



광주과학기술원

(주)씨엠바이오 연구위탁 과제 보고서

2018. 12. 18.

광주과학기술원 생명과학부
남 정 석

목 차

보고서 요약	1
1. 실험제목	2
2. 실험목적	2
3. 실험기간	2
4. 실험재료 및 방법	2
가. 시험계	2
나. 세포주	2
다. 실험방법	2
1) 시험군의 구성	2
2) 시험물질	3
3) 시험물질 투여	3
4) 실험계획	4
5) 종양측정	4
6) 체중측정	4
7) 통계처리	4
5. 실험결과	5
가. 일반 임상증상 관찰 및 체중측정	5
나. 종양 크기 측정	5
다. 부검	7
6. 실험요약	8

실험 보고서

□ 보고서 작성

소 속 (직위)	성 명	확 인	날 짜
실험동물자원센터 (전임수의사)	김지영	김 지 영 (서명)	2018. 12. 18.
생명과학부 (실험동물자원센터장)	남정석	남 정 석 (서명)	2018. 12. 18.

□ 실험수행 기관

기관명	소재지	전화
광주과학기술원 생명과학부 (실험동물자원센터)	광주시 북구 첨단과기로123	062-715-5592

□ 실험의뢰 기관

기관명	소재지	전화
(주)씨엠바이오	전남 나주시 동수농공단지길 62-8, 303호 (천연색소산업화지원센터)	010-6658-0094

□ 실험 수행자

성명	소속	업무	확인
최장현	광주과학기술원 생명과학부	동물실험 수행	(서명)
이효진	광주과학기술원 실험동물자원센터	실험동물 사육관리	(서명)
김지영	광주과학기술원 실험동물자원센터	실험 설계 및 보고서 작성	(서명)

보고서 요약

실험제목	엽록소 추출물의 항암효능에 대한 동물실험
실험목적	대장암 동물모델에서 엽록소 추출물 경구 투여에 따른 항암 효능을 평가함.
실험기간	2018년 11월 1일 ~ 2018년 12월 31일 (2개월)
수행기관	광주과학기술원 생명과학부 (실험동물자원센터)
의뢰기관	(주)씨엠바이오
실험내용	<p>○ 대장암 동물모델 제작</p> <p>- CT26 (<i>Mus musculus</i> colon carcinoma cells) 세포를 Balb/c 마우스 피하에 이식하여 대장암 Syngeneic 동물 모델을 제작함.</p> <p>○ 엽록소 추출물 투여</p> <p>- 종양의 크기가 약 100mm³ 도달하면 엽록소 추출물 (200mg/kg, 400mg/kg)을 5회/주 경구 투여하여 종양의 성장에 미치는 영향을 평가함.</p> <p>○ 측정 항목</p> <p>- 주 1회 체중측정</p> <p>- Digital calipers를 이용하여 주 2회 종양 크기 측정</p> <p>- <i>In vivo</i> image 장비 (Lumina II, PerkinElmer)를 이용하여 종양의 크기를 정량하여 측정함.</p> <p>- 매일 임상증상 관찰을 통한 엽록소 추출물의 독성유무를 확인함.</p>

1. 실험제목

엽록소 추출물의 항암효능에 대한 동물실험

2. 실험목적

대장암 동물모델에서 엽록소 추출물 경구 투여에 따른 항암효능을 평가함.

3. 실험기간

2018년 11월 1일 ~ 2018년 12월 31일 (2개월)

4. 실험재료 및 방법

가. 시험계

- 실험동물로는 5주령의 수컷 Balb/c 마우스 (오리엔트바이오) 구매하여 사용하였음. 본 시험동물은 미국 NTP (National Toxicology Program)의 권장 시험계이며, 암 연구에 널리 사용되고 있는 마우스 종임.
- 동물 입수시 광주과학기술원 실험동물자원센터의 SOP (Standard Operation Procedure)에 의거 검수·검역을 실시하였고, 입수 후 사육실에서 1주간의 순화기간을 거쳐 건강한 개체만 시험에 사용하였음.
- 사육실 및 실험실의 환경은 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 10\%$, 조도 150 ~ 300 Lux, 소음 60dB 이하, 취기 (암모니아가스) 20ppm 이하, 조명 12시간 (07:00 점등 ~ 19:00 소등), 환기횟수 12 ~ 20회로 설정된 229호 사육실의 개별환기케이지 (IVC, Techniplast)에서 사육되었음.

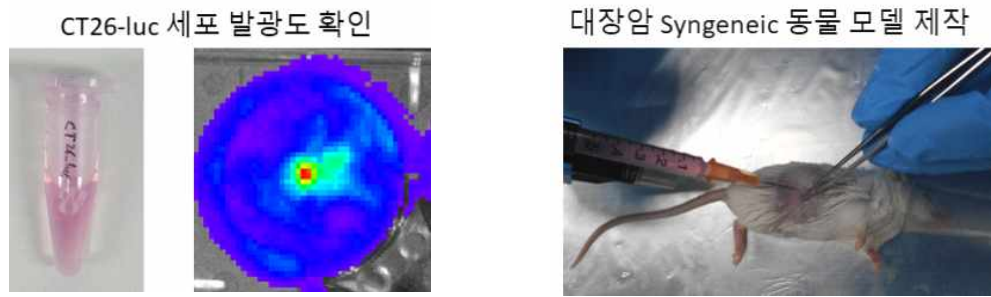
나. 세포주

- 대장암 동물모델 제작을 위하여 한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)으로부터 마우스 유래의 colon carcinoma 세포인 CT26 세포 (KCLB No. 80009)를 구매하였음.

다. 실험방법

1) 시험군의 구성

- 대장암 세포 (CT26-luc cells)를 수컷 Balb/c 마우스 오른쪽 옆구리 피하에 이식한 후 종양의 크기가 100mm^3 도달시 마우스를 임의적으로 대조군 (용매 투여군)과 저농도 엽록소 투여군 (200mg/kg), 고농도 엽록소 투여군 (400mg/kg)으로 시험군을 분리하였음 (그림 1).



< 그림 1. 대장암 세포 (CT26-luc) 준비 및 이식 >

2) 시험물질

- 엽록소 추출물 (Chlorophyll, ㈜씨엠바이오) 분말을 용매 (DW, Distilled water)에 녹여 저농도 (200mg/kg) 및 고농도 (400mg/kg)로 제조하였음 (그림 2).

200mg/kg 엽록소 추출물



400mg/kg 엽록소 추출물



< 그림 2. 시험물질 제조 >

3) 시험물질 투여

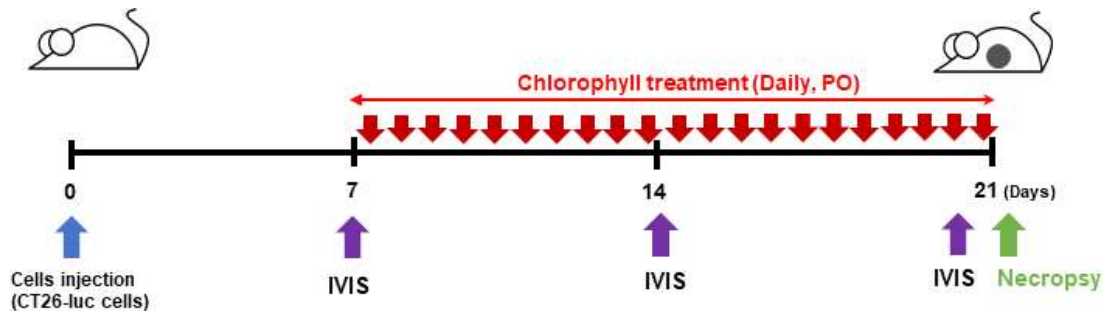
- 종양의 평균 크기가 100mm³ 도달시 임의적으로 3그룹 (1) 용매투여군, (2) 저농도 투여군 (200mg/kg), (3) 고농도 투여군 (400mg/kg)으로 나눈 후, 주 5일 경구 투여 하였음 (그림 3).



< 그림 3. 경구 투여 모습 >

4) 실험계획

- 대장암세포 (CT26-luc 세포) 이식 7일 후, 종양의 평균 크기가 약 110mm^3 에 도달하여 엽록소 추출물 (Chlorophyll)을 저농도와 고농도 투여군으로 임의적으로 분류하였음 (군당 7마리).
- 종양의 크기 변화를 정량화하기 위하여 디지털 캘리퍼 (Digital caliper)를 이용하여 주 2회 종양의 크기를 측정하였고, In vivo imaging 장비 (Lumina II, PerkinElmer)를 이용하여 주 1회 종양세포에서의 발광 정도 (Luminescence intensity)를 확인하였음 (그림 4).



< 그림 4. 실험 세부 계획 >

5) 종양 측정

- 종양의 크기는 Digital caliper (Fisher Scientific)를 이용하여 주 2회 측정하였음.
- 종양의 부피 계산은 아래 공식을 이용하였음.

$$\text{종양 부피} = (\text{단축}^2 \times \text{장축}) / 2$$

- 종양의 크기를 시각적으로 정량하기 위하여 CT26 세포에 luciferase를 태깅한 후, In vivo Imaging 장비인 Lumina II (PerkinElmer)를 이용하여 종양에서 발현되는 발광 시그널 (Luminescence signal)을 확인하였음.

6) 체중 측정

- 모든 동물에 대하여 매일 매일 1회 외관적 이상 및 임상 증상을 관찰하고, 1주일에 1회 체중을 측정하였음.

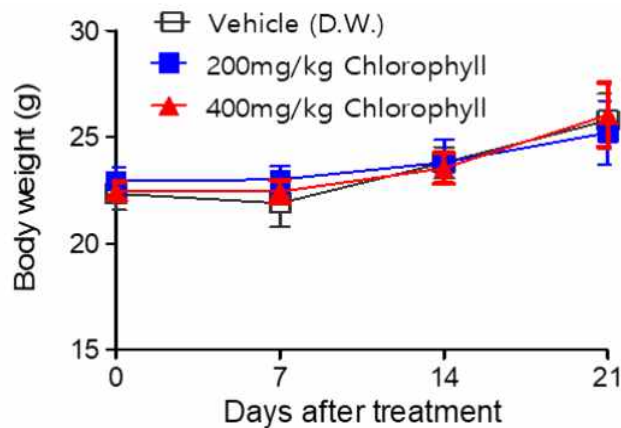
7) 통계처리

시험에서 얻은 측정치들은 Student *t*-test 분석을 실행하여 군 간의 통계학적 유의성을 검정하였음. $p < 0.05$ 이하시 “*”, $p < 0.01$ 이하시 “**”, $p < 0.001$ 이하시 “***” 표기하였음.

5. 실험결과

가. 일반 임상증상 관찰 및 체중 측정

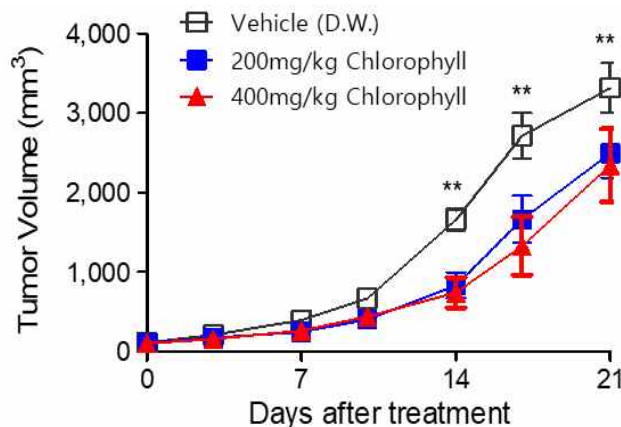
- 대장암 세포 (CT26-luc cells)를 투여한 모든 마우스에 대하여 매일 1회 사망 동물 및 이상 징후의 발생여부와 그 정도를 관찰하였음.
- 매주 1회 모든 마우스에 대하여 체중변화를 측정한 결과, 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았음 (그림 5).



< 그림 5. 체중 변화 그래프 >

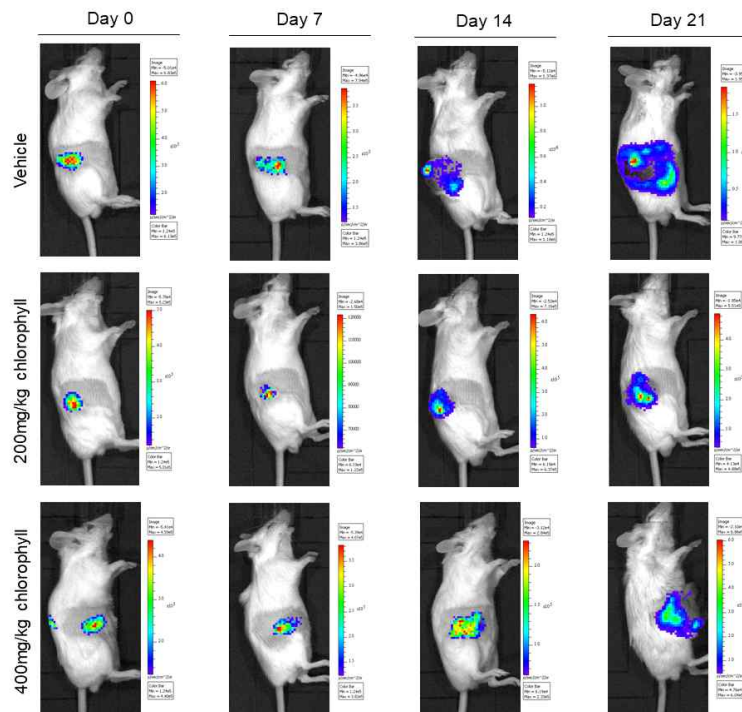
나. 종양 크기 측정

- Digital calipers를 이용하여 주 2회 종양크기를 측정한 결과, 엽록소 추출물 투여 14일째부터 대조군 (용매투여군) 대비 엽록소 투여군에서 종양의 크기가 통계학적으로 유의하게 감소 ($**P < 0.01$)되는 것을 확인하였음. 그러나, 200mg/kg 엽록소 투여군과 400mg/kg 엽록소 투여군 간의 유의성은 관찰되지 않았음. 엽록소 추출물 투여 21일째 평균 종양의 크기는 대조군 약 $3,315.67\text{mm}^3$, 200mg/kg 엽록소 투여군 약 $2,498.25\text{mm}^3$, 400mg/kg 엽록소 투여군 약 $2,343.45\text{mm}^3$ 에 이르렀음 (그림 6).

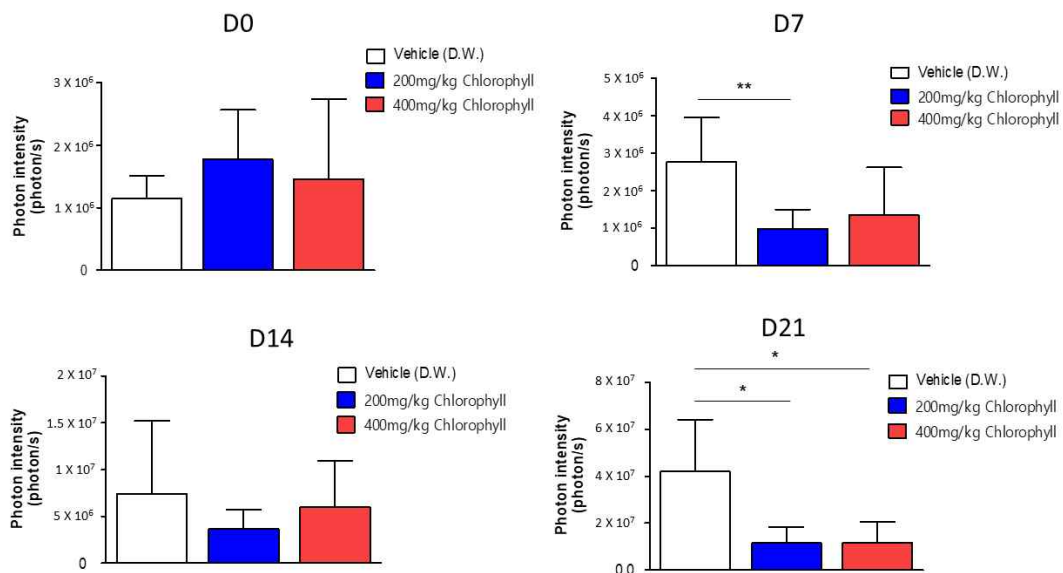


< 그림 6. 종양크기 변화 그래프 >

- *In vivo* imaging 장비 (Lumina II, PerkinElmer)를 이용하여 종양에서 발현되는 발광 시그널 (Luminescence intensity)을 주 1회 측정하였음. 그 결과, 엽록소 추출물 투여 7일째 대조군 대비 200mg/kg 엽록소 투여군의 종양세포에서 발현되는 발광 시그널이 감소 ($P < 0.01$) 되었고, 투여 21일째 대조군 대비 200mg/kg 엽록소 투여군과 400mg/kg 엽록소 투여군에서의 발광 시그널이 유의하게 감소 ($P < 0.05$) 되는 것이 관찰 되었음(그림 7, 그림 8).



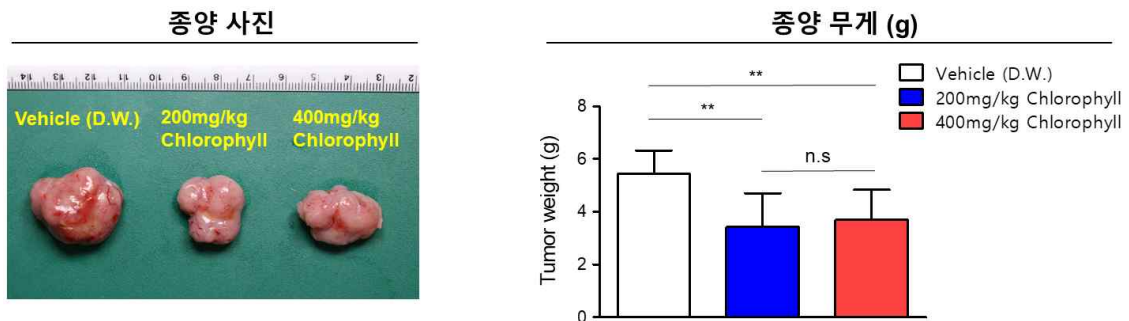
< 그림 7. *In vivo* imaging 장비를 이용한 종양 크기 측정 >



< 그림 8. 엽록소 추출물 투여에 따른 종양에서의 발광 (Luminescence) 변화 그래프 >

다. 부검

- 엽록소 추출물 투여 21일째 모든 마우스를 대상으로 부검을 실시하여, 종양을 적출하였음. 적출한 모든 종양은 사진 촬영과 무게를 측정한 후 조직병리학적 분석을 위하여 10% 중성포르말린 용액에 담아 보관함.
- 종양의 무게 측정 결과, 대조군 (D.W. 투여) 평균 5.444g 이었으며, 200mg/kg 엽록소 투여군 평균 3.422g, 400mg/kg 엽록소 투여군 평균 3.6874g 이었음. 대조군에 비해 엽록소 추출물 투여군 (저농도와 고농도)의 종양 무게는 통계학적으로 유의하게 감소 ($P < 0.01$)하였으나, 저농도 엽록소 투여군과 고농도 엽록소 투여군의 종양 무게에서는 통계학적 유의성이 관찰 되지 않았음 (n.s) (그림 9).



< 그림 9. *In vivo* imaging 장비를 이용한 종양 크기 측정 >

6. 실험요약

- 가. 본 연구과제는 대장암 동물모델에서 엽록소 추출물의 항암효능을 평가하였음. CT26-luc 세포를 수컷 Balb/c 마우스 피하조직에 이식한 후 엽록소 추출물을 200mg/kg, 400mg/kg 농도로 경구 투여 (5회/주)하여 종양세포의 증식에 미치는 영향을 평가하였음.
- 나. 종양의 크기는 Digital caliper와 In vivo imaging 장비 (PerkinElmer)를 이용하여 각각 측정하였음. 종양 측정 결과, 엽록소 추출물 투여 14주부터 대조군에 비하여 엽록소 추출물 투여군에서의 종양의 크기가 통계적으로 유의하게 감소 ($P < 0.01$ 되는 것을 관찰하였음. 그러나, 엽록소 추출물 투여군 간의 종양크기는 통계학적 유의성이 관찰되지는 않았음.
- 다. 엽록소 추출물 투여 기간 중 매일 임상증상을 관찰한 결과, 체중 감소와 같은 독성은 나타나지 않았으며, 실험 종료 시 주요장기 (간, 신장, 폐, 심장, 비장 등)에 대하여 H&E 조직염색을 실시한 결과, 엽록소 추출물에 의한 것이라고 사료되는 이상 소견은 관찰되지 않았음.
- 라. 본 연구 과제를 통하여 엽록소 추출물은 대장암 동물모델에서 종양세포의 증식을 효율적으로 억제시키는 것을 확인하였으나, 엽록소 추출물의 정확한 항암효능을 규명하기 위해서는 추가적인 분자생물학적 기전 규명에 대한 연구가 필요할 것으로 사료됨.