

적양배추에서 분리한 다당의 면역 및 항전이 활성

이수정¹ · 신광순^{1,*}

¹경기대학교 식품생물공학과

Immunomodulatory and anti-metastatic activities of polysaccharide isolated from red cabbage

Sue Jung Lee¹ and Kwang-Soon Shin^{1,*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

Abstract In this study, we examined the immunostimulating characteristics of a hot water extract (RCW) and crude polysaccharides (RCP) of red cabbage. RCW and RCP did not show any cytotoxicity in B16BL6 cells and macrophages. Although the sugar compositions of RCW and RCP were similar, the uronic acid content of RCP was higher than that of RCW. RCP significantly increased the production of various cytokines and NO, whereas RCW did not affect the production of cytokines and NO. In an *ex vivo* assay of natural killer (NK) cell activity, intravenous (*i.v.*) administration of RCP significantly augmented NK cytotoxicity against Yac-1 tumor cells at 3 days after RCP treatment. In an experimental lung metastasis model using B16BL6 melanoma cells, *i.v.* administration of RCP at a dose of 1,000 µg per mouse significantly inhibited 47.3% of lung metastasis. These results suggest that crude polysaccharide isolated from red cabbage is a promising food ingredient for the prevention of tumor metastasis.

Keywords: red cabbage, polysaccharide, macrophage, anti-tumor, NK cells

서 론

악성 신생물(암)은 전 세계적으로 주요 사망원인 중 하나이며, 특히 한국인의 경우, 폐암 및 위암은 사망률이 가장 높은 질병이다. 한국인의 위암 사망률은 10년간 꾸준히 감소하고 있는 추세이지만, 폐암으로 인한 사망률은 증가하고 있는 추세이다(Statistics Korea, 2017). 이와 같은 질환의 치료 방법으로는 외과적인 수술, 방사선 조사 또는 항암제 투여와 같은 방법이 있으나, 이는 어느 정도 치료 효과를 볼 수 있지만, 많은 부작용을 야기하며, 장기적으로는 면역력 저하에 따른 암 재발 및 병원균 감염과 같은 위험이 내포되어 있다(Kim, 2013). 이에 대한 대체 수단으로서 면역계 활성화를 유도하는 면역조절제의 개발에 많은 연구자들의 관심이 집중되고 있다(Diwanay 등, 2004; Li 등, 2018; Park과 Kim 2012). 지금까지 보고된 면역조절제는 대부분 선천면역계의 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있으며(Chen 등, 2006), 선천면역계 세포 중에서도 대식세포(macrophage) 및 자연살해(natural killer, NK)세포의 활성화에 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Hwang과 Shin, 2008).

다양한 면역조절제 중 다당류(polysaccharide)는 대식세포 표면에 발현되어 있는 패턴인식 수용체(pattern recognition receptor)에

결합하여 일련의 연속된 신호전달이 유도되며(Kawai과 Akira, 2010), 신호전달의 활성화 산물은 핵 내에 이행되어 면역 활성화에 관련된 다양한 유전자의 전사를 활성화 시켜(Kawai과 Akira, 2010; Pennini 등, 2013) 최종적으로 cytokine 등이 생산되어 진다(Kim 등, 2019). 이를 통하여 생산된 cytokine 중에서 tumor necrosis factor (TNF)- α 는 major histocompatibility complex (MHC)의 발현을 촉진시켜 항원제시능을 증진시키며(Knutson과 Disis, 2005), interleukin (IL)-12는 암세포를 선택적으로 파괴하는 NK세포를 활성화 시킬 뿐만 아니라 세포독성 T 림프구 활성화(Gately 등, 1992; Kobayashi 등, 1989; Trinchieri, 1994), Th1과 Th2 반응의 균형 조절(Manetti 등, 1993), 대식세포의 NO 생산에 대한 준비(Trinchieri, 1993; Wigginton 등, 1996) 등의 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Smyth 등, 2000).

적양배추는 십자화과(Brassicaceae)에 속하는 식물로써, 미네랄, 비타민, 올리고당과 같은 영양이 풍부하여 전 세계적으로 오랜 기간 식재료로 많이 이용되고 있다(Wiczkowski 등, 2013). 또한 적양배추에는 안토시아닌(anthocyanin), 플라보노이드(flavonoid), 글루코시놀레이트(glucosinolate)와 같은 물질이 함유되어있으며, 이 중 글루코시놀레이트는 섭취시 소화 과정에서 장내 세균에 의해 분비되는 미로시나아제(myrosinase)에 의해 가수분해되어 이소시아네이트(isocyanate), 인돌-3-카비놀(indole-3-carbinol), 알릴시아네이드(allyl cyanide) 및 설폴라판(sulforaphane) 등으로 전환되고, 글루코시놀레이트 가수분해 산물은 항암효과에 기인한다고 알려져 있다(Zhang과 Talalay, 1994). 그러나 적양배추에 대한 연구는 주로 안토시아닌, 글루코시놀레이트와 같은 저분자 물질에 대한 연구가 대부분이며, 적양배추 유래 고분자 다당의 생리활성에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 적양배추 유래 열수추출물 및 조다당의

*Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon, Gyeonggi 16227, Korea
Tel: +82-31-249-9655
Fax: +82-31-249-9650
E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr
Received April 17, 2019; revised May 27, 2019;
accepted May 27, 2019

일반화학적 특성 및 대식세포 활성을 비교하였으며, 높은 면역자극활성을 나타낸 조다당의 항진이 활성을 평가함으로써 적양배추 유래 조다당을 새로운 기능성 소재로서 제안하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

Balb/c (6주령, female)는 새론바이오(Saeronbio, Uiwang, Korea)에서 구입하였으며, 사료와 물을 자유롭게 공급하며 일주일간의 순응기간을 거친 후 무작위로 실험군을 나누어 실험에 사용하였다. 사육장은 온도 23±3°C, 습도 60±10% 및 12시간 간격으로 명암을 조절하였으며, 경기대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 이의 규정을 준수하며 실험을 진행하였다(2017-004).

적양배추 추출물 제조

본 실험에 사용한 적양배추는 2014년 제주도에서 재배된 생물을 구매하여 실험에 사용하였다. 세척한 적양배추에 두배의 증류수를 첨가하고 믹서기를 이용하여 거칠게 분쇄한 후, 8배의 에탄올을 첨가하여 에탄올에 용해된 색소물질을 제거하였다. 색소가 제거된 잔사는 건조 후, 10배의 증류수를 첨가하여 100°C에서 3시간 동안 가열하여 열수추출하였다. 열수추출물은 2,500×g에서 20분간 원심분리하여 맑은 상층액을 회수하였으며, 이 중 일부를 농축 및 동결건조하여 단순 열수추출물(red cabbage hot water extract; RCW)을 회수하였다. 나머지 상층액은 4배의 에탄올을 첨가하여 교반한 후, 24시간 정지하였다. 이후 2,500×g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 분리하였으며, 침전물을 소량의 증류수에 재용해하고 투석 및 동결건조하여 조다당(red cabbage crude polysaccharide; RCP)을 얻었다(Fig. 1(A)).

정제도 및 일반화학적 특성 분석

적양배추 유래 열수추출물 RCW 및 조다당 RCP의 정제도를 확인하기 위하여 시료(10 mg/mL)를 제조하여 여과한 후, 50 mM ammonium formate (pH 5.5)로 평형화된 Shodex GS520+GS320+GS220 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)이 장착된 high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent Technologies Co., Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분석하였으며, HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다.

적양배추 유래 열수추출물 RCW 및 조다당 RCP의 중성당, 산

성당, 단백질 및 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO)의 함량을 확인하기 위하여 중성당 함량은 페놀-황산(Phenol-sulfuric acid)법(Dubois 등, 1956)으로, 산성당 함량은 m-하이드록시비페닐(m-hydroxybiphenyl)법(Blumenkrantz와 Asboe-Hansen, 1973)으로, 단백질 함량은 Bradford법(Bradford, 1976)으로, KDO 함량은 tiobarbituric acid 비색정량(Karkhanis 등, 1978)법을 실험실 여건에 맞게 변형하여 사용하였다. 각각의 분석에는 갈락토오스(galactose; Gal), 갈락투론산(galacturonic acid; GalA), 소혈청알부민(bovine serum albumin) 및 KDO를 표준물질로 사용하였다.

구성당 분석

적양배추 유래 열수추출물 RCW 및 조다당 RCP의 구성당 분석은 Jones와 Albersheim 등(1972)의 방법을 일부 변형하여 실험하였다. 먼저 다당을 알디톨(alditol)로 전환하기 위하여 다당(1 mg)에 2 M 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)을 1 mL 첨가하여 121°C에서 90분간 가수분해를 행한 후, 건조하였다. 건조된 다당에 10 mg의 수소화붕소나트륨(NaBH₄)과 1 mL의 1 M 암모니아수(NH₄OH)를 첨가하고 상온에서 4시간 동안 반응하여 개환 및 환원시켰다. 이후, 아세트산(acetic acid)을 소량 첨가하여 개환 및 환원반응을 정지시켰으며, 과량으로 가해진 아세트산을 제거하기 위하여 메탄올(methanol)을 가한 후, 건조하기를 수차례 반복하였다. 이후, 알디톨로 전환된 다당을 알디톨 아세테이트(alditol acetate)로 유도체화하기 위하여, 300 µL의 무수초산(acetic anhydride) 및 300 µL의 피리딘(pyridine)을 가하고 121°C에서 30분 동안 반응 후 건조시켰다. 이를 클로로포름/물(chloroform/H₂O)의 2 상 용매계로 분리하여 클로로포름층만을 회수 및 건조시킨 다음 소량의 아세톤에 용해하여 가스 크로마토그래피(gas chromatography) 분석용 시료로 사용하였다. 알디톨 아세테이트 분석 조건은 Table 1과 같다.

정상세포 및 암세포 독성측정

Balb/c mouse의 복강에 1 mL의 5% thioglycollate medium을 주사하고 96시간 후 복강 내에 유도된 대식세포를 회수하였다. 회수한 세포는 2.5×10⁶/mL로 조정하고 96 well plate에 100 µL씩 분주하였다. 이후 부착된 세포에 시료를 다양한 농도로 희석하여 100 µL씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 종양세포주인 B16BL6 melanoma cell은 계대 배양된 세포를 회수하고 1×10⁶/mL로 조정하여 96 well plate에 100 µL씩 분주하

Table 1. Analytical conditions of samples by HPLC and GC

HPLC	Instrument	1260 Infinity (Agilent Technologies)
	Detector	Refractive index (RI; G1362A)
	Column	Asahipack GS520+GS320+GS220 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.)
	Mobile phase	50 mM ammonium formate (pH 5.5, 0.5 mL/min)
	Oven temperature	25°C
	Injection volume	20 µL
GC	Instrument	GC ACME6100 (YoungLin Co. Ltd., Korea)
	Detector	Flame ionization detector (FID) (YoungLin Co. Ltd., Korea)
	Column	SP2380 capillary column (Supelco, USA); 0.25 mm×30 m, 0.2 mm film thickness
	Carrier gas	N ₂ (1.5 mL/min)
	Oven temperature	60°C (1 min) → 220°C (12 min) → 250°C (15 min) 30°C/min 8°C/min
	Instrument temperature	Injector 240°C, Detector 270°C
	Injection volume	1 µL

였다. 이후 부착된 세포에 시료를 다양한 농도로 희석하여 100 μ L 씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 시료의 세포독성 측정에는 배양 상층액을 제거한 후, EZ-cytox (Dogen, Seoul, Korea)시약을 이용하여 water-soluble tetrazolium salt (WST)법으로 살아있는 세포의 양을 측정하였다.

대식세포(Macrophage)로부터 cytokine 생산능 측정

Balb/c mouse의 복강에 1mL의 5% thioglycollate medium을 주사하고 96시간 후 복강 내에 유도된 대식세포를 회수하고 세포수를 2.5 \times 10⁶/mL로 조정하여 96 well plate에 100 μ L씩 분주하였다. 이후 부착된 세포에 시료를 다양한 농도로 희석하여 100 μ L 씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양된 plate는 400 \times g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하였으며, 대식세포로부터 분비된 IL-6, IL-12 및 TNF- α 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (BD Biosciences and eBiosciences, San Diego, CA, USA), 산화질소(nitric oxide, NO)의 함량은 griss reagent system kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

자연 살해(Natural killer) 세포에 의한 종양세포 살해능

적양배추 유래 조다당 RCP에 의해 활성화된 NK 세포를 얻기 위해 실험 3일 전, 1일 전에 Balb/c mouse에 농도별로 정맥주사하고 경추탈구법으로 치사시켜 무균적으로 비장(spleen)을 적출하였다. 적출된 비장은 stainless steel mesh를 이용하여 phosphate buffered saline (PBS) 상에서 마쇄(100 mesh) 및 여과(200 mesh)하여 비장세포를 회수하였다. 비장세포에 혼입되어 있는 적혈구를 제거하기 위하여 400 \times g에서 5분간 원심분리 후, 상층액을 최대한 제거하고 0.2% NaCl을 1mL 첨가하여 1분간 흔들어서 주었다. 이후, 10배의 PBS를 첨가하고, 여과(200 mesh)하여 원심분리(900 rpm, 5 min) 하였다. 적혈구가 제거될 때까지 본 과정을 반복하였으며, 적혈구가 제거된 세포는 1 \times 10⁷/mL이 되도록 조정하고 이를 effector cell로 사용하였다. Target cell로 NK 세포에 대한 감수성이 높은 Yac-1 세포를 사용하였으며, 96-well plate (U-type)에 target cell 1 \times 10⁵/mL을 기준으로 effector cell과 target cell의 비율이 100:1, 50:1, 25:1이 되도록 조정하여 분주하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 배양 후 effect cell의 살해능에 의해 target cell로부터 유리되는 lactate dehydrogenase (LDH)의 발생량을 EZ-LDH (Dogen)을 사용하여 측정하였으며, NK 세포의 종양세포 살해능 지표물질인 LDH는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{NK cell activity (\%)} = \frac{(\text{experimental group} - \text{effector spontaneous} - \text{target spontaneous})}{(\text{target maximum} - \text{target spontaneous})} \times 100$$

종양세포에 대한 항전이 활성

적양배추 유래 조다당 RCP의 항전이 활성은 폐(lung)에 대한 전이성 종양세포주인 B16BL6 melanoma를 이용한 실험동물 종양전이 모델을 이용하였다. 시료에 의한 종양전이 효과를 관찰하기 위하여 시료는 농도별로 암 투여 3일전, 1일전에 2회 정맥주사하였으며, B16BL6 melanoma 세포를 3 \times 10⁴/mouse 농도로 조정하여 mouse에 정맥주사하였다. 종양접종 14일 후, mouse를 희생하여 종양 세포의 표적기관인 폐를 적출하여 Bouin's solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 고정하였다. 시료에 의한 항전이 효과는 종양의 colony를 계수하여 종양만을 접종한 대조군과 비교하여 산출하였다.

Arabino- β -3,6-galactan 함량 측정

Arabino- β -3,6-galactan의 존재를 확인하기 위한 β -glucosyl Yariv reagent (Biosupplies, Parkville, Australia)와의 반응성 검토는 Holst와 Clarke(1979)의 방법에 따라 single radical 젤 확산법으로 측정하였다. β -Glucosyl Yariv reagent 10 μ g/mL를 함유한 0.15 M NaCl agarose 평판을 조제하고 직경 3 mm의 well을 만들어 농도별로 희석한 표준물질 gum arabic과 시료 5 μ g을 함유한 용액을 well에 각각 첨가하였다. 이 평판을 습윤상태로 25°C에서 15시간 정치시켜 반응시키고, 생성된 붉은색 침전환을 관찰하여 arabino- β -3,6-galactan의 존재 유무를 관찰하였고, 시료와 β -glucosyl Yariv reagent와의 반응성은 생성된 침전환의 넓이를 계산하여 정량하였다.

통계처리

실험 결과는 SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA)을 사용하여 통계처리 하였으며, 평균값 \pm 표준편차로 나타내었다. 시료간 및 처리 농도 간 유의성은 ANOVA test 후 구체적인 사후 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 실시하였다.

결과 및 고찰

적양배추 유래 추출물의 일반화학적 특성

적양배추로부터 열수추출 및 80% 에탄올 침전법을 이용하여 시료를 제조한 결과(Fig. 1(A)) 적양배추 유래 열수추출물 RCW는 0.88% 수율로 회수되었으며, 정제도를 측정한 결과 고분자 물질과 저분자 물질이 혼재된 형태로 존재하는 것으로 확인되었다 [Fig. 1(B)] 또한, RCW의 성분을 분석한 결과 주로 중성당(60.0%)과 산성당(36.7%)으로 이루어져 있으며, 구성당 분석 결과 포도당(glucose, Glc, 28.2%)이 높은 비율로 검출되었다(Table 2). 반면, 적양배추 유래 조다당 RCP는 0.29%의 수율로 회수되었으며, 정제도를 측정한 결과 저분자 물질이 대부분 제거되어 있었으며, 고분자 영역에서는 큰 peak로 검출됨으로써 비교적 정제도가 우수한 것으로 판단되었다(Fig. 1(C)). RCP의 구성성분을 분석한 결과, RCW 대비 중성당은 감소하고, 산성당은 증가한 것으로 확인되었으며, 구성당으로는 Glc는 감소하고 아라비노스(arabinose, Ara)와 Gal의 비율은 증가한 것으로 확인되었다(Table 2).

식물체에는 전분(starch), 이눌린 등과 같은 저장성 다당류 이외에 셀룰로스(cellulose), 헤미셀룰로스(hemicellulose) 및 펙틴(pectin)과 같은 펙틴물질(pectic substances) 등의 구조 다당체들로 구성되어 있지만 펙틴 이외의 대부분은 단순 물 추출로는 분리가 어려운 것으로 알려져 있다(Carpita와 Gibeaut, 1993; Carpita와 McCann, 2000). 이중 단순 물 추출로 분리가 가능한 펙틴은 homogalacturonan (HG)과 rhamnogalacturonan (RG)-I 및 RG-II가 공유적으로 결합되어 있는 것으로 보고되고 있으며(O'Neill 등, 1990), RG-I은 람노스(Rhamnose, Rha)와 Gal가 번갈아가며 연결된 $[\rightarrow 2)\text{-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-GalAp-(1}\rightarrow n]$ 주쇄에 Rha의 C(O)4 위치에서 arabinan, galactan, arabinogalactan가 측쇄로 연결된 구조를, RG-II는 $[\rightarrow 4)\text{-GalAp-(1}\rightarrow 4)\text{-GalAp-(1}\rightarrow n]$ 주쇄에 KDO, 3-deoxy-D-hexo-2-heptulosaric acid (DHA), apiose와 3-C-carboxy-5-deoxyxylose (aceric acid) 같은 특이당을 포함한 다양한 당쇄가 결합된 구조를 이루고 있다고 보고되고 있다(Engelsen 등, 1996).

정제도 분석 및 구성당 분석을 종합한 결과, 적양배추 유래 열수추출물 RCW에 존재하는 Glc가 에탄올 침전 및 투석과정을 거친 적양배추 유래 조다당 RCP에서는 제거된 것으로 보아 대부분 저분자 형태로 존재하는 것으로 사료되었으며, RCP는 Ara,

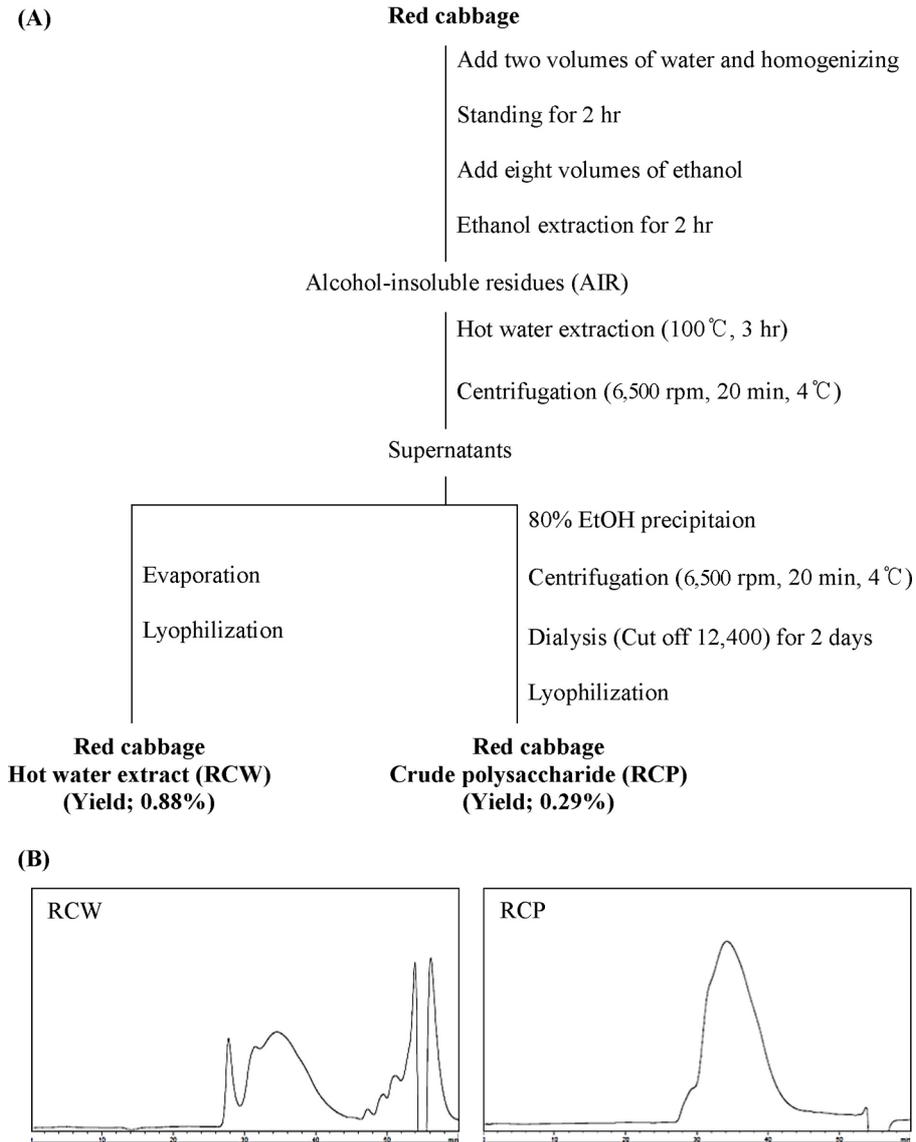


Fig. 1. Isolation of water extract and crude polysaccharides from red cabbage and their HPLC chromatograms. (A) Isolated scheme of polysaccharides from red cabbage and elution pattern of RCW (B) and RCP (C) on high performance size exclusion chromatography (HPSEC) linked with Asahipack GS520+GS320+GS220 column.

Gal 및 Rha로 구성되며, apiose, aceric acid 및 KDO와 같은 특이 당이 검출되지 않은 것으로 미루어 보아 pectin 유래 다당, 그 중에서도 RG-I 형태의 구조를 나타낼 것으로 추정되었다(Engelsen 등, 1996).

적양배추 유래 추출물의 정상세포 및 종양세포에 대한 세포독성

적양배추 유래 열수추출물 RCW 및 조다당 RCP가 정상세포인 대식세포 및 종양세포인 B16BL6 melanoma에 독성을 나타내는지 확인하기 위하여 RCW 및 RCP를 1, 10, 100 및 1000 µg/mL의 농도로 각각의 세포에 처리한 후 세포의 생존율을 WST 방법(Tominaga 등, 1999)을 이용하여 측정하였다. 그 결과, B16BL6 melanoma 세포에는 모든 농도에서 어떠한 증식 및 독성이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 반면 동일한 농도의 RCW 및 RCP를 대식세포에 처리한 결과 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않았으며, RCP 1 µg/mL을 제외한 모든 농도에서 유의적인 세포 증식능이 확인되었다(Fig. 2).

적양배추 유래 추출물의 대식세포 활성화

대식세포는 표적 항원(곰팡이, 세균, virus 감염세포 등)의 감시, 탐식 및 표적항원의 제거에 이르는 일련의 복잡한 기능을 수행하는 세포로서 선천면역에서 중요한 역할을 담당하고 있는 세포이다(Beutler, 2004; Gruchalla과 Jones, 2003). 최근 많은 연구자들이 질병은 치료가 아닌 예방이 효과적이라고 제안함에 따라 대식세포와 같은 선천면역 세포를 활성화 시키는 방법에 관심이 집중되고 있다(Hackett, 2003; Lolis과 Bucala 2003). 이에 대한 대안으로써 식물유래 면역 활성 물질에 대한 연구가 광범위하게 진행되고 있으며, 특히, 천연물 유래 다당은 구조적 특성으로 인하여 세포의 toll-like receptor (TLR), mannose receptor, dectin-1, complement receptor 3 (CR3), CD14 및 scavenger receptor와 같은 특이 수용체(specific receptor)에 인식되면서 세포내 신호전달 경로를 활성화시키고, 최종적으로 활성산소종(reactive oxygen species, ROS), NO와 같은 chemokine 및 TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12 등과 같은 cytokine을 생산하는 것으로 보고되고 있다

Table 2. Chemical properties of RCW and RCP isolated from red cabbage

Chemical composition (%)	RCW	RCP
Neutral sugar	60.0±5.0	40.0±1.6
Uronic acid	36.7±0.8	58.9±1.7
Protein	1.4±0.1	0.4±0.5
KDO ¹⁾ liked materials	2.3±0.5	1.0±0.5
Polyphenol	0.0±0.3	0.0±0.4
Component sugar ²⁾		(Mole%) ³⁾
Rhamnose	5.0±0.3	7.7±0.3
Fucose	0.5±0.1	0.9±0.0
Arabinose	14.6±0.2	27.5±1.0
Xylose	1.7±0.0	2.4±0.0
Mannose	1.9±0.1	2.1±0.1
Galactose	8.1±0.2	17.2±1.2
Glucose	28.2±0.7	2.3±0.1
KDO+DHA ⁴⁾	2.3±0.5	1.0±0.5
GalA ⁵⁾ +GlcA ⁶⁾	36.7±0.8	58.9±1.7

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

²⁾Monosaccharides were analyzed using alditol acetates.

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

⁴⁾DHA means 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid.

⁵⁾GalA means galacturonic acid.

⁶⁾GlcA means glucuronic acid.

(Schepetkin 등, 2005; Schepetkin과 Quinn, 2006).

적양배추 유래 열수추출물 RCW 및 조다당 RCP의 대식세포 활성화에 따른 cytokine 및 NO 분비능을 측정된 결과(Fig. 3), 적양배추 유래 열수추출물 RCW의 경우, IL-6, IL-12 및 TNF- α 모두 생산되지 않는 것으로 확인되었으며, NO는 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도에서만 미량 검출되었다. 반면 적양배추 유래 조다당 RCP는 유의적으로 높은 cytokine 생산량을 나타내는 것으로 확인되었으며, IL-6, IL-12 및 TNF- α 모두 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저농도에서도 높은 생산량을 나타내었다. 뿐만 아니라 NO의 경우에는 농도 의존적으로 높은 생산량을 나타내었다. 하지만 IL-12의 경우에는 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$

의 농도에서 최대로 생산되며 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지는 LPS와 유사한 높은 cytokine 생산을 나타냈으나, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도에서는 일부 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 시료의 대식세포 자극을 통한 cytokine 생산에는 최적 농도가 존재하는 것으로 추정되었다.

본 결과를 통하여 적양배추의 수용성 성분 중 면역활성은 다당에 있음이 확인되었으며, 적양배추 유래 조다당 RCP는 대식세포뿐만 아니라 다른 선천면역계 세포의 활성을 증가시킬 수 있을 것이라 사료되었다.

적양배추 유래 조다당의 자연 살해 세포 활성화

NK 세포는 림프구 계통의 세포로써 억제수용체와 활성화수용체를 모두 발현하고 있어 건강한 자기세포 이외의 해로운 표적(감염된 세포와 스트레스 받은 세포 등)을 인식하여 이들을 직접 죽이거나 염증성 사이토카인을 분비하여 세포를 사멸시키는 것으로 잘 알려져 있다(Moretta과 Moretta, 2004; Raulet, 2004; Vivier과 Biron, 2002). 이러한 NK 세포는 IL-15 또는 IL-12와 같은 사이토카인에 의해서 활성화되며, 특히 대식세포 유래 사이토카인 중 하나인 IL-12는 NK 세포의 IFN- γ 생산과 세포 용해작용을 일으키는 강력한 유도 물질로 보고되고 있다(Walzer 등, 2005).

앞서 본 연구진은 적양배추 유래 조다당 RCP의 대식세포 자극에 따른 사이토카인 생성능 측정에서 IL-12의 생산량이 증가됨을 확인한 바 있다. 따라서 적양배추 유래 조다당 RCP는 NK 세포 또한 활성화시킬 것이라 사료되어 RCP를 Balb/c 마우스에 정맥주사한 후, YAC-1 세포에 대한 NK 세포 살해능을 측정된 결과(Fig. 4), RCP 처리 군은 무처리군보다 농도 의존적으로 높은 활성을 나타내었으며, 특히 RCP 1,000 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 군에서 무처리군 대비 약 12배 증가한 것으로 확인되었다. 따라서 적양배추 유래 조다당 RCP는 NK 세포의 활성인자로 작용할 것이라 사료되었다.

적양배추 유래 조다당의 항전이 활성화

앞선 실험결과 적양배추 유래 조다당 RCP의 강력한 NK 세포 활성능이 확인되어 이들의 항전이 활성을 측정하고자 RCP를 농도별로 정맥주사한 후, B16BL6 melanoma 세포를 정맥으로 투여하여 항전이 활성을 평가하였다. 시료를 투여하지 않은 무처리군

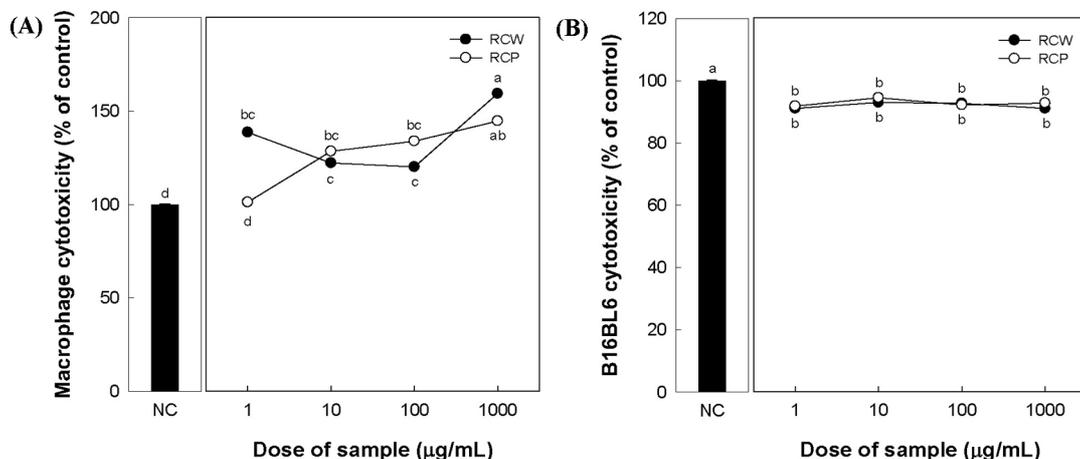


Fig. 2. Cytotoxic effect of RCW and RCP isolated from the red cabbage on macrophage cells (A) and B16BL6 melanoma cell lines (B) *in vitro*. NC used media as a negative control. Means with different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

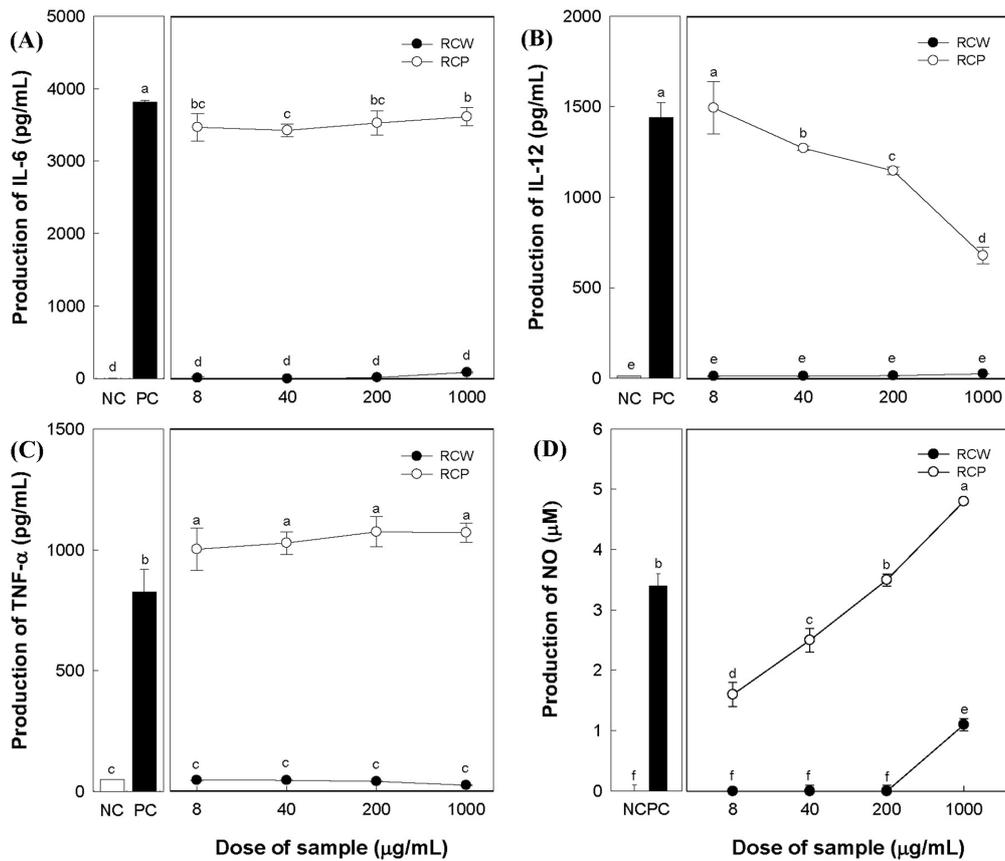


Fig. 3. Effect of RCW and RCP on the secretion of cytokines (IL-6, IL-12 and TNF- α) and nitric oxide (NO) in murine peritoneal macrophages. NC used media as a negative control and PC used lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/mL) as a positive control. Means with different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

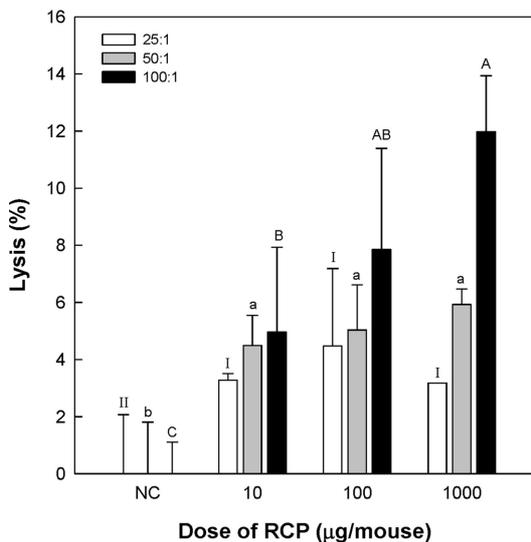


Fig. 4. Effect of RCP on cytolytic activity of natural killer (NK) cells *ex vivo*. NK cells (effector cells) collected from RCP-injected Balb/c mice were co-cultured with Yac-1 lymphoma cells (target cell) with different effector to target ratios (25:1, 50:1, and 100:1). The production of LDH were determined in the culture supernatant by LDH kit. NC means NK cells isolated from saline-injected Balb/c mice. Means with different superscript letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

의 종양 수와 적양배추 유래 조다당 RCP의 종양 수를 계수하여 항전이 활성을 확인한 결과(Fig. 5), 무처리군은 종양 수가 평균 147개 계수되었으나, RCP를 100 및 1,000 μ g/mouse 농도 투여한 군에서는 각각 평균 81개, 78개의 종양이 계수되었다. 따라서 RCP를 종양접종 3일, 1일 전 정맥으로 투여할 경우, 암전이가 최대 47.3% 억제되는 것으로 최종 확인되었다.

Fan 등(2012)은 홍조류 인 *Gracilaria lemaneiformis* 유래 다당을 ICR 마우스에 경구투여하고 H22 간암 세포주를 투여하여 종양 증식 저해, 비장 세포 증식 및 대식세포 탐식 작용이 증가됨을 보고한 바 있으며, Lee 등(2014)은 한라봉 유래 다당이 선천 면역계를 활성화 시키며, 항전이 효과를 나타낸다고 보고한 바 있다. 또한 Brunda 등(1993)은 IL-12를 마우스에 복강투여하여 무처리군 대비 T세포 및 NK 세포가 활성화되고 결과적으로 우수한 항전이 효과를 나타낸다고 보고한 바 있다. 이는 본 실험의 결과 내용과 동일하게 RCP에 의해 대식세포가 자극되면서 다양한 cytokine이 분비되며, 이를 통해 NK세포와 같은 면역세포가 활성화되고, 최종적으로 우수한 항전이 활성으로 이어진다는 추론을 가능케 하였다. 이상의 결과로부터 적양배추에는 저분자 생리활성물질 외에도 강력한 면역 활성화와 항전이 활성을 갖는 다당체가 존재하며, 이들은 건강 유지에 유익한 효과를 나타낸다고 판단된다.

β -Glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검토

일반적으로 arabinogalactan은 고등식물에서 주로 발견되는 다

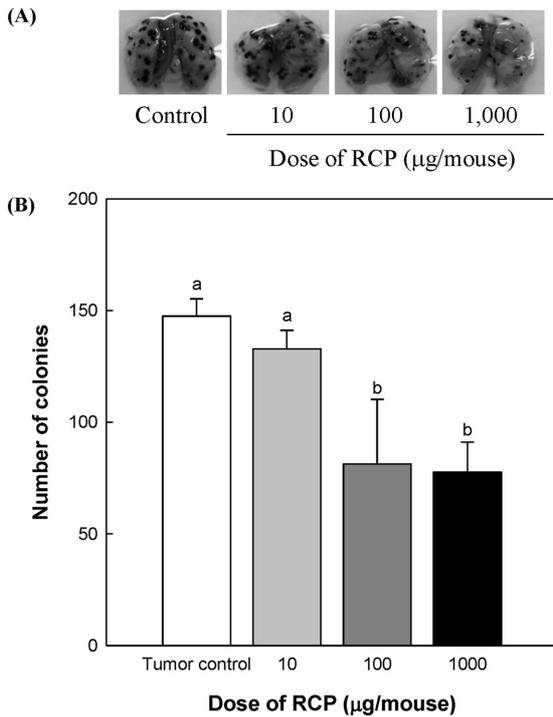


Fig. 5. Inhibitory effect of RCP from red cabbage on lung metastasis produced by *i.v.* inoculation of B16BL6 melanoma cells. Five BALB/C mouse per group were inoculated *i.v.* with 4×10^4 B16BL6 melanoma cells and administered intravenously with the indicated doses of RCP suspended in PBS on 3 days and 1 day before tumor inoculation. Mice were sacrificed at 16 days after tumor inoculation and excised lung to count colonies number.

당류의 일종으로(Aspinall, 1973), 구조적 특성에 따라 I, II형 및 기타형으로 구분된다(Clarke 등, 1979). I형 arabinogalactan은 (1→4)-β-D-galactan 주쇄에 arabinosyl oligosaccharide 잔기를 갖으며, II형은 (1→3)-β-D-galactan 주쇄에 galactose의 C(O)6 위치에서 galactosyl 혹은 arabinosyl 잔기를 갖는 arabino-β-3,6-galactan을, 그리고 기타형은 arabinogalactan 측쇄를 갖는 pectic polysaccharide를 의미한다. 이러한 다당의 구조를 규명하기 위해서는 linkage analysis, configurations, anomerizations 등과 같은 복잡한 일련의 과정이 요구되지만, type II arabino-β-3,6-galactan은 β-Glucosyl Yariv antigen (1,3,5-tri-(4-β-glucopyranosyl-oxyphenylazo)-2,4,6-tri-hydroxybenzene)과 비특이적으로 반응하여 적색의 침전환을 형성하기 때문에 비교적 쉽게 검출이 가능한 것으로 잘 알려져 있다(van Holst과 Clarke, 1985). 따라서 본 연구진은 앞서 적양배추 유래 열수추출물 RCW 및 적양배추 유래 조다당 RCP의 구성당 분석을 통하여 arabinose와 galactose가 높은 비율로 존재함을 확인하였으며, 특히, RCP에는 arabinogalactan 형태의 구조가 일부 존재할 것으로 추정되어 이를 β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토하고자 하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 arabino-β-3,6-galactan 표준물질인 gum arabic은 침전환이 농도 의존적으로 증가되었으며, RCW 및 RCP를 첨가한 곳에서도 환이 관찰되었다. 환의 크기를 표준물질이 나타낸 환의 크기로 작성한 기준곡선을 통해 환산한 결과, RCW 및 RCP 1000 µg/mL에는 각각 2.4% 및 9.7% 정도로 나타났으며, 본 결과를 통하여 적양배추에 함유되어있는 다당에는 II형 arabinogalactan 구조가 일부 존재함을 확인할 수 있었다.

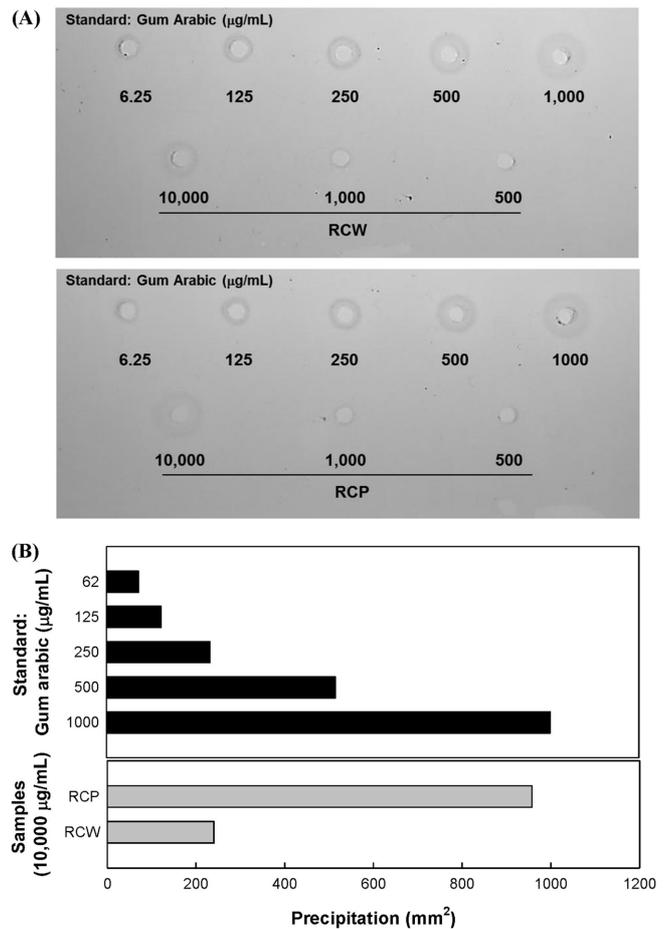


Fig. 6. Single radial gel diffusion (A) and reactivity (B) between β-glucosyl Yariv reagent and polysaccharide fractions isolated from red cabbage.

이상의 결과로부터 적양배추 중에 존재하는 다당은 대식세포 및 NK 세포 등과 같은 면역 관련세포의 활성화인자로 작용할 수 있음을 확인하였으며, 면역 세포가 활성화됨에 따라 항전이 활성이 나타나는 것으로 확인되었다. 또한 본 다당은 Ara, Gal 및 Rha로 구성되어 있으며, II형 arabinogalactan이 함유되어 있는 것으로 미루어 보아, 적양배추에 존재하는 다당은 RG-I 류의 다당일 것으로 사료되었다.

요 약

적양배추 유래물의 면역 활성 및 항전이 활성을 평가하기 위하여 적양배추 유래 열수추출물 RCW 및 조다당 RCP를 분리하였다. RCW는 중성당이 60%의 높은 비율로 검출되었으며, 이중 Glc가 28.2%로 구성되어 있었으며, RCP는 중성당과 산성당이 각각 40.0% 및 58.9%로 이루어져 있으며, 구성당 분석 결과, Ara (27.5%)와 Gal (17.2%)가 높은 비율로 검출되었다. RCW와 RCP는 정상세포 및 암 세포에 대한 어떠한 독성도 나타나지 않았으며, 오히려 정상세포에서는 약간의 증식능이 확인되었다. 또한 대식세포 자극을 통한 cytokine 분비능을 측정된 결과, RCW는 IL-6, IL-12 및 TNF-α 생산능은 어떠한 농도에서도 확인되지 않았으며, 1000 µg/mL 고농도에서 NO 생산능이 확인되었다. 반면에 RCP는 8 µg/mL의 저농도에서도 IL-6, IL-12, TNF-α 및 NO의 생

산능이 확인되었다. 높은 cytokine 생산능을 나타낸 RCP의 NK 세포 활성화 및 항진이 활성을 측정할 결과, RCP를 1000 µg/mouse 농도로 정맥투여할 경우, NK 세포를 무처리군 대비 최대 12배 활성화 시키는 것으로 확인되었으며, 47.3%의 항진이 활성이 확인되었다. 적양배추 유래 면역 활성화 다당의 구조를 추정하기 위하여 β-Glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토한 결과, RCP 1000 µg/mL에는 약 9.7%의 arabino-β-3,6-galactan이 검출되었다. 본 결과로부터 적양배추에는 arabino-β-3,6-galactan을 일부 함유하는 RG-I 형태의 다당으로 존재하며, 이들에 의해 강력한 면역 증진 활성이 나타나는 것이라 결론지을 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2018학년도 경기대학교 학술연구비(일반 연구과제) 지원에 의해 수행되었음.

References

- Aspinall GO. Carbohydrate polymers of plant cell wall. pp. 95-115. In: Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. Loewus F (ed). Academic Press, New York, NY, USA (1973)
- Beutler B. Innate immunity: An overview. *Mol. Immunol.* 40: 845-859 (2004)
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489 (1973)
- Bradford MM. 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 (1976)
- Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Gately M K. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J. Exp. Med.* 178: 1223-1230 (1993)
- Carpita NC, Gibeaut DM. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1-30 (1993)
- Carpita N, McCann M. The cell wall. pp. 52-108. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan BB (ed). American Society of Plant Physiologists, Maryland, Md, USA (2000)
- Chen X, Hu ZP, Yang XX, Huang M, Gao Y, Tang W, Chan SY, Dai X, Ye J, Ho PCL, Duan W, Yang HY, Zhu YZ, Zhou SF. Monitoring of immune responses to a herbal immuno-modulator in patients with advanced colorectal cancer. *Int. Immunopharmacol.* 6: 499-508 (2006)
- Clarke AE, Anderson RL, Stone BA. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* 18: 521-540 (1979)
- Diwanay S, Chitre D, Patwardhan B. Immunoprotection by botanical drugs in cancer chemotherapy. *J. Ethnopharmacol.* 90: 49-55 (2004)
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356 (1956)
- Engelsen SB, Cros S, Mackie W, Perez S. A molecular builder for carbohydrates: application to polysaccharides and complex carbohydrates. *Biopolymers* 39: 417-433 (1996)
- Fan Y, Wang W, Song W, Chen H, Teng A, Liu A. Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. *Carbohydr. Polym.* 88: 1313-1318 (2012)
- Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cellular Immunology* 143: 127-142 (1992)
- Gruchalla RS, Jones J. Combating high-priority biological agents: what to do with drug-allergic patients and those for whom vaccination is contraindicated?. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: 675-682 (2003)
- Hackett CJ. Innate immune activation as a broad-spectrum biodefense strategy: Prospects and research challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: 686-694 (2003)
- Hwang YC, Shin KS. Characterization of immuno-stimulating polysaccharides isolated from Korean persimmon vinegar. *Korean J. Food Sci. Technol.* 4: 220-227 (2008)
- Jones TM, 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)
- 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)
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11: 373 (2010)
- Kim HS. Natural Killer Cell and Cancer Immunotherapy. *Hanyang Med. Rev.* 33: 59-64 (2013)
- Kim HW, Shin MS, Lee SJ, Park HR, Jee HS, Yoon TJ, Shin KS. Signaling pathways associated with macrophage-activating polysaccharides purified from fermented barley. *Int. J. Biol. Macromol.* 131: 1084-1091 (2019)
- Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immun. Immunother.* 54: 721-728 (2005)
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sharma F, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170: 827-845 (1989)
- Lee EH, Park HR, Shin MS, Cho SY, Choi HJ, Shin KS. Antitumor metastasis activity of pectic polysaccharide purified from the peels of Korean Citrus Hallabong. *Carbohydr. Polym.* 111: 72-79 (2014)
- Li Q, Zhang F, Chen G, Chen Y, Zhang W, Mao G, Zhao T, Zhang M, Yang L, Wu X. Purification, characterization and immunomodulatory activity of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa*. *Int. J. Biol. Macromol.* 111: 1293-1303 (2018)
- Lolis E, Bucala R. Therapeutic approaches to innate immunity: Severe sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 635-645 (2003)
- Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* 177: 1199-1204 (1993)
- Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: Triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* 23: 255-259 (2004)
- O'Neill M, Albersheim P, Darvill A. The pectic polysaccharides of primary cell walls. pp. 415-441. In: Methods in Plant Biochemistry. Bryant JA. Carbohydrates, Academic, London, England (1990)
- Park SO, Kim JM. Functional food for immune regulation-beta-glucan. *Food Science and Industry* 45: 39-47 (2012)
- Pennini ME, Perkins DJ, Salazar AM, Lipsky M, Vogel SN. Complete dependence on IRAK4 kinase activity in TLR2, but not TLR4, signaling pathways underlies decreased cytokine production and increased susceptibility to *Streptococcus pneumoniae* infection in IRAK4 kinase-inactive mice. *J. Immunol.* 190: 307-316 (2013)
- Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat. Immunol.* 5: 996-1002. (2004)
- Schepetkin IA, Faulkner CL, Nelson-Overton LK, Wiley JA, Quinn MT. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. *Int. Immunopharmacol.* 5: 1783-1799 (2005)
- Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharma-*

- col. 6: 317-333 (2006)
- Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J. Immunol.* 165: 2665-2670 (2000)
- Statistics Korea. Annual report on the causes of death statistics. 11-1240000-000028-10. 1-75 (2017)
- Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, Watanabe M. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal. Commun.* 36: 47-50 (1999)
- Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol. Today* 14: 335-338 (1993)
- Trinchieri G. Interleukin-12: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84: 4008-4027 (1994)
- van Holst GJ, Clarke AE. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Anal. Biochem.* 148: 446-450 (1985)
- Vivier E, Biron CA. A pathogen receptor on natural killer cells. *Science* 296: 1248-1249 (2002)
- Walzer T, Dalod M, Vivier E, Zitvogel L. Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5: 49-59 (2005)
- Wiczowski W, Szawara-Nowak D, Topolska J. Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food Res. Int.* 51: 303-309 (2013)
- Wigginton JM, Kuhns DB, Back TC, Brunda MJ, Wiltrot RH, Cox GW. Interleukin 12 primes macrophages for nitric oxide production *in vivo* and restores depressed nitric oxide production by macrophages from tumor-bearing mice: implications for the anti-tumor activity of interleukin 12 and/or interleukin 2. *Cancer Res.* 56: 1131-1136 (1996)
- Zhang Y, Talalay P. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Res.* 54: 1976-1981 (1994)