J Korean Soc Food Sci Nutr
33(2), 287~290(2004)

한국식품영양과학회지

인체 폐암 세포주에 대한 무의 에탄올 추출물의 세포독성

임효빈[1] · 이건순[2] · 채희정[1†]
[1]호서대학교 식품생물공학전공 및 벤처전문대학원 첨단산업기술전공
[2]한국농업전문대학

Cytotoxicity of Ethanol Extract of *Raphanuse Sativus* on a Human Lung Cancer Cell Line

Hyo-Bin Yim[1], Gunsoon Lee[2] and Hee Jeong Chae[1†]
[1]*Dept. of Food and Biotechnology and Dept. of Innovative Industrial Technology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea*
[2]*Dept. of Rural Living Science, Korea National Agricultural College, Hwasung 445-893, Korea*

Abstract

This study was designed to investigate the cytotoxic effect of ethanonl extract of radish, *Raphanuse sativus* on human lung cancer cell lines (A-549) using MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Radish trunk and radish root were extracted by a mixed solvent of water and ethanol (5 : 5, v/v) after drying. The extracts were used for anticancer activity assay. IC_{50} (50% inhibitory concentration) of radish trunk and radish root were 0.015% and 0.03%, respectively. Radish trunk extract showed higher anticancer activity than radish root extract at the same concentration of 0.01%.

Key words: MTT assay, radish, lung cancer

서 론

암에 대한 WHO의 보고에 의하면 직업병, 대기오염, 방사능 등의 환경성 요인으로 인한 발생률이 85%를 차지하는데 이 중에서 식품에 의한 것이 50%를 차지한다. 발암의 큰 원인이 될 수 있는 음식으로는 짠 음식, 태우거나 높은 온도에서 조리된 음식, 인공 감미료, 방부제, 색소 등의 화학첨가물이 든 음식 등으로 알려져 있다(1). 음식물 외에 암 발생원인으로 알려진 것이 흡연이다. 담배연기 속에는 약 5000종의 화학물질이 포함되어 있으며 이 중 50여종에서 발암성이 확인되어 폐, 후두, 식도, 구강 등에 암을 유발시키고 있다. 통계청에 따르면 우리나라의 사망률 중 암으로 인한 것이 10만명당 125.5명으로 1위를 점하고 있다. 그 중 폐암은 1990년도까지만 해도 사망률 3위에 불과하였으나 2000년도에는 51.4%의 증가율을 보이며 10만명당 24.4명으로 1위를 점하고 있다(2). 이처럼 폐암의 발생률과 사망률은 지속적인 증가 추세를 나타내고 있는데 산업 발달 및 흡연 인구의 증가와 더불어 폐암의 조기 발견이 어렵다는 점과 발생 원인 및 기전이 잘 밝혀지지 않았다는 점 때문에 최근 10년간 폐암에 대한 내과적·외과적 치료의 발전에도 불구하고 폐암의 치유율은 크게 개선되지 않고 있다(3).

십자화과 채소인 무의 민간요법과 고전문헌을 보면 내복근(根)이라하여 소화 촉진과 어패류 또는 면류의 중독해소에 효과가 있고, 종자를 내복자(子)라 하여 기담, 혈담, 천식 및 늑간 신경통 등에 쓰인다고 한다(4). 또한 무의 생리활성 효과는 이뇨작용, 정장작용, 진해, 거담작용, 해열, 소염작용, 혈당저하, 니코틴 제거 작용, 담석증 치료 및 지혈작용 등이 있다고 보고된 바 있다(4).

암 발생률과 관련하여 식이 요인의 중요성이 대두되면서 발암원인 물질의 검색과 함께 일상에서 섭취하는 식품 중에서 항암제로 이용할 수 있는 물질이 활발히 연구되고 있다(5). 식품과 관련하여 채소류, 과실류, 곡류 및 해조류들로부터 이러한 활성물질이 계속 발견되고 있다(6-9). 특히 십자화과(Brassica) 채소들은 암을 예방하는 대표적인 식품으로 여러 역학조사 및 실험연구로 증명되고 있으며 암발생의 위험은 이들의 섭취 횟수가 많을수록 감소한다고 알려졌다(10, 11). 십자화과 채소에서 독특하게 발견되는 glucobrassicin (indolylmethyl glucosinolate)의 자가분해산물인 indole-3-carbinol(I3C), indole-3-acetonitrile(IAN), 3,3′-diinolylmethane은 설취류에서 화학적으로 발생되는 종양을 저해했고 이 indole 중, I3C가 cytochrome P-450 의존 monooxygenase의 가장 강력한 유발제이며, 실험동물들에서 화학적으로 유

†Corresponding author. E-mail: hjchae@office.hoseo.ac.kr
Phone: 82-2-6280-6346, Fax: 82-2-6280-6346

발되는 발암과정의 가장 강력한 저해제로 보고되어 있다(12). 녹황색 채소류 중에, 특히 양배추, 브로콜리 및 컬리플라워 등과 같은 십자화과 식물들이 항암효과가 강한 것으로 알려져 있으며(13), 또한 indole glucosinolate가 열처리에 의해서 indolemethanol과 indoleacetonitrile로 분해되고 이들이 항암효과를 갖는다고 보고되었다(14). 무는 십자화과 채소의 대표적인 작물로서 다른 십자화과 채소와 마찬가지로 glucosinolate 계통의 항암성 물질이 수 μmol/ g 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다(14,15).

국내 생산 과·채류중 배추와 더불어 총생산량의 60% 이상을 점하는 매우 중요하고 친숙한 작물인 무(*Raphanuse sativus*)의 기능성 식품소재 및 각종 응용제품에 대한 연구개발은 아직 미흡한 단계에 있다. 또한 무에 대해서는 항암효과에 대한 연구가 거의 없는 실정이므로 본 연구에서는 MTT법을 이용하여 무의 에탄올 추출물이 폐암 세포주에 대한 세포 독성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험에 사용한 무는 청운무로서 재래시장에서 구입하여 사용하였고 RPMI 1640, penicillin, streptomycin, trypsin과 Hank's balanced salts solution(HBSS)은 Gibco Laboratories Life Technologies Inc.(Canada)에서 구입하였다. 인체 폐암 세포주(A-549)는 서울대학교 세포주은행에서 분양받았다. Indole-3-carbinol(I3C), fetal bovine serum(FBS), dimethyl sulfoxide(DMSO)와 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Chemical Co.(USA)로부터 구입하였다.

시료 조제

시료는 무를 무뿌리와 무줄기로 나누어서 증류수로 여러 번 수세하고, 정선 및 탈수 과정을 거쳐 얇게 썰었다. 여기에 20배 중량의 50% 에탄올을 가하여 40°C에서 4시간씩 3회 진탕 추출한 후 8000 rpm에서 1시간 동안 원심분리하였다. 원심분리 상등액을 감압농축기(Eyler, Japan)로 감압 농축하여 농축된 시료의 고형분 농도를 굴절계(Tokyo Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. 또한 phosphate buffered saline (PBS)로 희석하여 사용하였다.

세포 배양 및 처리

세포주는 RPMI 1640 조직 배지에서 FBS(Gibco) 10%를 첨가하고 penicillin과 streptomycin이 각각 10,000 unit/mL와 10 mg/mL 섞인 배양액을 사용하여 37°C에서 CO_2 농도가 5%로 조절되는 CO_2 incubator(Forma, Germany)에서 배양하였다(16-18). 세포를 배양용기에서 분리하기 위한 trypsin 용액으로 HBSS에 trypsin(10,000 unit/mg)을 0.05%(w/v) 되도록 용해하고 EDTA(0.53 mM)가 첨가된 것을 사용하였고 배양 세포의 세척 등에는 HBSS를 사용하였다(19).

세포주 독성 실험은 1차적으로 세포의 형태 변화를 관찰한 후 활성을 가지는 시료를 MTT법(20)으로 측정하였다. MTT 용액은 PBS 0.1%에 2 mg/mL의 농도로 용해한 것을 사용하였다. 상기의 방법에 의해 조제된 탐색 시료 20 μL를 96-microwell plate에 4×10^4 cells/mL의 농도로 분주하여 미리 24시간 배양된 세포 배양액 180 μL에 가하였다. 48시간 배양 후 조제한 MTT 용액을 50 μL/well씩 첨가하여 4시간 더 배양하고 배지를 흡입, 제거하였다. 살아있는 세포에 의해 MTT로부터 생성되는 formazan crystal을 용해시키는데 사용하는 DMSO를 200 μL/well씩 가하고 plate-mixer에서 잘 교반하여 침전물을 완전히 용해하였다. 각 well의 흡광도는 570 nm에서 micro plate reader(BioRad, USA)를 사용하여 측정하였다.

IC_{50}(50% inhibitory concentration)값의 산출

폐암 세포주에 대한 IC_{50}값(19)은 각 추출물의 독성 정도를 같은 수준에서 알아보기 위해 구하였는데, 그 값은 폐암 세포의 증식 억제 정도가 50%일 때의 수치로서 다음과 같이 계산하였다.

$$IC_{50}\ (mg/mL) = [(A-B)/A]\times 100$$

여기서, A: 시료 무첨가 well의 A_{570}
B: 시료 첨가 well의 A_{570}

세포의 성장 측정 및 형태학적 관찰

인체 폐암 세포주인 A-549에 각각의 시료를 농도에 따라 첨가하고 72시간 배양하면서 대조군과 실험군의 세포 모양 변화 및 세포수 측정을 haemacytometer 및 도립형 배양현미경(Oympus CK40-32PH, Japan)으로 24시간 간격으로 관찰하였다. 모든 분석은 3회 반복실험의 결과를 평균±표준오차(mean±standard error)로 표시하였다.

결과 및 고찰

무줄기와 무뿌리 추출물 첨가시 시간에 따른 폐암 세포수의 증감

인체 폐암세포주 A-549를 무줄기 추출물과 무뿌리 추출물 0.04%씩 함유된 배양액에서 12시간 간격으로 배양하며 세포수를 측정하였다. 계대 배양은 2×10^5 cells/mL의 농도 수준에서 수행하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 대조군(PBS)에서는 12, 24, 36, 48 및 60시간 배양 후 각각 4×10^5, 7.6×10^5, 1.0×10^6, 2×10^6 및 3.6×10^6 cells/mL가 배양되어 배양시간의 경과에 따라 빠른 속도로 증식되었다. 무줄기 추출물, 무뿌리 추출물 및 양성대조군(I3C)에서는 증식율이 PBS와 비교하였을 때 현저하게 증식이 억제되었다. 즉, PBS와 비교하여 3.9%~63.5% 수준으로 세포수가 감소되어 증식이 현저하게 억제되는 현상을 보였다.

이상의 결과로 보아 무줄기와 무뿌리는 *in vitro*에서 인체

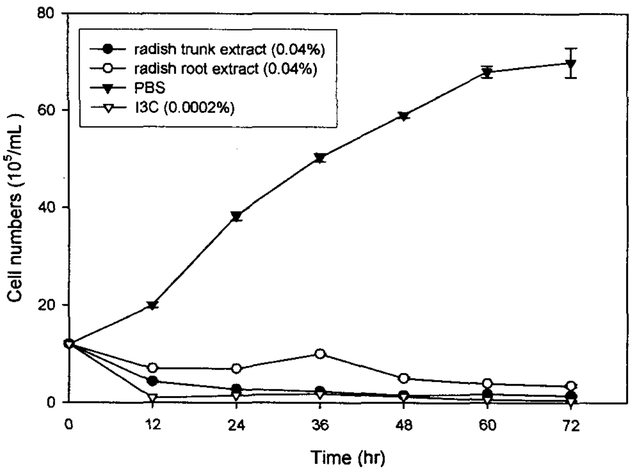


Fig. 1. Growth curves of A-549 cells in the culture medium containing test samples in 6-well plate.

폐암세포인 A-549의 증식을 억제시키는 작용이 있는 것으로 나타났다. 각종 항암제의 암세포 사멸작용의 유형을 살펴보면 첫째, 약제의 농도에 의존하는 경우로 단시간에 세포가 사멸되어 시간의 경과되어도 세포 생존율이 일정치 이하로 감소하지 않는 경우가 있고, 둘째는 작용시간에 의존하는 경우로 농도보다는 시간에 따라 세포사멸 작용이 커지는 경우이며, 셋째는 농도와 시간 모두 동시에 의존성을 가져 고농도에서는 단시간에, 저농도에서는 시간이 경과됨에 따라 사멸작용이 비례되는 경우 등으로 구분할 수 있는데(21), 본 실험의 결과는 셋째 경우에 해당되는 것으로 보여진다.

도립형 배양현미경을 사용하여 무줄기 추출물, 무뿌리 추출물, I3C 및 PBS가 투여된 폐암 세포주의 증식을 관찰하였다. 24, 48 및 72시간 간격으로 무줄기 추출물, 무뿌리 추출물 및 I3C는 24시간 이후부터 현저하게 폐암 세포주가 줄어들었다(데이터 제시 생략). PBS가 투입된 배양용기에서는 시간이 지날수록 세포의 크기와 세포수가 증가하였다.

농도별 무줄기 및 무뿌리의 항암활성

무줄기 추출물과 무뿌리 추출물은 각각 PBS로 희석하여 배지의 0.16, 0.08, 0.04, 0.02 및 0.01%의 농도가 되도록 준비하고 시료와 PBS 및 I3C(0.0002%)를 12시간 간격으로 72시간까지 측정하였다(Fig. 2). Fig. 3에서 보는 바와 같이 36시간까지의 흡광도의 변화는 거의 없으나 36시간이 지난 후에는 추출물의 농도가 높을수록 세포증식 억제율이 높았다. 각각 0.16%의 무줄기 추출물과 무뿌리 추출물은 I3C(0.0002%)의 항암 활성과 비슷한 수치를 보였다. 비록 비슷한 항암활성을 보이는 무추출물과 I3C의 농도는 현격한 차이를 보이지만 I3C는 순수분리 정제된 물질임에 비하여 무 추출물은 crude한 추출물임을 감안할 때 비록 활성은 낮지만 항암활성을 갖는 물질들이 무에 존재함을 시사하는 결과이었다.

무줄기 추출물과 무뿌리 추출물의 폐암세포에 대한 활성을 PBS를 대조군으로 하여 백분율로 환산한 결과는 Fig. 3에 함께 표시하였다. 이를 토대로 계산한 IC_{50} 값을 Table 1에

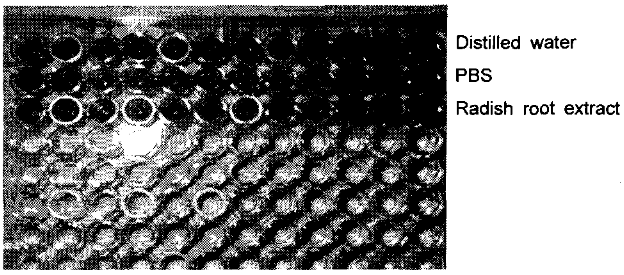
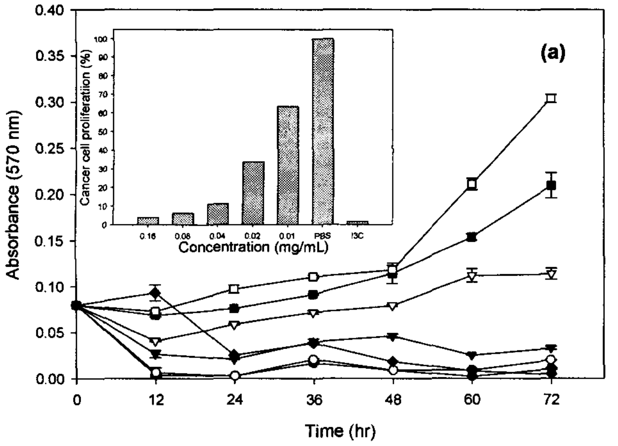


Fig. 2. MTT assay for the cytotoxicity of radish extract on lung cancer cell line in 96-well plate.



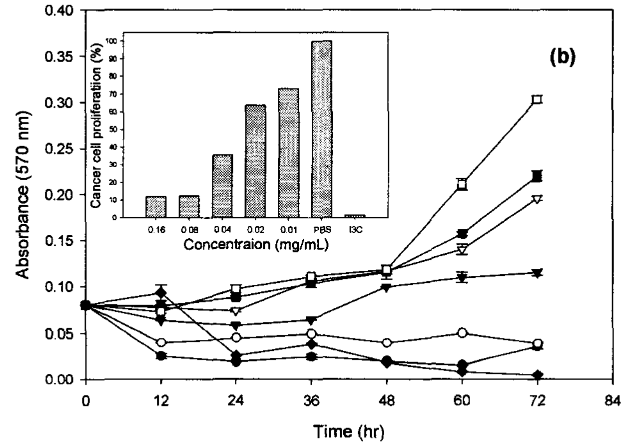


Fig. 3. Absorbance of A-549 cell line in 96-well plate by (a) EtOH extract of radish trunk and (b) EtOH extract of radish root.
■: 0.01%, ▼: 0.02%, ▽: 0.04%, ○: 0.08%, ●: 0.16%, □: PBS, ◆: I3C (0.0002%).

제시한 바와 같다. IC_{50}값이 무줄기 추출물에서는 0.015%, 무뿌리 추출물에서는 0.03%로 Rho와 Han의 연구(2)에서 인

Table 1. IC_{50} values of EtOH extracts of radish and I3C on lung cancer cell line

Sample	IC_{50} (%)
EtOH extract of radish root	0.015
EtOH extract of radish trunk	0.03
I3C	0.0012

체 폐암세포에 대한 마늘의 에탄올 추출물의 IC_{50}값이 0.84 mg/mL으로 보고하는 것과 비교할 때 무뿌리, 무줄기 추출물에 대한 인체 폐암 세포주의 감수성이 마늘에 대한 것보다 더 큰 것으로 나타났다.

요 약

무의 에탄올 추출물을 이용하여 폐암에 대한 세포 독성을 조사하였다. 청운 무를 무줄기와 무뿌리로 나누어 수세, 정선, 탈수한 후 에탄올과 물(5 : 5, v/v)의 혼합용매로 추출하고 폐암 세포주 A-549를 사용하여 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)법을 사용하여 항암 활성을 분석하였다. 각 well의 570 nm에서의 흡광도를 측정하고 대조군의 흡광도에 대한 백분율을 산출하였다. 실험 결과 무줄기 추출물과 무뿌리 추출물은 모두 A-549에 대한 세포 독성을 가지고 있었다. 무줄기 추출물의 IC_{50}(50% inhibitory concentration)은 0.015%이었고 무뿌리 추출물의 IC_{50}은 0.03%이었다. 동일 농도(0.01%)에서 무줄기 추출물이 무뿌리 추출물보다 A-549에 대한 항암활성이 더 뛰어났다.

감사의 글

본 연구는 농협중앙회의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. Weisburger JH. 1965. On the etiology of gastro-intestinal tract cancers, with emphasis on dietary factors in emmelot, krick. In *Environmental Carcinogensis*. Elsevier/North-Holland/Biochemical Press, Amsterdam. p 215-240.
2. Rho SN, Han JH. 2000. Cytotoxicity of garlic and onion methanol extract on human lung cancer cell lines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 870-874.
3. Park IW. 1993. Detection of mutations and human papillomavirus in human primary lung carcinoma by immunhistochemistry and ISH using biotinylated probes in paraffin embedded specimens. *MS Thesis*. Chung-Ang University.
4. Chung DH. 1998. *Biological activity of food*. Seonjinmunhwasa, Seoul. p 72-74.
5. Lee HS, Lee JY, Kim DC, In MJ, Hwang WI. 2000. The inhibitory effects of propolis on *in vitro* proliferation of human cancer cell. *Korean Nutr Soc* 33: 80-85.
6. Morita K, Hara M, Kada T. 1987. Studies on natural desmutagens: screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acid. *Agric Biol Chem* 42: 1235-1241.
7. Seo JS, Lee YW, Suh NJ, Chang IM. 1990. Assay of antimutagenic activities of vegetable plants. *Korean J Pharm* 21: 88-97.
8. Wall ME, Wani MC, Manikumar G, Taylor H, Hughse TJ, Gaetono K. 1989. Plant antimutagenic agents: structure and antimutagenic properties of cymobarbatol and 4-isocymobarbatol, new cympols from green alga (*Cymopollia barbata*). *J Nutr Prod* 52: 1092-1099.
9. Bardifield CA, Bjeldanes LF. 1984. Effect of dietary indole-3-carbinol on intestinal and hepatic monooxygenase, glutathione *S*-transferase and epoxide hydrolase activities in the rat. *Food Chem* 22: 977-982.
10. Whitty JP, Bjeldanes LF. 1987. The effects of dietary cabbage on xenobiotic metabolizing enzymes and the binding of aflatoxin B_1 to hepatic DNA in rats. *Food Chem* 25: 581-587.
11. Wattenberg LW, Loub WD. 1978. Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles. *Cancer Res* 38: 1410-1413.
12. Wattenberg LW. 1977. Inhibition of carcinogenic effects of polycyclic hydrocarbons by benzylisothicyanate and related compounds. *J Natl Cancer Inst* 58: 395-398.
13. Slominski BA, Campbell LD. 1988. Gas chromatographic determination of indoleacetonitriles in rapeseed and brassica vegetables. *J Chromatogr* 454: 258-291.
14. Moore GE, Gallo RC, Gallogher RE. 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270: 347-349.
15. Shin KW, Kang KS, Ahn CW, Seo KI. 1993 Quantitative analysis of glucosinolates and thermal degradation product of indole glucosinolates in radish. *J Korean Agric Chem Soc* 36: 23-28.
16. Campling BG, Pym J, Baker HM, Cole SPC, Lam YM. 1991 Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. *J Cancer* 63: 75-83.
17. Hanks JH, Wallace RE. 1949. Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc Exp Biol Med* 71: 196-201.
18. Shin JE, Park JH, Bai DH, Yu JH. 1995. Isolation and identification of a soil *Actinomycetes* YBE-316 producing an antitumor antibiotic. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 297-303.
19. Im SW, Kim TH. 1997. Physiological activity of alliin and ethanol extract from Korean garlic (*Allium sativum* L). *Korean J Food Sci* 29: 348-354.
20. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
21. Ohoshi A, Sugeno HG. 1975. *Culture of human cancer cells*. 1st ed. Asugurashoten, Tokyo, Japan.

(2003년 9월 8일 접수; 2003년 12월 18일 채택)