

초고압 가공 공정을 통한 지치 추출물의 항암 활성 증진

서용창* · 최운용** · 김지선* · 조정섭*** · 김영옥**** · 김진철** · 이현용**†

*의료바이오신소재융복합연구센터 강원대학교 생물소재공학과, **강원대학교 생물소재공학과,
두산에코비즈넷, *농진청 국립원예특작과학원 인삼특작부

Enhancement of Anticancer Activities from *Lithospermum erythrorhizon* Extracts by Ultra High Pressure Process

Yong Chang Seo*, Woon Yong Choi**, Ji Seon Kim*, Jeong Sub Cho***, Young Ock Kim****, Jin-Chul Kim** and Hyeon Yong Lee**†

*Medical & Bio-Material Research Center and Department of Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

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

***DooSan EcoBizNet, Chuncheon 200-161, Korea.

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

ABSTRACT : This study was performed to enhance anticancer activities of *Lithospermum erythrorhizon* by eluting high amount of shikonin through ultra high pressure process. Extraction yield was increased up to 5~10% by ultra high pressure process, compare to the normal extraction processes such as water solvent extraction, 70% ethyl alcohol solvent extraction. The cytotoxicity of the extracts (1.0 mg/ml) from ultra high pressure process was showed the lowest cytotoxicity 13.4% for human lung cell (HEL299). The anticancer activities showed 80~85% by adding 1.0 mg/ml of the extracts from ultra high pressure process in several cancer cell lines such as AGS, Hep3B, MCF-7 and HeLa cells. Among them, MCF-7 cell of the endocrine system was highest inhibited than other cells. The anticancer activities of the extracts from ultra high pressure extraction process showed 10~15%, which was higher than the extracts from normal extraction processes. From HPLC analysis of the extracts, the contents of shikonin in the extracts from ultra high pressure process was 11.42% (w/w), which was 20% higher than others. This results indicate that ultra high pressure process could increase the extraction yield of shikonin and other contents, which resulted in higher anticancer activities.

Key Words : *Lithospermum erythrorhizon*, Shikonin, Ultra High Pressure, Anticancer Activities

서 언

지치 (*Lithospermum erythrorhizon*)는 지치과 (Boraginaceae)에 속하는 다년생 초본 식물로서 우리나라 전역에 자생하고 있다. 일반적으로 지치 뿌리의 성상은 종에 따라 다른데 야생 종은 한두 번 뒤틀리면서, 재배종은 바로 땅속에 파고들면서 자라는 것으로 알려져 있으며 종에 따른 명칭은 정립되지 않은 상태이다 (Lee, 2003). 주로 남부지역에 야생으로 많이 자라는 지치는 찾는 이가 점점 줄어들고 있는 실정으로 지치의 맥을 잇기 위해 약용작물로 재배되고 있다. 지치과에 속하는 식물로는 송양나무, 모래지치, 당개지치, 섬꽃마리, 자반풀, 산지치, 들지치, 돌지치, 반디지치, 개지치, 갯지치, 참꽃마리, 거

센털개지치, 덩굴만이 어린순으로 나물을 해 먹었고 지치만이 식용, 약용으로 사용 된다 (Lee, 2003). 특히 자초로도 불리우는 지치 뿌리에는 allantoin, cyanoglucoside, fumaric acid, succinic anhydride, shikonin, acetylshikonin과 같은 다양한 성분들이 함유되어 있어 (Yun *et al.*, 1999) 항균, 항바이러스, 항종양, 착색 등 다양한 효능·효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Sasaki *et al.*, 2002; Bai, 2004; Chen *et al.*, 2003; Staniforth *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2003). 또한 지치에 함유되어 있는 acetylshikonin을 포함한 shikonin 유도체들은 항암 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Sankawa *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 2008).

또한, 세계적으로 사망원인의 1·2위를 차지하고 있는 암에

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr

Received 2010 October 2 / 1st Revised 2010 November 5 / 2nd Revised 2011 February 10 / Accepted 2010 April 13

대한 치료는 대부분 합성화학약품을 이용한 치료요법으로 조혈 및 면역기능에 이상을 초래하고 암세포 이외의 정상세포에도 독성을 나타내고 있어 특이적이며 선택적인 항암제의 개발이 요구되고 있는 실정이고, 최근에는 면역기능을 높여주고 암세포에만 선택적으로 작용하는 천연 항암제를 생약재로부터 개발하려는 많은 연구의 추세에 따라 본 연구를 수행하였다 (Lee *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2007; Jo and Min, 2007).

기존에 사용되어 왔던 추출 공정은 낮은 추출 효율과 많은 에너지 소비, 열로 인한 유용성분의 파괴, 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출, 높은 열에 대하여 불안정한 점 등의 단점을 가지고 있다. 이에 반해 초고압 공정은 최근 식품에서 주목받고 있는 가공기술 분야로서 기존 공정보다 식품의 보존성과 물성, 기능성을 향상시켜주는 장점이 있으며 100~1000 MPa의 압력을 이용한 압력매체로 물이나 오일에 압력을 순간적으로 균일하게 전달시키는 원리로서 기존의 열처리 공정은 화학변화가 많이 일어나는데 반하여 초고압 공정은 화학적으로 큰 변화를 일으키지 않는 장점이 있다 (Jeong *et al.*, 2009). 그리고 세포벽이 견고하여 유용물질을 얻는데 한계가 있는 지치와 같은 한약재는 기존의 공정과 다른 초고압 공정을 도입하여 작물에 작용하는 높은 압력으로 기존의 추출 공정으로 얻을 수 없는 유용 생리활성 물질을 얻을 수 있게 한다. 이러한 초고압 공정을 이용하여 기존의 공정이 가지고 있는 문제점을 개선하면서 약용식물로부터 단시간에 불순물이 적은 순도 높은 유용 생리활성 물질을 추출하여 항암활성과 같은 생리활성을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다 (Kim *et al.*, 2007).

따라서 초고압 공정과 기존의 공정을 비교함으로써 지치에 함유되어 있는 수용성 shikonin 유도체들이 용출되는 차이와 이에 관련한 항암 증진 효과를 알아보았다. 이러한 생리활성 검증을 통하여 항암 소재로서 지치의 가능성을 평가하고, 더 나아가 본 연구 자료들이 기능성 식품에 관련된 분야에 가치 있는 바탕자료로 사용되기 위해서 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 시중 약재상 (대광약업사, Chuncheon, Korea)에서 구입하였다.

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

초고압 공정은 지치의 뿌리부분을 80 g씩 비닐 팩에 70% ethyl alcohol 800 ml와 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 추출장치 (Ilshin autoclave, Korea)를 이용하여 500 MPa의 압력으로 30분간 실행하였다. 초고압 공정이 끝난 시료를 수직 환류 냉각기에 부착된 추출 flask에 시료 중량에 대하여 10배의 70% ethyl alcohol을 추출용매로 사용하여 60°C에서 3시간 추출하였다. 일반 추출은 증류수와 70% ethyl alcohol을 추출 용매로 각각 사용하여 70% ethyl alcohol 80°C, 증류수 60°C, 증류수 100°C에서 24시간 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들을 감압여과장치 (Rotary Vacuum Evaporator N-N series, EYELA, Germany)로 여과하여 농축을 하였고, 동결건조를 한 후 분말상태로 제조하여 실험에 사용하였다 (Kim *et al.*, 2008).

3. 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주로 인간 위암세포인 AGS (stomach adenocarcinoma, human, ATCC CRL-1739, USA), 인간 자궁경부암세포인 HeLa (cervix uterine adenocarcinoma, human, KCLB 10002, Korea), 인간 간암세포인 Hep3B (liver adenocarcinoma, human, ATCC HB-8064, USA), 인간 유방암세포인 MCF-7 (breast adenocarcinoma, human, ATCC HTB-22, USA)를 사용하였고, 시료 자체의 독성을 알아보기 위한 인간 정상 폐 세포인 HEL299 (lung normal, human, KCLB 10137, Korea)를 사용하였다. 실험에 사용된 세포주 모두 RPMI 1640배지 90%에 FBS를 10% 넣어 배양하였다.

4. 정상세포 독성 측정

인간의 폐에서 유래한 정상 세포인 HEL299 세포를 MTT solution (SIGMA, USA)을 사용하는 MTT assay를 이용하여 각 sample 농도에서 정상세포에 대한 sample의 세포독성을 측정하였다. 우선 HEL299 세포를 RPMI 1640배지와 10% fetal bovine serum을 이용하여 5% CO₂ incubator에 배양한다. 이 배양된 세포를 96 well plate에 4 × 10⁴ cells/ml로 분주한 후 각 sample을 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml의 농도로 PBS에 녹여 100 μl 씩 첨가하여 MTT assay를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 각 sample의 정상세포에 대한 세포독성을 측정하였다 (Michael *et al.*, 1998).

5. 항암 활성 측정

항암 활성을 측정하는 방법인 SRB (sulforhodamine B) assay는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험 대상 세포인 AGS, HeLa, Hep3B, MCF-7 (in 10% FBS media)의 농도를 4~5 × 10⁴ cells/ml로 96 well plate의 각 well에 100 μl 씩 첨가하여 24시간

동안 배양 (37°C, 5% CO₂)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml로 PBS에 녹여 100 µl 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 100 µl 를 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 µl 씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 µl 를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm 에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 각각의 세포 생존율을 확인하였다 (Dool and Peto, 1981).

MTT assay를 이용하여 HEL299 세포에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, SRB assay를 이용하여 각 암세포주의 생육 억제 활성을 측정한 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

$$Selectivity = \frac{\text{암세포 생육 억제 활성}}{\text{정상 세포의 세포 독성}}$$

6. HPLC 분석

각 추출 공정을 통한 지치의 성분을 알아보기 위해 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 각 추출공정을 통한 지치 추출물의 peak를 구하고 공정 별로 분석을 하였다. 각 시료의 분석을 위해 시료를 HPLC 분석용 water에 녹이고 0.2 µm syringe filter로 여과하여 1000 PPM의 농도로 분석하였으며, standard로 shikonin을 선정하여 100 PPM의 농도로 분석하였다. Injection volume은 20 µl 로 분석하였다. HPLC 기기는 BIO-TEK instrument (Italy)사 HPLC 500 series의 BIO-TEK 522 controller Pump와 BIO-TEK HPLC 535 UV Detector (280 nm)를 사용하였고, Column은 Alltech사의 Prevail C18 (5 µm, 4.6 × 150 mm)을 사용하였다. 이동상은 Water: Acetonitrile = 5 : 95로 혼합하여 사용하였고, 유속은 0.5 ml/min으로 흘러주었다.

7. 통계처리

데이터의 통계처리는 각 시료를 3회 반복으로 행해졌으며, 실험값의 통계는 SAS(Statistical Analysis System) 프로그램을 사용하여 실험 간의 평균을 구하였으며, 각 처리구간의 최소 유의차 (P < 0.05) 수준에서 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

1. 지치 추출 수율과 shikonin 함량

지치의 물, 에탄올 추출과 초고압 추출한 모든 공정 중에서

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

Sample	Extraction condition	Yields (% w/w) [†]	Shikonin contents (% w/w) [‡]
<i>L. erythrorhizon</i>	WE100 ¹⁾	20.47 ± 0.31 ^A	9.2 ± 0.12 ^A
	WE60 ²⁾	20.78 ± 0.62 ^A	9.31 ± 0.28 ^B
	EE ³⁾	19.78 ± 0.55 ^B	8.99 ± 0.52 ^A
	HPE ⁴⁾	23.66 ± 0.18 ^C	11.24 ± 0.35 ^C

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

²⁾WE60: water extraction for 24 hours at 60°C.

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

⁴⁾HPE: high pressure extraction for 30 minutes at 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 60°C.

[†]Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within yields are significantly different at p < 0.05.

[‡]Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within shikonin contents are significantly different at p < 0.05.

초고압 공정 추출물이 가장 높은 수율을 나타내었다 (Table 1).

지치 열수 추출물은 100°C와 60°C에서 각각 20.47%, 20.78%의 수율을 보였고, 에탄올 추출물은 19.78%의 수율을 보였다. 가장 낮은 수율을 보인 에탄올 추출물은 열수 추출의 물 용매보다 에탄올 용매에 가용성분이 적게 녹아 나와 추출 수율이 낮게 나왔을 것이라 생각된다. 가장 높은 수율은 초고압 공정 추출물로 23.66%의 수율을 나타내었으며, 일반 열수 추출물과 비교하였을 때 5~10% 정도 증진되었다. 이는 초고압 추출 처리에 의한 마황과 당귀의 항암 활성 증진 논문 (Jeong *et al.*, 2009)에서 보고된 당귀의 초고압 추출물 수율 13.67%와 비교하여 더 높은 추출 수율을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 또한 각 공정별 지치에 함유된 shikonin의 함량을 HPLC분석을 통해 분석한 결과 standard인 shikonin의 area와 비교하였을 때, 초고압 추출물이 11.42%로 가장 많은 함유량을 나타내었다 (Table 1).

기존의 추출물에 비하여 초고압 공정 추출물의 수율과 shikonin 함량이 높게 나타나는 것은 지치 세포벽의 견고함과 조직의 단단함으로 인해 일반 열에너지만을 가했을 때는 용출되어 나오지 못하던 지치의 shikonin 유도체 등의 생리활성 물질들이 500 MPa의 높은 압력을 통해 높은 에너지를 가했을 때 더 많이 용출되어 추출수율 증진에 영향을 미쳤을 것이라 사료된다 (Kim *et al.* 2008).

2. 정상 세포 독성

지치 추출물이 정상세포에 영향을 미치는지 알아보기 위해 정상세포 독성 실험을 하였다. 실험에 사용된 sample 농도는 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 조절하여 인간 정상 폐

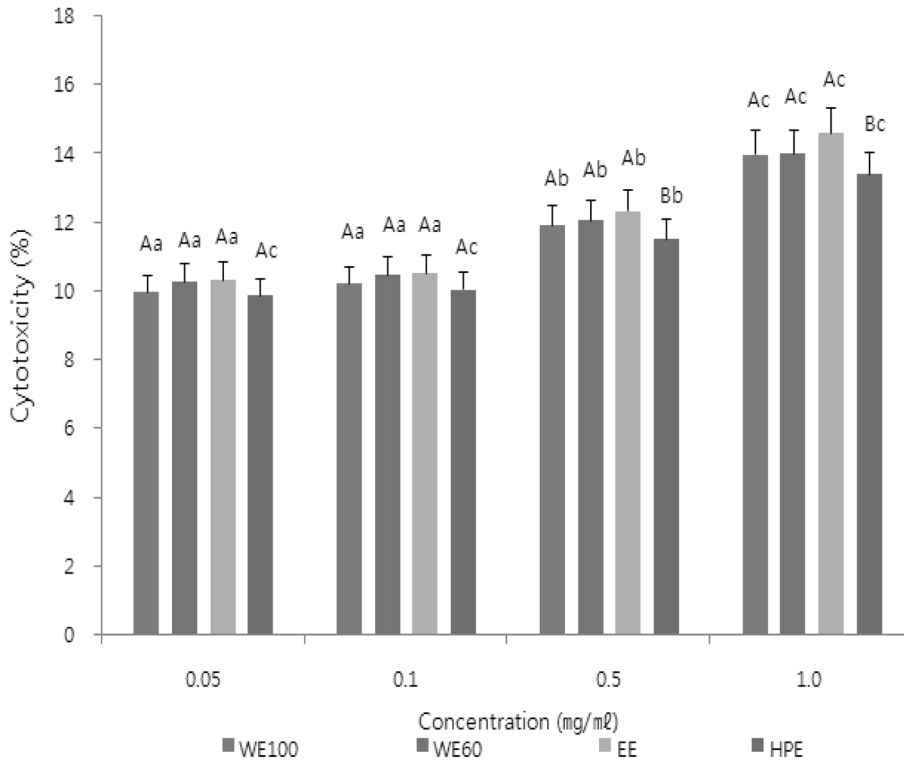


Fig. 1. Cytotoxicity for the extracts of *L. erythrorhizon* by different extraction processes on normal cell line, HEL299. Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-B) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-c) within same sample are significantly different at $p < 0.05$. WE100: water extraction for 24 hours at 100; WE60: water extraction for 24 hours at 60°C; EE: 70% ethyl alcohol extraction for 24 hours at 80°C; HPE: high pressure extraction for 30 minutes at 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 60°C.

세포 HEL299에 대한 세포독성을 측정하였다. Fig. 1은 지치 각 공정별 추출물의 HEL299 정상 세포에 대한 독성을 나타낸 그림으로 지치는 가장 높은 농도인 1.0 mg/ml에서 15% 미만의 세포독성을 나타내었다. 그 중에서 가장 낮은 세포독성을 나타낸 것은 1.0 mg/ml의 농도에서 초고압 공정 추출물이 13.4%로 가장 낮게 나타났고, 가장 높은 세포독성을 나타낸 것은 에탄올 추출물이 14.6%로 가장 높게 나타났다. 그리고 각 공정을 통해 얻은 지치 추출물의 세포독성은 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 모든 시료가 1.0 mg/ml의 농도에서 15% 미만의 낮은 세포독성을 나타낸 것으로 보아 지치 추출물이 인간 정상 폐 세포 HEL299에 대해 유의할만한 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다.

위의 결과를 통해 일반적인 추출보다 초고압 공정을 처리한 추출물의 세포독성이 더 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 이는 약용 작물들이 가지고 있는 독성 물질이 초고압 처리로 인해 변성되거나 파괴되어 독성이 낮아지는데 영향을 미친 것으로 사료된다 (Jeong *et al.*, 2009).

3. 항암 활성 측정

실험에 이용된 세포주는 소화기 계통의 인간 위암세포인 AGS (stomach adenocarcinoma, human)와 인간 간암세포인 Hep3B (liver carcinoma, human), 생식기 계통의 인간 자궁경부암세포인 HeLa (cervix uterine adenocarcinoma, human), 내분비 계통의 인간 유방암세포인 MCF-7 (breast adenocarcinoma, human)를 사용하여 지치 추출물에 대한 계통별 암세포 성장 억제율을 측정하였고 사용된 sample의 농도는 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml로 조절하여 실험하였다.

인간 간암세포인 Hep3B에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타 내었다 (Fig. 2). 모든 sample에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그 중 1.0 mg/ml의 농도에서 초고압 공정 추출물이 81%로 가장 높은 생육억제 활성을 나타내었고, 선택적 사멸도도 6.04로 높은 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 추출 공정 다변화를 통한 홍경천의 항암활성 증진효과 (Kim *et al.*, 2006)에서 보고된 1.0 mg/ml의 농도에서 물 60°C 초음파 병행 추출물의 72%보다 높은 활성을 나타낸 결과로 초고압 공정을 통해 지치의 Hep3B에 대한 생육

지치 추출물의 항암활성

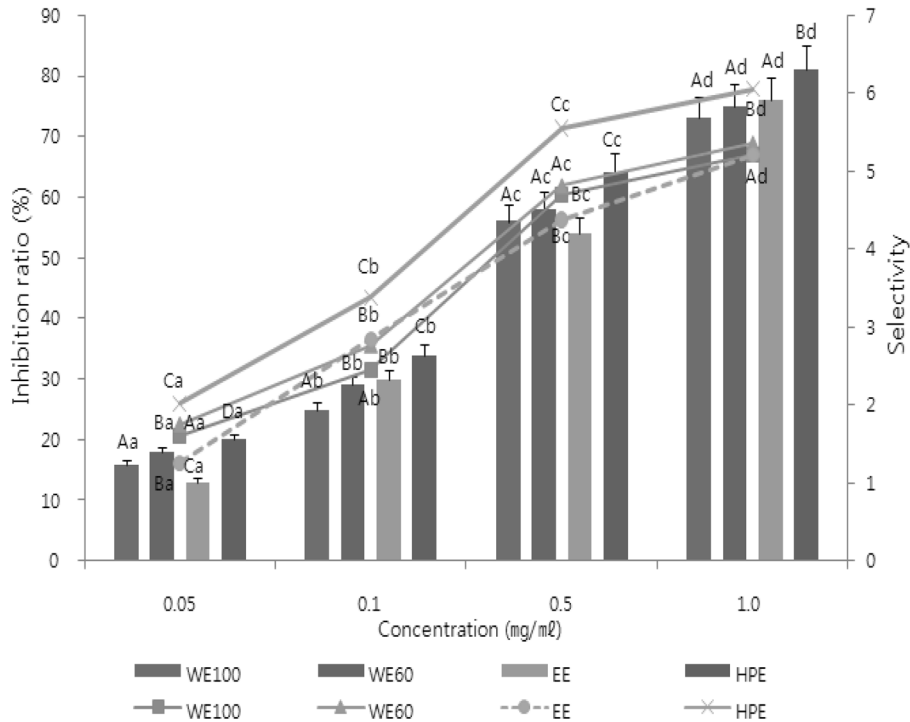


Fig. 2. Inhibition ratio of Hep3B growth (bar chart, %) and selectivity (line chart) by adding the extracts of *L. erythrorhizon*. Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-D) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-d) within same sample are significantly different at $p < 0.05$. WE100: water extraction for 24 hours at 100; WE60: water extraction for 24 hours at 60°C; EE: 70% ethyl alcohol extraction for 24 hours at 80°C; HPE: high pressure extraction for 30 minutes at 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 60°C.

억제 활성 성분이 더 많이 용출된 것으로 사료된다.

계통별 항암활성을 비교하기 위하여 소화기 계통의 인간 위암세포인 AGS와 생식기 계통의 인간 자궁경부암세포인 HeLa, 내분비 계통의 인간 유방암세포인 MCF-7에 대한 각 공정별 지치 추출물의 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타내었다 (Table 2). 인간 위암세포인 AGS의 생육억제 활성에서는 모든 sample에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그 중 1.0 mg/mL의 농도에서 초고압 공정 추출물이 78%로 가장 높은 생육억제 활성을 나타내었다. 선택적 사멸도는 1.0 mg/mL의 농도에서 5.82로 암세포에 대한 높은 선택적 사멸도를 나타내었다. 이는 차가버섯과 어성초 함유 발효 조성물이 인체 위암 AGS 및 대장암 HCT-15 세포 생육에 미치는 영향 (Cha *et al.*, 2004)에서 보고된 차가버섯 발효 조성물의 추출물을 4.0 mg/mL의 농도로 첨가하였을 때와 같은 78%의 활성을 나타내는 결과로 차가버섯 보다 낮은 농도로도 같은 활성을 나타내는 것으로 보아 지치 초고압 추출물이 효과적으로 인간 위암세포인 AGS를 사멸시킨다고 볼 수 있다. 생식기 계통의 인간 자궁경부암세포인 HeLa에 대한 각 공정별 지치 추출물의 생육억제 활성 및 선택적 사멸도는 모든 sample에서

농도 의존적으로 생육억제 활성이 증가하였으며, 그 중 1.0 mg/mL의 농도에서 초고압 공정 추출물이 76%로 가장 높은 생육억제 활성을 나타내었고, 선택적 사멸도는 1.0 mg/mL의 농도에서 5.67로 가장 높았다. 이는 복분자딸기 (*Rubus coreanum*) 에탄올 및 열수추출물의 항 돌연변이 활성과 암세포 성장 억제 효과 논문 (Jeon *et al.*, 2009)에서 보고된 1.0 mg/mL의 농도에서 복분자딸기 에탄올 추출물의 59.5% 생육억제 효과보다 높은 수치로 같은 에탄올 용매를 사용하여 추출한 지치 초고압 추출물이 더 높은 암세포 억제활성을 나타내는 것을 알 수 있다. 또한 내분비 계통의 인간 유방암세포인 MCF-7에 대한 각 공정별 지치 추출물의 생육억제 활성 및 선택적 사멸도는 모든 sample에서 농도 의존적으로 생육억제 활성이 증가하는 경향을 나타내었으며 1.0 mg/mL의 농도에서 초고압 공정 추출물이 86%로 가장 높은 생육억제 활성을 나타내었고, 선택적 사멸도는 6.42의 높은 수치를 나타내었다. 이 수치는 영경귀 추출물의 항산화성, 항 돌연변이원성 및 항암활성 효과 논문 (Lee *et al.*, 2003)에서 보고된 영경귀 메탄올 추출물의 83.3% 억제효과 보다 높은 억제효과를 나타내었다. 계통 중 가장 우수한 항암활성을 보인 계통은 내분비 계통의 암세포인

Table 2. Inhibition ratio of different human adenocarcinoma cell lines on the various growth system.

Concentration (mg/ml)	Sample	Human adenocarcinoma cell lines					
		AGS		HeLa		MCF-7	
		Inhibition ratio (%)	Selectivity	Inhibition ratio (%)	Selectivity	Inhibition ratio (%)	Selectivity
0.05	WE100 ¹⁾	5.18±0.81 ^{Aa†}	1.50±0.13 ^{Aa}	14.15±2.31 ^{Aa}	1.40±0.11 ^{Aa}	11.34±1.24 ^{Aa}	1.10±0.14 ^{Aa}
	WE60 ²⁾	17.61±1.39 ^{Ba}	1.65±0.51 ^{Aa}	16.69±1.69 ^{Aa}	1.55±0.08 ^{Aa}	13.43±1.54 ^{Aa}	1.26±0.07 ^{Aa}
	EE ³⁾	12.64±2.10 ^{Ca}	1.16±0.48 ^{Aa}	11.41±0.73 ^{Aa}	1.06±0.11 ^{Ba}	8.87±1.32 ^{Ba}	0.77±0.24 ^{Ba}
	HPE ⁴⁾	19.43±1.29 ^{Ba}	1.92±0.07 ^{Aa}	18.81±0.49 ^{Ba}	1.82±0.23 ^{Ca}	15.15±1.12 ^{Ca}	1.52±0.04 ^{Ca}
0.1	WE100	22.51±0.43 ^{Ab}	2.15±0.61 ^{Aa}	18.94±0.03 ^{Ab}	1.76±0.08 ^{Ab}	20.41±0.14 ^{Ab}	1.95±0.19 ^{Ab}
	WE60	26.41±0.07 ^{Bb}	2.48±0.13 ^{Ab}	29.61±0.19 ^{Bb}	2.76±0.81 ^{Bb}	24.53±1.29 ^{Bb}	2.29±0.45 ^{Ab}
	EE	27.69±1.08 ^{Cb}	2.56±0.51 ^{Ab}	30.84±0.08 ^{Cb}	2.84±0.07 ^{Bb}	25.12±1.58 ^{Bb}	2.37±0.51 ^{Ab}
	HPE	31.17±1.93 ^{Db}	3.08±0.47 ^{Ab}	34.15±1.11 ^{Db}	3.38±0.16 ^{Cb}	29.81±0.11 ^{Cb}	2.88±0.33 ^{Bb}
0.5	WE100	48.17±0.46 ^{Ac}	4.03±0.16 ^{Ab}	54.99±0.51 ^{Ac}	4.54±0.19 ^{Ac}	49.41±1.72 ^{Ac}	4.11±0.09 ^{Ac}
	WE60	48.99±1.71 ^{Ac}	3.98±0.31 ^{Ac}	56.81±0.13 ^{Bc}	4.65±0.03 ^{Ac}	51.43±1.64 ^{Ac}	4.23±0.24 ^{Ac}
	EE	51.51±2.11 ^{Ac}	4.13±0.04 ^{Ac}	55.91±0.47 ^{Bc}	4.45±0.01 ^{Ac}	48.19±0.1 ^{Ac}	3.89±0.11 ^{Bc}
	HPE	56.61±0.54 ^{Bc}	4.85±0.40 ^{Bc}	62.88±0.51 ^{Cc}	5.37±0.08 ^{Bc}	57.22±0.73 ^{Bc}	4.94±0.28 ^{Cc}
1.0	WE100	55.41±1.64 ^{Ad}	3.93±1.11 ^{Ab}	65.19±0.23 ^{Ad}	4.64±0.49 ^{Ac}	72.15±1.32 ^{Ad}	5.14±0.32 ^{Ad}
	WE60	57.11±0.39 ^{Ad}	4.07±0.08 ^{Ac}	70.69±0.11 ^{Bd}	5.00±0.46 ^{Ac}	80.91±1.51 ^{Bd}	5.71±0.1 ^{Bd}
	EE	58.64±0.81 ^{Bd}	3.97±0.43 ^{Ad}	71.35±1.35 ^{Cd}	4.86±0.13 ^{Ad}	76.25±0.54 ^{Cd}	5.20±0.42 ^{Ad}
	HPE	78.18±1.94 ^{Cd}	5.82±0.08 ^{Bd}	76.22±0.73 ^{Dd}	5.67±0.69 ^{Ac}	86.15±0.33 ^{Dd}	6.42±0.37 ^{Cd}

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

²⁾WE60: water extraction for 24 hours at 60°C.

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

⁴⁾HPE: high pressure extraction for 30 minutes at 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 60°C.

[†]Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-D) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-d) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

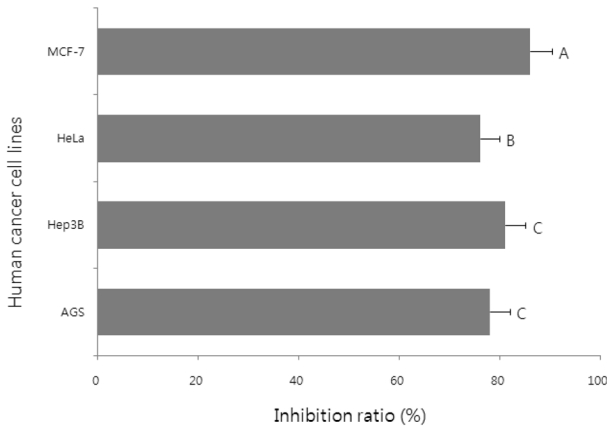


Fig. 3. Inhibition ratio of different human adenocarcinoma cell on growth system supplemented with 1.0 mg/ml concentration from the extracts of *L. erythrorhizon* by ultra high pressure process. Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within inhibition ratio are significantly different at $p < 0.05$

인간 유방암세포 MCF-7이었다.

항암활성 측정에서 가장 높은 생육억제 활성을 보인

1.0 mg/ml의 농도에서 초고압 공정 추출물의 암세포별 항암활성을 비교하여 나타내었다 (Fig. 3). 그 중 내분비계 암세포인 인간 유방암세포 MCF-7이 항암활성 측정에 사용된 암세포들 보다 가장 높은 생육억제 활성을 갖는 결과를 나타내었다. 이는 1.0 mg/ml 농도의 초고압 공정 추출물은 내분비계 암세포에 효과적인 생육 저해 활성을 보임으로써 특정 농도로의 조절을 통해 효과적인 암세포 생육억제 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료되며, 초고압 공정 추출물이 내분비계 암세포의 생육억제 활성에 효과적인 항암소재로의 개발 가능성을 가질 수 있을 것이라고 사료된다.

4. 지치 HPLC 분석

지치의 공정별 추출물의 HPLC 분석 결과, 먼저 standard로서 사용한 shikonin은 34분대에서 peak가 분석되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 그리고 모든 추출물에서 모두 34분대에 주요 peak인 shikonin으로 판단할 수 있는 peak가 분석되었으며 각각 WE100: 9.2%, WE60: 9.31%, EE: 8.99%, HPE: 11.24%로 shikonin 함량을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 수율 측정에서 나타난 결과와 같이 다른 추출 공정을 통해서 용출된 지치에 함유되어 있는 수용성 shikonin

지치 추출물의 항암활성

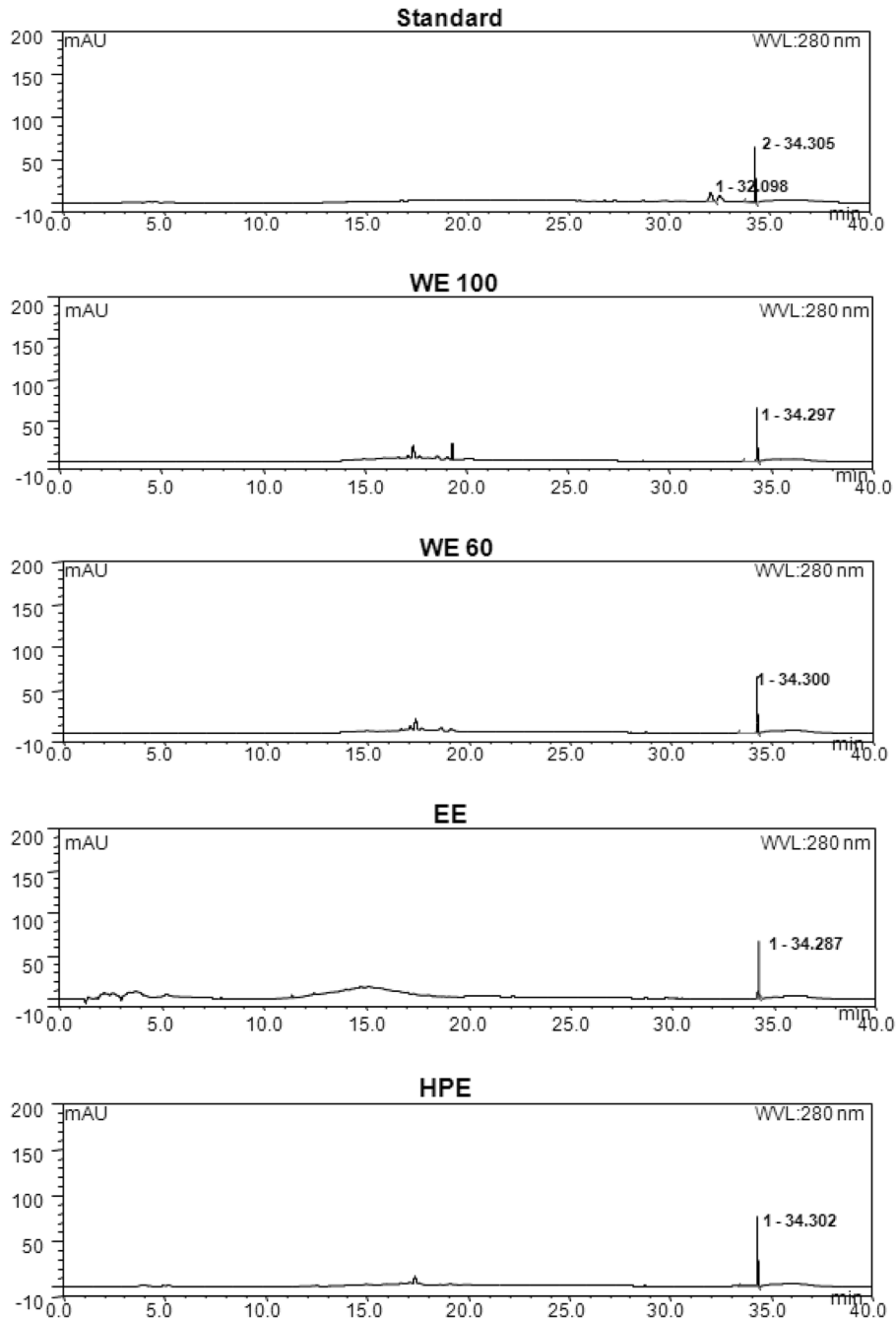


Fig. 4. Comparison of activity from the extracts of *L. erythrorhizon* and shikonin by using HPLC. WE100: water extraction for 24 hours at 100°C. WE60: water extraction for 24 hours at 60°C. EE: 70% ethyl alcohol extraction for 24 hours at 80°C. HPE: high pressure extraction for 30 minutes at 500 MPa with 70% ethyl alcohol solvent and extraction for 3 hours at 60°C.

유도체들보다 초고압 공정의 500 MPa에 높은 압력을 통해 높은 에너지를 가했을 때 지치 세포벽의 견고함과 조직의 단단함으로 인해 용출되어 나오지 못하던 지치의 수용성 shikonin 유도체 등의 생리활성을 가지는 유용 물질이 더 많이 용출되어 보다 높은 항암 활성을 나타내었다고 사료되며 (Kim et

al. 2008), 이처럼 초고압 공정 추출물의 높은 항암 활성은 기존의 추출 공정에서 용출되지 않았던 수용성 shikonin 유도체들의 용출량이 증가하고, 이를 통한 항암 활성의 증진이 이루어졌다고 판단 할 수 있다. 따라서 지치를 통한 생리 활성 연구와 항암 활성을 나타내는 성분의 작용기작에 대한 추가적인

연구가 필요할 것으로 사료된다.

항암 활성 측정과 HPLC 분석을 한 결과 모든 암세포에서 초고압 공정 처리한 지치 추출물이 가장 높은 항암 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었고, 선택적 사멸도도 초고압 공정을 처리한 추출물에서 가장 높은 수치가 나타났다. 또한 항암 효과가 있다고 보고된 shikonin (Sankawa *et al.*, 1977; Lee *et al.*, 2008)의 분석을 위하여 다른 공정 추출물과 초고압 공정 추출물을 비교 분석한 결과 초고압 공정에서 shikonin의 함량이 가장 높게 나왔다. 이러한 결과는 초고압 공정으로 인하여 기존의 공정보다 지치에 함유된 수용성 shikonin 유도체의 용출량이 증가하였고, 암세포에 대한 생육 억제 활성을 나타냈다고 판단된다. 따라서 초고압 공정의 추출 조건 다변화를 통하여 지치에 용출되어 나오는 성분 함량 변화에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료되며, 암에 관한 기능성 식품 또는 항암 소재의 개발에 대한 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 글

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

LITERATURE CITED

- Bai JH.** (2004). Antimicrobial effect of *Lithospermum erythrorhizon* extract on the food-borne pathogens. Korean Journal of Food Science and Technology. 36:823-827.
- Cha JY, Jeon BS, Park JW, Moon JC and Cho YS.** (2004). Effect of fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* on growth of human AGS Gastric and HCT-15 colon cancer cells. Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry. 47:202-207.
- 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.
- Dool 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. 66:1191-1208.
- Jeon YH, Choi SW and Kim MR.** (2009). Antimutagenic and cytotoxic activity of ethanol and water extracts from *Rubus coreanum*. Korean Journal of Food and Cookery Science. 25:379-386.
- Jeong HS, Han JG, Ha JH, Kim Y, Oh SH, Kim SS, Jeong MH, Choi GP, Park UY and Lee HY.** (2009). Enhancement of anticancer activities of *Ephedra sinica*, *Angelica gigas* by ultra high pressure extraction. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17:102-108.
- Jo MK and Min KJ.** (2007). Anti-microbial activities against oral microbes and growth-inhibitory effect on oral tumor cell of extracts of *Perilla* and *Mugwort*. Korean Journal of Environmental Health. 33:115-122.
- Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Bae GJ, Ahn JH, Lee HJ, Kang HY and Lee HY.** (2006). Increase effect of anticancer activities on *Rhodiola sachalinensis* A. Bor by the change of extraction process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 14:317-321.
- Kim CH, Kwon MC, Han JG, 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.
- Lee CB.** (2003). Korea Plant Picture book. HyangMoon Press. Seoul, Korea. p. 97-107.
- Lee HJ, Lee HJ, Magesh V, Nam DW, Lee EO, Ahn KS, Jung MH, Ahn KS, Kim DK, Kim JY and KIM SH.** (2008). Shikonin, acetylshikonin, and isobutyrylshikonin inhibit VEGF-induced angiogenesis and suppress tumor growth in lewis lung carcinoma-bearing Mice. Yakugaku Zasshi. 128:1681-1688.
- Lee HK, Kim JS, Kim NY, Kim MJ, Park SU and Yu CY.** (2003). Antioxidant, antimutagenicity and anticancer activities of extracts from *Cirsium japonicum* var. *Ussuriense* Kitamura. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 11:53-61.
- Lee KG, Mitchell AE and Shibamoto T.** (2000). Determination of antioxidant properties of aroma extracts from various beans. Journal of Agriculture and Food Chemistry 43:4817-4820.
- Michael CA, Domnic AS and Ahne M.** (1998). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell line using a microculture tetrazolium assay. Cancer Research. 48:589-601.
- Park HS, Min KJ, Cha CG, Song JW and Son JC.** (2007). Antimicrobial activities against oral microbes and growth-inhibitory effect on oral tumor cell by extract of *Paeonia lactiflora*. Korean Journal of Environmental Health. 33:21-29.
- Park YJ, Cho JY, Kim SH and Heo BG.** (2003). Natural dyeing of skeletonizing leaves using dyestuffs extracted from *Lithospermum erythrorhizon*. Korean of Journal Horticultural Science and Technology. 21:422-427.
- Sankawa U, Ebizuka Y, Miyazaki T, Isomura Y and Otsuka H.** (1977). Antitumor activity of shikonin and its derivatives. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 25:1392-1395.
- Sasaki K, Abe H and Yoshizaki F.** (2002). *In vitro* antifungal activity of naphthoquinone derivatives. Biological and Pharmaceutical Bulletin Science. 25:669-670.
- 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.
- Yun KJ, Kim DH, Ryu JH and Yook CS.** (1999). Studies on the constituents and their antibacterial effect of the root of *Lithospermum erythrorhizon*. Bulletin Kyung Hee Pharmaceutical Science. 27:27-31.