



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.

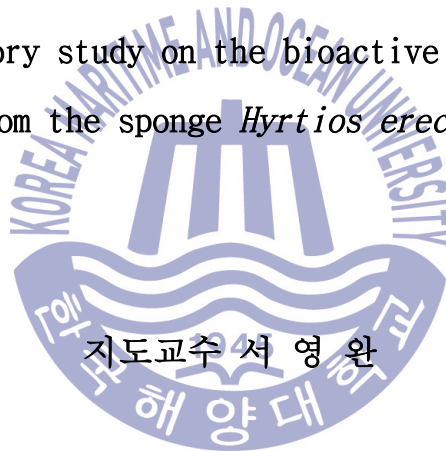
이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터
생리활성 성분의 탐색

An exploratory study on the bioactive constituents
from the sponge *Hyrtios erectus*



지도교수 서영완

2017년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

주 은 신

본 논문을 주은신의 이학석사 학위논문으로 인준함

위원장 : 임선영 인

위 원 : 박인석 인

위 원 : 서영완 인

2016 년 12 월 15 일

한국해양대학교 일반대학원

목 차

List of schemes -----	i
List of figures -----	ii
List of table -----	v
List of abbreviations -----	vi
 Abstract -----	 1
 1.서론 -----	 3
2. 재료 및 방법 -----	5
2.1. 시료 -----	5
2.2. 시약 및 기기 -----	5
2.2.1. 시약 -----	5
2.2.2. 기기 -----	6
2.2.3. 세포배양 -----	6
2.3. 추출 및 분리 -----	7
2.3.1. 추출 및 분획 -----	7
2.3.2. 활성 성분의 분리 -----	9
2.4. 항산화 활성 실험 -----	12
2.4.1. DPPH radical 소거 활성 -----	12
2.4.2. Peroxynitrite 소거 활성 -----	15
2.4.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정 -----	18
2.4.4. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성-----	19
2.4.4.1. HT-1080 세포 생존율 측정 -----	19
2.4.4.2. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성--	21

2.5. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과 -----	23
2.6. 인체 유래 암세포 증식 억제 활성 -----	25
2.7. 통계처리 -----	26
3. 결과 및 고찰 -----	27
3.1. 해면동물 <i>Hyrtios erectus</i> 로부터 분리된 물질의 구조 결정 -----	27
3.2. 항산화 활성 실험 -----	31
3.2.1. DPPH radical 소거 활성 -----	31
3.2.2. Peroxynitrite 소거 활성 -----	33
3.2.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정 -----	36
3.2.4. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성 -----	38
3.2.4.1. HT-1080 세포 생존율 측정 -----	38
3.2.4.2 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성 --	40
3.3. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과 -----	44
3.3.1. Raw 264.7 세포 생존율 측정 -----	44
3.3.2. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과 -----	44
3.4. 인체 유래 암세포 증식 억제 효과 -----	46
3.4.1. HT-1080 세포 증식 억제 효과 -----	46
3.4.2. HT-29 세포 증식 억제 효과 -----	48
3.4.3. AGS 세포 증식 억제 효과 -----	48
3.4.4. MCF-7 세포 증식 억제 효과 -----	50
3.5. 화합물들의 항산화 활성 -----	52
3.5.1. DPPH radical 소거 활성 -----	52
3.5.2. Peroxynitrite 소거 활성 -----	54
3.5.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정 -----	56
3.6. 화합물들의 NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과 -----	58
3.6.1. Raw 264.7 세포 생존율 측정 -----	58

3.6.2. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과 -----	58
3.7. 화합물들의 인체 유래 암세포 증식 억제 효과 -----	60
3.7.1. HT-1080 세포 증식 억제 효과 -----	60
3.7.2. HT-29 세포 증식 억제 효과 -----	60
3.7.3. AGS 세포 증식 억제 효과 -----	62
3.7.4. MCF-7 세포 증식 억제 효과 -----	62
4. 요약 및 결론 -----	64
5. 참고문헌 -----	66
부록 -----	69
감사의 글 -----	82



List of schemes

Scheme 1. Preparation of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> -----	8
Scheme 2. Isolation of the chemical compounds from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> -----	11
Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect -----	14
Scheme 4. Measurement of the ONOO ⁻ scavenging effect -----	17



List of figures

Figure 1.	Scavenging of the DPPH radical by phenol -----	13
Figure 2.	Peroxynitrite (ONOO ⁻) mediated oxidation of DHR 123 -----	16
Figure 3.	Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells ---	20
Figure 4.	Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system -----	22
Figure 5.	Coloring reaction for NO ₂ ⁻ detection -----	24
Figure 6.	Chemical structure of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> -----	29
Figure 7.	DPPH radical scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> -----	32
Figure 8.	Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on authentic ONOO ⁻ (% of control) -----	34
Figure 9.	Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on ONOO ⁻ from SIN-1 (% of control) -----	35
Figure 10.	Ferric reducing antioxidant power of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> (% of control) -----	37
Figure 11.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of HT-1080 cells -----	39
Figure 12.	Effects of crude extract from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells -----	41
Figure 13.	Effects of <i>n</i> -hexane and 85% aq.MeOH fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells -----	42
Figure 14.	Effects of <i>n</i> -BuOH and H ₂ O fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells -----	43
Figure 15.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of Raw 264.7 cells -----	45

Figure 16.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on nitrite production in Raw 264.7 cells -----	45
Figure 17.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of HT-1080 cells -----	47
Figure 18.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of HT-29 cells -----	49
Figure 19.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of AGS cells -----	49
Figure 20.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of MCF-7 cells -----	51
Figure 21.	DPPH radical scavenging activity of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> -----	53
Figure 22.	Scavenging activity of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on authentic ONOO ⁻ (% of control) -----	55
Figure 23.	Scavenging activity of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on ONOO ⁻ from SIN-1 (% of control) -----	55
Figure 24.	Ferric reducing antioxidant power of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> (% of control) -----	57
Figure 25.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of Raw 264.7 cells -----	59
Figure 26.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on nitrite production in Raw 264.7 cells -----	59
Figure 27.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of HT-1080 cells -----	61
Figure 28.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of HT-29 cells -----	61
Figure 29.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of AGS cells -----	63
Figure 30.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of MCF-7 cells -----	63
Figure 31.	¹ H NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	69
Figure 32.	¹³ C NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	69
Figure 33.	¹ H COSY spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	70
Figure 34.	¹ H TOCSY spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	70
Figure 35.	gHMQC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	71

Figure 36.	gHMBC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	71
Figure 37.	¹ H NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	72
Figure 38.	¹³ C NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	72
Figure 39.	¹ H COSY spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	73
Figure 40.	¹ H TOCSY spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	73
Figure 41.	gHMQC spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	74
Figure 42.	gHMBC spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	74
Figure 43.	¹ H NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	75
Figure 44.	¹³ C NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	75
Figure 45.	¹ H COSY spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	76
Figure 46.	¹ H TOCSY spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	76
Figure 47.	gHMQC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	77
Figure 48.	gHMBC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	77
Figure 49.	¹ H NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	78
Figure 50.	¹³ C NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	78
Figure 51.	¹ H COSY spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	79
Figure 52.	¹ H TOCSY spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	79
Figure 53.	gHMQC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	80
Figure 54.	gHMBC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	80
Figure 55.	Chemical structure of compounds 1-4 from the sponge <i>Hirtios erectus</i> -----	81

List of table

Table 1.	^1H and ^{13}C NMR assignments for compounds 1-4 -----	30
----------	--	----



List of abbreviations

BHA	: butylated hydroxyanisole
BHT	: butylated hydroxytoluene
CDCl ₃	: deuterated chloroform
CD ₃ OD	: deuterated methanol
CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
¹³ C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EtOAc	: ethyl acetate
H ₂ O	: water
¹ H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
Hz	: herz (sec ⁻¹)
MeOH	: methanol
<i>n</i> -BuOH	: normal-butanol
NO ·	: nitric oxide radical
· O ₂ ⁻	: superoxide anion radical
· OH	: hydroxyl radical
ONOO ⁻	: peroxyxynitrite
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reversed phase
S	: substrate
SiO ₂	: silica gel
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet



An exploratory study on the bioactive constituents from the sponge *Hyrtios erectus*

Ju, Eun Shin

Division of Marine Bioscience

Graduate School of Korea Maritime and Ocean University

Abstract

Specimens of the sponge *Hyrtios erectus* were consecutively extracted with methylene chloride and methanol, respectively. Combined crude extracts were fractionated into *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH and water fractions according to solvent polarity.

The crude extract and its solvent fractions were assessed for their scavenging effect on DPPH radical and peroxynitrite in a non-cellular system. There was no significant scavenging activity with any DPPH samples including crude extracts. However, for peroxynitrite, all tested samples showed a dose-dependent scavenging effect. Among them, *n*-hexane and 85% aq.MeOH fractions showed the most potent activity, comparable with vitamin C and penicillamine. Scavenging effect on intracellular ROS in HT- 1080 cells as well as reducing antioxidant power on ferric ion were also measured for crude extract and its four solvent fractions. All tested samples revealed the strong scavenging and reducing effect on both ROS and ferric ions, respectively, in a dose-dependent manner. In addition, all samples significantly inhibited production of LPS-activated nitric oxide (NO) in Raw

264.7 cells.

In the cytotoxicity assay system using the MTT reduction method, on the other hand, the crude extract showed a potent antiproliferative effect on HT-1080 (human fibrosarcoma) and AGS (human gastric cancer). The 85% aq.MeOH fraction of solvent-partitioned fractions exhibited the strongest growth inhibition against HT-1080 and AGS cells. *n*-Hexane fraction revealed the next strongest inhibition effect on growth of HT-1080 and AGS cells.

Four known compounds, Ilimaquinone (**1**), Smenotronic acid (**2**), Smenospongiic acid (**3**), and Pelorol (**4**) were isolated from the sponge *Hyrtios erectus*. They were also evaluated for antioxidant, antiproliferative, and antiinflammatory effects, respectively. Compound **1** of them showed the best antioxidant effect: 51.8% inhibition ratio for DPPH radical at 100 μ M; 97.3% and 97.5% inhibition ratios for authentic peroxyinitrite, and peroxyinitrite induced from decomposition of SIN-1 at 50 μ M, respectively; 60% reducing power for ferric ion at 1 μ M. In addition, all compounds dose-dependently showed the moderate or weak inhibition effect against production of nitric oxide in Raw 264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS).

All isolated compounds (**1-4**) were tested for their cytotoxicities against human cancer cell lines *in vitro* using MTT assay. All compounds revealed the significant cytotoxicity against human cancer cell lines. Ilimaquinone (**1**) and Smenotronic acid (**2**) displayed the significant cytotoxicities against HT-1080, HT-29, AGS, and MCF-7 cell lines with inhibition ratios of 60, 50, 35, and 50% at 10 μ M; 30, 45, 45, and 40% at 10 μ M. Smenotronic acid (**2**) and Smenospongiic acid (**3**) showed the significant cytotoxicities against HT-1080, HT-29, and MCF-7 cell lines with inhibition ratios of 45, 45, and 40% at 10 μ M; 45, 30, and 30% at 10 μ M.

KEY WORDS: *Hyrtios erectus*; antiproliferative; antioxidant; Ilimaquinone; Smenotronic acid; Smenospongiic acid; Pelorol

1. 서론

현대 의학의 발달로 인간의 수명은 연장되었지만, 여전히 당뇨, 암, 신경 퇴행성 질환 등의 다양한 질병들이 계속 발병하고 있다. 조합화학이나 고속 대량 스크리닝에 의한 합성신약들이 등장하고는 있지만 천연물 혹은 그 유도체가 전체 의약품 시장의 50% 이상을 차지하고 있음을 보아 천연물은 여전히 새로운 신물질의 보고로서 매우 중요한 위치를 차지하고 있음을 알 수 있다. 하지만 이러한 육상기원 천연물의 개발은 오랜 연구에 의해 그 자원이 고갈됨에 따라 특수한 환경에서 서식하는 해양생물로 관심을 돌리게 되었다. 해양생물은 육상생물과 서식 환경이 다르기 때문에 육상 천연물과는 구조적으로 상당히 다른 다양한 골격의 이차 대사물질들을 가지며, 이러한 다양한 구조는 신약개발에 유용하게 이용되고 있다(Yang et al., 2003). 현재까지 해양생물에서 개발된 대표적인 의약품으로는 말기암 환자의 진통제로 사용되는 ziconotide, 원색동물 *Ecteinascidia turbinata*로부터 분리되어 연부조직 육종의 항암제로 개발된 trabectedin 등이 있다(Molinski et al., 2009).

1950년대에 해면동물 *Tethya crypta*로부터 특이한 뉴클레오사이드 유도체인 ara-A가 분리된 이후로 해양생물로부터의 다양한 골격을 가진 새로운 천연물들이 분리되었다(Mohammad et al., 2014). 이러한 해양생물들 중에서 해면동물은 해양신물질의 가장 풍부한 원천으로서 특이한 골격과 항암, 항균, 항염증과 같은 다양한 생리활성을 가진 물질들이 분리되었다(Iguchi et al., 1992; Rho et al., 2004). 그 예로 해면동물 *Dysidea avara*에서 분리된 avarol과 avaron, *Halichondria okadai*에서 분리된 halichondrin B, 그리고 *Hemiassterella minor*에서 분리된 hemiassterlin 등은 특이한 골격과 강력한 항암활성으로 주목을 받고 있는 물질들이다(Crispino et al., 1989).

해면동물들 중에 *Hyrtios* 속은 흔히 열대 지방이나 아열대의 물에 서식하며, 주로 산호초에 우세한 생물군집을 형성한다. 이처럼 열대 지방

에 서식하는 생물종은 더욱 치열한 생물종간의 경쟁으로 인해 더욱 다양하고 특이한 이차대사물질이 분리될 가능성이 높다. 그리고 해면동물 *Hyrtios* 속과 그들과 관련된 미생물의 화학적 조사에서 scalarane sesterterpenoids, acyclic triterpenoids, indole alkaloids, macrolides, steroids 등을 포함한 구조적으로 독특한 다양한 천연물들이 분리되었으며, 이러한 많은 화합물들은 생물학적으로 중요한 활성을 가지는 것으로 알려졌다(Ryu et al., 1996; Qiu et al., 2004; Sauleau et al., 2006). 그 외에도 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리된 물질 중 hyrtiosal은 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 억제제로 작용하여 비만과 제2형 당뇨의 치료물질로 작용할 수 있으며(Sun et al., 2007), 또한 hyrtiosal은 HIV-1 integrase를 억제할 수 있다는 사실 또한 밝혀졌다(Du et al., 2008). 그리고 *Hyrtios* sp.에서 *Candida albicans*의 이소시트르산분해효소에 대해 억제활성을 가지는 물질이 분리되기도 하였다(Lee et al., 2009).

본 연구에서는 이처럼 다양한 이차대사산물을 생산하는 해면동물인 *Hyrtios erectus*로부터 항산화, 항암, 항염증과 같은 생리활성 효과를 탐색하고 항산화, 항암 및 항염증의 소재로서 활용가능성이 있는지 알아보았다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

실험에 사용된 해면동물 *Hirtios erectus*는 남태평양 미크로네시아 चु(chuuk)에서 채집되었으며, KIOST로부터 채집된 해면동물을 받아 실험에 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

2.2.1. 시약

추출, 분획 및 분리에 사용한 용매는 모두 1급 시약을 증류한 후 사용하였다. Column packing materials는 RP-18 (YMC-Gel ODS-A, 12 nm, S-75 μ m)을 사용하였고, TLC plate는 Silica gel 60 F₂₅₄ (1mm, Merck)를 사용하였다. High performance liquid chromatography (HPLC)에 사용한 column은 YMC pack ODS-A (250×10 mm, S-5 μ m, 12 nm)를 사용하였다.

항산화 활성 실험에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), 3-morpholinsydnnonimine (SIN-1), dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methyl-butanoic acid)은 Sigma aldrich (ST Louis, MO, USA)에서 구입하였고, peroxyntirite (ONOO⁻)는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포배양에 필요한 RPMI-1640과 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), FBS (Fetal Bovine Serum)는 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서, 0.05% Trypsin-0.02% EDTA와 100 units/mL penicillin-streptomycine은 GIBCO (USA)에서 구입하여 사용하였다. ROS측정에 사용된 DCFH-DA는 Molecular Probes inc. (Eugene, OR, USA)에서 구입하였고, NO 생성 측정 실험에 사용된 MEM (Modified Eagle Medium)과 Lipopolysaccharide (LPS), Griess 시약에 사용된 sulfanilamide와 N-(1-naphtyl)ethylene-diamide (NED)는 Sigma aldrich에서 구입하였다. MTT assay를 위한 kit (MTT cell proliferation Assay)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

2.2.2. 기기

High performance liquid chromatography (HPLC, Dionex p580)와 Varian RI detector를 사용하여 화합물을 정제 및 분리하였고, NMR 실험은 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였다.

항산화 활성 및 MTT assay 등의 측정에 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic, England), Multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT (Bio-TEK instruments, USA), Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)를 사용하였다.

세포의 배양은 CO₂ incubator (FormaScientific, Japan)를 사용하였고, 그 외에 rotary evaporator (EYELA, JAPAN), vacuum pump, water bath, pipet (JBM-pipet), 여과기 등을 사용하였다.

2.2.3. 세포배양

실험에 사용한 HT-1080 (human fibrosarcoma cells), HT-29 (human colon cancer cells), AGS (human gastric adenocarcinoma cells), Raw 264.7 (macrophage cells), MCF-7 (human breast cancer cells) 세포는 한국세포주 은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)으로부터 분양 받아 배양하여 실험에 사용하였다.

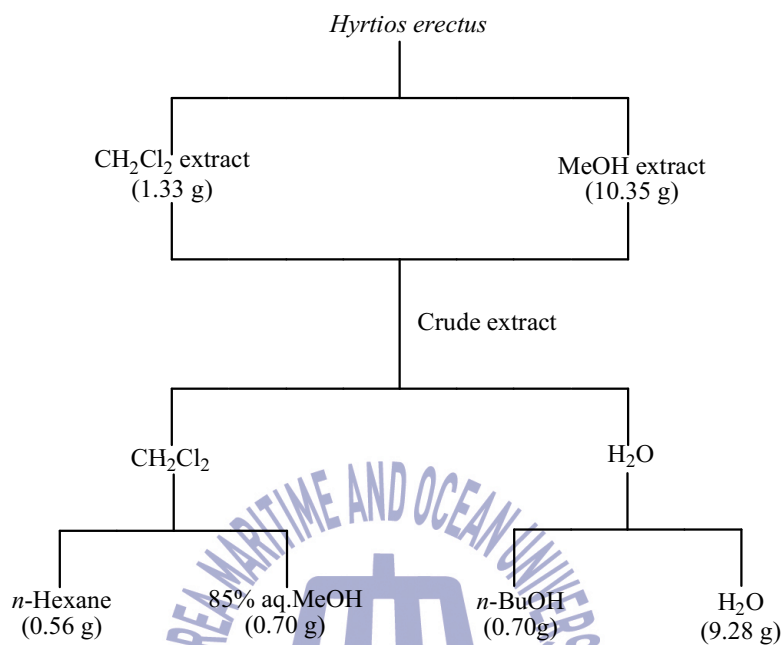
HT-1080, HT-29와 AGS 세포는 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS를 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하여 배양하였고, MCF-7과 Raw 264.7 세포는 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 모든 세포들은 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였고, 배양된 세포는 일주일에 5~6회 배지를 교환하고, 6~7일 만에 PBS로 세척한 후, HT-1080, HT-29, AGS, MCF-7 세포는 0.05% Trypsin-0.02% EDTA로, Raw 264.7 세포는 cell scraper로 부착된 세포를 분리하여 계대배양 하였다.

2.3. 추출 및 분리

2.3.1. 추출 및 분획

KIOST로부터 받은 해면동물 *Hyrtios erectus*를 methylene chloride에 24시간 침지시켜 추출하였고 이를 2회 반복하였다. 그리고 잔사에 동량의 methanol을 이용하여 마찬가지로 24시간 침지시켜 추출하였고 이를 2회 반복하였다. 이러한 방법으로 얻어진 methylene chloride 추출액과 methanol 추출액을 감압 농축하여 각각 1.33 g, 10.35 g의 조추출물을 얻었다.

두 조추출물을 합한 후에 methylene chloride와 H₂O로 분획하여 methylene chloride 분획층과 H₂O 분획층을 얻었다. 얻어진 methylene chloride 분획층은 감압 농축한 뒤 *n*-hexane과 85% aq.MeOH로 분획하였고, H₂O 분획층은 *n*-BuOH와 H₂O로 분획하였다. 이러한 방법으로 용매 극성에 따라 *n*-hexane 분획층, 85% aq.MeOH 분획층, *n*-BuOH 분획층, H₂O 분획층으로 총 네 개의 분획층들을 얻었으며, 각각 0.56 g, 0.70 g, 0.70 g, 9.28 g을 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1. Preparation of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus*.

2.3.2. 활성 성분의 분리

n-Hexane 분획층은 ethyl acetate와 *n*-hexane의 혼합용매를 사용하여 silica normal-phase vacuum chromatography를 실시하였으며 모두 10개의 분획(100% *n*-hexane, 5% EtOAc/*n*-hexane, 10% EtOAc/*n*-hexane, 20% EtOAc/*n*-hexane, 30% EtOAc/*n*-hexane, 40% EtOAc/*n*-hexane, 50% EtOAc/*n*-hexane, 70% EtOAc/*n*-hexane, 100% EtOAc, 100% MeOH)을 얻었다. 그 중 20% EtOAc/*n*-hexane 분획을 reversed-phase HPLC (ODS-A, 95% aq.MeOH)하여 **compound 1**을 분리하였고, 30% EtOAc/*n*-hexane 분획을 reversed-phase HPLC (ODS-A, 100% MeOH)하여 역시 **compound 1**을 분리하였다(Scheme 2).

85% aq.MeOH 분획층은 methanol과 H₂O의 혼합용매를 사용하여 C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography 하였고, 이 실험으로 50% aq.MeOH, 60% aq.MeOH, 70% aq.MeOH, 80% aq.MeOH, 90% aq.MeOH, 100% MeOH, 100% EtOAc의 총 7개 분획을 얻었다. 그 중 70% aq.MeOH 분획을 reversed-phase HPLC (ODS-A, 80% aq.MeOH)하여 **compound 1**을 분리하였고, 80% aq.MeOH, 90% aq.MeOH, 100% MeOH 분획을 같은 조건으로 reversed-phase HPLC (ODS-A, 80% aq.MeOH)하여 **compound 1, 2, 3, 4**를 분리하였다(Scheme 2).

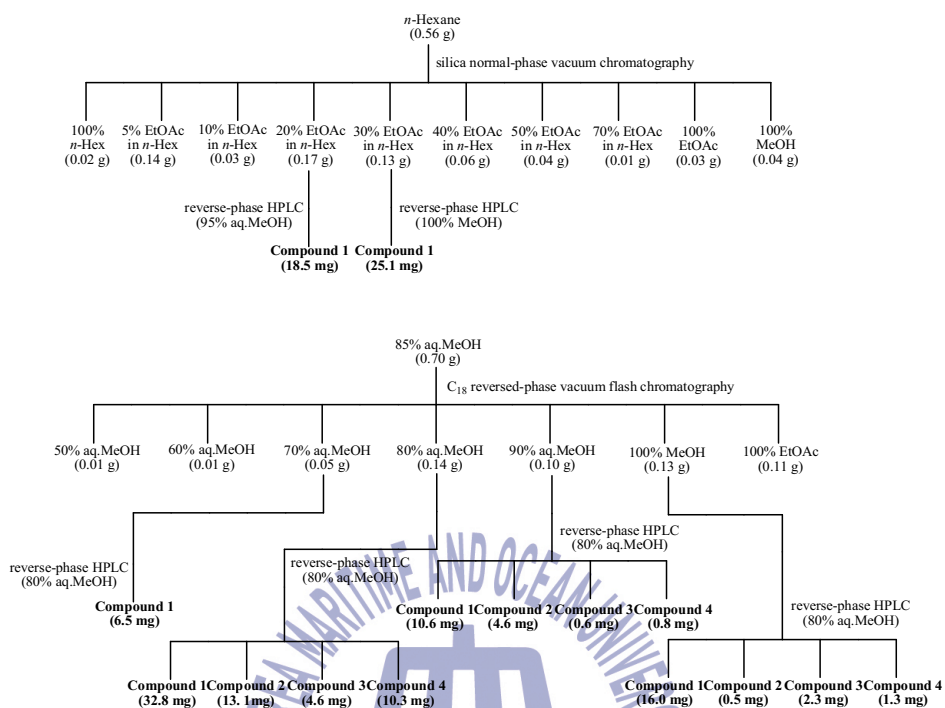
Compound 1 (Ilimaquinone): ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 5.89 (1H, s, H-19), 4.39 (2H, br s, H-11), (3H, s, OMe), 2.52 (1H, d, J = 13.6 Hz, H-15), 2.41 (1H, d, J = 13.6 Hz, H-15), 1.04 (3H, s, H-12), 0.98 (3H, d, J = 6.33 Hz, H-13), 0.84 (3H, s, H-14).

Compound 2 (Smenotronic acid): ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 5.36 (1H, s, H-19), 4.49 (1H, br s, H-11), 4.47 (1H, br s, H-11), 3.91(3H, s, methoxy), 2.81 (1H, d, J = 18.8, H-15), 2.59(1H, d, J = 18.8, H-15), 1.05 (3H, s, H-12) 0.83 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-13), 0.79 (3H, s, H-14).

Compound 3 (Smenospongic acid): ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ 4.48 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-19), 4.47 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-11), 2.34 (1H, d, $J = 13.5$, H-15), 2.24 (1H, d, $J = 13.5$, H-15), 1.07 (3H, s, H-12) 0.91 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-13), 0.81 (3H, s, H-14).

Compound 4 (Pelorol): ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ 6.95 (1H, s, H-19), 3.77 (3H, s, methoxy), 1.21 (3H, s, H-15), 1.09(3H, s, H-14), 0.89(3H, s, H-12), 0.86(3H, s, H-13).





Scheme 2. Isolation of the chemical compounds from the sponge *Hyrtios erectus*.

2.4. 항산화 활성 실험

2.4.1. DPPH radical 소거 활성

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 화학적으로 안정한 free radical을 가지는 수용성 물질로 진한 보라색을 띤다. DPPH가 free radical을 잃게 되면 안정한 분자인 diphenylpicrylhydrazine이 되며 노란색을 띠게 되고 흡광도 값이 변하게 된다(Figure 1). 이 흡광도 값을 비교하여 활성 유무를 측정하였으며, 대조군으로 BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene)와 vitamin C (L-ascorbic acid)를 사용하였다.

DPPH 시약 2 mg을 ethanol 15 mL에 녹여 만든 DPPH 원액 1.2 mL와 3 mL의 ethanol, 0.5 mL의 DMSO를 동일 비율로 혼합하여 DPPH radical solution을 만든다. 준비된 DPPH radical solution을 cuvette에 넣고 518 nm의 파장에서 흡광도 측정값이 0.94~0.97이 되도록 농도를 조절한다. 농도를 조절한 DPPH radical solution 900 μ L에 준비한 시료 100 μ L를 농도별로 가하고 10분 후에 518 nm의 파장에서 그 흡광도를 측정하였다(Scheme 3; Blois, 1958).

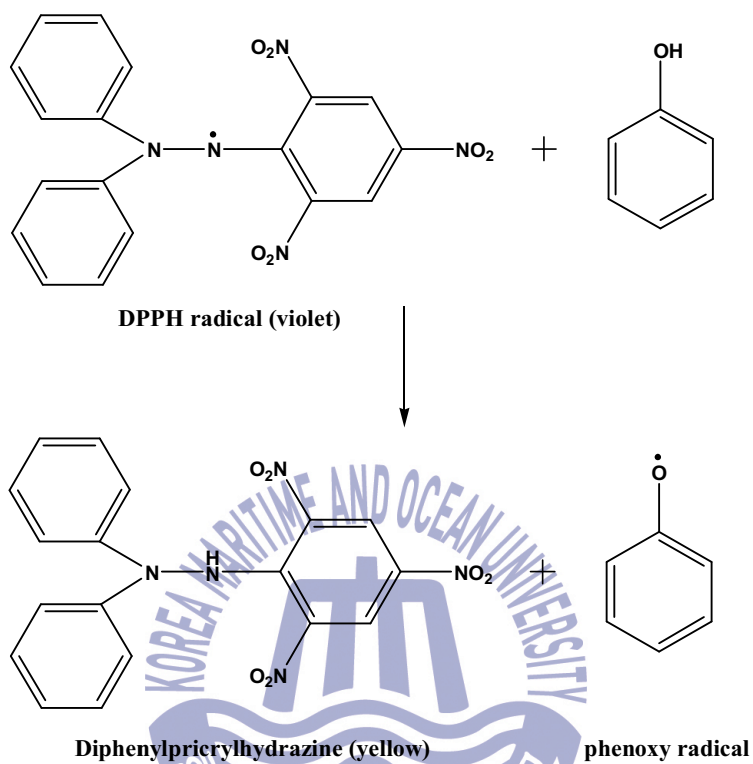
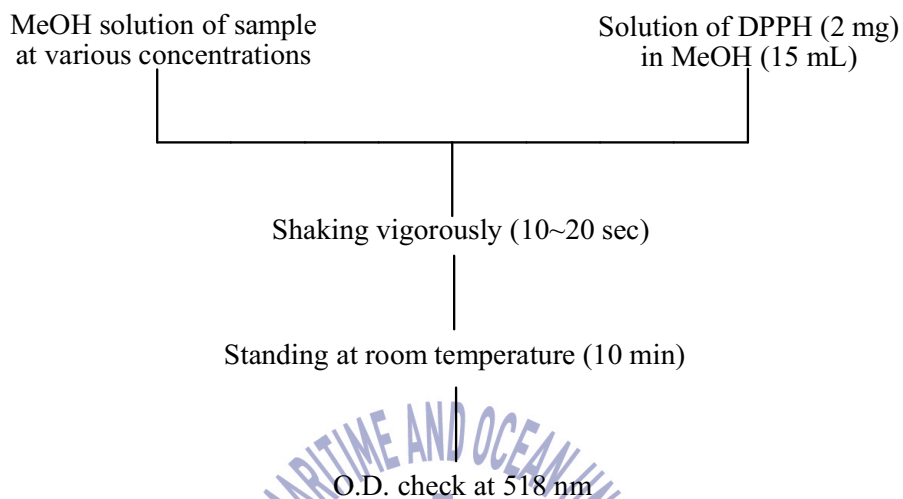
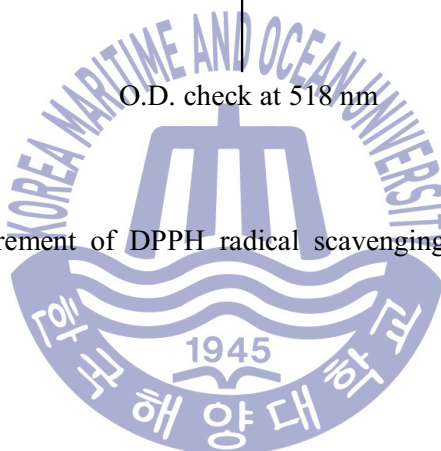


Figure 1. Scavenging of the DPPH radical by phenol.



Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging activity.



2.4.2. Peroxynitrite 소거 활성

Peroxynitrite (ONOO^-) 소거 활성은 dihydrorodamine 123 (DHR 123)의 산화되는 정도를 측정하는 방법으로 탐색하였다. DHR 123은 peroxynitrite와 반응하여 형광물질인 rodamine 123으로 바뀐다(Figure 2). DHR 123에 authentic peroxynitrite와 SIN-1을 처리하고 그 반응 생성물의 흡광도를 측정하여 시료의 peroxynitrite 소거능을 측정하였으며, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)와 penicillamine을 사용하였다.

DHR 123은 dimethylformamide에 녹여 질소로 purge시켜 -80°C 에 보관하였고, 보관된 DHR 123은 사용하기 전에 암실의 얼음 위에서 희석하여 실험에 사용하였다. Buffer는 90 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합하여 pH를 7.4로 조절한 용액에 100 μM DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid)를 혼합하여 만들고 냉장보관 하였다. 이 buffer로 DHR 123을 5 μM 로 희석하여 실험에 사용하였다. Buffer로 희석한 DHR 123에 시료와 authentic 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 경우에는 동일한 방법으로 실시한 후 1시간 동안 방치한 뒤 측정하였다. 이는 SIN-1이 $\text{NO}\cdot$ 와 $\text{O}_2\cdot^-$ 를 동시에 발생시켜 ONOO^- 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(Scheme 4; Kooy et al., 1994).

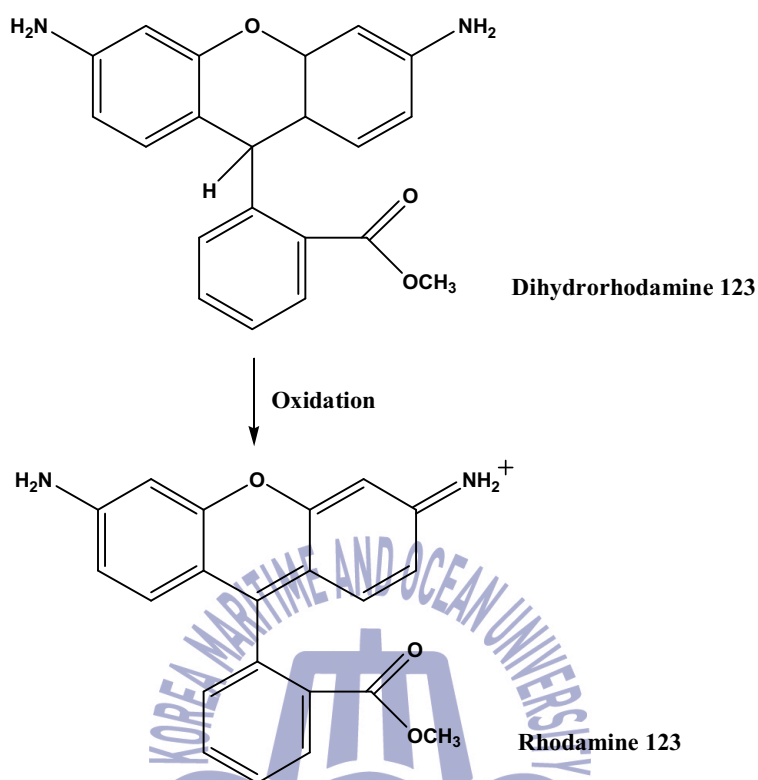


Figure 2. Peroxynitrite (ONOO^-) mediated oxidation of DHR 123.

Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μ M



Dihydrorhodamine 123 5 μ M



Incubation at 37°C for 1 min



Sample



SIN-1 200 μ M or peroxynitrite 5 μ M



Mesurement of fluorecence intensity
Excitation wavelength at 485 nm
Emission wavelength at 530 nm

Scheme 4. Mesurement of the ONOO^- scavenging activity.

2.4.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정

환원력을 측정하기 위해 시료를 적당한 농도로 희석한 후, 희석한 시료 0.2 mL와 200 mM sodium phosphate (pH 6.6) 0.2 mL, 1% potassium ferricyanide 0.2 mL를 혼합한다. 이를 20분 동안 50℃에서 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid 0.2 mL를 첨가하여 혼합한 뒤, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 한 후, 상등액 0.5 mL와 0.1% ferric chloride 0.5 mL를 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 vitamin C (L-ascorbic acid)를 사용하였다(Kim & Jeong, 2014).



2.4.4. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성

2.4.4.1. HT-1080 세포 생존율 측정

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 얻어진 물질이 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 시약을 사용하여 확인하였다. MTT assay는 세포의 증식과 살아있는 정도를 간접적으로 측정하며, 대사과정이 온전한 세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색을 띠는 수용성의 MTT tetrazolium이 환원되어 보라색을 띠는 MTT formazan[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]이 된다(Figure 3). 세포가 많을수록 MTT formazan을 많이 생성하게 되며 이를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다.

배양한 세포를 96 well micro-plate에 2×10^4 cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 배지를 교환한 후 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 다시 1시간 배양하였다. 시료를 처리하여 배양된 세포는 1 mg/mL 농도의 MTT 시약을 처리하여 4시간 배양하고, formazan이 형성되면 MTT 시약이 처리된 배지를 제거한 후, 형성된 formazan을 DMSO에 녹여 Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

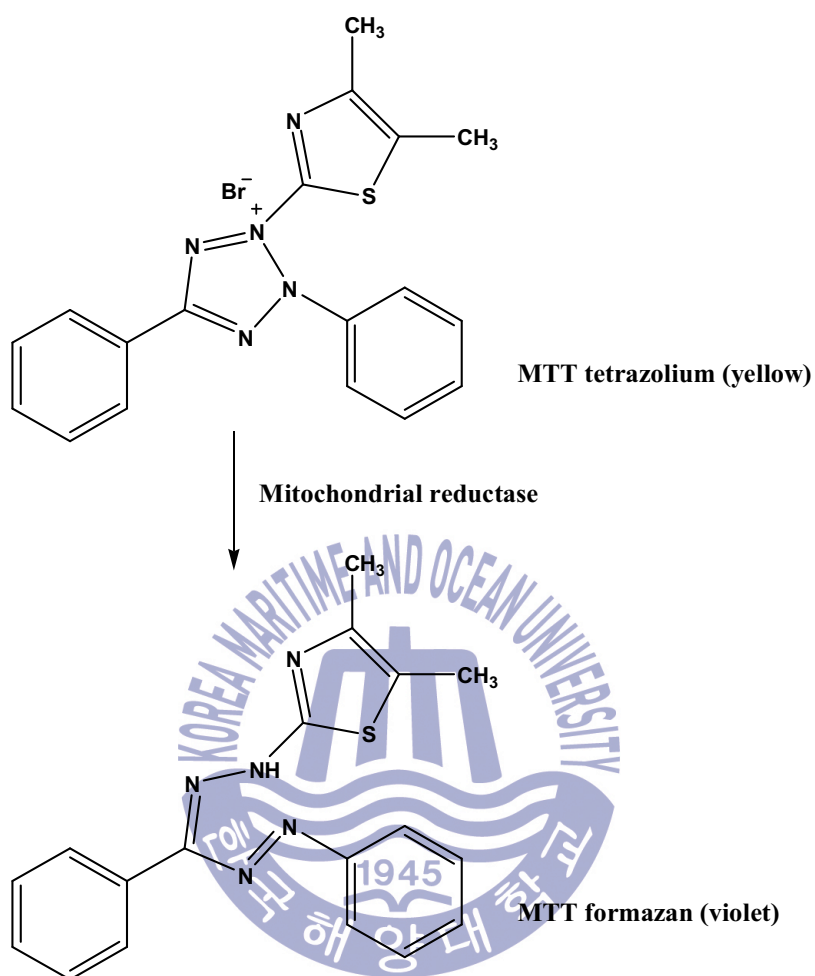


Figure 3. Metabolization of MTT to MTT formazan by viable cells.

2.4.4.2. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성

세포내 ROS free radical 생성은 비형광물질인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)가 세포내 생성된 free radical과 반응하여 형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 산화되는 원리를 이용한 DCFH-DA assay로 측정하였다(Figure 4; Okimoto, 2000).

HT-1080 세포를 96 well micro-plate에 2×10^4 cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 배지를 제거하고 PBS로 씻어낸 후 20 μ M DCFH-DA를 각 well에 처리하여 20분간 pre-incubation 하였다. Pre-incubation한 세포의 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 incubation 한 후, DCFH-DA를 제거하고 PBS로 씻어낸 후, 500 μ M H₂O₂를 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)로 측정하였다.



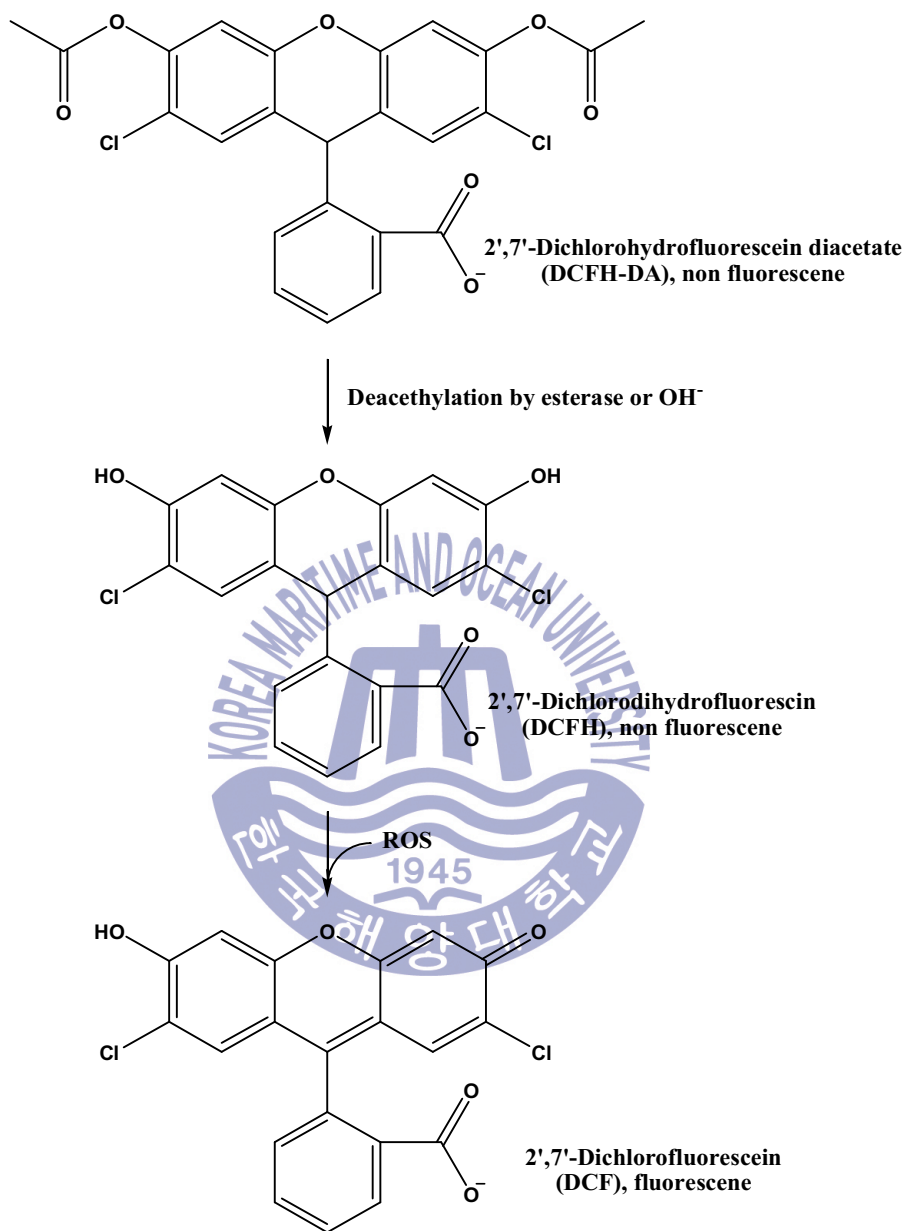


Figure 4. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.

2.5. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과

Raw 264.7 세포를 96 well micro-plate에 1×10^3 cells/well이 되도록 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 10% FBS가 함유된 MEM (Modified Eagle Medion) 배지로 교환한 후 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 다시 1시간 배양하였다. 1시간 배양 후, NO 생성을 유도하기 위해 1 μ g/mL (1 ppm)의 LPS를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. Raw 264.7 세포는 LPS에 의해 자극을 받아 NO를 생성한다. 생성된 NO가 함유된 배지의 상등액 50 μ L와 Griess 시약(0.1% N-1-naphtylenediamine : 1% sulfanilamide = 1 : 1) 50 μ L를 반응시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(Figure 5; Beda et al., 2005).



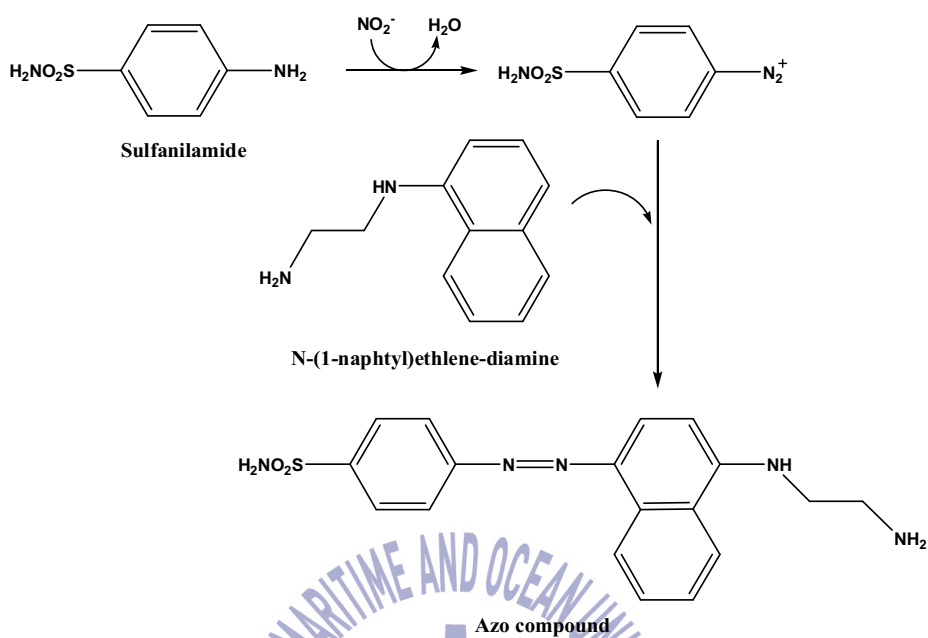


Figure 5. Coloring reaction for NO_2^- detection.

2.6. 인체 유래 암세포 증식 억제 활성

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 얻어진 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. MTT assay는 세포의 증식과 살아있는 정도를 간접적으로 측정하며, 대사과정이 온전한 암세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색을 띠는 수용성의 MTT tetrazolium이 환원되어 보라색을 띠는 MTT formazan[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]이 된다. 세포가 많을수록 MTT formazan을 많이 생성하게 되며 이를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다.

배양된 암세포는 96 well micro-plate에 1×10^4 cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 배지를 교환한 후 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 다시 24시간 배양하였다. 시료 처리하여 배양된 암세포에 1 mg/mL의 MTT 시약을 처리하여 4시간 배양하고, formazan이 형성되면 MTT 시약이 처리된 배지를 제거한 후, 형성된 formazan을 DMSO에 녹여 Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 구하였다.

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

2.7. 통계처리

실험결과는 각 항목에 따라 Mean $\pm$ SEM (Standard Error of Mean)으로 나타내었다. 분석된 실험결과는 대조군과의 비교를 위해 statistica program을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다.



3. 결과 및 고찰

3.1. 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리된 물질의 구조 결정

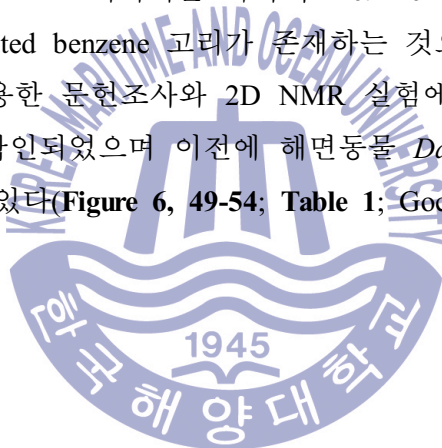
Compound 1은 황색의 고체로 분리되었으며, ^{13}C NMR 결과 22개의 carbon 신호가 나타났다. δ 183.9, 183.6, 162.2, 157.3, 118.1에 나타난 olefinic carbon 신호들과 δ 57.4에 나타난 methoxy carbon 신호는 2-hydroxy-5-methoxy-1,4-benzoquinone ring 부분구조가 존재한다는 것을 보여주었고, δ 161.2와 δ 103.7에 나타난 carbon 신호는 1개의 exomethylene olefinic 부분구조의 존재를 나타내었으며, ^1H NMR 스펙트럼의 δ 5.89, δ 3.83, 그리고 δ 4.39에 나타난 proton 신호들도 이 사실을 지지하였다(Seki et al., 1995; Singh et al., 2006). 그리고 δ 2.50에 benzylic proton들이 나타났으며, δ 4.43에서 terminal methylene이 나타났다. 이러한 부분구조를 바탕으로 2D NMR 실험을 통하여 이 물질의 구조를 Ilimaquinone으로 결정하였으며 문헌에 보고된 NMR 스펙트럼 데이터와 잘 일치하였다. 이 물질은 이전에 해면동물 *Smenospongia* sp.로부터 분리되었다(Figure 6, 31-36; Table 1; Luibrand et al., 1979; Wu et al., 1987; Kondracki & Guyot, 1989).

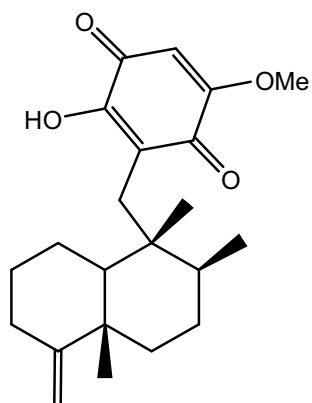
이와 유사한 물질 **compound 2**와 **compound 3**이 분리되었다. **Compound 2**의 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 나타난 δ 179.7, 172.3, 102.8, 91.2, 60.9 신호들은 하나의 methoxy group을 가진 tetronic acid 부분구조를 가진 것으로 추측되었다. 또 δ 201.9에서 관측된 신호는 하나의 carbonyl group으로 여겨졌으며 이러한 부분구조와 2D NMR 실험 및 문헌값을 비교한 결과 **compound 2**의 구조는 해면동물 *Smenospongia* sp.로부터 분리된 Smenotronic acid로 확인 되었다(Figure 6, 37-42; Table 1; Kondracki & Guyot, 1999).

Compound 3의 ^{13}C NMR 스펙트럼은 **compound 2**에서 나타났던 δ 201.9, 179.7, 172.3, 102.8, 91.2 60.9의 신호들이 사라지고 δ 175.6에 quaternary carbon 신호가 나타난 것 외에는 **compound 2**와 매우 유사하

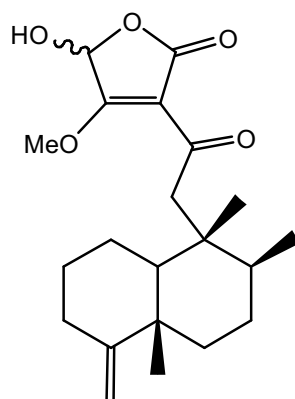
였다. 이러한 스펙트럼상의 변화는 **compound 2**의 tetronic acid 구조가 없어지고 존재하던 carbonyl group이 carboxylic acid로 바뀐 것으로 여겨졌다. 이 화합물의 전체적인 구조는 2D NMR 실험과 제시된 부분구조에 대한 문헌조사를 통하여 Smenospongiic acid로 결정되었으며 이 물질은 이전에 *Dacrylospongiu elegans*로부터 분리되어 보고되었다(**Figure 6, 43-48; Table 1**; Rodriguez et al., 1992; Lopez et al., 1994).

Compound 4는 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 23개의 carbon 신호가 나타났으며 이 중에서 δ 149.0, 146.3, 143.6, 131.1, 117.9, 115.5에 나타난 6개의 신호는 olefinic carbon들로 여겨졌다. 또한 ^1H NMR 스펙트럼에서도 δ 6.95에 방향족 수소로 여겨지는 하나의 methine 피크가 발견되어 하나의 penta-substituted benzene 고리가 존재하는 것으로 여겨졌다. 이러한 부분구조를 이용한 문헌조사와 2D NMR 실험에 의하여 이 물질의 구조는 Pelorol로 확인되었으며 이전에 해면동물 *Dacrylospongiu elegans*로부터 분리된 바 있다(**Figure 6, 49-54; Table 1**; Goclik et al., 2000).

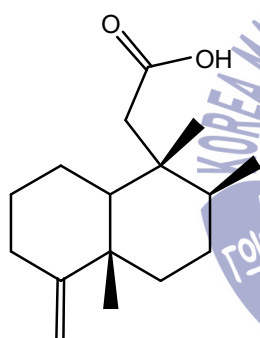




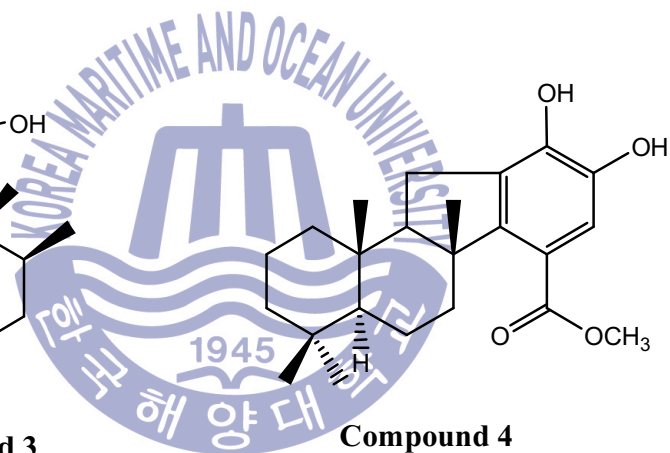
Compound 1



Compound 2



Compound 3



Compound 4

Figure 6. Chemical structure of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus*.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR assignments for **compounds 1-4**

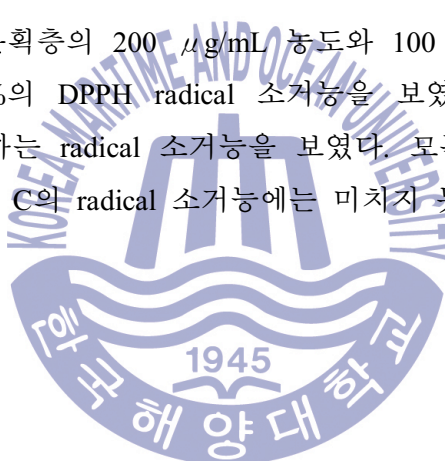
	Compound 1	Compound 2	Compound 3	Compound 4
1	24.4 t	23.6 t		41.4 t
2	29.1 t	29.7 t	23.6 t	13.5 t
3	34.1 t	34.1 t	29.6 t	43.7 t
4	161.2 s	161.1 s	34.1 t	34.0 s
5	41.5 s	41.3 s	161.2 s	58.5 d
6	38.0 t	38.2 t	41.4 s	21.3 t
7	29.8 t	28.6 t	38.4 t	38.0 t
8	39.2 d	38.2 d	28.6 t	49.4 s
9	44.1 s	42.5 s	39.0 d	66.6 d
10	51.3 d	49.3 d	42.1 s	38.3 s
11	103.7 t	103.2 t	51.1 d	25.6 t
12	21.1 q	21.3 q	103.2 t	21.6 q
13	18.6 q	16.9 q	21.3 q	33.9 q
14	17.9 q	17.9 q	16.9 q	16.9 q
15	33.0 t	43.6 t	17.7 q	20.3 q
16	118.1 s	201.9 s	43.9 t	131.1 s
17	157.3 s	102.8 s	175.6 s	146.3 s
18	183.9 s	179.7 s		143.6 s
19	103.1 d	91.2 d		115.5 d
20	162.2 s	172.3 s		117.9 s
21	183.6 s			149.0 s
22				169.8 s
-OMe	57.4 q	60.9 q		52.0 q

3.2. 항산화 활성 실험

3.2.1. DPPH radical 소거 활성

해면동물 *Hyrtios erectus*의 methylene chloride 추출물과 methanol 추출물을 합하여 얻어진 조추출물(crude extract)을 용매 극성도에 따라 분획하여 *n*-hexane 분획층, 85% aq.MeOH 분획층, *n*-BuOH 분획층, H₂O 분획층을 얻었다. Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 μ g/mL 농도로 희석하였고, 대조군으로 BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene)와 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

85% aq.MeOH 분획층의 200 μ g/mL 농도와 100 μ g/mL 농도에서는 각각 25.2%, 14.7%의 DPPH radical 소거능을 보였으며, 그 이외에는 10%에 미치지 못하는 radical 소거능을 보였다. 모든 시료가 대조군인 BHA, BHT, vitamin C의 radical 소거능에는 미치지 못하였다(Figure 7).



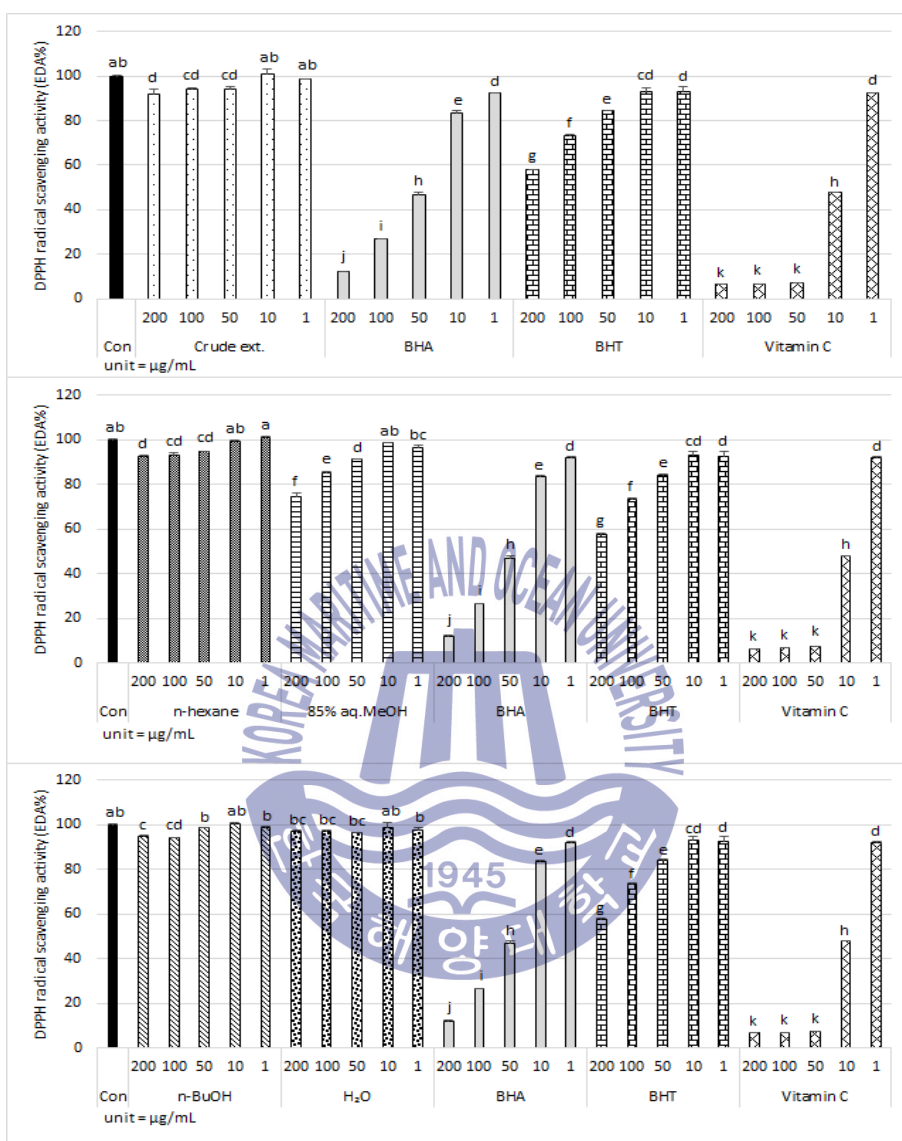


Figure 7. DPPH radical scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus*. ^{a-k} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.2.2. Peroxynitrite 소거 활성

Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하였고, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)와 penicillamine을 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Authentic peroxynitrite를 소거하는 경우에, crude extract와 *n*-hexane 분획층, 85% aq.MeOH 분획층에서 뛰어난 활성을 보였다. *n*-Hexane 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도와 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 98.6%, 96.1%의 peroxynitrite 소거능을 보였으며, 85% aq.MeOH 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도와 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 99.5%, 97.1%의 peroxynitrite 소거능을 보였다. 그리고 *n*-BuOH 분획층도 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 83.1%의 소거능을 보였으며 농도 의존적인 소거능을 보여주었다. 특히 *n*-hexane 분획층과 85% aq.MeOH 분획층은 대조군인 vitamin C와 penicillamine의 peroxynitrite 소거능과 비교할 만한 활성을 가진 것으로 볼 수 있다 (Figure 8).

SIN-1에서 유도된 peroxynitrite의 경우에는, 모든 분획층들이 뛰어난 활성을 보였으며 특히 crude extract와 *n*-hexane 분획층, 85% aq.MeOH 분획층에서 뛰어난 활성을 보였다. *n*-Hexane 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 100%, 99.4%, 96.5%의 peroxynitrite 소거능을 보였으며, 85% aq.MeOH 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도와 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 100%, 98.7%의 peroxynitrite 소거능을 보였다. 그리고 *n*-BuOH 분획층도 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 91.2%의 소거능을 보였으며 마찬가지로 농도 의존적인 소거능을 보여주었다. 특히 *n*-hexane 분획층과 85% aq.MeOH 분획층은 대조군인 vitamin C와 penicillamine의 peroxynitrite 소거능과 비교할 만한 활성을 가진 것으로 볼 수 있다(Figure 9).

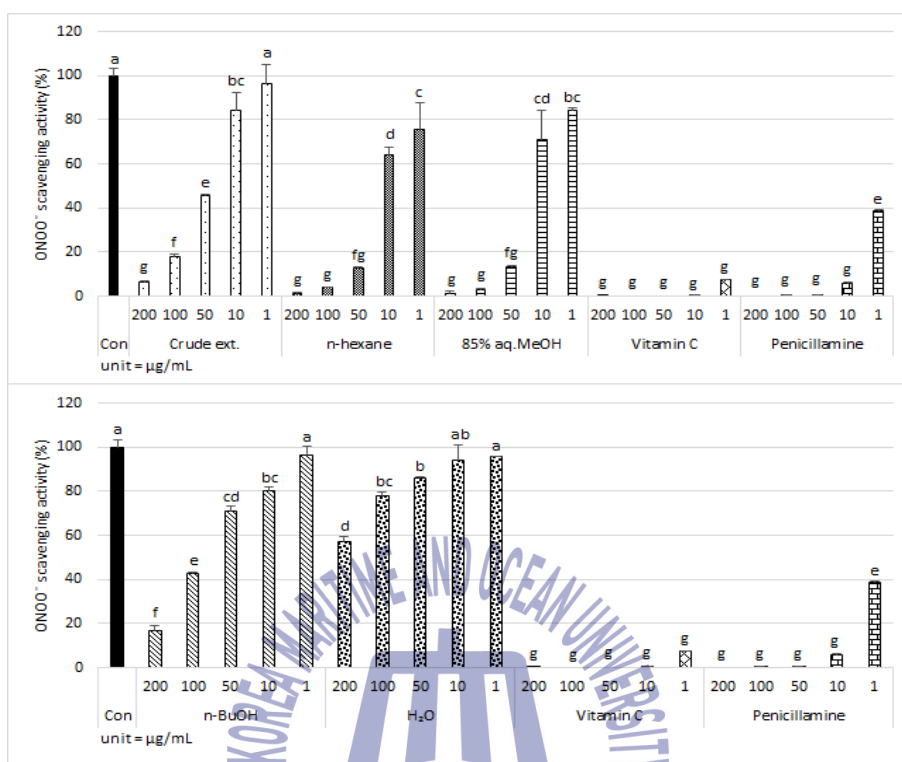


Figure 8. Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on authentic ONOO⁻ (% of control). ^{a-g} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

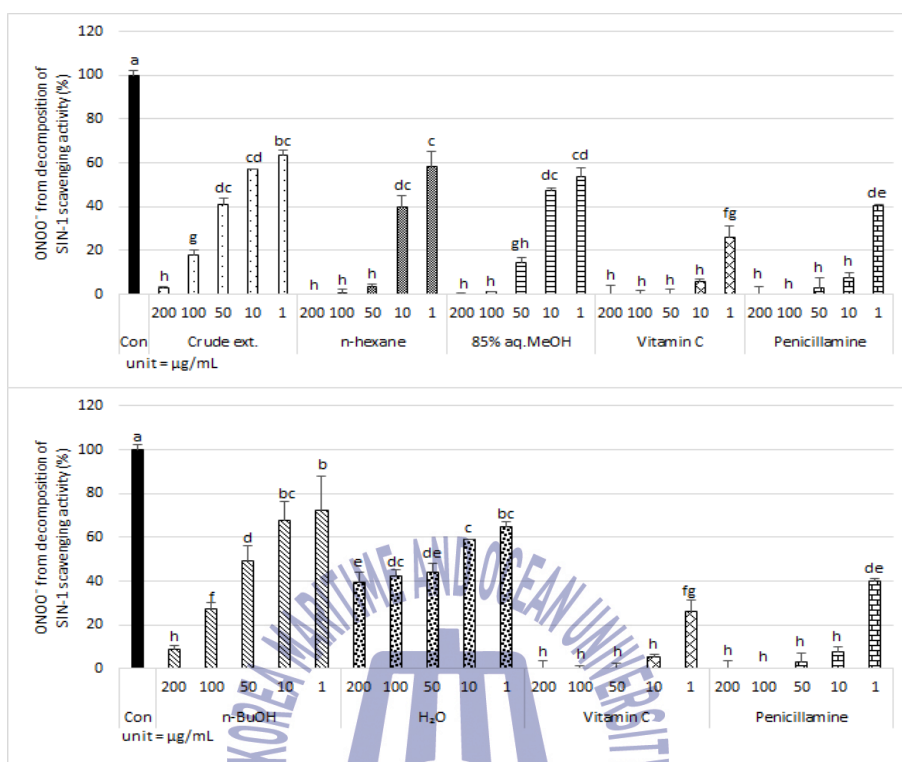


Figure 9. Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on ONOO⁻ from SIN-1 (% of control). ^{a-h} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.2.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정

항산화 활성과 환원력은 밀접한 관계가 있으며, 환원력 측정 실험에서는 crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 μ g/mL 농도로 희석하였고, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Crude extract와 네 개의 분획층들 모두에서 농도가 높을수록 강한 환원력을 나타내었으며, 그 중 85% aq.MeOH 분획층에서 가장 높은 환원력을 나타내었다(**Figure 10**).



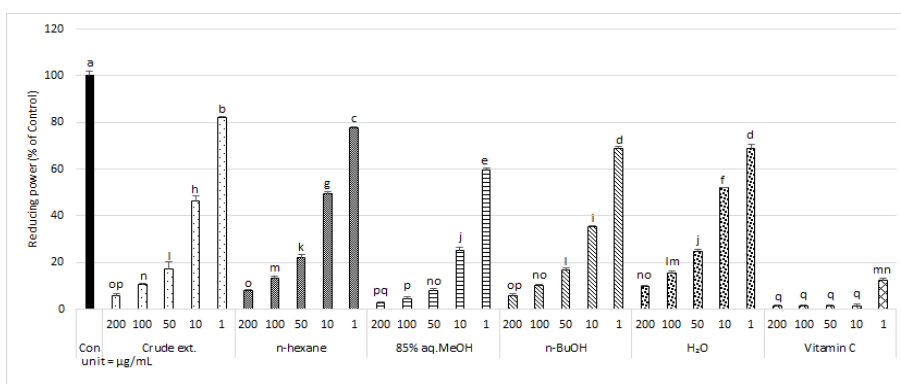


Figure 10. Ferric reducing antioxidant power of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* (% of control). ^{a-q} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.2.4. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성

3.2.4.1. HT-1080 세포 생존율 측정

세포 수준에서의 활성을 실험하기 전에 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 얻은 crude extract와 네 개의 용매 분획층들이 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였으며, crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

각각 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 *n*-hexane 분획층은 78.6%, 88.2%, 89.2%, 91.1%, 94.4%, 85% aq.MeOH 분획층은 26.8%, 71.2%, 78.8%, 87.5%, 92.7%, H₂O 분획층은 71.1%, 85.9%, 91.6%, 92.3%, 97.9%의 세포 생존율을 보였다. 그 외에 crude extract와 *n*-BuOH 분획층은 모든 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 보였다. MTT assay를 통한 세포 생존율 측정 결과를 바탕으로 crude extract와 *n*-hexane 분획층, *n*-BuOH 분획층은 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서, 85% aq.MeOH 분획층은 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서, H₂O 분획층은 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포 활성 실험을 실시하였다(Figure 11).

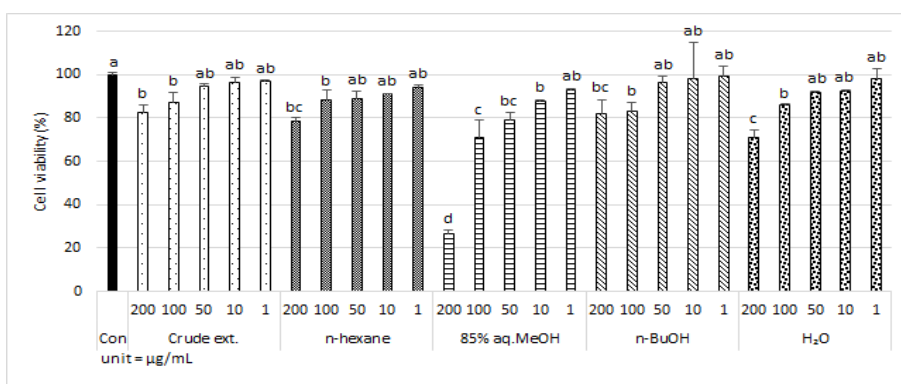


Figure 11. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of HT-1080 cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.2.4.2 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질인 DCF를 만들어내는 DCFH-DA를 사용하여 세포 내에 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였다. Crude extract와 *n*-hexane 분획층, *n*-BuOH 분획층은 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도, 85% aq.MeOH 분획층은 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도, H_2O 분획층은 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였고, 각 농도별 시료에 500 μM H_2O_2 를 처리한 후 0分から 120분까지 30분 간격으로 활성을 측정하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 500 μM H_2O_2 로 처리한 control과 시료와 H_2O_2 를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다.

대조군으로 사용한 control은 시간이 경과함에 따라 DCF fluorescence 값이 증가하였으며 blank는 DCF fluorescence 값의 변화가 크지 않았다.

Crude extract와 네 개의 용매 분획층들은 대조군과 비교하였을 때 control보다는 blank와 더 가까운 DCF fluorescence 값을 나타내어 세포내에 생성된 ROS를 유의적으로 소거하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 12-14).

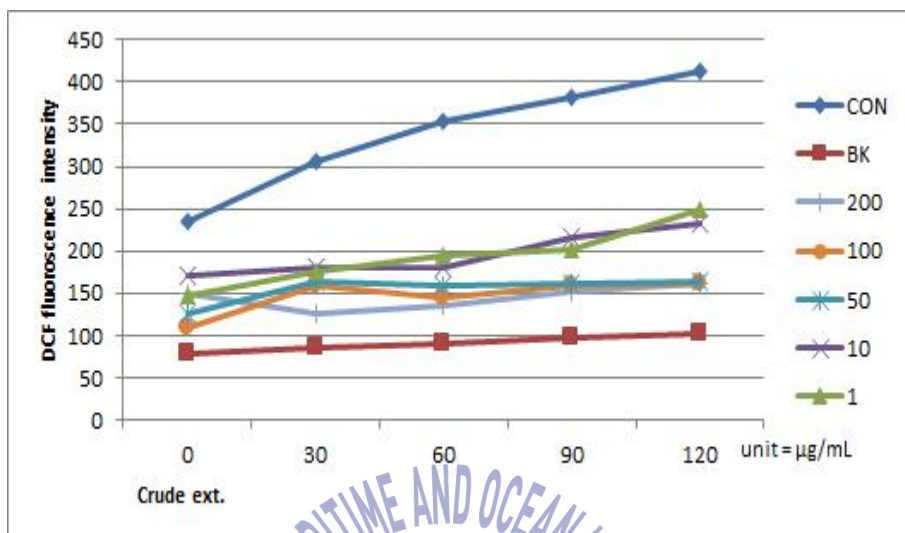
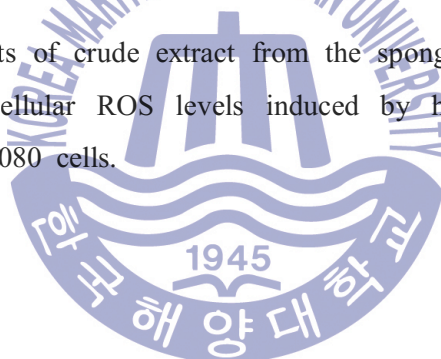


Figure 12. Effects of crude extract from the sponge *Hyrtios erectus* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.



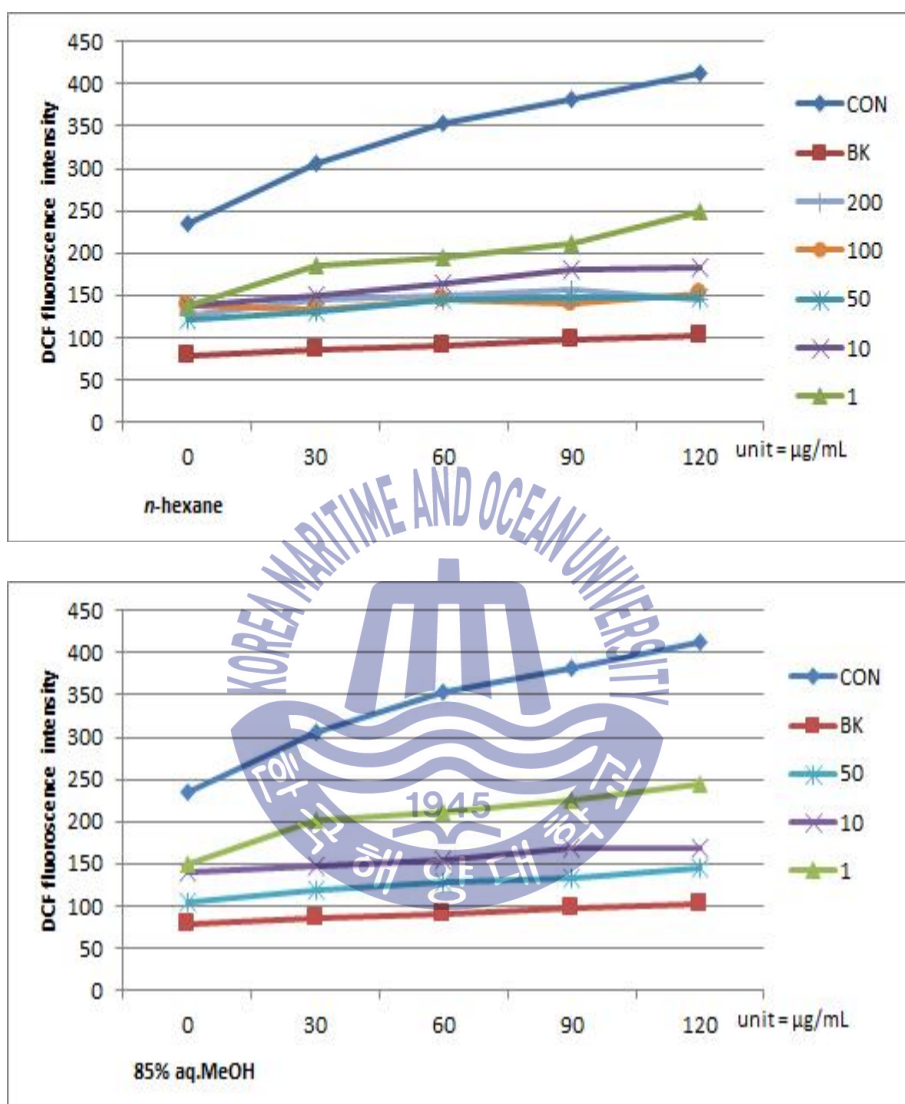


Figure 13. Effects of *n*-hexane and 85% aq.MeOH fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

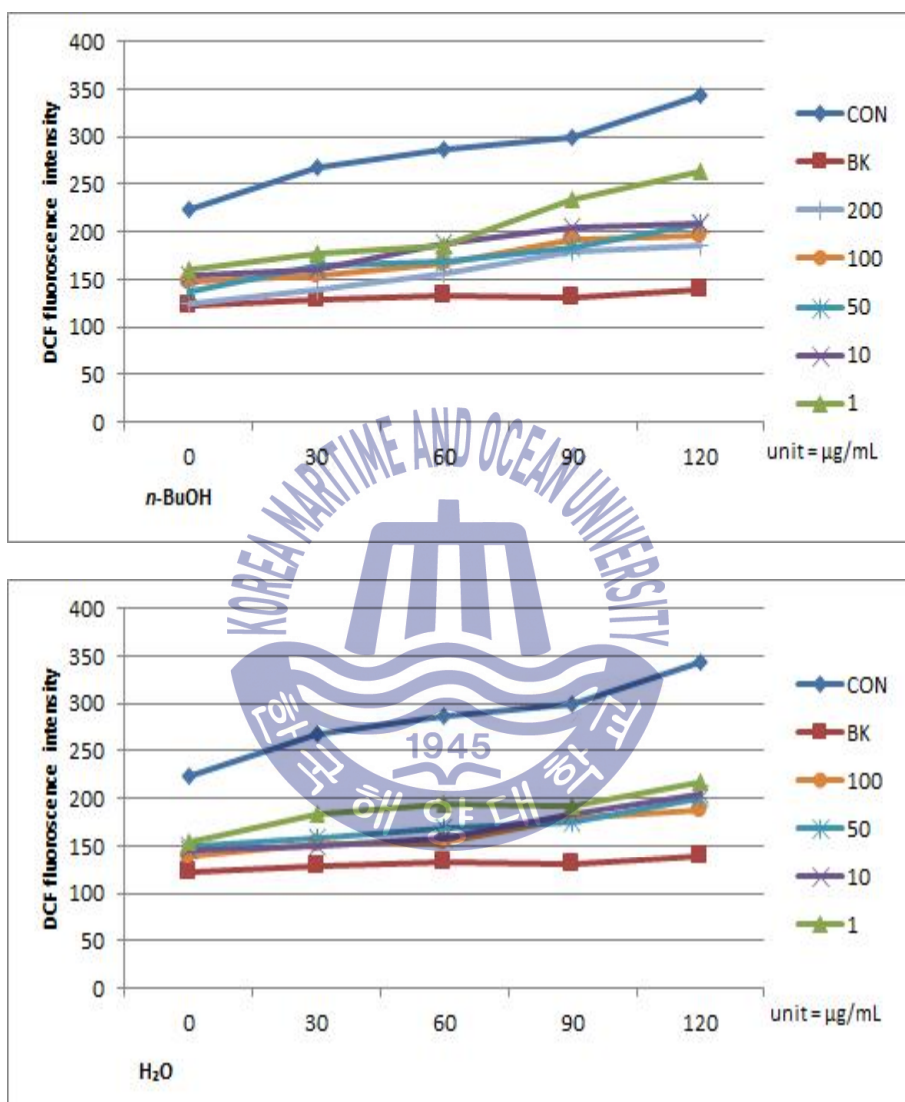


Figure 14. Effects of *n*-BuOH and H₂O fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

3.3. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과

3.3.1. Raw 264.7 세포 생존율 측정

세포 수준에서의 활성을 실험하기 전에 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 얻은 crude extract와 네 개의 용매 분획층들이 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였으며, crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

각각 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 crude extract 분획층은 68.8%, *n*-hexane 분획층은 48.2%, 85% aq.MeOH 분획층은 72.6%, *n*-BuOH 분획층은 73.6%, H_2O 분획층은 73.7%의 세포 생존율을 보여주었으며, *n*-hexane 분획층과 *n*-BuOH 분획층은 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 64.3%, 75.6%와 77.0%, 78.2%의 세포 생존율을 보여주었다. 그리고 그 외 분획층들의 모든 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 보였다. MTT assay를 통한 세포 생존율 측정 결과를 바탕으로 *n*-hexane 분획층은 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서, 그 외의 분획층들은 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포 활성 실험을 실시하였다(Figure 15).

3.3.2. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과

해면동물 *Hyrtios erectus*의 항염증 효과를 알아보기 위해 염증 유발 인자인 NO 생성 억제율을 측정해보았다. *n*-Hexane 분획층은 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로, 그 외의 분획층들은 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였고 각 농도별 시료에 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS를 처리하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS를 처리한 control과 시료와 LPS를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다.

Blank의 NO 함량인 46.8%와 비교하면 crude extract, 85% aq.MeOH 분획층, *n*-BuOH 분획층과 H_2O 분획층은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 59.6%, 59.7%, 61.3%, 58.0%의 NO 함량을 보여주었다. 그리고 *n*-hexane 분획층은 더 낮은 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 51.9%의 blank와 비교할만한 NO 함량을 보여주었다(Figure 16).

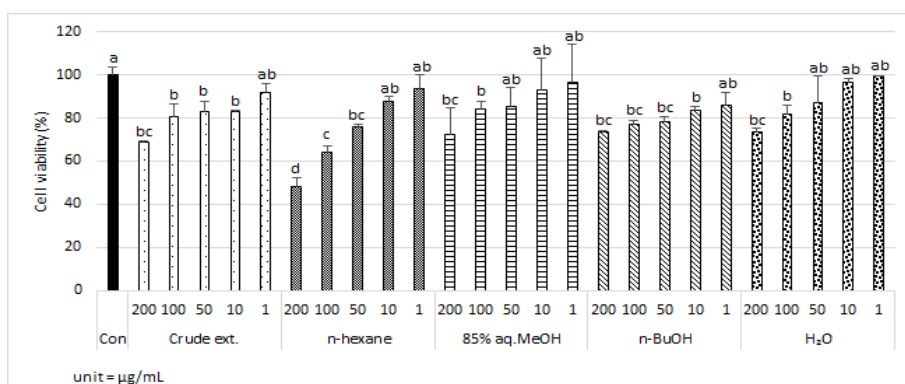


Figure 15. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of Raw 264.7 cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

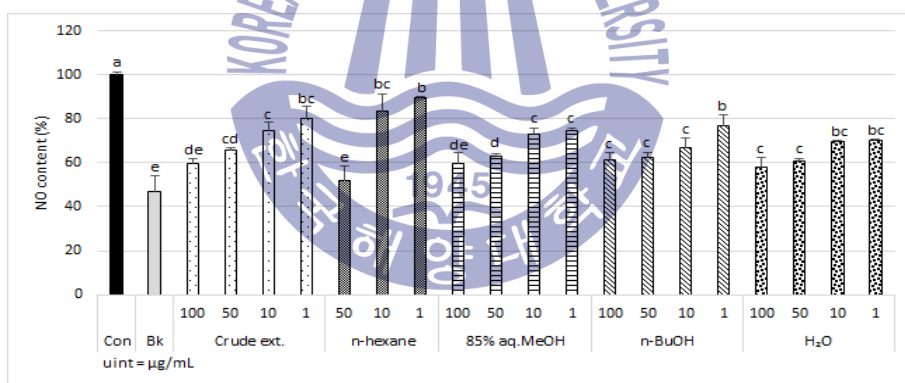


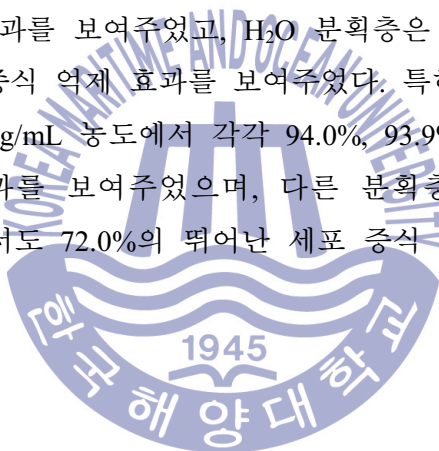
Figure 16. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on nitrite production in Raw 264.7 cells. ^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.4. 인체 유래 암세포 증식 억제 효과

3.4.1. HT-1080 세포 증식 억제 효과

인체 섬유 육종 세포인 HT-1080 세포에 대한 crude extract와 네 개의 용매 분획층들의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Crude extract와 네 개의 용매 분획층들은 모두 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. Crude extract와 *n*-hexane 분획층, *n*-BuOH 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 76.3%, 83.2%, 52.1%로 모두 50%가 넘는 세포 증식 억제 효과를 보여주었고, H_2O 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 37.9%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 특히 85% aq.MeOH 분획층은 200, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 94.0%, 93.9%의 90%가 넘는 세포 증식 억제 효과를 보여주었으며, 다른 분획층보다 낮은 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 72.0%의 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(Figure 17).



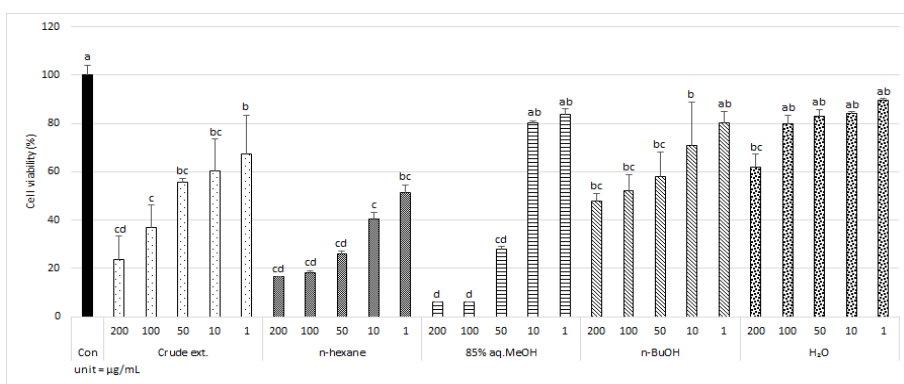


Figure 17. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of HT-1080 cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.4.2. HT-29 세포 증식 억제 효과

인체 결장암 세포인 HT-29 세포에 대한 crude extract와 네 개의 용매 분획층들의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

n-Hexane 분획층의 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 67.2%로 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 85% aq.MeOH 분획층은 200, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 89.8%, 89.6%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었으며, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 31.1%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 이는 같은 농도의 다른 분획층들에 비해 비교적 높은 세포 증식 억제 효과를 나타낸다(Figure 18).

3.4.3. AGS 세포 증식 억제 효과

인체 위암 세포인 AGS 세포에 대한 crude extract와 네 개의 용매 분획층들의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Crude extract와 네 개의 용매 분획층들은 비교적 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. Crude extract와 *n*-hexane 분획층, *n*-BuOH 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 65.3%, 87.1%, 62.2%로 모두 60%가 넘는 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 특히 85% aq.MeOH 분획층은 200, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 86.0%, 85.5%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 또한 다른 분획층보다 낮은 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 82.4%의 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(Figure 19).

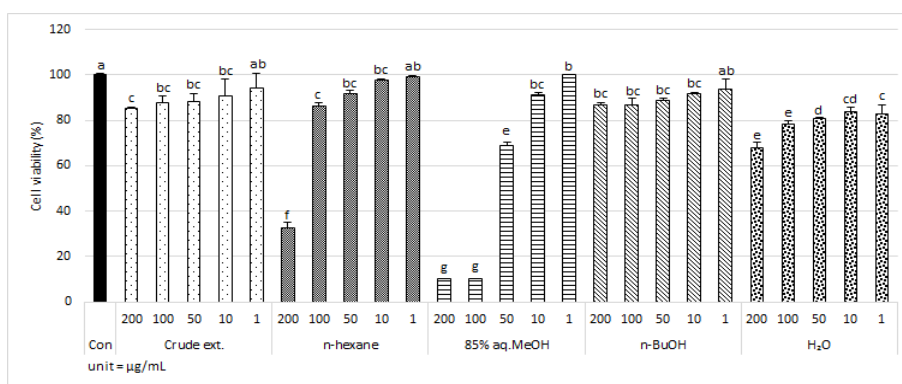


Figure 18. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of HT-29 cells. ^{a-g} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

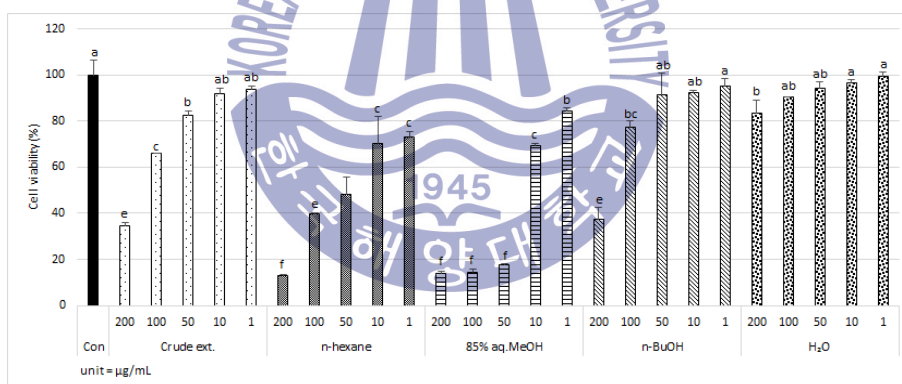


Figure 19. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of AGS cells. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.4.4. MCF-7 세포 증식 억제 효과

인체 유방암 세포인 MCF-7 세포에 대한 crude extract와 네 개의 용매 분획층들의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

n-BuOH 분획층을 제외한 crude extract와 세 개의 용매 분획층들에서 유의적인 활성을 보여주었고, *n*-hexane 분획층은 200, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 58.5%, 56.3%로 50%를 넘는 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 또한 85% aq.MeOH 분획층도 200, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 86.0%, 82.1%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(Figure 20).



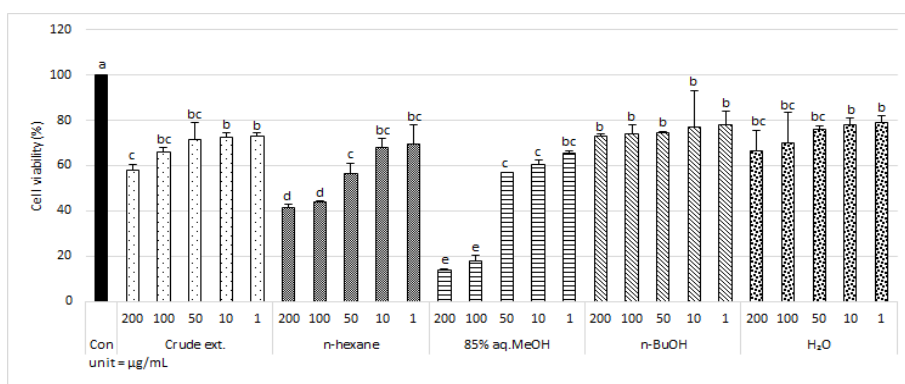


Figure 20. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of MCF-7 cells. ^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.5. 화합물들의 항산화 활성

3.5.1. DPPH radical 소거 활성

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리한 네 개의 화합물들을 100, 50, 10, 1 μ M 농도로 희석하였고, 대조군으로 BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene)와 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

대조군인 BHA, BHT는 100 μ M 농도에서 각각 22.4%, 7.6%의 DPPH radical 소거능을 보여주었다. 이와 비교하였을 때, **compound 4**는 100 μ M 농도에서 51.8%의 DPPH radical 소거능을 보여주어 대조군인 BHA와 BHT보다 더 높은 DPPH radical 소거능을 보여주었다(Figure 21).



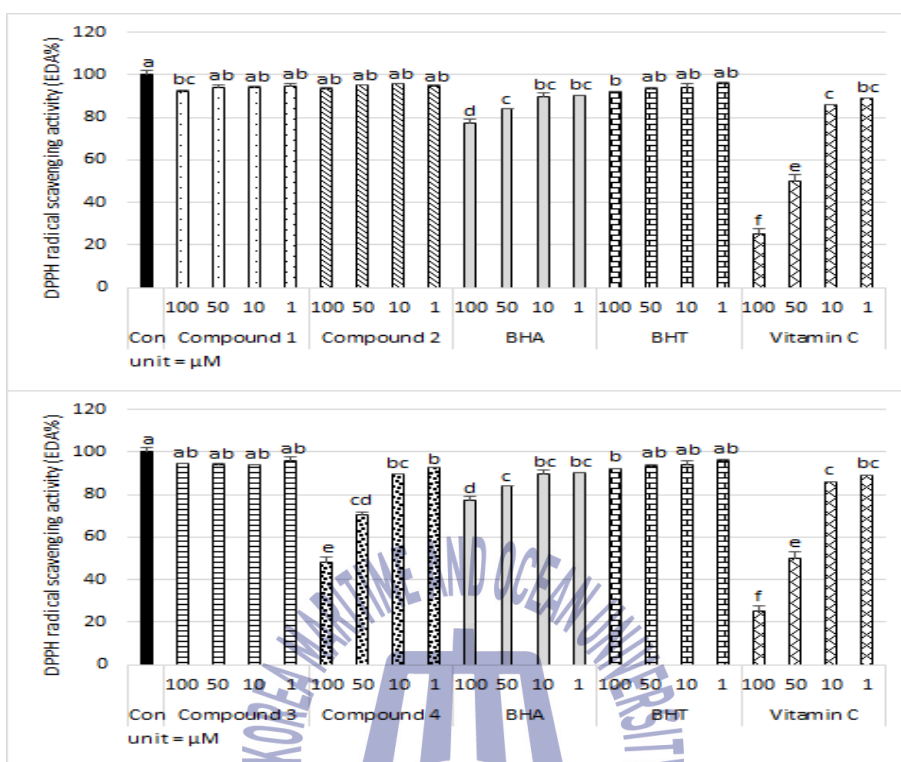


Figure 21. DPPH radical scavenging activity of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtilos erectus*. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.5.2. Peroxynitrite 소거 활성

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리한 네 개의 화합물들을 50, 10, 1 μ M 농도로 희석하였고, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)와 penicillamine을 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Authentic peroxynitrite의 경우에는 **compound 4**가 50 μ M 농도에서 대조군인 penicillamine의 peroxynitrite 소거능(94.8%) 보다 더 높은 97.3%의 peroxynitrite 소거능을 보였다(**Figure 22**).

SIN-1에서 유래된 peroxynitrite에 대해서도, **compound 4**는 50 μ M 농도에서 대조군인 vitamin C와 penicillamine의 peroxynitrite 소거능과 비교할 만한 97.5%의 peroxynitrite 소거능을 나타내었다(**Figure 23**).



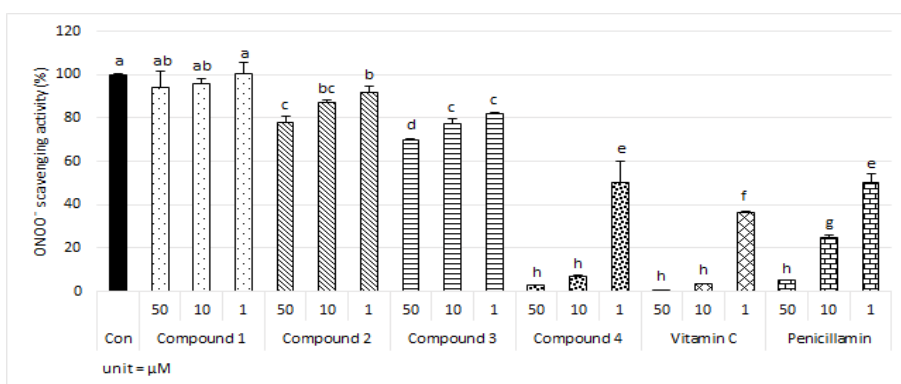


Figure 22. Scavenging activity of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on authentic ONOO⁻ (% of control). ^{a-h} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

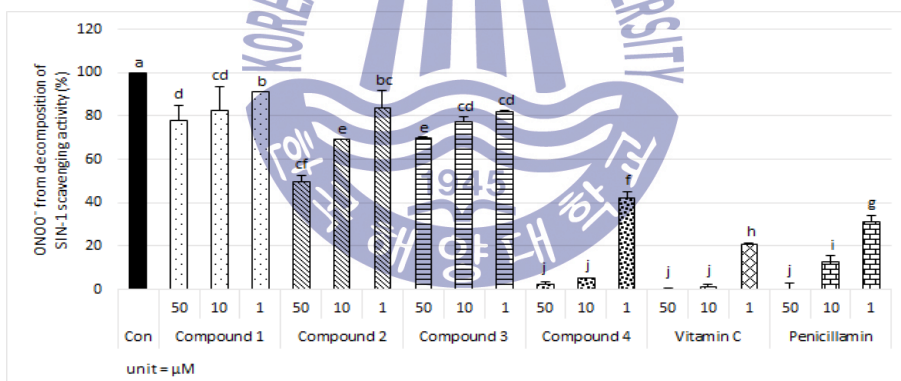


Figure 23. Scavenging activity of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on ONOO⁻ from SIN-1 (% of control). ^{a-j} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.5.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정

항산화 활성과 환원력은 밀접한 관계가 있으며, 환원력 측정 실험에서는 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리한 네 개의 화합물들을 50, 10, 1 μ M 농도로 희석하였고, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

네 개의 화합물들 모두에서 농도가 높을수록 강한 환원력을 나타내었으며, 그 중 **compound 4**가 50, 10, 1 μ M 농도에서 control과 비교하였을 때 각각 94.1%, 84.3%, 58.3%의 환원력을 보여주었으며, 네 개의 화합물들 중 가장 높은 환원력을 나타내었다(**Figure 24**).



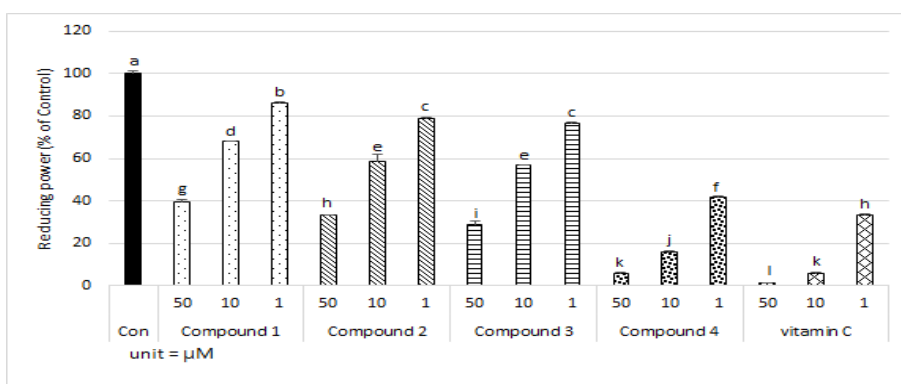


Figure 24. Ferric reducing antioxidant power of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* (% of control). ^{a-l} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.6. 화합물들의 NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과

3.6.1. Raw 264.7 세포 생존율 측정

세포 수준에서의 활성을 실험하기 전에 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 얻은 네 개의 화합물들이 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였으며, 네 개의 화합물들을 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

각각 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 **compound 1**은 63.5%, 68.2%, 73.5%, **compound 2**는 64.6%, 82.1%, 96.5%, **compound 3**은 83.5%, 96.5%, 97.7% 그리고 **compound 4**는 64.8%, 78.1%, 79.6%의 세포 생존율을 보였다. MTT assay를 통한 세포 생존율 측정 결과를 바탕으로 농도를 10, 5, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 통일하여 실험에 사용하였다(Figure 25).

3.6.2. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리한 네 개의 화합물들의 항염증 효과를 알아보기 위해 염증 유발 인자인 NO의 생성 억제율을 측정해보았다. 네 개의 화합물들을 10, 5, 1 μM 농도로 희석하여 실험에 사용하였고 각 농도별 시료에 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS를 처리하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS를 처리한 control과 시료와 LPS를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다.

Compound 2는 10 μM 농도에서 65.5%의 NO 함량을 보여주었는데 이는 Blank의 NO 함량인 59.7%와 유사한 값으로서 네 개의 화합물들 중에서 가장 좋은 억제 활성을 나타내었다(Figure 26).

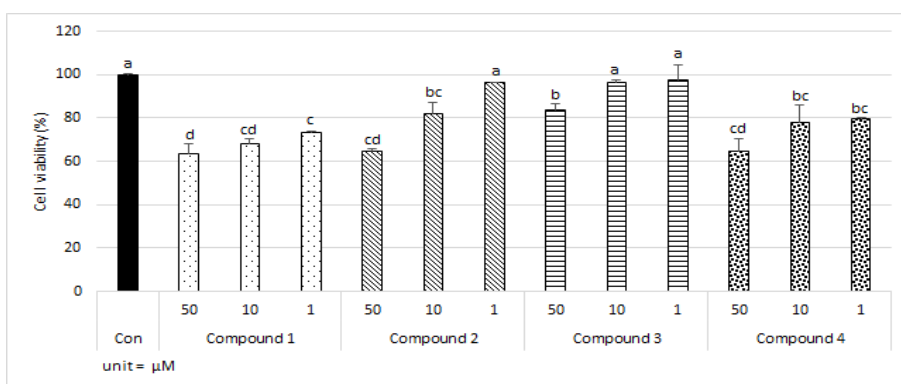


Figure 25. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of Raw 264.7 cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

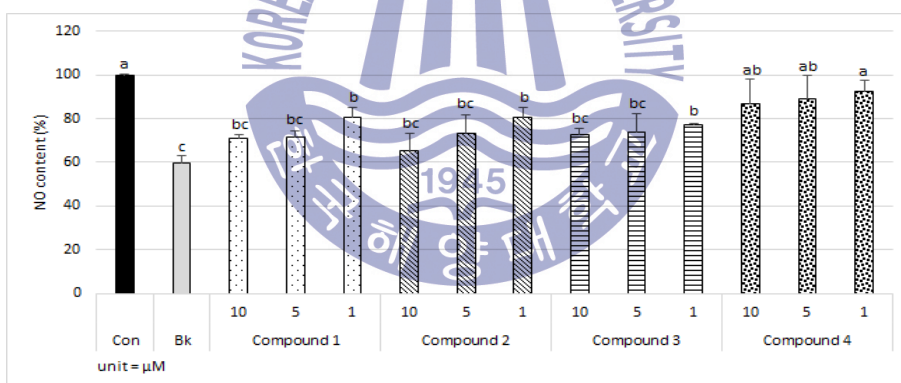


Figure 26. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on nitrite production in Raw 264.7 cells. ^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.7. 화합물들의 인체 유래 암세포 증식 억제 효과

3.7.1. HT-1080 세포 증식 억제 효과

인체 섬유 육종 세포인 HT-1080 세포에 대한 화합물 **1-4**의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였으며, 화합물 **1-4**를 10, 5, 1 μ M 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Compound 1은 10 μ M 농도에서 61.5%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었으며, **compound 2**와 **compound 3** 또한 10 μ M 농도에서 각각 48.2%, 45.0%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(**Figure 27**).

3.7.2. HT-29 세포 증식 억제 효과

인체 결장암 세포인 HT-29 세포에 대한 화합물 **1-4**의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였으며, 화합물 **1-4**를 10, 5, 1 μ M 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Compound 1은 10 μ M 농도에서 47.7%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었으며, **compound 2**와 **compound 4** 또한 10 μ M 농도에서 각각 42.2%, 44.9%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(**Figure 28**).

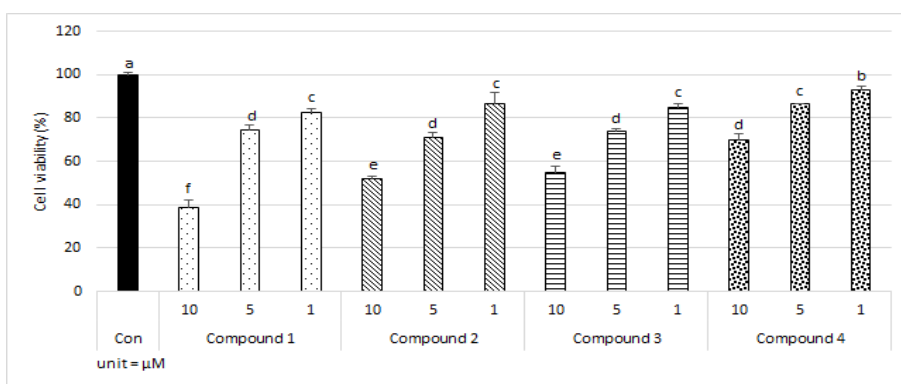


Figure 27. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of HT-1080 cells. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

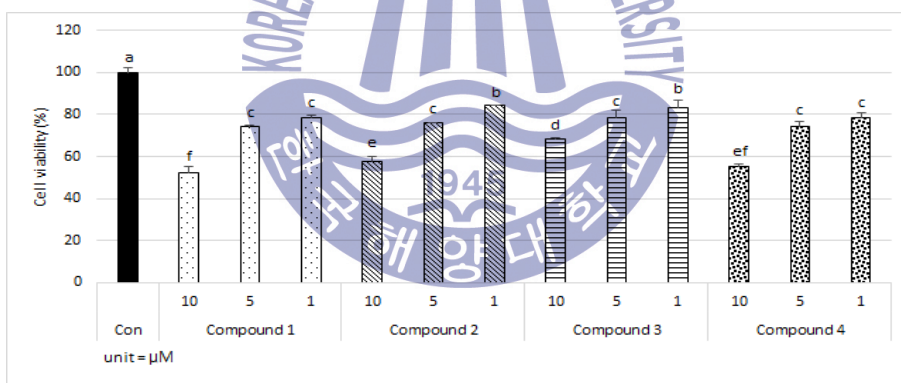


Figure 28. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of HT-29 cells. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.7.3. AGS 세포 증식 억제 효과

인체 위암 세포인 AGS 세포에 대한 화합물 **1-4**의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였으며, 화합물 **1-4**를 10, 5, 1 μ M 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Compound 1과 **compound 4**는 10 μ M 농도에서 각각 36.6%, 34.6%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(**Figure 29**).

3.7.4. MCF-7 세포 증식 억제 효과

인체 유방암 세포인 MCF-7 세포에 대한 화합물 **1-4**의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였으며, 화합물 **1-4**를 10, 5, 1 μ M 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

MCF-7 세포에서도 **compound 1**이 10 μ M 농도에서 48.0%의 비교적 높은 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(**Figure 30**).



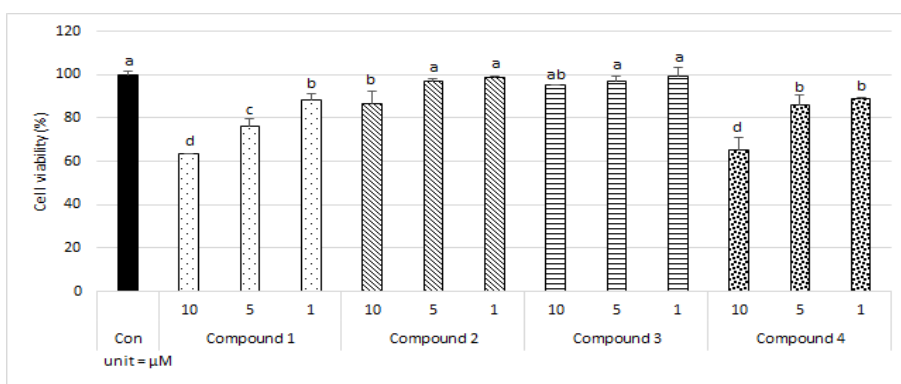


Figure 29. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of AGS cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

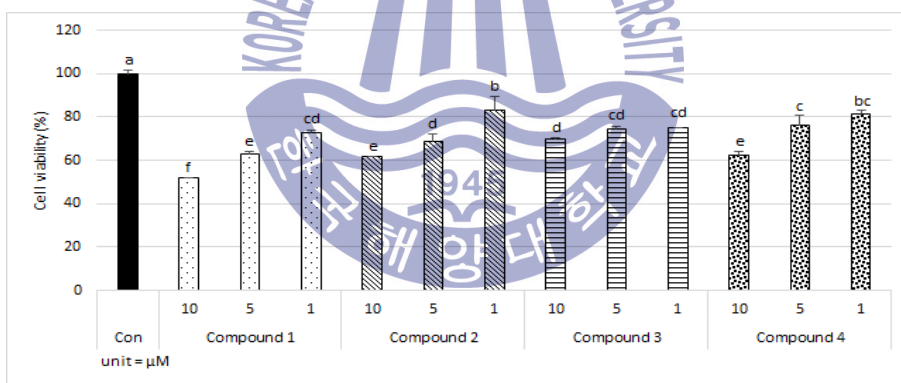


Figure 30. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of MCF-7 cells. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

4. 요약 및 결론

해면동물 *Hyrtios erectus*를 유기용매로 추출하여 조추출물(crude extract)을 얻은 후에 이 조추출물은 다시 네 개의 용매 분획층(*n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O)으로 분획하였으며 이들에 대한 항산화, 항염증 및 인체 암세포 증식억제 효과를 탐색하였다.

DPPH radical에 대해서는 모든 시료들이 유의적인 효과를 보여 주지 못하였으며 authentic peroxyinitrite와 SIN-1에서 유도된 peroxyinitrite에 대해서는 200 μ g/mL의 농도에서 *n*-hexane 분획층과 85% aq.MeOH 분획층이 대조군인 vitamin C와 penicillamine과 비교할 만한 활성을 보여주었다. 환원력 측정 실험에서는 모든 시료들이 좋은 활성을 나타내었으나 특히 85% aq.MeOH 분획층이 가장 뛰어난 환원력을 나타내었다. HT-1080 세포내에 생성되는 활성산소종(ROS)에 대한 소거능을 측정하기 위하여 먼저 시료에 대한 HT-1080 세포의 생존율을 측정하였으며, 실험 결과에 따라 시료농도를 조절하여 조추출물, *n*-hexane 및 *n*-BuOH 분획층들은 200, 100, 50, 10, 1 μ g/mL의 농도에서, 85% aq.MeOH 분획층은 50, 10, 1 μ g/mL 그리고 H₂O 분획층은 100, 50, 10, 1 μ g/mL 농도에서 세포내 ROS 소거능을 측정하였다. 조추출물을 포함한 모든 시료들이 좋은 소거능을 보여주었다. LPS로 처리한 Raw 264.7 세포에서 생성되는 NO에 대한 억제효과에 대한 검색에서도 조추출물과 네 개의 용매 분획층들이 모두 유의적인 NO 생성 억제 효과를 보여주었으며, 그 중에서 *n*-hexane 분획층은 50 μ g/mL의 농도에서도 blank와 비교 할 만한 NO 생성 억제 효과를 보여주었다.

인체 유래 암세포 증식 억제 활성 검색에서는 모든 시료들이 HT-1080 세포와 AGS 세포에 대해 농도의존적인 증식 억제 활성을 보여 주었으나 특히 *n*-hexane과 85% aq.MeOH 분획층이 뛰어난 억제 활성을 보여주었다. HT-29와 MCF-7 암세포에 대해서도 HT-1080과 AGS 암세포보다는 못하지만 *n*-hexane과 85% aq.MeOH 분획층이 비교적 뛰어난 억제 활성을 나타내었다.

조추출물과 용매 분획층들에 대한 생리활성 검색결과를 분석해 보면 *n*-hexane과 85% aq.MeOH 분획층에서 좋은 활성이 확인되었다. 따라서 이 두 분획층으로 물질분리를 시도하였으며 결과적으로 네 개의 화합물들 limaquinone (1), Smenotronic acid (2), Smenospongi acid (3), Pelorol (4)이 얻어 졌다.

분리된 네 개의 화합물들에 대해서도 항산화, 항염증, 암세포 증식 억제 활성을 탐색하였다. 항산화 활성검색에서는 **compound 4**가 DPPH radical과 peroxyxynitrite에 대해서 가장 뛰어난 활성을 나타내었다. 환원력 측정 실험에서는 모든 화합물들이 유의적인 활성을 나타내었으나 **compound 4**가 역시 가장 뛰어난 환원력을 보여주었다. NO 함량 측정에서도 네 개 화합물들 모두가 유의적인 억제 활성을 나타내었으며, 그 중에서 **compound 2**가 가장 좋은 효과를 나타내었다. 인체 유래 암세포에 대해서도 역시 네 개의 화합물들이 모두 유의적인 증식 억제 활성을 보여주었으며, **compound 1**이 네 개의 인체 유래 암세포 모두에서 우수한 증식 억제 활성을 나타내었다. 이러한 실험결과로부터 해면동물 *Hyrtios erectus*는 항산화, 항암 및 항염증의 소재로서 활용가능성이 있다는 것을 알 수 있다. 분리된 화합물들 중에서는 **compound 4**가 가장 좋은 항산화 효과를 보여 주었으며 **compound 1**이 가장 좋은 암세포 증식 억제 효과를 보여 주었다.

5. 참고문헌

- Beda N. and Nedospasov A., 2005. A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric oxide*, 13, pp.93-97.
- Blois M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 25, pp.1199-1200.
- Crispino A., Giulio A., Rosa de S. and Strazzullo G., 1989. A new bioactive derivative of avarol from the marine sponge *Dysidea avara*. *J. Nat. Prod.*, 52(3), pp.646-648.
- Du L. et al., 2008. Hyrtiosal, from the marine sponge *Hyrtios erectus*, inhibits HIV-1 integrase binding to viral DNA by a new inhibitor binding site. *ChemMedChem*, 3, pp.173-180.
- Goclik E., Konig G.M., Wright A.D. and Kaminsky R., 2000. Pelorol from the tropical marine sponge *Dactylospongia elegans*. *J. Nat. Prod.*, 63(8), pp.1150-1152.
- Iguchi K., Shimada Y. and Yamada Y., 1992. Hyrtiosal, a new sesterterpenoid with a novel carbon skeleton from the okinawan marine sponge *Hyrtios erectus*, *J. Org. Chem*, 57(2), pp.522-524.
- Kim D. and Jeong G., 2014. Antimicrobial and antioxidant activities of extracts of marine greenalgae *Enteromorpha intestinalis*. *KSBB Journal*, 29(2), pp.92-97.
- Kondracki M. and Guyot M., 1989. Biologically active quinone and hydroquinone sesquiterpenoids from the sponge *Smenospongia* sp.. *Tetrahedron*, 45(7), pp.1995-2004.
- Kondracki M. and Guyot M., 1999. A new sesquiterpene tetronic acid derivative from the marine sponge *Smenospongia* sp. *Tetrahedron Lett.*, 40, pp.3149-3150.

- Kooy N. W., Royall J. A., Ischiropoulos H. and Beckman J. S., 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biol. Med.*, 16, pp.149-156.
- Lee H. et al., 2009. 5-Hydroxyindol-type alkaloids, as *Candida albicans* isocitrate lyase inhibitors, from the tropical sponge *Hyrtios* sp.. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, pp.1051-1053.
- Lopez M.D., Quinoa E. and Riguea R., 1994. Dactyltronic acids from the sponge *Dactylospongia Elegans*, *J. Nat. Prod.*, 57(7), pp.992-996.
- Luibrand R.T., Erdman T.R., Vollmer J.J. and Scheuer P.J., 1979. Ilimaquinone, a sesquiterpenoid quinone from a marine sponge. *Tetrahedron*, 35, pp.609-612.
- Mohammad F. M., Jie L., Christopher F. and Wei Z., 2014. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Mar. Drugs*, 12, pp.4539-4577.
- Molinski T.F., Dalisay D.S., Lievens S.L. and Saludes J.P., 2009. Drug development from marine natural products. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 8, pp.69-85.
- Okimoto Y. et al., 2000. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.*, 474, pp.137-140.
- Qui, Y. et al., 2004. Sesterterpenoids from the marine sponge *Hyrtios erectus*. *Journal of Natural Products*, 67(5), pp.921-924.
- Rho J. et al., 2004. New sesterterpenes from the sponge *Smenospongia* sp.. *J. Nat. Prod.*, 67(10), pp.1748-1752.
- Rodriguez J. et al., 1992. The structure and stereochemistry of cytotoxic sesquiterpene quinones from *Dactylospongia Elegans*, *Tetrahedron*, 48(32), pp.6667-6680.

- Ryu G., Matsunaga S. and Fusetani N., 1996. Three new cytotoxic sesterterpenes from the marine sponge *Hyrtios* cf. *erectus*, *J. Nat. Prod.*, 59(5), pp.515-517.
- Sauleau P. et al., 2006. Hyrtiazepine, an azepino-indole-Type alkaloid from the red sea marine sponge *Hyrtios erectus*. *J. Nat. Prod.*, 69(12), pp.1676-1679.
- Seki K., Haga K. and Kaneko R., 1995. Phenols and a dioxotetrahydrodibenzofuran from seeds of *Iris pallasii*. *Phytochemistry*, 38, pp.965-973.
- Singh N. et al., 2006. A new alkylated benzoquinone from rhizomes of *Iris kumaonensis*. *Nat. Prod. Res.*, 20, pp.75-78.
- Sun T. et al., 2007. Hyrtiosal, a PTP1B Inhibitor from the marine sponge *Hyrtios erectus*, shows extensive cellular effects on PI3K/AKT activation, glucose transport, and TGF β /Smad2 signaling. *ChemBioChem*, 8, pp.187-193.
- Wu T., Wehmeyer R.M. and Rieke R.D., 1987. A revision of the absolute stereochemistry of ilimaquinone. *J. Org. Chem.*, 52, pp.5059-5060.
- Yang S. et al., 2003. A New sesterterpene, sch 599473, from a marine sponge, *Ircinia* sp.. *J. Antibiot.*, 56(9), pp.783-786.

부록

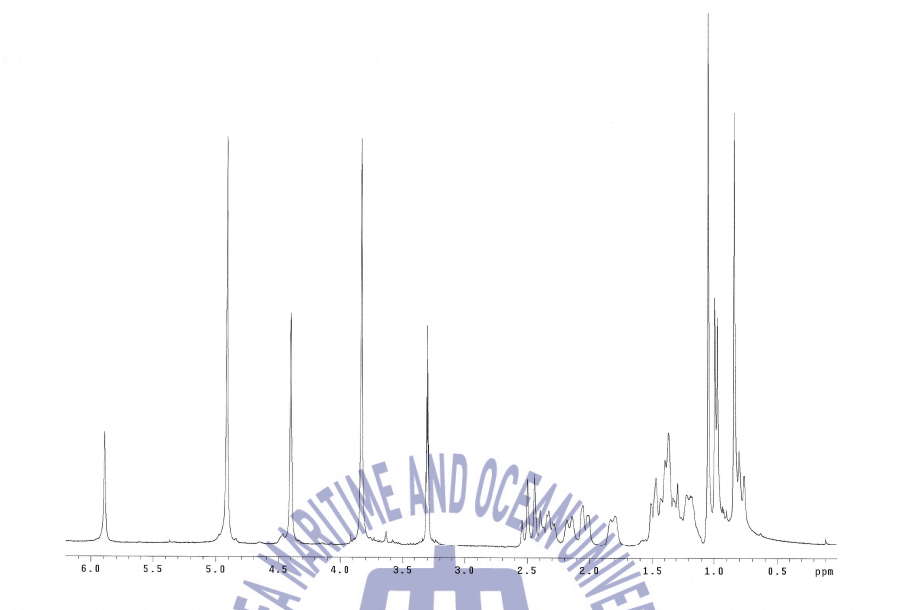


Figure 31. ^1H NMR spectrum of **compound 1** in CD_3OD .

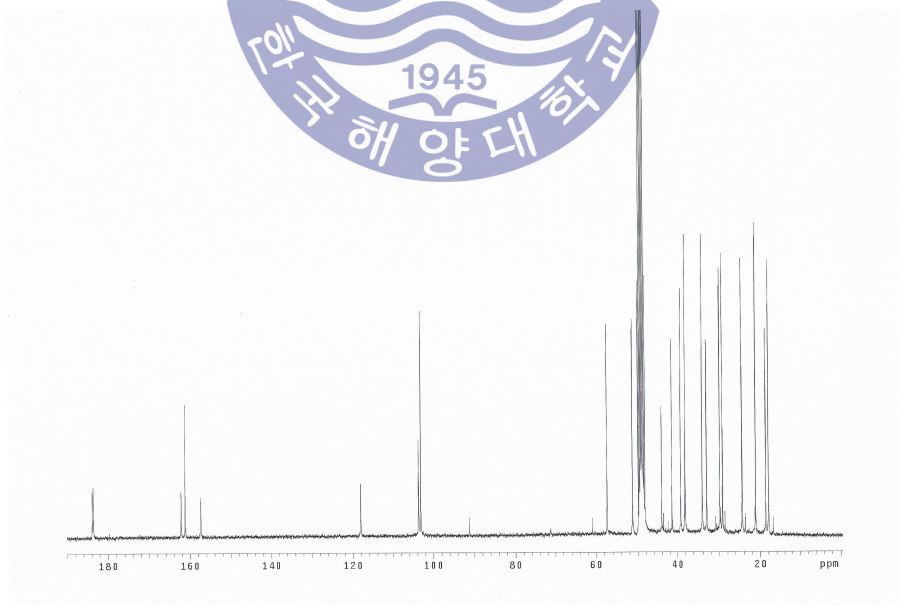


Figure 32. ^{13}C NMR spectrum of **compound 1** in CD_3OD .

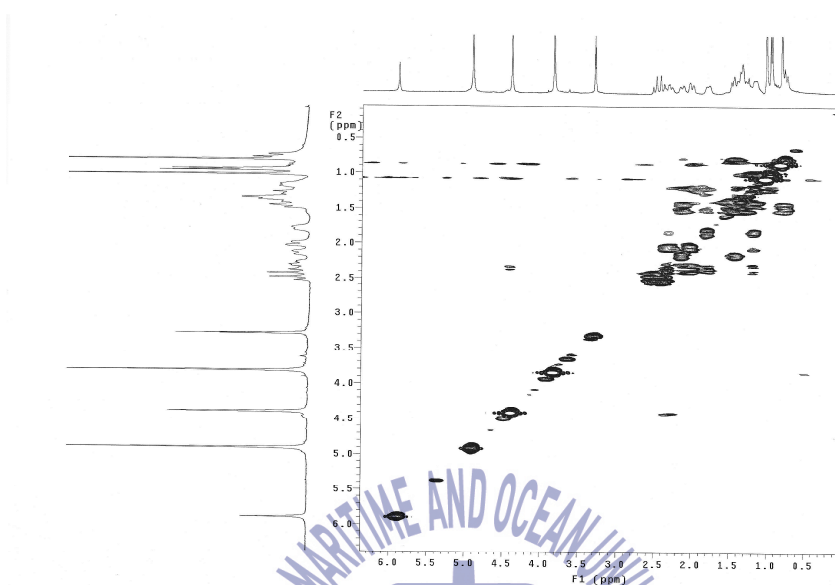


Figure 33. ^1H COSY spectrum of **compound 1** in CD_3OD .

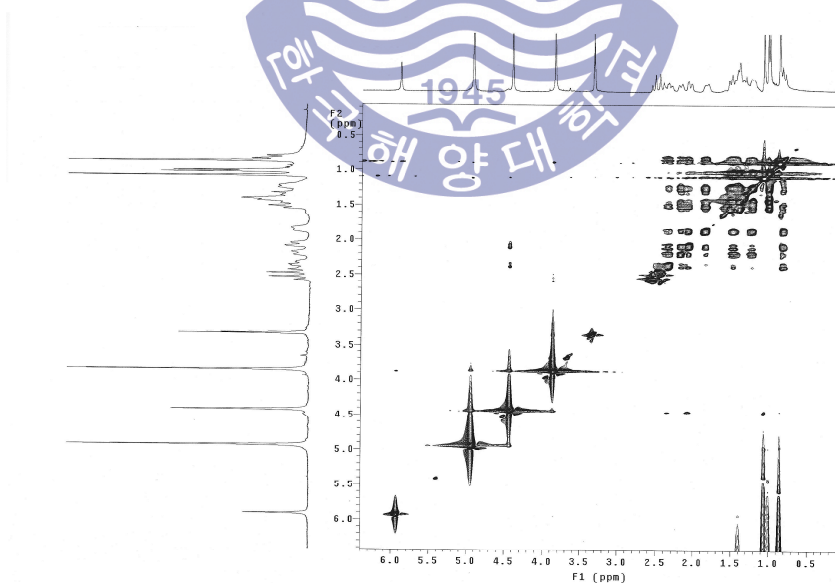


Figure 34. ^1H TOCSY spectrum of **compound 1** in CD_3OD .

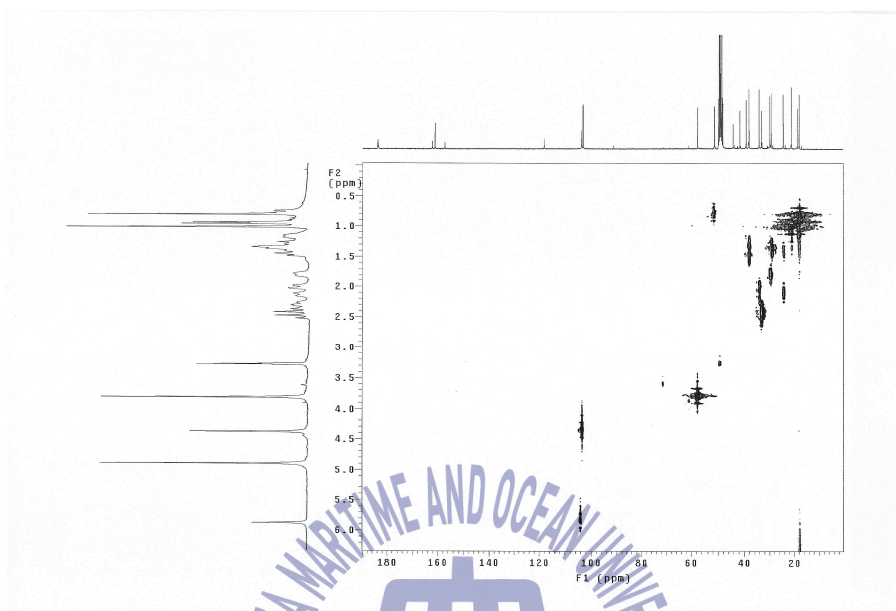


Figure 35. gHMQC spectrum of **compound 1** in CD_3OD .

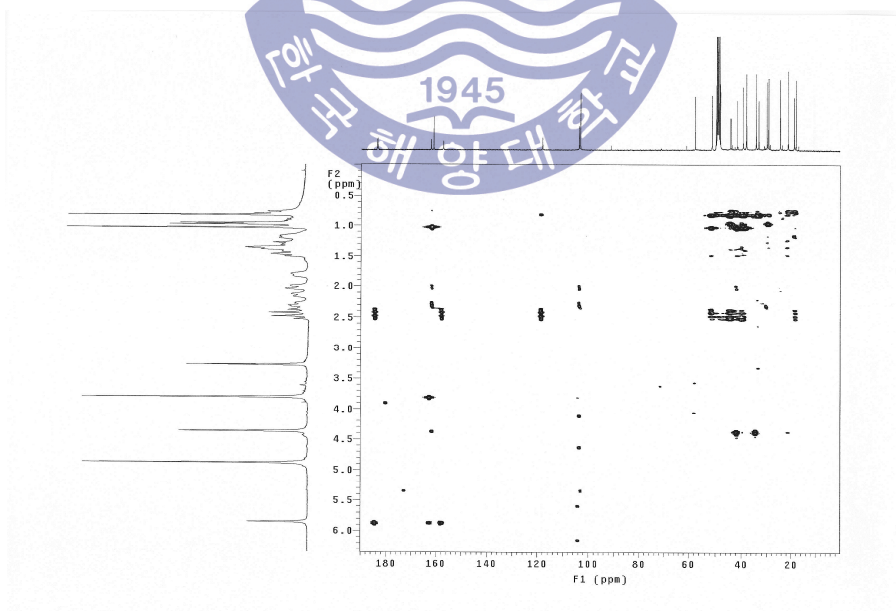


Figure 36. gHMBC spectrum of **compound 1** in CD_3OD .

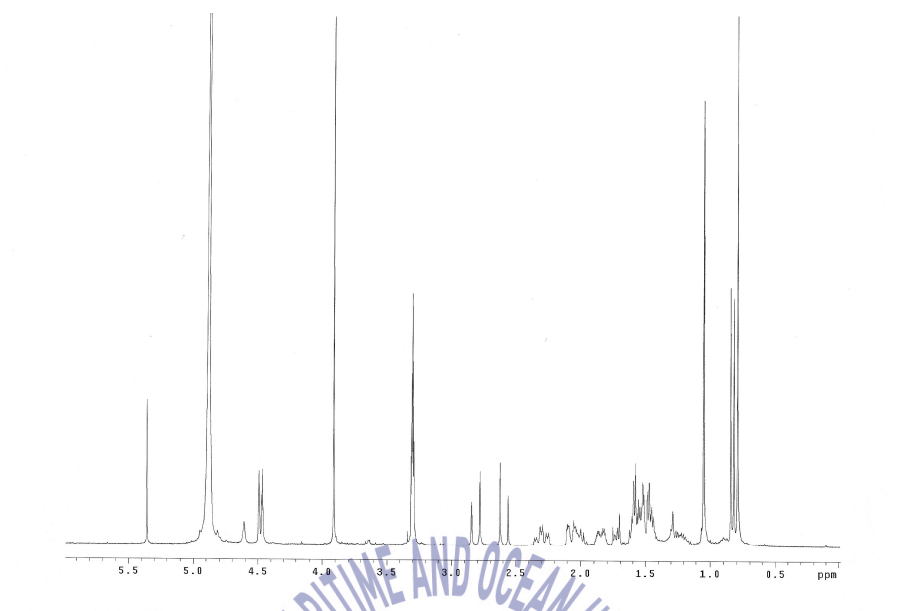


Figure 37. ^1H NMR spectrum of **compound 2** in CD_3OD .

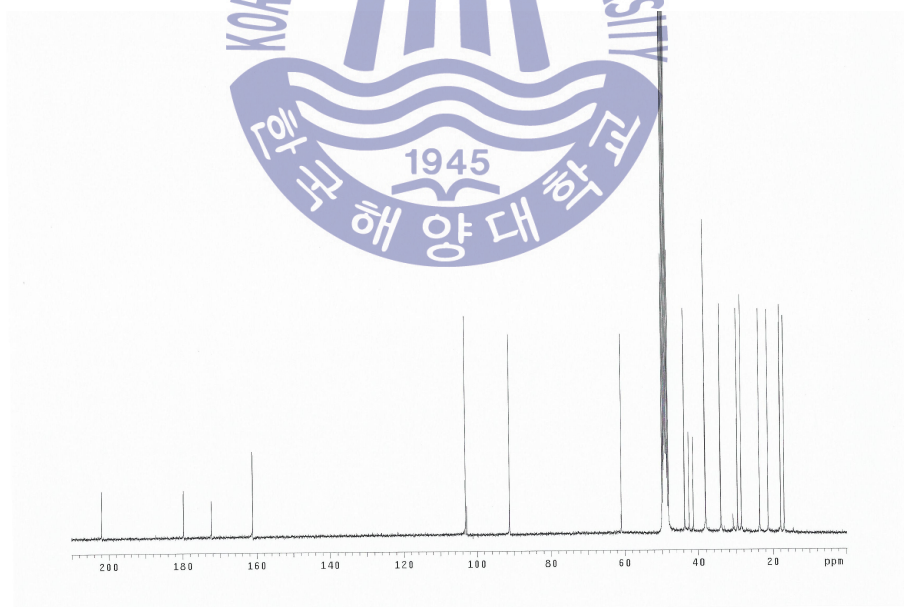


Figure 38. ^{13}C NMR spectrum of **compound 2** in CD_3OD .

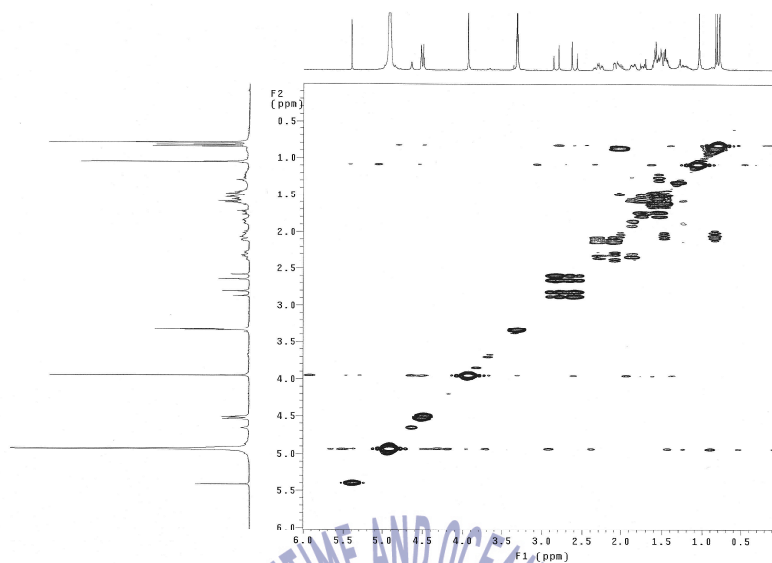


Figure 39. ^1H COSY spectrum of **compound 2** in CD_3OD .

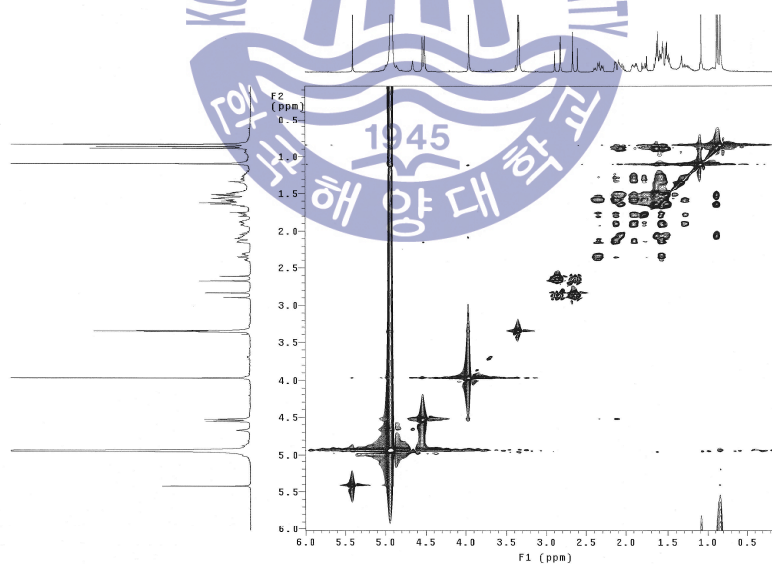


Figure 40. ^1H TOCSY spectrum of **compound 2** in CD_3OD .

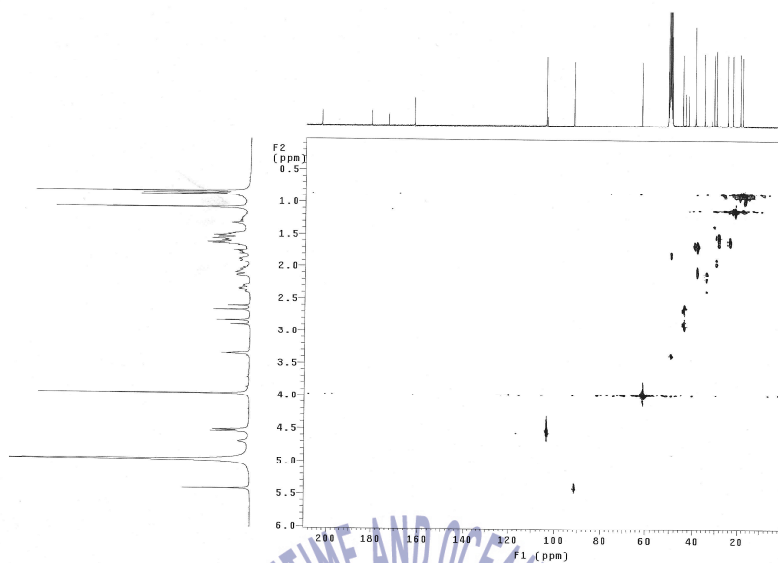


Figure 41. gHMBC spectrum of **compound 2** in CD₃OD.

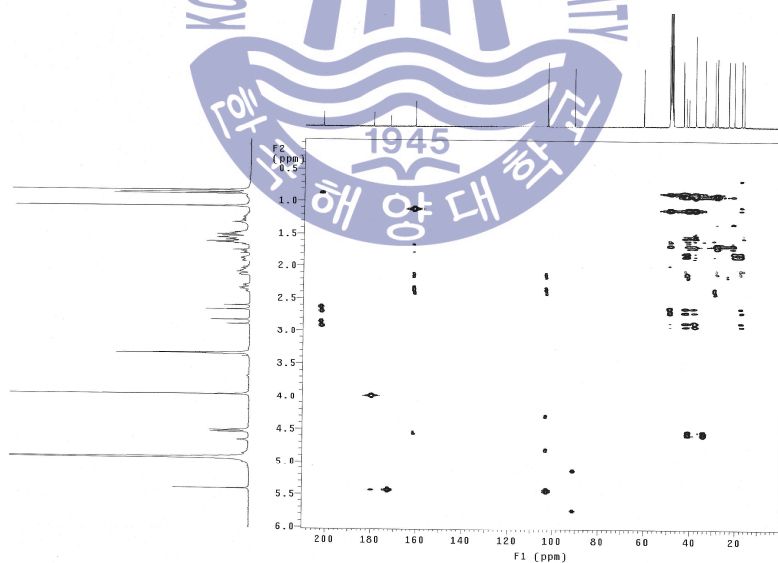


Figure 42. gHMBC spectrum of **compound 2** in CD₃OD.

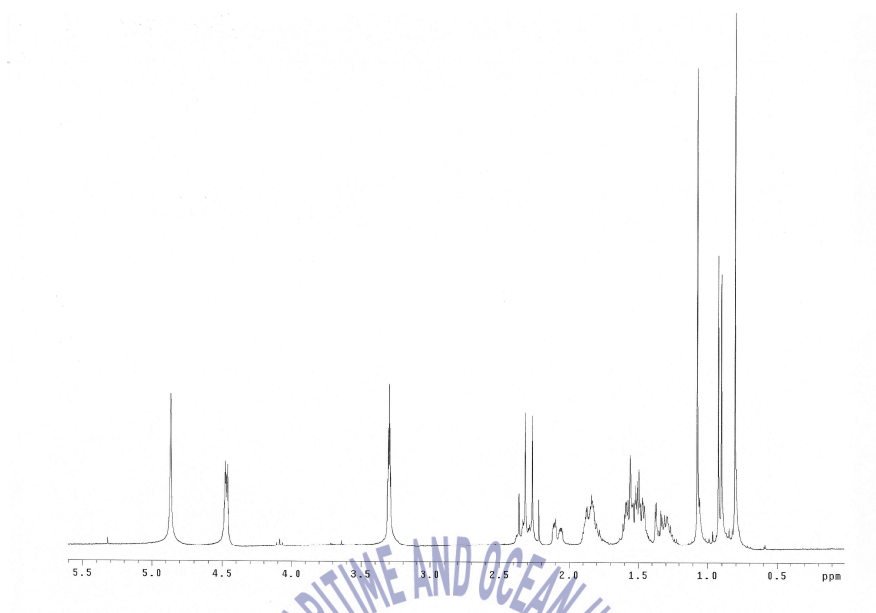


Figure 43. ^1H NMR spectrum of **compound 3** in CD_3OD .

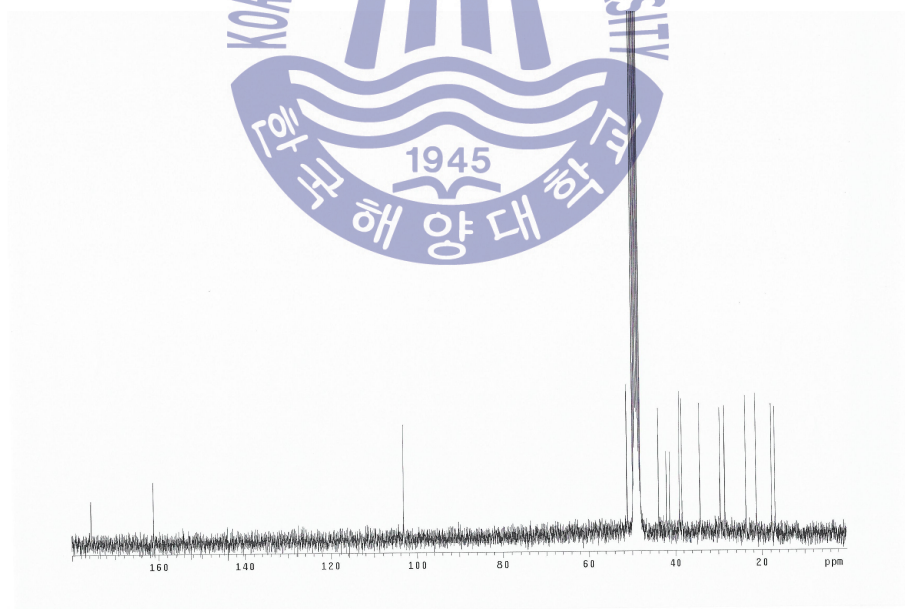


Figure 44. ^{13}C NMR spectrum of **compound 3** in CD_3OD .

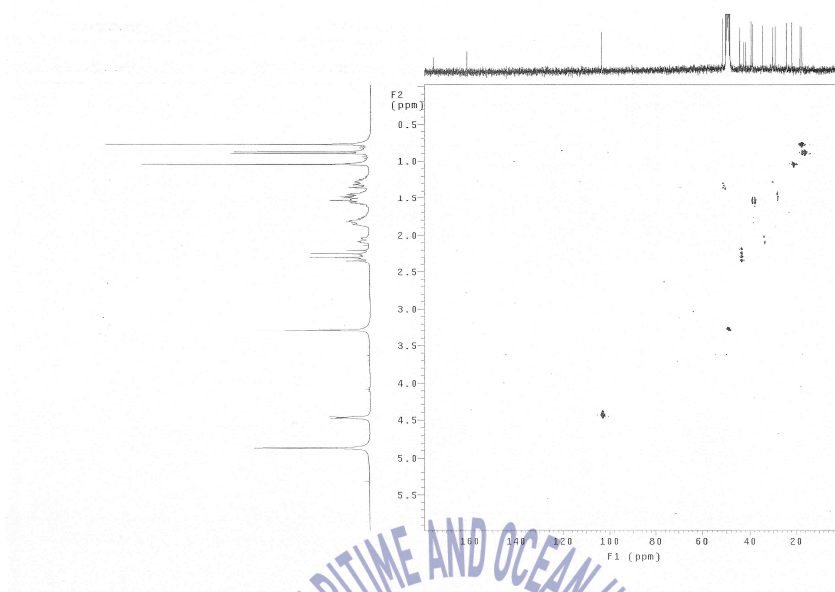


Figure 47. gHMQC spectrum of **compound 3** in CD₃OD.

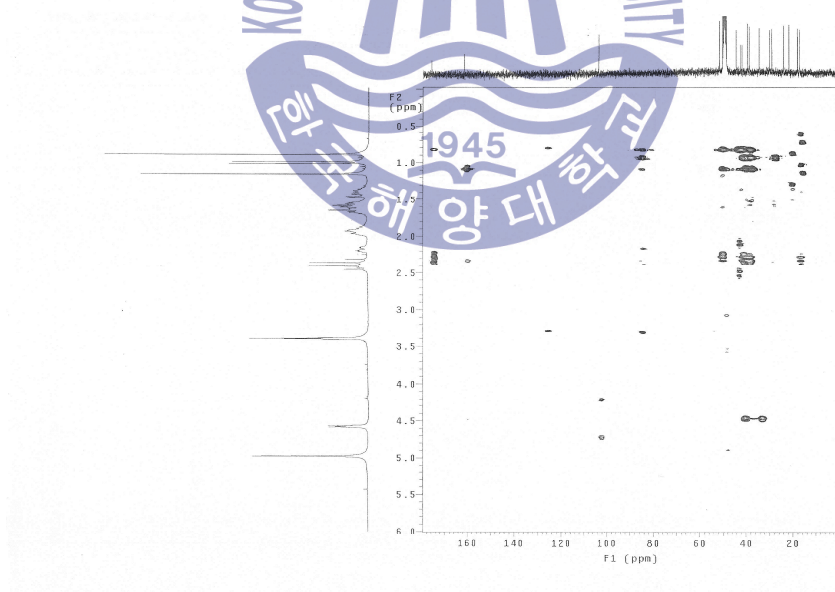


Figure 48. gHMBC spectrum of **compound 3** in CD₃OD.

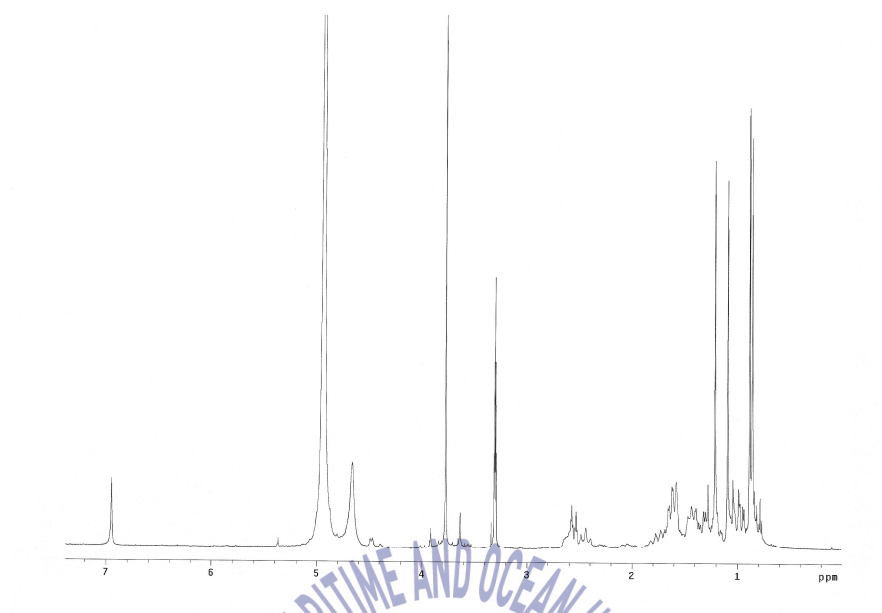


Figure 49. ^1H NMR spectrum of **compound 4** in CD_3OD .

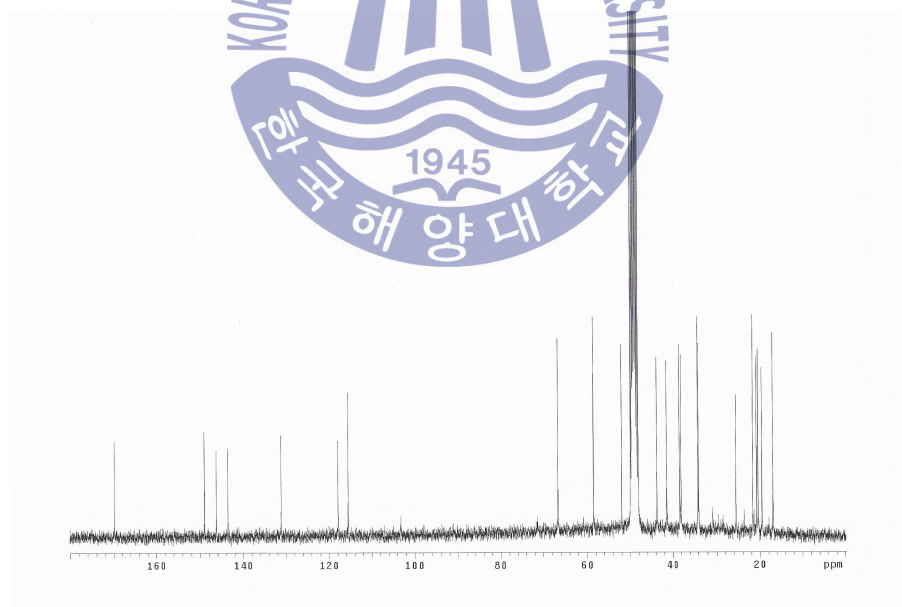


Figure 50. ^{13}C NMR spectrum of **compound 4** in CD_3OD .

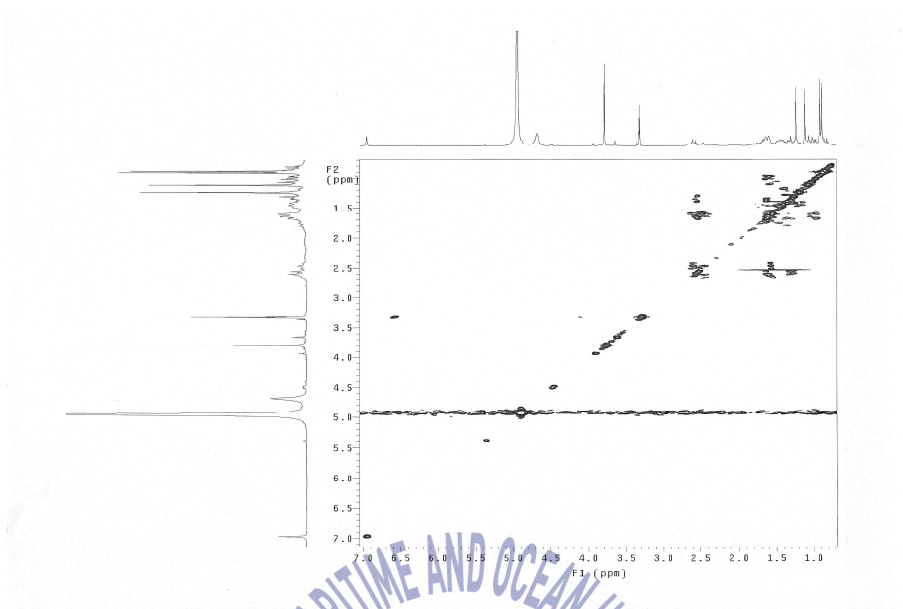


Figure 51. ^1H COSY spectrum of **compound 4** in CD_3OD .

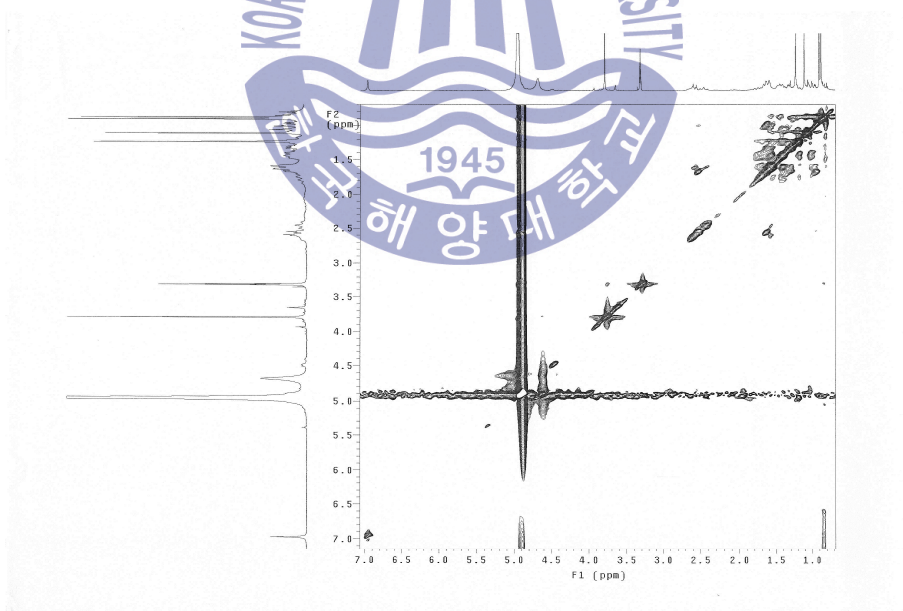


Figure 52. ^1H TOCSY spectrum of **compound 4** in CD_3OD .

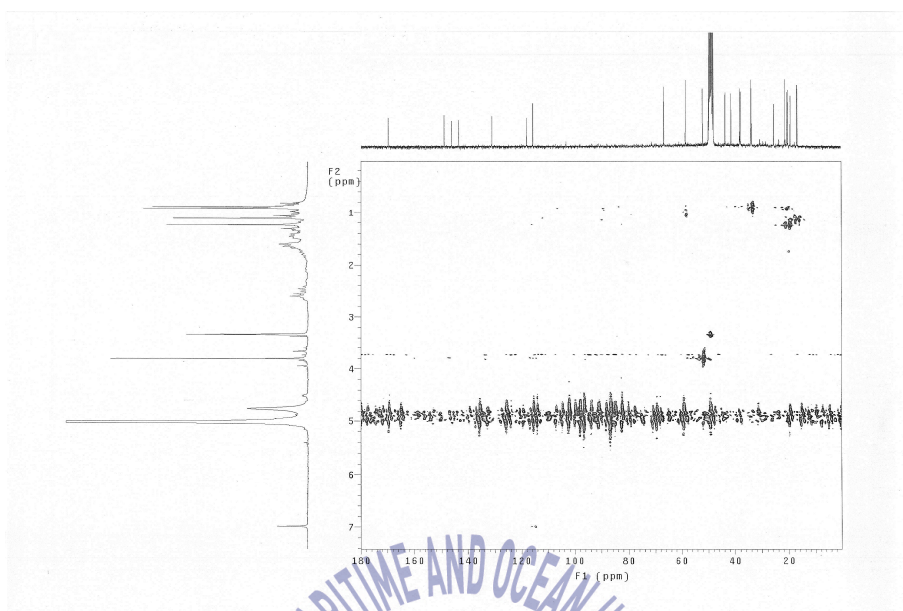


Figure 53. gHMQC spectrum of **compound 4** in CD_3OD .

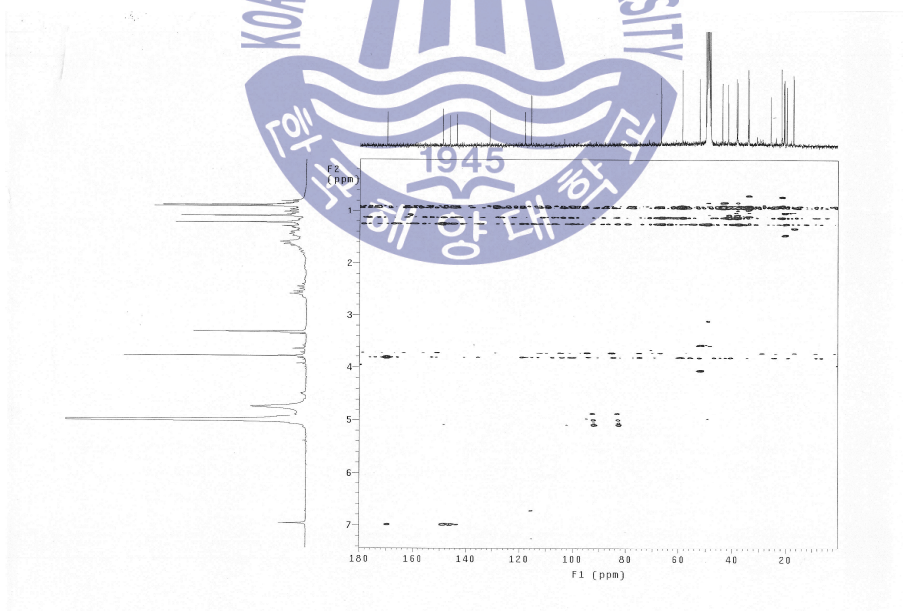
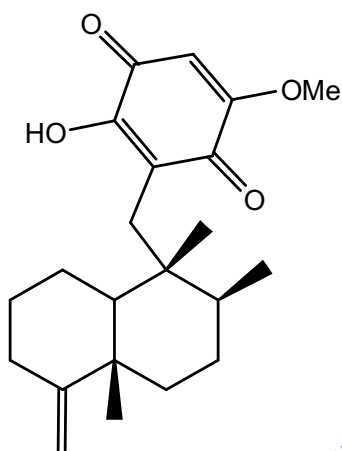
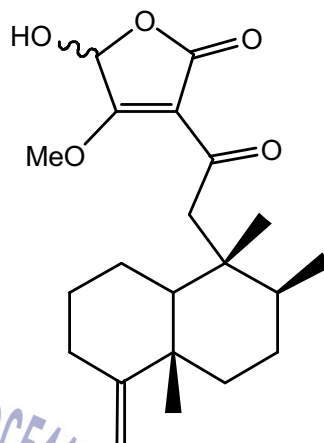


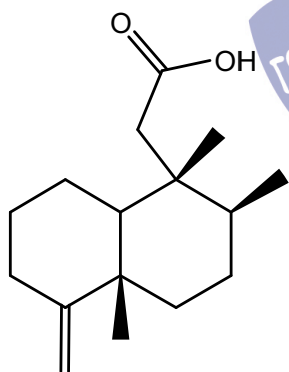
Figure 54. gHMBC spectrum of **compound 4** in CD_3OD .



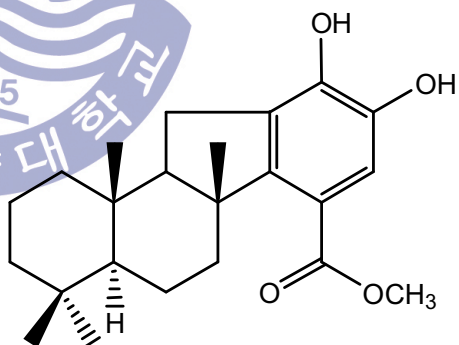
Compound 1



Compound 2



Compound 3



Compound 4

Figure 55. Chemical structure of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus*.

감사의 글

어느새 길게만 느껴졌던 2년간의 석사과정을 마치게 되었습니다. 부족한 저였지만 많은 분들의 도움이 있어 석사과정을 무사히 마칠 수 있었습니다.

먼저 부족한 저에게 많은 것을 가르쳐주시고 여러 가지를 지도해주신 서영완 교수님, 감사합니다. 교수님 덕분에 석사과정을 무사히 마칠 수 있었습니다. 다시 한번 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 석사 학위 논문 심사위원을 맡아주시고 더 나은 논문이 될 수 있도록 조언해주신 임선영 교수님과 박인석 교수님께도 감사의 말씀 전합니다.

그리고 제가 챙기지 못한 것들 놓치지 않도록 잘 챙겨주신 형주 언니께 감사드리고, 실험실에 처음 들어왔을 때부터 지금까지 저에게 실험을 비롯한 여러 가지를 가르쳐주고 도와준 호준이 오빠, 지금은 졸업하고 없지만 역시 많은 도움을 주었던 승오 오빠, 명국이 오빠, 다슬이 언니도 고맙습니다. 또 같이 실험실에 들어와 졸업할 때까지 같이 생활했던 희정이도 고맙습니다. 옆에서 많이 챙겨주고, 잘 모르는 것은 같이 고민할 수 있는 친구가 있어 많은 힘이 되었습니다. 그리고 실험실 생활하며 옆에서 많이 도와준 채민이 오빠, 준세, 민주와 식품 실험실의 재열이 오빠, 정우 오빠, 은이도 고맙습니다.

마지막으로 항상 같이 놀아주는 친구들, 그리고 지금의 저를 있게 한 사랑하는 우리 가족, 엄마와 언니도 감사합니다.

석사과정을 끝으로 사회로 나가게 되었습니다. 사회에서도 지금까지 배운 가르침들을 잊지 않고 열심히 하도록 하겠습니다. 모두 진심으로 감사드립니다.



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

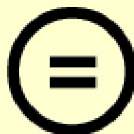
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



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.

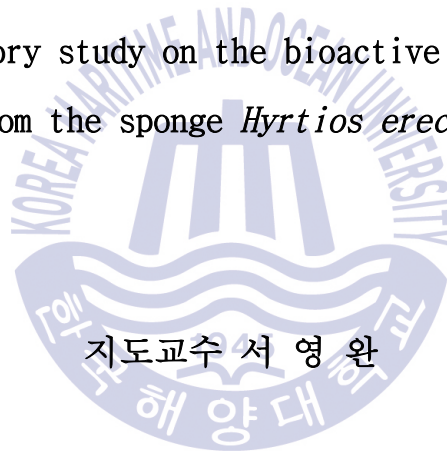
[Disclaimer](#)



이학석사 학위논문

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터
생리활성 성분의 탐색

An exploratory study on the bioactive constituents
from the sponge *Hyrtios erectus*



지도교수 서영완

2017년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

주 은 신

본 논문을 주은신의 이학석사 학위논문으로 인준함

위원장 : 임선영 인

위 원 : 박인석 인

위 원 : 서영완 인

2016 년 12 월 15 일

한국해양대학교 일반대학원

목 차

List of schemes -----	i
List of figures -----	ii
List of table -----	v
List of abbreviations -----	vi
 Abstract -----	 1
 1.서론 -----	 3
2. 재료 및 방법 -----	5
2.1. 시료 -----	5
2.2. 시약 및 기기 -----	5
2.2.1. 시약 -----	5
2.2.2. 기기 -----	6
2.2.3. 세포배양 -----	6
2.3. 추출 및 분리 -----	7
2.3.1. 추출 및 분획 -----	7
2.3.2. 활성 성분의 분리 -----	9
2.4. 항산화 활성 실험 -----	12
2.4.1. DPPH radical 소거 활성 -----	12
2.4.2. Peroxynitrite 소거 활성 -----	15
2.4.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정 -----	18
2.4.4. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성-----	19
2.4.4.1. HT-1080 세포 생존율 측정 -----	19
2.4.4.2. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성--	21

2.5. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과 -----	23
2.6. 인체 유래 암세포 증식 억제 활성 -----	25
2.7. 통계처리 -----	26
3. 결과 및 고찰 -----	27
3.1. 해면동물 <i>Hyrtios erectus</i> 로부터 분리된 물질의 구조 결정 -----	27
3.2. 항산화 활성 실험 -----	31
3.2.1. DPPH radical 소거 활성 -----	31
3.2.2. Peroxynitrite 소거 활성 -----	33
3.2.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정 -----	36
3.2.4. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성 -----	38
3.2.4.1. HT-1080 세포 생존율 측정 -----	38
3.2.4.2 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성 --	40
3.3. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과 -----	44
3.3.1. Raw 264.7 세포 생존율 측정 -----	44
3.3.2. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과 -----	44
3.4. 인체 유래 암세포 증식 억제 효과 -----	46
3.4.1. HT-1080 세포 증식 억제 효과 -----	46
3.4.2. HT-29 세포 증식 억제 효과 -----	48
3.4.3. AGS 세포 증식 억제 효과 -----	48
3.4.4. MCF-7 세포 증식 억제 효과 -----	50
3.5. 화합물들의 항산화 활성 -----	52
3.5.1. DPPH radical 소거 활성 -----	52
3.5.2. Peroxynitrite 소거 활성 -----	54
3.5.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정 -----	56
3.6. 화합물들의 NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과 -----	58
3.6.1. Raw 264.7 세포 생존율 측정 -----	58

3.6.2. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과 -----	58
3.7. 화합물들의 인체 유래 암세포 증식 억제 효과 -----	60
3.7.1. HT-1080 세포 증식 억제 효과 -----	60
3.7.2. HT-29 세포 증식 억제 효과 -----	60
3.7.3. AGS 세포 증식 억제 효과 -----	62
3.7.4. MCF-7 세포 증식 억제 효과 -----	62
4. 요약 및 결론 -----	64
5. 참고문헌 -----	66
부록 -----	69
감사의 글 -----	82



List of schemes

Scheme 1. Preparation of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> -----	8
Scheme 2. Isolation of the chemical compounds from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> -----	11
Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect -----	14
Scheme 4. Measurement of the ONOO ⁻ scavenging effect -----	17



List of figures

Figure 1.	Scavenging of the DPPH radical by phenol -----	13
Figure 2.	Peroxynitrite (ONOO ⁻) mediated oxidation of DHR 123 -----	16
Figure 3.	Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells ---	20
Figure 4.	Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system -----	22
Figure 5.	Coloring reaction for NO ₂ ⁻ detection -----	24
Figure 6.	Chemical structure of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> -----	29
Figure 7.	DPPH radical scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> -----	32
Figure 8.	Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on authentic ONOO ⁻ (% of control) -----	34
Figure 9.	Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on ONOO ⁻ from SIN-1 (% of control) -----	35
Figure 10.	Ferric reducing antioxidant power of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> (% of control) -----	37
Figure 11.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of HT-1080 cells -----	39
Figure 12.	Effects of crude extract from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells -----	41
Figure 13.	Effects of <i>n</i> -hexane and 85% aq.MeOH fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells -----	42
Figure 14.	Effects of <i>n</i> -BuOH and H ₂ O fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells -----	43
Figure 15.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of Raw 264.7 cells -----	45

Figure 16.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on nitrite production in Raw 264.7 cells -----	45
Figure 17.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of HT-1080 cells -----	47
Figure 18.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of HT-29 cells -----	49
Figure 19.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of AGS cells -----	49
Figure 20.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of MCF-7 cells -----	51
Figure 21.	DPPH radical scavenging activity of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> -----	53
Figure 22.	Scavenging activity of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on authentic ONOO ⁻ (% of control) -----	55
Figure 23.	Scavenging activity of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on ONOO ⁻ from SIN-1 (% of control) -----	55
Figure 24.	Ferric reducing antioxidant power of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> (% of control) -----	57
Figure 25.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of Raw 264.7 cells -----	59
Figure 26.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on nitrite production in Raw 264.7 cells -----	59
Figure 27.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of HT-1080 cells -----	61
Figure 28.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of HT-29 cells -----	61
Figure 29.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of AGS cells -----	63
Figure 30.	Effects of compounds 1-4 from the sponge <i>Hyrtios erectus</i> on viability of MCF-7 cells -----	63
Figure 31.	¹ H NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	69
Figure 32.	¹³ C NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	69
Figure 33.	¹ H COSY spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	70
Figure 34.	¹ H TOCSY spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	70
Figure 35.	gHMQC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	71

Figure 36.	gHMBC spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	71
Figure 37.	¹ H NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	72
Figure 38.	¹³ C NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	72
Figure 39.	¹ H COSY spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	73
Figure 40.	¹ H TOCSY spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	73
Figure 41.	gHMQC spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	74
Figure 42.	gHMBC spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	74
Figure 43.	¹ H NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	75
Figure 44.	¹³ C NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	75
Figure 45.	¹ H COSY spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	76
Figure 46.	¹ H TOCSY spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	76
Figure 47.	gHMQC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	77
Figure 48.	gHMBC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD -----	77
Figure 49.	¹ H NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	78
Figure 50.	¹³ C NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	78
Figure 51.	¹ H COSY spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	79
Figure 52.	¹ H TOCSY spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	79
Figure 53.	gHMQC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	80
Figure 54.	gHMBC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD -----	80
Figure 55.	Chemical structure of compounds 1-4 from the sponge <i>Hirtios erectus</i> -----	81

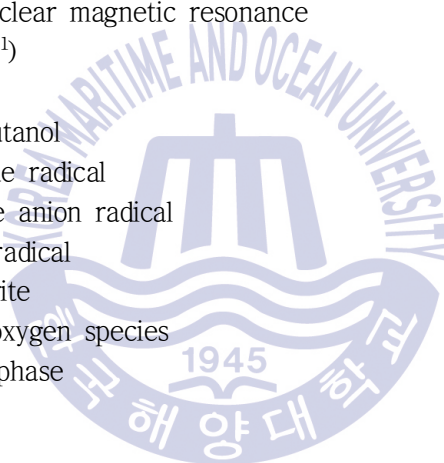
List of table

Table 1.	^1H and ^{13}C NMR assignments for compounds 1-4	-----	30
----------	--	-------	----



List of abbreviations

BHA	: butylated hydroxyanisole
BHT	: butylated hydroxytoluene
CDCl ₃	: deuterated chloroform
CD ₃ OD	: deuterated methanol
CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
¹³ C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EtOAc	: ethyl acetate
H ₂ O	: water
¹ H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
Hz	: herz (sec ⁻¹)
MeOH	: methanol
<i>n</i> -BuOH	: normal-butanol
NO ·	: nitric oxide radical
· O ₂ ⁻	: superoxide anion radical
· OH	: hydroxyl radical
ONOO ⁻	: peroxyxynitrite
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reversed phase
S	: substrate
SiO ₂	: silica gel
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet



An exploratory study on the bioactive constituents from the sponge *Hyrtios erectus*

Ju, Eun Shin

Division of Marine Bioscience

Graduate School of Korea Maritime and Ocean University

Abstract

Specimens of the sponge *Hyrtios erectus* were consecutively extracted with methylene chloride and methanol, respectively. Combined crude extracts were fractionated into *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH and water fractions according to solvent polarity.

The crude extract and its solvent fractions were assessed for their scavenging effect on DPPH radical and peroxyxynitrite in a non-cellular system. There was no significant scavenging activity with any DPPH samples including crude extracts. However, for peroxyxynitrite, all tested samples showed a dose-dependent scavenging effect. Among them, *n*-hexane and 85% aq.MeOH fractions showed the most potent activity, comparable with vitamin C and penicillamine. Scavenging effect on intracellular ROS in HT- 1080 cells as well as reducing antioxidant power on ferric ion were also measured for crude extract and its four solvent fractions. All tested samples revealed the strong scavenging and reducing effect on both ROS and ferric ions, respectively, in a dose-dependent manner. In addition, all samples significantly inhibited production of LPS-activated nitric oxide (NO) in Raw

264.7 cells.

In the cytotoxicity assay system using the MTT reduction method, on the other hand, the crude extract showed a potent antiproliferative effect on HT-1080 (human fibrosarcoma) and AGS (human gastric cancer). The 85% aq.MeOH fraction of solvent-partitioned fractions exhibited the strongest growth inhibition against HT-1080 and AGS cells. *n*-Hexane fraction revealed the next strongest inhibition effect on growth of HT-1080 and AGS cells.

Four known compounds, Ilimaquinone (**1**), Smenotronic acid (**2**), Smenosponic acid (**3**), and Pelorol (**4**) were isolated from the sponge *Hyrtios erectus*. They were also evaluated for antioxidant, antiproliferative, and antiinflammatory effects, respectively. Compound **1** of them showed the best antioxidant effect: 51.8% inhibition ratio for DPPH radical at 100 μ M; 97.3% and 97.5% inhibition ratios for authentic peroxyinitrite, and peroxyinitrite induced from decomposition of SIN-1 at 50 μ M, respectively; 60% reducing power for ferric ion at 1 μ M. In addition, all compounds dose-dependently showed the moderate or weak inhibition effect against production of nitric oxide in Raw 264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide (LPS).

All isolated compounds (**1-4**) were tested for their cytotoxicities against human cancer cell lines *in vitro* using MTT assay. All compounds revealed the significant cytotoxicity against human cancer cell lines. Ilimaquinone (**1**) and Smenotronic acid (**2**) displayed the significant cytotoxicities against HT-1080, HT-29, AGS, and MCF-7 cell lines with inhibition ratios of 60, 50, 35, and 50% at 10 μ M; 30, 45, 45, and 40% at 10 μ M. Smenotronic acid (**2**) and Smenosponic acid (**3**) showed the significant cytotoxicities against HT-1080, HT-29, and MCF-7 cell lines with inhibition ratios of 45, 45, and 40% at 10 μ M; 45, 30, and 30% at 10 μ M.

KEY WORDS: *Hyrtios erectus*; antiproliferative; antioxidant; Ilimaquinone; Smenotronic acid; Smenosponic acid; Pelorol

1. 서론

현대 의학의 발달로 인간의 수명은 연장되었지만, 여전히 당뇨, 암, 신경 퇴행성 질환 등의 다양한 질병들이 계속 발병하고 있다. 조합화학이나 고속 대량 스크리닝에 의한 합성신약들이 등장하고는 있지만 천연물 혹은 그 유도체가 전체 의약품 시장의 50% 이상을 차지하고 있음을 보아 천연물은 여전히 새로운 신물질의 보고로서 매우 중요한 위치를 차지하고 있음을 알 수 있다. 하지만 이러한 육상기원 천연물의 개발은 오랜 연구에 의해 그 자원이 고갈됨에 따라 특수한 환경에서 서식하는 해양생물로 관심을 돌리게 되었다. 해양생물은 육상생물과 서식 환경이 다르기 때문에 육상 천연물과는 구조적으로 상당히 다른 다양한 골격의 이차 대사물질들을 가지며, 이러한 다양한 구조는 신약개발에 유용하게 이용되고 있다(Yang et al., 2003). 현재까지 해양생물에서 개발된 대표적인 의약품으로는 말기암 환자의 진통제로 사용되는 ziconotide, 원색동물 *Ecteinascidia turbinata*로부터 분리되어 연부조직 육종의 항암제로 개발된 trabectedin 등이 있다(Molinski et al., 2009).

1950년대에 해면동물 *Tethya crypta*로부터 특이한 뉴클레오사이드 유도체인 ara-A가 분리된 이후로 해양생물로부터의 다양한 골격을 가진 새로운 천연물들이 분리되었다(Mohammad et al., 2014). 이러한 해양생물들 중에서 해면동물은 해양신물질의 가장 풍부한 원천으로서 특이한 골격과 항암, 항균, 항염증과 같은 다양한 생리활성을 가진 물질들이 분리되었다(Iguchi et al., 1992; Rho et al., 2004). 그 예로 해면동물 *Dysidea avara*에서 분리된 avarol과 avaron, *Halichondria okadai*에서 분리된 halichondrin B, 그리고 *Hemiassterella minor*에서 분리된 hemiassterlin 등은 특이한 골격과 강력한 항암활성으로 주목을 받고 있는 물질들이다(Crispino et al., 1989).

해면동물들 중에 *Hyrtios* 속은 흔히 열대 지방이나 아열대의 물에 서식하며, 주로 산호초에 우세한 생물군집을 형성한다. 이처럼 열대 지방

에 서식하는 생물종은 더욱 치열한 생물종간의 경쟁으로 인해 더욱 다양하고 특이한 이차대사물질이 분리될 가능성이 높다. 그리고 해면동물 *Hyrtios* 속과 그들과 관련된 미생물의 화학적 조사에서 scalarane sesterterpenoids, acyclic triterpenoids, indole alkaloids, macrolides, steroids 등을 포함한 구조적으로 독특한 다양한 천연물들이 분리되었으며, 이러한 많은 화합물들은 생물학적으로 중요한 활성을 가지는 것으로 알려졌다(Ryu et al., 1996; Qiu et al., 2004; Sauleau et al., 2006). 그 외에도 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리된 물질 중 hyrtiosal은 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 억제제로 작용하여 비만과 제2형 당뇨의 치료물질로 작용할 수 있으며(Sun et al., 2007), 또한 hyrtiosal은 HIV-1 integrase를 억제할 수 있다는 사실 또한 밝혀졌다(Du et al., 2008). 그리고 *Hyrtios* sp.에서 *Candida albicans*의 이소시트르산분해효소에 대해 억제활성을 가지는 물질이 분리되기도 하였다(Lee et al., 2009).

본 연구에서는 이처럼 다양한 이차대사산물을 생산하는 해면동물인 *Hyrtios erectus*로부터 항산화, 항암, 항염증과 같은 생리활성 효과를 탐색하고 항산화, 항암 및 항염증의 소재로서 활용가능성이 있는지 알아보았다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

실험에 사용된 해면동물 *Hirtios erectus*는 남태평양 미크로네시아 चु(chuuk)에서 채집되었으며, KIOST로부터 채집된 해면동물을 받아 실험에 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

2.2.1. 시약

추출, 분획 및 분리에 사용한 용매는 모두 1급 시약을 증류한 후 사용하였다. Column packing materials는 RP-18 (YMC-Gel ODS-A, 12 nm, S-75 μ m)을 사용하였고, TLC plate는 Silica gel 60 F₂₅₄ (1mm, Merck)를 사용하였다. High performance liquid chromatography (HPLC)에 사용한 column은 YMC pack ODS-A (250×10 mm, S-5 μ m, 12 mm)를 사용하였다.

항산화 활성 실험에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), 3-morpholinsydnnonimine (SIN-1), dihydrorhodamine 123 (DHR 123)과 penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methyl-butanoic acid)은 Sigma aldrich (ST Louis, MO, USA)에서 구입하였고, peroxyntirite (ONOO⁻)는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포배양에 필요한 RPMI-1640과 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), FBS (Fetal Bovine Serum)는 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서, 0.05% Trypsin-0.02% EDTA와 100 units/mL penicillin-streptomycine은 GIBCO (USA)에서 구입하여 사용하였다. ROS측정에 사용된 DCFH-DA는 Molecular Probes inc. (Eugene, OR, USA)에서 구입하였고, NO 생성 측정 실험에 사용된 MEM (Modified Eagle Medium)과 Lipopolysaccharide (LPS), Griess 시약에 사용된 sulfanilamide와 N-(1-naphtyl)ethylene-diamide (NED)는 Sigma aldrich에서 구입하였다. MTT assay를 위한 kit (MTT cell proliferation Assay)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

2.2.2. 기기

High performance liquid chromatography (HPLC, Dionex p580)와 Varian RI detector를 사용하여 화합물을 정제 및 분리하였고, NMR 실험은 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였다.

항산화 활성 및 MTT assay 등의 측정에 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic, England), Multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT (Bio-TEK instruments, USA), Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)를 사용하였다.

세포의 배양은 CO₂ incubator (FormaScientific, Japan)를 사용하였고, 그 외에 rotary evaporator (EYELA, JAPAN), vacuum pump, water bath, pipet (JBM-pipet), 여과기 등을 사용하였다.

2.2.3. 세포배양

실험에 사용한 HT-1080 (human fibrosarcoma cells), HT-29 (human colon cancer cells), AGS (human gastric adenocarcinoma cells), Raw 264.7 (macrophage cells), MCF-7 (human breast cancer cells) 세포는 한국세포주 은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)으로부터 분양 받아 배양하여 실험에 사용하였다.

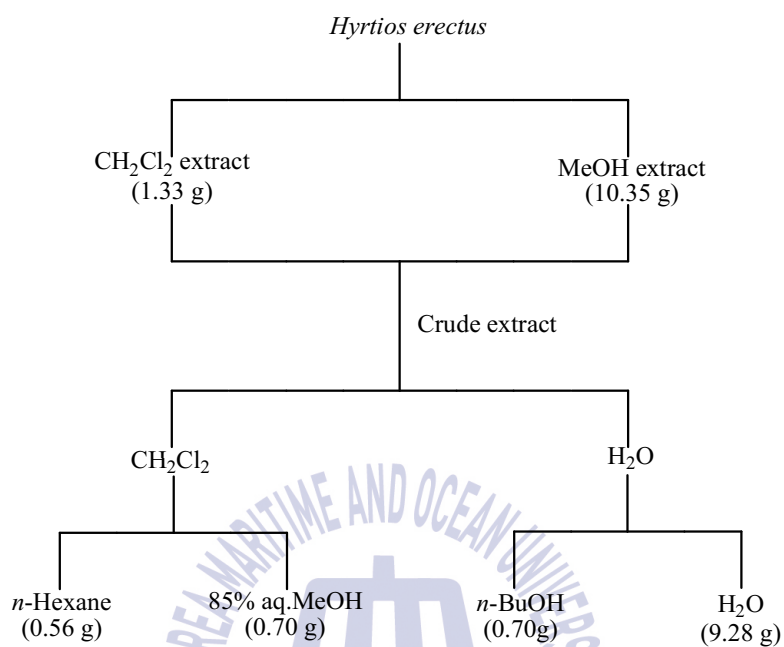
HT-1080, HT-29와 AGS 세포는 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS를 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하여 배양하였고, MCF-7과 Raw 264.7 세포는 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 모든 세포들은 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였고, 배양된 세포는 일주일에 5~6회 배지를 교환하고, 6~7일 만에 PBS로 세척한 후, HT-1080, HT-29, AGS, MCF-7 세포는 0.05% Trypsin-0.02% EDTA로, Raw 264.7 세포는 cell scraper로 부착된 세포를 분리하여 계대배양 하였다.

2.3. 추출 및 분리

2.3.1. 추출 및 분획

KIOST로부터 받은 해면동물 *Hyrtios erectus*를 methylene chloride에 24시간 침지시켜 추출하였고 이를 2회 반복하였다. 그리고 잔사에 동량의 methanol을 이용하여 마찬가지로 24시간 침지시켜 추출하였고 이를 2회 반복하였다. 이러한 방법으로 얻어진 methylene chloride 추출액과 methanol 추출액을 감압 농축하여 각각 1.33 g, 10.35 g의 조추출물을 얻었다.

두 조추출물을 합한 후에 methylene chloride와 H₂O로 분획하여 methylene chloride 분획층과 H₂O 분획층을 얻었다. 얻어진 methylene chloride 분획층은 감압 농축한 뒤 *n*-hexane과 85% aq.MeOH로 분획하였고, H₂O 분획층은 *n*-BuOH와 H₂O로 분획하였다. 이러한 방법으로 용매 극성에 따라 *n*-hexane 분획층, 85% aq.MeOH 분획층, *n*-BuOH 분획층, H₂O 분획층으로 총 네 개의 분획층들을 얻었으며, 각각 0.56 g, 0.70 g, 0.70 g, 9.28 g을 얻었다(Scheme 1).



Scheme 1. Preparation of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus*.

2.3.2. 활성 성분의 분리

n-Hexane 분획층은 ethyl acetate와 *n*-hexane의 혼합용매를 사용하여 silica normal-phase vacuum chromatography를 실시하였으며 모두 10개의 분획(100% *n*-hexane, 5% EtOAc/*n*-hexane, 10% EtOAc/*n*-hexane, 20% EtOAc/*n*-hexane, 30% EtOAc/*n*-hexane, 40% EtOAc/*n*-hexane, 50% EtOAc/*n*-hexane, 70% EtOAc/*n*-hexane, 100% EtOAc, 100% MeOH)을 얻었다. 그 중 20% EtOAc/*n*-hexane 분획을 reversed-phase HPLC (ODS-A, 95% aq.MeOH)하여 **compound 1**을 분리하였고, 30% EtOAc/*n*-hexane 분획을 reversed-phase HPLC (ODS-A, 100% MeOH)하여 역시 **compound 1**을 분리하였다(Scheme 2).

85% aq.MeOH 분획층은 methanol과 H₂O의 혼합용매를 사용하여 C₁₈ reversed-phase vacuum flash chromatography 하였고, 이 실험으로 50% aq.MeOH, 60% aq.MeOH, 70% aq.MeOH, 80% aq.MeOH, 90% aq.MeOH, 100% MeOH, 100% EtOAc의 총 7개 분획을 얻었다. 그 중 70% aq.MeOH 분획을 reversed-phase HPLC (ODS-A, 80% aq.MeOH)하여 **compound 1**을 분리하였고, 80% aq.MeOH, 90% aq.MeOH, 100% MeOH 분획을 같은 조건으로 reversed-phase HPLC (ODS-A, 80% aq.MeOH)하여 **compound 1, 2, 3, 4**를 분리하였다(Scheme 2).

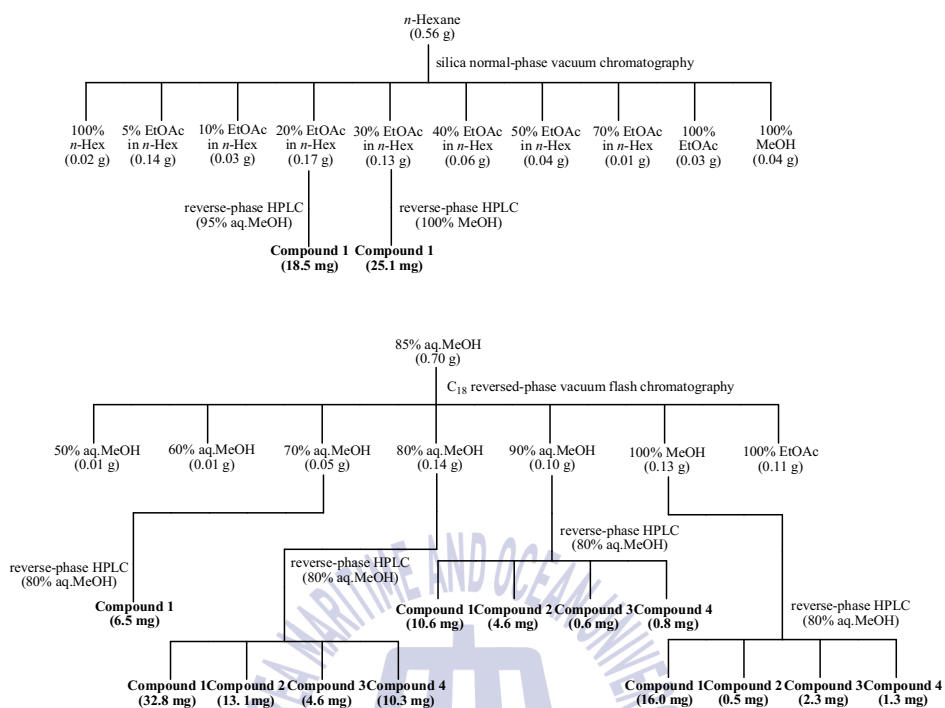
Compound 1 (Ilimaquinone): ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 5.89 (1H, s, H-19), 4.39 (2H, br s, H-11), (3H, s, OMe), 2.52 (1H, d, J = 13.6 Hz, H-15), 2.41 (1H, d, J = 13.6 Hz, H-15), 1.04 (3H, s, H-12), 0.98 (3H, d, J = 6.33 Hz, H-13), 0.84 (3H, s, H-14).

Compound 2 (Smenotronic acid): ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ 5.36 (1H, s, H-19), 4.49 (1H, br s, H-11), 4.47 (1H, br s, H-11), 3.91(3H, s, methoxy), 2.81 (1H, d, J = 18.8, H-15), 2.59(1H, d, J = 18.8, H-15), 1.05 (3H, s, H-12) 0.83 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-13), 0.79 (3H, s, H-14).

Compound 3 (Smenospongic acid): ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ 4.48 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-19), 4.47 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-11), 2.34 (1H, d, $J = 13.5$, H-15), 2.24 (1H, d, $J = 13.5$, H-15), 1.07 (3H, s, H-12) 0.91 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-13), 0.81 (3H, s, H-14).

Compound 4 (Pelorol): ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ 6.95 (1H, s, H-19), 3.77 (3H, s, methoxy), 1.21 (3H, s, H-15), 1.09(3H, s, H-14), 0.89(3H, s, H-12), 0.86(3H, s, H-13).





Scheme 2. Isolation of the chemical compounds from the sponge *Hyrtios erectus*.

2.4. 항산화 활성 실험

2.4.1. DPPH radical 소거 활성

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 화학적으로 안정한 free radical을 가지는 수용성 물질로 진한 보라색을 띤다. DPPH가 free radical을 잃게 되면 안정한 분자인 diphenylpicrylhydrazine이 되며 노란색을 띠게 되고 흡광도 값이 변하게 된다(Figure 1). 이 흡광도 값을 비교하여 활성 유무를 측정하였으며, 대조군으로 BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene)와 vitamin C (L-ascorbic acid)를 사용하였다.

DPPH 시약 2 mg을 ethanol 15 mL에 녹여 만든 DPPH 원액 1.2 mL와 3 mL의 ethanol, 0.5 mL의 DMSO를 동일 비율로 혼합하여 DPPH radical solution을 만든다. 준비된 DPPH radical solution을 cuvette에 넣고 518 nm의 파장에서 흡광도 측정값이 0.94~0.97이 되도록 농도를 조절한다. 농도를 조절한 DPPH radical solution 900 μ L에 준비한 시료 100 μ L를 농도별로 가하고 10분 후에 518 nm의 파장에서 그 흡광도를 측정하였다(Scheme 3; Blois, 1958).

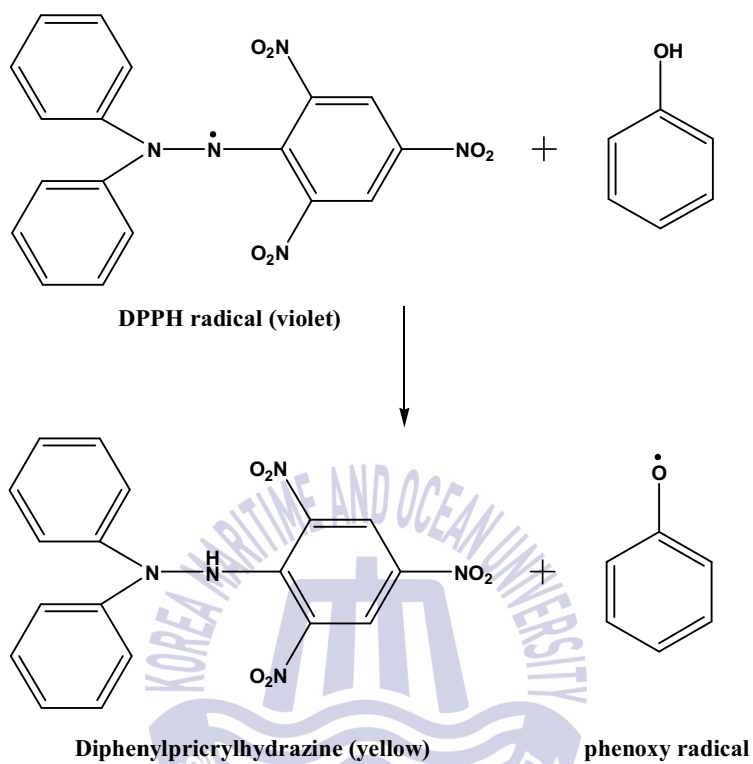
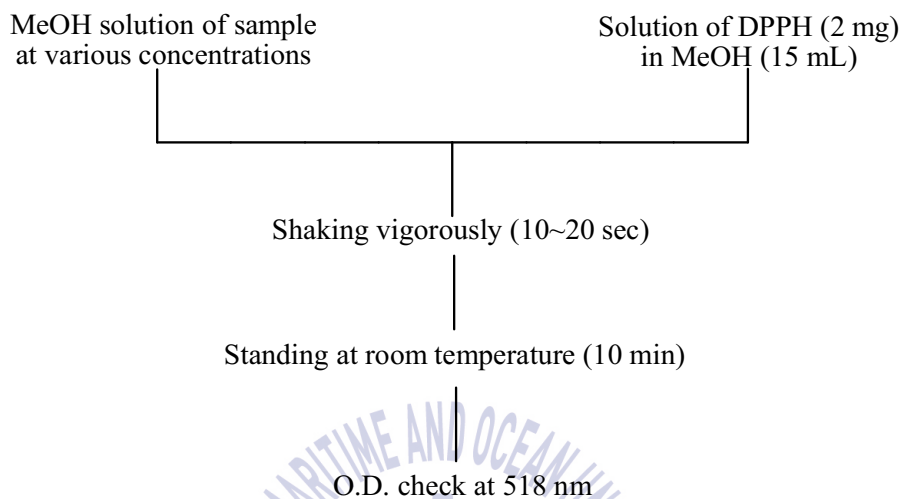


Figure 1. Scavenging of the DPPH radical by phenol.



Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging activity.

2.4.2. Peroxynitrite 소거 활성

Peroxynitrite (ONOO^-) 소거 활성은 dihydrorodamine 123 (DHR 123)의 산화되는 정도를 측정하는 방법으로 탐색하였다. DHR 123은 peroxynitrite와 반응하여 형광물질인 rodamine 123으로 바뀐다(Figure 2). DHR 123에 authentic peroxynitrite와 SIN-1을 처리하고 그 반응 생성물의 흡광도를 측정하여 시료의 peroxynitrite 소거능을 측정하였으며, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)와 penicillamine을 사용하였다.

DHR 123은 dimethylformamide에 녹여 질소로 purge시켜 -80°C 에 보관하였고, 보관된 DHR 123은 사용하기 전에 암실의 얼음 위에서 희석하여 실험에 사용하였다. Buffer는 90 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합하여 pH를 7.4로 조절한 용액에 100 μM DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid)를 혼합하여 만들고 냉장보관 하였다. 이 buffer로 DHR 123을 5 μM 로 희석하여 실험에 사용하였다. Buffer로 희석한 DHR 123에 시료와 authentic 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 경우에는 동일한 방법으로 실시한 후 1시간 동안 방치한 뒤 측정하였다. 이는 SIN-1이 $\text{NO}\cdot$ 와 $\text{O}_2\cdot^-$ 를 동시에 발생시켜 ONOO^- 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(Scheme 4; Kooy et al., 1994).

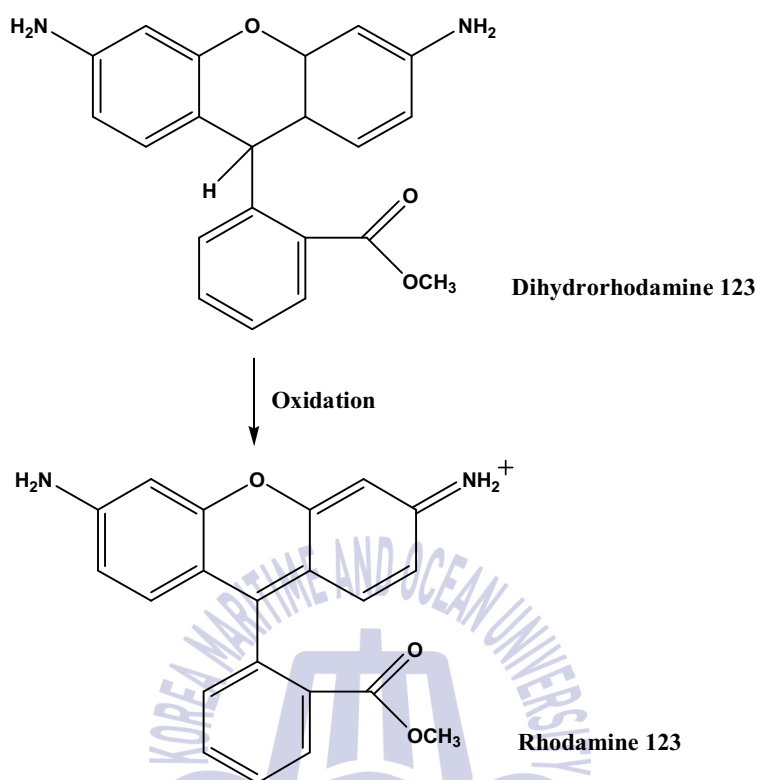


Figure 2. Peroxynitrite (ONOO^-) mediated oxidation of DHR 123.

Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μM



Dihydrorhodamine 123 5 μM



Incubation at 37°C for 1 min



Sample



SIN-1 200 μM or peroxynitrite 5 μM



Mesurement of fluorecence intensity
Excitation wavelength at 485 nm
Emission wavelength at 530 nm

Scheme 4. Mesurement of the ONOO^- scavenging activity.

2.4.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정

환원력을 측정하기 위해 시료를 적당한 농도로 희석한 후, 희석한 시료 0.2 mL와 200 mM sodium phosphate (pH 6.6) 0.2 mL, 1% potassium ferricyanide 0.2 mL를 혼합한다. 이를 20분 동안 50℃에서 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid 0.2 mL를 첨가하여 혼합한 뒤, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 한 후, 상등액 0.5 mL와 0.1% ferric chloride 0.5 mL를 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 vitamin C (L-ascorbic acid)를 사용하였다(Kim & Jeong, 2014).



2.4.4. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성

2.4.4.1. HT-1080 세포 생존율 측정

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 얻어진 물질이 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 시약을 사용하여 확인하였다. MTT assay는 세포의 증식과 살아있는 정도를 간접적으로 측정하며, 대사과정이 온전한 세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색을 띠는 수용성의 MTT tetrazolium이 환원되어 보라색을 띠는 MTT formazan[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]이 된다(Figure 3). 세포가 많을수록 MTT formazan을 많이 생성하게 되며 이를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다.

배양한 세포를 96 well micro-plate에 2×10^4 cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 배지를 교환한 후 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 다시 1시간 배양하였다. 시료를 처리하여 배양된 세포는 1 mg/mL 농도의 MTT 시약을 처리하여 4시간 배양하고, formazan이 형성되면 MTT 시약이 처리된 배지를 제거한 후, 형성된 formazan을 DMSO에 녹여 Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

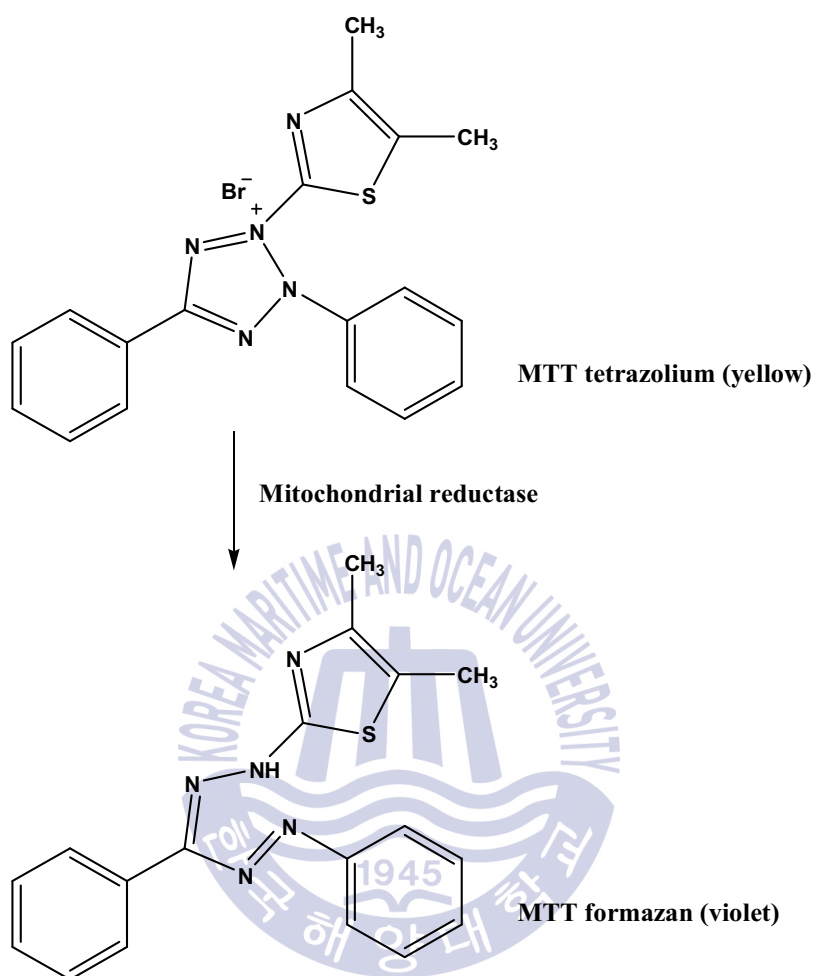


Figure 3. Metabolization of MTT to MTT formazan by viable cells.

2.4.4.2. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성

세포내 ROS free radical 생성은 비형광물질인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)가 세포내 생성된 free radical과 반응하여 형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 산화되는 원리를 이용한 DCFH-DA assay로 측정하였다(Figure 4; Okimoto, 2000).

HT-1080 세포를 96 well micro-plate에 2×10^4 cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 배지를 제거하고 PBS로 씻어낸 후 20 μ M DCFH-DA를 각 well에 처리하여 20분간 pre-incubation 하였다. Pre-incubation한 세포의 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 incubation 한 후, DCFH-DA를 제거하고 PBS로 씻어낸 후, 500 μ M H₂O₂를 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)로 측정하였다.



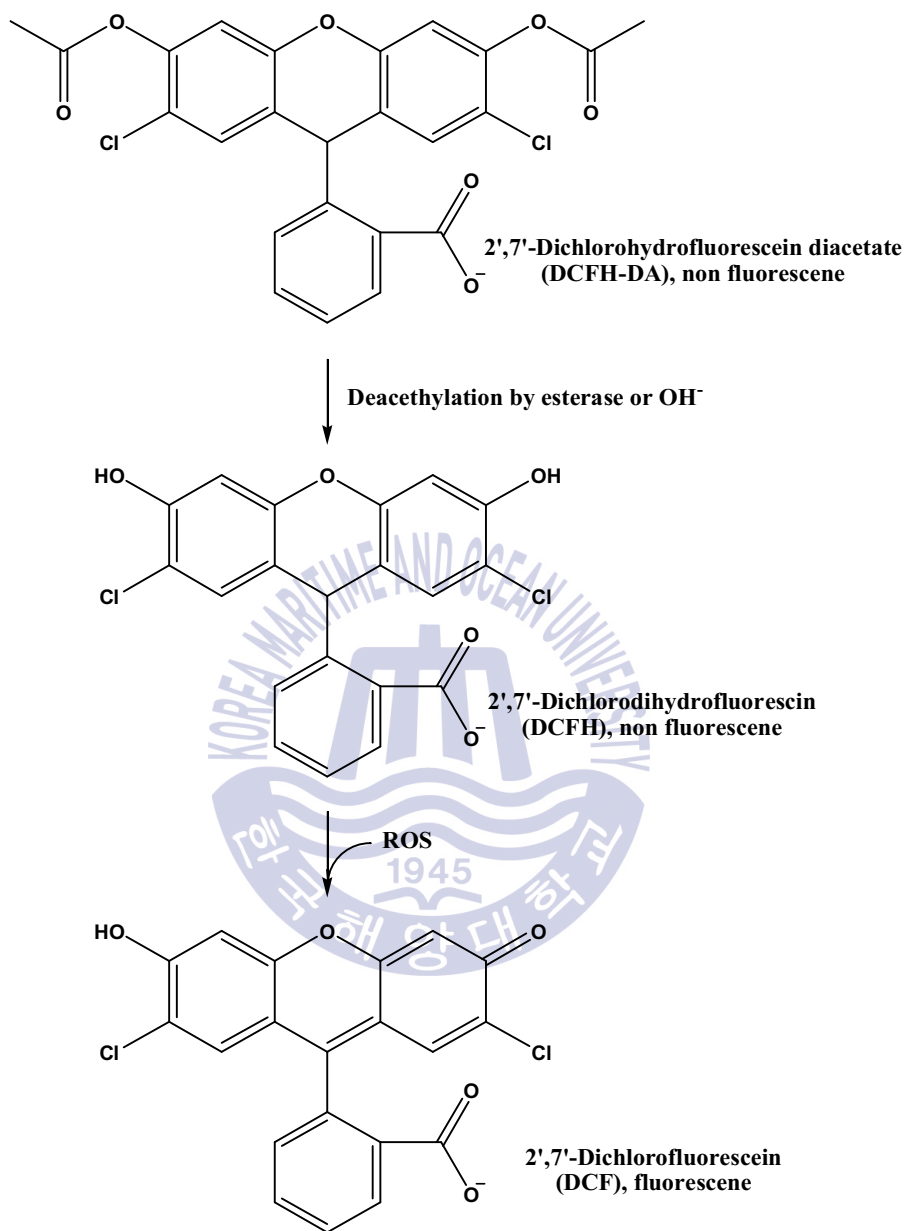


Figure 4. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.

2.5. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과

Raw 264.7 세포를 96 well micro-plate에 1×10^3 cells/well이 되도록 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 10% FBS가 함유된 MEM (Modified Eagle Medion) 배지로 교환한 후 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 다시 1시간 배양하였다. 1시간 배양 후, NO 생성을 유도하기 위해 1 μ g/mL (1 ppm)의 LPS를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. Raw 264.7 세포는 LPS에 의해 자극을 받아 NO를 생성한다. 생성된 NO가 함유된 배지의 상등액 50 μ L와 Griess 시약(0.1% N-1-naphtylenediamine : 1% sulfanilamide = 1 : 1) 50 μ L를 반응시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(Figure 5; Beda et al., 2005).



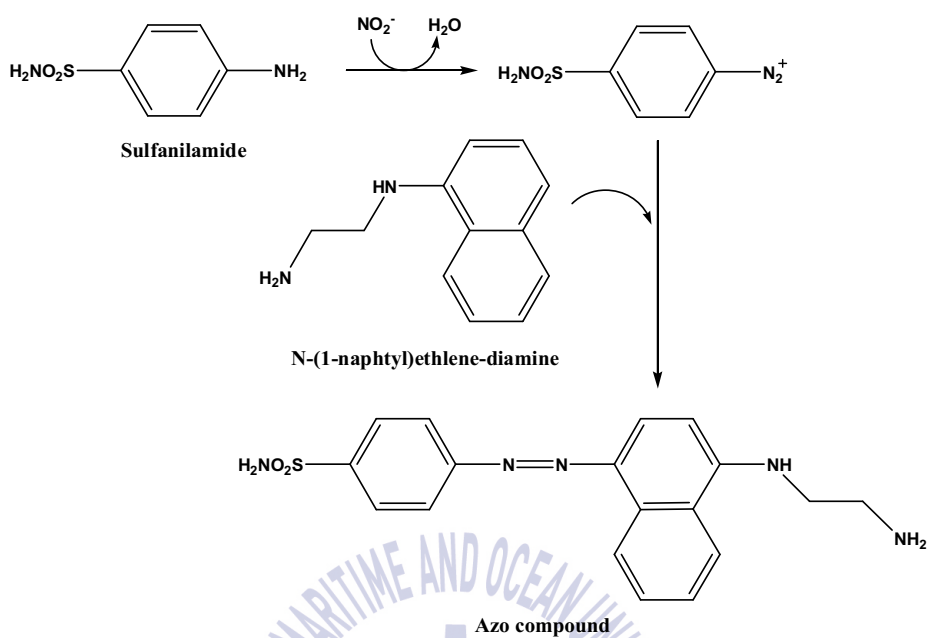


Figure 5. Coloring reaction for NO_2^- detection.

2.6. 인체 유래 암세포 증식 억제 활성

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 얻어진 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. MTT assay는 세포의 증식과 살아있는 정도를 간접적으로 측정하며, 대사과정이 온전한 암세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색을 띠는 수용성의 MTT tetrazolium이 환원되어 보라색을 띠는 MTT formazan[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]이 된다. 세포가 많을수록 MTT formazan을 많이 생성하게 되며 이를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다.

배양된 암세포는 96 well micro-plate에 1×10^4 cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 배지를 교환한 후 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 다시 24시간 배양하였다. 시료 처리하여 배양된 암세포에 1 mg/mL의 MTT 시약을 처리하여 4시간 배양하고, formazan이 형성되면 MTT 시약이 처리된 배지를 제거한 후, 형성된 formazan을 DMSO에 녹여 Victor3 multilabel plate reader (PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율(%)을 구하였다.

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

2.7. 통계처리

실험결과는 각 항목에 따라 Mean $\pm$ SEM (Standard Error of Mean)으로 나타내었다. 분석된 실험결과는 대조군과의 비교를 위해 statistical program을 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다.



3. 결과 및 고찰

3.1. 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리된 물질의 구조 결정

Compound 1은 황색의 고체로 분리되었으며, ^{13}C NMR 결과 22개의 carbon 신호가 나타났다. δ 183.9, 183.6, 162.2, 157.3, 118.1에 나타난 olefinic carbon 신호들과 δ 57.4에 나타난 methoxy carbon 신호는 2-hydroxy-5-methoxy-1,4-benzoquinone ring 부분구조가 존재한다는 것을 보여주었고, δ 161.2와 δ 103.7에 나타난 carbon 신호는 1개의 exomethylene olefinic 부분구조의 존재를 나타내었으며, ^1H NMR 스펙트럼의 δ 5.89, δ 3.83, 그리고 δ 4.39에 나타난 proton 신호들도 이 사실을 지지하였다(Seki et al., 1995; Singh et al., 2006). 그리고 δ 2.50에 benzylic proton들이 나타났으며, δ 4.43에서 terminal methylene이 나타났다. 이러한 부분구조를 바탕으로 2D NMR 실험을 통하여 이 물질의 구조를 Ilimaquinone으로 결정하였으며 문헌에 보고된 NMR 스펙트럼 데이터와 잘 일치하였다. 이 물질은 이전에 해면동물 *Smenospongia* sp.로부터 분리되었다(Figure 6, 31-36; Table 1; Luibrand et al., 1979; Wu et al., 1987; Kondracki & Guyot, 1989).

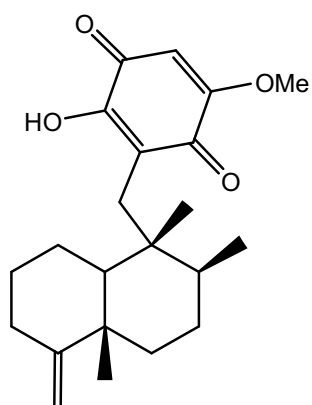
이와 유사한 물질 **compound 2**와 **compound 3**이 분리되었다. **Compound 2**의 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 나타난 δ 179.7, 172.3, 102.8, 91.2, 60.9 신호들은 하나의 methoxy group을 가진 tetronic acid 부분구조를 가진 것으로 추측되었다. 또 δ 201.9에서 관측된 신호는 하나의 carbonyl group으로 여겨졌으며 이러한 부분구조와 2D NMR 실험 및 문헌값을 비교한 결과 **compound 2**의 구조는 해면동물 *Smenospongia* sp.으로부터 분리된 Smenotronic acid로 확인 되었다(Figure 6, 37-42; Table 1; Kondracki & Guyot, 1999).

Compound 3의 ^{13}C NMR 스펙트럼은 **compound 2**에서 나타났던 δ 201.9, 179.7, 172.3, 102.8, 91.2 60.9의 신호들이 사라지고 δ 175.6에 quaternary carbon 신호가 나타난 것 외에는 **compound 2**와 매우 유사하

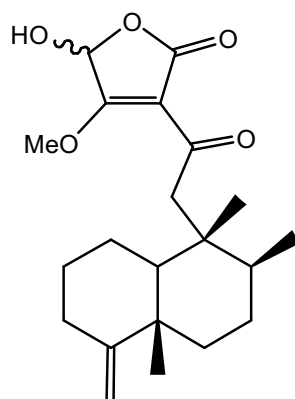
였다. 이러한 스펙트럼상의 변화는 **compound 2**의 tetronic acid 구조가 없어지고 존재하던 carbonyl group이 carboxylic acid로 바뀐 것으로 여겨졌다. 이 화합물의 전체적인 구조는 2D NMR 실험과 제시된 부분구조에 대한 문헌조사를 통하여 Smenospongiic acid로 결정되었으며 이 물질은 이전에 *Dacrylospongiu elegans*로부터 분리되어 보고되었다(**Figure 6, 43-48; Table 1**; Rodriguez et al., 1992; Lopez et al., 1994).

Compound 4는 ^{13}C NMR 스펙트럼에서 23개의 carbon 신호가 나타났으며 이 중에서 δ 149.0, 146.3, 143.6, 131.1, 117.9, 115.5에 나타난 6개의 신호는 olefinic carbon들로 여겨졌다. 또한 ^1H NMR 스펙트럼에서도 δ 6.95에 방향족 수소로 여겨지는 하나의 methine 피크가 발견되어 하나의 penta-substituted benzene 고리가 존재하는 것으로 여겨졌다. 이러한 부분구조를 이용한 문헌조사와 2D NMR 실험에 의하여 이 물질의 구조는 Pelorol로 확인되었으며 이전에 해면동물 *Dacrylospongiu elegans*로부터 분리된 바 있다(**Figure 6, 49-54; Table 1**; Goclik et al., 2000).

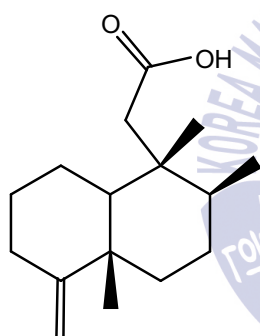




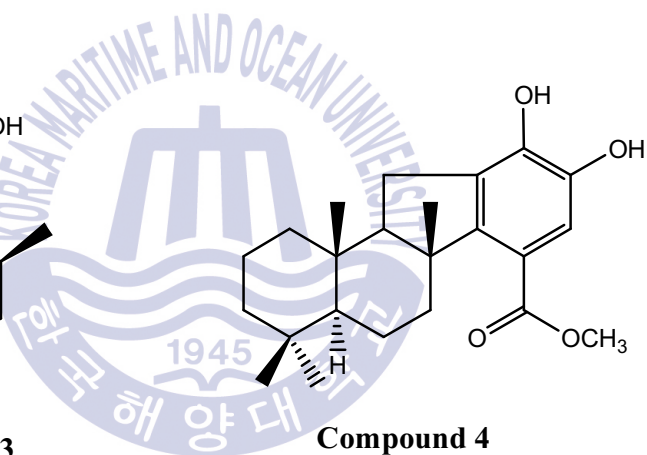
Compound 1



Compound 2



Compound 3



Compound 4

Figure 6. Chemical structure of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus*.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR assignments for **compounds 1-4**

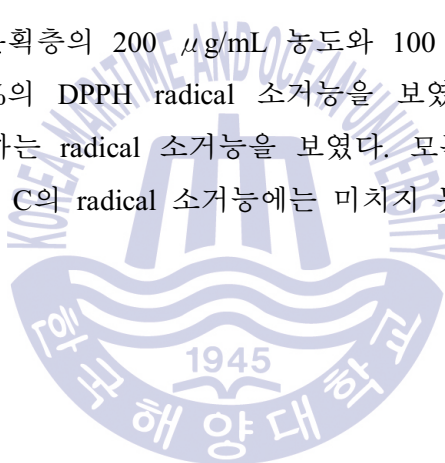
	Compound 1	Compound 2	Compound 3	Compound 4
1	24.4 t	23.6 t		41.4 t
2	29.1 t	29.7 t	23.6 t	13.5 t
3	34.1 t	34.1 t	29.6 t	43.7 t
4	161.2 s	161.1 s	34.1 t	34.0 s
5	41.5 s	41.3 s	161.2 s	58.5 d
6	38.0 t	38.2 t	41.4 s	21.3 t
7	29.8 t	28.6 t	38.4 t	38.0 t
8	39.2 d	38.2 d	28.6 t	49.4 s
9	44.1 s	42.5 s	39.0 d	66.6 d
10	51.3 d	49.3 d	42.1 s	38.3 s
11	103.7 t	103.2 t	51.1 d	25.6 t
12	21.1 q	21.3 q	103.2 t	21.6 q
13	18.6 q	16.9 q	21.3 q	33.9 q
14	17.9 q	17.9 q	16.9 q	16.9 q
15	33.0 t	43.6 t	17.7 q	20.3 q
16	118.1 s	201.9 s	43.9 t	131.1 s
17	157.3 s	102.8 s	175.6 s	146.3 s
18	183.9 s	179.7 s		143.6 s
19	103.1 d	91.2 d		115.5 d
20	162.2 s	172.3 s		117.9 s
21	183.6 s			149.0 s
22				169.8 s
-OMe	57.4 q	60.9 q		52.0 q

3.2. 항산화 활성 실험

3.2.1. DPPH radical 소거 활성

해면동물 *Hyrtios erectus*의 methylene chloride 추출물과 methanol 추출물을 합하여 얻어진 조추출물(crude extract)을 용매 극성도에 따라 분획하여 *n*-hexane 분획층, 85% aq.MeOH 분획층, *n*-BuOH 분획층, H₂O 분획층을 얻었다. Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 μ g/mL 농도로 희석하였고, 대조군으로 BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene)와 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

85% aq.MeOH 분획층의 200 μ g/mL 농도와 100 μ g/mL 농도에서는 각각 25.2%, 14.7%의 DPPH radical 소거능을 보였으며, 그 이외에는 10%에 미치지 못하는 radical 소거능을 보였다. 모든 시료가 대조군인 BHA, BHT, vitamin C의 radical 소거능에는 미치지 못하였다(Figure 7).



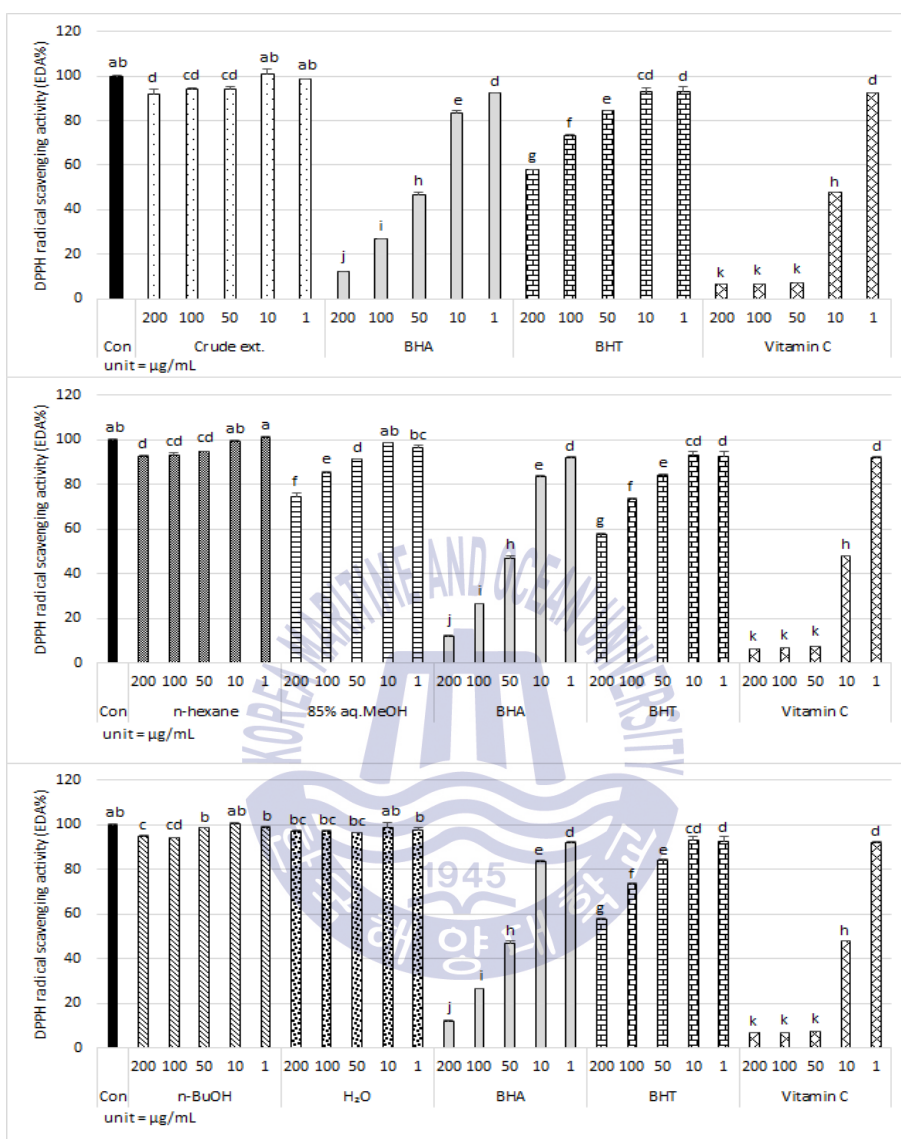


Figure 7. DPPH radical scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus*. ^{a-k} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.2.2. Peroxynitrite 소거 활성

Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하였고, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)와 penicillamine을 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Authentic peroxynitrite를 소거하는 경우에, crude extract와 *n*-hexane 분획층, 85% aq.MeOH 분획층에서 뛰어난 활성을 보였다. *n*-Hexane 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도와 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 98.6%, 96.1%의 peroxynitrite 소거능을 보였으며, 85% aq.MeOH 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도와 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 99.5%, 97.1%의 peroxynitrite 소거능을 보였다. 그리고 *n*-BuOH 분획층도 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 83.1%의 소거능을 보였으며 농도 의존적인 소거능을 보여주었다. 특히 *n*-hexane 분획층과 85% aq.MeOH 분획층은 대조군인 vitamin C와 penicillamine의 peroxynitrite 소거능과 비교할 만한 활성을 가진 것으로 볼 수 있다 (Figure 8).

SIN-1에서 유도된 peroxynitrite의 경우에는, 모든 분획층들이 뛰어난 활성을 보였으며 특히 crude extract와 *n*-hexane 분획층, 85% aq.MeOH 분획층에서 뛰어난 활성을 보였다. *n*-Hexane 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 100%, 99.4%, 96.5%의 peroxynitrite 소거능을 보였으며, 85% aq.MeOH 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도와 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 100%, 98.7%의 peroxynitrite 소거능을 보였다. 그리고 *n*-BuOH 분획층도 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 91.2%의 소거능을 보였으며 마찬가지로 농도 의존적인 소거능을 보여주었다. 특히 *n*-hexane 분획층과 85% aq.MeOH 분획층은 대조군인 vitamin C와 penicillamine의 peroxynitrite 소거능과 비교할 만한 활성을 가진 것으로 볼 수 있다(Figure 9).

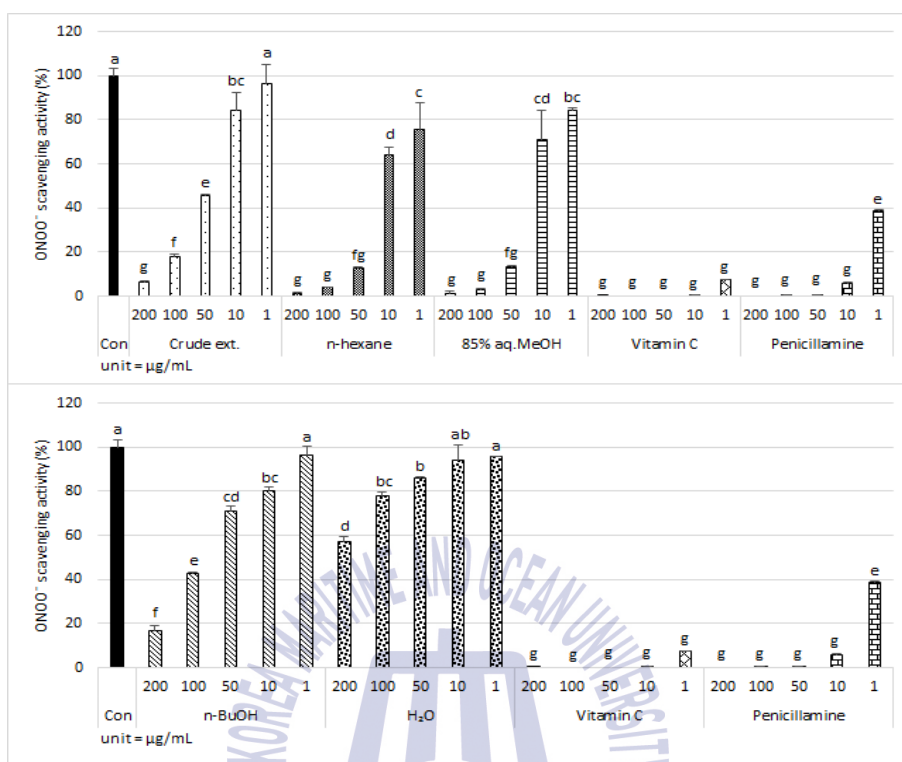


Figure 8. Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on authentic ONOO^- (% of control). ^{a-g} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

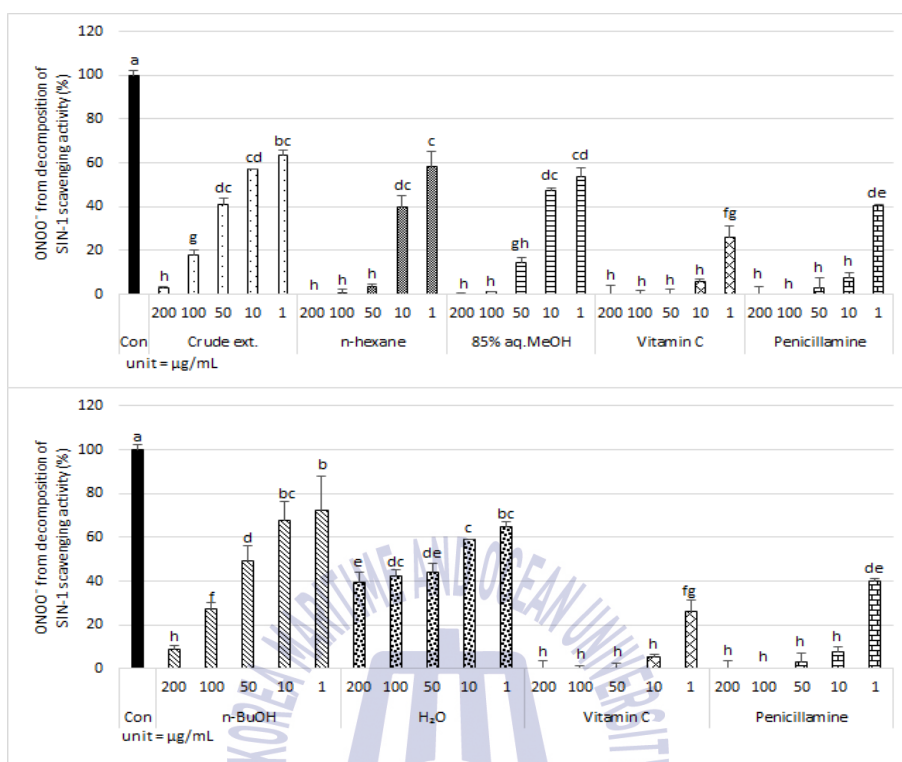


Figure 9. Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on ONOO⁻ from SIN-1 (% of control). ^{a-h} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.2.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정

항산화 활성과 환원력은 밀접한 관계가 있으며, 환원력 측정 실험에서는 crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 μ g/mL 농도로 희석하였고, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Crude extract와 네 개의 분획층들 모두에서 농도가 높을수록 강한 환원력을 나타내었으며, 그 중 85% aq.MeOH 분획층에서 가장 높은 환원력을 나타내었다(**Figure 10**).



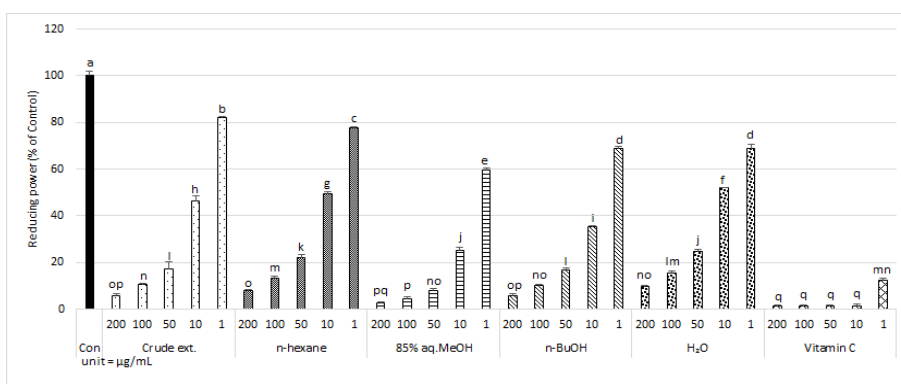


Figure 10. Ferric reducing antioxidant power of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* (% of control). ^{a-q} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.2.4. 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성

3.2.4.1. HT-1080 세포 생존율 측정

세포 수준에서의 활성을 실험하기 전에 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 얻은 crude extract와 네 개의 용매 분획층들이 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였으며, crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

각각 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 *n*-hexane 분획층은 78.6%, 88.2%, 89.2%, 91.1%, 94.4%, 85% aq.MeOH 분획층은 26.8%, 71.2%, 78.8%, 87.5%, 92.7%, H₂O 분획층은 71.1%, 85.9%, 91.6%, 92.3%, 97.9%의 세포 생존율을 보였다. 그 외에 crude extract와 *n*-BuOH 분획층은 모든 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 보였다. MTT assay를 통한 세포 생존율 측정 결과를 바탕으로 crude extract와 *n*-hexane 분획층, *n*-BuOH 분획층은 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서, 85% aq.MeOH 분획층은 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서, H₂O 분획층은 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포 활성 실험을 실시하였다(Figure 11).

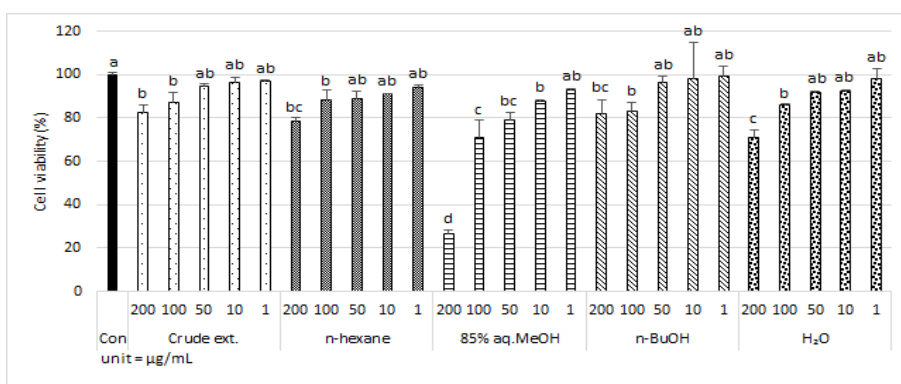


Figure 11. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of HT-1080 cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.2.4.2 세포내 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 소거 활성

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질인 DCF를 만들어내는 DCFH-DA를 사용하여 세포 내에 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였다. Crude extract와 *n*-hexane 분획층, *n*-BuOH 분획층은 200, 100, 50, 10, 1 μ g/mL 농도, 85% aq.MeOH 분획층은 50, 10, 1 μ g/mL 농도, H₂O 분획층은 100, 50, 10, 1 μ g/mL 농도로 희석하여 실험에 사용하였고, 각 농도별 시료에 500 μ M H₂O₂를 처리한 후 0分から 120분까지 30분 간격으로 활성을 측정하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 500 μ M H₂O₂로 처리한 control과 시료와 H₂O₂를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다.

대조군으로 사용한 control은 시간이 경과함에 따라 DCF fluorescence 값이 증가하였으며 blank는 DCF fluorescence 값의 변화가 크지 않았다.

Crude extract와 네 개의 용매 분획층들은 대조군과 비교하였을 때 control보다는 blank와 더 가까운 DCF fluorescence 값을 나타내어 세포내에 생성된 ROS를 유의적으로 소거하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 12-14).

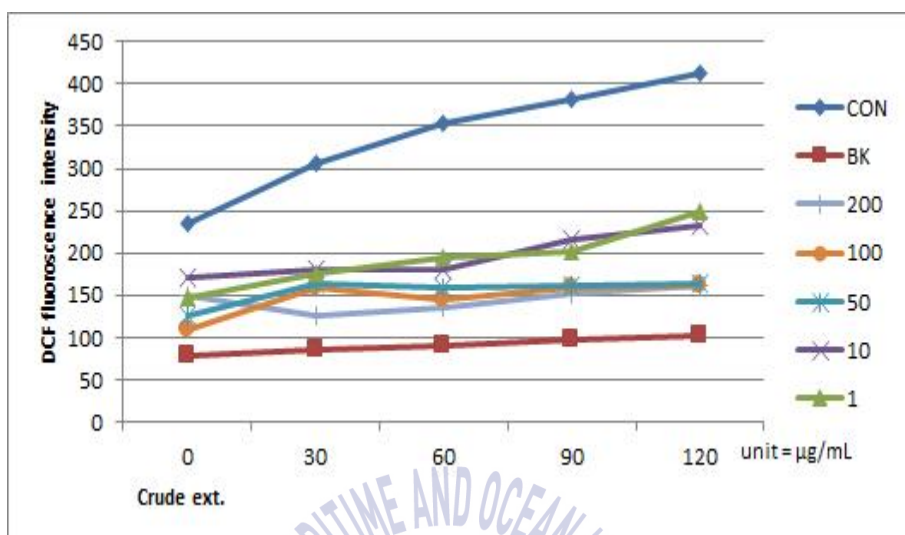


Figure 12. Effects of crude extract from the sponge *Hyrtios erectus* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

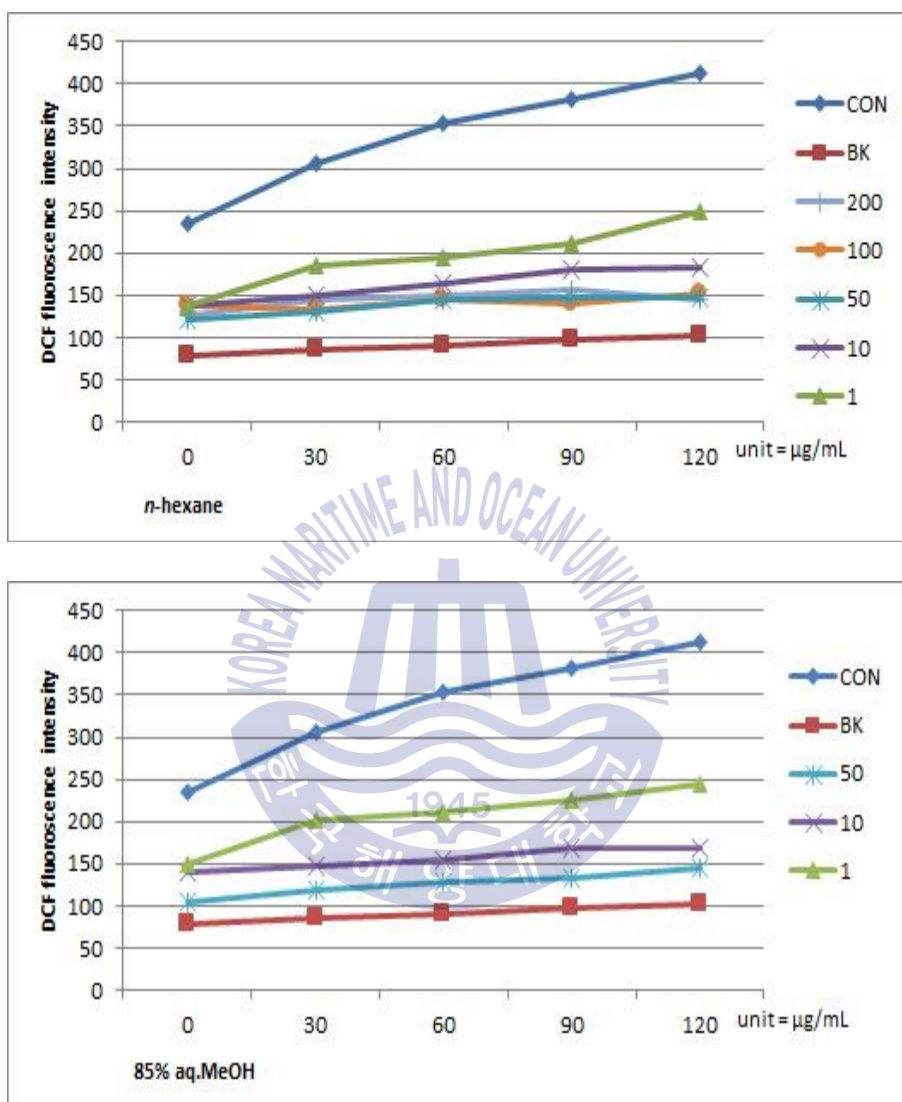


Figure 13. Effects of *n*-hexane and 85% aq.MeOH fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

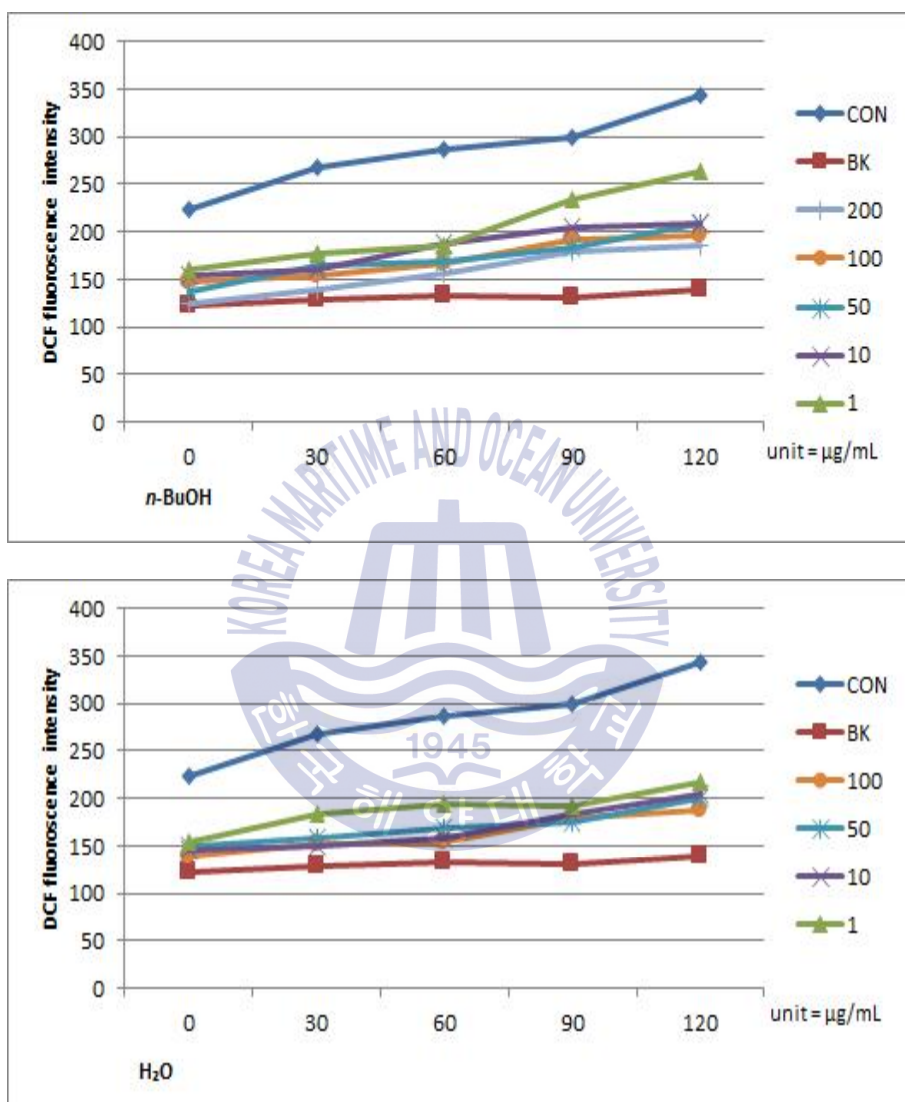


Figure 14. Effects of *n*-BuOH and H₂O fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

3.3. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과

3.3.1. Raw 264.7 세포 생존율 측정

세포 수준에서의 활성을 실험하기 전에 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 얻은 crude extract와 네 개의 용매 분획층들이 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였으며, crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

각각 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 crude extract 분획층은 68.8%, *n*-hexane 분획층은 48.2%, 85% aq.MeOH 분획층은 72.6%, *n*-BuOH 분획층은 73.6%, H_2O 분획층은 73.7%의 세포 생존율을 보여주었으며, *n*-hexane 분획층과 *n*-BuOH 분획층은 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 64.3%, 75.6%와 77.0%, 78.2%의 세포 생존율을 보여주었다. 그리고 그 외 분획층들의 모든 농도에서 80% 이상의 세포 생존율을 보였다. MTT assay를 통한 세포 생존율 측정 결과를 바탕으로 *n*-hexane 분획층은 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서, 그 외의 분획층들은 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포 활성 실험을 실시하였다(Figure 15).

3.3.2. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과

해면동물 *Hyrtios erectus*의 항염증 효과를 알아보기 위해 염증 유발 인자인 NO 생성 억제율을 측정해보았다. *n*-Hexane 분획층은 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로, 그 외의 분획층들은 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였고 각 농도별 시료에 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS를 처리하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS를 처리한 control과 시료와 LPS를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다.

Blank의 NO 함량인 46.8%와 비교하면 crude extract, 85% aq.MeOH 분획층, *n*-BuOH 분획층과 H_2O 분획층은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 59.6%, 59.7%, 61.3%, 58.0%의 NO 함량을 보여주었다. 그리고 *n*-hexane 분획층은 더 낮은 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 51.9%의 blank와 비교할만한 NO 함량을 보여주었다(Figure 16).

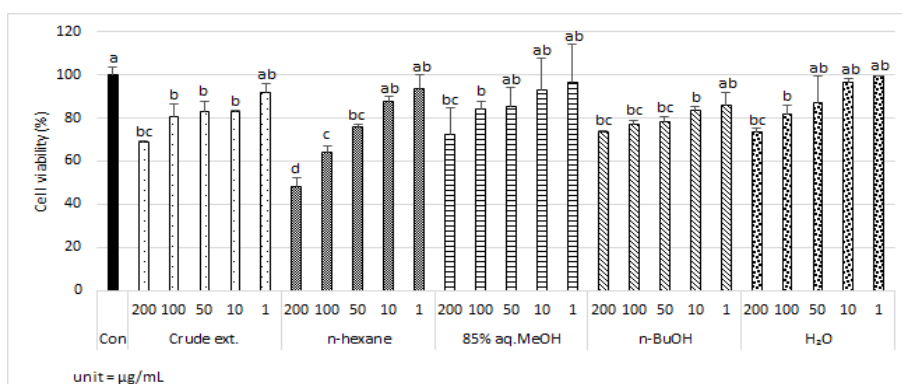


Figure 15. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of Raw 264.7 cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

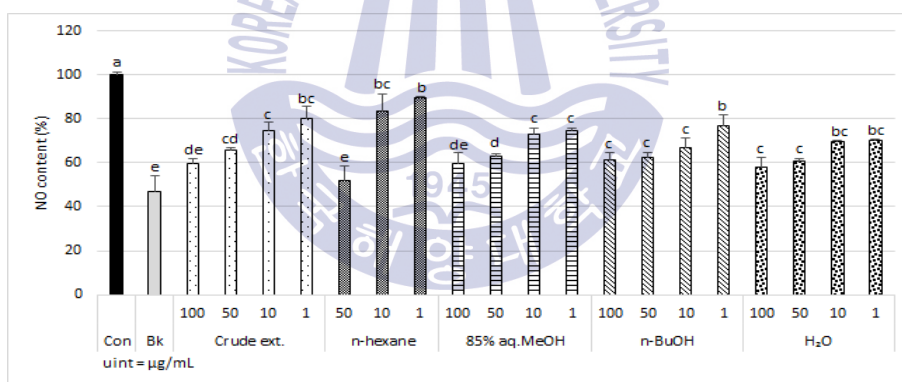


Figure 16. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on nitrite production in Raw 264.7 cells. ^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.4. 인체 유래 암세포 증식 억제 효과

3.4.1. HT-1080 세포 증식 억제 효과

인체 섬유 육종 세포인 HT-1080 세포에 대한 crude extract와 네 개의 용매 분획층들의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Crude extract와 네 개의 용매 분획층들은 모두 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. Crude extract와 *n*-hexane 분획층, *n*-BuOH 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 76.3%, 83.2%, 52.1%로 모두 50%가 넘는 세포 증식 억제 효과를 보여주었고, H_2O 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 37.9%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 특히 85% aq.MeOH 분획층은 200, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 94.0%, 93.9%의 90%가 넘는 세포 증식 억제 효과를 보여주었으며, 다른 분획층보다 낮은 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 72.0%의 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(Figure 17).

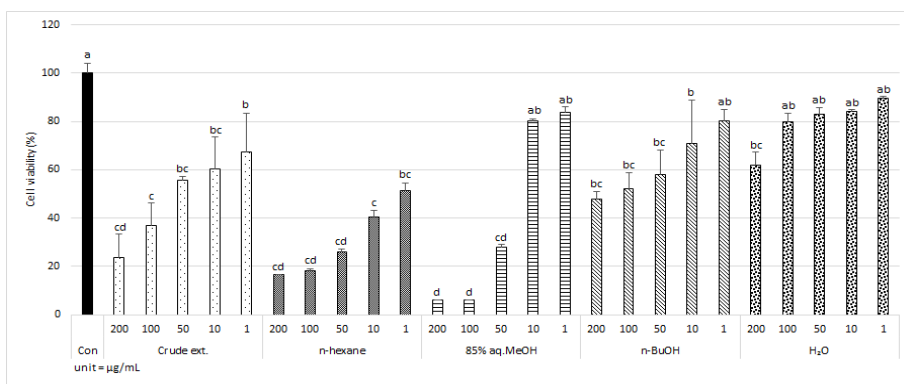


Figure 17. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of HT-1080 cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.4.2. HT-29 세포 증식 억제 효과

인체 결장암 세포인 HT-29 세포에 대한 crude extract와 네 개의 용매 분획층들의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

n-Hexane 분획층의 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 67.2%로 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 85% aq.MeOH 분획층은 200, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 89.8%, 89.6%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었으며, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 31.1%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 이는 같은 농도의 다른 분획층들에 비해 비교적 높은 세포 증식 억제 효과를 나타낸다(Figure 18).

3.4.3. AGS 세포 증식 억제 효과

인체 위암 세포인 AGS 세포에 대한 crude extract와 네 개의 용매 분획층들의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Crude extract와 네 개의 용매 분획층들은 비교적 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. Crude extract와 *n*-hexane 분획층, *n*-BuOH 분획층은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 65.3%, 87.1%, 62.2%로 모두 60%가 넘는 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 특히 85% aq.MeOH 분획층은 200, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 86.0%, 85.5%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 또한 다른 분획층보다 낮은 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서도 82.4%의 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(Figure 19).

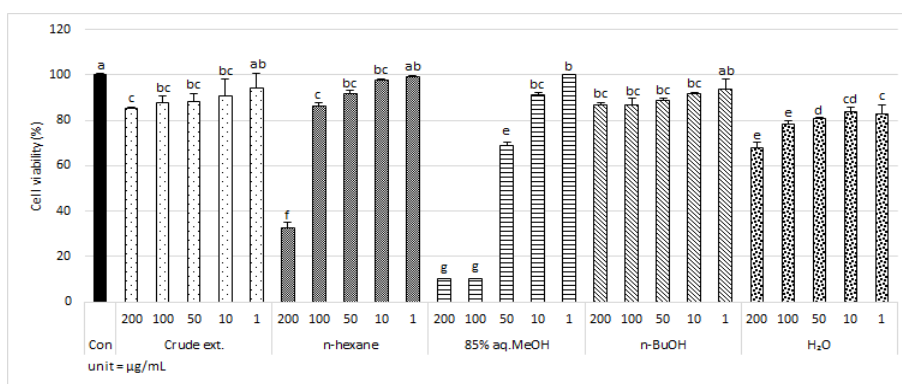


Figure 18. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of HT-29 cells. ^{a-g} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

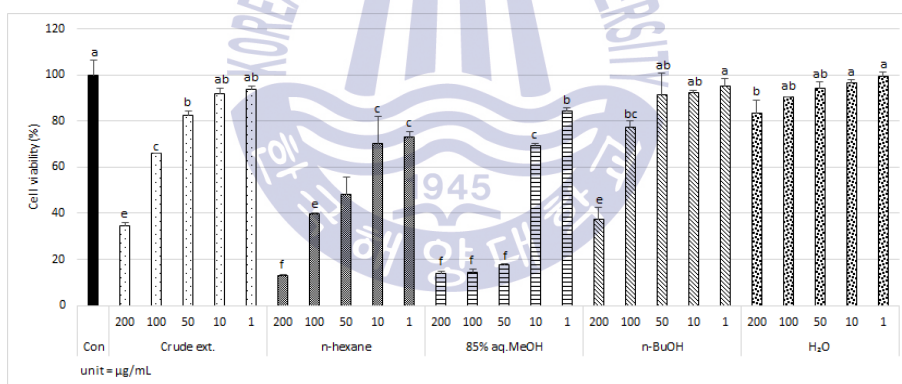


Figure 19. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of AGS cells. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.4.4. MCF-7 세포 증식 억제 효과

인체 유방암 세포인 MCF-7 세포에 대한 crude extract와 네 개의 용매 분획층들의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. Crude extract와 네 개의 용매 분획층들을 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

n-BuOH 분획층을 제외한 crude extract와 세 개의 용매 분획층들에서 유의적인 활성을 보여주었고, *n*-hexane 분획층은 200, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 58.5%, 56.3%로 50%를 넘는 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 또한 85% aq.MeOH 분획층도 200, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 86.0%, 82.1%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(Figure 20).



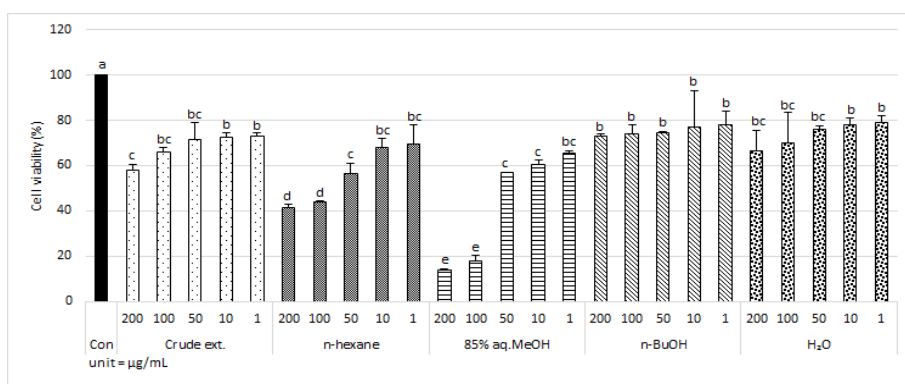


Figure 20. Effects of crude extract and its solvent fractions from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of MCF-7 cells. ^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.5. 화합물들의 항산화 활성

3.5.1. DPPH radical 소거 활성

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리한 네 개의 화합물들을 100, 50, 10, 1 μ M 농도로 희석하였고, 대조군으로 BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene)와 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

대조군인 BHA, BHT는 100 μ M 농도에서 각각 22.4%, 7.6%의 DPPH radical 소거능을 보여주었다. 이와 비교하였을 때, **compound 4**는 100 μ M 농도에서 51.8%의 DPPH radical 소거능을 보여주어 대조군인 BHA와 BHT보다 더 높은 DPPH radical 소거능을 보여주었다(Figure 21).



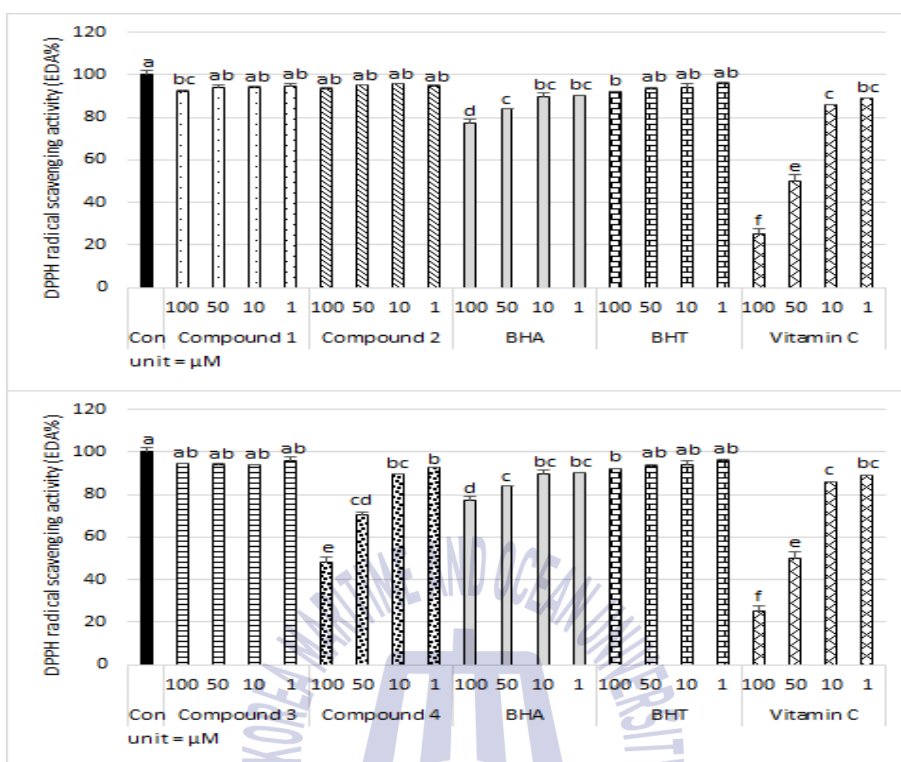


Figure 21. DPPH radical scavenging activity of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus*. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.5.2. Peroxynitrite 소거 활성

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리한 네 개의 화합물들을 50, 10, 1 μ M 농도로 희석하였고, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)와 penicillamine을 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Authentic peroxynitrite의 경우에는 **compound 4**가 50 μ M 농도에서 대조군인 penicillamine의 peroxynitrite 소거능(94.8%) 보다 더 높은 97.3%의 peroxynitrite 소거능을 보였다(**Figure 22**).

SIN-1에서 유래된 peroxynitrite에 대해서도, **compound 4**는 50 μ M 농도에서 대조군인 vitamin C와 penicillamine의 peroxynitrite 소거능과 비교할 만한 97.5%의 peroxynitrite 소거능을 나타내었다(**Figure 23**).



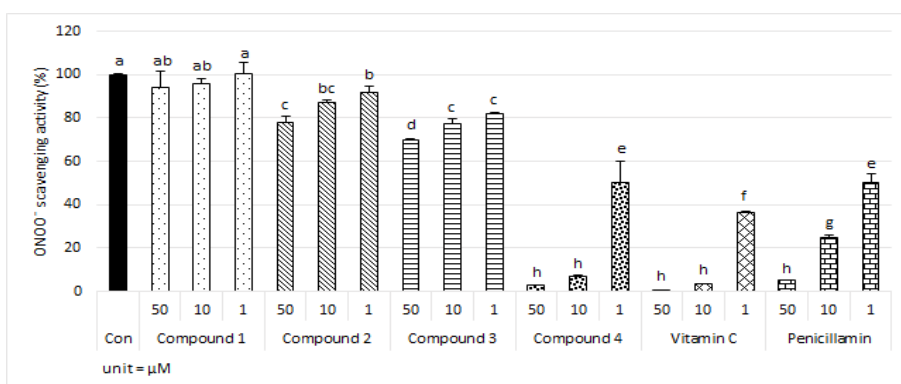


Figure 22. Scavenging activity of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on authentic ONOO⁻ (% of control). ^{a-h} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

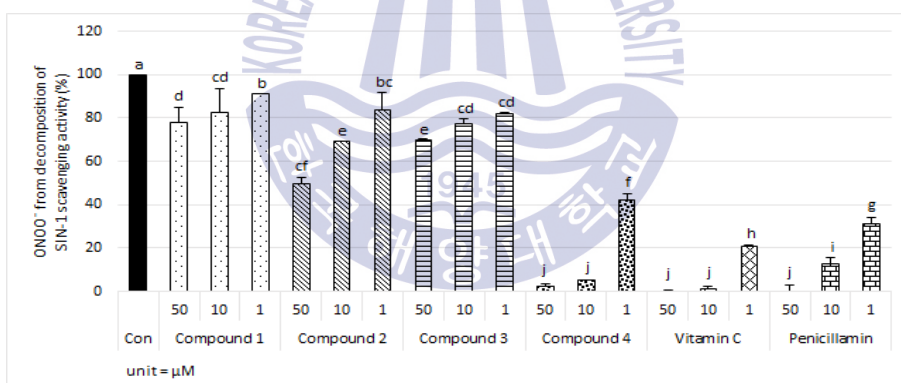


Figure 23. Scavenging activity of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on ONOO⁻ from SIN-1 (% of control). ^{a-j} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.5.3. 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정

항산화 활성과 환원력은 밀접한 관계가 있으며, 환원력 측정 실험에서는 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리한 네 개의 화합물들을 50, 10, 1 μ M 농도로 희석하였고, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

네 개의 화합물들 모두에서 농도가 높을수록 강한 환원력을 나타내었으며, 그 중 **compound 4**가 50, 10, 1 μ M 농도에서 control과 비교하였을 때 각각 94.1%, 84.3%, 58.3%의 환원력을 보여주었으며, 네 개의 화합물들 중 가장 높은 환원력을 나타내었다(**Figure 24**).



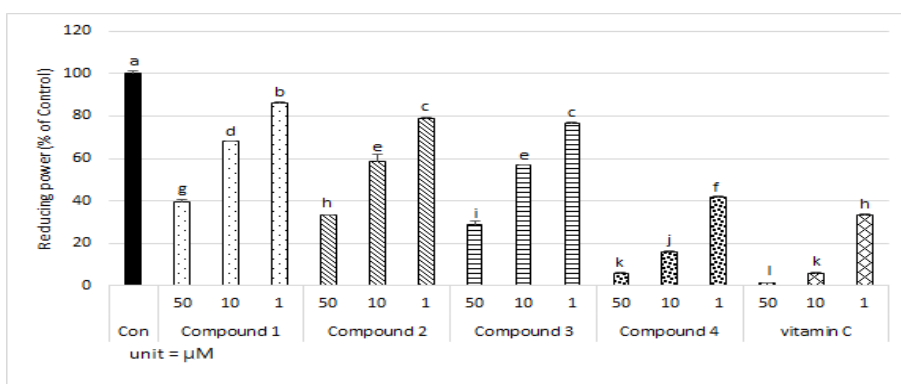


Figure 24. Ferric reducing antioxidant power of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* (% of control). ^{a-l} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.6. 화합물들의 NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과

3.6.1. Raw 264.7 세포 생존율 측정

세포 수준에서의 활성을 실험하기 전에 해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 얻은 네 개의 화합물들이 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였으며, 네 개의 화합물들을 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

각각 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 **compound 1**은 63.5%, 68.2%, 73.5%, **compound 2**는 64.6%, 82.1%, 96.5%, **compound 3**은 83.5%, 96.5%, 97.7% 그리고 **compound 4**는 64.8%, 78.1%, 79.6%의 세포 생존율을 보였다. MTT assay를 통한 세포 생존율 측정 결과를 바탕으로 농도를 10, 5, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 통일하여 실험에 사용하였다(Figure 25).

3.6.2. NO (Nitric oxide) 생성 억제 효과

해면동물 *Hyrtios erectus*로부터 분리한 네 개의 화합물들의 항염증 효과를 알아보기 위해 염증 유발 인자인 NO의 생성 억제율을 측정해보았다. 네 개의 화합물들을 10, 5, 1 μM 농도로 희석하여 실험에 사용하였고 각 농도별 시료에 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS를 처리하였다. 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS를 처리한 control과 시료와 LPS를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다.

Compound 2는 10 μM 농도에서 65.5%의 NO 함량을 보여주었는데 이는 Blank의 NO 함량인 59.7%와 유사한 값으로서 네 개의 화합물들 중에서 가장 좋은 억제 활성을 나타내었다(Figure 26).

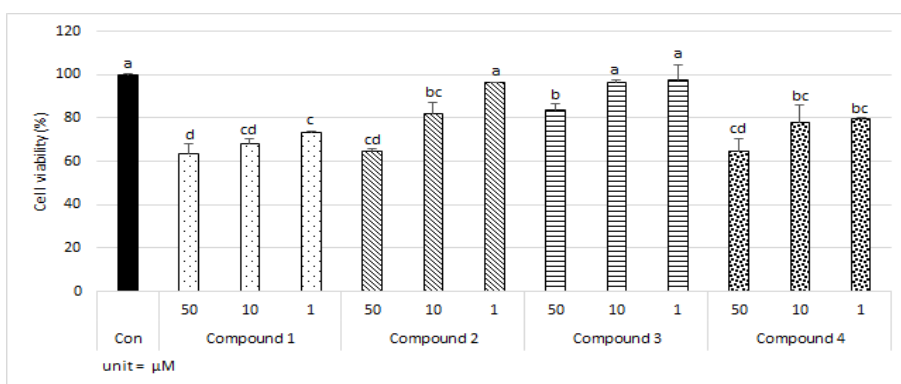


Figure 25. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of Raw 264.7 cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

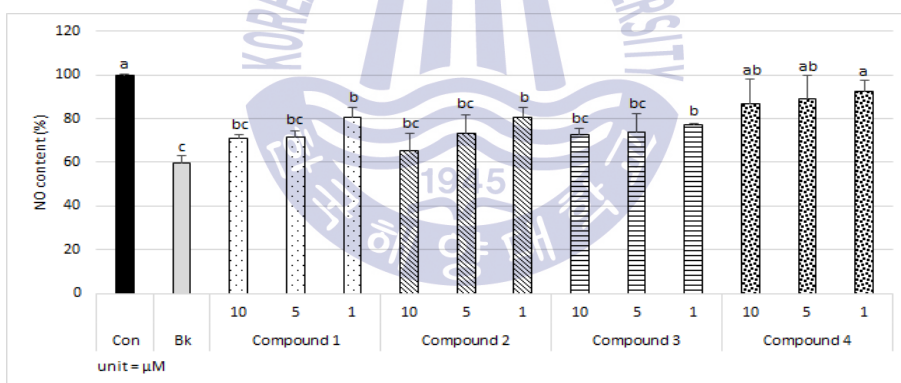


Figure 26. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on nitrite production in Raw 264.7 cells. ^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.7. 화합물들의 인체 유래 암세포 증식 억제 효과

3.7.1. HT-1080 세포 증식 억제 효과

인체 섬유 육종 세포인 HT-1080 세포에 대한 화합물 **1-4**의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였으며, 화합물 **1-4**를 10, 5, 1 μ M 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Compound 1은 10 μ M 농도에서 61.5%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었으며, **compound 2**와 **compound 3** 또한 10 μ M 농도에서 각각 48.2%, 45.0%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(**Figure 27**).

3.7.2. HT-29 세포 증식 억제 효과

인체 결장암 세포인 HT-29 세포에 대한 화합물 **1-4**의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였으며, 화합물 **1-4**를 10, 5, 1 μ M 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Compound 1은 10 μ M 농도에서 47.7%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었으며, **compound 2**와 **compound 4** 또한 10 μ M 농도에서 각각 42.2%, 44.9%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(**Figure 28**).

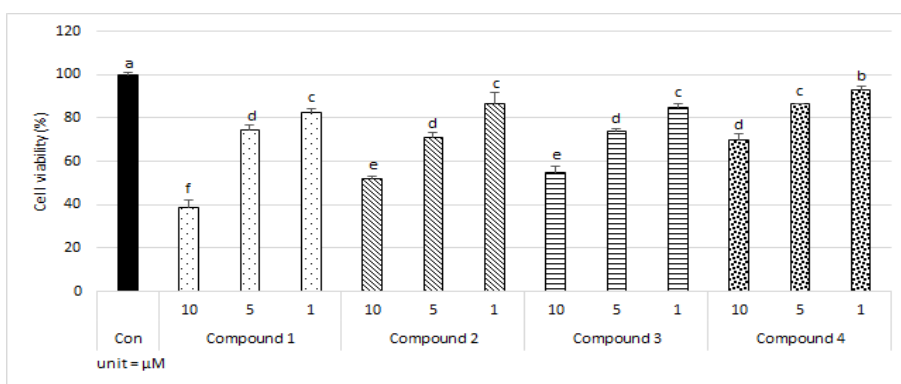


Figure 27. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of HT-1080 cells. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

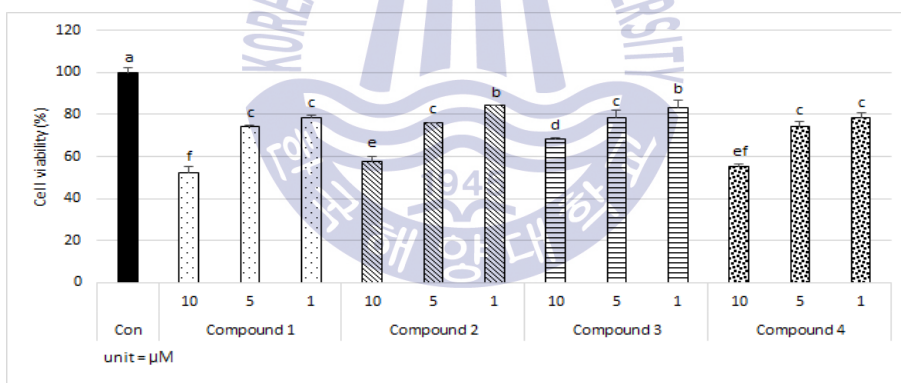


Figure 28. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of HT-29 cells. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.7.3. AGS 세포 증식 억제 효과

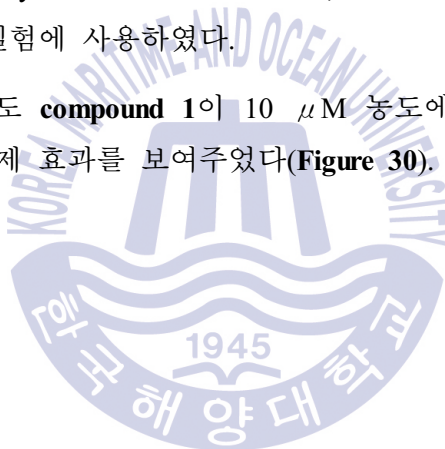
인체 위암 세포인 AGS 세포에 대한 화합물 **1-4**의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였으며, 화합물 **1-4**를 10, 5, 1 μM 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Compound 1과 **compound 4**는 10 μM 농도에서 각각 36.6%, 34.6%의 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(**Figure 29**).

3.7.4. MCF-7 세포 증식 억제 효과

인체 유방암 세포인 MCF-7 세포에 대한 화합물 **1-4**의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였으며, 화합물 **1-4**를 10, 5, 1 μM 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

MCF-7 세포에서도 **compound 1**이 10 μM 농도에서 48.0%의 비교적 높은 세포 증식 억제 효과를 보여주었다(**Figure 30**).



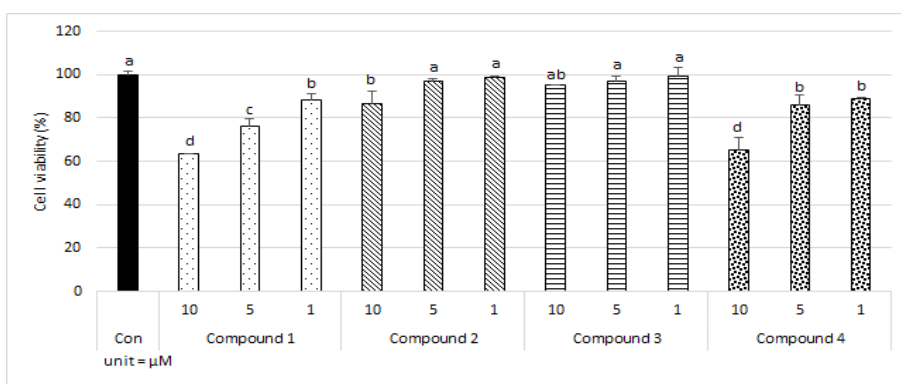


Figure 29. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of AGS cells. ^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

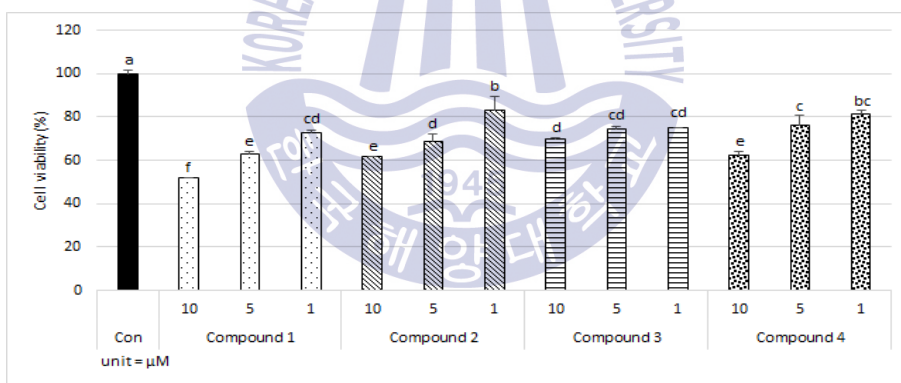


Figure 30. Effects of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus* on viability of MCF-7 cells. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

4. 요약 및 결론

해면동물 *Hyrtios erectus*를 유기용매로 추출하여 조추출물(crude extract)을 얻은 후에 이 조추출물은 다시 네 개의 용매 분획층(*n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O)으로 분획하였으며 이들에 대한 항산화, 항염증 및 인체 암세포 증식억제 효과를 탐색하였다.

DPPH radical에 대해서는 모든 시료들이 유의적인 효과를 보여 주지 못하였으며 authentic peroxyinitrite와 SIN-1에서 유도된 peroxyinitrite에 대해서는 200 μ g/mL의 농도에서 *n*-hexane 분획층과 85% aq.MeOH 분획층이 대조군인 vitamin C와 penicillamine과 비교할 만한 활성을 보여주었다. 환원력 측정 실험에서는 모든 시료들이 좋은 활성을 나타내었으나 특히 85% aq.MeOH 분획층이 가장 뛰어난 환원력을 나타내었다. HT-1080 세포내에 생성되는 활성산소종(ROS)에 대한 소거능을 측정하기 위하여 먼저 시료에 대한 HT-1080 세포의 생존율을 측정하였으며, 실험 결과에 따라 시료농도를 조절하여 조추출물, *n*-hexane 및 *n*-BuOH 분획층들은 200, 100, 50, 10, 1 μ g/mL의 농도에서, 85% aq.MeOH 분획층은 50, 10, 1 μ g/mL 그리고 H₂O 분획층은 100, 50, 10, 1 μ g/mL 농도에서 세포내 ROS 소거능을 측정하였다. 조추출물을 포함한 모든 시료들이 좋은 소거능을 보여주었다. LPS로 처리한 Raw 264.7 세포에서 생성되는 NO에 대한 억제효과에 대한 검색에서도 조추출물과 네 개의 용매 분획층들이 모두 유의적인 NO 생성 억제 효과를 보여주었으며, 그 중에서 *n*-hexane 분획층은 50 μ g/mL의 농도에서도 blank와 비교 할 만한 NO 생성 억제 효과를 보여주었다.

인체 유래 암세포 증식 억제 활성 검색에서는 모든 시료들이 HT-1080 세포와 AGS 세포에 대해 농도의존적인 증식 억제 활성을 보여 주었으나 특히 *n*-hexane과 85% aq.MeOH 분획층이 뛰어난 억제 활성을 보여주었다. HT-29와 MCF-7 암세포에 대해서도 HT-1080과 AGS 암세포보다는 못하지만 *n*-hexane과 85% aq.MeOH 분획층이 비교적 뛰어난 억제 활성을 나타내었다.

조추출물과 용매 분획층들에 대한 생리활성 검색결과를 분석해 보면 *n*-hexane과 85% aq.MeOH 분획층에서 좋은 활성이 확인되었다. 따라서 이 두 분획층으로 물질분리를 시도하였으며 결과적으로 네 개의 화합물들 limaquinone (1), Smenotronic acid (2), Smenosponic acid (3), Pelorol (4)이 얻어 졌다.

분리된 네 개의 화합물들에 대해서도 항산화, 항염증, 암세포 증식 억제 활성을 탐색하였다. 항산화 활성검색에서는 **compound 4**가 DPPH radical과 peroxyxynitrite에 대해서 가장 뛰어난 활성을 나타내었다. 환원력 측정 실험에서는 모든 화합물들이 유의적인 활성을 나타내었으나 **compound 4**가 역시 가장 뛰어난 환원력을 보여주었다. NO 함량 측정에서도 네 개 화합물들 모두가 유의적인 억제 활성을 나타내었으며, 그 중에서 **compound 2**가 가장 좋은 효과를 나타내었다. 인체 유래 암세포에 대해서도 역시 네 개의 화합물들이 모두 유의적인 증식 억제 활성을 보여주었으며, **compound 1**이 네 개의 인체 유래 암세포 모두에서 우수한 증식 억제 활성을 나타내었다. 이러한 실험결과로부터 해면동물 *Hyrtios erectus*는 항산화, 항암 및 항염증의 소재로서 활용가능성이 있다는 것을 알 수 있다. 분리된 화합물들 중에서는 **compound 4**가 가장 좋은 항산화 효과를 보여 주었으며 **compound 1**이 가장 좋은 암세포 증식 억제 효과를 보여 주었다.

5. 참고문헌

- Beda N. and Nedospasov A., 2005. A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric oxide*, 13, pp.93-97.
- Blois M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 25, pp.1199-1200.
- Crispino A., Giulio A., Rosa de S. and Strazzullo G., 1989. A new bioactive derivative of avarol from the marine sponge *Dysidea avara*. *J. Nat. Prod.*, 52(3), pp.646-648.
- Du L. et al., 2008. Hyrtiosal, from the marine sponge *Hyrtios erectus*, inhibits HIV-1 integrase binding to viral DNA by a new inhibitor binding site. *ChemMedChem*, 3, pp.173-180.
- Goclik E., Konig G.M., Wright A.D. and Kaminsky R., 2000. Pelorol from the tropical marine sponge *Dactylospongia elegans*. *J. Nat. Prod.*, 63(8), pp.1150-1152.
- Iguchi K., Shimada Y. and Yamada Y., 1992. Hyrtiosal, a new sesterterpenoid with a novel carbon skeleton from the okinawan marine sponge *Hyrtios erectus*, *J. Org. Chem*, 57(2), pp.522-524.
- Kim D. and Jeong G., 2014. Antimicrobial and antioxidant activities of extracts of marine greenalgae *Enteromorpha intestinalis*. *KSBB Journal*, 29(2), pp.92-97.
- Kondracki M. and Guyot M., 1989. Biologically active quinone and hydroquinone sesquiterpenoids from the sponge *Smenospongia* sp.. *Tetrahedron*, 45(7), pp.1995-2004.
- Kondracki M. and Guyot M., 1999. A new sesquiterpene tetronic acid derivative from the marine sponge *Smenospongia* sp. *Tetrahedron Lett.*, 40, pp.3149-3150.

- Kooy N. W., Royall J. A., Ischiropoulos H. and Beckman J. S., 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biol. Med.*, 16, pp.149-156.
- Lee H. et al., 2009. 5-Hydroxyindol-type alkaloids, as *Candida albicans* isocitrate lyase inhibitors, from the tropical sponge *Hyrtios* sp.. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, pp.1051-1053.
- Lopez M.D., Quinoa E. and Riguea R., 1994. Dactyltronic acids from the sponge *Dactylospongia Elegans*, *J. Nat. Prod.*, 57(7), pp.992-996.
- Luibrand R.T., Erdman T.R., Vollmer J.J. and Scheuer P.J., 1979. Ilimaquinone, a sesquiterpenoid quinone from a marine sponge. *Tetrahedron*, 35, pp.609-612.
- Mohammad F. M., Jie L., Christopher F. and Wei Z., 2014. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Mar. Drugs*, 12, pp.4539-4577.
- Molinski T.F., Dalisay D.S., Lievens S.L. and Saludes J.P., 2009. Drug development from marine natural products. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 8, pp.69-85.
- Okimoto Y. et al., 2000. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.*, 474, pp.137-140.
- Qui, Y. et al., 2004. Sesterterpenoids from the marine sponge *Hyrtios erectus*. *Journal of Natural Products*, 67(5), pp.921-924.
- Rho J. et al., 2004. New sesterterpenes from the sponge *Smenospongia* sp.. *J. Nat. Prod.*, 67(10), pp.1748-1752.
- Rodriguez J. et al., 1992. The structure and stereochemistry of cytotoxic sesquiterpene quinones from *Dactylospongia Elegans*, *Tetrahedron*, 48(32), pp.6667-6680.

- Ryu G., Matsunaga S. and Fusetani N., 1996. Three new cytotoxic sesterterpenes from the marine sponge *Hyrtios* cf. *erectus*, *J. Nat. Prod.*, 59(5), pp.515-517.
- Sauleau P. et al., 2006. Hyrtiazepine, an azepino-indole-Type alkaloid from the red sea marine sponge *Hyrtios erectus*. *J. Nat. Prod.*, 69(12), pp.1676-1679.
- Seki K., Haga K. and Kaneko R., 1995. Phenols and a dioxotetrahydrodibenzofuran from seeds of *Iris pallasii*. *Phytochemistry*, 38, pp.965-973.
- Singh N. et al., 2006. A new alkylated benzoquinone from rhizomes of *Iris kumaonensis*. *Nat. Prod. Res.*, 20, pp.75-78.
- Sun T. et al., 2007. Hyrtiosal, a PTP1B Inhibitor from the marine sponge *Hyrtios erectus*, shows extensive cellular effects on PI3K/AKT activation, glucose transport, and TGF β /Smad2 signaling. *ChemBioChem*, 8, pp.187-193.
- Wu T., Wehmeyer R.M. and Rieke R.D., 1987. A revision of the absolute stereochemistry of ilimaquinone. *J. Org. Chem.*, 52, pp.5059-5060.
- Yang S. et al., 2003. A New sesterterpene, sch 599473, from a marine sponge, *Ircinia* sp.. *J. Antibiot.*, 56(9), pp.783-786.

부록

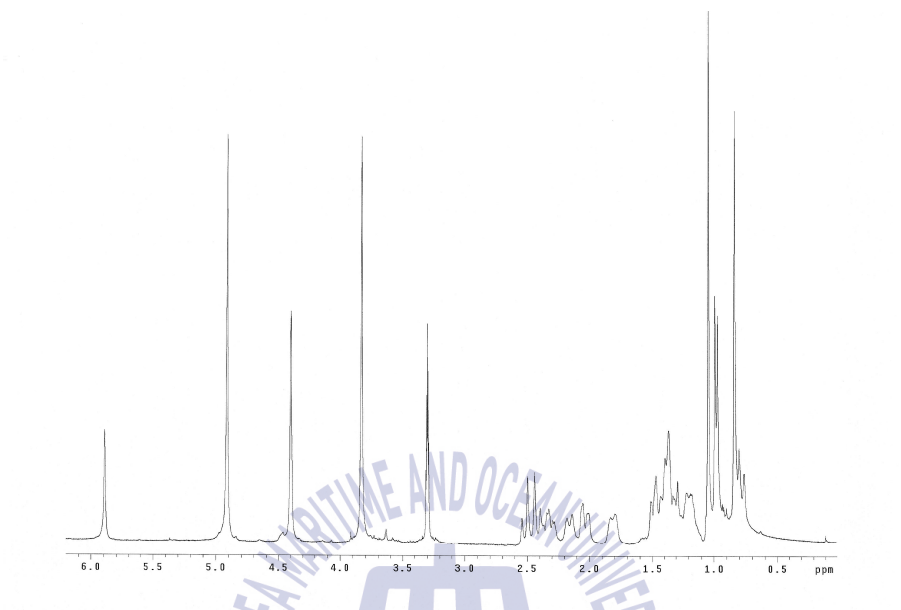


Figure 31. ^1H NMR spectrum of **compound 1** in CD_3OD .

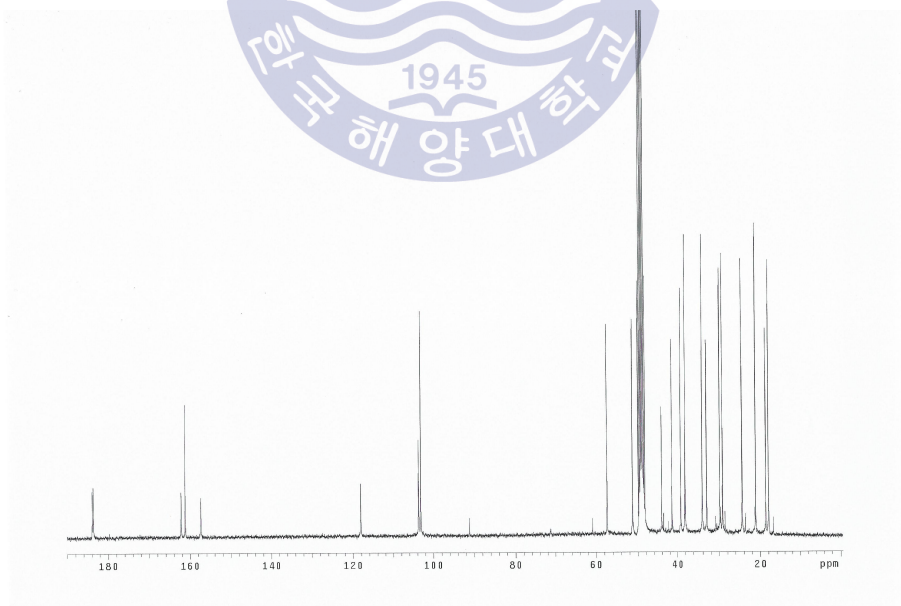


Figure 32. ^{13}C NMR spectrum of **compound 1** in CD_3OD .

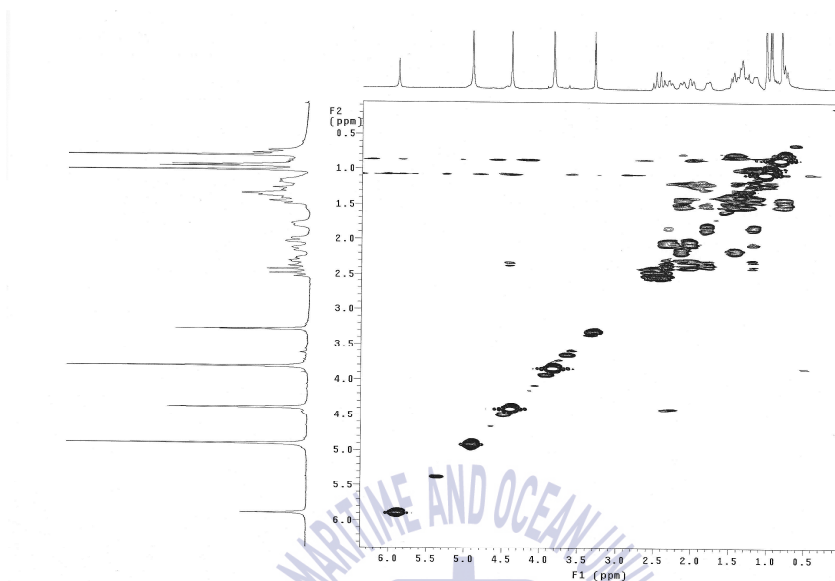


Figure 33. ^1H COSY spectrum of **compound 1** in CD_3OD .

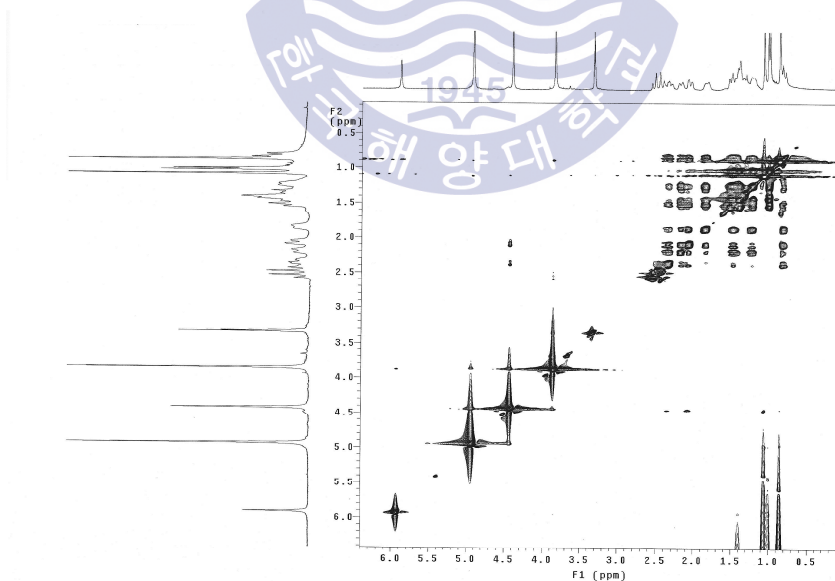


Figure 34. ^1H TOCSY spectrum of **compound 1** in CD_3OD .

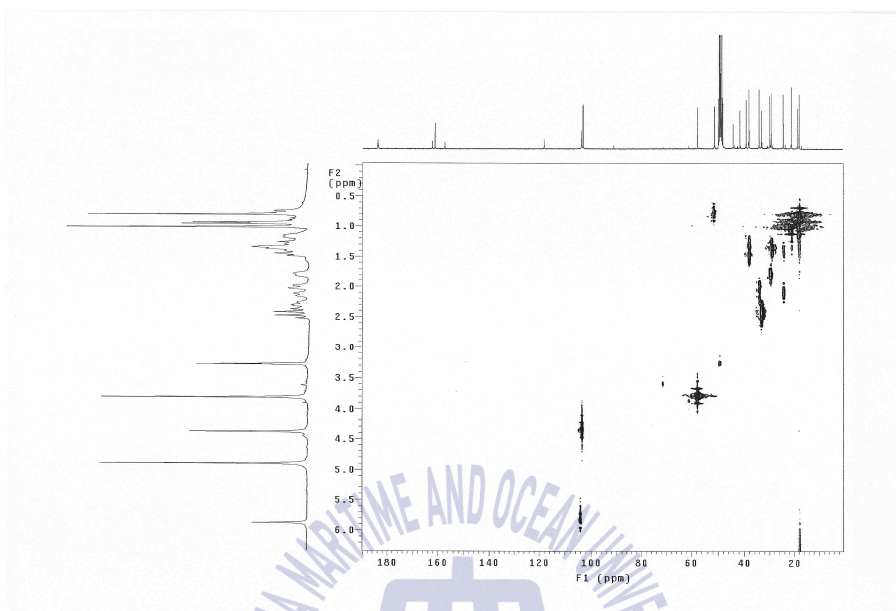


Figure 35. gHMQC spectrum of **compound 1** in CD₃OD.

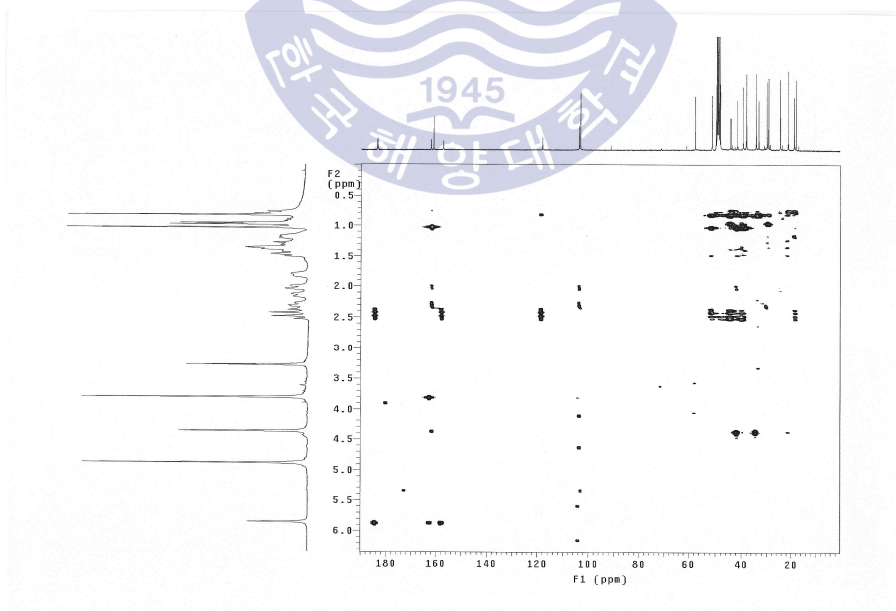


Figure 36. gHMBC spectrum of **compound 1** in CD₃OD.

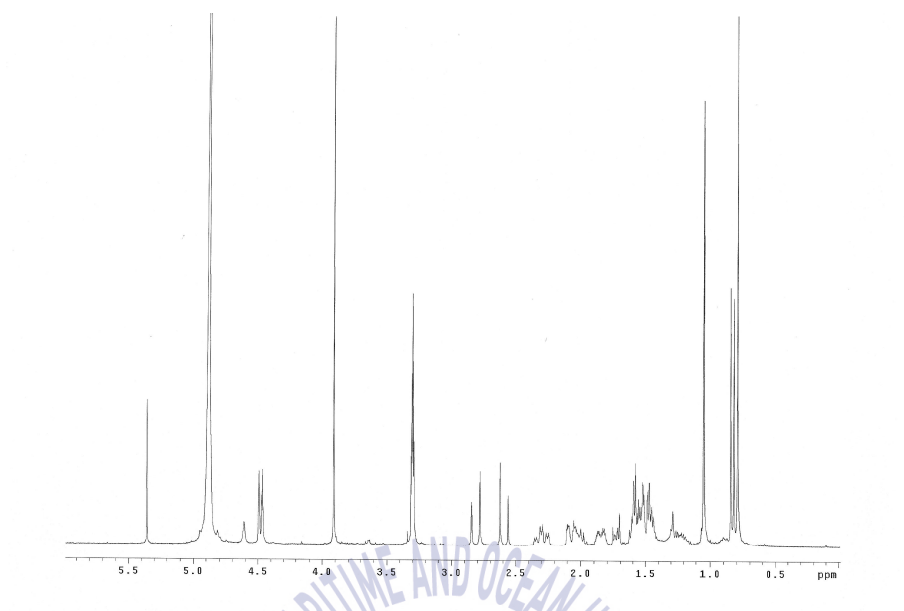


Figure 37. ^1H NMR spectrum of **compound 2** in CD_3OD .

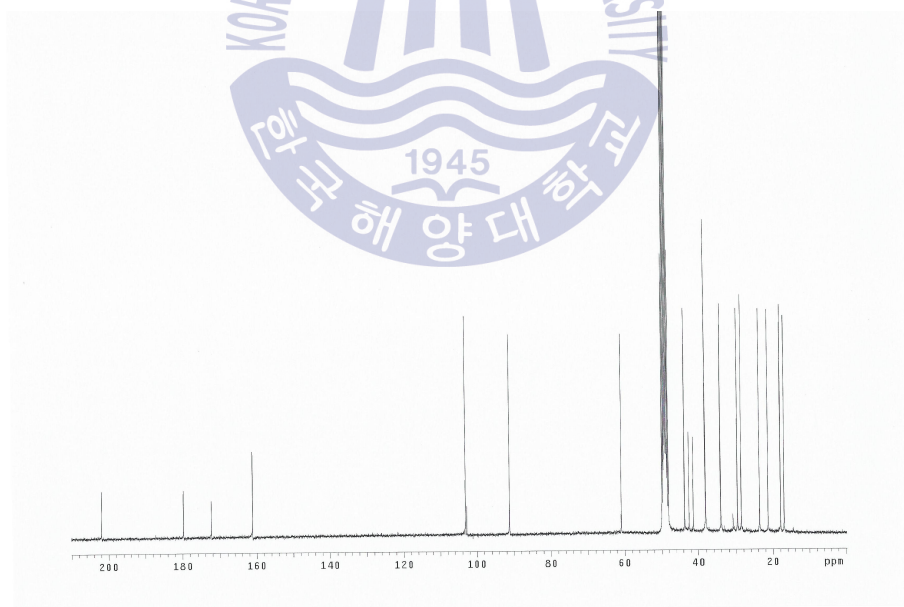


Figure 38. ^{13}C NMR spectrum of **compound 2** in CD_3OD .

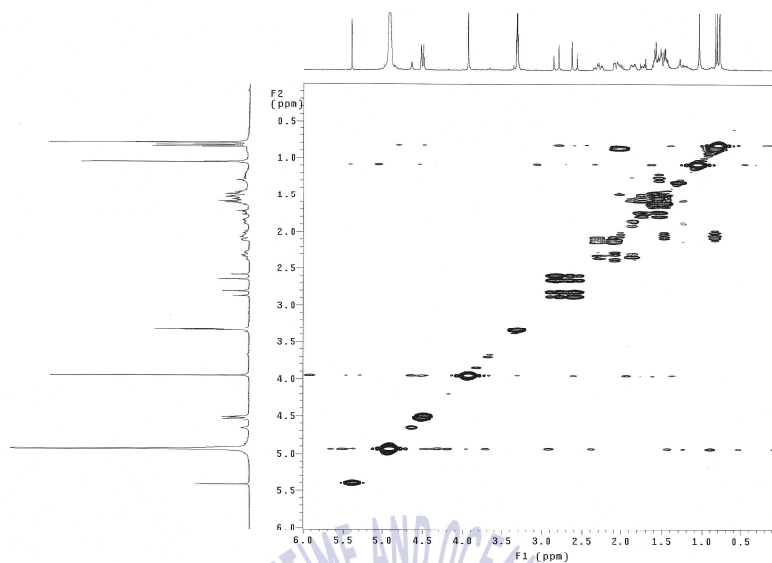


Figure 39. ^1H COSY spectrum of **compound 2** in CD_3OD .

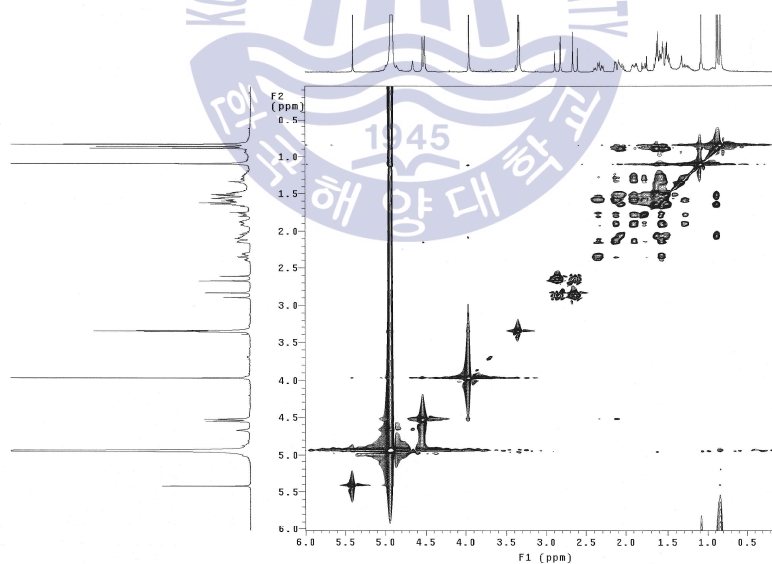


Figure 40. ^1H TOCSY spectrum of **compound 2** in CD_3OD .

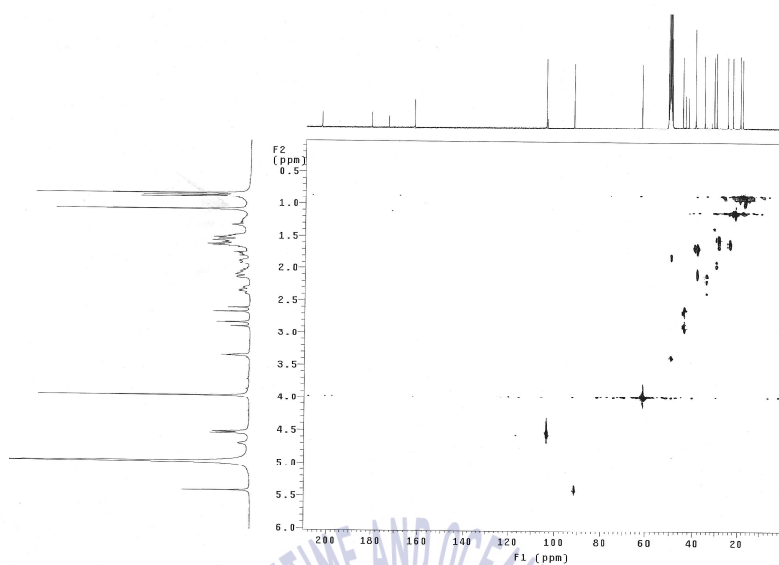


Figure 41. gHMBC spectrum of **compound 2** in CD₃OD.

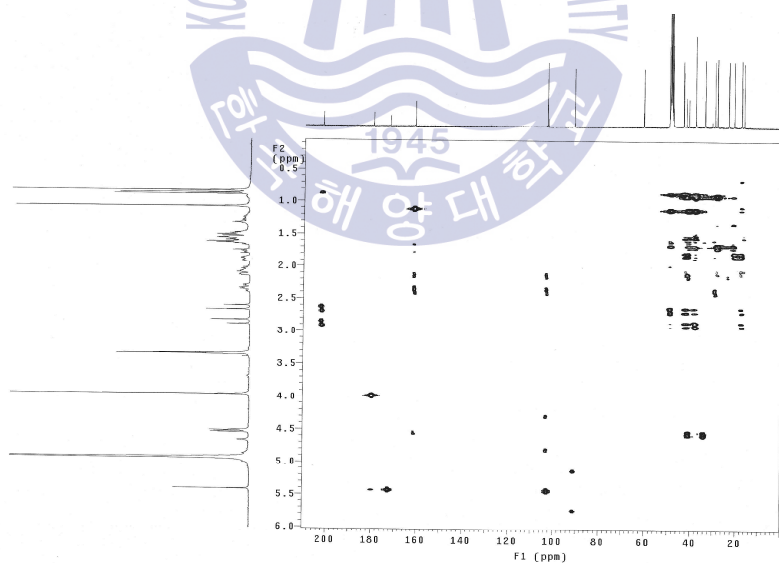


Figure 42. gHMBC spectrum of **compound 2** in CD₃OD.

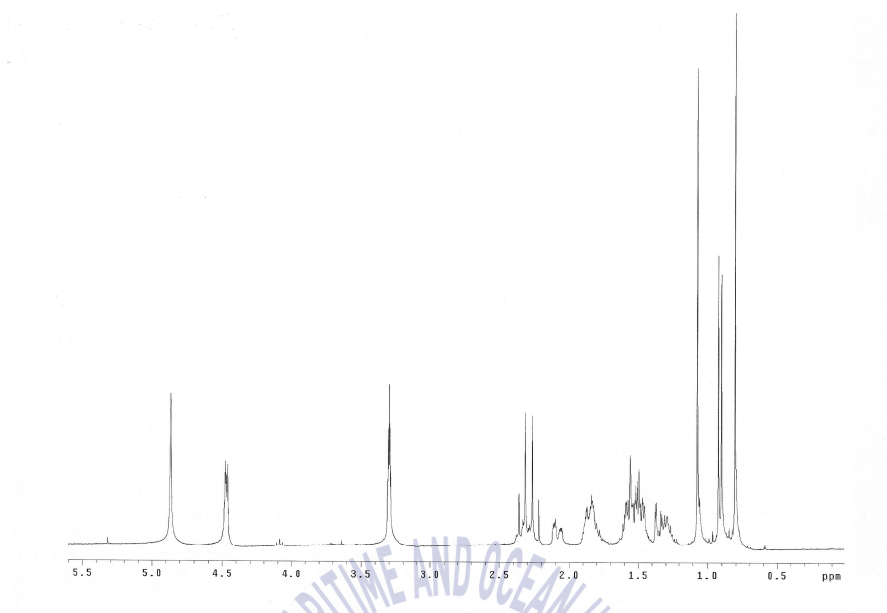


Figure 43. ^1H NMR spectrum of **compound 3** in CD_3OD .

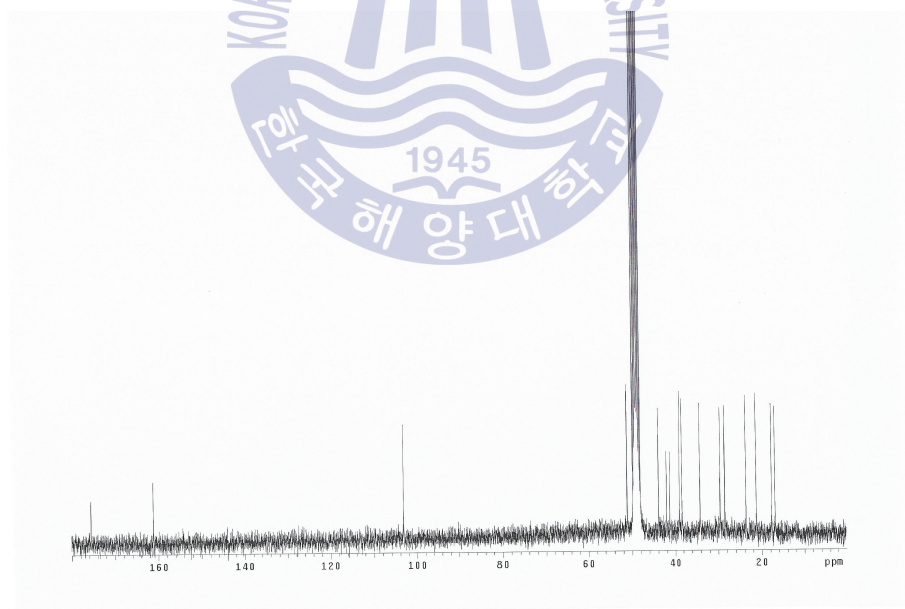


Figure 44. ^{13}C NMR spectrum of **compound 3** in CD_3OD .

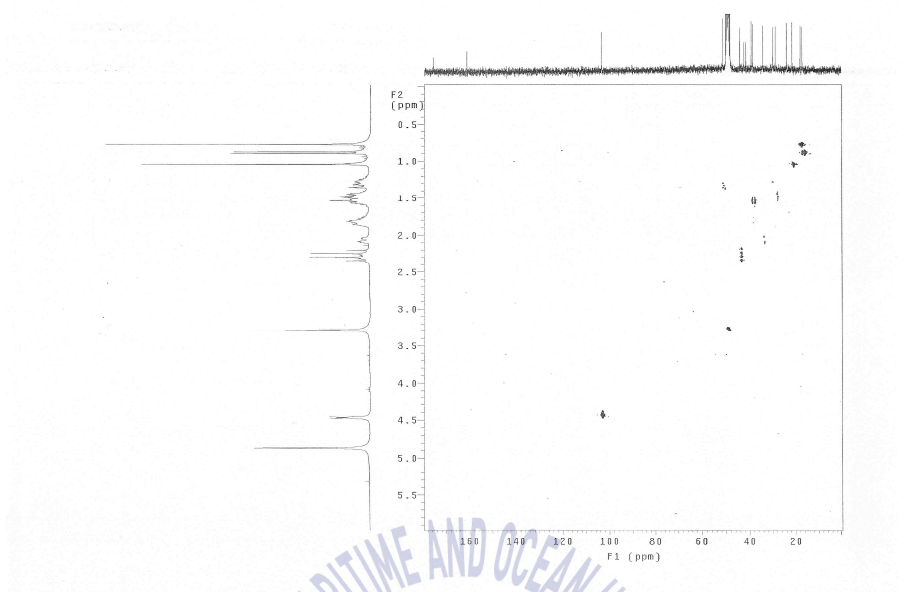


Figure 47. gHMQC spectrum of **compound 3** in CD_3OD .

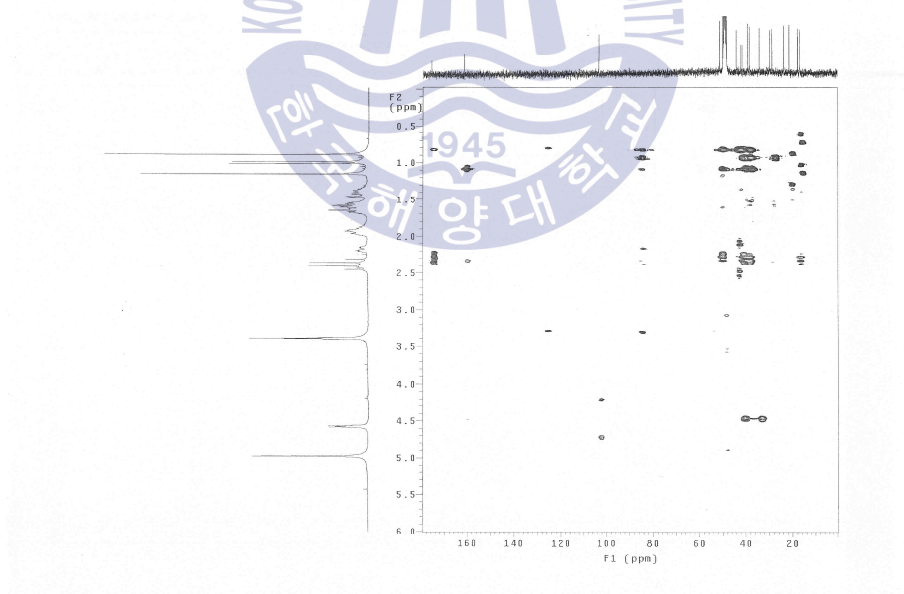


Figure 48. gHMBC spectrum of **compound 3** in CD_3OD .

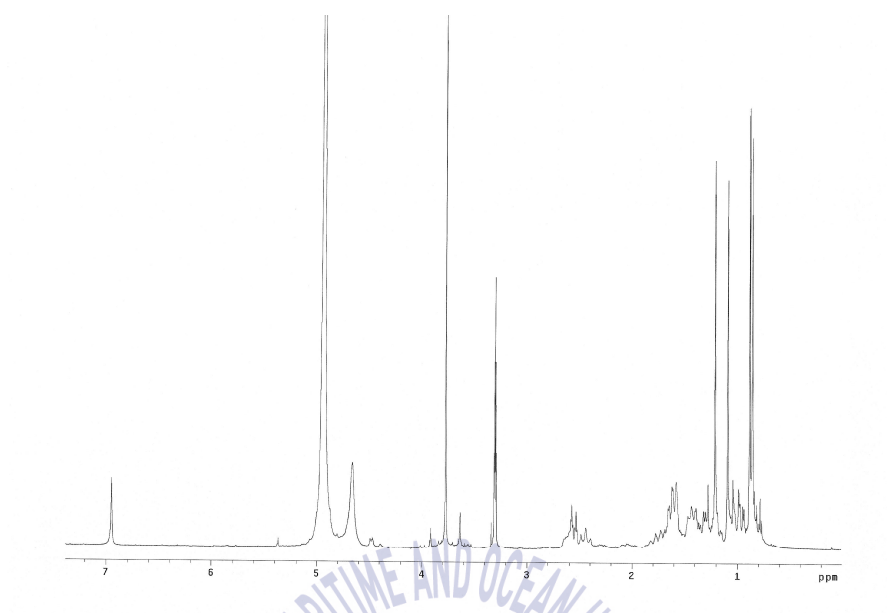


Figure 49. ^1H NMR spectrum of **compound 4** in CD_3OD .

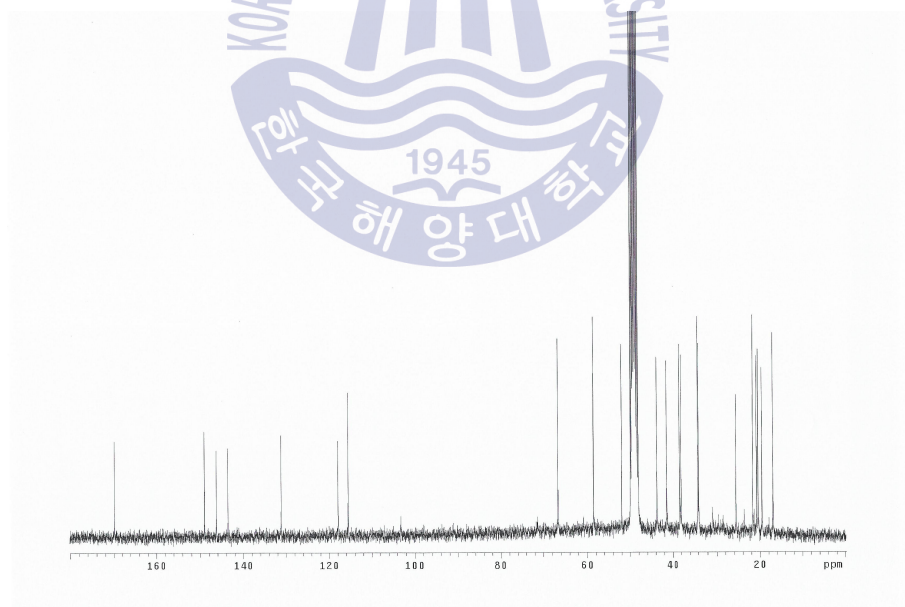


Figure 50. ^{13}C NMR spectrum of **compound 4** in CD_3OD .

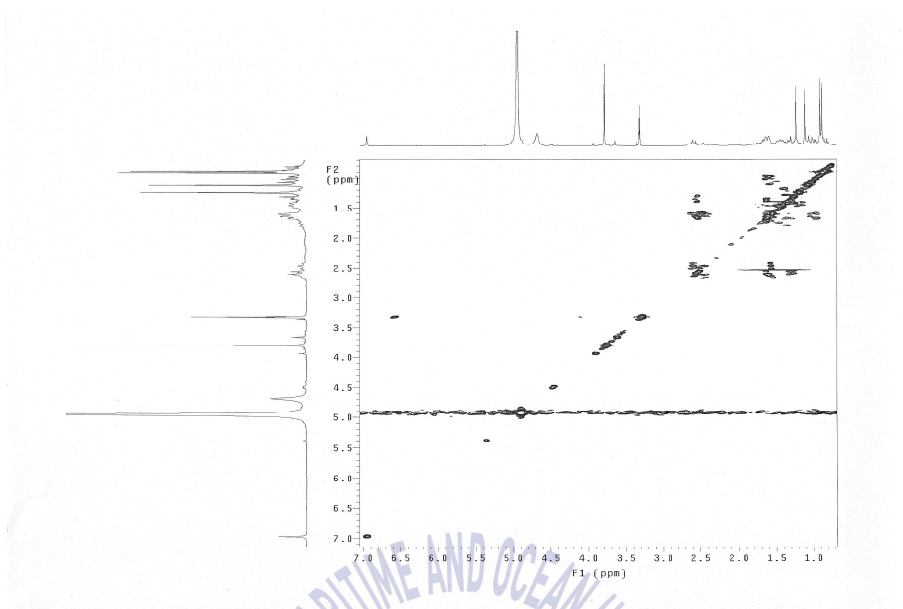


Figure 51. ^1H COSY spectrum of **compound 4** in CD_3OD .

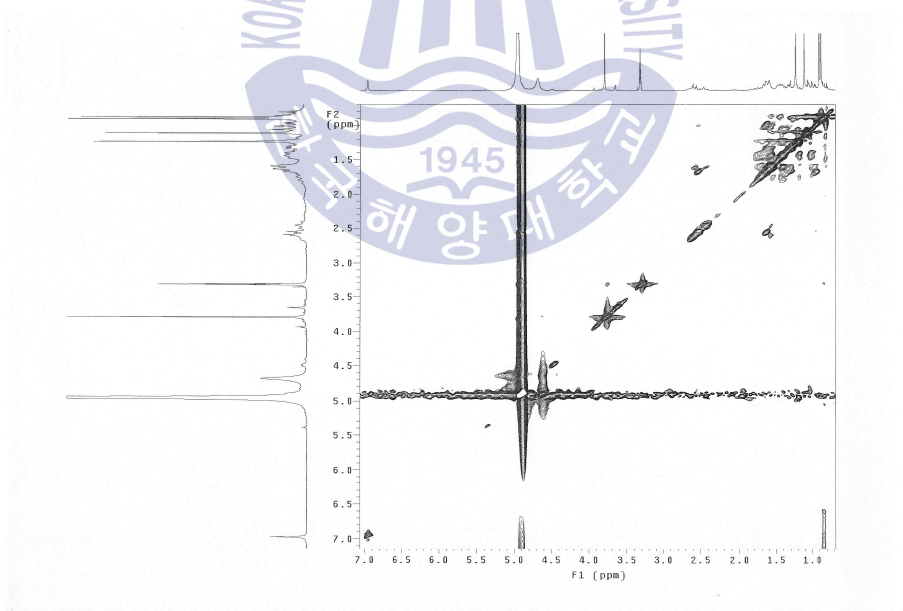


Figure 52. ^1H TOCSY spectrum of **compound 4** in CD_3OD .

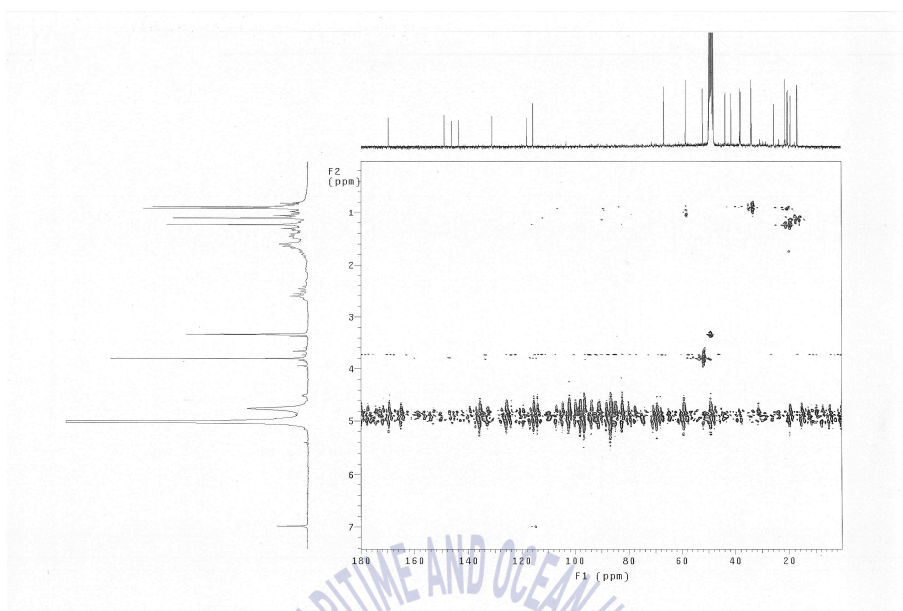


Figure 53. gHMQC spectrum of **compound 4** in CD_3OD .

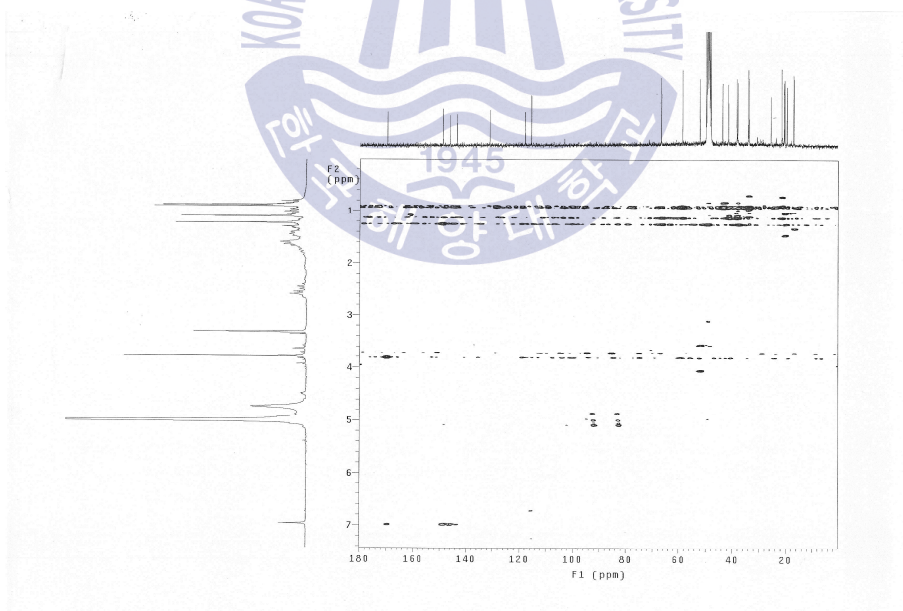
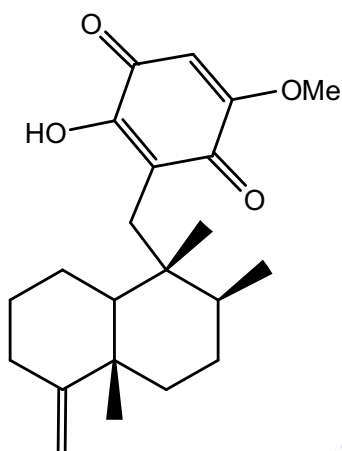
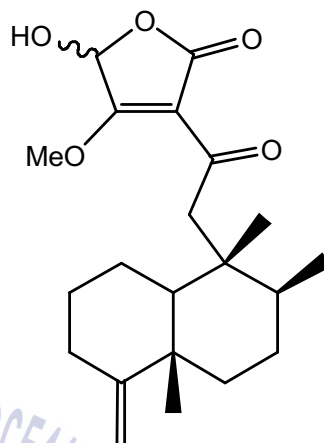


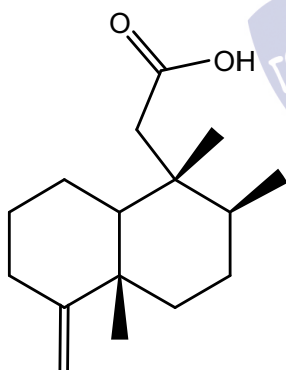
Figure 54. gHMBC spectrum of **compound 4** in CD_3OD .



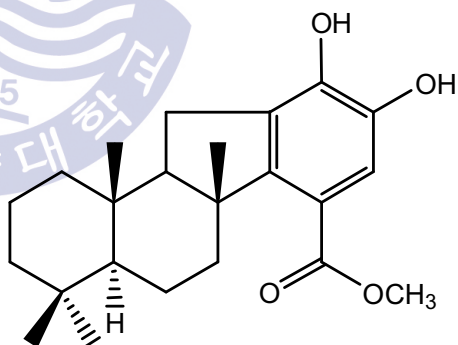
Compound 1



Compound 2



Compound 3



Compound 4

Figure 55. Chemical structure of **compounds 1-4** from the sponge *Hyrtios erectus*.

감사의 글

어느새 길게만 느껴졌던 2년간의 석사과정을 마치게 되었습니다. 부족한 저였지만 많은 분들의 도움이 있어 석사과정을 무사히 마칠 수 있었습니다.

먼저 부족한 저에게 많은 것을 가르쳐주시고 여러 가지를 지도해주신 서영완 교수님, 감사합니다. 교수님 덕분에 석사과정을 무사히 마칠 수 있었습니다. 다시 한번 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 석사 학위 논문 심사위원을 맡아주시고 더 나은 논문이 될 수 있도록 조언해주신 임선영 교수님과 박인석 교수님께도 감사의 말씀 전합니다.

그리고 제가 챙기지 못한 것들 놓치지 않도록 잘 챙겨주신 형주 언니께 감사드리고, 실험실에 처음 들어왔을 때부터 지금까지 저에게 실험을 비롯한 여러 가지를 가르쳐주고 도와준 호준이 오빠, 지금은 졸업하고 없지만 역시 많은 도움을 주었던 승오 오빠, 명국이 오빠, 다슬이 언니도 고맙습니다. 또 같이 실험실에 들어와 졸업할 때까지 같이 생활했던 희정이도 고맙습니다. 옆에서 많이 챙겨주고, 잘 모르는 것은 같이 고민할 수 있는 친구가 있어 많은 힘이 되었습니다. 그리고 실험실 생활하며 옆에서 많이 도와준 채민이 오빠, 준세, 민주와 식품 실험실의 재열이 오빠, 정우 오빠, 은이도 고맙습니다.

마지막으로 항상 같이 놀아주는 친구들, 그리고 지금의 저를 있게 한 사랑하는 우리 가족, 엄마와 언니도 감사합니다.

석사과정을 끝으로 사회로 나가게 되었습니다. 사회에서도 지금까지 배운 가르침들을 잊지 않고 열심히 하도록 하겠습니다. 모두 진심으로 감사드립니다.