

Fucoidan의 Oxy-radical 포획능 평가

김봉희, 오정민, 강건욱², 곽상훈¹, 윤세영^{1,2},
이철호³, 이현선³, 김상겸*

충남대학교 약학대학 형질전환 복제돼지 센터, ¹LG 생활건강,
²조선대학교 약학대학, ³한국생명공학연구원, 천연물의약 연구센터

Evaluation of Oxy-radical Scavenging Capacity of Fucoidan

Bong-Hee Kim, Jung Min Oh, Keon Wook Kang², Sang Hoon Kwak¹,
Sei Young Yun^{1,2}, Chul Ho Lee³, Hyun Sun Lee³ and Sang Kyum Kim*

College of Pharmacy and RCTCP, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

¹LG Household and Healthcare Ltd., Research Park, Daejeon, 305-353, Korea

²College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

³Natural Medicine Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT

Algal fucoidan is a marine polysaccharide containing sulfur with a wide variety of biological activities including anti-inflammatory and anti-thrombotic effects. Although antioxidants can inhibit inflammatory signals through inhibiting activator protein-1 and/or nuclear factor-kappaB activation, it is obscure whether fucoidan directly scavenges oxy-radicals or indirectly regulates oxidant production and/or antioxidant defense system. The antioxidant activities of fucoidan against peroxy radicals, peroxy nitrates and hydroxyl radicals were determined by the total oxy-radical scavenging capacity (TOSC) assay. The specific TOSC values of fucoidan against peroxy radicals, peroxy nitrates or hydroxyl radicals were 282 ± 60 , 43 ± 1 or 40 ± 1 TOSC/mg/mL, respectively. These specific TOSC values against peroxy radicals, peroxy nitrates or hydroxyl radicals are 23, 12, or 13% of the specific TOSC values of glutathione, a positive control, respectively. These results suggest that fucoidan has direct oxy-radical scavenging capacity, which may be related with anti-inflammatory effect of fucoidan.

Key words : fucoidan, oxy-radicals, TOSC, oxidative stress

서 론

Fucoidan은 *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* 등과 같은 갈조류의 대표적인 성분으로 황을

함유하고 있는 다당류이다. Fucoidan은 구조적으로 헤파린과 유사하며 실제 헤파린이 가지는 항혈전 작용을 보인다(Berteau and Mulloy, 2003). 최근 우리는 fucoidan이 macrophage 세포주인 RAW264.7에서 lipopolysaccharide에 의한 nitric oxide의 생성과 유도형 nitric oxide synthase의 발현을 억제함을 보고하였다(Yang *et al.*, 2006). Reporter gene assay

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-42-821-5930, E-mail: sangkim@cnu.ac.kr

와 gel shift assay는 fucoidan에 의한 항 염증작용이 activator protein-1의 활성화 억제에 의해 매개됨을 보였다. 이 결과는 fucoidan이 전사인자의 조절을 통하여 lipopolysaccharide에 의한 염증반응을 억제할 수 있음을 시사한다.

항산화 활성을 가지는 물질들은 항염증작용을 보이며 이러한 효과는 염증반응과 산화적 손상이 연관되어 있음을 시사한다. 실제로 염증반응에 의한 유전자 발현을 조절하는 전사인자들은 산화적 손상에 의해 활성화되는 것으로 보고되었다(Biesalski, 2007). 그러나 현재까지 oxy-radical에 대한 fucoidan의 직접적인 포획능에 관한 연구는 수행되지 않았다. 본 연구에서는 oxy-radical에 대해 직접적인 포획능을 평가할 수 있는 total oxy-radical scavenging capacity (TOSC) 방법(Regoli and Winston, 1999)을 이용하여 fucoidan의 항산화 활성을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 시약

Fucoidan, glutathione (GSH), alpha-keto-gamma-methiobutyric acid, SIN-1와 기타 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하였다.

2. TOSC assay

TOSC assay는 Winston *et al.* (1998)에 의해 제안되고 같은 저자들에 의해 보완된 방법(Regoli and Winston, 1999)을 기본으로 하여 수정되었다. Peroxyl radical과 peroxy-nitrite는 각각 2,2'-azobisamidinopropane와 SIN-1을 35°C에서 자발적으로 분해시켜 발생시켰다. Hydroxyl radical은 Fe와 ascorbic acid를 이용한 Fenton reaction으로 발생시켰다. 발생한 각각의 oxy-radical은 alpha-keto-gamma-methiobutyric acid와 반응하여 ethylene gas를 발생하며 이 반응은 일정 범위 내에서는 온도에 따른 차이를 나타내지 않는 것으로 보고되었다(Winston *et al.*, 1998).

반응은 최종 volume 1 mL의 반응액을 rubber septum으로 밀폐된 15 mL 용기에 넣어 진행시켰다. Ethylene 생성은 반응용기의 head space에서 200 μ L

의 공기를 취하여 gas chromatography에 주입하고 분석하였다. 분석을 위해 Poropack N column과 flame ionization detector를 장착한 gas chromatograph를 사용하였다.

실험결과는 실험측정치로부터 구한 그래프를 integration하여 area under the kinetic curve (AUC)를 얻고 TOSC는 아래의 식으로부터 산출하였다.

$$TOSC = 100 - \left(\frac{\int SA}{\int CA} \times 100 \right)$$

where $\int SA$ = integrated area from the curve of the sample reaction

$\int CA$ = integrated area from the curve of the control reaction

따라서 oxy-radical scavenging capacity를 전혀 갖지 못하는 시료의 $\int SA / \int CA = 1$ 이 되며 TOSC=0의 값을 갖는다. 반대로 $\int SA \rightarrow 0$ 일 때는 TOSC 값은 100에 접근한다. Specific TOSC 값은 얻어진 TOSC 값을 시험물질에 농도에 따라 좌표화하고 선형회귀분석(linear regression analysis)을 통해 기울기를 얻은 후 이 값을 시험물질의 농도로 나누어 구하였다. TOSC 값은 대조군에서의 값과 비교하게 되므로 이론적으로 기기의 감도나 사용시약, 기타 반응조건에 영향을 받지 않는다.

3. 통계 분석

Specific TOSC 값을 산출하기 위해 SigmaPlot 2000을 사용하여 선형회귀분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

Fucoidan은 거대분자 물질로 본 연구에서는 분자량이 8,000 이상인 것을 사용하였다. 거대 분자임에도 수용액에서 높은 용해도를 보였으며 모든 실험은 수용액에 녹인 fucoidan을 사용하였다. 생체에 가장 풍부한 thiol인 glutathione (GSH)을 양성대조군으로 하여 상대적인 fucoidan의 oxy-radical 포획능을 평가하였다.

1. Fucoidan의 peroxy radical에 대한 포획능 평가

Fucoidan의 peroxy radical 포획능을 Fig. 1A에

Table 1. Specific TOSC values of fucoidan against peroxy radicals, peroxynitrites and hydroxyl radicals

Oxy-radicals	Fucoidan (mg/mL)					GSH (mg/mL)	Specific TOSC value (TOSC/mg/mL)
	0.05	0.1	0.2	0.5	1	0.1	
TOSC value against peroxy radicals	2.2	24.9	46.2	66.9	69.7	74.6	282 ± 60
TOSC value against peroxynitrites	-0.3	-1.3	3.0	16.4	37.1	39.3	43 ± 1
TOSC value against hydroxyl radicals	-0.1	5.9	11.4	21.6	42.9	15.3	40 ± 1

Data are means ± S.D. Values varied by no more than 5% between experiments.

표시하였다. 본 연구에서 peroxy radical의 생성은 2,2'-azobisamidinopropane의 자발적인 분해를 이용하였으며 생성된 peroxy radical은 반응액에 존재하는 alpha-keto-gamma-methiolbutyric acid와 반응하여 ethylene gas를 생성한다(Winston *et al.*, 1998). 반응액에 첨가된 시험물질인 fucoidan은 0.05, 0.1, 0.2, 0.5와 1.0 mg/mL 농도에서 농도 의존적으로 peroxy radical에 의한 ethylene gas의 생성을 억제하였다. 이 결과는 본 연구에 사용한 농도에서 fucoidan이 효과적으로 peroxy radical을 포획함을 보인다. 양성 대조군인 0.1 mg/mL의 GSH 역시 현격한 ethylene gas 생성 억제효과를 보였다. 실험에 사용한 fucoidan 농도별로 시간에 따른 ethylene gas 값을 적분하여 각각의 AUC를 산출하고 이 값을 음성대조군인 시험물질이 없는 실험에서 얻은 값과 비교하여 TOSC 값을 산출하였다(Table 1). Fucoidan은 0.05, 0.1, 0.2, 0.5와 1.0 mg/mL 농도에서 각각 2.2, 24.9, 46.2, 66.9와 69.7의 TOSC 값을 보였으며 선형회귀분석결과 기울기로 얻어진 specific TOSC 값은 282 ± 60 TOSC/mg/mL로 산출되었다. GSH의 peroxy radical에 대한 specific TOSC 값인 1212 TOSC/mg/mL과 비교하여 fucoidan은 약 23%의 활성을 가지고 있었으며 이 결과는 fucoidan이 peroxy radical에 대해 의미 있는 포획능이 있음을 시사한다.

2. Fucoidan의 peroxynitrite에 대한 포획능 평가

Peroxynitrite는 SIN-1의 자발적인 분해에 의해 생성시켰으며 fucoidan에 의한 ethylene gas 생성 억제를 Fig. 1B에 표시하였다. Peroxynitrite는 superoxide anion과 nitric oxide의 결합반응으로 생성되며 염증반응에서 증가하는 대표적인 oxy-radical이

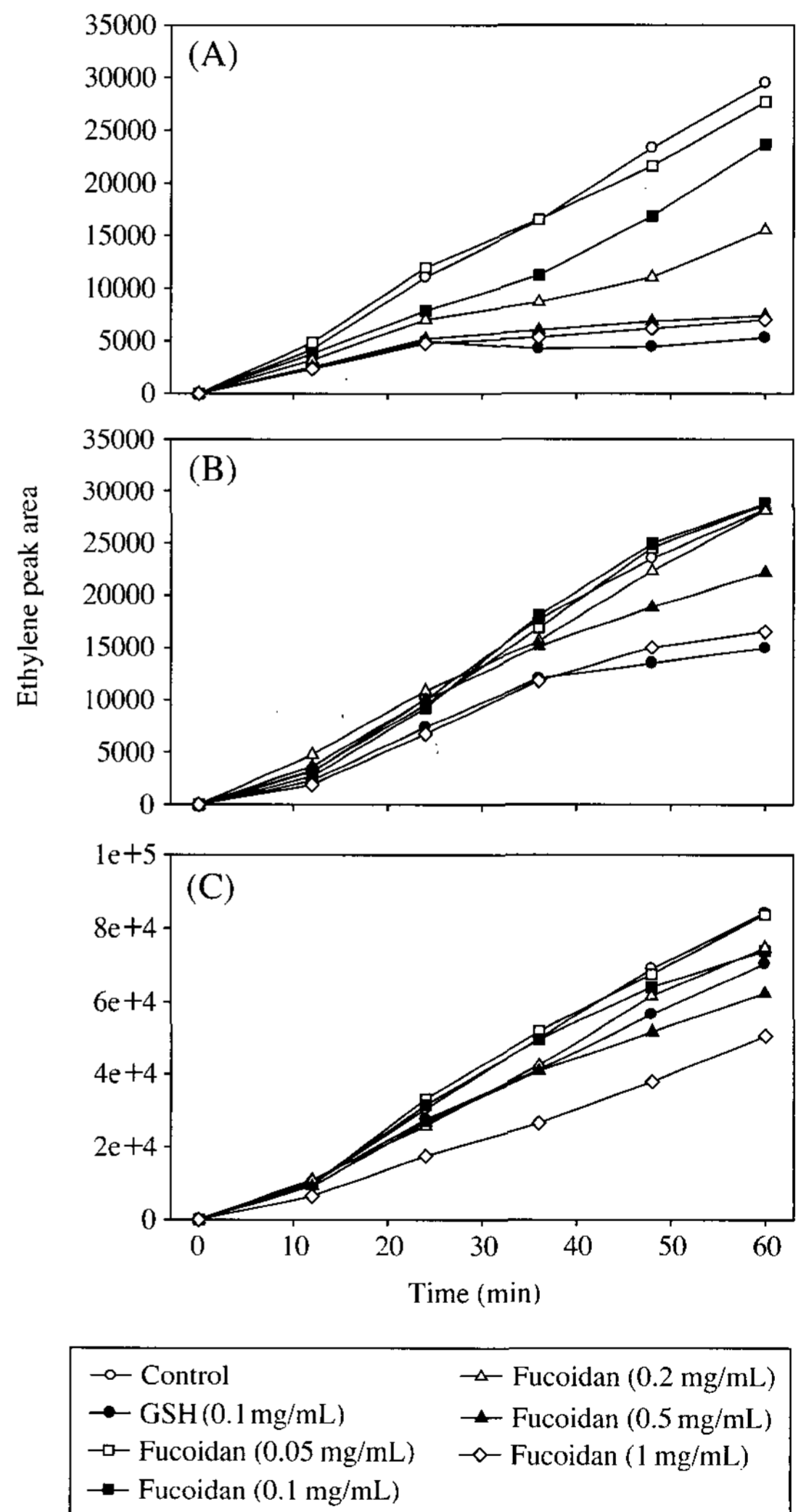


Fig. 1. Scavenging effect of fucoidan toward peroxy radicals (A), peroxynitrites (B) and hydroxyl radicals (C). Ethylene peak area are plotted as a percentage of the level observed in control samples at 60 min. Data are mean of duplicate experiments.

다(Brown *et al.*, 2007). 최근 peroxynitrite는 심혈관계질환, 퇴행성 뇌질환 등의 원인물질로 주목을 받고 있다(Pannu and Singh, 2006; Sun *et al.*, 2007). Peroxynitrite와 alpha-keto-gamma-methiolbutyric acid의 반응에 의해 생성되는 ethylene gas의 양은 반응액에 첨가된 0.2, 0.5와 1.0 mg/mL의 fucoidan에 의해 농도 의존적으로 감소하였다. 반면 0.05와 0.1 mg/mL의 fucoidan은 peroxynitrite에 의한 ethylene gas의 생성에 의미 있는 변화를 유발하지 못하였다. Fucoidan은 0.05, 0.1, 0.2, 0.5와 1.0 mg/mL 농도에서 peroxynitrite에 대해 각각 -0.3, -1.3, 3.0, 16.4와 37.1의 TOSC 값을 보였으며 선형회귀 분석결과 기울기로 얻어진 specific TOSC 값은 43 ± 1 TOSC/mg/mL로 산출되었다(Table 1). 양성대조군인 GSH의 peroxynitrite에 대한 specific TOSC 값은 362 TOSC/mg/mL로 fucoidan은 GSH에 비하여 약 12%의 peroxynitrite 포획능을 보였다.

3. Fucoidan의 hydroxyl radical에 대한 포획능 평가

Hydroxyl radical은 철과 ascorbic acid를 사용하여 발생시켰으며 fucoidan에 의한 ethylene gas 생성 억제를 Fig. 1C에 표시하였다. Hydroxyl radical은 가장 반응성이 강한 활성산소종으로 hydroxyl radical은 효소에 의해 무독화될 수 없다. 저분자의 항산화물질은 hydroxyl radical이 생체 내 고분자인 단백질, 지질, 핵산 등과 결합하는 것을 억제한다. 최근 음주에 의한 산화적 손상에 cytochrome P450E1이 관여하며, 특히 hydroxyl radical의 중요성이 보고되었다(Lu and Cederbaum, 2008). Hydroxyl radical과 alpha-keto-gamma-methiolbutyric acid의 반응에 의해 생성되는 ethylene gas의 양은 반응액에 첨가된 0.1, 0.2, 0.5와 1.0 mg/mL의 fucoidan에 의해 농도 의존적으로 감소하였으며 0.05 mg/mL의 fucoidan은 의미 있는 변화를 유발하지 못하였다. Fucoidan은 0.05, 0.1, 0.2, 0.5와 1.0 mg/mL 농도에서 hydroxyl radical에 대해 각각 -0.1, 5.9, 11.4, 21.6와 42.9의 TOSC 값을 보였으며 선형회귀분석결과 기울기로 얻어진 specific TOSC 값은 40 ± 1 TOSC/mg/mL로 산출되었다(Table 1). Hydroxyl radical에 대한 GSH의 specific TOSC 값은 301 TOSC/mg/mL로 fucoidan은 GSH에 비하여 약 13%의 hy-

droxyl radical 포획능을 보였다.

종합적으로 fucoidan은 peroxy radical에 대해 가장 높은 포획능을 발휘하였으며 peroxynitrite와 hydroxyl radical에 대해 GSH에 비해 약 11~13%의 포획능을 보였다. 이 결과는 실험에 사용한 oxy radical에 대해 fucoidan이 직접적인 포획능을 가지고 있음을 보인다. Fucoidan은 해양 조류에 광범위하게 분포하는 물질로 건강기능식품으로 미국 등에서 이미 사용되고 있다. 그러나 fucoidan의 정확한 생리활성은 최근 연구가 진행되고 있으며 본 연구결과는 fucoidan이 항산화 활성을 통해 항염증 작용 등을 발휘할 가능성을 시사한다. 추후 fucoidan의 항염증작용과 항산화활성의 상관성에 대한 추가적인 연구가 필요하며 이와 관련하여 연구가 진행 중이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20070501-034-004-007-01-01)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고 문헌

- Berteau O and Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide, *Glycobiology* 2003; 13(6): 29R-40R.
- Biesalski HK. Polyphenols and inflammation: basic interactions, *Curr Opin Clin Nutr Metab. Care* 2007; 10(6): 724-728.
- Brown GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase, *Biochem Soc Trans* 2007; 35(Pt 5): 1119-1121.
- Lu Y and Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol, *Free Radic Biol Med* 2008; 44(5): 723-738.
- Pannu R and Singh I. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms, *Neurochem Int* 2006; 49(2): 170-182.
- Regoli F and Winston GW. Quantification of total oxidant scavenging capacity of antioxidants for peroxynitrite,

peroxyl radicals, and hydroxyl radicals, *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 156: 96-105.

Sun Y. Oxidative stress and cardiac repair/remodeling following infarction, *Am J Med Sci* 2007; 334(3): 197-205.

Winston GW, Regoli F, Dugas AJ Jr, Fong JH and Blanchard KA. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and

biological fluids, *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 480-493.

Yang JW, Yoon SY, Oh SJ, Kim SK and Kang KW. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase, *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346(1): 345-350.