

극한 저온 추출 공정을 처리한 지치의 면역활성

서용창* · 김지선* · 김영옥** · 김진철* · 이현용***†

*강원대학교 생물의소재공학과, **농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, ***서원대학교 식품공학과

Immune Activity of *Lithospermum erythrorhizon* Extracted by Extreme Low Temperature Extraction Process

Yong Chang Seo*, Ji Seon Kim*, Young Ock Kim**,
Jin Chul Kim* and Hyeon Yong Lee***†

*Department of Medical Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

**Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea.

***Department of Food Science and Engineering, Seowon University, Chungju 361-742, Korea.

ABSTRACT : This study was performed to investigate the enhancement of immunomodulatory activities of *Lithospermum erythrorhizon* by extreme process. The extracts are WE100 (water extract for 24 hours at 100°C), WE80 (water extract for 24 hours at 80 °C), EE (70% ethyl alcohol extract for 24 hours at 80°C) and EPE (extreme process for 30 minutes at 25°C , 500 MPa after 70% ethyl alcohol extracts for 3 hours at 40, 50, 60°C). Extraction yield was increased up to 5 ~ 10% by extreme process, compare to the normal extraction such as water solvent extraction, 70% ethyl alcohol solvent extraction. The cytotoxicity of the extracts was showed in the range of 12.68 ~ 15.89% at 1.0 mg/ml for human lung cell (HEL299). The EPE40 was showed the lowest cytotoxicity 12.68%. The EPE60 extracted by extreme process increased the growth of human B and T cells up to 12.12×10^4 cells/ml and 14.88×10^4 cells/ml, respectively and the EPE60 greatly increased the cytokine secretion of both IL-6 and TNF- α . The extracts by extreme process also exhibited higher levels of nitric oxide production from macrophages than the lipopolysaccharides. It can be concluded that *Lithospermum erythrorhizon* has immune activities and The extreme process could increase higher immune activities possibly by immunomodulatory compounds.

Key Words : *Lithospermum erythrorhizon*, Extreme Process, Low Temperature, Immune Activity

서 언

생명체의 면역기능은 외부 자극으로부터 신체를 보호하는 기작을 총칭하는 것으로 우리 몸에는 이 면역을 담당하는 기관 및 조직, 세포들이 존재하고 있다. 이들의 유기적인 시스템을 면역계라고 하며, 이들은 다양한 요인에 의해 영향을 받는다 (Abo *et al.*, 2005). 또한 면역조절물질은 비특이적으로 면역 세포들을 자극하여 생체의 면역기능을 증진시킴으로써, 질병요인으로부터 생체의 방어력을 증강시키는 것이다. 이러한 면역 조절 물질로 화학 합성물질, 미생물 조성물, 생물체제 등이 연구되고 있다. 그러나 상기의 면역조절 물질의 대부분은 부작용

또는 독성으로 인하여 실제 생체에 적용하기에는 한계를 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근에는 독성이 없는 식품소재 또는 천연물로부터 추출한 유효성분이나 기존의 한방재의 효능검증을 통해 면역조절물질 개발의 연구가 수행되고 있다.

이러한 천연물 중 하나인 지치 (*Lithospermum erythrorhizon*, gromwell)는 지치과 (Boraginaceae) 식물로 자초, 자단, 지초, 자근 등의 이름으로 불리우는 다년생 초본 식물로 우리나라 전역에 야생하고 있다 (Cho *et al.*, 1999). 지치는 한방에서 해독, 청열 등의 소염제로서 급성 염증과 화농성 병증에 내복하면 효과가 있다고 알려져 있으며 화상, 동상, 습진 등을 치료하

†Corresponding author: (Phone) +82-43-299-8471 (E-mail) hyeonl@seowon.ac.kr

Received 2012 November 29 / 1st Revised 2012 December 20 / 2nd Revised 2013 February 5 / 3rd Revised 2013 February 19 / Accepted 2013 Revised March 27

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는데 사용하여 왔다 (Staniforth *et al.*, 2004). 지치의 유효 성분으로 알려진 acetylshikonin 등을 포함한 shikonin 유도체 성분은 항산화 활성 (Han *et al.*, 2008), 항염증 활성 (Bai, 2004), 항미생물 효과 (Chen *et al.*, 2003) 등이 알려져 있다.

천연물 유용성분의 추출방법은 추출효율이 높고 추출물의 품질이 우수하며 경제성, 안전성 및 환경 친화적 조건이 구비되어야 한다. 기존의 스티프 증류법, 고온용매 추출법 등의 전통적인 방법이나 최근 실용화가 활발한 초임계 유체 추출법 등은 여러가지 장점을 지니고 있지만 추출효율, 에너지 소비, 경제성 등의 측면에서 개선의 필요성이 남아있다 (Ganzler *et al.*, 1987; Lopez-Avila *et al.*, 1996; Kwon, 1998).

이에 반해 본 공정에서 사용한 극한 저온 처리 기술인 초고압 기술은 기존의 일반적인 열수 추출인 60°C 이상의 온도보다 낮은 30°C 이하의 온도에서 400 MPa 이상의 매우 높은 압력의 극한 조건으로 추출을 하는 공정으로서, 최근 다양한 분야에서 각광받고 있는 기술로 식품에 적용하여 영양소 및 비영양성 식물 화학성분 추출에 가장 효율적으로 활용될 수 있는 기술로 주목받고 있다. 특히 극한 저온 공정인 초고압 공정을 이용하면 열처리를 하지 않거나 최소의 열처리만으로 식품의 가공 및 처리가 가능함에 따라 산성 식품의 살균 등에 이용되는데, 그 식품들의 향, 맛, 영양가, 색을 기존의 물리적 처리와 비교하였을 때 기존 공정에 비해 더 좋은 효과를 나타내는 것으로 보고되었다 (Deliza *et al.*, 2005). 기존의 전통적인 추출 방법은 추출 효율이 낮고 에너지 소비가 많으며 발생하는 열로 인해 유용성분의 파괴 및 단백질 변성이 일어남에 따라 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출은 물론 열에 대하여 불안정한 단점을 가지고 있다 (Park *et al.*, 2004). 이러한 단점을 개선할 수 있을 것으로 기대되는 극한 저온 공정 기술인 초고압 공정은 약용식물로부터 높은 압력으로 단시간에 목적 성분을 추출하는 것이 가능하며, 천연물이 열에 의한 조직 손상에 의한 성분 변화를 막고 불순물의 생성을 줄여 높은 순도의 단일성분을 쉽게 얻을 수 있다는 장점을 가진다. 이는 초고압 하에서 일어나는 단백질 변형 및 세포막 파괴 (Kim *et al.*, 2007)의 결과와 같이 높은 압력 처리로 인하여 천연물의 단단한 조직을 파괴하여 천연물에 함유되어 있는 생리활성 성분의 용출을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 기존 일반 추출물과의 비교를 통한 극한 저온 공정 기술의 유용성분 활성 증진 효과를 알아보고자 초고압 기술을 이용하여 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려진 지치로부터 유용성분을 추출하고 세포수준에서 이들의 면역 활성을 탐색하고 면역 제제로서의 활용 가능성을 평가함으로써 약용식물을 이용한 기능성 식품 및 공정 관련 분야의 기초자료로서 가치를 지니게 하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시약

본 실험에서 사용된 지치 (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)는 2009년 11월에 경북 영천에서 생산된 것으로 약업사 (대광약업사, 한국)에서 구입하였으며, 건조된 상태로 사용하였다.

본 연구의 세포배양 시 필요한 배지로 RPMI 1640 (GIBCO, USA)을 사용하였고, 그 밖에 배양에 필요한 시약으로 hepes buffer (Sigma, USA)와 fetal bovine serum (GIBCO, USA), gentamycin sulfate (Sigma, USA), Trypsin-EDTA (Sigma, USA)를 사용하였다.

2. 시료 처리 조건

극한 저온 공정은 지치의 뿌리부분을 80 g에 70% ethyl alcohol 800 ml와 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 장치 (Ilshin autoclave, Korea)를 이용하여 500 MPa의 압력으로 25°C, 30분간 실행하였다. 초고압 공정이 끝난 시료를 수직 환류 냉각기에 부착된 추출 flask에 모은 뒤 40, 50, 60°C에서 각각 3시간 추출하였다. 일반 열수 추출은 시료 중량에 대하여 10배의 증류수를 추출용매로 사용하여 각각 80°C와 100°C에서 24시간 추출하였다. 에탄올 추출은 70% ethyl alcohol을 추출 용매로 시료 중량의 10배를 넣어 80°C에서 24시간 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들을 감압 여과장치 (Rotary Vacuum Evaporator N-N series, EYELA, Germany)로 여과하여 농축을 하였고, 동결건조를 한 후 분말 상태로 제조하여 실험에 사용하였다 (Kim *et al.*, 2008).

3. 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주는 인간 피부섬유아세포인 CCD-986sk (Skin fibroblast cell, human, ATCC, USA), 인간 면역 세포인 T cell (Jurkat, ATCC, USA)과 B cell (Raji, ATCC, USA)을 이용하여 검증하였으며 RPMI 1640배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였다. RAW264.7 (mouse, macrophage, 40071, KCLB)은 D-MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myo-inositol, 20 mM folic acid, 10-4M2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)을 첨가시켜 배양하였으며 실험에 사용하였다.

4. 정상세포 독성 측정

정상세포 독성 측정을 위해서 SRB assay를 이용하였다. Sulforhodamine B (SRB) assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 CCD-986sk의 농도를 10% heat-inactivated FBS media에서 45×10^4 cells/ml로 96 well plate의 각 well에 100 μ l씩 첨가

하여 24시간 배양 (37°C, 5% CO₂)한 후, 각각의 지치 시료를 최종농도 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml로 100 µl씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)를 100 µl 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 45회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100 µl씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 45회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 µl를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

5. 면역세포 생육 증진 효과

면역기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell (Jurkat)과 B cell (Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역기능 증강 효과는 6 well plate에 세포를 1.0 × 10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 6일 동안 배양하면서 매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포 수를 측정하여 생육도를 측정하는 방법을 사용하였다 (Lee *et al.*, 2002).

6. Cytokine 분비량 측정

Cytokine은 IL-6와 TNF-α의 정량을 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF-α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 1.0 ~ 2.0 × 10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 µl씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료의 최종농도를 0.5 g/l로 100 µl씩 첨가하여 다시 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 원심분리기를 이용하여 배양액의 상층액을 취한 다음 450 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Lim *et al.*, 2008).

7. 대식세포에서의 nitric oxide 생성능 측정

사용된 세포주는 마우스 유래 RAW264.7 대식세포이며, 세포는 10% heat-inactivated bovine serum과 90% DMEM을 이용하여 24 well plate에 45 × 10⁴ cells/well의 농도로 넣은 다음, 시료를 첨가하거나 첨가하지 않고 5% CO₂ incubator 안에서 37°C에서 48시간동안 배양하여 실험에 사용하였다. 대식세포에서 발생하는 nitric oxide의 양은 활성화된 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitrite의 양을 microplate assay를 이용하여 정량함으로써 측정하였다. 먼저 시료를 처리하고 48시간 동안 세포를 배양하고 상등액 50 µl를 취하여 동일부피의

griess시약 (1% sulfanilamide/ 0.1%, N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 0.25 µM에서부터 4 µM까지 DMEM 배지로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다. NO 생성능의 음성 대조구 물질로는 LPS를 사용하였다 (Petra *et al.*, 2008).

8. 통계처리

데이터의 통계처리는 각 시료를 3회 반복으로 행해졌으며, 모두 평균 ± SEM으로 나타내었다. 대조군을 포함한 각 실험 그룹의 평균 차는 일원분산분석 (one-way ANOVA)을 통해 그 값을 구하였다. 또한 데이터 분석을 실시하기 위해 통계용 소프트웨어 패키지인 SPSS 10.0 (SPSS institute, Chicago, IL)을 사용하였다. 평균값의 차이는 P < 0.05의 조건에서 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

1. 공정별 지치 추출물의 수율

Table 1은 지치의 공정별 추출 수율을 나타낸 것이다. 모든 공정 중에서 극한 저온 공정 추출물이 높은 수율을 나타내었다. 지치 열수 추출물은 100°C (WE100)와 80°C (WE80)에서 각각 20.47%, 20.78%의 수율을 보였고, 에탄올 추출물 60°C (EE)는 19.78%의 수율을 보였다. 가장 낮은 수율을 보인 에탄올 추출물은 용매가 물 용매가 아닌 에탄올 용매의 사용으로 지치에 있는 가용 성분들이 열수 추출의 물 용매보다 적게 녹

Table 1. Comparison of the extraction yields and shikonin contents of *Lithospermum erythrorhizon* according to different extraction processes.

Sample	Extraction condition	Yields (% w/w)
<i>L. erythrorhizon</i>	WE100 ¹⁾	20.47±0.31 [†]
	WE80 ²⁾	20.78±0.62
	EE ³⁾	19.78±0.55
	EPE40 ⁴⁾	20.78±0.22
	EPE50 ⁵⁾	21.27±0.80
	EPE60 ⁶⁾	23.66±0.18

[†] Mean values ± SEM from triplicate separated experiments are shown.

¹⁾WE100: Water extraction for 24 hours at 100°C.

²⁾WE80: Water extraction for 24 hours at 80°C.

³⁾EE: 70% ethyl alcohol extraction for 24 hours at 80°C.

⁴⁾EPE40: Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 40°C.

⁵⁾EPE50: Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 50°C.

⁶⁾EPE60: Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 60°C.

아 나와 추출 수율이 낮게 나왔을 것으로 사료된다. 극한 저온 공정 추출물의 수율은 40°C (EPE40)에서 20.45%, 50°C (EPE50)에서 21.27%, 60°C (EPE60)에서 23.66%의 수율을 나타냈다. 가장 높은 수율을 나타낸 공정은 극한 저온 공정 추출물 60°C (EPE60)로 나타났다. 기존의 일반 열수추출물에 비해 극한 저온 공정 추출물의 수율이 높게 나타나는 것은 지치와 같은 단단한 조직을 갖고 있는 시료가 갖고 있는 유용성분 용출의 어려움을 500 MPa의 높은 압력을 통하여 조직 및 세포벽을 파괴 (Bennett, 1998)하고 용매가 접촉하는 시료의 면적을 넓게 하여 조직과 세포내 유용성분들의 용출을 용이하게 된 것으로 사료되며 극한 저온 공정 추출물 중 60°C에서 가장 높은 수율을 나타낸 것은 초고압 처리 시 25°C의 저온에서 용출되어 나오는 유용성분과 고온에서 추출되어 나오는 유용성분이 40°C와 50°C보다 60°C에서 많이 용출되어 나온 것으로 사료된다.

2. 정상 세포 독성

각 공정별로 추출한 지치 추출물이 정상세포에 영향을 미치는지 세포 독성 변화를 알아보기 위해 인간 피부섬유아세포인 CCD-986sk를 이용하여 정상세포 독성 실험하였으며, 실험에 사용된 sample 농도는 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 조절하여 측정하였다. Fig. 1은 지치 각 공정별 추출물의 CCD986sk에 대한 독성을 나타낸 그림으로 각 공정을 통해 얻

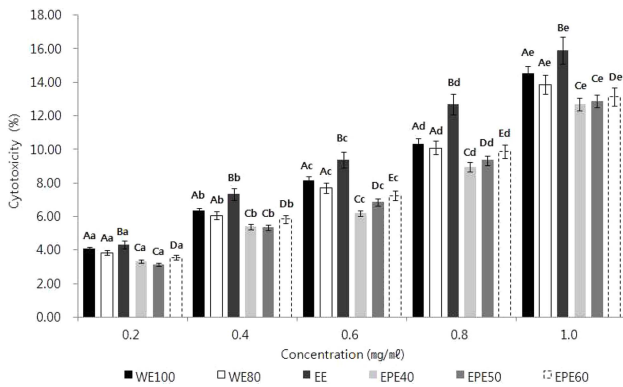


Fig. 1. Cytotoxicity for the extracts of *L. erythrorhizon* by different extraction processes on normal cell line, CCD-986sk. Mean values \pm SEM from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-E) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter within same sample are significantly different at $p < 0.05$. WE100; water extraction for 24 hours at 10°C, WE80; water extraction for 24 hours at 80°C, EE; 70% ethyl alcohol extraction for 24 hours at 80°C, EPE40; Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 40°C, EPE50; Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 50°C, EPE60; Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 60°C.

은 지치 추출물의 세포독성은 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 모든 시료가 1.0 mg/ml의 농도에서 16% 미만의 낮은 세포독성을 나타내었다. 모든 공정의 시료가 20% 미만의 낮은 독성을 나타내는 것으로 보아 지치 추출물이 CCD986sk에 대해 유의할만한 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서 극한 저온 공정 추출물이 다른 공정 추출물 보다 낮은 세포독성을 나타냈고, 극한 저온 공정 추출물 40°C의 1.0 mg/ml의 농도에서 12.68%로 가장 낮은 세포독성을 나타냈다. 가장 높은 세포독성을 나타낸 것은 에탄올 추출물이 15.89%로 가장 높게 나타났다. 위의 결과를 통해 일반적인 추출보다 극한 저온 공정을 처리 한 추출물의 세포독성이 더 낮아지는 것을 볼 수 있는데 이는 500 MPa의 높은 압력으로 인하여 약용 작물들이 가지고 있는 독성 물질이 변성되거나 파괴되

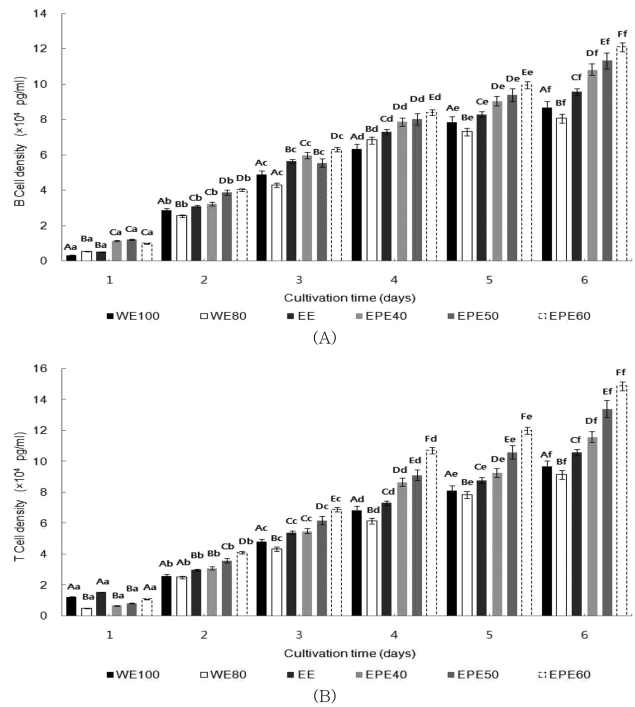


Fig. 2. The B cell (A) and T cell (B) growth by adding 0.5 mg/ml the extracts from *Lithospermum erythrorhizon* according to different extraction processes. Mean values \pm SEM from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter within same cultivation time are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-f) within same sample are significantly different at $p < 0.05$. WE100; water extraction for 24 hours at 10°C, WE80; water extraction for 24 hours at 80°C, EE; 70% ethyl alcohol extraction for 24 hours at 80°C, EPE40; Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 40°C, EPE50; Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 50°C, EPE60; Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 60°C.

지치의 면역활성

Table 2. The secretion of IL-6 and TNF- α from human B and T cells by the treatments of the extracts from *Lithospermum erythrorhizon* according to different extraction processes (0.5 mg/ml).

Sample	Time (day)	Cell line			
		B cell (10^{-4} pg/ml)		T cell (10^{-4} pg/ml)	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
WE100 ¹⁾	1	0.23 \pm 0.01	0.33 \pm 0.05	0.41 \pm 0.04	0.39 \pm 0.05 [†]
	2	0.44 \pm 0.04	0.56 \pm 0.02	0.59 \pm 0.01	0.47 \pm 0.01
	3	0.35 \pm 0.02	0.69 \pm 0.03	0.71 \pm 0.02	0.59 \pm 0.02
	4	0.99 \pm 0.03	0.81 \pm 0.03	0.93 \pm 0.02	0.71 \pm 0.03
	5	1.25 \pm 0.02	1.34 \pm 0.01	1.12 \pm 0.03	0.94 \pm 0.04
	6	1.36 \pm 0.01	1.43 \pm 0.04	1.47 \pm 0.01	1.25 \pm 0.05
WE80 ²⁾	1	0.38 \pm 0.02	0.42 \pm 0.02	0.37 \pm 0.05	0.40 \pm 0.05
	2	0.51 \pm 0.03	0.67 \pm 0.04	0.50 \pm 0.02	0.61 \pm 0.04
	3	0.63 \pm 0.01	0.84 \pm 0.02	0.72 \pm 0.03	0.66 \pm 0.02
	4	0.82 \pm 0.03	0.91 \pm 0.03	0.88 \pm 0.05	0.87 \pm 0.03
	5	0.97 \pm 0.02	1.10 \pm 0.04	0.98 \pm 0.05	0.94 \pm 0.02
	6	1.05 \pm 0.05	1.18 \pm 0.04	1.14 \pm 0.04	1.12 \pm 0.01
EE ³⁾	1	0.30 \pm 0.04	0.23 \pm 0.05	0.42 \pm 0.02	0.38 \pm 0.02
	2	0.48 \pm 0.02	0.55 \pm 0.06	0.60 \pm 0.01	0.59 \pm 0.02
	3	0.55 \pm 0.02	0.73 \pm 0.02	0.74 \pm 0.02	0.65 \pm 0.04
	4	0.78 \pm 0.05	0.84 \pm 0.04	0.82 \pm 0.03	0.80 \pm 0.05
	5	0.95 \pm 0.04	0.99 \pm 0.05	0.95 \pm 0.04	0.91 \pm 0.02
	6	1.07 \pm 0.03	1.04 \pm 0.02	1.11 \pm 0.02	1.08 \pm 0.03
EPE40 ⁴⁾	1	0.39 \pm 0.02	0.37 \pm 0.01	0.38 \pm 0.04	0.48 \pm 0.04
	2	0.47 \pm 0.03	0.67 \pm 0.03	0.49 \pm 0.01	0.54 \pm 0.02
	3	0.6 \pm 0.04	0.84 \pm 0.05	0.61 \pm 0.03	0.63 \pm 0.04
	4	0.77 \pm 0.02	0.96 \pm 0.04	0.75 \pm 0.02	0.77 \pm 0.01
	5	0.90 \pm 0.06	1.08 \pm 0.02	0.90 \pm 0.02	0.84 \pm 0.02
	6	1.25 \pm 0.04	1.22 \pm 0.02	1.02 \pm 0.05	0.98 \pm 0.02
EPE50 ⁵⁾	1	0.45 \pm 0.02	0.61 \pm 0.03	0.57 \pm 0.01	0.55 \pm 0.03
	2	0.80 \pm 0.03	0.89 \pm 0.04	1.04 \pm 0.02	0.62 \pm 0.05
	3	1.18 \pm 0.03	1.04 \pm 0.02	1.35 \pm 0.02	0.88 \pm 0.01
	4	1.90 \pm 0.01	1.14 \pm 0.01	1.67 \pm 0.03	1.14 \pm 0.04
	5	1.98 \pm 0.04	1.35 \pm 0.02	1.89 \pm 0.05	1.37 \pm 0.02
	6	2.21 \pm 0.05	1.78 \pm 0.05	2.11 \pm 0.01	1.66 \pm 0.03
EPE60 ⁶⁾	1	0.48 \pm 0.05	0.66 \pm 0.05	0.72 \pm 0.02	0.64 \pm 0.05
	2	0.86 \pm 0.04	0.94 \pm 0.02	1.12 \pm 0.02	0.83 \pm 0.02
	3	1.22 \pm 0.02	1.06 \pm 0.01	1.50 \pm 0.03	1.02 \pm 0.01
	4	1.96 \pm 0.03	1.22 \pm 0.02	1.98 \pm 0.03	1.40 \pm 0.02
	5	2.02 \pm 0.01	1.56 \pm 0.06	2.66 \pm 0.05	1.62 \pm 0.05
	6	2.44 \pm 0.04	1.94 \pm 0.04	2.32 \pm 0.01	1.88 \pm 0.03

[†] Mean values \pm SEM from triplicate separated experiments are shown.

¹⁾WE100: Water extraction for 24 hours at 100 $^{\circ}$ C.

²⁾WE80: Water extraction for 24 hours at 80 $^{\circ}$ C.

³⁾EE: 70% ethyl alcohol extraction for 24 hours at 80 $^{\circ}$ C.

⁴⁾EPE40: Extreme process extraction for 30 minutes at 25 $^{\circ}$ C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 40 $^{\circ}$ C.

⁵⁾EPE50: Extreme process extraction for 30 minutes at 25 $^{\circ}$ C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 50 $^{\circ}$ C.

⁶⁾EPE60: Extreme process extraction for 30 minutes at 25 $^{\circ}$ C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 60 $^{\circ}$ C.

어 독성이 저감된 것으로 사료되며 (Kwon *et al.*, 2008), 극한 저온 공정 추출물 중 40 $^{\circ}$ C에서 가장 낮은 독성을 나타낸 것은 저온 추출로 인하여 높은 온도에서 용출되어 나오는 유해 성분

들이 감소된 것으로 보인다. 이러한 극한 저온 공정은 지치의 독성저감을 통해 활용성 증진에 효율적으로 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

3. 면역세포 생육 증진 효과

Fig. 2는 인간의 면역체계와 항암에 중요한 역할을 하는 B cell 과 T cell에 대하여 면역 증진효과를 확인하기 위해 cytokine 분비량을 통해 면역세포의 생육촉진효과를 알아보았다. 극한 저온 공정 추출물에서 다른 공정에 비하여 B cell 과 T cell에서 가장 높은 생육도를 나타내었으며, 그 중 극한 저온 공정 추출물 중 60°C에서 시료첨가 시점으로 6일째에 일 반 80°C 열수추출에 비해 B cell 의 경우 약 1.5배 가량 높은 12.12 ($\times 10^4$ cell/ml) T cell에서는 1.2배 가량 높은 14.88 ($\times 10^4$ pg/cell)로 가장 높은 생육도를 나타내었다. 따라서 지치 추출물에는 면역세포의 생육 증진에 도움이 되는 유용성분이 함유되어 있으며, 이러한 유용성분이 세포내로 침투하여 생육 촉진을 높이는 것으로 사료된다. 또한 초고압공정에 의한 매 자나무 추출물을 통한 연구 등과도 비교하였을 때도 유사한 면역세포 생육촉진을 확인할 수 있다 (Jin *et al.*, 2008). 이러한 결과로 미루어 보아 극한 저온 공정을 통한 유용 활성 물 질의 용출 유도가 가능할 것으로 사료되며, 인간 생체 내에서 보다 높은 생체능 향상에 기인 할 것으로 기대된다.

4. Cytokine 분비량 측정

Table 2는 면역세포의 Cytokine 분비량을 측정한 것으로 표 적세포의 수용체에 결합하여 세포내 활성화 메커니즘을 발현 시켜 인간 면역세포의 생육 증진에 관여하는 성분으로 면역세 포들이 분비하는 cytokine (IL-6와 TNF- α)의 분비량을 B cell 과 T cell에서 측정한 결과이다. 종류에 따른 세포당 IL-6 의 경우 분비량을 보면, 극한 저온 공정 추출물 60°C에서 6일 제에 각각 B cell과 T cell의 경우 2.44 ($\times 10^4$ pg/cell), 2.32 ($\times 10^4$ pg/cell)로 최대 분비량을 나타내었다. TNF- α 도 마찬가지로 극한 저온 공정 추출물 60°C에서 1.94 ($\times 10^4$ pg/cell), 1.88 ($\times 10^4$ pg/cell)로 많은 분비량을 나타내었다. 이는 일반 열수추 출에 비해 2배 가량 높으며 초고압공정에 의한 복분자 추출물 을 통한 연구 (Kwon *et al.*, 2007) 등과도 비교하여 cytokine 분비량이 1.8배 가량 높은 수치를 나타낸다. 또한 이러한 결과는 앞서 실행한 면역세포 생육 증진 결과와 함께 면역세포의 생육 증진으로 인하여 인간 면역 체계가 활성화 되어 cytokine 분비량도 증가된 것으로 사료된다 (Mun *et al.*, 2004).

5. 대식세포에서의 nitric oxide 생성능 측정

대식세포로부터 생성된 NO는 interferon- γ , TNF- γ 또는 TNF- α 와 같은 여러 가지 cytokine과 LPS (E. coli derived lipo-polysaccharide)와 같은 세균 내 독소의 영향을 받아 유도 된 inducible NO synthase (iNOS)에 의해 발현이 유도된다. Fig. 3에서 보여지듯이 RAW264.7 세포에 시료를 처리하여 배 양한 후 배양액 중에 NO 농도를 측정된 결과 아무 처리도 하지 않은 대조군과 비교했을 때 각 시료의 NO 생산량에는

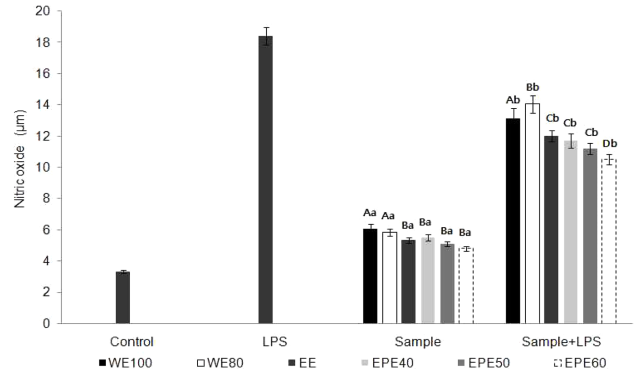


Fig. 3. Stimulation of nitric oxide production by adding the extracts from *Lithospermum erythrorhizon*. Mean values \pm SEM from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-D) within experimental group are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-b) within same sample are significantly different at $p < 0.05$. WE100; water extraction for 24 hours at 100°C, WE80; water extraction for 24 hours at 80°C, EE; 70% ethyl alcohol extraction for 24 hours at 80°C, EPE40; Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 40°C, EPE50; Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 50°C, EPE60; Extreme process extraction for 30 minutes at 25°C, 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 60°C.

큰 변화를 관찰할 수 없었다. 다음으로 LPS와 시료를 동시에 처리한 배양액에서는 모든 시료에서 LPS만 단독으로 처리한 배양액의 18.12 μ M보다 낮은 NO 생성능을 나타내었으며, 열 수 100°C 추출물에서 13.10 μ M, 열수 80°C 추출물에서 14.05 μ M, 에탄올 추출물에서 12.01 μ M의 수치를 나타내었으며, 특히 극한 저온 공정 추출물 60°C에서 가장 낮은 10.5 μ M 을 보여 주었다. 이러한 결과를 통해 지치 추출물 처리를 통하 여 낮아진 NO 생성능은 극한 저온 공정을 통해 일반 열수추 출 공정의 고온으로 인한 효능 성분이 파괴되는 점을 해결하 고 고압으로 인해 지치 조직 및 세포벽 속에 존재하는 면역 활성 증진 효과를 갖는 유용 활성 성분의 용출을 증가시켰을 것으로 사료된다 (Jeong *et al.*, 2010).

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호: PJ007479) 의 지원에 의해 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

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

- Bai JH.** (2004). Antimicrobial effect of *Lithospermum erythrorhizon* extract on the food-borne pathogens. Korean Journal of Food Science and Technology. 36:823-827.
- Bennett PB, Marquis RE and Demchenko I.** (1998). High pressure biology and medicine. University of Rochester Press. Rochester. New York, USA. p.1-428.
- Chen X, Yang L, Zhang N, Turpin JA, Buckheit RW, Osterling C, Oppenheim JJ and Howard OM.** (2003). Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47:2810-2816.
- Cho MH., Paik YS and Hahn TR.** (1999). Propionylshikonin from the roots of *Lithospermum erythrorhizon* cultivated in Korea. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47:4117-4120.
- Deliza R, Rosenthal A, Abadio FBD, Silva CHO and Castillo C.** (2005). Application of high pressure technology in the fruit juice processing: Benefits perceived by consumers. Journal of Food Engineering. 67:241-246.
- Ganzler K, Salg A and Valk K.** (1987). Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. Journal of Chromatography A. 371:299-306.
- Han J, Weng X and Bi K.** (2008). Antioxidants from a Chinese medicinal herb - *Lithospermum erythrorhizon*. Food Chemistry. 106:2-10.
- Jeong HS, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi WY, Seo YC, Choi PC, Kim JC and Lee HY.** (2010). Enhancement of immune activities of peptides from *Asterias amurensis* using a Nano-encapsulation Process. Korean Journal of Food Science and Technology. 42:424-430.
- Jin L, Han JG, Ha JH, Jeong HS, Kwon MC, Ahn JH, Min JC, Choi GP, Chung EK and Lee HY.** (2008). Effect of immune activity on *Berberis koreana* Palibin by ultra high pressure low temperature process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 16:439-445.
- Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi GP, Park UY and Lee HY.** (2008). Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 16:255-260.
- Kim CH, Kwon MC, Syed AQ, Hwang B, Nam JH and Lee HY.** (2007). Toxicity reduction and improvement of anticancer activities from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor by ultra high pressure extracts process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:411-416.
- Kwon JH.** (1998). High speed extraction of phytochemicals from food and natural products using microwave-assisted process. Food Science and Industry. 31:43-55.
- Kwon MC, Kim CH, Na CS, Kwak HG, Kim JC and Lee HY.** (2007). Comparison of immuno-modulatory regulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel by ultra high pressure extracts process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:398-403.
- Kwon MC, Han JG, Ahn JH, Lee DH, Syed Abdul Q 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.
- Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH and Lee HY.** (2002). Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 10:109-115.
- Lim BO, Park PJ, Choi WS and Kim JD.** (2008). *Scutellaria baicalensis* modulates cytokine production, T cell population and immunoglobulin level by mesenteric lymph node lymphocytes in experimental mice with colitis. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 16:100-105.
- Lopez-Avila V, Young R and Tepitsky N.** (1996). Microwave assisted extraction as an alternative to soxhlet, sonication, and supercritical fluid extraction. Journal of AOAC International. 79:142-156.
- Mun HC, Park JH, Kim DH, Yoo JE, Kim JH, Kim CH, Kim JD, Park YS, Lee HJ and Lee HY.** (2004). Comparison of immune activities of essential oils from *Juniperus rigida* S. et Z. and *Boswellia cartei* Birew by supercritical fluid extraction system. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 13:243-248.
- Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK and Lee HY.** (2004). Effect of ultrasonification process on enhancement of immuno-stimulatory activity of *Ephedra sinica* Stapf and *Rubus coreanus* Miq. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering. 19:113-117.
- Petra Z, Jan M, Barbora P, Hana K, Frantisek K and Martin F.** (2008). Quantitative nitric oxide production by rat, bovine, and porcine macrophages. Nitric Oxide. 19:36-41.
- Staniforth V, Wang SY, Shyur LF and Yang NS.** (2004). Shikonins, phytochemicals from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor alpha promoter *in vivo*. Journal of Biological Chemistry. 279:5877-5885.