

초음파 병행 추출을 이용한 가시오갈피, 마황, 복분자 및 인진쑥의 항암활성 증진

박진홍* · 이현수* · 문형철* · 김대호* · 성낙술** · 정해곤** · 방진기** · 이현용*†

*강원대학교 바이오산업공학부, **농촌진흥청 작물과학원

Improvement of Anticancer Activation of Ultrasonificated Extracts from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq. and *Artemisia capillaris* Thunb.

Jin Hong Park*, Hyun Soo Lee*, Hyoung Chul Mun*, Dae Ho Kim*,
Nak Sul Seong**, Hae Gon Jung**, Jin Ki Bang**, and Hyeon Yong Lee*†

*School of Biotechnology & Bioengineering, Kangwon Natl. Univ., Chunchon 200-701, Korea.

**National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea.

ABSTRACT : The anticancer activities of the extracts from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq and *Artemisia capillaris* Thunb were compared according to extract systems. About 70% of the growth of human hepatocarcinoma cancer cell was inhibited in adding 1.0 mg/ml of the water extract from *Rubus coreanus* Miq with ultrasonification at 60°C. The growth of human normal lung cell was limited to 25% in adding the extracts with ultrasonification at 60°C. The effect of extracts obtained by only water and with ultrasonification on different of human promyelocytic leukemia cells was also observed.

Key words : *Acanthopanax senticosus*, *Ephedra sinica*, *Rubus coreanus*, *Artemisia capillaris*, ultrasonification, HL-60, differentiation, anticancer activation

서 언

생리활성이 양호하다고 보고된바 있는 여러 생약재들을 기존의 열수 추출방법으로 추출할 때 낮은 추출효율과 이로 인한 에너지 소비가 많으며 열로 인한 많은 유용성분의 파괴, 단백질의 변이, 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출, 열에 대하여 불안정한 것 등의 단점을 드러내고 있다. 이에 반해 최근 대두되고 있는 초음파 추출을 병행하는 방법은 전통적인 열수 추출방법과는 달리 많은 경비가 소요되지 않으면서 추출공정의 효율을 높이고 식물성분의 용매 추출에 효과를 나타내는 등 최근 관심이 집중되고 있는 실정이다.

특히 초음파 에너지를 추출에 이용하면 초음파 진동에

의한 공동현상 (cavitation)에 의해 매우 큰 에너지를 발생하게 된다. 또한 높은 국부온도로 인하여 주위에 위치하는 반응물 입자들의 운동에너지를 크게 하기 때문에 반응에 필요한 충분한 에너지를 얻게 되고, 초음파 에너지의 충격 효과로는 높은 압력을 유도하여 혼합 효과를 높여주게 된다 (Chung *et al.*, 2000). 용매추출과 초음파 추출을 비교한 실험에서 초음파 에너지를 용매추출공정에 도입하여 추출한 결과 초음파 조사시간이 증가함에 따라 추출량은 증가하였고, 이는 용매추출에 비해 매우 짧은 시간에 추출이 완료된 것으로 초음파의 공동효과에 의한 높은 압력으로 세포 내부조직이 파괴되어 지방질의 이동거리가 짧아지고 확산이 용이하게 일어나기 때문이라는 결과를 보고한바 있다 (Kim *et al.*, 2001).

† Corresponding author : (Phone) +82-433-250-6455(E-mail) chyeonl@cc.kangwon.ac.kr

Received November 7, 2003 / Accepted July 21, 2004

가시오갈피 (*Acanthopanax senticosus* Harms)는 두릅나무과에 속하는 쌍떡잎식물로서 시베리아 원산의 다년생 목본으로 생약학에서는 줄기, 뿌리 및 가지의 껍질을 건조시킨 것을 가시오갈피 (*Acanthopanax senticosi Radicis Cortex*)라 한다 (Tagasugi *et al.*, 1985). 주로 한국 (지리산 이북) · 일본 · 사할린 · 중국 동북부 · 우수리강 유역 등에서 분포한다 (Medon *et al.*, 1984). 지금까지의 가시오갈피에 대한 성분연구가 이루어진 것은 뿌리 껍질에서 eleutheroside A, B, B1, C, D 및 E 등의 saponin 및 lignan glycoside를 분리 한 것들이 보고되어졌다 (Todorov *et al.*, 1984).

마황 (*Ephedra sinica* Stapf)은 마황과에 속하는 다년생 초본 혹은 초본성목으로 한방에서는 발한, 해열, 진해, 항염증의 목적으로 이용되어온 생약으로 ephedrine, pseudoephedrine, ephedroxane, norephedrine 등을 함유하고 있으며, 항염증작용, 교감 신경흥분작용, 이뇨작용 등 많은 약리 작용이 보고되어 있다 (Duncan *et al.*, 1957; Dulloo *et al.*, 1991).

복분자 (*Rubus coreanus* Miq.)는 중국, 일본, 우리나라 중 · 남부 지방의 해발 50~1000m 지역 산기슭 양지에 자생하는 장미과의 식물로 미성숙 열매를 건조시킨 것을 복분자라 한다 (Kim, 1997). 복분자는 식용 및 약용으로 사용되고 특히 열매는 식용 및 청량 음료제로 쓰고, 복분자 딸기의 줄기로부터 2종의 flavan-3-ol과 1종의 proanthocyanidin 및 1종의 ellagitannin을 분리하였고, 또한 복분자 잎으로부터 4종의 flavonoids를 분리하여 그 구조를 밝혔다 (Lee, 1995; Lee & Lee, 1995).

인진쑥 (*Atremisia capillaris* Thunb.)은 국화과에 속하는 다년생 식물로 우리나라에서뿐만 아니라 중국 일본 등지에서도 오래 전부터 간암, 간경변, 황달 등 주로 간질환의 치료에 사용되고 있다. 또한 인진쑥을 비롯한 약용식물에 함유되어 있는 탄닌류들의 항균작용, 콜레스테롤 저하작용 및 항산화 작용 등에 대한 연구가 많이 보고되어 왔다 (Ahn *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1999).

따라서 본 연구에서는 이러한 유용한 이점을 가진 초음파 병행 추출을 이용하여 기존에 항암 및 생리활성에 효과가 있다고 보고되어진 생약재를 이용하여 더 낮은 온도에서 추출효율과 높은 생리활성 효과와 이들을 이용한 기능성 식품 및 기능성 소재로서의 활용을 위해 본 실험에 임하였다.

재료 및 방법

1. 유용 생리 활성 실험

가. 암세포의 생육 저해 및 세포독성 실험

실험에 사용된 암 세포주는 인간 유래의 간암세포 (Hep3B),

정상세포로는 인간 폐세포 (HEL299)를 이용하였다. 세포배양에 사용된 기본 배지는 DMEM (GIBCO, USA)을 HEL299는 RPMI 1640 (GIBCO, USA)을 사용하여 10% FBS를 첨가하여 배양하였다. 실험에서 세포 농도를 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 96 well plate의 각 well에 100 μ l씩 접종하여 실험에 사용하였다. 암세포의 생육 저해 및 정상 세포에 대한 세포독성 실험은 Sulforhodamine B (SRB) 방법을 이용하여 540 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다 (Dool & Peto 1981).

나. 세포의 자기사멸 측정

인간 폐암세포인 A549 (lung carcinoma, human)을 이용해 세포의 자기사멸형태를 관찰하기 위하여 A549를 배양한 후 이 배양된 인간 폐암세포인 A549를 6 well plate에 3×10^4 cells/ml로 각 well에 4 ml씩 분주한 후 각 well의 A549를 5일간 세포 사멸형태를 TUNEL 염색법을 이용하여 관찰하였다. 분주된 각 well을 24시간 간격으로 배지를 제거한 후 4% paraformaldehyde (in PBS, pH 7.4)를 이용하여 상온에서 1시간 세포를 고정하였다. 그 후 PBS로 well을 세척한 후 3% H₂O₂ (in methanol)를 투여하고 10분간 상온에서 방치하였다. 다시 well을 PBS로 세척한 후 0.1% Triton X-100 (in 0.1% sodium citrate)을 이용하여 4℃의 얼음 위에서 2분간 방치하였다. well을 PBS로 2회 세척 후 well 주위를 잘 건조시켰다. 다 건조된 well에 50 μ l의 TUNEL 혼합용액을 첨가하는데, 이때 용액의 누출 방지를 위해 well 주위를 파라필름을 이용하여 잘 감쌌다. 파라필름으로 감싼 well plate를 incubator에서 60분간 방치한 후 PBS로 3회 세척한 후 형광 현미경으로 세포를 관찰하였다. 세포관찰 후 다시 well을 건조한 후 50 μ l의 Converter POD를 첨가하고 이것 또한 누출 방지를 위해 파라필름으로 감싼 incubator에서 30분 가량 방치한 후 PBS로 3회 세척을 하였다. 다시 여기에 100 μ l의 DAB-substrate solution을 첨가하여 상온에서 10분간 방치 후 PBS로 3회 세척한 후에 최종적으로 광학 현미경으로 세포의 사멸형태를 관찰하여 카메라를 이용해 세포의 사멸 형태를 촬영하였다 (Pratima *et al.*, 2003).

다. 세포 분화능 측정

HL-60 (human promyelocytic leukemia) 세포는 5% heat-inactivated fetal bovine serum과 RPMI 1640 medium을 사용하여 37℃, 5% CO₂의 조건 하에서 suspension culture로 유지하였다. 세포를 4×10^5 cells/ml의 농도로 24 well plate에 1 ml 접종하여 전 배양한다. 24시간 간격으로 배지를 제거한 후 세포를 수확하여 320 xg에서 10분간 원심분리하여 침전시킨 다음, 200 μ l의

0.1% Triton X-100을 넣어 37°C에서 30분간 lysis시켰다. 일정량의 lysate와 0.1% Triton X-100을 20 μ l 되게 96 well plate에 옮기고, 3 mg/ml의 4-nitrophenyl phosphate가 든 50 mM acetate buffer (pH 0.5)를 100 μ l 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응의 정지를 위해 0.1 N NaOH 100 μ l를 첨가한 후 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Yen & Guernsey 1986; Bang & Lee 1993).

결과 및 고찰

1. 항암 활성 탐색

가. 암세포의 생육 저해 및 세포독성 측정 결과

정상세포에 대한 세포독성을 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 모든 추출물에서 초음파를 병행한 60°C 추출물들이 물 60°C 추출물에 비해 1.0 mg/ml의 농도에서 정상세포 생존율을 75% 이상으로 유지시켜 정상세포에 대한 안전성이 유지된 것으로 나타났다. 또한 같은 농도에서 마찬가지로 초음파 병행 60°C 추출물이 암세포 생육억제활성이 70% 이상으로 나타나 시료자체에 대한 독성은 나타나지 않았으며, 암세포에 대한 선택적 사멸이 가능할 것으로 사료된다.

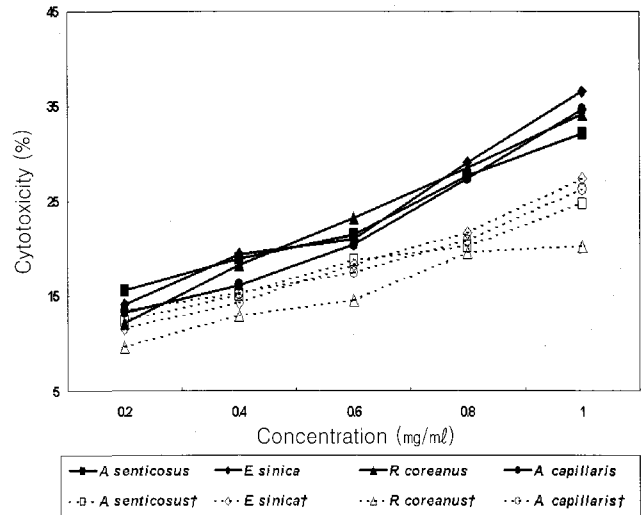


Fig. 1. Cytotoxicity of the water extracts and [†]water extracts with ultrasonification on according to temperature at 60°C from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq. and *Artemisia capillaris* Thunb. on the growth of normal fetus lung, HEL299.

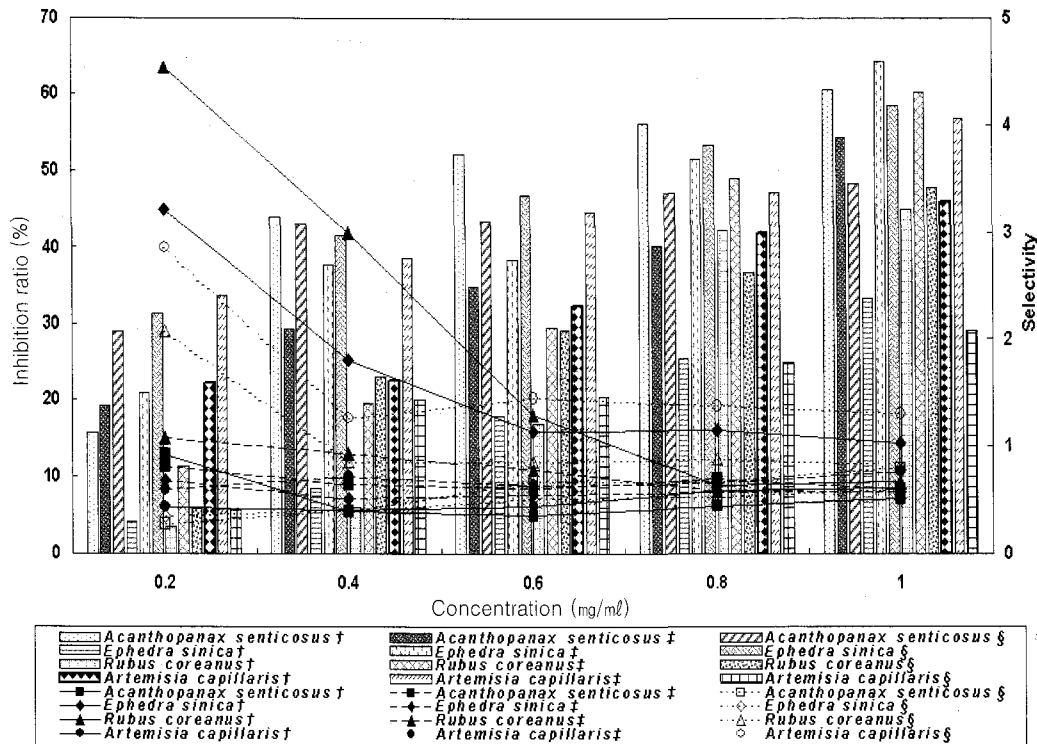


Fig. 2. Inhibition ratio of growth of hepatocellular carcinoma, Hep3B (bar chart, %) and selectivity (scatter line) in adding the water extracts according to temperature at [†]40, [‡]60, [§]100°C from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq. and *Artemisia capillaris* Thunb.

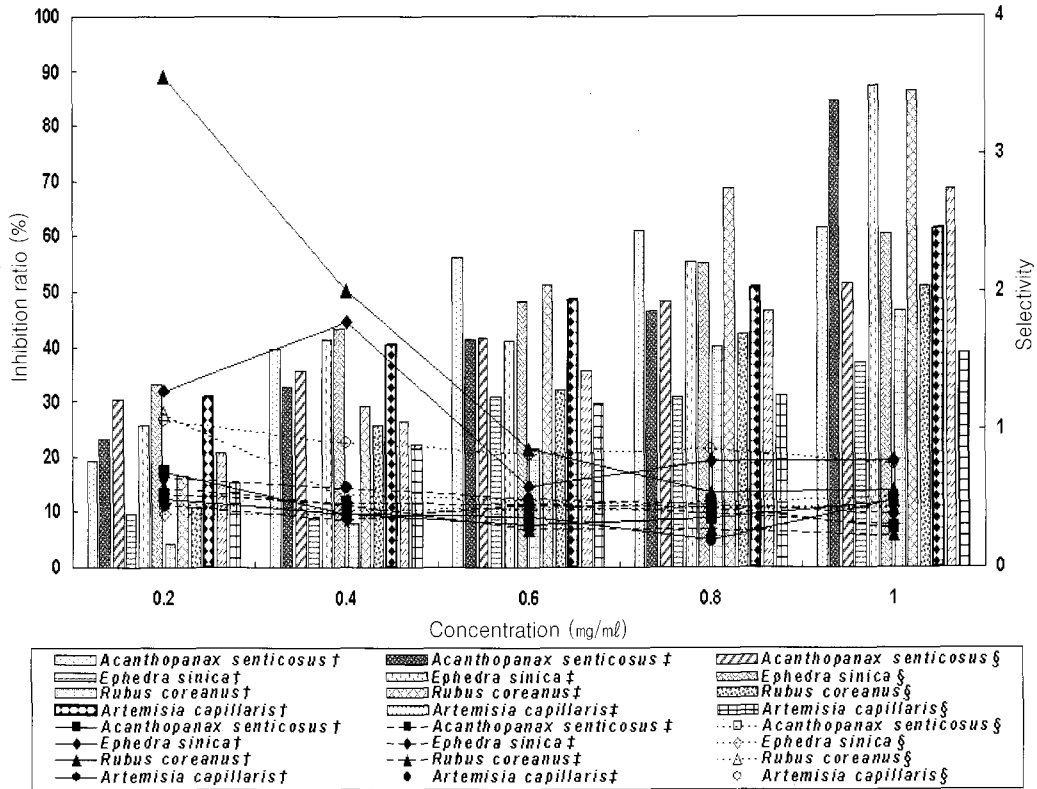


Fig. 3. Inhibition ratio of growth of hepatocellular carcinoma, Hep3B (bar chart, %) and selectivity (scatter line) in adding the water extracts with ultrasonification on according to temperature at [†]40, [‡]60, [§]100°C from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq. and *Artemisia capillaris* Thunb.

각 추출물들의 암세포에 대한 생육억제활성은 Fig. 2와 3에 나타난 바와 같이 1.0 mg/ml의 농도에서 각 60°C의 물 추출물들은 60% 이하의 생육억제활성을 나타낸 반면, 초음파 병행 추출물은 60% 이상의 생육억제활성을 나타내었다. 또한 각 추출물의 정상세포독성에 대한 암세포의 억제율을 나타내기 위하여 같은 농도에서의 정상세포 사멸도에 대한 암세포 사멸도의 비를 나타낸 selectivity에 있어서 60°C 초음파 병행 추출물들이 1.0 mg/ml의 농도에서 2.5 이상의 수치를 나타내어 물 추출물들보다는 초음파를 병행한 추출물들이 암세포를 선택적으로 사멸하는 것을 확인할 수 있었다. 이런 결과는 물 추출물들에서는 미처 추출하지 못했던 생리활성 물질을 초음파 병행을 통한 추출에서 공동화 현상에 의해 더 높은 생리활성 물질들의 추출이 이루어졌던 것으로 사료되어진다.

나. 암세포의 Apoptosis

Apoptosis (혹은 Programed cell death)의 초기단계에서, cell membrane은 그대로 유지되는 성질이 있다. Apoptotic cell은 그것들의 형태의 변화와 그것의 DNA가

가수분해되어 죽어가기 전에 TUNEL 염색액에 의해서 염색이 되어진다. 이런 현상을 이용해서 Fig. 4에서 5일 동안 인간 폐암 세포인 A549의 세포 농도 이용하여 활성이 좋았던 마황과 복분자 열수 추출물과 초음파 추출을 병행한 추출물 60°C에서 apoptotic이 열수 추출물보다는 초음파 병행 추출물을 가한 투여 군에서 더 많이 관찰되는 것을 볼 수 있었다.

다. 세포 분화능 측정

세포 분화활성도의 측정 결과 Fig. 5에서 확인할 수 있듯이 물 추출물보다는 초음파를 병행한 모든 생약 추출물들이 높은 세포 분화 활성도를 나타내는 것을 관찰할 수 있다. 생약재들이 60 초음파 병행 추출물에서 가장 높은 세포 분화 활성도를 나타냈다. 이는 초음파를 병행한 추출물들이 물 추출물들보다 분화유도 물질의 증가와 이로 인한 세포의 신호전달 체계가 신속하게 이루어져 분화도가 증가한 것으로 보인다. 이와 같은 결과는 초음파 병행 추출을 통한 추출물들에서 분화유도 물질의 증가를 보여 세포 분화 활성도를 초래했다고 사료된다.

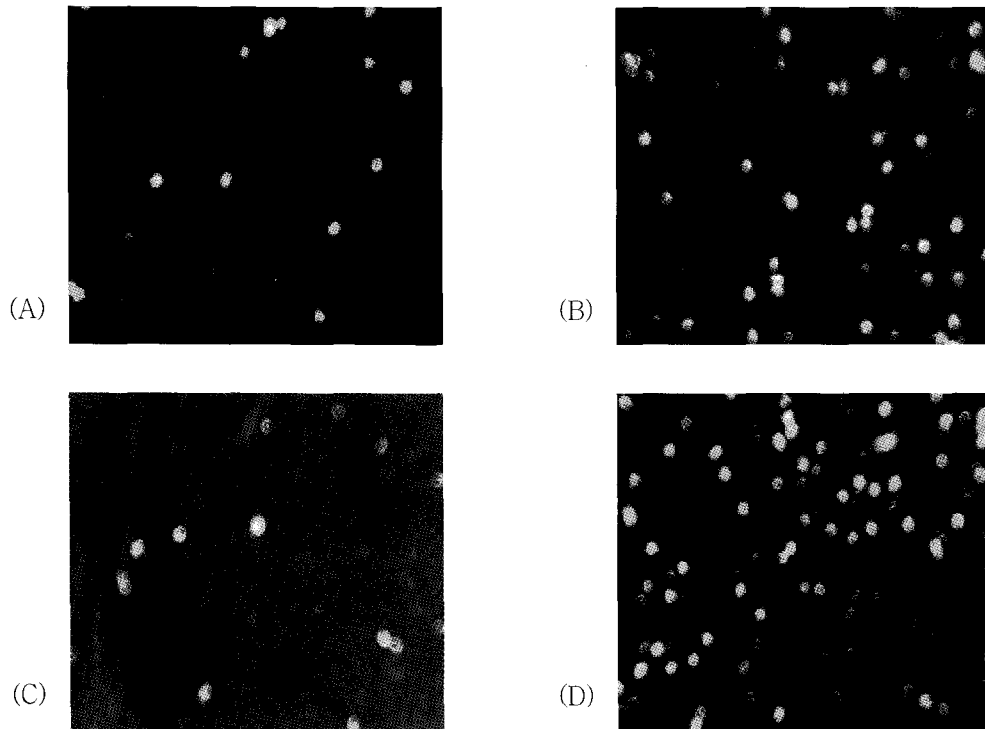


Fig. 4. Morphological differences between control A549 cell and treated with *Ephedra sinica* Stapf (A, B) and *Rubus coreanus* Miq. (C, D) for 5 day. (A, C : water extraction, B, D : ultrasonification with water extraction).

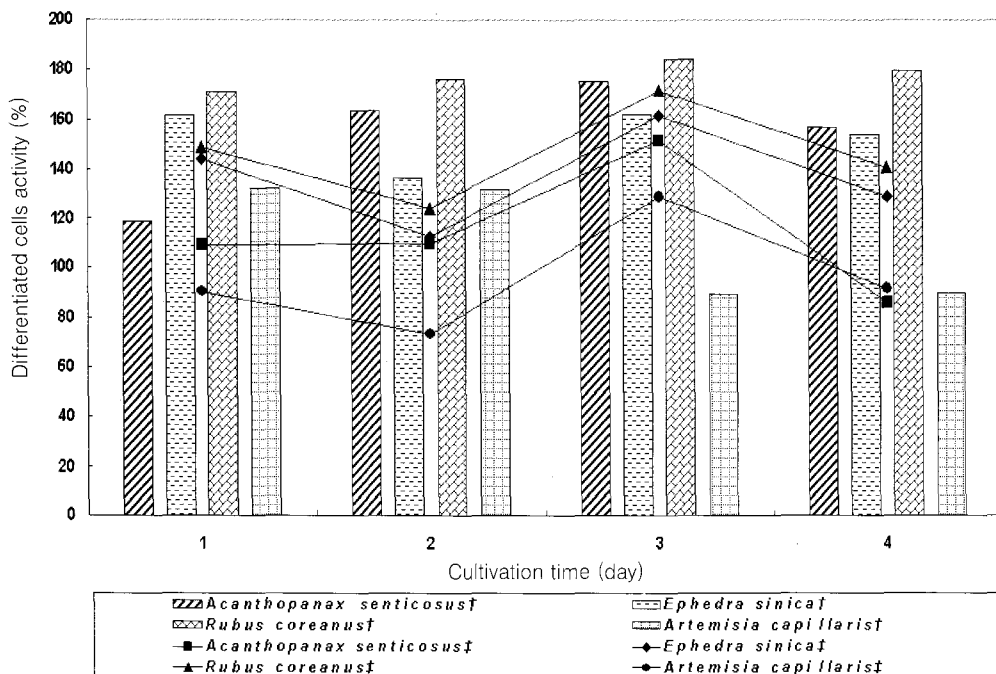


Fig. 5. Comparison of the differentiation of HL-60 cells by adding (1.0 mg/mL) of the water extracts and water extracts with ultrasonification on extracts according to temperature at 60°C from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq. and *Artemisia capillaris* Thunb.

적 요

한국산 생약재인 가시오갈피, 마황, 복분자, 인진쑥을 이용하여 추출과정 중 40℃, 60℃, 100℃로 온도를 달리 하여 기존의 열수 추출방법과 초음파를 병행한 추출로 인해 면역 활성 증진이 다르게 나타나는 효과를 비교 실험하였다. 실험 결과 여러 조건 중 복분자 60℃, 40 ㎖의 초음파 병행 추출물이 가장 좋은 항암활성 증진 효과를 나타내었다.

추출시 모든 열수 추출물들에 비해 초음파 병행 추출물의 추출 수율이 높게 나타났다. 이는 추출시 열수 추출에서 미처 빠져나오지 않았던 여러 활성 물질이 초음파 처리에 의해 공동화현상과 더불어 액체간의 상호 탈기 작용에 의해 추출 수율의 상승효과를 가져온 것으로 사료된다.

Apoptosis 실험에서는 5일 동안 인간 폐암 세포인 A549의 세포를 이용하여 활성이 좋았던 마황과 복분자의 60℃ 열수 추출물과 초음파 추출을 병행한 추출물을 이용하여 관찰한 결과 apoptotic이 열수 추출물보다는 초음파 병행 추출물을 투여한 군에서 더 많이 관찰되는 것을 볼 수 있었다. 이와 마찬가지로 HL-60 세포분화능 실험에서도 열수 추출물보다는 초음파를 병행한 추출물들이 높은 세포 분화 활성도를 나타냈다. 또한 모든 조건 중에서 생약재들이 60℃, 40 ㎖ 초음파 병행 추출물에서 가장 높은 세포 분화 활성도를 나타냈다.

이러한 결과로 보아, 앞으로 한국산 생약재의 고부가가치 창출을 위해 더 많은 실험을 통하여 초음파의 병행 처리에 따른 효과와 이를 통한 기능성 소재 및 기능성 식품으로의 이용을 위해 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각되어진다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 바이오 그린 21 연구 지원으로 수행한 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

LITERATURE CITED

- Ahn BY, Hwang HS, Beak SH, Kwak JS, Choi DS, Han JH (2000) Desmutagenic effect of water extract from *Artemisia capillaris* Thunb. on the mutagenicity of benzol[a]pyrene. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 15(4):331-336.
- Bang OS, Lee YS, Kang SS (1993) A possible role of fibronectin on the differentiation of monocyte to macrophage. Korean. J. Zool. 3:514-521.
- Chung K, Kim WI, Hong IK, Park KA (2000) Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. Applied Chemistry. 4(2):149-152.
- 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):1992.
- Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L (1991) Periphdral mechanism of thermogenesis induced by ephedrine and caffeine in brown adipose tissue. Int. J. Obes. 15(5):317-326.
- Duncan PE, Griffin JP, Solomon SS (1957) Bronchodilator drug efficacy via cyclic AMP. Thorax. 30(2):192-196.
- Lee CH, Han KH, Choi IS, Kim CY, Cho JK (1999) Effects of mugwort-water extracts on cadmium toxicity in rats. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 19(2):188-197.
- Lee MW (1995) Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. Korean J. Pharmacogn. 39:200-204.
- Lee YA, Lee MW (1995) Tannins from *Rubus coreanum*. Korean J. Pharmacogn. 6:27-30.
- Kim TJ (1997) Korean resources plants", Seoul University Republished. Seoul, 282.
- Kim WI, Chung KW, Lee SB, Hong IK, Park KA (2001) Ultrasound energy effects on solvent-extraction of amaranth seed oil. J. Korean Ind. Eng. Chem. 12(3):307-311.
- Medon PJ, Ferguson PW, Waltson CF (1984) Effects of *Eleuterococcus senticosus* extracts on hexo-barbital metabolism *in vivo* and *in vitro*. J. Ethnopharmacol. 10:235-241.
- Tagasugi NT, Moriguchi TS, Fuwa S, Sanada Y, Saiti H (1985) Effects of *Eleuterococcus seticosus* and its components on retal temperature, body and grip tones, motor coordination and exploratory and spontaneous movements in acut stress mice. Shoyakugaku Zasshi. 39:232-237.
- Todorov IN, Sizova ST, Kosagonova NY, Mitrokhin YI, German AV, Mitrofanova MA (1984) Pharmacokinetics and mechanism of action of glycosides of eleutherococci, Effects of extract on the metabolism and biosynthesis of protein in several organs and tissues of rats. Khim. Farm. Zh. 529-533.
- Pratima S, Sribnick EA, Wingrave JM, Nowak MW, Ray SK, Banik NL (2003) Estrogen attenuates oxidative stress-induced apoptosis in C6 glial cells, Brain Research 971:178-188.
- Yen Y, Guernsey DL (1986) Increased c-myc RNA levels associated with the precommitment state during HL-60 myeloid differentiation. Cancer Res. 46:4156-4161.

Ahn BY, Hwang HS, Beak SH, Kwak JS, Choi DS, Han JH (2000) Desmutagenic effect of water extract from *Artemisia capillaris* Thunb. on the mutagenicity of benzol[a]pyrene.