

고 안정한 free radical로 알려져 있는 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)에 대한 소거 효과를 알아보았다. 지층이의 분획물인 n-hexane, 85% aq. MeOH, n-BuOH, H₂O fraction을 assay한 결과 85% aq. MeOH fraction이 가장 탁월한 효과를 보였다. 따라서 85% aq. MeOH fraction으로부터 항산화 활성 물질 탐색을 시도하였고, 그 결과 분리실험을 한 결과 8개의 화합물 (1-8)을 결정하였으며, 그 구조는 1H COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC와 같은 2D NMR 실험으로 결정하였고, 신규물질 2개와 기지물질 6개임을 확인하였다. 분리한 화합물을 이용하여 항산화 실험을 한 결과, 분리한 화합물 (1-5)이 모두 우수한 효과를 보였으나, 특히 DPPH radical 소거 활성에서는 다섯 개의 화합물 모두 BHT의 IC₅₀ 농도 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다 우수한 효과를 보였으며, compound 1과 3은 각각 26, 27 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 L-ascorbic acid의 11.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 보다는 능력이 떨어지지만 탁월한 항산화제임을 확인할 수 있다. 그리고 authentic ONOO- 소거활성에서는 compound 1의 90.3%와 compound 3의 88.1%의 결과는 대조군으로 쓰인 강력한 항산화제인 L-ascorbic acid의 98.1%와 penicillamine의 90.4%의 결과만큼이나 뛰어난 것을 알 수 있다. SIN-1에 대해 특이적으로 활성을 나타낸 화합물은 compound 5가 98.6%의 효과로 가장 뚜렷한 결과를 보였고, compound 2 또한 95.8%의 효과로 그 다음으로 좋은 결과를 보였다. 이는 대조군인 L-ascorbic acid의 93.5%와 penicillamine의 88.2%보다 좋은 결과임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 지층이가 우수한 항산화물질을 포함하고 있음을 확인해준다.

3. 염생식물 함초(*Salicornia herbacea*)로부터 이차 대사 물질들의 분리와 구조결정

해양생명환경학과 김 유 아
지도교수 서 영 완

함초 (*Salicornia herbacea*)는 우리나라 서해안 갯벌에서 군락을 이루며 자생하는 한해살이 풀로 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 철, 인 등 갖가지 미네랄과 효소 등을 줄기와 가지에 농축한 상태로 지니고 있다. 이런 특징을 지닌 함초는 숙변을 제거하고 변비를 없애고, 암, 축농증, 관절염, 고혈압, 요통, 비만증, 치질, 당뇨병, 갑상선염, 천식, 기관지염, 간질환 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이런 효과를 지닌 함초의 생리 활성 물질을 탐색하고자 경기도 안산시 대부도에서 함초를 채집하여 조추출물을 제조하고 분획하여 각각을 DPPH radical과 peroxynitrite 소거 효과 그리고 MTT assay를 통한 면역 세포 조절 효과를

탐색하였다.

DPPH radical 소거 효과 검색 결과 함초 조추출물이 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 23.8%로 낮은 소거율을 보였다. 하지만 분획물 측정 결과 동일 농도에서 n-BuOH 과 85% aq. MeOH fr.이 각각 85.2%, 70.0%로 대조군인 BHT (86.9%)와 BHA (68.0%)와 비교해 좋은 효과를 보임을 알 수 있었다. 이에 반해 H₂O와 n-hexane fr. 큰 효과가 없었다.

Peroxynitrite 소거활성은 in vitro상에서 실험하였다. SIN-1 실험 결과 85% aq. MeOH, n-BuOH, H₂O, n-hexane fr.은 각각 99.8%, 99.5%, 83.9%, 44.2%로 우수한 소거 효과를 나타냈으며 대조군인 L-ascorbic acid (100.3%)과 penicillamine (99.2%)와도 견줄 만 하다. Authentic peroxyntirite 첨가 실험 결과는 85% aq. MeOH, n-BuOH, H₂O, n-hexane fr. 소거 정도가 각각 71.5%, 70.8%, 34.5%, 44.2%로 SIN-1을 첨가한 결과보다는 소거 활성이 낮지만 85% aq. MeOH, n-BuOH fr.은 여전히 좋은 결과를 나타냈다.

Thymus cell을 이용한 MTT assay 결과는 control에 비해 n-BuOH fr.이 6배 정도 세포사멸 효과 있음 보였다, n-hexane과 85% aq. MeOH fr.은 각각 2배, 1.5배 정도 소거 효과를 보임을 확인할 수 있었다. 하지만 H₂O fr.은 거의 효과가 없는 것으로 나타났다. Spleen cell을 이용한 MTT assay 결과는 thymus와 마찬가지로 n-BuOH fr.이 control에 비해 6배 정도 저해 효과가 있었고 n-hexane과 85% aq. MeOH fr.은 각각 2배, 1.5배 효과가 있었으며 H₂O fr.은 효과가 없는 것으로 나타났다.

조추출물 중 항산화 효과와 면역 세포 조절 효과를 보였던 n-BuOH은 RP flash column chromatography, silica column chromatography 그리고 역상 HPLC 하여 compound 1-4를 분리 할 수 있었다. 또한 silica prap. TLC와 sephadex LH-20을 통해 compound 5를 분리하였다. Compound 1과 2는 신물질로써 구조는 각각 3-O- β -D-glucuronopyranosyl 3 β -hydroxy-23-oxo-30-norolean-12:20(29)-dien-28-oic acid 28-O-D-glucopyranoside 와 3-O- β -D-glucuronopyranosyl 3 β ,23-dihydroxy-30-norolean-12:20(29)-dien-28-oic acid 28-O-D-glucopyranoside로 결정되었다.

Compound 3-5는 기지물질로써 그 구조는 각각 3-O- β -D-glucuronopyranosyl 3 β -hydroxy-23-oxo-olean-12-en-28-oic acid 28-O-D-glucopyranoside, 3-O- β -D-glucuronopyranosyl 3 β -hydroxy-23-oxo-olean-12-en-28-oic acid 그리고 isorhamnetin 3-O- β -D-glucopyranoside임이 확인되었다. 역시 각각을 DPPH radical과 peroxyntirite 소거 효과 그리고 MTT assay를 통한 면역 세포 조절 효과를 탐색하였다.

DPPH radical 소거활성 검색 결과 compound 1-4 모두 거의 효과가 없었다. 하지만 compound 5를 300, 200, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 측정 한 결과 71.0%, 65.2%, 56.8%로 대조군 BHT (84.8%, 83.5%, 71.7%)에 상응하는 효과를 지님을 확인할 수 있었다.

SIN-1을 첨가한 peroxyntirite 소거활성 검색 결과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 compound 1-4의 소거 정도는 각각 79.8%, 77.2%, 80.7%, 57.7%로 소거 효과가 조금 있는 것으로 나타났다. 이에 반해 compound 5는 101.0%로 대조군 L-ascorbic acid (114.2%), penicillamine (109.2%)과 유사

한 효과를 보임을 확인 할 수 있었다. Authentic peroxyntirite를 첨가한 결과에서 compound 2-4는 각각 88.2%, 86.8%, 65.9%의 소거 효과를 보였고, compound 1, 5는 각각 95.3%, 98.1%로 대조군 L-ascorbic acid (100.2%), penicillamine (96.3%)과 유사한 효과를 보임을 확인 할 수 있었다.

마지막으로 compound 1-5의 thymus, spleen cell을 이용한 apoptosis 저해 정도는 control 과 비교해 거의 효과가 없는 것으로 확인되었다.

위의 실험 결과, 함초의 분획물 특히 n-BuOH fr.은 DPPH와 peroxyntirite 소거에 효과를 보이며 MTT assay를 통해 함초의 일부 추출물이 면역관련 장기인 thymus와 spleen cell의 활성을 증가시킴을 알 수 있었고, 이것은 아마도 함초가 세포의 증식을 자극시키거나 세포의 apoptosis를 억제하는 것이라 추측할 수 있었다. 이에 반해 분리된 이차대사물질들은 저조한 활성을 보임을 확인할 수 있었다. 이는 아직 분획물에 활성을 보이는 물질이 남아 있을 것으로 생각되며 향후 더 분리될 가능성이 있을 것으로 보인다.

4. 미꾸라지, *Misgurnus mizolepis* 간조직의 expressed sequence tags (ESTs) 분석 및 estradiol-17 β 처리에 의한 발현 특징

해양생명환경학과 이 수 진
지도교수 박 인 석

Expressed sequence tags (ESTs)는 cDNA library로부터 얻은 대량의 길이가 짧은 유전자 단편들의 DNA 염기서열에서 발견되는 유전자들에 관한 정보를 대량 확보하는 기술로서 이를 통해 본 연구에서는 미꾸라지, *Misgurnus mizolepis*, Günther, 1888 간조직으로 부터 분리한 mRNA로 만들어진 cDNA를 이용하여 제작된 cDNA library 내에서 무작위로 선택된 1,032개의 클론에 대한 ESTs 데이터베이스를 구축하였다.

미꾸라지 간조직의 ESTs 내에서 GenBank 내에 등록된 유전자들과 상당한 상동성을 보인 클론(e-value<10⁻³)들의 경우 94.9%였으며, 상동이 아주 낮거나(e-value \geq 10⁻³) GenBank 내에 등록된 유전자들과 맞는 것이 없는 클론들의 경우 6.2%로 나타났으며, ESTs 내에 존재하는 singletons의 비율은 38.6%였다. 생물종에 따른 분석에서 가장 잘 맞는 종은 어류로 82.6%를 차지한다. 기능별로 분류된 10개의 class 중에서 가장 많은 클론들이 속한 group은 18.5%의