



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

博士學位論文

큰잎모자반 효소추출물의 항산화
및 항암활성 연구



濟州大學校 大學院

海洋生物工學科

梁 鉉 弼

2006年 12月

큰잎모자반 효소추출물의 항산화 및 항암활성 연구

指導教授 全 裕 珍

梁 鉉 弼

이 論文을 海洋生物工學 博士學位 論文으로 提出함

2006年 12月

梁鉉弼의 海洋生物工學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____
委 員 _____
委 員 _____
委 員 _____
委 員 _____

濟州大學校 大學院

2006年 12月

목 차

List of Figures.....	iv
List of Tables.....	x
Abstract.....	1
요 약.....	3
서 론.....	7
Part I : 큰잎모자반(<i>Sargassum coreanum</i>) 유기용매 분획물 및 효소추출물의 항산화활성 측정.....	12
1. 요약.....	12
2. 재료 및 방법.....	12
2-1. 재료.....	12
2-2. 큰잎모자반의 일반성분 분석.....	13
2-3. 큰잎모자반 유기용매 분획물 제조.....	13
2-4. 큰잎모자반 효소추출물 제조.....	14
2-5. 큰잎모자반 효소추출물의 분자량별 분획물 제조.....	16
2-6. DPPH free radical scavenging activity.....	16
2-7. Hydrogen peroxide scavenging activity.....	16
2-8. Metal chelating assay.....	19
2-9. Total polyphenolic assay.....	19
3. 결과.....	20
3-1. 큰잎모자반의 일반성분 분석.....	20
3-2. 큰잎모자반 유기용매 분획물의 수율.....	20
3-3. 큰잎모자반의 유기용매 추출물의 라디칼 소거활성.....	23

3-4. 큰잎모자반 효소추출물의 분자량별 수율.....	26
3-5. 큰잎모자반의 효소추출물의 라디칼 소거활성.....	26
4. 결론.....	35

Part II : 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 분자량별 분획물의 H₂O₂ 처리에 따른 V79-4 세포의 세포손상 보호효과

.....	37
1. 요약.....	37
2. 재료 및 방법.....	38
2-1. 재료.....	38
2-2. 큰잎모자반 효소추출물의 분자량별 분획물 제조.....	38
2-3. 세포배양.....	39
2-4. Cell 상에서의 hydrogen peroxide 소거활성.....	39
2-5. 형광현미경을 이용한 cell의 형태적 관찰.....	40
2-6. Cell viability 측정.....	40
2-7. Nuclear staining with Hoechst 33342.....	40
2-8. Alkaline comet assay를 이용한 DNA 손상 측정.....	41
2-9. Flow cytometry analysis.....	42
2-10. 항산화효소 분석.....	42
2-11. 통계분석.....	43
3. 결과.....	43
3-1. Cell 상에서의 hydrogen peroxide 소거활성.....	43
3-2. 효소분획물의 H ₂ O ₂ 처리 V79-4 cell의 세포사멸 억제효과.....	44
3-3. 효소분획물의 H ₂ O ₂ 처리 V79-4 cell의 형태적 변화.....	45
3-4. 효소분획물의 H ₂ O ₂ 처리 L-5178 cell의 DNA 손상변화.....	51
3-5. 효소분획물의 H ₂ O ₂ 처리 V79-4 cell의 cell cycle 변화.....	58
3-6. 효소분획물 첨가시 V79-4 cell의 항산화효소 변화.....	62
4. 결론.....	66

Part III : 암세포에 대한 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)

분자량별 분획물의 apoptosis 유도 및 항암활성.....	70
1. 요약.....	70
2. 재료 및 방법.....	71
2-1. 재료.....	71
2-2. 큰잎모자반 효소추출물의 분자량별 분획물 제조.....	71
2-3. 세포배양.....	72
2-4. Nuclear staining with Hoechst 33342.....	72
2-5. Cell growth inhibition activity 측정.....	72
2-6. 형광현미경을 이용한 cell의 형태적 관찰.....	73
2-7. Alkaline comet assay를 이용한 암세포의 DNA 손상 측정.....	73
2-8. Flow cytometry analysis.....	74
2-9. 통계분석.....	75
2-10. Western blot analysis.....	75
3. 결과.....	75
3-1. Cell growth inhibition activity 측정.....	76
3-2. 형광현미경을 이용한 cell의 형태적 관찰.....	83
3-3. Alkaline comet assay를 이용한 암세포의 DNA 손상 측정.....	89
3-4. Lymphocyte cell(정상세포)에 대한 >30kDa 분획물들의 독성효과.....	103
3-5. 효소분획물의 U-937 cell과 HL-60 cell에 대한 cell cycle 변화.....	107
4. 결론.....	117
참고문헌.....	120
감사의 글.....	134

LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Scheme of the organic solvent fractionation of *Sargassum coreanum*
- Fig. 2. Ultrafiltration membrane system for fractionation of *Sargassum coreanum* enzymatic extract according to the molecular weight of constituents.
- Fig. 3. Hydrogen peroxide scavenging activity(%) with different concentration of the different molecular weight fractions of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract.
- Fig. 4. DPPH radical scavenging activity(%) with different concentration of the different molecular weight fractions of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract.
- Fig. 5. Hydrogen peroxide scavenging activity(%) of 5~10 kDa fraction of the *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased hydrolysate by DCHF-DA on V79-4 cells. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm S.D.
- Fig. 6. Protective effect of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells.
- Fig. 7. Protective effect of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Celluclast extract against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells.
- Fig. 8. Protective effect of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Neutrased extract against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells.
- Fig. 9. The effect of supplementation in vitro with different concentration of

5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Celluclast extract on DNA damage of H₂O₂-induced in L-5178 cell. Values are means with standard errors of duplicate experiments.(□; % Fluorescence in tail, -◆-; Inhibitory effect of cell damage)

Fig. 10. Comet images of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Celluclast extract against H₂O₂-induced oxidative damage in L-5178 cells.

Fig. 11. The effect of supplementation in vitro with different concentration of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Neutrast extract on DNA damage of H₂O₂-induced in L-5178 cell. Values are means with standard errors of duplicate experiments.(□; % Fluorescence in tail, -◆-; Inhibitory effect of cell damage)

Fig. 12. Comet images of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Neutrast extract against H₂O₂-induced oxidative damage in L-5178 cells.

Fig. 13. Effect of 5-10 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells by flow cytometric analysis.

Fig. 14. Effect of 5-10 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrast extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells by flow cytometric analysis.

Fig. 15. Effect of the different concentration of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Neutrast extract on antioxidant enzyme activities in V79-4 cell. (A) SOD activity, (B) CAT activity. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control ± S.D.

Fig. 16. Effect of the different concentration of 5~10 kDa fraction from

Sargassum coreanum Celluclast extract on antioxidant enzyme activities in V79-4 cell. (A) SOD activity, (B) CAT activity . Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm S.D.

Fig. 17. Effect of different molecular weight fractions of *Sargassum coreanum* Celluclast extract on tumor cell growth inhibition activity in tumor cells(U-937, HL-60, HaLa, B-16 and CT-26 cells). Cells were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of different molecular weight fractions and measured for viability by MTT assay at 72hr after the sample treatment. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm S.D.

Fig. 18. Effect of different molecular weight fractions of *Sargassum coreanum* Neutrase extract on tumor cell growth inhibition activity in tumor cells(U-937, HL-60, HaLa, B-16 and CT-26 cells). Cells were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of different molecular weight fractions and measured for viability by MTT assay at 72hr after the sample treatment. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm S.D.

Fig. 19. Effect of various concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrase extract on tumor cell growth inhibition activity in tumor U-937 and HL-60 cell, Cells were measured for viability by MTT assay at 72hr after the sample treatment. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm S.D.

Fig. 20. Morphological changes of HL-60 cells treated with different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

Fig. 21. Morphological changes of HL-60 cells treated with different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrase

extract.

Fig. 22. Morphological changes of U-937 cells treated with different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

Fig. 23. Morphological changes of U-937 cells treated with different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.

Fig. 24 The effect of time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract on nucleolus DNA damage in HL-60 cells. Values are means with standard errors of duplicate experiments.

Fig. 25. Comet images of HL-60 cells after the treatments of different time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

Fig. 26. Comet images of HL-60 cells after the treatments of different time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.

Fig. 27. The effect of time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract on nucleolus DNA damage in U-937 cells. Values are means with standard errors of duplicate experiments.

Fig. 28. Comet images of U-937 cells after the treatments of different time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

Fig. 29. Comet images of U-937 cells after the treatments of different time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.

Fig. 30. The effect of different concentration >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract on nucleolus DNA damage in HL-60 cells. Values are means with standard errors of duplicate experiments.

Fig. 31. Comet images of HL-60 cells after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast

extract.

- Fig. 32. Comet images of HL-60 cells after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.
- Fig. 33. The effect of different concentration >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract on nucleolus DNA damage in U-937 cells. Values are means with standard errors of duplicate experiments.
- Fig. 34. Comet images of U-937 cells after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.
- Fig. 35. Comet images of U-937 cells after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.
- Fig. 36. The effect of different concentration >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract on nucleolus DNA damage in Lymphocyte cells. Values are means with standard errors of duplicate experiments.
- Fig. 37. Comet images of lymphocyte cell after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.
- Fig. 38. Comet images of lymphocyte cell after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.
- Fig. 39. Effect of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion in U-937 cells by flow cytometric analysis. Histogram patterns of U-937 cells treated with various concentration of >30 kDa fraction for 24hr by cell cycle analysis.

- Fig. 40. Bar graph for cell cycle patterns of U-937 cells treated by various concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.
- Fig. 41. Effect of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion in U-937 cells by flow cytometric analysis. Histogram patterns of U-937 cells treated with various concentration of >30 kDa fraction for 24hr by cell cycle analysis.
- Fig. 42. Bar graph for cell cycle patterns of U-937 cells treated by various concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.
- Fig. 43. Effect of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion in HL-60 cells by flow cytometric analysis. Histogram patterns of U-937 cells treated with various concentration of >30 kDa fraction for 24hr by cell cycle analysis.
- Fig. 44. Bar graph for cell cycle patterns of HL-60 cells treated by various concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.
- Fig. 45. Effect of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion in HL-60 cells by flow cytometric analysis. Histogram patterns of U-937 cells treated with various concentration of >30 kDa fraction for 24hr by cell cycle analysis.
- Fig. 46. Bar graph for cell cycle patterns of HL-60 cells treated by various concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

LIST OF TABLES

- Table 1. Optimum hydrolysis conditions of the enzymes used for preparation of enzymatic extracts.
- Table 2. Chemical composition of *Sargassum coreanum*(%).
- Table 3. Yield(%) of various organic solvent extracts of *Sargassum coreanum*
- Table 4. Scavenging activities of reactive oxygen species and total polyphenolic contents of various organic solvent extract of *sargassum coreanum*.
- Table 5. Scavenging activities of reactive oxygen species and total polyphenolic contents of the various enzymatic extract of *sargassum coreanum*.
- Table 6. Yield(%) of the different molecular weight fractions of *sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract.
- Table 7. Scavenging activities of reactive oxygen species and total phenolic contents of the different molecular weight fractions of *sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract.

Abstract

In this study, *Sargassum coreanum* was enzymatically hydrolyzed to prepare water-soluble extracts by using five carbohydrases(Viscozyme, Celluclast, AMG, Termamy and Ultraflo) and five proteases(Protamax, Kojizyme, Neutrase, Flavourezyme and Alcalase) and evaluated their potential antioxidant activity.

The Celluclast and Neutrase extracts of *Sargassum coreanum* exhibited better DPPH radical scavenging activities(92.42% and 92.78%, respectively) and hydrogen peroxide(H_2O_2) scavenging activities(58.28% and 57.97% respectively) compared to other enzymatic extracts. Celluclast and Neutrase extracts were fractionated using millipore's Labscale TFF system with ultrafiltration membrane(5kDa, 10kDa and 30kDa). The resultant fractions were collected according to the molecular weight(<5kDa, 5~10kDa, 10~30kDa and >30kDa). Among all the fractions, 5~10 kDa fraction showed the highest H_2O_2 scavenging activity and >30kDa fraction showed the highest DPPH radical scavenging activity. Also, 5~10kDa fraction strongly enhanced cell viability against H_2O_2 -induced oxidative damage in the chinese hamster lung fibroblast(V79-4) cell line.

Celluclast and Neutrase extracts of *Sargassum coreanum* were examined for a potential antitumor activity against five tumor cell lines such as CT-26(mouse colon carcinoma line), U-937(human monoblastoid leukemia cell line), HL-60(human promyelocyte leukemia cell line), HeLa(woman cervical carcinoma cell line) and B-16(murine melanoma cell line)

>30kDa fraction inhibited cell growth on the two tumor cells than the other fractions. Especially the fraction significantly showed inhibition of cell growth against U-937 cell and HL-60 cell.

Therefore the dose-dependent effect of >30kDa fraction on U-937 cell and

HL-60 cell were further investigated and the results are showed clear dose-dependent antitumor activity on U-937 cells and HL-60 cells.

It was also revealed that >30kDa fraction increased DNA fragmentation, apoptotic body and sub-G₁ DNA contents in U-937 cell and HL-60 cell. These results indicate that >30kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extracts can control U-937 cells and HL-60 cells through apoptosis. Therefore, >30kDa fraction has a potential antitumor activity.



요 약

이 연구에서는 큰잎모자반을 상업용 효소인 Celluclast와 Neutralse를 이용하여 효소적방법으로 수용성 추출물을 제조하여 이들의 항산화활성과 항암활성에 대해 연구하였다.

큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 유기용매 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 Chloroform과 Ethylacetate 희분에서 81% 정도의 활성을 나타냈고, 수용액 희분에서 가장 낮은 2.55%의 활성을 나타냈다. Ferrous ion 활성은 n-Haxane에서 68.61%로 가장 높았으며 Chloroform 추출물은 12.41%로 가장 낮게 나타났다. H₂O₂ 소거활성은 대부분이 80% 이상의 활성을 보였다. 총 폴리페놀함량은 Ethylacetate와 Ethanol에서 각각 0.1764 mg/ml와 0.1729 mg/ml로 n-Hexane의 0.0294 mg/ml 보다는 높게 나타났다.

당분해효소나 단백질분해효소 모두다 DPPH 라디칼 소거활성은 88% 이상을 나타내었고, Neutralse 효소추출물은 거의 93%의 소거활성을 보였다. H₂O₂ 소거활성에서도 Neutralse와 Celluclast 효소추출물이 다른 효소추출물보다 다소 높은 소거활성을 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성과 H₂O₂ 소거활성에서 활성이 높았던 Neutralse와 Celluclast 추출물을 분자량별 분획하여 5 kDa<, 5~10 kDa, 10~30 kDa >30 kDa 분획물을 얻어 항산화 활성을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성에서는 >30 kDa 분획물이 다른 분획물에 비해 DPPH 라디칼 소거활성이 높았고 현재 상용되어지고 있는 항산화제 BHA, BHT 및 α-tocopherol 보다도 약간 높은 유해산소 소거율을 보였다. H₂O₂ 소거활성에서는 Neutralse와 Celluclast 효소추출물의 5~10 kDa 분획물이 다른 분획물보다 높은 소거활성을 나타내었으며, 분자량별 분획물의 농도별에서도 같은 결과가 나왔다. DPPH 라디칼 소거활성도 각각 80% 이상 나타내었다.

세포상에서 큰잎모자반 Celluclast와 Neutralse 추출물의 5~10 kDa 분획물의 H₂O₂ 소거활성은 100 μg/ml에 약 70% 정도의 활성을 나타내었으며 H₂O₂에 의해 손상을 받은 V79-4 세포에 대한 세포사멸 억제효과는 Celluclast와 Neutralse의 5~10

kDa 분획물 모두에서 농도 비례적으로 세포 생존율이 증가하였으며 농도가 100 mg/ml 약 70%의 우수한 세포 보호효과를 가지는 것을 확인하였다.

Alkaline comet assay를 이용하여 H₂O₂ 처리로 손상된 L-5178 세포의 DNA 손상에 대한 Celluclast 추출물 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 세포손상 저해효과는 H₂O₂를 처리하지 않은 대조구에서 약 7% 세포손상을 보였고, H₂O₂를 처리하였을 때 약 50%의 높은 DNA 손상을 입었다. 반면 효소분획물을 100 µg/ml를 처리하였을 때 약 15% 정도의 DNA 손상만을 보였다. 농도에 따른 세포손상 저해효과는 25 µg/ml의 농도에서는 30% 정도였고, 100 µg/ml의 농도에서는 약 70%이 높은 세포손상 억제효과를 보였다. Neutrased 추출물 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리의 결과도 Celluclast 추출물과 유사한 결과를 나타내었다.

V79-4 세포를 H₂O₂ 처리 후 분획물의 농도별 처리에 따른 apoptosis 유도 억제효과는 H₂O₂만을 V79-4 세포에 처리하였을 때 H₂O₂를 처리하지 않은 대조구에 비해 apoptotic body가 많이 관찰되는 것을 확인하였다. 반면 Celluclast 5~10 kDa 분획물을 100µg/ml의 농도를 처리하였을 때 거의 대조구와 유사한 형태를 유지하였고, Neutrased 추출물 5~10 kDa 분획물의 경우는 Celluclast와 비교하며 다소 떨어지는 apoptosis 유도 억제효과를 보였다. 그리고 apoptosis 유도 억제 효과를 보기위한 또 다른 방법으로 flow cytometry를 이용하여 측정하였다. flow cytometry로 측정한 결과 H₂O₂를 처리하지 않은 대조군의 sub-G₁가 1.52%인 반면 H₂O₂에 의해 유도된 V79-4 세포의 apoptosis를 나타내는 sub-G₁은 18.5%로 크게 증가하였으나 100 µg/ml Celluclast의 5-10 kDa 분획물 첨가시 apoptosis나타내는 sub-G₁은 1.8%로 거의 대조구와 유사한 apoptosis를 보였다. 이것은 Celluclast의 5~10 kDa 분획물의 첨가가 H₂O₂에 의해 손상된 V79-4의 apoptosis 유도를 효과적으로 억제되었다는 것을 확인할 수 있었다.

Neutrased의 5~10 kDa 분획물의 apoptosis 유도억제 효과에서 H₂O₂에 의해 손상된 V79-4 세포에 대한 cell cycle 변화를 측정한 결과는 대조구의 sub-G₁의 1.52%인 반면 H₂O₂에 의해 유도된 V79-4 cell의 apoptosis sub-G₁은 18.5%였으나 100 µg/ml Neutrased의 5~10 kDa 분획물 첨가시 apoptosis를 나타내는 sub-G₁은 2.68%로 낮아진 것으로 보아 Neutrased의 5~10 kDa 분획물의 첨가가 H₂O₂에 의해 손상된 V79-4 세포의 apoptosis 유도를 억제하는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

큰잎모자반 Neutrased 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 V79-4 세포의 항산화효소 SOD와 CAT의 활성은 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 SOD 활성이 각각 21%, 38% 및 67%씩 증가하였다. CAT의 경우는 각각 9.6%, 24% 및 45%씩 증가하였다.

Celluclast 추출물의 경우 SOD와 CAT의 활성은 25, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 씩 처리시 SOD 활성이 각각 16%, 36% 및 58%씩 증가하였다. CAT의 경우 각각 15%, 23% 및 41%씩 증가하였다.

CT-26, U-937, HL-60, B-16과 Hela 세포에 대한 Celluclast와 Neutrased 효소분획물의 세포성장 억제효과는 다른 분획물에 비해 >30 KDa 분획물이 U-937와 HL-60 cell에 대해 높은 성장억제 효과를 나타내었으며, U-937 cell에 더 효과적이었다.

U-937와 HL-60 세포에 대한 분획물의 농도별 성장억제효과는 농도 의존적으로 세포성장 억제효과를 보였으며, 암세포에 효소분획물을 처리하였을 때 시간대별 DNA 손상정도는 시간이 증가할수록 DNA 손상도 증가하였고 12시간 경과한 후에는 HL-60 세포에 대해 약 40~50%의 DNA 손상을 보였다. 농도별 HL-60 과 U-937 세포에 대한 DNA 손상 측정 결과는 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 약 25~30%의 DNA 손상을 나타냈다.

Lymphocyte 세포(정상세포)에 대한 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased >30kDa 분획물의 DNA 손상 측정 결과 두 효소 모두 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지는 효소추출물을 처리하지 않은 대조구와 비슷한 DNA 손상 결과를 나타냈으나 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 대조구에 비해 약간의 Lymphocyte 세포의 DNA 손상이 나타났다.

Neutrased 추출물의 >30 kDa 분획물의 U-937 cell에 대한 cell cycle 변화를 측정한 결과 효소추출물을 처리하지 않은 대조구의 경우 apoptosis를 나타내는 sub-G₁는 약 3.15%였던 것이 Neutrased 추출물의 >30 kDa 분획물을 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리 하였을 때 sub-G₁이 각각 3.10%, 3.25%, 15.66%로 증가하는 것을 보였다. Celluclast 추출물의 경우도 Neutrased 추출물과 비슷한 경향을 보이며 대조구의 sub-G₁는 3.15%였던 것이, Neutrased 추출물의 >30 kDa 분획물을 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때 sub-G₁이 증가하는 것을 보였다 (17.74%).

Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물을 가지고 HL-60 cell에 대한 cell cycle 변화를 측정 결과 추출물을 처리하지 않은 대조구와 Neutrased 추출물의 >30 kDa 분획물을 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때 apoptosis를 나타내는 sub-G₁은 각각 2.91%, 4.33%, 6.21%와 14.45%를 나타내었으며, Celluclast 추출물의 경우는 대조구의 sub-G₁은 2.91%였고, 추출물을 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 와 200 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때 sub-G₁은 각각 5.02%, 5.63%와 16.21%의 수치를 나타내었다.

이러한 결과를 종합해 볼 때, 큰잎모자반 효소적 추출물이 식품에서 사용가능한 안전한 수용성 물질이고, 활성산소종의 하나인 H₂O₂를 효과적으로 제거시키고, 또한 암세포의 증식을 억제하는 것으로 볼 때 산업적 용도가 매우 다양할 것으로 추정되며, 특히 식품산업으로서의 이용 가능성을 높일 수 있을 것이라 판단된다. 또한 기존의 항산화제 및 항암제가 갖고 있던 인체 안전성 문제도 충분히 극복할 수 있을 것으로 기대된다.

서 론

호기성 생물의 대부분은 산소(O_2)를 체내에 받아드려 에너지 생성 등 여러 대사과정에 관여하고 생물의 생존에 가장 필수적인 물질이지만 체내 대사과정에서 생체에 독성을 나타낼 수 있는 부산물이 생성되기도 하는데 이들을 활성산소라 한다. 활성산소의 종류로는 lipid radical($LOO\cdot$), superoxide radical(O_2^-), 및 hydroxyl radical($\cdot OH$)과 같은 radical 뿐만 아니라 비라디칼인 single oxygen(1O_2), hydrogen peroxide(H_2O_2), hypochlorous acid($HOCl$), lipid peroxide($LOOH$), N-chloramine 성분들을 포함한다. 이런 활성산소들은 생체 내에서 생성될 뿐만 아니라 방향성 탄화수소, 담배, 살충제, 유기용매, 튀김 음식, 술 및 공기오염 등을 통하여 생체에 들어오는데 활성산소들은 생체 내 제거 기작에 의하여 대부분이 소멸되나 생성과 소멸의 균형이 깨어질 때 생체 내에서는 각종 질환이 발생한다. 이들 활성산소들은 단백질, 불포화 지방산등과 결합하여 과산화지질을 생성하고, DNA, RNA 등에 손상을 일으키며, 생체막의 손상, 면역능력의 약화와 함께 성인병 즉, 류마티스성 관절염, 세균성 혹은 바이러스성 감염, 심장병, 파킨스씨병, 알츠하이머병 그리고 암과 같은 질병과 노화를 유발하게 된다.

2005년도 한국의 사회지표에 따르면 2004년 기준으로 인구 10만명당 133.5명이 암으로 사망하는 것으로 밝혀졌다. 암 질환 다음으로는 뇌혈관질환(70.3명), 심장질환(36.9명), 자살(25.2명), 당뇨병(24.3명), 간질환(19.1명) 및 만성질환(17.3명)등의 순으로 암이 주된 사망원인이다,

암은 조기에 발견되지 못할 경우 완치가 거의 불가능하고, 병이 진전 될수록 환자와 가족의 고통과 경제적 손실이 막대하여, 의료보험의 재정고갈 등 사회적으로도 큰 비용을 초래한다. 그러므로 단순한 수명연장보다 즐겁고 건강한 삶을 원하는 삶의 질이 중요한 관심사로 대두되고 있는 요즘, 암의 예방과 조기 치료의 중요성은 그 어느 때 보다 높다고 할 수 있다. 암의 발병에는 유전적 소인도 깊이 관여하지만 환경적 요인 또한 큰 영향을 미치며 선진국일수록 암의 발병률이 증가하는 경향을 보인다. 그 이유로는 농약, 살충제 등의 사용량 및 식품내 잔유량 증가, 식품 보존제, 방부제, 착색제 등의 첨가된 가공식품의 소비 증가, 수질, 토양, 대기오염의 증가, 현대인의 스트레스의 증가, 활동량

의 감소 그리고 풍요로운 식생활을 통한 비만 등을 들 수 있다. 현대 의학의 눈부신 발전으로 암을 진단하고 치료하는 다양한 방법들이 개발되어 인류의 건강 증진에 기여하였으나 아직도 해결해야 할 많은 문제점들이 남아있다.

암 치료에 있어서 항암제 요법은 매우 중요한 부분을 차지하고 있지만 항암제 자체의 비특이성 및 독성으로 인한 정상세포의 손상은 해결해야 될 시급한 과제로 남아있다. 그래서 오늘날 보다 안전한 천연항암제 개발이 절실히 필요한 실정이다. 따라서 근래에는 인간이 안전하게 오랫동안 먹어 왔던 천연물로부터 항산화 효과가 있는 물질을 분리, 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다.

삼면이 바다로 둘러싸여 있고 비교적 해양생물 자원이 풍부한 입지조건을 가지고 있음에도 불구하고, 아직까지 해양생물자원을 단순한 식량자원으로만 이용할 뿐 생명공학기법을 이용하여 다방면으로 활용하기 위한 체계적인 연구가 미흡한 실정이다. 최근들어 건강에 대한 관심이 증폭되면서 천연물들이 갖는 phytochemical과 그들이 갖는 활성에 대한 연구가 증대되고 있다. 해조류는 양적으로 매우 풍부하게 먹을 수 있는 식품으로써 건강에 필수적인 여러 가지 무기염류들을 다량 함유하고 있으며, 동시에 단백질 같은 체구성 영양소도 함유하고 있다. 그리고 식물성 섬유인 알긴산과 칼슘이온(Ca^{++}), 요오드 성분이 많이 함유되어 있어서 대장의 연동운동을 도와주고 골다공증을 예방해주며, 갑상선 부종을 억제시키는 역할을 하기도 한다. 또한 해조류의 어떤 성분들은 항균, 항암, 항산화 등 많은 생리활성을 갖고 있다고 알려져 있으며, 이러한 분야들 중 항산화활성에 관심을 갖는 이유는 국민소득이 증대됨에 따라 식생활이 서구화되면서 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 비만 등 각종 성인병이 유발되고, 사회가 점차 고도화됨에 따라 고령화 인구가 늘어나게 되면서 건강문제에 대한 인식이 바뀌게 되었기 때문이다.

천연 항산화제는 지금까지 여러종류가 분리되었다고 보고되고 있지만 토코페롤 이외에는 인체독성, 양적, 경제적인 문제로 거의 사용되지 않는 실정이다. 또한 최근에 많이 사용되고 있는 페놀계 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxyanisol)와 BHT(butylated hydroxytoluene)는 다른 항산화제에 비해 뛰어난 활성을 지닌다고 평가받고 있지만 50mg/kg/day 이상을 섭취하였을 때는 생체효소 및 지방의 변화로 인해 암 및 각종 질병을 유발하는 등 거의 모든 합성 항산화제는 인체에 독성을 가진다고 보고되어 있다. 따라서 강력하면서도 인체에 해가 되지 않는 천연 항산화제

의 개발에 관한 연구가 요구되고 있는 실정이다.

지금까지 연구되어진 천연 항산화제로는 인삼, 녹용, 구기자, 버섯등의 생약제나 식생활에 많이 이용되고 있는 콩, 녹차 등 육상식물들을 이용한 연구가 가장 많이 이루어져 있다. 해조류에서는 육상식물들에 비해 그다지 많은 연구가 이루어지지 않았지만 해조류를 많이 섭취하는 일본과 유럽의 일부에서 많이 연구되어져 있다. 연구결과들을 보면 다음과 같다. Kaneda와 Ando(1971)는 20종의 해조류 중 김에서 항산화 활성을 나타내는 phospholipids를 분리하는데 성공한 바가 있고, Yan 등(1996)은 갈조류인 *Sargassum kjellmanianum*로부터 분리한 phlorotannins 성분이 우수한 지질과 산화 억제효과를 보인다고 밝힌 바 있다. 또한 Yan 등(1999)은 툃의 acetone 추출물에서 우수한 항산화 효과를 나타내어 이것을 분석한 결과 fucoxanthin이라는 것을 밝혀내었고, Estrada 등(2001)은 남조류인 *Spirulina platensis*의 phycocyanin 성분이 우수한 hydroxyl radical 소거활성을 나타내었다고 보고하였다. 우리 나라에서도 우리가 일상에서 많이 접할 수 있는 해조류들에 대한 연구는 상당수 이루어져 있는데, Park 등(1991)은 갈조류인 툃에서 항산화 활성을 검색한 결과 여러 가지 용매 희분에서 활성 산소종 소거활성과 지질과산화 억제활성을 보인다고 보고하였다. 이러한 연구들의 대부분이 유기용매 추출과 열수 추출을 이용하여 실험을 수행하였는데, 우수한 항산화 효과를 나타내는 반면에 추출 수율이 낮았고, 추출시 고온을 이용하였기 때문에 열에 불안정한 항산화 물질이 파괴되었을 가능성이 있다.

따라서 이러한 단점을 보완할 만한 방법으로 해조류에 생물공학 기법 중 하나인 효소적 가수분해방법을 적용하여 해조류가 갖고 있는 미량성분들 중 항산화 효과와 세포손상 억제 활성을 갖는 물질을 소재화하고 이들 소재를 주제로 한 기능성 식품 및 의약품으로서의 가치를 알아보고자 하였다.

이에 본 실험은 제주도에 서식하고 있는 갈조류의 한 종류인 큰잎모자반으로부터 수용성 활성물질을 제조하여 항산화활성 및 항암활성을 검토하였다. 큰잎모자반으로부터 수용성 활성물질 제조는 여러 종류의 단백질분해효소와 당분해효소를 이용하여 효소적 추출방법을 이용하였다. 큰잎모자반으로부터 수용성 효소추출물의 항산화활성을 검토하기 위하여 정상세포인 V79-4 세포에 과산화수소를 처리하였을 때의 과산화수소 소거활성을 조사하였으며, 또한 과산화수소에 의한 세포의 산화적 손상으로부터 큰잎모자반 추

출물의 보호효과와 큰잎모자반 효소추출물의 항암효과를 알아보기 위해 대장암 세포 (CT-26 cells), 백혈병 세포(U-937과 HL-60 cells), 자궁암 세포(HeLa cells) 및 피부암 세포(B-16 cells)를 이용하여 MTT assay, Comet assay, cell cycle 및 western blot의 apoptosis 유도기작을 통해 암세포의 세포 증식억제활성을 알아보았다.



Part I

큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 유기용매 분획물 및
효소추출물의 항산화활성 측정



Part I

큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 유기용매 분획물 및 효소추출물의 항산화활성 측정

1. 요약

큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 유기용매 추출물의 DPPH 소거활성은 Chloroform과 Ethylacetate 획분에서 81% 정도의 활성을 나타냈고, 수용액 획분에서 가장 낮은 2.55%의 활성을 나타냈다. Ferrous ion 활성은 n-Haxane에서 68.61%로 가장 높았으며 Chloroform 추출물은 12.41%로 가장 낮게 나타났다. H₂O₂ 소거활성은 대부분이 80% 이상의 활성을 보였다. 총 폴리페놀함량은 Ethylacetate와 Ethanol에서 각각 0.1764mg/ml와 0.1729mg/ml로 n-Hexane의 0.0294mg/ml 보다는 높게 나타났다.

당분해효소나 단백질분해효소 모두다 DPPH 라디칼 소거활성은 88% 이상을 나타내었고, Neutrase 효소추출물은 거의 93%의 소거활성을 보였다. H₂O₂ 소거활성에서도 Neutrase와 Celluclast 효소추출물의 다른 효소추출물보다 다소 높은 소거활성을 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성에서도 >30 kDa의 분획물에서는 현재 상용되어지고 있는 항산화제 BHA, BHT 및 α -tocopherol 보다도 약간 높은 유효산소 소거율을 보였다. H₂O₂ 소거활성에서는 Neutrase와 Celluclast 효소추출물의 5~10 kDa 분획물이 다른 분획물보다 높은 소거활성을 나타내었으며, 분자량별 분획물의 농도별에서도 같은 결과가 나왔다. DPPH radical 소거활성도 각각 80% 이상 나타내었다.

2. 재료 및 방법

2-1. 재료

제주지역에서 서식하고 있는 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)을 수거하여 불필요한 이물질을 제거한 후 세척하여 동결건조한다. 이것을 25 mesh 이하가 되도록 분쇄하여 분말화한다. 사용된 효소는 Novo. Co.(Novozyme Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)에서 생산되고 있는 효소들 중 당분해 효소 5종 (Viscozyme L, Celluclast 1.5L, AMG 300L, Termamyl 120L, Ultraflo L), 단백질 분해효소 5종 (Protamex, Kojizyme 500MG, Neutrased 0.8L, Flavourzyme 500MG, Alcalase 2.4L)을 구입하여 사용하였다. 이들 효소들의 최적 pH와 온도는 Table 1에 나타내었고, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), thiobarbituric acid(TBA), Trichloroacetic acid(TCA), 3-(2-Pyridyl)-5,6-di(p-sulfophenyl)-1,2,4-triazine, disodium salt(ferrozine), butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), α -tocopherol과 linoleic acid는 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그 밖의 시약들은 분석용 특급을 사용하였다.

2-2. 큰잎모자반의 일반성분 분석

AOAC(1990)에 따라 수분은 상압 105°C 가열건조법, 지방은 Soxhlet법, 조단백질은 semi-micro Kjeldahl법 그리고 회분은 건식회화법으로 측정하고 탄수화물 정량은 phenol sulfuric acid법으로 측정한다.

2-3. 큰잎모자반 유기용매 분획물 제조

분말화된 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 30g을 환류장치가 부착된 반응기에 넣고 여기에 70%(v/v) 에탄올 3L를 넣어 80°C에서 교반하면서 24시간 동안 추출하였다. 반응종료 후 추출액을 Whatman No. 1 여지로 여과한 다음 여과액을 n-Hexane과 1:1비율로 혼합하여 분액여두에 정치시킨 다음 Hexane층과 수용액층으로 구분하여 Hexane층을 회수하고 수용액층에 다시 chloroform을 1:1비율로 혼합하여 위과정을 반복한다. 연속적으로 수용액층에 Ethylacetate, Butanol도 위 과정을 행한다. 이 과정으로 Ethanol, n-Hexane, Chloroform, Ethylacetate,

Butanol 및 수용액층의 6가지 분획물을 제조하였다(Fig. 1). 이 분획물의 용매를 증발시킨 후 Methanol에 용해시켜 100mℓ로 정용하여 실험할 때 유기용매 추출물의 농도는 2 mg/mℓ로 조절하였다.

2-4. 큰잎모자반 효소추출물 제조

분말화된 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)을 1% 용액 100 ml를 만들어 기질 대비 10%의 효소 100 μ ℓ(또는 mg)을 첨가하여 각각 효소의 최적온도와 pH 조건에 따라 12시간 동안 가수분해 하였다. 가수분해액중 미반응물질을 제거하기 위해 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 가지고 라디칼소거능과 폴리페놀 함량을 측정하였다. 실험할 때 각 효소 추출물의 농도는 2 mg/mℓ로 조절하였다.

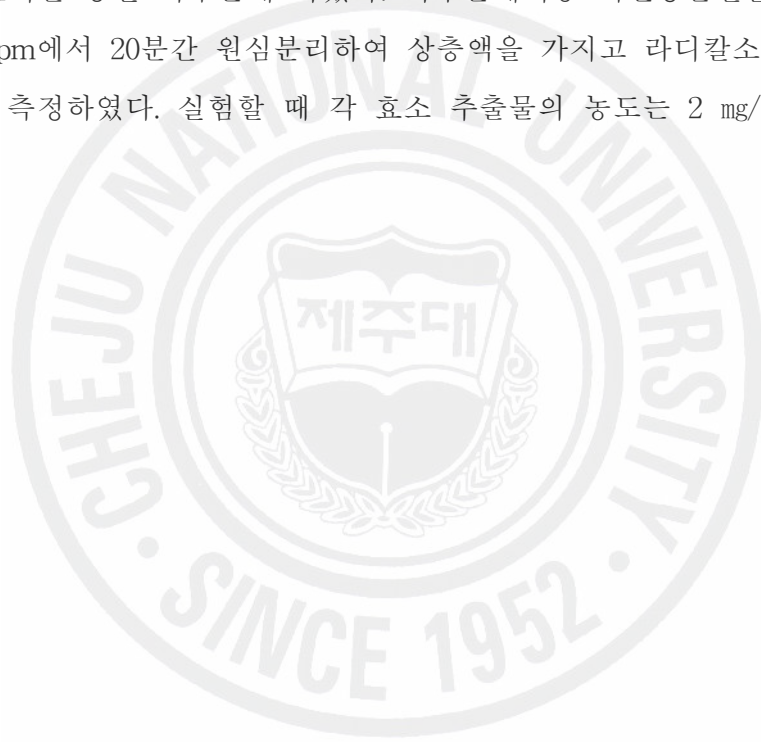


Table 1. Optimum hydrolysis conditions of the enzymes used for preparation of enzymatic extracts.

효 소	최적 조건	
	pH	온도(℃)
Viscozyme	4.5	50
Celluclast	4.5	50
AMG	4.5	60
Termamyl	6.0	60
Ultraflo	7.0	60
Protamex	6.0	40
Kojizyme	6.0	40
Neutrase	6.0	50
Flavourzyme	7.0	50
Alcalase	8.0	50

2-5. 큰잎모자반 효소추출물의 분자량별 분획물 제조

분말화된 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 1% 용액 2L를 만들어 기질대비 10%의 Celluclast와 Neutrase 효소 2 ml을 첨가하여 각각 효소의 최적온도(50℃, 50℃)와 pH(4.5, 6.0) 조건에 따라 12시간 동안 가수분해 하였다. 가수분해액중 미반응물질을 제거하기 위해 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 Fig. 2에 나타낸 Millipore Labscale TFF system을 이용하여 각각 5 kDa, 10 kDa 및 30 kDa의 멤브레인을 이용해 4가지 분자량별(<5 kDa, 5~10 kDa, 10~30 kDa 및 >30 kDa) 분획물을 제조하였다.

2-6. DPPH free radical scavenging activity

추출물의 자유라디칼 소거활성은 Blois (1958)의 방법을 변형하여 전자공여능 (Electron donating ability, EDA)으로 측정한다. 4.0×10^{-4} M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 2.9 ml에 각 효소분해액 0.1 ml를 넣고 5초간 교반하여 30분간 반응시킨 후 516 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 흡광도의 감소 비율로서 전자공여능을 나타낸다.

2-7. Hydrogen peroxide scavenging activity

H₂O₂ 소거활성은 Müller 등(1985)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 0.1 M phosphate buffer(pH 5.0) 100 μ l와 sample를 96 microwell plate에서 혼합시킨다. 다시 20 μ l의 H₂O₂를 첨가시키고 37℃에서 5분간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 1.25 mM ABTS 와 peroxidase (1 unit/ml)를 각각 30 μ l첨가하여 최종적으로 37℃에서 10분간 반응시켜 ELISA reader를 사용해 405 nm에서 활성도를 측정한다.

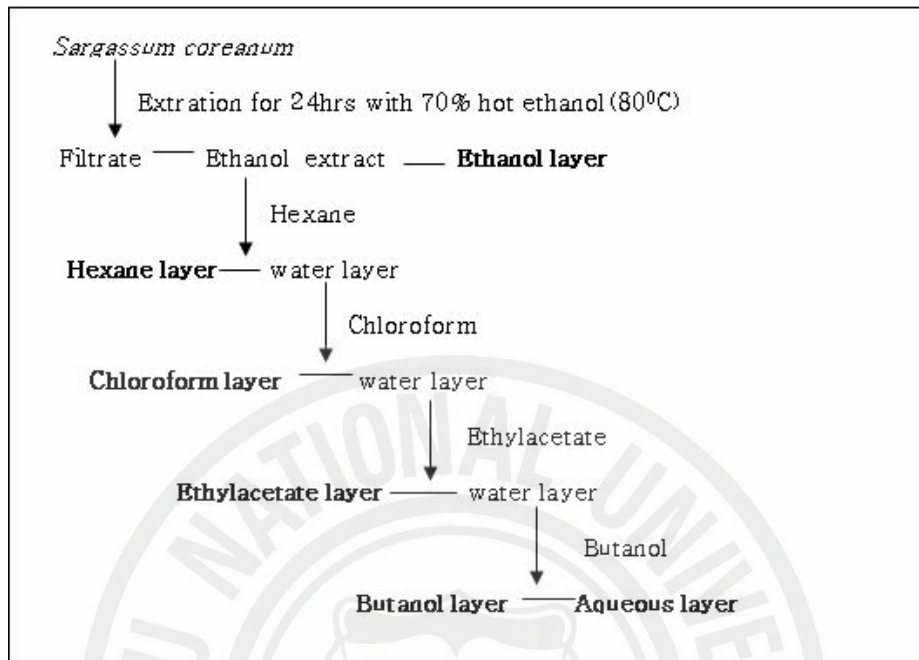


Fig. 1. Scheme of the organic solvent fractionation of *Sargassum coreanum*

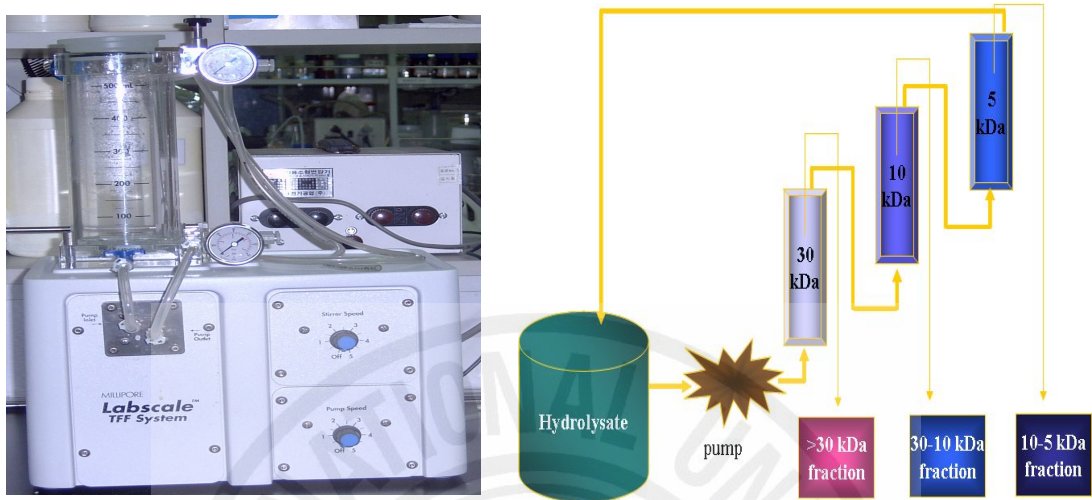


Fig. 2. Ultrafiltration membrane system for fractionation of *Sargassum coreanum* enzymatic extract according to the molecular weight of constituents.

2-8. Metal chelating assay

Metal chelating능은 Decker와 Welch(1990)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 0.1 ml에 정제수 0.1 ml와 0.5 mM FeCl₂ 0.025 ml을 혼합한 후 550 nm에서 흡광도(Abs. 1)를 측정을 하고 이 혼합물에 2.5 mM ferrozine 0.025 ml를 첨가한 후 실온에서 20분간 방치한 다음 550 nm에서 흡광도(Abs. 2)를 측정하였다. 계산식은 다음과 같다.

Ferrous ion chelating activity(%)

$$= [(1 - (\text{sample Abs. 2} - \text{sample Abs. 1}) / (\text{control Abs. 2} - \text{control Abs. 1})) \times 100]$$

positive control : EDTA

2-9. Total polyphenolic assay

총 페놀함량은 Chandler과 Dodds(1983)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 1 ml에 95% 에탄올 1 ml, 정제수 5 ml 및 50% Folin-Ciocalteu reagent(Sigma Chemical, St. Louis, MO) 0.5 ml를 혼합하여 5분간 방치한 후 5% Na₂CO₃ 1 ml를 첨가하여 교반시킨 다음 1시간 동안 암소에 둔 후 gallic acid를 표준으로 하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 계산식은 $Y(\text{mg/ml}) = 10.668X - 0.0122$ 이고, blank는 95% 에탄올 사용하였다.

3. 결과

3-1. 큰잎모자반의 일반성분 분석

채집한 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)을 불필요한 이물질을 제거한 후 세척, 동결건조 다음 25 mesh 이하가 되도록 분쇄하여 분말화 하여 일반성분을 분석한 결과는 Table 2와 같다.

탄수화물의 함량이 전체의 약 67%를 차지하였다. 여러 해조류들 중에 갈조류는 다당류를 비롯한 탄수화물 성분을 다량으로 함유하고 있다고 알려져 있는데 본 실험에서 또한 가장 많은 함량을 차지하고 있는 것을 확인하였다. 또한 각종 미네랄 및 비타민들을 다량으로 함유하고 있어서 회분함량도 12.77%를 나타내었고, 단백질의 함량이 14.4%를 차지하였고, 수분이 약 4.3%, 지방의 함량이 약 1.33% 내외의 함량을 나타내었다.

3-2. 큰잎모자반 유기용매 분획물의 수율

큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)을 Ethanol, n-Hexane, Chloroform, Ethylacetate, Butanol 등의 유기용매로 추출하여 수용액분까지 6가지 분획물을 얻은 결과를 Table 3.에 나타내었다. 용매를 증발시킨 후의 수율은 수용액분이 20.76%로 가장 높게 나타났으며 그 다음은 Ethylacetate 분획물이 8.52%의 수율을 나타냈으며 n-Hexane 분획물이 1.38%로 가장 낮은 수율을 보였다.

Table 2. Chemical composition of *Sargassum coreanum*(%)

Scientific name	Moisture	Ash	Protein	Carbohydrate	Lipid
<i>Sargassum coreanum</i>	4.30	12.77	14.40	67.21	1.33



Table 3. Yield(%) of various organic solvent extracts of *Sargassum coreanum*

Organic solvent	After solvent extraction			After solvent evaporation		
	Content (mg/ml)	Total content (g)	Yield (%)	Content (mg/ml)	Total content (g)	Yield (%)
EtOH	5.87	1.47	4.89	9.5	0.95	3.17
n-Hexane	0.47	0.86	2.88	4.13	0.41	1.38
Chloroform	0.53	1.38	4.59	6	0.60	2
Ethylacetate	2.47	2.96	9.86	25.57	2.56	8.52
Butanol	2.4	3.16	10.54	13.17	1.32	4.39
Aqueous	21.6	6.61	22.03	31.13	6.23	20.76
Residue		12.40	41.33			
Total		28.84	96.12			

* Sample weight : 30g

3-3. 큰잎모자반의 유기용매 추출물의 라디칼 소거활성

큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 유기용매 추출물의 라디칼 소거활성과 폴리페놀 함량의 결과를 Table 4.에 나타내었다. DPPH 소거활성은 Chloroform과 Ethylacetate 획분에서 81% 정도의 활성을 보였으며, 수용액 획분에서 가장 낮은 2.55%의 활성을 나타냈다. DPPH은 자유라디칼의 일반적인 화합물이고 여러 가지 항산화 성분의 자유라디칼 소거능을 평가할 때 가장 널리 사용되고 있다 (Hatano et al., 1989). 대부분의 자유라디칼 소거성분들은 친수성 용매 분획물 (ethylacetate)과 관련이 있는 경향이 있다.

Ferrous ion 활성은 n-Haxane에서 68.61%로 가장 높았으며 Chloroform 추출물은 12.41%로 가장 낮게 나타났다. 철, 구리, 망간과 같이 전이금속이온들은 모든 유기체에 보편적으로 분포되어 있으며 지질산화에 직, 간접적으로 관여하고 있다. 더 높은 원자상태 금속인 Ferrous ion은 전자전이 또는 지질 alkyl 라디칼 형성을 통해 지질산화에 참여하는 것으로 알려져 있다(Halliwell, 1991). Metal 킬레이트능은 지질과산화에 있어서 전이금속을 축진을 늦추어 주는데 기여한다 (Duh et al., 1999).

유기용매 추출물의 H₂O₂ 소거활성은 대부분이 80% 이상의 활성을 보였다. H₂O₂는 non-radical 화합물이지만 생체막을 통과하는데 매우 중요하다. 비록 자체는 반응성이 낮지만 hydroxyl radicals과 같은 반응성이 높은 종으로 전환될수 있다. H₂O₂ 소거활성 측정은 과산화수소와 같은 전단계산화제 level을 감소시키는 항산화제의 능력을 결정하는 유용한 방법중의 하나이다(Czochra and Widensk, 2002).

총 폴리페놀함량은 Ethylacetate와 ethanol에서 각각 0.1764 mg/ml와 0.1729 mg/ml로 n-Hexane의 0.0294 mg/ml 보다는 높게 나타났다. 많은 연구자들은 해조류의 polyphenol은 항산화활성과 관련이 있고, 지질과산화를 안정화시키는데 중요한 역할을 한다고 하였으며, polyphenolic 성분들은 인간의 돌연변이 생성이나 발암현상을 저해하는 효과를 가진다(Tanaka et al., 1998)

약용식물 9가지의 methanol 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과 *Areca catechu* var. *dulcissima* 추출물이 IC₅₀의 값이 1.8 µg/ml로 가장 높은

DPPH 소거활성을 나타내었고, *Cinnamomun cassia*, *Paeonia suffruticosa*와 *Alpinia officinarum*의 추출물이 다른 추출물보다 높은 DPPH 소거활성을 보였으며, 또한 모든 추출물들이 농도의존적으로 DPPH 소거활성을 보였다고 보고하였다(Lee et al., 2003).

지충이(*Sargassum thunbergii*)의 유기용매 추출물 총페놀함량에서 chloroform 추출물이 22.5 ± 0.8 mg/100 ml, methanol 추출물이 20.1 ± 0.6 mg/100 ml 전자공여능은 Hexane 추출물을 제외한 모든 시료에서 추출물의 농도가 높을수록 그 효과가 증가하였으며, 특히 추출물의 농도가 1000 $\mu\text{g/ml}$ 일때 methanol 추출물과 water 추출물에서 각각 70.4%와 63.2%의 라디칼 소거능을 보였다고 보고하였다(Choi et al., 2006).

톳(*Hizikia fusiformis*)의 여러 가지 유기용매 추출물과 수용액에서의 DPPH 소거활성은 organic ethylacetate 분획물($\text{IC}_{50} = 0.113 \pm 0.02$ mg/ml)이 BHT($\text{IC}_{50} = 0.36 \pm 0.002$ mg/ml)보다 활성이 높았으며, 또한 organic n-Hexane 분획물($\text{IC}_{50} = 0.144 \pm 0.03$ mg/ml)과 수용액 chloroform 분획물($\text{IC}_{50} = 0.157 \pm 0.03$ mg/ml)도 강한 DPPH 소거활성을 나타내었고, ethylacetate의 organic과 수용액 분획물에서 각각 $\text{IC}_{50} = 1.9 \pm 0.02$ mg/ml, $\text{IC}_{50} = 2.54 \pm 0.05$ mg/ml로 비교적 높은 H_2O_2 소거활성을 보였지만 상업용 항산화제 BHT($\text{IC}_{50} = 0.07 \pm 0.004$ mg/ml)와 α -tocopherol($\text{IC}_{50} = 0.127 \pm 0.03$ mg/ml)보다는 H_2O_2 소거활성이 낮았으며, 금속 킬레이트능은 chloroform 수용획분($\text{IC}_{50} = 0.131 \pm 0.002$ mg/ml)과 ethylacetate 수용획분($\text{IC}_{50} = 0.18 \pm 0.07$ mg/ml)이 α -tocopherol($\text{IC}_{50} = 1.72 \pm 0.2$ mg/ml)보다 높은 금속 킬레이트능을 보였으며, 이러한 결과 organic 분획물보다는 수용획분에서 더 높은 금속 킬레이트능을 나타내었다고 보고하였다(Karawita et al., 2005).

Table 4. Scavenging activities of reactive oxygen species and total polyphenolic contents of various organic solvent extract of *Sargassum coreanum*

	DPPH scavenging activity (%)	Ferrous ion chelating activity (%)	H ₂ O ₂ scavenging activity (%)	Total polyphenolic content (mg/ml)
EtOH	49.10	56.50	83.98	0.1729
n-Hexane	41.27	68.61	84.99	0.0294
Chloroform	81.28	12.41	84.14	0.1171
Ethylacetate	81.54	42.60	84.22	0.1764
Butanol	57.93	37.82	79.41	0.1683
Aqueous	2.55	48.28	85.01	0.0451

* Test sample content : 2 mg/ml

3-4. 큰잎모자반 효소추출물의 분자량별 수율

최적가수분해 조건에서 추출한 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)의 Celluclast와 Neutralse 효소추출물을 Millipore Labscale TFF system을 이용하여 각각 5 kDa, 10 kDa 및 30 kDa의 분자량 membrane를 이용하여 4가지 분자량별(<5 kDa, 5~10 kDa, 10~30 kDa 및 >30 kDa) 분획물의 수율을 Table 6.에 나타내었다. Neutralse 효소추출물의 분자량별 분획물에서는 5 kDa 이하가 19.5%로 가장 높은 수율을 나타내었고, 10~30 kDa 분획물이 1.8%로 가장 낮은 수율을 나타내었다. Celluclast 효소추출물의 분자량별 분획물에서는 >30 kDa이 29.8%로 수율이 가장 높았고, 5~10 kDa 분획물이 2.8%로 가장 낮은 수율을 나타내었다. 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)으로부터의 총수율은 Celluclast 효소추출물이 61.95%로 Neutralse 효소추출물의 47.9%보다 약 14%정도 높은 수율을 나타내었다.

툃(*Hizikia fusiformis*)을 원료로 하여 NOVO. Ltd., 각각 5가지 당분해효소와 단백질분해효소를 이용하여 최적pH와 온도에서 기질대비 5%의 효소를 첨가하여 3일간 반응시킨 효소분해물의 수율은 당분해효소 Viscozyme, Termamyl, Ultraflo과 5가지 단백질분해효소 모두 35% 이상이였으며, 40% 이상인 것도 있었다. 복합효소(Alcalase 2.5% + Ultraflo 2.5%) 분해물의 41.3% 이었고, 이 분해물의 분자량별 분획물에서 >30 kDa 분획물이 다른 분획물(10~30 kDa, 1~10 kDa, <1 kDa)보다 높은 수율을 나타내었다(Siriwardhana et al., 2004).

3-5. 큰잎모자반의 효소추출물의 라디칼 소거활성

생체내에서 산화와 관련된 현상으로 세포막에 존재하는 지질은 산소에서 유래되는 superoxide anion radical, Hydroxyl radical, singlet oxygen 및 H₂O₂ 등의 활성산소와 결합하여 과산화물을 만들고, 이들의 연속반응에 의하여 alcohol류, aldehyde류, ketone류 등을 생성함으로써 생체내에서 DNA를 손상시켜 암을 유발할 뿐만 아니라, 세포노화, 세포막 분해, 지방산화 등 심각한 생리적인 장애를 일으킨다. 따라서 본 실험에서는 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)을 당분해 효

소 5종 (Viscozyme L, Celluclast 1.5L, AMG 300L, Termamyl 120L, Ultraflo L), 단백질 분해효소 5종 (Protamex, Kojizyme 500MG, Neutrase 0.8L, Flavourzyme 500MG, Alcalase 2.4L)을 이용하여 최적가수분해 조건에서 분해한 분해물의 라디칼 소거활성 결과를 Table 5에 나타내었다.

당분해효소나 단백질분해효소 모두다 DPPH 소거활성은 88% 이상을 나타내었고, Neutrase와 Celluclast 효소추출물은 거의 93%의 소거활성을 보였다. H₂O₂ 소거활성에서도 Neutrase와 Celluclast 효소추출물은 다른 효소추출물보다 다소 높은 58%의 소거활성을 나타내었다.

팥(*Hizikia fusiformis*)을 원료로 하여 NOVO. Ltd., 각각 5가지 당분해효소와 단백질분해효소의 최적가수분해 조건에서 얻은 효소분해물의 DPPH 소거활성은 모든 효소분해물에서 70% 이상을 나타내었다. 또한 당분해효소 AMG, Termamyl, Ultraflo와 단백질분해효소 Flavourzyme와 Alcalase 분해물이 상대적으로 더 강한 H₂O₂ 소거활성을 보였으며, 복합효소(Alcalase 2.5% + Ultraflo 2.5%) 분해물의 DPPH 소거활성은 84.5%, H₂O₂ 소거활성은 71%로 단일효소보다는 높은 소거활성을 나타내었다(Siriwardhana et al., 2004).

*Ecklonia cava*의 효소추출물은 상업용 항산화제인 α -tocopherol, BHA보다는 낮고 BHT보다는 높은 70% 정도의 자유라디칼 소거활성을 나타내었고, 나머지 효소추출물들은 낮은 자유라디칼 소거활성을 나타내었다. H₂O₂ 소거활성에서도 여러 효소추출물들이 거의 90%의 소거활성을 나타내었는데 특히 *Ishige okamurae* Kojizyme 추출물은 가장 높은 96%의 소거활성을 나타내었다. *Sargassum horneri*의 Ultraflo와 Alcalase 추출물들은 비교적 높은 90%의 소거활성을 나타내었고, 이러한 소거활성은 상업용 항산화제인 α -tocopherol, BHA 및 BHT의 각각 64.11%, 67.37% 및 50.32% 보다도 높다고 보고하였다(Heo et al., 2005).

갈조류 잘록이 고리매(*Scytosiphon lomentaria*) 효소추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 농도의존적이었으며, AMG, Celluclast, Termamyl, Ultraflo 및 Viscozyme 추출물은 DPPH 소거활성은 0.125 mg/ml의 농도에서 각각 88.21%, 90.85%, 88.00%, 87.52% 및 95.54%를 나타냈고, Alcalase, Flavourzyme, Kojizyme, Neutrase 및 Protamex 추출물의 DPPH 소거활성은 같은 농도에서 각

각 88.84%, 87.12%, 82.45%, 74.03% 및 78.06%의 활성을 나타내었다고 보고하였다(Ahn et al., 2004).

툃(*Hizikia fusiformis*)의 효소추출물(OE)과 그 친수성 phlorotannis 추출물(CHPE)의 DPPH 소거활성은 농도의존적으로 증가하였으며, CHPE에서의 농도별 DPPH(6×10^{-5} M) 소거활성은 0.25 mg/ml(37.3%), 0.5 mg/ml(78.2%) 및 1mg/ml(91.6%)으로 OE의 같은 농도에서 각각 11.4%, 34.6% 및 61.7%보다 더 높은 DPPH 소거활성을 나타내었다고 보고하였다(Siriwardhana et al., 2005).

이 두 효소추출물을 다시 분자량별로 분획하여 그 분획물의 라디칼 소거활성을 Table 7.에 나타내었다. 표에서 보는 것처럼 거의 대부분의 분획물에서 소거활성을 나타내었는데, DPPH 소거활성에서도 >30 kDa의 분획물은 88.23%로 현재 상용되고 있는 항산화제 BHA, BHT 및 α -tocopherol의 각각 85.46%, 78.05% 및 87.54%보다 약간 높은 DPPH 소거활성을 보였다. H₂O₂ 소거활성에서는 Neutralse와 Celluclast 효소추출물의 5~10 kDa 분획물의 소거활성이 다른 분획물보다 높게 나타내었다.

큰잎모자반 Celluclast와 Neutralse 추출물의 분자량별 분획물의 농도별 H₂O₂와 DPPH 소거활성을 측정한 결과를 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다.

Fig. 3에서 H₂O₂의 소거활성이 두효소 추출물 모두에서 분자량 5~10 kDa에서 다른 분자량 분획물보다 높게 나타났으며, 500 μ g/ml의 분획물 농도에서는 약 70% 정도의 소거활성을 나타내었다. *Sargassum horneri*의 Ultraflo와 Alcalase 효소추출물의 농도별 H₂O₂의 소거활성은 8 mg/ml의 농도에서 약 90%의 소거활성을 보였다고 보고하였다(Heo et al., 2005).

Fig. 4에서는 두효소 추출물에서 >30kDa의 분획물에서 DPPH radical 소거활성이 각각 80% 이상 나타내었다.

갈조류 *E. cava*의 항산화활성은 카로테노이드 색소(fucoxanthin), 폴리페놀(phlorotannins), 비타민(vitamin C 와 E), 황산화 다당류 그들의 분해물(laminarin과 fucoidan) 그리고 단백질 또는 그들 분해물에 기인할 수 있다(Nardella et al., 1996; Yan et al., 1999; Burtin, 2003).

툃(*Hizikia fusiformis*)의 복합효소(Alcalase 2.5% + Ultraflo 2.5%) 분해물의 총페놀함량은 >30 kDa, 1~10 kDa, 10~30 kDa, <1 kDa 순으로 낮았으며, DPPH의 소

거활성은 <1 kDa이 다른 3가지 분획물보다 상대적으로 더 낮았고, 1~10 kDa 분획물이 가장 높은 DPPH 소거활성을 나타내었지만 다른 두가지 분획물과 크게 차이나지는 않았다. H₂O₂ 소거활성도 DPPH와 유사한 결과를 얻었다고 보고하였다 (Siriwardhana et al., 2004).

지충이(*Sargassum thunbergii*)의 당분해효소 AMG, Celluclast, Termamyl, Ultraflo 및 Viscozyme의 효소분해물의 25 µg/ml 농도에서 DPPH 소거활성은 각각 93.8%, 83.9%, 62.9%, 95.6% 및 61.1% 나타났으며 농도의존적이었다. 같은 농도에서 단백질 분해효소 Alcalase, Flavorzyme, Kojizyme, Neutrase 및 Protamex의 효소분해물의 DPPH 소거활성은 각각 95.9%, 75.1%, 80.4%, 71.8% 및 59.4%을 나타내었다. 모든 효소추출물에서 DPPH 활성을 가지고 있었으며, AMG와 Alcalase 추출물의 활성이 가장 높았으며 각각의 IC₅₀값은 1.56 µg/ml와 1.35 µg/ml을 나타내었다.

H₂O₂ 소거활성에서는 단백질 분해효소 추출물들은 80% 이상이었고, 특히 당분해효소인 Ultraflo 추출물은 90% 이상의 H₂O₂ 소거활성을 나타내었다. Alcalase와 Ultraflo 효소추출물의 농도별 H₂O₂ 소거활성에서는 Alcalase 효소추출물이 1 mg/ml 이하의 농도에서는 Ultraflo 추출물과 비교해서 더 높은 H₂O₂ 소거활성을 보였으나 2 mg/ml 이상에서는 유사한 활성을 나타내었다고 보고하였다(Park et al., 2005).

Table 5. Scavenging activities of reactive oxygen species and total polyphenolic contents of the various enzymatic extract of *Sargassum coreanum*

	DPPH scavenging activity (%)	Ferrous ion chelating activity (%)	H ₂ O ₂ scavenging activity (%)	Total polyphenolic content (mg/ml)
Kojizyme	92.50	31.18	54.83	0.1164
Ultraflo	88.50	57.58	42.94	0.0991
Protamax	92.41	26.79	55.18	0.1206
Neutrase	92.78	59.51	57.97	0.1242
Termamyl	89.71	28.33	44.90	0.0946
Viscozyme	92.03	35.18	57.37	0.1085
Celluclast	92.42	48.88	58.28	0.1151
Alcalase	91.35	29.10	56.44	0.1120
Flavozyme	92.33	34.33	55.17	0.1137
AMG	90.11	50.19	39.38	0.0916

* Test sample content : 2 mg/ml

Table 6. Yield(%) of the different molecular weight fractions of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract.

	Mol. Fr.	Vol. (ml)	Dry weight (mg/ml)	Total content (g)	Yield (%)
Neutrased	Crude liquid	200	6.65	1.33	6.65
	>30 kDa	315	10.7	3.37	16.86
	10~30 kDa	180	2	0.36	1.8
	5~10 kDa	310	2	0.62	3.1
	<5 kDa	290	13.45	3.90	19.51
					47.92
Celluclast	Crude liquid	200	6.4	1.28	6.4
	>30 kDa	545	10.95	5.97	29.84
	10~30 kDa	345	4.9	1.69	8.46
	5~10 kDa	115	4.85	0.56	2.79
	<5 kDa	106	27.25	2.89	14.45
					61.95

* Sample weight : 20g

Table 7. Scavenging activities of reactive oxygen species and total phenolic contents of the different molecular weight fractions of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract.

Treated enzyme	Mol. Fr.	DPPH scavenging activity (%)	Ferrous ion chelating activity (%)	H ₂ O ₂ scavenging activity (%)	Total polyphenolic content (mg/ml)
Neutrased	Crude liquid	89.15	44.59	46.92	0.0869
	>30 kDa	88.23	86.47	48.60	0.1362
	10~30 kDa	66.30	67.70	46.99	0.1538
	5~10 kDa	64.02	-35.27	52.94	0.1558
	<5 kDa	63.80	18.65	14.47	0.0420
Celluclast	Crude liquid	84.55	37.43	48.23	0.0945
	>30 kDa	91.02	52.43	40.85	0.1180
	10~30 kDa	73.81	24.20	43.31	0.0982
	5~10 kDa	75.77	74.46	53.08	0.1111
	<5 kDa	72.56	18.51	10.20	0.0338
Commercial antioxidant	BHA	85.46			
	BHT	78.05			
	α-tocopherol	87.54			

* Test sample content : 2 mg/ml

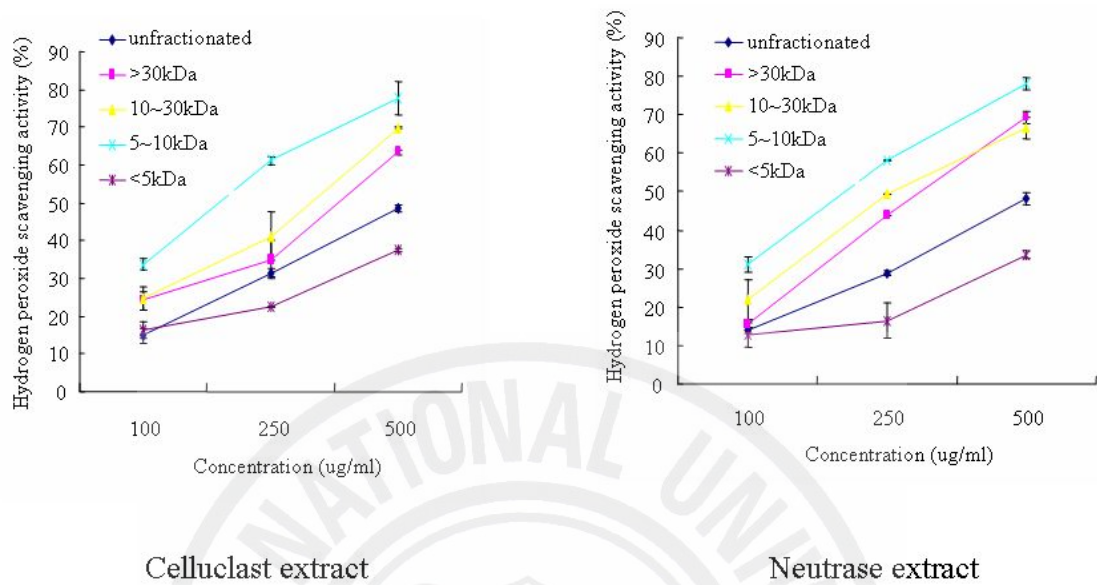


Fig. 3. Hydrogen peroxide scavenging activity(%) with different concentration of the different molecular weight fractions of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract.

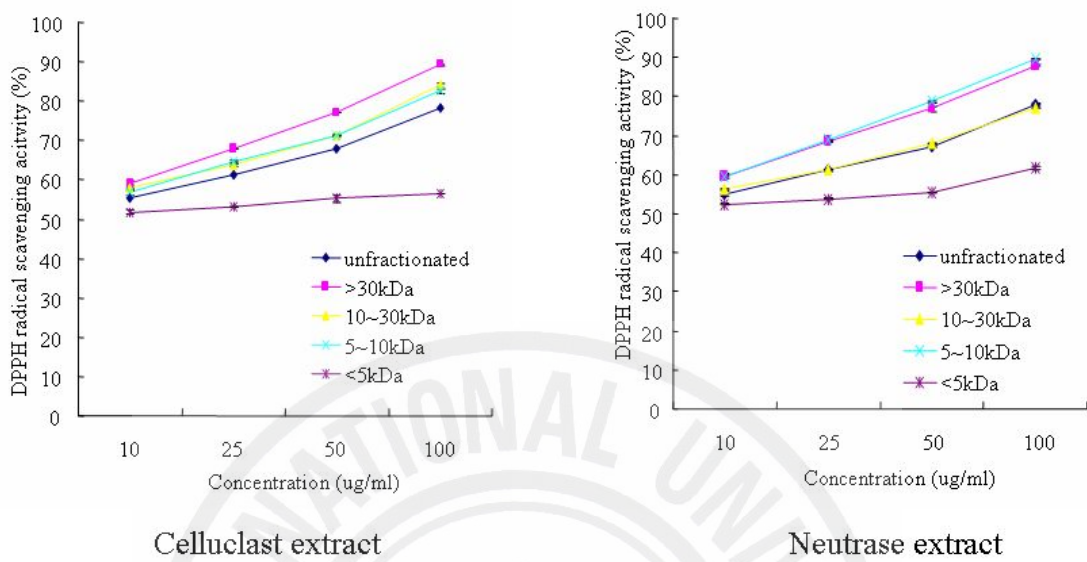


Fig. 4. DPPH radical scavenging activity(%) with different concentration of the different molecular weight fractions of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract.

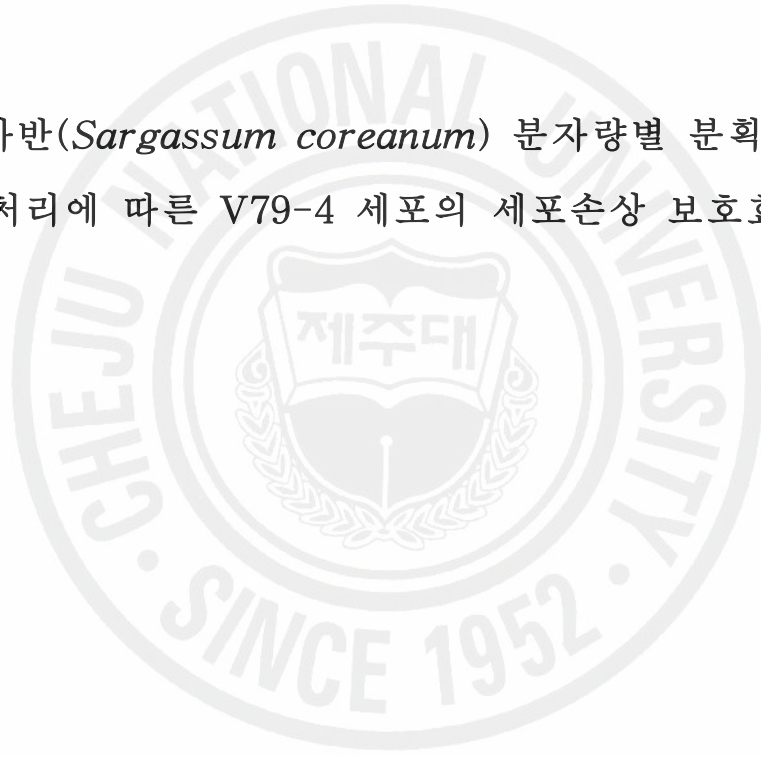
4. 결론

큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 유기용매 추출물의 DPPH 소거활성은 Chloroform과 Ethylacetate 희분에서 81% 정도의 활성을 나타냈고, 수용액 희분에서 가장 낮은 2.55%의 활성을 나타냈다. Ferrous ion 활성은 n-Haxane에서 68.61%로 가장 높았으며 Chloroform 추출물은 12.41%로 가장 낮게 나타났다. H₂O₂ 소거활성은 대부분이 80% 이상의 활성을 보였다. 총 폴리페놀함량은 Ethylacetate와 Ethanol에서 각각 0.1764 mg/ml와 0.1729 mg/ml로 n-Hexane의 0.0294 mg/ml 보다는 높게 나타났다.

당분해효소나 단백질분해효소 모두다 DPPH 소거활성은 88% 이상을 나타내었고, Neutralse 효소추출물은 거의 93%의 소거활성을 보였다. H₂O₂ 소거활성에서도 Neutralse와 Celluclast 효소추출물의 다른 효소추출물보다 다소 높은 소거활성을 나타내었다. DPPH free radical에서도 >30 kDa의 분획물에서는 현재 상용되어지고 있는 항산화제 BHA, BHT 및 α-tocopherol 보다도 약간 높은 유해산소 소거율을 보였다. H₂O₂ 소거활성에서는 Neutralse와 Celluclast 효소추출물의 5~10 kDa 분획물이 다른 분획물보다 높은 소거활성을 나타내었다. 이들 두 효소의 분자량별 분획물의 농도별 H₂O₂ 소거활성이 두효소 추출물 모두에서 분자량 5~10 kDa에서 다른 분획물보다 높게 나타났으며, DPPH radical 소거활성도 각각 80% 이상 나타내었다.

Part II

큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 분자량별 분획물의 H₂O₂
처리에 따른 V79-4 세포의 세포손상 보호효과



Part II

큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 분자량별 분획물의 H₂O₂ 처리에 따른 V79-4 세포의 세포손상 보호효과

1. 요약

세포상에서 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 5~10 kDa 분획물의 H₂O₂ 소거활성은 100 µg/ml 농도에서 두 추출물 모두 약 70% 정도의 활성을 나타내었다.

Celluclast와 Neutrased 추출물의 H₂O₂에 의한 V79-4 세포의 세포사멸 억제효과는 Celluclast와 Neutrased 분획물 모두에서 농도 비례적으로 세포 생존율이 증가하였으며 농도가 100 mg/ml 약 70%의 우수한 세포 보호효과를 가지는 것을 확인하였다.

Alkaline comet assay를 이용하여 H₂O₂ 처리로 손상된 L-5178 세포의 DNA 손상에 대한 Celluclast 추출물 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 세포손상 저해효과는 H₂O₂를 처리하지 않은 대조구의 경우 DNA 손상이 약 7%였던 것이 H₂O₂ 처리로 약 50%로 높은 DNA 손상을 입었으나 효소분획물 100 µg/ml의 농도를 처리함으로써 약 15%정도의 DNA 손상만 보였다. 농도에 따른 세포손상 저해효과는 25 µg/ml의 농도에서는 30% 정도였고, 100 µg/ml의 농도에서는 저해효과가 약 70%까지 보였다. Neutrased 추출물 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리의 결과도 Celluclast 추출물과 유사한 결과를 나타내었으며 Neutrased 추출물보다는 Celluclast 추출물이 DNA 손상을 더 억제하는 것으로 판단된다.

V79-4 세포를 H₂O₂ 처리 후 분획물의 농도별 처리에 따른 apoptosis 유도 억제효과는 형광형미경을 통하여 세포의 형태적 변화를 통하여 알아보았는데 H₂O₂만을 처리하였을 때 H₂O₂를 처리하지 않은 대조군에 비해 apoptotic body가 많이 관찰되었다. 반면 Celluclast 5~10 kDa 분획물을 100 µg/ml의 농도에서는 거

의 대조구와 유사한 형태를 유지하였고, Neutrase 추출물 5~10 kDa 분획물의 경우는 Celluclast와 비교하며 다소 떨어지는 apoptosis 유도 억제효과를 보였다.

큰잎모자반 Neutrase 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 V79-4 cell의 항산화효소 SOD와 CAT의 활성은 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리시 SOD 활성이 각각 21%, 38% 및 67%씩 증가하였다. CAT의 경우는 각각 9.6%, 24% 및 45%씩 증가하였다. Celluclast 추출물의 경우 SOD와 CAT의 활성은 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 처리시 SOD 활성이 각각 16%, 36% 및 58%씩 증가하였다. CAT의 경우 각각 15%, 23% 및 41%씩 증가하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 재료

제주지역에서 서식하고 있는 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)을 수거하여 불필요한 이물질을 제거한 후 세척하여 동결건조한다. 이것을 25 mesh 이하가 되도록 분쇄하여 분말화한다. 사용된 효소는 Novo. Co.(Novozyme Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)에서 생산되고 있는 효소들 중 당분해 효소 5종 (Viscozyme L, Celluclast 1.5L, AMG 300L, Termamyl 120L, Ultraflo L), 단백질 분해효소 5종 (Protamex, Kojizyme 500MG, Neutrase 0.8L, Flavourzyme 500MG, Alcalase 2.4L)을 구입하여 사용하였다. 이들 효소들의 최적 pH와 온도는 Table 1.에 나타내었고, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), thiobarbituric acid(TBA), Trichloroacetic acid(TCA), 3-(2-Pyridyl)-5,6-di(p-sulfophenyl)-1,2,4-triazine, disodium salt(ferrozine), butylated hydroxyanisol(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), α -tocopherol과 linoleic acid는 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그 밖의 시약들은 분석용 특급을 사용하였다.

2-2. 큰잎모자반 효소추출물의 분자량별 분획물 제조

분말화된 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 1% 용액 2L를 만들어 기질대비 0.1%의 Celluclast와 Neutrase 효소 2 ml을 첨가하여 각각 효소의 최적온도(50°C, 50°C)와 pH(4.5, 6.0) 조건에 따라 12시간 동안 가수분해 하였다. 가수분해액중 미반응물질을 제거하기 위해 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 Fig. 1에 나타낸 Millipore Labscale TFF system을 이용하여 각각 5 kDa, 10 kDa 및 30 kDa의 멤브레인을 이용해 4가지 분자량별(<5 kDa, 5~10 kDa, 10~30 kDa 및 >30 kDa) 분획물을 제조하였다.

2-3. 세포배양

V79-4 세포는 10%(v/v) heat-inactivated fetal calf serum과 streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 penicillin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

L-5178 세포는 10%(v/v) heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), penicillin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 함유된 RPMI 1640 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

2-4. 세포상에서의 hydrogen peroxide 소거활성

V79-4 cell들을 well당 약 1.5×10^5 세포수가 되도록 96 well에 각각 접종한 후에 16시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 잘 붙도록 한다. 그리고 난 후에 시료 추출물을 여러 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양한다. H₂O₂ (stock 20 mM)를 10 μl 씩 가한 후 (최종 농도 1 mM) 다시 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양한다. 반응기에서 well을 꺼내어 DCFH-DA (stock 500 μM)를 20 μl 씩 가한 후 spectrofluormeter (excitation 485 nm, emission 535 nm)로 측정한다. 시료를 넣지 않고 활성 산소종 형성만을 측정할 것을 대조군으로 정하고, 시료를 넣어 H₂O₂를 소거시키는 시료 처리군과 비교하여 H₂O₂ 저해율을 구한다.

2-5. 형광현미경을 이용한 세포의 형태적 관찰

V79-4 cell을 well당 약 1×10^5 세포수가 되도록 96 well에 각각 접종한다. 그리고 난 후에 시료 추출물을 여러 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 배양한다. 반응기에서 well을 꺼내어 Hoechst 33342 형광 염색약을 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10분간 배양한 후 형광 현미경으로 관찰한다. 세포가 손상을 받은 경우는 핵이 작은 파편 모양으로 염색이 되는 것을 관찰할 수 있다.

2-6. Cell viability 측정

V79-4 세포들을 well당 약 1.5×10^5 세포수가 되도록 96 well에 각각 접종한 후에 16시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 잘 붙도록 한다. 그리고 난 후에 시료 추출물을 여러 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양한다. H₂O₂ (stock 20 mM)를 10 μ l씩 가한 후 (최종 농도 1 mM) 다시 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한다. 반응기에서 well을 꺼내어 MTT 시약 (stock 2 mg/ml)을 50 μ l씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양한다. 상등액을 조심스럽게 버린 후 DMSO를 150 μ l씩 가하여 잘 섞고 540 nm에서 측정하여 세포 생존율을 구한다.

2-7. Nuclear staining with Hoechst 33342

세포의 핵 형태는 cell-permeable DNA dye Hoechst 33342을 사용하여 측정하였다. 염색된 핵들의 형태에서 동질성을 가진 세포는 핵들이 생동적인 반면 염색 질 응축 또는 파편은 apoptosis를 의미하는 것이다(Gschwind and Huber, 1995; Lizard et al., 1995). V79-4 cell들을 well당 약 1.5×10^5 세포수가 되도록 96 well에 각각 접종한 후에 16시간 배양한 후 이 cell에 여러 가지 농도의 분획물을 처리한 다음 1시간 더 배양하고, 최종농도 1mM되게 H₂O₂를 첨가하여 24시간 배양한다. 그 다음 1.5 μ l의 Hoechst 33342(10 mg/ml)와 DNA-specific fluorescent dye를 각 well당 첨가하여 37°C에서 10분간 배양하였다. 핵 응축정도를 관찰하기 위

해 염색된 cell들은 CoolSNAP-Pro color digital camera가 장착된 fluorescence microscope로 관찰하였다.

2-8. Alkaline comet assay를 이용한 DNA 손상 측정

Alkaline comet assay 는 Singh (1988)의 방법을 수정, 보완하여 실시하였다. L-5178 세포를 well당 약 4×10^4 세포수가 되도록 24 well에 각각 접종한다. 그리고 난 후에 시료 추출물을 여러 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2 시간 배양한다. 그 다음 75 μ l의 0.7% low melting agarose gel (LMA)과 섞은 후, 0.5% normal melting agarose (NMA)가 precoating된 fully frosted slide 위로 임파구와 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 약 10분간 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μ l를 slide 위에 떨어뜨린 후 다시 cover glass를 덮어 gel이 굳을 때까지 냉장 보관하였다. Gel이 굳은 것을 확인한 뒤 cover glass를 벗기고 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris)에 사용직전에 1% Triton X-100와 10% DMSO를 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지 시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 실험직전 제조하여 냉장 보관하였던 전기영동 buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH>13)를 채워 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 \pm 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동 tank를 어두운 천으로 덮은 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충 용액 (pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 slide를 건조시켰다. 20 μ g/ml 농도의 ethidium bromide로 핵을 형광 염색하고 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경 (Leica, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD camera (Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 4.0 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 임파구의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리 (tail length,

TL) 또는 tail length에 tail내 함유된 DNA%를 곱해준 tail moment (TM) 값을 측정하여 나타내었다.

2-9. Flow cytometry analysis

Flow cytometry analysis는 apoptotic sub-G₁ hypodiploid cells(Nicoletti et al., 1991)의 비율을 결정하기 위해 수행하였다. V79-4 세포를 well당 약 1.0×10^5 세포수가 되도록 96 well에 각각 접종하여 16시간 동안 배양한 후 효소분해물을 농도별로 첨가한다. 1시간 후 H₂O₂를 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 정해진 시간에 자란 cell들을 70% 에탄올 1ml를 첨가하여 4°C에서 30분간 고정시켰다. 그 다음 phosphate buffered saline(PBS)로 두 번정도 cell을 씻은 후 100 μ g PI와 100 μ g RNase가 포함된 PBS 용액 1ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 암소에 두었다. Flow cytometry analysis는 FACSCalibur flow cytometer(Becton Dickinson, San Jose, USA)를 이용하여 분석하였다.

Cell cycle의 효과는 cell cycle의 각 phase에서 cell 분포%의 변화로 결정하고, computer program Cell Quest와 Mod-Fit(Wang et al., 1999)에 의해 생성된 막대그래프로 평가하였다.

2-10. 항산화효소 분석

V79-4 세포를 well당 약 1.0×10^5 세포수가 되도록 96 well에 각각 접종하여 16시간 동안 배양한 후 효소분해물을 농도별로 첨가한 1시간 배양한다. 배양된 cell을 10 mM phosphate buffer(pH 7.5)에 현탁시켜 얼음물에서 15초 동안 두 번 초음파 조사하여 용해한 후 1% Triton X-100을 첨가하여 얼음물에서 10분간 배양한다. 용해물의 세포찌거기를 제거하기 위해 4°C에서 5,000 \times g로 10분간 원심분리한다. 상층액의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준으로하여 Bradford 방법에 따라 분석하였다.

SOD 활성은 epinephrine auto-oxidation inhibition(Misra and Fridovich, 1972) level을 측정하였다. 단백질 50 μ g에 500mM phosphate buffer(pH 10.2)와 1mM

epinephrine을 첨가한다. epinephrine은 pH 10에서 급격히 adrenochrom으로 자동 산화를 겪는다. pink color 반응물을 UV/VIS spectrophotometer로 480 nm에서 흡광도를 측정한다. SOD는 epinephrine의 자동산화를 저해한다. 1unit의 효소활성은 50% 저해를 보이는 효소량으로 정의한다. SOD 활성은 units/mg protein으로 나타내었다.

Catalase(CAT)의 활성은 단백질 50 μ g에 50 mM phosphate buffer(pH 7)와 100 mM(v/v) H_2O_2 을 첨가하여 37°C에서 2분간 배양한다. 흡광도는 240 nm에서 5분마다 측정한다. 흡광도의 변화는 H_2O_2 파괴에 비례적이다(Carrillo et al., 1991). 1unit의 효소활성은 1 μ M H_2O_2 파괴하는데 요구되는 효소량으로 정의한다. CAT 활성은 units/mg protein으로 나타내었다.

2-11. 통계분석

데이터는 Window상에서 SPSS package를 이용하여 분석하였으며, 수치는 mean \pm standard error(SE)로 표현하였다. 수치는 Duncan's multiple range test에 따라 variance(ANOVA)의 one-way analysis 사용 비교하여 얻어진 tail intensity를 의미한다.

3. 결과

3-1. Cell 상에서의 hydrogen peroxide 소거활성

화학적 분석을 통해 우수한 활성을 나타내었던 큰잎모자반 Celluclast와 Neutralse 추출물의 5~10 kDa 분획물이 세포상에서 어떠한 효과를 나타내는지 알아보기 위해 정상세포인 V79-4 세포를 이용해 DCFH-DA방법으로 항산화 활성을 측정하였다. 이 방법은 세포내에서 H_2O_2 를 측정하기 위한 fluorometric 분석법으로서 비형광물질인 dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCHF-DA)가 세포내에 들어가 esterase 효소에 의해 탈아세틸화되어 dichlorodihydrofluorescein (DCHF)로 변환되고 다시 세포내에서 H_2O_2 와 반응하여 dichlorofluorescein(DCF)

로 산화되면서 발색되는 형광정도를 측정함으로써 H_2O_2 소거활성을 나타내는 방법이다(Crow, 1997; Wang et al., 1999). 측정된 결과는 Fig. 5에 나타내었으며 Neutrase 분획물의 농도가 12.5, 25, 50 $\mu g/ml$ 일 때는 농도의존적인 소거활성을 보였으며, 100 $\mu g/ml$ 일 때는 50 $\mu g/ml$ 일 때와 유사한 약 70% 정도의 소거율을 나타내었고, Celluclast 분획물은 12.5, 25, 50 및 100 $\mu g/ml$ 로 농도가 증가할수록 소거활성은 농도 의존적이었다.

*E. cava*의 효소가수분해물이 높은 H_2O_2 소거활성과 DPPH 라디칼 소거활성을 나타냈다고 보고하였다(Heo et al., 2005).

많은 연구자들이 Reactive oxygen species(ROS) 소거활성과 총페놀화합물과 상관관계에 대해 보고하였으며, 폴리페놀화합물은 식물이나 해조류에 널리 분포되어 있고 높은 항산화활성을 나타낸다고 알려져 왔으며 이러한 활성은 ROS 소거활성의 여러 가지 방법과 지질과산화 저해등을 통해 보고되어 왔다(Yan et al., 1999; Athukorala et al., 2003a, b; Heo et al., 2003a, b; Siriwardhana et al., 2003, 2004).

*E. cava*에서 분리한 phloroglucinol의 세포상 H_2O_2 소거활성은 0.1 $\mu g/ml$ (28%), 1 $\mu g/ml$ (61%) 및 10 $\mu g/ml$ (73%)씩 농도의존적으로 증가하였으며, Eckol의 경우는 30 μM (79%)의 H_2O_2 소거활성을 나타내었고, triphlorethol-A의 경우는 0.3 μM (43%), 3 μM (69%) 및 30 μM (76%) H_2O_2 소거활성이 농도의존적으로 증가하는 것을 보고하였다(Kang et al., 2005; 2006).

3-2. 효소분획물의 H_2O_2 처리 V79-4 cell의 세포사멸 억제효과

H_2O_2 에 의해 손상을 받은 V79-4 cell에 대한 Celluclast와 Neutrase의 효소분해물의 cell viability는 MTT 방법으로 측정하였다. 이 방법은 살아있는 세포의 경우 노란색의 수용성 MTT 시약이 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 자주색으로 환원되는 정도를 흡광도를 측정함으로써 알아보는 방법이다(Garmichael et al., 1987). Celluclast와 Neutrase 분해물의 5~10 kDa 분획물을 대상으로 H_2O_2 처리 하였을 때 V79-4 세포의 세포사멸을 얼마만큼 억제효과를 나타내는지 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서 Celluclast와 Neutrase 분획물 모두에서 농도 비례적으로 세포

생존율이 증가하였으며, Celluclast 분획물인 경우 H₂O₂만 처리하였을 경우 세포 생존율이 45% 정도였으나, 5~10 kDa 분획물의 농도가 100 µg/ml 첨가하였을 때 약 70%의 세포생존율을 나타내었다. 두효소 분획물 간에는 그리 큰 차이를 나타내지 않았으나 우수한 세포 보호효과를 가지는 것을 확인하였다.

E. cava Celluclast 추출물의 >30 kDa 분획물이 H₂O₂에 손상된 V79-4 cell의 생존율을 향상시켰다고 보고하였다(Siriwardhana et al., 2004).

*E. cava*에서 분리한 phloroglucinol의 H₂O₂ 처리한 V79-4 cell에서 세포 생존율은 0.1 µg/ml(5%), 1 µg/ml(16%) 및 10 µg/ml(45%)씩 농도의존적으로 증가하였으며, Eckol의 경우도 농도의존적으로 세포 생존율이 증가하였고, triphlorethol-A의 경우는 0.3 µM(7%), 3 µM(22%) 및 30 µM(42%) 세포 생존율이 농도의존적으로 증가하는 것을 보고하였다(Kang et al., 2005; 2006).

H₂O₂ 처리된 V79-4 cell에서 약용식물 methanol 추출물의 세포 생존율을 측정 한 결과 *Areca catechu* var. *dulcissima*과 *Paeonia suffruticosa* 추출물은 다른 추출물보다 H₂O₂ 처리된 V79-4 cell에서 더 높은 세포 생존율을 보였으며, 100 µg/ml 농도에서 각각 61%와 50%의 세포 생존율을 보였다. *Alpinia officinarum*, *Glycyrrhiza uralensis*와 *Cinnamomum cassia* 추출물의 100 µg/ml 농도에서 각각 48%, 24%와 40%의 세포 생존율 증가를 보였다고 보고하였다(Lee et al., 2003).

3-3. 효소분획물의 H₂O₂ 처리 V79-4 cell의 형태적 변화

5~10 kDa 분획물이 H₂O₂에 의한 apoptosis 유도를 얼마만큼 억제하는지 알아보기 위해 현미경적 관찰을 하였다. 이것은 유해산소종에 의해 세포가 손상을 받은 정도를 Hoechst 33342 형광 염색약으로 핵을 염색하여 핵의 손상정도를 형광 현미경으로 관찰하는 방법으로 세포에 H₂O₂를 첨가시키지 않은 경우, 세포에 H₂O₂로 손상을 가한 경우, 그리고 세포에 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물을 50 µg/ml과 100 µg/ml로 처리하여 준 군으로 나누어 형태적 관찰을 실시하여 Fig. 7에 나타내었다. 사진에서 손상을 받지 않은 control의 경우는 세포의 형태가 뚜렷하고 타원형의 모양을 하고 있지만 H₂O₂를 첨가시킨 경우는 세포의 형태가 많이 깨져서 apoptosis의 특징인 apoptotic body가 많이 보이고 있으며 세포의 형태 또한 뚜렷하지가 않았

다. 하지만 Celluclast 5~10 kDa 분획물을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 사진은 H_2O_2 를 첨가한 것보다는 세포의 형태는 뚜렷하게 확인할 수 있었고, 특히 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 거의 control과 유사한 형태를 취하며 apoptotic body가 현저히 줄어든 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 Celluclast 5~10 kDa 분획물이 H_2O_2 에 의한 apoptosis 유도를 억제할 수 있는 것으로 판단된다.

Neutralse 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 apoptosis 유도 억제 효과를 Fig. 8에 나타내었다. 사진에서도 5~10 kDa 분획물의 농도를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 사진은 H_2O_2 에 의해 손상된 것보다 핵이 큰편으로 H_2O_2 에 의한 apoptosis 유도를 억제할 수 있는 것으로 판단된다.

H_2O_2 에 의해 손상된 V79-4 cell에서 약용식물 *Betula platyphylla* var. *japonica*의 보호효과의 형태적 관찰에서 control의 경우는 cell의 형태가 뚜렷하고 타원형의 모양을 하고 있지만 H_2O_2 를 첨가시킨 경우는 cell의 형태가 많이 깨져서 apoptotic body가 많이 보이고 있으며 cell의 형태 또한 뚜렷하지가 않았다. 하지만 약용식물 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 사진은 H_2O_2 를 첨가한 것보다는 cell의 형태는 뚜렷하게 확인할 수 있었다(Ju et al., 2004).

*E. cava*에서 분리한 phloroglucinol, Eckol 및 triphlorethol-A을 각각 처리한 cell 과 H_2O_2 에 의해 손상된 V79-4 cell의 Hoechst 33342의 형광염색법으로 apoptotic body의 관찰에서도 세포 생존율이 향상된 것을 확인할 수 있었다(Kang et al., 2005; 2006).

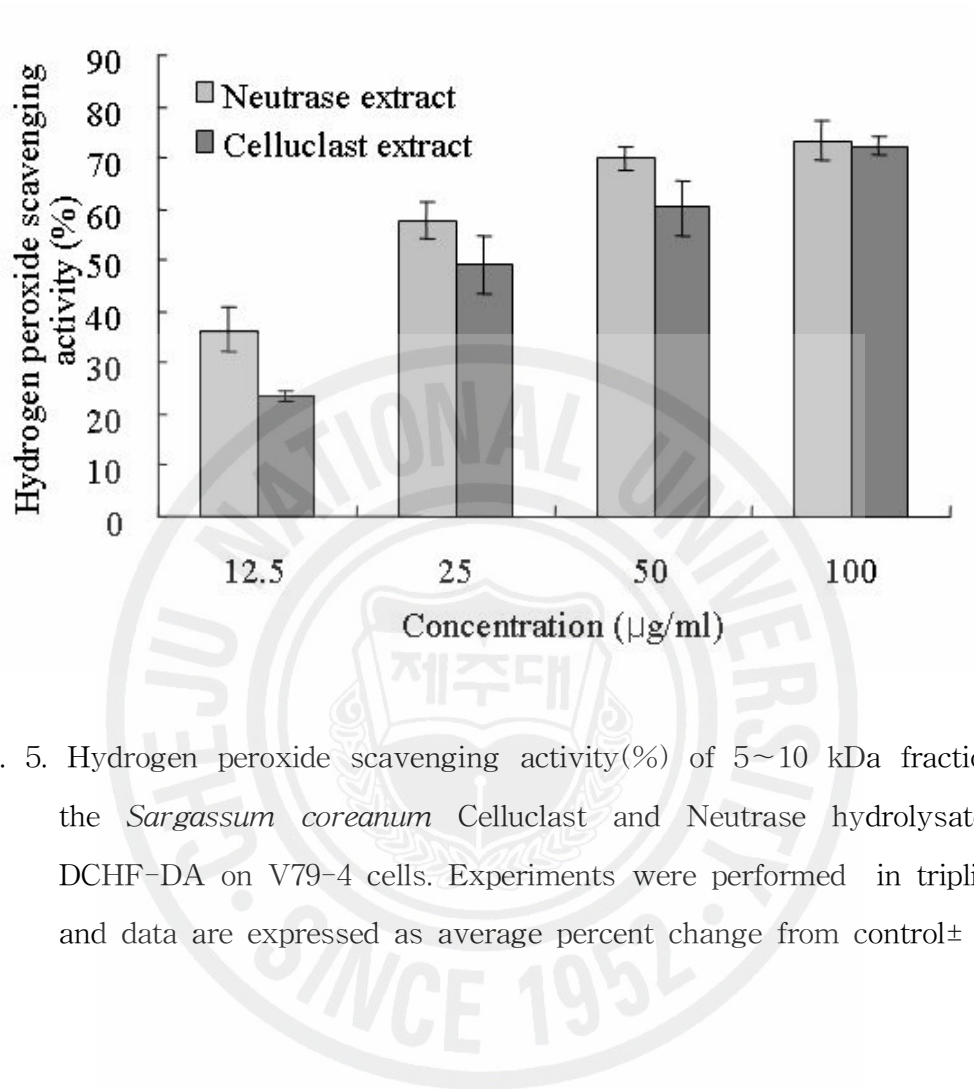


Fig. 5. Hydrogen peroxide scavenging activity(%) of 5~10 kDa fraction of the *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased hydrolysate by DCHF-DA on V79-4 cells. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm S.D.

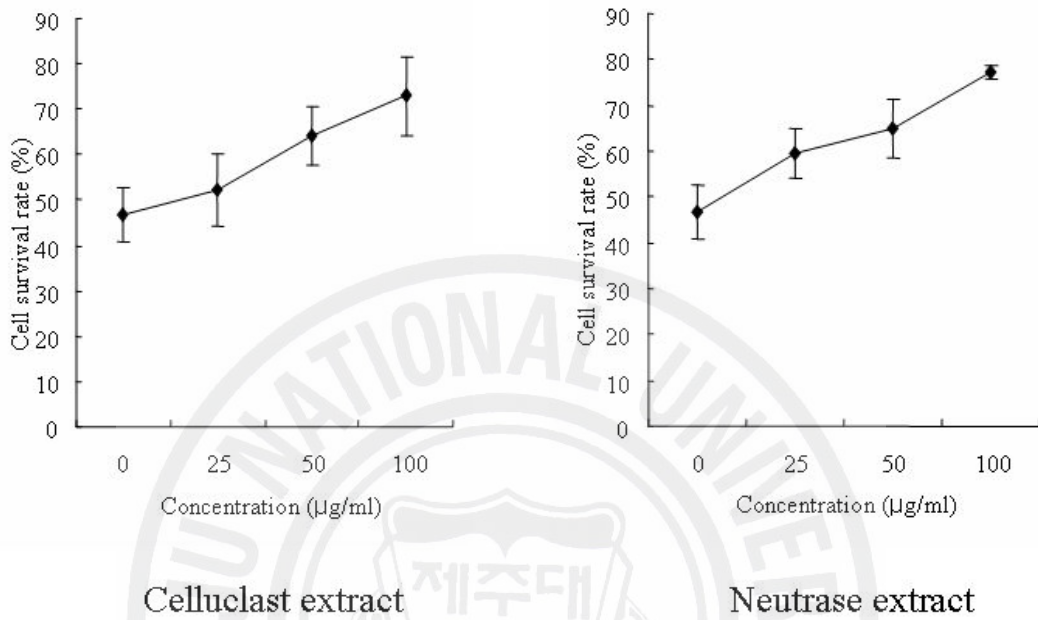


Fig. 6. Protective effect of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells.

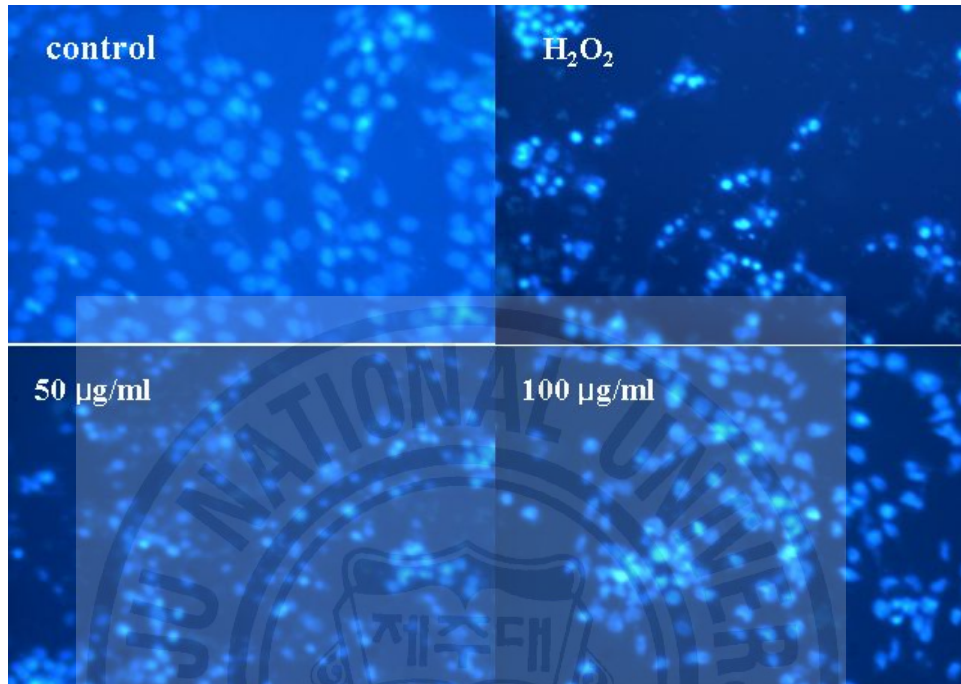


Fig. 7. Protective effect of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Celluclast extract against H_2O_2 -induced oxidative damage in V79-4 cells.

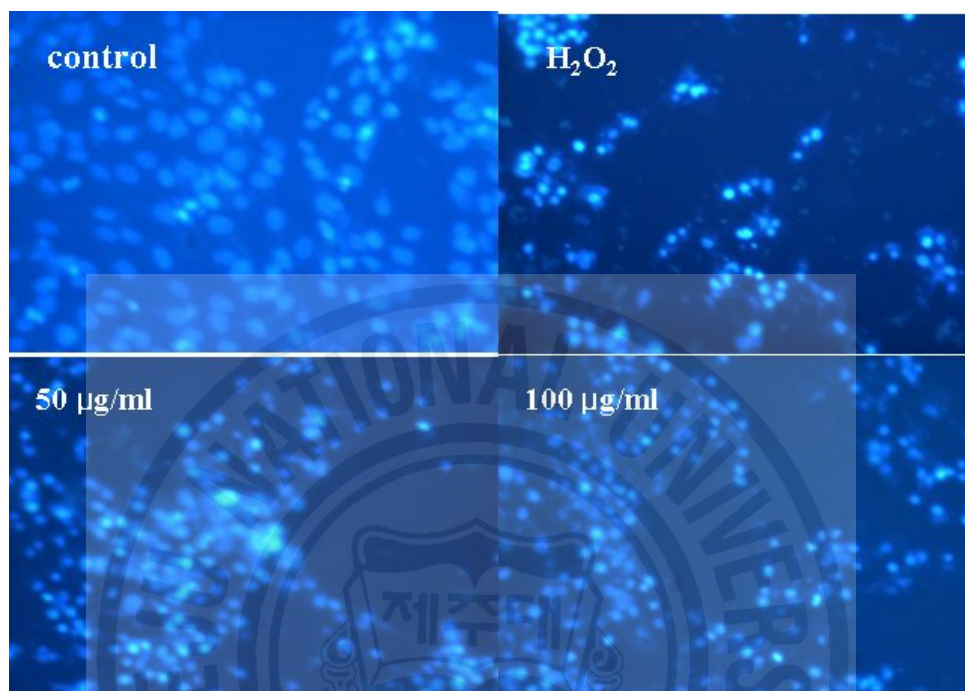


Fig. 8. Protective effect of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Neutrase extract against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells.

3-4. 효소분획물의 H₂O₂ 처리 L-5178 cell의 DNA 손상변화

Alkaline comet assay를 이용하여 H₂O₂ 처리로 손상된 정상세포 L-5178 cell의 DNA 손상에 대한 Celluclast 추출물 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 세포 손상 저해효과를 Fig. 9에 나타내었다. Fig. 9에서 control은 7% 정도의 DNA 손상을 입었고, H₂O₂ 처리시 약 50%의 DNA 손상을 입었으나 Celluclast 추출물 5~10 kDa 분획물의 농도를 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시킴에 따라 손상정도가 감소하였으며 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 약 16% 정도의 DNA 손상 결과를 나타내었다. 농도에 따른 세포손상 저해효과는 Celluclast 추출물 5~10 kDa 분획물 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 30% 정도였고, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 세포손상 저해효과가 약 70%까지 나타났다.

Fig. 10은 L-5178 세포에 H₂O₂ 처리 후 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물의 처리에 따른 DNA 손상 변화를 Comet image로 나타낸 것으로 H₂O₂를 처리하지 않은 control은 DNA가 손상을 입지 않아 동그란 형태를 나타내고 있지만, H₂O₂ 처리한 사진에서는 핵으로부터 손상된 DNA 가닥이 전기영동에 의해 길게 나타나는 형태를 하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 반면 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도를 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시킬 수록 손상된 DNA가 적어져 혜성의 꼬리모양이 점점 짧아지는 것을 사진으로부터 확인할 수 있었는데 이것은 L-5178 cell에 H₂O₂ 처리에 따른 DNA 손상을 Celluclast 추출물 5~10 kDa 분획물이 DNA 손상을 억제할 수 있다는 것을 의미하였다.

Alkaline comet assay를 이용하여 H₂O₂ 처리로 손상된 L-5178 세포의 DNA 손상에 대한 Neutrased 추출물 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 세포손상 저해효과를 Fig. 11에 나타내었다. Fig. 11에서 Celluclast 추출물과 유사한 결과를 나타내었으며 Fig. 12에서 L-5178 세포에 H₂O₂ 처리 후 Neutrased 추출물 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 DNA 손상 변화를 Comet image로 나타낸 것으로 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도를 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 증가시킬 수록 손상된 DNA가 적어져 혜성의 꼬리모양이 점점 짧아지는 것을 사진으로부터 확인할 수 있었는데 이것은 L-5178 cell에 H₂O₂ 처리에 따른 DNA 손상을 Neutrased 추출물 5~10 kDa 분획물이 DNA 손상을 억제할 수 있다는 것을 의미하

였다.

*E. cava*로부터 정제한 phlorotannins인 eckol의 H₂O₂에 의해 손상된 L5178Y-R 세포의 DNA 손상 저해효과와 comet image의 결과에서 eckol의 농도 5 µg/ml (34.61%), 10 µg/ml(42.76%), 15 µg/ml(53.00%), 20 µg/ml(56.28%) 및 25 µg/ml (68.96%)씩 증가할 수록 DNA 손상 저해효과가 증가하였으며, comet image에서도 H₂O₂ 처리군에서는 완전히 DNA가 손상을 받아 DNA의 꼬리 함량이 대조군에 비해 굉장히 증가하였으나 eckol을 cell에 처리하였을때 농도의존적으로 DNA 꼬리 함량이 점차적으로 감소하였다고 보고하였다(Ahn et al., 2006).

H₂O₂에 의해 손상된 인간 lymphocyte DNA 손상에 대해 *Sargassum horneri*의 Ultraflo와 Alcalase 효소추출물의 농도별 세포손상 억제효과에서는 H₂O₂만 처리시 40%의 DNA 손상을 받았으나 1 µg/ml의 효소추출물 첨가에서도 DNA 손상이 감소하였으며, 25 µg/ml와 50 µg/ml의 분해물을 첨가할 경우 약 20% 정도의 DNA 손상을 받았으며, 따라서 25 µg/ml와 50 µg/ml의 분해물을 첨가할 경우 세포손상 억제효과가 50% 이상 나타내었으며, Comet image에서도 H₂O₂만 처리할 경우 DNA가 완전히 손상되었으나, H₂O₂와 같이 50 µg/ml의 분해물 첨가에서는 control과 비교하여도 DNA 손상에 대해서 강한 세포손상 억제효과를 나타내었다고 보고한 바 있다(Heo et al., 2005).

H₂O₂에 의해 손상된 인간 lymphocyte DNA 손상에 대해 *Sargassum thunbergii*의 Ultraflo와 Alcalase 효소추출물의 농도별 세포손상 억제효과에서는 농도의존적으로 세포손상 억제효과를 나타내었으며, Ultraflo 추출물의 50 µg/ml의 농도에서는 약 79%의 세포손상 억제효과를 보였다(Park et al., 2005).

DNA 손상은 자유라디칼 세대와 항산화제 시스템의 효율사이의 불균형을 나타내는 산화적 스트레스를 평가하는 가장 민감한 생물지표중 하나로 알려져 있다(Gutteridge, 1995; Kassie et al., 2000). 개개의 세포 단계에서 일차적 DNA 손상의 감지를 위해 빠르고 민감한 형광현미경 방법인 Comet 분석(단일세포 겔 전기영동)은 시험물질의 유전독성을 평가 위해 광범위하게 이용되고 있다(Olive et al., 1990; Fairbairn et al., 1995).

많은 연구자들은 차(Zhang et al., 2002), 주스(Park et al., 2003), 식물추출물(Yen et al., 2001; Zhu and Loft, 2001) 및 flavonoid(Senthilmonhan et al., 2003)와 같은

식품원료에 의한 DNA 손상 저해에 관해 연구하였다.



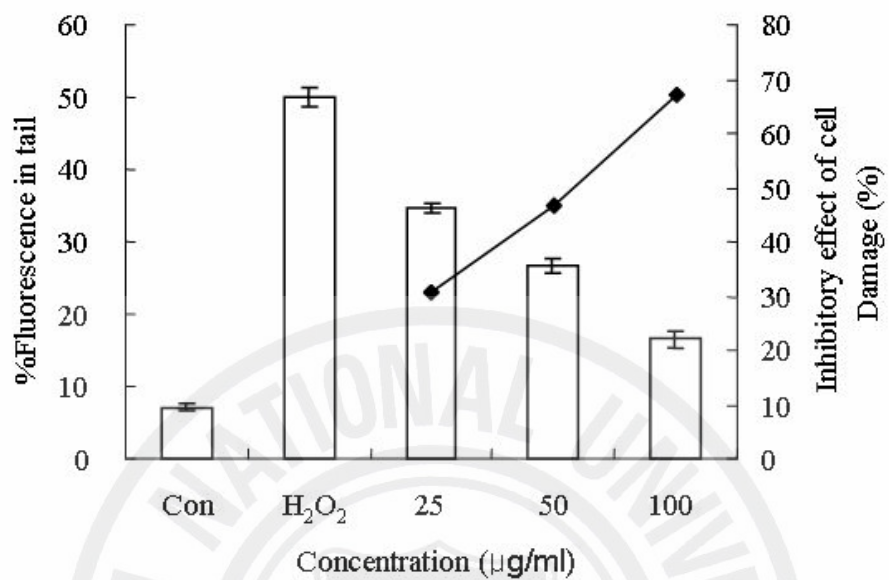


Fig. 9. The effect of supplementation in vitro with different concentration of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Celluclast extract on DNA damage of H₂O₂-induced in L-5178 cell. Values are means with standard errors of duplicate experiments.(□; % Fluorescence in tail, -◆-; Inhibitory effect of cell damage)

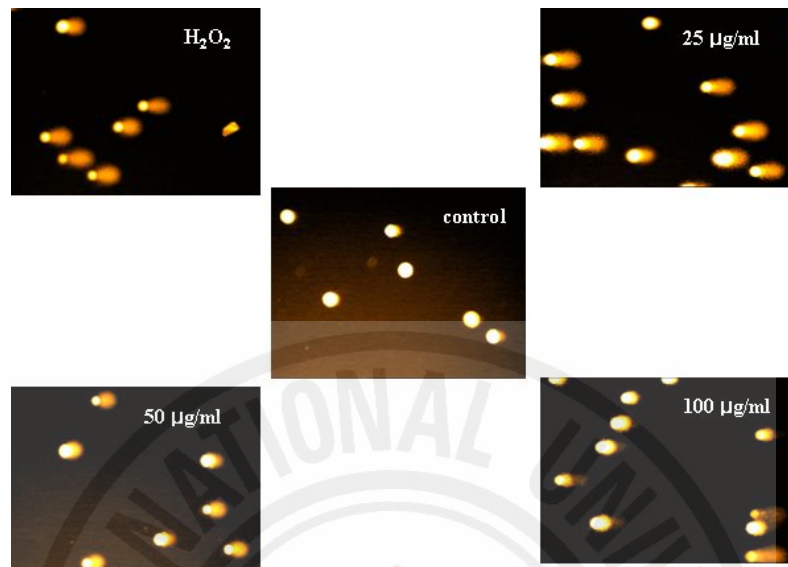


Fig. 10. Comet images of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Celluclast extract against H₂O₂-induced oxidative damage in L-5178 cells.

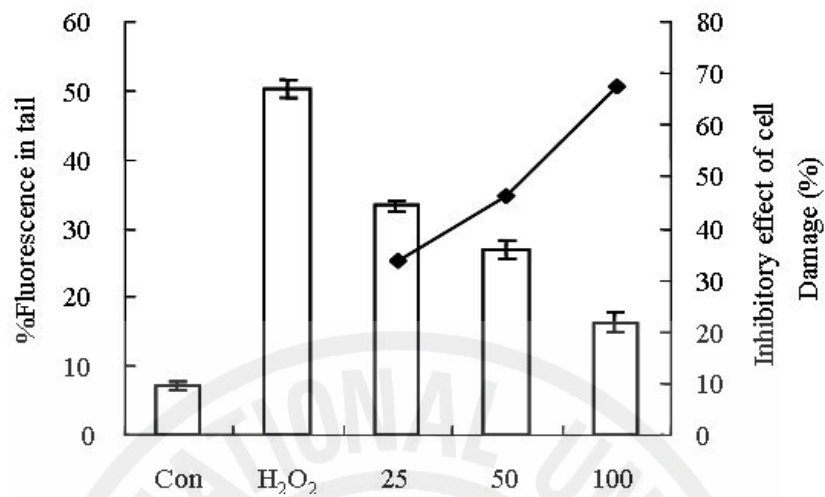


Fig. 11. The effect of supplementation in vitro with different concentration of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Neutrased extract on DNA damage of H₂O₂-induced in L-5178 cell. Values are means with standard errors of duplicate experiments. (□; % Fluorescence in tail, —◆—; Inhibitory effect of cell damage)

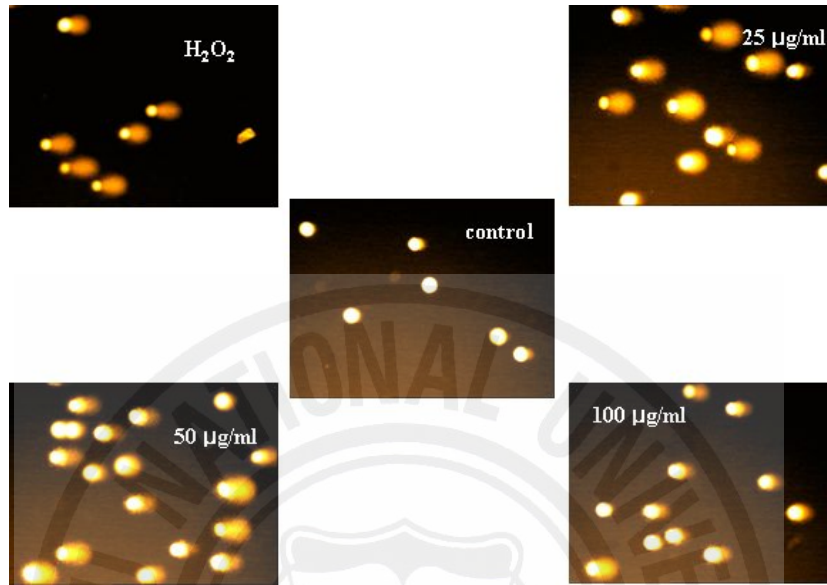


Fig. 12. Comet images of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Neutrased extract against H₂O₂-induced oxidative damage in L-5178 cells.

3-5. 효소분획물의 H₂O₂ 처리 V79-4 cell의 cell cycle 변화

Celluclast의 5~10 kDa 분획물이 갖는 H₂O₂ 처리에 의한 V79-4 세포의 apoptosis 유도를 얼마만큼 억제하는지 알아보기 위해 flow cytometry를 이용하여 다시 한번 확인하였다. 세포 수준에서 apoptosis를 가장 정확하게 정량할 수 있는 방법은 세포 DNA를 형광물질로 염색한 후 flow cytometry로 분석하는 것이다. 이것은 세포 또는 염색체 등의 세포성분을 부유 상태로 유체계 속을 고속으로 통과시키고 여기에 레이저를 부딪쳐 발생하는 빛의 산란과 형광물질의 발광현상을 이용하여 세포에 관한 여러 가지 정보를 측정하는 것으로 큰잎모자반 Celluclast의 5~10 kDa 분획물에 의해 세포들이 과산화수소의 손상에 대항해 얼마만큼 효과적으로 보호하는지 확인하였다.

Fig. 13은 H₂O₂에 의해 손상된 V79-4 cell에서 Celluclast의 5~10 kDa 분획물의 apoptosis 유도억제 효과를 flow cytometry를 이용해 측정한 결과를 나타낸 것으로 그림의 peak는 cell cycle 변화를 의미하는 것이다. Cell cycle는 한 세포가 성장하여 분열되는 과정으로 S기(DNA 합성기)를 시작으로 하여 G₂기(합성 후기), M기(유사 분열과 세포질 분리), G₁기(합성 전기)를 거친 후 다시 S기로 이어지는 4단계로 나누어 지는데 세포에 apoptosis가 유발되게 되면 DNA의 복제가 멈추고 cell의 고사가 일어나 flow cytometry로 측정하였을 때 sub-G₁부분에 보이는 것처럼 고사된 부분이 증가한 것을 확인할 수 있다. 그림에서 처럼 control의 sub-G₁의 1.52%인 반면 H₂O₂에 의해 유도된 V79-4 세포의 apoptosis를 나타내는 sub-G₁은 18.5%였으나 100 µg/ml Celluclast의 5~10 kDa 분획물 첨가시 apoptosis sub-G₁은 1.8%로 거의 control과 유사한 apoptosis를 보였는데, 이것은 Celluclast의 5~10 kDa 분획물의 첨가가 H₂O₂에 의해 손상된 V79-4의 apoptosis 유도를 효과적으로 억제되었다는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 14는 H₂O₂에 의해 손상된 V79-4 세포에서 Neutrased의 5~10 kDa 분획물의 apoptosis 유도억제 효과를 나타낸 것으로 H₂O₂에 의해 손상된 V79-4 세포에 대한 cell cycle 변화를 측정한 결과로써 control의 sub-G₁가 1.52%인 반면 H₂O₂를 처리함으로써 유도된 V79-4 세포의 sub-G₁은 18.5%로 증가하였다. 100 µg/ml Neutrased의 5~10 kDa 분획물 첨가시 apoptosis sub-G₁은 2.68%로 낮아진 것으로

보아 Neutrased의 5~10 kDa 분획물의 첨가가 H₂O₂에 의해 손상된 V79-4 세포의 apoptosis 유도를 억제하는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

현재까지 해조류로부터 항산화 효과를 보고한 연구들은 많았지만 이전까지의 연구들은 fucoxanthin, phlorotannin 등과 같은 pigment나 polyphenol 계열의 저분자 물질들을 대상으로 연구가 주를 이루었다. 이 실험에서는 큰잎모자반 5~10 kDa 분획물이 세포손상 억제효과를 나타내었다.

*E. cava*에서 분리한 triphlorethol-A의 apoptosis에 대해 보호효과를 확인하기 위해 Flow cytometry 방법으로 확인한 결과 H₂O₂ 처리한 V79-4 cell에서 apoptotic sub-G₁ DNA 함량이 65%이고, 처리하지 않은 대조구는 apoptotic sub-G₁ DNA 함량은 2%에 비해 apoptosis가 많이 일어난 것을 알수 있었는데, 30 μM triphlorethol-A 처리하였을 때 apoptotic sub-G₁ DNA 함량이 52%로 감소하였고, 10 μg/ml의 phloroglucinol을 처리하였을 때 apoptotic sub-G₁ DNA 함량이 44%로 감소하였으며, 30 μM의 eckol를 처리하였을 때는 apoptotic sub-G₁ DNA 함량이 34%를 나타내었는데 이것은 이들 물질들이 H₂O₂로 야기된 apoptosis를 저해함으로써 세포 생존을 향상시킨 것을 의미한다는 것을 나타낸다(Kang et al., 2005; 2006).

H₂O₂에 의해 야기된 V79-4 cell의 apoptosis에서 9가지 약용식물 추출물의 보호 효과를 분석한 결과 H₂O₂ 처리한 cell의 apoptotic sub-G₁ DNA 함량은 28.5%를 나타냈지만 특히, *Paeonia suffruticosa*와 *Areca catechu* var. *dulcissima* 추출물의 100 μg/ml의 농도에서는 apoptotic sub-G₁ DNA 함량이 각각 0.5%와 2.9%로 90% 이상 apoptosis를 감소시켰다고 보고하였다(Lee et al., 2003).

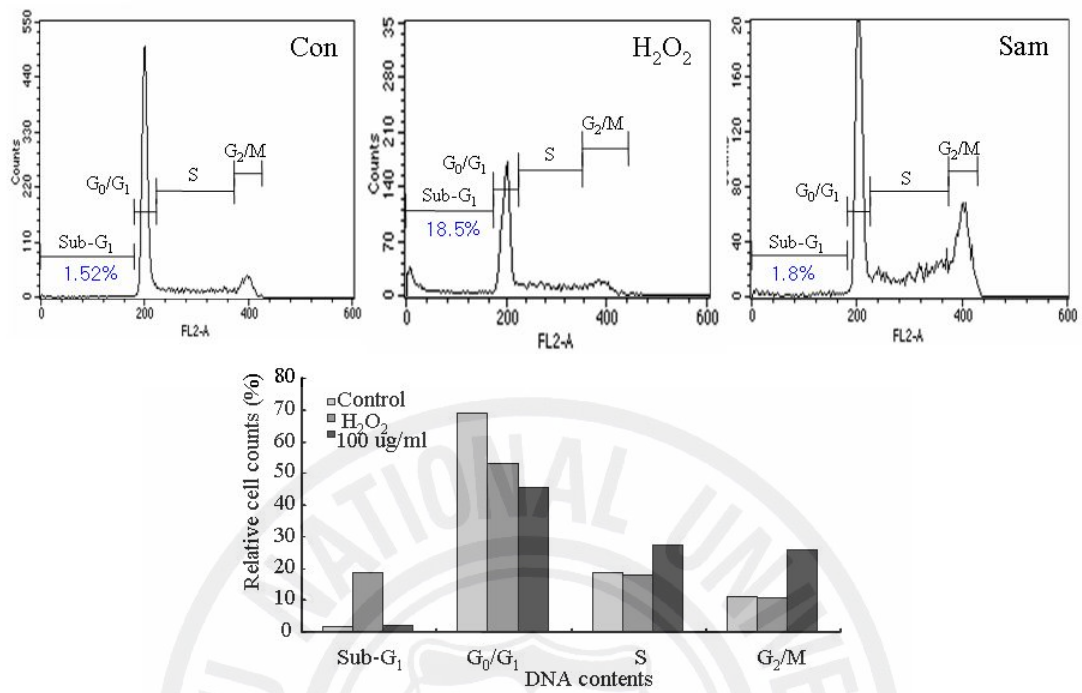


Fig. 13. Effect of 5–10 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells by flow cytometric analysis.

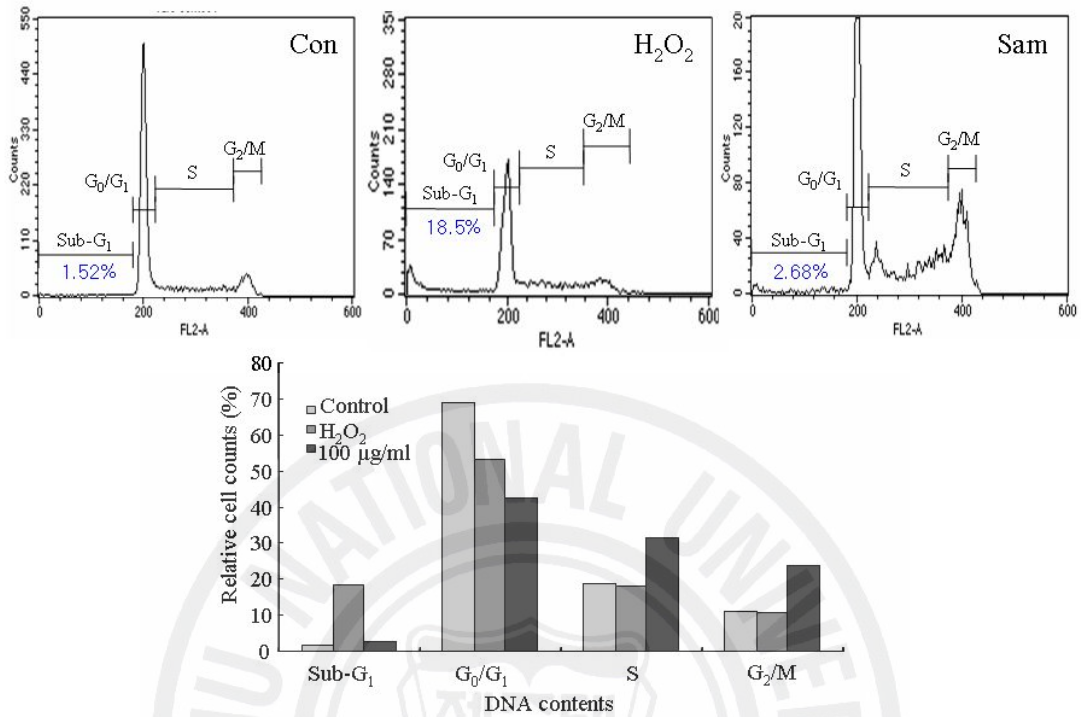


Fig. 14. Effect of 5–10 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion against H₂O₂-induced oxidative damage in V79-4 cells by flow cytometric analysis.

3-6. 효소분획물 첨가시 V79-4 cell의 항산화효소 변화

큰잎모자반 Neutrased 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 V79-4 세포의 항산화효소 변화를 Fig. 15에 나타내었다. SOD와 CAT의 활성을 측정한 결과 Fig. 15(A)에서 control의 SOD 활성은 14.25 ± 0.98 U/mg protein 이었으나 Neutrased 추출물의 5~10 kDa 분획물을 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하였을 때 SOD 활성이 각각 17.27 ± 1.42 U/mg protein(21%), 19.65 ± 2.17 U/mg protein(38%) 및 23.86 ± 1.99 U/mg protein(67%)씩 증가하였다. Fig. 15(B)에서 CAT의 control의 활성은 17.65 ± 1.15 U/mg protein 이었으나 Neutrased 추출물의 5~10 kDa 분획물을 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하였을 때 CAT의 활성이 각각 19.34 ± 1.66 U/mg protein(9.6%), 21.87 ± 1.31 U/mg protein(24%) 및 25.62 ± 1.72 U/mg protein(45%)씩 증가하였다. 이러한 결과로부터 V79-4 cell에 Neutrased 추출물의 5~10 kDa 분획물을 첨가하면 농도 의존적으로 SOD와 CAT의 생산을 유도하는 것을 알 수 있었다.

Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 V79-4 세포의 항산화효소 변화를 Fig. 16에 나타내었다. SOD와 CAT의 활성을 측정한 결과 Fig. 16(A)에서 control의 SOD 활성은 14.25 ± 0.98 U/mg protein 이었으나 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물을 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하였을 때 SOD 활성이 각각 16.55 ± 1.53 U/mg protein(16%), 19.43 ± 1.87 U/mg protein(36%) 및 22.54 ± 1.43 U/mg protein(58%)씩 증가하였다. Fig. 16(B)에서 CAT의 control의 활성은 17.65 ± 1.15 U/mg protein 이었으나 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물을 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하였을 때 CAT의 활성이 각각 20.28 ± 2.18 U/mg protein(15%), 21.65 ± 1.34 U/mg protein(23%) 및 24.92 ± 1.56 U/mg protein(41%)씩 증가하였다. 이러한 결과로부터 V79-4 cell에 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물을 첨가하면 농도의 의존적으로 SOD와 CAT의 생산을 유도하는 것을 알 수 있었다.

이와 같이 Celluclast와 Neutrased 추출물의 5~10 kDa 분획물이 V79-4 세포의 항산화 효소를 증가시키는 것으로 볼 때 두 추출물의 분획물들이 V79-4 세포의 항산화 효소를 증가시킴으로써 H_2O_2 에 의한 손상으로부터 세포를 보호하는 것으로 생각되어진다.

약용식물 *Butula platyphylla* var. *japonica* 추출물을 처리했을 때 V79-4 cell의 항

산화효소 변화에서 SOD의 활성은 4 $\mu\text{g/ml}$ (21%), 20 $\mu\text{g/ml}$ (31%) 및 100 $\mu\text{g/ml}$ (36%) 농도의존적으로 증가하였으며, CAT의 활성도 4 $\mu\text{g/ml}$ (12%), 20 $\mu\text{g/ml}$ (20%) 및 100 $\mu\text{g/ml}$ (24%) 농도의존적으로 증가하였다고 보고하였다(Ju et al., 2004).

*E. cava*에서 분리한 phloroglucinol, triphlorethol-A 및 eckol를 각각 V-79-4 cell에 첨가하였을 때 항산화효소의 변화를 관찰한 결과 먼저 phloroglucinol의 경우 catalase(CAT) 변화를 확인한 결과 대조구의 CAT 활성 15 unit/mg protein에 비해 phloroglucinol의 농도를 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (18 unit/mg protein), 1 $\mu\text{g/ml}$ (26 unit/mg protein), 10 $\mu\text{g/ml}$ (37 unit/mg protein)씩 증가시킬 때 CAT의 활성도 증가하였다.

Triphlorethol-A의 경우 SOD의 활성은 대조구의 SOD 활성 11 unit/mg protein에 비해 triphlorethol-A의 농도를 0.3 μM (16 unit/mg protein), 3 μM (18 unit/mg protein), 30 μM (21 unit/mg protein)씩 증가하면 SOD의 활성도 증가하였으며, CAT의 경우 대조구의 CAT 활성 15 unit/mg protein에 비해 triphlorethol-A의 농도를 0.3 μM (15 unit/mg protein), 3 μM (23 unit/mg protein), 30 μM (31 unit/mg protein)씩 증가하였으며, GPx의 활성은 대조구의 GPx 활성 7 unit/mg protein에 비해 triphlorethol-A의 농도를 0.3 μM (12 unit/mg protein), 3 μM (14 unit/mg protein), 30 μM (17 unit/mg protein)씩 증가하였다.

Eckol의 경우 CAT의 활성은 대조구의 CAT 활성 15 unit/mg protein에 비해 eckol의 농도를 0.3 μM (22 unit/mg protein), 3 μM (28 unit/mg protein), 30 μM (41 unit/mg protein)씩 증가하였다고 보고하였다(Kang et al., 2005; 2006).

9가지 약용식물 추출물의 V79-4 cell에 대한 항산화효소 변화를 관찰한 결과 모든 추출물이 V79-4 cell의 항산화효소 활성을 농도의존적으로 증가시켰으며 특히, *Areca catechu* var. *dulcissima* 추출물이 다른 추출물보다 항산화효소 활성이 높았는데 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 SOD, CAT 및 GPx의 활성이 각각 45%, 51% 및 48%씩 증가하였다. 또한 같은 농도에서 *Paeonia suffruticosa*는 SOD, CAT 및 GPx의 활성이 각각 43%, 28% 및 45%씩, *Alpinia officinarum*은 SOD, CAT 및 GPx의 활성이 각각 40%, 23% 및 42%씩, *Cinnamomun cassia*는 SOD, CAT 및 GPx의 활성이 각각 38%, 40% 및 41%씩 활성을 나타내었다고 보고하였다(Lee et al., 2003).

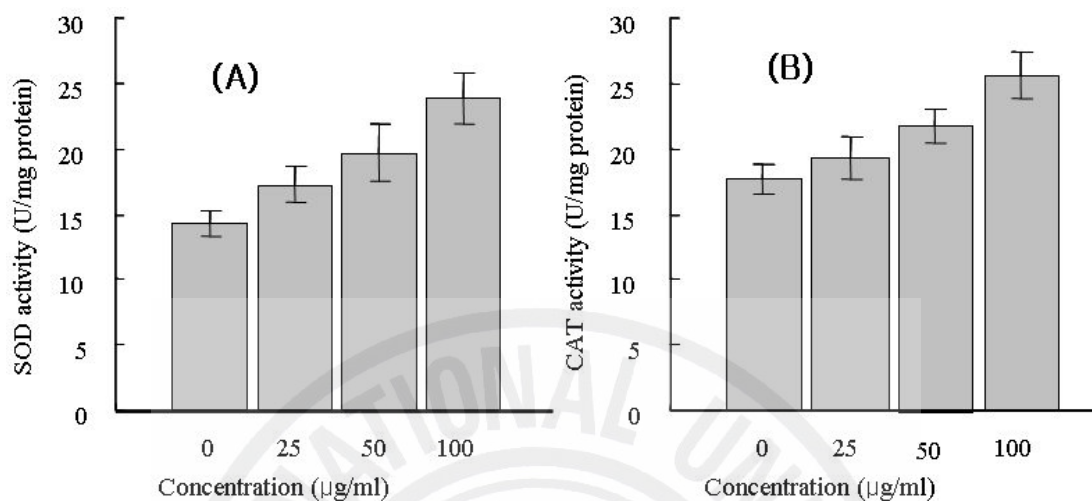


Fig. 15. Effect of the different concentration of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Neutraxe extract on antioxidant enzyme activities in V79-4 cell. (A) SOD activity, (B) CAT activity. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm S.D.

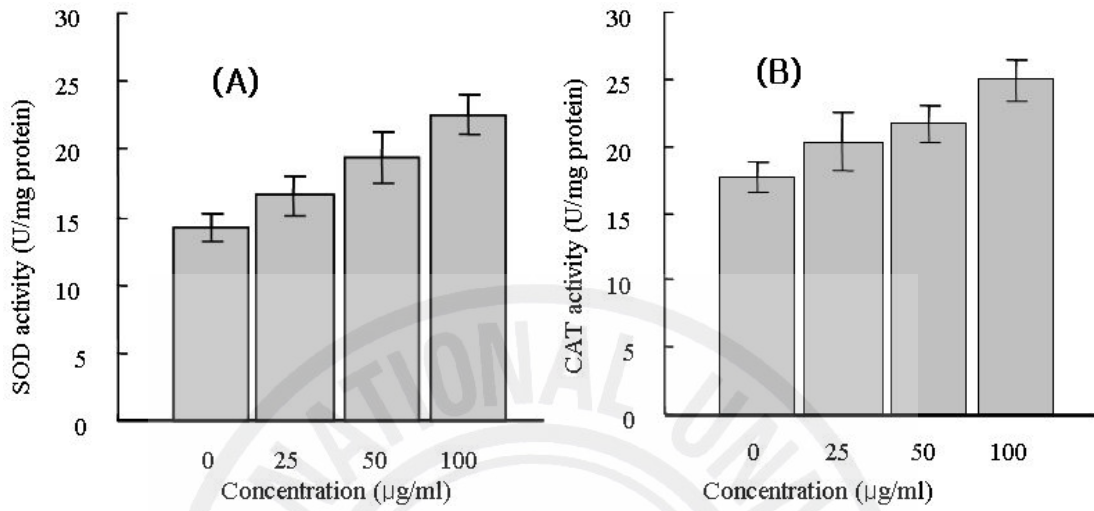


Fig. 16. Effect of the different concentration of 5~10 kDa fraction from *Sargassum coreanum* Celluclast extract on antioxidant enzyme activities in V79-4 cell. (A) SOD activity, (B) CAT activity . Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm S.D.

4. 결론

세포상에서의 H_2O_2 소거활성 측정된 결과 Neutrased 분획물의 농도가 12.5, 25, 50 $\mu g/ml$ 일 때는 농도의존적인 소거활성을 보였으며, 100 $\mu g/ml$ 일 때는 50 $\mu g/ml$ 일 때와 유사한 약 70% 정도의 소거율을 나타내었고, Celluclast 분획물은 12.5, 25, 50 및 100 $\mu g/ml$ 로 농도가 증가 할수록 소거활성은 농도 의존적이었다.

Celluclast와 Neutrased 분해물의 5~10 kDa 분획물을 대상으로 H_2O_2 처리 V79-4 세포에서 세포사멸 억제효과의 결과는 Celluclast와 Neutrased 분획물 모두에서 농도 비례적으로 세포 생존율이 증가하였으며, Celluclast 분획물인 경우 H_2O_2 만 처리하였을 경우 세포생존율이 45% 정도였으나, 5~10 kDa 분획물의 농도가 100 $\mu g/ml$ 첨가하였을 때 약 70%의 세포생존율을 나타내었다. 두 효소 분획물 간에는 그리 큰 차이를 나타내지 않았으나 우수한 세포 보호효과를 가지는 것을 확인하였다.

효소분획물의 H_2O_2 처리 V79-4 세포의 형태적 변화에서는 세포에 H_2O_2 를 첨가시키지 않은 경우, 세포에 H_2O_2 로 손상을 가한 경우, 그리고 세포에 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물을 50 $\mu g/ml$ 과 100 $\mu g/ml$ 로 처리하여 준 군으로 나누어 형태적 관찰을 실시한 결과, 손상을 받지 않은 control의 경우는 세포의 형태가 뚜렷하고 타원형의 모양을 하고 있지만 H_2O_2 를 첨가시킨 경우는 세포의 형태가 많이 깨져서 apoptotic body가 많이 보이고 있으며 세포의 형태 또한 뚜렷하지 않았다. 하지만 Celluclast 5~10 kDa 분획물을 50 $\mu g/ml$ 첨가한 사진은 H_2O_2 를 첨가한 것보다는 세포의 형태는 뚜렷하게 확인할 수 있었고, 특히 100 $\mu g/ml$ 의 농도에서는 거의 control과 유사한 형태를 취하고 있어 가수분해물이 가지고 있는 세포보호 효과로 인해 손상을 거의 입지 않는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 Celluclast 5~10 kDa 분획물이 H_2O_2 에 의한 apoptosis 유도를 억제할 수 있는 것으로 판단된다.

Neutrased 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 apoptosis 유도 억제 효과는 5~10 kDa 분획물의 농도를 50 $\mu g/ml$, 100 $\mu g/ml$ 첨가한 것은 H_2O_2 에 의해 손상된 것보다 핵이 큰편으로 H_2O_2 에 의한 apoptosis 유도를 억제할 수 있는 것으로 판단된다.

H_2O_2 처리로 손상된 L-5178 세포의 DNA 손상에 대한 Celluclast 추출물 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 세포손상 저해효과에서 control은 7% 정도의

DNA 손상을 입었고, H₂O₂ 처리시 약 50%의 DNA 손상을 입었으나 Celluclast 추출물 5~10 kDa 분획물의 농도를 25 µg/ml, 50 µg/ml 및 100µg/ml로 증가시키기에 따라 손상정도가 감소하였다. 특히 100 µg/ml의 농도에서는 약 16% 정도의 DNA 손상 결과를 나타내며 H₂O₂에 의한 DNA 손상을 크게 감소시키는 것을 알 수 있었다. 농도에 따른 세포손상 저해효과는 Celluclast 추출물 5~10 kDa 분획물 25 µg/ml의 농도에서는 30% 정도 DNA 손상을 억제하였고, 100 µg/ml의 농도에서는 DNA 손상 저해효과가 약 70%까지 나타났다.

Comet image로 나타낸 것에도 control은 손상된 잘려진 DNA 가닥이 없어 핵성의 꼬리모양과 같은 형상을 하지 않고 있으나, H₂O₂ 처리한 사진에서는 핵으로부터 손상된 DNA 가닥이 길게 나타난 형태를 하고 있는 것을 확인할 수 있었다. Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도를 25 µg/ml, 50 µg/ml 및 100µg/ml로 증가시킬 수록 손상된 DNA가 적어져 핵성의 꼬리모양이 점점 짧아지는 것을 사진으로부터 확인할 수 있었는데 이것은 L-5178 세포에 H₂O₂ 처리에 따른 DNA 손상을 Celluclast 추출물 5~10 kDa 분획물이 DNA 손상을 억제할 수 있다는 것을 의미하였다.

H₂O₂ 처리로 손상된 L-5178 세포의 DNA 손상에 대한 Neutrased 추출물 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 세포손상 저해효과는 Celluclast 추출물과 유사한 결과를 나타내었으며, comet image에서도 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도를 25 µg/ml, 50 µg/ml 및 100µg/ml로 증가시킬 수록 손상된 DNA가 적어져 핵성의 꼬리모양이 점점 짧아지는 것을 확인할 수 있었는데 이것은 L-5178 세포에 H₂O₂ 처리에 따른 DNA 손상을 Neutrased 추출물 5~10 kDa 분획물이 DNA 손상을 억제할 수 있다는 것을 의미하였다.

Celluclast의 5~10 kDa 분획물이 갖는 H₂O₂에 의한 V79-4 세포의 apoptosis 유도 억제효과는 flow cytometry를 이용하여 측정된 결과를 나타낸 것으로 sub-G₁ 부분에 보이는 것처럼 고사된 부분이 증가한 것을 확인할 수 있었고, control의 sub-G₁의 1.52%인 반면 H₂O₂에 의해 유도된 V79-4 세포의 apoptosis를 나타내는 구간인 sub-G₁은 18.5%로 증가하였으나 100 µg/ml Celluclast의 5~10 kDa 분획물 첨가시 apoptosis 구간인 sub-G₁은 1.8%로 거의 control과 유사한 apoptosis 유도 억제 효과를 보였는데, 이것은 Celluclast의 5~10 kDa 분획물의 첨가가 H₂O₂에 의

해 손상된 V79-4 세포의 apoptosis 유도를 효과적으로 억제되었다는 것을 확인할 수 있었다.

Neutrased의 5~10 kDa 분획물의 apoptosis 유도억제 효과에서 H₂O₂에 의해 손상된 V79-4 세포에 대한 cell cycle 변화를 측정된 결과는 control의 sub-G₁의 1.52% 인 반면 H₂O₂에 의해 유도된 V79-4 세포의 apoptosis를 나타내는 sub-G₁은 18.5% 였으나 100 µg/ml Neutrased의 5~10 kDa 분획물 첨가시 apoptosis 구간인 sub-G₁은 2.68%로 낮아진 것으로 보아 Neutrased의 5~10 kDa 분획물의 첨가가 H₂O₂에 의해 손상된 V79-4 세포의 apoptosis 유도를 억제하는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

큰잎모자반 Neutrased 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 V79-4 세포의 항산화효소 SOD와 CAT의 활성을 측정된 결과 **추출물을 처리하지 않은 control**의 SOD 활성은 14.25 ± 0.98 U/mg protein 이었으나 Neutrased 추출물의 5~10 kDa 분획물을 25, 50 및 100 µg/ml 처리하였을때 SOD 활성이 각각 17.27 ± 1.42 U/mg protein(21%), 19.65 ± 2.17 U/mg protein(38%) 및 23.86 ± 1.99 U/mg protein(67%)씩 증가하였다. CAT의 경우 추출물을 처리하지 않은 control의 활성은 17.65 ± 1.15 U/mg protein 이었으나 Neutrased 추출물의 5~10 kDa 분획물을 25, 50 및 100 µg/ml 처리하였을때 CAT의 활성이 각각 19.34 ± 1.66 U/mg protein(9.6%), 21.87 ± 1.31 U/mg protein(24%) 및 25.62 ± 1.72 U/mg protein(45%)씩 증가하였다.

Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물의 농도별 처리에 따른 V79-4 세포의 항산화효소 SOD와 CAT의 활성을 측정된 결과 추출물을 처리하지 않은 control의 SOD 활성은 14.25 ± 0.98 U/mg protein 이었으나 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물을 25, 50 및 100µg/ml 처리하였을때 SOD 활성이 각각 16.55 ± 1.53 U/mg protein(16%), 19.43 ± 1.87 U/mg protein(36%) 및 22.54 ± 1.43 U/mg protein(58%)씩 증가하였다. CAT의 경우 추출물을 처리하지 않은 control의 활성은 17.65 ± 1.15 U/mg protein 이었으나 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물을 25, 50 및 100µg/ml 처리하였을때 CAT의 활성이 각각 20.28 ± 2.18 U/mg protein(15%), 21.65 ± 1.34 U/mg protein(23%) 및 24.92 ± 1.56 U/mg protein(41%)씩 증가하였다. 이러한 결과로부터 V79-4 cell에 Neutrased와 Celluclast 추출물의 5~10 kDa 분획물을 첨가하면 농도의존적으로 SOD와 CAT의 생산을 유도하는 것을 알 수 있었다.

Part III

암세포에 대한 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 분자량별
분획물의 apoptosis 유도 및 항암활성



Part III

암세포에 대한 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 분자량별 분획물의 apoptosis 유도 및 항암활성

1. 요약

CT-26, U-937, HL-60, B-16과 Hela cell에 cell growth inhibition activity는 Celluclast와 Neutrane 효소분획물 (원액, <5 kDa, 5~10 kDa, 10~30 kDa, >30 kDa) 중 특히 >30 kDa 분획물이 U-937와 HL-60 세포에 대해 높은 성장억제 효과를 나타내었으며, U-937 세포에 더 효과적이었다.

U-937와 HL-60 세포에 대한 분획물의 농도별 성장억제효과는 농도 의존적으로 세포성장 억제효과를 보였다. 또한 추출물을 처리 시간에 따른 암세포의 DNA 손상정도는 추출물을 처리하여 12시간 경과 후에 HL-60 세포에 대해 약 40~50%의 DNA 손상을 보였다. 농도별 HL-60과 U-937 세포에 대한 DNA 손상 측정 결과는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 약 25~30%의 세포독성을 보였다.

Lymphocyte 세포(정상세포)에 대한 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrane >30kDa 분획물의 DNA 손상 측정 결과 두효소 모두 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지는 추출물을 처리하지 않은 control과 비슷한 DNA 손상 결과를 나타냈으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 control에 비해 약간의 Lymphocyte cell의 DNA 손상이 나타났다.

Neutrane 추출물의 >30kDa 분획물의 U-937 세포에 대한 cell cycle 변화를 측정 한 결과 control의 sub-G₁(3.15%), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3.10%), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3.25%) 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (15.66%)를 나타내었으며, Celluclast 추출물의 경우는 control의 sub-G₁(3.15%), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2.59%), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4.82%) 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (17.74%)로 Neutrane 추출물보다 약간 높은 apoptosis가 유도된 것을 확인할 수 있었다.

Neutrane 추출물의 >30kDa 분획물을 가지고 HL-60 세포에 대한 cell cycle 변화를 측정 결과 control의 sub-G₁(2.91%), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4.33%), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (6.21%)

및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (4.45%)를 나타내었으며, Celluclast 추출물의 경우는 control의 sub-G₁(2.91%), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5.02%), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5.63%) 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (16.21%)의 수치를 나타내었다.

2. 재료 및 방법

2-1. 재료

제주지역에서 서식하고 있는 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)을 수거하여 불필요한 이물질을 제거한 후 세척하여 동결건조한다. 이것을 25 mesh 이하가 되도록 분쇄하여 분말화한다. 사용된 효소는 Novo. Co.(Novozyme Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)에서 생산되고 있는 효소들 중 당분해 효소 5종 (Viscozyme L, Celluclast 1.5L, AMG 300L, Termamyl 120L, Ultraflo L), 단백질 분해효소 5종 (Protamex, Kojizyme 500MG, Neutrased 0.8L, Flavourzyme 500MG, Alcalase 2.4L)을 구입하여 사용하였다. 이들 효소들의 최적 pH와 온도는 Table 1에 나타내었고, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), thiobarbituric acid(TBA), Trichloroacetic acid(TCA), 3-(2-Pyridyl)-5,6-di(p-sulfophenyl)-1,2,4-triazine, disodium salt(ferrozine), butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxytoluene(BHT), α -tocopherol과 linoleic acid는 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그 밖의 시약들은 분석용 특급을 사용하였다.

2-2. 큰잎모자반 효소추출물의 분자량별 분획물 제조

분말화된 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 1% 용액 2 L를 만들어 기질대비 10%의 Celluclast와 Neutrased 효소 2 ml을 첨가하여 각각 효소의 최적온도(50°C, 50°C)와 pH(4.5, 6.0) 조건에 따라 12시간 동안 가수분해 하였다. 가수분해액중 미반응물질을 제거하기 위해 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 Fig. 1에 나타낸 Millipore Labscale TFF system을 이용하여 각각 5 kDa, 10 kDa 및

30 kDa의 멤브레인을 이용해 4가지 분자량별(<5 kDa, 5~10 kDa, 10~30 kDa 및 >30 kDa) 분획물을 제조하였다.

2-3. 세포배양

대장암 세포(CT-26 cells), 백혈병 세포(U-937과 HL-60 cells), 자궁암 세포(HeLa cells) 및 피부암 세포(B-16 cells)는 10%(v/v) heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), penicillin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 함유된 RPMI 1640 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

Lymphocyte cell은 10%(v/v) heat-inactivated fetal calf serum과 streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 penicillin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

2-4. Nuclear staining with Hoechst 33342

세포의 핵 형태는 cell-permeable DNA dye Hoechst 33342을 사용하여 측정하였다. 염색된 핵들의 형태에서 동질성을 가진 세포는 핵들이 생동적인 반면 염색질 응축 또는 파편은 apoptosis를 의미하는 것이다(Gschwind and Huber, 1995; Lizard et al., 1995). V79-4 cell들을 well당 약 1.5×10^5 세포수가 되도록 96 well에 각각 접종한 후에 16시간 배양한 후 이 cell에 여러 가지 농도의 분획물을 처리한 다음 1시간 더 배양하고, 최종농도 1mM되게 H₂O₂를 첨가하여 24시간 배양한다. 그 다음 1.5 μl 의 Hoechst 33342(10 mg/ml)와 DNA-specific fluorescent dye를 각 well당 첨가하여 37°C에서 10분간 배양하였다. 핵 응축정도를 관찰하기 위해 염색된 cell들은 CoolSNAP-Pro color digital camera가 장착된 fluorescence microscope로 관찰하였다.

2-5. Cell growth inhibition activity 측정

CT-26, U-937, HL-60, B-16과 Hela cell들을 well당 약 2×10^4 세포수가 되도록 96 well에 각각 접종한 후에 부착세포인 CT-26, B-16과 Hela cell은 16시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 세포가 잘 붙도록 한다. 그리고 난 후에 시료 추출물을 여러 dose로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양한다. 부유 cell인 U-937과 HL-60은 96 well에 접종한 후에 시료 추출물을 여러 dose로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양한다. 배양기에서 well을 꺼내어 MTT 시약 (stock 2 mg/ml)을 50 μ l씩 가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양한다. 상등액을 조심스럽게 버린 후 DMSO를 150 μ l씩 가하여 잘 섞고 540 nm에서 측정하여 세포 생존율을 구한다.

2-6. 형광현미경을 이용한 cell의 형태적 관찰

HL-60 cell과 U937 cell들을 well당 약 1×10^5 세포수가 되도록 96 well에 각각 접종한다. 그리고 난 후에 시료 추출물을 여러 dose로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한다. 반응기에서 well을 꺼내어 Hoechst 33342 형광 염색약을 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10분간 배양한 후 형광 현미경으로 관찰한다. 세포가 손상을 받는 경우는 핵이 작은 파편모양으로 염색이 되는 것을 관찰할 수 있다.

2-7. Alkaline comet assay를 이용한 DNA 손상 측정

Alkaline comet assay 는 Singh (1988)의 방법을 수정, 보완하여 실시하였다. HL-60 cell과 U-937 cell들을 well당 약 4×10^4 세포수가 되도록 24 well에 각각 접종한다. 그리고 난 후에 시료 추출물을 여러 dose로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양한다. U937 cell은 75 μ l의 0.7% low melting agarose gel (LMA)과 섞은 후, 0.5% normal melting agarose (NMA)가 precoating된 fully frosted slide 위로 임파구와 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 약 10분간 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를

벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μ l를 slide 위에 떨어뜨린 후 다시 cover glass를 덮어 gel이 굳을 때까지 냉장 보관하였다. Gel이 굳은 것을 확인한 뒤 cover glass를 벗기고 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris)에 사용직전에 1% Triton X-100와 10% DMSO를 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지 시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 실험직전 제조하여 냉장 보관하였던 전기영동 buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH>13)를 채워 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 \pm 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동 tank를 어두운 천으로 덮은 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액 (pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 slide를 건조시켰다. 20 μ g/ml 농도의 ethidium bromide로 핵을 형광 염색하고 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경 (Leica, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD camera (Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 4.0 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 임파구의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리 (tail length, TL) 또는 tail length에 tail내 함유된 DNA%를 곱해준 tail moment (TM) 값을 측정하여 나타내었다.

2-8. Flow cytometry analysis

Flow cytometry analysis는 apoptotic sub-G₁ hypodiploid cells(Nicoletti et al., 1991)의 비율을 결정하기 위해 수행하였다. U-937과 HL-60 cell을 1.0×10^5 cells/ml의 농도로 6-well plate에 접종한 후 16시간 동안 배양하였다. 여기에 여러 가지 농도(50, 100 및 200 μ g/ml)의 효소추출물 분획분을 처리한 다음 24시간 동안 배양하였다. 정해진 시간에 자란 cell들을 70% 에탄올 1 ml를 첨가하여 4°C에서 30분간 고정시켰다. 그 다음 phosphate buffered saline(PBS)로 두 번정도 cell을 씻은 후 100 μ g PI와 100 μ g RNase가 포함된 PBS 용액 1 ml를 첨가하여 37°C

에서 30분간 암소에 두었다. Flow cytometry analysis는 FACSCalibur flow cytometer(Becton Dickinson, San Jose, USA)를 이용하여 분석하였다.

Cell cycle의 효과는 cell cycle의 각 phase에서 cell 분포%의 변화로 결정하고, computer program Cell Quest와 Mod-Fit(Wang et al., 1999)에 의해 생성된 막대그래프로 평가하였다.

2-9. 통계분석

데이터는 Window상에서 SPSS package를 이용하여 분석하였으며, 수치는 mean±standard error(SE)로 표현하였다. 수치는 Duncan's multiple range test에 따라 variance(ANOVA)의 one-way analysis 사용 비교하여 얻어진 tail intensity를 의미한다.

2-10. Western blot analysis

세포를 lysis buffer[10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM EDTA, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100]와 0.2 M PMSF (phenylmethyl sulfonylfluoride) 및 proteinase inhibitor cocktail (0.02 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 5mM phenanthroline, 28 mM benzamidine-HCl)을 넣고 얼음에 30분간 둔 후 12,000rpm, 4°C에서 원심분리하여 상층액을 취하였다. 추출한 단백질은 Biorad protein assay kit으로 정량하였다. 100 μ g의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 다음, nitrocellulose paper (Millipore Co.)로 전이한 후 각종 일차 항체를 붙인 후 Enhanced chemilluminescence kit(Amersham Co.)방법으로 확인하였다. 사용한 일차 항체들은 다음과 같다 (caspase-3, Santa Cruz Biotechnology Inc.; Bax, Santa Cruz Biotechnology Inc.; PARP, Enzyme System products; Bcl-2, Santa Cruz Biotechnology Inc.; β -tubulin, Santa Cruz Biotechnology Inc.).

3. 결과

3-1. Cell growth inhibition activity 측정

신체를 구성하고 있는 기본단위인 세포는 조직의 항상성을 유지하기 위하여 세포분열과 죽음을 조절하는데 이중에서 능동적인 죽음을 자가사멸(apoptosis) 또는 programmed cell death라고 한다(Steller 1995). 이 과정에서 원하지 않거나 손상을 입은 세포는 제거된다. 이러한 자가사멸은 세포 내에 본래부터 존재하고 있던 자살 기작이 세포 내부와 외부의 자극에 의하여 활성화되어 계획한 대로 스스로 죽는 현상으로 세포의 괴사(necrosis)와는 달리 죽어 가는 세포의 내용물이 세포 외로 유리되지 않아 다른 세포에 손상을 주지는 않는다. 형태학적으로는 세포의 비중 감소와 세포막의 파괴 및 염색체이 응축과 더불어 사멸체(apoptotic body) 형성과 함께 식세포 작용을 거치는 작용을 의미하며, 생화학적으로는 염색체 DNA가 큰 조각에서 작은 조각으로 갈라지는 DNA fragmentation을 의미한다(Lee et al., 2000; Jaruga et al., 1998).

본 실험에서는 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 분자량별로 분획물을 이용하여 대장암 세포(CT-26 cells), 백혈병 세포(U-937과 HL-60 cells), 자궁암 세포(HeLa cells) 및 피부암 세포(B-16 cells)에 대한 항암활성을 측정하였다.

큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 분자량별 분획물의 cell growth inhibition activity 측정은 MTT법으로 측정하였다. 이것은 살아있는 세포의 경우 노란색의 수용성 MTT 시약이 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 자주색으로 환원되는 정도를 흡광도를 측정함으로써 알아보는 방법이다. CT-26, U-937, HL-60, B-16과 Hela 세포에 대한 큰잎모자반 가수분해물의 분자량별 분획물의 cell growth inhibition activity 결과는 Fig. 17와 Fig. 18에 나타내었다.

Fig. 17은 큰잎모자반 Celluclast 효소분획물의 세포성장 억제효과를 나타낸 것으로 분획물중에서 가장 낮은 분자량인 <5 kDa 에서는 HL-60 cell에 대해서만 성장억제 효과가 있었고, 특히 >30 KDa 분획물이 분획하지 않은 효소추출물보다 U-937와 HL-60 세포에 대해 높은 성장억제 효과를 나타내었으며, U-937 세포에 더 효과적이었다.

Fig. 18은 큰잎모자반 Neutrased 효소분획물의 세포성장 억제효과를 나타낸 것으로 분획물중에서 가장 낮은 분자량인 <5 kDa 에서는 HL-60 세포에 대해서만

성장억제 효과가 있었고, 5~10 kDa 분획물은 분획하지 않은 효소추출물과 모든 암세포에서 비슷한 성장억제효과를 보였으며, 10~30 kDa와 >30 kDa 분획물은 모든 암세포에서 비슷한 성장저해활성을 나타내었으나 >30 kDa 분획물이 다소 높은 활성을 보였다. Celluclast 효소분획물과 마찬가지로 >30 kDa 분획물이 분획하지 않은 효소추출물보다 U-937와 HL-60 세포에 대해 높은 성장억제 효과를 나타내었으며, U-937 세포에 더 효과적이었다. Celluclast와 Neutrase 추출물의 분획물 모두 >30 kDa 분획물에서 암세포성장 억제효과가 좋았고 특히 다섯 가지 암세포 중 U-937과 HL-60 세포에 대해 특이적으로 효과가 높게 나타났다. 그래서 >30 kDa 분획물을 선택하여 U-937과 HL-60 세포에 대해 더 많은 실험을 수행하였다.

U-937와 HL-60 세포에 대해 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrase 효소 >30 kDa 분획물의 농도별 성장억제효과를 본 결과는 Fig. 19에 나타내었다. 그림에서 두 효소 분획물이 모두 농도의존적으로 성장억제효과를 보였다.

인간 유래 대장암 세포주 HT-29에 대한 미더덕 추출물의 암세포 증식억제 효과를 본 결과 동결건조 미더덕 분말로부터 추출한 경우에는 acetone 추출물이 농도의존적으로 암세포증식억제를 나타내지는 않았지만, 추출물의 농도가 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약 40% 이하의 암세포 증식억제활성을 보였는데 이는 추출물에 불순물이 많이 함유되어 있음을 의미하고 정제수율을 높이면 상대적 활성이 증가하리라 예상된다고 보고하였다(Kim et al., 2006).

대장암 세포인 HT-29에 차가버섯 열수추출액을 1.5 mg/ml를 첨가하였을 때는 세포수는 대조군의 82.7%로 감소하였고, 3.0 mg/ml 첨가에서는 77.2%로 감소하여 차가버섯의 HT-29 세포증식 억제 효과를 알 수 있었으며, 버섯 추출물의 첨가수준이 높아짐에 따라 증식 억제 효과가 더 뚜렷하였다고 보고하였고, 위암세포 SNU484에 대한 차가버섯 추출물 1.5 mg/ml 첨가에서는 세포수가 9.2×10^5 으로 대조군의 19.5×10^5 에 비해 매우 유의적으로 감소하였으며, 320 mg/ml 첨가에서는 세포가 거의 관찰되지 않았으므로 차가버섯 추출물의 첨가량이 증가할수록 SNU484 세포수는 매우 감소하는 경향을 보였다고 보고하였다(Hwang et al., 2003).

간암세포인 H22와 백혈병세포인 L1210에 대한 표고버섯과 느타리버섯의 항암

효능을 확인하고 버섯의 첨가량이 증가할수록 암세포의 저지율이 증가하였다고 보고하였다(Park et al., 1998).

해조류 추출물의 인체 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에 대한 암세포 성장 억제효과는 해조류 에탄올 추출물 모두 50% 이상의 억제효과를 보였으며, 이중 90% 이상 해조류 억제효과를 보인 해조류는 톳(92%), 다시마(92%), 미역(93%), 파래(92%)였고, 김은 56%로 다른 해조류에 비해 다소 낮은 억제효과를 보였다. 추출물 농도별 암세포 성장 억제효과를 보면 다시마와 미역, 김은 농도가 높아짐에 따라 억제효과가 높아졌으나, 톳과 파래는 250 $\mu\text{g}/\text{assay}$ 의 농도에서 최대 성장억제 효과를 보였고, 유방암 세포인 MCF-7 cell에 대한 각 해조류 추출물의 암세포 증식의 저해율을 보면 50% 이상의 억제효과를 보인 해조류는 톳(89%), 다시마(90%), 미역(92%), 파래(91%), 김(50%)로 모든 해조류 에탄올 추출물에서 암세포 성장억제 효과가 있다고 보고하였고, 위암세포인 SNU-638에 대해서는 HeLa cell이나 MCF-7 cell에 대한 암세포 성장억제 효과보다는 다소 낮은 저해율을 보였으나 50% 이상 저해하였다고 보고하였다(Kim et al., 2005).

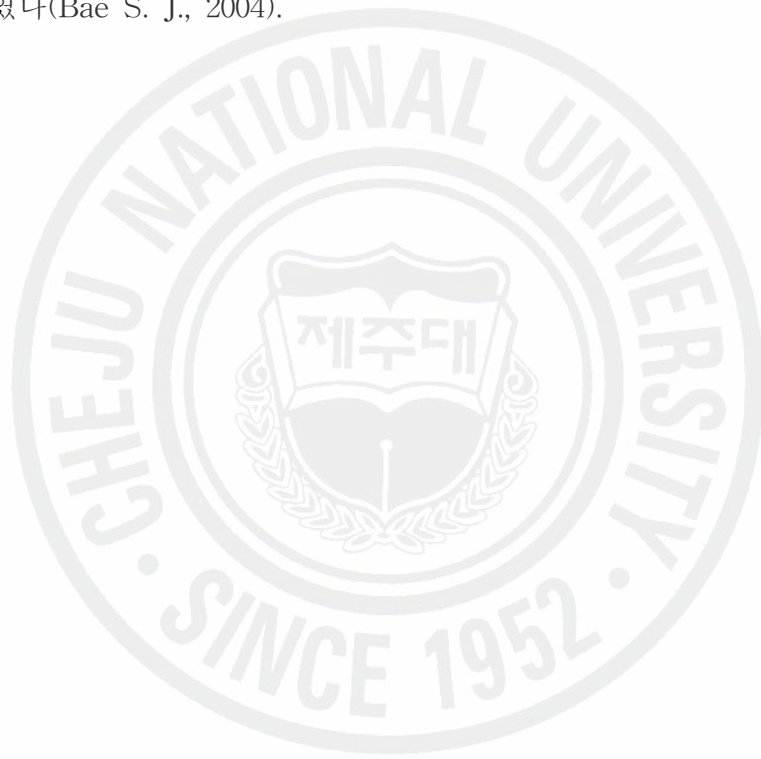
식용버섯 균사체를 이용하여 단독 배양한 발효대두의 메탄올 추출물 농도별로 인체 전립선암 세포주 DU145에 대한 성장억제 효과를 보면 균사체 배양물 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 팽이버섯(*F. velutipes*) 균사체를 배양한 발효대두가 35.07%로 가장 높았으며, 다음으로 아가리쿠스(*A. blazei*) 32.32%, 새송이(*P. eryngii*) 29.86%였으며, 동충하초(*P. japonica*) 20.92%로 가장 낮은 값을 나타내었다.

식용버섯 균사체와 *B. megaterium* SMY-212를 이용하여 2단계 배양한 발효대두의 메탄올 추출물 농도별의 세포성장 억제효과는 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각 추출물의 암세포 증식 억제효과는 32.01-50.03%의 범위로 나타났으며, 그 추출물의 농도에 비례적인 증가를 나타내었다고 보고하였다(Choi et al., 2004).

HL-60 세포에서 약용식물 *B. platyphylla* var. *japonica* 추출물의 세포독성은 0, 20, 100 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 2일 동안 처리했을 때 점진적으로 세포 생존율이 농도 의존적으로 감소하였으며, HL-60 cell에 대한 약용식물 *B. platyphylla* var. *japonica* 추출물 IC_{50} 은 159.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다고 보고하였다(Ju et al., 2004).

모자반(*Sargassum fulvellum*) 유기용매별 추출물의 HeLa 세포, 결장암 세포(HT29), 간암세포(HepG2)에 대한 세포독성은 HepG2에 용매별 각 시료 분획물

을 100, 200, 300, 400 및 500 $\mu\text{g/ml}$ 씩 첨가하였을때 ethylether층의 경우 시료 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가하였을때 이미 92%의 높은 암세포 독성효과를 보였으며 농도가 증가할 수록 증식억제효과가 그대로 유지되다가 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 다소 감소하는 경향을 보였고, ethylacetate층의 경우는 300 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가하였을때 암세포의 독성효과가 갑자기 증가되어 78%의 효과를 보였고 계속 농도의존적으로 증가하여 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 첨가하였을때 91%의 높은 효과가 나타났다고 하였으며, 결장암 세포인 HT29와 HeLa cell에 대한 암세포의 독성효과도 ethylether층과 ethylacetate층에서 높은 증식억제 효과를 보였는데 경향은 HepG2와 유사하였다고 보고하였다(Bae S. J., 2004).



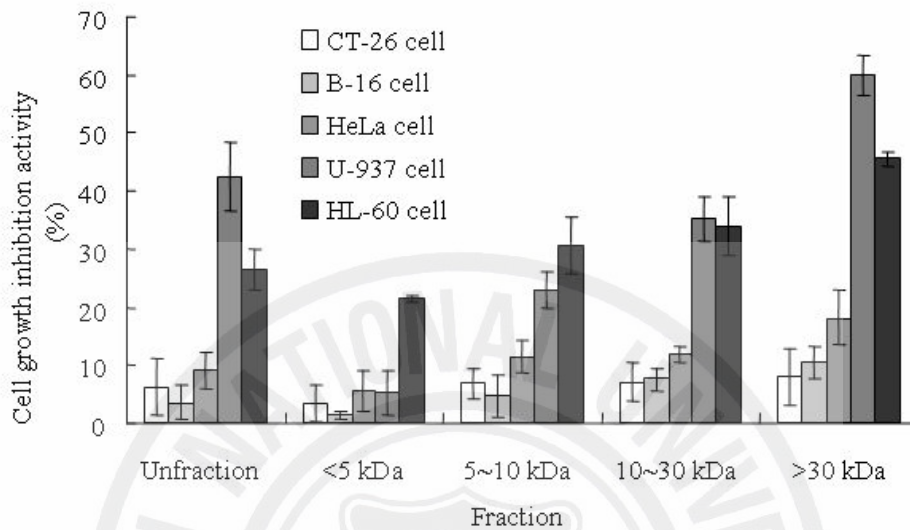


Fig. 17. Effect of different molecular weight fractions of *Sargassum coreanum* Celluclast extract on tumor cell growth inhibition activity in tumor cells (U-937, HL-60, HeLa, B-16 and CT-26 cells). Cells were treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ of different molecular weight fractions and measured for viability by MTT assay at 72hr after the sample treatment. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm S.D.

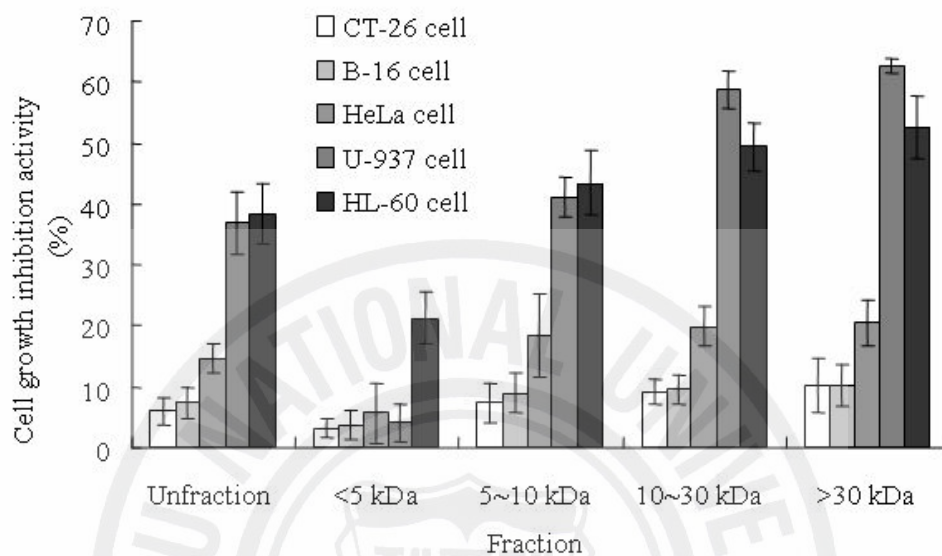


Fig. 18. Effect of different molecular weight fractions of *Sargassum coreanum* Neutralse extract on tumor cell growth inhibition activity in tumor cells(U-937, HL-60, HaLa, B-16 and CT-26 cells). Cells were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of different molecular weight fractions and measured for viability by MTT assay at 72hr after the sample treatment. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm S.D.

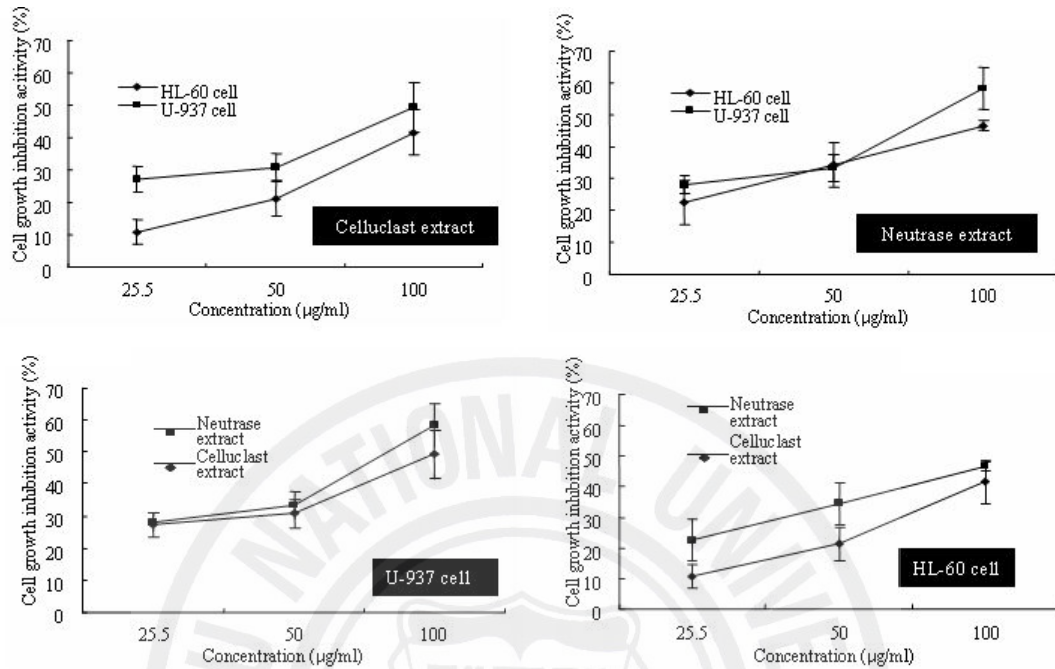


Fig. 19. Effect of various concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract on tumor cell growth inhibition activity in tumor U-937 and HL-60 cell, Cells were measured for viability by MTT assay at 72hr after the sample treatment. Experiments were performed in triplicates and data are expressed as average percent change from control \pm S.D.

3-2. 형광현미경을 이용한 cell의 형태적 관찰

큰잎모자반의 효소적 가수분해물 암세포 사멸을 apoptosis로 유도하는지 확인하기 위해 현미경적 관찰을 통해 확인해 보았다. 이것은 세포 손상 정도를 Hoechst 33342 형광 염색약으로 핵을 염색하여 핵의 손상정도를 형광 현미경으로 관찰하는 방법으로써 백혈병 세포인 HL-60과 U-937 세포에 큰잎모자반의 celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물을 농도별로 처리해 준 후 형태적 관찰을 실시하여 Fig. 20~23에 나타내었다. Fig. 20과 21은 HL-60 세포에 대해 큰잎모자반의 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물을 농도별로 처리결과 추출물을 처리하지 않은 control의 경우에는 세포의 형태가 뚜렷하고 타원형의 모양을 하고 있지만, 분획물을 100 μ g/ml를 처리하였을 때 세포의 형태가 많이 깨져서 apoptotic body가 많이 보이고 있으며 세포의 형태 또한 뚜렷하지 않았다. 따라서 큰잎모자반의 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물이 백혈병 세포인 HL-60 세포를 apoptosis로 유도하여 세포를 사멸 시키는 것을 확인할 수 있었다. U-937 세포에 대한 관찰결과는 Fig. 22과 23에 나타내었다. U-937 세포도 HL-60 세포와 마찬가지로 추출물농도 의존적으로 apoptotic body가 많이 형성됨을 알 수 있었다.

Apoptosis는 암세포 성장 억제 기전 중 중요하게 연구되고 있는 분야로 Apoptosis에 의해 죽은 세포의 특징중 하나가 apoptotic DNA ladder라는 DNA의 분절현상이다(Bortner et al., 1995).

키토산 올리고당에 의한 HL-60 암세포의 성장억제 효과가 apoptosis 유도로 인한 세포사망에 기인한 것인지를 알아보기로 Agarose gel 전기영동으로 DNA fragmentation 분석을 실시한 결과 키토산 올리고당의 농도가 증가할 수록 현저한 DNA 분자가 큰 조각에서 작은 조각으로 갈라지는 apoptotic DNA ladder가 관찰되었으며, glacial acetic acid 처리한 경우 glacial acetic acid 농도가 증가하여도 apoptotic DNA ladder를 관찰할 수 없었기 때문에 키토산 올리고당에 의한 HL-60 암세포의 성장억제 효과는 apoptosis 유도에 의한 것이라고 보고하였다 (Jeong et al., 2000).

Apoptosis 과정에서 실행경로의 활성화 과정에 관여하는 caspase는 apoptosis

시 활성화되는 중요한 단백질 분해효소이므로 이 효소의 활성도를 측정하여 apoptosis 정도를 파악할 수 있는데 차가버섯이 대장암세포 HT-29 세포의 apoptosis에 미치는 영향을 조사한 결과 차가버섯 1.5 mg/ml 첨가에서 caspase-3 활성이 대조군의 152%, 3.0 mg/ml에서 153%, 6.0 mg/ml에서 171%, 12.0 mg/ml에서 198%, 18.0 mg/ml에서 254%, 24 mg/ml에서 270% 증가하였다고 보고하였고, 위암세포 SNU484 세포에서 차가버섯 추출물의 첨가량이 증가할 수록 caspase-3 활성이 급격히 증가하였다고 하였다(Hwang et al., 2003).

Curcumin을 인간의 상피암세포인 A-431에 처리한 연구에서 curcumin 주입 48시간 뒤 세포 생존율은 10 μ M에서 80% 이상이였으나, 20 μ M 이상에서는 20%이하로 감소하였으며, 이때 caspase-3 활성은 증가하였으므로 curcumin에 의해 유도된 자가사멸이었다고 보고하였다(Shim et al., 2001).

MCSB에 의해 U-937 세포에서 apoptosis의 형태학적 변화를 확인하기 위해 TUNEL 방법으로 검사한 결과 MCSB 15 μ g/ml 농도에서 DNA fragment와 apoptotic body가 관찰되었다고 보고하였다(Cha et al., 2004).

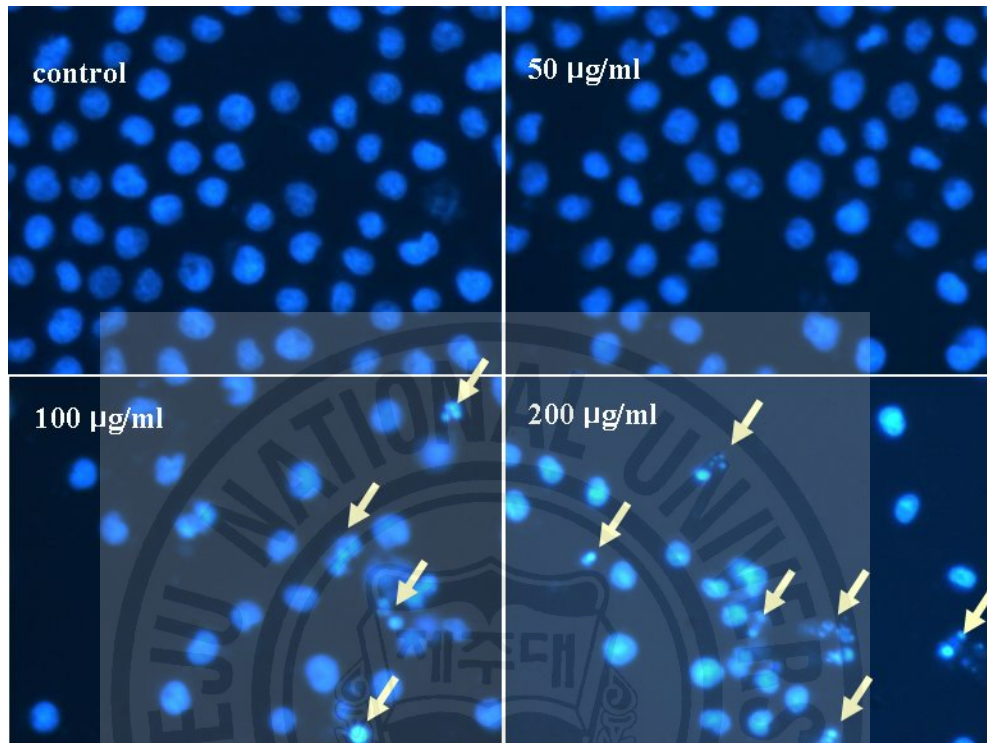


Fig. 20. Morphological changes of HL-60 cells treated with different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

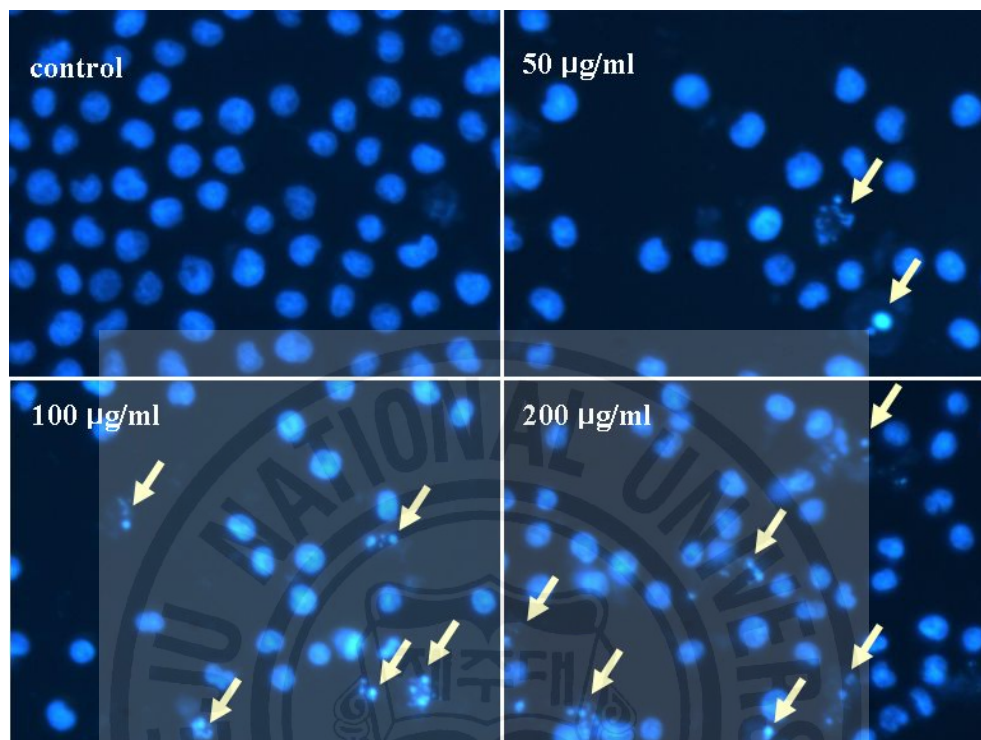


Fig. 21. Morphological changes of HL-60 cells treated with different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrase extract.

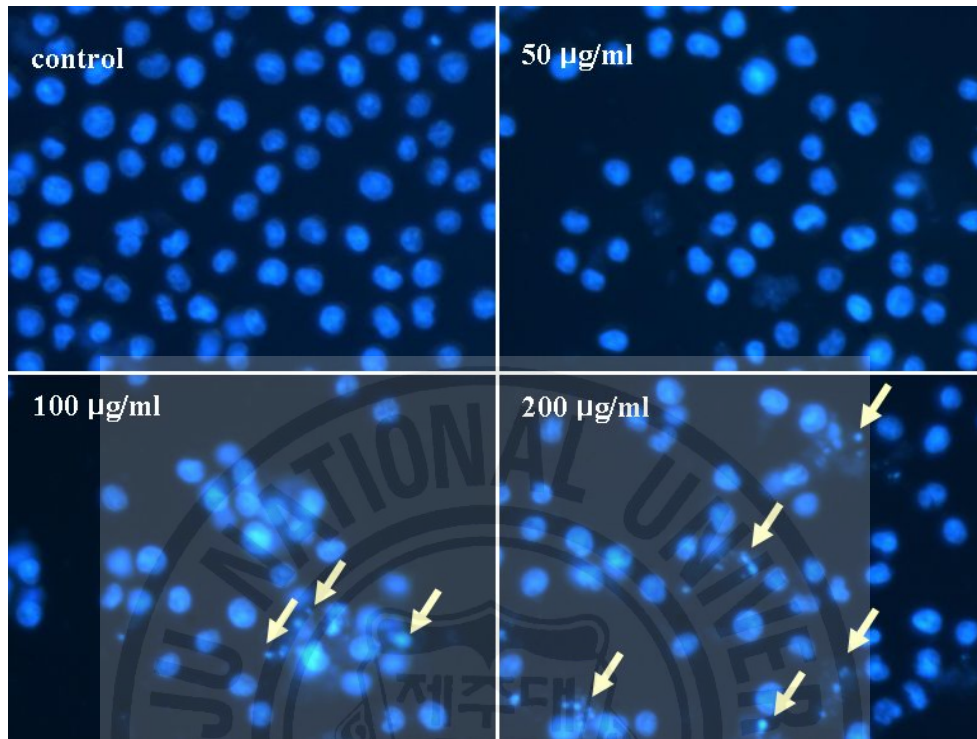


Fig. 22. Morphological changes of U-937 cells treated with different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

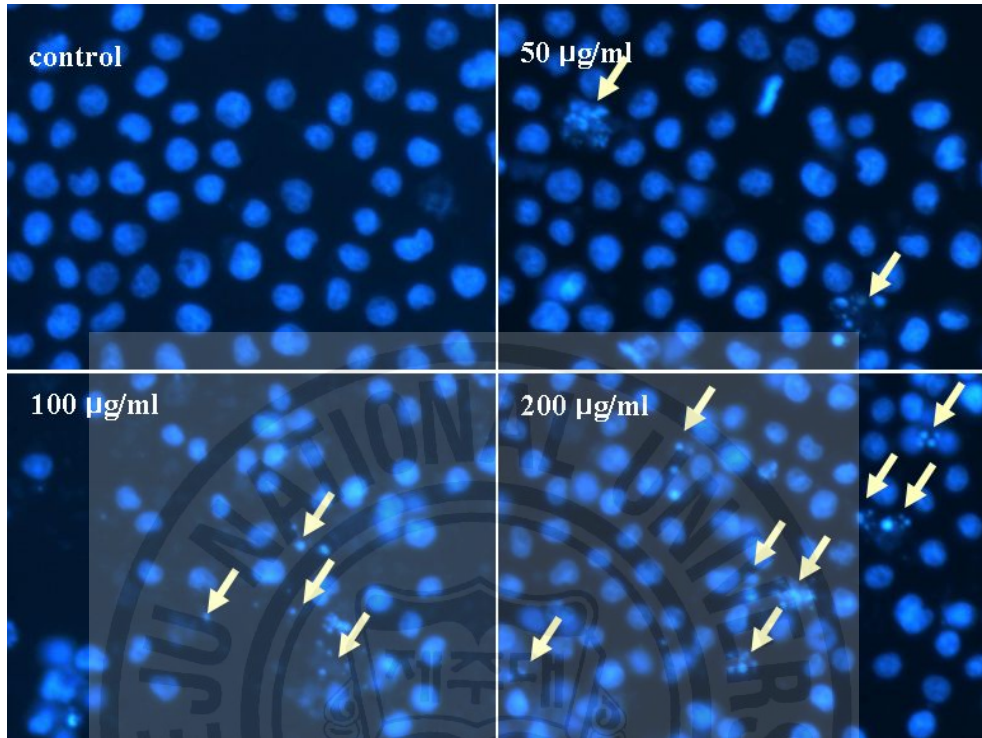


Fig. 23. Morphological changes of U-937 cells treated with different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrase extract.

3-3. Alkaline comet assay를 이용한 암세포의 DNA 손상 측정

본 실험에서는 세포의 DNA 손상을 측정하는 방법으로 comet assay를 이용하여 큰잎모자반 Celluclast 추출물과 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물이 갖는 암세포의 DNA 손상을 분석하였다. 이 방법의 이론은 근본적으로 분자량에 따라 그 이동속도가 반비례되는 전기영동의 원리에 기초하고 있다. 즉 DNA 손상을 입은 세포를 lysis시켜 핵만 남긴 후 전기영동을 하게되면 DNA 분자량의 크기가 작을수록 핵으로부터 멀리 이동되므로 손상되어 잘려진 DNA 가닥이 많을수록 혜성 꼬리처럼 긴 모양이 생긴다. 이러한 tail movement를 측정하여 얻은 결과를 아래 그림에 나타내었다.

Fig. 24~26은 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물의 시간대별 HL-60 세포에 대한 DNA 손상을 측정한 결과이다. Fig. 24에서는 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물은 처리 시간이 증가할수록 세포손상이 증가하는 경향을 보였으며 12시간 경과한 후에는 HL-60 세포에 대해 약 40~50%의 DNA 손상을 보였다. 이러한 결과를 Comet image로 본 결과 Fig. 25은 Celluclast >30kDa 분획물의 12시간 경과 후 HL-60 세포에 대한 DNA 손상이 많이 일어났음을 알 수 있었고, Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물 또한 12시간 경과 후 HL-60 세포에 대해 DNA 손상이 많이 일어난 것을 Fig. 26를 통해 알 수 있었다.

Fig. 27~29은 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물의 시간대별 U-937 세포에 대한 DNA 손상을 측정한 결과이다. Fig. 27에서는 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물은 처리 시간이 증가할수록 세포손상이 증가하는 경향을 보였으며 12시간 경과한 후에는 Neutrased의 경우는 U-937 세포에 대해 약 50% 이상의 세포독성을 보였다. 이러한 결과를 Comet image로 본 결과 Fig. 28는 Celluclast >30kDa 분획물이 1시간 경과 때부터 U-937 세포에 대한 DNA 손상을 보였으며 12시간 경과 후에는 U-937 세포에 대한 DNA 손상이 많이 일어났음을 알 수 있었다. Fig. 29은 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물이 U-937 세포에 대해 DNA 손상이 같은 시간대에서의 DNA가 많이 손상됨을 알 수 있었다.

Fig. 30~32는 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물의 농도별 HL-60 세포에 대한 DNA 손상 측정결과 나타낸 것으로 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물이 농도의존적으로 DNA 손상이 증가하는 경향이 있었고, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 약 25~30%의 세포독성을 보였다. 이러한 결과를 Comet image로 본 결과 Fig. 31은 Celluclast >30kDa 분획물의 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일때까지는 DNA 손상의 차이를 잘 확인할 수 없었으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일때 DNA 손상을 확인할 수 있었다. Fig. 32의 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물의 농도별 HL-60 세포에 대한 DNA 손상 Comet image에서도 Celluclast 추출물과 마찬가지로 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일때까지는 DNA 손상의 차이를 잘 확인할 수 없었으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일때 DNA 손상을 확인할 수 있었다.

Fig. 33~35는 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물의 농도별 U-937 세포에 대한 DNA 손상 측정 결과를 나타낸 것으로 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물의 농도의존적으로 DNA 손상이 증가하는 경향이 있었으며, 이러한 결과를 Comet image로 본 결과인 Fig. 34는 U-937 세포에서 Celluclast >30kDa 분획물의 농도를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가시킬 때 DNA 손상이 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였다. Fig. 35에서 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물의 농도별 U-937 cell에 대한 DNA 손상 Comet image에서도 농도를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가시킬때 DNA 손상이 증가함을 알 수 있었다.

약용식물 *Betula platyphylla* var. *japonica* 추출물 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 HL-60 세포에 대해 0, 3, 7, 16 및 24시간 시간별로 처리하였을때 시간 의존적으로 DNA fragmentation이 증가하였고, 추출물을 HL-60 세포에 0, 4, 20, 100 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 농도별로 24시간 처리하였을 때 농도 의존적으로 DNA fragmentation이 증가하였다고 보고하였다(Ju et al., 2004).

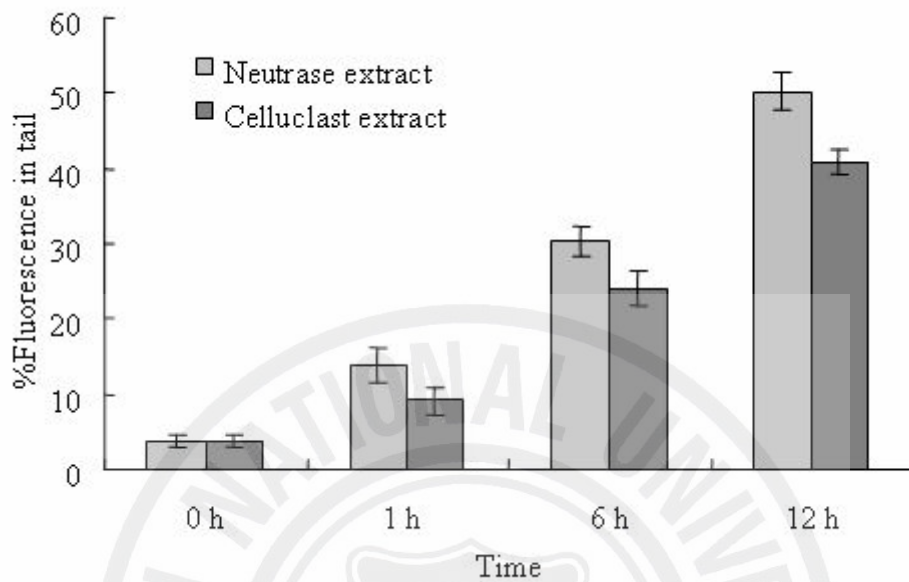


Fig. 24. The effect of time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract on nucleolus DNA damage in HL-60 cells. Values are means with standard errors of duplicate experiments.

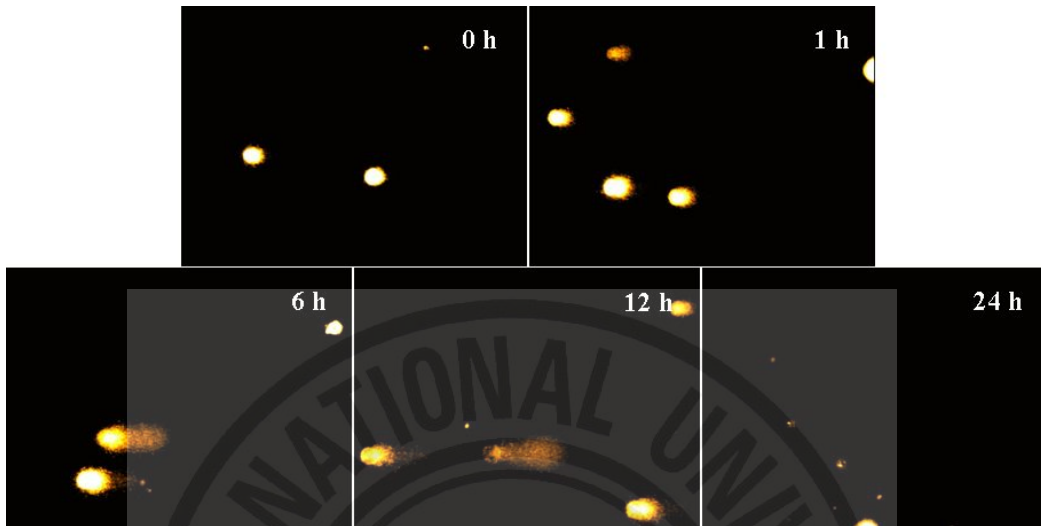


Fig. 25. Comet images of HL-60 cells after the treatments of different time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

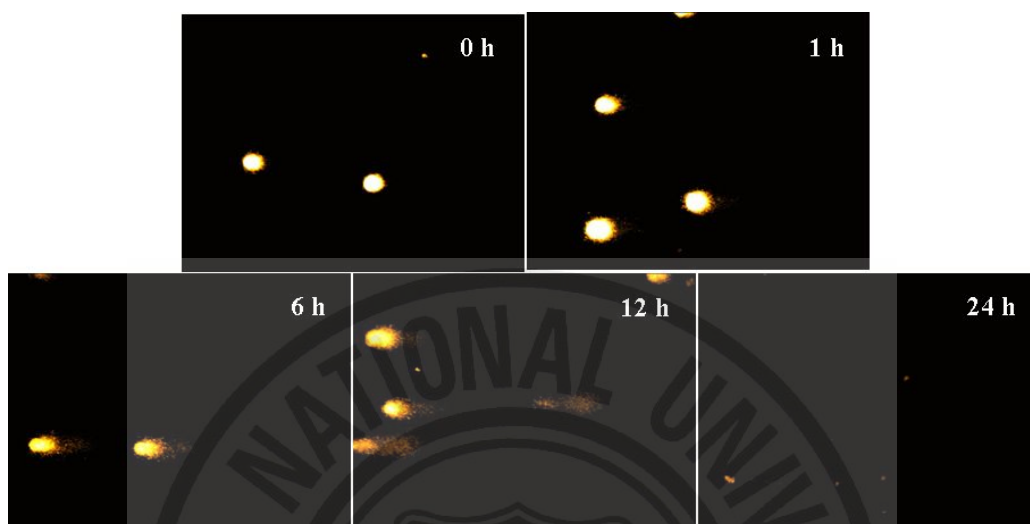


Fig. 26. Comet images of HL-60 cells after the treatments of different time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.

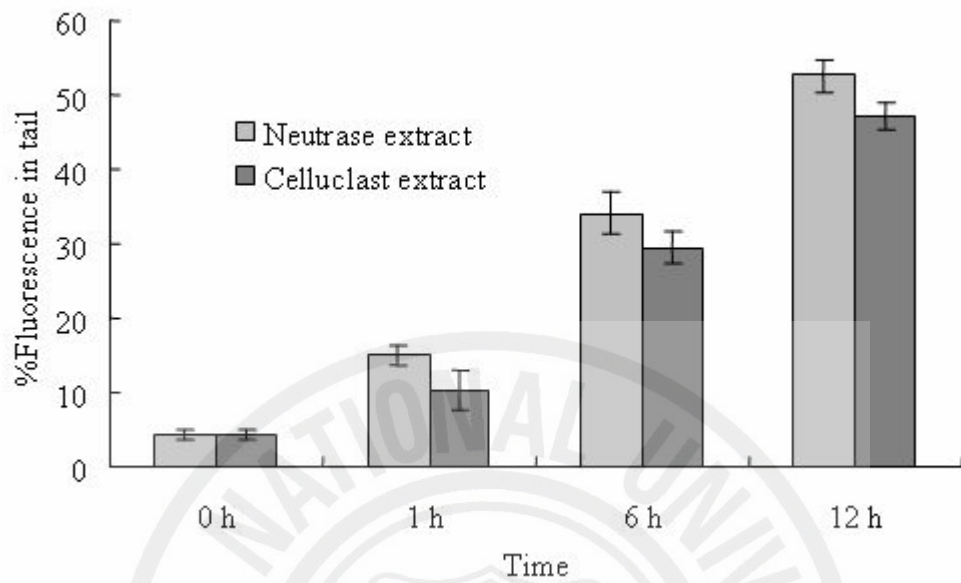


Fig. 27. The effect of time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract on nucleolus DNA damage in U-937 cells. Values are means with standard errors of duplicate experiments.

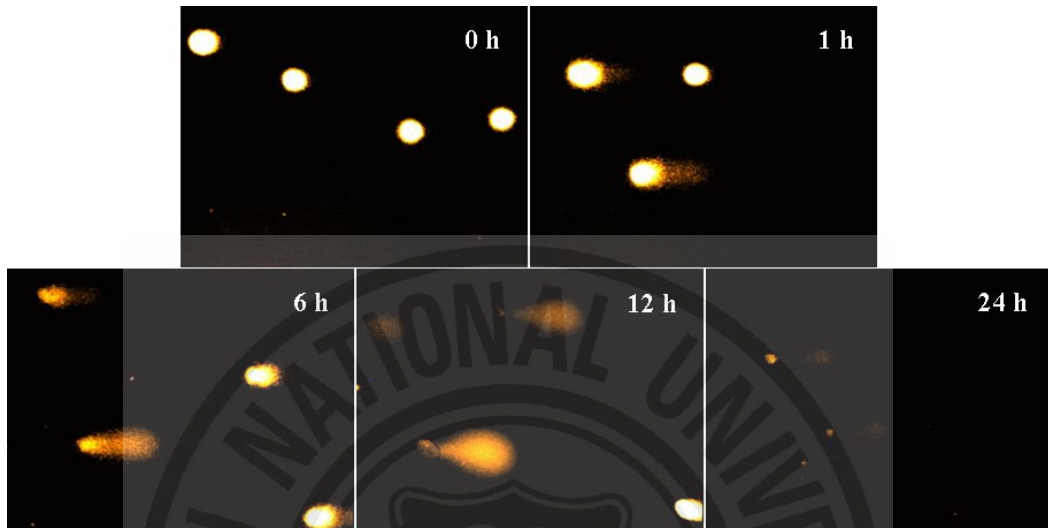


Fig. 28. Comet images of U-937 cells after the treatments of different time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

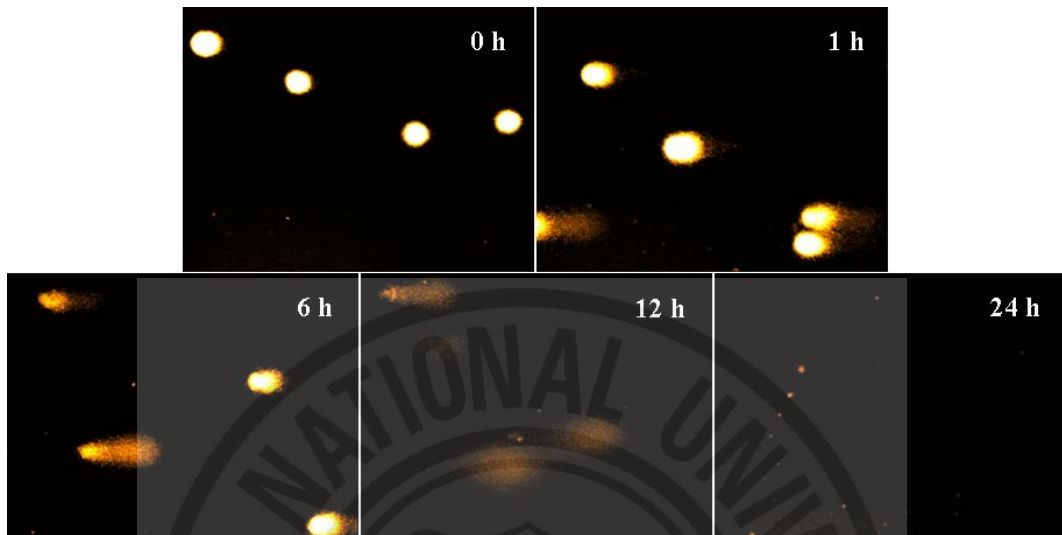


Fig. 29. Comet images of U-937 cells after the treatments of different time of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.

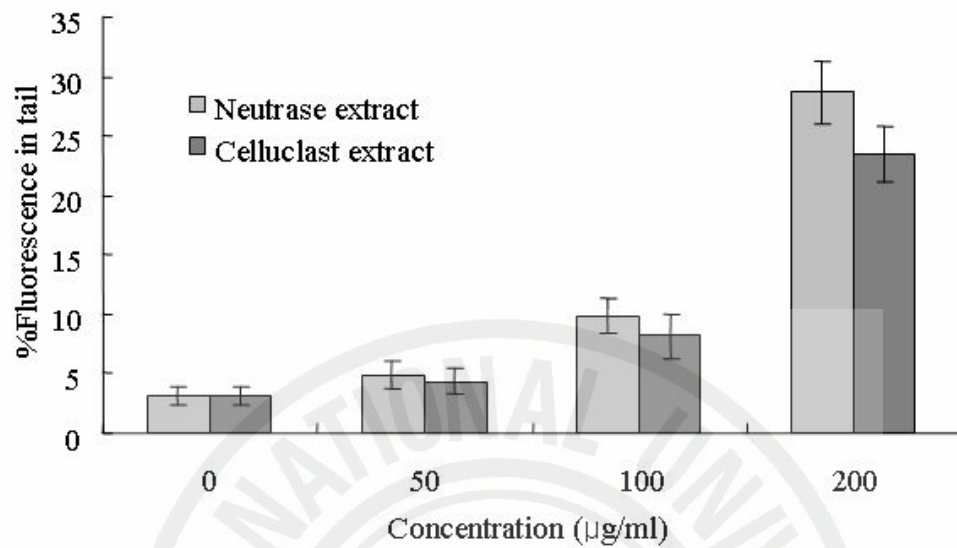


Fig. 30. The effect of different concentration >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract on nucleolus DNA damage in HL-60 cells. Values are means with standard errors of duplicate experiments.

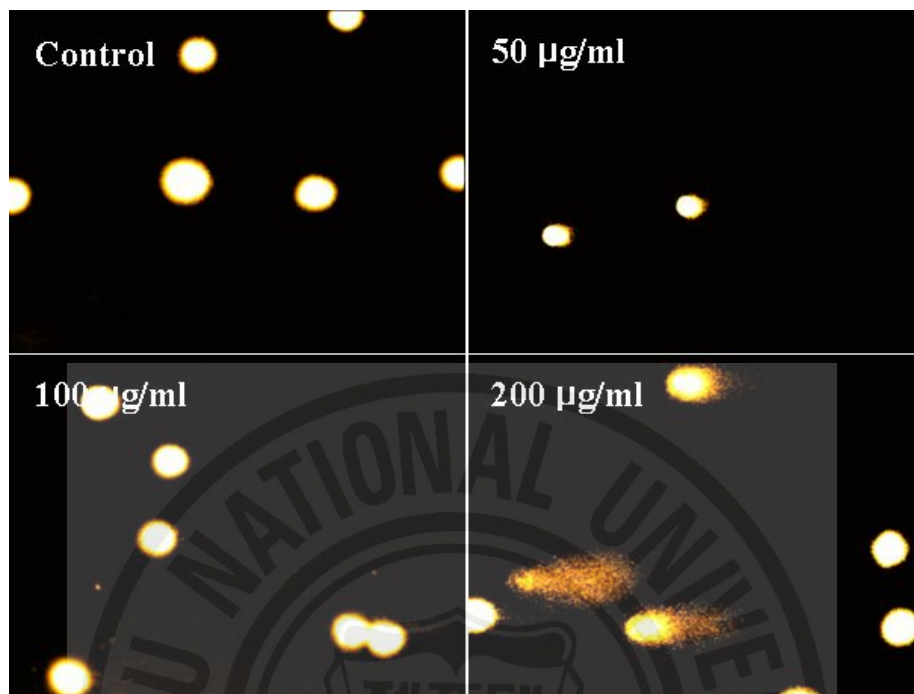


Fig. 31. Comet images of HL-60 cells after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

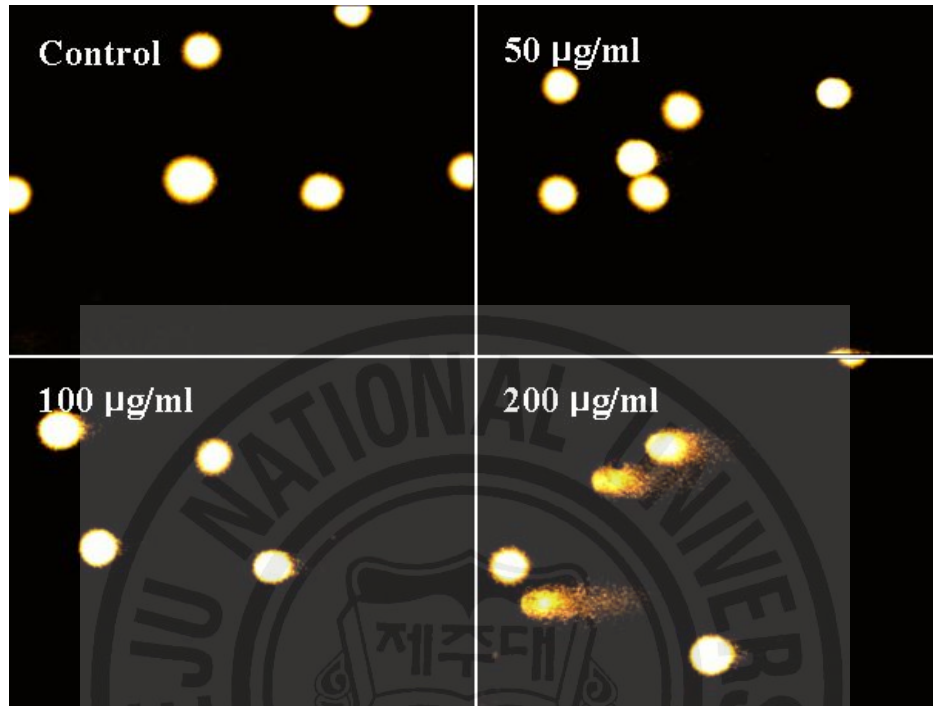


Fig. 32. Comet images of HL-60 cells after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.

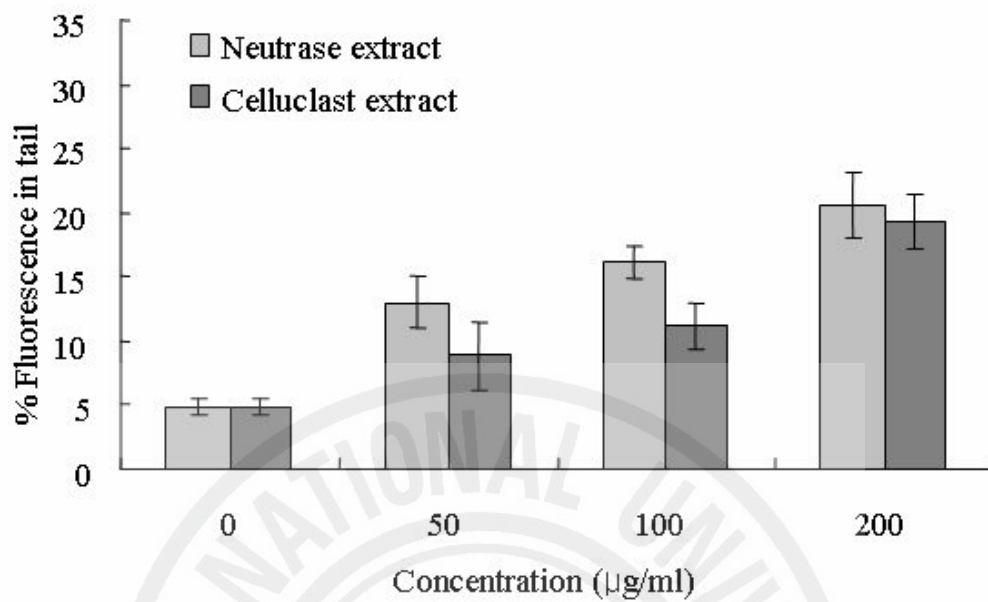


Fig. 33. The effect of different concentration >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract on nucleolus DNA damage in U-937 cells. Values are means with standard errors of duplicate experiments.

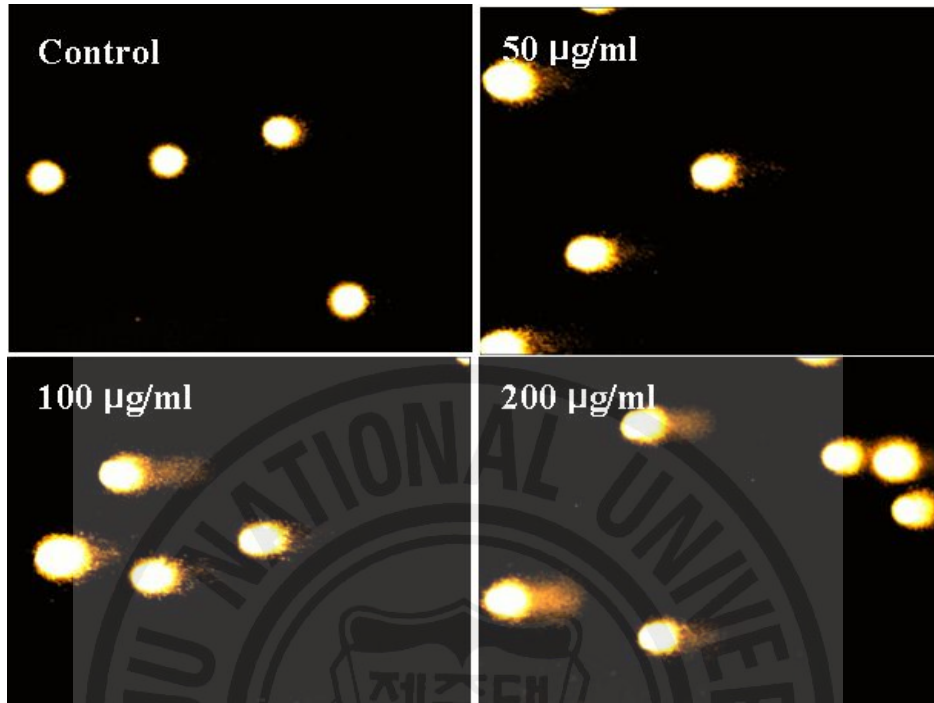


Fig. 34. Comet images of U-937 cells after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

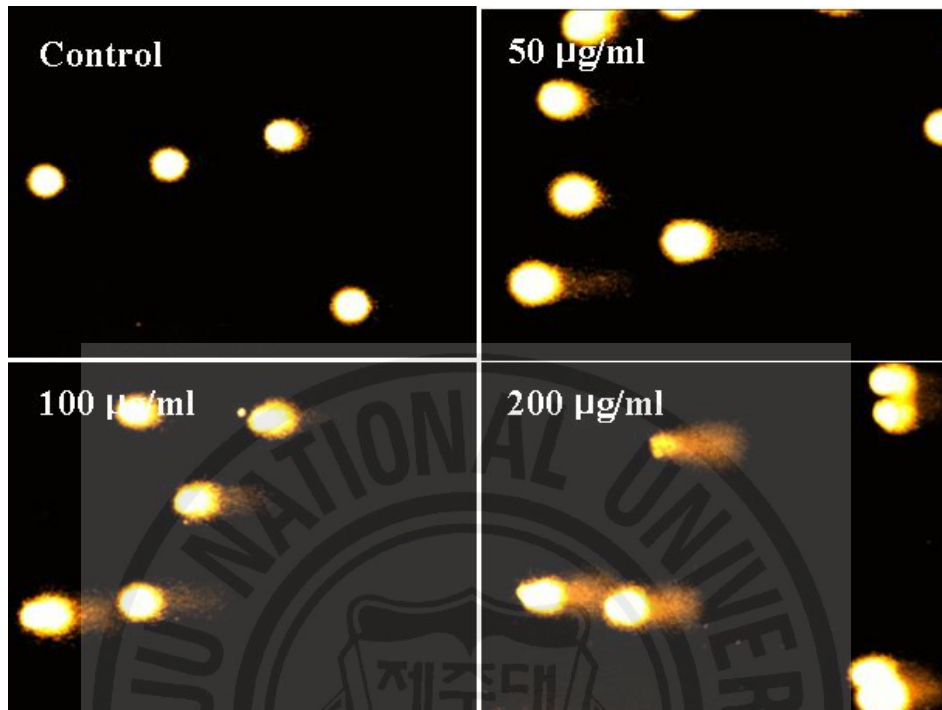


Fig. 35. Comet images of U-937 cells after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.

3-4. Lymphocyte cell(정상세포)에 대한 >30kDa 분획물들의 독성효과

Lymphocyte 세포(정상세포)에 대한 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrase > 30kDa 분획물의 DNA 손상을 측정된 결과는 Fig. 36~38에 나타내었다. Fig. 36에서 두효소 모두 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지는 control과 비슷한 DNA 손상 결과를 나타냈으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 control에 비해 약간의 Lymphocyte 세포의 DNA 손상이 생겼다. 이것을 확인하기 위해 comet image로 본 결과 Fig. 37의 Neutrase 분획물에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지는 control과 비슷하였으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 DNA 손상이 약간 일어나기 시작함을 알 수 있었다. Celluclast 추출물의 대한 Fig. 38은 Neutrase 추출물과 유사한 모습을 나타내었다. 이는 암세포에 비해 정상세포에 대해서 DNA 손상이 적게 나타난 것으로 볼 때 큰잎모자반 추출물을 이용하여 항암 관련 기능성 식품 또는 항암제의 재료로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

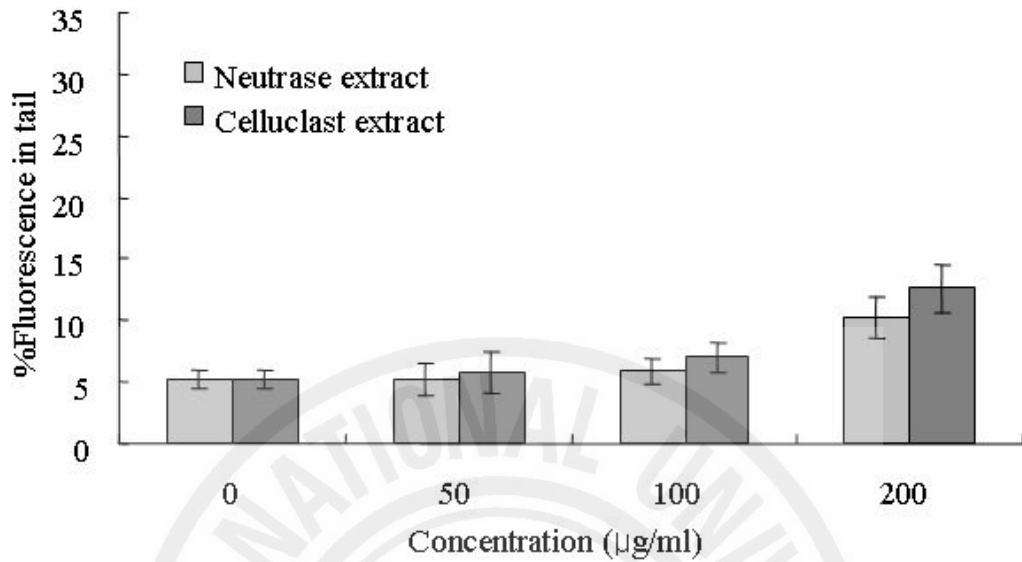


Fig. 36. The effect of different concentration >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast and Neutrased extract on nucleolus DNA damage in Lymphocyte cells. Values are means with standard errors of duplicate experiments.

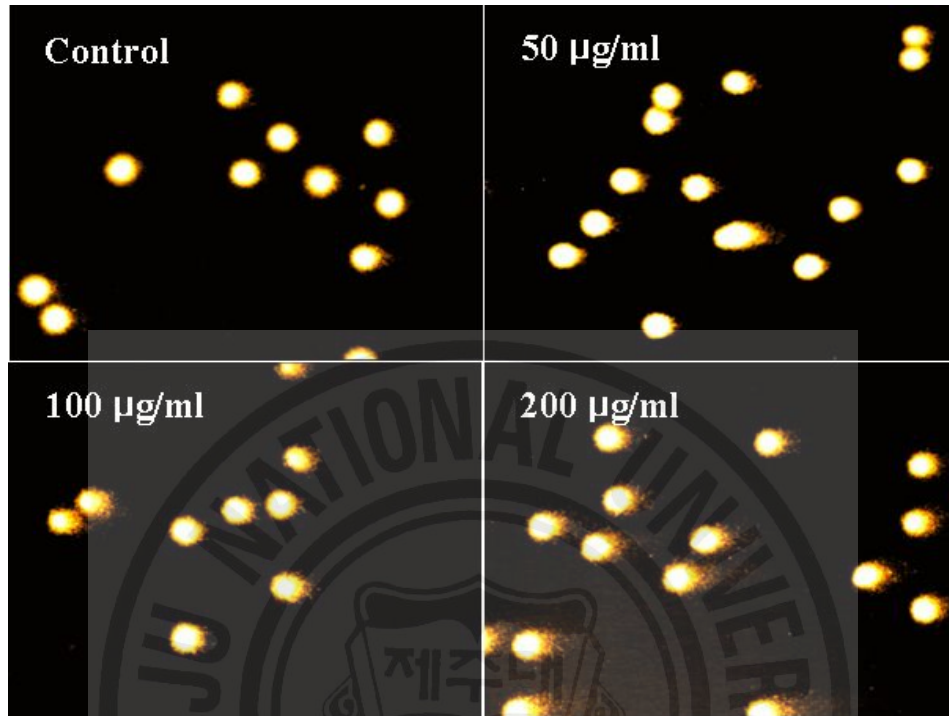


Fig. 37. Comet images of lymphocyte cell after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrase extract.

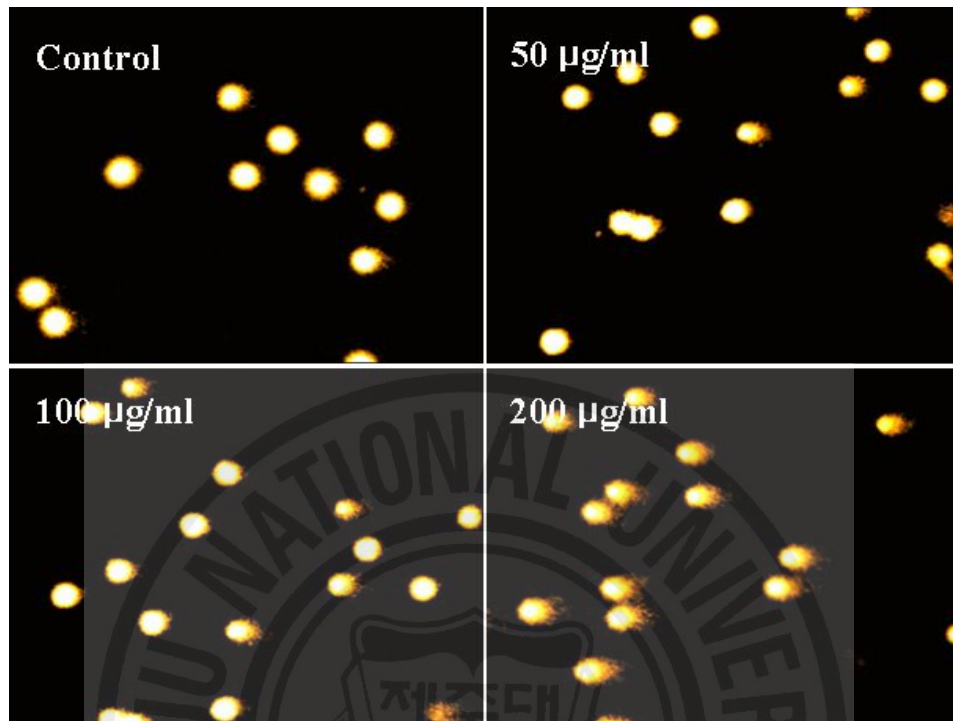


Fig. 38. Comet images of lymphocyte cell after the treatments of different concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

3-5. 효소분획물의 U-937 cell과 HL-60 cell에 대한 cell cycle 변화

Fig. 39~42은 큰잎모자반 Neutrased와 Celluclast의 >30kDa 분획물을 가지고 U-937 세포에 대한 cell cycle 변화를 측정된 결과로써 Fig. 39와 Fig. 40에서 Neutrased 추출물의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 추출물을 처리하지 않은 control의 sub-G₁의 3.15%와 비슷한 수치인 각각 3.10%와 3.25%의 sub-G₁ 수치를 나타냈으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 sub-G₁이 15.66%를 나타낸 것으로 보아 apoptosis가 유도된 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 41와 Fig. 42의 Celluclast 추출물의 경우는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 대조구의 sub-G₁의 3.15%보다 약간 높은 수치인 4.82% 수치를 나타냈으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 sub-G₁이 17.74%를 나타낸 것으로 보아 Neutrased 추출물보다 약간 높은 apoptosis가 유도된 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 43~46은 큰잎모자반 Neutrased와 Celluclast의 >30kDa 분획물을 가지고 HL-60 세포에 대한 cell cycle 변화를 측정된 결과로써 Fig. 43와 Fig. 44에서 Neutrased 추출물의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 sub-G₁이 각각 4.33%와 6.21%를 나타내어 control sub-G₁의 2.91%보다 약간 높은 apoptosis를 나타내었고 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 sub-G₁이 14.45%로 보다 높은 apoptosis가 유도된 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 45와 Fig. 46의 Celluclast 추출물의 경우는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 sub-G₁이 각각 5.02%와 5.63% 비슷한 apoptosis를 나타내었고, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 sub-G₁이 16.21%의 수치를 나타내었다.

HL-60 세포에 대한 약용식물 *Butula platyphylla* var. *japonica* 추출물의 flow cytometric 분석을 통한 apoptotic 효과에서 24시간 동안 추출물의 농도를 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (0%), 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5.7%), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (12.2%) 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (68.5%)씩 apoptotic cell의 비율이 증가하였으며, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 추출물 농도에서 시간을 3시간(25.5%), 7시간(46.3%), 16시간(58.2%) 및 24시간(68.5%)씩 apoptotic cell의 비율이 증가하였고 보고하였다(Ju et al., 2004).

U937 세포에 대한 MCSB의 apoptosis를 확인하기 위한 cell cycle 분석에서 G₀/G₁ 상에서 MCSB 농도의존적으로 DNA 함량이 증가한 반면 S 상에서는 감

소하였으며, sub-G1의 apoptotic 비율은 control과 비교하여 농도 5 $\mu\text{g/ml}$ (4.16%), 10 $\mu\text{g/ml}$ (8.76%) 및 15 $\mu\text{g/ml}$ (16.11%)씩 각각 증가하였다고 보고하였다 (Cha et al., 2004).



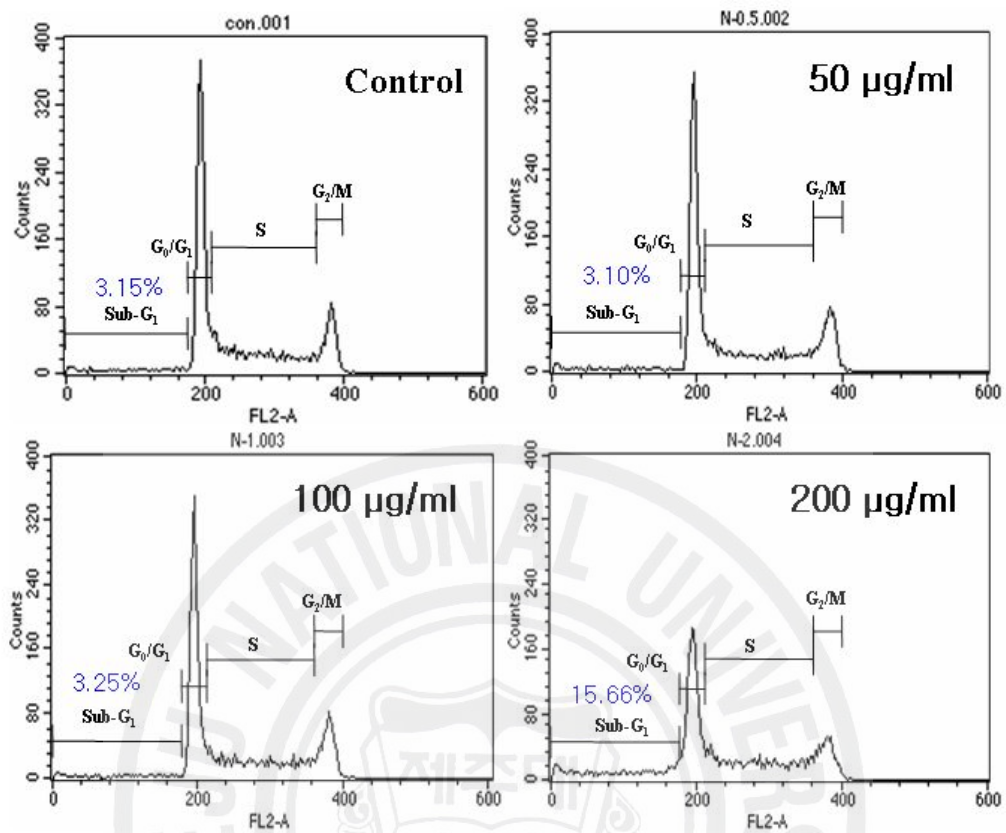


Fig. 39. Effect of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrase extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion in U-937 cells by flow cytometric analysis. Histogram patterns of U-937 cells treated with various concentration of >30 kDa fraction for 24hr by cell cycle analysis.

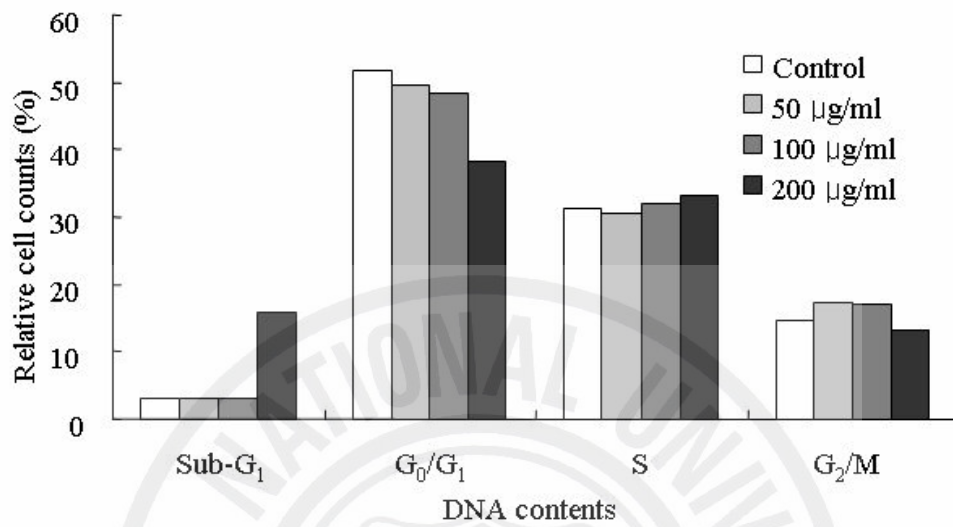


Fig. 40. Bar graph for cell cycle patterns of U-937 cells treated by various concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrase extract.

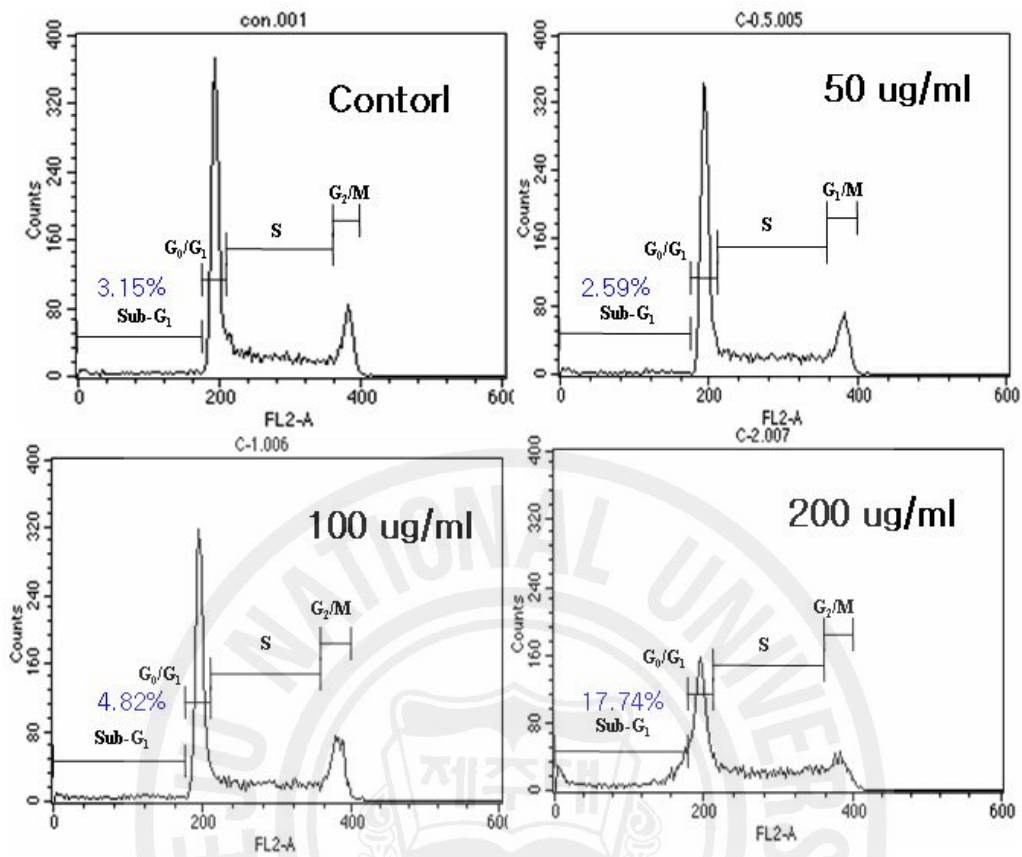


Fig. 41. Effect of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion in U-937 cells by flow cytometric analysis. Histogram patterns of U-937 cells treated with various concentration of >30 kDa fraction for 24hr by cell cycle analysis.

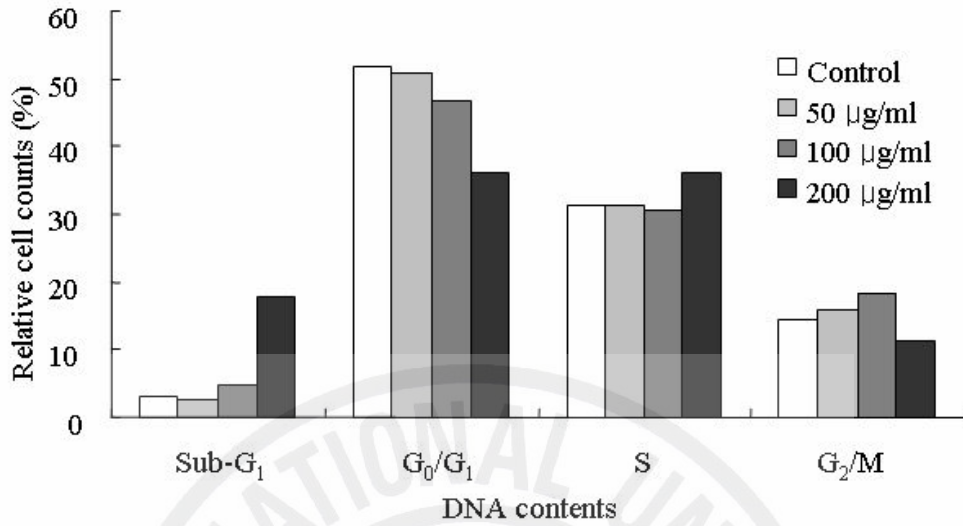


Fig. 42. Bar graph for cell cycle patterns of U-937 cells treated by various concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

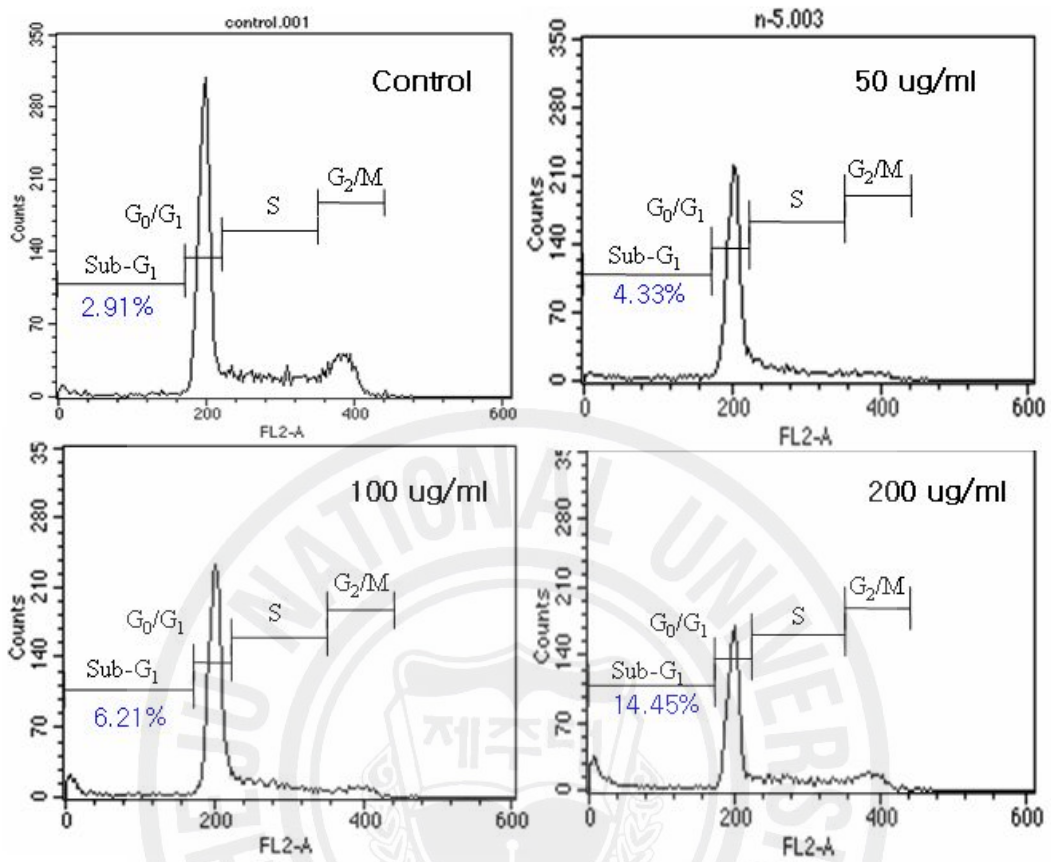


Fig. 43. Effect of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion in HL-60 cells by flow cytometric analysis. Histogram patterns of U-937 cells treated with various concentration of >30 kDa fraction for 24hr by cell cycle analysis.

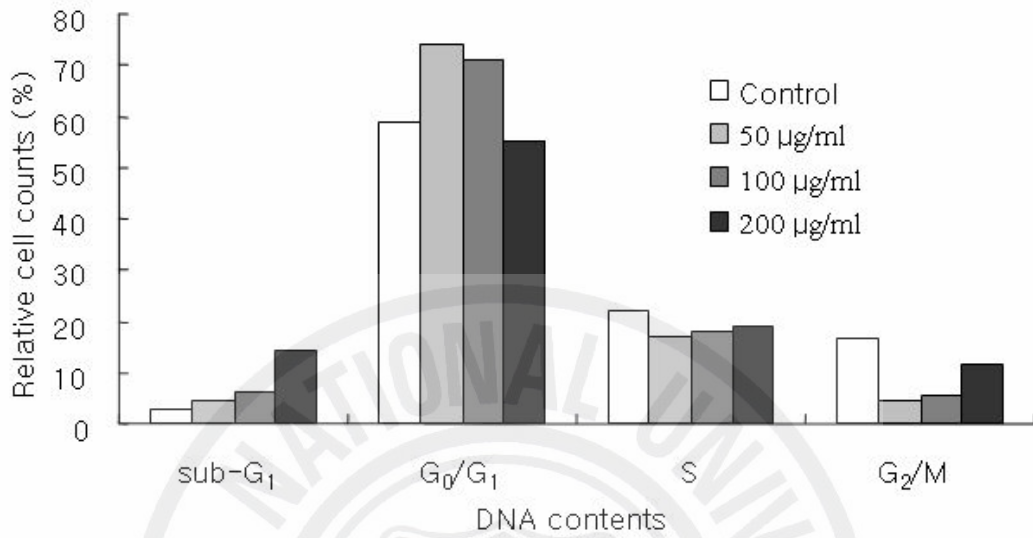


Fig. 44. Bar graph for cell cycle patterns of HL-60 cells treated by various concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Neutrased extract.

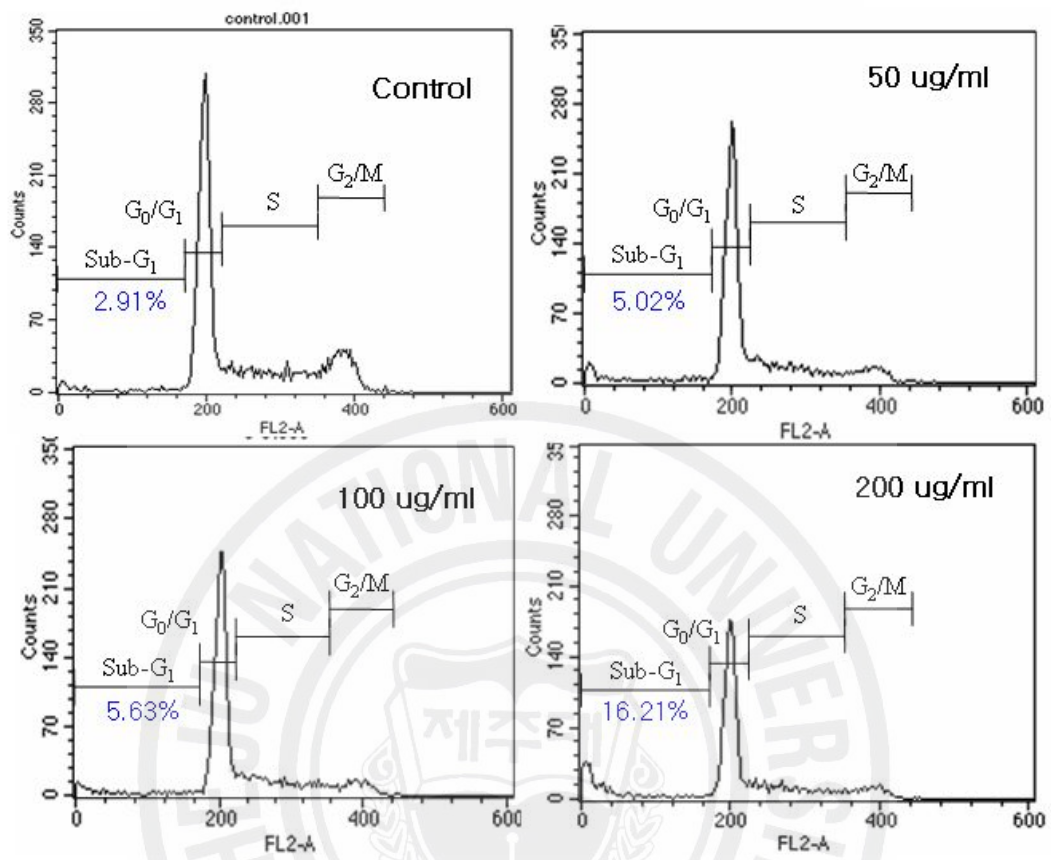


Fig. 45. Effect of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract on the cell cycle pattern and apoptotic portion in HL-60 cells by flow cytometric analysis. Histogram patterns of U-937 cells treated with various concentration of >30 kDa fraction for 24hr by cell cycle analysis.

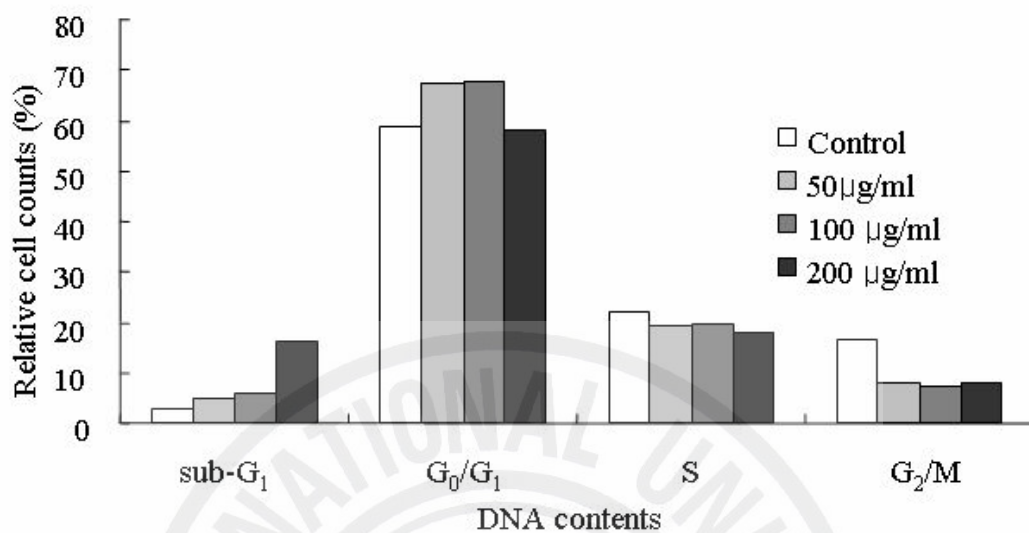


Fig. 46. Bar graph for cell cycle patterns of HL-60 cells treated by various concentration of >30 kDa fraction of *Sargassum coreanum* Celluclast extract.

4. 결론

CT-26, U-937, HL-60, B-16과 Hela 세포에 대한 큰잎모자반 가수분해물의 분자량별 분획물의 cell growth inhibition activity는 Celluclast 효소분획물(원액, >5 kDa, 5~10 kDa, 10~30 kDa, >30 kDa)에서 >30 kDa 분획물이 분획하지 않은 효소추출물보다 U-937와 HL-60 세포에 대해 높은 성장억제 효과를 나타내었으며, U-937 세포에 더 효과적이었다.

Neutrased 효소분획물의 세포성장 억제효과 <5 kDa 에서는 HL-60 cell에 대해서만 성장억제 효과가 있었고, 5~10 kDa 분획물은 분획하지 않은 효소추출물과 모든 암세포에서 비슷한 성장억제효과를 보였으며, 10~30 kDa와 >30 kDa 분획물은 모든 암세포에서 비슷한 성장저해활성을 나타내었으나 >30 kDa 분획물이 다소 높은 활성을 보였다. Celluclast 효소분획물도 마찬가지로 >30 kDa 분획물이 분획하지 않은 효소추출물보다 U-937와 HL-60 세포에 대해 높은 성장억제 효과를 나타내었으며, U-937 세포에 더 효과적이었다.

U-937와 HL-60 세포에 대해 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 효소 >30 kDa 분획물의 농도별 성장억제효과 모두 농도의존적으로 성장억제효과를 보였다.

백혈병 세포인 HL-60과 U-937 세포에 큰잎모자반의 celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물을 농도별로 처리해 준 후 형태적 관찰은 추출물을 처리하지 않은 control의 경우에는 세포의 형태가 뚜렷하고 타원형의 모양을 하고 있지만, 분획물의 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 경우에는 세포의 형태가 많이 깨져서 apoptotic body가 많이 보이고 있으며 세포의 형태 또한 뚜렷하지 않았다. 따라서 큰잎모자반의 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물이 백혈병 세포인 HL-60 세포를 apoptosis로 유도 시키는것을 확인할 수 있었다. U-937 세포에 대해서도 농도의존적으로 apoptotic body가 많이 형성됨을 알 수 있었다.

큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물의 시간대별 HL-60 cell과 U-937 cell에 대한 DNA 손상을 측정된 결과는 처리 시간이 증가할 수록 세포손상이 증가하는 경향을 보였으며 12시간 경과한 후에는 HL-60 cell에 대해 약 40~50%의 세포독성을 보였다. 이러한 결과를 comet image로 본

결과에서도 나타났으며, 시간대별 U-937 cell에 대한 DNA 손상을 측정 결과에서도 처리 시간이 증가할 수록 세포손상이 증가하는 경향을 보였으며 12시간 경과한 후에는 Neutrased의 경우는 U-937 cell에 대해 약 50% 이상의 세포독성을 보였다.

농도별 HL-60세포 U-937 세포에 대한 DNA 손상 측정 결과는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 약 25~30%의 세포독성을 보였다. 이러한 결과를 comet image로 본 결과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일때 까지는 DNA 손상의 차이를 잘 확인할 수 없었으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일때 DNA 손상을 확인할 수 있었다. Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물의 농도별 HL-60 세포에 대한 DNA 손상 comet image에서도 Celluclast 추출물과 마찬가지로 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일때 까지는 DNA 손상의 차이를 잘 확인할 수 없었으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일때 DNA 손상을 확인할 수 있었다.

큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30 kDa 분획물의 농도별 U-937 cell에 대한 DNA 손상 측정 결과를 나타낸 것으로 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased 추출물의 >30kDa 분획물의 농도의존적으로 DNA 손상이 증가하는 경향이 있었으며, U-937 세포에서 Celluclast >30kDa 분획물의 농도를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가시킬 때 DNA 손상이 증가하는 것을 comet image로 확인하였다. Neutrased 추출물 Celluclast 추출물과 마찬가지로 농도를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 증가시킬 때 DNA 손상이 증가함을 알 수 있었다.

Lymphocyte 세포(정상세포)에 대한 큰잎모자반 Celluclast와 Neutrased >30kDa 분획물의 DNA 손상 측정 결과 두효소 모두 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지는 control과 비슷한 DNA 손상 결과를 나타냈으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 control에 비해 약간의 Lymphocyte 세포의 DNA 손상이 나타났다. comet image의 결과도 Neutrased 분획물에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지는 control과 비슷하였으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 DNA 손상이 약간 일어나기 시작함을 알 수 있었다. Celluclast 추출물은 Neutrased 추출물과 유사한 모습을 나타내었다.

큰잎모자반 Neutrased와 Celluclast의 >30kDa 분획물을 가지고 U-937 세포에 대한 cell cycle 변화를 측정한 결과 Neutrased 추출물의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 추출물을 처리하지 않은 control의 sub-G₁의 3.15%와 비슷한 수치인 각각 3.10%와 3.25%의 sub-G₁ 수치를 나타냈으나 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는

sub-G₁이 15.66%를 나타낸 것으로 보아 apoptosis가 유도된 것을 확인할 수 있었고, Celluclast 추출물의 경우는 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 대조구의 sub-G₁의 3.15%보다 약간 높은 수치인 4.82% 수치를 나타냈으나 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 sub-G₁이 17.74%를 나타낸 것으로 보아 Neutrased 추출물보다 약간 높은 apoptosis가 유도된 것을 확인할 수 있었다.

큰잎모자반 Neutrased와 Celluclast의 >30kDa 분획물을 가지고 HL-60 cell에 대한 cell cycle 변화를 측정된 결과 Neutrased 추출물의 경우 50 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 sub-G₁이 각각 4.33%와 6.21%를 나타내어 control sub-G₁의 2.91%보다 약간 높은 apoptosis를 나타내었고, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 sub-G₁이 14.45%로 보다 높은 apoptosis가 유도된 것을 확인할 수 있었고, Celluclast 추출물의 경우는 50 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 sub-G₁이 각각 5.02%와 5.63% 비슷한 apoptosis를 나타내었으며, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 sub-G₁이 16.21%의 수치를 나타내었다.

참고문헌

- Abourriche, A., Charrouf, M., Berrada, M., Bennamara, A., Chaib, N. and Francisco, C. 1999. Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Fitoterapia* 70: 611-614.
- Ahn, G. N., Kim, K. N., Cha, S. H., Song, C. B., Lee, J. H., H, M. S., Yeo, I. K., Lee, N. H., Jee, Y. H., Kim, J. S., Heu, M. S., Jeon, Y. J. 2006. Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H₂O₂-mediated DNA damage. *Eur Food Res Technol*
- Ahn, C. B., Jeon, Y. J., Kang, D. S., Shin, T. S., Jung, M. B. 2004. Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry. 37: 253-258.
- Ames, B. 1998. Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicol. Lett.* 102, 5-18.
- AOAC. 1990. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists(15th ed), Washington D.C.
- Anggadiredja, J., Andyani, R. and Muawanah, H. 1997. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. *J. Appl. Phycol.* 9: 477-479.
- Athukorala, Y., Lee, K. W., Shahidi, F., Heu, M. S., Kim, H.T., Lee, J. S. and Jeon, Y. J. 2003a. Antioxidant efficacy of extracts of an edible red alga (*Grateloupia filicina*) in linoleic acid and fish oil. *J. Food Lipids* 10: 313-327.
- Athukorala, Y., Lee, K. W., Song, C. B., Shin, T. S., Cha, Y. J., Shahidi, F. and Jeon, Y. J. 2003b. Potential antioxidant activity of marine red alga *Grateloupia filicina* extract. *J. Food Lipids* 10: 251-265.

- Bae, S. J. 2004. Anticarcinogenic Effects of Sargassum fulvellum Fractions on Several Human Cancer Cell Lines in vitro. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33(3): 480-486.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. A., Joshi, S. S. and Pruess H. G. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148: 187-197.
- Boettcher, A. and Targett, M. 1993. Role of polyphenolic molecular size in reduction of assimilation efficiency in *xiphister mucosus*. *Ecology* 74: 891-903.
- Bold, R. J., Termuhlen, P. M. and McConkey, D. J. 1997. Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surgi. Oncol.* 6: 133-142.
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B. E., Cidlowski, J. A. 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends. Cell. Biol.*,5: 21-26.
- Burtin, P. Nutritional value of seaweeds. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* ([http://ejeafeche.uvigo.es/2\(4\)2003/017242003F.htm](http://ejeafeche.uvigo.es/2(4)2003/017242003F.htm)). 2003.
- Buttke, T. M. and Sandstrom, P. A. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 15: 7-10.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 47: 943-946.
- Carrillo, M. C., Kanai, S., Nokubo, M. and Kitani K. 1991. (-) deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sci.* 48: 517-521.
- Cha, Y. Y., Lee, E. O., Lee, H. J., Park, Y. D., K, S. G., Kim, D. H., Kim, H. M., Kang, I. C. and Kim, S. H. 2004. Methylene chloride fraction of *Scutellaria barbata* induces apoptosis in human U937 leukemia cells via the mitochondrial signaling pathway. *Clinica Chimica Acta* 348 : 41-48.

- Chandler, S. F. and Dodds, J. H. 1983. The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasidine in callus cultures of *Solanum laciniatum*. *Plant Cell Rep.* 2: 105-108.
- Choi, J. H., Yang, H. S., Shon, M. Y., Kim, J. S., Park, S. K. 2004. Antioxidant and Anticarcinogenic Activities of Methanol Extracts from Soybean Products Fermented by Some Mycelia of Mushroom and *Bacillus megaterium* SMY-212. *Food Industry and Nutrition* 9(3); 34-39.
- Choi, S. Y., Kim, S. Y., Hur, J. M., Choi, H. G., Sung, N. J. 2006. Antioxidant Activity of Solvent Extracts from *Sargassum thunbergii*. 35(2): 139-144.
- Cox, D. A. and Cohen, M. L. 1996. Effects of oxidized low density lipoproteins on vascular contraction and relaxation. *Pharmacol. Rev.* 48: 3-9.
- Crow JP. 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1: 145-157.
- Czochra, M. P. and A. Widensk. 2002. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide scavenging activity. *J. Analitica Chemica Acta* 452: 177-184.
- Duh, P. D., Y. Y. Tu and G. C. Yen. 1999. Antioxidant Activity of Water Extract of Harng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebnesmittel-Wissenschaft and Technology* 32: 269-277.
- Estrada JEP, Bescos PB, Fresno AMV. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco* 56: 497-500.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., O'Neill, K. L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-59.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247.
- Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, Z., Kido, M., Mori, H.,

- Nakayama, Y. and Takahashi, M. 1989. 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.
- Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, Z., Mori, H., Nakayama, Y. and Takahashi, M. 1989. Anti-plasmin Inhibitor. V. Structure of novel dimeric eckols isolated from the brown alga *Ecklonia kurome* OKAMURA. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 2438-2440.
- Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, Z., Mori, H., Nakayama, Y. and Takahashi, M. 1990. 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.
- Glombitza, K. W. and Koch, M. 1989. Secondary metabolites of pharmaceutical potential. In: *Algal and Cyanobacterial Biotechnology* (Cresswell, R.C., Rees, T.A., Shah, N., Eds.). *Longman Scientific & Technical.* pp. 161-238.
- Gonzalez, A. G., Darias, V. and Estevez, E. 1982. Chemotherapeutic activity of polyhalogenated terpenes from Spanish algae. *Planta Med.* 44: 44-46.
- Gschwind, M. and Huber, G. 1995. Apoptotic cell death induced by β -amyloid 1-42 peptide is cell type dependent. *J. Neurochem.* 65: 292-300.
- Gutteridge, J. M. C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarker of tissue damage. *Clin. Chem.* 41: 1819-1828.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1991. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *American J. of Med.* 91: 14-19.
- Hartmann, A., Herkomme,r K., Gluck M. and Speit G. 1995. DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with the single-cell gel test (Comet assay). *Environ. Mol.*

- Mutagen.* 25: 180-187.
- Hatano, T., R, Edamastu, A. Mori, Y. Fujita and E. Yasuhara. 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37: 2016-2021.
- Heo, S. J., Lee, K. W., Song, C. B. and Jeon, Y. J. 2003b. Antioxidant activity of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Algae* 18: 71-81.
- Heo, S. J., Jeon, Y. J., Lee J., Kim, H. T. and Lee, K. W. 2003a. Antioxidant effect of enzymatic hydrolyzate from a Kelp, *Ecklonia cava*. *Algae* 18: 341-347.
- Heo, S. J., Park, E. J., Lee, K. W. and Jeon, Y. J. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Biores. Tech.* 96: 1613-1623.
- Heo, S. J., Park, P. J., Park, E. J., Kim, S. K. and Jeon, Y. J. 2005. Antioxidant activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Ecklonia cava* by electron spin resonance spectrometry and comet assay. *Eur. Food Res. Technol.* 221 ; 41-47.
- Hirata, T., Tanaka, M., Ookie, M., Tsunomura, T. and Sakaguchi, M. 2000. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.* 12: 435-439. \
- Hiroishi, S., Sugie, K., Yoshida, T., morimoto, J., Taniguchi, Y., Imai, S. and Kurebayashi, J. 2001. Antitumor effects of *Marginisporium crassissimum* (Rhodophycere), a marine red alga.
- Hwang, Y. J., Noh, G. W. and Kim, S. H. 2003. Effect of *Inonotus Obliquos* Extracts on Proliferation and Caspase-3 Activity in Human Gastro-Intestinal Cancer Cell Lines. *Korean Nutri. Soc.* 36(1) : 18-23.
- Jaruga, E., Sokal, A., Chrul, S., Bartosz, Z. 1998. Apoptosis-independent alteration in membrane dynamics induced by curcumin. *Exp Cell Res*

245: 303-312.

- Jeon, K. I., Park, E. J., Park, H. R., Jeon, Y. J., Cha, S. H., and Lee, S. C. 2006. Antioxident Activity of Far-Infrared Radiated Rice Hull Extracts on Reactive Oxygen Species Scavenging and Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes. *J. Med. Food* 9(1) : 42-48.
- Jeong, Y. W., Kim, K. S., Oh, J. Y., Park, J. C., Lee, J. C., Yoo, K. J., Kim, J. W., Chang, S. J., Baek, W. K., Suh, S. I., Suh, M. H. and Cho, J. W. 2000. Chitosan-oligosaccharides Inhibits HL-60 Cell Growth through Induction of Apoptosis. *J. Chitin Chitosan*. 5(2) : 74-78.
- Jolles, B., Remington, M. and Andrews, P. S. 1963. Effects of sulphated degraded laminarin on experimental tumor growth. *Br. J. Cancer* 17: 109-115.
- Ju, E. M., Lee, S. E., Hwang, H. J., Kim, J. H. 2004. Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Life Sciences* 74: 1013-1026.
- Kahl, R. and Kappus, H. 1993. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196: 329-338.
- Kahl, R. 1994. Synthetic antioxidants: biochemical actions and interference with radiation, toxic compounds, chemical mutagens and chemical carcinogens. *Toxicology* 33: 185-228.
- Kamesaki, H. 1998. Mechanism involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int. J Hematol.* 68: 29-43.
- Kaneda T, Ando H. 1971. Component lipids of purple laver and their antioxidant activity. *Proc Int Seaweed Symp* 7: 553-557.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S. W., Zhang, R., Jung, M. S., Lee, Y. K., Kim, S. Y., Kim, H. S., Joo, H. G., Park, J. W., Ham, Y. M., Lee, N. H., Hyun, J. W. 2005. Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Letters* 579:

6295-6304.

- 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., Hyun, J. W. 2005. Triphlorethol-A from *Ecklonia cava* protects V79-4 lung fibroblast against hydrogen peroxide induced cell damage. *Free Radical Research* 39(8): 883-892.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S. W., Zhang, R., Jung, M. S., Ham, Y. M., Baik, J. S., Lee, N. H., Hyun, J. W. 2006. Cytoprotective Effect of Phloroglucinol on Oxidative Stress Induced Cell Damage via Catalase Activation. *J of Cellular Biochemistry* 97: 609-620.
- Karawita, R., Siriwardhana, N., Lee, K. W., Heo, M. S., Yeo, I. K., Lee, Y. D., Jeon, Y. J. 2005. Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *Eur Food Res technol* 220: 363-371.
- Kashiwagi, M., Mynderse, J. S., Moore, R. E and Norton, T. R. 1980. Antineoplastic evaluation of pacific basin marine algae. *J. Pharm. Sci.* 69: 735-738.
- Kassie, F., Parzefall, W. and Knasmuller, S. 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 463: 13-31.
- Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. 2000. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.* 256: 42-49.
- Kerr, J. F., Gobe, G. C., Winterford, C. M. and Harmon, B. V. 1995, Anatomical methods in cell death. In: L.M. Schwartz and B.A. Osborne, Editors, *Methods in Cell Biology*. V. Cell Death vol. 46, Academic, New York pp 1-27.
- Kim, J. J., Kim, S. J., Kim, S. H., Park, H. R. and Lee, S. C. 2006. Antioxident and Anticancer Activities of Extracts from *Styela clava* According to the Processing Methods and Solvents. *J. Korean Soc. Food*

- Sci. Nutr.* 35(3) 278–283.
- Kim, S. A., Kim, J., Woo, M. Y., Kwak, C. S., Lee, M. S. 2005. Antimutagenic and Cytotoxic Effects of Ethanol Extracts from Five Kinds of Seaweeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 34(4); 451–459.
- Kosovel, V., Avanzini, A., Scarcia, V. and Furlani, A. 1988. Algae as possible sources of antitumoral agents. Preliminary evaluation of the *in vitro* cytostatic activity of crude extracts. *Pharmacol. Res. Commun.* 20: 27–31.
- Kotake-Nara, E., Kushiro, M., Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K. and Nagao, A. 2001. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells *J. Nutr.* 131: 3303–3306.
- Kovatcheva, E. G., Koleva, I. I., Ilieva, M., Pavlov, A., Mincheva, M. and Konushlieva, M. 2001. Antioxidant activity of extracts from *Lavandula vera* MM cell cultures. *Food Chem.* 72: 295–300.
- Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Bast Jr, R. C., Gansier, T. S. and Holland, J. F. 2003. Cancer medicine, 6th ed. Hamiton, Ontario: American Cancer Society Inc. and B.C. Decker, Inc. *Cancer letters* 167: 145–150.
- Kuhnau, J. 1976. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 24: 117–191.
- Lee, C. H., Chung, M. C., Lee, H. J., Kho, Y. H. 2000. An apoptosis regulator isolated from *Petasites japonicum*. *Korean J Food Sci Technol* 32(2): 448–453.
- Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J. S., Jeong, H. S., Kim, J. H. 2003. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences* 73: 167–179.
- Lizard, G., Fournel, S., Genestier, L., Dhedin, N., Chaput, C., Flacher, M., Mutin, M., Panaye G. and Revillard, J. P. 1995. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in the cells undergoing apoptosis. *Cytometry* 21: 275–283.

- Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E. and Karube, I. A. 1997. comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 9: 29-35.
- Midgely, O. R. and Kerr, D. 1999. Colorectal cancer. *Lancet* 353: 391-399.
- Misra, H. P. and Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247:3170-3175.
- Mizukoshi, S., Matsuoka, S., Nakamura, K., Katou, H. and Noda, H. 1992. Search for bioactive substances from marine algae. *Bull. Faculty Biosources, Mie Univ.* 8: 27-34.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
- Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K. and Tanaka, R. 1996. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fish. Sci.* 62: 923-926.
- Nakayama, Y., Takahashi, M., Fukuyama, Y. and Kinzyo, Z. 1989. An anti-plasmin Inhibitor, eckol, isolated from the brown alga *Ecklonia kurome* OKAMURA. *Agric. Biol. Chem.* 63: 3025-3030.
- Nardella, A. Chaubet, F. Boisson-vidal, C. Blondin, C. Durand, P. and Jozefonvicz J. 1996. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr Res.* 289: 201-208.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani F. and Riccardi, C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139: 271-279.

- Nishino, H., Tsushima, M., Matsuno, T., Tanaka, Y., Okuzumi, J., Murakoshi, M., Satomi, Y., Takayasu, J., Tokuda, H., Nishino, A. and Iwashima, A. 1992. Anti-neoplastic effect of halocynthiaxanthin a metabolite of fucoxanthin. *Anticancer Drugs* 3:493-497
- Noda, H., Amano, H., Arashima, K., Hashimoto, S. and Nisizawa, K. 1989. antitumor activity of polysaccharides and lipids from marine algae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1265-1271.
- Olive, P. L., Banath, J. P., Durand, R. E., 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. *Radiat. Res.* 122, 86-94.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
- Okai, Y. and Okai, K. H. 1997. Potent anti-inflammatory activity of pheophytin a derived from edible green alga, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori). *Int. J. Immuno. pharmacol.* 19: 355-358.
- Oki, T., Masuda, M., Furuta, S., Nishibia, Y., Terahara, N. and Suda, I. 2002. Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. *J. Food Sci.* 67, 1752-1756.
- Okuzumi, J., Nishino, H., Murakoshi, M., Iwashima, A., Tanaka, Y., Yamane, T., Fujita, Y. and Takahashi, T. 1990. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. *Cancer Lett.* 55: 75-81.
- Park, J. H., Kang, K. C., Baek, S. B., Lee, Y. H., Rhee, K. S. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Kor J Food Sci Technol* 23: 256-261.
- Park, M. H., Oh, K. Y., Lee, B. W. 1998. Anti-cancer of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Food Sci Technol* 30(3); 702-708.
- Park, P. J., Heo, S. J., Park, E. J., Kim, S. K., Byun, H. G., Jeon, B. T. and

- Jeon, Y. J. 2005. Reactive Oxygen Scavenging Effect of Enzymatic Extracts from *Sargassum thunbergii*. *J. Agric. Food Chem.* 53 ; 6666-6672.
- Park, Y. K., Park, E., Kim, J. S. and Kang, M. H. 2003. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat. Res.* 529: 77-86.
- Ragan, M. A. and Glombitza, K. W. 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols: In: Round F. E. Chapman D. J. eds. *Progress in phycolgical Research 4*. Biopress, Bristol, England. pp. 129-241.
- Ruberto, G., Baratta, M. T., Biondi, D. M. and Amico, V. 2001. Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *J. Appl Phycol.* 13: 403-407.
- Ruperez, P., Ahrazem, O. and Leal, J. A. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 840-845.
- Senthilmohan, S. T., Zhang J. and Stanley, R. A. 2003. Effects of flavonoid extract Enzogenol with vitamin C on protein oxidation and DNA damage in older human subjects. *Nutr. Res.* 23: 1199-1210.
- Shim, J. S., Lee, H. J., Park, S. S., Cha, B. G., Chang, H. R. 2001. Curcumin-induced apoptosis of A-431 cells involves caspase-3 activation. *Biochem Mol Biol* 34: 189-193.
- Singh, N. P. Graham, M. M. Singh, V. and Khan, A. 1995. Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of X-rays. *Int. Radiat. Biol.* 68: 563-569.
- Siriwardhana, N., Lee, K. W., Kim, S. H. Ha, J. W. and Jeon, Y. J. 2003. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci. Tech. Int.* 9: 339-346.
- Siriwardhana, N., Lee, K. W., Kim, S. H., Ha, J. W., Park G. T. and Jeon, Y.

- J. 2004. Lipid peroxidation inhibitory effects of *Hizikia fusiformis* methanolic extract on fish oil and linoleic acid. *Food Sci. Tech. Int.* 10: 65-72.
- Siriwardhana, N., Lee, K. W., Jeon, Y. J. 2005. Radical Scavenging Potential of Hydrophilic Phlorotannins of *Hizikia fusiformis*. *Algae*. 20(1): 69-75.
- Siriwardhana, N., Jeon, Y. J., Kim, S. H., Ha, J. H., Heo, S. J., Lee, K. W. 2004. Enzymatic Hydrolysis for Effective Extraction of Antioxidative Compounds from *Hizikia fusiformis*. *Algae*. 19(1): 59-68.
- Steinberg, P. D. 1992. Geographical variation in the interaction between marine herbivores and brown algal secondary metabolites. In: V.J. Paul, Editor, *Ecological Roles of Marine Natural Products*, Cornell Univ. Press, Ithaca pp. 51-92.
- Steller H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449.
- Tanaka, M., C. W. Kuei, Y. Nagashima and T. Taguchi. 1998. Application of antioxidative maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1409-1414.
- Targett, M., Boettcher, A., Targett, E. and Vrolijk, H. 1995. Tropical marine herbivore assimilation of phenolic-rich plants. *Oecologia* 103: 170-179.
- Tutour, B. L., Benslimane, F., Gouleau, M. P., Gouygou, J. P., Saadan, B. and Quemeneur, F. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himantalia elongata*, *Fuecus vesiculosus*, *Fuecus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.* 10: 121-129.
- Wang H, Joseph j. 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27: 612-616.
- Wang, X. W., Zhan, Q., Coursen, J. D., Khan, M. A., Kontny, H. U., Yu, L., Hollander, M. C., O'Connor, P. M., Fornace A. J. and Harris, C. C. 1999. GADD45 induction of a G₂/M cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A. 96: 3706-3711.
- Wyllie, A. H. 1985. The biology of cell death in tumors. *Anticancer Res.* 5: 131-142.
- Xu, N., Fan X., Yan, X., Li, X., Niu, R. and Tseng, C.K. 2003. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. *Phytochemistry.* 62: 1221-1224.
- Xue, C. H., Fang, Y., Lin, H., Chen, L., Li, Z. J., Deng, D. and Lu, C. X. 2001. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *J. Appl. Phycol.* 13: 67-70.
- Yamamoto, I., Takahashi, M., Tamura, E. and Maruyama, M. 1982. Antitumor activity of crude extracts from edible marine algae against L-1219 leukemia. *Bot. Mar.* 25: 455-457.
- Yamamoto, I., Nagumo, T., Yagi, K., Tominaga, H. and Aoki, M. 1974. Antitumor effect of seaweeds. *Jpn. J. Exp. Med.* 44: 543-546
- Yan, X., Chuda, Y., Suzuki, M. and Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hizikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 63: 605-607.
- Yan, X., Nagata T. and Fan, X. 1998. Antioxidant activities in some common seaweeds. *Plant. Foods Human. Nutr.* 52: 253-262.
- Yan XJ, Li XC, Zhou CX, Fan X. 1996. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. *J Appl Phycol* 8: 201-203.
- Yang, L L., Lee, C. Y. and Yen, K. Y. 2000. Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. *Cancer letter* 157: 65-75.
- Yen, G. C., Chen, H. Y. and Peng, H. H. 2001. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem. Toxicol.* 39: 1045-1053.
- Zhang, H., Spitz, M. R., Tomlinson, G. E., Schabath, M. B., Minna, J. D., Wu, X., 2002. Modification of lung cancer susceptibility by green tea extract

as measured by the Comet assay. *Cancer Detect. Prev.* 26, 411-419.

Zhu, C. Y. and Loft, S. 2001. Effects of Brussels sprout extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.* 39: 1191-1197.



감사의 글

석사학위를 이수하고 직장생활을 10여년간 하면서 학위의 중요성을 느끼게 되었는데 때마침 제주대학교에 계시는 선배인 전유진 교수님의 조언에 힘을 얻어 박사과정에 진학하게 되었고, 여러 가지 어려운 여건 속에서도 학업을 포기하지 않게 이끌어 주시고 또한 이 논문이 나오기까지 물심양면으로 많은 도움을 주신 전유진 교수님께 머리숙여 감사드립니다. 반듯한 논문이 되도록 많은 조언을 해주시고 도움을 주신 심사위원장 이기완 교수님께 특히 감사드리며 또한 심사를 맡아주신 허문수 교수님, 이제희 교수님 그리고 김소미 교수님께도 감사드립니다. 송춘복 교수님과 지금은 교환교수로 가 계신 여인규 교수님께도 감사드립니다.

인생선배이자 입학동기인 진창남과장님과 바이넥스의 김원석 선배님께도 감사드립니다. 제주도에 갈 때마다 자리를 같이해준 오영빈 후배님 그리고 이 논문이 완성될 때까지 실험과 관련하여 많은 도움을 준 허수진 후배님과 김길남 후배님께 고마운 마음을 전합니다. 마지막 단계에서 많은 편의를 제공해 주고 고생을 해준 차선희 후배님께도 고마운 마음을 전합니다. 이 밖에도 실험실원 안긴내, 이승홍, 강성명, 고석천, 김대승, 이지혁, 조은산, 김아름다슬 및 Yasantha등에게 고마운 마음을 전합니다. 사장님을 비롯한 직원 여러분 그리고 저를 알고 있는 모든 선배님과 후배님, 친구들에게 고마운 마음을 전합니다.

오늘의 나를 있게 해주신 아버지, 어머님께 머리숙여 감사드립니다. 또한 아이들을 키워주시느라 늘 고생하셨던 장인어른, 장모님께도 머리숙여 감사드립니다. 누나와 두 여동생과 매제들에게도 고마운 마음을 전하고, 처가식구들에게 고마움을 전합니다.

끝으로 늘 옆에서 힘든 직장생활에도 불구하고 진심으로 따뜻한 내조를 아끼지 않은 아내 미숙과 장난꾸러기 아들 혁진, 귀여운 우리 공주님 소연이에게 부족하지만 작은 결실인 이 논문을 바칩니다. 나와 인연이 있는 모든 분들께 다시 한번 감사드리며 늘 건강하고 행복하기를 바랍니다.