

동과자(冬瓜子)의 항암활성과 방사선에 대한 감작효과

최혜란 · 이경호¹ · 김창한*

건국대학교 동물자원연구센터, ¹코오롱중앙연구센터

Radiosensitizing and Antitumor Effect of the Seed of *Benincasae hispida*

Hye-Ran Choi, Keyong-Ho Lee¹ and Chang-Han Kim*

Animal Resources Research Center, Konkuk University

¹Kolon Central Research Park

Radiosensitizing and antitumor effects of hot water extract derived from the seed of *Benincasae hispida* were investigated. The extract showed maximum survival rate of 21% at 0.1 g/kg against L1210 cells implanted in BDF1 mice. Radiosensitivity of human tumor cell line was evaluated through sulforhodamine assay. Inhibition rate of SK-OV-3 cells after 5 Gy radiation by *Benincasae hispida* seed extract at 2 mg/mL was 86%.

Key words: *Benincasae hispida*, antitumor, radiosensitivity

서 론

40세 이상 되는 사람들의 사망률에서 암은 22%를 차지하며 암 이외의 병으로 사망한 65세까지의 사람들에게 대한 세밀한 병리형태학적 검사에서도 그들의 50% 이상에서 암의 존재를 확인하였다. 암치료에서 수술, 방사선치료가 큰 역할을 하고 있지만 암에 대한 완치율을 비약적으로 높이는 데는 문제가 많다. 수술, 방사선치료에 의하여 잘 낫지 않고 치료한 후에 자주 재발하는 것은 진행기암 때 암세포가 국소에 머물러 있지 않고 전신의 혈액 속에 퍼져 있기 때문이라고 본다⁽¹⁾. 그러므로 전신적으로 작용하는 항암제가 수술, 방사선치료의 단점들을 보충하도록 할 목적으로 많은 경우에 수술, 방사선치료를 병합하는 방법을 쓰고 있다⁽²⁾. 방사선 조사는 일반적으로 외과요법 처리 이전에 처리하여 종양의 크기를 줄이는데 효과적이며⁽³⁾, 방사선 처리에 의한 cell의 감작효과는 이미 30여년 전에 *in vitro*상에서 보고된바 있다⁽⁴⁾. 최근에 기본 초점이 되는 것이 암 환자의 세포면역능력을 높이기 위한 면역치료법으로 암백신⁽⁵⁾, 면역요법⁽⁶⁾, 생물학적 제제⁽⁷⁾ 등이 암 예방 및 치료에 대한 근본적인 가능성을 제시하고 있음에도 불구하고 아직까지 만족할만한 치료제가 개발되지 않고 있다. 동약 항암제를 포함하여 임상에 쓰이고

있는 항암제는 약 40여 종이이며 임상검토 중에 있는 것은 수없이 많은데 최근에는 항암제 탐구에서 식물성 자원에 많이 주의하고 있다. 특히 동약 항암제는 대부분이 체내에서 오래 머무르며 혈중 농도를 보장하여 효과를 오래 가게 한다⁽¹⁾.

동과자(冬瓜子)는 대한약전의 한약규격집 및 본초학에 *Benincasae hispida* Cogniaux의 씨와 열매껍질로 규정되어 있다^(8,9). 주작용은 이뇨와 소종(消腫)작용이며, 간경화 복수증 및 각기(脚氣)부종 등의 수종을 치료하기 위해서 사용되어져 왔다⁽⁹⁾.

연구 효과로는 동과자의 추출물에 의한 점액분비 촉진 효과 즉 거담효과⁽¹⁰⁾, 위궤양의 예방효과⁽¹¹⁾, 동과열매의 histamine 분비 억제효과⁽¹²⁾ 및 면역증진에 의한 항종양효과⁽¹³⁾ 등이 보고되었다. 동과자에 대한 성분으로는 saponin, urea, citrulline, linoleic acid, oleic acid 및 포화지방산등으로 이루어져 있다⁽¹³⁾.

본 연구에서는 한방에서 쓰이고 있는 많은 종류의 재료에 대한 항종양효과의 연속적인 탐색과정 중에서 동과자 추출물 단독의 종양세포 생육억제 효과를 확인하였고, 방사선과 병용 처리시 종양세포주에 대한 병용투여효과를 확인하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 동과자는 서울시 제기동 경동시장의 한 약 건재상에서 2001년 7월경 구입하여 사용하였다.

추출

Organic solvent 추출물로 사용된 동과자는 분말화하여 20 g

*Corresponding author : Chang-Han Kim, Animal Resources Research Center, Konkuk University, 1, Hwayang-Dong, Kwangjin-Gu, Seoul 143-701, Korea
Tel: 82-2-450-3679
Fax: 82-2-3436-0266
E-mail : chhan@kkucc.konkuk.ac.kr

을 200 mL의 ethanol, butanol 및 chloroform에 넣고 각각 상온에서 24시간 동안 추출 후 감압 농축하여 사용하였고 열수 추출물은 동과자 20 g을 200 mL의 증류수(distilled water, DW)로 100°C와 121°C에서 각각 1시간 동안 중탕한 후 원심 분리하여 상층액을 감압 농축하였다.

종양세포

본 실험에서 사용된 종양세포주는 A549(human lung carcinoma), Farrow(human melanoma carcinoma), HEp-2(human larynx carcinoma), SK-MES-1(human lung carcinoma), SK-OV-3(human ovary carcinoma), 3LL(mouse Lewis lung carcinoma) 및 L1210(mouse leukemia)을 사용하였으며, Gibco사(Life Technologies, INC., Rockville, Maryland, USA)의 배지를 이용하여 배양하였다.

A-549, SK-OV-3 및 Farrow 세포주는 RPMI 1640, HEp-2 세포주는 MEM, 그리고 P388 세포주는 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum(FBS, heat inactivated)을 함유한 배지를 사용하였으며 SK-MES-1과 3LL 세포주는 MEM 배지에 10% FBS(HI)와 1% penicillin/streptomycin, 1% glutamine, 1% nonessential amino acid, 1% sodium pyruvate 및 1% MEM vitamin을 함유한 배지를 사용하여 37°C에서 5% CO₂를 함유하는 대기 조건 하에서 배양하였다.

Cytotoxicity

동과자 추출물에 대한 항종양효과를 알아보기 위하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하였다⁽¹⁴⁾. 각각의 종양세포주 5×10⁵ cells/mL를 100 µL씩 96 well에 분주하여 24시간 예비배양 한 후, 시료를 100 µL 접종하여 48시간 동안 노출시켰다. 노출완료 후 MTT solution(0.5 mg/mL)을 50 µL씩 각각 첨가하여 형성된 formazan을 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 녹여 multiwell scanning spectrophotometer(microplate autoreader, Bio-Tek instrument, Vermont, Winooski, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항종양효과는 세포성장 저해율로 평가하였다.

Radiosensitivity: 방사선에 대한 항종양효과의 상승효과는 SRB assay를 이용하였다⁽¹⁵⁾. 5×10⁴ cells/mL를 450 µL씩 4 well에 분주하여 24시간 예비배양 한 후, 시료를 세포에 50 µL씩 첨가하여 48시간 노출시켰다. 노출완료 후에 방사선 5 Gy를 조사하여 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후, 새로운 배지 500 µL로 5일간 배양하여 방사선에 대한 감

작 효과를 측정하였다. 방사선 조사는 Gammacell 3000(Tucson, Arizona, USA)을 사용하였으며 방사선원은 ¹³⁷Cs 동위원소로 3.6 Gy/min을 사용하였다.

In vivo antitumor activity: 마우스를 이용한 항종양효과의 측정을 위한 실험동물은 중앙실험동물로부터 BDF1 mouse(6주령, 수컷)를 공급받았으며, 사육조건은 온도 22~24°C, 습도는 60~70%, 사료는 펠렛형 사료로 자유급식, 음수는 삼투여과한 물을 공급하였다. 종양세포는 L1210(mouse leukemia)을 이용하였다. 마우스 당 1×10⁶ cells를 복강 내에 주입한 후, 다음 날부터 1주 동안 5회씩 동과자 추출물을 각각 0.01 g/kg, 0.1 g/kg의 농도로 경구투여 하였다. 마우스의 생존율은 30일까지 관찰하였고, 항종양효과는 생존율을 매일 계산하여 사망할 때까지의 적분비(inhibition rate)로 환산하여 생명연장율(increased life span, ILS)로 나타내었다.

Acute toxicity: 단 회 투여에 의한 독성은 6주령 ICR mice 암·수컷 각각 5마리씩 하였으며, 본 독성 실험에 사용한 농도 군은 0.5, 1, 2 및 4 g/kg이었다. 사육조건은 위와 동일하게 유지하였다. 투여 경로는 경구로 하였으며 체중은 주 2회 측정하였다.

결과 및 고찰

동과자의 추출용매에 따른 종양세포 증식억제 효과(Cytotoxicity)

천연물을 이용하여 생리활성이 있는 성분을 추출 분리하여 그 유효 성분을 탐색함으로써 질병 예방 및 치료제로 이용하고자 하는 연구가 최근 활발히 진행되고 있다⁽¹⁶⁾.

추출 용매에 따른 종양세포 저해효과에 대한 MTT assay 결과는 Table 1과 같다. Organic solvent 추출물의 CHCl₃ 추출 분획에서 LD₅₀ 이상의 저해효과를 나타낸 종양세포는 SK-MES-1과 HEp-2이었으나 나머지 종양세포들에서는 저해효과가 인정되지 않았다. Buthanol 및 ethanol 추출 분획의 경우에는 모든 종양세포에 대하여 성장저해효과가 나타나지 않았다. 열수 추출물의 경우는 유기용매 추출물보다 2배 이상의 성장저해효과가 나타났으며, 온도에 따른 효과는 121°C보다는 100°C에서 추출하는 것이 우수하게 나타났다. 따라서 유기용매에 의한 추출보다 열수에 의한 추출이 효과적임을 확인하였다. 또한 동과자의 종양세포 억제물질의 추출은 100°C에서 물로 추출하는 것이 본 실험에서 사용한 추출방법 중 가장 우수한 것으로 평가되었다. 본 연구 결과에는 나타내지

Table 1. Growth-inhibitory effect of various extracts (2 mg/mL) of the seed of *Benincasae hispida*

Cell lines	CHCl ₃	Buthanol	Ethanol	Water	
				100°C	121°C
SK-MES-1	77 ¹⁾	34	27	80	46
HEp-2	67	35	35	78	55
A549	47	28	16	82	65
SK-OV-3	37	36	23	76	86
Farrow	46	40	36	96	41
L1210	45	42	41	75	55
3LL	28	31	29	94	86

¹⁾Inhibition rate (%) = [1 - (treated O.D./control O.D.)] × 100.

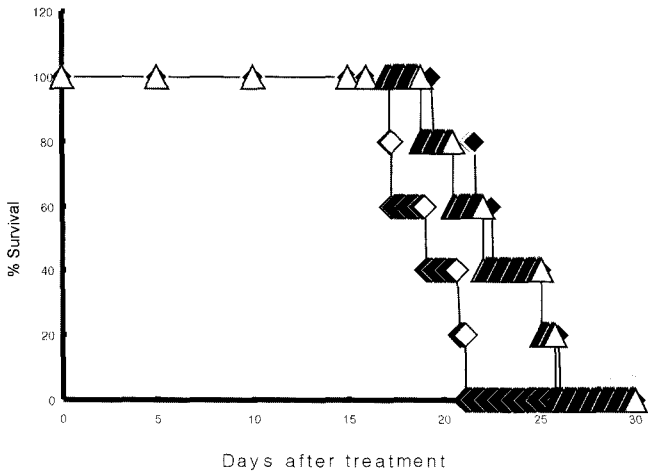


Fig. 1. In vivo antitumor activity of extract of the seed of *Benincasae hispida*.

-◇-: Hot water extract was treated 0 g/kg, -◆-: Hot water extract was treated 0.1 g/kg, -△-: Hot water extract was treated 0.01 g/kg.

않았으나 clonogenic assay를 이용한¹⁷⁾ 열수 추출물(100°C)의 항종양 억제 효과 측정시 7종의 세포주에 대해 80%이상의 높은 저해 효과를 나타내었으며 농도에 따른 저해 효과 측정시 2 mg/mL에서 높은 저해 효과를 나타내었다.

In vivo 상에서의 성장저해효과

Fig. 1은 동과자 열수 추출물(100°C)의 in vivo 성장저해효과 평가의 결과를 나타낸 것이다. 본 실험에서는 마우스 몸무게 kg당 열수 추출물을 각각 0.01 g 및 0.1 g을 투여하였다. 대조군의 평균 생존일수(maximum survival time, MST)는 19.2±2.0일이었으나 동과자 열수 추출물 0.01 g/kg 투여군의 평균 생존일수는 22.5±3.1일이었고, 0.1 g/kg 투여군의 평균 생존일수는 23.2±2.8일로 나타났다. 항종양효과는 생존율을 매일 계산하여 사망할 때까지의 대조군과 처리구의 적분비(inhibition rate)로 환산하여 생명연장을(increased life span, ILS)로 나타냈을 때 대조군에 비하여 0.01 g/kg과 0.1 g/kg 투여군은 각각 17%와 21%의 생명연장을(increased life span, ILS)이 확인되었다. 따라서 항종양효과가 있는 것으로 판단된다.

암세포 면역효과에 대한 연구 중 Kumazawa 등¹³⁾에 의하면 동과자의 열수 추출물의 Sepharose 4B column 분획 중에서 Meth A fibrosarcoma가 이식된 mouse에서 생명연명 효과가 있으며, 이 분획의 성분은 다량의 uronic acid가 함유되어 있다고 알려져 있다. 이상에서의 같이 Kumazawa 등¹³⁾은 동과자 열수 추출물의 암세포에 대한 면역 효과를 확인하였으며 본 실험에서는 종양세포 증식억제효과 확인하였다. 따라서 동과자 열수 추출물의 물질 분리, 정제 및 동정 과정을 통해 면역 및 항종양 효과에 대한 생리활성 물질의 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

열수 추출물의 방사선 감작효과(Radiosensitizing effect)

동과자 열수 추출물과 방사선 처리, 그리고 병용 처리에 의한 종양세포 증식억제효과를 Fig. 2에 나타내었다. 열수 추출물 단일처리시 A549는 성장저해율 23%을 나타냈으며, SK-

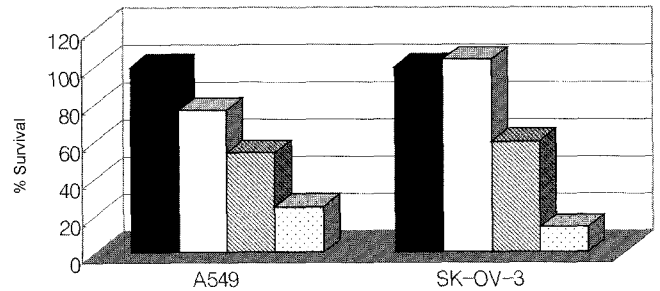


Fig. 2. Growth inhibitory and radiosensitizing effects from hot water extract (2 mg/mL) of the seed of *Benincasae hispida* on A549 and SK-OV-3 cells.

■ : Hot water extract was 0 mg/mL, □ : Hot water extract was 2 mg/mL, ▨ : Radiation dose was 5 Gy, ▩ : Hot water extract was combined with radiation.

OV-3는 성장저해에 대하여 아무런 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. 그리고 방사선 5 Gy 단독조사시 A549와 SK-OV-3이 각각 46%와 40%이었다. 반면, 열수 추출물과 방사선의 병용 처리시 A549는 75%, SK-OV-3는 86%의 성장 저해율이 나타났다. 따라서 동과자의 열수 추출물이나 방사선의 단독 처리에 의한 항종양 효과보다는 두 가지를 병용했을 경우 종양세포 증식억제효과에 대한 상승효과가 있는 것으로 판단된다. 앞에서 언급했듯이 특히 동약 항암제는 대부분이 체내에서 오래 머무르며 혈중 농도를 보장하여 효과를 오래 가게 하므로¹⁾ 방사선 감작제라는 약제를 적절하게 선택하여 항암화학요법을 방사선치료와 동시에 시행하여 약제 및 치료보조제의 발달을 기대할 수 있을 것이다. 또한 방사선치료기술의 발달로 그 치료효과를 높이면서 부작용을 감소시키는 방법이 될 수 있을 것이라 사료된다.

추출물의 급성독성

ICR mice에 동과자 열수 추출물의 단독 경구 투여에 의한 급성독성은 나타나지 않았다. 즉 본 독성 실험에 사용된 0.5, 1, 2 및 4 g/kg의 모든 농도군에서 투여에 의한 폐사 및 반사 동물은 전혀 없었다. 투여 후 관찰 기간 14일까지 대조군과 같은 체중변화를 보였으며 사료 및 음수량도 대조군과 유의차는 인정되지 않았다. 그리고 14일 이후 살아있는 모든 개체에 대한 도살부검을 실시한 결과 장기의 외관적 이상소견을 발견되지 않았고, 농도에 따른 차이도 전혀 발견할 수 없었다.

요 약

동과자 열수 추출물의 in vitro 항암효과는 2 mg/mL의 농도에서 가장 높게 나타났으며 in vivo 상에서의 0.1 g/kg, 0.01 g/kg의 경구 투여시 각각 21%, 17%의 생명연장을(increased life span, ILS)을 나타내었다. SK-OV-3에 대한 SRB assay를 이용한 열수 추출물(2 mg/mL)의 방사선(5 Gy) 병용 투여에 있어서 86%의 저해효과를 나타내었다.

문 헌

1. Ju, H.G. and Hong, J.H. Anticancer Plant Lexicon. Science Ency-

- clopaedia Pub., Seoul, Korea (1982)
2. Grigsby, P.W. Update on radiation therapy for endometrial cancer. *Oncology* 16: 777-786 (2002)
 3. Chung, P., Cook, T., Liu, K., Vodovotz, Y., Zamora, R., Finkelshtein, S., Billiar, T. and Blumberg, D. Overexpression of the human inducible nitric oxide synthase gene enhances radiation-induced apoptosis in colorectal cancer cells via a caspase-dependent mechanism. *Nitric Oxide* 8: 119-126 (2003)
 4. Pignol, J.P., Rakovitch, E., Beachey, D. and Le Sech, C. Clinical significance of atomic inner shell ionization (ISI) and Auger cascade for radiosensitization using IUdR, BUdR, platinum salts, or gadolinium porphyrin compounds. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 55: 1082-1091 (2003)
 5. Hellman, K., Phil, D. and Carter, S.K. *Foundamental of Cancer Chemother*, pp. 64. McGraw Hill Book Co., New York, USA (1987)
 6. Giampietri, A. Drug-mediated increase of tumor immunogenicity *in vivo* for a new approach to experimental cancer immunotherapy. *Cancer Res.* 41:681-687 (1981)
 7. Budd, G.T., Osgood, B., Burna, B., Boyett, J.M., Finke, J., Mden-drop, S.V., Murth, S. and Bukoski, R.M. Phase I clinical trial Toxicity and immunologic effects. *Cancer Res.* 49:6432-6438 (1989)
 8. Ji, H.J. and Lee, S.I. *The Korean Pharmacopoeia*, pp. 121-122. Korea Medical Index Co., Seoul, Korea (1988)
 9. Korea professor conference. *Phytology*. pp. 352-354. The Korean Pharmaceutical Association, Seoul, Korea (1995)
 10. Kim, Y.J. and Shin, M.G. Mucolytic effects of various parts of *Fructus Benincasae* extracts in the rat trachea. *J. Korean Med. Soc.* 20: 165-176 (1999)
 11. Grover, J.K., Adiga, G., Vats, V. and Rathi, S.S. Extracts of *Benincasa hispida* prevent development of experimental ulcers. *J. Ethnopharmacol.* 78: 159-164 (2001)
 12. Yoshizumi, S., Murakami, T., Kadoya, M., Matsuda, H., Yamahara, J. and Yoshikawa, M. Medicinal foodstuffs. XI. Histamine release inhibitors from wax gourd, the fruits of *Benincasa hispida*. *Cogn. J. Pharm. Soc.* 118: 118-192 (1998)
 13. Kumazawa, Y., Nakatsuru, Y., Yamada, A., Yadomae, T., Nishimura, C., Otsuka, Y. and Nomoto, K. Immunopotentiator separated from hot water extracts of the seed of *Benincasa hispida*. *Cancer Immunol. Immunother.* 19: 79-84 (1985)
 14. Rubinstein, L.V., Shoemaker, R.H., Paul, K.D., Simon, R.M., Tosini, S., Scudiero, D.A., Monks, A. and Boyd, M.R. Comparison of *in vitro* anticancer drug screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1113-1118 (1990)
 15. Griffon, G., Merlin, J.L. and Marchal, C. Comparison of sulforhodamine B, tetrazolium and clonogenic assays for *in vivo* radiosensitivity testing in human ovarian cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 6: 115-123 (1995)
 16. Park, Y.J., Kim, M.H. and Bae, S.J. Anticarcinogenic effects of *Allium tuberosum* on human Cancer cells. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 688-693 (2002)
 17. Uesato, S., Kitagawa, Y., Kamishimoto, M., Kumagai, A., Hori, H. and Nagasawa, H. Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. *Cancer Lett.* 170: 41-44 (2001)

(2002년 9월 15일 접수; 2003년 5월 21일 채택)