

초고압 추출 처리에 의한 마황과 당귀의 항암 활성 증진

정향숙* · 한재건* · 하지혜* · 김 영* · 오성호* · 김승섭* · 정명훈* · 최근표** · 박옥연** · 이현용****†

*강원대학교 BT특성화학부대학, **강원도립대학 식품가공제과제빵과, ***강원대학교 생명공학연구소

Enhancement of Anticancer Activities of *Ephedra sinica*, *Angelica gigas* by Ultra High Pressure Extraction

Hyang Suk Jeong*, Jae Gun Han*, Ji Hye Ha*, Young Kim*, Sung Ho Oh*, Seoung Seop Kim*, Myoung Hoon Jeong*, Geun Pyo Choi**, Uk Yeon Park**, and Hyeon Yong Lee****†

*College of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National Univ., ChunCheon 200-701, 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 enhance anticancer activities of *E. sinica*, and *A. gigas* by ultra high pressure extraction process. The cytotoxicity of *E. sinica* and *A. gigas* on human kidney cell (HEK293) was as low as 24.94% and 25.3% in adding 1.0 mg/ml of the sample extracted at 500 Mpa for 15 minute. Generally, the inhibition of cancer cell growth on A549 and MCF-7 was increased over 20% in the ultra high pressure samples, compared to the conventional extraction process. Under the extracts from ultra high pressure process showed not only the strongest anticancer activities, but also had better stability than normal extracts. It was also found that the extracts of *A. gigas* reduced the hypertrophy of the internal organs, such as adrenal and spleen caused stresses in several mouse models.

Key Words : Ultra high pressure extracts, *Ephedra sinica*, *Angelica gigas*, Anticancer, Cytotoxicity

서 언

마황은 중국 북부, 몽골 등지에 주로 분포하는 길이가 30~70 cm 인 한약재로서 천식치료 및 열병을 다스리는데 쓰이고 있으며 기존의 연구에서는 발한, 해열, 항염증에 효과가 있다고 보고되었다 (Song and Lee, 2006). 또한 마황의 알칼로이드 성분인 ephedrine, pseudoephedrine, ephedroxane, norephedrine 등의 체액성 면역과 관련된 물질의 약리작용이 연구 보고되어졌다. 이외에도 마황의 알러지성 피부염 억제 효과에 대해 보고되었던 바 있다 (Shin and Kim, 2005).

유즙이 있어 향기가 나고 단 맛과 쓴 맛이 동시에 나는 한약재인 당귀는 빈혈이나 부인병 등에서 탁월한 보혈효과가 있으며, 최근 국내에서 보혈효과와 관련된 연구가 진행된 바 있다 (Woo et al., 2007). 당귀는 부작용이 적은 생약재 중의 하나로 숙지황, 백작약 등과 함께 한의학에서 빈혈치료에 쓰이고 있다. 특히, 한의학 임상에서 가장 많이 처방되고 있는 참당귀는 보혈강장 목적으로 빈혈치료에 쓰이고 있으며 주로 혈액부족, 행혈, 활혈, 산전산후에 이용되고 있다. 뿐만 아니라

당귀는 생리불순, 무월경 등의 여성 혈관계질환에 특특히 감초역할을 한다. 또한 장을 부드럽게 하여 대장의 건강을 증진시킨다 (Kim et al., 2008).

초고압 처리는 최근 식품에서 주목받고 있는 가공기술 분야로서 식품의 보존성, 물성, 기능성을 향상시켜준다. 100~1000 Mpa의 압력을 이용하여 압력매체로 물이나 오일의 압력을 순간적으로 균일하게 전달시키는 원리이다. 식품가공에서 열처리와 압력처리는 모두 소화성을 향상시키는데, 열처리는 화학변화가 많이 일어나는데 반하여 압력 처리는 화학적으로 큰 변화를 일으키지 않는 장점이 있다. 따라서 초고압 공정은 비가열처리 가공방법이므로 식품 내 주요 성분을 변성시키지 않아 신선감을 유지시킬 수 있는 가공기술로 평가되고 있고, 기존의 가열처리에 의한 식품의 조직감 및 풍미 저하 등을 극복할 수 있다 (Kim, 2007).

최근 들어 초고압 기술이 식품의 개발에 직접 응용되면서 1990년대 초 일본에서는 초고압을 이용해 과일 잼을 생산하였다. 초고압을 통해 과일 잼을 만든 결과 열처리를 통해 발생하는 향과 색깔의 변화가 적고 과일 특유의 성질이 유지된다

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr
Received March 10, 2009 / Revised March 24, 2009 / Accepted March 31, 2009

고 보고되었다 (Horie *et al.*, 1991).

마황, 당귀와 같은 한약재는 세포벽이 견고하여 생리활성 물질을 얻기 위해서는 기존의 가공기술과 다른 초고압을 도입할 필요가 있다. 특히 한약재에 작용한 초고압의 높은 에너지와 압력은 보통 열수추출로 얻을 수 없는 유용생리활성 물질을 얻을 수 있게 하여 한약재에 함유한 천연물을 재평가할 수 있게 한다. 한약재의 화학 성분 추출에 가장 효율적으로 활용될 수 있는 초고압 기술을 이용하여 기존의 추출 방법이 가지고 있던 고에너지 저효율, 열에 의한 유용성분의 변성 및 손실, 가용성분 위주의 추출 등의 문제점을 개선하여 약용식물로부터 단시간에 불순물이 적은 순도 높은 목적하는 단일 성분의 추출이 가능할 것으로 사료된다 (Kim *et al.*, 2007).

따라서 초고압 추출 공정을 사용한 마황, 당귀의 세포 독성 및 항암활성을 기존의 일반 추출을 통한 추출물과 비교함으로써 초고압 공정의 유용성과 항암효과를 동시에 평가해 보고자 한다. 또한 심한 스트레스를 지속적으로 받으면 항암 능력이 떨어진다는 연구결과를 근거로 마우스 항스트레스 실험을 수행하였다 (Vitaliano *et al.*, 1998). 이러한 생리활성 검증을 통하여 한약재로 널리 쓰이는 마황과 당귀의 면역증진제로서의 기능성을 부여하고, 항암활성을 가지는 기능성 식품에 관련된 분야에 바탕 자료로서 가치를 지니게 하기 위해 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 마황과 당귀는 경동시장에서 2008년 국내산을 건시료로 구입하여 상온에서 보관하면서 사용하였다.

2. 시료 처리 조건

초고압 추출은 마황, 당귀 각각 50 g을 비닐 팩에 증류수와 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 추출 장치 (Ilshin autoclave, Korea) 를 이용하여 500 Mpa의 압력을 5분, 10분, 15분, 20분으로 추출 조건을 다르게 하여 실행하였다. 초고압 추출이 끝난 시료를 각각 수직 환류 냉각기에 부착된 추출 flask에 시료 중량에 대하여 각각 10배의 증류수를 추출용매로 사용하여 60°C에서 24시간 추출하였다. 대조군으로는 마황, 당귀 각각 50 g을 초고압 추출과정은 제외하고 나머지는 같은 조건인 60°C에서 24시간 열수 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들을 감압여과장치 (Rotary Vacuum Evaporator N-N series, EYELA, Germany)로 여과하여 농축을 하였고, 동결건조를 한 후에 실험에 사용하였다 (Kim *et al.*, 2008).

3. 시약

세포 배양에 필요한 배지로 RPMI1640, MEM (minimum

essential medium)과 Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin, 1×)는 GIBCO (USA)로부터 구입하였고, 혈청은 Hyclone laboratory (USA)의 FBS (fetal bovine serum)를 구입하여 사용하였으며, hepes buffer와 gentamycin sulfate는 SIGMA (USA)에서 구입하였다.

4. 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주로 인간 위암세포인 AGS (stomach adenocarcinoma, human)는 KCLB (Korean cell line bank)로부터 분양받았고, 인간 폐암세포인 A549 (lung adenocarcinoma)와 인간 유방암세포인 MCF-7 (breast adenocarcinoma), 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포인 인간 신장 세포 HEK293 (human embryonic kidney)는 ATCC로부터 분양받아 사용하였다. 실험에 사용된 암세포는 모두 RPMI1640배지 90%에 FBS를 10% 넣어 배양하였고, 정상세포 HEK293은 MEM배지 90%에 FBS를 10% 넣어 배양하였다.

5. 항암활성

정상세포 HEK293는 SRB (Sulforhodamine B) assay를 통해 세포독성 측정을 하였다. SRB assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험에 사용된 세포주로는 인간 정상세포인 HEK293을 이용하여 세포 독성을 측정하였고, 폐암세포 (A549), 위암세포 (AGS), 유방암세포 (MCF-7)을 이용하여 항암활성을 측정하였다. 세포를 충분히 배양한 후, 실험 대상 세포의 농도가 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml가 되는지 Nucleo counter를 이용해 세포수를 세었고 적정 농도가 되도록 배지희석을 한 후, 96well plate의 각 well에 100 μ l 씩 분주하였다. 24시간 동안 배양 (37°C 5% CO₂ incubator)한 후, 각각의 마황, 당귀 추출물 시료를 최종 농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 그리고 1.0 mg/ml가 되게 100 μ l 씩 세포가 배양된 배지에 첨가 분주하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상층액을 aspirator를 이용해 조심스럽게 제거하였고, 차가운 10% (w/v) TCA (trichloroacetic acid) 100 μ l를 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1% (v/v) acetic acid에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100 μ l 씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 μ l를 첨가하여 염색액을 녹여냈다. Micro reader (Molecular Devices, THERMO max, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Selectivity 측정은 SRB assay를 이용하여 정상세포 (HEK293)에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, SRB assay

를 이용하여 각 압세포주의 생육억제활성을 측정 한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 압세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산하였다 (Dol and Peto, 1981).

$$Selectivity = \frac{\text{압세포 생육 억제 활성}}{\text{정상세포의 세포 독성}}$$

6. In vivo 항 스트레스 실험을 통한 면역 증강 효과 관찰

1) 실험동물

본 연구에서 사용된 실험동물은 오리엔트바이오에서 female mouse (4주령, 22~24 g, ICR)를 구입하여 사용하였다. 사육장은 20~25°C의 온도와 55 ± 10%의 습도를 유지시켰으며, 12시간마다 점등하였다. 케이지는 살균 처리하여 1/4 정도 종이 깔짚으로 채워 사용하였고, 사료는 고품 사료로 자유급식을 하였으며, 물도 살균 처리하여 자유 식이를 하였다. 각 군 별로 나누는 마우스를 약 1주일 정도 적응시킨 후 실험을 하였다.

2) 스트레스의 부과

(1) Cold water swimming stress

24시간 동안 절식시킨 마우스를 cage (Natume, Japan)에 넣고 18 ± 1°C의 물에 담근 후 실온 (24 ± 2°C)에서 5분간 수영을 시켰다. 스트레스를 부과하기 1시간 전에 마황과 당귀 샘플을 Feeding 하였다. 측정항목으로 면역과 관련된 비장과 부신을 적출하여 장기의 무게를 측정하였다 (Kim et al., 2006).

(2) Cold Stress

4°C의 저온실에서 마우스를 연속되는 4일 동안 첫날은 4시간, 두 번째 날은 8시간, 세 번째 날은 12시간, 네 번째 날은 24시간동안 방치하였다. 마황, 당귀 시료는 스트레스를 부과하기 1시간 전마다 투여하였다. 마지막 Feeding 및 스트레스 부과 24시간 후 마우스를 희생하여 면역과 관련된 비장과 부신을 적출하여 장기의 무게를 측정하였다 (Kimura et al., 1996).

(3) Heat Stress

37°C가 유지되는 항온기에 4일 동안 각 15분간 노출시키고 마황, 당귀 시료는 스트레스를 부과하기 1시간 전마다 투여하였으며, 마지막 Feeding 및 스트레스 부과 24시간 후 마우스를 희생하여 비장과 부신의 무게를 측정하였다 (Kim et al., 2006).

3) 혈액 채취 및 분석

스트레스 부과 24시간 후에 각 군별로 capillary tube를 이용한 안와정맥총채혈법으로 1 ml의 혈액을 EDTA가 처리된 microcontainer에 취한 후 혈액자동분석기를 이용하여 측정하였다. 1.5 ml의 혈액은 약 30분 동안 방치시킨 후 3000 rpm에서 15분간 원심분리 후에 상등액인 혈청을 분리하여 DT

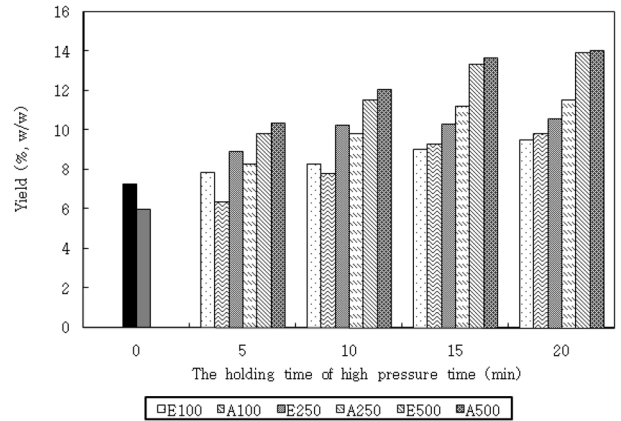


Fig. 1. Comparison of extract yields from *Ephedra sinica* and *Angelica gigas* by high pressure extraction with different pressure and holding time.

E100 : high pressure extraction of 100Mpa on *E. sinica*, E250 : high pressure extraction of 250 Mpa on *E. sinica*, E500 : high pressure extraction of 500 Mpa on *E. sinica*, A100 : high pressure extraction of 100 Mpa on *A. gigas*, A250 : high pressure extraction of 250 Mpa on *A. gigas*, A500 : high pressure extraction of 500 Mpa on *A. gigas*

Slides에 점적 후 혈액생화학분석기인 Dememision을 이용하여 스트레스와 관련이 있다고 생각되는 cholesterol (CHOL)과 glucose (GLU)를 선정하여 스트레스 지표로서 사용가능성을 평가하였다.

7. 통계처리

본 연구의 실험결과는 mean ± SDM으로 나타내었으며, 각 group 간의 통계학적 검정에는 Microsoft Excel 프로그램의 Student t-test를 이용하여 T-검정 하였다.

결과 및 고찰

1. 추출 수율

고압 추출을 이용한 추출 시 고압 추출기의 압력과 시간에 따른 추출 수율 측정을 통하여 각 시료의 추출 수율 극대화를 위한 고압 추출 조건을 결정하였다. Fig. 1은 마황과 당귀 각각의 압력과 시간에 따른 추출 수율을 나타낸 것이다. 압력을 주지 않았을 때와 비교했을 때 모든 시료에서 압력과 시간에 따라 점차적으로 추출 수율이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 고압을 처리하였을 때 일반 추출을 실시하였을 때보다 높은 추출 수율을 보여 압력이 500 Mpa에서 20분간 처리하였을 때 가장 높은 추출 수율을 나타내었는데 당귀의 경우 일반 추출과 비교하여 2.2배 이상의 높은 수율을 얻었다.

반면 초고압을 20분 처리하였을 때 수율은 증가하였지만, 기타 활성을 살펴보면 초고압을 15분과 20분 처리한 것이 크게 차이를 보이지 않는 것을 확인할 수 있다. 고압 추출을 실시

Table 1. The extraction yields of *Ephedra sinca* and *Angelica gigas* according to different extraction processes.

Sample	Extraction condition	Yields (% w/w)
<i>E. sinica</i>	WE	7.28 ± 0.12
	HPE5	9.82 ± 0.35
	HPE15	13.38 ± 0.22
<i>A. gigas</i>	WE	5.98 ± 0.43
	HPE5	10.37 ± 0.61
	HPE15	13.67 ± 0.36

[†]WE : water extraction at 60°C, HPE5 : high pressure extraction for 5 minutes at 60°C with water solvent, HPE15 : high pressure extraction for 15 minutes at 60°C with water solvent.

할 때 500 Mpa의 압력에서 15분 동안 추출을 실시하는 것이 가장 적합한 추출 공정으로 생각된다. 초고압 추출시간이 15분 이상이면 고압으로 인해 거의 대부분 유용활성 물질이 용출되어진 것으로 판단되어 15분 이상의 추출 시간은 큰 의미가 없을 것으로 사료된다.

Table 1은 최적 수율 추출 조건을 고려하여 마황과 당귀의 초고압 공정 시료의 조건을 설정한 것이다. 마황과 당귀 모두 초고압 15분 공정을 거친 추출물이 각각 13.38%, 13.67%의 높은 수율을 보인다. 각 추출공정을 통하여 얻어진 한약재의 추출 수율은 모든 조건 중 초고압 추출을 500 Mpa에서 15분간 실시하였을 때 가장 높은 추출량을 보였다. 그 중 줄기 활용 작물인 마황이 높은 추출 수율을 나타내었으며, 수율 증가는 당귀가 높게 나타났다. 이는 뿌리를 이용하는 다른 한약재인 홍경천의 초고압 공정에 의한 추출 수율 16.13%와 비교했을 때 수율 증진 면에서 효율이 있음을 보이는 수치이다 (Kim *et al.*, 2007). 이것은 뿌리 식물인 당귀는 섬유질이 많아 기존 추출 방법으로 용출되지 않았던 것들이 고압으로 인해 용출이 이루어진 것으로 보여 고압 추출은 뿌리 식물에서 특히 활용도가 높을 것으로 기대된다. 수율은 20분 처리에서 증가하였지만, 기타 활성은 15분과 20분 처리에 큰 차이가 없는 것으로 보이며, 초고압 추출을 할 경우 500 Mpa 압력에서 15분 추출이 가장 적합한 것으로 사료된다.

2. 정상세포 독성 및 항암활성

1) 정상세포 독성

실험에 사용된 sample 농도는 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml로 조절하여 정상세포에 대한 세포독성과 각 압 세포에 대한 성장 효과를 검토하였다. Fig. 2은 마황과 당귀의 HEK293 정상 세포에 대한 독성을 나타낸 것으로 마황은 모든 추출물 중 최고 농도인 1.0 mg/ml에서 초고압 15분 공정의 HPE15가 20.4%로 낮은 세포 독성을 나타냈고, 일반 열수추출물인 WE가 25.3%의 높은 세포독성을 나타냈다. 당귀의 세포 독성 또한 모든 추출물 중 HPE15가 1.0 mg/ml의 농도에서 21.6%로 낮은 세포독성을 나타냈고, WE가 26.3%로 높은 독

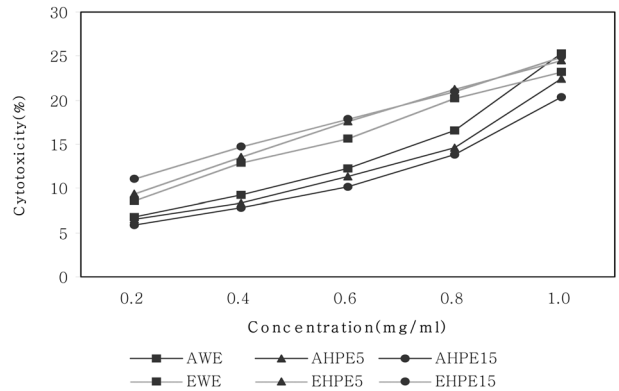


Fig. 2. Cytotoxicity of the extracts from *E. sinica* and *A. gigas* by different extraction processes on normal cell line, HEK293.

[†]Extraction process, AWE : water extraction at 60°C of *A. gigas*, AHPE5 : high pressure extraction for 5 minutes at 60°C with water solvent of *A. gigas*, AHPE15 : high pressure extraction for 15 minutes at 60°C with water solvent of *A. gigas*, EWE : water extraction at 60°C of *E. sinica*, EHPE5 : high pressure extraction for 5 minutes at 60°C with water solvent of *E. sinica*, EHPE15 : high pressure extraction for 15 minutes at 60°C with water solvent of *E. sinica*.

성을 나타냈다.

위의 결과를 통해 초고압 처리를 실시 할 경우 일반 추출물보다 세포독성이 낮아지는 효과를 확인할 수 있다. 이것은 약용 작물들이 가지고 있는 독성 물질이 초고압으로 인해 변성되거나 파괴되어 독성이 낮아지는데 영향을 미친 것으로 보인다. 초고압 추출물을 기존의 초음파 공정에 의한 추출물과 비교했을 때, 초음파 처리는 탈기 현상을 통해 단순히 활성물질의 용출량이 늘어나는 것에는 영향을 미치나 독성 물질의 파괴나 변성에는 영향을 미치지 않은 것으로 보인다 (Kwon *et al.*, 2008). 따라서 우리는 초고압 처리를 통해서 약용작물이 가지고 있는 독성물질의 파괴와 유용물질의 효과적 용출을 기대할 수 있다. 또한 초고압 공정을 통한 약용작물의 공동효과에 따른 활성 물질의 유도가 가능할 것으로 사료된다.

2) 폐암 항암 활성

Fig. 3는 마황의 인간폐암세포인 A549에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났으며, HPE15가 77.1%로 높은 억제활성을 나타내었다. 선택적 사멸도는 모든 추출물에서 2~6 사이로 나타났고, 0.6 mg/ml의 농도에서 5.23으로 암세포에 대한 높은 선택적 사멸도를 나타내었다.

Fig. 4는 당귀의 인간폐암세포인 A549에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하였고, 역시 HPE15에서 높은 억제 활성을 나타내었다. 선택적 사멸도는 모든 추출물

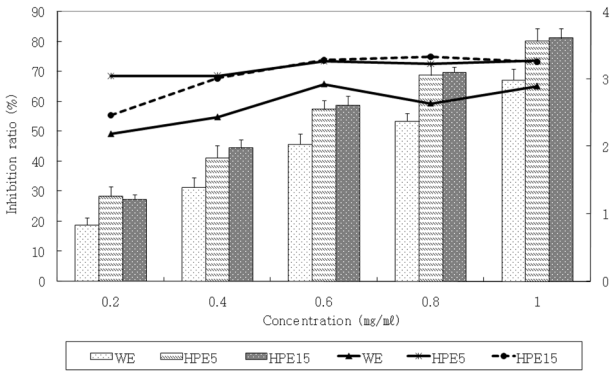


Fig. 3. Inhibition ratio of A549 (lung adenocarcinoma) growth (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts of *E. sinica*.

†Extraction process, WE : water extraction at 60°C, HPE5 : high pressure extraction for 5 minutes at 60°C with water solvent, HPE15 : high pressure extraction for 15 minutes at 60°C with water solvent

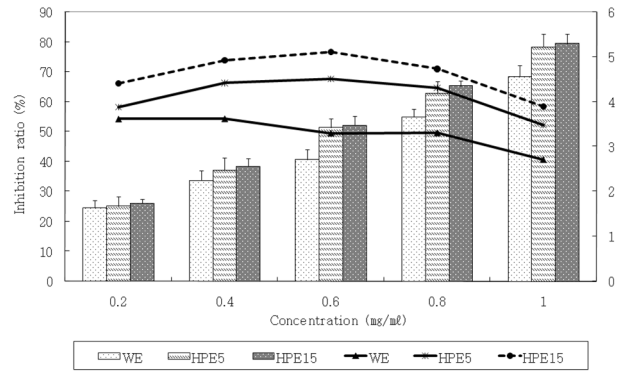


Fig. 5. Inhibition ratio of AGS (stomach adenocarcinoma, human) growth (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts of *A. gigas*.

†Extraction process, WE : water extraction at 60°C, HPE5 : high pressure extraction for 5 minutes at 60°C with water solvent, HPE15 : high pressure extraction for 15 minutes at 60°C with water solvent

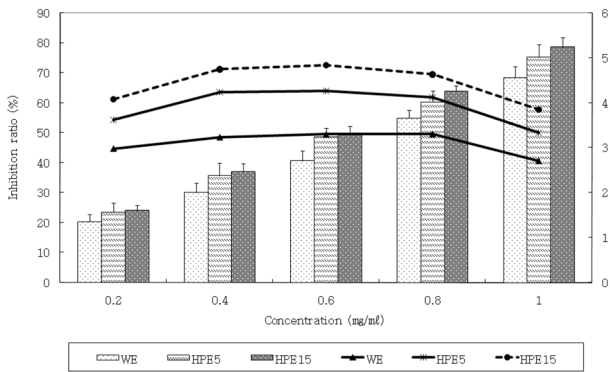


Fig. 4. Inhibition ratio of A549 (lung adenocarcinoma) growth (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts of *A. gigas*.

†Extraction process, WE : water extraction at 60°C, HPE5 : high pressure extraction for 5 minutes at 60°C with water solvent, HPE15 : high pressure extraction for 15 minutes at 60°C with water solvent

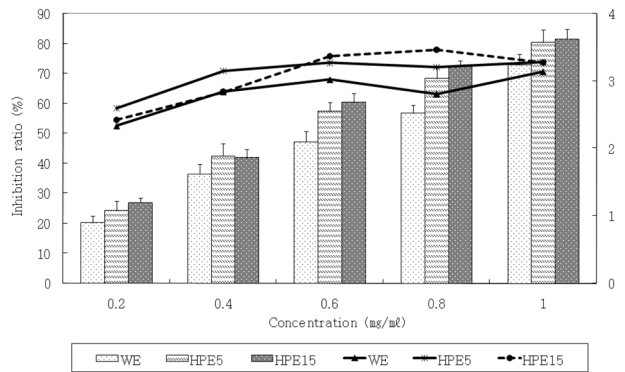


Fig. 6. Inhibition ratio of MCF-7 (breast adenocarcinoma) growth (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts of *E. sinica*.

†Extraction process, WE : water extraction at 60°C, HPE5 : high pressure extraction for 5 minutes at 60°C with water solvent, HPE15 : high pressure extraction for 15 minutes at 60°C with water solvent

에서 2~5 사이로 나타났고, 0.6 mg/ml에서 4.97로 암세포에 대한 높은 선택적 사멸도를 나타내었다.

이는 기존에 연구가 진행된 초음파 추출 공정의 1.0 mg/ml의 농도에서 2~3 정도의 선택적 사멸도를 보인 것과 크게 차이를 나타내는 것으로, 초고압 추출을 통해 분비된 유용생리 활성 물질이 독성이 적고 암세포에 대해 높은 억제활성을 나타내는 것을 확인할 수 있다 (Park et al., 2004).

본 연구 결과를 바탕으로 당귀 추출물의 초고압 추출 공정 15분을 통해 폐암에 대해 선택적으로 작용하는 유용물질이 많이 용출되어 나온 것을 알 수 있다.

3) 위암 항암 활성

Fig. 5은 당귀의 인간위암세포인 AGS에 대한 생육억제 활

성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하였고, 역시 HPE15에서 높은 억제 활성을 나타내었다. 선택적 사멸도는 모든 추출물에서 2~5 사이로 나타났고, 0.6 mg/ml에서 5.11로 암세포에 대한 높은 선택적 사멸도를 나타내었다.

한국인에게 발생하는 빈도가 가장 높은 위암에 대해, 당귀 초고압 추출물이 암세포에 선택적으로 효과적 작용을 한다는 것을 실험 결과를 통해 확인할 수 있었다.

4) 유방암 항암 활성

Fig. 6은 마황의 인간유방암세포인 MCF-7에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하였고, 역시 HPE15에

Table 2. Comparison of anticancer activity of *A. gigas* and *E. sinica* by different extraction processes.

Cancer organs (Cell line)		Lung (A549)	Stomach (AGS)	Breast (MCF-7)
Sample	<i>A. gigas</i>	78.7	79.5	-
	<i>E. sinica</i>	81.2	-	81.6

[†]HPE15 : high pressure extraction for 15 minutes at 60 with water solvent (%)

Table 3. The effects of *A. gigas* and *E. sinica* extracts on spleen and adrenal weight in restraint stress-induced in ICR mice (n = 5).

Standard Control		Spleen (g)	Adrenal (g)
Cold Water Swimming Stress	Control	0.0706 ± 0.6	0.0077 ± 0.2
	<i>A. gigas</i>	0.1532 ± 0.2	0.0125 ± 0.4
	<i>E. sinica</i>	0.0728 ± 0.3	0.0099 ± 0.2
Hot Stress	Control	0.0741 ± 0.2	0.0081 ± 0.5
	<i>A. gigas</i>	0.1563 ± 0.6	0.0144 ± 0.6
	<i>E. sinica</i>	0.0884 ± 0.4	0.0071 ± 0.1
Cold Stress	Control	0.0912 ± 0.8	0.0083 ± 0.5
	<i>A. gigas</i>	0.1466 ± 0.2	0.0131 ± 0.1
	<i>E. sinica</i>	0.0807 ± 0.3	0.0103 ± 0.1
		0.0791 ± 0.2	0.0161 ± 0.2

[†]Extraction process, WE : water extraction at 60°C

*Each value were compared with control at P < 0.05 by Student t-test.

서 가장 높은 억제 활성을 나타내었다.

항암활성 실험결과 초고압 처리를 실시하였을 때 기존의 일반 추출을 통한 실험결과와 비교하여 보면 10% 이상 항암활성이 증가하였다. 이것은 초고압 처리로 유용물질의 용출량 증가와 유용물질의 용출을 통한 암세포의 생육 억제를 증가의 결과를 가져온 것으로 생각된다.

Table 2를 통해 마황과 당귀 초고압 추출물의 폐암, 유방암, 위암 각각에 대한 항암 효과를 기존의 일반 추출물과 비교했을 때의 최적조건을 확인할 수 있다.

6. In vivo 항 스트레스 실험을 통한 면역 증강 효과 관찰

세포 독성이 모두 30% 이하로 암세포에 선택적으로 작용해 항암효과를 보이는 마황과 당귀의 초고압 추출물을 항스트레스 실험을 통해 ICR 마우스에 경구투여 함으로써 면역물질의 용출정도를 평가하였다. 이를 통해 초고압 추출법에 의해 용출된 유용물질이 면역에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

1) 면역 장기의 무게 측정

항체를 생성하는 기관으로서 면역 작용을 하는 비장과, 체내에 주요한 호르몬을 생성하는 기관인 부신의 무게를 제어 정상군(normal) 또는 스트레스를 준 대조군(control)과 비교를 하였다. Table 3에서 standard control과 비교했을 때 장기의 무게가 많이 증가한 것을 확인할 수 있다. 반면, 일반 control 군과 비교를 했을 때는 마황, 당귀의 마우스 군에서 장기의 무게가 더 가볍게 나타났다. 대체로 마황과 당귀 두 한약재 사이에서 당귀 식이 마우스 군이 약 1~5% 더 가볍게 나타났

다. 특히, hot stress 실험에서 당귀 마우스군의 비장 무게와, cold stress 실험에서 부신 무게는 각각 0.0884 g, 0.0103 g으로 마황 마우스군과 비교했을 때 큰 차이를 보였다.

2) 혈액 분석

Table 4에서는 각각의 시료의 투여 후 스트레스를 부과한 ICR 마우스를 그룹별로 나누어 혈액을 채취하였으며 그 혈청 내 cholesterol과 glucose의 농도 변화를 살펴보았다. 각 스트레스 군 control의 혈청 내 cholesterol과 glucose의 농도는 cold water swimming stress를 가한 그룹의 control이 각각 91 mg/dl 와 111 mg/dl, heat stress를 가한 그룹이 각각 106 mg/dl 와 115 mg/dl 이고, cold stress를 가한 그룹이 각각 92 mg/dl 와 102 mg/dl 를 나타내었다. 그러나 스트레스를 가하지 않은 standard control의 cholesterol과 glucose의 농도는 각각 61 mg/dl와 67 mg/dl를 나타내었다. 이것을 살펴보면 cholesterol의 농도는 스트레스 부과에 의해 유의적인 증가를 보이는 것으로 알 수 있었다. 이에 대해 한약재 시료를 투여한 마우스의 cholesterol과 glucose의 농도는 cold water swimming stress에서 당귀와 마황의 초고압 추출물이 standard control과 가장 가까운 수치를 나타냈다. 특히 마황의 cholesterol 수치는 70 mg/dl 로 시료를 투여하지 않은 스트레스 부과군의 마우스와 비교하였을 때 뛰어난 항스트레스 효과를 보였다. Heat stress에서도 초고압 처리한 당귀와 마황은 초고압 처리한 추출물이 standard control에 가장 가까운 농도를 나타내었고, cold stress에서도 초고압 처리한 추출물을 식이한 마우스군이 standard control군과 가장 유사한 cholesterol과 glucose 수치

Table 4. The effects of extracts on serum cholesterol and glucose in restraint stress-induced in ICR mice (n=5).

		<i>A. Gigas</i>		<i>E. Sinica</i>	
		Cholesterol (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	Glucose (mg/dl)
Standard Control		61 ± 0.5	67 ± 0.3	61 ± 0.1	67 ± 0.3
Cold Water Swimming Stress	Control	91 ± 0.4	111 ± 0.7	91 ± 0.5	111 ± 0.2
	WE60	88 ± 0.2	105 ± 0.4	84 ± 0.4	105 ± 0.5
	HPE5	80 ± 0.3	91 ± 0.4	82 ± 0.3	88 ± 0.6
	HPE15	75 ± 0.2	82 ± 0.3	70 ± 0.3	80 ± 0.4
Heat Stress	Control	106 ± 0.7	115 ± 0.5	106 ± 0.2	115 ± 0.5
	WE60	99 ± 0.6	97 ± 0.2	101 ± 0.6	103 ± 0.3
	HPE5	86 ± 0.3	84 ± 0.3	79 ± 0.1	88 ± 0.3
	HPE15	82 ± 0.4	79 ± 0.4	81 ± 0.5	85 ± 0.1
Cold Stress	Control	92 ± 0.2	102 ± 0.4	92 ± 0.4	102 ± 0.2
	WE60	84 ± 0.1	89 ± 0.2	94 ± 0.3	96 ± 0.3
	HPE5	75 ± 0.2	74 ± 0.2	76 ± 0.5	82 ± 0.5
	HPE15	68 ± 0.2	71 ± 0.6	73 ± 0.1	76 ± 0.1

*Each value were compared with control at P < 0.05 by Student t-test.

를 보였다. 이를 통해 당귀, 마황의 항스트레스 인자로서의 활용가치를 알 수 있다. 또한 초고압 추출물의 식이를 통한 항스트레스 활성 증진은 초고압 추출 공정을 통해 한약재의 견고한 세포벽이 깨어져 유용물질이 용출되어 나와, 항스트레스 효과를 보였고 마우스들의 면역력이 증가한 것으로 생각되어진다.

스트레스의 지속적인 부과가 암 발생을 유도할 수 있다는 연구 결과를 근거로, 낮은 정상세포 독성을 나타내는 초고압 공정을 통한 당귀, 마황의 항암소재로서의 기능을 탐색할 가치가 충분한 것으로 사료 된다 (Vitaliano *et al.*, 1998).

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 (과제번호 : 20070401 034013) 연구지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

LITERATURE CITED

- Dol R and Peto R.** (1981). The causes of cancer; Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute.* 66:1192-1308.
- Horie Y, Kimura K, Ida M, Yosida Y and Ohki K.** (1991). Jam preparation by pressurization. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* 65: 975-980.
- 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 JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS,**

- Lee SE, Yi JS, Kwon OW and Lee HY.** (2006). Effect of aqueous extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Nakai on anti-tumor and anti-stress activities in mice. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 14:206-211.
- 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.
- Kimura M, Suzuki M and Araki S.** (1996). Effect of immunostimulators on involution of lymphoid organs in mice exposed to heat and cold stress. *Journal of Veterinary Medical Science.* 58:255-257.
- Kwon MC, Han JG, Syed AQ, 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.
- Park JH, Lee HS, Mun HC, Kim DH, Seong NS, Jung HG, Bang JK and Lee HY.** (2004). Improvement of anticancer activation of ultrasonified extracts from *Acanthopanax senticosus* Harms, *Ephedra sinica* Stapf, *Rubus coreanus* Miq. and *Artemisia capillaris* Thunb. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 12:273-278.
- Song HG and Lee H.** (2006). The effect of EH-HA(Ephedrae Herba Herbal Acupuncture) at ST36 on OVA-induced Asthma in mice. *The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Society.* 23:1-14.
- Shin YW and Kim DH.** (2005). The anti-scratching effect of Ephedrae Herba and Ephedrae Radix. *Kyung Hee University. College of Pharmacy Press, Seoul, Korea.*
- Vitaliano PP, Scanlan JM, Ochs HD, Syrjala K, Siegler IC and Snyder EA.** (1998). Psychosocial stress moderates the relationship of cancer history with natural killer cell activity. *The Annals of Behavioral Medicine.* 20:199-208.
- Woo JH, Choi IY and Choue RW.** (2007). Hematological effects of water extracts of cham-dang-gui on dietary induced iron deficient anemia rat. *The Korean Nutrition Society.* 40:428-434.