

## 계지(桂枝) 열수추출물로부터 보체계 활성화 다당의 정제

권미향\* · 안현정 · 신광순\*\* · 나경수\*\*\* · 성하진\*\*\*\* · 양한철

고려대학교 식품공학과, \*고려대학교 생물공학연구소,  
\*\*경기대학교 식품가공학과, \*\*\*대구공업전문대학 식품영양과,  
\*\*\*\*고려대학교 유전공학과

### Purification of Complement System-Activating Polysaccharide from Hot Water Extract of Young Stems of *Cinnamomum cassia* Blume

Mee-Hyang Kweon\*, Hyun-Jung An, Kwang-Soon Shin\*\*,  
Ha-Chin Sung\*\*\* and Han-Chul Yang

Department of Food Technology, Korea University

\*Institute of Biotechnology, Korea University

\*\*Department of Food Technology, Kyonggi University

\*\*\*Department of Food Nutrition, Taegu Technical College

\*\*\*\*Department of Genetic Engineering, Korea University

#### Abstract

A complement system-activating (anti-complementary) polysaccharide was purified from the hot water extract of young stems of *Cinnamomum cassia* Blume. Crude polysaccharide fraction (CC-1) was prepared from the hot water extract of the young stems followed by methanol-reflux, precipitation with ethanol, dialysis, and lyophilization. The anti-complementary activity of CC-1 was decreased greatly by periodate oxidation, but was not changed by pronase digestion. These suggest that carbohydrate moiety may be related to the activation of complement system. According to its ionic strength CC-1 was fractionated first using cetavlon to give 4 fractions, CC-2, 3, 4 and 5. Among them CC-2 fraction was found to retain the highest activity and yield. CC-2 was separated to an unabsorbed neutral sugar portion (CC-2-I) and seven absorbed acidic sugar fractions (CC-2-II→CC-2-VIII) on DEAE-Toyopearl 650C (Cl-). CC-2-III showing higher anti-complementary activity and yield than those of other fractions, was further purified on the gel permeation of Sephadex G-100 and Sepharose CL-6B to CC-2-IIIa-3. CC-2-IIIa-3 was determined to have a homogeneity by GPC (Sephacrose CL-6B) and HPLC. Gel chromatography using standard dextrans gave a value of  $2.4 \times 10^5$  for the molecular weight. The purified polysaccharide, CC-2-IIIa-3 consisted of arabinose, xylose, glucose, galactose, galacturonic acid and glucuronic acid in a molar ratio of 5.56 : 3.77 : 1.87 : 1.00 : 5.12 : 3.13 and contained no nitrogen.

Key words: complement, polysaccharide, *Cinnamomum cassia* Blume

#### 서 론

보체계는 고등동물에서 액성 면역계의 일부를 담당하는 인자로서 항원 침입시 항체와 달리 비특이적으로 활성화되어 표적세포의 분해, 대식세포와 림프구의 활성화, 화학주화능(opsonization)을 통해 체내 병원체 등을 제거하는 주역할 이외에도 활성화 과정 중 생성되는 보체산물의 작용으로 인해 혈관 투과성과

부종의 증가(특히 C3a와 C5a의 작용), 백혈구 주화, 용해 효소의 방출, 응집 반응에 따른 혈소판 방출, 대식세포로부터 prostaglandin의 생성 등의 특정 면역 반응이 유도, 조절되어 염증, 알레르기 반응과 같은 숙주 면역 반응에 중요한 역할을 담당한다<sup>(1,2)</sup>.

최근 들어 생체방어계에서 중요한 역할을 담당하는 보체계(complement system)를 활성화하는 물질(항보체 활성화물질)들이 생체의 면역 부진상태를 개선 혹은 치료하는 면역요법제로 개발되어 질병의 예방과 치료에 효과적으로 사용될 수 있는 가능성이 제시되고 있다<sup>(3)</sup>. 또한 항보체 활성화물질이 생체내 대식세포 등의

Corresponding author: Han-Chul Yang, Mailing address: Institute of Biotechnology, Korea University, 1 Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea

면역세포들을 자극하여 임파구의 증식 및 활성화에 필요한 cytokine의 분비를 유도하며 암의 치료에 도움이 될 수 있다는 보고가 제시되고 있다<sup>9)</sup>. 현재까지 알려진 항보체 활성 물질로는 주로 식물체들로 분리된 다당류로서 당귀(*Angelica acutiloba*)<sup>(13)</sup>의 pectic arabinogalactan, 시호(*Bupleurum falcatum*)<sup>(20)</sup>의 arabinan, arabinoglucan, glucan, 대복피(*Arcae pericarpium*)<sup>(22)</sup>의 heterogalactan, 인삼(*Panax ginseng*)<sup>(16)</sup>의 acidic heteroglucan과 고사리<sup>(25)</sup>의  $\alpha$ -(1→2)-glucuronomannan back bone 등이 알려져 있다.

저자들은 전통차 재료들로부터 보체계 활성화 물질을 탐색하던 중 계지(桂枝)의 열수추출물이 양의 감작 적혈구를 이용한 보체소비 용혈법(complement fixation test)에서 높은 활성을 나타냄을 관찰하였다. 계피 나무의 어린 가지인 계지(桂枝)는 신농본초경을 비롯한 각 시대의 본초서<sup>(9)</sup>에 수록되어 한방에서는 해열, 발한, 진통, 진경, 방향성 건위를 목적으로 계지탕, 계지감초탕, 계마 각반탕, 영계 출감탕 등에 처방되어져 왔고 식용으로서는 계피와 함께 향신료로서 또는 민속 음식 등에 방향성 식욕 촉진제로서 이용되어 왔다<sup>(4)</sup>. 계피와 계지에 대해 밝혀진 약리적 효능 중 항알레르기 효과는 allergy type II와 III에서 보체가 관계하는 사구체 신염, 류마티즘같은 자가 면역 질환에서 계피 나무의 열수추출물이 완화 효과가 있다는 사실이 보고되었으나<sup>(5)</sup> 항보체 활성화에 관한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 계지에서 항보체 활성물질을 규명하여 식품재료의 생체조절 기능을 밝혀 기능성 식품인자로서 개발하고자 보체계 활성화 다당을 정제하여 화학적 특성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에서 사용된 계지(*Cinnamomum cassia* Blume)는 중국 광둥성이 원산지이며 건조된 상태로 경동시장에서 구입하였다. 양의 감작 적혈구(IgM hemolysin sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본 Bio test사로부터 구입하였고 혈청(normal human serum, NHS)은 실험실의 건강한 성인의 혈액으로부터 제조하여 사용하였다.

### 시료성분의 일반분석

총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법<sup>(40)</sup>으로, 산성당 함량은 D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 m-hydroxydiphenyl법<sup>(41)</sup>으로, 단백

질 함량은 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Lowry법<sup>(42)</sup>으로 각각 정량하였다.

### 구성당 분석

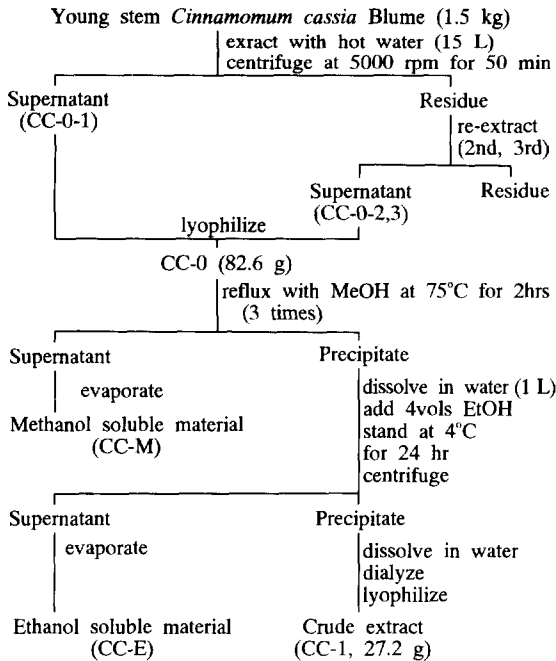
2M trifluoroacetic acid (TFA)로 121°C에서 1.5시간 동안 가수분해한 시료를 TLC cellulose coated plastic sheet (Merck, 5577)에 점착한 후 ethylacetate : pyridine : water : acetic acid = 5:5:1:3을 전개 용매로 하여 전체 구성당을 확인 후, 각 구성당의 정량분석을 위하여 다당의 가수분해 시료를 Dowex-1 (acetate form) resin으로 중성당 및 산성당으로 분리하여 각각 alditol acetate 유도체로 전환<sup>(43)</sup>시킨 후 GLC를 통하여 분석하였다. GLC의 분석은 3% OV-225 chromosorb WHP 100/120의 packed column이 장착된 Shimadzu GC-14A/FID/Shimadzu C-R6A chromatopac (column temp. 225°C, inject temp. 250°C, detect temp. 250°C)에서 실시하여 표준 구성당들의 retention time과 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였다. 구성당의 molar ratio는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

### 항보체 활성의 측정

시료에 의한 보체 소비(complement consumption)후 남은 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test<sup>(44)</sup>로 측정하였다. 즉, 여러 농도(100, 500, 1000  $\mu$ g/ml)로 중류수에 녹이거나 분산시킨 시료에 정상인의 혈청과 2% gelatin, 3 mM Ca<sup>++</sup>, 10 mM Mg<sup>++</sup>이 함유된 GVB<sup>++</sup> (gelatin veronal buffered saline, pH 7.4) 완충액을 각각 50  $\mu$ L씩 혼합하여 37°C에서 20분간 1차 반응시키고 GVB<sup>++</sup>를 350  $\mu$ L 가한 후 이를 10-160배로 연속 희석하였다. 여기에 다시 750  $\mu$ L의 GVB<sup>++</sup>를 가한 다음 양의 감작 적혈구를 250  $\mu$ L 가해 37°C에서 60분간 2차 반응시킨 후 PBS (phosphated buffered saline, pH 7.4) 2.5 mL을 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액을 2800 rpm에서 약 10분간 원심분리하여 얻어진 상정액의 흡광도를 412 nm에서 측정하였다. 항보체 활성은 NHS와 buffer, 탈이온수만을 반응시킨 대조군의 총보체 용혈(50% total complement hemolysis, TCH<sub>50</sub>%)에 대한 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH<sub>50</sub>%)로서 나타내었다.

### 보체계 활성화 다당의 추출 및 정제

건조하여 분쇄한 계지 1.5 kg을 10배 부피의 중류수로 3회에 걸쳐 열수 추출한 후 Scheme 1과 같은 방법으로 보체계 활성화 조다당(CC-1, 27.24 g)을 조제하



**Scheme 1. Isolation and preparation procedure of crude polysaccharide fractions from *Cinnamomum cassia* Blume**

였으며, 조다당 CC-1을 양이온 계면 활성제인 cetavlon (cetyltrimethyl ammonium bromide)으로 처리하여<sup>(21,23)</sup> 이온강도에 따라 4개의 획분(CC-2,3,4,5)으로 분리하였다. 이 중에서 활성과 수율이 높았던 CC-2 (300 mg)를 DEAE-Toyopearl 650C (Cl) column(4.0×25 cm)에 흡착시킨 후 증류수로 세척한 비흡착 획분(CC-2-I)과 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1 및 2 M NaCl용액을 500 ml씩 순차적으로 용출시켜 7개의 흡착획분(CC-2-II→CC-2-VIII)을 얻었다. 이온교환 크로마토그래피에 의해 얻어진 획분 중에서 활성과 수율이 높았던 CC-2-III를 0.5 M NaCl 용액으로 평형화된 Sephadex G-100 column (2.6×76 cm)을 이용하여 0.3 mL/min 유속으로 4°C에서 겔 여과 크로마토그래피를 행하여 얻어진 세 획분(CC-2-IIIa, -IIIb, -IIIc)을 투석, 농축, 동결 건조하였다. 이들 획분 중에서 주요 항보체 활성 획분인 CC-2-IIIa를 0.5 M NaCl용액으로 평형화시킨 Sepharose CL-6B column (2.3×90 cm)을 사용하여 분당 0.4 mL 유속으로 4°C에서 겔 여과 크로마토그래피를 행하여 정제다당 CC-2-IIIa-3을 얻었다.

#### 보체계 활성화 물질 본체의 확인

보체계 활성을 나타낸 고분자 획분인 CC-1 (30 mg)을 10 mM CaCl<sub>2</sub>가 함유된 50 mM Tris-HCl buffer (pH

7.9) 50 mL에 용해시킨 후 10 mg의 pronase를 가하여 37°C에서 48시간 동안 반응시켜 pronase 소화물을 얻었으며, CC-1 (30 mg)획분을 50 mM acetate buffer (pH 4.5) 50 mL에 녹여 50 mM sodium periodate (NaIO<sub>4</sub>)를 가하여 혼합물을 4°C 암소에서 3일간 반응시켜 periodate산화물을 조제하였다<sup>(15)</sup>. 각각의 반응생성물을 대조군과 함께 항보체 활성을 조사하였다.

#### 정제 다당의 순도 확인

Sephacrose CL-6B 겔여과 크로마토그래피에 의하여 단일 획분으로 분리된 보체계 활성화 다당 CC-2-IIIa-3를 HPLC (Waters 510, Shodex inopack S-805, GPC type, 0.4×50 cm, RI, 0.2 M NaCl, 1 ml/min)를 실시하여 순도를 확인하였다.

#### 정제 다당의 분자량 검토

정제 다당의 분자량은 dextran T-2000 (M.W.: 2×10<sup>6</sup>), T-500 (M.W.: 5×10<sup>5</sup>), T-70 (M.W.: 7×10<sup>4</sup>), T-40 (M.W.: 4×10<sup>4</sup>), T-10 (M.W.: 1×10<sup>4</sup>) 및 glucose를 표준물질로 사용하여 Sepharose CL-6B column에서 얻어진 표준곡선과 비교하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 보체계 활성화 물질의 추출 및 분획

계지(桂枝, *Cinnamomum cassia* Blume) 1.5 kg을 약 10배의 증류수로 열수추출하는 과정에서 3회 추출시까지는 1 mg/mL의 농도에서 85% ITCH<sub>50</sub>이상의 높은 활성과 추출수율을 얻을 수 있었으므로 3회 추출까지의 열수추출물(CC-0)을 혼합, 농축, 동결 건조하여 이후의 실험 시료로 이용하였다(Scheme 1). 계지 열수추출물(CC-0, 82.6 g)을 Scheme 1의 방법에 따라 methanol 환류, ethanol 침전을 실시하여 methanol 가용 성분인 CC-M, ethanol가용 성분인 CC-E와 투석, 동결 건조를 거친 조다당 획분인 CC-1을 얻었다. 각 획분의 항보체 활성을 측정된 결과(Fig. 1) CC-1은 0.5 mg 농도에서도 85%이상의 높은 활성을 보여 CC-0의 활성에 비해 증가되었다. CC-M과 CC-E는 CC-0에 비해 75%이상 낮은 활성을 보여 고분자 획분인 CC-1에 활성물질이 존재함을 확인하였다. CC-0와 CC-1의 화학적 조성을 비교한 결과(Table 1) 총당 함량은 52.3-55.4%와 60.3%로 큰 변화가 없었으나 산성당 함량은 CC-1(25%)이 CC-0(9.6-12.6%)에 비해 2배 이상 많았으며, 단백질 함량은 CC-1(32.8%)에서 약 10%정도 적게 함유되어 있었다. 구성당은 CC-1에서 galacturonic

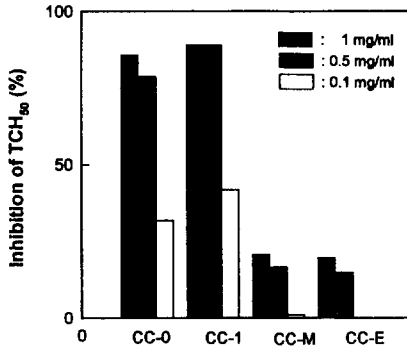


Fig. 1. Anti-complementary activities of several extracts obtained from the young stem of *Cinnamomum cassia* Blume. CC-0: Hot water extract, CC-1: Ethanol precipitate, CC-M: Methanol soluble component, CC-E: Ethanol soluble component.

Table 1. Chemical compositions and yields of crude extracts from the young stems of *Cinnamomum cassia* Blume

	CC-0 <sup>1)</sup>			CC-1 <sup>2)</sup>
	1st	2nd	3rd	
Total sugar	54.8	52.3	55.4	60.3
Uronic acid	9.6	12.6	10.3	25.0
Protein	41.2	40.1	39.5	32.8
Yield	2.5	1.8	1.2	32.9 <sup>4)</sup>
Component sugar (molar ratio)				
Rhamnose	0.48	0.26	0.36	0.32
Arabinose	2.74	2.96	3.16	3.63
Xylose	1.02	1.41	1.18	2.44
Mannose	1.40	0.87	0.50	0.51
Galactose	1.00	1.00	1.00	1.00
Glucose	7.42	5.05	4.33	3.55
Mannuronic acid	0.21	0.67	trace <sup>3)</sup>	0.17
Galacturonic acid	0.78	1.30	1.62	2.17
Glucuronic acid	1.39	1.76	0.70	1.77

<sup>1)</sup>CC-0 was obtained from the three times of hot water extraction of *Cinnamomum cassia* Blume.

<sup>2)</sup>CC-1 was the ethanol precipitate of CC-0.

<sup>3)</sup>Detected less than 0.10.

<sup>4)</sup>Calculated from the fraction CC-0.

acid, arabinose, xylose양이 CC-0에 비해 증가한 반면 glucose양은 감소한 점은 CC-0에 다량으로 존재하였던 유리당 형태의 glucose가 투석 및 에탄올 침전 등으로 제거된 결과로 해석되었다. 고분자 성분인 CC-1을 양이온 계면 활성제인 cetavlon (cetyltrimethyl ammonium bromide)으로 처리하여<sup>(21,23)</sup> 이온강도에 따라 CC-2, CC-3, CC-4, CC-5의 4개 성분으로 분리하였다. 4성분은 모두 1 mg/mL 농도에서 80% 이상의 높은 항보체 활성 효과를 보였고 수열면에서는 CC-2성분이

Table 2. Anti-complementary activities and chemical compositions of the polysaccharide fractions obtained by cetavlon treatment of CC-1

	CC-2	CC-3	CC-4	CC-5
ITCH <sub>50</sub> <sup>1)</sup>	87.3	83.2	82.1	90.1
Total sugar	60.0	79.3	86.5	91.0
Uronic acid	35.3	17.9	16.1	11.0
Protein	36.8	19.8	10.6	3.6
Yield	43.2	30.1	18.2	8.5
Component sugar (molar ratio)				
Rhamnose	0.52	0.10	0.35	1.41
Arabinose	2.55	0.55	1.44	2.62
Xylose	1.33	trace	0.69	1.42
Mannose	0.30	0.29	0.53	1.30
Galactose	1.00	1.00	1.00	1.00
Glucose	1.37	0.11	0.61	1.69
Mannuronic acid	0.35	trace <sup>2)</sup>	trace	trace
Galacturonic acid	8.87	2.56	0.87	0.16
Glucuronic acid	1.23	0.16	0.10	0.46

<sup>1)</sup>Anti-complementary activity at 1 mg/mL concentration of each fraction.

<sup>2)</sup>Detected less than 0.10.

43.2%로 가장 높았다(Table 2). 총당 함량은 CC-2<CC-3<CC-4<CC-5 순서로 나타났으며 산성당과 단백질 함량은 반대의 경향을 보여 CC-2에서 각각 35.3% 및 36.8%로서 가장 높았다. 주요 성분인 CC-2의 구성당은 galacturonic acid, arabinose, xylose, glucose, glucuronic acid가 높은 비율로 함유되어 있었다(Table 2).

#### 보체계 활성화 본체의 확인

60.3%의 당과 32.8%의 단백질로 구성되어 있는 고분자 성분인 CC-1에서 보체계 활성화 본체를 파악하기 위하여 pronase처리에 의한 단백질 분해 및 periodate를 이용한 다당부위를 선택적으로 산화시킨 후, 각각의 활성을 대조군인 CC-1과 함께 조사한 결과(Fig. 2) pronase 처리한 CC-1에서는 보체계활성능을 그대로 유지한 반면 CC-1의 periodate 산화물은 활성이 50% 이하로 감소되었다. 이는 현재까지 알려진 보체계 활성화 물질들이 대부분 식물체로부터 분리된 다당들<sup>(16-19)</sup>인 것과 마찬가지로, 계지 중의 보체계 활성화 물질도 다당성분으로 확인되었다.

#### 보체계 활성화 다당의 정제

Cetavlon 처리로 얻은 4성분중 수열면과 활성이 높은 CC-2에 대하여 DEAE-Toyopearl 650C 이온교환 크로마토그래피를 행하여(크로마토그램 생략) 얻어진 8개의 성분에 대하여 보체계 활성능을 측정된 결과(Fig. 3)

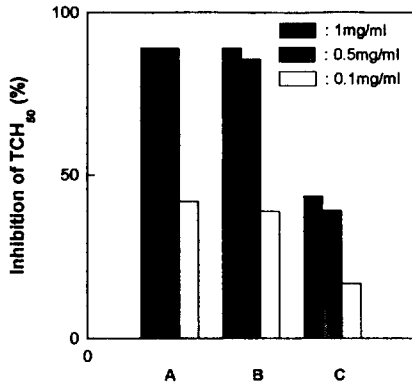


Fig. 2. Anti-complementary activity of pronase digested or periodate oxidized CC-1. A: Native CC-1, B: Pronase digested CC-1, C: Periodate oxidized CC-1.

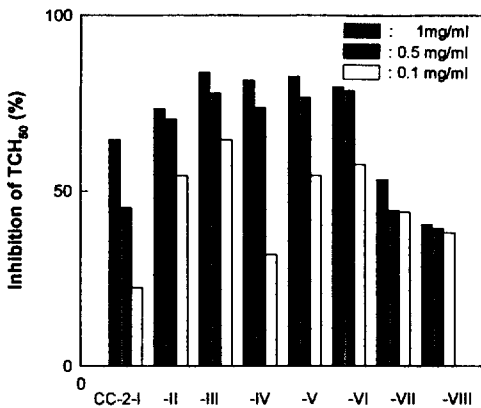


Fig. 3. Anti-complementary activities of CC-2 subfractions separated by ion exchange chromatography using DEAE-Toyopearl 650C.

비흡착 획분인 CC-2-I과 1 M, 2 M NaCl 용액으로 용출된 CC-2-VII, CC-2-VIII를 제외하고는 비교적 높은 활성을 보였지만 CC-1에 비해서 항보체 활성이 크게 증가하지는 않았다. 이는 음이온 교환 크로마토그래피를 행하여 나온 획분중 CC-2-III, CC-2-IV, CC-2-V가 물에 녹지않는 불용성 다당 획분으로 얻어져 항보체 활성 측정시 증류수에 용해시키는 대신 초음파 처리를 통하여 고르게 분산시켜 제조한 다당의 분산용액에서 활성을 측정한 결과라 생각된다. 이러한 불용성 다당 획분의 출현은 단백질과 다당들이 서로간의 상호결합으로 얽혀있는 입체적 구조에서 친수성 부분(hydrophilic group)으로 외부표면을 구성하고있는 다당들이 비슷한 이온 강도를 지닌 다당 분획들로 해리되어 용출된 결과 내부에 존재하던 불용성 다당 획분들이 얻어진 것으로 추정되었다. CC-2-III 획분을 Sephadex G-100 겔

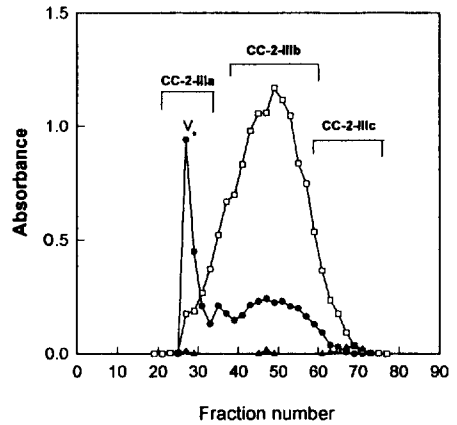


Fig. 4. Gel permeation chromatography of CC-2-III using Sephadex G-100. ●—●: Total sugar (490 nm), □—□: Uronic acid (520 nm), ▲—▲: Protein (280 nm). The column (2.5×76 cm) of Sephadex G-100 was eluted with 0.5 M NaCl at flow rate of 0.3 mL/min.

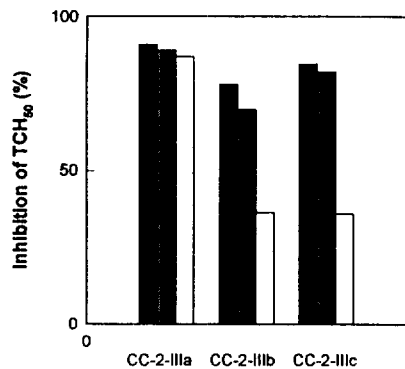


Fig. 5. Anti-complementary activities of CC-2-III subfractions separated by Sephadex G-100. ■: 1 mg/mL, ▨: 0.5 mg/mL □: 0.1 mg/mL.

여과 크로마토그래피에서 CC-2-IIIa, -IIIb, 및 -IIIc의 세 획분으로 분리되었다(Fig. 4). 이들 중 항보체 활성은 void volume에서 용출된 CC-2-IIIa 획분이 0.1 mg/ml 농도에서도 85%이상으로 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 5). Void 부분의 CC-2-IIIa 획분을 Sepharose CL-6B 겔 여과를 이용하여 재분획을 실시한 결과(Fig. 6) 물에 불용성인 CC-2-IIIa-1, -IIIa-2, -IIIa-3의 3획분으로 다시 분리되었다. 이들 획분중에서 CC-2-IIIa-2, -IIIa-3이 1 mg/mL 농도에서 84%, 94.0%로 비교적 높은 보체계 활성능을 나타내었으나, 분자량이 가장 큰 CC-2-IIIa-1의 경우는 70%로 활성이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 7). 활성이 가장 높은 CC-2-IIIa-3은 다시 겔 여과하여 하나의 획분으로 얻을 수 있었으며 GPC column을 이용한 HPLC에 의해서도 단일 peak로 나타나 계지로부터

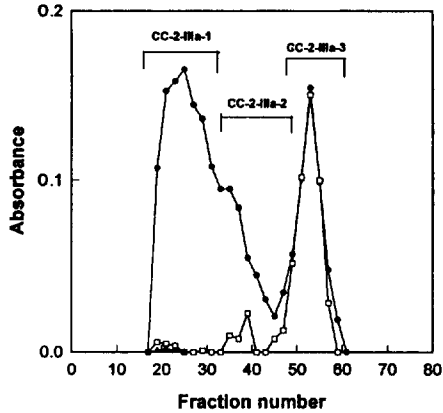


Fig. 6. Chromatographic behavior of CC-2-IIIa on Sepharose CL-6B. ●-●: Total sugar (490 nm), □-□: Uronic acid (520 nm), ▲-▲: Protein (280 nm) The column (2.5×76 cm) of Sephadex G-100 was eluted with 0.5 M NaCl at flow rate of 0.3 mL/min.

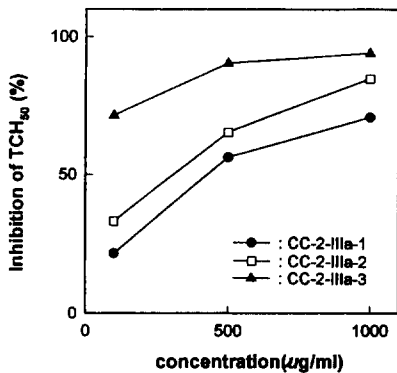


Fig. 7. Anti-complementary activities of CC-2-IIIa sub-fractions separated by Sepharose CL-6B.

터 거의 순수하게 정제된 보체계 활성화 다당 CC-2-IIIa-3을 얻을 수 있었다(Fig. 8).

#### 정제 다당의 화학적 특성

최종적으로 정제된 산성 다당체인 CC-2-IIIa-3은 Sepharose CL-6B column을 이용하여 분자량을 표준 dextran들과 비교 측정한 결과 약 240,000 정도의 분자량을 가진 다당임을 알 수 있었다(Fig. 9). 그동안 본 연구실에서 분리한 보체계 활성화 다당들의 분자량과 비교해보면 시호 중의 중성다당인 BR-5-I (M.W. 18,000)<sup>(20)</sup>과 고추 중의 산성다당인 CAP-IIIb (M.W. 36,000)<sup>(21)</sup>, 및 대복피중의 복합중성다당인 AC-2-IIIc (M.W. 120,000)<sup>(22)</sup> 보다는 높은 수준이었으며, 고사리에서 분리한 산성복합다당들인 PA-IIa-1 (M.W. 1,000,000) PA-IIa-2 (M.W. 450,000) 및 HPA-2-IVa (M.W.

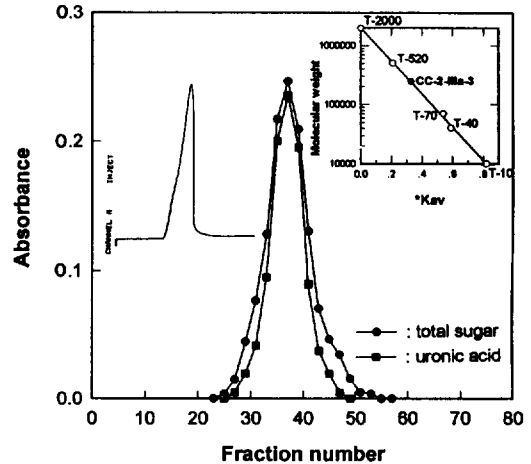


Fig. 8. Homogeneity of CC-2-IIIa-3 on HPLC and Sepharose CL-6B, and the molecular weight determination. The column (2.5×90 cm) of Sepharose CL-6B was eluted with 0.5 M NaCl. T-2000, T-500, T-70 and T-10 are standard dextrans of  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $7 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$  molecular weight. HPLC was performed on a Waters model 510 equipped with RI detector and column (0.4×54 cm) of Shodex ionpack S805 developed with 0.2 M NaCl.

500,000)<sup>(23)</sup> 보다는 낮은 수준을 나타내었다. Yamada 등은 보체계 활성화 다당들에서 일반적으로 분자량이 클수록 높은 활성을 나타내는 경향이 있다고 하였으나<sup>(24)</sup> 본 연구의 정제과정 얻어진 각획분들의 활성을 비교할 때 이러한 경향이 뚜렷하지는 않았다(Fig. 5, 7). 계지에서 정제된 CC-2-IIIa-3 정제다당의 보체계 활성화능(ITCH<sub>50</sub>)은 1 mg/ml의 농도에서 94%로서 고사리중의 PA-IIa-1이나 HPA-IVa보다 높았으며<sup>(23)</sup> 대복피 중의 AC-2-IIIc 보다는 낮은 수준<sup>(22)</sup>을 보임으로써 Yanahira<sup>(25)</sup>와 Otani<sup>(26)</sup> 등의 주장대로 다당의 분자량과 활성간에 뚜렷한 유의성이 없는 것으로 생각되었다.

CC-2-IIIa-3 정제다당의 화학적조성을 다른 획분들(CC-2-IIIa-1, CC-2-IIIa-2)과 비교한 결과(Table 3) 산성당이 41.1%로서 가장 많이 함유되어 있었으며 단백질은 전혀 검출되지 않은 순수 산성다당으로 확인되었다. 구성당은 arabinose, xylose, galacturonic acid, glucuronic acid가 5.56:3.77:5.12:3.13의 높은 비율로 존재하였고 그 외에도 rhamnose, galactose, glucose가 1.00:1.00:1.87의 비율로 함유되어 있었다. 현재까지 보고된 보체계 활성화 다당들은 구성당 조성에서 뚜렷한 공통성이 없는 다양성을 보여주고 있으며<sup>(16-22)</sup> 버섯 유래의 항암성 다당류들이 주로 β-1,3-glucan 및 β-1,6-glucan으로 구성된 단순다당류인 경우가 많은 것과는 달리<sup>(27,28)</sup> 산성 복합다당류들이 많이 보고되어 있다. 따라서 보체계

**Table 3. Chemical compositions and yields of sub-fractions obtained from CC-2-IIIa using Sepharose CL-6B column chromatography**

	CC-2-IIIa-1	CC-2-IIIa-2	CC-2-IIIa-3
			(%)
Total sugar	96.8	98.3	99.2
Uronic acid	3.2	10.3	41.1
Protein	2.9	0.2	0.0
Yield	50.3	19.4	30.3
	Component sugar (molar ratio)		
Rhamnose	0.66	0.09	1.00
Arabinose	12.37	2.82	5.56
Xylose	8.38	1.83	3.77
Mannose	0.76	0.29	0.57
Galactose	1.00	1.00	1.00
Glucose	3.89	0.93	1.87
Mannuronic acid	0.00	0.11	0.48
Galacturonic acid	0.36	0.56	5.12
Glucuronic acid	0.25	1.23	3.13

활성화 다당들에서 구성당의 조성이 활성화에 직접적인 영향을 미치지 않는다는 사실에 의한 전기적 성질이 활성화에 관여할 수 있다는 가설하에 산성당의 역할과 작용부위에 관한 기초연구가 진행되고 있다<sup>(29)</sup>.

한편, 자근(*Lithospermum euchromum*)에서 분리된 arabinan, 차전자 중의 Planto mucilage A, 세균 세포벽 중의 lipopolysaccharide 등은 보체계 활성화 과정에서 고전경로 및 부경로를 동시에 활성화하며, lentinan, inulin, zymosan, pachyman 등의 몇가지 불용성 다당들은 주로 부경로(alternative pathway)를 통하여, lipid A와 penicilatan 등은 고전경로를 통하여 보체계 활성화를 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>(30)</sup>. 계지에서 분리된 보체계 활성화 다당인 CC-2-IIIa-3도 불용성 다당으로 확인되었으므로 보체계 활성화 과정에서 면역 복합체의 관여없이 개시되는 부경로를 통하여 보체계를 활성화할 가능성이 높다고 보겠다. 따라서 이에 대한 자세한 활성화 경로연구와 다당의 활성화부위를 포함한 구조결정 및 활성화와 구조간의 상관성에 관한 진전된 연구들이 계속 필요하리라 본다.

## 요 약

계피나무의 어린가지인 계지의 열수추출물에서 높은 보체계 활성화효과(항보체 활성화)를 발견하여 대량으로 열수추출한 추출물(CC-0)에 대하여 메탄올 환류, 에탄올 침전, 투석, 동결건조를 실시하여 메탄올과 에탄올에 비가용성인 고분자 획분(CC-1)에서 증가된 활성을 보였다. 60.3%의 당과 32.8%의 단백질로 구성되

어 있는 CC-1 획분에서 보체계 활성화 본체를 파악하기 위하여 pronase처리에 의한 단백질 분해 및 periodate를 이용한 다당부위를 선택적으로 산화시킨 후, 각각의 활성을 조사한 결과 pronase 처리한 CC-1에서는 보체계활성 효과를 그대로 유지한 반면, CC-1의 periodate 산화물은 CC-1에 비하여 활성이 50% 이하로 감소한 사실로부터 보체계 활성화 물질이 다당임을 확인하였다. CC-1을 양이온 계면 활성제인 cetavlon으로 처리 후 CC-2, CC-3, CC-4 및 CC-5의 4획분으로 분리하였으며 수율과 활성이 가장 높은 CC-2분획을 음이온 교환 수지인 DEAE-Toyopearl 650C column에 흡착시켜 비흡착획분(CC-2-I)과 7개의 흡착획분(CC-2-II→CC-2-VIII)으로 분획하였다. 이 중 0.2 M NaCl로 용출된 CC-2-III 획분을 Sephadex G-100 및 Sepharose CL-6B 겔여과 크로마토그래피를 행하여 주요 활성화다당체인 CC-2-IIIa-3를 최종적으로 정제하였다. HPLC상에서 거의 순수한 단일 peak로 확인된 CC-2-IIIa-3는 41.1%의 산성당을 함유하는 산성 다당체로서 분자량은 240,000으로 확인되었다. CC-2-IIIa-3의 항보체 활성화(ITCH<sub>50</sub>)은 1 mg/ml의 농도에서 대조군의 94%를 나타내었으며 구성당 조성은 arabinose, xylose, glucose, galactose, galacturonic acid 및 glucuronic acid가 5.56:3.77:1.87:1.00:5.12:3.13의 비율로 존재하였다.

## 문 헌

- Porter, R.R. and Reid, K.B.M.: The biochemistry of complement. *Nature*, **275**, 699 (1978)
- Egweg, T.G. and Befus, A.D.: The role of complement in the induction and regulation of immune responses. *Immunology*, **15**, 207 (1984)
- 한덕용 : 現代生藥學, 學窓社, 서울, p.214 (1989)
- Otsuka, H., Fujioka, S., Kimiya, T., Mizuta, E. and Takamoto, M.: Studies on anti-inflammatory agents. VI. Anti-inflammatory constituents of *Cinnamomum sieboldii* Meissn. *Yakugaku-zasshi*, **102**, 162 (1982)
- Nagai, H., Shimazawa, T., Matsuura, N. and Koda, A.: Immunopharmacological studies of the aqueous extract of *Cinnamomum cassia* (CCAq) I. *J. Pharmacol.*, **32**, 813 (1982)
- Nagai, H., Shimazawa, T., Takizawa, T. and Koda, A.: Immuno pharmacological studies of the aqueous extract of *Cinnamomum cassia* (CCAq) II. *J. Pharmacol.*, **32**, 823 (1982)
- Tanaka, S., Yoon, Y., Fukui, H., Tanaka, M. and Akira, T.: Antiulcerogenic compounds isolated from chinese Cinnamon. *Planta Med.*, **55**, 235 (1989)
- Ohtani, K., Mizutani, K. and Hatono, S.: Sanchinan-A, A reticuloendothelial system activating arabinogalactan from Sanchi-Ginseng (roots of *Panax notoginseng*).

- Planta Med.*, **53**, 166 (1987)
9. Harada, M. and Yono, S.: Pharmacological studies on chinese cinnamon II. Effects of cinnamon aldehyde on the cardiovascular and digestive system. *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 941 (1975)
  10. Dubios, M.K.A., Hamilton, T.K., Rebers, P.A. and Sonisth, F.: Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
  11. Blumenkronz, N. and Asboe-Hansen, G.: New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, **54**, 484 (1973)
  12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L. and Rindall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256 (1951)
  13. Jones, T.M. and Albersheim, P.O.: A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharide. *Plant Physiol.*, **49**, 926 (1972)
  14. Kabat, E. A. and Mayer, M. M.: Complement and complement fixation. In *Experimental Immunology*, Charles C Thomas Publisher, Illinois, p.133 (1964)
  15. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Kojima, Y., Kumazawa, Y. and Otsuka, Y.: Studies of polysaccharides from *Angelica acutiloba*. part I. Fractionation and biological properties of polysaccharides. *Planta Med.*, **50**, 163 (1984)
  16. Gao, Q.P., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Yamada, H.: Chemical properties and anti-complementary activities of polysaccharides fractions from roots and leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Planta Med.*, **55**, 9 (1989)
  17. Yamada, H. and Kiyohara, H.: Structure of the neutral carbohydrate side chains in anti-complementary acidic polysaccharides from the root of *Angelica acutiloba* KITAGAWA. *Carbohydr. Res.*, **187**, 255 (1989)
  18. Zhao, I.F., Kiyohara, H., Matsumoto, T. and Yamada, H.: Anti-complementary acidic polysaccharides from roots of *Lithospermum euchromum*. *Phytochemistry*, **34**, 719 (1993)
  19. Yamada, H., Yanahira, S., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y.: Characterization of anti-complementary acidic heteroglycans from the seed of *Coix lacrym-jobi* var. *ma-yuen*. *Phytochemistry*, **26**, 3269 (1987)
  20. Yamada, H., Ra, K.S., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Yang, H.C. and Otsuka, Y.: Characterization of anti-complementary neutral polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum*. *Phytochemistry*, **27**, 3163 (1988)
  21. Ra, K.S.: Purification and chemical properties of anti-complementary polysaccharides from the Roots of *Bupleurum falcatum* L. and the fruits of *Capsicum annuum* L., Ph.D. Thesis, Korea Univ., Seoul (1990)
  22. Shin, K.S., Cho, H.Y., Sung, H.C. and Yang, H.C.: Action mode of the anti-complementary polysaccharide purified from *Arecae Pericarpium*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **35**, 462 (1992)
  23. Kweon, M.H., Sung, H.C., and Yang, H.C.: Acidic heteroglycans with anti-complementary activity from the water extract of *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. *Foods and Biotechnology*, **3**, 83 (1994)
  24. Yamada, H. and Kiyohara, H.: Bioactive polysaccharides from Chinese herbal medicines, *Abstract of Chinese Medicines*, **3**, 104 (1989)
  25. Yanahira, S., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y.: Characterization of anti-complementary acidic heteroglycans from the seed of *Coix lacrym-jobi* var. *ma-yuen*. *Phytochemistry*, **26**, 3269 (1987)
  26. Otani, K., Mizutani, K., Hatono, S., Kasai, R., Sumino, R., Tomoko, S., Ushijima, M., Zhou, J., Fuwa, T. and Tanaka, O.: Sanchinan-A, a reticuloendothelial system activating arabinogalactan from San chi-ginseng. *Planta Med.*, **52**, 166 (1986)
  27. Hirase, S.: Structural studies on the anti-tumor active polysaccharide from *Corilous versicolor* (Basidiomycetes) II. Structures of  $\beta$ -D-glucan moieties of fractionated polysaccharides. *Yakugaku-zasshi*, **96**, 419 (1976)
  28. Iino, K., Ohno, N., Susuki, I., Miyazaki, T. and Yadamae, T.: Structural characterization of a neutral anti-tumor  $\beta$ -D-glucan extracted with hot sodium hydroxide from cultured fruit bodies of *Grifora frondosa*. *Carbohydr. Res.*, **141**, 111 (1985)
  29. Yamada, H., Nagai, T., Cyong, J.C. and Otsuka, Y.: Relationship between chemical structure and activity potencies of complement by an acidic polysaccharide, *Plantago-muciliga* A from the seed of *Plantago asiatica*. *Carbohydr. Res.*, **156**, 137 (1986)
  30. Yamada, H., Nagai, T., Cyong, J.C. and Otsuka, Y.: Mode of complement activation by acidic heteroglycans from the leaves of *Artemisia princeps* PAMP. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2077 (1991)
  31. Wang, H.X., Liu W.K., Ooi, V.E.C. and Chang, S.T.: Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide from a mycelial culture of *Tricholoma* sp. a local edible mushroom. *Life Sci.*, **59**, 269 (1995)

---

(1996년 8월 5일 접수)