

발아 호박씨로부터 Cucurbitacin E의 분리정제 및 항암, 항염증 활성

심후성¹ · 장병철² · 박혜민¹ · 정병용³ · 오만진^{1*}

¹충남대학교 식품공학과

²계명대학교 의과대학

³상생식품

Isolation of Cucurbitacin E from Sprouted Pumpkin Seed and Analysis of Its Anti-cancer and Anti-inflammatory Activities

Hu-Sung Sim¹, Byeong-Chur Jang², Hye-Min Park¹, Byeong-Yong Jeng³, and Man-Jin Oh^{1*}

¹Dept. of Food Science & Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Dept. of Medical Genetic Engineering, School of Medicine, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

³Sangsaeng Food Company, Chungnam 320-860, Korea

Abstract

In order to improve the use of pumpkin seed, the present study was performed to isolate compositions of the bitter components which were not seen in pumpkin seed itself but newly biosynthesized during germination of the seed. The compositions isolated were then further purified by TLC and preparative HPLC in which a fraction with Rf 0.73 and RT 10.3 was obtained. Cucurbitacin E with molecular weight of 557 from the fraction was finally identified by subsequent structural analysis of LC-MS/MS. The production of cucurbitacin E peaked with 224.7 mg/kg at 4 days of germination at 20°C with the water supply at intervals of 48 hrs in the darkness, while that of cucurbitacin E reached 146.7 mg/kg in the brightness. In vitro-cell based assays demonstrated that the isolated and purified cucurbitacin E inhibited proliferation of A549 lung cancer cells and suppressed expression of the IL-1 β - or PMA-induced cyclooxygenase-2, an inflammatory protein in A549 cells, suggesting its anti-proliferative and anti-inflammatory activities.

Key words: pumpkin seed sprouts, cucurbitacin E, COX-2, IL-1 β , PMA

서 론

호박은 근래 건강 기능성 식품소재로 각광을 받고 있어 소비량이 매년 증가하고 있다. 호박에는 과육 중량의 2~3%에 달하는 씨앗이 함유되어 있으며 씨앗 중에는 다량의 지방과 단백질이 존재한다. 호박 씨앗은 가정에서 종실 자체로서나 과자의 원료로 이용되어 왔으나 민간에서는 전립선 비대 치료, 이노제, 구충제로서 이용하여 왔을 뿐이다. 또한, 어떤 종류의 호박 중에는 고미성분으로 알려진 생리활성이 높은 cucurbitacin류가 존재하는 것으로 보고되어 왔다(1,2).

고미물질인 cucurbitacin류는 호박, 참외, 오이 등의 박과류가 성장과정 중에 수분이 부족하고 온도가 저하될 때 꼭지 부분에 축적되는 tetracycle triterpene을 함유하는 물질로서 cucurbitacin A, B, C, D, E, F 등 11종류의 analogue가 존재하는 것으로 알려져 있다(3,4). Cucurbitacin류는 항암성, 항염증제, 항진균제, 해충제거제로 쓰이는 생리활성물질로서 의학 분야, 천연물 농약소재나 사료첨가제로서 유용성이 매

우 높아 많은 연구자들의 관심을 모은 물질이다. 특히, cucurbitacin류는 낮은 농도에서 전립선암에 강한 항암활성을 가지고 있고 다른 항암제에 비하여 부작용이 없는 물질로 알려져 있으나 합성이 불가능하고 식물체를 재배하여 생산한다 하더라도 식물체중의 함량이 낮고 대량생산이 어려워 그 이용이 제한되어 왔다(5,6). 이와 같은 암 예방과 치료에 실용적으로 쓰일 수 있는 cucurbitacin류는 우리 인류가 오랫동안 이용되어 온 호박, 오이, 참외 등에 존재하여 그 안전성이 입증된 항암성분이다.

Cucurbitacin류에 대한 그동안의 연구를 보면 Terrence와 Mark(7)는 호박의 고미성분은 cucurbitacin E glycoside라고 하였으며, Cardellina 등(8)은 cucurbitacin류는 구토를 일으키고 특이한 세포파괴성을 가지고 있지만 신장암, 뇌암 등에 대한 항암성을 가지고 있으며, cucurbitacin E는 전립선암 세포의 증식을 억제하고, actin과 vimentin의 세포골격 구조를 붕괴시키고(5,6), 작물의 흑사병이나 곤충으로부터의 피해를 줄여주는 물질로 사용되어지고 있다고 보고하였다(9).

*Corresponding author. E-mail: ohmj@cnu.ac.kr
Phone: 82-42-821-6728, Fax: 82-42-821-6728

Dulcie(10)는 Sahara지방의 herb 잎으로부터 cucurbitacin류를 추출하여 4개의 유사구조를 가진 화합물을 분리 동정하였으며, Fathi(11)는 박을 세포 배양하면서 cucurbitacin의 생성정도를 정량하고 대량생산을 위한 배양조건을 검토하여 2~4 D, kinetin, 인산염을 배지에 첨가할 때 축적량이 높아졌다고 보고하였다. 또한, Blaskovich 등(12)은 cucurbitacin I와 Q가 특이적으로 phosphorylation(13)을 저해하여 암세포의 활성을 억제하였다고 보고하였고, Raloff(14)는 옥수수 재배 시에 상기 물질을 해충제제로 사용하면 옥수수의 수확을 높이고 안전한 생물 농약으로 이용할 수 있음을 보고하였으며, Peters 등(15)은 cucurbitacin B가 항염증제로서 활성이 높음을 보고하였다.

본인 등은 호박씨를 발아시켜 식품학적 가치와 생리활성 물질을 검색하는 연구를 수행하는 과정에서 처음 종자에는 존재하지 않았으나 발아과정 중 고미물질이 다량으로 생성, 축적되는 것을 발견하고 이를 확인할 필요성을 느끼게 되었다. 본 연구는 호박씨 발아 과정 중에 생성되는 고미물질을 TLC, HPLC로 분리, 정제하고 LC/MS로 구조를 확인함과 동시에 호박씨 발아 조건에 따른 고미물질 생성 정도를 측정하였으며 분리 정제한 고미물질의 항암활성, 항염증활성을 측정하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

호박씨 발아 조건과 고미물질 생성

충남 지역에서 생산된 재래종 호박씨를 사용하여 물에 12시간 침지 후 15~30°C에서 48~96시간 간격으로 15분간 물을 살포하면서 생육상에서 암소와 1,000 Lux의 광을 12일간 조사하면서 머리 부분을 취하여 60°C에서 열풍건조한 후 분쇄하여 발아 조건에 따른 고미성분 함량을 정량하였다.

시약 및 분석기기

성분분석 및 고미성분 추출 및 순차 분획용 유기용매는 특급시약, HPLC, Mass spectrum 분석용매는 Baker사 제품, HPLC용 용매와 TLC plate(silica gel 60 F₂₅₄, 20×20 cm, 0.5 mm)는 Merck사 제품, HPLC는 Young-lin M 930 (Younglin Ins., Co., Ltd., Korea), LC-MS/MS는 HP 1100 series(Hewlett Packerd, USA), 4000 Q Trap(Applied Biosystems, USA)을 사용하였다.

고미성분의 분리 정제 및 구조 분석

호박씨 중의 고미성분을 추출한 후 분리, 정제하여 구조 분석 과정을 요약하면 Fig. 1과 같다.

고미성분 추출 및 분리

고미성분을 추출하기 위해서 건조한 발아 호박씨의 머리 부분 30 g을 chloroform용액으로 10배량을 가하여 24시간 환류 추출 후 다시 용매를 가하여 3회 반복 추출하였다. 추출물은 여과지로 여과한 후 50°C에서 vacuum evaporator로

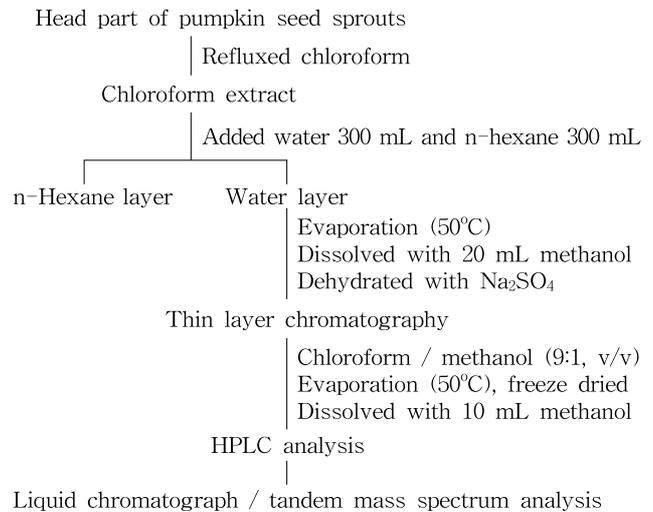


Fig. 1. Purification and isolation procedure of bitter compound from pumpkin seed sprouts.

감압 농축하여 용매를 완전히 제거하였다. 남은 추출물에 n-hexane 300 mL와 물 300 mL를 넣어 1시간 shaking 한 후 정치하여 색소와 지질을 완전히 분리하여 제거하고 물층을 감압 농축한 후 동결 건조하여 methanol 20 mL를 가한 후 Na₂SO₄로 탈수하였다.

Thin layer chromatography에 의한 고미성분의 분리

탈수된 시료는 TLC plate(20×20 cm, silica gel 60 F₂₅₄, 0.5 mm, Merck) 상에 점적하여 chloroform : methanol(9:1)로 전개시켜 UV lamp, 254 nm에서 band를 관찰하였다.

High performance liquid chromatography에 의한 고미성분 분리 및 정량

TLC에서 고미가 확인된 band만 모아서 methanol에 녹인 후 30분간 교반한 후 원심분리(3,000 g, 15 min)를 행하여 상정액을 취한 후 감압농축하고 동결건조 하였다. 이것을 10 mL methanol에 용해하고 0.2 μL 필터로 여과한 후 그 중 10 μL를 취하여 HPLC에 주입하고 단일 물질임을 확인하였다. HPLC의 분석 조건은 Table 1과 같으며 고미물질의 대량 분취는 조제용 column(Phenomenex C18 250×10 mm, 15 μ)을 이용하였다(16).

Liquid chromatograph/tandem mass spectrometry 분석

순수 분리된 고미 성분 0.3 mg을 1 mL methanol에 녹여

Table 1. Operating conditions for analysis of bitter component of pumpkin seed sprouts by HPLC

Apparatus	Young-lin M930
Column	Reversed phase (Agilent C18, 250×4.60 mm, 5 μ)
Mobile phase	Methanol/water (70:30, v/v)
Flow rate	0.8 mL/min
Detector	UV detector, 234 nm

liquid chromatograph/tandem mass spectrometer에 주입하여 분석하고 순수 분리된 고미성분을 확인한 후 mass spectrometer로 이온화시킨 후 3개의 mass analyzer에 의해 분자량을 측정하고 고미 성분의 화학적 구조를 확인하고 정량하였다. 이 때 표준물질인 cucurbitacin E(Cu E)와 retention time을 비교하여 고미성분을 확인, 동정하였다.

고미성분의 항암성

세포배양 및 시료처리: 인간 폐암상피세포 A549는 37°C CO₂ 세포배양기에서 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin이 함유된 RPMI 세포배지에서 배양시켰다. 먼저 Cu E의 항염증 생리활성 분석을 위해 Cu E의 염증성 단백질 COX-2 발현 조절 효과를 분석하였다. 이를 위해 A549 세포에 Cu E를 1시간 동안 전처리 후 세포배지를 제거 후 동일 세포에 COX-2 단백질의 발현 유도물질로 알려진 interleukin-1β (IL-1β) 또는 phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA)를 단독 또는 Cu E와 병용하여 6시간 동안 처리 후 세포 내 COX-2 단백질 발현량을 아래의 Western blot 방법으로 측정하였다. Cu E의 암세포 억제 효과를 알아보기 위해 A549 세포에 Cu E를 첨가 또는 첨가하지 않고 8, 24 또는 48시간 배양시켰다. 각각의 처리 시간 경과 후 이들 세포에 MTS 용액(A) 또는 trypan blue 염색료(B)를 각각 넣고 아래의 실험방법으로 세포 증식도 측정 또는 생존세포수를 산정하였다.

항염증 활성 측정(Western blot 분석): 시료 처리 또는 처리되지 않은 A549 세포를 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 세척 후 세포용해액[50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), 0.25% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40, 1 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L NaF, 1 mmol/EDTA, 1 mmol/L EGTA, proteinase inhibitor cocktail (1×)]을 넣고 얼음에서 10분간 정치시킨 다음 원심분리하여 상정액을 취하였다. Biorad 회사(Mississauga, ON, USA) 제품의 단백질정량 kit를 이용하여 단백질 농도를 구하였다. 약 40 µg 단백질을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기영동 후 단백질을 nitrocellulose membrane(Millipore Co., Bedford, MA, USA)로 전기영동 하였다. Membrane을 5% skim milk가 함유된 Tris-buffered saline-Tween 20(TBST) 용액[10 mmol/L Tris(pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20]에 1시간 동안 blocking 한 다음 일차항체[COX-2(1:1,000) 또는 actin(1:5,000)]를 넣고 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. Membrane을 TBST 용액으로 세척 후 이차항체(1:5,000)를 첨가 후 상온에서 2시간 반응시켰다. Membrane을 TBST 용액으로 세척 후 enhanced chemiluminescence kit (Amersham, Oakville, ON, USA)를 이용하여 세포 내 COX

-2 또는 actin 단백질 발현을 확인하였다(17).

세포증식도 분석(MTS assay): A549 세포를 96 well culture plate에 약 10,000 세포/100 µL/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 overnight 배양시켰다. 다음 날 A549 세포에 Cu E를 첨가하지 않거나 농도를 달리하여 Cu E를 8, 24 또는 48시간 처리 후 배지를 제거하였다. 각각의 처리 시간 경과 후 A549 세포에 MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] 용액을 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 경과 후 Victor 3(Perkin Elmer, Fremont, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(18).

생존세포 수 산정(cell survival assay): A549 세포를 6 well culture plate 약 100,000세포/1000 µL/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 overnight 배양시켰다. 다음 날 A549 세포에 Cu E를 첨가하지 않거나 농도를 달리하여 Cu E를 8, 24 또는 48시간 처리 후 배지를 제거하였다. 시료 처리 후 배양액을 제거하고 세포를 수집하여 원심분리 하였다. 회수한 일정 수의 세포현탁액에 trypan blue 염색시약을 0.2%가 되도록 첨가한 다음 hemacytometer를 이용하여 trypan blue에 염색되지 않은 생존 세포수를 산정하였다.

결과 및 고찰

TLC와 HPLC에 의한 고미성분 분리

호박씨를 발아시켰을 때 머리 부분에서 고미를 나타내는 물질이 생성되었으며 발아기간이 경과함에 따라 고미는 점차 증가하였다. 호박씨의 머리 부분만 건조시킨 시료를 chloroform으로 추출하여 얻은 추출액을 감압농축한 후 hexane과 물을 첨가하여 분획하여 각 층의 맛을 확인한 결과 물 층에서 고미가 있음을 확인하였다. 물 층을 chloroform/methanol(9:1)용액을 전개용매로 하여 silica gel TLC를 행하여 흡광도 254 nm에서 Fig. 2에서와 같이 7개의 band를 확인하고 각 band를 methanol로 추출하여 맛을 확인한 결과 Rf 0.73에서 고미를 느낄 수 있었다. Rf 0.73 부분을 분취하여 HPLC로 분석한 결과 Fig. 3과 같이 RT 10.3에서 고미성분의 peak가 나타났으며 조제용 HPLC column를 이용하여 고미성분을 순수 분리하여 건조시켜 백색분말을 얻을 수 있었다.

고미성분의 구조 분석

HPLC chromatogram상에서 각 peak의 물질을 분획하여 관능으로 맛을 확인한 결과 RT 10.3에서 고미를 나타내었으므로 RT 10.3의 순수 분리된 고미물질을 methanol에 녹여 LC-MS로 분자량을 알아 본 결과 Fig. 4(A,B)에서 보는 바와 같이 RT 10.52에서 m/z 557.5의 peak를 나타내었고, LC-MS/MS로 m/z 557.5의 물질을 쪼갬 결과 Fig. 4(C)에서 보는 바와 같이 m/z 557.5, 539.1, 497.8, 411.4, 385.8, 300.9,

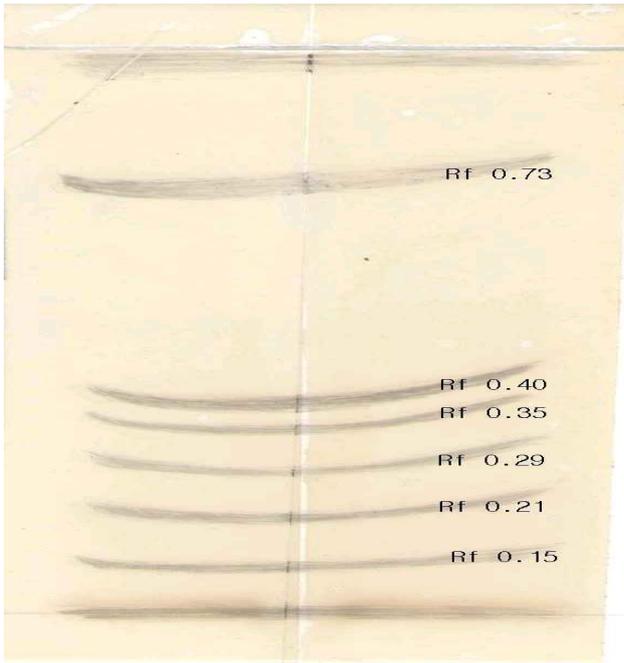


Fig. 2. Thin layer chromatogram of bitter components of pumpkin seed sprouts.

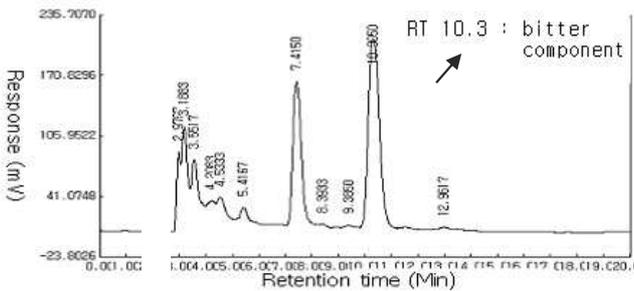


Fig. 3. HPLC chromatogram of TLC Rf 0.73 subfraction of bitter component of pumpkin seed sprouts.

165.3에서 peak를 나타내었다. m/z 557.5 물질이 쪼개지는 패턴을 해석한 결과 호박씨의 고미성분은 cucurbitacin E(Cu E)로 확인되었다.

본 연구진이 보고한 호박씨의 고미성분(16)은 cucurbitacin glycoside라고 보고한 결과를 Fig. 5에 나타낸 바와 같은 Cu E의 구조를 가진 물질로 정정하여 보고하고자 한다.

Terrence와 Mark(7)는 Cu E는 고미 Zucchini 호박에서도 높은 온도와 수분과 영양분이 부족할 때 600 mg/kg 수준으로 축적되며 1 mg/kg 농도에서 감지할 수 있다고 보고한 바 있는데 본 실험에서는 발아 호박씨 머리 부분에 220 mg/kg 농도로 존재하였다.

호박 씨 발아 조건에 따른 cucurbitacin E의 생성

수분 살포의 영향: 침지된 호박씨에 48시간, 96시간 간격으로 물을 살포하면서 20°C, 암소에서 머리 부분에 함유되어 있는 고미성분 Cu E를 HPLC로 분석한 결과는 Table 2와

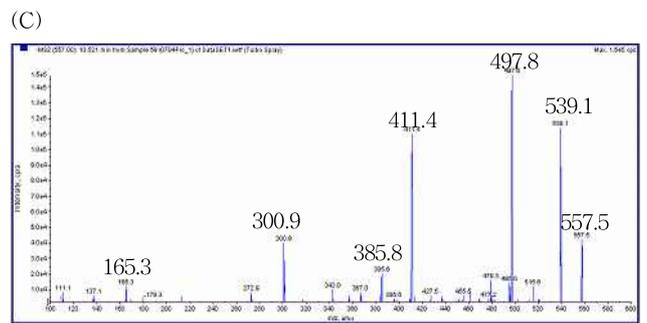
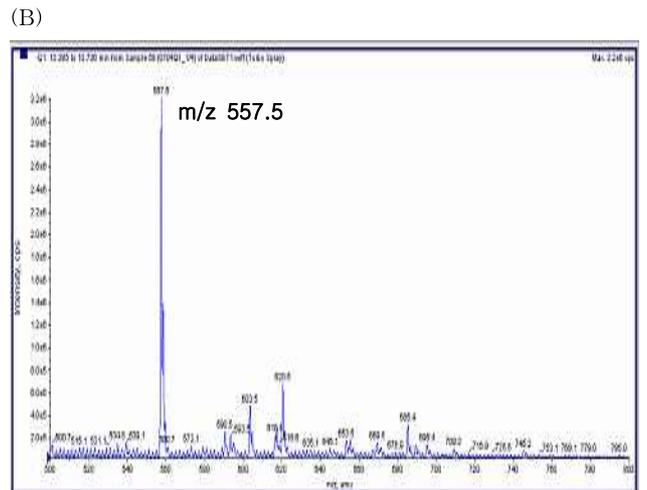
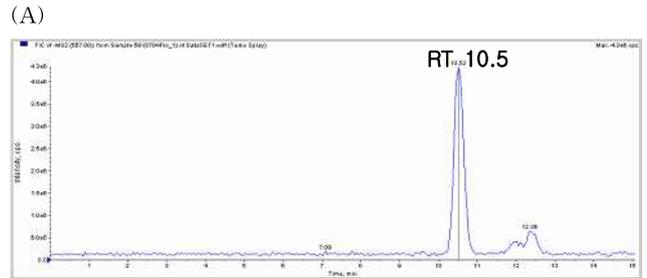
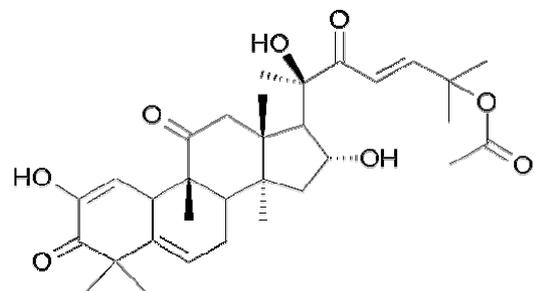


Fig. 4. Tandem mass spectrum of bitter component isolated from pumpkin seed sprouts.

A: HPLC chromatogram of bitter component isolated from pumpkin seed sprouts, B: LC-MS spectrum of bitter component isolated from pumpkin seed sprouts, C: LC-MS/MS spectrum of bitter component isolated from pumpkin seed sprouts.



Cucurbitacin E

Fig. 5. Identified chemical structure of bitter component of pumpkin seed sprouts.

Table 2. Changes of cucurbitacin E contents in the head of pumpkin seed sprouts according to water supply during germination at 20°C (mg/kg)

Water supply	Sprouting period (day)					
	0	2	4	6	8	10
N-0 h	0	13.7	166.7	132.0	112.8	102.4
N-48 h	0	12.6	224.7	175.8	180.8	184.9
N-96 h	0	11.6	75.8	184.0	203.4	188.9

N-0 h: No water supply, N-48 h: Water supply for 48 hrs interval, N-96 h: Water supply for 96 hrs interval.

같다. 호박씨에는 고미성분이 검출되지 않았고 발아 2일째부터 고미성분이 검출되기 시작하여 48시간 간격으로는 살포한 구에서는 4일째에 고미성분의 함량이 224.7 mg/kg으로 최고값을 나타내었으며 96시간 간격으로 처리구는 8일째에 최고값을 나타내었고 발아 기간 동안 물을 살포하지 않을 경우 고미성분의 함량이 적었는데 물이 없는 조건에서는 호박씨의 발아율이 떨어져 고미성분의 함량이 적어지는 것으로 판단된다.

광선의 영향: 호박씨에 48시간 간격으로 수분을 공급하면서 20°C에서 암소와 1000 Lux의 광을 12일간 조사시켜 머리 부분에 함유되어 있는 고미성분 Cu E의 함량은 Table 3과 같다. 암소에서는 발아 2일째부터 Cu E가 검출되기 시작하여 6일째에 218.9 mg/kg으로 고미성분의 함량이 최대가 되어 점차 줄어들었으며 1000 Lux 조사구에서는 발아 10일째에 고미성분의 함량이 최대가 되었다. 호박씨는 암소에서 발아시키는 것이 광이 있을 때보다 고미성분이 많이 축적됨을 알 수 있다.

발아 온도의 영향: 침지한 호박씨를 48시간 간격으로 수분을 공급하면서 암소에서 발아시키면서 머리 부분에 함유된 고미성분 Cu E의 생성에 미치는 발아 온도의 영향을 검토한 결과는 Table 4와 같다. 20°C, 30°C 발아구는 4일째에 고미성분의 함량이 최대가 되어 점차 줄어드는 반면 15°C는 발아 12일째까지 증가함을 알 수 있었으며 고미성분의 함량은 20°C에서 발아시켰을 때 224.7 mg/kg으로 최고값을 나타

Table 3. Changes of cucurbitacin E contents in the head of pumpkin seed sprouts according to light illumination during germination at 20°C (mg/kg)

Light	Sprouting period (day)					
	0	2	4	6	8	10
Dark	0	13.2	46.1	218.9	205.3	177.1
Light (1000 Lux)	0	0.3	7.8	50.8	131.5	146.7

Table 4. Changes of cucurbitacin E contents in the head of pumpkin seed sprouts during germination at various temperatures (mg/kg)

Temperature	Sprouting period (day)						
	0	2	4	6	8	10	12
15°C	0	0.0	11.1	98.3	148.7	198.2	203.4
20°C	0	12.6	224.7	175.8	180.8	184.9	181.5
30°C	0	20.3	189.6	95.9	92.9	78.0	72.0

내었다. 15°C에서 발아할 경우 발아 초기의 발아율은 낮았으나 발아일수가 경과함에 따라 상당량의 고미성분이 검출되었으며, 30°C에서 발아할 경우 발아 초기의 발아율은 빠르나 발아 6일째에 고미성분의 함량이 급격히 감소함을 알 수 있었다.

물 살포주기, 광, 온도를 달리하면서 발아시킨 호박씨의 고미성분인 Cu E 함량은 48시간 주기로 물을 살포하면서 20°C, 암소에서 최고값을 나타내었다.

Cucurbitacin E의 항염증 및 항암활성

1L-1β 유도 COX-2 염증 단백질 발현 억제 효과: 발아 호박씨로부터 분리 정제한 Cu E의 1L-1β 유도 COX-2 염증 단백질 발현 억제 효과는 Fig. 6에서 보는 것처럼 A549 세포에 염증성 사이토카인 1L-1β(5 ng/mL)를 6시간 처리 시 세포 내 COX-2 단백질 발현량이 대조군(lane 1)에 비해 크게 증가하였다(lane 3). 흥미롭게도 0.001, 0.01 및 0.1 μM Cu E 전처리 시 1L-1β에 의한 COX-2 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소되었다(lanes 4~6). 이 중 Cu E 0.1 μM 전처리 시 1L-1β 유도 COX-2 단백질 발현이 가장 크게 저해되었다(lane 5). 하지만 0.001, 0.01 및 0.1 μM Cu E 전처리 시 actin 단백질 발현량에는 큰 변화가 없었다. 1 μM Cu E를 단독으로 전처리 시 세포 내 COX-2 단백질 발현이 약간 증가하였으나 actin 단백질 발현은 오히려 크게 감소되었다(lane 2). 1L-1β와 1 μM Cu E를 병용 처리 시 COX-2 단백질 발현이 크게 증가하였으나 actin 단백질 발현은 크게 줄어들었다(lane 7). 이 결과는 0.001~0.01 μM Cu E가 1L-1β에 의해 유도되는 COX-2 염증단백질 발현을 크게 억제할 수 있음을 보여주었다.

이들 결과는 Cu E가 비교적 낮은 농도(0.001~0.01 μM)에서 COX-2 단백질 발현 억제를 통한 항염증 생리활성 효과를 가지고 있음을 암시하고 있다.

PMA 유도 COX-2 염증단백질 발현 억제 효과: 발아시킨 호박씨로부터 분리 정제한 Cu E에 의한 또 다른 COX-2 단백질 발현 유도 물질인 PMA 유도 COX-2 발현 억제 효과를 분석하였다. Fig. 7에서 보는 것처럼 A549 세포에 PMA (60 nM)를 6시간 처리 시 COX-2 단백질 발현량이 대조군(lane 1)에 비해 증가하였다(lane 3). 흥미롭게도 1, 2, 3 및 5 μM Cu E 전처리 군에서 PMA 유도 COX-2 단백질 발현이

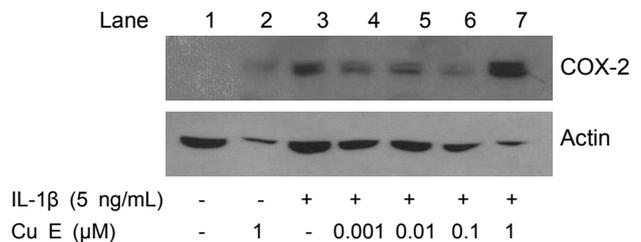


Fig. 6. Effect of cucurbitacin E on IL-1β-induced inflammatory COX-2 protein expression in A549 cells.

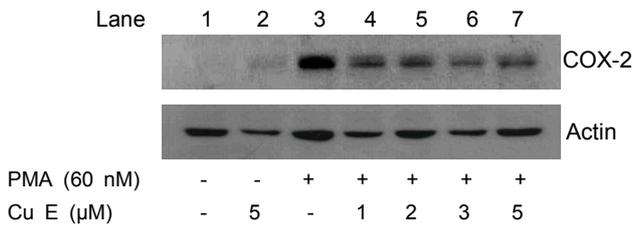


Fig. 7. Effect of cucurbitacin E on PMA-induced inflammatory COX-2 protein expression in A549 cells.

크게 억제되었다(lane 4-7). 한편, 대조군(lane1)에 비해 5 μM Cu E 단독 처리 시(lane 2) 또는 PMA와 Cu E(1, 2, 또는 5 μM) 병용 처리 시 actin 단백질 발현이 약간 감소됨을 알 수 있었다(lane 2). 이 결과는 다소 높은 농도에서 Cu E가 PMA에 의해 유도되는 COX-2 단백질 발현을 효과적으로 저해할 수 있음을 보여주었다. 이들 결과는 Cu E가 비교적 높은 농도(1~5 μM)에서는 PMA 유도 COX-2 단백질 발현 억제를 통한 항염증 생리활성 효과를 가지고 있음을 암시한다.

Jayaprakasam 등(19)은 호박의 일종인 *Cucurbita an-drena* 중의 Cu E는 COX-1 효소보다는 COX-2 효소를 더욱 강하게 저해하는 것으로 나타나 본 실험에서와 유사한 경향이 있었다.

A549 인간 폐암 상피 세포주 성장 억제 효과: A549 세포에 농도를 달리하여 분리 정제한 Cu E를 8, 24 또는 48시간 처리하였다. 각각의 처리 시간 경과 후 A549 세포에 MTS 용액(A) 또는 trypan blue 염색료(B)를 넣고 각각의 세포 증식도 또는 생존세포수를 산정한 결과는 다음과 같다. Fig. 8(A)에서 보는 것처럼 1, 10, 100, 1000 nM Cu E 8시간 처리 시 A549 세포증식에는 큰 영향을 미치지 못했다. 하지만 Cu E 100 또는 1000 nM을 24 및 48시간 처리 시 각각 20~28% 및 56~58%의 A549 세포증식 억제 효과가 나타났다. A549 세포 생존의 경우, Fig. 8(B)에서 보는 것처럼 1 또는 10 nM Cu E 8, 24 및 48시간 처리 시 A549 세포생존에 큰 영향을 미치지 않았으나 100 nM Cu E 24시간 및 48시간 처리 시

각각 60% 및 88%의 A549 세포생존수 감소를 초래하였다. 한편 1000 nM Cu E 8, 24 및 48시간 처리의 경우는 약 68%, 90% 및 97%의 높은 A549 세포생존수 감소를 초래하였다. Tehila 등(17)은 지중해 수박의 일종인 *Citrullin colocynthis* 잎으로부터 추출한 8 μM Cu E농도에서 유방암 세포를 48시간 노출시켰을 때 50% 생육 저해효과를 나타내었다고 하였으며, Kimberly 등(5)은 Cu E를 첨가하여 전립선 암세포에 배양할 때 7~50 nM 농도에서 2~6일간 노출시키면 50% 생육저해효과가 나타난다고 보고한 바 있어 본 실험에서 수행한 Cu E의 폐암상피세포에 대한 증식억제효과보다 전립선암 세포에 억제효과가 크게 나타났다. 또한, Attard 등(20)의 연구에서는 Cu E는 난소암세포에 대하여 성장억제 효과가 있었으나 임파구 암세포에는 억제효과가 인정되지 않았다.

요 약

호박 종실의 이용성을 증대시키기 위하여 호박 종실을 발아시켜 가면서 성장 중 고미성분의 성분분석을 행하고 고미 물질을 순수 분리하여 정제하고 구조분석을 행하였다. 정제된 고미물질의 항염증 활성 및 폐암세포에 대한 암세포 성장 억제 활성을 측정한 결과는 다음과 같다. 호박 종실을 발아시키면 종실에는 존재하지 않던 고미물질이 발아에 의하여 생성되므로 이 물질을 silica gel TLC, HPLC에 의하여 순수 분리한 결과 Rf 0.73, RT 10.3의 것을 모아 LC-MS/MS로 구조 분석을 행하여 분자량 557인 Cucurbitacin E(Cu E)로 확인되었다. 물 살포주기, 광, 온도를 달리하면서 발아시킨 호박씨의 고미성분인 Cu E 함량은 48시간 주기로 물을 살포하면서 20°C, 암소에서 4일간 발아시켰을 때 224.7 mg/kg로서 최고치에 달하였다. 분리 정제한 Cu E는 in vitro에서 Cu E가 비교적 낮은 농도(1~100 nM)에서 1L-1β에 의한 염증성 COX-2 단백질 발현을 크게 감소시켰고, 비교적 높은 농도(1~5 μM)에서는 PMA에 의한 COX-2 단백질 발현 억제를 통한 항염증 활성을 보여주었다. 그리고 Cu E에 의한

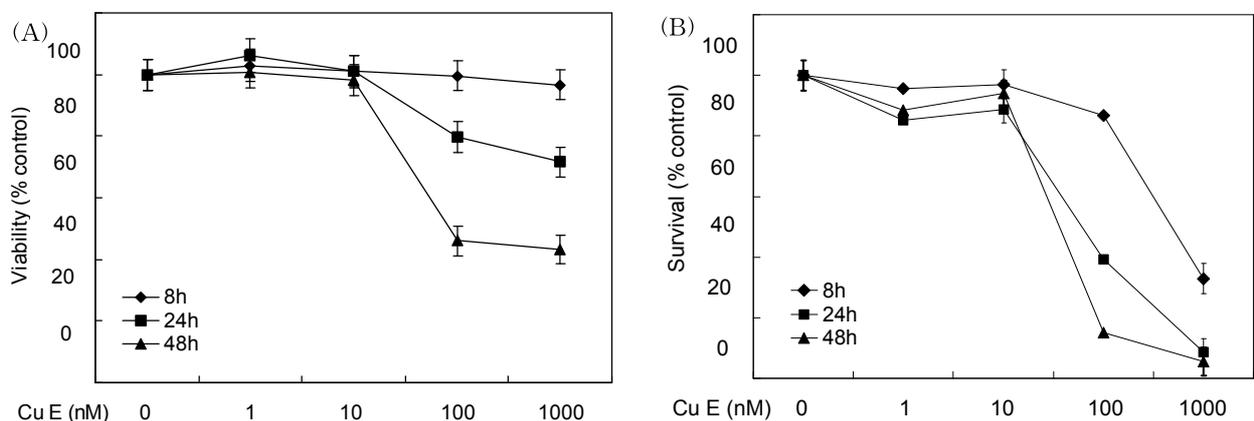


Fig. 8. Inhibitory effects of cucurbitacin E on lung cancer A549 cells.

A549 암세포의 증식 및 생존율에 미치는 영향을 확인한 결과 100 또는 1000 nM Cu E를 24 및 48시간 처리 시 약 20~28% 및 56~58%의 A549 세포증식 억제 효과가 나타났고, 100 nM Cu E를 24시간 및 48시간 처리 시 약 60% 및 88%의 A549 세포생존율이 감소하였다.

문 헌

1. Robinson RW, Munger HM, Whitaker TW, Bohn GW. 1976. Genes of the Cucurbitaceae. *Hort Science* 11: 554-568.
2. Rehm S. 1960. Die bitter stoffe der cucurbitaceen. *Ergeb Biol* 22: 106-136.
3. Enslin PR. 1954. Bitter principles of the cucurbitaceae—Observations on the chemistry of cucurbitacin A. *J Sci Food Agric* 5: 410-416.
4. Lavie D, Szinai S. 1958. The constituents of *Ecballium elaterium* L. *J Am Chem Soc* 80: 707-710.
5. Kimberly LKD, Mark DD, Michael CA, Edward AS. 1996. Cucurbitacin E induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 52: 1553-1560.
6. Duncan MD, Duncan KL. 1997. Cucurbitacin E targets proliferating endothelia. *J Surg Res* 69: 55-60.
7. Terrence FH, Mark EH. 1985. The determination of bitter principles in Zuccjinis. *J Sci Food Agric* 36: 1107-1112.
8. Cardellina JH, Gustafson KR, Beutler JA, He-Kee C, Hallock YF, Fuller RW, Boyd MR. 1990. *Human medicinal agents form plant*. American Chemical Society, Washington DC, 218-227.
9. Miro M. 1995. Cucurbitacin and their pharmacological effect. *Phyto Res* 9: 159-168.
10. Dulcie AM. 1997. Cucurbitacin triterpenoids from the leaves of *Momodica foetida*. *Phytochemistry* 45: 391-395.
11. Fathi TH. 1998. Production of cucurbitacin by cucurbit cell cultures. *Plant Sci* 13: 209-214.
12. Blaskovich MA, Sun J, Cantor A, Turkson J, Jove R, Sebti SM. 2003. A selective janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Res* 63: 1270-1279.
13. Sun J, Blaskovich MA, Jove R, Livingston SK, Coppola D, Sebti SM. 2005. Cucurbitacin Q: a selective START 3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene* 24: 3236-3245.
14. Raloff J. 1999. The bitter end. *Science News* 156: 24-30.
15. Peters RR, Saleh TF, Lora M, Patry C, de Brum-Fernandes AJ, Farias MR, Ribeiro-do-Valle RM. 1999. Anti-inflammatory effects of the products from *Wildbrandia ebracteata* on carragennan-induced pleurisy in mice. *Life Sci* 64: 2429-2435.
16. Lee BJ, Jang HS, Lee GH, Oh MJ. 2003. Changes in chemical compositions of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) seed sprouts. *Korean J Food Preservation* 10: 527-533.
17. Tehila TS, Shlomo G, Sara D, Hugo EG, Margalit B. 2007. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 73: 56-67.
18. Charmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Michell JB. 1987. Evaluation of tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 963-972.
19. Jayaprakasam B, Seeram NP, Nair MG. 2003. Anticancer and anti-inflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andrena*. *Cancer Lett* 189: 11-16.
20. Attard E, Cuschieri A, Brincat MP. 2005. Morphological effects induced by Cucurbitacin E on ovarian cancer cells in vitro. *J Natural Remedies* 5: 70-74.

(2008년 5월 6일 접수; 2008년 6월 23일 채택)