

## DSS(Dextran Sulfate Sodium)로 유도된 마우스의 대장염에 대한 유황오리 추출물의 항염증 효과

김선미<sup>1</sup> · 정민우<sup>1</sup> · 김윤세<sup>2</sup> · 이재양<sup>2</sup> · 정지강<sup>1</sup> · 김신정<sup>1</sup> · 박건영<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>(주)인산가

### Inhibitory Effects of Sulfur-Fed Duck Extracts on DSS-induced Colitis in Mouse

Sun-Mi Kim<sup>1</sup>, Min-Woo Jeong<sup>1</sup>, Yoon-Se Kim<sup>2</sup>, Jae-Yang Lee<sup>2</sup>, Ji-Kang Jeong<sup>1</sup>,  
Sin-Jeong Kim<sup>1</sup>, and Kun-Young Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

<sup>2</sup>Insan Inc., Gyongnam 676-802, Korea

**ABSTRACT** Anti-inflammatory effects of sulfur-fed duck extract on colitis induced by 2.5% dextran sulfate sodium (DSS) were examined in male Balb/c mice. Animals were divided into eight groups: normal (0.1 mL of PBS without 2.5% DSS), control (0.1 mL of PBS with 2.5% DSS), SD-H (3 mL/kg of high sulfur-fed duck extract), SD-L (1 mL/kg of low sulfur-fed duck extract), GD-H (3 mL/kg of high general duck extract), GD-L (1 mL/kg of low general duck extract), GC-H (3 mL/kg of high general chicken extract), and GC-L (1 mL/kg of low general chicken extract). Mice were fed PBS or six different doses of extracts (sulfur-fed duck, general duck, and chicken), once daily for 14 days. Colitis was induced from day 7 to 14 via the administration of 2.5% DSS in drinking water. The colon length was significantly shortened in mice compared to the control group. The administration of SD-H, SD-L, and GD-L increased colon length and decreased histological colon injury from DSS-induced colitis. However, chicken extracts did not recover any clinical sign of the colitis. SD-L significantly suppressed not only the concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, and IL-12 in serum but also the mRNA expressions of IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS and COX-2 in DSS-treated colon tissues ( $P < 0.05$ ). The administration of SD-H suppressed the concentrations of IL-6 in serum and the mRNA expressions of IL-6, iNOS, and COX-2 in colon tissues. Administration of GD-L suppressed the concentrations of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-17A in serum and the mRNA expressions of IL-6, iNOS, and COX-2 in colon tissues. The inhibitory effects of sulfur-fed duck extracts were effective at a dose of 1 mL/kg. Our results indicate that sulfur-fed duck extracts may possess anti-inflammatory effects on DSS-induced colitis mice.

**Key words:** sulfur fed duck, colitis, DSS, Balb/c mouse

## 서 론

유황이란 유황광이나 유황광물을 채취하여 가열 용해한 다음 상층의 액상유황을 취하여 냉각한 것으로 유황 및 텔루륨(Te), 셀레늄(Se) 등을 함유한다(1). 유황은 질병 치유의 오랜 역사를 가지고 있는 광물질이다. 현재까지 잘 알려진 유황의 효능으로는 통증완화 및 염증 제거 작용, 항산화 작용과 세균과 바이러스, 박테리아, 곰팡이와 같은 병원체에 대한 멸균작용 등이 보고되어 있다(2-5). 동의보감 등(6,7)에 의하면 유황은 인체에 직접적으로 투여될 경우 독성이 강하여 부작용을 초래하는 것이 일반적이므로 이에 두부제

(豆腐制), 나박제(羅篋制), 저장제(猪腸制) 등의 법제를 하여 사용하거나 병에 강하고 독성물질에 해독력이 있는 오리를 통해 사람에게 유익하게 약제화 하여 사용해왔다.

본초강목 등 옛 의학서에서는 오리고기는 순환기계통의 환자식에 이용하고 허약체질 등에 효능이 있으며 각종 해독 작용과 혈액순환을 도운다고 기록되어져 있다. 현재에 이르러 오리는 한방의학과 민간요법으로 여러 가지 병의 치료와 예방에 폭넓게 활용되고 있다(8). 일반 집오리에 국산 사료와 유황을 먹여 기른 것이 유황오리이고 1년 이상 유황을 먹이게 되면 약효가 난다. 오리에게 유황을 먹이면 유황독과 같은 독성물질을 제거시키는 해독물질이 오리세포 내에 생산되어 오리의 간, 쓸개, 뇌수, 뼈에 축적이 되고, 이 해독물질 때문에 해독력이 3~4배로 증가된다(9). 유황오리를 먹으면 몸 안에 쌓인 유해독을 풀어주고, 양기부족으로 정력이 떨어진 사람에게게는 보양 효과가 있다. 그리고 오리고기는

Received 7 June 2013; Accepted 5 September 2013

\*Corresponding author.

E-mail: kunypark@pusan.ac.kr, Phone: 82-51-510-2839

염분이 강하므로 항생제와 소염제의 역할을 하고, 오리의 기름은 리놀산과 리놀렌산을 함유하여 콜레스테롤 형성을 억제하고 혈액순환을 원활하게 하기 때문에 성인병을 예방하는 효과가 있다고 한다(10). 유향오리는 일반오리보다 지방함량과 콜레스테롤은 낮고 다중불포화지방산은 높다. 아미노산 중 cystein과 methionine은 약 2배 정도 많고, 무기질 중 Na, Mg, P, S, Ca, Ge, Fe 등이 더 많이 검출되어 영양적으로 우수한 것으로 알려져 있다(11). 또한 유향오리는 일반오리에 비해 5배 정도의 인체 해독 능력과 각종 암세포에 대한 생육억제효과를 나타내었다는 보고도 있으나 유향을 동물에게 섭취시키는 것 역시 지나칠 경우 동물에게 병을 초래할 수 있다는 실험결과도 있다(12-14). 유향오리가 다양한 좋은 효과를 가지고 있음에도 불구하고 유향오리에 대한 과학적인 연구가 미약하고 부족한 실정이다.

건강을 목적으로 유향오리를 섭취할 때는 유향오리를 열수추출 하고, 여기에 약제를 첨가하여 끓인 유향오리진액 및 추출물의 형태로 많이 이용하고 있다. 이에 본 연구에서는 2.5% DSS(dextran sulfate sodium)로 유발시킨 급성대장염 동물모델을 이용하여 유향오리와 일반오리와 닭을 열수추출 하고 이들을 비교 실험하여 유향오리의 대장염 억제효과를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 추출물의 조제

본 연구에서는 초산오리농장(경남, 함안)의 유향오리 2년 생을 사용하였고, 일반오리와 닭은 함안의 농협마트에서 구입하였다. 유향오리, 일반오리, 닭 추출물은 (주)인산가(경남 함안)에서 제조한 것을 공급받아 실험에 사용하였다. 유향오리, 일반오리 및 닭은 중량의 20배의 물을 넣고 6시간 끓였다. 기름막을 제거한 후, 물의 양이 1/10로 줄어들 때까지 계속 끓여서 여과하여 유향오리, 일반오리와 닭의 추출액을 제조하고 이를 실험 재료로 사용하였다.

### 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 5주령 male Balb/c 마우스(Samtako Bio Korea, Osan, Korea)로 체중이 20 g 전후의 것을 사용하였으며, 1주일간 표준사료(SAM #3 쥐사료, Samtako Bio Korea)로 사육하여 적응시킨 후 실험하였다. 구입한 마우스는 12시간 dark-light cycle로 조절하고 실험실 내에 설치한 micro ventilation cage system(온도 23±2°C, 습도 50±5%) 내에서 물과 사료는 충분한 양을 공급하여 사육하였다.

### 시료의 투여 및 궤양성 대장염 유발

실험동물은 1주일간의 적응기간을 가진 뒤, 무게를 측정하고 임의로 각 군당 8마리씩 나누어서 총 8군으로 하여 실험하였다. 정상군(normal)과 대조군(control)은 PBS(phosphate buffered saline), 유향오리 고농도군(SD-H)은 유향오리 추출물 3 mL/kg, 유향오리 저농도군(SD-L)은 유향오리 추출물 1 mL/kg, 일반오리 고농도군(GD-H)은 일반오리 추출물 3 mL/kg, 일반오리 저농도군(GD-L)은 일반오리 추출물 1 mL/kg, 일반닭 고농도군(GC-H)은 닭 추출물 3 mL/kg, 닭 저농도군(GC-L)은 닭 추출물 1 mL/kg의 농도로 PBS에 희석하여 100 µL씩 시료를 경구투여 하였다. DSS 염증성 장질환의 동물모델에 의하면 2.5%~10% 정도의 DSS를 음용수에 섞어 5~7일간 투여하여 대장염을 유발한다(15). 본 연구에서는 Vieira 등(16)과 Geier 등(17)의 연구를 참조하여 DSS의 농도를 2.5%로 정하였으며, 시료 투여는 적응기간이 끝나고 14일간 경구투여 하였다. 정상군(normal)을 제외한 실험군은 시료 투여 후 7일째부터 음수에 녹인 2.5% DSS를 7일간 자유롭게 섭취하게 하여 대장염을 유발하였다. 실험기간 중 3일에 한 번씩 개체별 체중을 측정하였다. 실험기간 중 체중측정은 매 측정 시 오차를 최소화하기 위하여 동일한 요일과 동일한 시간대에 같은 저울을 사용하여 측정하였다. 본 실험은 부산대학교 동물 실험윤리위원회 허가(PNU-2012-0139)를 받아 진행하였다(18).

실험동물은 희생 12시간 전에 절식시켰으며, ether로 가볍게 마취한 후 복부 대동맥으로부터 채혈하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분 정도 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 얻은 후 -80°C에서 냉동 보관하였다. 채혈 직후 대장을 분리하여 생리식염수에 담가 곁에 묻어 있는 혈액과 지방을 제거하고 흡습지에 수분을 제거한 뒤 대장의 길이를 측정하고 -80°C에서 냉동 보관하였다.

### 혈청 분리 및 대장 길이 측정

실험동물은 희생 12시간 전에 절식시켰으며, ether로 가볍게 마취한 후 복부 대동맥으로부터 채혈하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분 정도 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 얻은 후 -80°C에서 냉동 보관하였다. 채혈 직후 대장을 분리하여 생리식염수에 담가 곁에 묻어 있는 혈액과 지방을 제거하고 흡습지에 수분을 제거한 뒤 대장의 길이를 측정하고 -80°C에서 냉동 보관하였다.

### 조직학적 관찰

실험동물의 대장을 적출하여 생리식염수를 사용하여 깨끗이 씻어 10% 중성 포르말린 용액(NBF, natural buffered formalin)에 넣어 고정시킨 뒤 조직학적 평가를 위해 파라핀 조직표본을 제작하여 각 조직표본을 4 µm 두께로 절편하였다. 조직학적 검사를 위해 hematoxylin & eosin으로 염색하고 광학 현미경을 이용하여 ×100의 배율에서 관찰하였다(19).

### 혈청에서의 pro-inflammatory cytokines의 농도 측정

염증유발 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-17A와 IL-12의 농도는 ELISA(ELISA MAX, Biologend, San Diego, CA, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다. 96 well microplate에 mouse에 대한 IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-17A와 IL-12의 capture 항체를 coating buffer에 희석하여 100 µL씩 분주한 후 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 다음날 plate를 세척용 완충액(phosphate-buffered saline+0.05% tween-20, pH 7.4) 300 µL를 가하여 4번

세척한 후 1× assay diluent A 200 µL를 분주한 후 실온에서 1시간 동안 shaking 하면서 방치하였다. 세척용 완충액 300 µL를 가하여 4번 세척한 후 plate의 각 well에 dilute standards와 시료 100 µL씩 가하여 실온에서 2시간 동안 shaking 하면서 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 detection 항체 100 µL를 분주한 후 실온에서 1시간 동안 shaking 하면서 방치하였다. 세척용 완충액으로 4번 세척한 후 avidin-horse-radish peroxidase액 100 µL를 가하여 다시 실온에서 30분 shaking 하면서 방치하고, 세척용 완충액으로 5번 세척한 후 TMB substrate solution이 포함된 기질 액 100 µL를 가하여 실온에서 15분 동안 방치한 후 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 µL를 가하여 반응을 정지시켰다. Optical density는 ELISA reader로 450 nm에서 측정하였다.

### 대장조직에서의 TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 분석

유전자 발현은 ExiCycler(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 측정하였다. Total RNA는 마우스의 대장조직에서 Trizol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였다. Total RNA는 RNase-free DNase(Roche, Indianapolis, IN, USA)로 15분간 37°C에서 반응시키고 RNase kit(Qiagen, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 다시 정제하였다. 제조사의 설명에 따라 cDNA는 total RNA 2 µL와 AMV reverse transcriptase(Amersham, Piscataway, NJ, USA), random hexanucleotide와 함께 37°C에서 1시간 동안 반응하여 합성하였다.

합성된 cDNA에 PCR을 수행하기 위해 cDNA 1 µL에 primer 1 µL 및 10× buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 µM dNTP, 1 U Tag polymerase를 혼합하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS와 COX-2의 유전자를 증폭시켰다. Internal control은 housekeeping 유전자인 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 이용하여 이들의 발현 정도를 비교하였고, 각 유전자의 primer sequence는 TNF- $\alpha$ 의 증폭을 위하여 5'-CGGAGTCCGTCCGGCAGGT-3'(forward), 5'-GCTGGGTAGAGAATGGATGAACA-3'(reverse), IL-6의 증폭을 위하여 5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT-3'(forward), 5'-AGGGAAGGCCGGTGGTTGT-3'(reverse)을 사용하고, iNOS의 증폭을 위하여 5'-GCAGCTGGGCTGTACAAA-3'(forward), 5'-AGCGTTTCGGGATCTGAAT-3'(reverse), COX-2 증폭을 위하여 5'-GAATCATTCACCAGGCAAATTG-3'(forward), 5'-TC-TGTACTGCGGGTGAACA-3'(reverse), GAPDH 증폭을 위하여 5'-TGACGCTGGACCAATCAG-3'(forward), 5'-ACCTCATTGGACTGCATAGC-3'(reverse)을 사용하였다. PCR은 automatic BIONEER thermocycler(Bio-

neer)로 모든 유전자는 initial denaturation 94°C에서 3분 동안 1 cycle 수행하였고, denaturation 94°C 45초, annealing 58°C 45초, extension 72°C 1분 동안 35회 반복하였으며, 마지막 extension은 72°C에서 10분간 수행하였다. 이후 증폭된 DNA 산물들을 2% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide(EtBr, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다(20).

### 통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후  $P < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 SPSS(v18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다.  $P$ 값이 5% 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 체중 변화 및 대장 길이에 대한 영향

7일간 2.5% DSS 섭취에 의한 대장염 유발군의 체중을 시간별로 관찰하였다(Table 1). DSS를 섭취하지 않은 정상군(normal)은 1.7 g의 체중이 증가하였으나, DSS를 섭취한 대조군(control)군과 유허오리, 일반오리, 닭 추출액의 시료 투여군에서는 처음과 비슷한 체중을 나타내어 체중이 증가하지 않았다.

유허오리의 염증에 대한 효과를 알아 보기 위해 항문에서 회맹부(ileocecal junction)까지의 대장을 적출하여 맹장부터 항문까지의 길이를 측정하였다(Table 1). DSS 섭취에 의해 케양성 대장염이 유도된 마우스에서 대조군의 대장의 길이는 6.5 cm로 정상군 8.8 cm에 비해 26.1%가 유의적으로 감소되어 염증성 대장염의 유도를 확인하였다. 유허오리 저농도군과 고농도군은 대조군과 비교하였을 때 대장의 길이의 증가율은 각각 18.5%, 12.3%이었고( $P < 0.05$ ), 일반오리 저농도군과 고농도군의 증가율은 각각 9.2%, 7.7%이었다. 유허오리와 일반오리 추출물 투여군은 체중의 변화는 나타나지 않았으나 대장 길이의 축소가 완화되었고, 특히 유허오리 추출물 저농도군의 대장 길이는 정상군에 가까운 길이를 나타내었다. 그러나 닭 저농도군과 고농도의 대장 길이는 평균 약 0.4 cm 정도의 대장 길이가 대조군보다 증가하였으나 대조군과의 통계적 유의성이 나타나지 않아 대장염 억제 효과가 없는 것으로 나타났다.

유허오리 추출액을 처리한 군은 일반오리와 닭 추출액의 처리군보다 대장 길이가 길었다. DSS를 경구 섭취시키면 대장염이 유발되어 초기 병변은 주로 좌측 대장에 발생하며 혈변, 체중의 감소, 대장의 축소 및 점막케양 등이 생기는데 호중구가 주로 침윤하며 시간이 지나면서 형질세포 및 림프

**Table 1.** Effect of extracts from sulfur fed duck, general duck and general chicken on the changes of body weight and colon length in DSS-induced colitis mice

Treatment	Dose (mL/kg)	Body weight (g)			Colon length (cm)
		Initial	7th day	14th day	
Normal		21.3±1.4	22.3±1.4 <sup>1)</sup>	23.0±1.1	8.8±0.2 <sup>a1)</sup>
Control		21.5±1.0	22.4±1.2	21.1±1.6	6.5±0.3 <sup>d</sup>
SD-H	3	21.3±0.5	22.6±0.8	21.0±0.9	7.3±0.5 <sup>bc</sup>
SD-L	1	21.5±0.5	21.9±0.8	21.3±1.2	7.7±0.7 <sup>b</sup>
GD-H	3	21.1±0.8	21.9±0.8	20.8±0.9	7.0±0.9 <sup>bcd</sup>
GD-L	1	22.1±1.2	22.6±1.3	21.0±0.9	7.1±0.6 <sup>bc</sup>
GC-H	3	20.9±0.7	22.2±1.0	21.8±1.1	6.9±0.2 <sup>cd</sup>
GC-L	1	21.4±0.9	22.6±1.1	21.7±0.9	6.9±0.7 <sup>cd</sup>

Normal: Group received PBS without 2.5% DSS.

Control: Group received PBS and induced colitis by 2.5% DSS.

SD-H: Group received 3 mL/kg of sulfur fed duck extract and induced colitis by 2.5% DSS.

SD-L: Group received 1 mL/kg of sulfur fed duck extract and induced colitis by 2.5% DSS.

GD-H: Group received 3 mL/kg of general duck extract and induced colitis by 2.5% DSS.

GD-L: Group received 1 mL/kg of general fed duck extract and induced colitis by 2.5% DSS.

GC-H: Group received 3 mL/kg of general chicken extract and induced colitis by 2.5% DSS.

GC-L: Group received 1 mL/kg of general chicken extract and induced colitis by 2.5% DSS.

<sup>1)</sup>Values are mean±SD, n=8.

<sup>a-d</sup>Means with the different letters in the column are significantly different ( $P<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

구 등이 침윤하게 되고 만성염증의 소견을 띠게 된다(21). 유향오리 저농도군, 고농도군과 일반오리 저농도군에서 대장염 초기증상인 체중의 변화는 나타나지 않았으나 대장 길이의 축소현상이 유의성 있게 감소되어 DSS 유도에 의한 대장의 염증을 억제하는 효과를 나타내었다. 그러나 일반오리 고농도군과 닭 저농도군과 고농도군에서는 대장염 억제 효과가 나타나지 않았다.

### 조직 변화에 대한 영향

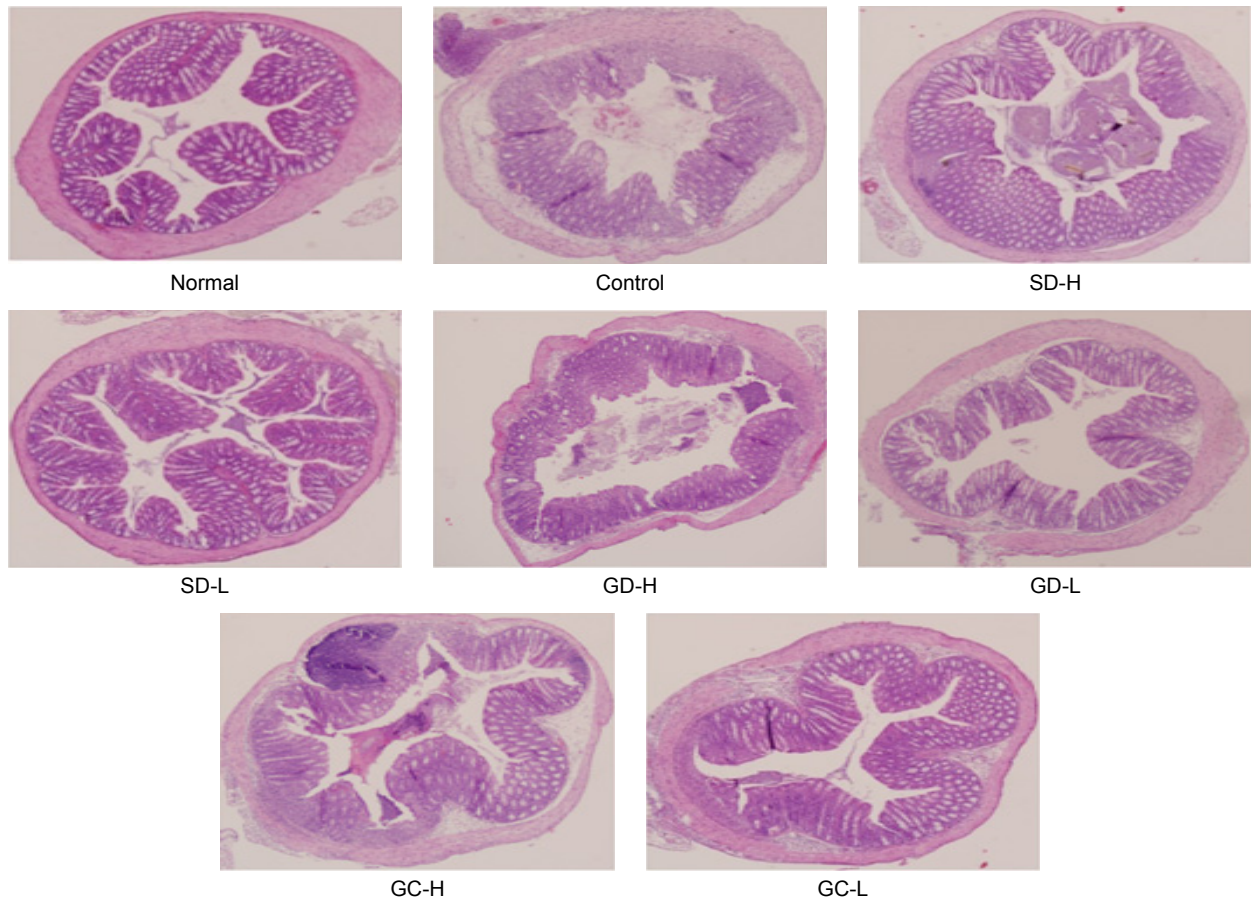
대장상피의 점막층은 상피세포층(epithelial cell layer)과 고유판(lamina propria)으로 구성되어 있고, 상피세포층에는 선와(crypt)가 있으며, 선와의 기저부에는 미분화세포(undifferentiated cell)가 위치하고 선와의 벽을 따라 많은 술잔세포(goblet cell)와 일부 흡수세포가 존재한다(19). 대장조직의 H&E 이중염색조건에서 정상군의 대장상피의 점막층은 정상적이었고 염증과 관련된 소견은 보이지 않았다(Fig. 1). DSS 유도군들에서는 점막 및 점막하층에 경미한 부종과 염증소견이 보였으므로 DSS의 7일간 투여로 인하여 염증반응이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 대조군에서는 상피 점막층 여러 곳에서 선와부와 술잔세포가 파괴되어 대장의 조직이 선명하지 않았다. 유향오리 고농도, 저농도군은 대조군에 비하여 대장의 조직의 구조가 훨씬 선명하게 보였고, 유향오리 저농도군은 정상군의 대장 조직과 비슷하였다. 일반오리와 닭의 추출물 처리군에서는 유향오리 추출액 처리군보다 선와부와 술잔세포가 더 많이 손실되었다. Song 등(19)에 의하면 조직소견의 악화 정도와 대장의 길이가 서로 비례하는 것으로 나타나 대장의 길이 변화와 대장염의 중증도와 상관관계가 있음을 알 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 조직의 관찰을 통해 대장의 길이 축소의 억제

효과가 증가함에 따라 대장 상피 점막층의 파괴도 줄어들었음을 관찰하였고, 일반오리와 닭의 추출물보다 유향오리 추출물이 더 높은 염증 억제효과와 장보호 효과를 나타내었다. 또한 유향오리 추출물의 저농도군이 고농도군보다 대장염 억제 효과가 더 높았다. 유향오리 추출물 저농도(1 mL/kg)는 시중에 판매되고 있는 유향오리의 엑기스 섭취량(300 mL/day)을 기준으로 설정하였다. 이에 추출물을 적당한 농도로 투여하는 것이 대장염 염증을 억제시키는 중요한 인자로 생각되며, 추후 실험의 범위를 더 좁혀서 유향오리 추출물의 농도(1 mL/kg)의 유효성에 대한 재 증명이 필요할 것으로 생각된다.

### 혈청에서 전염증 사이토카인에 대한 영향

최근의 연구들에 의하면 전염증 사이토카인(proinflammatory cytokine)이 대장염에서 염증반응의 초기에 수반되므로 유향오리 추출액의 대장염에 대한 효과를 알아보기 위하여 마우스의 혈액을 채취하여 염증매개인자인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-12의 생성정도를 관찰하였다(Table 2).

혈액 내 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-12의 농도가 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)은 현저히 증가하여 대조군에서 염증이 발생한 것을 확인하였다. 유향오리, 일반오리 추출액의 처리군에서는 저농도군이 고농도군보다 전염증성 사이토카인의 농도가 더 감소하였다( $P<0.05$ ). 닭 추출액 처리군에서는 전염증성 사이토카인의 농도가 대조군보다 더 증가하였다. Song 등(19)은 한의학에서 실제 임상에서 사용되고 있는 소염정장탕을 25 mg/kg 투여한 군보다 100 mg/kg으로 투여한 군에서 대장 조직의 소실이 더 크게 나타나 고용량으로 투여할 경우 DSS로 유발한 대장염



**Fig. 1.** Histological microphotograph of colonic tissue of DSS-induced colitis mice (H&E stain,  $\times 100$ ). Normal: Group received PBS without 2.5% DSS. Control: Group received PBS and induced colitis by 2.5% DSS. SD-H: Group received 3 mL/kg of sulfur fed duck extract and induced colitis by 2.5% DSS. SD-L: Group received 1 mL/kg of sulfur fed duck extract and induced colitis by 2.5% DSS. GD-H: Group received 3 mL/kg of general duck extract and induced colitis by 2.5% DSS. GD-L: Group received 1 mL/kg of general fed duck extract and induced colitis by 2.5% DSS. GC-H: Group received 3 mL/kg of general chicken extract and induced colitis by 2.5% DSS. GC-L: Group received 1 mL/kg of general chicken extract and induced colitis by 2.5% DSS.

**Table 2.** Effect of extracts from sulfur fed duck, general duck and general chicken on serum proinflammatory cytokines level of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-17A, IL-12 in DSS-induced colitis mice

Treatment <sup>1)</sup>	Dose (mL/kg)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-17A (pg/mL)	IL-12 (pg/mL)
Normal		1896.7 $\pm$ 176.8 <sup>d2)</sup>	4455.6 $\pm$ 13.7 <sup>c</sup>	328.4 $\pm$ 11.3 <sup>d</sup>	631.7 $\pm$ 91.4 <sup>e</sup>	2247.7 $\pm$ 104.4 <sup>d</sup>
Control		2146.7 $\pm$ 152.8 <sup>c</sup>	4629.3 $\pm$ 18.8 <sup>a</sup>	464.7 $\pm$ 37.1 <sup>b</sup>	1471.4 $\pm$ 212.8 <sup>bc</sup>	2533.8 $\pm$ 183.4 <sup>c</sup>
SD-H	3	2373.3 $\pm$ 153.7 <sup>abc</sup>	4507.4 $\pm$ 18.3 <sup>d</sup>	415.2 $\pm$ 21.8 <sup>bc</sup>	1213.7 $\pm$ 116.9 <sup>cd</sup>	2739.4 $\pm$ 112.8 <sup>bc</sup>
SD-L	1	1441.7 $\pm$ 128.5 <sup>e</sup>	4463.6 $\pm$ 11.9 <sup>e</sup>	326.4 $\pm$ 10.0 <sup>d</sup>	539.3 $\pm$ 137.1 <sup>e</sup>	1897.7 $\pm$ 104.2 <sup>e</sup>
GD-H	3	2631.7 $\pm$ 141.1 <sup>a</sup>	4600.5 $\pm$ 7.1 <sup>ab</sup>	444.3 $\pm$ 29.8 <sup>bc</sup>	1404.9 $\pm$ 160.7 <sup>bcd</sup>	2864.4 $\pm$ 132.4 <sup>ab</sup>
GD-L	1	2343.3 $\pm$ 95.0 <sup>bc</sup>	4531.5 $\pm$ 7.0 <sup>bc</sup>	392.9 $\pm$ 21.6 <sup>c</sup>	1149.3 $\pm$ 129.7 <sup>d</sup>	2736.6 $\pm$ 109.6 <sup>bc</sup>
GC-H	3	2466.7 $\pm$ 149.7 <sup>ab</sup>	4543.7 $\pm$ 37.1 <sup>c</sup>	465.5 $\pm$ 28.6 <sup>b</sup>	1976.2 $\pm$ 151.5 <sup>b</sup>	2858.8 $\pm$ 143.0 <sup>ab</sup>
GC-L	1	2601.7 $\pm$ 89.8 <sup>ab</sup>	4580.1 $\pm$ 18.6 <sup>b</sup>	597.3 $\pm$ 48.7 <sup>a</sup>	1546.6 $\pm$ 152.5 <sup>a</sup>	3039.4 $\pm$ 134.3 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>The abbreviations are same as shown in footnotes of Table 1.

<sup>2)</sup>Values are mean $\pm$ SD, n=8.

<sup>a-e</sup>Means with the different letters in the column are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

을 더 악화시킨다고 하였다. 이와 같이 본 연구에서도 유향오리와 일반오리의 저농도군에서 전염증성 사이토카인의 농도가 더 낮은 것으로 보아 오리 추출액의 섭취량과 염증억제 작용이 관련이 있는 것으로 생각된다. 향후 유향오리의

섭취량이 염증에 미치는 영향에 대한 면밀한 연구 검토가 필요하다고 하겠다.

유향오리 저농도군에서 전염증성 사이토카인의 농도가 가장 많이 감소하였고, 대조군보다 유의적으로 낮은 농도를

나타내었다. 그러나 나머지 시료 처리군에서의 전염증성 사이토카인의 농도는 대조군과 통계적인 유의성이 없었고, 오히려 닭 저농도군에서는 대조군보다도 평균 13.9% 높은 농도를 나타내어 본 연구의 실험군 중에서 전염증성 사이토카인의 농도가 가장 많이 증가하였다. 닭고기는 인체에 필요한 모든 필수아미노산이 풍부하고 양질의 단백질 공급원으로 많이 이용되고 있으며(22), 오리고기보다 아미노산의 함량도 높다(11). 닭고기는 소화력이 좋아 어린이나 노인의 영양식, 두뇌활동, 감기치료, 피부미용에 좋다고 한다(23). 그러나 본 연구 결과 닭 추출액은 오리 추출액보다 염증 억제 효과가 훨씬 낮았으며, 염증 억제효과도 없는 것으로 나타났다. 오리 추출액에서는 일반오리에게 유향을 먹인 유향오리 추출액의 염증 억제효과가 더 높았다.

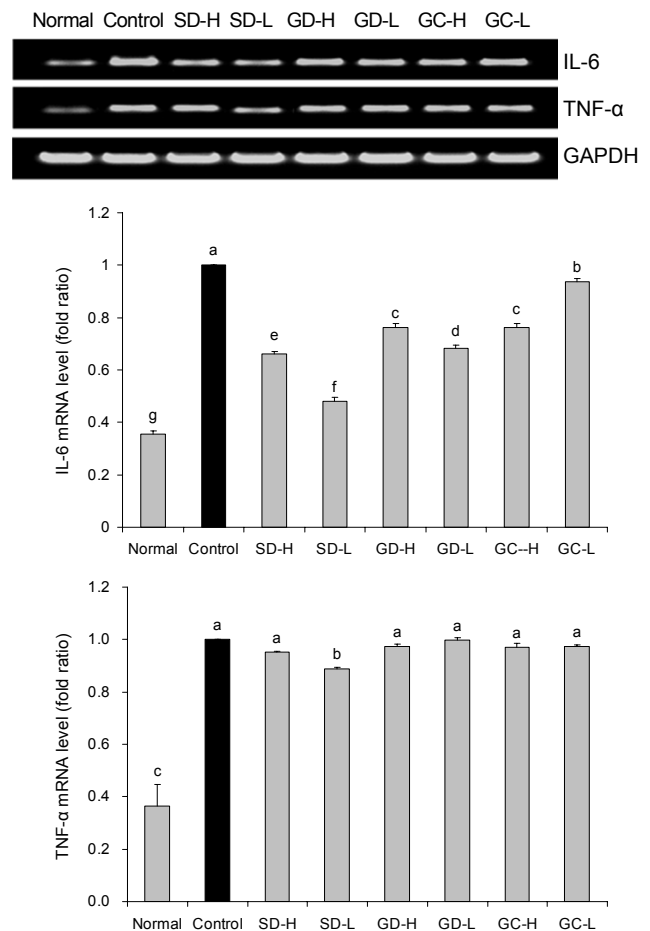
전염증 사이토카인에 대한 연구 결과들에 의하면, interleukin(IL)-6과 IL-1 $\beta$ 의 레벨이 궤양성 대장염 환자에서 현저히 증가되었고(24), IL-12와 IL-23을 억제하면 점막 면역세포에 의한 친염증 사이토카인 생성을 낮출 수 있다(25). TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 대표적인 전염증성 사이토카인으로서 다량 분비될 경우 prostaglandins, leukotrienes, NO, platelet activating factor 등의 매개물질들의 합성을 증가시키고 조직의 손상을 유도하여 각종 염증질환을 일으킨다(26). IL-17A와 IL-17F는 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, G-CSF, GM-CSF를 암호화하는 유전자를 발현하여 염증반응 발달과 외부 감염에 대한 숙주방어에 관여한다(27). 본 연구 결과에서 일반오리 추출물보다 유향오리 추출물에서 전염증성 사이토카인의 농도가 더 많이 낮아졌다. 유향오리 저농도군은 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-12의 생성을 유의적으로 감소시켰고, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A의 농도는 정상군과 비슷한 수준을 보였으며, IL-1 $\beta$ , IL-12의 농도는 정상군보다 더 낮은 수준을 나타내었다. 유향오리 고농도군은 TNF- $\alpha$ 와 IL-17A의 농도만 대조군보다 유의적으로 감소하였고, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12의 농도는 대조군보다 증가하였다.

대장의 길이와 조직학적 관찰에서 유향오리 저농도군의 대장염의 증상 개선이 우수하게 나타난 바와 같이 유향오리 추출물의 대장염의 억제 효과가 가장 우수하게 나타났다. 특히, 유향오리 저농도군의 전염증성 사이토카인의 농도가 유의적으로 가장 많이 감소하여 유향오리 추출물의 사용 농도가 중요한 인자로 생각된다.

#### 마우스 장 조직에서 염증 관련 유전자(IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS 및 COX-2)의 발현에 대한 영향

유향오리 추출액이 염증 사이토카인들의 유전자 발현에도 영향을 주는지 확인하기 위해 본 연구에서는 RT-PCR을 이용하여 DSS로 궤양성 대장염을 유도한 마우스의 대장조직에서 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현을 측정하였다(Fig. 2). 대조군은 정상군에 비해 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현이 크게 증가하였다. 모든 실험군의 IL-6 유전자 발현은 대

조군보다 유의적으로 감소하였고, 유향오리, 일반오리, 닭 추출액 처리군의 순서로 mRNA 발현이 증가되었으며, 유향오리 저농도군의 mRNA 발현양이 가장 낮았다( $P < 0.05$ ). 그러나 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현양은 유향오리 저농도군에서만 대조군과 유의적인 차이를 나타내며 감소하였고, 나머지 다른 실험군에서는 대조군과 유의적 차이가 없었다. 혈청에서 전염증성 사이토카인의 농도 측정 결과와 같이 유향오리 저농도군은 장 조직에서 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 유전자 발현을 억제시켰다. 궤양성 대장염에서는 호중구와 대식세포가 혈액에서 염증 부위의 점막층, 점막하층 및 점막내강으로 이동하며



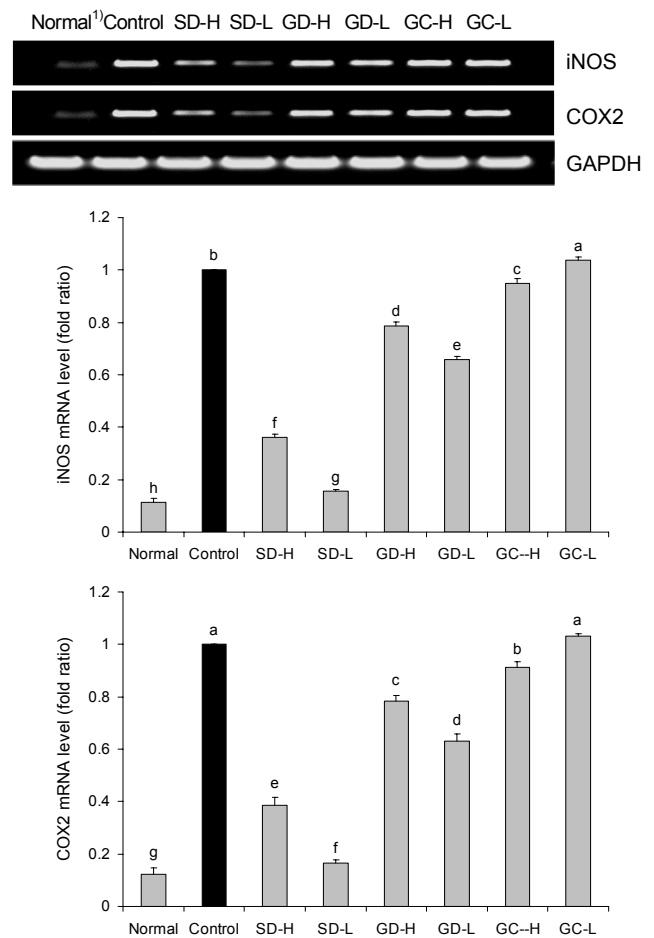
**Fig. 2.** Effects of extracts from sulfur fed duck, general duck and general chicken on mRNA expressions of IL-6 and TNF- $\alpha$  in colon tissues of DSS-induced colitis mice. Normal: Group received PBS without 2.5% DSS. Control: Group received PBS and induced colitis by 2.5% DSS. SD-H: Group received 3 mL/kg of sulfur fed duck extract and induced colitis by 2.5% DSS. SD-L: Group received 1 mL/kg of sulfur fed duck extract and induced colitis by 2.5% DSS. GD-H: Group received 3 mL/kg of general duck extract and induced colitis by 2.5% DSS. GD-L: Group received 1 mL/kg of general fed duck extract and induced colitis by 2.5% DSS. GC-H: Group received 3 mL/kg of general chicken extract and induced colitis by 2.5% DSS. GC-L: Group received 1 mL/kg of general chicken extract and induced colitis by 2.5% DSS. Values are mean $\pm$ SD. <sup>a-g</sup>Means with the different letters on the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

이동의 정도와 질병의 활성도는 비례한다. 점막 고유층에 침윤된 세포의 10~50%는 대식세포이고, 이 세포가 활성화되면 IL-6와 TNF- $\alpha$  등을 분비한다(28). 그러므로 장 조직의 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현의 감소는 유황오리 추출물을 저농도로 투여했을 때 염증사이토카인의 유전자 발현 단계를 조절하여 이들 사이토카인의 생성을 억제할 수 있음을 의미하며, 대장염의 증상완화에 효과적일 수 있음을 시사한다.

유황오리가 NO의 합성효소인 iNOS와 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)의 합성효소인 COX-2의 mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR을 이용하여 DSS로 케양성 대장염을 유도한 마우스의 대장조직에서 측정하였다(Fig. 3). DSS처리 대조군은 정상군에 비해 COX-2 및 iNOS의 유전자 발현이 크게 증가하였다. iNOS의 mRNA 발현양은 닭 저농도군을 제외한 모든 시료 처리군에서 대조군과 유의한 차이를 나타내며 감소하였다. 유황오리 추출물 처리군이 일반오리 추출물 처리군보다 iNOS의 mRNA 발현양이 적었으며, 유황오리 저농도군의 mRNA 발현양이 대조군에 비해 83%로 가장 많이 감소하였다( $P < 0.05$ ). COX-2의 유전자 발현은 유황오리 저농도, 고농도군과 일반오리 저농도군에서 감소되었다( $P < 0.05$ ).

대식세포에서 사이토카인, TNF- $\alpha$ , lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극은 염증 반응의 전사인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화시키며 그 결과 iNOS 및 COX-2를 발현시켜 NO(nitric oxide)와 PGE<sub>2</sub>를 생성하여 염증을 일으킨다(28,29). 또한 COX-2는 염증성 자극에 의해 단시간에 유도되어 발현되며, 염증상황 아래에서 증폭되어 대식세포, 단핵세포 등에 존재하는 효소로 염증, 통증, 발열 등과 관련이 깊은 것으로 알려져 있다(30). 유황오리와 일반오리 추출액의 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현양의 결과로 보아 유황오리 추출물이 일반오리 추출물보다 대장염 염증완화 효과가 더 있으며 유황오리 추출액 1 mL/kg을 투여한 저농도군에서 대장의 염증을 억제하는 효과가 가장 우수하게 나타났다.

동충하초 균사체를 이용한 법제 유황의 항염증 효과 실험에서도 법제 유황을 첨가하지 않은 동충하초 균사체보다 법제 유황 강화 동충하초 균사체에서 NO의 생성과 iNOS의 유전자발현을 더 억제시켰다(31). 그리고 유황오리와 일반오리 추출물의 암세포 생육억제효과 비교 실험에서도 유황오리에서 암세포 억제효과가 더 높게 나타났다(13). 또한 유황을 토양에 처리하여 재배한 열무가 일반 재배한 열무보다 유황의 함량이 150% 더 많았으며, 인체 대장암 세포인 HT-29, 인체 위암세포인 AGS의 성장을 억제하는 효과가 일반 재배한 열무보다 더 높았다(32,33). Lee 등(34)의 식이유황을 급여한 돈육 등심의 품질특성 연구에서 사료에 첨가한 유황의 양이 증가할수록 체내 유황의 축적량이 증가한다고 하였고, 돈육 체내에 황성분이 대조군보다 13.8% 증가하였다. 이러한 연구 결과들처럼 본 연구에서 사용한 시료에 함유된 유황의 양을 inductively coupled plasma



**Fig. 3.** Effects of extracts from sulfur fed duck, general duck and general chicken on mRNA expressions of iNOS and COX-2 in colon tissues of DSS-induced colitis mice. <sup>1)</sup>The abbreviations are same as shown in footnotes of Fig. 2. Values are mean $\pm$ SD. <sup>2-5)</sup>Means with the different letters on the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

optical emission spectrometry(ICP-OES, Optime 8300, Perkin Elmer, San Jose, CA, USA)로 분석한 결과 일반오리 추출물은 213.6 mg/L, 유황오리 추출물은 289.4 mg/L, 닭 추출물은 92.6 mg/L였고, 유황오리 추출물의 유황 함량은 일반 오리 추출물보다 26.2%가 더 많았다. 이는 일반오리에 먹인 유황 때문에 유황오리의 황 함량이 증가하였고 이로 인해 유황오리 추출물에서 대장의 염증을 억제하는 효과가 높아진 것으로 생각된다. 유황오리를 이용하여 질환을 예방 및 개선하기 위해서는 유황오리 추출물의 성분 분석과 농도변화에 따른 유황오리 추출물의 효과에 대한 다각적이고 지속적인 연구를 통해 본 연구의 결과를 뒷받침 해 줄 수 있는 결과를 도출해야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 유황오리의 우수성을 확인하기 위하여 유황오리, 일반오리, 닭을 열수추출 하여 유황오리의 대장염 염

중에 대한 억제 효과를 알아보려고 하였다. Balb/c 수컷 마우스에 2.5% DSS로 케양성 대장염을 유도하였고 이에 대한 대장염의 염증 억제효과를 검토하였다. 모든 실험군 중에서 정상군의 대장 길이가 가장 길었고, 대조군의 대장 길이가 가장 짧았다. 유향오리 고농도군, 저농도군의 대장의 길이는 일반오리 고농도군 저농도군의 대장 길이보다 길었으며, 닭 고농도군, 저농도군의 대장의 길이는 일반오리 추출물보다 짧았다. 유향오리 저농도군에서 대장 길이가 시료처리군 중에서 가장 길었고, 대장염 증상의 개선 효과를 나타내었다. 대장의 조직학적 관찰에서 대장의 길이의 축소 정도가 증가함에 따라 대장조직의 점막층의 선와부의 손실이 증가되었다. 대장염 염증 초기에 증가하는 염증성 biomarker인 혈청 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-12의 생성은 유향오리 저농도군에서만 대조군보다 유의적으로 감소하였고, 정상군과 비슷한 수준을 보였다( $P < 0.05$ ). 대장염을 일으킨 대장 조직에서의 염증성인자인 IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2, iNOS의 mRNA 발현에서도 유향오리 추출액이 일반오리 추출액보다 더 많이 감소하였고, 유향오리 저농도군에서 가장 많이 감소되었다. 이상의 결과로 DSS로 대장염이 유도된 마우스에서 유향오리 추출액이 일반오리와 닭 추출액보다 더 높은 항염증 효과를 나타내었고 처리 농도에 따른 차이가 있었으며, 유향오리 추출액을 1 mL/kg으로 투여하였을 때 대장의 염증을 억제하는 효과가 가장 우수하였다.

### 감사의 글

본 연구는 한국보건산업 진흥원과 인하대병원 국가지정 소화기질환 의료제품 유효성평가 서비스센터의 사업비지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Kim IR, Kim HC, Kug YB, Park SJ, Park YG, Park JH, Seo BI, Seo YB, Song HJ, Sin MG, Lee YJ, Lee YC, Lee JH, Im KH, Jo SM, Jeong JG, Ju YS, Choi HY. 1991. *Herbalogy sixth edition*. Young Limsa Publishing Co., Seoul, Korea. p 639-640.
- Guadagnini G. 1953. Sulfur therapy in chronic articular disease. *Reumatismo* 5: 223-235.
- Libenson L, Hadley FP, Mcllroy AP, Wetzel VM, Mellon RR. 1953. Antibacterial effect of elemental sulfur. *J Infect Dis* 93: 28-35.
- Grimble RF, Grimble GK. 1998. Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. *Nutrition* 14: 605-610.
- Gupta AK, Nicol K. 2004. The use of sulfur in dermatology. *J Drugs Dermatol* 3: 427-431.
- Heo J. 1994. *Dong ui bo gam*. Yeogang Publishing Co., Seoul, Korea. p 110-113.
- Kim SH, Seo YB. 1996. Effect of processed sulphur on experimental bone disease. *Korean J Oriental Medical Physiology* 10: 79-87.
- Jeon DM. 2006. Secret of mysterious duck I. *Monthly Duck's Village* 36: 68-71.
- Jeon DM. 2006. Secret of mysterious duck IV. *Monthly Duck's Village* 39: 92-95.
- Jeon DM. 2006. Secret of mysterious duck II. *Monthly Duck's Village* 37: 61-64.
- Jeong KH, Yu IJ, Park WM, Ha KH, Lee BH. 2000. A study of nutritional components of sulfur fed duck and general duck. Proceedings of the Korean Society for Food Science of Animal Resources Conference. Seoul, Korea. p 119.
- Yoon WH, Hwang JY, Kim CH. 2004. Isolation and purification of antitumor substance from the sulfur fed duck. *Korean J Food Sci Ani Resour* 24: 293-297.
- Choi GH, Kim CH. 2002. Growth inhibition of extract from sulfur fed duck carcass against various cancer cell lines. *Korean J Food Sci Ani Resour* 22: 348-351.
- Bouchard R, Conrad HR. 1973. Sulphur requirement of lactating dairy cows. II. utilization of sulphates, molasses and lignin-sulfonate. *J Dairy Sci* 56: 1429-1434.
- Jang BI. 2008. Animal models of inflammatory bowel disease. *Intest Res* 6: 8-18.
- Vieira EL, Leonel AJ, Sad AP, Beltrão NR, Costa TF, Ferreira TM, Gomes-Santos AC, Faria AM, Peluzio MC, Cara DC, Alvarez-Leite JI. 2012. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. *J Nutr Biochem* 23: 430-436.
- Geier MS, Butler RN, Giffard PM, Howarth GS. 2007. *Lactobacillus fermentum* BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *Int J Food Microbiol* 114: 267-274.
- Kim DB, Sin DG. 2004. *Functional testing guide of functional health food*. Korea Health Supplement Association, Seoul, Korea. p 569-570.
- Song YG, Ryu BH, Yoon SW. 2008. The effects of *Soyumjungjang-tang* on DSS-induced ulcerative colitis in mouse. *Korean J Orient Int Med* 29: 385-400.
- Zhao X. 2011. Anticancer and antiinflammatory effects of bamboo salt and *Rubus coreanus* Miquel bamboo salt. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Busan, Korea.
- Jung HC. 2001. Animal model for inflammatory bowel disease. *Korean J Gastroenterol* 37: 69-75.
- Chae HS, Cho SH, Park BY, Yoo YM, Kim JH, Ahn JN, Lee JM, Kim YM, Choi YI. 2002. Changes of the fatty acid, amino acids and collagen contents in domestic broiler chickens of different marketing standard. *Korean J Food Sci Ani Resour* 22: 1-7.
- Korea chicken council. 2012. Do you know why homemade chicken is good? *Chicken* 19: 60-64.
- Huh K, Kim YH, Jin DQ. 2001. Protective effect of an aged garlic-bamboo salt mixture on the rat with the alcohol-salicylate induced gastropathy. *Yakhak Hoeji* 45: 258-268.
- Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W. 2004. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 351: 2069-2079.
- Hanada T, Yoshimura A. 2002. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 3: 413-421.
- Kolls JK, Linden A. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21: 467-746.
- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in



- inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2046-2050.
29. Cosme R, Lublin D, Takafuji V, Lynch K, Roche JK. 2000. Prostanoids in human colonic mucosa: effects of inflammation on PGE<sub>2</sub> receptor expression. *Hum Immunol* 61: 684-696.
30. Kim KB, Lee EG, Choi OH, Song CH, Jeong JM. 2007. Inhibitory effects of phyto-extract mixture (PEM381) on type I allergic reaction. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 155-162.
31. Cho HE, Kim HJ, Choi YH, Lee KN, Jeong MS. 2009. Study on the anti-oxidative activity and anti-inflammatory effects of processed sulfur with *Cordyceps militaris* Mycelium. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 23: 360-367.
32. Bark SS, Kong CS, Rhee SH, Rho CW, Kim NK, Choi KL, Park KY. 2006. Effect of sulfur enriched young *radish kimchi* on the induction of apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *J Food Sci Nutr* 11: 184-190.
33. Kong CS, Bark SS, Rhee SH, Rho CW, Kim NK, Choi KL, Park KY. 2006. Fermentation properties of young radish kimchi prepared using young radish cultivated in the soil containing sulfur and its inhibitory effect on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 158-163.
34. Lee JI, Min HK, Lee JW, Jeong JD, Ha YJ, Kwack SC, Park JS. 2009. Changes in the quality of loin from pigs supplemented with dietary methyl sulfonyl methane during cold storage. *Korean J Food Sci Ani Resour* 29: 229-237.