

## Effect of commercial *Makgeolli* on tumor growth in tumor xenograft mice

Eun-Ju Shin<sup>1,2</sup>, JaeHo Kim<sup>1</sup>, Ki-Seung Seong<sup>1</sup>, Sung-Kwan Yum<sup>3</sup>,  
Jin-Taek Hwang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Korea Food Research Institute, Seongnam 13539, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Biotechnology, Korea University of Science and Technology, Daejeon 34113, Korea

<sup>3</sup>Seoul Jangsoo CO., LTD., Jincheon 25465, Korea

## 종양이식 모델 쥐에서 동결건조 시판 막걸리가 종양성장에 미치는 영향

신은주<sup>1,2</sup> · 김재호<sup>1</sup> · 성기승<sup>1</sup> · 염성관<sup>3</sup> · 황진택<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>한국식품연구원, <sup>2</sup>과학기술연합대학원, <sup>3</sup>서울장수 주식회사

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the inhibitory effect of commercial *Makgeolli* on tumor growth in human gastric adenocarcinoma cells (AGS) in a xenograft cancer model, transplanted with AGS cells. Commercial *Makgeolli* was first dealcoholized by evaporation and used as the test sample. We detected a significant increase in the volume and weight of tumor in nude mice (induction) that were transplanted with AGS cells. Administration of 100 mg/kg·day group (ML), and 500 mg/kg·day group (MH) dealcoholized commercial *Makgeolli* significantly decreased tumor growth. In this study, 5-FU 18 mg/kg·day was used as a positive control for tumor growth inhibition. Additionally, determination of the body weight of both the groups revealed no side effects after the administration of dealcoholized commercial *Makgeolli*. Using the cell culture system, we also evaluated the effect of dealcoholized commercial *Makgeolli* on caspase-3/7 activity in the AGS cells. Treatment with dealcoholized commercial *Makgeolli* increased the activation of caspase-3/7 and the apoptotic markers in AGS cells in a dose-dependent manner. Therefore, dealcoholized commercial *Makgeolli* can be used for cancer prevention.

**Key words** : commercial *Makgeolli*, AGS human gastric adenocarcinoma cells, dealcoholization, tumor xenograft, mice

### 서 론

과도한 스트레스, 불규칙한 식습관 및 공해환경은 인체에 다양한 질환을 일으키는 요소로서 작용하게 되고 그로인한 삶의 질 저하는 현대인에게 있어 큰 문제가 되고 있다. 특히 다양한 질병 중 암은 사망률에 있어 최상위에 있을 정도로 심각한 질병이며 이들을 치료하기 위하여 개인적으

로나 국가적으로 경제적 손실을 가져오게 된다. 여러 암 중에서 위암은 위의 점막에서 발생하는 암으로서 일반적으로 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)에 의한 감염이 주요한 원인으로 알려져 있다. 이와 더불어 흡연이나 과도한 염분이 발병을 촉진시킨다고도 알려져 있다(1). 2014년 발표된 중앙 암 등록본부 자료에 따르면 위암은 2012년 우리나라 암 중 2위의 발병률을 나타내고 있고 남성 암 중에서는 1위를 여성은 4위를 나타내고 있었다(1). 위암을 예방하기 위하여 신선한 채소와 과일을 충분히 섭취할 것을 권장하고 있으며 이는 식습관이 위암의 예방에 있어 중요한 요소라는 것을 나타내는 것이라 할 수 있다. 이러한 암을 치료하기 위하여 비교적 초기에는 약물투여, 수술, 및 방사선 치료법 등으로 시행하고 있으나 여전히 암은

\*Corresponding author. E-mail : jthwang@kfri.re.kr  
Phone : 82-31-780-9315, Fax: 82-31-709-9876  
Received 1 December 2015; Revised 29 January 2016;  
Accepted 4 February 2016.  
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

치료가 까다로운 질병이 되고 있어 말기환자의 경우 그 생존율이 상당히 희박한 실정이다. 이러한 까다로운 특성으로 인하여 암이 발병하기 전에 예방하고자 하는 전략이 많은 관심을 불러일으키고 있으며 실제로 식이요법 및 운동 등은 암을 예방하기 위한 좋은 전략으로 인식되어 지고 있다. 식품을 활용하여 암 발병의 과정을 예방하고 속도를 지연 시켜 암을 예방하는 화학적 암 예방(chemoprevention) 개념이 있는데 이는 항암제와는 차별화된 개념으로 1976년에 Sporn 및 그 동료 연구자들에 의해 처음으로 사용되었다(2). 화학적 암 예방식품 소재는 항암작용을 나타내는 다양한 약물들과 유사하게 암 세포내 증식 및 전이 등에 관련되는 신호전달분자들을 억제하여 항암작용을 나타내는 것으로 보고되어지고 있다(3,4). 여전히 많은 연구자들을 통해 천연물 유래의 화학적 암 예방 소재의 연구가 활발히 진행되고 있다(3,4). 예를 들면 와인의 주성분인 resveratrol, 녹차의 성분 중 하나인 catechin, 인도산 강황의 성분인 curcumin 등의 천연물 유래 소재가 다양한 기전으로 여러 종류의 암세포에서 세포증식을 억제하고 apoptosis를 일으켜 암 예방 효과가 보고된 바 있다(5-8).

막걸리는 한국을 대표하는 술로서 누룩, 쌀, 효모로 만드는 전통 술이다. 최근 많은 논문들에서 인체에 이로움을 줄 수 있는 생리활성 물질이 포함되어 있음이 보고되고 있고, 더불어 각종 단백질, 당, 및 비타민 등이 포함되어 있다(9,10). 보고에 의하면 막걸리로부터 분리된 *Pediococcus acidilactici* M76(lactic acid bacteria)는 고지방 식이에 의해 유도된 비만 쥐에서 지방의 축적을 억제하는 것으로 나타났는데 지방대사 관련 바이오마커인 acetyl CoA carboxylase, fatty acid synthase, 및 PPAR- $\gamma$ 의 활성억제를 통해서 효능을 발휘하는 것으로 밝혀졌다(11). 또 다른 연구에서는 막걸리에서 분리된 다당류가 면역기능의 향상에 도움이 될 수 있다는 보고도 있었다(12). 암 예방 측면에서 막걸리는 최근 강력한 항암물질인 파네졸을 포함하고 있음이 보고가 되었는데 이는 막걸리가 암 예방 식품효능을 나타낼 수 있음을 시사하는 결과가 되었다(13). 더 최근에는 본 연구진에서도 전통기법으로 제조된 막걸리의 암 예방 활성을 보고한 바가 있는데, 막걸리는 혈관생성을 억제하고 위암 세포의 사멸을 유도하는 것을 밝혀내었다(14). 이러한 연구결과를 바탕으로, 본 연구진은 마켓에서 판매되고 있는 시판막걸리도 암 예방활성을 나타낼 수 있는지를 AGS 위암 세포가 이식된 종양이식마우스(tumor xenograft mouse)를 이용하여 평가하였다. 종양이식 마우스모델은 항암제 스크리닝을 위해 전 세계적으로 널리 사용되어지고 있으며, 가장 잘 알려져 있는 것으로는 면역세포가 결핍되어 있는 누드마우스가 있다. 막걸리는 6%정도의 알콜 함량술로 과량의 알콜은 오히려 여러 암들에 있어 위험요인이 될 수 있다(15). 본 연구에서는 시판 막걸리가 가지고 있는 암 예방 효능 가능성을 알아보기 위한 첫 실험으로 부득이

수분이 제거된 시판막걸리의 동결건조물을 투여하는 방식으로 실험을 고안하였다. 이를 위해 면역세포가 결핍되어 있는 누드마우스를 이용하여 AGS 위암세포 주를 이식하고 알콜과 수분이 제거된 막걸리 건조물을 경구 투여하여 실질적으로 암의 성장이 억제되는지를 실험하였다.

## 재료 및 방법

### 막걸리추출물 제조

본 연구에 사용된 막걸리는 마켓에서 판매되고 있는 장수막걸리(Seoul Jangsu Co., Ltd., Jincheon, Korea)를 구입하였고 실험을 위하여 막걸리를 동결 건조물로 만들어 실험에 이용하였다. 동물실험에는 정수된 물을 이용하여 막걸리 total 동결건조물 100 mg/kg·day; 막걸리추출물 저 농도군(ML), 500 mg/kg·day; 막걸리추출물 고농도군(MH), 양성대조군으로 항암제인 5-fluorouracil(5-Fu)는 18 mg/kg·day의 양으로 준비하여 생쥐에게 경구 투여하여 효과를 확인하였다.

### 세포배양

종양유도에 사용된 세포 주는 위암세포인 AGS human gastric carcinoma cell을 사용하였는데 세포를 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포는 10% FBS, 항생제가 들어있는 RPMI1640배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양했다. 마우스 한 마리당 1.5 plate에 2×10<sup>6</sup> cell/100  $\mu$ L 배지 씩 세포현탁액을 만들어 이용하였다.

### 종양모델

실험동물은 5주령 male nude mice를 라온 바이오(Yongin, Korea)에서 구입하여 이용하였다. Male nude mice는 온도, 50% 습도항습, 그리고 12시간 광주기의 일정한 환경에서 사육하였고 실험기간동안 사료와 식수는 자유롭게 섭취하도록 제공하였다. 1주 안정화 후 mice는 무작위 배정하여 정상 군(None), 종양유도군(Induction), 막걸리추출물 저 농도 군(ML), 막걸리추출물 고농도군(MH), 양성대조군(Fu) 4마리씩 5그룹으로 나누었다. 준비된 위암 세포주 AGS 세포 (3×10<sup>6</sup>/100  $\mu$ L)와 100  $\mu$ L matrigel을 섞어 none 그룹을 제외한 나머지 생쥐의 뒷다리 양쪽에 주사기로 주입하여 종양을 유도하였다. 정상 군 그룹은 AGS 세포 대신 PBS 100  $\mu$ L를 이용하였다. 주입 후 2주 후부터 매일 정상군과 종양유도군 그룹에는 물을, 각 그룹에는 준비된 샘플 ML, MH, Fu를 200  $\mu$ L 씩 7주간 경구 투여하고 매주 생쥐의 무게를 측정하였다. 해부 시 각 군별로 모아 사진 찍고, 종양을 떼어 무게와 크기측정을 하였다. 종양의 크기는 종양의 가로, 세로 길이를 측정한 다음 기존실험의 방법과 동일하게  $V=a \times b^2/2$ (a:긴 부분의 지름, b:짧은 부분의 지름)

의 계산식으로 측정하였다. 동물실험은 한국식품연구원 동물연구윤리위원회의 허가 하에 이루어졌다(KFRI-M-15004).

**Caspase-3/7 활성 측정**

세포는 24 well plate에 배양하였고 시판막걸리 동결건조물(M100, 250, 500, and 1000 µg/mL)을 24시간 동안 처리한 후 세포 내 Caspae-3/7활성은 Muse™ Caspase-3/7 assay kit(Millipore, Darmstadt, Germany)를 사용하여 측정하였다.

**통계처리**

모든 값은 평균±표준 오차로 나타낸 것이며 통계처리는 IBM SPSS Statistics(2.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하였고 non-paired t-test를 시행하였다. 확률적 유의성은 0.05이하로 간주하였다.

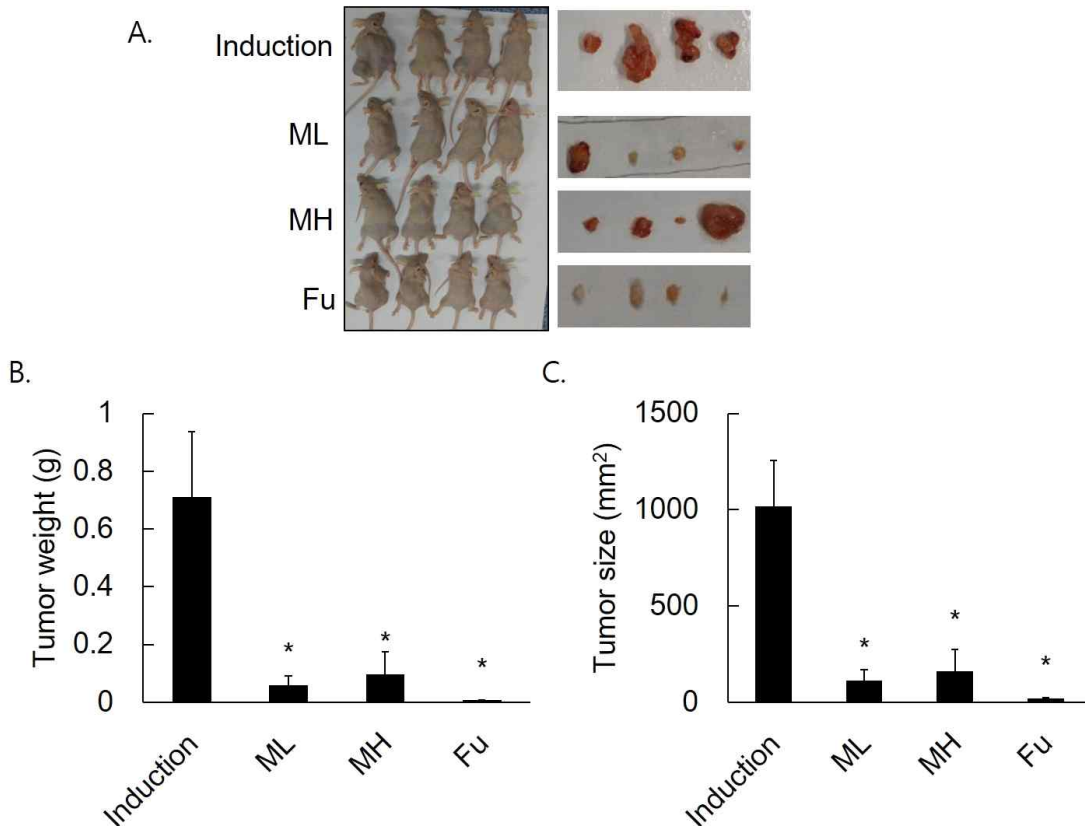
**결과 및 고찰**

**시판막걸리 동결건조물의 경구 투여에 의한 종양성장 억제효능**

시판 막걸리 동결건조물의 암 예방 효능을 검증하기 위

하여, AGS위암 세포 주가 이식된 누드마우스 모델에 경구 투여를 실시하여 평가하였다. 그림 1A,B,C에서 보여주는 바와 같이 각각을 AGS위암 세포 이식 군(Induction), AGS 위암 세포 이식+시판막걸리 동결건조물 100 mg/kg·day군 (ML), AGS위암 세포 이식+시판막걸리 동결건조물 500 mg/kg·day군(MH), AGS위암 세포 이식+5-FU 18 mg/kg·day군으로 나누어 경구 투여를 실시하였다. 7주가 지난 후 각각의 마우스를 희생시킨 후 종양의 크기와 무게를 측정하였는데 AGS위암 세포 이식 군(Induction)에 비해 ML 및 MH군은 같이 종양의 크기와 무게가 유의하게 감소 되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이때 5-FU는 잘 알려진 항암제로서 양성대조군으로 사용하였다. 이들의 결과로 시판 막걸리는 동물모델에서 종양의 성장을 억제할 수 있음을 확인할 수 있었으며, 본 연구진에서 이미 보고한 제조된 막걸리의 암 성장억제효능이 시중에 판매되고 있는 막걸리에서도 나타나고 있음을 알 수 있다.

지금까지의 막걸리에 대한 연구는 막걸리의 미생물을 동정하고, 조절하는 연구와 막걸리의 일반성분분석을 통하여 특성을 규명하는 연구가 주를 이루었었다(16,17). 그러나 최근에 들어와 막걸리의 기능성이 주목받기 시작하였고, 몇몇의 연구자들을 통해 막걸리의 생리활성이 예측되



**Fig. 1. The effects of *Makgeolli* on the size and weight of tumor in AGS gastric cancer xenograft model.**

Induction, AGS cell inoculation; ML, AGS cell inoculation with MK at 100 mg/kg·day; MH, AGS cell inoculation with MK at 500 mg/kg·day; 5-FU, AGS cell inoculation with 5-FU at 18 mg/kg·day. Data are expressed as mean±SD. \*p<0.05 vs. induction.

는 성분들이 밝혀졌으며, 막걸리의 균주의 생리활성, 막걸리 자체의 생리 활성 등 그 연구 범위가 다양해지고 있다(9-14). 특히 최근 막걸리에 포함되어 있는 파네졸이 강력한 항암물질이라는 사실이 보고됨에 따라 막걸리의 암 예방 효능에 대한 기대가 더욱 커지게 되었지만, 지금까지 막걸리의 암 예방 효능에 대한 연구는 *in vitro* 수준에서 머물러 있었다(13,18). 이에 본 연구진은 시판 막걸리를 알콜과 수분만을 제거한 동결건조물을 만들어 암 예방 효능을 평가한 결과 AGS위암 세포가 이식된 동물모델에서 종양의 성장을 억제하는 것을 발견할 수 있었다. 이는 기존에 연구자들에 의해 밝혀진 바와 같이 막걸리의 주재료인 쌀, 누룩, 효모 안에 포함되어 있는 다양한 생리활성성분이 역할을 한 것으로 보이고 이 성분들 중 기존에 알려진 바와 같이 파네졸(farnesol) 등의 강력한 항암 성분들의 역할이 클 것으로 예상하고 있다(9-14). 다만 본 연구에서는 어떠한 성분이 이러한 종양성장억제에 강력하게 작용할 것인지에 대한 실험은 실시하지 않았고, 막걸리의 종양의 성장억제 능에 있어서 다양한 Cancer바이오마커에 대한 영향평가 또한 실시하지 않았다. 추후 연구에서는 이러한 성분들에 대한 연구와 관련 바이오마커의 동정에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 사료된다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서는 막걸리가 암 예방 효능을 나타낼 수 있음을 처음으로 보고한 것으로 의의가 있고 향후 화학적 암 예방을 위한 천연 소재로서 쓰일 수 있음을 예상하게 되었다.

#### 시판막걸리 동결건조물 섭취가 체중에 미치는 영향

다음으로 시판막걸리 동결건조물의 투여가 경구 투여 중 안전성을 평가 할 수 있는 지표인 체중에 미치는 영향을 평가하였다. Fig. 1에서와 같은 조건에서 각각을 대조군, AGS위암 세포 이식 군(Induction), AGS위암 세포 이식+시

판막걸리 동결건조물 100 mg/kg·day군(ML), AGS위암 세포 이식+시판막걸리 동결건조물 500 mg/kg·day군(MH), AGS위암 세포 이식+5-FU 18 mg/kg·day군으로 나누어 경구 투여를 실시할 때 체중의 변화를 1주일에 한번 씩 측정하였다. 그림 2에서 보는바와 같이 각각의 군에서 체중감소에 있어서 어떠한 유의적인 변화는 없었다. 이들의 결과로 시판 막걸리는 동물모델에서 경구 투여에 의한 종양의 성장을 억제할 때 안전성에 별다른 문제가 없을 것으로 예측되었다. 이들의 모든 결과로 시판막걸리 동결건조물의 투여는 종양의 성장을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났으며 체중 감소 등의 부작용을 보이지 않았다. 이들의 결과를 토대로, 향후 시판막걸리의 다양한 암 세포모델 계에서의 암 예방 효능검증, 암 관련 작용기작 연구, 암 예방 활성성분 도출 등에 대한 연구가 수반 되어야 할 것이다.

#### 시판막걸리 동결건조물이 AGS세포의 Caspase-3/7활성에 미치는 영향

마지막으로 시판막걸리 동결건조물이 AGS위암 세포 주에서 암 세포의 사멸을 유도하는 데 있어 중요한 타겟인 Caspase-3/7의 활성에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보았다. 그림 3에서 보는바와 같이 시판막걸리의 동결건조물을 AGS위암 세포 주에 농도 의존적으로 처리 후 Caspase-3/7의 활성을 측정 한 결과, 대조군(Con)에 비해 시판막걸리 동결건조물 처리 군(M)에서 농도 의존적으로 Caspase-3/7의 활성을 증가시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과로 막걸리의 AGS위암 세포 주에서 동물실험과 유사하게 종양의 증식을 억제할 수 있을 것으로 판단되어지며 이는 Caspase-3/7의 활성화를 통해 이루어 질 것으로 예측할 수 있었다.

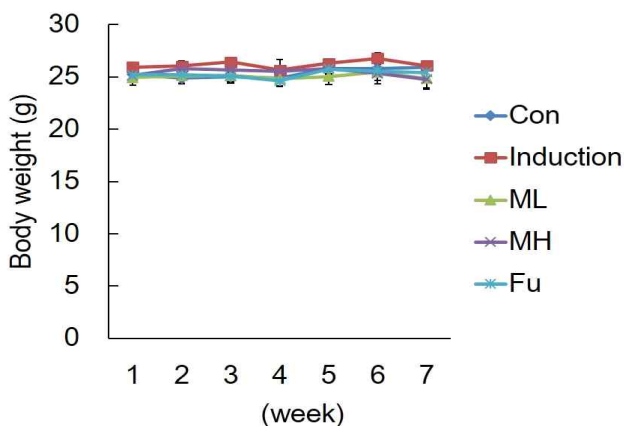
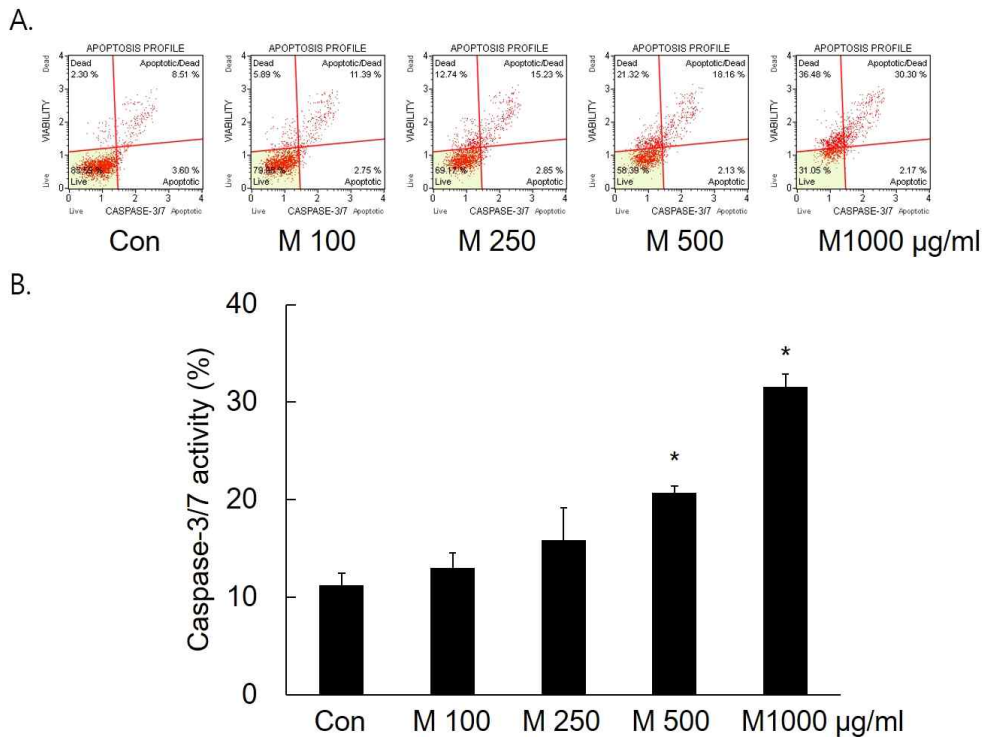


Fig. 2. Body weight change between group in AGS gastric cancer xenograft model.

Con, untreated; Induction, AGS cell inoculation; ML, AGS cell inoculation with MK at 100 mg/kg·day; MH, AGS cell inoculation with MK at 500 mg/kg·day; 5-FU, AGS cell inoculation with 5-FU at 18 mg/kg·day. Data are expressed as mean±SD. \*p<0.05 vs. induction.

#### 요 약

본 연구는 시중에서 판매되고 있는 막걸리를 알콜과 수분을 제거한 막걸리 동결건조물로 만들어 AGS위암세포주가 이식된 종양이식 마우스 모델을 가지고 종양성장에 미치는 영향을 관찰하였다. 면역세포가 결핍된 C57/BL/6누드마우스를 이용하여 AGS위암 세포 이식 군(Induction), AGS위암 세포 이식+시판막걸리 동결건조물 100 mg/kg·day군(ML), AGS위암 세포 이식+시판막걸리 동결건조물 500 mg/kg·day군(MH), AGS위암 세포 이식+5-FU 18 mg/kg·day군으로 나누어 비교한 결과, 시판막걸리 동결건조물에서 종양의 성장을 유의하게 감소시키는 것을 관찰하였다. 이와 더불어 각 군 간에 체중변화는 유의한 차이가 없어 막걸리의 투여에 의한 체중감소 등의 특이한 부작용이 없는 것으로 판단하였다.



**Fig. 3. Effect of *Makgeolli* on caspase-3/7 activity in AGS cells.**

Cells were treated with dealcoholized commercial *Makgeolli* (M) for 24 hr in a dose-dependent manner, and then caspase-3/7 activity was measured by Muse™ Caspase-3/7 kit (A). Data were presented as graph (B).

## 감사의 글

이 연구는 한국식품연구원의 사업연구비의 지원을 받아 수행한 연구결과로 이에 감사드립니다.

## References

- Zhong C, Li KN, Bi JW, Wang BC (2012) Sodium intake, salt taste and gastric cancer risk according to *Helicobacter pylori* infection, smoking, histological type and tumor site in China. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 2481-2484
- Cazzaniga M, Bonanni B (2012) Breast cancer chemoprevention: old and new approaches. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 1-15
- Hu G, Zhang L, Rong Y, Ni X, Sun Y (2014) Downstream carcinogenesis signaling pathways by green tea polyphenols: a translational perspective of chemoprevention and treatment for cancers. *Curr Drug Metab*, 15, 14-22
- Park EJ, Pezzuto JM (2013) Antioxidant marine products in cancer chemoprevention. *Antioxid Redox Signal*, 19, 115-138
- Lin HY, TangHY, Davis FB, Davis PJ (2011) Resveratrol and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1215, 79-88
- Philips BJ, Coyle CH, Morrisroe SN, Chancellor MB, Yoshimura N (2009) Induction of apoptosis in human bladder cancer cells by green tea catechins. *Biomed Res*, 30, 207-215
- Park IJ, Lee YK, Hwang JT, Kwon DY, Ha J, Park OJ (2009) Green tea catechin controls apoptosis in colon cancer cells by attenuation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated COX-2 expression via the AMPK signaling pathway at low-dose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Ann N Y Acad Sci*, 1171, 538-544
- Somasundaram S, Edmund NA, Moore DT, Small GW, Shi YY, Orlowski RZ (2002) Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer. *Cancer Res*, 62, 3868-3875
- Kang BS, Lee JE, Park HJ (2014) Qualitative and quantitative prediction of volatile compounds from initial amino acid profiles in Korean rice wine (*Makgeolli*) model. *J Food Sci*, 79, C1106-1116
- Park HJ, Lee SM, Song SH, Kim YS (2013) Characterization of volatile components in *Makgeolli*, a

- traditional Korean rice wine, with or without pasteurization, during storage. *Molecules*, 18, 5317-5325
11. Moon YJ, Baik SH, Cha YS (2014) Lipid-lowering effects of *Pediococcus acidilactici* M76 isolated from Korean traditional *Makgeolli* in high fat diet-induced obese mice. *Nutrients*, 6, 1016-1028
  12. Cho CW, Han CJ, Rhee YK, Lee YC, Shin KS, Hong HD (2014) Immunostimulatory effects of polysaccharides isolated from *Makgeolli* (traditional Korean rice wine). *Molecules*, 19, 5266-5277
  13. Ha J, Wang Y, Jang H, Seog H, Chen X (2014) Determination of E,E-farnesol in *Makgeolli* (rice wine) using dynamic headspace sampling and stir bar sorptive extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem*, 142, 79-86
  14. Shin EJ, Kim SH, Kim JH, Ha J, Hwang JT (2015) Dealcoholized Korean rice wine (Makgeolli), exerts potent anti-tumor effect in AGS human gastric adenocarcinoma cells and tumor xenograft mice. *J Microbiol Biotechnol*, 25, 1485-1492
  15. Ghosh S, Guria S, Das M (2015) Alcohol as a risk factor for cancer burden: a review. *Proc Zool Soc*, DOI 10.1007/s12595-014-0134-3
  16. Kim HR, Kim JH, Bai DH, Ahn BH (2013) Microbiological characteristics of wild yeast strain *Pichia anomala* Y197-13 for brewing *Makgeolli*. *Mycobiology*, 41, 139-144
  17. Song YR, Jeong DY, Cha YS, Baik SH (2013) Exopolysaccharide produced by *Pediococcus acidilactici* M76 isolated from the Korean traditional rice wine, makgeolli. *J Microbiol Biotechnol*, 23, 681-688
  18. Shin MO (2008) Effect of growth inhibition and quinone reductase activity stimulation of *Makgeolli* fractions in various cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 37, 288-293