

추출 공정별 매자나무 추출물의 항암활성 비교

하지혜 · 권민철 · 서용창 · 최운용 · 정을권² · 정애란² · 김진철 · 안주희 · 이현용^{1,*}
강원대학교 바이오산업공학부, ¹강원대학교 생명공학연구소, ²명진농장

Comparison of Anticancer Activities of *Berberis koreana* Extracts Obtained by Different Extraction Processes

Ji Hye Ha, Min Cheol Kwon, Yong Chang Seo, Woon Yong Choi, Eul Kwon Chung², Ae Ran Chung², Jin Chul Kim, Ju Hee Ahn, and Hyeon Yong Lee^{1,*}

Department of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University

¹Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

²Myung Jin Farm Cooperation

Abstract This study was conducted to examine the anticancer activities of *Berberis koreana* extracts according to different extraction processes. The highest extraction yield obtained was 8.26% following extraction by ultrasonification at 60 kHz and 60°C followed by high pressure at 500 MPa. Generally, the extracts from the ultrasonification process showed relatively low cytotoxicities against the human normal cell line, HEK293 showing as low as 15%. This extract inhibited the growth of the digestive related organs cell lines, human stomach adenocarcinoma cell and human epithelial adenocarcinoma cell by up to 80% when administered at 1.0 mg/mL, and showed 2.5-3.5 of selectivity. It was also found that this extract induced the production of nitric oxide levels as high 37.87 μM from macrophages. For the *in vivo* experiment using ICR mice, the total serum IgG levels of mice treated with *B. koreana* extracts from ultrasonification extraction were increased by up to 57 ng/mL. The survival time of this group was longer than that of the other group after the injection of Sarcoma-180 and the increment of their body weights was also greatly suppressed. In addition, the extract showed the highest tumor inhibition activities, leading to a reduction of 78.47%. These results indicate that the highest activities of *B. koreana* associated with this extraction process can be significantly improved.

Key words: *Berberis koreana*, high-pressure process, Sarcoma-180, antitumor activity, Nitric oxide, NK cell

서 론

오래전부터 소염, 진통, 항암, 항결핵, 항균 및 호흡기 질환 예방 등의 목적(1)으로 약재로 널리 사용되어져 온 매자나무는 (*Berberis koreana* Palibin) 미나리아재비목 매자나무과의 낙엽관목으로 국내 특산종으로 뿌리와 줄기부에서 높은 폴리페놀 함량과 더불어 높은 항산화 및 항균 활성이 보고되었으며(2), 매자나무 수피부에서 NK 세포의 활성 증진 효과(3) 및 높은 암세포 생육 억제 활성(4)이 보고되었다. 또한 매자나무의 ethyl alcohol 분획물에서 강력한 항암활성이 있으며, 그 유효성분이 2-(3,4-dihydroxybenzyl)-ethyl alcohol로 밝혀진 바 있다(5). 하지만 목질계 자원인 매자나무의 단단한 조직으로 인해 기존의 단순 열수 추출 및 용매 추출 등으로는 유용 활성성분의 용출 증대 및 활성 증진에 한계가 있으며, 시료자체의 독성으로 인하여 그 활용이 매우 제한적이었다. 따라서 매자나무를 대상으로 저온 초고압 공정을 적

용 시 매자나무의 단단한 조직에 영향을 주어 활성 성분의 용출을 용이하게 하고 기존의 추출 공정으로는 용출이 어려웠던 성분들의 용출을 가능하게 하여 독성 저감에 기여하는 결과를 확인할 수 있어 매자나무가 항암 치료를 위한 면역 기능성 소재로 사용될 수 있음을 기대할 수 있다(6). 또한 초음파 공정이 높은 초음파 에너지의 충격 효과로 높은 압력을 유도하여 생물 활성 물질과 식물 성분의 추출효율을 높인다고 보고된 바가 있어(7-9) 이러한 추출 공정을 통해 매자나무의 기능성을 증진시킬 수 있을 것으로 보인다. 현재까지 기능성 식약품 소재로서의 매자나무의 연구 및 개발이 거의 이루어지지 않아 그 효과를 입증할 수 있는 결과가 미미하여 이에 대한 다양한 연구가 더욱 시급하다고 할 수 있다.

인체의 면역감시체계가 정상적으로 유지되지 못하였을 경우 세포는 증식과 사멸을 일정하게 유지하는 항상성을 상실하고 비정상적으로 증식을 계속하여 암 질환으로 발전하게 된다. 따라서 암은 유전적 변이 세포를 사멸하는 면역 기능 이상으로 발생하는 면역학적 질환으로 볼 수 있으며 면역학적 의미에서 종양을 하나의 이식된 항원으로 본다면 숙주의 일반적 면역반응을 회복 또는 증강을 통해 암의 치료가 가능하다고 할 수 있다(10). 현재 암의 치료는 주로 수술, 방사선, 항암제 요법 등을 통해 이루어지고 있으나 치료에 대한 내성 및 부작용으로 인해 최근 악성 종양의 치료를 위한 접근방법으로 면역치료(immunotherapy)에 관한 관심이 증대되고 있다. 항암 면역치료는 암 관련 항원에 대한

*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 December 8, 2009; revised January 14, 2010; accepted January 15, 2010

면역 기능을 회복 또는 증강시켜 체내의 면역기능에 의존하여 능동적으로 변이 세포의 성장을 억제하고 제거하도록 유도하는 방법으로 항암제의 내성발현과 정상조직에의 독성유발이라는 한계점을 극복하며 장기적인 치료효과를 상승시켜 전이암과 같은 악성 종양에 대한 새로운 중앙 치료법으로 보고되어지고 있으며(11), 이러한 면역요법을 통한 암 치료의 효능 향상을 위해 다양한 시도들이 이루어지고 있다(12). 이러한 맥락에서 뛰어난 항암 및 면역 활성을 갖는 기능성 식의약품 소재의 개발이 필수적이라 할 수 있다.

따라서 본 연구는 매자나무 활성성분의 용출 및 활성 극대화를 위해 초고압 공정에 초음파 추출을 병행하여 매자나무 최적 추출 공정의 연구와 함께 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통해 매자나무 추출물의 면역 증진 및 항암 활성을 평가하여 국내 수목자원인 매자나무의 기능성 식품 소재로서의 부가가치 창출에 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 매자나무는 경기도에 분포하는 한국 특산종인 *Berberis koreana*로써 2007년, 국립산림과학원 광릉시험림으로부터 묘목을 지원받아 사용하였다.

추출조건

고압 추출은 매자나무 묘목의 수피만 분리하여 100 g을 진공 포장한 후 고압 추출장치(Ishin autoclave, Daejeon, Korea)를 이용하여 5,000 bar의 압력으로 25°C에서 5분간 고압 추출을 진행한 다음 수직환류 냉각기가 부착된 추출 플라스크에 10배수의 증류수를 사용하여 60°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 초음파 추출은 수직 환류 냉각기가 부착된 플라스크에 시료와 시료 중량의 10배수의 증류수를 용매로 넣고 60°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출한 후 60 kHz의 초음파 공정을 1시간 동안 추가로 실시하였다. 초음파 병행 고압 추출은 상기 고압 추출 공정 후 환류 냉각 추출에 선행하여 60 kHz의 초음파 공정을 1시간 동안 병행한 후 추출하였다. 대조군으로 사용된 일반적인 열수 추출은 100 g의 매자나무 수피를 100°C에서 12시간 동안 2회 반복 환류 냉각 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물은 회전감압농축기(rotary vacuum evaporator N-N series, Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하여 여과 및 농축한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다.

시약

본 연구의 세포배양 시 Roswell Park Memorial Institute Medium(RPMI 1640)과 Alpha Minimum Essential Medium(α -MEM)의 배지와 Fetal bovine serum(FBS)과 Horse serum의 혈청은 Gibco C.(NY, USA)사로부터 구입하였으며, HEPES buffer, Gentamycin sulfate 및 Trypsin-EDTA는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포염색을 위한 SRB (sulphorhodamine B)는 Sigma사로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

세포주 및 실험 동물

정상세포에 대한 독성을 측정하기 위하여 인간 신장세포인 HEK293(human embryonic kidney cell, ATCC, Manassas, VA, USA)을 이용하였으며, 세포 수준의 항암활성을 평가하기 위해 인간 유래 위암 세포인 AGS(human stomach adenocarcinoma, ATCC, USA)와 대장암 세포인 Caco-2(human epithelial adenocar-

cinoma, ATCC)를 이용하였다. 상기의 인간 전과립 세포의 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 10% heating inactivated FBS를 포함한 RPMI1640 배지를 이용하여 4-5 세대 계대 배양 후 실험에 사용하였다. Nitric oxide(NO) 생성능은 마우스 유래 macrophage(J774.1, ATCC)를 사용하여 측정하였다. *In vivo* 실험에 사용된 실험 동물은 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)로부터 구입한 4주령의 ICR(female, 22-24 g) 마우스이며 온도 20-25°C, 습도 55±10% 유지 가능한 사육실에서 일주일간 안정기를 취한 후 실험에 사용하였다. 12시간 간격으로 점등하였으며, 멸균된 고형 사료와 식수를 자유 급식하였다. *In vivo* 실험에 사용된 암세포주는 Sarcoma-180(CCL 8, ATCC)로 마우스 복강내에서 6-7일 간격으로 계대배양하여 사용하였다.

정상세포 독성 및 *in vitro* 항암활성 측정

SRB assay(13)방법을 이용하여 매자나무 추출물의 정상세포에 대한 세포독성 및 세포 수준에서의 항암 활성을 평가하였다.

SRB assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 인간 정상세포인 HEK293과 인간 소화기계 유래 암세포인 AGS와 Caco-2의 농도를 4-5×10⁴ cells/mL으로 96 well plate의 각 well에 100 μ L씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)한 후, 시료의 최종 농도를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL로 조절하여 100 μ L씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10%(w/v) TCA(Trichloroacetic acid) 100 μ L를 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 4-5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액을 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 L를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader(THERMO max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

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

대식세포에서의 Nitric Oxide 생성량 측정

J774.1 macrophage(mouse)를 이용하여, 홍경천 및 홍경천 callus의 첨가를 통하여 활성화 된 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitric oxide의 양을 microplate assay를 통해 정량하였다(14). 10% FBS를 포함하는 RPMI1640 배지에서 배양한 macrophage를 4-5×10⁴ cells/mL의 농도로 조절하여 24 well plate에 분주하여 실험에 사용하였으며, 추출물은 상기의 정상 세포를 이용한 독성 측정 실험에서 나타난 결과를 참고하여, 본 실험의 대상세포 활성에 있어서 세포독성을 배제할 수 있는 농도로 조절하여 실험에 사용하였다.

추출물의 최종 농도가 0.5 mg/mL이 되도록 24 well plate에 첨가하여 humidified 5% CO₂ incubator에서 37°C, 48시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 상등액 50 μ L를 취하여 동일부피의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine diglyochloride/2.5% H₃PO₄)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 32 μ M부터 0.25 μ M까지 RPMI1640 배지를 이용하여 단계 희석하여 얻어지는 표준곡선과 비교하여 생성량

을 계산하였다. Nitric oxide(NO) 생성의 양성 대조군 물질로는 Lipopolysaccharide(LPS)를 사용하였다.

마우스를 이용한 항체생성능(IgG) 평가

항체(antibody)는 항원과 결합하는 단백질을 말하며, 혈액과 체액에 녹아있는 면역 글로블린(immunoglobulin, Ig)을 일컫는 말로써, 항체는 B 림프구의 세포 표면에 존재함으로써 B세포의 증식과 더불어 항체의 생성이 증가한다. ICR mouse를 이용한 항체 생성능은 15일 동안 3일 간격으로 mouse로부터 혈액을 채취한 후, 이로부터 혈청을 분리하여 Mouse IgG quantitative ELISA kit (Bethyl laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA)을 사용하여 측정하였다. Coating antibody와 coating buffer를 1:100으로 희석하여 각 well에 100 μ L씩 주입하고, 1시간동안 실온에서 배양한 후 각 well에서 antibody solution을 제거하고 wash solution으로 3회 세척한다. Blocking을 위해 각 well에 blocking solution을 200 μ L씩 주입하고, 30분 배양 후 wash solution으로 3회 세척한다. Blocking 후 sample를 50배수로 희석하여 각 100 μ L씩 주입한 후 1시간 동안 배양한 후 wash buffer로 5회 세척한다. 그 후 HRP conjugate를 1:100,000의 비율로 conjugate diluent를 이용하여 희석한 후 각 100 μ L씩 주입하고, 1시간동안 배양한 후 wash buffer를 이용하여 5회 세척한다. TMB의 두 기질 용액을 동일 양을 혼합한 후 각 well에 100 μ L씩 주입한 후 5-30분 동안 배양한 후 반응을 정지시키기 위해 2 N H₂SO₄를 동일양인 100 μ L씩 주입한다. 마지막으로 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한다(15).

Sarcoma-180 복수암 및 고형암에 대한 *in vivo* 항암 활성 측정

Sarcoma-180 세포를 10% heating inactivated FBS를 함유한 RPMI 1640의 기본 배지에서 배양하였다. 0.25% trypsin-EDTA로 배양 flask로부터 분리한 후 2 \times 10⁶ cells/mouse의 농도로 조절하여 200 μ L를 mouse 복강에 1 mL syringe를 이용하여 피하이식 하였다. 상기의 방법으로 mouse 복강 내에서 6-7일 간격으로 계대 배양을 통해 보존된 sarcoma-180 세포를 취하여 복수암 실험군 mouse의 복강과 고형암 실험군 mouse의 왼쪽 대퇴부 근육에 200 μ L씩 피하이식 하였다. 종양세포 이식 후 21일 동안 1일 투여량 0.5 mL, 최종 농도를 30, 100 mg/kg로 조절한 각각의 시료를 경구투여 하였다. 실험군은 암을 유발시키지 않고 사료만 먹인 group(negative control group), 암 유발 후 사료만 먹인 group(positive control group), 암을 유발시킨 후 시료를 투여한 group(treated sample group)으로 분리하여 실험을 수행하였다. 30일간 3일 간격으로 복수암 유발 mouse의 체중을 측정하였고 생존율(survival rate)을 측정하였으며, 고형암 유발 mouse에서 종양 세포이식 30일 후 경추 탈골법을 통해 치사 후 고형암과 비장 및 간의 무게를 측정하여 체중에 대한 장기의 중량을 측정하였다(16).

통계

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

결과 및 고찰

추출공정에 따른 추출물의 추출수율

매자나무 수피부의 각 추출공정에 따른 추출물의 수율을 Table 1에 나타냈다. 일반 열수 추출물의 수율이 5.21%로 가장 낮았으

Table 1. Yields of *Berberis koreana* extraction by different extraction processes

Sample	Extraction process			Yield (% w/w)	
	Solvent	Temp. (°C)	Pressure (bar) / Ultrasonification (kHz)		
WE ¹⁾	Water	100	-	5.21 \pm 0.26	
HPE ²⁾		60	5,000	7.25 \pm 0.34	
USE ³⁾		60	-	60	6.79 \pm 0.36
HUE ⁴⁾		60	5,000	60	8.26 \pm 0.41

Each value were compared with control at $p < 0.05$ by the student's t-test.

¹⁾ *B. koreana* bark extracts by normal extraction.

²⁾ *B. koreana* bark extracts under high pressure condition.

³⁾ *B. koreana* bark extracts by ultrasonification extraction.

⁴⁾ *B. koreana* bark extracts by ultrasonification extraction after high pressure extraction.

며, 초음파 추출물과 초고압 추출물이 각각 6.79%와 7.25%로 일반 열수 추출물에 비해 약 1.3-1.4배의 추출 수율이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 목질계 시료인 고로쇠의 경우 초고압 공정을 통해 추출을 시행하였을 경우 열수 추출보다 약 1.7배 수율이 증가하는 것으로 보고(17)된 바와 같이 매자나무 또한 초고압을 통한 조직파괴에 의한 유용 활성 성분의 용출 증대를 통해 일반적인 추출 공정을 통한 목질계 시료의 활성 성분 용출의 한계를 극복하고 추출 수율 증진에 기여한 것으로 사료된다. 초음파 공정 또한 매자나무 추출수율 증가에 기여하는 것을 확인하였으며 이는 초음파 에너지의 탈기현상을 통해 성분이 용출이 증가하는 것으로 보인다. 초고압 공정과 초음파 공정을 병행하여 추출한 매자나무 추출물은 8.26%의 가장 높은 추출 수율을 나타내었다. 이는 열수 추출물에 비해 약 1.59배 증가한 결과로 매자나무의 단단한 조직이 초고압 공정을 통해 세포벽이 파괴되고 내부조직까지 느슨해진 상태가 되면서 용매와 초음파 에너지가 더욱 용이하게 내부까지 도달하여 성분 용출의 상승효과를 나타낸 것으로 사료된다.

정상세포 독성 측정 및 항암활성

Fig. 1은 인간 신장 정상세포인 HEK293를 이용하여 정상세포

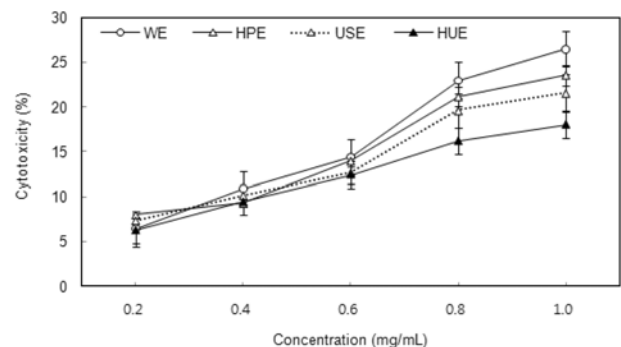


Fig. 1. Cytotoxicity of *B. koreana* extracts from different extraction processes on human embryonic kidney cell, HEK 293. [†]WE: *B. koreana* bark extracts by normal extraction. HPE: *B. koreana* bark extracts by high pressure extraction. USE: *B. koreana* bark extracts by ultrasonification extraction. HUE: *B. koreana* bark extracts by high pressure and ultrasonification extraction. Each value were compared with control at $p < 0.05$ by student t-test. Mean values \pm standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

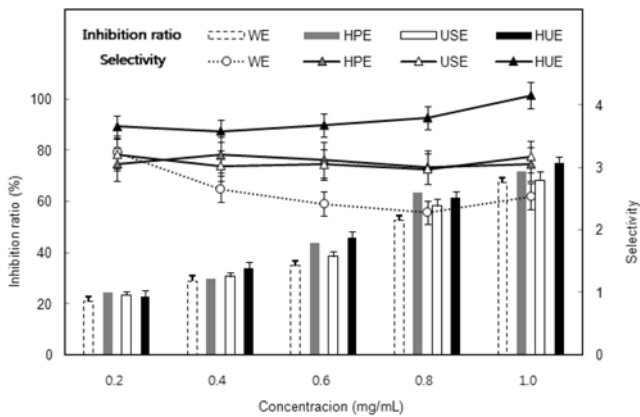


Fig. 2. Inhibition effect (bar chart) of *B. koreana* extracts from different extraction processes on the growth of human stomach adenocarcinoma cell, AGS and its selectivity (line chart). †See the Fig. 1 for abbreviation. Each value was compared with the control at $p < 0.05$ by student's t-test. Mean values \pm standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

에 대한 매자나무 추출물의 세포독성을 측정된 결과로 각 공정별 추출물이 모두 농도 의존적으로 독성이 증가하였으며 최고농도인 1.0 mg/mL에서 매자나무 열수 추출물이 26.52%로 가장 높았다. 동일 농도에서 초음파 추출물이 21.54%, 초고압 추출물이 23.54%로 각 공정을 통해 세포 독성이 저감되는 효과를 확인할 수 있었다. 매자나무가 식물자체 독성을 가지는 시료임을 감안할 때 상기의 공정들이 매자나무 독성저감에 효과적으로 작용하여 기능성 소재로서의 활용 폭을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. 특히 매자나무 초고압, 초음파 병행 추출물은 최고 농도에서 18.02%의 가장 낮은 독성을 나타내었으며, 열수, 초음파 및 초고압 추출물이 0.6 mg/mL 농도 이상에서 독성이 비교적 급격히 증가하는 패턴과 비교해 볼 때, 초고압, 초음파 병행 추출물은 전 농도에 걸쳐 특정 농도 이상에서의 급격한 독성의 증가 없이 완만한 상승 패턴을 보여주어, 향후 기능성 소재로서 사용 시 추출물의 고농도 첨가를 가능하게 하여 효과적인 유용 생리활성을 나타낼 수 있을 것이라 사료된다.

인간 유래 위암 세포와 대장암 세포인 AGS와 Caco-2를 이용하여 소화기계 암세포에 대한 *in vitro* 항암 활성을 평가하여 각각 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 위암 세포에 대한 매자나무 추출물의 암세포 생육 저해 활성 측정 결과, 매자나무 열수 추출물이 최고농도 1.0 mg/mL에서 67.3%의 가장 낮은 활성을 나타내었으며, 초고압, 초음파 추출물에서 각각 71.82%와 68.32%로 열수 추출물에 비해 비교적 높은 활성을 확인할 수 있었다. 또한 열수 추출물이 최저농도를 제외한 모든 농도에서 약 2.3-2.7의 selectivity를 나타낸 결과와 비교할 때 초음파, 초고압 추출물이 모든 농도에서 3.0 이상의 selectivity를 나타내며 양호한 항암활성을 확인할 수 있었다. 또한 초고압, 초음파 병행 추출물이 최고농도 1.0 mg/mL에서 가장 높은 74.86%의 생육저해 활성을 보이며, 모든 농도에서 3.5 이상의 selectivity를 나타냈다. 특히 최고농도에서 4.15의 selectivity를 나타내어 동일 농도에서의 열수 추출물과 비교할 때 약 38.91% 증가된 우수한 선택적 암세포 사멸 효과를 갖는 것으로 확인할 수 있었다. 대장암 세포 대상 매자나무 추출물의 항암활성 측정 결과도 마찬가지로 열수 추출물이 최고농도에서 59.03%의 암세포 생육저해 활성을 나타낸 것에 비해 열수 추출물을 제외한 모든 추출물이 1.1-1.2배 증가된 활성을 나타내었으며, 매자나무 초고압, 초음파 추출물이 0.4 mg/mL에서 4.14

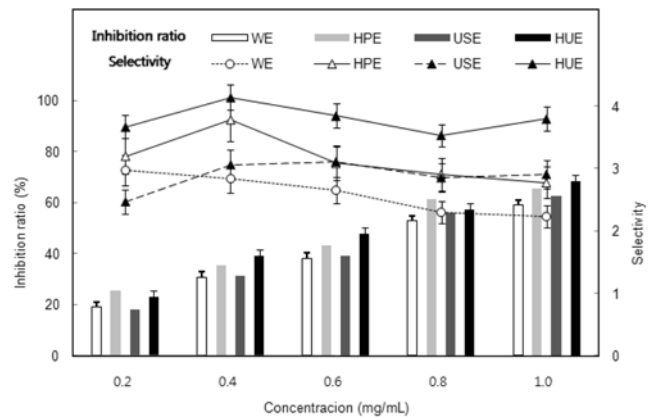


Fig. 3. Inhibition effect (bar chart) of *B. koreana* extracts from different extraction processes on the growth of human epithelia adenocarcinoma cell, Caco-2 and its selectivity (line chart). †See the Fig. 1 for abbreviation. Each value was compared with the control at $p < 0.05$ by student's t-test. Mean values \pm standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

의 selectivity를 나타내며 가장 양호한 암세포에 대한 선택적 사멸 효과를 나타내었다. 미황, 당귀 및 홍경천과 같은 우수한 항암활성이 보고된 약용 작물이 소화기계 암세포에 대해 높은 생육저해 활성을 보여 주었지만 고농도에서 생육저해 활성에 비해 높은 세포독성으로 selectivity가 감소하는 경향을 보여주는 데 반해(18,19) 본 연구의 매자나무 추출물은 상기 두 가지의 소화기계 암세포에 대한 선택적 사멸효과가 고농도에서도 마찬가지로 유지되는 것을 확인할 수 있다. 이는 앞선 정상세포에 대한 세포독성 측정 결과에 미루어 보아 초고압과 초음파를 병행하는 추출공정에 의해 정상세포에 독성으로 작용하는 매자나무 성분의 파괴 및 변환 효과적으로 이루어내 고농도에서도 정상세포에 대한 독성이 크게 증가하지 않기 때문인 것으로 생각 된다.

대식세포에서의 Nitric Oxide 생성량 측정

각 공정별로 추출한 매자나무 추출물을 이용하여 대식세포의 NO⁻ 생성능을 확인한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 면역계에서 생성된 NO는 interferon- γ , TNF- γ 또는 TNF- α 와 같은 여러 가지 cytokine과 LPS(*E. coli* derived lipopolysaccharide)와 같은 세균 내 독소에 의해 유도된 inducible NO synthase(iNOS)에 의해 생성된다. 이러한 NO가 면역계에서 중요한 방어 분자로서 작용하며 비교적 장기간 동안 많은 양이 분비되어 암세포의 사멸에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다(20). 기존의 연구에 의하면 NO가 종양세포의 apoptosis를 유도하고(21) antigen-presenting cell (APC)로 작용하여 T cell에 의한 특이적 면역을 개시 또는 조절하며 활성화된 macrophage에서 생성되는 TNF- α 는 종양세포의 용혈성 괴사를 일으키는 것으로 보고되어 있다(22).

각 공정별 매자나무 추출물과 LPS를 같이 투여하여 대식세포로부터 NO의 생성능을 확인한 결과 J774.1 세포주에 LPS와 추출물을 동시에 처리하여 이틀간 배양한 후 배양액 중에 NO⁻ 농도를 측정된 결과 LPS만 처리한 배양액과 비교하여 열수 추출물이 9.1%, 초고압 추출물이 17.4%, 초음파 추출물이 12.5% 그리고 초고압, 초음파 병행 추출물이 24% 생성량이 증가하였다. 이러한 결과는 매자나무 추출물의 첨가를 통해 LPS 등 세균 내 독소와 함께 상승작용을 이루어 NO 생성능을 증진시킴으로써 면역체계에 활성 증진 효과를 나타낸 것으로 볼 수 있다. 이를 통해 모든 매자나무 추출물이 이러한 면역 증진 효과를 나타내었

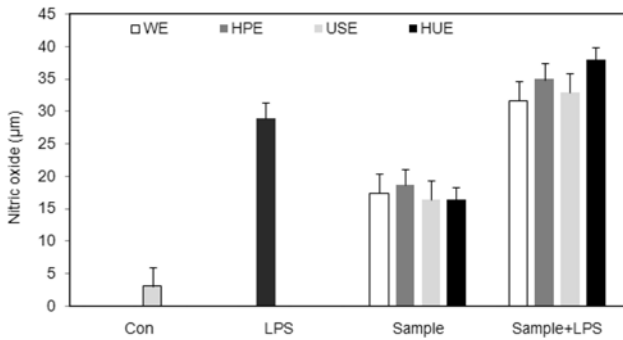


Fig. 4. Stimulation of nitric oxide production by adding 0.5 mg/mL of *B. koreana* extracts from different extraction processes. †See the Fig. 1 for abbreviation. Each value were compared with the control at $p < 0.05$ by student's t-test. Mean values \pm standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

으며 특히 초고압, 초음파 병행 추출을 통한 매자나무 추출물이 샘플과 LPS를 함께 투여한 NO 생성능 측정에서 37.87 μ M로 가장 높은 수치를 보여주어 초고압, 초음파 병행 추출 공정이 면역 반응을 통한 항암 활성 증진에 기여하였음을 확인할 수 있다.

마우스를 이용한 항체생성능(IgG) 평가

항체(antibody, Ab)는 항원과 결합하는 단백질을 말하며, 혈액과 체액에 녹아있는 면역글로불린(immunoglobulin, Ig)을 일컫는 말이다. 항체는 B 림프구의 세포표면에도 존재하는데, 이를 표면 면역 글로불린(surface immunoglobulin)이라고 부르며, B 림프구에서 항원수용체(antigen receptor)로 작용한다. B 림프구는 세포 표면의 항체 단백질 즉 면역글로불린을 이용하여 항원과 반응하게 되며, 특정한 항원과 반응한 B 림프구 클론은 플라즈마 세포(plasma cell)로 분화되어 자신이 세포표면에 가지고 있던 것과 똑같은 항체를 세포 밖으로 분비하게 되는 것이다. 이렇게 B 림프구 밖으로 분비된 항체는 혈액이나 체액에 있는 항원과 결합하여 항원의 작용을 방해하거나 항원이 제거되도록 만든다. 상기 *in vitro* 실험 결과 전반적으로 항암 및 면역 활성이 높게 나타난 매자나무 초고압, 초음파 병행 추출물에 대한 *in vivo* 실험을 실시하였다. 매자나무 추출물의 농도는 각각 30 mg/kg/day, 100 mg/kg/day로 정하여 경구투여 하였으며, 15일 동안 3일 간격으로 혈액을 채취하여 IgG 항체 생성을 측정하여 Table 2에 나타내었다. 모든 추출물을 경구투여한 모든 실험군에서 시간이 지날수록 항체의 양이 전반적으로 증가하였으며, 그 중 초고압, 초음파 병행 추출물 100 mg/kg/day 실험군이 15일 쯤 57.25 ng/mL로 가장 많

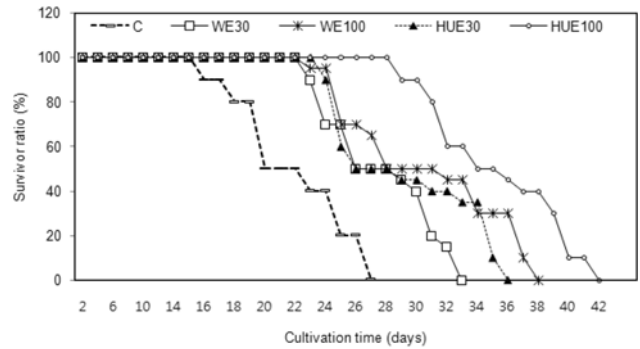


Fig. 5. Survival rate of ICR mice inoculated by Sarcoma-180 in feed of *B. koreana* extracts from different extraction processes. †WE30: *B. koreana* bark extracts by normal extraction at 30 mg/kg/day concentration, WE100: *B. koreana* bark extracts by normal extraction at 100 mg/kg/day concentration, HUE30: *B. koreana* bark extracts by high pressure and ultrasonication extraction at 30 mg/kg/day concentration, HUE100: *B. koreana* bark extracts by high pressure and ultrasonication extraction at 100 mg/kg/day concentration. Each value were compared with the control at $p < 0.05$ by student's t-test. Mean values \pm standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

은 양의 항체를 생성하였다. 이는 동일 투여 농도에서의 열수 추출물 투여 실험군과 비교하였을 때 약 20% 증가한 수치로 *in vivo* 실험을 통해서도 매자나무 추출물이 면역활성 증진 효과가 있음을 확인할 수 있다.

Sarcoma-180 복수암 및 고형암에 대한 *in vivo* 항암 활성 측정

Fig. 5는 Sarcoma-180을 마우스 복강에 투여한 후 각각의 추출물을 경구투여하며 45일까지 마우스의 수명기간을 측정한 결과로 대조군이 14-24일 사이에 복수암에 의해 생존 수가 감소하였으며, 매자나무 열수 추출물 30 mg/kg/day 실험군이 평균 27.5일, 100 mg/kg/day 농도 실험군이 평균 30일간 생존하여 대조군에 비해 각각 23.64%, 30% 생존일수가 지연되었다. 또한 초고압, 초음파 병행 추출물 100 mg/kg/days 투여 실험군이 28-42일 내에 생존 수가 감소, 생존일수가 대조군에 비해 40% 이상 지연되는 결과를 나타내어 매자나무 초고압, 초음파 병행 추출물이 복수암 유발 마우스의 수명을 효과적으로 연장시키는 것을 확인할 수 있었다. 천연물을 대상으로 20-30% 이상 생명연장 효과를 보일 경우, 통계적으로 유의성 있는 항암효과로 인정된다는 기존의 연구 결과를 통해(23) 매자나무 추출물이 매우 효과적인 복수암 증식

Table 2. Effect *Berberis koreana* extracts from different processes on total serum IgG level in ICR mice

(ng/mL)

Sample*	Time (days)				
	3	6	9	12	15
Con	21.71 \pm 0.65 ^b	19.32 \pm 0.21 ^a	16.26 \pm 0.49 ^b	16.95 \pm 0.51 ^b	15.54 \pm 0.26
WE30 ¹⁾	26.77 \pm 0.80 ^b	25.17 \pm 0.43 ^c	29.83 \pm 0.33 ^a	31.25 \pm 0.34 ^a	33.22 \pm 0.37 ^a
WE100 ²⁾	35.10 \pm 1.05 ^b	39.34 \pm 0.43 ^a	38.12 \pm 0.42 ^a	42.94 \pm 0.47 ^a	39.09 \pm 0.51 ^a
HUE30 ³⁾	30.57 \pm 0.34 ^a	28.21 \pm 0.48 ^c	33.44 \pm 0.57 ^c	37.03 \pm 0.63 ^c	46.44 \pm 0.43 ^a
HUE100 ⁴⁾	36.85 \pm 0.63 ^c	42.94 \pm 0.47 ^a	54.20 \pm 0.60 ^a	55.13 \pm 0.94 ^c	57.25 \pm 0.97 ^a

Value are expressed as mean \pm SDM of data obtained from three independent experiments. ^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.005$, ^c $p < 0.01$ Vs. control.

¹⁾*B. koreana* bark extracts by normal extraction at 30 mg/kg/day.

²⁾*B. koreana* bark extracts by normal extraction at 100 mg/kg/day.

³⁾*B. koreana* bark extracts by high pressure and ultrasonication extraction at 30 mg/kg/day.

⁴⁾*B. koreana* bark extracts by high pressure and ultrasonication extraction at 100 mg/kg/day.

억제 효과를 나타낸다고 할 수 있다. 또한 고형암 유발 마우스에 매자나무 추출물을 경구투여하여 종양의 성장을 관찰한 결과 대조군에 비해 모든 실험군의 종양 성장률이 낮았으며, 모든 농도에서 매자나무 초고압, 초음파 병행 추출물이 매자나무 열수 추출물에 비해 높은 종양 성장 저해 활성을 나타내었다. 매자나무 열수 추출물 30 mg/kg/day 실험군이 34.54% 가장 낮은 활성을 나타낸 것에 반해 초고압, 초음파 병행 추출물 100 mg/kg/day 실험군이 74.87%의 매우 높은 종양 저해 활성을 나타냈다.

요 약

본 연구에서는 초고압 및 초음파 공정을 병행하여 실시하는 추출공정을 이용하여 매자나무 수피의 면역활성 및 Sarcoma-180에 의해 유발되는 복수암 및 고형암에 대한 항암활성 증진 효과를 평가하였다. 상기 추출 공정을 통해 매자나무 추출물의 수율이 일반 열수 추출에 비해 1.7배 증가하였으며, 정상세포에 대한 생존율을 80% 이상 유지하는 것으로 나타나 독성 저감 효과도 갖는 것으로 확인되었다. 특히, 매자나무의 초고압, 초음파 병행 추출물이 소화기계 암세포주인 AGS와 Caco-2에 대해서 약 70%의 암세포 생존 저해활성을 나타내며, 최고 4 이상의 selectivity를 나타내며 선택적인 암세포 사멸 효과를 나타내었다. 기존의 연구에서 항암성 면역증강제로 사용되고 있는 버섯의 단백 다당체와 관련하여 영지버섯이 효과적인 항암 활성을 나타내며, 특히 위암 세포인 AGS에 대해 50 mg/mL의 고농도의 영지버섯 추출물이 76% 이상의 암세포 생존저해 활성을 나타내었다(24). 이러한 연구 결과와 비교할 때 본 연구의 매자나무 추출물이 갖는 소화기계 암세포 생존저해 활성은 매우 높다고 할 수 있다. 또한 항암성 면역 활성 측정 결과 초고압, 초음파 병행 추출물이 일반 열수 추출 공정이나 초음파, 초고압 단독 추출 공정을 통한 추출물에 비해 nitric oxide 및 IgG의 생성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 초고압 및 초음파 추출 공정이 약용작물의 활성성분 용출에 기여하며, 특히 저온 초고압 추출 공정이 매자나무의 주요 활성성분인 berberine의 용출을 증가시킨다는 연구 결과(25,26)에 미루어 볼 때 초고압, 초음파 병행 추출 공정이 매자나무 활성 성분 용출에 효과적인 영향을 미치는 것으로 사료된다. *In vivo* 실험을 통한 추출 공정별 매자나무 추출물의 항암 활성 평가를 통해서 상기 공정을 통한 매자나무 추출물이 40% 이상의 복수암 유발 마우스의 수명을 연장하고 약 75%의 고형암 억제 활성을 나타내며 효과적인 항암활성을 확인할 수 있어, 향후 항암성 면역증강제 및 기능성 항암제로서의 기능성 소재화로서의 활용성이 매우 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산림청에서 시행한 산림특정연구사업의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Yoo SJ, Lee KB, Kwak JH. Studies on the seasonal variation of berberine contents in *Berberis koreana*. Korean J. Pharmacogn. 17: 123-128 (1986)
2. Jung HK, Kim YJ, Park BK, Park SC, Jeong YS, Hong JH. Antioxidative and antimicrobial activities of medicinal plant extracts for screening phytobiotic material. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 36: 1235-1240 (2007)
3. Jin L, Han JG, Ha JH, Jeong HS, Kwon MC, Ahn JH, Kim JC, Choi GP, Chung EK, Lee HY. Effect of immune activity on *Berberis koreana* Palibin by ultra high pressure low temperature process. Korean J. Medicinal Crop Sci. 16: 439-445 (2008)
4. Syed Abdul Q, Kwon MC, Han JG, Ha JH, Chung HS, Ahn JH, Lee HY. Effect of different extraction protocols on anticancer and antioxidant activities of *Berberis koreana* bark extracts. J. Biosci. Bioeng. 107: 331-338 (2009)
5. Kim YK, Kwak BM. Analysis of cytotoxic constituent of *Berberis koreana* Palibin. Mokchae Konghak 26: 100-106 (1998)
6. Jin L, Ha JH, Jeong MH, Chung EK, Chung AR, Kim JC, Ahn JH, Lee HY. Enhancement of the antioxidant and anticancer activities of *Berberis koreana* bark using a low temperature and high-pressure extraction process. Korean J. Food Sci. Technol. 41: 284-291 (2009)
7. Toma M, Vimatoru M, Panjwnyk L, Mason TJ. Investigation of effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. Ultrason. Sonochem. 8: 137-142 (2001)
8. Vinatoru M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrason. Sonochem. 8: 303-313 (2001)
9. Chung K, Kim WI, Hong IK, Park KA. Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. Appl. Chem. 4: 149-152 (2000)
10. Choi IP. Natural killer cell therapy. Korean J. Hepatol. 14: 49-52 (2008)
11. Jeong JY, Kim OH, Lee YS. Effects of the *ex-vivo* immunotherapy on the mammary gland tumorigenesis induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in rats. J. Toxicol. Pub. Health 14: 465-474 (1998)
12. Kim EM, Jeong HJ, Park EH, Cheong SJ, Lee CM, Jang KY, Kim DW, Lim ST, Sohn MH. Evaluation of the radioimmunotherapy using I-131 labeled vascular endothelial growth factor receptor 2 antibody in melanoma xenograft murine model. Nucl. Med. Mol. I. 42: 307-313 (2008)
13. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. Methods 42: 277-287 (2007)
14. Sung JH, Choi DH, Kim DH, Chun BG, Choi SG. White ginseng saponin upregulated the production of TNF- α , IL-1 β , and NO in primary cultures of mixed glial cells. J. Ginseng Res. 28: 120-126 (2004)
15. 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. Medicinal Crop Sci. 16: 383-389 (2008)
16. Kim JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS, Lee SE, Yi JS, Kwon OW, Lee HY. Effect of aqueous extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Nakai on anti-tumor and anti-stress activities in mice. Korean J. Med. Sci. 14: 206-211 (2006)
17. Jeong MH, Kim SS, Ha JH, Jin L, Lee HJ, Kang HY, Park SJ, Lee HY. Enhancement of anticancer activity of *Acer mono* by high pressure extraction process. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 1243-1252 (2009)
18. Jeong HS, Han JG, Ha JH, Jin L, Kim SS, Jeong MH, Choi GP, Park UY, Lee HY. Enhancement of anticancer activities of *Ephedra sinica*, *Angelica gigas* by ultra high pressure extraction. Korean J. Medicinal Crop Sci. 17: 102-108 (2009)
19. Kim CH, Kwon MC, Syed Abdul Q, Hwang B, Nam JH, Lee HY. Toxicity reduction and improvement of anticancer activities from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor by ultra high pressure extraction process. Korean J. Medicinal Crop Sci. 15: 411-416 (2007)
20. Choi BG, Kim SW. Studies on the regulation of nitric oxide synthesis in murine mononuclear phagocytes. Korean J. Environ. Toxicol. 15: 69-80 (2000)
21. Kim KH, Roh SG, Park HR, Choi WC. Inhibition of apoptosis by nitric oxide in MCF-7 cells. J. Life Sci. 19: 157-162 (2009)
22. Kim YS, Park KM, Song KS, Nam KY, Park JD. Anticancer activities of red ginseng acidic polysaccharide by activation of

- macrophage and natural killer cells. *Yakhak Hoeji* 46: 113-119 (2002)
23. Kim HM, Oh GT, Han SB, Hong DH, Hwang BY, Kim YH, Lee JJ. Comparative studies of adriamycin and 28-deacetyl sendanin on *in vitro* growth inhibition of human cell lines. *Arch. Pharm. Res.* 17: 100-103 (1994)
 24. Song JH, Lee HS, Hwang JK, Chung TY, Hong SR, Park KM. Physiological activities of *Phellinus ribis* extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 690-695 (2003)
 25. Kwon MC, Han JG, Ha JH, Oh SH, Jin L, Jeong HS, Choi GP, Hwang B, Lee HY. Immno-regulatory effects on *Centella asiatica* L. Urban extraction solvent associated with ultrasonification process. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 16: 294-300 (2008)
 26. Jin L, Ha JH, Jeong MH, Chung EK, Chung AR, Kim JC, Ahn JH, Lee HY. Enhancement of the antioxidant and anticancer activities of *Berberis koreana* bark by using a low temperature and high-pressure extraction process. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 284-291 (2009)