

초음파 병행 추출을 이용한 마황과 복분자, 당귀 분획물의 면역활성 조절 효과

김정화* · 김대호* · 유진현* · 김철희* · 권민철* · 성낙술** · 이승은** · 이현용*†

*강원대학교 바이오산업공학부, **농촌진흥청 작물과학원

Immuno-regulatory Activities of Various Fractions from *Ehpedrae Sinica* STAPF, *Rubus Coreanus* Miq. and *Angelica gigas* Nakai Extracts with Ultrasonification

Jung Hwa Kim*, Dae Ho Kim*, Jin Hyun You*, Cheol Hee Kim*, Min Chul Kwon*, Nak Sul Seong**, Seung Eun Lee***, and Hyeon Yong Lee*†

*School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

**National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea.

ABSTRACT : This study was performed to examine immuno-regulatory activities of *Ehpedrae Sinica* STAPF, *Rubus Coreanus* Miq. and *Angelica gigas* Nakai extracts in combination with ultrasonification. The extract yields of plants were the highest in the extraction system of 60 °C and 40 kHz of ultrasonification. The immune cell growth ratio of human immune B and T cells was increased compared to other fractions by the water fraction of the plants at 60 °C and 40 kHz. The water fractions of the plants at 60 °C and 40 kHz increased the specific secretion of IL-6 and TNF- α of human immune B and T cells compared to other fractions of the plants. The water fraction of *Ehpedrae Sinica* STAPF among the plants was observed to show the highest specific secretion of IL-6 and TNF- α . Also, NK-92 MI cells growth was increased in adding the water fractions of the plants at 60 °C and 40 kHz. The water fraction of *Ehpedrae Sinica* STAPF among the plants showed the highest in NK-92 MI cell growth ratio. The differentiation activity of the HL-60 cells significantly increased in adding the water fraction of *Ehpedrae Sinica* STAPF compared to other fractions of the plants. These results suggest that the water fractions of the plants in extraction system of temperature 60 °C and ultrasonification 40 kHz have marked useful immuno-stimulatory activities.

Key words : *Ehpedrae Sinica* STAPF, *Rubus Coreanus* Miq. and *Angelica gigas* Nakai immune activity, cytokine, NK cell, HL-60

서 언

생리활성이 양호하다고 보고된바 있는 여러 생약재들을 기존의 열수 추출방법으로 추출할 때 낮은 추출효율과 이로 인한 에너지 소비가 많으며 열로 인한 많은 유용성분의 파괴, 단백질의 변이, 성분의 손실, 가용성분 위주의 추출, 열에 대하여 불안정한 것 등의 단점을 드러내고 있다. 이에 반해 초음파 추출의 병행 방법은 추출공정의 효율을 높이고, 생물 활성물과 식물 성분의 용매 추출동안 초음파를 이용하는 것이 효과가 있다고 보고된 바 있다 (Toma *et al.*, 2001; Vinatoru, 2001). 특히 초음파 에너지를 추출에 이용하면 초음파 진동에 의한 공동현상 (cavitation)에 의해 매우 큰 에너지를 발생하게 된다. 또한 높은 국부온도로 인하여 주위에 위치하는 반응물 입자들의 운동에너지를 크게 하기 때문에 반응에 필요한 충분한

에너지를 얻게 되고, 초음파 에너지의 충격 효과로는 높은 압력을 유도하여 혼합 효과를 높여주게 된다 (Chung *et al.*, 2000).

마황 (*Ehpedrae Sinica* STAPF)은 마황과에 속하는 다년생 초본 혹은 초본성목으로 한방에서는 발한, 해열, 진해, 항염증의 목적으로 이용 되어온 생약으로 ephedrine, pseudoephedrine, ephedroxane, norephedrine 등을 함유하고 있으며 항염증 작용, 교감 신경흥분 작용, 이뇨 작용 등 많은 약리 작용이 보고되어 있다 (Duncan *et al.*, 1957; Dulloo *et al.*, 1991). 마황은 알카로이드 성분인 ephedrine과 pseudoephedrine의 약리 작용으로 인해 세포성 및 체액성 면역반응에 대해 억제적으로 작용하는 것으로 보고 되어졌다 (Kim *et al.*, 1991). 복분자 (*Rubi Fructus*)는 중국, 일본, 우리나라 중·남부 지방의 해발 50~1000 m 지역 산기슭 양지에 자생하는 장미과의 식물로 미성숙 열매를 건조시킨 것을 복분자라 한다 (Kim, 1997). 복분

†Corresponding author: (Phone) 033-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr

Received March 25, 2005 / Accepted July 31, 2005

자는 식용 및 약용으로 사용되고 특히 열매는 식용 및 청량 음료제로 쓰고, 복분자 딸기의 줄기로부터 2종의 flavan-3-ol과 1종의 proanthocyanidin 및 1종의 ellagitannin을 분리하였고, 또한 복분자 잎으로부터 4종의 flavonoids를 분리하여 그 구조를 밝혔다 (Lee, 1995; Lee & Lee, 1995). 복분자 추출물은 인간 면역체계에서 항체 생성에 중요한 역할을 하는 인간 B세포와 T세포주의 생육을 촉진한다고 알려져 있다 (Lee, 2003).

당귀 (*Angelica gigas* Nakai)는 미나리과 다년생초목의 뿌리를 꽃이 피기 전에 채취하여 건조한 것으로 재배되는 지역에 따라 크게 4가지 종류가 있는 것으로 알려져 있다. 당귀는 혈액을 보충시켜주는 보혈효과가 있다고 알려져 있으며, 이로 인해 빈혈이나 부인병 등에서 보혈제로 처방하는 것으로 알려져 있다. 당귀의 약리학적 작용을 나타내는 주성분은 coumarin 유도체인 decursin이라는 물질이며, 이 외에 decursinol, umbelliferon, β -sitosterol 등이 함유되어 있다. Coumarin 유도체는 과거 출혈을 막는 지혈시에 사용한 항응고제로 급성심근경색 (acute myocardial infarction) 시에 사용한 것으로 알려져 있다 (Wessler *et al.*, 1974; Ristola & Pyorala, 1972). 따라서 본 연구는 이러한 유용한 이점을 가진 초음파 병행 추출을 이용함과 동시에 극성, 비극성 용매 (water, butanol, ethyl acetate, chloroform 등)를 이용하여 얻어진 분획물들의 면역 증진활성을 탐색하고, 이러한 생리활성 검증을 통하여 이들의 면역 증진제로서의 가능성을 부여하고, 더 나아가 본 연구 자료들이 기능성 식품에 관련된 분야에 바탕 자료로서 가치를 지니게 하기 위해 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 마황과 복분자, 당귀는 경동시장에서 2003년 구입하여 상온에서 보관하면서 사용하였다. Fig. 1의 추출 공정도와 같이 각 시료를 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료증량에 대하여 각각 10배의 증류수를 추출 용매로 사용하여 40°C, 60°C, 100°C에서 추출한 후, 초음파 추출기 (Asia industry, Kor.)를 통하여 각각의 온도에서 40 kHz, 60 kHz, 130 kHz의 초음파로 30분간 초음파 추출을 병행하였다. 초음파 병행 추출로 얻어진 추출물들을 극성, 비극성 용매 (water, butanol, ethyl acetate, chloroform)를 이용하여 분획물들을 얻었고, 이렇게 얻어진 분획물들을 감압 여과장치로 여과하여 농축 후 동결 건조한 뒤에 실험에 사용하였다.

2. 시약

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Alpha minimum essential medium (α -MEM)은 GIBCO (USA)로부터 구입하였고, HEPES buffer는 SIGMA (USA)에서 구입하였다. 혈청은 GIBCO (USA)사의 fetal bovine serum과 horse serum을 이

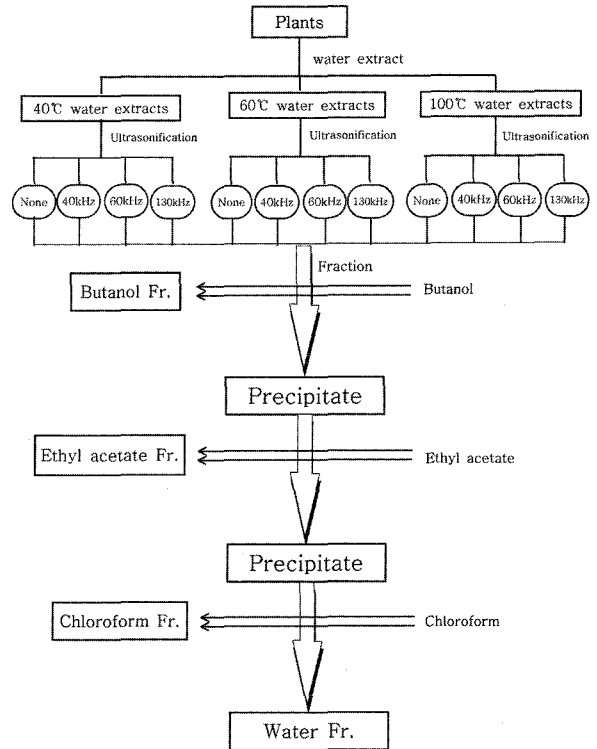


Fig. 1. Flow diagram of fractionation of Plants (*Angelica gigas* Nakai, *Rubus Coreanus* Miq., *Ehpdedrae Sinica* STAPP) by temperature (40°C, 60°C, 100°C) and ultrasonification (0, 40, 60, 130 kHz).

용하였고 gentamycin sulfate, trypsin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였다. Cyokine 측정을 위해 IL-6와 TNF- α kit는 Chemicon (USA)사의 것을 구입하여 실험에 사용하였다.

3. 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용한 세포주로 T cell (Jurkat, ATTC, USA)과 B cell (Raji, ATTC, USA)을 이용하여 면역세포 생육 증진 효과를 검토하였고, NK cell (NK-92MI cell, ATTC, USA)의 활성을 측정하였다. 인간 전과립 세포 (human promyelocytes; HL60, ATTC, USA)를 이용하여 세포 분화 정도를 측정하였다. 인간 전과립 세포는 RPMI 1640배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였고, NK-cell은 α -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 10-4M2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)을 첨가시켜 배양하였다.

4. 면역세포 생육 증진 효과 및 cytokine 분비량 측정

면역 기능 증강 효과는 인간 면역 세포인 T cell과 B cell을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 24 well plate에 세포를 1.0×10⁴ cells/ml의 농도로 심고 시료를 투여하여 8일 동안 배양하면서

매일매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포 수를 측정하여 생육 증강도를 측정하는 방법으로 control에 대한 증식률로 계산하였다 (Lee *et al.*, 2002).

Cytokine은 IL-6와 TNF- α 의 정량을 IL-6와 TNF- α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 $1\sim 2\times 10^4$ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 $900\ \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C , 5% CO_2)시킨 후 시료의 최종농도를 $1.0\ \text{g/l}$ 로 $100\ \mu\text{l}$ 씩 첨가하여 다시 5일 동안 배양 (37°C , 5% CO_2)

하였다. 배양매지를 원심분리기를 이용하여 상층액을 취한 다음 $450\ \text{nm}$ 에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Oh, 1991; Han *et al.*, 1998).

5. NK-cell의 면역증진 효과

인간 T세포와 B세포를 T-25 Flask에 배양하면서 시료를 투

Table 1. The fraction yield of the water extract with various ultrasonification and temperature conditions

Sample	Temp. ($^\circ\text{C}$)	Ultrasonification (kHz)	Yield (%. w/w)			
			Fraction solvents			
			Chloroform Fr.	Ethyl acetate Fr.	Butanol Fr.	Water Fr.
<i>Angelica gigas</i>	40	0	0.85	1.36	17.68	40.83
		40	1.84	1.98	18.94	45.68
		60	1.32	2.06	21.58	46.28
		130	1.63	2.24	22.68	45.86
	60	0	1.08	1.36	17.68	43.34
		40	0.94	1.34	21.58	50.17
		60	1.43	2.23	20.52	46.38
		130	1.21	2.03	19.73	48.68
	100	0	1.19	1.88	20.38	45.36
		40	1.36	2.12	22.64	46.28
		60	1.23	2.64	19.67	44.39
		130	1.47	2.93	23.67	46.39
<i>Ephedra sinica</i>	40	0	1.05	2.19	20.13	45.09
		40	1.33	2.86	24.36	48.69
		60	1.49	2.64	24.02	51.39
		130	1.67	2.58	23.64	50.46
	60	0	1.12	2.32	20.48	46.68
		40	1.61	2.84	24.32	55.63
		60	1.75	2.73	22.68	51.25
		130	1.56	2.06	20.64	50.38
	100	0	1.38	2.34	21.55	48.67
		40	1.24	2.56	22.34	50.39
		60	1.43	2.63	21.68	51.78
		130	1.34	2.57	20.48	49.68
<i>Rubus coreanus</i>	40	0	1.86	3.64	17.58	49.38
		40	2.28	4.86	20.89	53.92
		60	2.07	4.65	20.04	52.04
		130	2.32	3.78	19.02	51.64
	60	0	2.48	4.22	18.06	50.08
		40	2.56	4.58	19.06	59.63
		60	2.14	4.28	20.68	54.58
		130	2.87	4.04	19.28	55.68
	100	0	1.99	3.86	19.88	51.39
		40	2.31	4.56	20.02	53.68
		60	2.46	4.27	19.32	50.48
		130	2.18	4.02	21.24	53.92

여한 후 증식정도를 관찰하면서 3~4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-cell을 24well plate에 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 900 μ l씩 분주하고 24시간 후 T세포와 B세포의 상층액을 각 plate에 100 μ l씩 투여하여 48시간 동안 배양한 후 6일동안 NK-cell의 생육도는 cell counter를 이용하여 생세포수를 이용하여 NK-cell의 생육 증진 효과를 측정한다. 이것은 T세포와 B세포에서 분비하는 cytokine인 IL-6와 TNF- α 의 영향을 받아 NK-cell의 생육도를 측정하기 위한 방법이다 (Yueran *et al.*, 2003; Limdbolum, 2002).

6. 세포의 분화도 측정

인간 전과립 세포인 HL60을 이용하여 세포분화 중 단핵구 세포 분화 단계의 검정을 위한 acid phosphatase의 활성도를 측정하였다. 이것은 단핵구의 정량적인 수치를 측정하기 위한 방법으로 세포의 농도가 $4\sim 5 \times 10^4$ cells/ml로 포함된 배지를 24 well plate에 900 μ l씩 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. Sample을 농도별로 100 μ l씩 첨가하여 24시간 다시 배양하였다. 이것을 24시간 간격으로 배양하면서 배지를 pipetting하여 15 ml C-Tube에 옮겨 320 \times g에서 10분간 원심분리 하였다. 배지를 제거한 후 0.1% Triton x-100을 200 μ l씩 첨가한 후 incubator에서 30분간 용해하였다. 용해된 solution 20 μ l를 96 well plate에 옮긴 후 3 mg/ μ l의 4-nitrophenyl phosphate가 든 50 mM acetate buffer (pH 5.0)를 100 μ l씩 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰으며 반응 정지를 위해 0.1N NaOH 100 μ l를 첨가한 후 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(Yen & Guernsey, 1986; Bang *et al.*, 1993).

결과 및 고찰

1. 추출 수율

Table 1에서 나타난 결과로 복분자 (*Rubus Coreanus* Miq.)

water 분획층 수율이 59.63%로 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 butanol 분획층과 ethyl acetate 분획층, chloroform 분획층의 순서로 각각 19.06%, 4.58%, 2.56%로 나타났다. 마황, 당귀 water 분획층의 수율은 각각 55.63%와 50.17%로 나타나 water 분획층의 수율이 가장 높게 나타났으며, butanol 분획층, ethyl acetate 분획층, chloroform 분획층의 순서로 나타난 것을 확인 할 수 있었다. 이것의 결과로는 온도가 60 $^{\circ}$ C, 40 kHz의 초음파일 때 최대의 생산성을 나타내는 것으로 나타났다. 이러한 추출 공정과 수율이 높게 나타난 분획물을 이용하여 실험에 이용하였고, 온도와 초음파 주파수를 달리하여 비교한 실험도 실시하였다.

2. 면역세포 생육 증진 효과

Table 2에서는 당귀와 복분자, 마황을 이용한 면역세포의 활성 증진 실험 결과를 나타내었다. 이것은 각 공정별로 얻어진 분획물을 이용하여 면역 활성도를 실험하여 최적의 추출 조건을 확립하기 위한 실험으로서, T 세포와 B 세포에 대한 활성이 가장 높은 추출 조건으로는 온도가 60 $^{\circ}$ C와 40 kHz의 초음파를 병행 추출하였을 때 면역 활성도가 가장 높게 나타났다. 그 중 당귀 water 분획층에서 184.9%, 171.5%로 butanol 분획의 173.4%, 165.3%보다 높은 면역 활성도를 나타내었고, ethyl acetate나 chloroform 분획물보다 더 높은 활성도를 나타내어, water의 분획층에서 가장 높은 면역 활성도를 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 복분자와 마황의 결과 또한 당귀와 유사한 결과를 관찰할 수 있었다. 여기서 알 수 있듯이 생체 방어 기능의 하나인 면역 세포들의 활성도에서는 온도가 60 $^{\circ}$ C에서 40 kHz의 초음파를 병행 추출하여 이것의 water 분획물일 때 가장 좋은 생체 방어 기능을 나타낸 것을 확인 할 수 있었다.

Table 2. Effect on human B and T cell growth of each fraction from plants water extracts extracted with various condition

Sample	Temp. ($^{\circ}$ C)	Ultrasonification (kHz)	Activation compared to control (%)							
			Chloroform Fr.		Ethyl acetate Fr.		Butanol Fr.		Water Fr.	
			B cell	T cell	B cell	T cell	B cell	T cell	B cell	T cell
<i>Angelica gigas</i>	40	0	122.4	123.8	128.6	130.3	135.1	139.7	139.4	149.3
		40	137.6	140.6	140.5	143.1	149.6	155.6	155.9	165.8
	60	0	128.7	130.6	132.6	137.8	139.8	150.2	145.1	159.9
		40	140.4	143.9	143.5	148.8	165.3	173.4	171.5	184.9
<i>Ehpedra sinica</i>	40	0	115.6	132.4	125.5	141.1	130.5	147.2	140.4	152.3
		40	133.3	145.8	141.4	150.7	148.2	155.4	157.1	166.3
	60	0	125.8	137.9	131.2	142.5	140.3	148.8	148.3	160.3
		40	155.7	160.3	161.8	169.5	165.3	171.3	174.5	180.1
<i>Rubus coreanus</i>	40	0	111.3	120.5	115.4	131.3	120.8	135.7	129.6	141.3
		40	127.2	138.9	134.8	142.8	140.3	147.9	148.6	152.3
	60	0	115.7	130.3	119.6	137.9	125.7	142.4	133.6	149.9
		40	147.6	154.8	150.3	158.4	152.5	160.3	163.6	166.7

3. Cytokine 분비 증진 효과

Cytokines 분비량은 면역 세포에 대한 활성 실험에서 효과가 가장 높게 나타났던 추출공정인 60°C의 40 kHz 초음파 병

행 추출물의 water 분획층과 butanol 분획층을 이용하여 분획물 실험을 행하였다. Fig. 2는 B세포에서의 IL-6 분비량에 대한 당귀와 미황, 복분자 분획물의 증진효과를 측정 한 것으로,

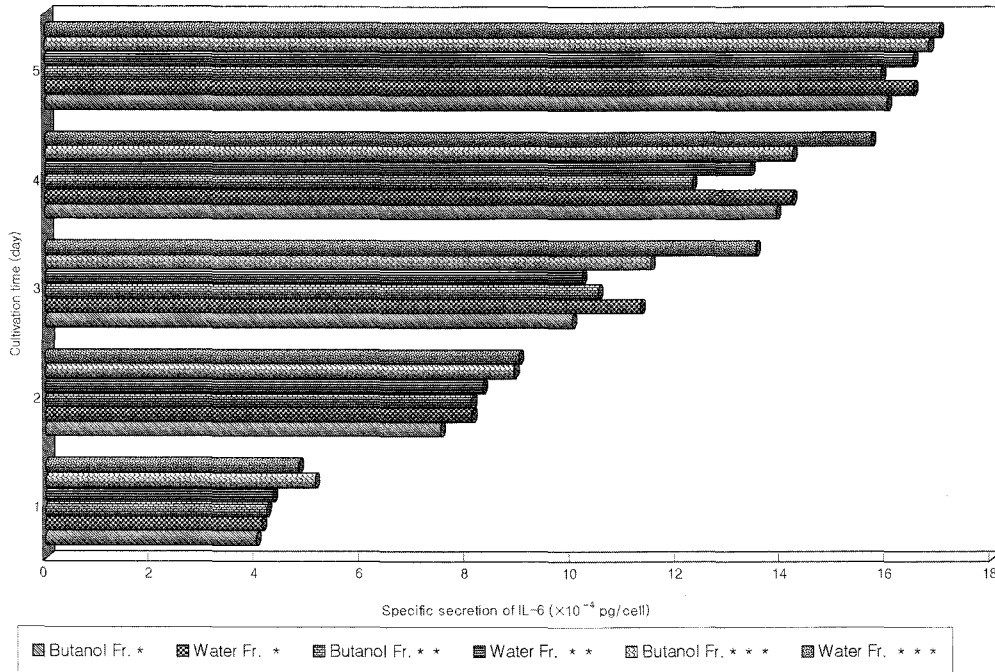


Fig. 2. Enhancement of cytokine IL-6 secretion from human B cells by water and butanol fractions of plants water extracts. The cells were incubated for 1 to 5 day with 1.0 mg/ml of each fraction, which was extracted at 60°C and by 40 kHz ultrasonification (*Angelicae gigantis Radix*, *Ehpedrae Sinica* and *Rubus Coreanus*).

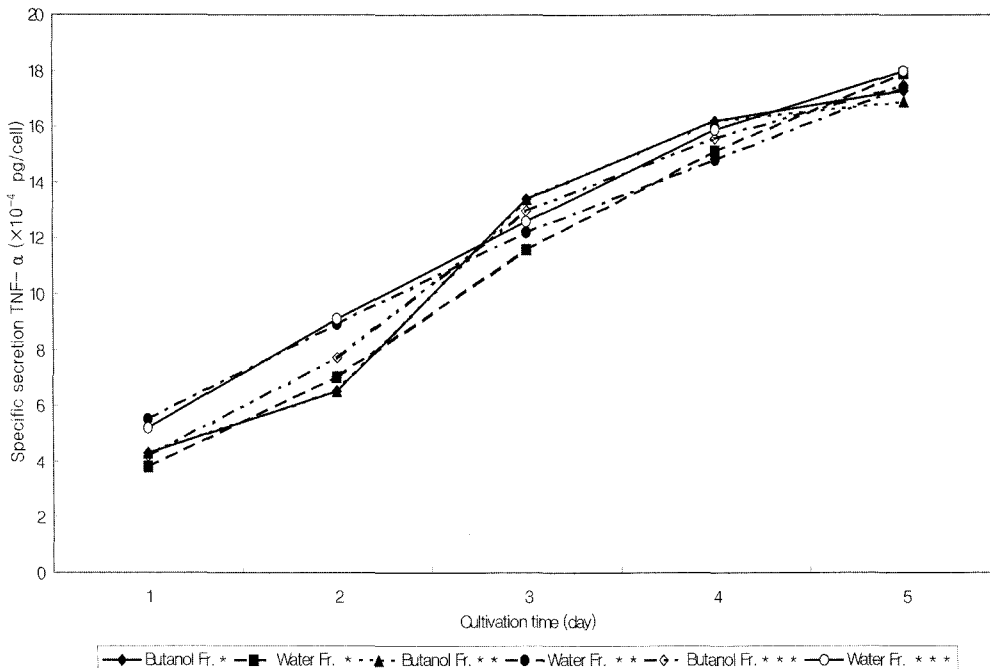


Fig. 3. Enhancement of cytokine TNF-α secretion from human B cells by water and butanol fractions of plants water extracts. The cells were incubated for 1 to 5 day with 1.0 mg/ml of each fraction, which was extracted at 60°C and by 40 kHz ultrasonification (*Angelicae gigantis Radix*, *Ehpedrae Sinica* and *Rubus Coreanus*).

복분자 water 분획층이 1.0 g/l에서 17×10^{-4} pg/cell로 가장 높은 증진 효과를 나타내었으며, butanol 분획층이 16.8×10^{-4} pg/cell의 증진효과를 보였고, 마황과 당귀 water 분획층이 각각 16.5×10^{-4} pg/cell, 16.5×10^{-4} pg/cell의 증진효과를 보였다.

Fig. 3은 B 세포에서의 TNF- α 분비량을 측정하는 것으로 복분자 water 분획층이 1.0 g/l에서 18×10^{-4} pg/cell로 가장 증진 효과가 크게 나타났으며, butanol 분획층이 17.5×10^{-4} pg/cell

로 cytokine 분비 증가량을 나타냈다. Fig. 4~5에서는 당귀와 마황, 복분자의 추출공정 요인인 온도와, 초음파를 달리하여 그것의 분획물인 water 분획층과 butanol 분획층에 대한 T 세포에서의 cytokine 분비량을 측정하는 것이다.

Fig. 4에서 온도를 달리한 추출공정에서의 IL-6 분비량을 측정하는 결과 60°C에서 복분자가 18.5×10^{-4} pg/cell의 가장 효과적인 분비 증가를 나타내었으며, 40°C에서는 17.9×10^{-4} pg/cell

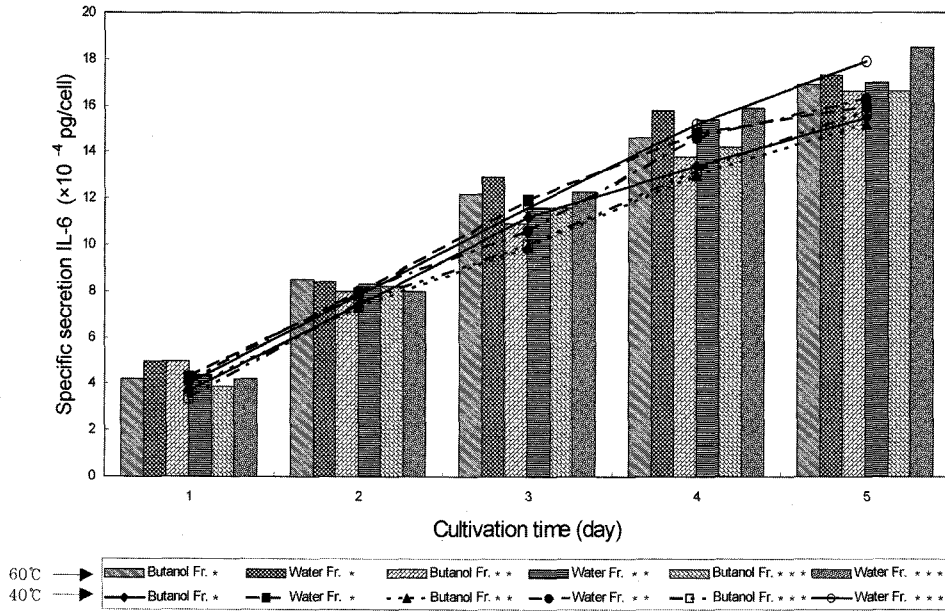


Fig. 4. Enhancement of cytokine IL-6 secretion from human T cells by water and butanol fractions of plants water extracts. The cells were incubated for 1 to 5 day with 1.0 mg/ml of each fraction, which was extracted at 40°C, 60°C and by 40kHz ultrasonification (*Angelicae gigantis Radix*, *Ehpedrae Sinica* and *Rubus Coreanus*).

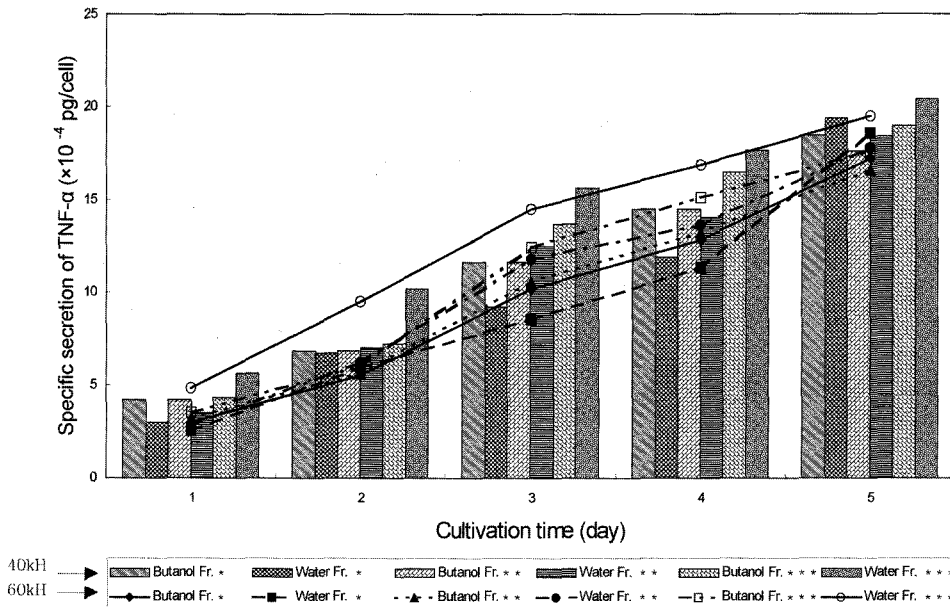


Fig. 5. Enhancement of cytokine TNF- α secretion from human T cells by water and butanol fractions of plants water extracts. The cells were incubated for 1 to 5 day with 1.0 mg/ml of each fraction, which was extracted at 60°C and by 40kHz, 60kHz ultrasonification (*Angelicae gigantis Radix*, *Ehpedrae Sinica* and *Rubus Coreanus*).

로 나타났다. 다른 작물인 마황과 당귀 또한 60°C로 추출하였을 때, 각각 1.08배, 1.04배 높은 분비량을 나타내었다. 이것으로 60°C의 온도에서 추출하였을 때, 생체 방어 기능 효과가 우수한 것으로 나타났다. Fig. 5에서는 초음파의 주파수의 변화를 주어 추출한 것으로 T세포의 TNF- α 의 분비량을 측정하였다. 40 kHz의 초음파 병행 추출한 복분자 water 분획층이 1.0 g/l 농도에서 20.4×10^{-4} pg/cell로 60 kHz로 병행 추출한 복분자 water 분획층의 19.5×10^{-4} pg/cell보다 높은 분비량을 나타내었다. 당귀와 마황에서도 40 kHz의 초음파로 병행 추출한 것이 더 높은 분비량을 나타낸 것을 확인 할 수 있었다. 이것으로 40 kHz의 초음파로 병행 추출하는 것이 생산성 향상이나 생체 방어 기능에 있어서 다른 추출 공정보다 더 좋은 결과를 나타내며, 따라서 이러한 공정을 이용하여 추출하는 것이 가장 경제적인 것으로 사료된다.

4. NK-cell의 면역증진 효과

NK-cell에 대하여 인간 면역세포인 B, T cell을 이용 이 세포들이 분비하는 IL-2를 비롯한 여러 가지 cytokine이 생약재의 분획물 투여로 cytokine 분비량의 증가에 따른 NK-cell의 생육 증진 효과가 초음파 병행 추출물에 비해 얼마나 더 증가되는지를 관찰하였다. 이전에 확인했던 실험들에서와 마찬가지로 그 결과가 좋았던 water 분획층과 butanol 분획층을 가지고 그 결과를 관찰하여본 결과를 Fig. 6과 Table 3에 나타내었다. Fig. 6은 B세포에 의한 NK-cell의 생육도 증가율을 나타낸 것으로 복분자 water 분획층은 1.0 g/l의 농도에서 배양 6일째 날 91%의 활성증진을 나타내었고, butanol 분획층은

82%의 증진을 나타내 control의 31%에 비해 각 2.94배, 2.65배 증가한 것으로 나타났으며, 당귀 water 분획층과 butanol 분획층에서 각 84%와 80%의 활성 증진을 나타내 control에 비해 각각 2.71배, 2.58배 증진효과를 나타낸 것을 확인 할 수 있었다. cell density를 측정된 결과 복분자 water 분획층을 첨가했을 때 가장 높은 NK-cell의 세포 생육도를 나타내었으며, 배양 6일째 1.0 g/l의 농도에서 17.3×10^2 cells/ml의 생육도를 나타내 control 6×10^2 cells/ml에 비해 2.88배 증가한 것으로 높은 생육 증진도를 나타내었고, 마찬가지로 당귀 분획물도 control에 비해 water 분획층에 의해 2.65배의 NK-cell 생육 증진도를 나타내 아주 높은 생육 증진도를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 3은 T세포에 의한 NK-cell의 활성도를 공정 요인 별로 나타낸 것으로 공정 요인으로는 초음파 병행의 유무와 온도의 변화를 이용하였다. 가장 좋은 활성 촉진 효과를 나타낸 것으로는 60°C에서 40 kHz의 초음파로 병행 추출한 복분자 water 분획층이며, 이 추출물 1.0 g/l를 가하여 배양한 T cell 상층액을 가하였을 때 NK-cell은 배양 6일째 97%, butanol 분획층은 93%의 활성증진을 보여 초음파 병행 추출하지 않은것과 다른 온도 조건에 비해 높은 생육 활성 촉진 효과를 나타내었다. 그리고 당귀 분획물 또한 60°C, 40 kHz의 초음파 추출물의 water 분획층과 butanol 분획층에서 각 92%와 80%의 활성 증진을 나타내 다른 추출 공정보다 높은 활성을 나타내었다. 이것으로 알 수 있듯이 생체 방어 기능을 증진 시킬 수 있는 최적의 추출공정은 60°C에서 40 kHz의 초음파를 병행하여 추출하는 것으로 사료된다.

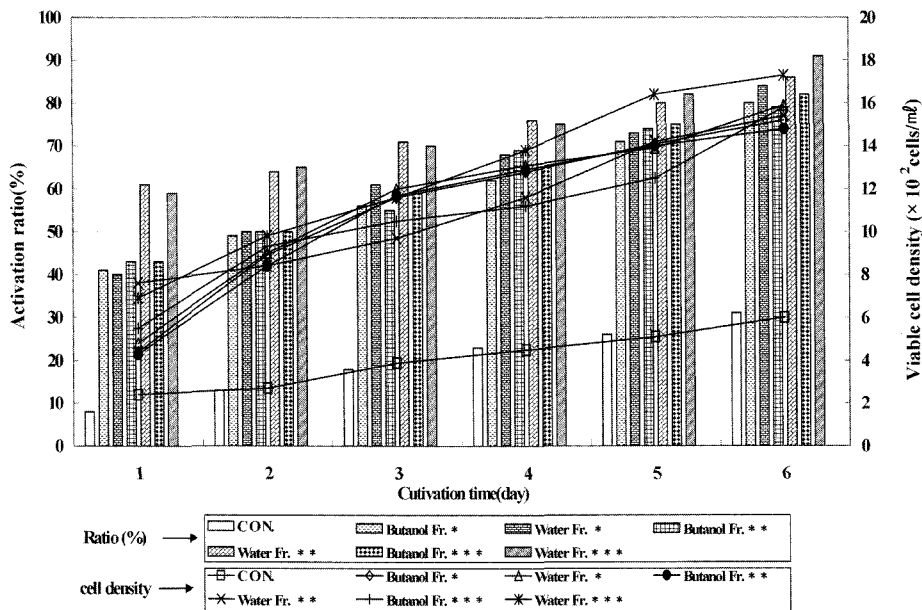


Fig. 6. Enhancement of NK cell count and density by the B cell growth medium treated with water and butanol fractions from plants water (60°C) extracts combined with ultrasonification (40 kHz).

Table 3. Effect on NK cell proliferation of T cell growth medium treated with butanol and water fractions from plants water extracts with various temperature and ultrasonification (40 kHz)

Sample	Fraction solvent	Ultrasonification (kHz)	Activation compared to control (%)		
			Temperature (°C)		
			40	60	100
<i>Angelica gigas</i>	Butanol Fr.	0	68.3	72.8	67.9
		40	76.8	80.6	70.5
	Water Fr.	0	80.6	84.7	81.3
		40	87.4	92.8	82.6
<i>Ehpedra sinica</i>	Butanol Fr.	0	74.9	80.5	72.5
		40	82.5	88.3	78.9
	Water Fr.	0	79.4	85.4	80.8
		40	88.7	91.4	83.6
<i>Rubus coreanus</i>	Butanol Fr.	0	80.7	83.8	78.8
		40	86.8	93.5	82.5
	Water Fr.	0	85.6	88.5	82.8
		40	90.6	97.2	88.3

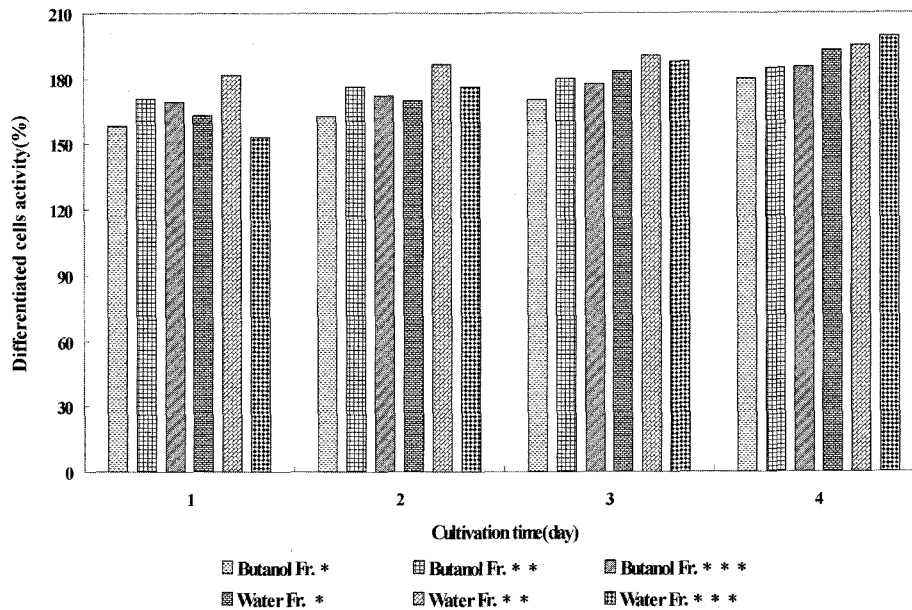


Fig. 7. Effect on HL-60 cells differentiation of the water and butanol fractions of plants water extracts extracted in 60°C and 40 kHz ultrasonification condition.

5. 세포 분화도 증진 효과

세포 분화활성도의 측정 결과는 Fig. 7에서 확인할 수 있듯이 모든 분획물이 높은 세포 분화 활성도를 나타내는 것을 관찰할 수 있다. 그 중 복분자 water 분획층이 가장 높은 세포 분화 활성도를 나타냈다. 또한 복분자와 마황의 분획물이 crude 상태의 초음파 병행 추출물에 비해 최고 20% 이상의 분화 활성도를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 이것은 분획으로 인해 초음파를 병행한 추출물들보다 분화유도 물질의 증가와 이로 인한 세포의 신호전달 체계가 신속하게 이루어져 분화도가 증가한 것으로 사료되어진다.

적 요

당귀, 복분자, 마황의 추출공정 요인별 [추출온도 (40°C, 60°C, 100°C), 초음파 병행 (처리조건 : 초음파별) 추출]에 따른 추출물들의 분획물들의 추출수율 증진 및 생산성 향상이 가능한 공정 개발을 위하여 공정 요인에 따라 추출과 분획을 실시하였다. 그 중 모든 분획 추출물 들 중에서 60°C 온도에서 40 kHz의 초음파 병행 추출한 복분자 water 분획층 수율이 59.63%로 다른 추출 공정에 비하여 가장 높게 나타났으며, 당귀 water 분획층의 수율은 50.17%로 나타나 water 분획층의

수율이 가장 높게 나타났으며, butanol, ethyl acetate, chloroform 분획층의 순서로 수율이 나타난 것을 확인 할 수 있었다. 이것으로 60°C의 40 kHz 초음파 병행 추출 공정이 생산성이 가장 우수한 것으로 나타났다. 면역활성 증진 효과에서 인간의 면역세포인 B, T 세포에 대한 생육 활성도를 각 공정별 추출물을 이용하여 측정된 결과 60°C의 40 kHz의 초음파 병행 추출물의 water 분획물에서 180% 이상의 높은 생육 활성도를 나타내었고, butanol 분획물에서는 160% 이상의 높은 생육 활성도를 나타내었다.

Cytokines 분비량은 면역 세포에 대한 활성 실험에서 효과가 가장 높게 나타났던 추출공정인 60°C의 40 kHz 초음파 병행 추출물의 water 분획층과 butanol 분획층을 이용하여 분획물 실험을 행하였다. B세포에서의 IL-6 분비량에 복분자 water 분획층이 1.0 g/l에서 5일째 17×10^{-4} pg/cell로 가장 높은 증진 효과를 나타내었으며, butanol 분획층이 16.8×10^{-4} pg/cell의 증진효과를 보였고, 마황과 당귀 water 분획층이 각각 16.5×10^{-4} pg/cell, 16.5×10^{-4} pg/cell의 증진효과를 보였다. B세포에서의 TNF- α 분비량은 복분자 water 분획층이 1.0 g/l에서 5일째 18×10^{-4} pg/cell로 가장 증진 효과가 크게 나타났다. 이것은 세포의 생육이 시간에 따라 증가됨으로서 그에 따른 cytokines의 분비량도 시간에 따라 증가하는 것으로 사료된다.

추출공정 요인인 온도와, 초음파를 달리하여 그것의 분획물인 water 분획층과 butanol 분획층에 대한 T 세포에서의 cytokine 분비량을 측정한 결과 온도의 변화를 준 추출공정에서의 IL-6분비량은 60°C에서 가장 좋은 분비량을 나타낸 것으로 복분자가 18.5×10^{-4} pg/cell로 가장 높은 증진 효과를 나타내었다. 마황과 당귀 또한 60°C로 추출하였을 때, 1.08배, 1.04배 높은 분비량을 나타내었다. 또한 초음파의 주파수의 변화를 주어 추출한 것으로 T세포의 TNF- α 의 분비량을 측정된 결과 40 kHz의 초음파 병행 추출한 복분자 water 분획층이 1.0 g/l 농도에서 20.4×10^{-4} pg/cell로 60 kHz로 병행 추출한 복분자 water 분획층의 19.5×10^{-4} pg/cell보다 높은 분비량을 나타내었다. 당귀와 마황에서도 40 kHz의 초음파로 병행 추출한 것이 더 높은 분비량을 나타내었다.

NK-cell의 활성도를 공정 요인별로 측정된 결과 가장 좋은 활성도를 나타낸 것으로는 60°C에서 40 kHz의 초음파로 병행 추출한 복분자 water 분획층 이 배양 6일째 날 1.0 g/l의 농도에서 97%, butanol 분획층은 93%의 활성증진을 보여 초음파 병행 추출하지 않은 것과 다른 온도 조건에 비해 높은 생육 활성도를 나타내었다. 그리고 당귀 분획물 또한 60°C, 40 kHz의 초음파 추출물의 water 분획층과 butanol 분획층에서 각 92%와 80%의 활성 증진을 나타내 다른 추출 공정보다 높은 활성을 나타내었다. 이것으로 알 수 있듯이 생체 방어 기능을 증진 시킬 수 있는 최적의 추출공정으로는 60°C에서 40 kHz의 초음파를 병행하여 추출하는 것으로 사료된다.

세포 분화활성도의 측정 결과는 복분자 water 분획층이 가장 높은 세포 분화 활성도를 나타내었고, 또한 복분자와 마황의 분획물이 crude 상태의 초음파 병행 추출물에 비해 최고 20% 이상의 분화 활성도를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오 그린 21 연구 지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

LITERATURE CITED

- Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason TJ (2001) Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochem.* 8:137-142.
- Vinatoru M (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochem.* 8:303-313.
- Chung K, Kim WI, Hong IK, Park KA (2000) Ultrasonic energy effects on squalene extraction from amaranth seed. *Applied Chemistry.* 4(2):149-152.
- Ducan PE, Griffin JP, Solomon SS (1957) Bronchodilator drug efficacy via cyclic AMP. *Thorax.* 30(2):192-196.
- Dullo AG, Seydoux J, Girardier L (1991) Periphdral mechanism of thermo-genesis induced by ephedrine and caffeine in brown adipose tissue. *Int. J. Obes.* 15(5):317-326.
- Kim TH, Yang KS, Hwang EZ, Park SB (1991) Effect of *Ephedrae Herb* on the immune response in mice. *Kor. J. Pharmacogn.* 22(3):183-191.
- Kim TJ (1997) *Korean resources plants.* Seoul University Republished. Seoul, 282.
- Lee MW (1995) Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. *Korean J. Pharmacogn.* 39:200-204.
- Lee YA, Lee MW (1995) Tannins from *Rubus coreanum*. *Korean J. Pharmacogn.* 6:27-30.
- Lee MK, Lee HS, Choi GP, Oh DH, Kim JD, Yu CY, Lee HY (2003) Screening of biological activities of the extracts from *Rubi Fructus*. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 11(1):5-12.
- Wessler S, Kleiger RE, Cornfield J, Teitelbaum SL (1974) Coumarin therapy in acute myocardial infarction. A Hobson's choice. *Arch. Intern. Med.* 134:774-779.
- Ristola P, Pyorala K (1972) Determinants of the reponse to coumarin anticoagulants in patients with acute myocardial infarction. *Ata. Med. Scand.* 192:183-188.
- Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY (2002) Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 10:109-115.
- Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo, ES, Baik KU (1998) Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- α production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji.* 42(3):296-301.
- Yueran Z, Rui S, You L, Chunyi G, Zhigang T (2003)

- Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300:247-252.
- Limdbolum CK** (2002) IL-2 receptor signaling through the Shb adapter protein in T and NK cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296:929-936.
- Yen Y, Guernsey DL** (1986) Increased c-myc RNA levels associated with the precommitment state during HL-60 myeloid differentiation. *Cancer Res.* 46:4156-4161.
- Bang OS, Lee YS, Kang SS** (1993) A possible role of fibronectin on the differentiation of monocyte to macrophage. *Korean J. Zool.* 36:514-521.
- 오오진** (1991) 쇠비름이 세포성 및 체액성 면역반응에 끼치는 영향. 숙명여자대학교 대학원 석사학위논문