

새꼬막(*Scapharca subcrenata*) 추출물의 혈관신생 억제활성과 특성

임치원* · 박희연 · 심길보 · 윤나영 · 김연계¹

국립수산과학원 식품안전과, ¹국립수산과학원 남서해수산연구소

Anti-angiogenesis Activity and Characterization of Extract of Ark Shell *Scapharca subcrenata*

Chi-Won Lim*, Hee-Yeon Park, Kil-Bo Shim, Na-Young Yoon and Yeon-Kye Kim¹

Food & Safety Division, National Fisheries Research & Development Institute, Busan 619-705, Korea

¹Southwest Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute, Yeosu 556-823, Korea

Anti-angiogenesis therapy is one of the most promising strategies for the treatment of cancer. We investigated the anti-angiogenesis activity of an extract from the ark shell *Scapharca subcrenata* and attempted to purify the active compounds. The crude extract of the ark shell inhibited the proliferation of human vein endothelial cells (HUVEC-1) and tube formation by human dermal *microvascular* endothelial cells (HMEC-1). The methanol extract of the viscera of the ark shell showed activity. The ark shell extract acts as an angiogenesis inhibitor and could be developed further as a health substance, functional food, and anticancer agent.

Key words: Ark shell, Anti-angiogenesis, Extract, HUVEC, HMEC

서론

새꼬막(*Scapharca subcrenata*)은 우리나라 남해와 서해 연안해역에 분포하며 진흙 또는 모래진흙 갯벌 하부 조하대에서부터 수심 10 m 전후의 조하대까지에서 흔히 발견되는 식용패류로, 표면에 30-34개의 방사상의 좁은 방사륜이 있으며, 저질로부터 약 10 cm 전후로 얇게 잠입하여 서식하며, 각장은 5 cm 전후이고, 외부의 색상은 서식 기질의 종류에 따라 짙은 흑갈색에서부터 황갈색에 이르기까지 다양하며 패각의 가장자리 쪽으로 가면서 각피가 변형된 털이 흩어져 나 있다. 식물성플랑크톤이나 유기세편을 섭취하여 살아가며(Min, 2002; Yoo, 1976), 주로 양식이 주종을 이루고 2009년도에는 꼬막을 포함해서 3,865 M/T이나 생산되었다.

혈관신생(angiogenesis)은 모세혈관 또는 세정맥의 혈관내피세포가 여러 가지 조절인자의 자극을 받아 분화함으로써 새로운 모세혈관을 만드는 현상으로서 세포증식에 필요한 영양분과 산소를 공급하는 일종의 파이프와 같은 기능을 한다. 이들은 혈관내피세포 증식 촉진인자 및 억제인자에 의해 그 증식이 균형을 유지하며, 정상적인 상황에서는 배아, 상처치료, 여성의 생리조절 등에 관여한다(Folkman and Cotran, 1976).

그러나 암세포의 이상증식이나 당뇨 등에 의해 체내대사 균형이 파괴되면 혈관형성이 촉진되어 암세포의 증식을 돕고 당뇨 황달에 의한 시력상실 등과 같은 특수기관의 마비를 일으키는 것으로 알려져 있다(Timar et al., 2001).

혈관신생 초기 단계에 기존의 혈관이 확장된 후에 혈관의 투과성이 증가하며, 세포외 기질이 분해된다. 그 후에 혈관내피세포가 이동하여 증식하면서 새로운 혈관을 구성하게 된다. 이러한 혈관신생 과정이 진행되는데 중요한 역할을 하는 두 가지 인자 중 한 가지는 세포외 기질을 분해하는 MMP (matrix metalloprotease)라는 단백질 분해효소이며, 다른 한 가지는 혈관내피세포의 증식을 유도하고 새로운 혈관생성을 유도하는 VEGF (vascular endothelial growth factor)이다(Mignatti and Rifkin, 1996; Veikkola and Alitalo, 1999).

혈관신생 억제활성을 이용하여 최근 천연물에서 항암제나 안과질환 치료제의 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있는데 육상식물 추출물에서는 플라보노이드, 카테킨, 폴리페놀 등이 억제활성이 있는 것으로 밝혀지고 있으며(Jeong, 2011), 해양생물에서도 또한 해산어류, 해조류, 해면 및 패류 등에서 terpene 및 peptide 화합물 등이 다양하게 분리되어 혈관신생 억제활성이 속속 밝혀지고 있다(Cho and Kim, 2002; Haefner,

Article history;

Received 8 March 2012; Revised 19 June 2012; Accepted 3 August 2012

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2670 Fax: +82. 51. 720. 2619

E-mail address: cwlim@nfrdi.go.kr

Kor J Fish Aquat Sci 45(4) 303-306, August 2012

http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0303

pISSN:0374-8111

© The Korean Society of Fishereis and Aquatic Science. All rights reserved

2003).

본 연구에서 해양생물에서 혈관신생 억제활성물질의 탐색 및 개발을 위해 대중적으로 널리 식용하는 패류를 대상으로 활성을 탐색한 결과, 꼬막에서는 혈관신생 억제활성이 나타나지 않았지만 새꼬막 추출물에서 혈관신생 억제활성이 확인되었기에 효과적인 추출을 위한 검토 및 열처리시험을 하였고, 또한 활성물질의 분리를 위한 시험도 실시하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 새꼬막(*Scapharca subcrenata*)은 2008년 2월 부산 자갈치 시장에서 전남 벌교산 새꼬막을 구입하여 껍질을 제거한 뒤 전체를 동결건조하여 1차적으로 활성을 탐색하였으며, 활성물질의 생체내 존재부위를 확인하기 위하여 새꼬막 내장과 육을 분리하여 추출하였고, 최종적으로 실험에 사용한 시료는 동결건조한 다음 마쇄하였다.

새꼬막 추출물의 제조

동결건조된 시료는 98% methanol (MeOH) 10배량으로 24시간 동안 교반하면서 2번 추출하였다. 추출액은 vacuum rotary evaporator를 이용하여 40°C에서 감압증발시킨 다음 -80°C의 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

HUVECs proliferation

Proliferation assay는 XTT assay를 이용하여 실시하였다. 사람의 제대로부터 분리한 혈관내피세포(HUVECs, human umbilical vein endothelial cells)를 24-well culture plate에서 2×10^4 cell 농도에서 10% FBS (fetal bovine serum, Wel-GENE Inc., Korea)를 포함하는 MCDB (Life Technologies, NY) 배지에서 배양한 뒤 새꼬막 추출물과 세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 그 다음 XTT 용액을 용해시키기 위해 well에 demethyl sulfoxide 0.3 mL을 첨가하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다(Mosmann, 1983).

HMEC-1 tube formation assay

새꼬막추출물에 대한 tube formation assay는 HMEC-1 (human dermal microvascular endothelial cells-1) cell을 이용하여 실시하였다. 우선 Growth factor reduced matrigel을 24-well plate에 200 µL씩 분주하여 CO₂ incubator (37°C)에서 1시간 동안 중합시킨 다음, 각 well당 시료 1 mg/10 µL, 배양시킨 HMEC-1 $4-6 \times 10^4$ cell을 배지에 넣어 전체 부피 1 mL이 되도록 한 후, CO₂ incubator (37°C)에서 18-24시간 동안 배양하여 현미경으로 혈관신생 억제유무를 확인하였다(Yi et al., 2008).

활성물질의 특성 및 열안정성 측정

새꼬막 추출물의 존재부위와 추출용매에 따른 혈관신생 억제 활성을 확인하기 위하여 *n*-hexane, MeOH 및 증류수로 추출하였으며, 활성이 확인된 희분에 대해서는 열에 대한 안정성을 조사하기 위해 98±2°C에서 30분간 중탕한 다음 활성변화를 확인하였고, 실험에 사용된 첨가량은 모두 1 mg/µL로 되도록 하였다.

활성물질의 분리정제

MeOH 추출물을 *n*-hexane, 85% MeOH, hutanol (BuOH), DW로 용매분획하였다. 분배과정에서 혈관신생 억제활성이 강하게 나타난 85% MeOH 희분을 ODS C18 칼럼(50×2.5 cm, I.d., Cosmosil, Japan)상에서 50%, 60%, 70%, 85%, 100% MeOH, ethyl acetate 순으로 각각 칼럼 부피의 3배량씩 흘려 분취하고, 각 희분별로 혈관신생 억제효과와 silica plate (60 F₂₅₄, Merck)를 사용하여 같은 R_f값을 나타내는 희분을 모아 분리정제를 시도하였다.

결과 및 고찰

새꼬막 추출물의 HUVECs에 대한 증식억제 효과

혈관신생을 위해서는 혈관내피세포가 증식된 후 침윤성 성장을 통해 압조직을 향해 자라나고, 혈관내피세포들이 분화하여

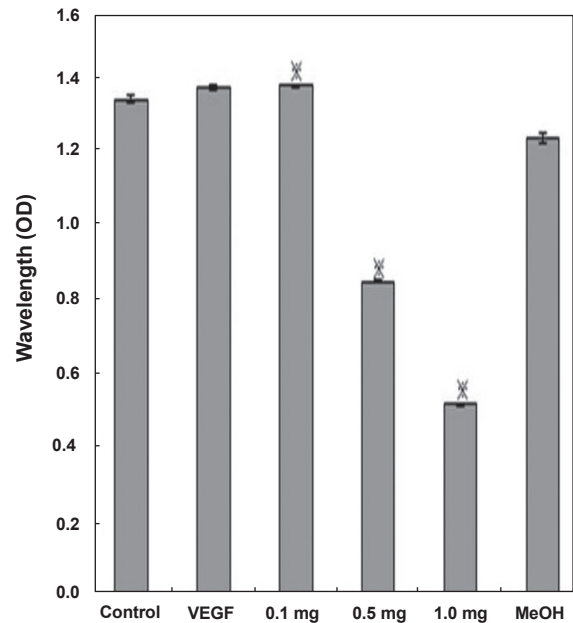


Fig. 1. Effects of MeOH extract of ark shell *Scapharca subcrenata* on the proliferation of HUVECs. Increasing the concentration of MeOH extract reduced the proliferation of HUVECs for 24 h. Data represent the mean±SD of three independent experiments performed in triplicate. **P*<0.05 versus control.

혈관을 형성하게 된다. VEGF는 사람 혈관내피 세포인 HU-VECs의 강력한 혈관형성 촉진제로서 다양하게 사용되고 있는 물질이다. 새꼬막 추출물이 VEGF에 의해서 유도된 증식억제 활성을 조사하기 위하여 VEGF 20 ng/mL을 첨가하여 이때 유도되는 혈관신생에 대한 억제효과 여부를 확인하였다. Fig. 1과 같이 추출물 첨가농도를 0 mg/mL에서부터 1.0 mg/mL 범위로 조정하여 XTT assay로 유도시킨 HUVECs 증식에 대한 새꼬막 추출물의 효과를 시험한 결과, 24시간 동안 새꼬막 추출물로 처리한 시험구와 대조구를 비교했을 때 새꼬막 추출물의 농도가 증가할수록 뚜렷한 억제활성을 나타내었고, 1.0 mg/mL로 처리된 처리구에서는 70% 정도 증식을 억제하는 농도의존적인 증식억제 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 새꼬막 추출물이 확실한 HUVECs의 증식억제능을 가지는 것으로 확인되었다. Yi et al. (2008)은 마우스에 VEGF로 유도된 모세혈관과 함께 새꼬막 추출물을 투여한 시험을 한 결과, 모세혈관의 생성을 억제한다고 보고하였고, 또한 SNU-1 cell에 대해서도 세포독성을 나타내는 것으로 보고하여 새꼬막 추출물이 암세포에 대해 뚜렷한 증식억제활성이 있는 것으로 확인되었다.

활성억제성분의 특성

혈관내피세포는 증식된 후 침윤성 성장을 통해 암 조직을 향해 자라나고, 혈관내피세포들이 분화하여 최종적으로 혈관을 형성하게 된다. 따라서 새꼬막 추출물이 혈관내피세포의 분화를 억제하는지 여부를 확인하기 위해 tube formation assay를 실시하였다. 본 실험은 확인된 새꼬막 추출물이 패류조식내 활성억제성분이 어느 부위에 존재하는지와 활성성분의 물리적 특성을 확인하기 위해 실시하였다. 먼저 육과 내장으로 따로 분리하여 각각을 동결건조한 다음 *n*-hexane, MeOH, DW의 순으로 순차추출하여 얻은 획분을 HMEC-1 cell에 대해 혈관

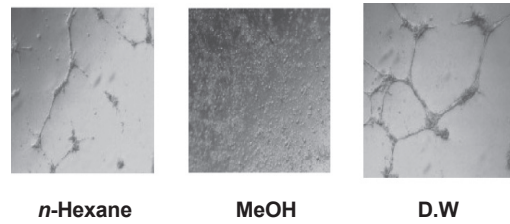


Fig. 3. Effects of proliferation inhibition against HMEC-1 cell of MeOH, *n*-hexane and DW extracts of ark shell *Scapharca subcrenata* treated by 98±2°C, 30 min.

신생 억제실험을 한 결과는 Fig. 2와 같다. 실험결과, 육에서는 모든 획분에서 활성이 확인되지 않은 반면, 내장에서는 *n*-hexane과 DW 획분에서는 육과 마찬가지로 모두 억제활성이 나타나지 않았지만, 내장의 MeOH 추출물에서는 뚜렷한 혈관신생 억제활성이 나타났다. 이는 내장에만 특이하게 존재하는 2차 대사산물이거나, 내장에 기생하는 미생물이거나, 또는 새꼬막은 해수나 갯벌을 걸러먹는 생물이므로 여기에 존재하는 미세조류등에서 유래하는 대사산물일 가능성도 있는 것으로 추정된다. 마비성독소인 saxitoxin의 경우 plankton feeder인 이매패가 먹이연쇄에 의해 독화되는데 처음에는 패류에서 분리되었으나 나중에 원인생물인 플라크톤이 분리되어 내장의 중장선에 축적되는 것으로 보고된 바 있다(Schantz et al., 1958; Scheuer, 1970; Gorham and Carmichael, 1979).

한편, 새꼬막 추출물의 열에 의한 억제활성의 변화를 확인하기 위해 시험한 결과 98±2°C에서 30분간 열처리하여도 내장에 대한 MeOH 추출물의 억제활성은 변화가 없는 것으로 나타나 비교적 열안정성이 높은 것으로 추정된다(Fig. 3).

추출 및 분리정제 특성

활성이 확인된 MeOH 추출물을 *n*-hexane, 85% MeOH, BuOH, DW로 극성에 따라 순차 액-액 분배하여 억제활성을 확인한 결과는 Fig. 4와 같다. 실험결과, 85% MeOH 획분에서만 혈관신생 활성억제가 확인되었고, 그 외의 *n*-hexane층이나 BuOH 획분 및 수용성 획분에서는 억제효과가 확인되지 않았다. 85% MeOH 획분을 ODS C₁₈ column에 흡착시켜 50, 60, 70, 85, 100% MeOH, ethyl acetate로 용출시킨 결과, 50% MeOH 획분을 제외한 모든 획분에서 혈관신생 억제능이 나타났다(Fig. 5).

60, 70, 85, 100% MeOH을 CHCl₃:MeOH (1:1) 혼합용매를 전개 용매로 TLC 전개 한 결과, 60, 70% MeOH 획분이 같은 Rf값을 나타내었고 85, 100% MeOH, ethyl acetate 획분이 같은 Rf값을 나타내어 분리정제를 시도하고 있는 중이다(그림 생략).

이상의 결과로부터 새꼬막 추출물에 존재하는 혈관신생 억제 물질은 비교적 극성도가 낮은 여러 가지 물질로 이루어져 있음을 추정할 수 있으며, 이러한 물질이 패류의 내장에 기생하는

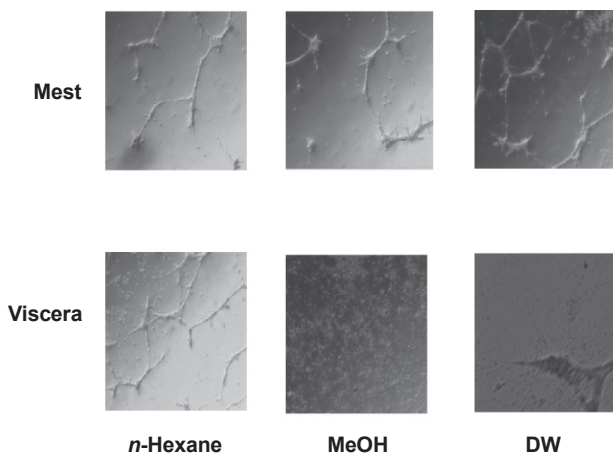


Fig. 2. Effects of proliferation inhibition against HMEC-1 cell of MeOH, *n*-hexane and DW extracts of ark shell *Scapharca subcrenata*.

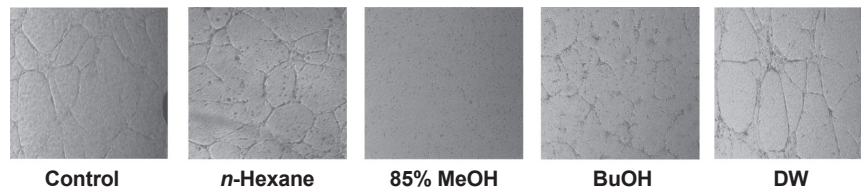


Fig. 4. Effects of proliferation inhibition against HMEC-1 cell of *n*-Hexane 85% MeOH, BuOH and DW fractions from MeOH extract of ark shell *Scapharca subcrenata*.

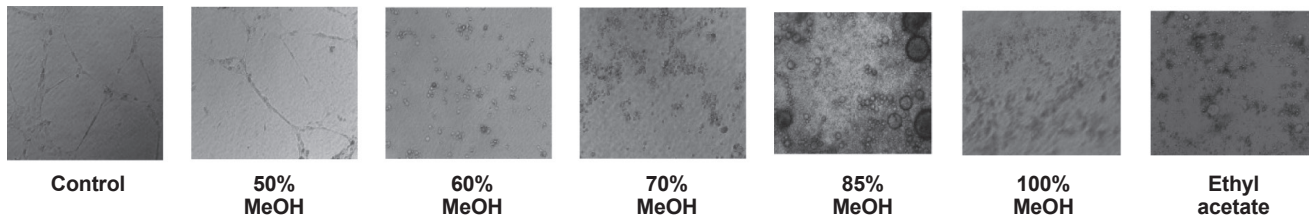


Fig. 5. Effects of proliferation inhibition against HMEC-1 cell of solvent fractions isolated by column chromatography.

미생물이나 미세조류 등에서 유래하는 것이라면 산업적으로도 이용가능성이 매우 높을 것으로 생각된다.

사 사

이 연구는 국립수산과학원(RP-2012-FS-009)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참고문헌

- Cho JJ and Kim Y. 2002. Sharks : A potential source of antiangiogenic featos and tumor treatments. *Marine Biotechnology* 4, 521-525.
- Folkman J and Cotran R. 1976. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* 16, 207-248.
- Gorham PR and Carmichael WW. 1979. Phycotoxins from blue-green algae. *Pure Appl Chem* 52, 165-174.
- Haefner B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug discovery Today* 8, 536-544.
- Jeong SJ. 2011. Antiangiogenic phytochemicals and medicinal herbs. *Physiotherapy Research* 25, 1-10.
- Mignatti P and Rifkin DB. 1996. Plaminogen activators and matrix metalloproteinase in angiogenesis. *Enzyme Protein*

49, 117-137.

Min DK. 2004. *Mollusks in Korea*. Hangeul Graphics, Busan, Korea, 387.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 65, 55-63.

Schantz EJ, McFarren EF, Schafer ML and Lewis KH. 1958. Purified shellfish poisons bioassay standardization. *AOAC* 41, 160-168.

Scheuer PJ. 1970. Toxins from fish and other organisms. *Advanced in Food Research* 18, 141-161.

Timar J, Domae B, Fazekas K, Janovics A and Paku S. 2001. Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathol Oncol Res* 7, 85-94.

Veikkola T and Alitalo K. 1999. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 9, 211-220.

Yi EY, Park SY, Choi JS, Lim CW, Kim YK, Park HY and Kim YJ. 2008. A natural marine compound extracted from the Ark shell, *Scapharca subcrenata*, inhibits in vivo and in vitro angiogenesis. *Cancer Prevention Res* 13, 47-53.

Yoo JS. 1976. *Korean Shells in Colour*. Iljisa, Seoul, Korea, 196.