

미강 추출 Tocotrienol의 항암 및 독성 평가

이영상 · 김용호[†]

순천향대학교 생물자원공학과

Evaluation of Anticancer Activity and Toxicity of Tocotrienol Extracted from Rice Bran

Young-Sang Lee and Yong-Ho Kim[†]

Dept. of Biological Resources and Technology, Soonchunhyang Univ., Asan-si, Chungnam 336-745, Korea

ABSTRACT Rice is the most important crop in Korea and its annual production of 5.2 million ton is followed by over 0.5 million ton of bran as by-products of milling process. Although rice bran contains various nutritious and pharmaceutical compounds, rice brans are rarely utilized as functional food sources in Korea. In recent, tocotrienols are well known having distinctive pharmaceutical effectiveness. So tocotrienols extracted from rice bran oil were evaluated about pharmaceutical function. The IC₅₀ of tocotrienols products against liver cancer, HepG2 cells were 149 mg mL⁻¹, indicating anticancer activity of final products. By animal feeding tests, the final products containing tocotrienols did not induce any toxicity signs in mortality, incidence of clinical signs, body weight, etc. after a single oral administration, which proved safety of the tocotrienol products. In conclusion, tocotrienol extracted from rice bran has pharmaceutical activity without any toxic effects, which is also suggested tocotrienol products may be a good fortifying nutrition for the health and medical care.

Keywords : tocotrienol, rice bran, pharmaceutical activity, toxicity, cancer

벼의 도정 과정 중에 상실되는 미강 층에는 다양한 영양소가 존재하나 국내에서는 극히 일부가 미강유 제조에 사용될 뿐 대부분 사료용으로, 혹은 농업폐기물로 처리되고 있는 실정이다. 특히 미강에는 tocotrienol이 다량 포함되어 있는데, tocotrienol은 혈액, 조직, 세포의 지질 산화를 방지하는 기능을 가진 것으로 알려진 비타민 E의 일종이다. 그동안 비타민 E를 대표하는 것으로 tocopherol이 알려져 있었으나 최근의 보고에 의하면 tocotrienol이 in vitro 실험 결과 오히

려 tocopherol보다 40-60배 기능이 우수한 것으로 알려졌으며(Kamat & Sarma, 1995; Suarna *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1993; Lehmann & Slover, 1976), 이와 함께 다양한 항암 효과가 보고되고 있다(Sugano & Tsuji, 1997). Tocotrienol이 갖고 있는 주요한 생리활성은 혈중 cholesterol 저하, 고지혈증 개선 및 혈관계 장애 억제 효과(Qureshi *et al.*, 1995; Sies & Stahl, 1995), 혈압 강하, 세포의 보호, 면역 기능 강화, 치매증 개선 등 다양한 종류의 인체 기능 향상 효과를 갖고 나타내는 것으로 보고되어 있으며(Kamat & Devasagayam, 1995; Thiele *et al.*, 1997; 김 등, 1997; Kamal & Appelqvist, 1996; Serbinova & Packer, 1994), 자외선 노출에 의한 피부 손상을 방지하는 효과로 화장품에 이용되기도 한다. Woo *et al.*(2005)은 국내산 미강 추출 tocotrienol의 강력한 항산화 효과를 보고한 바 있다.

따라서 국내에서 연간 60만 톤 정도 생산되는 것으로 추정되는 미강의 활용은 주요한 과제가 될 수 있다. 특히 수입 개방화와 더불어 어려움을 겪고 있는 국내 농산물 시장의 현황을 볼 때, 현재 활용도가 극히 낮은 우수한 국내산 미곡의 부산물을 건강보조식품 또는 의약품으로의 고부가가치화 시도는 미곡산업의 활성화에도 큰 도움이 될 것이라 판단된다.

본 연구는 국내산 미곡 추출 tocotrienol의 항암효과 및 독성평가를 동물식이 실험을 통하여 검증하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Tocotrienol 추출 및 원료 준비

Tocotrienol 추출을 위한 원료는 (주)세림현미로부터 현

[†]Corresponding author: (Phone) +82-41-530-1281
(E-mail) yohokim@sch.ac.kr

미유 생산용 미강 pellet을 hexane으로 추출한 crude oil을 분양 받아 사용하였으며, 모든 과정은 실험실에서 제작된 pilot system에서 수행되었다. 먼저 hexane 추출 crude oil 1.5 kg에 EtOH 18 L, ascorbic acid 200 g, KOH(44%) 900 mL 등을 첨가한 후, 80°C에서 18분간 비누화 반응을 실시하였다. 냉각된 반응물은 hexan 18 L로 2회 분획한 후, 다시 물로 1회 세척하고 hexan을 증류 제거시켰다. 이후 얻어진 hexan 수집액을 -20°C에서 24시간 저온 처리한 후 원심분리하였으며, 이때 얻어진 상정액을 다시 감압농축 하여 hexan을 제거하였다. hexan이 제거된 농축물은 EtOH을 첨가하여 다시 저온 처리 및 원심분리한 후 감압농축 시켜 EtOH을 제거하였으며, 이후 얻어진 농축물을 최종생산물로 하였다.

최종 생산물의 항암성 평가

국내산 미강에서 추출된 최종생산물(FP)의 항암성 평가를 위하여 MTT assay를 다음과 같이 수행하였다. 간암세포인 HepG2 cells(1×10^4 cells/well)를 96-wells plate에 seeding하고 다음날 시료 용액(15, 75, 150, 300, 600 µg/ml)이 함유된 RPMI 배지 100 µl를 처리하였다. 이를 CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음 신선한 배지(200 µl)로 치환하고 MTT시약(1 mg/ml soln) 50 µl를 처리하였다. 4시간 후에 배지를 제거하고 DMSO 150 µl를 넣어 생성된 formazan을 용해하고 ELISA reader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

최종생산물의 랫드를 이용한 단회 경구투여 독성시험

본 시험은 식품의약품안전청 고시 제1999-61호(1999년 12월 22일) '의약품등의 독성시험기준'에 준하여 수행되었다. 실험동물은 일반독성시험에 널리 사용되는 Sprague Dawley(SD) 계통의 특정병원균 부재(SPF) 랫드를 (주)샘타코 BIO KOREA에서 공급받아 사용하였다. 사용된 랫드는 암수 각 7주령 14마리로 입수 시 체중은 수컷 227.11 g ~ 236.08 g, 암컷 171.38 g ~ 183.08 g이었다. 최종 생산물 투여는 암수 각 8주령의 12 마리에서 시작하였으며 투여개시 시 체중은 수컷 239.42 g ~ 251.47 g, 암컷 178.70 g ~ 192.51 g이었다. 또한 입수 동물의 검역 및 순화를 위하여 동물 입수시 공급처에서 제공한 시험계의 병원체 검사 성적서를 참고로 하여 입수동물의 검수검역을 실시하였으며, 동물 입수 후 7일간 시험을 실시하는 동물실내에서의 순화과정을 거쳤고 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

1. 사육환경

본 시험은 온도 23±3°C, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10-20회/hr, 조명시간 12시간(오전 8시 점등 ~ 오후 8시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 설정된 주식회사 캡온의 전임상연구센터 제2동물사육구역 6호실에서 수행하였다. 시험기간 중 동물실의 온습도는 컴퓨터 시스템을 이용한 자동 온습도측정기로 매 시간마다 측정하였으며, 환기횟수 및 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정하였다. 환경측정 결과, 위 설정범위를 4 시간 이상 벗어나는 이상은 관찰되지 않았다. 동물은 스테인레스제 망사육상자(215 W × 360 L × 200 Hmm)에서 사육되었으며, 순화/검역기간에는 5 마리 이하/사육상자, 투여/관찰기간에는 2마리 이하/사육상자로 사육하였다. 사육상자는 시험번호 및 동물번호를 기입한 개체식별 카드를 부착하여 구분하였다.

2. 식이법 및 시험물질 투여

사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(Harlan Co. Ltd, 미국)를 플라스인터내셔널로부터 공급 받아 사용하였다. 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후 물병을 이용하여 자유섭취 시켰다. 본 시험은 시험물질의 개략적인 치사량을 구하기 위한 실험으로, 최고용량으로는 경구투여의 한계량으로 많이 사용하는 2,000 mg/kg을 투여하고 그 아래로 4개의 용량군을 추가하였다. 대조군으로는 무처리 대조군을 두었다.

본 시험의 시험군 구성은 Table 1과 같다.

Table 1. Grouping of experimental animals.

Group	Gender	No. of animals	Animal number	Dose (mg/kg)
G1 (blank control)	Male	2	1~2	0
	Female	2	13~14	0
G2	Male	2	3~4	250
	Female	2	15~16	250
G3	Male	2	5~6	500
	Female	2	17~18	500
G4	Male	2	7~8	1,000
	Female	2	19~20	1,000
G5	Male	2	9~10	1,500
	Female	2	21~22	1,500
G6	Male	2	11~12	2,000
	Female	2	23~24	2,000

동물의 군분리는 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후, 5 g 간격으로 구분하여 각각의 평균체중에 가까운 동물들을 암수 각각 12마리를 선택하였다. 이렇게 선택한 동물들은 암수 각각 2마리씩 균등하게 분배되도록 순위화 한 체중을 이용하여 무작위법으로 분배하였다. 동물의 개체식별은 포화 피크린산을 이용한 피모 색소표식법 및 개체식별 카드 표시법으로 실시하였다.

경구투여는 시험물질 원액을 별도의 조제 없이 실시하였는데, 투여 바로 전일 실험동물을 하룻밤 절식시켜 위 내용물을 비운 후 금속제 경구투여용 존데와 주사기를 이용하여 위 내로 강제 경구투여를 실시하였다. 투여는 당일 체중을 기준으로 투여량을 계산하여 당일 오전 1회 투여하였다. 관찰 항목은 모든 동물에 대하여 매일 1회 이상 증상관찰 및 투여 전, 투여 후 1, 3, 7 및 14일째의 체중을 측정하였다. 부검은 ether 마취로 동물을 심장 마취시킨 후 개복하였으며, 후대정맥과 복대동맥을 절단하여 방혈 치사시키고 흉강 및 복강의 모든 장기에 대한 육안적인 부검소견을 관찰하였다.

통계 분석

체중변화의 경우 일원배치 분산분석을 통해 무처리 대조군과 비교하였다. 통계 프로그램으로는 SPSS 10.1을 사용하였다.

결과 및 고찰

최종 생산물의 항암성 평가

국내산 미강에서 추출된 최종 생산물의 항암성 평가를 위하여 간암세포인 HepG2 cells에 tocotrienol이 포함된 최종 생산물(15, 75, 150, 300, 600 µg/mL)이 함유된 RPMI 배지 100 µl를 처리하였다.

Fig. 1에 나타난 바와 같이 처리 농도가 증가함에 따라 암세포의 생장이 억제되어 국내산 미강추출 tocopherol 및 tocotrienol은 항암성 효과를 갖는 것으로 나타났으며, 50%의 암세포 억제효과를 나타내는 IC₅₀은 149 µg/mL로 추정되었다.

랫드를 이용한 최종 생산물의 단회 경구투여 독성시험

최종생산물의 단회 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 암수 랫드에 시험물질을 2,000, 1,500, 1,000, 500 및 250 mg/kg을 투여하고 무처리 대조군과 2 주간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

전 시험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않아(Table 2) 본 시험에서 랫드의 최소치사량은 2,000 mg/

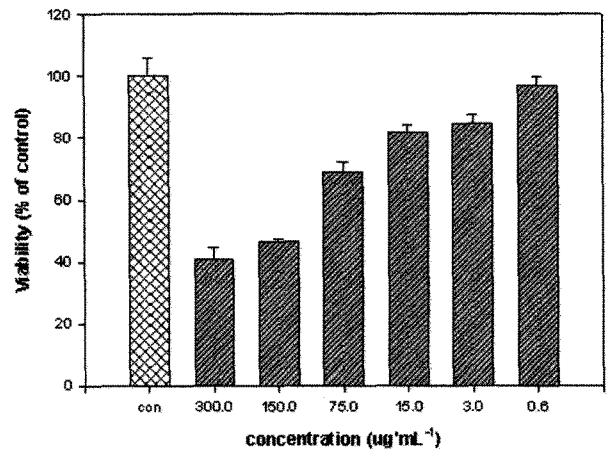


Fig. 1. Viability of HepG2 cells treated with final products containing tocopherol and tocotrienol extracted from rice bran.

Table 2. Mortality in rats after single oral administration of final product.

Dose (mg/kg)	No. dead/ No. dosed	Number of death										LD ₅₀ value
		Days after dosing										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8-14		
Male	0	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	250	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	500	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,000	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,500	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2,000	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> 2,000 mg/kg
Female	0	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	250	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	500	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,000	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1,500	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2,000	0/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> 2,000 mg/kg

kg을 상회하는 것으로 판단되었다. 또한 일반증상의 변화는 관찰되지 않았으며(Table 3), 암수 모두에서 전 시험기간 동안 유의성 있는 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 4).

단, 부검소견에서 나타난 폐의 변화는 용량과 상관성 없이 산발적으로 관찰되었다(표 5). 수컷의 경우 250 mg/kg 투여군(G2)에서 짙은 암적색 반점의 산재(diffused dark red

spots) 및 500 mg/kg 투여군(G3)에서 우측 고환의 위축(atrophy)이 각 1례씩 관찰되었다. 또한 암컷에서는 짙은 암갈색 반점의 산재(diffused dark brown spots)가 무처리 투여군(G1) 1례 및 1,500 mg/kg 투여군(G5) 2례에서 관찰되었다. 이는 SPF 사육구역에서 2-5개월령의 SD 랫드에서 월인불명의 간질성 폐렴의 빈도가 높다는 보고(손, 2004;

Table 3. Incidence of clinical signs in rats after single oral administration of final products.

Day	Signs observed	Dose level (mg/kg)					
		0	250	500	1,000	1,500	2,000
0	Appears normal	4/4*	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
1	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
2	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
3	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
4	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
5	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
6	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
7	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
8	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
9	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
10	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
11	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
12	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
13	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
14	Appears normal	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined

Table 4. Body weight changes in rats after single oral administration of final products.

	Dose (mg/kg)	Body weight (g)					Gain
		0 day	1 day	3 day	7 day	14 day	
Male	0	244.14	272.15	288.55	311.26	355.05	110.91
	250	247.58	271.06	282.44	298.77	339.68	92.10
	500	245.90	269.83	282.97	301.19	345.41	99.52
	1,000	249.91	275.70	292.36	317.12	650.67	100.76
	1,500	247.28	269.95	280.21	190.77	320.62	73.34
	2,000	246.66	269.08	280.82	296.49	334.08	87.43
Female	0	184.69	201.85	207.38	215.52	227.68	43.00
	250	185.95	200.76	206.53	215.97	234.70	48.75
	500	185.99	201.97	204.23	212.87	234.45	48.46
	1,000	184.34	201.12	205.15	207.86	225.74	41.40
	1,500	188.66	203.91	214.83	221.88	238.73	50.07
	2,000	184.34	204.05	208.22	213.75	232.35	48.01

Table 5. Gross findings in rats after single oral administration of final products.

	Dose (mg/kg)	Gross observation		Frequency	
		Location	Gross findings	Death	Survivors
Male	0		No gross findings	0/0*	2/2
	250		No gross findings	0/0	1/2
		Lung	Diffused dark red spots	0/0	1/2
	500		No gross findings	0/0	1/2
		Testis	Atrophy	0/0	1/2
	1,000		No gross findings	0/0	2/2
	1,500		No gross findings	0/0	2/2
2,000		No gross findings	0/0	2/2	
Female	0		No gross findings	0/0	1/2
			Diffused dark red spots	0/0	1/2
	250		No gross findings	0/0	2/2
	500		No gross findings	0/0	2/2
	1,000		No gross findings	0/0	2/2
	1,500		No gross findings	0/0	0/2
			Diffused dark red spots	0/0	2/2
2,000		No gross findings	0/0	2/2	

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined.

Patricial, 1997)와 일치하며 본 시험물질에 의한 독성학적인 변화는 아닌 것으로 판단되었다. 수컷 500 mg/kg 투여군 1레에서 관찰된 고환의 위축 또한 SD 랫드를 이용한 시험에서 자연 발생적으로 관찰되는 것으로 본 시험물질에 의한 독성과는 관련이 없는 것으로 판단되었다.

이상의 결과로 보아 본 시험 조건 하에서 최종생산물의 랫드에 대한 단기 경구투여는 아무런 독성학적인 변화를 유발하지 않는 것으로 판단되었다. 또한 사망동물은 관찰되지 않아 본 시험물질의 랫드에서의 최소치사량(MLD)은 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 사료된다.

적 요

Tocotrienol의 건강식품 및 의료용 가공품으로의 고부가가치화 가능성을 평가하기 위하여 미강에서 추출한 tocotrienol의 항암 효과 및 독성평가를 실시하였다. HepG2 간암 세포를 대상으로 한 항암효과 분석 결과 tocotrienol이 간암세포의 증식을 억제함을 입증할 수 있었다. 또한 랫드를 이용한 경구독성 검사를 수행한 결과 tocotrienol 최종생산물은 경구투여 한계량인 2,000 mg kg⁻¹ 수준에서도 사망률, 일반 증상, 체중 변화 등에 이상을 보이지 않았으며,

부검 후 흉강 및 복강의 모든 장기에 대한 육안적 부검 소견 등에서도 아무런 독성학적 변화가 유발되지 않음을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 농림기술센터(과제번호 : 201034-03-2-SB010)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Kamal, E. A. and L. A. Appelqvist. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31 : 671-701.
- Kamat J. P. and H. D. Sarma. 1997. Tocotrienols from palm oil as effective inhibitors of protein oxidation and lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem.* 170 : 131-137.
- Kamat, J. P. and T. P. Devasagayam. 1995. Tocotrienols from palm oil as potent inhibitors of lipid peroxidation and protein oxidation in rat brain mitochondria, *Neurosci. Lett.*, 195 : 179-182.
- 김영수, 하태열, 이상효, 이현유. 1997. 미강 식이섬유 추출물이 밀가루의 호화 및 노화에 미치는 영향. 한국식품과학회지.

- 293 : 464-469.
- Lehmann, J. and H. T. Slover. 1976. Relative autooxidative and photolytic stabilities of tococls and tocotrienols. *Lipids* 11 : 853-857.
- Patricial L. 1997. Diagnostic Exercise : Interstitial Pneumonia in viral and mycoplasmal antibody-free Sprague Dawley rats. ACLAD newsletter (American Committee on Laboratory Animal Diseases), fall 18(1).
- Qureshi, A. A., B. A. Bradlow, L. Brace, J. Manganello, D. M. Peterson, B. C. Pearce, B. C., J. J. K. Wright, A. Gapor, and C. F. Elson. 1995. Response of hypercholesterolemic subjects to administration of tocotrienols. *Lipids* 30 : 1171-1177.
- Serbinova, E. A. and L. Packer. 1994. Antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Method. Enzymol.* 234 : 354-366.
- Sies, H. and W. Stahl. 1995. Serum antioxidants and age-related macular generation in a population-based case-control study. *Arch. Ophthalmol-Chic.* 113 : 1518-1523.
- 손우찬. 2004. 안전성 평가의 평가 기법 및 최신동향 조사. 한국과학기술정보연구원.
- Suarna, C., R. I. Hood, R. T. Dean, and R. Stocker. 1993. Comparative antioxidant activity of tocotrienols and other natural lipid-soluble antioxidants in a homogeneous system, and in rat and human lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1166 : 163-170.
- Sugano, M. and E. Tsuji. 1997. Rice bran oil and cholesterol metabolism. *J. Nutr.* 127 : 521S-524S.
- Suzuki, Y. J., M. Tsuchiya, S. R. Wassell, Y. M. Choo, G. Govil, V. E. Kagan, and L. Packer. 1993. Structural and dynamic membrane properties of α -tocopherol and α -tocotrienol : implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry* 32 : 10692-10699.
- Thiele, J. J., M. G. Traber, M. Podda, K. Tsan, C. E. Cross, and L. Packer. 1997. Ozone depletes tocopherols and tocotrienols topically applied to murine skin. *FEBS lett.* 401 : 167-170.
- Woo, K. M., Y. S. Lee, and Y. H. Kim. 2005. Antioxidant activity of tocotrienol in rice bran. *Korean J. Crop Sci.* 50(S) : 4-8.