

목화 부위별 추출물의 암 세포주 증식 억제 효과

조수인^{1#*}, 문경일¹, 김형우¹, 정현우²

1 : 동신대학교 한의과대학 본초학교실 2 : 동신대학교 한의과대학 병리학교실

Inhibitive Effects of Cotton Plant Sectional Extracts in Cancer Cell Lines

Su-In Cho^{1#*}, Gyoung-Il Moon¹, Hyung-Woo Kim¹, Hyun-Woo Jeong²

1 : Dept. of Herbology, College of Korean Medicine, Dongshin University

2 : Dept. of Pathology, College of Korean Medicine, Dongshin University

ABSTRACT

Objectives : This study was carried out to investigate the inhibitive effects of cotton plant sectional extracts in cancer cell lines, Calu-6(human, Caucasian, lung, adenocarcinoma) and MCF-7(human, Caucasian, breast, adenocarcinoma). The incidence of cancer has been increasing even in Korea due to the change of dietary life and westernization and becoming conspicuous as the disease threatening health. But cancer treatment have not been fully effective against the high incidence or low survival rate of most cancer.

Methods : Calu-6 and MCF-7 cells were cultured and seeded in cell culture plates, respectively. And sectional extracts of cotton plant were treated to MCF-7 cells.

Results and Conclusion : Sectional extracts of cotton plant showed no anti-proliferative effect on MCF-7 cells, but root and stem extracts showed strong anti-proliferative effects on Calu-6 cells. Fruit, leaf and flower extracts also showed anti-proliferative effects on Calu-6 cells but not so much like root and stem extracts. But seed extract showed no anti-proliferative effect on Calu-6 cells.

Key words : cotton plant, Calu-6, MCF-7, cancer cells, inhibitive effect.

서 론

목화(Cotton; *Gossypium* spp.)는 아욱과(Malvaceae) 목화속(*Gossypium*)에 속하는 식물로 동아시아 원산이고 전국 각처의 농가에서 재배하는 귀화식물이며 섬유 생산을 목적으로 재배하는 세계적으로 가장 중요한 공예작물 중 하나이다. 개화기는 7~8 월이고 결실기는 9~10 월이며 중부 이남에서 재배된다^{1,2)}.

주로 공업용·약용에 쓰이는데, 섬유재·화약재·綿絲材·거어즈·봉대·탈지면에 쓰이고, 종자에서 면실유를 짜내기도 하며, 한의학에서는 종자의 솜털을 棉花, 뿌리 및 뿌리껍질을 棉花根, 外果皮를 棉花殼, 종자를 棉花子, 종자의 기름을 棉子油라 부르며 민간에서 뿐만 아니라 임상에서 吐血·下血·血崩·膈氣·陽痿·疥癬 등을 치료할 목적으로 사용하여 왔다¹⁻³⁾.

목화에 관한 최근의 연구들로 무하마드자밀 등⁴⁾이 파키스탄의 목화 생산 현황과 경제적 역할을, 김 등⁵⁾이 목화진딧물(*Aphis gossypii* Glover)의 온도발육과 발육모형을, 윤 등⁶⁾은 식물생장억제제 침지처리가 목화종자의 발아 유모 생육에 미치는 영향을 연구 발표하는 등 주로 생산량 및 병해충 방제에 대한 연구들이 주류를 이룰 뿐 약용 자원으로서의 개발 가능성 검토 및 생리 및 약리 활성 등에 대한 연구는 거의 전무한 실정이며 이는 국외의 경우에서도 마찬가지이다.

다만 목화의 구성 성분 중 하나인 gossypol을 시료로 Chase 등⁷⁾이 그 구조를 확인하였고, De-Xing 등⁸⁾은 gossypol이 HL-60 암세포주의 사멸에 관여하며 ROS와 의존하지 않은 과정을 거친다는 것을 보고하는 등 특정 성분에 관한 활성에 관한 극히 제한된 편수의 논문만 접할 수 있었다.

이에 본 연구에서는 지역에 자생하는 목화를 채취하였는데, 꽃·잎·열매·줄기·종자 및 뿌리를 적절한 시기에 채취하여 각 부위별 추출물을 얻은 후 유방암 및 대장암 세포주를 각각 하나 씩 선정하여 암 세포주에 대한 독성을 확인하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 암 세포주

본 실험에 사용된 세포주는 폐암 세포주 Calu-6,

유방암 세포주 MCF-7을 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 사용하였다.

2) 시료

본 실험에 사용된 목화의 각 부위별 시료는 전남 곡성군에서 채취한 것으로 열매, 잎 및 꽃은 2004 년 9 월 1 일 이후에, 줄기와 뿌리는 12 월 14 일 이후에 적어도 2 회 이상 방문하여 직접 채취한 재료를 대상으로 하였으며 종자는 2003 년 수확한 것을 사용하였다.

3) 시약 및 기기

항암 활성을 측정하기 위해 사용한 MTT 등의 시약은 Sigma 제품(Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였고, 기기는 microplate reader(Bio-Tek, USA)를 사용하였다.

2. 방법

1) 목화 부위별 추출물의 調製

목화를 부위별(종자, 열매, 뿌리, 잎, 줄기, 꽃)로 신선도가 유지된 상태로 분리 채취한 후 동결 건조(Freeze dryer, Samwon Co.)하였으며, 부드러운 가루로 마쇄한 후 각각 70 g을 99.8% 에탄올 500 ml에 첨가하여 상온에서 24 시간 3 회 추출하였다. 잔여물을 제거하기 위해 여과(Whatman filter paper No. 10)한 후 여과액을 감압농축하여 1/10으로 농축한 후 동결 건조하여 분말화하여 냉장보관하면서 시료로 사용하였다. 목화 종자·열매·뿌리·잎·줄기·꽃의 부위별 건조 추출물은 각각 5.2, 8.4, 9.7, 5.8, 7.6 g 및 5.6 g 이었다.

2) 암 세포주 배양

Calu-6, MCF-7 세포주의 배양은 RPMI 1640 복합 배지를 이용하여 10% fetal bovine serum(FBS)와 항생제(Antibiotic antimycotic)을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂의 습윤화 된 incubator에서 적응시켜 배양하였다. 기타의 세포 배양법 및 독성 평가 방법은 기존의 방법⁹⁻¹⁷⁾에 준하여 사용하였다.

3) 세포 독성 측정

암세포에 대한 세포 독성능 측정은 MTT 검정법으로 실험하였다. 암세포에 대한 세포 독성능을 측정하기 위해 96 well flat bottom microtiter의 각 well에 logarithmic phase에 도달한 암 세포주를 2×10^4

cells/ml의 농도가 되도록 조절하여 96 well microplate에 세포부유액 90 μ l씩 분주하고, 24 시간 동안 배양한 후 무처리구인 대조군과 세포 대신 배양액만을 넣어 blank로 하였다. 각각의 시료는 DMSO에 녹여 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml 및 400 μ g/ml로 첨가하여 3 일 배양한 후 모든 well에 MTT 용액(5 mg/ml PBS) 10 μ l씩을 가해주고 다시 37°C, 5% CO₂의 습윤 배양기에서 4 시간 30 분 더 배양함으로써 MTT가 환원되도록 하였다. 각 well에 생성된 formazan 결정을 DMSO 150 μ l로 잘 녹여서 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도 값을 측정하여 IC₅₀(50% inhibitory concentration) 값을 산출하였다.

4) 통계 처리

본 연구의 통계처리는 SPSS 10.0 for windows program을 사용하여 실시하여 평균 \pm 표준 편차로 표현하고 치사 효능 값(IC50)은 Sigma Plot ver. 9.0을 이용하여 산출하였다.

성 적

1. 목화 부위별 에탄올 추출물의 암 세포주 치사 효능 값

목화를 종자, 열매, 뿌리, 잎, 줄기 및 꽃의 6개 부분으로 나누어 에탄올로 추출한 시료를 대상으로 암 세포주에 대한 치사 효능 값(IC50)을 구한 결과 다음의 Table 1과 같이 Calu-6 세포주의 경우 목화의 뿌리에서 가장 강한 항암 효과가 나타났다. 다음으로 목화의 줄기 순이었으며 종자에서는 거의 효과가 없는 것으로 보인다. MCF-7 세포주에서는 모든 부위에서 거의 효과를 보이지 않았다.

2. 목화 종자의 암 세포주 증식 억제 효과

목화의 종자인 棉花子를 에탄올로 추출한 시료를 두 종류의 인체 암세포(Calu-6, MCF-7)에 처리한 결과를 살펴보면, Calu-6에 대해서는 200 μ g/ml 농도에서 약한 세포독성 효과를 나타내었지만, MCF-7에 대해선 유의할 만한 활성을 보이지 않았다. 그리고 두 암 세포주 모두에서 약한 치사 효능(IC50 값; 800 μ g/ml 이상)을 보였다(Fig. 1, Table 1).

3. 목화 열매의 암 세포주 증식 억제 효과

목화 열매의 에탄올 추출물을 Calu-6와 MCF-7에 처리한 결과, Calu-6에 대해서는 세포 독성을 보였지만 MCF-7에 대해서는 유의할 만한 활성을 보이지

않았다. 그리고 Calu-6에서의 치사 효능 값은 132.5 μ g/ml인데 비해 MCF-7에서의 치사 효능 값은 800 μ g/ml 이상이였다(Fig. 2, Table 1).

4. 목화 뿌리의 암 세포주 증식 억제 효과

목화 뿌리의 에탄올 추출물을 Calu-6와 MCF-7에 처리한 결과, Calu-6에 대해서는 50 μ g/ml의 농도에서도 세포 독성을 보였지만 MCF-7에 대해선 전혀 활성을 보이지 않았다. 그리고 Calu-6에서의 치사 효능 값은 44.3 μ g/ml이었다(Fig. 3, Table 1).

5. 목화 잎의 암 세포주 증식 억제 효과

목화 잎의 에탄올 추출물을 Calu-6와 MCF-7에 처리한 결과, Calu-6에 대해서는 현저한 세포 독성을 보였지만 MCF-7의 경우에는 200 μ g/ml 농도에서 약한 세포 독성을 보이다가 다시 용량이 증가하면서 활성이 약해졌다. 그리고 Calu-6에서의 치사 효능 값은 160.22 μ g/ml이었다(Fig. 4, Table 1).

6. 목화 줄기의 암 세포주 증식 억제 효과

목화 줄기의 에탄올 추출물을 Calu-6와 MCF-7에 처리한 결과, Calu-6에 대해서는 현저한 세포 독성을 보였지만 MCF-7의 경우에는 200 μ g/ml 농도에서 약한 세포 독성을 보이다가 다시 용량이 증가하면서 활성이 약해졌다. 그리고 Calu-6에서의 치사 효능 값은 71.19 μ g/ml이었다(Fig. 5, Table 1).

7. 목화 꽃의 암 세포주 증식 억제 효과

목화 꽃의 에탄올 추출물을 Calu-6와 MCF-7에 처리한 결과, Calu-6에 대해서는 세포 독성을 보였지만 MCF-7의 경우에는 뚜렷한 세포 독성을 보이지 않았다. 그리고 Calu-6에서의 치사 효능 값은 377.12 μ g/ml이었다(Fig. 6, Table 1).

고 찰

최근의 통계청 자료에 의하면 우리나라 2004년 총 사망자 수는 24만 6천명으로 1일평균 672명 사망했으며 2004년 연간 사망자 수는 2003년과 거의 비슷한 수준으로 나타났다. 주요 사망 원인 별로 살펴보면 2004년 5대 사망원인은 암, 뇌혈관질환, 심장질환, 고의적 자해(자살) 및 당뇨병으로 그 사망자가 1십만 4천명에 이르며 전체 사망자의 57%를 차지한다. 또한 사망자의 26.3%인 6만 5천명(10만명 당 사망률 133.5명)이 암으로 사망하여 원인별 1위를 달리고 있다. 이

에 이어서 뇌혈관질환(2위), 심장질환(3위), 고의적 자해(4위), 당뇨병(5위) 등의 순서로 사망률이 높게 나타났다¹⁸⁾.

현재까지의 가장 보편적인 암 치료법은 수술과 방사선요법, 화학요법, 면역요법 등이며, 일반적으로 초기의 국소치료로 수술과 방사선요법이 이용되고 수술이나 방사선요법의 보조요법이나 완치가 불가능한 암에서 증상 경감의 목적으로 화학요법이 사용되어진다¹⁹⁾. 그러나 대부분이 매우 제한적 적응증과 골수 및 신장을 비롯한 위장관, 모발, 피부 등 정상 조직에 매우 심각한 부작용을 초래하고 있다²⁰⁾.

이에 저자는 종합적이고 전체적 조화 및 환자 스스로의 면역력 회복에 의한 자연 치유력을 증시하는 한의학적 암 치료의 새로운 가능성을 확인하고자 하였으며 지역 자생 약용 자원의 활용 방안을 모색하기 위하여 棉花, 棉花根, 棉花殼, 棉花子, 棉子油 등의 명칭으로 임상에서 사용되어진 목화를 재료로 대장암 및 유방암 세포인 Calu-6 및 MCF-7 세포주를 대상으로 항암 효과를 확인하여 보았다.

목화는 용도가 다양하고 전국적으로 널리 분포하는 등 재배하기에도 적당하기 때문에 자원 개발 가능성도 비교적 높은 식물로 생각되므로³⁾ 향후 목화의 물리화학적 성분 분석과 효능평가 등에 관한 실험 자료의 확보가 시급한 실정이다.

목화에 함유되어 있는 gossypol 이라는 성분에 대해 일본의 가고시마 대학에서 De-Xing 등⁸⁾이 인간 백혈병 세포인 HL-60을 재료로 연구한 결과 DNA fragmentation과 PARP cleavage를 통한 억제효과를 확인한 바 있으며 이와 유사한 여러 연구결과들이 발표되어 항암제로의 개발 가능성이 기대되고 있다.

棉花는 止血의 효능이 있어 吐血·下血·血崩·金瘡出血 등을 치료하며, 棉花根은 補虛·平喘·調經의 효능이 있어 體虛咳嗽·疝氣·崩帶·子宮脫垂를 치료하고, 棉花殼은 膈食·膈氣를 치료하며, 棉花子는 溫腎·補虛·止血의 효능으로 陽痿·辜丸偏墜·遺尿·痔血·脫肛·崩漏·帶下 등을 치료하고, 棉子油는 惡瘡·疥癬을 치료하기 위하여 外用하였다¹⁾.

위와 같이 목화의 각종 부위 중 뿌리 부분에 대해서는 止咳·祛痰·平喘·抗菌·抗癌·子宮興奮 등의 약리 활성¹⁾이 연구되어져 있으나 기타의 부위에 대해서는 연구가 미진한 실정이다.

본 연구에 사용된 목화 부위별 에탄올 추출물의 암세포에 대한 치사 효능 값(IC₅₀)은 MCF-7 세포주에 대해서는 모든 부위에서 800 µg/ml 이상으로 거의 효과를 보이지 않았는데 비해, Calu-6 세포주의 경우

목화의 뿌리에서 44.3 µg/ml, 줄기에서 71.19 µg/ml로 비교적 강한 항암 활성을, 그리고 열매에서 132.5 µg/ml, 잎에서 160.22 µg/ml, 꽃에서 377.12 µg/ml로 중등도의 효과를 보였고 종자에서는 800 µg/ml 이상으로 효과가 없는 것으로 나타났다(Table 1).

부위별 에탄올 추출물의 항암 활성은 종자의 경우 Calu-6에 대해서는 세포 독성 효과를 나타내었지만, MCF-7에 대해선 유의할 만한 활성을 보이지 않았으며(Fig. 1), 열매의 경우 Calu-6에 대해서는 세포 독성을 보였지만 MCF-7에 대해선 유의할 만한 활성을 보이지 않았고(Fig. 2), 뿌리에서는 Calu-6에 대해서는 세포 독성을 보였지만 MCF-7에 대해선 전혀 활성을 보이지 않았다(Fig. 3). 목화 잎의 에탄올 추출물을 Calu-6와 MCF-7에 처리했을 때 Calu-6에 대해서는 현저한 세포 독성을 보였지만 MCF-7의 경우에는 200 µg/ml 농도에서 약한 세포 독성을 보이다가 다시 용량이 증가하면서 활성이 약해졌으며(Fig. 4), 줄기의 경우 Calu-6에 대해서는 현저한 세포 독성을 보였지만 MCF-7의 경우에는 200 µg/ml 농도에서 약한 세포 독성을 보이다가 다시 용량이 증가하면서 활성이 약해졌으며(Fig. 5), 목화 꽃의 경우 Calu-6에 대해서는 비교적 강한 세포 독성을 보였지만 MCF-7의 경우에는 뚜렷한 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 6).

따라서 목화 에탄올 추출물은 MCF-7 암 세포주에서는 항암 활성이 없었고, Calu-6 암 세포주에서는 뿌리 및 줄기에서 강한 활성이 나타났으므로 향후 이러한 항암의 기전에 관한 연구가 진행되어 약용 자원으로 개발되어 그 효용이 확대되어야 할 것이다.

결론

지역에 자생하는 목화를 채취하여 각 부위별 추출물을 얻은 후 유방암 및 대장암 세포주인 MCF-7 및 Calu-6의 증식에 어떻게 작용하는지를 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 추출물의 암 세포주에 대한 치사 효능 값(IC₅₀)은 MCF-7에 대해서는 모든 부위에서 800 µg/ml 이상으로 거의 효과를 보이지 않았는데 비해, Calu-6의 경우 목화의 뿌리 및 줄기에서 비교적 강한 항암 활성을, 그리고 열매, 잎, 꽃에서 중등도의 효과를 보였고 종자에서는 효과가 없었다.
- 종자의 경우 Calu-6에 대해서는 세포성 효과를 나

타내었지만, MCF-7에 대해선 유의할 만한 활성을 보이지 않았다.

3. 열매의 경우 Calu-6에 대해서는 세포 독성을 보였지만 MCF-7에 대해선 유의할 만한 활성을 보이지 않았다.
4. 뿌리에서는 Calu-6에 대해서는 세포 독성을 보였지만 MCF-7에 대해선 전혀 활성을 보이지 않았다.
5. 잎의 경우 Calu-6에 대해서는 현저한 세포 독성을 보였지만 MCF-7의 경우에는 200 µg/ml 농도에서 약한 세포 독성을 보이다가 다시 용량이 증가하면서 활성이 약해졌다.
6. 줄기의 경우 Calu-6에 대해서는 현저한 세포 독성을 보였지만 MCF-7의 경우에는 200 µg/ml 농도에서 약한 세포 독성을 보이다가 다시 용량이 증가하면서 활성이 약해졌다.
7. 꽃의 경우 Calu-6에 대해서는 비교적 강한 세포 독성을 보였지만 MCF-7의 경우에는 뚜렷한 세포 독성을 보이지 않았다.

참고문헌

1. 鄭普燮, 辛民教. 圖解鄉藥大事典. 서울:永林社. 1990:562-564.
2. 김태정. 한국의 자원식물. 서울:서울대학교출판부. 1996:3:98.
3. 김태정. 우리가 정말 알아야 할 우리 꽃 백가지. 서울:현암사. 1990:195-198.
4. 무하마드자밀, 나의식. 파키스탄의 목화 생산현황과 경제적 역할. 한국국제농업개발학회지. 2005; 17(1):27-31.
5. 김지수, 김용현, 김태홍, 김정환, 변영웅, 김광호. 목화진딧물(*Aphis gossypii* Glover)의 온도발육과 발육모형. 한국응용곤충학회지. 2004;43(2):111-116.
6. 윤재길, 강호중, 박상현. 식물생장억제제 침지처리가 목화종자의 발아 유모 생육에 미치는 영향. 한국원예학회 2001년 춘계 학술연구발표회. 2001: 104.
7. Chase LB, Michael KD and Peter JR. Conformational analysis of gossypol and its derivatives by molecular mechanics. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. 2005;730: 5158.
8. De-Xing H, Takuhiro U, Xuhui T, Toru T, Shunsuke T, Izumi I, Takashi O and Makoto F. Involvement of reactive oxygen species-independent mitochondrial pathway in gossypol-induced apoptosis. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2004;428:179-187
9. Chung HK, Park JH, Lim JK, Lee KJ, Chung GY and Jeoung HJ. The activity of antioxidants and suppression of cancer cell proliferation in extracts of *Orostachys japonicus* A. Berger. Kor.J. Med. Crop Sci. 2003;11(1):31-39.
10. Yim HB, Lee GS and Chae HJ. Cytotoxicity of Ethanol Extract of *Raphanuse Sativus* on a Human Lung Cancer Cell Line. Kor. J. Soc.Food. sci. 2004;33(2):287-290.
11. Cha YJ and Lee SY. Cytotoxicity and Multidrug-Resistance Reversing Activity of Extracts from Gamma-Irradiated *Coix lachryma-jobi* L. Var. ma-yuen Stapf seed. Kor. J. Soc. Food. sci. 2005;34(5):613-618.
12. Kwag JS and Baek SH. Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of Extracts from *Salvia miltiorrhiza*. Kor. J. Pha. 2003;34(4):293-296.
13. Lee MK, Choi GP, Lee HR, Lee GY, Yu CY and Lee HY. Enhanced Immune Activity and Cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. Extracts against Human Cell Line. Kor.J. Med. Crop. Sci. 2004;12(1):36-42.
14. Robert KY, Cheng YZ and Cheng CC. Screening and evaluation of anticancer agents. Exptl. Clin. Pharmacol. 1998;10(2):67.
15. Jun YY, Cui CB, Lee HJ, Moon SY, Lee DS and Ham SS. Antimutagenic and Cytotoxicity Effects of Extracts of *Eleutherococcus senticosus* Maxim fruits. Kor. J. Food. Pha.2003;10(3):394-400.
16. Kim JH, Kim DH, You JH, Kwon MC, Lee HJ, Lee HJ and Lee HY. Anticancer and Immune Activities of the Extracts from *Amorpha fruticosa* L. Kor. J. Med. Crop. Sci. 2005;13(1):41-47.
17. Jung BM, Lim SS, Park YJ and Bae SJ. Inhibitory Effects on Cell Survival and Quinone Reductase Induced Activity of *Aster yomena*

- Fractions on Human Cancer Cells. J. Kor. Soc. Food. Sci. 2005;34(1):8-12.
18. 통계청. 보도자료. 2004년 사망원인통계결과. http://www.nso.go.kr/newnso/notice/report_view.html?content_id=3343.
 19. 조정효, 유화승, 이연월, 손창규, 조종관. 항암단을 투여한 각종 암환자 320례에 대한 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2004;12(2):157-175.
 20. 대한병리학회. 병리학(I). 서울:고문사. 1995:213.