

해양 미세조류 *Nannochloropsis oculata* 추출·분획물의 ACE, α -glucosidase 및 암세포 저해 활성

차선희·김민주·양혜영·진창범·전유진¹·Tatsuya Oda²·김대경*
한국기초과학지원연구원 해양바이오연구팀, ¹제주대학교 해양의생명과학부,
²나가사키대학 수산학부 생화학과

ACE, α -Glucosidase and Cancer Cell Growth Inhibitory Activities of Extracts and Fractions from Marine Microalgae, *Nannochloropsis oculata*

Seon-Heui Cha, Min-Joo Kim, Hye-Young Yang, Chang-Beum Jin,
You-Jin Jeon¹, Tatsuya Oda² and Daekyung Kim*

Marine Bio Research Team, Korea Basic Science Institute (KBSI), Jeju 690-140, Korea

¹School of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Division of Biochemistry, Faculty of fisheries, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, Japan

Extracts of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* were obtained using 80% methanol (MeOH) and water. The 80% MeOH extract was further fractionated with *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH), and water to isolate the active fraction. Seven samples were prepared and their angiotensin converting enzyme (ACE), α -glucosidase, and cancer cell growth inhibitory activities *in vitro* were determined. The most profound ACE inhibitory activity was observed in the chloroform fraction, while the others had moderate effects. By contrast, greater α -glucosidase inhibitory activity was found in the EtOAc fraction, *n*-hexane fraction, and water extract of *N. oculata*. The antiproliferative effects of the extracts and fractions against HL-60, U937, CT-26, and SK-Hep1 cancer cells were also determined. The *n*-BuOH fraction had the strongest antiproliferative effects on CT-26 cells in a time-dependant manner ($P < 0.05$). These results suggest that the extracts and fractions from *N. oculata* could be used as a potential functional food or as pharmaceutical ingredients.

Key words: Microalgae, *Nannochloropsis oculata*, Angiotensin converting enzyme (ACE), α -glucosidase, Cancer

서 론

현대사회는 식·의약품산업의 발달로 경제적인 여유와 문화적인 혜택을 누리고 있으나 이로 인한 환경오염 또는 과영양화로 인하여 인류의 생명 및 건강이 직·간접적으로 위협받고 있다. 이에 대응하여 건강유지나 생체리듬을 조절하는 효능이 있는 기능성 식품 또는 그런 약품들에 대한 관심이 높아지고 있어 연구의 중심이 되고 있다. 또한 식품의 기능에 있어서 영양기능과 그 맛 또는 조직이 인체의 감각에 미치는 기능 이외에 식품의 유해물질의 중화, 해독, 배설, 혈압, 혈당, 콜레스테롤의 감소, 비만 방지 및 다이어트 등의 생체 조절기능을 가지는 기능성 식품으로의 가치가 고려대상이 된지 이미 오래이다. 한편, 현재 대부분의 성인병 중 가장 문제가 되는 것은 영양과잉 및 운동부족으로 인한 비만으로 이에 수반하는 고혈압과 같은 순환기질병과 당뇨병이다.

고혈압은 전 세계적으로 만연한 질병으로 성인의 15~20%에 달하며 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색 및 당뇨병 등 심각한

만성 질병문제를 야기한다. 이는 정상적인 혈압을 유지하는 기구들이 천천히 붕괴되는 질병으로 순환기계 질병의 원인이 되는 동시에 앞서 언급한 질병들과 함께 합병증으로 나타날 경우 치사율이 매우 높은 만성 퇴행성 질환으로 발전하게 된다 (Frohlich, 1982).

고혈압 질병과 관련하는 angiotensin 전환 효소 (angiotensin converting enzyme, ACE)는 아연 금속 protease 그룹에 속하고 폐 혈관내피를 감싸고 있다 (Miyoshi et al., 1991). Angiotensin I 은 10개의 아미노산 잔기로 이루어진 펩타이드로서 angiotensinogen이 renin에 의해 분해되어 생성되며, 이것은 ACE에 의해서 C말단의 dipeptide (His-Leu)가 절단되어 8개의 펩타이드를 가진 강력한 혈관 수축 물질인 angiotensin II가 생성된다 (Curtiss et al., 1978; Dzau, 2001). 이렇게 생성된 angiotensin II는 동맥 혈관을 수축시키고 혈압을 상승시켜, 아드레날에서의 aldersterone의 분비를 촉진하여 신장의 sodium 및 수분의 재흡수를 증가시키는 역할을 한다. 또한 ACE는 혈관 확장, 장의 운동성 증대 등의 작용을 가진 bradykinin을 분해하여 불활성화시킴으로써 결과적으로 혈압

*Corresponding author: dkim@kbsi.re.kr

을 상승시키는 역할을 한다 (Cushman and Cheung, 1971; Sealey and Larahg, 1990). 이와 같이 혈압을 강화하는 ACE의 저해제를 연구함으로써 고혈압이나 심장병 치료를 위해 ACE 저해물질인 alacepril, benazepril, captopril, cilazapril, enalapril, fosinopril, lisinopril, moexipril, perindopril, quinapril, ramipril, tandolapril 및 zofenopril 등을 포함하여 많은 연구가 이루어졌다 (Kato and Suzuko, 1971; Atkinson and Rovertson, 1979, Sawayama et al., 1990). 그러나 이와 같은 화학 합성 치료제들은 헛기침, 미각 장애 및 피부 홍진 등의 부작용이 나타나기 때문에 (Ondetti, 1977) 식품 및 의약 등에서 천연물 유래의 ACE 저해제를 찾는 데 많은 관심을 기울이고 있다.

특히, ACE에 의하여 혈관수축 물질이 생성되어 고혈압을 유발하게 되어 이런 혈관 수축물질 제어물질로 captopril 등의 다양한 물질이 개발되고 연구되고 있으나, 이와 같은 화학 합성 치료제들은 다양한 부작용이 나타나기 때문에 식품 및 의약품 등에서 천연물 유래의 ACE 저해제를 찾는 데 많은 관심을 기울이고 있다. 천연물과 관련하여 한국을 비롯한 중국, 일본은 바다를 옆에 두는 지형을 가져서 문명시대부터 해산물을 전통 식품으로 널리 식용하였고, 해양조류도 고대부터 아시아에서 식용으로 소비해 온 반면, 서양에서는 주로 식물성 콜로이드, 농화제 (濃化劑) 및 겔 성분으로 산업 및 식품에서 응용해 왔다. 이런 선조들의 응용을 바탕으로, 최근에는 해양생물자원 유래의 천연물에 대한 기능성 천연 생리활성물질에 대한 관심이 지속적으로 높아지고 있으며, 해양 동물유래 생리활성 물질 뿐만 아니라 해양조류 유래의 생리활성물질의 연구가 영양적인 측면은 물론, 각종 질병 치료 및 건강 유지 등을 위해 수많은 연구자들에 의해서 지속적으로 연구되고 있으나, 해양조류 유래 성분으로부터의 ACE 저해물질에 대한 연구는 그다지 많이 이루어지지 않았으며 특히 이 연구에 사용한 *Nannochloropsis oculata*에 대한 결과는 아주 미미하다.

당뇨병은 고혈당 상태가 오랜 시간 지속됨에 따라 뇌중풍, 심근경색, 협심증, 시신경손상, 족부궤양 등 만성 합병증이 발생하게 되는 대사성질환으로서 현재 우리나라 인구의 약 10%가 이 질병을 앓고 있으며, 그 발병률 또한 급격히 증가하고 있는 추세이다 (Woo et al., 1998; Choi et al., 2008; DeFronzo, 1992). 이 질병에 대한 대안으로 사용되는 α -glucosidase 저해제는 소장 점막의 brush border에 분포하고 있는 탄수화물 소화효소 즉 maltose, sucrose, glucoamylase 등 각종 α -glucosidase의 효소 활성을 저해함으로써 다당류가 단당류로 분해되는 과정을 억제하여, 식후 과도한 혈당상승을 지연시키는 효과를 나타내게 된다 (Del Prato et al., 2007; Van de Laar et al., 2009). 현재 α -glucosidase 저해제로는 acarbose, voglibose 등이 임상에서 널리 사용되고 있지만, 이러한 약물들은 공통적으로 복부팽만, 설사 등의 위장 장애와 같은 부작용을 야기하고 있는 것으로 알려져 있다 (Tsujiimoto et al., 2008).

그 외, 인류에게 가장 대표적인 질병인 암은 현대의학의 발전과 다양한 식·의약품의 개발에도 불구하고 여전히 해결되

지 않는 위협요소로 작용하고 있다.

특히, doxorubicin과 paclitaxel (taxol) 같은 항암제는 부작용이나 내성 등의 부정적인 면을 지니고 있어 이러한 면을 보완할 수 있는 의약품의 지속적인 개발이 요구된다. 최근에 들어서는 합성의약품보다는 천연물의 약리효과에 대한 관심이 높아지고 있는 추세이다. 최근에 대표적인 천연물인 조류 (algae)가 많이 논의 되고 있으며 생명공학의 새로운 개척분야로 인식되고 있다. 또한, 미세조류는 해양에서의 기초생산, 즉 태양에너지를 이용하여 무기물로부터 유기물을 생산하며, 그 종류도 수만 중에 이르고 있을 뿐만 아니라, 해양생물의 먹이사슬에서 1차생산자로서 그 중요성은 매우 크다 (Choi et al., 2000). 미세조류의 산업적 이용에 관한 것으로 대체에너지원 및 건강식품으로의 이용성 외에도 건강보조 식품, 수산양식용 사료, 의약 원료 물질, 생화학 물질 등으로 그 대상이 점차 확대되고 있다.

미세조류 중 건강식품으로서 클로렐라와 스피롤리나는 비교적 높은 부가가치를 지닌 미세조류로 상품화되고 있다. 스피롤리나는 단백질 함량이 50%이상으로 매우 높고, γ -linolenic acid (GLA), phycocyanin, myxoxanthophyll, zeaxanthin 등 약리작용을 나타내는 물질이 다량 함유되어 있어 건강식품으로 선호되고 있다. 또한 옥내 배양이 가능하고 배양이 용이하여 전세계적으로 다수의 기업이 생산에 참여하고 있다.

최근에는 단세포 조류에 의한 기름이나 지방산의 생산에 대한 관심이 증가하고 있다. 영양보충제로서 docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA)와 같은 긴사슬불포화 지방산 (long-chain polyunsaturated fatty acids, LCPUFAs)이 대표적 예가 된다. 이 중 EPA는 20개의 탄소와 5개의 2중 결합 (20:5)을 갖는 LCPUFA이다. 조류 중에서 *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Navicula*, *Porphyridium* 등이 EPA를 다량으로 함유한 것으로 알려져 있다. EPA의 부족으로 혈관계의 이상을 초래할 수 있으며, EPA를 포함한 조류의 건조체가 상품화되었다.

이러한 이유 등으로 미세조류의 생리활성 추출물질에 대한 관심이 높아지고 있으며, 적조나 녹조를 일으키는 조류를 대상으로 다양한 toxin의 기능 및 이들의 이용에 대한 연구도 보고되고 있다.

본 연구에서는 이 연구에서는 새로운 기능성 식품 및 제약 소재 탐색을 목적으로 대표적인 해양미세조류인 *Nannochloropsis oculata*를 대량 배양하고 분획하여 이에 대한 다양한 생리활성을 평가하였다.

재료 및 방법

시약

세포배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin 및 Trypsin-EDTA는 Gibco/BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Bovine serum albumin (BSA), 3-(4,5-dimethylthiazol-

2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), α -glucosidase, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, DMSO (dimethyl sulfoxide) 과 본 연구에 사용한 일반적인 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) 에서 구입하였다. 그 외 시약은 특급용을 구입하여 사용하였다.

f/2-Si 배지의 조성 및 조제

여과 해수 1 L에 NaNO₃ (75 mg), NaH₂PO₄·H₂O (5 mg), FeCl₃·6H₂O (3.15 mg), Na₂·EDTA·2H₂O (4.36 mg), MnCl₂·4H₂O (0.18 mg), CoCl₂·6H₂O (0.01 mg), CuSO₄·5H₂O (9.8 μ g), Na₂MoO₄·2H₂O (6.3 μ g), ZnSO₄·7H₂O (22 μ g), B₁₂ (0.5 μ g), biotin (0.5 μ g), thiamine HCl (0.1 mg)을 용해하여 제조하였으며, pH 8로 조정후 121°C에서 15분간 멸균하여 배지로 사용하였다.

배양

f/2-Si 배지로 26°C, 60% 수분을 유지하면서, 형광불빛 (50 μ mol/m²/s) 아래 12시간 암·광주기로 배양하였다. 이 후, 배양액을 같은 조건에서 f/2-Si배지 100 mL, 500 mL 순으로 계대 배양하였다.

수확 및 추출

배양액 (3 L)에 증류수를 첨가하여 4°C, 4,500 rpm에서 30분간 원심분리 하였다. 총 3회 세척하여 상층액은 제거하고 세포만 회수하여 세포량의 5배량에 해당하는 증류수를 넣고 30분

간 초음파 파쇄 후, 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 건조된 분말 시료에 4배량의 80% methanol (MeOH)을 첨가하여 추출한 후 여과하여 얻은 추출액은 감압농축기 (rotary vacuum evaporator, N-1000, EYELA, Japan)로 40°C이하에서 농축하여 동결 건조하였다. 건조된 MeOH 추출물에 10배량의 80% MeOH과 동량의 n-hexane을 첨가하여 분획갈대기로 n-hexane과 80% MeOH 층으로 분획하였다. 80% MeOH 층은 감압농축한 후 chloroform과 증류수를 동량 처리하여 분획갈대기로 chloroform과 수층으로 분리하였다. 이 후 EtOAc 및 n-BuOH을 순차적으로 위와 동일한 방법으로 분리하여 각각 농축한 후 동결 건조하였다. 각 동결 건조하여 얻은 80% MeOH, n-hexane, chloroform, EtOAc, n-BuOH 및 수층 분획물과 물추출물을 실험에 사용하였다 (Fig. 1).

ACE 저해 활성 측정

ACE 저해활성 측정 방법은 Cushman and Cheung (1971)의 방법을 약간 응용하여 기질인 hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu)에 ACE가 작용하여 생성된 hippuric acid를 측정하는 방법을 사용하였다. 기질용액은 300 mM NaCl (pH 8.35)을 포함한 100 mM sodium borate buffer에 5 mM Hip-His-Leu를 섞어서 만들었고, 여기에 추출 시료 80 μ L를 첨가하여 37°C에서 3분간 전배양한 후 ACE (100 mU/mL)를 20 μ L넣고 30분 동안 효소반응을 시켰다. 반응시간이 끝난 후 반응을 정지시키기 위해 1 M HCl 250 μ L를 교반하면서 첨가하였다. 반응

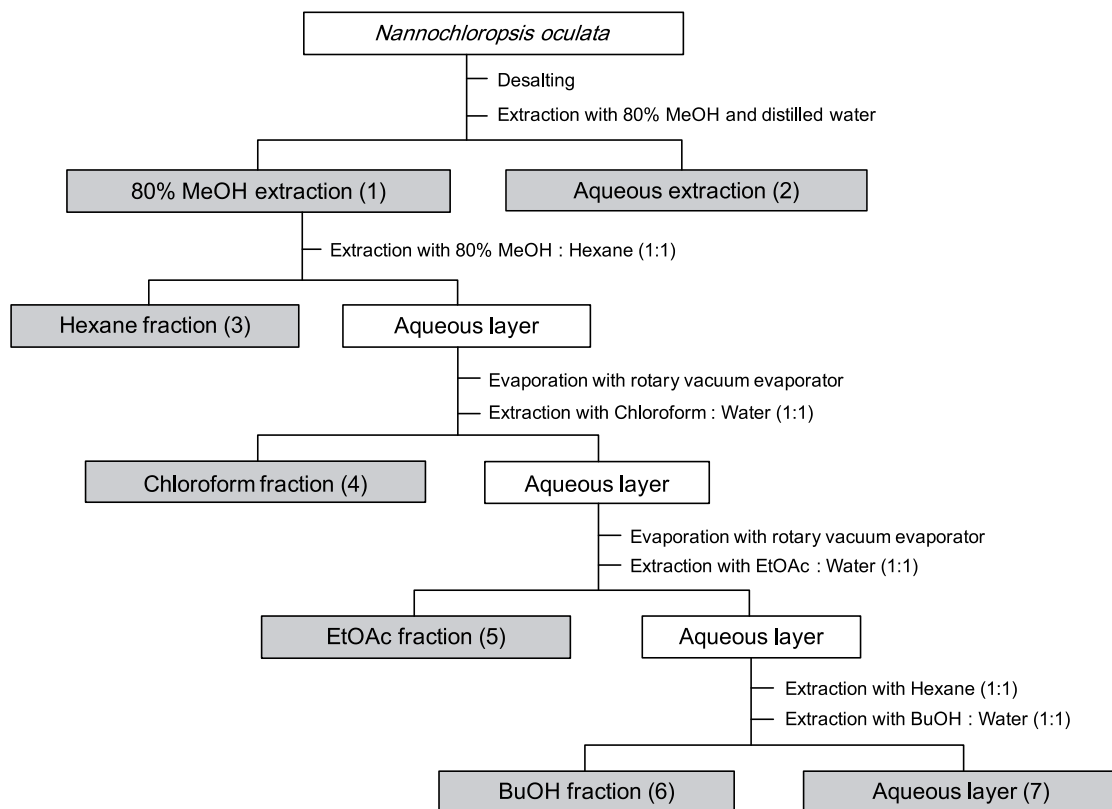


Fig. 1. The scheme for solvent fraction of Nannochloropsis oculata.

정지 후 hippuric acid를 추출하기 위해 1.7 mL ethyl acetate (EtOAc)를 넣고 잘 섞어 주었으며, 앞의 반응물을 원심 분리 (800 × g, 15분)한 후 상층액 1 mL를 microtube에 옮기고 약 40분정도 원심농축기 (VS802, Vision, Korea)에서 EtOAc를 모두 휘발시킨 다음 1 mL 증류수를 첨가하여 잘 섞었다. 이어서 ACE 저해활성은 혼합물을 228 nm에서 흡광도를 측정하고, 각 실험은 3회 반복 수행하였으며 각 실험치의 평균치로 나타내었다.

Alpha-glucosidase 효소저해 활성

Alpha-glucosidase 저해 활성은 Watanabe et al. (1997)의 방법을 이용하였으며, 효소는 효모로부터 얻어진 α -glucosidase를 사용하였고, 기질은 p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside를 사용하였다. Alpha-glucosidase는 0.2% BSA와 0.02% NaN_3 가 포함된 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 녹여서 효소 용액으로 사용하였고, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside는 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 5 mM이 되게 녹여서 기질 용액으로 사용 하였다. DMSO에 녹인 sample을 microplate에 10 μL 씩 분주하고, 대조군에는 DMSO를 10 μL 씩 처리하였다. Sample을 분주한 microplate에 효소 용액을 50 μL 씩 첨가 하여 섞어 주고, 5분 동안 실온에서 반응시킨 후에 microplate reader (Packard spectrocount™, Meriden, CT, Austria)로 405 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 그런 다음 기질 용액을 50 μL 씩 첨가하고 5분 동안 실온에서 반응시킨 후에 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기질 첨가 후 변화된 흡광도의 차이로부터 효소 저해율을 산출하였다. 각 실험은 3회 반복 수행하였으며 각 실험치의 평균치를 구하였다.

세포 배양

세포는 DMEM 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin 과 100 μg streptomycin을 첨가한 세포 배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO_2 incubator (5% CO_2)에서 배양하였다. 세포가 배양 접시의 80% 정도 차면 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA로 처리하여 계대 배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

세포 증식 측정

미세조류 추출물 및 분획물이 HL60, U937, CT-26 및 SK-Hep1 세포의 증식에 미치는 영향을 측정하기 위해 세포를 10% FBS가 첨가된 배지로 희석하여 1×10^5 cells/well의 밀도로 96 well plate 에 분주하였다. 16시간이 지난 후 1% FBS가 포함되어 있는 배지로 교환하여 혈청에 들어있는 여러 성분들의 효과를 최소화 한 후 미세조류 추출물 및 분획물 (500 $\mu\text{g/mL}$)을 첨가하여 0, 1, 2, 3일 동안 배양한 후 MTT assay 방법 (Denizot and Lang, 1986)을 이용하여 살아있는 세포수를 측정하였다. 각 실험은 3회 반복 수행하였으며 각 실험치의 평균치를 구하였다.

통계 처리

모든 분석 수치는 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 으로 나타내었다. 수집된 결과

는 SPSS (SPSS Inc., Version 12.0) 프로그램을 이용하여 통계 분석하였으며, 각 실험군들의 평균치간의 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

추출물 및 분획물의 ACE 저해 활성

고혈압은 전세계적으로 만연한 질병으로 성인의 15~20%에 달하며 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색 및 당뇨병 등 심각한 만성 질병문제를 야기한다. 이는 정상적인 혈압을 유지하는 기구들이 천천히 붕괴되는 질병으로 순환기계 질병의 원인이 되는 동시에 다양한 질병과 함께 합병증으로 나타날 경우 치사율이 매우 높은 만성 퇴행성 질환으로 발전하게 된다.

이 연구에서는 해양 미세조류 *N. oculata* 추출물 및 분획물을 대상으로 ACE 저해 활성을 검색하여 본 결과, chloroform 분획물이 유의적으로 가장 높았다. 즉 Hip-His-Leu를 기질로 사용하여 *in vitro*상에서 ACE 저해효과 검색실험 결과, *N. oculata* chloroform 분획물 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 측정농도에서 약 60% 효소 저해율을 보여주었다. 한편 메탄올 추출물을 *n*-hexane, chloroform, ethyl acetate (EtOAc) 및 *n*-butanol (*n*-BuOH)로 단계적으로 용매 분획하여 얻은 *n*-hexane 분획물은 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 측정농도에서 약 40%의 효소활성 저해효과를 나타내었으며, 메탄올 추출물은 동일한 농도에서 약 30%, 그리고 물 추출물은 25%의 효소활성 저해 효과를 보여주었으며, 그 밖의 EtOAc 분획물, *n*-BuOH 분획물 및 잔류 물 층은 20% 이하의 미미한 효소 저해율을 나타내었다 (Fig. 2).

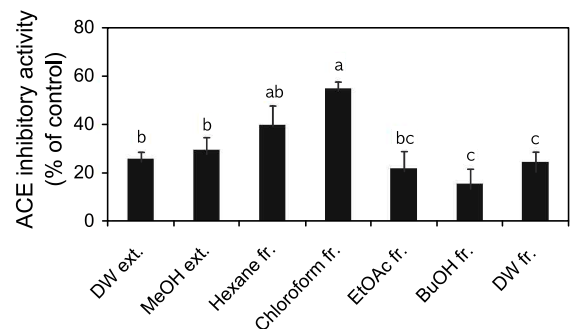


Fig. 2. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity of *Nannochloropsis oculata* extracts and fractions. The results are presented as means \pm S.D. of three independent experiments. ^{a,b,c} Values having different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

한편 해조류의 항고혈압 효과에 대한 연구개발 또한 활발히 진행되고 있으나 현재 분포하는 해조류의 약 10% 정도의 종만 연구되고 있는 미비한 실정이다. Cha et al. (2006)의 연구에서 제주 자생 갈조류 19종, 녹조류 10종, 홍조류 26종에 대한 항고혈압 효과를 검색한 결과 갈조류인 외톨개모자반 (*Myagropsis myagroides*), 넓패 (*Shige sinicola*), 바위주름

(*Petrospongium rugosum*), 툯 (*Hizikia fusiforme*), 말미역 (*Undaria pinnatifida*), 다시마 (*Laminaria ochotensis*) 등에서 우수한 효과를 보였고, 녹조류에서는 잎과래 (*Enteromorpha linza*), 납작과래 (*E. compressa*) 등이, 홍조류에서는 흑돌잎 (*Lithophyllum okamurai*), 잎꼬시래기 (*Gracilaria textorii*), 부챗살 (*Ahnfeltiopsis flabelliformis*), 마디잘록이 (*Lomentaria catenata*), 쌍발이서실 (*Laurencia okamurae*), 가는개도박 (*Grateloupia lanceolata*), 꼬시래기 (*Gracilaria verrucosa*) 등에서 우수한 항고혈압 효과를 보였다. Athukoral and Jeon (2005)은 감태 (*E. cava*), 패 (*Ishige okamurai*), 모자반 (*Sargassum fulvellum*), 잇바디팽생이모자반 (*S. horneri*), 큰잎모자반 (*S. coreanum*), 지층이 (*S. thunbergii*) 및 고리매 (*Scytosiphon lomentaria*) 등 7종의 갈조류의 효소 가수분해물로 항고혈압 활성을 측정하였고, 이 7종의 모든 가수분해물에서 우수한 항고혈압 활성을 확인하였으며 그 중 감태 가수분해물이 가장 뛰어난 항고혈압 활성을 나타내었다. 이러한 결과를 통해 해조류의 우수한 항고혈압 효과에 대한 연구는 정보구축 단계에 불과하나 그 잠재적 가능성은 매우 높다는 것을 알 수 있다.

이렇듯 해양 생물 유래 물질로부터의 AEC 저해 활성 물질에 대한 연구는 지속적으로 수행되고 있으며, 그 결과 또한 긍정적으로 나타나고 있다. 또한 이전 연구 결과에 따르면, 해조류는 식품이나 의약학적인 측면에서 잠재적인 천연 ACE 저해물질을 가지고 있는 것으로 사료된다. 그러나, 미세조류를 포함한 해조류에 있어서의 ACE 저해물질에 대한 연구는 아직까지 많이 이루어지지 않고 있다. 그렇기 때문에 해조류 분획물에 대한 ACE 저해 활성에 대한 더 많은 연구가 절실히 필요하다. *N. oculata*에 함유된 ACE 저해 성분들은 주로 chloroform과 *n*-hexane 분획물에 분포하는 것으로 예측되며 이 두 분획물로부터 효소활성 저해성분의 분리 정제가 필요할 것으로 사료된다.

추출물 및 분획물의 α-glucosidase 저해 활성

당뇨병 환자의 경우 소장 내 α-glucosidase는 정상인에 비하여 활성이 높아져 있기 때문에, 음식물의 열량을 생산하는 가장 주된 영양소인 탄수화물의 섭취시 혈당이 큰 폭으로 상승하게 마련이다. 이러한 α-glucosidase 억제제는 소장의 brush border에 존재하는 이당류 분해효소를 가역적으로 억제하여 장에서 탄수화물 흡수를 지연시켜, 식후 혈당을 감소시키고, 인슐린 비 의존성 당뇨병의 고혈당으로 인한 인슐린 분비 지연의 개선에 효과적이다. 임상에서 α-glucosidase의 억제제로 acarbose 및 voglibose 등이 사용되고 있다. 이런 α-glucosidase 억제제는 인슐린 분비를 통하지 않고, 소장에서의 탄수화물 소화 및 흡수를 저해함으로써 기존 약물들이 갖고 있는 저혈당 현상, 간독성 유발, 베타세포 기능저하 등의 부작용을 최소화 할 수 있는 장점을 가지고 있다.

이와 관련하여 이 연구에서 해양 미세조류 *N. oculata* 추출물 및 분획물을 대상으로 α-glucosidase 저해 활성을 검색하여 본 결과, EtOAc 분획물이 유의적으로 가장 높은 α-glucosidase 저해효과를 나타내었다. 즉 p-nitrophenyl-α

-D-glucopyranoside를 기질로 사용하여 *in vitro*상에서 α-glucosidase 저해효과 검색실험 결과, *N. oculata* EtOAc 분획물 500 µg/mL의 측정농도에서 약 63% 효소 저해율을 보여주었다. 한편 메탄올 추출물을 *n*-hexane, chloroform, EtOAc 및 *n*-BuOH로 단계적으로 용매분획하여 얻은 *n*-hexane 분획물 및 물 추출물은 500 µg/mL의 각각 55% 및 48%의 효소활성 저해효과를 나타내었으며, 메탄올 추출물은 동일한 농도에서 40%, 그리고 *n*-BuOH 분획물 및 잔류 물층은 20% 이하의 미미한 효소 저해율을 나타내었다 (Fig. 3).

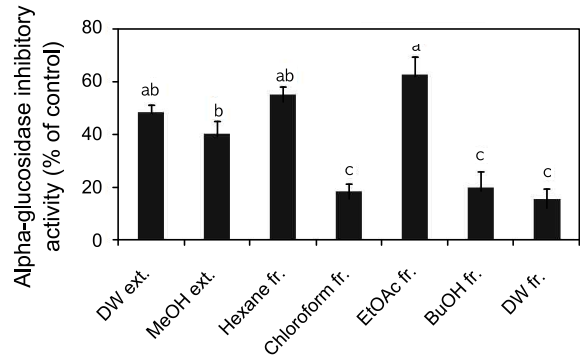


Fig. 3. Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Nannochloropsis oculata* extracts and fractions. The results are presented as means±S.D. of three independent experiments. ^{a,b,c} Values having different superscripts are significantly different at *P*<0.05.

해양미세조류와는 별도로 해조류를 소재로 한 기능성 물질 및 약리학적으로 연구가 활발히 이루어지고 있으나, 해조류는 그 성장 배경이 육상 식물과는 다르고, 해역, 그해의 날씨, 수온, 염분 변화 등에 따라 동일 종 이라도 기능성 활성이 항상 일정하지는 않아 한동안은 연구개발에 많은 어려움을 겪고 있는 것도 사실이다. 하지만 미세조류는 실내에서 대량 배양이 가능하기 때문에 기능성만 입증되면 물질 분리에 필요한 시료를 얻는데 유리하다.

이미 해조류는 항산화, 항암, 항혈액응고 및 항고혈압 등의 다양한 생리활성 기능이 있음이 밝혀졌다. 몇몇 해조류에서는 aldose reductase를 억제하여 항당뇨 소재로의 잠재성이 Lee et al. (2004)에 의해 연구되기도 했으며 이는 당뇨쥐를 이용한 *in vivo* 연구결과를 통해 해조류의 항당뇨 소재로서의 잠재성을 보여주고 있다. 또한, 해조류는 알칼리성 식품으로 각종 미네랄이 풍부하고 칼로리가 거의 없어 성인병 예방 및 비만 방지 효과 등이 알려져 있으며, 칼륨, 요오드, 칼슘, 식물성 섬유 등 몸에 좋은 성분이 종합해서 짙어지는 미용에 좋은 식품, 성인병 및 비만을 방지하는 식품으로 현대에 특히 각광 받고 있는 건강식품이다. 미세조류는 다른 조류에 비하여 단백질 함량이 높아 영양식품으로 간주하기도 한다. 이 연구 결과에 의하면 *N. oculata*에 함유된 α-glucosidase 효소활성 저해 성분들은 주로 EtOAc 분획물에 분포하는 것으로 예측되며 이 EtOAc 분획물로부터 효소활성 저해성분의 분리 정제가 필요할 것으로 사료된다.

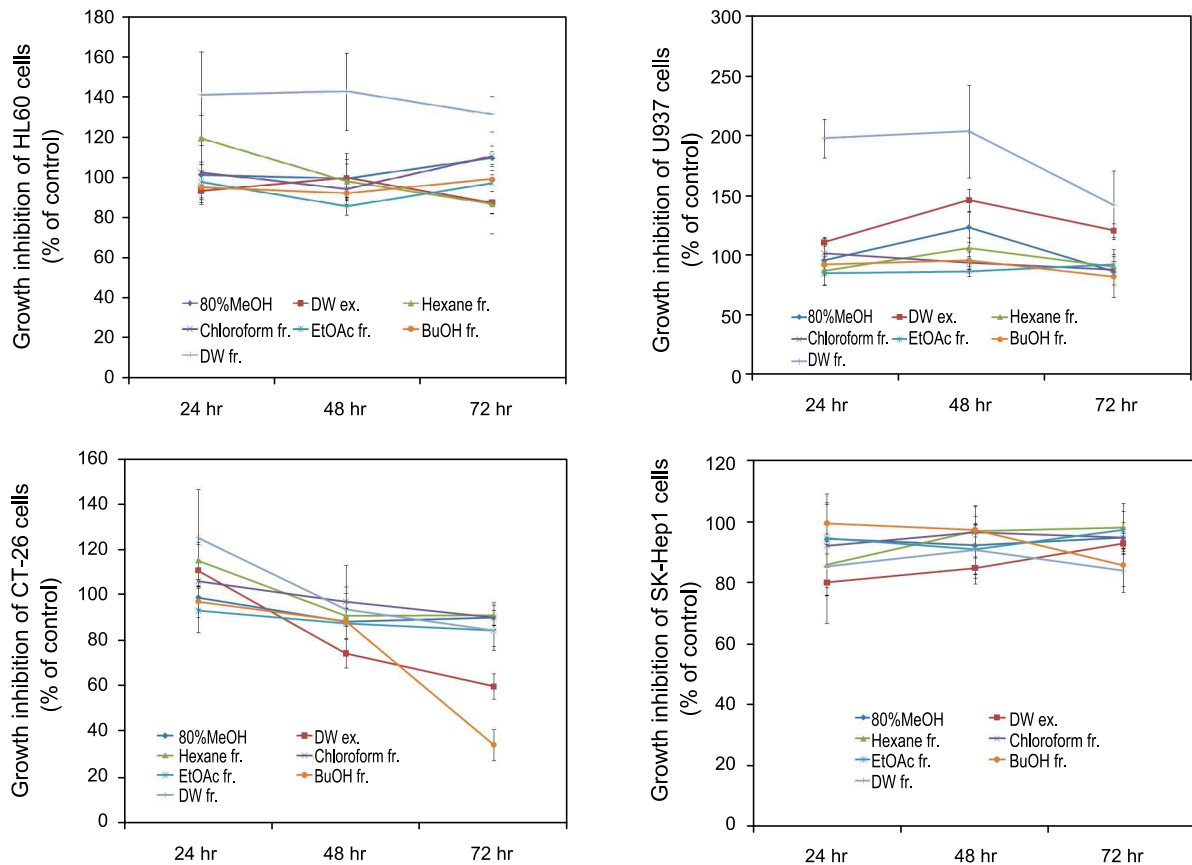


Fig. 4. Antiproliferative effect of *Nannochloropsis oculata* extracts and fraction on HL-60, U937, CT-26 and SK-Hep1 cell lines. The results are presented as means±S.D. of three independent experiments.

추출물 및 분획물의 암세포의 증식 억제 활성

해조류를 이용한 항암제의 연구개발은 해조류를 많이 섭취하는 일본에서 특히 많은 연구 (Matsuda et al., 2010)가 이루어져 있으며 국내 (Qwak et al., 2006)에서도 꾸준히 이루어지고 있다. 최근 들어 해조류를 비롯한 여러 천연물에서 항암 물질을 탐색하는 이유는 국민소득이 증대됨에 따라 식생활이 서구화되면서 각종 성인병과 암들이 유발되고, 고령화 인구가 늘어가게 되면서 건강문제에 대한 인식이 바뀌게 되었기 때문이다. 또한 합성 항암제를 다량 섭취했을 때의 독성문제가 야기되면서 인체에 무해하고 활성이 우수한 천연 항암제를 찾기 위한 노력이 계속되고 있다. 뿐만 아니라, 천연물 유래의 새로운 암예방 물질의 개발로 그 예방과 치료의 방향이 전환되어 가고 있는 실정이며 이들 중간 화합물은 주로 공격적인 암세포들의 증식을 막거나 약화시켜 예방하는데 사용되고 있으며, 천연물질의 동정과 활성여부의 판단 및 그 대체 요법의 성공 등은 천연물을 이용한 생물학적 기초를 형성하는데 크게 기여하고 있는 실정이다 (Reddy et al., 2003; Doll and Peto, 1981; Sharma et al., 1994). 육상 생물에서 뿐만 아니라 해양생물에서 항발암 효과에 대한 천연물 검색이 활발히 연구되고 있으며 (Schwartzmann et al., 2001) 특히, 식용으로 쓰이는 해양식물인

해조류는 일반적으로 영양가는 풍부하지 않지만 다양한 생리활성 물질들을 가지고 있음이 보고되고 있다. 일반적으로 해조류에는 carotinoids가 풍부하고 (Krinsky, 1991) 높은 항산화 효과를 나타내는 mycosporine-glycine이 많이 들어 있으며 (Dunlap and Yamamoto, 1995), 항발암 물질, 항산화 물질 등을 함유하고 있다. 식물성 식품에 함유된 플라보노이드, 폴리페놀 등의 phytochemicals은 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있는데, 특히 해조류 중에 풍부한 알긴산과 펙틴산 등의 수용성 다당류는 식품의 조리 및 가공 중에 생성되는 nitrosoamine과 같은 발암원이 소장에서 흡수되는 것을 감소시켜 암의 발생을 감소시킨다고 보고되기도 하였다 (Chiharu et al., 1992). 해조류에 함유된 sulfated polysaccharide인 fucoidan은 육종 암세포 sarcoma-180, 백혈구 암세포 L-1210, 피부암세포 Meth-A, B-16 melanoma cell 등과 같은 암세포의 성장에 억제효과가 있고, 미역과 다시마의 다당류 분획은 sarcoma-180 cell에 대하여 항암작용을 나타내었다 (Ryu et al., 1989).

이 연구에서 해양 미세조류 *N. oculata* 추출물 및 분획물이 4종류의 암세포 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 세포 배양액에 *N. oculata* 추출물 및 분획물을 첨가하여 세포를 24, 48 및 72시간 배양한 후 MTT assay를 실시하여 살아있는

세포수를 측정해 본 결과, 혈액암 세포인 HL-60 (human promyelocytic leukemia cell), U937 (human leukemic monocyte lymphoma cell) 세포의 증식억제 효과는 없었고, 인간 간암세포 SK-Hep1 (human hepatocellular carcinoma cell)의 세포 증식억제에는 영향을 주지 못하였지만, 대장암세포인 CT-26 (murine colon carcinoma cell)에서는 우수한 세포 성장 억제 효과를 보여 주었다. 특히, *n*-BuOH 분획물에서 암세포 성장률이 약 34%로 약 66%의 암세포 성장억제로 가장 높은 저해 활성을 보여주었다. 또한 물 추출물에서는 약 40%의 암세포 성장억제 활성을 나타내었다 (Fig. 4). *N. oculata* 추출물 및 분획물을 이용하여 더 많은 암세포 성장 억제 활성에 대한 스크리닝이 요구되고, 이 연구를 통하여 *n*-BuOH 분획물에 대하여 대장암에 대한 좀 더 체계적인 항암 기작 연구가 필요할 것으로 사료되며 아울러 지속한 연구개발을 통해 *N. oculata*에서 생리활성 물질의 구조를 추적하면 항암효과를 지닌 기능성 식품의 산업화도 가능할 것으로 전망된다.

사 사

이 연구는 한국기초과학지원연구원 제주센터 설치운영 사업과 제주특별자치도 및 제주국제자유도시개발센터 (JDC)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Athkoral Y and Jeon YJ. 2005. Screening for angiotensin -I converting enzyme inhibitory activity of *Ecklonia cava*. J Food Sci Nutr 10, 134-139.
- Atkinson AB and Roverson J. 1979. Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. Lancet 2, 836-839.
- Cha SH, Ahn GN, Heo SJ, Kim KN, Lee KW, Song CB, K. Cho SM and Jeon YJ. 2006. Screening of extracted from marine green and brown algae in Jeju for potential marine angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. J Kor Soc Food Sci Nutr 35, 307-314.
- Chiharu N, Tadadhi N and Toshimara Y. 1992. Effect of pH on the *in vitro* absorption of mutagens to dietary fibers. Biosci Biotechnol Biochem 56, 1100-1105.
- Choi HJ, Kang JS, Choi YW, Jeong YK and Joo WH. 2008. Inhibitory activity on the diabetes related enzymes of *Tetragonia tetragonoides*. Kor J Biotechnol Bioeng 23, 419-424.
- Choi JS, Lee WK, Son BW, Kim DS, Choi HD, Choi JS, Jung JH, Im KS and Choi WC. 2000. Screening on radical scavenging activity of marine algae. Kor J Pharmacogn 31, 252-255.
- Curtiss C, Chon JN, Vrobel T and Francious JA, 1978. Role of the rennin-angiotensin system in the systemic vasoconstriction of chronic congestive heart failure. Circulation 58, 763-770.
- Cushman DW and Cheung HS, 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol 20, 1637-1648.
- DeFronzo RA. 1992. Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. Diabetologia 35, 389-397.
- Del Prato S, Bianchi C and Marchetti P. 2007. Beta-cell function and anti-diabetic pharmacotherapy. Diabetes Metab Res Rev 23, 518-527.
- Denizot F and Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods 89, 271-277.
- Doll R and Peto R. 1981. The cause of cancer. Quantitative estimates of available risks of cancer in the United State today. J Natl Cancer Inst 66, 1191-1308.
- Dunlap WC and Yamamoto Y. 1995. Small-molecule antioxidants in marine organism: antioxidant activity of mycosporine-glycine. Comp Biochem Physiol 112B, 105-114.
- Dzau VJ. 2001. Tissue Angiotensin and pathobiology of vascular disease : A unifying hypothesis. Hypertension 37, 1047-1052.
- Frohlich ED. 1982. Hemodynamic factors in the pathogenesis and maintenance of hypertension. Fed Am Soc Exp Biol 41, 2400-2408.
- Kato H and Suzuko T, 1971. Bradykinin-potentiating peptides from venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*: Isolation of five bradykinin potentiators B and C. Biochemistry 10, 972-980.
- Krinsky NI. 1991. Effects of carotenoids in cellular and animal systems. Am J Clin Nutr 53, 238-246.
- Lee dg, Hyun JW, Kang KA, Lee JO, Lee SH, Ha BJ, Ha JM, Lee EY and Lee JH. 2004. *Ulva lactuca* : A Potential Seaweed for Tumor Treatment and Immune Stimulation. Biotechnol Bioprocess Eng 9, 236-238.
- Matsuda Y, Teruya K, Matsuda S, Nakano A, Nishimoto T, Ueno M, Niho M, Yamashita M, Eto H and Katakura Y. 2010. Anti-Cancer Effects of Enzyme-Digested Fucoïdan Extract from Seaweed Mozuku. Animal Cell Technol: Basic & Applied Aspects 16, 295-300.
- Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T, Fukui F, Tanaka H and Maruyama S. 1991. Structure and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -zein

- hydrolysate. *Agri Biol Chem* 55, 1313-1318.
- Ondetti MA. 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science* 196, 441-444.
- Reddy L, Odhav B and Bhoola KD. 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther* 99, 1-13.
- Ryu BH, Kim DS, Cho KJ and Shin DB. 1989. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *J Kor Food Sci Technol* 21, 595-600.
- Sawayama T, Itokawa A, Shumada K, Doi Y, Kimura K and Nishimura H. 1990. Synthesis of 1-[(S)-acetylthio-2-methylpropanoyl]-L-propyl-L-phenylalanine (Alacepril) and one of its active metabolites, the desacetyl derivation (DU-1227). *Chem Pharm Bull* 38, 529-531.
- Schwartzmann G, Rocha AB, Berlinck GS and Jimeno J. 2001. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Oncology* 2, 221-225.
- Sealey JE and Laragh JH. 1990. Pathophysiology, diagnosis and management. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. Raven Press, LTD, New York, U.S.A. 1287-1317.
- Sharma S, Stutzman JD, Kelloff GJ and Steele VE. 1994. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res* 54, 5848-5855.
- Tsujimoto T, Shioyama E, Moriya K, Kawaratani H, Shirai Y, Toyohara M, Mitoro A, Yamao J, Fujii H and Fukui H. 2008. Pneumatosis cystoides intestinalis following alpha-glucosidase inhibitor treatment: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 14, 6087-6092.
- Van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, Van de Lisdonk EH and De Grauw WJ. 2009. Alpha-glucosidase inhibitors for people with impaired glucose tolerance or impaired fasting blood glucose. *Cochrane Database Sys Rev* 18, CD005061.
- Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H and Niki R. 1997. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from Tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 177-178.
- Woo JT, Kim YS, Choi YK, Kim JW, Yang IM, Kim SW, Kim DY, Kim K W, Lee MK, Lee MS and Jung JH. 1998. Lowering effect of voglibose, monotherapy on uncontrolled postprandial glucose in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) being treated with strict diet control. *J Kor Diabet Assoc* 22, 419-428.

2010년 9월 8일 접수
 2010년 10월 1일 수정
 2010년 10월 11일 수리