

갈파래(*Ulva lactuca*)의 용매별 추출물의 면역 증강 효과

김인혜¹ · 현진원³ · 이상현^{1,2} · 하종명^{1,2} · 하배진^{1,2} · 이재화^{1,2*}

¹신라대학교 의생명과학대학 제약공학과

²신라대학교 공과대학 생명공학과

³제주대학교 의과대학 생화학 교실

Immunological Stimulating Effects of the Marine Macroalgae, *Ulva lactuca* with Different Solvents

In Hae Kim¹, Jin Won Hyun³, Sang Hyun Lee^{1,2}, Jong-Myung Ha^{1,2}, Bae-Jin Ha^{1,2}, and Jae-Hwa Lee^{1,2*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Collage of Medical Life Science

²Department of Bioscience and Biotechnology, Collage of Engineering,

Silla University, Kwabop-dong 1-1, Sasang-gu, Busan, 607-736, Korea

³Department of Biochemistry, College of Medicine and Applied Radiological Science Research Institute, Cheju National University, Jeju-si 690-756, Korea

(Received August 3, 2006 / Accepted August 31, 2006)

ABSTRACT : To enhance our understanding of immunological stimulating effects through the pathway by which nitric oxide (NO) activity and alkaline phosphatase (ALP) enzyme activity from the marine algae, *Ulva lactuca*, we have investigated NO activity by using mouse RAW264.7 cell line. And ALP enzyme activity performed by spleen of ICR mouse. The results showed that NO activity of the H₂O fraction is the most effective than activities of other solvent fractions.

Key words : *Ulva lactuca*, Immunological stimulating effects, Nitric oxide, Alkaline phosphatase

서 론

오랜 기간 동안 많은 연구들이 천연자원으로부터 의약품등 신기능성 생리활성 물질들을 개발하고자하는 노력이 시도되어 왔지만 그 대상이 육상 생물 및 육상에 존재하는 식물체에만 한정적으로 편중되어 왔다. 그러나 최근에는 해양에 대한 관심이 고조되면서 해양 생물자원에서 새로운 생리활성 물질에 대한 개발이 많은 각광을 받고 있는 실정이다 (Ito and Hori, 1989).

지구 표면의 70%를 차지하는 해양에서는 많은 해양 생물이 서식하고 있으며 그 종류도 매우 많고 풍부하다. 해양 생물체는 높은 salt 농도와 수압 등으로 인해 해양 생태계의 특이한 환경에 적응하여 살아가고 있으며 육상 생물과는 다른 생체 방어 시스템 및 대사과정을 거치므로 육상 생물과는 다른 다양한 생리활성 및 화학적 구조를 지니고 있음을 알 수 있다 (Ayako *et al.*, 1982). 삼면이 바다로 둘러싸인

우리나라는 일찍이 전통적으로 한방 혹은 민간 요법등과 같은 대체의학에서만 종종 사용되어 왔다 (Beuchat and Golden, 1989).

녹조류 중 갈파래는 오래전부터 식용으로 이용되어 다양한 식품학적 연구만 보고되어 왔다. 갈파래의 주요 특성 중 하나는 육상 식물과 달리 황산기를 함유한 수용성 산성 다당류를 다량 함유하고 있으며 이 산성 다당류는 항암 작용과 더불어 여러 활성이 생리활성이 보고되어 있다 (Percival and Wold, 1963). 국내의 연구는 홰파래 (*Ulva rigida*)에서 당단백을 추출하여 항암 효과 (Noda *et al.*, 1989) 및 면역 활성이 보고된 바 있다 (Ray and Lahye, 1995).

면역 (immune)이란 생물이 외부의 침입 및 공격으로부터 방어하는 것을 지칭하며, 생체조직으로 침입하거나 주입되는 모든 외부 고분자 물질에 대한 생체반응을 포괄하여 지칭한다 (Hancock and Diamond, 2000). 또한, 면역은 크게, 태어날 때부터 지니고 있는 선천면역 (innate immunity)과 후천적으로 생활 등에 적응되어 얻어지는 획득면역 (acquired immunity)으로 구분 된다 (선천면역은 자연면역이라고도 하며, 항원에 대해 비특이적으로 반응하며 특별한 기

*To whom correspondence should be addressed

역작용은 없다. 선천적인 면역체계로는 항원의 침입을 차단하는 피부, 점액조직, 위산, 혈액에 존재하는 보체 (complement) 등이 있다. 세포로는 식균 작용을 담당하는 대식세포 (macrophage)와 다형핵 백혈구 (polymorphic clear leukocyte), 감염세포를 죽일 수 있는 세포 등이 있다 (Lehrer *et al.*, 1993). 획득면역은 후천면역이라고도 하며, 처음 침입한 항원에 대해 기억할 수 있고, 다시 침입할 때 특이적으로 반응하여 효과적으로 항원을 제거할 수 있는 특징이 있어 선천면역을 보강하는 역할을 한다. 획득면역은 체액성 면역 (humoral immunity)와 세포성 면역 (cell-mediated immunity)으로 나누어 볼 수 있다. 이러한 면역기능이 저하되는 경우 다양한 질환이 유발될 수 있다. 대표적인 면역 질환으로는 류마티스 관절염, 아토피성 피부염, 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS), 백혈구 감소증, 홍반성 낭창, 중증 근무력증, 위축성 위염, 자가 면역성 용혈성빈혈 등이 있다. 이에 면역기능을 강화시킬 수 있는 물질 또는 화합물을 개발하고자 하는 노력들이 이루어지고 있다 (Diamond *et al.*, 1991)

따라서 본 연구에서는 국내에서 서식하는 갈파래 (*Ulva lactuca*)의 여러 분획들을 가지고 면역 증강 능력을 조사하였다. 그 방법으로는 nitric oxide (NO) 측정과 Alkaline phosphatase (ALP) 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시료의 추출

본 연구에 사용된 갈파래 (*Ulva lactuca*)는 2005년 12월에 부산 소재의 민락동 수변공원에서 수집하여 실험에 사용하였다. 동결 보관된 갈파래 (*Ulva lactuca*)를 시료 : EtOH 를 1 : 20 (v/v)로 첨가하여 균질화 시키고 4°C에서 8시간 추출하여 cheesecloth로 걸러 내었다. 잔사에 동일 용매를 넣어 추출하는 과정을 세 번 반복하여 처음의 추출물과 혼합하였다. 균질화된 추출용액을 원심분리 (8,000 × g, 4°C, 30 min) 하여 상층액을 농축하였다. 얻어진 상층액에 ethyl-ether/H₂O (1 : 1) (v/v) 용매를 시료 : ethyl-ether/H₂O (1 : 1) 를 1 : 10 (v/v)로 첨가하여 추출하였다. 그 이후 분액여두를 이용하여 H₂O/organic layer로 분리하였다. 이 후 실험에 사용할 organic layer는 ethyl-ether로 명명하였다. 그 후 H₂O 층은 ethyl-acetate/H₂O (1 : 1) (v/v) 용매를 첨가하여 원심분리 (8,000 × g, 4°C, 30 min) 과정과 농축 과정을 거쳐 ethyl-acetate 층으로 명명하였다. 그 이후의 잔사에 butanol/H₂O (1 : 1)를 1 : 10 (v/v)로 첨가하여 추출한 다음, 분액여두를 재사용하여 H₂O/butanol층으로 분리하였다. 이 후 이 분액을 butanol fraction이라 명명하였으며, 분리된 H₂O는 water fraction이라 명명하여 본 실험에 사용하였다 (Fig. 1).

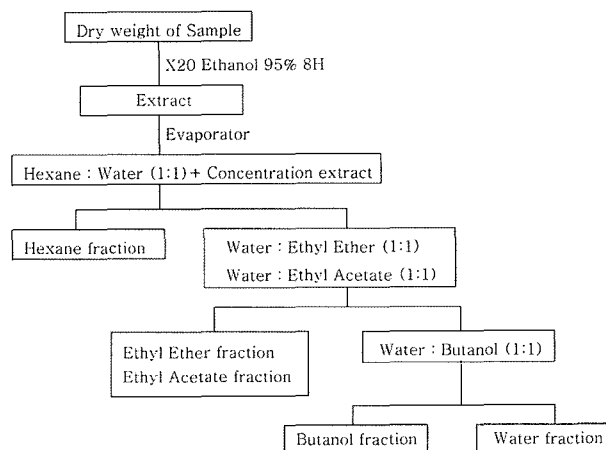


Fig. 1. Procedure of fractionated with different solvents from the marine algae, *Ulva lactuca*.

시약 및 재료

Nitric Oxide (NO) 측정용 kit로는 Griess Reagent System (Promega G2930)를 사용하였으며, 그 이외에 ALP enzyme 측정에는 p-nitrophenylphosphat (PNPP) 및 opsitive control로 사용한 LPS등은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

Nitric oxide (NO) 측정

활성화된 대식세포만이 분비하는 것으로 알려진 NO (nitric oxide)의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 mouse 단핵구 기원의 Raw 264.7 cell line을 이용하여 NO 생성량의 변화를 측정하였다 (Fallarero *et al.*, 2006). 그 방법은 Raw 264.7 cell line은 10% FBS와 1% 페니실린 스트렙토마이신이 함유된 RPMI 1640 배지를 이용하여 37°C, 5%, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포 배양용 plate에 배양한 RAW264.7 세포를 1% 트립신으로 처리하여 떼어낸 후, 무혈청 RPMI 1640으로 원심분리 (300 × g, 4°C, 5 min), 3회 반복하여 세척하였다. 이후 세포는 2 × 10⁵ cells/mL로 24 well plate에 분주하고, 여기에 농도별 시료를 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 그 후, 원심분리 (300 × g, 4°C, 30 min)에 상층액 100 μl를 취하여 ELISA titer plate에 옮긴 후, 100 μl Griess Reagent 넣고 10 분간 실온에서 방치한 다음, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control로는 lipopolysaccharide (LPS)를 사용하였다.

Alkaline phosphatase (ALP) 측정

Mouse (ICR, 수컷 약 5-6주)를 경구 탈구법에 의해 치사

시킨 후 무균적으로 비장을 적출하여 cell strainer (mesh size 100) 위에서 분쇄하였다 (Lee *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 1984). 분쇄한 세포는 1 mL의 media (R10)을 넣어 cell suspension을 만들었다. 그 이후, 원심분리 (300 × g, 4°C, 5 min)하여 상층액을 버린 후, RBC lysis buffer 용액 (2:1, v/v) 비율로 첨가하여 다시 원심분리 (300 × g, 4°C, 20 min) 하였다. 그 다음 상층액을 조심스럽게 취한 후, media 10 mL을 첨가 한 후, 원심분리 (300 × g, 4°C, 20 min)를 3회 세척한 다음 24 well에 세포 (1 × 10⁵) 세포를 가하고, 시료를 농도별로 가하여 최종 부피 2 mL로 적정하였다. 이후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하여 배양 2일째 원심분리하고 남아있는 세포 침전물에 p-nitrophenolphosphate를 포함하는 50 mM carbonate buffer (pH 9.0) 1 mL을 첨가하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰고 carbonate buffer (pH 9.0)의 조성은 다음과 같다: 0.01 M NaHCO₃; 50 mL, 0.1 M NaOH; 3 mL, H₂O; 47 mL. 그 이후, 0.3 N NaOH 용액 500 μL를 가하여 반응을 종결시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 이용한 B 임파구의 Alkaline phosphatase 활성은 계산식에 따라 산출하였다.

(계산식)

$$\text{ALP activity} = \frac{(\text{p-nitrophenol } \mu\text{mol} / 10^6 \text{ lymphocytes} / 60 \text{ min})}{1.15 \times \text{OD}_{405 \text{ nm}}}$$

결과 및 고찰

대식세포의 활성화

활성화된 대식세포만이 분비하는 것으로 알려진 nitric oxide (NO)의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 mouse 단핵구 기원의 Raw 264.7 세포주를 이용하여 갈파래 (*U. lactuca*)의 용매별 추출물의 NO 생성량의 변화를 관찰하였다. 특히, 소듐 나이트리트의 standard curve (검량선)으로부터 NO의 대사산물인 아질산염의 농도를 계산하였다. 표준시료로는 농도별 LPS를 이용하였으며, 검량선은 Fig. 2에 나타내었다. 검량선에 준하여 갈파래의 용매별 추출물의 결과는 Fig. 3에 나타내으며, 각 추출물은 10 μg/mL로 assay 농도를 결정하여 조사하였다. Fig. 3에서 나타내듯이 MeOH 추출물에서는 2.1 μM, EtOH 추출물에서는 2.05 μM, Hexane 추출물에서는 10.18 μM, ethyl-ether 추출물에서는 5.32 μM, ethyl-acetate 추출물에서는 5.76 μM, BuOH 추출물에서는 4.08 μM 그리고 H₂O 추출물에서는 26.87 μM의 활성을 나타내었다. 유기용매별 추출물에서는 Hexane과 H₂O 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 해조류 추출물 처리에 따른 활성화 정도를 질

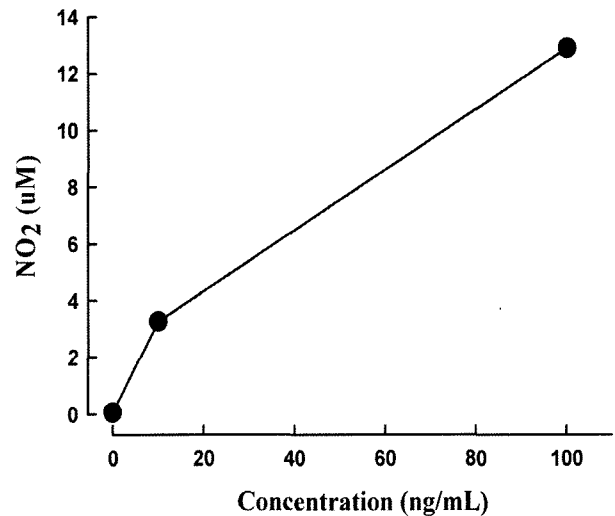


Fig. 2. The standard curve of nitric oxide activity measured by lipopolysaccharide.

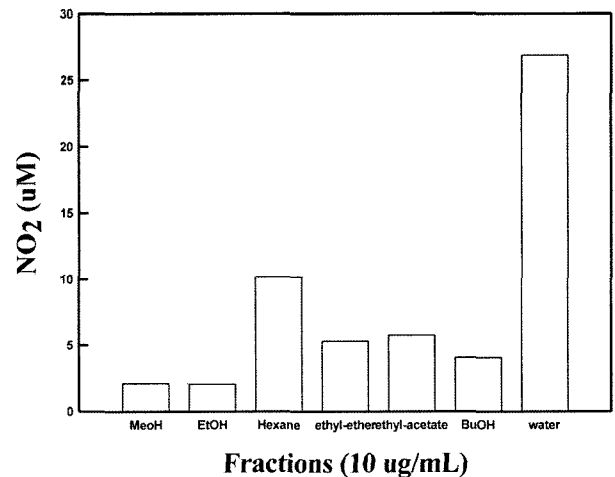


Fig. 3. Nitric oxide activity in the fractionated different solvents from marine algae, *Ulva lactuca*.

산 생성량을 나타낸 것으로, 면역작용에 있어서 사이토카인 (cytokinin)과 더불어 면역 매개체 (mediator)로서 중요한 역할을 수행하는 항바이러스, 항균, 항기생충 작용을 보이는 NO가 대량 생산됨은 갈파래 추출물의 생리활성 기능이 우수함을 나타내는 동시에 대식세포를 현저히 활성화시킴을 나타내는 지표로 볼 수 있을 것이다.

비장세포의 활성화

해조류 용매별 추출물의 비장세포의 증식정도를 Alkaline phosphatase (ALP)의 활성을 조사하여, 그 결과를 나타내었다. ALP의 활성측정법은 p-nitrophenyl-phosphate (PNPP)를 이용한 enzyme rate assay (IFCC)방법을 이용하였으며

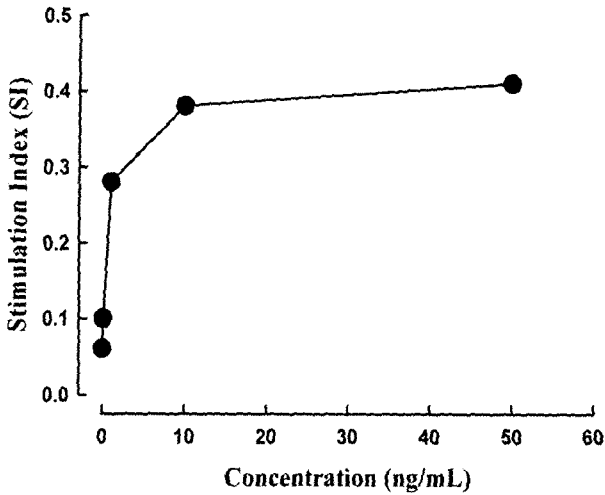


Fig. 4. The standard curve of alkaline phosphatase activity measurement by lipopolysaccharide.

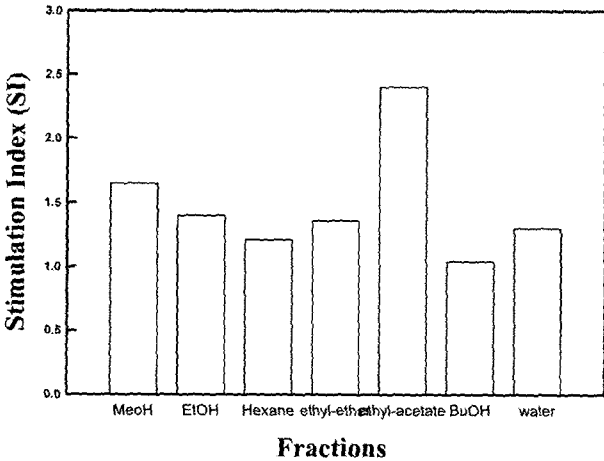
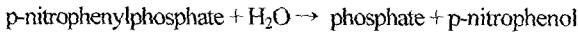


Fig. 5. Alkaline phosphatase activity in the fractionated different solvents from marine algae, *Ulva lactuca*.

반응식은 다음과 같다.

ALP (Alkaline phosphatase)



표준시료로는 LPS를 이용하였으며, 검량선은 Fig. 4에 나타내었다. 검량선에 준하여 갈파래의 용매별 추출물의 결과는 Fig. 5에 나타내으며, 각 추출물은 10 µg/mL로 assay 농도를 결정하여 조사하였다. Fig. 5에 나타내었으며 ALP의 활성을 살펴보면 먼저, MeOH 추출물에서는 1.65, EtOH 추출물에서는 1.40, Hexane 추출물에서는 1.21, ethyl-ether

추출물에서는 1.36, ethyl-acetate 추출물에서는 2.40, BuOH 추출물에서는 1.04였으며 그리고 H₂O 추출물에서는 1.30의 ALP 활성을 나타내었다. 결론적으로 갈파래 (*U. lactuca*)의 면역 증강 활성으로 ALP 활성을 조사한 결과 mouse의 spleen (비장) 세포의 증식을 볼 수 있었으며 향후, 면역 활성을 증가시키는 물질의 규명을 통하여 좀 더 심도 있는 연구가 필요한 것으로 생각되어진다.

참 고 문 헌

Ayako, Y., Koichi, Y. and Keiichi, O. (1982) Iodine distribution in blades of several laminarias grown in the same sea area. *Bull Japan Soc. Sci. Fish.* **58**, 1373-1379.

Bachat, G.C. and Golden, D.A. (1989) Antimicrobial occurring naturally foods. *Food Technol.* **43**, 134-142.

Cho, W.K., Lee, C.C. and Kim, H.K. (1984) A study of alkaline phosphatase activity on the preimplantation mouse embryos. *Kor. J. Zoology* **27**, 1-12.

Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Bresseur, M., Maloy, W.L. and Bevins, C.L. (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cystein rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3952-3956.

Fallarero, A., Peltoketo, A., Loikkanen, J., Tammela, P., Vidal, A. and Vuorela, P. (2006) Effects of the aqueous extracts of *Bryothamnion triquetrum* on chemical hypoxia and aglycemia-induced damage in GF1-& mouse hypothalamia immortalized cells. *Phytomedicine* **13**, 240-245.

Hancock, R.E.W. and Diamond, G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptide in innate host defenses. *Trends Microbiol.* **8**, 402-410.

Ito, K. and Hori, K. (1989) Seaweeds; chemical composition and potential food uses. *Food Rev. Int.* **5**, 101-144.

Lee, D.H., Ahn, T.S. and Cho, K.S. (1990) Heterophilic bacteria community and alkaline phosphatase releasing bacteria in lake soyang. *Kor. J. Microbiol.* **28**, 204-219.

Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K. and Ganz, T. (1993) Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 105-128.

Noda, H., Amano, H., Arshima, S., Hashimoto, S. and Nisizama, K. (1989) Studies on the antitumor activity of marine algae. *Bull Japan Soc. Sci. Fish.* **55**, 1259-1264.

Percival, E. and Wold, J.K. (1963) The acidic polysaccharide from the green seaweed *Ulva lactuca*. Part II-The site of ester sulfate. *J. Chem. Soc.* 5459-5468.

Ray, B. and Lahye, M. (1995) Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvae, chlorophyta), Extraction and chemical composition. *Carbohydr. Res.* **274**, 251-261.