

해당화 뿌리 추출물의 면역 증진 효과

이미경* · 이서호* · 최근표*** · 유창연** · 이신영* · 이진하* · 이현용*†

*강원대학교 바이오산업공학부, **강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부, 강원전문대학 식품생명과학과

Screening of immune enhancement activities of the extracts from *Rosa rugosae* Radix

Mi Kyoung Lee*, Seo-Ho Lee*, Geun Pyo Choi***, Chang Yeon Yu**
Jin Ha Lee* and Hyeon Yong Lee*†

*School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

**Division of Applied Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

***Dept. Food & Life Science, Gangwon Provincial University, Gangneung, Korea

ABSTRACT : The biological activities of extracts from *Rosa rugosae* Radix were compared. About 78% of the growth of human hepato- carcinoma and 68% of human gastric cancer cell was inhibited in adding 0.5 mg/ml of the extracts of *Rosa rugosae* Radix respectively. The growth of human breast cancer cells was also inhibited in adding 0.5 mg/ml of the extracts as well as 66% of the human cancer cells. It was proved that the growth of human normal lung cell, scored as 20% for the extracts. Overall selectivity of the extracts on several human cancer cell line was over 4, which is higher than those from the *Rosa rugosae* Radix. The growth of both human immune B and T cells was enhanced up to 1.2 to 1.5 times by adding the extracts, compared to the controls. The secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α) from T cell was also increased up to 61.9 pg/ml in adding the ethanol extract (0.5 mg/ml). Ethanol extract also increased up to about 61.3 pg/ml of interleukin-6(IL-6) from B cell.

서 언

해당화는 장미과에 속하는 낙엽지는 넓은 잎 큰키나무이다. 우리 나라 전국 해안의 모래밭이나 해변 가까운 표고 1600m이하의 산록지대에서 자라며 일본, 동북아시아에 분포한다(정, 1955). 꽃과 열매는 향수원료와 약용으로 사용되고 줄기의 껍질과 뿌리는 다갈색을 내는 염료로 사용되기도 하며 우리나라에서는 예로부터 붉은 꽃잎을 따서 밥을 지을 때 넣어 색을 내기도 했다(김, 1984). 해당화에는 유기산과 vitamine C등이 풍부하며, phenol 성 화합물로서 rosamultin, quercetin, tannine 등이, terpenod 인 euscaphic acid과 saponin인 arjunetin와 glucoside성

물질로서 β -sitosterol glucoside, campesterol glucoside 등이 보고 되었다(박 등, 1993). 해당화에 대한 연구는 풍부한 phenol 성분에 대한 항산화 활성과, 뿌리 추출물로부터의 혈당강하활성, 지질대사에 미치는 영향 등이 보고 되었으나(김 등, 2001 ; 최 등, 1993) 세포독성, 면역활성 등에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

또한 천연물질 및 생약은 인체내에서 식균작용을 활성화하고, 항체의 생성을 촉진시키며, 체내 생화학적 수치들을 정상화하는 등, 질병에 대한 방어력을 증가시켜 만성질환을 예방하고 치료할 수 있도록 하여, 면역반응을 강화시키거나 저하된 면역기능을 정상화시킴으로 치료에 사용된다(Itoh et al., 1985; Agarwal et al., 1986). 때문

† Corresponding author(phone) : 033-250-6455, E-mail : hyeonl@kangwon.ac.kr

Received 13 November 2002 / Accepted 19 February 2003

에 동서양을 막론하고 이러한 면역증진활성을 가지는 천연물질 및 생약에 대한 관심이 높아지고, 이들에 대한 수요도 증가하고 있다.

따라서, 본 연구에서는 해당화뿌리에 대하여 여러 암세포주에 생육억제 활성과 인간 면역 세포에 대한 활성증진 실험으로 배양 기간동안 세포 생육도의 증진과 cytokine의 분비를 측정하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 추출방법

본 실험에 사용한 해당화(*Rosa rugosa* Radix) 뿌리는 경동시장에서 국산으로 확인된 것을 구입하여 물로 깨끗이 세척 후 열풍 건조기를 이용하여 24시간 동안 열에 의한 성분의 변화 등을 막기 위해 32.5℃에서 건조시킨 후에 추출 수율의 향상을 위해 잘게 분쇄한 후 수직의 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량 100g에 대하여 각각 10배의 증류수와 ethanol을 사용하여 100℃와 78℃에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압 여과장치로 여과하여 농축·동결건조한 후 각각의 수율을 계산하여 실험에 사용하였다.

2. 암세포의 생육 저해 및 독성 실험

실험에 사용된 암세포주는 인간 유래의 간암세포(Hep3B), 위암세포(AGS), 유방암 세포(MCF7), 폐암세포(A549), 정상세포로는 인간 폐세포(HEL299)를 이용하였다. 세포 배양에 사용된 기본배지는 HEL299, AGS, A549는 RPMI1640(GIBCO, USA)을 Hep3B, MCF7는 DMEM(GIBCO, USA)을 사용하여 FBS를 10% 첨가하여 배양하였다. 실험에 사용한 세포의 초기 농도는 4×10^4 cells/ml의 농도로 조절하여 96well tissue culture microplate에 100 μ l/well씩 접종하여 사용하였다. 암 세포의 생육저해와 정상세포의 세포독성은 sulforhodamineB(SRB) 방법을 이용하였다(Doyle et al., 1993; Dool et al., 1981).

3. 암세포 생육 억제 기능의 산화도 측정

해당화 뿌리 에탄올 추출물의 세포에 대한 대사(산화)활성도의 영향을 측정하기 위하여 Microphysiometer (Molecular Devices, USA)를 사용하였다(Junferg et al., 1997). 측정조건은 Pump cycle은 total cycle time이 2분으로 하여 최종 측정되는 시간은 30초 간격으로 하였다. Adherent cell은 보통 실험 1일전, capsule에 옮겨 안정화시킨다. Plate속에 있는 capsule cup에 3×10^5 cells/ml의 농도로 세포를 투여하여 37.5℃, 5% CO₂의 incubator에서 24시간 안정화시킨 다음 측정할 때

spacer, insert를 차례로 넣은 후, plate 속에 들어있는 capsule cup만을 sensor chamber에 장착하여 측정한다. 이때 running buffer는 세포의 growth medium으로 하였으며, 본 실험에서는 인간 간암세포인 Hep3B와 정상 폐세포인 HEL299를 이용했고, running buffer로 세포주에 따라 각각 DMEM과 RPMI 1640배지를 사용하였다(Masanori, 1997; Lingchuan, 1999).

4. 면역 증진 검색

면역 기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell(Jurkat)과 B cell(Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37℃에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 24well plate에 세포를 2.0×10^4 cells/ml의 농도로 조절한 후 0.2 μ m의 filter로 여과되어진 시료(0.5mg/ml)들은 24시간 이 지난 각각의 well에 첨가한 후 8일간 다시 incubation된 cell을 hemacytometer로 세포 수를 측정하였다. 그리고 추출물들을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 세포의 생육과 세포 수에 따라 면역활성을 측정하였다. 또한 보다 명확한 면역활성 효과를 검증하기 위한 면역세포들이 배지 내에 분비하는 cytokine인 Tumor Necrosis Factor- α 와 Interleukine-6의 양은 ELISA kit(Genzyme, USA)를 이용하여 측정되어졌다. 배양액을 원심분리한 상등액을 다양한 농도의 표준물질들과 함께 37℃에서 30분간 배양 후 450nm에서 흡광도를 측정하여 표준물질을 이용해 표준곡선을 작성하고 이에 시료에서 얻어진 O.D 값을 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다(오, 1991).

5. 세포사멸 형태 측정

세포 사멸형태는 염색법을 이용하여 측정(Al-Rubei et al., 1995; Bharat et al., 1985)하였다. 염색시약은 Ca²⁺와 Mg²⁺이 없는 PBS에 acridine orange와 ethidium bromide를 각각 100 μ g/ml가 되도록 녹였다. 이 두 용액을 섞고 세포농도가 5×10^6 cells/ml가 되는 세포 현탁액 100 μ l에 염색시약 4 μ l를 첨가한후 형광 현미경으로 세포를 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 추출 수율

해당화(*Rosa rugosa* Radix) 뿌리의 증류수 및 에탄올 추출물의 수율은 11.00%의 4.97%를 나타내어 증류수 추출물이 에탄올 추출물보다, 2.2배 정도 높은 수율을 나타내었다.

2. 해당화 뿌리 추출물의 세포독성

각 추출물들의 정상세포에 대한 세포독성을 측정한 결과는 Fig 1.에 나타내었다. 해당화의 물 추출물의 경우 0.5g/L 이하의 농도로 투여시는 정상세포 생존율을 85% 내외로 유지시켜 정상세포에 대한 안정성이 유지될 것으로 사료되나, 1.0 mg/ml이상의 농도에서는 정상세포의 생육이 20% 가까이 저해되었다.

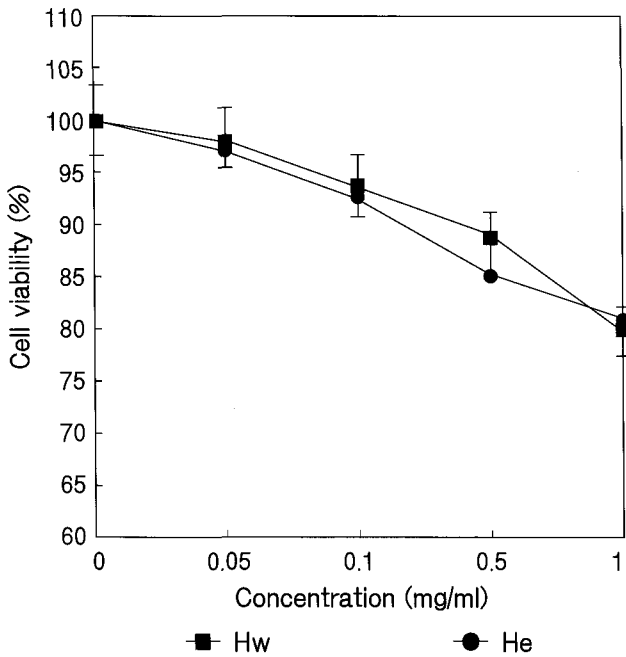


Fig. 1. Cell viability of human normal lung cell, HEL299 in adding of the extracts from Rosa rugosae Radix. (Hw, H₂O Ex. ; He, EtOH Ex.)

각 추출물의 암세포에 대한 생육억제활성은 Fig. 2와 3, Table 1에 나타난 바와 같이 0.1 mg/ml의 낮은 농도에서도 비교적 40~50%의 높은 억제율을 나타내었다. 해당화 뿌리의 증류수 및 에탄올 추출물 모두 0.5mg/ml이상의 농도에서 유방암 세포주인 MCF7에 대하여 65%이상, 폐암세포주인 A549에 대하여서는 모든 추출물 0.5mg/ml의 농도 이상에서 76%이상의 생육억제활성을 나타내었다. 간암세포주인 Hep3B에 대하여서는 증류수 추출물은 0.5mg/ml이상의 농도에서 약 55%정도, 에탄올 추출물들은 78%이상의 높은 암세포 생육억제활성을 나타냈으며, 위암세포주인 AGS에 대하여 증류수 추출물들은 0.5mg/ml이상의 농도에서 약 68%정도, 에탄올 추출물들은 62%이상의 높은 암세포 생육억제활성을 나타내었다. 또한 각 추출물의 정상세포독성에 대한 암세포의 억제율을 나타내기 위하여 같은 농도에서의 정상세포 사멸도에 대한 암세포 사멸도의 비를 나타내는 selectivity에 있어

서 각 추출물이 0.1mg/ml에서 1.0mg/ml의 농도에서 4.5 이상의 수치를 나타내어 해당화 뿌리 추출물들은 암세포를 선택적으로 사멸하는 기작을 지닌 것을 확인하였다.

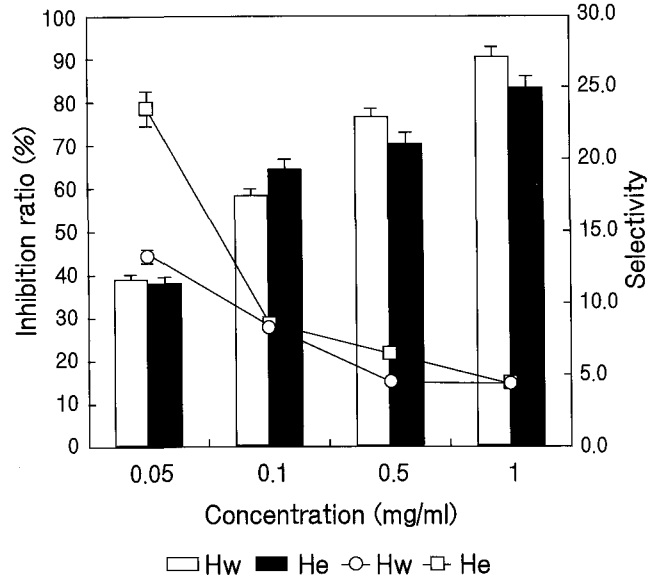


Fig. 2. Inhibition ratio of growth of human lung carcinoma, A549 (bar chart) and selectivity (scatter line) in adding of the extracts from Rosa rugosae Radix. (Hw, H₂O Ex. ; He, EtOH Ex.)

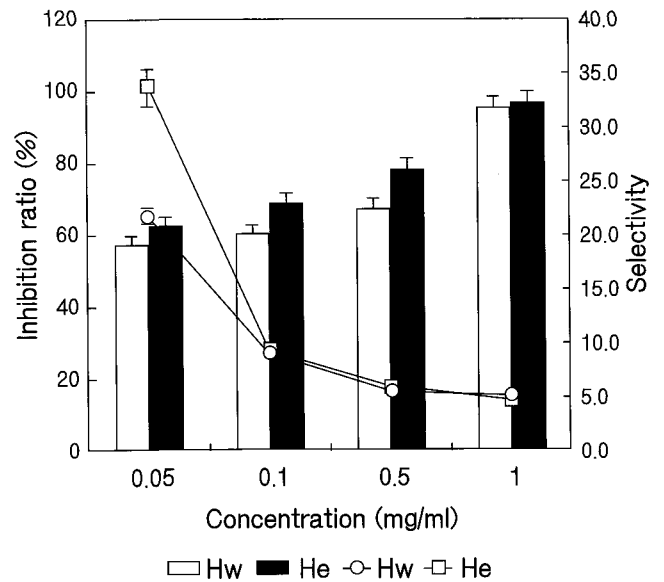


Fig. 3. Inhibition ratio of growth of human breast adenocarcinoma, MCF7 (bar chart) and selectivity (scatter line) in adding the extracts from Rosa rugosae Radix. (Hw, H₂O Ex. ; He, EtOH Ex.)

Table 1. Comparison of the ratio inhibiting the growth of four different cancer cell lines in adding the extracts from *Rosa rugosae Radix*

Sample	Solvent	Concentration (mg/ml)	Inhibition ratio(%)				Selectivity			
			A549	AGS	MCF7	Hep3B	A549	AGS	MCF7	Hep3B
<i>R. rugosae</i>	H ₂ O	0.05	38.86	30.74	56.91	34.36	23.4	18.5	34.3	20.7
		0.1	58.23	54	59.61	43.45	8.7	8.1	8.9	6.5
		0.5	76.86	68.74	66.01	54.55	6.6	5.9	5.7	4.7
		1	91.07	89.85	95.62	66.55	4.6	4.5	4.8	3.3
	EtOH	0.05	37.92	43.93	62.42	39.45	13.1	15.1	21.5	13.6
		0.1	64.5	52	67.08	42.18	8.6	6.9	8.9	5.6
		0.5	70.14	62.89	78.03	78.73	4.7	4.2	5.3	5.3
		1	84.17	84.07	96.97	86.55	4.4	4.4	5.1	4.6

또한 암세포(Hep3B)와 정상세포(HEL299)에 대하여 Microphysiometer를 이용한 시간에 세포의 산화도 측정 한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 해당화 뿌리 에탄올 추출물 모두 시료 투여 후 세포의 산화가 서서히 나타남을 확인할 수 있었으며, 암세포의 경우 정상세포에 비하여 산화도의 증가가 점차 급격해 지는 것을 확인할 수 있었다. 간암세포의 경우 같은 농도에서 시료 투여 48시간 후 약 78.8%정도의 생육저해를 나타내고 있는데, 산화도의 양상으로 미루어 세포가 약물에 대한 반응이 빠르게 나타남을 알 수 있었다.

택적 사멸 기작을 갖고 있는 것으로 확인되어 이들이 인간 면역체계에서 항체 생성의 중요한 역할을 하는 인간 B와 T 세포주의 생육촉진 실험 결과를 Fig. 5와 6에 나타내었다. 증류수 추출물과 에탄올 추출물의 면역세포생육 촉진 기능은 Fig. 5에 나타난 바와 같이 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 B세포의 성장을 1.2~1.3배 이상 증가시켰으며, 단일클론 항체의 생성 등에 관여하는 cytokine인 IL-6는 에탄올 추출물이 배양 6일째 0.5mg/ml의 농도에서 최고 61.3 pg/ml의 분비량을 나타내었다. Fig. 6에 나타난 T 세포의 경우 1.2~1.5배 이상의 세포 성장율의 증

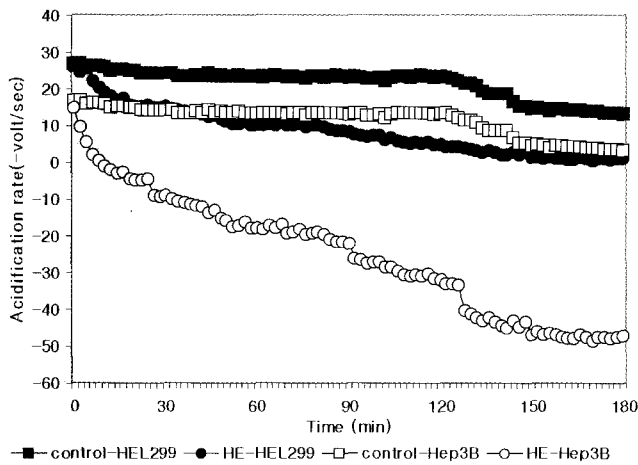


Fig. 4. The result of measuring cellular activity of human hepatocellular carcinoma and normal lung cell in adding 0.5mg/ml of the ethanol extracts from *Rosa rugosae Radix*, using a microphysiometer.

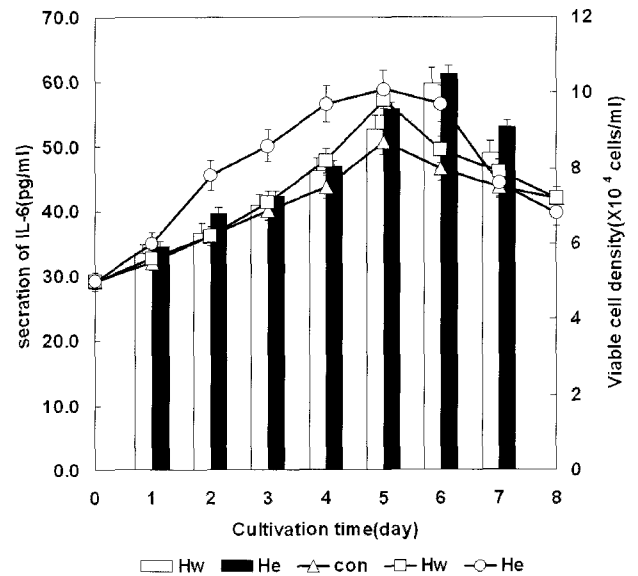


Fig. 5. The relationship between the growth of human Immune B-cell(scatter line), and the secretion of cytokines IL-6(bar chart) by adding 0.5mg/ml of the extracts from *Rosa rugosae Radix*. (Hw, H₂O Ex. ; He, EtOH Ex.)

3. 면역활성 탐색 결과

이상과 같이 해당화 뿌리 추출물들이 암세포에 대한 선

가를 나타내었다. 에탄올 추출물의 경우 0.5mg/ml의 농도에서 배양 5일째 T세포의 성장을 1.4배 이상 생육증진 효과를 나타내었다. 또한 또한 신호전달계도 활성화 시켜

세포사멸을 유도하며, 염증, 감염 및 환경 위해 인자에 의해 발현되며 발열, 쇼크, 조직손상, 암세포괴사, 식욕부진, 다른 cytokine의 발현, 세포분열, 세포분화, 세포사멸(apoptosis)등 광범위한 생리기능을 유도하는 중요한 cytokine 인 TNF- α (Eli et al., 1991)도 에탄올 추출물이 배양 6일째 최고 61.9 pg/ml의 분비량을 나타내었다. 또한 해당화 뿌리 추출물의 인간 면역 T cell에 대한 세포사멸형태를 acridine orange와 ethidium bromide로 형광염색하여 측정된 결과, Fig. 7에 나타낸 바와 같이 배양 4일째부터 15% 이상의 세포들이 자가 사멸 형태로 사멸함을 확인할 수 있었다.

해당화 뿌리의 경우 phenol 성분 및 배당체, saponin 등이(김; 오), 높은 항산화 활성과 지질대사 및 혈당강하 등에 효과를 나타내는 것이 보고(김; 최)되어 있는데, 이러한 높은 항산화성 물질들이 암세포의 생육억제 및 면역활성증진에 효과를 나타내는 것으로 사료되어진다.

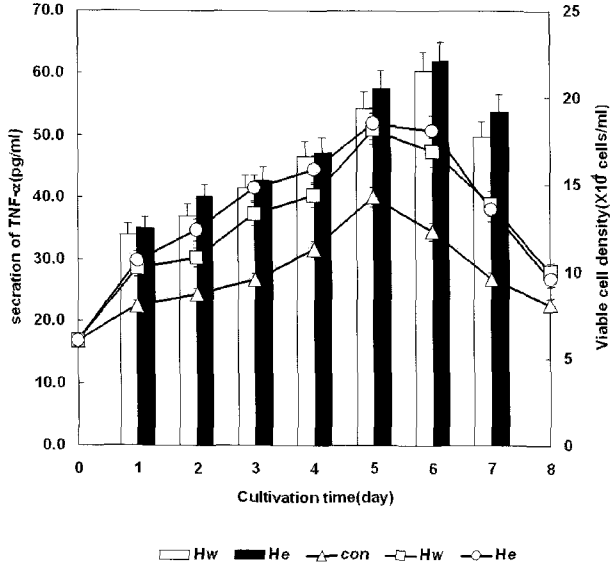


Fig. 6. The relationship between the growth of human Immune T-cell(scatter line), and the secretion of cytokines TNF- α (bar chart) by adding 0.5mg/ml of the extracts from Rosa rugosae Radix. (Hw, H₂O Ex. ; He, EtOH Ex.)

적 요

해당화 뿌리의 추출물 모두 0.5g/L 이하의 농도로 투여 시는 정상세포 생존율을 80%이상으로 유지시켜 시료 자체에 의한 독성은 나타나지 않으며, 각 추출물의 암세포에 대한 생육억제활성은 0.1 mg/ml의 낮은 농도에서도 비교적 40~60%의 높은 억제율을 나타내었다. 추출물들은 0.5mg/ml이상의 농도에서 MCF7에 대하여 66%이상, A549에 대하여서는 70%이상의 생육억제활성을 나타내었다. Hep3B에 대하여서는 에탄올 추출물은 78%이상의 높은 암세포 생육억제활성을 나타내었으며, AGS에 대하여 물 추출물이 약 68%정도의 암세포 생육억제활성을 나타내었다. 각 추출물의 selectivity에 있어서 각 추출물이 0.1mg/ml에서 1.0mg/ml의 농도에서 4이상의 수치를 나타내어 해당화 뿌리 추출물들이 암세포를 선택적으로 사멸하는 기작을 지닌 것을 확인하였다. 또한 암세포와 정상세포의 시간에 따른 산화 정도를 Microphysiometer를 이용하여 측정된 결과 시료 투여 후 점차적으로 산화도가 빠르게 증가하는 것을 확인하였다. 각 시료들의 면역세포생육 증진 기능은 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 B세포의 성장을 1.2~1.3배 이상 증가시켰으며, T 세포의 경우 1.2~1.5배 이상의 성장율의 증가를 나타내었다. 에탄올 추출물이 물 추출물들에 비하여 높은 면역세포의 생육증진활성을 나타냄을 확인하였고, cytokine의 생성측정 정도를 측정된 결과, IL-6는 에탄올 추출물이 배양 6일째 0.5mg/ml의 농도에서 최고 61.3 pg/ml의 분비량을 나타내었으며, TNF- α 도 에탄올 추출물이 배양 6일째 최고 61.9 pg/ml의 분비량을 나타내었다. acridine orange와

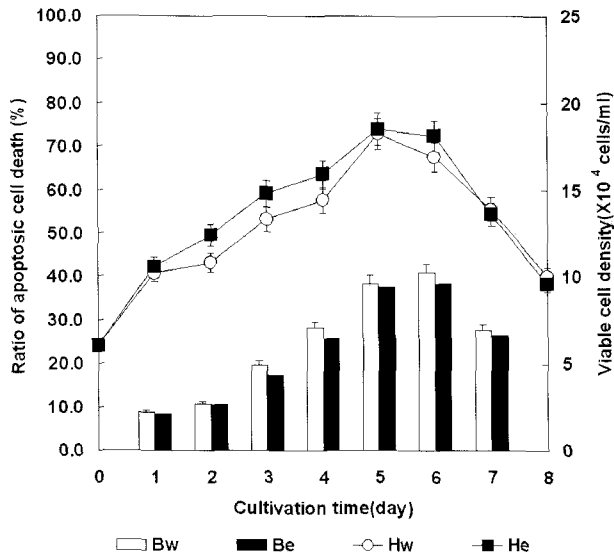


Fig. 7. Cell growth(scatter line) and the change in death pattern(bar chart) of human immune T cells in adding of 0.5 mg/ml the extracts from Rosa rugosae Radix. (Hw, H₂O Ex. ; He, EtOH Ex.)

ethidium bromide로 형광염색하여 인간 면역 T cell에 대한 세포 사멸형태를 측정할 결과 배양 4일째부터 15% 이상의 세포들이 자가 사멸 형태로 사멸함을 확인할 수 있었다.

사 사

본 연구논문은 2001년도 한국과학재단 지역협력연구센터사업 (한림대 실버생물산업기술연구센터 R12-2001-047-00000-0)의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Al-Rubei MR, Singh RP, Goldman MH, Emery AN (1995). Death mechanisms and animal cells in conditions of intensive agitation. *Biotechnol. Bioeng.* 45: 463
- Bharat BA, William JK, Philip EH, Barbara M, Steven AS, William JH, Timothy SB, Glenn EN, David VG, Richard NH (1985) Human tumor necrosis factor, *The J. Biol. Chem.* 260(4) 2345-2354.
- Benson AM, Bueding E, Cha YN, Heine HS, Talalay P (1979) Elevation of extrahepatic glutathione S-transferase and epoxide hydratase activities by 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole. *Cancer Res.* 39: 2971-~2977.
- Choi JS, Park JH, Kim HG, Young HS, Mun SI (1993) Screening for antioxidant activity of plants and marine algae and its active principles from *Prunus daviana*. *Kor. J. Pharmacology.* 24: 299-303.
- Dool R, Peto R (1981) The causes of cancer : Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66(6): 1192.
- Doyle A, Griffiths JB, Newell DG (1993) *Cell & Tissue culture : Laboratory procedures.* Wiley.
- Junferg Y, Xiang C, Gao CM, Li, Z (1997) Voltammetric Behavior of Living cells *T. shanghaiensis* and its Bioanalytical Application, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* 44: 89-93.
- Kim SH, Park ES, Jo TH, Choi JW (1994) The study of Pretreated GE-132 on the Mepatic Glutathione S-Transferase Activity in Rat. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23(4): 581-~586.
- Lingchuan C, Armen HT (1999) Identification of Distinct Signalling Pathways for Somatostatin Receptors SSTR1 and SSTR2 as Revealed by Microphysiometry, *Cell. Signal.* 11(7): 499-505.
- Masakico S, Masubi M (1995) Enhancement of plasma fibrinolysis in vitro by Jararhagin. *Toxicon.* 33(12): 1605-1617.
- Masanori K, Hiroshi K (1997) Creation of and In vivo Cytosensor Using Engineered Mesangial Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 22(3): 1394-1399.
- Seico Y, Kazumaxa S, Gunki F (1996) Isolation from -Zein of Thermolysin peptides with Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(40): 661-663.
- Welling D, Tina J, Mikael B, Troels S, Michael RS (1996) Evaluation of Isofagomine and Its Derivatives as Potent Glycosidase inhibitors. *Biochemistry.* 35: 2788-2795.
- Xiong Q, Kadota S, Tadota T, Namba T (1996) Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 1580-1585.
- 김명조, 김주성, 김기은, 신국현, 허권, 조동하, 박철호, 유창연 (2001) 해당화의 채취 부위별 항산화 활성 비교. *한국약용작물학회지.* 9(1): 40-44.
- 김재길 (1984) *원색약물전연대사전.* 남산당. 서울.
- 박종철, 양한석, 이승호 (1993) 해당화 지하부에서 분리한 탄닌 화합물. *생약학회지.* 24(4): 319-321.
- 오오진 (1991) 쇠비름이 세포성 및 체액성 면역 반응계에 끼치는 영향. *숙명여자대학교 대학원 석사학위논문*
- 정태현 (1955) *한국식물도감.* 교육사. 서울.
- 주광지, 박정미 (1982) 과즙색소 Anthocyanin 의 안전성에 관한 연구. *한국식품영양과학회지.* 11(3): 67-74
- 최용순, 안철, 주진우, 박종철, 이상영 (1993) 흰쥐의 지질대사에 미치는 해당화 뿌리 추출물의 효과. *한국생물공학회지.* 8(3): 224-229.