

## 참취에서 분리한 다당의 면역자극 활성

성수경 · 이영경 · 조장원 · 김은영 · 강동주\* · †홍희도

한국식품연구원, \*연변대학교 약학대학

### Immunostimulating Activities of Polysaccharide Fractions isolated from *Aster scaber* Thunb.

Su-Kyung Sung, Young Kyung Rhee, Chang-Won Cho, Eun Young Kim,

Dong-Zhou Kang and †Hee-Do Hong

Korea Food Research Institute, Seongnam 13539, Korea

\*College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133-002, China

#### Abstract

ASW0 is a polysaccharide derived from the perennial herb *Aster scaber* Thunberg. We isolated ASW0, a fraction of crude polysaccharide, by means of ethanol precipitation and dialysis after hot water extraction to investigate its physicochemical properties and immunostimulatory effects. ASW0 contains neutral sugar (45.7%), acidic sugar (51.6%), protein (2.3%), and 2-keto-3-deoxy-D-manno-octonate (KDO) (0.4%). The neutral sugar in ASW0 (in mole percentage) was mainly composed of arabinose (34.5 mol%), glucose (31.1 mol%), galactose (14.9 mol%), and rhamnose (8.1 mol%), which are characteristic of pectic polysaccharides. ASW0 also contained small amounts of xylose, mannose, and fucose. The anti-complementary activity of ASW-0 was similar to that of polysaccharide K (used as positive control). ASW0 exhibited no cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages and dramatically increased nitric oxide (NO) production in a dose dependent manner (0.3~30 µg/mL). Also, macrophages stimulated with ASW0 showed enhanced production of immunostimulatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) in a dose dependent manner. These results suggest that the ASW0 have a potent immunostimulatory effect and can be used as a natural immune health ingredient.

Key words: *Aster scaber* Thunb., polysaccharide, immunostimulatory activity, anticomplement activity, macrophage

#### 서 론

최근 생활수준의 향상 및 식생활의 개선으로 건강에 대한 관심이 증대되는 시점에서 유용 생리활성을 가지면서 부작용이 없는 천연물 유래의 활성물질 탐색에 관한 연구가 진행되고 있다(Sung 등 2013). 천연소재 유래 다당체의 경우, 주로 셀룰로오스 등 세포구조 물질 또는 녹말(전분), 글리코겐 등 에너지 소스로서의 연구가 대부분이었으나, 최근 들어 다양한 식물체, 동물, 미생물 등으로부터 분리된 다당체와 다당체 복합물의 항종양 활성 및 면역증진 활성 등 다양한 생물학적 분야에서 연구가 수행되고 있다(Jiang 등 2010). 천연소재 중

에서도 특히, 웰빙 산채(산나물)에 관한 연구가 집중되고 있으며, 이들의 생리적인 기능이 밝혀짐에 따라 식문화적, 약리학적 가치를 새롭게 인정받고 있다(Choi & Yang 2008). 우리나라에 서식하고 있는 자생식물 4,500여 종 중 480여 종이 식용이 가능한 식물로 분류되고 있는데, 대부분 독특한 맛과 풍미를 가지고 있어 식용으로 활용되며, 기능적 특성 또한 우수한 것으로 알려져 있다(Kim JW 2014).

참취(*Aster scaber* Thunb.)는 우리나라 전국 각지의 산야지에 흔히 자생하는 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본으로 백운초, 백산국, 동풍, 나물채, 암취 및 나물취라고도 한다. 또한 동풍채(東風菜)라 하여 한방에서는 이뇨, 방광염, 두

† Corresponding author: Hee-Do Hong, Korea Food Research Institute, Seongnam 13539, Korea. Tel: +82-31-780-9285, Fax: +82-31-709-9876, E-mail: honghd@kfri.re.kr

통, 해독, 진통 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Kim TJ 1996). 참취에는 무기질 및 비타민 C,  $\beta$ -카로틴 등이 다량 함유되어 있어, 항암활성, 항산화력 등이 높은 것으로 보고되고 있으며, 약용성분으로는 다량의 플라보노이드 화합물과 사포닌을 함유하고 있고, 꽃 이삭과 줄기에는 정유 성분이, 뿌리에는 쿠마린, 사포제닌, 시오논, 알칼로이드, 스쿠알렌, 프리텔린,  $\alpha$ -스피나스테롤 등의 기능성 성분을 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다(RDA 1997; Choi 등 2001). 이외에도 참취의 기능성에 관한 연구로는 지질대사 개선 및 콜레스테롤 억제효과(Lim & Lee 1997), 항산화능 및 증금속 제독효과(Park & Kim 1999; Lee 등 2001) 등이 보고되었다.

전통적으로 식물재료를 이용한 약물은 주로 열수로 추출하여 이용되어 왔는데, 이러한 추출물 중에는 알칼로이드, 플라보노이드, 테르페노이드 및 사포닌과 같은 저분자 물질과 다당류, 단백질과 같은 고분자 물질이 다양하게 혼재되어 있으나, 대부분의 연구는 저분자 물질이 갖는 생물 활성에만 이루어져왔다(Shin KS 2012). 최근 식품 재료 및 생약의 열수추출물 중 고분자획분에서 다양한 약리활성이 관찰되고 있으며 특히, 식물유래 다당체에서 높은 면역증진 활성이 보고되고 있다(Franz 1989; Srivastava & Kulshreshtha 1989; Wagner 1990). 대부분의 참취 관련 연구들이 폴리페놀, 플라보노이드 등의 저분자 화합물을 대상으로 이루어져 참취에 존재하는 고분자 다당류에 관한 연구 및 그 외 기능성에 관한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 참취를 대상으로 열수추출을 행하고, 이로부터 다당류를 분리하여 화학 특성에 대해 검토하였으며, 각종 면역자극 활성 특히, 자연면역계를 구성하고 있는 보체계 및 활성화된 마우스 복강 대식세포에서 분비되는 대표적인 사이토카인(IL-6, TNF- $\alpha$ )에 대한 영향을 평가함으로써, 면역증진 기능성 소재화로서의 활용가능성을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 실험에 사용된 시료는 2012년 전남 고흥군에서 생산된, 건조 참취(*Aster scaber* Thunb.)를 구입하여 실험에 사용하였다. 이화학적 성분 분석에 사용된 표준품 시약으로 D-(+)-glucose, galacturonic acid, albumin from bovine serum(BSA) 및 2-keto-3-deoxyoctonate ammonium salt(KDO)을 Sigma(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

면역증진 효능평가를 위해 사용된 phosphate buffered saline (PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin은 Gibco TM(Grand Island,

NY, USA)으로부터 구입하였고, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), griess reagent, sodium nitrite, tween 20은 Sigma(Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, ELISA kit와 substrate solution은 BD Biosciences(San Diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 조다당체 분리

조다당을 분리하기 위한 단순 열수추출 방법은 시료 분말 100 g에 10배 부피의 증류수를 가하여 100°C에서 추출한 후 원심분리기(Mega 17R, Hanil Science Industrial Co. Ltd., Incheon, Korea)로 6,500×g 에서 20분간 원심분리 하였다. 분리한 상등액은 최종농도가 80%가 되도록 냉 에탄올을 첨가하여 -4°C에서 하룻밤 정지한 후 원심분리기를 이용하여 침전물을 회수하였다. 회수된 침전물을 소량의 증류수에 재용해한 다음, dialysis tubing(M.W. cut off 6,000~8,000, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 3일간 투석을 진행하여 저분자물질을 선택적으로 제거하였다. 이후 동결건조(Tokoyo Rikakikai Co. Ltd., FD-1000, Tokyo, Japan)를 행하여 조다당 시료(ASW0) 3.3 g을 얻었다.

### 3. 일반분석 및 구성당 분석

시료 중의 중성당 함량은 D-gulose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법으로(Dubois 등 1956), 산성당 함량은 D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl 법으로(Blumenkronz & Asboe-Hansen 1973), TBA-positive material의 함량은 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid(KDO)를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid 법(Karkhanis 등 1978)으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 하여 Bradford 법(Bradford MM 1976)을 변형하여 분석하였다.

구성당 분석은 다당을 가수분해한 후 alditol acetate와 aldono-lactone로 유도체화 하여 GC(Gas Chromatography ACME-6100, Young-Lin Co. Ltd. Anyang, Korea)를 이용해 분석하는 Jones와 Albersheim 방법(Jones & Albersheim 1972)을 일부 변형하여 진행하였다. 조다당 시료를 2 M TFA(trifluoroacetic acid) 중 에서 121°C, 1.5시간 반응시켜 가수분해한 후, 1 mL의 1 M NH<sub>4</sub>OH(ammonia solution)에 용해하여 10 mg의 NaBH<sub>4</sub>로 4시간 환원시켰다. 아세트산을 적당량 가하여 잔존 NaBH<sub>4</sub>를 제거한 후, 메탄올을 가하며, 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 아세트산을 제거하여 각 구성당에 상당하는 alditol로 전환하였다. 중성당의 구성을 알기 위해 각각의 alditol에 1 mL의 acetic anhydride를 가하여 121°C에서 30분 동안 반응시켜 alditol acetate로 전환시켰으며, 이를 chloroform/H<sub>2</sub>O 2상 용매계로

분리하여 추출하고, 추출물은 건조 후 소량의 아세톤에 용해하여 GC 분석용 시료로 사용하였다. GC 컬럼은 SP-2380 capillary column(0.25 mm×30 m, 0.2 µL film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을, detector는 Flame ionization detector(FID, Young-Lin Co. Ltd.)를 사용하였고, carrier gas로서 질소를 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 flame ionization detector(FID)에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

#### 4. 항보체 활성 평가

항보체 활성은 Kabat와 Mayer 방법(Kabat & Mayer 1971)을 이용하여 시료에 의한 보체 활성화 후, 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 활성에 근거를 둔 complement fixation test로 측정하였다. 즉, 정상인의 혈청과 2% 젤라틴, 500 µM Ca<sup>2+</sup>, 2 mM Mg<sup>2+</sup>이 함유된 GVB<sup>2+</sup>(gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 완충용액 및 시료를 각각 50 µL씩 혼합하여 37°C에서 30분 동안 1차 반응시킨 후, 이 반응액에 GVB<sup>2+</sup>를 350 µL씩 첨가하고, 이를 10~160배까지 연속 희석하였다. 여기에 GVB<sup>2+</sup> 750 µL와 양의 감각적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocytes, EA Cell, Biotest Co., Tokyo, Japan)를 250 µL씩 가하여 37°C에서 1시간 반응시키고, 사전 냉각된 인산완충액(phosphate buffered saline, pH 7.4, Sigma-Aldrich)을 넣은 후 4°C, 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 412 nm 흡광도에서 측정하여 잔존 용혈활성을 측정하였다. 다당체의 항보체 활성(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH<sub>50</sub>%)은 아래의 식에 의거하여 정상인의 혈청(NHS)과 GVB<sup>2+</sup>, 시료 대신 증류수만을 반응시킨 대조군의 총 보체용혈(50% of total complement hemolysis, TCH<sub>50</sub>%)에 대한 저지율로 표시하였다.

$$ITCH_{50}(\%) = \frac{TCH_{50} \text{ of control } TCH_{50} \text{ of sample}}{TCH_{50} \text{ of control}} \times 100$$

#### 5. 실험동물

생후 5~6주령의 웅성 BALB/c 마우스를 3일간 적응을 거친 후 실험에 사용하였다. 마우스는 사육조에 2마리씩 넣어 일정한 온도 23.3±3°C, 습도 55~70%에서 사육하였으며, 물과 사료는 자유 급식 형태로 유지하였다.

#### 6. 세포에 대한 독성 측정

본 실험에 사용한 마우스 복강 대식세포는 BALB/c 마우스의 복강에 5% thioglycollate 배지(Sigma, St Louis, MO, USA)를 1 mL 주입하고, 72~96시간 내에 유도된 대식세포를 PBS

를 이용하여 회수하였다. 그 후 RPMI 1640 medium(Gibco™, Grand Island, NY, USA)으로 2~3회 세척하고, 세포 수를 2.5×10<sup>6</sup> cells/mL로 조정하여 96 well plate(NUNC Co., Roskilde, Denmark)에 100 µL씩 분주하여 배양하였다. 배지는 RPMI 1640에 10%(v/v) FBS(Fetal bovine serum)와 1%(v/v) penicillin-streptomycin(Gibco™)을 혼합해 사용하였다. 다양한 농도로 희석된 시료를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

대식세포에 대한 취나물 유래의 독성 여부는 MTT assay(Hansen 등 1989)로 측정하였다. 세포수를 2×10<sup>5</sup> cell/well의 농도로 조정하여 96 well plate에 분주 후 2시간 동안 배양한다. 이후 배지를 제거하고 시료와 대조군을 처리하여 24시간 배양한다. 96 well plate의 상등액을 조심스럽게 제거한 후, MTT 0.5 mg/mL 용액을 200 µL씩 첨가하여 4시간 동안 배양하여 formazan을 형성시켰다. 그 후, 상등액을 제거하고 DMSO(Junsei Chem. Co., Ltd., ToKyo, Japan) 200 µL를 각 well에 첨가하여 formazan을 녹인 후 ELISA reader(Infinite M200 Pro, TECAN, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 7. 일산화질소(NO) 생성량

참취의 면역 증강능력을 확인하기 위하여 대식세포의 배양 상등액 중의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 생성 농도를 정량함으로써 측정하였다. 즉, 100 µL의 세포배양 상등액을 취하여 동량의 griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylene diamine dihydrochloride, 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 얻어진 흡광도로부터 표준곡선을 작성하여 측정하였다.

#### 8. 사이토카인(IL-6, TNF-α) 생성량

배지로 희석시킨 참취 유래 다당 시료를 농도별(0.3~30 µg/mL)로 대식세포에 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 후, 대식세포에 의해 유도, 분비된 상등액 중 IL-6, tumor necrosis factor(TNF)-α의 양을 ELISA kit을 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다. 즉, Anti-cytokine capture antibody를 coating buffer(0.2 M sodium phosphate, pH 6.5)에 희석하여 96 well plate에 100 µL/well씩 넣은 후, 4°C에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. Tween 20을 PBS에 0.05%(v/v)가 되도록 가한 PBS/Tween 용액으로 plate를 3회 세척하였다. Assay diluent(PBS with 10% FBS)를 plate에 200 µL/well씩 넣은 후 상온에서 1시간 방치하였다. PBS/Tween로 3회 세척 후, 배양 상등액을 각 well에 100 µL씩 넣어준 뒤 2시간 상온에서 방치하였다. PBS/Tween로 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 1시간 방치하였다. PBS/Tween로 7회 세척 후, substrate solution(TMB substrate reagent Set, BD Biosciences)을 100 µL/well씩 넣은 후 암소에서 30분 동안 방치하였다. Stop solution인 2 N 황산용액을 well 당 50 µL씩 넣어 발색반응을 정지시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. 통계처리

본 실험 결과 얻어진 자료에 대한 분석결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 실험군 간의 통계학적 분석은 analysis of variance(ANOVA) 분석을 실시하였고, Duncan's multiple range test로  $p < 0.05$  수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 참취 유래다당체의 화학적 특성

참취로부터 열수 추출물에 의해 분리된 조다당체 ASW0의 일반 화학 특성을 살펴본 결과는 Table 1과 같았다. 수율은 3.3%였으며, 중성당 45.7%, 산성당 51.6%, 단백질 2.3%로 구성되어 있었으며, 일반적으로 자연계에 거의 발견되지 않는 특이당인 TBA-positive material(KDO)가 0.4%로 미량 검출되었다. 한편, ASW0를 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하여 구성당을 분석한 결과, 모두 7종의 구성당이 분석되었으며, 그 중 arabinose와 glucose가 각각 34.5 mol%와 31.5 mol%

Table 1. Chemical composition of ASW0 crude polysaccharides isolated from *Aster scaber* Thunb.

Chemical property		ASW0
Chemical composition (%)	Neutral sugar	45.7±1.7
	Uronic acid	51.6±0.7
	KDO <sup>1)</sup> -liked material	0.4±0.1
	Protein	2.3±0.1
Component of neutral sugar <sup>2)</sup> (Mole%) <sup>3)</sup>	Rhamnose	8.1±0.9
	Fucose	0.8±0.0
	Arabinose	34.5±1.4
	Xylose	1.4±1.5
	Mannose	1.3±0.1
	Galactose	14.9±0.3
	Glucose	31.5±1.5

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

로 가장 높았고, 그 외 galactose 14.9 mol%, rhamnose 8.1 mol%, xylose 1.4 mol%, mannose 1.3 mol%, fucose 0.8 mol%를 함유하고 있었다. Shin 등(2012)의 연구에서 감잎으로부터 조다당(PLW-0)을 추출하여 성분을 분석한 결과, arabinose 20.0 mol%, galactose 17.9 mol%, glucose 9.2 mol%를 주로 함유하고 있었으며, rhamnose 4.2 mol%, xylose 3.4 mol%, mannose 0.7 mol%, fucose 0.7 mol% 비율로 참취의 결과와 유사한 것으로 보았을 때, 참취 유래 다당이 펙틴 유래 물질임을 추정할 수 있었다.

2. 참취 유래 다당체의 보체계 활성화능 측정

보체계(complement system)는 혈청에서 발견되는 일련의 단백질군으로써 외부로부터 감염된 병원체에 대하여 항체의 존재 혹은 비 존재하에 비 특이적으로 이들을 제거시킬 수 있는 주요 방어기구이며, 면역시스템 증진에도 관련되어 있다고 알려져 있다(Muller-Eberhard & Kunkel 1961; Song & Sarrias 2000; Holers 2003). 보체계를 활성화하는 천연물은 주로 저분자획분보다 고분자획분(주로 다당체나 단백질다당체)에 존재하며, 과거 에너지원으로써의 기능만 부각되어온 탄수화물, 그 중에서도 천연물 유래의 항보체 활성화 다당체는 생체 내 대식세포 등의 면역세포들을 자극하여 임파구의 증식 및 활성화에 필요한 사이토카인의 분비를 유도하여 암 치료에 도움이 될 수 있거나, 생체의 면역 부전 상태를 개선 치료하는 면역 요법제로 개발되어 질병의 예방과 치료에 효과적으로 이용될 수 있는 가능성이 보고되고 있다(Vincent 등 2000; Schepetkin & Quinn 2006; Zhang 등 2007).

참취 유래 다당체의 보체계 활성화능을 측정한 결과, Fig.

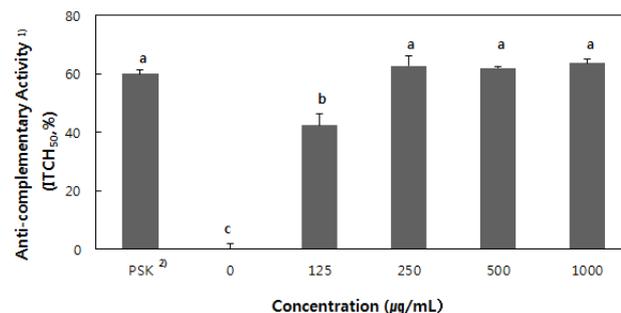


Fig. 1. Anti-complementary activity of ASW0 from *Aster scaber* Thunb. <sup>1)</sup> The ant-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complementary hemolysis by Mayer's method. <sup>2)</sup> PSK, a known immunosuppressive polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control and its concentration is 500 µg/mL. The data were expressed as mean±S.D. of five separate experiments. Different corresponding letters (a~c) indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

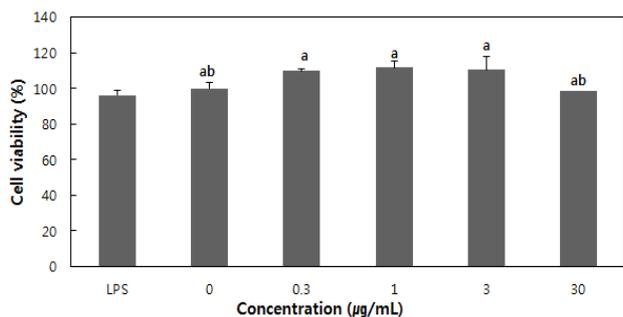
1과 같았다. 양성대조군으로는 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래 면역활성 다당체인 PSK(Polysaccharide-K)를 사용하였다(Tsukagoshi 등 1984). ASW0의 활성화능을 확인한 결과, 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 농도에서 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며, 특히, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 PSK와 유사하거나, 다소 높은 항보체 활성능을 보였다.

### 3. 참취 유래 다당체의 대식세포에 대한 세포독성

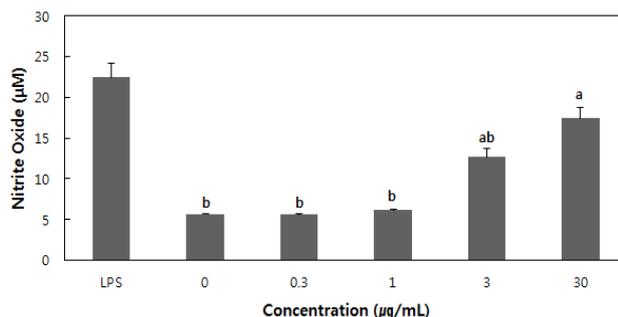
면역계 세포인 대식세포에 대한 ASW0의 독성 여부를 확인하였다(Fig. 2). ASW0를 0.3~30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 대식세포에 처리했을 때, 모든 농도에서 세포사멸이 일어나지 않아 세포 독성에 큰 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다. 일반적으로 식품유래 다당체의 경우 면역계 세포에 대해 독성을 나타내지 않는 것으로 알려져 있으며, 막걸리 및 감잎으로부터 분리한 다당체 연구에서도 대식세포에 대해 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았을 뿐 아니라, 비장세포의 경우 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 유의적인 세포 증식효과를 보인바 있다(Nam 등 2012; Shin 등 2012).

### 4. 참취 유래 다당체의 대식세포에 대한 NO 생성능

생체 면역 체계의 사이토카인이나 LPS(lipopolysaccharide) 등에 노출되면 대식세포의 NOS 유전자가 발현되고, NOS 유전자 발현으로 생성되는 NO는 생체내에서 신호전달, 혈압조절, 혈소판응집 등 다양한 작용을 하는 것으로 알려져 있으며(Sharma 등 2007), nitric oxide synthetase의 작용에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 생성되어 비특이적 숙주방어기작 대식작용, 세균 및 암세포의 증식억제 활성이 증명된 바 있다(Kim & Kang 2008). 본 연구에서는 ASW0



**Fig. 2. Cell cytotoxicity of ASW0 from *Aster scaber* Thunb. on mouse peritoneal macrophages.** Mouse peritoneal macrophage were indicated with various concentrations of ASW0 for 24 h. 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.



**Fig. 3. Effect of ASW0 from *Aster scaber* Thunb. on NO synthesis in mouse peritoneal macrophages.** Mouse peritoneal macrophage were treated with various concentrations of ASW0 for 24 h. 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.

를 0.3~30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대식세포에 처리하였을 때 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도부터 유의적인 활성을 보였다(Fig. 3). 이는 Kim 등(2002)의 보고에서 홍삼 다당체를 추출하여 대식세포에 처리한 결과 농도가 증가함에 따라 NO 생성이 증가하였다는 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

### 5. 참취 유래 다당체의 대식세포 자극에 의한 사이토카인 (IL-6, TNF- $\alpha$ ) 분비량 측정

대식세포는 체내 거의 모든 조직에 분포하며, 이물질이나 노폐물을 탐식, 제거하는 역할을 하는데, 이 과정에서 여러 가지 사이토카인을 분비하여 면역 반응을 조절한다고 알려져 있다. 사이토카인은 면역세포에서 생성되는 단백질 중재자로 외부 항원에 대한 여러 면역 세포간의 협력을 증대하므로, 이들의 생성과 분비는 면역반응 조절에 있어 매우 중요하다고 알려져 있다. 대식세포가 분비하는 대표적인 면역 유도 사이토카인에는 IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  등이 있다(Wang 등 2003). IL-6는 면역반응, 조혈작용과 염증을 조절하는데 관여하는 사이토카인으로서 면역글로불린의 합성을 증진하고, 다른 사이토카인과 협동하여 상승작용을 나타내는 등 다양한 작용을 하며, B 임파구의 항체 생성 세포인 plasma cell 분화를 유도하는 활성을 갖고 있다는 것으로 알려져 있다(Mano-Hirano 등 1987; Cha 등 2010). 본 실험에서는 ASW0의 자극에 의한 대식세포의 IL-6 발현량을 ELISA 방법으로 측정된 결과, Fig. 4(A)와 같았다. ASW0의 농도를 0.3~30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리하였을 때, 시료를 넣지 않은 대조군(Con, 0)보다 2~19배 정도 IL-6 발현량이 높게 나타내었으며 특히, 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 농도를 처리하였을 때 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 이는 Cho 등(2014)의 연구에서 막걸리 조다당체(RWW)를 1~100  $\mu\text{g}/$

mL 농도별로 대식세포에 처리하였을 때, 대조군보다 2~8배 이상의 높은 IL-6가 생성되었다고 보고하였으며, Shin 등(2012)의 연구에서 감잎 유래 활성 다당체(PLW-0)를 대식세포에 62.5~1,000 µg/mL 농도별로 처리하였을 때, 250 µg/mL 이상의 농도에서 유의적으로 증가한 연구결과와 유사한 경향을 나타내었으나, PLW-0보다 ASW0가 훨씬 낮은 농도에서 유의적인 IL-6 분비량을 보여주었다.

활성화된 대식세포에 의해 분비되는 TNF- $\alpha$ 는 질병에 있어 면역을 증강시키고 염증반응을 매개하며, 이물질들을 감염부위로 유인하여 방어 작용을 하는 사이토카인이지만, 과도하게 생성될 때 염증 및 면역반응에 관여하여 상태를 더욱 악화시키는 원인이 되기도 한다(Medzhitov & Janeway 1997; An 등 2010). 하지만 적정량의 TNF- $\alpha$ 의 생성은 오히려 선천성 면역의 중요한 인자로 여겨지기 때문에, 본 연구에서는 LPS를 처리한 군과 비교하여 LPS를 처리하지 않은 정상세포에 ASW0

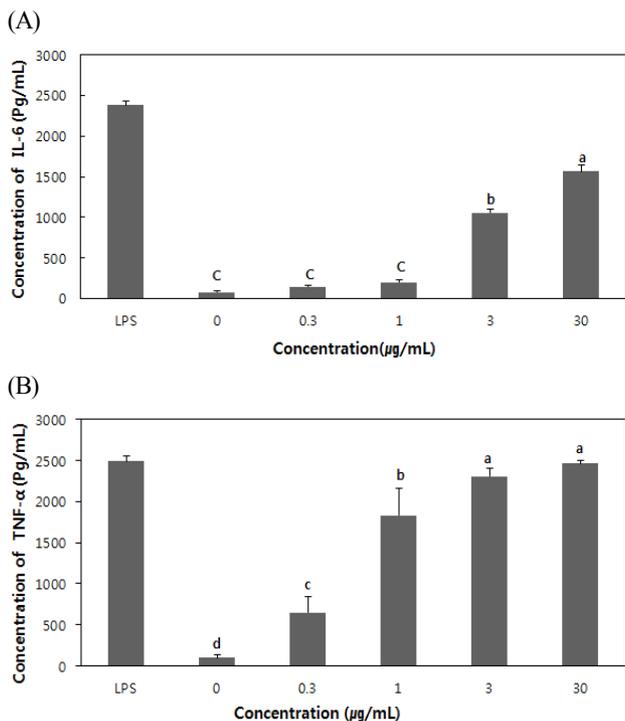
를 0.3~30 µg/mL로 처리하였을 때, 선천성 면역을 활성화시킬 정도의 TNF- $\alpha$ 가 생성되는지 관찰한 결과, TNF- $\alpha$ 의 분비농도 의존적으로 증가시키는 것으로 확인되었다(Fig. 4B). 특히, ASW0가 0.3 µg/mL 이상의 낮은 농도에서 대조군보다 유의적으로 높은 사이토카인 분비능을 나타내었다. 이는 Kim & Cho(2007)의 연구에서 신령버섯의 다당체를 대식세포에 4~500 µg/mL로 처리하였을 때, 사이토카인이 농도 유의적으로 증가한 연구 결과와 비슷한 경향을 보였다.

이와 같이 대식세포로부터 분비되는 IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성 사이토카인들은 병원체 및 종양세포들에 대한 제거활성을 증진시킨다는 이전 연구결과들을 고려해 보았을 때(Yoon 등 2008), 참취 유래 다당체가 대식세포의 염증성 사이토카인들의 생성을 증가시켜 인체의 면역력을 증진시킬 수 있으며, 면역반응에도 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료되었다.

## 요약 및 결론

최근 부작용이 없는 천연물 유래의 활성물질 탐색에 관한 연구가 진행되고 있으며, 천연물 소재 중에서도 특히, 산나물에 관한 연구가 집중되고 있다. 참취는 우리나라에서 흔히 자생하는 다년생 초본으로 많은 연구들에서 다양한 생리활성 효과에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있지만, 다당류에 관한 연구는 미비한 실정하기에 본 연구에서는 참취에서 다당류를 분리하고, 화학적 특성 및 각종 면역자극 활성을 평가함으로써 기능성 소재로서의 활용가능성에 대하여 알아보고자 하였다.

연구 결과, ASW0는 중성당 45.7%, 산성당 51.6%, 단백질 2.3%, KDO 0.4%를 함유하고 있었으며, 주요 구성당류는 glucose, arabinose, galactose, rhamnose 순으로 높은 비율을 함유하고 있었고, fructose, xylose, mannose를 미량 함유하고 있었다. 한편, 인체 초기 면역반응에 있어서 중요한 역할을 담당하는 보체계에 대하여 ASW0를 250 µg/mL 이상의 농도로 처리하였을 때 우수한 항보체 활성을 나타냈으며, 이는 시판 면역활성 다당인 구름버섯 유래의 PSK에 상당하는 활성이었다. ASW0를 마우스 복강 대식세포에 처리하여 면역자극을 유도한 후, NO 생성 및 사이토카인 분비활성을 평가한 결과 NO 및 IL-6 생성은 0.3~1 µg/mL 낮은 농도에서는 유의적인 활성을 보이지 않았으나, 3~30 µg/mL 농도에서는 유의적인 차이를 보였다. 또한, TNF- $\alpha$ 의 생성에서는 0.3 µg/mL 이상의 낮은 농도에서 농도 유의적인 활성을 보였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, ASW0는 자연면역계를 구성하고 있는 보체계와 대식세포에 의해 활성인자로 작용할 수 있음이 확인되었으며, ASW0에 의해 활성화된 대식세포는 IL-6 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 염증성



**Fig. 4. Effect of ASW0 from *Aster scaber* Thunb. on cytokine induction by mouse peritoneal macrophages.** (A): IL-6, (B): TNF- $\alpha$ . Mouse peritoneal macrophage were treated with various concentrations of ASW0 for 24 h. The level of each cytokine in the supernatants of the culture was determined by ELISA kits. LPS (1 µg/mL) was used as the positive control. The data were expressed as mean±S.D. of five separate experiments. Different corresponding letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

사이토카인의 분비를 유도, 조절함으로써 체내 면역기능을 증강시킬 수 있는 가능성이 있는 것으로 판단되었으며, 또한 면역증진 기능성 식품 개발의 소재로 활용될 가능성이 있을 것으로 기대되었다.

## References

- An CS, Jin HL, Jeon YH, Bak JP, Kim JD, Yoon JH, Lim BO. 2010. Immunoregulatory effects of water extracts of *Inonotus obliquus* in carbon tetrachloride-induced liver damage animal model. *Korean J Medicine Crop Sci* 18:1-8
- Blumenkronz N, Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* 54: 484-489
- 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
- Cha JH, Kim YS, Lee EM. 2010. Effects of *Prunellae spica* water extract on immune response in macrophage cells. *J Korean Obstet Gynecol* 23:91-100
- Cho CW, Rhee YK, Lee YC, Kim YC, Shin KS, Nam SH, Hong HD. 2014. Immunomodulatory activity of crude polysaccharide from *Makgeolli*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43:238-242
- Choi MS, Yang JK. 2008. Industrial potentiality of wild edible greens. *J Food Res Technol* 21:1-7
- Choi NS, Oh SS, Lee JM. 2001. Changes of biologically functional compounds and quality properties of *Aster scaber* (Chamchiwi) by blanching conditions. *Korean J Food Sci Technol* 33: 745-752
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Robers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Franz G. 1989. Polysaccharides in pharmacy: Current applications and future concepts. *Planta Med* 55:493-497
- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Immunotechnology* 119:203-210
- Holers VM. 2003. The complement system as a therapeutic target in autoimmunity. *Clin Immunol* 107:140-151
- Jiang MH, Zhu L, Jiang JG. 2010. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert Opin Ther Targets* 14:1367-1402
- Jonesand TM, 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
- Kabat EA, Mayer MM. 1971. Experimental Immunochemistry. Thormas Publisher. Illinois USA. pp. 133-240
- 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
- Kim HS, Kang JS. 2008. Preparation and characteristics of bread by medicinal herb composites with immunostimulating activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:109-116
- Kim JW. 2014. Physicochemical and physiological properties of *Aster scaber* Thunb., and utilization as food materials. Ph.D. Thesis, Catholic University of Daegu. Daegu. Korea
- Kim MS, Cho HB. 2007. Immune enhancing effects of intracellular and extracellular polysaccharides extracted from mycelial cultivate of *Agaricus blazei* Murill. *The Korean Journal of Microbiology* 43:292-297
- Kim TJ. 1996. Korea Resources Plants. IV. Seoul National University. Seoul, Korea. p 230
- 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
- Lee JM, Park YJ, Lee SM. 2001. Sensory and physicochemical attributes of glutinous rice *dduk* added *cham-chwi*. *Korean J Dietary Culture* 16:180-186
- Lim SS, Lee JH. 1997. Effect of *Aster scaber* and *Ixeris dentata* on contractility and vasodilation of cardiovascular and endothelial cell in hyperlipidemic rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26:300-307
- Mano-Hirano Y, Sato N, Sawaaski Y, Haranaka K, Satomi N, Nariuchi H, Goto T. 1987. Inhibition of tumor-induced migration of bovine capillary endothelial cells by mouse and rabbit tumor necrosis factor. *J Natl Cancer Inst* 78:115-120
- Medzhitov R, Janeway CA. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9:4-9
- Muller-Eberhard HJ, Kunkel H. 1961. Isolation of a thermolabile serum protein which precipitates  $\gamma$ -globulin aggregates and participates in immune hemolysis. *Exp Biol Med(Maywood)* 106:291-295
- Nam SH, Rhee YK, Hong HD, Lee YC. 2012. Immuno-modulatory activity of the crude polysaccharide from wild ginseng adventitious root. *Korean J Food & Nutr* 25:755-761

- Park JA, Kim MK. 1999. Effect of Korean native plant diet on lipid metabolism, antioxidative capacity and cadmium detoxification in rats. *Korean J Nutr* 32:353-368
- RDA. 1997. Illustrated Book for Emergency Plants. National Honam Agricultural Experiment Station p. 221
- Schepetkin IA, Quinn MT 2006. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutical potential. *Int Immunopharmacol* 6:317-333
- Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15:252-259
- Shin KS. 2012. Immunostimulating plant polysaccharides; macrophage immunomodulation and its possible mechanism. *Department of Food Science and Biotechnology* 45:12-22
- Shin YA, Park HR, Hong HD, Shin KS. 2012. Immuno-stimulating activities of polysaccharide fractions isolated from persimmon leaves. *Korean J Food & Nutr* 25:941-950
- Song WC, Sarrias MR. 2000. Complement and innate immunity. *Immunopharm* 49:187-198
- Srivastava R, Kulshreshtha DK. 1989. Bioactive polysaccharides from plant. *Phytochemistry* 25:2877-2883
- Sung SK, Rhee YK, Cho JW, Kim YC, Lee OH, Hong HD. 2013. Physicochemical properties and antioxidative activity of fermented *Rhodiola sachlinensis* and Korean red ginseng mixture by *Lactobacillus acidophilus*. *Korean J Food & Nutr* 26:358-365
- Tsakagoshi S, Hashimoto Y, Fujii G, Kobayashi H, Nomoto K, Orita K. 1984. Krestin (PSK). *Cancer Treat Rev* 11:131-155
- Vincent E, Ooi C, Liu F. 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry* 7:715-729
- Wagner H. 1990. Search for plant derived natural products with immunostimulatory activity: Recent advances. *Pure Appl Chem* 62:1217-1222
- 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
- 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
- Zhang, M, Cui SW, Cheung, PCK, Wang Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol* 18:4-19

---

Received 28 July, 2015  
Revised 21 August, 2015  
Accepted 7 October, 2015