



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](#)

2023년 2월
박사학위논문

모자반류 유래 천연물에 의한 구강암세포의 세포사멸 효과

조선대학교 대학원

치의학과

정 서 윤

모자반류 유래 천연물에 의한 구강암세포의 세포사멸 효과

Induction of apoptotic pathway by *Sargassum* spp. extracts in
oral cancer cells

2023년 2월 24일

조선대학교 대학원

치의학과

정 서 윤

모자반류 유래 천연물에 의한 구강암세포의 세포사멸 효과

지도교수 김 춘 성

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2022년 10월

조선대학교 대학원

치의학과

정 서 윤

정서윤의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이숙영 (인)

위원 조선대학교 교수 최철웅 (인)

위원 초당대학교 교수 최미숙 (인)

위원 경운대학교 교수 박보람 (인)

위원 조선대학교 교수 김춘성 (인)

2023년 1월

조선대학교 대학원

목 차

List of Table	iii
List of Figures	iv
List of Abbreviations	vi
초 록	vii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
1.1. 시료	4
1.2. 시약 및 기기	5
2. 실험 방법	7
2.1. 유해물질 분석을 위한 시료 조제 및 분석 조건	7
2.1.1. 수은분석을 위한 시료 조제 및 분석 조건	7
2.1.2. 중금속 분석을 위한 시료 조제 및 분석 조건	8
2.1.3. 비소화학종 분리분석을 위한 시료 조제 및 분석 조건	10
2.2. 모자반류 메탄올추출물 제조 방법	13
2.3. 총 폴리페놀 함량 분석	13
2.4. 총 플라보노이드 함량 분석	14
2.5. 항암활성 분석	15
2.5.1. 세포배양	15
2.5.2. 세포 독성 분석	15
2.5.3. Live & Dead 분석	16
2.5.4. Hematoxylin & Eosin assay	16
2.5.5. Colony formation	17
2.5.6. Wound-healing assay	17
2.5.7. DAPI stain	18

2.5.8. 단백질 면역 염색법	18
2.5.9. 실험자료의 통계학적 검정	19
III. 결과	20
1. 모자반류 유해물질 함량	20
1.1. 모자반류의 중금속 함량	20
1.2. 비소화학종 분리분석	22
2. 모자반류 추출 수율 비교	24
3. 모자반류 총 폴리페놀 함량	26
4. 모자반류 총 플라보노이드 함량	28
5. 모자반류 추출물의 항암활성	30
5.1. 구강암세포 YD-9에 대한 모자반류 추출물의 세포 생존율 분석	30
5.2. 정상세포 PDL에 대한 모자반류 추출물의 세포 생존율 분석	32
6. 팍배기모자반 추출물의 구강암세포 YD-9의 사멸 효과	34
6.1. 구강암세포 YD-9의 세포 독성 효과	34
6.2. 구강암세포 YD-9의 형태학적 변화	36
6.3. 구강암세포 YD-9의 콜로니 형성 억제 효과	38
6.4. 구강암세포 YD-9의 wound- healing 억제 효과	40
6.5. 구강암세포 YD-9의 핵 형태학적 변화	42
6.6. 구강암세포 YD-9의 세포사멸 유도	44
6.7. 구강암세포 YD-9의 세포사멸 기전 분석	46
IV. 고찰	48
V. 결론	53
VI. 참고문헌	55
감사의 글	65

List of Tables

Table 1. Information on <i>Sargassum</i> spp.	4
Table 2. Content analysis of 9 heavy metal in <i>Sargassum</i> spp.	21
Table 3. Analysis of inorganic and organic arsenic content in <i>Sargassum</i> spp.	23
Table 4. The comparison of methanol extract yield in <i>Sargassum</i> spp.	25

List of Figures

Figure 1. Mercury analysis conditions and calibration curve for mercury standard substance	7
Figure 2. Heavy metal analysis condition and calibration curves for heavy metal standard substances	8
Figure 3. Calculation formula of arsenic content and Structure of arsenic species	11
Figure 4. Arsenic species analysis conditions and calibration curves for arsenic standard substances	12
Figure 5. Calibration curve for total polyphenol standard(gallic acid)	13
Figure 6. Calibration curve for total flavonoid standard(quercetin)	14
Figure 7. Total phenolic content of <i>Sargassum</i> spp.	27
Figure 8. Total flavonoid content of <i>Sargassum</i> spp.	29
Figure 9. Cell viability of YD-9 cells after treatment with <i>Sargassum</i> spp. ·	31
Figure 10. Cell viability of PDL cells after treatment with <i>Sargassum</i> spp. ·	33
Figure 11. <i>S. siliquastrum</i> methanol extract exhibits cytotoxicity in YD-9 cells.	35
Figure 12. <i>S. siliquastrum</i> methanol extract changes the cell morphology of YD-9 cells.	37
Figure 13. Methanol extract of <i>S. siliquastrum</i> inhibits colony formation of YD-9 cells.	39
Figure 14. Methanol extract from <i>S. siliquastrum</i> inhibits MMP-2/9 of YD-9 cells and wound-healing.	41
Figure 15. <i>S. siliquastrum</i> methanol extract changes the nuclear morphology from of YD-9 cells.	43
Figure 16. <i>S. siliquastrum</i> methanol extract from the regulation controls the activity of the protein in YD-9 cells.	45
Figure 17. <i>S. siliquastrum</i> methanol extract affects PI3K and Akt	

expression in YD-9 cells. 47

List of Abbreviations

Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninic acid protein assay
Bcl-2	Bcell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma extra-large
DAPI	4',6'-diamidino-2'-phenylindole dihydrochlorid
DIW	Delonized Water
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
FBS	Fetal bovine serum
PDL	Periodontal ligament
MEM	Minimum essential medium
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2
MMP-9	Matrix metalloproteinase-9
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RPMI-1640	Poswell Park Memorial Institute 1640
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis
TBS-T	Tris-buffered saling with Tween 20

ABSTRACT

Induction of apoptotic pathway by *Sargassum* spp. extracts in oral cancer cells

Jung Seo Yun

Advisor: Prof. Kim Chun Sung, Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

The main cause of oral squamous cell carcinoma with smoking, drinking, eating spicy food that irritates the tongue lining. Treatment options for oral squamous cell carcinoma today are surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Among seaweeds such as the *Sargassum* spp., it was reported that concentration-dependent proliferation was suppressed for human liver cancer, colon cancer, cervical cancer, and gastric cancer cells.

The *Sargassum* spp. used in this study were *Sargassum confusum* (*S. confusum*), *Sargassum macrocarpum* (*S. macrocarpum*), *Sargassum siliquastrum* (*S. siliquastrum*), *Sargassum thunbergii* (*S. thunbergii*), *Sargassum horneri* (*S. horneri*) and *Sargassum fulvellum* (*S. fulvellum*) and oral cancer cell YD-9 and normal oral cell PDL were used as cell lines. 6 spp. of *Sargassum* were extracted with methanol, and as a result of analyzing the yield, *S. fulvellum* was the highest at 9.8%. In addition, the total polyphenol content was high in *S. macrocarpum* (250.39 mg GAE/mL) and *S. siliquastrum* (223.982 mg GAE/mL), and the total flavonoid content was also high in *S. macrocarpum* (27.449 mg QE/mL) and *S. siliquastrum*

(165.366 mg QE/mL) was high. Oral cancer cell (YD-9) and normal cell (PDL) were treated with the extracts from 6 spp. of *Sargassum*.

As a result of analyzing cytotoxicity and cell viability, YD-9 cells were inhibited by 80% at a concentration of 400 ug/mL, and normal cell viability was over 90% in all concentration. Based on the above experimental results, an additional experiment was performed by finally selecting *S. siliquastrum* from 6 spp. of *Sargassum* was finally selected. The apoptosis mechanism of *S. siliquastrum* extract (SSE) against oral cancer cells was verified by MTT assay, live and dead assay, DAPI staining, H&E staining, colony formation, wound healing assay and immunoblotting. As a result of analyzing the cytotoxic effect of SSE through Live & Dead assay, significant results were confirmed at concentrations of 200 and 400 ug/mL. The result of analyzing the cell morphological changes of oral cancer cells by H & E staining was confirmed that the cytoplasm was condensed in the concentration range of 100 to 400 ug/mL. In addition, colony formation and cell proliferation of YD-9 cell were decreased at the concentration of SSE of 50 and 100 ug/mL. As a result of analyzing cancer cell metastasis potential through wound-healing assay, YD-9 cells lost wound-healing activity at 50 and 100 ug/mL of SSE, and it was confirmed that this was mediated through inhibition of MMP-2 and MMP-9 activity. In addition, as the concentration of SSE increased in YD-9 cells, many nuclear changes such as cytoplasmic condensation and nuclear fragmentation were observed, indicating that apoptosis was induced. The SSE affected the activation of PARP following protein division of caspase-3 against YD-9 cells. SSE increased the expression of pro-apoptotic protein Bax and anti-apoptotic protein Bcl-2 decreased. Thereafter, decreased MMP-2 and MMP-9 through phosphorylation of PI3K/Akt. As a result, it was confirmed that the *S. siliquastrum* extract inhibits cell growth and induces cell death in

YD-9, an oral squamous cell carcinoma cell, through an endogenous apoptosis pathway.

The above research results suggest that it is necessary to separate active substances from *S. siliquastrum* extract through additional research, and that *S. siliquastrum* can be used as a natural material to inhibit the proliferation of oral cancer cells.

KEY WORDS: *Sargassum* spp., *Sargassum siliquastrum*, Squamous cell carcinoma, Apoptosis, Anti-cancer, Cell death, Cancer cells

I. 서론

구강암은 혀, 치은, 협점막 등 구강 내 발생하는 종양을 통칭한 것으로, 담배 및 알코올 남용이 주 발병 원인이며, 이외에도 Human papilloma virus (HPV) 감염, 비위생적인 구강 상태 및 염색체 변이로 인해 발병한다[1]. 구강암의 80% 이상은 편평상피세포암으로 알려져 있다[2]. 편평상피세포 암종은 임파선 전이 능력이 뛰어나 쉽게 인접 조직으로 침윤하므로 5년 생존율이 30% 이하로 그 예후가 매우 좋지 않다[3]. 구강암 수술 후 발생하는 저작, 발음 등 기능적 장애 및 안모 변형은 심미적 손상을 유발하여 건강한 삶을 방해하며, 사회·경제적 부담을 야기한다[4]. 구강암 치료 요법에는 수술 요법, 방사선 요법과 항암제 요법이 있으며, 단독으로 사용되거나 두 가지 요법 이상이 병행되어 사용된다. 기존 1세대 세포독성항암제는 빠르게 분열하는 암세포의 성질을 표적 한 것으로, 암세포의 세포사멸을 효과적으로 유도하였으나, 정상세포의 성장도 억제함으로써 탈모와 위장장애 같은 부작용을 초래한다. 2세대 표적항암제는 암의 분자생물학적 특성을 규명하여 암세포만의 특정 기전을 표적 한 것으로 1세대 항암제의 부작용을 최소화하였으나, 내성에 대한 문제점이 유발되어 1세대 항암제 사용이 제한된 환자의 경우 2세대 항암제가 제한적으로 사용된다[5]. 따라서, 정상세포에는 영향을 주지 않으면서 암세포의 성질을 효과적으로 억제하고, 부작용이 적은 세포독성 항암 소재를 탐색하는 것은 암 치료제 개발의 매우 중요한 과제이다.

세포사멸(apoptosis)은 유전학적으로 프로그램된 염증반응을 일으키지 않는 세포사의 한 형태를 의미한다. 1972년 Kerr, Wyllie 및 Currie에 의해 논문에서 처음 사용되었으며, 세포사멸의 개념 및 형태학적 현상이 보고되었다[6]. 세포사멸은 조직 내 일정한 세포 수, 면역체계의 적절한 발달 및 기능, 배아 발달 등 정상적인 생리활성을 위한 중요한 구성 요소로 간주하였다[7]. 따라서 부적절한 세포사멸은 질병을 유발하게 되며, 과도한 세포사멸은 신경퇴행성 질환, 허혈성 손상을 야기하고, 불충분한 세포사멸은 암과 같은 질환을 야기한다[8]. 세포의 암화(carcinogenesis)는 세포사멸 회피기전을 통해 세포사멸에

대한 저항성을 획득하여 밀집-의존도 상관없이 과다 증식하며, 다양한 기질 분해 효소 활성을 통해 인접 조직으로 침윤하여 전이되면서 유발된다[9]. 따라서, 세포 성장 주기를 정지하거나 세포사멸 기전 활성화는 항암제의 중요한 기전이며 지표로 간주하고 있다.

해조류는 생태학적으로 크게 거대조류(macro algae)와 미세조류(micro algae)로 분류되며, 거대조류는 엽록소에 따라 갈조류, 녹조류, 홍조류로 분류된다[10]. 이들은 일반적으로 칼슘, 마그네슘, 무기질이 다량 함유되어있어 건강식품으로 알려져 있다[11]. 해양에 서식하는 해조류는 바다의 깊이나 색소의 조성과 같은 특수한 서식 환경으로 인해 이들로부터 유용한 분자를 탐색하기 위한 연구 소재에 주목하고 있다[9].

모자반(*Sargassum*)은 갈조식물문에 속하는 대표적인 갈조식물로 열대 및 아열대 해안 지역에서 흔히 볼 수 있으며, 약 400종이 넘는 종이 분포하고 있다[12]. 참모자반, 팽생이모자반, 큰열매모자반, 파배기모자반, 알송이모자반, 지충이모자반을 포함한 18종이 연구 소재로 주로 이용되었으며, 이는 오랫동안 많은 국가에서 식품 또는 전통 의학 소재로 사용되어온 종이다[13]. 모자반은 테르페노이드(terpenoid)[14], 메로테르페노이드(meroterpenoids)[15], 플라보노이드(flavonoid)[16], 황산화 다당류[17], 폴리페놀(polyphenol)[18], 플로로탄닌(phlorotannin)[19] 등 생체 활성 대사 산물이 다량 함유되어있어 항염증[20-22], 항바이러스[23], 항박테리아[24] 및 멜라닌 생성 억제[25] 효능뿐만 아니라 바이오 연료[26], 기능성 식품, 제약 및 화장품 산업에서도 다양하게 응용되고 있다. 모자반의 대표적인 유효성분인 메로테르페노이드(meroterpenoids)는 비타민 E와 구조적으로 매우 밀접하여 비타민 E와 유사한 항산화 및 항암 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며[27], 사가크로마놀(sargachromanol)은 NF- κ B 및 MAPK 신호전달 체계 활성화 억제를 통해 파골세포 생성을 억제하며, 진피 섬유아세포에서 자외선에 의한 reactive oxygen species (ROS), matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성을 억제하여 피부 노화를 예방한다고 보고되어 있다[28]. 또한 모자반에 다량 함유된 저분자(low molecular weight) 후코이단은 짧은 길이로 인해 생체 흡수율이 높아 고분자의 후코이단에 비해 빠른 약리효과를 보인다[29]. 현재까지 모자반은 황산화[19,30,31],

항염증[20,22,32], 항세균[24], 항아토피[33], 항노화[34], 항비만[35,36], 간보호
 활성[18] 등의 다양한 생리활성 기능이 보고되었으며, 암세포에 대한 연구로
 Bae[37]는 인체 간암 세포인 HepG2, 대장암 세포인 HT-29, 자궁경부암 세포
 인 HeLa 세포를 이용하여 모자반 추출물 속에 DPPH 소거능을 가진 물질이
 존재하고 있으며, 항발암 활성을 설명하는데 그 기초 배경이 될 것임을 보고
 한 바 있다. 또한 Choi 등[38]은 모자반 추출물을 인체 결장암 세포보다 위암
 세포에 처리했을 때 농도 의존적으로 증식을 억제하였다고 보고하였으며,
 Jonathan 등[39]은 MDA-MB-231 및 MCF-7 세포에 대하여 모자반 추출물
 이 항증식 효과를 가지고 있다고 보고함으로써 모자반 추출물이 다양한 암세
 포의 증식 억제에 영향을 미친다고 보고하였다. 하지만 모자반에 대한 다양
 한 기능성 및 성분 연구가 수행되었음에도 불구하고 구강암에 대한 약리효과
 는 아직 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 구강암에 대한 모자반류의 항암 효능을 평가하기 위해, 구강
 편평상피암 세포 YD-9에서 알송이모자반, 큰열매모자반, 파패기모자반, 지충
 이모자반, 팽생이모자반, 참모자반의 항암 활성을 평가하고 그 기전을 규명함
 으로써 정상세포에는 영향을 주지 않으며, 구강암세포의 성장을 유의적으로
 억제하고 부작용을 최소화 할 수 있는 항암제 개발을 위한 유효소재를 발굴
 하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1.1. 시료

알송이모자반(*Sargassum confusum*), 큰열매모자반(*Sargassum macrocarpum*), 파배기모자반(*Sargassum siliquastrum*), 지충이모자반(*Sargassum thunbergii*)은 2017년 파라제주를 통해 구입하였다. 팽생이모자반(*Sargassum horneri*)은 2017년 전남 완도에서 구입하였고, 참모자반(*Sargassum fulvellum*)은 2022년 전남 완도에서 구입하였다. 각 원물은 구입 후 즉시 민물에 세척하여 염분을 최대한 제거한 후 60 °C에서 48시간 열풍건조하여 분쇄 후 냉장보관 하였다. 6종 모자반 시료의 학명, 구입처, 구입일을 Table 1에 정리하여 나타내었다.

Table 1. Information on *Sargassum* spp.

분류군	Scientific Name	Korea Name	Extraction	Purchase	Sampling Date
	<i>Sargassum confusum</i>	알송이모자반		파라제주	2017.04.10
	<i>Sargassum macrocarpum</i>	큰열매모자반		파라제주	2017.02.26
갈조류	<i>Sargassum siliquastrum</i>	파배기모자반	Methanol	파라제주	2017.02.26
	<i>Sargassum thunbergii</i>	지충이모자반	40°C, 2hr	파라제주	2017.02.26
	<i>Sargassum horneri</i>	팽생이모자반		완도	2017.12
	<i>Sargassum fulvellum</i>	참모자반		완도	2022.02.21

1.2. 시약 및 기기

실험에 사용한 모든 시약과 용매는 특급시약(extra pure grade)과 HPLC급으로 구입하였다. 중금속 분석을 위해 수은 표준물질인 European Reference Materials (ERM)-EC681K (Geel, Antwerpen, Belgium)과 ICP-MS Multi-element Calibration Standard 2A은 Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, CA, USA)에서 구입하였다. 총 비소 분석을 위해 비소 표준물질인 Arsentie [As(III)], Arsenate [As(V)], Cacodylic acid (DMA), Arsenobetaine (AsB)은 Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, monomethyl arsonic acid (MMA)는 Santa cruz (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. 중금속 분석 전처리시 사용되는 69 % Nitric acid는 Merck (Branchburg, NJ, USA)에서 구입하였고, 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 분석을 위해 Gallic acid, Folin-Ciocalteu's reagent, Sodium carbonate, Quercetin, Aluminium chloride는 Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 구강암세포의 생존율을 확인하기 위한 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)는 Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Colony formation을 위한 Crystal violet은 Junsei chemical co., (Chuo-ku, Tokyo, Japan)에서 구입하였고, Live & Dead Cell Imaging Kit (488/570)는 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. H & E 염색시약은 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. Phospho-PI3 Kinase p85/55 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 제외한 모든 1차 항체 MMP-2, MMP-9, Caspase-3, Caspase-9, PARP, Bcl-2, Bax, β -actin, PI3 Kinase p85, AKT, Phospho AKT는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Rabbit anti-mouse IgG은 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였으며, Mouse anti-rabbit IgG은 Santa cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. 세포 배양에 필요한 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 penicillin/streptomycin solution은 WelGene (Daegu, Republic of Korea)에서 구입하였

으며, Fetal bovine serum (FBS)은 ATLAS Biologicals (Fort collins, CO, USA)에서 구입하였다.

모자반류 내 수은분석을 위해 DMA-80 evo (Milestone S&T, Seoul, Republic of Korea) 기기를 이용하여 수은 함량 분석을 하였으며, 수은을 제외한 8종의 중금속 함량 분석은 Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) 7900 (Agilent technology, Santa Clara, CA, USA) 기기를 사용하여 분석하였다. 총 비소의 무기비소와 유기비소 분리분석을 위해 ICP-MS에 liquid chromatography (LC, Agilent technology, Santa Clara, CA, USA)를 연결하여 분석하였다. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 SpectraMax[®] ABS Plus (Molecular devices, CA, USA) 기기를 사용하여 분석하였다.

2. 실험 방법

2.1. 유해물질 분석을 위한 시료 조제 및 분석 조건

2.1.1. 수은분석을 위한 시료 조제 및 분석 조건

모자반류의 수은분석을 위해 0.05 g 건조분말을 이용하였으며, 시료의 수은 함량은 ERM-EC681K으로 표준검량곡선을 작성하고 mg/kg으로 나타내었다 (Fig. 1).

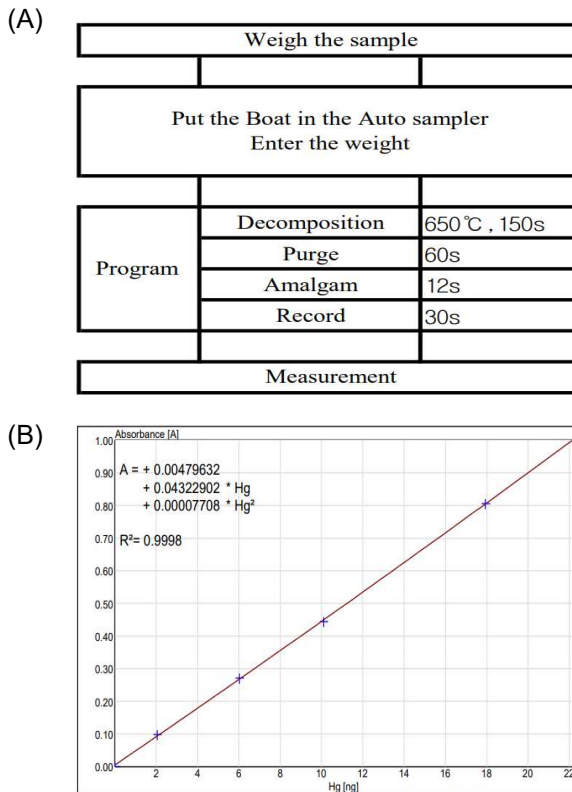


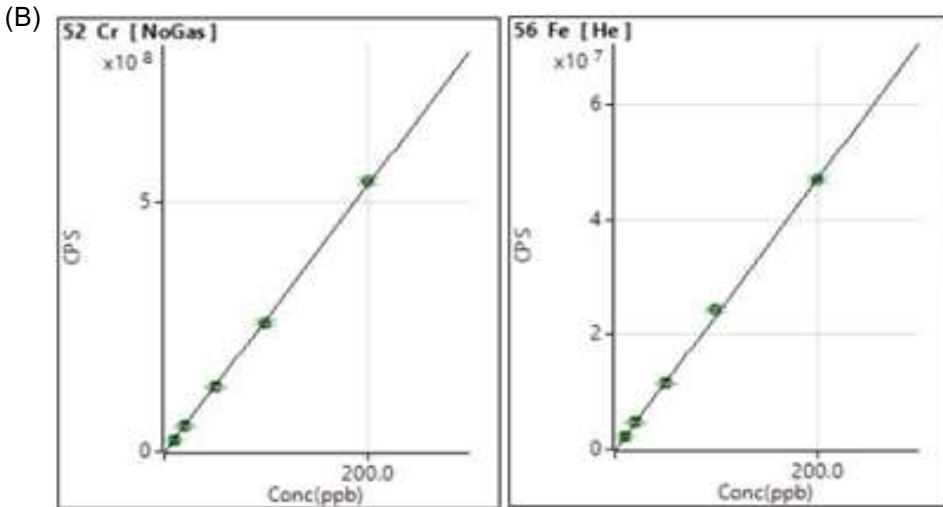
Figure 1. Mercury analysis conditions and calibration curve for mercury standard substance (A) Mercury analysis conditions, (B) Calibration curve for mercury standard substance

2.1.2. 중금속 분석을 위한 시료 조제 및 분석 조건

모자반류의 중금속(Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Pb) 분석은 식품공전 중금속 분석법 실무해설서에 따라 수행되었다. 모자반류 6종의 시료 0.2 g 에 69 % HNO₃ 4 mL을 가한 다음 초고압극초단파분해장치(OMC-300, Ctrl-M Scientific, USA)를 사용하여 전처리한 후, 185 mm filter paper로 여과하여 DIW로 최종 용량이 50 mL가 되도록 정용한 것을 분석 용액으로 사용하였다. 최종 분석 용액은 0.45 uM syringe filter로 여과 후 분석에 이용하였다. 각 중금속 표준물질은 ICP-MS Multi-element Calibration Standard 2A 10 ug/mL를 5 % HNO₃ 에 10, 20, 50, 100, 200 ppb의 농도로 희석하여 표준검량곡선을 작성하였다(Fig. 2).

(A)

Parameter	Conditions	
Instrument	Agilent Technologies 7900 ICP-MS	
RF power	Forward	1.55KW
	Plasma Ar	15.0 L/min
Gas flow rate	Nebulizer Ar	0.7 L/min
	Auxiliary Ar	0.9 L/min
	Acquisition replicates / total acquisition time	3 times / 68 sec



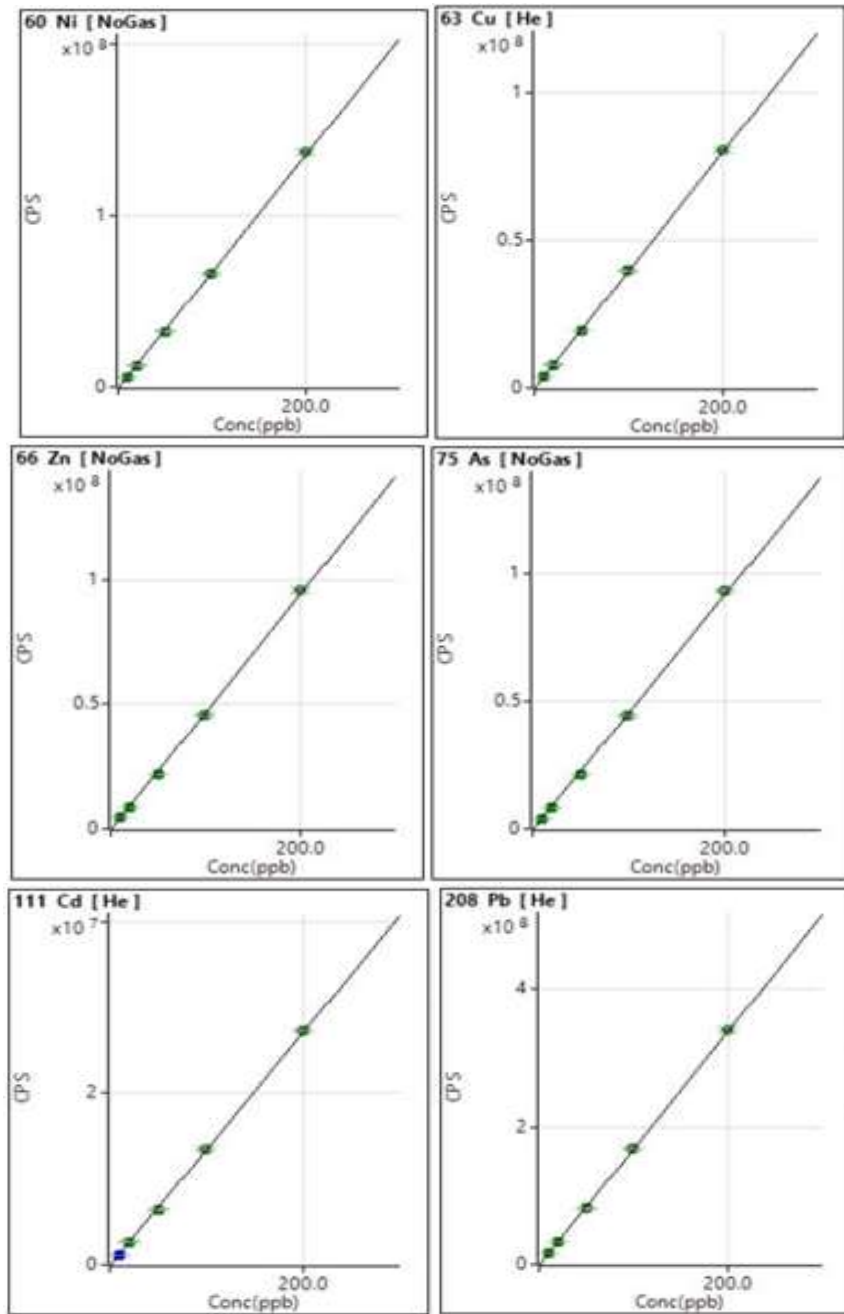


Figure 2. Heavy metal analysis conditions and calibration curves for heavy metal standard substances (A) Heavy metal analysis conditions, (B) Calibration curves for heavy metal standard substances

2.1.3. 비소화학종 분리분석을 위한 시료 조제 및 분석 조건

모자반류의 총비소 중 무기비소와 유기비소의 분리분석을 위해 시료 1 g에 1 % HNO₃ 5 mL을 넣은 후 90 °C에서 90분간 중탕 추출하였다. DIW로 25 mL 정용 후 3,000 RPM으로 10분간 원심분리 후 상층액을 적당히 취하여 다시 10분간 원심분리하였다. 상층액을 0.45 uM syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였다. 무기비소 표준물질은 Arsenate [As(V)]와 Arsenite [As(III)]을 사용하였으며, 유기비소 표준물질은 Monomethyl arsonic acid (MMA), Cacodylic acid (DMA)와 Arsenobetaine (AsB)을 사용하였다. 각 표준물질은 1,000ppm으로 맞춰 혼합하여 표준검량곡선을 작성하였다(Fig. 4). 무기비소 및 유기비소 함량 계산은 peak 면적을 검량선에 적용하여 As (III), As (V), MMA, DMA, AsB의 농도를 구하고 다음 식에 따라 모자반류 6종의 각 비소 함량을 계산하였다(Fig. 3).

(A) The content of Arsenic (mg/kg) = $A * V/B * 1/1000 * C$

A: Concentration of Arsenic (ug/L)

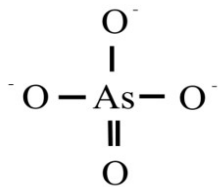
B: Mount of sample (g)

V: Volume of extraction solvent (mL)

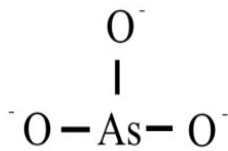
C: Additional dilution multiple

The content of Inorganic Arsenic (mg/kg) = As(III) + As (V)

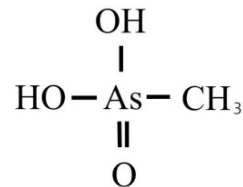
(B)



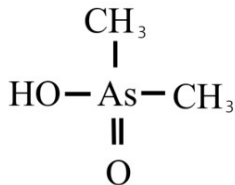
arsenate, As(V)



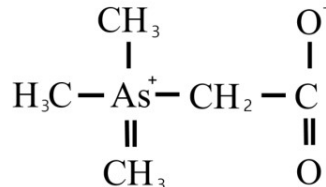
arsenite, As(III)



Monomethyl arsenate, MMA



Dimethyl Arsenate, (DMA)



Arsenobetaine, (AsB)

Figure 3. Calculation formula of arsenic content and structure of arsenic species

(A) Calculation formula of arsenic content, (B) Structure of arsenic species

Parameter	setting
Solvent A	Methanol
	Sodium 1-vutane sulfonate
	Malonic acid
	Tetramethyl ammonium hydroxide pentahydrate 10% Nitric acid
Column	Osaka Soda, Japan Capcell pack C18, 4.6mm I.D. x 250mm, 5um
Flow Rate	0.75 mL/min
Autosampler Flush Solvent	20% Methanol
Sample Injection Volume	50 uL
Total Analysis Time	20 min

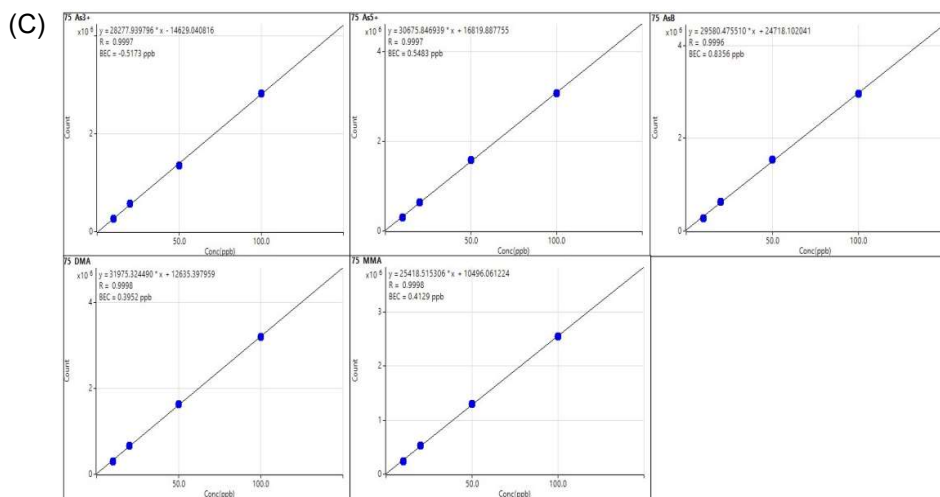
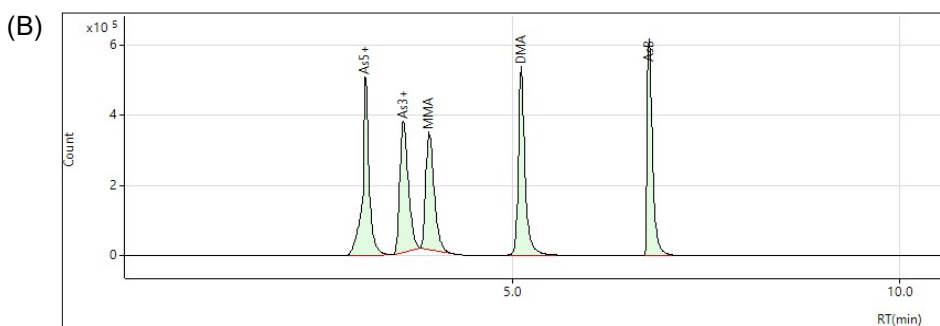


Figure 4. Arsenic species analysis conditions and calibration curves for arsenic standard substances (A) Arsenic species analysis conditions, (B) Calibration curves peak, (C) Calibration curves for arsenic standard substances

2.2. 모자반류 메탄올추출물 제조 방법

50 g 모자반의 20배수 메탄올을 가하여 40 °C에서 2시간 동안 환류추출하였다. 여과지를 이용하여 수용성을 분리한 후 회전감압농축기(Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하여 추출액을 농축하였다. 이후, -80°C 동결건조를 사용하여 48시간 동안 건조한 후 최종 추출분말을 획득하였다.

2.3. 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu's reagent 방법을 이용하여 분석하였다. 모자반류 메탄올추출물 200 ug/mL의 10 uL, Folin-Ciocalteu's reagent의 10 uL, DIW의 130 uL와 10 %, Na₂CO₃의 100 uL을 첨가하여 실온에서 90분간 반응시킨 후 SpectraMax[®] ABS Plus를 이용하여 750 nM에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 분석을 위한 표준물질은 Galic acid를 25, 50, 75, 100 ug/mL 농도로 희석하여 표준검량곡선을 작성하였으며 mg GAE/mL로 나타내었다 (Fig. 5).

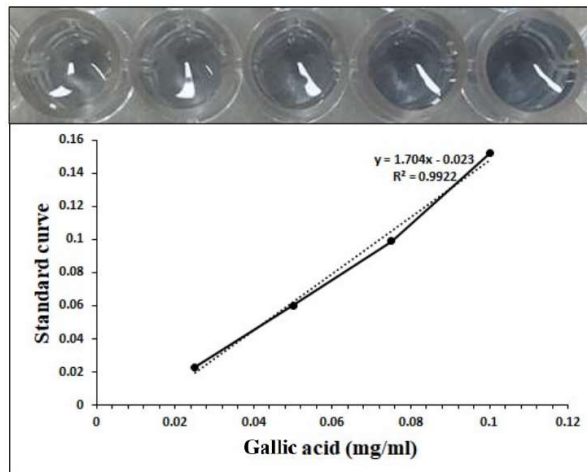


Figure 5. Calibration curve for total polyphenol standard(gallic acid)

2.4. 총 플라보노이드 함량 분석

총 플라보노이드 함량 분석을 위해 모자반류 메탄올추출물 200 ug/mL의 200 uL, Ethanol의 800 uL와 2 % AlCl₃ 의 1000 uL을 혼합한 뒤 실온에서 60분 동안 반응시킨 후 SpectraMax[®] ABS Plus를 이용하여 415 nM에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 분석을 위한 표준물질은 Quercetin를 10, 25, 50, 75, 100 ug/mL 농도로 희석하여 표준검량곡선을 작성하였으며 mg QE/mL로 나타내었다(Fig. 6).

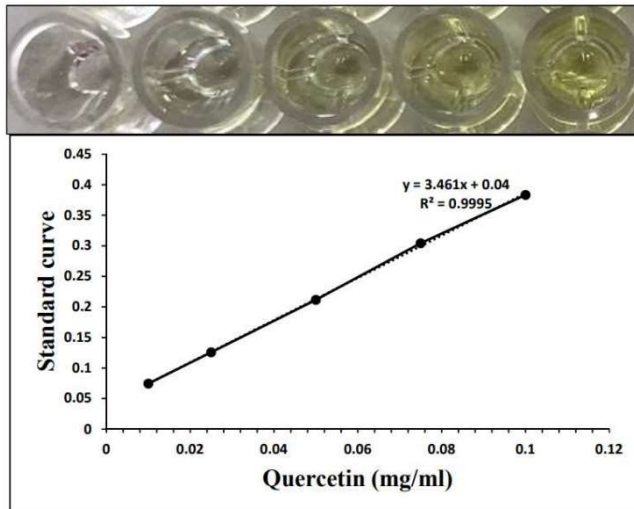


Figure 6. Calibration curve for total flavonoid standard(quercetin)

2.5. 항암활성 분석

2.5.1. 세포 배양

구강 정상세포 PDL은 SeouLin Bioscience (Gyeonggi-do, Republic of Korea)에서 구입하였으며, 구강 편평상피암 세포 YD-9는 한국 세포주 은행 (Seoul, Republic of Korea)에서 구입하였다. PDL과 YD-9는 37 °C, 5 % CO₂가 유지되는 세포 배양기에서 phenol red 지시약이 포함된 배지를 이용하여 배양하였다.

2.5.2. 세포 독성 분석

구강 정상세포 PDL과 구강암세포 YD-9를 각각 12-well culture plate에 2 X 10⁵ cells/well로 동일하게 분주한 후 세포 부착을 위해 24시간 배양하였다. 알송이모자반(*S. confusum*), 큰열매모자반(*S. macrocarpum*), 팍배기모자반(*S. siliquastrum*), 지충이모자반(*S. thunbergii*), 꿩생이모자반(*S. horneri*), 참모자반(*S. fulvellum*) 메탄올추출물을 0, 50, 100, 200, 400 ug/mL으로 처리한 후 24시간 추가 배양하였다. 배양 후, 5 mg/mL의 MTT solution을 100 uL 첨가하여 4시간 반응시킨 후 SpectraMax[®] ABS Plus를 이용하여 540 nM에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다. 각 추출물에 대한 세포 생존율은 다음의 수식을 이용하여 계산하였으며 대조군의 생존율을 100 %로 하였다.

$$Cell\ viability\ (\%) = \frac{Means\ Abs.\ of\ the\ sample - Means\ Abs.\ of\ the\ blank}{Means\ Abs.\ of\ the\ control - Means\ Abs.\ of\ the\ blank} \times 100$$

2.5.3. Live & Dead assay

Live & Dead assay의 calcein AM은 살아있는 세포의 esterase 효소에 의해 녹색 형광을 띄며, ethidium bromide은 죽은 세포의 핵으로 침투하여 적색 형광을 나타내는 원리로, 살아있는 세포와 죽은 세포의 비율 변화를 형광으로 분석할 수 있다. 구강암세포 YD-9를 8-well Chamber silde (Lab-Tek I Chamber Slide, Thermo Fisher, Rockford, IL, USA)에 2×10^5 cells/well 동일하게 분주한 후 세포 부착을 위해 24시간 배양하였다. 파배기모자반 메탄올추출물을 0, 100, 200, 400 ug/mL으로 처리한 후 24시간 추가 배양하였다. 배지를 제거한 후 DPBS로 2회 세척하고 calcein AM과 ethidium bromide를 넣은 다음 어두운 상온에서 15분 반응하였다. 반응 후 염색을 제거하고 DPBS로 세척 후 염색된 세포를 암실에서 형광현미경(Eclipse Ni-u, Nikon, Melville, NY, USA)으로 촬영하였다.

2.5.4. Hematoxylin & Eosin assay

세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 H & E 염색을 수행하였다. 구강암 세포 YD-9를 6-well culture plate에 4×10^5 cells/well 동일하게 분주한 후 세포 부착을 위해 24시간 배양하였다. 파배기모자반 메탄올추출물을 0, 100, 200, 400 ug/mL으로 처리한 후 24시간 추가 배양하였다. DPBS로 1회 세척 후 hematoxylin을 넣고 5분 동안 반응하였다. DPBS로 2회 세척 후 bluing reagent를 15초 반응한 다음 DPBS로 2회 세척하였다. Ethanol로 5분 동안 고정 후 eosin Y solution을 넣고 3분 동안 반응하였다. DPBS로 2회 세척 후 암실에서 형광현미경(DS-Ri2, Nikon, Melville, NY, USA)으로 촬영하였다.

2.5.5. Colony formation

구강암세포 YD-9의 세포 증식 및 군락 형성에 대한 파배기모자반 메탄올 추출물의 영향을 확인하기 위해 colony formation을 수행하였다. 구강암세포 YD-9를 6-well culture plate에 4×10^3 cells/well을 동일하게 분주한 후 세포 부착을 위해 24시간 배양하였다. 구강암세포 YD-9에서 세포 독성을 나타내지 않는 농도인 0, 25, 50, 100 ug/mL을 처리하여 24시간 배양한 후, 추출물이 포함되지 않은 세포 배양액으로 교환하여 3일동안 배양하였다. Colony 분석을 위해 배양액을 제거한 다음 DPBS로 세척 후 ethanol을 사용하여 10분 동안 세포를 고정시켰다. 고정 후 상온에서 완전히 건조하였으며, 0.5 % crystal violet으로 20분 동안 염색한 뒤 DIW로 세척 후 사진 촬영하였다.

2.5.6. Wound-healing assay

구강암세포 YD-9의 이동성에 대한 파배기모자반 메탄올추출물의 영향을 확인하기 위해 wound-healing assay를 수행하였다. 24-well culture plate에 2×10^5 cells/well 동일하게 분주한 후 세포 부착을 위해 24시간 배양하였다. Cell scratcher를 이용하여 wound를 생성한 다음 DPBS로 세척 후 세포 독성을 나타내지 않는 농도인 0, 25, 50, 100 ug/mL을 24시간 처리 후 추출물이 없는 배양액으로 교체하여 3일동안 배양하였다. Wound-healing은 EVOS XL CORE (Thermo Fisher, Rockford, IL, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.5.7. DAPI stain

DAPI 염색은 DAPI 분자가 DNA에 강한 친화력을 나타내는 성질을 이용한 것으로 핵의 형태를 분석할 수 있다. 구강암세포 YD-9를 8-well Chamber silde에 2×10^4 cells/well 동일하게 분주한 후 세포 부착을 위해 24시간 배양하였다. 파배기모자반 메탄올추출물을 0, 100, 200, 400 ug/mL으로 처리한 뒤 24시간 추가 배양하였다. DPBS로 1회 세척 후 4 % paraformaldehyde (ThermoFisher, Rockford, IL, USA)와 0.1 % Triton X-100 (Duksan, Seoul, Republic of Korea)을 넣고 5분 동안 고정한 다음 DPBS로 1회 세척하였다. DAPI (1ug/mL) solution을 넣은 후 어두운 상온에서 15분 동안 반응하였다. DPBS로 1회 세척 후 암실에서 형광현미경(Eclipse Ni-u, Nikon, Melville, NY, USA)으로 촬영하였다.

2.5.8. 단백질 면역 염색법

파배기모자반 메탄올추출물에 의해 구강암세포 YD-9의 세포사멸 및 기전을 확인하기 위해 단백질 면역 염색 기법을 수행하였다. 구강암세포 YD-9를 6-well culture plate에 4×10^5 cells/well을 동일하게 분주한 후 세포 부착을 위해 24시간 배양하였다. 파배기모자반 메탄올추출물을 0, 100, 200, 400 ug/mL으로 24시간 처리하였다. 단백질 추출을 위해 cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) 100 uL 첨가하여 20초 vortexing 후 4 °C에서 5분 반응하기를 총 6회 시행하였다. 12,000 RPM으로 15분간 원심분리 후 상층액을 새로운 1.5ml 튜브로 옮겨 단백질을 획득하였다. BCA protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질을 정량한 다음 Loading 5X buffer (LPS solution, Daejun, Republic of Korea)에 단백질 15 ug과 DIW를 혼합하여 90 °C에서 10분 동안 반응하였다. 변성된 단백질을 10 % SDS page gel에서 전기영동하였으며, 크기별로 분리된 단백질은 polyvinylidene fluoride membrane으로 전달되었다. Membrane은 5 % BSA blocking solution으로 1차 항체의 non-specific을 예방한 뒤, 특정 단백

질과 특이적으로 결합하는 1차 항체(MMP-2, MMP-9, Caspase-3, Caspase-9, PARP, Bcl-2, Bax, β -actin, PI3 Kinase p85, AKT, Phospho AKT, Phospho-PI3 Kinase p85/55)와 4 °C에서 24시간 반응하였다. 이후 1X TBS-T로 10분 동안 4회 세척한 다음 1:10,000 비율로 희석된 2차 항체 [Rabbit anti-mouse IgG, Mouse anti-rabbit IgG]로 실온에서 60분 동안 반응하였다. ECL solution (Merck Millipore, Massachusetts, USA)을 이용하여 Imaging systems (UVITEC, Cambridge, UK)을 통해 단백질 밴드를 가시화 하였다.

2.5.9. 실험자료의 통계학적 검정

실험 결과는 3회 반복 시행하였으며 평균 \pm 표준편차 (MD \pm SD)로 나타내었다. 각 실험의 유의성 검정은 Microsoft Excel 2013을 이용한 Independent t-test로 나타내었으며 *p*-value가 0.05, 0.01, 0.001 미만의 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. 모자반류 유해물질 함량

1.1. 모자반류의 중금속 함량

해조류는 중금속을 흡수하는 성질이 있으므로, 알송이모자반(*S. confusum*), 큰열매모자반(*S. macrocarpum*), 파배기모자반(*S. siliquastrum*), 지충이모자반(*S. thunbergii*), 팽생이모자반(*S. horneri*), 참모자반(*S. fulvellum*)에 대한 중금속 함량 분석을 수행하였다. 분석 결과는 Table 2에 나타내었으며, 현재 해조류에 설정된 중금속 기준은 납(Pb)의 경우 미역(미역귀 포함)에만 0.5 mg/kg 이하로 설정되어 있으며, 카드뮴(Cd)은 김(조미김 포함)과 미역(미역귀 포함)에 0.3 mg/kg 이하로 설정되어 있다. 따라서, 6종의 모자반 모두 납(Pb)과 카드뮴(Cd)이 기준치 이하로 안전한 수준인 것으로 분석되었다. 중금속 중 비소(As)의 경우 6종의 모자반 모두에서 대체로 높은 함량을 나타내었다(Table 2).

Table 2. Content analysis of 9 heavy metal in *Sargassum* spp.

	(Unit: mg/kg)					
	<i>S. confusum</i>	<i>S. macrocarpum</i>	<i>S. siliquastrum</i>	<i>S. thrunbergii</i>	<i>S. horneri</i>	<i>S. fulvellum</i>
Hg	0.0077 ± 0.0003	0.0247 ± 0.0011	0.0285 ± 0.0004	0.0208 ± 0.001	0.0416 ± 0.0013	0.0502 ± 0.0039
Cr	0.027 ± 0.001	0.064 ± 0.001	0.062 ± 0.236	0.045 ± 0.002	0.042 ± 0.003	0.057 ± 0.001
Fe	4.908 ± 0.210	7.073 ± 0.247	5.953 ± 0.236	10.409 ± 0.076	18.971 ± 0.492	24.126 ± 0.807
Ni	0.129 ± 0.002	0.089 ± 0.001	0.080 ± 0.001	0.159 ± 0.002	0.049 ± 0.000	0.193 ± 0.002
Cu	0.425 ± 0.012	0.678 ± 0.018	0.722 ± 0.046	0.624 ± 0.008	0.542 ± 0.013	1.041 ± 0.039
Zn	1.241 ± 0.021	1.128 ± 0.020	2.712 ± 0.057	1.794 ± 0.031	2.437 ± 0.023	2.766 ± 0.292
As	4.388 ± 0.110	2.567 ± 0.037	3.388 ± 0.057	8.765 ± 0.161	4.014 ± 0.041	1.425 ± 0.015
Cd	0.086 ± 0.003	0.055 ± 0.002	0.098 ± 0.003	0.110 ± 0.002	0.091 ± 0.002	0.186 ± 0.004
Pb	0.021 ± 0.004	0.029 ± 0.003	0.019 ± 0.003	0.037 ± 0.004	0.035 ± 0.009	0.025 ± 0.001

1.2. 비소화학종 분리분석

해조류는 비소의 함량이 특히 높은 것이 특징으로, 식약처에서는 일반적인 농산물의 경우 비소의 함량이 0.2 mg/kg보다 높게 나올 경우 무기비소의 함량 분석을 요구하고 있다. 해조류에 대한 규격은 아직 정해진 바가 없으나, 중금속 분석 결과 총 비소의 함량이 높게 나타났으므로, LC-ICP-MS 기기를 이용하여 모자반류의 무기비소 함량 분석을 수행하였다. 그 결과, 독성이 없는 유기비소보다 독성이 있는 무기비소 함량이 높게 나타났으며, 5가와 3가 무기비소의 함량이 참모자반을 제외한 다른 5종은 기준치 이상으로 높은 것으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Analysis of inorganic and organic arsenic content in *Sargassum* spp.

	<i>S. confusum</i>	<i>S. macrocarpum</i>	<i>S. siliquastrum</i>	<i>S. thrunbergii</i>	<i>S. horneri</i>	<i>S. fulvellum</i>
As(V)	1.243	0.244	0.81	3.324	1.083	0.037
As(III)	1.354	0.271	0.885	3.612	1.18	0.015
MMA	0.008	0.01	0.014	0.014	0.023	0.004
DMA	0.04	0.014	0.013	0.033	0.002	0.004
AsB	0.001	0.007	0.027	0.06	0.025	0.009
As(V) + As(III)	2.597	0.515	1.695	6.936	2.263	0.052

(Unit: mg/kg)

2. 모자반류 추출 수율 비교

전라남도 완도 및 제주에서 수급된 알송이모자반, 큰열매모자반, 파배기모자반, 지충이모자반, 팽생이모자반, 참모자반을 민물로 깨끗하게 세척 한 후 60 °C에서 48시간 동안 열풍 건조하였다. 이후 20 mesh 크기로 분쇄하여 50 g의 분말에 20배수인 100 L의 메탄올을 첨가하여 40 °C에서 2시간 환류 추출하였다. 알송이모자반, 큰열매모자반, 파배기모자반, 지충이모자반, 팽생이모자반, 참모자반의 메탄올추출 수율은 각각 8.9 %, 7.2 %, 6.3 %, 6.7%, 8.6 % 그리고 9.8 %이었다(Table 4).

Table 4. The comparison of methanol extract yield in *Sargassum* spp.

	<i>S. confusum</i>	<i>S. macrocarpum</i>	<i>S. siliquastrum</i>	<i>S. thrunbergii</i>	<i>S. horneri</i>	<i>S. fulvellum</i>
수율	8.9	7.2	6.3	6.7	8.6	9.8

(Unit: %)

3. 모자반류 총 폴리페놀 함량

모자반류 메탄올추출물의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과, 알송이모자반 164.31 mg GAE/mL, 큰열매모자반 250.39 mg GAE/mL, 파배기모자반 223.98 mg GAE/mL, 지충이모자반 162.362 mg GAE/mL, 팽생이모자반 121.282 mg GAE/mL, 참모자반 105.634 mg GAE/mL의 함량으로 나타났다. 이 중 큰열매모자반이 가장 높은 함량을 나타냈으며, 그다음 파배기모자반이 높은 함량으로 나타났다(Fig. 7).

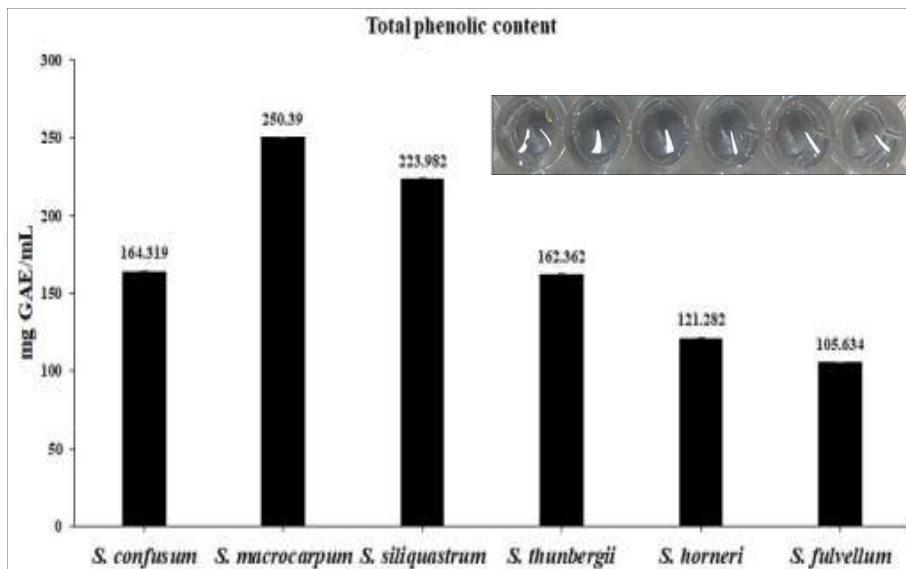


Figure 7. Total phenolic content of *Sargassum* spp Total polyphenol content in *Sargassum* spp. methanol extract was analyzed using the Folin-Ciocalteu's reagent method with a gallic acid calibration curve.

4. 모자반류 총 플라보노이드 함량

모자반류 메탄올추출물의 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 알송이모자반 164.319 mg GAE/mL, 큰열매모자반 27.449 mg QE/mL, 파배기모자반 165.366 mg QE/mL, 지충이모자반 25.522 mg QE/mL, 팽생이모자반 70.693 mg QE/mL, 참모자반 156.409 mg QE/mL의 함량으로 나타났다. 이 중 큰열매모자반이 가장 높은 함량을 나타냈으며, 그다음 파배기모자반이 높은 함량으로 나타났다(Fig. 8).

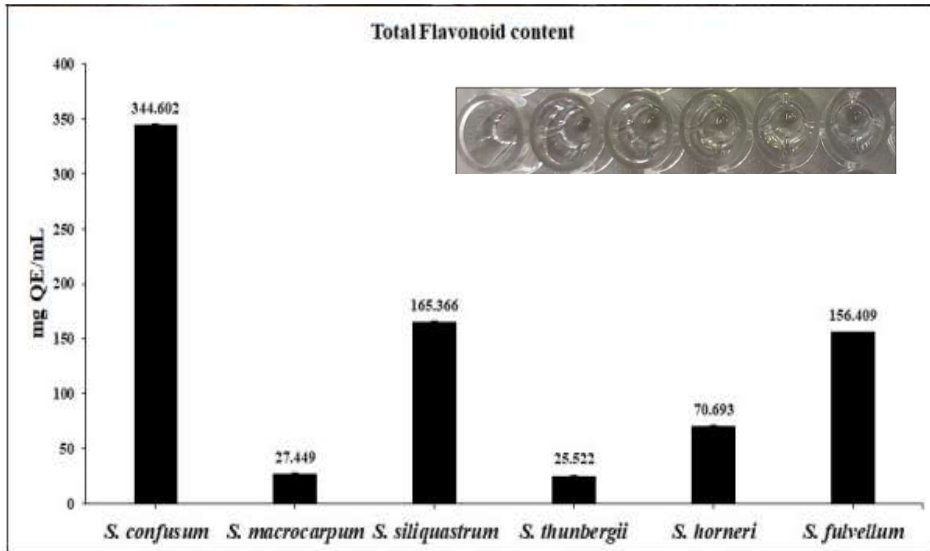


Figure. 8. Total flavonoid content of *Sargassum* spp Total flavonoid content in *Sargassum* spp. methanol extract was analyzed using the $AlCl_3$ method with a quercetin calibration curve.

5. 모자반류 메탄올추출물의 항암활성

5.1. 구강암세포 YD-9에 대한 모자반류 추출물의 세포 생존율 분석

구강암세포 YD-9에 대한 모자반류 메탄올추출물의 세포 생존율 분석을 위해 0, 50, 100, 200, 400 ug/mL의 농도로 구강암세포 YD-9에 24시간과 48시간 동안 처리하였다. 24시간 처리한 구강암세포 YD-9의 경우, 지충이모자반과 참모자반을 제외한 알송이모자반, 큰열매모자반, 파배기모자반, 팽생이모자반에서 농도 의존적으로 세포 생존률이 감소하였으며, 파배기모자반에서 가장 유의미한 세포 생존률 감소를 확인할 수 있었다. 또한 알송이모자반의 경우 200, 400 ug/mL 농도에서 구강암세포 생존율이 50 %이하로 감소하였으며, 큰열매모자반, 파배기모자반, 팽생이모자반은 400 ug/mL의 농도에서 구강암세포 생존율이 50 %이하로 감소하였음을 확인할 수 있었다. 48시간 처리한 구강암세포 YD-9의 경우 24시간 처리한 구강암세포에 비해 농도 의존적으로 세포 생존률이 감소하였으나 지충이모자반에서는 24시간 처리한 세포의 생존율과 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 9).

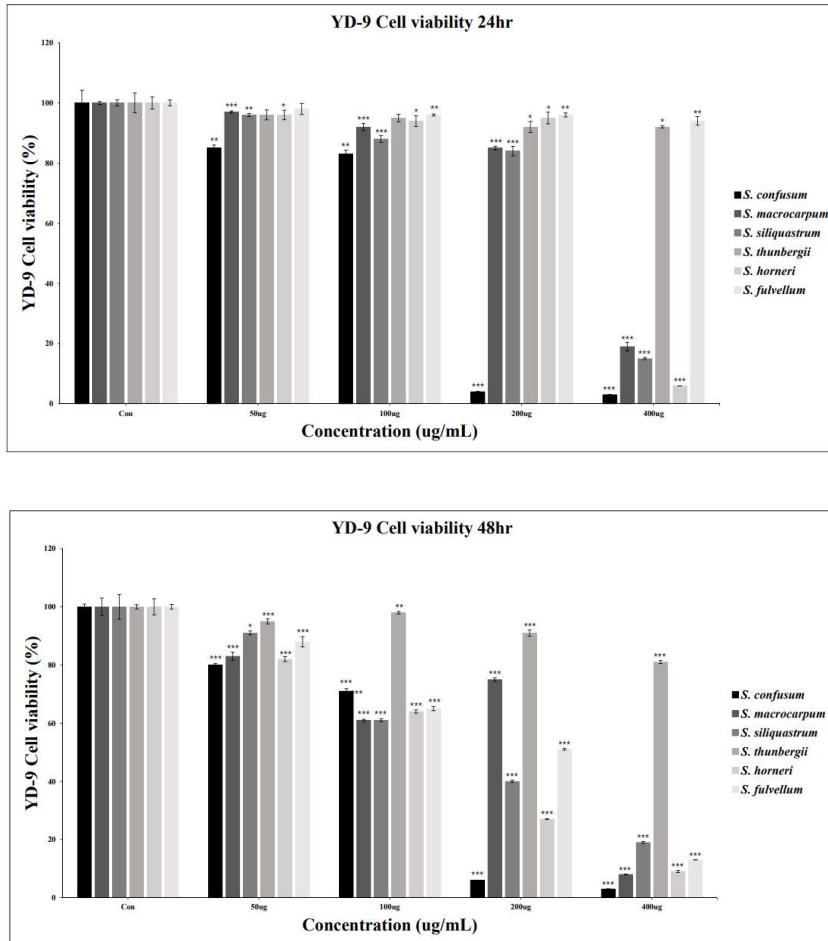


Figure 9. Cell viability of YD-9 cells after treatment with *Sargassum* spp. Cells were seed into an 12-well culture plate at 2×10^5 cells/well, and then treated with 50, 100, 200 and 400 ug/mL of the methanol extract of *Sargassum* spp. for 24 hr and 48 hr. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

5.2. 정상세포 PDL에 대한 모자반류 추출물의 세포 생존율 분석

구강 정상세포 PDL에 대한 모자반류 메탄올추출물의 세포 생존율 분석을 위해 구강암세포 YD-9과 동일한 농도로 24시간 동안 처리하였다. 알송이모자반과 참모자반에서 농도 의존적으로 세포 생존율의 감소를 보였으며, 큰열매모자반, 파배기모자반, 지층이모자반, 팽생이모자반에서 구강 정상세포인 PDL의 생존율에 영향을 미치지 못하였다(Fig. 10).

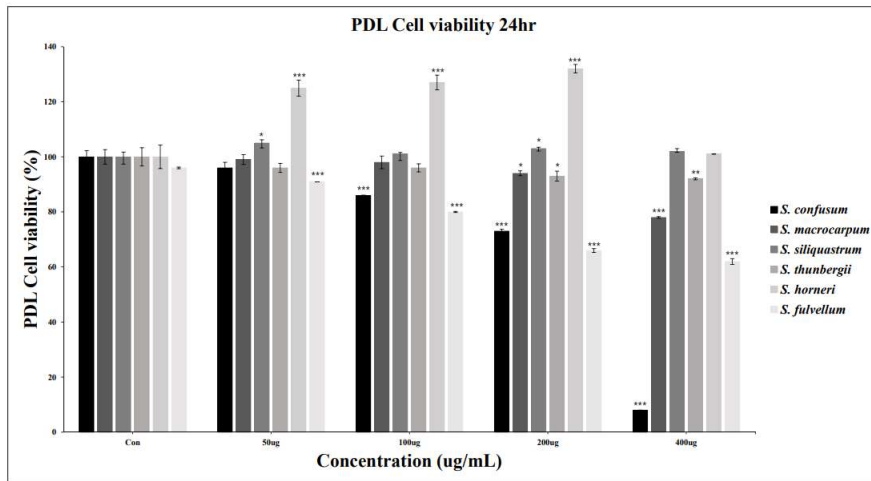


Figure 10. Cell viability of PDL cells after treatment with *Sargassum* spp. Cells were seed into an 12-well culture plate at 2×10^5 cells/well, and then treated with 50, 100, 200 and 400 ug/mL of the methanol extract of *Sargassum* spp. for 24 hr. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

6. 팍배기모자반 추출물의 구강암세포 YD-9의 사멸 효과

6.1. 구강암세포 YD-9의 세포 독성 효과

세포 증식 억제 효과가 가장 뛰어났던 팍배기모자반 메탄올추출물을 이용하여 YD-9 암세포에 대한 독성효과를 Live & Dead kit를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 추출물의 농도가 높아질수록 살아있는 세포를 의미하는 녹색 형광은 점차 줄어들고, 죽은 세포를 의미하는 적색 형광이 점차 많아졌으며, 200 ug/mL에서 적색 형광이 확연히 증가함을 확인하였다. 또한, 400 ug/mL에서 적색 형광이 감소하였으나, 녹색 형광을 나타내는 세포가 없는 것으로 보아 이는 추출물에 의해 세포가 감소하여 나타나는 현상임을 알 수 있다 (Fig. 11).

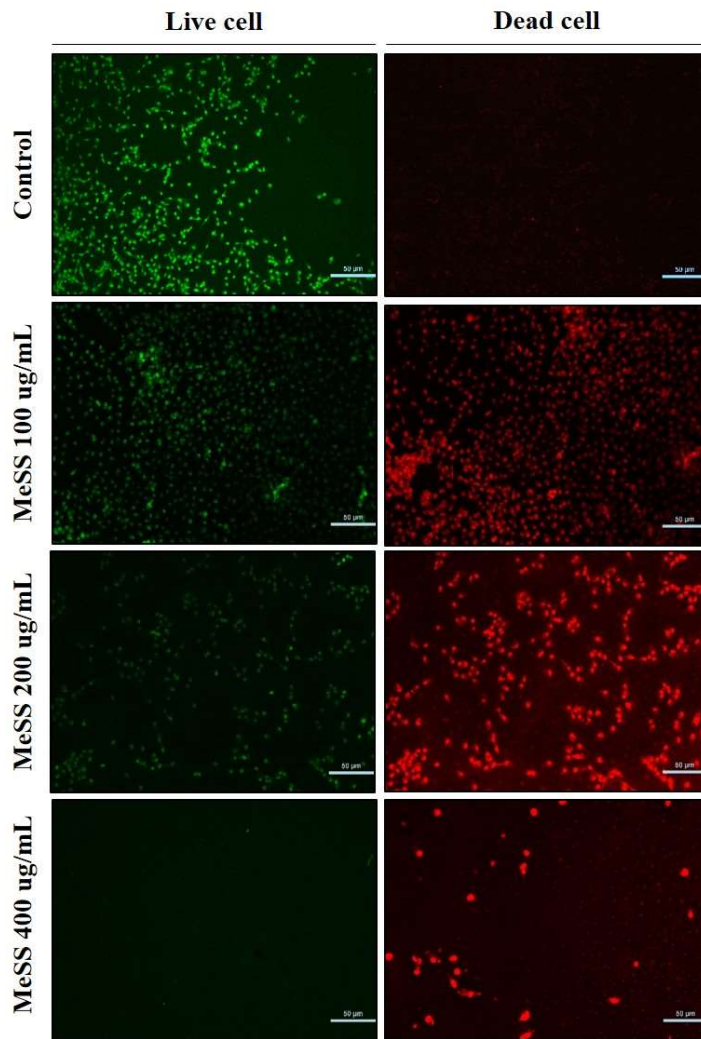


Figure 11. *S. siliquastrum* methanol extract exhibits cytotoxicity in YD-9 cells. Cells were seeded into an 8-well chamber slide at 2×10^5 cells/well, and then treated with 100, 200 and 400 ug/mL of the methanol extract of *S. siliquastrum* for 24 hr. Live & Dead assay was performed and stained cells were observed under a fluorescence microscope (X40).

6.2. 구강암세포 YD-9의 형태학적 변화

파배기모자반 메탄올추출물이 YD-9 구강암세포의 형태학적 변화를 분석하기 위해 H & E 염색을 수행하였다. 그 결과, 100 ug/mL부터 세포 형태가 점차 변화하였으며 400 ug/mL에서는 세포질이 완전히 응축된 것을 확인하였다 (Fig. 12).

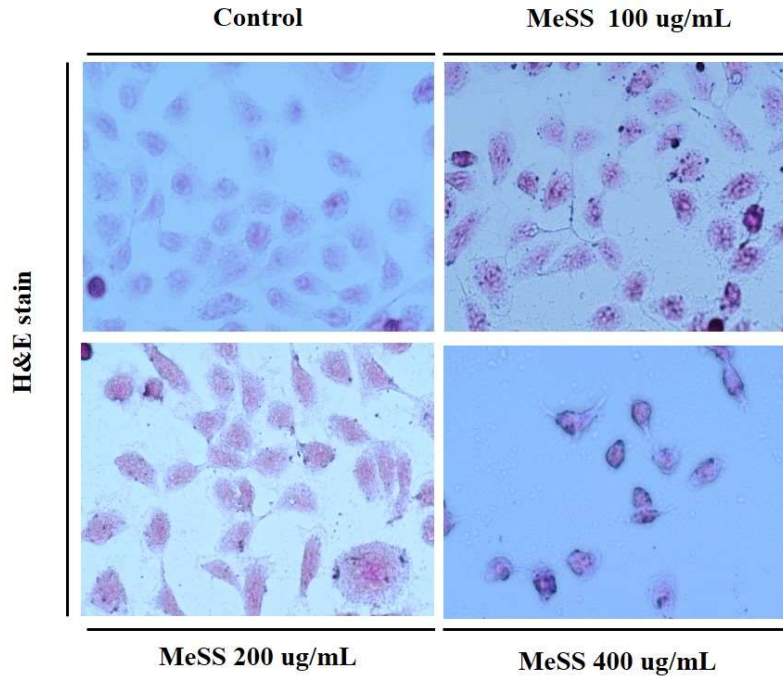


Figure 12. *S. siliquastrum* methanol extract changes the cell morphology of YD-9 cells. Cells were seed into an 6-well culture plate at 4×10^5 cells/well, and then treated with 100, 200 and 400 ug/mL of the methanol extract of *S. siliquastrum* for 24 hr. H&E staining was performed to observe cell mophological changes. The stained cells were observed under a fluorescence microscope (X40).

6.3. 구강암세포 YD-9의 콜로니 형성 억제 효과

파배기모자반 추출물이 구강암세포 YD-9의 세포 군집 형성 및 세포 증식과 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포 독성을 나타내지 않는 0, 25, 50, 100 ug/mL의 농도로 24시간 처리하여 colony formation을 수행하였다. 파배기모자반 메탄올추출물을 0, 25, 50, 100 ug/mL의 농도로 24시간 처리 후 추출물이 없는 배양액으로 교체한 다음 3일 동안 추가 배양하였다. 0.5 % crystal violet 염색을 통하여 형성된 군집을 분석한 결과 대조군과 비교하여 25, 50, 100 ug/mL농도에서 구강암세포 YD-9의 군집 형성과 세포 증식 활성화가 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 13).

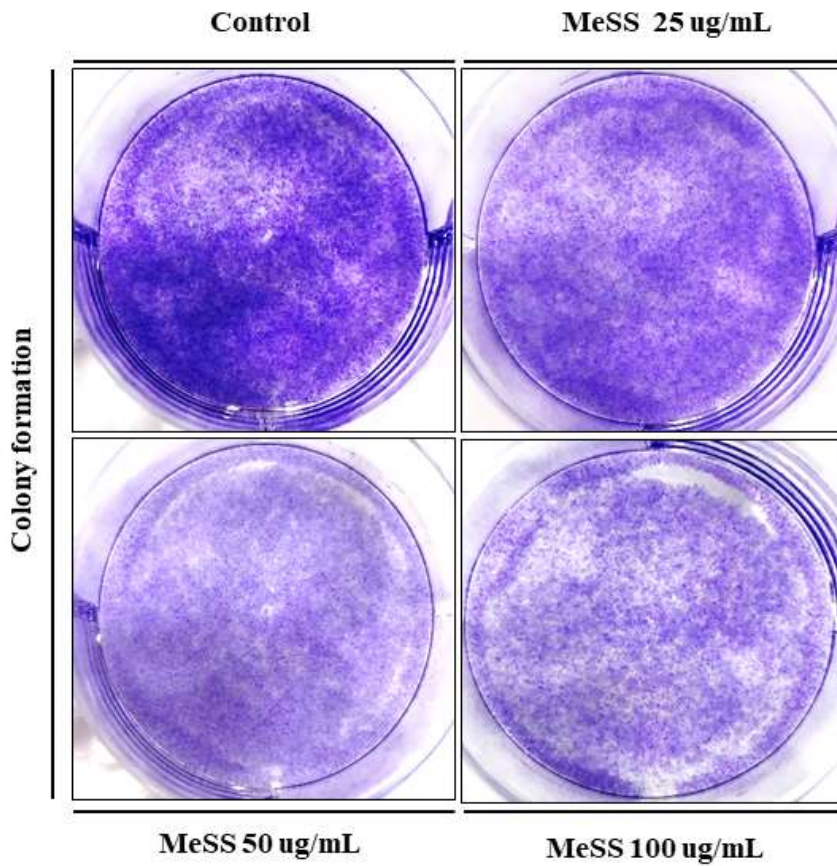


Figure 13. Methanol extract of *S. siliquastrum* inhibits colony formation of YD-9 cells. Cells were treated with 0, 25, 50, 100 ug/mL of methanol extract of *S. siliquastrum* for 24 hr. After cultured for an additional 3 days in growth medium without extract. Cells were stained with 0.5 % crystal violet. Images of the cells were taken with a camera.

6.4. 구강암세포 YD-9의 wound-healing 억제 효과

Wound-healing은 암세포의 전이 잠재력을 평가할 수 있는 실험으로, 암세포는 주변 기질을 분해하면서 이동한다. 파배기모자반 메탄올추출물이 구강암세포 YD-9의 wound-healing에 미치는 영향을 분석하기 위해 세포 독성을 나타내지 않는 0, 25, 50, 100 ug/mL의 농도로 처리하여 wound-healing assay를 수행하였다. 그 결과, 세포 독성이 없는 농도임에도 불구하고 파배기모자반 메탄올추출물은 YD-9의 wound-healing 능력을 상실시켰으며, 이러한 억제 효과는 암세포의 주변 기질 분해 효소인 MMP-2와 MMP-9의 활성 억제를 통해 매개됨을 확인하였다(Fig. 14).

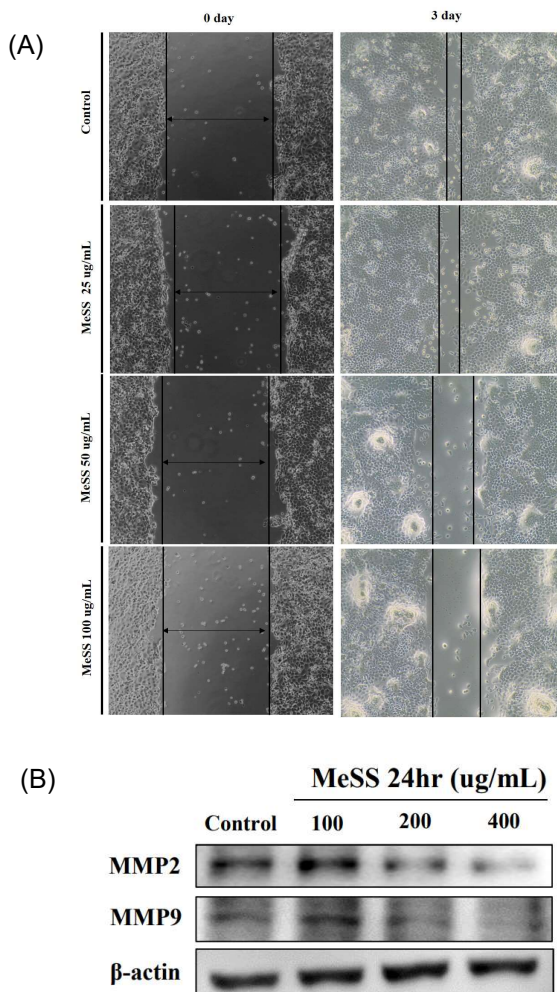


Figure 14. Methanol extract form *S. siliquastrum* inhibits MMP-2/9 of YD-9 cells and wound-healing. (A) Cells were treated with 0, 25, 50, 100 ug/mL of methanol extract of *S. siliquastrum* for 24 hr. After cultured for an additional 3 days in growth medium without extract. Images of the cells were taken with a EVOS microscope. (B) Cells were treated with 0, 100, 200, 400 ug/mL of methanol extract of *S. siliquastrum* for 24 hr. Inhibition effect of methanol extract of *S. siliquastrum* on MMP-2/9.

6.5. 구강암세포 YD-9의 핵 형태학적 변화

파배기모자반 메탄올추출물이 구강암세포 YD-9의 핵 형태에 미치는 영향을 알아보기 위해 파배기모자반 메탄올추출물을 0, 100, 200, 400 ug/mL의 농도로 24시간 처리하여 DAPI 염색을 수행하였다. 그 결과 파배기모자반 메탄올추출물의 농도가 증가할수록 세포질의 응축, 핵 분절 등 핵의 변화가 다수 관찰되었으며 이는 세포사멸이 유도되었음을 알 수 있다(Fig. 15).

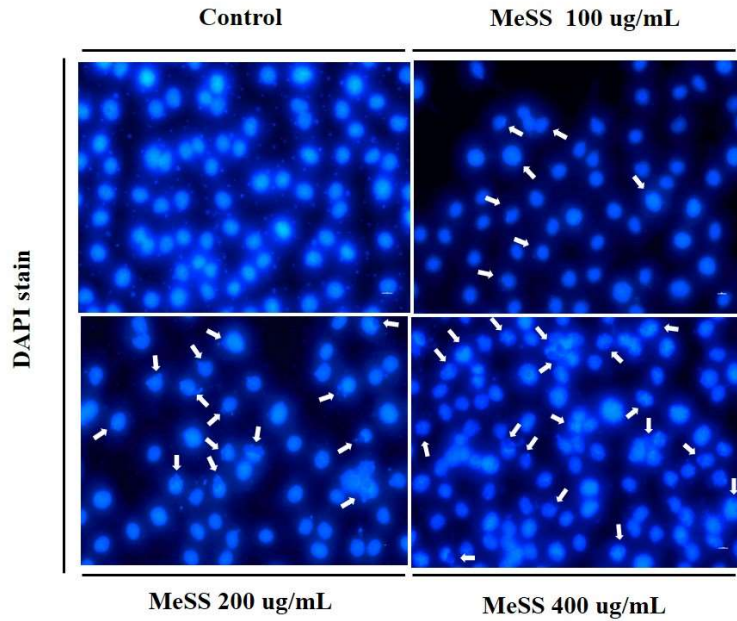


Figure 15. *S. siliquastrum* methanol extract changes the nuclear morphology from of YD-9 cells. Cells were treated with 0, 100, 200, 400 ug/mL of methanol extract of *S. siliquastrum* for 24 hr. Thereafter, DAPI stain was performed to observe the nucleus. Images of the cells were taken with a fluorescence microscopy (X40).

6.6. 구강암세포 YD-9의 세포사멸 유도

Caspase는 세포사멸을 수행하는 핵심적인 효소로, 이들의 활성화 여부는 세포사멸을 평가하는데 매우 중요한 지표이다. 파배기모자반 추출물의 세포사멸 유도를 확인하기 위해 구강암세포 YD-9에 0, 100, 200, 400 ug/mL의 농도로 24시간 동안 처리한 다음 western blot assay를 수행하였다. 그 결과, 파배기모자반 메탄올추출물이 caspase-9의 가수분해를 유도하였으며, 절단된 caspase-9은 caspase-3의 가수분해를 유도하였다(Fig. 16A). 궁극적으로 손상된 DNA의 복구를 돕는 PARP가 가수분해되어 세포사멸이 유도됨을 확인하였다(Fig. 16A). 또, 미토콘드리아 외막에 존재하여 세포사멸을 조절하는 Bcl-2 family 중 항-세포사멸 인자인 Bcl-2의 발현이 감소하였으며, 세포사멸 촉진인자인 Bax의 발현이 유의적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 16B).

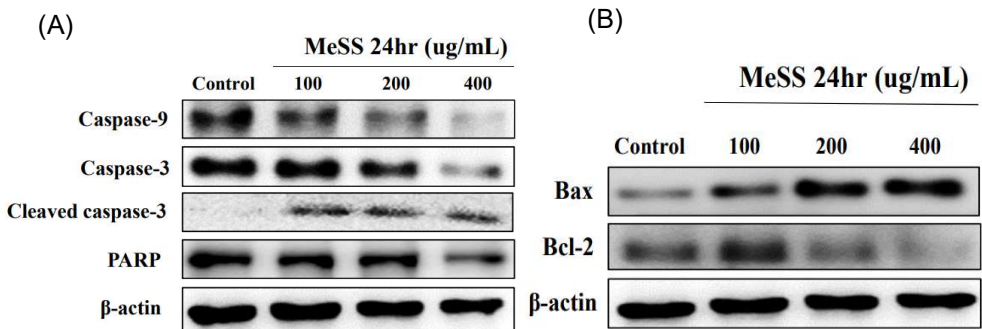


Figure 16. *S. siliquastrum* methanol extract from the regulation controls the activity of the protein in YD-9 cells. Cells were treated with 0, 100, 200, 400 ug/mL of methanol extract of *S. siliquastrum* for 24 hr. Thereafter, the expression of apoptotic-related protein, caspase-9, caspase-3, cleaved caspase-3, PARP (A), Bax and Bcl-2 (B) were assessed by western blot, and β -actin was used as the loading control.

6.7. 구강암세포 YD-9의 세포사멸 기전 분석

PI3K/Akt 신호전달체계는 세포성장, 분화 및 세포사멸 등 다양한 세포 생리를 조절하는 매우 중요한 신호전달경로이다. 따라서, 파배기모자반 메탄올 추출물에 의한 구강암세포 YD-9의 세포사멸이 PI3K/Akt 경로를 통해 매개되는지 분석하였다. 그 결과, 파배기모자반 메탄올추출물이 PI3K의 p85와 p55의 인산화를 억제하였으며, Akt의 ser473의 인산화를 유의적으로 억제하였다(Fig. 17). 이러한 결과는 파배기모자반 메탄올추출물이 PI3K/Akt의 신호전달 경로를 통해 세포사멸을 매개할 수 있음을 시사한다.

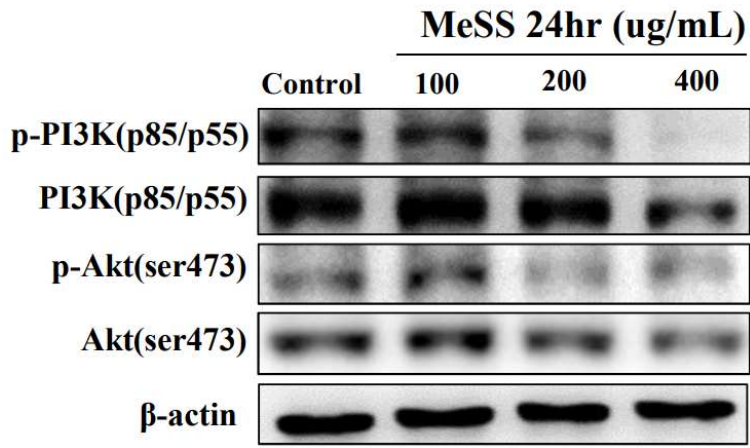


Figure 17. *S. siliquastrum* methanol extract affects PI3K and Akt expression in YD-9 cells. Cells were treated with 0, 100, 200, 400 ug/mL of methanol extract of *S. siliquastrum* for 24 hr. Thereafter, the protein expression levels of PI3K and Akt were assessed by western blotting, and β -actin was used as the loading control.

IV. 고찰

암 치료에서 항암제의 역할은 매우 중요하다. 수술 전 암의 크기를 줄이거나 수술 후 재발 방지를 위해 항암제를 복용하게 되며, 이러한 과정은 항암 치료를 위해 필수이다. 현재 사용되는 대부분 항암제는 세포 내에서 핵산의 합성을 억제하거나 직접 핵산과 결합하여 기능 손상을 유도해 항암효과를 발휘하는 약제로, 암세포만 선택적으로 표적 하는 것이 아니다[40]. 핵산 합성을 통해 세포분열을 하는 모든 세포에 작용함으로써 세포분열이 활발한 조직세포(골수, 위장관 등)에도 손상을 입혀 골수의 기능 저하, 위장장애 등 여러 가지 부작용을 나타낸다[41]. 이처럼 부작용을 줄이며, 안정성이 입증된 해양 자원을 이용해 항암 활성을 평가하고 그 유효성분을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

모자반은 갈조식물에 속하는 해조류로, 항염증, 항산화, 항노화 및 항바이러스 등 다양한 기능이 밝혀져 있으나 아직 구강암에 대한 항암 활성은 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 6종의 모자반(알쏭이모자반, 큰열매모자반, 파배기모자반, 지층이모자반, 썩생이모자반, 참모자반)을 메탄올추출하여 구강암세포주 YD-9에 대한 항암 활성과 그 기전을 분석하였다.

해조류 중 모자반은 비소 함량이 높은 것으로 잘 알려져 있으므로, 먼저 중금속 함량 분석을 수행하였으며, 그 결과 수은, 크롬, 철, 니켈, 구리, 아연, 카드뮴, 납의 함량은 모두 기준치 이하였으나 비소는 높은 함량으로 나타났다. 비소는 인체에 독성이 없는 유기비소와 1급 발암물질로 규정된 무기비소로 나눌 수 있으며 각각에 대한 함량을 분석한 결과, 유기비소에 비해 3가 무기비소와 5가 무기비소의 함량이 높게 나타났다. 인체 내로 유입된 무기비소는 헤모글로빈, 단백질 등과 결합하여 효소 반응을 억제하고 세포의 대사를 방해하여 세포사를 유발한다. 그리하여 식품의약품안전처에서는 무기비소의 저감화를 위해 자숙 후 섭취를 권고하고 있으며, 모자반이 사용된 가공식품에 대하여 무기비소 기준치를 1.0 mg/kg 이하로 정하였으나[42], 그럼에도 무기비소 인체 섭취량에 대한 기준을 시급히 마련해야 할 것이다.

식물의 다양한 생리활성은 식물이 함유한 페놀성 화합물의 함량과 비례하는 경향이 있다고 보고되어 있으며[43], 해조류 중 갈조류가 녹조류나 홍조류에 비해 우수한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[44]. 모자반 6종의 총 폴리페놀 함량을 분석한 결과, Figure 7과 같이 큰열매모자반, 파배기모자반의 함량이 가장 높게 나타났다. You 연구팀에서 수행한 모자반 19종에 대한 총 폴리페놀 함량 분석 결과, 본 연구결과와 동일하게 파배기모자반이 가장 높은 함량을 보였다[19]. 그런 점에서 본 연구 결과와 유사하나, You 연구팀에서는 파배기모자반의 총 폴리페놀 함량이 36.67 mg/g extract로 본 연구와 비교했을 때 상당히 낮은 함량으로 나타났다. 이러한 결과는 해조류의 자생 지역, 채취 시기 및 추출 방법의 차이에 의한 것으로 사료된다. Lee 연구팀이 수행한 국내 자생 갈조류의 생리활성 비교 분석연구에서 해조류는 육지 식물보다 채취, 분류, 보관 및 염 제거와 같은 샘플 준비 과정이 연구 결과에 큰 영향을 미치며, 갈조류의 생리활성 비교 연구 간의 연구 불일치의 원인이 된다고 보고된 바 있다[45]. 해조류 중 갈조류는 폴리페놀계 화합물 중 육상 식물과 다른 플로로탄닌(phlorotanin)이라는 독특한 구조를 지닌 폴리페놀계 대사 산물을 다량 함유하고 있으며, 항산화, 혈압강하, 간 보호, 항바이러스 및 항박테리아, 항암, 항염증 효과 등 다양한 생리활성에 기여한다고 보고되어 있다[46]. 뿐만 아니라 갈조류의 플라보노이드는 프로스타글란딘(prostaglandin)을 억제하여 진통 효과가 있음이 보고되어 있다[47]. 모자반류 6종의 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과, Figure 8과 같이 알송이모자반, 파배기모자반에서 가장 높은 함량을 나타내었다. 위와 같은 실험 결과를 바탕으로 구강암세포 YD-9에 대한 모자반 6종의 성장억제 효과를 분석하였다.

알송이모자반, 큰열매모자반, 파배기모자반, 지충이모자반, 팽생이모자반, 참모자반 추출물이 구강암세포 YD-9에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과, 지충이모자반을 제외한 나머지 모자반류에서 시간 및 농도 의존적으로 암세포의 성장을 유의적으로 억제하였다. 알송이모자반과 참모자반은 구강 정상세포인 PDL의 성장도 억제하였다. 따라서, 이후 실험은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 우수하고, 정상세포의 성장에 영향을 주지 않으면서, 구강암세포의 성장억제 효과가 뛰어난 파배기모자반 메탄올

추출물을 이용하여 항암 활성을 분석하였다.

파배기모자반 메탄올추출물에 의한 YD-9 암세포의 성장억제 효과가 추출물의 독성에 의한 것인지 live & dead assay를 통해 확인한 결과, 추출물의 농도가 높아질수록 죽은 세포를 의미하는 붉은 형광이 점차 많아짐을 확인하였으며, 최고 농도인 400 ug/mL에서는 암세포가 모두 사멸하여 실험과정의 세척 과정에서 모두 제거된 것으로, 초록 형광과 붉은 형광 모두 나타나지 않음을 확인하였다. 이러한 결과는 파배기모자반 메탄올 분획물이 위암 (AGS), 대장암(HT-29, HT-1080), 유방암(MCF-7)세포에 대해 세포독성을 유도하였다는 연구 결과와 일치하며[48], 경단구술모자반 메탄올추출물의 유방암세포에 대한 세포 독성 효과와 일치한다[49]. 파배기모자반 메탄올추출이 YD-9 암세포의 형태에도 영향을 미치는지 H & E 염색을 수행한 결과, 추출물에 의해 세포 모양이 확연히 변화함을 확인하였다. 추출물이 세포 독성을 유도하지 않는 농도 구간에서도 암세포의 성질을 억제하는 것은 매우 유의미한 항암 활성을 갖는 것으로 분석할 수 있다. 따라서, 파배기모자반 메탄올추출물의 세포 성장억제 효과가 없는 농도를 처리하여 YD-9 암세포의 세포 군집 형성과 wound-healing에 미치는 영향을 분석하였다. 세포 독성이 없는 농도임에도 불구하고 농도-의존적으로 암세포의 군집 형성을 확연히 억제하였으며, wound-healing 능력을 감소하였다. 뿐만 아니라, 파배기모자반 메탄올추출물의 이러한 군집 형성 및 wound-healing 억제가 MMP-2와 MMP-9의 활성화와 관련이 있는지 분석한 결과, 추출물에 의해 MMP-2와 MMP-9의 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 luteolin과 ellagic acid가 MMP-2와 MMP-9의 발현을 저해시킴으로써 난소암세포 A2780의 전이를 억제한 연구와 일치하는 결과이다[50].

파배기모자반 메탄올추출물에 의한 YD-9 암세포의 성장억제 효과가 세포 사멸에 의한 것인지 확인하기 위해 DAPI 염색을 수행한 결과, 추출물의 농도가 증가함에 따라 염색질의 분절, 핵과 세포질의 응축 등 apoptotic body가 관찰되었다. 세포사멸에 관여하는 Bcl-2 family 및 caspase의 가수분해 여부를 확인한 결과, 세포사멸을 촉진하는 Bax의 발현이 농도 의존적으로 증가하였으며, 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 발현이 감소하였다. 세포 내 중요한 신

호 전달체로 미토콘드리아의 안전성을 조절하는 Bax는 세포질에서 미토콘드리아로 이동하며 Cytochrom C의 분비를 촉진하여 세포사멸을 일으키고, Bcl-2는 Bax가 미토콘드리아로 이동하는 것을 억제하며 세포사멸을 억제하게 된다[51,52]. 이들 인자에 의해 미토콘드리아 외막에 막 투과성을 야기하고 cytochrom C 방출을 유도하여 세포사멸의 신호 경로가 진행되므로 세포사멸 조절에서 Bcl-2 family의 균형은 매우 중요하다[53,54]. 방출된 cytochrom C에 의해 initiator caspase인 caspase-9가 활성화되고 effector caspase인 caspase-3의 가수분해가 유도됨으로써 세포사멸이 유발된다. 이후, DNA 손상을 인지하는 PARP는 caspase-3에 의해 가수분해되어 DNA 복구 기능 상실로 인해 궁극적으로 세포사멸의 최종 지표로 간주하고 있다[1,55,56]. 파배기모자반 메탄올추출물에 의해 pro-caspase-9과 pro-caspase-3의 발현을 감소와 caspase-3의 가수분해가 유도되었으며, 결과적으로 PARP의 발현이 감소하였다. 이러한 결과는 다양한 천연물에 의한 항암 기전과 유사한 결과로, 흑종호박 과일추출물은 Tp53/caspase 유도를 통해 유방암세포의 세포사멸을 유도하였으며, *Mitrephora chulabhorniana* 잎 추출물은 caspase-의존적 경로를 통해 자궁 경부 암세포의 세포사멸을 유도함을 보고하였다[57,58].

PI3K/Akt 신호전달은 세포의 성장, 발달, 분화 등 다양한 생리활성에 관여하는 매우 중요한 역할 신호전달 체계이다. PI3K는 Akt의 인산화에 의해 활성화되며, Akt의 인산화는 암세포에서 세포의 무제한 성장과 증식에 관여하고 있다[59]. 파배기모자반 메탄올추출물의 세포사멸이 PI3K/Akt 경로에 의해 매개되는지 확인한 결과, PI3K와 Akt의 인산화를 확연히 감소시켰다. 이러한 결과는 PI3K/Akt 신호전달 체계가 파배기모자반 메탄올추출물에 의한 구강암세포 YD-9의 세포사멸에서 관여하고 있음을 시사한다.

Lee 연구팀은 파배기모자반 추출물에 함유된 Sargachromanol K(SK)가 멜라닌 세포 B16F10에서 농도-의존적으로 세포사멸 및 세포 정지를 유도한다고 보고한 바 있으며[60], Heo 연구팀은 파배기모자반 추출물이 인간 백혈병 HL-60세포에 대한 성장억제 효과와, Sargachromanol E(SE)의 세포사멸 유도를 보고하며[61], 인간 백혈병과 같은 암을 예방할 수 있는 유력한 항암제로써 충분한 가치가 있다는 것을 보여주었다. 위의 결과를 종합하여 구강암

세포 YD-9에서 파배기모자반 추출물이 미토콘드리아를 통하여 세포사멸을 유도한다는 것을 확인하였으며, *in vitro*에서 파배기모자반 추출물에 대한 항암효과를 확인하였다. 따라서, 향후 후속 연구에서는 파배기모자반에 다량 함유된 Sargachromanol 계열 성분을 이용하여 각기 다른 조직에서 유래한 구강암 세포주에서의 항암 활성 연구가 추가로 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 알송이모자반, 큰열매모자반, 파배기모자반, 지층이모자반, 팽생이모자반, 참모자반의 중금속 함량, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 확인하였다. 또, 파배기모자반 메탄올추출물을 이용하여 구강암세포 YD-9에 대한 항암효능을 평가하였다.

1. 모자반류 6종에서 수은(Hg), 크롬(Cr), 철(Fe), 니켈(Ni), 구리(Cu), 아연(Zn), 비소(As), 카드뮴(Cd), 납(Pb)의 함량을 분석한 결과, 식품의약품안전처 식품 원료 기준에 의한 기준치 이하였으나, 총 비소는 높은 함량을 보였다.
2. 모자반류 6종에서 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과 파배기모자반에서 모두 높은 함량을 보였다.
3. 모자반류 6종에서 파배기모자반이 구강암세포 YD-9의 성장을 가장 유의적으로 억제하였으며, live & dead assay를 통해 세포독성 효과를 확인하였다.
4. 파배기모자반 메탄올추출물은 세포독성이 없는 농도임에도 불구하고 구강암세포 YD-9의 군집 형성을 확연히 억제하였으며, MMP-2와 MMP-9 활성 억제를 통해 wound-healing을 유의적으로 억제하였다.
5. 파배기모자반 메탄올추출물은 구강암세포 YD-9에서 Bcl-2 발현 감소, Bax 발현 증가, caspase 가수분해 유도 및 PARP의 발현 감소를 통해 미토콘드리아-의존적인 세포사멸을 유도하였다.

6. 파배기모자반 메탄올추출물에 의한 구강암세포 YD-9의 세포사멸은 PI3K/Akt 신호전달체계에 의해 일부 매개될 수 있음을 확인하였다.

위와 같은 결론들은 파배기모자반 메탄올추출물에 의한 구강암세포 YD-9의 세포사멸 유도와의 기전을 규명한 것으로써, 해양천연자원을 기반으로 항암제 개발을 위한 유력한 후보 소재로 잠재적인 활용 가능성을 제시한다.

VI. 참고문헌

1. Kim HS, Seo MH, Kim SM, Cho YA, Lee SK, Lee JH, Myoung H. Prevalence of Human Papillomavirus Infection in the Korea Oral Cancer Patients. J Koreand Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg. 35(4);227-235, 2013.
2. Jo SH, Kim TW, Choung HW, Park SW, Park JY, Choi SW. Clinical Outcomes of Oral Squamous Cell Corcinoma Patients Treated in National Cancer Center for Last 10 Years. J Korean Assoc Maxillofac plast Reconstr Surg. 32(6);544-550, 2010.
3. Beak CH. Sentinel Lymph Node Biopsy in the Oral Cavity Cancer. Hanyang medical reviews. 29(3):255-264, 2009.
4. Kim MY, Kim CS, Lee SH, Kim JW, Jang HJ. A clinicostatistical analysis of oral cancer patients for recetn 8 years. J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 33;660-668, 2007.
5. Kim SC, Lee JR, Park SJ. Porphyra tenera induces apoptosis of oral cancer cells. Kor J Herbology. 30(2);25-30, 2015.
6. Kerr JF, Wyllie AHW, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kientics. Br J Cancer. 26(4);239-257, 1972.
7. Chang H. Immune Evasion Mechanism as a Guide for Immunotherapy in Head and Neck Cancer. Korean J Head Neck Oncol. 33(1);1-5, 2017.

8. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 73(8);2013-2016, 1994.
9. Kang MC, Lee KS, Expression of apoptosis related genes from HaCaT cell after UVB irradiation. *Korean J Dermatol*. 47(7);790-797, 2009.
10. Kumar M, Gupta V, Kumari P, Reddy CRK, Jha B. Assessment of nutrient composition and antioxidant potential of Caulerpaceae seaweeds. *J. Food Compost. Anal*. 24(2);270-278, 2011.
11. Lim SY, Choi HJ, Kil JH, Park SS, Gong CS, Park KY, Seo YW. Inhibitory Effect of Solvent Extracts from Seven Brown Algae on Mutagenicity and Growth of Human Cancer cells. 16(7);1080-1086, 2006.
12. Kim NG. Effects of temperature, photon irradiance, and photoperiod on the growth of embryos of *Sargassum horneri* in laboratory culture. *Korean J Fish Aquat Sci*. 48(1);76-81, 2015.
13. Lee SH. Current Status and Prospect of Nutraceuticals from Marine Algae. *Bulletin of Food Technology*. 24(4);165-175, 2011.
14. Kown JY, Lee KR, Hwang HS, Kim SH, Park SE, Durai PNK, Pa7} KW, Kim HS, Jang DS, Choi JS, Kwon HC. New Monocyclic Terpenoid Lactones from a Brown Algae *Sargassum macrocarpum* as Monoamine Oxidase Inhibitors. *Plant*. 11(15);1-10, 1998.
15. Zbakh H, Zubia E, Reyes CDL, Calderon-Montano JM, Motilva V. Anticancer Activities of Meroterpenoids Isolated from the Brown Alga

Cystoseira usneoides against the Human Colon Cancer Cells HT-29. Foods. 9(3);2-19, 2020.

16. Kim SH. Antioxidant activity and cell bioactivity of *Sargassum macrocarpum* extract. Journal of the Korea Convergence Society. 12(8);301-308, 2021.

17. Kim AR, Song EJ, Kim MJ, Lee SY, Kim KBWR, Kim JH, Kim SJ, Hong YK, Park JG, Kim JH, Lee JW, Byun MW, Ahn DH. Effects of Gamma Irradiation on Antioxidant Properties and Physical Characteristics of *Sargassum siliquastrum* Water Extract. J Korean Soc Food Sci Nutr. 37(3);357-361, 2008.

18. Park JC, Choi JS, Song SH, Choi MR, Kim KY, Choi JW. Hepatoprotective Effect of Extracts and Phenolic Compound from Marine Algae in Bromobenzene-treated Rats. Kor. J. Pharmacogn. 28(4):239-246, 1997.

19. You SH, Jang M, Kim GH. Inhibition of nitric oxide and lipid accumulation by *Sargassum* sp. seaweeds and their antioxidant properties. The Korean Society of Food Preservation. 28(2):288-296, 2021.

20. Lee SJ, Lee DG, Kim MH, Kong CS, Yu KH, Kim YY, Lee SH. Enhancement of Anti-inflammatory activity by fermentation of *Sargassum siliquastrum*. Journal of Life Science. 26(3):318-324, 2016.

21. Jeong DH, Kim KBWR, Kang BK, Jung SA, Kim HJ, Jeong HY, Bark SW, Ahn DH. Anti-inflammatory activity of the water extract of *Sargassum fulvellum*. KSBB J. 27(6):325-329, 2012.

22. Jeong DH, Kim KBWR, Kim MJ, Kang BK, Bark SW, Pak WM, Kim BR, Ahn NK, Choi YU, Ahn DH. Anti-inflammatory effect of ethanol extract from *Sargassum fulvellum* on lipopolysaccharide induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells and mice ears. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 43(8):1158-1165, 2014.

23. Liu QY, Meng QY. Therapeutic effect of seaweed polysaccharide from *Sargassum confusum* on sarcoma s180 in mice and its mechanism. Ai Zheng. 24(12);1469-1473, 2005.

24. Chang KW, Kim HG, Cho CH. Antibacterial effects of *Sargassum horneri* extract to the *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* strains. The Korean Academy of Preventive Dentistry and Oral Health. 21(2):379-338, 1997.

25. Lee JH, Ko JY, Oh JY, Kim CY, Jeon YJ. Anticancer activity of Sargachromanol K from *Sargassum siliquastrum* against B1610 cells via apoptosis and cellular differentiation. Fish Aquatic Sci. WORLD AQUACULTURE, 378-378, 2015.

26. Kim YJ, Jeong SM. Effect of Salinity on Hydrolysis for Bioethanol Production from *Sargassum horneri*. Journal of the Korean Society of Urban Environment. 20(3);191-197, 2020.

27. Yende SR, Harle UN, Chaugule BB. Therapeutic potential and health benefits of *Sargassum* species. Pharmacogn Rev. 8(15);1-7, 2014.

28. Kim JA, Ahn BN, Kong CS, Kim SK. The chromene sargachromanol E inhibits ultraviolet A-induced ageing of skin in human dermal

fibroblasts. Br J Dermatol. 168(5):968-976, 2013.

29. Fernando IPS, Dias MKHM, Madusanka DMD, Han EJ, Kim MJ, Jeon YJ, Ahn GN. Step gradient alcohol precipitation for the purification of low molecular weight fucoidan from *Sargassum siliquastrum* and its UVB protective effects. International Journal of Biological Macromolecules. 163(15):26-35, 2020.

30. Ham YM, Kim KN, Lee WJ, Lee NH, Hyun CG. Chemical constituents from *Sargassum micracanthum* and antioxidant activity. Inter. J. Pharmacol. 6(2):147-151, 2010.

31. Kim C, Lee IK, Cho GY, Oh KH, Lim YW, Yun BS. Sargassumol, a novel antioxidant from the brown alga *sargassum micracanthum*. J. Antibiotics. 65:87-89, 2012.

32. Jeong DH, Kim KBWR, Kang BK, Jung SA, Kim HJ, Jeong HY, Bark SW, Ahn DH. Anti-inflammatory activity of the water extract of *Sargassum fulvellum*. KSBB J. 27(6):325-329, 2012.

33. Jeong DH, Kim KBWR, Kim MJ, Kang BK, Bark SW, Pak WM, Kim BR, Park HM, Im MH, Ahn DH. Anti-atopic activity of *Sargassum micracanthum* ethanol extracts. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 42(1):82-88, 2014.

34. Rim DB, Kim CH, Hwang JK. Inhibitory effect of majaban (*Sargassum fulvellum*) extract on ultraviolet B-induced photoaging in hairless mouse skin. Korean J. Food Sci. Technol. 52(5):467-475, 2020.

35. Jang YJ, Kwon SO, Yeo KM, Hong MJ, Kim BN, Han DS. Anti-obesity effect of *Sargassum confusum* ethanol extract in Obese Rats. Korean J. Food Sci. Technol. 43(2):189-194, 2011.

36. Lee YJ, Yoon BR, Choi HS, Lee BY, Lee OH. Effect of *Sargassum micracanthum* extract on lipid accumulation and reactive oxygen species (ROS) production during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Korean J. Food Preserv. 19(3):455-461, 2012.

37. Bae SJ. Anticarcinogenic effects of *Sargassum fulvellum* fractions on several human cancer cell lines *in vitro*. J Korean Soc Food Sci Nutr. 33(3):480-486, 2004.

38. Choi HJ, Seo YW, Lim SY. Effect of solvent extracts from *sargassum hemiphyllum* on inhibition of growth of human cancer cell lines and antioxidant activity. Journal of Life Science. 17(11):1533-1538, 2007.

39. Jonathan FVM, Darling D, Cecilia RHM, Alan EP, Luvriel MFH, Ivonne OC, Elena MWJ, Augusto RLC, Sayuri VQJ, Angel GRL, Jose CB. UHPLC-MS/MS studies and antiproliferative effects in breast cancer cells of mexican *Sargassum*. AntiCancer Agents Med Chem, 23(1):76-86, 2023.

40. Lee SE, Lim CY, Ahn SC, Cho SI. A Study of the Anti-Cancer Effects of the Hexane Fraction of the Methanol Extract of Forsythiae Fructus. Pharmacogn Mag. 13(52):719-724, 2017.

41. Ji NN. A Study of Gastrointestinal and Bone Marrow Adverse Events after Administration of Various Chemotherapeutic Agents in Canine Malignant

- Tumor Patients. Gyeongsang National University. master's thesis. 2018.
42. Kim KS. Development of analysis method on arsenic chemicals in seafood., Ministry of Food and Drug safety, Cheong Ju, Korea, 2007.
43. Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total Polyphenols, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Korean Natural and Medicinal Plants. Korean J. Food Sci. Technol. 44(3);337-342, 2012.
44. Chiharu N, Tadashi N, Toshimara Y. Effect of pH on the *in vitro* absorption of mutagens to dietary fibers. Biosci Biotech Biochem. 56(7);1100-1103, 1992.
45. Lee CH, Park YN, Lee SG. Analysis and comparison of bioactive compounds and total antioxidant capabilities of Korean brown algae. Korean J. Food Sci. Technol. 42(1);54-59, 2020.
46. Li Y, Fu X, Duan D, Liu X, Xu J, Gao X. Extraction and Identification of Phlorotannins from the Brown Alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. 15(2);1-15, 2017.
47. Lee SY. Isolation and Structure Determination of Bioactive Constituents from a Brown Alga *Sargassum siliquastrum* and a Terrestrial Vascular Plant *Portulaca oleracea*(Purslane). Korea Maritime & Ocean University. Doctoral dissertation. 2012.
48. Lee JI, Kwak MK, Park HY, Seo YG. Cytotoxicity of meroterpenoids from *Sargassum siliquastrum* against human cancer cells. Nat Prod Commun. 8(4);431-432, 2013.

49. Kim JY, Lee JA, Kim KN, Yoon WJ, Lee WJ, Park SY. Antioxidative and Antimicrobial Activities of *Sargassum muticum* Extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr. 36(6);663-669, 2007.
50. Liu H, Zeng Z, Wang S, Li T, Mastriani E, Li QH, Bao HX, Zhou YJ, Wang X, Liu Y, Liu W, Hu S, Gao S, Yu M, Qi Y, Shen Z, Wang H, Gao T, Dong L, Johnston RN, Liu SL. Main components of pomegranate, ellagic acid and luteolin, inhibit metastasis of ovarian cancer by down-regulating MMP-2 and MMP-9. Cancer Biol Ther. 18(12);990-999, 2017.
51. Zhang Y, Zhang XX, Yuan RY, Ren T, Shao ZY, Wang HF, Cai WL, Chen LT, Wang X, Wang P. Cordycepin induces apoptosis in human pancreatic cancer cells via the mitochondrial-mediated intrinsic pathway and suppresses tumor growth in vivo. Onco Targets Ther. 11;4479-4490, 2018.
52. Nam MK, Kang KJ. The Effect of Red Cabbage (*Barssica oleracea* L. Var. *capitata* f. *rubra*) Extract on the Apoptosis in Human Breast Cancer MDA-MB-231 cells. J Korean Soc Food Sci Nutr. 42(1);8-16, 2013.
53. Lee KW, Kim JI, Lee SY, Choi KM, Oh YT, Jeong JW. Induction of Apoptosis by Water Extract of Glycyrrhizae radix in Human Bladder T24 Cancer Cells. Korean J. Plnat Res. 32(4);255-263, 2019.
54. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science. 281;1322-1326, 1998.

55. Yinjun L, Jie J, Weilai X, Xiangming T. Homo harringtonine mediates myeloid cell apoptosis via up regulation of pro-apoptotic bax and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). *Am J Hematol.* 76(3);199-204, 2004.
56. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BAm Wang G, Iyle S, Smulson M. Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Bio Chem.* 274(33);22932-22940, 1999.
57. Alshammari GM, Balakrishnan A, Alshatwi AA, Al-Khalifa A. Cucurbita ficifolia Fruit Extract Induces Tp53/Caspase-Mediated Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Biomed Res Int.* 25;1-11, 2020.
58. Nimlamool W, Chansakaow S, Potikanond S, Wikan N, Hankittichai P, Ruttanapattanakul J, Thaklaewphan P. The Leaf Extract of Mitrephora chulabhorniana Suppresses Migration and Invasion and Induces Human Cervical Cancer Cell Apoptosis through Caspase-Dependent Pathway. *Biomed Res Int.* 12;1-13, 2020.
59. Yao X, Jiang W, Yu D, Yan Z. Luteolin inhibits proliferation and induces apoptosis oh human melanoma cells in vivo and in vitro by suppressing MMP-2 and MMP-9 through the PI3K/AKT pathway. *Food Funct.* 10(2);703-712, 2019.
60. Lee JH, Ko JY, Oh JY, Kim CY, Jeon YJ. Anticancer activity of Sargachromanol K from *Sargassum siliquastrum* against B1610 cells via apoptosis and cellular differentiation. *Fish Aquatic Sci. WORLD AQUACULTURE*, 378-378, 2015.

61. Heo SJ, Kim KN, Yoon WJ, Oh CH, Choi YU, Affan A, Lee YJ, Lee HS, Kang DH. Chromene induces apoptosis via caspase-3 activation in human leukemia HL-60 cells. *Food Chem Toxicol*, 49(9);1998-2004, 2011.

감사의 글

인생의 숙제와도 같았던 박사학위의 긴 여정이 마무리되었습니다. 길이 보이지 않아 막막하고 외로웠던 힘든 시기, 포기하고 싶은 날도 많았지만 잘 극복하고 이겨낼 수 있도록 도와주신 분들과 많은 우여곡절을 끝으로 학위논문이 세상에 빛을 볼 수 있도록 도와주신 많은 분들께 진심으로 감사의 말씀드립니다. 많이 부족하지만 박사학위 논문을 마치면서 그분들께 감사의 말씀을 전하고자 합니다.

먼저 저를 믿어주시고 관심으로 지도해 주신 김춘성 지도 교수님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 대학원 생활에서 많은 대외 활동을 통해 즐거운 추억을 많이 남겨주신 김수관 원장님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 사람의 인연을 소중히 생각하시며, 가장 가까이에서 걱정과 응원으로 지도해 주신 이숙영 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 실험과는 거리가 멀었던 제가, 실험을 배우고 싶다면 처음 실험실에 발을 디딘 날, 걱정하는 표정으로 제게 직접 실험을 가르쳐주시던 김재성 교수님의 따뜻한 마음 덕분에 제가 많은 것을 배웠다고 꼭 전해드리고 싶었습니다 감사드립니다. 2015년부터의 인연을 시작으로 멀리 강원도에서 현재까지 아낌없는 사랑과 관심, 응원과 격려를 보내주고 계신 강원대학교 치위생학과 정미애 교수님께 깊은 사랑과 감사의 말씀을 드립니다. 항상 밝은 에너지로 제게 응원과 격려, 조언을 아끼지 않으신 김진 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 부족한 제가 완도에서 잘 적응할 수 있도록 도와주시며, 또한 학위논문을 잘 마칠 수 있도록 도와주신 이슬아 교수님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다.

2022년 4월 완도 해양생물연구센터에 오게 되며, 현재까지 함께 가족같이 동고동락(同苦同樂)하고 있는 선생님들과의 인연은 평생 잊지 못할 것 같습니다. 날개 잃은 완도 센터 수호천사 강하리 과장님, 있던 스트레스도 날려주시는 완도에서 제일 잘나가는 서일환 선생님, 성실함, 책임감, 씩씩하고 멋진 여성의 표본인 강초은 선생님, 어디선가 누군가에게 무슨 일이 생기면 항상 출동해 주셔서 도와주시는 황경하 반장님, 너무나 짧게 느껴졌던 한 달 동안 함께 한술밥 먹으며 유능하고 뚜렷한 실력자의 모습을 보여줬던 장고은 선생님까지 모두 깊은 감사의 말씀을 드리며, 이 외에도 학위과정 동안 저를 아끼고 격려해주셨던 많은 분들께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다.

아울러 하나뿐인 딸 공부한다고 안쓰러워서 하시면서도 박사학위 졸업을 누구

보다 기뻐하실 박지현 어머니, 전관중 아버지, 가장 든든한 조력자인 사랑하는 박은임 큰이모와 소용희 큰이모부, 든든한 남동생 소승준, 공부하는 며느리 맛있는 음식으로 열심히 응원해 주신 정정순 어머니님, 언제나 예뻐해주신 김양호 아버지님, 예쁘고 사랑스럽고 유쾌한 김다혜 아가씨, 힘들지만 끝까지 열심히 하라고 응원해주신 박정대 큰삼촌, 박정곡 둘째 삼촌, 박은옥 작은이모, 박정언 작은삼촌 모두 감사의 말씀을 드립니다. 내 인생의 20대 후반을 뜨거운 전성기로 만들어줬던, 앞으로도 함께할 사랑하는 오.징.어(오랫동안 징그럽게 어울리자) 친구들 남영희, 김선영 너무 고마워!

마지막으로, 가장 어두울 때 만나 이렇게 졸업을 하게 되는 지금까지 한결같은 관심과 사랑, 응원으로 곁을 지켜준 인생의 동반자, 평생의 단짝 김현수에게 감사의 말씀을 드립니다.

사람은 평생을 배움의 과정으로 삼고 살아간다고 합니다. 박사학위라는 큰 산을 넘은 만큼 제 자신도 더 단단해지고 성숙해졌을 것이라 믿습니다. 새로운 지식뿐 아니라 인(仁)과 의(義)가 바탕이 되는 삶을 살 수 있도록 저의 좌우명인 ‘初志一貫’의 마음으로 박사라는 무게감과 겸손함을 가지고 나아가도록 노력하겠습니다.

2023년 2월, 9년간의 대학원 생활을 마칩니다. 다시 한번 모든 분들께 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

정서윤 올림