

Brine Shrimp Bioassay를 이용한 해양생물의 세포독성검색

손병화* · 조용진 · 이대령 · 노연숙 · 이선미 · 최홍대*

부산수산대학교 화학과, *동의대학교 화학과

(Received August 31, 1993)

Screening on Cytotoxicity of Marine Organisms Using Brine Shrimp Bioassay

Byeng-Wha Son[#], Yong-Jin Cho, Dae-Ryoung Yi, Yeon-Suk Roh,

Sun-Mi Lee and Hong Dae Choi^{*}

Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

^{*}Department of Chemistry, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract—As a part of chemical study on the bioactive metabolites from marine organisms, we have investigated cytotoxicity using brine shrimp bioassay for each solvent fractions of the marine algae(12 species), marine sponges(3 species), coelenterates(2 species), echinoderms(4 species), marine molluscs(17 species), and ascidians(2 species), respectively. As the results, chloroform extract of *Stichopus japonicus* (LC₅₀ : 274 µg/ml), ethyl acetate extract of *Anthocidaris crassispina*(LC₅₀ : 121 µg/ml), n-butanol extract of *Undaria pinnatifida* (LC₅₀ : 178 µg/ml), and water extract of *Thais clavigera* (LC₅₀ : 61 µg/ml) displayed the most significant cytotoxic activity against brine shrimp. Among the marine organisms tested, echinoderms and marine molluscs were thought to be the most active Phylums on screening of new bioactive compounds.

Keywords □ Marine organisms, Cytotoxic activity, Antitumor compounds, Brine shrimp bioassay.

50만종 이상의 풍부한 종류의 해양생물은 해수중이라는 폐쇄계의 특이한 환경(높은 염의 농도, 수압 그리고 체표면이 해수에 노출되어 있어 병원미생물의 침입을 받기쉬운 점 등)에 적응하면서 살아가기 위해서 그 진화과정에서 육상생물과는 극히 다른 대사계 혹은 생체방어계를 발전시켜 왔다고 생각된다.

따라서, 해양생물이 대사 생산하는 물질은 육상생물유래의 천연물질과는 다른 특이한 화학구조와 다양한 종류의 생물활성발현이 기대된다. 최근에, 병원균이나 바이러스에 대한 성장억제물질, 생물의 생리기능이나 생태계의 제어에 관계되는 생리활성물질, 약리활성물질, 세포독성이나 항종양활성물질 및 유독물질 등의 새로운 생물활성물질들이 해양생물로부터

발견되고 있다.¹⁾

예를들면, 카리브산 해변 *Cryptothya crypta*로부터 발견된 이상당 뉴클레오시드 spongothymidine 및 spongouridine이 의약소재의 선도화합물로서 단리되어²⁾ 합성항암제 Ara-C의 개발로 발전하였다. 그리고, 두 종류의 원색동물 *Eudistoma olivaceum* 및 *Trididemnum solidum*으로부터 강력한 항비루스작용을 나타내는 eudistomin류³⁾ 및 강력한 항종양활성의 고리상 펩티드 didemnin류⁴⁾가 단리되었다. 이중 didemnin B는 현재 미국의 국립암연구소(NCI)에서 Phase II 임상검사단계에 있어 새로운 항암제로서 가장 유망한 해양천연화합물이며, 이미 전합성이 달성되어 있어 양의 공급도 충분히 가능하리라 생각된다. 따라서, 가까운 장래에 해양생물이 생산하는 물질로부터 새

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

로운 항암제의 출현가능성에 많은 흥미가 기대된다.

풍부한 종류의 해양생물로부터 새로운 생리활성물질을 개발하기 위해서는 선택성이 크며, 적은비용으로 손쉽게 검색할 수 있는 생물활성검정법의 확립은 대단히 중요하다. Brine shrimp란(卵)은 저렴한 가격으로 손쉽게 구입할 수 있으며, 진공하의 건조된 상태에서는 수년간 활성을 유지한 채 보관될 뿐만 아니라, 해수중에서 48시간내에 부화되는 등의 이점등에 의해 잔류농약, 수질오염 및 해양유독물질등의 분석에 이용되고 있다.⁵⁾ 특히 부화된 brine shrimp에 독성을 나타내는 화합물들은 P388 및 KB cell등의 암세포에도 유의성있게 세포독성을 나타내어 항암제개발을 지향한 생물활성검정법으로 고등식물,⁵⁾ 생약류,^{6,7)} 및 해양생물성분^{8,9)} 등에 활용되고 있다.

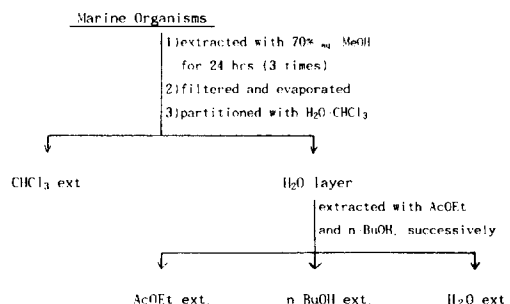
이러한 관점에서 자원의 보고로 남아있는 다양한 종류의 해양생물로부터 생물활성물질 탐색연구의 일환으로 해조류(12종류), 해면류(3종류), 강장동물(2종류), 극피동물(4종류), 연체동물(17종류) 및 원색동물(2종류)의 각각의 CHCl_3 엑스, AcOEt 엑스, n-BuOH 엑스 및 H_2O 엑스를, 선택성이 높으며 간편한 생물활성검정법으로서 보고되고 있는 brine shrimp를 이용한 세포독성시험법⁵⁾을 이용하여 세포독성을 조사하였다.

실험방법

실험재료—해조류(12종류), 해면동물(3종류), 강장동물(2종류), 극피동물(4종류), 연체동물(17종류) 및 원색동물(2종류)을 경남 충무(장도 및 필도), 진해(안골) 및 부산(동백섬 및 청사포)근해에서 채집하였다. 각 시료를 세절 후 70% aq. MeOH로서 실온하 24시간 냉침하여 얻은 엑스를 CHCl_3 과 H_2O 로 분배하여 지용성 분획(CHCl_3 엑스)과 수용성 분획을 얻었다. 그리고, 수용성 분획은 AcOEt 및 n-BuOH로서 차례로 추출하여 AcOEt, n-BuOH 및 H_2O 엑스를 조제하였다 (Scheme I).

시료의 조제—용매분획한 각 엑스를 칭량하여 증류수 혹은 10% aq. DMSO에 녹여 20 mg/ml로 만들었으며, 이것을 단계별로 희석하여 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 조절하였다.

Brine shrimp의 부화—소형수조(30×20×10 cm)에 플라스틱 칸막이를 이용하여 큰 구획 대 작



Scheme I—Extraction and fractionation of marine organisms for a test of cytotoxicity against brine shrimp.

은구획(2 : 1)의 두 구간으로 구획지은 다음 큰 구획은 전체면에 차광막을 입혀 빛을 차단하였다. 두 구획간에 물의 흐름과 함께 부화된 brine shrimp의 이동을 용이하게 하기 위하여 플라스틱칸막이에 몇개의 작은 구멍(2 mm ϕ)을 만들었다. 이렇게 만들어진 부화조에 해수를 담고 산소를 주입하면서 brine shrimp란(卵) (Supreme, Golden West Artemia, 411 East 100 South Salt Lake City, Utah 84111, USA)(50 mg)을 차광된 큰 구획에 넣고 실온에서 48시간 부화시킨 후, 작은 구획에 빛을 조사하여 부화된 굴광성의 brine shrimp를 작은 구획에 모은 다음 피펫으로 취하여 bioassay에 이용하였다.

세포독성실험—시료 20 mg/ml, 2 mg/ml 및 0.2 mg/ml 농도의 각 시료(0.15 ml)를 각각 2개의 시험관에 취하고 여기에 부화된 brine shrimp 20마리를 함유한 해수(2.85 ml)를 가하여 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 조절하였다. 각 농도군 및 대조군에 대한 24시간 후의 brine shrimp의 평균치사량을 조사하였으며, 평균치사율은 다음과 같은 Abbott식⁵⁾에 따라 대조군으로부터 보정하였다.

$$\text{Corrected \% Mortality} = \frac{\text{Sample \% Mortality} - \text{Control \% Mortality}}{100 - \text{Control \% Mortality}} \times 100$$

LC₅₀값의 결정—LC₅₀값은 대조군에 비해 brine shrimp의 50%를 치사시키는 데 필요한 각 엑스의 brine로서 Finney 등의 probit analysis법¹⁰⁾을 이용하여, Corrected % Mortality (y)대 log concentration(x)

의 liner regression관계식을 구한 다음, $y=50\%$ 일 때의 x 값을 구하고, 이 값의 antilog치를 취하여 LC_{50} 값을 계산하였다.

결과 및 고찰

1970년 이후 풍부한 해양생물로부터 항균, 항진균, 항비루스, 약리 및 항종양활성물질의 탐색연구가 행하여져, 지금까지 약 4000종 이상의 신규화합물이 보고되고 있으나 그 중 생물활성이 조사된 것은 의외로 적다.¹¹⁾ 따라서 선택성이 크며, 다루기 간편한 생물활성검정법을 확립하는 것은 의약자원개발 내지 신물질 창출이라는 관점에서 대단히 중요하다. 이와 같은 관점에서 볼때, brine shrimp를 이용한 세포독

성시험법은 세포독성물질내지 항종양성물질군을 고선택적으로 검출가능하기 때문에 이 방법을 우리나라 연안에서 채집한 해양생물유래의 항종양성화합물개발을 지향한 세포독성물질의 검색에 적용하였다. 즉 생시료를 세절한 후 70% aq. MeOH로서 냉침하여 얻은 엑스를, $CHCl_3$ 과 H_2O 로 분배하여 지용성분획($CHCl_3$ 엑스)과 수용성분획을 얻었다. 수용성분획을 다시 AcOEt 및 n -BuOH로 순차적으로 추출하여 AcOEt, n -BuOH 및 H_2O 엑스를 조제하였다. 적당한 농도로 희석된 각 엑스에 부화된 brine shrimp를 가하고, 그 영향을 조사하였다(Table I). 40종류의 해양생물 중 $CHCl_3$ 엑스에서 해삼 등 4종, AcOEt 엑스에서 지충이 등 8종, n -BuOH엑스에서 청각 등 10종 및 H_2O 엑스에서 주홍해면 등 12종에서 세포독성이

Table I—Brine shrimp bioassay results of $CHCl_3$, AcOEt, n -BuOH and H_2O extracts of marine organisms

Scientific Names	$LC_{50}(\mu g/ml)$			
	$CHCl_3$ ext.	AcOEt ext.	n -BuOH ext.	H_2O ext.
1. Marine Algae				
– Green Algae –				
<i>Codium fragile</i> (청각)	>1,000	>1,000	631	>1,000
<i>Caulerpa okamurae</i> (옥덩굴)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
– Brown Algae –				
<i>Hizikia fusiforme</i> (뚝)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Laminaria japonica</i> (참다시마)	>1,000	>1,000	745	>1,000
<i>Myagropsis myagroides</i> (외톨게모자반)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Sargassum thunbergii</i> (지충이)	>1,000	419	>1,000	>1,000
<i>Undaria pinnatifida</i> (미역)	>1,000	>1,000	178	>1,000
– Red Algae –				
<i>Gracilaria verrucosa</i> (꼬시래기)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Phachymeniopsis lanceolata</i> (개도박)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Chondria crassicaulis</i> (서실)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Hypnea charoides</i> (참가시우무)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Gelidium amansii</i> (우무가사리)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
2. Marine Sponges				
<i>Halichondria panicea</i> (회색해면)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Halichondria japonica</i> (주홍해면)	>1,000	207	>1,000	243
<i>Haliclona permollis</i> (보라해면)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
3. Coelenterates				
<i>Actinia mesembryanthmum</i> (해변 말미잘)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Aurelia aurita</i> (물해파리)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
4. Echinoderms				
<i>Stichopus japonicus</i> (해삼)	274	176	720	>1,000
<i>Asterina pectinifera</i> (별불가사리)	451	283	355	>1,000
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> (말뚝성게)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Anthocidaris crassispina</i> (보라성게)	>1,000	121	>1,000	92

Table I—Continued

Scientific Names	LC ₅₀ (µg/ml)			
	CHCl ₃ ext.	AcOEt ext.	n-BuOH ext.	H ₂ O ext.
5. Marine Molluscs				
<i>Siphonaria japonica</i> (고랑따개비)	>1,000	>1,000	>1,000	741
<i>Nordotis discus</i> (진북)	441	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Corbicula japonica</i> (일본재첩)	>1,000	622	244	182
<i>Cellana nigrolineata</i> (흑색배말)	>1,000	309	607	831
<i>Acanthchiton japonica</i> (군부)	741	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Acanthchiton defilippi</i> (털군부)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Acanthchiton rubroloneatus</i> (애기털군부)	>1,000	>1,000	>1,000	347
<i>Chlorostoma lischkei</i> (밤고둥)	>1,000	225	275	136
<i>Heminerita japonica</i> (갈고둥)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Notoacmaea schrenkii</i> (배무래기)	>1,000	>1,000	>1,000	239
<i>Thais clavigera</i> (대수리)	>1,000	>1,000	>1,000	61
<i>Japeuthria ferrea</i> (타래고둥)	>1,000	>1,000	>1,000	199
<i>Cerithideopsilla</i>				
<i>djadjariensis</i> (갯비틀이고둥)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Omphalius rutilus</i> (보말고둥)	>1,000	>1,000	263	380
<i>Scapharca broughtonii</i> (2)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Anadara broughtonii</i> (1) (피조개)	>1,000	>1,000	>1,000	207
<i>Mytilus edulis</i> (진주담치)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
6. Ascidians				
<i>Styela clava</i> (미더덕)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000
<i>Halocynthia roretzi</i> (우렁쟁이)	>1,000	>1,000	863	>1,000

Table II—The evaluation of cytotoxic frequency of marine organisms by brine shrimp bioassay

Marine organism	Numbers of sample	Bioactive samples(%)
Marine Algae	12	4(33)
Marine Sponges	3	1(33)
Coelenterates	2	0
Echinoderms	4	3(75)
Marine Molluscs	17	12(71)
Ascidians	2	1(50)

관찰되었다(LC₅₀<1000 µg/ml). 생물별로 살펴본 활성 빈도는 극피동물류가 75%, 그리고 연체동물류가 71%로 나타나, 이들 두 종류가 세포독성의 출현빈도 등에서 새로운 생물활성물질탐색에 유망한 것으로 관찰되었으며(Table II), 이들을 대상으로 활성성분의 단리, 구조결정 및 2차적 항종양활성검색 등의 구체적인 약화학적 연구를 시행하고자 한다.

결 론

항종양성화학물의 개발을 지향한 해양생물유래의 생물활성물질의 화학적 연구의 일환으로서, 해조류(12종류), 해면동물(3종류), 강장동물(2종류), 극피동물(4종류), 연체동물(17종류) 및 원색동물(2종류)의 각 용매분획을 대상으로 brine shrimp bioassay에 의한 세포독성을 검색한 결과, 엑스군별로 해삼의 CHCl₃ 엑스(LC₅₀: 274 µg/ml), 보라성게의 AcOEt 엑스(LC₅₀: 121 µg/ml), 미역의 n-BuOH 엑스(LC₅₀: 178 µg/ml) 및 대수리의 H₂O엑스(LC₅₀: 61 µg/ml)에서 가장 강력한 세포독성이 관찰되었다. 그리고 생물별로 살펴본 세포독성의 출현빈도 등에서는 극피동물 및 연체동물이 새로운 생물활성검색에 가장 유망한 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 논문은 1992년도 보건사회부 신약개발 연구지원비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다. 아울러 brine shrimp bioassay에 대해 많은 조언을 하여 주신 서울대학교 약학대학 김진웅 교수에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 安元 健編, “化學 探 海洋生物謎”, 化學增刊 121, 化學同人, 京都, 1992.
- 2) Bergmann, W. and Burke, D.C.: The nucleosides of sponges. III. Sphongothymidine and spongouridine. *J. Org. Chem.* **20**, 1501 (1955).
- 3) Rinehart, K.L., Kobayashi, J., Harbour, G.C., Gilmore, J., Mascall, M., Holt, T.G., Shield, L.S. and Lafargue, F.: Eudistomins A-Q, β -carboline from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3378 (1987).
- 4) Rinehart, K.L., Kishore, V., Bible, K.C., Sakai, R., Sullins, D.W. and Li, K.N.: Didemnins and tunichlorin : novel natural products from the marine tunicate *Trididemnum solidum*. *J. Nat. Prod.* **51**, 1 (1988).
- 5) Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and McLaughlin, J.L.: Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica* **45**, 31 (1982) and references cited therein.
- 6) Lee, J.S. and Kim, J.: Screening of biological activity of crude drugs using brine shrimp bioassay. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**, 100 (1990).
- 7) Kim, Y.C. and Kim, J.H.: Studies on the brine shrimp toxicity of crude drugs(I). *Kor. J. Pharmacogn.* **24**, 263 (1993).
- 8) Aiello, A., Fattorusso, E. and Menna, M.: Four new bioactive polyhydroxylated sterols from the black coral *Antipathes subpinnata*. *J. Nat. Prod.* **55**, 321 (1992).
- 9) Albrizio, S., Fattorusso, E., Magno, S. and Mangoni, A.: Linear diterpenes from the Caribbean sponge *Myrmekioderma styx*. *J. Nat. Prod.* **55**, 1287 (1992).
- 10) Finney, D.J.: “Probit Analysis”, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1971.
- 11) Faulkner, D.J.: Marine Natural Products. *Natural Product Reports* **9**, 323 (1992) and references cited therein.