(Sigma)에서 전이된 종양을 고정시킨 후, 종양의 군집 수를 측정하였다. 한편, 시료에 의한 항종양 전이 효과는 종양만 접종한 대조군과 비교하여 산출하였다.

11. 통계처리

실험결과는 SPSS 20.0(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계처리 하였으며, 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 시료간 및 처리 농도간 유의성은 two-way ANOVA를 실시한 다음, Duncan's multiple range test로 사후 검정을 실시하여 $p<0.05\sim p<0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 감잎 유래 다당의 화학적 특성

감잎으로부터 단순 열수추출 및 pectinase 효소처리에 의해 분리한 조다당 PLW-0와 PLE-0의 일반 화학특성을 살펴본 결과는 Table 1과 같다. 단순 열수추출 조다당인 PLW-0는 중성당 60.4%, 산성당 38.3%, KDO 1.3%로 구성되어 있었으며, pectinase 처리에 의한 조다당 PLE-0는 중성당 71.3%, 산성당 26.2%, KDO 1.8%를 함유하고 있었다. 이는 pectinase 효소처리 시 산성당이 감소되고, 식물추출물에서 검출되는 중성당 및 KDO 함량이 상대적으로 증가했음을 알 수 있었다. 한편, PLW-0와 PLE-0를 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을 분석한 결과, 두 시료 모두 15종의 구성당이 분석되었으며, galactose, arabonose, rhamnose가 높은 비율로 함유되어 있었으며, 자연계에서 거의 발견되지 않는 2-O-methyl-fucose, 2-O-methyl-xylose, apiose, aceric acid, KDO, DHA와 같은 특이당이 미량 검출되었다. 특히 pectinase 효소에 의해 처리된 조다당 PLE-0가 PLW-0보다 비교적 높은 비율의 특이당이 검출되었는데, 이는 pectinase 효소를 처리함으로써 pectin 형태로 존재하는 다당에서 α-1,4 결합의 galacturonic acid 중합체인 homogalacturonan이 절단되어 특이당 비율이 상대적으로 높아진 것으로 추정되었다.

Table 1. Chemical compositions of PLW-0 and PLE-0 polysaccharides isolated from persimmon leaves

Chemical property	PLW-0	PLE-0
Chemical composition		(%)
Neutral sugar	60.4	71.3
Uronic acid	38.3	26.2
KDO[1)]	1.3	1.8
Protein	0.0	0.7
Component sugar[2)]		(Mole%)[3)]
2-Methyl-fucose	0.2	1.1
Rhamnose	4.2	11.7
Fucose	0.7	1.7
2-Methyl-xylose	0.3	1.4
Arabinose	20.0	18.6
Xylose	3.4	4.7
Apiose	2.3	3.2
Aceric acid	1.5	1.0
Mannose	0.7	1.5
Galactose	17.9	22.8
Glucose	9.2	3.6
Galacturonic acid	27.2	22.3
Glucuronic acid	11.1	3.9
DHA	0.2	0.7
KDO	1.1	1.1
Protein	0.0	0.7

1) KDO means 2-keto-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid.
2) Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.
3) Monosaccharides were analyzed using alditol acetates.

2. 감잎 유래 조다당의 보체계 활성화능 측정

인체의 초기 감염방어에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 보체계에 대하여 감잎 유래 열수 추출 조다당 PLW-0와 pectinase 효소처리한 조다당 PLE-0의 활성화 여부를 측정하기 위해 항보체 활성을 측정하였다. 양성대조군으로는 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 면역활성 다당체인 PSK(polysaccharide-K)를 사용하였으며(Tsukagoshi 등 1984), 음성대조군으로는 시료를 첨가하지 않은 증류수를 이용하였다. 음성대조군에서의 활성화 정도를 $ITCH_{50}$ 0%로 하여 PLW-0과 PLE-0의 활성화능을 확인한 결과(Fig. 1), 두 시료 모두 1,000 ㎍/㎖의 농도에서 동일 농도를 가한 양성대조군에 준하는 우수한 항보체 활성을 보였다. 그러나 100 ㎍/㎖의 저농도에서는 PLW-0보다 PLE-0의 활성이 약 14배 정도 높은 것으로 나타나, pectinase

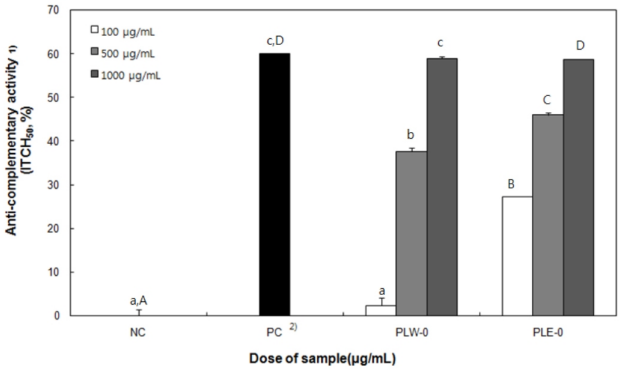

Fig. 1. Anti-complementary activities of PLW-0 and PLE-0 from persimmon leaves. [1)] The anti-complementary was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. [2)] PC (Positive control) is PSK, a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* which was used as a positive control and its concentration is 1,000 ㎍/㎖. Means with different superscript letters (a~c or A~D) indicate significant differences at $p<0.001$ by Duncan's multiple range tests.

효소 처리한 PLE-0가 저농도에서도 우수한 활성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 또한 시료의 농도에 차이를 두어 실험한 결과, 두 시료 모두 활성이 농도의존적임을 알 수 있었다.

3. 감잎 유래 조다당의 세포독성 측정

Mouse의 복강으로부터 분리한 일반 세포인 macrophage와 종양세포주인 Colon 26-M3.1 carcinoma를 이용하여 감잎으로부터 분리한 단수열수추출 PLW-0와 pectinase 처리 PLE-0에 대한 세포에 대한 직접 독성 여부를 측정하였다. 1×10^4 cells/㎖로 조정된 종양 및 일반세포주에 PLW-0와 PLE-0 1.6~1,000 ㎍/㎖까지의 다양한 농도로 가하여 배양한 후 세포의 생존 여부를 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 결과에서 제시한 바와 같이 정상세포의 경우 뚜렷한 독성은 나타나지 않았으며, PLW-0 시료농도 200 ㎍/㎖ 이상에서 약간의 세포증식 효과가 관찰되었다. 한편, 각 실험 농도에서 Colon 26-M3.1 carcinoma 세포에 대한 급격한 사멸은 관찰되지 않았다. Fig. 2의 PLE-0의 경우, 200 ㎍/㎖ 이상의 농도에서 다소 생육이 감소하는 경향을 나타내었는데, 이는 고농도에서 PLE-0의 세포의 사멸을 추정하게 하였으나, 이는 직접적인 세포독성에 의한 것이라는 결론을 내리기에는 어려운 수치였다. 이상의 결과로 PLW-0와 PLE-0 두 시료 모두 종양세포주에 대한 세포독성은 나타내지 않으며, 따라서 암세포에 대해 직접적인 세포독성에 근거한 항암활성은 없음을 추정할 수 있었다.

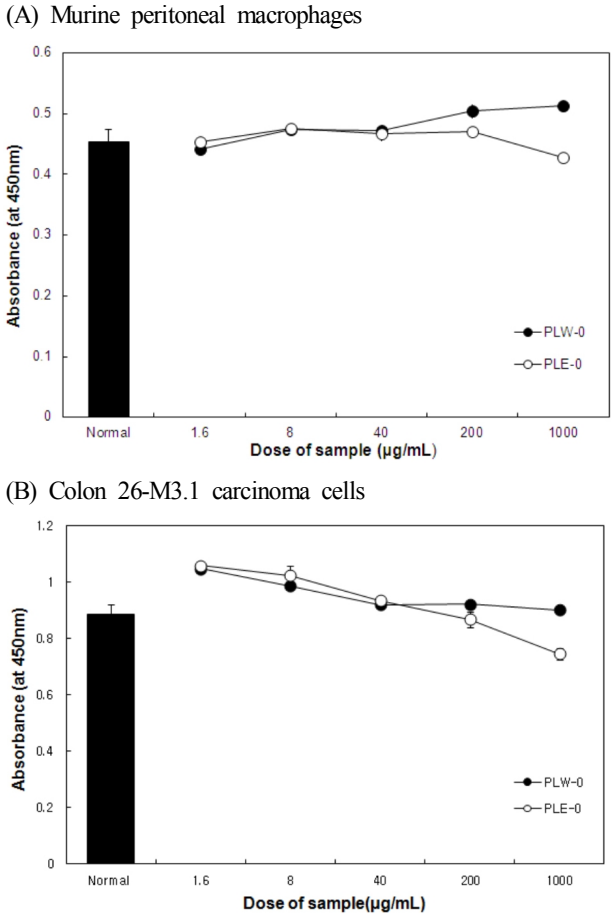

Fig. 2. Cytotoxic effect of PLW-0 and PLE-0 from persimmon leaves on murine peritoneal macrophages and Colon 26-M3.1 carcinoma cells *in vitro*.

4. 감잎 유래 조다당의 림프구 증식활성 측정

비장은 혈액으로부터 항원을 수집하며, B 및 T 림프구의 성숙과 항원에 의해 자극을 받은 후에 림프구의 분화가 이루어지는 주요 림프기관으로 비장 내 림프구의 증식은 면역시스템에서 매우 중요한 의미를 갖는다(Parham P 2011). BALB/c mouse의 비장으로부터 획득한 림프세포에 감잎으로부터 분리한 PLW-0와 PLE-0를 가하여 그 증식 정도를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 단순 열수추출 조다당인 PLW-0의 림프구 증식 활성은 농도의존적으로 증가하는 양상을 보였으며, 1.6~1,000 ㎍/㎖ 농도에서 림프구 증식활성은 immune modulator인 lipopolysaccharide(LPS) 5 ㎍/㎖ 농도로 자극했을 때보다 더 높은 활성을 나타냈다. 이는 무첨가 대조군에 비해 약 160% 증식율을 해당하는 것이었다. 또한 pectinase 효소처리에 의해 얻어진 감잎 다당 PLE-0는 PLW-0와 달리 8~40 ㎍/㎖의 저농도에서, 최대의 림프구 증식활성을 나타내었다. 이러한 결과는 PLW-0가 1.6~1,000 ㎍/㎖ 농도에서 전반적으로 농도의존

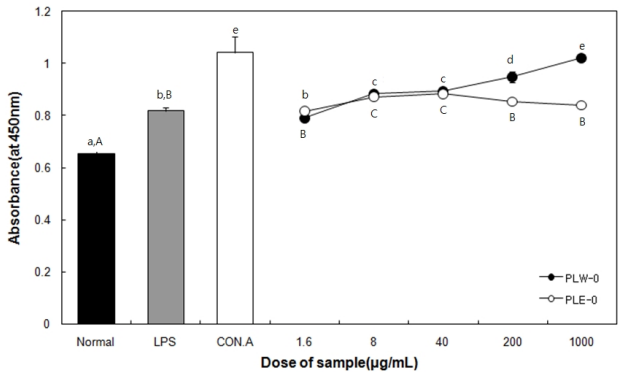

Fig. 3. Lymphocyte proliferation activity of PLW-0 and PLE-0 from persimmon leaves. Lymphocyte were co-incubated with the indicated samples for 72 hr. Cell proliferation was measured by using CCK-8 kit. The data were expressed as mean±S.D. of quadruplicate cultures. LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 was used as a positive control. Means with different superscript letters (a~e or A~C) indicate significant differences at $p<0.05$ by Duncan's multiple range tests.

적인 증식능을 보인 결과보다는 낮은 활성이었으나, 저농도에서 PLE-0가 성숙된 면역세포를 직접 증식시키는 mitogen 활성이 있음을 보여주는 것이다. 따라서 PLW-0와 PLE-0 모두 투여가 외부로부터 항원에 노출 시, 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 작동세포의 수를 증가시킴으로써 항원에 대한 효과적인 방어를 유도할 수 있을 것으로 사료되었다.

5. 감잎 유래 조다당의 macrophage 자극에 의한 cytokine 생산 활성 측정

Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine를 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로써, 항원제시와 림프구의 비특이적인 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타낸다(Keller 등 1990; Nathan 등 1980). 또한, TLR(toll like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 macrophage를 활성화하여 T세포와 B세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF-α와 같은 cytokine을 생산한다고 알려져 있다(Wang 등 2003). 감잎 유래 단순 열수추출 조다당 PLW-0와 pectinase 효소처리 조다당 PLE-0의 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산을 *in vitro*에서 측정한 결과, IL-6, IL-12의 생산을 촉진하였다(Fig. 4). IL-6의 경우, PLW-0와 PLE-0 모두 농도 의존적인 생산량의 증가가 관찰되었고, 특히 250 ㎍/㎖

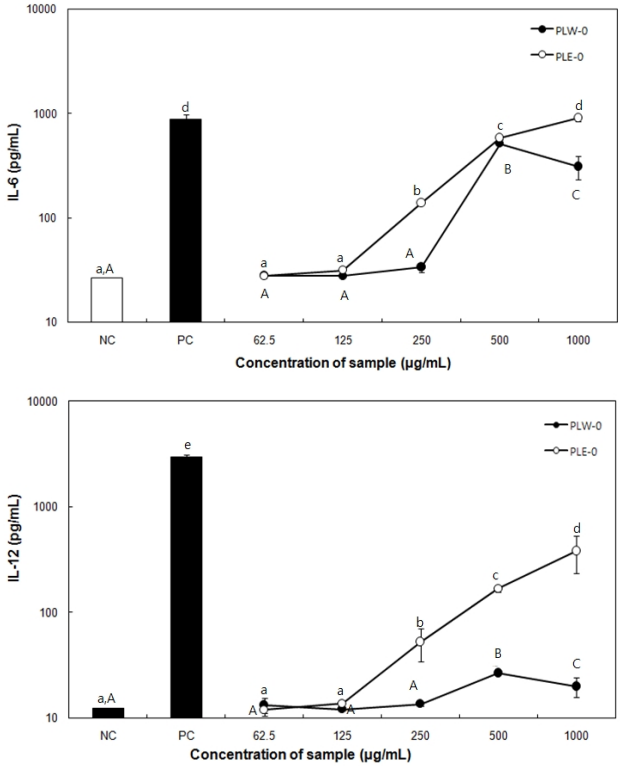

Fig. 4. Effect of PLW-0 and PLE-0 from persimmon leaves on cytokine induction by murine peritoneal macrophages *in vitro*. Peritoneal macrophages (2.0×10^5/well) were treated with sample in 96-well plates for 24 hr. The level of each cytokine in the supernatant of the cultures was determined by ELISA kits. The data were expressed as mean±S.D. of quadruplicate cultures. PC (Positive control) is LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 which was used as a positive control. Means with different superscript letters (a~e or A~C) indicate significant differences at $p<0.001$ by Duncan's multiple range tests.

이상의 농도에서는 PLE-0가 상대적으로 우수한 IL-6 생산 유도능을 보여주었는데, 그 활성은 양성대조군인 LPS에 상당하는 높은 활성이었다.

IL-12의 경우, PLW-0와 PLE-0 모두 농도의존적인 생산량의 증가가 관찰되었지만, 125 ㎍/㎖의 농도이상에서는 PLE-0의 생산량이 급격히 증가됨을 확인할 수 있었다. 이는 감잎 유래 다당체가 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역반응 유도를 통한 cytotoxic T lymphocyte(CTL)의 활성화와 같은 세포매개성 면역에 있어 활성을 나타낼 것이라 예측되었다(Hunter 등 1995). 특히 IL-12는 암세포에 치사작용을 하는 NK cell 활성화에 직접 관여하여 항암활성 유도에 필수적인 cytokine으로 인정되고 있으므로, 감잎 유래 효소처리 조다당

PLE-0가 PLW-0보다 암세포에도 유용하게 작용할 가능성이 예견되었다(Lee 등 2003; Lasek 등 1997).

본 실험에서 macrophage를 감잎 유래 다당 PLE-0에 의해 자극한 결과, 염증부위에 면역세포의 귀소와 직접 관련이 있는 염증성 cytokine으로 분류되는 IL-6의 생산 및 세포성 면역능의 활성화와 직접 관련이 있는 IL-12를 유의하게 생산하는 활성이 있음이 확인되었으므로 감잎 유래 효소처리 조다당 PLE-0는 생체방어에 작용하는 면역기구를 활성화(조절)하는 기능이 있다고 판단되었다.

6. 감잎 유래 조다당의 자연 살해세포(NK cell)의 사멸능 측정

인체 내에서 활성화된 NK cell은 광범위하게 바이러스 감염세포 및 종양세포에 대하여 비특이적으로 세포독성을 나타내는 작동세포이다(Hunter 등 1995; Shida 등 2006). 특히 암세포를 직접 공격하여 제거하거나, interleukin 등을 매개로 cytotoxic T cell 또는 macrophage를 활성화시켜 감염세포 및 암세포를 제거한다고 알려져 있어, NK cell의 활성자극 효과는 항암효과 외에도 체내 면역력의 증가와 유사한 연장선상에 있다고 할 수 있다(Kantakamalakul 등 2003). 감잎 유래 단순 열추추출 조다당 PLW-0와 효소처리 조다당 PLE-0를 BALB/c mouse에 농도별로 정맥주사한 후 YAC-1 세포에 대한 NK cell의 사멸능을 측정한 결과는 Fig. 5에 나타난 바와 같다. Target cell(T, YAC-1)에 대한 Effect cell(E, splenocytes)의 비율(E/T ratio)을 달리하여 종양세포에 대한 사멸능을 비교한 결과, E/T=100에서 가장 뚜렷한 활성이 관찰되었으며, PLW-0와 PLE-0 모든 농도에서 대조군에 비해 높은 활성이 확인되었고, 투여량에 의존적으로 활성이 급격히 증가하는 경향을 나타내었다. 특히, PLW-0 1000 ㎍/㎖의 경우 PLE-0와 동일하게 무투여 대조군에 비해 약 2배에 이르는 종양세포 사멸능을 보였지만, 저농도인 40 ㎍/㎖에서는 PLE-0가 PLW-0보다 약 2배의 사멸능을 보여주었다. 이로써 감잎 유래 효소처리 조다당 PLE-0가 단순 열수추출 조다당 PLW-0보다 종양세포에 대해 우수한 사멸능을 가지는 NK cell의 활성화에 기여함을 확인할 수 있었다.

7. 감잎 조다당의 항전이 활성

감잎을 단순 열수추출 및 pectinase 효소처리하여 에탄올 침전, 투석 및 동결건조를 행하여 얻어진 조다당 PLW-0와 PLE-0를 대상으로 Colon 26-M3.1 carcinoma를 이용하여 폐로의 암 전이에 대한 억제활성을 관찰하였다(Fig. 6). 시료를 투여하지 않은 대조군에서는 평균 120개의 전이암 colony가 관찰된 반면, 1,000, 100, 10 ㎍/mouse 농도로 PLW-0와 PLE-0를 1회 투여한 군에서는 각각 34, 58.7, 83.7개의 colony가 관찰되었고, PLE-0는 각각 14.8, 24.4, 43.7개의 colony가 관찰되었다. 이러한 사실은 종양접종 2일 전 1,000, 100, 10 ㎍/mouse의 정맥 투여로, PLW-0은 각각 71.7%, 51.0%. 30.2%, PLE-0는 각각 87.7%, 79.7%, 63.5%의 유의한 예방적 전이억제 활성을 보여주는 결과였다.

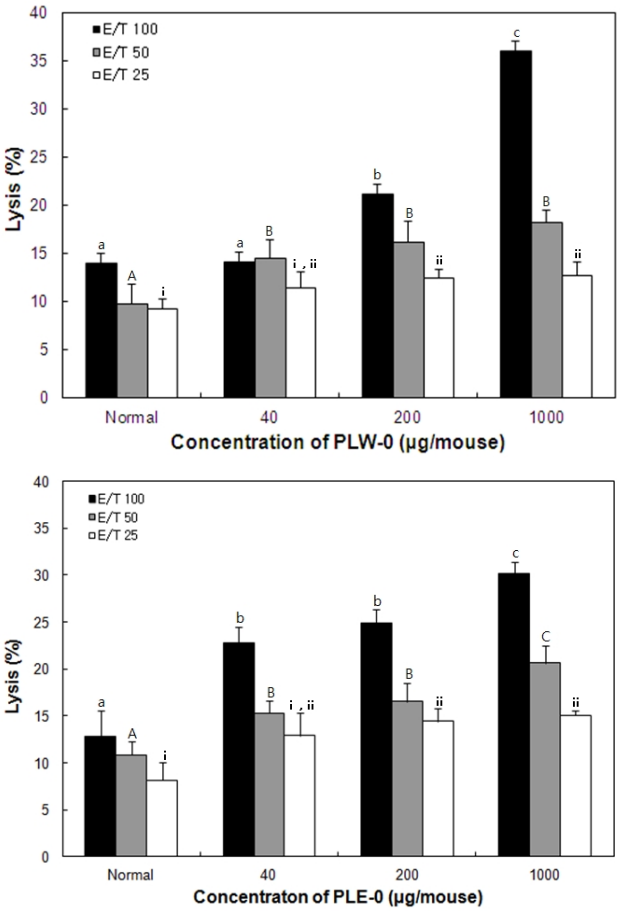

Fig. 5 Effect of PLW-0 and PLE-0 from persimmon leaves on NK cell-mediated cytotoxicity against tumor cells. NK cell activity was determined by LDH assay as described in Materials and methods. The E/T ratio indicates ratio of effector cells (splenocytes) target cells (YAC-1 cells). Means with different superscript letters (a~c, A~C or i~ii) indicate significant differences at $p<0.05$ by Duncan's multiple range tests.

식물 유래 생체조절물질(BRM)은 종양의 증식 혹은 전이를 억제하기 위한 주요한 도구로 많이 사용되어 왔다(Lee 등 2003; Lasek 등 1997). 실질적으로 BRM들은 외래물질에 대한 숙주의 방어력을 증진시킴으로써 종양에 대한 면역요법제재로 이용되고 있는데(Shida 등 2006; Kantakamalakul 등 2003), 마우스를 이용한 종양의 실험전이 모델에서 식물추출물을 포함하는 BRM에 의한 종양의 억제결과는 주로 macrophage 혹은 NK-cell 등 비특이적 면역작동세포의 활성화에 기인하는

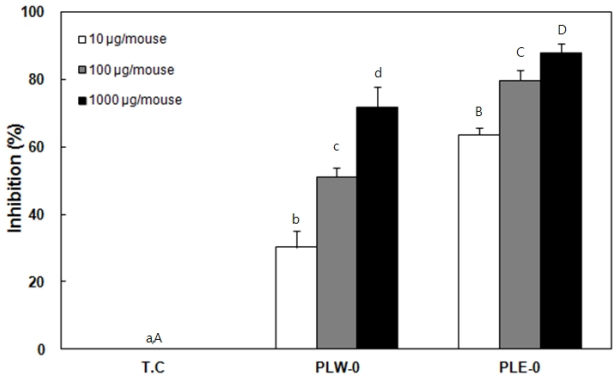

Fig. 6. Inhibitory effect of PLW-0 and PLE-0 from persimmon leaves on lung metastsis produced by *i.v.* inoculation of Colon 26-M3.1 carcinoma cells. Groups of five BALB/c mice were administered *i.v.* with the indicated doses of PLW-0 and PLE-0 two days before *i.v.* inoculation of 4×10^4 cells. Mice were sacrificed 14 days after tumor inoculation for evaluation. Means with different superscript letters (a~d or A~D) indicate significant differences at $p<0.01$ by Duncan's multiple range tests.

것으로 보고되고 있다(Lasek 등 1997; Kantakamalakul 등 2003; Aspinall GO 1973). Fig. 6의 결과에서 PLW-0보다 PLE-0의 예방적 암전이 억제활성이 100 및 1,000 ㎍/mouse의 혈관 투여에 의하여 80% 이상의 높은 전이억제 효과를 보인 결과는 타 식물추출물에 비하여 매우 우수한 결과로 판단된다. 또한 단순열수추출보다 pectinase 효소처리로 다당을 분리할 경우, 암전이 효과가 우수한 면역활성다당을 획득할 수 있음을 재차 확인할 수 있었다.

요약 및 결론

감 재배농가의 대표적 농산부산물인 감잎으로부터 새로운 생리활성 다당 소재를 개발할 목적으로 감잎의 열수추출물과 pectinase 처리 추출물로부터 서로 다른 두 종류의 다당 획분 PLW-0 및 PLE-0를 분리하고, 이들의 화학적 특성과 면역자극활성을 비교 측정하였다. PLW-0와 PLE-0는 구성당 분석 결과, 2-O-methyl-fucose, 2-O-methyl-xylose, apiose, aceric acid, 3-deoxy-D-*manno*-2-octulosonic acid 및 3-deoxy-D-*lyxo*-2-heptulosaric acid 등의 특이당을 포함한 총 15종의 구성당으로 조성되어 있었으나, 효소처리에 기인하여 PLE-0 획분의 산성당 함량이 열수추출 다당인 PLW-0에 비해 상대적으로 낮은 결과를 보였다. 한편, 초기 면역반응에 있어 중요 역할을 담당하는 보체계에 대한 감잎 다당의 활성화 여부를 측정한 결과, PLW-0와 PLE-0 모두 농도의존적으로 강력한 항보체 활성을 보였으며, 이는 시판 면역활성 다당인 구름버섯 유래의 PSK에 상당하는 활성이었다. 특히 PLE-0의 경우, 100 ㎍/㎖ 농도에서 PLW-0보다 약 14배 높은 활성을 나타냈다. 감잎 유래 다당들은 복강 대식세포와 Colon 26-M3.1 종양세포주에 대해 직접적인 세포독성은 보이지 않았으나, 비장세포 유래 림프구에 대해 농도 의존적 증식활성을 보였다. 또한 PLW-0와 PLE-0로 자극한 대식세포는 IL-6 및 IL-12를 농도 의존적으로 증가시켰는데, 효소처리 다당 PLE-0가 훨씬 우수한 cytokine 유도활성을 나타냈다. Mouse에 PLW-0와 PLE-0를 정맥 주사한 후 얻어진 NK cell은 YAC-1 종양 세포주에 대한 치사활성을 증진시켰으며, 특히 PLE-0는 40 ㎍/mouse의 낮은 농도로 투여한 경우에서도 PLW-0보다 상대적으로 높은 치사활성을 보였다. 또한 Colon 26-M3.1 carcinoma를 이용한 폐암전이모델에서 PLW-0와 PLE-0는 모두 농도의존적으로 항전이 활성을 나타냈지만, PLE-0의 경우 각 투여군에서 공히 PLW-0의 항전이 효과를 뛰어넘는 우수한 활성을 보였다. 이상의 결과로부터 감잎 유래 다당은 인체에 유익한 선천면역을 자극하여 항전이 효과를 나타낼 수 있음이 확인되었으며, 감잎으로부터 면역활성 다당을 조제시, pectinase 처리공정은 활성 배가를 위해 필수적임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2011년 한국식품연구원의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

An BJ, Kwak JH, Park JM, Lee JY, Park TS, Lee JT, Son JH, Jo C, Byun MW. 2005. Inhibition of enzyme activities and the antiwrinkle effect of polyphenol isolated from the persimmon leaf (*Diospyros kaki*) on human skin. *Derm Surg* 31:848-855

Aspinall GO. 1973. Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. Academic Press, New York, USA. pp. 95-115

Blumenkarntz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* 54:484-489

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356

Gorinstein S, Zachwjeja Z, Folta M, Barton H, Plotrowicz J, Zemser M, Welsz M, Trakhtenberg S, Martin-Belloso O. 2001. Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples. *J Agr Food Chem* 49:952-957

Gorinstein S, Zensler M, Wietz M, Halvey S, Bartnikowska E. 1994. Fluorometric analysis of phenolics in persimmon. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:1078-1092

Hong HD. 2011. New technology-immunoregulatory actions of polysaccharides from natural plant resources. *Bull Food Technol* 24:390-409

Hunter CA, Chizzonite R, Remington JS. 1995. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *J Immunol* 155:4347-4354

Jeong JH, Lee JM, Lee CH, Cho JH, Jang JB, Lee KS. 2009. Anti-tumor metastatic effect and activation of innate immunity by extract of *Mori radicis cortex*. *J Orient Obst Gyn* 22: 31-40

Jones TM, Albersheim P. 1972. A gas chromatography method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol* 49:926-936

Jung UJ, Lee JS, Bok SH, Choi MS. 2011. Effects of extracts of persimmon leaf, buckwheat leaf, and Chinese matrimony vine leaf on body fat and metabolism in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40:1215-1226

Jung WY, Jeong JM. 2012. Change of antioxidative at different harvest time and improvement of atopic dermatitis effects for persimmon leaf extract. *Kor J Herbology* 27:41-49

Kabat EA, Mayer MM. 1971. Experimental Immunochemistry. Thormas Publisher. Illinois. USA. pp. 133-240

Kadhim S, Penney C, Lagraoui M, Heibein J, Attardo G, Zacharie B, Connolly T, Gagnon L. 2000. Synergistic anti-tumor activity of a novel immunodulator, BCH-1393, in combination with cyclophosphamide. *Int J Immunopharmacol* 22:659-671

Kantakamalakul W, Jaroenpool J, Pattanapanyasat K. 2003. A novel enhanced green fluorescent protein (EGFP)-K562 flow cytometric method for measuring natural killer (NK) cell cytotoxic activity. *J Immunol Methods* 272:189-197

Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative. *Anal Biochem* 85: 595-601

Kawakami K, Aketa S, Sakai H, Watanabe Y. 2011. Anti-hypertensive and vasorelaxant effects of water-soluble pro-anthocyanidins from persimmon leaf tea in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 75:1435-1439

Keller R, Keist R, Wechsler A, Leist PT, van der Meide PH. 1990. Mechanism 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

Kim HJ, Kim MK. 2003. Anticancer effect of persimmon leaf extracts on Korean gastric cancer cell. *Korean J Nutr* 36:133-146

Ko HS, Park MN, Kim BE, Yoon TJ, Song HS, Cho SY, Lee HJ, Jeong SJ, Lee EO, Kim SH. 2010. Anti-metastatic activity of water extract of *Samuikoeuiang* via enhancement of natural killer cells. *J Kor Trad Oncology* 15:29-36

Lasek W, Feleszko W, Golab J, Stoklosa T, Marczak M, Dabrowska A, Melejczyk M, Jako´bisiak M. 1997. Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha in mice. *Cancer Immunol Immunother* 45:100-108

Lee SJ, Saiki I, Hayakawa Y, Nunome S, Yamada H, Kim SH. 2003. Antimetastatic and immunomodulating properties of a new herbal prescription, Bojung-bangam-tang. *Int Immunopharmacol* 3:147-157

Moon SH, Kim KH, Park KY. 1996. Antitumor effect of persimmon leaves *in vivo* using Sarcoma-180 cells. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 25:865-870

Moon SH. 2002. Inhibitory effect of persimmon leaves on the mutagenicity in spore rec assay and on the growth of human cancer cells. *Korean J Food Nutr* 15:23-28

Nathan CF, Murray HW, Cohen ZA. 1980. Current concepts: the macrophage as an effector cell. *N Engl J Med* 303:662-665

Parham P. 2009. The Immune System. Garland Science Press. New York. USA. pp. 17-49

Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. 2004. Cancer immuno-therapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10:909-915

Shida K, Suzuki T, Kiyoshima-Shibata J, Shimada S, Nanno M. 2006. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokine and augment natural killer cell activity. *Clin Vaccine Immunol* 13:997-1003

Stevenson TT, Darvill AG, Albersheim P. 1988. 3-Deoxy-D-

lyxo-2-heptulosaric acid, a component of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan-Ⅱ. *Carbohyd Res* 179: 269-288

Strome SE, Voss S, Wilcox R, Wakefield TL, Tamada k, Files D, Chapoval A, Lu J, Kasperbauer JL, Padly D, Vile R, Gastineau D, Wettstein P, Chen L. 2002. Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res* 62:1884-1889

Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, Kobayashi H, Nomoto K, Orita K. 1984. Krestin (PSK). *Cancer Treat Rev* 11:131-155

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 macrophages. *Clin Chim Acta* 327:123-128

Yamada H, Ra KS, Kiyohara K, Cyong JC, Otsuka Y. 1989. Structural characterization of an anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Carbohyd Res* 189:209-226

Yoo YC, Saiki I, Sato K, Azuma I. 1994. MDP-Lys(L18), a lipophilic derivative of muramyl dipeptide, inhibits the metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumours in mice. *Vaccine* 12:175-180

York WS, Darvill AG, Mcneil M, Albershiem P. 1985. 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan-Ⅱ, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohyd Res* 138:109-126

접 수 : 2012년 11월 10일
최종수정 : 2012년 11월 27일
채 택 : 2012년 11월 28일