

## 울무 디클로로메탄 분획물의 항암효과 및 작용기전

부산대학교 식품영양학과 및 암연구소, <sup>1</sup>부산광역시보건환경연구원,  
<sup>2</sup>미국국립암연구소, <sup>3</sup>부산대학교 생물학과

김성준<sup>1</sup> · 최영현<sup>2</sup> · 이원호<sup>3</sup> · 권은영 · 박건영

### *In vitro* Anticancer Effects and the Mode of Action of Dichloromethane Fraction of *Coix lachryma-jobi* (adlay)

Seong-Joon Kim<sup>1</sup>, Yung-Hyun Choi<sup>2</sup>, Won-Ho Lee<sup>3</sup>  
Eun-Young Kwon and Kun-Young Park

Department of Food Science and Nutrition and Pusan Cancer Research Center,  
Pusan National University; <sup>1</sup>Pusan Institute of Health and Environment;  
<sup>2</sup>National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD, USA;  
<sup>3</sup>Department of Biology, Pusan National University

Anticancer effects and the mode of action of dichloromethane fraction from the methanol extract of defatted *Coix lachryma-jobi* (adlay) were studied. Adlay was defatted with hexane and extracted with methanol. The methanol soluble fraction of the defatted adlay was further fractionated with dichloromethane, ethylacetate, butanol and water. Dichloromethane fraction that exhibited the highest antimutagenic and anticancer activities was chosen to investigate the further anticancer effects and the mode of action. Dichloromethane fraction inhibited the growth of MCF-7 and MDA-MB-231 human breast carcinoma cells and the morphological changes of the cancer cells were observed. Also, dichloromethane fraction arrested G2/M phase in the MCF-7 human breast carcinoma cell cycle and induced apoptosis of HL-60 human leukemia cells.

**Key Words:** *Coix lachryma-jobi* (adlay), Anticancer, Cell cycle, Apoptosis

## 서 론

울무(薏苡, adlay, *Coix lachryma-jobi* L. var. *Mayuen*)는 벼과(禾本科)의 열대성 1년생 초본으로 우리나라에서는 옛날부터 흉년이 들었을 때 식량대용으로 쓰였기 때문에 구황식물(救荒植物)이기도 하다.<sup>1)</sup> 열매는 薏苡仁이라고 하며, 식용 또는 약용으로 사용되고, 뿌리는 薏苡根이라 하여 오래전

부터 약용 또는 식용으로 사용되어 왔다.<sup>2)</sup> 민간에서는 울무를 오래 먹으면 피부가 윤택해지고 병에 대한 저항력이 강해지며 손, 발, 피부 등에 사마귀가 없어지고, 울무 뿌리를 달여 즙을 내어 마시면 황달에 효과가 있다고 하여 많이 식용으로 하고있다.<sup>3-5)</sup> <藥性論>에는 “울무쌀은 폐결핵과 해소(기침)를 다스리고, 달여서 마시면 독종을 없앤다”는 기록이 있다.<sup>6)</sup>

울무의 약리적 효과는 혈압강하, 혈당저하, 항염작용 및 항암효과 등이 알려져 있으며, 울무의 항암성에 관한 연구로는, Ukita등<sup>7)</sup>이 울무의 coixenolide가 생쥐의 Ehrlich ascites sarcoma에 대한

증식억제효과가 있다고 하였고, 민간요법으로도 울무를 암의 식이요법으로 사용하고 있으나, 울무의 암화학적 예방에 관한 과학적인 연구는 그리 많지 않은 실정이다. 이에따라, 김 등<sup>8)</sup>은 울무의 methanol extract와 hexane으로 지방을 제거한 후 (hexane extract), 다시 메탄올로 추출(methanol soluble fraction)하여 dichloromethane fr., ethylacetate fr., butanol fr., aqueous fr.로 용매분획하여 각 추출물과 분획물에 대해 Ames test와 SOS chromotest 실험계를 통하여 항돌연변이 효과를 살펴보고, AGS, HT-29, MG-63 등의 인체 암세포를 이용한 *in vitro* 항암 실험으로 암세포 증식억제, SRB assay 및 MTT assay에 의한 저해효과를 검토한 결과, 울무의 각 용매 분획물 중 dichloromethane fr. 이 항돌연변이 및 항암활성이 가장 뛰어난 것으로 확인되었다.

따라서 본 연구보고에서는 울무의 각 용매 분획물 중 항돌연변이 및 항암활성이 가장 뛰어난 dichloromethane fr.을 이용하여 MCF-7 및 MDA-MB-231 유방암세포에 대한 증식억제효과와 암세포의 형태변화를 관찰하였고, 암세포의 cell cycle에 미치는 영향을 분석하여 cell cycle arrest 효과를 검토하였다. 그리고 HL-60 인체 혈액암 세포에 대한 Comet assay를 실시하여 암세포에 대한 apoptosis 유도효과를 조사하는 등, 항암효과 및 그 작용기전을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1) 울무의 추출 및 분획

실험에 사용한 울무는 경상남도 함양에서 유기농법으로 재배한 국내산 울무(adlay, *Coix lachryma-jobi L. var. Mayuen*)를 부산시 서구 서대신동에 소재하는 자연건강연구원에서 구입하여, 건조 상태에서 분말로 만들었고, hexane으로 3회 탈지하고 잔사물을 5배의 메탄올로 12시간 교반하여 3회 반복 추출하여 methanol soluble fr.으로 하였다. Methanol soluble fr.은 회전식 진공농축기를 이용하여 농축한 후, 다시 dichloromethane, ethylacetate, butanol 및 aqueous fr.으로 순차적으로 분획하고 회전식 진공농축기를 이용하여 농축하여 시료를 조제하였고, 이 중 가장 항돌연변이 및 항암효

과가 컸던 dichloromethane fr.을<sup>8)</sup> 취하여 본 실험에 사용하였다.

### 2) 암세포의 증식억제 실험 및 형태변화 관찰

(1) **암세포 배양:** MDA-MB-231과 MCF-7 인체 유방암세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)로부터 구입하여 penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 RPMI-1640 배지(Biofluids)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin- 0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 ml cell culture flask에 5 ml씩 일정수 분할하여 주입하고 계속 6~7일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 암세포를 액체질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

(2) **암세포 증식억제 실험<sup>9-11)</sup>:** 암세포 배양과 동일한 방법으로 배양하되, 10mm dish에  $0.5 \times 10^4$  개 정도의 세포를 seeding 하여 24시간 배양한 다음 울무의 dichloromethane fr.을 처리하였다. 24시간 배양 후, 울무의 dichloromethane fr.을 처리한 세포와 정상 조건 하에 자란 세포들을 대상으로 trypan blue로 염색한 후 살아있는 세포수를 계수하여 암세포 증식억제 효과를 관찰하였다.

(3) **암세포의 형태변화 관찰:** 암세포(MCF-7, MDA-MB-231)의 형태변화 관찰을 위해, 정상배지 및 울무의 dichloromethane fr.을 처리한 배지에서 24시간 배양된 암세포를 PBS로 수회 수세 후 3.7% formaldehyde로 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 Wright staining (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)을 실시한 후 광학현미경 하에서 세포의 형태를 비교하였다.

### 3) Cell cycle 저해효과 실험

정상배지 및 울무의 dichloromethane fr.을 처리한 배지에서 24시간 배양된 암세포(MCF-7, MDA-MB-231)들을 0.02% EDTA가 함유된 PBS 용액으

로 수세한 후, 4°C에서 30분간 70% 에탄올에서 고정하였다. 고정 후 RNase A (Sigma)를 처리하고 DNA intercalating dye인 propidium iodide (Sigma)로 DNA를 염색하여 Vindelvo등<sup>12)</sup>의 방법에 따라 Becton Dickinson FACStar flow cytometer 및 Becton Dickinson Cell Fit software를 이용하여 세포주기를 비교분석하였다.

4) Comet assay (single cell gel electrophoresis)에 의한 Apoptosis 효과실험<sup>13,14)</sup>

(1) 세포 배양 및 시약: 인체 혈액암 세포인 HL-60을 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받아 15% fetal bovine serum(FBS) 및 100 unit/ml의 penicillin - streptomycin이 포함된 RPMI 1640 배지에서 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 항온기에서 배양하였다. 대조군에는 PBS를 처리하고, 울무의 dichloromethane fr.은 0.1 mg/ml와 0.5 mg/ml로 처리한 후, 자라는 세포수가 10,000~30,000개가 되게 하여 1일간 배양하였다. Lysis buffer는 0.03M NaOH, 1M NaCl, 0.1% N-lauroylsarcosinate (Sigma)를 사용하였고, alkaline buffer는 0.03M NaOH, 2 mM EDTA를, 그리고 염색제로는 ethidium bromide 2 μ/ml를 사용하였다.

(2) Comet assay: 1~4 × 10<sup>4</sup>/ml의 농도로 세포를 PBS에 현탁시킨 후, 증류수에 녹인 1% LMPA (low melting point agarose)를 40°C로 유지시키면서, 0.25 ml cell 현탁액에 0.75 ml LMPA를 섞은 후, 0.5 ml를 slide에 분주하였다. 4°C에서 5분간

방치한 후, 4°C를 유지하며 암실에서 1시간 동안 lysis buffer로 lysis 시킨 다음, alkaline buffer에 옮겨서 15분간 3회 수세시켜 DNA를 unwinding 시켰다. 0.6~0.7 Volt/cm로 20분간 electrophoresis 시키고, 증류수로 수세한(10분간) 후 50 μl EtBr로 염색하여 형광현미경으로 apoptotic fraction을 관찰하였다.

5) 통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험자료로부터 평균과 표준편차를 구한 후 independent t-test를 이용하여 통계분석하였다.

결과 및 고찰

1) 암세포 증식억제 효과

울무의 dichloromethane fr.의 MCF-7 및 MDA-MB-231 인체 유방암세포에 대한 증식억제 효과를 Fig. 1과 2에 나타내었다. MCF-7 및 MDA-MB-231 두 종류의 세포주에서 비슷한 암세포 증식억제 효과가 있었고 처리한 울무의 dichloromethane fr.의 농도가 높을수록 세포 증식억제 효과가 컸으며, 특히 1 mg/ml의 농도 처리군에서 높은 세포 증식의 억제효과가 있었다.

2) 암세포의 형태 변화

정상배지 및 울무의 dichloromethane fr.을 처리한 배지에서 24시간 배양한 MCF-7 및 MDA-MB-

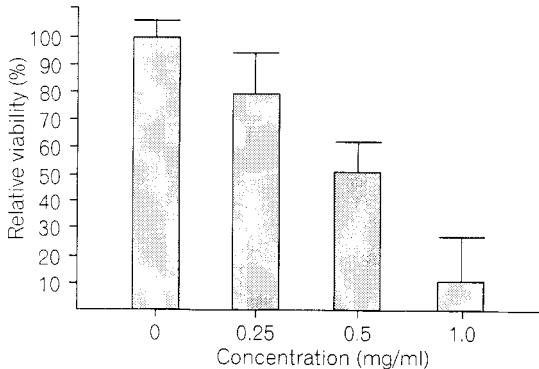


Fig. 1. Inhibition of cell proliferation by dichloromethane fraction of defatted adlay in MCF-7 human breast carcinoma cells.

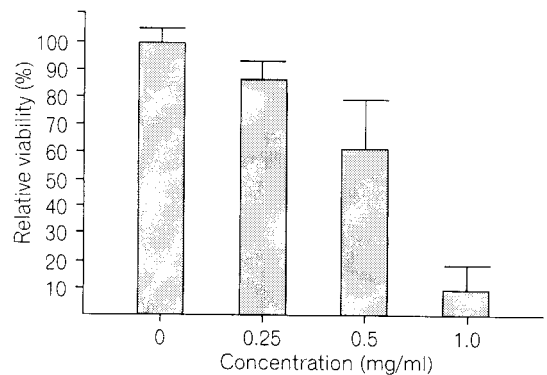


Fig. 2. Inhibition of cell proliferation by dichloromethane fraction of defatted adlay in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells.

231 암세포의 형태변화를 관찰하여 Fig. 3과 4에 나타내었다. 사진에서 볼 수 있듯이, 울무의 dichloromethane fr.에 의한 암세포 증식억제는 심한 형태적 변화를 동반하였는데, 처리한 울무의 dichloromethane fr.의 농도가 높을수록 형태적 변화의 정도가 심하였다. 세포들의 부착 능력이 없어지면 세포질의 수축을 유발하였는데, 특히 MCF-7 암세포에서 그 정도가 더 심하였다. 그리고 신경 세포에서 볼 수 있는 dendrite-like structure form (수지상 돌기 구조)을 형성하였다. 이는 울무의 dichloromethane fr.에 의한 암세포의 분화유도 가능성을 시사하여 주는 것이다.

**3) Cancer cell cycle progression 저해효과**

인체 유방암세포인 MCF-7과 MDA-MB-231 세

포주에 울무의 dichloromethane fr.을 투여했을 때 세포주기의 어느 단계를 차단하여 항암활성을 나타내는지 살펴보았다. 정상 배지 및 울무 dichloromethane fr.을 처리한 배지에서 24시간 배양된 세포들을 Becton Dickinson FACStar flow cytometer 및 Becton Dickinson Cell Fit software를 이용하여 세포주기 분석을 한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. MDA-MB-231 암세포에서는 전체적으로 큰 변화가 없었으나, MCF-7 암세포주는 G2/M기에서 control 군의 세포비율 28.6%에 비하여 dichloromethane fr.을 0.25 mg/ml 농도로 첨가하였을 때 37.3%, 0.5 mg/ml 농도로 첨가하였을 때 38.7%의 세포비율을 나타내어, G2/M기에서의 세포주기 차단효과가 있음을 보여주고 있다.

그러므로 울무의 dichloromethane fr.의 암세포

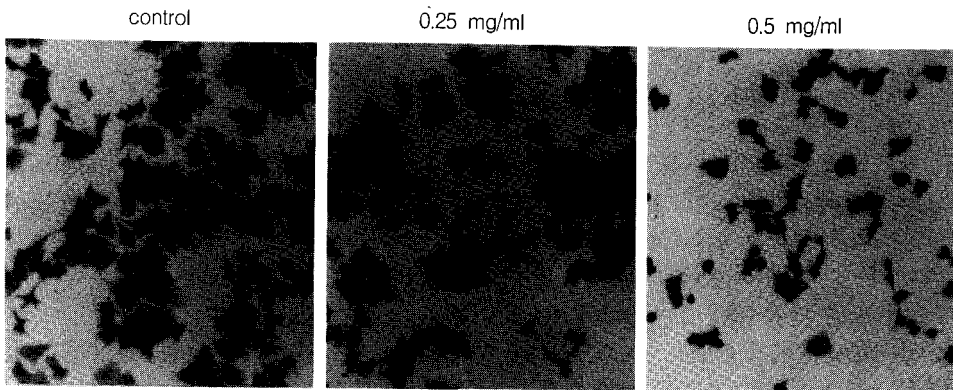


Fig. 3. The effect of dichloromethane fraction of defatted adlay on the morphology of MCF-7 human breast carcinoma cells.

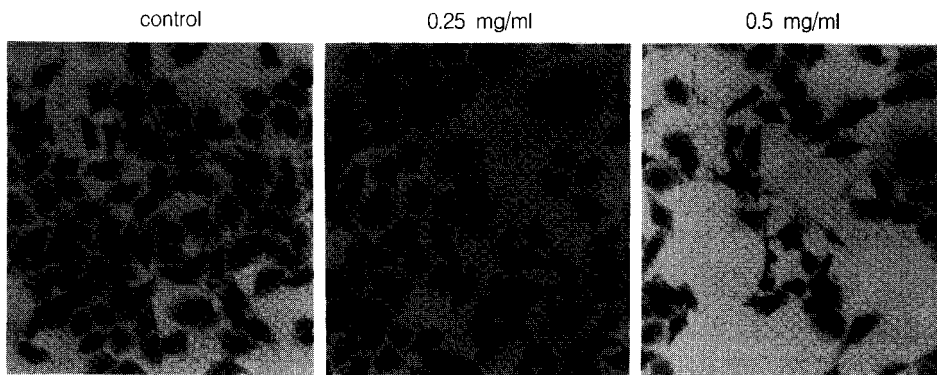


Fig. 4. The effect of dichloromethane fraction of defatted adlay on the morphology of MDA-MB-231 human breast carcinoma cells.

**Table 1.** The effect of dichloromethane fraction of defatted adlay on cell cycle distribution in MCF-7 and MDA-MB-231 cells

Cell line	Concentration (mg/ml)	% of cells		
		G1	S	G2/M
MCF-7	0	56.4	15.0	28.6
	0.25	53.2	9.5	37.3
	0.5	50.4	10.9	38.7
MDA-MB-231	0	47.0	18.7	34.3
	0.25	42.1	21.7	36.2
	0.5	43.6	20.7	35.6

**Table 2.** The effect of dichloromethane fraction of defatted adlay on HL-60 human leukemia cell in the Comet assay

Treatment conc. (mg/ml)	Normal cell (%)	Apoptotic comet (%)	Necrotic comet (%)
Control	94.6 ± 0.9 <sup>1</sup>	2.7 ± 0.4	2.7 ± 0.5
0.1	64.9 ± 3.7*	26.1 ± 2.4*	9.0 ± 1.3*
0.5	59.0 ± 2.9*	5.6 ± 1.1*	35.4 ± 2.5*

<sup>1</sup>Values represent mean ± SD.

\*Significantly different from control (p < 0.05, t-test)

증식억제는 암세포에 대한 DNA 손상과 그로 인하여 cell cycle progression을 지연, 차단시켜 결과적으로 유방암세포의 증식을 감소시킬 수 있는 것으로 생각된다. 한편 콩과 된장 중의 항암성분으로 알려진 genistein은 인체 유방암 세포인 MCF-7과 위암 세포인 HGC-27에서 G2/M 단계의 세포주기를 차단시켜 세포주기의 불균형을 유발하고 apoptosis와 관련된 2차적인 변화를 야기시킨다고 보고된 바 있다.<sup>15-17)</sup>

#### 4) Comet assay에 의한 apoptosis 유도 효과

울무의 dichloromethane fr. 중의 활성성분이 cell cycle progression을 저해하고, 결과적으로 apoptosis를 야기하는지를 검토하기 위하여 HL-60 human leukemia cell을 이용, comet assay를 이용하여 apoptotic comet의 비율을 측정하므로 apoptosis 유발효과를 조사하였다.

Apoptosis는 생체에서 생기는 불필요한 세포와 정상적이지 못한 세포를 제거하는 기구로서 중요하다. 세포의 apoptosis는 배자발생, 면역 및 신경계의 발생, 종양퇴행 등과 같은 생체의 여러 가지 생리학적, 병리학적 상태에서 흔히 관찰되는 세포

사망기전 중의 하나로 정상적인 성인세포에 비해서 성장조직이나 종양과 같은 비정상적인 조직에서 훨씬 높은 빈도로 나타난다. 특히 종양의 자연치유나 종양세포들이 각종 항암제에 의하여 사망할 때 많이 관찰된다.<sup>18)</sup>

Comet assay는 독소나 항암활성성분 등에 의해 손상을 입은 세포 또는 암세포의 nucleosome 내의 DNA fragmentation을 single cell gel electrophoresis 방법을 이용하여 측정, 세포의 손상정도, 그리고 apoptosis (규칙적 DNA fragmentation)와 necrosis (불규칙적 DNA fragmentation)에 의한 세포사망을 조사하는 방법이다.

울무 dichloromethane fr.의 HL-60 암세포에 대한 comet assay의 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 대조군의 apoptotic comet 2.7%에 비하여 0.1 mg/ml 농도 처리군에서 26.1%의 현저한 apoptotic comet을 관찰할 수 있었으며, 0.5 mg/ml 농도 처리군에서는 5.6%로 대조군의 약 두배의 apoptosis를 관찰할 수 있었다. 한편 necrotic comet을 살펴보면, 대조군의 2.7%에 비하여 0.1 mg/ml 농도 처리군에서 9.0%의 necrotic comet을 관찰할 수 있었으며, 0.5 mg/ml 농도 처리군에서는 35.4%의 ne-

crosis를 관찰할 수 있었다. Fairbairn등<sup>14)</sup>은 화학요법에 의한 암세포의 사망은 상당부분 apoptosis의 유도에 의한다고 하였다.

### 요약 및 결론

율무는 오래전부터 약용 또는 식용으로 사용되어 왔으며, 암을 예방하는 식품으로 알려져 있으므로, 율무의 항암효과 및 그 작용기전을 조사하고자 하였다. 먼저, 율무를 헥산으로 지방을 제거하고 그 잔사물을 메탄올로 추출하여 이 농축액을 다시 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 가용부로 용매분획하여, 그 중 항돌연변이, 항암활성이 가장 높았던 디클로로메탄 분획물로, 암세포 증식 억제효과, 암세포의 형태변화, cell cycle에서 G2/M phase 저해효과 그리고 comet assay에 의한 apoptosis 유도효과 등을 이용하여 항암효과 및 그 작용기전을 조사하였다. 율무의 디클로로메탄 분획물은 MCF-7 및 MDA-MB-231 인체 유방암세포의 증식을 크게 저해하였고 세포의 형태도 변화시켜 암세포의 분화유도 가능성이 있었다. 그리고 율무의 디클로로메탄 분획물은 MCF-7 인체 유방암세포의 cell cycle에서 G2/M phase를 차단하여 암세포 증식저해 효과를 나타내었고, human leukemia cell인 HL-60의 apoptosis를 유도하여 암세포의 증식을 억제하였다. 이상으로 율무의 디클로로메탄 분획물의 항암효과 및 그 작용기전을 살펴본 결과, 율무의 디클로로메탄 분획물은 암세포의 증식을 저해하고 분화를 유도할 가능성이 있으며, 암세포의 cell cycle에서 G2/M기를 지연, 차단시키고, apoptosis를 유도하여, 결과적으로 항암효과를 나타내는 것으로 생각된다.

### 감사의 글

이 연구는 (주)엄마사랑의 연구비지원에 의한 것으로 이에 감사를 드립니다.

### 참고 문헌

- 1) 교육출판공사편집국. 원예대백과, 교육출판공사. 1981; pp1205.
- 2) 김재길. 원색 천연약물 대사전 (하권), 남산당. 1984; pp270.
- 3) 심상용. 한방식료 사전, 창조사. 1976; pp62.
- 4) 佐藤潤平. 漢藥의 原植物, 東京, 朝倉書店, 1961; pp242.
- 5) Hidaka Y, Kaneda T, Amino N, Miyai K. Chinese medicine, coix seeds increase peripheral cytotoxic T and NK cells. *Biotherapy* 1992; 5: 201.
- 6) 심상용. 약과 인간, 도서출판 삼과꿈, 1997; pp175.
- 7) Ukita T, Tanimura A. Study on the anti-tumor component in the seed of *Coix lachryma-jobi* L. var. *Ma-Yuen* (Roman.) Stapf. I. Isolation and anti-tumor activity of coixenolide. *Chem Pharm Bull* 1961; 9: 43.
- 8) 김성준. 율무의 암예방효과와 활성물질. 부산대학교 대학원 박사학위논문 1998.
- 9) Franceschi RT, James WM, Zerlauth G. 1 $\alpha$ , 25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> specific regulation of growth, morphology and fibronectin and a human osteosarcoma cell line. *J Cell Physiol* 1985; 123: 401.
- 10) 손홍수, 황우익. 마늘 중 지용성 성분의 암세포 증식 억제 효과 연구. *한국영양학회지* 1990; 23: 135.
- 11) Goldberg E, Nitowsky H, Colowick S. The role of glycolysis in the growth of tumor cells. *J Biol Chem* 1965; 24: 2791.
- 12) Vindelvo L, Christen I, Nissen N. A detergent- tpsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983; 3: 323.
- 13) Olive PL, Garnet F, Judit PB. Radiation-induced apoptosis measured in Tk6 human B lymphocytes cells using the comet assay *Radiat Res* 1993; 136: 130.
- 14) Fairbairn DW, Olive PL, Kim L O'neill. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995; 339: 37.
- 15) 임선영. 된장의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원 박사학위논문, 1997.
- 16) Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida H, Matsumoto K, Nishino H, Aoike A. Genistein arrests cell cycle progression at G<sub>2</sub>-M. *Cancer Res* 1993; 53: 1328.
- 17) Supko JG, Malspeis L. Plasma pharmacokinetics of genistein in mice. *Inter J Oncology* 1995; 7: 847.
- 18) Gorczyca W, Gong J, Ardelit B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res* 1993; 53: 3186.