

## 복수암 생쥐에 대한 발효녹용의 항암작용

김동현\* · 한상범 · 유기웅 · 김유숙 · 한명주\*  
경희대학교 약학대학, 경희대학교 식품영양학과\*

(Received August 20, 1994)

### Antitumor Activity of Fermented Antler on Sarcoma 180 in Mice

Dong-Hyun Kim\*, Sang-Bum Han, Ki-Ung Yu, Yu-Suk Kim and Myung-Joo Han\*

Kyung Hee University, College of Pharmacy and Department of Food Science and Nutrition\*

**Abstract**—Some components and antitumor effect of antler and fermented antler with *Bacillus* P-92 were determined. By fermenting the antler with *Bacillus* P-92, the amount of free amino acids, polypeptides and other compounds were increased. The free amino acid of the fermented antler was 6-fold higher than those of the untreated antler. Sarcoma 180 cells were intraperitoneally implanted into ICR mice to determine the effect of fermented antler and untreated antler on life span prolongation. The life span of ICR mouse treated with antler and fermented antler were prolonged to 24.4% and 39.2% ( $p < 0.05$ ), and survival rates were 22% and 33%, respectively. In addition, the induction of neutrophil was 2.3-fold and 3.4-fold, respectively.

**Keywords** □ Antler, Fermentation, *Bacillus* P-92, Antitumor activity

녹용에 대한 약리효과를 조사한 결과 흰쥐의 성장 촉진작용, 조혈작용, 단백질합성 촉진작용, 척추신경의 효소활성증가, 콜레스테롤 저하작용, 면역활성증가 등의 작용을 갖고 있는 것으로 보고하고 있다.<sup>1-7)</sup> 저자는 녹용의 효율을 높이고 아울러 새로운 약리효과를 기대하기 위해 녹용을 분해하는 미생물을 분리하고 이 발효녹용에 대하여 생리활성을 조사한 결과 carbon clearance 및 유산균증식작용등이 있음을 보고하였다.<sup>8)</sup>

본 연구에서는 녹용 및 *Bacillus* P-92을 이용하여 발효시킨 녹용에 대하여 아미노산 및 TLC 양상의 변화, 및 복수에 Sarcoma 180을 이식한 생쥐에 대한 항암효과를 조사하였다.

#### 실험방법

**시약**—녹용은 뉴우질랜드산을 구입하여 사용하였다. TLC plate는 Merck사에서 구입하여 사용하였다.

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

**녹용 및 발효녹용의 조제**<sup>9)</sup>—이미 보고한 방법에 따라 녹용을 적당히 분쇄한 덩어리 15 g을 증류수 1000 ml에 넣어 20분간 가압멸균하고 여과한 여액을 녹용추출액으로 사용하였다. 발효녹용은 *Bacillus* P-92균주를 녹용을 적당히 절단한 덩어리 15 g을 증류수 1000 ml에 넣어 멸균하여 만든 녹용배지에 이식하여 5~7일간 배양한 후 멸균하여 여과한 여액을 발효녹용추출액으로 사용하였다.

**복수암세포액의 조제와 투여**—경희의료원 임상병리학 교실에서 Sarcoma 180을 이식한 생쥐를 분양받아 복수암 세포액을 조제하여 약 3주 간격으로 새로운 생쥐의 복강에 이식하면서 계속 유지하였다. 이 생쥐들에서 복수액을 취하여 4°C의 생리식염수액에 현탁하여 500 xg로 원심분리한 침전액을 2회 반복하여 세척후 0.4% tryphan blue로 염색하여  $1 \times 10^7$  cell/ml이 되도록 만들었다. 복수암 생쥐를 만들기 위해 이 액을 0.1 ml 생쥐의 복강에 투여하였다.

**실험동물**—실험동물은 생쥐(ICR계 25 g 웅성)의 경우는 한 군을 9마리로, 흰쥐(Wistar계 250 g 웅성)의 경우는 5마리로 하여 실험했으며, 생쥐의 경우 Sar-

coma 180을 복강에 투여한후 대조군(Control), 녹용 투여군(A-treated), 발효녹용 투여군(FA-treated)으로 나누어 Sarcoma 180 이식한 날부터 생쥐 한마리당 녹용 투여군에는 분말사료(삼양사료) 10g에 녹용액 0.5 ml(녹용 0.0075g에 상당하는 추출액)를 혼합하여 투여했으며, 발효녹용투여군에는 분말사료 10g에 발효녹용액 0.5 ml(P-9으로 발효시켜 얻은 여액)을 혼합하여 투여했다. 흰쥐의 경우는 대조군, 녹용투여군, 발효녹용투여군으로 나누고 생쥐에서와 같이 검체를 같은 비율로 넣어 만든 사료를 투여하였다. 사료투여량은 흰쥐 한마리당 40g으로 하여 13일간 투여한 후 실험하였다. 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다.

**TLC 분석**-녹용과 발효녹용의 추출액에 대하여 chloroform, ethylacetate 순으로 추출한 후 각 분획에 대하여 TLC 분석을 하였다. 박층크로마토그래피는 precoated TLC plate kiesegel 60F<sub>254</sub>(Merck Art 5714)를 사용했으며, chloroform 분획에 대해서는 chloroform을, ethylacetate 분획에 대해서는 chloroform/methanol (6/1)을 전개용매로 사용했다. 발색제로는 10% 바닐린-황산을 사용하였다.

**아미노산 분석**-녹용, 발효녹용 및 약전의 방법<sup>9)</sup>에 따라 35% 에틸알콜로 추출한 녹용에 대하여 유리아미노산과 총아미노산을 Beckman 6300 amino acid analyzer에 sodium high performance column (4mm×12cm, Hewlett Packard)를 장착하여 사용했으며 데이터 적분은 Hewlett Packard 3390 integrater를 사용하였다. (조건은 Ninhydrin flow rate: 7 ml/h, Detection wavelength: sum(570+400 nm), injection size: 50 µl, column temperature 0~11 min: 48°C, 11~36 min: 75°C, 36~70 min: 77°C)

**중성구의 측정**-대조군, 2주간 녹용을 투여한 군, 2주간 발효녹용을 투여한 군의 흰쥐의 복강에 6%카제인(7.5 ml/kg)을 투여한 후 15시간 후에 ether로 마취사시킨 후 헤파린 함유 생리식염수(500 IU/ml) 15 ml로 복강을 세척하여 얻은 액을 1200 rpm에서 7분간 원심분리하고 상등액을 버리고 Tris-NH<sub>4</sub>Cl(pH 7.2) 완충액 10 ml로 현탁시키고 30분 후 300 xg에서 7분간 원심분리하고 생리식염수액으로 3회 세척하여 얻은 중성구를 hemacytometer로 측정하였다.<sup>10)</sup>

## 결 과

**녹용과 발효녹용의 TLC 패턴의 비교**-녹용과 발효녹용에 대하여 chloroform, ethylacetate 순으로 추출하고 각분획에 대하여 TLC를 행한 결과는 Fig. 1과 같다. Chloroform분획에서는 각각 원점과 0.14, 0.62, 0.92의 Rf치를 갖는 spot을 관찰할 수 있었다. Ethylacetate분획에서는 원점과 0.10, 0.23, 0.79, 0.93의 spot을 관찰할 수 있었다. 여기에는 나타내지 않았지만 수층에서는 원점과 Rf치 0.89의 spot이 관찰되었다. 이러한 성분이 약효성분이라고는 생각할 수 없지만 모두 균처리한 경우에 2배이상의 spot의 크기를 나타냈으며, 수층의 경우는 5배이상의 크기를 나타냈다.

**발효녹용과 녹용사이의 아미노산의 비교**-녹용, 발효녹용 및 35% ethanol tincture에 대하여 아미노산의 양을 측정한 결과 proline, tyrosine, phenylalanine을 제외하고는 발효녹용의 경우가 거의 비슷하거나 훨씬 많았다(Table I). Ethanol tincture의 아미노산 양을 100%으로 하였을때 녹용의 경우는 51%였으나 발효녹용의 경우는 308%로 녹용의 약 6배 정도였다.

여기에 결과를 나타내지는 않았지만, 녹용을 대한 약전의 방법에 따라 분리한 ethanol tincture 중의

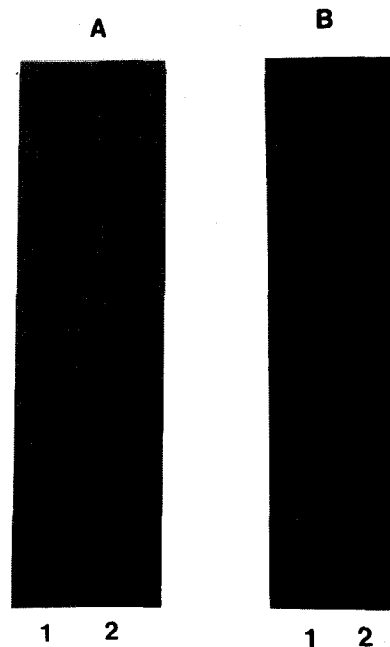


Fig. 1-TLC chromatogram of fermented antler(1) and untreated antler(2) : (A), ether fraction ; (B), ethylacetate fraction.

polypeptide를 발효녹용의 것과 비교한 결과 발효녹용의 경우가 녹용에 비해서 377%였다.

**녹용이 체중증가에 미치는 영향**—생쥐에 녹용 및 발효녹용을 투여했을때 체중변화에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2). 생쥐에 일반사료를 먹인 대조군의 경우 24일 후에 17.3 g이 증가하였고, 발효녹용을 투여한 경우에는 대조군에 비해 체중이 증가한 반면에 녹용을 투여했을 경우에는 대조군보다 체중이 감소하는 경향이 있었다. 그러나 이들 기간에 유의성은 인정되지 못했다.

**항암효과**—Sarcoma 180을 생쥐의 복강에 이식시키기 전, 후에 녹용 또는 발효녹용을 예비적으로 투

여하여 생명연장에 미치는 효과를 조사한 결과는 암세포이식에 녹용 또는 발효녹용 함유먹이를 먹이다 정상사료로 먹이는 군보다 암세포이식 후에 녹용과 발효녹용을 투여하는 것이 더 좋은 효과가 있었다. 그래서 본실험에서는 Sarcoma 180을 복강내에 이식시킨 생쥐에 대하여 녹용 및 발효녹용이 생명연장에 미치는 효과를 측정하였다(Table II). 그 결과 녹용 투여군이 대조군에 비해 T/C%가 124.4%로 24.4%가 증가하였으며 46일 후에 살아남은 생쥐는 22%였다. 또한 발효녹용투여군은 대조군에 비해 T/C%가 139.2%나 증가하였으며 46일 후에 살아남은 생쥐도 33%였다.

**Table I.** Content of free amino acids in an antler and a fermented antler

Amino acid	Antler	Fermented antler	35% Et OH tinc.
L-aspartic acid	0.18+0.01	1.64+0.02	0.03+0.05
L-threonine	0.06+0.00	0.02+0.00	0.32+0.01
L-serine	0.12+0.01	0.24+0.00	0.42+0.02
L-glutamic acid	0.98+0.05	14.34+0.34	1.90+0.08
L-proline	1.50+0.03	N.D.*	0.76+0.02
Glycine	0.58+0.03	3.50+0.07	1.10+0.05
β-alanine	0.51+0.03	0.82+0.02	1.34+0.05
L-cystine	N.D.	0.23+0.01	N.D.
L-valine	0.06+0.01	0.05+0.02	0.32+0.20
L-methionine	N.D.	1.53+0.23	0.32+0.05
L-isoleucine	0.08+0.01	0.05+0.04	0.25+0.03
L-leucine	N.D.	0.28+0.02	0.72+0.05
L-tyrosine	0.04+0.02	N.D.	0.19+0.01
L-phenylalanine	0.14+0.02	N.D.	0.21+0.01
L-histidine	0.06+0.01	0.41+0.01	0.13+0.01
L-lysine	0.46+0.11	2.71+0.04	0.48+0.04
L-arginine	0.02+0.01	0.12+0.18	0.49+0.04
DL(+)-allo-δ-hydroxylysine	0.02+0.00	2.81+0.04	0.04+0.00
	4.81(51)	28.75(308)	9.32(100)

\*N.D.=Not Detected

**Table II**—Effect of fermented antler and untreated antler on the life span of ICR mice implanted with Sarcoma 180.

Group	No. of animals	Survival days± S.D.	T/C*(%)	S.R.**
Control	9	26.6± 9.8	100.0	0
A-treated	9	33.1± 10.4	124.4	22
FA-treated	9	35.9± 11.7***	139.2	33

\*  $\frac{T}{C} = \frac{\text{treated group의 mean survival days}}{\text{control group의 mean survival days}} \times 100$

\*\* S.R.; survival rate after 46days.

\*\*\* p<0.05

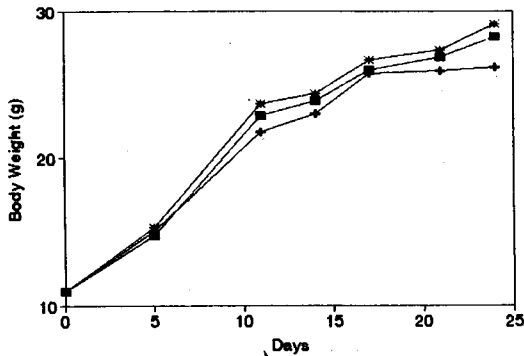


Fig. 2—Change of body weight by administering fermented antler and untreated antler.: ■, control; \*, fermented antler-administered group; +, untreated antler-administered group.

**중성구에 미치는 영향**—녹용과 발효녹용을 2주간 투여한 후 복강내에 카제인을 투여하여 18시간 경과 후 복강내 중성구와 폐포의 마크로파지의 동원능력에 대한 영향을 본 결과, 대조군( $0.69 \times 10^7$  cell)에 비교해서 중성구는 녹용을 투여한 경우 228% ( $p < 0.05$ ) 증가하였으며 발효녹용을 투여한 경우는 341% ( $p < 0.05$ ) 증가를 보였다. 그러나 마크로파지에는 별영향을 보이지 않았다.

## 고찰 및 결론

녹용을 *Bacillus P-92*으로 발효시킴으로써 carbon clearance, 유산균증식등과 같은 생리활성의 증강이 있음은 이미 보고한 바 있다<sup>8)</sup>. 그러나 구체적으로 어떠한 성분이 증강되었고 어떠한 성분이 감소하였는지를 TLC분석만으로 알 수는 없었지만 유기용매추출분획에서 발효녹용이 녹용에 비해서 상당히 많은 양이 유기용매층으로 분획됨을 알 수 있었다. 이러한 현상은 아미노산을 분석한 결과에서도 마찬가지였다. 예를 들면, 간장해에 효과가 있는 것으로 알려진 아미노산인 methionine, cysteine의 경우 녹용에서는 검출되지 않았으나 발효녹용에서는 상당량이 검출되었다. 아울러 폴리펩타이드성분도 35%알콜 처리를 해서 얻은 경우보다도 발효녹용의 경우가 훨씬 많았다. 이러한 결과는 녹용이 발효를 시킴에 따라 *Bacillus P-92*에 의해 녹용덩어리 중에 함유하고 있던 성분이 녹용이 분말화 되면서 녹용중에 있던 성분이 효율적으로 유리되었기 때문으로 생각된다. 그러나

모든성분이 증가된 것은 아니었다. Proline, tyrosine, phenylalanine의 경우는 발효녹용의 경우가 거의 검출되지 못해서 녹용을 발효시키는 *Bacillus P-92*균주가 이용하는 것으로 생각된다.

이러한 차이를 보이는 발효녹용에 대하여 생쥐의 복수암에 대하여 항암효과를 녹용과 비교하여 보았다. 그 결과 대조군보다 녹용의 경우 생존기간이 24.4% 증가하고 생존율은 22%였다. 발효녹용을 투여한 경우에는 대조군에 비해 39.2% 증가하고 생존율도 33%였다. 이러한 결과는 녹용이 생쥐의 복수암에 대하여 녹용 및 발효녹용 모두 효과가 있으나, 이 중에서는 발효녹용이 더 우수하다고 생각된다. 한편, 예비실험결과 복수암을 일으키기전에 녹용 또는 발효녹용을 투여하는 것은 대조군보다 약간 우수했으나 복수암을 일으킨 후에 투여하는 것이 우수한 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 이미 보고한 발효녹용에 의한 carbon clearance의 증가, 유산균증식효과와 무관하지 않다고 생각된다.<sup>8)</sup> 아울러, 본실험에서 발효녹용투여에 의해 흰쥐의 복강내로 중성구의 유도증가 효과도 관찰할 수 있었다.

생쥐의 복수암에 대한 항암효과는 녹용을 발효시킴으로써 더 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 개교 45주년 기념 경희대학교 교내연구비(1994년)에 의해 진행되었기에 이에 감사드립니다.

## 문헌

- 1) 한국생약학회, 생약제제의 평가방향에 관한 워크샵 94-110 (1991).
- 2) 高木敬次郎, 木村正康, 原田正敏, 大塚 男 和漢藥學 南山堂, 東京 204-205 (1982).
- 3) Wang, B., Zhao, X., Qi, S., Kaneko, Hattori, M., Namba, T. and Nomura, Y. : Stimulating effect of deer antler extract on protein synthesis in senescence-accelerated mice in vivo. Chem. Pharm. Bull. 36, 2593-2598 (1988).
- 4) Wang, B., Zhao, X., Qi, S., Kaneko, Hattori, M., Namba, T. and Nomura, Y. : Effect of repeated administration of biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice. Chem.

- Pharm. Bull.* **36**, 2587-2592 (1988).
- 5) 용재익: 녹용에 관한 연구-Cholesterol투여 가토의 혈청중 cholesterol 에 미치는 녹용의 영향. 약학회지 **5**, 6-19 (1961).
  - 6) 용재익: 실험적 가토빈혈에 미치는 녹용투여의 영향. 약학회지 **8**, 6-115 (1964).
  - 7) 신국현, 이은방, 김재현, 정명숙, 조성익: 분말녹용의 약물활성 연구. 생약학회지 **20**, 180-187 (1989).
  - 8) 김동현, 한상범, 박주석, 한명주: 발효녹용의 생리활성. 생약학회지 **25**, 233-237 (1994).
  - 9) 약전분과위원회 대한약전(제 6개정) 문성사 46 (1992).
  - 10) John, T.C. and Bernard, B.M. : Biological defense mechanism. *J. Clin. Invest.* **53**, 1662-1673 (1974).