

항종양활성이 있는 차나무 종자 추출물의 부분 분리 및 정제

남정옥 · 남보라 · 김진주 · 조향숙 · 김진만 · 김창한*

건국대학교 축산대학 축산식품생물공학

서 론

차나무과 식물은 전 세계적으로 40속 600여종이 열대, 아열대, 난·온대지방에 분포하며 우리나라에서는 5속 6종이며, 종자나 덩음공정을 거친 차잎을 뜨거운 물로 침출한 용액(green tea)은 예전 신라시대부터 선조들이 즐겨 마셔온 기호음료이다(Yang, *et al.* 2000).

건강에 기여하는 생리활성물질로서 녹차는 총치 예방 효과, 항산화 작용, 항균 효과와 항암 효과등의 다양한 기능이 있는 것으로 보고되고 있다(Choe, *et al.* 1999). 녹차의 항암성분은 EGCG(epigallocatechin-3-gallate)로 알려져 있는 폴리페놀(polyphenol) 화합물의 일종으로 알려져 있다. 한잔의 녹차에는 150~200mg의 EGCG가 포함되어 있으며 차를 좋아하는 사람들은 하루에도 몇 잔씩 마실 수가 있으므로 더욱 효과가 있다(Yoshinobu, *et al.* 1996).

그러나 이는 거의 차잎에 관한 연구에서 발견된 내용으로 차나무 종자(seed)는 거의 이용되지 못하고 폐기되고 있는 실정이며 종자에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 그러나 종자 역시 천식이나 뇌명(腦鳴) 등에 효과가 있어 민간요법으로 사용되기도 하며 수량이 많고 기름이 풍부하여 중국 등지에서는 식용으로 이용되기도 한다(Rah, *et al.* 1992). 따라서 본 연구는 차나무 종자를 물로 추출하여 활성물질을 부분 분리하여 MTT assay를 통해 차나무 종자의 항종양 효과를 확인하고자 기획하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 시료는 2005년 1월에 (주)한국제다(전남 장성군)에서 30년생인 차나무(*Camellia sinensis* L.) 열매를 제공 받아 사용하였다. 열매는 종자를 분리하여 동결건조시킨 후 시료로 사용하였다. 본 연구에 사용된 종양세포주는 AGS(human stomach carcinoma), A549(human lung carcinoma)이며, Gibco사(Life Technologies, INC., Rockville, Maryland, USA)의 배지를 이용하여 배양하였고 RPMI 1640에 10% fetal bovine serum(FBS, heat inactivated)을 함유한 배지를 사용하여 37°C에서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

Fig. 1의 순서에 따라 건조분쇄한 종자 20g에 10배의 증류수(distilled water, DW)를 가하여 실온에서 6시간씩 3회 추출하고 Whatman No. 2 여과지를 사용하여 여과하였다. 모두 합한 추출액을 원심분리한 후 상등액만을 취해 동량의 Ethylether를 넣고 추출물속에 남아 있는 지방을 제거하여 추출물을 물층과 에테르층으로 분리하였다. 분리된 물층에 4배의

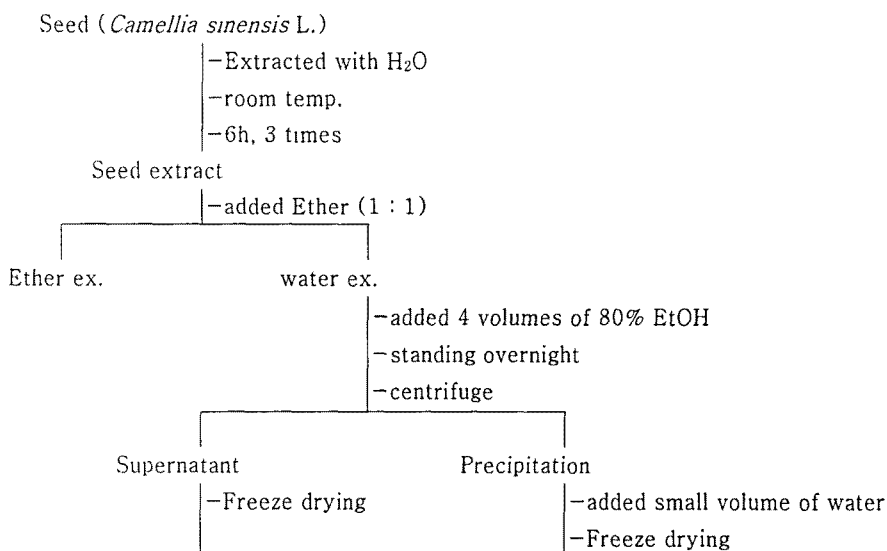


Fig. 1. Scheme of fractionation of tea seed.

80% 에탄올을 첨가하고 24시간 실온에서 방치시킨 후 원심분리하여 상징액과 침전물을 분리하였다. 분리된 상징액은 rotary evaporator를 이용하여 감압농축한 후 동결건조하였고, 침전물은 소량의 물을 첨가한 후 동결건조하여 시료로 사용하였다.

차나무 종자 추출물에 대한 항종양효과를 알아보기 위하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하였다. 즉, 각각의 종양세포주 2×10^5 cells/mL를 100 μ L씩 96 well plate에 접종하여 37°C, CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 적절한 농도의 시료를 100 μ L 분주하여 48시간 동안 배양시켰다. 배양이 끝나기 4시간 전에 MTT solution(0.5 mg/mL) 50 μ L씩 각각 첨가한 후 37°C에서 4시간 추가 배양하여 formazan 형성을 유도시켰고, 이것을 용해시키기 위하여 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 각 well당 100 μ L씩 첨가한 후 plate shaker에서 20분간 교반하였다. Multi well scanning spectrophotometer(microplate autoreader, Bio-Tek instrument, U.S.A)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항종양효과는 세포성장 저해율로 평가하였다. 저해율이 50% 이상일 때를 항종양활성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 차나무 종자 물추출물의 항종양 활성

종자 물추출물(0.5 mg/mL)에 대한 종양세포 증식저해 정도를 보면 종양세포주 마다 약간의 차이는 있으나 약 98% 정도의 종양세포 증식억제율이 나타나 물추출 시에도 그 활성이 상당히 유지되었다.

Table 1. Growth inhibition effect of *Camellia sinensis* L.

	Cell lines	
	AGS	A549
Supernatant	72.75*	71.42*
Precipitation	0	0

Concentration of tested sample : 100 µg/mL.

* . Sensitive i.e., % inhibition ≥ 50.

2. 상징액과 침전물의 항종양 활성

Fig. 1과 같은 과정을 거친 상징액과 침전물의 최종농도를 100 µg/mL로 조절한 후 위암 세포인 AGS와 폐암 세포인 A549 종양세포주에 대해 억제효과를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 상징액에서는 약 70% 이상의 종양세포 증식억제효과를 나타냈으나 침전물에서는 항종양 활성이 나타나지 않았다. 상징액에서 확인한 증식억제효과로 항종양 활성을 띠는 물질은 비교적 저분자의 물질이라고 사료된다.

이상에서와 같이 차나무 종자 물 추출물의 항종양 효과를 확인하였고 상징액에서는 100 µg/mL 농도에서 비교적 높은 항종양효과를 얻을 수 있었다. 따라서 차나무 종자의 물 추출물에 대한 물질의 추가적인 정제 및 동정과 함께 항종양 효과에 대한 활성기작에 관한 규명이 필요하리라고 사료된다.

요 약

본 연구는 폐기되는 차나무 종자를 이용하여 항종양효과를 비교하고 차나무 잎뿐만 아니라 항종양 효과를 나타내는 차나무 종자의 이용가능성에 대해 탐색하고자 기획하였다. 항종양활성을 검토하기 위하여 2종류의 인체 암세포주(위암 및 폐암)에 대하여 조사하였다. 항종양효과는 종자 물추출물에서는 큰 효과를 나타내었다. 종자 물 추출물에서 분리한 상징액의 항암효과를 측정한 결과, 100 µg/mL 농도에서 위암 세포인 AGS 세포주에 대해 72.8%, 폐암 세포인 A549 세포주에 대해 71.4%의 항종양 효과를 얻을 수 있었고 침전물에서는 종양세포증식억제효과가 나타나지 않았다.

참 고 문 헌

1. Choe WK., et al. (1999) *Korean J. Nutrition* 32: 838-843.
2. Rah HH., et al. (1992) *Hanguk Nonghwahak Hoechi* 35: 272-275.
3. Yang JK., et al. (2000) *J. Kor. Tea Soc.* 6: 83-91.
4. Yoshinobu A., et al. (1996) *Life Sciences* 60: 135-142.