

청갓과 적갓에 함유된 Glucosinolates의 항암 활성 및 정량 분석

김 활 · 김준열 · 김호진 · 김도경 · 조혜진 · [†]한병수 · 김현웅* · 김정봉*

경기북과학교등학교, *국립농업과학원 농식품자원부

Anticancer Activity and Quantitative Analysis of Glucosinolates from Green and Red Leaf Mustard

Hwal Kim, Jun-Yeol Kim, Hyo-Jin Kim, Do-Kyung Kim, Hye-Jin Jo,

[†]Byoung-Su Han, Heon-Woong Kim* and Jung-Bong Kim*

Gyunggibuk Science High School, Uijeongbu 480-826, Korea

*National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

Abstract

The objective of this study was to compare the anticancer activity of glucosinolates against four different cancer cells; SNU-251, SNU-354, SNU-C4, MCF-7 and to determine the amounts of glucosinolates in mustard leaves. Green and red mustard leaves were cultivated on the field of Rural Development Administration from May to July, 2010. After the leaves were harvest and lyophilized, the fine powder was extracted with boiling 70% methanol(v/v) for the measurement of anticancer activity and then applied to the cancer cells obtained from Korean Cell Line Bank(KCLB). The anticancer activity of red leaf mustard was higher than that of green mustard leaf, particularly in SNU-251 for 24 hr and in SNU-C4 for 48 hr. In both green and red mustard leaf, sinigrin was the most abundant glucosinolate and was determined as 4.71 and 3.06 mg/g dry wt., respectively, but glucoiberin only presented 0.14 mg/g dry wt. with minor amounts.

Key words: *Brassica juncea* Cosson, glucosinolates, anticancer activity, ion-exchange chromatography, HPLC

서 론

최근 국내는 물론 세계적으로 암 발병률이 급증하는 추세이다. 보건복지부와 중앙암등록본부(국립암센터)는 2010년도 국가암등록사업을 통해 산출한 2008년 국가암등록통계를 발표했다. 자료에 따르면 2008년 한 해 동안 암 진단을 받은 환자는 17만 8,816명으로 전년에 비해 7.8% 증가하였고, 10년 전인 1999년에 비해 77% 늘어났다. 또한 인구 10만 명 당 암 발생률도 1999년 214.2명에서 2008년 361.9명으로 69% 늘었다. 이러한 암 발병률의 증가는 항암 관련 치료비 부담뿐만 아니라 질적인 노동력 감소와 같은 사회적인 문제를 불러일으킬 수 있다. 2010년부터 농촌진흥청에서는 배추과 식물에 함유된 ‘글루코시놀레이트(glucosinolates, GSLs)’의 정량값에 대한 데이터베이스를 공개하고 있다. 이 GSLs는 질소와 황을

함유하고 있는 2차 대사물질로 식물 세포 조직이 상처를 받으면 내재되어 있는 myrosinase 효소 작용에 의하여 분해산물인 isothiocyanates(ITC)를 형성한다. 1990년대부터 이러한 isothiocyanates는 특히 cytochrome P450, Phase 1 and 2 enzymes와 관련된 항암 예방 효과에 매우 뛰어난 효과를 가진 것으로 알려져 있다(Zhang 등 1992; Zhang & Talalay 1994; Fahey 등 1997). 농촌진흥청이 국내에서 수집·보존하고 있는 토종 갓 240종을 직접 재배하여 GSLs 성분을 조사한 결과, 항암 성분으로 알려진 sinigrin의 함유량이 일반 배추보다 더 많이 함유하고 있는 것으로 확인되었고, 적갓과 청갓에서 그 함유량이 가장 높았다.

갓(leaf mustard, *Brassica juncea* (L.) Czern.)은 배추과에 속하는 1년생 또는 2년생 초본식물로 원산지는 중앙아시아로 추정되고 있으며, 용도에 따라 유류용은 유럽, 인도, 소련 남

[†] Corresponding author: Byoung-Su Han, Gyunggibuk Science High School, Uijeongbu 480-826, Korea. Tel: +82-31-870-2717, E-mail: hbs951895@paran.com

부에서 재배되고 있으며, 채소용은 중국을 중심으로 아시아에서 많이 재배되고 있다. 우리나라에서 재배되고 있는 일반 재래종 채소용 갓은 퇴화되고 보존이 안 되어 거의 찾아볼 수 없으며, 현재 재배되고 있는 돌산갓은 50여 년 전 일본 “만생평경대엽고채” 계통을 도입하여 재배된 것이다. 갓의 잎은 넓고 특 쓰는 매운 맛이 적고 섬유질이 거의 없어 부드럽고 잎과 줄기에 잔털이 없다(농촌진흥청 2003). 갓의 매운맛은 세포조직이 손상을 입을 때 휘발성 성분인 isothiocyanate의 발생에 의한 것으로 특히 갓의 잎에서는 주요한 GSL 성분인 sinigrin이 가수 분해되어 allylisothiocyanate(AITC)가 생성되면서 매운맛이 난다(Choi 등 2001). 생성된 isothiocyanate 성분들은 효모, 곰팡이, 각종 박테리아 등에 대해 항균력이 있어서 갓김치로 제조 시에 미생물 군에 항균작용을 하여 갓김치의 발효를 지연시켜 저장성을 높여준다(Jeon 등, 1995). ITC는 세포자살 유도, 혈관신생 억제, 세포주기 저해에 연관되어 있어 항암 효과가 나타난다. ITC는 시토크롬 c의 mitochondrial release, Bcl-2 집단을 조절하고 MAPK 신호표시 및 세포사멸의 시작에 관여하는 단백질 분해효소를 후속 활성화 시켜 세포자살을 유도하며, VEGF의 표현과 분비를 제한하여 혈관의 신생을 억제한다. AITC를 처리하면 Cdk1, Cdc25B, Cdc25C의 감소조절에 의해 세포주기가 저해된다(Mithen R 2001; Cartea & Velsco 2009; Clarke DB 2010). 또한 갓은 많은 양의 thiosulfates와 organosulfur 화합물을 함유하고 있으며, 이 화합물은 화학적으로 유도되는 종양을 저해한다고 보고되었다(Cheigh & Park 1994; Muller & Sieling 2006). Kim 등(1993)은 돌산 갓에서 분리한 4-decanol이 항돌연변이 효과가 있다고 하였고, Wattenberg & Loud(1987)는 GSLs 중에서 indol-3-carbinol, indol-3-acetonitrile 및 3,3-diindolymethane 등 화합물이 유방암과 위암 등의 종양을 억제한다고 보고하였다.

본 연구에서는 토종 청색갓과 적색갓의 잎에서 메탄올로 GSLs를 추출하여 한국인에게 흔히 발병되는 4종류의 암세포(난소암, 간암, 결장암, 유방암)에 처리해 갓의 종류에 따른 항암 활성을 비교 분석하였다. 또한 GSLs의 추출액의 처리 시간을 다르게 하여 처리시간에 따른 항암 활성의 차이도 분석하였다. 그리고 청갓과 적갓의 추출물 중 GSLs를 PLC와 LC-MS로 동정 및 정량화 하였다.

재료 및 방법

1. 식물 재료

갓의 종자는 국립유전자원센터에서 제공된 것으로서 2010년 5월에 농촌진흥청 포장(수원)에 직접 파종하여 7월에 잎(지상부)을 수확한 다음 곧바로 -70°C 초저온 냉동기에 보관하였다. 식물체는 얼린 상태로 동결건조(FDS5508, IshinBioBase,

Korea) 시킨 다음 분쇄기로 곱게 분말화하였다.

2. 기기 및 시약

암세포주는 한국인의 일반적인 암질병과 관련된 SNU-251(난소암), SNU-354(간암), SNU-C4(결장암), MCF-7(유방암)와 같은 4종류를 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 계대배양하여 실험에 사용하였다. 암세포주를 배양하는 incubator는 SHEL LAB Sheldon Mfg. Inc(USA)이었고, 배지는 RPMI1640(Gibco BRL, Carlsbad, USA), 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco BRL), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin/streptomycin(GIBCO BRL) 항생제를 혼합하여 사용하였다. 암세포주를 장기간 보관하기 위해 Recovery Cell Culture Freezing Medium contained in D-MEM with FBS and calf sera(GIBCO)를 사용하였으며, cell counting은 C-Chip DHC-N01(inCYTO, Korea)로 하였으며, 세포 염색용 염료는 Trypan Blue Stain, 0.4%(GIBCO)를 사용하였다.

이온교환크로마토그래피 column은 Bio-Spin Column(BIO-RAD, USA)을 사용(10 $\text{cm} \times 2 \text{ cm}$)하였고, GSL 흡착 충전제는 DEAE SephadexTM A-25(GE Healthcare, Sweden)이었다. Desulpho-GSL 용 aryl sulfatase 효소는 Helix pomatia(Type H1, Sigma Aldrich Laboratories Inc., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. GSLs를 분해(isothiocyanate 활성)를 위한 thioglucosidase(myrosinase) 효소는 Sinapis alba(White mustard)에서 추출한 것을 Sigma Aldrich Laboratories Inc.에서 구입하여 사용하였다. PLC는 Alliance e2695 HPLC system(Waters Co. Milford, MA, USA)이었다.

3. 이온교환크로마토그래피를 이용한 갓의 Glucosinolates 추출

1) Myrosinase 불활성화 및 전처리

갓 잎(0.8 g)을 막자사발에 넣고 액체질소를 적당량 부은 다음에 끓는 70% 메탄올 용액 12 mL를 넣고 진탕 혼합하였다. 이 과정에서 갓 자체에 함유된 myrosinase는 불활성화된다. 막자사발을 알루미늄 호일로 밀봉하여 항온수조(69 $^{\circ}\text{C}$)에서 5분간 배양한 다음, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4,500 rpm 속도로 10분간 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 이 과정을 적갓과 청갓 분말에 대해 각각 3번씩 반복한 다음에 각 상층액을 혼합하였다.

2) Desulfo-Glucosinolates 추출

0.5M sodium acetate를 이용해 H^+ 형태로 활성화시킨 충전제(Sephadex A-25)로 mini column을 만든 다음에 조(crude) GSL 추출물을 loading하였다. Loading이 끝나면 초순수로 column을 3회 세척한 후 하단을 파라필름(parafilm)으로 밀봉한 다음에 aryl sulfatase(75 μl)를 loading하고, 상단을 파라필름으로 봉인하여 상온에서 16~18시간 동안 반응시켰다. 그 후, 초순

수로 1 ml씩 3회 세척하여 걸러진 용액(desulfo-GSLs)을 필터한 다음, HPLC로 분석하였다.

4. Glucosinolates의 항암 활성 측정

1) 세포배양

암세포주는 한국세포주은행(KCLB)에서 4종류의 세포주를 분양받아 100 µg/ml penicillin/streptomycin(GIBCO BRL) 항생제를 혼합한 배지[RPMI1640(Gibco BRL, Carlsbad, USA), 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco BRL)에서 배양(5% CO₂, 37°C)하여 사용하였다. 배양된 세포는 일주일에 2~3회 새로운 배지로 갈아주고 4~5일마다 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후, 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 세포에 배지를 넣고 피펫으로 세포가 끌고루 분산되도록 혼합한 다음 실험에 사용하였다. 계대 배양 시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 세포를 액체질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

2) Bio-assay를 이용한 항암 활성 확인

계대 배양한 세포수가 10 µl당 3×10³여개의 세포가 되도록 희석한다. 적갓과 청갓에서 추출한 GSLs를 PBS로 100배 희석한 용액 600 µl를 실온에 준비하여, 추출물 각각에 myrosinase 0.0096 g(2.4 unit)을 투여하고 1시간 30분 동안 교반기 상에서 반응시켰다. 준비한 세포 250 µl와 활성화된 glucosinolates를 50 µl를 24-well plate에서 세포주별로 24시간, 48시간 동안 반응배양한 시킨 다음 bio-assay에 의한 항암 활성을 비교하였다. Trypan blue를 세포 부유액과 1:1의 부피비로 되도록 혼합하고 1~2분 후 관찰하면 죽은 세포들만 푸른색으로 염색된다. 죽은 세포는 haemacytometer로 계수하여 세포 생존율을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. Glucosinolates(GSL) 추출물의 항암 활성 비교

암세포주에 따른 GSLs의 항암 활성을 비교한 결과(Table

1), GSLs는 SNU-354(간암) 세포주에서 가장 높은 항암 활성(평균 15% 사멸)을 보인 반면에 MCF-7(유방암) 세포주에서 가장 낮은 항암 활성(평균 4.5% 사멸)을 나타내었다. 또한 한국인 유래 세포인 SNU-354, SNU-C4(결장암), SNU-251(난소암)의 경우 GSLs의 항암 활성에 큰 차이가 나타나지 않았으나, 백인 유래 세포인 MCF-7의 경우 다른 세포주에 비해 항암 활성이 현저하게 떨어졌다. 따라서 인종에 따른 세포의 유전적 차이에 의하여 GSLs에 대한 항암 활성의 차이가 발생한 것으로 판단된다.

GSLs 추출물을 암세포에 처리한 다음에 처리시간에 따른 생존율을 보면, 24시간 처리한 실험군과 48시간 처리한 실험군 사이에서는 MCF-7를 제외한 세포주에서는 24시간 처리구의 항암 활성이 매우 높았다. 세포주별로 처리 시간에 따른 세포생존율을 비교한 결과, SNU-251과 MCF-7의 경우 처리시간을 48시간으로 했을 경우 생존율 변화가 거의 없었다.

갓에서 추출한 GSLs의 항암 활성 효과는 SNU-354, SNU-C4, SNU-251, MCF-7의 순서로 높게 나타났다. 세포주에 따른 GSLs 추출물의 항암 활성을 비교해 본 결과, SNU-354 세포주에서 가장 높은 항암 활성(평균 15% 사멸)을 보이고, MCF-7 세포주에서는 낮은 항암 활성(평균 4.5% 사멸)이 나타났다. 이와 같은 결과는 Wattenberg & Loud(1987)이 GSLs 중에서 indol-3-carbinol, indol-3-acetonitrile 및 3,3-diindolymethane 등 화합물이 유방암과 위암 등의 종양을 억제한다고 보고한 것과 비교했을 때, 유방암에 대한 효과도 있지만 그보다는 간암 세포에서 항암 활성이 더 높게 나타난 것으로 보인다.

2. 적갓과 청갓의 Glucosinolates 정량

Electrospray ionization(ESI) source를 장착한 single quadrupole Mass Spectrometry에서 positive-ion mode로 분석하였을 때, GSLs의 MS spectrum은 ([M+H]⁺)와 기본구조로부터 당 한 분자(β-D-glucose, C₆H₁₀O₅, m/z 162)가 잘려나간 프래그먼트(fragment)([M+H-glucose]⁺)가 확인되었다(Fig. 1). 주요 성분은 sinigrin이었으며, MS spectrum에서 해당 DS-sinigrin의 분자량(m/z 280)뿐만 아니라 당이 잘려나간 패턴(m/z 118)을 정확히 확인할 수 있었다. 각 GSL의 정량 결과, sinigrin 함량은 청갓

Table 1. The cytotoxicity(%)¹⁾ against four kinds of cancer cells by adding glucosinilate extract from green and red leaf mustard

Culture duration	SNU-354		SNU-251		SNU-C4		MCF-7	
	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Green	Red
24 hr	14	14	5	19	11	17	4	5
48 hr	11	6	10	11	9	15	7	7

¹⁾ Cytotoxicity(%) was calculated as follow: Cytotoxicity(%)=[(C-S)/C×100].

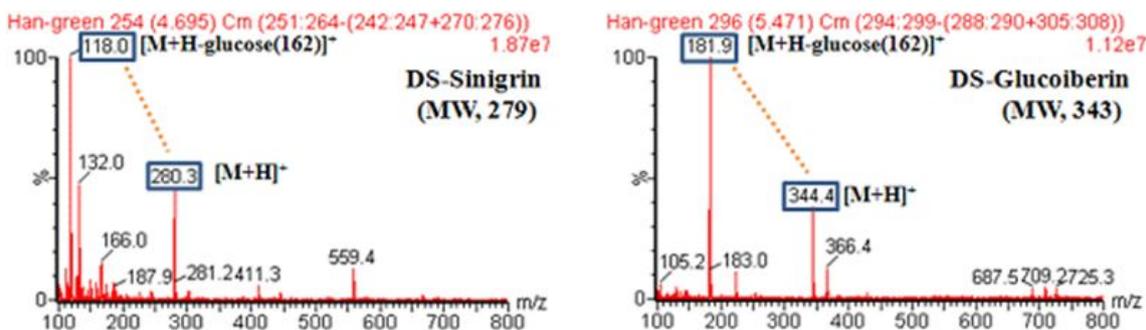


Fig. 1. MS fragments of sinigrin(left) and glucoiberin(right) by LC-ESI/MS.

Table 2. The content(mg/g dry wt.) of sinigrin and glucoiberin in green and red leaf mustard

Glucosinolates	Leaf mustard	
	Green	Red
Sinigrin	4.71	3.06
Glucoiberin	0.14	N.D. ¹⁾

¹⁾ N.D.: not detected.

(4.71 mg/g dry wt.)이 적갓(3.06)보다 정도 더 높은 함량을 나타내었다(Table 2). 또한 glucoiberin은 청갓에서만 미량(0.14 mg/g dry wt.)으로 검출되었다.

요 약

청갓과 적갓에서 추출한 GSLs에 의한 4종류의 암세포주를 이용하여 항암 활성을 조사하였다. 또한 갓 추출물에 함유된 GSLs를 HPLC와 LC-ESI/MS로 분석한 결과는 다음과 같다. 1. 갓에서 추출한 GSLs의 항암 활성을 분석한 결과, SNU-354(간암)>SNU-C4(결장암)>SNU-251(난소암)>MCF-7(유방암) 순으로 높게 나타났다. 또한 GSLs 추출물의 처리 시간(24, 48시간)에 따르면 적갓 추출물의 항암 효과가 청갓 추출물의 항암 효과보다 큰 것으로 나타났다.

2. 갓의 주요한 GSLs 성분은 sinigrin이었으며, 청갓이 적갓보다 더 높은 함량을 나타내었으며, 또한 청갓에서만 glucoiberin이 미량으로 검출되었다.

3. 항암 활성 평가에서 적갓 GSLs 추출물이 청갓보다 더 높은 활성을 나타낸 것은 GSLs 물질 이외에 다른 물질들이 관여했을 것으로 생각되므로 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

GSLs 추출과정에 대해 많은 조언과 수고를 해주신 농촌진

흥청 추상미 연구원과 암세포주 추천 및 세포 배양법을 전수해준 한국세포주은행(KCLB) 신영경 연구조교수께 감사드립니다. 또한 동결건조기 사용을 허락해 주신 한국과학기술연구원(KIST) 안대로 연구원, 고려대학교 CJ식품안전관 장성오 관리실장께 감사드리며, ELISA leader 기기의 사용법을 알려주신 한국과학기술연구원(KIST) 한기철 연구원과 파워랩의 김상혁 대리에게 감사드립니다. 이온교환크로마토그래피 column에 대해 조언해 주신 Bio-rad의 남궁순영 과장께 감사드립니다. 이 연구는 2010년 3월~2011년 2월까지 한국과학창의재단의 연구비 지원을 받아 진행된 과학고등학교 R&E 지원 사업의 결과이며, 이에 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

- 농촌진흥청. 2003. 엽채류 재배. pp.111-116. 표준영농교본 140. 삼미기획
- Betz JM, Fox WD. 1994. High-performance liquid chromatographic determination of glucosinolates in *Brassica* vegetables. ACS Symposium Series. pp.181-196. American Chemical Society, Washington, DC.
- Calson DG, Daxenbichler ME, Vanetten CH et al. 1987. Glucosinolates in crucifer vegetables---broccoli, brussels sprouts, cauliflower, collards, kale, mustard greens, and kohlrabi. *J Am Soc Hortic Sci* 112:173-178
- Cartea ME, Velasco P. 2009. Glucosinolates in *Brassica* foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem Rev* 8:269-282
- Cheigh HS, Park KY. 1994. Biochemical, microbiological and nutritional aspects of kimchi(Korean fermented vegetable products). *Crit Rev Food Sci Nutr* 34:175-203
- Choi MR, Yoo EJ, Song SH, Kang DS, Park JC, Lim HS. 2001. Comparison of physiological activity in different parts of Dolsan leaf mustard. *Korean Soc Food Sci Nutr* 30:721-725

- Chun SS, Choi OJ, Cho YS, Park SK, Park JR. 1995. Changes in pungent components of Dolsan leaf mustard kimchi during fermentation. *Korean Soc Food Sci Nutr* 24:54-59
- Clarke DB. 2010. Glucosinolates, structures and analysis in food. pp.310-325. The Royal Society of Chemistry.
- Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci* 94:10367-10372.
- Fahey JW, Zalzman AT, Talalay P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51
- Giamoustaris A, Mithen RF. 1997. Glucosinolates and disease resistance in oilseed rape(*Brassica napus* spp. *oleifera*). *Plant Path* 46:271-275
- Gupta K, Wagle DS. 1988. Nutritional and antinutritional factor of green leafy vegetables. *J Agric Food Chem* 36:472-475
- Haikier BA, Gershenzon J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* 57:303-333
- Holst B, Williamson G. 2004. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. pp.425-447. The Royal Society of Chemistry
- Holst B. 1997. Glucosinolates and Abbauprodukte in Cruciferen-Gemuse-Einfluss der Speisenzubereitung auf Glucosinolate-skatabolismus und Aroma. Technische Uni DE Berlin
- Ippoushi K, Takeuchi A, Azuma K. 2010. Sinigrin suppresses nitric oxide production in rats administered intraperitoneally with lipopolysaccharide. *Food Chemistry* 120:1119-1121
- Kim JO, Kim MN, Park KY, Moon SH, HA YL, Rhee SH. 1993. Antimutagenic effects of 5-decano identified from mustard leaf. *J Korean Agric Soc* 36:424-427
- Lim HS, Yoo EJ, Choi MR. 2000. Changes physiological activity of mustard leaf during its fermentation period. *J Microbiol Biotechnol* 10:43-47
- Luthy J, Benn MH. 2002. Thiocyanate formation from glucosinolates: A study of the autolysis of allylglucosinolates in *Thlaspi arvense* L. seed flour extracts. *Can J Biochem* 55: 1028-1031
- Martin N, Muller C. 2006. Induction of plant responses by a sequestering insect: Relationship of glucosinolates concentration and myrosinase activity. *Basic Appl Ecol* in press
- Mithen R. 2001. Glucosinolates-biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regulation* 34:91-103
- Muller C, Sieling N. 2006. Effects of glucosinolates and myrosinase levels in *Brassica juncea* on a glucosinolates-sequestering herbivore-and vice versa. *Chemoecology* 16: 191-201
- Park SK, Cho YS, Park JR, Chun SS, Moon JS. 1993. Non-volatile organic acid, mineral, fatty acid and fiber compositions in Dolsan leaf mustard(*Brassica juncea*). *J Korean Soc Food Nutr* 22:53-57
- Rapeseed-Determination of Glucosinolates Content. 1995. Part 1: Method using high-performance liquid chromatography. ISO 9167-1:1-9
- Steven FV, Mark AB. 2005. Glucosinolates hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Crops and Products* 21:193-202
- Talalay P, Zhang Y. 1996. Chemoprotection against cancer by isothiocyanates and glucosinolates. *Biochem Soc Trans* 24: 806-810
- Thejass P, Kuttan G. 2007. Allyl isothiocyanate(AITC) and phenyl isothiocyanate(PITC) inhibit tumor-specific angiogenesis by downregulating nitric oxide(NO) and tumor necrosis factor-alpha(TNF-alpha) production. *Nitric Oxide* 16:247-257
- Traka M, Mithen R. 2009. Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem Rev* 8:269-282
- Wattenberg W, Loud WD. 1987. Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon induced neoplasia by naturally occurring indole. *Cancer Research* 38:1410-1413
- Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci* 89:2399-2403
- Zhang Y, Talalay P. 1994. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: Chemistry and mechanisms. *Cancer Res* 54: 1976-1981

접 수 : 2011년 7월 7일
 최종수정 : 2011년 7월 22일
 채 택 : 2011년 7월 27일