

Propolis가 종양 억제작용에 미치는 영향

권명상¹ · 김영후² · 조정순^{2*}

¹강원대학교 수의학과, ²명지대학교 식품영양학과

Effects of Propolis on Tumoricidal Activities

Myung-Sang Kwon¹, Young-Hwu Kim² and Jung-Soon Cho^{2*}

¹Dept. of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Myongji University, Yongin 449-728, Korea

Abstract

In recent years, propolis has attracted much attention as an useful substance in medicine and functional food, even if it is known as a natural remedy in folk medicine since ancient times. Propolis was registered as natural food since 1995 on Korean Food Act by Korean Food and Drug Administration(KFDA). The present study demonstrated the optimization of isolation of crude propolis by ethanol, and tumoricidal effect of propolis. The optimal concentration of ethanol to separate a high quantity of propolis was 60%. The cytotoxic effect of ethanol extracted propolis against various cancer cell lines including murine lymphoma (Sarcoma-180), murine T-lymphoma (YAC-1), human breast carcinoma (MCF-7), human gastric carcinoma (KATO III) and human hepatocellular carcinoma (Hep3B) and human lung adenocarcinoma (A-549) was observed using SRB and MTT assay. In order to investigate the curative activity by oral administration of propolis on tumor, ICR mice was subcutaneously implanted Sarcoma 180. In 300mg/kg and 600mg/kg propolis administered group, development of implanted tumors was inhibited by 40.9% and 67.9% at 16th day, respectively. In the same dose of propolis administered group, development of implanted tumors was inhibited more strongly with dose dependent manner. Therefore, these data suggested propolis may show tumoricidal effects. In conclusion, these results indicate that propolis, one of the few natural remedies, can be used as functional food with tumoricidal effects.

Key words : Propolis, Tumoricidal activities, Sarcoma-180, SRB assay, MCF-7.

서 론

Propolis는 꿀벌들이 박테리아로부터 벌집을 보호하기 위해 나무에서 분비되는 resin을 수집하여 체내에서 대사하여 만들어진 물질로서 꿀, 화분, 봉납, balsam과 필수 방향족 oil을 주성분으로 하고, 아미노산과 미량원소를 포함하며, 비타민 C, E와 베타-카로틴, bioflavonide 등이 상당량 혼합되어 있어 건강증진(Sabatier *et al* 1992) 및 감염, 질병, 세포파괴, 노화 등에 대항하는 면역계를 강화시킨다고 보고되어 있다 (Pepljnjak 1985, Morse *et al*, 1987, Yamauchi *et al* 1992).

Chinthalapally 등(1993)과 Grunberger 등(1988)은 프로폴리스 ethyl ether 분획 중의 caffeic acid phenethyl ester로 흰 쥐와 사람의 흑색종 및 유방암 세포를 치료하면 암세포의 증식이 낮아지고 DNA 합성률도 낮아짐을 보고하였으며 항암

작용을 하는 주요 성분중의 하나로 caffeic acid phenethyl ester를 설명하였다.

Scheller 등(1977)은 Ehrlich carcinoma에 대한 항종양 효과에 대하여 기존의 항암제인 bleomycin와 혼용시의 효능의 탁월성을 보고하기도 하였다. 그리고 Sud'ina 등(1993)은 propolis의 성분 중 caffeic acid가 lipooxygenase inhibitor로 작용한다고 보고하였고, 아울러 Borrelli 등(2002)은 propolis 성분의 항염증효과에 관한 연구 결과를 발표하기도 하였다.

이제까지 propolis의 항암성 연구(Strehl *et al* 1992, Frenkel 1993)에서는 생쥐의 피부암 세포에 대해 암세포 증식억제 효과가 있는 것으로 보고되었다(Lee *et al* 2000).

본 연구에서는 우리나라에서 1995년 식품공전(보건복지부 1997)에 등재되어 건강보조식품으로 사용할 수 있도록 허가된 인체에 유익한 천연물질인 propolis의 Sarcoma 180, 유방암, 위암, 간암, 폐암 등 종양 세포주에 대한 종양 억제 작용을 검색, 분석하여 propolis가 식품산업에서 항암 효과를 보이는 기능성 식품으로의 응용 가능성을 제시하고자 한다.

* Corresponding author : Jung-Soon Cho, Tel : +82-31-330-6201, Fax : +82-31-330-6201, E-mail : chojs@mju.ac.kr

재료 및 방법

1. 실험재료

1) Propolis

(1) 원료

본 실험에 사용된 propolis는 (주)천보실업을 통하여 수입된 중국산 시료를 사용하였고 60% ethanol을 사용하여 rotary vacuum evaporator (Heidolph VV2011, Germany)로 추출한 결과 46.6% 수율을 나타내었다.

2) 종양 세포

(1) 종양 세포주

Propolis의 종양 세포주에 대한 증식 억제 능력 시험을 위하여 Table 1에 나타나는 바와 같은 종양세포주인 Sarcoma 180, YAC-1, MCF-7, KATOIII, Hep3B, 그리고 A-549 등을 준비하였다. 사람의 간암세포주인 Hep 3B(Human hepatocellular carcinoma)는 American type culture collection (ATCC, HB8064)로부터 구입하였고 Sarcoma 180(ATCC, TIB 64)를 비롯한 나머지 종양 세포주들은 한국 세포주 은행으로부터 분양받았다.

(2) 종양세포의 배양

종양세포 배양(Lefkovis I. 1997a)은 Hep3B의 경우는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco USA, 6.7 g)과 nutrient mixture F-12(5.3 g)를 1:1(V/V) mixture, gentamicin sulfate 40 mg, sodium bicarbonate 2 g, hepes buffer 2 g을 3차 증류수에 용해시킨 후 pH 7.0~7.2로 조절하여 20% fetal

bovine serum(FBS, Gibco. USA)로 보강된 배지에 접종하여 37°C(5% CO₂ incubator, Sanyo, Japan MCO-175)에서 24시간 배양하였다. Sarcoma 180은 DMEM 배지를 사용하여 배양하였으며, 나머지 종양세포들도 배양방법은 동일하나, 배지로는 RPMI(Rosewell Park Memorial Institute, Sigma, USA)-1640 완전배지를 사용하였다.

3) 실험동물 및 사육

8주간의 Sarcoma 180에 의해 유발된 종양의 성장저해도 측정을 위해서는 계대배양용으로 5주령 수컷 ICR mice 수컷을 (주)오리엔트로부터 공급받아 동물 사육실에서 7일간 고형사료(pellet)로 사육하면서 환경에 적응시켰다. 1주일간 안정시킨 후 실험동물을 체중에 따라 난피법(randomized complete block design)에 의해 각 군별로 분리하였다.

사육실 조건은 온도는 20°C~25°C, 습도는 60~70%로 유지시켰으며, 조명은 12시간 간격으로 조절하였다. 사료는 제일제당(주)의 마우스용 배합사료(조단백질 20%, 조지방 3%, 조섬유 10%, 조회분 10%, 칼슘 0.6%, 인 0.4% 등)를 급여하였고 사료와 물은 실험종료시점까지 자유롭게 먹도록 하였다.

(1) 실험용 Propolis의 조제

Propolis를 녹이기 위한 용매로는 Tween 80(Sigma, USA)을 사용하였으며 그 용해방법은 다음과 같다.

Tween 80용액 100 μ L, 150 또는 300 μ L를 10 mL의 Falcon 캡 튜브에 넣고 25 mg, 75 mg 또는 150 mg의 곱게 분쇄한 propolis와 잘 혼합한 후 이 용액을 90°C 상태의 항온수조에 5~10분 정도 담가 충분히 용해시킨 다음 항온수조에서 용기를 꺼내고 다시 PBS(phosphate buffered saline, Difco, USA)나 증류수를 4.9 mL 또는 4.7 mL씩 채워 5 mL로 맞추었다. 그런 다음 최종적으로 5 mL의 propolis 용액을 재차 항온수조에 담그면서 녹였다. 그 후 완전히 용해 시에는 실온의 온도로 맞추어 후 체중 20 g의 Balb/C 수컷 마우스에 투여하며 이때 최종적인 경구투여량은 200 μ L로 하였다.

2. 실험방법

1) SRB Assay

SRB(sulforhodamine B) 방법은 *in vitro* 내에서 세포 단백질 염색을 이용하였다(Martin & Martin 1997). 96well plate의 각 well에 5×10⁴/mL의 다양한 세포주가 포함된 100 μ L의 배지를 가하여 37°C(5% CO₂ incubator)에서 24시간 배양한 후 0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL 및 100 μ g/mL의 각 농도별 중국산 propolis의 무균적으로 여과된 수용성 시료가 들어있는 100 μ L의 배지를 가한 후 48시간 배양하였다.

Table 1. Various cancer cell lines

Cancer cell lines	Sources	Culture media
Sarcoma 180	Murine lymphoma	DMEM
YAC-1	Mmurine T-lymphoma	RPMI-1640
MCF-7	Hhuman breast adenocarcinoma	RPMI-1640
KATOIII	Human gastric carcinoma	RPMI-1640
Hep3B	Human hepatocellular carcinoma	DMEM
A-549	Human lung adenocarcinoma	RPMI-1640

48시간 후 배지를 aspirator로 제거하고 미리 cooling한 TCA (trichloro acetic acid, 최종농도 10%) 100 μ L를 가하여 4°C에서 1시간 방치하고 증류수로 5회 세척하여 건조시킨 후 각 well에 1% acetic acid에 녹인 SRB(sulforhodamine B) 용액 100 μ L를 가하였다. 그리고 상온에서 30분 염색한 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 건조시킨 후 10 mM Tris buffer (pH 10.5)로서 염색액을 녹여서 ELISA reader(Perkin Elmer HYS-7000, USA)로 540 nm에서 OD를 측정하여 다양한 종양 세포주에 미치는 propolis의 성장 저해 효과를 검증하였다.

2) MTT assay

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium-bromine)방법은 종양세포의 cell viability 변화를 측정하는 방법이다(Russell & Vindelov 1998).

96 well microtiter plate에 KATO III, Sarcoma 180, YAC-1 및 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 완전배지를 1×10^5 /mL 농도로 각각의 well에 180 μ L씩 넣고 37°C, 5% CO₂에서 24시간 incubation한 다음 0.1 μ g/mL, 1 μ g/mL, 5 μ g/mL 및 25 μ g/mL의 각 농도별 중국산 A급 propolis의 수용성 시료를 무균적으로 여과하여 첨가하고, 최종 volume이 200 μ L가 되게 배지를 채운 후 48시간 incubation한 다음, MTT 용액(2 mg/mL)을 50 μ L씩 각 well에 첨가하고 formazan을 형성시키기 위해 4시간 동안 incubation한 후 aspirator로 상등액을 제거하고, 150 μ L의 DMSO를 첨가하여 formazan을 충분히 녹인 다음 ELISA reader(Perkin Elmer HYS-7000, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

3) 측정 결과에 대한 분석방법

Propolis의 수용성 추출물이 종양 세포주에 대해 나타내는 세포독성을 항종양 효과의 지표로 삼았으며 시험군의 평균 O.D.값을 구하여 대조군(100% 생존군)의 평균 O.D.값에 대한 백분율을 산출하여 저해효과로 하였다.

4) Sarcoma 180에 의해 유발된 종양의 성장 저해도 측정

(1) 종양세포의 접종

계대배양용으로 수컷 ICR 마우스의 복강 내에 5×10^6 개의 Sarcoma 180을 주입하여, 1주일 후 같은 요령으로 종양 세포주를 유지하였다. 계대배양용 마우스의 경추를 탈구한 후, 마우스 피부 표면을 70% ethanol 분무로 소독한 다음, 피부를 벗기고 복막이 보이면, 일부를 외과용 가위로 cutting 후, 복수를 채취하며 PBS를 복강 내에 주입하면서 지속적으로 최대 복강 내로 주입한 Sarcoma 180을

50 mL Cornical tube에 모았다. 모은 세포는 얼음 내에 유지하면서 PBS를 부어 1,000rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리로 washing하는 과정을 3회 반복한 후 5주령 수컷 ICR 마우스의 등에 5×10^6 개의 Sarcoma 180 세포를 피하로 접종하였다.

(2) 항암 스크리닝 평가

분리 추출한 propolis를 종양 발생 마우스에 경구로 투여하여 종양의 성장을 저해하는가에 대한 기초 스크리닝 검사를 실시하였다. 종양 세포인 Sarcoma 180을 접종한 후 7일이 되면, calliper로 종양의 직경을 재서 5 mm가 넘는 개체들을 골라 propolis를 투여하였다. 투여 방식과 투여량, 농도는 다음과 같다. Propolis 추출물 300 mg/kg과 600 mg/kg으로 각 군에 zonde를 이용하여 경구로 위내에 투여하였다. 투여기간 중 일정한 기간의 차이를 두고 다음의 식 (1)에 의해 암의 크기를 측정하고 아울러 propolis의 Sarcoma 180의 저해도를 식 (2)에 의해 군별로 측정하였다.

$$\textcircled{1} \text{ 종양의 크기} = \frac{4/3 \pi \times a^2 b}{2} \quad (a: \text{최단직경}, b: \text{최장직경})$$

$$\textcircled{2} \text{ 종양의 저해도} = \frac{(C-T)}{\text{Control 군의 종양크기}}$$

C : 양성 대조군의 종양 크기
T : 실험군의 종양 크기

5) 통계 분석

본 실험에서의 모든 실험 결과는 실험군별 평균(mean)±표준편차(SD)로 표시하였고 각 군간 평균치의 통계적 유의성 검정은 one way analysis of variance(ANOVA) 검정을 하였으며, 다군간의 차이는 statistical analysis software(SAS) package 를 이용하여 Duncan's new multiple *t*-test에 의하여 $p < 0.05$ 의 수준에서 검정하였다(The Bureau of Statistics 1996).

결과 및 고찰

1. Propolis의 종양 세포 증식 억제 효과

Table 2와 Table 3은 SRB assay와 MTT assay를 종합한 결과이다. 본 실험을 위하여 세포의 수는 각각 5×10^5 /well, 1×10^7 /well 의 2 가지로 하였는데 실험에 사용한 모든 종양세포들이 공히 propolis의 첨가에 의하여 억제작용을 나타냈으며 그 중에서도 Table 2에서 나타나는 바와 같이 특히 human breast carcinoma인 MCF-7의 경우 0.1 μ g/mL의 저 농도의 propolis 첨가군에서도 세포의 농도와 무관하게 10%가 넘는

발육 억제 효과를 나타냈고 고농도인 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시에는 발육 억제 효과가 더욱 증가하여 세포 수에 따라 각기 36.8%와 33.6%의 유의성이 있는 발육 억제 효과를 나타내었다.

한편 Sarcoma 180과 YAC-1의 경우는 propolis를 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가한 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군의 경우 각각 28.9%와 29.8%의 발육 억제 효과를 나타내었으며 propolis를 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가한 군에서 오히려 발육 억제 효과가 점차 감소되어 각각 21.3%와 22.6%를 나타내었다. 이는 *in vitro*내에서의 이들 세포주에 대한 발육 억제를 위한 적합한 농도는 MCF-7과 달리 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하인 것을 시사하여 주는 것이다.

Human gastric carcinoma인 KATO III에 대한 propolis의 발육 억제 효과는 Table 3에 나타내었다. 이 경우 고농도인 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 propolis와 반응시킨 $5 \times 10^5/\text{well}$ 의 군에서는 38.1% 그리고 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서 49.4%의 강력한 발육 억제 효과를 나타내었고 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 propolis와 반응시킨 $5 \times 10^5/\text{well}$ 의 군에서도 25.9%, $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서는 28%의 발육 억제

효과를 나타내었다. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 propolis와 반응시킨 $5 \times 10^5/\text{well}$ 의 군에서는 11.8%, $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서는 12.1%의 억제 효과를 보였으며, 최저농도인 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 propolis와 반응시킨 $5 \times 10^5/\text{well}$ 의 군에서는 7.2% 그리고 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서는 8.7%의 발육 억제 효과를 나타내었다.

한편 human hepatocellular carcinoma인 Hep3B의 경우는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 propolis와 처리한 $5 \times 10^5/\text{well}$ 의 군에서는 50.1% 그리고 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서 50.7%를 나타내어 propolis의 경우 본 실험에서 사용한 여러 가지 종양세포주 중에서도 human hepatocellular carcinoma인 Hep3B에 가장 강력한 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 그리고 폐암세포주인 A 549의 경우는 고농도인 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서 44.3%가 넘는 발육 억제 효과를 나타내었다.

이상의 결과는 Banskota *et al*(2002)의 연구에서 보고한 네덜란드산 methanol 추출 propolis의 murine colon 26-L5, murine B16-BL6 melanoma 및 human HT-1080 fibrosarcoma cell

Table 2. Inhibitory effect of propolis on the growth of different cancer cell lines I

(unit = %)

Concentration of propolis($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cancer cell lines					
	Sarcoma 180 ¹⁾		YAC-1 ²⁾		MCF-7 ³⁾	
	5 $\times 10^5/\text{well}$	① 1 $\times 10^7/\text{well}$	② 5 $\times 10^5/\text{well}$	③ 1 $\times 10^7/\text{well}$	④ 5 $\times 10^5/\text{well}$	⑤ 1 $\times 10^7/\text{well}$
Control	0	0	0	0	0	0
0.1	2.6 \pm 1.3	8.4 \pm 1.6	1.4 \pm 0.3	1.0 \pm 0.4	14.0 \pm 1.9	12.1 \pm 1.7
1	13.4 \pm 1.9	14.8 \pm 2.7	7.6 \pm 1.3	5.2 \pm 1.0	19.9 \pm 1.4 ^{a)}	12.6 \pm 1.6 ^{a)}
5	19.2 \pm 2.3 ^{a)}	28.9 \pm 5.8 ^{a)}	19.9 \pm 5.9	29.8 \pm 3.6 ^{a)}	17.2 \pm 5.2 ^{a)}	25.4 \pm 7.6 ^{a)}
25	15.0 \pm 3.9	21.3 \pm 8.1 ^{a)}	14.9 \pm 4.0	22.6 \pm 6.5 ^{a)}	36.8 \pm 8.8 ^{a)}	33.6 \pm 12.9 ^{a)}

Values are means \pm SD. (n=5), Each data were mean of triplicate, ^{a)} Significantly different from control by *t*-test ($p < 0.05$), ¹⁾ Sarcoma 180 is murine lymphoma, ²⁾ YAC-1 is murine T-lymphoma, ³⁾ MCF-7 is human breast adenocarcinoma.

Table 3. Inhibitory effect of propolis on the growth of different cancer cell lines II

(unit = %)

Concentration of propolis($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cancer cell lines					
	KATO III ¹⁾		Hep 3B ²⁾		A-549 ³⁾	
	5 $\times 10^5/\text{well}$	⑥ 1 $\times 10^7/\text{well}$	5 $\times 10^5/\text{well}$	⑦ 1 $\times 10^7/\text{well}$	5 $\times 10^5/\text{well}$	⑧ 1 $\times 10^7/\text{well}$
Control	0	0	0	0	0	0
0.1	7.2 \pm 1.4	8.7 \pm 1.7	5.0 \pm 1.4	11.8 \pm 2.4	4.3 \pm 1.1	3.6 \pm 1.3
1	11.8 \pm 2.5	12.1 \pm 2.6	7.5 \pm 1.9	13.9 \pm 3.1	6.3 \pm 2.1	18.2 \pm 1.8
5	25.9 \pm 3.1	28.0 \pm 3.5	18.4 \pm 6.8	23.1 \pm 4.9 ^{a)}	35.1 \pm 8.5 ^{a)}	33.5 \pm 3.1 ^{a)}
25	38.1 \pm 2.2	49.4 \pm 6.7 ^{a)}	50.1 \pm 7.4 ^{a)}	50.7 \pm 12.5 ^{a)}	27.3 \pm 7.9 ^{a)}	44.3 \pm 8.6 ^{a)}

Values are means \pm SD. (n=5), Each data were mean of triplicate, ^{a)} Significantly different from control by *t*-test ($p < 0.05$), ¹⁾ KATO III is human gastric carcinoma, ²⁾ Hep3B is human hepatocellular carcinoma, ³⁾ A-549 is human lung adenocarcinoma.

lines들에 대한 결과와 추출 용매의 차이와 사용된 세포주의 차이가 있음에도 강력한 증식 억제 효과가 있다는 보고와 유사하며 특히 본 연구에서도 사용된 human lung adenocarcinoma인 A-549에 대한 네덜란드산에 대한 증식 억제 효과에 대한 보고는 본 연구와 정확하게 일치하여 propolis의 효능을 다시금 일깨워 주는 중요한 연구 결과라고 사료된다. 한편 Song *et al*(1997), Lee *et al*(2000)도 본 연구와 유사한 결과들을 최근 발표하며 이러한 propolis의 종양 세포주인 인체 결장암세포인 HT-29와 간암세포주인 HepG2에 대한 증식 억제는 세포주기 중 G1 phase에서 S phase로의 진행을 지체시키는 데 의한다고 보고하였다.

이상의 결과들을 종합 분석하여 볼 때 비록 본 실험이 *in vitro* 상에서 실시되었지만 다음의 *in vivo* 동물실험의 결과와 종합하여 보면 propolis내 함유된 다양한 flavonoids를 바탕으로 한 기능성 물질로서 개발 가능성이 있다고 하겠다.

2. Propolis의 Sarcoma 180 종양세포 성장 억제

Propolis의 종양 억제 작용의 *in vivo*의 실험으로 propolis가 실제로 생체 내에서 생성된 종양세포에 대한 저해 능력이 있는가를 검증하기 위하여 실시하였다. Table 4와 Table 5에서 보는 바와 같이 propolis를 투여한 군의 경우 대조군에 비하여 현저한 종양세포의 제어 효과가 있음을 알 수 있었다.

결과는 propolis의 농도에 비례한 효과로서 종양 발생 16일째부터 300 mg/kg propolis 투여군의 경우 종양의 용적이 대조군의 148.6 mm³에 비하여 87.8 mm³의 현저한 저해작용을 하였으며, 이를 저해율로 환산하면 40.9%에 해당한다. 또한 600 mg/kg 투여군의 경우는 47.7 mm³ 더욱 더 억제되어 저해율은 67.9%이었다. 종양 발생 29일째의 경우는 대조군의 경우 118.3 mm³인데 반하여 300 mg/kg 투여군은 57.5 mm³로 저해율은 51.4%이었으며 특히 600 mg/kg propolis 투여군은 더욱 억제 작용을 하여 19.5 mm³의 83.5%의 강력한 저해율을 나타내었다.

Data were calculated by the following formula

$$\text{Inhibitory ratio} = \frac{(C - T)}{C}$$

C : means tumor size of Sarcoma 180 inoculated groups.

T : means tumor size of propolis treated groups.

그런데 본 실험에서 대조군 역시 시간이 경과함에 따라 종양세포 접촉 29일째부터 종양의 크기가 점차적으로 줄어드는 현상을 볼 수 있는데 이는 종양 자체가 ICR mice에 xenograft로 작용하여 생체 자체가 면역반응을 유발하여 종양을 제거하려 하는 것을 알 수 있다. 그러므로 본 연구 결과

Table 4. Inhibitory effect of propolis on the growth of Sarcoma 180 induced tumor *in vivo* (unit = mm³)

Dose of propolis (mg/kg)	Days after Sarcoma 180 inoculation				
	8	16	22	29	36
Untreated	68.5±5.6	148.6±12.5	127.1±6.9	118.3±11.3	102.7±13.6
300	69.6±6.2	87.8± 7.5	62.9±7.1 ^{a)}	57.5± 4.2 ^{a)}	63.9±11.5
600	65.3±8.2	47.7± 5.3 ^{a)}	23.5±4.4 ^{a)}	19.5± 3.6 ^{a)}	38.6± 5.8 ^{a)}

Values are mean±SD. (n=10).

^{a)} Significantly different from control by *t*-test (*p*<0.05).

Table 5. Influence of propolis on inhibitory ratio of Sarcoma 180 induced tumor *in vivo* (unit = %)

Dose of propolis (mg/kg)	Days after Sarcoma 180 inoculation				
	8	16	22	29	36
Untreated	UC*	100	100	100	100
300	UC	40.9±5.2 ^{a)}	50.5 ^{b)} ±6.3	51.4±6.3 ^{a)}	37.8±4.6
600	UC	67.9±8.3 ^{a)}	81.5 ±9.2 ^{a)}	83.5±7.2 ^{a)}	62.4±5.2 ^{a)}

* UC is uncountable

^{a)} Significantly different from control by *t*-test (*p*<0.05).

^{b)} Values are means±SD. (n=10).

Table 6. Change of body weight

(unit = g)

Dose of propolis (mg/kg)	Days after Sarcoma 180 inoculation					
	8	16	22	29	36	43
Untreated	37.2±3.5	37.6 ^{b)} ±2.2	39.1±4.9	40.4±3.8	40.6±7.1	41.5±8.6
300	37.2±2.5 ^{a)}	38.6 ±2.7 ^{a)}	38.4±3.1 ^{a)}	39.7±8.2	40.4±3.7 ^{a)}	40.8±5.6 ^{a)}
600	37.2±3.9 ^{a)}	39.8 ±6.2	39.7±9.6	41.2±6.6 ^{a)}	42.5±4.5 ^{a)}	41.9±6.1 ^{a)}

^{a)} Significantly different from control by *t*-test ($p < 0.05$), ^{b)} Values are means±SD. ($n=10$).

가 시사하는 것은 propolis의 투여는 면역 증강 작용을 하여 생체 자체가 지닌 종양세포 제어작용을 더욱 활성화시킬 수 있다는 것이다(Park HK). 그런데 종양세포 접종 후 propolis 투여군과 대조군의 체중의 변화를 비교하였을 때 Table 6에서 보는 바와 같이 propolis 투여에 따른 특별한 차이는 관찰되지 않았다.

이상의 연구 결과는 Scheller 등(1989)이 보고한 Ehrlich carcinoma로 유발된 암의 치료에 있어서 항암제인 bleomycin과 ethanol 추출 propolis의 병용시 항암 치료 효과를 높였다는 보고에서 유추할 수 있는 propolis의 항암 효과와 일치하였으며 또한 Suzuki등은 수용성 propolis를 ascitic Ehrlich carcinoma로 암을 유발시킨 마우스에 항암제를 단독으로 투여하여 생기는 백혈구 감소증, 혈소판 감소증, 탈모 및 식욕감퇴 등의 부작용을 줄이고자 항암제인 5-fluorouracil 및 mytomycin C와 병용하여 사용한 결과 항암제의 사용량도 줄임으로 항암제에 의해 발생하는 부작용도 줄일 수 있다고 설명하였는데 본 실험의 propolis 단독으로 사용한 항암 효과를 바탕으로 향후 항암제 병용 실험을 한다면 매우 의미 있는 결과가 나올 수 있을 것으로 기대된다.

Lee 등(2000)의 최근 연구에 의하면 propolis 투여군의 경우 Sarcoma 180에 유발된 종양 마우스에서 종양의 크기가 줄어들었으며 생존기간이 다소 늘었다는 보고를 하였는데 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다고 하겠다. Banskota 등(2000)은 최근 브라질산 propolis의 성분 중에서 2가지의 benzofuran 유도체들이 종양에 대한 세포독작용을 하는 성분인 것을 발표하였는데 본 연구 결과에서의 propolis의 항 종양성분과의 연관성도 유추할 수 있겠다.

요약 및 결론

본 실험은 우리나라에서 1995년 식품공전에 등재되어 건강보조식품으로 사용할 수 있도록 허가된 인체에 유익한 천연 물질인 propolis의 Sarcoma 180, YAC-1, MCF-7, KATO III, Hep3B, A-549 등의 종양 세포주에 대한 종양 억제 작용을 검색을 하여 분석한 결과는 다음과 같다.

*In vitro*상에서 human breast carcinoma인 MCF-7의 경우 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 저 농도의 propolis 첨가군에서도 세포의 농도와 무관하게 10% 이상, 고농도인 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시에는 세포 수에 따라 각기 36.8%와 33.6%의 증식 억제 효과를 나타내었다.

Sarcoma 180과 YAC-1의 경우는 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가한 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군의 경우 각각 28.9%와 29.8%의 증식 억제 효과를 나타내었으며 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가한 군에서 오히려 증식 억제 효과가 점차 감소되어 각각 21.3%와 22.6%를 나타내었다.

Human gastric carcinoma인 KATOIII의 경우 고농도인 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 propolis와 반응시킨 $5 \times 10^5/\text{well}$ 의 군에서는 38.1%, 그리고 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서 49.4%의 강력한 증식억제효과를 나타내었고 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 propolis와 반응시킨 $5 \times 10^5/\text{well}$ 의 군에서도 25.9% 그리고 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서는 28%의 증식억제효과를 나타내었고 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 propolis와 반응시킨 $5 \times 10^5/\text{well}$ 의 군에서는 11.8% 그리고 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서는 12.1%의 증식억제효과를 보였으며 최저농도인 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 propolis와 반응시킨 $5 \times 10^5/\text{well}$ 의 군에서는 7.2% 그리고 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서는 8.7%의 증식억제효과를 나타내었다.

Human hepatocellular carcinoma인 Hep3B의 경우는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propolis와 처리한 $5 \times 10^5/\text{well}$ 의 군에서는 50.1% 그리고 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서 50.7%를 나타내어 가장 강력한 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 폐암 세포주인 A-549의 경우는 고농도인 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 $1 \times 10^7/\text{well}$ 의 군에서 44.3%가 넘는 발육 억제 효과를 나타내었다.

이상의 결과로 propolis는 자연이 선물한 최고의 항암 효과를 지닌 천연 기능성 물질임을 알 수 있었으며 향후 사용 목적에 따른 추출방법이나 제형의 변형 등을 통한 제품의 실용화를 통하여 국민 보건의 증진에 활용 가능성이 많을 것으로 사료된다.

문헌

보건복지부 (1977) 식품공전. 한국식품공업협회.
Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY, Tezuka Y, Awale S,

- Midorikawa K, Matsushige K, Ksadota S (2002) Antiproliferative activity of the netherlands propolis and its active principles in caner cell lines. *J Ethnopharmacology* 80: 67-73.
- Banskota AH, Tezuka Y, Adnytana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, Huertas AAG, Ksadota S (2000) Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacology* 72: 239-246.
- Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S (2000) Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. *J Nat Prod* 63: 1277-1279.
- Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A (2002) Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitotera* 73: S53-S63.
- Chinthalapally VR, Dhimant D, Abraham R, Barbara S, Shantu A, Bandaru SR (1993) Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res* 53: 4182-4188.
- Frenkel K, Wei H, Bhimani R, Ye J (1993) Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res* 53: 1255-1261.
- Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM (1988) Preferential phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 44: 230-232.
- Lee HS, Lee JY, Kim DC, In MJ, Hwang WI (2000) The inhibitory effects of propolis on *in vitro* proliferation of human cancer cell lines. *National Sci* 33: 80-85.
- Lee SH, Dong Kim C, Lee JY, Cho MJ, Hwang WI (2000) A study on the anticancer activity of propolis. *J Food Sci Nutr* 5: 54-57.
- Morse RA, Culloney TW, Gutenmann WH, Littman CB, Lisk DJ (1987) Polychlorinated biphenyl in honey bees. *Bulletin Environ. Contamination and Toxicol* 38: 271-276.
- Park HK (2000) Use of the propolis as folk medicine by beekeepers in Korea. *Korean J Apiculture* 15: 121-130.
- Pepljnjak S (1985) Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis* identification of pinocembrine and galangin as antiseptic compounds. *Pharmazie* 40: 122-123.
- Sabatier S, Amiot M, Tacchini M, Aubert S (1992) Identification of flavonoids in sunflower honey. *J Food Sci* 57: 733-734.
- Scheller S, Szaflarski J, Tustanowski J, Nolewajka E, Stojko A (1977) Biological properties and clinical application of propolis I. Some physicochemical properties propolis I. Some physicochemical properties of propolis. *Arzneim. Forsch/Drug Res* 27: 889-890.
- Song YH, Huh HY, Kim CS, Kim KJ (1997) Effects of Propolis and caffeic acid phenethyl ester on tumorigenesis, pulmonary metastases, and activities of splenocytes and macrophages in mice. *Korean J Immunol* 19: 617-627.
- Statistical annual of mortality cause (1996) The Bureau of Statistics, p 37.
- Strehl E, Volpert R, Elstner EF (1994) Biochemical activities of propolis extract. III inhibition of dihydrofolate reductase. *Z Naturforsch C J Biosci* 49: 39-43.
- Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD (1933) Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxigenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS* 329: 21-24.
- Suzuki I, Hayash I, Gu T, Koide M, Takai H, Yamamoto H, Ahn KS (1999) The anti-tumor and anti-cytopenic effects of combined use of water-soluble propolis and anti-cancer drugs. *J Oriental Medicine* 4: 47-54.
- Yamauchi R, Kato K, Oida A, Kamaeda I, Ueno Y (1992) Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1321-1322.

(2005년 7월28일 접수, 2005년 10월 11일 채택)