

참외(*Cucumis melo* L. var *makuwa* Makino) 종자 추출물의 항암 활성

김정현, 서전규, 강영화*
경북대학교 농업생명과학대학 원예과학과

Anticancer Effects of the Extracts of Oriental Melon (*Cucumis melo* L. var *makuwa* Makino) Seeds

Jung-Hyun Kim, Jun-Kyu Suh and Young-Hwa Kang*

Department of Horticultural Science, College of Agriculture and Life Sciences,
Kyungpook National University, Deagu 702-701, Korea

Abstract - The objective of this study was to investigate the anticancer effects of the extracts of oriental melon seeds. Various solvent extracts of oriental melon seeds were prepared and their anticancer effects were examined using in vitro MTT and CV assays. The anticancer effects of various extracts of oriental melon seeds were also examined in five human cancer cell lines including A549, AGS, HT-29, MCF-7 and HepG2. The ethanol extract of heated oriental melon seeds showed the potent cytotoxic effects especially against mouse hepatoma cell line(Hepa1c1c7), human hepatoma cell line(HepG2) and human breast cancer cell line(MCF-7). These data suggest that oriental melon seeds can be a promising anticancer agent against human liver and breast cancer.

Key words - Oriental melon, Seeds, Cytotoxicity, Anticancer

서 언

삶의 질 향상으로 건강에 대한 관심이 높아졌으나, 지나치게 서구화된 식문화 및 식습관으로 인하여 비만 인구의 증가 및 심혈관계 질환 등 만성질환이 증가하고 있는 추세이다. 특히 암은 현대의학의 발전에도 불구하고 그 원인이 뚜렷하게 밝혀지지 않은 채 발생률과 사망률이 계속 증가하고 있는 실정이다. 지금까지 알려진 암 발생의 원인으로 유전적 요인과 면역학적 요인, 호르몬적 요인, 개인적 스트레스, 담배, 직업성 발암물질, 환경오염 등 다양한 요인들이 관련되어 있다고 알려져 있다(Kim, 1998; McIntire and Cioppa, 1984). 최근에는 이러한 암 발생을 예방할 수 있는 물질을 식품 중에서 찾는 노력이 많이 이루어지고 있다(Jin and Song, 2012; Murakami and Ohigashi, 2007). 많은 연구자들은 부작용을 최소화하면서 암을 치료할 수

있는 새로운 천연물 유래 의약품이나 기능성 식품을 개발하기 위해 천연물에 관심을 갖고 항암활성 소재를 개발하려는 노력을 하고 있다(Chang and Yoo, 2006). 식용 및 약용식물에 함유되어 있는 페놀성 성분들이 항산화, 항염, 항암 등 다양한 생리활성을 갖는 것으로 보고되고 있다(Kuhnau, 1976; Lee and Lee, 2006; Rhim and Choi, 2011; Yoon *et al.*, 2009). 또한 최근 들어 종자의 중요성이 증대하면서 종자의 영양학적 가치뿐만 아니라 질병의 예방 및 치료에 이용할 수 있는 기능성 자원으로 인식되어, 종자의 항산화, 항암 등 생리활성에 관한 연구가 최근 보고되고 있는 실정이다(Kang and Sohn, 2010).

참외(*Cucumis melo* L. var *makuwa* Makino)는 중앙아시아를 중심으로 하여 중국, 한국 및 일본 등에서 재배되어 왔다. 우리나라에서는 신라시대 이전부터 참외가 재배된 것으로 추정되며, 각 지방에서 여러 가지 다양한 품종의 재래종 참외가 재배되었다. 여름철 대표적인 과일로 생산되는 참외는 다른 과채류에 비해 열량과 비타민이 많아서

*교신저자(E-mail) : youngh@knu.ac.kr

식품학적 가치가 높은 편이다. 약리작용으로는 진해·거담 작용, 완하 작용, 이뇨작용 및 변비에 효능이 있는 것으로 민간에 알려져 있다. 참외 과실의 경우 항암 활성(Kim *et al.*, 2009a), 항균활성(Shin *et al.*, 2008), 항산화 활성(Kim *et al.*, 2009b)에 관한 보고가 있고, 비식용 부위의 항산화 활성(Kim and Kang, 2010)에 관한 논문이 보고되어 있으나 아직까지 생리활성에 대한 연구가 미비한 실정이다. 본 연구는 참외 종자의 기능성을 규명하는 연구의 일환으로 추출용매에 따른 항암활성을 조사하였고, 인체 유래 5종(MCF-7, A549, AGS, HT-29, HepG2) 암 세포주를 이용하여 항암 활성의 조직 특이성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 추출물 제조

본 실험에 사용된 참외 종자는 성주군에서 폐기되고 있는 비상품과 및 발효과에서 얻은 것으로 성주군에서 재배되고 있는 대표 품종인 오복 꿀 참외 종자와 칠성 꿀 참외 종자 등의 혼합 종자이다. 참외 종자는 자연건조 시킨 후 볶음 기계를 이용하여 250°C에서 120분간 볶음처리를 한 후 분쇄하여 실험재료로 사용하였다. 분쇄한 참외 종자를 둥근 플라스크에 각 10 g씩 넣고, 환류 냉각장치가 된 수직 추출기에서 헥산 유기용매로 3시간 2회 탈지하였다. 탈지한 후 에탄올 유기용매로 3시간씩 3회 연속 추출하여 에탄올 추출물을 얻었다. 물 추출물은 증류수를 이용하여 참외 종자를 3시간 3회 추출하여 얻었다. 추출액은 Whatman No. 2 여과지로 여과하고 여과액은 회전식 감압 농축기를 이용하여 45°C에서 감압 농축하였다. 참외종자 추출물의 항암활성을 규명하기 위한 추가연구로 용매분획법을 실시하여 에탄올 추출물로부터 EtOAc분획물과 n-butanol 분획물을 순차적으로 제조하여 그 활성을 측정하였다.

암세포 배양

인체 유래 5종 암세포주(human breast cancer cell line(MCF-7), human stomach cancer cell line(AGS), human colon cancer cell line(HT-29), human lung cancer cell line(A549), human liver cancer cell line(HepG2))는 한국 세포주 은행(KCLB)에서 구입하였다. 참외 종자의 항암활성을 조사하기 위한 예비 실험으로 생쥐 간암 세포주인 Hepa1c7이 사용되었다. 모든 암세포는

10% FBS(fetal bovine serum), 1% antibiotic(100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin)를 첨가한 RPMI 1640 또는 DMEM 배지를 이용하여, 5% CO₂ 및 37°C의 배양기에서 배양하였다.

총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량을 측정하기 위해 Folin-Denis법을 변형하여 사용하였다(Isabelle *et al.*, 2008). 시료와 Folin-Ciocalteu's phenol 시약을 넣어 교반기를 이용하여 100 rpm에서 3분 동안 반응시켰다. Sodium carbonate 포화 용액을 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 이용하여 검량선을 작성하여 총 페놀함량을 계산하였다.

Crystal Violet Assay

참외 종자의 암세포 활성을 측정하기 위해 Drysdale *et al.*(1986)의 방법에 따라 crystal violet(CV) assay를 실시하였다. Hepa1c7 세포를 96 well plate에 1×10^4 농도로 각 well에 분주하고 24시간 후 참외 추출물의 각 시료를 일정농도로 가하고 다시 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 0.2% crystal violet/2% EtOH용액을 첨가하고 10분간 염색 후 증류수로 세척하였다. 각 well에 0.5% SDS/50% EtOH을 가한 후 610 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MTT assay

5종 인체유래 암세포주에 대한 참외 종자 추출물의 항암 활성을 측정하기 위해 Martin *et al.*(1993)의 방법에 따라 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 실시하였다. 배양된 암세포를 96 well plate에 2×10^4 cell/ml 농도로 분주하여 24시간 배양한 후 시료를 각 well에 seeding하고 24시간 배양하였다. 배양 후 시료를 농도별로 첨가하고 5% CO₂ 및 37°C 조건의 배양기에서 48시간 배양하였다. MTT 용액을 첨가하고 4시간 동안 더 배양 한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군의 세포수를 100% 하여 상대적인 세포 증식 억제율을 구하였다.

$$\text{Cell survival(\%)} = \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

통계처리

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 반복 실시하여 얻은 결과를 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 통계처리는 SAS (version 9.1.3)를 이용하여 다중범위검정(Duncan's multiple range test)을 실시하여 5% 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

총 페놀 함량 측정

페놀성 물질들은 항산화, 항암 효능뿐만 아니라 다양한 생리활성을 가지고 있음이 보고되어 대표적인 기능성 물질로 인식되고 있다(Lee and Lee, 2006). 참외 종자 추출물의 기능성분 분석을 위하여 총 페놀 함량을 측정하였고 결과는 Fig. 1과 같이 나타났다. 열처리를 하지 않은 참외 종자 에탄올 추출물의 총 페놀 함량은 109 mg/100 g 이었고, 250°C, 120분 볶음 처리한 참외종자 에탄올 추출물의 총 페놀 함량은 289 mg/100 g 으로 열 처리에 의해 총 페놀 함량이 2배 이상 증가하였다. 열 처리에 의한 총 페놀 함량 증가에 대한 유사 연구로, Kim *et al.*(2008)이 참외, 수박, 멜론의 식용부위가 열처리에 의해 총 페놀함량이 크게 증가하였다고 보고하였다.

생쥐 간암 세포주에 대한 참외 종자 추출물의 항암활성

참외 종자로부터 헥산과 에탄올 유기용매를 이용하여 제조한 각각의 추출물에 대하여 생쥐 간암세포인 Hepal1c7에 대한 항암활성을 알아보고자 crystal violet assay 를 실시하였다. 헥산 추출물 보다 탈지 후 제조한 에탄올 추출물에서 강한 항암활성이 나타났고, 250°C에서 120분간 볶음 처리한 참외 종자의 헥산 추출물과 에탄올 추출물에서 볶음처리 하지 않은 참외 종자의 추출물보다 활성이 훨씬 높게 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과는 열처리에 의해 과일과 채소의 생리활성이 증가한다고 보고한 Kim *et al.* (2008)의 연구 결과와 같다. 볶음 처리에 의해 총 페놀 함량이 증가하고, 항암활성이 증가하는 것으로 미루어 참외 볶음 종자의 항암효과는 페놀성 화합물이 영향을 미치는 것으로 사료된다.

인체 5종 암세포주에 대한 다양한 용매 추출물의 항암 활성

알코올을 이용한 천연물 추출방법이 널리 이용되고 있다.

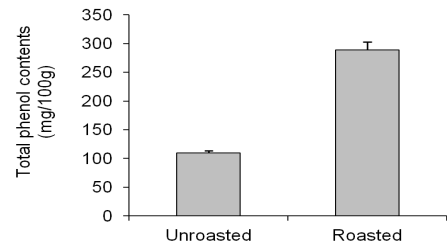


Fig. 1. Total phenol contents of raw and heated oriental melon seeds(250°C, 120 min). Values are means ± SD.

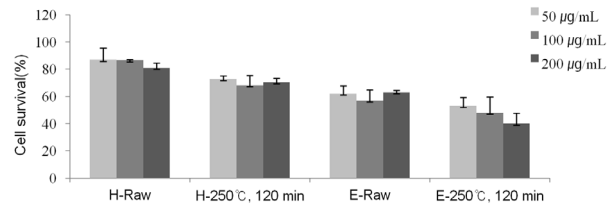


Fig. 2. Cancer cell viabilities of the EtOH(E) and hexane (H) extracts of raw and heated oriental melon seeds.

참외 종자는 지질 성분을 다량 함유하고 있기 때문에 헥산 유기 용매를 이용하여 지질 성분을 먼저 추출하였고 탈지 후 에탄올을 이용하여 에탄올 추출물을 제조하였다. 한의 학적인 측면에서 전통적으로 약재를 물에 달여 먹었다. 물 추출물의 경우엔 지금까지 활성이 낮은 것으로 보고되고 있지만 활용도 제고를 위하여 추가적으로 증류수를 이용하여 참외 종자 물 추출물을 제조하였다. 인체 유래 5종 암세포주에 대하여 참외 볶음종자의 water, hexane, EtOH 추출 용매별로 항암 활성을 비교하고자 하였다(Fig. 3). EtOH, hexane, water 추출 용매순으로 항암활성이 나타났다. 물 추출물은 다른 용매 추출물에 비해 항암 활성을 나타내지 못하였다. EtOH 용매 추출물은 5종 인체암 세포주 중에서 특히적으로 간암 세포주인 HepG2와 유방암 세포주인 MCF-7에 대해서 우수한 항암활성을 보여주었다.

참외 볶음종자 에탄올 추출물의 항암활성

항암 활성이 가장 높게 나타난 참외 볶음 종자의 에탄올 추출물의 항암활성을 알아보고자 인체 유래 암세포인 MCF-7, A549, HT-29, HepG2, AGS와 생쥐 간암 세포인 Hepal1c7에 대해 MTT assay법으로 항암 활성을 측정하였다(Fig. 4). 에탄올 추출물 200 µg/ml 농도에서 Hepal1c7 세포에 대하여 40%, 간암세포인 HepG2에 대하여 62%, 유방암 세포인 MCF-7에 대하여 63%, 폐암 세

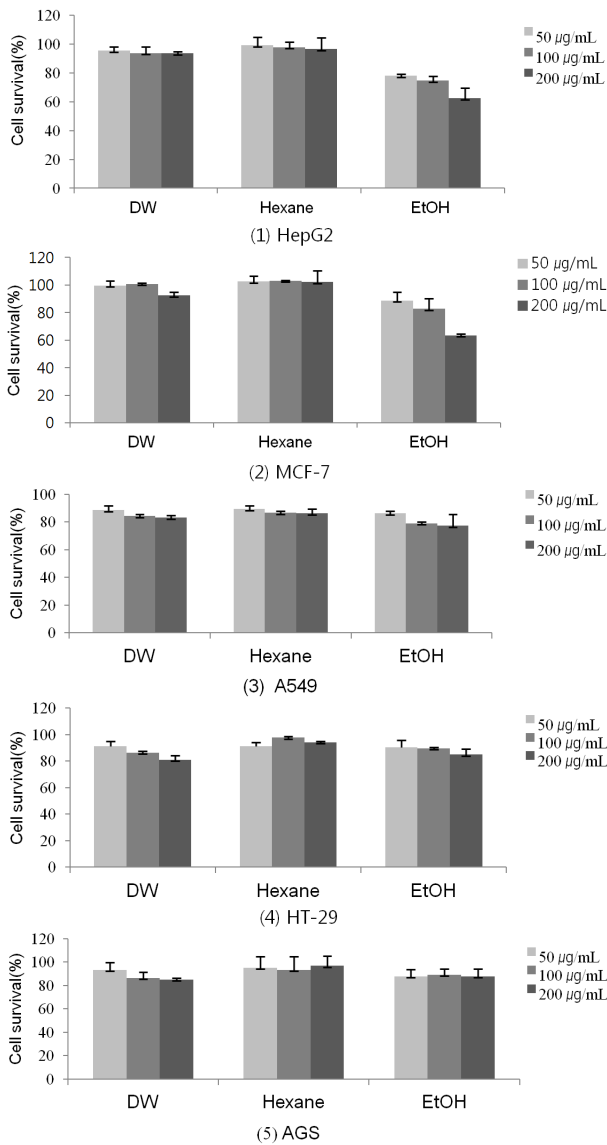


Fig. 3. Cancer cell viabilities of water, hexane, and EtOH extracts from heated oriental melon seeds(250°C, 120 min) against five human cancer cell lines such as HepG2, MCF-7, A549, HT-29 and AGS. DW: Distilled water extract, Hexane: hexane extract, EtOH: ethanol extract. Values are means ± SD.

포인 A549에 대하여 77%, 대장암 세포인 HT-29에 대하여 84%, 위암세포인 AGS에 대하여 87%의 세포생존율을 보여주었다. 참외 볶음종자 에탄올 추출물은 생쥐 간암 세포에서 가장 높은 항암활성을 보여주었다.

용매 분획물의 항암 활성

항암 활성이 가장 높게 나타난 에탄올 추출물을 용매 분

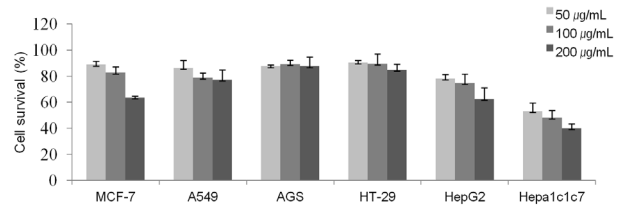


Fig. 4. Anticancer activity of the ethanol extract of heated oriental melon seeds against five human cancer cell lines (MCF-7, A549, HT-29, HepG2 and AGS) and one mouse liver cancer cell line(hepa1c1c7). Values are means ± SD.

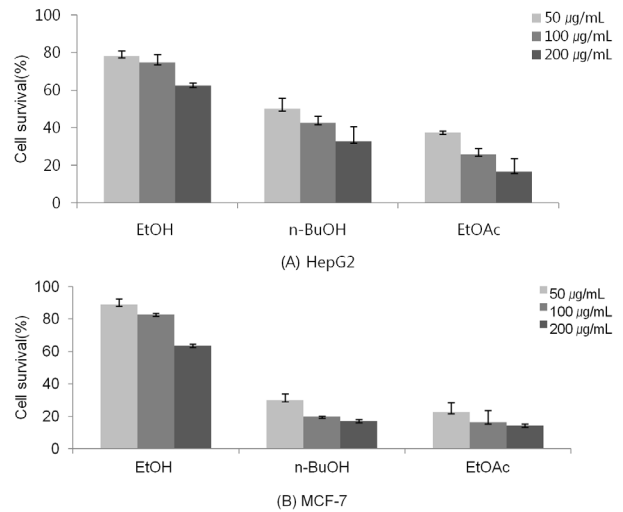


Fig. 5. Anticancer effects of the EtOH, n-BuOH and EtOAc extracts of heated oriental melon seeds(250°C, 120 min) against HepG2 and MCF-7 cells. Values are means ± SD.

획법에 의하여 극성에 따라 EtOAc, n-BuOH 용매로 순차적으로 분획하여 EtOAc 분획물과 n-BuOH 분획물을 제조하였다. 참외 볶음종자의 추출용매 중 가장 강한 활성을 보여주었던 에탄올 추출물에서 효과가 좋았던 간암 세포주인 HepG2, 유방암 세포주인 MCF-7에 대하여 EtOAc 분획물과 n-BuOH 분획물의 항암활성을 조사하였다. 결과는 Fig. 5와 같이 비극성 분획물인 EtOAc 분획물이 극성 분획물인 n-BuOH 분획물 보다 우수한 항암활성을 보여주었고, 모두 에탄올 추출물보다 항암 활성이 크게 증가하였다.

적 요

참외 종자의 기능성을 규명하는 연구의 일환으로 항암활성을 조사하고자 하였다. 추출용매에 따른 항암활성을 조

사하고자 핵산, 에탄올, 물 등 다양한 추출용매를 사용하여 참외 종자 추출물을 제조하였고, 가공에 따른 활성 증진효과를 알아보기 위해 볶음 처리하였다. 볶음 처리한 참외 종자는 볶음 처리하지 않은 종자보다 활성이 2~4배까지 증가하는 경향을 보여주었다. 추출용매에 따른 활성은 에탄올 추출물, 핵산 추출물, 물 추출물 순으로 항암활성이 나타났다. 인체 유래 5종(MCF-7, A549, AGS, HT-29, HepG2) 암 세포주를 이용하여 항암 활성의 조직 특이성을 알아보하고자 하였다. 참외 볶음 종자 에탄올 추출물이 간암 세포주인 HepG2세포와 유방암 세포주인 MCF-7 세포에서 우수한 항암활성을 보여주었다. 용매분획법을 실시하여 제조한 분획물의 경우 에탄올 추출물보다 활성이 증가하였고, 비극성 분획물인 에칠아세테이트층이 극성 분획물인 부탄올층 보다 강한 항암활성을 보여주었다. 이상의 연구결과, 참외 볶음종자가 간암과 유방암 예방 및 치료 소재로서 개발될 가치가 있는 것으로 사료된다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 : PJ008300)의 지원과 2012학년도 경북대학교 학술연구비에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Chang, J.C. and K.M. Yoo. 2006. Screening of natural herb methanol extract for antioxidant activity in V79-4 cell. *J. Korean Food* 22:428-437 (in Korean).
- Drysdale, B.E., C.M. Zacharchuk, M. Okajama and H.S. Shin. 1986. Assay of a cytotoxic protein excreted by activated macrophages. *Methods Enzymol.* 132: 549-555.
- Jin, Y.O. and W.S. Song. 2012. Antioxidant activity of *Pyrus serotina* fruit in different cultivars and parts. *Korean J. Plant Res.* 25:498-503 (in Korean).
- Kang, N.S. and E.H. Sohn. 2010. Immunomodulatory effects of fructus and semen from *Rosa rugosa* on macrophages. *Korean J. Plant Res.* 23:399-405 (in Korean).
- Kim, H.S., K.M. Ku, J.K. Suh and Y.H. Kang. 2009a. Quinone reductase inductive activity and growth inhibitory effect against hepatoma cell of oriental melon extract. *J. Kor. Bio-Env. Con.* 18:448-453 (in Korean).
- Kim, H.S., M.J. Hong, I.Y. Kang, J.Y. Jung, H.K. Kim, Y.S. Shin, H.J. Jun, J.K. Suh and Y.H. Kang. 2009b. Radical scavenging activities and antioxidant constituents of oriental melon extract. *Korean J. Plant Res.* 18:442-447 (in Korean).
- Kim, H.S. and Y.H. Kang. 2010. Antioxidant activity of ethanol extracts of non-edible parts(stalk, stem·leaf, seed) from oriental melon. *Korean J. Plant Res.* 23:451-457 (in Korean).
- Kim, H.Y., K.S. Woo, I.G. Hwang, Y.R. Lee and H.S. Jeong. 2008. Effects of heat treatments on the antioxidant activities of fruits and vegetables. *Korean J. Food Sci. Technol.* 40:166-170 (in Korean).
- Kim, S.S. 1998. A study on the related factors of Korean cancer - Outbreaks. *J. Korean Soc. Health Inform. Stat.* 23:1-16 (in Korean).
- Kuhnau, J. 1976. The flavonoid, a class of semiessential food components; their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 24:117-120.
- Lee, K.W. and H. J. Lee. 2006. The roles polyphenols in cancer chemoprevention. *Biofactors* 26:105-121.
- Martin, A. and M. Clynes. 1993. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnol.* 11:49-48.
- McIntire, S.N. and A.L. Cioppa. 1984. Cancer nursing: A developmental approach. *Media Public.* 557-571.
- Murakami, A. and H. Ohigashi. 2007. Targeting NOX, INOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer* 121:2357-2363.
- Rhim, T.J. and M.Y. Choi. 2011. The antioxidant effects of *Rhododendron brachycarpum* extracts. *Korean J. Plant Res.* 24:456-460 (in Korean).
- Shin, Y.S., J.E. Lee, I.K. Yeon, H.W. Do, J.D. Cheung, C.K. Kang, S.Y. Choi, S.J. Youn, J.G. Cho and D.J. Kwoen. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of extract with water and ethanol of oriental melon(*Cucumis melo* L. var *makua* Makino). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 51:194-199 (in Korean).
- Yoon, J.A., S.W. Hahm, J. Park and Y.S. Son. 2009. Total polyphenol and flavonoid of fruit extract of *Opuntia humifusa* and its inhibitory effect on the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38:1679-1684 (in Korean).

(Received 23 October 2012 ; Revised 25 October 2012 ; Accepted 29 October 2012)