

Antiobesity Effect of the *Cucubita moschata* Duch Extracts in 3T3-L1 Adipocytes

Gun-Pyo Do, Hye-Jin Lee, Jeong-Ryong Do and Hyun-Ku Kim[†]
Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea

지방세포에서 늙은호박(*Cucubita moschata* Duch) 추출물의 항비만 효과

도건표 · 이혜진 · 도정룡 · 김현구[†]
한국식품연구원

Abstract

The anti-obesity activity of the *Cucubita moschata* Duch. extracts was investigated. The inhibitory effect on triglyceride accumulation was shown in 3T3-L1 preadipocyte. The lipid accumulation of the ethanol extract in 5 mg/mL concentration was shown to be 75.4%, where as that of water extract was shown to be 85.2%. The survival rate of the cell in the viability test was shown to be 86.5% in the 0.5-5 mg/mL concentration. Total polyphenol content was highest in the water extract(46.54 ± 0.02 mg). These results suggest that *Cucubita moschata* Duch. extracts have a potential as anti-obesity material by reducing the lipid accumulation.

Key words : 3T3-L1, polyphenol, adipocyte, cell viability, *Cucubita moschata* Duch

서 론

늙은 호박(*Cucurbita* spp)은 박과에 속하는 일년생 덩굴성 초본으로 국내에서 재배종으로 가장 많이 이용되고 있는 호박은 동양계 호박(*C. moschata* Duch), 서양계 호박(*C. maxima* Duch), 페포계 호박(*C. pepo* L.)이다. 동양계 호박은 청등호박이라 하여 청과와 완숙과를 모두 식용으로 사용한다.

최근 연구를 통하여 늙은 호박에 carotene과 무기물, 식이 섬유, 전분, 자당, 포도당 등이 호박에 다량 함유되어 있음이 밝혀졌고 성숙함에 따라 당질과 vitamin A, carotene, lycopene 및 lutein 등의 함량이 증가하기 때문에 식품산업에서 건강식품원료로써 가치가 재조명 되고 있다. 또한 늙은 호박이 함유한 β-carotene은 vitamin A의 전구물질이며, 항암효과(1,2)와 면역기능(3), 항산화활성(4) 등의 생리활성기능에 대한 연구가 활발히 진행중이다. 이와 같이 늙은 호박은 생체조절 기능성이 우수하여 전통적으로 한방에서

위장이 약한 사람, 회복기의 환자, 산후 부종제거 등에 효과적이라고 알려져 건강식으로 애용되어 왔다(5).

또한 최근 늙은 호박은 다이어트 효과가 있다고 알려져면서 호박가루, 호박진액 등 체중조절용 가공식품으로 많이 시판되고 있다. 하지만 대부분 소비자의 경험에 의한 판단 일 뿐 호박의 성분이 체지방에 직접적으로 미치는 영향에 대한 연구는 아직 미비하다.

늙은 호박이 체지방에 미치는 영향은 지방세포의 분화 억제제를 통하여 알 수 있는데 지방세포는 약 30 여년 전 Green 박사가 소개한 3T3-L1 세포(6)이며 단순한 에너지의 저장기관이 아니라 여러 가지 호르몬을 분비하는 내분비기관이기도 하며, 인체 대사에서 능동적으로 작용 한다. 섭취한 영양소는 중성지방의 형태로 지방 조직에 축적되며, 비만은 지방세포의 비대(hypertrophy)와 과형성(hyperplasia)으로 초래된다(7). 본 연구에서는 3T3-L1 지방전구세포에 늙은 호박의 물 및 70% 에탄올 추출물을 처리하여 세포의 분화 및 지방생성 억제에 미치는 영향을 관찰하여 저해 활성을 확인 하였기에 보고하고자 한다.

[†]Corresponding author. E-mail : hyunku@kfri.re.kr
Phone : 82-31-780-9134, Fax : 82-31-709-9876

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 시료로 사용된 늙은 호박은 가락동 농수산물 시장에서 구입한 것을 분쇄기(M20, IKA®, Staufen, Germany)로 분쇄하였고, 0.2 mm PE film에 밀봉 포장하여 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

추출방법

유용성분의 추출을 위해 2,450 MHz 주파수에 환류냉각관이 장치된 상압형 마이크로파 추출장치(MAP, Soxwave-100, Prolabo, France)를 사용하였다. 시료의 마이크로웨이브 추출조건은 추출 용매로 water, 70% ethanol을 사용하였고, 마이크로 파워는 90 W, 추출시간은 5분으로 하였다. 이렇게 하여 얻어진 추출물을 Whatman filter paper No. 2에 거른 후 회전 감압증발기(Ratavapor R-123, Buchi, Flawil, Switzerland)로 감압 농축하였고 50 mL 증류수로 정용하여 시료 추출물을 얻었다.

일반성분 및 무기질 측정

각 시료는 일반성분, 무기질 성분, 추출 수율을 측정하였다. 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 micro Kjeldahl 법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조회분은 건식회화법에 따라 각각 정량하였다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법(8)에 따라 시행하였으며 각 추출물 20 μ L에 Folin reagent 20 μ L 및 2% Na₂CO₃ 250 μ L을 가하고 혼합한 후 암실에서 실온으로 30분 반응한 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 tannic acid (Sigma Co, St Louis, MO, USA)를 사용하였으며 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 검량선에 따라 계산하였다.

세포 생존율 측정 (MTT assay)

시료에 대한 세포 생존율은 MTT {3-(4,5-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} colorimetric assay(9) 방법으로 실험하였다. 세포는 1.25×10^5 cell/200 μ L의 농도로 96-well plate에 분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거하였다. 여기에 새로운 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Co, Gaithersburg, MD, USA) 200 μ L에 농도별로 희석한 시료를 각각 첨가하여 24시간 배양한 다음 5 mg/mL로 제조한 MTT (Sigma Co, St. Louis, MO, USA)용액 20 μ L를 각 well에 첨가하고 4시간동안 배양하였다. 배양종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader (Molecular devices Co, Santa

Clara, California, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 - (A - B)/A \times 100$$

A : 대조군의 흡광도

B : 시료처리군의 흡광도

3T3-L1 세포배양과 분화

3T3-L1 지방전구세포의 배양은 1% penicillin-streptomycin (P/S Gibco Co, Gaithersburg, MD, USA) 과 10% bovine calf serum (BCS) 이 첨가된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양은 3일 간격으로 하고, 세포는 100 \emptyset plate 바닥에 70% 정도에서 phosphate buffered saline (PBS) 로 세척한 후, 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣어 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3분간 정지 후 세포를 탈착시켜 계대배양하여 유지하였다. 3T3-L1 지방전구세포를 분화 유도하기 위하여 세포를 10% fetal bovine serum (FBS) 와 1% P/S가 첨가된 DMEM을 이용하여 6-well plate의 각 well 에 1.25×10^5 cells/well로 분주 하고 2일후 배지를 교환하여 3-4일째에 세포가 완전히 융합상태가 되게 하였다. 융합상태에서 10% FBS와 MDI solution (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μ M dexamethsone, 5 μ g/mL insulin) 를 처리하여 분화를 유도 하였다. 이때, 시료가 지방세포분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 시료를 농도별로 함께 처리하였다. 분화 유도 2일 후, 배지를 시료, 10% FBS, 1% P/S, 5 μ g/mL insulin이 포함된 DMEM으로 교환 하였고 분화 유도 4일째부터는 2일에 한번씩 10% FBS와 1% P/S가 포함된 DMEM으로 교환하여 세포를 분화시켰다.

Oil Red O 염색

Oil Red O staining은 분화 유도 7-9일째 된 세포를 사용하여 실시하였다. 10% FBS DMEM을 제거한 뒤, 세포를 PBS 로 2번 세척하고, 10% formalin으로 4°C에서 1시간 동안 고정한 다음 증류수로 3번 세척하였다. 세척된 세포는 세포내 생성된 지방구와 특이적으로 반응하는 Oil Red O (Sigma Co, St Louis, MO, USA)로 1시간 동안 염색하였다. 염색 후, 염색액을 제거하고 증류수를 이용해 3번 세척한 다음 증류수를 well에 채우고 현미경으로 관찰하였다. 중성지방의 정량은 증류수를 제거하고 완전히 마른 well에 100% iso-propyl alcohol을 2 mL 첨가하여 Oil-Red O를 다시 용출시킨 후 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Lipid accumulation (\%)} = 100 - (A - B)/A \times 100$$

A : 대조군의 흡광도

B : 시료처리군의 흡광도

통계처리

본 실험은 3반복 측정하여 얻어진 결과에 대해 Statistical Analysis System (SAS version 8.0, 2004)을 이용하여 평균, 표준편차의 값을 산출하였고 Duncan's multiple range test를 통해 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

일반성분 및 무기질 측정

늪은 호박 분말과 물 및 70% 에탄올 추출물의 일반성분 함량을 측정된 결과 Table 1과 같다. 단백질의 함량은 분말이 10.80%로 높았고 회분은 물 추출물이 13.29%로 높았다. 수분과 탄수화물의 함량은 시료들 간에 거의 차이를 보이지 않았으나 지방의 함량은 에탄올 추출물에서 0.46%로 다른 두 시료에 비해 유의적으로 낮았다. 추출물의 미네랄 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. Na함량은 에탄올 추출물에서 가장 높았고 K의 함량은 시료들 간에 거의 비슷한 수준이었으나 Ca, Fe, Mg, P의 함량은 에탄올 추출물이 다른 두 시료에 비해 유의적으로 낮게 나타났다.

Table 1. Proximate composition of *Cucurbita moschata* Duch with extraction condition

	Proximate composition				
	Moisture	Protein	Lipid	Ash	Carbohydrate
Raw powder	12.80±0.23 ^a	10.80±0.08 ^a	1.30±0.12 ^a	8.4±0.04 ^b	66.7±0.11 ^b
Water extracts	13.50±0.36 ^a	8.99±0.24 ^b	1.46±0.05 ^a	13.29±0.02 ^a	63.84±0.12 ^c
70% ethanol extracts	13.50±0.36 ^a	8.91±0.04 ^b	0.46±0.01 ^b	8.06±0.32 ^b	67.99±0.08 ^a

* All values are expressed as mean ± SD of triplicate determinations. Means with the same lettered superscripts in a column are not significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test.

Table 2. Mineral composition of *Cucurbita moschata* Duch with extraction condition

	Mineral composition					
	Ca	Fe	Na	Mg	P	K
Raw powder	336.02±8.52 ^b	4.50±0.13 ^b	11.06±0.47 ^c	191.12±4.55 ^a	516.42±5.12 ^b	3220.88±79.68 ^b
Water extracts	421.94±16.33 ^a	6.06±0.16 ^d	21.67±1.23 ^b	201.12±1.56 ^a	614.62±9.34 ^a	3789.07±93.52 ^a
70% ethanol extracts	16.37±0.07 ^c	1.92±0.31 ^c	56.67±2.47 ^a	76.33±4.27 ^b	291.25±17.61 ^c	3219.71±217.22 ^b

Expressions are the same as in Table 1.

총 폴리페놀 함량

늪은 호박 분말과 물 및 70% 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 물 추출물에서 총 폴리페놀의 함량은 46.54±0.02 mg으로 에탄올 추출물과 분말 보다 유의적으로 높았다. 폴리페놀은 식물에 널리 존재하는 2차 대사산물의 하나로서 phenolic hydroxyl기를 포

함하고 있어 단백질 및 거대분자들과 쉽게 결합하여 항산화 작용, 항혈전 작용, 고지혈증 및 지방간 억제 작용 등을 나타낸다(10). Oh 등(11)은 늪은 호박이 보이는 높은 항산화력은 페놀성 화합물의 효과라고 하였고 Kim 등(12)은 늪은 호박의 부위별 추출물 연구에서 과육보다 과피에서 높은 폴리페놀 함량이 나타났다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 과육과 과피를 모두 사용하여 과피 추출물보다 폴리페놀 함량이 다소 떨어지나 Kang 등(13)의 땅콩나물 메탄올 추출물로부터 폴리페놀 함량 보고와 것과 비교하면 늪은 호박의 폴리페놀 함량이 비교적 높은 것으로 나타났다.

Table 3. Total polyphenol content of *Cucurbita moschata* Duch with extraction condition

Sample	(mg%)		
	Raw powder	Water extracts	70% ethanol extracts
	42.02±0.16 ^c	46.54±0.02 ^a	42.43±0.03 ^b

Expressions are the same as in Table 1.

세포 생존율 평가

늪은 호박의 물 및 70% 에탄올 추출물의 세포독성 범위를 분화된 3T3-L1 지방세포를 이용하여 MTT assay에 의해 측정하였다. Fig. 1은 0-5 mg/mL 농도범위에서 세포 생존율을 측정된 결과 늪은 호박의 물 및 70% 에탄올 추출물 각각의 평균 cell viability는 83.3%, 89.6%로 세포의 성장에

영향을 미치지 못하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 양을 측정하는 표준 비색분석법(standard colorimetric assay)이라고 할 수 있으며, 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소작용(dehydrogenases)에 의하여 노란색의수용성 기질인 MTT 를 자주색을 띄는 비수용성의 MTT-formazan 결정으로 환원

시키는 미토콘드리아의 능력을 이용한 측정방법으로, 결과에서 물 추출물보다 에탄올 추출물에서 cell viability가 높게 나타난 것으로 보아 에탄올 추출물의 안전성이 높은 것으로 나타났다. 또 이것은 Chin의 결과(14)와 같이 배합된 한약재 추출물이 최대 1 mg/mL 농도로 실험을 진행한 것에 비해 농도대비 높은 생존율을 보였다고 판단되며, 수세미 오이와 영지, 연구 결과(15,16)와 비교하여볼 때 유효범위가 대체로 넓게 나타나고 있어 비교적 세포독성이 낮은 것으로 판단된다.

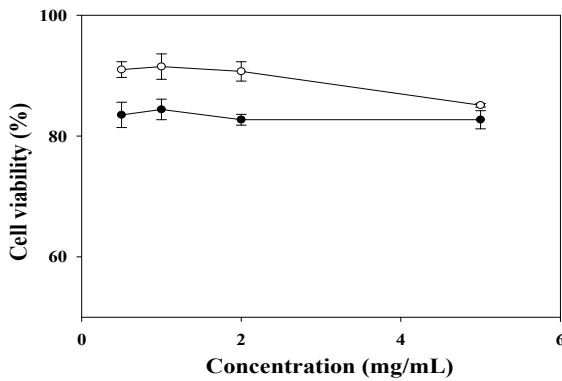


Fig. 1. Cytotoxic effect of *Cucurbita moschata* Duch extracts on the 3T3-L1 cells.

○: *Cucurbita moschata* Duch 70% ethanol extract, ●: *Cucurbita moschata* Duch water extract.

지방 축적 억제 능력

늪은 호박의 물 및 70% 에탄올 추출물의 지방세포 분화 저해 효과를 검증하기 위하여 분화된 3T3-L1 세포에 호박 물 및 70% 에탄올 추출물을 1 mg/mL의 농도로 처리한 후 지방축적을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같이 나타났다. 늪은 호박의 물 및 70% 에탄올 추출물의 지방축적은 각각 101.67%, 64.97%로 측정되어 에탄올 추출물이 물 추출물보다 지방축적에 대한 억제력이 높았으며 물 추출물은 지방 축적억제력을 보이지 않았다. 이러한 결과는 Hwang 등(15)

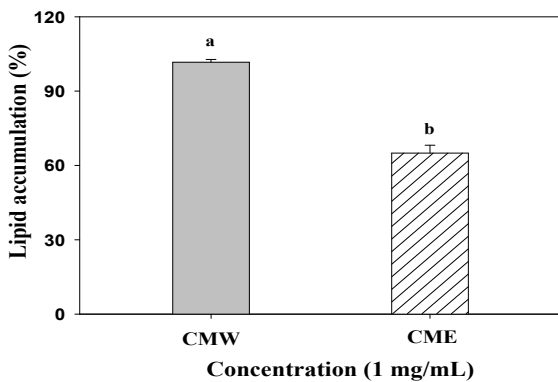


Fig. 2. Inhibitory effect of *Cucurbita moschata* Duch extracts on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

CMW: *Cucurbita moschata* Duch water extract, CME: *Cucurbita moschata* Duch 70% ethanol extract.

*All values are expressed as mean±SD. Means with the same lettered superscripts on bars are not significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test.

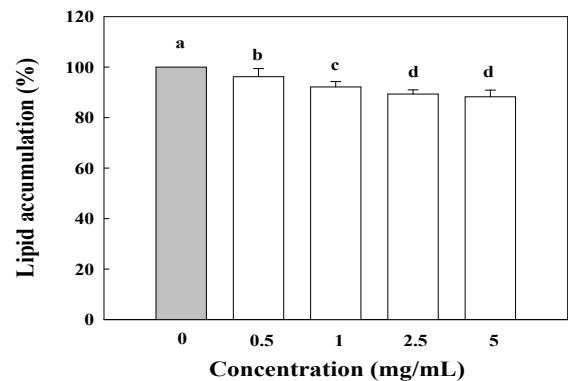


Fig. 4. Inhibitory effect of *Cucurbita moschata* Duch water extracts on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

Expressions are the same as in Fig. 2.

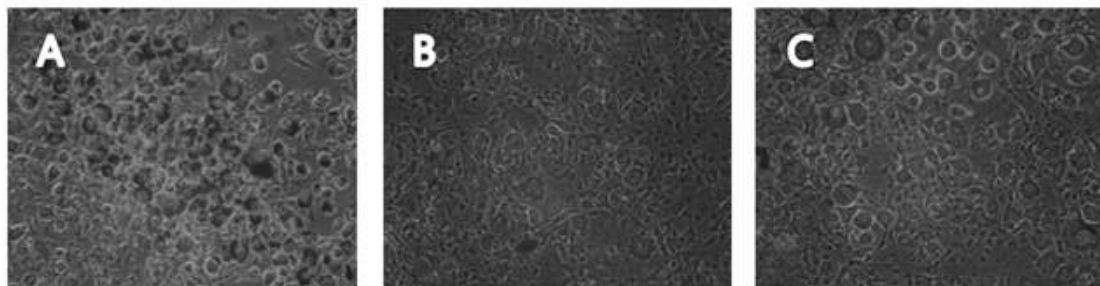


Fig. 3. The intracellular lipid accumulation was quantified by Oil red O staining and also optically observed by an inverted microscope.

A: Control, B: *Cucurbita moschata* Duch 70% ethanol extract, C: *Cucurbita moschata* Duch water extract.

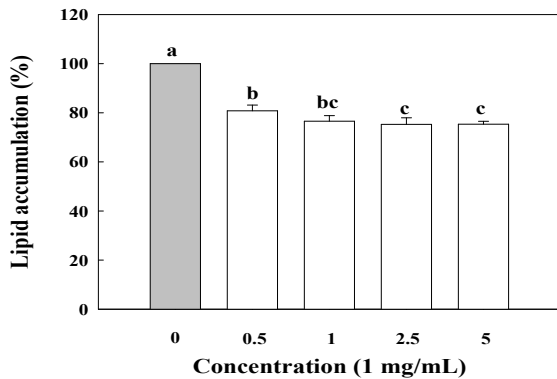


Fig. 5. Inhibitory effect of *Cucurbita moschata* Duch 70% ethanol extracts on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

Expressions are the same as in Fig 2.

의 연구결과에서 물 추출물의 생리활성이 에탄올 추출물보다 낮게 나타나 항비만 연구 소재로 에탄올 추출물을 선발한 것과 비슷한 결과라고 사료된다. 본 연구에 사용한 3T3-L1세포는 MDI를 첨가하면 지방세포로 분화하는 성질을 갖는 세포로 지방세포의 분화를 억제하고 지방생성을 저해하는 소재의 효능 및 기전을 연구하는데 유용하며(17), 지금까지 밝혀진 지방세포분화에 관여하는 전사인자는 PPAR γ 와 C/EBP α , ADD1, SREBP1c 등이 있다(18,19). 물 추출물과 에탄올 추출물의 지방축적이 유의적 차이를 보임에 따라 각각 0.5-5 mg/mL 농도 범위에서 지방축적을 관찰하였다. 물 추출물의 농도별 지방축적 측정 결과 Fig. 4와 같이 지방축적이 농도 의존적으로 감소하여 5 mg/mL의 농도에서 85.22%로 나타났으며, 에탄올 추출물의 결과도 Fig. 5에서와 같이 농도 의존적으로 감소하였으며 5 mg/mL에서 75.35%로 물 추출물에 비해 유의적인 감소를 보였다. 고농도에서 나타난 세포 내 지방축적의 억제는 Oil-red O 염색에 대한 현미경적 관찰에서도 동일한 결과로 확인되었다. 이는 Cho 등(20)의 포도씨탈지박 추출물에 비하여 다소 높은 농도에서 지방축적 억제 효과를 나타냈으나 본 실험에 사용한 늙은 호박에는 탈지 등 전처리과정이 없었던 것을 고려하면 농도차이는 줄어들 것으로 사료된다.

요 약

늙은 호박의 물 및 70% 에탄올 추출물에 대한 세포의 독성 및 지방생성에 미치는 영향을 조사하였다. 세포 생존율 측정에서 늙은 호박 추출물이 0.5-5 mg/mL의 농도일 때 물 및 에탄올 추출물 모두 세포의 생장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 세포에 대한 독성이 없다고 판단되었다. 3T3-L1 지방세포의 지방축적에 미치는 영향을 1 mg/mL 농도로 조사하였을 때 에탄올 추출물은 지방축적을 저해하였으나 물 추출물은 저해력이 없는 것으로 나타났다. 따

라서 0.5-5 mg/mL로 농도를 달리하여 조사한 결과 두 추출물 모두 농도 의존적으로 지방축적을 저해하는 것으로 나타났다. 물 추출물과 에탄올 추출물 농도가 5 mg/mL 일 때 각각 85.22% 75.35%의 지방축적을 보였다. 따라서 본 실험에서는 늙은 호박의 물 및 70% 에탄올 추출물이 3T3-L1 지방세포의 분화를 억제하였으나 다른 많은 천연물에 비해 다소 높은 농도에서 효과가 나타났다. 또한 총 폴리페놀 함량조사 결과, 물 추출물에서 최대 46.54±0.02 mg을 함유한 것으로 나타나 늙은 호박은 제약 원료로는 제한점이 있으나 식품으로 꾸준히 섭취 할 경우 항비만 소재로서의 가능성이 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Choi CB, Park YK, Kang YH, Park MW (1998) Effects of pumpkin powder on chemically induced stomach and mammary cancers in sprague-dawley rats. J Korean Soc Food Sci Nutr, 27, 973-979
2. Krinsky NL, Deneke SM (1982) Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. J Natl Cancer Inst, 69, 205-210
3. Mathews MM (1985) Carotenoids and cancer prevention - Experimental and epidemiological studies. Pure Appl Chem, 57, 717-722
4. Nishihito H (1998) Cancer prevention by carotenoid. Mutat Res, 402, 159-165
5. Jeong MK, Yong HR, Yang JY (2004) Quality properties of cream soup added with chungdong pumpkin and sweet pumpkin. J Korean Soc Food Sci Nutr, 33, 1023-1033
6. Green H, Kehinde O (1974) Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. Cell, 1, 113-116
7. Otto TC, Lane MD (2005) Adipose development from stem cell to adipocyte. Crit Rev Biochem Mol Biol, 40, 229-242
8. AOAC (1980) Official methods of analysis. 13th ed. Association of official Analysis Chemists, Washington, DC, USA, Method 914-915
9. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, 65, 55-63
10. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. (2005) Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. J Med Food, 8, 281-290
11. Oh CK, Kim MC, Oh MC, Yang TS, Hyun JS, Kim SH (2010) Antioxidant activities in enzymatic hydrolysates of pumpkin powder (*Cucurbita* spp.). J

- Korean Soc Food Sci Nutr, 39, 172-178
12. Kim MJ, Hong CO, Nam MH, Lee KW (2011) Antioxidant effects and physiological activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) extract from different aerial parts. Korean J Food Sci Technol, 43, 195-199
 13. Kang HI, Kim JY, Kwon SJ, Park KW, Kang JS, Seo KI. (2010) Antioxidative effects of peanut sprout extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr, 39, 941-946
 14. Chin HS, Park KJ, Park SH, Kim JK (2009) The effects of herbal extract mixture on anti-obesity. J Korean Soc Food Sci Nutr, 38, 32-38
 15. Hwang EY, Hong JH, Choi JH, Lee EJ, Lee IS (2009) Study on anti-obesity and hypoglycemic effects of Lycium chinense mill extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr, 38, 1528-1534
 16. Lee CW, Yoon HM, Kang KH (2008) The effects of ganoderma lucidum herba pharmacopuncture on 3T3-L1 preadipocyte differentiation. J Pharmacopuncture, 11, 47-53
 17. Green H, Meuth M (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. Cell 3, 127-133
 18. Miki H, Yamauchi T, Suzuki P, Komeda K, Tsuchida A, Kubota N, Terauchi Y, Kaburagi Y, Matsui J, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kadowaki T (2001) Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. Mol Cell Biol, 21, 2521-2532
 19. Yamamoto H, Kurebayashi S, Hirose T, Kouhara H, Kasayama S (2002) Reduced IRS-2 and GLUT4 expression in PPAR gamma 2-induced adipocytes derived from C/EBP beta and C/EBP delta deficient mouse embryonic fibroblasts. J Cell Sci, 115, 3601-3607
 20. Cho Y, Lee SM, Kim Y, Jeon G, Sung J, Jeong HS, Lee J (2010) Defatted grape seed extracts suppress adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. J Korean Soc Food Sci Nutr, 39, 927-931

(접수 2011년 9월 2일 수정 2011년 12월 13일 채택 2012년 1월 6일)