



유황오리 추출물의 각종 암세포에 대한 생육억제 효과

[최귀현 · 김창한]
건국대학교 동물자원연구센터

1. 서론

예로부터 유황은 여러질병의 처방제로 쓰여왔다. 서양의학에서는 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: 황우의 등, 1980)

오리는 동의보감을 비롯한 옛날 의학서에서는 고혈압, 중풍, 신경통, 동맥경화, 비만, 결핵, 병후회복, 정력증강, 위장질환, 혈액순환을 좋

게 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 생산 하기 위해 유황과 여러 가지 한약재를 섞은 사료로서 유황오리를 사육하고 있으며, 유황오리는 앞에서 열거한 생리적 효과 뿐만 아니라 암 예방효과도 있다고 알려져 있으나 아직까지 세계적인 과학적 근거가 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 유황오리 추출액의 각종 암세포에 대한 생육억제효과를 검토함으로써 유황오리의 과학적인 항암효과를 확인하고자 실시하였다.



2. 재료 및 방법

가. 추출물의 조제

본 연구에 사용한 유허오리와 일반오리는 전라북도 정읍의 (주)해성농산으로부터 생후 9~10주령을 제공받아 사용하였다. 유허오리와 일반오리의 추출물 조제과정은 오리지육 중량의 10배 증류수를 넣고 18시간 중탕하였다. 그것을 여과한 다음 원심분리에 의해 oil 층을 제거하고 액상층을 rotary evaporator에서 감압농축한 후 동결건조하였다. 동결건조물을 phosphate buffer solution(PBS)으로 녹인 후 추출액으로 사용하였다.

나. 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 uterus 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.

나. 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 confluency 가 되는 시점에서 계대배양하였다. 플라스크 바닥에 monolayer를 형성하는 세포는 0.25% trypsin/1 Mm EDTA 용액을 사용하여 단세포로 만들었으며 부유세포인 SNU-1 및 P388등은 여러 번 pipetting하여 단세포로 만들어 사용하였다(XU et al.,1999; Yan et al.,2001)

3. 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(0.5mg/mL)용액 50μL를 첨가한 다음 4시간 추가 배양하여 formazan 형성을 유도시키고,추가 배양이 끝난 후 원심분리(1,000rpm,5 min,4℃)하여 상정액을 제거하였다(Rubinstein et al.,1990).원심분리 후 생긴 blue formazan을 용해시키기 위하여 DMSO를 각 well당 100μL 씩 첨가한 후 plate shaker(Wallac,Finland)에서 20분간 교반 한 후 각 well의 흡광도를 multiwell scanning spectrophotometer(microplate autoreader,Bio-T다 instrument,USA)로

570nm에서 흡광도를 측정하였다.

MTT assay는 $[1 - (\text{OD of treated cells} / \text{OD of control cell})] * 100$ 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-20을 methyl alcohol에 넣고 기포를 충분히 뺀 후에 methyl alcohol을 물로 치환하여 column(2*50 cm, Pharmacia Biotech., USA)속에 40 cm 채워 놓고, 3차 증류수를 이용하여 24시간동안 충분히 흘려 안정화를 시킨 다음 유향오리 추출액 200ml 을 흡착시킨 후 증류수로 충분히 세척 하였다(구 등,1992; Yan et al.,2001).Diaion HP-20에 흡착 된 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.,2000 a,b; Grdisa et al.,2001)

4. 결과 및 고찰

가. 추출물의 수율

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



나. 일반오리와 유황오리 추출물의 암세포 생육억제효과 비교

일반오리와 유황오리의 열수 추출물의 10mg/ml 농도에서 암세포 생육억제효과는 <표 1>과 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 암세포주에 생육억제효과가 나타났으나 유황오리보다 그 수치가 낮았다. 유황오리 추출물의 경우 KB, Farrow, HEP-2, 3LL 등에서는 80% 이상의 높은 암세포 생육억제효과를 나타내었다.

<표 1>

세 포	생 육 억 제	
	유황오리 열수추출물	일반오리 열수추출물
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

다. 유황오리 추출물의 농도에 따른 암세포 생육억제효과

유황오리 추출물의 각 농도에 따른 각종 암세포의 생육억제효과는 <표 2>와 같다.

10mg/mL의 농도에서는 인체 암세포인

KB, SNU-1, K-562, Farrow, WiDr, SK-MES-1, HL60, Calu-3 및 HEP-2 와 마우스 암세포인 P388과 3LL에 현저한 생육억제효과가 있었다. 그러나 1mg/ml 와 0.1mg/ml 의 농도에서는 생육억제효과가 거의 나타나지 않았다.

한편 A-549, SF-188, HEC-1B 등에서는 10, 1 및 0.1 mg/ml의 농도에서도 세포독성이 없는 것으로 판단되었다.

<표 2>

세 포	추 출 물		
	10mg/ml	1mg/ml	0.1mg/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
HL-60	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±0.8
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

라. HP-20 Column Chromatography에 의한 유황오리 추출물 각 분획의 항암활성

HP-20 column chromatography에 의한 유황오리 추출물 각 분획의 HEP-2에 대한 생육억제효과는 <표 3>과 같다.

25, 50 및 75% methyl alcohol에서 용출된 용출물의 생육억제효과는 10mg/ml의 농도에서도 거의 나타나지 않았으나 100%



methyl alcohol에서 용출된 용출물의 HEP-2에 대한 생육억제효과는 10mg/ml에서 99% 이상의 강한 효과를 나타내었다. 그러나 1mg/ml 및 0.1 mg/ml 농도에서는 생육억제효과가 거의 나타나지 않았다.

추출물의 각종 암세포에 대한 생육억제효과를 비교하였을 때 거의 모든 암세포에서 유향오리 추출물의 효과가 더 높았다.

5. 감사의 글

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

<표 3>

구 분	생 육 억 제		
	10mg/ml	1mg/ml	0.1mg/ml
A	45.9±1.5	31.4±1.4	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	1.4±1.0

4. 요 약

유향오리 추출물의 각종 암세포에 대한 생육억제효과를 MTT assay를 이용하여 검토한 결과 10mg/ml 의농도에서 KB(구강상피암) 89.5±0.7%, SNU-1(위암) 69.8±1.7%, K-562(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) 80.7±0.5%, P388(마우스 백혈병) 79.9±3.7%, 3LL(마우스 폐암) 87.2±3.3±%의 효과가 있다는 사실이 판명되었다. 그리고 유향오리 추출물의 HP-20 column chromatography에서는 100% methyl alcohol 용추물이 HEP-2에 대한 생육억제효과가 있었으며, 10 mg/ml에서 99.1±0.4%의 생육억제효과가 나타났다. 또한 일반오리 추출물과 유향오리