

감잎 유래 다당체가 면역억제 마우스의 면역조절에 미치는 영향

조장원 · 이영경 · 김영찬 · 한춘희¹ · 신광순² · 홍희도*

한국식품연구원 융합기술연구본부, ¹연변대학교 식품연구센터, ²경기대학교 식품생명공학과

Immunomodulatory Effects of Polysaccharides Derived from Persimmon Leaves on Cyclophosphamide-induced Immunosuppressed Mice

Chang-Won Cho, Young Kyoung Rhee, Young-Chan Kim, Chun-ji Han¹, Kwang-Soon Shin², and Hee-Do Hong*

Division of Convergence Technology, Korea Food Research Institute

¹Food Research Center, Yanbian University, China

²Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

Abstract We prepared 2 different crude polysaccharides from persimmon leaves, by hot water (PLW-0) and pectinase digestion (PLE-0), respectively. PLW-0 and PLE-0 showed similar sugar compositions and contained 11 different sugars, including rarely observed sugars such as 2-methyl-fucose, 2-methyl-xylose, apiose, and aceric acid. However, the uronic acid content of PLE-0 was lower than that of PLW-0, because of pectinase treatment. In normal mice, administration of PLW-0 and PLE-0 increased the spleen index and splenocyte proliferation. The effect of PLE-0 on the spleen index and splenocyte proliferation was greater than that of PLW-0. We subsequently assessed the immunomodulatory activities of PLW-0 and PLE-0 on cyclophosphamide (CY)-induced immunosuppressed mice. We revealed that mice treated with PLW-0 or PLE-0 showed increased splenocyte proliferation, NK cell activity, and white blood cell numbers. Taken together, our results indicate that PLW-0 and PLE-0 can enhance immune function in normal mice and modulate CY-induced immune suppression.

Keywords: persimmon leaves, polysaccharide, immunomodulating activity, cyclophosphamide

서 론

감(*Diospyros kaki* Thumb)은 우리나라를 비롯한 동아시아에서 널리 재배되고 있으며, 포도당, 과당 등의 당질과 비타민 A, C가 풍부하며 펙틴, 카로티노이드, 폴리페놀과 같은 기능성 성분을 많이 함유하고 있는 과일이다(1). 감은 설사, 숙취제거, 기침, 기관지염, 고혈압 등에 약리작용이 있는 것으로 알려져 있고, 식품 가공소재로서 가치를 인정받아 생과나 건조품 외에 고부가가치 가공식품으로 개발되고 있다(2). 예로부터 감잎차는 한국과 일본에서 녹차와 함께 건강에 좋은 음료로 여겨지고 있어(3), 일부 감잎이 차로 가공되고 있으나 그 양은 매우 미미하여 대부분 폐기되고 있는 실정이다. 따라서 이와 같이 이용성이 낮은 농산 폐기물을 이용하여 고부가가치 기능성 식품 소재를 개발한다면 폐자원을 이용한 부가가치 창출이라는 의미가 있을 것으로 사료된다. 현재까지 알려진 감잎의 생리활성으로는 항알러지, 항산화, 항고혈압, 체지방 감량효과 등이 보고된 바 있으며(4-7), 다양한 암 세포주에 대한 항암효과도 보고되었다(8-10). 그러나 감잎을 이용한 대부분의 연구들이 폴리페놀, 플라보노이드, 안토시아닌 등의 저

분자 화합물들을 대상으로 수행되어, 감잎에 다량으로 존재하는 다당류의 기능성에 관한 연구는 미비한 상황이다.

최근, 식품소재와 약용식물을 포함한 천연물로부터 분리된 다당체들이 미생물 유래 다당체와 합성의약품에 비해 비교적 낮은 독성과 부작용으로 면역체계를 강화시킬 수 있다는 사실이 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 보고되었다(11). 이러한 천연물유래 다당체들은 대식세포, 림프구, natural killer (NK)세포 등 면역세포의 활성화 및 면역관련 cytokine들의 분비를 유도함으로써 체내 면역능을 증진시킨다고 알려져 있어(12), 면역반응조절제(immunopotentiator) 후보물질들로 천연물 유래 다당체를 이용한 많은 연구가 진행되고 있다(13-16).

이전 연구에서 본 연구팀은 감잎을 대상으로 열수추출 및 효소처리를 행하고, 이로부터 다당류를 분리하여 성분 특성을 밝혔으며, 각종 면역자극 활성을 평가하여 감잎 유래 다당체들이 다양한 면역관련 지표들을 증가시키는 것을 확인하였다(17). 따라서 본 연구에서는 열수추출 및 효소처리 감잎 다당을 이용하여 정상 마우스 모델에서의 면역자극 활성 및 면역억제제인 cyclophosphamide (CY) 처리에 의해 면역이 억제된 마우스의 면역력 증강 활성을 평가해 봄으로써 면역반응조절제로서의 감잎의 가능성을 살펴보았다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 이용한 감잎(persimmon leaves)은 2011년 경북 영천

*Corresponding author: Hee-Do Hong, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9285
Fax: 82-31-709-9876
E-mail: honghd@kfri.re.kr
Received June 14, 2013; revised July 17, 2013;
accepted July 18, 2013

군에서 생산되어 건조된 것을 구매하여 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), concanavalin A (ConA), dimethyl sulfoxide (DMSO), lipopolysaccharide (LPS), trypan blue solution (0.4%)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하여 실험에 이용하였다. RPMI-1640 medium 은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA), fetal bovine serum (FBS)은 Zhejiang Tianhang Biological Technology Co. (Zhejiang, China), cyclophosphamide (CY)는 Jiangsu Heungrui Medicine Co. (Jiangsu, China) 제품을 사용하였다.

감염 다당의 분리 및 정제

감염으로부터 단순 열수추출조다당 PLW-0와 효소처리 조다당 PLE-0는 Shin 등(17)의 방법을 변형하여 분리하였다. 단순 열수 추출은 감염 분말 100 g에 10배 부피의 증류수를 가하여 100°C에서 추출하였다. 감염 열수추출물에 4배 부피의 95% ethanol을 가하고, 침전물은 소량의 증류수에 용해하여 3일간 투석(MWCO: 12,000-14,000, Spectrum Laboratory Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)하여, 저분자물질을 선택적으로 제거하였다. 이를 동결 건조하여 조다당 시료인 PLW-0 획득을 얻었다. 이와 별도로 감염 시료 100 g에 증류수(pH 5.0) 2L를 가하여 현탁시킨 후, 시료의 1% 함량의 pectinase (from *Aspergillus niger*; Sigma-Aldrich)를 가하여 50°C에서 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 투석(MWCO: 3,500)을 행하고, 이를 동결 건조하여 효소처리 조다당 획득, PLE-0를 얻었다.

일반 성분 및 구성당 분석

시료의 총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법(18)으로, 산성당 함량은 β-D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 carbazole-sulfuric acid 법(19)으로 측정하였다. 단백질 함량 측정은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 법(20)으로 측정하였으며, 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO)는 thiobarbituric acid (TBA) 비색정량법(21)을 사용하였다. 구성당 분석은 Albersheim 등의 방법(22)을 일부 변형하여 가수분해 후 각 구성당을 alditol acetate와 aldonolactone 유도체로 전환시킨 후, gas chromatography (GC ACME-6100, Young-Lin Co. Ltd., Anyang, Korea)를 이용하여 분석하였다. GC column은 SP-2380 capillary column (0.25 mm×30 m, 0.2 μm film, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을, detector는 flame ionization detector (FID, Young-Lin Co. Ltd.)를 사용하여 분석하였다. 각 구성당의 mole%는 각 유도체의 peak면적, 분자량 및 FID에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

실험동물

생후 7-8주령된 웅성 SPF KM 마우스(18-22 g)를 연변대학 실험동물센터(Yanbian, China)로부터 분양 받아 고형 사료와 물을 자유로이 공급하면서 5일 정도 실험동물실의 IVC시설에서 순화시킨 후 무작위로 실험군에 10마리씩 나누었다. 마우스 사육조건은 온도 22±2°C, 습도는 40-60%로 유지하였고, 명암 주기(Light and dark cycle)는 12시간 간격으로 조절하였다.

실험 동물모델

정상 동물모델 실험을 위하여 마우스를 무작위로 5군(n=10)으

로 분류하여 처치하였다. 정상군(normal group)은 증류수를, 감염 조다당시료 PLW-0, PLE-0 처리군은 100, 200 mg/kg을 15일간 각각 경구 투여하였다. 실험 종료일에 실험동물의 체중을 측정하고 희생한 후 흉선, 비장을 적출하여 그 무게를 측정하고, 비장세포를 분리하여 증식능을 확인하였다. 실험동물의 비장과 흉선지수는 체중에 대한 상대장기중량으로 계산하였다.

면역억제 동물모델 실험을 위하여 마우스를 무작위로 6군(n=10)으로 분류하여 처치하였다. 정상군(control군)은 매일 1회씩 3일간 생리식염수를 복강 투여한 후, 증류수를 14일간 경구 투여하였다. 면역억제 모델군(model control군)은 CY 100 mg/kg을 매일 1회씩 3일간 복강 주사하여 면역력을 억제한 후, 증류수를 14일간 경구 투여하였다. 감염 조다당시료 PLW-0, PLE-0 처리군은 CY 100 mg/kg을 매일 1회씩 3일간 복강 주사한 후, 다당시료들을 100 mg/kg과 200 mg/kg 두가지 투여량으로 매일 1회씩 14일간 경구 투여하였다. 마지막 투여가 끝난 24시간 후, 마우스의 혈액을 채집한 다음 마우스를 희생한 후 비장을 적출하여 비장세포의 증식능, NK세포 활성, 말초혈액중의 백혈구수를 측정하였다. 백혈구수는 자동표준방법으로 semi-automatic blood cell analyzer (KCTH04, Kingcare Medical Equipment Co., Ltd., Guangdong, China)을 이용하여 측정하였다.

림프구 증식활성 측정

경추 탈골법으로 희생시킨 마우스로부터 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI-1640 배양액으로 세척 후 멸균 유리병으로 가볍게 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 분리된 세포현탁액을 200 mesh stainless steel sieve에 통과시켜 RPMI-1640-FBS 배양액(10% FBS 포함)으로 2회 세척하고, 1,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 이것을 Tris-buffered ammonium chloride (pH 7.2)와 증류수에 현탁시켜 5분간 처리하여 적혈구를 제거하였다. 적혈구가 제거된 비장세포는 다시 RPMI-1640-FBS 배양액에 분산시켜, trypan blue solution으로 염색한 후 hemocytometer를 이용하여 그 세포 수를 측정하고, RPMI-1640-FBS 배양액으로 세포농도 3.0×10⁶ cell/mL로 분산시킨 후 96-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 90 μL씩 분주한 후 세포 증식능 측정에 사용하였다. ConA와 LPS는 최종농도로 5 μg/mL와 10 μg/mL를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각 well당 10 μL의 MTT 0.5 mg/mL 용액을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후, 배양액을 제거하고 각 well에 DMSO를 첨가하여 formazan을 용해한 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용 540 nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 비교하였다.

NK세포 활성 측정

Natural killer (NK) 세포의 세포독성은 NK세포에 의해 파괴된 종양세포 YAC-1 (NK-sensitive cell line)으로부터 유리된 lactate dehydrogenase (LDH)를 측정하는 방법을 이용하였다. RPMI-1640-FBS medium으로 96-well U-bottom culture plate (Nunc)에 1×10⁴ cell/100 μL가 되도록 YAC-1 (target cell) 세포수를 조정하고 분리된 비장세포(effector cell)와 같이 배양하였는데, effector-to-target 세포 비가 50 : 1이 되도록 세포 수를 조정하였다. 이후 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 이 때 NK 세포의 사멸능에 의해 표적세포로부터 유리되는 LDH의 발생량을 cytotoxicity LDH detection kit (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

실험결과는 SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계처리 하였으며, 실험군당 평균±표준편차(Mean±SD)로 표시하였다. 실험군간 통계적인 유의성은 one-way ANOVA를 실시한 다음, Duncan's multiple range test로 사후 검정을 실시하여 $p < 0.05$ - $p < 0.01$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

감잎 유래 다당의 특성

감잎으로부터 열수추출 및 pectinase 효소처리에 의해 분리한 조다당 PLW-0와 PLE-0의 화학특성을 살펴본 결과는 Table 1과 같다. PLW-0와 PLE-0의 수율은 각 4.5%와 5.4%로 효소처리 다당 PLE-0의 수율이 열수추출 다당 PLW-0에 비해 약 20% 높았는데, 이는 효소처리에 의한 세포벽 분해 등에 의해 수율이 증가한 것으로 사료되었다. Pectinase 처리에 의한 추출수율의 증가는 복분자 및 딸기과즙에서 보고된바 있다(23,24). PLW-0는 중성당 60.5%, 산성당 35.9%, 단백질 2.3%, KDO 1.3%로 구성되어 있었으며, PLE-0는 중성당 64.5%, 산성당 31.2%, 단백질 1.8%, KDO 2.5%로 구성되어 있었다. Pectinase 효소처리에 의해 산성당이 감소되고, 식물추출물에서 많이 검출되는 중성당 및 KDO 함량이 상대적으로 증가하였는데 이는 감잎 다당을 이용한 이전의 연구결과와 일치하는 결과이다(17). 구성당 분석 결과, PLW-0와 PLE-0 모두 arabinose, galactose, rhamnose를 주로 함유하고 있었으며 2-methyl-fucose, 2-methyl-xylose, apiose, aceric acid 등의 특이당을 포함한 총 11종의 구성당으로 구성되어 있었다.

정상 마우스의 체중과 장기무게에 대한 영향

감잎 유래 단순 열수추출 조다당 PLW-0와 효소처리 조다당 PLE-0를 마우스에 농도별로 투여한 후, 평균 체중과 흉선 및 비장지수에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 2와 같다. 평균 체중은 유의성 있는 차이를 보이지 않아 실험에 사용한 감잎 유래 다당체가 마우스의 체중에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다. 일반적으로 생체 내 면역기능 측정 기준으로 인지되는 흉선 및 비장지수는 식이 성분에 의해 유의적인 영향을 받기 때문에 식이로 인한 이들의 체내축적치 차이는 곧 부분적으로 입파구 생성 능력의 차이를 초래하고, 이것은 특정질환 감염 시 더욱 큰 영향을 받는 것으로 해석된다. 또한, 일반적으로 면역조절제(immunopotentiator)는 흉선과 비장의 무게를 증가시킨다고 알려져 있다(14). 본 연구에서 PLW-0 200 mg/kg, PLE-0 100, 200 mg/kg 투여군에서 비장지수의 유의성 있는 증가가 관찰되었다. 모든 처리군에서 비장지수는 농도의존적으로 증가하였으며, 효소처리 조다당 PLE-0가 PLW-0에 비해 다소 높은 증가를 나타내었

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

	PLW-0	PLE-0
Yield (g/100 g)	4.5	5.4
Chemical composition (%)		
Neutral sugar	60.5	64.5
Uronic acid	35.9	31.2
Protein	2.3	1.8
KDO ¹⁾	1.3	2.5
Composition of neutral sugar ²⁾ (Mole%) ³⁾		
2-Methyl fucose	1.0	0.6
Rhamnose	9.0	11.8
Fucose	1.3	1.0
2-Methyl xylose	0.5	0.5
Arabinose	45.5	38.6
Xylose	7.5	4.9
Apiose	5.1	3.4
Aceric acid	1.3	0.3
Mannose	0.8	2.5
Galactose	20.6	33.3
Glucose	7.5	3.1

¹⁾KDO: 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid.

²⁾Monosaccharides were analyzed using alditol acetates.

³⁾Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.

다. 흉선지수는 각 처리군에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 보이지 않았다.

감잎 유래 조다당의 정상 마우스 림프구 증식능에 대한 효과

비장세포 증식은 세포성 또는 체액성 면역반응의 활성화 경로에 있어 가장 중요한 단계 중 하나로 알려져 있다(13). 감잎 유래 조다당 PLW-0와 PLE-0를 투여한 마우스의 비장세포를 이용하여 면역세포의 증식능을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 마우스로부터 분리된 비장세포의 증식능을 측정하기 위한 mitogen으로는 T 입파구 증식능을 측정하기 위하여 ConA를, B 입파구 증식능의 측정을 위하여 LPS를 사용하였다(25). T 입파구 증식능을 고찰해 보았을 때, PLW-0와 PLE-0 모두 농도 의존적으로 증식을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). B 입파구 증식능의 경우 PLW-0 100 mg/kg 투여군을 제외한 모든 투여군이 대조군에 비해 전부 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 1B). 또한 PLE-0 군은 같은 농도의 PLW-0 투여군에 비해 T 입파구와 B 입파구의 증식능을 유의성 있게 높였다. 비장세포 증식능은 각종 항원이나 mitogen, cytokine 등 여러종류의 자극에 의하여 초래된 새

Table 2. The effects of PLW-0 and PLE-0 on body weight and immune organs in mice

Group	Number of animal	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Weight growth rate (%)	Spleen Index (SI) ¹⁾	Thymus Index (TI) ²⁾
Control	10	25.02±2.87	33.30±3.35	24.86	0.64±0.07	0.34±0.12
PLW-0 100 mg/kg	10	25.51±2.34	33.78±3.23	24.48	0.69±0.10	0.36±0.12
PLW-0 200 mg/kg	10	25.82±3.17	34.12±3.21	24.33	0.73±0.10*	0.37±0.13
PLE-0 100 mg/kg	10	25.25±2.56	33.80±2.67	25.30	0.75±0.08*	0.39±0.11
PLE-0 200 mg/kg	10	25.90±2.90	35.20±3.10	26.42	0.78±0.06*	0.44±0.14

* $p < 0.05$, when compared with control group.

¹⁾SI=Spleen weight/Body weight

²⁾TI=Thymus weight/Body weight

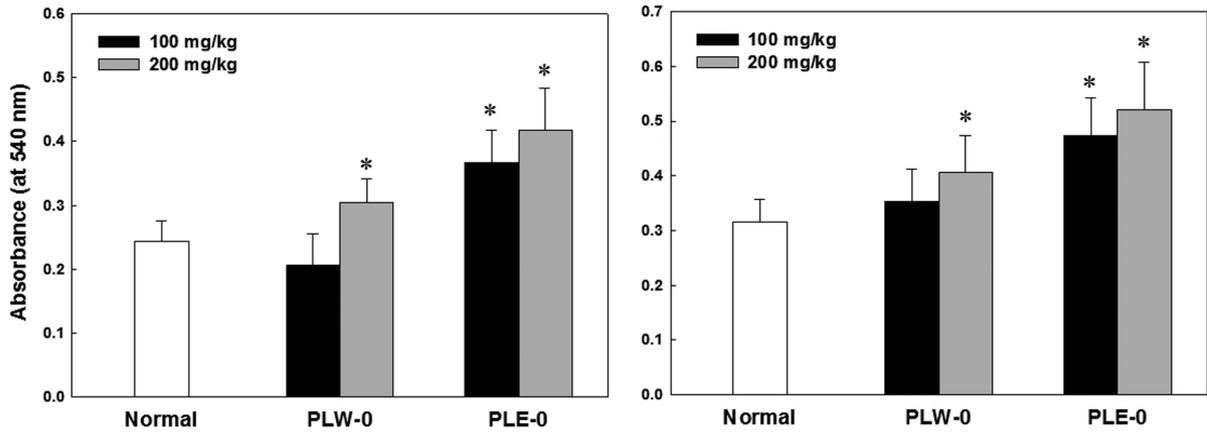


Fig. 1. Effects of PLW-0 and PLE-0 on lymphocyte proliferation in normal mice. Effects on (A) ConA-induced T-lymphocyte or (B) LPS-induced B-lymphocyte proliferation. Cell proliferation was measured by MTT assay. The data were expressed as mean±SD (n=10). **p*<0.05, when compared with normal control group.

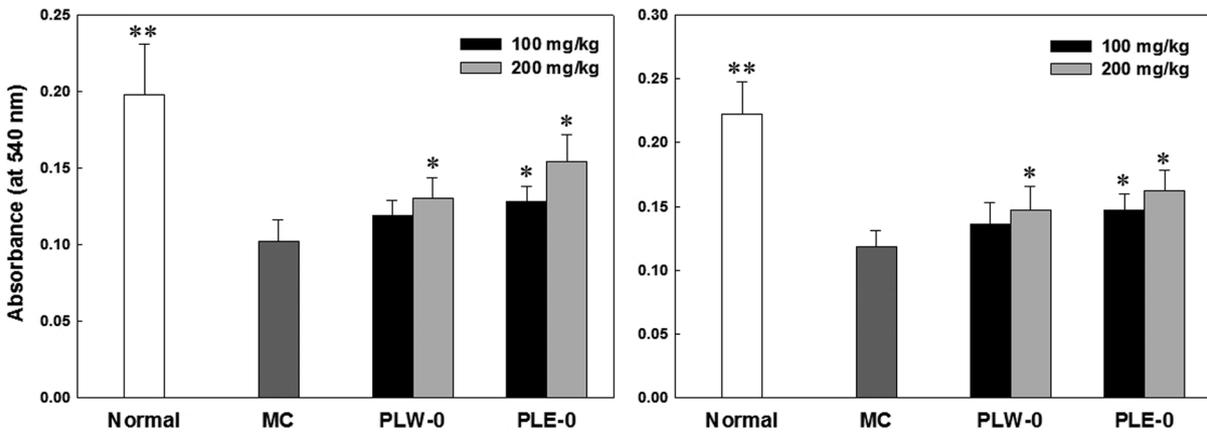


Fig. 2. Effects of PLW-0 and PLE-0 on lymphocyte proliferation in CY-treated immunosuppressed mice. Effects on (A) ConA-induced T-lymphocyte or (B) LPS-induced B-lymphocyte proliferation. Model control (MC): CY-treated immunosuppressed mice group. Cell proliferation was measured by MTT assay. The data were expressed as mean±SD (n=10). **p*<0.05, ***p*<0.01, when compared with MC group.

로운 DNA 합성과 더불어 세포분열의 결과로 새로운 면역조절제를 탐색하는 방법으로 광범위하게 사용되어 지고 있다(26). 본 연구에서 감염 유래 조다당 PLW-0와 PLE-0의 투여가 mitogen 자극에 의한 마우스 비장세포의 증식능을 농도 의존적으로 증가시키며 확인되었으므로, 감염 유래 조다당이 마우스 림프구를 활성화하는 기능이 있다고 판단되었는데 이러한 활성화는 pectinase 효소처리에 의해 얻어진 감염 다당 PLE-0에서 높게 나타났다.

면역억제 마우스의 T, B 림파구 증식능에 미치는 영향

CY는 전신 홍반성 루프스, 신염, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염 등의 자가 면역질환치료에 사용되는 알킬레이팅 물질로, CY 대사체들은 비장세포의 DNA를 알킬레이션시켜, T, B 림파구에 의한 면역반응을 억제시킨다고 알려져 있다(27). PLW-0와 PLE-0를 투여한 면역억제마우스의 비장세포를 이용하여 면역세포의 증식능을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. CY 100 mg/kg 투여는 비장세포의 증식능을 감소시켰는데, 이는 CY 투여가 mitogen에 의한 림파구의 증식을 억제하였다는 이전 연구와 일치하였다(28). 본 연구에서는 PLW-0 100 mg/kg 투여군을 제외한 투여군에서 CY투여로 억제된 T와 B 림파구 증식능은 CY투여군에 비해 현저하게 증가되었다. PLE-0 투여군의 T와 B 림파구 증식능은 PLW-0 투여군에 비해 전 농도에서 높게 나타났으나 유의

성은 발견되지 않았다. T, B 림파구 증식능을 비교해 보았을 때 PLE-0 200 mg/kg 투여군의 증식능이 CY투여군에 비해 50%를 초과하였다. 이전 연구에서 감염유래 다당 PLW-0와 PLE-0가 림파구를 직접 증식시키는 mitogen활성이 있음을 보고한 바 있다(17). 또한 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 PLW-0와 PLE-0를 경구투여한 정상마우스의 림파구가 mitogen 자극에 대한 증식효과를 보인 것을 고려해 보았을 때, 감염유래 다당의 투여가 CY에 의한 T와 B 림파구의 증식능 저해를 감소시킨 것은, 감염유래 다당 자체가 mitogen 활성을 가지고 있어 림파구의 면역능력을 강화시켰기 때문으로 사료되었다.

면역억제 마우스의 NK세포 활성화에 미치는 영향

NK세포는 전체 peripheral blood monocyte cell (PBMC)의 5-15%, 비장세포의 3-4% 차지하고 있는 면역세포로, 활성화된 이후 다양한 cytokine을 빠르게 분비하는 능력을 가지고 있기 때문에 선천면역계(innate immune system)의 핵심적인 요소이다(29). 또한 각종 바이러스, 박테리아와 같은 외부항원들에 대응하여 초기의 면역반응을 유발하는데 중요한 역할을 하며, 표적세포에 대한 세포 살해기능을 갖고 있어 NK세포의 활성화자극 효과는 체내 면역력의 증가와 연장선상에 있다고 할 수 있다(30). CY투여는 NK세포의 활성을 정상군에 비해 유의적으로 감소시켰는데 PLE-

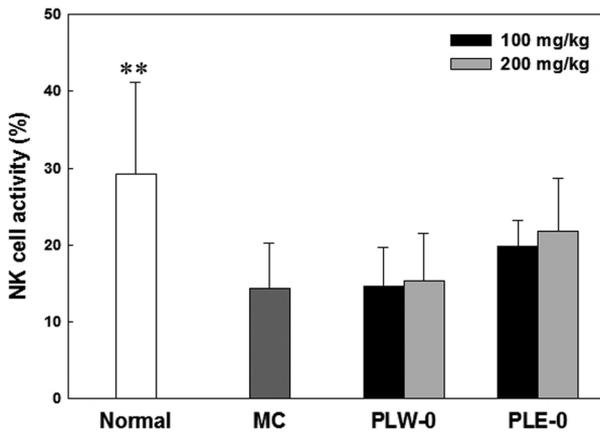


Fig. 3. Effects of PLW-0 and PLE-0 on NK cell-mediated tumor cell cytotoxicity in CY-treated immunosuppressed mice. NK cell activity was determined by LDH assay. Model control (MC): CY-treated immunosuppressed mice group. The data were expressed as mean±SD (n=10). ** p <0.01, when compared with MC group.

0 100, 200 mg/kg 투여군의 NK세포 활성은 CY 투여군에 비하여 통계적으로 유의하지는 않았으나 증가하는 경향을 보여주었다 (Fig. 3).

면역억제 마우스의 백혈구 수에 미치는 영향

다량의 CY 투여는 면역억제에 의한 백혈구 및 호중구 수 감소를 유발한다고 알려져 있다(31). CY 100 mg/kg으로 면역억제 마우스 모델을 만들고 감잎 유래 다당소재를 14일간 경구 투여한 후 혈액중의 백혈구 수를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. CY 투여군의 백혈구 수는 정상군에 비해 현저하게 감소되었고, 본 실험에 사용한 감잎유래 다당시료는 CY에 의해 저하된 백혈구 수를 현저하게 증가시켰으므로 CY로 인한 백혈구감소증을 어느 정도 방지할 수 있다는 것을 제시하였다. 백혈구 수 증가율을 비교해보면 PLW-0 200 mg/kg, PLE-0 200 mg/kg 투여군의 백혈구 수 증가율은 CY군에 비해 전부 50%를 초과하였다. CY 투여에 의한 백혈구 수의 감소는 심각한 면역저하를 일으키기 때문에, 이러한 백혈구 수 저하를 극복하기 위한 다양한 약물들이 개발되었다. 특히 granulocyte macrophage stimulating factor (GM-CSF), interleukin (IL)-11 등의 cytokine은 백혈구 수의 증가를 나타내기는 하지만 전체적인 면역 반응을 증가시키지 못한다고 알려져 있어(32), 백혈구 수 증가 및 전체적인 면역반응을 증진시킬 수 있는 면역조절제의 개발이 매우 중요하다고 할 수 있다. 감잎유래 다당체의 경우 CY 투여에 의해 면역이 저하된 동물에서 임파구 증식, NK세포활성 및 백혈구 수 증가를 동시에 나타내어 CY 투여에 의해 저하된 면역활성을 회복시킬 수 있는 가능성을 가지고 있다고 사료되었다.

요약

감잎으로부터 새로운 생리활성 다당 소재를 개발하기 위하여 감잎의 열수추출물로부터 다당획분 PLW-0, pectinase 처리 추출물로부터 다당획분 PLE-0를 분리하여 정상 및 면역 억제 동물모델에서 면역자극활성을 측정하였다. 감잎 유래 다당체들은 정상 모델에서 마우스의 면역기관인 비장과 흉선의 무게를 증가시켰으며, 비장세포 유래 림프구의 증식에 농도 의존적으로 증식활성을 보였는데, pectinase 처리 다당 획분 PLE-0의 활성이 열수추출

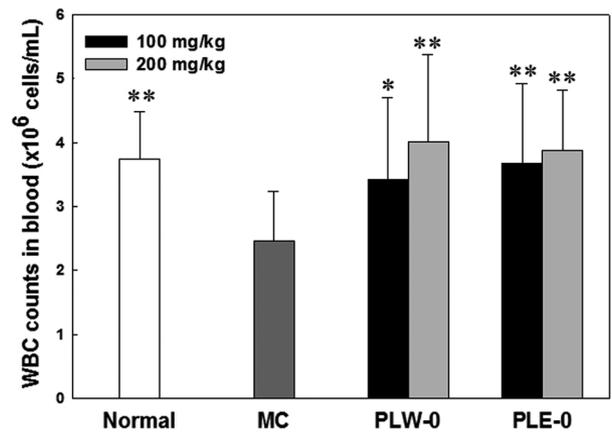


Fig. 4. Effects of PLW-0 and PLE-0 on white blood cell number in CY-treated immunosuppressed mice. Model control (MC): CY-treated immunosuppressed mice group. The data were expressed as mean±SD (n=10). * p <0.05, ** p <0.01, when compared with MC group.

다당 획분 PLW-0에 비해 전체적으로 높은 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 CY에 의해 면역이 억제된 동물모델에서도 CY처리에 의해 저하된 임파구 증식, NK 세포 활성 및 백혈구 수를 현저하게 증가시켰다. 이러한 면역억제 극복 활성 역시 유의적인 차이는 보이지 않았으나 PLE-0가 PLW-0에 비해 높음을 확인할 수 있었다. CY는 악성 종양의 치료 및 장기이식 후 나타나는 거부반응의 억제제로 사용되고 있는 대표적인 약물로 알려져 있다. 그러나 CY의 비선택적인 독성으로 인해 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 독성을 나타내어 백혈구 수 감소, 혈소판 감소, 빈혈 등과 같은 부작용을 나타내고 있다. 따라서 최근에는 이와 같은 부작용이나 면역독성을 최소화 할 수 있는 물질을 발굴하고자 하는 연구가 이루어지고 있는데, 본 실험의 결과로부터 감잎 유래 다당체는 정상모델에서의 면역자극 및 CY에 의해 초래된 면역억제를 감소시킴으로써 면역조절제로서의 개발 가능성을 제시해 줄 수 있다고 생각된다. 또한 pectinase 처리 다당 PLE-0가 열수추출 다당 PLW-0에 비해 비교적 높은 활성을 보인 것을 감안해 보았을 때 효소처리가 감잎 유래 다당의 활성 증가에 도움을 준다는 것을 확인하였다.

References

- Lee YR, Chung HS, Seong JH, Moon KD. Quality characteristics of *tofu* with added astringent persimmon powder. Korean J. Food Sci. Technol. 43: 329-333 (2011)
- IM CY, Jeong ST, Choi HA, Choi JH, Yeo SH, Kang WW. Characteristics of *gammakgeolli* added with processed forms of persimmon. Korean J. Food Preserv. 19: 159-166 (2012)
- Han J, Kang S, Choue R, Kim H, Leem K, Chung S, Kim C, Chung J. Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. Fitoterapia 73: 710-712 (2002)
- Mok JY, Jeon IH, Cho JK, Park JM, Kim HS, Kang HJ, Kim HS, Jang SI. Effect of persimmon leaf extract on phthalic anhydride-induced allergic response in mice. Prev. Nutr. Food Sci. 17: 14-21 (2012)
- Jung WY, Jeong JM. Change of antioxidative activity at different harvest time and improvement of atopic dermatitis effects for persimmon leaf extract. Kor. J. Herbology 27: 41-49 (2012)
- Kawakami K, Aketa S, Sakai H, Watanabe Y. Antihypertensive and vasorelaxant effects of water-soluble proanthocyanidins from persimmon leaf tea in spontaneously hypertensive rats. Biosci.

- Biotech. Bioch. 75: 1435-1439 (2011)
7. Jung UJ, Lee JS, Bok SH, Choi MS. 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 (2011)
 8. Moon SH, Kim KH, Park KY. Antitumor effect of persimmon leaves *in vivo* using Sarcoma-180 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 865-870 (1996)
 9. Moon SH. 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 (2002)
 10. Kim HJ, Kim MK. Anticancer effect of persimmon leaf extracts on Korean gastric cancer cell. *Korean J. Nutr.* 36: 133-146 (2003)
 11. Hong HD, Cho CW, Rhee YK, Choi HD, Lee HS. Status of technology development using immune-modulating polysaccharide. *Food Sci. Ind.* 45: 1-11 (2012)
 12. Jiang MH, Zhu L, Jiang JG. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert Opin. Ther. Tar.* 14: 1367-1402 (2010)
 13. Zhao C, Li M, Luo Y, Wu W. Isolation and structural characterization of an immunostimulating polysaccharide from fuzi, *Aconitum carmichaeli*. *Carbohydr. Res.* 341: 485-491 (2006)
 14. Chen Y, Tang J, Wang X, Sun F, Liang S. An immunostimulatory polysaccharide (SCP-IIa) from the fruit of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *Int. J. Biol. Macromol.* 50: 844-848 (2012)
 15. Guo L, Liu J, Hu Y, Wang D, Li Z, Zhang J, Qin T, Liu X, Liu C, Zhao X, Fan YP, Han G, Nguyen TL. Astragalus polysaccharide and sulfated epimedium polysaccharide synergistically resist the immunosuppression. *Carbohydr. Polym.* 90: 1055-1060 (2012)
 16. Park HR, Lee MS, Jo SY, Won HJ, Lee HS, Lee H, Shin KS. Immuno-stimulating activities of polysaccharides isolated from commercial soy sauce and traditional Korean soy sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 228-234 (2012)
 17. Shin YA, Park HR, Hong HD, Shin KS. Immuno-stimulating activities of polysaccharide fractions isolated from persimmon leaves. *Korean J. Food Nutr.* 25: 941-950 (2012)
 18. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356 (1956)
 19. Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 4: 330-334 (1962)
 20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
 21. Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 85: 595-601 (1978)
 22. Thomas MJ, Albersheim P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 49: 926-936 (1972)
 23. Jeong EJ, Kim HE, Shin DH, Kim YS. Effect of pectinase treatment on the extraction yield improvement from *Rubus coreanus* juice and physicochemical characteristics during alcohol fermentation. *Korean J. Food Preserv.* 14: 702-708 (2007)
 24. Jeong EJ, Kim MH, Kim YS. Effect of pectinase treatment on the extraction yield of the juice of *Fragaria ananassa* Duch. and the quality characteristics of strawberry wine during ethanolic fermentation. *Korean J. Food Preserv.* 17: 72-78 (2010)
 25. Cerqueira F, Cordeiro-Da-Silva A, Gaspar-Marques C, Simões F, Pinto MM, Nascimento MS. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on T- and B-lymphocyte proliferation. *Bioorgan. Med. Chem.* 12: 217-223 (2004)
 26. Lee YS, Lee GH, Kwon YK, Park JH, Shin SW. Immunomodulatory effect of aqueous extracted *Zingiberis* rhizoma on cyclophosphamide-induced immune suppression. *Korean J. Ori. Med. Physiol. Pathol.* 21: 485-490 (2007)
 27. Artym J, Zimecki M, Kruzel ML. Normalization of peripheral blood cell composition by lactoferrin in cyclophosphamide-treated mice. *Med. Sci. Monitor* 10: BR84-BR89 (2004)
 28. Moynihan J, Cohen N. The kinetics of recovery of leukocyte number and lymphocyte function following an injection of a single high dose of cyclophosphamide in C3H/HeJ mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 11: 517-27 (1989)
 29. Vivier E, Nunes JA, Vely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306: 1517-1519 (2004)
 30. Kantakamalakul W, Jaroenpool J, Pattanapanyasat K. A novel enhanced green fluorescent protein (EGFP)-K562 flow cytometric method for measuring natural killer (NK) cell cytotoxicity activity. *J. Immunol. Methods* 272: 189-197 (2003)
 31. Shalit I, Kletter Y, Halperin D, Waldman D, Vasserman E, Nagler A, Fabian I. Immunomodulatory effects of moxifloxacin in comparison to ciprofloxacin and G-CSF in a murine model of cyclophosphamide-induced leukopenia. *Eur. J. Haematol.* 66: 287-296 (2001)
 32. Zhou H, Sun F, Li H, Zhang S, Liu Z, Pei J, Liang C. Effect of recombinant *Ganoderma lucidum* immunoregulatory protein on cyclophosphamide-induced leukopenia in mice. *Immunopharm. Immunot.* 35: 426-433 (2013)