

## 제주 연안 갈조류 추출물의 신경세포 보호효과

신동범 · 한은혜 · 박성수<sup>†</sup>

제주대학교 식품영양학과

### Cytoprotective Effects of Phaeophyta Extracts from the Coast of Jeju Island in HT-22 Mouse Neuronal Cells

Dong-Bum Shin, Eun-Hye Han, and Sung-Soo Park<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Nutrition, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

**ABSTRACT** Marine algae have long been recognized as a health and beauty food, based on its anti-tumor, anti-inflammatory and anti-obesity activities. In this study, methanol extracts were prepared from 10 different phaeophyta, after which DPPH radical scavenging and cytoprotective activities of HT-22 cells against  $\beta$ -amyloid protein ( $A\beta$ ), which has neurotoxic effects, were investigated. In DPPH experiments, *Ecklonia cava* and *Ishige okamurai* showed strong ROS scavenging activities, whereas eight other phaeophyta including *Petalonia binghamiae* (*P. bin*) showed weak ROS scavenging activities. To validate the cytoprotective effects of 10 different phaeophyta in  $A\beta$ -induced HT-22 cells, protein expression levels of APP, BACE1, iNOS, phosphorylated ERK1/2, phosphorylated p38 and phosphorylated JNK1/2 were determined along with MTT assay. In the MTT assay, *P. bin* showed the best effective cytoprotective activity at a concentrations of 25  $\mu$ g/mL, whereas *Sargassum confusum*, *Colpomenia sinuosa*, *Myelophycus simplex*, and *Sargassum hemiphyllum* showed potential. Determination of protein expression levels related to  $A\beta$ -induced neurotoxicity in the five selected phaeophyta showed that *P. bin* inhibited BACE1 and iNOS expression in  $A\beta$ -induced HT-22 cells. These results indicate that the cytoprotective effects of *P. bin* are mediated by suppressing the pathways involving  $A\beta$ -induced ERK and p38 activation.

**Key words:** edible phaeophyta, cytoprotection,  $\beta$ -amyloid protein ( $A\beta$ ), mitogen-activated protein kinase (MAPK), *Petalonia binghamiae*

## 서 론

제주도 연안에서 자생하는 해조류는 520여종이 넘는 것으로 보고되었고, 이는 한반도 전체의 약 70%를 차지하는 수준이다(1). 제주도 연안은 우리나라에서 가장 수온이 높고 다른 지역에서 볼 수 없는 아열대성의 남방계 해조류를 많이 볼 수 있으며, 특히 툇과 모자반을 이용한 전통 음식이 많이 전해 내려오고 있다(2).

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(3). 특히 갈조류는 항암과 항염증 생리활성을 갖는 fucoidan과 laminarin이라는 각각의 성분이 알려져 있다(3,4). 그리고 제주도 연안에서 서식하는 갈조류를 이용한 생리활성 물질을 탐색하기 위한 활발한 연구가 이루어지고

있는데 고리매 추출물이 인간 혈액암 세포주인 HL-60 세포의 성장을 억제하는 효과가 나타났고(5), 미역취 추출물은 생쥐의 3T3-L1 세포와 B16/F10 세포에서 각각 항비만 및 미백활성이 밝혀져 미용 기능성 식품으로의 가능성도 제기되고 있다(6,7). 또한 갈조류의 효소적 가수분해 방법을 이용한 추출물에 관한 연구에서는 과산화수소로부터의 활성 산소 소거능이 90%로 높게 나타났고 50%의 DNA 손상을 보호하는 효과를 나타냈으며(8), 감태의 분획물에서는 암세포의 증식억제 효과가 있었고 항산화 효과도 합성 항산화제인 BHA, BHT보다 매우 높게 나타났다(9). 비틀대모자반으로부터 얻은 farnesylacetone 유도체는 아세틸콜린의 작용을 저하시키는 cholinesterase의 두 가지 형태인 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase를 억제시켜 치매 예방 효과가 기대되고 있다(10).

일반적으로 치매에는 알츠하이머형 치매와 혈관성 치매가 대표적인데, 혈관성 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(11).

Received 8 October 2013; Accepted 21 October 2013

<sup>†</sup>Corresponding author.

E-mail: foodpark@jejunu.ac.kr, Phone: +82-64-754-3552

알츠하이머병의 병리학적 특징으로는 신경세포 외부에 축적되는 노인반점(senile plaques)과 신경세포의 세포체 내에 엉켜진 신경섬유덩어리(neurofibrillary tangles)를 들 수 있다. 이 중 노인반점의 생성은 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein; APP)의 용해과정에서 유래된 아밀로이드 베타 단백질( $\beta$ -amyloid protein;  $A\beta$ )의 축적에 의하며 축적된  $A\beta$ 가 신경세포에 독성으로 작용하여 신경세포에서 염증반응이 촉진되고 결국 신경세포의 사멸을 일으키게 된다. 따라서 알츠하이머병의 주요 병인은  $A\beta$ 로 생각되어지고 있다(12-14).

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, 염증반응 시 세포내에 증가하는 것으로 알려진 iNOS의 발현이 증가함에 따라 활성산소의 일종인 일산화질소(nitric oxide; NO)가 다량 생성되고 NO의 자극에 의해 세포신호 전달 체체인 mitogen activated protein (MAP) kinase pathway가 작동되는 것으로 알려져 있다(15,16).  $A\beta$ 는 APP의 대사과정에서 생성되는 일부분으로서 39~43개 내외의 아미노산으로 이뤄진 펩타이드이다(17). 아세틸콜린의 저하가 알츠하이머의 발병 원인이라고 생각해왔던 아세틸콜린 가설 이후에 등장한 아밀로이드 베타 가설은  $A\beta$ 가 알츠하이머의 발병 원인으로 작용할 것이라는 실험적 증거들에 의하여 가장 오래도록 일반적으로 받아들여지고 있다(18).

$A\beta$ 의 전구 단백질 APP는 770개의 아미노산으로 구성되어진 펩타이드로 amyloidogenic pathway와 non-amyloidogenic pathway의 두 가지로 그 대사과정이 진행된다. Amyloidogenic pathway는  $A\beta$ 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 경로를 거친다. Amyloidogenic pathway의 대사산물인  $A\beta$ 가 신경세포 주변에 축적되어 신경세포 독성을 일으켜 신경세포의 손상과 염증반응을 촉진시키고 결국 신경세포의 사멸을 가져와 알츠하이머병을 일으킨다. Non-amyloidogenic pathway는  $\alpha$ -secretase라고 알려진 단백질 분해효소가 활성화되어 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)와 CTF $\gamma$ 로 대사된다. Non-amyloidogenic pathway는  $A\beta$ 의 일부분이 잘려나가게 되어  $A\beta$ 의 축적이 방해되며 대사산물인 sAPP $\alpha$ 는 세포 성장 및 보호 작용을 보인다(12,13,19-21).

$A\beta$ 의 형성에 관여하는 효소인  $\beta$ -secretase는 aspartic protease의 일종으로 BACE1과 BACE2가 동정되어지고 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(20-24).

MAP kinase는 크게 ERK(the extracellular signal-activated kinases), JNK(the c-JUN N-terminal kinase), p38 등이 있다. ERK(ERK1/2)는 성장 호르몬의 신호전달에 주로 관여하며 세포의 증식 및 분화에 중추적인 역할을 담당한다. 반면에 stress activated protein kinase로 분류되는 p38과 JNK는 이름 그대로 세포 외부의 스트레스 자극에 의해 활성화되며 염증반응, 세포사멸 등에 연관되어 있다(25-27). 이들 MAP kinase와 뇌신경세포 사멸과의 연관성에 대해 최근 연구가 활발히 진행 중인데 알츠하이머병과 다운증후군 환자의 뇌에서 MAP kinase의 활성이 증가되었고(28)  $A\beta$ 가 자극원이 되어 p38과 ERK를 활성화시키면서 염증반응을 유도하여 신경세포의 사멸이 일어나게 된다는 보고가 있다(29). 이와 같은 결과들로 보아 알츠하이머 발병의 주요 원인인  $A\beta$  생성에 따르는 세포내 스트레스 반응에 MAP kinase pathway가 연관되어 있음을 알 수 있다.

많은 연구들에서 알츠하이머병의 치료제로  $A\beta$ 의 축적을 억제하는 물질이나  $A\beta$ 를 생성시키는 APP 분해효소인 BACE1의 저해제, 항산화제, 항염증제 개발이 진행되고 있다(30-33). 그러므로 본 연구에서는 제주 연안에서 자생하는 해조류 중 갈조류 10종의 메탄올 추출물을 이용하여 활성산소 소거능과 아밀로이드 베타 단백질( $A\beta$ )이라는 신경독성 유발물질에 대한 HT-22 신경세포 보호효과를 관찰해 보았다.

## 재료 및 방법

### 갈조류 추출물 제조

본 실험에서는 제주도 연안에 서식하고 있는 갈조류 10종의 추출물을 제주테크노파크 산하 제주생물자원지원센터 제주유용생물자원 추출물 은행으로부터 채집해 보관해 놓았던 것을 분양받아 사용하였다(Table 1). 분양받은 추출물은 80% 메탄올을 용매로 추출하여 감압농축된 것으로 농도는 1 mg/mL가 되게 dimethylsulfoxide(DMSO, JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA)에 녹여서 실험에 사용하였다.

### 세포배양

본 연구에서는 흰쥐의 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, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양기(MCO-17AI, SANYO Electric Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 계대 배양은 trypsin-EDTA(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 2~3일에 한 번씩 시행하였다.

**Table 1.** List of 10 phaeophyta

Binomial name	Korean name	Sampling date	Location
<i>Sargassum confusum</i> ( <i>S. con</i> )	알송이모자반	2005. 03. 09	Oedo
<i>Colpomenia sinuosa</i> ( <i>C. sin</i> )	불레기말	2005. 03. 11	Sinchon
<i>Myelophycus simplex</i> ( <i>M. sim</i> )	바위수염	2005. 04. 07	Bukchon
<i>Petalonia binghamiae</i> ( <i>P. bin</i> )	미역쇠	2005. 04. 07	Bukchon
<i>Ishige sinicola</i> ( <i>I. sin</i> )	넓패	2005. 04. 22	Samyang
<i>Dictyota dichotoma</i> ( <i>D. dic</i> )	참그물바탕말	2005. 04. 26	Sasudong
<i>Dictyota coriacea</i> ( <i>D. cor</i> )	참가죽그물바탕말	2005. 04. 26	Sasudong
<i>Sargassum hemiphyllum</i> ( <i>S. hem</i> )	짜릿모자반	2005. 05. 23	Sindo
<i>Ishige okamurai</i> ( <i>I. oka</i> )	패	2005. 07. 19	Gimnyeong
<i>Ecklonia cava</i> ( <i>E. cav</i> )	감태	2005. 10. 14	Wimi

### 전자공여능(DPPH) 측정

전자공여능의 측정은 Blois의 방법(34)을 변형하여 사용하였다. 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)을 180  $\mu$ L, 1 mg/mL 농도의 갈조류 추출물 20  $\mu$ L를 섞어 총량이 200  $\mu$ L가 되게 96 well plate에 분주하고 암실에서 30분 반응 후 VersaMax tunable microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 널리 알려져 있는 합성 항산화제인 butyl hydroxyanisole(BHA)을 사용하였으며 전자공여능은 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

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

### 세포생장률 측정

갈조류 추출물이 아밀로이드 베타에 의한 독성으로부터 신경세포의 생존 및 성장에 미치는 영향을 관찰하고자 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 분석법을 수행하였다. MTT 분석법은 세포의 생장률을 측정하는 방법으로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase가 황색 수용성 물질인 MTT (Gibco-BRL)에 의해 dark blue formazan을 생성하는 원리로 이 환원되는 정도를 흡광도로 측정함으로써 알아보는 방법이다(35). HT-22 세포를 96 well plate에 세포수가  $5 \times 10^4$ /well이 되게 분주하여 24시간 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/mL를 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양기에서 배양하였다. 48시간 후 5 mg/mL 농도의 MTT reagent 10  $\mu$ L를 분주하여 4시간 배양하였고 상층액을 제거한 후 100  $\mu$ L의 DMSO를 첨가하여 5분 정도 incubation 시켜 생성된 blue formazan을 완전히 녹여준 후 VersaMax tunable microplate reader로 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.

### 단백질 발현양상 분석

아밀로이드 베타 단백질( $A\beta$ )의 신경독성에 대한 신경세포 보호효과를 가진 갈조류 추출물이 신경세포 사멸 경로 중 작용되는 부분을 알아보고자 Western blot을 통해 APP, BACE1, iNOS, MAP kinase의 단백질 발현양상을 살펴본다. 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<sub>2</sub> 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 원심분리 하여 그 상층액을 취한 후 단백질 농도는 2D quant kit(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 정량하였다. 30  $\mu$ g의 lysate를 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel에서 전기영동을 이용하여 단백질을 분리하였다(36). 분리된 단백질을 PVDF(polyvinylidene fluoride) membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)에 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 10분간 3회 세척하였다. APP(1:5,000, Sigma-Aldrich Co.), BACE1(1:2,000, Sigma-Aldrich Co.), iNOS(1:10,000, Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA), ERK1/2(1:1,000, Sigma-Aldrich Co.), phospho ERK1/2(1:1,000, Sigma-Aldrich Co.), p38(1:1,000, Sigma-Aldrich Co.), phospho p38(1:1,000, Sigma-Aldrich Co.), JNK(1:1,000, Sigma-Aldrich Co.), phospho JNK(1:1,000, Sigma-Aldrich Co.)로 희석한 1차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TTBS로 10분간 3회 세척한 다음 2차 항체로는 HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 anti-mouse IgG(Bio-Rad)를 1:5,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 membrane을 TTBS로 10분간 3회 세척한 다음 ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham

Biosciences) 기질과 5~10분간 반응 후 X-ray 필름 (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA)에 감광하였다.

**통계처리**

모든 실험은 3회 반복으로 이루어졌으며, 그 결과는 SPSS software(Ver. 12.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 처리하였다. 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 분산분석 후 유의차가 있는 경우 Duncan의 다중범위 검정으로  $P < 0.05$  수준에서 유의성을 검정하였다.

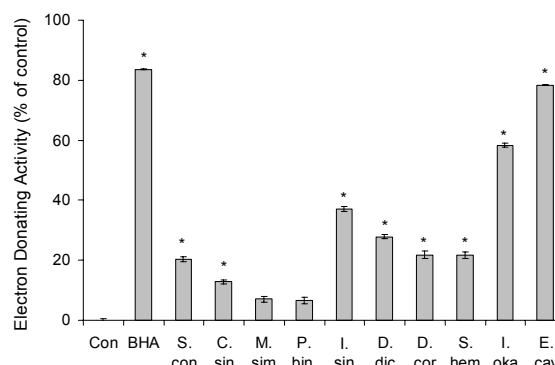
**결과 및 고찰**

제주 연안 갈조류 추출물이 아밀로이드 베타 단백질의 신경독성에 대한 신경세포 보호효과를 탐색하기 위해 항산화 활성(DPPH 라디칼 소거능), 세포 생존에 미치는 영향(MTT assay), 신경독성에 관여하는 HT-22 세포내 단백질의 발현 정도를 조사하였다.

**전자공여능 측정 분석**

본 연구에서는 갈조류 10종의 메탄올 추출물과 일반적으로 잘 알려진 합성 항산화제인 BHA를 대조군으로 하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정해 보았다(Fig. 1). 그 결과 대조군은 83.68%의 DPPH 라디칼 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 나머지 갈조류는 50% 미만의 라디칼 소거능을 나타내서 라디칼 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(37). 툃(*Hizikia fusiformis*) 자숙액 에탄올 추출물을 이용한 DPPH 라디칼 소거능에서는 1,000 µg/mL



**Fig. 1.** Electron donating activity of methanol extracts from 10 phaeophyta in the concentrations of 1 mg/mL. All data were obtained in triplicate and are presented as means±SD. Significant differences between treatments with the Student's t-test in an one-way analysis of variance. BHA: positive control group. \* $P < 0.05$  compared to control.

일 때 85%, 100 µg/mL일 때 77%의 소거능을 나타내어 갈조류가 천연 항산화제로서의 개발 가능성이 있음을 밝혔다(38). 또한 갈조류인 셀만모자반(*Sargassum kjellmanianum*)으로부터 분리한 phlorotannins 성분이 우수한 지질과 산화 억제 효과를 보인다고 밝혀졌는데(39) 최근 노화를 비롯한 여러 가지 성인병의 원인이 free radical의 산화에 의한 것임이 밝혀지고 있어 phlorotannins가 풍부한 갈조류의 섭취는 노화를 비롯한 만성 성인병 예방에 큰 도움이 될 것이다(40).

**세포생장률 측정을 통한 세포 보호효과 분석**

아밀로이드 베타 단백질의 독성에 의한 신경세포 생존율을 측정함으로써 갈조류의 HT-22 세포 보호효과를 살펴보았다(Table 2). 배양한 세포에 아밀로이드 베타 단백질(Aβ<sub>1-42</sub>)을 처리하고 갈조류 추출물을 25 µg/mL 처리하였을 때 Aβ<sub>1-42</sub>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(*Sargas-*

**Table 2.** Cytoprotective effects of methanol extract of phaeophyta in Aβ-treated HT-22 neuronal cell line

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

Mean±SD. \*The mean difference is significant at  $P=0.05$ .

*sum hemiphyllum*) 102.17%로  $A\beta_{1-42}$ 만을 처리한 군에 비해 유의적으로 높은 신경세포 생존율을 보였다. 알송이모자반(*Sargassum confusum*)과 감태는 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 세포 보호효과를 나타내지 못하였다.

갈조류 추출물을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리하였을 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  $A\beta$ 의 독성에 대한 세포 보호효과를 나타내지 못하였다.

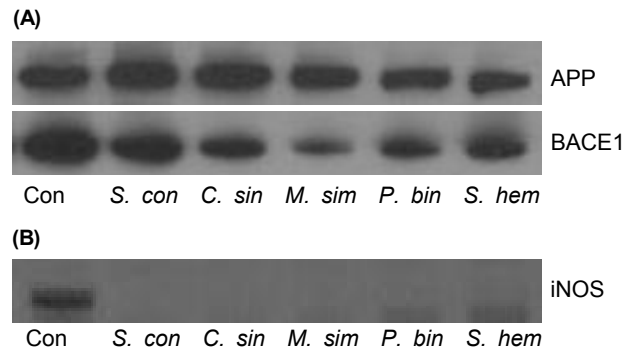
선행되었던 연구 중 원추리 추출물을 이용하여  $A\beta$ 에 의하여 유발된 PC12 세포에서의 독성을 억제하는 효능을 연구한 결과에서는 애기원추리, 죽대 및 각시원추리 추출물은 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지의 농도에서 생존율이 100~120%를 유지함을 확인하였다(41). 해조류 추출물을 대상으로 bromo-benzene으로 간 독성을 유발한 흰쥐의 *in vitro* 실험에서는 뜻, 파베기모자반(*Sargassum siliquastrum*), 지층이(*Sargassum thunbergii*) 추출물이 과산화 지질 생성을 억제한다는 연구 결과가 있었으며(42) 감태에서 유래된 eckol이 산화적 스트레스에 의한 U79-4 세포 손상을 억제하는 것으로 나타났다(43).

세포생장률 측정분석 결과 알송이모자반, 불레기말, 바위수염, 미역쇠, 짝잎모자반이  $A\beta$ 의 신경독성에 대해서 세포를 효과적으로 보호하는 것으로 보였고 대조군에 비해 높은 신경세포 생존율을 나타내고 있어 신경세포 생존율의 증가뿐만 아니라 신경세포의 증식에도 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

### 신경세포 보호효과에 연관된 단백질 발현양상 분석

세포생장률 측정 분석을 통해 아밀로이드 베타 단백질( $A\beta$ )의 신경독성에 대한 신경세포 생존률이 유의적으로 높았던 알송이모자반, 불레기말, 바위수염, 미역쇠, 짝잎모자반 추출물을 이용하여 신경세포 사멸과 관련된 단백질 발현양상을 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 발현양상을 살펴 본 결과, APP는 대조군에 비해 알송이모자반과, 불레기말, 바위수염을 처리하였을 때 높거나 비슷한 발현양상을 나타냈고, 미역쇠와 짝잎모자반을 처리하였을 때는 대조군보다 낮은 발현양상을 나타내었다. BACE1의 경우에는 다섯 가지 갈조류 모두에서 대조군에 비해 낮은 발현양상을 나타내었고 바위수염에서 가장 낮은 발현양상을 나타내었다. 따라서 미역쇠 추출물이 아밀로이드 베타



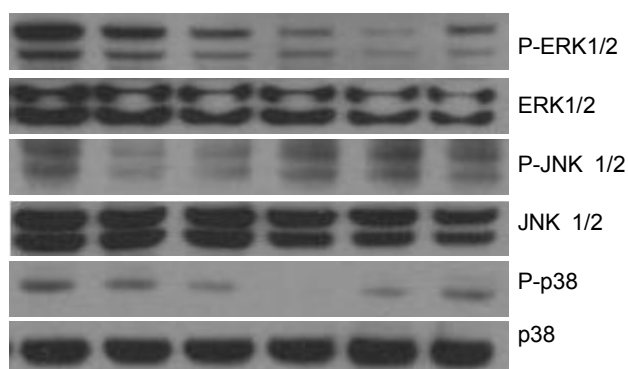
**Fig. 2.** Cytoprotective effects of selected 5 phaeophyta on APP and BACE1 protein expression associated with  $A\beta$  accumulation (A) and iNOS protein expression associated with NO generation (B) in  $A\beta$ -induced HT-22 neuron cell line.

전구체 물질의 감소효과와 더불어 신경독성 물질인  $A\beta$  생성기전 중 단백질 분해 효소인 BACE1의 활성을 저해함으로써  $A\beta$  생성을 감소시키는 효과를 보였다(Fig. 2A). 녹차에서 분리된 catechin계 화합물이 BACE1을 저해한다는 보고가 있었다(44).

세포에서 염증반응이 일어날 때 발현되어 세포의 사멸에 관여하는 iNOS는 대조군에 비해 갈조류 추출물을 처리한 군에서는 낮은 발현양상을 나타내었다(Fig. 2B). 이 결과로 보아 갈조류 추출물이 세포손상과 염증을 유도시키는 NO의 생성을 유발하는 iNOS 단백질의 발현을 저해하는 효과가 밝혀졌다. 청각(*Codium fragile*) 추출물의 항염증 효과를 살펴 본 연구에서도 RAW264.7 세포에 치주질환균에서 유도된 LPS와 청각 추출물을 처리한 결과 NO 활성을 현저히 감소시켜 높은 항염증 효과를 나타내었으며 iNOS 활성화도 저해시킨다는 보고도 있다(45).

신경세포의 사멸과 관련된 MAP kinase의 활성화된 상태의 발현 양상을 살펴보았다(Fig. 3). PC12세포에서  $A\beta$ 의 처리로 ERK와 p38을 통해 iNOS의 발현이 증가한다는 연구 결과가 있었고(16) MAP kinases pathway가 알츠하이머병의 병인인  $A\beta$ 와 밀접한 관련이 있다는 많은 보고가 있었다(28,29).

본 연구에서는  $A\beta$ 의 신경독성으로 인해 신경세포에서 활성화된 MAP kinase의 저해양상을 분석하였다. 그 결과 HT-22 세포에서 ERK와 p38의  $A\beta$ 에 의한 활성화를 저해한 해조류는 미역쇠와 바위수염이었으며, 이 중 미역쇠는 식용으로 쓰이는 갈조류로 알려져 있다(Fig. 3). 실험동물의 ischemia model에서 ERK 활성화 정도는 ischemia가 일어난 중심 부위(ischemic core)에서는 감소하지만 주변 부위(penumbra)에서는 활성화됨이 알려져 있다. 다른 실험결과에서는 ischemic core에서도 ERK 활성도가 증가함이 보고된 바 있다. 또한 p38이 신경세포의 사멸에 관여함이 알려진 것은 *in vitro* 실험에서 신경성장 호르몬인 NGF 결핍이나 흥분상태 시에 유발된 신경세포사멸에 p38 활성도가 관련되어 있으며, 최근 뇌졸중 실험동물 모델에서의 연구 결과를



**Fig. 3.** Cytoprotective effects of selected 5 phaeophyta on P-ERK1/2 and P-p38 MAPK protein expression associated with NO generation and P-JNK SAPK protein expression in A $\beta$ -induced HT-22 neuron cell line. P represents phosphorylated form of MAPK.

보면 p38이 뇌의 microglia에서 활성화되며 p38 저해제들이 우수한 신경세포 보호 작용을 나타낸다는 보고가 있다 (46-48).

본 연구 결과들을 종합해 볼 때, 미역취 추출물은 DPPH 소거를 통한 항산화 활성은 낮지만 A $\beta$ 의 축적을 야기하는 BACE1 단백질의 발현을 저해함과 동시에 A $\beta$ 의 신경독성으로 인한 MAP kinase 활성화 중 iNOS 활성화와 연관된 ERK와 p38의 활성화를 저해함으로써 HT-22 신경세포에 염증반응이 감소되고 결국 신경세포사멸이 줄어들게 된다. 그러므로 미역취 추출물의 A $\beta$ 의 축적감소 및 A $\beta$ 의 신경독성에 대한 신경세포 보호효과가 밝혀짐에 따라 식용 갈조류인 미역취를 활용하여 알츠하이머형 치매 예방에 도움이 되는 건강기능성 식품소재의 개발이 가능하다고 사료된다.

## 요 약

항암, 항염증 및 비만억제 등의 생리활성을 지닌 해조류는 최근 건강기능 식품, 기능성 화장품 그리고 의약품 산업 분야에서 미용과 건강식품 소재로 각광받고 있다. 본 연구에서는 10종의 갈조류 메탄올 추출물을 이용하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능과 아밀로이드 베타 단백질(A $\beta$ )의 신경독성에 대한 HT-22 신경세포 보호효과를 조사함으로써 천연물로부터 안전하고 새로운 신경세포 보호소재를 개발해내고자 한다. DPPH 라디칼 소거능의 경우 미역취를 포함한 8종의 갈조류에서는 비교적 낮은 활성산소 소거능을 보인 반면, 감태와 폐에서 강력한 활성산소 소거능이 나왔다. A $\beta$ 의 신경독성에 대해 10종의 갈조류 추출물이 갖는 HT-22 신경세포 보호효과를 검증하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 분석과 APP, BACE1, iNOS 단백질의 발현양상 및 ERK1/2, p38, JNK1/2 단백질의 활성화 양상을 분석했다. MTT 분석 결과, A $\beta$ 의 신경독성으로부터 미역취가 25  $\mu$ g/mL의 농도에서 가장 효과적으로 세포를

보호하고 있는 것으로 나타났고, 알송이모자반, 불레기말, 바위수염, 짝잎모자반도 세포 보호효과가 있는 것으로 나타났다. 세포 보호효과가 있는 것으로 밝혀진 5종의 갈조류를 가지고 수행한 단백질 발현분석 결과, 미역취는 A $\beta$ 의 신경독성에 의해 HT-22 신경세포에서 발현되는 단백질인 BACE1과 iNOS의 발현을 저해하였다. 이는 미역취의 세포 보호효과가 A $\beta$ 의 신경독성으로부터 일어난 ERK와 p38의 활성화에 연관된 세포신호전달 경로를 억제하는 것으로 보인다. 그러므로 특히 식용 갈조류인 미역취는 A $\beta$ 에 의해 유도된 신경독성에 대해서 신경세포 보호효과를 갖는 건강기능 식품 소재로서의 가치가 충분한 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2013학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Lee YP, Kang SY. 2001. *A catalogue of the seaweeds in Korea*. Jeju National University Press, Jeju, Korea. p 477.
2. Cha SH, Ahn GN, Heo SJ, Kim KN, Lee KW, Song CB, Cho SK, Jeon YJ. 2006. Screening of extracts from marine green and brown algae in Jeju for potential marine angiotensin-1 converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 307-314.
3. Noda H, Amano H, Arshima K, Hashimoto S, Nisizawa W. 1989. Studies on the antitumor activity of marine algae. *Bull Japan Soc Sci Fish* 55: 1259-1264.
4. Schwartzmann G, Brondani da Rocha A, Berlinck RG, Jimeno J. 2001. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncol* 2: 221-225.
5. Kim SC, Park SY, Hyoun JH, Cho H, Kang JH, Lee YK, Park DB, Yoo ES, Kang HK. 2004. The cytotoxicity of *Scytosiphon lomentaria* against HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Biother Radiopharm* 19: 641-648.
6. Kang SI, Kim MH, Shin HS, Kim HM, Hong YS, Park JG, Ko HC, Lee NH, Chung WS, Kim SJ. 2010. A water-soluble extract of *Petalonia binghamiae* inhibits the expression of adipogenic regulators in 3T3-L1 preadipocytes and reduces adiposity and weight gain in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem* 21: 1251-1257.
7. Yoon HS, Koh WB, Oh YS, Kim IJ. 2009. The anti-melanogenic effects of *Petalonia binghamiae* extracts in  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone-induced B16F10 murine melanoma cells. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 52: 564-567.
8. Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol* 96: 1613-1623.
9. Athukorala Y, Kim KN, Jeon YJ. 2006. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food Chem Toxicol* 44: 1065-1074.
10. Ryu G, Park SH, Kim ES, Choi BW, Ryu SY, Lee BH. 2003. Cholinesterase inhibitory activity of two farnesylacetone derivatives from the brown alga *Sargassum sagaminum*. *Arch Pharm Res* 26: 796-799.
11. Panayi AE, Spyrou NM, Iversen BS, White MA, Part P.

2002. Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Neurol Sci* 195: 1-10.
12. Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81: 741-756.
  13. Selkoe DJ. 1999. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399: A23-A31.
  14. Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. 1998. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci* 1: 335-338.
  15. Law A, Grauthier S, Quirion R. 2001. 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.
  16. Jang JH, Surh YJ. 2005. AP-1 mediates  $\beta$ -amyloid-induced iNOS expression in PC12 cells via the ERK2 and p38 MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1421-1428.
  17. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid (beta) protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250: 279-282.
  18. Lehericy S, Hirsch EC, Cervera-Pierot P, Hersh LB, Bakchine S, Piette F, Duyckaerts C, Hauw JJ, Javoy-Agid F, Agid Y. 1993. Heterogeneity and selectivity of the degeneration of cholinergic neurons in the basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 330: 15-31.
  19. Nunan J, Small DH. 2000. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett* 483: 6-10.
  20. Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. 2003. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 1505-1535.
  21. Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC. 2002. Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59: 1381-1389.
  22. 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. 1999. Beta secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735-741.
  23. Hartlage-Rubsamen M, Zeitschel U, Apelt J, Gartner U, Franke H, Stahl T, Gunther A, Schliebs R, Penkowa M, Bigl V, Rossner S. 2003. Astrocytic expression of the Alzheimer's disease beta-secretase (BACE1) is stimulus-dependent. *Glia* 41: 169-179.
  24. Jang CH, Jung MW, Mook-Jung I. 2001. Enzymes for beta amyloid generation and their therapeutic applications for Alzheimer's disease. *Kor J Brain Sci Tech* 1: 45-52.
  25. Robinson MJ, Cobb MH. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180-186.
  26. English JM, Cobb MH. 2002. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 23: 40-45.
  27. Harper SJ, LoGrasso P. 2001. Signaling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell Signal* 13: 299-310.
  28. Swaton JE, Sellers LA, Faull RLN, Holland A. 2004. Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. *Eur J Neurosci* 19: 2711-2719.
  29. Frasca G, Chiechio S, Vancheri C, Nicoletti F, Copani A, Angela Sortino M. 2004. Beta-amyloid-activated cell cycle in SH-SY5Y neuroblastoma cells: correlation with the MAP kinase pathway. *J Mol Neurosci* 22: 231-236.
  30. Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P. 2003. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24: 915-919.
  31. Mary S. 2002. Do dietary antioxidants prevent Alzheimer's disease? *The Lancet Neurology* 1: 342.
  32. Michael H, Bernd LF, Gunter S, Klaus L, Joachim B. 1999. Anti-inflammatory substances—a new therapeutic option in Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today* 4: 275-282.
  33. Pasinetti GM, Aisen PS. 1998. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience* 87: 319-324.
  34. Blois M. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
  35. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer* 47: 943-946.
  36. Schagger H, Jagow G. 1989. Tricine-sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 66: 368-379.
  37. Ruperez P, Ahrazem O, Leal JA. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem* 50: 840-845.
  38. Yon XJ, Li XC, Zhou CX, Fan X. 1996. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. *J Appl Phycol* 8: 201-203.
  39. Park KE, Jang MS, Lim CW, Kim YK, Seo Y, Park HY. 2005. Antioxidant activity on ethanol extract from boiled-water of *Hizikia fusiformis*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 435-439.
  40. Kim JA, Lee JM. 2004. The changes in the chemical components and antioxidant activities in *Ecklonia cava* according to the drying methods. *J Korean Home Econom Assoc* 42: 193-203.
  41. Kim ES, Choi SJ, Ryu BH, Choi JH, Oh MS, Park WJ, Choi YW, Paik DH, Ha KC, Kang DO, Cho YK, Park KT, Moon JY. 2006. Protective effects of *Hemerocallis fulva* extracts on amyloid  $\beta$ -protein-induced death in neuronal cells. *J Korean Oriental Med* 27: 122-133.
  42. Park JC, Choi JS, Song SH, Choi MR, Kim KY, Choi JW. 1997. Hepatoprotective effect of extracts and phenolic compound from marine algae in bromobenzene-treated rats. *Kor J Pharmacogn* 28: 239-246.
  43. 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. 2005. Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Lett* 579: 6295-6304.
  44. Jeon SY, Bae KH, Seong YH, Song KS. 2003. Green tea catechin as a BACE1 ( $\beta$ -secretase) inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 3905-3908.
  45. Kim YJ, Jung IS, Choi IS, Gil SW, Choi YJ. 2006. Studies on antioxidant activity and inhibition of nitric oxide synthesis from *Codium fragile*. *J Life Sci* 16: 788-793.
  46. Han BH, Holtzman DM. 2000. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury *in vivo* via the ERK pathway. *J Neurosci* 20: 5775-5781.
  47. Harper SJ, LoGrasso P. 2001. Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell Signal* 13: 299-310.
  48. Irving EA, Bamford M. 2002. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 631-647.