

목화의 미성숙다래 추출물의 항종양활성

박정일* · 김왕유 · 이용희 · 문경식* · 김준겸* · 김원기** · 이승기

서울대학교 약학대학, 종근당*, 이화여자대학교 의과대학**

(Received November 27, 1998)

Antitumor Activity of the Extract of Unripe Cotton Ball

Jeong Hill Park*, Wang Yu Kim, Yong Hee Lee, Kyoung Sik Moon*,
Joon Kyum Kim*, Won Ki Kim** and Seung Ki Lee

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Chong Kun Dang Research Center, Sunggeo-eup, Chonan, Chungchongnam-do 330-830, Korea

**College of medicine, Ewha Womans University, Seoul 158-056, Korea

Abstract— We previously reported that the extract of unripe cotton ball of *Gossypium indicum* shows cytotoxic activity and induces an apoptosis *in vitro*. In present study, its antitumor activity was investigated *in vivo*. Butanol soluble extract of unripe cotton ball reduced the weight of solid tumor in sarcoma 180 transplanted mouse model. It showed stronger activity than that of krestin.

Keywords □ *Gossypium indicum*, cotton ball, antitumor activity

목화는 민간에서 세균성 하리, 상처의 소독 등에 사용되어 왔다. 지금까지 목화의 성분이나 약효에 관한 연구는 주로 뿌리나 종자에 관한 것으로 특히 남성 피임제로 gossypol이 알려지면서 그에 대한 연구가 많았다.¹⁻⁵⁾ 한편, 목화 다래는 주로 솜을 생산하는 기관으로만 알려져 이에 대한 성분과 활성 연구는 거의 없는 형편이다. 이미 본 연구팀은 목화의 미성숙 다래의 추출물이 *in vitro*에서 B16과 L1210세포에 비교적 강한 세포독성(IC₅₀ 각각 8.4, 22 ug/ml)을 나타내며, apoptosis를 유발한다는 사실을 보고한 바 있다.⁶⁾ 또한 성분분석 결과, 이 추출물이 catechin, (-)-epigallocatechin, quercetin 등의 flavonoid류를 다량 함유하고 있는 것으로 밝혀졌다.⁷⁾ 따라서 본 연구에서는 목화의 미성숙다래 추출물에 대한 천연물유래의 항종양 의약품 또는 건강보조식품으로서 개발가능성을 검토하고자 sarcoma-180 세포를 이식한 생쥐 모델을 이용하여 *in vivo*에서의 항종양 효과를 평가

하였다.

실험방법

재료 - 본 실험에 사용된 시료는 목화다래의 추출 분획 중 *in vitro*에서 항암활성이 가장 강력한 부탄올 가용성 분획에 대해 실리카겔 칼럼을 통하여 얻은 분획 (CKD606)이었으며, 이 분획의 epigallocatechin 함량은 0.37%였다. 대조물질로 사용된 운지버섯 균사체 추출물인 krestin은 광동제약제품을 구입하여 사용하였다. 또한 sarcoma-180은 서울대학교 암연구소에서 분양 받아 ICR 생쥐에 계대배양을 하여 사용하였다.

시료의 추출 및 분획의 정제 - 전북 고창에서 7월에 수확한 미성숙 목화 다래(50 kg)를 메탄올로 추출한 후, 감압상태에서 용매를 날려보낸 다음 물에 현탁시키고, 부탄올로 용매 추출하여 부탄올 가용성 분획을 얻었다. 수득한 부탄올 가용성 분획(304 g)을 에틸아세테이트(EtOAc) : 메탄올(MeOH) : H₂O(10 : 1 : 0.1, v/v)를 용매로 실리카겔 칼럼크로마토그래피를 실시하였

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7880 (팩스) 02-874-8928

다.^{6,7)} 순차적으로 용출되는 2개의 분획중 먼저 용출되는 분획(CKD606)을 시료로 얻었다.

종양성장 저해효과 평가 - 4~5주령의 ICR계 수컷 생쥐(20~25 g)를 (주)대한실험동물센터에서 분양 받아 1주일 동안 사육실에 적응시켰으며 실험기간 중 사료와 급수는 제한하지 않았다. 일주일 간격으로 계대 배양한 sarcoma-180 종양세포 부유액 0.1 ml(1×10⁷ cell/ml)씩을 생쥐의 오른쪽 서혜부에 피하 이식한 후 24시간 후부터 각 군을 10마리로 하여 용량별로 시료를 투여하여 고행암 성장저해율을 측정하였다. 시료는 멸균생리 식염수에 녹여 25, 50, 100 mg/kg의 용량으로 종양이식 24시간 후부터 투여를 시작하여 수명연장실험의 경우에는 10일간, 종양성장 억제실험의 경우에는 4주 동안 1일 1회 복강 내에 투여하였다. 따로 krestin을 동일한 방법으로 투여하였으며 투여용량은 문헌^{8,9)}에 보고된 최대효력용량으로 하였다. 종양이식 28일째 되는 날 생쥐를 경구 탈구법으로 치사시키고 유발된 고행암을 적출한 후 그 중량을 측정하여 평균종양중량을 얻고 다음의 식에 따라 종양저지 백분율(I.R. %)을 계산하였다.¹⁰⁾

$$I.R.(%) = \frac{Cw - Tw}{Cw} \times 100$$

Cw: 대조군의 평균 종양중량

Tw: 시료 투여군의 평균 종양중량

종양부피의 측정 - 시간에 따른 고행암의 성장저지 정도를 알아보기 위해 종양 이식후 8, 12, 16, 20, 24 및 28일째에 종양의 크기를 측정하여 다음의 식에 따라 종양부피를 계산하였다.

$$Tumor\ volume(cm^3) = \frac{ab^2}{2}$$

a: 종양의 장경(cm)
b: 종양의 단경(cm)

수명연장실험 - 종양부유액 0.1 ml(1×10⁷ cell/ml) 씩을 생쥐의 복강 내에 이식한 뒤 24시간 후부터 10일간 연속으로 시료를 복강 내에 투여하여 대조군과 시료투여군의 생존여부를 35일까지 관찰하여 평균생존일(mean survival time, MST)을 계산하여 다음 식에 따라 수명연장백분율(prolongation ratio, %)을 구하였다.

$$TC(%) = \frac{T_{MST}}{C_{MST}} \times 100$$

T_{MST}: 시료투여군의 평균생존일

C_{MST}: 대조군의 평균생존일

결과 및 고찰

고행암 성장 저지효과 - 목화다래 추출물 투여군(이하, 시료투여군)의 고행암성장에 미치는 효과를 평가하였다(Table I, Fig. 1). 대조군의 종양무게는 5.2g이었

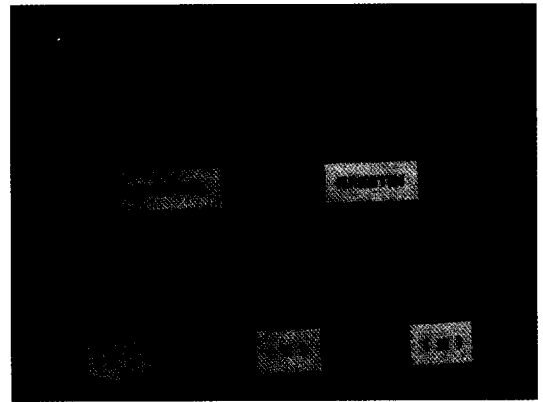


Fig. 1— Tumors excised from the groin after the termination of experiment. (I) CKD606 25 mg/kg/day, (II) CKD606 50 mg/kg/day, (III) CKD606 100 mg/kg/day.

Table I— Growth-inhibitory effect of krestin and *Gossypium indicum* extract, CKD606, in sarcoma 180-bearing ICR mice

Compounds	Dose (mg/kg/day)	Tumor volume (mm ³)	Inhibition rate (%)	Tumor weight (g)	Inhibition rate (%)
control	-	5194±634	-	5.2±0.5	-
krestin	20	3827±485*	26	3.8±0.4*	26
CKD606	25	4909±695	6	4.9±0.8	7
	50	3841±421*	26	3.9±0.4*	26
	100	3431±417* [†]	34	3.5±0.3* [†]	34

* significantly different from the value obtained for control (p<0.01).

[†] significantly different from the value obtained for krestin (p<0.05).

고 krestin 투여군의 종양 무게는 3.8 g으로 26%의 종양 성장 저해효과가 나타났는데 비해, 시료 25, 50, 100 mg/kg 투여군에서는 각각 7%, 26%, 34%의 고형암성장 억제 효과가 나타났다. 50 mg/kg 이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성있는($p < 0.01$) 효과를 나타내었으며 krestin보다 강한 종양성장 저해효과를 나타내었다. 한편, 종양의 부피에서는 시료 50 mg/kg 투여군에서는 3841 mm^3 ($p < 0.01$), 100 mg/kg 투여군에서는 3431 mm^3 ($p < 0.01$)으로 대조군에 비해 종양의 부피가 감소함을 알 수 있었다. krestin 투여군은 3827 mm^3 ($p < 0.01$)으로 시료 50 mg/kg 투여군과 유사한 효능을 나타내었다. 그러나 본 시료가 나타내는 이러한 고형암성장저지효과는 대조약물인 krestin에 비하여 동등 이상의 효력을 나타내며 대조군에 비해 유의성있는 종양성장억제효과를 보이고 있으나 일반적인 세포독성 항암제가 가져야 하는 고형암 성장저해율(58%이상)에는 미치지 못하고 있다.

수명 연장효과 - 대조군의 평균생존일은 17.8일이었으며, krestin 20 mg/kg을 투여한 경우는 18일, 시료를 25, 50, 100 mg/kg으로 투여한 경우는 각각 19일, 21일, 20일로 나타났다(Table II). 한편, 대조군과 krestin 투여군이 19일과 21일에 모두 사망한 반면, 시료투여군에서는 각각 1마리씩이 35일간 장기 생존하였다(Fig. 2). 따라서 시료투여군의 수명연장효과실험에서 수명연장백분율(T/C%)은 일반적인 세포독성 항암제가 나타내는 125%이상의 효과는 나타내지 못하였고 면역반응등을 매개하는 항암물질로서 평균생존일수에 큰 영향을 미치지 않았으나 장기생존 생쥐의 존재는 시료투여군의 항암효과에 시사하는 바 큰 것으로 사료된다. 또한 체중증가에 미치는 효과를 조사한 결과(Fig. 3), 시료 투여군은 대조군과 마찬가지로 서서히 체중이 증가하는 경향을 보이는데 비하여 krestin 투여군에서는 8일째부터 대조군에 비하여 체중의 증가가 다소 억

Table II - Effect on life-span of krestin and *Gossypium indicum* extract, CKD606, in sarcoma 180-bearing ICR mice

Compounds	Dose (mg/kg/day)	mean survival time (day)	T/C%
Control	-	17.8	-
Krestin	20	18	101.4
CKD606	25	19	107.0
	50	21	118.3
	100	20	112.7

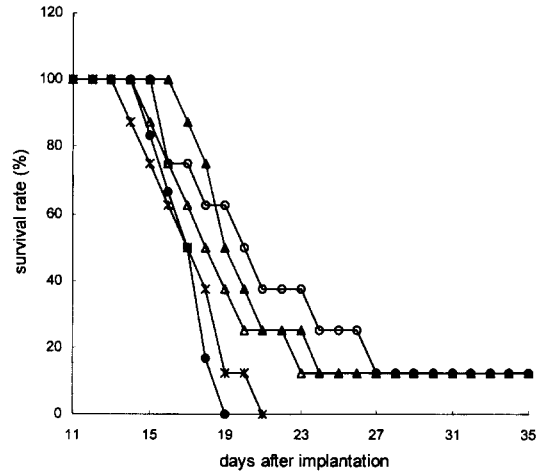


Fig. 2 - Antitumor effect of krestin and *Gossypium indicum* extract, CKD606, on life-span of sarcoma 180-bearing ICR mice. ●: control, ×: krestin 20 mg/kg/day, △: CKD606 25, ○: CKD606 50, ▲: CKD606 100 mg/kg/day.

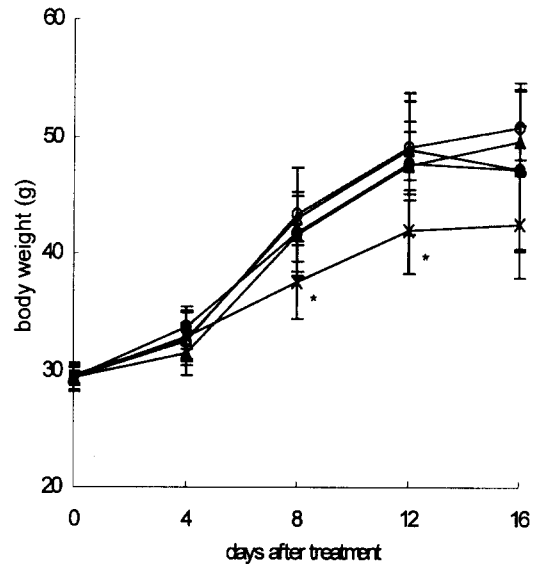


Fig. 3 - Responsiveness on body weight change of krestin and *Gossypium indicum* extract, CKD606 in S180 murine sarcoma-bearing ICR mice. ●: control, ×: krestin 20 mg/kg/day, △: CKD606 25, ○: CKD606 50, ▲: CKD606 100 mg/kg/day. *significantly different from the value obtained for control ($p < 0.05$)

제($p < 0.05$)되는 경향을 보였다. 체중변화는 세포독성이 강한 물질에 지속적으로 노출되었을 시 나타날 수 있는 전신독성을 예측하는 일반적인 지표^{11,12)}인 것으로 볼 때, 이 시료가 생체 내에서 약한 세포독성 효과를 가

지며 장기간 투여 시에도 안전성이 높다는 것을 시사하는 것으로 판단되었다.

따라서 본 시료는 강력하지는 않지만 유의성있게 고형암의 성장을 저지하고 평균생존일의 연장효과를 보이며 독성을 나타내지 않는 것은 시료 속에 함유되어 있는 flavonoid성분들이 생체 면역계를 자극하거나^{13,14)} 또는 강한 항산화 작용^{15,16,17)} 등의 여러 요인이 영향을 주어 나타나는 것으로 추정되나 이에 관한 추가적인 연구는 더욱 진행되어야 할 것으로 생각된다. 한편, 목화다래 추출물은 성분분석결과, catechin, (-)-epigallocatechin, quercetin 등의 flavonoid성분과 methyl caffeate, (-)-geranyllinalool, methyl linolenate, β -sitosterol 및 기타 무기물을 미량 함유하고 있는 것으로 밝혀졌다.⁷⁾ 본 연구에서 대조물질로 사용된 krestin은 천연물인 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 유래의 항종양보조제로서 임상적으로 사용되고 있으며 항종양활성이 숙주 면역반응을 매개하며 또한 저독성을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{18,19,20)} 하지만 krestin 투여군의 8일째부터 나타나는 유의성 있는 체중증가 억제에는 대조군의 약 10%에 이르지만 전신독성의 지표로 또한 관찰되어지는 입모와 털의 변색 등은 관찰되지 않아 경미한 상태로 사료되었으며 투여 스케줄의 차이에서 오는 변화인 것으로 사료되었다. 그리하여 본 연구에서 목화다래 추출물은 강력하지는 않으나 고형암의 성장을 저지하는 효과를 나타내고 있으며 전신적인 독성을 나타낼 가능성이 적음으로 인해 차후 이 천연물이 갖고 있는 다양한 생리활성을 이용하여 건강보조식품으로 개발할 경우 암 발생 및 성장을 예방 또는 억제하는 차원에서 매우 의미 있는 일이 될 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처의 지원을 받아 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Comhaire, F. H. : Male contraception: hormonal, mechanical and other, *Hum. Reprod.*, **9**(suppl. 2), 22 (1994).
- 2) Tuszyunski, G. P. and Cossu, G. : Differential cytotoxic effect of gossypol on human melano-

ma, colon carcinoma, and other tissue culture cell lines. *Cancer Res.*, **44**, 768 (1996).

- 3) Shidaifat, F., Canatan, H., Kulp, S. K., Sugimoto, Y., Chang, W. Y., Zhang, Y., Brueggemeier, R. W., Somers, W. J. and Lin, Y. C. : Inhibition of human prostate cancer cells growth by gossypol is associated with stimulation of transforming growth factor. *Cancer Lett.*, **107**, 37 (1996).
- 4) Gilbert, N. E., O'Reilly, J. E., Chang, C. J., Lin, Y. C. and Brueggemeier, R. W. : Antiproliferative activity of gossypol and gossypolone on human breast cancer cells. *Life Sci.*, **57**, 61 (1995).
- 5) Iiu, Y. F., Chang, C. J., Brueggemeier, R. W. and Lin, Y. C. : Gossypol inhibits basal and estrogen stimulated DNA synthesis in human breast carcinoma cells. *Life Sci.*, **53**, PL 433 (1993).
- 6) Choi, J. J., Yoon, K. N., Lee, S. K., Lee, Y. H., Park, J. H., Kim, W. Y., Kim, J. K. and Kim, W. K. : Antitumor activity of aqueous-alcoholic extracts from unripe cotton ball of *Gossypium indicum*. *Archives of Pharmacal Research*, **21**, 266 (1998).
- 7) Lim, J. H. : Studies on the chemical constituents of cotton boll II, Seoul National University, College of Pharmacy, Master degree theme (1998).
- 8) Kim, Y. S., Park, K. S., Chang, I. M., Hyun, J. W., Park, J. G. and Park, H. K. : Antitumor activity of reaction mixture of chitin and green onion extract. *Yakhak Hoeji*, **38**, 579 (1994).
- 9) Lee, K. H., Lee, C. O., Lee, J. W., Jeong, H., Han, M. D., Jeong, J. H. and Oh, D. H. : Pharmacological and toxicological studies of antitumor polysaccharides obtained from garoderma lucidum IY009. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 182 (1994).
- 10) David L. E., Jeffrey M. B., H. Roger Brown, *In vivo* antitumor activity of two new seven-substituted water-soluble camptothecin analogues. *Cancer Res.*, **55**, 603 (1995).
- 11) Gralla, E. J., Fleischman, R. W. and Luthra, Y. K. : The dosing schedule dependent toxicities of adriamycin in beagle dogs and rhesus monkeys.

- Toxicology*, **13**, 263 (1979).
- 12) Peter J. H., Pamela, J. C., James, D. H. and Lois L. : Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan and irinotecan, administration at low dose levels in protected schedules to mice bearing xenografts of human tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **36**, 393 (1995).
 - 13) Brattig, N. W., Diao, G. J. and Berg, P. A. : Immunoenhancing effect of flavonoid compound on lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis. *Int. T. Immunopharmacol.*, **6**, 205 (1984).
 - 14) Bibby, M. C., Phillips, R. M., Double, J. A. and Pratesti, G. : Antitumor activity of flavone acetic acid (NSC347512) in mice-influence of immune status. *Br. J. Cancer*, **63**, 57 (1991).
 - 15) Ruch, R. J., Cheng, S. J. and Klaunig, J. E. : Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, **10**(6), 1003 (1989).
 - 16) Metodiewa, D., Skolimowski, J., Kochman, A., Gwozdziński, K. and Glebska, J. : Tempicol-2(4-hydroxy-4-(2-picolyl)-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl), a stable free radical, is a novel member of nitroxide class of antioxidants and anticancer agents. *Anticancer Res.*, **18**(1A), 369 (1998).
 - 17) Matsuzawa, T., Saitoh, H., Sano, M., Tomita, I., Ohkawa, M. and Ikekawa, T. : Studies on antioxidant effects of *Hypsizigus marmoreus*. II. Effects of *Hypsizigus marmoreus* for antioxidant activities of tumor-bearing mice. *Yakugaku Zasshi*, **18**(10), 476 (1998).
 - 18) Thsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Komoto, K. and Orita, K. : Krestin (PSK). *Cancer Treatment Reviews*, **11**, 131 (1984).
 - 19) Ando, T., Noguchi, Y., Oguchi, Y., Feyoda, N., Matsunagu, K., Fujii, T., Inoguchi, E., Saito, K., Iijima, H., Yoshikumi, C., Hotta, T., Yanagisawa, M. and Nomoto, K. : Effect of PSK on macrophage function in tumor-bearing mice. *Proceedings of the Japanese Cancer Association: 39th Annual Meeting: 1256* (1980).
 - 20) Enrke, M. J., Reino, H. M., Eppolito, C. and Mihich, E. : The effect of PSK, a protein bound polysaccharide, on immune responses against allogenic antigens. *Int. J. Immunopharmacol.* **15**, 35 (1983).