

추출조건에 따른 참돌꽃의 면역 활성

김철희* · 권민철* · 한재건* · 하지혜* · 정향숙* · 최근표** · 박옥연** · 남종현***
황 백**** · 이현용*****†

*강원대학교 BT특성화학부대학, **강원도립대학 식품가공제과제빵과, ***(주)그래미,
****전남대학교 생물학과, *****강원대학교 생명공학연구소

Immune Activities of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor Extracts Isolated with Various Extraction Process

Cheol Hee Kim*, Min Chul Kwon*, Jae Gun Han*, Ji Hye Ha*, Hyang Suk Jeong*, Geun Pyo Choi**,
Uk Yeon Park**, Jong Hyun Nam***, Baik Hwang****, 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.

***Grami Co., Ltd., Cheolwon, Kangwon 269-802, Korea.

****Department of Biology, Chonnam National Univ., Kwangju 520-830, Korea.

*****Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National Univ., Chuncheon 200-701, Korea.

ABSTRACT : This study was performed to compare effect of immune activities of *Rhodiola sachalinensis* by various extraction process with different temperature and extraction solvents. Experiments were performed for investigate the immune activities on human B and T cell growth and secretion of their cytokines. Also, antibodies in serum were investigated in female ICR mouse by feeding the extracts of *R. sachalinensis* at doses of 40, 120 and 360 mg/kg orally for 15 days. The immune cell growth and secretion of cytokines (IL-6, TNF- α) on human B and T cells were increased by adding *R. sachalinensis* extracts compare to the control. Also, total serum IgG levels increased by feeding *R. sachalinensis* extracts. It can be conclude that optimum condition for efficient extraction of *R. sachalinensis* as functional material is slovent extraction process using water with ultrasonification at below 100 °C than typical process.

Key Words : *Rhodiola sachalinensis*, Ultrasonification, Immune Activity, Cytokine, IgG, NK cell

서 언

참돌꽃 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)은 고산지대에서 자라는 다년생 초본식물로서 돌나물과 (Crassulaceae)의 돌꽃속 (*Rhodiola*)에 속한다. 참돌꽃은 중국에 70종 이상 (Ip *et al.*, 2001)을 포함하여, 유럽, 아시아, 알라스카에 걸쳐서 서식하며 200종 이상의 다른 종을 갖는 고산 식물이다 (Kelly, 2001). 인삼, 가시오가피 이후 발견된 보건의약용식물의 일종으로 원기를 회복시키고 병과 독을 극복하며 장수에 도움을 줌에 따라 고원인삼이라는 별칭을 가지고 있다 (Cui *et al.*, 2003). 의약적 부분에서 기억력과 학습력 (Petkov *et al.*, 1986), 면역반응 (Majewska *et al.*, 2006), 중추신경계와 스트레스 (Afanas'ev *et al.*, 1996; Lishmanov *et al.*, 1999), 항암 (Razina *et al.*, 2000) 치료에 사용될 수 있는 것으로 보고되어 있다.

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). 면역 감마글로블린 (immunoglobulin G, IgG)은 체액성 면역에 관여하는 주요 단백질로서 감염에 대한 방어 기능이 있으며 자가면역 질환의 병리에도 관여하는 것으로 여겨진다. 따라서 혈청 내 면역글로블린의 정량은 개 개인의 면역능을 추정하는 대표적인 지표로 이용되고 있다 (Lee *et al.*, 1999).

기능성 소재의 개발 및 실용화에서는 유용성분이 다량 함유된 원료의 선별과 이를 효과적으로 추출 분리하는 공정이 요구된다. 특히 기능성 성분의 추출방법은 추출효율이 높고 추출물의 품질이 우수하며 경제성, 안전성 및 환경친화적 조건이 구비되어야 한다. 기존의 스팀 증류법, 고온용매 추출법 등의 전통적인 방법이나 최근 실용화가 활발한 초임계 유체 추

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

Received September 1, 2008 / Revised September 30, 2008 / Accepted October 11, 2008

출법 등은 여러 가지 장점을 지니고 있지만 추출효율, 에너지 소비, 경제성 등의 측면에서 개선의 필요성이 남아있다 (Ganzler *et al.*, 1987, Lopez-Avila *et al.*, 1996, Kwon *et al.*, 1998). 이에 반해 초음파는 추출 공정의 효율 증진이 가능하며 식물의 추출에 적용하여 생리 활성 및 수율 증진 효과가 있다고 보고된 바 있다 (Vinatoru, 2001; Kwon *et al.*, 2008).

본 연구에서는 초음파 병행을 통해 참돌꽃 추출물이 면역활성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 참돌꽃 추출물을 이용하여 세포수준에서 실험을 수행하고 동물실험을 통한 면역항체 실험을 통해 면역활성을 검증하여 참돌꽃에 면역제재로서의 가능성을 부여함으로써, 연구자료들이 약용식물을 이용한 기능성 식품 및 공정 관련 분야의 기초자료로서 가치를 지니게 하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

1) 실험재료 및 수율 측정

실험에서 사용된 참돌꽃 (*Rhodiola sachlinensis* A. Bor)은 2004년 10월 백두산에서 채취한 참돌꽃 뿌리를 중국 연변에서 수입하여 사용하였다. 참돌꽃 뿌리를 깨끗하게 씻은 후 손질하여 분쇄하고 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 플라스크에 시료 증량에 대한 10배의 증류수와 에탄올을 추출 용매로 각각 사용하여 에탄올은 60°C에서 증류수는 각각 60°C와 100°C에서 12시간 동안 2회 반복 추출하였다. 이를 다시 초음파 발생기를 이용하여 추출온도에서 60 kHz의 초음파 공정을 30분간 병행한 것을 함께 이용하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 감압 여과장치로 여과하여 농축한 후 동결건조 하고 각각의 수율(% , w/w)을 계산한 뒤 실험에 사용하였다.

2) 세포 및 시약

면역세포 생육 증진 효과는 인간 면역 세포인 T세포 (Jurkat, ATTC, USA)와 B세포 (Raji, ATTC, USA)를 이용하여 검증하였으며, 세포배양에 필요한 배지로 RPMI1640은 Gibco (USA)사로부터 구입하였고, hepes buffer와 gentamycin sulfate는 Sigma (USA)사에서 구입하였다. 염색제 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma사로부터 구입하여 실험에 사용하였으며, cytokine 측정을 위해 IL-6와 TNF- α kit는 Chemicon (USA)사의 것을 구입하여 실험에 사용하였다.

Mouse IgG ELISA quantitation kit와 enzyme substrate는 Bethyl Laboratories Inc.의 국내 지사인 Koma Biotech Co.에서 구입하였다. BSA (bovine serum albumin)와 carbonate-bicarbonate는 Sigma사의 것을 사용하였고, Tris는 J.T.Baker (USA)사의 것을 사용하였다. NaCl은 Junsei (Japan)사의 것을

사용하였고, Tween 20과 H₂SO₄는 Yakuri (Japan)사의 것을 사용하였다.

2. 정상세포 독성 측정

일반 열수 추출물과 초음파 병행 추출물의 정상세포에 대한 독성은 인간 신장 세포주(cell line)인 HEK293과 폐 세포주인 HEL299를 이용하여 세포 단백질을 염색하고 세포의 증식이나 독성을 측정하는 방법인 SRB (sulforhodamine B) assay (Doll and Peto, 1983)로 측정하였다. 실험 대상 세포의 농도를 4~5 × 10⁴ cells/ml로 96 well plate의 각 well에 100 μ l 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)한 후, 각각의 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 그리고 1.0 mg/ml로 100 μ l 씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 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) 아세트산으로 녹인 0.4% (w/v) SRB 용액을 100 μ l 씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% 아세트산으로 4~5회 정도 세척, 건조 시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 μ l를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

3. 면역세포 생육 증진 효과

면역 기능 증강 효과를 알아보기로 시료의 첨가를 통한 면역세포의 생육도를 인간 유래 T세포주인 Jurkat과 B세포주인 Raji를 이용하여 확인하였으며, 세포는 10% FBS를 함유하는 RPMI1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 면역 기능 증강을 확인하기 위한 면역세포의 증식율은 MTT assay를 이용하였으며 생육 증진 효과 실험은 24 well plate에 세포를 2.0 × 10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양시켰고, 매일 각 well의 세포수를 세포계수기 (Chemometec, Germany)를 사용하여 측정하였다 (Lee *et al.*, 2002).

4. 면역세포의 cytokine 분비량 측정

면역세포의 생육 증진에 따른 면역활성 증진도를 확인하고자 면역세포가 분비하는 cytokine의 분비량을 Chemicon (USA)사의 IL-6와 TNF- α 정량 kit를 사용하여 측정하였다. 세포의 농도를 4.0~5.0 × 10⁴ cells/ml의 농도로 조절한 후 24 well plate에 900 μ l 씩 첨가하여 24시간 동안 배양 (37°C, 5% CO₂)시킨 후, 시료의 최종농도를 1.0 mg/ml로 100 μ l 씩 첨가하여 다시 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 배양배지를 원심분리기를 이용하여 상등액을 취한 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 O.D. 값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다 (Han *et al.*, 1998).

5. 마우스를 이용한 항체 생성능 측정

시료 첨가를 통해 세포수준에서 확인된 면역활성의 증진 효과를 실험쥐를 이용한 *in vivo* 실험을 통해 확인하고자 실험 쥐의 혈액에서의 항체 생성능을 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

1) 실험동물

실험에 사용된 쥐는 오리엔트바이오(Orient Bio Inc. Seongnam, Korea)사에서 자성 ICR 실험쥐(4주령, 22~24 g)를 구입하여 사용하였다. 사육장은 20~25°C의 온도와 55±10%의 습도를 유지시켰으며, 12시간마다 점등하였다. 케이지는 살균 처리하여 1/4 정도 깔짚으로 채워 사용하였고, 사료는 고품 사료로 자유급식을 하였으며, 물도 살균 처리하여 자유급식 하였다. 실험쥐는 약 1주일 정도 적응시켜 실험을 시작하였다. 실험군마다 10마리씩 사육하고, 실험 식이는 매일 일정한 시간에 자유 급식방법으로 제공하였다. 실험은 15일 동안 3일 간격으로 각 군마다 2마리씩의 실험쥐로부터 혈액을 채취, 혈청을 이용하여 실험에 이용하였다.

2) IgG 항체생성능 측정

항체 코팅을 하기 위해 96 well plate에 코팅 항체와 코팅 완충액을 1:100으로 희석하여 각 well에 100 µl 씩 주입하고 1시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 각 well에서 항체액을 제거하고 세척액으로 3회 세척하였다. Blocking을 위해 blocking solution을 각 well에 200 µl 씩 주입한 후 30분 동안 배양하고, 세척액을 이용하여 3회 세척하였다. Standard는 sample buffer에 각 단계별로 희석시켰으며, 시료는 50배수로 희석하여 사용하였다. 희석한 standard와 시료를 각 well에 100 µl 씩 주입한 후 1시간 동안 배양하고 세척액으로 5회 세척하였다. HRP conjugated 2nd 항체를 1:100,000의 비율로 희석한 후 각 well에 100 µl 씩 주입한 후 1시간 동안 배양시키고 세척액으로 5회 세척하였다. TMB의 두 기질 용액을 동일 양으로 혼합한 후 각 well에 100 µl 씩 주입하고 5~30분 동안 배양하였다. 반응을 정지시키기 위해 2N H₂SO₄를 동일양인 100 µl 씩 주입한 뒤에 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Kim *et al.* 2001).

결과 및 고찰

1. 참돌꽃의 추출공정별 수율

Table 1은 참돌꽃의 증류수와 에탄올을 이용한 각 공정별 추출 수율을 나타낸 것이다. 초음파를 병행한 100°C 물 추출물이 14.11%로 가장 높은 수율을 나타냈으며, 60°C 에탄올 추출물이 6.02%로 가장 낮았다. 열수추출과 초음파 병행추출 모두에서 증류수를 이용한 추출이 에탄올을 이용한 추출에 비

Table 1. The extraction yields of *R. sachalinensis* according to extraction process.

Sample	Yields (% w/w)
60°C Water	8.39
60°C Water [†]	12.47
100°C Water	7.54
100°C Water [†]	14.11
60°C EtOH	6.02
60°C EtOH [†]	8.84

[†]Associated with ultrasonification (60 kHz) at extraction temperature.

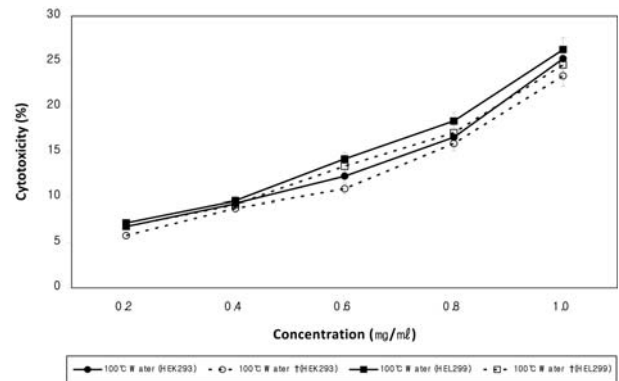


Fig. 1. Cytotoxicity of the extracts of *R. sachalinensis* on human normal cell lines (HEK293 and HEL299). Each value were compared with control at $P < 0.05$ by Student *t*-test.

[†]Associated with ultrasonification (60 kHz) at extraction temperature.

해 높은 수율을 나타내었다. 또 각각의 추출조건에서 초음파 병행추출이 일반 열수추출에 비해 30% 이상의 수율 향상을 나타내었다. 이와 같은 추출 수율의 향상은 기존 참돌꽃 추출에 대한 연구가 없어 직접적인 비교는 불가하나 기존의 천연물 연구를 통해 알려진 초음파 추출에 의한 사자발쑥의 추출 수율 20~30% 증진 (Kwon *et al.*, 2007)을 상회하는 결과로 초음파 추출이 참돌꽃의 추출에 효율적으로 작용한 것으로 사료된다. 기존 열수 추출에 비하여 초음파 병행 추출의 수율이 높게 나타나는 것은 초음파 조사 시 용존 산소나 기포를 액외로 방출시키는 탈기현상이 일어나고 이들이 용매와 상호작용하면서 상승작용을 일으키기 때문인 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2005). 이런 상승작용으로 인하여 기존의 열수 추출보다 낮은 온도에서 더 효율적인 추출이 이루어져 초음파 병행 추출물의 수율이 높게 나타나는 것으로 판단되며, 따라서 초음파를 병행한 추출물에 보다 많은 활성성분이 함유되어 있을 것이 기대되어 이후의 실험을 진행하였다.

2. 정상세포 독성

초음파 병행 공정을 통한 참돌꽃 추출물의 세포독성 변화는 인간 신장 세포인 HEK293과 폐 세포인 HEL299를 이용하여 확인하고 측정결과를 Fig. 1에 나타내었다. 최고 농도인

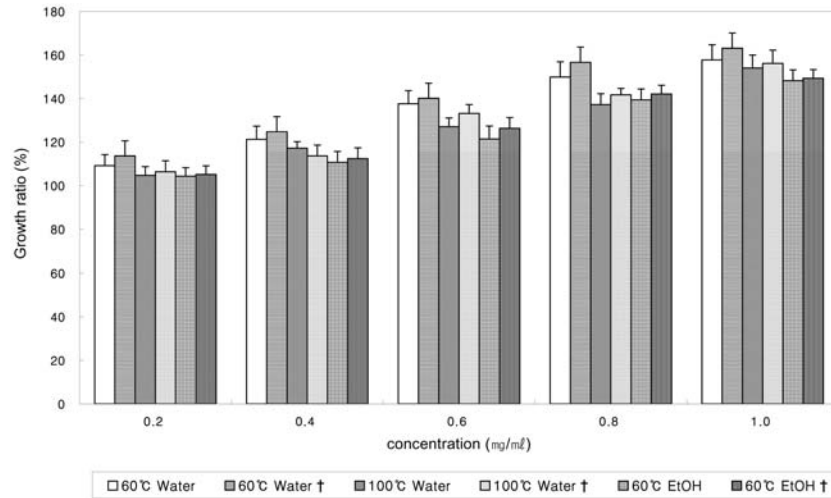


Fig. 2. Growth of human immune B cell (Raji) in adding several concentration of the extracts from *R. sachalinensis*. Each value were compared with control at $P < 0.05$ by Student *t*-test.
 †Associated with ultrasonification (60 kHz) at extraction temperature.

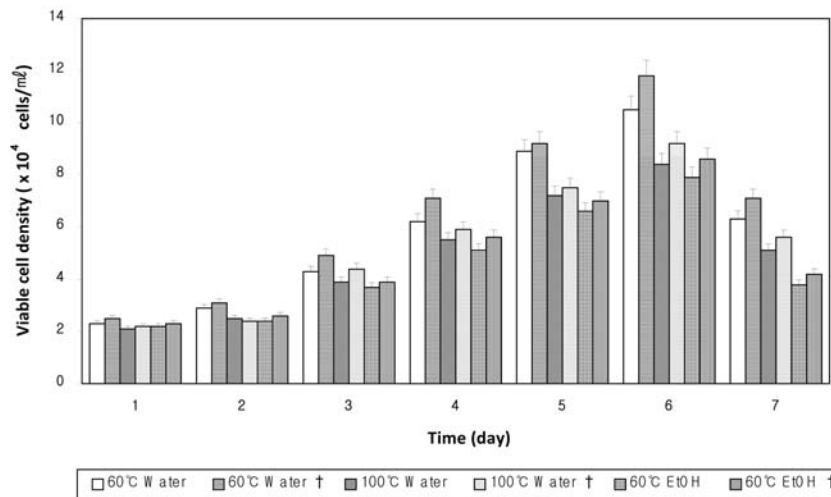


Fig. 3. Growth of human immune B cell (Raji) in adding the extracts of *R. sachalinensis* for 7 days. Each value were compared with control at $P < 0.05$ by Student *t*-test.
 †Associated with ultrasonification (60 kHz) at extraction temperature.

1.0 mg/ml에서 100°C 물 추출물이 HEK293과 HEL299에 대하여 각각 25.3%와 26.3%의 세포독성을 나타내었으며, 초음파를 병행한 100°C 물 추출물은 각각 23.4%와 24.6%로 이보다 감소된 세포독성 수치를 나타내었다. 결과에서 초음파 병행을 통해 추출물의 세포독성이 유의적으로 감소되는 것을 확인함에 따라 초음파 기작의 연구를 통해 식물 추출에서 독성의 저감이 가능할 것으로 사료된다.

3. 면역세포 생육 증진 효과

면역 세포의 생육 활성화도 실험에서는 면역체계에 중요한 역할을 하는 면역세포인 B세포와 T세포를 이용하였고, 생육 증

진 효과를 측정하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. 사용된 시료의 농도는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml로 조절하여 사용하였으며 각각의 실험결과는 다음과 같다.

Fig. 2는 B세포와 T세포의 생육 증진 효과를 MTT assay를 통하여 나타낸 것이다. 모든 추출물에서 생육 증진이 농도 의존적으로 높아지는 것을 확인할 수 있다. 그 중 물 60°C에서 초음파 병행 추출한 것이 1.0 mg/ml 농도에서 B세포와 T세포가 각각 163.1%와 165.2%를 나타내며 가장 높은 생육 증진 효과를 보여주고 있다.

Fig. 3과 Fig. 4는 농도별 시료 첨가를 통한 면역세포 생육 실험의 유의성을 감안하여 0.5 mg/ml 농도의 시료 첨가를 통한

추출조건에 따른 참돌꽃의 면역 활성

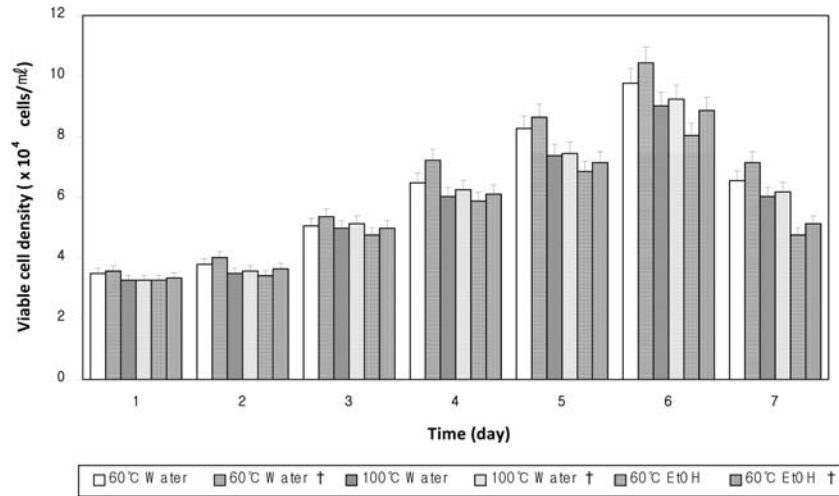


Fig. 4. Growth of human immune T cell (Jurkat) in adding the extracts of *R. sachalinensis* for 7 days. Each value were compared with control at $P < 0.05$ by Student *t*-test.
 †Associated with ultrasonification (60 kHz) at extraction temperature.

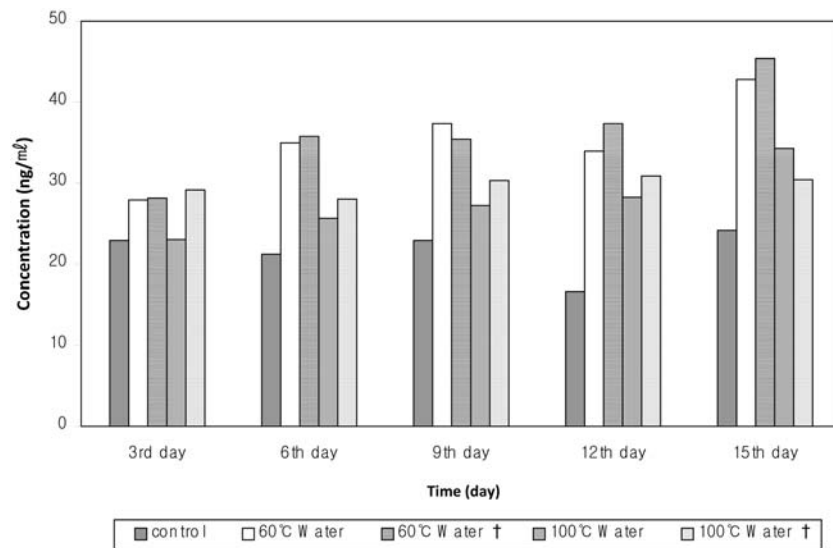


Fig. 5. Effect of *R. sachalinensis* on total serum IgG level in ICR mouse. Each value were compared with control at $P < 0.05$ by Student *t*-test.
 †Associated with ultrasonification (60 kHz) at extraction temperature.

B세포와 T세포의 생육을 배양 날짜별로 살펴본 결과이다. 각 추출물에 대하여 배양 6일째까지 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었는데, B세포와 T세포 모두 초음파를 병행한 60°C 물 추출물이 6일째 최고인 11.8×10^4 cells/ml와 10.4×10^4 cells/ml의 농도를 나타낸 것으로 확인할 수 있었다. 반면 6일째 이후에는 모든 조건에서 면역세포의 생육도가 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 이는 식용으로도 널리 사용되며 면역 활성을 나타내는 것으로 알려진 사철쑥의 추출물을 통한 면역 활성 연구 (Lee *et al.*, 2004)의 20~50% 생육 증진을 상회하는 결과로 낮은 농도에서도 유의적인 수치를 나타내는

것으로 보아 고농도에서는 가시적인 면역증강 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

4. Cytokine 분비량 측정

Table 2는 B세포와 T세포를 이용한 시료 첨가에 따른 cytokine 분비량을 나타낸 것이다. 각각의 세포로부터 분비되는 IL-6와 TNF- α 를 cytokine kit를 이용하여 측정하였다. Cytokine 측정 실험에서는 앞선 생육활성 증진효과 실험과 마찬가지로 분비량이 각 추출물에 대해 6일째까지 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었는데, 각 시료에 대한 IL-6의

Table 2. Comparison of IL-6, TNF- α secretion on cell growth in adding the extracts from *R. sachalinensis*.

Sample	Time (day)	B cell (10^{-4} pg/ml)		T cell (10^{-4} pg/ml)	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
60°C Water	1	5.3±0.6	5.6±0.7	5.9±0.7	5.7±0.2
	2	7.8±0.7	7.7±0.6	8.0±1.3	8.8±0.5
	3	10.5±1.5	11.2±0.9	11.4±1.6	11.5±1.2
	4	12.6±1.6	13.4±1.4	13.2±1.8	14.5±1.1
	5	14.5±1.6	15.0±1.4	15.3±1.8	16.7±1.7
	6	16.4±1.4	17.5±1.3	18.0±1.7	18.6±1.7
	7	12.2±1.2	13.5±0.8	13.3±0.9	14.1±1.3
	8	9.2±1.2	9.1±0.9	11.5±1.0	11.2±0.6
60°C Water [†]	1	5.1±0.7	4.9±1.1	6.1±1.0	6.4±1.1
	2	8.2±1.1	7.1±1.2	9.2±1.2	9.8±1.4
	3	11.6±1.6	11.5±1.2	12.1±1.8	13.0±2.5
	4	13.2±1.4	13.9±1.5	14.7±2.2	15.6±3.0
	5	15.9±2.7	16.1±2.4	16.1±2.8	16.4±3.4
	6	17.7±2.4	18.3±2.4	18.9±2.4	19.5±4.0
	7	13.0±1.8	14.2±1.8	15.0±2.0	14.9±3.4
	8	10.5±1.6	11.5±1.0	11.3±1.1	12.1±2.8
100°C Water	1	5.4±0.8	5.6±0.9	5.1±1.0	5.3±0.7
	2	8.4±1.0	7.9±0.9	7.8±1.5	8.3±1.3
	3	10.9±1.2	10.5±1.6	11.0±1.8	11.5±1.8
	4	12.5±1.5	12.6±1.8	12.9±1.9	12.2±2.2
	5	13.9±1.8	13.4±1.9	14.3±2.0	15.2±2.6
	6	16.2±1.9	15.8±2.0	16.7±2.2	17.9±2.1
	7	12.2±1.5	11.7±1.1	12.3±1.3	13.5±1.7
	8	9.8±1.2	9.6±1.6	10.8±1.8	10.4±1.4
100°C Water [†]	1	5.1±0.8	5.3±0.7	5.3±1.0	5.6±0.7
	2	6.9±0.9	7.3±0.8	6.5±1.6	7.1±0.8
	3	10.4±1.5	9.9±1.4	9.6±2.3	10.5±1.1
	4	11.9±1.7	12.3±2.0	12.3±2.4	14.1±1.2
	5	14.3±1.6	15.2±2.0	15.0±2.9	15.6±2.0
	6	16.9±1.5	17.1±2.0	17.5±2.6	18.6±2.1
	7	11.5±0.9	12.3±1.7	13.6±2.5	14.7±1.6
	8	9.6±1.0	10.1±0.7	11.2±2.0	11.8±1.4
60°C EtOH	1	4.4±0.7	4.6±0.9	4.8±1.0	4.7±0.8
	2	5.9±0.9	6.5±1.1	6.2±1.8	6.3±1.3
	3	8.5±1.1	9.3±1.3	8.9±2.7	9.0±2.2
	4	11.5±1.3	12.9±1.7	10.5±2.2	11.3±2.6
	5	13.2±1.7	14.6±1.8	14.2±2.4	14.0±2.7
	6	15.3±1.7	15.6±1.6	16.2±2.1	17.2±2.6
	7	9.5±1.3	10.8±0.9	12.6±2.4	13.5±2.2
	8	7.7±0.8	8.4±0.9	10.3±1.8	10.5±2.1
60°C EtOH [†]	1	4.8±0.6	5.0±0.6	4.6±1.0	5.3±0.8
	2	6.5±1.1	7.2±1.0	7.1±1.6	6.8±0.7
	3	9.4±1.6	9.2±1.9	9.5±1.3	10.1±1.5
	4	10.5±2.3	11.8±2.4	12.5±1.4	13.1±1.4
	5	13.9±2.6	14.3±2.9	14.2±1.6	15.3±2.3
	6	15.8±2.6	16.0±2.7	16.8±1.5	17.4±2.2
	7	10.3±1.9	11.5±1.1	12.8±0.8	13.3±1.8
	8	7.5±1.1	9.3±1.3	9.9±1.0	10.5±1.0

[†]Associated with ultrasonification (60 kHz) at extraction temperature.
[‡]Each value were compared with control at $P < 0.05$ by Student t-test

분비량을 살펴보면, 초음파를 병행한 60°C 물 추출물이 B세포와 T세포에서 각각 17.7×10^{-4} pg/cell과 18.9×10^{-4} pg/cell을 나타내며 가장 많은 분비량을 나타내었다. 각 시료에 대한 TNF- α 의 분비량에서도 IL-6의 결과와 마찬가지로 60°C에서 초음파를 병행한 물 추출물이 B세포와 T세포에서 각각 18.3×10^{-4} pg/cell과 19.5×10^{-4} pg/cell로 가장 많은 분비량을 나타내었다.

이상의 결과를 통해 세포의 증진 활성과 cytokine의 분비량을 살펴보았을 때 물 60°C에서 초음파 병행 추출에서 가장 좋은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 참돌꽃 뿌리가 단단하여 일반적인 열수 추출로는 용출되지 않았던 것들이 초음파 추출의 탈기현상을 통하여 용출량이 증가되어 면역활성에 영향을 준 것으로 사료된다. 또한 참돌꽃 추출물의 농도와 배양일에 따른 세포의 생육 및 cytokine 분비량의 증진을 통하여 참돌꽃 추출물이 면역활성과 관련하여 활용 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

5. IgG 항체생성능 측정

항체는 항원과 결합하는 단백질을 말하며, 혈액과 체액에 녹아있는 면역글로불린 (immunoglobulin, Ig)을 일컫는 말이다. 항체는 B림프구의 세포표면에도 존재하는데, 이를 표면 면역글로불린 (surface immunoglobulin)이라고 부르며, B림프구에서 항원수용체로 작용한다. B림프구는 세포표면의 항체 단백질을 즉 면역글로불린을 이용하여 항원과 반응하게 되며, 특정한 항원과 반응한 B림프구 클론은 플라즈마 세포로 분화되어 자신이 세포표면에 가지고 있던 것과 똑같은 항체를 세포 밖으로 분비하게 되는 것이다. 이렇게 B림프구 밖으로 분비된 항체는 혈액이나 체액에 있는 항원과 결합하여 항원의 작용을 방해하거나, 항원이 제거되도록 만든다.

Fig. 5는 *in vivo* 실험으로서 ICR 실험쥐를 이용하여 15일 동안 3일 간격으로 혈액을 채취하고 IgG 항체의 생성을 측정하는 것이다. 시간이 지날수록 항체의 양이 점차적으로 증가하는 것을 볼 수 있었고, 모든 추출물이 대조군에 비해 IgG 항체의 양을 증진시킨 것을 확인할 수 있었다. 그 중 물 60°C에서 초음파 병행 추출한 것이 15일째 45.41 ng/ml로 가장 많은 양의 항체를 생성하였다. 정상세포에서의 세포독성 측정을 통한 농도를 감안할 때 이는 시료 투여를 통한 면역 증진 효과로 볼 수 있다. 또한 참돌꽃 추출물을 실험쥐에 식이한 날씨가 증가함에 따라서 항체의 생성량이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었는데, 이상의 결과를 통하여 *in vitro* 실험에서 얻은 결과를 마우스를 이용한 동물 실험에서 확인함으로써 참돌꽃이 면역증강제재로 활용 가능성이 높음을 확인할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 농업특정연구과제 (과제 번호:

20070101033021)의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Abo T, Kawamura T and Watanabe H.** (2005). Immunologic states of autoimmune diseases. *Immunologic Research*. 33:23-34.
- Afanas'ev SA, Krylatov AV, Lasukova TV and Lishmanov YB.** (1996). Participation of inducible stress proteins in the cardioprotective effect of *Rhodiola rosea*. *Biochemistry (Moscow)*. 61:1258-1263.
- Cui CB, Lee DS and Ham SS.** (2003). Antioxidative, antimutagenic and cytotoxic effects of *Rhodiola sachalinensis* extract. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*. 32:211-216.
- Doll R and Peto R.** (1983). The causes of cancer : quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*. 66:191-308.
- Ganzler K, Salgó A and Valkó K.** (1987). Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography A*. 371:299-306.
- Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES and Baik KU.** (1998). Effect of Ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- α production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji*. 42:296-301.
- Ip SP, Che CT, Leung PS.** (2001). Association of free radicals and the tissue renin-angiotensin system: prospective effects of *Rhodiola*, a genus of Chinese herb, on hypoxia-induced pancreatic injury. *Journal of the Pancreas*. 2:16-25.
- Kelly GS.** (2001). *Rhodiola rosea*: a possible plant adaptogen. *Alternative Medicine Review*. 6:293-302.
- Kim DH, Park JH, Kim JH, Kim CH, You JH, Kwon MC and Lee HY.** (2005). Enhancement of immune activities of *Ephedrae herba* and *Rubi fructus* at low temperature extraction. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 13:81-86.
- Kim JH, Mun YJ, Im SJ, Han JH, Lee HS and Woo WH.** (2001). Effects of the aqueous extract of *Epimedii herba* on the antibody responses in mice. *International Immunopharmacology*. 1:935-944.
- 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, Han JG, Qadir SA, Ahn JH, Lee DH and Lee HY.** (2008). Enhancement of Immuno-potential of *Chicorium endivia* L. by ultrasonification extraction process. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:9-15.
- Kwon MC, Kim CH, Kim HS, Lee SH, Choi GP, Park UY, You SG and Lee HY.** (2007). Optimal extract condition for the enhancement of anticancer activities of *Artemisia princeps* Pampanini. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 15:233-240.
- Lee MK, Choi GP, Ryu LH, Lee GY, Yu CY and Lee HY.** (2004). Enhancement immune activity and cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. extracts against human cell lines. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 12:34-42.
- 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.
- Lee YK, Kim DS, Lee JW, Lim HB and Lee KY.** (1999). Normal values of IgG and IgG subclass concentrations according to age in children. *Pediatric Allergy and Respiratory Disease*. 9:93-99.
- Lishmanov YB, Maimeskulova LA, Uskina EV and Maslov LN.** (1999). Opiatergic mechanisms of cardioprotective and antiarrhythmic effects of adaptation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 127:151-154.
- 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.
- Majewska A, Hoser G, Furmanowa M, Urbańska N, Pietrosiuk A, Zobel A and Kuraś M.** (2006). Antiproliferative and antimetabolic effect, S phase accumulation and induction of apoptosis and necrosis after treatment of extract from *Rhodiola rosea* rhizomes on HL-60 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 103:43-52.
- Petkov VD, Yonkov D, Mosharoff A, Kambourova T, Alova L, Petkov VV and Todorov I.** (1986). Effects of alcohol aqueous extract from *Rhodiola rosea* L. roots on learning and memory. *ACTA Physiologica et Pharmacologica Bulgarica*. 12:3-16.
- Razina TG, Zueva EP, Amosova EN and Krylova SG.** (2000). Medicinal herb preparations as a means of additional therapy : experimental oncology evidence. *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya*. 63:59-61.
- Vinatoru M.** (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8:303-313.