

투스 유래 저분자 푸코이단의 면역활성 증진

하지혜¹ · 권민철¹ · 한재건¹ · 김 령¹ · 정향숙¹ · 최근표² · 박옥연² · 유상권³ · 이현용^{1,4,*}
¹강원대학교 BT특성화학부대학, ²강원도립대학 식품가공제과제빵과, ³강릉대학교 해양생명공학부,
⁴강원대학교 생명공학연구소

Enhancement of Immunomodulatory Activities of Low Molecular Weight Fucoidan Isolated from *Hizikia fusiforme*

Ji Hye Ha¹, Min Chul Kwon¹, Jae Gun Han¹, Ling Jin¹, Hyang Suk Jeong¹, Geun Pyo Choi²,
Uk Yeon Park², Sang Guan You³, and Hyeon Yong Lee^{1,4,*}

¹College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University
²Department of Food Processing and Bakery, Gangwon Provincial College
³Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University
⁴Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

Abstract The anticancer and immunomodulatory activities of low molecular weight (Mw 11 kDa) fucoidan isolated from *Hizikia fusiforme* (*H. fusiforme*) via the ultrasonification extraction process were assessed in this study. Low molecular weight fucoidan improved the growth of human B and T cells, up to approximately 40% as compared to the controls (untreated) and 30% for commercially available fucoidan (Mw 150 kDa). IL-6 and TNF- α were secreted from human B cells at levels of 7.8×10^{-4} pg/mL and 7.2×10^{-4} pg/mL, respectively, and these levels were higher than the levels measured in the controls and with other high molecular weight fucoidan. It was also determined that the cytokine from human B and T cells cultivated with added fucoidan enhanced the growth of human NK cells. The fucoidan isolated from *H. fusiforme* showed low cytotoxicity, approximately 19%, after the addition of 1.0 mg/mL, the highest tested concentration. The growth of human lung cancer cells (A549) and human breast cancer cells (MCF-7) were inhibited by 69.8% and 83.3%, respectively. These results demonstrated that the low molecular weight fucoidan isolated from *H. fusiforme* has potential as a new functional food component that evidences immunomodulatory activities and anticancer activity. One of the primary positive features of this fucoidan is that low molecular weight polysaccharides can be readily handled during processing.

Key words: *Hizikia fusiforme*, low molecular weight fucoidan, immune activities

서 론

해양성 조류는 예로부터 육상생물에 비하여 비타민, 미네랄 및 식이섬유의 함량이 높고 마그네슘, 철, 요오드, 아연 등의 필수 미네랄이 많이 존재하는 것으로 알려져 있다(1). 특히 최근에는 이러한 식물들이 항암 및 항종양, 항혈액응고 등의 생리활성 기능을 가지고 있는 것으로 밝혀지고 있다(2,3).

투스(*Hizikia fusiforme*)은 갈조류 모자반과에 속하며 형태는 원주상의 줄기로 체장 20-100 cm까지 성장하는 다년생 해조류이다. 투스는 독특한 맛과 함께 칼슘, 비타민 A 및 식이섬유소 함량이 풍부하여 당뇨병, 고혈압 예방, 대장암 및 변비 등에 효과가 좋으며 요오드 성분 함량이 많아 갑상선암 및 각기병 예방에 효과가 있다고 알려져 있다(4). 지금까지 투스와 관련된 연구로는, 추출 분

리한 푸코이단의 항혈액 응고 활성(5,6)과 쥐를 이용한 열수추출물의 종양 및 고형암 성장 억제, 항암활성 측정 연구(7,8) 및 지질대사에 미치는 영향(9), 에탄올 추출물과 분리 동정된 fucoxanthin의 항산화 활성(10,11) 등이 보고된 바 있다.

해양성 조류 중 갈조류에는 alginic acid, 푸코이단, laminarin 등과 같은 생리활성이 우수한 다당이 함유되어 있다. 이러한 다당류는 세포내 골지체에서 합성되어 세포조직에 존재하며 세포 보호를 위해 분비되는데(12), 갈조류에 다량 존재하는 푸코이단은 황산기를 포함하는 다당체로 세포 내 골지체에서 합성되어 갈조류의 세포 간 조직에 주로 존재한다. 종에 따라 엽체의 삼출액(exudate)에도 존재하는데 주로 L-fucose가 α -1,3 결합된 골격을 가지며 D-xylose, D-galactose 및 uronic acid 등을 함유한 함황 hetero형 산성 다당류로 황산기가 C4 위치에 결합되어 있으며, 점성이 낮고 용해성이 우수한 특징을 갖는다(13). 일반적으로 20 kDa 이상 130 kDa의 분자량을 가지는 푸코이단은 fucoidanase로 분해되는데 이 효소는 해양생물에만 존재하며 활성도 매우 낮은 것으로 알려져 있다(14,15). 이처럼 수용성 식이섬유로서의 이용 가능성이 매우 높음에도 불구하고 식이섬유로서의 특성에 대해서는 별로 보고된 바가 없다. 푸코이단은 갈조류 등에 존재하는 기타 식이섬유 다당인 alginic acid, carrageenan, laminaran 등과는 구조 및 생리적 작용이 다르고 오히려 동물의 혈액응고 저해능

*Corresponding author: Hyeon Yong Lee, College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon-do 200-701, Korea
Tel: 82-33-250-6455
Fax: 82-33-256-4819
E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr
Received June 13, 2008; revised September 2, 2008
accepted September 3, 2008

을 가지는 산성 다당인 heparin과 구조 및 작용이 매우 유사하여 항혈액응고 및 혈액정화활성을 나타낸다(16). 하지만 푸코이단의 항혈액응고 활성은 갈조류의 종류, 화학적 조성 및 분자량에 따라 매우 큰 차이를 보이는데, 황산기의 함량이 활성에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(17).

또한 푸코이단은 antiinflammatory, antitumor, antiviral 및 immunosuppressive 등의 탁월한 생리활성이 밝혀지고 있는데, 푸코이단의 항암활성, 항HIV, 항혈액응고 작용 등은 고분자 보다 저분자 상태인 푸코이단에 의해 높은 활성이 나타난다고 보고되고 있어 푸코이단의 산업적 응용성을 향상시키기 위해서는 푸코이단을 저분자화 하는 연구가 요구된다.

본 연구는 국내 연안에서 대량 생산되고 있는 갈조류의 활용 증진 연구의 일환으로 생리활성이 기대되는 톳으로부터 푸코이단을 추출 분리하고 면역활성을 탐색함으로써 톳의 기능성 소재로의 활용 가능성을 확인하고자 수행되었다. 해조류 유래 다당류의 저분자화를 통한 기능성 소재화 연구는 거의 전무한 실정으로 해조류 연구의 기반연구로서 작용할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

톳 유래 푸코이단의 분리

톳은 강원도 강릉시 연안에 서식하는 것을 채취한 후 수회 세척하여 염분을 최대한 제거한 뒤 음건하여 사용하였다.

푸코이단의 추출은 Tako등의 방법(18)을 변형하여 다음의 방법으로 분말시료를 얻어 사용하였다. 분쇄된 톳 100 g을 0.1 N HCl 1 L에 넣어 상온에서 24시간 동안 추출하고 초음파 추출기(ultrasonic extraction system, Asia Industry, Incheon, Korea)에서 60 kHz의 초음파를 1시간 동안 병행하여 푸코이단의 추출 및 저분자화를 촉진하였다. 이 때 온도는 냉각수를 사용하여 상온 이하로 유지하였다. 추출된 푸코이단은 Scotch bright pad로 여과하고 얻은 여액을 NaOH로 중화한 후 생긴 침전물은 동일 방법으로 재차 여과하였다. 또한 여과시 얻은 잔사물 20 g에 5배량의 0.2 N HCl을 가하여 70°C에서 2시간 동안 2차 추출하였으며 전체 여액을 60°C에서 회전증발기(rotary vacuum evaporator N-N series, Eyela, Tokyo, Japan)로 감압농축하여 1 L로 농축하였다. 농축액 3 배 용량의 95% 에탄올을 첨가한 후 원심분리기(VS-15000N, Vision Scientific Co., Bucheon, Korea)로 원심분리(8,000 rpm, 15 min)하여 회수하고 증류수에 용해시켰다. 용해시 중탕조건에서 산을 이용하여 pH 2로 조정된 후 침전물을 용해하고 여기에 CaCl₂를 최종농도가 2 M이 되도록 첨가한 다음, 침전물을 동일방법으로 원심분리하여 제거한 확분의 상등액에 다시 3배 용량의 95% 에탄올을 첨가하는 방법으로 재침전시켰다. 재침전물을 원심분리로 회수한 다음, 증류수에 용해시켜 evaporator로 잔류 에탄올을 제거한 후에 동결건조기(Cleanvac 8B, Biotron, Bucheon, Korea)를 이용하여 -70°C, 0.1 ton에서 진공 동결건조하였다. 동결건조한 시료를 3.26%(w/v)의 비율로 증류수(pH 2)에 녹인 후 4°C 투석막에서 48시간 동안 투석한 것을 동결 건조하여 푸코이단을 회수하였다.

저분자 푸코이단 시료의 제조

분리된 푸코이단의 분자량을 측정된 후 10³-10⁵ Da의 분자량 부근을 용출할 수 있는 sephadex G-75를 이용하여 분획별로 구분하고 spectrophotometer(HP 8453, HP Inc., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 OD값이 증가하는 시점을 기준으로 주피크를 모았으며, 다시 MALDI-TOF MS(Voyager-DETM PRP, PerSeptive

Biosystems Inc., Framingham, MA, USA)를 이용해 분자량을 확인하여 분리하고 분자량 14,000 Da 이하의 것만 모아 저분자 푸코이단 시료로 사용하였다. 톳으로부터 얻어진 저분자 푸코이단 시료의 활성 비교를 위해 시판되고 있는 푸코이단 표준물질(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 구입하여 각 실험의 비교 시료로 사용하였다.

세포 배양

실험에 사용된 면역세포주는 인간 면역 T세포(Jurkat, American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VA, USA)와 B세포(Raji, ATCC)를 실험에 사용하였고, NK세포 활성 측정에는 NK-92MI 세포(NK-92MI, ATCC)를 사용하였다. 암세포주는 인간 폐암세포인 A549(lung carcinoma, human, ATCC)와 인간 유방암세포인 MCF-7(breast adenocarcinoma, human, ATCC)을 사용하였으며, 시료 자체의 세포독성을 확인하기 위한 정상세포주는 인간 신장세포인 HEK293(human embryonic kidney, ATCC)을 사용하였다.

세포배양에 필요한 시약으로 배지는 RPMI 1640(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), DMEM-F12(Invitrogen Corp.), DMEM(Invitrogen Corp.)을 각각 사용하였고, 혈청은 fetal bovine serum(Hyclone, Logan, UT, USA)을 이용하였다. 그 외에 세포 배양에 필요한 시약으로 hepes 버퍼(Sigma Chemical Co), gentamycin sulfate(Sigma), trysin-EDTA(Sigma Chemical Co)를 사용하였다.

세포 독성 및 항암활성 측정

세포독성은 sulforhodamine B(SRB) assay(19) 방법을 통해 인간 신장 세포인 HEK293을 이용하여 측정하였고, 항암활성은 인간 폐암 세포인 A549와 인간 유방암 세포인 MCF-7을 이용하여 마찬가지로 SRB 방법으로 측정하였다. 실험 대상 세포의 농도를 4.5×10⁴ cells/mL 으로 96 well plate의 각 well에 100 μL씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)한 후, 각각의 시료 최종 농도를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL로 제조하고 100 μL씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 후에 상등액을 제거하고 차가운 10%(w/v) trichloroacetic acid(TCA) 100 μL를 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 4-5회 세척하여 TCA를 제거하고 실온에서 plate를 건조한 뒤 각 well에 1%(v/v) 아세트산에 녹인 0.4%(w/v) SRB 용액을 100 μL씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% 아세트산 용액으로 4-5회 정도 세척하고, 실온에서 건조시킨 후에 10 mM tris buffer 100 μL를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader(Thermo max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

Selectivity는 SRB 방법을 이용하여 각각의 시료 농도에서 정상 세포(HEK 293)에 대한 세포독성 및 각 암세포주에 대한 생육 억제 활성을 측정된 후 각 농도에서의 세포 독성에 대한 암세포 생육 억제 활성의 비로 계산하였다.

면역세포 생육 증진 효과 및 cytokine 분비량 측정

면역 기능 증강 효과는 면역세포인 T세포와 B세포를 이용하여 검증하였다. 세포의 생육은 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂, 37°C에서 배양하였으며, 면역 기능 증강 효과는 24 well plate에 세포를 1.0×10⁴ cells/mL의 농도로 조절한 후 시료를 투여하여 8일 동안 배양하면서 매일 hemacytometer를 이용하여 각 well의 세포 수를 측정하여 생육 증강도를 계산함으로써 확인하였다.

Cytokine은 분비되는 IL-6와 TNF- α 의 양을 cytokine 정량 kit (United Chemi-Con, Rosemont, IL, USA)를 사용하여 정량하였다. 세포의 농도를 1.2×10^4 cells/mL의 농도로 조절한 24 well plate 에 900 μ L씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 시료의 최종농도를 0.5 mg/mL로 100 μ L씩 첨가하여 다시 배양 (37°C, 5% CO₂)하였다. 배양매지를 원심분리하여 상층액을 취한 다음 450 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 얻어진 OD값을 표준물질을 이용해 작성한 표준곡선과 비교하여 cytokine의 양을 측정하였다.

NK 세포의 면역증진 효과

NK-92MI 세포를 α -MEM배지에 2 mM L-glutamine, 0.2 mM myoinositol, 20 mM folic acid, 2-mercaptoethanol, 12.5% FBS와 12.5% horse serum(Myelocult, StemCell Technologies Inc., Vancouver, British Columbia, Canada)에 2×10^7 cells/mL의 농도로 희석시켜 이용하였다.

인간 T세포와 B세포를 T-25 flask에 배양하면서 시료를 투여한 후 증식정도를 관찰하면서 3-4번의 계대 배양 후 세포를 원심분리하여 상층액을 취하였다. NK-92MI 세포를 24 well plate에 4.5×10^4 cell/mL로 900 μ L씩 분주하고 24시간 후 T세포와 B세포의 상층액을 각 plate에 100 μ L씩 투여하여 배양 48시간 후 6일 동안 NK-92MI 세포의 활성도를 cell counter(nucleocounter, Chemometec, Denmark)를 이용하여 생세포수를 측정하여 NK-92MI 세포의 활성도를 측정하였다.

통계

SPSS program(ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 T-test로 검정하였으며 모든 data는 평균 \pm 표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

푸코이단 분자량 측정

MALDI-TOF MS를 이용하여 분자량을 검정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 전체적으로 15,628 Da 이하에서 많은 피크가 나타난 것을 확인할 수 있다. 피크의 값은 mass를 charge값으로 나눈 값이므로 15,000 Da 이상의 피크도 같은 물질로 판단할 수 있으나 실험에 사용된 푸코이단은 14 kDa를 기준으로 푸코이단과 저분자 푸코이단으로 분리하고 나누어 사용하였다.

세포 독성 측정

실험에 사용된 푸코이단 시료들을 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL의 농도로 조절하여 정상세포에 대한 세포독성을 검토하였다.

Fig. 2는 인간 신장 세포인 HEK293에 대한 세포독성을 나타낸 것으로 시료 간 유의적인 차이를 보이지는 않았으나 1.0 mg/mL에서 시판 푸코이단 표준물질이 21.45%로 가장 높은 수치를 나타내었고, 뚝 유래 저분자 푸코이단이 19%로 가장 낮은 수치를 나타내었다.

이처럼 저분자 푸코이단 시료들이 최고농도인 1.0 mg/mL에서도 20% 내외의 세포독성을 나타냄에 따라 뚝 유래 푸코이단이 세포 수준에서 유의할만한 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있다.

면역세포 생육 증진 효과

저분자 푸코이단의 면역활성 탐색을 위해 인간 면역체계에서 중요한 역할을 하는 면역세포인 B세포와 T세포의 생육 촉진 효과를 측정함으로써 면역증진 효과를 확인하였다. B세포 생육도

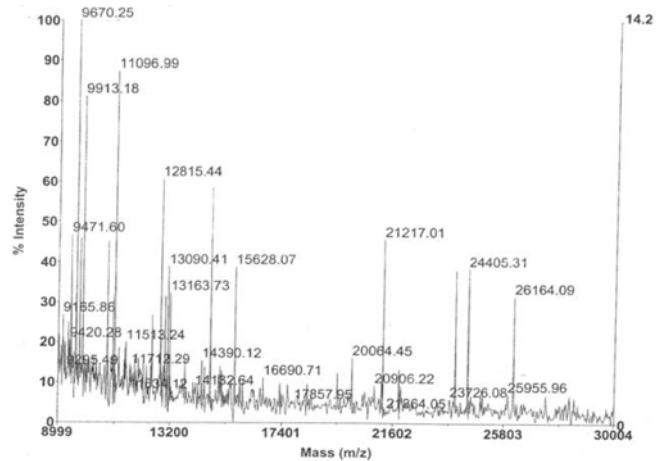


Fig. 1. MALDI-TOF MS analysis of the fucoidan isolated from *H. fusiforme*.

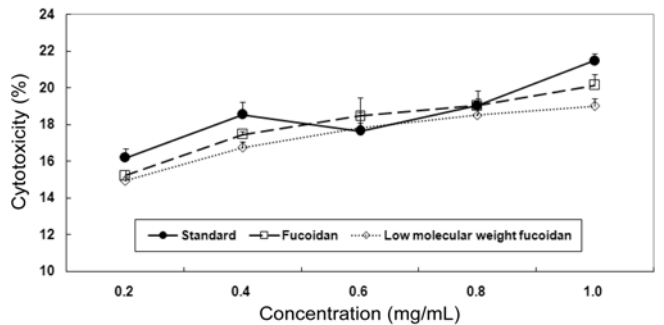


Fig. 2. Cytotoxicity of fucoidans on human normal cell line, HEK293. Mean values \pm standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

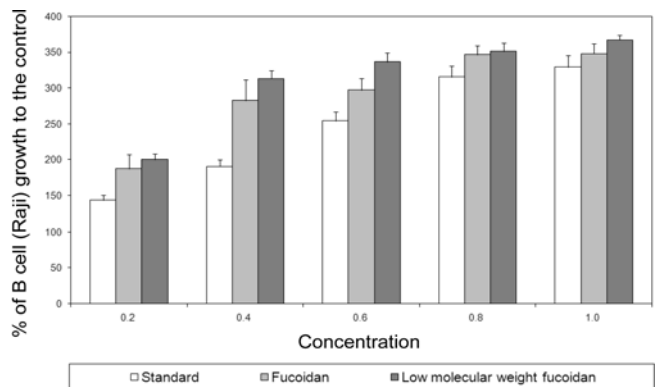


Fig. 3. Growth of human immune B cell by adding various fucoidan samples. Mean values \pm standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

의 경우 Fig. 3에 나타낸 결과를 통해 푸코이단 시료 투여를 통해 생육의 증가를 보였으며, 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그 중 뚝 유래 저분자 푸코이단이 1.0 mg/mL의 농도에서 무첨가 대조구와 비교해 367%의 생육도를 나타내며 가장 높은 활성을 보였다. Fig. 4에 나타낸 T세포의 생육 결과에서도 B세포 생육도와 유사한 결과를 보였는데 0.6 mg/mL의 농도에서 뚝 유래 푸코이단이 대조구 대비 385%의 생육을 나타내며 가장 높은 수치를 나타내었으며, 나머지 농도에서는 대체적으로 저

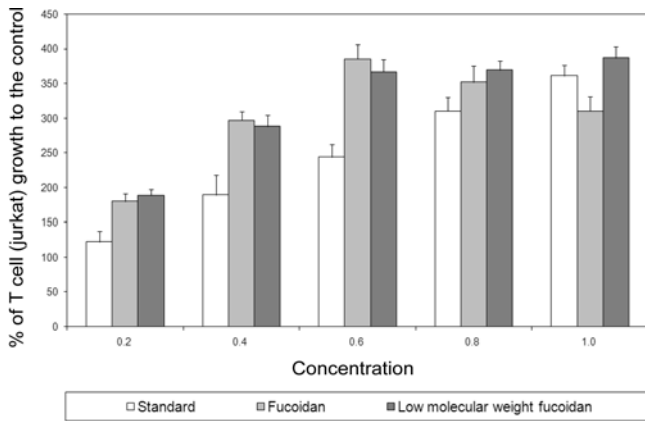


Fig. 4. Growth of human immune T cell by adding the various fucoidan samples. Mean values±standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

분자 푸코이단의 활성이 높게 나타났다. 반면 시판 푸코이단 표준물질이 0.8 mg/mL 이상의 농도에서 활성이 낮게 나타났는데 세포독성을 감안하면 저분자화하지 않은 푸코이단이 고농도에서 활성의 저감을 나타낸 것으로 사료된다.

이상의 결과를 통해 나타난 푸코이단의 면역활성 증진 효과는 면역 활성을 나타내는 것으로 알려진 사철쭉의 추출물을 통한 식물 추출물의 면역 활성 연구(20)에서 보고된 20-50% 생육 증진을 상회하는 결과로 낮은 농도에서도 유의적인 수치를 나타내는 것으로 보아 고농도에서는 가시적인 면역증강 효과를 나타낼 것으로 사료되며, 이에 따른 해양자원을 이용한 기능성 소재 개발 가능성이 높은 것으로 사료된다.

Cytokine 분비량 측정

Table 1은 인간면역 세포의 생육 증강도를 뒷받침할 수 있는 자료로서 면역 세포들이 분비하는 cytokine(IL-6와 TNF- α)의 분비량을 인간 면역체계에서 중요한 역할을 담당하는 B, T 세포에서 측정된 결과를 나타낸 것이다. 각 시료에 따른 cytokine 분비량은 면역세포 생육도와 유의적인 값을 나타내었다. 각 시료에 대한 B세포의 IL-6와 TNF- α 의 분비량을 살펴보면, 톳 유래 저분자 푸코이단 첨가군이 6일째 각각 7.8×10^{-4} pg/cell과 7.2×10^{-4} pg/cell을 나타내어 가장 많은 분비량을 나타내었고, 시판 푸코이단 표준물질은 각각 7.6×10^{-4} pg/cell과 7.1×10^{-4} pg/cell을 나타낸 것을 확인할 수 있다. 마찬가지로 T세포의 cytokine 분비에서도 저분자 푸코이단과 푸코이단 표준물질의 cytokine 분비량이 무첨가 대조구에 비해 높게 나타났으며 근사한 수치로 저분자 푸코이단이 많은 분비량을 나타내었다.

이상의 결과를 통해 톳 유래 푸코이단 시료 첨가군 모두가 cytokine 분비의 증가를 나타내었으며, 이는 해당화의 뿌리 추출물을 통한 연구(21) 등에서 보고된 면역세포 cytokine 분비와 유사한 수치로 톳 유래 저분자 푸코이단 및 푸코이단이 면역세포의 생육 증진 및 cytokine 분비량 증가를 통한 면역 활성 증진에 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

NK 세포의 면역증진 효과

NK 세포의 활성 측정은 시료를 첨가한 면역 B세포의 배양액을 NK 세포에 첨가하여 나타나는 생육도의 변화를 비교하여 활성을 측정하였다. Fig. 5는 B세포에 각 시료를 첨가하여 배양한 후 그 배양액을 NK 세포에 첨가하였을 때 나타나는 NK 세포의 활성도를 시료별로 나타낸 것이다. 6일 동안 생육도를 관찰하였는데 6일째에 톳 유래 저분자 푸코이단이 14.5×10^4 cells/mL의 생

Table 1. Secretion of IL-6, TNF- α from immune B, and T cells in adding the several kinds of fucoidan

Sample	Time (day)	Specific secretion (10^{-4} pg/mL)			
		B cells		T cells	
		IL-6	TNF- α	IL-6	TNF- α
Standard*	1	1.3±0.20	1.1±0.24	2.6±0.56	3.1±0.24
	2	1.9±0.31	2.6±0.23	1.9±0.66	4.8±0.48
	3	2.6±0.22	3.7±0.42	3.1±0.54	5.4±0.64
	4	4.2±0.26	4.4±0.33	5.9±0.94	5.2±0.74
	5	6.4±0.69	5.3±0.42	8.0±1.34	6.1±0.66
	6	7.9±0.74	6.5±0.44	9.1±1.66	7.3±0.98
Fucoidan	1	2.3±0.33	2.0±0.22	1.8±0.44	2.2±0.94
	2	3.1±0.46	3.9±0.28	2.7±0.78	4.6±1.22
	3	3.9±0.54	4.8±0.56	4.0±0.68	6.9±1.72
	4	4.7±0.33	5.9±0.44	5.8±0.96	7.3±1.60
	5	6.9±0.68	6.7±0.46	7.9±1.12	8.4±1.66
	6	7.6±1.40	7.1±0.84	9.1±1.68	8.9±1.98
Low molecular weight fucoidan	1	1.9±0.12	2.2±0.11	2.0±0.32	1.9±0.23
	2	3.4±0.22	4.5±0.14	2.6±0.43	3.8±0.45
	3	4.7±0.43	5.3±0.28	4.5±0.55	5.8±0.66
	4	5.9±0.55	6.2±0.35	6.7±0.84	7.2±0.99
	5	7.6±0.66	6.7±0.46	8.1±1.00	8.4±1.05
	6	7.8±0.84	7.2±0.82	8.8±1.11	9.0±1.44

*Commercially available fucoidan from *Fucus vesiculosus* (Mw: 130,000).

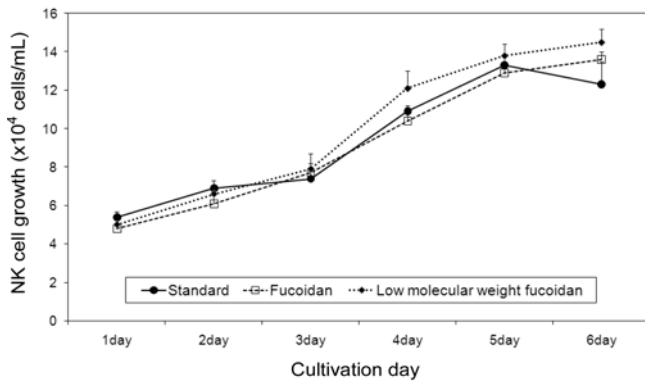


Fig. 5. Effects on the growth of the NK cells by the addition of human B cell secretion after treating fucoidans. Mean values± standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

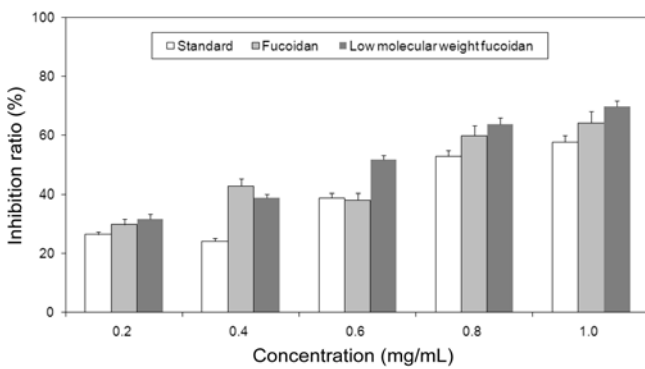


Fig. 6. Inhibition ratio of A549 growth by adding several kinds of fucoidan samples. Mean values±standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

육을 나타내며 가장 높은 생육 증진을 나타내었으며, 측정기간 동안 대체로 높은 생육도를 보였다. 각각의 시료가 유의적인 차이를 보이지는 않았으나 시료첨가를 통한 생육 증진은 시간 경과에 따라 뚜렷해지는 양상을 보였으며, 대체적으로 cytokine 분비량 측정을 통한 증가율과 유사한 생육도를 나타내었다.

이상의 결과로부터 면역세포의 분비물 첨가를 통해 NK 세포의 생육이 증진되는 것을 확인하였으며, 그 중에서도 특히 저분자 푸코이단을 첨가한 배양액의 효과가 가장 높았다. 따라서 푸코이단이 세포 수준의 면역 증진 활성을 가지며, 이를 통한 해양 자원의 기능성 소재 개발의 가능성이 있음을 확인하였다.

항암활성 측정

항암활성은 실험에 사용된 푸코이단 시료들을 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL의 농도로 조절하여 암세포에 대한 성장저해 효과를 검토하였다.

Fig. 6은 인간폐암세포인 A549에 대한 생육억제 활성을 나타낸 것으로 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 저분자 푸코이단이 1.0 mg/mL의 농도에서 69.8%로 가장 높은 항암효과를 나타내었으며 시판 푸코이단 표준물질도 57.7%까지 활성을 나타내었다.

Fig. 7은 유방암 세포인 MCF-7에 대한 생육억제 활성을 나타낸 것이다. A549의 측정과 마찬가지로 억제활성이 모든 시료에서 농도 의존적으로 증가하였으며, 저분자 푸코이단이 1.0 mg/mL의 농도에서 83.3%를 생육억제를 나타내며 가장 높은 항암활성

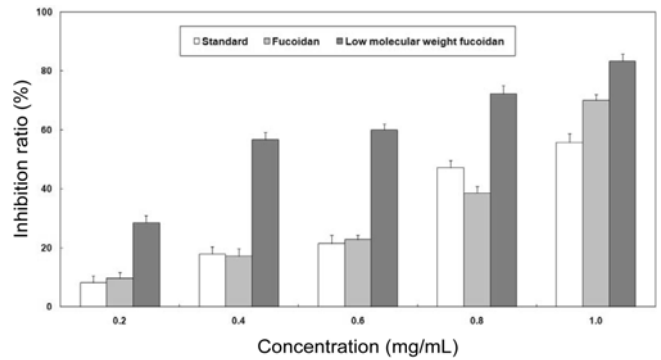


Fig. 7. Inhibition ratio of MCF-7 growth by adding several kinds of fucoidan samples. Mean values±standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

을 나타내었다. 시판 푸코이단 표준물질은 A549에서와 마찬가지로 55.7%의 활성을 보였다.

이는 항암활성을 나타내는 것으로 알려진 홍경천의 활성 연구 결과(22)와 근사한 실험 수치로 이를 통해 푸코이단 시료가 항암은 물론 면역 등 생리활성 소재로서 활용 가능성이 있음을 확인할 수 있는 기초자료로서 가치가 있다고 사료된다. 선택적 사멸도는 보통 1.5 이상일 때 암세포에 대한 선택성이 있어 암세포의 생육을 억제하는 것으로 판단할 수 있는데, 본 연구의 암세포에 대한 생육억제 활성 및 선택적 사멸도의 측정 결과를 통해 푸코이단 시료가 선택적인 항암 활성을 가짐을 확인할 수 있었다. 특히 푸코이단 시료는 저분자화를 통해 활성의 증진은 물론 독성의 저감 등 유용 활성의 증진을 나타남에 따라 이를 통해 푸코이단의 기능성 소재로서 가치를 증진할 수 있을 것으로 사료된다.

또한 본 실험을 통해 얻어진 결과에서 해조류 유래 푸코이단을 기능성 소재로 활용하기 위해서는 면역기능의 증진과 항암활성의 향상을 가져오는 활성성분을 탐색은 물론 고농도에서 활성이 저하되는 기작을 파악하고 이 물질의 단리 연구를 통해 유용활성에 대한 연구를 보다 다각적으로 수행해야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 툃에서 푸코이단의 추출시 초음파 공정을 이용하여 처리함으로써 유래 푸코이단의 저분자화를 통한 면역활성 및 항암활성의 증진 효과를 알아보고자 툃 유래 푸코이단 및 저분자 푸코이단(분자량 14,000 이하)을 이용하여 수행하고, 푸코이단 표준물질과 비교하였다. 시료 첨가를 통한 면역 B세포와 T세포의 생육도에서 툃 유래 저분자 푸코이단이 1.0 mg/mL의 농도에서 무첨가 대조구와 비교해 각각 367%와 387%의 생육도를 나타내며 가장 높은 활성을 나타내었다. 면역세포의 cytokine 분비량 측정에서도 생육도 측정에서와 유사한 결과를 나타내며 저분자 푸코이단이 가장 많은 cytokine 분비량을 나타내었으며, 이는 NK 세포의 생육에도 영향을 끼치는 것으로 사료되는 바, NK 세포 생육 증진에서도 가장 높은 수치를 나타냈다. 인간 정상세포를 이용한 세포독성 측정에서는 시료 간 큰 차이를 보이지는 않았으나 1.0 mg/mL에서 푸코이단 표준물질이 21.45%로 가장 높은 수치를 나타내었고, 저분자 툃 유래 푸코이단이 19%로 가장 낮은 수치를 나타내었다. 인간폐암세포인 A549와 유방암세포인 MCF-7에 대한 생육억제 활성 측정에서도 저분자 푸코이단이 1.0 mg/mL의 농도에서 각각 69.8%와 83.3%를 나타내었으며, 푸코이단 표준물질도 55% 이상의 활성을 나타내었다. 이상의 결과를

통해 푸코이단 시료는 저분자화를 통해 면역 및 항암활성의 증진이 가능함을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신사업(RTI05-01-02)의 지원으로 얻어진 결과로 이에 감사드립니다.

문헌

- Lee JH, Sun VJ. The content of minerals in algae. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 9: 51-58 (1980)
- Cho KJ, YS Lee, Ryu BI. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. J. Korean Fish. Soc. 23: 315-325 (1990)
- Maruyama H, Tamauchi H, Hashimoto M, Nakano T. Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. In Vivo 17: 245-249 (2003)
- Indergaard M, Minssas J. Animal and human nutrition. pp. 21-64. In: Seaweed resources in europe: uses and potential. Guiry MD, Blunden G (eds). John Wiley & Sons Inc., Chichester, UK (1991)
- Nishino T, Nagumo T. Sugar constituents and blood-anti coagulant activities of fucose-containing sulfated polysaccharides in nine brown seaweed species. Nippon Nog. Kag. Kaish. 61: 361-363 (1987)
- Nishio T, Nagumo T. The sulfate-content dependence of the anti-coagulant activity of sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. Carbohydr. Res. 314: 193-197 (1991)
- Nakazawa Y, Kuroda H, Abe F, Nishino T, Otsuki M, Umezaki I. Antitumor effect of water extracts from marine algae (I). Chemotherapy 22: 1435-1440 (1974)
- Ito H, Sugiura M. Antitumor polysaccharide fraction from *Sargassum thumbergii*. Chem. Pharm. Bull. 24: 114-118 (1976)
- Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Kim CM, Koo JG. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) extract and fucoidan components on lipid metabolism of stressed mouse. J. Korean Fish. Soc. 33: 124-128 (2000)
- Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer. J. Natl. Cancer I. 91: 317-331 (1999)
- Yan X, Yoshihiro C, Masahiro S, Tadahiro N. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hizikia fusiformis*, a common edible seaweed. Biosci. Biotech. Bioch. 63: 605-607 (1999)
- Schaeffer DJ, Krylov VS. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. Ecotox. Environ. Safe. 45: 208-227 (2000)
- Koo JG. Structure characterization of purified fucoidan from *Laminaria religiosa*, sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiforme*, and *Sargassum fulvellum* in Korea. J. Korean Fish. Soc. 30: 128-131 (1997)
- Kusaikin MI, Chizhov AO, Alekseeva SA, Bakunina II, Nedashkovskaya OI, Sova VV, Zvyagintseva TN, Academician G Elyakov B. A comparative study of the specificity of fucoidanases of marine microorganism and invertebrates. Dokl. Biochem. Biophys. 396: 187-189 (2004)
- Torsdottir I, Alpsten M, Holm G, Sandberg AS, Thli JA. Small dose of soluble alginate-fiber affects postprandial glycemia and gastric emptying in human with diabetes J. Nutr. 121: 795-799 (1991)
- Penagini R, Velio P, Vigorelli R, Bozzani A, Vastagnone D, Ranza T, Bianchi PA. The effect of dietary guar on serum cholesterol, intestinal transit, and fecal out in man. Am. J. Gastroenterol. 81: 123-125 (1986)
- Church FC, meade JB, Treanor RE, Whinna HC. Anti-thrombin activity of fucoidan. J. Biol. Chem. 264: 3618-3623 (1989)
- Tako M, Uehara M, Kawashima Y, Chinen I, Hongo F. Isolation and identification of fucoidan from Okinawamozuku (*Cladosiphon Okamuraus* Tokida). J. Appl. Glycosci. 43: 143-148 (1996)
- Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. Food Chem. Toxicol. 21: 512-513 (1983)
- Lee MK, Choi GP, Ryu LH, Lee GY, Yu CY, Lee HY. Enhancement immune activity and cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thrunb. extracts against human cell lines. Korean J. Med. Crop Sci. 12: 34-42 (2004)
- Lee MK., Lee SH, Choi GP, Yu CY, Lee JH, Lee HY. Screening of immune enhancement activities of the extracts from *Rosa rugosae* Radix. Korean J. Med. Crop Sci. 11: 13-18 (2003)
- Kim CH, Kwon MC, Qadir SA, Hwang B, Nam JH, Lee HY. Toxicity reduction and improvement of anticancer activities from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor by ultra high pressure extracts process. Korean J. Med. Crop Sci. 15: 411-416 (2007)