

## 감잎(*Diospyros kaki* L.)으로부터 정제한 보체계 활성화 다당류

정영주 · 전 혁 · 김경임 · 안정희 · 신동훈 · 홍범식\* · 조홍연 · 양한철  
 고려대학교 생명공학원

### Purified Polysaccharide Activating the Complement System from Leaves of *Diospyros kaki* L.

Yung-Joo Jung, Hyug Chun, Kyung-Im Kim, Jeung-Hee An, Dong-Hoon Shin  
 Bum-Shik Hong\*, Hong-Yon Cho and Han-Chul Yang

Graduate School of Biotechnology, Korea University

Cold and hot water fractions of *Diospyros kaki* were screened to determine its anti-complementary activity. Flour of *Diospyros kaki* leaf (250 g) was boiled at 100°C for 3 h and passed through a membrane of 10 kDa molecular weight (DK-0). DK-0 was precipitated with ethanol and refluxed with methanol to obtain the crude polysaccharide (DKC). DKC-1 was isolated by ion exchange chromatography on DEAE-Toyopearl 650C, and DKC-1c was purified from DKC-1 by size exclusion chromatography on Bio gel P-60. The anti-complementary activities of DKC-1c at 1000 µg/mL were 85.4 and 61.1% via whole and alternative pathways, respectively. DKC-1c was determined as a neutral polysaccharide composed of glucose (29.0 mol.%), arabinose (24.3 mol.%), and galactose (16.2 mol.%) with the molecular weight of 66.6 kDa. Results of agarose gel immunoelectrophoresis revealed DKC-1c, as a complement activator, cleaved C3 into C3a and C3b via both pathways.

**Key words:** *Diospyros kaki*, anti-complementary activity, complement activator, C3 cleavage

#### 서 론

감나무(*Diospyros kaki*)는 중부이남에 분포하고 있는 낙엽 활엽 교목에 속하며, 특히 잎에는 레몬의 20배 이상인 비타민 C가 많이 함유되고 있어 건강차로 애용되고 있다. 감잎차는 비타민 C 및 B, 무기질이 많이 함유되어 있으며 그 외에 flavonoid 배당체, tannin, polyphenols 등이 많이 함유되어 있다<sup>(1,3)</sup>. 감잎의 효능으로는 혈액 순환을 원활하게 하고 혈관을 튼튼하게 하여 괴혈병, 빈혈, 심장병, 동맥경화와 뇌출혈에 효과적이며<sup>(4)</sup> 고혈압의 원인이 되는 angiotensin converting enzyme에 대한 억제효과<sup>(5)</sup>와 콜레스테롤 저하능<sup>(6)</sup>이 보고되고 있다. 그러나 지금까지 일반 면역계에 미치는 영향에 대해서는 거의 연구가 이루어지지 않았다.

보체계(complement system)는 1차 면역 체계로써 항원 항체 복합체의 C1q로의 결합에 의하여 활성화되는 고전적 경로와 혈액 중에 존재하는 C3b에 B인자, D인자가 관여하여 lipopolysaccharide<sup>(7)</sup>, 내독소(endotoxin)<sup>(8)</sup>, zymosan<sup>(9)</sup> 등의

activator에 의해 비특이적으로 활성화되는 부경로, 세포벽에 존재하는 mannose에 특이적으로 결합하는 lectin에 의해서 활성화되는 lectin 경로의 3가지 경로에 의해서 활성화되는 것으로 알려져 있다. 보체계가 활성화되면 연속적인 cascade반응에 의해서 활성화된 보체분자로 분해되고 이들 보체분자들이 각종 생리반응을 매개한다<sup>(10)</sup>. 지금까지 밝혀진 천연물 유래의 보체계활성화에 관여하는 물질들은 표고버섯(*Lentinus edodes*)에서 분리한 lentinan<sup>(11)</sup>과 구름버섯(*Coliolum versicolor*)에서 분리한 PSK(polysaccharide K)<sup>(12)</sup>가 있으며 최근에는 western larch에서 분리된 arabinogalactan<sup>(13)</sup>이 상업화에 성공하여 항암제로써 사용되고 있다. 이들 다당류는 화학제제에 비해서 숙주에 대한 부작용이 거의 나타나지 않는 특징을 가지고 있다. 지금까지 보고된 천연 다당류는 당귀(*Angelica acutiloba*)의 pectic arabinogalactan<sup>(14)</sup>, 시호(*Bupleurum falcatum*)의 산성 다당류와 arabinan<sup>(15)</sup>, 인삼(*Panax ginseng*)의 acidic heteroglucan<sup>(16)</sup>, 질경이(*Plantago major*)에서 분리된 pectin<sup>(17)</sup> 등이 보고되어져왔다. 이들 다당류는 항보체 활성화과 더불어 mitogen 활성화<sup>(18)</sup>, 항종양 효과<sup>(19)</sup>, 항염증 효과<sup>(20)</sup>, 식세포강화작용<sup>(21)</sup>을 가지는 것으로 보고되었다. 한편, Yamada 등은 보체계 활성화 다당류에 대한 연구에서 rhamnagalacturon core구조가 중요하다고 보고하였다<sup>(22)</sup>.

따라서 본 연구에서는 건강차로 애용되고 있는 감잎의 면역증강효과를 항보체 활성을 통하여 검토하였고 감잎 열수

\*Corresponding author : Bum-Shik Hong, Graduate School of Biotechnology, Korea University, 5-1 Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea  
 Tel: 82-2-3290-3926  
 Fax: 82-2-923-8733  
 E-mail: bshong@korea.ac.kr

추출물로부터 활성 다당류를 정제하고 그 특성을 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료 및 시약

본 실험에 사용한 감잎은 충북 영동산으로 경동 한약제 시장에서 구입하였다. 항보체 활성측정에 사용한 양의 감작 적혈구(IgM hemolysin-sensitized sheep erythrocyte, EA cell)는 일본 Bio test사로부터 구입하였고 부경로 활성측정에 사용한 토끼 적혈구는 대한 Bio-link(주)로부터 구입한 토끼로부터 채혈 후, 생리식염수로 수세하여 획득하였고 4°C에서 보관하며 사용하였다. 혈청(normal human serum, NHS)은 실험실의 건강한 성인의 혈액으로부터 제조하여 -30°C에서 냉동보관하며 실험시 녹여서 사용하였다. 면역 전기영동에는 anti-human C3 혈청(in goat developed, Sigma Co. St. Louis, MO), agarose(Bethesda Research Laboratories Co., Gaithersburg, MD), Coomassie brilliant blue RG-250(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)등을 사용하였다. 정제에 사용한 resin은 DEAE-Toyopearl 650C(Tosoh Co., Japan)와 Bio-gel P60(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)이었다. 그 외의 시약은 시약 일급 또는 특급을 사용하였다.

#### 일반 성분 분석

전당의 함량은 glucose를 표준 물질로 하여 phenol-sulfuric acid법<sup>(23)</sup>으로, 산성당 함량은 α-D-galacturonic acid를 표준 물질로 하여 m-hydroxydiphenyl법<sup>(24)</sup>으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Lowry법<sup>(25)</sup>으로 각각 정량하였다. 구성 단당류의 분석은 Jones 등의 방법<sup>(26)</sup>에 따라 시료(1~3 mg)를 2 M TFA(trifluoacetic acid)로 121°C에서 2시간 동안 가수분해한 후 NaBH<sub>4</sub>를 사용하여 중성당을 alditol로 환원시킨 후 acetic anhydride를 이용하여 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography(GLC)로 구성 단당류를 분석하였다. GLC의 분석조건은 SP-2380(Supelco Co. Bellefonte, PA) column이 장착된 Yong Lin MD600(Yon Lin Co., Korea, FID detector) 기종을 사용하여 oven 온도를 230°C(10 min) → 250°C(2.5°C/min, 10 min)으로 프로그래밍하여 gas liquid chromatography를 실시하였다. 이때 이동상은 N<sub>2</sub> gas(1.0 mL/min)을 사용하였고 각 표준 단당류의 alditol acetate 유도체의 체류시간과 비교하여 시료중의 mol.%를 각 peak의 면적비와 단당류 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

#### 항보체 활성 측정

항보체 활성은 Mayer법<sup>(27)</sup>을 이용하여 시료에 의한 보체계 활성화능을 시료대신 3차 증류수만을 반응시킨 대조군의 총 보체 용혈(50% total complement hemolysis, TCH50)에 대한 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH50%)로서 나타내었다. 부경로 활성측정<sup>(28)</sup>은 GVB<sup>2+</sup> buffer와 EA cell 대신에 Mg<sup>2+</sup>-EGTA-GVB<sup>2-</sup> buffer와 토끼의 적혈구를 사용하여 양 경로(total complement pathway) 활성 측정법과 동일한 방법으로 활성을 측정하였다.

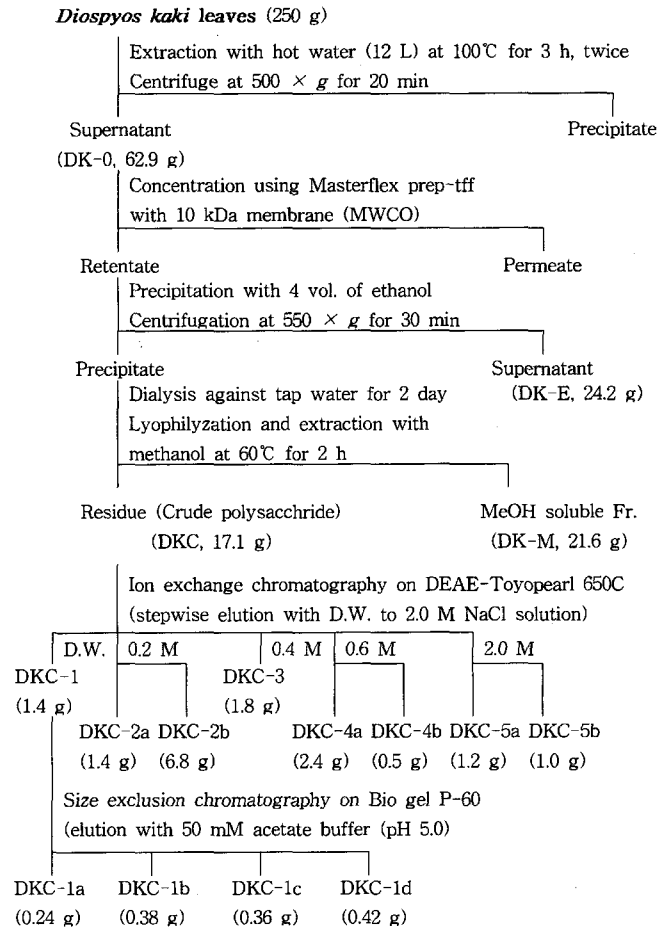


Fig. 1. Extraction and purification procedure of DKC-1c from *Diospyos kaki*.

#### Immuno-electrophoresis

Morrison 등의 방법<sup>(29)</sup>에 따라 GVB<sup>2+</sup> buffer, Mg<sup>2+</sup>-EGTA-GVB<sup>2-</sup> buffer와 EDTA-GVB<sup>2-</sup> buffer에 정상인 혈청과 정제 다당류 DKC-1c를 동량 혼합하여 37°C에서 30분간 각각 반응시켰다. 반응 후, 각 반응액을 barbital buffer(pH 8.6)에 용해시켜 만든 1% agarose gel plate(5×5 cm)의 well에 5-6 μL 씩 loading한 후 4°C에서 약 90분간 1차 전기영동(2.1 mA/cm)을 실행한 후, 다시 C3의 활성화 여부를 관찰하기 위하여 1% anti-human C3 serum이 함유된 1% agarose 상에서 2차 전기영동(1.0 mA/cm)을 4°C에서 약 7시간 동안 실시한 후 침강선(precipitation line)을 확인하였다. 전개된 gel은 0.15 M NaCl 용액으로 3번 정도 세척하여 기타 단백질을 제거한 후 Coomassie brilliant blue RG-250로 염색시키고 다시 탈색시켜 C3의 분해 양상을 관찰하였다.

#### 감잎으로부터 보체계 활성화 다당류의 분리 및 정제

건조시킨 감잎을 마쇄한 후, Fig. 1과 같이 분말 250 g을 12 L 증류수를 가하고 100°C에서 3시간 동안 열수추출하였다. 열수 추출물은 500×g에서 20분간 원심분리하였고 추출 후 남은 잔사에 동일한 조건으로 재추출하여 열수 추출 상등액(DK-0)을 얻었다. DK-0는 Masterflex prep/scale-tff<sup>TM</sup>

**Table 1. Anti-complementary activities of fractions in each purification step**

Fraction	Anti-complementary activity/ITCH <sub>50</sub> (%) <sup>1)</sup>
DK-0	42.6
DK-E	21.5
DK-M	6.5
DKC	44.4
(A) Ion exchange chromatography	
DKC-1	67.6
DKC-2a	44.4
DKC-2b	26.0
DKC-3	49.2
DKC-4a	55.4
DKC-4b	32.4
DKC-5a	28.6
DKC-5b	44.8
(B) Size exclusion chromatography	
DKC-1a	61.3
DKC-1b	67.2
DKC-1c	85.4
DKC-1d	78.8
PSK <sup>2)</sup>	58.4

<sup>1)</sup>All fractions were tested in triplicate at a concentration of 1000 µg/mL.

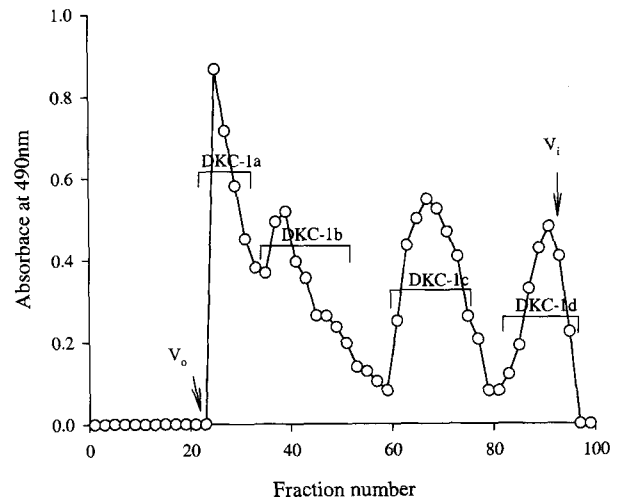
<sup>2)</sup>Polysaccharide-K (PSK) was used as a positive reference.

(Millipore Co. Bedford, MA)와 membrane(10 kDa)을 사용하여 농축 후 4배 부피의 ethanol을 첨가하여 고분자 물질을 침전시켰다. 상등액은 감압농축시킨 후 동결건조하여 ethanol 가용획분인 DK-E를 얻었고 침전물은 투석시킨 후 동결건조한 후 색소 성분을 제거하기 위하여 methanol로 추출(60°C, 1 h, 4 회)하여 색소성분인 DK-M과 조다당류 획분인 DKC를 얻었다. 조다당류 DKC로부터 항보체 활성 다당류를 정제하기 위하여 소량의 증류수에 녹인 후 증류수로 평형화시킨 DEAE-Toyopearl 650C column(CI<sup>-</sup> form, 1.7×30 cm)에 흡착시킨 후 증류수 및 0.2, 0.4, 0.6, 2.0 M NaCl 용액으로 차례로 용출시켜 8개의 획분(DKC-1, -2a, -2b, -3, -4a, -4b, -5a, -5b)으로 분리되었다. DEAE-Toyopearl 650C에서 얻은 주요 활성 획분인 DKC-1를 소량의 acetate buffer(pH 5.0, 50 mM) 용액에 녹인 후 동일한 acetate buffer로 평형화된 Bio-gel P60 column(1.6×95 cm)에서 0.2 mL/min의 유속으로 4°C에서 size exclusion chromatography를 행하여 4개의 획분(DKC-1a, -1b, -1c, -1d)으로 분리하였다. Bio-gel P60에서의 활성 획분인 DKC-1c를 Shodex OH-pak KB805(SEC type, 8×300 mm, Waters Co., Milford, MA) column을 사용하여 HPLC 상에서의 정제도와 분자량을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 감압으로부터 항보체 활성 물질의 분리 및 정제

감압의 활성물질을 분리하기 위하여 감압 250 g을 열수 추출하였다. 열수 추출물 DK-0을 한의여과를 통해 분자량



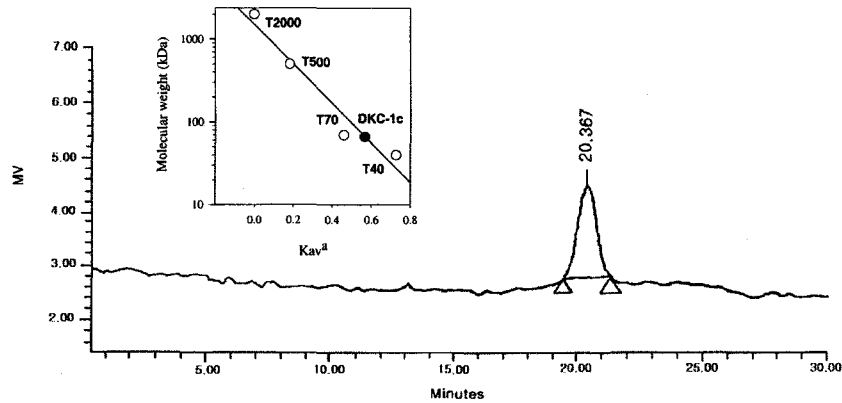
**Fig. 2. Size exclusion chromatography of DKC-1 on Bio gel P-60.**

DKC-1 was loaded on Bio gel P-60 column (1.6×95 cm) and eluted with acetate buffer (pH 5.0, 50 mM) at a flow rate of 0.2 mL/min. Each fraction was collected by 4 mL. V<sub>0</sub>: void volume, V<sub>i</sub>: inner volume.

10 kDa 이상인 농축액을 얻었다. 농축액을 ethanol을 사용하여 침전시켜 상등액인 DK-E를 얻은 후 침전물은 동결건조한 후 methanol에 용출시켜 methanol에 가용성을 나타내는 DK-M과 불용성인 조다당류 DKC을 얻었다. 각각의 시료의 항보체 활성을 측정된 결과(Table 1) positive reference인 LPS에 비해 낮지만 1000 µg/mL에서 ITCH50(%)의 값이 DK-0, DK-E, DK-M, DKC 순으로 42.6, 21.5, 6.5, 44.4%로 나타내었다. 조다당류 DKC로부터 항보체 활성 물질을 정제하기 위하여 DEAE-Toyopearl 650C를 이용하여 이온교환 크로마토그래피를 실시한 결과 8개의 획분으로 분리되었고 이들의 항보체 활성을 측정된 결과(Table 1A), 항보체 활성은 비흡착 획분인 DKC-1이 가장 높게 나타나(67.6%) 항보체 활성 물질로 보고된 PSK(58.4%)보다 높은 활성을 보였다. DEAE-Toyopearl 650C에서 비흡착 획분인 DKC-1를 Bio-gel P60에 의해 size exclusion chromatography를 행하였다. DKC-1은 Bio-gel P60을 사용하여 용출한 결과(Fig. 2) DKC-1a, -1b, -1c, -1d의 4개의 획분으로 분리되었고 각 획분의 항보체 활성을 측정된 결과 항보체 활성은 LPS보다 모든 획분에서 높게 나타났으나 DKC-1c가 다른 획분(DKC-1a, -1b, -1d)에 비해서 우수한 활성(85.4%)을 나타내었다(Table 1B). 일반적인 면역증강활성에서 보여지는 활성의 불변현상과는 차이를 나타내었다. 정제 다당류 DKC-1c는 HPLC상에서 단일 peak를 나타내었고 동일 column상에서 표준 dextran을 이용하여 column 내의 체류시간과 분자량의 plot으로부터 정제다당류 DKC-1c의 분자량을 계산한 결과 DKC-1c는 66.6 kDa 정도의 분자량을 나타내는 것으로 추정되었다(Fig. 3).

### 정제에 따른 화학적 조성의 변화

정제에 따른 화학적 조성의 변화를 검토하였다. DEAE-Toyopearl 650C를 통해서 분리한 각 획분의 화학적 조성구성당을 분석한 결과(Table 2) 조다당류의 경우 전당의 함



**Fig. 3. HPLC profile and the molecular weight determination of DKC-1c.**

DKC-1c was injected into the column of Shodex OH-pak KB805 and eluted with 0.2 M NaCl solution at a flow rate of 0.5 mL/min. The molecular weight of DKC-1c was estimated as 66.6 kDa.  $^dKav = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ ,  $V_e$ : elution volume,  $V_t$ : total volume,  $V_0$ : void volume.

량이 43.8%이고 산성당 16.7%, 단백질 33.4%를 나타내었으나 ion exchange chromatography상에서 분리된 각획분의 화학적 조성과 구성당은 활성획분인 DKC-1의 경우 전당의 함량이 62.7%로 DKC보다 20% 정도 증가가 이루어졌으며 비흡착획분이므로 0.2%의 산성당 함량을 나타내었고 단백질 함량도 18.9%로 감소되었다. 한편, 구성당의 변화에서는 조다당류(DKC)에서 가장 많이 포함된 arabinose와 rhamnose의 경우 DKC-1에서는 71.2 mol.%와 17.1 mol.%에서 각각 54.4 mol.%와 0.2 mol.%로 감소하는 경향을 나타내었으며 galactose와 glucose의 경우에는 3.8 mol.%와 2.0 mol.%에서 각각 12.2 mol.%와 25.9 mol.%로 큰 폭으로 증가되었다.

DEAE-Toyopearl 650C에서 분리된 활성획분인 DKC-1을 Bio-gel P60에서 분리한 활성획분 DKC-1c의 화학적 조성을 확인한 결과 Table 2와 같이 전당함량은 43.8%에서 69.5%로 증가되었으나 산성당과 단백질은 각각 16.7%와 33.4%에

서 감소하여 정제다당류에서는 거의 검출되지 않았다. 구성당의 경우, DKC-1에서 54.4 mol.%를 나타낸 arabinose가 24.3 mol.%로 크게 감소되었고 galactose와 glucose 함량은 16.2 mol.%와 29.0 mol.%로 약간 증가하였다. 이러한 결과는 정제 다당류 DKC-1c가 기존에 보고된 arabinogalactan<sup>(13)</sup>, pectic polysaccharide<sup>(14-16)</sup>나 glucan<sup>(30)</sup>과는 다른 구조를 갖는 다당류로 추정되었다. 따라서 정제 다당류의 구조에 대한 연구가 이루어져 구조와 활성의 관계를 검토해야 할 것으로 사료되었다.

#### 정제 다당류의 보체계에서의 활성

정제 다당류 DKC-1c의 각 경로에서의 dose-response curve를 작성한 결과, 농도의 증가에 따라 고전경로와 부경로 모두에서 항보체 활성이 뚜렷이 증가하는 경향을 나타내었다

**Table 2. Changes of chemical composition of the anti-complementary polysaccharide obtained from each purification step**

	DKC	DKC-1	DKC-1c
Carbohydrate % (w/w) <sup>1)</sup>	43.8	62.7	69.5
Uronic acid % (w/w) <sup>2)</sup>	16.7	0.2	n.d.
Protein % (w/w) <sup>3)</sup>	33.4	18.9	n.d.
Yield % (w/w) <sup>4)</sup>	16.0	8.1	46.1
Structural sugar composition (mol. %)			
Rhamnose	17.1	0.2	3.2
Fucose	0.2	0.7	4.1
Arabinose	71.2	54.4	24.3
Xylose	1.3	1.0	9.3
Mannose	4.3	5.6	13.9
Galactose	3.8	12.2	16.2
Glucose	2.0	25.9	29.0

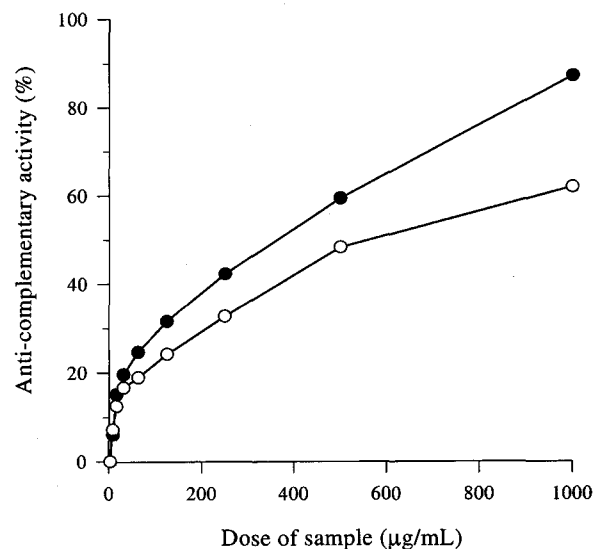
<sup>1)</sup>α-D-Glucose as a standard.

<sup>2)</sup>β-D-Galacturonic acid as a standard.

<sup>3)</sup>Bovine serum albumin as a standard.

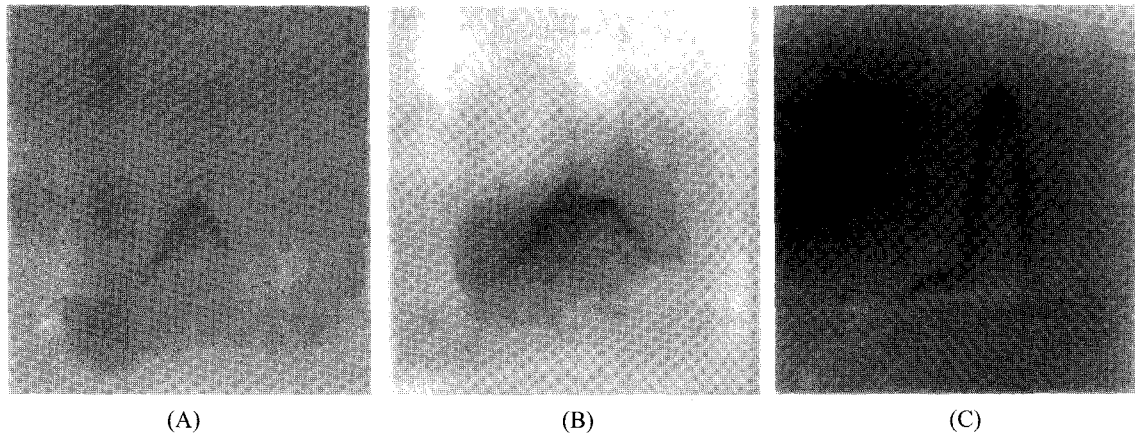
<sup>4)</sup>The yield was calculated from the active fraction of the previous purification step.

n.d.: not detectable.



**Fig. 4. Dose-response curve of the purified polysaccharide from the leaves of *Diospyos kaki*.**

For the determination of  $ITCH_{50}$  (%), DKC-1c was incubated with equal volume of serum and  $GVB^{2+}$ , and then the reaction mixture was reincubated with EA cells.  $IACH_{50}$  (%) was assayed by the same method described above except for using  $Mg^{2+}$ -EGTA- $GVB^{2-}$  and rabbit blood cells instead of  $GVB^{2+}$  and EA cells.



**Fig. 5. Observation of C3 activation by the purified polysaccharide on crossed immunoelectrophoresis.**

Serum was incubated at 37°C for 30 min with an equal volume of EDTA-GVB<sup>2-</sup>(A), Mg<sup>2+</sup>-EGTA-GVB<sup>2-</sup>(B), (C) and DKC-1, respectively. Each reaction mixture was loaded to crossed immunoelectrophoresis by using anti-human C3 sera to locate the C3 cleavage products. The anode is to the left.

(Fig. 4). DKC-1c는 저농도에서는 고전경로와 부경로 모두에서 비슷한 활성을 나타내었지만 농도가 증가함에 따라 부경로 활성의 증가폭이 낮게 나타났다. 그러나 정제 다당류 DKC-1c는 부경로와 고전경로 양쪽 경로 모두를 통해서 보체계를 활성화시키는 것으로 추정되었으며 ITCH50(%)은 1000 µg/mL의 농도에서 85.4%으로 PSK<sup>(12)</sup>(58.4%)에 비해 상당히 높은 활성을 나타내었지만 부경로에서의 활성은 zymosan<sup>(9)</sup>의 72.4%보다 낮은 61.1%의 활성을 나타내었다. DKC-1c의 부경로를 통한 활성은 천연에서 분리된 다당류인 pachyman<sup>(30)</sup> 등의 부경로 activator의 활성보다는 높은 것이었다.

### C3 activation 관찰

보체계 활성화능을 측정하는 방법으로 사용하는 Mayer 법은 용혈 억제 정도를 측정하는데 있어서 1차 반응으로 정상인의 혈청과 시료를 반응시킨다. 이때 시료에 의한 보체의 활성화와 시료에 의한 보체의 억제반응의 결과는 모두 용혈의 억제양상으로 2차 반응 결과 나타나게 된다<sup>(28)</sup>. 따라서 Mayer 법을 통해서 시료가 보체계를 활성화시키는지 아니면 억제시키는지에 대해서 확인할 수 없는 단점이 있다. 따라서 면역 전기영동을 통해서 보체계 활성화 과정 중에서 세 가지 활성화 경로에 공통적이며 가장 중심 단계인 C3의 활성화 여부를 확인하고자 하였다. 정제 다당류 DKC-1c와 반응한 혈청을 agarose gel plate에 1차원 전기영동을 실시하고 이를 다시 1%의 anti-C3 항체가 포함된 agarose gel 상에서 2차 전기영동을 실시하였다. Fig. 5와 같이 정제 다당류 DKC-1c와 혈청이 GVB<sup>2+</sup> buffer에서 반응한 경우는 anti-C3 항체에 대해 동일한 epitope를 가지는 혈청 중의 C3 분해산물인 C3a+C3b의 peak이 높게 형성되었으나 Mg<sup>2+</sup>-EGTA-GVB<sup>2-</sup> buffer에서는 C3a+C3b peak이 낮게 형성되었고 EDTA-GVB<sup>2-</sup> buffer에서 반응한 혈청에서는 C3a+C3b peak이 전혀 형성되지 않았다. 이를 통해서 정제 다당류 DKC-1c는 C3를 C3a와 C3b로 분해하는 것과 고전경로에서 주로 활성화시키는 것을 알 수 있었고 이것은 tube상에서 확인된 결과와 일치하는 것이었다. 따라서 이상의 결과로부터 정제다당류는 complement activator임을 알 수 있었다.

### 요 약

감잎으로부터 항보체 활성물질을 분리정제하기 위해 감잎(250 g)을 100°C에서 3시간 동안 열수 추출하고 분자량 10 kDa membrane을 사용하여 농축한 후 ethanol 침전과 methanol 추출을 통해 조다당류(DKC)를 얻었다. 조다당류의 정제는 DEAE-Toyopearl 650C와 Bio-gel P60을 사용하여 실시하였다. 정제된 DKC-1c는 1000 µg/mL의 농도에서 고전경로를 통해서 85.4% 활성화시켰고 부경로에서는 65.1% 활성화시켰다. 정제 다당류 DKC-1c는 분자량은 66.6 kDa이고 정제도가 높은 중성다당류로서 주요 구성당은 glucose(29.0 mol.%), arabinose(24.3 mol.%), galactose(16.2 mol.%) 순으로 검출되었다. 면역전기영동을 통하여 확인한 결과 DKC-1c는 C3를 부경로에서도 C3a와 C3b로 활성화시키는 complement activator임이 확인되었다.

### 문 헌

1. Joung, S.Y., Lee, S.J., Sung, N.J., Jo, J.S. and Kang, S.K. The chemical composition of persimmon (*Diospyros kaki*, Thumb) leaf tea. *J. Korean Soc. Food Nut.* 24: 720-726 (1995)
2. Choi, S.H. The aroma components of duchung tea and persimmon leaf tea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22: 405-410 (1990)
3. Matsuo, T. and Ito, S. The chemical structure of Kaki tannin from immature fruit of the persimmon. *Agric. Biol. Chem.* 42: 1637-1639 (1978)
4. Funayama, S. and Hikino, H. Hypotensive principles of *Diospyros kaki* leaves. *Chem. Pharm. Bull.* 27: 2865-2868 (1979)
5. Kameda, K., Takaku, T., Okuda, H., Kimura, Y., Okuda, T., Hatano, T., Agata, I. and Arichi, S. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J. Nat. Prod.* 50: 680-683 (1987)
6. Innami, S., Tabata, K. and Shimizu, J. Dried green leaf powders of Jew's mallow (*Corchorus*), Persimmon (*Diospyros kaki*) and sweet potato (*Ipomoea batatas* *poir*) lower hepatic cholesterol concentration and increase fecal bile acid excretion in rats fed a cholesterol-free diet. *Plant Foods Human Nutr.* 52: 55-59 (1998)
7. Paeng, N., Kido, N., Schmidt, G.K., Sugiyama, T., Kato, Y., Noide, N. and Yokochi, T. Augmented immunological activities of recombinant lipopolysaccharide possessing the mannose

- homopolymer as the O-specific polysaccharide. *Infect. Immunity*. 64: 305-309 (1996)
8. Muschel, L.H., Schmocker, K. and Webb, P.M. Anti-complementary action of endotoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117: 639-646 (1964)
  9. Schenkein, H.A. and Ruddy, S. The role of immunoglobulins in alternative complement pathway activation by zymosan 1. Human IgG with specificity for zymosan enhances alternative pathway activation by zymosan. *J. Immunol.* 126: 7-15 (1981)
  10. Thiel, S. Vorup-Jensen, T., Stover, C.M., Schwaeble, W., Laursen, S.B., Poulsen, K., Willis, A.C., Eggleton, P., Hansen, S., Holmskov, U., Reid, K.B. and Jensenius, J.C. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386: 506-510 (1997)
  11. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Siio, T. and Suga, T. Anti-tumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator: an overview. *Cancer Detet. Prev.* 1: 423-443 (1987)
  12. Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K. and Orita, K. Krestin (PSK). *Cancer Treat. Rev.* 11: 131-155 (1984)
  13. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y. Structural characterization of anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydr. Res.* 159: 275-291 (1987)
  14. Kiyohara, H. and Yamada, H. Structure of an anti-complementary arabinogalactan from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydr. Res.* 193: 173-192 (1989)
  15. Yamada, H., Ra, K.S., Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Otsuka, Y. Structural characterization of an anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. *Carbohydr. Res.* 189: 209-226 (1989)
  16. Gao, Q.P., Kiyohara, H., Cyong J.C. and Yamada H. Chemical properties and anti-complementary activities of polysaccharide fractions from roots and leaves of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Planta Med.* 57: 132-136 (1991)
  17. Samuelsen, A.B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Platago major* L. *J. Ethnopharmacol.* 71: 1-21 (2000)
  18. Kiyohara, H., Takemoto, N., Zhao, J.F., Kawamura, H. and Yamada, H. Pectic polysaccharides in the galacturonase-resistant region to anticomplementary and mitogenic activities. *Planta Med.* 62: 14-19 (1996)
  19. Harris, C.L., Kan, K.S., Stevenson, G.T. and Morgan, B.P. Tumour cell killing using chemically engineered antibody constructs specific for tumor cells and the complement inhibitor CD59. *Clin. Exp. Immunol.* 107: 364-371 (1997)
  20. Latremouille, C., Genevaz, D., Hu, M.C., Schussler, O., Goussef, N., Mandet, C., Bruneval, P., Haeffner-Cavaillon, N., Carpentier, A. and Glotz, D. Normal human immunoglobulins for intravenous use (IVIg) delay hyperacute xenograft rejection through F(ab')<sub>2</sub>-mediated anti-complement activity. *Clin. Exp. Immunol.* 110: 122-126 (1997)
  21. Kim, K.I., Shin, K.S., Jun, W.J., Hong, B.S., Shin, D.H., Cho, H.Y., Chang, H.I., Yoo, S.M. and Yang, H.C. Effects of polysaccharides from rhizomes of *Curcuma zedoaria* on macrophage functions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2369-2377 (2001)
  22. Wang, N.L., Kiyohara, H., Sakurai, M.H. and Yamada, H. Antigenic epitope for polyclonal antibody against a complement activating pectin from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydr. Polym.* 39: 257-264 (1999)
  23. Dubois, M., Hamilton, K.A., Rebers, J.K. and Sonisth, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356 (1956)
  24. Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.* 54: 484-489 (1973)
  25. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L. and Rindall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
  26. 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: 926-936 (1972)
  27. Mayer, M.M. Complement and complement fixation, 2nd ed. pp. 133-240, In: *Experimental Immunochemistry*. Kabat, E.A. and Mayer, M.M. (eds.). Charles C. Thomas Publisher, IL, USA (1971)
  28. Kiyohara, H., Cyong, J.C. and Yamada, H. Relationship between structure and activity of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydr. Res.* 193: 193-200 (1989)
  29. Morrison, D.C. and Kline, L.F. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J. Immunol.* 188: 362-368 (1977)
  30. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y., and Fukuoka, F. Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (Pachyman). *Nature* 225: 7-12 (1970)

---

(2001년 11월 27일 접수; 2002년 7월 25일 채택)