

프로폴리스 물추출물의 약효연구

최혁재 · 심상범 · 김남재* · 김종우

경희대학교 동서의학연구소

Studies on the Efficacies of Water Extract of Propolis

Hyuck Jai CHOI, Sang Bum SHIM, Nam Jae KIM* and Jong Woo KIM

East-West Medical Research Institute, Kyung Hee University, Seoul 130-702, Korea

(Received April 2, 1998; accepted July 1, 1998)

Abstract – Propolis is a lipophilic, natural product prepared by mixing the exudates collected from various plants by honeybees with beeswax for the purpose of using to seal hive walls and to strengthen the borders of combs. Because of its versatile bioactivities, propolis has been attracting many investigators' interest. But the pharmacological studies on propolis has, to date, been exclusively performed for an alcohol extract, there is few information of water extract. Therefore, in this study, we investigated the various effects of water extract of Chinese propolis. The water extract of propolis and its fractions of organic solvents showed strong antioxidative activities, especially ether and ethylacetate fractions, and reduced the lipid peroxidation of rat liver *in vitro*. Additionally the ether fraction of propolis (10 mg/ml) inhibited the activity of hyaluronidase by 50%. *In vivo*, the water extract of propolis considerably decreased s-GOT, s-GPT and s-LDH activities which represent for the hepatotoxicity induced by CCl₄ in rats, and prolonged the MST (Medium sevival time) and ILS (Increasing in MST over control) by 18% in mice which inoculated with sarcoma 180 ascites cells. These results suggest that the water extract of propolis has various bioactivities as well as the alcohol extract.

Keywords □ propolis water extract, radical scavenger, anti-lipid peroxidation, liver protective activity, anti-inflammation, anticancer effect

꿀벌로부터 얻어지는 약용재료로는 蜂蜜(꿀), 蜂蠟(蜜蠟), 蜂針, 露蜂房 등이 여러 본초서에 기록되어져 있으며 (동의학연구소 편, 1994; 赤松金芳, 1980), 이외에 프로폴리스가 독일, 영국, 폴란드 등 유럽이나 브라질 등지에서 민간약으로 이용되고 있다.

프로폴리스는 꿀벌이 유해 세균이나 바이러스로부터 보금자리를 보호하고 청결한 환경을 유지하기 위하여 수목에서 모집한 수액에 봉납이나 타액을 혼합시켜 만든 점착성이 있는 수액상의 천연 물질로서 황갈색, 호지성 천연 화합물이다(Havsteen, 1983).

프로폴리스의 성분으로는 지금까지 약 150종 이상의 화합물이 알려져 있으며 주성분으로는 polyphenols이며, polyphenols로서는 비당부로서 flavonoid, phenolic acid 및 ester, phenolic aldehydes, ketone, 다량의 왁스, 수지, 발삼, 정유, 화분 등이 있으며, 그외에 각종의 비타민 및 미네랄 등도 함유되어 있다(Walker 등, 1987). 특히, 산지나 채집 시기

및 주변의 식물 등에 따라서 함유 성분이나 함량이 다르며 효능에도 다소 차이가 있다고 알려져 있다(Miyataka 등, 1997).

프로폴리스(propolis)라는 어원은 그리스어로부터 유래되어졌으며, 「Pro」와 「Polis」의 합성어로써 「도시를 수호하는 방어함」이라고 하는 의미를 지니고 있다. 즉 프로폴리스는 천연물질로 꿀벌의 보금자리(巢)의 환경을 수호하는 역할을 하는 것으로 보금자리를 만드는 재료로서 뿐만 아니라 幼蟲이 감염되는 것을 방지하고 보금자리가 오염되는 것을 방지하는 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서, 프로폴리스의 어원에서 나타내는 함축적 의미에서도 알 수 있듯이 다양한 생리활성을 기대하여 B.C. 300년 경부터 유럽이나 브라질 등에서 민간약으로서 이용되어 왔으며, 항균작용, 항염증작용, 면역조절작용, 항궤양작용, 항고혈압작용, 항산화작용, 간장보호작용, 항암작용 등이 밝혀지고 있으며 빈혈, 순환기계 질환, 알레르기성 염증, 관절염, 소화기계 염증, 비뇨기 및 생식기계 염증, 신경계 질환 등의 개선 효과가 있음이 밝혀졌다(Wanscher, 1976; Havsteen, 1983;

* To whom correspondence should be addressed.

Dobrowolski 등, 1991; Frenkel 등, 1993; Pascual 등, 1994; Tatefuji 등, 1996; Lin 등, 1997; Miyataka 등, 1997).

최근까지는 주로 프로폴리스의 알코올 추출물에 관한 많은 연구가 되어져 왔으나, 알코올 추출물은 다량의 왁스나 수지, 발삼 등이 추출되어 복용이 어렵거나 물에 비교적 흔합이 잘되지 않아 제제화하기가 곤란하여 알코올을 사용하지 않으면 안되는 단점을 갖고 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 최근 새로운 추출방법의 하나로 물을 사용한 프로폴리스 추출법이 개발됨에 따라 프로폴리스 물추출물에 대한 연구와 관심이 높아가고 있다. 따라서, 본 연구자들은 프로폴리스 물추출물의 활성을 검토하고자 *in vivo*에서 sarcoma 180 복수암에 대한 항암작용과 사염화탄소 유발 간장해에 대한 간보호 작용 및 *in vitro*에서 지질파산화를 생성 억제작용 및 DPPH 라디칼 제거작용을 검토하였다. 또한, 프로폴리스 물추출물의 생리활성물질을 분리 탐색하고자 하는 연구의 일환으로 물추출물을 에텔, 에칠아세테이트 및 부탄올로 차례로 분획하여 *in vitro*에서 각각의 분획물의 항산화 작용, 지질파산화물 생성억제작용 및 hyaluronidase 저해활성을 검토하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

추출 및 분획

본 실험에 사용한 프로폴리스를 물로 추출한 동결건조물(이하 프로폴리스 물추출물)은 강원양봉 축산업협동조합에서 제공받았으며, 물추출물 50 g을 물 250 ml에 녹여 에텔, 에칠아세테이트 및 부탄올로 수회 반복, 순차적으로 추출하여 얻어진 유기용매 추출물을 감압, 농축하여 에텔 분획 6.35 g, 에칠아세테이트 분획 1.0 g, 부탄올 분획 9.0 g 및 잔류물 24.5 g의 절조성의 추출물을 각각 얻어 실험에 사용하였다. **항산화활성**

안정한 free radical인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)을 이용한 Blois(1958)의 방법에 준하였다. 프로폴리스 물추출물 및 물추출물의 유기용매 분획물 즉, 에텔분획물, 에칠아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 잔류물에 각각 MeOH를 가하여 100, 50, 10, 5, 1, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되게 조제하여 각 시료 4 ml씩 시험관에 옮기고, 여기에 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ DPPH의 메탄올 용액 1 ml를 가한 다음 잘 혼합한 후 실온에서 30분간 방치하고 520 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH를 환원시키는 정도를 산출하여 항산화활성으로 하였다. 따로 양성대조약물로 sodium ascorbate를 사용하여 비교관찰하였다.

파산화지질 혈성억제작용

Uchiyama 및 Mihara 등(1978)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 흰쥐에 50% 에탄올 용액 0.75 ml/100 g을 경구투여하고 15시간 후 흰쥐를 에텔로 가볍게 마취시켜 복부를 절

개하여 간문맥에 polyethylene tube를 삽입한 다음 4°C로 냉장한 생리식염수로 간을 세척하고 간을 적출하여 즉시 칭량하고 10%가 되도록 4°C의 phosphate buffer 용액(pH 7.4)를 가하여 homogenizer로 10분간 균질화하여 homogenate를 얻어 실험에 사용하였다.

각 검체의 농도가 1 mg/ml, 5 mg/ml 및 10 mg/ml으로 조제된 각 검액 0.2 ml를 시험관에 취하고 흰쥐의 간균질화물 0.5 ml를 가한 다음 잘 혼합하고 37°C에서 30분간 배양한 후, 흐르는 물에 냉각시켰다. 1% Phosphate buffer 3 ml와 0.6% TBA 1 ml를 가하여 100°C 수육에서 45분간 발색시킨 후 다시 흐르는 물에 냉각시켰다. 다시 여기에 n-BuOH 4 ml를 가하여 진탕, 혼합하여 4°C, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 BuOH층을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 양성 약물로 sodium ascorbate를 사용하였다.

Hyaluronidase 저해활성

프로폴리스 물추출물 및 물추출물의 유기용매 분획물 즉, 에텔분획물, 에칠아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 잔류물을 각각에 물을 가하여 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005 mg/ml의 농도가 되도록 조제하여 각 검액을 각각 1.0 ml씩 시험관에 취하고 hyaluronidase 용액(from bovine testis, 7900 units in 0.1 M acetate buffer soln, pH 5.0) 0.05 ml를 가하고 잘 혼합한 후 37°C에서 20분간 incubation한 다음 activator로서 12.5 mM CaCl₂ 0.1 ml를 가하고 잘 혼합한 다음 다시 20분간 incubation하였다. 기질로서 0.12% hyaluronic acid-K 용액 0.25 ml를 가한 다음 다시 40분간 incubation하고 0.4N NaOH 0.1 ml 및 potassium borate 용액(boric acid 49.44 g을 중류수 1 L에 녹인 용액에 KOH 22.4 g을 가하여 용해한 용액) 0.1 ml를 가하여 3분 동안 끊는 수육상에서 가열하였다. 흐르는 물에 식힌 후 빨색제로서 DMAB 시약(*p*-dimethylaminobenzaldehyde 10 g을 냉초산: 10N HCl(7:1) 용액 100 ml에 녹인 용액을 다시 냉초산으로 10배 희석함) 3.0 ml를 가하여 37°C에서 20분간 incubation한 다음 585 nm에서 흡광도를 측정하여 저해활성을 산출하였다(Hans Ulrich Bergmeyer, 1974; Kim 등, 1995). 양성 비교약물로 indomethacin을 사용하여 비교관찰하였다.

사염화탄소 유발 간독성에 미치는 작용

Maeda 등(1982)의 방법에 준하였다. 즉, 흰쥐 1군을 6마리로 하여 프로폴리스 물추출물 100 mg/kg body weight 및 300 mg/kg body weight을 각각 1일 1회 4일 동안 경구투여하고, 검액 최종 투여 1시간 후에 olive oil에 용해시킨 20% 사염화탄소 용액 1.0 ml/100 g를 경구투여하였다(최 등, 1997). 24시간 후에 심장 채혈하여 상법에 따라 혈청을 분리하여 아래의 방법에 의하여 혈청중 GOT, GPT 및 LDH 효소 활성도를 측정하였다. 양성 비교 약물로는 silymarin 100 mg/kg을 경구 투여하여 비교 관찰하였다.

암세포(Sarcoma 180)이식 생쥐에서의 항암작용

생쥐 1군을 10마리로 하여 복강내에 sarcoma 180 암세포 1×10^6 cells/mouse를 이식하고 24시간 후에 프로폴리스의 물추출물 100 mg/kg 및 300 mg/kg을 각각 1일 1회, 1주일에 5회 3주간 투여하였으며, 대조군은 생리식염수만을 투여하였고 암세포를 이식한 후 매일 생쥐의 생존 여부를 관찰하여 평균생존일수(MST) 및 연명률(ILS)를 산출하여 비교 관찰하였다(김 등, 1991).

MST(Medium servival time): 생존일수의 중앙치

$$\text{ILS}(\text{Increasing in MST over control, 연명률}) = (\text{T/C}-1) \times 100\% \\ \text{T:처치군의 MST, C:대조군의 MST}$$

혈청중 transaminase 효소 활성도 측정

혈청중 GOT와 GPT효소 활성도는 Reitman & Frankel (1957)의 방법에 따라 GOT·GPT kit 시약(아산제약주식회사, 서울)을 사용하여 측정하였다.

혈청중 lactic dehydrogenase(LDH) 효소 활성도 측정

혈청중 LDH 효소 활성도는 젖산기질법(Wroblewski 등, 1955)을 이용하여 LDH-LQ kit 시약(아산 제약 주식회사, 서울)을 사용하여 측정하였다.

통계 처리

본 실험에서의 결과치의 유의성 검증은 Student's *t*-test법에 준하여 처리하였다.

실험결과

DPPH 라디칼 소거효과

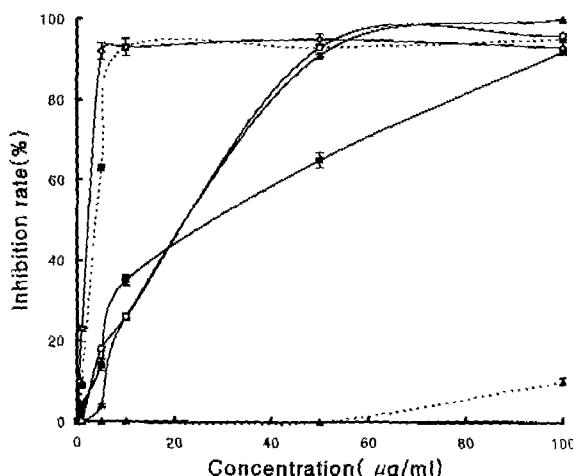


Fig. 1. Radical scavenging effects of water extract of propolis and its fractions on DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) *in vitro*. ■: water extract, ▨: ether fraction, ◇: ethylacetate fraction, ▲: n-BuOH fraction, ▨: residual water fraction, ○: sodium ascorbate. Each value represents mean \pm S.D.

안정한 free radical인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 제거활성에 미치는 프로폴리스 물추출물 및 물추출물의 유기용매 분획물의 활성을 Fig. 1에 제시하였다. 프로폴리스 물추출물은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 검액의 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 제거효과를 나타내었다. 이어 프로폴리스 물추출물의 유기용매 분획물에서는 에텔 및 에칠아세테이트 분획물에서 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 90% 이상 강한 라디칼 소거활성을 보였고 부탄을 분획물에서는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 강한 소거활성을 관찰할 수 있었다. 특히 에텔 및 에칠아세테이트 분획물 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 양성비교약물 sodium ascorbate 보다 약 10배 강한 라디칼 소거활성이 인정되었다. 반면에 유기용매 분획의 잔류물에서는 별다른 영향을 미치지 못하였다.

과산화 지질 형성 억제효과(TBA법)

프로폴리스 물추출물 및 유기용매 분획물이 혈쥐의 간질화물에 대한 지질과산화물 형성 억제활성에 미치는 결과를 Fig. 2에 제시하였다. 물추출물 10.0 mg/ml 에서 약 20% 정도의 지질과산화물 형성 억제효과를 나타내었다. 그리고, 물추출물의 유기용매 분획물 중에서 에텔 및 에칠아세테이트 분획물에서는 검액 1.0 mg/ml , 5.0 mg/ml 및 10.0 mg/ml 의 각 농도에서 용량의존적인 지질과산화물 형성 억제효과를 관찰할 수 있었으며 이러한 효과는 양성 대조 약물인 sodium ascorbate보다는 다소 멀어지는 실험결과를 얻었다.

Hyaluronidase 효소활성 억제효과

Hyaluronidase 효소활성에 대한 프로폴리스 물추출물 및

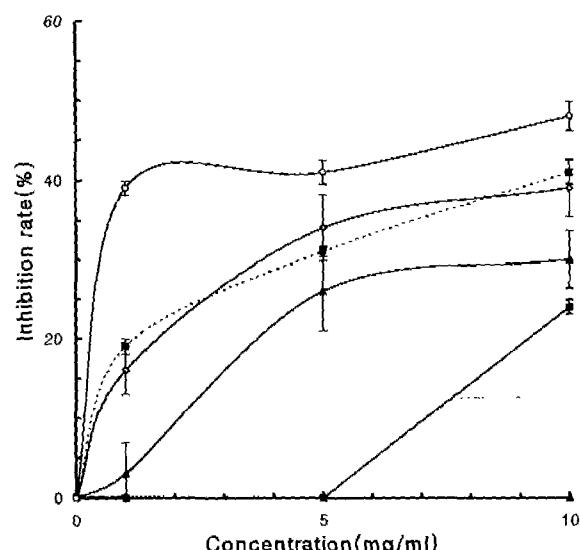


Fig. 2. Effects of water extract of propolis and its fractions on TBA-RS formation in rat liver homogenate *in vitro*. ■: water extract, ▨: ether fraction, ◇: ethylacetate fraction, ▲: n-BuOH fraction, ▨: residual water fraction, ○: sodium ascorbate. Each value represents mean \pm S.D.

Table I. Inhibitory effects of water extract of propolis and its fractions on the hyaluronidase activity

Groups	Concentration (mg/ml)	Inhibition (%)
Control	-	-
Water extract	1	-
Water extract	10	1
Ether fraction	1	3
Ether fraction	10	51
Ethylacetate fraction	1	4
Ethylacetate fraction	10	25
n-BuOH fraction	1	2
n-BuOH fraction	10	17
Residual H ₂ O layer	1	-
Residual H ₂ O layer	10	-
Indomethacin	5 mM	86

Results are presented as mean value of triplicate experiments

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Control O.D} - \text{Sample O.D}}{\text{Control O.D}} \times 100$$

유기용매 분획물에 대한 저해활성을 Table I에 제시하였다. 프로폴리스 물추출물에서는 별다른 저해활성을 나타내지 못하였으나 에텔 분획물에서는 10 mg/ml에서 51%의 현저한 hyaluronidase 저해활성을 나타내었고, 에칠아세테이트 분획물에서는 25%, 부탄을 분획물에서는 17%의 저해활성을 나타내었다. 반면에 물층에서는 hyaluronidase 저해활성에 대한 저해효과는 관찰되지 않았다.

사염화탄소 유발 간독성에 미치는 효과

사염화탄소를 흰쥐에 투여하여 유발시킨 간장해에 대한 프로폴리스 물추출물의 간보호효과를 혈청중의 transaminase 및 lactic dehydrogenase(LDH)효소활성도를 지표로하여 검토하였다. 혈청중 GOT 및 GPT 효소활성도는 사염화탄소 처치 대조군은 비처치 정상군에 비하여 각각 유의한 상승을 나타내었으며, 혈청중의 GOT 활성은 프로폴리스 100 mg/kg 및 300 mg/kg 투여군에서 각각 1253±441 Karmen unit와 1206±811 Karmen unit로 대조군에 비하여 p<0.05의 유의성이 있는 상승억제효과가 인정되었고, 양성비교약물로 사용한 silymarin 100 mg/kg 투여군에서도 p<0.05의 유의한 상승억제효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

혈청중 GPT 효소활성도에 대하여 검색 프로폴리스 100 mg/kg 및 300 mg/kg 투여군에서 각각 640±37 Karmen unit와 680±91 Karmen unit로 대조군에 비하여 p<0.001의 유의성이 있는 상승억제효과를 관찰할 수 있었으며 양성대조약물 silymarin 100 mg/kg 투여군에서도 740±203 Karmen unit로 p<0.05의 유의한 상승억제효과를 나타내었다.

또다른 간장해의 지표인 혈청중 LDH 효소활성도에 대하여 사염화탄소 처치 대조군은 비처치 정상군에 비하여 유의한 상승효과를 나타내었으며 프로폴리스 물추출물 300

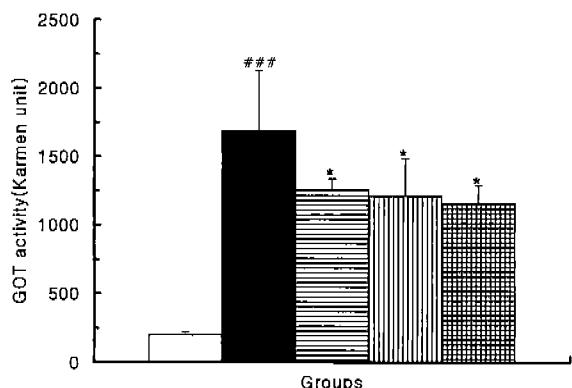


Fig. 3. Hepatoprotective effects of water extract of propolis and its fractions on serum transaminase(GOT) activities in CCl₄-induced experimental liver injury rats. □: normal group, ■: control group, ▨: sample 100 mg/kg, ▨: sample 300 mg/kg, ■: silymarin 100 mg/kg. Each value represents mean±S.D. #: Statistically significant compared with normal data (###: p<0.001). *: Statistically significant compared with control data (*: p<0.05).

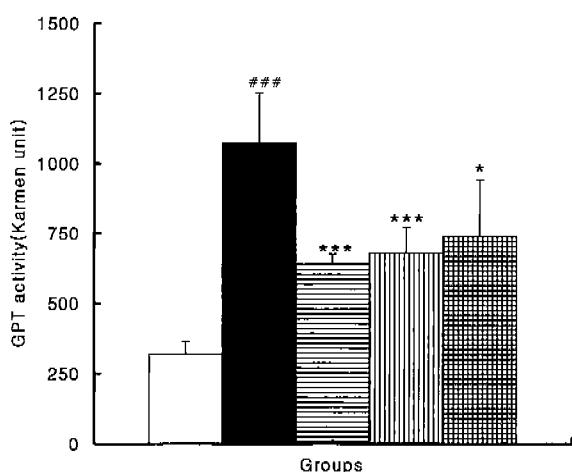


Fig. 4. Hepatoprotective effects of water extract of propolis and its fractions on serum transaminase (GPT) activities in CCl₄-induced experimental liver injury rats. □: normal group, ■: control group, ▨: sample 100 mg/kg, ▨: sample 300 mg/kg, ■: silymarin 100 mg/kg. Each value represents mean±S.D. #: Statistically significant compared with normal data (###: p<0.001). *: Statistically significant compared with control data (*: p<0.05 and ***: p<0.001).

mg/kg 투여군에서 5266±499 Wroblewski unit로 대조군에 비하여 p<0.001의 유의한 상승억제효과를 나타내었고, 100 mg/kg 처치군에서는 6700±659 Wroblewski unit로 대조군에 비하여 억제시키는 경향을 보이나 유의차는 없었다. 양성비교약물 silymarin 100 mg/kg 투여군의 혈청중 LDH효소활성도는 4080±1127 Wroblewski unit로 대조군에 비하여 유의성이 있는 상승억제효과를 나타내었다(Fig. 5).

암세포(Sarcoma 180) 이식 생쥐에서의 항암효과

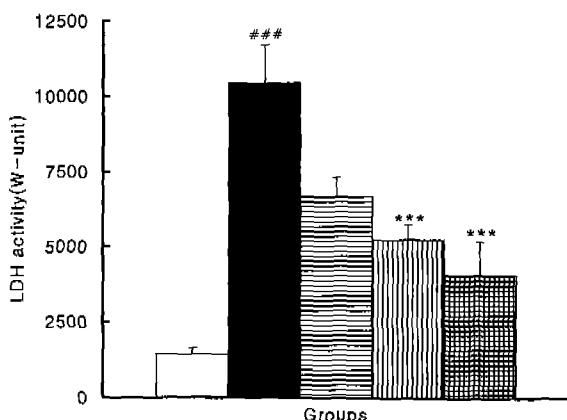


Fig. 5. Hepatoprotective effects of water extract of propolis and its fractions on serum lactidehydrogenase (LDH) activities in CCl₄-induced experimental liver injury rats. □: normal group, ■: control group, ▨: sample 100 mg/kg, ▨: sample 300 mg/kg, ▨: silymarin 100 mg/kg. Each value represents mean \pm S.D. #: Statistically significant compared with normal data (###: p<0.001). *: Statistically significant compared with control data (***: p<0.001).

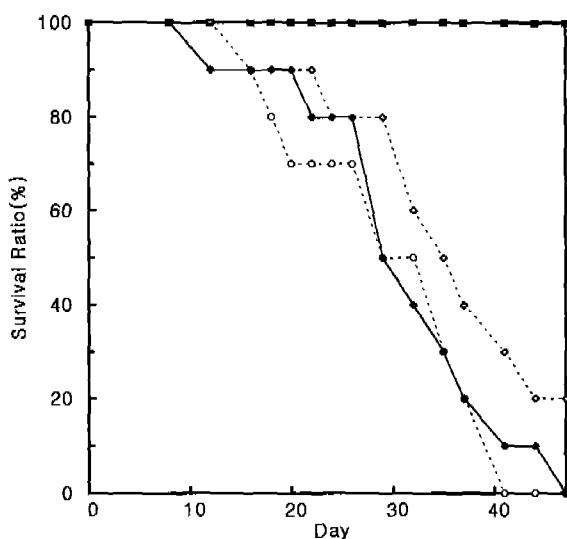


Fig. 6. Effects of water extract of propolis on sarcoma 180 ascites tumor in mice. —■—: normal group, -○-: control group, -◇-: sample 100 mg/kg, —◆—: sample 300 mg/kg.

Sarcoma 180 암세포를 이식하여 생성된 생쥐 복수암에 대한 검체 프로폴리스 물추출물을 투여시 생쥐의 생존기간 및 연명률에 미치는 효과를 Fig. 6 및 Table II에 제시하였다. Fig. 6에 나타낸 바와 같이 sarcoma 180 암세포를 이식하고 생리식염수만을 투여한 대조군에 비하여 프로폴리스 물추출물 300 mg/kg을 1일 1회 3주간 경구투여한 실험군에서는 현저한 생쥐의 생존률을 보여 주었으며 암세포 이식 42일째의 생존률은 30%를 나타내었고 검액 100 mg/kg 투여군에서는 10%의 생존률을 보여 주었다. 따라서, 생존

Table II. Effects of water extract of propolis and its fraction on sarcoma 180 ascites tumor in mice

Groups	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	MST (days)	ILS (%)
Control	-	10	30.1	-
Sample I	100	10	31.0	3.0
Sample II	300	10	35.5	17.9

MST: Medium survival time.

ILS (Increase in MST over Control) = (T/C-1) × 100.

(T: MST of Sample group, C: MST of Control group)

일수의 중앙치(MST)는 생리식염수만을 투여한 대조군에서는 각각 30.1일 이었으나 프로폴리스 300 mg/kg 투여군에서는 35.5일로 대조군에 비하여 17.9%의 현저한 연명률의 상승을 관찰할 수 있었다(Table II).

고 칠

프로폴리스는 벌집으로부터 얻어지는 황갈색의 호지성 물질의 혼합물로 유럽이나 브라질 등에서 민간약으로 널리 이용되고 있으나 동양의 전통의학에서는 프로폴리스는 사용되지 않았으나 벌집이나 꿀 등은 약용으로 사용하였다. 프로폴리스의 유효성에 관하여 근래에 이르러 생물학적 및 약물학적으로 연구가 진행되어 항균작용, 항바이러스작용, 항염증작용, 항암작용 등이 있음이 밝혀지고 있다 (Wanscher, 1976; Havsteen, 1983; Dobrowolski 등, 1991; Frenkel 등, 1993; Pascual 등, 1994; Tatefuji 등, 1996; Lin 등, 1997; Miyataka 등, 1997).

프로폴리스에는 cinnamic acid, benzoic acid 및 ester, phenolic acid 및 그 유도체와 ester, flavonoid, wax, caffeic acid phenethyl ester 등 약 150여종의 화합물이 함유되어 있으며, caffeic acid phenyl ester는 항암작용, 항바이러스작용 및 항산화작용이 있음이 밝혀졌다(Frenkel 등, 1993; Chinthalachalapally 등, 1993). 이들 화합물의 대부분은 비극성 물질로 알코올 등 유기용매에 잘 용출되므로 지금까지는 주로 알코올로 추출한 프로폴리스 알코올 추출물을 이용하고 있다. 그러나 알코올의 자극적인 맛 때문에 노인이나 어린이 등이 복용하기가 어렵고, 알코올 자체에도 독성을 갖고 있을 뿐만아니라 물에 용해되기 어려운 수지나 납(wax)이 다량으로 추출되는 등 제제화에 어렵다고 하는 단점을 갖고 있다.

프로폴리스에 관한 많은 연구는 주로 프로폴리스 알코올 추출물을 대상으로 하여 왔으나 근래에 와서 인체에 가장 친근한 물을 용매로 한 물추출물에도 생리활성이 있음이 밝혀지고 있다. 프로폴리스 물추출물에도 면역조절작용이나 감염 억제작용이 있고, 특히 물추출물중에 함유되어 있

는 dicaffeoyl quinic acid 유도체들이 *in vivo* 및 *in vitro*에서 사염화탄소에 의한 화학적 유발 간독성 및 LPS 등에 의한 면역학적 유발 간독성에 대하여 기존의 glycyrrhizin보다 강한 간보호효과가 있음을 보고하였다(Basnet 등, 1996).

따라서, 프로폴리스 물추출물의 효능을 추구하고 생리활성 물질을 추구하고자 실험부에 기술한 방법에 따라 물추출물을 유기용매로 순차적으로 분획한 유기용매 분획물을 검체로 하였다. 각 검체의 DPPH radical 소거작용, 지질과산화 형성 억제활성, hyaluronidase효소 저해활성, 사염화탄소 유발 간장보호작용 및 항암작용 등을 *in vitro* 및 *in vivo*계에서 실시하였다.

우선 프로폴리스 물추출물 및 유기용매 분획물의 효능을 추구하고자 비교적 안정한 free radical인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 소거활성, 지질과산화 형성 억제활성 및 염증과 밀접히 관련이 있는 hyaluronidase효소 저해활성을 비교 고찰하였다.

근래에 이르러 각종 질환의 병인으로서 활성산소나 free radical이 고려되어지고 있으며 한방약물중에는 이를 free radical에 대한 소거작용이나 생성억제작용을 갖고 있다고 하는 연구가 있으며(Egashira 등, 1992), 본 실험에서는 free radical인 DPPH를 사용하여 DPPH에 의하여 발색되는 자색을 퇴색시키는 정도를 지표로하여 측정한 바 프로폴리스 물추출물은 저농도에서도 강한 라디칼 소거활성이 인정되었다. 그리고 물추출물의 유기용매 분획물에서는 에텔 및 에칠아세테이트 분획물 5 µg/ml의 농도에서 강한 DPPH free radical 소거활성을 나타내었으며 양성비교약물로 사용한 sodium ascorbate 보다도 양호한 DPPH free radical 소거활성이 인정되었다.

지질과산화는 다가불포화지방을 많이 함유하는 지질로 구성되어져 있는 생체막에서 일어나기 쉬운 반응이며 지질과산화반응은 생체막 기능장해를 초래하여 생체에 부반응으로서 각종 성인병이나 노화 등과 관련하여 중요한 요인으로 대두되고 있다(Fujita 등, 1992; 秦哉 등, 1978). 따라서, 알코올을 투여한 흰쥐의 간 균질화물의 과산화된 지질성분에서 TBA-reactive substance를 유리시켜 TBA와 반응적색색소를 생성시켜 이 색소를 정량함으로써 지질의 과산화정도를 측정하여 비교하였다(Kikugawa 등, 1993). 프로폴리스 물추출물이 알코올 처치로 유발된 지질과산화형성을 검액의 농도의 준적으로 저해시킴이 인정되었고, 용매분획추출물인 에텔 및 에칠아세테이트 분획에서도 각각 현저한 지질과산화물 형성억제효과가 인정되었다. Pascual 등(1994)은 프로폴리스의 에탄올 추출물에서 유리산소기 소거활성이 있어 항산화효과가 있음을 보고한 바 있으며, 또한 flavonoid류가 항산화활성을 나타낸다고 하는 것이 밝혀졌다(Ratty 등, 1988; Rekka 등, 1991). 따라서, 프로폴리스 물추출물의 항산화활성은 물추출시 이행되는 polyphenol성

물질에 기인하는 것으로 생각되며 앞으로 계속 추구하고자 한다.

프로폴리스의 알코올 추출물이 임상에서 접촉성 피부염 등 염증성 질환에 유효한 효과가 있음을 보고한 바 있고(Wascher, 1976), 항염증작용이 있음을 보고하고 있어(Dobrowolski 등, 1991), 프로폴리스 물추출물의 항염증활성 물질을 추구하고자 hyaluronidase 저해활성 유기용매분획물의 항염증활성의 지표로 하였다. Hyaluronidase는 mucopolysaccharide-splitting enzyme의 하나로서 모세혈관 투과성에 관여하고, 간염, 치주염 등의 염증부위에서 활성이 증가하고 급성부종을 일으키며, chemical mediator의 유리에도 관여하는 등 염증에 관여하는 효소로 알려져 있다(Goldberg 등, 1991). 또한 최근에는 천연물로부터 항염증제 개발을 위한 screening법으로도 이용되고 있다(Pascal 등, 1994; Kim 등, 1995). 프로폴리스 물추출물에서는 별다른 hyaluronidase효소 저해활성을 보이지 않았으나, 에텔 분획물 50 mg/ml에서 약 51%의 저해활성이 인정되어 항염증활성 물질은 주로 에텔분획으로 이행됨을 알 수 있었다. Dobrowolski 등(1991)은 프로폴리스를 비롯한 각종의 bee products는 formaldehyde 유발 관절염이나 carrageenan 유발 부종등에 억제효과가 있음을 밝힌 바 있으며, Miyataka 등(1997)은 프로폴리스 에탄올 추출물이 hyaluronidase 저해활성이 있음을 밝힌 바 있어 앞으로 hyaluronidase 저해활성을 나타내는 에텔 분획물로부터 항염증활성물질을 분리하고자 한다.

사염화탄소는 생체내에서 Cytochrome P-450에 의해 free radical로 대사되어 생체막의 지질과산화 반응을 촉진시켜 간에서 단백질 합성의 억제, 간 ATP양의 감소, 혈중 GOT, GPT 등의 일탈을 일으켜 혈중의 transaminase효소활성이 증가하고 간세포의 지방변성 및 괴사 등을 촉진하여 간장해를 유발한다고 알려져 있다(McCay 등, 1984; Recknagel, 1967). 따라서, 사염화탄소로 유발된 간장해 흰쥐에서 간장해 지표로써 측정한 대조군의 혈청중 GOT, GPT 및 lactic dehydrogenase 효소활성의 유의한 상승에 비하여 프로폴리스 물추출물 처치로 효소활성의 유의한 상승억제효과를 나타내어 간보호효과가 있음이 인정되었다.

프로폴리스에 함유된 성분중에서 caffeic acid phenethyl ester가 tumor promoter 및 azoxymethane 등의 발암 물질에 의해 유발된 각종의 암에 억제 효과를 나타내었음이 보고된 바 있어(Frenkel 등, 1993; Chinthalapally 등, 1993), 프로폴리스 물추출물의 항암활성을 검토하기 위하여 복수암 병태모델인 sarcoma 180 담암 생쥐에 있어서 생존률과 연명률을 관찰하였다. 프로폴리스 300 mg/kg을 1일 1회, 1주 5일, 3주간 연속투여한 실험군에서는 sarcoma 180 암세포 처치 42일에서 생존율이 30%로 매우 높은 생존율을 나타내며 연명률 역시 대조군에 비하여 17.9%로 프로폴리스 물

추출물 처치료 항암효과가 인정되었다.

이상의 실험 결과로 미루어 볼 때 프로폴리스 물추출물은 DPPH radical 소거활성 및 지질파산화물 형성억제효과로 미루어 보아 항산화효과가 있음이 인정되었다. 또한, 사염화탄소로 유발된 간장해에 대한 보호효과 및 sarcoma 180 담암 생쥐에서 현저한 연명률을 나타내어 항암효과를 기대할 수 있을 것으로 생각되며, 특히 *in vitro*계 실험에서 유기용매 분획물중에서 보다 현저한 활성을 보인 에텔분획물에 대하여 유효성분을 규명하고자 한다.

감사의 말씀

본 연구에 필요한 시료 프로폴리스 물추출물의 동결건조물을 제공해준 강원양봉 축산업협동조합 및 (주)세원무약 이강호 사장님께 감사드립니다.

참고문헌

- Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S. and Namba, T. (1996). Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. *Biol. Pharm. Bull.* **19**(4), 655-657.
- Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S. and Namba, T. (1996). Four Di-O-caffeooyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biol. Pharm. Bull.* **19**(11), 1479-1484.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **181**, 1199-1200.
- Chinthalapally, V. R., D. Dhimant, R. Abraham, S. Barbara, A. Shantu, and S. R. Bandaru (1993). Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res.* **53**(18), 4182-4188.
- Dobrowolski, J. W., Vohora, S. B., Sharma, K., Shah, S. A., Naqvi, S. A. H. and Dandiya, P. C. (1991). Antibacterial, antifungal, antimoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol.* **35**(1), 77-82.
- Egashira, T., Wada, Y., Takayama, F., Kudo, Y., Kono, T., Goto, S. and Yamanaka, Y. (1992). Effects of Gomishi and Shosaiko-to on lipid peroxidation of rat brain. *Folia pharmcol. japon.* **100**, 345-351.
- Frenkel, K., Wei, H., Bhimani, R., Ye, J., Zadunaisky, J. A., Huang, M., Ferraro, T., Conney, A. H. and Grunberger, D. (1993). Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res.* **53**(6), 1255-1261.
- Fujita, T. and Fujimoto, Y. (1992). Formation and removal of active oxygen species and lipid peroxides in biological systems. *Folia pharmcol. japon.* **99**, 381-389.
- Goldberg, R. L., Huff, J. P., Lenz, M. E., Glickman, P., Katz, R. and Thonar, E. J.-M. A. (1991). Elevated plasma levels of hyaluronate in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arth. Rheum.* **34**, 799-807.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*. **32**, 1141-1148.
- Kikugawa, K. and Kosugi, H. (1993). Detection and quantitative determination of lipid peroxidation in living bodies- Thiobarbituric acid-. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*. **39** (1), 1-99.
- Kim, Y. S., Noh, Y. K., Lee, G. I., Kim, Y. K., Lee, K. S. and Min, K. R. (1995). Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor. J. Pharmcogn.*, **26**(3), 265-272.
- Lin, S., Lin, Y., Chen, C., Chung, C. and Hsu, S. (1997). The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chronic alcohol-induced liver injuries. *Am. J. Chin. Med.* **25**(3), 325-332.
- Maeda, S., Sudo, K., Miyamoto, Y., Takeda, S., Shinbo., M., Aburada, M., Ikeya, Y., Taguchi, H. and Harada, M. (1982). Pharmacological studies on Schizandra Fruits. II. Effects of constituents of Schizandra Fructus on drugs induced hepatic damage in rats. *Yakugaku Zasshi*. **102**(6), 579-588.
- McCay, P. B., Lai, E. K., Poyer, J. L., DuBose, C. M. and Jansen, E. G. (1984). Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. *J. Biol. Chem.* **259**, 2135-2143.
- Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M. and Satoh, T. (1997). Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol. Pharm. Bull.* **20**(5), 496-501.
- Pascual, C., Gonzalez, R. and Torricella, R. G. (1994). Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J. Ethnopharmacol.* **41**, 9-13.
- Recknagel, R. O. (1967). Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **4**, 145-208.
- Ratty, A. K. and Das, N. P. (1988). Effect of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*. **39**, 69-79.
- Reitman, S. and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Path.* **28**, 56-60.
- Rekka, E. and Koukounakis, P. N. (1991). Effect of hydroxyethyl rutosides and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. Some structural aspects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **43**, 486-491.
- Tatefuiji, T., Izumi, N., Ohta T., Arai, S., Ikeda, M. and Kuroimoto M. (1996). Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol. Pharm. Bull.* **19**(7), 966-970.
- Uchiyama, M. and Mihara, M. (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **86**, 271-278.
- Walker, P. and Crane, F. (1987). Constituents of propolis. *Apidologie*. **18**, 327-334.
- Wanscher, B. (1976). Contact dermatitis from propolis. *Br. J. Dermatol.* **94**(4), 451-455.

Wroblewski, F. and LaDue J. S. (1955). Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **90**, 210-213.
赤松金芳 (1980). 新丁和漢藥. 醫齒藥出版株式會社, 東京, pp. 935-940.
秦哉, 相原和南, 宮崎和枝 (1978). 動脈硬化と過酸化脂質に関する研究 1. 血清過酸化脂質の臨床的指標として検討. *日老醫會誌*. **15**, 192-200.
김남재, 홍남두, 김종우, 조종관, 김진식, 백승학 (1991). 생약

복합제제와 항암제의 병용투여에 관한 연구(제 1보). 가미
삼령백출산과 cis-Platin 병용투여에 의한 부작용 경감효과.
생약학회지. **22**(3), 197-206.
동의학연구소 편저(1994). 동물성 동약. 여강출판사, 서울,
pp. 175-190.
최혁재, 김남재, 김종우, 홍남두. (1997). 마디풀(*Polygonum aviculare* L.) 성분의 지질파산화억제 및 간보호에 미치는
효과. *생약학회지*. **28**(3), 117-123.