

추출 공정 다변화를 통한 홍경천의 항암활성 증진효과

김철희* · 김효성* · 권민철* · 배근중* · 안주희* · 이학주** · 강하영** · 이현용*†

*강원대학교 바이오산업공학부

Increase Effect of Anticancer Activities on *Rhodiola sachalinensis* A. Bor by the Change of Extraction Process.

Cheol Hee Kim*, Hyo Sung Kim*, Min Chul Kwon*, Geun Jung Bae*, Ju Hee Ahn*,
Hak Ju Lee**, Ha Young Kang**, and Hyeon Yong Lee*†

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

**Division of Wood Chemistry, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea.

ABSTRACT : This study was performed to compare effect of anticancer activities on *Rhodiola sachalinensis* by ultrasonification process and solvent. Compared the yield to the water extracts (WE), water extracts with ultrasonification (WEU) at 60, 100 °C and ethyl alcohol extracts (EE), ethyl alcohol extracts with ultrasonification (EEU) at 60 °C from *Rhodiola sachalinensis*. Experimental studies were progressed through the anticancer activities such as cell cytotoxicity, inhibition activities of cell growth. The cell cytotoxicity using human embryonic kidney cell (HEK293) was showed cytotoxicity of below 26.26% by extracts of *Rhodiola sachalinensis* in 1.0 mg/ml concentration. The anticancer activities were increased in over 70% by extracts of *Rhodiola sachalinensis* in A549, AGS, Hep3B and MCF-7 cells. From the results, the extract of *Rhodiola sachalinensis* were showed useful anticancer activities.

Key Words : anticancer activities, *Rhodiola sachalinensis*, ultrasonification

서 언

홍경천 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)은 고산지대에서 자라는 다년생 초본식물로서 돌나물과 (Crassulaceae)의 돌꽃속 (*Rhodiola*)에 속한다 (Chung, 1974). 홍경천은 중국에 70종 이상 (Ip *et al.*, 1994)을 포함하여, 유럽, 아시아, 알라스카에 걸쳐서 서식하는 200종 이상의 다른 종을 갖는 고산 식물이다 (Kelly, 2001). 그 중 오직 14종만이 약학적 연구의 대상이 되었다. 홍경천에 함유되어 있는 약리적으로 중요한 성분은 salidroside, p-tyrosol, flavonoid, monoterpene glycoside, cyanoglycoside, penthyl glycoside, aliphatic glycoside, phenylpropanoid, proanthocyanidin 등을 함유한다 (Kurkin *et al.*, 1982).

홍경천은 최근에 인삼, 가시오가피 이후에 발견한 보건의료용 식물의 일종으로 원기를 회복시키고 병과 독을 극복하고 장수하게 할 수 있어 “고원인삼”이라는 별칭을 가지고 있다 (김주철 등, 1994). 의약적 부분에서 기억력과 학습력 (Petkov *et al.*, 1986), 면역반응 (Furmanowa *et al.*, 1999), 중추신경계와

스트레스 (Afanas'ev *et al.*, 1996; Lishmanov *et al.*, 1999), 암 (Razina *et al.*, 2000) 치료에 사용될 수 있는 것으로 보고되어 있다.

본 연구에서는 용매에 따른 기존의 열수 추출 방법과 초음파 추출의 홍경천 추출물의 항암 활성을 비교하였다. 기존의 열수 추출방법으로 추출할 때 낮은 추출 효율과 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 초음파 추출의 병행 방법은 추출공정의 효율을 높이고, 생물 활성을과 식물 성분의 용매 추출동안 초음파를 이용하는 것이 효과가 있다고 보고된 바 있다 (Toma *et al.*, 2001; Vinatoru, 2001). 용매 내에서 초음파 (ultrasound)의 공동 (cavitation) 효과에 의해 유발된 분자운동이 활성화 에너지로 작용하여 세척이나 반응성 향상, 특정성분의 추출 공정에 도입되어 공정의 효율을 높이는 효과가 있다 (Noltingk *et al.*, 1950; Kim *et al.*, 1998).

본 연구에서는 초음파 병행 추출과 용매의 조건을 달리 함

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

Received July 3, 2006 / Accepted November 28, 2006

에 따라 얻어진 추출물들의 항암활성을 비교하고, 이러한 생리활성 검증을 통하여 이들의 항암제로서의 가능성을 부여하고, 더 나아가 본 연구 자료들이 기능성 식품에 관련된 분야에 바탕 자료로서 가치를 지니게 하기 위해 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

1) 실험재료

실험에서 사용된 홍경천 (*R. sachalinensis*)은 2004년 10월 백두산에서 재배 중인 홍경천 뿌리를 수입하였다.

2) 시약

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Alpha minimum essential medium (α -MEM)은 GIBCO (USA)로부터 구입하였고, HEPES buffer는 SIGMA (USA)에서 구입하였다. 혈청은 GIBCO (USA)사의 fetal bovine serum과 horse serum을 이용하였고 gentamycin sulfate, trypsin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였다.

2. 홍경천 추출

홍경천 뿌리를 깨끗하게 씻은 후 손질하여 분쇄하고 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량에 대한 10배의 증류수와 ethyl alcohol을 추출 용매로 각각 사용하여 ethyl alcohol 60°C, 증류수 60°C, 100°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압 여과장치로 여과하여 농축 후 동결건조 한 뒤에 실험에 사용하였다.

3. 정상세포 독성 측정

인간 신장 세포 HEK293을 MTT assay를 이용하여 각 sample 농도에서 정상세포에 대한 sample의 세포독성을 측정하였다. 우선 HEK293를 RPMI 1640배지와 10% fetal bovine serum을 이용하여 5% CO₂ incubator에 배양한다. 이 배양된 세포를 24 well plate에 4 × 10⁴ cells/ml로 분주한 후 각 sample을 농도별로 100 μ l씩 첨가하여 MTT assay를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 각 sample의 정상세포에 대한 세포독성을 측정하였다 (Michael *et al.*, 1998).

4. 항암 활성 측정

SRB (sulforhodamine B) assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 Hep3B, MCF-7 (10% FBS, DMEM+F12 배지)과 A549, AGS (10% FBS, RPMI 1640 배지)의 농도를 4 ~ 5 × 10⁴ cells/ml로 96well plate의 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 24시간 동안

배양 (37°C, 5% CO₂)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 100 μ l씩 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) TCA (trichloroacetic acid) 100 μ l를 가하여 1~4시간 동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 후 각 well에 1% (w/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB 용액을 100 μ l씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 μ l씩을 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다 (Dool R. and R. Peto, 1992; Doyle *et al.*, 1993).

MTT assay를 이용하여 인간 신장 세포 HEK293에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, SRB assay를 이용하여 각 암세포주의 생육 억제 활성을 측정한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

$$Selectivity = \frac{\text{암세포 생육 억제 활성}}{\text{정상 세포의 세포 독성}}$$

결과 및 고찰

1. 홍경천의 추출 수율

홍경천의 추출 수율은 Table 1과 같다. 물과 에탄올의 열수 추출과 열수 추출 후 초음파 병행 추출한 모든 조건 중 100°C에서 가장 높은 추출량을 보였다.

수율 면에서는 물 100°C에서 초음파 병행 추출한 것이 1.96배 증가한 것으로 추출물 중에서 14.11%로 가장 높은 추출 수율을 나타내었다. Table 1에서 확인 할 수 있듯이 열수 추출만 한 것에 비해 모든 초음파 병행 추출물이 1.6배 이상 수율이 증가한 것으로 나타났다.

기존의 열수 추출물에 비하여 초음파 병행추출물의 수율이 높게 나타나는 것은 초음파 조사 시 초음파의 공동효과에 의한 높은 압력으로 세포 내부조직이 파괴되어 추출물의 이동거리가 짧아지고 확산이 용이하게 일어나기 때문이다. 또한 초음파에 의한 혼합효과에 의해 추출 함유 조직의 입자가 파쇄

Table 1. The extraction yields of water extracts and ethanol extracts from *Rhodiola sachalinensis*.

Sample	Solvent	Extraction temperature (°C)	Yields (% w/w)		
			I	II	Ratio(%)
<i>Rhodiola sachalinensis</i>	Water	60	7	12.9	1.84
		100	7.2	14.11	1.96
	Ethanol	60	6.4	10.37	1.62

I : Simple water extraction, II : Ultrasonification extraction.

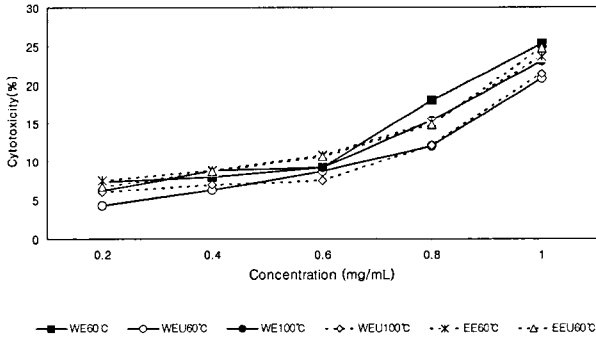


Fig. 1. Cytotoxicity of the water extracts and water extracts(WE) and water extracts with ultrasonification (WEU) at 60, 100 °C from *Rhodiola sachalinensis* on the growth of Human embryonic kidney cell, HEK 293. Also, ethanol extracts (EE) and ethanol extracts ultrasonification (EEU) according to temperature at 60°C from *Rhodiola sachalinensis* on the growth of Human embryonic kidney cell, HEK 293.

되어 큰 비표면적을 가짐으로써 작은 입자에 의한 활성 증가가 기존 열수 추출 보다 더 효율적인 추출이 이루어져 수율이 높게 나타난 것으로 보여 진다 (이승범 등, 2003).

2. 정상 세포의 독성측정

실험에 사용된 sample 농도는 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 조절하여 정상세포에 대한 세포독성과 각 암세포에 대한 성장 효과를 검토하였다. sample과 표준물질인 인간 신장 세포 HEK293에 대한 세포 독성은 sample과 표준물질 모두 최고 농도인 1.0 mg/ml에서 30% 이하의 낮은 세포독성을 나타내었다 (Fig. 1).

그 중에서 가장 낮은 세포 독성을 나타낸 것은 60°C 물에서 초음파 병행 추출한 것이 20.80%로 가장 낮게 나타났고, 같은 조건에서 초음파 병행 추출을 한 것이 하지 않은 것보다 낮게 나타났다. 또 sample의 농도가 증가하면서 세포 독성이 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 가장 낮은 농도인 0.2 mg/ml의 농도에서 모든 sample이 10% 미만의 낮은 세포독성을 나타내었다. 이상의 결과들로 초음파 병행한 추출물들의 독성효과가 낮게 나타나 항암효과에 대한 실험에서도 마찬가지로 높은 효과를 나타낼 것으로 판단되어 그 효과를 증명해 보고자 실험을 행하였다.

3. 항암 활성 측정

실험에 이용된 세포주는 암세포로 인간 간암세포인 Hep3B (hepatocellular carcinoma, human), 인간 폐암세포인 A549 (lung carcinoma, human), 인간 위암세포인 AGS (stomach adenocarcinoma, human), 인간 유방암 세포인 MCF-7 (breast carcinoma, human)을 사용하였고 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포로는 인간 신장 세포 HEK293 (human

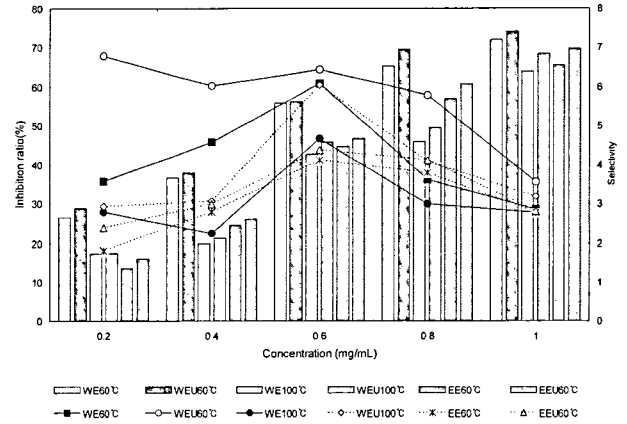


Fig. 2. Inhibition ratio of growth of A549 (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts from *Rhodiola Sachalinensis*.

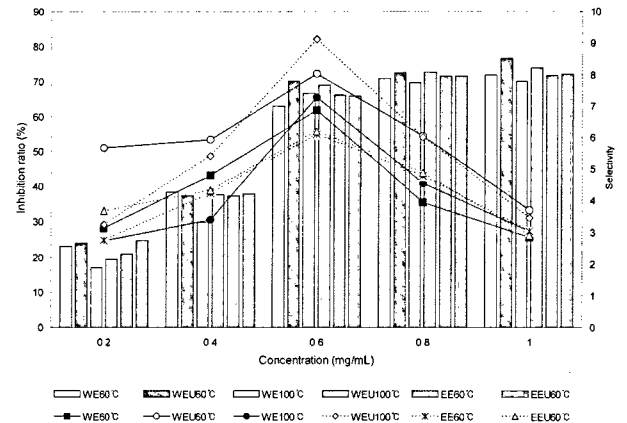


Fig. 3. Inhibition ratio of growth of ACS (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts from *Rhodiola Sachalinensis*.

embryonic kidney cell)을 사용하여 홍경천의 추출물에 대하여 SRB assay를 측정하였고 사용된 sample의 농도는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 조절하여 실험하였으며 다음과 같은 실험결과를 얻었다.

Fig. 2는 폐암 세포인 A549에 대한 각 추출물의 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그 중 1.0 mg/ml의 농도에서 가장 높은 억제율을 나타낸 것은 물 60°C에서 초음파 병행한 추출물이 74.08%로 가장 높았고 selectivity는 3.56으로 가장 높았다.

Fig. 3은 위암 세포인 AGS에 대해서 억제율과 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성이 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 1.0 mg/ml의 농도에서 물 60°C에서 초음파 병행한 추출물이 76.70%로 가장 높았고 selectivity는 3.69로 가장 높은 것을 확인할 수 있다.

적 요

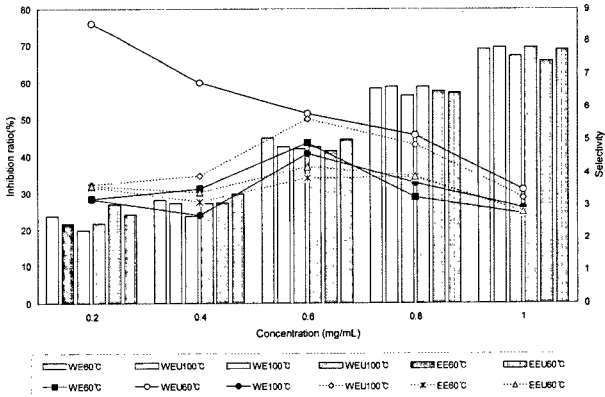


Fig. 4. Inhibition ratio of growth of Hep3B (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts from *Rhodiola Sachalinensis*.

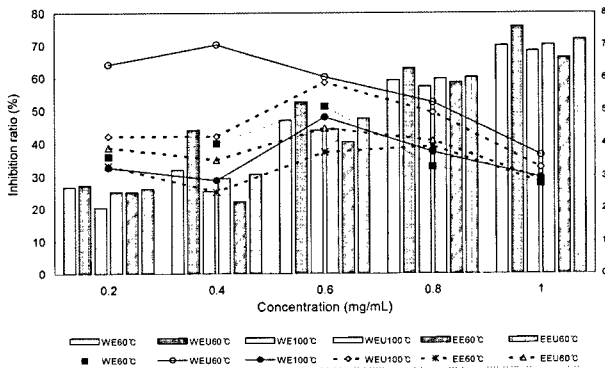


Fig. 5. Inhibition ratio of growth of MCF-7 (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts from *Rhodiola Sachalinensis*.

Fig. 4, 5는 각각 간암세포인 Hep3B와 유방암 세포인 MCF-7의 억제율과 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 앞선 A549, AGS의 결과와 마찬가지로 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 1.0 mg/ml의 농도에서 물 60°C에서 초음파 병행한 추출물이 각각 72%와 75.8%로 가장 높은 억제율을 나타내었다. 또한 selectivity는 1.0 mg/ml의 농도에서 물 60°C에서 초음파 병행한 추출물이 각각 3.46과 3.64로 가장 높았다.

이상의 결과를 종합해 보면, 여러 가지의 추출물 중에서 물 60°C에서 초음파 병행한 추출물이 가장 높은 항암 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또 홍경천 자체가 농도가 1.0 mg/ml일 때 65% 이상의 높은 항암 활성을 보인다는 것을 알 수 있었다. 전체적으로 열수 추출만 한 것과 초음파 병행추출한 것을 비교하였을 경우에도 초음파 추출을 병행한 것이 보다 높은 활성도를 보이는 것을 알 수 있다.

따라서 이러한 결과에서 홍경천의 추출 방법의 변화를 통하여 각각의 추출방법에 따른 성분 함량 변화에 관한 비교 실험이 진행되어야 할 것으로 사료되는 바이다.

용매의 조건 변화와 초음파 병행추출에 의한 홍경천 추출물의 항암 활성에 대해 살펴보았다. 추출 수율은 물과 에탄올 추출물과 열수 추출 후 초음파를 병행한 모든 조건 중 물 100°C에서 초음파를 병행한 것이 가장 높은 수율을 보였고 열수 추출만 한 것과 초음파 추출을 병행한 것을 비교해 보면 초음파를 병행한 것이 최소 1.6배 이상 높게 나왔다.

홍경천 추출물의 정상세포에 대한 독성을 알아보기 위하여 인간 신장 세포 HEK293을 이용하였으며 각 추출물은 1.0 mg/ml의 농도에서 최고 25.26%, 최저 20.80%의 독성을 나타내었다. 또한 항암 효과를 살펴보기 위하여 인간 폐암세포 (A549)와 위암세포 (AGS), 인간 간암세포 (Hep3B), 인간 유방암세포 (MCF-7) 4가지 암세포주를 이용하여 세포 생육 저해능을 측정하였다. A549, AGS, Hep3B, MCF-7에서 60°C 초음파 추출물에서 각각 74.08%, 76.70%, 72%, 75.8%로 가장 높은 억제 활성을 나타내었고, 암세포의 생육 활성에 대한 정상 세포의 세포 독성의 비로 나타낸 선택적 사멸도는 고농도에서 3.46 이상으로 나타나 모두 암세포에 대한 선택성이 있는 것으로 나타났다. 전체적으로 열수 추출만 한 것과 비교하면 초음파 병행추출을 한 것이 최대 5%이하까지 높은 활성도를 보이는 것을 알 수 있다.

감사의 말

본 연구논문은 2006년도 산업자원부 지역혁신센터사업 (한림대 식의약품의 효능평가 및 기능성소재개발센터)의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

Afanas'ev SA, Krylatov AV, Lasukova TV, Lishmanov YB (1996) Role of inducible stress proteins in cardioprotective effects of *Rhodiola rosea*. *Biokhimiya* 61:1779-1784.
 Chung TH (1974) Korean flora (herb part), 283.
 Dool R, Peto R (1992) The causes of cancer : Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *J. Natl. Cancer Inst.* 66(6).
 Doyle A, Griffiths JB, Newell DG (1993) Cell & Tissue culture : Laboratory procedures, *Wiley*.
 Furmanowa M, Kedzia B, Hartwich M, Kozlowski J, Krajewska-Patan A, Mscisz A, Jankowiak J (1999) Phytochemical and pharmacological properties of *Rhodiola rosea* L. *Herba Pol.* 45(2):108-113.
 Ip SP, Che CT, Leung PS (1994) Association of free radicals and the tissue renin-angiotensin system: prospective effects of *Rhodiola*, a genus of Chinese herb, on hypoxia-induced pancreatic injury. *JOP. Jan;* 2(1):16-25.
 Kelly GS (2001) *Rhodiola rosea*: a possible plant adaptogen.

- Altern Med Rev. Jun; 6(3):293-302.
- Kim HJ, Hong IK (1998)** J. Ind Eng. Chem, 4(1):39.
- Kurkim VA, Zapesochya GC, Klyazinka VG (1982)** Flavonoids of *Rhodiola rosea*. Khim Prir Soedin B:581-584.
- Lishmanov YB, Maimeskulova LA, Uskina EV, Maslov LN (1999)** Opiatergic mechanisms of cardioprotective and antiarrhythmic effects of adaptation. Bull. Exp. Biol. Med. 127:151-154.
- Michael CA, Domnic AS, Ahne M (1998)** Feasibility of drug Screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay, Cancer Res. 48:589-601.
- Petkov VD, Yonkov D, Mosharoff A, Kambourova T, Alova L, Petkov VV, Todorov I (1986)** Effects of alcohol aqueous extract from *Rhodiola rosea* L. roots on learning and memory. Act. Physiol. Pharmacol. Bulg. 12:3-16.
- Noltingk BE, Neppiras EA (1950)** *Proc. Phys. Soc.*, 63B, 674.
- Razina TG, Zueva EP, Amosova EN, Krylova SG (2000)** Medicinal herb preparations as a means of additional therapy: Experimental oncology evidence. Eksp. Klin. Farmakol. 63:59-61.
- Seong KL, Song YI, Song HS (2002)** A Study on the Dye Wasterwater Treatment Using in the Ultrasonic Process(1), J. Korea Technol. Soc. Water and Waster Treatment 10(3):85-97.
- Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason TJ (2001)** Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. Ultrasonics Sonochem. 8:137-142.
- 김주철, 안상득, 이명래 (1994)** 원색백두자원식물, 아카데미서적, 서울, p. 324.
- 이승범, 이승문, 홍인권 (2003)** 초음파가 도입된 용매 추출 공정에 서 에너지밀도 분석 한국공업화학회, 14(7):989-993.