creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

석사학위논문

제주지역 해조류의 항당뇨 활성 탐색

Screening of Anti-diabetic Activity in Seaweeds Produced in Jju Island

제 출 자 : 신 현 주
지도교수 : 정 윤 화

2011

식품영양학과
식품영양학전공
단국대학교 일반대학원

제주지역 해조류의
항당뇨 활성 탐색

Screening of Anti-diabetic Activity in
Seaweeds Produced in Jeju Island

이 논문을 석사학위논문으로 제출함.

2011년 6월

단국대학교 일반대학원
식품영양학과
식품영양학전공

신 현 주

dCollection @ dankook

신 현 주의 석사학위 논문을
합격으로 판정함

심 사 일 : 2011. 06. 03.

심사위원장 이 정민 (인)

심사위원 박 헌용 (인)

심사위원 김 윤화 (인)

단국대학교 일반대학원

dCollection @ dankook

(국문초록)

제주 지역 해조류의 항당뇨 활성 탐색

단국대학교 대학원 식품영양학과
식품영양학전공
신 현 주
지도교수 : 정 윤 화

제주 지역 해조류의 항당뇨 활성을 탐색하기 위하여 다당류에서 단당류로 가는 과정에서의 억제 및 소장에서의 포도당 흡수 억제의 활성과 대사 과정 중에서의 혈당 이용률을 알아 보았다. 다당으로부터 단당류 분해 억제는 α-glucosidase와 α-amylase저해, 당의 장내 흡수 지연 효과는 Transwell을 이용하여 Caco-2 cell 투과 실험과 Caco-2 cell에서의 GLUT2와 SGLT1의 유전자와 단백질발현을 통해 확인하였다. 당대사를 촉진시키는 것은 HepG2 cell에서의 pyruvate kinase와 glucokinase의 단백질발현을 통해 확인하였다.

해조류의 항당뇨 활성 탐색은 당 분해 억제 실험인 α-glucosidase와 α-amylase 활성억제 능력을 통하여 확인하였다. 활성이 나타난 패(*Ishige okamurai*)와 넓패(*Ishige foliacea*) 80%주정 추출물을 가지고 농도별로 α-glucosidase억제 활성을 연구한 것은 넓패와 패 추출물 200 ㎍/㎖농도에서 각각 95.2, 98.1% 저해하였고, α-amylase저해 활성은 농도 의존적으로 저해 활성이 증가하였다.

소장에서 포도당 흡수 억제정도는 SGLT1과 GLUT2의 유전자와 단백질 발현정도에 따라 판단하였는데, SGLT1의 발현양이 많을수록 당의 흡수도가 높다는 것이고, GLUT2의 발현양이 많을수록 소장에서 혈액으로 포도당 이동이 많다는 것을 의미한다. 패와 넓패 추출물에서 SGLT1과 GLUT2 단백질 발현양이 낮게 나타났다. 넓패 추출물이 대조군에 비해 SGLT1 단백질 발현을 47.7% 저해시켰고, 패 추출물은 60%

dCollection @ dankook

를 저해시켰다. GLUT2의 단백질발현정도는 넓패 추출물이 대조군에 비해 34.9%, 패 추출물이 37.6%저해되었다.

HepG2에서 pyruvate kinase와 glucokinase 단백질 발현을 확인하여 대사과정 중 혈당 이용률을 보았다. 패 추출물의 농도가 높아짐에 따라 glucokinase, pyruvate kinase모두 단백질발현이 감소하였다. 세포내로 흡수된 당의 이용 속도를 증가시키기 위해서는 간에서 포도당대사에 관여하는 glucokinase활성을 증가시켜야 한다. 하지만 본 연구에서는 패 추출물을 처리함에 따라 감소하였고, 해당계(解糖界)에 있어 제2의 ATP 생산반응을 촉매하는 효소로 phosphenolpyruvate (PEP)과 ADP로부터 pyruvic acid와 ATP를 생성하는 pyruvate kinase의 발현 역시 패 추출물의 처리농도가 높아짐에 따라 감소하였다.

80%주정 해조류추출물 중 패 추출물은 대사 과정 중에서의 혈당 이용률에서는 활성이 없었으나, 다당류에서 단당류로 가는 과정을 억제 하는 활성이 좋았고, 소장에서의 포도당 흡수에도 도움이 되었다.

dCollection @ dankook

감사의 글

많은 고비를 견디며 졸업논문을 마무리하게 된 지금. 만감이 교차하며 가슴 떨림을 느낍니다. 비록 부족한 결과물이지만 저에겐 소중하고 특별한 지난 시간의 정성이 담겨져 있습니다.

우선 이 논문을 완성하기까지 힘 써주신 저의 지도교수님이신 정윤화 교수님께 감사의 마음을 전합니다. 언제나 저한테 든든한 힘이 되어주신 교수님 때문에 순조롭게 실험을 마무리 하였습니다. 교수님 감사합니다. 그리고 사랑합니다.

그리고 논문을 지도해주시고, 분자생물학과에서 실험을 할 수 있게 도와주신 박헌용 교수님과 논문심사 위원장을 맡아주시고, 바쁘신 와중에도 제 실험과 논문을 지도해 주신 이정민 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 많은 가르침을 주신 김성곤 교수님, 장명숙 교수님, 문현경 교수님, 김우경 교수님, 장혜자 교수님, 김미숙 교수님께도 깊은 감사의 마음을 전합니다.

제가 여기까지 올 수 있게 도와주신 허석현 국장님. 늘 감사한 마음뿐인데, 제가 잘 표현을 못해 이렇게나마 감사의 표현을 하고 싶습니다. 감사합니다.

제 인생에 많은 추억과 배움을 안겨준 식품학실. 힘든 시기를 함께 해주고, 실험 도와주느라 내 기분 맞춰주느라 너무 수고 많았던 은지, 가끔 개그맨 소질이 보이는 무조건적인 의지가 되는 한나언니, 막내라고 궂은 일 다하면서도 꿋꿋이 잘하는 듬직하고 착한 해연이, 하나뿐인 동기 다현이, 인용이, 상연이, 예성이, 현정이, 한새, 조셉오빠, 하림이, 박선생님에게 감사의 마음을 전합니다. 그리고 웃는 얼굴로 오빠같이 대해주셨던 장윤혁 교수님, 유머와 젠틀함을 겸비하신 이근배소장님, 엄마 같이 저희에게 항상 맛있는 음식을 해주시던 한경순 선생님, 맛있는 빵과 쿠키를 가져다주시던 푸근한 미소의 윤성준 선생님, 이란숙 선생님, 유애령 선생님, 서성희 선생님, 김수빈 선생님, 유재식 선생님, 이영승 박사님, 구용의 연구관님 모두에게 감사의 마음을 전합니다.

정윤화 교수님을 통해 인연의 끈이 되어 저를 예뻐 해주신 김성수 교수님, 멋진 말씀 많이 해주신 이정근 박사님, 오성훈 교수님, 조윤호 선생님께도 진심으로 감사합니다.

분자생물학과의 은실언니, 선영언니, 조진구 선생님, 김성현 선생님. 많이 불편하고 귀찮으셨을 텐데도 잘 대해주시고 실험에 있어 모르는 거 있음 잘 가르쳐 주셨던 거 너무 감사합니다.

경희대의 이정민 교수님 연구실의 다은선생님, 옥경선생님, 혜림선생님, 수정선생님께는

dCollection @ dankook

죄송하다는 말과 감사의 말을 함께 전하고 싶습니다. 그리고 해조류를 보내주신 제주대 전유진 교수님과 강민철 선생님에게도 감사의 마음을 전합니다.
사랑하고 고맙다는 말로는 한없이 부족한 나의 친구들... 멋쟁이 영양사님 미진, 꼭 스튜어디스가 되리라 믿어 의심치 않는 락커 유리, 중국에서 혼자 대학원 다니는 대견한 복태, 참한 외모와는 상반되는 쿨한 성격의 소유자 희정언니, 가끔 연락하지만 만나면 마음 편해지는 심군, 잠수타서 연락은 안 되지만 그래도 내 어릴적 단짝 보노, 까질유 관심, 현화씨, 김보, 지선이, 은정이, 대원이, 석기, 형돈오빠 모두에게 고마움을 전합니다. 그리고 갈굼을 충고로 받아들이라는 정재영 주임님. 우울할 때 전화하거나 급할 때 전화하면 잘 받아주시는 김한종 선배님, 편함함을 주시는 김용수 선배님 감사합니다. 또한 고등학교 학생회 유진언니, 병철오빠, 중현오빠, 고운언니, 소정언니, 창호오빠, 연경언니, 용완이, 선호, 임징, 민수, 옥이, 동헌, 희선, 아라, 기훈, 동일, 걸삼이에게 감사의 마음으로 전합니다.
마지막으로 물심양면으로 나를 아껴주고 사랑해주는 우리 가족모두. 이 세상 그 어떠한 말로도 사랑과 감사의 마음을 표현할 수 없지만, 제 마음을 아실 엄마, 아빠, 효인이에게 머리 숙여 감사드리며 이 논문을 바칩니다.

dCollection @ dankook

2011년 6월 신현주

목 차

국문요약 ····· i
감사의 글 ····· iii
목 차 ····· v
LIST OF TABLES ····· vii
LIST OF FIGURES ····· viii
Ⅰ. 서 론 ····· 1
Ⅱ. 문헌고찰 ····· 3
1. 당뇨 ····· 3
1.1. 당뇨병 ····· 3
1.2. 당뇨합병증 ····· 3
1.3. 당뇨병의 종류 ····· 4
1.4. 한국인의 10대 사망률 ····· 5
1.5. 혈당조절 ····· 6
1.6. α-glucosidase ····· 6
1.7. α-amylase ····· 7
1.8. 소장에서의 포도당 흡수 ····· 7
1.8. 대사과정 관련 Glucokinase와 Pyruvate kinase ····· 9
2. 해조류 ····· 12
2.1. 해조류 ····· 12
2.2. 패(*Ishige okamurai*)와 넓패(*Ishige foliacea*) ····· 21
Ⅲ. 재료 및 방법 ····· 14
1. 실험 재료 ····· 14
2. 세포주 배양(cell culture) ····· 14
3. 시료의 추출 ····· 14
4. 일반성분 분석 ····· 15
5. α-glucosidase 저해 활성 측정 ····· 15
6. α-amylase 저해 활성 측정 ····· 15
7. WST-1 Assay ····· 16
8. Caco-2 세포 투과 실험 ····· 17
9. RT-PCR (reverse-transcriptase polymerase chain reaction) ····· 18

dCollection @ dankook

10. Western blot ····· 18
11. 통계처리 ····· 19
Ⅳ. 결과 및 고찰 ····· 20
1. 해조류의 일반성분 ····· 20
2. 수율 ····· 21
3. α-glucosidase 억제 활성 ····· 22
4. α-amylase 억제 활성 ····· 26
5. 세포 생존율 ····· 30
6. Caco-2 cell에서의 세포 투과도 ····· 34
7. RT-PCR ····· 38
8. Western blot ····· 40
Ⅴ. 요약 및 결론 ····· 48
참고문헌 ····· 50
영문요약 ····· 63

dCollection @ dankook

LIST OF TABLES

Table 1. Sequence and RT-PCR program of protein ····· 18

Table 2. The general composition of various seaweeds ····· 20

Table 3. Yields of 80% ethanol extracts of seaweed ····· 21

Table 4. α-glucosidase inhibition rate of 80% ethanol extracts of seaweed ····· 23

Table 5. α-glucosidase inhibition rate of 80% ethanol extract of *Ishige foliacea* · 24

Table 6. α-glucosidase inhibition rate of 80% ethanol extract of *Ishige okamura* 25

Table 7. α-amylase inhibition rate of 80% ethanol extracts of seaweed ····· 27

Table 8. α-amylase inhibition rate of 80% ethanol extract of *Ishige foliacea* ··· 28

Table 9. α-amylase inhibition rate of 80% ethanol extract of *Ishige okamurai* ·· 29

Table 10. Cell viability of 80% ethanol extracts of seaweed on HepG2 cells ····· 31

Table 11. Cell viability of 80% ethanol extracts of seaweed on Caco-2 cells ···· 33

Collection @ dankook

LIST OF FIGURE

Figure 1. Rate of the cause of death ····· 5

Figure 2. The operation of SGLT1 and GLUT2 on epithelial cell ····· 9

Figure 3. ATP feedback inhibition of pyruvate in the glycolysis cycle ····· 11

Figure 4. Principle of WST-1 ····· 16

Figure 5. Side view of Caco-2 cell on membrane of Transwell ····· 17

Figure 6. Transportation of 80% ethanol extracts of seaweed across Caco-2 cell · 36

Figure 7. Inhibitory effect of 80% ethanol extracts of seaweed on glucose uptake on Caco-2 cell ····· 37

Figure 8. The mRNA expression level of SGLT1 and GLUT2 on Caco-2 cells ·· 39

Figure 9. The protein expression level of SGLT1 on Caco-2 cells ····· 41

Figure 10. The protein expression level of GLUT2 on Caco-2 cells ····· 42

Figure 11. The protein expression level of Glucokinase on HepG2 cells with *Ishige okamurai* ····· 45

Figure 12. The protein expression level of Pyruvate kinase on HepG2 cells with *Ishige okamurai* ····· 46

dCollection @ dankook

Ⅰ. 서 론

당뇨병은 고혈당을 특징으로 하는 대사 질환 군이다. 당질은 인슐린의 분비와 식후 혈당을 결정하는 중요한 영양소로 식후 혈당증가와 인슐린 분비에 영향을 미친다. 당뇨병은 인슐린이 분비가 되지 않는 제 1형 당뇨와 인슐린의 작용력이 감소하여 나타나는 제 2형 당뇨로 나누어진다. 제 2형 당뇨는 인슐린이 분비는 되지만 인슐린에 민감한 조직에서 그 작용력이 낮아짐으로써 혈당이 높아져 나타난다(Ko et al., 2005). 인슐린 비의존형 당뇨인 제 2형 당뇨는 성인 당뇨로서 당뇨병의 가장 흔한 형태로 당뇨병의 90%를 차지하는 만성질환으로(JI et al., 2002; Oates and Wood, 1989; Vessby et al., 1994), 치료에 있어 가장 중요한 것은 혈당 조절이다. 고혈당은 당뇨 증세를 악화시키고, 당뇨합병증을 일으키는 주된 요인이다. 따라서 혈당조절효과가 우수한 소재는 당뇨병을 효과적으로 치료할 수가 있는 것이다. 그러나 현재 당뇨병 치료에 사용되고 있는 경구 혈당강하제는 저혈당, 복통 등 여러 부작용을 수반하여 부작용 없는 천연물 유래 혈당강하제 개발이 필요한 실정이다(Kim et al., 2008; Braunwald et al., 2001; Kameswara et al., 1997; Prout et al., 1974).

지구 표면의 70%를 차지하는 해양에는 지구상의 모든 생물종의 약 80% 이상의 많은 생물이 서식하고 있으며 그 종류도 풍부하다(Lee et al., 1999; Scheuer, 1990). 높은 염 농도와 수압 같은 해수의 특이한 환경에 적응해가며 사는 해양 생물은 육상 생물과는 다른 생리활성을 가질 것으로 예상된다.

해양생물 중 특히 해조류는 육상식물에서 보기 어려운 생합성 경로를 가지고 있어 생리활성 물질 생산에 관한 무한한 가능성을 가지고 있는 것으로 평가되고 있다(Lee et al., 1999; 김영섭 등 1996). 또한 해조류는 영양학적으로 열량은 낮으면서 비타민, 무기질, 식이 섬유소가 풍부하고 비소화성의 점질성 다당류를 다량 함유하고 있다(Kwak et al., 2005; Jimenez et al., 1999). 해조류의 영양 및 생리 기능성에 대한 연구는, 해양 생물자원을 이용한 건강기능 식품소재 및 대체의약품과 같은 고부가가치의 소재 개발 가능성을 높일 수 있다고 본다. 소비자들 역시 기능성 소재로서 여러 부작용을 유발하는 화학적 합성품보다는 천연물 유래의 안전한 기능성 물질을 선호하는 추세이다(Jung et al., 2004). 최근에 해조류에 대한 연구가 활발해지면서, 해조류의 고지혈증 예방(Awad et al., 2003), 항암(Ryu et al., 1989), 면역조절작용(Liu et al., 1997), 항바이러스(Iwahima et al., 2005), 항염증(Kim et al., 1997), 항산화(Yang et al., 2005), 항혈액응고(Lee et al., 1999) 등 다양한 생리활성이 확인되어 기능성 소재로서 해조류의 활용이 주목을 받고 있다(Manou et al.,1998; Heo and Jeon, 2005). 해조류 중에서도 녹조류나 홍조류보다 갈조류가 뛰어난 생리활성을 보인다(Lee et al., 2000). 특히 모자반과 해조류에서 다양한 생리활성을 보이는 것으로 보고된다

dCollection @ dankook

(Lee et al., 2009a; Bae, 2004). 본 연구에서 sample로 사용한 지충이(*Sargassum thunbergii*)는 우리나라 남해안에 널리 자생하고 있는 갈조류로 식용, 구충제, 사료용으로 사용되고 있으며, 최근에는 항산화 작용(Yang et al., 2005; Seo et al., 2004)및 항암 작용(Zhuang et al., 1995)등의 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있고(Lee et al., 2009b), 꽈배기모자반(*Sargassum tortile*)은 모자반목 모자반과에 속하는 갈조류로 우리나라 동해안 중부 이남에서부터 남해안, 서남해안 및 제주도 일대 등에 폭넓게 자생하고 있고(Dawson, 1974), 현재 항산화 활성(Cho et al., 2007), 향균 활성(Lee et al., 2007), 세포독성 억제(Numata et al., 1992)등의 생리활성이 보고되고 있다.

패(*Ishige okamurai*)는 우리나라 남해안 각지에 분포하는 갈조식물문 패목 패과에 속하는 갈조류로(Kim et al., 2009a) 현재 패에 관한 연구는 항응혈성(Athukorala et al., 2007), 토코페롤 함유(Nakamura et al., 1994)에 관한 연구가 있고, 큰잎모자반(*Sargassum ringgoldianum*)에 관한 연구는 항산화(Ko et al., 2010)에 대한 연구만 진행된 상태이다.

이렇듯 각종 해조류의 여러 가지 생리활성에 관한 연구는 활발하나 아직 항당뇨 활성에 관한 연구는 미비한 실정이여서, 본 연구에서는 제주지역 해조류 5종의 80%주정추출물에서 항당뇨 활성을 탐색하였다.

dCollection @ dankook

Ⅱ. 문헌고찰

1. 당뇨

1.1 당뇨병

당뇨병은 소변에 단맛의 당이 나오는 병이다. 원래 이 명칭은 라틴어 'Diabetes mellitus'에서 비롯되었다. Diabetes는 분수를 뜻하는 말로 당뇨병의 주요 증상인 다뇨의 현상을 가리키고 mellitus는 달다라는 뜻이다. 즉 이 두 낱말이 혼합된 Diabetes mellitus는 '단맛이 있는 소변이 많이 나오는 병'이라는 뜻이 된다(김영설, 1999).

당뇨병은 췌장의 Langerhan's 섬의 β세포에서 인슐린 분비장애와 말초 조직의 인슐린저항에 의해 발생되는, 고혈당을 특징으로 하는 이질성 질환이다(Kobayashi et al., 2000). 당뇨병의 증상은 혈당 농도가 증가하고 소변으로 당이 배설되며, 오래 지속되면 대사 장애로 신경계, 순환계, 신장 등에 변성이 오고, 혈중 아미노산의 증가 등에 의해 말초조직에서 당질의 이용 장애가 온다. 당뇨병의 특징적인 증상으로는 다뇨, 갈증, 식욕항진, 체중감소가 있다(Brant et al., 2005). 초기 당뇨환자는 목마름 증상이 심하고, 건강한 사람이 소변으로 하루 1000~1500cc 정도를 배설하는데 비해 당뇨병 환자는 2000~5000cc로, 2~5배나 되는 다뇨증상을 보이며, 음식을 먹어도 허기증이 있어 자꾸만 먹게 되는 다식증상이 나타난다. 모든 당뇨병 환자의 약 60%에서 이러한 증상들이 나타나는데, 이러한 증상들의 진행 결과, 몸무게가 줄어들게 되고, 쉽게 피로를 느끼며 의욕이 떨어져 권태감을 호소하게 된다(김영설, 1999).

1.2 당뇨합병증

당뇨병 진단을 받으면 적절한 치료법에 의해 당뇨병을 잘 관리하는 것이 중요하다. 이것은 치료와 함께 일상생활의 질을 높이고, 당뇨병으로 인하여 발병하는 합병증을 예방하거나 지연 시킬 수 있다.

당뇨병의 합병증에는 급성 합병증과 만성 합병증이 있다.

급성 합병증에는 저혈당성 혼수, 당뇨병성 케톤산혈증, 비케톤성 고삼투압성 혼수 등이 있다. 당뇨병성 케톤산혈증은 인슐린의 절대적인 부족으로 인해 당질로부터 에너지를 얻을 수 없어 몸 안의 지방으로부터 에너지를 얻기 위해 지방이 분해되면서 몸 안의 지방질의 분해

dCollection @ dankook

산물인 산성의 케톤체가 다량으로 생겨 몸 안이 산성으로 바뀌어 혈당이 오르고 숨이 가빠지며 심장이 빨리 뛰게 되는데 서두르지 않으면 혼수, 사망에 이르게 된다.

비케톤성 고삼투압성 혼수는 혈당이 1000 ㎎/dl까지 올라가 심한 탈수와 몸 안의 대사 이상이 초래되어 나타나는 혼수로 사망에 까지 이를 수 있는 위중한 합병증이다.

만성 합병증으로는 당뇨병성 안질환, 당뇨병성 신장질환, 당뇨병성 신경병증이 있다.

당뇨병성 안질환에는 당뇨병성 망막증, 백내장, 안근장애, 녹내장 등이 있으며, 당뇨병 환자가 합병증으로 안질환을 앓는 비율은 5~10%라 한다. 신장의 합병증은 당뇨병 환자가 사망하는 원인 가운데 큰 부분을 차지하고 있다. 초기에는 신장의 비대, 사구체 여과율의 증가가 나타나고, 앓는 기간이 길어지면 신부전증으로 바뀌게 된다. 당뇨병 환자에게 신장합병증이 발생하는 것은 보통 당뇨병을 앓은 지 5~10년이 지난 후이다. 치료수단으로는 보존요법, 투석요법, 신장이식 등이 있고, 보존요법은 다시 식사요법과 약물요법이 있다. 당뇨병성 신경병증은 당뇨병으로 인한 신경장애를 말하며 이는 당뇨병 합병증 가운데 가장 많이 나타나는 만성 합병증이다(김영설, 1999; Stevens et al., 2001).

1.3 당뇨병의 종류

당뇨병은 발생되는 원인에 따라 인슐린의존성 당뇨(IDD, insulin-dependent diabetes)와 인슐린비의존성 당뇨(NIDDM, non-insulin-dependent diabetes mellitus)로 구분된다. 인슐린의존성 당뇨를 제 1형 당뇨라 하고, 인슐린비의존성 당뇨를 제 2형 당뇨라 한다(National Diabetes Data Group, 1979). 인슐린의존성 당뇨는 췌장 β세포의 파괴로 인한 인슐린의 절대적 결핍에 의해 발생하는 질환으로 인슐린을 투여하지 않을 경우, 당뇨병성 케톤산증으로 사망하므로 치료를 위해서는 인슐린을 반드시 투여해야 한다. 우리나라에서 발생하는 당뇨병의 90% 이상을 차지하는 제 2형 당뇨병은 인슐린 분비능과 인슐린 저항성의 조화가 깨져 나타나는 질병이다. 근육, 간 그리고 지방조직에서 인슐린 작용이 저하되어 인슐린 저항성이 나타날 때 췌장의 β세포가 인슐린 저항성을 극복할 수 있을 만큼 인슐린을 분비하여야 정상혈당을 유지할 수 있다. 반면에 인슐린 저항성을 극복할 수 있을 만큼 인슐린이 분비되지 않을 때 당뇨병이 유발된다. 서구인은 주로 비만을 동반하며 인슐린 저항성이 나타나는 초기에는 이를 극복할 수 있을 만큼 인슐린을 분비하여 고인슐린혈증을 유발하지만 당뇨병으로 진전되지는 않는다. 반면 한국인을 비롯한 동양인은 인슐린 저항성이 증가 할 때 서구인만큼 인슐린 분비를 향상시키지 못해 서구인에 비해 당뇨병으로의 진전이 빠르고 그 증세도 심하다. 그러므로 한국인의 제 2형 당뇨병을 치료함에 있어서는 인슐린 작용력을 향상시킴과 동시에 인슐린 분비능도 증가시키는 것이 중요하다(Brant et al., 2005; Stevens et al., 2001; Kadowaki et al., 2003).

dCollection @ dankook

현재 제 2형 당뇨병 치료제를 살펴보면 인슐린 분비능을 증가시키는 sulfonylure 계통의 약물이 있고, 인슐린의 작용력을 향상시키는 peroxisome proliferator activated receptor-γ (PPAR-γ) agonist인 pioglitazone과 rosiglitazone의 약물이 있으며 간에서 당 신생합성을 감소시키는 metformin 계통의 물질도 있고, 탄수화물의 소화흡수를 방해하여 식후 혈당의 상승을 방지하는 acarbose 계통의 약물도 있다(Fineman et al., 2003; Tosi et al., 2003; Oudjeriouat et al., 2003). 하지만 당뇨병 치료에 사용되고 있는 약물은 저혈당, 복통 등 여러 부작용을 수반하여 부작용 없는 천연물 유래 항당뇨제 개발이 필요한 실정이다(Kim et al., 2008; Braunwald et al., 2001; Kameswara et al., 1997; Prout, 1974).

1.4 한국인의 10대 사망률

우리나라 10대 사망원인은 암, 뇌혈관 질환, 심장 질환, 자살, 당뇨병, 운수 사고, 만성하기도 질환, 간 질환, 폐렴, 고혈압성 질환으로 총 사망자의 70.9%이다. 2010년 당뇨병은 사망률 순위 4위였으며, 이는 1999년에 비해 당뇨병이 6위에서 4위로 사망원인 순위가 상승하였다(Statistics Korea, 2010).

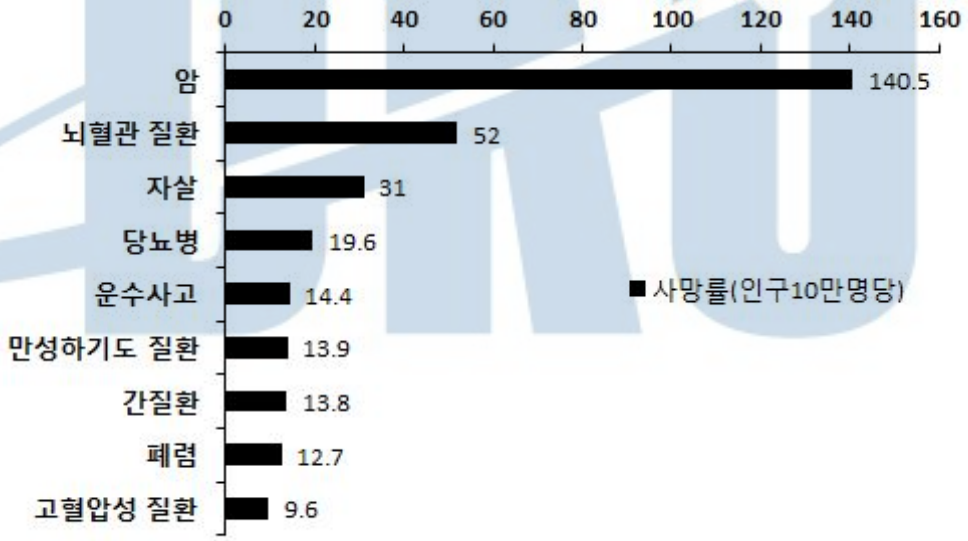


Figure 1. Rate of the cause of death(Statistics Korea, 2010).

dCollection @ dankook

1.5 혈당조절

혈당은 혈액 속에 함유된 유리 포도당을 의미하는 것으로 조직세포에 대해 에너지의 보급을 관장하는 중요한 물질이다. 생체는 생명유지를 위하여 내적 환경의 항상성을 유지하는데, 혈당 역시 간의 작용을 중심으로 한 각종 호르몬의 상호작용을 통하여 당의 소비와 공급의 균형을 맞추어 혈액 내에서 적절한 수준으로 유지된다. 혈당은 정상 동요범위가 비교적 좁은 편으로 70~110 ㎎/dl 정도이다. 정상적인 상태에서 혈당은 식후에 180 ㎎/dl를 넘는 일이 없고, 기아 때에도 60 ㎎/dl 이하로 떨어지는 일은 거의 없다. 새벽 공복 시의 혈당치가 140 ㎎/dl 이상의 경우를 고혈당증이라 하며, 200 ㎎/dl 이상의 혈당량을 나타내며 2시간 이상 고혈당이 지속될 경우 당뇨병으로 판명한다. 혈당 값은 당뇨병의 중요한 기준이다.

혈당조절은 조절 중추인 간뇌에서 혈당량에 변화가 생기면 이를 감지하고, 자율신경과 호르몬을 조절하여 이루어진다. 혈당은 인슐린, 글루카곤, 에피네프린, 당질코르티코이드, 부신피질자극호르몬, 갑상선 호르몬 등 각종 호르몬의 상호작용과 간에서의 포도당 공급량과 말초조직에서의 포도당 이용량의 균형을 통하여 조절된다. 체내의 혈당량이 높아지면 이자의 랑게르한스섬 β세포에서 합성된 인슐린에 의하여 포도당이 물과 이산화탄소로 산화되거나, 글리코겐으로 전환되어 간과 근육에 저장된다. 저혈당의 경우, 랑게르한스섬 α세포에서 간과 근육에 저장된 글리코겐을 포도당으로 전환시키는 글루카곤을 분비한다. 또한 당질코르티코이드에 의하여 단백질과 지방이 포도당으로 전환되며 혈당이 상승된다(Doopedia).

1.6 α-glucosidase

α-glucosidase는 탄수화물의 소화 과정 중 마지막 단계를 촉매 하여 포도당으로 전환시키는 효소이므로 α-glucosidase저해제는 다당류에서 단당류로 분해되는 과정을 저해하여 당의 흡수를 지연시켜 혈당을 조절하는데 도움을 준다(Choi et al., 2008a; Andrade et al., 2000).

α-glucosidase 저해제의 작용기전은 인슐린을 분비 하지 않고 소장에서 당의 흡수를 저해해 기존 약물들이 가지고 있는 저혈당, 간독성, 베타세포 기능 저하 등의 부작용을 최소화 할 수 있다(Heo et al., 2009; Choi et al., 2008b; Gao et al., 2008). STOP-NIDDM연구(Chiasson et al., 2002)에서 사용되고 있는 α-glucosidase억제제인 acarbose는 소장에서 포도당의 흡수를 억제(Kim, 2008; Bischoff, 1994)함으로써 항당뇨에 효과적이라고 알려져 있으나, 복부팽만, 복통, 구토, 설사 등의 부작용이 알려졌다. 시중에 나온 약들의 부작용이 알려지면서 사람들이 뽕잎(Hwang et al., 2008), 곶감, 생감, 감잎(Hong et al.,2008), 더덕(Kim et al., 2009b)등과 같이 식품에서 α-glucosidase를 저해할 수 있는 소재를 찾고 있다. 하지만 해양식물에 대한 연구는 육상식물에 비해 미흡한 실정이고, 지금까지 알려진 해조류

dCollection @ dankook

유래의 α-glucosidase저해제는 패(Heo et al., 2009), 곰피(Iwaki, 2008), 감태(Kim, 2008), 파래(Li et al., 2005)정도만 보고되고 있을 뿐 다양하고 풍부한 자원에 비해 해조류에 대한 연구는 미흡하다.

1.7 α-amylase

효소 저해 물질은 복잡한 생리기능에 있어 효소의 역할 및 질병에 관여하는 효소의 해명에 중요한 역할을 해왔고, 이는 특정 효소의 기능을 억제하여 질병을 치료하는 물질이기도 하다(Moon et al., 1998). α-amylase는 전분이나 다른 탄수화물의 α-D-1,4-glucan결합을 분해하는 효소로 식품의 탄수화물은 α-amylase에 의해 체내에 흡수되기 쉬운 형태의 당으로 분해되어 생명유지를 위한 에너지원으로 이용되기 때문에 사람, 동물, 미생물 등의 탄수화물 대사 작용에 필수적인 효소이다(Lee et al., 2004). 그러나 종종 이러한 전분분해효소의 과잉반응은 당의 급격한 생성으로 당뇨등의 질병을 유발하기도 한다. 그렇기 때문에 이러한 질병 예방을 위해 α-amylase같은 전분분해 효소의 활성을 조절할 필요가 있는 것이다. 이러한 α-amylase저해제는 탄수화물의 분해를 억제해 당의 흡수를 억제하여 식후 혈당 상승을 완만하게 하는 장점이 있다(Markwick et al., 1996; Rekha et al., 2003). 현재 시판중인 acarbose는 방선균인 *Actinoplanes* sp.의 발효에 의해 생산되는데, 이는 췌장과 침샘의 α-amylase와 소장의 brush border에 존재하는 α-glucosidase의 활성을 저해하여 탄수화물 소화 및 흡수를 지연시키는데 도움을 준다. 그러나 acarbose는 뛰어난 효능에도 불구하고, 복부팽만감, 설사, 복병 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 문제가 되고 있다(Choi et al.,2008b). 따라서 최근 부작용이 적은 천연 식물로부터 α-amylase저해제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있고, 제비꽃(Lee et al., 2008), 사방오리나무(Choi et al., 2008a), 밀(Granum, 1978), 두류(Mulicani and Rudrappa, 1994) 등의 육상식물에서 유래한 물질이 주를 이루고 있다. 반면 해양식물에 대한 효소저해제 연구는 육상식물에 비해 미흡한 실정이다. 지금까지 알려진 해조류 유래의 α-amylase저해제는 패(Heo et al., 2009), 감태(Lee et al., 2009c), 지충이(Lee et al., 2010) 정도만 보고되고 있을 뿐 다양하고 풍부한 자원에 비해 연구는 미흡한 실정이다.

1.8 소장에서의 포도당 흡수

소장에서의 포도당 흡수과정은 Figure 2와 같은데, 포도당을 세포막으로 통과시켜 세포내로 이입시키는 단백질은 두 종류가 있다. 그중 하나는 세포 내외의 포도당 농도차이를 통해

dCollection @ dankook

촉진 확산형 수송체이며 다른 하나는 Na^+수송과 공역하는 능동수송형 수송체가 있다. GLUT2(Glucose transporter 2)는 포도당 농도차이를 통해 촉진 확산하는 수송체이고, SGLT1(Sodium -glucose transport protein)이 능동수송형 수송체이다(Youm et al., 1998: Thorens et al., 1990). 처음 장에서 ephitherial cell로 포도당을 흡수 할 때는 세포 바깥쪽 즉 장을 포함한 소화관에서의 포도당 농도는 세포 안에 비해 낮기 때문에 Na^+의 에너지를 이용하여 운반하는 운반체에 의해 세포내로 이동하는데 이 단백질을 SGLT1이라 한다. 그 후 포도당을 몸 전체로 이동시켜 필요한 세포로 전달하기 위해 포도당을 혈관으로 이동시킬 때 세포 안은 높은 농도의 포도당이 존재하여 운반체만 있으면 확산이 가능하다. 이때 운반체가 GLUT2인데, GLUT2는 혈관 쪽으로 향한 부분에만 분포하여 소화관 쪽으로 역류를 막고 혈관 쪽으로 포도당이 이동되게 한다.

포유동물에서 가장 중요한 영양소 중 하나인 포도당을 세포 외부에서 세포 내로 이동시키는, 세포 원형질막에 존재하는 포도당 운반체(glucose transporter, GLUT4)는 7종류가 있다. 그 중 GLUT1~GLUT4가 현재까지 가장 많이 알려져 있다. GLUT1은 주로 대부분의 조직 세포에서 발현되고(Hruz and Mueckler, 2001), GLUT2는 장, 췌장, 간에서 포도당의 이동을 매개하고, GLUT3은 뇌와 신장에서 발현되고, 인슐린에 의해 자극된 포도당 흡수를 주관하는 곳은 GLUT4로 주로 근육과 지방조직에 분포한다(Bell et al., 1990: Wikipedia, 2011).

이번 연구에서 사용된 GLUT2는 혈중 포도당 농도가 매우 높은 경우 활성화 된다. GLUT2가 췌장에서는 고혈당에 반응하여 인슐린 분비를 촉진하고, 간에서는 고혈당시 포도당이 간으로 유입되어 글리코겐을 합성하는데 도움을 준다(Hogan et al., 1991). 또한 GLUT2는 소장 내에서 혈액으로 당을 이동시키는데 필요한 수송체로 발현양이 많을수록 소장에서 혈액으로 포도당 이동이 많다는 것을 의미한다.

SGLT1은 소장이나 신장의 상피세포에 있는 포도당 수송체로 cotransporter인 Na^+의 작용에 의해 포도당이 이동하게 된다. SGLT1이 포도당을 빠르게 이동시킬 때 농도에 의존적이다. 즉 고혈당일수록 더 빠르게 포도당을 이동시킨다(Park et al., 2004). Chang 등(Chang et al., 2007)에 의하면 SGLT1은 소장의 미세 융모를 통해 제일 먼저 포도당을 이동시키는 운반단백질이다. SGLT1 유전자의 발현양이 많을수록 소장 내로 포도당이 많이 들어온다는 것으로 즉 흡수도가 높다는 것을 의미한다. SGLT1은 소장 내 가장 함량이 높은 포도당 운반체로서 상피세포의 BBMV(brush border membrane vesicle)에 존재하기 때문에 포도당 과다흡수에 의한 비만과 당뇨의 예방용 소재개발에 있어 주목을 받아온 포도당 운반체이다(Bell et al., 1990).

dCollection @ dankook

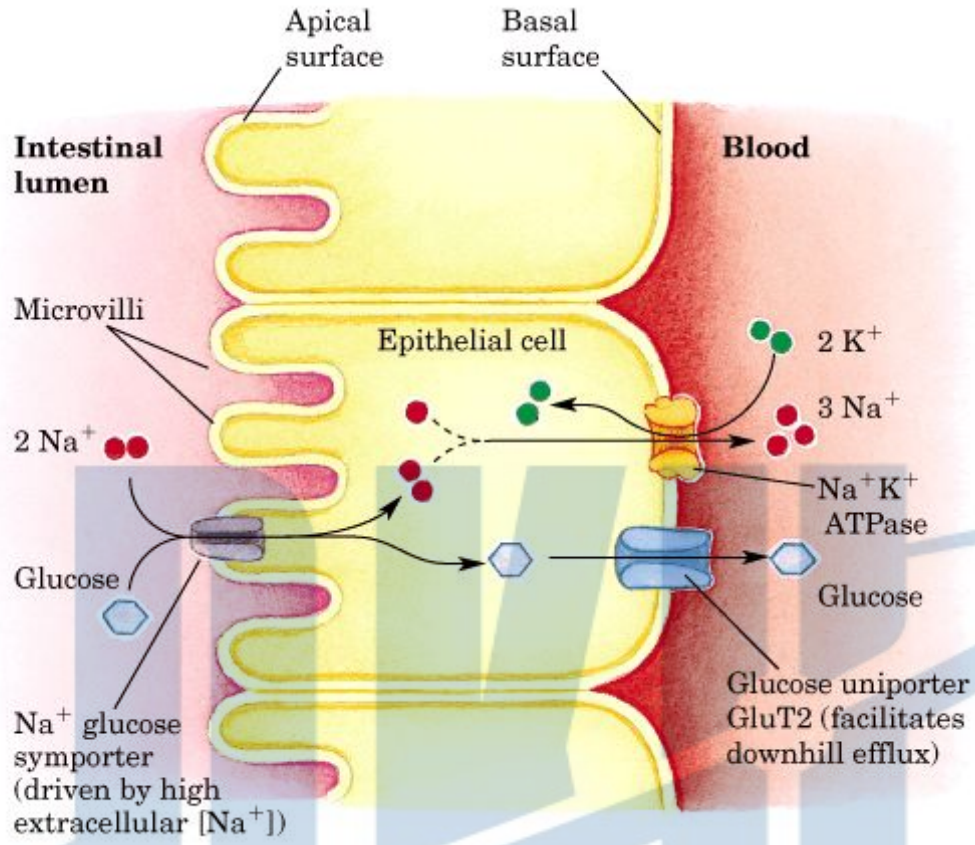


Figure 2. The operation of SGLT1 and GLUT2 on epithelial cell

1.9 대사과정 관련 Glucokinase와 Pyruvate kinase

Hexokinase는 육탄당의 인산화를 담당하는 효소로, 모든 기관, 골격근, 심장근, 뇌에 존재하는 효소이고, glucokinase는 hexokinase의 이성화 효소로 조직 특이적인 전사 조절부위(promoter)의 조절을 받아 단지 간과 췌장에만 존재한다. Hexokinase와 Glucokinase는 차이가 있는데, 포도당에 대한 낮은 친화성(Km 15-20mM)을 가지고, 그 대사산물인 glucose-6-phosphate에 의한 억제작용이 없어(Kim, 2001) 혈당조절에 중요한 역할을 해 hexokinase 보다는 glucokinase를 연구에 이용한다.

Glucokinase는 대사과정에 필요한 포도당 인산화 효소로 glucose를 glucose-6-phosphate로 인산화시켜 glycogen을 합성시킴으로써 간에서의 포도당 합성에 관계하는 것으로 췌장 β세포에서 작용한다(Sharma et al, 1963; Kim and Kim, 2001). 또한, 췌장의 glucokinase는 혈

dCollection @ dankook

당에 의해 효소활성이 변화하고, 간의 glucokinase는 인슐린에 의해 활성도가 좌우된다(Kim and Kim, 2001; Bedoya et al., 1986a). 간세포에서는 인슐린이 발현을 강력히 자극하고, β세포에서는 포도당이 중요한 조절 인자이다. 즉, 혈중 인슐린의 증가는 간세포의 glucokinase를 자극하여 포도당 이용이 간세포에서 증가하게 되어 혈중 포도당 농도가 감소하게 되고, 반면 혈중 포도당의 상승은 β세포의 glucokinase를 자극하여 포도당의 대사가 증가하고 따라서 인슐린의 분비가 증가하여 혈중 내 포도당 농도가 감소하게 된다. 그런데 인슐린을 자극하면 바로 glucokinase가 활성화 되는 것이 아니고 먼저 유전자 수준에서 mRNA의 발현이 증가되고 그 후 단백 합성이 증가되어 최종적으로 포도당 이용이 촉진된다(Bedoya et al., 1986a). Glucokinase는 당대사와 인슐린 분비조절인자로 알려져 있다(Bedoua et al., 1986b; Kim et al., 2005; Iynedjian et al., 2008). 즉 세포내로 흡수된 당의 이용 속도를 증가시키기 위해서는 간에서 포도당대사에 관여하는 glucokinase활성을 증가시켜야 한다.

Pyruvate kinase는 EC 2. 7. 1. 40. 정식으로는 ATP: 피루브산-2-*O*-인산전이효소이다. 해당계(解糖界)에 있어 제 2의 ATP생산반응을 촉매하는 효소로 phosphenolpyruvate(PEP)와 ADP로부터 pyruvic acid와 ATP를 생성한다(Lee et al., 2009c). 즉 pyruvate kinase는 ATP생산을 위해 필요한 당분해 경로에 있는 효소로 간 세포내 ATP가 감소하게 되면 pyruvate kinase는 증가하게 되고 그로 인해 간에서 포도당 생산이 감소하게 된다.

$$PEP + Mg\text{-}ADP \xrightarrow{K^+/Mg^{2+}} Pyruvate + Mg\text{-}ATP$$

Pyruvate kinase의 결핍은 해당과정을 늦추게 된다. 해당과정 중 ATP가 많이 발생하게 되면 ATP가 Fructose-6-phosphatase로 feedback과정을 가지게 되는데, 이때 ATP가 phosphofructokinase(PFK)의 작용을 억제시켜 결과적으로 pyruvate kinase의 작용이 억제된다(Albert, 1982)(Figure 3).

dCollection @ dankook

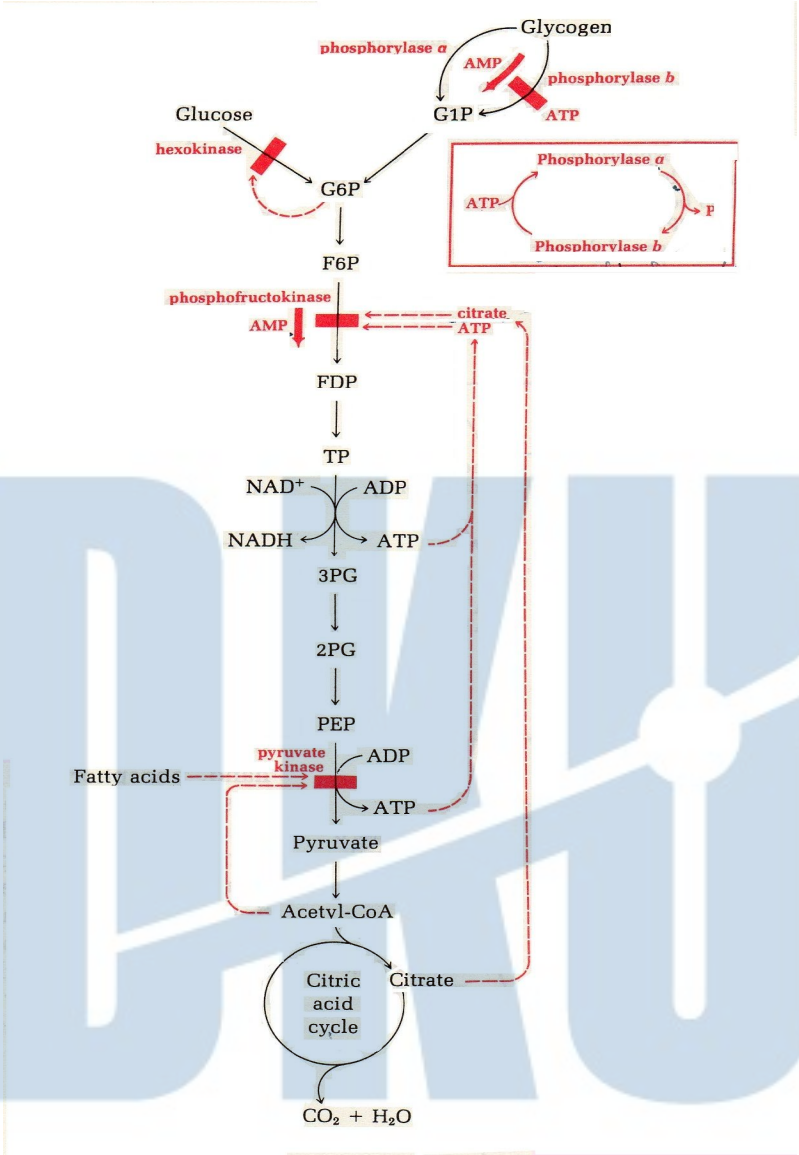


Figure 3. ATP feedback inhibition of pyruvate in the glycolysis cycle

Regulation of the entry and use of glucose residues in glycolysis. Regulatory inhibition is shown by dashed feedback arrows leading to bars across the reaction arrows.

G1P: Glucose 1-phosphate, G6P: Glucose 6-phosphate, F6P: Frcutose 6-phosphate, FDP: Fructose 1,6-diphosphate, TP: Triose phosphates, 3PG: 3-phosphoglycerate, 2PG: 2-phosphoglycerate, PEP: Phosphoenol pyruvate(Albert, 1982).

dCollection @ dankook

2. 해조류

2.1 해조류

지구 표면의 70%를 차지하는 해양에는 지구상의 모든 생물종의 약 80% 이상의 많은 해양생물이 서식하고 있으며 그 종류도 다양하다. 해양 생물은 높은 염 농도와 수압 등 특이한 환경에 적응하며 살아가 육상 생물과는 다른 대사계 또는 생체 방어계를 지녀 육상 생물과는 다른 구조와 생리활성을 가지리라 기대된다(Lee et al., 1999; Scheuer, 1990; 김영섭, 정현도, 1996).

해조류란 바다에서 생산되는 조류식물의 총칭으로 많은 종류가 있으나 생태 및 색소 특성에 따라, 조간대나 옅은 수심에서 서식하면서 녹색을 띄는 녹조류(green algae), 중간 수심대에 자라면서 갈색을 띄는 갈조류(brown algae), 비교적 깊은 수심에서 자라면서 홍색을 띄는 홍조류(red algae) 등으로 구분한다.

해조류는 예로부터 아시아 지역에서 널리 섭취해 왔는데, 영양학적으로 열량은 매우 낮으며, 비타민, 무기질, 식이섬유소가 풍부하며, 육지 식물에는 없는 비소화성 점질성 다당류를 다량 함유하고 있다(Lee et al, 2006). 해조류는 채소류와 비교해서 필수 아미노산과 불포화지방산이 많으며(Jimenez et al., 1999), 어떤 특정 성분에서는 항산화, 항바이러스, 항암활성, 동맥경화, 향균 등의 질병에 효과적이라는 보고들을 통해 다양한 분야에서 이용될 수 있다(Nagayama et al., 2002).

최근 천연물로부터 약리작용이 있는 물질을 찾으려는 관심이 높아지면서 해조류의 생리활성에 관한 연구 뿐 아니라 유효 활성성분을 추출, 개발하여 이용하고자 하는 노력이 증대되고 있다(Kwak et al., 2005; Ruperez et al., 2002). 해조류를 이용한 항당뇨관련 연구는 Lee 등(Lee et al., 1996)의 다시마, 미역, 한천, 김파래 등을 섭취한 당뇨 유발 쥐에 관한연구, 패(Heo et al, 2009), 곰피(Iwai, 2008), 감태(Kim, 2008; Lee et al., 2009c), 지충이(Lee et al., 2010), 파래(Li et al., 2005) 정도만 보고되어 있다.

2.2 패(*Ishige okamurai*)와 넓패(*Ishige foliacea*)

패과(*Ishigea ceae*)식물은 갈조식물문(phacophyta), 민가지말목(chordariales)에 속하는 갈조식물로서 대표적인 종으로는 패와 넓패가 있다.

패(*Ishige okamurai*)는 디크티오시폰목(dictyosiphonales) 넓적미역쇠과(unctariaeceae)로 크기는 5~10 cm, 폭 3 mm정도이고, 남부 해안 각지, 제주도(각 지역 연안), 일본에까지 분포하

dCollection @ dankook

며, 형태학적 특징으로는 딱딱한 나뭇가지처럼 보이고, 색은 암갈색이며 건조하면 흑색으로 된다. 몸의 구조는 외층은 몸의 표면에 직각하고 열을 지은 소세포로 되어있고, 내층은 엉켜진 사상세포로 되어있다. 뿌리는 작은 반상근이고, 짧은 줄기를 가지고 있으며 복차상으로 분기한다. 상부는 가는 원주상이고 모가 나고 총 평원이며 세로는 주름이 있다. 조간대 중부의 바위위에 군락을 이루며 서식한다.

넓패(*Ishige foliacea*)는 식용가능하며, 남부 해안 각지, 제주도, 중국, 일본에 분포하며, 형태학적 특징으로는 엽상이고, 흑갈색이다. 뿌리는 작은 반상이며 짧은 원주상의 줄기를 가지고 상부는 넓은 사상 또는 대상이며 차상 분기한다. 때로는 가지 끝부분의 조직 속에 공기를 갖기 때문에 기포처럼 팽대해지기도 한다. 기포처럼 팽대한 부분은 황갈색이며 건조하면 흑색으로 된다. 주로 파도가 조용한 곳의 조간대 중부 바위 위에 군락을 이루면서 서식하고 있다(한국동식물도감; 김기옥 등, 2007).

dCollection @ dankook

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험 재료

제주산 넓패(*Ishige foliacea*), 큰잎모자반(*Sargassum ringgoldianum*), 꽈배기모자반(*Sargassum tortile*), 지충이(*Sargassum thunbergii*), 패(*Ishige okamurai*)는 아쿠아그린텍(주)에서 동결건조 된 원물을 구매하였다.

α-glucosidase, α-amylase, Acarbose는 (주)SIGMA에서 구매하였고, DMEM(Dulbeco"s Modified Eagle"s Medium), DPBS(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), Trypsin EDTA, FBS(Fetal Bovine Serum)는 (주)WELGENE, PVDF membrane은 Bio-Rad, OligodT, M-MLV, Trizol은 (주)Invitorogen에서 구매하였다. 그리고 glucokinase, pyruvate kinase, GLUT2, SGLT1 프라이머는 (주)코스모진텍에서 구매하였다. 또한 glucokinase 항체는 SANTA Cruze, pyruvate kinase는 Cell Signaling, GLUT2는 MILLIPORE, SGLT1항체는 Cell signaling에서 구매하였다.

2. 세포주 배양(cell culture)

인간 소장세포 Caco-2(human adenocarcinoma)와 인간 간세포 HepG2(human hepatocellular carcinoma)는 Korea Cell Line Bank(KCLB. Seoul)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. Caco-2와 HepG2세포는 불활성화 시킨 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% PEST(penicillin streptomycin)을 함유한 DMEM(Dulbeco"s Modified Eagle"s Medium) 배지에 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

3. 시료의 추출

동결건조 된 샘플 10 g에 80%(v/v) 주정 200 ml를 넣고 30℃에서 24시간 동안 shaking bath를 이용하여 추출하였다. 이를 감압여과 한 후, dry oven 60℃에서 건조 시킨 다음 동결건조 하여 시료로 사용하였다.

dCollection @ dankook

4. 일반성분 분석

일반성분 분석은 AOAC법(AOAC Intenational)(AOAC, 1995)을 사용하였으며, 수분함량은 105℃ dry oven에서 상압가열건조법으로 측정하였으며, 조단백질 함량은 micro-Kjeldahl법, 조지방 함량은 Soxhlet 추출법, 조회분 함량은 550℃ 회화로에서 직접 회화법으로 측정하였다. 탄수화물 함량은 전체 100%에서 수분, 조단백질, 조지방, 및 조회분 함량을 제외한 나머지 부분으로 계산하였다.

5. α-glucosidase 저해 활성 측정

α-glucosidase 저해 활성은 Kim 등(Kim et al., 2010a)의 방법을 변형하여 실험하였다. 0.1M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 50 μl에 sample 50 μl와 α-glucosidase(0.3 U/μl) 50 μl씩 넣은 후 37℃에서 15분간 반응시켰다. 그 후에 2 mM pNPG(p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside) 200 μl를 넣고 37℃에서 10분간 반응 시켰다. 10분 후 0.1 M Na_2CO_3 1.5 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Inhibition rate (%)={1-(A-B)/C}×100 ·····식 (1)

A= 시험군 흡광도 값
B= blank 흡광도 값(기질을 넣지 않은 것)
C= 대조군(샘플 넣지 않은 것)

6. α-amylase 저해 활성 측정

α-amylase 저해 활성은 Starch-iodine 방법을 이용하여 실험 하였다. 샘플 50 μl에 buffer 340 μl와 α-amylase 10 μl를 넣고 섞어 37℃에서 10분간 반응시켰다. 10분 후 전분용액 100 μl를 넣고 섞은 다음 37℃에서 한 시간 동안 반응시켰다. 한 시간 반응 후 1% iodine solution 0.1 ml를 넣고, 증류수 5 ml를 넣어 섞은 후 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

dCollection @ dankook

Inhibition rate (%)= (A-C)×100/(B-C) ·····식 (2)

A= 시험군 흡광도 값
B= blank 흡광도 값(α-amylase 넣지 않은 것)
C= 대조군 (전분용액 넣지 않은 것)

7. WST-1 Assay

WST-1은 세포 증식능력이나 세포 생존 능력을 정량하기 위한 것으로 세포 내의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 Tetrazolium salts에서 formazan이라는 발색물질이 생성되는 것을 측정하는 것이다(Tominaga et al., 1999)(Figure 4). 소재들의 항당뇨 효능을 나타내는 기전에 관한 연구를 수행하기 전 시료의 독성이 없는 농도결정을 위해 WST-1을 이용하였다.

세포 독성은 WST-1 (2- (4- iodophenyl) -3- (4-nitrophenyl) -5- (2,4- disulfophenyl)- 2H -tetrazolium monosodium salt))환원 방법을 이용하여 측정하였다.

배양된 세포를 cell counting하여 $0.1\times10^4 cell/ml$로 한 다음 96 well plate에 준비된 세포를 100 μl씩 첨가 한 후 48시간 배양시킨 후 배지를 제거 하고, FBS가 들어있지 않은 배지를 100 μl씩 넣어 16시간 이상 배양시켰다. 16시간이 지난 후 샘플을 농도별로 처리하여 12시간 배양시켰다. 12시간이 되기 4시간 전에 WST시약을 10 μl넣고. 샘플 처리 시간이 되면 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 생존율(%)=(시료처리군의 흡광도/대조군의 흡광도)×100

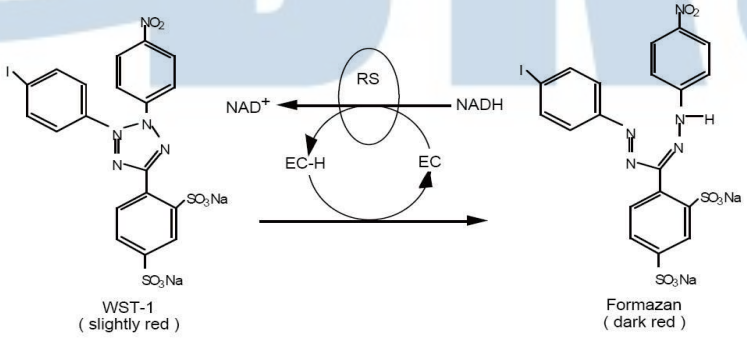


Figure 4 Principle of WST-1

(EC=electron coupling reagent, RS=mitochondrial, succinate-tetrazolium-reductase system)

dCollection @ dankook

8. Caco-2 세포 투과 실험

Figure 5에서는 Transwell의 측면도를 나타내었다. Caco-2 세포막의 상부는 소장관 세포의 장관측(apical side, AP) 특징을 띄게 되고, polycarbonate membrane에 접한 쪽은 소장관 세포의 혈관측(basal side, BL) 특징을 갖게 된다(Hidalgo et al., 1989; Seo et al., 2010). 그러므로 소장관에서 혈액으로의 흡수를 보려면 샘플을 AP쪽에 넣고 BL쪽에서 샘플을 채취하여 정량한다.

Caco-2 세포를 collagen으로 코팅된 Transwell에 seeding하였다. Culture flask 중의 complete media를 제거한 뒤 10 ml의 DPBS를 가하고 2분 방치한 후 DPBS를 제거하고 trypsin-EDTA용액 3 ml를 가한 뒤 곧 제거하고 CO_2 incubator 안에서 5분간 방치하였다. 10 ml의 배양액을 이용하여 flask 내면에 부착된 세포를 씻어내고, 세포의 밀도를 $0.5x10^6$ cell/well정도로 현탁 시킨 후 각 well의 polycarbonate membrane위에 600 μl씩 가하여 seeding하였다. Transwell 아래쪽에도 1 ml의 배양액을 가하여 배양하였다. 그 후 전기저항을 통해 세포 자란 것을 확인 한 후 샘플처리하고 50 μM 2NBDG (2-(N- (7- nitrobenz-2-oxa-1,3- diazol- 4-yl)amino)- 2- deoxyglucose) 5 μl 넣었다. 2NBDG는 포도당에서 산소 하나가 없는 deoxyglucose에 형광성의 NBD를 결합한 합성체로서 체내에서 분해되지 않는 형광성의 포도당 유사체이다. 따라서 소장세포에서 포도당이 흡수되는 정도를 형광도로 측정 할 수 있다(Brant et al., 2005). 샘플처리 6시간 후 채취하여 정량하였다.

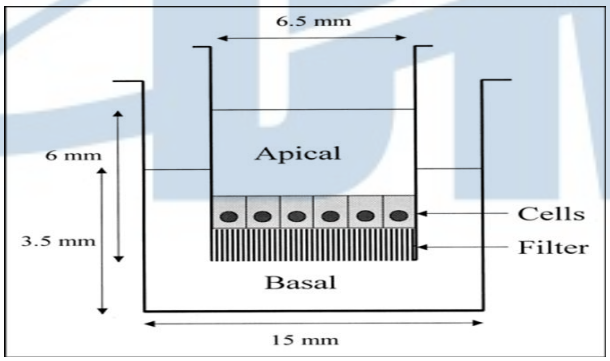


Figure 5. Side view of Caco-2 cell on membrane of Transwell

dCollection @ dankook

9. RT-PCR (reverse-transcriptase polymerase chain reaction)

세포 부유액을 60πdish에 분주 한 후 세포가 배양접시의 80% 이상 자라면 배지를 제거하고 새 배지로 교체한 후 각각의 해조류 추출물을 처리하였다. 해조류 추출물 처리 4시간 후 배지를 제거하고, 차가운 DPBS로 세척 한 다음 10 μl 2-Mercaptoethanol 과 1 ml RLT buffer 혼합액을 각 배양접시마다 350 μl씩 처리하여 scraper를 이용하여 세포를 수확하였다. RNA추출은 Access Quick RT-PCR system (주)PROMEGA를 사용하였다. 세포를 QIA shreder에 옮긴 후 2분간 max speed로 원심분리 한 후 위의 column을 제거하고 밑의 collection튜브에 차가운 70%에탄올 350 μl를 첨가하고 up & down시켰다. 그 후 700 μl의 sample을 따서 RNA easy mini spin column을 넣고 max speed로 20초간 원심분리 돌렸다. collection tube를 제거하고 새로운 tube를 꽂은 후 RNA-free water 50 μl를 넣고 1분 동안 원심분리하였다. 이를 spectrophotometer를 이용해 정량 분석 하였다. 정량 분석 후 2 ㎍의 RNA를 주형으로 사용하였다. 이에 master mix 10μl에 각각의 primer 2 μl를 넣고 총 20 μl volume으로 맞춰 (Promega corporation-2800 Woods Hollow Road Madison, USA) PCR(Applied Biosystem, GeneAmp, PCR system 2700)을 돌렸다. PCR생산물은 1% 한천 겔 전기영동으로 확인하였다. 실험에 사용된 primer는 Table 1과 같다.

Table 1. Sequence and RT-PCR program of protein

Protein	Primer	Sequence	Cycle	
GAPDH	Forward	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	95℃ 1min 55℃ 1min 72℃ 90sec	35
	Reverse	AGCCTTCTCCATCCTGGTGAAGAC		
SGLT1	Forward	GATTTACACGGACACCTTGC	95℃ 1min 55℃ 1min 72℃ 90sec	35
	Reverse	GAGCTCCACCACTAAGGTTG		
GLUT2	Forward	GAGCACTTGGCACTTTTCATC	95℃ 1min 55℃ 1min 72℃ 90sec	35
	Reverse	AGGAATACAGAGACAGCAGTG		

10. Western blot

세포 부유액을 60 π dish에 분주 한 후 세포가 배양접시의 80% 이상 자라면 배지를 제거한 후 새 배지를 교체하고 해조류 추출물을 4시간 동안 처리하였다. 4시간 후 Triton X-100

dCollection @ dankook

완충액(50 mM HEPES, 150mM Nacl, 1mM Na_3VO_4, 1% Triton X-100, 10% glycerol)으로 분해한 다음 4℃ 13000 rpm에서 20분간 원심분리를 통해 상층액을 얻었다. 각 해조류 추출물을 처리한 세포 용해액은 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 하여 Bradford assy를 통해 단백질을 정량하였다. 동일한 양의 총 단백질을 포함하는 일정량의 세포 용해액 내의 단백질들을 SDS-PAGE (polyacrlamide gel electrophoresis)에 의해 분리 시켰다. 분리된 단백질을 PVDF(polyvinylidene fluoride) 막으로 이동시켜 고정시키고, 분석하고자 하는 표적 단백질에 해당하는 1차 항체를 24시간 동안 반응시켰다.

Glucokinase (SANTA Cruze, CA, USA)는 원액 1:200 비율로 희석하여 반응시켰고, GLUT2 (MILLIPORE, Billerica, MA, USA)는 원액 1:500 비율로 희석하여 반응시켰다. 그 외 pyruvate kinase, SGLT1 (Cell signaling, Danvers, MA, USA)는 원액 1:1000비율로 희석하여 반응시켰다. 2차 항체는 HRP conjugated goat anti rabbit항체(Millipore, Billerica, MA, USA)를 1:250비율로 희석하여 사용하였다. 2차 항체 반응 후 화학발광 검출법을 통해 X-ray film에 현상하여 western blot 결과를 확보하였다(Seo et al., 2010; Cho et al., 2010).

11. 통계처리

모든 실험결과는 SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 사용하여 one-way ANOVA를 실시하였고 $P<0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

dCollection @ dankook

Ⅳ. 결과 및 고찰

1. 해조류의 일반성분

해조류의 일반 성분 중 탄수화물의 함량이 가장 높았다. 큰잎모자반은 49.27% 과배기모자반은 58.13%, 패는 72.16%, 지충이는 56.93%, 넓패는 69.61%의 탄수화물을 함유하고 있었으며, 탄수화물 다음으로는 회분, 단백질 순이었다(Table 2).

Table 2. The general composition of various seaweeds

(Unit : %)

Sample	Moisture	Crude ash	Crude protein	Crude fat	Carbohydrate * *
Sargassum ringgoldianum	12.29±0.02	15.75±0.05 (17.96) *	14.66±0.65 (16.71)	0.53±0.01 (0.60)	43.22 (49.27)
Sargassum tortile	15.63±0.07	22.54±0.14 (26.72)	12.32±0.11 (14.61)	0.46±0.15 (0.54)	49.05 (58.13)
Sargassum thunbergii	9.32±0.01	26.40±0.03 (29.11)	12.58±1.16 (13.87)	0.08±0.03 (0.09)	51.63 (56.93)
Ishige okamurai	11.67±0.23	11.57±0.00 (13.09)	12.40±1.22 (14.04)	0.63±0.04 (0.71)	63.73 (72.16)
Ishige foliacea	8.78±0.36	14.20±0.03 (15.57)	13.01±0.04 (14.26)	0.51±0.03 (0.56)	63.50 (69.61)

* Dry weight basis.

* * Carbohydrate content was calculated by subtracting sum of moisture, crude fat, crude ash and crude protein contents from total percentage(100%).

dCollection @ dankook

2. 수율(Yield)

큰잎모자반, 꽈배기모자반, 지충이의 동결건조 후 건조 수율은 25%를 넘었으나 패는 13.68%, 넓패는 9.42%에 그쳤다(Table 3).

Table 3. Yields of 80% ethanol extracts of seaweed

Sample	Yield (%)
Sargassum ringgoldianum	**27.23**
Sargassum tortile	**27.12**
Sargassum thunbergii	**25.64**
Ishige okamurai	**13.68**
Ishige foliacea	**9.42**

dCollection @ dankook

3. α-glucosidase 저해 활성

α-glucosidase 저해제들은 혈당강하제 중 소화관에서 포도당 흡수를 지연시키는 약물로 당뇨치료에 주로 사용되고 있는데, 시중에 판매되고 있는 acarbose와 voglibose 는 저혈당, 복통, 설사 등의 부작용(Andrade et al., 2000; Choi et al., 2008b)이 많아 천연 소재에서 이들 저해제들을 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행 중이다. 해조류추출물 중 활성이 있는 것을 탐색하고, 그중 효과가 있는 것을 선발해 농도별로 α-glucosidase저해 활성을 살펴보았다.

먼저 해조류를 screening하기 위해 α-glucosidase저해실험을 1 ㎎/㎖에서 실시하였다 (Table 4). 꽈배기모자반 추출물과 지충이 추출물에서는 α-glucosidase저해 활성이 나타나지 않았으나, 큰잎모자반 추출물은 60.8%, 패 추출물은 86.9%, 넓패 추출물에서는 90%정도 α-glucosidase를 저해하였다.

Kim 등(Kim et al., 2009c)은 메밀을 가지고 α-glucosidase활성 억제 실험을 하였는데, 이때 70%에탄올 추출물과 메탄올에서는 농도 의존적으로 저해 활성이 높아지는 경향을 보였다.

김 등(김기옥 등, 2007)에 의하면 넓패 에탄올추출물에서의 IC_{50}값은 0.1103 ㎍/ml이었고, 패 IC_{50}값은 0.8117 ㎍/ml이었다. 즉 넓패는 0.1103 ㎍/ml, 패는 0.8117 ㎍/ml농도에서도 50%의 α-glucosidase활성을 저해하는 것으로 나타나 본 연구보다 높은 저해활성을 보였다. 5 ㎍/ml과 10 ㎍/ml농도 처리군에서는 α-glucosidase저해 활성을 보이지 않았으나, 넓패 추출물 50 ㎍/ml농도 처리군에서부터 농도 의존적으로 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였고, 이들은 각 농도별로 유의적인 차이가 있었으며, 넓패 추출물 200 ㎍/ml처리군에서 95.2%로 가장 높은 α-glucosidase저해 활성을 보였다 (Table 5).

패 추출물은 농도 의존적으로 50 ㎍/ml에서 15.6%, 100 ㎍/ml에서 77.44%, 200 ㎍/ml에서 98.1%의 α-glucosidase저해 활성을 보였으며, 각각의 농도별로 유의적인 차이를 보였다. 패 추출물 200 ㎍/ml농도에서는 표준물질인 acarbose와 비교했을 때 유의적인 차이가 나지 않았다(Table 6).

Kim(Kim, 2008)의 연구에서는 감태(*Ecklonia cava*)를 가지고 α-glucosidase저해 활성을 보았는데, 감태 물 추출물 (0.25 brix)에서 98%의 억제활성을 보였다. 즉 2500 ㎍/㎖농도에서 98%의 활성을 보였는데, 본 연구의 넓패와 패 추출물의 200 ㎍/㎖농도에서 각각 95.24, 98.1%의 α-glucosidase저해활성을 보였다. 즉 Kim(Kim, 2008)의 연구에서와 같이 감태 물 추출물보다 본 연구에서 사용한 패와 넓패 80%주정추출물의 α-glucosidase 저해활성이 더 높았다.

dCollection @ dankook

Table 4. α-glucosidase inhibition rate of 80% ethanol extracts of seaweed

Sample	Inhibition rate (%)
Acarbose 1㎍/ml	99.23
Sargassum ringgoldianum	60.8 ± 1.77
Sargassum tortile	ND[1)]
Sargassum thunbergii	ND
Ishige okamurai	86.9 ± 0.55
Ishige foliacea	90.0 ± 0.29

ND[1)]= Not detected.

Collection @ dankook

Table 5. α-glucosidase inhibition rate of 80% ethanol extract of *Ishige foliacea*

Sample	Concentration (μg/ml)	α-glucosidase inhibition rate (%)
Acarbose	1	99.83[a]
Ishige foliacea	5	ND[1)]
	10	ND
	50	12.82[d] ± 3.13
	100	71.86[c] ± 1.01
	200	95.24[b] ± 1.38

[a-c]Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with SAS($p<0.05$).
ND[1)]= Not detected.

dCollection @ dankook

Table 6. α-glucosidase inhibition rate of 80% ethanol extract of *Ishige okamurai*

Sample	Concentration (μg/ml)	α-glucosidase inhibition rate (%)
Acarbose	1	99.83[a]
Ishige okamurai	5	ND[1)]
	10	ND
	50	15.60[c] ± 6.81
	100	77.44[b] ± 4.20
	200	98.10[a] ± 0.84

[a-c]Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with SAS($p<0.05$).
ND[1)]= Not detected.

dCollection @ dankook

4. α-amylase 저해 활성

α-amylase는 amylose 및 amylopectin이나 glycogen과 같이 α-결합의 glucose로 되어 있는 다당류에 작용하여 포도당과 엿당으로 분해하는 소화효소로 사람, 동물, 곤충, 미생물 등의 탄수화물 대사에 필수적 효소이다(Lee et al., 2008; Jang and Jeong, 2010). 이러한 효소의 활성 저해는 당질 가수분해와 흡수과정을 지연시킴으로써 식후 당 농도를 제한할 수 있다.

당뇨 치료를 위한 해조류의α-amylase 저해활성에 대한 보고는 미흡하므로 이번 연구를 통해 해조류 추출물을 이용하여 α-amylase 저해 활성을 알아보았다(Table 7, 8, 9). 패와 넓패 추출물에서만 α-amylase 저해 활성이 나타났고, 패와 넓패 추출물간의 유의적인 차이는 없었다. Lee 등(Lee et al., 2010)에 지충이 에탄올 추출물 1, 2.5, 5 mg/ml 농도에서 각각 35, 59, 69%의 α-amylase저해 활성이 나타났으나 본 연구에서는 지충이 추출물의 α-amylase 저해활성은 없었다.

활성이 나온 패와 넓패 추출물을 가지고 농도별로 활성을 보았다(Table 8, 9).

넓패 추출물 200 ㎍/ml의 농도에서 35.21%의 활성을 보였고, 이는 표준물질인 acarbose와 유의적인 차이가 났다. 넓패 추출물 100 ㎍/ml농도와 200 ㎍/ml 그리고 넓패 추출물 50 ㎍/ml농도와 100 ㎍/ml에서는 유의적인 차이는 없었고, 넓패 추출물 5, 10, 50 ㎍/ml은 각각 200 ㎍/ml과 유의적인 차이가 났다.

패 추출물의 경우 농도 의존적으로 농도가 증가함에 따라 α-amylase 활성을 저해하였다. 패 추출물 역시 200㎍/ml농도에서 넓패 추출물과 같은 35.21%의 α-amylase저해 활성을 보였다. 통계 처리한 결과 acarbose와 패 추출물 200 ㎍/ml에서는 유의적인 차이가 났고, 패 추출물은 100 ㎍/ml농도와 200 ㎍/ml, 50 ㎍/ml과 100 ㎍/ml, 10 ㎍/ml과 50 ㎍/ml에서는 유의적인 차이는 없었으나, 패 추출물 5 ㎍/ml농도와 나머지 농도에서는 다 유의적인 차이를 보였다. 즉 낮은 농도인 5 ㎍/ml만 차이가 나고 나머지 농도에서는 유의적인 차이가 나지 않았다. 그리고 Heo 등(Heo et al., 2009)의 연구와 비교를 해보면 패 80%메탄올 추출물 0.1 mM에서 17.12%, 0.19 mM에서 34.78%, 0.49 mM에서 50.23%, 0.98 mM에서 61.66%의 α-amylase저해 활성을 보여 본 연구의 패 80%주정추출물 200 ㎍/ml농도와 Heo 등(Heo et al., 2009)의 연구에서의 80% 에탄올추출을 한 패 0.19 mM농도에서 α-amylase 저해활성이 유사하였다.

dCollection @ dankook

Table 7. α-amylase inhibition rate of 80% ethanol extracts of seaweed

Sample	α-amylase inhibition rate (%)
Acarbose 1㎍/㎖	72.70
Sargassum ringgoldianum	ND[1)]
Sargassum tortile	ND
Sargassum thunbergii	ND
Ishige okamurai	19.40 ± 10.78
Ishige foliacea	38.90 ± 15.01

t-test

P=0.072>0.05

ND[1)]= not detected.

Collection @ dankook

Table 8. α-amylase inhibition rate of 80% ethanol extract of *Ishige foliacea*

Sample	Concentration (μg/ml)	α-amylase inhibition rate (%)
Acarbose	1	69.28[a]
Ishige foliacea	5	15.20[d] ± 2.76
	10	15.28[d] ± 7.17
	50	23.06[cd] ± 1.35
	100	26.31[bc] ± 3.10
	200	35.21[b] ± 9.07

[a-d]Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with SAS($p<0.05$).

Collection @ dankook

Table 9. α-amylase inhibition rate of 80% ethanol extract of *Ishige okamurai*

Sample	Concentration (μg/ml)	α-amylase inhibition rate (%)
Acarbose	1	69.28[a]
Ishige okamurai	5	8.74[d] ± 4.87
	10	23.86[c] ± 1.63
	50	30.96[bc] ± 3.99
	100	33.50[bc] ± 8.67
	200	35.21[b] ± 9.07

[a-d]Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with SAS ($p<0.05$).

dCollection @ dankook

5. 세포 생존율

WST-1(water soluble tetrazolium-1)을 이용하여 HepG2 cell과 Caco-2 cell의 생존율을 측정하였다. WST-1은 세포 증식능력이나 세포 생존능력을 정량하기 위한 것으로 세포내의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 Tetrazolium salts에서 formazan이라는 발색물질이 생성되는 것을 측정하는 것이다. 이러한 반응은 대사적으로 왕성한 활동을 하는 세포의 미토콘드리아 전자전달계에 존재하는 탈수소효소 (Dehydrogenase)인 succinate tetrazolium reductase (EC.1.3.99.1)에 의한 것으로 살아있는 세포에만 유효하며 발색강도가 세포수와 상관관계를 나타낸다(Tominaga et al., 1999).

WST-1을 통해 세포 생존력과 더불어 이것을 바탕으로 다른 실험의 농도로 설정하였다.

1) HepG2 cell의 생존율

HepG2 cell에 해조류 추출물을 처리하여 셀 생존율을 확인하였다(Table 10). 큰잎모자반 추출물을 처리한 것은 200 ㎍/㎖을 제외하고는 모두 대조군과는 유의적 차이가 났으나, 각 농도별 세포 생존율에는 유의적인 차이가 없었다. 그리고 농도가 높아짐에 따라 세포가 더 잘 살아있었다.

꽈배기모자반 추출물을 처리한 경우, 800 ㎍/㎖을 제외하고는 모두 대조군과는 유의적 차이가 나지 않았으며, 각 농도별로도 유의적인 차이가 없었다.

패 추출물의 경우, 400 ㎍/㎖농도부터 대조군과 유의적인 차이를 보였고, 대조군에 비해 패 추출물 400 ㎍/㎖부터 생존력이 떨어진 것을 보아 셀에 어느 정도 독성을 미치는 것으로 사료된다.

지충이 추출물은 200 ㎍/㎖농도와 800, 1000 ㎍/㎖농도에서 유의적인 차이가 나타났으며, 농도가 높아짐에 따라 생존력이 줄어드는 경향을 보였다.

넓패 추출물을 처리 한 경우 모든 농도에서 대조군과 유의적인 차이를 보였고, 농도 의존적으로 농도가 증가함에 따라 셀이 죽었다. 각 농도 별로 비교했을 땐 넓패 추출물 200 ㎍/㎖과 600, 800, 1000 ㎍/㎖농도에서 유의적인 차이를 보였고, 고농도인 600부터 1000 ㎍/㎖까지는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Jang 등(Jang et al., 2006)에서 갈파래 메탄올 분획물을 가지고 HepG2 세포 생존율을 보았는데, 100 ㎍/㎖ 농도에서 25%생존율을 감소시켰고, 500 ㎍/㎖농도 처리군에서 50%의 생존율을 감소시켰다. 이는 본 연구의 지충이, 넓패, 패 추출물 처리군과 비슷하게 농도가 높아짐에 따라 세포 생존율이 감소하는 경향을 보였으나 Jang 등(Jang et al., 2006)의 갈파래 처리군에서 세포의 생존율이 더 크게 감소하였으므로 본연구의 샘플인 지충이, 넓패, 패

dCollection @ dankook

추출물이 HepG2 세포에 대해 독성이 더 적다고 사료된다. Park 등(Park et al., 2005)에서는 불등가사리 메탄올 추출물을 처리하여 HepG2 세포의 생존율을 본 결과 20, 40, 60, 80, 100 ㎍/㎖에서 유의적인 차이 없이 모든 농도에서 셀 생존율을 20%정도 감소시켰다. 이는 본 연구의 지충이, 패, 넓패 추출물과 비슷하게 생존율을 감소시켰다. Bae(Bae, 2004)에서는 모자반 메탄올 추출물을 HepG2 세포에 100, 200, 300, 400, 500 ㎍/㎖의 농도로 처리하여 셀 생존율을 보았다. 300 ㎍/㎖농도 처리군까지는 저해 활성이 없었고, 400 ㎍/㎖농도 처리군에서 20%, 500 ㎍/㎖농도 처리군에서 30%의 셀 생존율을 저해하였다. 농도가 증가함에 따라 셀의 생존율이 감소하였는데, 이는 본 연구의 큰잎모자반 추출물과는 다른 경향을 보였다. 같은 모자반과지만 종류에 따라 성분 역시 다른 것으로 사료된다.

Table 10. Cell viability of 80% ethanol extracts of seaweed on HepG2 cells

(Unit: %)

Extract	Concentration (㎍/㎖)					
	control	200	400	600	800	1000
Sargassum ringgoldianum	100^{b}	109.04 ±8.82^{ab}	116.73 ±3.36^{a}	115.27 ±7.18^{a}	116.81 ±2.53^{a}	117.00 ±6.19^{a}
Sargassum tortile	100^{a}	95.00 ±10.64^{ab}	97.50 ±10.49^{ab}	89.35 ±3.78^{ab}	88.04 ±10.10^{b}	92.42 ±2.91^{ab}
Ishige okamurai	100^{a}	97.27 ± 6.77^{a}	87.15 ±6.89^{b}	86.08 ±6.19^{b}	84.46 ±3.80^{b}	86.88 ±4.26^{b}
Sargassum thunbergii	100^{a}	97.00 ±7.75^{ab}	89.45 ±2.82^{bc}	91.13 ±9.55^{ab}	79.88 ±5.80^{cd}	71.20 ±9.00^{d}
Ishige foliacea	100^{a}	90.15 ±5.12^{b}	85.15 ±3.18^{bc}	82.85 ±2.99^{c}	81.88 ±2.21^{c}	82.31 ±1.29^{c}

$^{a-c}$Values with different superscripts in the same line are significantly different by ANOVA with SAS ($p<0.05$).

dCollection @ dankook

2) Caco-2 cell의 생존율

Caco-2 cell에 해조류 추출물을 처리하여 세포 생존율을 확인하였다(Table 11).

큰잎모자반 추출물을 처리한 군은 농도 의존적으로 농도가 증가할수록 생존율이 높아졌다. 꽈배기모자반 추출물을 처리한 것은 600 ㎍/㎖농도부터 대조군과 유의적인 차이를 보였고, 꽈배기모자반 추출물 200 ㎍/㎖농도와 800 ㎍/㎖에서 유의적인 차이가 났으며, 200 ㎍/㎖농도와 1000 ㎍/㎖에도 유의적인 차이가 났다. 꽈배기모자반 추출물의 처리 농도가 증가할수록 생존율이 증가하였다.

패 추출물 600 ㎍/㎖과 800 ㎍/㎖농도에서는 유의적 차이가 없었으나 그 외의 농도에서는 농도 의존적으로 유의적인 증가를 보였다.

지충이 추출물을 처리했을 경우 대조군과 800 ㎍/㎖농도 간에만 유의적인 차이가 나타났고, 그 외의 농도에선 유의적인 차이가 없었다.

넓패 추출물을 처리한 경우 대조군과 대비하여 각 농도별 추출물에서 유의적인 차이가 났다. 그러나 넓패 추출물 200 ㎍/㎖과 400 ㎍/㎖의 농도 간에는 유의적 차이가 없었고, 넓패 추출물 400, 600, 800 ㎍/㎖또한 유의적인 차이가 없었으나, 200 및 400 ㎍/㎖농도와 1000 ㎍/㎖의 처리군에서는 유의적인 차이가 있었다. Hwang 등(Hwang et al., 2003)은 Caco-2 cell에 표고버섯과 새송이 버섯 열수추출물을 6 ㎎/㎖과 12 ㎎/㎖의 농도를 처리하여 세포 생존율을 보았는데, 두 가지 버섯 모두 버섯 첨가량이 많아짐에 따라 세포 증식이 유의적으로 억제됨을 알 수 있었다. 본 연구의 해조류 추출물들을 처리한 군은 대체로 농도가 높아짐에 따라 세포 증식이 억제되는 것이 아니라 증식 되었기에 Hwang 등(Hwang et al., 2003)의 연구와는 다른 경향을 보였다. Jeong 등 (Jeong et al., 2009)에서도 본 연구와 다르게 샘플 처리 농도가 높아짐에 따라 셀 생존율이 감소하는 경향을 보였다.

dCollection @ dankook

Table 11. Cell viability of 80% ethanol extracts of seaweed on Caco-2 cells

(Unit: %)

Extract	Concentration (㎍/㎖)					
	control	200	400	600	800	1000
Sargassum ringgoldianum	100^{f}	115.04 ±1.56^{e}	128.54 ±4.28^{d}	136.99 ±1.60^{c}	149.67 ±1.60^{b}	156.34 ±3.52^{a}
Sargassum tortile	100^{d}	100.73 ±0.93^{cd}	103.01 ±1.23^{bcd}	106.42 ±3.46^{abc}	107.97 ±3.06^{ab}	112.03 ±3.51^{a}
Sargassum thunbergii	100^{a}	98.76 ±2.56^{ab}	97.17 ±3.29^{ab}	96.82 ±2.29^{ab}	94.17 ±4.47^{b}	96.73 ±4.36^{ab}
Ishige okamurai	100^{e}	117.07 ±3.06^{d}	125.77 ±1.81^{c}	137.97 ±2.84^{b}	143.33 ±2.98^{b}	155.45 ±5.45^{a}
Ishige foliacea	100^{d}	128.62 ±12.35^{c}	132.60 ±2.23^{bc}	142.68 ±11.66^{ab}	142.03 ±6.13^{ab}	148.94 ±4.58^{a}

$^{a-f}$Values with different superscripts in the same line are significantly different by ANOVA with SAS ($p<0.05$).

dCollection @ dankook

6. Caco-2 cell에서의 세포 투과도

흡수된 당질이 소장에서 흡수가 억제되면 혈당을 조절하게 되어 당뇨에 도움을 준다(Kang et al., 2001). 따라서 해조류 주정추출물이 사람의 소장세포에서 포도당 흡수저해에 미치는 영향을 측정하였다.

세포막의 상부는 소장관 세포의 장관측(apical) 특징을 띄게 되고, membrane에 접한 쪽은 소장관 세포의 혈관측(basal)특징을 갖게 된다. 따라서 물질의 소장관으로부터 혈액으로의 흡수를 연구하려면 물질은 apical쪽에 넣어주고, basal쪽에서 샘플을 채취하여 정량한다(Kim and Kim, 1999; Hidalgo et al., 1989).

장에는 장세포안으로 포도당의 유입을 도와주는 운반체가 있는데, 이를 SGLT1(Sodium-glucose transport protein)이라 하고, 포도당을 세포막을 통과시켜 세포내로 이입시키는 단백질이 있는데, 이를 포도당수송체(GLUT)라고 한다. 그중 GLUT2가 주로 간과 장에서 발현이 된다. 혈당을 조절하기 위해서는 아예 SGLT1의 작용이 억제되어 소장으로 흡수가 되지 않거나, GLUT2가 억제되어 소장으로 들어온 포도당을 혈액으로 보내지 않는 것도 중요하다(Youm et al., 1998; Thorens et al., 1990).

Caco-2 cell에서의 세포 투과도는 각각의 해조류 추출물을 200 ㎍/㎖농도로 처리하였다.(Figure 6,7)

큰잎모자반 추출물의 경우, apical에서 대조군과 유의적 차이가 없었고, basal 값은 89%의 투과율을 보였고 이는 대조군과 유의적인 차이가 있었다. 이는 GLUT2의 작용으로 89%가 혈액으로 이동했음을 의미하여 혈당조절에는 효과가 없는 것으로 사료된다.

소장으로 흡수된 꽈배기모자반 추출물의 양은 91.6%로 대조군과 유의적으로 차이가 나지 않았고, 혈액 쪽으로의 유입된 꽈배기모자반 추출물양도 대조군과 유의적인 차이가 나지 않았다. 즉 소장으로 100%정도 다 들어오고, 소장으로 들어온 물질이 혈액으로 100%정도 나간다고 볼 수 있다.

지충이 추출물의 소장으로의 흡수는 123.2%로 대조군과 유의적인 차이를 보였으나, 패와 넓패 추출물보다는 잔류양이 높지 않았다. 그리고 혈액으로의 유입된 지충이 추출물은 71.1%로 대조군과 유의적인 차이는 났으나 이 역시 패와 넓패 추출물 보다는 혈당을 조절하는 정도가 떨어진다.

패와 넓패 추출물이 apical부분에서 높게 나타났는데, 넓패 추출물은 210.3%, 패 추출물은 233.7%로 대조군과 유의적인 차이가 났다. 즉 넓패, 패 추출물이 apical부분에서 많이 투과되지 않았으며, 이중 특히 패가 대조군에 비해 2배정도 잔류되었다. 이는 SGLT1의 작용으로 인해 아예 패와 넓패 추출물이 소장으로 흡수 되지 않았을 가능성이 있고, 이것은 소장으로 흡수되는 것을 막아 혈당조절에 도움이 될 것으로 사료된다. 그리고 패와 넓패 추

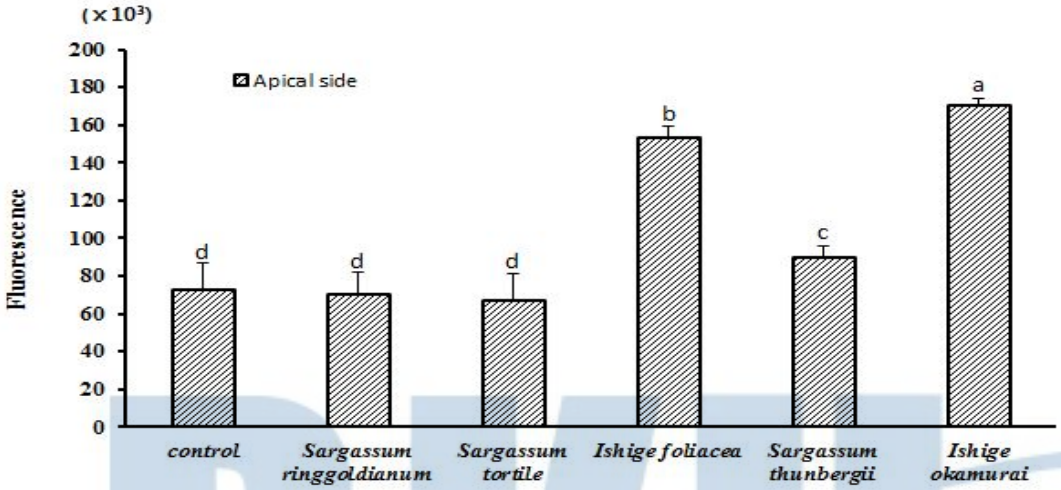
dCollection @ dankook

출물 처리군에서는 basal 값도 유의적 차이가 났는데, 이는 GLUT2의 작용으로 혈액으로 패와 넓패 추출물이 많이 이동하지 않은 것으로 볼 수 있다.

Kobayashi 등(Kobayshi et al., 2000)은 녹차의 폴리페놀성분으로 SGLT1관련하여 당 흡수 억제정도를 보았는데, 0.001 ㎍/㎖농도에서 62%의 저해력을 보였다. 이것은 본 연구의 패와 넓패 추출물보다도 낮은 농도에서 더 높은 활성을 보였고, Hong 등(Hong et al., 2004)의 연구에서는 아위버섯 에탄올 추출물 10 ㎎/㎖농도의 포도당 흡수 저해효과는 8% 이었으며 본 연구의 넓패 추출물은 대조군에 비하여 80.5% , 패 추출물은 85.1% 흡수를 저해하는 것으로 나타나 아위버섯보다 낮은 농도에서 더 많은 활성을 보였다.

dCollection @ dankook

A)



B)

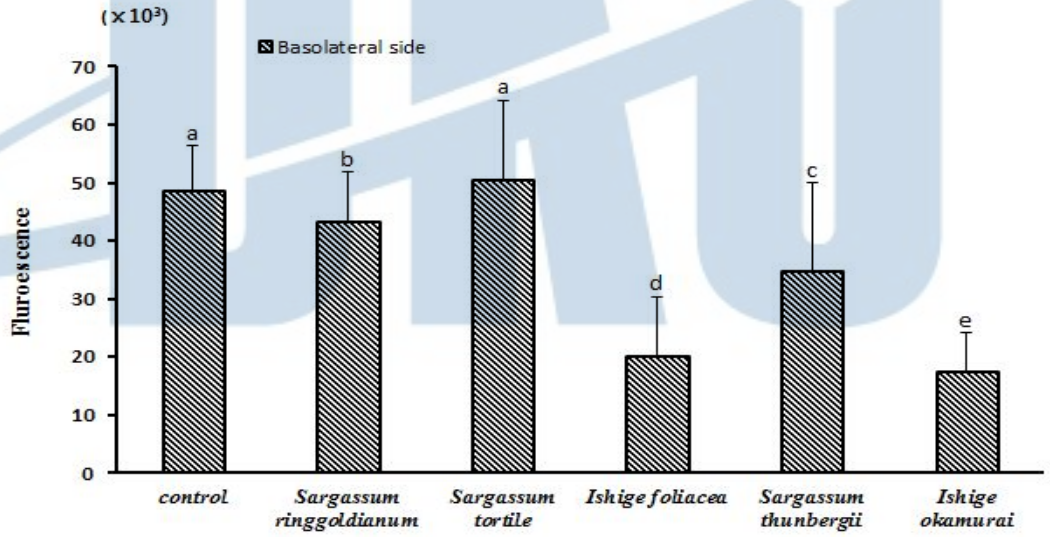


Figure 6. Transportation of 80% ethanol extracts of seaweed across Caco-2 cell

[a-e]Values with different superscripts are significantly different by ANOVA with SAS ($p<0.05$).

A) Fluorescence of Apical side

B) Fluorescence of Basolateral side

dCollection @ dankook

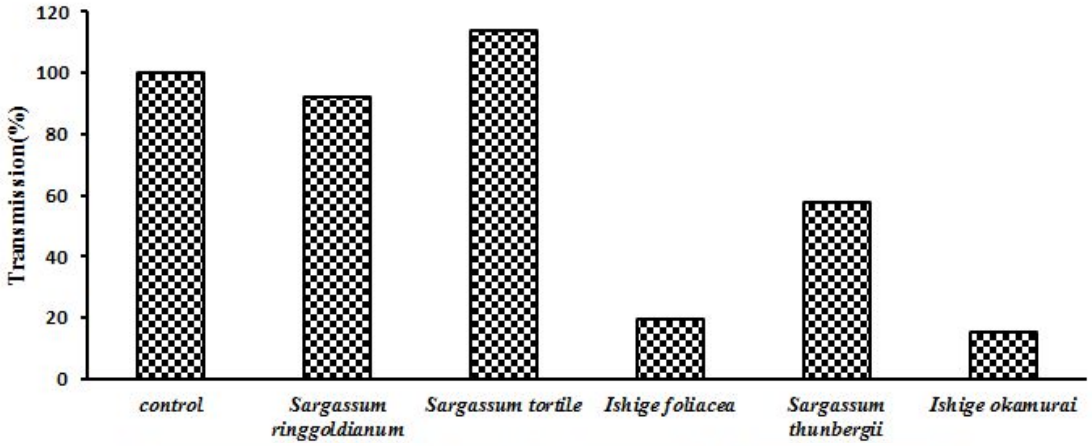


Figure 7. Inhibitory effect of 80% ethanol extracts of seaweed on glucose uptake on Caco-2 cell

$$Transmission(\%) = \frac{Basolateral side}{Apical side} \times 100$$

dCollection @ dankook

7. RT-PCR

소장에서의 포도당 흡수를 알아보기 위해 Caco-2 세포에서 GLUT2유전자와 SGLT1유전자의 발현을 확인하였다. Caco-2 세포에 해조추출물을 처리한 후 GLUT2와 SGLT1 mRNA 발현 정도를 알아보았다(Figure 8).

당뇨병은 혈액 내의 혈당을 조절하여 빨리 혈당을 낮춰야 하는 질병이다. 당의 흡수경로를 보면 당은 단당류로 분해되어 장점막으로 부터 혈관 내로 들어가 간장으로 보내지고 그 후 심장을 통해 각 조직으로 들어가 이용된다. 이렇듯 소장을 통해 당이 흡수가 되어야만 온몸으로 당이 이동할 수가 있는 것이다. 만약 소장에서 당의 흡수를 억제한다면 이것은 혈당을 조절하는데 도움이 될 것이다(Kobayashi et al., 2000).

SGLT1은 소장표피에서 소장내로 포도당이 흡수될 때 필요로 하는 당 수송체이고, GLUT2 소장 내에서 혈액으로 당을 이동시키는데 필요한 수송체이다(Hogna et al., 1991; Park et al., 2004). SGLT1 유전자의 발현양이 많을수록 소장 내로 포도당이 많이 들어온다는 것을 의미한다. SGLT1의 발현양이 많다는 것은 그만큼 흡수도가 높다는 뜻인데, 꽈배기모자반과 지충이추출물은 소장으로의 흡수도가 높은 것으로 사료되는 반면, 큰잎모자반과 넓패, 그리고 패추출물은 소장으로의 흡수도가 낮은 것으로 사료된다. 큰잎모자반, 넓패, 패추출물을 처리한 군에서 SGLT1 mRNA가 감소하였다. 꽈배기모자반 추출물 처리군과 지충이 추출물 처리군은 SGLT1 mRNA를 각각 28.2, 6.4% 증가를 시켰다. 반면 큰잎모자반추출물 처리군은 5%정도 감소시켰고, 넓패 추출물 처리군은 17.4%, 패 추출물은 24.2%의 SGLT1 mRNA를 감소 시켰다. 패는 소장상피세포에서 소장으로의 흡수를 24.2%를 저해함으로써 다른 해조류에 비해 혈당조절에 도움이 될 것으로 본다.

GLUT2 유전자의 발현양이 많을수록 소장에서 혈액으로 포도당 이동이 많다는 것을 의미한다. GLUT2 mRNA 발현정도에서는 각각의 큰잎모자반, 꽈배기모자반, 넓패, 지충이, 패추출물에서 큰 변화는 없었다. 큰잎모자반 추출물에서는 5% 증가, 꽈배기모자반 추출물에서는 4.8% 증가, 넓패 추출물은 2.5% 감소, 지충이 추출물은 1% 감소시켰고, 패 추출물에서는 GLUT2 mRNA발현을 0.8% 증가시켰다. 넓패 추출물에서 2.5%의 GLUT2 mRNA발현 감소를 보였으나 이는 커다란 변화는 아니기에 각각의 추출물이 GLUT2 mRNA발현 변화에는 비교적 큰 영향을 미치지 못하였다. 즉 소장세포내로의 흡수가 적고, 혈액으로의 이동도 많지 않은 패와 넓패 추출물은 다른 해조류에 비해 혈당을 조절할 가능성이 높다고 사료된다.

dCollection @ dankook

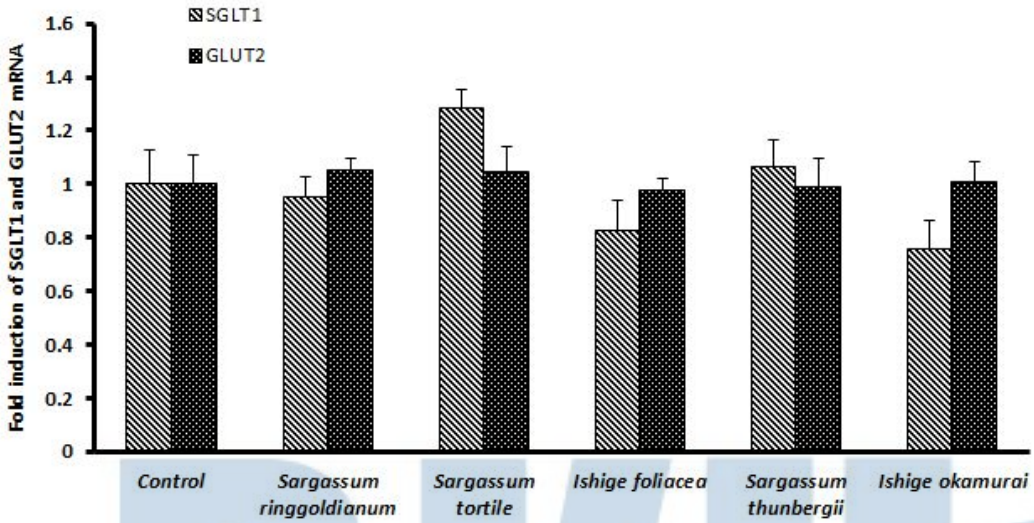


Figure 8. The mRNA expression level of SGLT1 and GLUT2 on Caco-2 cells.

dCollection @ dankook

8. Western blot

1) Caco-2 cell에서의 SGLT1과 GLUT2 단백질 발현확인

소장에서 포도당 흡수 억제 활성을 보기위해 Caco-2 cell에서 Western blot을 실시하여 SGLT1과 GLUT2 발현정도를 확인하였다(Figure 9,10).
SGLT1은 sodium-glucose transport proteins의 약자로 소장 표피에서 소장 내로 포도당이 흡수될 때 필요로 하는 수송체이다.

포도당의 소장흡수 억제 기전 즉 소장으로 포도당이 들어오는 것을 막아야 혈액으로도 보내지 않아 혈당을 조절할 수 있다. 결과적으로 SGLT1의 양이 많을수록 소장으로 당이 더 많이 들어오게 된다(Hogan et al., 1991).

꽈배기모자반 추출물을 제외하고는 대조군에 비해 SGLT1 발현양이 줄어들었다. 큰잎모자반 추출물 처리군은 23.1%감소, 꽈배기모자반 추출물 처리군은 오히려 14% 증가, 지충이 추출물 처리군은 27.4%감소, 넓패와 패 추출물 처리군은 각각 47.7 및 60% 감소하는 경향으로 패 추출물 처리군이 확연히 SGLT1을 감소시키는 것으로 나타났다(Figure 9). 이는 Caco-2 cell에서의 세포 투과도를 본 실험 결과와도 같은 경향을 나타내었으며 결국, 패와 넓패 추출물 처리군에서 SGLT1의 작용을 감소시킨 것으로 사료된다.

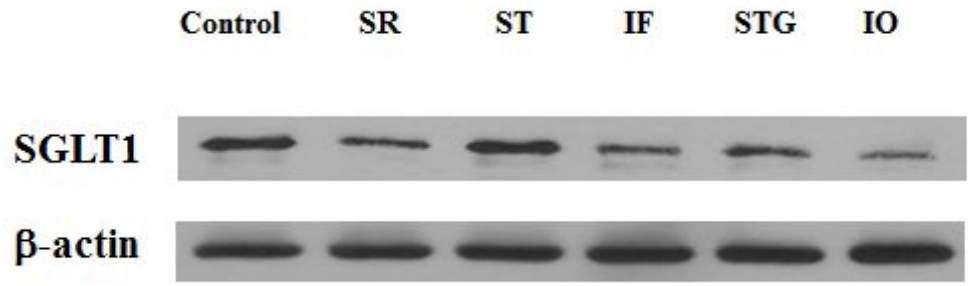
GLUT2는 소장 내에서 혈액으로 당을 이동시키는데 필요한 수송체로 glucose transporter 중 간, 소장 상피세포, 췌장의 β세포에서 발견된다. GLUT2의 발현이 감소되어야 소장에서 혈액으로 당의 이동이 감소하여 혈당조절에 도움이 된다(Park et al., 2004).

꽈배기모자반 추출물 처리군을 제외하고는 GLUT2발현을 감소시켰다(Figure 10). 큰잎모자반 추출물 처리군의 경우 대조군에 비해 9.4% 감소, 꽈배기모자반 추출물 처리군은 6.4% 감소, 지충이 추출물 처리군은 19.6% 감소, 패와 넓패 추출물 처리군이 그 중 가장 효과적으로 감소하였다. 넓패 추출물 처리군은 대조군보다 34.9% 감소하였고, 패 추출물 처리군에서는 37.6% 감소하였다. 즉 패 추출물은 SGLT1의 발현을 60% 줄이고, GLUT2는 37.6% 감소시키는 것으로 나타났고, 넓패 추출물은 SGLT1의 발현을 47.7% 줄이고, GLUT2는 34.9%감소시켰다.

패와 넓패 추출물의 경우 소장으로 당이 들어오는 자체도 억제 하고 들어온 당을 혈액으로 보내는 것도 억제 하여 혈당조절에 비교적 효과적일 것으로 사료된다.

dCollection @ dankook

A)



B)

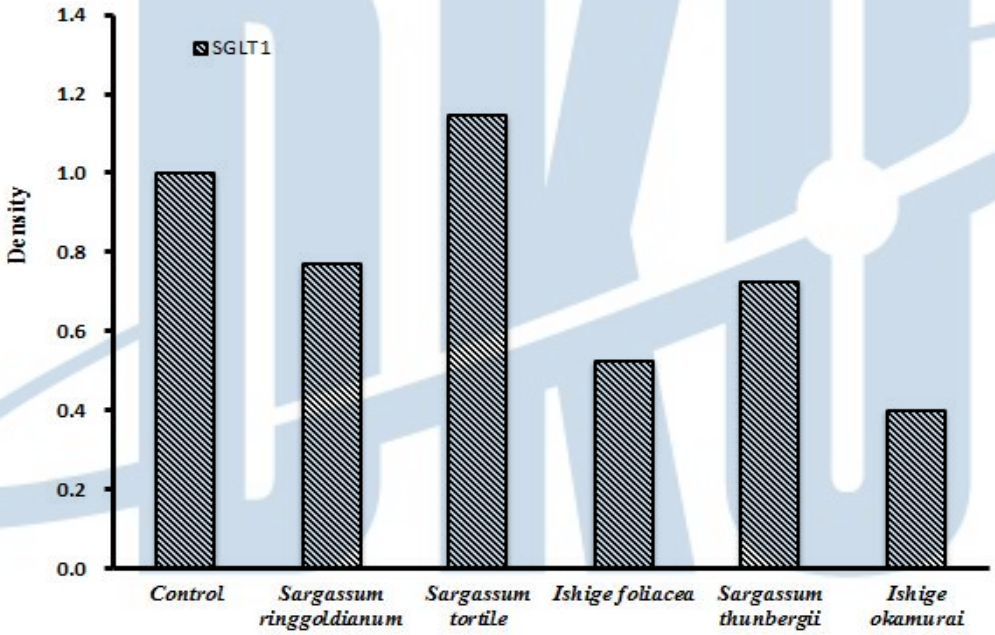


Figure 9. The protein expression level of SGLT1 on Caco-2 cells.

Treatment of 80% ethanol extracts of seaweed

A) Photographs of chemiluminescent detection of the blots.

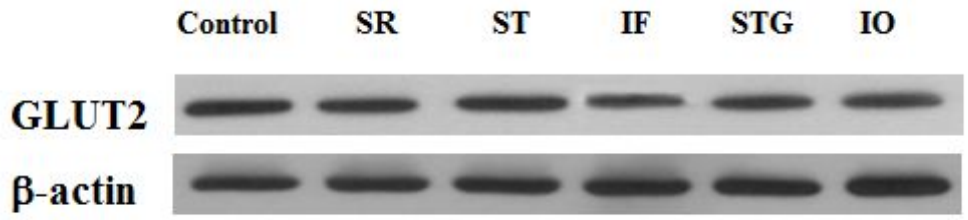
B) Quantitative analysis of western blots.

SR: *Sargassum ringgoldianum*, ST: *Sargassum tortile*, IF: *Ishige foliacea*,

STG: *Sargassum thunbergii*, IO: *Ishige okamurai*

dCollection @ dankook

A)



B)

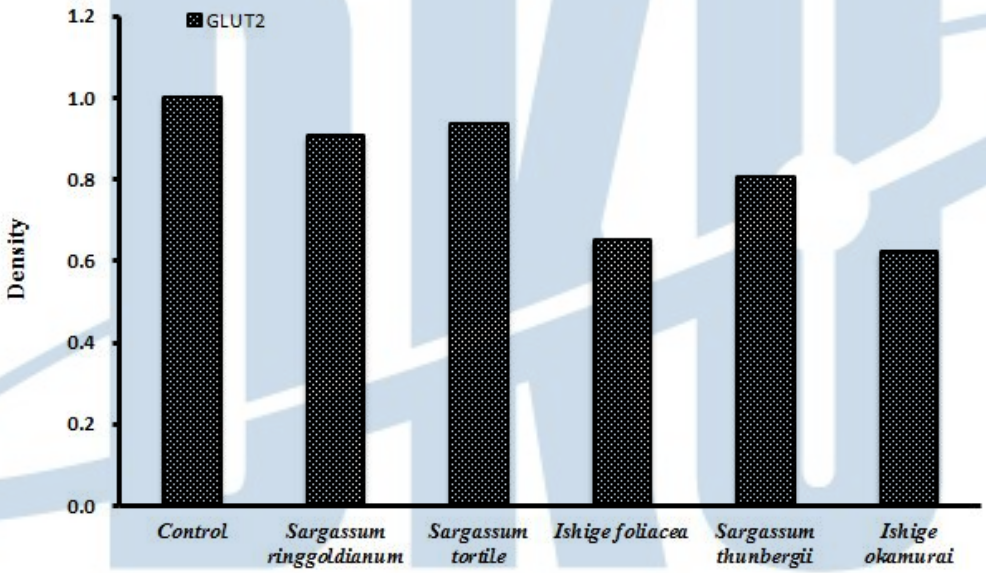


Figure 10. The protein expression level of GLUT2 on Caco-2 cells.

Treatment of 80% ethanol extracts of seaweed

A) Photographs of chemiluminescent detection of the blots.

B) Quantitative analysis of western blots.

SR: *Sargassum ringgoldianum*, ST: *Sargassum tortile*, IF: *Ishige foliacea*,

STG: *Sargassum thunbergii*, IO: *Ishige okamurai*

dCollection @ dankook

2) HepG2 cell에서 glucokinase와 pyruvate kinase의 단백질 발현확인

대사과정 중 혈당 이용율을 보기 위해 당 분해와 당 흡수억제에서 활성이 좋았던 패를 농도별로 처리하여 HepG2 cell에서 glucokinase, pyruvate kinase의 발현 정도를 보았다 (Figure 11,12).

Glucokinase단백질의 발현을 농도별로 확인 한 것은 패 추출물의 처리 농도가 높아짐에 따라 발현이 줄어들었다(Figure 11). 패 추출물 20 ㎍/㎖농도에서는 74% 감소, 50 ㎍/㎖에서는 glucokinase 단백질의 발현을 84% 감소시켰다. Glucokinase는 당대사와 인슐린 분비 조절인자로 알려져 있기 때문에(Kim, 2001; Sharma et al., 1963; Kim and Kim, 2001) 세포내로 흡수된 당의 이용 속도를 증가시키기 위해서는 간에서 포도당대사에 관여하는 glucokinase 활성을 증가시켜야 한다. 현재 당뇨병과 glucokinase의 활성 연관성에 관한 연구는 많이 보고가 되고 있다(Jumg et al., 2006; Kondeti et al., 2010; Kim et al., 2010). Jung 등(Jung et al., 2006)은 감귤에 있는 hesperidin과 naringin 성분을 가지고 당대사 관련 주요 효소들의 활성을 측정하였을 때 glucokinase는 대조군에 비해 유의적으로 증가하여 항당뇨 효능이 있다고 보고하였고, Kondeti 등(Kondeti et al., 2010)은 자단껍질을 가지고 당대사 관련 효소들의 활성을 보았을 때, 당뇨 유발군에서 glycolysis에 관여하는 glucokinase의 활성이 증가하였다. Kim 등(Kim et al., 2010b)은 지골피, 동충하초, 가시오가피 복합추출물이 glucokinase의 단백질 발현을 증가시켜 항당뇨 효과가 있다고 보고하였다. 하지만 본 연구에서는 패 추출물을 처리함에 따라 감소하는 경향을 보였다. Bedoya 등(Bedoya et al., 1986a)은 인슐린 등의 호르몬으로 glucokinase를 자극하면 바로 활성화 되는 것이 아니고 유전자 수준에서 mRNA의 발현이 증가되고 이어 단백 합성이 증가되고 최종적으로 포도당의 이용이 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서는 단백질 합성이 감소되어 최종적으로 패 추출물 처리가 포도당 이용을 감소시키는 것으로 사료된다.

Pyruvate kinase는 해당과정 중 ATP를 합성하는 두 가지 단계 중 하나에 관여하는 중요한 효소로 phosphenolpyruvate를 pyruvate로 전환하는 촉매작용을 한다(Lee et al., 2009c). Joo 등(Joo and Kim, 1993)은 인삼의 지용성 분획물을 당뇨 유발 쥐에 투여해 pyruvate kinase활성을 보았는데, 5 ㎎ 투여시 대조군보다 60%의 활성이 증가하였다. 하지만 본 연구에서는 pyruvate kinase의 발현정도는 대조군에 비해 패 추출물 20 ㎍/㎖처리군이 44.1% 감소, 50 ㎍/㎖처리군이 60% 감소, 100 ㎍/㎖처리군이 94% 감소시켰다(Figure 12). 해당과정 중에 ATP가 많이 발생이 되는데, ATP가 많아지면 ATP가 Frucktose-6-phosphatase로 feedback과정을 가지게 되는데, 이때 ATP가 Phosphofructokinase(PFK)의 작용을 억제시켜 결과적으로 Pyruvate kinase가 억제된다(Albert, 1982). Pyruvate kinase의 feedback작용은 Figure 3에 나타나 있다. 즉 패 추출물의 농도가 높아지면서 ATP의 양이 많아져

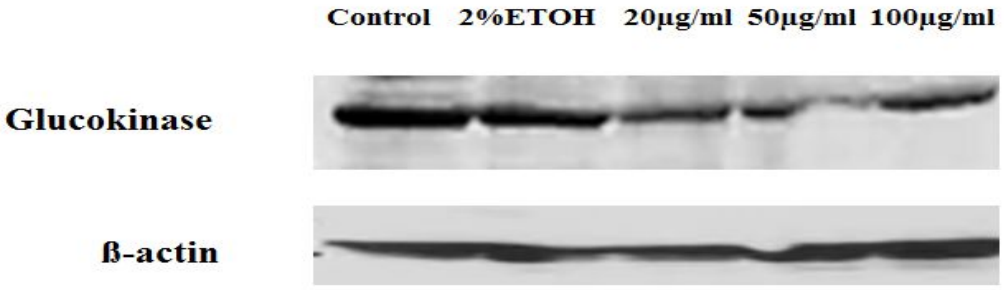
dCollection @ dankook

pyruvate kinase양이 감소했다고 사료된다.

결론적으로 HepG2 cell에서 패 추출물을 농도별로 처리 하여 glucokinase, pyruvate kinase의 단백질발현 정도를 보았을 때, glucokinase와 pyruvate kinase 단백질 발현 모두 감소하였다. 그러므로 대사 과정 중 혈당 이용율 부분에서는 패 추출물이 활성이 없어 대사 과정 중 혈당 이용율에서는 패 추출물은 활성이 비교적 낮은 것으로 사료된다.

dCollection @ dankook

A)



B)

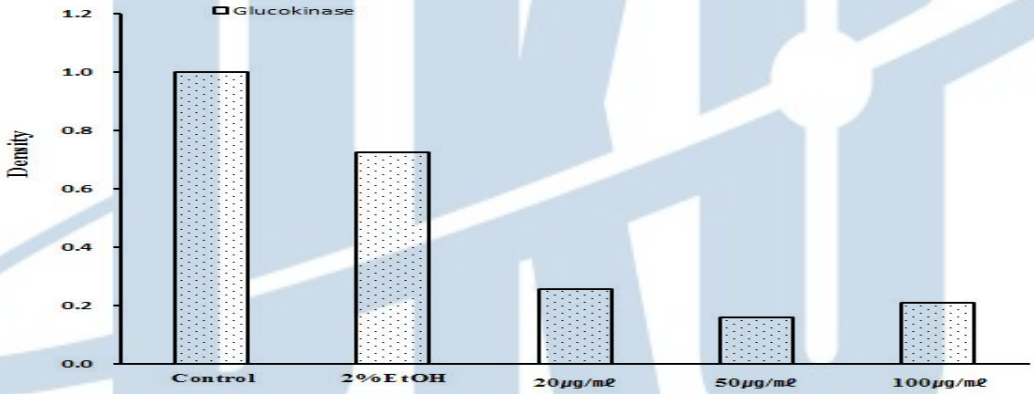


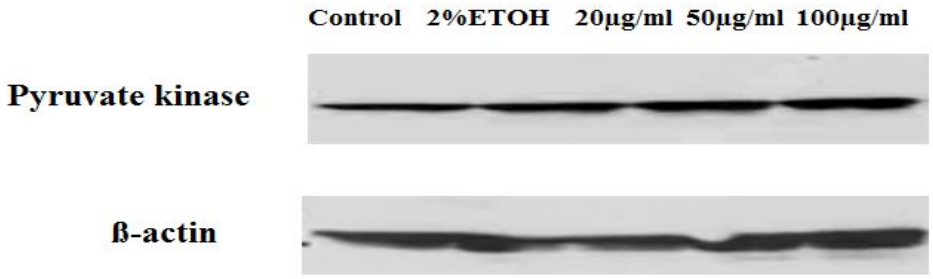
Figure 11. The protein expression level of Glucokinase on HepG2 cells with *Ishige okamurai*.

A) Photographs of chemiluminescent detection of the blots.

B) Quantitative analysis of western blots.

dCollection @ dankook

A)



B)

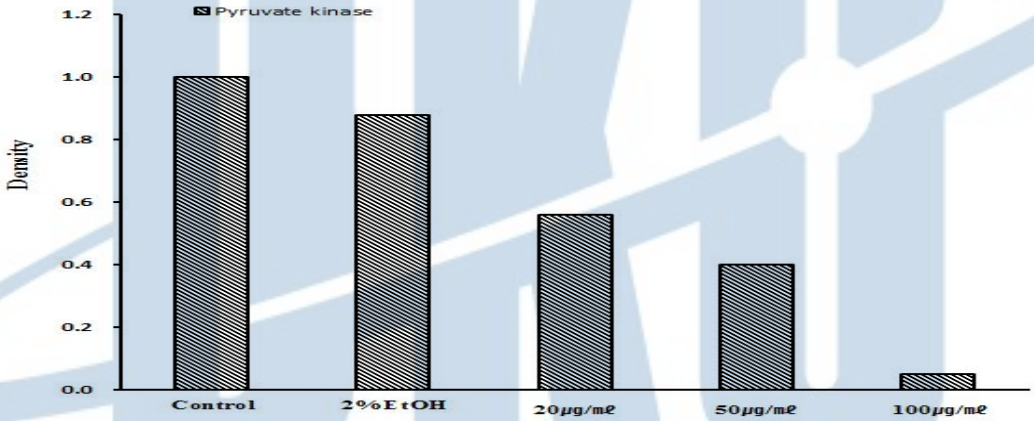


Figure 12. The protein expression level of Pyruvate kinase on HepG2 cells with *Ishige okamurai*.

A) Photographs of chemiluminescent detection of the blots.

B) Quantitative analysis of western blots.

dCollection @ dankook

Ⅴ. 요약 및 결론

1. 제주도산 5종의 해조류 즉 큰잎모자반, 꽈배기모자반, 지충이, 패, 넓패의 80% 주정추출물을 대상으로 항당뇨 활성을 탐색하였다.

2. 5종의 해조류모두 50%이상이 탄수화물이었고, 회분, 단백질, 지방순이었다. 지방함량은 1%도 안 되었으며, 수분함량은 10~15%정도였다.

3. 해조류 중 패 추출물이 α-glucosidase억제 활성에 가장 좋았다. 대조군에 비해 패 추출물 50 μg/ml에서 15.6%, 100 μg/ml에서 77.44%, 200 μg/ml에서 98.1%의 활성을 보였고, 200 μg/ml는 표준물질인 acarbose 1 μg/ml와 유의적인 차이가 없었다.

4. 5종의 해조류 추출물중 패와 넓패 추출물만이 α-amylase저해 활성을 보였다. 패와 넓패 추출물 200 ㎍/ml 농도에서 35.21%로 표준물질인 acarbose의 거의 절반정도의 활성을 보였으며, 이는 유의적인 차이가 있었다. 패 추출물의 경우 농도 의존적으로 α-amylase 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 패 추출물 5 ㎍/ml과 나머지 농도에서는 유의적인 차이를 보였다.

5. 해조류 추출물의 독성검사와 농도설정을 위해 HepG2 cell의 생존율을 보았을 때, 큰잎모자반 추출물은 200 ㎍/ml처리군을 제외하고는 모두 대조군과 유의적 차이가 있었으나, 농도별 유의차는 없었다. 패 추출물은 400 ㎍/ml농도부터 대조군과 유의적인 차이가 있었다. 넓패 추출물 처리군은 모든 농도에서 대조군과 유의적인 차이를 보였다.

6. Caco-2 cell에서 패 추출물처리군의 농도가 높아짐에 따라 생존율도 증가하였고, 모든 농도의 패 추출물에서 대조군과 유의적인 차이가 있었다. 넓패 추출물 처리군 역시 농도의존적으로 생존율이 증가하였다.

7. 소장에서의 포도당 흡수를 보기 위한 Caco-2 cell에서의 세포 투과도를 살펴보면 패 추출물 처리군의 값이 apical 부분에서 높게 나타났는데, 이는 대조군과 비교했을 유의적인 차이가 있었고, 이는 패 추출물이 233.7% 투과되지 않았다. 이것은 SGLT1의 작용으로 인해 패와 넓패 추출물이 소장으로 흡수 되지 않았을 가능성이 있어 패와 넓패 추출물이 소장으로 흡수되는 것을 막아 혈당조절에 효과가 있을 것으로 사료된다. 그리고 패 추출물 처리군에서는 basal 값도 유의적으로 낮게 나왔는데, 이는 GLUT2의 작용으로

dCollection @ dankook

혈액으로 패 추출물이 많이 이동하지 않은 것으로 볼 수 있다.

8. 패 추출물을 처리한 Caco-2 cell에서 GLUT2와 SGLT1 mRNA발현 정도를 보았을 때 SGLT1 mRNA가 24.2% 감소하였다. 이는 소장 상피세포에서 소장으로의 흡수를 24.2%를 저해함으로써 다른 해조류추출물에 비해 혈당조절에 도움이 될 것으로 사료된다. GLUT2의 mRNA발현에서 패 추출물 처리군은 0.8% 증가하는 경향을 보였고, 넓패 추출물에서 GLUT2의 mRNA발현을 2.5% 감소시켰으나, 이는 커다란 변화는 아니기에 각각의 해조류 추출물이 GLUT2발현 변화에는 큰 영향을 미치지 못했다.

9. Caco-2 cell에서 SGLT1 단백질의 발현정도를 보면 큰잎모자반 추출물 처리군에서는 23.1%감소, 꽈배기모자반 추출물 처리군에서는 14% 증가, 지충이 추출물 처리군에서는 27.4% 감소, 넓패와 패 추출물 처리군에서는 각각 47.7%, 60% 감소하는 경향으로 패추출물 처리군에서 확연히 SGLT1 단백질 발현을 감소시켰다. 이는 Caco-2 cell에서의 세포 투과도 실험 결과와도 같은 경향이었다. 이로써 패와 넓패 추출물 처리가 소장으로 당이 들어오는 자체를 억제 하여 혈당조절에 효과적일 것으로 사료된다.

10. Caco-2 cell에서 GLUT2 단백질의 발현정도를 보면 넓패 추출물 처리군은 대조군보다 GLUT2단백질 발현을 34.9%감소시켰고, 패 추출물 처리군은 37.6%감소시켰다. 즉 패 추출물은 SGLT1의 단백질발현을 60%줄이고, GLUT2 단백질 발현을 37.6%감소시켰으며, 넓패 추출물 처리군은 SGLT1의 단백질 발현을 47.7%줄이고, GLUT2의 단백질 발현은 34.9%감소시켰다. 패와 넓패 추출물은 소장에 들어온 당을 혈액으로 보내는 것을 억제를 하여 혈당조절에 도움이 될 것으로 사료된다.

11. 대사과정 중 혈당 이용정도를 보기 위한 것으로 HepG2 cell에서 glucokinase, pyruvate kinase의 단백질 발현 정도를 보았을 때 패 추출물 200 ㎍/㎖처리군에서는 glucokinase 단백질 발현을 무려 91%감소하였고, pyruvate kinase는 패 추출물 200 ㎍/㎖농도 처리군에서 99% 감소시켰다. 이는 패 추출물이 대사 과정 중 혈당 이용율을 높이지 못하는 것으로 혈당조절에 도움이 되지 않을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 패 주정 추출물이 α-glucosidase와 α-amylase를 가장 효과적으로 억제하였고, 소장세포인 Caco-2 cell에서 포도당 흡수 정도를 보았을 때도 패가 SGLT1을 억제하여 소장세포 안으로의 흡수를 저해하였고, GLUT2의 발현 역시 감소시켜 소장 안으로 흡수된 당을 혈액으로 보내는 것 또한 다른 해조류추출물에 비해 저해활성이

dCollection @ dankook

좋았다. 위의 결과들만 봤을 때 혈당조절에 효과적일 것으로 사료되나 아쉽게도 HepG2 cell에서의 glucokinse와 pyruvate kinase의 발현을 감소시켜 대사과정 중의 혈당 이용에 관한 부분에서는 효과가 없었다.

dCollection @ dankook

참고문헌

Ko BS, Lee MY, Kim HK, Chun JM, Choi SB, Jun DW, Jang JS and Park SM. (2005) Effect of *Cinnamomum camphora* Leaf Fractions on Insulin Action, *J Korean Soc Food Sci Nutr,* 34(9):1336-1343

Ji ST, Lee SJ, Lee KE, Son YT and Chung YK. (2002) Inhibitory Effect of Extracts from *Paeoniae radix* on Postprandial Hyperglycemia. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr,* 31(1):131-135

Oates JA, and Wood JJ. (1989) Oral hypoglycemic agents. *New England Journal of Medicine*, 321:1231-1245

Vessby B, Aro A, Skarfors E, Berglund L, Salminen I, and Lithell H. (1994) The risk to develop NIDDM is related to the fatty acid composition of the serum cholesterol esters. *Diabetes*, 43:1353-1357

Kim KH, Roh SG, Li CR, Jin CF, Kim A and Choi WC. (2008) Anti-diabetic Effects of Banaba Leaf Extracts(Lagerstroemia speciosa Pers.) through Solvents, Journal of Life Science, 18(9):1305-1311

Braunwald E, Fauci AS , Kasper DL, Hauser SL , Longo DL, and Jameson JL. (2001) Harrison's Principles of Internal Medicine. pp. 2109-2137, 15th des., McGraw-Hill, New York.

Kameswara, Rao, B., R. Giri, M. M. Kesavulu and C. Apparao. (1997) Herbal medicine: in the management of diabetes mellitus. *Manphar. Vaidyya. Patrika*. I: 33-35

Prout TE. (1974) Proceedings ⅧongressⅧ of international diabetes federation. pp. 162 *In* Malaisse W. J. and J. Pirart(Eds.), Excerpta Medica, Amsterdam.

Lee HJ, Kim JH , Lee CH, Kim JS, Kwak ST, Lee KB, Song KS, Choi BW and Lee BH, Kor. J. (1999) Inhibitory Activities of Sea Weeds on Prolyl Endopeptidase,

dCollection @ dankook

Tyrosinase and Coagulation, Pharmacogn, 30(3):231-237

Scheuer. P.J. (1990) Bioorganic Marine Chemistry. Springer Verlag.123

김영섭, 정현도 편(1996) 수산과학의 하이테크. 219-220.부산수산대학교 해양과학공동연구소.

Kwak CS, Kim SA and Lee MS (2005) The Correlation of Antioxiative Effects of 5 Korean Common Edible Seaweeds and Total Polyphenol Content, *J Korean Soc Food Sci Nutr,* 34(8):1143-1150

Jimenez-Escrig A, and Goni Cambrodon I. (1999) Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. *Arch Latinoam Nutr* 49:114-120.

Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, and Back NI. (2004) Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47:135-140

Awad NE, Selim MA, Saleh MM, and Matloub AA. (2003) Seasonal variation of the lipoidal matters and hypolipidaemic activity of the red alga Corallina officinalis L.Phytother Res 17:19-25.

Ryu BH, Kim DS, Cho K, and Sin DB. (1989) Antitumor activity of seaweeds agarne Sarcoma-180. Kor J Food Sci Technol 21:595-600.

Liu JN, Yoshida Y, Wang MQ, Okai Y, and Yamachita UB. (1997) B cell stimulating activity of seaweed extracts. Int J Immunopharmac 19:135-142.

Iwashima M, Mori J, Ting X, Matsunaga T, Hayashi K, Shinoda D, Saito H, Sankawa U, and Hayashi T. (2005) Antioxidant and antiviral activities of plastoquinones from the brown alga Sargassum micracanthum, and a new chromene derivative converted from the plastoquinones. Biol Pharm Bull 28:374-377.

Kim JY, Kim KH, Suh HS, and Choi WC. (1997) Antiinflammatory effects of new

dCollection @ dankook

chemical compounds, HS-1580 series (HS-1580, HS-1581, HS-1582). *J Life Sci* 16:1181-1187

Yang F, Wang Lin, and Hu Qiuhui. (2005) Preparation of polysaccharide derived from Sargassum thunbergii and its antioxidant activity. *Food Sci* 26:224-227.

Manou I, Bouillard L, M.J. Develeeschouwer, and A. O. Bsrel. (1998) Evaluation of the preservative properties of *Tymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test, *J. Appl. Microbiol.*, 84, 368

Heo SJ, and Jeon YJ. (2005) Antioxidant effect and protecting effect against cell damage by enzymatic hydrolysates from marine algae. *Food Indus. Nutr.* 10:31-41

Lee NH, O KL. (2000) Screening of radical scavenging effects from marine algae. Cheju *J. Life Sci,* 3:95-101

Lee EH, Ham J, Ahn HR, Kim MC, Kim CY, Pan CH, Um BH, and Jun SH. (2009) Inhibitory effects of the compounds isolated from Sargassum yezoense on α-glucosidase and oxidative stress. Korean *J.Pharmacogn,* 40:150-154

Bae SJ. (2004) Anticarcinogenic effects of Sargassum fulvellum fractions on several human cancer cell lines in vitro. J. Korean Soc. *Food Sci. Nutr,* 33:480-486

Seo Y, Lee HJ, Park KE, Kim YA, Ahn JW, Yoo JS, and Lee BJ. (2004) Peroxynitrite-scavenging constituents from the brown alga Sargassum thunbergii. *Biosci Biotech Eng,* 9:212-216.

Zhuang C, Itoh H, and Mizuno T. (1995) Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (Sargassum thunbergii). *Biosci Biotech Biochem,* 59:563-567.

Lee SY, Eu-Jin Song, Kim KBWR, Yoon SY, Kim SJ, Lee SJ, Hong YK, Lim SM and Ahn DH. (2009) Antimicrobial Activity of Ethanol Extract from *Sargassum thunbergii, J Korean Soc Food Sci Nutr,* 38(4):502-508

dCollection @ dankook

Dawson EY. (1974) Marine botany. Kang JW, ed. Daehan book publishing Co., Seoul. p 224-226

Cho SH, Kang SE, Cho JY, Kim AR, Park SM, Hong YK, and Ahn DH. (2007) The antioxidant properties of brown seaweed (Sargassum siliquastrum) extracts. *J Med Food* 10:479-485.

Lee SY, Kim JH, Kim KBWR, Song EJ, Kim AR, Park SM, Han CS, and Ahn DH. (2007) Antimicrobial activities of medicinal herbs and seaweeds extracts against microorganisms isolated from the rice warehouses. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36:476-480.

Numata A, Kanbara S, Takahashi C, Fujiki R, Yoneda M, Usami Y, and Fujita E. (1992) A cytotoxic principle of the brown alga Sargassum tortile and structures of chromenes. *Phytochem* 31:1209-1213.

Kim MJ, Choi JS, Song EJ, Lee SY, Kim KBWR, Lee SJ, Kim SJ, Yoon SY, Jeon YJ, and Ahn DH. (2009) Effects of Heat and pH Treatments on Antioxdant Properties of *Ishige okamurai* Extract, *Korean J Food SCI. Technol,* 41(1): 50-56

Athukorala Y, Lee KW, Kim SK, and Jeon YJ. (2007) Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technol*. 98:1711-1716

Nakamura T, Nagayama k, and Kawaguchi S. (1994) High Tocopherol Content in a Brown Alga *Ishige okamurae*. *FISHERIES sci*. 60:783-794

Ko SC, Kang SM, Ahn GN, Yang HP, Kim KN, and Jeon YJ. (2010) Antioxdant Activity of Enzymatic Exrtacts from *Sargassum coreanum*, *J Korean Soc Food Sci Nutr,* 39(4):494-499

김영설 (1999) 당뇨병 알아야 이긴다. 홍신문화사, pp244-268

dCollection @ dankook

Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, Arai S, Har Y, Suzuki K, Miyamoto Y, and Shimizu M. (2000) Green Tea Polyphenols Inhibit the Sodium- Dependent Glucose Transporter of Intestinal Epithelial Cells by a Competitive Mechanism. *J. Agric. Food Chem*, 48:5618-5623

Brant RB, Mathew JP, Y CZ., Sihong S, Clive HW, & Mark, AA. (2005) Glucose transporter-2 (GLUT2) promoter mediated transgenic insulin production reduces hyperglycemia in diabetic mice. *Federation of European Biochemical Societies*, 579(25): 5759-5764.

Stevens RJ, Kothari V, Adler AI, Startton IM, United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. (2001) The UKPDS risk engine a model for the risk of coronary heart disease in Type 2 diabetes. *Clin Sci*, 101:671-679

National Diabetes Data Group. (1979) Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes* 28(12):1039-1057

Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K and Nagai R. (2003) Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp. Biol. Med.(Maywood)*, 228:1111-1117

Fineman MS, Bicsak TA, Shen LZ, Taylor K, Gaines E, Varns A, Kim D, Baron AD. (2003) Effect on glycemic control of exenatide(synthetic exendin-4) additive to existing metformin and/or sulfonylurea treatment in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26:2370-2377

Tosi F, Muggeo M, Brun E, Spiazzi G, Perobelli L, Zanolin E, Gori M, Coppini A, Moghetti P.(2003) Combination treatment with metformin and glibenclamide versus single-drug therapies in type 2 diabetes mellitys: a randomized, double-blind, comparative study. *Metabolism*, 52:862-867

Oudjeriouat N, Moreau Y, Santimone M, Svensson B, Marchis-Mouren G, Desseaux V.

dCollection @ dankook

(2003) On the mechanism of alpha-amylase. *Eur.J.Biochem,* 270:3871-3879

STATISTICS KOREA. http://kostat.go.kr/wnsearch/search.jsp. Accessed Sept. 9, 2010.

doopedia 두산백과. 혈당.
http://www.doopedia.co.kr/doopedia/master/master.do?_method=view&MAS_IDX=101013000868244

Choi HJ, Jeong YK, Kang DO and Joo WH. (2008) Inhibitory Effects of Four Solvent Fractions of *Abnus firma* on α-Amylase and α-Glucosidase, *Jounal of Life Science,*7:1005-1010

Andrade-Cetto, A., H. Wiedenfeld, M.C. Revilla and I. A. Sergio. (2000). Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol*. 72:129-133

Heo SJ, Hwang JY, Choi JI, Han JS, Kim HJ, Jeon YJ. (2009) Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent α-glucosidase and α-amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice, European Jounal of Pharmacology 615:252-256

Choi HJ, Kang JS, Choi YW, Jeong YK, and Joo WH. (2008) Inhibitory Activity on the Diabetes Related Enzymes of *Tetragonia teragonioides*, *Korean J. Biotechnol. Bioneng* 23(5):419-424

Gao, H., Huang, Y.N., Gao, B., Li, P., Inagaki, C., Kawabata, J., (2008) Inhibitory effect on α-glucosidase by *Adhatoda vasica* Nees. Food Chem. 108:965-972.

Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A and Laaksoe M (2002) Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet,* 359:2072-2077

Kim JY. (2008) The Anti-diabetic Effects of Ecklonia cava Extract on Pancreatic

dCollection @ dankook

β-Cell Lines. Masters thesis, Dankook University, Korea

Bischoff, H. (1994). Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. *Eur. J. Clin. Invest*. 24:3-10

Hwang KY, Kim YH, Cho YS, Park YS, Lee JY, Kang KD, Kim KU, Joo DK, Ahn DK, and Seong SI (2008) Hypoglycemic Effect of Fermented Soybean Culture Mixed with Mulberry Leaves on Neonatal Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 37(4):452-458

Hong JH, Kim HJ, Choi YH, and Lee IS (2008) Physiological Activities of Dried Persimmon, Fresh Persimmon and Persimmon Leaves, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 37(8):957-964

Kim SS, Ha JH, Jeong MH, Ahn JH, Yoon WB, Park SJ, Seong DH, and Lee HY. (2009) Comparison of Biological Activities of Fermented *Codonopsis lanceolata* and Fresh *Codonopsis lanceolata*, Korean J. Medicinal Crop Sci, 17(4):280-285

Iwai K (2008) Antidiabetic and antioxidant effects of polyphenols in brown alga *Ecklonia stolonifera* in genetically diabetic KK-Ay MICE, *Plant Foods Hum Nutr*, 63:163-169

Li XC, Niu RG, Fan X, Han LJ, Zhang LX. (2005) Macroalage as a source of alpha-glucosidase inhibitors. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology,* 23(3):354-356.

Moon JS, Bae YI and Shim KH. (1998) The physicochemical properties of α-amylase inhibitors from black bean and naked barley in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37:367-375

Lee WY, Ahn JK, Park YK, Park SY, Kim YM, and Rhee HI. (2004) Inhibitory Effects of Proanthocyanidin Extrancted from *Distylium racemosum* on α-Amylase and α-Glucosidase Activities, Kor. J. Pharmacogn. 35(4):271-275

dCollection @ dankook

Markwick, N. P. Laing, W. A., Christeller. J. T., Reid, S. J., and Netwton. M. R. (1996) α-amylase activities in larval midgut extractes from four species of *Lepidoptera* (Tortricidae and Geleghiidae): Response to pH and to inhibitors from wheat, barley, kidney bean, and streptomyces. *J. Eeon. Entomol.* 89:39-45

Rekha, M. R., Sasikiran, K., and Padmaja, G. (2003) Inhibitor potential of protease and α-amylase inhibitors of sweet potato and taro on the digestive enzymes of root crop storage pests. *J. Stored Prod. Res*. In press.

Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park EJ, Park HR, and Lee SC. (2008) Antioxidant activity and inhibitory activity against α-amylase and α-glucosidase of *Viola mandshurica* extracts, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 37:405-409

Granum PE (1978) Purification and characterization of an amylase inhibitor from rye (*Secale cerale*) flour, *J Food Biochem*, 2:103-120

Mulicani VH and Rudrappa G (1994) Effect of heat treatment and germination on alpha amylase inhibitor activity in chick peas (*Cicer arietimum L*), *Plant Food Human Nutr*, 46:133-137

Lee SH, Li Y, Karadenix F, Kim MM and Kim SK (2009) α-Glucosidase and α-amylase inhibitory activities of phloroglucinal derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava, J Sci Food Agric* 89:1552-1558

Lee SJ, Song EJ, Kim KBWR, Lee CJ, Jung JY, Kwak JH, Choi MK, Kim MJ, Kim TW, and Ahn DH (2010) Inhibitory Effects of *Sargassum thunbergii* Ethanol Extract against α-amylase, *Kor J Fish Aquat Sci*, 43(6):648-653

Youm HW, Byun HK, Song GJ, Kim HK Lee HJ. (1998) Differential Expression of Glucose Transporter Gene in Mouse Early Embryos, *Kor. J. Fertil. Steril.*, 25(1):4

Thorens B, Charron MJ and Lodish HR. (1990) Molecular physiology Dof glucose transporters, *Diabetes Care,* 13:209-218

dCollection @ dankook

Hruz P, Mueckler M (2001) Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter. *Mol. Membr. Biol.* 18(3):183-193

Bell GI, Kayano T, Buse J, Burant C, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters, *Diabetes Care* 13(3):198-208

Wikipedia. Glucose transporter. http://en.wikipedia.org/wiki/Glucose_transporter. 24 May 2011.

Hogan A, Heyner S, Charron MJ, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Thorens B and Schyltz GA.(1991) Glucose transporter gene expression in early mouse embryos, *Development* 113:363-372

Park IW, Hwang GS, Kim HW and Lee DH (2004) Characterization of Acetoxyscirpendiol of *Paecilomyces tenuipes* as Inhibitor of Sodium Glucose Co-transporters Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes, *The Journal of Applied Pharmacology*, 12:250-256

Chang TC, Hyang SF, Yang TC, Chan FN, Lin HC, and Chang WL (2007) Effect of Ginsenosides on Glucose Uptake in Human Caco-2 Cell is Mediated through Altered Na+/GLucose Cotransporter 1 Expression, *J. Agric. Food Chem*, 55:1993-1998

Kim HJ. (2001) Effects of Silk Fibroin on Expression of Glucokinase Gene and Glucose Transporters in the C57BL/KsJ-*db/db* Mice, Hanlim University, Korea.

Sharma, C., R. Manfeshwar and S. Weinhouse. (1963) Effects of diet and insulin on glucose-adenosine triphosphate phosphotansferases of rat liver. *J. Biol. Chim.* 238:3841-3845.

Kim DS and Kim CH. (2001) Effect of Sea Tangle, Laminaria japonicus, Extract on The Activities of Glucokiase and Hexokinase in Alloxan-Induced Diabetic Mellitus Mice, *Korean Jounal of Life Science*, 11(5):476-482

dCollection @ dankook

Bedoya FJ, Matschinsky FM, Shimizu T, O'Neil JJ, Appel MC (1986) Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islets and liver of the rat, *J Biol Chem* 261:10760-10764

Bedoya, FJ, Wilson JM, Ghosh AK, Finegold D and Matschimsky FM. (1986) The glucokinas glucose sensor in Human pancreatic islet tissue. *Diabetes* 35:61-67

Kim HS, Roh YJ and Choe ME. (2005) *Cordyceps militaris* Increases Hepatic Glucokinase Activities, *J Korean Soc Food Sci Nutr,* 34(2):158-161

Iynedjian PB, Birkhauser Verlag, and Balel. (2008) Molecular Physiology of Mammalian Glucokianse

Albert L. Lehninger. (1982) Principles of Biochemistry. Worth publishers INC. JOHNS HOPKINS University school of medicine. p421.

Lee SH, Kim KN, Cha SH, Ahn GN, Jeon YJ. (2006) Comparison of Antioxidant Activities of Enzymatic and Methanolic Extracts from *Ecklonia cava* Stem and Leave. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 35(9):1139-1145.

Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. (2002) Bactericidal activity of pholrotannins from the brown alga *Ecklonia kurome. J Antimicrob Chemoth* 50:889-893.

Ruperez P, Ahrazem O, Leal JA. (2002) Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus. J Agric Food Chem*, 50:840-845.

Lee HS, Choi MS, Lee YK, Park SH, Kim YJ. (1996) A Study on the Development of High-fiber Supplements for the Diabetic Patients Effect of Seaweed Supplementation on the Lipid and Glucose Metabolism in Streptozotocin- indyced *Diabetic Rats.* *한국의학회지*, 29(3):296-306

dCollection @ dankook

한국동실물도감 제8권 식물편(해조류) 교육과학기술부

김기옥, 이주엽, 한종헌, 김미량, 오유성, 강민철, 고광효, 진호경, 김행범, 김봉석, 엄병헌(2007). 항당뇨 활성을 나타내는 패과식물의 추출물. 대한민국 특허 제 10- 2007-0057318.

AOAC (1995) Official Method of Analysis of AOAC Intl. 16th ed. Method 991-43. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA.

Kim JS, Kwon YS, Chun WJ, Kim TY, Sun JH, Yu CY, and Kim MJ. (2010) *Rhus verniciflua* Stokes flavonoid extracts have anti-oxidant, anti-microbial and α-glucosidase inhibitory effect, *Food Chemistry* 120:539-543

Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, and Watanabe M. (1999) A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell vaibility assay. *Anal. Commun*.,36:47-50

Kim DC, and Kim JH. (1999) Transport of Transferrin-Horseradish Peroxidase Conjugate Through Cultured Caco-2 Cell Monolayer, *J. Kor. Pharm. Sci.*, 29(4): 287-293

Hidalgo IJ, Raub TJ and RT.(1989) Borchardt, Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, Gastroenterology, 96:736-749

Seo JH, Kim SH, Ahn SY, Jeong ES, Cho JG and Park HY. (2010) Pathological Effect of Melatonin on Vascular Endothelial Cell Detachment. *Jounal of Life Science*, 20(6):914-921

Cho JG, Kim SH, Seo JH, Ahn SY, Jeong ES and Park HY. (2010) Novel Function of Lycopene in Vascular Endothelial Cell, *Journal of Life Science*, 20(7):1093-1099

Kim JE, Joo SI, Seo JH, and Lee SP. (2009) Antioxidant and α-Glucosidase Inhibitory

dCollection @ dankook

Effect of Tartary Buckwheat Extract Obtained by the Treatment of Different Solvents and Enzymes, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 38(8):989-995

Jang YS and Jeong JM. (2010) Antioxidative Effect and Digestive Enzyme Inhibition of Grape Seed Extract(GSE). *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39(6):783-788

Jang Mk, Kim NY, Lee DG, Lee JH, Ha JM, Ha BJ, Kim MH, Bae SJ, Jang JS, and Lee SH. (2006) Extracts on Cytotoxicity of Cancer Cell Lines and Immune Stimulation. *Jounal of Life Science*, 16(7):1169-1173

Park SY, Jung BM, Choi YH, Bae SJ. (2005) Growth Inhibition Effects of Cancer Cell Lines by *Gloiopeltis furcata Fractions in Vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 34(6):771-775

Hwang YJ, Nam HK, Chang MJ, Noh GW, Kim SH. (2003) Effect of *Lentinus edodes and Pleurotus eryngii* Extracts on Proliferation and Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr*, 32(2):217-222

Jeong MH, Kim SS, Ha JH, Jin L, Lee HJ, Kang HY, Park SJ, Lee HY. (2009) Enhancement of Acitcancer Activity of *Acer mono* by High Pressure Extraction Process. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 38(9):1243-1252

Kang TS, Kang MS, Sung JM, Kang AS, Shon HR, Lee SY. (2001) Effect of *Pleurotus eryngii* on the blood glucose and cholesterol in diabetic rats. *Korean J Mycology*, 29:86-90

Hong KH, Kim BY, Kim HK. (2004) Studies on the Biological Activity of *Pleurotus ferulea*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 33(5):791-796

Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. (2006) Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol*, 38:1134-1145

dCollection @ dankook

Kondeti VK, Badri KR, Maddirala DR, Thur SKM, Fatima SS, Kasetti RB, Rao CA. (2010) Effect of *Pterocarpus santalinus* bark, on blood glucose, serum lipids, plasma insulin and hepatic carbohydrate metabolic enzymes in streptozotocin-induced diabetic rates. *Food Chem Toxicol,* 48:1281-1287

Kim DJ, Kim JM, Kim TH, Baek JM, Kim HS, Choe ME. (2010) Effects of Mixed Extract from *Lycium chinense, Cordyceps militaris, and Acanthopanax senticosus* on Glucose-Regulating Enzymes of HepG2 in Hyperglycemic Conditions. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 39(9):1257-1262

Joo CN, Kim SJ. (1993) Hypoglycemic Action of the Soluble Fraction of *Panax Ginseng* C.A. Meyer in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Korean J. Ginseng Sci*, 17(2):101-108

Suzuki T, Nakai Y, Yoshie Y, Shira T, Hirano T. (1993) Seasonal variation in the diatery fiber content and molecular weight of soluble diatery fiber in brown algae. *Hijiki Suisan Gakkish,*59:1633-1637

dCollection @ dankook

(Abstract)

Screening of Anti-diabetic Activity in Seaweeds Produced in Jeju Island

HyunJu Shin
Department of Food Science and Nutrition
Graduate School
Dankook University
Advisor : Professor Yoonhwa Jeong

The aim of this study was to investigate the anti-diabetic effects of seaweed extracts. To investigate whether seaweed extracts inhibit α-glucosidase and α-amylase activities, the inhibition of glucose absorption in the small intestines was studied in the Caco-2 cells through the operation of SGLT1 and GLUT2. Also, the uptake of blood glucose in the metabolism process of glucokinase, pyruvate kinase in HepG2 cells was studied as well.

The ethanol extracts of *Ishige okamurai* had the greatest inhibitory activities of α-glucosidase and α-amylase. α-glucosidase inhibitory activity was at about 98% at 200㎍/㎖ and α-amylase inhibitory activity was at about 35% at 200 ㎍/㎖.

By studying the expression protein SGLT1 and GLUT2, along with their mRNA expression, the effect of seaweed extracts were measured through the inhibition of blood glucose absorption in the small intestines through Caco-2 cells. *Ishige foliacea* and *Ishige okamurai* decreased the SGLT1 mRNA level to 17.4 and 24.2%, respectively, and they increased the GLUT2 mRNA level to 2.5

dCollection @ dankook

and 0.8%, respectively, when compared to the control.

Ishige foliacea inhibited the protein expression level of SGLT1 to about 47.7%, while *Ishige okamurai* inhibited the protein expression level to about 60% of the level of the control. The GLUT2 protein expression level decreased to 34.9 and 37.6% due to *Ishige foliacea* and *Ishige okamurai* extracts, respectively, when compared to the control.

The uptake of the blood glucose in the metabolism process using HepG2 cells showed that *Ishige okamurai* inhibited the expression protein concentration level of glucokinase, pyruvate kinase.

In summary, *Ishige okamurai* extract had a positive effect on α-glucosidase and α-amylase inhibition, and a positive effect on glucose uptake in the small intestines. However, *Ishige okamurai* extract had a negative effect on the glucose uptake in the metabolism process.

dCollection @ dankook