

이 학 석 사 학 위 논 문

곰피의 항당뇨 및 항동맥경화 효과



2012년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

문 혜 은

이 학 석 사 학 위 논 문

곰피의 항당뇨 및 항동맥경화 효과

지도교수 최재수

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함



2012년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

문 혜 은

문혜은의 이학석사 학위논문을 인준함.

2012년 2월 24일



주 심 농학박사 남택정 (인)

위 원 이학박사 김형락 (인)

위 원 약학박사 최재수 (인)

목 차

LIST OF SCHEMES	iv
LIST OF TABLES	v
LIST OF FIGURES	vi
ABBREVIATIONS	viii
LIST OF SYMBOLS	ix
ABSTRACT	x
I. 서론	1
II. 실험 재료 및 방법	7
1. 재료	7
2. 시약 및 기기	7
2-1. 시약	7
2-2. 기기	8
3. 실험 방법	9

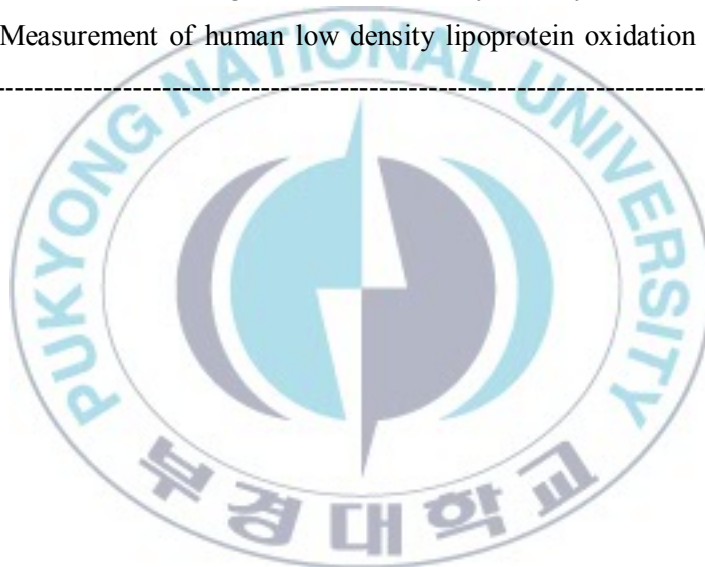
3-1. 추출 및 분획	9
3-2. 활성성분 분리	11
3-2-1. EtOAc 분획물의 활성성분 분리	11
3-2-2. EtOAc 분획물에서 분리된 성분의 분광학적 성질	13
3-3. 항당뇨 실험	17
3-3-1. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성 실험	17
3-3-1-1. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성에 대한 enzyme 실험	17
3-3-1-2. Protein tyrosine phosphatase 1B에 대한 저해활성 kinetic 실험	18
3-3-2. α -glucosidase 억제활성 실험	21
3-3-2-1. α -glucosidase 억제활성 실험에 대한 enzyme 실험 ---	21
3-3-2-2. α -glucosidase에 대한 저해활성 kinetic 실험	22
3-4. 항동맥경화증 실험	24
3-4-1. Human 저밀도 지단백 산화 억제활성 실험	24
3-4-2. Human 저밀도 지단백 산화에 대한 conjugated diene 형성에 대한 측정 실험	27
III. 결과 및 고찰	28
1. 항당뇨 실험	28
1-1. PTP1B 억제활성과 α -glucosidase 억제활성	28
1-1-1. MeOH 추출물과 각 분획물들의 PTP1B 억제활성과 α -glucosidase 억제활성	28
1-1-2. 분리된 화합물들의 protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성과 저해활성의 상관관계	31

1-1-3. 분리된 화합물들의 α -glucosidase 억제활성과 저해활성의 상관관계	41
2. 항동맥경화증 실험	50
2-1. MeOH 추출물과 각 분획물들의 human 저밀도 지단백 산화 억제활성	50
2-2. 분리된 화합물들의 human 저밀도 지단백 산화 억제활성	54
2-3. 분리된 화합물들의 human 저밀도 지단백 산화에 대한 conjugated diene 형성에 대한 측정	56
IV. 요약 및 결론	60
V. 참고문헌	64



LIST OF SCHEMES

Scheme	Page
Scheme 1. Extraction and fractionation procedure of <i>Ecklonia stolonifera</i> -----	10
Scheme 2. Isolation of compounds from the EtOAc fraction of <i>Ecklonia stolonifera</i> -----	12
Scheme 3. Measurement of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity -----	20
Scheme 4. Measurement of α -glucosidase inhibitory activity -----	23
Scheme 5. Measurement of human low density lipoprotein oxidation inhibitory activity -----	26



LIST OF TABLES

Table		Page
Table 1.	Inhibitory effects of MeOH extract and its fractions obtained from <i>Ecklonia stolonifera</i> on protein tyrosine phosphatase 1B and α -glucosidase activity -----	30
Table 2.	Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of phlorotannins isolated from <i>Ecklonia stolonifera</i> -----	34
Table 3.	α -Glucosidase inhibitory activities of phlorotannins isolated from <i>Ecklonia stolonifera</i> -----	43
Table 4.	Anti-atherosclerosis activity of the MeOH extract and its different fractions from <i>Ecklonia stolonifera</i> on Cu^{2+} -induced human low density lipoprotein oxidation -----	52
Table 5.	Anti- atherosclerosis activity of the isolated compounds from <i>Ecklonia stolonifera</i> on Cu^{2+} -induced human low density lipoprotein oxidation -----	55
Table 6.	The effect of compounds on lag phase time for conjugated diene formation in human low density lipoprotein -----	59

LIST OF FIGURES

Figure	Page
Fig. 1. Chemical structures of the compound 1-6 isolated from <i>Ecklonia stolonifera</i> --- -----	16
Fig. 2. Mechanism of the protein tyrosine phosphatase 1B assay -----	19
Fig. 3. Mechanism of the α -glucosidase assay -----	23
Fig. 4. Mechanism of the human low density lipoprotein oxidation assay -----	25
Fig. 5. Dixon plot for inhibition of phloroglucinol on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate -----	35
Fig. 6. Dixon plot for inhibition of dioxinodehydroeckol on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate ----	36
Fig. 7. Dixon plot for inhibition of eckol on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate -----	37
Fig. 8. Dixon plot for inhibition of phlorofucofuroeckol-A on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate ----	28
Fig. 9. Dixon plot for inhibition of dieckol on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate -----	39
Fig. 10. Dixon plot for inhibition of 7-phloroeckol on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate -----	40
Fig. 11. Dixon plot for inhibition of phloroglucinol on α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate -----	44
Fig. 12. Dixon plot for inhibition of dioxinodehydroeckol on α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate -----	45
Fig. 13. Dixon plot for inhibition of eckol on α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate -----	46
Fig. 14. Dixon plot for inhibition of phlorofucofuroeckol-A on α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate -----	47
Fig. 15. Dixon plot for inhibition of dieckol on α -glucosidase in the presence of different	

concentrations of substrate -----	48
Fig. 16. Dixon plot for inhibition of 7-phloroeckol on α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate -----	49
Fig. 17. Anti-atherosclerosis activity of the MeOH extract and its fractions from <i>Ecklonia stolonifera</i> on Cu^{2+} -induced human low density lipoprotein oxidation ----	53
Fig. 18. Dose-response effect of compounds on Cu^{2+} -induced oxidation of human low density lipoprotein, as measured as kinetic of conjugated dienes formation --	57



ABBREVIATIONS

CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
EtOAc	: ethyl acetate
<i>n</i> -BuOH	: <i>n</i> -butanol
H ₂ O	: water
¹ H-NMR	: proton nuclear magnetic resonance
¹³ C-NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
DMSO- <i>d</i> ₆	: deuterium dimethyl sulfoxide
CD ₃ OD	: deuterated methanol
Fig.	: Figure
Hz	: herz (sec ⁻¹)
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
RP	: reverse phase
TLC	: thin layer chromatography
UV	: Ultraviolet
PTP1B	: protein tyrosine phosphatase 1B
LDL	: low density lipoprotein

LIST OF SYMBOLS

J	Coupling constant (Hz)
δ	Chemical shift



In vitro anti-diabetic and anti-atherosclerotic effects of edible brown algae, *Ecklonia stolonifera*

Hye Eun Moon

Department of Food and Life science, The Graduate School,

Pukyong National University

Abstract

Ecklonia stolonifera OKAMURA belonging to the perennial brown alga, is a member of the family Laminariaceae. It usually grows well in subtidal zones at 2-10 m depth and commonly distributed in the mid-Pacific coast around Korea and Japan. It is frequently consumed as a foodstuff, together with *Undaria pinnatifida* and *Laminaria japonica*. This brown alga has been also used as phlorotannin-rich raw materials and phlorotannins are secondary metabolites polymerizing phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) through an ether, phenyl, or 1,4-dibenzodioxin linkage. Phlorotannins were found to have a variety of bioactivities, such as anti-diabetic complications, antioxidant, tyrosinase inhibitory, angiotensin-converting enzyme inhibitory, antimutagenic, nitrite-scavenging, algicidal, anti-inflammatory, nitrite-scavenging,

anti-skin aging, and anti-allergic. However, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and α -glucosidase inhibitory activities of phlorotannins isolated from *E. stolonifera* and their antioxidative effects on human low density lipoprotein (human LDL) have not been investigated yet. Increased PTP1B enzyme related insulin resistance and α -glucosidase that catalyze the final step in the digestive process of carbohydrates have been implicated in the pathogenesis of many diabetic complications containing atherosclerosis, cardiac dysfunction, retinopathy, and nephropathy. The diabetic patients have a higher risk of developing atherosclerotic diseases than non-diabetic. Oxidation of LDL has been represented as one of the main reason for atherosclerosis and has been reported that dietary antioxidants and free radical scavenger are able to prevent LDL oxidation which can reduce the risk of atherosclerosis in diabetes. The present work investigated the anti-diabetic and anti-atherosclerotic effects of the methanol (MeOH) extract and different solvent soluble fractions including dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH), and water (H₂O) of the edible brown alga, *E. stolonifera* together with its isolated phlorotannins via the inhibition of α -glucosidase, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), the inhibition of human low density lipoprotein (LDL) oxidation and the conjugated diene formation in human LDL under *in vitro* conditions, respectively. The MeOH extract showed promising inhibitory activities of both PTP1B and α -glucosidase, with IC₅₀ values of 6.39 ± 0.18 μ g/ml against PTP1B and 2.82 ± 0.63 μ g/ml against

α -glucosidase, respectively. Among several fractions, the EtOAc fraction and *n*-BuOH fraction exhibited potential inhibitory activities in PTP1B with IC_{50} values of $0.26 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$ and $0.23 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ and in human LDL oxidation with IC_{50} values of $3.04 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ and $4.54 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$, respectively. On the other hand *n*-BuOH fraction showed weak α -glucosidase inhibitory activities with IC_{50} value of $4.59 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$ than EtOAc fraction with IC_{50} value of $1.15 \pm 4.59 \mu\text{g/ml}$. Since the EtOAc fraction showed significant inhibitory activities in PTP1B, α -glucosidase, human LDL oxidation, it was selected for chromatographic separation of active compounds using silica gel, Sephadex LH-20, RP-18 column chromatographies to isolate six phlorotannins, phloroglucinol (1), dioxinodehydroeckol (2), eckol (3), phlorofurofueckol-A (4), dieckol (5), and 7-phloroeckol (6). Phlorotannins 3-6 were found as the potent and non-competitive PTP1B inhibitors with respective K_i values of 2.86, 1.43, 1.22, and 2.90 μM and with IC_{50} values ranging from 0.56 to 2.64 μM . Phlorotannins 4-6 exhibited the most potent α -glucosidase inhibitory activity with IC_{50} values ranging from 1.37 to 6.13 μM . Interestingly, phlorotannins 4 and 6 were non-competitive with K_i values of 0.45 and 0.56 μM , while phlorotannins 5 exhibited competitive inhibition with a K_i value of 0.27 μM against α -glucosidase enzyme. Furthermore, phlorotannins 3-5 showed the strongest inhibitory activity against human LDL oxidation with IC_{50} value of $7.47 \pm 0.05 \mu\text{M}$, $4.34 \pm 0.07 \mu\text{M}$, $3.10 \pm 0.24 \mu\text{M}$ and significantly reduced the lag time ($117.48 \pm 0.15 \text{ min}$, $105.42 \pm 0.59 \text{ min}$, $137.61 \pm 0.39 \text{ min}$).

min at concentration 10 μ M) of conjugated diene formation, respectively. These results demonstrated that the MeOH extract and individual fractions of *E. stolonifera* as well as its isolated phlorotannins exhibited the potent anti-diabetic and anti-atherosclerotic effects via the inhibition of PTP1B, α -glucosidase, and human LDL oxidation, conjugated diene formation. Therefore, the extract and individual fractions of *E. stolonifera* as well as its isolated phlorotannins have anti-diabetic and anti-atherosclerotic effects in *vitro* conditions, which can be explored further for developing pharmaceutical drugs or functional foods to treat diabetes and atherosclerosis.



I. 서론

과거의 식생활과 만성질환의 관계는 주로 영양부족 또는 영양불균형에 기인하는 것으로 생각되었고, 이러한 질병들은 저개발국가형의 질병들로만 여겨졌다. 그러나 최근 20~30년 동안의 경제성장으로 인하여 문화양상의 변화와 함께 우리의 식생활에도 큰 변화를 초래하였다 (고정삼 등, 2002). 특히 식생활이 서구화로 변화되면서 고혈압, 당뇨병, 비만증, 고지혈증, 심혈관 질환인 만성 질환들의 발병률이 증가되었고, 이로 인해 국민들의 관심이 고조되고 있다. 그리고 이제는 선진국의 경우와 비슷한 형태의 만성질환들이 주요 사망원인들로 꼽히게 되었다 (이규태, 1994). Heart Disease and Stroke Statistics 에 따르면 전 세계적으로 당뇨병의 발병률은 2000년도에는 2.8%였으며 2030년도에는 4.4%로 증가할 것으로 예상하고 있으며, 또한 당뇨병에 걸린 전체 환자의 수는 2000년에는 171 백만명이었으며 2030년에는 366 백만명이 당뇨병에 걸릴 것으로 추측하였다. 이중에서 제2형 당뇨병 (인슐린 비의존성)이 90~95%를 차지한다 (Thomas *et al.*, 2006). 제2형 당뇨병은 인슐린의 분비량은 정상이나 세포 내에서 정상적인 기능을 하지 못하여 혈중 포도당의 농도가 높아지는 특징을 지닌 대사적 증후군으로서 체내에 들어 온 당을 충분히 흡수하지 못해 혈액에 축적되는 증상이 나타난다 (Suresh *et al.*, 2011). 인슐린은 혈액 속의 포도당의 양을 일정하게 유지시키고, 체내의 당과 지방, 에너지의 대사 및 저장에 관여하는 중요한 호르몬이다 (Hong *et al.*, 2004). 인슐린의 기능 이상으로 고혈당 증세가 지속 될 경우 망막변증, 신장변증, 그리고 신경변증과 같은 미세혈관 합병증과 관상동맥질환, 말초동맥질

환, 그리고 뇌혈관 질환과 같은 대혈관 질환 합병증인 만성당뇨합병증을 야기시킨다 (Wright *et al.*, 2006).

제2형 당뇨병 증상 중의 하나인 인슐린 저항성은 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 효소와 관련이 있다. 많은 논문들에 따르면 PTP1B는 인슐린의 세포 내 신호전달을 차단함으로써 인슐린 저항성을 유발한다고 증명하였다 (Ahmad *et al.*, 1997; Byon *et al.*, 1998; Goldstein *et al.*, 1998). 인슐린이 세포막 상에 있는 인슐린 수용체 (insulin receptor, IR)의 α -subunit에 결합하면 β -subunit의 세포내 영역에 있는 tyrosine phosphatase가 활성화되고 수용체에 있는 tyrosine 잔기의 인산화가 일어난다. 이와 함께 IR substrates (IRS) 1-4도 인산화 되어지면서 세포 내로 glucose 수송과 glycogen 합성과 같은 생물학적 반응을 야기시키는 몇몇의 신호전달체계를 활성화시킨다 (Na *et al.*, 2006; Bialy and Waldmann, 2005). Protein tyrosine phosphatases (PTPs)는 단백질의 tyrosine 잔기를 탈인산화 시키고 인슐린 신호전달에 있어서 negative한 조절자로 여겨지고 있다 (Johnson *et al.*, 2002). PTP- α , leukocyte antigenrelated tyrosine phosphatase (LAR), and SH2-domain-containing phosphotyrosine phosphatase (SHP2)와 같은 다양한 PTP 효소가 인슐린 신호를 조절하는데 이용되지만 그 중에서 PTP1B 효소는 인슐린 신호전달을 조절하는 중요한 효소로 알려져 있다. PTP1B 효소는 활성화된 IR과 IRS protein과 반응하여 탈인산화를 일으킨다 (Na *et al.*, 2006; Asante-Appiah *et al.*, 2003). 이 효소의 과발현이 인슐린 신호전달체계를 억제하고 인슐린 민감성의 변화를 초래하여(Ahmad *et al.*, 1997) 체내로 당이 흡수되지 못하고 혈중 당 함량이 증가하게 된다 (Jeong *et al.*, 2011). 게다가 leptin의 신호전달에도 PTP1B에 의해서 감소되어 지는데 이것은 leptin의 신호전달체계 (signaling cascades) 또한 이 효소에 의해서 조절되어진다는 것을 알려준다 (Johnson *et al.*, 2002).

제2형 당뇨병에 관여하는 또 다른 효소로는 α -glucosidase가 있다. 이 효소는 소장의 용모에 존재하고 이당류 또는 소당류를 탄수화물의 최종 소화흡수 상태인 단당류로 가수분해하는 역할을 하는 소화효소이다. 이 효소가 증가하게 되면 이당류나 소당류가 빠르게 포도당으로 분해되어 혈당량을 증가시켜 고혈당 상태를 야기시킨다 (Caspary, 1987). 따라서 α -glucosidase 효소를 억제시키는 억제제를 발견하는 것이 중요하다. α -Glucosidase 억제제의 기능은 소장으로부터 탄수화물 흡수를 지연시키고, 식후 혈당량을 낮춰주는 효과 (Hui *et al.*, 2011) 뿐만 아니라 제2형 당뇨병의 증상인 고혈당으로 인한 인슐린의 분비를 지연시키는데 효과적이다 (Satho *et al.*, 1978). 그러므로 PTP1B와 α -glucosidase 효소 활성을 감소 시키는 억제제를 발견하는 것이 제 2형 당뇨병 치료에 있어서 유용한 약물을 개발하는데 사용되어 질 수 있으며 (Johnson *et al.*, 2002; van de Laar *et al.*, 2005) 또한 PTP1B 효소 활성을 저해시키는 억제제는 비만 치료제를 개발하는데 사용되어 질 수 있다. (Asante-Appiah and Kennedy, 2003).

당뇨병에 걸린 환자들의 65%는 심혈관계 질환 또는 뇌경색 등으로 인한 사망률이 당뇨병에 걸리지 않은 환자들보다 2~4배 높으며, 전세계적으로 제2형 당뇨병 환자의 주요 사망 원인은 심혈관계 질환으로 보고 있다. American heart association에 따르면 1997년에 당뇨병과 함께 심혈관계 질환을 가진 환자수는 420 만명이었으나, 2005년에는 570 만명으로 약 36% 증가하여 당뇨병과 함께 심혈관계 질환의 관계를 중요 시 하고 있다 (Veronique, 2011). 이처럼 당뇨병이 있는 환자가 당뇨병이 없는 환자들보다 죽상동맥경화증 (atherosclerosis)과 심혈관계 (cardiovascular) 질환에 걸릴 위험이 훨씬 높다. 당뇨병뿐만 아니라 동맥경화를 일으키는 많은 요인들 중 하나는 산화된 저밀도 지단백 (low density lipoprotein, LDL)이며 이것은 초기 단계에서 동맥경

화증의 유발 인자로 보고된 바 있다 (Joseph *et al.*, 1991). LDL 입자는 혈중에서 콜레스테롤을 운반하는 역할을 하며 대부분 콜레스테롤 에스터(cholesterol ester)와 중성지방으로 구성되어 있으며 lecithin, sphingomyelin과 lysolecithin으로 구성된 단층의 phospholipid와 콜레스테롤 분자가 둘러싸고 있고, 하나의 apolipoprotein B-100분자가 바깥 층에 존재한다 (김인주 등, 2003). LDL은 세포막에 있는 수용체와 결합하여 세포내로 이동하고 리소좀에서 가수분해 되는데, 수용체에 이상이 생기면 선천성 고콜레스테롤 혈증을 유발하게 된다 (Lusis, 2000). 동맥경화증의 초기 단계는 LDL 입자가 동맥 벽에 축적되면서 금속 이온에 의해 산화되거나 (Park *et al.*, 2009), LDL이 동맥세포 표면에 있는 소거 수용체 (scavenger receptors)를 이용하여 대식세포 (macrophase)와 혈관 내피세포 내로 흡수되면 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)와 macrophage colony-stimulating factor에 의해 산화되어 산화-LDL로 바뀐다. 게다가 산화된 LDL은 monocyte를 자극시켜 세포표면에 부착하여 발현하게 된다 (Liao *et al.*, 1997). Monocyte는 세포내에 있는 콜레스테롤 함량에 따라 지질이 과량으로 축적되면 대식세포로 유도되어 (Glass *et al.*, 2001) 산화된 LDL이 수용체로 인식하여 지질 과산화물 형성과 콜레스테롤 에스터의 축적을 야기시키며 그 결과로 거품세포 (foam cell)가 형성된다 (Franklin *et al.*, 1999). 이러한 과정이 일어나는 동안 일부 세포들은 사멸하게 되고 또 다른 세포들은 거품세포를 형성하여 지방반 (fatty streak)이 동맥 주위에 쌓여 죽상동맥경화증을 일으킨다 (Libby *et al.*, 2002). 따라서 LDL의 산화를 억제시키는 억제제를 발견하는 것이 중요하고 항동맥경화를 치료하는 약물을 개발하는데 유용하게 사용될 수 있다.

본 연구에서 사용된 곰피 (*Ecklonia stolonifera* OKAMURA)는 *Ecklonia* 속의 대표적인 해조류이며, 한국과 일본 등지에 분포하는 다년생의 다시마과

(Laminariaceae) 에 속하는 갈조류이다. 곰피는 해안선을 따라 2~10 m 수심에서 자라며, 미역 (*Undaria pinnatifida*), 다시마 (*Laminaria japonica*), 툇 (*Hizikia fusiformis*), 그리고 모자반 (*Sargassum fulvellum*) 등과 함께 식용으로 널리 이용하는 대표적인 해조류이다 (Hoppe *et al.*, 1982). 곰피의 생리활성은 항산화 활성 (Lee *et al.*, 1996a), 항돌연변이 활성 (Lee *et al.*, 1996b; Han *et al.*, 2000), 섭식저해효과 (Taniguchi *et al.*, 1991) 등이 알려져 있는데, 이와 같은 생리활성은 곰피로부터 얻어지는 2차 대사산물인 phlorotannins 성분에 기인하는 것으로 알려져 있다. Phlorotannins은 1,3,5-trihydroxybenzene (phloroglucinol)을 기본구성 단위로 하는 phloroglucinol 중합체 형태의 페놀성 화합물이다 (Regan and Glomitza, 1986; Waterman and Mole, 1994). 곰피에서 알려진 2차 대사산물로는 phloroglucinol (Lee *et al.*, 1996a), eckol, dieckol (Kang *et al.*, 2004a) 등을 포함하는 phlorotannins류 화합물 (Taniguchi *et al.*, 1991), ecklonialactones (Kurata *et al.*, 1989; 1993) 그리고 vanadium bromoperoxidase (Hara and Sakurai, 1998)가 있다.

곰피에서 분리된 phlorotannins 화합물의 생리활성은 항산화 활성 (Lee *et al.*, 1996b; Kang *et al.*, 2004a; 2005a; 2005b; 2007; Nakamura *et al.*, 1996), 항돌연변이 활성 (Lee *et al.*, 1996a; Han *et al.*, 2000), 섭식저해효과 (Taniguchi *et al.*, 1991), tyrosinase 억제활성 (Kang *et al.*, 2004b), 항피부노화 활성 (Kim *et al.*, 2006; Joe *et al.*, 2006; Bu *et al.*, 2006), antiplasmin 효과 (Fukuyama *et al.*, 1989), 항바이러스 활성 (Ahn *et al.*, 2004a; 2004b; 2006), 심혈관 보호 효과 (Kang *et al.*, 2003), glycosidase 억제활성 (Shibata *et al.*, 2002a), 기억개선 효과 (Myoung *et al.*, 2005), hyaluronidase 억제활성 (Shibata *et al.*, 2002b; Bu *et al.*, 2006), 항알레르기 활성 (Sugiura *et al.*, 2006), 저지혈증 효과 (Yoon *et al.*, 2008) 그리고 tacrine으로 유도된 간세포 독성에 대한 간보호 활성 (Kim *et al.*, 2005) 등이 연구되었으나,

phlorotannin 성분에 대한 PTP1B, α -glucosidase, LDL 산화 억제효과 및 conjugated diene 측정에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

본 연구에서는 곰피 (*Ecklonia stolonifera*)의 100% MeOH 추출물과 계통적 분석법에 따라 순차적으로 분획한 각각의 분획물들에 대한 PTP1B 억제활성과 α -glucosidase 억제활성, 그리고 human LDL 산화 억제활성을 평가하였다. 그 중에서 활성이 뛰어난 분획물을 선택하여 silica gel, Sephadex LH-20, RP-18 column chromatography를 수행하여 생리활성 물질을 분리하였다. 분리한 화합물에 대한 PTP1B 억제활성과 α -glucosidase 억제활성, human LDL 산화 억제활성 뿐만 아니라 PTP1B와 α -glucosidase 억제활성에 대한 상관관계를 Dixon plot을 통하여 살펴보았으며, human LDL 산화 시 conjugated diene 형성을 측정하였다. 본 연구는 곰피의 생리활성 성분인 phlorotannins이 PTP1B와 α -glucosidase 그리고 human LDL 산화 시 형성되는 conjugated diene 형성 억제효과를 통하여 살펴본 당뇨병과 동맥경화증의 치료·예방 효과에 대한 최초의 연구결과이다. 곰피와 곰피에서 분리된 phlorotannins 성분이 당뇨 합병증과 동맥경화증을 치료하고 예방할 수 있는 기능성 식품으로 이용할 수 있는 가능성을 제시하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용된 곰피 (*Ecklonia stolonifera*)는 2000년 2월에 부산 기장군 대변항에서 채집하여 강릉대학교 김형근 교수의 감정을 받았다. 그 표본은 본 연구실에서 보관하고 있다. (No.20000228)

2. 시약 및 기기

2-1. 시약

Colum packing materials은 Kieselgel 60 (Si gel, 70~230 mesh ASTM, Merck, Art. 7734), Sephadex LH-20 (bead size 25~100 μm , Sigma, St. Louis, MO, USA), RP-18 (LiChroprep[®] RP-18, 40~63 μm , Merck, Germany)를 사용하였으며, Thin layer chromatography는 Kieselgel 60 F₂₅₄ plates (20 × 20 cm, 0.25 mm, precoated, Merck, Art. 5715)와 RP-18 F_{254s} plates (5 × 10 cm, Merck, Art. 5685)를 사용하였다. 발색 시약은 50% H₂SO₄을 사용하였으며 추출 및 column chromatography에는 1급 시약을 사용하였다. NMR 측정에 사용된 용매는 dimethyl sulfoxide (DMSO)-*d*₆ (Cambridge Isotope Laboratories, deuterium degree 99.9%)이다. Yeast α -glucosidase, acarbose, *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP), *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (pNPG), L-ascorbic acid, probucol, human low density lipoprotein (LDL), 그리고 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B, human recombinant)는

Biomol[®] International LP (Plymouth Meeting, PA, USA)에서 dithiothreitol (DTT)는 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)에서 구입하였고, 2-thiobarbituric acid (TBA)는 Tokyo Chemical Industry Co., LTD (Tokyo, Japan)에서 Trichloroacetic acid (TCA)는 Lancaster Synthesis (Morecambe, England), copper(II) sulfate (CuSO₄)는 Shinyo Pure Chemicals Co., LTD (Osaka, Japan)으로부터 각각 구입하였다.

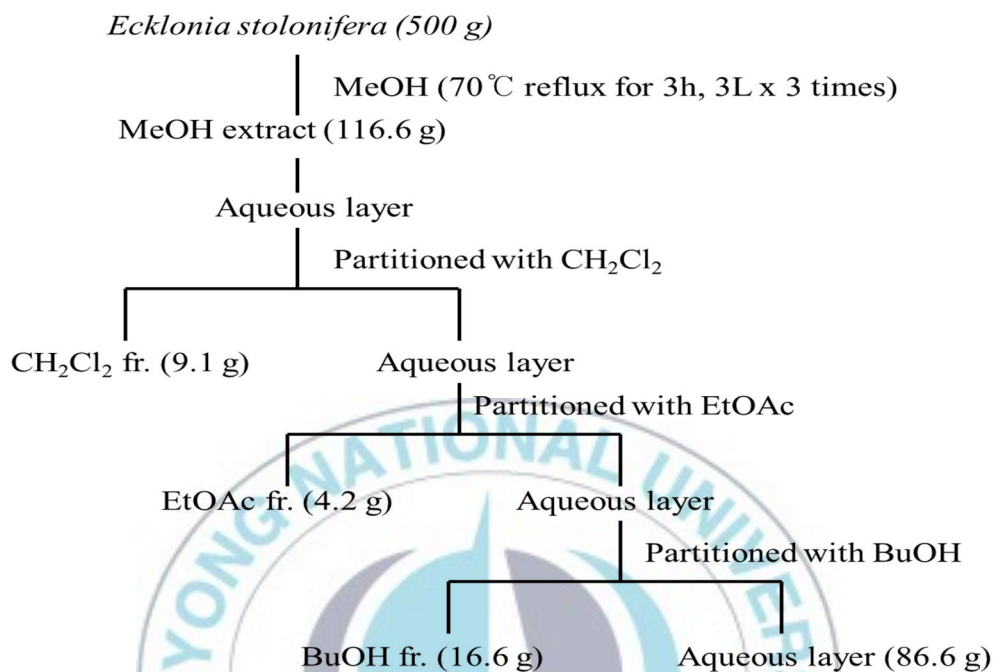
2-2. 기기

¹H-NMR과 ¹³C-NMR은 JEOL JNM-ECP 400 spectrometer (¹H-NMR 400 MHz and ¹³C-NMR 100 MHz, JEOL, Japan)로 측정하였으며, 2D-NMR인 HMQC와 HMBC는 pulsed field gradient를 사용하여 측정하였다. TLC상의 화합물 검색을 위해 장파장 (365 nm)과 단파장 (245 nm) 겸용 UV lamp (Model ENF-240C, Spectroline, USA)를 사용하였다. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성, α -glucosidase 억제활성, 그리고 human low density lipoprotein 산화 억제활성 측정은 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 하였으며, Low density lipoprotein 산화에 대한 conjugated diene 형성에 대한 흡광도는 UV/ Visible Spectrophotometer (Ultraspec[®] 2100 *pro*, Amersham Biosciences, USA)로 측정하였다.

3. 실험방법

3-1. 추출 및 분획

곰피 (*Ecklonia stolonifera*)의 엽상체를 동결건조 시킨 후 분말로 만든 시료 500 g을 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후 3 L의 MeOH을 넣고, 70℃ 수욕상에서 3시간씩 3번 추출하였다. 그리고 추출액을 여과한 후 rotary vacuum evaporator로 농축하여 116.6 g의 MeOH 추출물을 얻었다. MeOH 추출물을 H₂O:MeOH (9:1, v/v)로 녹여 분액깔때기에 넣고 동량의 CH₂Cl₂을 넣어 분액깔때기를 흔든 다음 평형화를 시켰다. 이후 평형화된 하층의 CH₂Cl₂ 가용부를 모아 무수 황산 나트륨 (sodium sulfate, anhydrous)를 처리한 다음 여과하여 농축한다. 위와 같은 방법으로 4회 더 반복하여 CH₂Cl₂ 분획물 9.1 g을 얻었다. 동일한 방법으로 EtOAc를 가하여 평형화된 상층의 EtOAc 가용부를 모아 농축한 후 EtOAc 분획물 4.2 g을 얻었다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 시행하여 상층의 *n*-BuOH 분획물 16.6 g과 하층의 H₂O 분획물 86.6 g을 얻었다. 곰피의 MeOH 추출물 및 각 용매별 분획과정을 Scheme 1에 나타내었다.

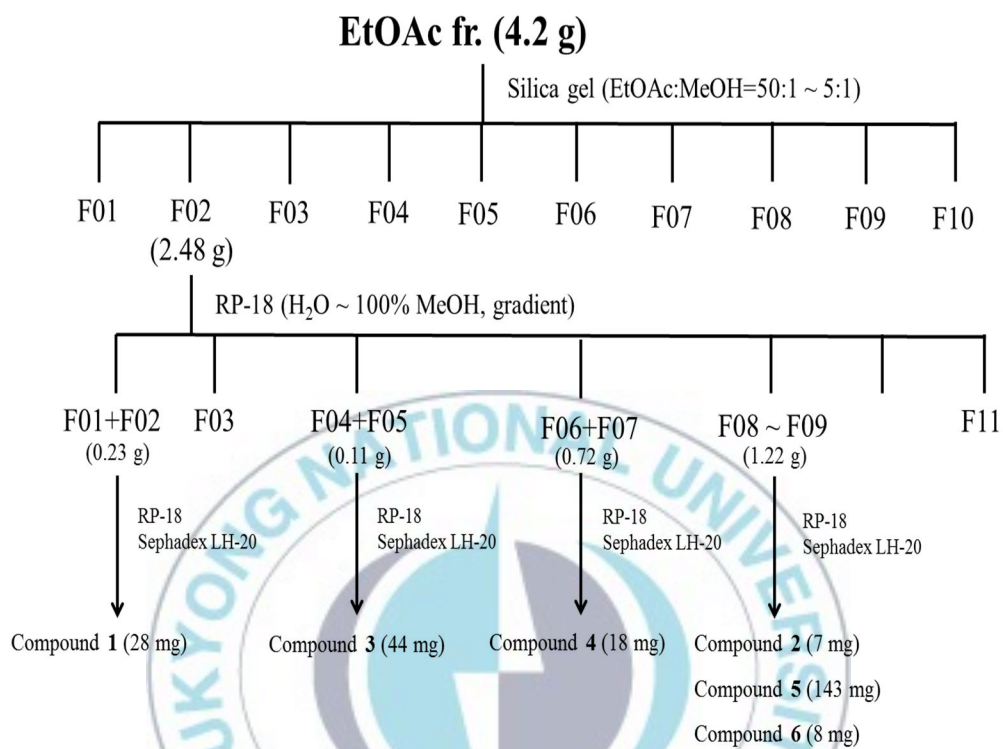


Scheme 1. Extraction and fractionation procedure of *Ecklonia stolonifera*.

3-2. 활성성분 분리

3-2-1. EtOAc 분획물의 활성성분 분리

곰피 (*Ecklonia stolonifera*)의 MeOH 추출물과 각각의 분획물들에 대하여 항당뇨 합병증 생리활성 실험과 항동맥경화증 생리활성 실험을 한 결과 EtOAc 분획물이 α -glucosidase 억제활성에서 가장 높은 활성을 보였고, protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성과 저밀도 지단백 (LDL) 산화 억제활성에서도 높은 활성을 나타내었다. 그리하여 EtOAc 분획물을 대상으로 silica gel, Sephadex LH-20, RP-18 column chromatography를 사용하여 활성성분을 분리하였다. EtOAc 분획물 (4.2 g)을 EtOAc:MeOH (50:1 ~ 5:1)로 silica gel column chromatography를 하여 10개의 subfractions (F1 ~ F10)으로 나누었다. F2 (2.48 g)을 RP-18 column chromatography (H₂O ~100% MeOH, gradient)를 수행하여 11개의 subfractions을 얻었다. F2-(FF1+FF2) (0.23 g)을 RP-18 (20% MeOH ~ 100% MeOH, gradient)과 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)를 반복적으로 수행하여 화합물 1 (28 mg)을 얻었다. F2-(FF4+FF5) (0.11 g)을 반복적인 RP-18 column chromatography (10% MeOH ~ 100% MeOH, gradient)와 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)로 정제하여 화합물 3 (44 mg)을 분리하였다. F2-(FF6+FF7) (0.72 g)을 반복적인 RP-18 column chromatography (10% MeOH ~ 100% MeOH, gradient)와 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)로 정제하여 화합물 4 (18 mg)을 얻었다. 또한 F2-(FF8+FF9) (1.22 g)을 RP-18 column chromatography (20% MeOH ~ 100% MeOH, gradient)와 반복적인 Sephadex LH-20 column chromatography (MeOH)로 정제하여 화합물 2 (7 mg), 5 (143 mg), 그리고 6 (8 mg)을 분리하였다. 분리 과정은 Scheme 2에 나타내었고, 이들 화합물들은 분광학적 기기분석에 의해 구조를 확인하였다.



Scheme 2. Isolation of compounds from the EtOAc fraction of *Ecklonia stolonifera*.

3-2-2. EtOAc 분획물에서 분리된 성분의 분광학적 성질

Compound 1 (phloroglucinol). White powder; $C_6H_6O_3$; IR $\nu_{\max}$ cm^{-1} 3481, 1617, 1499, 1419; EI-MS m/z (rel. int., %) 126 $[M]^+$ (100); 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 5.78 (3H, s, H-2, 4, 6); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 160.9 (C-1, 3, 5), 96.3 (C-2, 4, 6).

Compound 2 (dioxinodehydroeckol). Off-white powder; $C_{18}H_{10}O_9$; Negative FAB-MS m/z 369.0, Positive FAB-MS m/z 370.0, HR-FAB-MS m/z 370.0324 $[M]^+$; IR $\nu_{\max}$ cm^{-1} 3243, 1635, 1518, 1494, 1396, 1281, 1243, 1207, 1154, 1118, 1089, 1012, 810; 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 9.77 (1-OH), 9.64 (9-OH), 9.60 (6-OH), 9.27 (3-OH), 9.26 (11-OH), 6.10 (1H, s, H-7), 6.04 (1H, d, $J=2.7$ Hz, H-2), 6.01 (1H, d, $J=2.7$ Hz, H-10), 5.84 (1H, d, $J=2.7$ Hz, H-4), 5.82 (1H, d, $J=2.7$ Hz, H-12); ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 153.3 (C-3), 153.0 (C-11), 146.1 (C-1), 146.0 (C-9), 142.1 (C-4a), 141.7 (C-12a), 140.1 (C-6), 137.2 (C-7a), 131.6 (C-13b), 125.9 (C-5a), 122.7 (C-8a), 122.5 (C-13a), 122.3 (C-14a), 98.8 (C-2, 10), 97.6 (C-7), 93.9 (C-4, 12).

Compound 3 (eckol). Amorphous powder; $C_{18}H_{12}O_9$; Positive FABMS m/z 372 $[M]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.13 (1H, s, H-3), 5.94 (2H, s, H-7, 9), 5.93 (3H, s, H-2', 4', 6'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 162.4 (C-1'), 160.7 (C-3', 5'), 150.0 (C-8), 147.7 (C-3), 147.6 (C-6), 144.7 (C-9a), 143.8 (C-1), 139.0 (C-4a), 126.1 (C-4), 125.3 (C-5a), 125.1 (C-10a), 100.3 (C-7), 99.9 (C-2), 98.2 (C-4'), 96.3 (C-9), 95.9 (C-2', 6').

Compound 4 (phlorofucofuroeckol-A). Amorphous powder; $C_{30}H_{18}O_{14}$; Positive FABMS m/z 602 $[M]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.63 (1H, s, H-7), 6.40 (1H, s, H-11), 6.26 (1H, s, H-2), 5.97 (2H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'', 6''), 5.94 (1H, t, $J=1.9$ Hz, H-4'), 5.92 (1H, t, $J=2.0$ Hz, H-4''), 5.88 (2H, d, $J=2.1$ Hz, H-2', 6'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 162.7 (C-1''), 162.6 (C-1'), 161.0 (C-3', 5'), 161.0 (C-3'', 5''), 154.0 (C-7a), 152.5 (C-10), 152.0 (C-8a), 149.1 (C-3), 149.0 (C-12), 146.7 (C-6), 144.7 (C-1), 139.2 (C-4a), 136.2 (C-12c), 128.9 (C-5a), 125.9 (C-13a), 125.6 (C-4), 123.2 (C-9), 106.2 (C-12a), 106.1 (C-12b), 100.8 (C-11), 100.2 (C-2), 98.6 (C-4'), 98.5 (C-4''), 97.0 (C-7), 96.2 (C-2'', 6''), 96.2 (C-2', 6').

Compound 5 (dieckol). Amorphous powder; $C_{36}H_{22}O_{18}$; Positive FABMS m/z 742 $[M]^+$; 1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 6.15 (1H, s, H-3''), 6.13 (1H, s, H-3), 6.09 (2H, s, H-2'', 6''), 6.06 (1H, d, $J=2.9$ Hz, H-8), 6.05 (1H, d, $J=2.9$ Hz, H-6''), 5.98 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-6), 5.95 (1H, d, $J=2.8$ Hz, H-6), 5.92 (3H, s, H-2', 4', 6'); ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 162.7 (C-1'), 161.0 (C-3', 5'), 158.6 (C-1'''), 156.8 (C-7), 155.3 (C-7''), 153.2 (C-3''', 5'''), 148.1 (C-2''), 148.01 (C-2), 147.9 (C-9''), 147.7 (C-9), 145.1 (C-5a''), 145.0 (C-5a), 144.2 (C-4''), 144.1 (C-4'''), 139.4 (C-10a), 139.3 (C-10a''), 127.3 (C-4'''), 127.0 (C-9a), 126.5 (C-1), 126.4 (C-1'), 125.7 (C-9a''), 125.5 (C-4a''), 125.4 (C-4a), 100.7 (C-8''), 100.6 (C-8), 100.3 (C-3), 100.2 (C-3''), 98.5 (C-4'), 97.0 (C-2''', 6'''), 96.7 (C-6''), 96.6 (C-6'), 96.2 (C-2', 6').

Compound 6 (7-phloroeckol). Pale brown powder; $C_{24}H_{16}O_{12}$; 1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 5.72 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-2', 6'), 5.79 (1H, d, $J=3.1$ Hz, H-6), 5.80 (1H, t, $J=2.0$ Hz, H-4'), 5.86 (2H, s, H-3'', 5''), 6.01 (1H, d, $J=3.1$ Hz, H-8), 6.14 (1H, s, H-3),

9.0 (1H, s, H-4''), 9.12 (4H, d, $J=6.3$ Hz, 3', 5'-OH, 2'', 6''-OH), 9.20 (1H, s, 2-OH), 9.40 (1H, s, 4-OH), 9.61 (1H, s, 9-OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 160.3 (C-1'), 158.8 (C-3', 5'), 154.8 (C-4''), 154.5 (C-7), 151.2 (C-2'', 6''), 146.0 (C-9), 145.9 (C-2), 142.3 (C-5a), 141.8 (C-4), 137.1 (C-10a), 123.9 (C-9a), 123.1 (C-4a), 122.5 (C-1''), 122.2 (C-1), 98.9 (C-3), 98.3 (C-8), 96.2 (C-4'), 94.8 (C-3'', 5''), 93.6 (C-2', 6'), 93.4 (C-6).



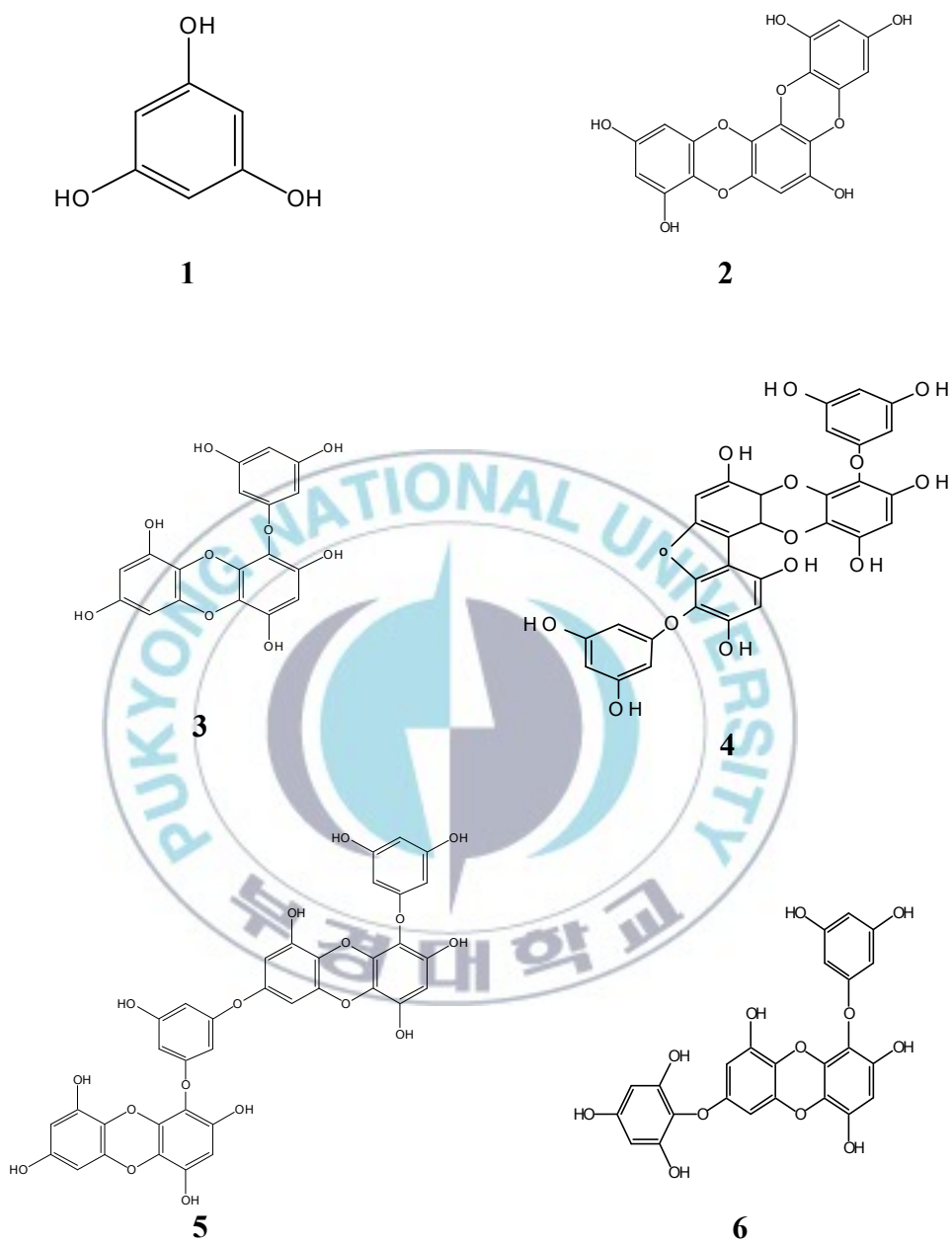


Fig. 1. Chemical structures of the compounds **1-6** isolated from *Ecklonia stolonifera*.

3-3. 항당뇨 실험

3-3-1. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성 실험

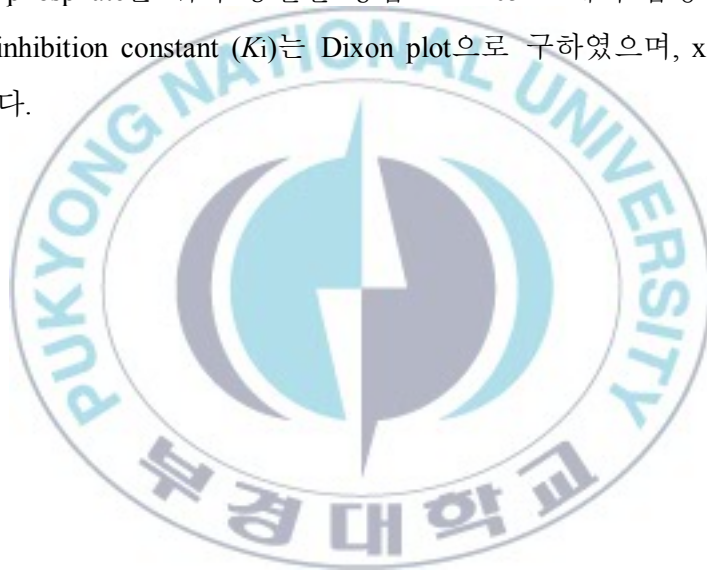
3-3-1-1. Protein tyrosine phosphatase 1B 억제활성에 대한 enzyme 실험

Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP 1B)의 억제 활성을 평가하는 방법은 Na 등(2006)의 방법을 변형하여 실험하였다. PTP1B (human, recombinant) 효소는 BIOMOL International LP로부터 구입하였다. 효소의 활성은 *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP)을 기질로서 사용하여 측정하였다. 96 well microtiter plate에 반응 혼합물의 총 부피를 100 μ L로 한다. 먼저 여러 농도의 sample 10 μ L와 효소 10 μ L, 그리고 PTP1B buffer [50 mM citrate buffer (pH 6.0), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid), 1 mM DTT (dithiothreitol)] 30 μ L를 넣어 35 $^{\circ}$ C, 5~10분간 preincubation을 시킨다. 그리고 기질 (*p*-NPP) 50 μ L를 첨가하여 35 $^{\circ}$ C, 20분간 incubation을 시킨 후 10 M NaOH를 10 μ L를 넣어 반응을 종결시킨다. 이후 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 positive control로는 ursolic acid를 사용하였다. PTP1B 억제 활성은 아래의 식을 이용하여 구한 후, IC₅₀ 값으로 환산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - (\text{시료의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}) / \text{표준흡광도} \times 100$$

3-3-1-2. Protein tyrosine phosphatase 1B에 대한 저해활성 kinetic 실험

PTP1B 효소의 저해활성에 대한 상관관계를 결정하기 위하여 다양한 sample 농도 [phloroglucinol (100 μ M, 50 μ M), dioxinodehydroeckol (50 μ M, 25 μ M, 10 μ M), eckol (10 μ M, 5 μ M), phlorofuofucoeckol-A (25 μ M, 10 μ M), dieckol (5 μ M, 1 μ M), 7-phloroeckol (10 μ M, 5 μ M)]와 기질인 *p*-nitrophenyl phosphate를 0.5 mM, 1 mM 그리고 2 mM의 농도로 준비한다. 여러 가지 농도의 sample와 *p*-nitrophenyl phosphate를 위와 동일한 방법으로 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 저해제의 inhibition constant (K_i)는 Dixon plot으로 구하였으며, x-축의 값은 $-K_i$ 를 나타낸다.



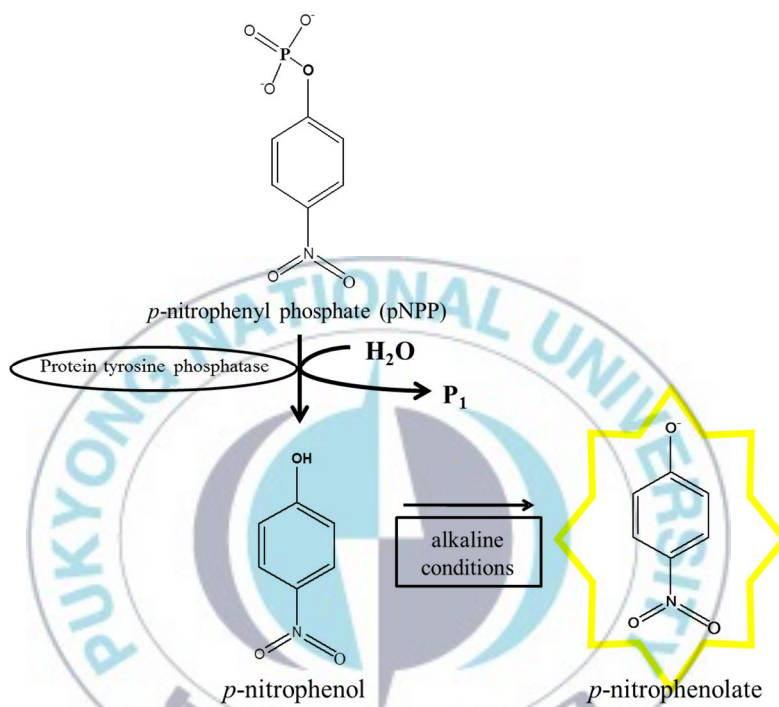


Fig. 2. Mechanism of the protein tyrosine phosphatase 1B assay.

Sample (inhibitors) 10 μ L + PTP1B enzyme 10 μ L + PTP1B buffer 30 μ L



35 °C preincubation for 5~10 min



Substrate (p-NPP) 50 μ L



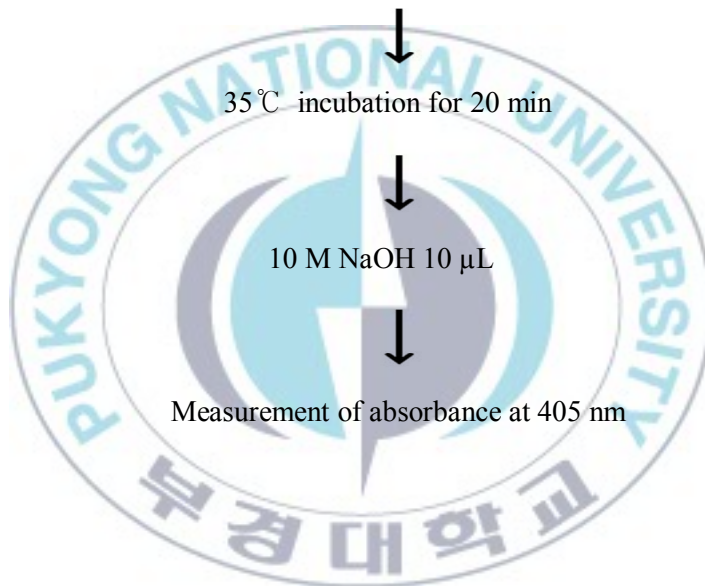
35 °C incubation for 20 min



10 M NaOH 10 μ L



Measurement of absorbance at 405 nm



Scheme 3. Measurement of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity.

3-3-2. α -Glucosidase 억제활성 실험

3-3-2-1. α -Glucosidase 억제활성에 대한 enzyme 실험

α -Glucosidase 효소의 억제활성을 측정하기 위해서 Li *et al.*(2005) 방법을 수정하여 실시하였다. 각각의 well에 100 mM phosphate buffer (pH 6.8) 20 μ L와 10% DMSO에 녹인 여러 농도의 sample 20 μ L를 넣는다. 그리고 기질 사용된 100 mM phosphate buffer (pH6.8)에 녹인 2.5 mM *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (pNPG) 20 μ L 넣은 후, 효소인 0.2 unit/mL α -glucosidase를 10 mM phosphate buffer (pH6.8)에 녹여 20 μ L를 넣는다. 37℃에서 15분 동안 incubation을 시킨 후 반응을 종결시키기 위해 0.2 M sodium carbonate solution 80 μ L를 넣는다. 이후 405 nm 에서 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였으며 이 실험에서 acarbose는 positive control로 사용되었다. α -glucosidase 억제활성은 아래의 식을 이용하여 억제율을 구한 후, IC₅₀ 값으로 환산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \{1 - (A_{\text{Sam}} - A_{\text{Sam-C}}) / A_{\text{Cont}}\} \times 100$$

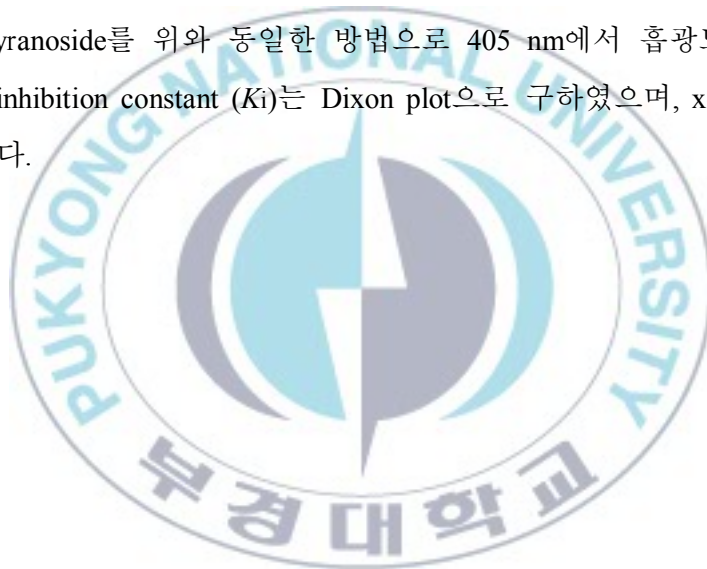
A_{Sam} : 측정시료를 넣었을 때의 흡광도

$A_{\text{Sam-C}}$: 측정시료를 넣고 pNPG를 넣지 않았을 때의 흡광도

A_{Cont} : 측정시료를 넣지 않았을 때의 흡광도

3-3-2-2. α -Glucosidase에 대한 저해활성 kinetic 실험

α -Glucosidase 효소의 저해활성에 대한 상관관계를 결정하기 위하여 다양한 sample 농도 [phloroglucinol (500 μ M, 250 μ M, 200 μ M, 100 μ M), dioxinodehydroeckol (90 μ M, 50 μ M, 10 μ M), eckol (30 μ M, 10 μ M, 5 μ M), phlorofurofuoceckol-A (3 μ M, 1 μ M), dieckol (3 μ M, 2 μ M), 7-phloroeckol (10 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M)]와 기질인 *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside를 0.625 mM, 1.25 mM 그리고 2.5 mM의 농도로 준비한다. 여러 가지 농도의 sample와 *p*-nitrophenyl α -D-glucopyranoside를 위와 동일한 방법으로 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 저해제의 inhibition constant (K_i)는 Dixon plot으로 구하였으며, x-축의 값은 $-K_i$ 를 나타낸다.



100 mM phosphate buffer 20 μ L + Sample 20 μ L
 + 2.5 mM pNPG 20 μ L + α -glucosidase enzyme 20 μ L



37°C incubation for 15 min



0.2 M Na_2CO_3 80 μ L



Measurement of absorbance at 405 nm

Scheme 4. Measurement of α -glucosidase inhibitory activity.

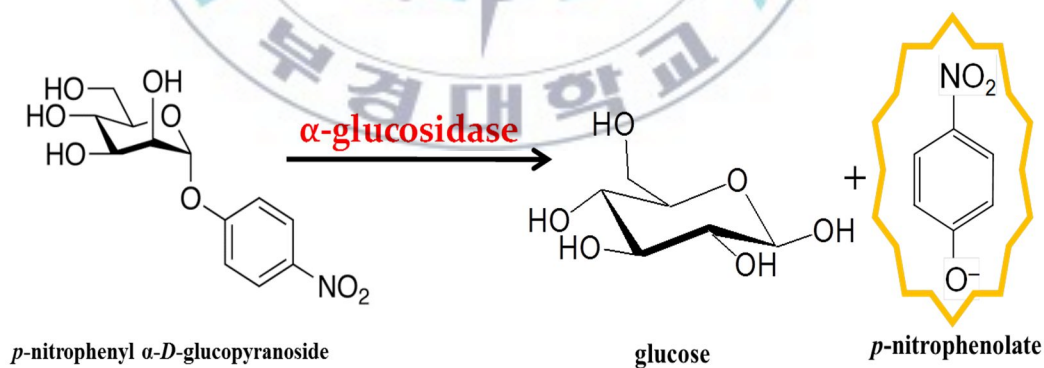


Fig. 3. Mechanism of the α -glucosidase assay.

3-4. 항동맥경화증 실험

3-4-1. Human 저밀도 지단백 산화 억제활성 실험

Human 저밀도 지단백 (Human low density lipoprotein, Human LDL) 산화 억제 효과를 측정하기 위해서 thiobarbituric acid (TBA)에 따른 malondialdehyde (MDA) 생성을 측정하는 방법은 Jeong *et al.* (2004)의 방법을 수정하여 실시하였다. 최종 농도가 50 µg / mL가 되도록 human LDL을 10 mM phosphate buffered saline (PBS) buffer (pH 7.4)에 희석하였다. Human LDL 500 µL (50 µg / mL)에 10 mM PBS buffer (pH 7.4)를 320 µL, 1 mM CuSO₄ 90 µL 및 MeOH extract, 각각의 분획물과 화합물의 90 µL를 튜브에 넣어 37°C의 water bath에서 4시간 배양하였다. 이 때 생성된 지질 과산화의 생성물인 MDA의 양을 측정하기 위해서 20% trichloroacetic acid (TCA)를 1 mL, 0.05 M NaOH에 녹인 0.67% TBA를 1 mL 첨가하였다. 반응 혼합액을 90°C, 20분간 water bath에서 배양하고 차갑게 냉각한 후 2000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 microplate reader spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, CA, USA)로 534 nm에서 흡광도를 측정하였으며, human LDL 산화 억제율은 아래의 식을 통하여 구한 후 IC₅₀ 값으로 환산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \{1 - (A_{\text{Sam}} - A_{\text{Cont}}) / A_{\text{Std}}\} \times 100$$

A_{Sam}: 측정시료를 넣었을 때의 흡광도

A_{Cont}: 측정시료를 넣고 CuSO₄를 넣지 않았을 때의 흡광도

A_{Std}: 측정시료를 넣지 않았을 때의 흡광도

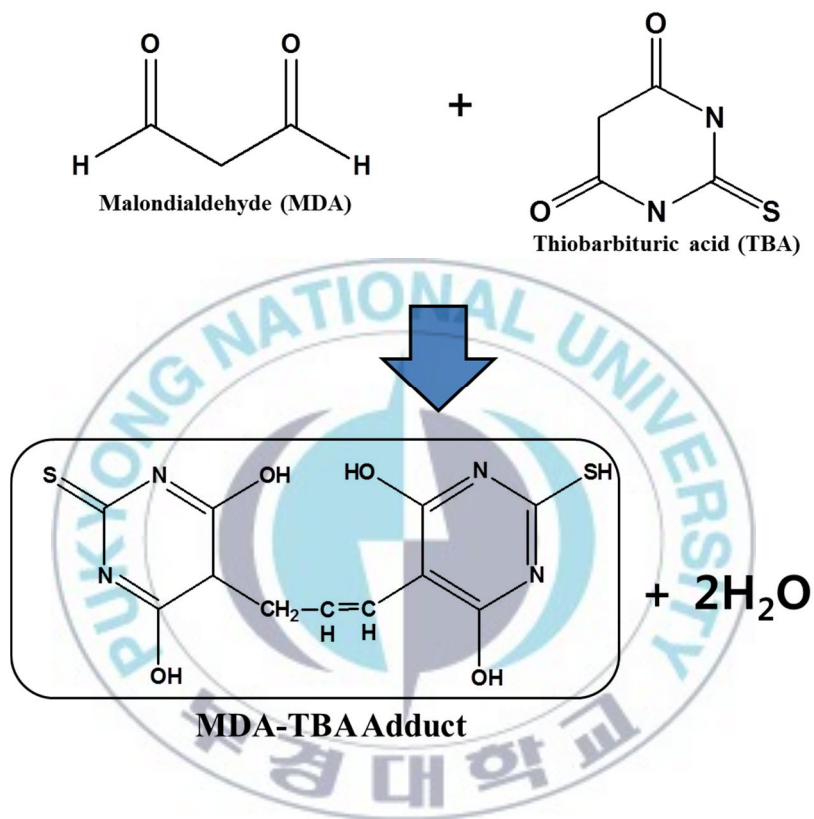
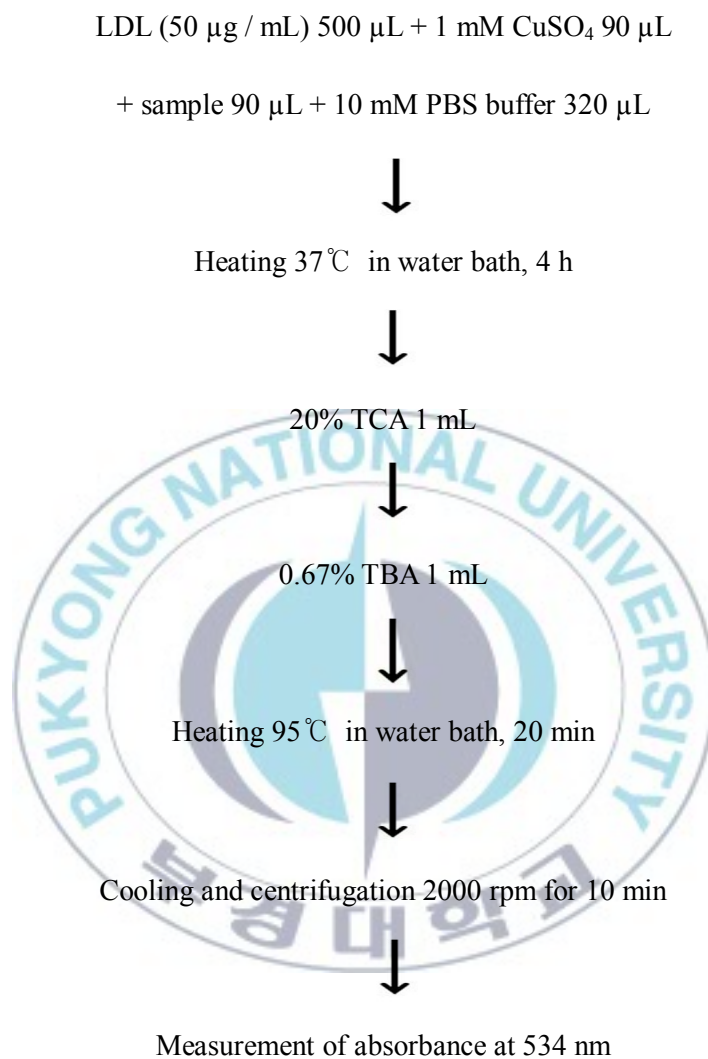


Fig. 4. Mechanism of the human low density lipoprotein oxidation assay.



Scheme 5. Measurement of human low density lipoprotein oxidation inhibitory activity.

3-4-2. Human 저밀도 지단백 산화에 대한 conjugated diene 측정 실험

지방질 산화물을 측정하기 위하여 지질 산화도를 Esterbauer (1989)의 conjugated dienes 측정 방법을 사용하였다. Human LDL의 최종 농도가 50 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 10 mM phosphate buffered saline (PBS) buffer (pH 7.4)에 희석하였다. 최종 부피가 3 mL이 되도록 human LDL (50 $\mu\text{g/mL}$)과 10 μM 의 CuSO_4 그리고 농도별의 화합물을 석영 큐벳에 넣는다. 이 반응혼합액에 대한 conjugated diene를 측정하기 위하여 4시간 동안 20분마다 UV/ Visible Spectrophotometer (Ultraspec[®] 2100 *pro*, Amersham Biosciences, USA)을 사용하여 234 nm에서 흡광도를 측정하였으며 온도는 37°C를 유지하였다.



III. 결과 및 고찰

1. 항당뇨 실험

1-1. PTP1B 억제활성과 α -glucosidase 억제활성

1-1-1. MeOH 추출물과 각 분획물들의 PTP1B 억제활성과 α -glucosidase 억제활성

곰피 (*Ecklonia stolonifera*)의 MeOH 추출물과 MeOH 추출물을 계통적 용매 분획하여 얻은 CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH 분획물과 H_2O 층에 대한 PTP1B 억제활성과 α -glucosidase 억제활성을 측정하여 각각 50% PTP1B와 α -glucosidase 억제활성을 나타내는 IC_{50} 값 ($\mu\text{g/ml}$)으로 나타내었으며, 그 결과는 Table 1에 나타내었다.

곰피의 MeOH 추출물은 PTP1B와 α -glucosidase 억제활성에서 IC_{50} 값이 $6.39 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$ 과 $2.82 \pm 0.63 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 곰피의 MeOH 추출물로부터 얻은 각각의 분획물들에 대한 PTP1B 억제활성은 *n*-BuOH 분획물 ($\text{IC}_{50} = 0.23 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$) > EtOAc 분획물 ($\text{IC}_{50} = 0.26 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$) > CH_2Cl_2 분획물 ($\text{IC}_{50} = 0.91 \pm 0.98 \mu\text{g/ml}$) > H_2O 분획물 ($\text{IC}_{50} = 3.97 \pm 0.44 \mu\text{g/ml}$)의 순으로 나타났다. MeOH 추출물과 각각의 분획물들 중에서 *n*-BuOH와 EtOAc 분획물이 다른 분획물들에 비해 높은 PTP1B 억제활성을 나타내었으며, 대조군으로 사용된 ursolic acid ($\text{IC}_{50} = 3.37 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$)보다 높은 억제활성을 나타내었다. 이들 결과에서 PTP1B 억제활성을 가지는 MeOH 추출물에 대한 각 분획물들 중 EtOAc와 *n*-BuOH 분획물이 비교적 높은 PTP1B 억제활성을 나타내는 것으로 보아 PTP1B 억제 활성물질은 이 두 분획물에 존재하며, 다소 극성을 가진 물질임을 유추할 수 있다.

곰피의 MeOH 추출물과 분획물들의 α -glucosidase 억제활성을 측정하기 위해서 사용된 대조약물로는 α -glucosidase 억제제로 알려져 있는 acarbose (Hui *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Lekshmi *et al.*, 2011)을 사용하였다. α -Glucosidase 억제활성 실험에서 곰피의 EtOAc 분획물은 IC_{50} 값이 $1.15 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ 로 가장 높은 활성을 나타내었다. 다음으로는 CH_2Cl_2 분획물 ($IC_{50} = 1.46 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$) > MeOH 추출물 ($IC_{50} = 2.82 \pm 0.63 \mu\text{g/ml}$) > *n*-BuOH 분획물 ($IC_{50} = 4.59 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$) > H_2O 분획물 ($IC_{50} = 163.63 \pm 5.17 \mu\text{g/ml}$)의 순으로 나타났다. H_2O 분획물을 제외한 MeOH 추출물과 분획물들은 대조군인 acarbose의 IC_{50} 값인 $101.52 \pm 3.82 \mu\text{g/ml}$ 보다 훨씬 높은 α -glucosidase 억제활성을 나타내었다. 이 결과에서는 α -glucosidase 억제활성을 가지는 MeOH 추출물에 대한 각 분획물들 중 높은 활성을 나타낸 EtOAc 분획물이 α -glucosidase 억제 활성물질이 다량 함유되어 있다고 생각할 수 있다.

따라서 이러한 결과를 바탕으로 PTP1B와 α -glucosidase의 억제활성이 모두 높은 EtOAc 분획물에 이들의 활성을 나타내는 성분이 다량 존재하고 있을 것으로 추측할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 곰피의 EtOAc 분획물에서 그 생리활성성분을 분리하고자 하였다.

Table 1. Inhibitory effects of MeOH extract and its fractions obtained from *Ecklonia stolonifera* on protein tyrosine phosphatase 1B and α -glucosidase activity

samples	PTP1B ^a	α -glucosidase ^a
	IC ₅₀ (μ g/ml)	IC ₅₀ (μ g/ml)
	Mean $\pm$ S.E.M.	Mean $\pm$ S.E.M.
MeOH extract	6.39 $\pm$ 0.18	2.82 $\pm$ 0.63
CH ₂ Cl ₂ fraction	0.91 $\pm$ 0.98	1.46 $\pm$ 0.11
EtOAc fraction	0.26 $\pm$ 0.06	1.15 $\pm$ 0.03
<i>n</i> -BuOH fraction	0.23 $\pm$ 0.07	4.59 $\pm$ 0.57
H ₂ O fraction	3.97 $\pm$ 0.44	163.63 $\pm$ 5.17
Ursolic acid ^b	3.37 $\pm$ 0.13	
Acarbose ^c		101.52 $\pm$ 3.82

PTP1B : protein tyrosine phosphatase 1B.

^aThe 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined by regression analyses and expressed as mean $\pm$ S.E.M of triplicate experiments. ^bUrsolic acid was used as a positive control on the PTP1B inhibitory activity. ^cAcarbose was used as a positive control on the α -glucosidase inhibitory activity.

1-1-2. 분리된 phlorotannin 화합물들의 PTP1B 억제활성과 저해활성의 상관관계

곰피의 EtOAc 분획물로부터 분리된 phlorotannins 화합물들을 대상으로 PTP1B 억제활성을 평가하고, 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 그리고 PTP1B 효소에 대한 저해제와 기질과의 상관관계를 Dixon plot을 통하여 알아보았으며, 각각의 화합물에 대한 Dixon plot은 Fig. 5 - 10에 나타내었다.

평가된 phlorotannins 화합물 중에서 화합물 **4** (phlorofucofuroeckol-A)가 가장 높은 억제활성을 나타내었으며, IC_{50} 값으로는 $0.56 \pm 0.10 \mu M$ 이다. 다음으로 화합물 **5** (dieckol, $1.18 \pm 0.02 \mu M$) > 화합물 **6** (7-phloroeckol, $2.09 \pm 0.09 \mu M$) > 화합물 **3** (eckol, $2.64 \pm 0.04 \mu M$) > 화합물 **2** (dioxinodehydroeckol, $29.97 \pm 4.52 \mu M$) > 화합물 **1** (phloroglucinol, $55.48 \pm 1.85 \mu M$) 순으로 나타났다. 화합물 **3 - 6**은 대조군으로 사용된 ursolic acid ($10.82 \pm 0.32 \mu M$)보다 훨씬 높은 억제활성을 보였으나, 화합물 **1, 2**는 대조군보다는 낮은 활성을 보였다.

PTP1B 효소에 대한 저해제와 기질과의 상관관계를 Dixon plot으로 분석하였으며, 화합물 **1**은 무경쟁적 저해제로 나타났다 (Fig. 5). 무경쟁적 저해제 (I)는 가역적 저해반응이며, 효소 (E)-기질 (S) 복합체에 결합하여 불활성 ESI 복합체를 형성한다. 즉 무경쟁적 저해제는 유리 효소에는 결합하지 않는다. 따라서 기질농도가 증가하여도 저해활성에는 영향을 받지 않는다 (Segel, 1976). 화합물 **2 - 6**의 K_i 값은 각각 16.76, 2.86, 1.43, 1.22, 그리고 $2.90 \mu M$ 이다. Fig. 6-10에 따르면, 화합물 **2 - 6**을 Dixon plot로 분석한 결과, 비경쟁적 저해제로 나타났다. Dixon plot에서 비경쟁적 저해제의 그래프는 각각의 기질 농도별 그래프 선이 X축에서 서로 교차하는 곳을 가지며, 이 교차점은 저해상수 (inhibition constant, K_i)를 의미한다. 비경쟁적 저해제는 효소의 기질 결합부

위와 다른 곳에 결합하여 효소와 기질의 결합에 영향을 주지 않으며, 기질 또한 효소와 저해제의 결합부위가 아닌 다른 곳에 결합하여 영향을 주지 않는다. 기질 (S)과 저해제 (I)는 가역적 저해반응이며, 독립적으로 그리고 무작위적으로 다른 부위에 결합한다. 다시 말하면, 저해제는 효소 (E) 또는 효소-기질 복합체 (ES)와 결합하고, 기질은 효소 (E) 또는 효소-저해제 복합체 (EI)와 결합한다 (Segel, 1976).

따라서 화합물 2 - 6는 PTP1B 효소와 기질인 *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP)의 결합에 영향을 주지 않고, PTP1B 효소 또는 PTP1B - pNPP의 복합체에 결합한다는 것을 알 수 있다. 화합물에 대한 K_i 값은 IC_{50} 와 비교할 수 있으며, 기질에 대한 결합상수 (binding constant)인 K_m 과의 상대적인 저해제 효과를 비교할 수 있다. 이 parameter는 특히 효소 촉매반응에 있어서 강력한 치료제로서의 저해제 값을 측정하는데 중요하고 유용하게 쓰인다. 일반적으로 K_i 값이 낮으면 낮을수록 결합력이 더 강하여 저해제로서 더 효과적이다. 그러나 화합물 4의 경우 기질의 존재에 따라서 K_i 값이 3배정도 높게 측정되었다.

PTP1B 효소의 활성부위 (His214-Arg221)에 기질인 tyrosine이 결합한다. 게다가 높은 전하를 띄는 PTP1B catalytic site인 WDP loop (Thr 177-Pro185)와 이차적 aryl phosphate-binding site에 tyrosine의 phenyl ring이 결합함으로써 활성부위로 전환된다 (Koren and Fantus, 2007; Comeau *et al.*, 2010). 앞에서 설명한 바와 같이 곰피로부터 분리된 phlorotannins에는 일반적으로 phloroglucinol 중합체가 존재한다. Phloroglucinol은 trihydroxylated phenolic nucleus이기 때문에 이 중체와 중합체인 phlorotannins은 ether, phenyl, 그리고 1,4-dibenzodioxin 결합으로 인하여 많은 hydroxyl 기와 aromatic 고리를 가진다.

PTP1B 억제활성 결과에 따르면, 화합물 4, 5가 PTP1B의 저해활성에 있어

서 가장 높은 활성을 나타냈다. 이 결과는 비교적 큰 분자량을 가지고 많은 hydroxyl 기를 가진 phlorotannins이 PTP1B 억제활성에 중요한 역할을 할 것이라고 유추할 수 있다.



Table 2. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of phlorotannins isolated from *Ecklonia stolonifera*

Compound	IC ₅₀ (μM) ^a			Inhibition type ^b
Phloroglucinol (1)	55.48	±	1.85	uncompetitive
Dioxinodehydroeckol (2)	29.97	±	4.52	non-competitive
Eckol (3)	2.64	±	0.04	non-competitive
Phlorofucofuroeckol-A (4)	0.56	±	0.10	non-competitive
Dieckol (5)	1.18	±	0.02	non-competitive
7-Phlorocekol (6)	2.09	±	0.09	non-competitive
Ursolic acid ^c	10.82	±	0.32	

^aThe 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined by regression analyses and expressed as mean ± S.E.M of triplicate experiments. ^bInhibition type was determined by interpretation of the Dixon plot. ^cUrsolic acid was used as a positive control on the PTP1B inhibitory activity.

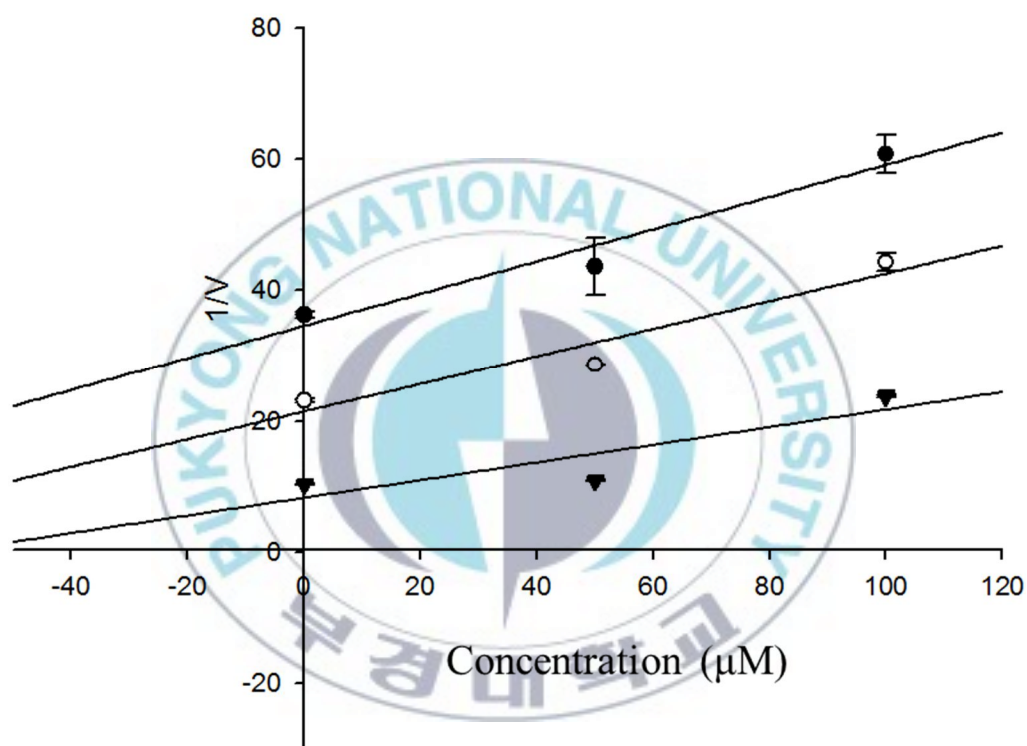


Fig. 5. Dixon plot for inhibition of phloroglucinol on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate: 0.5 mM (●); 1 mM (○); and 2 mM (▼).

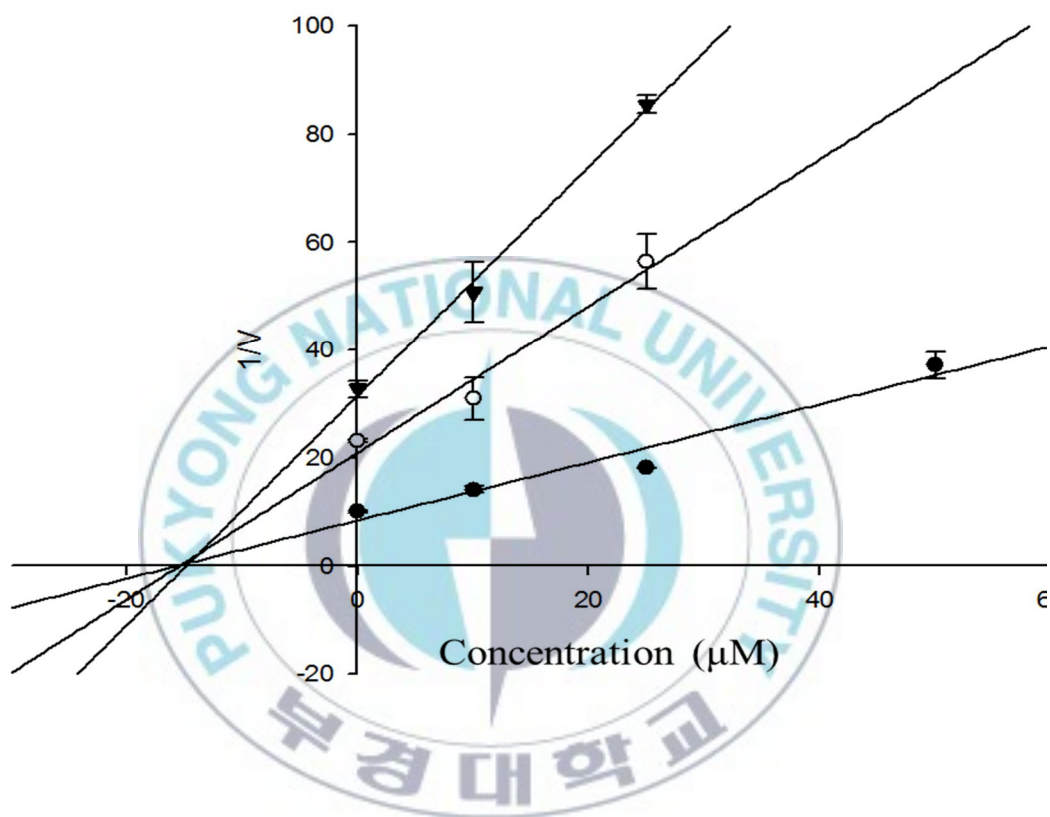


Fig. 6. Dixon plot for inhibition of dioxinodehydroeckol on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate: 0.5 mM (●); 1 mM (○); and 2 mM (▼). The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 16.76 \mu\text{M}$.

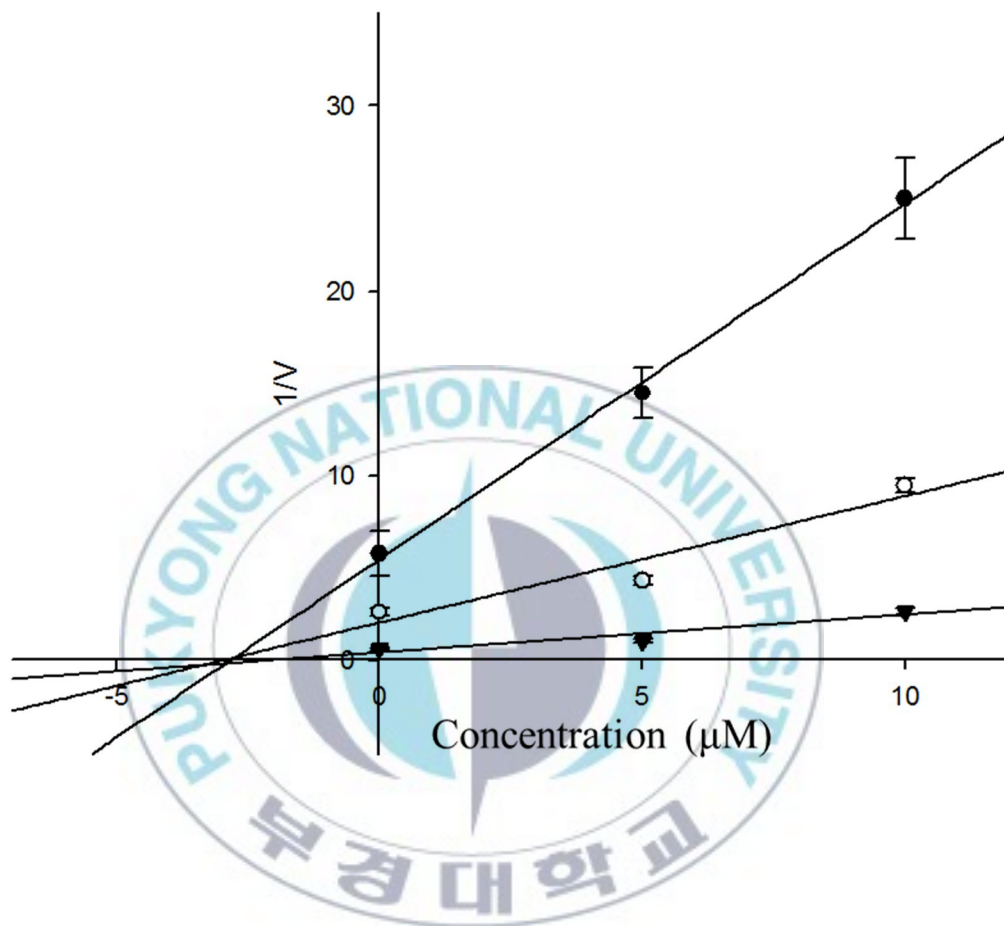


Fig. 7. Dixon plot for inhibition of eckol on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate: 0.5 mM (●); 1 mM (○); and 2 mM (▼). The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 2.86 \mu\text{M}$.

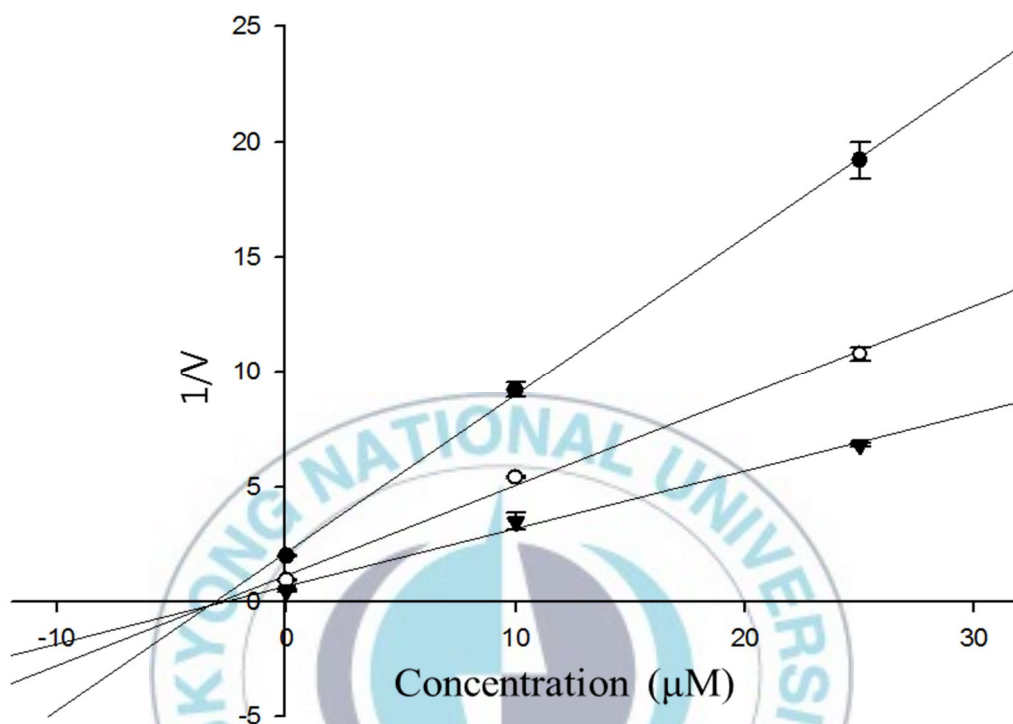


Fig. 8. Dixon plot for inhibition of phlorofucofuroeckol-A on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate: 0.5 mM (●); 1 mM (○); and 2 mM (▼). The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 1.43 \mu\text{M}$.

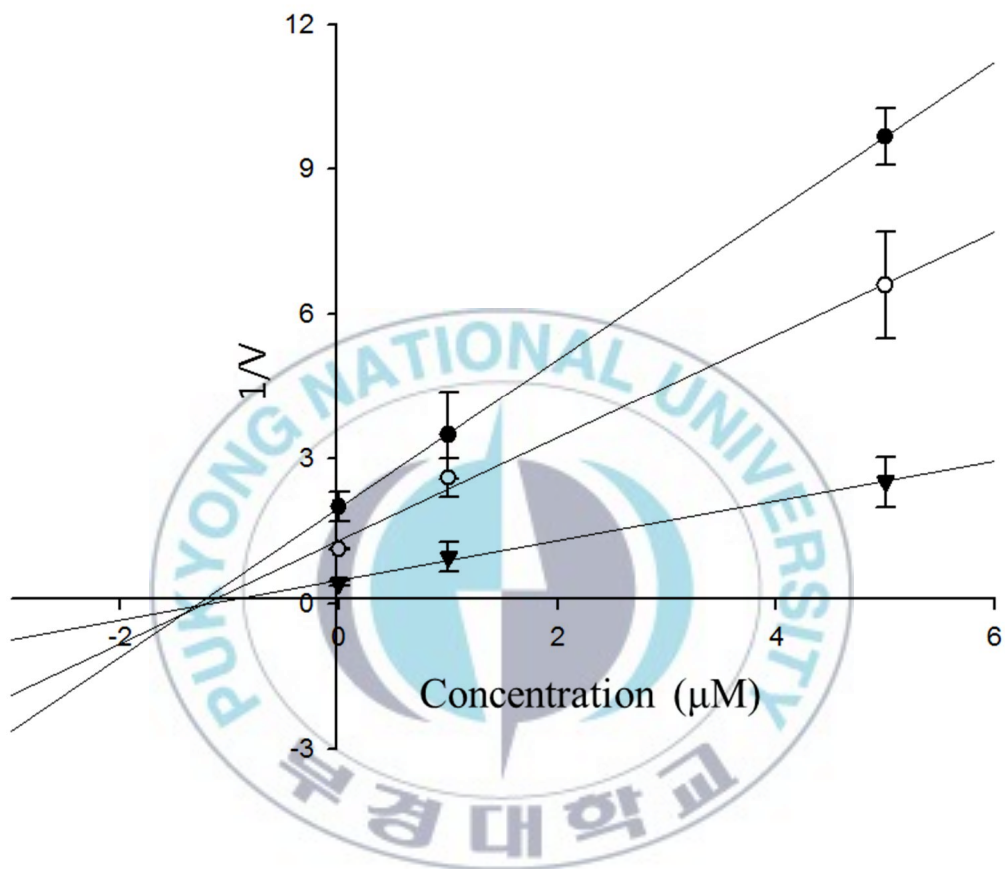


Fig. 9. Dixon plot for inhibition of dieckol on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate: 0.5 mM ($\bullet$); 1 mM ($\circ$); and 2 mM ($\blacktriangledown$). The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 1.22 \mu\text{M}$.

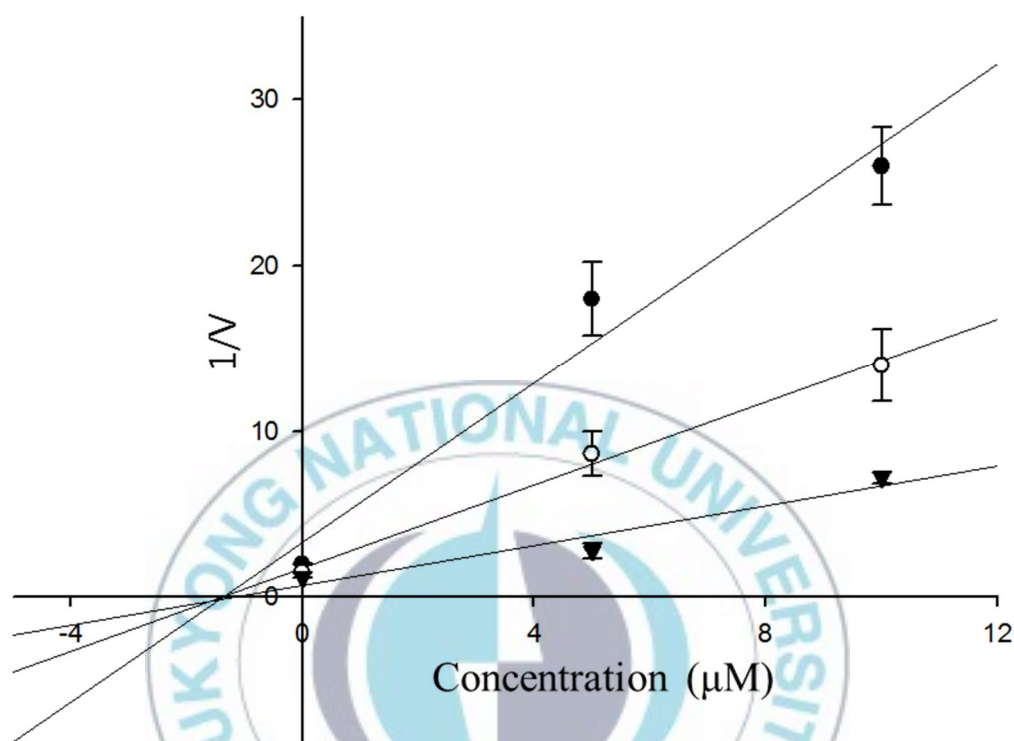


Fig. 10. Dixon plot for inhibition of 7-phloroeckol on protein tyrosine phosphatase 1B in the presence of different concentrations of substrate: 0.5 mM (●); 1 mM (○); and 2 mM (▼). The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 2.90 \mu\text{M}$.

1-2-2. 분리된 화합물들의 α -glucosidase 억제활성과 저해활성의 상관관계

효소와 저해제의 저해활성 상관관계를 알아보기 위해 사용된 Dixon plot는 효소-저해제 복합체에 대한 효소억제와 inhibitor constant (K_i)의 저해형태 [저해제 농도에 따른 $1/\text{enzyme velocity}$ ($1/V$)의 plot]를 알아보기 위한 graphical 방법이며, 쉽게 효소와 저해제의 관계를 알아볼 수 있다. 경쟁적 저해제일 경우, $1/V$ 이 $1/V_{\max}$ 이면 x축의 값은 K_i 값을 의미하고 반대로 비경쟁적 저해제일 경우, $1/V$ 가 0일 때 x축의 값이 K_i 값을 나타낸다 (Cornish-Bowden, 1974; Dixon, 1953).

곰피의 EtOAc 분획물로부터 분리된 phlorotannins 화합물들을 대상으로 α -glucosidase 억제활성을 측정하고, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 그리고 Dixon plot을 이용하여 α -glucosidase 효소에 대한 저해제와 기질과의 상관관계를 분석하였으며, 각각의 화합물에 대한 결과는 Fig. 11-16에 나타내었다. 측정된 화합물들의 억제활성은 화합물 4 > 화합물 5 > 화합물 6 > 화합물 3 > 화합물 2 > 화합물 1 순으로 나타났다. 가장 강력한 억제효과를 보인 화합물 4 ($1.37 \pm 0.05 \mu\text{M}$)의 IC_{50} 값은 대조군으로 사용된 acarbose ($157.25 \pm 5.92 \mu\text{M}$)의 IC_{50} 값보다 무려 114배나 높은 억제활성을 나타내었음을 확인할 수 있었다. 화합물 1, 2, 3, 5, 6의 IC_{50} 값은 각각 141.18 ± 13.1 , 34.60 ± 1.95 , 22.78 ± 2.15 , 1.61 ± 0.08 , $6.13 \pm 0.30 \mu\text{M}$ 로 나타났다. 평가된 화합물 중 화합물 4-6이 α -glucosidase의 억제활성에 대해 높은 활성을 띠었기 때문에 이 결과를 바탕으로 phlorotannin의 분자크기와 hydroxyl 기의 수가 α -glucosidase의 억제활성에 영향을 미칠 것이라는 기대를 할 수 있다.

α -Glucosidase의 저해 상관관계에 있어서 화합물 1, 3, 5는 PTP1B의 저해 상관관계와는 다른 저해형태를 나타내었다. Fig. 11을 보면, 화합물 1의 K_i 값은

170.16 μM 로 혼합형 저해제로 나타났다. 혼합형 저해제는 비경쟁적 저해형태와 경쟁적 저해형태가 혼합되어 있는 것을 말한다. 혼합형 저해제의 경우 효소나 효소-기질 복합체에 모두 결합하지만 기질이 결합하는 활성자리와 다른 곳에 결합한다. 따라서 기질의 결합비율을 감소시키고 동시에 전환속도를 감소시킬 수 있다 (Segel, 1976; Abdulaziz, 1996).

Fig. 13과 15를 보면, 화합물 **3**와 화합물 **5**는 경쟁적 저해제로 나타났으며, K_i 값은 각각 15.48 μM 와 0.27 μM 이었다. 경쟁적 저해제는 기질이 효소와 결합하는 것을 막는 물질로서, 그 효소에 대해서는 같은 결합부위를 가지기 때문에 기질과 저해제는 경쟁관계를 가지고 상호배타적이다. 경쟁적 저해제는 기질과 구조적 유사성을 가지는 물질이거나 또 다른 그 효소의 기질이거나 그 반응 생성물일 것으로 생각되고 있다. 이 저해제와 기질은 같은 부위에 결합하기 때문에 상호배타적이다 (Segel, 1976). 화합물 **2**, **4**, 그리고 **6**의 K_i 값은 51.80 μM , 15.48 μM , 그리고 5.67 μM 로 각각 나타났으며, PTP1B의 저해상관관계와 같은 형태인 비경쟁적 저해제로 분석되어졌고, 그 결과는 Fig. 12, 14 그리고 16에 나타내었다.

Table 3. α -Glucosidase inhibitory activities of phlorotannins isolated from *Ecklonia stolonifera*

Compound	IC ₅₀ (μ M) ^a	Inhibition type ^b
Phloroglucinol (1)	141.18 $\pm$ 13.1	mixed type
Dioxinodehydroeckol (2)	34.60 $\pm$ 1.95	non-competitive
Eckol (3)	22.78 $\pm$ 2.15	competitive
Phlorofucofuroeckol-A (4)	1.37 $\pm$ 0.05	non-competitive
Dieckol (5)	1.61 $\pm$ 0.08	competitive
7-Phlorocekol (6)	6.13 $\pm$ 0.30	non-competitive
Acarbose ^c	157.25 $\pm$ 5.92	

^aThe 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined by regression analyses and expressed as mean $\pm$ S.E.M of triplicate experiments. ^bInhibition type was determined by interpretation of the Dixon plot. ^cAcarbose was used as a positive control on the α -glucosidase inhibitory activity.

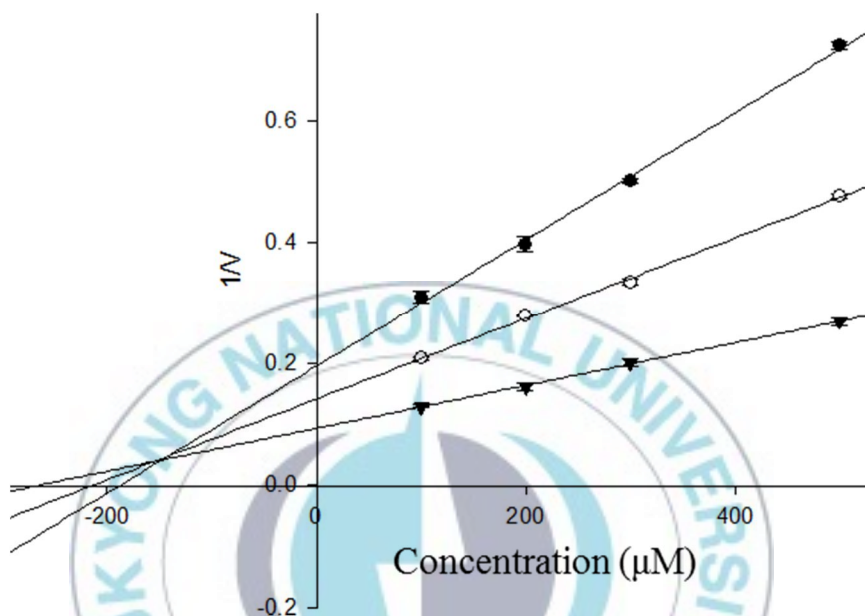


Fig. 11. Dixon plot for inhibition of phloroglucinol on α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate: 0.625 mM (●); 1.25 mM (○); and 2.5 mM (▼). The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 170.16 \mu\text{M}$.

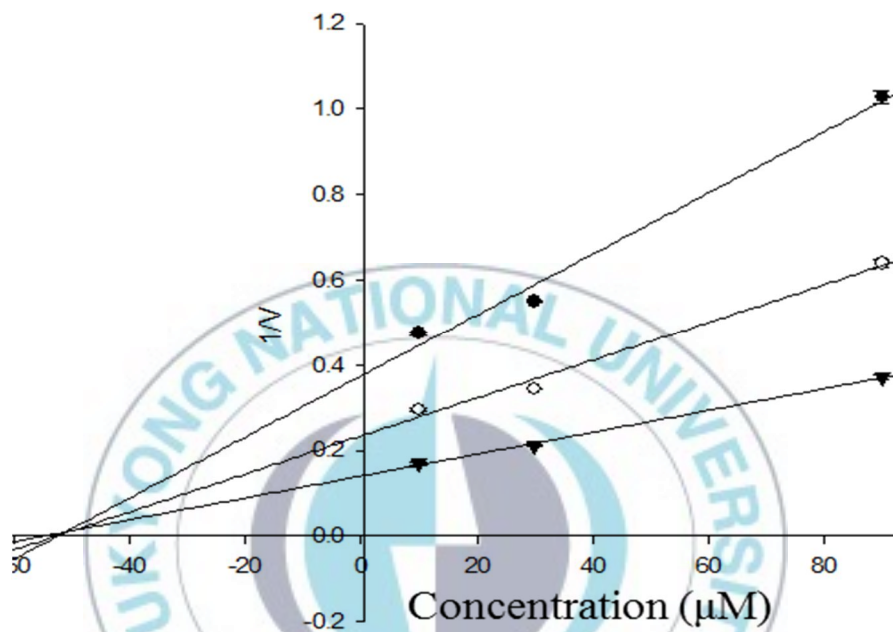


Fig. 12. Dixon plot for inhibition of dioxinodehydroeckol on α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate: 0.625 mM (●); 1.25 mM (○); and 2.5 mM (▼). The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 51.8 \mu\text{M}$.

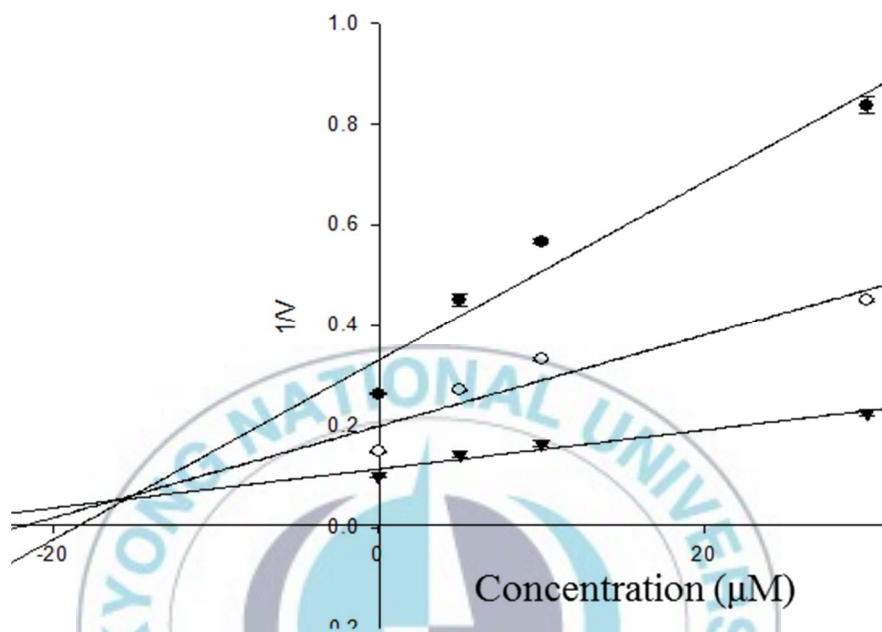


Fig. 13. Dixon plot for inhibition of eckol on α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate: 0.625 mM (●); 1.25 mM (○); and 2.5 mM (▼). The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 15.48 \mu\text{M}$.

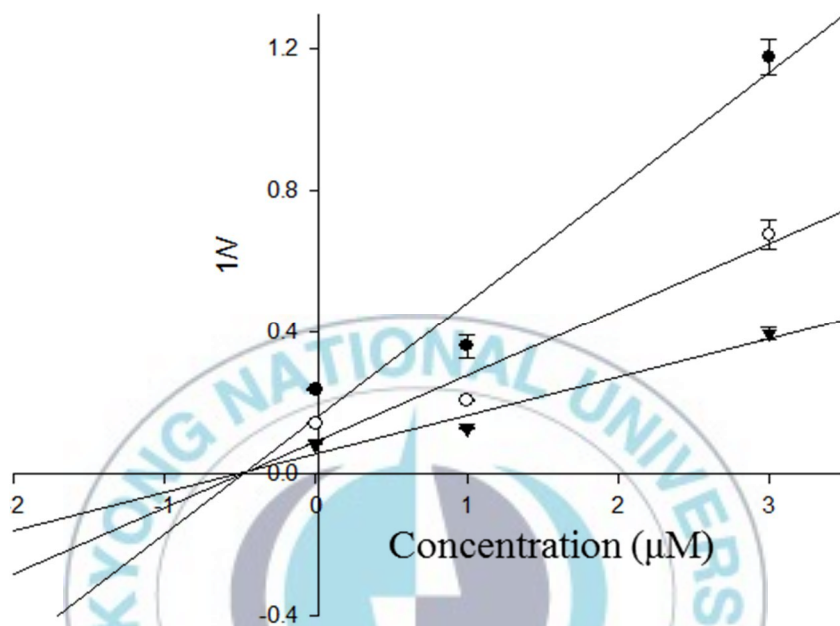


Fig. 14. Dixon plot for inhibition of phlorofucofuroeckol-A on α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate: 0.625 mM ($\bullet$); 1.25 mM ($\circ$); and 2.5 mM ($\blacktriangledown$). The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 0.45 \mu\text{M}$.

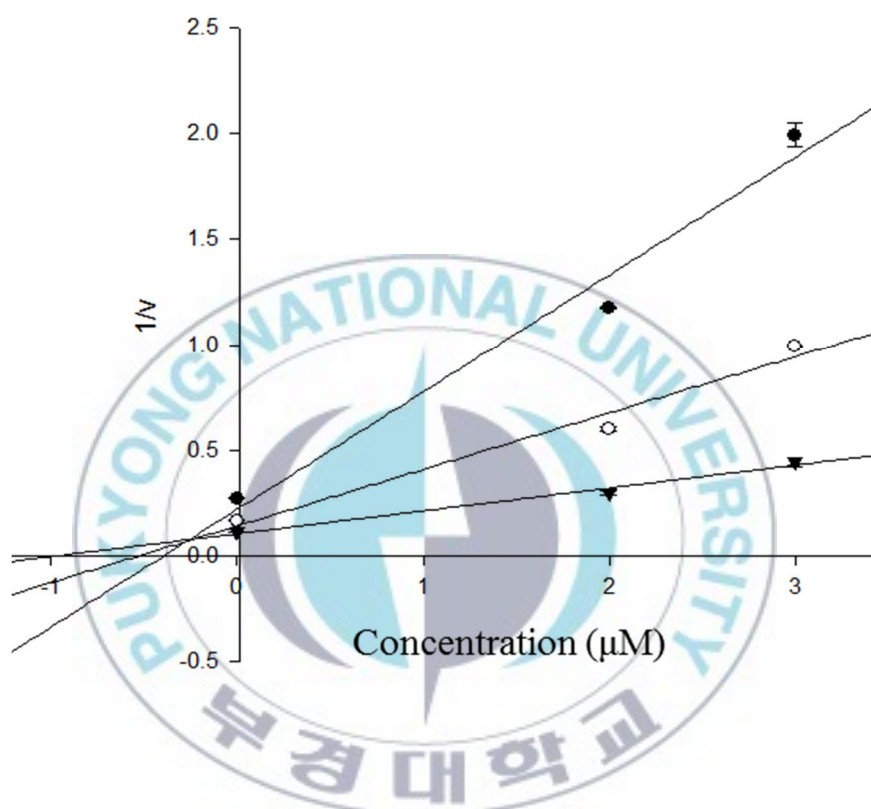


Fig. 15. Dixon plot for inhibition of dieckol on α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate: 0.625 mM ($\bullet$); 1.25 mM ($\circ$); and 2.5 mM ($\blacktriangledown$). The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 0.27 \mu\text{M}$.

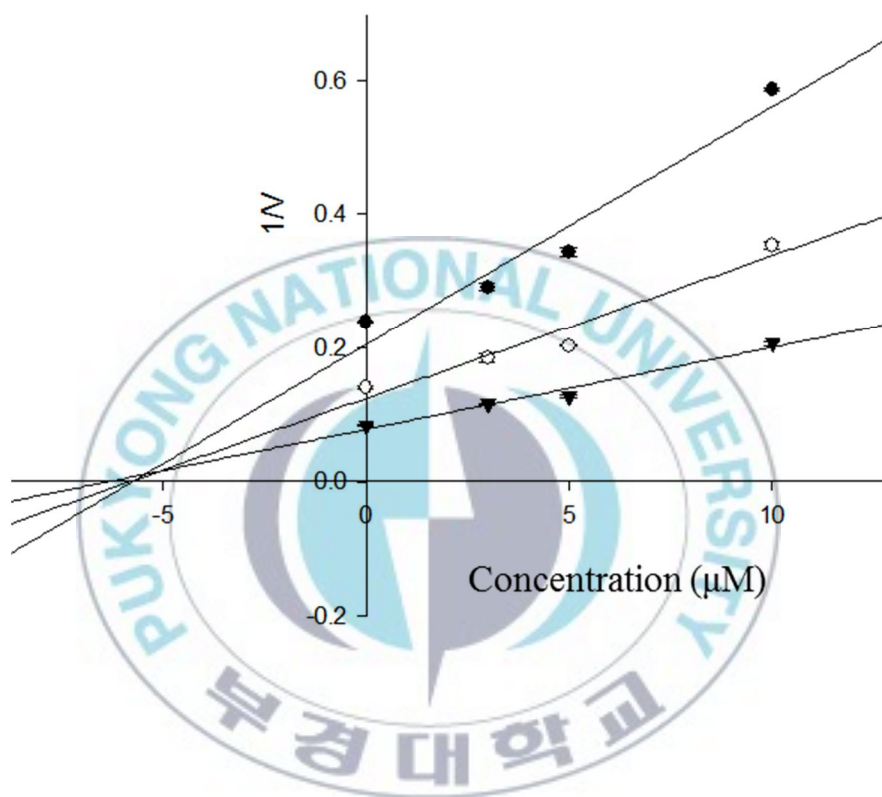


Fig. 16. Dixon plot for inhibition of 7-phloroeckol on α -glucosidase in the presence of different concentrations of substrate: 0.625 mM (●); 1.25 mM (○); and 2.5 mM (▼). The inhibitory constant of the compound was determined as $K_i = 5.67 \mu\text{M}$.

2. 항동맥경화증 실험

2-1. MeOH 추출물과 각 분획물들의 human 저밀도 지단백 산화 억제활성

저밀도 지단백 (human low density lipoprotein, human LDL)의 입자는 endothelial border를 통해서 이동되며 arterial subendothelial space로 들어간다. 하지만 LDL이 필요이상으로 존재하거나 다른 요인에 의해 LDL이 산화적 변형을 일으키면 혈장에서 순환하기 보다는 subendothelium 안에서 변화하기 쉬운 상태로 전환된다. 또한 혈관의 내피세포와 대식세포에 있는 monocyte chemotactic protein-1과 colony stimulating factor에 의해 산화되면 대식세포에 의해 포집되어져 거품세포를 형성한다. 이와 같은 LDL의 이상대사는 동맥경화와 깊은 관련이 있다 (Park *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2009; Libby, 2002). 따라서 LDL 산화 정도를 알아보기 위해서 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 방법을 이용하여 평가하였다. TBARS는 지질과산화 과정에 의해서 생성되는 물질인 malonaldehyde (MAD)를 thiobarbituric acid (TBA)와 반응시켜 측정하는 방법이다 (Esterbauer *et al.*, 1989).

Human LDL의 산화방지에 대한 효과 연구들 중에서 추출물로는 양파 추출물 (Munday *et al.*, 1999), 생열귀나무 (*Rosa davurica*) 추출물 (Sa *et al.*, 2004), 그리고 곰취(*Ligularia fischeri*) 추출물 (Jeong *et al.*, 2009)의 높은 항산화 효능이 입증되어 동맥경화를 예방하는데 효과가 있음이 보고되었다. 그리고 분리된 화합물로는 갈근의 puerarin 성분 (Park *et al.*, 1997), 천속단 (*Dispacus asper*)의 dicaffeoyl quinic acid 성분 (Hung *et al.*, 2006), 봄의 꼬리과 (*Previs ensifovmis*)의 caffeic acid 성분 (Wei *et al.*, 2007)들의 human LDL 산화 억제활성 효능이 보고되었다. 그러나 식용갈조류인 곰피에서는 human LDL 산화억제에 대한 연구가 보고된 바 없기에 선택하여 실험을 수행하였다.

곰피의 MeOH 추출물과 MeOH 추출물을 계통적 용매 분획하여 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 분획물과 H₂O 층에 대한 human LDL 산화 억제활성을 평가하기 위하여 TBARS 방법으로 실험하였으며, 그 결과는 Table 4에 나타내었다.

곰피의 MeOH 추출물은 human LDL 산화 억제활성에 대한 IC₅₀ 값이 5.66 ± 0.05 µg/ml로 나타났다. 곰피의 MeOH 추출물로부터 얻은 각각의 분획물들에 대한 human LDL 산화 억제활성은 EtOAc 분획물이 가장 효과가 좋게 나타났다으며, IC₅₀ 값은 3.04 ± 0.13 µg/ml이다. 다음으로는 CH₂Cl₂ 분획물과 *n*-BuOH 분획물의 IC₅₀ 값은 각각 4.58 ± 0.09 µg/ml과 4.54 ± 0.02 µg/ml로 서로 유사한 억제활성을 나타내었으며, MeOH 추출물의 IC₅₀ 값은 5.66 ± 0.05 µg/ml이다. MeOH 추출물과 각 분획물들의 human LDL 산화 억제활성 실험에서 H₂O 분획물은 30 µg/ml 이상에서도 전혀 효과가 나타나지 않았다. 이 실험에서 대조군으로는 ascorbic acid와 probucol이 사용되었다. 항산화제로 알려진 ascorbic acid (Esterbauer *et al.*, 1998)의 IC₅₀ 값은 2.59 ± 0.01 µg/ml이며, 고지혈증 치료제이자 항산화 기능이 있는 probucol (Joseph *et al.*, 1991)의 IC₅₀ 값은 4.69 ± 0.52 µg/ml로 나타났다.

곰피의 EtOAc 분획물에서 LDL 산화 억제에 대한 활성이 높게 나타났으므로 이 분획물에는 다량의 활성성분이 함유되어 있을 것이라 생각된다.

Table 4. Anti-atherosclerosis activity of the MeOH extract and its different fractions from *Ecklonia stolonifera* on Cu²⁺-induced human low density lipoprotein oxidation

samples	LDL oxidation
	IC ₅₀ (μg/ml) ^a
	Mean ± S.E.M.
MeOH extract	5.66 ± 0.05
CH ₂ Cl ₂ fraction	4.58 ± 0.09
EtOAc fraction	3.04 ± 0.13
<i>n</i> -BuOH fraction	4.54 ± 0.02
H ₂ O fraction	> 30
Ascorbic acid ^b	2.59 ± 0.01
Probucol ^b	4.69 ± 0.52

LDL : low density lipoprotein.

^aThe 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined by regression analyses and expressed as mean ± S.E.M of triplicate experiments. ^bAscorbic acid and probucol were used as a positive control on the human LDL oxidation inhibitory activity.

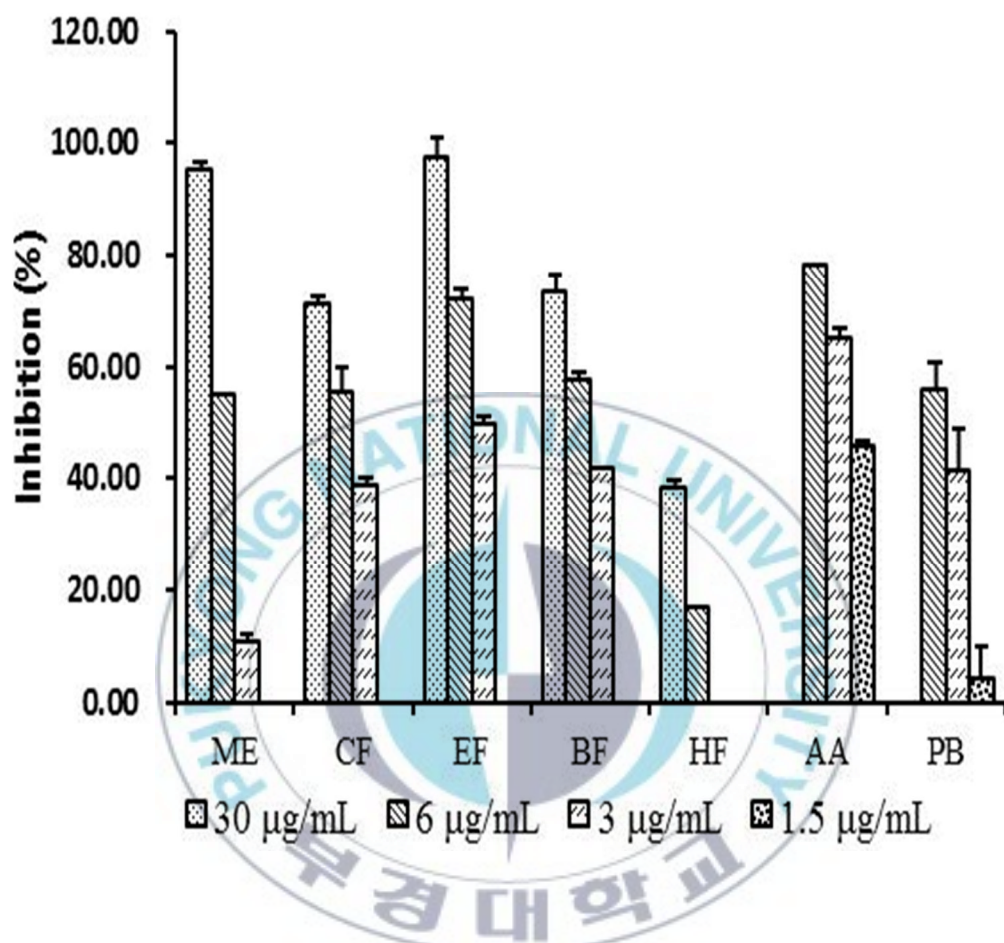


Fig. 17. Anti-atherosclerosis activity of the MeOH extract and its fractions from *Ecklonia stolonifera* on Cu^{2+} -induced human low density lipoprotein oxidation.

ME = Metanol Extract, HF = Hexane Fraction, CF = CH_2Cl_2 Fraction, EF = Ethylacetate Fraction, BF = *n*-Butanol Fraction, HF = Water Fraction, AA = L-Ascorbic acid, PB : Probucol.

2-2. 분리된 화합물들의 human 저밀도 지단백 산화 억제활성

곰피의 EtOAc 분획물로부터 분리된 phlorotannins 화합물들을 대상으로 human LDL 산화 억제활성을 측정하여 그 결과를 Table 5에 나타내었다.

분리된 화합물들 중에서 화합물 **5**가 가장 강력한 산화 억제활성을 나타내었으며, IC_{50} 값으로는 $3.10 \pm 0.24 \mu M$ 이다. 다음으로는 화합물 **4** ($IC_{50} = 4.34 \pm 0.07 \mu M$) > 화합물 **3** ($IC_{50} = 7.47 \pm 0.05 \mu M$) > 화합물 **6** ($IC_{50} = 9.07 \pm 0.79 \mu M$) > 화합물 **2** ($IC_{50} = 16.57 \pm 1.16 \mu M$) > 화합물 **1** ($IC_{50} = 87.30 \pm 5.71 \mu M$) 순으로 확인할 수 있었다. 이 실험에서 대조군으로 사용된 ascorbic acid와 probucol의 IC_{50} 값은 각각 $14.70 \pm 0.05 \mu M$ 와 $9.07 \pm 1.01 \mu M$ 로 나타났다. 화합물 **3**과 **4**는 대조군들과 비교하였을 때 훨씬 높은 산화 억제효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었으며 이것은 phlorotannins 화합물 중에서 비교적 분자량이 크고 hydroxyl 기를 많이 가지고 있는 화합물일 경우 human LDL에 대한 높은 산화억제효과를 나타내는 것으로 생각된다.

Table 5. Anti-atherosclerosis activity of the isolated compounds from *Ecklonia stolonifera* on Cu²⁺-induced human low density lipoprotein oxidation

Compound	LDL oxidation
	IC ₅₀ (μM) ^a
	Mean ± S.E.M.
Phloroglucinol (1)	87.30 ± 5.71
Dioxinodehydroeckol (2)	16.57 ± 1.16
Eckol (3)	7.47 ± 0.05
Phlorofucofuroeckol (4)	4.34 ± 0.07
Dieckol (5)	3.10 ± 0.24
7-Phloroeckol (6)	9.83 ± 0.79
Ascorbic acid ^b	14.70 ± 0.05
Probucol ^b	9.07 ± 1.01

LDL : low density lipoprotein.

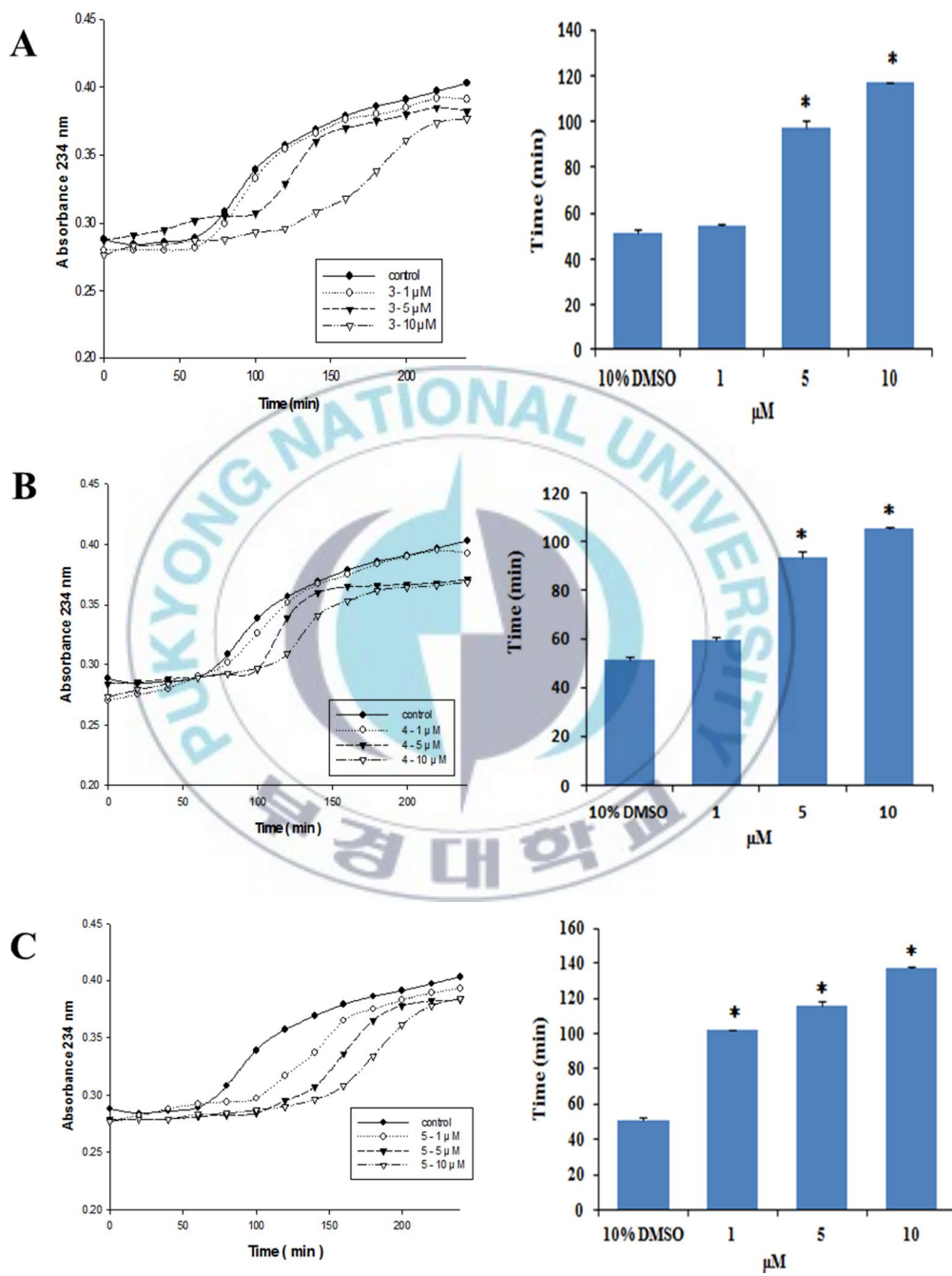
^aThe 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined by regression analyses and expressed as mean ± S.E.M of triplicate experiments. ^bAscorbic acid and probucol were used as a positive control on the human LDL oxidation inhibitory activity.

2-3. 분리된 화합물들의 저밀도 지단백 산화에 대한 conjugated diene 측정

분리된 화합물 중에서 human LDL 산화 억제에 대한 실험을 바탕으로 가장 억제활성이 뛰어난 화합물인 화합물 **3**, **4**, 그리고 **5**를 선택하여 LDL 산화에 대한 conjugated diene을 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 18과 Table 6에 나타내었다. 따라서 lag phase time이 연장되면 될수록 LDL의 항산화력이 증가됨을 알 수 있다.

Fig. 18과 Table 6에서 알 수 있듯이, 화합물 **5**가 conjugated diene을 형성하는 시간을 오랫동안 지연시켰으며, 1 μM 농도에서 lag phase time은 101.79 ± 0.04 min, 5 μM 농도에서는 116.08 ± 2.54 min, 그리고 10 μM 농도에서는 136.61 ± 0.39 min으로 평가된 화합물들 중에서 가장 지연효과가 있었다. 다음으로는 화합물 **3**이 1 μM 농도에서 54.54 ± 0.79 min, 5 μM 농도에서 97.65 ± 2.64 min, 10 μM 농도에서 117.48 ± 0.15 min을 나타내었다. 화합물 **4**는 1 μM 농도에서 59.14 ± 1.37 min, 5 μM 농도에서 93.66 ± 2.56 min, 10 μM 농도에서 105.42 ± 0.59 min을 나타내었다. 1 μM 농도에서는 화합물 **3**이 화합물 **4**보다 lag phase time이 빨랐지만, 농도가 증가할수록 화합물 **4**보다 화합물 **3**이 conjugated diene의 lag phase time 훨씬 더 지연되었다.

측정된 화합물들은 대조군으로 사용된 probucol (1 μM = 55.60 ± 2.47 min, 5 μM 74.48 ± 1.82 min, 10 μM = 91.07 ± 7.16 min)보다 conjugated diene 형성을 훨씬 더 지연시키는 것을 알 수 있었다.



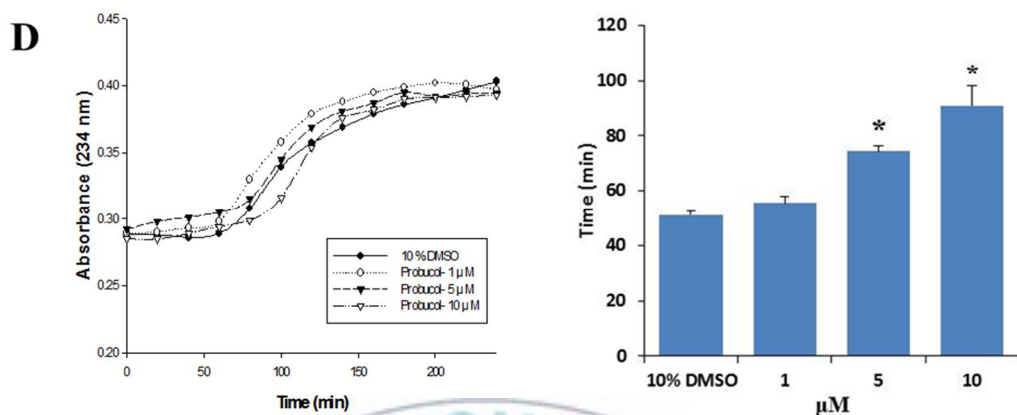


Fig. 18. Dose-response effect of compounds on Cu^{2+} -induced oxidation of human low density lipoprotein, as measured as kinetic of conjugated dienes formation. LDL (50 μg protein /ml) was incubated with 1.5 mM of CuSO_4 in the absence (control) or presence of test compounds. Conjugated diene formation was determined by measuring the absorbance at 234 nm every 20 min for 4h. The results show the inhibitory effect on conjugated diene formation in the presence of different concentrations of eckol (A), phlorofurofueckol-A (B), dieckol (C) and probucol (D). * indicates statistically significant difference from control group ($p < 0.05$).

Table 6. The effect of compounds on lag phase time for conjugated diene formation in human low density lipoprotein

Test compound	Lag phase time (min) ^a		
	1 μ M	5 μ M	10 μ M
Control (10% DMSO)		51.28 $\pm$ 1.39	
Eckol (3)	54.54 $\pm$ 0.79	97.65 $\pm$ 2.64	117.48 $\pm$ 0.15
Phlorofurofuoceckol (4)	59.14 $\pm$ 1.37	93.66 $\pm$ 2.56	105.42 $\pm$ 0.59
Dieckol (5)	101.79 $\pm$ 0.04	116.08 $\pm$ 2.54	137.61 $\pm$ 0.39
Probucol ^b	55.6 $\pm$ 2.47	74.48 $\pm$ 1.82	91.07 $\pm$ 7.16

All the values are expressed as Mean $\pm$ SEM of duplicate experiments.

^a Lag phase time was determined to be the intercept of the slopes for the lag and propagation phases. ^b Probucol was used as a positive control on conjugated diene formation of the human LDL oxidation.

IV. 요약 및 결론

최근 급속한 경제발전과 산업화로 인해 소득수준이 향상되면서, 서구적인 생활 습관과 더불어 고단백질, 고지방질, 그리고 고탄수화물 식품 섭취 및 운동부족 등의 복합적인 작용으로 인해 당뇨병 환자는 급속히 증가하고 있으며, 특히 말초신경장애, 망막증, 신증, 동맥경화 등과 같은 당뇨 합병증으로 인한 사망률이 급속도로 증가하고 있다. 이에 따라 당뇨병과 그 합병증에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는 가운데 PTP1B 및 α -glucosidase 활성 억제제가 당뇨병 예방 및 치료제로서 주목을 받고 있다. 또한 당뇨합병증으로 유발될 수 있는 동맥경화는 LDL 산화를 억제하는 저해제에 대한 연구가 되어져오고 있다. PTP1B, α -glucosidase, 그리고 LDL 산화 억제제들은 합성물질뿐만 아니라 천연물질로부터 그 억제성분을 규명하려는 활발한 연구가 이루어지고 있다. 이에 본 연구에서는 곰피와 그로부터 분리한 화합물에 대한 당뇨병과 동맥경화증에 대한 억제효과를 PTP1B 와 α -glucosidase 억제활성법 및 저해 상관관계, LDL 산화억제 활성법 및 conjugated diene 측정을 *in vitro* 실험에서 수행하여 이들 성분의 생리활성을 검색하였다.

1. 곰피의 MeOH 추출물뿐만 아니라 CH_2Cl_2 , EtOAc, *n*-BuOH 그리고 H_2O 분획물에 대한 PTP1B 억제활성과 α -glucosidase 억제활성, LDL 산화 억제활성, 그리고 conjugated diene 측정을 *in vitro* 실험을 통하여 검색하였다. 추출물과 분획물들 중 EtOAc 분획물이 *in vitro*에서 수행된 모든 실험에서 높은 억제활성을 나타내었다. 따라서 EtOAc 분획물에 이러한 활성을 나타내는 성분들이 다량 함유되어 있을 것이라 예상하였다.

2. PTP1B, α -glucosidase, 그리고 LDL 산화 억제활성에 대해 높은 활성을 나타낸 EtOAc 분획물을 대상으로 silica gel, Sephadex LH-20, RP-18 column chromatography를 수행하여 활성 성분을 분리하였다. 1D NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR)의 분광학적 방법을 이용하여 분리된 화합물들을 측정하였으며, 화합물들의 구조는 각각의 문헌치와 비교하여 phloroglucinol (1), dioxinodehydroeckol (2), eckol (3), phlorofucofuroeckol-A (4), dieckol (5), 7-phloroeckol (6)임을 확인하였다. 이들 화합물은 phlorotannins으로서 1,3,5-trihydroxybenzene (phloroglucinol)을 기본 구성단위로 하는 phloroglucinol 중합체 형태의 페놀성 화합물이다 (Regan and Glomitza, 1986; Waterman and Mole, 1994). 곰피에서 분리된 phlorotannins 화합물의 생리활성은 항산화 활성 (Lee *et al.*, 1996b; Kang *et al.*, 2004a; 2005a; 2005b; 2007; Nakamura *et al.*, 1996), 항돌연변이 활성 (Lee *et al.*, 1996a; Han *et al.*, 2000), 섭취저해효과 (Taniguchi *et al.*, 1991), tyrosinase 억제활성 (Kang *et al.*, 2004b), 그리고 항피부노화 활성 (Kim *et al.*, 2006; Joe *et al.*, 2006; Bu *et al.*, 2006) 등이 연구되었지만, 그러나 PTP1B, α -glucosidase, LDL 산화 억제효과 및 conjugated diene 형성에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 곰피로부터 분리된 phlorotannins 화합물의 LDL 산화억제효과 및 conjugated diene 형성에 대한 측정 및 PTP1B, 그리고 α -glucosidase 억제효과를 평가하였다.

3. PTP1B는 인슐린 감수성이 높은 간과 근육, 그리고 지방세포에서 동정되어져 왔고, endoplasmic reticulum의 cytoplasmic 표면에 위치하고 있다 (Tonks NK, 2003). 이 효소는 인슐린과의 반응 초기에 인산화된 인슐린 수용체와 인슐린 수용체 기질을 탈인산화시키는 인슐린 negative regulator이다 (Lee, 2007).

이에 따라 PTP1B를 억제하는 것은 인슐린 저항성을 완하시킴으로서 제2형 당뇨병을 치료하는 약물로 사용될 수 있음을 나타낸다. 그리하여 곰피로부터 분리된 phlorotannins 화합물들에 대한 PTP1B 억제활성 및 저해 상관관계를 평가하였다. 화합물 **3-6**는 강력한 PTP1B 억제활성 나타내었으며, IC_{50} 값은 $2.64 \pm 0.04 \mu M$, $0.56 \pm 0.10 \mu M$, $1.18 \pm 0.02 \mu M$, $2.09 \pm 0.09 \mu M$ 로 나타났으며, 화합물 **1-2**의 IC_{50} 값은 $55.48 \pm 1.85 \mu M$, $29.94 \pm 4.52 \mu M$ 이며, 대조군으로 사용된 ursolic acid ($10.82 \pm 0.32 \mu M$)보다 낮은 억제활성을 나타내었다. 또한 PTP1B 저해 상관관계를 살펴보면, 화합물 **1**은 무경쟁적 저해제이고, 나머지 화합물 **2-6**은 모두 비경쟁적 저해제로 나타났다.

4. 식후 혈당의 조절에 관여하는 효소로 알려진 α -glucosidase의 억제활성에 대해 곰피로부터 분리된 phlorotannins 화합물로 측정하였다. 그 결과 화합물 **4-6**은 α -glucosidase에 대해 강력한 억제제이다. 이들의 IC_{50} 값은 각각 $1.37 \pm 0.05 \mu M$, $1.61 \pm 0.08 \mu M$, $6.13 \pm 0.30 \mu M$ 로 나타났다. 다음으로는 화합물 **2**와 **3**이 높은 억제활성을 나타내었으며 IC_{50} 값으로는 $34.60 \pm 1.95 \mu M$, $22.78 \pm 2.15 \mu M$ 이었다. 화합물 **1**의 IC_{50} 값은 $141.18 \pm 13.1 \mu M$ 이며, 이는 대조군인 acarbose ($157.25 \pm 5.92 \mu M$)와 비슷한 억제활성을 보였다. α -Glucosidase의 저해 상관관계를 분석한 결과 화합물 **1**은 혼합형 저해제로, 화합물 **2, 4, 6**은 비경쟁적 저해제로, 화합물 **3**와 **6**을 경쟁적 저해제로 밝혀졌다. 몇몇의 화합물들은 PTP1B 저해와 다른 상관관계 구조를 가졌다.

5. 지질 산화에 의해 생성하는 MDA를 TBA와 반응시켜 알아보는 TBARS 법을 이용하여 LDL 산화 억제활성 살펴보았다. 이 실험에서 화합물 **3**, **4** 그리고 **5**가 가장 높은 활성을 나타내었으며, IC_{50} 값으로는 $7.47 \pm 0.05 \mu M$, $4.34 \pm 0.07 \mu M$, $3.10 \pm 0.24 \mu M$ 이다. 화합물 **2**와 **6**의 IC_{50} 값은 $16.57 \pm 1.16 \mu M$, $9.83 \pm 0.79 \mu M$ 이다. 반면에 화합물 **1**의 IC_{50} 값은 $87.30 \pm 5.71 \mu M$ 이며, 이는 대조군으로 사용된 ascorbic acid ($14.70 \pm 0.05 \mu M$)와 probucol ($9.07 \pm 1.01 \mu M$)의 IC_{50} 값보다 각각 6배, 9배 낮은 활성을 나타내었다. LDL 산화 억제에서 높은 활성을 나타낸 화합물 **3-5**를 conjugated diene 형성에 대한 실험을 하였다. 그 결과 화합물 **5**가 conjugated diene의 형성을 가장 오랫동안 지연 시켰으며 lag phase time은 $1 \mu M$ 농도에서 $101.79 \pm 0.04 \text{ min}$, $5 \mu M$ 농도에서 $116.08 \pm 2.54 \text{ min}$, 그리고 $10 \mu M$ 농도에서 $137.61 \pm 0.39 \text{ min}$ 을 나타내었다.

이들 결과로부터 곰피 MeOH 추출물과 분획물, 그리고 분획물로부터 분리된 phlorotannin 성분이 PTP1B와 α -glucosidase를 억제함으로써 당뇨병 억제활성을 가지고, LDL 산화 억제 및 conjugated diene 형성을 지연 시킴으로써 동맥경화 억제활성을 가진다고 할 수 있다. 따라서 곰피 추출물과 분리된 phlorotannin 성분이 당뇨병 및 동맥경화증을 치료하고 예방할 수 있는 가능성을 가진 기능성 식품 소재로서 가치가 있다는 것을 증명 하였다.

V. 참고문헌

고정삼, 식품산업의 이해, 유한 문화사, 2002

김인주, 손석만, 김보완, 하승우, 김두만, 김용기, 김태화, 박중열, 유형준, 이문규, 이인규, 차봉연, 동맥경화에서 저밀도지단백의 산화, 생물학 연구정보센터 *BioWave*, Vol. 5, No. 8, 2003.

이규태, 한국인의 음식이야기, 기린원, 1994.

Abdulaziz, A. A. J., Fareeda, A. K., Mohammad, A. K., and Abdullah, S. A., Kinetics for Camel (*Camelus dromedaries*) retina acetylcholinesterase inhibition by methotrexate *in vitro*, *Jpn. J. Pharmacol.*, 72, 49-55, 1996.

Ahmad, F., Azevedo, J. J., Cortright, R., Dohm, G., and Goldstein, B., Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes, *J. Clin. Invest.*, 100, 449-458, 1997.

Ahn, M. J., Yoon, K. D., Kim, C. Y., Kim, J. H., Shin, C. G. and Kim, J., Inhibitory activity on HIV-1 reverse transcriptase and integrase of a carmalol derivative from a brown alga, *Ishige okamurae*. *Phytother. Res.*, 20, 711-713, 2006.

Ahn, M. J., Yoon, K. D., Min, S. Y., Lee, J. S., Kim, J. H., Kim, T. G., Kim, S. H., Kim, N. K., Huh, H. and Kim, J. W., Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*, *Biochemistry*, 35, 9090-9096, 2004a.

Ahn, M. J., Yoon, K. D., Min, S. Y., Lee, J. S., Kim, J. H., Kim, T. G., Kim, S. H., Kim, N. K., Huh, H. and Kim, J. W., Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and

protease by phlorotannin from the brown alga *Ecklonia cava*, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 544-547, 2004b.

Asante-Appiah, E., and Kennedy, B. P., Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 284, E663–E670, 2003.

Bialy, L. and Waldmann, H., Inhibitors of protein tyrosine phosphatases : Next-generation drugs, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 3814-3839, 2005.

Bu, H. J., Ham, Y. M., Kim, J. M., Lee, S. J., Hyun, J. W. and Lee, N. H., Elastase and hyaluronidase inhibition activities of phlorotannin isolated from *Ecklonia cava*, *Kor. J. Pharmacogn.*, 37, 92-96, 2006.

Byon, J. C. H., Kusari, A. B., and Kusari, J., Protein-tyrosine phosphatase-1B acts as a negative regulator of insulin signal transduction, *Mol. Cell. Biochem.*, 82, 101–108, 1998.

Caspary, W. F., Sucrose malabsorption in man after ingestion of α -glucoside hydrolase inhibitor, *Lancet.*, 1, 1231-1233, 1978.

Cho, M. C., Part, D. B., Yang, E. Y., Pae, D. H., Won, S. R., Yu, W. K., and Rhee, H. I., Selection and horticultural characteristics evaluation of high α -glucosidase inhibitor in pepper, *Journal of Bio-Environment Control*, 16, 233-239, 2007.

Comeau, A. B., Critton, D. A., Page, R., and Seto, C.T., A focused library of protein tyrosine phosphatase inhibitors, *J. Med. Chem.*, 53, 6768-6772, 2010.

Cornish-Bowden, A., Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods, *Biochem. J.*, 137, 143-144,

1974.

Dixon, M., The determination of enzyme inhibitor constants, *Biochem. J.*, 55, 170-171, 1953.

Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., and Rotheneder, M., Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein, *Free Rad. Res.*, 6, 67-75, 1989.

Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, Z., Kido, M., Mori, H., Nakayama, Y. and Takahashi, M., Structure of an anti-plasmin inhibitor, eckol, isolated from the brown alga *Ecklonia kurome* OKAMURA and inhibitory activities of its derivatives on plasma plasmin inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 349-353, 1989.

Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, Z., Mori, H., Nakayama, Y. and Takahashi, M., Anti-plasmin inhibitor. VI. Structure of phlorofucofuroeckol-A, a novel phlorotannin with both dibenzo-1,4-dioxin and dibenzofuran elements, from *Ecklonia kurome* OKAMURA, *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 133-135, 1990.

Fukuyama, Y., Miura, I., Kinzyo, Z., Mori, H., Kido, M., Nakayama, Y., Takahashi, M. and Ochi, M., Eckols, novel phlorotannins with a dibenzo-*p*-dioxin skeleton possessing inhibitory effects on α_2 -macroglobulin from brown alga *Ecklonia kurome* OKAMURA. *Chem. Lett.*, 739-742, 1985.

GBiosciences, Protein assays for further details, hand book and selection guide, pp. 7628-7730, 2001.

Goldstein, B. J., Ahmad, F., Ding, W., Li, P. M., and Zhang, W. R., Regulation of the insulin signaling pathway by cellular protein tyrosine phosphatases, *Mol. Cell. Biochem.*, 182, 91-99, 1998.

- Glass, C. K. and Witztum, J. L., *Atherosclerosis : The road ahead.*, Cell, 147, 503-516, 2001.
- Han, E. S., Kim, J. W., Eom, M. O., Kang, I. H., Kang, H. J., Choi, J. S., Ha, K. W. and Oh, H. Y., Inhibitory effects of *Ecklonia stolonifera* on gene mutation on mouse lymphoma tk^{+/+} locus in L5178Y-3.7.2C cell and bone marrow micronuclei formation in ddY mice, *Environ. Mutagen. Carcinogen.*, 20, 104-111, 2000.
- Hara, I. and Sakurai, T., Isolation and characterization of vanadium bromoperoxidase from marine macroalga, *Ecklonia stolonifera*, *J. Inorg. Biochem.*, 72, 23-28, 1998.
- Hui, Z., Junpeng, X., Shu, L., Fengrui, S., Zongwei, C., Zifeng, P., Zhiqiang, L., and Shuying, L., Screening and determination for potential α -glucosidase Inhibitors from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms by using UF-LC/MS and ESI-MSn, *Phytochem. Anal.*, 1360, 2011.
- Hong, J. H., Lee, M. S., Bae, E. Y., Kim, Y. H., Oh, H. C., Oh, W. K., Kim, B. Y., and Ahn, J. S., Screening of the Inhibitory activity of medicinal plants against protein tyrosine phosphatase 1B, *Kor. J. Pharmacogn.*, 35, 16-21, 2004.
- Hoppe, H. A. and Lervig, T., *Marine algae in Pharmaceutical Science*. Vol. 2, Walter de Gruyter: Berlin, 3-48, 1982.
- Hung, T. M., Na, M. K., Thuong, P. T., Su, N. D., Sok, D. E., Song, K. S., Seong, Y. H., and Bae, K. H., Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall, *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 188-192, 2006.
- Jeong, I. K., and George, K., New perspectives on diabetic vascular complications: the loss of endogenous protective factors Induced by hyperglycemia, *Diabetes &*

Metabolism J., 35, 8-11, 2011.

Jeong, S. W., Kim, E. J., Hwang bo, H. J., and Ham, S. S., Effects of *Ligularia fischeri* extracts on oxidation of low density lipoprotein, *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol. 30, No. 5, 1214-1221, 1998.

Jeong, T. S., Kim, J. R., Kim, K. S., Cho, K. H., Bae, K. H., and Lee, W. S., Inhibition effects of multi-substituted benzylidenethiazolidine-2,4-diones on LDL oxidation, *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 4017-4023, 2004.

Joe, M. J., Kim, S. N., Choi, H. Y., Shin, W. S., Park, G. M., Kang, D. W. and Kim, K. Y., The inhibitory effects of eckol and dieckol from *Ecklonia stolonifera* on the expression of matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts, *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1735-1739, 2006.

Johnson, T. O., Ermolieff, J., and Jirousek, M. R., Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 1, 696-709, 2002.

Joseph, L. W., and Daniel, S., Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis, *Perspectives*, 88, 1785-1792, 1991.

Kang, H. S., Chung, H. Y., Jung, J.H., Son, B. W., and Choi, J. S., A new phlorotannin from the brown alga *Ecklonia stolonifera*, *Chem. Pharm. Bull.*, 51, 1012-1014, 2003.

Kang, H. S., Chung, H. Y., Kim, J. Y., Son, B. W., Jung, H. A. and Choi, J. S., Inhibitory phlorotannin from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation, *Arch. Pharm. Res.*, 27, 194-198, 2004a.

Kang, H. S., Kim, H. R., Byun, D. S., Son, B. W., Nam, T. J. and Choi, J. S., Tyrosinase

- inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Arch. Pharm. Res.*, 27, 1226-1232, 2004b.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S. W., Koh, Y. S., Yoo, B. S., Kim, J. H., Ham, Y. M., Baik, J. S., Lee, N. H. and Hyun, J. W., Triphlorethol-A from *Ecklonia cava* protects V79-4 lung fibroblast against hydrogen peroxide induced cell damage, *Free Radical Research*, 39, 883-892, 2005a.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S. W., Zhang, R., Jung, M. S., Lee, Y. G., Kim, S. Y., Kim, H. S., Joo, H. G., Park, J. W., Ham, Y. M., Lee, N. H. and Hyun, J. W., Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells, *FEBS Letters*, 579, 6295-6304, 2005b.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Park, J. W., Lee, N. H., Na, H. K., Surh, Y. J., You, H. J., Chung, M. H. and Hyun, J. W., Triphloethol-A induces heme oxygenase-1 via activation of ERK and NF-E2 related factor 2 transcription factor, *FEBS Letters*, 581, 2000-2008, 2007.
- Kang, K., Park, Y., Hwang, H. J., Kim, S. H., Lee, J. G. and Shin, H. C., Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors, *Arch. Pharm. Res.*, 26, 286-293, 2003.
- Kim, M. M., Ta, Q. V., Mendis, E., Rajapakse, N., Jung, W. K., Byun, H. G., Jeon, Y. J. and Kim, S. K., Phlorotannin in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity, *Life Sciences*, 79, 1436-1443, 2006.
- Kim, Y. C., An, R. B., Yoon, N. Y., Nam, T. J., and Choi, J.S., Hepatoprotective constituents of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on tacrine-induced

- cytotoxicity in Hep G2 cells, *Arch Pharm Res.*, 12, 1376-1380, 2005.
- Koren, S., and Fantus, I. G., Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 21, 621-640, 2007.
- Kotamballi, N., Chidambara, M., Ravendra, P. S., and Guddadarangavvanahally, K. J., Antioxidant activities of Grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5909-5914, 2002.
- Lee, J. H., Oh, H. Y. and Choi, J. S., Preventive effect of *Ecklonia stolonifera* on the frequency of benzo(a)pyrene-induced chromosomal aberrations, *J. Food Sci. Nutr.*, 1, 64-68, 1996a.
- Lee, J. H., Park, J. C., and Choi, J. S., The antioxidant activity of *Ecklonia stolonifera*, *Arch. Pharm. Res.*, 19, 223-227, 1996b.
- Lee, J. S., Chang, S. I., Namgoong, S. K., Shin, J. H., and Choi, J. D., Interaction of barley acetolactate synthase with triazolopyrimidine inhibitors, *Journal of Korean Chemical Society*, 42, 306-314, 1998.
- Lee, S. and Wang, Q., Recent development of small molecular specific inhibitor of protein tyrosine phosphatase 1B, *Med. Res. Rev.*, 27, 553-573, 2007.
- Lekshmi, P. C., Ranjith, A., Raghu, K. G., and Menon, N. A., Turmerin, the antioxidant protein from turmeric (*Curcuma longa*) exhibits anti-hyperglycemic effects, *Natural Product Research*, 1, 1-5, 2011.
- Liao, L., Starzyk, R. M., and Granger, D. N., Molecular determinants of oxidized low-density lipoprotein-induced leukocyte adhesion and microvascular dysfunction,

Arterioscler:Thomb. Vasc. Biol., 17, 437-444, 1997.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis, *Nature*, 420, 868-874, 2002.

Lin, S. D., Wang, J. S., Hsu, S. R., Sheu, W. H., Tu, S. T., Lee, I. T., Su, S. L., Lin, S. Y., Wang, S. Y., and Hsieh, M. C., The beneficial effect of α -glucosidase inhibitor on glucose variability compared with sulfonylurea in Taiwanese type 2 diabetic patients inadequately controlled with metformin: preliminary data, *Journal of Diabetes and Its Complications*, 25, 332-338, 2011.

Lusis, A. J., Atherosclerosis. *Nature*, 407, 233-241, 2000.

Moon, H. E., Nurul, M. I., Ahn, B. R., Sabiha, S. C., Sohn, H. S., Jung, H. A., and Choi, J. S., Protein tyrosine phosphatase 1B and α -glucosidase inhibitory phlorotannins from edible brown algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1472-1480, 2011.

Munday, J. S., Jamcs, K. A., Fray, L. M., Kirkwood, S. W., and Thompson, K. G., Daily supplementation with aged garlic extract, but not raw garlic, protects low density lipoprotein against *in vitro* oxidation, *Atherosclerosis*, 143, 399-404, 1999.

Myoung, C. S., Shin, H. C., Bao, H. Y., Yeo, S. J., Lee, B. H. and Kang, J. S., Improvement of memory by dieckol and phlorofucofuroeckol-A in ethanol-treated mice: Possible involvement of the inhibition of acetylcholinesterase, *Arch. Pharm. Res.*, 28, 691-698, 2005.

Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K., and Tanaka, R., Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*, *Fish. Sci.*, 62, 923-926, 1996.

- Na, M. K., Jang, J. P., Dieudonne, N., Joseph, T. M., Zacharias, T. F., Kim, B. Y., Oh, W. K., and Ahn, J. S., Protein Tyrosine Phosphatase-1B inhibitory Activity of isoprenylated flavonoids isolated from *Erythrina mildraedii*, *J. Nat. Prod.*, 69, 1572-1576, 2006.
- Na, M. K., Thuong, P.T., Hwang, I. H., Bae, K. H., Kim, B. Y., Osada, H., and Ahn, J. S., Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of 24-norursane triterpenes isolated from *Weigela subsessilis*, *Phytother. Res.*, 3203, 2010.
- Park, J. O., Kim, K. S., Ji, Y. A., and Ryu, B. H., Antioxidant activity of daidzin and puerarin toward oxidation of human low density lipoprotein, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 25-31, 1997.
- Park, S. G., Lee, M. J., Jung, H. J., Lee, H. S., Kim, H., Na, S. T., Park, S. D., and Park, W. H., Preventive effects of *Peony Root* extracts on oxidative stress, thrombosis and atherosclerosis, *J Korean Oriental Med.*, 30, 88-103, 2009.
- Regan, M. A. and Glombitza, K. W., Phlorotannin, brown algal polyphenols. pp.129-241, in Round and Champman (eds.), *Progress in Phycological Research*, Vol. 4., Biopress Ltd., 1986.
- Russell R., Atherosclerosis - An inflammatory disease, *Mechanisms of disease*, 340-2, 115-126, 1999.
- Sa, J. H., Lee, W., Shin, I.C., Jeong, K. J., Shim, T. H., Oh, H. S., Kim, Y. J., Cheung, E. H., Kim, G. G., and Choi, D.S., Antioxidant effect of *Rosa davurica* pall extract on oxidation of human low density lipoprotein (LDL), *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol. 36, No. 2, 311-316, 2004.

- Segel, I. H. Enzymes. In Biochemical calculations 2nd ed.; John Wiley & Sons Inc.; New York, pp.246-260, 1976.
- Shibata, T., Fujimoto, K., Nagayama, K., Yamaguchi, K. and Nakamura, T., Inhibitory activity of brown algal phlorotannin against hyaluronidase. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 703-709, 2002b.
- Shibata, T., Yamaguchi, K., Nagayama, K., Kawaguchi, S. and Nakamura, T., Inhibitory activity of brown algal phlorotannin against glycosidases from the viscera of the turban shell *Turbo cornutus*, *Eur. J. Phycol.*, 37, 493- 500, 2002a.
- Steven, P. G., and Hermann, E., Low density lipoprotein is saturable by prooxidant copper, *FEBS Letters*, 343, 188-194, 1994.
- Suguiira, Y., Matsuda, K., Yamada, Y., Nishikawa, M., Shioya, K., Katsuzaki, H., Imai, K. and Amano, H., Isolation of a new anti-allergic phlorotannin, phlorafucofuroeckol-B, from an edible brown alga, *Eisenia arborea*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2807-2811, 2006.
- Suresh, V. N., Prathapan, A., Ozathil, L., Cherian, K.G., Raghu, V.V., and Venugopalan, A. S., *In vitro* antioxidant and inhibitory potential of *Terminalia bellerica* and *Emblica officinalis* fruits against LDL oxidation and key enzymes linked to type 2 diabetes, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 125-131, 2011.
- Taniguchi, K., Kurata, K. and Suzuki, M., Feeding-deterrent effect of phlorotannin from the brown alga *Ecklonia stolonifera* against the abalone *Haliotis discus hannai*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 2065-2071, 1991.
- Thomas, T., Nancy, H., Wayne, R., Virginia J. H., John, R., Teri, M., Zheng, Z. J.,

- Katherine, F., Christopher, O., Steven, K., Donald, L. J., David, C. G., and Jr, Y. H., Heart disease and stroke statistics--2006 update, *American Heart Association*, 113, 85-151, 2006.
- Tonks, N. K., PTP1B: From the sidelines to the front lines, *FEBS Lett.*, 546, 140-148, 2003.
- Veronique, L., Roger, A. S., Donald, M. L., Robert, J. A., and Jarett, D. B., *et al.*, Heart disease and stroke statistics--2011 update, *American Heart Association*, 123, 18-209, 2011.
- Waterman, P. G. and Mole, S., (eds.) Analysis of Phenolic Plant Metabolites, *Blackwell Scientific Oxford*, 1994.
- Wei, H. A., Lian, T. W., Tu, Y. C., Hong, J. T., Kou, M. C., and Wu, M. J., Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxidative burst in polymorphonuclear neutrophils by caffeic acid and hispidin derivatives Isolated from sword brake fern (*Pteris ensiformis* Burm.), *J. Agric. Food Chem.*, 55, 10579-10584, 2007.
- Yoon, N. Y., Kim, H. R., Chung, H. Y., and Choi, J. S., Anti-hyperlipidemic Effect of an Edible Brown Algae, *Ecklonia stolonifera*, and its Constituents on Poloxamer 407-Induced Hyperlipidemic and Cholesterol-fed Rats, *Arch. Pharm. Res.*, 31, 1564-1571, 2008.
- Yoshihito, O., Akiko, I., Ryuichiro, S., and Toru, O., A new phloroglucinol derivative from the brown alga *Eisenia bicyclis*: potential for the effective treatment of diabetic complications, *J. Nat. Prod.*, 67, 103-105, 2004.