

Sarcoma-180 암세포 이식 마우스에서 암예방조제식이 및 식이제한의 효과

부산대학교 식품영양학과

김 수 옥 · 이 숙 희 · 박 건 영

Effect of a Formulated Cancer Preventive Diet and Its Dietary Restriction in Sarcoma-180 Cell Transplanted Mice

Su-Ok Kim, Sook-Hee Rhee and Kun-Young Park

Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University,
Busan 609-735, Korea

The effects of a formulated cancer preventive diet and its dietary restriction on tumor formation, natural killer (NK) cell activity, hepatic lipid peroxide content and glutathione S-transferase activity were investigated in sarcoma-180 cell transplanted Balb/c mice. The formulated diet was prepared with cooked cereals, cooked legume, freeze-dried vegetables and seaweed, oil seeds, and fruit, and freeze-dried *doenjang* and *kimchi*. Total calorie of the formulated diet for the mice was designed to take 341 kcal/100 g and the ratio of protein, fat and carbohydrate was 21%, 11% and 68%, respectively. Five-week old male Balb/c mice were divided into 5 different groups: normal group, sarcoma-180 cell transplanted control group that fed with commercial chow diet *ad libitum* during experimental period, pre-treatment group fed with the formulated diet *ad libitum* for 8 weeks, co-treatment group that received the formulated diet *ad libitum* for 4 weeks followed by transplantation of sarcoma-180 cells, and dietary restriction group that was given 30% restriction of the formulated diet compared to the pre-treatment group for 8 weeks. At 4 weeks, all groups except normal group were transplanted with sarcoma-180 cells on the left groin of the mouse. The solid tumor growth in each group was inhibited by the treatment of the formulated diet. Especially, dietary restriction (30%) group resulted in the smallest tumor growth. The feeding of the formulated diet enhanced the NK cell activity of splenocyte, which was very low in normal and control group. Lipid

peroxide content in the liver that increased by the injection of sarcoma-180 cells to the mice decreased significantly in the dietary restriction group. The effect of the diet restriction on hepatic glutathione S-transferase activity was higher than that of the other groups. These results suggest that the formulated diet has anticancer effect *in vivo* and the diet restriction even increases this activity.

Key Words: Sarcoma-180 cells, Formulated cancer preventive diet, Diet restriction

서 론

우리가 섭취하는 식품에는 항돌연변이/항암 활성을 나타내는 것들이 많으며, 곡류와 두류 중에서는 현미,¹⁾ 수수,²⁾ 율무³⁾와 콩⁴⁾ 등이 항돌연변이 활성 및 항암활성이 높다고 보고되고 있다. 또한 콩을 발효시켜 만든 된장 추출물 또한 항돌연변이⁵⁾ 및 *in vivo* 항암효과⁶⁾가 높다고 보고되고 있다. 이처럼 각각 개별 식품에 대한 항돌연변이 및 항암 기능성에 대한 연구는 계속되어진 반면 우리 식생활에서처럼 이들을 혼합조제하여 섭취하였을 경우에 대한 연구는 미진하다. 고등⁷⁾은 간암으로 진단된 환자들에게 잡곡밥, 해조류, 두류, 채소류를 주부식으로 하면서 보충식으로 식용건조 효모, 밀배아, 영지버섯, 야채녹즙 등을 섭취하도록 하였을 경우 간암이 호전되거나 체중감소, 식욕부진, 피로감 등이 현저히 개선되었음을 보고하였다.

또한 식품을 섭취함에 있어서도 영양불량 상태가 되지 않을 범위에서 총 에너지를 제한하는 방법인 식이제한을 하였을 때 노화가 억제되고 항암활성이 증진된다는 여러 실험연구들이 보고된 바 있다.⁸⁻¹¹⁾ 장기간의 식이제한과 지속적인 운동을 함께 계속할 경우 심장의 free radical에 의한 지질과산화에 의한 손상을 조절할 수 있고 체내의 항산화 방어계를 향상시킬 수 있다.⁸⁾ 또한 장기간의 부분적 식이제한은 항산화 효소인 SOD, catalase 및 GSH-Px 활성도를 증가시켰으며,⁹⁾ 완전 식이제한은 SOD 활성을 증가시켰다고 한다.¹⁰⁾ 그리고 여러가지 조직에 화학적으로 유도시킨 종양에 대한 식이제한의 효과도 보고되고 있다.¹¹⁾

우리의 식생활은 곡류를 위주로 한 주식과 채소류, 해조류, 김치, 된장 등의 발효식품, 어패류, 양념류를 바탕으로 한 부식류로 구성되어 있는데 밥을 주식으로 해 왔기 때문에 부식으로는 김치, 장류, 젓갈, 장아찌 등 소금을 이용한 저장, 발효 식품을 많이 이용해 왔다. 김치와 된장은 한국의 대표적인 전통식품으로 그 암예방 효과는 본 실험실을 통해 보고한 바 있다.^{12,13)}

따라서 본 연구에서는 우리 나라의 전통 식이를 고려하여 간편하게 먹을 수 있는 선식 형태로 전통의 맛을 가지면서 암예방 효과를 갖는 혼합 식이를 조제하였다. 즉 현미를 비롯한 곡류를 중심으로 두류와 종실류, 채소류 및 해조류를 이용하면서 김치와 된장을 첨가한 식이를 조제하고 이 식이의 효과를 sarcoma-180 암세포를 이식한 마우스에 섭취시켜 항암효과를 측정하고자 하였다. 또한 이들 식이로 부분적 식이제한에 의한 효과도 살펴보았다.

재료 및 방법

1) 시료

곡류 재료인 현미(*Oryza stiva* L., Brown rice), 현미율무(*Coix lacryma-jobi* L. var. Mayuen, Job's tears), 검정콩(*Phaseolus vulgaris* L., Black soybean)은 경북 고산지대에서 무공해 유기농법으로 재배된 것을 구입하여 사용하였고, 검정깨(*Sesamum indicum* L., Black sesame), 수수(*Sorghum bicolor* L. Moench, Sorghum)는 충북 보은 회인골에서 무공해로 재배된 것을 각각 자연건강연구원(부산시 동대신동 소재)을 통해 구입하여 사용하였다. 쇠

비름, 케일, 들미나리, 고등어, 잔멸치는 부전시장(부산시 부전동)에서 구입하였으며, 미역, 당근, 양배추, 사과는 건조된 것으로 엄마사랑(주) 제품을 이용하였다. 된장은 전통적 방법으로 담근 문옥례할머니 전통된장(순창, 전북)을 이용하였고, 김치는 부산대 김치연구소에서 유기배추를 이용하여 담은 유기배추김치¹⁴⁾를 이용하였다.

2) 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 4주령 음성 Balb/c mouse (한국화학연구소, 대전)로, 체중이 20 g 전후의 것을 사용하였으며, 1주일간 적응시키는 동안 물과 사료는 자유로이 섭취하도록 하였다. 동물실험실은 온도 22±1°C, 습도 55±5%를 유지하였고, 12시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하

3) 암예방식이의 조제 및 실험군

보통의 마우스 표준 사료는 340~350 kcal/100 g의 열량을 함유한다. 따라서 본 실험의 식이를 조제하기 위해 Knapka¹⁵⁾의 마우스 사료처방을 조절하여 탄수화물, 단백질, 지방의 개별 영양소의 열량비는 각각 68%, 21%, 11%로, 총열량은 426.8 kcal/125 g (341 kcal/100 g)가 되도록 식단을 작성하였다. 식품은 현미, 수수, 울무의 곡류와 들미나리, 미역, 당근, 케일, 쇠비름의 채소류, 들깨, 검은깨의 종실류, 검은콩의 두류를 기본으로 구성하였고, 항암효과가 알려진 전통된장과 유기배추김치¹⁶⁾를 첨가하여 제조하였다(Table 1). 조제식이의 암예방 효과와 식이제한에 의한 효과를 알아보기 위해 sarcoma-180 종양세포를 주사하기 4주전부터

Table 1. Summary of nutritional composition and food exchange list for the formulated cancer preventive diet

Exchange group (Number of exchange)	Food (Exchange No. of food)	Weight (g)	Calorie (kcal)	Protein (g)	Fat (g)	Carbohyd -rate (g)	Fiber (g)	
Cereals (2.8)	Brown rice (2.2)	54.35	200	3.91	1.36	41.74	0.71	
	Job's tears (0.3)	9.38	35	1.98	0.35	5.60	0.19	
	Sorghum (0.3)	13.40	45	1.28	0.34	9.87	0.05	
Meat substitute	Low-fat (0.9)	Anchovy larvae (0.4)	8.36	20	3.55	0.50	0.08	0
	Mackerel (0.5)	6.68	25	4.78	0.49	0.07	0	
	Middle-fat (0.6)	Doenjang (0.4)	10.14	30	3.68	0.76	1.73	0.35
		Black soybean (0.2)	3.63	15	1.50	0.64	0.68	0.16
Vegetables (2.4)	Small water dropwort (0.4)	1.83	6	0.37	0.22	0.56	0.34	
	o-kimchi ¹⁾ (0.3)	2.32	6	0.31	0.11	1.40	0	
	Sea mustard (0.4)	3.51	8	0.37	0.06	1.34	0.50	
	Carrot (0.4)	2.89	10	0.30	0	2.05	0.24	
	Kale (0.3)	1.37	4	0.60	0.10	0.29	0.14	
	Cabbage (0.3)	1.82	6	0.36	0.05	1.13	0.17	
	Purslane (0.3)	3.40	10	0.69	0.09	1.76	0.36	
Fats (0.04)	Perilla seeds (0.02)	0.17	0.9	0.03	0.07	0.03	0.03	
	Black sesame (0.02)	0.16	0.9	0.03	0.08	0.02	0.02	
Fruits (0.1)	Apple (0.1)	1.82	5	0.02	0.03	1.23	0.07	
Total		125.23	426.8	23.76	5.24	69.58	3.33	

¹⁾Organically cultivated Korean cabbage Kimchi였다.

조제식이를 한 시료전처리군(Pre-treatment; Pre,

-4 w)과 주사 후부터 조제식을 한 동시처리군 (Co-treatment; Co, 0 w) 그리고 주사하기 4주 전부터 조제식이의 총 에너지를 제한(30%)하여 제한 식이를 섭취시킨 식이제한군(Pre-treatment and Dietary restriction; DR, -4 w)으로 나누어 식이를 공급하였다. 예비실험에서 마우스는 하루 평균 4 g/mouse의 식이를 섭취하였으므로 식이제한군은 2.8 g/day/mouse의 조제식을 공급하였다. 대조군으로 마우스에 표준사료(346 kcal/100 g, 퓨리나, 삼양유지(주))만을 급여한 정상대조군과 sarcoma-180 종양세포를 이식하고 표준사료를 섭취시킨 종양세포 이식 대조군을 두어 실험을 하였다(Fig. 1). 식이제한군을 제외한 다른 군은 모두 자유급식을 하였다.

4) 마우스를 이용한 항암효과 실험

(1) 종양세포: Balb/c mouse의 복강 내에 1주일 간격으로 계대배양하여 보존하고 있는 sarcoma-180 세포를 실험용 종양세포로 사용하였다. 즉 실험동물의 복강 내에서 1주일간 배양된 sarcoma-180세포를 복수와 함께 취하고 phosphate buffered saline (PBS)과 함께 원심분리(1,200 rpm, 10 min.)하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심분리하여 상등액을 제거한 후 1.0×10^6 cells/ml가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 ml씩을 복강주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다.

(2) 고형암 성장 저지 실험: 실험동물을 각 군당

대 보관 중인 종양세포부유액 0.2 ml (6×10^6 cells/mouse)씩을 실험동물의 왼쪽 서혜부(left groin)에 피하 이식하였다. 종양세포 이식 26일째 되는 날 치사시켜 생성된 고형암을 적출하고 그 무게를 측정된 후 다음 식에 따라 종양 성장 저지 백분율 (tumor growth inhibition ratio, I.R.: %)을 계산하였다.^{17,18)}

$$I.R. (\%) = \frac{Cw - Tw}{Cw} \times 100$$

Cw: 대조군의 평균 종양무게

Tw: 처리군의 평균 종양무게

(3) 마우스 비장에서서의 natural killer (NK) 세포

활성 실험: Balb/c 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml)를 함유한 5 ml의 RPMI 1640 배지로 3회 세척한 후, 곁게 마쇄하였다. 이 세포부유액을 70 µm nylon mesh로 여과시켜서 원심분리하여 림프구를 모은 다음 histopaque-1077을 이용하여 원심분리(500×g, 30 min, 18°C)하여 림프구를 분리하였다. 분리된 세포를 10% FCS를 함유한 RPMI 1640 배지에 재현탁하고 37°C, CO₂ incubator에서 1~2시간 배양시켜서 세포가 배양 플라스크(6 cm petri dish)에 부착되도록 한 후, 비부착성 세포를 원심분리를 통해서 수집하여 배양배지에 재현탁시킨 다음 적정 세포수를 계수하여 사용하였다.¹⁹⁻²¹⁾

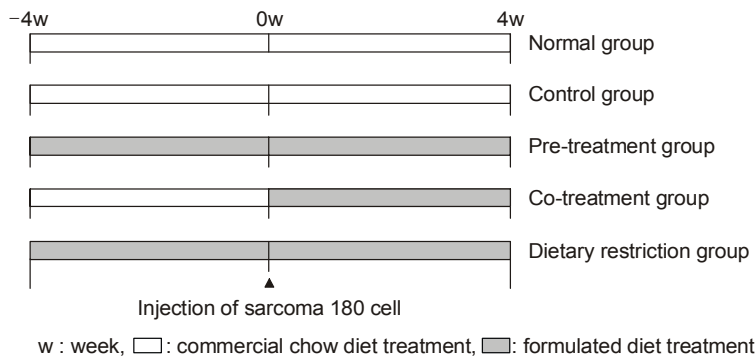


Fig. 1. Experimental design for treatment groups of the 5 week-old male Balb/c mice. 6마리씩으로 하여 실험실에서 1주일 간격으로 계 NK cell 활성의 측정은 Yac-1 mouse lymphoma

cell을 target cell로, MTT assay 방법^{22,23)}을 이용하였다. 96 well에 Yac-1 세포(5×10^4 cells/ml)와 NK 세포(1×10^7 cells/ml) 현탁액을 각각 50 μ 씩을 첨가하여 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 3일 후에 MTT (5 mg/ml)용액을 10 μ 씩 가하고 37°C에서 4시간 배양한 다음 10% SDS-0.02M HCl액 25 μ 씩을 첨가하여 실온에서 30분간 발색시킨 후에 540 nm에서 OD를 측정하였다. Cell cytotoxicity percentage는 아래 공식에 의해서 계산하였다.

$$\text{Cell cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{OD of non-lysed target cells} - \text{OD of effector cell}}{\text{OD of target cell alone}} \times 100$$

(4) 간내의 lipid peroxide량과 GST 활성 측정:

마우스를 경추탈골법을 이용하여 치사시킨 후 4°C 이하의 생리 식염수로 간을 관류하여 간 내에 남아있는 혈액을 제거한 후 간장을 적출하였다. 간조직 1 g 당 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 homogenate 분획으로 하였으며, 이것을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 다시 105,000 \times g에서 1시간 동안 초원심분리하여 얻은 상등액을 cytosol분획으로 하였다. 이렇게 얻은 homogenate 분획은 lipid peroxide 함량 측정에, cytosol 분획은 glutathione S-transferase 활성 측정에 이용하였다.

① Lipid peroxide의 측정; Ohkawa등²⁴⁾의 방법에 준하여 10% 간 균질액 0.4 ml에 8.1% SDS 0.2 ml, 20% acetate buffer (pH 3.5) 1.5 ml와 0.8% thiobarbituric acid 1.5 ml를 가한 후 95°C에서 1시간 반응시켰다. 실온에서 n-butanol : pyridine (15 : 1) 5.0 ml와 H₂O 1 ml를 첨가하여 잘 섞어 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 홍색의 n-butanol:pyridine층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정하고 표준곡선에 준하여 그 함량을 조직 1 g당 malondialdehyde nmole로 표시하였다.

② Glutathione S-transferase의 활성 측정; Habig 등²⁵⁾의 방법에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 중에 0.04 M reduced glutathione 75 μ 와 효소액을 0.1 ml 넣고 blank에만 20% trichloroacetic acid 0.5 ml를 가해 25°C에서 5분간 반응

시켰다. Blank와 시료 각각에 0.12 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 25 μ 를 가하여 25°C에서 2분간 반응시키고 시료에 20% trichloroacetic acid를 첨가한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성의 단위는 1분 동안 protein 1 mg이 생성한 2,4-dinitrobenzene-glutathione의 nmole수로 표시하였다. 단백질의 함량은 Lowry 등²⁶⁾의 방법에 준하여 bovine serum albumin (Sigma, USA)을 표준품으로 하여 측정하였다.

5) 통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험자료들은 ANOVA를 구한 후, SAS system에서 Duncan's multiple range test (p<0.05)를 이용하여 통계분석을 하였다.

결 과

1) 각 군의 마우스의 체중변화

실험실에서 1주일간 적응시킨 5주령의 Balb/c 마우스를 5군으로 나누어 실험을 하였다(평균체중 22.3~23.3 g). 실험이 진행됨에 따라 총 에너지를 제한한 식이제한군(DR, -4 w)을 제외한 나머지 군에서는 체중이 증가하여 2주에는 2 g정도, 실험의 마지막인 8주에는 5~7 g이 증가하였다. 정상군과 종양세포를 주사한 대조군의 체중증가는 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table 2). 시료전처리군(Pre, -4 w)의 체중증가는 정상군과 비슷하였고 시료동시처리군(Co, 0 w)도 정상군과 비슷하였으나 종양세포 처리 대조군이 가장 체중증가가 컸었다. 한편 식이제한군은 처음 2주간에 체중감소를 나타냈으며 실험종료시에도 실험 초기의 체중보다 낮은 값인 20.8 g을 나타내었다.

2) 각 장기의 중량 변화

조제식을 섭취한 각 군의 마우스에서 장기의 무게 변화를 살펴보았다. 신장과 면역관련 장기인 간과 비장은 정상군에 비하여 종양세포를 이식한 대조군에서 증가를 나타내었고, 시료전처리군(Pre, -4 w)과 시료동시처리군(Co, 0 w)은 대조군과 유사하거나 다소 감소하였고, 식이제한군(DR, -4 w)은 정상군 정도로 감소함을 알 수 있었다. 심장의

Table 2. Changes in body weights of Balb/c mice during feeding the experimental diets for 8 weeks

Group	0 w ¹⁾	2 w	4 w	6 w	8 w
Normal	22.2±1.7 ^{a,6)}	25.0±2.0 ^a	24.9±2.1 ^a	25.8±2.0 ^a	27.5±2.8 ^{ab}
S-180+C ²⁾	23.3±1.5 ^a	25.4±2.3 ^a	25.7±2.0 ^a	27.8±2.2 ^a	30.0±1.6 ^a
S-180+Pre (-4 w) ³⁾	22.6±2.7 ^a	25.1±2.6 ^a	24.2±2.4 ^a	24.9±3.1 ^a	27.0±2.4 ^{ab}
S-180+Co (0 w) ⁴⁾	22.4±1.4 ^a	24.9±1.7 ^a	25.3±1.6 ^a	26.2±1.4 ^a	25.8±2.5 ^b
S-180+DR (-4 w) ⁵⁾	22.4±2.6 ^a	19.2±2.9 ^b	19.8±2.8 ^b	19.8±2.7 ^b	20.8±2.0 ^c

Normal and S-180+Control group were fed with commercial chow diet and other groups were fed with experimentally formulated diet during the experimental period. At 4 weeks, 7 day-old sarcoma 180 ascites cells in the mice were s.c. transplanted into the left groin of inbred strain.

¹⁾Represents 5 week old mice

²⁾S-180+C: S-180+Control group (fed commercial chow diet),

³⁾S-180+Pre (-4 w): S-180+Pre-treatment group of the formulated diet at initiation (-4 wks)

⁴⁾S-180+Co (0 w): S-180+Co-treatment group of the formulated diet at 0 weeks (sarcoma-180 injection) after feeding commercial chow diet from initiation (-4 wks) to 0 week.

⁵⁾S-180+DR (-4 w): S-180+Pre-treatment and dietary restriction group of the formulated diet at initiation (-4 wks, restriction rate; 30%)

⁶⁾Values are mean±SD; All mice were sacrificed at 26 days following the transplantation and tumor weight and organ weight were measured.

^{a-c}Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

Table 3. Effects of experimental diet groups on the immunoorgan (spleen and liver), heart and kidney weights of Balb/c mice¹⁾ with sarcoma 180 cell transplantation after 4 weeks

Diet group	Body wt. (g)	Liver/body wt. (%)	Spleen/body wt. (%)	Kidney/body wt. (%)	Heart/body wt. (%)
Normal	27.5±2.8 ^{ab}	6.0±0.8 ^b	0.4±0.0 ^c	1.6±0.5 ^{NS}	0.5±0.2 ^{NS}
S-180 + Control	30.0±1.6 ^a	6.5±1.0 ^a	1.3±0.1 ^a	1.6±0.3	0.3±0.0
S-180 + Pre (-4 w)	27.0±2.4 ^{ab}	7.2±1.5 ^a	1.0±0.2 ^b	1.3±0.3	0.5±0.2
S-180 + Co (0 w)	25.8±2.5 ^b	7.2±2.0 ^a	1.0±0.4 ^b	1.3±0.5	0.6±0.2
S-180 + DR (-4 w)	20.8±2.0 ^c	5.2±1.7 ^c	0.5±0.1 ^c	1.0±0.4	0.5±0.0

¹⁾The explanation is the same as the footnote in Table 2. NS: none significant. ^{a-c}Means with the different letters in the same column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

경우 각 군간에 거의 차이를 보이지 않았다(Table 3).

3) 고형암 성장저지 효과

조제식을 섭취시킨 마우스의 암예방 및 식이 제한의 효과를 살펴보기 위해 S-180 암세포를 이식한 후 26일에 마우스 서혜부의 암조직을 적출하여 형성된 종양무게를 측정하였다(Table 4). 종양세포를 이식한 대조군의 종양크기는 5.1 g±0.7

를 나타내었고, 시료전처리군(Pre, -4 w)은 4.1 g으로 20%가 저해되었으며 시료동시처리군(Co, 0 w)은 3.4 g으로 33%가 억제되므로 시료동시처리군이 더 효과가 좋았다. 한편 열량을 제한한 식이제한군(DR, -4 w)은 3.1 g으로 39%가 저해되어 종양의 무게가 가장 낮았다(p<0.05). 그러나 체중당 종양무게로 볼때는 시료동시처리군(Co, 0 w)이 종양 생성 저해율이 가장 높았다.

Table 4. Antitumor activity of experimental diet groups in tumor bearing Balb/c mice with sarcoma-180 cells after 4 weeks

Diet	Tumor weight (g)	Inhibition rate (%)
S-180+C	5.1±0.7 ^a	-
S-180+Pre (-4 w)	4.1±0.7 ^b	20
S-180+Co (0 w)	3.4±0.6 ^{bc}	33
S-180+DR (-4 w) ¹⁾	3.1±0.5 ^c	39

¹⁾ The explanation is the same as the footnote in Table 3. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

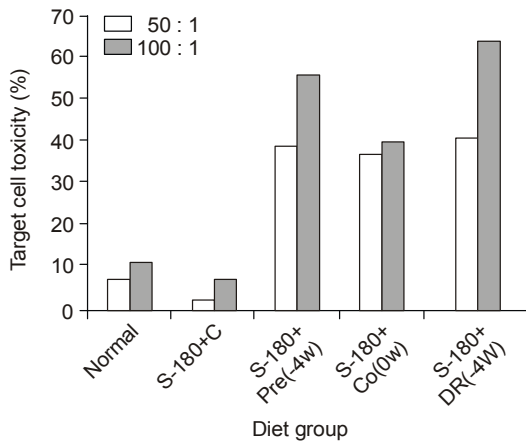


Fig. 2. Effects of experimental diet groups on the natural killer (NK) cell activity of the Balb/c mouse splenic cells¹⁾ after 4 weeks of transplantation of the sarcoma-180 cells. Target cells used were the Yac-1 mouse lymphoma cells. Effector cells and Yac-1 cells were added, to each well of a 96-well plate (final volume: 100 μ l/well). Determination were carried out after 3 days later. ¹⁾The explanation is the same as the footnote in Table 3.

4) 비장에서 자연살해세포의 활성화

마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 자연살해세포(NK cell)의 활성을 측정하였다. Effector cell (NK cell) : target cell (Yac-1 cell)의 비율이 50 : 1이었을 때 정상군의 경우 7%, 종양세포를 투여한 대조군은 2%의 세포 파괴 활성을 나타내었고, 시료전처리군(Pre, -4 w)은 39%, 시료동시처리군

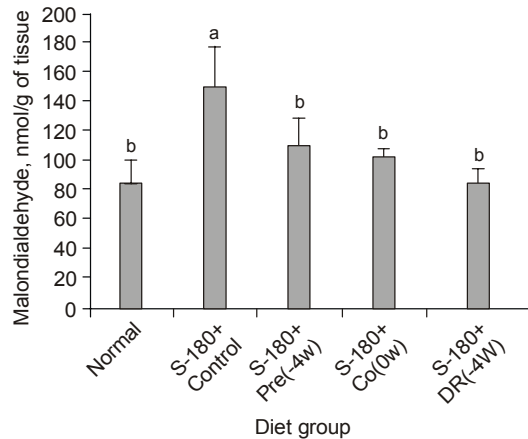


Fig. 3. Effects of experimental diet groups on hepatic lipid peroxide content in sarcoma-180 treated Balb/c mice¹⁾ after 4 weeks. ¹⁾The explanation is the same as the footnote in Table 3. ^{a-b}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

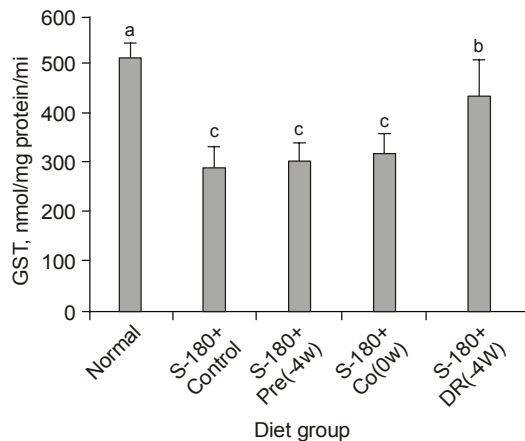


Fig. 4. Effects of experimental diet groups on hepatic glutathione S-transferase activity in sarcoma-180 treated mice¹⁾ after 4 weeks. ¹⁾The explanation is the same as the footnote in Table 3. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

(Co, 0 w)은 37% 그리고 식이제한군(DR, -4 w)은 41%로 정상군 및 종양세포 처리 대조군보다 활성이 크게 나타났다. Effector cell (NK cell) : target cell의 비율을 100 : 1로 처리하였을 때 시료전처리군은 56%, 시료동시처리군은 40%, 식이제

한군은 64%로 Yac-1 mouse lymphoma cell에 대한 natural killer의 세포 파괴 활성은 암예방조제식이 처리에서 크게 증가되었고 또 이 조제식을 식이제한(DR, -4 w)하였을 때 더 큰 활성을 나타내었다(Fig. 2). 이 경우 시료전처리군이 동시처리군보다 활성이 높았다.

5) 간 내의 lipid peroxide량과 GST 활성 변화

Lipid peroxide (malonedialdehyde nmol/g of tissue) 함량을 측정한 결과, 정상군은 85, 종양세포를 이식한 대조군은 151로 종양세포를 이식하여 과산화지질의 형성이 크게 증가($p < 0.05$)되었음을 알 수 있다(Fig. 3). 그러나 sarcoma 180 세포를 이식한 군에 암예방조제식을 공급하였을 때 malondialdehyde 값의 유의적인 감소를 볼 수 있었다. 시료전처리군과 시료동시처리군은 각각 111, 103으로 함량이 감소하였는데 특히 식이제한군은 85로 정상군과 유사한 정도로 감소되었다($p < 0.05$).

간의 GST 활성(nmol/mg protein/min)은 정상군이 515를 나타내었고, 종양세포를 투여한 대조군에서는 294로 유의적으로 감소되었다($p < 0.05$). 시료전처리군은 307, 시료동시처리군은 322로 종양세포를 투여한 대조군에 비하여 다소 증가하였지만 식이제한군(DR, -4 w)은 439로 종양세포가 이식된 상태에서 종양세포를 투여한 대조군에 비하여 유의적인 증가($p < 0.05$)를 나타내었다(Fig. 4).

고 찰

본 실험에서는 한국인의 암예방식이 개발의 일환으로 한국인이 많이 섭취하는 식품인 현미, 수수, 울무의 곡류와 검정콩, 들깨의 종실류 및 들미나리, 케일, 쇠비름, 미역, 채소류와 해조류 그리고 항암효과가 알려져 있고 전통식품인 된장과 김치(유기배추김치)를 일정한 비율로 섞어 암예방조제식을 만들고, sarcoma-180 세포를 이식한 마우스에 섭취시켜 이 조제식의 항암효과를 측정하였다. 곡류에는 caffeic acid, ferullic acid, gallic acid, ellagic acid 등의 여러 가지 phenol 화합물,²⁸⁾ 김치에는 β -sitosterol, 된장에 함유되어 있는 genistein 등, 그리고 채소와 과일에 들어있는 vitamin C, E, β -carotene, flavonoid 등의 물질²⁹⁾은 항산화

효과뿐 아니라 항발암효과가 있다고 알려져 있다. 본 연구 결과에서 암예방조제식이 종양생성을 억제하였지만 개개식품의 효과에^{2,3,6)} 비해 활성이 크게는 증가되지는 않았다.

한편, 고형암 성장억제 효과는 조제식이 처리와 처리방법에 따라 효과에 다소의 차이가 있었다. 전처리군보다는 동시처리군이 항암활성이 높았으며 식이섭취를 제한하였을 때 가장 컸었다. 일반적으로 식이제한은 암발생을 억제시킨다고 보고되고 있다.¹²⁾ Mukherjee등³⁰⁾은 식이제한이 전립선암의 성장을 감소시켰으며, 이는 암의 angiogenesis를 억제하기 때문이라고 하였고, 에너지 섭취가 감소된 경우에는 식이지방 농도는 전립선암의 성장에 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 또한 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA)로 유방암이 유도된 rat에 50%의 식이제한을 하였을 때 암의 크기와 수가 감소하였는데, 이는 식이제한에 의해 유방암의 성장에 관여하는 prolactin의 분비가 감소하였기 때문이라고 하였다.³¹⁾ 그러나 이 실험의 경우 식이제한의 경우 체중감소와 종양성장억제가 동시에 일어났기에 이에 대한 연구와 다른 실험계와 실험처리방법 등을 이용한 더 많은 연구가 필요하다. 본 실험에 사용한 암예방조제식은 사람에게 적용할 경우 한 끼 분량이 50g으로 189 kcal를 내며 보통 우유에 타서 설탕이나 꿀을 넣어 마시므로 한 번 먹을 때 총 350 kcal 이하의 낮은 에너지를 함유한다. 따라서 보통의 한 끼 식사가 600~800 kcal를 낸다는 사실을 고려해 볼 때 보통식사보다 열량이 적은 이런 조제식을 섭취할 경우 이들 자체의 암예방 효과와 식이제한에 의한 항암효과의 상승작용을 기대할 수 있다.

면역관련 장기 중 하나인 비장의 체중에 대한 중량변화를 살펴본 결과, 식이제한군에서는 종양세포 이식 대조군에 비해 상당한 감소를 나타내었고, 시료전처리군과 시료동시처리군은 유사한 값을 보였다. 그러나 비장에서 NK 세포의 활성은 시료전처리군이 시료동시처리군보다 높았으며 식이제한군에서 가장 높은 세포파괴 활성을 나타내었다. 이는 암예방조제식과 또 이 식이를 제한한 경우 종양 세포가 이식되어 종양이 성장된다 하더라도 NK세포를 활성화하여 종양 생성을 억

제하는데 작용하였으리라 생각된다.

조제식을 섭취한 세 군의 마우스에서 간 내 lipid peroxide 함량과 glutathione S-transferase (GST)의 활성도 비슷한 패턴을 보였다. 간 내 lipid peroxide 함량은 종양세포 이식 대조군에 비하여 조제식을 섭취한 세 군 모두에서 감소하였으며 식이제한을 하였을 때 가장 큰 감소를 나타내었다. Kim 등³²⁾의 보고에 의하면 식이제한과 운동을 같이 하였을 때 심장의 mitochondria의 malondialdehyde 함량이 감소하였고, cytosol에서 항산화 효소인 superoxide dismutase, selenium dependent glutathione peroxidase, GST의 활성이 증가하였다고 한다. 간내의 GST 활성은 식이제한시 자유급식을 한 군보다 유의적으로 증가하였다. 항암 효소로 알려진 GST는 생체 대부분의 조직에 함유되어있으며, 특히 간에 많이 함유되어 있는데, 이의 체내에서 역할은 친전자성 발암물질의 활성대사산물의 해독작용이다.³³⁾ 발암물질은 생체 내에서 cytochrome P-450이나 phosphotransferase 등의 각종 약물 대사효소에 의해 활성화되어 DNA 손상을 일으키지만, GST는 이들 소수성 잔기를 가지는 활성 대사물을 기질로 하고, 여기에 glutathione을 결합시켜 안정한 형태의 물질로 만들어 노 중으로 배설시킨다고 알려져 있다.³⁴⁾ 위 결과로 볼 때 식이제한을 할 경우 간의 항산화 효소계 및 발암물질 대사효소계를 활성화시키는 것으로도 항암 활성을 나타낼 것으로 생각된다.

결 론

항돌연변이 및 항암 효과를 나타내는 것으로 알려진 현미, 수수, 울무, 검정콩, 들미나리 쇠비름, 케일, 미역 및 된장과 김치(유기배추김치)를 이용하여 암예방조제식을 만들고 이의 항암효과를 sarcoma-180 세포 이식 실험을 하여 측정하였다. 종양세포 이식 4주 전부터 식이제한(30%)를 한 식이제한군이 고형암 성장저지 효과가 컸으며, 식이제한 때문에 체중 및 간과 비장의 중량이 감소하였음에도 비장에서의 NK cell 활성은 자유급식을 한 다른 군에 비해 현저한 증가를 나타내었다. 또한 식이를 제한했을 때 간의 lipid peroxide 함량은 유의적으로 감소되었으며, GST 활성은 현

저히 증가되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 암예방조제식은 그 자체도 항암활성이 있으나 식이제한을 했을 때 더 효과가 컸었다. 그러나 sarcoma 180 실험계에서는 기대 이상의 큰 효과는 나타나지 않아 여러 가지 실험처리방법, 또는 다른 실험계에 의한 지속적인 연구가 필요하다고 하겠다.

감사의 글

이 연구는 (주)엄마사랑의 연구비지원에 의한 것으로 이에 감사를 드립니다.

참고 문헌

- 1) 전향숙, 김인호, 김현정. 현미 추출물이 Mitomycin C로 유발한 CHL 세포의 염색체 이상에 미치는 영향. 한국식품과학회지 1995; 27: 1003-1007.
- 2) 권영미, 박진영. 수수(Sorghum)의 항돌연변이 및 항암 효과. 대한암예방학회지 1998; 3: 128-135.
- 3) 김성준. 울무의 암예방효과와 활성물질. 부산대학교 박사학위논문 1998.
- 4) 강미영, 최영희, 남석현. 쌀을 포함한 곡류 및 두류의 항변이원 활성의 검색. 한국농화학회지 1996; 39: 419-423.
- 5) 박진영, 손미현, 문숙희, 김광혁. *In vitro* 및 *in vivo*에서 된장의 암예방 효과: 1. 된장 추출물의 항돌연변이 및 *in vivo* 항암효과. 대한암예방학회지 1999; 4: 68-78.
- 6) 손미현, 문숙희, 최종원, 박진영. *In vitro* 및 *in vivo*에서 된장의 암예방 효과: 2. 된장 추출물이 sarcoma-180 이식 마우스의 혈청 및 간내 주요 효소활성에 미치는 효과. 대한암예방학회지 1999; 4: 143-154.
- 7) 고 경, 이희숙, 박원봉. 식이요법에 의한 간암환자의 일부증상의 호전. 한국영양학회지 1993; 26: 174-181.
- 8) Yu BP, Lee DW, Marler CG, Choi JH. Mechanism of food restriction: protection of cellular homeostasis. *Poc Soc Exp Biol Med* 1990; 193: 13-15.
- 9) Xia E, Rao G, Van RH, Heydary AR, Richardson A. Activities of antioxidant enzyme in various tissue of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *J Nutr* 1995; 125: 195-201.
- 10) 박평심, 고춘남, 박재윤. 절식이 흰쥐의 간과 신장의 thiobarbituric acid-reactive substance량 및 항산화효소 활성도에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 1999; 28: 471-476.
- 11) Chou NW, Kong J, Chung KT, Hart RW. Effect of caloric restriction on the metabolic activation of

- xenobiotics. *Mutat Res* 1993; 295: 223-235.
- 12) Park KY, Rhee SH. Nutritional evaluation and anti-cancer effect of kimchi. 8th Asian Congress of Nutrition, Abstract book. S11-4, p 149, Aug. 29-Sept. 2 1999
 - 13) 박건영. 된장의 안정성과 암예방 효과. 대한암예방학회지 1997; 2: 27-37.
 - 14) 최운영. 유기배추의 특성과 유기배추김치의 항돌연변이성 및 항암기능성. 부산대학교 석사학위논문 1998.
 - 15) Knapka JJ. Nutrition. In: The mouse in biomedical research III. Normative biology, Immunology and Husbandry. pp 52-64, San Diego, Academic press, 1983.
 - 16) 김문경. Sarcoma 180 투여 마우스에서 재래식 된장의 항암효과. 부산대학교 석사학위논문 1998.
 - 17) 이영숙, 김동석, 류병호, 이성호. 파래와 곤피에서 추출한 당단백질의 sarcoma-180 cell에 대한 항암효과 및 면역활성. 한국영양식품학회지 1992; 21: 544-550.
 - 18) Ryu BH, Kim DS, Cho KJ, Sin DB. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J Food Sci Technol* 1989; 21(5): 595-601.
 - 19) Yagoob P, Newsholme EA, Calder PC. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipid, *Immunology Letters* 1994; 41: 241-247.
 - 20) Erickson KL, Schumacher LA. Lack of an influence of dietary fat on marine natural killer cell activity. *J Nutr* 1989; 119: 1311-1317.
 - 21) Brouard C, Pascaud M. Modulation of rat and human lymphocyte function by n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and acetylsalicylic acid. *Ann Nutr Metab* 1993; 37(3): 146-159.
 - 22) Skehan P, Storeng R, Monks SA, McMahon J, Vsitica D, Warren JT, Bokesch, J, Kenney S, Boyd KR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1107-1112.
 - 23) Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens KJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 48: 4827-4833.
 - 24) Ohkawa H, Ohishi N, Yaki K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
 - 25) Habig WH, Pabist MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. The first step in mercapturate acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139.
 - 26) Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
 - 27) Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31(6): 347-364.
 - 28) Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Wang A, Suzui M, Okamoto K, Mori H. Inhibitory of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acid. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1321-1325.
 - 29) 정소영, 김현위, 윤 선. 녹즙의 항산화 영양성분 분석. 한국식품과학회지 1999; 31: 880-886.
 - 30) Mukherjee P, Sotnikov AV, Mangian HJ, Visek WJ, Zhuo J-R, Clinton SK. Energy intake and prostate tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor expression. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 512-523.
 - 31) ThyagaRajan S, Meites J, Quadri SK. Underfeeding-induced suppression of mammary tumors: counteraction by estrogen and haloperidol. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 203: 236-242.
 - 32) Kim JD, Yu BP, McCarter RM. Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(1): 83-88.
 - 33) Warholm M, Guthenberg C, Bahr CV, Mannervik B. Glutathione transferases from human liver. In: eds, by Meister A. *Methods in Enzymology* vol. 113. glutamate, glutamine, glutathione, and related compounds. pp 499-504, Orlando, Academic press, 1985
 - 34) Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711-716.