



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**변경금지.** 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주연안 갈조류 추출물이  
아밀로이드 베타 단백질에 의해  
일으키는 신경세포 독성의 억제 효과



濟州大學校 教育大學院

營養教育專攻

韓 恩 惠

2007年 8月

The Inhibitory Effects of Brown algae Extracts  
Derived from the Coast of Jeju Island on  
Amyloid  $\beta$  Protein-Induced Toxicity in  
Neuronal cell

Eun-Hye Han

(Supervised by Professor Dong-Bum Shin)

A thesis submitted in partial fulfillment of the  
requirement for the degree of Master of Education

2007 . 8 .

Department of nutrition education  
GRADUATE SCHOOL OF EDUCATION  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

목차	i
Abstract	ii
List of Tables	iv
List of Figures	v
I. 서론	1
1. 연구배경	1
2. 연구목적	9
II. 재료 및 방법	10
1. 갈조류 추출물 준비	10
2. 세포배양	10
3. DPPH radical 소거능 측정	11
4. MTT assay	11
5. Western blot	12
III. 결과 및 고찰	14
1. DPPH radical 소거능 측정	14
2. MTT assay	17
3. Western blot	22
IV. 결론	30
V. 참고문헌	32
국문초록	42

<Abstract>

The Inhibitory Effects of Brown algae Extracts  
Derived from the Coast of Jeju Island on  
Amyloid  $\beta$  Protein-Induced Toxicity in Neuronal cell

Eun-Hye Han

Department of Nutrition Education, Graduate School of Education,  
Cheju National University  
Jeju, Korea  
Supervised by Professor Dong-Bum Shin

Ten kinds of methanol extract of brown algae derived from the coast of Jeju island were conducted to test the antioxidant activity as well as the activity to reduce the toxicity to the neuronal cell HT-22 induced by amyloid beta protein(A $\beta$ ).

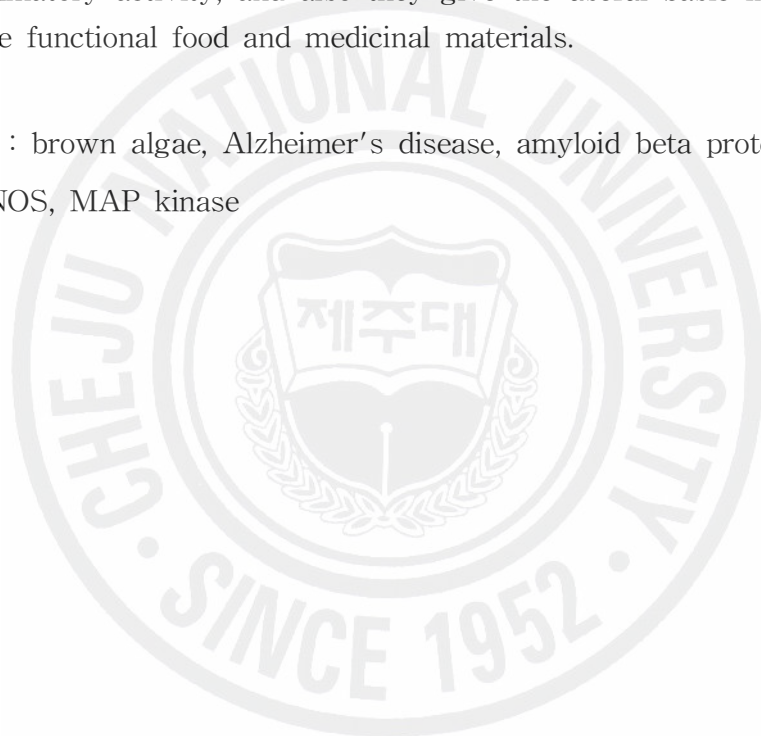
*Ecklonia cave* and *Ishige okamurai* among ten kinds of brown algae showed outstanding DPPH radical scavenging antioxidant activity. MTT assay showed that brown algae extracts had the ability to reduce the toxicity to the neuronal cell caused by A $\beta$  compared to the control. When the brown algae extracts were added to the cell line 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , it showed the higher cell survival rate in order of *Petalonia binghamiae*, *Myelophycus simplex*, *Colpomenia sinuosa* and *Sargassum hemiphyllum*. When added 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , it showed the higher cell survival rate in order of *Sargassum confusum*, *Petalonia binghamiae*, *Colpomenia sinuosa* and *Sargassum hemiphyllum*

According to the result of protein expression patterns relating to the death of the neuronal cell caused by A $\beta$  when treated brown algae extracts, the expression of APP, the precursor protein of A $\beta$ , did not decrease, however

the expression of BACE1, the degradation enzyme of A $\beta$ , decreased. The expression of iNOS induced by inflammatory reaction decreased as well. The experiment of protein expression patterns of molecular components of MAP kinase showed the most inhibitory effect of ERK by *Sargassum hemiphyllum*, JNK by *Colpomenia sinuosa* and p38 by *Myelophycus simplex*.

In these results, brown algae extracts showed high antioxidant activity, and they had the activity to reduce the toxicity of neuronal cell induced by A $\beta$  in the Alzheimer's disease. Therefore it is considered that brown algae lived on the coast of Jeju island will be the useful biological materials that have the activity to protect neuronal cell, the anti-Alzheimer's disease activity and the anti-inflammatory activity, and also they give the useful basic informations to develop the functional food and medicinal materials.

Key word : brown algae, Alzheimer's disease, amyloid beta protein(A $\beta$ ), APP, BACE1, iNOS, MAP kinase



## List of Tables

Table 1. List of brown algae .....	10
Table 2. Inhibitory effects of methanol extract of 10 kinds brown algae on A $\beta$ -induced toxicity in HT-22 cells .....	19



## List of Figures

Fig. 1. DPPH radical scavenging activity (%) of brown algae extracts on the concentration in the range of 1 mg/mL	16
Fig. 2. Inhibitory effects of methanol extract of brown algae at 25 µg/mL on Aβ-induced toxicity in HT-22 cells	20
Fig. 3. Inhibitory effects of methanol extract of brown algae at 50 µg/mL on Aβ-induced toxicity in HT-22 cells	21
Fig. 4. Inhibitory effects of methanol extract of brown algae on the APP and BACE1 protein level in HT-22 cells	25
Fig. 5. Inhibitory effects of methanol extract of brown algae on the iNOS protein level in HT-22 cells	26
Fig. 6. Inhibitory effects of methanol extract of brown algae on the ERK protein level in HT-22 cells	27
Fig. 7. Inhibitory effects of methanol extract of brown algae on the JNK protein level in HT-22 cells	28
Fig. 8. Inhibitory effects of methanol extract of brown algae on the p38 protein level in HT-22 cells	29



# I. 서 론

## 1. 연구배경

현대사회에서 국민들이 건강에 대한 관심이 날로 증가함에 따라 노화 억제와 심장, 암, 당뇨, 치매 등 만성 또는 난치성 질환의 예방을 위한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다<sup>(1)</sup>. 이와 더불어 식생활 수준의 향상과 식품의 안전성에 대한 사람들의 의식이 증가 되면서 천연에서 위와 같은 질병을 예방 할 수 있는 생리활성 물질을 찾는데 노력을 기울이고 있다<sup>(2)</sup>. 생리활성 물질은 매우 적은 양으로 현저한 활성을 나타내는 고부가가치의 물질로서 유용하게 이용되고 있으며 그 소재를 육상의 동·식물은 물론 해양 생물에서도 탐색되고 있다<sup>(3-4)</sup>.

우리나라는 삼면이 바다로 둘러 싸여 있고 비교적 해양생물 자원이 풍부하여 과거로부터 해산물을 널리 식용으로 이용해 왔고, 해조류는 고대부터 식용으로 소비해 왔다. 더욱이 제주도 연안은 우리나라에서 가장 수온이 높고 다른 지역에서 볼 수 없는 아열대성의 남방계 해조류를 많이 볼 수 있으며 특히 툃과 모자반을 이용한 전통 음식이 많이 전해 내려오고 있다<sup>(5-6)</sup>.

식용으로 쓰이는 해조류는 소화흡수율이 낮고 영양가가 낮아서 예전에는 영양학적 측면에서 관심을 끌지 못하였으나, 무기질, 비타민 및 식이섬유소가 풍부하고 최근 다양한 생리활성 물질들을 가지고 있음이 보고되고 있어 해조류에서 기능성 생리활성 물질 탐색에 대한 관심이 지속적으로 높아지고 있다<sup>(7)</sup>. 특히 갈조류는 fucoidan이라는 성분이 항암작용에, laminarin이라는 성분이 항염증작용에 효과가 있다고 알려져 있다<sup>(7-8)</sup>. 그리고 제주 연안의 해조류를 이용한 항산화 활성 연구 결과 갈조류에서의 항산화 활성이 녹조류 및 홍조류에 비해 매우 높았고 그 중 모자반류에서 뛰어난 활성이 나타났다<sup>(9)</sup>. 이밖에도 제주도 연안에서 서식하는 갈조류를 이용한 생리활성 물질을 탐색하기 위한 활발한 연구가 이루어지고 있는데 백혈병 세포인 HL-60를 이용한 연구<sup>(10)</sup>에서 고리매 추출물이 암세포의 성장을 억제 시키는 효과가 나타났고 툃, 미역, 다시마의 에탄올 추출물이

항돌연변이성, 항균성을 나타냈으며<sup>(2)</sup> 잇바디펩생이모자반, 말미역, 바위주름, 넓  
패, 톳, 다시마의 메탄올 추출물과 감태의 수용성 추출물에서 항고혈압성 활성을  
보였다<sup>(5)</sup>. 또한 갈조류의 효소적 가수분해 방법을 이용한 연구에서는 과산화수소  
로부터의 활성산소 소거능이 90%로 높게 나타났고 50%의 DNA손상을 보호하는  
효과를 나타냈으며<sup>(11)</sup> 감태의 분획물이 암세포의 증식을 억제 시키는 항증식성  
효과가 있었고 항산화 효과도 합성 항산화제인 BHA, BHT보다 매우 높게 나타  
났다<sup>(12)</sup>. 비틀대모자반으로부터 얻은 farnesylacetone 유도체는 아세틸콜린의 작  
용을 저하시키는 Cholinesterase의 두 가지 형태인 acetylcholinesterase과  
butyrylcholinesterase을 억제 시켜 치매 예방 효과가 기대되고 있다<sup>(13)</sup>. 이와 같이  
제주 연안 해조류로부터의 생리활성 물질의 연구가 영양학적인 면에서부터 의학  
적인 면까지 이루어지면서 새로운 식품첨가물 및 기능성식품 소재, 의약품 소재  
로서 개발이 기대되고 있다.

한편, 의학의 발달은 인간의 수명을 연장해 주는 동시에 노인 인구의 증가로 인  
한 노인성 질환의 급격한 증가를 가져왔으며 그 중에서도 치매는 “21세기 질병”  
으로 불릴 만큼 심각한 보건 문제로 대두되고 있다<sup>(14)</sup>. 치매(dementia)는 인간의  
기억력, 인지력, 언어력, 계산력 장애로 독립적인 생활능력을 현저히 감퇴시키는  
만성 진행성 뇌 정신질환으로 타인에 대한 의존도가 매우 높아 가정은 물론 사  
회적인 문제로까지 인식되고 있다. 치매는 그 발생 원인에 따라 매우 다양하게  
분류되고 있는데 크게 뇌신경 세포의 퇴행에 의한 치매와 후천적 뇌질환에 의한  
치매로 분류 할 수 있다. 뇌신경 세포의 퇴행으로 인한 질환에는 알츠하이머병  
(Alzheimer's disease), 픽크병(Pick disease), 파킨슨병(Parkinson disease), 헌팅  
톤병(Huntington disease) 등이 있으며 후천성 뇌질환이 원인이 되어 발생할 수  
있는 질환에는 혈관성 치매, 다발성 경화증, 뇌종양, 외상(경막하혈종), 뇌수종 등  
이 있다<sup>(15)</sup>. 이중 알츠하이머형 치매와 혈관성 치매가 대표적인 치매의 종류로 혈  
관성 치매는 뇌출혈, 뇌졸중 등 뇌혈관에 장애가 생겨 발생하는 치매를 말하며  
알츠하이머형 치매는 뇌신경 세포의 퇴행으로 인하여 발생하는 치매로 노인성  
치매 환자의 60~70%를 차지하며 나이가 들수록 이환율이 높은 것으로 알려져  
있다<sup>(16-17)</sup>.

알츠하이머병의 병리학적 특징으로는 신경세포 외부에 축적되는 노인반점

(senile plaques)과 신경세포의 세포체 내에 엉켜진 신경섬유덩어리(neurofibrillary tangles)를 들 수 있다. 이중 노인반점의 생성은 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein; APP)의 용해과정에서 유래된 아밀로이드 베타 단백질(amyloid  $\beta$ -protein; A $\beta$ )의 축적에 의하며 축적된 A $\beta$ 가 신경세포에 독성으로 작용하여 신경세포에 염증반응이 촉진되고 결국 신경세포의 사멸을 일으키게 된다. 따라서 알츠하이머병의 주요 병인은 아밀로이드 베타 단백질로 생각되어지고 있다<sup>(18-20)</sup>.

알츠하이머병의 병인인 A $\beta$ 는 다양한 경로를 통하여 신경세포의 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있는데 A $\beta$ 의 축적은 신경세포에 독성작용을 나타내며 이로 인해 세포에 염증반응을 일으키고 염증 반응 시 세포내에 증가 하는 것으로 알려진 iNOS의 발현을 증가시킨다. 그리고 iNOS의 발현으로 free radical의 일종인 NO가 다량 생성되고 NO의 자극에 의해 세포신호 전달 체제인 MAP kinase pathway가 작동되는 것으로 알려져 있다<sup>(21-22)</sup>.

다음은 본 연구에서 지표로 이용 되고 있는 A $\beta$ 의 생성 경로와 iNOS 그리고 MAP kinase pathway에 의한 신경세포의 사멸 과정에 대한 연구 결과를 요약정리 하였으며, 시료로 사용된 갈조류에 대한 기존 연구 결과들을 정리 하였다.

#### 1) 세포사

정상적인 세포는 세포분열에 의하여 세포 증식이 이루어지고 일정기간 동안 자신에게 주어진 기능을 수행한 후 세포사(cell death)를 일으키는데 이러한 세포사에는 apoptosis와 necrosis의 2가지 형태가 존재하게 된다<sup>(23)</sup>.

apoptosis는 동물의 발생 및 성장 과정이나 면역세포 등에서 불필요해진 세포 또는 원하지 않는 세포를 제거하는 정상적인 생리 과정으로 제어 기구에 의해 프로그램 된 능동적 과정이라고 할 수 있다. 또한 질병 상태 하에서 영향을 받은 세포를 제거하기 위하여 apoptosis가 일어나게 된다<sup>(24)</sup>.

necrosis는 영양소 결핍, 독성이 있는 화학물질에 노출, 기계적인 충격 같은 상황에서 유발되는 수동적 세포사라고 할 수 있다. necrosis 발생 시에는 세포내로 extracellular ion 과 water가 유입되어 세포의 주요한 homeostasis를 깨트려 세포의 능력을 손상시킨다. 또 세포의 plasma membrane이 붕괴되어 세포질이 포

함하고 있는 lysosomal enzyme이 세포외부의 조직으로 분비된다. 그 결과 necrosis가 일어난 cell의 외부 조직은 극심한 염증반응을 받게 된다<sup>(25)</sup>.

## 2) 아밀로이드 베타 단백질에 의한 신경세포 사멸

아밀로이드 베타 단백질(A $\beta$ )은 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 대사 과정에서 생성되는 일부분으로서 39~43개 내외의 아미노산으로 이뤄진 펩타이드이다<sup>(26)</sup>. A $\beta$ 가 알츠하이머병의 발병 원인으로 작용할 것이라는 아밀로이드 베타 가설은 아세틸콜린의 저하가 알츠하이머병의 병인이라고 생각해왔던 아세틸콜린 가설 이후에 가장 오래도록 여러 가지 실험적 증거들에 의하여 공통적으로 받아들여지고 있다<sup>(27)</sup>.

A $\beta$ 의 전구 단백질 APP는 770개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로 amyloidogenic pathway와 non-amyloidogenic pathway의 두 가지로 그 대사과정이 진행된다. amyloidogenic pathway은 A $\beta$ 가 형성되는 경로로  $\beta$ -secretase와  $\gamma$ -secretase라는 단백질 분해효소에 의하여 APP가 대사되는데 먼저  $\beta$ -secretase에 의해 APP가 sAPP $\beta$ 와 C-terminal fragment- $\beta$ (CTF $\beta$ )로 분해되고 CTF $\beta$ 가 다시  $\gamma$ -secretase에 의해 A $\beta$ 와 CTF $\gamma$ 로 분해되는 경로이다. amyloidogenic pathway의 대사산물인 A $\beta$ 가 신경세포 주변으로 침착되어 신경세포 독성을 야기시켜 신경세포의 손상과 염증반응을 촉진 시키고 결국 신경세포의 사멸을 가져와 알츠하이머병의 병인이 된다. non-amyloidogenic pathway는  $\alpha$ -secretase라고 알려진 단백질 분해 효소가 활성화 되어 APP를 분해하는 것으로  $\alpha$ -secretase는 A $\beta$ 의 16~17번째 부분에 작용하여 sAPP $\alpha$ 와 CTF $\alpha$ 가 생성되며 CTF $\alpha$ 는 다시  $\gamma$ -secretase 작용에 의해 short peptide(P3)과 CTF $\gamma$ 로 대사된다. non-amyloidogenic pathway는 A $\beta$ 의 일부분이 잘려나가게 되어 그 침적이 방해되며 대사산물인 sAPP $\alpha$ 는 세포 성장 및 보호 작용을 보인다<sup>(18,19,28-30)</sup>.

A $\beta$ 의 형성에 관여하는 효소인  $\beta$ -secretase는 aspartic protease의 일종으로 BACE1과 BACE2가 동정 되어지고 있으며 BACE1( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1)은 이자, 뇌 등에서 발현이 되며 세포내의 소포체와 골지체와 같은 APP가 발현되는 곳과 같은 위치에서 발현된다. 뇌에서는 hippocampus, cortex, cerebellum에서 그 발현량이 높다<sup>(29-33)</sup>.

### 3) Mitogen-activated protein kinases(MAP kinase) pathway

MAP kinase pathway는 세포 밖의 성장 호르몬, cytokine, stress 등의 자극을 세포가 수용체를 통하여 받아들여 세포막에서부터 세포내 핵까지 전달하는 세포안의 신호 전달 분자체계이다. 이렇게 받아들인 정보는 증식, 분화, 사멸 등 다양한 기능을 수행할 수 있게 유전자를 발현시킴으로써 반응하게 된다<sup>(34)</sup>.

MAP kinase는 크게 ERK (the extracellular signal-activated kinases), JNK (the c-JUN N-terminal kinase), p38 세 가지로 분류를 할 수가 있다. ERK (ERK1/2)는 성장 호르몬의 신호전달에 주로 관여하며 세포의 증식 및 분화에 중추적인 역할을 담당한다. 반면에 stress kinase로 분류되는 p38와 JNK는 이름 그대로 세포외부의 스트레스성 자극에 의해 활성화 되며 염증반응, 세포사멸 등을 매개함이 알려져 있다<sup>(35-37)</sup>. 이들 MAP kinase는 뇌신경세포 사멸과의 연관성은 최근에 활발히 연구가 진행 중인데 알츠하이머병과 다운증후군의 환자의 뇌에서 MAP kinase의 활성이 증가되었고<sup>(38)</sup> A $\beta$ 가 자극원이 되어 p38과 ERK를 활성화시키면서 염증반응을 유도하여 세포사가 이루어지게 된다는 보고가 있다<sup>(39)</sup>. 이와 같은 결과들로 보아 MAP kinase pathway가 알츠하이머병의 주요원인인 A $\beta$  생성에 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

### 4) Inducible Nitric Oxide Synthase(iNOS)에 의한 세포의 염증반응

NO는 반감기가 매우 짧은 free radical로 뇌 조직에서 저농도일 때는 신경전도, 혈관확장 기능이 있고 고농도 일 때는 허혈, 뇌조직 손상, 탈수질시에 퇴행성 뇌 질환 및 뇌졸중의 원인이 된다. NO는 Nitro oxide synthase(NOS)라는 단백질에 의하여 L-arginine의 guanidinonitrogen grop을 기질로 하여 생성된다<sup>(40)</sup>.

iNOS는 neuronal NOS, endothelial NOS 등과 더불어 NOS family의 한 종류로 평소에는 세포 내에 존재하지 않으나 염증성 자극이 주어질 때 유도되는 것으로 알려져 있다. 일단 유도되면 장시간 동안 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 그리고 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진 시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화

시키는 것으로 알려져 있다<sup>(41-43)</sup>.

#### 5) 갈조류

위와 같은 알츠하이머병의 병인인 A $\beta$ 의 침착으로 증가될 것으로 보이는 신경 세포의 독성을 억제시키기 위해 다음과 같은 제주 연안에서 서식하는 갈조류를 이용하였다<sup>(44)</sup>.

**알송이 모자반**은 모자반과로 학명은 *Sargassum confusum*이다. 크기는 식물체 0.6~2m, 하부 잎 길이 7 cm, 상부 잎 길이 3~5 cm로 조간대 하부에서 점심대에 걸쳐 생육한다. 식물체는 반상의 뿌리에서 짧은 중심 가지를 1개 또는 2~3개 내고 0.6~2 m로 커진다. 중심가지는 원주상이고 작은 가시가 있다. 하부의 잎은 타원형 또는 주걱 모양이고 길이 7 cm이며 중륵이 파문힌다. 또한 잎 가장자리에 톱니가 있으나 때로는 없어진다. 상부의 잎은 변화가 많으나, 보통 긴 피침상이고 길이 3~5 cm이며 양 끝이 가늘다. 기포는 대개 작은 가지의 기부에 생기고 구상이며, 어린 것은 도란형이고 미철두가 있다. 한국, 사할린, 쿠릴열도, 중국 등지에 분포한다.

**블레기말**은 고리매과로 학명은 *Colpomenia sinuosa*이다. 식물체는 얇은 막질의 블레기 모양이며 직경 4~10 cm, 때로는 30 cm쯤 되는 것도 있다. 어릴 때에는 속에 물이 차 있다. 구상 또는 불규칙한 모양이다. 두께는 250~350  $\mu$ m이며 몸 구조는 피층은 1~2층의 정방형 또는 다각형 세포로 되었고 내층은 2~5층의 좀 큰 다소 둥근 세포로 되었다. 바위두둑과 외견상 비슷한 점도 있으나 본종이 보다 더 얇다. 전국 각지 및 제주도에 분포한다.

**바위수염**은 바위수염과로 학명은 *Myelophycus simplex*이다. 식물체는 많은 개체가 뭉쳐서 나고 직립하며 가지를 내지 않고, 높이 5~15 cm, 굵기 1 mm쯤 되는 사상이며 더러는 비틀어진다. 하부는 차차 가늘게 되며 짧은 줄기가 있다. 어렸을 때는 실질이나 후에 중공으로 된다. 몸 구조는 내층은 원형, 정방형 또는 긴 세포로 되었고 이 조직은 노성하면 파괴된다. 중층은 가는 원주상의 세포로 세로로 밀집해 있고 외층은 직립하는 사상 세포열로 되었다. 유주자낭은 이 사상 세포열 속에 끼어 있다. 질은 연골질이며 건조하면 대지에 붙지 않는다. 색은 암갈색이며 건조하면 흑색으로 되어있고 남부 해안 전역, 제주도, 일본 등지에 분

포한다.

**미역쇠**는 고리매과로 학명은 *Petalonia binghamiae*이다. 식물체는 작은 반상근에서 모여서 나고 가지를 내지 않는 편평한 대나무 잎 모양이다. 크기는 25 cm, 폭은 2~3 cm에 달하고 하부는 썩기꼴이다. 몸의 구조는 내부의 수층은 가는 사상세포가 세로로 배열되어 서로 엉켜있고, 중층은 1~2층의 원형 내지 다각형의 밀접한 유세포이고, 외층은 작은 피층세포로 된다. 자낭균은 처음에 엽면에 얼룩진 무늬처럼 나타나고 나중에는 엽면 전체에 퍼진다. 어릴 때는 황갈색이나 노성하면 암갈색으로 된다. 특히 동계에 균락을 이루어 번무하고 태평양 연안에 분포한다.

**넓패**는 패과로 학명은 *Ishige sinicola*이다. 식물체는 엽상이며 흑갈색이며 기포처럼 팽배한 부분은 황갈색이고 건조하면 흑색으로 되고 대지에 붙지 않는다. 부착기는 작은 반상이며 짧은 원주상의 줄기를 가지고 상부는 넓은 사상 또는 대상이며 차상 분기한다. 때로는 가지의 끝 부분의 조직 속에 공기를 갖기 때문에 기포처럼 팽대하는 수도 있다. 때때로 패(*Ishige okamurae*)에 착생한 것을 볼 수 있고 남부해안과 제주도에 분포한다.

**참그물바탕말**은 그물바탕말과로 학명은 *Dictyota dichotoma*이다. 식물체는 기부에는 다소 모용이 있고 뭉쳐서 나며 반상근으로 부착하고 좁은 또는 넓은 선상이며 편평하고 차상분기한다. 양 가장자리는 평탄하다. 꼭대기는 넓게 퍼져 있거나 얇게 이열하고 둔원이다. 내부구조는 내층은 큰 무색의 장방형의 세포가 1층 있고 피층은 작은 정방형 또는 장방형의 색소를 가진 1층의 세포로 되어 있다. 생장점은 가지 끝에 1개 있다. 식물체의 색은 황록색이거나 갈색이다. 질은 얇은 막질이고 남부해안과 제주도에 분포한다.

**참가죽그물바탕말**은 그물바탕말과로 학명은 *Pachydictyon coriaceum*이다. 식물체는 다소 부채모양으로 펼쳐지고 높이 30~40 cm까지 되며 복차상으로 분기한다. 하부는 짧은 경상부를 이루고 갈색의 모용이 있다. 가지는 대상이며 폭은 7~15 mm, 가장자리는 전연이다. 가지의 끝은 설상이며 원형 또는 이열한다. 구조는 노성부는 피층은 3층의 세포로 되고 내층은 큰 1층의 세포로 되었고 군데 군데 몸 표면에 평행해서 2개로 분열한다. 살았을 때는 암갈색이나 건조하면 거의 흑색으로 되고 끝 부분만 황갈색이다. 질은 두꺼운 혁질이고 끝 부분만 얇은

막상이다. 대진, 영해, 청하, 구룡포, 목도, 부산, 추자도, 제주도에 분포한다.

**짜잎모자반**은 모자반과로 학명은 *Sargassum hemiphyllum*이다. 식물체의 부착기는 섬유상이며 포복지를 낸다. 중심가지는 길고 30~50 cm, 가지가 각 방향으로 호생하고 길이는 5~10 cm이다. 가지는 사상이며 굵기는 1.5~2 mm이다. 몸하부의 잎은 썩기꼴, 도란형 또는 긴 타원형이며 다소 엽각이 가늘고 상부의 가장자리는 작은 톱니가 있거나 더러는 전연이며 좌우 상칭이다. 상부 또는 가지의 잎은 좌우 상칭이 아니고 잎의 상연은 전연이며 위쪽으로 반곡하고 하연에는 톱니가 있다. 기포는 도란형 원두, 또는 방추형 철두이다. 생식기탁은 원주상이고 울릉도, 부산, 제주도에 분포한다.

**괘**는 괘과로 학명은 *Ishige okamurae*이다. 식물체는 딱딱한 나뭇가지처럼 보이고, 색은 암갈색이며 건조하면 흑색으로 되고 질은 단단하고 대지에 붙지 않는다. 부착기는 작은 반상근이고 짧은 줄기를 가지고 복차상으로 분기하고 상부는 가는 원주상이며 또는 모가 나고 편원이며 세로로 주름이 있는 수도 있다. 크기는 5~10 cm쯤 된다. 몸의 구조는 내층은 배게 엉켜진 사상세포로 되었고, 외층은 몸의 표면에 직각하고 열을 지운 소세포로 되어있고 남부 해안과 제주도에 분포한다.

**감태**는 미역과로 학명은 *Ecklonia cava*이다. 식물체의 줄기는 원주상이며 충분히 자란 것은 1 m 이상 되는 것도 있다. 중앙부가 좀 굵고 어릴 때는 다 실질이 나 후에는 중앙부가 다소 중공으로 된다. 점액강도는 줄기의 피층하에 환상으로 1층 배열되었다. 줄기의 상부는 차차 편평하게 되고 양측에서 우상엽이 나고 여기서 다시 호생한 우상의 소엽편을 낸다. 중앙엽은 좀 두터워서 3~5 mm된다. 엽면에는 주름이 없다. 색은 갈색인데 건조하면 흑색으로 되고 질은 혁질이고 남해안과 제주도에 분포한다.



## 2. 연구목적

많은 연구들에서 알츠하이머병의 치료제로 A $\beta$ 의 침착을 억제 시키는 물질이나 A $\beta$ 를 생성시키는 APP 분해효소인 BACE1의 저해제, 항산화제, 항염증제 개발이 계속되고 있다<sup>(45-48)</sup>. 본 연구에서는 제주 연안에서 자생하는 해조류 중 갈조류 10종의 메탄올 추출물을 이용하여 항산화력과 아밀로이드 베타 단백질(A $\beta$ )에 의해 유도된 HT-22 신경세포의 독성 억제 효과를 관찰해 보았다. DPPH radical 소거능 측정을 통해 합성 항산화제인 BHA와 갈조류 추출물의 radical 소거능을 비교해 봄으로써 갈조류 추출물이 천연 항산화제로서의 가능성을 살펴보고 갈조류 추출물이 A $\beta$ 에 의한 독성으로부터 신경세포의 생존율을 얼마나 높여 줄 수 있는지를 MTT assay를 통해 알아보았다. 그리고 그 결과 신경세포 생존율을 높여 주었던 갈조류 추출물의 세포내 독성억제 작용을 알아보하고자 western blot을 통해 A $\beta$ 의 전구 단백질(APP)과 A $\beta$  생성에 관여하는  $\beta$ -secretase(BACE1)의 세포내 단백질 발현 양상과 A $\beta$ 의 독성에 의한 염증 반응 시 증가 될 것으로 보이는 iNOS와 신경세포의 사멸과 관련된 세포신호전달 경로인 MAP kinase pathway와 관련된 단백질 발현 양상을 살펴보았다.

이 연구 결과는 A $\beta$ 의 독성으로부터 신경세포를 보호 또는 증식 시킬 수 있는 생리활성 물질의 탐색, A $\beta$ 의 생성 경로를 차단 할 수 있는 효소의 불활성, 즉 BACE1의 저해제, NO의 생성을 촉진시키는 iNOS의 저해제, 신경 세포의 MAP kinase pathway 전달 분자들의 저해제 등 새로운 생리활성 물질의 탐색과 이를 이용한 고부가가치의 기능성식품 또는 항치매 소재로서의 개발을 위한 기초 자료로 이용되고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 갈조류 추출물 준비

본 실험에서는 제주도 연안에 서식하고 있는 갈조류 10종의 추출물을 하이테크 산업진흥원 제주유용생물자원 추출물 은행으로부터 분양 받아 사용하였다 (Table 1). 분양받은 추출물은 80% 메탄올을 용매로 추출하여 감압농축 된 것으로 농도는 1 mg/mL 가 되게 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여서 실험에 사용하였다.

Table 1. List of brown algae

학명	국명	채집시기	채집지
<i>Sargassum confusum</i> (S. con)	알송이모자반	2005. 03. 09	외도
<i>Colpomenia sinuosa</i> (C. sin)	불레기말	2005. 03. 11	신촌
<i>Myelophycus simplex</i> (M. sim)	바위수염	2005. 04. 07	북촌
<i>Petalonia binghamiae</i> (P. bin)	미역쇠	2005 .04 .07	북촌
<i>Ishige sinicola</i> (I. sin)	넓패	2005. 04. 22	삼양
<i>Dictyota dichotoma</i> (D. dic)	참그물바탕말	2005. 04. 26	사수동
<i>Dictyota coriacea</i> (D. cor)	참가죽그물바탕말	2005. 04. 26	사수동
<i>Sargassum hemiphyllum</i> (S. hem)	짚잎모자반	2005. 05. 23	신도
<i>Ishige okamurai</i> (I. oka)	패	2005. 07. 19	김녕
<i>Ecklonia cava</i> (E. cav)	감태	2005. 10. 14	위미

### 2. 세포배양

본 연구에서는 흰 쥐의 HT-22(hippocampal neuron cell line) 세포를 사용하였다. HT-22 세포는 10% fetal bovine serum(FBS), 100 unit/mL

penicillin-streptomycin이 함유된 dulbecco's modification of eagle's medium(DMEM) 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 계대 배양은 trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 부유시킨 후 2~3일에 한 번씩 시행하였다.

### 3. DPPH radical 소거능 측정

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거능의 측정은 Blois의 방법을 변형하여 사용하였다<sup>(49)</sup>. 전자공여능이 시료의 flavonoid 및 polyphenol성 물질 등에 대한 항산화 작용이 지표로 알려져 있으며, 이러한 물질들이 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 높다. 이러한 항산화물질은 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 free radical에 의한 노화를 억제 하는 척도로 이용할 수 있다<sup>(50)</sup>.

0.2 mM DPPH을 180 µL, 1 mg/mL 농도의 갈조류 추출물 20 µL을 섞어 총량이 200 µL이 되게 96 well에 분주하고 암실에서 30 분 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 널리 알려져 있는 합성 항산화제인 BHA(butyl hydroxyanisole)를 사용하였으며 전자공여능은 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = (1 - \text{시료의 흡광도} / \text{Blank의 흡광도}) \times 100$$

### 4. MTT Assay

갈조류 추출물이 아밀로이드 베타에 의한 독성으로부터 신경세포의 생존 및 성장에 미치는 영향을 관찰하고자 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 시행하였다. MTT assay는 세포의 생육을 측정하는 방법으로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase가 황색 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan을 생성하는 원리로 이 환

원되는 정도를 흡광도로 측정함으로써 알아보는 방법이다<sup>(51)</sup>. HT-22 세포를 96 well에  $5 \times 10^4$ 개를 분주하여 24 시간 배양 후 배양액을 제거하고 fetal bovine serum이 포함되지 않은 배양액을 분주한 후 200  $\mu$ M 아밀로이드 베타 단백질( $A\beta_{1-42}$ ) 1  $\mu$ L와 갈조류 추출물 25, 50  $\mu$ g/mL을 처리하여 37°C, 5%  $CO_2$  배양기에서 배양하였다. 48시간 후 5 mg/mL 농도의 MTT reagent 10  $\mu$ L을 분주하여 4 시간 배양하였고 상층액을 제거하고 100  $\mu$ L의 DMSO를 첨가하여 5분정도 incubation 시켜 생성된 blue formazan을 완전히 녹여준 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.  $A\beta_{1-42}$ 와 갈조류 추출물 처리군과  $A\beta_{1-42}$  처리군의 세포 생존율은  $A\beta_{1-42}$ 와 갈조류 추출물을 처리하지 않은 HT-22 세포의 세포 생존율을 100%로 정하고 이에 대해 상대적인 세포 생존율로 구하였다.

## 5. Western blot

아밀로이드 베타 단백질( $A\beta$ )이 일으키는 신경세포의 독성을 억제하는 갈조류 추출물이 신경세포 사멸 경로 중 작용되는 부분을 알아보고자 Western blot을 통해 APP, BACE1, iNOS, MAP kinase의 단백질 발현 양상을 살펴보았다. HT-22 세포 ( $5 \times 10^5$ )에 200  $\mu$ M 아밀로이드 베타 단백질( $A\beta_{1-42}$ ) 10  $\mu$ L와 25  $\mu$ g/mL의 갈조류 추출물을 처리하여 37°C, 5%  $CO_2$  배양기에서 배양하였다. 48시간 후 배양한 세포를 수확하여 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척 후, 500  $\mu$ L의 lysis buffer를 첨가하여 초음파분쇄기로 분쇄한 후 10,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 그 상층액을 취한 후 단백질 농도는 2D quant kit를 이용하여 정량 하였다. 30  $\mu$ g의 lysate를 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에서 전기영동을 이용하여 단백질을 분리하였다<sup>(52)</sup>. 분리된 단백질을 PVDF(Polyvinylidene fluoride) membrane에 200 mA로 2시간 동안 transfer 한 후 5% skim milk가 함유된 TTBS (Tris buffered saline containing 0.1% + Tween 20)에 넣어 상온에서 1시간 정도 blocking 시킨 후 TTBS로 10 분간 3회 세척하였다. APP (1:5000), BACE1 (1:2000), iNOS (1:10000), ERK1/2 (1:1000), phospho ERK1/2 (1:1000), p38 (1:1000), phospho p38(1:1000), JNK (1:1000),

phospho JNK (1:1000)으로 희석한 1차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TTBS로 10분간 3회 세척한 다음 2차 항체로는 HRP(Horseradish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG와 anti-mouse IgG를 1:5000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응 시켰다. 그 후 membrane을 TTBS로 10분간 3회 세척한 다음 ECL(enhanced chemiluminescence)기질과 5~10분간 반응 후 X-ray 필름에 감광하였다.



### III. 결과 및 고찰

제주 연안 갈조류 추출물이 아밀로이드 베타 단백질에 의한 신경세포 독성을 억제하는 효능을 탐색하기 위해 라디칼 소거활성(DPPH radical 소거능), 세포 생존에 미치는 영향(MTT assay), 신경세포 독성과 관련된 단백질의 발현 정도(Western blot)를 조사하였다.

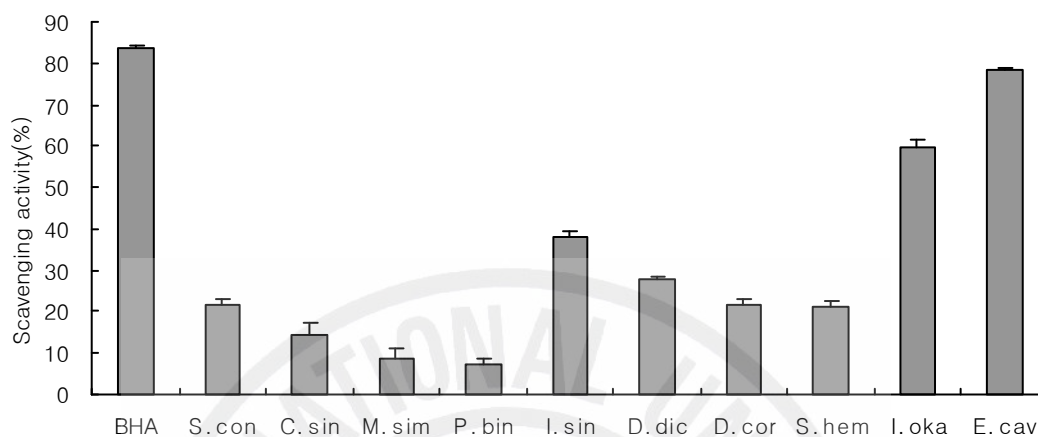
#### 1. DPPH 소거능 측정

일반적으로 알려진 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxyanisole)와 BHT(butylated hydroxytoluene)은 50 mg/kg/day 이상 섭취 시 생체효소 및 지방의 변화로 질병과 암을 유발시켜 인체에 독성을 가진다고 보고되어 있어 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다<sup>(53)</sup>. 본 연구에서는 갈조류 10종의 메탄올 추출물과 일반적으로 잘 알려진 합성 항산화제인 BHA를 대조군으로 하여 DPPH radical 소거능을 측정해 보았다(Fig. 1). 그 결과 대조군은 83.68%의 DPPH radical 소거능을 보였고 갈조류 중 가장 높은 활성을 보인 것은 감태(*Ecklonia cava*)로 78.24%로 대조군과 비슷한 결과를 나타내었다. 그리고 갈조류 중 패 (*Ishige okamurai*)는 59.69%의 소거능을 나타내서 감태와 더불어 천연 항산화제로서 가능성을 나타내었으며 선행 연구에서 100 ppm의 모자반(*Sargassum fulvellum*) 메탄올 추출물과 1000 µg/mL의 지층이(*Sargassum thunbergii*) 메탄올 추출물이 약 70%의 radical 소거능을 보인 것과 유사한 결과를 보였다<sup>(54-55)</sup>. 나머지 갈조류는 50% 미만의 radical 소거능을 나타내서 radical 소거능 이외의 생리활성 능력을 탐색해 보는 것이 바람직할 것으로 보였다.

갈조류 추출물은 많은 연구에서 항산화 활성의 우수성을 나타내었는데 특히 fucan과 같은 황화 다당은 polyphenol 화합물과 더불어 항산화 활성을 갖는 갈조류의 주요 성분으로 알려져 있다<sup>(56)</sup>. 툃(*Hizikia fusiformis*) 자숙액 에탄올 추출물을 이용한 DPPH radical 소거능에서는 1000 µg/mL일때 85%, 100 µg/mL일때 77%의 소거능을 나타내어 갈조류가 천연 항산화제로서의 개발 가능성이 있음을

밝혔다<sup>(57)</sup>. 또한 갈조류인 셀만모자반(*Sargassum kjellmanianum*)으로부터 분리한 phlorotannins 성분이 우수한 지질과산화 억제 효과를 보인다고 밝혀졌는데<sup>(58)</sup> 최근 노화를 비롯한 여러 가지 성인병의 원인이 free radical에 의한 산화에 의한 것임이 밝혀지고 있어 phlorotanins이 풍부한 갈조류의 섭취는 노화를 비롯한 만성 성인병 예방에 큰 도움이 될 것이다<sup>(59)</sup>.





**Fig. 1.** DPPH radical scavenging activity (%) of brown algae extracts on the concentration in the range of 1 mg/mL

S. con; <i>Sargassum confusum</i>	C. sin; <i>Colpomenia sinuosa</i>
M. sim; <i>Myelophycus simplex</i>	P. bin; <i>Petalonia binghamiae</i>
I. sin; <i>Ishige sinicola</i>	D. dic; <i>Dictyota dichotoma</i>
D. cor; <i>Dictyota coriacea</i>	S. hem; <i>Sargassum hemiphyllum</i>
I. oka; <i>Ishige okamurai</i>	E. cav; <i>Ecklonia cava</i>



## 2. MTT assay

아밀로이드 베타 단백질의 독성에 의한 신경세포 생존율을 측정함으로써 갈조류의 독성억제 효과를 살펴보았다(Table 2). 배양한 세포에 아밀로이드 베타 단백질( $A\beta_{1-42}$ )를 처리하고 갈조류 추출물을 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리하였을 때  $A\beta_{1-42}$ 만을 처리한 군에서는 85.88%의 신경세포 생존율을 보였으며 미역쇠(*Petalonia binghamiae*)에서는 120.34%, 바위수염(*Myelophycus simplex*)은 116.49%, 불레기말(*Colpomenia sinuosa*)은 108.47%, 짝잎모자반(*Sargassum hemiphyllum*) 102.17%로  $A\beta_{1-42}$ 만을 처리한 군에 비해 유의적으로 높은 신경세포 생존율을 보였다. 알송이모자반(*Sargassum confusum*)과 감태(*Ecklonia cava*)는 각각 98.12%, 93.39%로  $A\beta_{1-42}$ 만을 처리한 군에 비하여 높은 신경세포 생존율을 보였으나 유의적이지는 않았다. 그 외 갈조류에서는 생존율이 80% 미만으로 독성 억제 효과를 나타내지 못하였다(Fig. 2).

갈조류 추출물을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리 하였을 때  $A\beta_{1-42}$ 만을 처리한 군에서는 82.81%의 신경세포 생존율을 보였고 알송이모자반은 114.54%, 미역쇠는 113.02%, 불레기말은 105.77%, 짝잎모자반은 102.53%의 생존율을 보여  $A\beta_{1-42}$ 만을 처리한 군에 비해 유의적으로 높은 신경세포 생존율을 보였다. 나머지 6종의 갈조류에서는 70% 미만의 세포 생존율을 나타내  $A\beta$ 에 의한 독성 억제에 특이한 효과를 나타내지 못하였다(Fig. 3). 선행되었던 연구 중 원추리 추출물을 이용하여  $A\beta$ 에 의하여 유발된 PC12 세포에서의 독성을 억제하는 효능을 연구한 결과에서는 애기원추리, 죽대 및 각시원추리 추출물은 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지의 농도에서 생존율이 100~120%를 유지함을 확인하였다<sup>(60)</sup>. 해조류 추출물을 대상으로 bromobenzene으로 간 독성을 유발한 흰 쥐의 in vitro 실험에서는 툃(*Hisikia fusiformis*), 파베기모자반(*Sargassum siliquastrum*), 지충이(*sargassum thunbergii*) 추출물이 과산화 지질 생성을 억제한다는 연구 결과가 있었으며<sup>(61)</sup> 감태(*Ecklonia cava*)에서 유래된 eckol이 산화적 스트레스에 의한 U79-4 세포 손상을 억제하는 것으로 나타났다<sup>(62)</sup>.

MTT assay 결과 알송이모자반, 불레기말, 바위수염, 미역쇠, 짝잎모자반이  $A\beta$ 에 의한 신경세포 독성을 효과적으로 억제 하는 것으로 보였고 대조군에 비해

높은 신경세포 생존율을 나타내고 있어 신경세포의 보호 작용에 의한 세포 생존율의 증가 뿐 만 아니라 신경세포의 증식에도 영향을 미쳤다.

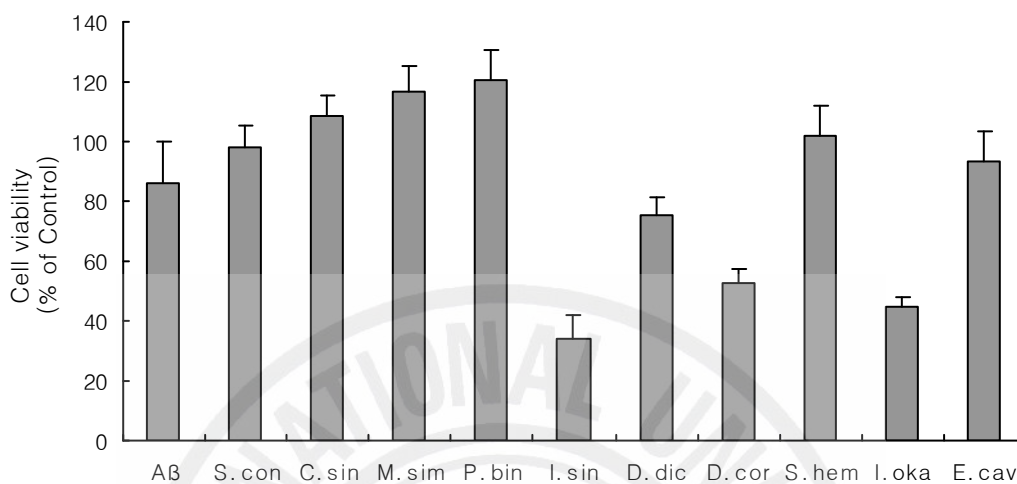
갈조류로부터 암세포 성장억제 효과에 관한 연구 결과들도 많이 이루어지고 있는데 미역 등 갈조류의 carotenoid계 색소인 fucoxanthin은 신경아세포의 증식을 저해하거나 증식 속도를 저하시켰고<sup>(63)</sup> 톳, 다시마, 미역 추출물은 자궁경부 암세포, 유방암세포의 성장을 90%이상 저해하는 것으로 나타났다<sup>(64)</sup>. 다시마과의 갈조류 *Ascophyllum nodosum*에서 추출한 fucoidan은 폐암세포에서 세포분열 주기 중 G1기를 차단하여 암세포 증식을 억제하였다는 보고가 있다<sup>(65)</sup>.



**Table 2. Inhibitory effects of methanol extract of 10 Kinds brown algae on A $\beta$ -induced toxicity in HT-22 cells**

Brown algae name	Cell viability (% of Control)	
	25 $\mu$ g/mL	50 $\mu$ g/mL
Amyloid-beta	85.88 $\pm$ 14.31	82.81 $\pm$ 4.03
<i>Sargassum confusum</i> ( <i>S. con</i> )	98.12 $\pm$ 7.08	114.54 $\pm$ 13.54*
<i>Colpomenia sinuosa</i> ( <i>C. sin</i> )	108.47 $\pm$ 6.93*	105.77 $\pm$ 7.21*
<i>Myelophycus simplex</i> ( <i>M. sim</i> )	116.49 $\pm$ 9.13*	63.19 $\pm$ 4.23
<i>Petalonia binghamiae</i> ( <i>P. bin</i> )	120.34 $\pm$ 10.49*	113.02 $\pm$ 13.69*
<i>Ishige sinicola</i> ( <i>I. sin</i> )	33.97 $\pm$ 7.79	13.26 $\pm$ 1.56
<i>Dictyota dichotoma</i> ( <i>D. dic</i> )	75.51 $\pm$ 5.6	32.40 $\pm$ 7.61
<i>Dictyota coriacea</i> ( <i>D. cor</i> )	52.51 $\pm$ 4.88	22.21 $\pm$ 4.56
<i>Sargassum hemiphyllum</i> ( <i>S. hem</i> )	102.17 $\pm$ 9.55*	102.53 $\pm$ 7.47*
<i>Ishige okamurai</i> ( <i>I. oka</i> )	45.00 $\pm$ 2.7	12.73 $\pm$ 1.15
<i>Ecklonia cava</i> ( <i>E. cav</i> )	93.39 $\pm$ 9.88	54.02 $\pm$ 12.65

\* Mean  $\pm$  S.D.; The mean difference is significant at the 0.05 level



**Fig. 2.** Inhibitory effects of methanol extract of brown algae at 25 ug/mL on A $\beta$ -induced toxicity in HT-22 cells

S. con; *Sargassum confusum*

C. sin; *Colpomenia sinuosa*

M. sim; *Myelophycus simplex*

P. bin; *Petalonia binghamiae*

I. sin; *Ishige sinicola*

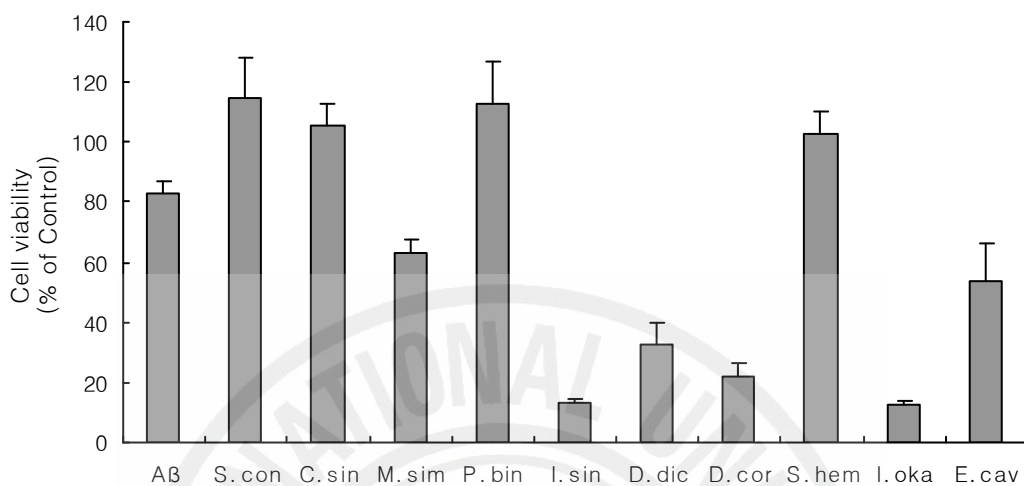
D. dic; *Dictyota dichotoma*

D. cor; *Dictyota coriacea*

S. hem; *Sargassum hemiphyllum*

I. oka; *Ishige okamurai*

E. cav; *Ecklonia cava*



**Fig. 3.** Inhibitory effects of methanol extract of brown algae at 50 ug/mL on A $\beta$ -induced toxicity in HT-22 cells

S. con; <i>Sargassum confusum</i>	C. sin; <i>Colpomenia sinuosa</i>
M. sim; <i>Myelophycus simplex</i>	P. bin; <i>Petalonia binghamiae</i>
I. sin; <i>Ishige sinicola</i>	D. dic; <i>Dictyota dichotoma</i>
D. cor; <i>Dictyota coriacea</i>	S. hem; <i>Sargassum hemiphyllum</i>
I. oka; <i>Ishige okamurai</i>	E. cav; <i>Ecklonia cava</i>

### 3. western blot

MTT assay를 통해 아밀로이드 베타 단백질(A $\beta$ )에 의한 신경세포 독성 억제 효과가 유의적으로 높았던 알퐁이모자반(*Sargassum confusum*), 불레기말(*Colpomenia sinuosa*), 바위수염(*Myelophycus simplex*), 미역쇠(*Petalonia binghamiae*), 짝잎모자반(*Sargassum hemiphyllum*) 추출물을 이용하여 신경세포 사멸과 관련된 단백질 발현 양상을 살펴보았다.

알츠하이머병의 병인으로 알려진 A $\beta$ 의 전구 단백질이 APP와 APP로부터 아밀로이드 베타를 생성시키는 단백질 분해효소인 BACE1( $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1)의 단백질 발현 양상을 살펴 본 결과 APP는 대조군에 비해 알퐁이모자반과, 불레기말, 바위수염을 처리하였을 때 높거나 비슷한 발현을 나타냈고, 미역쇠와 짝잎모자반을 처리 하였을 때는 대조군보다 낮은 발현 양상을 나타내었다(Fig. 4). BACE1의 경우에는 다섯 가지 갈조류 모두에서 대조군에 비해 낮은 발현을 나타내었고 바위수염에서 가장 낮은 발현을 나타내었다(Fig. 4). 따라서 갈조류 추출물이 아밀로이드 베타 전구체 물질 감소에는 효과적인 영향을 미치지 못하지만 A $\beta$  생성 기전 중 단백질 분해 효소의 활성을 억제시킴으로서 아밀로이드 베타 생성을 감소시키고 이로 인하여 신경세포의 독성을 억제시키는 효과를 보였다. BACE1 활성 억제에 관한 선행 연구들을 살펴보면 한약재인 지유(*Sanguisorbae radix*)로부터 분리된 SO<sub>3</sub>와 SO<sub>4</sub>라는 성분이 BACE1에 대해 저해 효과를 나타내었으며<sup>(66)</sup>, 녹차에서 분리된 Catechin계 화합물도 BACE1에 높은 저해 활성을 나타낸다는 사실이 보고되었다<sup>(67)</sup>. 또한 BACE assay system을 이용한 BACE의 활성 억제 효능을 연구한 결과 백합과의 소엽맥분동(*Ophiopogon japonicus*)의 chloroform 추출물이 BACE에 대해 강력한 저해활성을 나타내는 저해제 LB83190과 LB83192보다 높은 저해 활성을 나타내었다<sup>(68)</sup>.

세포에서 염증 반응 시 발현되어 세포의 사멸에 관여하는 iNOS는 대조군에 비해 갈조류 추출물을 처리한 군에서는 낮은 발현을 나타내었다(Fig. 5). 이 결과로 보아 갈조류 추출물이 세포손상과 염증을 유도 시키는 NO의 생성을 유발하는 iNOS를 억제 시키는 효과가 있었다. 청각(*Codium fragile*)추출물에 의한 항염증 효과를 살펴 본 연구에서는 RAW264.7 세포에 치주질환균에서 유도된 LPS와

청각추출물을 처리한 결과 NO 활성을 현저히 감소시켜 높은 항염증 효과를 나타내었으며 iNOS 활성에서도 유사한 결과를 나타냈다<sup>(69)</sup>.

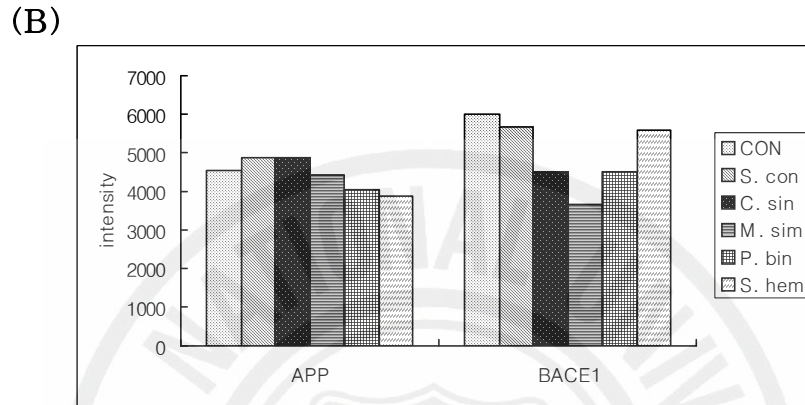
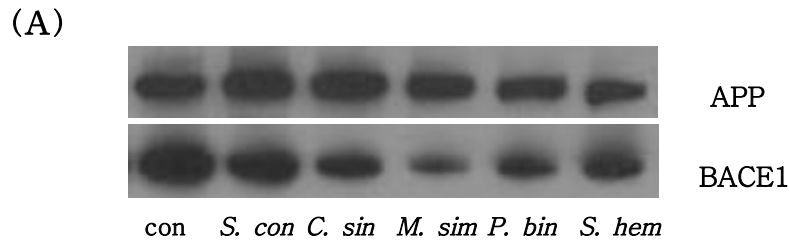
신경세포의 사멸과 관련된 MAP kinase pathway의 세 가지 전달 분자의 활성화 전과 활성화 된 상태의 발현 양상을 살펴보았다(Fig. 6). PC12세포에서 A $\beta$ 의 처리로 ERK와 p38을 통해 iNOS의 발현이 증가한다는 연구결과가 있었고<sup>(22)</sup> MAP kinases pathway가 알츠하이머병의 병인인 A $\beta$ 와 밀접한 관련이 있다는 많은 연구 결과들이 있었다<sup>(38-39)</sup>.

본 연구에서는 ERK는 갈조류 추출물을 처리한 군에서 전반적으로 낮게 발현되었고, ERK1보다는 ERK2가 바위수염을 제외한 갈조류 추출물 처리군에서 낮은 발현 양상을 보였다. 활성화 상태인 phospho ERK는 ERK1에서 활성화 전보다 많이 감소되는 양상을 보였으며 짝잎모자반을 처리하였을 때는 활성화 상태의 ERK1, ERK2 모두에서 가장 낮은 발현을 나타내었고 활성화 전보다 발현이 매우 감소되었다. 이와 유사한 연구 결과로 PC12 세포에서 A $\beta$ 의 처리로 ERK가 활성화 되었다가 benzothiazol의 유도체인 KHG21834의 처리로 ERK의 활성화가 차단되었다는 보고가 있었다<sup>(70)</sup>. JNK의 경우 활성화 전 상태나 활성화 되었을 때 갈조류 추출물 처리군에 대조군에 비해 전반적으로 낮은 발현을 보였고 불레기말을 처리 했을 때 활성화 상태의 JNK가 매우 감소하는 양상을 나타내었다. 활성화 되기 전 p38의 발현은 대조군과 갈조류 추출물을 처리한 군 간의 뚜렷한 차이를 보이지 않았지만 활성화 상태의 p38인 phospho p38에서는 대조군에 비해 갈조류 추출물을 처리하였을 때 발현이 감소하였고 바위수염의 경우 활성화 전보다 활성화 상태의 p38이 매우 낮은 발현을 보였다. 선행 연구 결과에서도 JNK와 p38은 알츠하이머병의 동물모델 중의 하나인 Tg2576/PS1 Transgenic mice 나이에 의존적인 A $\beta$ 의 침착과 함께 증가하는 것을 나타내었다<sup>(71)</sup>. 실험동물의 ischemia model에서 ERK 활성화정도는 ischemia가 일어난 중심부위(ischemic core)에서는 감소하지만 주변 부위(penumbra)에서는 활성화가 됨이 알려져 있다. 다른 실험 결과에서는 ischemic core 에서도 ERK 활성화가 증가함이 보고된 바 있다. 또한 p38가 신경세포의 사멸에 관여함이 알려진 것은 in vitro 실험에서 신경성장 호르몬인 NGF 결핍이나 과흥분에 의해 유발된 신경세포사멸에 p38 활성화가 신경세포의 사멸을 일으킴이 보고된 이후이다. 최근의 연구결과를 보면 in vivo 뇌졸

중 실험동물 모델에서 p38이 뇌의 microglia에서 활성화가 되며 p38 저해제들이 우수한 신경세포 보호 작용을 나타내고 있다<sup>(72-74)</sup>. A $\beta$ 에 의한 신경세포에서 활성화된 MAP kinases pathway의 전단 분자 중 짝잎모자반은 ERK 활성화 저해능력이 가장 뛰어났고, 불레기말은 JNK의 활성화 저해, 바위수염은 p38의 활성화 저해능력이 가장 우수하여 MAP kinase pathway의 세 가지 전달 분자의 저해제로서 효과를 나타내었다.







**Fig. 4. Inhibitory effects of methanol extract of brown algae on the APP and BACE1 protein level in HT-22 cells.** (A) Detection of APP and BACE1 by Western blot analysis of HT-22 treated with  $A\beta_{1-42}$ , HT-22 treated with  $A\beta_{1-42}$  and brown algae extracts. (B) The intensity of each immunoreactive signal for these antibodies was analyzed using an image J

con; control

S. con; *Sargassum confusum*

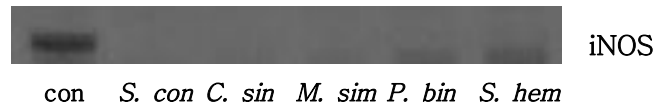
C. sin; *Colpomenia sinuosa*

M. sim; *Myelophycus simplex*

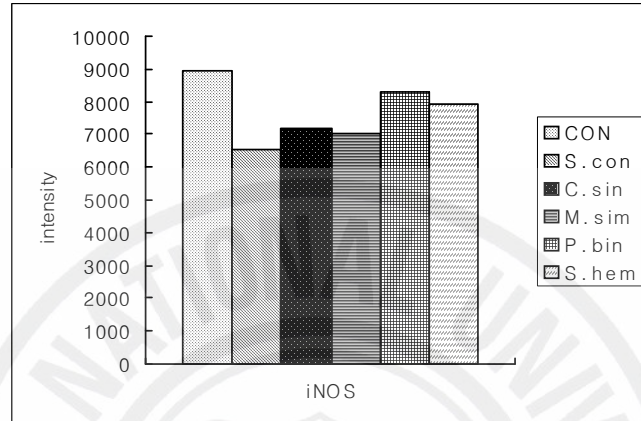
P. bin; *Petalonia binghamiae*

S. hem; *Sargassum hemiphyllum*

(A)



(B)



**Fig. 5. Inhibitory effects of methanol extract of brown algae on the iNOS protein level in HT-22 cells.** (A) Detection of iNOS by Western blot analysis of HT-22 treated with  $A\beta_{1-42}$ , HT-22 treated with  $A\beta_{1-42}$  and brown algae extracts. (B) The intensity of each immunoreactive signal for these antibodies was analyzed using an image J

con; control

C. sin; *Colpomenia sinuosa*

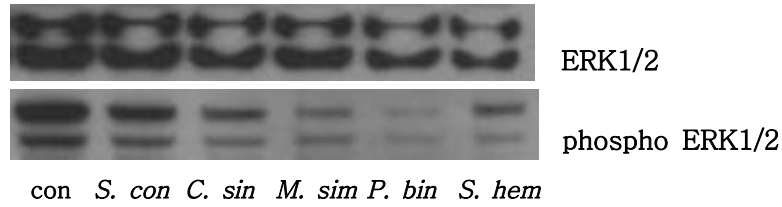
P. bin; *Petalonia binghamiae*

S. con; *Sargassum confusum*

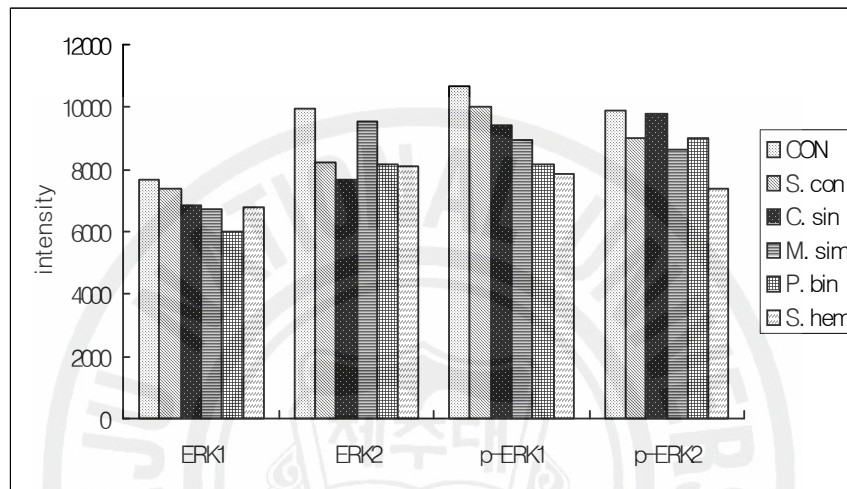
M. sim; *Myelophycus simplex*

S. hem; *Sargassum hemiphyllum*

(A)



(B)



**Fig. 6.** Inhibitory effects of methanol extract of brown algae on the ERK protein level in HT-22 cells (A) Detection of ERK by Western blot analysis of HT-22 treated with A $\beta$ <sub>1-42</sub>, HT-22 treated with A $\beta$ <sub>1-42</sub> and brown algae extracts. (B) The intensity of each immunoreactive signal for these antibodies was analyzed using an image J

con; control

C. sin; *Colpomenia sinuosa*

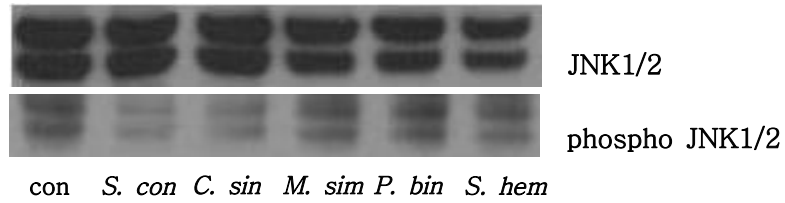
P. bin; *Petalonia binghamiae*

S. con; *Sargassum confusum*

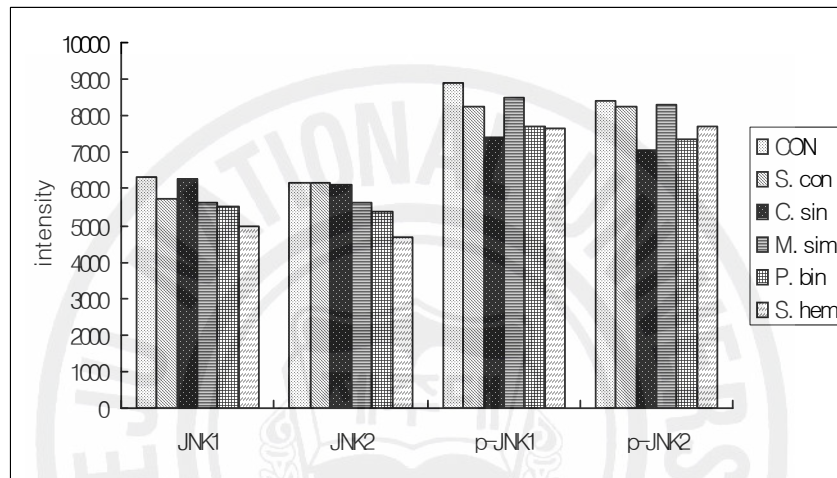
M. sim; *Myelophycus simplex*

S. hem; *Sargassum hemiphyllum*

(A)



(B)



**Fig. 7. Inhibitory effects of methanol extract of brown algae on the JNK protein level in HT-22 cells** (A) Detection of JNK by Western blot analysis of HT-22 treated with Aβ<sub>1-42</sub>, HT-22 treated with Aβ<sub>1-42</sub> and brown algae extracts. (B) The intensity of each immunoreactive signal for these antibodies was analyzed using an image J

con; control

C. sin; *Colpomenia sinuosa*

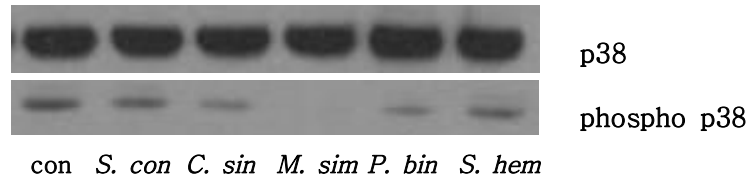
P. bin; *Petalonia binghamiae*

S. con; *Sargassum confusum*

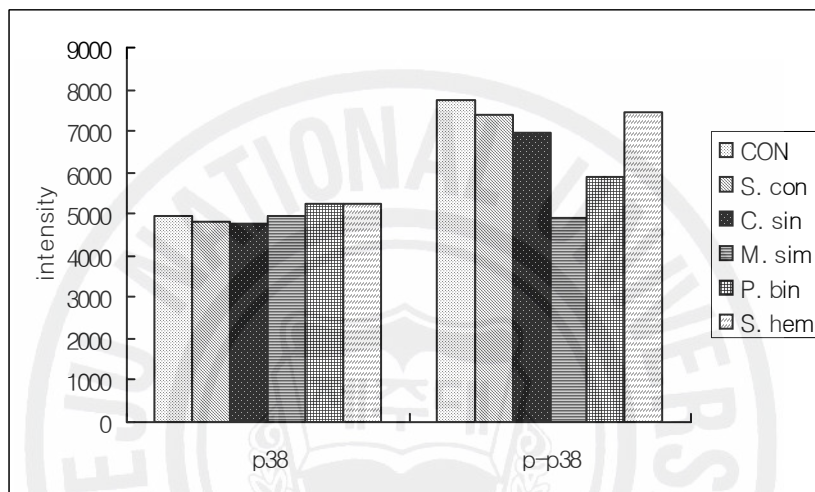
M. sim; *Myelophycus simplex*

S. hem; *Sargassum hemiphyllum*

(A)



(B)



**Fig. 8. Inhibitory effects of methanol extract of brown algae on the p38 protein level in HT-22 cells** (A) Detection of p38 by Western blot analysis of HT-22 treated with A $\beta$ <sub>1-42</sub>, HT-22 treated with A $\beta$ <sub>1-42</sub> and brown algae extracts. (B) The intensity of each immunoreactive signal for these antibodies was analyzed using an image J

con; control

C. sin; *Colpomenia sinuosa*

P. bin; *Petalonia binghamiae*

S. con; *Sargassum confusum*

M. sim; *Myelophycus simplex*

S. hem; *Sargassum hemiphylum*

## IV. 결 론

본 연구에서는 제주연안에서 서식하는 갈조류 10종의 항산화 활성과 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 신경세포 독성 억제 효과를 살펴보았다.

그 동안 행해졌던 해조류를 이용한 연구들에서 갈조류는 항산화제, 항균제, 항암제, 항플라즈민 저해제 등 그 기능이 탐색되면서 기능성 식품 소재 및 의약품 소재로 각광받고 있다<sup>(2,10,75-76)</sup>. 특히 갈조류 중 모자반류의 폐놀성 물질은 뛰어난 항산화 활성을 나타냈으며 톡의 acetone 추출물에서도 우수한 항산화 효과를 나타내는 fucoxanthin이라는 물질을 발견해 냈다<sup>(77)</sup>. 본 연구에서 DPPH radical 소거능으로 살펴 본 갈조류의 항산화 활성은 대조군인 합성 항산화제인 BHA가 83.68%의 소거능을 나타내었고 감태는 78.24%, 패는 59.69%로 10가지 갈조류 중 비교적 높은 소거능을 나타내어 천연 항산화제로서의 가능성을 나타내었다.

MTT assay를 통해 아밀로이드 베타 단백질에 의한 신경 세포 독성의 억제 효과는 갈조류 추출물을 25 µg/mL을 처리하였을 때 미역쇠는 120.34%, 바위수염은 116.49%, 불레기말은 108.47%, 짝잎모자반은 102.17%의 세포 생존율을 보여 대조군 85.88%보다 유의적으로 높은 독성 억제 효과를 보였고 갈조류 추출물 50 µg/mL을 처리 하였을 때에는 알송이모자반은 114.54%, 미역쇠는 113.02%, 불레기말은 105.77%, 짝잎모자반은 102.53%의 신경 세포 생존율을 나타내 대조군 82.81 %의 생존율을 나타낸 대조군에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타내었고 신경세포의 증식에도 영향을 미치는 것으로 보인다.

아밀로이드 베타 단백질(A $\beta$ )는  $\beta$ -secretase에 의해 절단된 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 일부분으로서 본 연구 결과 아밀로이드 베타 전구 단백질인 APP는 대조군에 비해 감소하지 않았지만 아밀로이드 베타 생성 기전 중 단백질 분해 효소로 작용하는  $\beta$ -secretase의 일종인 BACE1는 대조군에 비해 갈조류 추출물을 처리한 군에서 감소한 것으로 나타났다. 이는 갈조류 추출물이 BACE1의 활성을 억제시켜 아밀로이드 베타 생성을 감소시키고 이것이 신경세포 생존율을 증가 시킨 것으로 보인다. free radical의 하나로 알려진 NO를 생성하는 iNOS는

세포의 염증성 자극 시 유도 되는 것으로 A $\beta$ 의 침착으로 인해 신경세포의 독성이 유도될 때 활성이 증가 된다<sup>(41)</sup>. A $\beta$ 로 신경세포에 독성을 유도하였을 때 iNOS는 발현되지만 갈조류 추출물을 처리 하였을 때는 낮은 발현 양상을 보여 갈조류 추출물이 염증 자극을 완화시켜 세포 독성을 억제 시키는 것으로 보인다.

최근 뇌 신경세포의 사멸과 관련되어 활발한 연구가 진행되고 있는 MAP kinase pathway 구성 전달 분자의 단백질 발현 양상을 살펴본 결과 짝잎모자반 추출물을 처리하였을 때 ERK의 활성이 가장 우수하게 저해 되었고, 세포 외부의 스트레스성 자극에 의해 활성화 되어 염증반응, 세포 사멸과 관련된 것으로 알려진 JNK와 p38의 경우 JNK는 불레기말 추출물을 처리하였을 때에서 가장 감소된 활성을 나타내었으며 p38은 바위수염에서 뛰어난 활성저해 능력을 나타내었다.

본 연구 결과에서 제주연안 갈조류 10종 중 감태가 우수한 항산화 활성을 나타내어 천연 항산화제로서의 개발 가능성을 나타내었다. 알송이모자반, 바위수염, 불레기말, 미역쇠, 짝잎모자반 등의 갈조류는 알츠하이머병을 일으키는 독성물질인 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 신경 세포의 독성을 억제 한다는 것을 알 수 있었고 신경세포의 생존율을 높이는 보호 기능 뿐 만 아니라 신경세포의 증식에도 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한 알송이모자반, 바위수염, 불레기말, 미역쇠, 짝잎모자반은 BACE1과 iNOS의 활성을 억제 시키는 것으로 나타나 두 효소의 저해제로서 개발이 기대되고 짝잎모자반은 ERK의 저해제, 불레기말은 JNK의 저해제, 바위수염은 p38의 저해제로서 개발 가능성이 기대되며 이러한 결과는 제주 연안에 서식하는 갈조류를 이용한 신경세포 보호 작용 및 항치매, 항염작용을 위한 생리활성 물질을 탐색하고 기능성 식품 소재와 의약품 소재로서의 개발에 기초 자료로서 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

## V. 참고문헌

- (1) 박수희. 쌍말이서실과 비틀대모자반으로부터 분리된 생리활성 물질의 연구. *한밭대학교 산업대학원 석사학위논문*, 2004
- (2) 오창경, 박제석, 오명철, 현재석, 김봉오, 김수현. 해조류 에탄올 농도별 추출물의 항돌연변이원성 및 항균성. *尖端技術研究所論文集*. 7(2) : 11-20, 1996
- (3) 이충환, 고영희. 국내 생리활성물질 탐색 연구현황. *한국미생물생명공학회소식지(생물산업)*. 12(3) : 30-35. 1999
- (4) 조길석, 도정룡, 구재근. 기능성 해조차의 소재로 활용을 위한 김, 미역 및 다시마의 처리조건. *한국식품영양과학회지*. 27(2) : 275-280, 1998
- (5) 차선희, 안긴내, 허수진, 김길남, 이기환, 송춘복, 김소미, 전유진. 제주 자생 해양 녹조류와 갈조류 추출물로부터의 항고혈압 활성. *한국식품영양과학회지*. 35(3) : 307-314, 2006
- (6) 강재원. *해산식물학* 4판. 209-217, 1984
- (7) Schwartsmann G, Brondani da Rocha A, Berlinck RG, Jimeno J. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncol*. 2(4) : 221-225, 2001
- (8) Noda H, Amano H, Arshima K, Hashimoto S, Nisizawa W. Studies on the antitumor activity of marine algae. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 55(7) : 1259-1264, 1989



- (9) 오기림. 해조류의 항산화 활성 검색 및 뜻을 이용한 유효성분 분리. *제주대학교 대학원 석사학위논문*, 1997
- (10) Kim SC, Park SY, Hyoun JH, Cho H, Kang JH, Lee YK, Park DB, Yoo ES, Kang HK. The cytotoxicity of *Scytosiphon lomentaria* against HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Biother Radiopharm.* 19(5) : 641-648, 2004
- (11) Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol.* 96(14) : 1613-1623, 2005
- (12) Athukorala Y, Kim KN, Jeon YJ. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food Chem Toxicol.* 44(7) : 1065-1074, 2006
- (13) Ryu G, Park SH, Kim ES, Choi BW, Ryu SY, Lee BH. Cholinesterase inhibitory activity of two farnesylacetone derivatives from the brown alga *Sargassum sagamianum*. *Arch Pharm Res.* 26(10) : 796-799, 2003
- (14) 이창숙. 한약재와 해조류로부터 Acetylcholinesterase 억제제의 추출 및 구조분석. *동아대학교 대학원 석사학위논문*, 2000
- (15) 권재룡. 우리나라 치매 연구 동향에 관한 연구. *서울신학대학교 대학원 석사학위논문*, 2003
- (16) 김승엽. 치매, 알츠하이머병. *삶과 꿈*, 1997

- (17) Panayi AE, Spyrou NM, Iversen BS, White MA, Part P. Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Neurol. Sci.* 195(1) : 1-10, 2002
- (18) Selkoe DJ. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81 : 741-756, 2001
- (19) Selkoe DJ. Translating Cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399 : A23-A31, 1999
- (20) Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias : amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci.* 1(5) : 335-338, 1998
- (21) Law A, Grauthier S, Quirion R. Say NO to Alzheimer's disease : the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res. Rev.* 35 : 73-96, 2001
- (22) Jang JH, Surh YJ. AP-1 mediates  $\beta$ -amyloid-induced iNOS expression in PC12 cells via the ERK2 and p38 MAPK signaling pathways. *Biochem biophys res commun.* 331(4) : 1421-1428, 2005
- (23) Trump BF, Berezesky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol.* 25(1) : 82-8, 1997
- (24) Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, Walker SW, Evan G. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol.* 4(6) : 389-97, 1992
- (25) Luster MI. Inflammation, tumor necrosis factor, and toxicology. *Environ*

*Health Perspect.* 106(9) : A418-9, 1998

- (26) Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. Neurotrophic and Neurotoxic Effects of Amyloid (beta) Protein: Reversal by Tachykinin Neuropeptides. *Science* 250 : 279-282, 1990
- (27) Lehericy S, Hirsch EC, Cervera-Pierot P, Hersh LB, Bakchine S, Piette F, Duyckaerts C, Hauw JJ, Javoy-Agid F, Agid Y. Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *J Comp Neurol.* 330(1) : 15-31, 1993
- (28) Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* 483(1) : 6-10, 2000
- (29) Ling Y, morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein(APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J biochem Cell Biol.* 35(11) : 1505-1535, 2003
- (30) Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC. Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 59(9) : 1381-1389, 2002
- (31) Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta secretase cleavage of Alzheimer' s amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286 : 735-741, 1999

- (32) Hartlage-Rubsamen M, Zeitschel U, Apelt J, Gartner U, Franke H, Stahl T, Gunther A, Schliebs R, Penkowa M, Bigl V, Rossner S. Astrocytic expression of the Alzheimer's disease beta-secretase (BACE1) is stimulus-dependent. *Glia* 41(2) : 169-179, 2003
- (33) 장창환, 정민환, 묵인희. 베타 아밀로이드 형성에 관여하는 효소와 그를 응용한 알츠하이머병 치료법 개발 동향. *한국뇌학회지*. 1(1) : 45-52, 2001
- (34) 西田榮介, 大野茂男 편, 최인장 역. 정보 전달 : 세포 운명과 세포 기능을 조절하는 구조. *월드사이언스*, 2004.
- (35) Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 9 : 180-186, 1997
- (36) English JM, Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 23(1) : 40-45, 2002
- (37) Harper SJ, LoGrasso P. Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell Signal.* 13(5) : 299-310, 2001
- (38) Swaton JE, Sellers LA, Faull RLN, Holland A. Increased MAP Kinase activity in Alzheimer's and Down Syndrome but not in schizophrenia human brain. *Eur J Neurosci.* 19 : 2711-2719, 2004
- (39) Frasca G, Chiechio S, Vancheri C, Nicoletti F, Copani A, Angela Sortino M. Beta-amyloid-activated cell cycle in SH-SY5Y neuroblastoma cells: correlation with the MAP kinase pathway. *J Mol Neurosci.* 22(3) :

231-236, 2004

- (40) Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269 : 13725-13728, 1994
- (41) Law A, Grauthier S, Quirion R. Say NO to Alzheimer's disease : the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res. Rev.* 35 : 73-96, 2001
- (42) Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, Smiyh TW, Michel T. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem.* 269(44) : 27580-27588, 1994
- (43) Martin E, Nathan C, Xie QW. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 180(3) : 977-984, 1994
- (44) 강제원. 한국동식물도감 식물편:해조류. 삼화출판사, 1968
- (45) Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 24(7) : 915-919, 2003
- (46) Mary S. Do dietary antioxidants prevent Alzheimer's disease?. *The Lancet Neurology.* 1(6) : 342 2002

- (47) Michael H, Bernd LF, Gunter S, Klaus L, Joachim B. Anti-inflammatory substances -a new therapeutic option in Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*. 4(6) : 275-282, 1999
- (48) Pasinetti GM, Aisen PS. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience*. 87 : 319-324, 1998
- (49) Blois M. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 181 : 1199-1200, 1958
- (50) Torel J, J Gillard, P Gillard. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25 : 383-385, 1986
- (51) Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer*. 47 : 943-946, 1987
- (52) Schagger H, Jagow G. Tricine-sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Anal Biochem*. 66(2) : 368-379, 1989
- (53) Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J Am Oil Chem Soc*. 52(2) : 59-63, 1975
- (54) 배송자. 모자반 분획물의 invitro에서의 항발암효과. *한국식품영양과학회지*. 33(3) : 480-486, 2004
- (55) 김순영. 지충이(*Sargassum thunbergii*) 추출물의 항산화 효과. *경상대학교*

대학원 석사학위 논문, 2004

- (56) Ruperez P, Ahrazem O, Leal JA. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem.* 50(4) : 840-5, 2002
- (57) Yon XJ, Li XC, Zhou CX, Fan X. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from sargassum kjellmanianum. *J Appl Phycol.* 8 : 201-203, 1996
- (58) 박기의, 장미숙, 임치원, 김연계, 서영완, 박희연. 톳 자숙액 에탄올 추출물의 항산화 활성. *한국응용생명화학회지.* 48(4) : 435-439, 2005
- (59) 김진아, 이종미. 건조방법에 따른 해조류(감태)의 주요성분 및 항산화 활성의 변화. *대한가정학회지.* 42(5) : 193-203, 2004
- (60) 김은숙, 최수진, 류병호, 최진호, 오명식, 박우진, 최영환, 백도현, 하권철, 강대욱, 조용권, 박기태, 문자영. 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 신경세포 독성에 대한 원추리의 억제 효과 탐색. *대한한의학회지.* 27(2) : 122-133, 2006
- (61) 최재수, 송상호, 최영락, 김관용, 최종원, 박종철. 해조류 추출물과 페놀성화합물의 in vitro 및 in vivo 간 보호 활성. *생약학회지.* 28(4) : 239-246, 1997
- (62) Kang KA, Lee KH, Chae S, Zhang R, Jung MS, Lee Y, Kim SY, Kim HS, Joo HG, Park JW, Ham YM, Lee NH, Hyun JW. Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Lett.* 579(28) : 6295-6304, 2005

- (63) Krinskyey NI. Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation. *Ann New York Acad Sci.* 686 : 229-234, 1993
- (64) 김성애, 김진, 우미경, 곽충실, 이미숙. 다섯 가지 해조류 에탄올 추출물의 항돌연변이 활성 및 암세포 성장억제 효과. *한국식품영양과학회지.* 34(4) : 451-459, 2005
- (65) Riou D, Colliec-Jouault S, Pinczon Du Sel D, Bosch S, Siavoshian S, Le Bert V, Tomasoni C, Siquin C, Durand P, Roussakis C. Antitumor and Antiproliferative Effects of a Fucan Extracted from *Ascophyllum Nodosum* against a Non-Small-Cell Bronchopulmonary Carcinoma Line. *Anticancer research.* 16(3) : 1213-1218, 1996
- (66) 이희주. 지유(*Sanguisorbae Radix*)로부터 분리한  $\beta$ -secretase 활성 및 A $\beta$  유도 세포 독성 억제 물질. *경북대학교 대학원 석사학위 논문*, 2004
- (67) Jeon SY, Bae KH, Seong YH, Song KS. Green tea catechin as a BACE1 ( $\beta$ -secretase) inhibitor. *Boorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 13(22) : 3905-3908, 2003
- (68) 김은숙. 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 신경세포 독성에 대한 백합과 속근류의 억제 효과 탐색 연구. *창원대학교 대학원 석사학위 논문*, 2005
- (69) 김유정, 정일선, 최인순, 길상완, 최영주. 청각추출물의 항산화 및 일산화질소 합성 저해 연구. *생명화학회지.* 16(5) : 788-793, 2006
- (70) 김은아. Inhibition of B-Amyloid Peptide-Induced Neurotoxicity by Benzothiazoles in Neuronal Cells. *연세대학교 대학원 석사학위 논문*, 2006



- (71) Zhu X, Castellani RJ, Takeda A, Nunomura A, Atwood CS, Perry G, Smith MA. Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. *Mech Ageing Dev.* 123(1) : 39-46, 2001
- (72) Han BH, Holtzman DM, BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci.* 20 : 5775-5781, 2000
- (73) Harper SJ, LoGrasso P. Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell Signal.* 13 : 299-310
- (74) Irving EA, Bamford M. Role of mitogen- and stress- activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22 : 631-647, 2002
- (75) Nakamura T, Shibata T, Yamaguchi K, Tanama R. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown algae *Eisenia bicyclis*. *Fisherise Science.* 23(1) : 923-929, 1996
- (76) Fukuyama X, Kodama M, Miura I, Kinzyo Z, Mori H, Nakayama Y, Takahashi M. Antiplasma inhibitor. V. Structures of novel dimeric eckol isolated from the brown alga *Eckolnia Kurome*. *Chem Pharm Bull.* 37(9) : 2438-2441, 1989
- (77) Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia Fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci Biotechol Biochem.* 63 : 605-6-7, 1999

<국문초록>

제주연안 갈조류 추출물이 아밀로이드 베타 단백질에 의해  
일으키는 신경세포 독성의 억제 효과

韓 恩 惠

濟州大學校 教育大學院 營養教育專攻  
指導教授 申東範

본 연구에서는 제주연안에서 자생하는 해조류 중 갈조류 10종의 메탄올 추출물을 이용하여 항산화력과 아밀로이드 베타 단백질(A $\beta$ )에 의해 유도된 HT-22 신경세포의 독성 억제 효과를 관찰해 보았다.

갈조류 추출물의 항산화 효과는 DPPH radical 소거능으로 측정해 보았는데 그 결과 감태와 패에서 radical 소거능이 높게 나타났다. MTT assay를 통해 알아본 아밀로이드 베타 단백질에 의한 신경 세포 독성의 억제 효과는 갈조류 추출물을 25  $\mu$ g/mL을 처리하였을 때 미역쇠, 바위수염, 불레기말, 짝잎모자반 순으로 높은 세포 생존율을 보였고 갈조류 추출물을 처리 하지 않은 것에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타냈다. 갈조류 추출물 50  $\mu$ g/mL을 처리 하였을 때에는 알쏭이 모자반, 미역쇠, 불레기말, 짝잎모자반 순으로 대조군에 비해 유의적으로 높은 신경 세포 생존율을 나타내었다.

갈조류 추출물을 이용하여 신경세포 사멸과 관련된 단백질 발현 양상을 살펴본 결과 아밀로이드 베타 전구 단백질인 APP의 발현은 감소하지 않았지만 아밀로이드 베타 단백질을 분해하는 효소인 BACE1는 대조군에 비해 갈조류 추출물을 처리한 군에서 감소하였다. 또한 염증성 자극 시 유도 되는 iNOS의 발현도 감소하였다. MAP kinase 구성 전달 분자의 단백질 발현 양상은 ERK는 짝잎모

자반 추출물을 처리하였을 때, JNK는 불레기말 추출물을 처리하였을 때, p38은 바위수염 추출물을 처리하였을 때 뛰어난 활성 저해 증력을 나타내었다.

본 연구에서는 갈조류가 우수한 항산화 활성을 나타내며 알츠하이머병을 일으키는 독성물질인 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 신경 세포의 독성을 억제 한다는 것을 보여 주었다. 제주 연안에 서식하는 갈조류를 이용하여 신경세포 보호 작용 및 항치매, 항염증작용을 갖는 생리활성 물질의 탐색 가능성과, 이들 물질들의 기능성 식품 및 의약품 소재의 개발에 기초 자료로 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

핵심어 : 갈조류, 알츠하이머병, 아밀로이드 베타 단백질, APP, BACE1, iNOS, MAP kinase

