

들깨잎에서 동정된 Phytol과 Eicosatrienoic Acid의 암세포 증식억제 효과

이경임 · 이숙희* · 박건영*†

양산대학 호텔조리과

*부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

Anticancer Activity of Phytol and Eicosatrienoic Acid Identified from Perilla Leaves

Kyeong-Im Lee, Sook-Hee Rhee* and Kun-Young Park*†

Dept. of Hotel Culinary Arts, Yangsan College, Yangsan 626-800, Korea

*Dept. of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

We investigated the inhibitory effects of phytol and methyl 11,14,17-eicosatrienoic acid (methyl ETA, n-3, 20 : 3) separated from perilla leaves on the growth of human cancer cells. Phytol inhibited significantly the growth of HT-29 human colon cancer cells, MG-63 osteosarcoma cells and AZ-521 gastric cancer cells. Although the activity of methyl ETA was lower than that of phytol, it was also observed to have the inhibitory effect on three human cancer cell lines. Furthermore, the DNA synthesis of the MG-63 osteosarcoma cells was markedly decreased by the addition of the phytol and methyl ETA. These results suggest that phytol and methyl ETA identified from the perilla leaves may play a role on the growth inhibition of the human cancer cells.

Key words: phytol, methyl 11,14,17-eicosatrienoic acid, human cancer cells

서 론

들깨잎은 한국인이 즐겨 먹는 채소로 비타민 A와 비타민 C가 풍부하며 K, Ca, Mg과 같은 무기질(1-3)이 많이 함유되어 있다. 뿐만 아니라 여러 종류의 flavonoid와 anthocyanin계 색소가 함유되어 있으며(4-6), perillaldehyde와 limonene과 같은 정유성분이 있어 독특한 향과 맛을 낸다(7-9). 들깨잎에 관한 최근의 일련의 연구로 들깨잎 추출물에서 항산화작용, 항돌연변이 및 항암 효과도 또한 관찰되었다(10,11).

이와 같은 효과를 나타내는 들깨잎의 새로운 생리활성 성분으로 phytol과 methyl 11,14,17-eicosatrienoic acid (methyl ETA, n-3, 20 : 3)가 분리되었다(12). Phytol은 식물조직에서 녹색의 색소성분인 클로로필의 구성성분으로 존재하며 식물 조직이 파괴될 때 가수분해되어 나온다(13). 클로로필은 녹색채소에서 색소로서의 역할 뿐만 아니라 중요한 생리 활성 물질로 알려져 있으며(14) 그 구조의 일부인 phytol 또한 항돌연변이 및 항암 효과를 가지는 것으로 보고되고 있다. 즉 종양세포에 직접적인 증

식 억제효과를 나타내며(15), UV와 EMS에 의한 *Salmonella*와 *Drosophila*의 돌연변이 유발을 억제하고(16) 자연살해세포와 대식세포의 활성을 항진시킨다(17,18). 이러한 효과 외에 phytol은 자스민의 sleep time을 줄이는 성분으로 분리되었으며(19) antispasmodic activity(20)와 골격근의 비효소적 지질과산화에 의해 부분적으로 저해된다는 것도 보고되고 있다(21). 한편 ω -3계 불포화지방산인 methyl ETA도 들깨잎 추출물에서 분리되어 항돌연변이 활성을 나타내었다고 하였다(12).

이와 같이 phytol과 methyl ETA가 들깨잎에서 항돌연변이 활성을 나타내는 성분으로 분리되었으므로 본 연구에서는 이러한 활성 물질이 인체 암세포 증식에서는 어떻게 작용하는지를 관찰하고 그 작용 기전을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

시료

실험에 사용한 phytol과 methyl ETA는 Aldrich사(Aldrich chemical Co., USA)와 Sigma사(Sigma chemical

† To whom all correspondence should be addressed

Co., USA)로부터 각각 구입하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여서 농도별로 첨가하여 실험을 행하였다. Fig. 1에 phytol과 methyl ETA의 구조식을 나타내었다.

암세포 및 배양

인체의 결장암 세포인 HT-29는 고려대학교 의과대학 생화학교실에서, 인체의 위암세포인 AZ-521은 일본의 cell line collection 본부로부터 제공받았으며 MG-63 human osteosarcoma cells는 한국 세포주 은행(서울)에서 분주받아 배양하면서 실험에 사용하였다.

100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 fetal calf serum(FCS) 5%가 함유된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco Co., USA)을 사용하여 flask에 암세포를 이식시킨 후 5% CO₂가 공급되는 37°C humidified incubator에서 monolayer로 배양하였다. 일주일에 2~3 번 feeding하고 일주일 간격으로 0.05% trypsin-EDTA 로 분리시켜 계대 배양하였다(22,23).

암세포 증식 및 형태관찰

Human gastric cancer cells(AZ-521)를 24 well plate 에 2×10⁴ cells/ml 되도록 이식하여 24시간 동안 배양하여 세포가 plate에 부착된 후 5% FCS와 시료가 첨가된 새로운 배양액으로 교체하여 CO₂ incubator에서 배양하였다. 4일간 배양한 후 세포를 PBS로 씻어서 0.05% trypsin-EDTA로 분리시킨 뒤 각 균의 세포 수를 hemocytometer로 세어 대조군과 비교하였으며 inverted microscope (Olympus, model PM-10AZ, Japan)를 통하여 암세포 증식을 관찰하였다(24).

DNA 합성

Human osteosarcoma cells(MG-63)를 24 well plate 에 well당 3×10⁴ cells/ml가 되도록 이식하여 24시간 배양하여 세포가 plate에 부착되었을 때 배양액을 제거하고 5% FCS와 시료가 함유된 새로운 배양액으로 교체한 후

37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 후 3μCi/ml의 [³H] thymidine이 함유된 배지로 교체하여 2시간 동안 cell을 표지시킨 뒤 배지를 제거하고 1ml의 PBS로 2번 씻은 후 1ml의 5% cold TCA를 첨가하여 4°C에서 방냉하였다. 1시간 후 TCA를 제거하고 250μl의 1% sodium dodecylsulfate(SDS)를 첨가하여 1시간 동안 처리하였다. 이것을 scintillation vial에 옮기고 3.5ml의 scintillation cocktail을 첨가하여 교반하여 잘 섞은 후 Beckman LS 250 scintillation counter로 radioactivity를 측정하였다(25).

결과 및 고찰

Phytol은 클로로필의 ester side-chain의 알코올 부분으로 여러 식물 조직에 존재하며 비타민 E 제조에도 이용되고 있는 식물성 알코올 성분이다(13). 들깨잎에서 동정된 phytol은 들깨잎의 methanol 추출물을 silica gel column으로 분획하여 항돌연변이 효과가 높은 부위에서 얻어진 물질로, 추출 및 분획 과정에서 클로로필로부터 분리되어 나온 것으로 생각된다(12).

또한 들깨잎의 활성 성분으로 분리된 methyl ETA는 이중결합을 3개 가지고 있으며 methyl기가 ester화되어 있는 ω-3계 지방산이다(12). 식물에는 일반적으로 ω-6계 지방산인 linoleic acid가 많이 함유되어 있으나 들깨에는 ω-3계 지방산인 α-linolenic acid가 60% 함유되어 있다(26). 식물조직에서 이러한 ω-3계 다가불포화 지방산의 합성은 linoleic acid에서 생성된 α-linolenic acid를 거쳐 이중결합과 탄소수를 늘리면서 eicosapentaenoic acid (EPA)로 합성되는 것으로 알려져 있다(27). 본 연구에서 사용된 eicosatrienoic acid는 α-linolenic acid보다 탄소수가 2개 많고 EPA보다 이중결합이 2개 적은 ω-3계 지방산이다. 따라서 들깨잎에도 eicosatrienoic acid 등 ω-3계 지방산의 함량이 높다고 생각된다.

한편 들깨잎에서 분리된 phytol과 methyl ETA는 돌연변이 유발억제 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다(12). 이 두 가지 물질은 돌연변이 유발물질인 aflatoxin B₁ 및 Trp-P-2에 의해서 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100 균주의 돌연변이를 억제한다고 한다. 또한 phytol은 *Drosophila melanogaster*를 UV 조사와 EMS 처리하였을 때, single small *mwh* spots와 single large *mwh* spots의 빈도 유발을 감소시키기(16) 때문에 phytol은 *in vitro* 뿐만 아니라, *in vivo* mutagenicity 검출계에서도 돌연변이 억제효과가 있음을 알 수 있다.

이와 같이 phytol과 methyl ETA가 항돌연변이 효과를 나타내었으므로, 본 연구에서는 들깨잎에 있는 이러한 물질이 항암 효과를 가지는지 살펴보고자 HT-29, AZ-521, MG-63과 같은 인체의 암세포에 대해 세포독성 실험을 행하였다.

먼저 인체의 결장암 세포인 HT-29에서 phytol과 meth-

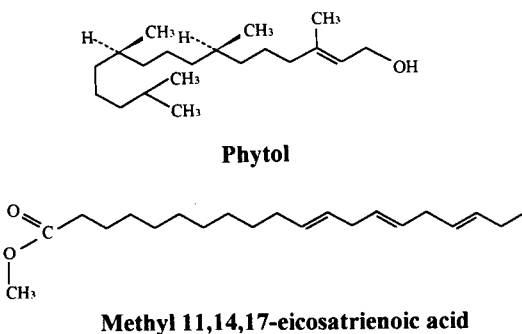


Fig. 1. Chemical structures of phytol and methyl 11,14,17-eicosatrienoic acid.

yl ETA의 증식 억제 효과를 관찰하였다. Phytol을 5.0µg/ml 첨가하였을 때 HT-29 세포는 성장 4일 후 약 60% 정도의 증식이 억제되었고 10.0µg/ml를 첨가한 경우에 결장암 세포는 전부 사멸되었다. Methyl ETA의 경우에 HT-29 세포에서 농도 10.0µg/ml 첨가군은 약 40%, 25.0µg/ml 첨가군은 약 80% 정도의 증식이 억제되었다. HT-29 결장암 세포에 대한 phytol과 methyl ETA의 두 화합물의 효과를 비교할 때 phytol이 결장암 세포의 증식억제 효과가 훨씬 강한 것으로 나타났다(Fig. 2).

Fig. 3은 인체의 골육암 세포인 MG-63에서 두 화합물의 증식 억제 효과를 관찰한 것이다. Phytol의 농도를 1.0, 5.0, 7.5와 10.0µg/ml되게 첨가하여 4일간 배양한 결과 대조군에 비해 각각 33, 50, 64, 91%의 성장 억제 효과를

나타내어 HT-29 세포의 경우와 유사한 결과를 볼 수 있었다. Methyl ETA를 첨가한 군도 HT-29 세포의 경우와 거의 동일한 결과를 나타내었다. 즉, 10.0µg/ml 첨가시 47%의 증식이 억제되었고 25.0µg/ml 첨가군에서는 63%, 50.0µg/ml 첨가하여 배양하였을 때는 94%의 골육암 세포의 증식이 억제되었다. 두 물질간 MG-63 세포의 증식 억제 효과는 동일 농도에서 phytol이 높게 나타났으며 각각 10.0µg/ml 첨가한 경우에 phytol이 methyl ETA보다 활성이 약 2배정도 높게 관찰되었다.

Fig. 4는 AZ-521 위암세포에서 phytol과 methyl ETA를 첨가하여 6일 동안 배양한 후 현미경으로 관찰한 것이다. 사진 A는 대조군으로서 세포가 모두 정상이고 세포밀도가 조밀하며 증침되어 정상적으로 암세포가 증식되어

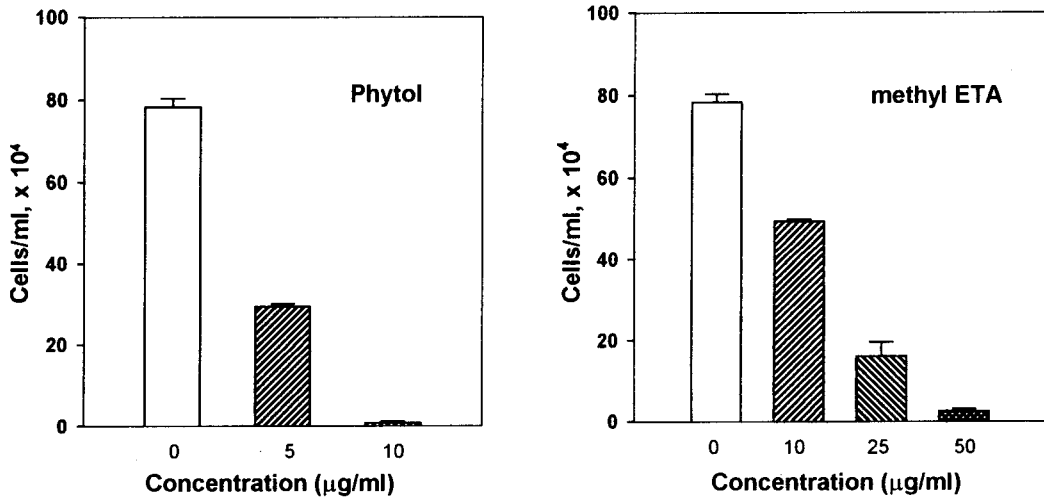


Fig. 2. Inhibitory effect of phytol and methyl 11,14,17-eicosatrienoic acid on the growth of HT-29 colon cancer cell after 4 days of incubation at 37°C.

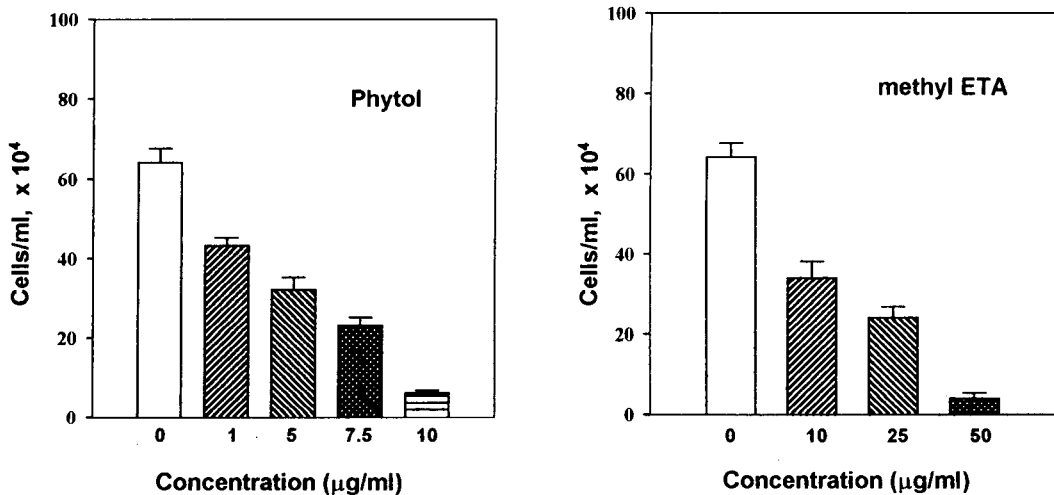


Fig. 3. Inhibitory effects of phytol and methyl 11,14,17-eicosatrienoic acid on the growth of MG-63 osteosarcoma cell after 4 days of incubation at 37°C.

있다. 그러나 10.0 μ g/ml의 phytol과 25.0 μ g/ml의 methyl ETA를 첨가하여 배양한 경우, 대조군에 비하여 세포의 모양이 길게 변형되었고 세포수도 적어 암세포의 증식이 억제되었음을 알 수 있다.

이러한 실험 결과, 인체의 결장암 세포인 HT-29, 골육암 세포인 MG-63 및 위암세포인 AZ-521에 phytol과 methyl ETA를 첨가하였을 때 암세포의 증식이 억제되었고 세 종류 암세포 모두에서 phytol이 methyl ETA보다 효과적인 것을 알 수 있었다. 한편, aflatoxin B₁ 및 Trp-P-2와 같은 돌연변이 유발물질에 의한 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100 균주의 돌연변이 억제 효과는 phytol 보다 오히려 methyl ETA가 강한 활성을 나타낸다고 보고되었다(12). 따라서 항돌연변이와 항암 효과를 비교할 때 활성의 세기는 반드시 일치되지 않는다는 것을

알 수 있다.

Phytol에 대한 Kim 등(17)의 연구에 의하면 phytol이 sarcoma 180 세포에서 직접적인 세포증식 억제효과를 나타내며 Balb/c 마우스의 평균 수명을 연장시킨다고 한다. 또한 종양세포에 대해서 작동세포가 되고 있는 자연 살해세포나 대식세포의 활성을 항진시키는 것으로 보고되고 있다. 따라서 phytol과 methyl ETA는 돌연변이 유발억제, 암세포 증식억제 및 sarcoma 180에 대한 세포독성을 나타내며 아울러 면역활성 증강 효과도 가지는 것을 알 수 있다.

대부분의 암세포는 세포 분열 및 성장속도가 빠르다. 즉 암세포에서는 DNA, RNA 및 단백질과 같은 고분자 물질의 합성이 정상 세포에 비해 빠르게 진행된다. 지금까지 알려진 많은 항암제들의 기본 작용 기작은 이러한

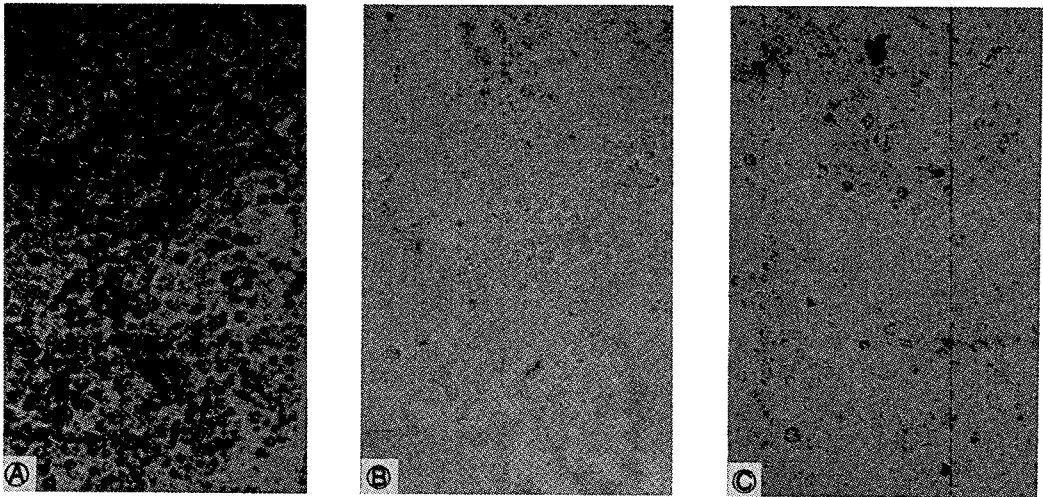


Fig. 4. Photomicrographs of human AZ-521 gastric cancer cells incubated for 6 days at 37°C with or without phytol and methyl 11,14,17-eicosatrienoic acid (×125). A: Control, B: Phytol(10 μ g/ml) treated, C: Methyl 11,14,17-eicosatrienoic acid(25 μ g/ml) treated

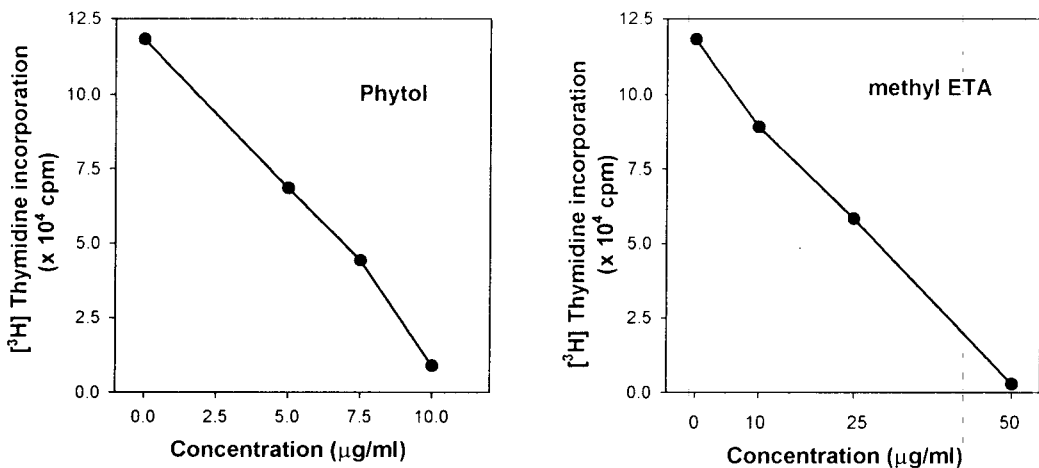


Fig. 5. Effects of phytol and methyl 11,14,17-eicosatrienoic acid on the DNA [3H] thymidine incorporation of MG-63 osteosarcoma cells.

고분자 물질의 합성을 억제하므로써 항암성을 나타낸다 (28). 따라서 phytol과 methyl ETA의 암세포에 대한 증식억제가 고분자물질 합성의 억제작용과 관련되어 항암성을 나타내는지 검토하였다.

Fig. 5는 MG-63 골육암 세포에 phytol 및 methyl ETA를 농도별로 첨가하여 세포내 DNA 합성 정도를 살펴본 것이다. Phytol을 1 μ g/ml 첨가하여 처리하였을 때 대조군에 비하여 41%의 DNA 합성이 억제되었으며 10 μ g/ml 첨가로 93% 억제되어 첨가량에 비례하여 DNA 합성이 감소되는 것을 볼 수 있었다. Methyl ETA의 경우에 대조군에 비하여 10 μ g/ml 첨가군은 25%, 25 μ g/ml 첨가군은 51%, 50 μ g/ml 첨가군에서는 98%의 DNA 합성이 억제되었다. 이러한 결과는 앞에서 관찰한 암세포의 증식억제 실험의 결과와 일치되는 것으로 methyl ETA보다 phytol이 낮은 농도에서 효과가 큰 것을 볼 수 있었다.

이상의 연구결과에 따라 phytol 및 methyl ETA의 첨가로써 인체의 결장암, 골육암과 위암 세포의 증식이 억제되었으며 암세포의 DNA 합성 단계에도 영향을 미치는 것으로 관찰되었다. 그러므로 phytol 및 methyl ETA는 인체내에서 항암 효과를 나타내며 이러한 물질을 함유하고 있는 들깨잎은 좋은 암 예방 식품으로 생각되어진다.

요 약

들깨잎 추출물에서 분리 동정되어진 phytol과 methyl ETA는 인체의 암세포의 증식을 강하게 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. Phytol을 10.0 μ g/ml 첨가하였을 때 인체의 결장암 세포인 HT-29와 골육암 세포인 MG-63이 각각 사멸되거나 91%의 증식이 억제되었다. 또한 methyl ETA는 25.0 μ g/ml 첨가시 HT-29 세포의 증식을 80% 억제하였고 MG-63 세포를 63% 억제하였다. 이러한 암세포 증식 억제는 AZ-521 위암세포의 형태 변화를 관찰함으로써도 알 수 있었다. Phytol과 methyl ETA의 첨가로 MG-63 골육암 세포의 DNA 합성이 감소되었는데 phytol을 10.0 μ g/ml 첨가하였을 때 현저히 감소되었고 (93%), 50.0 μ g/ml의 methyl ETA 첨가로 합성이 거의 일어나지 않았다. 이상의 결과에 의해 들깨잎에서 분리된 phytol과 methyl ETA는 인체의 암세포 증식을 억제하며 암세포의 DNA 합성 과정을 억제할 수 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단 연구비 지원(과제번호 : 90-0500-03)에 의한 결과의 일부이며 이를 감사드린다.

문 헌

1. 식물대보감(자원편). 도서출판 일홍, pp.164-165(1989)

2. Park, J. S. : Studies on the contents of inorganic compounds in Korean foods—the contents of sodium and potassium of fruits and vegetables. *J. Dugseong Women's Univ.*, **7**, 299-311(1978)

3. Kim, E. S. and Im, K. J. : A study on oxalic acid and calcium content in Korean foods. *Korean J. Nutr.*, **10**, 104-110(1977)

4. Ishikura, N. : Anthocyanins and flavones in leaves and seeds of perilla plants. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1855-1860(1981)

5. Tamura, H., Fujiwara, M. and Sugisawa, H. : Production of phenyl-propanoids from cultured callus tissue of the leaves of Akachirimen-shiso(*Perilla* sp.). *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1971-1973(1989)

6. Yoshida, K., Kondo, T., Kameda, K. and Goto, T. : Structure of anthocyanins isolated from purple leaves of *Perilla ocimoides* L. var. *crispa*. Benth and their isomerization by irradiation of light. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1745-1751(1990)

7. Morisada, S. and Yosida, T. : Distribution of oil glands, percentage yield of essential oil and its chemical composition in several shiso plants(perilla species). *Jap. J. Trop. Agric.* (Nettai Nogyo), **17**, 9-12(1973)

8. Karp, F., Mihaliak, C. A., Harris, J. L. and Croteau, R. : Monoterpene biosynthesis : specificity of the hydroxylations of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*) and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, **276**, 219-226(1990)

9. Takano, I., Yasuda, I., Hamano, T., Seto, T. and Akiyama, K. : Determination of perilla ketone in perilla herb by capillary gas chromatograph/mass spectrometry. *Jap. J. Toxic. Envir. Health*, **36**, 320-325(1990)

10. Park, K. Y., Lee, K. I. and Rhee, S. H. : Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity in *Salmonella* assay system and on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 149-153(1992)

11. Lee, K. I., Rhee, S. H., Kim, J. O., Chung, H. Y. and Park, K. Y. : Antimutagenic and antioxidative effects of perilla leaf extracts. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**, 175-180(1993)

12. Lee, K. I., Rhee, S. H., Park, K. Y. and Kim, J. O. : Antimutagenic compounds identified from perilla leaf. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 302-307(1992)

13. Gross, J. : *Pigments in vegetable*. Pb. Van Nostrand Reinhold, New York, pp.29-30(1991)

14. Lawson, T., Nunnally, J., Walker, B., Bresnick, E., Wheeler, D. and Wheeler, M. : Isolation of compounds with antimutagenic activity from Savoy Chieftain cabbage. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1363-1367(1989)

15. Lee, K. I. : Inhibitory effects of green-yellow vegetables on the mutagenicity induced by various mutagens and on the growth of human cancer cells. Doctor's thesis of Pusan National Univ., Pusan, Korea(1992)

16. Cho, Y. H., Ahn, S. J., Park, K. Y., Yoo, M. A. and Lee, W. H. : Effects of phytol on the mutagenicity of UV and EMS in *Salmonella* and *Drosophila* mutation assaying systems. *Environ. Mutag. Carcin.*, **13**, 92-100(1993)

17. Kim, K. H., Chang, M. W., Park, K. Y., Rhee, S. H., Rhew, T. H. and Sunwoo, Y. I. : Antitumor activity of phytol identified from perilla leaf and its augmentative effect on cellular immune response. *Korean J. Nutr.*, **26**, 379-389

- (1993)
18. Kim, K. H., Chang, M. W., Park, K. Y., Rhee, S. H., Rhew, T. H. and Sunwoo, Y. I. : Effects of phytol and small water dropwort extract on the T subset in the sarcoma 180-transplanted mice. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**, 405-411(1993)
 19. Tsuchiya, T., Tanida, M., Uenoyama, S. and Nakayama, Y. : Effects of olfactory stimulation with jasmin and its component chemicals on the duration of pentobarbital-induced sleep in mice. *Life Sciences*, **50**, 1097-1102(1992)
 20. Pongprayoon, U., Baekström, P., Jacobsson, U., Lindström, M. and Bohlin, L. : Antispasmodic activity of β -damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Med.*, **58**, 19-21(1992)
 21. Phoenix, J., Edwards, R. H. and Jackson, M. J. : Inhibition of Ca^{2+} -induced cytosolic enzyme efflux from skeletal muscle by vitamin E and related compounds. *Biochem. J.*, **257**, 207-213(1989)
 22. Anzano, M. A., Rieman, D., Prichett, W., Bowen-Pope, D. F. and Greig, R. : Growth factor production by human colon carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, **49**, 2898-2904 (1989)
 23. Cecele, R. E., Kedingler, M. and Haffen, K. : Modulation of HT-29 human colonic cancer cell differentiation with calmidazolium and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.*, **48**, 6173-6182(1988)
 24. Franceschi, R. T., James, W. M. and Zerlauth, G. : 1 α , 25-Dihydroxy vitamin D₃ specific regulation of growth, morphology, and fibronectin and a human osteosarcoma cell line. *J. Cell. Physiol.*, **123**, 401-409(1985)
 25. Kream, B. E., Reynolds, R. D., Knutson, J. C., Eisman, J. and DeLuca, H. F. : Intestinal cytosol binders of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃. *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 779-787(1976)
 26. 磯田 好弘, 崔春彦 : α -리놀레산(linolenic acid)의 생리기능. *식품과학과 산업*, **22**, 58-67(1990)
 27. Burr, M. I. and Harwood, J. L. : *Lipid biochemistry*. 4th ed., Chapman & Hall, London, pp.64-69(1991)
 28. 윤연숙, 이세영, 김병수, 윤택구 : 인삼의 세포독성분획의 작용기작에 관한 연구(I)-인삼중의 petroleum ether 분획이 동물암세포에서 고분자 물질의 합성에 미치는 영향. *Korean Biochem. J.*, **13**, 203-217(1980)

(1999년 7월 27일 접수)