

국내산 7종 다슬기 추출물의 생리활성 특성 비교

김연계*·문호성·이문희·박미주·임치원·박희연·박진일·윤호동·김대희¹
국립수산과학원 식품안전연구단, ¹내수면양식연구소

Biological Activities of Seven Melania Snails in Korea

Yeon-Kye Kim*, Ho-Sung Moon, Moon-Hee Lee, Mi-Ju Park, Chi-Won Lim,
Hee-Yeon Park, Jin-Il Park, Ho-Dong Yoon and Dae-Hee Kim¹

Food and Safety Research Center,

¹Inland Aquaculture Research Institute

National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea

This study was conducted to compare the biological activities of 7 melania snails from the family Pleuroceridae (*Semisulcospira coreana*, *Koreanomelania nodifila*, *Semisulcospira forticosta*, *Koreoleptoxis globus ovalis*, *Semisulcospira libertina*, *Semisulcospira tegulata* and *Semisulcospira gottschei*) in Korea. Among the 7 species, *S. coreana*, *Korean. nodifila*, *S. forticosta* and *S. gottschei* showed over 80% cytotoxicities on three cancer cell lines (SNU-1, A549 and Hep 3B) compared to the non-treatment, whereas *S. libertina* and *S. tegulata* showed almost no growth inhibition activities on the same cancer cell lines. In relation to ACE inhibition activity, only *S. coreana*, *Korean. nodifila*, and *S. forticosta* showed over 60% ACE inhibition activities, whereas other melania snails exhibited inhibition activities of lower than 25%. DPPH radical scavenging activities were also determined, and used to categories melania snails into three groups based on Duncan's multiple range test at $P < 0.05$. The amount of TNF- α produced by in vitro mouse peritoneal macrophage was determined according to bioactivity on L-929 cells. Three melania snails, *S. coreana*, *Korean. nodifila* and *S. gottschei*, exhibited 95.2%, 89.7% and 93.7% cell death(%) on L-929 cells, respectively. Glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibitory activity was also obtained in the extract of *S. coreana* (31.9%) and *Korean. nodifila* (28.1%), showing that these extracts can be used as supplemental dietary health foods. In conclusion, we believe that the extracts of melania snails should be given due consideration in functional health food development.

Key words: Melania snail, ACE inhibition activity, DPPH radical, TNF- α , Cytotoxicity

서 론

우리가 한국에서 흔히 부르는 다슬기는 다슬기과 (Pleuroceridae)에 속하는 담수패류의 일종으로 분류 및 계통유연관계에 대한 논란의 여지가 아직 남아있지만 총 3속 9종 (*Semisulcospira coreana* (참다슬기), *Koreanomelania nodifila* (염주알다슬기), *Semisulcospira forticosta* (주름다슬기), *Koreoleptoxis globus ovalis* (띠구슬알다슬기), *Semisulcospira libertina* (다슬기), *Semisulcospira tegulata* (줄주름다슬기), *Semisulcospira gottschei* (꽃체다슬기), *Koreanomelania paucincta* (주머니알다슬기), *Koreoleptoxis globus* (구슬알다슬기))으로 대표되고 있다 (Choi and Yoon, 1997; Kwon et al., 2001; Martens, 1905). 다슬기는 자라는 지역의 환경에 따라 모양과 형태의 변화가 매우 심하며, 대부분 난생이지만 *Koreanomelania*속에 속하는 *Korean. nodifila* (염주알다슬기)와 *Korean. paucincta* (주머니알다슬기) 그리고 *Koreoleptoxis*속에 속하는 *Koreol. globus ovalis* (띠구슬알다슬기) 및 *Koreol. globus* (구슬알다슬기)와 같은 난생종도 보고되어 있다 (Kwon, 1990; Nakano and Izawa, 1996; Chang et al., 2000).

다슬기는 하천이나 호수 등지에서 흔히 볼 수 있는 고등류로서 진흙 땅보다는 모래와 자갈이 많은 곳에 더 많이 서식한다 (Davis, 1969). 고갱이, 고둥, 고디, 대사리, 올갱이 및 올뱅이라고도 불리는 다슬기는 한여름 시냇가에서 손쉽게 채취할 수 있는 패류이기 때문에 일찍부터 우리나라에서는 살짝 삶아서 가식부를 그대로 식용하기도 하고, 찜, 탕 또는 초무침 등으로 조리하여 식용하거나 미역국 등에 넣어 맛을 내는데 이용하여 왔으며, 빈혈증 치료에 좋다 하여 민간요법제로도 널리 이용되어 왔다 (Kim et al., 1985).

동의보감 및 본초강목에서 볼 수 있는 다슬기의 한방학적 효능에 대해서는 예로부터 간염, 간경화, 지방간 등의 치료 및 개선에 이용되어 왔으며, 숙취해소와 신경통 완화, 빈혈증세 완화, 골다공증 예방과 치료에 이용되어 왔다고 알려져 있다. 또한 성질이 차고 열독과 갈증해소에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 무지방의 고단백질 건강식품으로써 인식되어 현재도 많이 이용되고 있다 (Kim, 1999; Shim et al., 1994). 그 밖에도, Lee et al. (2005)은 사염화탄소에 의해 유도된 흰쥐의 간손상에 미치는 보호효과가 다슬기에 존재한다는 것을 보고하였으며, Cha and Baik (1999)은 다슬기 추출물에 십이지장의 근수축활성물질 및 혈관이완활성물질이 존재한다고 보

*Corresponding author: yeonkyekim@korea.kr

고하였다.

이와 같은 보고와 연계하여 다슬기 추출물을 활용한 다양한 기능성 제품이 유통되고 소비량도 계속적으로 증가하고 있으나, 다슬기의 생리활성에 관한 최근의 연구는 거의 없는 실정이다. 또한 7종의 다슬기가 때로는 개체별 구분 없이 유통되기도 하는 실정이다. 따라서 국내에서 서식하는 다슬기 각 종에 대한 생리활성 평가 비교는 절실히 요구되는 실정이다. 이에 본 연구에서는 우리나라에 서식하는 7종 다슬기 (*S. coreana*, *Korean. nodifila*, *S. forticosta*, *Koreol. globus ovalis*, *S. libertina*, *S. tegulata*, *S. gottschei*)를 각 지역에서 채취하여 각각의 생리활성 (항암활성, 항산화능, ACE 저해활성, TNF- α 생산능, G-6-P dehydrogenase 저해활성, 항균활성)을 비교 평가하였다. 본 연구에서 얻어진 7종 다슬기의 생리활성평가 결과는 다슬기 종간의 대사산물 차이를 예측해 주며, 나아가 건강기능성 식품 소재의 개발을 위한 기초 자료로 활용 될 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 실험에서 이용한 7종의 다슬기 (*S. coreana* (참다슬기), *Korean. nodifila* (염주알다슬기), *S. forticosta* (주름다슬기), *Koreol. globus ovalis* (띠구슬다슬기), *S. libertina* (다슬기), *S. tegulata* (좁주름다슬기), *S. gottschei* (꽃체다슬기))는 우리나라 각 지역의 하천에서 서식하는 것을 채취하여 사용하였다. 즉, 춘천지역으로부터 *S. coreana*와 *S. gottschei*, 연천지역에서 *Korean. nodifila*와 *Koreol. globus ovalis*, 문경지역에서 *S. forticosta*와 *S. tegulata* 그리고 청송지역에서 *S. libertina*와 같이 각 지역에서 다량으로 채취 가능한 다슬기를 이용하였다 (Table 1).

Table 1. Seven species of melania snails used in this experiment and its extraction yield (%)

MBRDB code*	Classification	Date	Collection sites	Latitude/ Longitude	Extraction Yield (%)
RG071-020	<i>S. coreana</i>	Nov. 2007	Chuncheon Gangwon	37°40' / 127°50'	10.9
UC071-010	<i>Korean. nodifila</i>	Nov. 2007	Yeoncheon Gyeonggi	38°09' / 127°02'	7.9
LP071-020	<i>S. forticosta</i>	Nov. 2007	Mungyeong Gyeongbuk	36°32' / 128°15'	10.6
VD071-010	<i>Koreol. globus ovalis</i>	Nov. 2007	Yeoncheon Gyeonggi	38°11' / 127°15'	4.8
KP071-010	<i>S. libertina</i>	Nov. 2007	Cheongsong Gyeongbuk	36°29' / 129°20'	8.2
LP071-010	<i>S. tegulata</i>	Nov. 2007	Mungyeong Gyeongbuk	36°32' / 128°15'	6.1
RG071-010	<i>S. gottschei</i>	Nov. 2007	Chuncheon Gangwon	37°40' / 127°50'	6.5

* Each melania snail has their own code to identify and preserve the biological activity data in Marine Bioactive Resource Database(MBRDB; <http://portal.nfrdi.re.kr/mbrdb>).

각 다슬기 추출물의 생리활성평가를 위한 위암세포 (SNU-1), 폐암세포 (A549) 및 간암세포 (Hep 3B) 그리고 TNF- α 유도활성평가를 위한 L-929 섬유아세포는 한국세포주은행 (<http://cellbank.snu.ac.kr/>)에서 분양을 받아 사용하였다. 실험에 사용한 세포주는 10% FBS를 함유하는 RPMI1640 배지를 이용하여 37°C incubator (5% CO₂)에서 배양하였다. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P-D)의 저해활성평가에 사용한 효소원은 rat (Sprague Dawley, 5주령)의 간장을 적출하여 Markwell et al. (1973)의 방법에 따라 처리한 후 사용하였다. Angiotensin converting enzyme (ACE), N-hippuryl-histidyl-L-leucine (HHL), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), tumor necrosis factor- α (TNF- α), 6-phosphogluconic dehydrogenase (6-P-D), glucose-6-phosphate (G-6-D), β -nicotineamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), acetyl CoA, malonyl CoA 그리고 sodium dodecyl sulfate (SDS) 등의 시약은 Sigma-Aldrich Inc. (USA)의 제품을 사용하였으며, 그 외에 본 연구에서 사용한 모든 시약은 표준 방법에서 요구되는 표준시약을 특별한 정제과정 없이 사용하였다.

추출물 조제 및 수율

채취한 다슬기는 껍질을 깨어 가식부만 동결건조하여 사용하였다. 다슬기 추출물의 조제를 위해서는 각각의 다슬기 동결건조 시료 1 g에 10 mL의 메탄올을 부어 실온에서 3시간 동안 3회 반복하여 추출하여 automatic multi parallel sample evaporation system (Büchi syncore)을 이용하여 증발시킨 후 추출 수율을 확인하였으며 (Table 1), 증발건조 시료는 다시 메탄올로 용해하여 농도 (100 mg/mL)를 맞춘 후에 사용하였다. 각 추출물은 실험에 따라 적당히 희석한 후에 사용하였으며 각 단계에서 침전물이 발생할 경우 원심분리로 침전시킨 후에 사용하였다.

XTT assay

각 다슬기 추출물의 생리활성평가는 현재 수산과학원이 운영 중인 수산생물활성소재D/B (MBRDB: <http://portal.nfrdi.re.kr/mbrdb>)에서 이용하고 있는 아래의 6가지 방법을 사용하였다. 즉, 다슬기 추출물에 의한 암세포 독성평가는 한국인의 다발성 암세포 중에 하나인 위암세포 (SNU-1), 폐암세포 (A549) 및 간암세포 (Hep 3B)에 대한 XTT assay법 (Boehringer Mannheim, Cell Proliferation Kit II (XTT))을 이용하여 실시하였다. XTT assay는 생존 암세포의 미토콘드리아 내에 존재하는 dehydrogenase의 효소작용에 의해 황색의 수용성물질인 XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrasolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate)가 환원되어 노랑색을 형성하는 원리를 이용하는 실험으로, 생성되는 수용성 formazan salt의 생성 정도를 흡광도로 측정함으로써 암세포 독성을 갖는 물질의 암세포에 대한 사멸 또는 증식억제 정도를 결정하여 측정하였다. 배양된 각 암세포주는 5×10³ cells/well 와 1×10⁴ cells/well의 2종류 농도로 96-well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하면서 생성되는 formazan의 양을 ELISA plate reader (Bio-Tek, USA)

를 이용하여 490nm에서 측정하였다. 이때 사용한 다슬기 추출물 시료는 최종농도 0.2 mg/well, 0.1 mg/well 및 0.01 mg/well가 되도록 첨가하여 활성의 변화를 시간별로 측정하였으며, 얻어지는 흡광도 변화 값 중 7시간 때의 값을 이용하여 cell cytotoxicity(%)로 나타냈다.

$$\text{Cell cytotoxicity (\%)} = [(OD_{7hr \text{ 무처리}} - OD_{7hr \text{ sample}}) / OD_{7hr \text{ 무처리}}] \times 100$$

ACE 활성저해 평가

각 다슬기 추출물이 갖는 angiotensin converting enzyme (ACE)의 저해활성은 Cushman and Cheung (1971)의 방법에 따라 실시하였다. 즉 효소 반응을 위한 기질은 5 mM의 HHL (*N*-hippuryl-histidyl-L-leucine)을 300 mM의 NaCl이 함유된 100 mM sodium borate buffer (pH8.3)에 녹여 사용하였으며, 여기에 100 mU/mL의 ACE를 첨가하여 37°C에서 30분간 생성되는 hippuric acid의 양을 시간 별로 측정하여 기울기 (slope)값으로 표시하였다. 각 반응단계에서의 다슬기 추출물은 0-20 mg/mL로 희석하여 효소 반응액에 첨가하였으며, 효소 반응액에 포함된 hippuric acid는 ethyl acetate를 이용하여 분획하고 ethyl acetate를 증발시킨 후 증류수에 녹여 그 생산량을 측정하였다. Inhibition (%)는 다음과 같이 측정하였다.

$$\text{Inhibitor (\%)} = [(slope A - slope B) / slope A] \times 100$$

Slope A는 다슬기 추출물을 함유하지 않은 경우에 대한 반응속도, slope B는 다슬기 추출물을 함유하는 경우의 반응속도를 나타낸다.

DPPH radical 소거능 평가

DPPH radical 소거능은 Blies (1958)의 방법에 따라 실시하였으며, 전자공여능 (electron donating ability; EDA (%))으로 나타냈다. 즉 앞의 제조방법에 따라 제조한 다슬기 메탄올 추출물의 8 mg/mL, 4 mg/mL, 0.4 mg/mL 농도가 DPPH radical에 전자를 공여함으로써 radical을 소거하는 효과를 518 nm에서 측정하여 나타냈다. 즉 각 반응은 0.4 mM DPPH 용액 0.15 mL에 실험 농도로 희석한 시료 0.1 mL를 포함하며, 37°C에서 30분간 반응시킨 후 518 nm에서 ELISA plate reader (Bio-Tek, USA)을 이용하여 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성도는 기존의 항산화제로 알려진 caffeic acid를 positive control로 하였으며, 시료에 의하여 얻어진 흡광도의 감소치를 DPPH radical 소거활성으로 나타냈다.

$$\text{EDA (electron donating activity, \%)} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$$

A_{blank} 는 다슬기 추출물을 함유하지 않은 경우 즉 control에 대한 radical 소거능을 나타내며, A_{sample} 은 위의 반응에 다슬기 추출물을 함유하는 경우의 radical 소거능을 나타낸다.

TNF- α 유도 평가

면역계 조절활성 평가를 위한 TNF- α 유도 실험은 마우스 복강내 macrophage에 의한 TNF- α 생성량을 in vitro L-929 세포주의 사멸률을 측정함으로써 실시하였다 (Baarsch et al., 1991; Flick and Gifford, 1984). 즉 SPF에서 사육하는 마우스 (ICR, 6주령)에 1% glycogen 용액 400 μ L를 복강내 투여하여 24시간 macrophage를 활성화시킨 후 경추탈골에 의하여 도살하고 차가운 PBS(-) 5 mL를 복강에 투여한 후 복강액을 취하여

macrophage를 취하고 이것을 TNF- α 유도 실험에 이용하였다. 각 시료 추출물 (250 μ g/well)에 의한 TNF- α 생성량의 차이는 macrophage (2×10^5 cell/well)에 다슬기 추출물을 24시간 동안 처리 후 상등액을 취하고, 그 상등액 50 μ L와 4 μ g/mL로 희석한 actinomycin D 용액 50 μ L를 L-929 plate (8×10^4 cell/well)에 첨가하여 20시간 동안 배양한 후 살아있는 L-929 세포주의 수를 0.1% crystal violet를 이용하여 염색하였다. 이때 염색한 L-929 세포주는 0.5% SDS에 가용화 하고 560 nm에서 OD값을 측정하여 L-929 세포주의 사멸율을 측정함으로써 TNF- α 의 생산량으로 계산하였다.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase 저해활성 평가

Pentose phosphate의 첫 번째 경로에 관여하는 효소인 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P-D)의 저해활성 평가는 G-6-P-D에 의하여 NADP로부터 생성되는 NADPH의 양을 340 nm에서 측정하였다 (Betke et al., 1967). 즉, 반응액에는 1.2 mM NADP, 3.3 mM G-6-P, 0.5 U G-6-P-D 및 SD rat 간장유래 효소원이 0.16 M Tris-Cl (pH 7.6) buffer 1 mL에 포함되어 있으며, 실험조건에 따라 적당히 희석한 다슬기 추출물을 첨가하여 G-6-P-D의 저해활성을 평가하였다. 모든 실험조건은 30°C로 안정화 되어있는 spectrophotometer (Thermo Bio, USA)에서 실시하였으며 생성되는 NADPH의 양은 5분간 측정하였다.

항균활성

다슬기 추출물에 의한 항균활성 평가는 disk diffusion법 (Raahave, 1974) 또는 radial diffusion법 (Mostow et al., 1975)에 의하여 실시 하였다. Disk diffusion법을 위해서는 필터여지 (Whatman, Ø8 mm)에 20 mg/mL로 희석한 각 추출물 20 μ L를 분주한 후 미생물 배지 위에 올려놓고 37°C에서 배양하면서 형성되는 hallow의 크기로 측정하였다. 또한 radial diffusion법의 경우에는 미생물 plate에 일정한 크기의 구멍 (Ø4 mm)를 뚫고 여기에 10 μ L의 추출물을 분주하여 형성되는 hallow의 크기로 평가하였다.

통계처리

각각의 평가 분석은 3반복 이상으로 하였으며 시료로부터 얻어진 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석을 실시한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시 하였다. 이때 사용한 모든 통계분석은 Statistic Analysis System (SAS Institute Inc, NC, USA) 통계 프로그램을 이용하여 처리 하였다.

결과 및 고찰

다슬기 추출물의 인체 암세포에 대한 성장 억제 효과

7종 다슬기 추출물에 의한 암세포 독성 평가를 3종의 암세포주 즉, 위암세포주 (SNU-1), 폐암세포주 (A549) 및 간암세포주 (Hep 3B)에 대하여 실시하였다. 각 다슬기 추출물을 0.2 mg/well, 0.1 mg/well 및 0.01 mg/well로 희석하여 5×10^3 cells/well (Fig.1(D), (E), (F)) 와 1×10^4 cells/well (Fig.1 (A), (B), (C)) 의 두 가지 암세포 농도에 작용시킨 결과, *Koreol.*

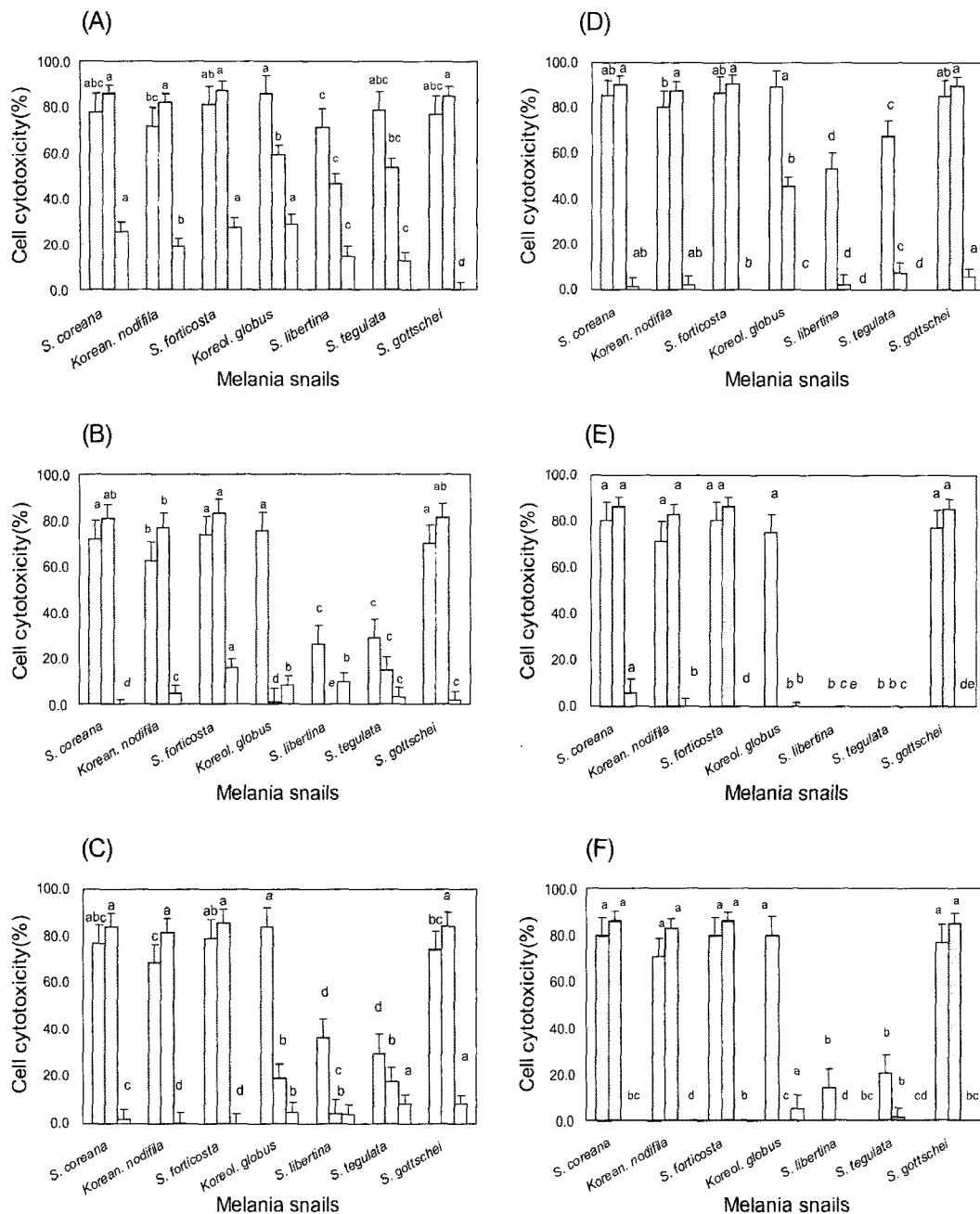


Fig. 1. Cytotoxic activities of crude extracts from 7 species of melania snails on human cancer cell lines. (A) and (D), SNU-1; (B) and (E), A549; (C) and (F), Hep 3B. Three concentrations (0.2 mg/well(), 0.1 mg/well(▨) and 0.01 mg/well(□)) of the extracts were used to determine the cell cytotoxicities. a-e Means with the different letters at the same concentration are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are expressed as mean SD(n=3).

globus ovalis 및 *S. libertina*에서 보는 바와 같이 각 시료의 사용 농도 범위 내에서 농도 의존적으로 3종 암세포에 대한 세포 독성이 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 1(A), (B)). 3종의 암세포에 대한 세포독성을 평가한 결과 위암세포인 SNU-1의 경우에는 이용한 7종 다슬기 추출물에 의하여 모두 높은 암세포 증식억제효과를 나타냈다. 반면, A549 및 Hep 3B의 경우에는 *S. coreana*, *Korean. nodifila*, *S. forticosta*, *S. gottschei*의 4종 시료에 의하여 80% 이상의 암세포 성장억제효과를 나타

냈다. 그 외에 *S. libertina* 및 *S. tegulata*의 경우에는 SNU-1을 제외한 나머지 A549 및 Hep 3B에 대하여 성장억제 효과를 거의 나타내지 않았으며, *Koreol. globus ovalis*의 경우에는 0.2 mg/well의 농도에서 80% 이상의 암세포 성장억제효과를 나타낸 반면, 0.1 mg/well의 농도에서는 급격하게 저해활성이 감소하여 30% 미만의 저해활성을 나타냈다. 이상의 결과를 보면 7종의 다슬기 추출물은 A549와 Hep 3B 보다는 SNU-1에 대하여 상대적으로 높은 증식억제효과를 나타냈으며, A549와

Hep 3B는 유사한 활성도를 나타내는 것을 알 수 있었다. 한편, 본 실험에서 사용한 7종 다슬기는 Fig. 1에서 보는 와 같이 종별 유의차 ($P < 0.05$)가 인정되며, 활성도를 바탕으로 하여 크게 3부류로 나누어질 수가 있었다. 즉, 본 실험에서 사용한 3종 암세포에 대하여 모두 높은 세포독성을 나타낸 *S. coreana* (참다슬기), *Korean. nodifila* (염주알다슬기), *S. forticosta* (주름다슬기)와 *S. gottschei* (곶체다슬기), 그리고 시료의 농도에 따라 확인한 유의차를 보인 *Koreol. globus ovalis* (띠구슬다슬기) 그리고 고농도에서도 거의 활성을 나타내지 않았던 *S. libertina* (다슬기), *S. tegulata* (좁주름다슬기)으로 나눌 수 있었다. 해양천연물에서 암세포독성을 갖는 물질의 탐색은 접근하는 방법에 따라 암세포에 대하여 직접적으로 세포독성을 평가하는 방법과 (Yin et al., 2008; Lee et al., 2002) 암세포가 세포신장을 할 때 수반되는 혈관신생 (Angiogenesis)의 요인 제거를 통한 항암제 탐색 등으로 이루어지고 있다 (Yi et al., 2008). 직접적인 방법에 의하여 암세포독성을 갖는 물질의 탐색은 지금까지 많은 연구자들에 의하여 보고되어 왔으며 (Lee et al., 1999; Okutani, 1982), Suh et al. (2000)은 동일한 방법을 이용하여 재첩 추출물이 Sarcoma-180 종양세포에 작용하여 종양세포의 수를 크게 줄인다고 보고하였다. 본 연구에서 사용한 다슬기 추출물의 경우에도 3종의 암세포 (SNU-1, A549, Hep 3B)에 대하여 강한 세포독성을 나타냈으므로 특정 다슬기를 이용한 암세포 독성 물질의 분리 및 동정을 통한 추가적인 연구가 기대되는 바이다.

ACE 저해활성 평가

7종 다슬기의 초추출물에 의한 혈압조절활성을 angiotensin converting enzyme (ACE)의 저해활성으로 평가한 결과, *S. coreana*, *Korean. nodifila*, *S. forticosta*는 ACE에 대하여 각각 63.8%, 69.0% 및 55.9%의 저해활성을 나타냈으며, 그 밖의 다슬기 *Koreol. globus ovalis*, *S. libertina*, *S. tegulata*, *S. gottschei*에 대해서는 15% 미만의 ACE저해활성을 나타냈다 (Fig. 2). 본 결과는 혈압조절에 관여하는 물질이 다슬기의

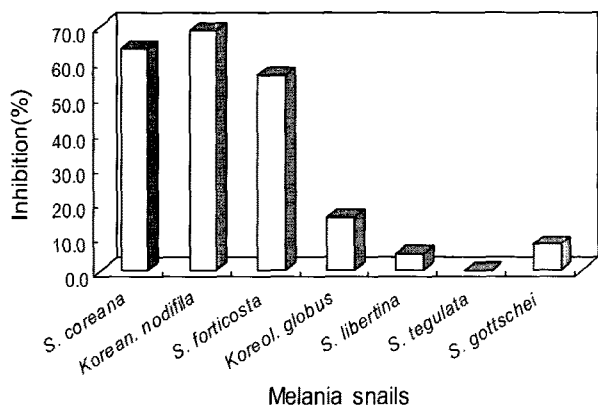


Fig. 2. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition pattern by the extract of seven species of melania snails. The reaction solution contains 80 μ L of each melania extract (20 mg/mL), 200 μ L of 5 mM HHL and 20 μ L of ACE (100 mU/mL).

종에 따라 차이가 있음을 시사하고 있다. 또한 문경에서 채취한 *S. forticosta* 와 *S. tegulata* 그리고 춘천에서 채취한 *S. coreana* 와 *S. gottschei* 의 ACE저해활성을 비교한 결과 각 추출물에 의하여 나타나는 저해활성은 같은 지역이라도 종별 차이에 의하여 크게 활성이 다른 결과를 나타냈다. 한편, 본 실험에서 이용한 3종 암세포에 대하여 높은 세포독성을 나타냈던 *S. gottschei* 의 경우에는 ACE 저해활성이 7.5%만을 나타냈으며, 이것은 *S. gottschei* 에 함유된 생리활성물질에 현저한 차이가 있음을 강력히 시사하고 있다.

다음은 각 다슬기 추출물의 희석농도에 대한 ACE 저해활성의 영향성을 평가하기 위하여 Fig. 2에서 높은 저해활성을 나타냈던 *S. coreana*, *Korean. nodifila* 의 추출물을 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL로 희석한 후 ACE활성의 저해 정도를 평가하였다. 그 결과, *S. coreana* 및 *Korean. nodifila* 의 추출물 모두가 농도 의존적으로 저해활성이 증가함을 알 수 있었다. 한편, Dixon plot에서 요구되는 반응속도의 역수 (1/Slope)를 y축으로 하고 다슬기 추출물의 농도를 x축으로 하였을 때, 각 다슬기 추출물의 희석농도에 대한 ACE 저해활성이 두 시료 모두 정확하게 농도 의존적으로 진행되고

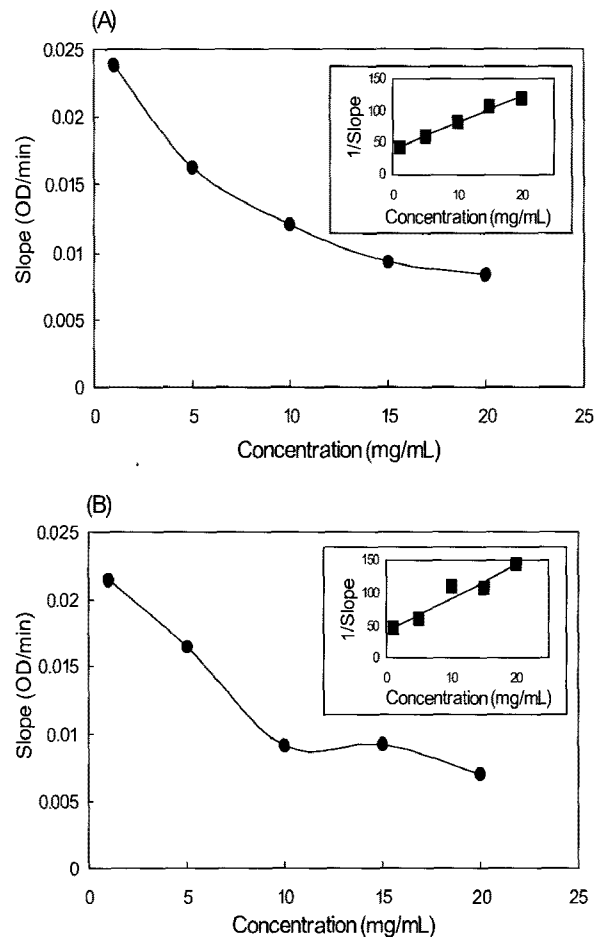


Fig. 3. Relationship between the concentration of the extracts and ACE inhibitory effects. The graph shown as 1/slope vs [I] is a part of Dixon plot. (A) and (B) are the reaction with the extracts of *S. coreana* and *Korean. nodifila*, respectively.

있음을 알 수 있었다. 본 그래프만을 이용해서 저해상수 (Ki)를 정확하게 구하기는 어렵지만 *S. coreana* 및 *Korean. nodifila*의 추출물은 모두가 유사하고 단순한 패턴에 의하여 저해반응이 진행되고 있음을 예측할 수 있었다 (Fig. 3). 이것은 *S. coreana* 및 *Korean. nodifila*에 함유되어 있는 ACE 저해물질의 종류가 유사할 것이라는 것을 시사하고 있으며, 포함되어 있는 저해물질의 종류 또한 많지 않을 것이라는 것을 시사해 준다. ACE는 혈관 내에서 Angiotensin I을 Angiotensin II로 전환하여 혈압을 높이는데 관여하는 효소로서 (Ondetti and Cushman, 1982), *S. coreana* 및 *Korean. nodifila*로부터 ACE 저해활성이 검출된 것은 다슬기가 혈압을 낮추는 역할을 할 수 있다는 것을 시사하고 있다. 현재는 ACE 저해활성을 갖는 물질의 정제 및 구조해석이 이루어지고 있다.

항산화활성 평가

각 다슬기 추출물이 갖는 항산화 활성을 DPPH radical 소거능으로 평가한 결과, 각 다슬기 조추출물의 항산화활성은 표준물질로 사용한 caffeic acid (0.1 mg/mL)에 비교하여 높지 않은 DPPH radical 소거능을 나타냈지만, 유의차 ($p < 0.05$)가 인정되는 4개의 그룹으로 나눌 수 있었다 (Fig. 4). 즉 8 mg/mL의 농도를 이용했을 때, 제 1 그룹은 *S. coreana*, *Korean. nodifila*, *S. forticosta*로 각각 95.3%, 95.7% 및 90.6%을 나타냈으며, 제 2 그룹은 *Koreol. globus ovalis*, *S. libertina*로 77.7%와 82.4%를 나타냈다. 또한 *S. tegulata*, *S. gottschei*는 각각 58.9%와 46.9%로 낮은 DPPH radical 소거능을 나타냈으며 이들은 다시 2개의 그룹으로 나누어짐을 알 수 있었다. 반면 4 mg/mL의 농도를 이용했을 경우, 8 mg/mL에서 같은 그룹이었던 *S. coreana*, *Korean. nodifila*, *S. forticosta*은 각기 다른 3개의 그룹으로 나누어졌으나 *S. tegulata*, *S. gottschei*의 경우에는 하나의 그룹으로 합쳐지는 결과를 나타냈다. 이것은 각 다슬기 조추출물의 항산화활성이 농도 의존적으로 감소하지만, 희석효과는 각 시료마다 다를 수 있다는 것을 시사하고 있다. 한편, 본 실험에서

사용한 3종 암세포에 대하여 강한 세포독성을 나타냈던 *S. gottschei*에 대해서는 상대적으로 낮은 항산화활성 (46.9%)을 나타냈다. 반면, ACE 저해활성 및 암세포 세포독성에서 낮은 활성을 나타냈던 *S. libertina*와 *S. tegulata*는 각각 82.4% 및 58.9%의 활성을 나타내 항산화활성 특이적인 생리활성 물질이 함유되어 있는 것으로 판단된다. 한편, 0.4 mg/mL의 농도에 대하여 항산화활성을 평가한 결과 모든 시료에 있어서 20% 이하의 EDA (%)를 나타냈으며, 추출물을 기준으로 한 각 다슬기 추출물의 EC_{50} 은 1.7-9.0 mg/mL이며 (data not shown), Obeid et al., (2009) 등이 보고한 표준시료 (caffeic acid, EC_{50} (1.73 μ g/mL)와 비교하면 전반적으로 낮은 항산화활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

TNF- α 유도 실험

마우스 섬유아세포주인 L-929에 대한 TNF- α 민감성을 이용하여 면역계조절활성을 평가하고자 하는 실험은 지금까지 많은 연구자들에 의하여 실시되어 왔다 (Shiau et al., 2001). 5 mg/mL로 희석한 다슬기 추출물에 의하여 mouse macrophage (2×10^5 cell/well)로부터 유발된 TNF- α 생성량의 차이를 L-929 cell을 이용하여 평가한 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 7종의 다슬기의 TNF- α 유도실험에 대한 Duncan's multiple range test에서는 $P < 0.05$ 의 유의차 범위 내에서 3개의 그룹으로 나눌 수 있었다. 즉 *S. coreana*, *Korean. nodifila* 및 *S. gottschei*의 경우에는 95.2%, 89.7% 및 93.7%의 L-929 cell을 사멸시켰으며, *S. forticosta*의 경우에는 42.4%의 L-929 사멸을 나타냈다. 반면, *Koreol. globus ovalis*, *S. libertina* 및 *S. tegulata*의 경우에는 L-929에 대하여 5% 이하로 사멸시킴으로써 TNF- α 의 생성이 거의 이루어지지 않고 있는 것을 시사해 준다. 이것은 Fig. 1에서 보여지는 암세포 독성평가와 비교할 때, 유사한 패턴을 나타냈지만 *S. forticosta* 및 *Koreol. globus ovalis*의 경우에는 전혀 다른 작용패턴을 나타내는 것으로 보아 이 부분의 추가적인 검토가 필요할 것으로 판단된다.

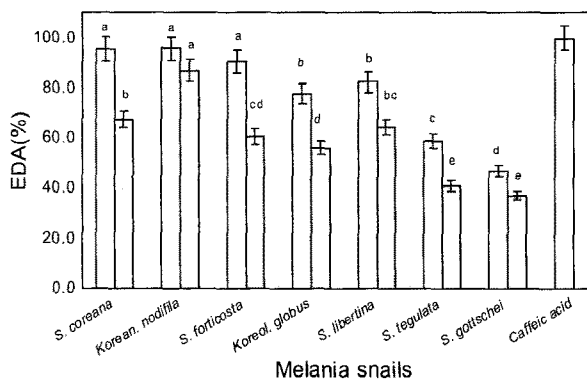


Fig. 4. DPPH radical scavenging activities of the melania snail extracts. 8 mg/mL() and 4 mg/mL(□) of the melania snail extracts were used to determine the DPPH radical scavenging activity. a-e Means with the different letters at the same concentration are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are expressed as mean SD(n=3).

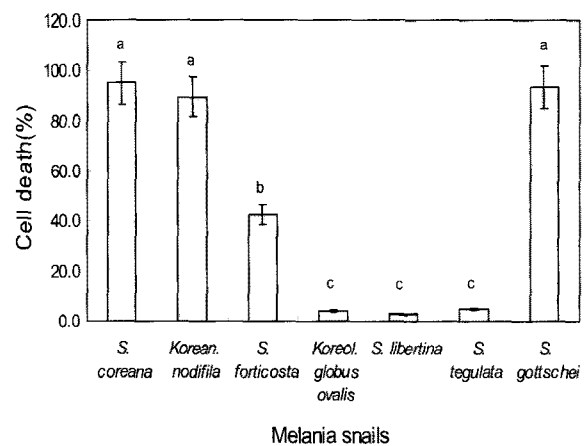


Fig. 5. TNF-like cytotoxicity in macrophage supernatants stimulated by the melania snail extracts. a-c Means with the different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are expressed as mean SD(n=3).

각종 목적 생물의 추출물에 의하여 형성되는 macrophage의 cytokine류는 TNF- α 를 포함하여 다양하다 할 수 있으며 이들 에 대한 세부적인 연구가 기대된다.

G-6-P-D 저해활성 평가

지방대사계조절에 관여하는 효소 중 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P-D)는 pentose phosphate pathway의 첫번째 단계에 작용하는 효소로써 이 효소에 대한 저해활성은 산화적 단계의 전체적인 이상을 초래하여 ribulose-5-phosphate의 생산이 중지되며, 이로 인해 비산화적인 pentose phosphate pathway 단계까지도 이상을 초래하여 지방합성에 필수적인 glyceraldehydes 3-phosphate의 생성량을 감소시키며, 결과적으로는 지방의 합성이 저하된다 (Levy, 1979). 따라서 G-6-P-D의 저해활성에 관여하는 물질의 탐색은 지방합성을 저해하는 차원에서의 대사계조절활성을 갖는 물질의 탐색

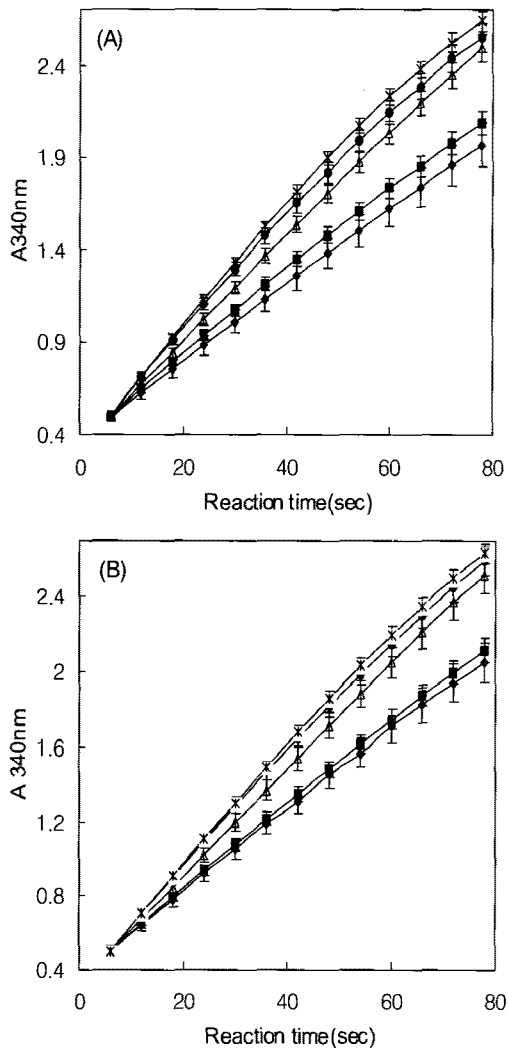


Fig. 6. Inhibition pattern of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P-D) by the extracts of *S. coreana* (A) and *S. tegulata* (B). Values are expressed as mean SD (n=3). 0 $\mu\text{g/mL}$ (*), 40 $\mu\text{g/mL}$ (●), 80 $\mu\text{g/mL}$ (△), 200 $\mu\text{g/mL}$ (■) and 400 $\mu\text{g/mL}$ (◆) of the extract was included in the reaction solution.

이라 할 수 있다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 *S. coreana* (Fig. 6(A)) 및 *Korean. nodifila* (Fig. 6(B))의 경우에 농도 의존적으로 G-6-P로부터 생성시키는 NADPH의 양을 감소시켰으며, 기울기 (a)값 (A340 nm/reaction time)을 기준으로 할 때 *S. coreana*는 31.9%, 그리고 *Korean. nodifila*의 경우에는 28.1%로 G-6-P dehydrogenase의 활성을 저해하였다. 반면, 기타 5종의 다슬기 추출물에 대해서는 G-6-P로부터 생성되는 NADPH 양을 전혀 감소시키지 못하는 결과를 나타냈다.

항균활성

본 연구에서는 4종의 Gram⁺균 (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus subsp aureus*, *Streptococcus vestibularis*, *Staphylococcus haemolyticus*) 과 4종의 Gram⁻균 (*Klebsiella pneumoniae subsp pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Serratia marcescens*)에 대한 항균활성을 disk diffusion 과 radial diffusion법에 의하여 검출하였다. 본 연구에 사용한 다슬기 추출물의 농도 (20 mg/mL) 및 균주에서는 어느 균주에 대하여도 항균활성을 나타내지 않았다. 이것은 *S. libertina*의 산성열수추출물이 *B. subtilis* 및 *Saccharomyces cerevisiae* 등에 대하여 항균활성을 나타냈다는 Cha and Baik (1999)의 결과와 상반되는 결과라 할 수 있다. 이와 같은 차이점은 균주의 특성 또는 추출물 시료의 조제방법 등에 의한 차이라고 추측된다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원(수산물의 영양 및 건강기능성 연구, RP-2009-BT-020)의 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Baarsch MJ, Wannemuehler MJ, Molitor TW and Murtaugh MP. 1991. Detection of tumor necrosis factor alpha from porcine alveolar macrophages using an L929 fibroblast bioassay. *J Immunol Methods* 140, 15-22.
- Betke K, Beutler E, Brewer GH, Kirkman HN, Luzzatto L, Motulsky AG, Ramot B and Siniscalco M. 1967. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Report of a WHO scientific group. WHO Tech Rep Ser No 366.
- Blios MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.
- Cha HO and Baik WA. 1999. Effect of *Semisulcospira libertina*, *Corbicula* sp. and *Cipangopaludina chinesis malleata* extracts on liver function and other biological activities. 45th National Sci Exhibition, Ministry of Sci & Tech.
- Chang YJ, Chang HJ, Min BH and Bang IC. 2000. Reproductive cycle of melania snail, *Semisulcospira libertina libertina*. *Dev Reprod* 4, 175-180.

- Choi BR and Yoon SH. 1997. Mollusca. In : List of animals in Korea. The Korean Society of Systematic Zoology, Seoul, Korea.
- Cushman DW and Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20, 1637-1648.
- Davis GM. 1969. A taxonomic study of some species of *Semisulcospira* in Japan (Mesogastropoda: Pleuroceridae). *Malacologia* 7, 211-294.
- Flick DA and Gifford GE. 1984. Comparison of in vitro cytotoxic assay for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 68, 167-175.
- Kim SJ. 1999. Health foods with detoxification effects. Didim 21 press. Seoul Korea.
- Kim YH, Lee TK and Cha YS. 1985. Studies on the nutritive component of black snail (*Semisulcospira libertina*). *Bull Agric College, Chonbuk Univ* 16, 101-105.
- Kwon OK. 1990. Illustrated encyclopedia of fauna & flora of Korea. Vol 32, Mollusca (I), Ministry of Education, Seoul, Korea.
- Kwon OK, Min DK, Lee JR, Lee JS, Je JG and Choe BL. 2001. Korean Mollusks with color illustration. Hangeul Publishing Co., Busan, Korea.
- Lee JY, Ryu HS, Moon JH and Suh JS. 1999. Antitumor effect and immunological activity of glycoprotein from *Urechis unicinctus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28, 917-923.
- Lee MK, Lee HY, Lee JH, Oh JS, Choi GP, Kim JH and Kim JD. 2002. Anticancer effect of *Sorbus commixta* Hedl extracts. *Korean J Medicinal Crop Sci* 10, 403-408.
- Lee MS, Park JB and Yoon SH. 2005. Hepatoprotective effects of the water extract from *Semisulcospira gottschei* against liver injuries induced by carbon tetrachloride in rats. *J Korean Soc Hygienic Sciences* 11, 17-26.
- Levy HR. 1979. Glucose 6-phosphate dehydrogenases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 48, 97-192.
- Markwell MAK, McGroarty EJ, Bieber LL and Tolber NE. 1973. The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney. *J Biol Chem* 248, 3426-3432.
- Martens E. 1905. Koreanische Susswasser-Mollusken. *Zoologischen Jahrbuchern, suppl* 8, 23-70.
- Mostow SR, Schild GC, Dowdle WR and Wood RJ. 1975. Application of the single radial diffusion test for assay of antibody to influenza type A viruses. *J Clin Microbiol* 2, 531-540.
- Nakano D and Izawa K. 1996. Reproductive biology of *Semisulcospira libertina* (Prosobranchia: Pleuroceridae) in Iga basin, Mie prefecture. *Venus* 55, 235-241.
- Obeid HK, Prenzler PD, Konezak I, Rehman A and Robards K. 2009. Chemistry and bioactivity of olive biophenols in some antioxidant and antiproliferative in vitro bioassay. *Chem Res Toxicol* 22, 227-234.
- Okutani K. 1982. Further investigation of the antitumor activity of the squid internal shell. *Bull Jap Soc Sci Fish* 48, 421-424.
- Ondetti MA and Cushman DW. 1982. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann Rev Biochem* 51, 283-308.
- Raahave D. 1974. Paper disk-agar diffusion assay of Penicillin in the presence of Streptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 6, 603-605.
- Shiau MY, Chiou HL, Lee YL, Kuo TM and Chang YH. 2001. Establishment of a consistent L929 bioassay system for TNF- α quantitation to evaluate the effect of lipopolysaccharide, phytoestrogens and cytodifferentiation agents on cytotoxicity of TNF- α secreted by adherent human mononuclear cells. *Mediators Inflamm* 10, 199-208.
- Shim TH, Han KS, Lee TJ, Cheong EH and Lee HK. 1994. Composition of lipid and amino acid in *Semisulcospira gottschei* tissues. *J Food Hyg Safety* 9, 81-87.
- Shu JS, Choi MW, Chun SS and Chang MW. 2000. Physiological effects and utilization of Corbicula elatior Products. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29, 235-240.
- Yi EY, Park SY, Choi JS, Lim CW, Kim YK, Park HY and Kim YJ. 2008. A natural marine compound extracted from the ark shell, *Scapharca subcrenata*, inhibits in vivo and in vitro angiogenesis. *Cancer Prev Res* 13, 47-53.
- Yin Y, Heo SI and Wang MH. 2008. Antioxidant and anticancer activities of methanol and water extracts from leaves of *Cirsium japonicum*. *J Appl Biol Chem* 51, 160-164.

2009년 9월 14일 접수

2009년 9월 21일 수정

2009년 10월 26일 수리