

수산생물자원 추출물의 과산화지질생성의 억제효과

박종철*, 최종원¹

순천대학교 한약자원학과, ¹경성대학교 약학과

Screening of Marine Natural Products on Inhibitory Effect of the Formation of Lipid Peroxidation

Jong-Cheol Park* and Jong-Won Choi¹

Department of Oriental Medicine Resources, Suncheon National University,
Suncheon 540-742, Korea; and

¹College of Pharmacy, Kyongsung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract - The methanolic extracts of some marine natural products were tested for investigating the effects on the formation of lipid peroxide and the activities of free radical generating enzymes. The methanolic extracts of *Styela clava*, *Ecklonia stolonifera*, *Pachymeniopsis elliptica* and *Hypnea charoides* which decreased the formation of lipid peroxide inhibited the activity of xanthine oxidase about 41, 20, 20 and 21% by adding 100 µg/ml of each methanolic extracts, respectively. However, the four extracts didn't inhibit the activity of aldehyde oxidase.

Key words - *Styela plicata*; *Ecklonia stolonifera*; *Pachymeniopsis elliptica*; *Hypnea charoides*; lipid peroxide; xanthine oxidase; marine natural product.

바다생물을 식용으로 하였던 것은 아마 인류의 탄생과 함께 시작되었다고 할 수 있으며 인류의 역사와 함께 그 대상은 근해에서 깊은 바다에 생식하는 생물로 넓게 퍼져 갔다. 그러나 물이라는 매체의 방해에 의해 해양생물의 식용이외의 이용, 예를 들면, 의약자원으로서의 이용은 제한되어 왔다. 1970년대가 되어서 다이빙의 보급, 해양개발의 발전 혹은 새로운 골격과 작용기전을 가진 의약품 개발의 필요성 등의 요인이 중요하게 되고, 미개척으로 풍부하고 다채로운 해양생물의 항균, 강심작용 등 의약상 중요한 활성을 가진 물질을 탐구하는 분야가 활성화되었다. 그 결과 해조, 해변, 연체 및 원색동물로부터 지금까지 3,000이 넘는 신규화합물이 얻어졌으며 이중 항암제, 항염증제 등의 개발이 임박한 화합물

들도 포함되어 있다.¹⁾

수산 천연물은 육상생물에 없는 특유의 대사양식을 가지고 육상의 천연자원식물과는 다른 새로운 생물활성물질이 기대됨에 따라 앞으로는 신규 천연물의 탐색 가능성이 해양 천연물에서 보다 관심이 높으며 이에 대한 연구도 활성화되어 가고 있는 추세이다. 근래 대사성 질환의 예방 및 치료제 개발 연구의 필요성이 대두되고 있으며 특히 부작용이 적은 천연자원으로부터 새로운 의약품 개발이 주목을 받고 있다. 저자 등은 수산 생물자원의 활성연구 일환으로서 17종의 해조류 및 어패류 추출물에 대한 성인병을 포함한 노인성 질환 등의 중요한 유발 인자로 지목되고 있는 free radical의 생성과정에 관여하는 효소의 활성과 과산화 지질의 생성에 미치는 영향을 관찰하였다.

*교신저자 : Fax 0661-52-8551

재료 및 방법

실험 재료 - 수산생물자원으로 사용한 재료는 17종의 해조류 및 어패류로서, *Codium fragile* (청각), *Corbicula leana* (참재첩), *Ecklonia stolonifera* (곰피), *Enteromorpha linza* (잎파래), *Gelidium amansii* (우뭇가사리), *Gloiopeltis furcata* (불등풀가사리), *Gloiopeltis tenax* (세모가사리), *Gymnogongrus flabelliformis* (부챗살), *Hizikia fusiformis* (툇), *Hypnea charoides* (참가시우무), *Larminaria japonica* (다시마), *Mytilus edulis* (진주담치), *Pachymeniopsis elliptica* (참도박), *Sargassum piluliferum* (구슬모자반), *Styela plicata* (오만둥이), *Trachypenaeus curvirostris* (꽃새우), *Undaria pinnatifida* (미역)이며, 이들 재료를 각각 MeOH을 가하여 실온에서 냉침한 후 농축하여 추출물을 얻었다.

실험 동물 - 일정한 조건으로 사육한 Sprague-Dawley계 숫쥐(200±50 g)를 사용하여 streptozotocin (50 mg/kg, citrate buffer pH 4.5)을 꼬리 정맥주사하고 1주일 후 혈당을 측정하여 혈당치가 300mg/dl인 동물을 사용하였으며 실험전 24시간 물만 주고 절식하였다.

과산화지질 함량 측정 - 실험동물을 CO₂ gas로 마취시킨후 복부 정중선을 따라 절개하여 복부대동맥에서 채혈하여 실험사시켰다. 간을 병냉의 생리식염수로 관류시켜 조직내 혈액을 제거하고 적출하여 여지로 혈액 및 기타 이물을 제거하고 평량하였다. Ohkawa 등²⁾의 방법에 준하여 간 조직 1g당 9배량의 생리식염수를 가해 마쇄하고, 이 마쇄액에 8.1% sodium dodecyl sulfate 0.2 ml, 20% acetate buffer (pH 3.5), 0.8% thiobarbituric acid 및 시료를 가한 후 95 °C에서 1시간동안 반응시켰다. 실온에서 냉각시켜 n-BuOH:pyridine (15:1)을 첨가하여 15분간 원심분리한 후 홍색의 n-BuOH-pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정한 다음 표준곡선에서 그 함량을 간조직 1g당 malondialdehyde nmole 수로 표시하였다.

효소원의 조제 - 실험동물을 CO₂ gas로 마취하고 복부 정중선을 따라 개복한 후, 복부 대동맥으로부터

혈액을 채취하고 생리식염수로 관류시킨 간장을 적출하여 간조직 1g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (K.P. buffer, pH 7.5)를 가하여 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 600×g, 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상등액을 얻고 다시 1시간 동안 초원심분리하여 cytosolic fraction을 분리하였다. 이 분획을 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase 활성 측정의 효소원으로 사용하였으며 모든 조작은 0-4 °C에서 행하였다.

Xanthine oxidase 활성 측정 - Stripe와 Della Corte의 방법⁴⁾에 준하여 K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine sodium 60 μM 및 효소원을 첨가하여 37 °C에서 5분간 반응시킨 다음 20% trichloroacetic acid (TCA)를 가하여 단백질을 제거시키고 원심분리한 후 상등액을 292 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성하는 uric acid의 양을 nmole로 나타내었다.

Aldehyde oxidase 활성 측정 - Rajagopalan 등⁴⁾의 방법에 의해 K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 N-methylnicotinamide 1.5 μM과 효소액을 첨가하여 37 °C에서 20분간 반응시킨 다음 20% TCA를 가해 반응을 종료시켰다. 반응 종료후 생성된 pyridone을 파장 300 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 pyridone의 양을 nmole로 나타내었다.

단백질의 정량 - Lowry 등⁵⁾의 방법에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, Fr. IV)을 표준품으로 하여 측정하였으며 통계처리는 Duncan's new multiple range test를 이용하였다.

결과 및 고찰

수산생물자원중 채집한 17종의 MeOH추출물을 얻고, 추출물을 대상으로 불포화 지방산의 과산화 반응에 미치는 영향을 관찰할 때, *Ecklonia stolonifera*, *Styela plicata*, *Pachymeniopsis elliptica*, *Hypnea charoides* 4종 추출물의 1mg/ml농도에서 시험관내 과산화 지질생성의 작용이 각각 15%, 15%, 14% 및 17% 억제됨을 관찰할수 있

Table I. Effect of methanolic extract from marine natural products on the hepatic lipid peroxidation in rats treated with streptozotocin

Treatment	mg/ml	Malondialdehyde nmoles/g of tissue	Inhibition %	Treatment	mg/ml	Malondialdehyde nmoles/g of tissue	Inhibition %
Control	0	26.8±4.50 ^a		<i>fusiformis</i>	10 ⁻¹	28.9±4.84	
<i>Codium fragile</i>	10 ⁻²	26.9±4.81 ^{NS}		1	27.1±4.31		
	10 ⁻¹	26.5±4.54		<i>Hypnea</i>	10 ⁻²	24.6±4.15 ^a	8
<i>Corbicula</i>	1	25.8±4.12		<i>charoides</i>	10 ⁻¹	24.1±4.06 ^{a,b}	10
	10 ⁻²	28.1±4.71 ^{NS}		1	22.2±3.73 ^{a,b}	17	
<i>leana</i>	10 ⁻¹	27.6±4.63		<i>Laminaria</i>	10 ⁻²	26.5±4.45 ^{NS}	
	1	26.3±4.40		<i>japonica</i>	10 ⁻¹	25.5±4.25	
<i>Ecklonia</i>	10 ⁻²	25.7±4.29 ^a	4	1	25.3±4.27		
<i>stolonifera</i>	10 ⁻¹	24.9±4.20 ^a	7	<i>Mytilus edulis</i>	10 ⁻²	29.5±4.93 ^{NS}	
	1	22.8±3.81 ^{a,b}	15	10 ⁻¹	28.9±4.84		
<i>Enteromorpha</i>	10 ⁻²	27.3±4.59 ^{NS}		1	27.8±5.81		
	10 ⁻¹	27.6±4.63		<i>Pachymeni-</i>	10 ⁻²	25.0±4.25 ^a	7
<i>linza</i>	1	26.1±3.47		<i>opsis elliptica</i>	10 ⁻¹	23.9±3.97 ^{a,b}	11
	10 ⁻²	26.1±4.37 ^{NS}		1	23.0±3.86 ^{a,b}	14	
<i>Gelidium</i>	10 ⁻¹	27.9±5.69		<i>Sargassum</i>	10 ⁻²	26.3±4.40 ^{NS}	
	1	25.7±4.34		<i>piluliferum</i>	10 ⁻¹	27.3±4.44	
<i>Gloiopeltis</i>	10 ⁻²	27.2±4.59 ^{NS}		1	28.1±3.77		
	10 ⁻¹	28.2±4.69		<i>Styela plicata</i>	10 ⁻²	25.5±4.25 ^a	5
<i>furcata</i>	1	27.4±4.62		10 ⁻¹	24.6±4.15 ^{a,b}	8	
	10 ⁻²	28.4±4.79 ^{NS}		1	22.9±2.95 ^{a,b}	15	
<i>Gloiopeltis</i>	10 ⁻¹	28.1±4.76		<i>Trachypenaeus</i>	10 ⁻²	26.3±4.40 ^{NS}	
	1	27.6±4.63		<i>curvirostris</i>	10 ⁻¹	26.0±4.36	
<i>Gymnogongrus</i>	10 ⁻²	25.6±3.46 ^{NS}		1	25.5±4.25		
	10 ⁻¹	27.4±4.35		<i>Undaria</i>	10 ⁻²	27.9±4.70 ^{NS}	
<i>flabelliformis</i>	1	27.2±4.38		<i>pinnatifida</i>	10 ⁻¹	27.5±5.55	
	10 ⁻²	28.2±4.73 ^{NS}		1	26.0±3.47		

The values are mean±S.D. of five replications. ^{a,b}Means sharing the same superscript letter are not significantly different from control (p<0.05).

N.S.: not significant.

있으며 (Table I), 그 이상의 농도를 첨가하였을 때는 1 mg/ml 첨가보다 지질과산화의 생성이 현저히 억제되었다.⁶⁾ 과산화 지질의 생성은 병태생리현상이나 조직손상 정도를 나타내는 지표⁷⁾로 활용되고 있는 점을 고려할 때 4종 추출물에서 나타나는 과산화 지질의 생성을 억제하는 항산화작용의 약리작용은 난치성 성인병 치료효과가 있을 것으로 사료된다. 생체막 구성성분인 인지질질의 불포화 지방산은 활성 산소종과 같은 free radical에 의해 과산화 반응이 개시되며 또한 연쇄적으로 진행된다.⁸⁾ 그러므로 free radical에 의한 과산화 반응은 세포막의 투과성을 항진시킬 뿐만 아니라, 전반적인 세포독성을 초래하여 노화현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유도하며 발암과정에도 관여할 것으로

생각되고 있다.⁹⁻¹¹⁾ 이러한 지질 과산화의 생성에 관여하는 free radical의 생성계는 생체에서 microsomal oxidation system과 non-microsomal oxidation system으로 구별하고 있는데 본 실험에서는 4종의 지질 과산화 생성 억제효과 기전을 규명할 목적으로, cytosol분획에 존재하며 free radical의 생성계에 관여하는 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase활성에 대한 영향을 관찰하였다. Xanthine oxidase의 활성에는 *Ecklonia stolonifera*, *Styela plicata*, *Pachymeniopsis elliptica*, *Hypnea charoides* 4종 추출물의 100 µg/ml 농도에서 20%, 41%, 20% 및 21%의 억제율을 나타내었으며, 1 mg/ml에서는 25%, 50%, 33% 및 47%의 억제효과가 관

Table II. Effect of methanolic extract from marine natural products on xanthine oxidase activity in rats treated with streptozotocin

Treatment	mg/ml	Uric acid nmole/mg protein/min	Inhibition %
Control	0	3.17±0.19 ^a	
<i>Styela plicata</i>	10 ⁻⁴	3.10±0.18 ^{a,b}	5
	10 ⁻³	2.91±0.17 ^b	8
	10 ⁻²	2.12±0.13 ^c	33
	10 ⁻¹	1.87±0.11 ^d	41
	1	1.59±0.09 ^e	50
<i>Ecklonia stolonifera</i>	10 ⁻⁴	3.01±0.18 ^{a,b}	2
	10 ⁻³	2.85±0.18 ^{a,b}	10
<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	10 ⁻²	2.91±0.17 ^b	8
	10 ⁻¹	2.53±0.15 ^c	20
	1	2.38±0.14 ^c	25
	10 ⁻⁴	3.13±0.20 ^a	1
	10 ⁻³	3.03±0.18 ^a	4
<i>Hypnea charoides</i>	10 ⁻²	2.63±0.17 ^b	17
	10 ⁻¹	2.53±0.15 ^b	20
	1	2.11±0.13 ^c	33
	10 ⁻⁴	3.00±0.18 ^a	5
<i>Hypnea charoides</i>	10 ⁻³	2.73±0.16 ^b	14
	10 ⁻²	2.63±0.16 ^b	17
	10 ⁻¹	2.50±0.15 ^b	21
	1	1.69±0.96 ^c	47

The values are mean±S.D. of five replications. ^{a,b,c,d,e}Means sharing the same superscript letter are not significantly different from control (p<0.05).

찰되었다(Table II). 그러나 4종 추출물은 aldehyde oxidase활성에는 별다른 영향을 주지 못하였다(Table III).

Xanthine oxidase는 최초로 우유에서 그 존재가 확인되었으며 동물조직에서는 간 및 소장조직의 세포질에도 널리 분포되어 있고, 최근에 와서는 type D와 type O의 두가지 형태로 존재하고 있는 것으로 알려져있다.¹²⁾ 정상적인 상태의 생체내에서는 type D로 존재하고 있으나 병적상태가 진행되거나 과잉의 단백분해 효소에 의한 가수분해를 받을 경우 type O로 형전환이 일어나는 것이 동물실험에서 관찰되었다.^{13,14)} 한편 전환된 xanthine oxidase가 superoxide anion생성에 관여할 것이라는 보고^{15,16)}가 조직손상 실험에서 조직병변의 직접적인 원인은 활성산소나 이들에 의해서 생성되는 free radical일 것이라는 가능성을 제시하며 이 효소의 생체내 역할에 대한 많은 관심을 갖게 하였다.

Table III. Effect of methanolic extract from marine natural products on aldehyde oxidase activity in rats treated with streptozotocin

Treatment	mg/ml	Pyridone nmole/mg protein/min
Control	0	1.93±0.17 ^{NS}
<i>Ecklonia stolonifera</i>	10 ⁻⁴	1.94±0.19
	10 ⁻³	1.92±0.21
	10 ⁻²	1.86±0.15
	10 ⁻¹	1.95±0.17
	1	1.99±0.18
<i>Styela plicata</i>	10 ⁻⁴	1.89±0.16
	10 ⁻³	1.84±0.16
	10 ⁻²	1.73±0.14
	10 ⁻¹	1.96±0.17
	1	1.80±0.16
<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	10 ⁻⁴	1.83±0.16
	10 ⁻³	2.00±0.18
	10 ⁻²	1.96±0.17
	10 ⁻¹	1.84±0.11
	1	1.85±0.16
<i>Hypnea charoides</i>	10 ⁻⁴	1.99±0.21
	10 ⁻³	1.98±0.14
	10 ⁻²	1.86±0.10
	10 ⁻¹	1.87±0.16
	1	1.80±0.22

The values are mean±S.D. of five replications. N.S.: not significant.

즉 산소결여 상태의 조직에 산소를 제공급할 때 형 전환된 xanthine oxidase에 의해 생성된 superoxide anion, hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical과 같은 oxygen-derived free radical이 세포손상의 일차적인 원인일 것이라는 연구보고¹⁷⁻¹⁹⁾와 연관하여 볼 때, 본 실험에서의 *Ecklonia stolonifera*, *Styela plicata*, *Pachymeniopsis elliptica*, *Hypnea charoides* 4종 재료에 대한 지질과산화의 억제현상은 xanthine oxidase의 활성을 선택적으로 억제하므로서 나타나는 결과로 생각되나 앞으로 *in vivo* 실험을 병행하여서 직접적인 작용인지 아니면 다른 기전에 의하여 나타나는지 여부에 대한 연구를 계속할 예정이다.

결 론

수산생물차원의 17종 MeOH추출물을 대상으로

불포화 지방산의 과산화 반응에 미치는 영향을 관찰하였을 때 *Ecklonia stolonifera*, *Styela plicata*, *Pachymeniopsis elliptica*, *Hypnea charoides* 추출물은 시험관내 과산화 지질생성을 억제하였다. 이들 추출물의 지질 과산화 생성 억제 효과의 기전연구를 위한 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase활성 영향에서 xanthine oxidase 활성에는 시험관내에서 용량의존성에 의해 억제되었으나 aldehyde oxidase활성에는 별다른 영향이 없었다. 따라서 이들의 지질과산화 억제현상은 xanthine oxidase의 활성을 선택적으로 억제하므로써 나타나는 결과로 사료된다.

사 사

이 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비(해양수산과학분야) 지원에 의한 결과의 일부이며, 해조류를 동정하여 주신 전남대학교 해양학과 김광용 교수님께 감사드립니다.

인용 문헌

1. 代谷伸宏 (1990) 수산식품중의 약효성분. 식품공업 33: 22-27.
2. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. (1979) Assay for lipid peroxide in animal tissues by thionbarbituric acid reaction. *J. Biol. Chem.*, 95: 351-358.
3. Stripe, F. and Della Corte, E. (1969) The reaction of rat liver xanthine oxidase: Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O). *J. Biol. Chem.*, 244: 3855-3863.
4. Rajagopalan, K. V., Fridovich, I. and Handler, P. (1962) Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 237: 922-928.
5. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
6. Unpublished data
7. Tappel, A. (1975) Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes. In Trump, B.F. and Arstila A. (eds.), Pathology of cell Membranes, Vol. J, 145. Academic Press, N. Y.
8. Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
9. Baccaro, C., Bennardione, F., Dini, C., Francini, F., Giotti, A., Mutuci, R. and Munutii, P. (1986) Cardiac hypoxia and subsequent reoxygenation-sensitivity to L-arginine methylester. *Br. J. Pharmac.* 87: 449-456.
10. Kehrer, J.P., Piper, H. M. and Sies, H. (1987) Xanthine oxidase is not responsible for reoxygenation injury in isolated-perfused rat heart. *Free Radic. Res. Commun.* 3: 69-78.
11. Bindoli, A., Cavallini, L., Ringobello, M. P., Coassin, M. and Dilisa, F. (1988) Modification of the xanthine-converting enzyme of reperfused rat heart during ischemia and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 4: 163-167.
12. Battelli, M.G., Dalla Corte, E. and Stripe, F. (1972) Xanthine oxidase type D in the intestine and other organs of the rat. *Biochem. J.* 126: 747-749.
13. Tubaro, E., Banei, F., Lotti, B. and Croce, C. (1976) Xanthine oxidase activation in animal liver during infectious processes. *Arzneim Forsch. (Drug Res.)*, 26: 2185-2186.
14. Tubaro, E., Lotti, B., Croce, C., Caballo, G. and Borelli, G. (1980) Liver xanthine oxidase increase in mice in three pathological models. *Biochem. Pharmacol.* 29: 1939-1943.
15. McCord, J.M. and Roys, R.S. (1980) The pathophysiology of superoxide: Roles in inflammation-Superoxide dependent activation of neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sca.* 77: 1159-1163.
16. McCord, J.M. and Roy, R.S. (1982) The pathophysiology of superoxide: Roles in inflammation and ischemia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60: 1346-1352.
17. Grum, C.M., Ragsdale, R.A., Ketai, L.H. and Schlafer, M. (1986) Absence of xanthine oxidase or xanthine dehydrogenase in the rabbit myocardium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141: 1104-1108.
18. Grover, A.K. and Samson, S.E. (1987) Impurities in commercial xanthine oxidase inhibit Ca-pump and interfere in contractility of pig coronary artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143: 575-581.

19. Kuppusamy, P. and Zweier, J.I. (1989) 9884.
Characterization of free radical generation by
xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 264 : 9880-

(1996년 5월 13일 접수)