

*Artemisia*속 생약의 다당류 분획 연구 (I)

이강노 · 지옥표 · 광종환 · 김영식* · 박호군** · 구경아*** · 윤현주***

성균관대학교 약학대학 · 서울대학교 천연물과학연구소* ·

한국과학기술연구원** · 인제대학교 미생물학과***

The Polysaccharide Fractions of *Artemisia* Species(I)

Kang Ro Lee, Ok Pyo Zee, Jong Hwan Kwak, Yeong Shik Kim*,

Ho Kun Park**, Kyong Ah Koo*** and Hyun Joo Youn***

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746,

*Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460,

**Division of Chemistry, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791 and

***Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

Abstract—Polysaccharides fractions from the leaves of *Artemisia selengensis*(ASP1) and *Artemisia iwayomogi*(AIP1) were extracted and purified by Sephadex gel filtration and DEAE-Sephadex ion exchange chromatographies. Both ASP1 and AIP1 fractions were tested for their effects on the spleen cell culture *in vitro*. Both ASP1 and AIP1 fractions allow growth of spleen cells up to 3 months in culture, suggesting the immunoregulatory activities of those polysaccharide fractions. The molecular weights of ASP1 and AIP1 fractions were found to be about 2,500 daltons by Sephadex gel filtration chromatography using standard dextrans. Both ASP1 and AIP1 fractions were composed of glucose, xylose and galactose.

Keywords—*Artemisia selengensis* · *Artemisia iwayomogi* · polysaccharide · spleen cell culture · immunoregulatory activity · sugar analysis

천연물에서 유래된 다당류는 다양한 생물활성을 나타내고 있다.¹⁻³⁾ 그 중에서 특히 면역 활성 작용을 갖는 다당류는 생체의 방어 기전을 이용하여 항암효과를 갖는 물질을 개발하려는 시도에서 매우 관심있게 연구하는 분야이다. Lentinan이나 schizophyllan 등은 이러한 연구의 결과로서 암의 면역 요법제로서 임상적으로 응용되고 있는 물질들이다.⁴⁻⁶⁾ Yamada 등은⁷⁾ *Artemisia princeps*로부터 lentinan보다도 더 강력한 항보체 활성을 갖는 다당체를 분리 보고한 바 있으며, *Artemisia herba*에서 유래된 다당체는 강력한 항응고 작용을 갖는 것으로 연구되

었다.⁸⁾

본 연구에서는, 국내에 자원이 풍부하고 또한 민간요법에서 황달, 간염, 간암 등 각종 간질환에 빈번히 응용되고 있는 국화과(Compositae)의 물쭉(유기노, *Artemisia selengensis*)과 더위지기(인진호, *Artemisia iwayomogi*)^{9,10)}를 실험 재료로 하여, 이들이 비장세포 배양에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 그 결과, 물쭉과 더위지기의 유기층 추출액(ethanol extract)에서는 아무런 활성을 발견할 수 없었으나, 수층 추출액(water extract)에서 얻은 다당체 분획에서는 활성이 인정되었으므로, 이들 분획을 분리정제

하여, 그 분획의 분자량과 당의 조성 및 비장과 용선 세포에 미치는 영향을 연구하였다.

실 험 방 법

실험 재료—본 실험에 이용된 물쭈과 더위지는 1992년 9월 경기도 남양주군 구암리 및 고동산에서 각각 약 3 kg씩 채취하여 신선한 상태에서 잎 부위만을 세절하여 사용하였다.

시약—Sephadex G150, DEAE Sephadex A25, 표준 분자량의 dextran (2,000,000 dalton, 515,000 dalton, 70,000 dalton, 39,000 dalton, 9,300 dalton), Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum, glucurono-lactone, alcian blue, phenol red, methylene blue, 7-amino-1,3-naphthalene disulfonic acid (7-AGA), 표준품으로 사용된 당 (glucose, galactose, mannose, arabinose, fucose, rhamnose, xylose, N-acetylglucosamine, glucosamine) 등은 미국 Sigma사에서 구입하였다.

실험 기기—전기 영동 기기는 Hoefer SE600을, power supply는 비전과학의 KMC101을 사용하였다. Electrotransfer unit는 Hoefer TE70을, HPLC는 Spectra Physics사의 SP8860 pump와 Spectra 1000검출기, Rheodyne사의 #7125 injector를 사용하였다. 결과의 처리는 Spectra Physics사의 SP4270 적분계를 이용하였다. 흡광도측정은 영국 Cecil사의 digital ultraviolet spectrophotometer를 이용하였으며, 미국 HBI사의 fraction collector LC100을 사용하여 분획을 나누었다.

다당류 분획의 추출 및 분리—잎을 세절한 후, 상온에서 에탄올로 2회 추출하여 유기층 분획으로 하였으며, 잔사를 건조시킨 후 열탕의 증류수로 2회 추출하여 수층 분획으로 하였다. 수층 분획을 반정도로 농축하여 2배량의 에탄올을 가하여 0°C에서 다당류를 침전시켜 다당류 분획으로 하였다.

화학적 분석—Uronic acid의 분석은 glucurono-lactone을 표준품으로하여 carbazole을 이용하여 실시하였고¹¹⁾, 중성당은 phenol-H₂SO₄을 이용하여 측정하였다.¹²⁾

다당류 분획의 정제

Sephadex G150 column chromatography—2그램의 물쭈 다당류분획 (*Artemisia selengensis* polysaccharide fraction: ASP)을 5 ml의 증류수에 녹인 후, 시료를 Sephadex G150으로 충전한 25 mm×700 mm column에서 증류수를 이용하여, 0.8 ml/min의 유속으로 분획당 4 ml씩 분리하여 ASP1 분획을 얻었으며 (Fig. 1), 같은 방법으로 더위지기 다당류분획 (*Artemisia iwayomogi* polysaccharide fraction: AIP)을 분리하여 AIP1을 얻었다 (Fig. 2).

DEAE-Sephadex A25 column chromatography: Sephadex G150 column chromatography를 이용하여 분리한 ASP1 분획을 3 ml의 증류수에 녹여서 HCl과 NaOH로 전처리한 DEAE Sephadex A25 음이온 교환 수지를 이용하여 다시 정제하였다. 즉, 15 mm×200 mm column에 3 ml의 시료 용액을 실은 후, 증류수 400 ml로

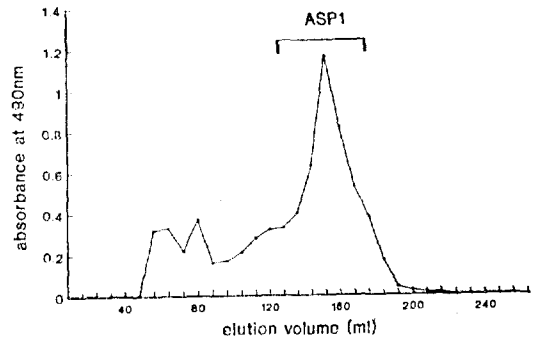


Fig. 1. Fractionation of the crude polysaccharide extract from *Artemisia selengensis* (ASP) on Sephadex G150 (4 ml/tube)

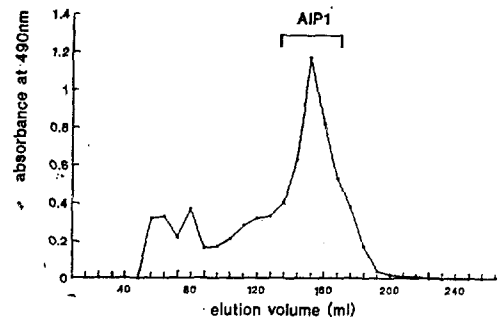


Fig. 2. Fractionation of the crude polysaccharide extract from *Artemisia iwayomogi* (AIP) on Sephadex G150 (4 ml/tube)

수지에 결합되지 않은 시료들은 씻어낸 다음, NaCl 용액 0N에서 4N까지의 농도구배를 이용하여 분당 0.5 ml의 속도로 분리하였다.

당의 조성 분석

환원성 amine화 반응에 의한 형광기가 결합된 당의 제조—ASP과 AIP(1 mg)를 trifluoroacetic acid 40 μ l와 혼합한 후, 질소를 불어 넣어준 다음, 3시간 동안 100°C에서 가온하여 가수분해를 하였다. 물을 가한 다음 동결건조 시킨 후, 55 μ l의 methanol-pyridine-water(35 : 15 : 10), 2 μ l의 acetic anhydride를 가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 중 30 μ l를 채취하여 30 μ l의 1 M NaCNBH₃와 15 μ l의 0.2 M 7-AGA와 함께 37°C에서 15시간 반응시킨 다음, 반응의 정도를 전기영동에 의해서 확인하였다. 반응이 되지 않은 7-AGA는 전기영동을 한 후 나일론 막에 전이시켜 제거하였고, 단당류 역시 나일론 막에 전이시켜서 정제하였다.¹³⁻¹⁵⁾ 나일론 막을 잘게 자른 후, 1 M NaCl 용액에 의해 추출한 다음, LC를 이용하여 표준품과 비교하였다.

전기영동—20~30% gradient polyacrylamide gel과 6%의 polyacrylamide stacking gel을 이용한 전기영동법을 사용하여, 당의 분리를 시도하였다. Spacer의 두께는 분석용일 경우는 7.5 mm를, 많은 양이 필요할 경우는 15 mm를 사용하였다. 위, 아래 chamber에는 0.1 M boric acid, 0.1 M Tris, 0.01 M EDTA (pH 8.3)의 완충용액을 사용하였고, 50%의 sucrose를 이용하여 시료를 적용하여, 300 V에서 3시간 정도 실시하였다.¹³⁻¹⁵⁾ Marker로서는 phenol red 및 methylene blue를 사용하였으며, 분리된 당은 360 nm에서 형광을 나타내는 점을 이용하여 확인하였다. 전기영동 후에 gel로부터 주요한 밴드를 잘라내어, semi-dry electrotransfer 방법으로 양이온 나일론막에 전이시킨 다음, 1 M NaCl을 이용하여 유리시킴으로서 AGA를 제거하였다.¹³⁻¹⁵⁾

HPLC에 의한 당의 분리—전기영동법으로는 단당류의 분리가 어렵기 때문에, 정량적인 목적을 위하여 HPLC를 이용하여 분리를 시도하였다. 전기영동에 사용된 시료를 희석하여, C₁₈ 역상칼럼 (4.6×220 mm, Applied Biosystem)을 이

용하여 분리하였다. 사용한 eluent는 0.1 M triethylamine(pH 4.0, glacial acetic acid)이었고, 속도는 1.0 ml/min, 파장은 250 nm에 고정하였다.

생쥐 비장 세포의 배양—ASP1과 AIP1 다당류 분획이 *in vitro*에서 생쥐의 비장세포에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 여러가지 농도의 다당류분획이 첨가된 10% fetal bovine serum을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium을 이용하여 생쥐의 비장세포 현탁액을 배양하였다. 생후 6주된 BALB/c 생쥐 암능의 비장을 분리하여, 적혈구를 제거한 비장세포 현탁액을 준비하였다. 비장세포를 배양액 ml 당 백만개가 되게 만든 후, 24 well plate를 이용하여 각각 2 ml씩 분주하여 배양을 시작하였다. 4개의 well에는 ASP1이나 AIP1 다당류 분획을 각각 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml, 800 μ g/ml씩 첨가하여 배양을 시작하였다. 매 3일마다 발전의 배양액을 제거한 후, 같은 양의 다당류 분획이 첨가된 새로운 배양액을 보충하면서, 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양을 계속하였다. 대조군으로는 시료가 첨가되지 않은 비장세포를 같은 조건에서 배양하였다. 모든 배양은 적어도 세배수의 well을 사용하여 그 결과를 비교하였다.

DEAE-Sephadex ion exchange chromatography를 이용하여 분리한 시료(ASP2)도 같은 방법으로 비장세포에 미치는 영향을 조사하였다. 이때, 배양액에 첨가된 시료의 양은 각각 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml, 80 μ g/ml를 사용하였다.

생쥐 흉선세포의 배양—*in vitro*에서, ASP1과 AIP1 다당류 분획이 분화중인 생쥐의 흉선세포에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 생쥐의 흉선세포 현탁액을 여러가지 농도의 다당류 분획이 첨가된 10% fetal bovine serum을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium을 이용하여 배양하였다. 생후 6주된 BALB/c 생쥐 암능의 흉선을 분리하여, 적혈구를 제거한 흉선세포 현탁액을 준비하였다. 이 흉선세포 현탁액을 이용하여 비장세포에 대한 시험에서와 같은 방법으로 ASP1과 AIP1를 첨가하여 배양하여, 시료가 흉선세포에 미치는 영향을 조사하였다.

결과 및 고찰

다당류의 분리 및 정제—약 2그램의 물속 다당류 분획을 Sephadex G150를 이용하여 분리한 결과, 소량의 분자량이 큰 다당류와 다량의 분자량이 적은 다당류로 분리되었다. 작은 분자량의 다당류는 160 ml의 용출액에서 가장 많이 분리되었으며, 그 근처의 몇개 분획들을 모아서 ASP1 다당류 분획으로 사용하였다(Fig. 1). 같은 방법으로 더워지기 다당류 분획을 정제하였다. 약 160 ml의 용출액에서 가장 높은 다당류의 peak를 관찰하였으며, 작은 분자량의 다당류 분획 근처의 분획들을 모아서 AIP1 다당류 분획으로 사용하였다(Fig. 2).

ASP1과 AIP1 다당류 분획들은 각각 ethanol을 이용하여 침전시킨 후, 다시 물에 녹여 DEAE Sephadex A25 ion exchange chromatography를 이용하여 실험방법에서 기술한대로 다시 분획하였다. ASP1을 첨가한 분리에서, 대부분의 다당류가 ion exchange 수지에 아주 강하게 결합하여 용출되지 않고 남아 있었으며, 약 10% 정도의 다당류만이 1 N NaCl 근처에서 용출되었다(ASP2, Fig. 3). 수지에 결합된 시료들은 0.1 N NaOH나 0.1 N HCl로 용출하여 보아도 용출되지 않았다.

AIP1을 같은 방법으로 분리하였을 때에도 같은 결과를 관찰하였다. ASP1의 경우와 같이 대부분의 다당류가 ion exchange 수지에 아주 강하게 결합하여 용출되지 않고 남아 있었으며, 약 10% 정도의 다당류만이 1 N NaCl 근처에서 용

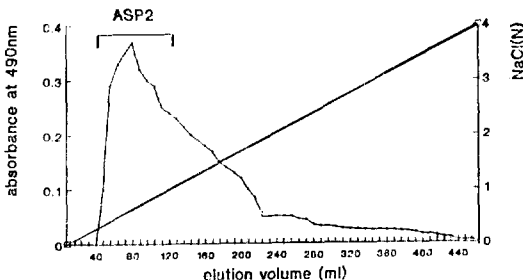


Fig. 3. Fractionation of the ASP1 on DEAE-Sephadex A-25 (4 ml/tube)

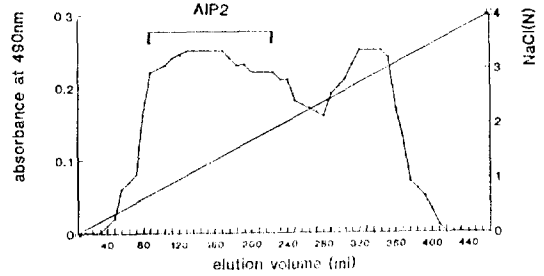


Fig. 4. Fractionation of the AIP1 on DEAE-Sephadex A-25 (4 ml/tube)

Table I. Analysis of polysaccharide fractions from *Artemisia selengensis*(ASP) and *Artemisia iwayomogi*(AIP) (mg/10mg)

	ASP	AIP
Total hexose	3.0	3.4
Total uronic acid	2.1	1.9

Table II. Compositional sugar analysis of ASP1 and AIP1 (area %)

	Glucose	Galactose	Xylose
ASP1	88.3	1.0	10.7
AIP1	97.9	0.8	1.3

출되었다(AIP2, Fig. 4). 수지에 결합된 시료들은 0.1 N NaOH나 0.1 N HCl로 용출하여 보아도 용출되지 않았다.

당의 화학적 분석 및 조성—물속과 더워지기의 정제전의 다당류 분획(ASP와 AIP)에 대한 전체 중성당(neutral sugar)과 유론산(uronic acid)의 함량분석의 결과는 Table I과 같다. 두 경우 모두 중성당과 유론산이 3:2 정도의 비슷한 비율로 존재함을 보여준다.

Sephadex G150으로 분리한 ASP1과 AIP1 다당류 분획을 가수분해한 후, 환원당 말단에 형광기를 결합시켜 HPLC를 이용하여 분석한 결과, ASP1은 88%가 glucose로 구성되어 있으며, AIP1은 97%가 glucose로 구성되어 있는 것으로 나타났다(Table II). ASP1과 AIP1 모두 glucose 외에 미량의 xylose와 galactose를 함유하고 있는 것으로 나타났다(Table II).

ASP1과 AIP1의 분자량 결정—ASP1과 AIP1

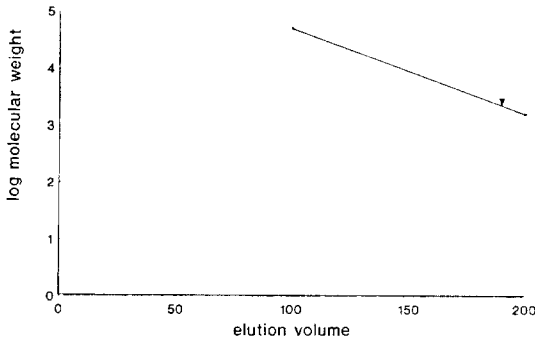


Fig. 5. Determination of the molecular weights of ASP1 and AIP1 on Sephadex G 150 using standard dextran molecular weight markers (2,000,000 dalton, 515,000 dalton, 70,000 dalton, 39,000 dalton, 9,300 dalton). The arrow indicates the positions of ASP1 and AIP1 fractions.

다당류 분획의 분자량을 결정하기 위하여, 분자량이 2백만 dalton인 blue dextran과 분자량이 각각 515,000 dalton, 70,000 dalton, 39,000 dalton, 9,300 dalton인 표준품의 dextran을 Sephadex G 150을 이용하여 분리하였다. ASP1과 AIP1 다당류 분획의 위치를 역산한 이들 분획의 분자량은 ASP1과 AIP1 다당류 분획 모두 약 2,500 dalton정도인 것으로 나타났다(Fig. 5).

ASP1과 AIP1 다당류 분획의 비장세포 배양에 미치는 영향—비장세포 현탁액의 배양에 시료를 첨가하여 배양해본 결과, 배양을 시작한지 약 3주째 부터, 대조군과 시료를 첨가한 배양사에서 차이가 나타나기 시작하였다. ASP1이나

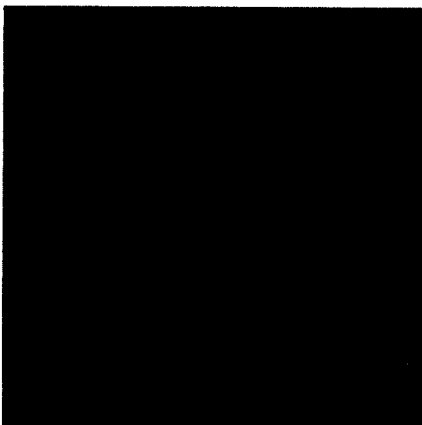
AIP1 다당류 분획을 첨가하지 않은 대조군의 배양에서는 비장세포의 수가 현저히 줄어들고 있으나, ASP1이나 AIP1 다당류 분획을 첨가한 배양에서는 여전히 세포의 수가 줄어들지 않고 성장하고 있음을 볼 수 있었다. 약 6주가 지난 후 부터는, 대조군에서는 세포의 존재를 확인하기가 어려웠으며, 약 10주정도가 되었을 때는 대조군에서는 전혀 세포를 관찰할 수가 없었다. 그러나, 이때에도 ASP1이나 AIP1 다당류 분획을 첨가한 배양에서 여전히 세포가 잘 자라고 있음을 확인 할 수 있었으며(Fig. 6), 3개월까지 배양하였을 때에도 같은 양상으로 세포가 잘 자라고 있음을 관찰할 수 있었다.

이들 ASP1이나 AIP1 다당류 분획을 첨가한 배양에서는 일반적인 작은 임프구의 형태를 한 세포와 lymphoblast처럼 보이는 커다란 세포, 그리고 대식세포 같이 plate 표면에 붙어서 자라는 세가지 종류의 세포들이 자라고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 6). 이러한 결과는 면역반응에 관여하는 비장의 세포들이 다당류 분획의 첨가로 인하여 여전히 잘 자라고 있음을 제시한다.

DEAE Sephadex A25를 이용하여 분리한 시료를 첨가한 배양에서도 비슷한 결과를 확인하였다. ASP2 다당류 분획(Fig. 7)이나 AIP2 다당류 분획을 첨가한 비장세포 배양 모두에서 비장세포가 잘 자라고 있음이 확인되었다.

이러한 결과로 미루어, *in vitro*에서 물속과 더워지기의 다당류 분획중 분자량이 작은 다당

a)



b)

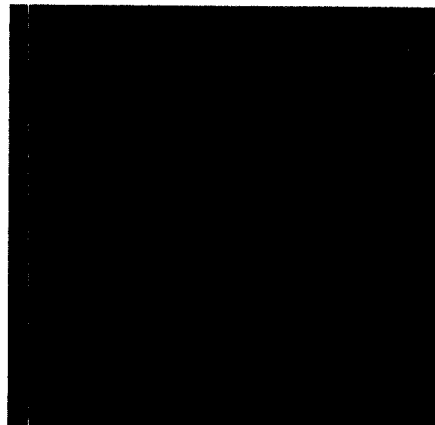


Fig. 6. The effects of ASP1 fraction (a) and AIP1 fraction (b) at 200 µg/ml, each, on the mouse spleen cell culture. The pictures were taken at the tenth week of the culture. (×100)

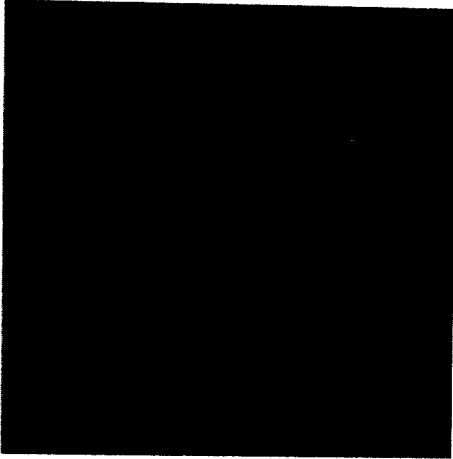


Fig. 7. The effects of ASP2 fraction at 20 μ g/ml on the mouse spleen cell culture. The picture was taken at the tenth week of the culture. ($\times 100$)

류들이 비장세포의 성장에 영향을 미치고 있는 것으로 보여진다. 비장은 생체내에서 혈액을 통하여 침투한 항원이 대식세포와 B 임프구 그리고 T 임프구 등과 상호작용하여 면역반응이 일어나는 장소로 잘 알려져 있다. 이러한 사실은 이들 다당류 분획이 생체내에서 면역반응에 영향을 미칠수도 있음을 간접적으로 제시해주는 것이다.

생쥐의 흉선세포 배양에 미치는 영향—ASP와 AIP 다당류 분획들이 비장세포의 배양에 영향을 미치는 것으로 확인되어, 같은 효과가 다른 종류의 임파기관에서 얻은 세포에도 관여하는지를 확인 하였다. 이를 위하여 비장과는 다른 기능을 가진 임파기관인 흉선의 세포를 선택하였다. 흉선(thymus)은 비장과 같이 항원과 임프구가 만나서 면역반응이 일어나는 곳이 아니라, T 임프구의 성장과 분화가 일어나는 장소로 잘 알려져 있다. 비장세포에서와 같은 방법으로 흉선세포 현탁액을 4주간 배양해본 결과, 비장세포의 경우와 같은 결과를 관찰할 수 없었다. 즉, 대조군이나 ASP1과 AIP1 다당류 분획을 첨가한 배양 모두에서 세포들이 여전히 자라고 있는 것으로 확인되었다. 이 결과는 다당류 분획이 임프구의 분화가 일어나는 흉선과 같은 기관보다는 면역 반응이 일어나는 비장과 같은 기관의 세포들에 작용할지도 모른다는 점을 제시하

는 것이다.

결 론

물쭉의 다당류 분획(ASP)과 더위치기의 다당류 분획(AIP)이 생쥐의 비장세포 배양에 미치는 영향을 조사해본 결과, ASP와 AIP 다당류 분획 모두 비장세포의 배양에 활성을 보였으나 흉선세포의 배양에는 특이적인 영향이 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 생체내에서 이들 다당류 분획들이 면역반응에 영향을 미칠지도 모름을 간접적으로 제시하는 것이다. 연구결과, 이러한 효과를 가진 다당류는 그 분자량이 약 2,500 dalton 정도되는 물에 녹는 산성의 분자들인 것으로 추측된다.

이들 다당류 분획들이 비장의 어떠한 세포들과 작용을 하는지, 실제로 *in vivo*에서 면역반응에 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 연구들이 현재 진행중에 있다.

감사의 말씀—본 연구는 과기처 신약개발연구비와 일부는 92년도 인체 연구 장학재단 연구지원금(윤현주)으로 연구되었으며, 지원에 감사드립니다.

(1993년 10월 20일 접수 : 10월 30일 수리)

참 고 문 헌

- Ohno, N., Suzuki, I., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T. and Yadomae, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 32, 1142 (1984).
- Wagner, H. and Proksch, A.Z.: *Angew. Phytother.* 2, 166 (1981).
- Takasai, M., Chchachi, K., and Hiroshi, H.: *Planta Med.* 3, 258 (1985).
- Taguchi, T.: *Jpn. J. Cancer Chemother.* 10, 387 (1983).
- Kosaka, A., Imaizumi, A., Hattori, Y., Mori, F., Wani, T. and Yamashita, A.: *Jpn. J. Cancer Chemother.* 11, 1399 (1984).
- Taguchi, T., Furue, H., Kimura, T., Kondo, T., Hattori, T., Itoh, I. and Ogawa, N.: *Jpn. J. Cancer Chemother.* 12, 366 (1985).
- Yamada, H., Ohtani, K., Kiyohara, H., Cyong,

- J.C., Otusa, Y. and Omura, S.: *Planta Med.* 2, 121 (1985).
8. Abdel-Fattah, A.F., Magdel-Din Hussein, M. and Fouad, S.: *Phytochem.* 17, 741 (1978).
9. 이창복 : 대한식물도감, 향문사, p.758 (1989).
10. 상해과학기술 출판사 소학관, 중약대사전(4), p. 2683 (1985).
11. Dische, Z.: *Methods Carbohydr. Chem.* 1, 478 (1962).
12. Bitter, T. and Muri, H.M.: *Anal. Biochem.* 4, 330 (1962).
13. Al-Hakim, A. and Linhardt, R.J.: *Electrophoresis* 11, 23 (1990).
14. Kim, Y.S., Lee, K.B. and Linhardt, R.J.: *Korean Biochem. J.* 24, 466 (1991).
15. Kim, Y.S., Roh, J.E. and Ann, H.S.: *Kor. J. Pharmacogn.* 2A, 124 (1993).