

한국산 발아 벼 추출물의 여러 가지 암세포주에 대한 증식 억제 효과 비교

김현영¹ · 황인국¹ · 정은미¹ · 김태명² · 김대중² · 박동식³ · 이준수¹ · 정현상^{1*}

¹충북대학교 식품공학과

²충북대학교 수의학과

³국립식량과학원 농식품자원부

Antiproliferation Effects of Germinated-Korean Rough Rice Extract on Human Cancer Cells

Hyun Young Kim¹, In Guk Hwang¹, Eun Mi Joung¹, Tae Myoung Kim²,
Dae Joong Kim², Dong Sik Park³, Junsoo Lee¹, and Heon Sang Jeong^{1*}

¹Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

²College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine,
Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

³National Institute of Crop Science, Gyeonggi 441-797, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of 70% ethanol extracts of various germinated-rough rice cultivars: ('Ilpum', 'Goami2', 'Keunnun', 'Sulgaeng', 'Baegjinju', and 'Heugkwang') on proliferation of human cancer cell lines (MKN-45, HCT116 and NCI-H460). Antiproliferation effects of rough rice on different cancer cell lines were higher in after germination than before germination. The viability of HCT-116 colon cancer cells was lowest at 18.89% in after germination of 'Heugkwang' at 1.0 mg/mL. The cell viability of MKN-45 lung cancer cells and MKN-45 stomach cancer cells were in the range of 5~10% in after germination of 'Ilpum', 'Goami2', 'Baegjinju', and 'Sulgaeng', and 'Heugkwang' at 1.0 mg/mL. These results suggest that germinated rough rice might have a potential preventive effect on human cancer cells.

Key words: rough rice, germination, antiproliferation, human cancer cells

서 론

벼(*Oryza sativa* L.)는 세계 3대곡물 중 하나이며, 벼를 도정한 쌀은 세계인구의 절반이상이 주식으로 이용하고 있다(1,2). 벼는 80% 현미, 20% 왕겨로 구성되어 있으며, 왕겨층을 제거한 것을 현미라 하는데 이 현미는 과피(pericarp), 종피(seed coat) 및 호분층(aleurone layer)으로 구성된 미강층을 배아(embryo) 및 배유(endosperm)로 이루어져 있다(3,4).

벼의 종자는 씨눈과 배젓에 있는 비활성 상태의 DNA 유전정보와 각종 효소, 영양소 등이 외적환경 여건이 좋아지면 활성화되어 발아되는데, 일반적으로 발아가 진행됨에 따라 다양한 성분들이 증가되거나 생성되고 그에 따라 다양한 생리활성이 증가되는 경향이 있다고 보고되고 있으며 특히 발아된 벼는 γ -orizanol이나 arabinoxylane, γ -aminobutyric acid(GABA), vitamin E 등의 생리활성 성분들이 증가하고 발아 중에 효소가 활성화되어 영양성분들의 체내 흡수가 용

이하게 되는 것으로 알려져 있다(5). 최근, 발아에 의하여 탄수화물(6), 단백질과 아미노산(7), 지방산(8,9), 무기질(10) 및 비타민(8,11) 등 영양성분의 함량 변화와 더불어 각종 효소나 효소 저해제의 하나인 트립신 저해제의 변화(6,12)에 관한 연구들이 수행되어 왔으나 벼를 발아시킬 경우 항암활성의 변화에 대한 연구는 찾아보기 어려운 실정이다.

본 연구는 6종의 발아벼가 인체유래 암세포주(위암, 대장암 및 폐암) 증식에 미치는 효과를 비교하고 암 예방 가능성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

발아벼 제조 및 추출방법

본 실험에 사용된 시료는 농촌진흥청(Suwon, Korea)에서 2008년에 재배 생산된 일반 벼인 일품벼(Ilpumbyeo), 백진주벼(Baegjinbyeo) 및 설강벼(Sulgaengbyeo) 3품종과 특수미인 고아미2호(Goami2), 거대배아벼(Keunnunbyeo)

*Corresponding author. E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr
Phone: 82-43-261-2570, Fax: 82-43-271-4412

및 흑광벼(Heugkwangbyeo) 3품종을 분양받아 4°C 저온저장고에 저장하면서 실험에 사용하였다. 품종별 벼 500 g을 20°C의 물로 수세하고 3일간 침지시킨 다음 발아기(TP-CB 400, EZIONE Inc., Beijing, China)에서 발아시켰다. 발아기의 온도는 37°C, 상대습도는 85%로 유지시키면서 48시간 동안 발아시켰으며, 발아된 싹의 길이가 1~1.5 cm 정도 된 후 발아를 정지시키고 50°C의 건조기(WFO-459PD, EYELA, Tokyo, Japan)에서 2일 동안 건조 후 80 mesh로 분쇄(Micro hammer cutter mill type-3, Culatti AG, Zurich, Swiss)하였다. 벼 및 발아벼에 함유된 유효성분은 70% 에탄올을 사용하여 추출하였다. 즉, 벼 시료 10 g에 70% ethanol 500 mL을 가하고 80°C에서 3시간 동안 3회 환류추출한 다음 감압 여과하여 불용성 물질을 제거하였다. 여과

된 추출물은 회전진공농축기(EYELA N-1000, Tokyo, Japan)로 농축하여 용매를 완전히 제거한 다음 동결건조(FD-5508, Ilshin Lab Co., Seoul, Korea)하여 발아벼 추출물 시료로 사용하였다.

암세포주 배양

본 실험에서 사용한 암세포는 HCT-116(colorectal carcinoma: KCLB 10247), NCI-H460(lung large cell carcinoma: KCLB 30177) 및 MKN-45(stomach adenocarcinoma: KCLB 80103)이었으며, 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 사용하였다. 각각의 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 100 U/mL penicillin G, 50 µg/mL streptomycin을 첨가한 RPMI-1640(Gibco Co., NY, USA)을 사용하여 5% CO₂,

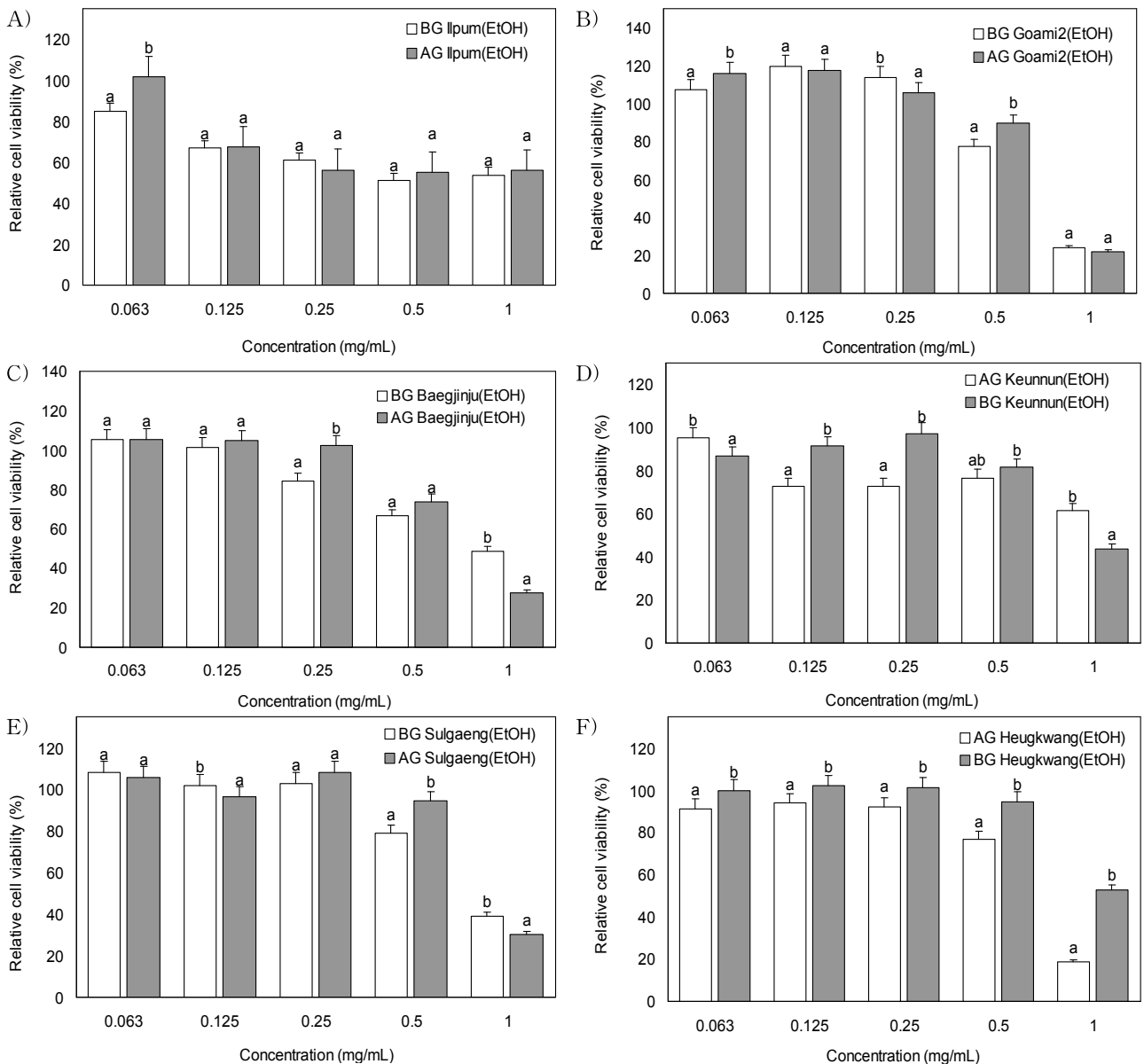


Fig. 1. Antiproliferation effects of 70% ethanol extracts of the rough rice before (BG) and after (AG) germination on human colorectal cancer cell line (HCT-116).

37°C 배양기에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 5분 간 trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양을 실시하였다.

세포주 증식 측정

발아벼의 암세포주 증식에 미치는 영향은 Ishiyama 등 (13)의 방법에 따라 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay로 실험하였다. 즉, 1×10^5 cell/well 농도로 96 well plate에 100 μ L씩 분주한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지에 일정 농도로 희석된 추출물을 100 μ L를 첨가하여 다시 24시간 배양하였다. 배양 완료 후 2 mg/mL 농도의 MTT시약을 well당 10 μ L씩 분주한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양한 후 MTT시약

이 포함된 배지를 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO) 100 μ L를 가한 다음 상온에서 발색시키고, ELISA microplate reader(ELx808, BioTek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각각의 암세포증식 억제율은 다음의 식에 따라 생존율로 표시하였다.

$$\text{Cell viability (\% of control)} = \frac{\text{시료처리구의 흡광도}}{\text{Control 흡광도}} \times 100$$

통계분석

통계분석은 SPSS Ver 12.0 package program을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

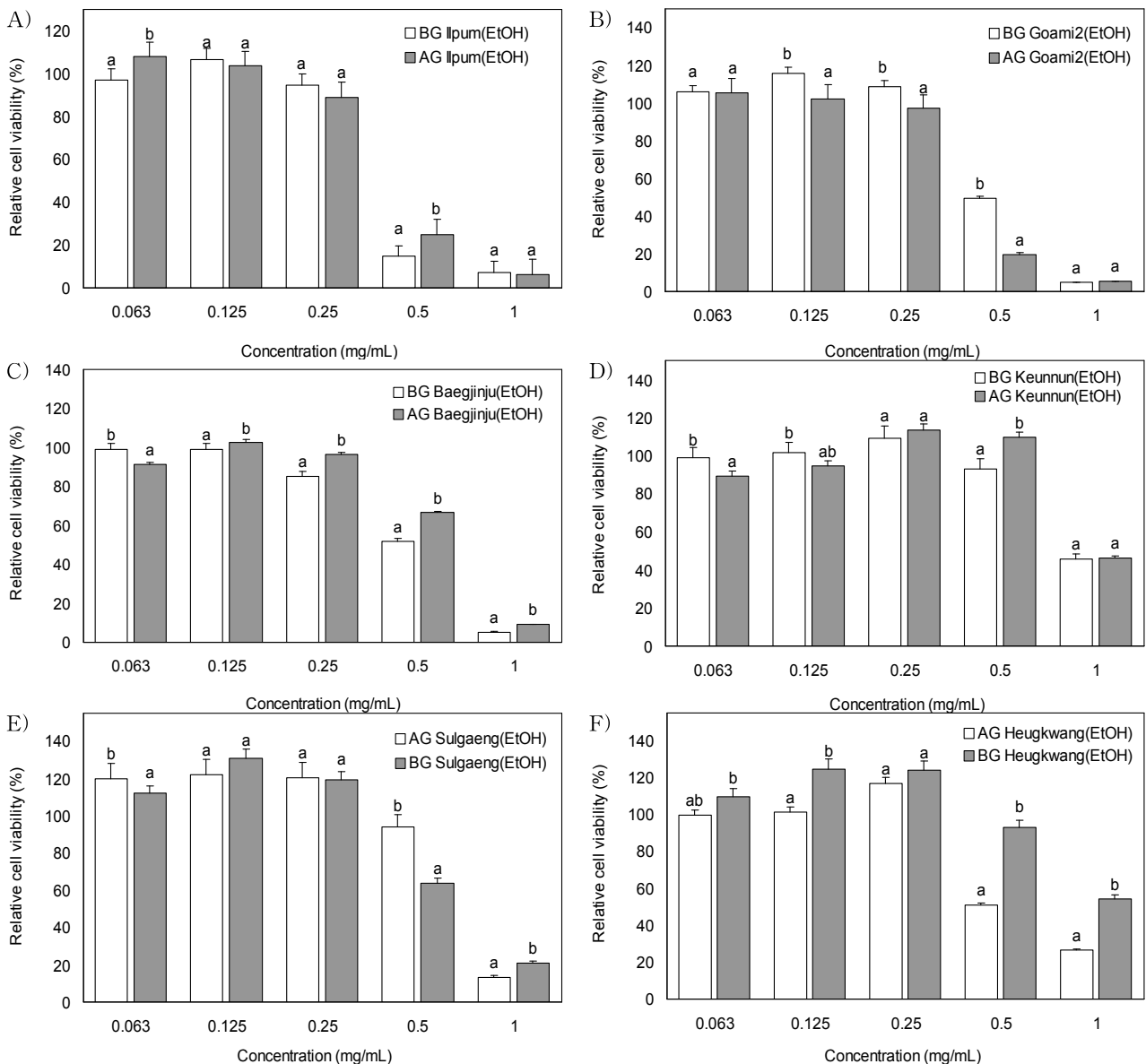


Fig. 2. Antiproliferation effects of 70% ethanol extracts of the rough rice before (BG) and after (AG) germination on human lung cancer cell line (H460).

결과 및 고찰

대장암 세포주(HCT-116)에 대한 발아벼의 증식억제효과 한국산 벼 6품종에 대한 발아 전후의 에탄올 추출물이 대장암세포주(HCT-116) 증식에 미치는 영향을 살펴본 결과 일품벼(Fig. 1A)와 큰눈벼(Fig. 1D)를 제외한 4종의 벼 모두 저농도에서는 대장암세포의 증식을 억제하지 못하였지만 1 mg/mL의 농도에서는 대장암세포주의 증식억제효과가 나타났다. 고아미2호(Fig. 1B)는 발아 유무에 따른 차이가 작게 나타났지만 백진주벼(Fig. 1C) 및 설강벼(Fig. 1E)는 발아한 후 우수한 효과를 보였다. 특히, 흑광벼(Fig. 1F)는 발아 추출물에서 18.89%로 낮은 생존율을 보여 대장암 세포주 증식억제효과가 큰 것으로 나타났다. Hong 등(14)

에 의하면 홍국쌀 추출물의 경우 대장암세포(HCT-116)에 대한 증식억제효과가 0.2 mg/mL에서 약 80% 억제율을 보였다고 보고하였는데 이는 홍국균이 생산하는 유효물질(Monacolin K)에 의한 영향으로 보고 있으나 본 연구의 경우에는 단순히 발아에 의한 효과로 볼 때 전곡의 발아 시 protease inhibitors, phytic acids 및 γ -oryzanol 등과 같은 물질들의 증가에 의해 암세포증식을 억제하는 것으로 판단된다(15).

폐암세포주(NCI-H460)에 대한 발아벼의 증식억제효과 발아 전후 벼 추출물이 인체유래 폐암세포(NCI-H460) 증식억제에 미치는 영향을 살펴본 결과 저농도에서는 폐암세포의 증식을 억제하지는 못하였지만 1 mg/mL 농도에서 일

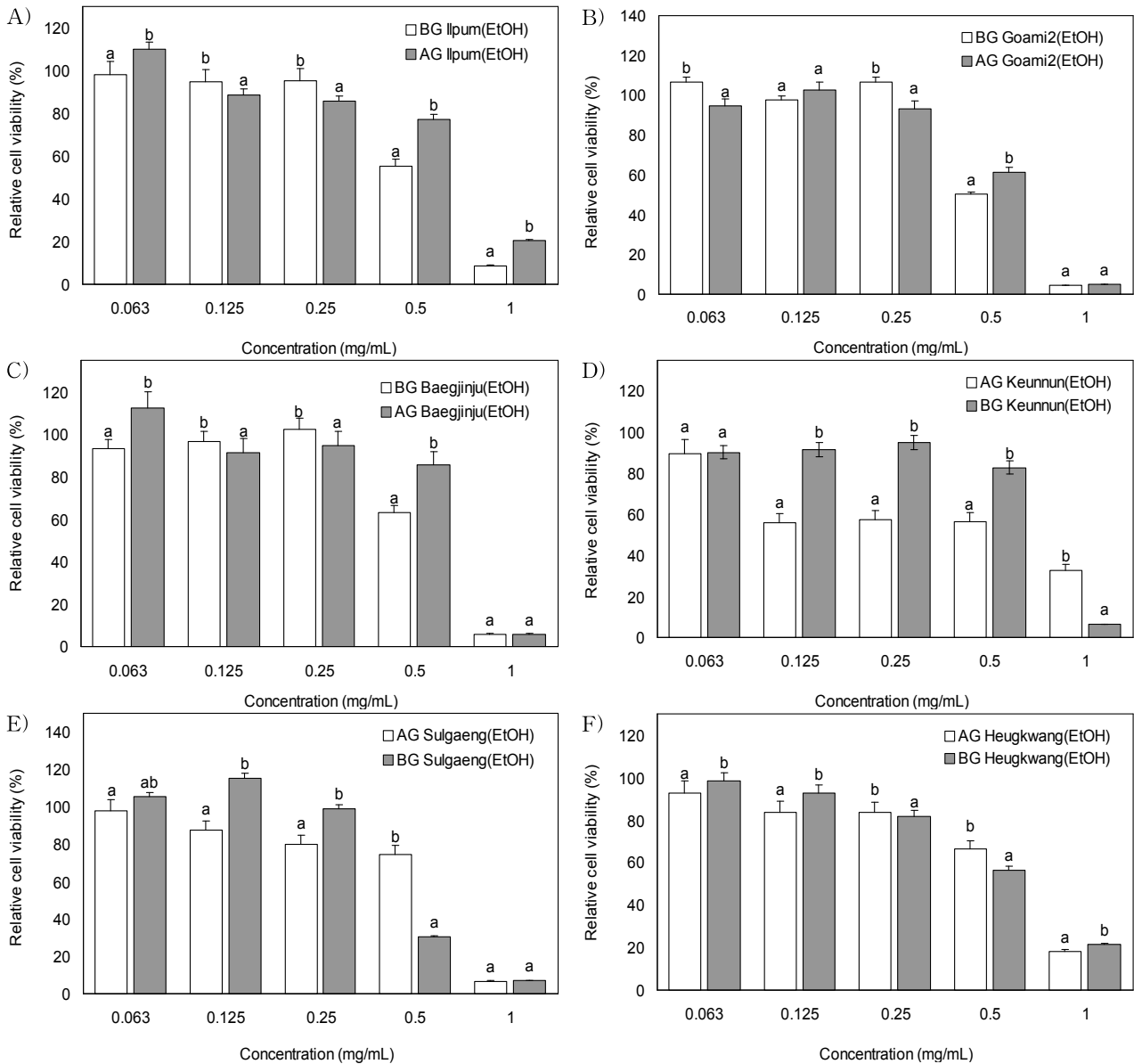


Fig. 3. Antiproliferation effects of 70% ethanol extracts of the rough rice before (BG) and after (AG) germination on human stomach cancer cell line (MKN-45).

품벼(Fig. 2A)는 발아 및 무발아 시 생존율이 각각 6.38 및 7.28%로 폐암세포주 증식억제효과가 나타났으며, 고아미(Fig. 2B)도 발아 및 무발아 시 생존율이 각각 5.28 및 5.00%로 우수한 효과를 보였다. 백진주(Fig. 2C) 및 큰눈벼(Fig. 2D) 추출물들은 발아 전후 암세포증식 억제효과가 다른 품종에 비해 작게 나타났다. 설갱벼(Fig. 2E)와 흑광벼(Fig. 2F)의 발아추출물은 각각 13.31 및 26.40%의 생존율을 보여 발아 전과 후의 폐암세포증식 억제효과의 차이를 나타내었다. Lee 등(16)에 의하면 한국 재래종 벼 종실의 폐암세포주 A549에 대한 항암활성 측정 결과 IC₅₀ 값이 약 0.3 mg/mL로 보고하였는데 본 연구에서도 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 발아 과정 중 전곡에 함유되어 있는 생리활성물질의 종류 및 양의 변화가 발생하여 항염증작용, 항돌연변이 작용 및 암세포주의 증식을 억제하는 것으로 생각된다(17). 발아곡류 중 어떤 성분이 암세포주 증식을 억제하는지는 명확하게 밝혀져 있지 않지만, 발아 후 phenol성 화합물의 증가(18)와 발아 후 SOD 유사활성과 nitrite 소거능이 증가된다는 결과들(19)로 미루어 볼 때 생리활성 물질의 증가가 관련이 있을 것으로 생각된다.

위암세포주(MKN-45)에 대한 발아벼의 증식억제효과

국산 벼 6품종에 대한 발아 전후 에탄올 추출물이 인체유래 위암세포(MKN-45) 증식억제에 미치는 영향을 살펴본 결과 발아 전후 추출물 모두 낮은 농도에서는 위암세포의 증식을 억제하지 못하였지만 1 mg/mL 농도에서는 억제효과가 높게 나타났다. 일품벼(Fig. 3A)의 경우 발아보다는 무발아 추출물이 암세포증식 효과가 크게 나타났으며, 고아미(Fig. 3B)와 백진주벼(Fig. 3C)의 경우 발아 추출물에서 각각 4.95 및 5.71%의 매우 낮은 생존율을 보여 위암세포주에 대한 증식억제효과가 크게 나타났다. 또한 흑광벼(Fig. 3F)에서는 발아 및 무발아 추출물이 각각 18.11 및 21.33%의 생존율을 보였다. Craig(20) 및 Adom과 Liu(21)의 연구에 의하면 전곡의 항암효과는 곡류에 함유된 영양성분 이외에 배아와 겨층에 다량 함유된 질병을 예방할 수 있는 항산화 영양소, phenolic compound와 phytoestrogen 등의 phytochemicals를 풍부하게 함유하고 있기 때문이라고 보고하였으며, Kang 등(22)은 특수미 발아 시 여러 항산화 물질들이 증가된다고 보고하였는데 본 연구에서도 발아 시 다양한 성분들이 증가하기 때문에 높은 암세포증식 억제효과가 나타난 것으로 판단되며, 향후 이러한 성분들에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

요 약

한국산 벼 6종(일품벼, 백진주벼, 설갱벼, 고아미2호, 거대배아벼 및 흑광벼)의 발아 및 무발아 에탄올 추출물에 대한 암세포주 증식 억제효과를 위암세포주(MKN45), 대장암세포(HCT116) 및 폐암세포(NCI-H460)에 대하여 살펴 본 결

과 일부 품종의 경우 발아 후에 1 mg/mL 농도에서 암세포증식 억제효과가 증가하였다. 대장암세포주에 대한 성장억제 효과가 가장 좋았던 품종은 흑광벼로 발아 에탄올 추출물 18.89%의 생존율을 보였으며, 폐암세포주에 대해서는 일품, 고아미2호, 백진주 및 설갱벼 발아 에탄올 추출물은 5~10%의 생존율을 보였다. 위암세포에 대해서는 일품, 고아미2호, 백진주 및 설갱벼에 대하여 5~10%의 생존율을 보여 대조군에 비해 암세포주 증식 억제효과가 있는 것으로 나타났다. 본 연구결과 벼를 발아시킬 경우 항암활성이 증가함을 알 수 있었으며, 발아 후 벼의 성분분석 및 추후 항암실험의 다양한 지표를 활용하여 항암활성을 입증하는 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 아젠다과제(과제번호: 200901AFT143782462) 예산으로 추진된 연구의 일부로서 연구비를 지원해 주신 농촌진흥청에 감사를 드립니다.

문 헌

1. Kwak TS, Teo JH. 2004. Varietal variation of ripening and physico-chemical properties in different rice ecotypes. *J Korean Intl Agric* 16: 130-135.
2. Ministry of Agriculture and Forestry Republic of Korea. 2005. Agricultural and Forestry Statistical Yearbook, Agricultural and Forestry Major Statistics.
3. Kim LS, Son YK, Son JR, Hur HS. 2001. Effect of germination condition and drying methods on physicochemical properties of sprouted brown rice. *J Korean Crop Sci* 46: 221-228.
4. Ministry of Agriculture and Forestry Republic of Korea. 2005. Agricultural and Forestry Statistical Yearbook, Agricultural and Forestry Major Statistics, Stock Farm Product Annual per Consumption Trend.
5. Lee YR, Kim JY, Woo KS, Hwang IG, Kim KH, Kim KJ, Kim JH, Jeong HS. 2007. Changes in the chemical and functional components of Korean rough rice before and after germination. *Food Sci Biotechnol* 16: 1006-1010.
6. Lee MH, Son HS, Choi OK, Oh SK, Kwon TB. 1994. Changes in physico-chemical properties and mineral contents during buck-wheat germination. *J Korean Food Nutr* 7: 267-273.
7. Cho BM, Yoon SK, Kim WJ. 1985. Changes in amino acid and fatty acids composition during germination of rapeseed. *J Korean Food Sci* 45: 87-91.
8. Choi KS, Kim ZU. 1985. Changes in lipid components during germination of mungbean. *J Korean Food Sci Technol* 17: 271-275.
9. Colmenarse DRAS, Bressani R. 1990. Effect of germination on the chemical composition and nutritive values of amaranth grain. *Cereal Chem* 67: 519-523.
10. Kim IS, Kwon TB, Oh SK. 1985. Study on the chemical change of general composition fatty acids and mineral contents during germination. *J Korean Food Sci Technol* 17: 371-376.
11. Hsu D, Leung HK, Finney PL, Morad MM. 1980. Effect of

- germination on nutritive value and baking properties of dry peas, lentils and faba beans. *J Food Sci* 45: 87-91.
12. Ikeda K, Arioka K, Fujii S, Kusano T, Oku M. 1984. Effect on buck-wheat protein quality of seed germination and changes in trypsin inhibitor content. *Cereal Chem* 61: 236-240.
 13. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. 1996. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19: 1518-1520.
 14. Hong MY, Seeram NP, Zhang Y, Heber D. 2008. Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 19: 448-458.
 15. Manson MM, Gescher A, Hudson EA, Plummer SM, Squires MS, Prigent SA. 2000. Blocking and suppressing mechanism of chemoprevention by dietary constituents. *Toxicology Lett* 112: 499-505.
 16. Lee DJ, Kim KH, Kang JH, Lee TS, Kim HW. 2006. Antioxidant and anticancer activities of methanolic extracts in grains of the Korean rice laneraces. *J Korean Intl Agric* 18: 264-269.
 17. Kuno T, Hirose Y, Yamada Y, Hata K, Quiang SH, Asano N, Oyama T, Zhi H, Iwasake T, Kobayashi H, Mori H. 2006. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by fermented brown rice and rice bran. *Oncol Rep* 15: 533-538.
 18. Tian S, Nakamura K, Cui T, Kayahara H. 2005. High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *J Chromatogr A* 1063: 121-128.
 19. Kang BR, Park MJ, Lee HS. 2006. Germination dependency of antioxidative activities in brown rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 389-394.
 20. Craig WJ. 1997. Phytochemicals: guardians of our health. *J Am Diet Assoc* 97: S119-S204.
 21. Adom KK, Liu RH. 2002. Antioxidant activity of grains. *J Agric Food Chem* 50: 6182-6187.
 22. Kang MY, Kim SI, Koh HJ, Chin JH, Nam SH. 2004. Antioxidative activity of germinated specialty rices. *J Korean Food Sci Technol* 36: 624-630.

(2009년 11월 9일 접수; 2009년 12월 21일 채택)