



유황오리 추출물의 각종 암세포에 대한 생육억제 효과

최 귀 헌 · 김 창 한[†]
건국대학교 동물자원연구센터

Growth Inhibition of Extract from Sulfur Fed Duck Carcass against Various Cancer Cell Lines

G. H. Choi and C. H. Kim[†]
Animal Resources Research Center, Konkuk University

Abstract

This study was carried out to investigate the anticancer effect of extracts from sulfur fed duck carcass. Growth inhibition of cancer cell lines was measured by MTT assay. Eleven cancer cell lines, such as Calu-3(human lung carcinoma), SK-MES-1(human lung carcinoma), HL60(human leukemia), KB(human epidermoid of mouth carcinoma), Farrow(human melanoma), HEP-2(human larynx carcinoma), SNU-1(human stomach carcinoma), K-562 (human leukemia), WiDr(human colon carcinoma), P388(mouse leukemia) and 3LL(mouse lung carcinoma) showed the growth inhibition higher than 50%, but those, such as SF-188(human brain carcinoma), A-549(human lung carcinoma) and HEC-1B(human uterus carcinoma) showed the growth inhibition lower than 50% in the extract of sulfur fed duck carcass at the concentration of 10 mg/mL. The sulfur fed duck carcass extract had better growth inhibition than the normal counterpart against various cancer cell lines at the concentration of 10 mg/mL. When the effect of growth inhibition of an effluent by different concentrations of methyl alcohol(25, 50, 75 and 100%) tested on Diaion HP-20 column chromatography, an effluent by concentration of 100% methyl alcohol showed the most strong effect of growth inhibition against HEP-2(human larynx carcinoma).

Key words : sulfur feed duck carcass, cancer cell lines, MTT assay.

서 론

예로부터 유황은 여러 질병의 처방제로 쓰여왔다. 서양의 학에서는 유황을 의약품으로 국부자극제, 피부질환, 변비, 치질 등에 이용되었으며 동양의학에서는 그 독성을 완전히 제거한 후 사용하면 기를 보호하고 근골을 튼튼히 하고 양기를 보호한다고 하였으며 또 지혈작용, 신경마비, 냉수족 등의 처방에 쓰여왔다. 그러나 유황은 인체에 직접적으로 투여될 경우 독성이 강하여 많은 부작용을 초래하는 것이 일반적이다. 따라서 독성이 있는 유황은 사람이 직접 먹지 못하고 한 단계 걸친 법제를 통하여 간접적으로 섭취되었다(구정희 등,

1992; 박재갑, 1993; 한국식품개발원, 1999; 황우익 등, 1980).

오리는 동의보감을 비롯한 옛날 의학서에서는 고혈압, 중풍, 신경통, 동맥경화, 비만, 결핵, 병후회복, 정력증강, 위장질환, 혈액순환을 좋게 하는 등의 여러 가지 생리효과가 있고 각종 질병치료에 응용되어 왔다. 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 것이 유황오리라고 한다(허준, 1994a,b).

현재 국내의 몇몇 오리농장에서는 기능성 오리육을 생산하기 위해 유황과 여러 가지 한약재를 섞은 사료로서 유황오리를 사육하고 있으며, 유황오리는 앞에서 열거한 생리적 효과 뿐만 아니라 암 예방효과도 있다고 알려져 있으나 아직까

[†]Corresponding author : C. H. Kim, Animal Resources Research Center, Konkuk University, 1, Hwayang-dong, Kwangjin-gu, Seoul, 143-701, Korea. Tel : 02-450-3679, Fax : 02-3436-0266, e-mail address : chhan@kkucc.konkuk.ac.kr

스 체계적인 과학적 근거가 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 유황오리 추출액의 각종 암세포에 대한 생육억제효과를 검토함으로써 유황오리의 과학적인 항암효과를 확인하고자 실시하였다.

재료 및 방법

추출물의 조제

본 연구에 사용한 유황오리와 일반오리는 전라북도 정읍의 (주)혜성농산으로부터 생후 9~10주령을 제공받아 사용하였다. 유황오리와 일반오리의 추출물 조제과정은 오리지육 1kg의 10배 증류수를 넣고 18시간 중탕하였다. 그것을 여과한 다음 원심분리에 의해 oil층을 제거하고 액상층을 rotary evaporator에서 감압농축한 후 동결건조하였다. 동결건조물은 phosphate buffer solution(PBS)으로 녹인 후 추출액으로 사용하였다.

암세포 및 정상세포주

본 실험에서는 암세포주 SF-188(human brain carcinoma), Calu-3, SK-MES-1, A-549(human lung carcinoma), HL60 (human leukemia), KB(human epidermoid of mouth carcinoma), Farrow(human melanoma), HEP-2(human larynx carcinoma), SNU-1(human stomach carcinoma), K-562 (human leukemia), HEC-1B(human uterus carcinoma), WiDr(human colon carcinoma), 3LL(mouse lung carcinoma), P388(mouse leukemia)을 사용하였고, 정상세포주로는 MDBK(bovine kidney)를 사용하였다.

암세포 및 정상세포의 배양

본 실험에 사용한 암세포주 및 정상세포주의 배양을 위한 배지조성은 다음과 같으며, 모두 Gibco(USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

1) SF-188

MEM(Eagle's)+10% fetal bovine serum(FBS, heat inactivated) + 1% sodium pyruvate + 1% nonessential amino acid

2) Calu-3, SK-MES-1

MEM(Eagle's) + 10% FBS(HI) + 1% penicillin/streptomycin + 1% Glutamine + 1% nonessential amino acid + 1% sodium pyruvate + 1% MEM vitamin

3) HL 60, Farrow, SNU-1, K-562

RPMI 1640 + 10% FBS(HI)

4) KB

MEM(Eagle's) + 10% FBS(HI) + 1% nonessential amino acid

5) HEP-2, WiDr

MEM(Eagle's) + 10% FBS(HI)

6) HEC-1B

MEM + 10% FBS(HI) + 1% nonessential amino acid + 1% sodium pyruvate

7) P388, 3LL

DMEM + 10% FBS(HI)

8) A-549, MDBK

Ham F12 + 10% FBS(HI)

모든 세포는 25 cm² 조직 배양용 플라스크(Corning, N. I., USA)를 사용하였고 37℃에서 5% CO₂를 함유하는 공기 조건 하에서 배양하였다. 매주 2회씩 feeding을 하면서 세포가 증식하여 confluency가 되는 시점에서 계대배양하였다. 플라스크 바닥에 monolayer를 형성하는 세포는 0.25% trypsin/ 1 mM EDTA용액을 사용하여 단세포로 만들었으며 부유세포인 SNU-1 및 P388등은 여러 번 pipetting하여 단세포로 만들어 사용하였다(Xu et al., 1999; Yan et al., 2001).

MTT assay

각 배지에 접종농도의 각 세포 수를 접종하여 37℃, CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 시료를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 MTT(0.5 mg/mL)용액 50 μL를 첨가한 다음 4시간 추가 배양하여 formazan 형성을 유도시키고, 추가 배양이 끝난 후 원심분리(1,000 rpm, 5 min, 4℃)하여 상정액을 제거하였다(Rubinstein et al., 1990). 원심분리 후 생긴 blue formazan을 용해시키기 위하여 DMSO를 각 well당 100 μL씩 첨가한 후 plate shaker (Wallac, Finland)에서 20분간 교반 한 후 각 well의 흡광도를 multiwell scanning spectrophotometer(microplate autoreader, Bio-Tek instrument, U.S.A)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. MTT assay는 $[1 - (\text{OD of treated cells} / \text{OD of control cell})] \times 100$ 을 계산하여 %저해율로 나타내었으며, 저해율이 50% 이상인 경우에 세포 생육억제효과가 있다고 판정하였다(Ahmann et al., 1982; Alley et al., 1988; Suganuma et al., 2001).

Diaion HP-20 Column Chromatography

Diaion HP-20을 methyl alcohol에 넣고 기포를 충분히 뺀 후에 methyl alcohol을 물로 치환하여 column(2×50 cm, Pharmacia Biotech., USA)속에 40 cm 채워 넣고, 3차 증류수를 이용하여 24시간동안 충분히 흘려 안정화를 시킨 다음 유황오리 추출액 200 mL을 흡착시킨 후 증류수로 충분히 세척하였다(구 등, 1992; Yan et al., 2001). Diaion HP-20에 흡착된 성분을 용출하기 위해 25%, 50%, 75%와 100% 농도의 methyl alcohol을 사용하였으며 각 용출액은 rotary evaporator에서 농축한 후 동결건조하여 각 분획 시료로 사용하였다. 암세포 생육억제효과의 측정은 MTT assay로 실시하였고 사용한 암세포주는 HEP-2 (human larynx carcinoma)로 하였다(Lee et al., 2000a,b; Grdisa et al., 2001).

결과 및 고찰

추출물의 수율

일반오리 580 g과 유황오리 600 g으로부터 각각 22.0 g, 25.4 g의 열수 추출물을 얻었으며 추출물의 수율은 일반오리 3.8%, 유황오리 4.2%이었다.

일반오리와 유황오리 추출물의 암세포 생육억제효과 비교

일반오리와 유황오리의 열수 추출물의 10 mg/mL 농도에서 암세포 생육억제효과는 Table 1과 같다. 유황오리 추출물의 경우에는 실험에 사용한 암세포주 중에서 A549를 제외한 모든 세포주에서 현저한 암세포 생육억제효과가 있었다. 한편 일반오리 추출물의 경우도 KB, K-562, Farrow, WiDr 및 3LL

Table 1. Growth inhibition of extracts from sulfur fed duck carcass and normal duck carcass against various cancer cell lines

Cell line	Inhibition	
	Sulfur fed duck carcass extract	Normal duck carcass extract
KB	89.5±0.7*	70.2±0.6*
SNU-1	69.8±1.7*	46.1±1.5
K-562	79.8±2.8*	56.4±1.7*
Farrow	82.7±2.6*	62.2±1.8*
WiDr	76.3±2.5*	64.5±0.9*
SK-MES-1	59.2±4.4*	38.6±1.1
3LL	87.2±3.3*	59.8±1.5*
A-549	48.6±1.6	38.5±1.3
HL60	60.5±3.5*	35.2±0.9
HEP-2	80.7±0.5*	48.3±0.5

*: Sensitive i.e., % inhibition≥50, data are mean ±SD from each of four separated experiments.

Table 2. Growth inhibition according to concentration of extract from sulfur fed duck carcass against various cancer cell lines

Cell line	Concentration of extract		
	10 mg/mL	1 mg/mL	0.1 mg/mL
KB	89.5±0.7*	35.5±1.5	2.3±0.8
SNU-1	69.8±1.7*	27.8±1.5	1.3±0.9
K-562	79.8±2.8*	22.1±1.4	11.1±1.0
Farrow	82.7±2.6*	43.3±1.2	9.2±0.8
WiDr	76.3±2.5*	38.2±1.4	2.4±2.8
SK-MES-1	59.2±4.4*	27.2±1.5	2.2±1.6
A-549	48.6±1.6	21.3±0.8	10.5±0.8
SF-188	45.6±0.4	32.4±1.6	8.0±0.4
HL60	60.5±3.5*	41.3±1.9	15.4±2.1
HEC-1B	35.3±2.2	12.1±2.1	5.5±0.1
Calu-3	53.2±1.6*	19.9±0.8	8.9±0.6
HEP-2	80.7±0.5*	30.3±1.5	11.3±0.7
P388	79.9±3.7*	48.6±1.7	8.8±0.5
3LL	87.2±3.3*	36.4±0.9	9.5±1.4
MDBK	46.2±2.8	20.4±2.5	5.3±0.5

*: Sensitive i.e., % inhibition≥50, data are mean ±SD from each of four separated experiments.

암세포주에 생육억제효과가 나타났으나 유황오리보다 그 수치가 낮았다. 유황오리 추출물의 경우 KB, Farrow, HEP-2, 3LL등에서는 80% 이상의 높은 암세포 생육억제효과를 나타내었다.

유황오리 추출물의 농도에 따른 암세포 생육억제효과

유황오리 추출물의 각 농도에 따른 각종 암세포의 생육억제효과는 Table 2와 같다. 10 mg/mL의 농도에서는 인체 암세포인 KB, SNU-1, K-562, Farrow, WiDr, SK-MES-1, HL60, Calu-3 및 HEP-2와 마우스 암세포인 P388과 3LL에 현저한 생육억제효과가 있었다. 그러나 1 mg/mL와 0.1 mg/mL의 농도에서는 생육억제효과가 거의 나타나지 않았다.

한편 A-549, SF-188, HEC-1B 등에서는 10, 1 및 0.1 mg/mL의 농도에서 각종 암세포에 대한 생육억제효과가 거의 없었다. 대조구로 사용된 정상세포주인 MDBK의 경우는 10 mg/mL의 농도에서도 세포독성이 없는 것으로 판단되었다.

HP-20 Column Chromatography에 의한 유황오리 추출물 각 분획의 항암활성

HP-20 column chromatography에 의한 유황오리 추출물 각 분획의 HEP-2에 대한 생육억제효과는 Table 3과 같다. 25, 50 및 75% methyl alcohol에서 용출된 용출물의 생육억

Table 3. Growth inhibition of various fractions of extract from sulfur fed duck carcass against HEP-2 cell lines

Sample	Inhibition(%)		
	10 mg/mL	1 mg/mL	0.1 mg/mL
A	45.9±1.5*	31.4±1.7	8.3±1.0
B	46.4±2.2	33.3±4.3	6.1±1.9
C	43.8±1.5	25.9±1.5	1.1±0.4
D	99.1±0.4*	38.0±1.0	11.4±1.0

* : Sensitive i.e., % inhibition ≥ 50 , data are mean \pm SD from each of three separated experiments. A - fraction of 25% MeOH an effluent, B - fraction of 50% MeOH an effluent, C - fraction of 75% MeOH an effluent, D - fraction of 100% MeOH an effluent.

이 효과는 10 mg/mL의 농도에서도 거의 나타나지 않았으나 100% methyl alcohol에서 용출된 용출물의 HEP-2에 대한 생육억제 효과는 10 mg/mL에서 99% 이상의 강한 효과를 나타내었다. 그러나 1 mg/mL 및 0.1 mg/mL 농도에서는 생육억제 효과가 거의 나타나지 않았다.

요 약

유황오리 추출물의 각종 암세포에 대한 생육억제효과를 MTT assay를 이용하여 검토한 결과 10 mg/mL의 농도에서 SK(B구강상피암) 89.5±0.7%, SNU-1(위암) 69.8±1.7%, K562(백혈병) 79.8±2.8%, Farrow(흑색종) 82.7±2.6%, WiDr(결장암) 76.3±2.5%, SK-MES-1(폐암) 59.2±4.4%, HL60(백혈병) 60.5±3.5%, Calu-3(폐암) 53.2±1.6%, HEP-2(후두암) 40.7±0.5%, P388(마우스 백혈병) 79.9±3.7%, 3LL(마우스 폐암) 87.2±3.3%의 효과가 있다는 사실이 판명되었다. 그리고 유황오리 추출물의 HP-20 column chromatography에서는 100% methyl alcohol 용출물이 HEP-2에 대한 생육억제 효과가 있었으며, 10 mg/mL에서 99.1±0.4%의 생육억제 효과가 나타났다. 또한 일반오리 추출물과 유황오리 추출물의 각종 암세포에 대한 생육억제효과를 비교하였을 때 거의 모든 암세포에서 유황오리 추출물의 효과가 더 높았다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 건국대학교 학술진흥연구비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Ahmann, F. R., Meyskens, F. L., Moon, T. E., Durie, G. M. and Salmon, S. E. (1982) *In vitro* chemosensitivities of human tumor

stem cells to the phase II drug 4'-[9-acridiny lamino)methanesulfon-*m*-anisidide and prosectine *in vivo* correlations. *Cancer Research*, **42**, 4495-4498.

- Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursley, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, **48**, 589-601.
- Grdisa, M., Popovic, M. and Hrenjak, T. (2001) Glycolipoprotein extract (G-90) from earthworm *Eisenia foetida* exerts some antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **128**, 821-825.
- Lee, K. H., Hong, H. S., Lee, C. H. and Kim, C. H. (2000a) Induction of apoptosis in human leukaemic cell lines K562, HL60 and U937 by diethylhexylphthalate isolated from *Aloe vera* Linne. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **52**, 1037-1041.
- Lee, K. H., Kim, J. H., Lim, D. S. and Kim, C. H. (2000b) Anti-leukaemic and anti-mutagenic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate isolated from *Aloe vera* Linne. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **52**, 593-598.
- Robert, H., Shoemaker, M. K. and Wolpert (1985) Application of a human tumor colony-forming assay to new drug screening. *Cancer Research*, **45**, 2145-2153.
- Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paul, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Scudiero, D. A., Monks, A. and Boyd, M. R. (1990) Comparison of *in vitro* anticancer drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, **82**, 1113-1118.
- Suganuma, M., Ohkura, Y., Okabe, S. and Fujiki, H. (2001) Combination cancer chemoprevention with green tea extract and sulindac shown in intestinal tumor formation in Min mice. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **127**, 69-72.
- Xu, J. M., Song, S. T., Tang, Z. M., Jiang, Z. F., Liu, X. Q., Zhou, L., Zhang, J. and Liu, X. W. (1999) Predictive chemotherapy of advanced breast cancer directed by MTT assay *in vitro*. *Breast Cancer Research and Treatment*, **53**, 77-85.
- Yan, M., Lin, H., Shen, Y. and Wang, Q. (2001) Studies on inhibiting activities of five antitumor drugs to human cancer cell *in vitro* with MTT assay. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, **24**, 418-419.
- 구정희, 김운애, 류경희, 정형도 (1992) 동약학 개론, 여강 출판사, pp. 442-443.
- 박재갑 (1993) 전통약물로부터 신약 개발, 항암제의 검색방법. 서울대학교 천연물 과학 연구소, 174-181.
- 한국식품개발연구원 (1999) 유황오리와 일반오리의 영양성분 분석 및 비교시험 보고서.
- 황우익, 차승만, 이세영 (1980) 한국산 생약제로부터 항암성분의 추출 및 그의 항암성 활성 측정에 관한 연구. 한국생화학회지, **13**(1), 25-29.
- 허준 (1994a) 동의보감 I - 내경편, 여강 출판사.
- 허준 (1994b) 동의보감, 탕액편 「오리」 조.