

## 상엽, 상지 및 잠분 에탄올 추출물의 품종별 세포독성 효과

안미영 · 류강선 · 김익수 · 김선여<sup>1</sup> · 이희삼 · 김진원 · 이용기  
농업과학기술원 잠사곤충부, <sup>1</sup>경희대학교 동서의학대학원

### Cytotoxicity of the ethanol extracts of mulberry leaves, branches and silkworm feces

Mi Young Ahn, Kang Sun Ryu, Iksoo Kim, Sun Yeou Kim<sup>1</sup>,  
Heui Sam Lee, Jin Won Kim and Yong Ki Lee

Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-100, Korea  
<sup>1</sup>Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea

#### ABSTRACTS

The cytotoxicity of the ethanol extracts of varietal samples of mulberry leaves and branches and silkworm feces was measured using CT-26 cells originated from murine metastatic colon cancer, using dye uptake assay in order to find potential anticancer agents. Two ethanol extracts (varietal mulberry leaves and mulberry branches) were prepared from 16 varietal mulberries and used as partial extract materials for the activity assay. Among these, the ethanol extracts from Shinkwangppong leaves showed a little anticancer activity, and those from Sugaeppong, Cheongunppong and Gumsulppong branches showed some anticancer activity as well as cytotoxicity. In contrast, ethanol extracts from freeze-dried, the 3rd day of 5th instar feces showed more potent anticancer activity than that of other mulberry leaves, mulberry branches and other 5th silkworm instar larva feces on the basis of high UV absorbance at 665 nm.

**Key words :** Mulberry leaves and branches, Silkworm feces, Cytotoxicity, Chlorophyll contents

#### 서 론

최근 상엽(桑葉)의 생리활성이 밝혀짐에 따라 상엽을 이용한 많은 기능성 식품이 개발되고 있다. 현재까지 알려진 활성은 상엽 및 상백피의 mimic sugar인 deoxyojirimycin류의 혈당강하 효과, rutin의 혈압강하 효과, moracin류의 항균작용, umbelliferone의 소염작용이 보고되어지고 있다(이, 1999). 최근 일본에서는 상백피에서 isoprenylated flavonoid 계열인 Kuwanon이 혈압강하 작용을 나타낸다는 보고가 있으며 morusin, cyclomorucin, kuwanon C등의 전형적인 페놀성 chlorophyll derivatives(cpd)을 함유한다고 보고되고 있다(Nomura and Fukai, 1998). 또한 상지(桑枝)의 추출물이 최근 일부 화장품의 미백제로 사용되어지고 있고 그 성분이 mulberrin으로 밝혀지고 있으며 상엽, 상백피보다 생리활성이 높을 것으로 보고되어지고 있다.

잠분은 고대부터 중국에서 原蠶沙(原蠶屎)라 명명되며 주로 풍습을 치료하는 데 사용하여 왔으며 chlorophyll

을 함유하는 데 주로 누에 5령 시기에 많은 양이 생산되어진다.

일명 클로로필이라 불리는 엽록소는 20세기 초 그 구조와 기능이 규명된 이래 암, 위장병, 당뇨병, 여드름, 기미, 주근깨, 얼룩점, 빈혈, 만성피로, 심장병, 고혈압, 간염, 간경화 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구는 상엽, 상지 품종별 및 5령 누에의 잠분(Lee *et al.*, 1990)에 있는 chlorophyll의 함량을 비교하였으며 아울러 대장암 세포 저해능을 비교하여 항암효과를 평가하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 시료준비

상엽은 2000년 5월30일(누에 5령1일) 농업과학기술원 잠사곤충부에 식재 중인 16품종(Kim *et al.*, 2001)을 채취하여 50°C의 열풍순환기(Wako Co. Ltd., Japan)로 건조 후

세절하여 각각 50 g을 취하였고, 상지는 2000년 6월3일 채취한 것을 사용하였다. 잠분은 5령 2, 3, 4일 및 숙잠의 잠분을 같은 방법으로 건조한 후 각각 50 g을 1,000 ml ethylalcohol에 녹인 후 저온실에 보관 4일 보관 후 감압 여과하였다. 그 후 추출액 중 10 ml를 취하여 coming tube에 담아 UV(Jasco V-550) 최대 흡광도를 나타내는 파장에서 흡광치(UV<sub>max</sub>)를 구하였다. 그 후 에탄올을 oevaporator (Buchi Co., Ltd)로 증발 농축시킨 후 암세포저해능 검사(XTT assay)에 사용하였다. 각 시료들은 전과정을 빛을 차단하면서 조작하였으며 잠분의 경우는 시료건조과정을 열풍순환기에 의하지 아니하고 음건 또는 냉동건조 방법으로 건조하여 시험에 사용하였다.

**2. 세포주**

세포주는 CT-26의 마우스(Balb/c) 유래 전이성 대장암 세포주로서 RPMI 1640 배지에 10% FBS, 1 mmol/L L-glutamune, 100 units/ml penicillin G와 streptomycin surfate 100 µg/ml를 가하여 monolayer로 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 배양하여 지수성장을 하는 것을 사용하였다(Ahn *et al.*, 2000).

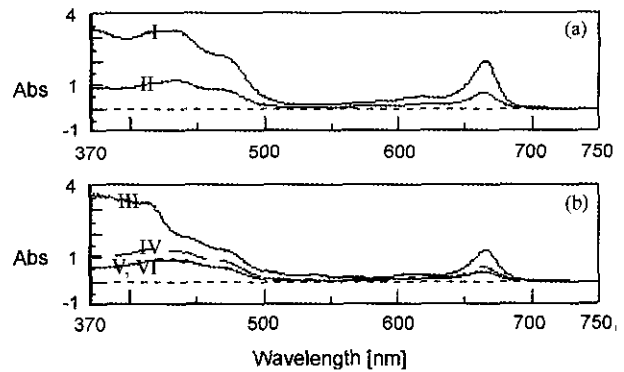
**3. 세포독성측정**

잠상산물의 에탄올 추출물의 세포독성은 CT-26 세포주에 대해 XTT{sodium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate} kit solution(Boehringer Mannheim)을 사용하여 3반복 처리하여 측정되었다(Geldof *et al.*, 1999). 세포독성의 정도 표시는 IC<sub>50</sub>(50% inhibitory concentration; mg/ml)으로 대조군에 대하여 50% 저해하는 추출 분획의 농도로 표시하였다.

**결과 및 고찰**

**1. 품종별 뿌잎 및 상지에서 chlorophyll 함량분석**

뿌잎, 상지를 품종별로 채취 건조 후 50 g씩 1,000 ml ethylalcohol에 추출 후 10 ml 중의 최대흡광도를 나타내는 파장에서 흡광치(UV<sub>max</sub>)를 구하였다. 뿌잎은 434 nm에서 정점이 완만하여 비교 정량이 가능한 최대흡광도 파장이 665 nm으로 정하였으며 상지피는 665 nm와 434 nm 두 파장에서 비교정량 가능한 흡광도 곡선의 정점을 가졌으며(Fig. 1) 그때 흡광도 비교치는 Table 1에 표시하였다. 뿌잎의 경우, 수성, 신광, 청운, 밀성, 상일, 대륙, 용천, 수봉, 청을, 홍월뿌이 665 nm에서 높은 흡광도를 가짐으로써 높은 클로로필 함량을 나타내었으며 상지의 경우에는 신광, 청운, 밀성, 수원뿌이 높은 클로로필 함량을 나타내었다. 따라서 클로로필 함량면에서는 신광, 청운, 밀성뿌



**Fig. 1.** Profile of UV spectrum (a) mulberry leaves (I) and branches (II) (b) The 5th instar silkworm feces at each instar, 3rd day freezing dried (III), matured freezing dried (IV), 2nd day shade dried (V) and 3rd day shade dried (VI).

**Table 1.** Chlorophyll contents in the varietal mulberry leaves and branches under UV at maximal wavelength

Sample number and variety	Mulberry leaves		Mulberry branches
	665 nm	665 nm	434 nm
1. Keryangppong	1.221	0.489	0.860
2. Cheongilppong	1.368	0.371	0.671
3. Shinilppong	1.179	0.525	0.939
4. Susungppong	1.830	0.609	1.058
5. Sugyeppong	1.573	0.606	1.063
6. Shinkwangppong	1.810	0.674	1.154
7. Cheongwoonppong	1.937	0.698	1.122
8. Milsungppong	1.954	0.689	1.171
9. Sangilppong	2.002	0.576	1.009
10. Daeryukppong	1.818	0.435	0.767
11. Suwonppong	1.596	0.685	1.161
12. Yongchunppong	1.979	0.598	1.049
13. Gumsulppong	1.512	0.518	0.946
14. Subongppong	2.018	0.372	0.660
15. Cheogolppong	2.066	0.431	0.757
16. Hongolppong	2.050	0.595	1.011

이 뿌잎과 상지 부위에서 클로로필 함량이 높다고 할 수 있다.

**2. 뿌잎과 상지의 품종별 암세포 성장 억제 효과**

각각의 품종별 에탄올 추출분획을 대장암 세포인 CT-26에 처리 후 40시간 배양하여 세포독성을 비교하여 본 결과 뿌잎에서는 신광, 신일뿌이 상지에서는 수계, 청운뿌이 암세포 억제효과를 보였다. 따라서 뿌잎에서 신광뿌이, 상지에서는 청운뿌이 높은 클로로필 수치와 암세포의 성장억제의 비례관계를 증명함에 따라 상관성을 보였으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다.

**Table 2.** Measurement of cytotoxicity of the ethanol extracts of mulberry leaves and branches to CT-26 cell lines

Mulberry variety	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	
	Leaves	Branches
1. Keryangppong	>100	226.27
2. Cheongilppong	>100	>100
3. Shinilppong	40.8	418.24
4. Susungppong	>100	>100
5. Sugyeppong	>100	4.78
6. Shinkwangppong	12.64	>100
7. Cheongwoonppong	>100	7.43
8. Milsungppong	461.5	343.96
9. Sangilppong	895.7	20.38
10. Daeryukppong	2837.5	44.60
11. Suwonppong	>100	>100
12. Yongchunppong	>100	>100
13. Gumsulppong	>100	19.42
14. Subongppong	>100	>100
15. Cheogolppong	65.0	>100
16. Hongolppong	>100	35.32
Mitomycin C	0.034	

**Table 3.** UV absorption at 665/434nm and estimate of cytotoxicity of the ethanol extracted silkworm excrements to CT-26 cell lines

Drying method	5th instar age	UV absorbance		Drying method	5th instar age	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
		665 nm	434 nm			
Shade dry	2nd day	0.463	0.894	Shade dry	2nd day	1160.40
	3rd day	0.455	0.901		3rd day	58685.38
	4th day	0.516	1.023		4th day	137.42
Freezing dry	3rd day	1.274	1.710	Freezing dry	3rd day	49.65
	matured larvae	0.649	0.126		matured larvae	996.02

**3. 잠분의 건조방법과 5령 유충의 발육단계별 클로로필 함량과 암세포저해능 검사**

Table 3에서 나타내듯이 건조방법으로는 동결건조 방법이 5령 유충의 발육단계는 5령3일째의 것이 높은 클로로필 함량과 암세포 저해능을 보였고 서로 비례관계가 성립되는 상관성도 보여주었다. 그러나 본 실험에 있어서의 광조사는 일반 형광등 아래서 세포독성실험을 행하였고 배양세포에 시료처리 후 650 nm 이상 파장의 적외선 조사(10분)를 생략하였음에도 불구하고 뽕잎, 상지 및 잠분의 에탄올 추출물은 품종별로 상대적으로 비교되는 암세포저해능을 나타내었으며 품종별 클로로필 함량과

거의 일치하는 상관성을 나타내었다. 따라서 클로로필의 암세포 저해능은 일반 태양광선 아래서도 자연스럽게 일어날 수 있으며 이는 클로로필 함량과 비례한다는 것을 시사하여 준다고 할 수 있겠다. 차후에 좀더 체계적인 뽕잎, 상지 및 잠분 내의 클로로필의 변동상 및 적외선 조사 요법에 의한 더 강력한 암세포의 저해능이 있을 것으로 생각되어진다.

**적 요**

뽕잎, 상지 16 품종별 에탄올 추출물을 대상으로 클로로필의 함량을 자외선 최대흡수파장에서 흡광도치로 비교하였고 암세포 저해능 효과를 알아보기 위해 마우스의 대장암세포인 CT-26에 처리한 결과 싹뽕이 뽕잎에서, 청운뽕이 상지에서, 높은 클로로필함량과 상관된 상대적 항암효과를 보였다. 잠분에 있어서는 냉동건조된 5령3일 잠분에서 높은 클로로필 함량과 항암효과를 보여 클로로필 함량과 항암효과는 품종별 비교에 있어서도 상관성을 가짐을 알 수 있었다. 일반 광조사 조건의 세포배양시에도 어느 정도의 항암효과를 가질 수 있는 것으로 사려되어진다.

**인용문헌**

Geldof, A. A., S. C. Mastbergen, R. E. Henrar and G. T. Faircloth (1999) Cytotoxicity and neurocytotoxicity of new marine anticancer agents evaluated using *in vitro* assays. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **44** : 312-318.

Kim, I., H. S. Lee, J. W. Kim, B. K. Yang, M. Y. Ahn, D. H. Kim and K. S. Ryu (2001) Variation of mineral compositions in the regional, varietal and seasonal mulberry leaves. *Int. J. Indust. Entomol.* **2** : 27-35.

Ahn, M. Y., K. S. Ryu, Y. W. Lee and Y. S. Kim (2000) Cytotoxicity and L-Amino Acid Oxidase Activity of Insect Crude Drugs. *Arch. Pharm. Res.* **23** : 477-481.

Nomura, T. and T. Fukai (1998) "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products", ed, by Herz, W. Kirby, G.W. Moore, R.E. Steglich, W. Tamm, Ch. Springer-Verlag, Wien. New York. **73** : 1-140.

이원주(1999) 뽕잎함유 생체활성성분의 식품이용전망. 1999년 한국잠사학회 심포지움. 3-14.

Lee, W. Y., J. H. Park, B. S. Kim, M. J. Han and B. S. Hahn (1990) Chlorophyll derivatives (CpD) extracted from silk worm excreta specially cytotoxic to tumor cells *in vitro*, *Yonsei Medical Journal.* **31** : 225-233.