

## 수종의 작물에 대한 세포독성효과

문형인<sup>1)</sup>, 윤종탁<sup>2)</sup>, 정교순<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>한국식물자원연구소, <sup>2)</sup>강원도농촌진흥원 홍천옥수수시험장, <sup>3)</sup>농촌진흥청 잠사곤충연구소

## Cytotoxic Effect of Variable Crops

Hyung In Moon<sup>1)</sup>, Jong Tag Youn<sup>2)</sup>, and Kyo Soon Jung<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Korea Plant Resource Institute, 1003 Ducki-dong Goyang Kyunggido 411-450, Korea

<sup>2)</sup>Hong Cheon Maize Experiment Station, Hongcheon, Gangwondo 250-820, Korea

<sup>3)</sup>National Sericulture and Entomology Reasearch Institute, RDA, Suwon Kyunggdo 441-100, Korea

### ABSTRACT

Antineoplastic activities against human gastric and colon carcinoma cell lines were measured in seventeen methanol extracts of seventeen food and medicinal crops using the MTT(3-[4.5-dimethyl thiazol-2-yl)-2.5-diphenyl tetrazolium bromide) method. Three extracts(*Hodeum vulgare*, *Schizandra chinensis* and *Zea mays*) from seventeen tested crops have been reported to have antineoplastic effects. The extracts obtained from remaining fourteen tested crops failed to show significant cytotoxic effect at the concentration of less than 230 $\mu$ g/ml(50% inhibitory concentration).

**Key words:** antineoplastic activity, food and medicinal crops, cancer cell lines, MTT method.

### 서 언

19세기말부터 암치료를 위하여 암환자의 생물학적 반응을 조절하려는 시도가 시작되었다(Oldham, 1983). 이러한 항암제개발 전략의 동향은 화학적인 합성물질 또는 천연물로부터 유래하는 많은 후보물질의 약효여부를 검색하는 것으로 시작되는 것이 일반적이며 최근에는 사람들의 대표적인 암들로부터 수립된 암세포주에 대한 생체세포독성을 1차적으로 검색하는 것이 일반적인 경향이다(Garzdar, 1988; 현 등, 1994a). 1차검색에서 어느 특정한 암세포에 대하여 선택적인 세포독성을 나타내면 그 암세포를 누드 마우스에 이식하여 종양을 만들고 이에 대한 치료효과를 검색하는 이형이식체내검사가 많이 쓰이는 검색방법으로 이를 “질환-지향성” 항암제검색시스템(Boyd, 1989) 이라고 불리운다. 특히 천연물로부터 유래한 물질은 합성된 화학요법제와는 달리 생체의

생물학적인 반응에 영향을 미쳐 암에 대한 억제효과를 나타냄으로써 치료시 부작용을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 그 효과도 증가시킬 수 있다는 점에서 많은 관심을 끌고 있다. 그러나 천연물로부터 후보물질의 탐색과정에서 항암효과의 검색대상 식물이 거의 약용식물에 국한하거나 희귀식물이 많은 부분을 차지하고 있어 식용으로 항상 섭취하기에 적합한 식물은 버섯과 몇 종의 식물에 국한되어 있는 실정이다(현, 1995). 버섯의 경우는 영지버섯으로부터 다당체 성분인 homoglucon을 분리하여 항종양활성을 나타냄을 보고하였고(Mizuno, 1983), 식용버섯 중에서는, 구름버섯, 표고버섯, 느타리버섯의 자실체로부터 마우스의 sacroma 180에 대해 강력한 항암작용을 나타내는 다당류와 단백질로 구성된 고분자를 분리하여 보고하였으며(김, 1979), 버들송이에서 마우스의 면역반응에 대해 강력한 작용을 나타내는 다당류와 단백질로 구성된 고분자물질을 분리하여 보고하였다(현 등, 1995). 그 외의 작물로는 비름과 작물인 아마란스

로부터 위암과 대장암세포주에 대하여 항암활성이 높게 나타남을 보고하였고(이 등, 1996), 콩의 기능성 심포지움에서는 콩의 메탄올추출물이 암세포억제의 활성을 보인다고 하였다 그러므로 본 연구자는 암 예방식품개발을 위한 기초자료를 확보하고자 우리나라에서 재배되는 벼와 전작물을 대상으로 하여 한국인의 인체 암세포에서 수립된 대장암과 위암세포주에 (Hay, 1994) 대해 생체세포독성효과의 검색을 실시하였던 바 몇 가지 작물에 대하여 새로운 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험재료

본 시험의 1차 검색에서 사용된 작물들은 일반농가에서 재배하여 수확한 것을 사용하였으며, 암세포에 대한 생체세포 독성의 50%세포성장저지농도의 품종간 차이를 검색하기 위해서 농촌진흥청 유전자원과의 홍천옥수수시험장에서 보리, 옥수수, 귀리는 색깔을 기준으로 그 특성이 다른 품종을 분양받았고, 벼는 특성에 따라 양질미, 유색미, 향미, 찰벼계열의 품종을 분양받아 4℃에서 밀봉하여 저장하면서 사용하였다.

### 2. 시료의 조제

암세포에 대한 생체세포독성검색을 위해서 건조한 종실 200g을 분쇄기로 잘게 마쇄한 후 추출병에 넣고 메탄올 300ml씩으로 3회 환류추출한 후 감압농축하여 농축액을 만든 후 다시 일정량의 증류수로 희

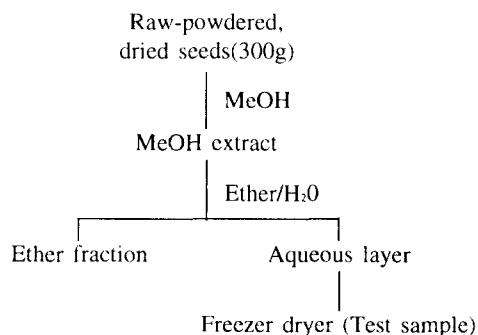


Fig 1. Schema for the extraction from medicinal crops and foods crops

석하여 동량의 ether와 분액여두에 넣고 격렬히 흔들어 ether층을 제거한 후 물층을 동결건조한 것을 -40℃에서 밀폐시켜 보관하면서 사용하였으며(그림 1), 실험을 위해 용해시킬 경우에는 매번 실험 직전에 꺼내어 사용하였다.

### 3. 세포주

실험에 사용된 세포주들은 서울대학교 암연구소 종양세포학연구실에서 수립한 성장속도가 빠르면서 비교적 항암제 감수성이 예민한 위암세포주인 SNU-1(CRL 597.1), 성장속도는 빠르나 일부분의 항암제에 내성을 갖는 대장암세포주인 SNU-C4(C2A)를 56℃에서 30분동안 heat inactivation시킨 것을 bovine calf serum 10%, Streptomycin 0.1mg/ml, penicillin 100unit/ml, RPMI 1640 2pack, Hepes buffer 9.5g, NaHCO<sub>3</sub> 4g을 3차증류수 2L로 녹인 R10 배양액으로 5% CO<sub>2</sub>, 37℃의 온도와 적당한 습도의 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 것을 이용하였다. SNU-C4는 다중약제내성유전자의 발현이 비교적 높은 편이지만, SNU-1은 그 발현이 낮은 세포주이다.

### 4. 실험방법

식용작물의 추출물이 살아 있는 암세포에 대하여 나타내는 세포독성을 항암작용의 지표로 삼았다. 세포독성을 판독하는 방법은 시료를 비교적 짧은 시간 내에 검색할 수 있고 검사 결과를 객관화할 수 있는 MTT검색법으로 하였으며 실험방법의 원리는 3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 살아있는 암세포가 환원시킴으로써 측정가능한 청색의 formazan결정을 형성하는 특성을 이용하며 그 방법은 아래와 같다.

**MTT검색법:** 실험에 사용한 적정세포수는 약물 처리를 하지 않은 대조군에서 세포접종당시와 4일 후 MTT실험종료시에 모두 세포가 지수함수적으로 활발히 증식하면서, MTT처리후의 OD<sub>540</sub>값이 0.6-0.7에 이를 수 있는 세포수로 정하였다. 적정수의 세포를 180μl의 배지에 부유시켜 96-well plate의 12컬럼 중 10개의 컬럼에 접종하였다. 난용성 시료는 0.02%의 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시키고, 수용성 시료는 PBS(phosphate buffer saline)에 용해시킨 후 20μl씩 각 well에 가하여 시료의 최종농도가 well당

각각 300, 100, 30  $\mu\text{g/ml}$ 씩이 되도록 하였다. 한가지 농도군에 대해서는 1컬럼(8 well)을 동일한 조건으로 사용하며, 나머지 한 컬럼에서는 약물대신 PBS만을 20  $\mu\text{l}$  첨가하여 100%생존군(Control survival)으로 삼았다. 흡광도 측정시 사용할 blank에는 세포 없는 배지만 180  $\mu\text{l}$  가하고 PBS 또는 약물을 20  $\mu\text{l}$  첨가하였다. 암세포와 약물이 접종된 plate를 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 하에서 4일간 배양후 0.1mg의 MTT(3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide: Sigma M2128)를 모든 well에 가하고 다시 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 더 배양한다. 배양종료시에 plate를 450xg에서 5분간 원심분리한 후 배지를 30  $\mu\text{l}$  정도만 남기고 모두 빨아낸다(이때 각 well의 바닥에 형성된 formazan결정이 흐트러지지 않게 주의한다). 배지가 제거된 각 well에 DMSO를 150  $\mu\text{l}$ 씩 가한 후 formazan결정이 녹을 때까지 약 10분간 가볍게 진탕해 주고 바로 micro plate reader(scanning multiwell spectrophotometer)로 540nm에서 흡광도를 측정한다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의하여 formazan (blue)으로 분해된 양을 나타내며 각 well에 살아 있는 세포(viable cell)수와 비례한다.

### 5. 결과분석

시험군에서 8개 well의 OD값으로부터 한 컬럼의 평균 OD<sub>540</sub>값을 구하여 대조군(100%생존군)의 평균 OD<sub>540</sub>값에 대한 백분율을 산출하였다. 이 백분율은 대조군과 비교한 시험군으로 세포 생존율에 해당하

는 값이다. 50% 억제농도(IC<sub>50</sub>)는 이 생존율이 50%가 되게 하는 약물 농도로 정의하였으며, 이 IC<sub>50</sub> 값을 항암효과의 지표로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 암세포에 대한 생체세포독성

식용작물로부터 암예방식품개발의 가능성을 파악하고자 한국인 종양에서 유래한 대장암세포주(SNU-C4)와 위암세포주(SNU-1)들을 이용하여 검색하였으며, 항암활성의 기준은 두 암세포중에서 적어도 1개의 암세포주에 대해서 230  $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 50% 세포성장억제율을 보이는 작물에 대해 활성효과가 나타나는 것으로 판단하였다. 그 이유는 암세포에 대하여 생체세포독성물질을 분리하기 위하여 약용식물 및 회귀식물들에 대하여 검색한 결과 식물체로부터 세포독성물질이 분리된 식물들로부터 추출한 메탄올 추출물은 시험관내에서 적어도 대장암세포주 또는 위암세포주들중 최소한 한 세포주에서 50%세포성장억제율을 보이는 농도가 230  $\mu\text{g/ml}$ 이하로 나타났기 때문이다(현 등, 1994a; 현 등, 1994b). 이러한 지표를 바탕으로 국내에서 쉽게 수급이 가능하면서 암예방식품개발의 가능성이 있는 작물을 선별하고자 MTT검색법으로 실시한 결과 세포독성효과가 있는 것으로 판단되는 식물은 표 2에서 보는 바와 같이 17개의 검색식물중에서 옥수수, 보리, 오미자의 3종류였으며 세포독성이 미약하거나 없는 것으로 판단되는 작물은 표 1에서 보이는 14개의 작물이었다. 세포독성이 미약한 것으로 판단되는 식물들중에서도 콩과 소엽은 대장암세포주와 위암세포주 모두에서 230  $\mu\text{g/ml}$ 이하의 범위는 아니지만 검색농도에서 50%세포성장억제율을 보이는 농도가 나타나므로 품종별 검색 또는 성분육종적인 방법을 통하여 세포독성효과를 높일수 있는 연구가 진행되어야 할 것이며, 나머지 작물들 중 쑥, 울무, 물레나물, 고구마, 감자는 50%세포성장

Table 1. Fourteen extracts from 17 tested crops without antineoplastic activity.

Crop species	Part used	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		SNU-1	SNU-C4
<i>Artemisia princeps</i>	Herba	291	300 ↑
<i>Arachis hypogea</i>	Seed	300 ↑	300 ↑
<i>Avena sativa</i>	Seed	300 ↑	300 ↑
<i>Coix lacryma</i>	Seed	296	300 ↑
<i>Glycine max</i>	Seed	278	298
<i>hypericum ascyron</i>	Herba	289	300 ↑
<i>Ixeris repens</i>	Herba	300 ↑	300 ↑
<i>Ipomoea batatas</i>	Fleshy root	287	300 ↑
<i>Oryza sativa</i>	Seed	300 ↑	300 ↑
<i>Perilla frutescens</i>	Herba	268	286
<i>Peucedanum terebinthaceum</i>	Radix	300 ↑	300 ↑
<i>Setaria italica</i>	Seed	300 ↑	300 ↑
<i>Solanum tuberosum</i>	Tuber	298	300 ↑
<i>Triticum aestivum</i>	Seed	300 ↑	300 ↑

Table 2. Three extracts from 17 tested crops with antineoplastic activity.

Crop species	Part used	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		SNU-1	SNU-C4
<i>Hodeum vulgare</i>	Seed	212	246
<i>Schizandra chinensis</i>	Fruit	209	238
<i>Zea mays</i>	Seed	216	247

억제농도가 공시농도에서 다중약제내성 유전자의 발현의 정도가 낮은 위암세포주에 대하여 미약하게나마 나타나지만 다중약제내성 유전자의 발현이 비교적 높은 대장암세포주에 대하여서는 거의 나타나지 않으므로 작물체내에 존재하는 성분에 의한 생체세포독성의 효과가 아니라 성분의 상호작용에 의한 상승효과로 추측할 수 있었다. 옥수수, 보리, 오미자의 경우는 공통적으로 다중약제내성유전자의 발현의 정도가 낮은 위암세포주에서 230 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서 50% 세포성장억제율을 보이므로 작물체에 존재하는 성분에 의한 생체세포독성의 효과임을 추측할 수 있었다. 문헌에 의하면 오미자의 경우에는 gomisins A라는 화합물이 세포독성효과에 관여하는 것으로 보고되어 있다(육, 1990).

## 2. 품종별 암세포에 대한 생체세포독성의 차이

작물의 경우에는 보다 진보된 품종의 개발을 위하여 많은 종류의 품종을 도출하여 놓은 상태이므로 품종에 의한 검색보다는 특정작물에 해당하는 품종별 활성의 차이를 조사함으로써 보다 우수한 식물화학적 특성을 나타내는 소재를 선발할 수 있으므로 활성을 나타내는 작물중에서는 보리와 옥수수를, 활성을 나타내지 않는 작물들중에서도 품종의 종류가 다양한 벼와 귀리를 대상으로 세포독성을 검색하였다. 품종선택에 있어서는 벼는 기능성에 따라 일반미 2품종, 향미 1품종, 유색미 1품종, 찰벼 2품종을 선택

하였고 그 외의 작물은 색깔의 명암에 따라 1종씩 선택하여 검색하였다. 그 결과는 표3에서 보는 바와 같이 보리의 경우는 품종간에 50%세포성장억제농도의 차이가 현저하게 나타났으며 그 중에서도 종피의 색깔이 진한 수집종의 50% 세포성장억제농도가 낮게 나타났다. 귀리의 경우는 1차 검색에서와 마찬가지로 활성이 나타나지 않았으며, 옥수수는 품종별로 활성차이를 나타냈으나 품종간에 50% 세포성장억제농도의 차이는 볼 수 없었다. 벼는 1차 검색에서 시중에 판매하고 있는 양질미에 대하여 검색하였을 때에는 활성을 나타내지 않았으나 품종별 검색에서는 유색미와 찰벼에서 활성을 나타냈고 그중에서도 유색미인 흑도에서 50% 세포성장억제농도가 현저한 차이를 나타내므로, 벼의 경우에는 품종에 따라 암세포에 대한 생체세포독성농도의 정도가 다르게 나타날 수 있음을 추측할 수 있었다. 결론적으로 1차 검색에서 일반적으로 이용하고 있는 식용작물의 상품을 구입하여 대량으로 검색한 결과와 품종별로 활성을 검색한 결과가 벼와 같이 품종의 종류 및 특성이 다양한 경우를 제외하고는 활성의 존재 유무에는 같은 결과를 나타내었다. 그러므로 작물로부터 암세포에 대해 생체세포독성검색을 실시할 경우 본 실험에 사용한 작물들의 결과를 참고로 하여 좀 더 광범위한 작물들을 대상으로 향후 지속적인 검색이 필요하며 암세포에 대해 생체세포독성효과가 있다고 판단되는 작물에 대해서는 생체세포독성을 일으키는 농도의

Table 3. Antineoplastic effect in methanol extracts from food and medicinal crop plants.

Crop species	Variety	Part used	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	
			SNU-1	SNU-C4
Oats	Local collection(Suwon)	Seed	300 ↑	300 ↑
	Local collection(Koyang)	Seed	300 ↑	300 ↑
	Local collection(Suwon)	Seed	298	300 ↑
Barley	Olchalssalbori	Seed	226	256
	Local collection(Hong cheon)	Seed	238	270
	Local collection(Suwon)	Seed	198	208
	Chuchungbyeo	Seed	297	300 ↑
Rice	Hyangmiby eo 1	Seed	300 ↑	300 ↑
	Ilpumbyeo	Seed	300 ↑	300 ↑
	Heukdo	Seed	228	238
	Shinseonchalbyeo	Seed	245	286
	Jinbuchalbyeo	Seed	243	279
Corn	Chalok 1	Seed	229	248
	Local collection(North Korea)	Seed	228	259
	Local collection(Hongcheon)	Seed	228	258

품종간 차이를 검색하는 것이 병행되어야만 작물특성개량이나 품질의 고급화에 이용할 수 있는 기초적인 자료를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

### 摘要

식용 및 약용작물중에서 암세포에 대하여 생체세포독성을 유발하는 소재를 선별하기 위하여 한국인 종양에서 유래한 대장암세포주(SNU-C4)와 위암세포주(SNU-1)에 대해 MTT검색법으로 50% 세포성장저해농도(IC<sub>50</sub>)를 측정 한 결과는 다음과 같다.

1. 암세포에 대해 생체세포독성활성을 가지는 작물을 선별하기 위하여 17종의 작물을 대상으로 검색한 결과 보리, 옥수수, 오미자에서 세포독성효과가 230 $\mu$ g/ml이하의 농도로 유의한 효과를 나타내었다.
2. 품종간의 세포독성효과의 차이를 검색하기 위하여 세포독성효과를 나타낸 작물중에서는 보리와 옥수수를, 세포독성효과를 미약하게 나타내거나 나타내지 않은 작물중에서는 벼와 귀리를 대상으로 품종별로 검색한 결과, 세포독성의 유무는 1차 검색과 동일한 경향이 나타났으나, 벼에서는 품종에 따라 현저하게 세포독성의 차이를 나타내었으며, 특이할만한 집은 유색미인 흑도에서 다른 품종에 비하여 50% 세포성장저해농도가 유의하게 낮게 나타났다.

사 사

본 논문은 1995년 건농농산물유통의 고품질 농산물개발사업과제의 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부분으로 연구비를 지원해 준 건농농산물유통에 감사의 뜻을 표한다.

### 인 용 문 헌

- Boyd, M. R. 1989. Principle and Practice of Oncology. 3(10):1-12.
- Garzdar, A. F. 1988. Prediction of Tumor Treatment Response. Pergamon Press. New York. p175.
- Hay, R. J. 1994. Human Tumor Cell Lines. Academic Press. Sandiego.
- Herbert, N. Nigg and David seigler. 1992. Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture. Plenum. pp75-84
- 현진원, 임경화, 신진이, 김영식, 우원식, 박재갑. 1994a. 전통약물및 각종 식물의 항암효과에 대한 연구. 생약학회지 25(2) 171-177.
- 현진원, 임경화, 신진이, 김영식, 양용만, 박재갑. 1994b. 전통약물 및 각종 식물의 항암효과에 대한 연구 (II). 생약학회지 25(4):382-387.
- 현진원. 1995. 버들송이의 항암성분 연구. 서울대학교 약학대학 박사학위논문
- Kim, B. K. 1979. Antineoplastic activities of *Coriolus versicolor*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*, *Arch. Pharm. Res.* 2:145-121
- 이재학, 문형인, 이정일, 이승택, 강철환, 이승택. 1996. Amaranth의 Squalene동정과 잔사추출물의 항암작용검색. 한국작물학회지. 41(4):450-455.
- Mizuno, T. 1983. Structure and antitumor activities of D-giucan of *Ganoderma applanatum*. *J. Cancr Chemother.* 21:473-479
- Oldham, R. K. 1983. Biological response modifiers. *J. Natl. Cancer Inst.* 70:789-796.
- 육창수. 1990. 생화학회지모음집. 한국생화학회. p15.