

## 웅담이 mammalian세포의 생육에 미치는 영향

주현규 · 김연옥\* · 박동기\*\*

건국대학교 농화학과, \*오사카대학 의학부 세균학교실, \*\*건국대학교 생화학과

**초록:** 동물세포에 미치는 웅담의 영향을 조사하기 위해서 원숭이 kidney cell 유래의 COS-7 cell과 hybridoma cell(murine myeloma cell과 rat의 spleen cell을 융합)을 가지고 이들 세포의 생육과 단백질 발현기작에 미치는 영향을 조사했다. COS-7 cell과 hybridoma cell을 웅담이 첨가된 10% FCS DMEM complete medium에서 78시간 배양한 결과 COS-7 cell에는 거의 영향을 미치지 않았으나 myeloma cell과 spleen cell과의 융합세포는 48시간내에 거의 모든 세포가 사멸됐다. 또한 cDNA를 COS-7 cell에 transfection에서 발현되는 단백질양을 조사한 바 웅담이 첨가된 배지에서의 단백질 생산량이 첨가되지 않은 배지에서 보다 30~40% 감소되었다(1991년 6월 12일 접수, 1991년 8월 31일 수리).

웅담은 곰 담낭의 건조물로서 복통, 위경련, 담석 용해작용,<sup>1)</sup> 혈중지질 개선약, 가축 사료에 있어서의 성장률 촉진 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그 주성분의 하나는 ursodeoxycholic acid(UDCA)이며, 1929년 Sawada 등에 의해 분리되어 Chiyoda와 Iwazaki 등이 구조를 밝혔다.<sup>2)</sup>

최근에는 웅담의 천연 공급원에 한계가 있는 관계로 가격이 싸고, 축산 부산물로서 구하기 쉬운 cholic acid를 원료로 해서 화학적 변환을 시키는 방법을 통해서 웅담 대용품을 얻고 있으나, 수율이 낮아서 미생물을 이용한 연구가 많이 행해지고 있다.<sup>3-5)</sup>

지금까지 웅담 효능에 대한 연구에 있어서 세포 level에서 실시한 실험결과는 거의 발표되어져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 몇 가지 동물세포, 즉 원숭이 세포인 COS-7 cell과 myeloma cell과 spleen cell을 융합시킨 hybridoma cell에서의 웅담의 영향을 밝히기 위해 함유된 세포 배양배지에서의 세포 성장과 COS-7 cell과 cDNA를 주입했을 때 생산 산물에의 영향 등을 웅담과 인삼즙 등을 대조실험으로 사용해 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### Buffer와 세포배양 배지

PBS-BSA-Az(1% BSA, 0.1%, Az)와 PBS-Az(0.1% Az)가 단백질 정량에 사용되었고, 세포배양에는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) [10% fetalcal-

serum(FCS), 5 mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 50 units penicillin과 streptomycin/ml]이 사용되었다.

#### 웅담 조제

중국산 곰의 건조 담낭을 멸균수에 녹여 30% 용액으로 만든 후 0.2  $\mu$ m filter로 제균시켜 사용하였다. 대조실험을 하기 위하여 우담(ox-gall)과 인삼을 같은 방법으로 준비하였다.

#### Hybridoma cell 조제

SDS-PAGE상에서 90%이상 정제된 것으로 확인된 보체 C4 단백질을 면역한 rat의 spleen cell과 Murine myeloma cell(x64 Ag8, 653)을 융합시킨 뒤 배양해서 배양상등액을 다음과 같은 방법으로 조제하였다. 즉 정제된 C4 단백질을 비환원 상태에서 SDS-PAGE<sup>6)</sup>을 행한 뒤 nitrocellulose에 blot한 후 BSA 용액에 담가 blocking한 후에 각 lane을 잘라 hybridoma cell 배양액을 넣어 반응한 후 <sup>125</sup>I-labeled affinity-purified rabbit F(ab')<sub>2</sub> anti-rat IgG와 반응시켰다. 반응후에 비특이성 결합을 없애기 위해 세척 후 filter를 건조시켜 radioautography를 얻기 위해 X-ray film에 감광시켰다. 이 실험에서 positive인 cell line(m C4.9.1)을 사용하였다.

#### 세포 배양

Hybridoma cell(m C4.9.1)과 COS-7 cell을 10% FCS

Key words : Bear's gall, mammalian cell growth  
Corresponding author : H. K. Joo

complete DMEM에서 48시간 배양 후  $1 \times 10^4$ 개 cell을 직경 35 mm plastic petridish에 옮긴 후 우담, 인삼이 포함된 10% FCS medium을 넣어 6% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하면서 12시간 간격으로 Toypan blue exclusion에 의해 생존 세포수를 count했다.

**cDNA transfection**

COS-7 cell을 10% FCS complete medium에서 48시간 배양 후에 직경 35 mm plastic petridish에  $1 \times 10^4$ 개 넣은 후에 DEAE-dextran법<sup>11)</sup>에 의해 보체 C4 cDNA(PMT-2/C4-cDNA)를 transfection한 뒤 10% FCS complete DMEM(우담 혹은 우담 또는 인삼 함유)을 넣어 6% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 72시간 배양하였다. 배양 후 1500 rpm, 15분간 원심분리하여 cell debris를 없앤 후에 two-site immunoradiometric assay를 통해 생산된 C4 단백질을 조사하였다.

**Two-site immunoradiometric assay**

Plastic plate(96 well flate, Becton, Dickinson, oxnard, C4)의 각 well에 capture antibody(Anti-C4 50 μl/well, IgG 20 μg/mg PBS-Az)를 넣어 실온에서 2시간 배양후 여분의 binding site를 BSA로 blocking했다. 그 후 25 μl의 C4 cDNA로 된 COS-7 cell 배양 상청 25 μl를 각 well에 넣은 후 실온에서 2시간 배양후 PBS-BSA-Az 3회 세척했다. 그 후에 25 μl <sup>125</sup>I-labeled Anti-C4 antibody(5 ng,  $5 \times 10^4$  cpm)을 넣어 실온에서 1시간 배양 후 PBS-BSA-Az로 4회 세척 후 각 well을 잘라 γ-counter로 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**Hybridoma cell(m C4.9.1)에 대한 우담의 영향**

사용된 hybridoma cell의 성장은 암세포와 같은 형태이지만 생리적인 기능은 C4에 대한 항체를 생산하는 spleen cell의 기능을 갖고 있다. 직경 35 mm plastic plate에  $1 \times 10^4$  cell을 넣어 우담(0.1, 0.3, 0.6%), 우담(0.1%), 또는 인삼(0.1%)을 포함한 10% FCS complete medium(DMEM)에 배양한 다음 12시간 간격으로 생존 세포수를 count한 결과는 Fig.1과 같이 0.1%의 우담을 포함한 배지에서는 48시간에 걸쳐 서서히 hybridoma cell을 상해하는 것을 알 수 있었으며, 그 농도의 증가에 따라 좀더 빠른 시간내에 cell에 손상을 입히는 것을 알 수 있었다. 한편 인삼과 우담에서는 12시간만에 50% 이상의 세포가 손상되는 것으로 나타났다.

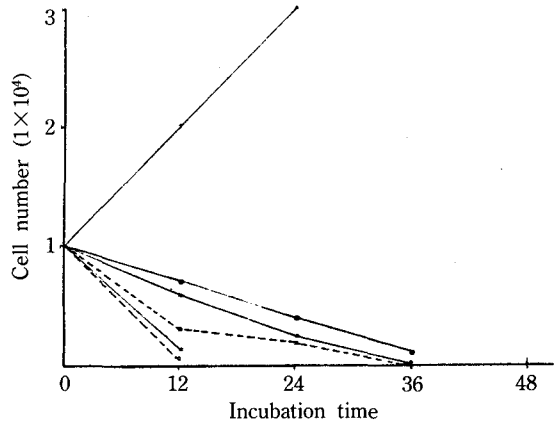


Fig. 1. Effect of bear's gall on the growth of hybridoma cell.

The cell were grown in the 10% FCS complete medium contained bear's gall, ox-gall or ginseng. ▲-▲ : control, ●-● : 0.1% bear's gall, %-% : 0.3% bear's gall, ■-■ : 0.6% bear's gall, ★-★ : 0.1% ox-gall, ○-○ : 0.1% ginseng

우담의 주성분인 ursodeoxycholic acid, 3α, 7β-dihydroxy, 5β-cholanic acid(UDCA) 등은 담즙의 분비를 촉진시켜 복통이나 위경련에 특효를 나타낸다고 알려졌고, 또한 혈중의 지질개선약 등으로 쓰여지며, 가축 사료에 첨가했을 경우 성장을 촉진시킨다는 보고가 있다. 이러한 결과들과 그 밖에 아직 알려지지 않은 영향에 의해 성장이 촉진되리라 예상되었으나, hybridoma cell은 암세포 분열을 통해서 성장하기 때문에 이 분열과정, 즉 암세포의 분열 과정중의 어느 step이 통해서 성장하기 때문에 이 분열과정, 즉 암세포의 분열 과정중의 어느 step이 손상을 입어 성장이 억제된 것으로 추정되어진다.

**COS-7 cell에 대한 우담의 영향**

우담이 암세포가 아닌 정상세포에는 어떤 영향을 미치는가를 살펴보기 위해 원숭이 세포에 Simian virus 40의 초기 promoter를 감염시켜 무한대로 성장 가능한 세포, 즉 cDNA를 감염시켜 대응하는 물질을 생산하는 세포에 대해 우담의 영향을 조사한 결과 Fig.2에서 같이 0.1% 우담을 함유한 medium에서는 세포 성장에 아무 장애가 나타나지 않았으나 0.3, 0.6% 우담을 함유한 배지에서는 성장이 어느정도 저해되는 것을 볼 수가 있었다. 그리고 대조실험으로서 사용한 우담이나 인삼에서는 Fig.1과 거의 같은 결과, 즉 24시간내에서 거의 모두 세포에 손상을 주어 세포가 죽었다.

본 실험에서 사용된 COS-7 cell은 정상적인 세포기능

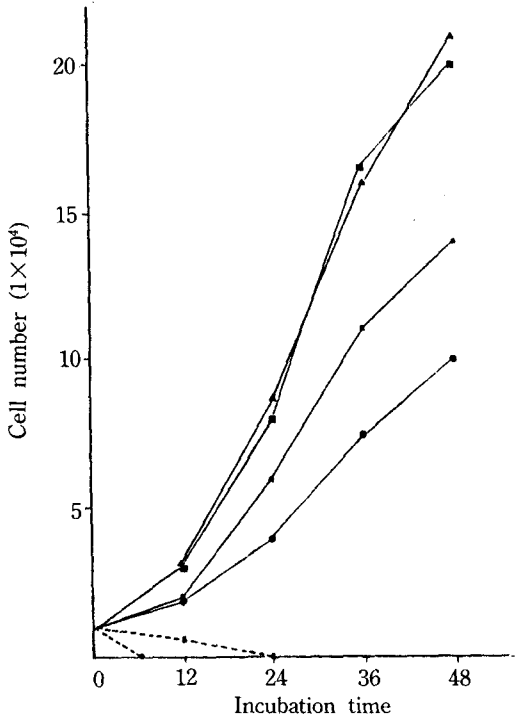


Fig. 2. Effect of bear's gall on the growth of COS-7 cell.

The cell were grown in the 10% FCS complete medium contained bear's gall, ox-gall or ginseng. ■-■ : control, ▲-▲ : 0.1% bear's gall, ★-★ : 0.3% bear's gall, ●-● : 0.6% bear's gall, &-& : 0.1% ox-gall, ○-○ : 0.1% ginseng

을 가지고 있으며 단지 SV-40에 의해 성장하는 힘만을 빌린 것으로 Fig. 1에서와는 다른 경향을 나타내어, 웅담이 암세포에 대한 Killer와 어떤 작용 mechanism을 갖고 있는 것이 아닌가 추측되어진다. 따라서 알수 없는 여러가지 mechanism 중에 가장 손쉬운 cDNA 도입에 따른 물질생산 mechanism에 대한 영향을 조사하였다.

**cDNA 도입과 물질 발현에 대한 웅담의 영향**

사용된 cDNA는 보체중에 C4 cDNA의 완전장을 phagemid vector인 pMT-2에 삽입한 것으로서, 이 C4 cDNA를 DEAE-dextran법에 의한 transient expression system을 사용해 생산된 보체 C4 protein을 radioimmuno assay 사용해 측정하였다. 정확한 생산량을 측정하기 위해 capture antibody를 poly-antibody와 monoclonal antibody 두 종류를 사용하였다. Fig. 3은 DEAE-dextran법에 의한 transfection 후에 0.1% 웅담을 포함한 10% FCS complete DMEM medium에서 72시간 배양 후

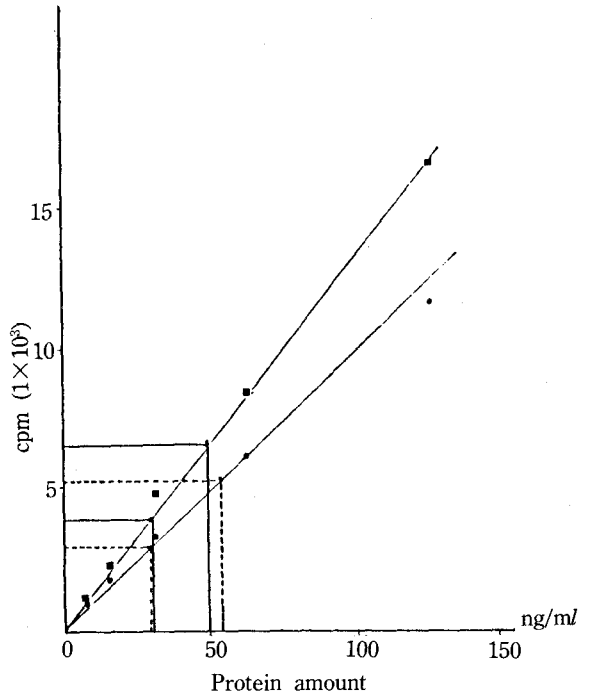


Fig. 3. Influence of bear's gall on protein production from C4 cDNA transfected COS-7 cell.

■-■ : monoclonal antibody, ●-● : polyclonal antibody, \$-\$ : control, ★-★ : 0.1% bear's gall contained. Respectively 49 ng/ml and 30 ng/ml in monoclonal antibody and 53 ng/ml and 29 ng/ml in polyclonal antibody.

그 배양상청을 측정된 결과로서 세포 성장에는 transfection을 행하지 않은 것과 비교해 볼 때 세포 성장에는 영향이 없었으나 생산된 산물은 웅담을 함유한 배지가 40% 정도 감소된 것을 볼 수 있었다.

이 결과를 토대로 DEAE-dextran법에 의한 cDNA 도입에 있어서는 DEAE-dextran-C4 cDNA의 상태로 cell membrane에 부착되어 cell내에 들어갈 때 웅담 성분 (deoxycholic acid)이 membrane permeability를 변화시켜 cDNA 도입을 방해 하든가 *in vivo*에서 C4 protein을 생합성하는 여러 과정 중에 하나를 방해할 수 있는 가능성을 들 수 있는데, 만약 후자일 경우에는 C4 단백질이 거의 생산되지 않을 것이다. 본 실험 실험결과를 통해서 도입과정에 있는 것이 아닐까 생각한다. 즉 cDNA가 cell membrane에 부착되어 cell내에 들어갈 때 웅담성분이 어떤 미묘한 영향을 미친다고 생각되어진다. 결론적으로 C4 단백질 생합성 과정에는 영향이 없는 것으로 추측된다.

참 고 문 헌

1. 牧野勳 : 日本消化器病雜誌 72 : 690(1975)
2. The Merk Index, 8th ed., Merk & Co., Ltd., Rahway (1968)
3. Nihira, T., Nishino, T., Maehara, M., Kulprecha, S., Yoshida, T. and Taguchi, H. : Appl. Environ. Microbiol., 54 : 3(1988)
4. Charney, W. and Herzog, M. L. : Academic Press, Inc., New York(1976)
5. Sawada, H., Kulprecha, S., Yoshida, T. and Taguchi, H. : Appl. Environ. Microbiol., 44 : 1249(1982)
6. Laemmli, U. K. : Nature (Lond.), 227 : 680(1970)
7. Oprian, D. D., Molday, R. S., Kaufman, R. J. and Khorana, H. G. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84 : 8874(1987)

---

**Effect of bear's gall on mammalian cell growth**

Hyun Kyu Joo, Youn Uck Kim\* and Dong Ki Park\*\*(Department of Agricultural Chemistry, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea, \*Research Institute for Microbial Diseases, Osaka Univeristy, Osaka, Japan, \*\*Department of Biochemistry, Kon-Kuk University, Chungju 380-150, Korea)

**Abstract :** In the present investigation we have studied the effect of bear's gall on mammalian cells and demonstrated that COS-7 cells, which were derived Monkey kidney cells, had shown almost same extent of growth with 78 hrs in 10% FCS Dulbecco's Modified Eagle's medium with bear's gall and without bear's gall. But the hybridoma cells which were fused murine myeloma cells and the rat spleen cells for monoclonal antibody production died almost within 48 hrs. To investigate the effect of biosynthetic mechanism, cDNA were transfected to COS-7 cells, and it was shown that cDNA-transfected COS-7 cell had produced 30-40% less the amount of recombinant protein than the medium without bear's gall.