

## 고로쇠와 우산고로쇠 나무의 부위별 항암 및 면역조절능 비교

Syed Abdul Qadir\* · 김철희\* · 권민철\* · 이학주\*\* · 강하영\*\* · 최돈하\*\* · 이현용\* · \*\*\*\*†

\*강원대학교 BT특성화학부대학, \*\*국립산림과학원, \*\*\*강원대학교 생명공학연구소

## Comparison of Anticancer and Immuno-Modulatory Activities in the different parts of the *Acer mono* Max. and *Acer okamotoanum*

Syed Abdul Qadir\*, Cheol Hee Kim\*, Min Chul Kwon\*,  
Hak Ju Lee\*\*, Ha Young Kang\*\*, Don Ha Choi\*\*, and Hyeon Yong Lee\* \*\*\*\*†

\*College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

\*\*Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea.

\*\*\*Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

**ABSTRACT :** This study was performed to investigate anticancer activities and immuno modulatory activities in the several parts of the *A. mono* and *A. okamotoanum*. The cytotoxicity of 1 mg/ml of the water extracts on normal human lung cell (HEL299) was < 19.5%. The anticancer activity of all extracts were increased in over 55% against AGS (stomach adenocarcinoma), A549 (lung adenocarcinoma), Hep3B (liver adenocarcinoma, and MCF-7 (breast adenocarcinoma) cells. The growth of human immune B and T cells was improved of *A. mono* and *A. okamotoanum* in adding 1.0 mg/ml concentration. The secretion of the IL-6 and TNF- $\alpha$  of human immune B and T cells was increased with all extracts of *A. mono* and *A. okamotoanum*. All extracts of *A. mono* and *A. okamotoanum* increased NK cell growth. The results showed that the barks and woods extracts of *A. mono* and *A. okamotoanum* had useful biological activities. In addition, bark of *A. okamotoanum* showed the highest anticancer and immune activities.

**Key Words :** *Acer mono*, *Acer okamotoanum*, anticancer activites, immune activity, cytokine, NK cell

### 서 론

고로쇠나무 (*Acer mono* Max.)는 단풍나무과에 속하는 낙엽 교목으로 표고 100~1,800 m에 자생하며, 한국, 일본, 중국, 만주에까지 분포한다. 우리나라의 고로쇠나무는 내한성이 강하여 지리산, 백운산, 조계산 및 강원도 일대의 습한 고로쇠나무 (*Acer mono*), 붉은고로쇠나무 (*A. mono* for. *rubripes*), 우산고로쇠나무 (*A. okamotoanum*), 만주고로쇠 (*A. truncatum*), 긴고로쇠나무 (*A. mono* for. *dissectum*), 왕고로쇠나무 (*A. mono* var. *savatieri*), 산고로쇠나무 (*A. mono* var. *horizontale*), 집게고로쇠나무(*A. mono* for. *connivens*), 털고로쇠나무 (*A. mono* var. *ambiguum*) 등 9종의 품종과 변종이 생육하고 있는 것으로 알려져 있다 (Lee, 1982). 이 중 우산고로쇠는 울릉도 지역에 자생하고 있는 수종이다 (Kwon, 2003).

우리나라에서 고로쇠는 “골리수(骨利水)” 즉 뼈에 이로운 나무라는 뜻에서 유래하였다는 속설이 있다 (Ahn, 1975). 고로

쇠나무의 수액은 신라시대 화랑이 음용했다는 기록이 있으며, 최근에는 건강 음료 등 다양한 형태로 개발되어 일반인들에게 애용되면서 (농림부, 2001) 고로쇠나무가 주로 분포하는 강원도, 전라도, 경상도의 산촌에서 폭넓게 채취되고 있다. 고로쇠나무 수액을 건강음료로서 마시는 풍습은 소련, 중국, 일본 등에서도 오랜 역사를 가지고 있으며 민간약으로서는 이뇨, 변비, 위장병, 통풍, 류마티스, 관절염, 수창, 부창, 습진, 괴혈병, 신경통, 산후통 등에 효험이 있다고 하여 이들 수액 성분에 대한 관심이 높다 (Haski & Takeshita, 1973; 중국흑룡강성, 1986).

현재 고로쇠나무 수액에 관한 연구로 국내에서는 무기물과 당류 분석 (Kim, 1991), 자작나무 수액중에 칼슘, 마그네슘 분석 (윤, 1992), 수액 성분분석과 효능 (Ahn, 1975) 등을 보고하였다. 일본의 경우는 국내에 비해 비교적 폭넓은 연구가 이루어지고 있으나 우리나라와 마찬가지로 약리적 효과보다는 수액의 성분분석에 관한 것으로 일본은 자작나무의 성분에 관

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr  
Received August 13, 2007 / Accepted October 4, 2007

한 연구 (Terazawa *et al.*, 1984; Iguchi *et al.*, 1985)가 진행되었다.

우리나라는 고로쇠 나무 수액에 대한 응용의 역사도 깊고 최근에는 수액 소비량도 증가하고 있어 수액을 이용한 산업화가 시도되고 있으나 이를 뒷받침할 과학적 연구가 많지 않다 (Moon & Kwon, 2004).

백운산, 지리산 지역에서는 30~40여년 전부터 수액채취가 이루어져 왔으나, 우산고로쇠나무가 자생하고 있는 울릉도 지역에서는 2002년도 처음으로 수액채취가 허가되어 최근에서야 수액채취가 활발하게 이루어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 울릉도 자생 우산고로쇠나무와 강원도 인제군에서 자생하고 있는 고로쇠나무의 목부와 수피 부위를 이용하여 면역세포의 생육도 측정, cytokine, NK cell 등의 면역활성 측정과 암세포 억제 능력 측정을 통하여 고로쇠 및 우산고로쇠나무가 기능성 식품소재로서의 가능성을 평가하기 위해 부위별로 항암 및 면역 활성 탐색을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

고로쇠, 우산고로쇠 나무의 수피, 목부를 2006년 5월에 채취한 것을 국립산림과학원으로부터 지원받았으며, 실온에서 음건 시킨 후 분쇄기로 분말화한 후 물을 이용하여 60°C에서 12시간 2회 반복 추출하여 초음파 추출공정을 1시간 동안 병행하였고, 이 조작을 통해 얻어진 추출물을 실험에 이용하였다.

고로쇠, 우산고로쇠 나무의 수피, 목부 조추출물을 약자로 표시하였다. 고로쇠, 우산고로쇠 나무의 학명인 *Acer mono* Max.와 *Acer okamotoanum*의 M과 O를 각각 가장 앞에 표시하고, 그 뒤에 수피 (bark)는 B, 목부 (wood)는 W를 붙여 그 부위별로 표시하였다. 즉, 고로쇠나무 수피는 MB, 목부는 MW로 표시되며, 우산고로쇠 나무 수피는 OB, 목부는 OW의 약자로 나타내었다.

### 2. 시약

세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640과 Alpha minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM)은 GIBCO (USA)로부터 구입하였고, Hepes buffer는 SIGMA (USA)에서 구입하였다. 혈청은 GIBCO (USA)사의 fetal bovine serum과 horse serum을 이용하였고 gentamycin sulfate, trypsin-EDTA는 Sigma사의 것을 사용하였다.

### 3. 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주는 암세포로 인간 폐암세포인 A549 (lung adenocarcinoma, human, ATTC, USA), 인간 위암세포인 AGS (stomach adenocarcinoma, human, ATTC, USA),

인간 유방암세포인 MCF-7 (breast adenocarcinoma, human, ATTC, USA), 인간 간암세포인 Hep3B (liver adenocarcinoma, human, ATTC, USA)를 사용하였고, 시료 자체의 세포 독성을 알아보기 위한 정상세포로는 인간 정상 폐세포인 HEL299 (Human Embryonic lung, ATTC, USA)를 사용하였다. 면역세포 생육 증진 효과에 이용된 면역세포로는 T cell (Jurkat, ATTC, USA)와 B cell (Raji, ATTC, USA)을 실험에 사용하였고, NK cell 활성 측정에 이용된 세포는 NK-cell (NK-92MI cell, ATTC, USA)을 사용하였다. 실험에 사용된 암세포와 정상세포, 면역세포는 RPMI 1640 배지에 10% heating-inactivated FBS를 첨가시켜 배양하였고, NK-cell은  $\alpha$ -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 2-mercaptoethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)을 첨가시켜 배양하였다.

### 4. 정상세포 독성 및 항암활성 측정

SRB (sulforhodamine B) assay (Doll & Peto, 1981)는 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법으로 실험에 사용된 세포주로는 인간 정상 폐 세포인 HEL299을 이용하여 세포독성을 측정하였고, 항암활성은 폐암 세포 (A549), 위암세포 (AGS), 간암세포(Hep3B), 유방암 세포(MCF-7)를 이용하여 측정하였다. 실험 대상 세포의 농도를  $4-5 \times 10^4$  cells/ml 으로 96 well plate의 각 well에 100  $\mu$ l 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C 5% CO<sub>2</sub>)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml 로 100  $\mu$ l 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10% (w/v) TCA (trichloroacetic acid) 100  $\mu$ l 를 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  $\mu$ l 씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid로 4~5회 정도 세척, 건조 시킨 후에 100  $\mu$ l 의 10 mM Tris buffer를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, THERMO max, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Selectivity 측정은 SRB assay를 이용하여 정상폐세포 (HEL 299)에 대한 각 sample 농도에서 세포독성을 측정하고, SRB assay를 이용하여 각 암세포주의 생육 억제 활성을 측정된 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 selectivity를 계산한다.

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

5. 면역세포 생육 증진 효과 및 cytokine 분비량 측정

면역 기능 증강 효과는 면역 세포인 T cell (Jurkat)과 B cell (Raji)을 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 24 well plate에 세포를 1.0 × 10<sup>4</sup> cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양하면서 매일매일 각 well의 cell을 hemacytometer로 세포 수를 측정하여 생육 증강도를 측정하는 방법을 사용하였다 (Lee et al., 2002).

Cytokine은 IL-6와 TNF-α의 정량을 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF-α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 1~2 × 10<sup>4</sup> cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μl씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)시킨 후 시료의 최종농도를 0.5 mg/ml로 100 μl씩 첨가하여 다시 배양 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)하였다. 배양배지를 원심분리기를 이용하여 상층액을 취한 다음 450 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Han et al., 1998).

6. NK cell의 면역증진 효과

NK-92MI cell을 α-MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 2-mercaptomethanol, 12.5% fetal bovine serum (FBS)와 12.5% horse serum (Myelocult)에 2 × 10<sup>7</sup> cells/ml의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포와 B세포를 T-25 Flask에 배양하면서 sample을 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3-4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI cell을 24 well plate에 4~5 × 10<sup>4</sup> cell/ml로 900 μl씩 분주하고 24시간 후 T세포와 B세포의 상층액을 각 plate에 100 μl씩 투여하여 배양 48 시간 후 6일 동안 NK-92MI cell의 활성도를 cell counter를 이용하여 생세포수를 측정하여 NK-92MI cell의 활성도를 측정한다 (Yueran et al., 2003).

7. 통계처리

고로쇠, 우산고로쇠 추출물에 대한 항암 및 면역활성은 Microsoft Excel의 student t-test에 의해 유의성을 검증하였다. 또한 각 활성 실험 등에 대한 각 실험결과는 triplicate determinations에 의한 Mean ± SD로 표시했으며 각 평균치 간의 차이는 anova test에 의해 p=0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 정상세포 독성 및 항암활성

실험에 사용된 sample 농도는 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 그리고

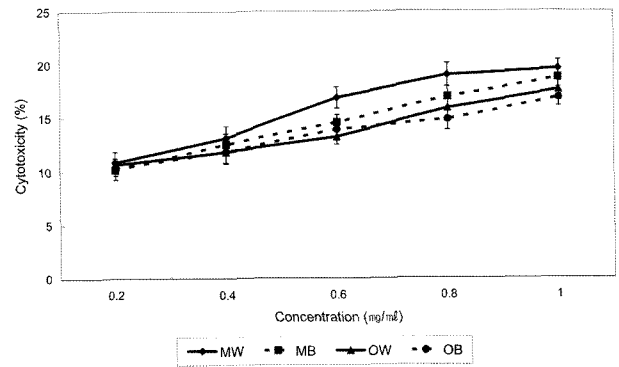


Fig. 1. Cytotoxicity of the extracts from *A. mono* and *A. okamotoanum* on normal cell line, HEL299. Mean values ± S.D. from three separate experiments are shown (MW: wood of *A. mono*, MB: bark of *A. mono*, OW: wood of *A. okamotoanum*, OB: bark of *A. okamotoanum*).

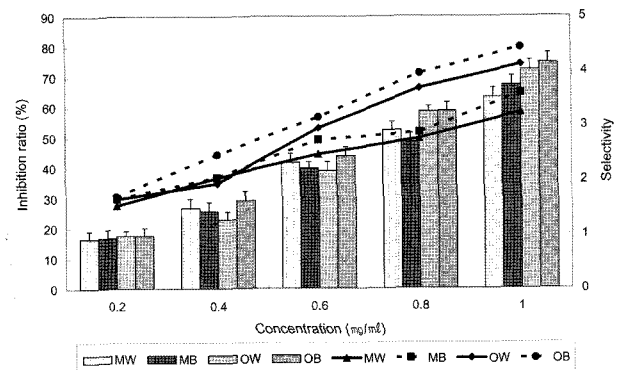
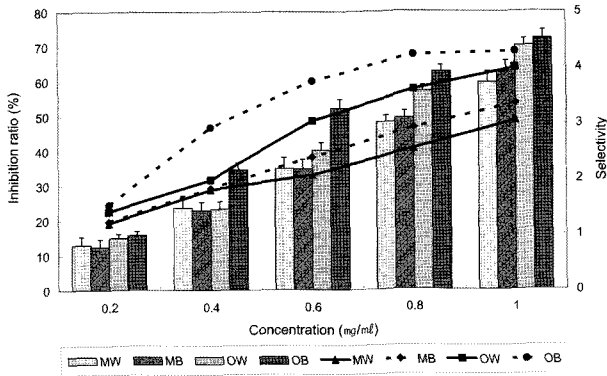


Fig. 2. Inhibition ratio of growth A549 (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts of *A. mono* and *A. okamotoanum*. Mean values ± S.D. from three separate experiments are shown (MW: wood of *A. mono*, MB: bark of *A. mono*, OW: wood of *A. okamotoanum*, OB: bark of *A. okamotoanum*).

고 1.0 mg/ml로 조절하여 정상세포에 대한 세포독성과 각 암세포에 대한 성장 효과를 검토하였다. Fig. 1은 인간 폐 세포 HEL299에 대한 세포 독성을 나타낸 것으로 sample과 표준물질 모두 최고 농도인 1.0 mg/ml에서 고로쇠나무 목부 (MW)가 가장 높은 19.5%로 가장 높은 세포 독성을 나타내었고, 우산고로쇠 나무 수피 (OB)가 가장 낮은 세포독성인 16.8%의 낮은 세포독성을 나타내었다.

Fig. 2는 인간폐암세포인 A549에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났으며, 고로쇠와 우산고로쇠 모두 목부보다 수피가 더 높은 항암 효과를 나타내었다. 선택적 사멸도는 모든 추출물에서 1~5사이로 나타났고, OB의 1.0 mg/ml의 농도에서 4.43으로 암세포에 대한 가장 높은 선택적 사멸도를 나타내었다.



**Fig. 3.** Inhibition ratio of growth AGS (bar chart, %) and selectivity (line chart) in adding the extracts of *A. mono* and *A. okamotoanum*. Mean values  $\pm$  S.D. from three separate experiments are shown (MW: wood of *A. mono*, MB: bark of *A. mono*, OW: wood of *A. okamotoanum*, OB: bark of *A. okamotoanum*).

Fig. 3은 인간위암세포인 AGS에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. 억제활성의 경우 A549와 비슷한 경향을 나타내었다. 선택적 사멸도는 모든 추출물에서 1~5 사이로 나타났고, OB의 1.0 mg/ml의 농도에서 4.28로 암세포에 대한 가장 높은 선택적 사멸도를 나타내었다.

Table 1은 유방암, 간암세포인 MCF-7, Hep3B에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도를 나타낸 것이다. MCF-7과 Hep3B의 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하였고, 고로쇠와 우산고로쇠 모두 목부보다 수피에서 각각 63.9, 60.2%로 가장 높은 항암 효과를 나타내었다. 선택적 사멸도는 모든 추출물에서 1~5사이로 나타났고, OB의 1.0 mg/ml의 농도에서 각각 3.78, 3.57로 암세포에 대한 가장 높은 선택적 사멸도를 나타내었다. 유방암세포와 간암세포에 대한 생육억제 활성에서는 앞선 암세포와 마찬가지로 억제활성의 경우 대부분의 시료에서 농도 의존적으로 증가하였고, 고로쇠와 우산고로쇠 모두 목부보다 수피가 더 높은 항암 효과를 나타내었다. 선택적 사멸도는 모든 추출물에서 1~5사이로 나타났고, OB의 1.0 mg/ml에서 4.28로 암세포에 대한 가장 높은 선택적 사멸도를 나타내었다. 또한 모든 암세포에서 고로쇠에 비해 우산고로쇠가 높은 활성을 나타내었다.

**2. 면역세포 생육 증진 효과**

인간의 면역체계에서 중요한 역할을 하는 면역세포인 B세포와 T세포에 대하여 면역증진 효과를 확인하기 위하여 면역세포의 생육 촉진 효과를 생육도를 통하여 측정하였다. B-cell 생육도의 경우 시료 부여 후 전체적으로 6일까지 최고로 증가하였다. 그 중 가장 높은 활성을 나타낸 조추출물인 OB의 경우 5일에  $7.5 \times 10^4$  cells/ml으로 시료 첨가하지 않은 대조구가  $2.8 \times 10^4$  cells/ml 보다 대략 37.3% 정도 B-cell의 생육을 더

**Table 1.** Inhibition ratio of growth MCF-7, Hep3B and selectivity in adding the extracts of *A. mono* and *A. okamotoanum*.

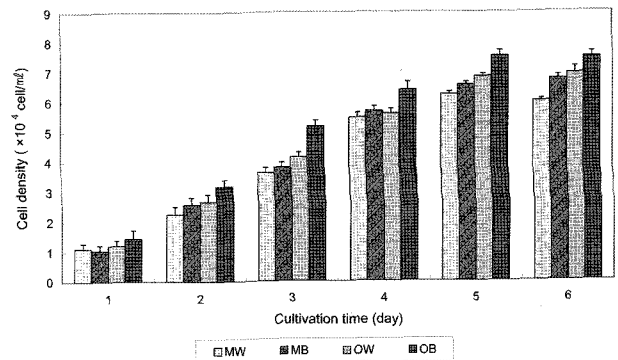
Sample	Concentration	MCF-7		Hep3B	
		Inhibition ratio	Selectivity	Inhibition ratio	Selectivity
MW <sup>1)</sup>	0.2	11.3 $\pm$ 3.2	1.06	12.6 $\pm$ 2.2	1.16
	0.4	23.7 $\pm$ 2.4	1.80	27.0 $\pm$ 2.7	2.05
	0.6	33.8 $\pm$ 2.8	2.00	38.6 $\pm$ 3.6	2.28
	0.8	48.2 $\pm$ 3.4	2.53	42.6 $\pm$ 2.5	2.24
	1.0	56.6 $\pm$ 4.1	2.89	54.2 $\pm$ 4.8	2.77
MB <sup>2)</sup>	0.2	11.8 $\pm$ 1.8	1.16	12.8 $\pm$ 2.6	1.26
	0.4	20.5 $\pm$ 3.1	1.65	21.8 $\pm$ 2.7	1.74
	0.6	36.5 $\pm$ 3.6	2.50	38.2 $\pm$ 4.9	2.57
	0.8	47.1 $\pm$ 2.8	2.78	42.3 $\pm$ 3.8	2.84
	1.0	60.5 $\pm$ 4.4	3.23	57.0 $\pm$ 5.3	3.05
OW <sup>3)</sup>	0.2	12.9 $\pm$ 3.4	1.20	13.7 $\pm$ 2.0	1.28
	0.4	27.2 $\pm$ 4.1	2.29	22.8 $\pm$ 3.1	1.93
	0.6	25.6 $\pm$ 2.8	2.69	38.2 $\pm$ 2.8	2.89
	0.8	47.9 $\pm$ 4.4	3.01	42.3 $\pm$ 5.2	3.55
	1.0	59.3 $\pm$ 3.3	3.37	56.1 $\pm$ 3.4	3.57
OB <sup>4)</sup>	0.2	13.7 $\pm$ 1.4	1.32	13.7 $\pm$ 3.8	1.32
	0.4	28.2 $\pm$ 4.2	2.38	27.4 $\pm$ 2.9	2.31
	0.6	38.7 $\pm$ 2.5	2.78	34.8 $\pm$ 3.5	2.50
	0.8	50.4 $\pm$ 2.8	3.39	52.7 $\pm$ 4.2	3.55
	1.0	63.9 $\pm$ 5.1	3.78	60.2 $\pm$ 4.9	3.57

<sup>1)</sup> MW: wood of *A. mono*

<sup>2)</sup> MB: bark of *A. mono*

<sup>3)</sup> OW: wood of *A. okamotoanum*

<sup>4)</sup> OB: bark of *A. okamotoanum*



**Fig. 4.** The cell growth of B cells by adding *A. mono* and *A. okamotoanum* extracts (0.5 mg/ml). Mean values  $\pm$  S.D. from three separate experiments are shown (MW: wood of *A. mono*, MB: bark of *A. mono*, OW: wood of *A. okamotoanum*, OB: bark of *A. okamotoanum*).

증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

T-cell 생육도의 경우 B-cell 생육도와 유사한 모습을 보여주고 있었다. 최대 생육도를 나타내는 6일째 수피의 생육도는  $8.2 \times 10^4$  cells/ml로 대조구의  $3.0 \times 10^4$  cells/ml 보다 36.5% 정

**Table 2.** The secretion of IL-6, TNF- $\alpha$  from human B·T cells in adding the water extracts of *A. mono* and *A. okamotoanum* (0.5 mg/ml).

Sample	Time (day)	Cell line			
		B cell ( $10^{-4}$ pg/ml)		T cell ( $10^{-4}$ pg/ml)	
		IL-6	TNF- $\alpha$	IL-6	TNF- $\alpha$
MW	1	0.45 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.04	0.48 $\pm$ 0.05	0.48 $\pm$ 0.03
	2	0.70 $\pm$ 0.04	0.75 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.04	0.77 $\pm$ 0.04
	3	0.78 $\pm$ 0.03	0.85 $\pm$ 0.05	0.82 $\pm$ 0.04	0.85 $\pm$ 0.06
	4	0.90 $\pm$ 0.07	1.08 $\pm$ 0.05	0.93 $\pm$ 0.08	0.97 $\pm$ 0.04
	5	1.12 $\pm$ 0.04	1.22 $\pm$ 0.07	1.13 $\pm$ 0.07	1.19 $\pm$ 0.05
	6	1.19 $\pm$ 0.05	1.26 $\pm$ 0.08	1.20 $\pm$ 0.04	1.23 $\pm$ 0.04
MB	1	0.49 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.04
	2	0.75 $\pm$ 0.03	0.77 $\pm$ 0.05	0.78 $\pm$ 0.05	0.81 $\pm$ 0.02
	3	0.83 $\pm$ 0.05	0.94 $\pm$ 0.04	0.85 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.06
	4	0.95 $\pm$ 0.04	1.08 $\pm$ 0.04	1.02 $\pm$ 0.07	1.10 $\pm$ 0.04
	5	1.25 $\pm$ 0.09	1.34 $\pm$ 0.05	1.28 $\pm$ 0.05	1.38 $\pm$ 0.08
	6	1.28 $\pm$ 0.06	1.38 $\pm$ 0.07	1.32 $\pm$ 0.06	1.40 $\pm$ 0.03
OW	1	0.45 $\pm$ 0.04	0.58 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.03
	2	0.76 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.05	0.69 $\pm$ 0.05	0.82 $\pm$ 0.05
	3	0.96 $\pm$ 0.05	0.95 $\pm$ 0.06	0.85 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.05
	4	1.13 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.04	1.10 $\pm$ 0.04
	5	1.26 $\pm$ 0.07	1.21 $\pm$ 0.02	1.15 $\pm$ 0.03	1.21 $\pm$ 0.06
	6	1.31 $\pm$ 0.04	1.32 $\pm$ 0.04	1.29 $\pm$ 0.06	1.36 $\pm$ 0.03
OB	1	0.51 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.03
	2	0.79 $\pm$ 0.05	0.84 $\pm$ 0.03	0.81 $\pm$ 0.06	0.84 $\pm$ 0.02
	3	0.99 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.04	0.95 $\pm$ 0.07	1.04 $\pm$ 0.05
	4	1.18 $\pm$ 0.03	1.15 $\pm$ 0.05	1.20 $\pm$ 0.04	1.22 $\pm$ 0.02
	5	1.30 $\pm$ 0.06	1.24 $\pm$ 0.07	1.32 $\pm$ 0.05	1.35 $\pm$ 0.04
	6	1.42 $\pm$ 0.03	1.36 $\pm$ 0.06	1.44 $\pm$ 0.07	1.48 $\pm$ 0.08

1) MW: wood of *A. mono*  
 2) MB: bark of *A. mono*  
 3) OW: wood of *A. okamotoanum*  
 4) OB: bark of *A. okamotoanum*

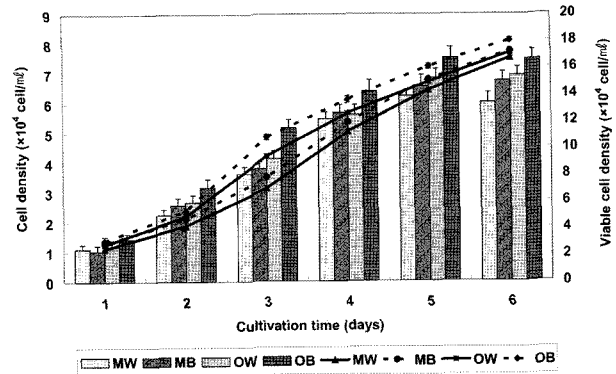
도 T-cell의 생육을 더 증가시키는 것으로 나타났다. 그리고 대부분의 다른 부위의 추출물에서 대조구에 비해 생육도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

**3. Cytokine 분비 증진 효과**

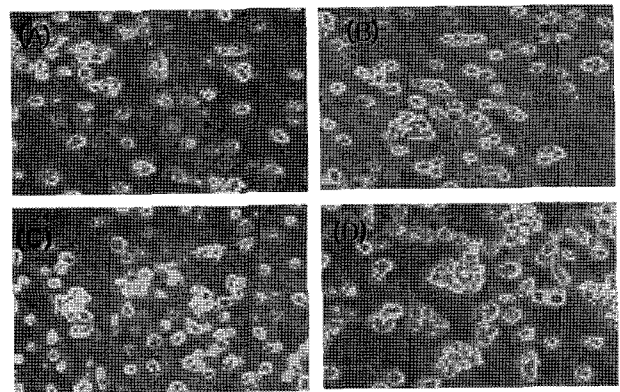
Table 2는 인간면역 세포의 생육 증강도를 뒷받침할 수 있는 자료로서 면역 세포들이 분비하는 cytokine (IL-6와 TNF- $\alpha$ )의 분비량을 B, T 세포에서 측정된 결과를 나타낸 것이다.

각 시료에 대한 세포 당 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 살펴보면, 우산고로쇠의 수피에서 B cell에서는 각각 6일째  $1.42 \times 10^4$  pg/cell,  $1.36 \times 10^4$  pg/cell로 가장 많은 분비량을 나타내었다.

각 시료에 대한 세포당 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 분비량을 살펴보면, 우산고로쇠 수피에서 B cell과 마찬가지로 가장 많은 분비량을 나타내었다. IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 각각 6일째



**Fig. 5.** The NK cell growth (bar chart) added the secretion of B cells in adding the extracts from *A. mono* and *A. okamotoanum* 0.5 mg/ml). Mean values  $\pm$  S.D. from three separate experiments are shown (MW: wood of *A. mono*, MB: bark of *A. mono*, OW: wood of *A. okamotoanum*, OB: bark of *A. okamotoanum*).



**Fig. 6.** Morphology of NK cells supplemented with the supernatant from human B cell in adding 0.5 mg/ml of *A. mono* and *A. okamotoanum* (A: wood of *A. mono*, B: bark of *A. mono*, C: wood of *A. okamotoanum*, D: bark of *A. okamotoanum*).

$1.44 \times 10^4$  pg/cell,  $1.48 \times 10^4$  pg/cell로 가장 많은 분비량을 나타내었다.

고로쇠 및 우산고로쇠 추출물의 농도와 배양일에 따라 cell의 농도증가와 cytokine 분비량의 증가를 통하여 면역활성과 관련하여 활용 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

**4. NK-cell의 면역증진 효과**

NK cell의 활성 측정은 B cell과 T cell 추출물을 첨가한 후 그의 배양액을 NK cell에 첨가함에 따른 생육도의 변화를 첨가하지 않은 control과 비교하여 활성을 측정하였다. Fig. 5는 B cell에 각 시료를 첨가하여 배양 후 그 배양액을 NK cell에 첨가하였을 때 NK cell의 활성도를 나타낸 그림이다. 6일 동안 생육도를 관찰하였는데 모든 시료에 대한 생육도가 증가하는 것을 나타내었고, 가장 좋은 활성을 나타낸 것은 우산고로쇠 수피로 6일째  $18.0 \times 10^4$  cells/ml를 나타내어  $9.5 \times$

$10^4$  cells/ml 를 나타낸 대조군에 비해 1.89배 정도의 활성을 나타낸 것을 확인하였다. 그 외에도 고로쇠 수피가  $17.2 \times 10^4$  cells/ml로 대조군과 비교하여 좋은 활성을 나타낸 것을 볼 수가 있었다.

Fig. 6은 NK cell의 생육활성도를 형광현미경을 사용하여 촬영한 사진을 나타낸 것이다. OB가 가장 많은 세포 수를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

이것은 앞에서 살펴본 면역세포의 증식에서와 마찬가지로 수피가 NK-cell의 생육활성에 가장 높은 활성을 나타내었기에 면역세포 생육활성에 영향을 미칠 수 있는 성분을 함유하고 있는 것으로 생각되어진다.

앞선 면역활성 실험을 통하여 고로쇠와 우산고로쇠 추출물에서 면역활성의 증진에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었고, 우산고로쇠는 고로쇠와 비교하여 전체적으로 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

## 적 요

인간 정상 폐세포인 HEL299을 이용한 세포 독성을 살펴본 결과, 각 추출물은 1.0 mg/ml의 농도에서 최고 19.5%의 세포 독성을 나타내었다. 또한 항암활성 효과를 살펴보기 위하여 2가지의 암세포를 이용하였는데, AGS, A549, MCF-7, Hep3B에서 수피 추출물의 경우 1.0 mg/ml의 농도에서 55% 이상의 높은 억제활성을 나타내었고, 또한 암세포의 생육활성에 대한 정상 세포의 세포독성 비로 나타낸 선택적 사멸도는 고농도에서는 모두 3이상으로 나타났다.

B cell과 T cell을 이용한 면역세포의 생육 촉진 실험에서는, BT cell은 배양 5일째 수피 추출물이 각각  $7.5 \times 10^4$  cells/ml,  $8.2 \times 10^4$  cells/ml로 가장 높은 세포농도를 나타냈다.

면역세포를 이용한 cytokine의 분비량 측정실험에서는 수피 추출물이 배양 시간에 따른 cytokine의 분비가 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 각 세포의 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 6일째 최고의 분비량을 나타내었고, 수피 추출물의 경우 대조군에 비해 7-8 배가량 정도 더 높은 분비량을 나타낸 것을 확인하였다. IL-6의 경우 6일째 최고의 분비량을 나타내었고, 수피 추출물에서 가장 높은 분비량을 나타내었다. 또한 우산고로쇠 수피 추출물을 첨가한 배지에 의한 NK cell의 면역활성을 측정하였으며, 모든 추출물에서 배양 시간에 따라 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 그 중 우산고로쇠 수피 추출물에서 B cell의 경우  $18.0 \times 10^4$  cells/ml, T cell의 경우  $17.2 \times 10^4$  cells/ml로 가장 높은 생육 활성을 나타내었다.

본 실험 결과를 통하여 고로쇠와 우산고로쇠의 기능성 소재로서의 가능성을 확인하였으며, 유용성분 분리와 생리활성에 대한 연구가 보다 다각적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 감사의 말

본 연구는 국립산림과학원의 지원으로 수행된 것으로 이에 심심한 사의를 표합니다.

## LITERATURE CITED

- Ahn WY (1975) Color index and coloring substances in Korean sugar maple, *Acer mono* Max. syrup. J. Kor. For. Res. 26:7-12.
- Dool R, Peto R (1983) The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. Food and Chemical Toxicology 21(4):512-513.
- Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES, Baik KU (1998) Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- $\alpha$  production and T cell proliferation. Yakhak Hoeji 42(3):296-301.
- Haski M, Takeshita T (1973) Hypocholesterolemic effect of wood hemicellulose on cholesterol fed rats. J. Jap. Wood Res. Soc. 19(2):101.
- Iguchi H, Terazawa M, Kayama T (1985) Conductive sap from Shira-kamba birch, *Betula platyphylla* Sukatchev var. Hara. Proceedings of the Hokkaido Bran. of the Jap Wood Res. Soc. 17:49-52.
- Kim CM, Jung DL, Sheo HJ (1991) A study on the ingredients in the sap of *Acer mono* Max. and *Betula costata* T. Mt. Jiri area. J. Korea Soc. Food Nutr. 20(5):479-482.
- Kwon SD (2003) A study on the sap of *Acer mono*, *Acer mono* for. *rubripes* and *Acer okamotoanum*. Gyeongsang Natl. Univ. PhD thesis. p. 48-54.
- 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.
- Lee TB (1982) Illustrated flora of Korea. Hyangmunsa., p. 522-524.
- Moon HS, Kwon SD (2004) Sap collection and major components of *Acer okamotoanum* Nakai native in Ullungdo. Korean J. Medicinal Crop Sci. 12(3):249-254.
- Terazawa M, Koga T, Okuyama H, Miyake M (1984) Phenolic compounds in living tissues of woods, III. Platyphylloside, a new diarylbeptanoid glucoside from the green bark of Shirakamba. *Betula platyphylla* Sucatchev var. *japonica* Hara. Mokuzaei Gakkaishi. 30(5):391-403.
- Yoon SL, Jo JS, Kim TO (1992) Utilization and tapping of the sap from Birches and Maples. Mokchae Konghak 20(4):15-20.
- 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.
- 농림부 (2001) 고로쇠나무 수액채취기술 및 조림경영관리체계 개선에 관한 연구. p. 251.
- 중국흑룡강성 경공업 과학연구소 (1986) 소흥안령 지구 백화 수액 분석결과.