

## 천년초에서 분리한 점질다당의 면역자극 활성

서이슬 · 신광순<sup>†</sup>

경기대학교 식품생물공학과

### Immune System-Stimulating Activities of Mucilage Polysaccharides Isolated from *Opuntia humifusa*

Yi Seul Seo and Kwang-Soon Shin<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Gyeonggi-do 443-760, Korea

#### Abstract

To examine the new practical utilization of mucilages in *Opuntia humifusa*, the Korean pear cactus, the polysaccharides were isolated from *O. humifusa*, and immuno-stimulating activities were assayed. The main polysaccharide, CNC-E, was prepared by a commercial enzyme treatment, water extraction, and ethanol precipitation. The molecular mass of CNC-E was estimated to be about 700 kDa, and it consisted mainly of arabinose, galactose and xylose in addition to two minor sugars such as rhamnose and fucose. On the other hand, CNC-E showed considerably high splenocyte proliferation activity in a dose-dependent manner. Peritoneal macrophages stimulated with CNC-E produced cytokines such as IL-6, IL-12, IL-10, and TNF- $\alpha$ . The intravenous administration of CNC-E significantly augmented the cytotoxicity of natural killer (NK) cells against Yac-1 tumor cells. Especially, NK cells obtained from the mice treated with 100  $\mu$ g of CNC-E showed threefold higher cytolytic activity than those of untreated mice. CNC-E also showed potent anti-complementary activity in a dose-dependent fashion. Identification of C3 activation products by the crossed immunoelectrophoresis using anti-human C3 and the anti-complementary activity of CNC-E in a  $Ca^{2+}$ -free condition suggested complement activations by CNC-E that occur *via* both alternative and classical pathways. These results indicate that Korean pear cactus contains selected polysaccharides that provide immuno-stimulating activities beneficial to human health.

**Key words:** *Opuntia humifusa*, polysaccharide, immuno-stimulating activity, macrophage, NK cell, complement

#### 서 론

탄수화물은 이제까지 생체 구조물질이나 에너지원으로써의 역할만이 강조되어 왔으나, 최근 세포 표면의 당단백질이나 당지질에 결합해 있는 당쇄(carbohydrate chains)가 세포간의 인식과 접촉을 통하여 세포의 분화, 정보 전달, 감염 및 암화, 암전이 등을 포함한 생명현상에 깊이 관여한다는 사실(1,2)이 밝혀지고 있어 이에 대한 관심이 집중되고 있다. 또한 과거 식이섬유로써 밖에 그 기능을 평가받지 못했던 담자균류, 생약재, 식용식물 및 해조류 유래의 다당류에서 항보체 활성(3), 항종양 활성(4,5), 식작용 증강활성(6) 등의 면역 조절기능과 혈당강하 활성(7) 등 여러 약리작용이 발견되고 있어 주목되고 있는데 이들은 주로 신체의 항상성(homeostasis) 유지와 기능의 조절 역할을 담당하는 biological response modifier(BRM)로써 작용하여 치료효과를 낸다고 알려져 있다.

천년초(*Opuntia humifusa*)(8)는 충남지역에서 중소단위로 생산되고 있는 선인장류로서, 길고 굵은 가시가 많고 높

이 약 1~2 m까지 자라는 제주도의 백년초(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)(9)와 달리, 솜털 가시를 가지며 토양에서 약 30 cm 정도로 자라는 특성이 있다. 천년초는 여름에는 수분이 풍부한 지역에서 성장 번식하고, 휴면기인 겨울에는 비닐하우스가 없는 노지에서 생존하며, 병충해에도 강한 특징을 갖는다고 알려져 있다. 천년초의 가장 큰 특징은 점질 다당을 다량으로 함유하고 있다는 점으로 이를 이용한 가공식품 및 기능성 소재 개발 등이 추진되고 있다. 천년초 추출물의 생리활성에 대한 연구로는 항산화 활성(10), 간손상 예방 효과(11), 병원성 식중독 미생물에 대한 항균 효과(12), 항동맥경화 효과(13) 등이 보고되어 있으며, 식품에의 응용연구로는 천년초 분말의 첨가에 의한 식빵의 노화 억제 효과(14)가 보고되기도 하였다. 그러나 천년초 추출물이 타 식물체에서 볼 수 없는 고점도의 물성으로 인해 개발 및 응용에 큰 어려움이 되고 있다.

최근 저자 등은 천년초의 점질 다당이 강력한 면역자극 활성을 나타냄을 확인하였으며 따라서 본 연구에서는 활성 물질로 추정되는 천년초 점질다당을 상업용 효소 및 에탄올

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr  
Phone: 82-31-249-9655, Fax: 82-31-249-9650

침전을 통해 분리하고, 각종 면역자극활성을 평가함으로써 천년초를 새로운 기능성 소재로 개발하기 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 천년초(*Opuntia humifusa*)는 2010년 초 충남 연기군에서 생산된 것을 (주)월드웨이(Yeongi, Korea)로부터 공급받아, 토사 일부와 잔가시를 제거하고 물로 세척하여 실험재료로 사용하였다.

### 일반 분석방법

중성당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(15)으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl법(16)으로, 단백질 함량은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Bradford법(17)을 실험실 여건에 맞게 변형하여 사용하였다. 한편 분자량 및 정제도 측정에 사용한 HPLC는 Asahipak GS-520+GS-320+GS-220(각 0.76×30 cm, Showa Denko Co., Tokyo, Japan)을 장착한 SP 930D(Young-Lin Co. Ltd., Anyang, Korea)를 사용하여 0.2 M NaCl를 용매로 0.5 mL/min로 용출하였으며 정제다당의 분자량은 standard pullulans(P-800, P-400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5; Showa Denko Co.)를 표준물질로 하여 얻어진 표준곡선과 비교하여 측정하였다. 구성당 분석은 다당시료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA)로 121°C에서 1.5시간 가수분해하여 각각 alditol acetate 유도체(18)로 전환시킨 후, GC로 분석하였다. GC의 분석은 SP-2380 capillary column(0.2 μm film, 0.25 mm i.d.×30 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA)이 장착된 GC ACME-6100(Young-Lin Co.)을 이용하였으며 표준온도조건[60°C(1 min), 60°C→220°C(30°C/min), 220°C(12 min), 220°C→50°C(8°C/min), 250°C(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.

### 천년초 다당의 분리 및 정제

(주)월드웨이로부터 제공받은 천년초 생체 500 g을 약 1 cm 단위로 세절하고 20배 부피의 증류수를 가하여 균질화를 행하였다. 여기에 점성을 낮출 목적으로 상업용 효소 Rapi-dase와 Viscozyme를 1:3의 비율로 혼합한 효소액을 10 g 가하고 50°C에서 12시간 반응시켰다. 반응 후, 잔존 효소 활성을 제거할 목적으로 100°C 30분간 가열하고, 5,000 rpm에서 15분간 원심분리(SUPRA 30K, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Incheon, Korea)하여 상등액을 회수하였다. 반응 상등액으로부터 고분자 다당만을 회수하기 위해 4배 부피의 95% ethanol를 가하고 하룻밤 방치한 후, 발생한 침전물을

회수하고 80% 에탄올을 이용, 2~3회 세척하였다. 침전물은 소량의 증류수에 용해하여 Spectra/Por 2 투석막(MWCO: 12,000~14,000, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)을 이용하여 2~3일간 투석을 행하고 동결건조를 거쳐 천년초 효소처리 다당획분 CNC-E(29.2 g, 수율: 5.84%)를 얻었다.

### 실험동물

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

### 비장세포 mitogen 활성 측정

BALB/c mouse에서 비장을 적출하여 마쇄 및 여과를 거쳐 비장세포를 획득한 후, 0.2% 식염수를 이용 적혈구를 제거하고, RPMI 1640-FBS 배지(with 7% FBS, Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA)로 2~3회 세척하여 세포수를 5×10<sup>6</sup> cell/mL가 되도록 조정하였다. 이때 얻어진 세포 부유액은 96 well plate에 180 μL씩 분주하고 배지로 연속 희석된 시료용액 20 μL를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양한 후, 각 well당 20 μL의 CCK-8 kit(Dojindo, Kumamoto, Japan) 용액을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3시간 배양하고 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용, 450 nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 비교하였다.

### Macrophage cytokine 생산자극 활성 측정

BALB/c mouse의 복강에 5% thioglycollate 배지(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1 mL 주입하고 72시간 내에 유도된 macrophage를 회수한 후, RPMI 1640으로 2~3회 세척하고 세포수를 2.0×10<sup>6</sup> cell/mL로 조정하여 96 well plate에 100 μL씩 분주하였다. 이를 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양(37°C, 2 hr)하여 macrophage monolayer를 형성시키고 상등액을 제거한 후, 미부착 macrophage RPMI 1640-FBS 배지를 이용하여 세척하였다. 여기에 RPMI 1640-FBS을 각 well당 100 μL를 분주하고, 다양한 농도로 희석된 100 μL의 시료를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. Macrophage에 의해 유도, 분비된 배양상등액 중의 cytokine(IL-6, IL-12, IL-10 및 TNF-α) 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 이용, 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

### 자연치사세포(NK cell)의 사멸능 측정

천년초 유래 다당 시료를 6주령의 웅성 BALB/c 마우스에 정맥주사하고 3일 후에 비장을 적출하여 비장세포를 조제하

였다. 96-well plate에 마우스로부터 얻은 비장세포(effector cell, E)와 NK cell 감수성으로 알려진 종양세포 YAC-1 (target cell, T)을, E/T 비율이 100:1, 50:1, 25:1이 되도록 조정하여 6시간 동안 배양하였다. 이때 비장의 NK cell의 사멸능에 의해 표적세포로부터 유리되는 lactate dehydrogenase(LDH)의 발생량을 CytoTox 96 kit(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다.

### 보체계 활성화능

항보체 활성화는 Kabat과 Mayer법(19)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<sup>2+</sup>, 10 mM Mg<sup>2+</sup>이 함유된 GVB 완충용액(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 및 시료를 각각 50 µL씩 혼합하여 37°C에서 30분 동안 1차 반응시킨 후, 이 반응액에 GVB를 350 µL씩 첨가하고 이를 10~160배까지 연속 희석하였다. 여기에 750 µL의 GVB와 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocytes, EA Cell, Biotest Co., Tokyo, Japan)를 250 µL씩 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고 4°C의 PBS(phosphate buffered saline)를 2.5 mL 가하여 반응을 정지시켰다. 각 반응액을 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하였으며 상등액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 항보체 활성화는 총보체 용혈 저지율(ITCH<sub>50</sub>: Inhibition of 50% total complement hemolysis)로 나타내었다. 한편 보체계 활성화 경로를 조사하기 위해 GVB와 GVB에서 Ca<sup>2+</sup>이온만을 제거한 Mg-EGTA-GVB(2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA 함유) 및 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB buffer(10 mM EDTA 함유)에 시료 및 정상인의 혈청을 각각 첨가하고 상기 방법과 같이 총보체 용혈의 저지율을 측정함으로써 시료의 보체계 활성화 경로를 비교 검토하였다.

### 2차원 면역전기영동(crossed immunoelectrophoresis)

GVB buffer, EDTA-GVB buffer, Mg-EGTA-GVB buffer에 정상인의 혈청과 시료를 각각 혼합하여 37°C, 30분간 반응시킨 후, pH 8.6 barbital buffer(ionic strength, 0.025)를 사용하여 조제한 1% agarose gel 상에서 1차원 전기영동을 행하였다(3 mA/cm). 이후 0.5% anti-human C3 serum (Sigma)이 함유된 1% agarose gel 상에서 약 15시간 동안 2차 전기영동을 행하였다(1 mA/cm). 전개된 gel은 bromophenol blue로 염색시켜 항체와 반응하여 형성된 침강선을 관찰함으로써 C3의 분해산물을 확인하였다(20).

### 통계처리

실험결과는 평균값±표준편차(means±SD)로 나타내었고 Student t-test를 이용하여 통계처리한 후, p<0.01 또는 p<0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

**Table 1. Chemical composition of CNC-E, mucilage polysaccharide prepared from *O. humifusa***

Chemical property	(%)	Component sugar <sup>1)</sup>	(mole%)
Molecular weight	700 kDa	Rhamnose	3.06
Yield from raw material	5.84	Fucose	1.95
Neutral sugar	95.47	Arabinose	38.92
Uronic acid	4.53	Xylose	15.80
Protein	0.00	Galactose	40.27

<sup>1)</sup>Monosaccharides were analyzed using alditol acetates. Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.

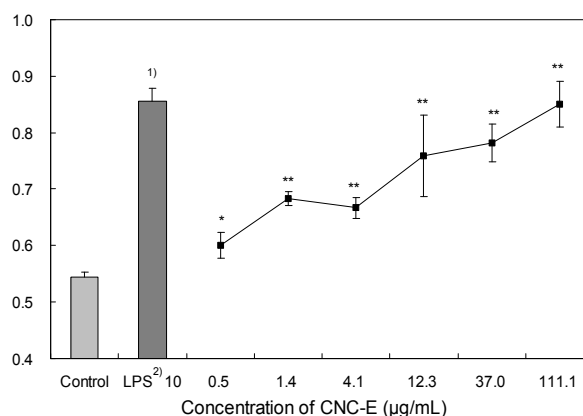
## 결과 및 고찰

### 천년초 유래 다당의 화학적 특성

천년초로부터 효소처리 및 ethanol 침전에 의해 분리한 다당 CNC-E의 일반 화학특성을 살펴본 결과는 Table 1과 같다. CNC-E는 분자량 약 700 kDa의 고분자 화합물로서 중성당 95.5%, 산성당 4.5%로 구성되어 있었으며 일반적으로 식물 추출물에서 검출되는 단백질은 함유하고 있지 않았다. 한편 CNC-E를 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을 분석한 결과, CNC-E는 arabinose, galactose 및 xylose를 각각 38.9%, 40.3%, 15.8%의 높은 비율로 함유하고 있었으며(Table 1) 그 외 rhamnose와 fucose가 미량 검출되었다. CNC-E의 구성당 결과로 미루어, 이들은 고도로 분지된 arabinogalactan으로 존재할 가능성을 강력히 시사한다.

### 천년초 유래 다당의 비장세포 mitogen 활성

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(21). BALB/c mouse의 비장으로부터 획득한 림프세포에 천년초로부터 획득한 CNC-



**Fig. 1. Effect of CNC-E from *O. humifusa* on the growth of splenocytes.** Splenocytes were co-incubated with the indicated samples for 72 hr. Cell proliferation was measured by using CCK-8 kit. <sup>1)</sup>The data were expressed as mean±SD of quadruplicate cultures. <sup>2)</sup>LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 was used as a positive control. \*p<0.01, \*\*p<0.001 compared with the untreated group.

E를 가하여 그 증식 정도를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 효소 처리 다당인 CNC-E의 림프구 증식 활성은 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보였으며, 111 µg/mL의 농도에서 림프구 증식활성은 immune modulator인 lipopolysaccharide (LPS) 10 µg/mL 농도로 자극했을 때와 유사한 정도로, 무첨가 대조군에 비해 약 150% 활성을 보였다. 이러한 결과는 천연초 효소 처리 다당인 CNC-E가 성숙된 면역세포를 직접 증식시키는 mitogen 활성이 있음을 보여주는 것으로, 따라서 CNC-E의 투여가 외부로부터 항원에 노출 시, 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 작동세포의 수를 증가시킴으로써 항원에 대한 효과적인 방어 효과를 유도할 수 있을 것으로 사료되었다.

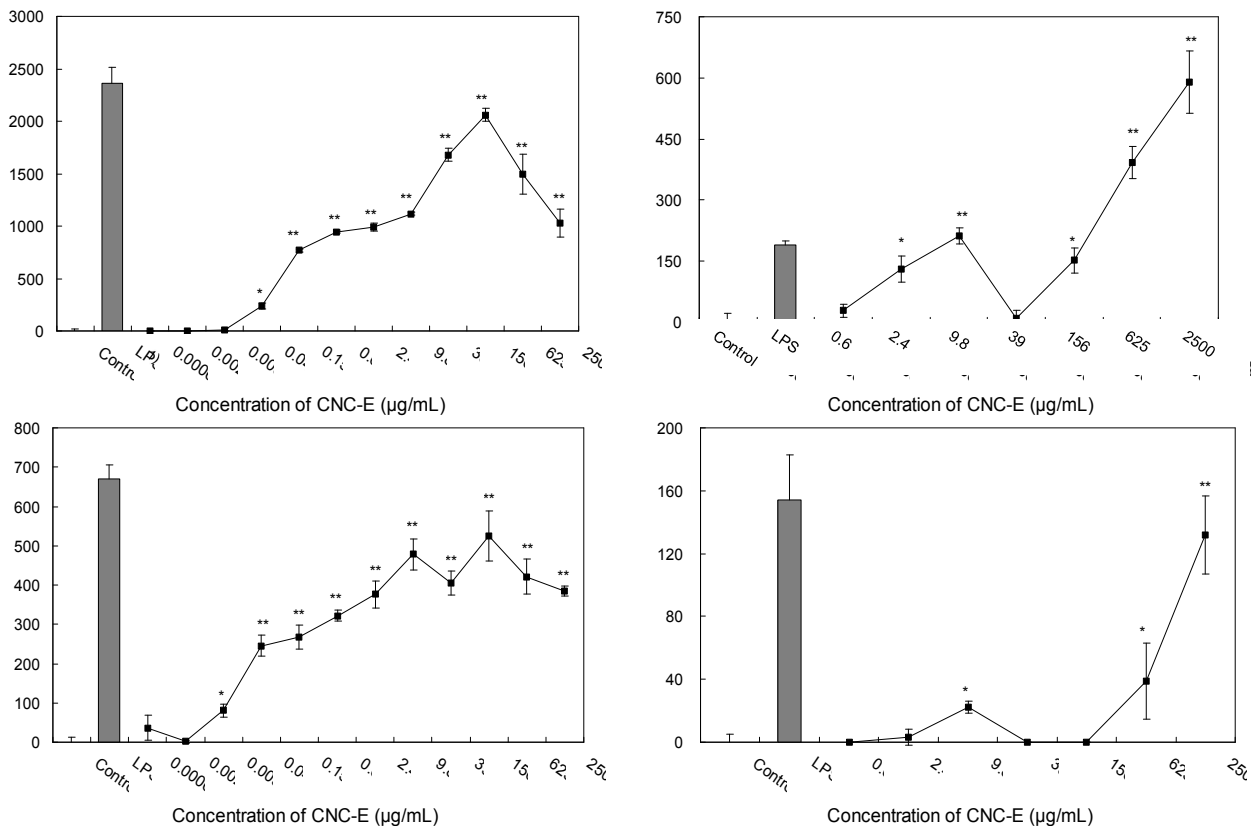
**천연초 유래 다당의 macrophage 자극에 의한 cytokine 생산 활성**

Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 여러 가지 cytokine을 분비하여 면역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 중추적인 역할을 하는 세포로서, 항원 제시와 림프구의 비특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타낸다(22,23). 또한 TLR(toll like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 macrophage를 활성화하여 T세포와 B 세포의 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(24).

천연초 유래 활성 다당 CNC-E의 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산을 *in vitro*에서 측정한 결과 IL-6, IL-12, IL-10 및 TNF-α의 생산을 촉진하였다(Fig. 2). IL-6의 경우, CNC-E는 40 ng/mL 이상의 농도에서 농도의존적인 생산량의 증가가 관찰되었지만 150 µg/mL 이상의 농도에서는 생산량이 급격히 감소함을 확인되었다. 한편 IL-12의 경우, CNC-E는 약 10 ng/mL 이상부터 농도의존적으로 IL-12의 생산량을 증가시키는 경향을 보였으며 그 활성은 양성대조군인 LPS에 상당하는 높은 활성이었다. 이는 천연초 유래 다당체가 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응 유도를 통한 cytotoxic T lymphocyte(CTL)의 활성화와 같은 세포매개성 면역에 있어 활성을 갖으리라 예측되었다(25). 특히 IL-12는 암세포에 치사작용을 하는 NK cell 활성화에 직접 관여하여 항암활성 유도에 필수적인 cytokine으로 인정되고 있으므로, 천연초 다당은 암세포에도 작용할 가능성이 예견되었다(26,27).

**천연초 유래 다당에 의한 IL-10 및 TNF-α 생산 유도 효**



**Fig. 2.** Effect of CNC-E from *O. humifusa* on cytokine induction by macrophages. Peritoneal macrophages ( $1.0 \times 10^5$ /well) were treated with samples 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  $\pm$  SD of quadruplicate cultures. <sup>1)</sup>LPS, lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O127:B8 was used as a positive control. \*p<0.01, \*\*p<0.001 compared with the untreated group.

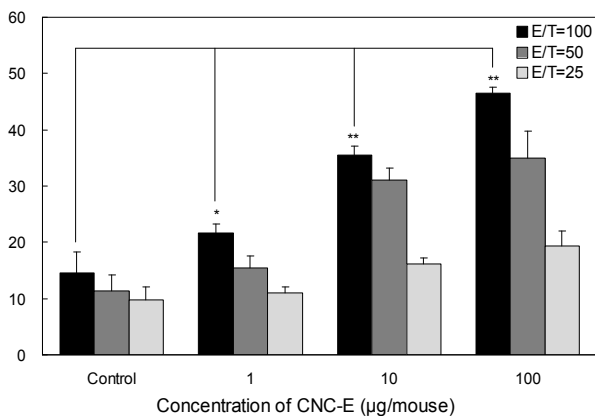
과(Fig. 2)는 IL-6 및 IL-12 생산 활성에 비해 전반적으로 낮은 양상을 보였다. TNF- $\alpha$ 는 약 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 농도에서 생산능의 증가가 확인되었으며 IL-10의 경우도 유사한 경향을 보였다. 이는 본 실험에 적용한 24시간까지의 배양 조건에서 예상되는 천년초 유래 다당에 의한 면역자극이 낮은 것으로 사료되는 결과였다. 상세한 효과를 확인하기 위해서는 시간별 배양 등의 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

본 실험에서 macrophage를 천년초 유래 다당에 의해 24시간 자극한 결과, 염증부위에 면역세포의 귀소와 직접 관련이 있는 염증성 cytokine으로 분류되는 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 생산 및 세포성 면역능의 활성화와 직접 관련이 있는 IL-12를 유의하게 생산하는 활성이 있음이 확인되었으므로 천년초 유래 다당 CNC-E는 생체방어에 작용하는 면역기구를 활성화(조절)하는 기능이 있다고 판단되었다.

**천년초 유래 다당의 NK cell 활성**

인체 내에서 활성화된 NK cell은 광범위하게 바이러스 감염 세포 및 종양세포에 대하여 비특이적으로 세포독성을 나타내는 작동세포이다(25,28). 특히 암세포를 직접 공격하여 제거하거나, interleukin 등을 매개로 cytotoxic T cell 또는 macrophage를 활성화시켜 감염세포 및 암세포를 제거한다고 알려져 있어 NK cell의 활성화 자극 효과는 항암효과 외에도 체내 면역력의 증가와 유사한 연장선상에 있다고 할 수 있다(29).

천년초 유래 다당 CNC-E를 BALB/c mouse에 농도별로 정맥주사한 후 YAC-1 세포에 대한 NK cell의 사멸능을 측정된 결과는 Fig. 3에 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, 특히 CNC-E의 경우 모든 농도에서 대조군에 비해 높은 활성이 확인되었



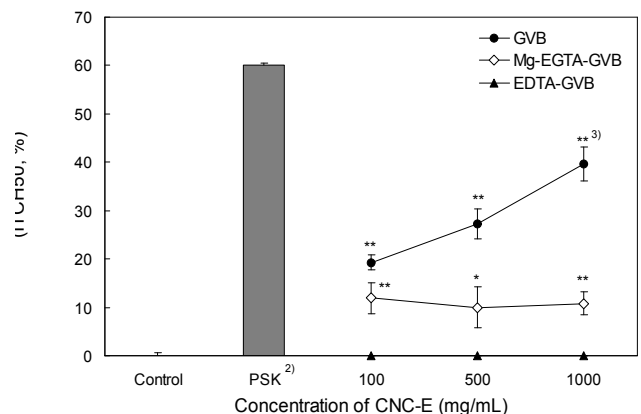
**Fig. 3. Effect of CNC-E from *O. humifusa* on NK cell-mediated cytotoxicity against tumor cells.** NK cell activity was determined by LDH assay as described in Materials and Methods. The E/T ratio indicates the ratio of effector cells (splenocytes) to target cells (YAC-1 cells). \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  compared with the untreated group.

고 투여량에 의존적으로 활성이 급격히 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 mouse에 100  $\mu\text{g}$ 을 투여하고 얻어진 NK cell은 무투여 대조군에 비해 약 3배에 이르는 종양세포 사멸능을 보이는 등 높은 활성을 보였다. 이로써 천년초로부터 추출한 효소처리 다당은 종양세포에 대한 사멸능을 가지는 NK cell의 활성화에 기여함을 확인할 수 있었다.

**천년초 유래 다당의 보체계 활성화능**

천년초 유래 다당에 대한 보체계 활성화능을 측정된 결과, CNC-E는 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 ITCH<sub>50</sub>값이 약 40%에 이르는 양호한 보체계 활성화능을 보였으며 농도의존적인 활성화 경향을 보였다(Fig. 4). 이는 보체계의 강력한 활성화자로 알려져 있는 시판 면역활성 다당체인 구름버섯(*Coriolus versicolor*, 운지) 기원의 PSK(30)보다는 상대적으로 낮은 활성이었지만 천년초 다당이 보체계의 활성화인자임을 확실히 해 주는 결과였다.

보체계는 C1-C9의 활성 단백질과 조절인자를 포함하여 약 20여종의 혈중 순환 단백질들로 구성되어 있으며, 외부 감염 병원체 등 침입인자를 항체의 존재 또는 비존재 하에 비특이적으로 제거하는 생체의 주요 방어기구이다(31). 보체계가 활성화되면 연속적인 cascade반응에 의하여 보체 단백질이 활성 분자로 분해되고 이들이 침입인자의 표면에 부착되어 최종적으로 MAC(membrane attack complex)를 형성하여 감염 병원체 등을 제거하는 것으로 알려져 있다(32). 또한 보체 활성화 과정 중 생성되는 여러 보체 분해산물은 각종 생리반응을 매개한다고 알려져 있으며, 특히 macrophage와 lymphocyte의 활성화, 면역증강 등과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되고 있다(32). 보체계 활성화 경로는 보체의 중요성분인 C3의 활성화 방법에 따라 크게 고전경로(classical pathway)와 부경로(alternative pathway)로 구성



**Fig. 4. Complement activation by CNC-E from *O. humifusa* and the effect of calcium and magnesium ions on anti-complementary activity.** <sup>1)</sup>The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Mayer's method. <sup>2)</sup>PSK, a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control. <sup>3)</sup>The data were expressed as mean  $\pm$  SD of three separate experiments. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  compared with the untreated group.

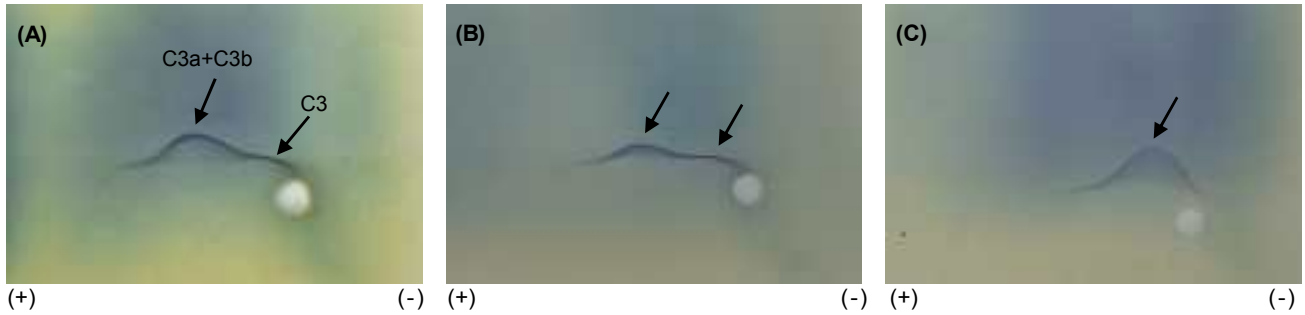


Fig. 5. Crossed immunoelectrophoretic patterns of C3 converted by CNC-E from *O. humifusa*. Normal human serum was incubated with the samples in GVB (A), Mg-EGTA-GVB (B) and EDTA-GVB (C) at 37°C for 30 min. The sera were then subjected to immunoelectrophoresis using anti-human C3 antibody to locate C3 cleavage products. The anode is to the left.

되어 있는데, 고전경로의 활성화에는  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$  모두, 부경로에는  $Mg^{2+}$ 만이 선택적으로 관여하고 있는 것으로 알려져 있다(31). 따라서 활성화에 관여하는 금속이온의 존재여부에 따라 반응계를 조절하면 보체계 활성화 경로를 예측할 수 있게 된다. 보체계에 대해 양호한 활성을 나타내었던 CNC-E를 대상으로 GVB 기본반응계와 2가 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB 반응계 및  $Ca^{2+}$ 이온만을 선택적으로 제거한 Mg-EGTA-GVB 반응계로 나누어 농도별로 항보체 활성(ITCH<sub>50</sub>)을 비교 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 천년초 다당 CNC-E의 경우,  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$ 가 모두 존재하는 기본 반응계에서의 활성과 비교할 때 2가 금속이온 모두 제거된 반응계에서는 대조군에 비해 거의 완전한 활성의 소실이 관찰되었으나,  $Mg^{2+}$ 이온만 존재하는 반응계에서는 고농도기준으로 활성이 상당량 유지(약 30% 수준)되는 결과를 보였다. 이러한 사실은 천년초 유래 활성 다당 CNC-E가 보체계의 고전경로와 부경로를 모두 활성화시킬 수 있음을 의미하는 것으로, 특히 부경로는 항체에 의한 면역 반응이 일어나기 전에 활성화되기 때문에 항원에 의해 감각되지 않은 숙주에 있어 중요한 1차적 방어기작이므로 그 의미가 크다고 할 수 있다(32).

#### 2차원 면역전기영동에 의한 C3 산물의 동정

Kabat과 Mayer법(19)에 의한 항보체 활성측정법은 1차 반응단계에서 시료성분의 보체계 활성화에 의한 보체의 소모 정도를 측정하는 방법으로 만일 시료 중 보체의 활성화가 아닌 특정한 저해성분이 존재할 경우에도 높은 항보체 활성을 보일 수 있는 문제점을 갖고 있다(33). 따라서 CNC-E의 항보체 활성이 보체계 활성화에 기인한 것인지, 혹은 시료의 보체 저해활성에 의한 것인지를 확인하기 위하여 보체계 활성화에서 가장 중요한 성분으로 알려진 C3의 활성화 여부를 조사하였다. 일반적으로 보체계가 활성화되면 C3는 C3a와 C3b로 분해되므로(34) 시료와 정상인 혈청을 반응시킨 후 1차 전기영동을 실시하고 anti-human C3를 이용하여 2차 면역전기영동을 행함으로써 C3 분해산물을 동정하고자 하였다. Fig. 5(A)에 나타난 바와 같이 천년초 유래 CNC-E와 혈청을 기본반응계에서 반응시킨 경우는 C3의 활성화가 일

어나 두 개의 침강선이 형성된 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 CNC-E의 항보체 활성은 보체계의 저해가 아닌 직접 활성화에 기인함을 확인할 수 있었다. CNC-E를 Mg-EGTA-GVB 및 EDTA-GVB 반응계에서 반응시킨 후 그 분해 산물을 관찰한 결과는 Fig. 5(B) 및 Fig. 5(C)에 나타난 바와 같다. 금속이온을 모두 제거한 EDTA-GVB 반응계에서는 C3의 활성화가 진행되지 않아 1개의 침강선이 관찰된 반면,  $Ca^{2+}$ 이온을 선택적으로 제거한 Mg-EGTA-GVB 반응계에서는 2개의 침강선이 관찰되었다. 교차 면역전기영동의 결과에서 시작점으로부터 첫 번째 침강선은 C3를, 두 번째 침강선은 활성화된 C3a와 C3b의 혼합물에 기인한 침강선(34)임을 고려해 볼 때 기본 반응계인 GVB에서는 첫 번째 침강선이 상대적으로 불분명하고 두 번째 침강선이 뚜렷한 반면(Fig. 5(A)), Ca를 선택적으로 제거한 반응계에서는 첫 번째 침강선이 분명하게 남아있는 것으로 나타남으로써(Fig. 5(B)) 기본 반응계에서 보체의 활성화가 훨씬 강력하게 진행되었음을 확인할 수 있었다. 참고로 전혀 활성화가 진행되지 않은 경우는 Fig. 5(C)처럼 시작점으로부터 첫 번째 침강선만이 관찰된다. 따라서 CNC-E는 보체계의 고전경로와 부경로를 모두 활성화시킴을 재차 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 천년초 중 존재하는 다당은 macrophage, 림프구 및 NK cell 등 면역 관련 세포의 활성인자로 작용할 수 있으며, 보체계에도 유효하게 작용함이 확인되었다. 따라서 천년초는 유효한 여러 영양성분 외에도 인체의 항상성 유지에 중요한 역할을 담당하는 면역계를 활성화하는 다당류를 다량 함유함을 확인할 수 있었다.

#### 요 약

천년초(*Opuntia humifusa*)에 존재하는 점질다당의 새로운 이용방안을 모색하기 위해 천년초로부터 다당을 분리하여 면역자극활성을 측정하였다. 천년초의 주요 다당 CNC-E는 상업용 효소처리, 물 추출 및 ethanol 침전을 거쳐 조제하고 이들의 특성을 검토하였다. CNC-E는 분자량 약 700 kDa의 다당체로, 구성당 조성을 확인한 결과, arabinose,

galactose 및 xylose를 높은 비율로 함유하고 있었으며 rhamnose와 fucose를 미량 함유하고 있었다. 한편 CNC-E는 비장세포 유래 림프구에 대해서는 비교적 높은 증식활성을 농도 의존적으로 나타냈다. CNC-E로 자극한 macrophage는 IL-6, IL-12, IL-10 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 cytokine의 생산을 농도 의존적으로 증진시켰으며 CNC-E를 mouse에 정맥 주사한 후 얻어진 NK세포는 Yac-1 종양 세포주에 대한 높은 치사작용을 보였다. 특히 CNC-E를 mouse 당 100  $\mu$ g 처리한 후 얻어진 NK세포는 미처리 대조군에 비해 3배 높은 치사활성을 나타냈다. CNC-E는 인체 초기 면역반응에 있어 중요한 역할을 담당하는 보체계에 대하여 농도 의존적인 활성을 나타냈으며, anti-human C3를 이용한 면역전기영동실험과  $Ca^{2+}$ 이온이 제거된 상태에서의 항보체 활성 실험을 통해 천년초 다당 CNC-E는 고전경로와 부경로를 모두 경유하여 활성을 나타내고 있음을 확인하였다. 이상의 결과로부터 한국산 선인장 천년초에는 인체에 유익한 면역 활성 다당체를 다량 함유함을 알 수 있었다.

### 감사의 글

본 연구는 (주)월드웨이의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

1. Ruoslahti E. 1989. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 264: 13369-13372.
2. Paulson JC. 1989. Glycoprotein: What are the sugar chains for? *Trends Biochem Sci* 14: 272-276.
3. Zhu H, Zhang YY, Zhang JW, Chen DF. 2008. Isolation and characterization of an anti-complementary protein-bound polysaccharide from the stem barks of *Eucommia ulmoides*. *Int Immunopharmacol* 8: 1220-1230.
4. Wang HX, Liu WK, Ng TB, Ooi VE, Chang ST. 1995. Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide-peptide complex from mycelia culture of *Tricholoma* sp., a local edible mushroom. *Life Sci* 57: 269-281.
5. Iino K, Ohno N, Suzuki I, Sato K, Okigawa S, Yadomae T. 1985. Structure-function relationship of antitumor  $\beta$ -1,3-glucan obtained from matted mycelium of cultured *Grifora frondosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 33: 4950-4956.
6. Yadomae T. 2000. Structure and biological activities of fungal  $\beta$ -1,3 glucans. *Yakukaku Zasshi* 120: 413-431.
7. Hikino H, Kobayashi M, Suzuki Y, Konno C. 1989. Mechanism of hypoglycemic activity of aconitan A, a glycan of *Aconitum carmichaeli* roots. *J Ethnopharmacol* 25: 295-304.
8. Lee KS, Oh CS, Lee KY. 2005. Antioxidative effect of the fractions extracted from a cactus Cheonnyuncho (*Opuntia humifusa*). *Korean J Food Sci Technol* 37: 474-478.
9. Lee YC, Pyo YH, Ahn CK, Kim SH. 2005. Food functionality of *Opuntia ficus-indica* var. cultivated in Jeju Island. *J Food Sci Nutr* 10: 103-110.
10. Kim SY. 2003. Studies on the separation of antioxidative and anti-microbial compounds of Korean perennial cactus Cheonnyuncho. *PhD Dissertation*. Hoseo University, Asan,

- Korea. p 34-58.
11. Park MK, Lee YJ, Kang ES. 2005. Hepatoprotective effect of *Cheonnyuncho* (*Opuntia humifusa*) extract in rats treated carbon tetrachloride. *Korean J Food Sci Technol* 37: 822-826.
12. Lee KS, Kim MG, Lee KY. 2004. Antimicrobial effect of the extracts of cactus Chounnyuncho (*Opuntia humifusa*) against food borne pathogens. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1268-1272.
13. Kwon DK, Song YJ. 2005. Effect of *Opuntia humifusa* supplementation on endurance exercise performance in rats fed a high-fat diet. *Korean J Exer Nutr* 9: 183-188.
14. Kim KT, Choi AR, Lee KS, Joung YM, Lee KY. 2007. Quality characteristics of bread made from domestic Korean wheat flour containing cactus Chounnyuncho (*Opuntia humifusa*) powder. *Korean J Food Cookery Sci* 23: 461-468.
15. 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.
16. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* 54: 484-489.
17. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
18. 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.
19. Kabat EA, Mayer MM. 1971. Complement and complement fixation. In *Experimental Immunochimistry*. 2nd ed. Charles C, ed. Thormas Publisher, Springfield, IL, USA. p 133-240.
20. Shimura K, Ito H, Hibasami H. 1983. Screening of host-mediated antitumor polysaccharides by crossed immunoelectrophoresis using fresh human serum. *Jap J Pharmacol* 33: 403-408.
21. Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I. 2006. Cells, tissues, and organs of the immune system. In *Immunology*. 7th ed. Mosby, St. Louis, MO, USA. p 19-58.
22. Keller R, Keist R, Wechsler A, Leist TP, 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.
23. Nathan CF, Murray HW, Cohen ZA. 1980. Current concepts: the macrophage as an effector cell. *N Engl J Med* 303: 662-665.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Lasek W, Feleszko W, Golab J, Stoklosa T, Marczak M, Dabrowska A, Malejczyk M, Jakóbsiak M. 1997. Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha in mice. *Cancer Immunol Immunother* 45: 100-108.

28. 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 cytokines and augment natural killer cell activity. *Clin Vaccine Immunol* 13: 997-1003.
29. 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.
30. Saito H, Tomioka H, Sato K. 1988. 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.
31. Kwon MH, Sung HJ. 1997. Characteristics of immune response by polysaccharides with complement system activity. *Food Sci Indus* 30: 30-43.
32. Whaley K. 1986. The complement system. In *Complement in Health and Disease*. Whaley K, ed. MTP Press, Lancaster, UK. p 1-35.
33. Kim JH, Shin KS, Lee H. 2002. Characterization and action mode of anti-complementary substance prepared from *Lactobacillus plantarum*. *Korean J Food Sci Technol* 34: 290-295.
34. Hudson L, Hay FC. 1989. Two dimensional or crossed immunoelectrophoresis. In *Practical Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. p 244-246.

(2011년 11월 10일 접수; 2011년 11월 21일 채택)