

## 실크 단백질 식이공급이 동물대장암에 미치는 영향

여주홍\* · 이광길 · 우순옥 · 권해용 · 한상미 · 박경호<sup>1</sup> · 김성수<sup>2</sup>  
농촌진흥청 농업생물부, <sup>1</sup>경희대학교 동서의학대학원, <sup>2</sup>중앙대학교 의과대학

## Dietary Effect of Silk Protein on Colon Cancer of Animal

Joo-Hong Yeo\*, Kwang-Gill Lee, Soon-Ok Woo, HaeYong Kweon, Sang-Mi Han,  
Kyung-Ho Park<sup>1</sup> and Sung-Su Kim<sup>2</sup>

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea  
<sup>1</sup>Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Seoul 130-710, Korea  
<sup>2</sup>Department of Anatomy, Chung-Ang University, 156-755 Seoul, Korea

### ABSTRACT

This study was done for the dietary effect of silk protein, molecular controlled silk sericin and silk fibroin, on colon cancer of animal. The ICR mice were given weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine (DMZ) for the initial 10 mg/kg with four weeks, and fed a diets supplemented with 3% (v/v) molecular controlled sericin and fibroin for 6 weeks, respectively. Then, the body weight, efficiency of dietary, typical histologic appearance of animal colon tissue and COX-2 effect were studied, too. Molecular controlled sericin protein are shown more higher dietary effect on animal colon cancer than fibroin supplemental case. The results suggest a potential usefulness of sericin as a chemopreventive for colon carcinogenesis and the development functional food.

**Key words :** Silk protein, Sericin, Fibroin, Dietary effect, Animal colon cancer

### 서 론

사회생활의 지나친 스트레스와 서구식 식생활 습관은 소화기 계통을 비롯한 대장질환 관련 질병유발을 부추기고 있고, 사회적 문제로까지 확산되고 있다. 특히, 최근 특이할 만한 것은 변비를 비롯한 대장관련 질환 환자가 급증하고 있으며, 심지어서는 사회 시사 프로그램에까지 소개되고 있다(비타민, 2007). 이와 관련하여 천연물을 소재로 한 여러 가지의 식이소재 연구가 활발히 추진되고 있는 가운데(한국일보 2006, 김 등 2004, 여 등, 1999, Yeo *et al*, 2000, 2006; Kato and Masahiro, 2000; Kato *et al*, 2000). 전보(여 등 2006)에서 실크세리신 단백질이 전체 아미노산의 30% 이상(北條 1980)을 차지하고 있는 세린 및 다른 방향족 성분 등으로 인하여 항산화 효과 및 수분과 관련된 효과를 기대할 수 있음을 보고한 바 있다. 아울러 이것이 새로운 대장관련 소재 개발로 이어질 수 있음을 보고하였다.

이에 본보에서는 전보 이후의 연구결과로서 실크단백질

을 식이 섭취한 동물의 대장암 효과에 미치는 영향을 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 피브로인 단백질 제조

본 연구에 사용한 실크단백질의 제조는 동충하초 생산 후 얻어지는 절각편을 사용하였으며, 제조방법은 여(2006) 등의 방법에 따라 제조하여 사용하였다.

#### 2. 식이 사료조성

실크 단백질을 함유하는 동물식이 사료는 그림 1과 같이 한살R&D(서울)에서 난피법으로 제조하여 각 군으로 30마리를 나누어 6주간 공급하였다. 각 실험군의 식이조성은 표 1과 같으며 실크단백질 세리신과 피브로인은 전체 식이 무게의 3%에 상응하는 실크단백질 세리신과 피브로인을 식이에 혼합하여 공급하였다. 6주간 실크단백질을 첨가하지 않은 정상식을 공급 받은 군을 정상대조군으로 하였다.

\*Corresponding author. E-mail: y610525@rda.go.kr

### 3. 동물 대장암 유도 실험

삼육 실험 동물센터로부터 분양 받은 체중  $20 \pm 2$  g 내외의 ICR 마우스 웅성 흰쥐를 사용하여 고형 사료 및 표준사육조건(온도 :  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도 : 50%)하에서 충분히 적응시킨 후 사용하였다. 그 후 1,2-dimethylhydrazine(DMZ) 시약을 10 mg/kg 농도로 4회(1회/1주) 피하 주사 유발한 후부터 6주간 제조사료로 식이급여를 하였다(Sasaki, *et al.* 2000 Zhaorigetu, *et al.* 2001).

### 4. 현미경 관찰 실험

H&E 염색 등 동물 조직 관찰 실험은 Yeo *et al.* (2000)의 방법에 따라 행하였고, 조직관찰 및 병리학적 소견은 중앙대 의대에 의뢰하여 수행하였다.

### 5. 동물 대장암 인자변화 실험

유도되어진 동물조직의 대장암 인자변화를 알아보기 위하여 COX-2에 대한 인자변화를 알아보았다(Sasaki *et al.*, 2000). COX-2에 대한 면역조직화학적 염색은 먼저 절편한 표본에서 paraffin을 제거한 후 4%  $\text{H}_2\text{O}_2$  용액에 5분간 전 처리하여 조직에 남아 있는 peroxidase를 제거하였다. 표본은 증류수로 세척한 후 COX-2 일차항체 (Anti-human goat polyclonal, Santa Cruz, USA)로 상온에서 2시간 동안 항습 chamber에서 반응시킨 후 LSAB-kit (DAKO A/S, Glostrup, Denmark)에 포함된 2차 항체를 사용하여 20분간 처리하였다. 표본은 TB buffer로 세척한 후 5분간 diaminobenzidine(DAB; DAKO A/S, Denmark)을 이용하여 발색시켰으며, hematoxylin으로 10초간 대조 염색하여 canadian balsam으로 봉입한 후 관찰하여 유효 면적 비에 의한 변화를 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 동물 사료

전문의 방법대로 각각의 실크 단백질 3%(v/v)가 들어간 사료(그림 1) 및 동물 섭취 사료 조성을 표 1에 각각 실었다. 정상식이를 공급받은 정상군은 casein으로 전체 식이무게 중 23% 상응하는 단백질을 공급한 반면, 피브로인 군과 세리신 공급군의 경우는 20%의 casein 단백질에 나머지 3%를 실크단백질로 공급하였다. 또한 이러한 조성으로 만들어진 사료 즉, 실크단백질이 들어가지 않는 사료(R)와 평균 분자량(Mw) 100,000의 세리신이 함유된 사료(S) 및 평균 분자량(Mw) 65,000의 피브로인(F)이 각각 3% 들어간 사료를 제조하였으며, 그림 1의 기존의 (그림 1 좌측) 사료에 비하여 섭취 인자인 향을 개량하여 동물의 섭취가 보다 용이하게 제조하였다(그림 1 우측).

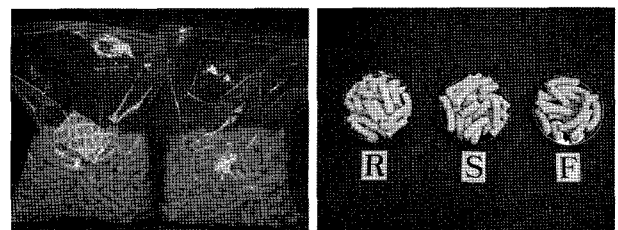
**Table 1.** Compositions of Experimental Diet (g/kg)

Ingredients	Group		
	Control (n = 10)	Sericin	Fibroin
Casein <sup>1)</sup>	230	200	200
Sericin	0	10	0
Fibroin	0	0	10
L-cystine	3	3	3
Corn oil	100	100	100
Cellulose powder	50	50	50
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	10	10	10
Salt mixture <sup>3)</sup>	35	35	35
Sucrose	200	200	200
Corn starch	372	372	372

<sup>1)</sup> Casein (nitrogen  $\times$  6.25), 870 g/kg

<sup>2)</sup> Vitamin Mix Composition : AIN-93 Vitamin Mix #310025 (Dyets Inc, Bethlehem, PA, USA) : Niacin 3 g/kg, Calcium Pantothenate 1.6 g/kg, Pyridoxine HCl 0.06 g/kg, Thiamine HCl 0.6 g/kg, Riboflavin 0.6 g/kg, Folic Acid 0.2 g/kg, Biotin 0.2 g/kg, Vitamin E Acetate (500 IU/g) 15 g/kg, Vitamine B<sub>12</sub> (0.1%) 2.5 g/kg, Vitamine A Palmitate (500,000 IU/g) 0.8 g/kg, Vitamine D<sub>3</sub> (400,000 IU/g) 0.25 g/kg, Vitamine K<sub>1</sub>/Dextrose Mix (10 mg/g) 7.5 g/kg, Sucrose 967.23 g/kg

<sup>3)</sup> Salt Mix Composition : AIN-93 G salt mix #210025 (Dyets Inc, Bethlehem, PA, USA) : Calcium Carbonate 357 g/kg, Potassium Phosphate (monobasic) 196 g/kg, Potassium Citrate H<sub>2</sub>O 70.78 g/kg, Sodium Chloride 74 g/kg, Potassium Sulfate 46.6 g/kg, Magnesium Oxide 24 g/kg, Ferric Citrate U.S.P 6.06 g/kg, Zinc Carbonate 1.65 g/kg, Manganous Carbonate 0.63 g/kg, Cupric Carbonate 0.3 g/kg, Potassium Iodate 0.01 g/kg, Sodium Selenate 0.01025 g/kg, Ammonium Paramolydate 4H<sub>2</sub>O 0.00795 g/kg, Sodium Metasilicate 9H<sub>2</sub>O 1.45 g/kg, Chromium Potassium Sulfate 12H<sub>2</sub>O 0.275 g/kg, Lithium Chloride 0.0714 g/kg, Boric Acid 0.0815 g/kg, Sodium Flouride 0.0635 g/kg, Nickel Carbonate 0.0318 g/kg, Ammonium Vanadate 0.066 g/kg, Sucrose finely powdered 221.026 g/kg



**Fig. 1.** Dietary feed of included molecular controlled silk sericin and fibroin.

### 2. 동물 대장암 유도

그림 2는 1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride(1,2-DMH) 시약을 10 mg/kg 농도로 4회(1회/1주) 피하 주사 유발하였을 때의 동물 형태를 나타내고 있다. 아무런 처리를 하지 않은 대조군(C), 대장암 유발군(CA), 유발-세리신 섭취

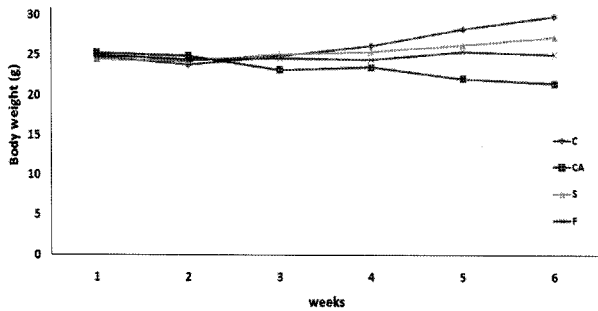
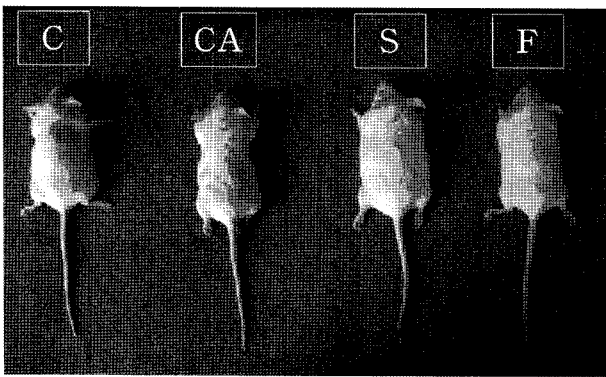


Fig. 2. 1,2-dimethylhydrazine (DMZ) treated ICR-animal and change of body weight.

군(S) 및 유발-피브로인 섭취군(F)을 나타내고 있다. 또한 6주간 식이 섭취하였을 때의 체중변화를 그림 2에 같이 그래프로 나타내었다. 우선, 1,2-DMH로 대장암을 인위적으로 유도하였을 경우, 대조군(C)에 비하여 외형적으로 체형이 작음을 나타내고 있다. 반면 (S)군 및 (F)군의 경우, 특히 (S)군의 경우는 대조군과 거의 유사한 체형을 나타내고 있음을 그림에서 알 수 있다. 이러한 체형적인 변화는 그림 2 그래프로 확인할 경우 보다 확실하게 알 수 있는데, 유발군(CA)의 경우는 6주 후 대조군(정상)에 비하여 30% 내외의 체중이 감소하였다. 후, 대장암의 영향으로 체중감소 현상과 더불어 외형상으로 확실한 동물 대장암이 유발되었음을 확인할 수 있었다.

이러한 것을 보다 확실히 알아보기 위하여 6주간 식이 섭취한 각 샘플군 별 체중변화와 사료섭취량과의 관계를

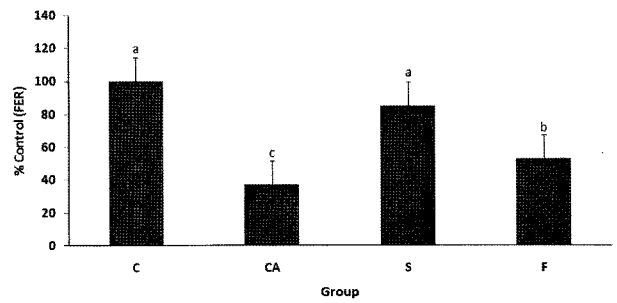


Fig. 3. Yield of dietary effect each sample groups.

나타내는 식이효율을 계산하여 그림 3에 실었다.

그림 3에서 보는 바와 같이, 동물 대장암을 치료하지 않은 정상군(C)을 100%로 하였을 경우 대장암 유발군(CA), 세리신섭취군(S) 및 피브로인 섭취군(F)은 각각 40%, 85%, 60% 내외의 식이효율을 나타내었다. 세리신 섭취군(S)의 경우, 대장암에 걸렸을 경우라 할지라도 식이섭취효율이 생각보다 높게 나타나 원기회복차원에서 효과가 있을 것으로 생각되어졌다.

### 3. 조직관찰

동물 대장암 유발 후 6주간 식이섭취를 하였을 경우, 대장 조직에 대한 현미경학적 조직관찰 결과를 그림 4에 실었다.

그림4에 보는 바와 같이 정상 조직(C)의 경우 조직의 배열 및 파란색으로 염색되어진 부분에 병반이 없음을 확인할 수 있었다. 특히 대장암 유도군(CA)의 경우, 열은 분홍색의 암 병반이 염색되어져 있음을 알 수 있는데, 특히 조직과 조직 사이 뿐 아니라 조직 위쪽(윗부분)에까지 병반이 있음을 확인할 수 있다. 그러나 세리신 섭취군(S)의 경우는 어떠한 병반 및 특이 사항을 발견할 수 없었고, 피브로인 섭취군(F)의 경우는 약간의 병반이 관찰되는 소견을 보였다.

### 4. 대장암 인자변화 정량화

제 4절에서 관찰되어진 병반의 정량화를 위하여 COX-2 발현량을 비교하였다. 조직내에 암에서 발현하는 특이 물

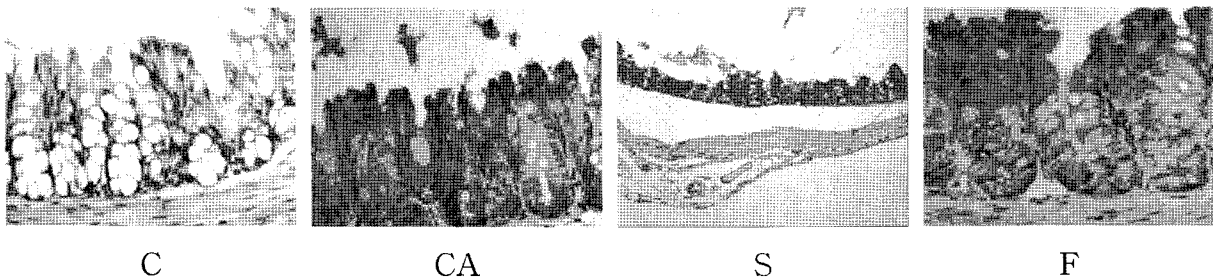


Fig. 4. Typical histologic appearance of animal colon tissue.

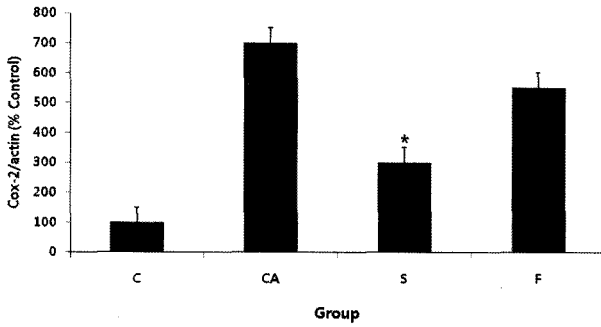


Fig. 5. COX-2 effect of animal colon.

질을 감지하는 COX-2의 방법(Sasaki *et al.*, 2000 Zhaorigetu *et al.*, 2001)은 그 발현량을 나타내는데 적합하며 그 정량화의 평균을 그림 5에 실었다.

그림 5에서 나와 있는 것과 같이 정상군(C)의 경우를 100%으로 그 농도를 가정하였을 경우, 유발군(CA)의 경우는 COX-2량이 거의 7배에 달함을 알 수 있어서 동물 대장암이 확실히 발현되었음을 나타내고 있고, 여기에 비하여 세리신 섭취군(S)의 경우는 약 유발군의 1/2 이하로, 대장암 발현이 줄어든 효과가 관찰되어져 확실한 유의차가 있음을 나타내었다. 그러나 피브로인 섭취군(F)의 경우는 세리신 섭취군(S)보다는 그 효과가 미비하였으나, 유발군(CA) 보다는 효과가 있는 것으로 나타났다. 특히 세리신 섭취군(S)의 경우는 만족할만한 동물 대장암 억제효과가 나타남으로써 금후 동물 대장암 예방 효과 연구 및 그 메커니즘 등의 연구가 진행되어야 할 것으로 사료되어졌다.

## 적 요

실크단백질 식이공급이 동물대장암에 미치는 효과를 알아본 결과 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 동물 대장암에 투여한 식이공급용 선발 실크단백질의 피브로인 및 세리신 단백질은 각각 Mw 65,000 내외의 피브로인 및 Mw 100,000만 내외의 세리신 단백질이며, 동물사료의 경우, 섭식 등 물성 등이 작년대비 개선된 3% 첨가된 전용 사료를 조제하여 섭식하도록 하였다.
2. 1,2-DMH에 의한 동물 대장암 유발(1회/1주, 4회 주사) 후 6주 시료 투여에 있어서 대장암 유발군(CA)의 경우, 체중변화 및 식이 섭취량의 관계인 식이효율은 세리신 섭취군(S)의 경우 정상군(C)의 85% 수준을 나타내었다.
3. 동물대장암 조직의 조직관찰에 있어서는 대장암 조직의 COX-2 발현을 염색한 결과, 대장암 유도군(CA)의 경우 확실한 COX-2에 의한 발현을 나타내었으며, 세리신

섭취군(S)의 경우는 그 정도가 미비함을 나타내어 대장암에 효과가 있음을 나타내었다.

4. 대장암 인자변화를 정량적으로 확인한 결과, 정상군(C)에 비하여 대장암 유발군(CA)은 확실한 7배 정도의 COX-2량이 확인되었으며, 세리신 섭취군(S)의 경우는 유발군(CA) 대비 1/2 이하 수준으로 줄어듦을 확인할 수 있어서 금후 대장 질환 관련 소재 개발 가능성을 나타내었다.

## 사 사

본 연구는 바이오그린 21연구과제의 연구비 지원 및 농업과학기술원 정상기본과제에 의해 일부 수행되었으며 관계자 여러분들께 감사드립니다.

## 인용문헌

- Kato Norihisa and Masahiro Sasaki (2000a) New physiological functions of sericin and its application for cosmetic and food, *FRAGRANCE J.*, 4: 28~33.
- Kato Norihisa, Jun Kayasita and Masahiro Sasaki (2000b) Physiological Functions of Buckwhat Protein and Sericin as Resistant Proteins, *食品と開発*, 24(8): 4~6.
- 北條 裕正(1980), 續絹絲の構造 (信州大學): 379~415.
- Sasaki Masahiro, Norihisa Kato, Hiromitsu Watanabe and Hideyuki Yamada (2000) Silk Protein, Sericin, Suppresses Colon carcinogenesis induced by 1,2-Dimethylhydrazine in Mice, *Oncology Report*, 7: 1049~1052.
- Yeo, J. -H, Lee, K. -G, Kweon, H. Y., Woo, S. -O., Han, S. -M., Kim, S. -S. and Demura M. (2006) Fractionation of a Silk Fibroin Hydrosate and Its Protective Function of Hydrogen Peroxide Toxicity, *J. Appl. Polym. Sci.*, 102: 772~776.
- Yeo, J. H, Lee, K. W., Kim, H. C., Oh, Y. L., Kim, A. J. and Kim, S. Y. (2000) The Effects of PVA/Chitosan/Fibroin(PCF)-Blended Spongy Sheets on Wound Healing in Rats, *Biol. Pharm. Bull.*, 23: 1220~1223.
- Zhaorigetu Siqin, Masahiro Sasaki, Hiromitsu Watanabe and Norihisa Kato (2001) Supplement Silk Protein, Sericin, Suppresses Colon Tumorigenesis in 1,2-Dimethylhydrazine-Treated Mice by Reducing Oxidative Stress and Cell Proliferation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(10): 2181~2186.
- 김태일, 박소진, 최창환, 이상길, 김원호 (2004) 만성 기능성 변비 환자에 대한 목이버섯의 효과, *대한소화기학회지*, 44: 34~41.
- 비타민 (KBS, 2007. 10. 21).
- 여주홍, 이광길, 이용우, 남진, 김선여 (1999) 용해조건에 따른 견 단백질의 조성 변화, *Anal. Sci. & Tech.*, 12(4): 306~311.
- 여주홍, 이광길, 권해용, 한상미, 박경호, 김성수, 신봉섭 (2006) 실크 단백질의 식이소재로서의 응용, *한잠학지*, 48(1): 6~10.
- 한국일보 (2006 10.25) 대장암 억제 “셀레늄” 많이 드세요.