



## 유황오리로부터 항종양 활성 성분의 분리 및 정제

윤원호 · 황진용<sup>1</sup> · 김창한<sup>1\*</sup>

서일대학 식품가공과, <sup>1</sup>건국대학교 축산식품생물공학과

### Isolation and Purification of Antitumor Substance from the Sulfur Fed Duck

Won-Ho Yoon, Jin-Yong Hwang<sup>1</sup>, and Chang-Han Kim<sup>1\*</sup>

*Department of Food Science and Technology, Seoil College*

*<sup>1</sup>Department of Animal Life Science, Konkuk University*

#### Abstract

This study was carried out to investigate the antitumor activity from sulfur fed duck. The antitumor substances were crude purified by solvent extraction, silica gel column chromatography, and HPLC using C18 column. In MTT assay, the active compounds exhibited more cytotoxic activity on tumor cell lines than normal cell line. In addition of 100 µg/mL concentrations of crude purified active compounds, the growth inhibition rate of tumor cell lines was 56% (Hep-2; human larynx), 58% (KB; human epidermoid of mouth carcinoma), and 28% (MDBK; bovine normal kidney), respectively. The survival rate of clonogenic assay was 26% in Hep-2 and 28% in KB at 200 µg/mL.

**Key words** : sulfur fed duck, MTT assay, clonogenic assay, purification

#### 서 론

우리나라는 최근 암이 심혈질환과 함께 사망의 주 원인이 되고 있으며, 유전적 요소와 함께 식이를 포함한 여러 환경적 요소가 원인으로 작용하여 발암을 증가시킨다고 생각된다. 따라서 식이를 조절함으로써 암에 걸리지 않도록 하는 일, 암 발생을 억제시키는 일, 암의 예방 등에 관심이 높아지고 있다. 현재 국내에서는 민간요법에 주로 이용되는 전통의학이나 식생활에 이용되는 식물 중 항암 성분을 추출하여 새로운 항암제의 개발에 노력을 기울이고 있으며 또한 생약에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다(박재갑, 1993). 예로부터 유황은 여러 질병의 처방제로 쓰여왔다. 서양의학에서는 의약품으로 국부 자극제, 변비, 치질 등에 이용하였으며 동양의학에서는 그 독성을 완전히 제거한 후 사용하면 기를 보호하고

근골을 튼튼히 하며 양기를 보호한다고 하였다(허준, 1994 a,b). 그러나 유황은 인체에 직접적으로 투여될 경우 독성이 강하여 부작용을 초래하는 것이 일반적이다. 따라서 독성이 있는 유황은 법제를 통하지 않고서는 약으로 쓰이지 않는다(구정희 등, 1991). 이에 병에 강하고 독성 물질에 대해 해독력이 우수하다고 알려져 있는 오리를 통해 사람에게 유익하게 약제화하여 유황오리라 하였다. 유황을 먹인 오리는 장기능에 약성이 차게 되고 살과 피에 약성이 고루 퍼져 뼈까지 무독성의 유황 성분이 분배되며, 일반 오리에 비해 5배 정도 사람의 인체에 쌓여 있는 독을 분해시킬 수 있는 효능을 가진다고 한다(한국식품개발연구원, 1999). 또한 일반오리 추출물과 유황오리 추출물의 각종 암세포에 대한 생육 억제 효과를 비교하였을 때 거의 모든 암세포에서 유황오리 추출물의 효과가 더 높게 나타났다(Choi et al., 2002). 현재 국내에서는 기능성 오리육을 생산하기 위해 유황과 한약재를 섞은 사료로서 유황오리를 사육하고 있으나 유황오리에 관한 연구는 미약한 실정이며 과학적으로 밝혀진 바가 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 유황오리로부터 항종양 활성물질을 용매

\* Corresponding author : Chang-Han Kim, Department of Animal Life Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-02-450-3679, Fax: 82-02-3436-0266, E-mail: chhan@konkuk.ac.kr

추출법과 각종 크로마토그래피를 이용하여 분리 및 정제하였다.

### 재료 및 방법

#### 유황오리

본 연구에서는 ㈜혜성농산의 생후 9~10주령의 유황오리를 사용하였으며, 오리 중량의 10배 증류수를 넣고 18시간 증탕한 후 여과하여 oil층을 제거하고 액상층을 시료로 사용하였다.

#### 종양 및 정상세포주

본 실험실에 보관중인 종양세포주 HEp-2(human larynx), SNU-5(human stomach carcinoma), SW-156(human kidney carcinoma), KB(human epidermoid of mouth carcinoma), SK-MES-1, Calu-3, A549(human lung carcinoma), Farrow(human melanoma), WiDr(human colon carcinoma), SK-OV-3(human ovary), Raji(human lymphoma), 3LL(mouse lung), SF-188(human brain carcinoma)를 사용하였고, 세포독성을 측정하기 위한 정상세포주 MDBK (bovine kidney)는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다. 종양 및 정상 세포주의 배양에 사용한 배지조성은 Table 1과 같으며, Gibco사(Life Technologies, INC., Rockville, Maryland, USA)의 배지를 사용하여 37℃에서 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는 incubator에서 배양하였다. 배양중인 세포는 매주 2회 refeeding하고 일주일 후 phosphate buffer solution(PBS)으로 세척한 뒤 0.05% trypsin - 0.02% EDTA로 분리, 계대배양하면서 실험에 사용하였다(Ahmann et al., 1982; Yan et al., 2001).

#### 활성물질의 분리 및 정제

유황오리로부터 항암 활성 성분의 분리 및 정제 과정은 Fig. 1과 같다. 유황오리 열수 추출물 100 mL(50 mg/mL)을

Table 1 Cell culture medium

Cell line	Medium
SK-MES-1, Calu-3, 3LL	MEM(Eagle's)+ 10% FBS +1% penicillin/streptomycin + 1% Glutamine + 1% nonessential amino acid + 1% sodium pyruvate + 1% MEM vitamin
SNU-5, SW-156, Farrow, A549, Raji MDBK, SK-OV-3,	RPMI 1640 + 10% FBS(HI)
KB, HEp-2, SF188	MEM(Eagle's)+10% FBS + 1% nonessential amino acid
WiDr	MEM(Eagle's) + 10% FBS

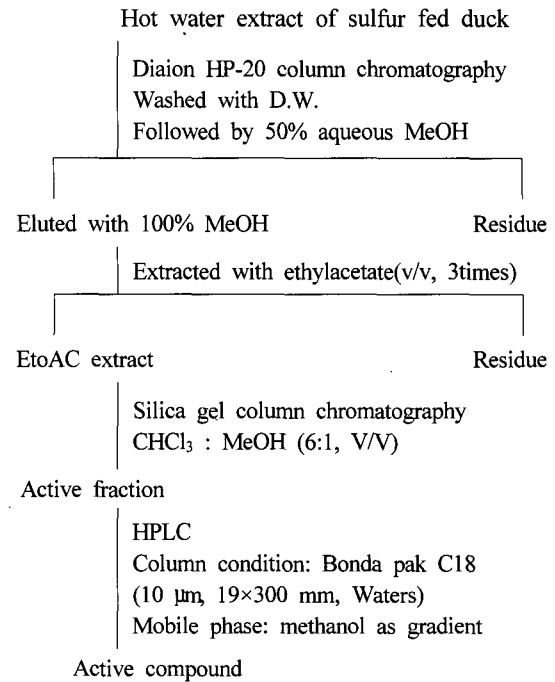


Fig. 1. Isolation and purification scheme of antitumor substance from sulfur fed duck.

Diaion HP-20 컬럼(2.8×50 cm, wet volume 600 mL) 크로마토그래피를 이용하여 증류수, 50% 메탄올, 100% 메탄올로 순차적 용출하였고(Choi et al., 2002) 활성이 인정된 100% 메탄올 용출액을 감압 농축한 후 물로 치환하여 에틸아세테이트로 3회 반복 추출하였다. 에틸아세테이트 추출물을 농축하여 실리카겔(3.5 cm×50 cm, 63~200 mesh, Merck) 컬럼 크로마토그래피에서 CHCl<sub>3</sub> : MeOH (6:1 V/V)를 전개용매로 하여 10 mL씩 fraction collector를 이용하여 분취하였고, 검출은 UV detector(238 UVICORD S II, LKB)를 이용하여 254 nm에서 검출하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 활성이 인정된 fraction을 HPLC용 메탄올에 녹인 후 0.2 μm disposable syringe filter(Adventec MCF)로 여과하여 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC(GILSON, UV/VIS-151) 컬럼은 Bonda pak C18(10 μm, 19×300 mm, Waters)을 사용하였으며 280 nm에서 검출하였다. 이동상은 30분동안 4 mL/min의 유속으로 메탄올의 농도를 10~60%로 증가시켰으며 시료는 20 μL를 투입하였다. 각 단계별 분획은 농축하여 동결건조한 후 phosphate buffer solution(PBS)으로 녹여 활성 측정을 하였다.

#### 1) MTT assay

각 종양 세포주마다의 접종 농도의 세포를 접종하여(Lee et al., 2000) 24시간 동안 배양한 후 종양세포 증식 억제 물질을 처리하고 나서 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 MTT(0.5 mg/mL)용액 50 μL를 각각 첨가한 후 37

℃에서 4시간 추가 배양하여 formazan 형성을 유도시키고, 추가 배양이 끝난 후 원심분리 후 생긴 blue formazan을 용해시키기 위하여 DMSO를 각 well당 100 µL씩 첨가한 후 plate shaker (Wallac, Finland)에서 20분간 교반한 후 각 well의 흡광도를 570 nm에서 측정하였다. 항종양효과는  $[1 - (\text{treated O.D.} / \text{control O.D.})] \times 100$ 을 계산하여 % 저해율로 나타내었으며, 저해율이 50% 이상인 경우에 종양세포 증식 억제 효과가 있다고 판정하였다(Alley et al., 1988; Campling et al., 1991).

2) Clonogenic assay

6 well plate에  $2 \times 10^2$ 의 종양 세포주를 37℃, CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 전배양한 후, 항종양 활성물질에 노출시켰다. 노출 5~7일 후 배지를 제거한 후 phosphate buffer solution(PBS)로 세척하여 1% methylene blue/methanol로 종양 세포주를 1시간 동안 고정시켰다. 다시 증류수로 세척하여 건조시켜 배양 5~7일 후 평판에서 50 µm 이상의 크기를 나타내는 집락을 도립 현미경(Model CK, Olympus, Japan)을 사용하여 계수하였다. 시료처리 평판과 비처리 평판에 나타난 집락의 수를 비교하여 생존율을 %로 나타내었으며, 생존율이 30% 이하일 때를 종양세포에 대한 증식 억제 효과가 있는 것으로 판정하였다(Pauwels et al., 2003).

결과 및 고찰

Diaion HP-20 컬럼 크로마토그래피에 의해 활성이 인정된 100% 메탄올 용출액을 에틸아세테이트로 추출한 후 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시한 결과 4부분(A, B, C, D)의 분획으로 모았다(Fig. 2). HEp-2(human larynx) 종양세포주와 MDBK(bovine kidney)정상세포주에 대한 각 분획의 MTT assay 결과는 Fig. 3과 같다.

분획 C는 500 µg/mL의 농도에서 HEp-2는 91%, MDBK는 40%의 세포 증식 억제율을 나타내어 정상세포보다는 종양세포에 대하여 높은 증식 억제 효과를 나타내었다. 분획 D는

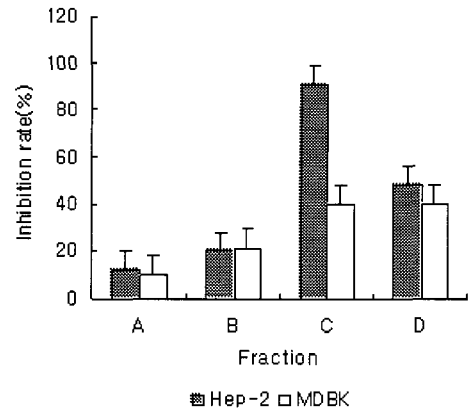


Fig. 3. Growth inhibition of fractions separated by silica gel chromatography against HEp-2 (human larynx) and MDBK (bovine kidney) in MTT assay. Concentration of each fraction is 500 µg/mL.

HEp-2와 MDBK에서 각각 50%, 40%의 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 분획 A와 B는 종양 세포 증식 억제 효과가 전혀 인정되지 않았다.

실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 활성이 인정된 분획 C를 UV 최대 흡수 파장인 280 nm에서 HPLC를 실시한 결과의 chromatogram은 Fig. 4와 같다.

Retention time 9.0분의 Peak를 P<sub>1</sub>, 11.1분의 Peak를 P<sub>2</sub>, 18.0분의 Peak를 P<sub>3</sub>라 하였다. 각 Peak의 HEp-2에 대한 종양 세포 증식 억제 효과는 가장 큰 면적을 나타낸 P<sub>3</sub>가 500 µg/mL의 농도에서 81%의 종양 세포 증식 억제 효과를 나타내었고, P<sub>1</sub>과 P<sub>2</sub>는 종양 세포 증식 억제 효과가 나타나지 않았다. 따라서 HPLC에 의해 retention time 18.08분에 종양 세포 증식 억제 물질을 분리할 수 있었다.

HPLC로 분리한 P<sub>3</sub>의 항암활성 효과는 살아 있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의하여 tetrazolium의 환원으로 생성되는 blue formazan을 측정하는 MTT assay와 종양세포의 집락 형성능을 지표로 하는 clonogenic assay로 측정하여 비교하였다.

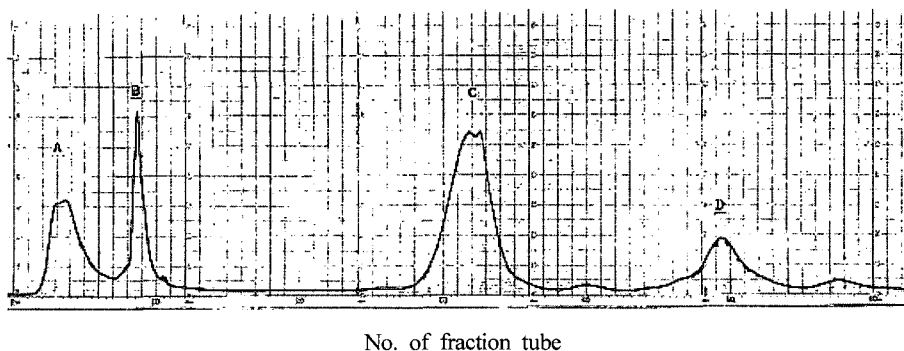


Fig. 2. Chromatogram of the extract of ethylacetate on silica gel chromatography.

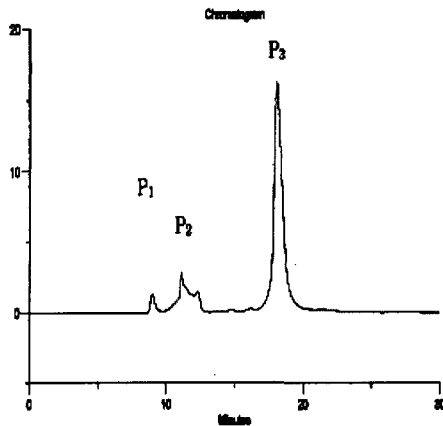


Fig. 4. HPLC chromatogram of fraction S-3 from silica gel chromatography.

Column condition; Bonda pak C18 (10  $\mu$ m, 19 $\times$ 300 mm, Waters). Mobile phase; methanol as gradient (4 mL/min, 30 min). Detector: 280 nm. Injection: 20  $\mu$ L.

Table 2. Antitumor effects of the active compound which isolated from the sulfur fed duck against various cell lines by MTT assay

Cell line	Inhibition(%)		
	500 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL
A549	76* <sup>1)</sup>	40	18
Calu-3	74*	48	22
SK-MES-1	78*	71*	48
Farrow	80*	62*	43
SNU-5	80*	71*	49
SF188	51*	28	0
WiDr	63*	46	12
Hep-2	93*	81*	58*
KB	95*	81*	56*
SK-OV-3	81*	59*	37
SW156	86*	68*	47
Raji	60*	41	26
3LL	61*	38	11
MDBK	48	34	28

<sup>1)</sup> \*Sensitive i.e., % inhibition  $\geq$  50.

Table 2는 MTT assay에 의한 결과로 500  $\mu$ g/mL의 농도에서는 13종류의 모든 종양 세포주에서 50% 이상의 세포 증식 억제 효과를 나타내었으나, 100  $\mu$ g/mL로 농도가 낮아지자 HEp-2 와 KB에 대해서만 각각 56%와 58%의 세포 증식 억제 효과가 나타났다. 정상 세포주인 MDBK는 모든 농도에서 50% 미만의 세포 증식 억제 효과가 나타나 정상 세포에 대한

Table 3. Antitumor effects of the active compound which isolated from the sulfur fed duck against various cell lines by clonogenic assay

Cell line	Survival(%)		
	500 $\mu$ g/mL	200 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL
SK-MES-1	20*	88	99
Farrow	18*	46	60
Hep-2	10*	26*	39
KB	11*	28*	47
SK-OV-3	24*	46	63
SW156	16*	37	50

\*:Sensitive i.e., % survival  $\leq$  30.

세포 독성은 강하지 않은 것으로 판단되어진다.

Clonogenic assay는 MTT assay의 200  $\mu$ g/mL의 농도에서 활성을 나타낸 종양 세포주를 선별하여 세포의 집락 형성 억제 정도를 측정하였으며 그 결과는 Table 3과 같다. 500  $\mu$ g/mL의 농도에서는 MTT assay의 결과와 같이 모든 종양 세포주에서 저해 효과가 인정되었지만, 200  $\mu$ g/mL의 농도에서는 HEp-2 와 KB에서만 각각 26% 및 28%의 생존율을 나타내어 항종양 효과가 나타났다. 그러나 MTT assay에서 활성이 인정된 100  $\mu$ g/mL의 농도에서는 모든 종양 세포주들의 생존율이 30% 이상으로 항종양 효과가 나타나지 않았다. 이와 같은 결과로 보아 유향오리로부터 정제한 활성물질은 후두암 세포주인 HEp-2와 구강암 세포주인 KB에서만 특이적으로 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 유향오리 열수 추출물은 10 mg/mL의 농도 미만에서는 암세포 생육 억제 효과가 나타나지 않았지만(Choi et al., 2002), 유향오리 열수 추출물을 정제한 활성물질은 100  $\mu$ g/mL의 농도에서도 암세포 생육 억제 효과가 나타나 항암 활성이 증가된 것을 알 수 있었다. 따라서 이 활성물질의 구조 분석 등 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 유향오리로부터 항종양 효과를 나타내는 물질을 용매 추출법과 각종 크로마토그래피를 사용하여 분리 및 정제하였다. 유향오리로부터 정제한 활성 물질의 각종 종양세포에 대한 항암 효과를 측정한 결과 MTT assay는 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 HEp-2는 56%, KB는 58%의 세포 증식 억제 효과가 나타났다. 정상 세포주인 MDBK는 28%의 세포 증식 억제 효과가 나타나 정상 세포에 대한 세포 독성은 나타나지 않았다. Clonogenic assay는 200  $\mu$ g/mL의 농도에서 HEp-2는 26%, KB는 28%의 생존율을 나타내었다. 따라서 유향오리로부터 정제한 활성 물질은 후두암 세포주인 HEp-2와 구강암 세포주인 KB에서만 특이적으로 세포 증식 억제 효과를

나타내었다.

### 감사의 글

본 연구는 2003년도 서일대학 학술연구비 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Ahmann, F. R., Meyskens, F. L., Moon, T. E., Durie, G. M., and Salmon, S. E. (1982) *In vitro* chemosensitivities of human tumor stem cells to the phase II drug 4'- (9-acridinylamino) methanesulfon-m-anisidide and prospectin *in vivo* correlations. *Cancer Res.* **42**, 4495-4498.
2. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursley, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., and Boyd, M. R. (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589-601.
3. Campling, B. G., Pym, J., Baker, H. M., Cole, S. P. C., and Lam, Y. M. (1991) Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. *Br. J. Cancer* **63**, 75-83.
4. Choi, G. H. and Kim, C. H. (2002) Growth inhibition of extracts from sulfur feed duck meat against various tumor

- cell lines. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **22**, 348-351.
5. Lee, K. H., Kim, J. H., Lim, D. S., and Kim, C. H. (2000) Anti-leukaemic and anti-mutagenic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate isolated from *Aloe vera* Linne. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **52**, 593-598.
6. Pauwels, B., Korst, A. E., De Pooter, C. M., Pattyn, G. G., Lambrechts, H. A., Baay, M. F., Lardon, F., and Vermorken, J. B. (2003) Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for *in vitro* chemoradiation studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* **51**, 221-226.
7. Yan, M., Lin, H., Shen, Y., and Wang, Q. (2001) Studies on inhibiting activities of five antitumor drugs to human cancer cell *in vitro* with MTT assay. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 418-419.
8. 구정희, 김운애, 류경희, 정형도 (1991) 동약학 개론. 여간출판사, pp. 442-443.
9. 박재갑 (1993) 전통약물로부터 신약 개발 : 항암제의 검색방법. 서울대학교 천연물과학연구소, pp. 174-181.
10. 한국식품개발연구원 (1999) 유황오리와 일반오리의 영양 성분 분석 및 비교시험 보고서.
11. 허준 (1994 a,b) 동의보감. 여간출판사, pp. 110-113.

(2004. 6. 30. 접수 ; 2004. 9. 8. 채택)