

호박씨유의 지방산 성분 분석 및 Human Umbilical Vein Endothelial Cell에 미치는 영향 연구

김경곤^{1*} · 강윤환^{2*} · 김대중² · 김태우² · 이정일³ · 최 면^{1,2*}

¹강원대학교 생명건강공학과, ²강원대학교 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터, ³(주)한빛향료

Analysis of Fatty Acid Composition and Effects of Pumpkin Seed Oil on Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Kyoung Kon Kim^{1*}, Yun Hwan Kang^{2*}, Dae Jung Kim², Tae Woo Kim²,
Jeong Il Lee³ and Myeon Choe^{1,2,†}

¹Dept. of Bio-Health Technology, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Republic of Korea

²Well-being Bioproducts RIC, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Republic of Korea

³Basic Lab., Hanbit Flavor & Fragnance, Eumseong 369-821, Republic of Korea

Abstract

Pumpkin seed oil (PSO) was investigated for its parasite elimination activity and efficacy in treating disorders of the prostate gland and urinary bladder. We confirmed the composition of PSO and identified its ability to improve vessels. Gas chromatography coupled with mass spectrometric (GC-MS) system was used for PSO composition analysis. Cytotoxicity and cell proliferation were confirmed by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. Nitric oxide(NO) production was measured with Griess reagent, and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 mRNA expression levels were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). As a result, PSO revealed the presence of several components such as linoleic acid, oleic acid, palmitic acid and stearic acid. Cytotoxic effects of PSO were not observed, and PSO increased nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Additionally, TNF- α -induced cell proliferation and ICAM-1 expression in HUVEC were inhibited by PSO treatment, whereas VCAM-1 expression was not significantly reduced. Taken together, these results show that PSO is worthy of study as a candidate food material for improvement of vascular disease.

Key words : Pumpkin seed oil, composition assay, nitric oxide production, cell proliferation, intercellular adhesion molecule-1, food material

서 론

호박은 Cucurbitaceae과에 속하며, 한국에서 재배하는 주요 종은 중앙아메리카 또는 멕시코 남부의 열대 아메리카 원산의 동양계 호박(*C. moschata*), 남아메리카 원산의 서양계 호박(*C. maxima*), 멕시코 북부와 북아메리카 원산의 폐포계 호박(*C. pepo*)의 3 가지가 있다(Jang *et al* 2003). 이 중 동양계 호박은 한국을 비롯한 중국·일본 등지로 전파된 시기가 가장 이른 것으로 추정되며, 예로부터 애호박·호박고지용·호박범벅 등으로 이용되었고, 약리적인 효과 또한 기대되어 위장 약한 사람이나 회복기의 환자, 부종 완화 등에 사용되었다(Kim DS 2012). 호박의 씨에는 비타민 B, C, E와 효소인

urease가 있고, 기름이 약 40~50% 있다. 기름의 주성분은 리놀산, 올레산, 팔미트산, 스테아르산이 알려져 있다(Procida *et al* 2012). 대부분은 불포화지방산인 리놀산과 올레산으로 이루어져 있으며, 리놀산은 항염증 작용이 잘 알려져 있고, 올레산은 상처 치료, 면역 및 염증 질환과 암에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Procida *et al* 2012, Zhao *et al* 2005, Sales-Campos *et al* 2013).

혈관의 건강을 위해서는 혈압을 조절하고, 혈관 내 이물질의 침착을 막는 것이 가장 중요하다. 혈압은 심장의 박동과 함께 혈관 내피 세포와 근육 세포의 수축과 이완이 유기적으로 조절되면서 유지된다(Horowitz *et al* 1996, Fleming & Busse 2003). 혈관에 압력이 가해지거나 혈류량이 증가할 때 혈관이 적절하게 이완하지 못하면 혈압이 상승하고, 그로 인해 고혈압, 부정맥, 심장마비 및 동맥경화가 발생하게 된다(Kang *et al* 2013). 대표적인 혈관 이완인자로는 혈관 내피 세포의 endothelial nitric oxide synthase(eNOS)에 의해 발생

* These authors contributed equally to this work.

† Corresponding author : Myeon Choe, Tel : +82-33-250-8645, Fax : +82-33-342-7368, E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr

하는 nitric oxide(NO)가 잘 알려져 있으며, 이는 anti-atherogenic 효과를 유도하는 것으로도 알려져 있다(Fleming & Busse 2003). 내피 세포에서 생산된 NO는 혈관평활근으로 이동하여 세포 내 guanylate cyclase(GC)와 결합하게 되고, 활성화된 GC는 guanosine triphosphate(GTP)를 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)로 전환하여 cGMP-dependent protein kinase G(PKG)를 활성화하여 Ca^{2+} -activated K^{+} channel이나 myosin light-chain phosphatase의 활성 증가를 통한 혈관 이완을 유도하게 된다(Kang *et al* 2013, Buys & Sips 2014). 이와 같은 혈관 이완을 통한 혈압의 조절뿐만 아니라, 앞에서 언급한 anti-atherogenic 효과를 포함한 혈관의 항상성 유지에 다양한 방법으로 작용하는 것이 보고되어 있다(Tousoulis *et al* 2012).

혈관 건강을 유지하기 위한 또 다른 방법은 혈관 내 이물질의 축적을 막는 것이다. 특히, 혈관 내 죽종(atheroma) 생성과 유도에 영향을 미치는 다양한 cell adhesion molecule(CAM) 중 intercellular adhesion molecule(ICAM)-1 및 vascular cell adhesion molecule(VCAM)-1의 발현을 억제하는 것은 혈관 건강 유지를 위한 중요한 요소이다(Naito & Yoshikawa 2009). Chang *et al*(2013)은 HUVEC에서 TNF- α 에 의해 증가된 ICAM-1과 VCAM-1의 발현을 저해하는 것이 죽상 동맥경화의 개선에 도움이 될 수 있음을 보고하였다. 또한 TNF- α 에 의해 증가된 HUVECs의 proliferation은 혈관 신생에 영향을 주어 암세포의 성장을 도울 수 있고, 건선 등의 혈관 생성에 의한 질병을 유발할 수 있으므로 이를 저해시키는 것은 항암과 함께 혈관 신생에 의해 발생할 수 있는 질병 예방의 효과를 기대할 수 있다(Yamasaki *et al* 2003, Weidemann *et al* 2013). 이에 본 연구는 기존의 roasting 후 압착하는 방법이 아니라 핵산 유기 용매를 이용해 추출한 호박씨유를 이용하여 구성 성분을 분석하고, HUVECs를 이용하여 호박씨유의 섭취가 유도할 수 있는 유익한 기능에 대한 기초 자료를 확보하고자 실험을 진행하였으며, 이를 통해 확보된 기초 자료들은 호박씨유의 기능을 이용한 다양한 제품의 생산 및 적용에 근거 자료로 이용될 것이다.

재료 및 방법

1. 호박씨유 제조

호박씨유(Pumpkin seed oil; PSO)는 호박씨 550 g에 n-hexane 700 mL를 혼합한 후 30분 동안 초음파 추출한 다음 그대로 24시간 침지 시킨 후 0.45 μ m filter로 여과하여 감압 농축 후 분석 시료로 사용하였다.

2. 호박씨유의 성분 분석

1) GC 분석용 시료 전처리

샘플 25 mg을 cap tube에 칭량하고, 0.5 N methanolic NaOH 1.5 mL를 가한 뒤 100°C 가량의 히팅 블록에 5분간 가열하였다. 식물성 유지에는 트리글리세라이드의 양이 적어 비누화로 메틸레이션을 촉진시켰다. 가열된 시료를 30~40°C의 수욕상에서 1~2분간 냉각하고, 냉각된 시료에 촉매 역할을 위해 14% BF-methanol(Supelco Inc, bellefonte, PA, USA) 2 mL를 가한 뒤 충분히 vortex한 뒤 약 100°C 히팅 블록에서 약 2분간 가열하였다. 이후 30~40°C 수욕상에서 1~2분 방치하여 완전히 냉각시켰다. 냉각된 샘플에 Isooctane 2 mL와 층 분리를 잘 되게 하기 위하여 saturated NaCl 1 mL를 가하고, 이후 충분히 vortex한 뒤 1~2분간 방치한 뒤 상층액을 회수하여 sodium sulfate를 이용하여 여과, 탈수한 뒤 gas chromatography(Agilent 6890N GC/FID, Beijing, China)로 분석하였다.

2) 분석 방법

시료 중 지방산의 분석은 식약처 분석법 “지방산과 트랜스 지방 분석법”에 기초하여 gas chromatography를 이용하여 지방산을 분석하였다. 지방산 표준용액은 지방산 메틸에스터 혼합(37종) 표준품 FAME Mix C4-C24(Supelco Inc, bellefonte, PA, USA) 100 mg을 isooctane 1 mL에 녹여 조제하였다. 지방산의 정량을 위해 gas chromatography를 이용하였으며, 지방산 37종의 머무름 순서를 확인하기 위해 GC/MSD(Agilent 5975C, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하였다. 분석 조건은 Table 1과 같다

3. HUVEC 배양 및 호박씨유의 세포 독성

Table 1. Analysis condition of GC and GC/MSD

Item	Condition	
	GC	GC/MSD
Column	Supelco SP-2560(US) (100 m×0.25 mm I.D, 0.20 μ m film)	Supelco SP-2560(US) (100 m×0.25 mm I.D, 0.20 μ m film)
Detector	FID, 260°C	-
Oven	100°C(3 min) → 3°C/min → 240°C (20 min)	100°C(3 min) → 3°C/min → 240°C (15 min)
Injector	225°C	240°C
Split ratio	100:1	10:1
Injection volume	1 μ L	0.2 μ L
Mobile phase	He, 0.8 mL/min	He, 0.75 mL/min

HUVEC(Human umbilical vein endothelial cell)는 강원대학교 혈관 연구 센터(Kangwon, Korea)로부터 분양받아 사용하였다. HUVEC은 10% fetal bovine serum(FBS, Welgene, Daegu, Korea)과 1% penicillin-streptomycin(PE-ST, Welgene)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Welgene, Daegu, Korea)에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

PSO의 세포 독성은 Cell Counting Kit(CCK)-8(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 이용하여 확인하였다. HUVEC을 96-well tissue culture plate에 1×10^4 cells/well로 100 μ L씩 분주하고, 24시간 동안 배양한 후 FBS가 첨가되지 않은 배지에 PSO를 농도별로 제조한 후 세포에 처리한 후 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 24시간 후 배양 중인 배지에 CCK-8 reagent를 10 μ L씩 가해주고, 3시간 동안 37°C에서 배양한 후 ELISA microplate reader(EL808, BioTek, Winooski, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)의 흡광도 값을 기준으로 세포 독성을 비교하였다.

4. Nitric Oxide 측정

PSO의 NO 분비량은 Griess Reagent를 이용하여 확인하였다(Wang *et al* 2007). HUVEC을 96-well tissue culture plate에 1×10^5 cells/well로 100 μ L씩 분주하고 24시간 동안 배양한 후 FBS가 첨가되지 않은 배지에 농도별로 제조한 PSO와 TNF- α (100 ng/mL)를 세포에 처리한 후 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. 24시간 후 배양 중인 배지 100 μ L에 동량의 Griess 시약을 넣어 10분간 반응시킨 후 ELISA microplate reader(EL808, BioTek, Winooski, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. ICAM-1 및 VCAM-1의 발현 확인

HUVEC을 6-well plates에 1×10^6 cells/mL로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 PSO 0.1 mg/mL 및 TNF- α 100 ng/mL를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. PSO가 함유된 배지를 제거한 후 QIAzol lysis reagent(Qiagen, Hilden, Germany)를 각 wells에 1 mL씩 분주하여 세포를 lysis하였다. Lysate는 chloroform 200 μ L를 분주하여 15초간 섞었다. 그 후 12,000 \times g 15분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 μ L가 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 12,000 \times g 10분간 원심 분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 100% ethanol과 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC) water를 75:25로 섞어 만든 75% ethanol을 각 튜브에 1 mL씩 분주하여 12,000 \times g에서 5분간 원심 분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water를 40 μ L씩 분주하여 녹인 후 RNA 5 μ L에 0.1% DEPC water를 995 μ L를 첨가하여 260 nm에서 흡광 측정하여 total RNA 양을 정량하였다.

First strand cDNA를 합성하기 위하여 AmfiRiert Platinum cDNA synthesis Master Mix(GenDEPOT, Barker, TX, USA)를 이용하였다. 추출한 RNA(2 μ g)와 RNase free water로 9 μ L를 맞추고, 70°C에서 5분간 반응시킨 후 2 \times cDNA synthesis 완충 용액 10 μ L, cDNA synthesis Enzyme Mix 1 μ L를 섞어 11 μ L씩 각 PCR tube에 더한 후 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

ICAM-1 및 VCAM-1의 mRNA 발현량을 측정하기 위하여 cDNA로 RT-PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequence는 Table 2와 같다. PCR tube에 Go Tag Green Master (Promega, Madison, WI, USA) 10 μ L, forward primer(15 μ M)와 reverse primer(15 μ M)를 각각 0.5 μ L, nuclease free water 8 μ L, 합성한 first-stand cDNA 1 μ L를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR를 실행하였으며, PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1.0% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동 후 UV 광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 imageJ(National institutes of health, Bethesda, MD, USA) 소프트웨어를 이용하여 분석 정량하였다.

6. HUVEC Cell Proliferation

Cell proliferation는 Chung 등이 사용한 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-di-phenyl-tetrazolium bromide(MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. HUVEC을 96 well plate에 1×10^4 cells/mL로 100 μ L씩 분주하고, 24시간 동안 배양한 후 FBS와 항생제가 첨가되지 않은 배지에 제조한 PSO와 TNF- α (100 ng/mL)를 세포에 처리 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하여 MTT 시약(5 mg/mL)을 넣고, 4시간 동안 배양한 후 상등액을 제거하였다. 각 well에 형성된 formazan에 DMSO 100 μ L를 첨가한 후 shaker를 이용하여 녹이고, 30분 후 UV/vis spectrophotometer를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)의 흡광도 값을 기준으로 cell proliferation을 비교하였다.

Table 2. PCR primer sets used in the experiment

	Primer	Sequence(5'→3')	PCR product size
ICAM-1	Sense	CCAGGACCTGGCAATGCC	355bp
	Antisense	CACCCTCCACCTGGCAGCG	
VCAM-1	Sense	CACTGAATGGGAAGGTGACG	250bp
	Antisense	TCCAGCCTGTCAAATGGGTA	
β -Actin	Sense	ACAGGAAGTCCCTTGCCATC	248bp
	Antisense	AGGGAGACCAAAAGCCTTCA	

7. 통계 처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS(statistical package for social sciences, Version 10.0, Chicago, USA) program을 이용하여 평균±표준편차로 표시하였고, One-way ANOVA test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. Fatty acid profiles by GC

호박씨유는 standard fatty acid mix(FAME Mix C4-C24, Supelco Inc, bellefonte, PA, USA)의 retardation time을 기준으로 그 구성 성분을 분석하였다. PSO에 함유된 성분을 분석한 결과, Fig. 1과 같은 결과를 확인하였으며, 그 함량은 Table 3에 정리한 바와 같다. Procida *et al*(2012)의 논문에서 보고된 바와 같이 linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, stearic acid를 주요 성분으로 하고 있었으며, 추가로 arachidic acid가 미량 확인되었다. 내부 표준 물질로 사용된 undecanoic acid의 함량을 기준으로 분석한 결과, 불포화 지방산인 linoleic acid가 44.7%, oleic acid가 25.3%로 전체의 70%를 차지하고 있었으며, 포화 지방산인 palmitic acid가 17.4%, stearic acid가 7.9%, arachidic acid가 0.4%로 약 26%를 차지하였고, 기타 미량의 성분들이 약 4% 함유되어 있었다. 이 함량은 Procida *et al*(2012)의 논문에서 언급한 linoleic acid 35.6~60.8%, oleic acid 21.0~46.9%, palmitic acid 9.5~14.5%, stearic acid 3.1~7.4% 범위와 유사하며, 포화 지방산인 palmitic acid와 stearic acid가 보고된 용량보다 소량 증가해 있지만, 전체적인 포화 지방산과 불포화 지방산의 함량 비에는 영향을 미치지 않는 수준이다.

Table 3. Fatty acid profiles of pumpkin seed oil(PSO)

Peak #	Name(acid methyl esters)	Retention time[min]	Area	Area(%)
1	1	29.121	24.8763	3.2237
2	-	34.248	4.1967	0.5438
3	2	41.618	134.4874	17.2484
4	3	45.906	60.9159	7.8942
5	4	47.334	195.2507	25.3028
6	-	47.499	3.5445	0.4593
7	5	49.368	345.0544	44.7162
8	6	49.846	3.3279	0.4312

Undecanoic acid($C_{11:0}$, 29.065 min) was used as a internal standard(ISTD).

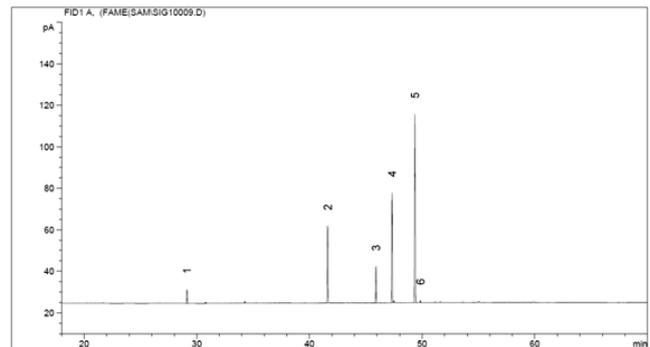


Fig. 1. GC chromatograms and MS fragments of individual fatty acids extracted from pumpkin seed oil(PSO).

1 : undecanoic acid, 2 : palmitic acid, 3 : stearic acid, 4 : oleic acid, 5 : linoleic acid, 6 : arachidic acid.

2. PSO의 세포 독성

PSO는 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 용매로 하여 본 실험에 사용되었으므로 PSO의 HUVECs 세포에서의 독성 실험은 DMSO 용매단독 처리군과 비교하여 확인하였다(Fig. 2). PSO는 농도에 따라 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL 그리고 0.4 mg/mL를 처리하였으며, 최고 농도인 0.4 mg/mL에서 독성이 관찰되었다. 그러나 DMSO 용매단독 처리군에서도 PSO 독성 실험과 동일한 결과를 확인할 수 있었다. 이는 실험에서 관찰된 PSO의 세포 독성이 oil 성분이 아닌 DMSO의 농도에 따른 것임을 알 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 이후의 실험에서는 PSO 0.2 mg/mL농도 이하에서 수행하였다.

3. PSO 처리에 의한 Nitric Oxide (NO) 분비량 측정

NO는 혈관 내피 세포에서 분비되는 대표적인 혈관 이완

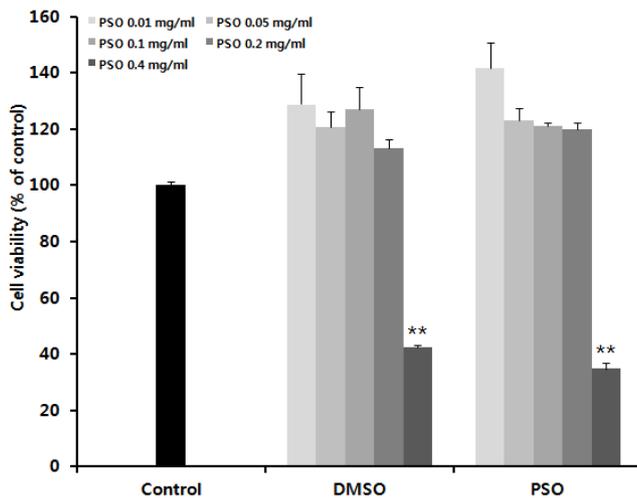


Fig. 2. Concentration-dependent effects of pumpkin seed oil(PSO) on HUVEC cell growth.

Cell viability was analyzed using the CCK-8 assay kit. Each bar is the mean±S.D. from three independent experiment. ** indicate significant differences($P<0.001$) by ANOVA test.

인자이며, NO-cGMP-PKG pathway에 의한 혈관 이완 기전이 잘 알려져 있다(Kang *et al* 2013, Buys & Sips 2014). 본 실험에서는 PSO 처리가 HUVEC에서 NO의 분비에 미치는 영향을 배지 내 NO의 함량을 측정함으로써 확인할 수 있었으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. TNF- α 의 처리에 의한 NO의 감소는 control 대비 약 23%로 측정되었으며, TNF- α 와 함께 PSO를 처리한 경우, control 대비 0.01 mg/mL에서 13%, 0.05 mg/mL에서 11%, 0.1 mg/mL에서 29%의 NO 분비 증가 효과가 있었으며, TNF- α 단독처리군에 비교하여 0.01 mg/mL에서 26%, 0.05 mg/mL에서 24%, 0.1 mg/mL에서 42%를 나타내어 농도 의존성은 없지만, 유의한 NO 분비 개선 효과가 관찰되었다. 이 결과를 통해 PSO가 TNF- α 에 의한 혈관 이완 인자인 NO 분비 억제 작용을 저해함으로써 혈관의 이완에 도움을 줄 수 있음을 확인할 수 있었다. 이것은 El-Mosallamy *et al.*,(2012)이 고혈압이 유도된 쥐에서 관찰한 PSO의 NO 발생 유도 현상과 비슷한 결과이며, PSO의 혈압저하 기능에 대한 기전 연구가 필요할 것으로 판단된다.

4. ICAM-1 및 VCAM-1의 발현 억제 활성 측정

ICAM-1과 VCAM-1은 immunoglobulin superfamily에 속하는 대표적인 cell adhesion molecule이다. 이들은 죽상 동맥경화 병변에서 발현이 증가되어 있는 것으로 확인되며, 죽종을 가속화하여 혈관의 기능을 저하시키는 것으로 알려져 있다(Fotis *et al* 2012). 이런 ICAM-1과 VCAM-1 인자의 mRNA 발현 변화를 PSO 처리 후 관찰한 결과, Fig. 4와 같다. ICAM-1의 mRNA 발현은 TNF- α 의 처리에 의해 control 대비 약 2배

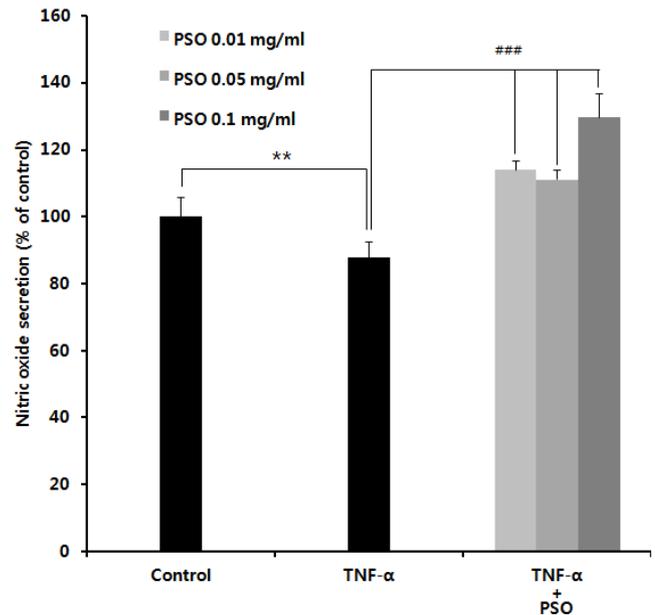


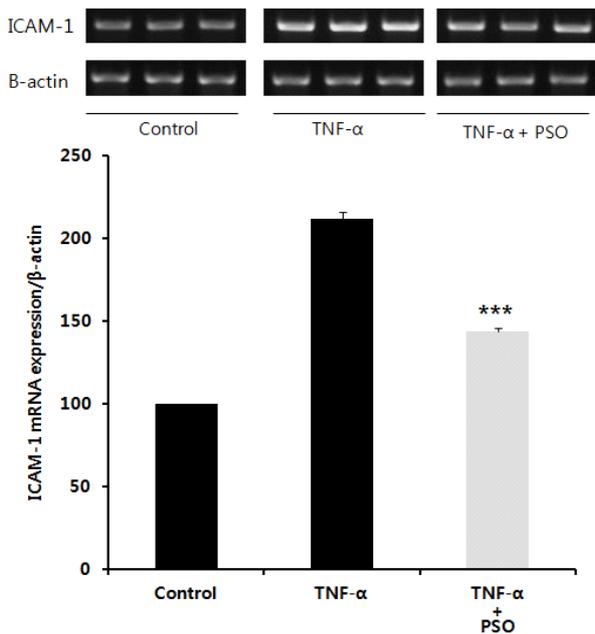
Fig. 3. Effect of pumpkin seed oil(PSO) on nitric oxide (NO) secretion.

Results are presented as mean±S.D. of three independent experiments. ** $p<0.01$ as compared to the control. ### $p<0.001$ as compared to the TNF- α (100 ng/mL).

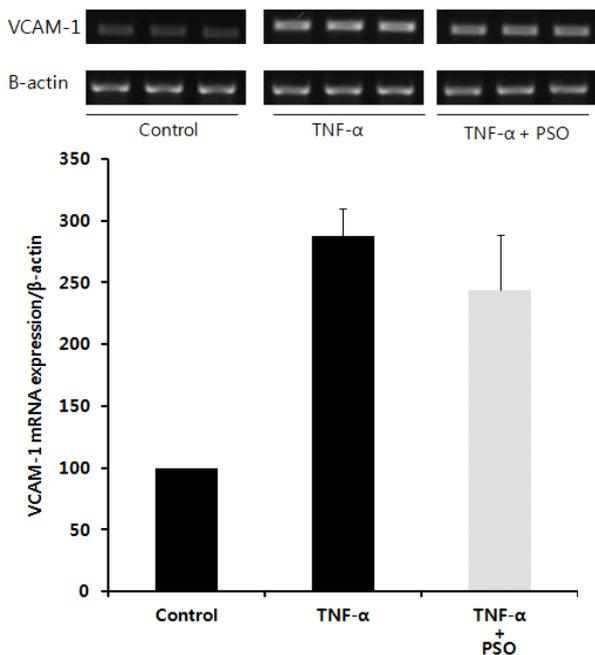
증가하였지만, PSO 0.1 mg/mL을 추가 처리한 후 유의한 수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). VCAM-1의 mRNA 발현을 ICAM-1과 동일한 방법으로 확인한 결과, PSO 처리에 의해 감소하는 경향은 관찰되었지만 유의한 수준의 변화는 아니었다(Fig. 4B). 이를 통해 PSO의 처리는 VCAM-1 보다 ICAM-1에 더 효과적으로 작용하는 것을 확인할 수 있었다. ICAM-1은 내피 세포에 백혈구의 결합 단계 및 migration 단계에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Fotis *et al* 2012, Tousoulis *et al* 2006). 그러므로 PSO의 처리가 죽상 동맥경화 병변에 백혈구의 부착 및 migration을 억제하여 혈관 질환 개선 및 예방에 도움이 될 수 있음을 실험 결과로 예측할 수 있다. Livingstone *et al*(2014)의 보고에서는 종실유의 주요 성분인 linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, stearic acid 등이 ICAM-1의 발현을 증가시키지만, VCAM-1에는 영향을 미치지 못하는 결과를 확인할 수 있다. 이는 PSO의 ICAM-1 저해 효과가 분석된 fatty acid의 성분에 의한 것이 아니라 PSO에 함유된 다른 성분에 의한 효과임을 예측할 수 있으며, 추가적인 성분 분석과 실험이 필요함을 보여준다.

5. Pumpkin Seed Oil(PSO)의 HUVEC Proliferation 저해

TNF- α 처리에 의한 HUVEC의 proliferation 증가는 잘 알려져 있다(Yamamoto *et al* 2004, Zhang *et al* 2007). 또한 자극에 의한 HUVEC의 proliferation 증가는 angiogenesis와



(a)



(b)

Fig. 4. Effect of pumpkin seed oil(PSO, 0.1 mg/mL) on the intracellular adhesion molecule-1(ICAM-1, a) and vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1, b) mRNA expression in a HUVECs.

Results are presented as mean±S.D. of three independent experiments. * $p < 0.01$ as compared to the control. *** $p < 0.001$ as compared to the TNF-α(100 ng/mL).

연관됨이 보고되어 있어(Kurzen *et al* 2003) TNF-α에 의해 증가된 HUVEC의 proliferation 제어는 죽상 동맥경화 진행

(Fujita *et al* 2006)과 암세포 성장(Saraswati *et al* 2013) 저해의 효과를 유도할 수 있을 것으로 기대된다. 이에 본 실험은 TNF-α에 의해 촉진된 HUVECs의 proliferation을 PSO 처리를 통해 저해하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같다. Control(100%)과 비교하여 TNF-α 100 ng/mL 처리군(113%)의 proliferation이 유의한 수준으로 증가하는 것을 관찰하였으며, TNF-α와 함께 PSO 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL 및 0.1 mg/mL를 각각 처리한 군에서 농도 의존성은 관찰되지 않았지만 100.7%, 100.8%, 90.3%로 proliferation이 control 수준 또는 그 이하로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. Ciapaite *et al*(2007)과 Lu *et al*(2010)의 연구에서 linoleic acid와 palmitic acid가 세포의 proliferation을 억제할 수 있음을 보고하였다. 이는 linoleic acid와 palmitic acid를 포함하는 PSO의 처리가 TNF-α에 의한 죽상 동맥경화의 진행을 억제할 수 있음을 보여준다.

요 약

본 연구에서는 호박씨유의 성분 특성과 기능성의 기초 자료 확보를 위해 수행되었다 그 결과, 호박씨유는 알려진 바와 같이 linoleic acid(44.7%), oleic acid(25.3%), palmitic acid(17.4%), stearic acid(7.9%)가 분석되었으며, 미량의 arachidonic acid(0.4%) 또한 함유하고 있었다. 세포 독성 실험을 통해 0.2 mg/mL 농도까지 독성이 관찰되지 않았고, 그 이상의 농도에서도 호박씨유보다는 용매에 의한 독성이 관찰되었다. 지방 성분 분석을 통해 구성 성분 및 함유량이 확인된

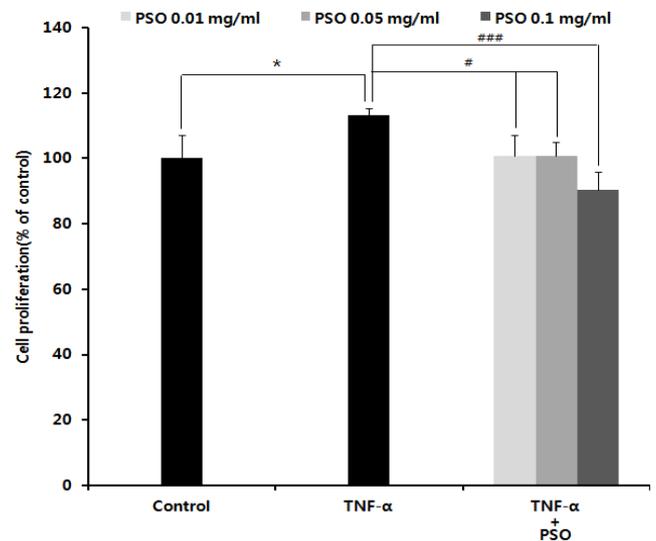


Fig. 5. Effect of pumpkin seed oil(PSO) on HUVECs proliferation.

Results are presented as mean±S.D. of three independent experiments. * $p < 0.01$ as compared to the control. # $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ as compared to the TNF-α(100 ng/mL).

호박씨유를 이용하여 혈관 보호 및 질병 예방에 대한 잠재적 가능성을 연구하기 위해 nitric oxide 분비량 측정, 대표적인 세포 부착 단백질인 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현과 cell proliferation 측정한 결과, 호박씨유는 TNF- α 에 의해 감소된 nitric oxide를 유의하게 증가시켰다. 또한 ICAM-1과 VCAM-1의 발현을 확인한 결과, ICAM-1은 유의한 수준으로 감소되었고, 반면 VCAM-1은 감소하는 경향은 보였으나, 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다. 호박씨유의 HUVEC proliferation 억제 효과는 TNF- α 100 ng/mL 처리군(113%)과 비교하여 PSO 0.01 mg/mL, 0.05 mg/mL 및 0.1 mg/mL를 처리 군에서 100.7%, 100.8%, 90.3%의 억제 효과가 관찰되어 무처리 control군과 유사한 수준을 유지하는 것으로 관찰되었다. 위의 연구 결과를 종합해 보면, 호박씨유는 불포화지방산이 다량 함유된 우수한 식물성 유지이며, 기능적으로 혈관 보호 및 질병 예방에 잠재적으로 우수한 활성이 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구 결과를 기초 자료로 하여 효과적인 기능성 식품 및 소재의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부 고부가가치 식품개발사업 (312001-03-01-HD040), 강원웰빙특산물산업화지역혁신센터 (B0009702), 강원대학교 생명공학연구소(320130015) 및 강원대학교 공동실험실습관의 일부 지원으로 수행한 연구 결과로 이에 감사드립니다.

References

- Buyts E, Sips P (2014) New insights into the role of soluble guanylate cyclase in blood pressure regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 23: 135-142.
- Ciapaite J, van Bezu J, van Eikenhorst G, Bakker SJ, Teerlink T, Diamant M, Heine RJ, Krab K, Westerhoff HV, Schalkwijk CG (2007) Palmitate and oleate have distinct effects on the inflammatory phenotype of human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1771: 147-154.
- El-Mosallamy AE, Sleem AA, Abdel-Salam OM, Shaffie N, Kenawy SA (2012) Antihypertensive and cardioprotective effects of pumpkin seed oil. *J Med Food* 15: 180-189.
- Fleming I, Busse R (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1-R12.
- Fotis L, Giannakopoulos D, Stamogiannou L, Xatzipsalti M (2012) Intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in children. Do they play a role in the progression of atherosclerosis? *Hormones(Athens)* 11: 140-146.
- Fujita Y, Yoshizumi M, Izawa Y, Ali N, Ohnishi H, Kanematsu Y, Ishizawa K, Tsuchiya K, Tamaki T (2006) Transactivation of fetal liver kinase-1/kinase-insert domain-containing receptor by lysophosphatidylcholine induces vascular endothelial cell proliferation. *Endocrinology* 147: 1377-1385.
- Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG (1996) Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 76: 967-1003.
- Jang HD, Kim CS, Baek KG, Ryu SR (2003) The studies on the analyses of sterols from pumpkin seed oil. *Appl Chem* 7: 687-690.
- Kang YH, Kang JS, Shin HM (2013) Vasodilatory effects of cinnamic acid via the nitric oxide-cGMP-PKG pathway in rat thoracic aorta. *Phytother Res* 27: 205-211.
- Kim DS (2012) The quality characteristics of powder pumpkin soup by different varieties of pumpkins and addition ratios. *Korean J Culinary Res* 18: 65-76.
- Kurzen H, Schmitt S, Näher H, Möhler T (2003) Inhibition of angiogenesis by non-toxic doses of temozolomide. *Anticancer Drugs* 14: 515-522.
- Livingstone KM, Givens DI, Jackson KG, Lovegrove LA (2014) Comparative effect of dairy fatty acids on cell adhesion molecules, nitric oxide and relative gene expression in healthy and diabetic human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 234: 65-72.
- Lu X, Yu H, Ma Q, Shen S, Das UN (2010) Linoleic acid suppresses colorectal cancer cell growth by inducing oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Lipids Health Dis* 9: 106.
- Naito Y, Yoshikawa T (2009) Green tea and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol* 54: 385-390.
- Procida G, Stancher B, Cateni F, Zacchigna M (2012) Chemical composition and functional characterization of commercial pumpkin seed oil. *J Sci Food Agric* 93: 1035-1041.
- Sales-Campos H, Souza PR, Peghini BC, da Silva JS, Cardoso CR (2013) An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev Med Chem* 13: 201-210.
- Saraswati S, Kumar S, Alhaider AA (2013) α -santalol inhibits the angiogenesis and growth of human prostate tumor growth by targeting vascular endothelial growth factor receptor

- 2-mediated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathway. *Mol Cancer* 12: 147.
- Tousoulis D, Charakida M, Stefanadis C (2006) Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. *Heart Apr* 92: 441-444.
- Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C (2012) The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* 10: 4-18.
- Wang S, Chen Y, He L, Yang Y, Chen J, Wang X (2007) Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rats treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction, a traditional Chinese formulation. *J Ethnopharmacol* 114: 458-462.
- Weidemann AK, Crawshaw AA, Byrne E, Young HS (2013) Vascular endothelial growth factor inhibitors: investigational therapies for the treatment of psoriasis. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 6: 233-244.
- Yamamoto Y, Ishizu A, Ikeda H, Otsuka N, Yoshiki T (2004) Dexamethasone increased plasminogen activator inhibitor-1 expression on human umbilical vein endothelial cells: an additive effect to tumor necrosis factor-alpha. *Pathobiology* 71: 295-301.
- Yamasaki E, Soma Y, Kawa Y, Mizoguchi M (2003) Methotrexate inhibits proliferation and regulation of the expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 by cultured human umbilical vein endothelial cells. *Br J Dermatol* 149: 30-38.
- Zhang B, Ouyang P, Chen Y, Lai WY, Xie JG, Xu DL (2007) Tumor necrosis factor-alpha regulates the proliferation and syndecan-4 expression of human umbilical vein endothelial-like cells cultured in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 27: 496-498.
- Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Vanden Heuvel JP, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM (2005) Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 909-917.
- http://fse.foodnara.go.kr/residue/RS/jsp/menu_02_01_03.jsp?id x=298

접 수: 2014년 3월 26일
 최종수정: 2014년 5월 3일
 채 택: 2014년 6월 28일