

Comet Assay를 이용한 제주 자생 녹조류 추출물의 세포내 DNA 손상 억제 활성 효과

안긴내¹ · 이승홍¹ · 차선희¹ · 고석천¹ · 전유진^{1,2†}

¹ 제주대학교 해양생물공학과

² 제주대학교 방사선응용과학연구소

Effect of DNA damage inhibitory activity of green seaweed extracts from Jeju Island using a Comet Assay

Gin-Nae Ahn¹, Seung-Hong Lee¹, Seon-Heui Cha¹,
Seok-Chun Ko¹ and You-Jin Jeon^{1,2†}

¹Faculty of Applied Marine Biotechnology,

²Applied Radiological Science Research
Institute, Cheju National University, Jeju
690-756, Korea

†Corresponding author. E-mail: youjinj@cheju.ac.kr

Phone: 82-64-754-3475

Fax: 82-64-756-3493

Abstract

The extracts of green seaweeds collected from Jeju Island of Korea were prepared by methanol and distilled water at a high (70°C) and a room temperature (20°C). In this study, we used comet assay known as a sensitive, direct and accurate method to measure the inhibitory activities against H₂O₂-induced DNA damage in the L5178 mouse T-cell lymphoma cell line (L5178Y-R). We showed that most of the 20°C and 70°C aqueous extracts and methanolic extracts have the suppressive activities on DNA damage in the

cell. Especially, the 70°C aqueous extract of *Enteromorpha compressa* showed the highest inhibitory activity (approximately 81.18 %). And the 20°C and 70°C methanolic extracts of *Enteromorpha linza* and 20°C methanolic extract indicated 67.15%, 64.65% and 63.46% of the inhibition activities on DNA damage, respectively. As the results, this study indicate that the 20°C and 70°C extracts prepared by methanol and aqueous from the green seaweeds have the inhibitory activities against the DNA damage in cell and can be used as antioxidants for the inhibition of oxidation. Further studies are required to measure various antioxidant abilities using the extracts of the green seaweeds and to investigate the active compounds related to antioxidant effects from green seaweeds.

Key words : Green seaweed, DNA damage, Comet Assay, Jeju island

서론

제주도는 사면이 바다이면서 청정한 해역을 바탕으로 다양한 해조류들이 풍부하게 서식하고 있는 지역이다. 해조류는 고대부터 아시아에서 식용으로 소비해왔으나, 최근 들어 해양생물자원 유래의 천연물에 대한 기능성 천연 생리활성물질에 대한 관심이 지속적으로 높아짐에 따라, 해조류로부터 생리 활성 물질을 추출하고자 하는 노력이 꾸준히 진행되어 왔고, 특히 프랑스와 일본에서 많은 연구가 진행되었다. 해조류는 풍부한 다당류를 함유하고 있을 뿐만 아니라 다양한 미네랄과 비타민이 풍부하게 함유되어 있고, 어떤 특정 성분에서는 항균, 항산화, 항바이러스, 항암활성을 비롯하여 동맥경화, 심근경색, 고혈압, 협심증, 뇌졸중 등의 성인병 예방에 효과적이라는 보고들을 통해 해조류가 내재하고 있는 잠재적인 활성들을 엿볼 수 있다 (Nagayama et al. 2002, Ottino

Table 1. Jeju green seaweeds used in this study.

Scientific name	Korean name	Collected station
<i>Chaetomorpha linum</i>	실염주발	삼양
<i>Codium contractum</i>	몽우리청각	신촌
<i>Codium fragile</i>	청각	김녕
<i>Enteromorpha compressa</i>	납작파래	조천
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	창자파래	도두
<i>Enteromorpha linza</i>	잎파래	조천
<i>Enteromorpha</i> sp.	파래류	도두
<i>Monostroma nitidum</i>	참흙파래	조천
<i>Ulva conglobata</i>	모란갈파래	조천
<i>Ulva pertusa</i>	구멍갈파래	조천

and Duncan, 1997, Okai et al. 1998).

산소는 인체 내 소화 및 에너지 생성 등 여러 대사과정에 관여하고 생물의 생존에 가장 필수적인 물질이지만, 반응성이 매우 큰 활성산소로 전환되면 생체에 큰 영향을 미친다. 활성 산소의 종류로는 일반적으로 alkyl radical (LOO·), superoxide radical (O_2^-) 및 hydroxyl radical (HO·)과 같은 라디칼 물질 뿐만 아니라 비라디칼인 singlet oxygen (1O_2), hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), lipid peroxide (LOOH), N-chloramine 성분들을 포함한다 (Yagi, 1987). 이러한 활성산소들은 세포막 지방질을 과산화시키고, 세포막투과성의 변화를 초래하여 DNA손상을 유발시킨다고 보고되어 있다 (Gung et al 2000). 현재까지 다양한 연구를 통해 암 발생은 산화적 스트레스로 인한 세포내 DNA 손상과 깊은 관련이 있는 것으로 밝혀지고 있다. DNA 손상을 측정하기 위해 많은 연구 방법들이 개발되어 왔는데 이제까지 사용되었던 방법들보다 쉽고, 민감한 방법으로 최근 소개되고 있는 것이 comet assay 혹은 단세포 전기영동법 (single cell gel electrophoresis)이다 (Ostling and Johanson 1984). 이 방법은 인체의 어떤 조직에서도 DNA 손상정도를 측정할 수 있으며 분석 시 소량의 시료만을 필요로 하고 실험과정이 간단할 뿐 아니라 시료 채취 후 몇 시간 내에 결과를 얻을 수 있는 등 많은 장점을 가지고 있고 comet assay를 이용하면 산소 라디칼의 형성에 의한 DNA 손상과 항산화제의 관계 등을 쉽게

관찰할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 comet assay를 이용하여 다양한 생리 활성 물질이 내재되어 있는 제주 자생 녹조류 추출물로부터 DNA 손상 억제에 대한 활성 효과를 알아보고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 녹조류

실험에 사용한 녹조류는 2004년 2월 ~ 4월 사이에 제주도 연안에서 채집하여 제주대학교 해양생산과학부에서 동정받아 수세 후 동결 건조하여 사용하였다. 채집하여 추출에 이용된 녹조류의 목록은 Table 1에 제시하였다.

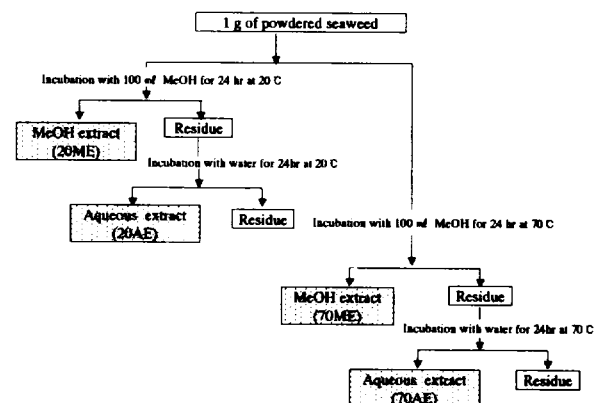


Fig. 1. Scheme for preparations of methanol and aqueous extracts at 20°C and 70°C, respectively.

Table 2. Lot number of extracts from green seaweeds.

Scientific name	Lot number			
	20ME ^{a)}	70ME ^{b)}	20AE ^{c)}	70AE ^{d)}
<i>Chaetomorpha linum</i>	20M1	70M1	20A1	70A1
<i>Codium contractum</i>	20M2	70M2	20A2	70A2
<i>Codium fragile</i>	20M3	70M3	20A3	70A3
<i>Enteromorpha compressa</i>	20M4	70M4	20A4	70A4
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	20M5	70M5	20A5	70A5
<i>Enteromorpha linza</i>	20M6	70M6	20A6	70A6
<i>Enteromorpha</i> sp.	20M7	70M7	20A7	70A7
<i>Monostroma nitidum</i>	20M8	70M8	20A8	70A8
<i>Ulva conglobata</i>	20M9	70M9	20A9	70A9
<i>Ulva pertusa</i>	20M10	70M10	20A10	70A10

^{a)} 20ME: methanolic extract at 20°C, ^{b)} 70ME: methanolic extract at 70°C, ^{c)} 20AE: aqueous extract at 20°C, ^{d)} 70AE: aqueous extract at 70°C

2. 추출물의 준비

동결 건조한 녹조류를 곱게 갈아 1 g을 취한 후, 100 ml 메탄올에 섞어 20°C와 70°C에서 24시간 동안 추출하였다. 그 추출물은 여과 후, 액상층은 모든 용매를 휘발 시킨 후, 증류수에 녹여 메탄올 샘플로 사용되어졌고, 남은 잔사는 증류수에 현탁시켜 위와 동일한 조건에서 추출하여 수용성 추출물 샘플로 각각 사용되어졌다(Fig. 1). 20°C에서 얻은 메탄올 추출물을 20ME, 70°C에서 얻은 메탄올 추출물을 70ME, 20°C에서 얻은 수용성 추출물 20AE, 70°C에서 얻은 수용성 추출물을 70AE라고 정했다(Table 2).

3. Comet assay를 이용한 DNA 손상 억제 활성 측정

Alkaline comet assay는 Singh (Singh et al. 1988)의 방법을 수정, 보완하여 수행되어졌다. L5178Y-R (L5178 mouse T-cell lymphoma cell line) 세포를 1 ml 당 4×10^4 의 세포수로 e-tube에 첨가한 후, 샘플 100 ug/ml를 처리하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양된 세포들은 PBS로 세척하였고, 세포 DNA의 산화적 스트레스를 유도하기 위하여 50 uM H₂O₂를 포함하는 1 ml의 PBS를 처리하여 5분간 얼음 위에서 반응시켰다. PBS로 세척한 그 세포들은 100 ul

의 0.7% low melting point agarose (LMPA)와 섞어진 후, 1.0% normal melting point agarose (NMPA)로 fully frosted slide 위에 LMPA와 세포 현탁액을 분주하여 cover glass로 덮어 4°C에서 10분간 보관하였다. Gel이 굳은 후, cover glass를 제거하고 다시 0.7% LMPA 100 ul를 slide 위에 떨어뜨린 후, 40분 동안 4°C에서 보관하였다. Gel이 굳은 것을 확인하고 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 uM EDTA, 10 mM Tris, 1% sodium laurylsarcosine)와 1% triton X-100을 섞어 바로 cover glass를 벗긴 slide를 담가 4°C에서 1시간 동안 침지시켜 주었다. 이에 따라, DNA의 double strand가 풀어지게 되고, unwinding buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH 13)에 slide를 침지시켜 20분 동안 4°C에서 unwinding 되어졌다. 이 과정을 통해 DNA는 alkali labile sites가 드러나게 되고, 이것은 25V/300m의 전압이 걸리는 electrophoresis buffer에서 20분 동안 전기영동 되었다. 이 때 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정에서 전기영동 tank를 빛으로부터 차단한 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후, slide는 0.4 M Tris 완충용액 (pH 7.5)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하였고,

70% 에탄올에서 5분간 탈수과정을 거쳐 건조되어 졌다. 이렇게 건조된 slide는 핵을 형광 염색시키는 20 ul/ml ethidium bromide를 45 ul씩 떨어뜨려 cover glass로 덮었다. 염색된 slide는 형광 현미경 (LEICA DMLB, Germany)으로 관찰되어졌고, CCD camera (Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 5.0 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, U.K)이 설치된 컴퓨터상에서 분석하였다. 세포의 DNA 손상 정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리 (tail length, TL) 또는 tail length에 tail내에 함유된 DNA%를 곱해준 tail moment (TM) 값을 측정하여 나타내었으며 각 처리구 당 2개의 slide를 만들어 각각 50개의 세포를 관찰하여 H₂O₂에 의한 DNA 손상 및 각 추출물에 의한 DNA 손상 억제정도를 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{DNA damage inhibition activity (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A: DNA tail percentage of H₂O₂-treated cells

B: DNA tail percentage of sample-treated cells

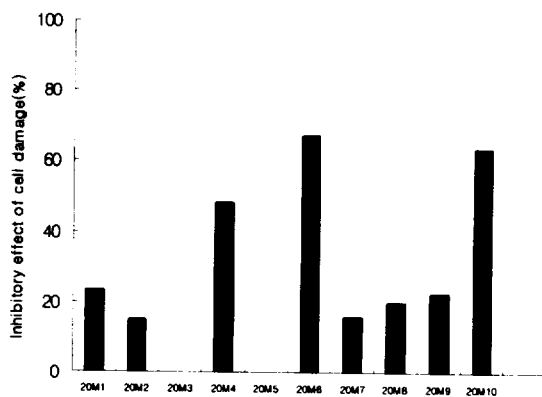


Fig. 2. Inhibitory activity of methanolic extracts at 20°C from green seaweeds (100 µg/mL) against H₂O₂-induced DNA damage in L5178YR cell.

20M3 ; Null , 20M5 ; No detected

결과 및 고찰

본 연구에서 활성산소종 중 H₂O₂가 세포막을 통과하여 세포 내에서 산화적 스트레스를 일으키고, DNA의 손상을 이끈다는 점을 이용하여, 세포가 H₂O₂에 의한 인위적인 산화적 스트레스 상태에서 제주 자생 녹조류의 각 추출물들이 DNA 손상에 대한 억제 활성 효과를 가지는지를 검색해 보았다.

Comet assay는 근본적으로 분자량에 따라 그 이동속도가 반비례되는 전기영동의 원리에 기초하고 있다. 즉, DNA 손상을 입은 세포를 lysis시켜 핵만 남긴 후, 전기영동을 하게 되면 DNA분자량의 크기가 작을 수록 핵으로부터 멀리 이동되므로 손상되어 잘려진 DNA 가닥이 많을 수록 혜성 꼬리처럼 긴 모양이 생긴다 (Kang, 2003). 이러한 tail movement를 측정하여 얻은 DNA damage 억제활성 효과를 Fig. 2~6에 나타내었다. Fig. 2~5 에서 보는 바와 같이 서로 다른 조건의 녹조류 추출물들이 DNA damage 억제활성 효과를 보였다. 녹조류의 모든 추출물 중 70°C 수용성 추출물인 *Enteromorpha compressa*가 가장 높은 81.18%의 DNA damage 억제 활성을 나타내었다. 또한 *Enteromorpha linza*는 20°C와 70°C 메탄올 추출물에서 각각 67.15%와

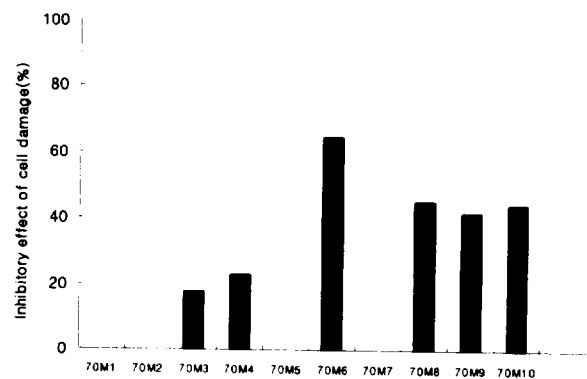


Fig. 3. Inhibitory activity of methanolic extracts at 70°C from green seaweeds (100 µg/mL) against H₂O₂-induced DNA damage in L5178YR cell.

70M1, 70M2, 70M5, 70M7 ; No detected

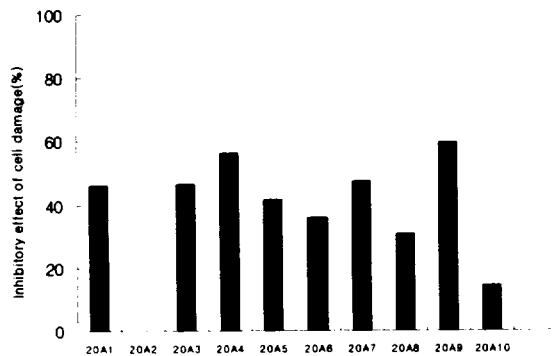


Fig. 4. Inhibitory activity of aqueous extracts at 20°C from green seaweeds (100 µg/mL) against H₂O₂-induced DNA damage in L5178YR cell.

20A2 ; Null

64.64%의 DNA damage 억제 활성을 나타내었고, 20°C 메탄올 추출물 *Ulva pertusa*는 63.46%의 DNA damage 억제 활성을 나타내었다. Fig. 6은 이러한 결과를 한눈에 볼 수 있는 사진으로, Fig. 6A는 아무 처리도 하지 않은 세포에 대한 전기영동 사진으로서 세포가 손상을 받지 않았음을 알 수 있었다. 이에 비하여 H₂O₂를 처리하게 되면 세포가 크게 손상을 받아 대부분의 DNA가 손상되어 혜성 꼬리처럼 긴 모양이 형태가 되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 6B). 반면 H₂O₂ 처리 전에 여러 종류의 녹조류 추출물들을 처리하였을 때에 DNA 손상이 현저히 줄어드는 결과를 볼 수 있었다(Fig. 6C~F). 이와 같이 녹조류 추출물에 의해 DNA 손상이 현저히 줄어드는 것으로 보아, 녹조류를 이용하여 제조한 추출물은 hydrogen peroxide에 의한 산화적 스트레스로부터 세포를 보호해 줄 수 있을 것으로 보인다.

해조류의 항산화 물질로 알려진 것은 fucoxanthin 및 Chlorophyll과 같은 색소, 알긴산, phlorotannin, fucoidan과 같은 다당류, 단백질 등이 있다. 그러나 본 연구 결과 네개의 다른 종류의 추출물에서 DNA 손상에 대한 억제 활성 효과가 다양하게 나타나는 것은 생리활성 성분이 다양한 형태로 존재하는 것으로 사료되며, 다양한 녹조류 추출물은 추출 용매와 온도를 감안하여 보면, 한 종(species)이 다양한 형태의 DNA 손상에 대한

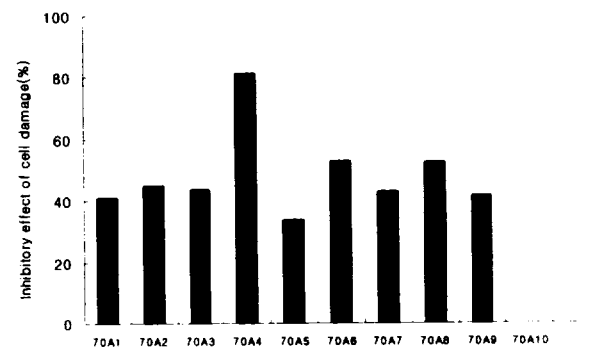


Fig. 5. Inhibition activity of aqueous extracts at 70°C from green seaweeds (100 µg/mL) against H₂O₂-induced DNA damage in L5178YR cell.

70A10 ; Null

억제 활성을 하는 물질을 가지고 있는 것으로 여겨진다.

지금까지의 결과들을 종합해 볼 때, 제주도에서

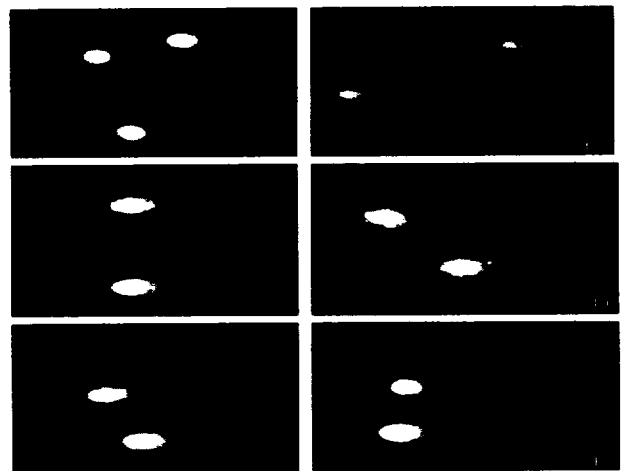


Fig. 6. Photomicrographs of DNA damage and migration observed under the extracts of green seaweeds.

(A) negative control ; (B) only 50 µM H₂O₂ ; (C) 100 µg/ml of methanolic extract at 20°C from *Enteromorpha linza* + 50 µM H₂O₂ ; (D) 100 µg/ml of methanolic extract at 70°C from *Enteromorpha linza* + 50 µM H₂O₂ ; (E) 100 µg/ml of aqueous extract at 20°C from *Ulva conglobata* + 50 µM H₂O₂ ; (F) 100 µg/ml of aqueous extract at 20°C from *Enteromorpha compressa* + 50 µM H₂O₂

자생하고 있는 다양한 종류의 녹조류들은 다양한 추출과정을 통해 추출되어졌으며, 그렇게 추출된 추출물은 세포내 DNA damage에 대한 각기 다른 억제활성을 가진다고 할 수 있다. 또한 이 연구에서 실시한 comet assay는 활성산소종에 의한 산화적 스트레스 상에서 직접적으로 세포 내의 DNA가 가지게 되는 damage 정도를 확인할 수 있는 직접적이고 민감한 방법이기, in vitro 상의 실험을 뒷받침해주는 좋은 방법이라 할 수 있다. 우리는 앞에서 다양한 녹조류 추출물이 DNA damage에 대한 억제 활성을 가진다는 것을 확인하였고, 이것은 제주 자생 녹조류의 다양한 추출물들의 가치를 입증하게 된다. 게다가 이 연구를 통해 세포내 DNA damage를 직접 관찰할 수 있었다는 것을 간주할 때, 다양한 해조류들을 screening해서 우수한 DNA damage에 대한 억제 활성을 나타내는 개체를 선정한 후 임상에 적용시킬 수 있다면 잠재적 의약품 및 기능성 식품 소재 개발에 있어 매우 중요한 자료가 될 것으로 사료되어지며, 그에 따른 더 구체적이고 추가적인 실험의 수행이 요구되어진다.

감사의 글

이 연구는 산업자원부에서 시행한 제주생명자원공동연구개발사업 (제주도 생물자원을 이용한 기능성 화장품 소재 개발)의 주관부서인 한국생명공학연구원의 위탁과제로 수행한 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Gung GT., Ju IO., Choi JS., Hong JS., 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT (Omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.
2. Kang MH., 2003. Green vegetable juice reduces in vitro and in vivo DNA damage and plasma lipid concentrations. *Food Ind Nutr* 8(1): 8-14
3. Nagayama K., Iwamura Y., Shibata T., Hirayama I., Nakamura T., 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J. Antimicrob. Chemoth.* 50: 889-893.
4. Okai Y., Higashi OK., Ishizaka S., Ohtani K., Matsui YI., Yamashita U., 1998. Possible immunomodulating activities in an extract of edible brown alga, *Hijikia fusifome* (Hijiki). *J. Sci. Food. Agric.* 76: 56-62.
5. Ostling O., Johanson KJ., 1984. Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298.
6. Ottino, P., and Duncan JR., 1997. Effect of α -tocopherol succinate on free radical and lipid peroxidation levels in BL6 melanoma cells. *Free Radical Biol. Med.* 22: 1145-1151.
7. Singh PN., McCoy MT., Tice RR., Schneider EL., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
8. Yagi K., 1987. Lipid peroxides and human disease. *chem phys Lipids* 45: 337-341.