

유황오리 추출물로부터 항종양활성 성분의 분리 및 정제

윤원호 · 황진용¹ · 김창한^{1*}

서일대학 식품가공과, ¹건국대학교 축산가공학과

서 론

오리는 병에 강하고 독성물질에 대해 그 해독력이 우수하다고 알려져 있으며, 이러한 내성과 체성분의 작용을 이용하여 사람이 직접 섭취할 수 없는 유황을 오리를 통해 사람에게 유익하게 약제화 한 것을 유황오리라고 한다.^(7,9) 유황오리에 관한 연구는 아직까지 국내는 물론 세계적으로도 미약한 실정이며 과학적으로 밝혀진 바가 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 유황오리 추출물로부터 항종양 활성물질을 용매추출법과 각종 크로마토그래피를 이용하여 분리, 정제하였으며^(8,10) 정제한 물질을 MTT assay 와 Clonogenic assay를 통하여 항암효과를 확인하였다.^(5,6)

재료 및 방법

유황오리

유황오리 추출물 제조과정은 오리 중량의 10배의 증류수를 넣고 121℃에서 18시간 증탕한 후 oil 층을 제거하여 시료로 사용하였다.

종양 및 정상세포주

HEp-2(human larynx), SNU-5 (human stomach carcinoma), SW-156 (human kidney carcinoma), KB (human epidermoid of mouth carcinoma), SK-MES-1, Calu-3, A549 (human lung carcinoma), Farrow (human melanoma), WiDr (human colon carcinoma), SK-OV-3(human ovary), Raji(human lymphoma), 3LL(mouse lung)를 사용하였고, 세포독성을 측정하기 위한 정상세포주는 MDBK (bovine kidney)를 사용하였다.

유황오리로부터의 항종양활성 성분의 분리

유황오리 추출물 100ml(50mg/ml)을 Diaion HP-20 column(2.8×50cm, wet volume 600ml)에 흡착시켰다. 이후 증류수, 50% 메탄올, 100% 메탄올을 이용하여 순차적으로 용출하였다. 활성이 인정된 100% 메탄올 용출액을 감압농축한 후 물로 치환하여 에틸아세테이트로 3회 반복 추출하였다. 에틸아세테이트 분획물을 농축하여 실리카겔(3.5cm×50cm, 63-200 mesh, Merck) 컬럼 크로마토그래피에서 CHCl₃ MeOH (6:1 V/V)를 전개용매로 하여 10ml씩 fraction collector를 이용하여 분취하였고, 검출은 UV

detector(238 UVICORD S II, LKB)를 이용하여 254nm에서 검출하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 활성이 인정된 fraction을 HPLC용 메탄올에 녹인후 0.2 μ m disposable syringe filter(Adventec MCF)로 여과하여 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC(GILSON, UV/VIS-151) column은 Bonda pak C18(10 μ m, 19 \times 300mm, Waters)을 이용하였고, mobile phase는 gradient로 methanol을 이용하였다.

MTT assay

각 종양세포주마다의 집중 농도의 세포를 집중하여 24시간 동안 배양한 후, 종양세포 증식억제물질을 처리하고 나서 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 MTT (0.5mg/ml)용액 50 μ l를 각각 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 추가 배양하여 formazan 형성을 유도시키고, 추가 배양이 끝난 후 원심 분리 후 생긴 blue formazan을 용해시키기 위하여 DMSO를 각 well당 100 μ l씩 첨가한 후 plate shaker (Wallac, Finland)에서 20분간 교반한 후 각 well의 흡광도를 570nm에서 측정하였다.^(1,4)

Clonogenic assay

직경 60mm 조직배양용 Petri-dish(Nunc, USA)에 2 \times 10²의 종양세포주를 37 $^{\circ}$ C, CO₂ incubator에서 24시간 동안 전배양한 후, 항종양 활성물질에 노출시켰다. 노출 5~7일 후 배지를 제거한 후 phosphate buffer saline(PBS)로 세척하여 1% methylene blue/methanol로 종양세포주를 1시간 동안 고정시켰다. 다시 증류수로 세척하여 건조시켜 배양 5~7일 후 평판에서 50 μ l 이상의 크기를 나타내는 집락을 도립 현미경(Model CK, Olympus, Japan)을 사용하여 계수하였다. 시료처리 평판과 비처리 평판에 나타난 집락의 수를 비교하여 생존율을 %로 나타내었으며, 생존율이 30%이하일 때를 종양세포에 대한 증식억제 효과가 있는 것으로 판정하였다(Uesato et al., 2001; Pauwels et al., 2003; Banasiak et al., 1999).^(2,3)

결과 및 고찰

Silica gel column chromatography

Chromatography를 실시하여 4부분의 분획(분획 A, B, C 및 D)으로 모았다. 분획 C는 500 μ g/ml의 농도에서 HEp-2는 91%의 세포증식억제 효과가 나타났으며, MDBK는 40%의 세포증식억제율을 나타내어 정상세포보다는 종양세포에 대하여 증식억제 효과가 나타나는 것으로 판단하였다. 분획 D는 HEp-2, MDBK에서 각각 50%, 40%의 세포증식억제 효과를 나타내었다. 분획 A와 B는 종양세포증식억제 효과가 전혀 인정되지 않았다.

HPLC로 분리한 물질의 항암활성

HPLC에 의해 정제한 물질을 14종류의 종양세포주에 대하여 농도별 세포증식억제 효과를 MTT assay에 의해 측정된 결과 500 μ g/ml의 농도에서는 14종류의 모든 종양세포주에서 50% 이상의 세포증식억제 효과를 나타내었다. 200 μ g/ml의 농도에서는 SK-MES-1, Farrow, SNU-5, HEp-2, KB, SK-OV-3, SW-156에 대하여 각각 71%, 78%, 71%, 81%, 81%, 59% 및 62%의 세포증식억제 효과를 나타내었다.

100 μ g/ml의 농도에서는 Farrow, HEP-2 및 KB에 대해서 각각 56%, 58% 및 56%의 세포증식억제 효과를 나타내었으나 200 μ g/ml의 농도에서 활성이 나타났던 SK-MES-1, SNU-5, SK-OV-3 및 SW-156 대해서는 각각 48%, 49%, 37% 및 43%로 세포증식억제 효과가 감소되었다. bovine normal kidney cell line인 MDBK는 500 μ g/ml, 200 μ g/ml, 100 μ g/ml에서 각각 48%, 34%, 28%로 증식억제 효과가 나타나 정상세포에 대한 세포독성은 강하지 않은 것으로 판단되어진다.

Clonogenic assay에서는 500 μ g/ml의 농도에서는 MTT assay의 결과와 같이 종양세포 저해효과가 인정되었지만, 200 μ g/ml의 농도에서는 HEP-2, KB 및 SW-156에서만 각각 26%, 28% 및 30%의 생존율을 나타내어 항종양 효과가 나타났다. 100 μ g/ml의 농도에서는 모든 종양세포주들의 생존율이 30% 이상으로 항종양 효과가 나타나지 않았다.

요 약

본 연구는 유향오리로부터 항종양 효과를 나타내는 물질을 용매추출과 각종 chromatography를 사용하여 분리 및 정제하였다. HPLC를 사용하여 정제한 항종양활성 성분의 수율은 유향오리 1Kg당 10mg이었다. HPLC를 이용하여 정제한 항종양활성 물질을 Clonogenic assay로 측정된 결과 200 μ g/ml의 농도에서 HEP-2, KB 및 SW-156에서 각각 26%, 28% 및 30%의 생존율을 나타내어 항종양 효과가 나타났다. MTT assay에서는 100 μ g/ml의 농도는 Farrow, HEP-2 및 KB에 대해서 각각 56%, 58% 및 56%의 세포증식억제 효과를 나타내었다. bovine normal kidney cell line인 MDBK는 500 μ g/ml, 200 μ g/ml, 100 μ g/ml에서 각각 48%, 34%, 28%로 증식억제 효과가 나타나 정상세포에 대한 세포독성은 강하지 않은 것으로 판단되어진다.

참고문헌

1. Alley et al., *Cancer Res.*, 48: 589-601, 1988.
2. Buhagiar, J A et al., *Anticancer Research*, 19: 5435-5443. 1999
3. Campling, B.G et al., *Br. J. Cancer* 63: 75-83, 1991.
4. Griffon, G et al., *Anti-Cancer Drugs*, 6: 115-123(1995)
5. Suganuma, M et al., *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 127: 69-72. 2001.
6. Yan, M et al., *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 418-419, 2001.
7. 구정희 등, 여간출판사, 442-443, 1991
8. 박재갑, 서울대학교 천연물 과학 연구소. 174-181. 1993
9. 한국식품개발연구원, 1999.
10. 황우익 등, *Kor. J. Biochem*, 13(1). 25-29.