

이학석사 학위논문

왕거머리말(*Zostera asiatica*)의  
생리활성 성분의 분리

Isolation of bioactive constituents from *Zostera asiatica*



지도교수 서영완

2013년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

홍주완

本 論文을 홍주완의  
理學碩士 學位論文으로 認准함.

위원장 임선영 (인)

위원 손재학 (인)

위원 서영완 (인)



한국해양대학교 대학원

# 목 차

	Page
List of schemes -----	i
List of table -----	ii
List of figures -----	iii
List of abbreviations -----	vi
Abstract -----	1
1 서론 -----	3
2 재료 및 방법 -----	6
2-1. 재료 -----	6
2-2. 시약 -----	6
(1) 추출, 분획 및 분리 -----	6
(2) 활성 -----	6
(3) 기기 -----	7
(4) 세포배양 -----	7
2-3. 추출 및 분리 -----	9
(1) 왕거머리말의 추출 및 분획 -----	9
(2) 왕거머리말의 활성 성분 분리 -----	11
2-4. 총 polyphenol 함량 측정 -----	13
2-5. 항산화 활성 실험 -----	14
(1) DPPH radical 소거 활성 -----	14
(2) Peroxynitrite 소거 활성 -----	17

(3) 세포 독성 측정 -----	20
(4) 세포내 활성 산소종(ROS) 측정 -----	22
(5) GSH 함량 측정 -----	24
(6) Genomic DNA 추출 및 Genomic DNA 산화 생성물 측정 -----	25
2-5 암세포 증식 억제 실험 -----	26
(1) MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정 -----	26
(2) 역전사 증합 연쇄 반응(RT-PCR) 분석 -----	27
2-6 항염증 활성 실험 -----	29
(1) NO 생성 억제 효과 -----	29
3. 결과 및 고찰 -----	31
3-1 총 polyphenol 함량 측정 -----	31
3-2 왕거머리말로부터 분리한 물질의 구조 결정 -----	33
3-3 <i>In vitro</i> 항산화 활성 -----	39
(1) DPPH radical 소거 활성 -----	39
(2) Peroxynitrite 소거 활성 -----	41
3-4 세포 수준에서의 항산화 활성 -----	44
(1) HT-1080 세포에 대한 조추출물과 용매분획물의 독성 효과 -----	44
(2) 세포내 활성 산소종(ROS) 소거 활성 -----	46
(3) 세포내 GSH 함량 측정 -----	50
(4) Genomic DNA의 산화 생성물 측정 -----	53
3-3 인체 유래 암세포에 대한 세포증식 억제 효과 -----	55
(1) HT-1080 세포 증식 억제 효과 -----	55
(2) AGS 세포 증식 억제 효과 -----	57

(3) HT-29 세포 증식 억제 효과	59
(4) MCF-7 세포 증식 억제 효과	61
(5) 용매 분획물이 apoptosis 관련 mRNA 발현에 미치는 효과	63
3-4 NO 생성 억제 효과	66
4. 요약 및 결론	69
5. 참고문헌	71
6. 부록	75



## List of schemes

	Page
Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from <i>Zostera asiatica</i> .	10
Scheme 2. Isolation of the compound from <i>Z. asiatica</i> .	12
Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect.	16
Scheme 4. Measurement of the ONOO <sup>-</sup> scavenging effect.	19



## List of tables

	Page
Table. 1. Sequence of primer used for RT-PCR	28
Table. 2. $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ NMR spectral data for compound.	34



## List of figures

	Page
Fig. 1. Scavenging of the DPPH radical by phenol.	15
Fig. 2. Peroxynitrite (ONOO <sup>-</sup> ) mediated oxidation of DHR123.	18
Fig. 3. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.	21
Fig. 4. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.	23
Fig. 5. Coloring reaction of NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> detection.	30
Fig. 6. Contents of total polyphenol in crude extracts and solvent fractions from <i>Z. asiatica</i> .	32
Fig. 7. Chemical structure of compound from <i>Z. asiatica</i> .	35
Fig. 8. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound in CD <sub>3</sub> OD.	36
Fig. 9. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound in CD <sub>3</sub> OD.	36
Fig. 10. COSY spectrum of compound in CD <sub>3</sub> OD.	37
Fig. 11. TOCSY spectrum of compound in CD <sub>3</sub> OD.	37
Fig. 12. gHMQC spectrum of compound in CD <sub>3</sub> OD.	38
Fig. 13. gHMBC spectrum of compound in CD <sub>3</sub> OD.	38
Fig. 14. DPPH radical scavenging effect of crude extracts and solvent fractions from <i>Z. asiatica</i> .	42
Fig. 15. Scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from <i>Z. asiatica</i> on authentic ONOO <sup>-</sup> (% of control).	43
Fig. 16. Scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from <i>Z. asiatica</i> on ONOO <sup>-</sup> from SIN-1 (% of control).	45
Fig. 17. Effect of crude extracts and solvent fractions from <i>Z. asiatica</i> on viability of HT-1080 cells.	47
Fig. 18. Effects of crude extracts from <i>Z. asiatica</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cell	48



- were incubated with different concentration (200, 100, 50, 10 and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of the sample for the indicated times respectively.
- Fig. 19. Effects of  $\text{H}_2\text{O}$  and *n*-BuOH fractions from *Z. asiatica* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cell were incubated with different concentration (200, 100, 50, 10 and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of the sample for the indicated times respectively. 49
- Fig. 20. Effects of 85% aq. MeOH and *n*-hexane fractions from *Z. asiatica* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cell were incubated with different concentration (200, 100, 50, 10 and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of the sample for the indicated times respectively. 51
- Fig. 21. Effects of solvent fractions of *Z. asiatica* on regulation of GSH level in HT-1080 cells. 52
- Fig. 22. Antioxidant effect of crude extracts and its solvent fractions from *Z. asiatica* on genomic DNA in HT-1080 cells. 54
- Fig. 23. Effects of crude extracts and its solvent fractions from *Z. asiatica* on viability of HT-1080 cell. (200, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 56
- Fig. 24. Effects of crude extracts and its solvent fractions from *Z. asiatica* on viability of AGS cell. (200, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 58
- Fig. 25. Effects of crude extracts and its solvent fractions from *Z. asiatica* on viability of HT-29 cell. (200, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 60
- Fig. 26. Effects of crude extracts and its solvent fractions from *Z. asiatica* on viability of MCF-7 cells. (200, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 62
- Fig. 27. Effects of crude extracts from *Z. asiatica* on nitrite production in Raw 264.7 cells. (100, 50, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 64
- Fig. 28. Effect of solvent fractions from *Zostera asiatica* on apoptosis related gene expression (A) Bax (B) Bcl-2 (C) p53 (D) p21 in AGS human gastric adenocarcinoma cells. 64
- Fig. 29. Effect of 85% aq. MeOH fraction from *Zostera asiatica* on 65

apoptosis related gene expression (A) Bax (B) p53 (C) p21 in AGS human gastric adenocarcinoma cells.

Fig. 30. Effects of crude extracts from *Z. asiatica* on nitrite production in Raw 264.7 cells. (100, 50, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 67

Fig. 31. Effects of solvent fractions from *Z. asiatica* on nitrite production in Raw 264.7 cells. (100, 50, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 68

Fig. 32. Chemical structure of compound from *Z. asiatica*. 75



## List of abbreviations

BHA	: butylated hydroxyanisole
BHT	: butylated hydroxytoluene
c	: concentration
CD <sub>3</sub> OD	: deuterium methanol
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	: dichloromethane (methylene chloride)
<sup>13</sup> C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EtOAc	: ethyl acetate
Fig.	: figure
H <sub>2</sub> O	: water
<sup>1</sup> H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
HRFAB	: high resolution fast atom bombardment
Hz	: hertz (sec <sup>-1</sup> )
IC <sub>50</sub>	: 50% inhibitory concentration
IR	: Infrared
LRFAB	: low resolution fast atom bombardment
MeOH	: methanol
MS	: mass spectroscopy
<i>n</i> -BuOH	: normal-butanol
NO·	: nitric oxide radical
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: superoxide anion radical
·OH	: hydroxyl radical
ONOO <sup>-</sup>	: peroxyxynitrite
RNS	: reactive nitrogen species
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reverse phase
S	: substrate
SiO <sub>2</sub>	: silica gel
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet
<i>v</i> <sub>max</sub>	: maximal velocity

# Isolation of bioactive constituents from *Zostera asiatica*

Joowan Hong

*Division of Marine Environment and Bioscience, Korea Maritime University, Busan, 606-791, Korea*

## Abstract

As the human lifespan has been extended due to great advances in medical science, the incidence of various adult diseases has rapidly increased – cancer, cardiac disorder, diabetes, dementia etc. In recent years, there has been growing interest in the use of natural products, especially those derived from terrestrial plants or seaweeds. Plant-based medicine has definitely played an expanding role in the treatment of adult diseases.

As a part of our search for bioactive compounds from marine organisms, we collected *Zostera asiatica*, one of the marine flowering plants, from the southern coastal area of Korea. Dried samples were extracted twice: with acetone/methylene chloride (A+M) and with methanol (MeOH), respectively. The combined crude extracts were evaporated *in vacuo*, and then the residue was partitioned between water and methylene chloride. The aqueous layer was fractionated into H<sub>2</sub>O and *n*-butanol, and then the organic layer was also fractionated

into 85% aq. MeOH and *n*-hexane, successively.

The crude extracts and their solvent fractions were evaluated for antioxidant, antiproliferative, and antiinflammatory effects, respectively. In antioxidant bioassay, *n*-BuOH and 85% aq. MeOH fractions showed a strong scavenging effect on DPPH radical and peroxynitrites. In a cellular system using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) as fluorescence probe in HT-1080 cells, all extracts and solvent fractions except the H<sub>2</sub>O fraction significantly decreased the level of intracellular reactive oxygen species(ROS). On the basis of the above, two flavonoids were obtained from *n*-BuOH fraction by bactivity-guided separation.

On the other hand, in cytotoxicity bioassay system using the MTT reduction method, the 85% aq. MeOH fraction among samples tested showed the most inhibitory effect on growth of human cancer cells AGS, HT-29, and MCF-7 cells. However, all samples didn't exhibit the significant inhibitory effect on lipopolysaccharide(LPS)-stimulated nitric oxide(NO) production. Therefore, these results suggest that *Z. asiatica* may be useful as a potential candidate for both natural antioxidant to oxidative damage, and chemopreventive agent for cancer.

# 1. 서론

인류의 사회는 점차 과학이 발달하게 되고 삶이 윤택해지며, 높은 수준의 의료 기술로 인해 인류의 수명 또한 증가하게 되었다. 이에 따라 심장질환, 암, 당뇨, 치매 등의 정신 질환 등의 만성 또는 난치성 질환이 증가하게 되었고, 이들을 해결하기 위한 의약품 개발이 중요한 연구의 대상이 되었다.

예로부터 인류는 각종 질병과 상처를 치료하기 위한 수단으로 여러 종류의 약초를 이용하여 이를 해결하였다. 시대가 지남에 따라 여러 약초에 대한 지식은 현재 천연물 개발의 지표가 되어 수많은 의약품들이 개발되었다, 하지만 점차 늘어나는 인구수와 새로운 질병의 발생 등으로 인해 육상에서의 천연물의 양과 효능은 그 한계에 이르고 있다. 이를 해결하기 위해 인류는 바다로 눈을 돌리게 되었고, 해양 천연물에 주목하게 되었다.

지구상에 존재하는 생명체 중 약 80%가 해양에 존재하며, 해양 생물종에 대해 진행된 연구는 극히 일부에 불과하므로 해양생물자원에 대한 기대와 가능성은 무한하다. 그리고 해양생물은 고염분과 고압의 환경에서 서식하기 때문에 육상에서의 생물과 다른 특이한 생화학적 대사산물이 발견될 가능성 또한 크다. 실제로 1951년 미국 플로리다 연안에서 채집된 해면동물인 *Cryptotethya crypta* 로부터 육상에서 발견된 적이 없는 독특한 구조의 ara-A(vidarabine)과 ara-C(cytarabine)가 분리되었다(Molinski et al. 2009).

그리고 항산화물질을 생산하는 해양 방선균인 *Streptomyces* Sp. 로부터 항산화활성이 연구되는가 하면(Kim et al. 2010), 김, 다시마, 미역 등과 같은 해양 소재 생물로부터 얻은 추출물로 항산화 활성에 대한 연구가 진행되기도 하였다(Jang et al. 2010).

이러한 해양 유래 생물로부터 항산화제로의 가능성 뿐만 아니라 해양 식물의 추출물로부터 항균 물질로의 개발 가능성 또한 이루어졌다(Lim et al. 2008).

그리고 암에 대한 관심이 높아지면서 항암에 대한 연구 또한 활발해졌는데, 그

연구 대상 또한 바다에서 찾게 되었다. 바다에 서식하는 따개비로부터 항암효과를 가지는 물질을 탐색하는가 하면(Sin et al. 2010), 해양에 서식하는 식물의 추출물로부터 항암 효과에 대한 가능성을 찾기도 하였다(Kong et al. 2008).

이러한 각종 생리활성 뿐만 아니라 해양심층수를 이용한 개량식 된장, 간장, 고추장 등을 제조하여 기능적 특성을 연구하는 등 해양으로부터 얻을 수 있는 발전 가능성은 무궁무진하다(Ham et al. 2008, Jung et al. 2009).

이 실험에 사용된 왕거머리말(*Zostera asiatica*)은 해양 현화식물로 해초(seagrass)에 속한다. 이들은 형태학적으로 잎, 줄기 및 뿌리의 구분이 명확하고 관다발 조직이 잘 발달되어 있고 바닥에 고착하여 조간대에서부터 조하대까지 출현한다. 해양 현화식물은 대부분 길고 가는 잎을 가지고 있어 이들이 군집을 이루어 자라는 모습이 육지의 초원처럼 보이기 때문에 해조류와 구별하여 바다에서 자라는 풀, 즉 해초라 불린다. 모든 자가영양 식물들처럼 대부분이 빛이 잘 도달할 수 있는 수심이 얕은 곳에서 자란다. 해초는 넓은 해중립을 형성하여 다른 생물들의 좋은 서식처가 되므로 온갖 종류의 해양생물들이 서식하며 매우 높은 1차 생산력을 갖는다(Huh et al. 1998; Lee et al. 2005; Kim et al. 2009; Kim et al. 2010). 왕거머리말은 수심 1~3 m 깊이의 모래나 진흙땅에 서식하는 다년생 속씨식물(angiosperm)로서 동아시아의 아열대해역에서부터 베트남, 사할린, 러시아까지 분포하며 북아메리카의 서부연안에서 발견되기도 한다. 거머리말과에 대한 연구는 생태나 환경적인 영향에 대한 연구가 대부분이며(Huh et al. 1998; Choi et al. 2005; Lee et al. 2005; Khotimchenko et al. 2006; Kim et al. 2009; 2010), 천연물화학적인 연구는 거머리말속(*Zostera*)에 속한 종을 제외하고 거의 이루어지지 않았다(Kumar et al. 2008). 최근 이루어진 거머리말속에 대한 천연물화학적인 연구도 거머리말(*Z. marina*)에 집중되었으며 다른 종에 대한 연구는 매우 드물었다(Hua et al. 2006; Archamlale et al. 2009). 지금까지 거머리말에 대해서는 항산화, 항미생물 등의 생리활성(Roth et al. 1988; Kim et al. 2004; Kolenchenko et al. 2005; Sonina et al. 2007; Kumar et al. 2008; Choi et al. 2009; Yang et al. 2010)과 flavonoid 같은 이차 대사물질들(Kim

et al. 2004; Archamlale et al. 2009)이 보고되었다.

본 연구에서는 해양 현화식물인 왕거머리말을 대상으로 *in vitro*와 세포수준에서의 항산화 효과와 인체 유래 암세포를 이용한 항암효과, 항염증 효과를 탐색하여 왕거머리말의 각종 생리활성효과를 파악하고, 더 나아가 항산화제 및 항암제와 같은 의약품 등의 개발가능성을 알아보았다.





## 2. 재료 및 방법

### 2-1 재료

2007년 7월 경상남도 창원시 진동면 다구리 해변에서 직접 채집한 왕거머리말을 사용하였으며, 응달에 건조한 후 냉동보관하여 실험에 사용하였다.

### 2-2 시약

#### (1) 추출, 분획 및 분리

추출과 분획, 분리에 사용한 용매는 모두 1급 시약을 사용하였다. Column packing materials 는 RP-18(YMC-Gel ODS-A, 12 nm, S-75  $\mu\text{m}$ )을 사용하였으며, TLC plate 는 Silica gel 60 F254(1 mm, Merck)를 사용하였다. HPLC에 사용한 column 은 YMC pack ODS-A(250 $\times$ 10 mm, S 5  $\mu\text{m}$ , 12 mm)를 사용하였고, guard column(7.5 $\times$ 4.6 mm, Alltech)을 사용하였다.

#### (2) 활성화

항산화 활성화 실험에 사용한 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical(DPPH), 3-morpholinsydnonimine(SIN-1)과 dihydrorhodamine 123(DHR 123), penicillamine(DL-2-amino-3-mercapto-3-methyl-butanoic acid)은 Sigma사(ST Louis, MO, USA)에서 구입하였고 peroxyntirite( $\text{ONOO}^-$ )는 Cayman(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양에 필요한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)과 RPMI-1640, FBS(Fedal

Bovine Serum)는 Hyclone(Logan, Utah, USA), 0.05 % Trypsin-0.02 % EDTA와 100 units/ml penicillin-streptomycin은 GIBCO사(USA)에서 구입하였다. ROS측정에 사용된 DCFH-DA는 Molecular Probes inc.(Eugene, OR, USA)로부터 구입하였다. NO에 사용된 MEM(Modified Eagle Medium) Sigma에서 구입하였다.

### (3) 기기

$^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR, two-dimensional NMR 실험은 모두 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였다. Varian RI detector와 high performance liquid chromatography(HPLC, Dionex p580)를 사용하여 화합물을 정제·분리하였다. 항산화 활성 및 MTT 등의 측정에 UV-Vis spectrophotometer(Thermo Spectronic, England), Multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT(Bio-TEK instruments, USA)를 사용하였다. 세포의 배양은  $\text{CO}_2$  incubator(Forma Scientific, Japan)를 사용하였고, 그 외에 rotary Evaporator(EYELA, JAPAN), vacuum pump, water bath, pipet(JBM-pipet), 여과기 등을 사용하였다.

### (4) 세포배양

실험에 사용된 AGS(human gastric adenocarcinoma cells), HT-29(human colon cancer cells), HT-1080(human fibrosarcoma cells), MCF-7(human breast cancer cells), Raw 264.7 macrophage 세포는 한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 분양받아 배양하여 실험에 사용하였다. AGS와 HT-29는 RPMI 1640 배지를 사용하여 배양하였고, HT-1080, MCF-7, Raw 264.7은 DMEM 배지를 사용하여 배양했으며, 각 배지에는 100 units/ml의

penicillin-streptomycin과 10% FBS를 첨가하였다. 실험에 사용된 세포들은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator(Forma Scientific, Japan)에서 배양하였으며, 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 배지를 교환하고, 6~7일 만에 PBS로 세척하여 AGS, HT-29, HT-1080, MCF-7은 0.05% Trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대배양하였고, Raw 264.7은 cell scraper로 분리하여 계대배양하였다.



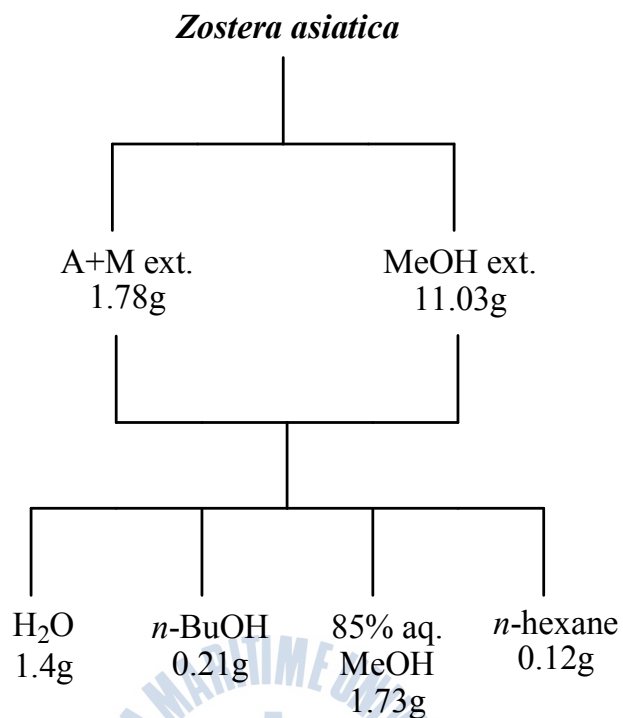
## 2-3 추출 및 분리

### (1) 왕거머리말의 추출 및 분획

창원시 진동면 다구리에서 채집한 왕거머리말(*Z. asiatica*)을 응달건조 후 acetone 과 methylene chloride 를 1:1 비율로 섞은 용매(A+M)에 침지시켜 24 시간 방치 후 여과하여 추출액을 얻었으며, 이 과정을 2회 반복하였다. 남은 잔사에 동량의 MeOH 을 첨가하여 동일한 과정으로 추출액을 얻었고, 추출액은 감압농축하여 각각 15.12 g, 229.33 g 의 조추출물을 얻었다.

조추출물은 용매극성에 따라 순차적으로 분획하여 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 각각 14.58 g, 9.56 g, 22.41 g, 171.39 g 을 얻었다.



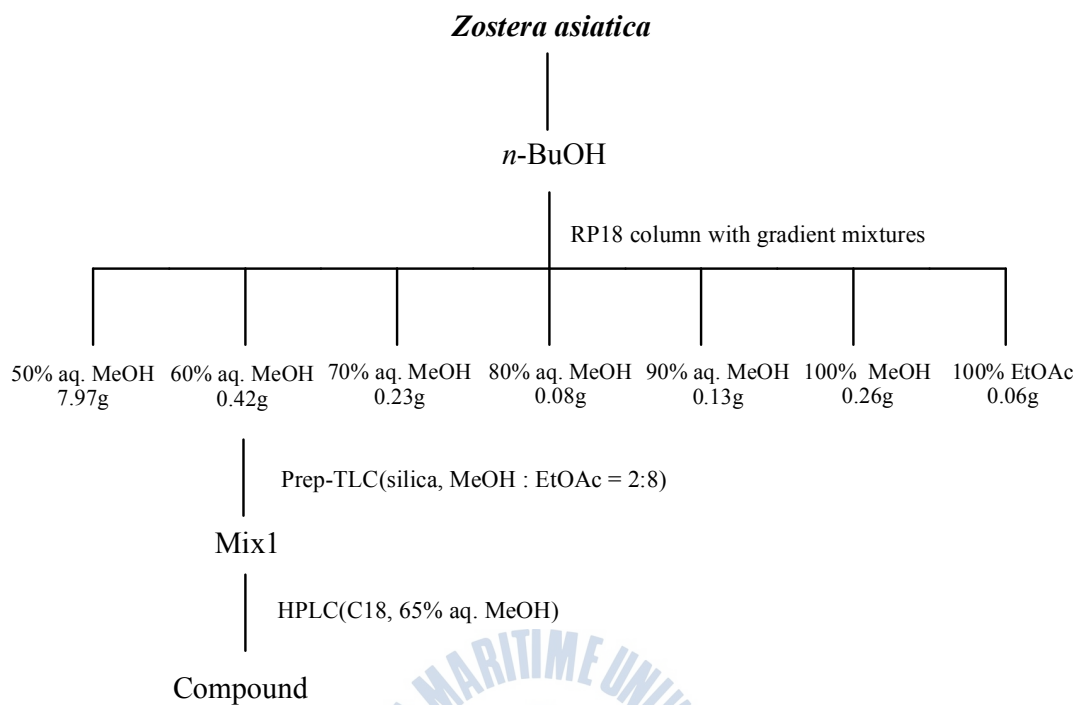


Scheme 1. Preparation of crude extractions and its solvent fractions from *Zostera asiatica*.

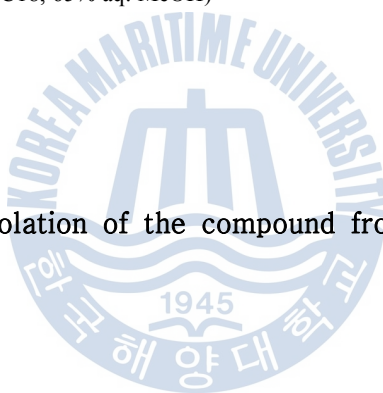
## (2) 왕거머리말의 활성 성분 분리

*n*-BuOH 분획물을 MeOH과 H<sub>2</sub>O의 혼합용매를 사용하여 C18 reversed-phase vacuum flash chromatography 를 사용하여 50%, 60%, 70%, 80%, 90% aq. MeOH, 100% MeOH 그리고 100% EtOAc 7개의 fraction을 얻었으며, 그 중 60% aq. MeOH fraction을 preparative TLC[silica, MeOH : EtOAc (2 : 8)] 하였다. 얻어진 mixture 1을 reversed-phase HPLC(ODS-A, 65% aq. MeOH) 하여 compound를 분리하였다.





Scheme 2. Isolation of the compound from *Z. asiatica*.



## 2-4 총 Polyphenol 함량 측정

각각의 추출물과 분획물에 대한 polyphenol 함량을 Folin-Denis 방법(Folin et al., 1912)을 변형한 방법으로 측정하였다. 1 mg/ml(0.1% stock)의 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물 20 µl에 250 µl의 Folin-Denize reagent를 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 70°C에서 H<sub>2</sub>O로 녹인 35% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 500 µl씩 넣어 실온에서 20분간 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 polyphenol 함량은 galic acid를 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다.



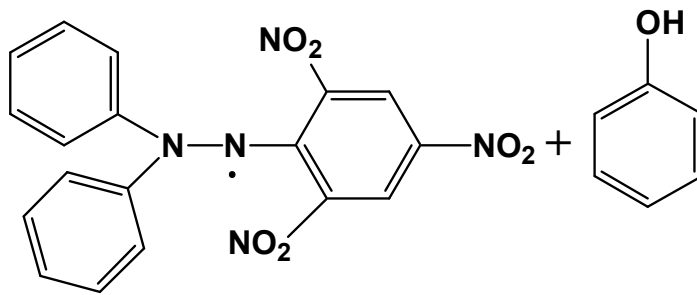


## 2-5 항산화 활성 실험

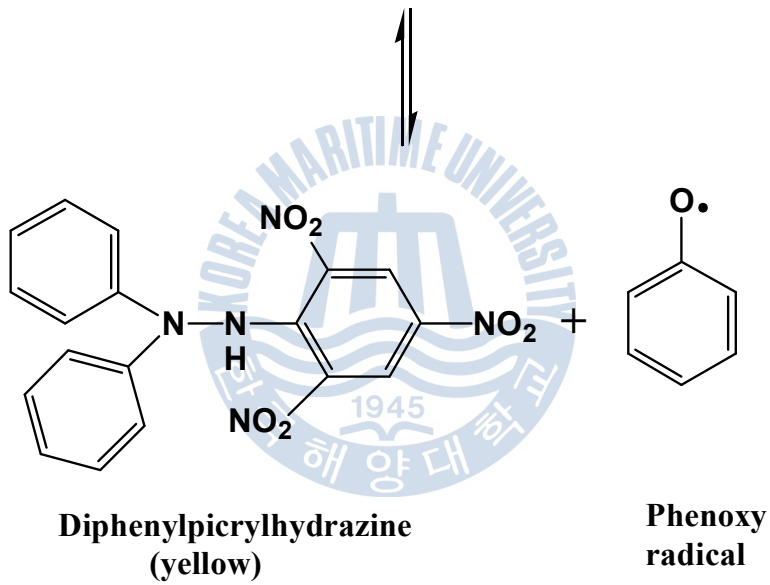
### (1) DPPH radical 소거 활성

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 시약 2 mg 을 ethanol 15 ml 에 녹여 만든 DPPH원액 1.2 ml 와 3 ml 의 ethanol, 0.5 ml 의 DMSO를 동일 비율로 혼합하여 DPPH radical solution을 준비한다. 준비된 DPPH radical solution 을 cuvette에 넣고 518 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하여 그 측정값이 0.94~0.97이 되도록 농도를 조절한다. 농도를 조절한 DPPH radical solution 900  $\mu$ l 에 준비한 시료 100  $\mu$ l 를 가하여 vortex한 후 10분 후에 518 nm의 파장에서 그 흡광도를 측정하였다(Fig. 1)(Blois, 1958).





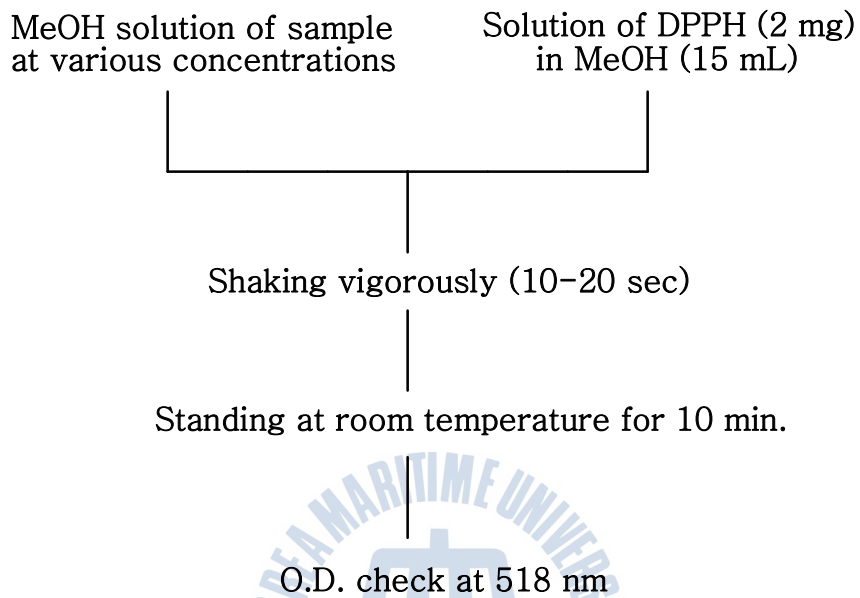
**DPPH • (Violet, 518nm)**



**Diphenylpicrylhydrazine  
(yellow)**

**Phenoxy  
radical**

Fig. 1. Scavenging of the DPPH radical by phenol.



Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect.

## (2) Peroxynitrite 소거 활성

ONOO<sup>-</sup> 소거 활성은 dihydrorodamine 123(DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다. DHR 123은 dimethylformamide에 녹여 질소로 purge시켜 -80°C 에 보관하였고, DHR 123 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서 조절하여 사용하였다. Buffer는 90 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합하여 pH를 7.4로 조절하여 100 μM DTPA(diethyltriaminepenta acetic acid)를 혼합하여 냉장보관하였고, buffer로 DHR 123을 5 μM로 희석하여 실험에 사용하였다. DHR 123 buffer 용액에 시료와 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치 후, Victor3 multilabel plate reader(PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 동일한 방법으로 실시하여 1시간동안 방치한 후 측정하였다. 이는 SIN-1이 NO•와 O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>를 동시에 발생시켜 ONOO<sup>-</sup>를 생성시키는 화합물로, authentic peroxynitrite의 급속한 DHR 123의 산화와는 달리 점진적으로 산화가 일어나게 하기 때문이다. blank는 0.3 N NaOH를 사용하였고, 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다(Kooy et al., 1994).

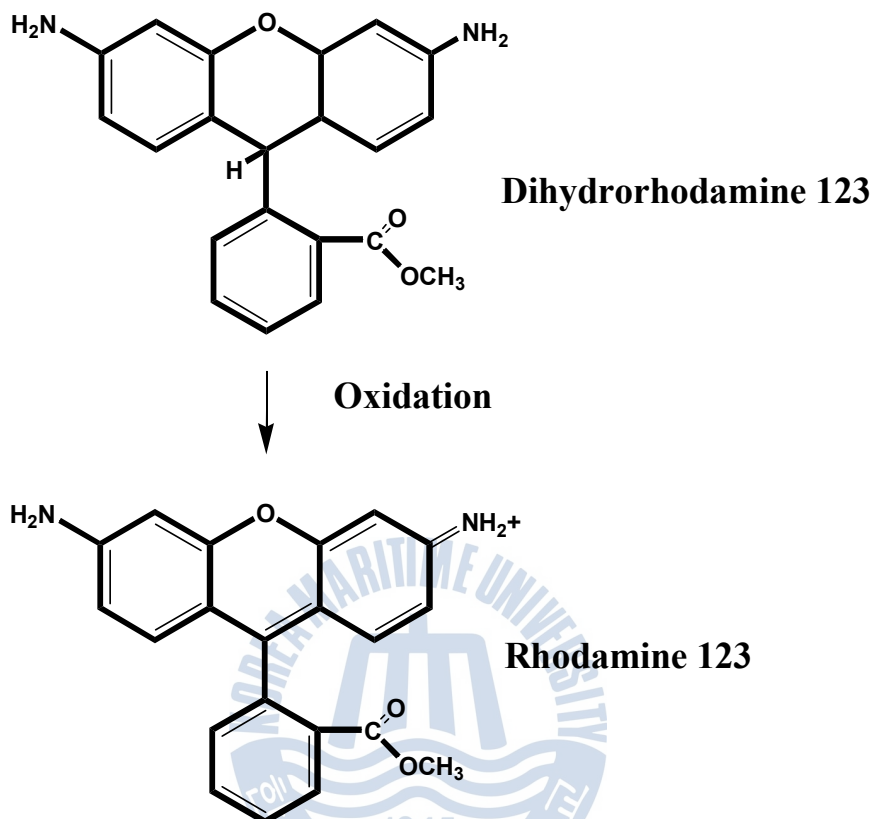


Fig. 2. Peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) mediated oxidation of DHR 123.

**Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100  $\mu$ M**



**Dihydrorhodamine 123 5  $\mu$ M**



**Incubation at 37 °C for 1 min**



**Sample**



**SIN-1 200  $\mu$ M or peroxynitrite 5  $\mu$ M**



**Measurement of fluorescence intensity**

**Excitation wavelength at 480 nm**

**Emission wavelength at 525 nm**

Scheme 4. Measurement of the ONOO<sup>-</sup> scavenging effect.

### (3) 세포 독성 측정

왕거머리말로부터 얻은 물질이 cell viability에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]시약을 이용하여 확인하였다. 배양한 세포를 각각 cell counting하여 96 well micro-plate에  $2 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 배지를 갈아준 후 농도별로 준비한 시료를 각 well에 처리하여 다시 1시간 배양하였다. 시료를 처리하여 배양된 세포는 배지를 제거한 뒤, 1 mg/ml농도의 MTT 시약을 처리하여 4시간 배양하였다. Formazan이 형성되면 MTT 시약처리한 배지를 제거 후, 형성된 formazan을 DMSO에 녹여 Victor3 multilabel plate reader(PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.



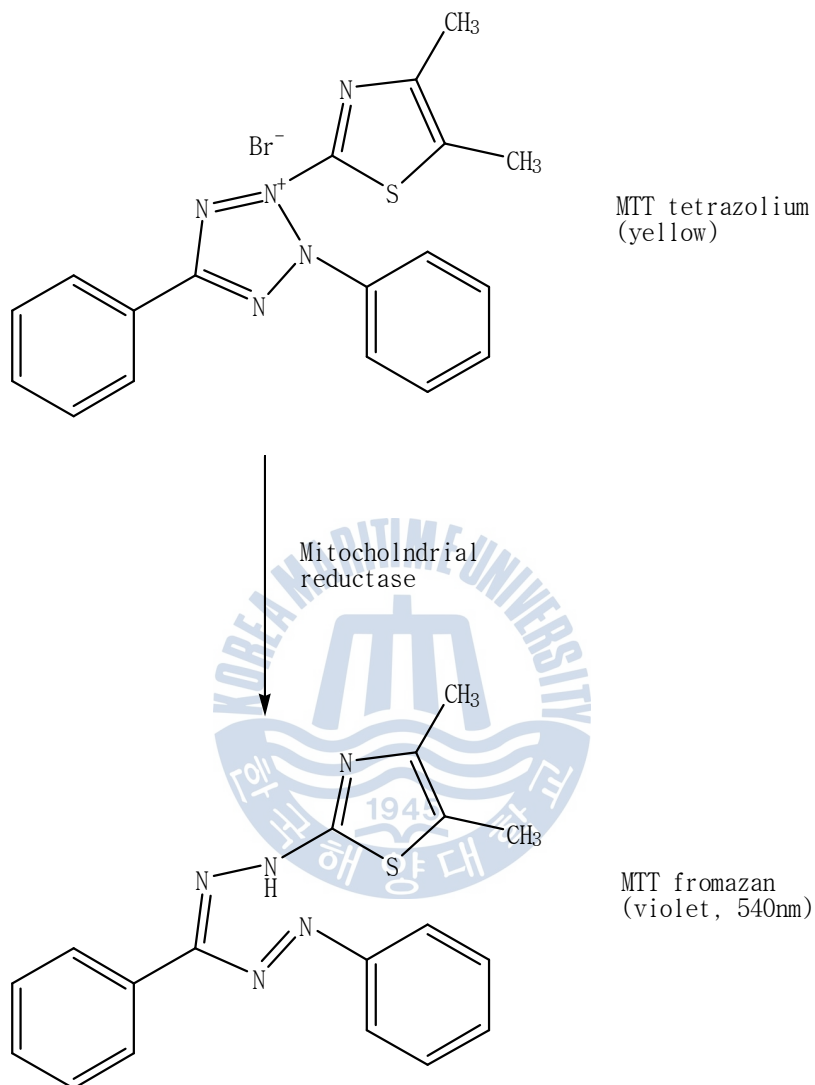


Fig. 3. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.



#### (4) 세포내 활성 산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 측정

세포내 ROS free radical 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다(Okimotoa., 2000). HT-1080 세포를 96 well micro-plate에  $2 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 PBS로 씻은 후 20 µM DCFH-DA를 각 well에 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 incubation한 후, DCFH-DA를 제거하고 PBS로 씻은 후 500 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 Victor3 multilabel plate reader(PerkinElmer, MA, USA)로 측정하였다.



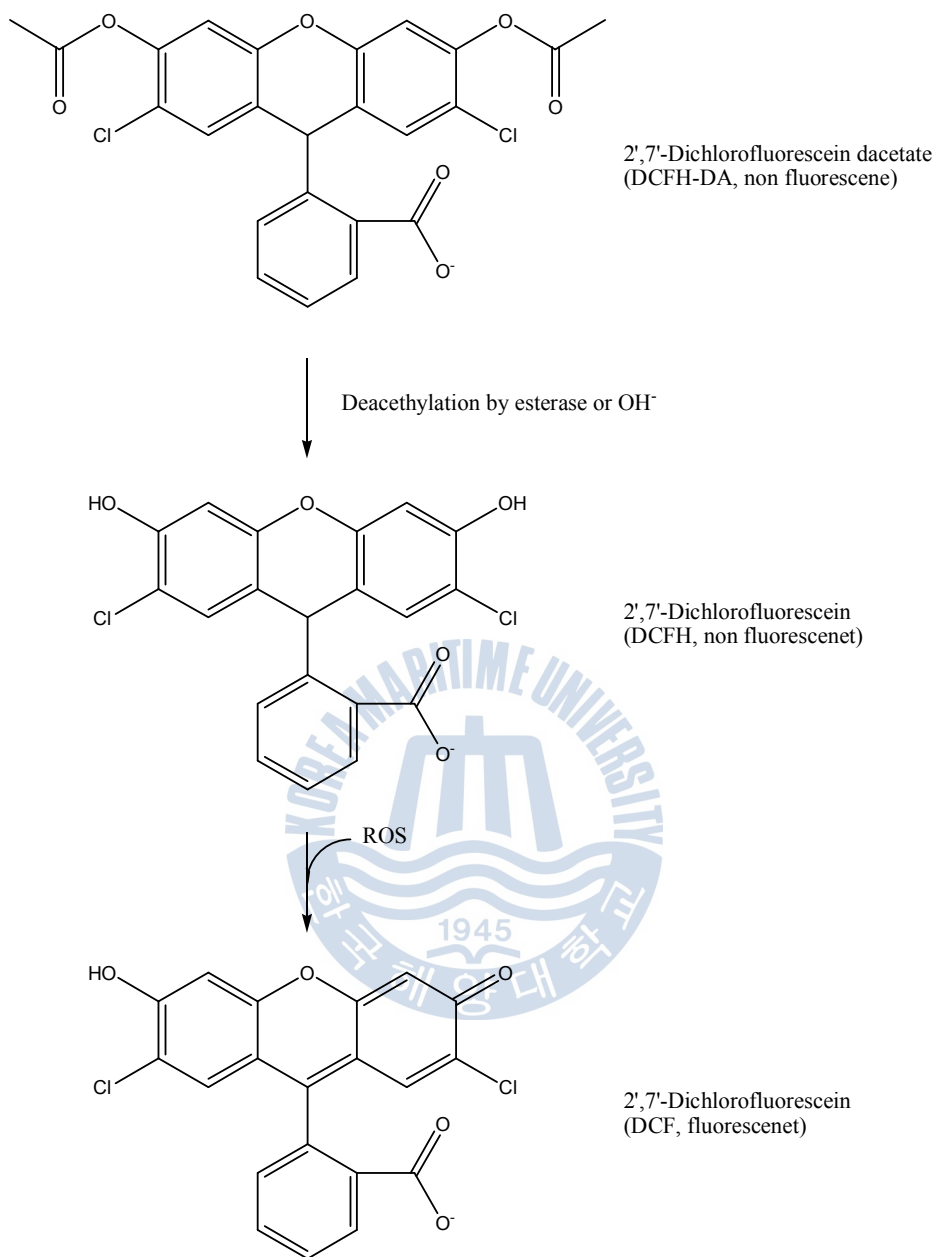


Fig. 4. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.

## (5) GSH(Glutathione) 함량 측정

세포내 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBr(monobromobimane)을 이용하여 측정하였다. 세포는 fluorescence microtiter 96-well plate에 well당  $1 \times 10^7$  cell/ml가 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분간 배양하였다. 각 well은 PBS buffer로 씻은 후 40 µM mBBr을 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분간 반응시킨 뒤, 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 시간별로 excitation 360 nm, emission 465 nm에서 형광분석기로 측정하였다.



## (6) Genomic DNA 추출 및 Genomic DNA의 산화 생성물 측정

실험에 사용한 genomic DNA는 AccuPrep<sup>®</sup> Genomic DNA Extraction kit(Bioneer Inc., USA)를 이용하여 HT-1080 세포로부터 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 260 nm와 280 nm의 파장에서 그 흡광도를 측정하여 순도와 농도를 정량한 후, -20℃에서 냉동보관하여 사용하였다.

0.5~1.0  $\mu\text{g}$ 의 genomic DNA에 4  $\mu\text{l}$ 의  $\text{H}_2\text{O}$ 와 600  $\mu\text{M}$ 의  $\text{FeSO}_4$ , 0.5 mM의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 각각 10  $\mu\text{l}$ 씩 가하여 genomic DNA를 30분간 상온에서 산화시킨 뒤 130 mM의 EDTA를 가하여 반응을 중지시켰다. 산화된 genomic DNA는 6X agarose gel loading buffer와 mix하여 1% agarose gel에 loading하여 100 mV로 전기영동하였다. 전기영동을 마친 gel은 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EtBr에 20~30분간 염색시켜 UV를 통해 산화된 정도를 확인하여 사용된 시약의 농도와 양을 조절하여 실험하였다.



## 2-6 암세포 증식 억제 실험

### (1) MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정

왕거머리말로부터 얻은 물질에 대한 암세포 증식 억제 효과를 확인하기 위하여 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]시약을 이용하여 암세포 증식 억제율을 측정하였다.

배양된 암세포는  $2 \times 10^4$  cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 뒤, 새 배지로 교체하여 시료를 처리한 후 다시 24시간동안 배양하였다. 시료처리 후 배양된 암세포에 1 mg/ml의 MTT 시약을 처리하여 4시간동안 배양하여 formazan이 형성되면 MTT시약이 처리된 배지를 제거한 후, 형성된 formazan을 DMSO에 녹여 Victor3 multilabel plate reader(PerkinElmer, MA, USA)를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 구하였다.

$$\text{Cytotoxicity}(\%) = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

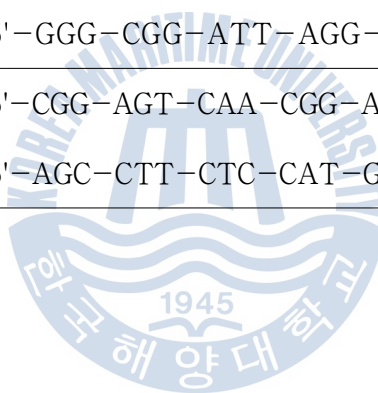
(2) 역전사 중합 연쇄 반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 분석

실험에 사용된 암세포에 RNazol B(GIBCO, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 뒤, oligo dT primer(Invitrogen, USA)와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template를 사용하여 Bax, Bcl-2, p53, p21 유전자를 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 증폭하였다(Table. 1). 이때 housekeeping 유전자인 GAPDH 유전자를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하여 ethidium bromide(EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.



Table. 1. Sequence of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
Bax	Forward	5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3'
	Reverse	5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
Bcl-2	Forward	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Reverse	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
p53	Forward	5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3'
	Reverse	5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Forward	5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3'
	Reverse	5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
GAPDH	Forward	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Reverse	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'



## 2-7 항염증 활성 실험

### (1) NO 생성 억제 효과

Raw 264.7 세포를 96 well micro-plate에  $1 \times 10^4$  cells/ml로 well당 100  $\mu$ l씩 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 Modified Eagle Medion(MEM)으로 교체한 뒤 준비된 시료를 처리한 후 1시간동안 배양하였다. 그 뒤, NO 생성을 유도하기 위해 1  $\mu$ g/ml(1 PPM)의 LPS를 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간동안 배양하였다. LPS에 의해 자극받은 Raw 264.7세포로부터 생성된 NO가 함유된 배지 50  $\mu$ l와 Griess 시약(0.1% N-1-naphtylenediamine : 1% sulfanilamide = 1 : 1) 50  $\mu$ l를 반응시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(Beda et al., 2005).





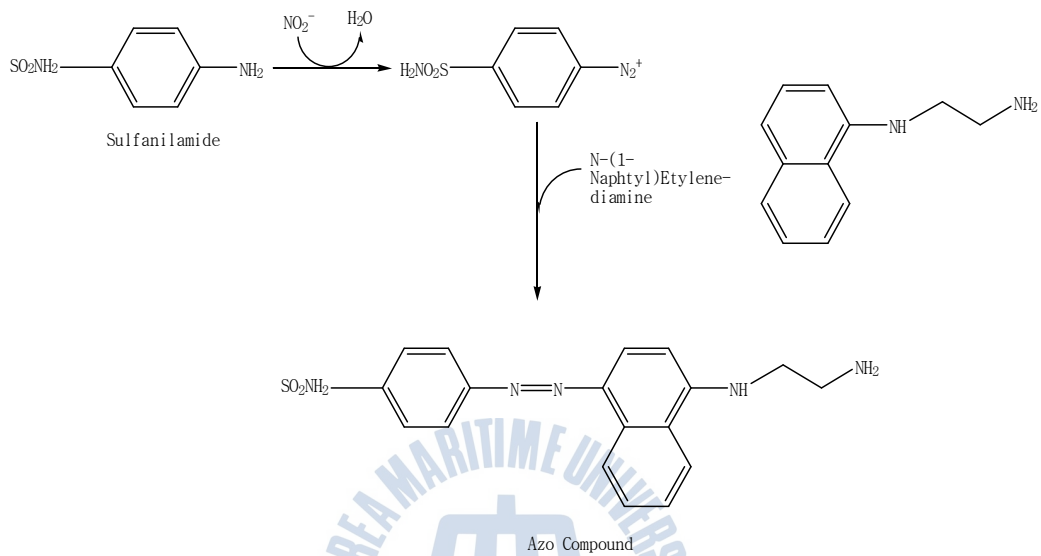


Fig. 5. Coloring reaction of  $\text{NO}_2^-$  detection.

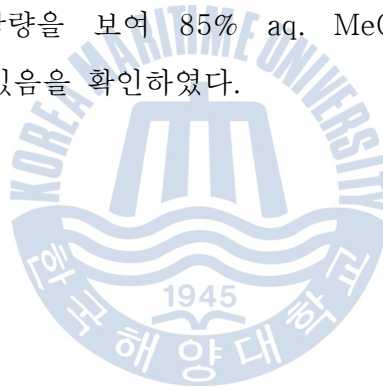
### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1 총 Polyphenol 함량 측정

왕거머리말로부터 얻은 추출물과 각 용매 분획물에 함유된 총 polyphenol 함량을 galic acid를 기준물질로 하여 측정하였다.

추출물의 총 polyphenol 함량을 측정한 결과, A+M 추출물은 634.0  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , MeOH 추출물은 652.2  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 함량을 나타내었다.

각 용매 분획물의 총 polyphenol 함량은 H<sub>2</sub>O 분획물은 582.2  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , *n*-BuOH 분획물은 548.6  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , 85% aq. MeOH 분획물은 769.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , *n*-hexane 분획물은 270.4  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 함량을 보여 85% aq. MeOH 분획물에 많은 양의 polyphenol이 함유되어 있음을 확인하였다.



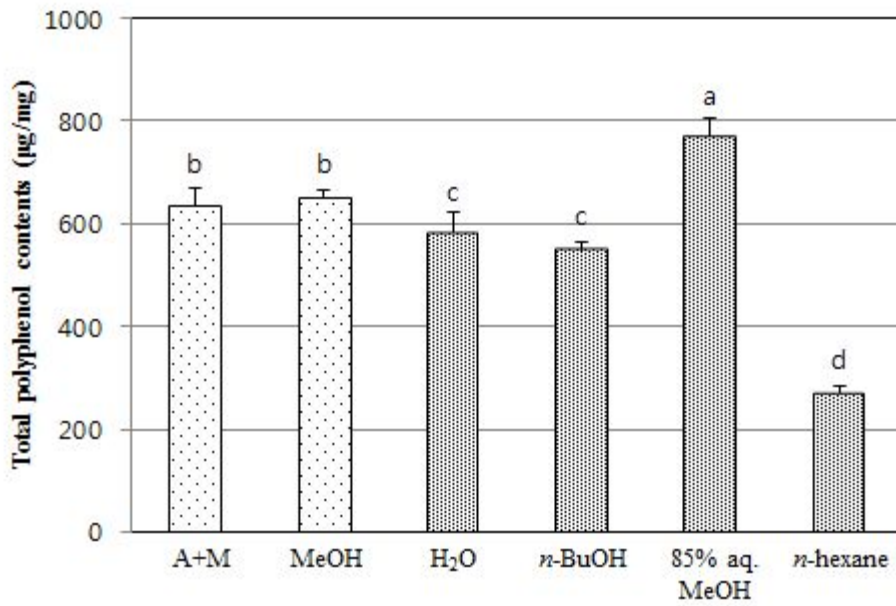
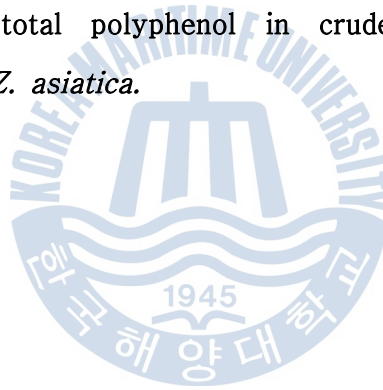


Fig. 6. Contents of total polyphenol in crude extracts and solvent fractions from *Z. asiatica*.



### 3-2 왕거머리말로부터 분리한 물질의 구조 결정

Compound는 황색의 투명한 형태로 분리되었으며, 분자식은  $C_{15}H_{10}O_6$ 로, 질량 분석[HREIMS( $[M]^+$   $m/z$  286.2363)]과  $^{13}C$  NMR 자료에 의해 결정되었다.  $^1H$  NMR 스펙트럼에서  $\delta$  6.19 ~ 7.37 사이에서 대다수의 peak가 나타난 것으로 보아 aromatic ring의 구조로 이루어진 화합물로 추측하였다. 그리고  $^{13}C$  NMR 스펙트럼에서  $\delta$  95.0 ~ 104 사이에 나타난 peak가 일반적인 aromatic ring의 위치보다 다소 upfield로 이동한 것으로 미루어보았을 때, 이 위치의 탄소들은 주변에 hydroxy기를 가진 탄소와 인접해 있을 것으로 추측하였으며,  $\delta$  4.6에 broad한 peak로 hydroxy기의 존재를 확인하였다. 뿐만 아니라  $^{13}C$  NMR 스펙트럼에서  $\delta$  183.6에 하나의 peak가 존재하여 -CHO의 존재가 예상되나  $^1H$  NMR 스펙트럼에서  $\delta$  10부근의 peak가 부재인 것으로 보아, 이는 케톤기가 aromatic ring에 붙어 upfield로 이동한 것으로 추측할 수 있다. Compound의 보다 정확한 구조를 분석하기 위해 2D NMR 실험을 통하여 COSY, TOCSY, gHMQC, gHMBC의 2D NMR 스펙트럼을 얻었다.  $^1H$ - $^1H$  COSY correlation으로  $\delta$  6.89 (1H, dd, 8.8, 2.0)와  $\delta$  7.37 (1H, dd, 8.8, 2.0)이 직접적으로 coupling되어 -CH(C-5')=CH(C-6')-로 연결되어 있음을 확인하였다. 그리고 TOCSY 스펙트럼으로 -CH(C-2')=와 -CH(C-5')=, -CH(C-6)=와 -CH(C-8)=가 서로 long range coupling이 되어있음을 확인하였다. 또한 gHMQC로부터 각 aromatic ring에 존재하는 -CH-의 개수가 총 6개임을 확인하고, 각각의  $^1H$  NMR과  $^{13}C$  NMR peak의 chemical shift 값을 구하였다. 그리고 gHMBC 데이터로부터 각 부분구조를 예측하였고, 각각의 chemical shift 값 등을 토대로하여 화학구조를 예측하였으며, 그 구조와 chemical shift 값을 문헌값과 비교한 결과, Compound의 구조는 Luteolin으로 결정되었다(R.W. Owen et al., 2003).

Table. 2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data for compound\*

position	$\delta_{\text{H}}$ (H, m, Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	—	
2	—	166.3
3	6.53 (1H, s)	103.7
4	—	183.6
5	—	159.3
6	6.19 (1H, d, 2.0)	100.2
7	—	166.1
8	6.42 (1H, d, 2.0)	95.0
9	—	158.6
10	—	103.7
1'	—	123.5
2'	7.36 (1H, d, 2.0)	114.0
3'	—	146.9
4'	—	149.1
5'	6.89 (1H, dd, 8.8, 2.0)	116.7
6'	7.37 (1H, dd, 8.8, 2.0)	120.2

\* Measured in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at 300 MHz. Assignments were aided by  $^1\text{H}$  COSY, TOCSY, ROESY, NOESY experiments.

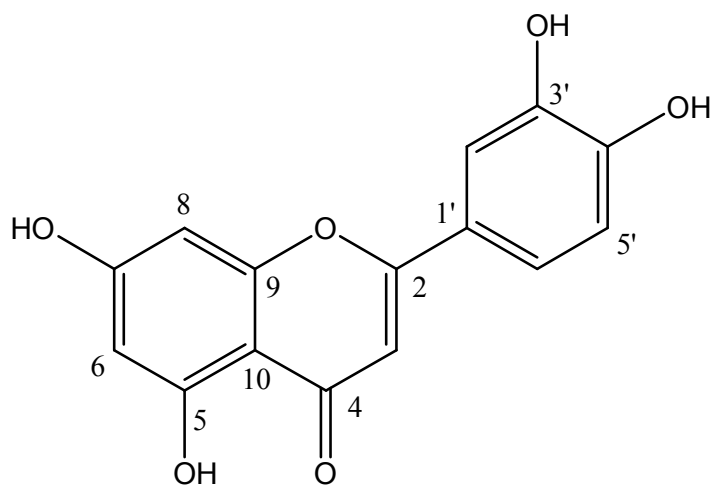


Fig. 7. Chemical structure of compound from *Z. asiatica*.



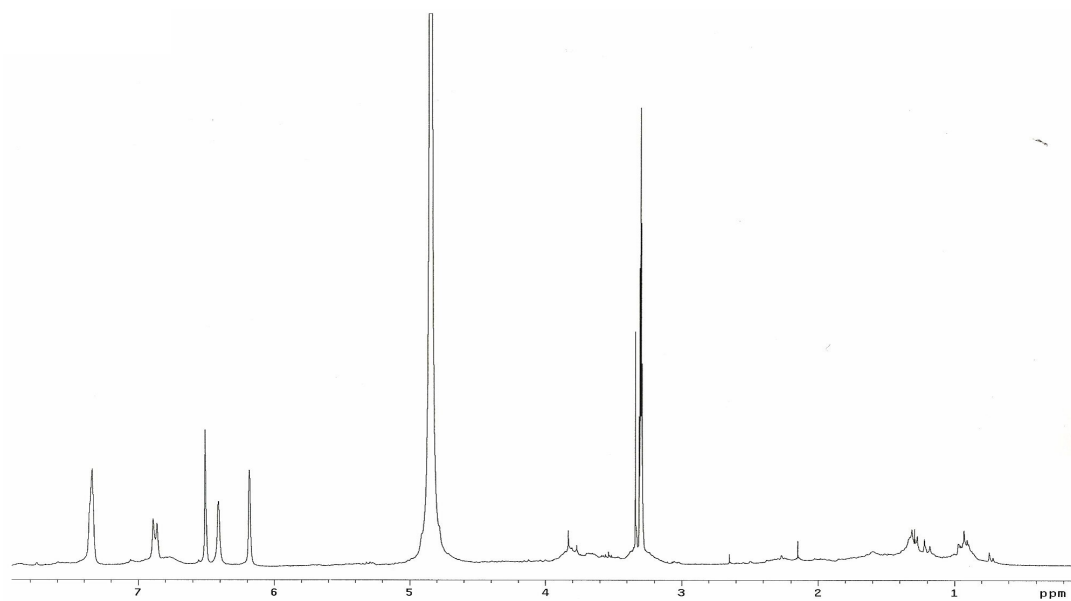


Fig. 8.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

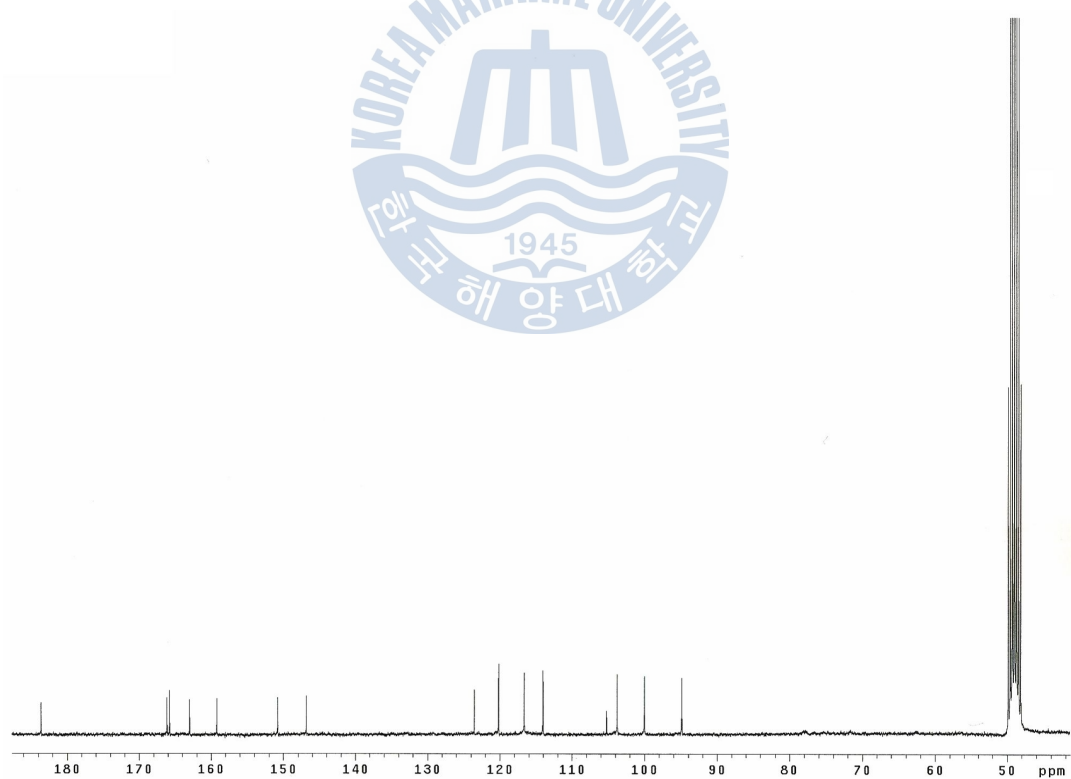


Fig. 9.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

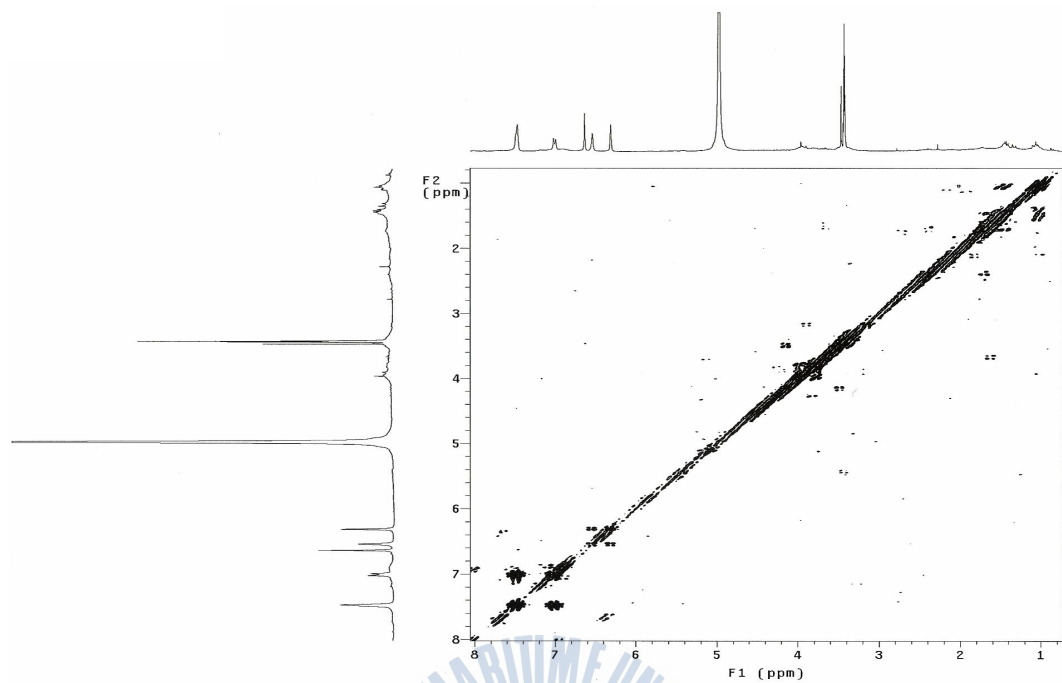


Fig. 10. COSY spectrum of compound in CD<sub>3</sub>OD.

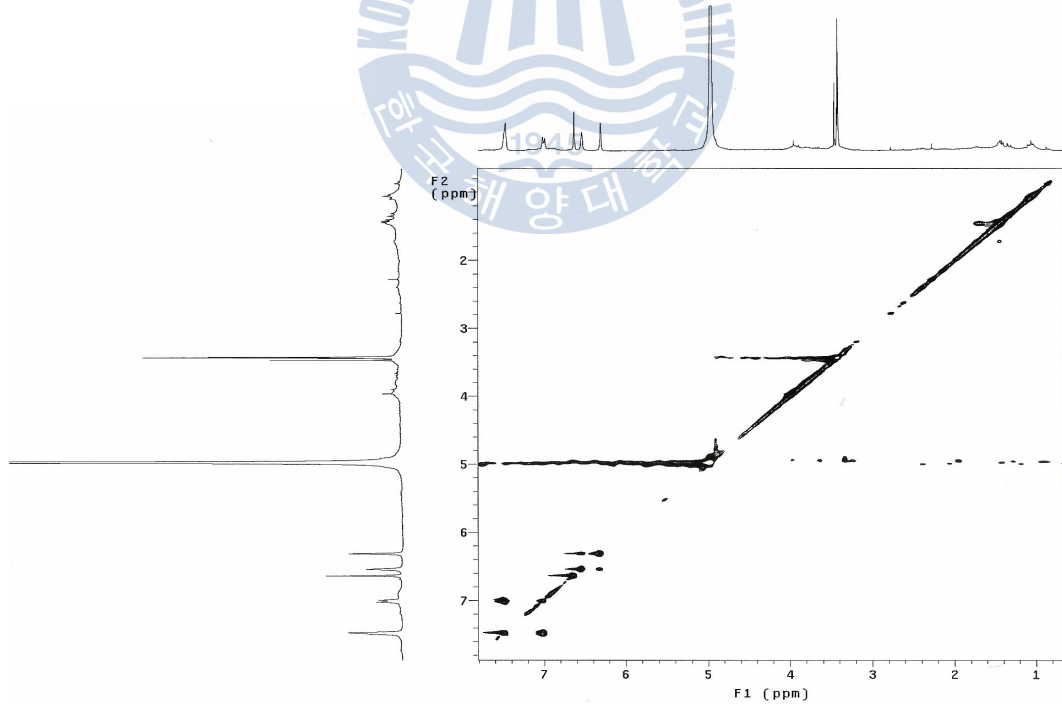


Fig. 11. TOCSY spectrum of compound in CD<sub>3</sub>OD.



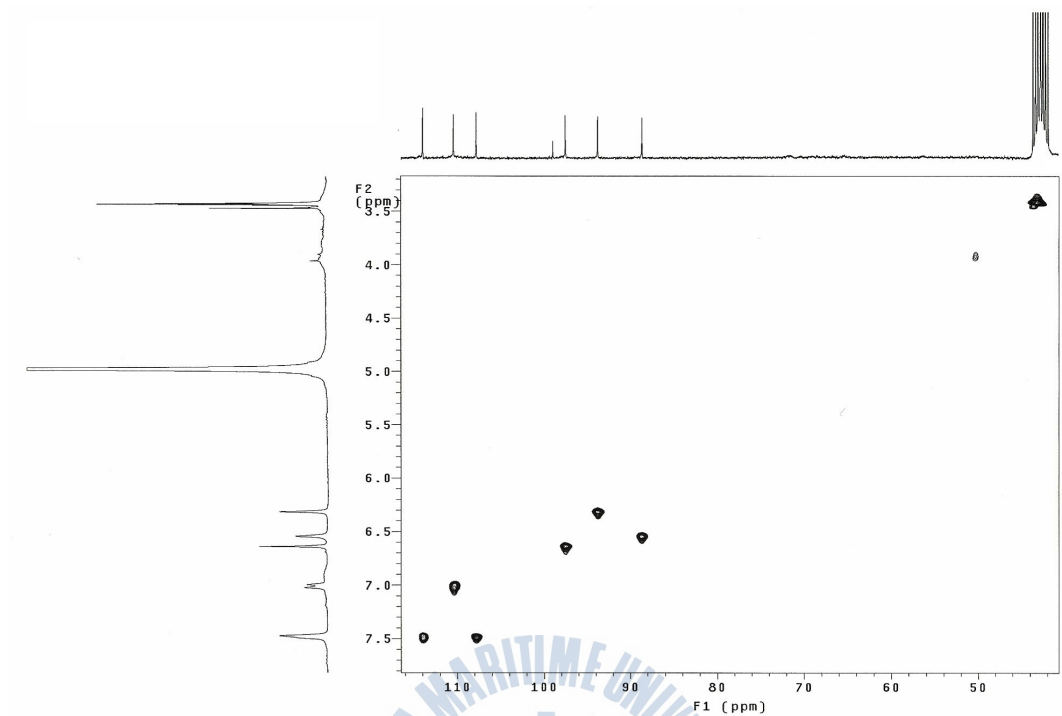


Fig. 12. gHMBC spectrum of compound in CD<sub>3</sub>OD.

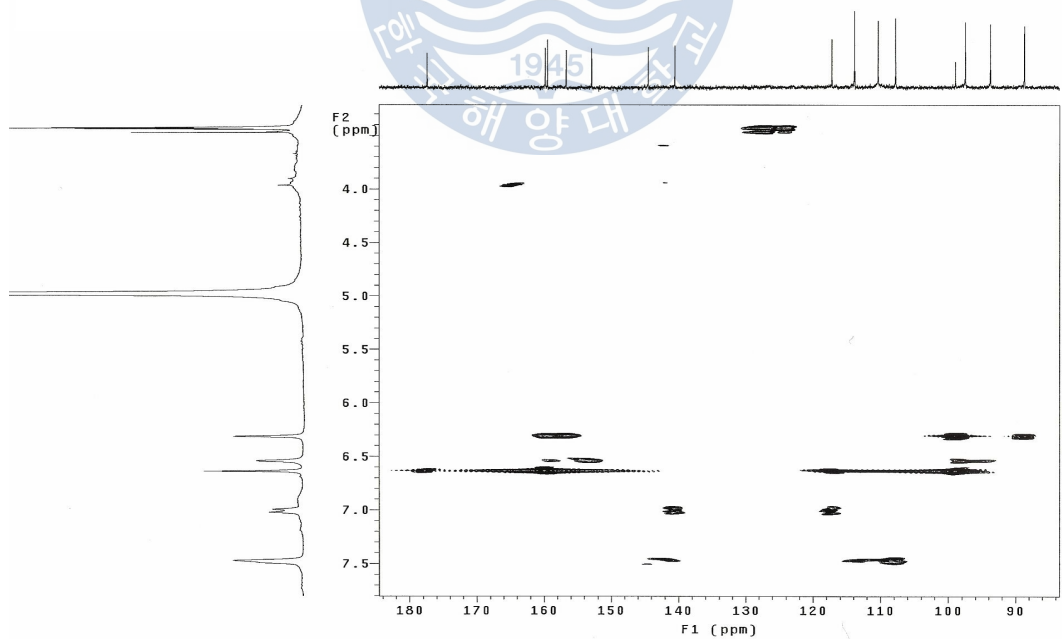


Fig. 13. gHMBC spectrum of compound in CD<sub>3</sub>OD.

### 3-1 *In vitro* 항산화 활성

#### (1) DPPH radical 소거 활성

왕겨머리말을 acetone + methylene chloride(A+M)와 methanol로 추출한 추출물과 이를 용매 극성도에 따라 H<sub>2</sub>O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-hexane 순으로 순차적으로 분획하여 각 시료의 농도를 500, 200, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu$ g/ml로 희석하여 DPPH radical 활성을 측정하였다. 대조군으로는 BHT(butylated hydroxy toluene)과 L-ascorbic acid를 사용하였으며, 시료와 동일한 농도로 희석하여 사용하였다.

측정결과, BHT는 각 농도에서 89, 78, 59, 39, 13, 4%의 radical 소거능을 보였으며, L-ascorbic acid는 96, 96, 96, 96, 61, 4%의 소거능을 보였다.

A+M 추출물은 9, 11, 11, 9, 11, 8%의 낮은 소거능을 보였지만 MeOH 추출물은 44, 23, 17, 12, 8, 7%로 비교적 높은 소거능을 확인 할 수 있었다.

H<sub>2</sub>O 분획물은 28, 14, 11, 8, 9, 5%의 소거능을 보였고, *n*-BuOH 분획물은 88, 72, 45, 24, 10, 7%, 85% aq. MeOH 분획물은 71, 44, 28, 9, 6, 4%의 높은 소거능을 보였으며, *n*-hexane 분획물은 8, 8, 7, 6, 3%의 낮은 소거능을 보였다.

*n*-BuOH 분획물은 500  $\mu$ g/ml의 높은 농도에서 동일한 농도의 BHT와 유사한 radical 소거능을 보였으며, 85% aq. MeOH 분획물 또한 500  $\mu$ g/ml의 높은 농도에서 200  $\mu$ g/ml의 BHT과 비슷한 radical 소거능을 보였다.

*n*-BuOH과 85% aq. MeOH 분획물에서 높은 radical 소거능이 확인된 것으로 보아 두 가지 분획물이 뛰어난 항산화 활성을 가진 물질을 내포하고 있을 것으로 예상된다.

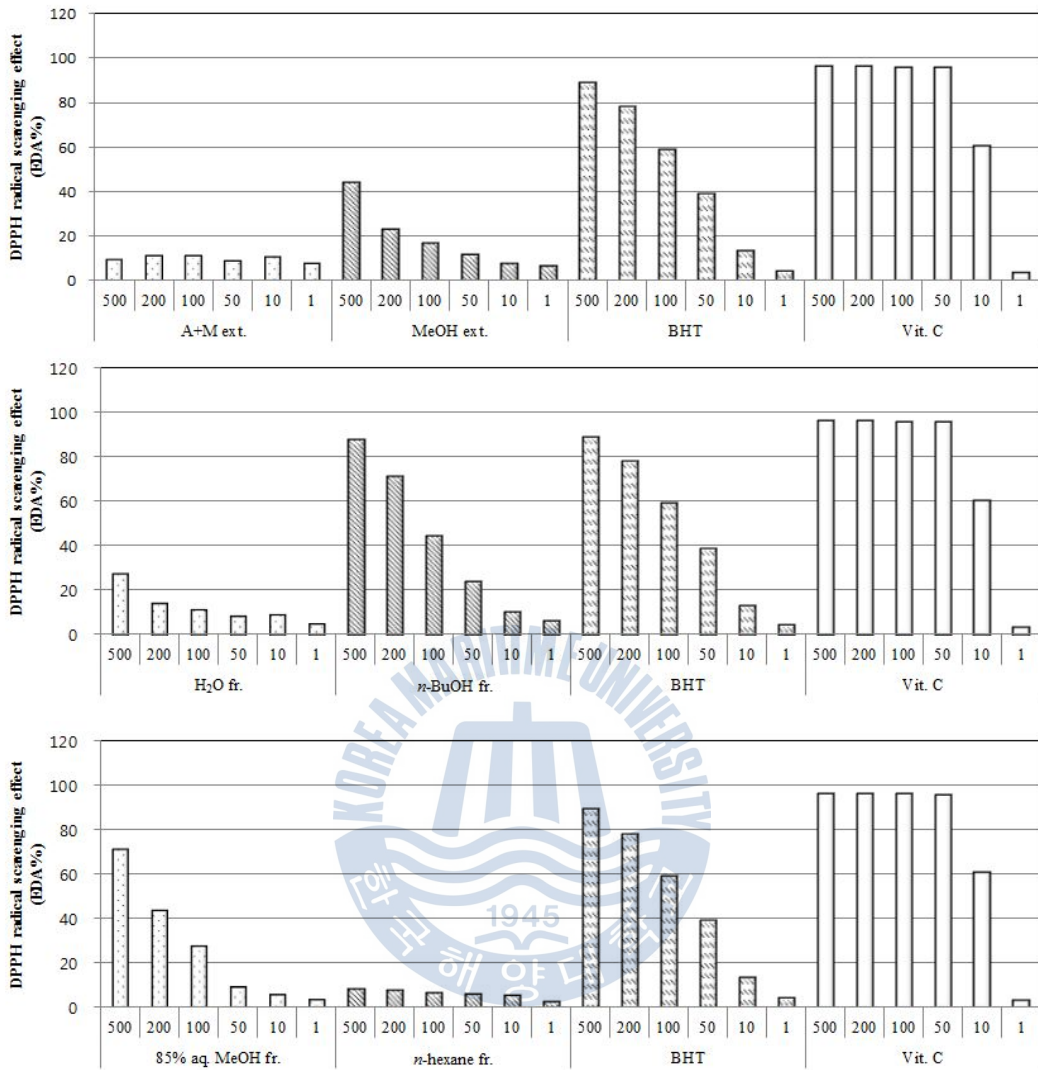


Fig. 14. DPPH radical scavenging effect of crude extracts and solvent fractions from *Z. asiatica*.

## (2) Peroxynitrite 소거 활성

ONOO<sup>-</sup>는 DHR123과 반응하여 형광성 물질인 rhodamine 123으로 바뀌게 되므로, rhodamine 123에 ONOO<sup>-</sup>와 SIN-1을 처리하여 그 반응 생성물의 흡광도를 측정하여 왕거머리말의 peroxynitrite 소거능을 검토하였다. 대조군으로는 L-ascorbic acid와 penicillamine을 사용하였으며, 각 추출물과 분획물, 대조군의 농도는 100, 50, 10, 5  $\mu\text{g/ml}$ 로 희석하여 사용하였다.

ONOO<sup>-</sup>를 처리하였을 때, 조추출물에서는 MeOH 추출물이 A+M 추출물보다 뛰어난 소거 활성을 보였으며, 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 약 80%의 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성을 나타냈다. 용매분획물에서는 *n*-BuOH과 85% aq. MeOH 분획물에서 높은 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성을 보였다. 특히 *n*-BuOH 분획물에서는 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 80% 이상의 높은 ONOO<sup>-</sup> 소거 활성을 나타냈다. 이는 동일한 농도로 보았을 때, 대조군으로 사용한 penicillamine보다 높은 활성을 보였다.

SIN-1을 처리하였을 때도 마찬가지로 MeOH 추출물이 더 뛰어난 활성을 보였으며, 용매 분획물에서도 역시 *n*-BuOH분획물에서 가장 뛰어난 활성을 나타내었다. *n*-BuOH 분획물 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 80%의 소거능을 보였으며, 이는 대조군으로 사용한 penicillamine과 비교하였을 때 큰 차이가 없었다.

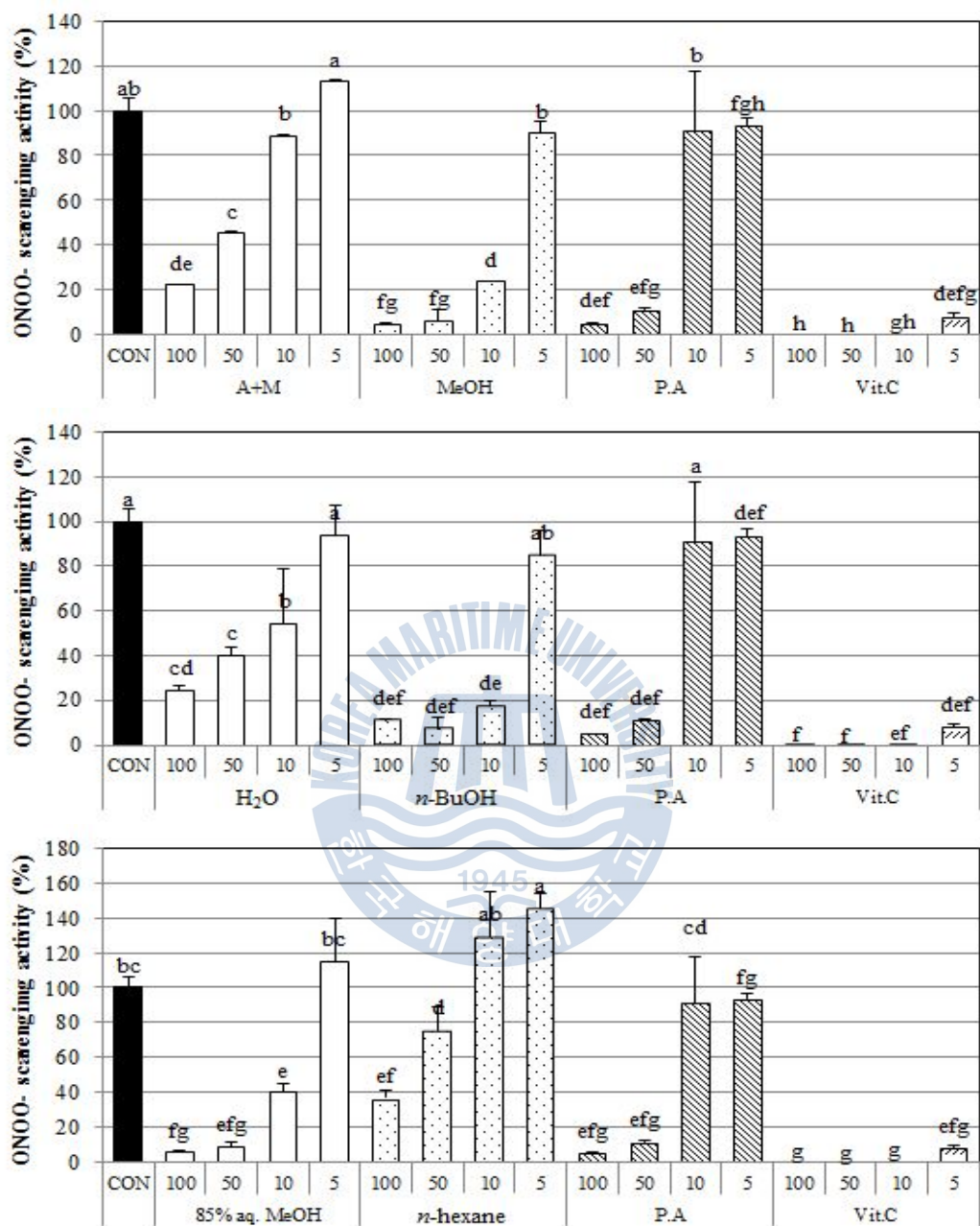


Fig. 15. Scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from *Z. asiatica* on authentic ONOO<sup>-</sup> (% of control)

<sup>a-h</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

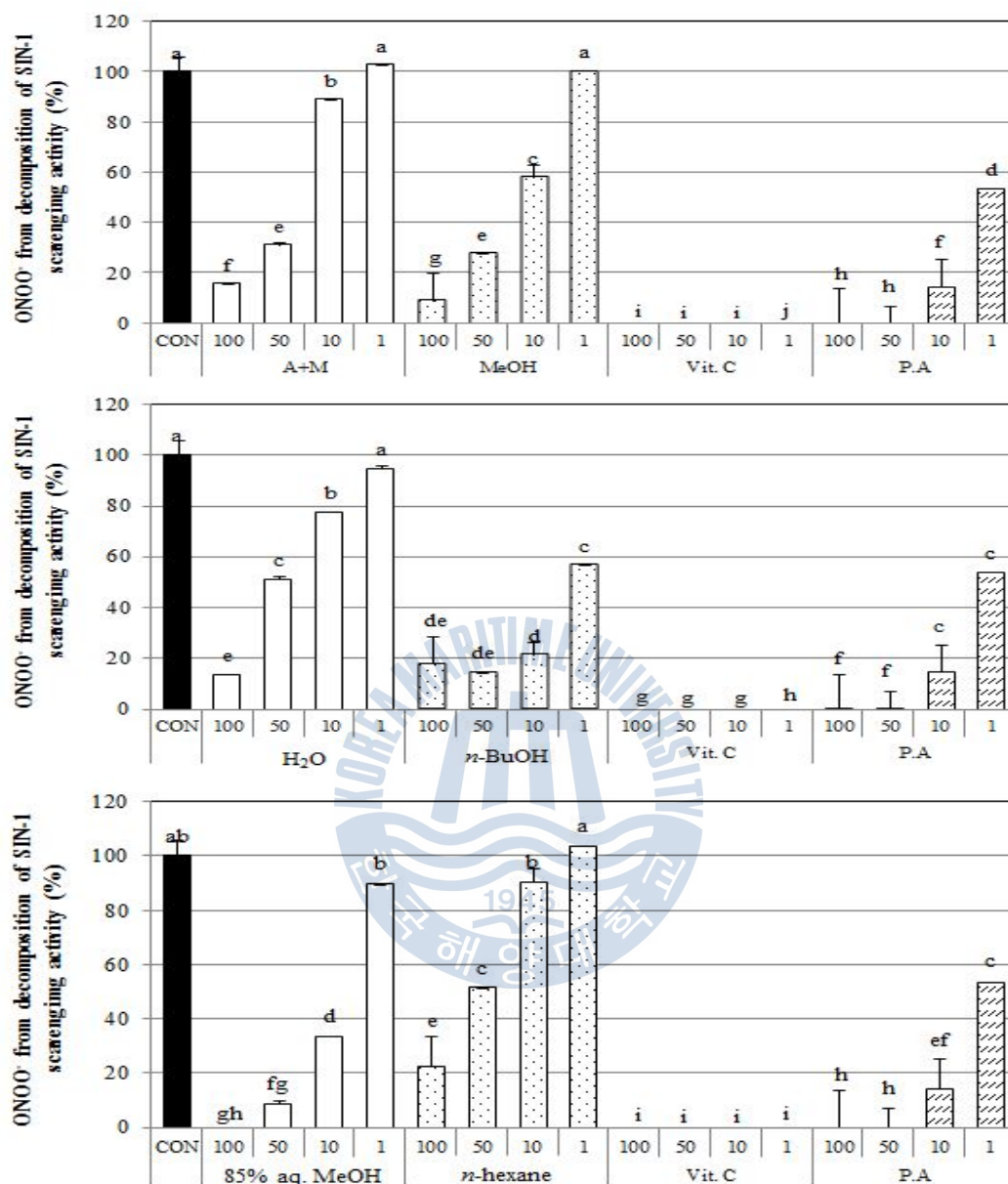


Fig. 16. Scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from *Z. asiatica* on ONOO<sup>-</sup> from SIN-1 (% of control)

<sup>a-j</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 3-2 세포 수준에서의 항산화 활성

#### (1) HT-1080 세포에 대한 조추출물과 용매분획물의 독성 효과

왕거머리말로부터 얻은 조추출물과 용매분획물의 항산화 활성을 측정하기 위해 조추출물과 용매분획물이 HT-1080 세포의 viability에 미치는 영향을 MTT assay를 통하여 확인하였다. 모든 시료의 농도는 200, 100, 10, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석하여 사용하였다.

A+M 추출물을 처리한 결과 70, 73, 97, 100%의 cell viability를 보였고, MeOH 추출물을 처리한 세포는 94, 95, 97, 97%의 cell viability를 보였다.

각 용매 분획물에서 H<sub>2</sub>O 분획물은 95, 91, 89, 103%, *n*-BuOH 분획물은 66, 81, 100, 108%, 85% aq. MeOH 분획물은 64, 66, 101, 100%, *n*-hexane 분획물은 90, 92, 99, 100%의 cell viability를 보였다.

A+M 추출물과 *n*-BuOH, 85% aq. MeOH 분획물은 200, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포 생존을 억제하는 효과를 보였지만, 그 외의 추출물과 분획물에서는 90% 이상의 세포 생존율을 보여 세포 성장에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

MTT assay를 이용한 cell viability 측정 결과를 바탕으로 하여 세포 수준에서의 각종 항산화 활성 실험을 실시하였다.

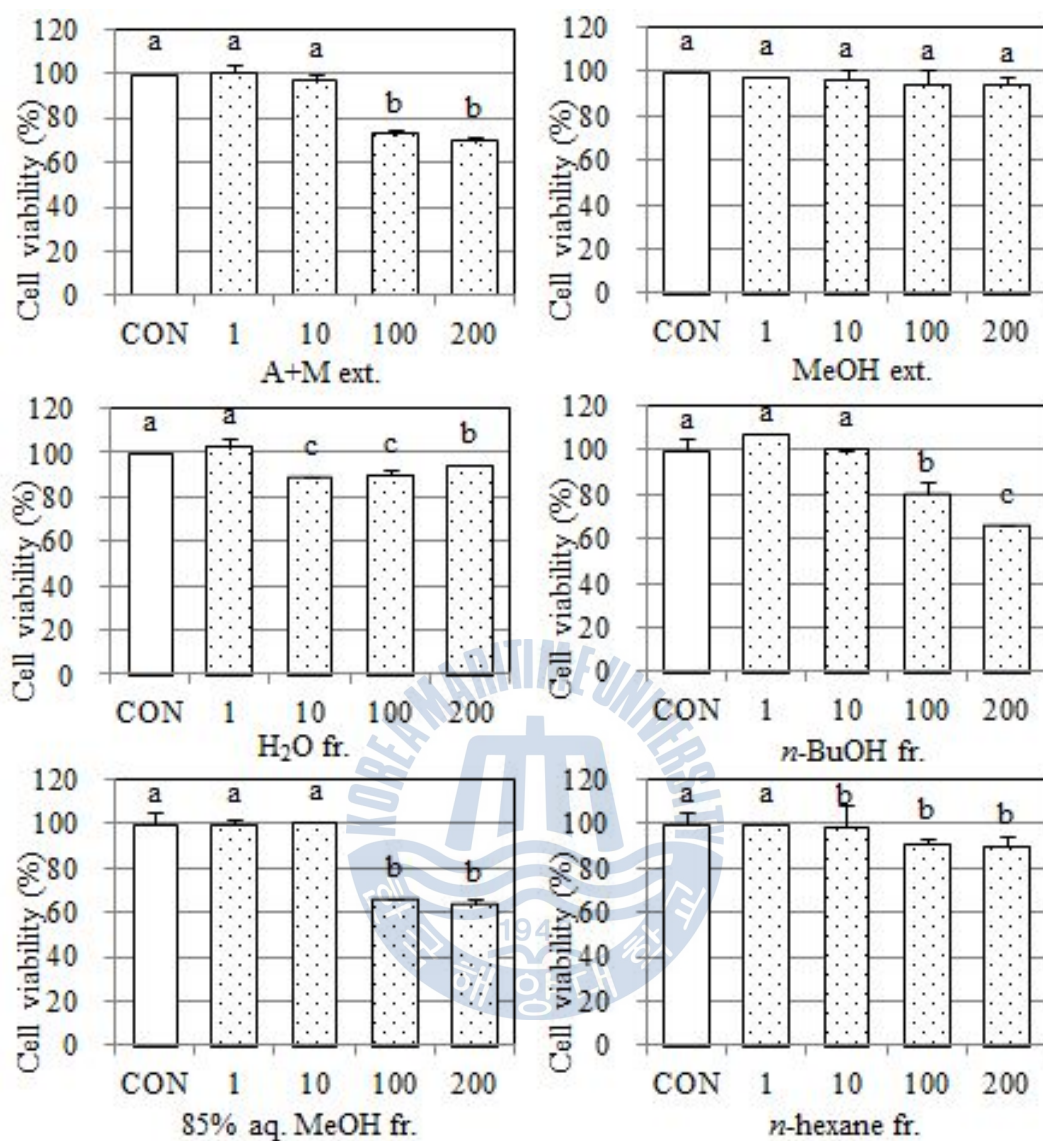


Fig. 17. Effect of crude extracts and solvent fractions from *Z. asiatica* on viability of HT-1080 cells.

<sup>a-j</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



## (2) 세포내 활성 산소종(ROS) 소거 활성

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어내는 DCFH-DA를 사용하여 세포 내에 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였다. 각 추출물과 용매 분획물은 200, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석하여 실험에 사용하였으며, 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 500  $\mu\text{M}$ 의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리한 control과 시료와  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 모두 처리하지 않은 blank를 실험에 사용하였고, DCF fluorescence 값은 0분부터 120분까지 30분 간격으로 측정하였다.

대조군으로 사용한 control은 시간이 경과함에 따라 급격한 증가를 보였으며, blank는 그 값의 변화가 거의 없었다.

A+M 추출물과 MeOH 추출물은 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 blank와 유사할 정도의 높은 소거활성을 보였지만, A+M 추출물은 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 blank와 유사한 소거활성을 보인 반면에 MeOH 추출물은 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도부터 그 활성이 떨어지기 시작하였다.

각 용매 분획물에서  $\text{H}_2\text{O}$  분획물은 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 높은 농도에서도 좋은 소거 활성을 보이지 않았지만, *n*-BuOH 분획물과 85% aq. MeOH, *n*-hexane 분획물에서는 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 높은 소거활성을 보였다.

이것으로 보아  $\text{H}_2\text{O}$  분획물을 제외한 다른 분획물에서는 세포내 ROS 소거 활성에 뛰어난 효과를 보임을 확인할 수 있었다.

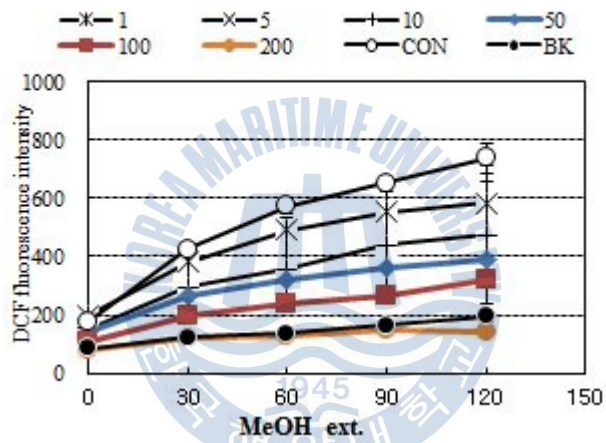
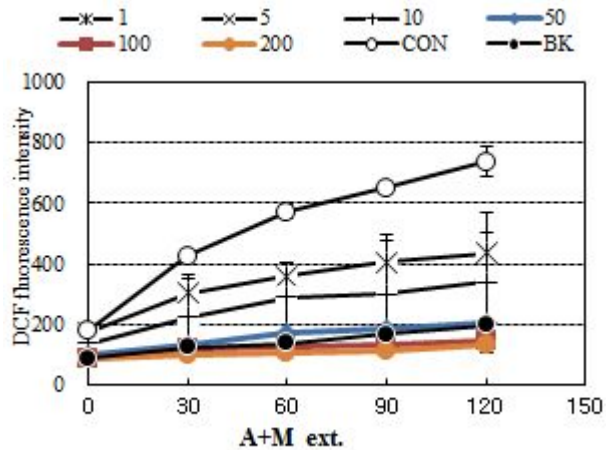


Fig. 18. Effects of crude extracts from *Z. asiatica* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. The cell were incubated with different concentration (200, 100, 50, 10 and 1  $\mu\text{g/ml}$ ) of the sample for the indicated times respectively.

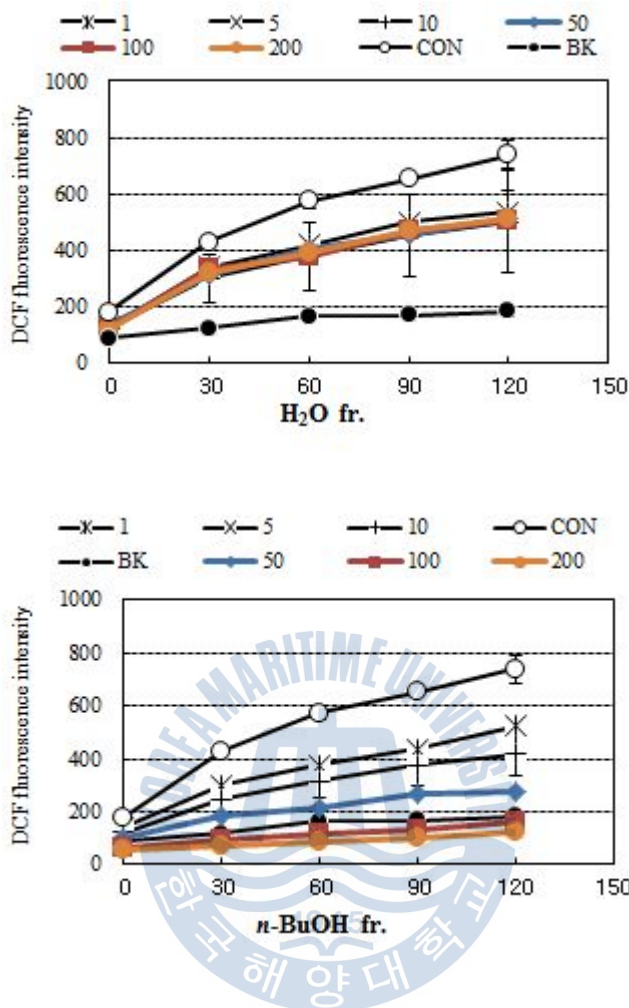


Fig. 19. Effects of H<sub>2</sub>O and *n*-BuOH fractions from *Z. asiatica* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in Ht-1080 cells. The cell were incubated with different concentration (200, 100, 50, 10 and 1 µg/ml) of the sample for the indicated times respectively.

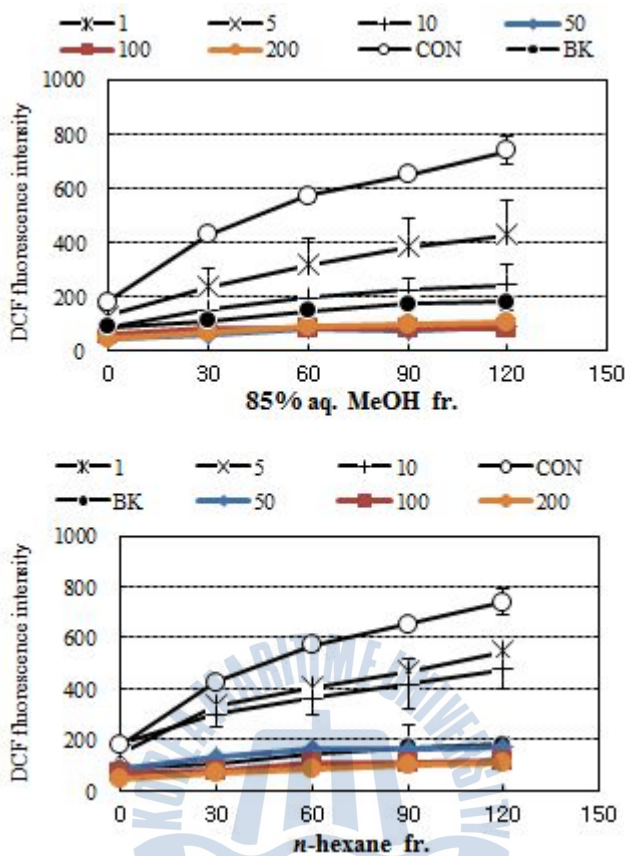


Fig. 20. Effects of 85% aq. MeOH and *n*-hexane fractions from *Z. asiatica* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in Ht-1080 cells. The cell were incubated with different concentration (200, 100, 50, 10 and 1  $\mu\text{g/ml}$ ) of the sample for the indicated times respectively.

### (3) 세포내 Glutathion(GSH) 함량 측정

세포내 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBr(monobromobiman)을 이용하여 측정하였다. 비형광물질인 mBBr은 세포내 산화생성물을 제거하는 역할을 하는 GSH와 결합하여 형광을 나타내기 때문에, 이를 측정하여 GSH의 함량을 측정하였다.

배양된 HT-1080 세포에 시료를 처리한 후 1시간 뒤, 40  $\mu$ M mBBr을 처리하여 60분 후 GSH 함량의 변화를 측정하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 mBBr을 처리한 control을 사용하였다.

실험 결과, 조추출물과 용매 분획물을 처리한 세포는 모두 대조군과 비교하여 GSH 함량이 증가하였음을 확인할 수 있었으며, 최대 10%가량의 GSH 함량이 증가하였다.



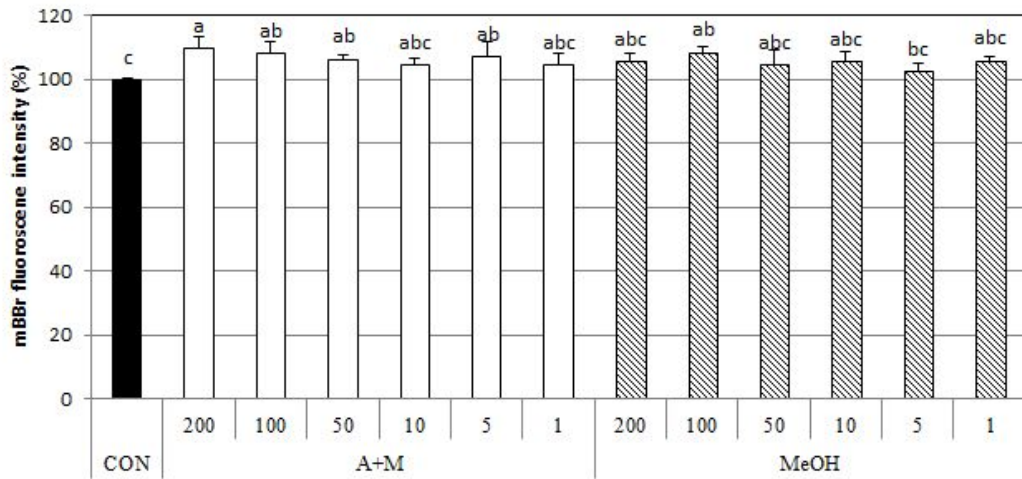
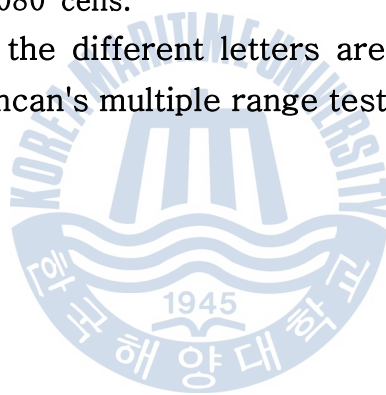


Fig. 21. Effects of crude extracts of *Z. asiatica* on regulation of GSH level in HT-1080 cells.

<sup>a-c</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



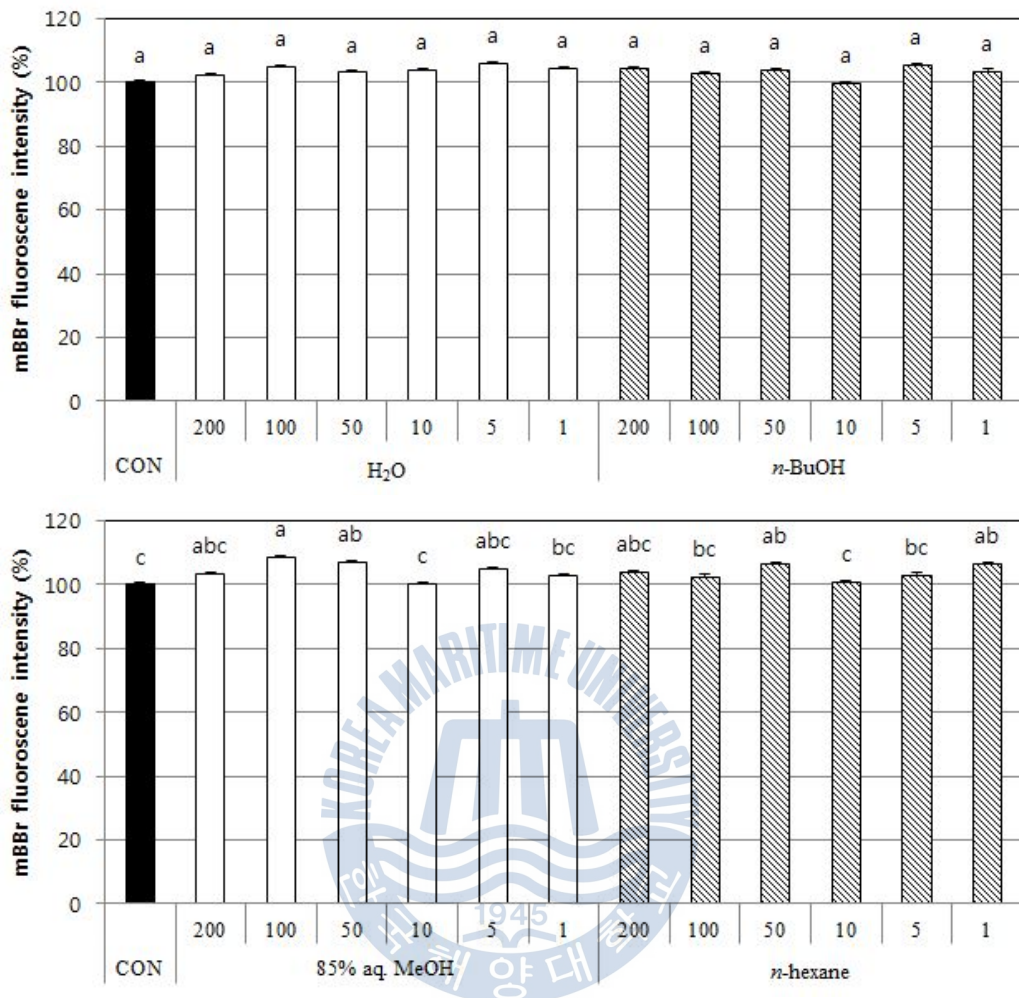


Fig. 22. Effects of solvent fractions of *Z. asiatica* on regulation of GSH level in HT-1080 cells.

<sup>a-c</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

#### (4) Genomic DNA의 산화 생성물 측정

HT-1080 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 각 시료를 처리한 후,  $H_2O_2$ 와  $FeSO_4$ 로 산화시켜 시료가 DNA 산화를 방지하는 정도를 측정하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 산화시킨 control과 시료와  $H_2O_2$ ,  $FeSO_4$  모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다.

실험 결과, 조추출물에서는 A+M 추출물보다 MeOH 추출물이 DNA 산화를 더 억제시켰음을 확인하였다.

분획물 중에서는  $H_2O$ 와 *n*-BuOH 분획물이 85% aq. MeOH과 *n*-hexane보다 DNA 산화를 더 억제시켰음이 확인되었다.





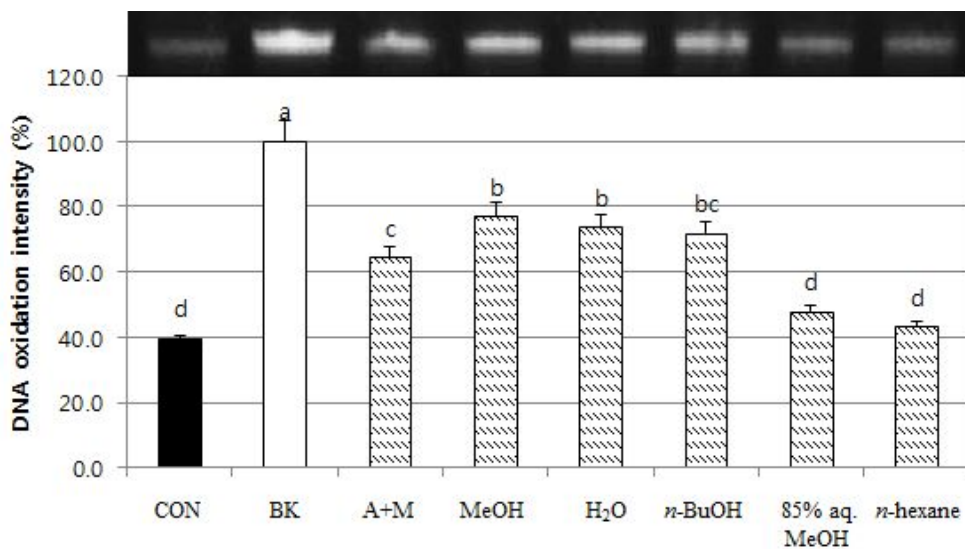


Fig. 23. Antioxidant effect of crude extract and its solvent fractions from *Z. asiatica* on genomic DNA in HT-1080 cells.

<sup>a-d</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 3-3 인체 유래 암세포에 대한 세포 증식 억제 효과

#### (1) HT-1080 세포 증식 억제 효과

인체 섬유 육종 세포인 HT-1080 세포에 대하여 추출물 및 분획물의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통하여 측정하였다. 시료는 200, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였다.

A+M 추출물을 처리한 세포는 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 60%의 억제율을 보였지만, MeOH 추출물에서는 큰 효과를 보이지 않았다.

용매 분획물에서는  $\text{H}_2\text{O}$  분획물을 제외한 다른 분획물에서는 높은 억제율을 보였으며, 특히 85% aq. MeOH 분획물에서 높은 억제율을 보였다.



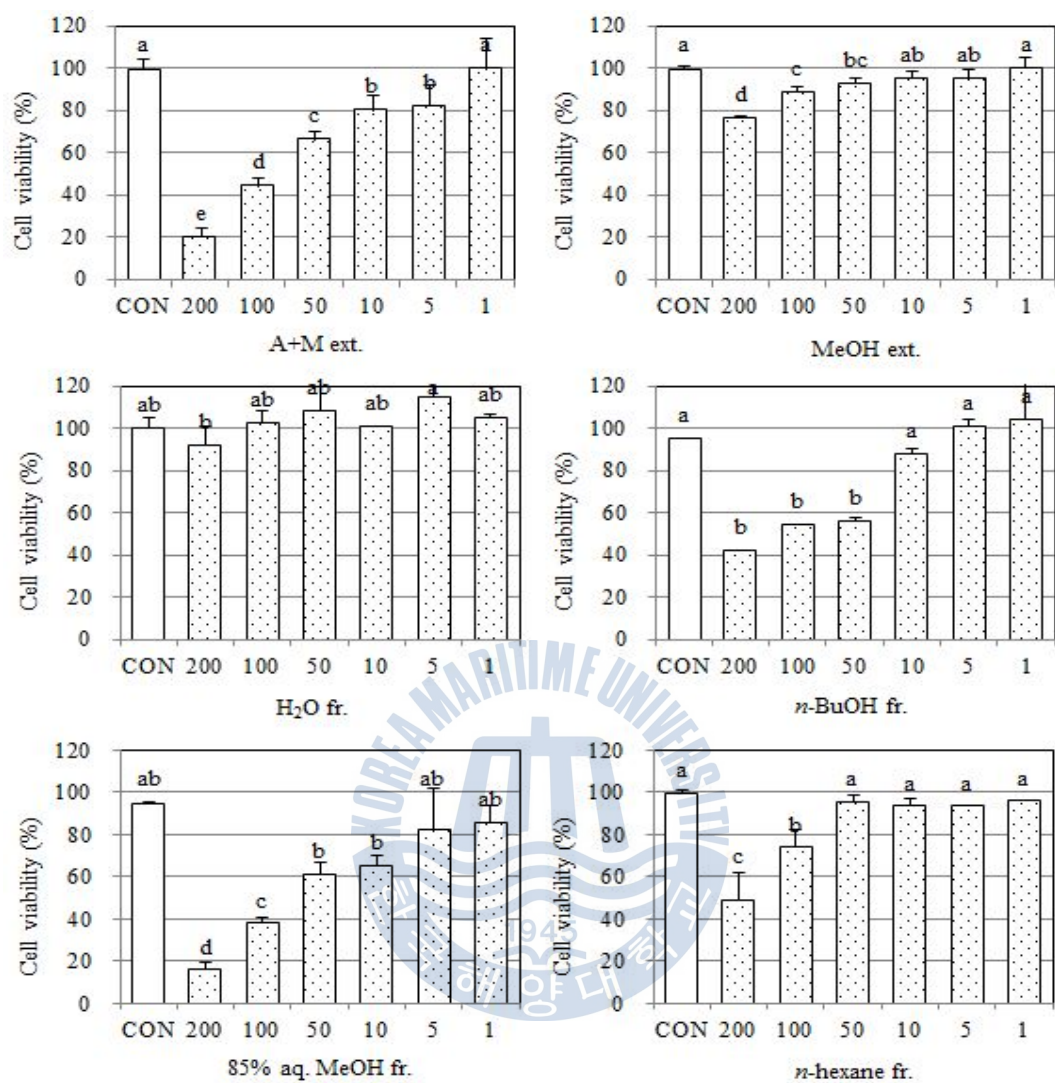


Fig. 24. Effects of crude extracts and its solvent fractions from *Z. asiatica* on viability of HT-1080 cells.(200, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu\text{g/ml}$ )

<sup>a-d</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## (2) AGS 세포 증식 억제 효과

인체 위암 세포인 AGS 세포에 대하여 추출물 및 분획물의 세포 증식 억제 효과를 MTT assay를 통하여 동일한 방법으로 측정하였다.

조추출물 중에서는 A+M 추출물이 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서도 60%의 억제능을 보이는 등 MeOH 추출물보다 높은 암세포 억제능을 보였다.

용매 분획물에서는 85% aq. MeOH과 *n*-hexane에서 높은 억제능을 보였으며, 특히 85% aq. MeOH 분획물은 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서도 60% 이상의 높은 억제율을 보였다.



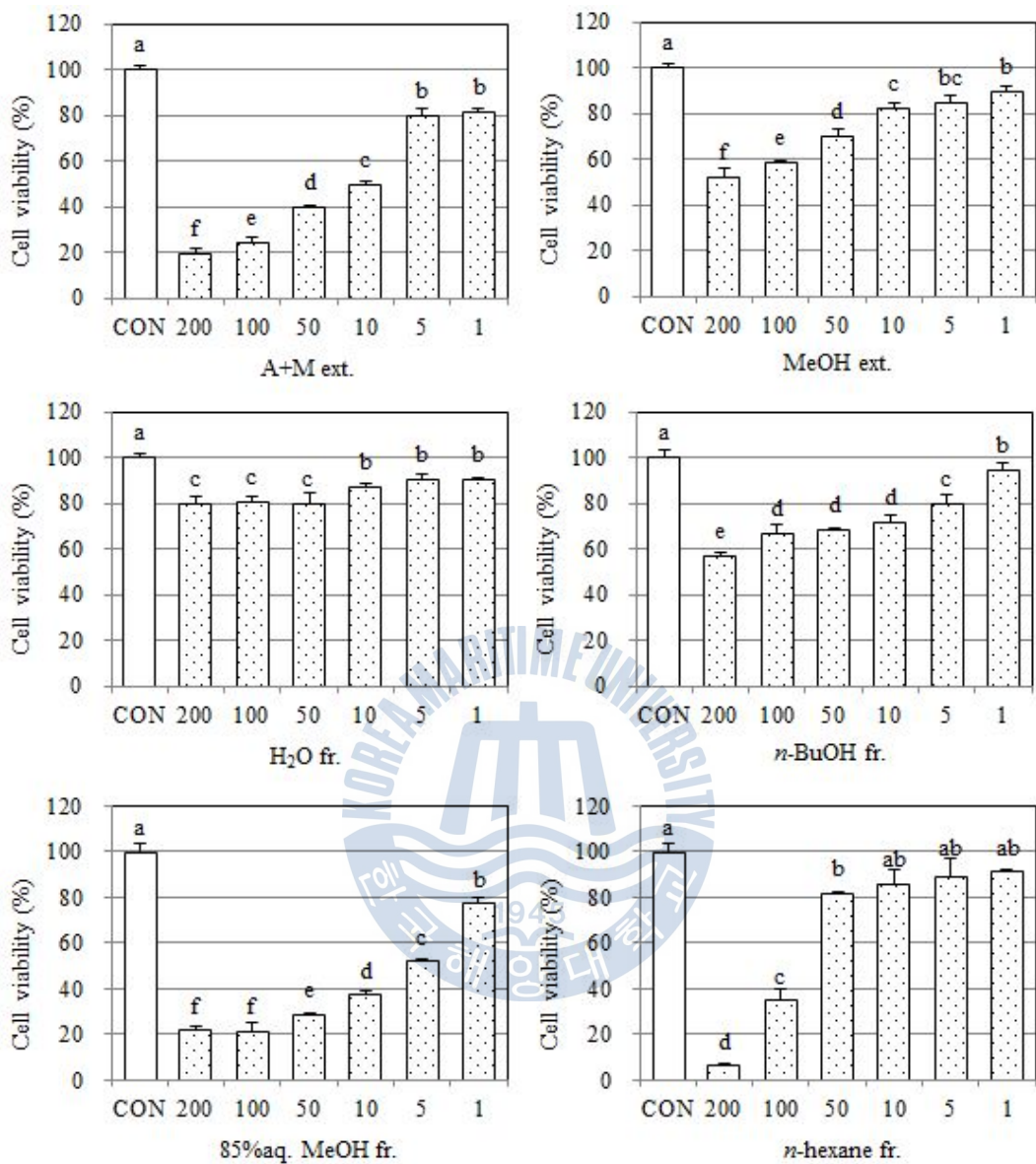


Fig. 25. Effects of crude extracts and its solvent fractions from *Z. asiatica* on viability of AGS cells. (200, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu\text{g/ml}$ )  
<sup>a-f</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### (3) HT-29 세포 증식 억제 효과

인체 결장암 세포인 HT-29 세포 증식에 대한 추출물 및 분획물의 영향을 동일한 방법으로 측정하였다.

조추출물인 A+M 추출물과 MeOH 추출물 모두 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서도 50% 이상의 높은 억제능을 보였다.

용매 분획물에서는  $\text{H}_2\text{O}$  분획물을 제외한 모든 분획물에서 높은 세포 증식 억제 효과를 보였으며, 특히 85% aq. MeOH에서 가장 좋은 효과를 보였다.



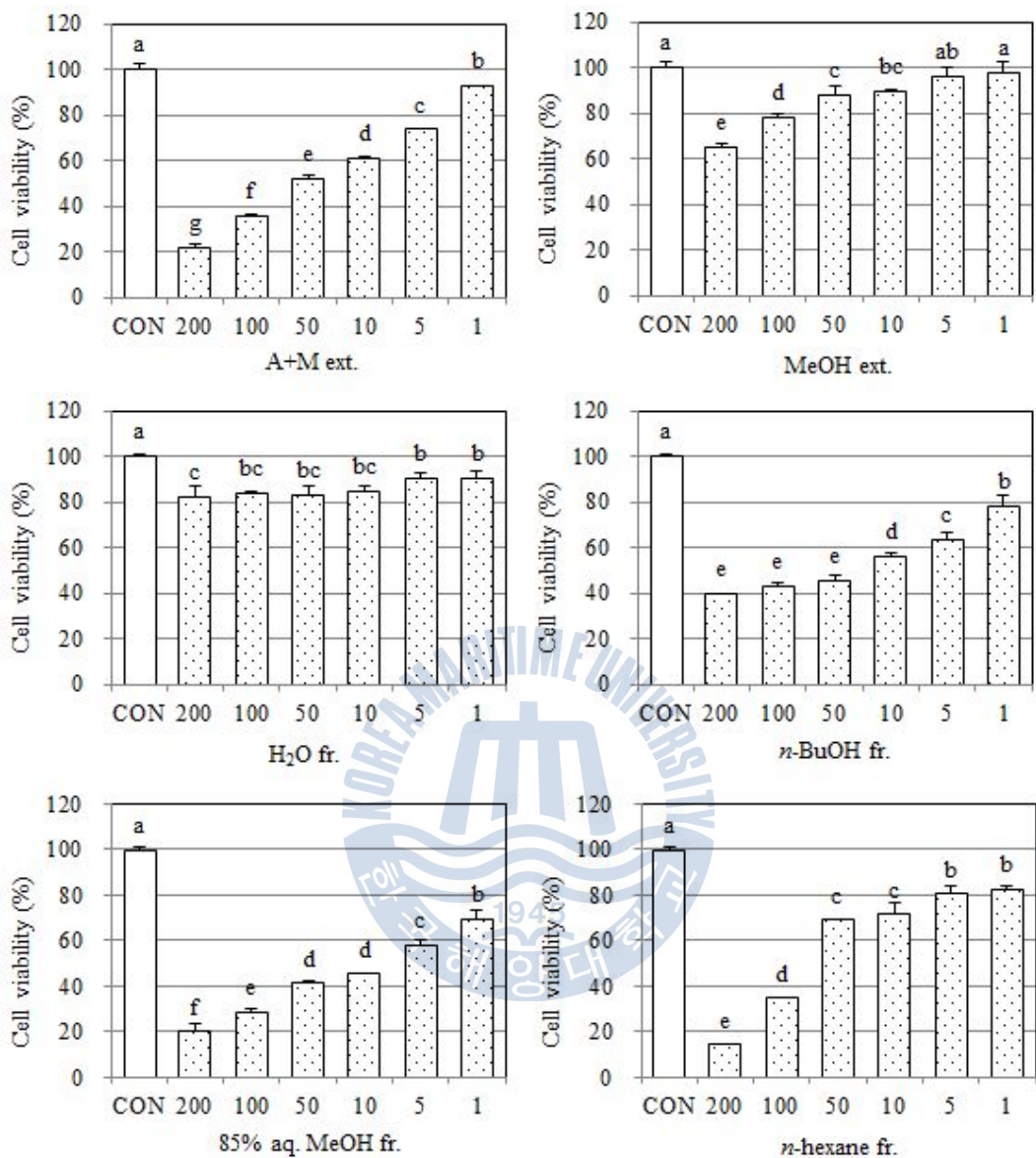


Fig. 26. Effects of crude extracts and its solvent fractions from *Z. asiatica* on viability of HT-29 cells. (200, 100, 50, 10, 5, 1 µg/ml)

<sup>a-f</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

#### (4) MCF-7 세포 증식 억제 효과

인체 유방암 세포인 MCF-7 세포에 대하여 조추출물 및 용매 분획물이 미치는 영향을 동일한 방법으로 측정하였다.

조추출물에서는 A+M 추출물이 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 60%의 억제율을 보였으나 MeOH 추출물에서는 큰 효과를 보이지 않았다.

용매 분획물에서는 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외한 다른 분획물에서 세포 증식 억제율을 보였으며, 85% aq. MeOH 분획물에서 특히 높은 억제율을 보였다.





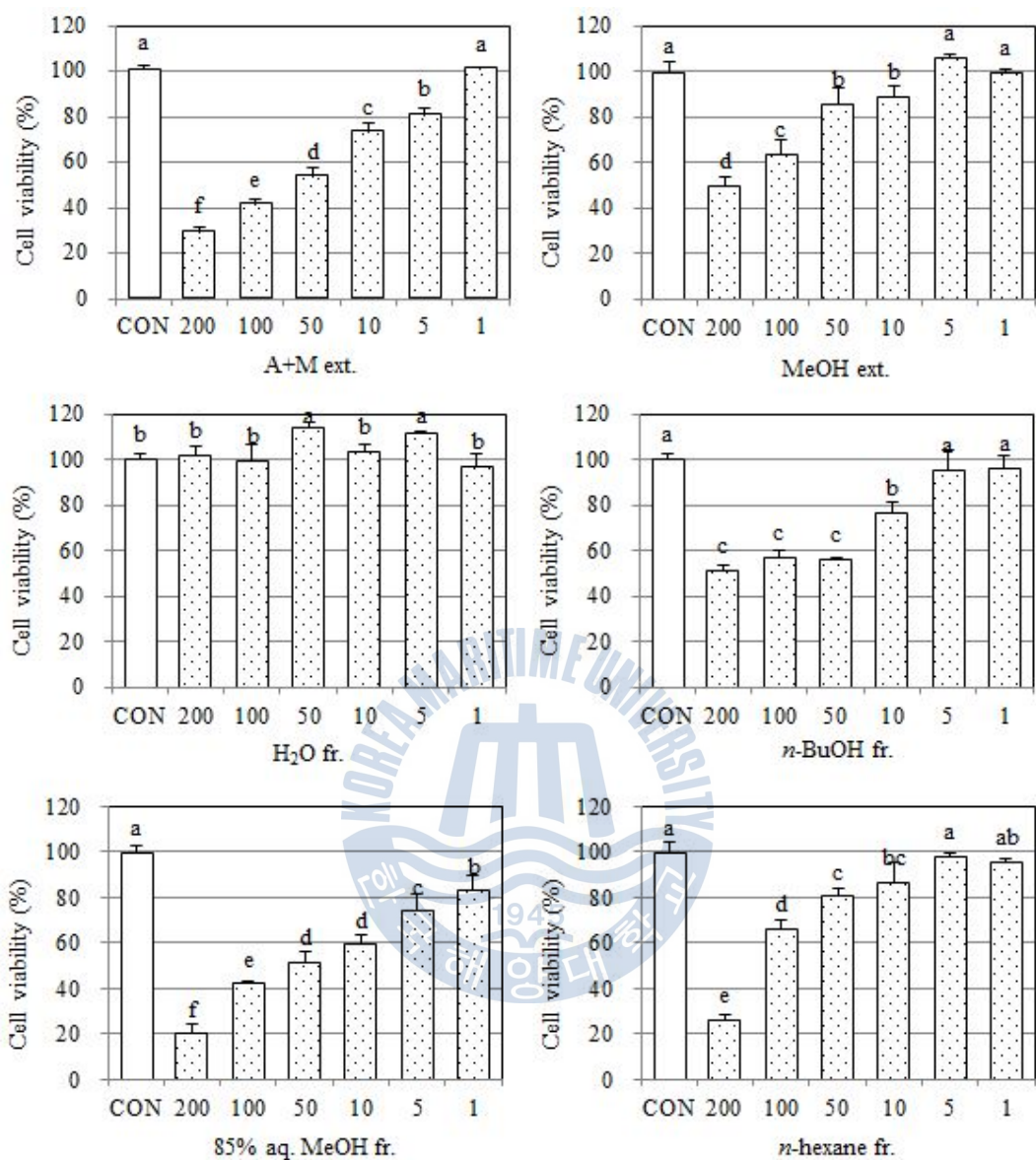


Fig. 27. Effects of crude extracts and its solvent fractions from *Z. asiatica* on viability of MCF-7 cells. (200, 100, 50, 10, 5, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

<sup>a-f</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## (5) 용매 분획물이 apoptosis 관련 mRNA 발현에 미치는 효과

왕거머리말의 분획물의 MTT assay의 결과를 근거로 하여, 높은 암세포 성장 억제효과를 보인 AGS에 대해 apoptosis 관련 유전자들의 발현에 미치는 효과를 관찰하였다. apoptosis 관련 유전자로서는 세포사 억제 유전자인 Bcl-2 유전자와 이와 상호작용하는 Bax 유전자, 종양억제유전자로 많이 알려진 p53 유전자와 이에 의해 조절을 받는 p21 유전자의 발현양상을 비교하였다.

AGS 세포에 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 용매분획물을 처리하여 각 유전자의 발현 양상을 관찰한 결과, 용매추출물에 의해 Bcl-2 유전자의 발현은 감소하였으며, Bax 유전자와 p21 유전자의 발현은 증가시켰다. 특히, 종양억제유전자인 p53 유전자의 경우 85% aq. MeOH 처리군에서 가장 높은 발현율을 보였다. 용매분획물 중에서 85% aq. MeOH 추출물은 다른 용매 분획물에 비해 Bax, Bcl-2, p53, p21 등 apoptosis 관련 유전자들의 발현을 가장 적절히 조절하는 효과를 보였다.

이러한 결과를 바탕으로 농도 변화에 따른 이들 유전자의 양상을 200  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 처리 농도에서 관찰하였다. 85% aq. MeOH 분획물은 농도 의존적으로 Bax, p53, p21 유전자의 발현을 증가시켰다. 이 결과로 보아 왕거머리말의 85% aq. MeOH 분획물은 이들 유전자의 발현을 조절하여 apoptosis를 촉진하여 암세포 증식을 억제하는 것으로 사료된다.

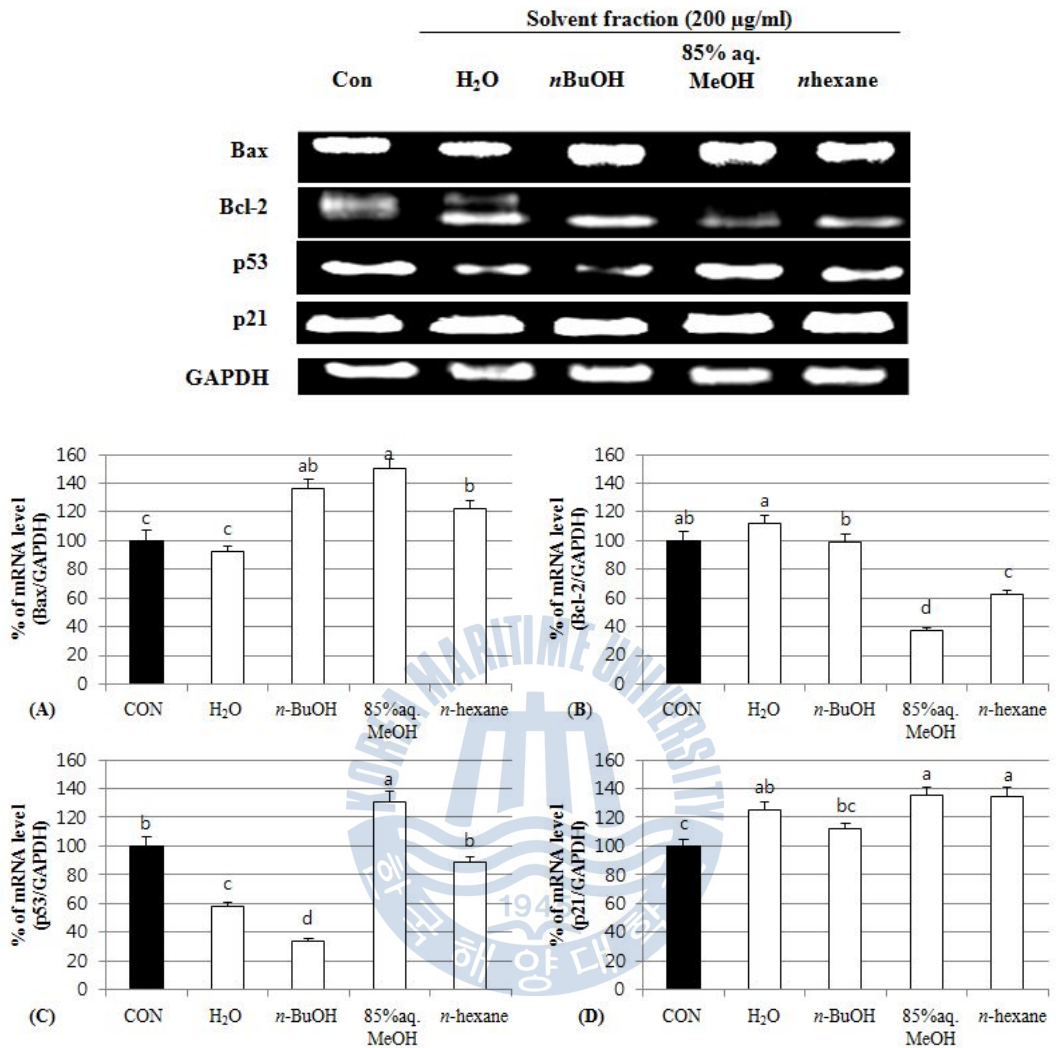


Fig. 28. Effect of solvent fractions from *Zostera asiatica* on apoptosis related gene expression (A) Bax (B) Bcl-2 (C) p53 (D) p21 in AGS human gastric adenocarcinoma cells.

<sup>a-d</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

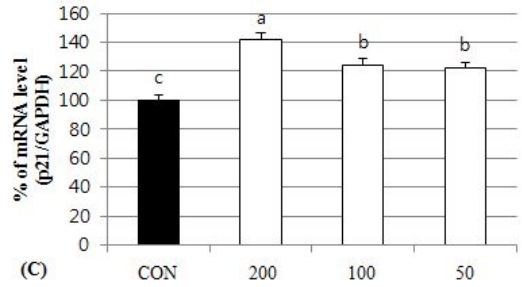
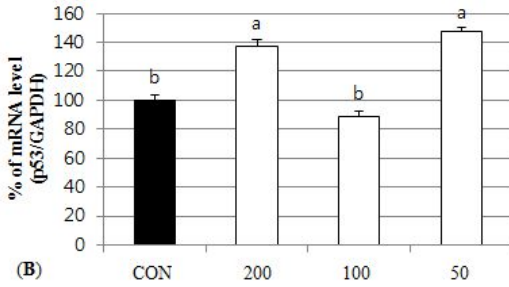
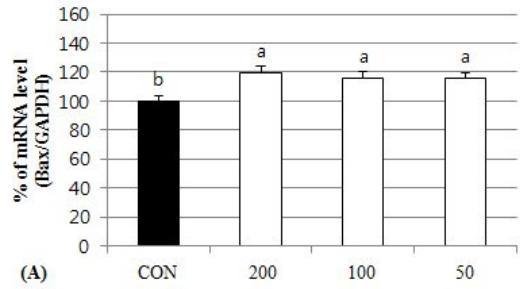
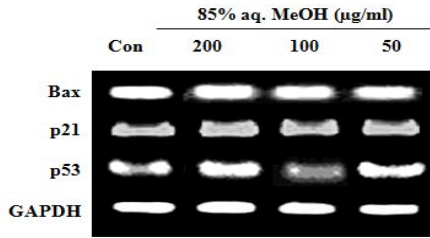


Fig. 29. Effect of 85% aq. MeOH fraction from *Zostera asiatica* on apoptosis related gene expression (A) Bax (B) p53 (C) p21 in AGS human gastric adenocarcinoma cells.

<sup>a-c</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

### 3-4 NO 생성 억제 효과

왕거머리말의 항염증 효과를 알아보기 위해 염증 유발 인자인 NO 생성 억제율을 확인하였다. 각 시료의 농도는 100, 50, 10, 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 희석하여 실험에 사용하였고, 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS를 처리한 control과 시료와 LPS를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다.

NO 생성을 측정한 결과, LPS로 자극한 control과 비교하였을 때, 모든 시료에서 NO 생성의 억제 효과가 보이지 않았으며, 항염증에 대한 왕거머리말의 효과는 없는 것으로 판단되었다.



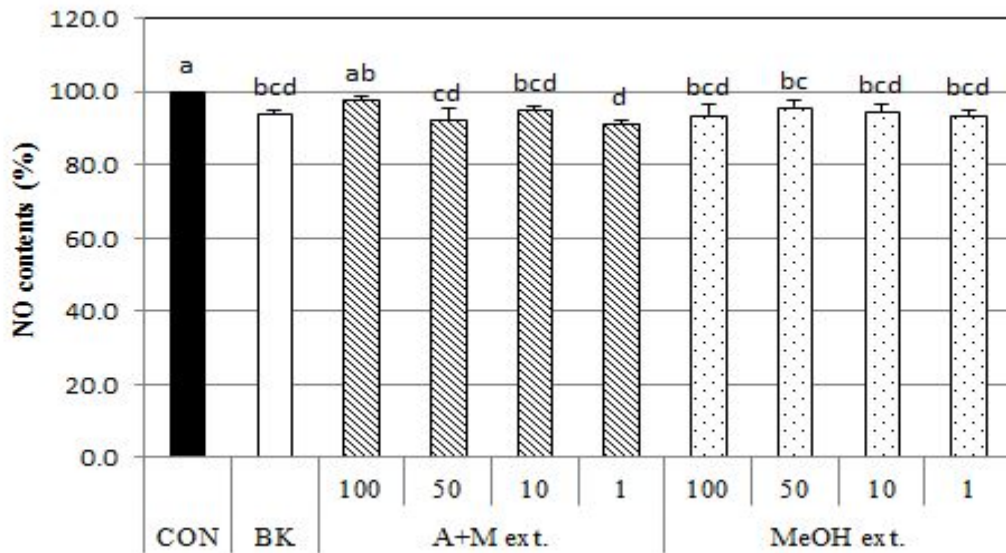
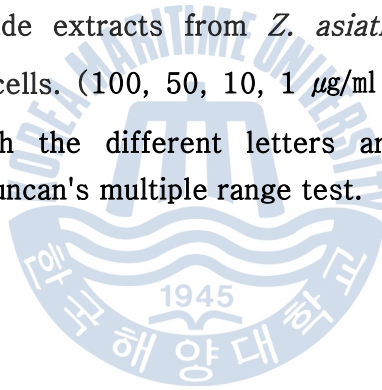


Fig. 30. Effects of crude extracts from *Z. asiatica* on nitrite production in Raw 264.7 cells. (100, 50, 10, 1  $\mu\text{g/ml}$ )

<sup>a-d</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



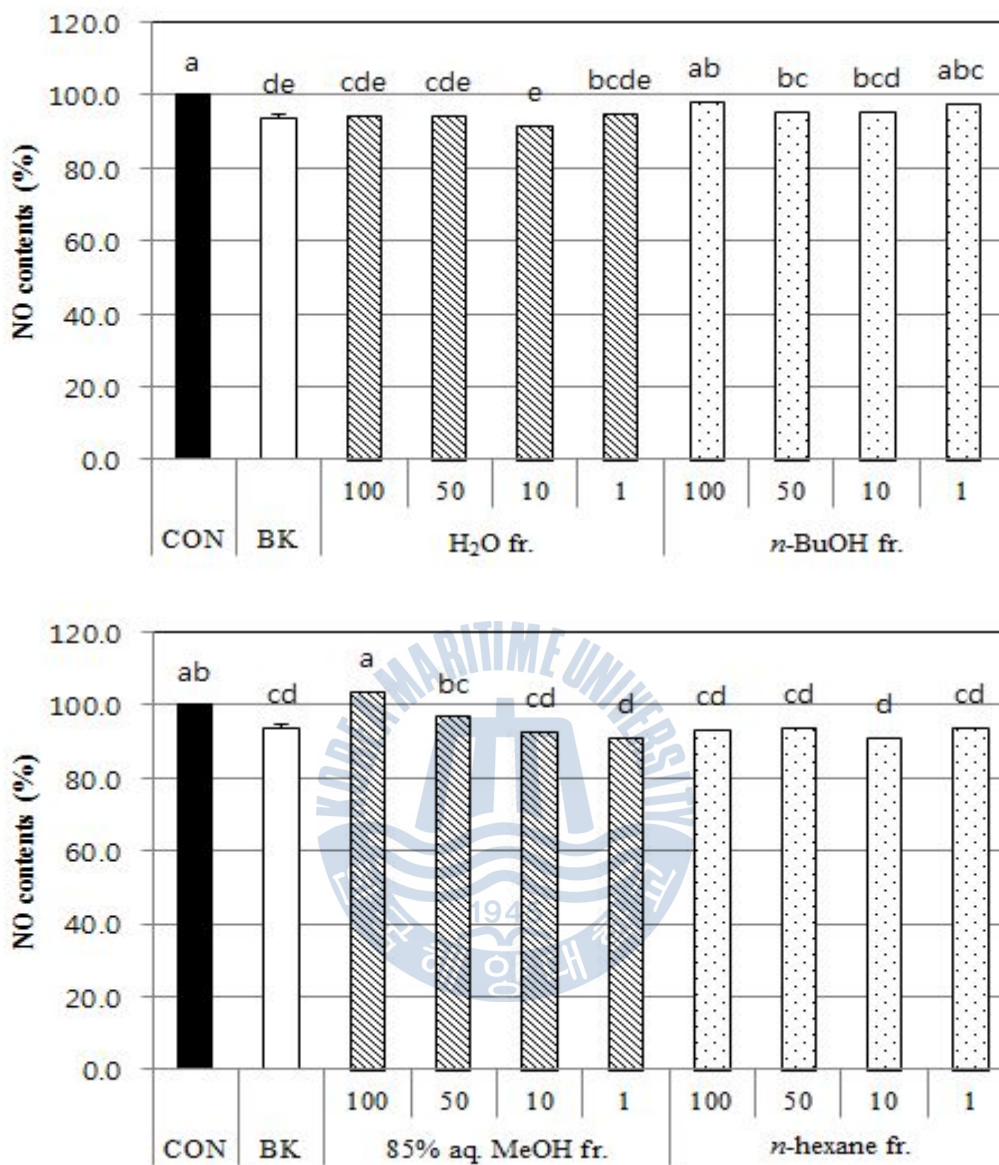


Fig. 31. Effects of solvent fractions from *Z. asiatica* on nitrite production in Raw 264.7 cells. (100, 50, 10, 1 µg/ml)

<sup>a-e</sup> Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

## 4. 요약 및 결론

시대가 지남에 따라 인류의 생활 환경이 변하면서 기존에 알던 질병 이외에도 많은 질병이 생겨나고, 암이라는 불치의 병과 같은 풀지 못하는 과제 또한 생겨나게 되었다. 이러한 많은 질병을 정복하기 위해 천연물에 대한 연구로 약제 등의 개발 및 연구를 통해 해결하려 하였다. 하지만 육상에서의 천연물로도 많은 질병을 정복하였지만 그 한계에 부딪치게 되고, 해양 천연물로 눈을 돌리게 되었다.

특이하게도 바다 속에서 꽃을 피우는 해양현화식물의 한 종류인 왕거머리말은 육상 식물에서 많이 내포하고 있는 플라보노이드가 왕거머리말에도 다량 함유하고 있음이 알려지면서 많은 관심을 받고 있다. 이러한 왕거머리말의 생리 활성 효과를 알아봄으로써 인체 생리 활성 물질 개발에 대한 가능성을 탐색하였다.

경상남도 창원시 다구리에서 채집한 왕거머리말을 응달에서 건조하여 acetone 과 methylene chloride를 1:1로 혼합하여 추출하고, 그 잔사를 methanol로 다시 추출하여 조추출물을 얻었으며, 이를 극성도에 따라 H<sub>2</sub>O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, *n*-hexane 분획물을 순차적으로 얻었다. 각 조추출물과 용매 분획물이 *in vitro*에서의 항산화 활성을 검색하기 위해 DPPH radical 소거능과 peroxinitrite 소거능을 측정한 결과, MeOH 추출물의 DPPH radical 소거능이 A+M 추출물보다 뛰어났으며, 용매분획물에서는 *n*-BuOH 분획물과 85% aq. MeOH분획물의 소거능이 가장 뛰어나게 나타났다.

세포 수준에서의 항산화 활성을 실험하기 위하여 세포내 활성 산소종(ROS) 소거 활성을 탐색한 결과, 조추출물에서는 A+M 추출물이 높은 ROS 소거 활성을 보였으며, 용매 분획물에서는 H<sub>2</sub>O 분획물을 제외한 모든 분획물에서 ROS 소거 활성을 나타내었다. 세포내 항산화 물질인 GSH 함량에 왕거머리말이 미치는 영향을 탐색하기 위해 GSH 함량을 측정한 결과, 모든 추출물 및 분획물을 처리하였을 때 그 함량이 증가하였다.



왕거머리말이 DNA 산화에 미치는 영향을 알아보고자 HT-1080 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 DNA 산화물 생성을 측정한 결과, 조추출물 중 MeOH 추출물이 DNA 산화 억제에 보다 높은 효과를 보였으며, 용매 분획물에서는 H<sub>2</sub>O 분획물과 *n*-BuOH 분획물이 높은 산화 억제 효과를 보였다.

왕거머리말이 항암에 미치는 영향을 탐색하기 위하여 인체 유래 암세포인 HT-1080, AGS, HT-29, MCF-7 세포를 이용하여 MTT assay를 통해 cell viability를 측정한 결과, 조추출물 중에서 A+M 추출물이 4가지 암세포에서 보다 높은 암세포 증식 억제 효과를 보였으며, 용매 분획물에서는 *n*-BuOH 분획물과 85% aq. MeOH 분획물을 처리하였을 때 암세포 증식 억제 효과가 가장 뛰어났다. RT-PCR을 통해 apoptosis 관련 mRNA 발현에 미치는 효과를 알아본 결과, 85% aq. MeOH 분획물이 Bax, p53, p21 유전자의 발현을 조절하여 apoptosis를 촉진하여 암세포 증식을 억제함을 확인하였다.

항염증에 대한 왕거머리말이 미치는 영향을 알아보기 위해 NO의 생성 억제 효과를 측정하였지만 모든 시료에서 그 효과가 나타나지 않았다.

위의 실험을 바탕으로 왕거머리말이 세포내 활성 산소를 제거하는 등의 항산화 효과와 각종 암세포의 성장을 억제하는 항암효과에 높은 활성을 보이는 것으로 보아, 추가적인 더 많은 연구를 토대로 항산화제와 항암제 등의 개발이 기대되어 진다.

## 5. 참고문헌

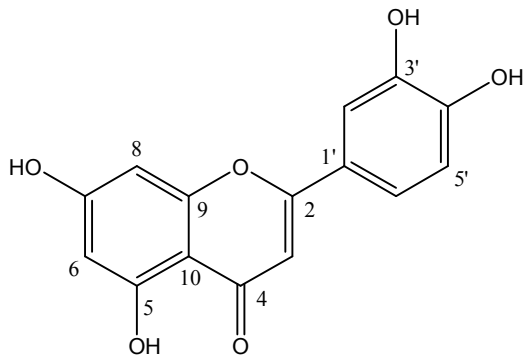
- Archamllale S., Rezzonico B., and M. Grignon-Dubois, Rosmarinic acid from beach waste: isolation and HPLC quantification in *Zostera detritus* from Arcachon lagoon. *Food Chemistry* **113**, 878-883(2009)
- Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **25**, 1199-1200(1958)
- Beda, N., and Nedospasov, A. A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric oxide*. **13**, 93-97(2005)
- Choi H. G., Lee J. H., Park H. H., Sayegh FAQ Antioxidant and antimicrobial activity of *Zostera marina* L. extract. *Algae*, **24**, 179-184(2009)
- Choi T. S., Kim K. Y., Lee B. G. and J. S. Lee, Preliminary study on the toxicity and transfer of heavy metals and tributyltin to seagrass *Zostera marina*. *Algae* **20**, 157-166(2005)
- Folin, O., Denis, W. On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**, 239-249(1912)
- Ham, S. S., Kim S. H., Yoo S. J., Oh H. T., Choi H. J. and Chung M. J., Biological Activities of Soybean Sauce (Kanjang) Supplemented with Deep Sea Water and Sea Tangle, *Korean J. Food Presery*, **15(2)**, 274-279(2008)
- Ham, S. S., Kim S. H., Yoo S. J., Oh H. T., Choi H. J. and Chung M. J., Quality Characteristics of Kochujang Added Deep Sea Water Salt and Sea Tangle, *Korean J. Food Presery*, **15(2)**, 214-218(2008)
- Hua K. F., Hsu H. Y. Su Y. C., Lin I. F. Yang S. S., Chen Y. M. and L. K. Chao. Study on the antiinflammatory activity of methanol extract

- from seagrass *Zostera japonica*. *J Agric Food Chem*, **54**, 306–311(2006)
- Huh S. H., Kwak S. N. and K. W. Nam, Seasonal variations of eelgrass (*Zostera marina*) and Epiphytic algae in eelgrass beds in Kwangyang Bay. *J. Kora Fish. Soc.*, **31**,56–62(1998)
- Jang J. H., Lee C., Kim S. C., Chung J. W. and C. I. Park, Protective Effect of Marine Natural Products against UVB-induced Damages in Human Skin Fibroblast via Antioxidant Mechanism, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **36(1)**, 79–87(2010)
- Jung H. K., Jeong Y. S., Youn K. S., Kim D. I. and Hong J. H., Quality Characteristics of Soybean Paste (Doenjang) Prepared with *Bacillus subtilis* DH3 Expressing High Protease Levels, and Deep-Sea Water, *Korean J. Food Presery*, **16(3)**, 348–354(2009)
- Kim J. B., Park J. I. and K. S. Lee, Seagrass distribution in Deukryang Bay. *Kor J Fish Aquat Sci* **42**, 509–517(2009)
- Kim J. B., Park J. I., Choi W. J., Lee J. S. and K. S. Lee, Spatial distribution and ecological characteristics of *Zostera marina* and *Zostera japonica* in the Seomjin Estuary. *Kor J Fish Aquat Sci* **43**, 351–361(2010)
- Kim J. H., Cho Y. H., Park S. M., Lee K. E., Lee J. J., Lee B. C., Pyo H. B., Song K. S., Park H. D. and Y. P. Yun, Antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves of *Zostera marina* L. *Arch Pharm Res*, **27**, 177–183(2004)
- Kim M. C., Kim J.S., Ramasamy Harikishnan, Han Y.J. and M. S. Heo, Identification and Antioxidant Activity using Electron Spin Resonance Spectrometry of Antioxidant Producing Marine Actinomycetes *Streptomyces* sp. ACT-18. *Kor. J. Microbiol.*

- Biotechnol.* **38(1)**, 24–31(2010)
- Kolenchenko E. A., Sonina L. N., and Y. S. Khotimchenko, Comparative in vitro assessment of antioxidant activities of low-etherified pectin from the eelgrass *Zostera marina* and antioxidative medicines. *Russian Journal of Marine Biology* **31**, 331–334(2005)
- Kong C. S., Um Y. R., Lee J. I., Kim Y. A. Lee J. S. and Y. W. Seo, Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on growth of human cancer cells, *Korean J. Niotechnol. Bioeng.*, **23(2)**, 177–182(2008)
- Kooy, N. W., J. A. Royall, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine* **16**:149–156, 1994.
- Kumar C. S., Sarada D. V. L., Gideon T. P., and R. Rengasamy, Antibacterial activity of three South Indian seagrasses, *Cymodocea serrulata*, *Halophila ovalis* and *Zostera capensis*. *World J Microbiol Biotechnol* **24**, 1989–1992(2008)
- Lee S. M., Lee S. Y., C. I. Choi, Reproductive phenology of four Korean seagrasses, *Zostera caespitosa*, *Z. caulescens*, *Z. japonica* and *Z. marina*. *Ocean and Polar Research*, **27**, 125–133(2005)
- Lim J. H., Jung K. S., Lee J. S., Kim D. K., Kim Y. S., Kim Y. W. and D. H. Park, The Study on Antimicrobial and Antifungal Activity of the Wild Seaweeds of Jeju Island, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **34(3)**, 201–207(2008)
- Molinski T. F., Molinski, D. S. Dalisay, S. L. Lievens, and J. P. Saludes,

- Drug development from marine natural products, *Drug Discovery*, **8**, 69–85(2009).
- Owen R. W., Haubner R., Mier W., Giacosa A., Hull W. E. Spiegelhalder B., H. Bartsch, Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology* **41**, 703–717(2003)
- Roth N. C. and A. M. Pregnall, Nitrate reductase activity in *Zostera marina*. *Marine Biology* **99**, 457–463(1988)
- Shin H. J. and M. O. Shin, Antimicrobial– and Anticarcinogenic Activities of Amphitrite albicostatu Fractions, *Journal of Life Science*. **20(10)**. 1505~1510(2010)
- Sonina L. N., and M. Y. Khotimchenko, Effectiveness of pectin extracted from the eelgrass *Zostera marina* for alleviating lead–induced liver injury. *Russian Journal of Marine Biology*, **33**, 2004–206(2007)
- Yang L, Guoliang J, and W. Zhiqiang Antibacterial activity of extracts from *Zostera marina* against pathogens of *Apostichopus japonicus* skin ulceration disease. *J. Ocean Univ. Chin*, **9**, 68–70(2010)

## 6. 부록



Luteolin

Fig. 32. Chemical structure of compound from *Z. asiatica*.



## 감사의 글

여러 가지 일로 다사다난하였던 2년의 시간이 지나고 그 결과가 끝을 맺었습니다.

우선 부족한 저를 지금까지 이끌어주시고 지도해주신 서영완 교수님께 진심으로 감사드립니다. 교수님의 가르침이 있어 부족하지만 그 결실을 맺을 수 있었습니다.

그리고 부족한 제게 많은 가르침을 주셨던 임선영 교수님과 안중용 교수님께도 감사드립니다.

연구생활동안 정말 많이 의지가 되었던 호준이, 든든하게 항상 뒤를 챙겨준 명국이, 바쁜 학업중에도 연구실 업무를 도와준 승오에게도 감사드립니다.

졸업 후에도 저의 고민과 문제를 상담해주시며 실험실의 버팀목이 되어주신 정임이 누나, 연구실의 어려운 일이 있을 때 매번 도와주신 공창숙 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다.

제가 신경쓰지 못한 부분도 챙겨주신 형주누나와 힘든 일이 있을 때마다 푸념을 들어주며 위로해준 저의 동기 성연이에게도 감사드립니다.

무엇보다 부족한 제가 학업에 열중할 수 있게 말없이 뒤에서 믿고 응원해주신 제 가족 모두에게 진심으로 감사드립니다.

드디어 석사과정을 무사히 마치고 사회로 한 발짝 내딛게 되었습니다. 부족한 제가 이 한걸음을 내딛을 수 있게 된 건 많은 분들의 도움이 있었기 때문에 가능했습니다. 이처럼 많은 분들에게 도움을 받은 저는 정말 행운아입니다. 제가 받았던 많은 가르침과 도움을 잊지 않고, 앞으로 더욱더 발전하는 모습으로 보답하겠습니다. 다시 한번 이 논문을 내기까지 도와주신 모든 분들께 감사의 인사를 올립니다. 감사합니다.