

## 홍경천 뿌리 및 캘러스 초음파 추출물의 항암활성 비교

하지혜 · 정향숙 · 정명훈 · 김승섭 · 김 영 · 남종현<sup>2</sup> · 항 백<sup>3</sup> · 마충제 · 이현용<sup>1,\*</sup>  
강원대학교 BT 특성화학부대학, <sup>1</sup>강원대학교 생명공학연구소, <sup>2</sup>(주)그래미, <sup>3</sup>전남대학교 생물학과

### Comparison of Anticancer Activities of Ultrasonification Extracts of Callus and Roots from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor

Ji Hye Ha, Hyang Suk Jeong, Myoung Hoon Jeong, Seung Seop Kim, Ling Jin, Jong Hyun Nam<sup>2</sup>,  
Baik Hwang<sup>3</sup>, Choong Je Ma, and Hyeon Yong Lee<sup>1,\*</sup>

College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

<sup>1</sup>Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

<sup>2</sup>Grami Co., Ltd.

<sup>3</sup>Department of Biology, Chonnam National University

**Abstract** In this study, the anticancer activity of the water extract at 100°C was compared to that of the callus extracts via a ultrasonification extraction process. All the extracts were utilized to evaluate cytotoxicity, antioxidant and immune activities. The callus extracted via ultrasonification extraction showed relatively low cytotoxicity on normal human cell lines, HEK293 and HEL299, showing 13.17% and 21.78%, respectively. The callus extract has 59.82% which was similar to 61.70% for water extracts. It was also found that callus extract yielded higher nitric oxide secretion form macrophage than other extracts. The growths of both human stomach adenocarcinoma (AGS) cell and human lung carcinoma (A549) were inhibited up to 70% by adding 1.0 mg/mL of the callus extracts with ultrasonification extraction. This inhibition ratio (70%) was almost close to that of water extract. Human hepatoma carcinoma (HEP3B) cell growth was most significantly inhibited up to 75% by adding 1.0 mg/mL of callus extracts, and its selectivity was highest compared to other extracts. It indicates that the callus extracts could selectively inhibit growth of digestive system-related cancer cells. It can be also concluded from the results of this study that the callus extracts associated with ultrasonification extraction process have the potential for anticancer activity.

**Key words:** *Rhodiola sachalinensis* A. Bor, callus, ultrasonification extraction, anticancer activity, cytotoxicity

## 서 론

홍경천(*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)은 고산지대에 자라는 다년생 초본으로 돌나물과(Crassulaceae)의 돌꽃속(Rhodiola)에 종속하며 온도가 낮고 건조하며 산소가 적고 자외선이 강하며 주야간 온도차가 심한 해발 2,000-5,000 m 사이의 극한 환경에서 생존할 수 있는 특수한 적응력을 가진 고산 식물이다. 주요 유효 성분으로 salidroside 배당체 및 *p*-tyrosol이 있으며 이외에도 전분, 단백질, 지방, 당분, 플라본류 화합물 및 트레오닌, 글루타민산, 글리신 등의 필수 아미노산과 불포화지방산, 필수 무기질 등이 균형 있게 함유되어(1) 식품학적 성분 가치가 충분한 소재로 주로 항암(2), 항산화(3), 항돌연변이(4), 면역 반응(5) 및 신경세포 보호효과(6) 등의 작용을 하는 것으로 보고되어 있다. 하지만

대부분 노지에서 자생하는 홍경천은 혹독한 환경이나 바위틈에서 적은 영양분의 섭취로 인하여 그 번식률이 매우 낮을 뿐만 아니라 우리나라에서 재배할 시 여름철 높은 기온에 의해 지상부가 쉽게 고사하기 때문에 생산성이 낮아 기능성 소재로 이용하기 위해 산업적으로 재배하기에는 불가능한 실정이다(7).

최근 약리성 자원식물에 대한 관심이 높아지면서 이들 자원식물의 번식법 확립, 신물질의 탐색, 세포배양을 통한 유용물질 생산(8) 등에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 기내조직배양을 이용한 대량번식은 자연환경의 제약을 받지 않고 기내의 최적 환경에서 원하는 시기에 대량생산이 가능함으로써 환경과 온도에 민감하여 재배가 어려운 홍경천에 적용할 경우 기능성 소재로서의 상업적 이용이 가능하다.

이에 본 연구에서는 홍경천의 노지재배를 통한 유용물질 생산의 한계성을 극복할 수 있는 방안으로 외부 환경조건을 적절히 조절할 수 있고 좁은 공간에서도 대량생산이 가능한 기내배양기술을 적용하여 기내에서 홍경천 조직을 유도하여 얻은 홍경천 callus를 이용(10)하여 기존의 홍경천의 생리활성 연구에 있어 대표적인 약리기능으로 보고되었던 항암활성(2,9)을 평가함과 동시에 초음파 추출을 통한 홍경천 callus의 유용 활성성분의 효과적 인 용출(11)이 항암 활성 증진 및 세포독성 저감에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

\*Corresponding author: Hyeon Yong Lee, College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 200-701, Korea

Tel: 82-33-250-6560

Fax: 82-33-256-4819

E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr

Received May 21, 2009; revised August 10, 2009;

accepted September 1, 2009

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 추출 방법

본 실험에 사용한 홍경천은 2004년 중국 연변에서 백두산에서 채취한 홍경천(*Rhodiola sachalinensis* A. Bor) 뿌리를 수입하여 세척한 후 상온 음지에서 건조 후 약 0.5 cm의 적당한 크기로 분쇄하여 사용하였으며, 홍경천 조직에서 유도된 callus는 전남대학교 식물생리학실험실에서 30일 동안 배양된 홍경천 callus 배양체를 건조한 상태로 제공 받았다. 홍경천 뿌리는 열수 추출하였으며, 홍경천 callus는 열수 추출과 초음파 추출을 각각 시행하여 추출물을 획득하였다.

초음파 추출은 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 플라스크에 시료와 시료 중량의 10배수의 증류수를 용매로 넣고 60°C에서 12시간 동안 추출을 2회 반복하였다. 수득한 추출물에 대하여 초음파 발생기(Asia industry, Incheon, Korea)를 사용하여 40 kHz에서 60분 동안 초음파 추출을 시행하였다. 대조군에 적합한 추출 공정은 일반적인 열수 추출 공정으로써, 시료를 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 플라스크에 시료와 시료 중량의 10배수의 증류수를 용매로 넣고 100°C에서 12시간 씩 2회 추출을 시행하였다. 상기와 같은 초음파 추출과 열수 추출공정으로부터 얻어진 각각의 추출물은 감압농축기(rotary vacuum evaporator N-N series, Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과, 농축한 뒤 동결건조를 통해 용매를 완전히 제거하여 건조한 Powder 상태로 제조하여 본 실험에 사용하였다.

### 시약

세포배양 배지로 Roswell park memorial institute medium (RPMI1640), Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)를 GIBCO(Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였고, Hepes buffer는 SIGMA(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 혈청은 HYCLONE(Walsam, MA, USA)의 Fetal bovine serum(FBS)을 이용하였고 gentamycin sulfate, trypsin-EDTA는 SIGMA사의 것을 사용하였다. 세포 염색을 위한 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zilium bromide(MTT)와 sulforhodamine B(SRB), 그리고 nitric oxide 생성량 측정에 사용된 Lipopolysaccharide(LPS)는 SIGMA사로부터 구입하였다. 본 연구에 사용한 홍경천 활성 단리 물질인 Salidroside은 R&S Pharmchem Co.(Zhejiang Province, P. R. China)로부터 구입하여 본 연구에 사용하였다.

### 세포주 및 세포 생육 배지

정상세포에 대한 독성은 인간 신장세포인 HEK293(human embryonic kidney cell line)과 인간 간세포인 HEL299(human embryonic lung cell line)을 통하여 측정하였으며 인간 면역세포인 T cell(Jurkat, ATTC, Manassas, VA, USA)과 B cell(Raji, ATTC, Manassas, VA, USA)를 사용하여 면역 세포 생육도를 측정하였다. Nitric oxide 생성능은 마우스 유래 macrophage(J774.1, ATTC, Manassas, VA, USA)를 사용하여 측정하였으며 위암세포인 AGS (human stomach adenocarcinoma, ATTC, Manassas, VA, USA), 폐암세포인 A549(human lung carcinoma, ATTC, Manassas, VA, USA) 그리고 간암세포인 HEP3B(human hepatoma carcinoma, ATTC, Manassas, VA, USA)를 이용하여 소화기 및 호흡기 계통의 암에 대한 항암활성을 측정하였다. 본 실험에 사용한 인간 전과립 세포와 대식세포는 RPMI1640 배지에 10% heating inactivated FBS를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 4-5세대 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

### 홍경천 및 callus 추출물의 정상세포 독성 측정

인간 정상 신장 세포 HEK293와 인간 정상 간 세포인 HEL299를 이용하여 SRB(sulforhodamine B) assay(12)를 통해 홍경천 및 홍경천 callus의 정상세포에 대한 독성을 측정하였다. SRB assay는 세포 단백질 염색을 통하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험에 앞서 상기의 각 정상세포의 농도가 4-5×10<sup>4</sup> cells/mL가 되도록 배양한 후 96 well plate의 각 well에 100 μL씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다(37°C, 5% CO<sub>2</sub>). 각각의 시료의 최종 농도가 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 0.1 mg/mL가 되도록 조절한 후 배양된 정상세포에 농도별로 각각 100 μL씩 첨가하여 48시간 배양하였다(37°C, 5% CO<sub>2</sub>). 배양이 종료되면 상등액을 제거하고 4°C, 10%(w/v) TCA(trochloroacetic acid)을 100 μL씩 가하여 4°C에서 1시간 동안 정치한 후 증류수로 5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 완전히 건조하였다. 건조된 plate의 각 well에 1%(v/v) acetic acid로 녹인 0.4%(w/v) SRB 용액을 100 μL씩 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 μL를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 micropalte reader(THERMO max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하여 정상세포에 대한 독성을 측정하였다.

### 항암 활성 및 선택적 사멸도 측정

소화기계 암세포주인 인간 위암세포(AGS) 및 인간 간암세포(HEP3B), 호흡기계 암세포주인 인간 폐암세포(A549)를 이용하여 홍경천 및 홍경천 callus의 첨가를 통한 인간 유래 암세포의 생육 저해활성 측정을 통해 항암활성을 평가하였다.

HEP3B는 10%의 FBS를 포함하는 DMEM배지에서 배양하였고, AGS와 A549는 10%의 FBS를 포함하는 RPMI1640배지에서 배양하였으며, Monolayer로 배양되는 각각의 암 세포주에 trypsin-EDTA 용액을 처리한 후 4-5×10<sup>4</sup> cells/mL의 농도로 조절하여 single 세포의 상태로 96 well plate에 분주하였다. 상기 세포독성 측정 방법과 동일한 SRB assay를 통해 암세포 생육 저해 활성을 측정하였다.

Selectivity는 SRB assay를 이용하여 각각의 시료 농도에서 각 정상세포에 대한 세포독성 및 각 암 세포주에 대한 생육 억제 활성을 측정 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 계산하였다.

$$\text{Selectivity} = \frac{\text{암세포 생육억제활성}}{\text{정상세포의 세포독성}}$$

### DPPH radical 소거능 측정을 통한 항산화 활성 평가

DPPH는 홀전자로 인해 전자나 hydrogen radical(H)을 얻어 쉽게 안정화되는 대표적인 안정한 free radical의 모델로서 이러한 DPPH radical 소거능 측정을 통해 추출물의 전자공여능(electron donating abilities, EDA) 및 지질 과산화 초기 반응 저해활성을 평가하였다. DPPH( $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) radical 소거활성은 Blois의 방법(13)을 변형하여 측정하였다.

Ethanol을 용매로 하여 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL의 농도로 조절한 각 시료 10 μL와 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.5) 990 μL를 분주한 시험관에 ethanol을 용매로 하여 제조된 0.5 mM DPPH 용액 0.5 mL를 넣고 vortex mixer를 이용하여 10초간 vortexing하여 완전히 혼합한 후 실온 암실에서 30분 정치하여 반응을 유도하였다. 반응을 완료한 후 UV spectrophotometer를 이용

하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 소거 활성은 대조군에 대한 시료 첨가구의 흡광도를 비교하여 다음과 같이 계산하여 측정하였다.

$$\text{EDA}(\%) = \left(1 - \frac{A_s}{A_c}\right) \times 100$$

As: 실험군(시료 첨가구)의 흡광도

Ac: 대조군(시료 무첨가)구의 흡광도

#### MTT assay를 이용한 면역세포 생육도 측정

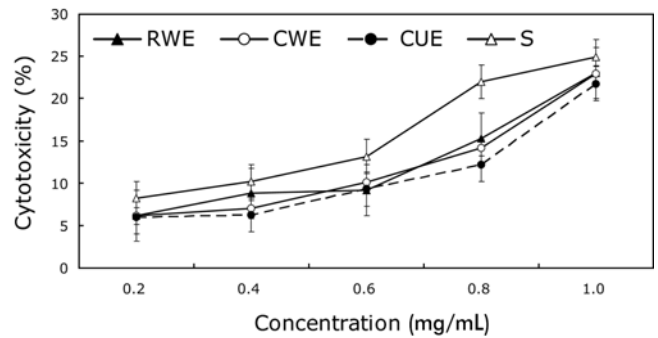
본 실험에 사용한 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay(14)는 Yellow tetrasolium salt MTT가 살아있는 세포에서 미토콘드리아 dehydrogenase에 의해 물에 녹지 않는 자주색 formazan crystal로 환원되는 원리에 바탕을 두고 있으며, 이렇게 생성되는 crystal을 DMSO로 용해시켜 분광학적 방법(spectroscopic method)으로 그 양을 정량하여 세포의 생존율을 확인하는 방법으로서이다. 본 실험에서는 인간 유래 면역세포인 T cell(Jurkat)과 B cell(Raji)를 이용하여 홍경천 및 홍경천 callus의 첨가를 통한 면역세포의 생육 증식율을 측정하는 방법으로 면역 증진 활성을 평가하였다.

인간 유래 면역세포는 10%의 FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에서 배양하였으며,  $1 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 조절하여 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ L씩 분주하고 최종 농도를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL로 조절한 시료를 각각 100  $\mu$ L씩 첨가하여 48시간 동안 배양하였다(37°C, 5% CO<sub>2</sub>). 배양 종료 4시간 전에 PBS(pH 7.4) buffer를 용매로 하여 제조한 5  $\mu$ g/mL MTT 시약을 가한 후 빛에 반응하지 않도록 은박지로 차단하여 3시간 동안 배양한다. 그 다음 0.1N HCl에 녹인 10% SDS 100  $\mu$ L를 각 well에 첨가하고 차광상태에서 18시간 추가 배양 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 통해 570 nm에서 측정하여 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 백분율로 환산하여 세포 생존율을 계산하였다.

#### 대식세포에서의 nitric oxide 생성량 측정

J774.1 macrophage(mouse)를 이용하여, 홍경천 및 홍경천 callus의 첨가를 통하여 활성화된 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitric oxide의 양을 microplate assay를 통해 정량하였다(15). 10% FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에서 배양한 macrophage를  $4.5 \times 10^4$  cells/mL의 농도로 조절하여 24 well plate에 분주하여 실험에 사용하였으며, 추출물은 상기의 정상 세포를 이용한 독성 측정 실험에서 나타난 결과를 참고하여, 본 실험의 대상세포 활성화에 있어서 세포독성을 배제할 수 있는 농도로 조절하여 실험에 사용하였다.

추출물의 최종 농도가 0.5 mg/mL이 되도록 24 well plate에 첨가하여 humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C, 48시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 상등액 50  $\mu$ L를 취하여 동일부피의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine digydochloride/2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 32  $\mu$ M부터 0.25  $\mu$ M까지 RPMI1640 배지를 이용하여 단계 희석하여 얻어지는 표준곡선과 비교하여 생성량을 계산하였다. NO 생성의 양성 대조군 물질로는 LPS(lipopolysaccharide)를 사용하였다.



**Fig. 1. Cytotoxicity of root and callus extracts of *R.sachalinensis* on human embryonic kidney cell line, HEK293.** (RWE: *R.sachalinensis* A. Bor root extracts by water extraction for 24 hr at 100°C, CWE: Callus extracts from *R.sachalinensis* A. Bor by water extraction for 24 h at 100°C, CUE: Callus extracts from *R.sachalinensis* A. Bor by water extraction with 40 kHz ultrasonification process at 60°C, Solidroside: A active component in *R.sachalinensis* A. Bor) Result are expressed as mean $\pm$ SD of data obtained from triplicate separated experiments. Each value were compared with control at  $p < 0.01$  by t-test.

#### 통계처리

본 연구에서 실험값의 통계는 SPSS package program(ver. 12.0, SPSS Inc, Chicago, IL USA)의 paired t-test로 검정하였으며 모든 Data는 평균 $\pm$ 표준편차(Mean $\pm$ SD)로 나타내었다.

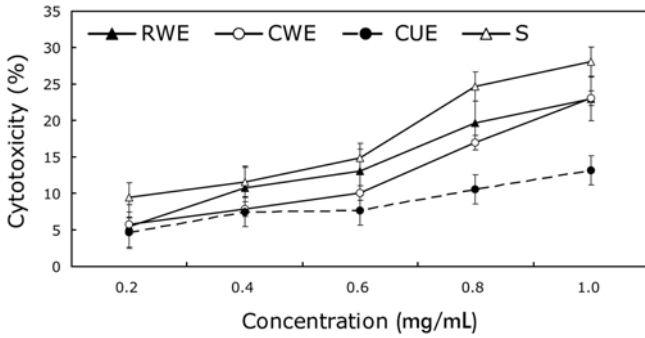
## 결과 및 고찰

#### 정상세포 독성 평가

인간 신장 정상 세포인 HEK293에 대한 홍경천 및 홍경천 callus 추출물과 항피로(16), 항염증(17) 및 항바이러스 작용(18) 등에 대해 높은 활성을 갖는 것으로 보고되어 있는 홍경천의 대표적 활성 성분으로 배당체의 일종인 solidroside의 세포독성을 측정하였다. Fig. 1은 인간 신장 정상 세포인 HEK293에 대한 세포독성 측정 결과로 solidroside가 0.6 mg/mL 이상의 농도에서 유의적인 독성 증가를 보이며 모든 농도에서 가장 높은 세포독성을 나타낸 것과 비교해 모든 추출물이 이보다 낮은 세포독성을 나타내었으며, 특히 홍경천 callus 초음파 추출물이 최고 농도 1.0 mg/mL에서 21.78%의 가장 낮은 세포독성을 나타냈다. 인간 신장 정상 세포에서 홍경천과 callus 추출물이 유의적인 큰 세포독성 차이를 나타내지 않은 것으로 미루어 볼 때 조직 배양공정이 인간 신장 정상세포에 독성으로 작용하는 물질의 파괴나 변형에는 크게 영향을 주지 않은 것으로 사료된다.

또한 인간 간 정상 세포인 HEL299를 대상으로 동일한 세포독성 실험 결과, solidroside가 HEK293에서의 독성 결과와 유사한 패턴을 보이고 0.6 mg/mL 이상의 농도에서 급격한 증가를 나타내었으며, 최고 농도 1.0 mg/mL에서 28.08%의 가장 높은 세포독성을 나타낸 반면 홍경천 callus 추출물은 농도에 따른 급격한 세포독성의 증가 없이 전체적으로 완만하고 유의적인 낮은 세포독성을 나타내었으며, 특히 최고 농도 1.0 mg/mL에서 홍경천 추출물보다 약 10% 낮은 13.16%를 나타내며 가장 낮은 세포독성을 확인할 수 있었다.

이상의 세포독성 실험 결과, 홍경천과 홍경천 조직으로부터 유도된 callus의 세포독성이 큰 차이를 보이지 않은 것으로 미루어 보아 조직 배양 공정을 통해 독성 물질의 파괴나 변형을 기



**Fig. 2. Cytotoxicity of root and callus extracts of *R.sachalinensis* on human embryonic lung cell line, HEL299.** Result are expressed as mean±SD of data obtained from triplicate separated experiments. Each value were compared with control at  $p<0.01$  by t-test. See Fig. 1 for abbreviation.

대하기 어려울 것으로 사료되나 자연산 홍경천 뿌리와 기내에서 배양된 callus에서 동일한 salidroside 성분이며 HPLC를 통한 정량 분석 결과 자연 상태의 홍경천의 뿌리가 건중량 당 0.17%의 salidroside를 함유하고 있음에 비해 callus에서 0.41%의 salidroside 생산성을 보여 자연산 홍경천 뿌리에 비해 callus에서 salidroside의 함량이 높은 것으로 보고된 바와 같이(19) 홍경천 조직에서 유도된 callus가 홍경천 식물체와 비교하였을 때 비교적 높은 활성 성분 함량과 더불어 기내 조직 배양 공정을 통한 홍경천의 조직배양이 우수한 종자 유지와 기후 및 환경에 영향을 받지 않으며 대량생산이 가능함을 생각해 볼 때, 이러한 callus를 통한 유용 활성 성분의 생산이 홍경천의 기능성 식품 소재의 활용에 있어 매우 효율적인 방법임을 알 수 있다. 또한 이미 초음파 추출 공정을 통해 추출 수율 증진이나 홍경천의 세포독성 저감이 가능하다는 연구 결과가 보고되어 있으며(20) 홍경천 조직으로부터 유도된 callus 역시 본 실험에서 결과에서 확인된 바와 같이 일반 추출물에 비해 낮은 세포독성을 나타냄을 미루어 보아 초음파 추출 공정을 통한 홍경천 callus의 세포독성 저감으로 callus의 기능성 식품 소재화가 용이할 것으로 사료된다.

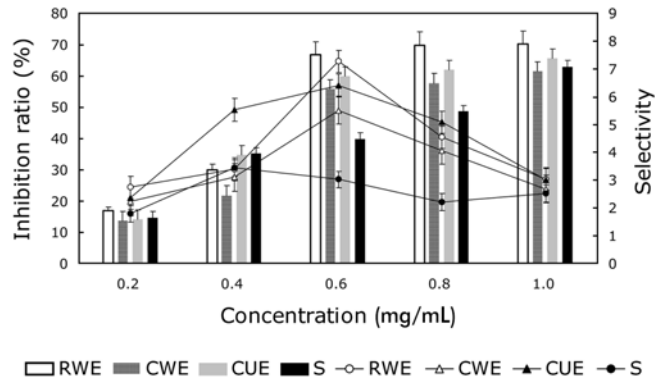
**항암활성 평가**

홍경천 및 홍경천 callus 추출물의 항암활성 평가를 위해 인간 유래 폐암 세포주 A549, 위암 세포주 AGS, 간암 세포주 Hep3B를 이용하여 농도별 추출물 첨가에 따른 세포 생육을 SRB assay를 이용하여 측정하였다.

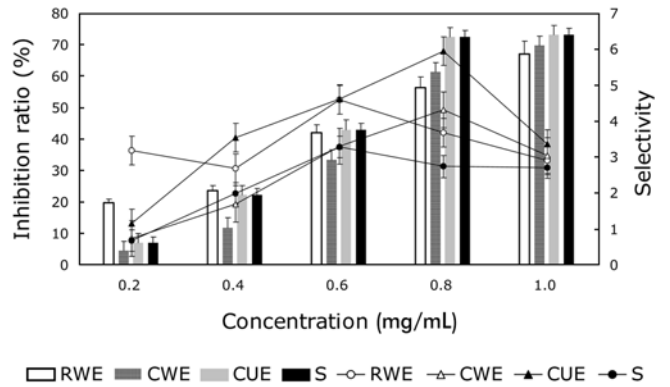
Fig. 3, 4, 5는 추출공정별 홍경천 및 홍경천 callus 추출물 첨가에 따른 상기 인간 유래 암세포주들의 세포 생육저해률(bar chart)과 선택적 사멸률(line chart)을 농도별로 나타낸 결과이다.

최근 소화기계 위장관암의 한 종류인 인간 유래 위암세포(AGS)를 포함한 많은 종양세포가 정상세포에 영향을 주지 않으면서 암세포와 같은 형질변형 세포의 apoptosis를 유도하는 TNF-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)에 대한 저항성을 획득하고 있는 것으로 보고(21)됨에 따라 효율적인 암치료를 위한 새로운 항암 방법으로 상기 연구 결과에서 정상세포에 낮은 독성을 나타내었던 홍경천 callus가 식품의학적인 항암 소재로서의 기능적 역할을 할 수 있을 것이라 생각된다.

Fig. 3의 결과에서 확인할 수 있듯이 모든 추출물 첨가를 통하여 AGS의 생육이 저해되었으며, 홍경천 callus 초음파 추출물에서 0.6 mg/mL의 농도일 때 59.95%의 세포생육 저해활성 및 6.42의 높은 selectivity를 나타내어 효과적인 항암활성을 확인하



**Fig. 3. Inhibition effects of root and callus extracts of *R.sachalinensis* according to different extraction processes on AGS and its selectivity.** (Bar chart: Inhibition ratio of cancer cell growth, line chart: selectivity) Result are expressed as mean±SD of data obtained from triplicate separated experiments. Each value were compared with control at  $p<0.01$  by t-test. See Fig.1 for abbreviation.



**Fig. 4. Inhibition effects of root and callus extracts of *R.sachalinensis* according to different extraction processes on HEP3B and its selectivity.** (Bar chart: Inhibition ratio of cancer cell growth, line chart: selectivity) Result are expressed as mean±SD of data obtained from triplicate separated experiments. Each value were compared with control at  $p<0.01$  by t-test. See Fig.1 for abbreviation.

였다. 이와 같은 결과는 항암활성을 갖는 식용식물로 생약재료 암환자에게 많이 처방되는 약재 중 그 활성이 매우 높다고 보고된 사자발쑤 추출물의 항암활성에 관한 연구(22)에서 초음파 추출공정을 통한 사자발쑤 추출물이 1.0 mg/mL에서 약 70%의 AGS 생육저해 활성을 나타내며 최대 4.33의 selectivity와 비교하였을 때 낮은 세포독성에 비해 높은 암세포 생육저해 활성을 나타낸 것이라 판단되며, 따라서 callus에 대해 효과적인 항암활성을 기대할 수 있을 것이라 사료된다.

또한 인간 유래 간암세포, HEP3B에 대한 항암활성을 측정된 결과(Fig. 4), salidroside를 포함한 모든 추출물이 0.8 mg/mL 이상의 농도에서 급격한 암세포 저해 활성 증진을 나타내었으며 전체적으로 홍경천 callus 추출물의 활성이 높게 나타난 것을 확인할 수 있다. callus 초음파 추출물은 최고농도 1.0 mg/mL에서 73.19%의 가장 높은 활성을 나타냈으며 selectivity 또한 0.8 mg/mL에서 5.94로 가장 높게 나타났다. 간암은 잔존 간 기능과 환자의 활력상태 및 지속적인 관리 등이 치료에 영향을 미치는 중요한 인자로 작용한다는 점에서 다른 암과는 구별되며 종양 특

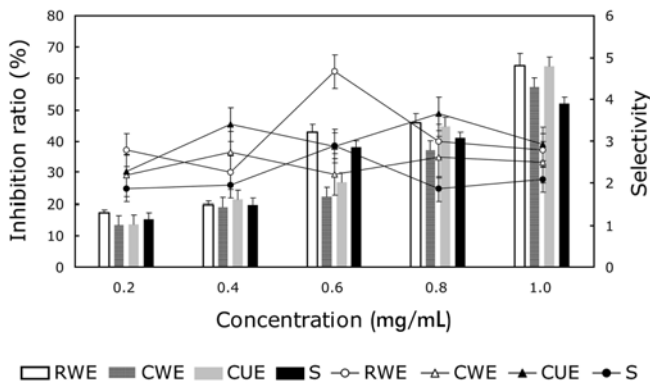


Fig. 5. Inhibition effects of root and callus extracts of *R.sachalinensis* according to different extraction processes on A549 and its selectivity. (Bar chart: Inhibition ratio of cancer cell growth, line chart: selectivity) Result are expressed as mean±SD of data obtained from triplicate separated experiments. Each value were compared with control at  $p<0.01$  by t-test. See Fig. 1 for abbreviation.

성상 성장과 침윤이 빨라 암화가 상당히 진행된 상태에서의 치료가 어렵다는 특징이 있다(23). 그러므로 간암에 관여하는 인자를 증점적으로 조절할 수 있는 표적치료가 필요하며, HEP3B에 대한 홍경천 callus의 항암활성을 평가한 결과와 같이 고농도 첨가 시 특정 암세포에서 높은 생육 저해활성 및 selectivity를 나타내었던 홍경천 callus 추출물이 간암에 대한 탁월한 항암효과를 나타낼 것으로 사료되며, 앞선 결과와 마찬가지로 정상세포에 대한 낮은 독성에 비해 암세포에 대한 높은 생육저해를 가짐으로써 callus의 기능성 식품 소재로서의 활용을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

호흡기계 암 중 하나인 인간 유래 폐암세포, A549에 대한 홍경천 및 callus 추출물의 항암 활성을 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 홍경천 callus 초음파 추출물이 0.8 mg/mL 이상의 농도에서 암세포 생육저해 활성이 유의적으로 증가하여 최고농도인 1.0 mg/mL에서 63.83%의 높은 활성을 나타내었다. 이는 동일 농도에서 홍경천 추출물이 나타낸 생육 저해 활성과 약 0.23%의 근소한 차이로, 이를 통해 홍경천 조직으로부터 유도된 callus가 홍경천과 마찬가지로 높은 항암 성분 및 활성을 가지고 있다는 것을 알 수 있다. 특히 조기발견이 어렵고 치료 후 예후가 좋지 않아 낮은 완치율을 가지고 있는 폐암의 특징(24)으로 인해 암에 대한 예방차원으로 식이 요인의 중요성이 강조되고 있으며, 이에 대해 홍경천의 callus 추출물이 폐암의 치료 및 예방에 효과가 높은 기능성 식품의 소재로서 활용이 높을 것으로 생각되는 바이다.

하지만 상기의 세포독성 실험에서 고농도에서의 세포독성이 급격히 증가함을 고려해 볼 때 홍경천 callus의 항암 소재로의 활용을 위해서는 항암에 관여하는 활성성분의 용출을 극대화 할 수 있는 공정의 최적화뿐만 아니라 정상세포에 독성을 크게 주지 않으면서도 높은 항암 활성을 나타낼 수 있는 농도 최적화가 일차적으로 이루어져야 한다고 사료된다.

Fig. 6는 정상세포에 대해 최고 15%의 낮은 세포독성이 확인되었던 0.6 mg/mL에서 추출물의 암세포 생육 저해율 및 selectivity를 각 암세포 별로 비교한 것으로 특히 소화기계통의 암인 위암과 간암 세포에 대해 callus 초음파 추출물이 홍경천 일반 추출물과 비슷하거나 또는 더 높은 생육 저해율 및 selectivity를 나타내어 전반적으로 홍경천 callus가 호흡기계 암보다 소화기계 암에서 더 높은 항암활성을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 또한

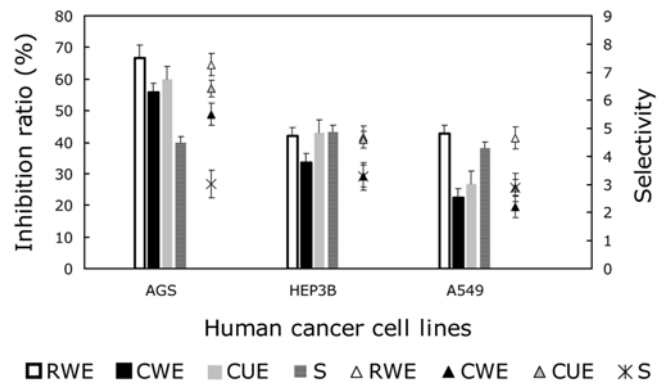


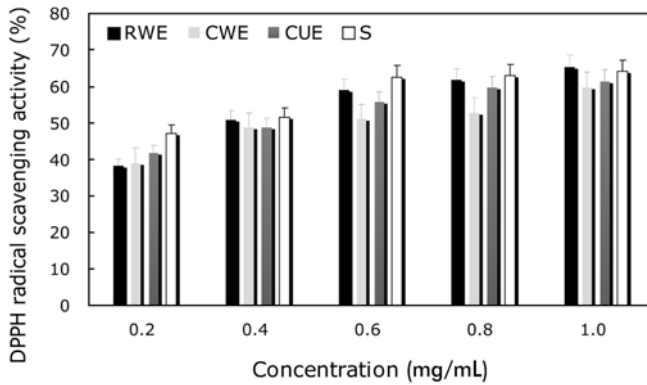
Fig. 6. Comparison of inhibition effects of root and callus extracts of *R. sachalinensis* on human cancer cell lines and their selectivity. (Bar chart: Inhibition ratio of cancer cell growth, line chart: selectivity) Result are expressed as mean±SD of data obtained from triplicate separated experiments. Each value were compared with control at  $p<0.01$  by t-test. See Fig. 1 for abbreviation.

이전의 연구(9)에서 홍경천의 ethylether 분획물의 각종 암세포에 대한 항암활성 측정 결과, 간암세포(HepG2) 및 대장암세포(HT-29)에 있어 500 µg/mL의 농도에서 각각 약 90%와 60%의 항암 활성을 나타내었으며 특히 간암에 대해 큰 효과를 나타낸 것을 미루어 보아 홍경천 및 callus가 소화기계 암 또는 특정 암에 대하여 나타내는 항암활성에 대해 더 검토할 가치가 있다고 생각된다.

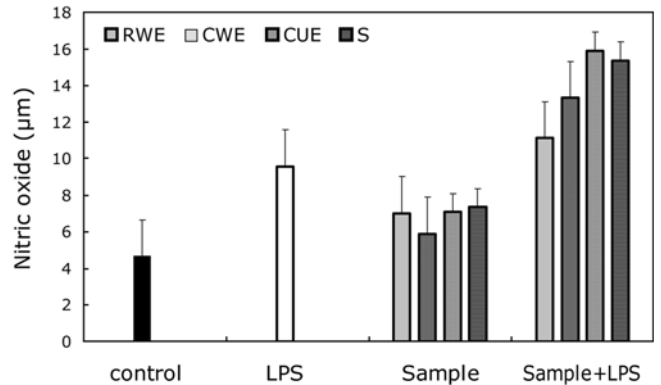
#### DPPH 전자공여능 측정

생체 내의 대사 활동에 의한 활성 산소의 과잉 생성은 인체의 효소 및 단백질, DNA 등의 손상을 가져오고 최근 연구에 의하면 이러한 과잉 공급된 활성 산소로 인해 유전자를 손상시키는 암의 개시 단계뿐만 아니라 촉진 단계에서도 작용하여 발암의 원인이 되는 것으로 알려졌다(25). 따라서 이러한 활성 산소를 조절하여 암 예방에 중요한 방어 기작으로 작용할 수 있는 항산화 소재에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

전자공여능 측정에 사용된 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원되는데 이러한 radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 radical에 대하여 소거활성을 기대할 수 있다(26). 이에 홍경천 및 홍경천 callus 추출물의 DPPH radical 소거 활성을 농도별로 측정하여 비교한 결과, Fig. 7에 나타낸 바와 같이 홍경천 열수 추출물이 최고 농도 1.0 mg/mL에서 69.71%의 양호한 DPPH 전자 공여능을 나타낸 것과 비교해 callus 열수 추출물과 초음파 추출물은 동일 농도에서 각각 48.94%, 58.57%의 비교적 낮은 항산화 활성을 나타내었다. 하지만 이는 보편적인 식품소재로서 산화스트레스를 중화시키는 대표적인 자연 항산화제로 항산화 효소계를 강화함으로써 지질과 산화물의 형성을 억제하는 항산화 작용이 뛰어나다고 알려진 흑미의 DPPH radical 소거활성(27)이 10 mg/mL의 농도에서 69.40±0.13%의 활성을 나타낸 것과 비교하였을 때 매우 높은 활성이라 할 수 있으며 이러한 높은 DPPH radical 소거능을 보이는 물질 중 DPPH radical과 최적의 반응을 보이는 폴리페놀 성분과 같은 hydroxyl group을 포함하는 화합물이 존재한다는 연구결과(28)에 비추어 보아, 홍경천의 대표적인 활성 성분 중 유리형 페놀산 화합물인 L-trosol 또는 기타 폴리페놀류와 플라보노이드 화합물



**Fig. 7. Comparison of DPPH radical scavenging activity in adding root and callus extracts of *R. sachalinensis* according to different extraction processes.** Result are expressed as mean±SD of data obtained from triplicate separated experiments. Each value were compared with control at  $p < 0.05$  by t-test. See Fig. 1 for abbreviation.



**Fig. 8. Stimulation of nitric oxide production in adding root and callus extracts of *R. sachalinensis* according to different extraction processes.** Result are expressed as mean±SD of data obtained from triplicate separated experiments. Each value were compared with control at  $p < 0.05$  by t-test. See Fig. 1 for abbreviation.

이 높은 항산화 활성에 기여한 것으로 사료된다.

또한 초음파 공정을 통해 추출한 홍경천 callus 추출물이 열수 추출물에 비해 약 9.64%의 높은 소거능을 보이며 활성이 증진된 것으로 보아 초음파 공정을 통해 callus의 항산화 활성 성분 용출이 용이하였음을 알 수 있다, 따라서 항산화 활성 성분 용출의 극대화가 가능한 효과적인 초음파 추출 공정을 통해 홍경천 callus가 항산화 및 암의 예방 및 억제 가능한 식품 소재로서의 가치 창출에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

**면역세포 생육 측정**

MTT assay(29)는 세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의한 MTT 환원을 통한 formazan의 농도를 측정함으로써 세포의 증식 및 생존율을 비교적 정확히 측정할 수 있으며, 실험 시 육안으로 그 발색을 확인할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 따라서 본 실험의 MTT assay를 통해 홍경천 및 홍경천 callus 추출물의 인간 면역 B, T 세포에 대한 생존율을 농도별로 측정하였으며 그 결과를 Table 1에 나타냈다.

인간 면역세포인 B, T cell은 홍경천 및 홍경천 callus 추출물 첨가에 따라 농도 의존적으로 면역 활성에 자극을 받는 것을 확

인할 수 있으며 홍경천 열수 추출물의 첨가를 통해 B세포와 T 세포에서 모두 가장 높은 생존율을 나타냈다. 또한 홍경천 callus 초음파 추출물이 평균적으로 callus 열수 추출물에 비해 높은 생존율을 나타내었다. 이러한 결과는 홍경천 조직으로부터 유도된 callus에 면역 활성에 유효한 영향을 미치는 활성 성분이 존재함과 동시에 앞선 항산화 실험 결과에서와 마찬가지로 이러한 유용 활성성분이 초음파 추출공정을 통해 용출이 용이해짐에 따라 결과적으로 그 활성이 높아 졌다는 것을 알 수 있다. 따라서 초음파 추출 공정의 최적화를 통한 활성 성분의 용출 극대화를 통해 홍경천 callus의 기능성 식품 소재로서의 부가가치를 높일 수 있을 것이라 사료된다. 또한 면역세포 생존율을 통해 면역세포의 직접적인 사멸이 관찰되지 않음에 따라 추출물의 세포독성이 면역세포에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

**대식세포의 nitric oxide 생성량 측정**

대식세포를 이용하여 홍경천 및 홍경천 callus 추출물의 첨가를 통한 nitric oxide(NO<sup>-</sup>) 생성능을 측정된 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 세포내 독소로 작용하는 LPS(lipopolysaccharide)와 추출물을 J774.1 세포 주에 처리하여 이틀간 배양한 후, 배양액 중에

**Table 1. The effect of the callus extracts from *R.sachalinensis* A. Bor on the growth of human immune B cell (Raji) and T cell (Jurkat) according to different extraction process**

Cell line	Sample	Concentration (mg/mL)				
		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
B cell	RWE <sup>1)</sup>	101.47±2.02 <sup>b</sup>	109.50±2.19 <sup>b</sup>	154.22±3.08 <sup>b</sup>	178.58±3.57 <sup>c</sup>	193.84±3.88 <sup>b</sup>
	CWE <sup>2)</sup>	104.15±2.08 <sup>b</sup>	112.18±1.40 <sup>c</sup>	137.88±1.72 <sup>c</sup>	166.53±1.66 <sup>a</sup>	187.15±1.87 <sup>a</sup>
	CUE <sup>3)</sup>	106.02±2.12 <sup>b</sup>	122.09±1.53 <sup>c</sup>	147.26±2.94	175.10±2.19 <sup>c</sup>	185.54±1.85 <sup>a</sup>
	S <sup>4)</sup>	106.30±1.50 <sup>c</sup>	108.20±1.54	116.60±1.28 <sup>c</sup>	120.80±2.42 <sup>a</sup>	126.90±2.52 <sup>a</sup>
T cell	RWE	112.26±2.25 <sup>b</sup>	116.14±1.45 <sup>c</sup>	128.41±2.56 <sup>b</sup>	138.70±2.77 <sup>b</sup>	145.58±1.81 <sup>c</sup>
	CWE	105.00±1.04 <sup>a</sup>	110.55±1.10 <sup>a</sup>	111.95±1.12 <sup>a</sup>	117.00±1.46 <sup>c</sup>	119.33±1.93 <sup>a</sup>
	CUE	107.99±1.06 <sup>a</sup>	113.89±1.42 <sup>c</sup>	116.26±2.32	120.96±2.41	124.02±1.24 <sup>a</sup>
	S	106.80±1.53 <sup>c</sup>	110.40±1.58	114.90±1.28 <sup>a</sup>	121.20±2.42 <sup>c</sup>	126.60±2.53

The values are expressed as mean±SD of data obtained from three independent experiments. <sup>a</sup> $p < 0.001$ , <sup>b</sup> $p < 0.005$ , <sup>c</sup> $p < 0.01$  vs. control.

<sup>1)</sup>*R.sachalinensis* A. Bor root extracts by water extraction for 24 h at 100°C.

<sup>2)</sup>Callus extracts from *R.sachalinensis* A. Bor by water extraction for 24 h at 100°C.

<sup>3)</sup>Callus extracts from *R.sachalinensis* A. Bor by water extraction with 40 kHz ultrasonification process at 60°C.

<sup>4)</sup>Isolated active component from *R.sachalinensis* A. Bor.

NO<sup>-</sup> 농도를 측정된 결과, 시료처리를 하지 않은 대조군과 비교하였을 때 모든 시료 첨가군에서 높은 NO<sup>-</sup> 생성을 나타내었다. 홍경천 및 callus 추출물만 처리한 실험군에서 6-7  $\mu\text{m}$ 의 NO<sup>-</sup> 생성이 유도되었다. 이는 추출물 자체가 가지고 있는 세포독성에 기인한 것으로 사료되며 LPS를 처리한 실험군에서 9.57  $\mu\text{m}$ 의 NO가 생성된 것과 비교하여 낮은 수치로서, 홍경천 추출물 및 홍경천 callus가 염증반응 및 면역 활성화에 있어 항상성을 유지하면서 면역기능조절 물질인 NO 생성에 있어 효과적인 결과를 나타낼 수 있을 것이라 사료된다. 추출물 단독 첨가군과 추출물 및 LPS 혼합 첨가군의 NO<sup>-</sup> 생성량을 비교해 볼 때 홍경천 열수 추출물이 4.12  $\mu\text{m}$ , 홍경천 callus 열수 추출물이 7.43  $\mu\text{m}$ , 홍경천 callus 초음파 추출물이 8.82  $\mu\text{m}$ 로 LPS와 혼합 처리하였을 때 nitric oxide의 생성능이 큰 폭으로 증진되는 것을 확인하였으며, 이는 LPS 등 세균 내 독소와 함께 추출물의 활성성분이 대식세포의 면역 조절에 있어 상승작용을 이루었음을 알 수 있다. 특히 홍경천 callus에서 NO<sup>-</sup> 생성이 비교적 큰 폭으로 증가하는 것을 통해 홍경천 callus에 macrophage의 NO<sup>-</sup> 생성을 활성화시키는 성분이 존재하며, 이러한 NO가 항종양 및 항미생물 작용을 통해 면역체계를 조절하며 P53의 발현을 통해 암세포를 사멸시킨다는 연구결과(30,31)에 미루어 보아 홍경천 callus의 NO<sup>-</sup> 생성 증진이 항암활성에 기여할 수 있을 것이라 기대할 수 있다. 이상의 결과로부터 홍경천 callus 추출물의 면역증강 활성을 통한 항암 소재로서의 가능성을 제시하고 있으며 이러한 높은 면역 활성화의 규명을 위해 암세포에 대한 독성 및 선택적인 면역 활성을 나타내는 유효성분에 대한 탐색이 진행되어야 할 것이라 생각된다.

## 요 약

홍경천은 높은 약리작용에도 불구하고 특수한 배양 조건 및 낮은 번식율로 인해 홍경천 활성 성분의 대량생산이 불가능한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 환경에 구애받지 않고 대량생산 및 품질유지가 가능한 식물조직배양 공정을 통해 홍경천 조직으로부터 유도된 callus를 대상으로 초음파 추출공정을 적용하여 활성성분의 용출을 극대화 및 독성저감을 가능하게 하고 callus에 대한 항암활성을 탐색하여 홍경천 callus의 기능성 식품 소재로서 가치를 발견하고자 하였다.

인간 정상 세포인 HEK293과 HEL299에 대한 세포독성을 측정한 결과, 홍경천과 callus의 독성이 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 홍경천 callus 초음파 추출물이 전체적으로 낮은 독성을 나타내는 것으로 미루어 보아 초음파 공정을 통한 세포독성 저감효과를 확인할 수 있었으며, 조직배양 공정을 통해 홍경천의 독성 저감이 이루어지지 않은 것을 미루어 볼 때 callus가 홍경천과 같거나 비슷한 정도의 활성 성분을 함유하고 있을 것이라 사료된다.

홍경천 및 callus의 소화기, 호흡기 계통의 암세포 생육억제 활성 및 selectivity를 측정한 결과, 특히 간암 세포(HEP3B)에 대해 홍경천 및 callus 추출물의 고농도 첨가 시 암세포 저해 활성이 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, callus 초음파 추출물은 최고농도 1.0 mg/mL에서 73.19%의 암세포 생육저해 활성과 최고 5.94의 selectivity를 나타내었다. 전체적인 항암활성 측정 결과, callus 추출물에서 높은 항암활성을 나타냈으며 특히 위암 및 간암에 대한 탁월한 항암효과가 확인됨에 따라 앞으로 홍경천 및 홍경천 callus의 소화기계 암 또는 특정 암에 대한 항암활성 연구가 필요할 것으로 생각된다.

암의 예방 및 억제에 중요한 기전으로 작용할 수 있는 항산화

활성 평가를 위해 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, 초음파 공정을 통한 callus 추출물에서 홍경천의 높은 항산화 작용을 확인할 수 있었다. 또한 인간 면역세포 생존율의 측정을 통해 홍경천 및 callus 추출물에 의해 면역세포가 자극을 받는 것을 확인할 수 있었으며 대식세포의 NO생성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 면역계 세포들의 면역체계의 항상성 유지 및 antibody와 cytokine과 같은 면역물질 생성을 통한 암세포 억제 및 제거작용이 가능할 것이라 사료된다.

홍경천 조직으로부터 유도된 callus에 초음파 추출 공정을 적용할 시 세포독성 저감과 활성 성분 용출량의 극대화에 기인한 항암 및 암 발생과 억제 기작에 영향을 주는 항산화 및 면역증강 활성의 증가를 확인함에 따라 홍경천 callus가 기능성 항암 소재로서의 가치가 매우 높다고 사료된다. 하지만 이와 같은 홍경천 callus의 항암 소재로서 활용을 위해서는 활성성분의 용출을 극대화 할 수 있는 추출 공정의 확립과 홍경천 본래의 독성은 줄이고 암세포에 선택적인 활성을 나타낼 수 있는 활성 성분의 규명 및 정상세포 독성을 배제할 수 있는 추출물 농도의 최적화에 대한 연구가 이루어져야 하겠다.

## 감사의 글

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

## 문 헌

1. Lee EJ, Im JS, Park CK, Jeon BS, Kim SC. Food components and volatile flavors in *Rhodiola sachalinensis* roots. Food Indus. Nutr. 9: 53-57 (2004)
2. Kim JY, Seong NS, Lee YJ. A study on the effects of *Rhodiola rosea* root on the cancers. Korean J. Herbology. 21: 79-87 (2006)
3. Park KU, Yoon JH, Kim JY, Jeong CH, Park CK, Song WS, Seo KI. Biological activity of the fractions extracted from *Rhodiola dumulosa*. Korean J. Food Preserv. 12: 496-500 (2005)
4. Cui SB, Lee DS, Ham SS. Antioxidative, antimutagenic, and cytotoxic effects of *Rhodiola sachalinensis* extract. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 211-261 (2004)
5. Kim JY, Lee YJ. A study on the effects of *Rhodiola rasea* root on the immune system. Korean J. Herbol. 23: 179-189 (2008)
6. Bu YM, Baek SK, Jin ZH, Kang TH, Rho SJ, Kim HC. Neuroprotective effect of *Rhodiola sachalinensis* extracts on transient focal cerebral ischemia in rats. Korean J. Herbol. 19: 191-197 (2004)
7. Hong EY, Kim IH, Yun JS, Yun T, Lee CH. Growth characteristics and search for eligible cultivation area of *Rhodiola sachalinensis* A. Boriss. Korean J. Plant Res. 16: 212-217 (2003)
8. Kim SJ, Hwang B, Hwang SJ, Ahn JC. Production of salidroside from callus culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Korean J. Plant Biotechnol. 31: 89-94 (2004)
9. Bae SJ. Anticarcinogenic and antioxidant effects of *Rhodiola sachalinensis*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 34: 1302-1307 (2005)
10. Oh IS, So SS, Xu MZ. Growth and utility of *Rhodiola sachalinensis* in Baekdu mountain I. induction of callus and composition of free amino acids. Korean J. Environ. Biol. 22: 148-152 (2004)
11. Lee KJ, Um BH. Extraction of useful component from natural plants using ultrasound system. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 23: 101-108 (2008)
12. Doll R, Peto R. The causes of cancer, quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J. Nat. Cancer Inst. 66: 1192 (1981)
13. Kang MY, Lee YR, Koh HJ, Nam SH. Antioxidative and antimutagenic activity of ethanolic extracts from *Glant embryonic rices*. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47: 61-66 (2004)

14. Yu CY, Kim SH, Lim JD, Kim MJ, Chung IM. Intraspecific relationship analysis by DNA markers and *in vitro* cytotoxic and antioxidant activity in *Eleutherococcus senticosus*. *Toxicol. In vitro* 17: 229-236 (2003)
15. Choi BK, Kim SW. Studies on the regulation of nitric oxide synthesis in murine mononuclear phagocytes. *Korean J. Environ. Toxicol.* 15: 69-80 (2000)
16. Ma L, Cai D, Li HX, Tong BB, Song LH, Wang Y. Anti-fatigue effects of salidroside in mice. *J. Med. Coll. PLA* 23: 88-93 (2008)
17. Jung WK, Lee DY, Kim JH, Choi IH, Park SG, Seo SK, Lee SW, Lee CM, Park YM, Jeon YJ, Lee CH, Jeon BT, Qian ZJ, Kim SK, Choi IW. Anti-inflammatory activity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) extracted from *Rhodiola sacra* against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in mice. *Process Biochem.* 43: 783-787 (2008)
18. Wang HB, Ding YY, Zhou J, Sun XL, Wang SW. The *in vitro* and *in vivo* antiviral effects of salidroside from *Rhodiola rosea* L. against coxsackievirus B3. *Phytomedicine* 16: 146-155 (2009)
19. Kim SJ, Kim KS, Hwang SJ, Chon SU, Kim YH, Ahn JC, Hwang B. Identification of salidroside from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. and its production through cell suspension culture. *Korean J. Med. Crop Sci.* 12: 203-208 (2004)
20. Kim CH, Kwon MC, Han JG, Ha JH, Jeong HS, Choi GP, Park UY, Nam JH, Hwang B, Lee HY. Immune activities of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. extracts isolated with various extraction process. *Korean J. Med. Crop Sci.* 16: 383-389 (2008)
21. Lee JJ, Shin DH, Park SE, Kim WI, Park DI, Choi YH, Hong SH. *Euphorbiae humifusae* sensitizes apoptosis of TRAIL-resistant human gastric adenocarcinoma AGS. *J. Life Sci.* 18: 120-128 (2008)
22. Kwon MC, Kim CH, Kim HS, Lee SH, Choi GP, Park UY, You SG, Lee HY. Optimal extract condition for the enhancement of anticancer activities of *Atemisia princeps* Pampanini. *Korean J. Medical Crop Sci.* 15: 233-240 (2007)
23. Park JW. New targeted agents for hepatocellular carcinoma. *Korean J. Liver Cancer Study Group* 8: 16-17 (2008)
24. Kim BS. The management of lung cancer. *Family Physician* 6: 8 (1985)
25. Jung HJ, Choi YJ, Won CW, Seo YR. The Chemopreventive effects of antioxidant enzyme. *Environ. Mutagen. Carcinogen.* 26: 45-47 (2006)
26. Park JG, Kim SW. Molecular study of aging by free radical. *J. Basic Sci.* 9: 103-114 (1998)
27. Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Sung NJ. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 965-971 (2008)
28. Chen JH, Ho CT. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agr. Food Chem.* 45: 2374-2378 (1997)
29. Ha H, Yoon SH, Takeru FJ, Hitoshi HR. MTT assay using primary cultured rat hepatocytes. *Korean J. Environ. Toxicol.* 9: 19-23 (1994)
30. Choi BK, Kim SW. Studies on the regulation of nitric oxide synthesis in murine mononuclear phagocytes. *Korean J. Environ. Toxicol.* 15: 69-80 (2000)
31. Lee DI, Kim HK, Lee MW, Choi YW, Kim HH, Kim EJ. Augmentation of macrophage cytotoxicity and NO production by pedunculagin. *Yakhak Hoeji* 44: 174-181 (2000)