

홍경천의 면역활성이 증진된 용매별 분획 추출물

하지혜* · 김철희* · 정향숙* · 김 영* · 오성호* · 김승섭* · 정명훈* · 마충제*
남종현** · 황 백*** · 최근표**** · 박옥연**** · 이현용*****†

*강원대학교 BT특성화학부대학, **(주)그래미, ***전남대학교 생물학과,
****강원도립대학교 식품가공제과제빵과, *****강원대학교 생명공학연구소

Improvement of Immune Activities of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. by Serial Solvent Fractionization

Ji Hye Ha*, Cheol Hee Kim*, Hyang Suk Jeong*, Jin Ling*, Sung Ho Oh*, Seung Seop Kim*,
Myoung Hoon Jeong*, Choong Je Ma*, Jong Hyun Nam**, Baik Hwang***, Geun Pyo Choi****,
Uk Yeon Park****, and Hyeon Yong Lee*****†

*College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National Univ., Chuncheon 200-701, Korea.

**Grami Co., Ltd., Cheonwon, Kangwon 269-802, Korea.

***Department of Biology, Chonnam National Univ., Kwangju 520-830, Korea.

****Department of Food Processing & Bakery, Gangwon Provincial Univ., Gangneung 210-804, Korea.

*****Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National Univ., Chuncheon 200-701, Korea.

ABSTRACT : This study was performed to compare the effects of immuno-modulating activities of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. fractionized by consecutive solvent separation. The Cytotoxicity of all fractionized extracts on human kidney cell (HEK293) was lower than crude extracts. Generally, the butanol and chloroform extracts showed less cytotoxicity on about 10.07% and 9.67% than the crude extracts. For human immune B and T cell growth, chloroform fraction showed the highest cell growth compared to the control. The secretion of cytokines (IL-6, TNF- α) on human B and T cells were increased by adding chloroform extracts. Also, NK cell growth was significantly improved up to nearly 30% by adding the supernatant of B cell medium grown with the chloroform fraction. It was also found that chloroform fraction could yield higher nitric oxide production from macrophage than untreated control cells. Differentiation of HL-60 cells was increased up to 131.9% after treatment with chloroform fraction extracts, compared to the control. These results indicate that the chloroform fraction of *R. sachalinensis* have high immune activation activity than others fractions and the crude extracts, implying that this chloroform fractions could be used a new functional material.

Key Words : *Rhodiola sachalinensis* A. Bor., Consecutive Solvent Fraction, Immune Activation Activity, Natural Killer (NK) Cell

서 언

홍경천 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor.)은 들나무과 (Crassulaceae)의 들꽃속 (*Rhodiola*)에 속하는 다년생 초본으로 대부분 해발 1,700~2,300 m 사이의 주야간 온도차가 크고, 저온, 건조, 광풍, 강자외선의 극한 환경에 자생하는 고산 식물이다. 민간에서는 진정제, 해열제로 주로 쓰이며, 항산화 (Park *et al.*, 2005), 항암 (Kim *et al.*, 2006a), 면역 반응 (Kim *et al.*, 2008), 중추신경계와 스트레스 (Afanas'ev *et al.*, 1996; Lishmanov *et al.*, 1999)에 효과가 있다고 보고되어 있다. 또한 최근 연구에서 홍경천 에탄올 추출물이 중추신경계 손상에

의해 증가되는 IEGs (immediate-early genes)의 발현을 조절하여 운동 후 피로회복과 운동능력의 향상 및 피로유발 억제 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다 (Ryu *et al.*, 2008).

면역기능은 자가가 인식하는 외부로부터의 자극에 신체를 보호하는 반응 기작을 총칭하는 것으로 우리 몸에는 면역 기능에 관여하는 세포나 조직이 모여서 이루어진 하나의 유기적인 체계가 존재하며, 이를 면역계라고 한다. (Abo *et al.*, 2005). 능동적인 면역 반응을 결정짓는 가장 중요한 림프구 (lymphocytes)에는 체액성 면역반응과 세포 매개성 면역반응에서 각각 중요한 역할을 하는 B 림프구와 T 림프구가 있으며, 신체의 일차적 방어 기구 역할을 하는 자연면역 세포로 대식

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr
Received 2009 April 17 / Revised 2009 June 8 / Accepted 2009 June 11

세포 (macrophage), 자연살해 세포 (Natural Killer cell, NK cell) 등이 존재한다. 따라서 이러한 면역 세포의 활성 측정 및 활성 물질 정량을 통해 면역 증진능을 평가할 수 있는 지표로 이용할 수 있다.

유용 생리활성을 가지는 원료가 기능성 식품 소재로 이용되기 위해서는 활성성분을 효과적으로 추출 및 분리 할 수 있는 공정이 요구되는데, 초음파 공정을 통하여 효율적인 추출과 면역활성 및 항암활성 증진 효과가 보고된 바 있다 (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006b). 이에 본 연구는 초음파 병행 추출을 이용함과 동시에 극성, 비극성 용매 (butanol, water, ethyl acetate, chloroform)를 이용하여 얻어진 분획물을 생리활성 검증 실험에 사용하였다. 상기와 같은 용매의 성분 친화력에 따른 분배를 통해 성분을 분리하는 용매 분획을 실시할 경우 추출물에 존재하는 다량의 화합물을 물리, 화학적으로 성질이 유사한 화합물 근거리 분리할 수 있어 용매 분획물 각각의 특이적인 유용 생리활성 평가에 기여하며, 활성 성분의 분리와 농축에 의한 독성저감 및 신물질과 기저물질 농도의 증가로 인한 효율적인 활성 증진으로 인해 기능성 소재로서 활용도를 높이고 식품 가공에 단계적인 분획 추출 공정을 직접 적용할 경우 효율적, 경제적 산업화를 가능하게 한다.

본 연구는 상기와 같은 초음파 공정을 통한 홍경천 분획물들의 면역 조절 활성 탐색을 통해 특정 용매 분획물의 유용 생리활성을 검증하여 이를 면역조절 기능성 식품 소재화로서의 가치를 부여하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료 및 분획

본 연구에 사용된 홍경천 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor.)은 2004년 중국연변에서 홍경천 뿌리를 수입하여 사용하였다. 홍경천 뿌리를 깨끗이 세척하고 상온에서 건조 후 분쇄한 후 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 플라스크에 시료 중량 10배의 증류수를 용매로 사용하여 60°C에서 12시간 동안 추출을 2회 반복하였다. 이를 다시 초음파 발생기 (Asia industry, Kor.)를 이용하여 40 kHz에서 30분 동안 초음파 추출을 병행하였다. 상기의 추출공정에 의해 얻어진 홍경천 추출물로부터 분획물을 얻기 위하여 극성의 차이를 이용해 서로 다른 극성, 비극성 용매 (water, butanol, ethyl acetate, chloroform)를 첨가하여 단계적으로 분획하였다. 홍경천 초음파 추출물을 100 g을 증류수에 완전히 용해시킨 후 분획여두에 넣고 Chloroform 300 ml을 첨가하여 Water층과 Chloroform층을 분리하였고 이와 같은 공정을 3번 반복하였다. 동일한 과정을 통해 Ethyl acetate, Butanol을 순차적으로 가하여 각 분획물을 얻었고 최종 남은 용액은 Water 분획물로 사용하였다. 얻어진 각각의 분획물을 감압여과 장치로 여과하여 농축한 후 동결건조하여

용매를 완전히 제거한 뒤 본 실험에 사용하였다.

2. 시약

본 연구의 세포배양 시 사용되는 RPMI 1640, Alpha minimum essential medium (α -MEM) 배지와 Fetal bovine serum, horse serum은 GIBCO (USA)로부터 구입하였으며, Hepes buffer, Gentamycin sulfate, Trypsin-EDTA는 SIGMA (USA)에서 구입하여 사용하였다. Cytokine 측정을 위한 IL-6와 TNF- α KIT는 Chemicon (USA)사의 것을 구입하여 실험에 사용하였다.

3. 세포 주 및 세포 생육 배지

세포 독성은 인간 정상 신장 세포주인 HEK293을 이용하여 측정하였고 면역세포 생육 및 Cytokine 측정 실험을 위해 T cell (Jurkat, ATTC, USA)와 B cell (Raji, ATTC, USA)를 사용하였으며, NK cell (NK-92MI cell, ATTC, USA)을 이용하여 면역 증진 효과를 측정하였다. 대식세포의 nitric oxide 생성능은 마우스 유래 macrophage (J774.1, ATTC, USA)를 사용하여 측정하였고 분화도 측정을 위해 인간 전 골수성 세포인 HL-60 (human promyelocytic leukemia)세포를 사용하였다. 인간 전과립 세포와 대식세포는 RPMI 1640 배지와 10% heating inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였고, NK-cell은 α -MEM 배지와 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10^{-4} M 2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum과 12.5% horse serum을 첨가시켜 배양하였다.

4. 정상세포 독성 측정

인간 정상 신장 세포 HEK293을 이용하여 SRB (sulforhodamine B) assay (Doll and Peto, 1983)를 통해 홍경천 분획물의 정상세포에 대한 독성을 측정하였다. SRB assay는 세포 단백질의 염색을 통하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험에 사용되는 세포의 농도를 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 조절한 다음 96 well plate의 각 well에 100 μ l 씩 분주하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)한 후, 각각의 시료를 최종농도가 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 0.1 mg/ml 되게 조절하여 100 μ l 씩 첨가하였다. 48시간 배양 후에 상등액을 제거하고 4°C, 10% (w/v) TCA (trichloroacetic acid) 100 μ l 을 가하여 4°C에서 1시간 동안 정치하였다. 그 후 증류수를 이용하여 5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 완전히 건조한다. 건조된 plate 각 well에 1% (v/v) acetic acid로 녹인 0.4% (w/v) SRB 용액을 100 μ l 씩 첨가하여 상온에서 30분 동안 염색시킨 후 결합되지 않은 SRB 염색액을 제거하기 위해 1% acetic acid로 4~5회 세척한다. 실온에서 완전히 건조 후 10 mM Tris buffer 100 μ l 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서

microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

5. 면역세포 생육 증진 효과

인간 유래 T 세포주인 Jurkat과 B 세포주인 Raji를 이용하여 홍경천 분획물 첨가를 통한 면역 기증 증강 효과를 확인하였다. 인간 유래 면역세포는 10% FBS를 함유하는 RPMI1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, MTT assay를 이용하여 면역세포 증식율을 측정하는 방식으로 그 효과를 평가하였다. Yellow tetrazolium salt MTT는 살아 있는 세포에서 물에 녹지 않는 formazan crystal로 환원되는데 이 크리스탈을 DMSO로 녹여서 생성된 크리스탈의 양을 분광학적인 방법 (Spectroscopic method)으로 측정하여 세포의 생존율을 확인하는 것이다. 살아있는 세포의 수가 많을수록 크리스탈의 생성도 많아지므로 이러한 방법을 통해 세포의 성장을 쉽게 측정할 수 있다. 면역세포 생육 증진효과 실험은 24 well plate에 세포를 2.0 × 10⁴ cells/ml의 농도로 조절 한 후 시료를 투여하여 7일 동안 배양시키면서 1일 단위로 각 well의 세포수를 세포계수기 (Chemometec, Germany)를 이용하여 측정하였다 (Kwon *et al.*, 2008).

6. 면역세포 cytokine 분비량 측정

면역 활성화에 중요한 역할을 담당하는 면역세포 분비물인 Cytokine의 측정을 통해 면역세포 생육 증진에 따른 면역 활성 증진도를 확인하였다. 세포의 농도를 4~5 × 10⁴ cells/ml의 농도로 조절하여 24 well plate에 900 μl 씩 분주한 후 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 배양 후 시료의 최종농도가 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml 이 되도록 조절하여 100 μl를 첨가하여 다시 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂) 하였다. 원심분리기를 이용하여 배양액을 분리시킨 후 배양 상층액을 취하여 Chemicon (USA)사의 IL-6, TNF-α kit를 이용하여 분비된 Cytokine의 양을 측정하였다. microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 450 nm 에서 측정하였으며 얻어진 O.D.값을 표준물질을 이용하여 작성한 표준곡선과 비교하여 Cytokine의 양을 측정하였다 (Han *et al.*, 1998; Ha *et al.*, 2008).

7. Natural Killer (NK) 세포의 면역증진 효과

선천면역반응에 중요한 역할을 하는 자연살해세포 (Natural Killer cell, NK cell)의 활성을 측정하여 시료 첨가 시 나타나는 면역증진 효과를 평가하였다. NK cell은 ATCC로부터 NK-92MI 세포를 분양받아 사용하였으며, α-MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinisitol, 20 mM folic acid, 10⁻⁴M 2-mercaptoethanol, 12.5% FBS와 12.5% horse serum을 첨가하여 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 인간 B 세포와 T

세포를 T-25 Flask에 각각 배양하여 시료를 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 2~3번 계대 배양하였다. 배양 후 원심분리기를 이용하여 배양액을 분리하여 상층액을 얻었다. 4~5 × 10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 NK-92MI 세포를 24 well plate에 900 μl 씩 분주하여 24시간 배양 후 상기와 같은 방법으로 얻은 B 세포와 T 세포의 배양 상층액을 100 μl 씩 첨가하여 배양 48시간 후부터 6일 동안 각 well의 생세포 수를 측정하여 그 활성을 확인하였다 (Yueran *et al.*, 2003; Cesilia 2002).

8. 대식세포에서의 nitric oxide 생성능 측정

마우스 유래 J774.1 대식세포를 이용하여 홍경천 분획물의 첨가를 통하여 활성화 된 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitric oxide의 양을 microplate assay를 통해 정량하여 측정하였다. 대상 세포를 4~5 × 10⁴ cells/ml의 농도로 조절하여 24 well plate에 분주하여 48시간 동안 배양한 후 실험에 사용하였다. 시료를 처리하여 48시간 동안 배양한 후 상층액 50 μl를 취하여 동일부피의 Griess 시약 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine digydochloride/2.5% H₃PO₄)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 32 μM부터 0.25 μM까지 RPMI 1640 배지를 이용하여 단계 희석하여 얻는 표준곡선과 비교하여 계산하였다. NO⁻ 생성능의 양성대조구 물질로는 LPS (Lipopolysaccharide)를 사용하였다 (Ding *et al.*, 1998).

9. 세포 분화도 측정

인간 전골수성 세포인 HL-60 (human promyelocytic leukemia) 세포를 4 × 10⁵ cells/ml의 농도로 조절하여 24 well plate에 900 μl 씩 분주하여 24시간 배양한다. 배양 후 시료의 최종농도가 1.0 mg/ml 이 되도록 조절하여 100 μl를 첨가하여 다시 24시간동안 배양하였다. 이것을 24시간 간격으로 320 × g에서 10분간 원심분리하여 배지를 제거하고 세포만 수확한 후 200 μl의 0.1% Triton X-100을 넣어 37°C에서 30분간 용해시켰다. 일정량의 용해액을 20 μl 씩 96 well plate에 옮기고, 3 mg/ml의 4-nitriphenyl phosphate가 용해되어 있는 50 mM acetate buffer (pH 0.5)를 100 μl 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응의 정지를 위해 0.1 N NaOH 100 μl를 첨가한 후, microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Yen and Guernsey, 1986; Bang *et al.*, 1993).

결과 및 고찰

1. 정상세포 독성

인간 정상 신장 세포 HEK293을 이용하여 홍경천의 용매별

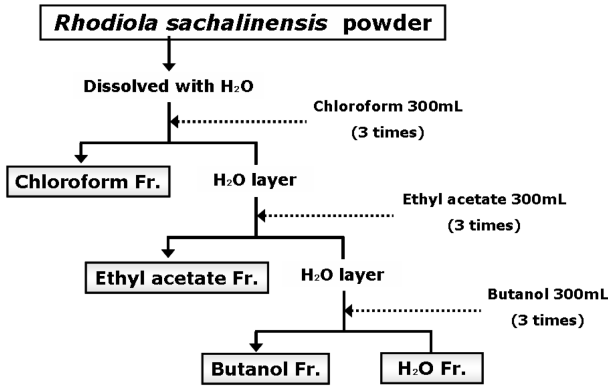


Fig. 1. Flow diagram of fractionizing of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor by water extracts with ultrasonification.

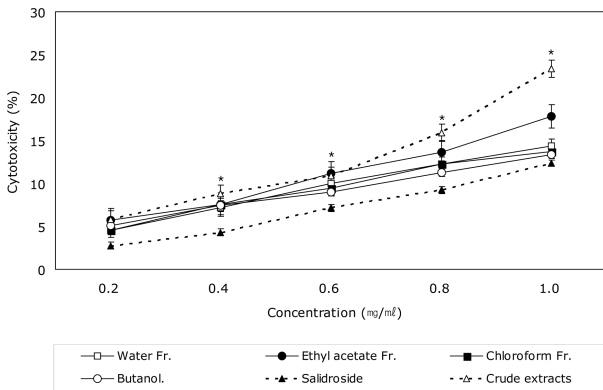


Fig. 2. Cytotoxicity of the crude and fractionized extracts of *R. sachalinensis* A. Bor on human normal cell lines (HEK293). Result are expressed as mean \pm S.D.M of data obtained from three independent experiments. *Each value were compared with control at $P < 0.05$.

분획물 첨가에 의한 세포독성을 측정된 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 분획을 실시하지 않은 일반적인 열수 추출을 통한 홍경천 조추출물은 0.6 mg/ml 이상의 농도에서 세포독성의 급격한 증가를 나타내며 시료의 최고농도 1.0 mg/ml에서 23.4%의 가장 높은 독성을 나타내었다. 반면 분획물 중 Ethyl acetate 분획물이 1.0 mg/ml에서 14.58%의 가장 높은 세포독성을 나타내었으며 이는 조추출물에서 나타난 독성과 비교하였을 때 세포독성이 8.82% 감소된 수치이다. 특히 butanol 분획물과 chloroform 분획물이 13.33%와 13.73%로 가장 낮은 독성을 나타내었으며 이는 조추출물에 비해 각각 10.07%, 9.67% 낮아진 세포독성 수치임을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 분획을 통한 홍경천 독성 분산으로 인한 결과라 사료되며, 기존의 연구 (Cui *et al.*, 2003)에서 에탄올 조추출물과 에탄올 조추출물의 분획물 중 가장 낮은 독성을 나타낸 Hexane 분획층이 1.0 mg/ml에서 각각 약 33.6%, 26.4%의 세포독성을 나타낸 것과 비교하였을 때 본 연구 결과에서 열수

조추출물 및 그 분획물이 전반적으로 매우 낮은 세포독성을 가지고 있음을 확인할 수 있다. 특히 특정 용매에서의 낮은 독성이 확인됨에 따라 본 연구에서 제시한 분획 공정을 통한 홍경천 분획물의 활성 성분이 기능성 소재로서의 높은 활용 가능성을 갖고 있다고 사료된다.

2. 면역세포 생육 증진 효과 및 Cytokine 분비량 측정

면역반응에 중요한 역할을 하는 B세포와 T세포를 이용하여 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하여 면역세포의 생육 증진 효과와 시료 첨가를 통한 B세포와 T세포의 cytokine 분비량 측정결과를 Table 1에 나타내었다. 그 결과 모든 추출물에서 생육이 농도 의존적으로 증가하였으며 특히 chloroform 분획물이 최고농도 1.0 mg/ml 일 때 B세포와 T세포에서 각각 135.6%와 137.6%의 생존율을 보이며 가장 높은 생육활성을 나타내었다.

Cytokine은 면역세포들의 상호 작용에 관여하며 신체의 방어체계를 제어하고 자극하는 면역체계 신호 전달물질로서 B세포와 T세포를 이용하여 각각의 세포로부터 시료 첨가에 따른 cytokine 분비량을 cytokine kit를 사용하여 정량하였다. 그 결과 면역세포 생육 증진 측정 실험과 마찬가지로 농도에 따라 cytokine 분비량이 유의적으로 증가하였으며 최고농도 1.0 mg/ml에서 IL-6와 TNF- α 모두 가장 높은 수치를 나타내었다. 각 시료에 대한 IL-6 분비량을 살펴보면, chloroform 분획물이 B세포와 T세포에서 각각 91×10^{-4} pg/ml, 95×10^{-4} pg/ml로 가장 많은 분비량을 나타내었다. TNF- α 분비량에서도 마찬가지로 chloroform 분획물이 각각 94×10^{-4} pg/ml와 99×10^{-4} pg/ml로 가장 많은 분비량을 나타내었다. 각 분획물의 생육 증진도와 cytokine 분비량을 홍경천 조추출물과 비교하였을 때 조추출물의 경우 세포의 생육도가 분획물에 비해 높은 반면 그에 따른 cytokine 분비량이 낮은 결과를 나타내었다. 이러한 결과로 보아 홍경천 조추출물이 면역세포의 생육을 촉진시키기는 하나 면역물질 분비에 있어 효율적인 결과를 나타내지 못하였으며 이는 홍경천 조추출물이 가지고 있는 활성 성분이 면역세포에 효과적으로 자극을 줄 수 있으나 상기 세포독성 실험에서 나타난 비교적 높은 세포독성이 면역세포의 기능 및 활성을 저감시키거나, 빠른 사멸을 유도하기 때문이라 사료되며, 결과적으로 분획을 통한 홍경천의 독성저감이 홍경천의 면역기능 증진에 있어 효과적인 기여를 하였다고 생각된다. 상기에서 서술한 바와 같이 농도와 배양일에 따른 세포의 생육 및 cytokine 분비량 측정 결과를 살펴보았을 때 chloroform 홍경천 분획물이 면역 활성과 관련하여 가장 좋은 활성을 나타내었으며 그 결과 홍경천의 chloroform 분획물이 면역 활성과 관련하여 기능성 소재로서의 활용 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

Table 1. Effects of the crude extracts and fractionized extracts from *R. sachalinensis* A. Bor. on the immune B and T cell growth and IL-6 and TNF- α secretion.

Sample	conc. (mg/ml)	Cell line					
		B cell			T cell		
		cell growth (%)	cytokine(10 ⁻⁴ pg/ml)		cell growth (%)	cytokine(10 ⁻⁴ pg/ml)	
		IL-6	TNF- α		IL-6	TNF- α	
Crude ext.	0.2	113.6 ± 0.1 [†]	5.1 ± 0.7	4.9 ± 1.1	115.1 ± 0.1	6.1 ± 1.0	6.4 ± 1.1
	0.4	124.7 ± 0.3	8.2 ± 1.1	7.1 ± 1.2	126.2 ± 0.4	9.2 ± 1.2	9.8 ± 1.4
	0.6	140.1 ± 0.7	11.6 ± 1.6	11.5 ± 1.2	139.4 ± 0.7	12.1 ± 1.8	13.0 ± 2.5
	0.8	156.1 ± 1.1	13.2 ± 1.4	13.9 ± 1.5	155.3 ± 1.0	14.7 ± 2.2	15.6 ± 3.0
	1.0	163.1 ± 1.9	15.9 ± 2.7	16.1 ± 2.4	165.2 ± 2.0	16.1 ± 2.8	16.5 ± 3.4
Water Fr.	0.2	107.3 ± 1.7	25 ± 0.6	27 ± 0.7	109.1 ± 1.0	27 ± 0.5	26 ± 0.6
	0.4	113.5 ± 2.6 ^{***}	32 ± 0.8 [*]	33 ± 0.9	114.7 ± 1.3 [*]	35 ± 0.6	35 ± 0.7 [*]
	0.6	120.1 ± 3.0 ^{***}	54 ± 0.9 [*]	59 ± 1.1 ^{***}	119.8 ± 1.3 ^{**}	49 ± 0.6 [*]	53 ± 1.2 ^{**}
	0.8	127.7 ± 3.4 ^{***}	71 ± 0.8 ^{**}	75 ± 1.3	126.5 ± 1.9 ^{**}	72 ± 1.1 [*]	73 ± 1.7 ^{**}
	1.0	134.1 ± 3.7 ^{**}	88 ± 1.1 ^{***}	92 ± 1.3	130.5 ± 2.3 ^{***}	85 ± 1.5 ^{**}	88 ± 1.7 ^{**}
Ehtyl acetate Fr.	0.2	105.7 ± 1.8	21 ± 0.3	22 ± 1.1	109.3 ± 1.0	24 ± 0.4	24 ± 1.1
	0.4	110.3 ± 2.2 ^{***}	29 ± 0.5 ^{**}	28 ± 1.6	111.4 ± 1.1	30 ± 0.8	33 ± 1.4 ^{**}
	0.6	119.6 ± 2.8 ^{**}	49 ± 0.5 ^{**}	52 ± 1.7	118.7 ± 1.2 ^{***}	45 ± 0.9 [*]	49 ± 1.9 ^{**}
	0.8	121.5 ± 3.1 ^{**}	66 ± 0.5 [*]	67 ± 2.0 ^{***}	120.7 ± 1.5 ^{**}	68 ± 1.1 ^{***}	71 ± 2.2 ^{**}
	1.0	127.6 ± 3.5 ^{**}	78 ± 1.0 ^{**}	80 ± 2.1	124.8 ± 1.7 ^{***}	79 ± 1.2 [*]	83 ± 2.2 [*]
Butanol Fr.	0.2	105.3 ± 1.7 ^{***}	24 ± 0.3	25 ± 0.6	104.8 ± 1.5	22 ± 0.5	24 ± 0.4
	0.4	107.2 ± 1.7 ^{**}	31 ± 0.9 ^{***}	34 ± 1.0	108.4 ± 1.9 ^{***}	34 ± 1.1	36 ± 0.8
	0.6	114.6 ± 2.7 ^{***}	50 ± 1.0 ^{***}	49 ± 1.1 ^{**}	113.6 ± 2.0 ^{***}	48 ± 1.3 [*]	46 ± 1.1 ^{**}
	0.8	122.8 ± 3.2 [*]	68 ± 1.1 ^{**}	71 ± 1.6 ^{**}	118.2 ± 2.1 ^{**}	66 ± 1.9 ^{***}	68 ± 1.4 ^{**}
	1.0	126.9 ± 3.3 [*]	81 ± 1.7 [*]	85 ± 1.9 [*]	122.5 ± 2.7 ^{**}	78 ± 2.0	83 ± 1.7 ^{**}
Chloroform Fr.	0.2	108.7 ± 1.9 ^{**}	35 ± 0.1 ^{**}	33 ± 0.3	109.3 ± 1.8	36 ± 0.1 ^{***}	37 ± 0.2
	0.4	115.2 ± 2.9 ^{**}	44 ± 0.2 ^{**}	46 ± 0.2 ^{***}	120.1 ± 1.8	49 ± 0.3 ^{***}	52 ± 0.2 ^{**}
	0.6	127.3 ± 3.3 [*]	62 ± 0.1 ^{**}	66 ± 0.9 ^{***}	129.2 ± 2.2 ^{***}	65 ± 0.7 [*]	69 ± 0.9 ^{***}
	0.8	131.1 ± 3.4 [*]	77 ± 0.8 ^{***}	81 ± 1.1 [*]	132.4 ± 3.0 ^{**}	78 ± 1.4 [*]	85 ± 1.4 ^{**}
	1.0	136.5 ± 3.6 [*]	91 ± 1.9 ^{**}	94 ± 1.7	137.6 ± 3.3 ^{**}	95 ± 2.2	99 ± 1.5 ^{**}
Salidroside	0.2	105.3 ± 1.7	22 ± 0.5 [*]	20 ± 0.9 [*]	106.8 ± 1.5	21 ± 0.3	23 ± 1.0
	0.4	108.2 ± 1.8 ^{***}	30 ± 0.6 ^{**}	29 ± 0.9 ^{***}	110.4 ± 1.7 ^{***}	32 ± 0.4 [*]	29 ± 1.1 ^{***}
	0.6	115.6 ± 2.9 ^{***}	49 ± 0.8 ^{**}	51 ± 1.6 ^{**}	114.9 ± 2.1 ^{***}	47 ± 0.7 ^{**}	48 ± 1.0 ^{**}
	0.8	120.8 ± 3.0 ^{**}	66 ± 1.1 ^{***}	64 ± 1.8 ^{**}	121.2 ± 2.7 ^{**}	65 ± 1.1 ^{**}	67 ± 1.5 [*]
	1.0	125.9 ± 3.3 [*]	82 ± 1.9 ^{**}	83 ± 2.0 [*]	126.5 ± 2.9 [*]	84 ± 1.8	88 ± 1.7 [*]

† Values are expressed as mean ± S.D.M of data obtained from three independent experiments. Significant at ^{*}P<0.001, ^{**}P<0.005, ^{***}P<0.01 vs. control.

3. Natural Killer (NK) 세포의 면역증진 효과

Fig. 3와 Fig. 4는 상기의 농도별 시료 첨가를 통한 면역세포 생육 실험의 유의성을 감안하여 0.5 mg/ml의 농도로 조절된 시료를 첨가하여 배양 시간에 따른 인간 유래 면역세포인 B세포와 T세포의 생육과 B세포와 T세포의 배양액을 NK 세포에 첨가하여 배양하였을 때 NK 세포의 활성도를 시료별로 측정된 결과이다. B세포와 T세포의 생육을 배양 날짜별로 살펴 본 결과 분획물을 첨가한 모든 실험군에서 배양 6일째까지 생육이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있으며, 특히 B세포와 T세포에서 모두 chloroform 분획물 첨가를 통해 최고 생육도를 나타낸 6일째 각각 13.2 × 10⁴ cells/ml와 12.6 × 10⁴

cells/ml로 가장 높은 농도를 나타내었다.

NK 세포의 활성 측정을 위해 시료를 첨가한 면역 B세포와 T세포의 배양액을 각각 NK 세포에 첨가하여 나타나는 생육도의 변화를 측정하여 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 활성을 평가하였다. 6일 동안 NK 세포의 생육도를 관찰한 결과, 모든 분획물에서 대조군 보다 높은 생육 활성을 나타내었으며 대체로 chloroform 분획물과 water 분획물에서 활성이 높게 나타났다. 특히 활성이 최대 증가한 6일째 B세포와 T세포 배양액을 첨가한 NK 세포에서 chloroform 분획물이 각각 14.05 × 10⁴ cells/ml, 13.6 × 10⁴ cells/ml의 생육을 나타내었으며 이는 대조군보다 29% 이상의 증가한 세포 활성도로 가장

홍경천의 면역활성이 증진된 용매별 분획 추출물

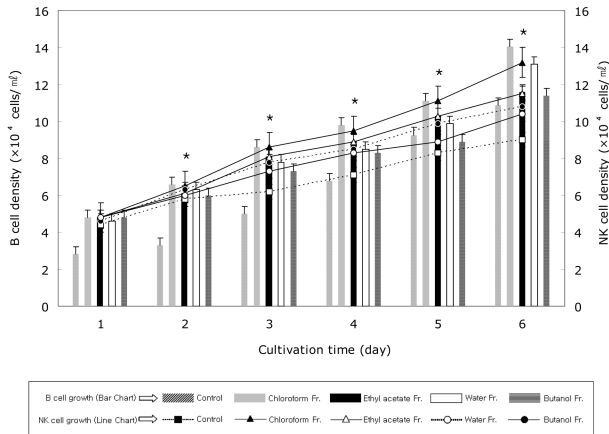


Fig. 3. Enhancement of NK cell growth in adding the supernatant of human immune B cell with the fractionized extracts of *R. sachalinensis* A. Bor. Result are expressed as mean \pm S.D.M of data obtained from three independent experiments. Each value were significant compared with control at $*P < 0.05$.

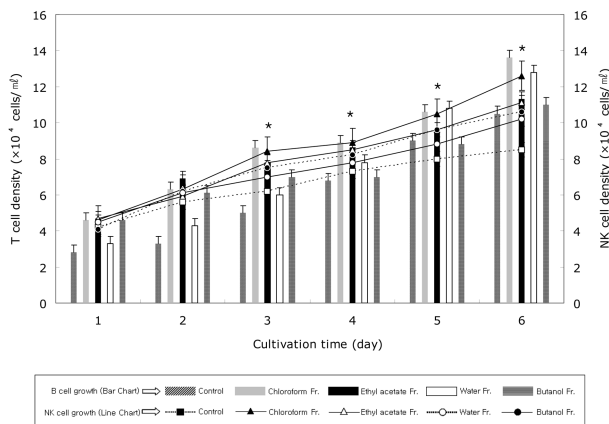


Fig. 4. Enhancement of NK cell growth in adding the supernatant of human immune T cell with the fractionized extracts of *R. sachalinensis* A. Bor. Result are expressed as mean \pm S.D.M of data obtained from three independent experiments. Each value were significant compared with control at $*P < 0.05$.

높은 생육 증진을 나타내었다.

4. 대식세포에서의 nitric oxide 생성능

대식세포를 이용하여 NO^- 생성능을 측정 한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 대식세포의 NOS (nitric oxide synthase)는 항상 존재하는 것이 아니라 interferon- γ , TNF- γ 또는 TNF- α 와 같은 여러가지 cytokine과 LPS (*E. coli* derived lipopolysaccharide)와 같은 세균 내 독소에 노출되는 경우에만 NOS 유전자의 발현이 유도된다. 따라서 시료와 LPS를 같이 투여하여 대식세포로부터 NO^- 의 생성능을 확인하였다. 결과를 통해 대식세포의 NO^- 생성은 LPS 첨가를 통해 증가됨을 확인

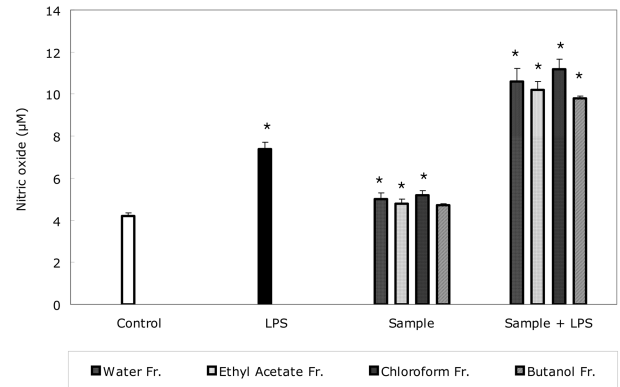


Fig. 5. Stimulation of nitric oxide production by adding the fractions of *R. sachalinensis*. Result are expressed as mean \pm S.D.M of data obtained from three independent experiments. Each value were significant compared with control at $*P < 0.05$.

할 수 있었으며, 홍경천 분획물 시료만을 투여하였을 경우 LPS보다 적지만 일정량 이상의 NO^- 가 생성되었다. 이는 홍경천 분획물 시료의 독성성분에 기인한 것으로 사료된다. 하지만 홍경천 분획물 시료와 LPS를 동시에 처리한 결과 NO^- 생성량이 증가한 것은 홍경천 분획물 첨가를 통하여 LPS 등 세균 내 독소와 함께 상승작용을 이루어 NO^- 생성능을 증진시킴으로써 면역체계에 활성 증진 효과를 나타낸 것으로 볼 수 있다. 결과를 통해 홍경천의 모든 분획물이 이러한 면역 증진 효과를 나타내었음을 확인할 수 있다. 특히 chloroform 분획물 시료 첨가를 통해 NO^- 생성량이 11.2 μM 로 가장 높은 값을 보였다.

5. 세포 분화능 측정

본 실험에서 사용된 세포는 human promyelocytes (HL-60)인 전골수세포로서 macrophage, granulocyte, monocyte나 eosinophil 등으로 분화되는 등 분화 유도제에 따라 다른 세포 분화가 유도되는 기작을 가지고 있다 (Edmund and Wolf, 1985). 세포 분화는 수정란으로부터 유래된 미분화 세포가 특정 형질을 갖는 세포들로 변화되어 가는 과정이며, 이러한 과정은 여러 신호 전달 체계와 유전자의 형질 발현의 조절에 기인한다. 이러한 세포분화로 인하여 세포와 세포간의 신호전달 체계에 영향을 미쳐 세포와 구조의 기능을 결정짓게 되는 것이다. 이러한 분화 촉진으로 인하여 여러가지 세포로의 분화를 촉진하게 될 것으로 사료되어지며 그 중 면역세포에도 그 효과가 있을 것으로 생각되어지는 바이다. 5일 동안 세포 분화도를 측정 한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 모든 분획물 시료 첨가를 통해 배양시간에 따라 HL-60 세포의 분화도가 증가하며 4일째 최대치를 나타내었고 5일째부터 감소하는 경향을 나타내었다. 홍경천 chloroform 분획물이 최대 분화도를 나타낸 4일째 control에 비해 약 1.32배 높은 세포 분화 활성도를 나

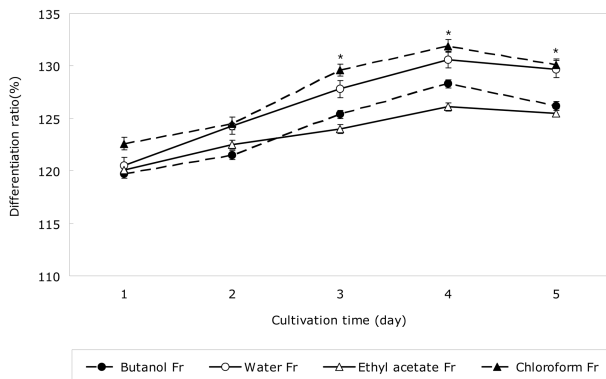


Fig. 6. Comparison of the differentiation of HL-60 cells by adding *R. Sacharinensis* fractions. Result are expressed as mean \pm S.D.M of data obtained from three independent experiments. Each value were significant compared with control at $^*P < 0.05$.

타내었다. 이는 홍경천 chloroform 분획물에 의한 세포 분화 유도 물질의 증가로 세포 분화 활성도를 초래하였다고 볼 수 있으며, 면역체계에 점진적 작용을 할 수 있을 것으로 사료된다. 이상의 결과를 통해 홍경천의 chloroform 분획물이 면역기능 향상과 나아가 기능성 식품으로서의 연구 개발에 있어 가능성 있는 소재로 사용될 수 있을 것으로 사료되어진다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 농업특정연구과제 (과제번호 : 20070101033021)의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

Abo T, Kawamura T and Watanabe H. (2005). Immunologic states of autoimmune diseases. *Immunologic Research*. 33:23-34.

Afanas' ev SA, Krylatov AV, Lasukosa TV and Lishmanov YB. (1996). Participation of inducible stress proteins in the cardioprotective effects of *Rhodiola rosea*. *Biochemistry (Moscow)*. 61:1258-1263.

Bang OS, Lee YS and Kang SS. (1993). A possible role of fibronectin on the differentiation of monocyte to macrophage. *Korean Journal of Zoology*. 36:514-521.

Cecilia KL. (2002). IL-2 receptor signaling through the shb adapter protein in T and NK cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 296:929-936.

Cui CB, Lee DS and Ham SS. (2003). Antioxidative, actimutagenic and cytotoxic effects of *Rhodiola sachalinensis* extracts. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*. 32:211-216.

Ding AH, Nathan CF and Stuhr DJ. (1998). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from

mouse peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*. 141: 2407-2412.

Doll R and Peto R. (1983). The cause of cancer : quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*. 66:191-308.

Edmund KW and Wolf PS. (1985). Induction of fibrinolytic activity in Hela cells by phorbol myristate acetate. *Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 260:6354-6360

Ha JH, Han JG, Jeong HS, Oh SH, Kwon MC, Choi YB, Ko JR and Lee HY. (2008). Enhancement of immune activities of natural water-soluble sulforaphane by nano encapsulation process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:402-408.

Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES and Bail KU. (1998). Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- α production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji*. 42:296-301.

Kim JY, Seong NS and Lee YJ. (2006a). A study on the effects of *Rhodiola rosea* root on the cancers. *Korean Journal of Herbology*. 21:79-87.

Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Bae GJ, Ahn JH, Lee HJ, Kang HY and Lee HY. (2006b). Increase effect of anticancer activities on *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. by the change of extraction process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 14:317-321.

Kim CH, Kwon MC, Han JG, Ha JH, Jeong HS, Choi GP, Park UY, Nam JH, Hwang B and Lee HY. (2008). Immune activities of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. extracts isolated with various extraction process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:383-389.

Kwon MC, Han JG, Qadir SA, Ahn JH, Lee DH and Lee HY. (2008). Enhancement of immuno-potential of *Cichorium endivia* L. by ultrasonification extraction process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:9-15.

Kwon MC, Han JG, Jeong HS, Qadir SA, Choi YB, Ko JR and Lee HY. (2008). Enhancement of immune activities of *Opuntia ficus-india* L. var. Miller by ultrasonification extraction process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:1-8.

Lishmanov YB, Maineskulova LA, Uskina EV and Maslov LN. (1999). Opiatergic mechanisms of cardioprotective and antiarrhythmic effects of adaptation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 127:151-154.

Park HU, Yoon JH, Kim JY, Jeong CH, Park CK, Song WS and Seo KI. (2005). Biological activity of the fractions extracted from *Rhodiola dumulosa*. *Korean Society of Food Preservation*. 12:596-500.

Ryu SH, Kim SY, Jung HS, Sohn NW and Sohn YJ. (2008). Effects of *Rhodiola Rosea* on anti-fatigue and hypothalamic IEGs expressions of forced swimming rats. *Korea Journal of Herbology*. 23:9-19.

Yen Y and Cuernsey DL. (1986). Increased c-myc RNA levels associated with the precommitment state during HL-60 myeloid differentiation. *Cancer Research*. 46:4156-4161.

Yueran Z, Rui S, You L, Chunyi G and Zhigang T. (2003). Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 300:247-252.