

Verification of the Fractions with Strong Estrogenic Activities from Brown Algae

Seungwoo Lee, Min-Kyung Jang, Nam-Young Kim, Hye-Ji Jang, Dong-Geun Lee, Mihyang Kim¹, Yuck Young Kim², Sung Gu Kim³, Byung Hong Yoo³ and Sang-Hyeon Lee*

Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan, 617-736 Korea

¹Department of Food and Nutrition, Silla University, Busan, 617-736 Korea²Bioport Korea Co., Marine Bio-industry Department Center, Busan, 619-912 Korea³IS Food Co., Marine Bio-industry Department Center, Busan, 619-912 Korea

Received August 6 2010 / Accepted November 18, 2010

In order to evaluate estrogenic compounds in brown algae, an *in vitro* test system for the verification of estrogenic activity was applied. Fractions from ethanol extracts of each brown alga were prepared by a systematic fractionation procedure with solvents such as H₂O, hexane, butanol and methanol. Aqueous fractions of brown algae showed the highest estrogenic activities. Estrogenic activities of 500 µg/ml aqueous fractions of *Undaria pinnatifida* and *Laminaria japonica* showed almost the same strength as that of 10⁻⁷ M standard solution (17β-estradiol). Furthermore, estrogenic activities of 500 µg/ml aqueous fractions of *Ecklonia stolonifera* and *Porphyra suborbiculate* represented higher activities than that of 10⁻⁸ M 17β-estradiol. These observations suggest that aqueous fractions of all these brown algae are expected to possess estrogenic compounds and could be developed as estrogenic agents for post-menopausal disorder.

Key words : Brown algae, *Ecklonia stolonifera*, estrogenic activity, *Laminaria japonica*, *Porphyra suborbiculate*, *Undaria pinnatifida*

서 론

우리나라에 분포하는 해조류는 750여 종으로 보고되고 있으며 그 중 산업적으로 식용 또는 공업용으로 이용되고 있는 해조류는 30여 종 이내이다[9]. 해조류에는 녹조류, 홍조류, 및 갈조류가 있으며 이들은 얇은 바다의 서식지를 풍요롭게 하고 있다. 녹조류의 대표적인 식품인 파래(*Enteromorpha*)는 항산화 효과가 우수하며, 지질과산화물이 단백질과 결합하는 반응을 매우 효과적으로 저해한다고 보고되었다[8]. 홍조류인 김(*Porphyra tenera*)은 신경중앙, 간암 및 유방암세포의 성장억제 효과가 탁월한 것으로 알려졌다[14]. 갈조류에는 미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마(*Laminaria japonica*), 모자반(*Sargassum*) 등이 있으며, 이들은 항암활성[2,11]과 angiotensin-I converting enzyme 저해와 관련된 고혈압 억제 활성[1]을 갖는 것으로 알려져 있다.

한편 혈중 에스트로겐 농도가 5 pg/ml 이하인 폐경 여성은 그 이상의 혈중 농도를 보이는 여성에 비해 척추 골절과 대퇴부 골절의 상대적 위험이 2.5배 증가되므로 이를 예방하기 위하여 혈중 에스트로겐 농도를 인위적으로 상승시키는 것이 필요하다[6]. 건강기능식품 소재로 활용되는 일부 식물의 추출물 중에는 여성호르몬인 estrogen과 화학적 구조와 활성이 유사한 phy-

toestrogen을 포함하고 있으며, phytoestrogen은 합성 estrogen과 달리 부작용이 적은 것으로 알려져 있다. Phytoestrogen을 섭취한 여성의 경우 폐경증후군(postmenopausal syndrome) 증상인 심혈관계 질환, 치매와 골다공증을 예방 및 완화시키고, 진행 중인 골다공증의 치료에도 효과가 있다고 보고되었다[12,15].

본 연구진은 이전 연구에서 에스트로겐 수용체를 발현하는 인체 유방암 세포주에 에스트로겐에 반응성을 나타내도록 고안된 CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 리포터인 pDsCAT-ERE119-Ad2MLP를 도입한 *in vitro* 검출시스템[7]을 사용하여 해양생물 추출물로부터 에스트로겐 유사활성을 검증하여 보고하였다[5,10].

본 연구에서는 확립된 *in vitro* 검출시스템을 이용하여 갈조류인 미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마(*Laminaria japonica*), 곰피(*Ecklonia stolonifera*) 및 돌자반(*Porphyra suborbiculate*)의 에탄올 추출물로부터 hexane, methanol, H₂O 및 butanol 분획물을 제조하였고 이들의 에스트로겐 유사활성을 검증하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 해조류 시료들은 국내에서 자생 또는 양식되는 갈조류의 생시료를 구입하여 부착물을 제거하고 수세 및 건조시킨 후 분쇄한 다음 밀봉하여 보관하면서 사

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

용하였다.

해조류 추출물의 제조 및 용매에 따른 분획

미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마(*Laminaria japonica*), 곰피(*Ecklonia stolonifera*) 및 돌자반(*Porphyra suborbiculate*)의 건조분말시료에 10배량 (w/v)의 80% ethanol을 첨가하여 80°C에서 8시간 동안 추출을 행하였으며, 추출액을 지름 150 mm의 여과지(Advantec, Japan)로 2회 여과하여 에탄올 추출시료로 하였다. 에탄올 추출시료를 다시 hexane, methanol, H₂O, butanol 등을 이용하여 Fig. 1에 나타낸 방법으로 분획을 행한 후, speed vacuum evaporation으로 농축하여 각각의 용매에 대한 분획물을 제조하였다.

에스트로겐 유사활성 측정

본 연구진에 의해 제작된 에스트로겐 유사물질 검정용 세포주 MCF7/pDsCAT-ERE119-Ad2MLP [7]를 10% dextran-coated charcoal stripped FBS [12]를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, BioWhittaker) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 각 분획물들은 ethanol에 완전히 용해시켰고 세포가 약 90%의 confluence가 되었을 때, 각 시료와 표준물질인 17β-estradiol (RBI, Natick, MA, USA) 그리고 대조구로 에탄올을 각각 5 μl 씩 처리하였다. 각 시료의 추출물은 최종농도 500, 50, 5 μg/ml로 사용하였고, 표준물질은 최종농도 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ M로 사용하였다. 그 후, 48시간 동안 배양한 다음 세포를 회수하였고, -20°C에서 5분, 37°C에서 5분 동안의 처리를 4회 반복하여 세포를 파괴한 후, 14,000×g에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 취하여 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 단백질의 함량을 측정하였다. CAT 단백질의 함량측정은 CAT-ELISA Kit (Roche

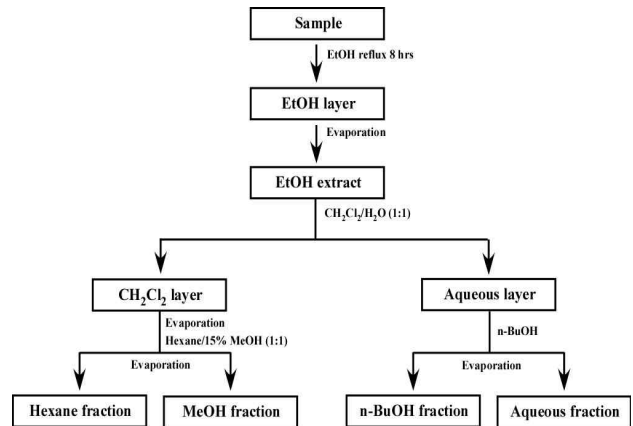


Fig. 1. Procedure of extraction and fractionations of brown algae.

Applied Science, Mannheim, Germany)를 이용하여 manual에 따라 수행하였다. CAT 단백질의 함량측정 결과는 BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용해 측정된 각 추출물의 총 단백질함량으로 표준화시켰다.

결과 및 고찰

해조류 추출물 및 분획물의 수율

미역, 다시마, 곰피 및 돌자반 건조분말시료를 80% 에탄올로 80°C에서 8시간 동안 추출하고 농축시킨 후 획득된 에탄올 추출물의 수율과 획득된 추출물들을 분획하여 얻은 분획물들의 수율을 Table 1에 나타내었다. 각각의 추출물들은 12.7~19.6%의 수율을 나타냈으며, 미역의 경우는 19.6%로 가장 높은 수율의 추출물이 획득되었고 곰피의 경우는 12.7%의 가장 낮은 수율의 추출물을 획득되었다. 분획물의 수율은 미역과

Table 1. Yields (%) of ethanol extractions and various solvent fractionations of brown algae

Brown algae	Yields (%) of extractions	Solvents	Yields (%) of frctionation
<i>Undaria pinnatifida</i>	19.6	Hexane	2.5
		Butanol	2.4
		Methanol	4.2
		Aqueous	3.2
<i>Laminaria japonica</i>	16.4	Hexane	2.7
		Butanol	2.6
		Methanol	3.8
		Aqueous	2.5
<i>Ecklonia stolonifera</i>	12.7	Hexane	3.8
		Butanol	8.7
		Methanol	1.8
		Aqueous	5.0
<i>Porphyra suborbiculate</i>	15.5	Hexane	3.9
		Butanol	7.5
		Methanol	1.8
		Aqueous	1.2

다시마의 경우는 methanol 분획에서 가장 높았고, 곰피와 돌자반의 경우는 butanol 분획에서 가장 높았다.

해조류 추출분획의 에스트로겐 유사활성

생물체내로 유입된 에스트로겐 유사물질은 에스트로겐을 모방하여 세포 내에 있는 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)와 결합하고 DNA의 특정 염기서열인 estrogen responsive element (ERE)를 인식하여 결합한다. 이러한 DNA 상의 반응인자의 전사를 증대시키고 결국 특정 단백질의 발현을 유도하여 에스트로겐 유사물질에 의한 세포반응을 유도하는 것으로 알려져 있다[3,4,13]. 본 연구에서는 에스트로겐 수용체를 발현하는 것으로 알려진 인체 유방암 세포주 MCF7에 에스트로겐에 반응성을 나타내도록 고안된 CAT 리포터 플라스미드인 pDsCAT-ERE119-Ad2MLP를 도입한 *in vitro* 검출시스템을 사용하여 에스트로겐 활성을 측정하였다[7].

미역의 수층 분획물은 500 µg/ml의 농도에서는 10⁻⁸ M의 표준물질(17β-estradiol)의 활성보다 높은 활성을 보였으며 10⁻⁷ M의 표준물질의 활성보다는 낮은 활성을 보였다(Fig. 2). 50 µg/ml의 농도에서는 10⁻⁸ M의 표준물질의 활성과 비슷한 활성을 보였다. 헥산 분획물의 경우는 500, 50 µg/ml의 농도에서 10⁻⁹ M의 표준물질의 활성과 비슷한 활성을 보였다. 부탄올 및 메탄올 분획물들은 500, 50, 5 µg/ml의 농도에서 매우 낮은 활성을 보였다.

다시마의 헥산과 수층 분획물은 500 µg/ml의 농도에서는 10⁻⁷ M의 표준물질의 활성과 비슷한 활성을 보였으며, 헥산과 수층 분획물은 50 µg/ml의 농도에서 10⁻⁸ M의 표준물질

의 활성과 비슷한 활성을 보였다(Fig. 3). 헥산과 수층 분획물은 5 µg/ml의 농도에서는 활성이 매우 낮았다. 부탄올과 메탄올 분획물은 500 µg/ml의 농도에서 10⁻⁸ M의 표준물질의 활성과 비슷한 활성을 보였다. 또한, 메탄올 분획물은 50 µg/ml의 농도에서 10⁻⁸ M의 표준물질과 유사한 활성을 보였다. 5 µg/ml 농도의 메탄올 분획물과 50, 5 µg/ml 농도의 부탄올 분획물들은 10⁻⁹ M의 표준물질의 활성보다 낮은 활성을 보였다.

곰피의 수층 분획물은 500 µg/ml의 농도에서 10⁻⁸ M의 표준물질의 활성보다 높은 활성을 보였으며, 수층 분획물은 50 µg/ml의 농도에서는 10⁻⁸ M과 10⁻⁹ M의 표준물질의 활성 사이의 활성이 나타났다(Fig. 4). 5 µg/ml 농도의 수층 분획물과 500 µg/ml 농도의 헥산 분획물 및 500 µg/ml 농도의 메탄올 분획물은 10⁻⁹ M의 표준물질의 활성과 비슷한 활성을 보였다. 한편, 500, 50, 5 µg/ml 농도의 부탄올 분획물과 50, 5 µg/ml 농도의 헥산 분획물 및 50, 5 µg/ml 농도의 메탄올 분획물은 10⁻⁹ M의 표준물질의 활성보다 낮은 활성이 보였다.

돌자반의 수층 분획물은 500 µg/ml의 농도에서는 10⁻⁷ M과 10⁻⁸ M의 표준물질의 활성 사이의 활성을 보였으며, 50 µg/ml의 농도에서는 10⁻⁸ M과 10⁻⁹ M의 표준물질의 활성 사이의 활성을 보였다(Fig. 5). 또한, 5 µg/ml 농도의 수층 분획물과 500, 50, 5 µg/ml 농도의 헥산, 부탄올, 메탄올 분획물들은 10⁻⁹ M의 표준물질의 활성 보다 낮은 활성을 보였다.

본 연구의 결과, 용매에 따른 각각의 분획물들의 에스트로겐 유사활성은 공통적으로 농도 의존적인 활성을 보였으며, 미역(Fig. 2), 곰피(Fig. 4) 및 돌자반(Fig. 5)의 경우는 수층 분획

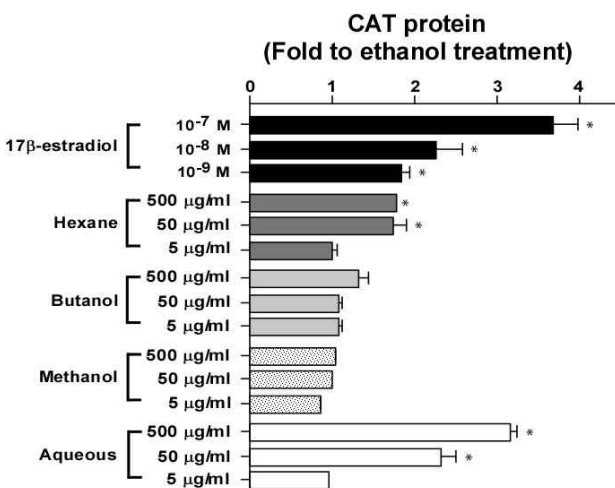


Fig. 2. Estrogen activities of various solvent fractions from *Uncaria Pinnatifida*. Means±SEM for three samples are shown as multiples of the ethanol treatment result. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test **p*<0.001 was compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

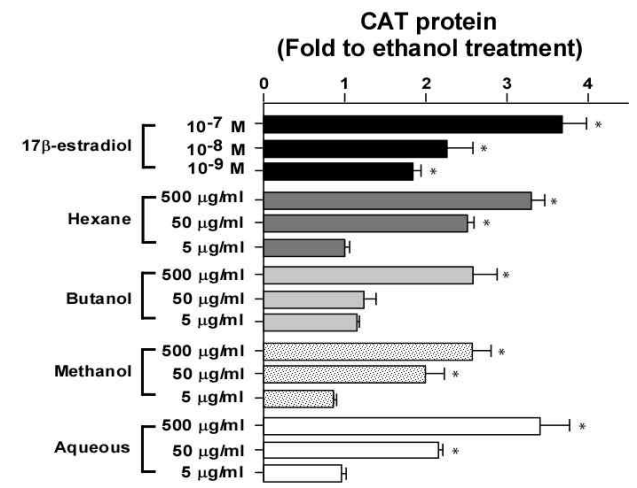


Fig. 3. Estrogen activities of various solvent fractions from *Laminaria japonica*. Means±SEM for three samples are shown as multiples of the ethanol treatment result. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test **p*<0.001 was compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

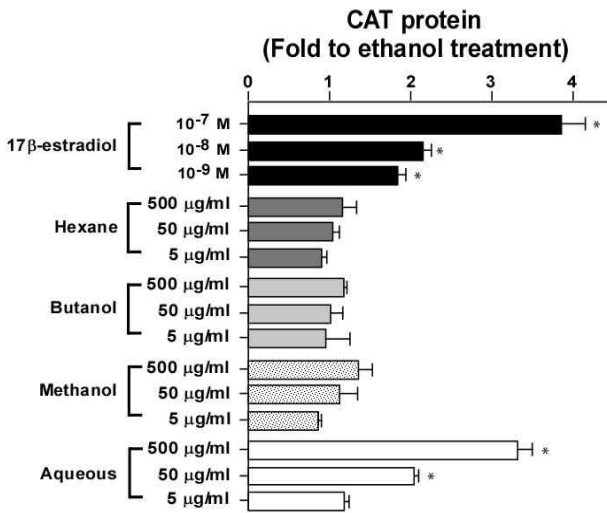


Fig. 4. Estrogen activities of various solvent fractions from *Ecklonia stolonifera*. Means±SEM for three samples are shown as multiples of the ethanol treatment result. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test * $p < 0.001$ was compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

물이 가장 높은 활성을 보였다. 한편, 다시마(Fig. 3)의 경우는 헥산과 수층 분획물이 농도 500 μg/ml에서 비슷한 활성을 보였으며 50 μg/ml에서는 수층 분획물보다 헥산 분획물이 높은 활성을 보였다.

본 연구를 통하여 해조류로부터 에스트로겐 대체 작용을 할 수 있는 물질을 신속하게 탐색하고 그 물질을 효율적으로 얻을 수 있는 토대를 마련하였다. 다시마를 제외한 해조류 추출물에서 수층의 활성이 높은 이유는 물의 극성에서 분획이 잘 되는 식물성 에스트로겐 유사성분의 함유비율이 높거나 잔류된 헥산, 메탄올, 부탄올에 의한 세포독성으로 인해 수층 분획물이 상대적으로 높게 검출된 것으로 예상할 수 있다. 그러나 Fig. 3인 다시마를 보면 수층 분획물 뿐만 아니라 다른 용매의 분획물에서도 높은 활성을 보였다. 따라서 미역, 곰피 그리고 돌자반의 결과는 용매에 의한 세포독성이 아니라 물의 극성에서 분획이 잘되는 식물성 에스트로겐 유사물질 때문일 가능성이 높다. 그리고 다시마는 다양한 극성의 식물성 에스트로겐 유사물질을 함유하는 것으로 판단 된다. 일반적으로 알려져 있는 식물성 에스트로겐을 함유하는 식물인 석류의 500 μg/ml 농도의 에탄올 추출물[7]과 본 연구의 시료인 미역, 다시마, 곰피 그리고 돌자반 추출물을 같은 농도에서 비교해보면 미역의 수층 분획물과 다시마의 수층, 헥산 분획물 곰피의 수층 분획물 등은 오차 범위 내에서 비슷한 활성을 보였다. 그리고 돌자반의 500 μg/ml 농도의 수층 분획물의 경우는 50 μg/ml 농도의 석류의 추출물과 비슷한 활성을 보였다. 본 실험에서 사용된 시료인 미역, 다시마, 곰피 및 돌자반의 수층

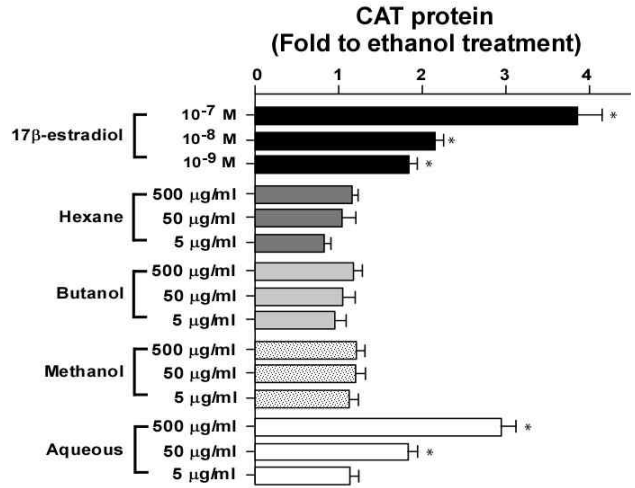


Fig. 5. Estrogen activities of various solvent fractions from *Porphyra suborbiculate*. Means±SEM for three samples are shown as multiples of the ethanol treatment result. Factorial ANOVA with Fisher's PLSD post-hoc test * $p < 0.001$ was compared with no treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

분획물들을 이용하여 에스트로겐 대체작용을 할 수 있는 성분을 가진 천연 유래의 기능성 식품을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Cha, S. H., G. N. Ahn, S. J. Heo, K. N. Kim, K. W. Lee, C. B. Song, S. K. Cho, and Y. J. Jeon. 2006. Screening of extracts from marine green and brown algae in Jeju for potential marine angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *J. Food Sci. Nutr.* **35**, 307-314.
2. Cho, K. J., Y. S. Lee, and B. H. Ryu. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward Sarcoma-180. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **23**, 345-352.
3. Gaido, K. W., L. S. Leonard, S. C. Maness, J. M. Hall, D. P. McDonnell, B. Saville, and S. Safe. 1999. Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2,2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane with estrogen receptors alpha and beta. *J. Endocrinol.* **140**, 5746-5753.
4. Gronen, S., N. Denslow, S. Manning, S. Barnes, D. Barnes, and M. Brouwer. 1999. Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese Medaka exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Health Perspect* **107**, 385-390.
5. Ha, J. M. and S. H. Lee. 2003. Verification of estrogenic activity in ethanol extracts of marine organisms using *in vitro* test system. *J. Life Sci.* **13**, 799-804.
6. Heikkinen, J., R. Vaheri, and P. Ainulainen. 2000. Long-term continuous combined hormone replacement therapy in the prevention of postmenopausal bone loss: a comparison of high- and low-dose estrogen-progestin regimens. *Int.*

- Osteoporosis* **11**, 929-937.
7. Jang, M. K., O. H. Lee, M. Kim, S. R. Kang, and S. H. Lee. 2008. Evaluation of estrogenic activities of natural products. *J. Clin Biochem. Nutri.* **43**, 145-148.
 8. Kwak, C. S., S. A. Kim, and M. S. Lee. 2005. The correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content. *J. Food Sci. Nutr.* **34**, 1143-1150.
 9. Lee, I. K. and S. W. Gang. 1986. A check list of marine algae in Korea. *Algae* **2**, 311-325.
 10. Lee, S. H. 2003. Verification of estrogenic activities in ethanol extracts of oriental herbal medicines using *in vitro* detection system. *Korean J. Oriental Physiol. Pathol.* **17**, 1054-1058.
 11. Lee, Y. S., D. S. Kim, B. H. Ryu, and S. H. Lee. 1992. Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward Sarcoma-180 cell. *J. Food Sci. Nutr.* **21**, 544-550.
 12. Lien, L. L. and E. J. Lien. 1996. Hormone therapy and phytoestrogen. *J. Clin Pharm. Ther.* **21**, 101-111.
 13. Ponglikitmongkol, M., J. H. White, and P. Chambon. 1990. Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *EMBO J.* **9**, 2221-2231.
 14. Shin, M. O. and S. J. Bae. 2005. Anti-proliferating effects of *Porphyra tenera* fractions on several cancer cell lines *in vitro*. *J. Food Sci. Nutr.* **34**, 1543-1519.
 15. Yang, S. R., H. D. Hong, S. D. Cho, N. S. Ahn, J. W. Jung, J. S. Park, E. H. Jo, J. W. Hwang, B. Sun, J. R. Park, S. H. Lee, J. Y. Jung, and C. Choi. 2005. Screening of Korean medicinal herbs for hormonal activities using recombinant yeast assay and MCF-7 human breast cancer cells. *J. Food Hyg. Safety* **20**, 1-6.

초록 : 갈조류로부터 에스트로겐 고활성 분획의 검증

이승우 · 장민경 · 김남영 · 장혜지 · 이등근 · 김미향¹ · 김육용² · 김성구³ · 유병홍³ · 이상현*

(신라대학교 의생명과학대학 제약공학과, ¹신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과, ²(주) 아이에스푸드, ³(주) 바이오포트 코리아)

갈조류에서 에스트로겐 활성소재를 평가하기 위하여 *in vitro* 검출시스템을 사용하여 에스트로겐 효과를 가지는 분획을 검증하였다. 각각의 갈조류의 분획물들은 에탄올 추출로부터 물, 헥산, 부탄올 그리고 메탄올의 용매를 이용한 분획과정을 통해 제조하였다. 갈조류들의 수층 분획물에서 가장 높은 에스트로겐 활성을 보였다. 미역과 다시마의 수층 분획물들은 500 µg/ml의 농도에서 10⁻⁷ M의 표준물질(17β-estradiol)과 비슷한 활성을 보였으며, 곰피와 돌자반의 수층 분획물들은 500 µg/ml의 농도에서 10⁻⁸ M의 표준물질보다 높은 활성을 보였다. 이 연구의 결과로 갈조류인 미역, 다시마, 곰피 및 돌자반의 수층 분획물에 에스트로겐 대체 작용을 할 수 있는 성분이 포함되어 있는 것을 확인하였으며, 이를 이용하여 폐경기 장애를 예방할 수 있는 에스트로겐 활성소재의 개발이 가능할 것으로 기대된다.