

## 고추나물의 면역 활성

박진홍\* · 김대호\* · 최근표\*\* · 류이하\*\*\* · 이강윤\*\*\*\* · 이현용\*†

\*강원대학교 바이오산업공학부, \*\*알앤지 바이오텍, \*\*\*주) 진로, \*\*\*\*유니온화학

### Immune Activities in *Hypericum perforatum* L.

Jin Hong Park\*, Dae Ho Kim\*, Geun Pyo Choi\*\*, Lee Ha Ryu\*\*\*, Kang Yoon Lee\*\*\*\*, and Hyeon Yong Lee\*†

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

\*\*R&G BioTech, Gangneung 210-821, Korea.

\*\*\*JINRO Ltd., 1448-3, Seocho-dong, Seocho-ku, Seoul 137-866, Korea.

\*\*\*\*UNION, 1-143, Gansuk-3-dong, Namdong-ku, Incheon 405-801, Korea.

**ABSTRACT :** Immune enhancing activities of water and ethanol extracts of *Hypericum perforatum* L. (HP) were examined. HP extracts inhibited the growth of human hepatocarcinoma, human gastric cancer cell and human breast cancer cells in concentration-dependent manners over a concentration range of 0.05~1.0 mg/ml, showing inhibition of more than 80% with the concentration of 1.0 mg/ml. However, HP the same concentration. Overall selectivity of the extracts on the three human cancer lines was over 3.5, which is higher than those from the conventional herbs. The growth of human immune B and T cells was enhanced up to 1.4 to 2.0 folds by the addition of the extracts for 4 days, compared to controls. Ethanol extracts of HP after 6 days incubation increased the secretions of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) from T cells and interleukin-6 (IL-6) from B cells to 6.7 pg/cell and 6.8 pg/cell, respectively. These results suggest that HP has a potent immune enhancing effect.

**Key words :** *Hypericum perforatum* L., TNF- $\alpha$ , interleukin-6, immune modulating activities

## 서 언

St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.)는 크기가 1 m까지 자랄 수 있는 물푸레나무과에 속한 여러해살이식물로 주요 성분은 Hypericin, 정유, 플라빈, hyperforin, tannin 등이 알려져 있으며, 꾸준히 차로 마시면 가벼운 우울증 증세나 신경과민으로 인한 불안과 공포감 등에 좋은 효과가 있다고 하며, 북미에서는 *Echinacea*와 더불어 널리 이용되는 허브이다. 외용으로는 수렴작용과 항균작용 및 염증 억제작용 등이 알려져 있다. 허브는 대체치료 요

법에서 질병의 예방 및 완화를 위해 널리 사용되어지고 있으며, 우리나라에서도 점차 그 이용이 늘어나고 있다. 그러나 이러한 대체 요법뿐만 아니라 그 허브 자체가 천연물질 및 생약으로서의 관심도 증가되고 있다. 천연물질 및 생약은 20세기 초부터 발전된 백신과 화학 약물요법으로 뚜렷한 치료법을 발견할 수 없는 만성질환 및 성인병에 일정한 개선효과를 나타내어 관심을 끌고 있다. 또한 허브를 포함한 천연물질 및 생약은 인체 내에서 식균작용을 활성화하고, 항체의 생성을 촉진시키며, 체내 생화학적 수치들을 정상화하는 등, 질병에 대한 방어력을 증가시켜 만성질환을

† Corresponding author : (Phone) +82-33-250-6455(E-mail) hyeonl@cc.kangwon.ac.kr

Received April 2, 2004 / Accepted July 21, 2004

예방하고 치료할 수 있도록 하여, 면역반응을 강화시키거나 저하된 면역기능을 정상화시킴으로 치료에 사용된다 (Itoh *et al.*, 1985; Agarwal *et al.*, 1986). 때문에 동서양을 막론하고 이러한 면역증진활성을 가지는 허브나 천연물질 및 생약에 대한 관심이 높아지고, 이들에 대한 수요도 증가하고 있다.

따라서 본 연구는 St. John's Wort 뿌리 추출물의 암세포의 생육억제활성과 면역세포의 성장과 면역세포가 생성하는 cytokine에 대한 영향을 측정하여 St. John's Wort의 기존의 허브로서 뿐만 아니라 기능성 식품소재로서의 활용가능성을 높이고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 추출방법

본 실험에 사용한 St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.)는 미국의 오하이오 서부지역에서 채배된 것의 뿌리를 구입하여 사용하였다. 수직의 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량 100 g에 대하여 각각 10배의 증류수와 ethanol을 사용하여 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압 여과장치로 여과하여 농축 후 동결건조 한 후 각각의 수율을 계산하여 각각의 실험에 사용하였다.

### 2. 암세포의 성장저해 및 세포 독성 실험

실험에 사용된 암세포주는 인간 유래의 간암 세포주인 Hep3B (hepatocellular carcinoma, human, ATCC HB-8064), 위암 세포주인 AGS (stomach adenocarcinoma, human, ATCC CRL-1739), 유방암 세포주인 MCF-7 (breast adenocarcinoma, human, ATCC HTB-22) 정상세포로는 인간 정상 폐세포주인 HEL299 (embryo lung cell, human, ATCC CCL-137)을 이용하였다. 세포 배양에 사용된 기본배지는 AGS와 HEL299에는 RPMI1640(GIBCO, USA)을 Hep3B와 MCF-7에는 DMEM (GIBCO, USA)을 사용하였으며, 모두 FBS를 10%로 첨가하여 배양하였다. 암 세포의 생육저해와 정상 세포의 세포독성은 sulforhodamine B (SRB) 방법을 이용하였다 (Doyle *et al.*, 1993; Dool *et al.* 1981). 실험에 사용한 세포의 초기 농도는  $4 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 조절하여 96 well tissue culture microplate에 100  $\mu$ l/well씩 접종하여 사용하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 후 최종농도가 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml가 되도록 조정하여 100  $\mu$ l씩 시료를 투여 한 후 48시간 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 차가운 trichloroacetic acid (TCA) 100  $\mu$ l를 가하여 4°C에서 1시간동안 놓아둔

뒤 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하였다. 다시 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB 용액을 100  $\mu$ l씩 첨가, 상온에서 30분 동안 염색한 후 1% acetic acid로 염색액을 충분히 세척, 건조하였다. 건조된 well에 10 mM Tris buffer 100  $\mu$ l를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 microplate reader를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다 (Kada *et al.*, 1986; Micael *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1996). 각 실험 결과들은 실험군에서 최대치와 최소치를 제외한 자료들의 평균을 계산하였으며, 각 평균치간의 차이는 Student t-test에 의해 유의성을 검정하였다.

### 3. 면역 활성 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% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 24 well plate에 세포를  $2.0 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 조절한 후 900  $\mu$ l/well씩 접종하고 24시간 배양한 후, 0.2  $\mu$ m의 filter로 여과되어진 시료들은 각각의 well에 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml의 농도로 첨가한 후 4일간 다시 배양하였다. 배양 후 cell을 hemacytometer로 세포수를 측정하였다. 그리고 이것은 추출물을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 세포의 생육과 세포수에 따라 면역 활성을 측정하였다. 또한 보다 명확한 면역 활성 효과를 검증하기 위하여 면역세포들이 배지 내에 분비하는 cytokine인 Tumor Nerosis Factor-와 Interleukin-6의 양을 ELISA kit (Genzyme, USA)를 이용하여 측정하였다. 배양액을 원심 분리한 상층액에 ELISA kit (Tumor necrosis factor- (1,000 pg/ml, 250 pg/ml, 62.5 pg/ml, 15.6 pg/ml, 0.0 pg/ml), Interleukine-6 (5,00 pg/ml, 125 pg/ml, 31.25 pg/ml, 7.81 pg/ml, 0.0 pg/ml) 시약을 가하여 37°C에서 30분간 배양 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질을 이용해 표준곡선을 작성하고 이에 시료에서 얻어진 O.D값을 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Han *et al.*, 1998).

## 결과 및 고찰

### 추출 수율

St. John's Wort 뿌리의 증류수 및 에탄올 추출물의 수율은 각각 21.3%와 7.7%를 나타내어 증류수 추출물이 에탄올 추출물보다 2.7배 정도 높은 수율을 나타내었다. 증류수 추출물과 에탄올 추출물이 2.7배정도 차이가 나는 것은 추출물에 수용성 물질보다는 지용성 물질이 보다 많이 함

유되어 있는 것으로 사료되어져 이러한 수율의 차이가 나타나는 것으로 생각되어진다.

**St. John's Wort의 세포독성**

St. John's Wort의 정상세포에 대한 세포독성을 측정한 결과는 Fig 1.에 나타내었다. 두 종류의 추출물 모두 1.0 mg/ml의 농도에서도 정상세포 생존율을 80% 이상으로 유지시켜 정상세포에 대한 세포독성은 매우 낮았다. 이는 0.5 mg/ml이상의 농도에서 St. John s Wort의 암세포 생육억제활성이 50% 이상으로 나타나, 암세포에 대한 선택적 사멸이 가능할 것으로 사료된다.

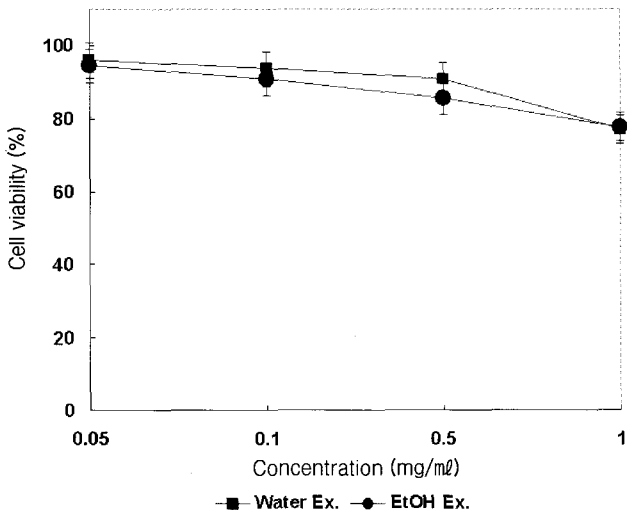


Fig. 1. Effect of *Hypericum perforatum* L. extracts on HEL299 viability.

St. John's Wort의 암세포에 대한 생육억제활성은 Fig. 2, 3, 4에 나타낸 바와 같이 농도의존적인 억제활성을 보였으며, 0.5 mg/ml 이상의 농도에서는 매우 높은 억제율을 나타내었다. 고추나물의 증류수 및 에탄올 추출물 모두 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 간암세포주인 Hep3B에 대하여 80% 이상의 높은 억제율을 나타내었으며, 증류수 추출물의 경우 0.1 mg/ml의 농도에서도 60%의 높은 억제율을 나타내었다. 위암세포주인 AGS에 대하여서도 에탄올 추출물에서 0.1 mg/ml의 농도 이상에서 60% 이상의 생육억제활성을 나타내었으며, 0.5 mg/ml의 농도에서 두 종류의 추출물 모두 75% 이상의 높은 생육억제율을 나타내었다. 유방암세포주인 MCF-7에 대하여서는 에탄올 추출물들은 0.05 mg/ml 이상의 농도에서도 약 65% 이상의 높은 암세포 생육억제활성을 나타내었으며, 증류수 추출물들은 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 약 80% 정도, 에탄올 추출물들은 90% 이상의 높은 암세포 생육억제활성을 나타내었

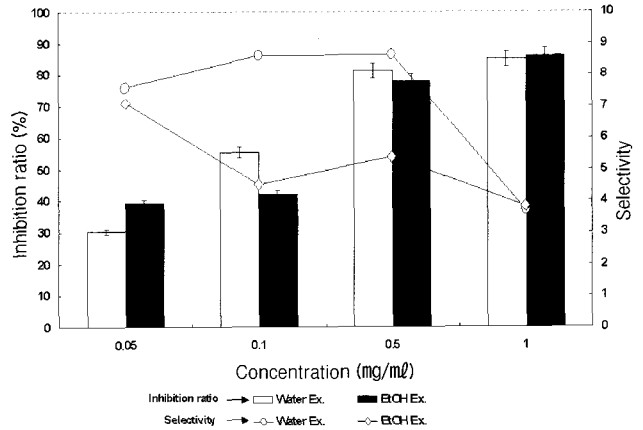


Fig. 2. Inhibitory effect of *Hypericum perforatum* L. extracts on Hep3B growth and the cancer cell selectivity.

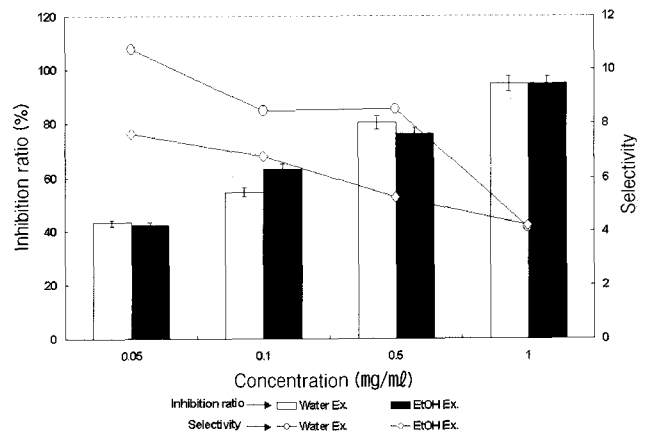


Fig. 3. Inhibitory effect of *Hypericum perforatum* L. extracts on AGS growth and the cancer cell selectivity.

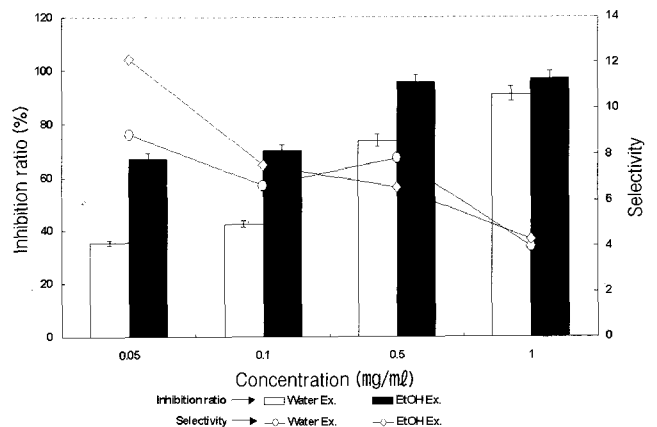


Fig. 4. Inhibitory effect of *Hypericum perforatum* L. extracts on MCF7 growth and the cancer cell selectivity.

다. 또한 각 추출물의 정상세포독성에 대한 암세포의 억제율을 나타내는 selectivity에 있어서 각 추출물이 1.0 mg/ml의 농도에서 4이상의 수치를 나타내어 고추나물 추출물이 암세포를 선택적으로 사멸하는 기작을 지닌 것을 확인하였다.

이상과 같이 St. John's Wort 뿌리 추출물들이 암세포에 대한 선택적 사멸 기작을 갖고 있는 것으로 확인되어, 인간 면역체계에서 항체 생성의 중요한 역할을 하는 인간 B와 T 세포주의 생육촉진에 대한 이 추출물들의 영향을 실험한 결과를 Fig. 5, 6, 7에 나타내었다. St. John's Wort 뿌리의 증류수 추출물과 에탄올 추출물의 면역세포생육 촉진 기능은 Fig. 5에 나타난 바와 같이 농도가 증가할수록 면역세포들의 성장율이 농도 의존적으로 증가하였으

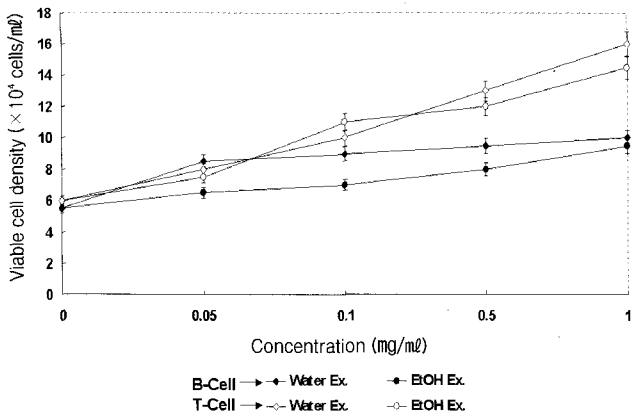


Fig. 5. Concentration-response of *Hypericum perforatum* L. extracts on the growth of human T-cell and B-cell. Each cell was incubated with the extracts for 4 days.

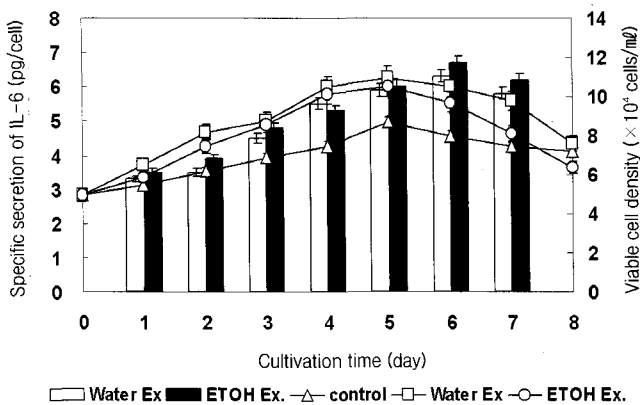


Fig. 6. Concentration-response of *Hypericum perforatum* L. extracts on the growth of human B-cell and IL-6 secretion from the cells. The concentration of 0.5 mg/ml for every extract was used.

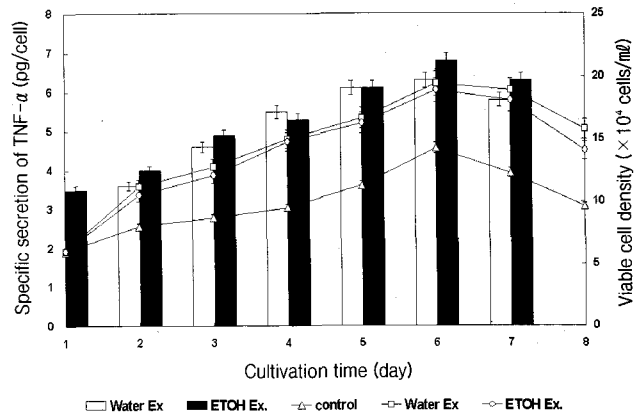


Fig. 7. Concentration-response of *Hypericum perforatum* L. extracts on the growth of human B-cell and TNF- $\alpha$  secretion from the cells. The concentration of 0.5 mg/ml for every extract was used.

며, 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 T세포의 성장을 2배 이상 증가시켰으며, B-cell의 경우 1.2~1.5배 이상의 성장율의 증가를 나타내었다. 또한 물 추출물들이 에탄올 추출물에 비하여 높은 면역세포의 생육 촉진활성을 나타냄을 확인하였다. 이는 암세포의 생육억제활성에 있어서 에탄올 추출물들이 높은 활성을 나타내는 것에 반대되는 것으로 St. John's Wort 뿌리 추출물의 면역 활성 기능이 있는 유용성분 물질이 80°C 이상의 높은 온도에서 잘 녹아 나오는 수용성 물질로 사료되어 진다. 또한 증류수 추출물의 경우 에탄올 추출물에 비하여 약 2.7배 이상의 높은 수율을 나타내어 이를 잘 활용할 경우 용매의 수율 및 가격 측면에서 좀더 효율적인 고추나물의 이용이 가능하리라고 예상된다. Fig. 6과 7은 배양기간에 따른 면역세포의 생육과 면역물질인 cytokine의 생산에 대한 것이다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 0.5 mg/ml의 농도에서 B세포의 생장은 배양 5일째 두 종류 추출물에서 가장 높은 생존율을 나타내었으며 추출물을 첨가하지 않은 경우에 비교하여 약 1.5배의 성장율을 나타내었다. 또한 단일 클론 항체의 생성 등에 관여하는 cytokine인 IL-6은 에탄올 추출물이 배양 6일째 0.5 mg/ml의 농도에서 최고 66.8 pg/cell의 분비량을 나타내었다. Fig. 7의 T 세포의 경우 대조구에 비하여 1.5배 이상의 세포 성장율의 증가를 나타내었다. 또한 신호전달 계도 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- $\alpha$  (Eli et al., 1991)도 에탄올 추출물이 배양 6일째 최고 67.5 pg/cell의 분비량을 나타내었다. 이러한 면역증진활성의 확인은 이들의 기능

성식품 소재로서의 이용할 수 있는 기초 자료가 되어, 고추나물의 부가가치를 좀더 높이고, 이에 따라 이들의 수요 증대에도 기여할 것으로 사료되어진다.

## 적 요

St. John's Wort의 정상세포에 대한 세포독성을 측정된 결과 두 종류의 추출물 모두 1.0 mg/ml의 높은 농도에서도 정상세포 생존율을 80% 이상으로 유지시켜 정상세포의 안전성이 유지되었다. St. John's wort 추출물은 0.5 mg/ml의 농도에서 간암세포주인 Hep3B에 대하여 80% 이상의 높은 억제율을 나타내었으며, 위암세포주인 AGS에 대하여서는 75% 이상의 높은 생육억제율을 나타내었고, 유방암세포주인 MCF-7에 대하여서는 증류수 추출물들은 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 약 80%정도, 에탄올 추출물들은 90% 이상의 매우 높은 암세포 생육억제활성을 나타내었다. 또한 각 추출물의 정상세포독성에 대한 암세포의 억제율을 나타내는 selectivity에 있어서 각 추출물이 4이상의 수치를 나타내어, 암세포를 선택적으로 사멸하는 기작을 지닌 것을 확인하였다. 고추나물의 뿌리 물 추출물들은 인간 B와 T 세포주의 생육을 0.5 mg/ml 이상의 농도에서 T세포의 성장을 2배 이상, B-cell의 경우 1.2~1.5배 이상의 생육 증가를 나타내었으며, 물 추출물들이 에탄올 추출물에 비하여 높은 면역세포의 생육 증진활성을 나타내었다. 배양기간에 따른 면역세포의 생육과 면역물질인 cytokine의 생산을 보면 배양 5일째 두 종류 추출물에서 가장 높은 생존율을 나타내었으며 추출물을 첨가하지 않은 경우에 비교하여 약 1.5배의 성장율을 나타내었고, B 세포에서 IL-6은 에탄올 추출물이 배양 6일째 0.5 mg/ml의 농도에서 최고 6.9 pg/cell의 분비량을 나타내었고, T 세포의 TNF- $\alpha$ 도 에탄올 추출물이 배양 6일째 최고 6.8 pg/cell의 분비량을 나타내었다.

## 사 사

본 연구논문은 2004년도 한국과학재단 지역협력연구센터사업 (한림대 실버생물산업기술연구센터 R12-2004-047-00000-0)의 연구비 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사 드립니다.

## LITERATURE CITED

- Agrwal BB, PR Traquna, TE Eessalu. (1986) Modulation of receptor and cytotoxic response of tumor necrosis factor-L by various lectins. *J. Biol. Chem.* 261:13652-13656.
- Dool R, R Peto (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, JB Griffiths, DG Newell (1993) *Cell & Tissue culture : Laboratory procedures*, Wiley.
- Fernci P, B Dragosies, H Dittrich, H Frank, L Benda, H Lochs, S Meryn, W Base, B Schneider (1989) Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J. Hepatol.* 9:105-113.
- Han, BH, MH Park, JY Cho, JS Park, ES Yoo, KU Baik (1998) Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- $\alpha$  production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji.* 42(3):296-301.
- Itoh A, K Iizuka, S Natori (1985) Antitumor effects of Sarcophage lectin on murine transplanted tumors. *J. Cancer Res.* 76:1027-1033.
- Micael CA, AS Domnic, M Anne (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48:589-601.
- Rubin, H (1985) Cancer as a dynamic development disorder. *Cancer Res.* 45:2935.
- Lee SH, SL Choi, CO Lee, SY Ryu, JW Ahn, OP Zee (1994) Antitumor activity of some phenolic components in plants. *Arch. Pharm. Res.* 17:42.
- Jung CH, EJ Hwang, HC Kwon, SY Kim, KW Bae, OP Zee, KR Lee (1999) Antioxidative flavonoids from *Hypericum erectum*, *Korean J. Pharmacogn.* 30(2):196-201.