



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

염생식물 *Atriplex gmelinii*로부터
생리활성 성분의 탐색

An exploratory study on bioactive constituents from
the halophyte *Atriplex gmelinii*

지도교수 서 영 완

2019년 8월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

박 민 정

본 논문을 박민정의 이학석사 학위논문으로 인준함

위원장 : 문 기 환 

위 원 : 서 영 완 

위 원 : 임 선 영 

2019년 6월 28일

한국해양대학교 대학원

이학석사 학위논문

염생식물 *Atriplex gmelinii*로부터
생리활성 성분의 탐색

An exploratory study on bioactive constituents from
the halophyte *Atriplex gmelinii*

지도교수 서 영 완

2019년 8월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

박 민 정

목 차

List of Schemes -----	i
List of Figures -----	ii
List of Abbreviations -----	v
Abstract -----	vi
1. 서론 -----	1
2. 재료 및 방법 -----	3
2.1. 시료 -----	3
2.2. 시약 및 기기 -----	3
2.2.1. 추출, 분획 및 분리 -----	3
2.2.2. 활성 실험 시약 -----	3
2.2.3. 기기 -----	4
2.2.4. 세포배양 -----	4
2.3. 추출 및 분리 -----	6
2.3.1. 추출 및 분획 -----	6
2.3.2. 화합물의 분리 -----	8
2.4. 항산화 활성 실험 -----	10
2.4.1. DPPH radical 소거 활성 -----	10
2.4.2. Peroxynitrite 소거 활성 -----	13
2.4.3. 환원력(ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정 -----	16
2.4.4. 세포내 활성 산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 측정 -----	17
2.4.4.1. HT-1080 세포 생존율 측정 -----	17

2.4.4.2. 세포내 활성 산소종 (ROS) 측정 -----	19
2.4.5. Genomic DNA 추출 및 Genomic DNA의 산화 생성물 측정-----	21
2.5. 항염증 활성 실험 -----	22
2.5.1. RAW 264.7 세포 생존율 측정 -----	22
2.5.2. Nitric oxide (NO) 억제 활성 측정 -----	23
2.5.3. 염증 발현 인자 억제 활성 측정 -----	24
2.6. 항암 활성 실험 -----	25
2.6.1. 인체 유래 암세포에 대한 세포 증식 억제 활성 측정 -----	25
2.6.2. 기질 금속단백질분해효소(Matrix metalloproteinase) 저해 활성 실험 -	26
2.6.2.1. Gelatin zymography를 통한 MMP 활성 측정 -----	26
2.6.2.2. mRNA 추출과 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) -----	27
2.6.2.3. Western blot을 통한 MMP 발현 측정 -----	28
2.7. 통계처리 -----	29
3. 결과 및 고찰 -----	30
3.1. 염생식물 <i>Atriplex gmelinii</i> 에서 분리된 물질의 구조결정 -----	30
3.2. <i>In vitro</i> 항산화 활성 -----	32
3.2.1. DPPH radical 소거 활성 -----	32
3.2.2. Peroxynitrite 소거 활성 -----	34
3.2.3. 환원력(ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정 -----	36
3.3. 분획층의 세포 수준에서의 항산화 활성 -----	38
3.3.1. HT-1080 세포에 대한 독성 -----	38
3.3.2. 세포내 활성 산소종(ROS) 소거 활성 -----	40
3.3.3. Genomic DNA 산화억제능 측정 -----	42
3.4. 항염증 활성 -----	44

3.4.1. RAW264.7 세포생존을 측정 -----	44
3.4.2. NO생성 억제효과 -----	46
3.5. 분획층의 세포수준에서의 항암 활성 -----	48
3.5.1. 분획층의 인체 유래 암세포에 대한 세포 증식 억제 효과 -----	48
3.5.1.1. HT-1080 세포 증식 억제 효과 -----	48
3.5.1.2. HT-29 세포 증식 억제 효과 -----	50
3.5.1.3. AGS 세포 증식 억제 효과 -----	52
3.5.2. 기질 금속단백질분해효소(Matrix metalloproteinase) 저해활성 효과---	54
3.5.2.1. Gelatin zymography를 통한 MMP-9과 MMP-2의 발현-----	54
3.5.2.2. RT-PCR과 Western Blot을 통한 MMP-9과 MMP-2의 mRNA와 protein level의 발현 -----	56
3.6. 화합물의 항산화 활성 -----	58
3.6.1. DPPH radical 소거 활성 -----	58
3.7. 화합물의 항염증 활성 -----	60
3.7.1. RAW264.7 세포에 대한 독성 -----	60
3.7.2. 화합물의 NO생성 억제 효과 -----	62
3.7.3. 화합물의 염증 유발 인자 억제 효과 -----	64
3.8. 화합물의 항암 활성 -----	66
3.8.1. 화합물의 인체 유래 암세포에 대한 세포 증식 억제 효과 -----	66
3.8.1.1. HT-1080 세포 증식 억제 효과 -----	66
3.8.1.2. HT-29 세포 증식 억제 효과 -----	66
3.8.1.3. AGS 세포 증식 억제 효과 -----	66
3.8.2. 화합물의 기질 금속단백질분해효소(Matrix metalloproteinase) 저해 활성 -----	68
3.8.2.1. 화합물의 gelatin zymography를 통한 MMP-9과 MMP-2의 발현	

효과 -----	68
4. 결론 및 고찰 -----	70
5. 참고문헌 -----	72
6. 부록 -----	77

List of scheme

Scheme 1. Preparation of crude extractions and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> -----	7
Scheme 2. Separation procedure of compounds 1 and 2 from <i>A. gmelinii</i> -----	9
Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect -----	12
Scheme 4. Measurement of the ONOO ⁻ scavenging effect -----	15

List of figures

Figure 1.	Scavenging of the DPPH radical by phenol -----	11
Figure 2.	Peroxynitrite (ONOO ⁻) mediated oxidation of DHR 123 -----	14
Figure 3.	Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells ---	18
Figure 4.	Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system -----	20
Figure 5.	Chemical structure of compound 1 and 2 from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> -----	31
Figure 6.	DPPH radical scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> -----	33
Figure 7.	Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on authentic ONOO ⁻ (% of control) -----	35
Figure 8.	Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on ONOO ⁻ from SIN-1 (% of control) -----	35
Figure 9.	Ferric reducing antioxidant power of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> (% of control) -----	37
Figure 10.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on viability of HT-1080 cells -----	39
Figure 11.	Scavenging effects of crude and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells -----	41
Figure 12.	Antioxidant activity of crude and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on genomic DNA in HT-1080 cells	43
Figure 13.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on viability of RAW264.7 cells -----	45
Figure 14.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on nitrite production in RAW264.7 cells -----	47

Figure 15.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on viability of HT-1080 cells -----	49
Figure 16.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on viability of HT-29 cells -----	51
Figure 17.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on viability of AGS cells -----	53
Figure 18.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on enzymatic activity of MMP-9 and MMP-2 determined by gelatin zymography in HT-1080 cells -----	55
Figure 19.	Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on mRNA levels and protein levels of MMP-9 and MMP-2 determined by RT-PCR and Western blot in HT-1080 cells -----	57
Figure 20.	DPPH radical scavenging activity of compounds 1 and 2 from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> -----	59
Figure 21.	Effects of compounds 1 and 2 from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on viability of RAW264.7 cells -----	61
Figure 22.	Effects of compounds 1 and 2 from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on nitrite production in RAW264.7 cells -----	63
Figure 23.	Effects of compound 1 from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on mRNA level in HT-1080 cells -----	65
Figure 24.	Effects of compounds 1 and 2 from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on viability of HT-1080 (a) and HT-29 (b), AGS (c) cells -----	67
Figure 25.	Effects of compounds 1 from the halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> on enzymatic activity of MMP-9 and MMP-2 determined by gelatin zymography in HT-1080 cells -----	69
Figure 26.	¹ H NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	77
Figure 27.	¹³ C NMR spectrum of compound 1 in CD ₃ OD -----	77
Figure 28.	¹ H NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	78
Figure 29.	¹³ C NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	78
Figure 30.	¹ H COSY spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	79
Figure 31.	¹ H TOCSY spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	79

Figure 32.	gHSQC spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	80
Figure 33.	gHMBC spectrum of compound 2 in CD ₃ OD -----	80
Figure 34.	Chemical structure of compounds 1 and 2 from halophyte <i>Atriplex gmelinii</i> -----	81

List of abbreviations

BHA	: butylated hydroxyanisole
BHT	: butylated hydroxytoluene
CDCl ₃	: deuterated chloroform
CD ₃ OD	: deuterium methanol
CHCl ₃	: chloroform
CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
H ₂ O	: water
¹ H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
¹³ C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
HRFAB	: high resolution fast atom bombardment
Hz	: herz (sec ⁻¹)
IR	: Infrared
LRFAB	: low resolution fast atom bombardment
MeOH	: methanol
MS	: mass spectroscopy
<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	: reverse phase
S	: substrate
SiO ₂	: silica gel
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet
ν_{\max}	: maximal velocity

An exploratory study on bioactive constituents from the halophyte *Atriplex gmelinii*

Min Jeong Park

Department of Marine Bioscience and Environment
Graduate School of Korea Maritime & Ocean University

Abstract

As a part of our search for new biologically active substances from halophytes, their crude extracts were screened for antioxidant, antiinflammatory, cytotoxic, and MMP-inhibiting activities. The significant activities were shown for the crude extract of *A. gmelinii*. Specimens of the halophyte *A. gmelinii* were extracted twice for 24 hrs with methylene chloride (CH₂Cl₂) and methanol (MeOH), respectively. After removal of the solvent, the combined crude extracts were partitioned between CH₂Cl₂ and H₂O. The aqueous layer was further fractionated between *n*-butanol (*n*-BuOH) and H₂O and then the organic layer was re-partitioned between *n*-hexane and 85% aqueous methanol, affording four solvent-partitioned fractions. Their antioxidizing effects were evaluated using three antioxidant assay systems - DPPH, peroxyxynitrite, and intracellular ROS. Inhibitory effect of crude extracts and their solvent-partitioned fractions against NO production in Raw 264.7 cells were evaluated by Griess reagent assay. In addition, we measured the

cytotoxicity against four kinds of cancer cells derived from human body, and conducted experiments related to MMP which is closely related to cancer. The inhibitory effect of *Atriplex gmelinii* against gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 secreted from HT-1080 cells was evaluated by gelatin zymography. mRNA and protein expressions of MMP-2 and MMP-9 in HT-1080 cells were also measured by polymerase-chain reaction (PCR) and Western blot, respectively.

The 85% aqueous methanol and the *n*-BuOH fractions revealed the strong scavenging effect in antioxidant assays. For the anti-inflammatory assay, the 85% aqueous methanol and the *n*-BuOH fraction significantly inhibited production of LPS-activated nitric oxide (NO) in Raw 264.7 cells. In the anticancer assay system using the MTT reduction method and MMP inhibition experiments, the 85% aq.MeOH fraction of solvent-partitioned fractions exhibited the strongest growth inhibition against all human cancer cells. Therefore, attempt to isolate bioactive constituents from two solvent fractions showing the significant biological activity was made, and two compounds **1** and **2**, including 3,5-dicaffeoyl-*epi*-quinic acid (**1**) were obtained from the *n*-BuOH and 85% aqueous methanol fractions, respectively.

KEY WORDS: *Atriplex gmelinii* 가느갓농쟁이; Antioxidant activity 항산화 활성; Anticancer activity 항암활성; Anti-inflammatory activity 항염증 활성; MMP; 3,5-dicaffeoyl-*epi*-quinic acid

1. 서론

현대의 사회가 고령화 사회로 변화하게 되면서 선천성, 후천성으로 발병되는 다양한 질병으로부터 벗어나고자 하는 사람들의 관심은 수명 연장이라는 하나의 최종 목적지에 도달하게 되었다. 이로써 암, 뇌질환, 심장질환, 당뇨 등의 여러 질병들의 치료방법에 대한 다양한 연구가 진행이 되었다(Miller et al. 1981).

호기성 생물의 대부분이 세포 대사과정에서 필연적으로 생성하는 부산물인 활성산소종(ROS)은 여러 과정의 환경적 스트레스가 반복되면서 그 양이 축적이 되고 생물체의 주체적인 효소적, 비효소적 항산화 기작에 의해서 ROS(reactive oxygen species)의 농도는 조절된다. 세포내에 과도하게 축적된 ROS는 막지질 과산화, 단백질 산화, 효소억제, 그리고 DNA와 RNA를 손상시켜 결국 세포를 사멸시키게 된다. 특히 높은 산화 스트레스를 받는 염분이 높은 지역에 서식하는 염생식물들은 이러한 ROS의 해로운 효과를 억제하기 위해 효과적인 항산화 방어기작을 발전시켜 온 것으로 보고되고 있다(Hernández et al. 1999; Foyer and Noctor. 2005; Ozgur et al. 2013; Yildiztugay et al. 2011; Møller et al 2007).

염증반응은 신체에서 나타나는 방어보호반응으로써 외부자극원에 의해 야기되는 세포조직의 손상 및 감염 등에 대항하여 인체의 항상성을 유지하기 위해 유발되는 필수적인 조절반응이다. 하지만 과도한 염증반응이 지속적으로 나타나게 되면 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , TNF- α 등과 같은 염증반응 촉진 인자들의 생성을 유도하게 되고 나아가 천식, 뇌질환, 정신질환, 심장질환 및 암 등의 여러 질병과 신체 노화의 직·간접적 발병요인이 되는 것으로 알려져 있다(Jin et al. 2014; Kim et al. 2014; Kong 2014; Mun et al. 2015).

세포의 기질 금속단백질분해효소(MMP)는 Zn²⁺, Ca²⁺의존성 펩타이드 내부가수분해 효소로서 20여종 이상이 알려져 있으며, 세포의 기질의 분해와 재형성, 그리고 사이토카인, 성장인자, 호르몬 수용체 및 세포 부착 인자의 합성과 분비를

조절한다는 것이 보고되어 있다(Legrand et al. 1999; Sternlicht et al. 2001; Egeblad and Werb 2002; Ha et al. 2004; 2007; Mook et al. 2004; Zhang and Kim 2009; Hadler-Olsen et al. 2011). 이들은 collagenase, gelatinase 등 5개의 그룹으로 나누어지며 특히 MMP-2(gelatinases A 혹은 72 kDa type IV collagenase)와 MMP-9(gelatinases B 혹은 92 kDa type IV collagenase)는 악성종양인 초기 암의 발달과 진행 즉 전이에 중요한 역할을 하기 때문에 특별한 흥미의 대상이었으며, 이들을 억제하는 물질을 발견하는 것은 항암치료의 표적으로서 많은 관심을 받아 왔다. 따라서 이 효소들의 발현을 억제하는 물질을 탐색하는 것은 암의 진행과 전이를 조절하여 암을 극복하는데 크게 기여할 수 있을 것이다(Seo et al. 2005; Kang et al. 2008; Yang et al. 2013; Zheng et al. 2014).

염생식물은 해안사구, 염분을 함유한 호숫가, 염염이 있는 지표 등 염분기가 많은 토양에서 서식하고 성장하는 식물로, 삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라는 특히 염분기가 많은 토양에서 서식하는 다양한 식생을 관찰할 수 있다. 이러한 염생습지에 서식하는 식물은 육상식물이 서식하는 환경과는 상당히 다른 극한 환경(강한 바람, 해무, 뜨거운 햇빛, 염분, 침수)에 노출되면서 육상식물과는 구조적으로 다른 특이 이차대사산물의 생성을 통해 독특한 생리적 및 생화학적 대사 과정이 이루어지는 것으로 알려져 있다(Hamed et al. 2007; Jithesh et al. 2006; Ksouri et al. 2009; 2008).

가는갯능쟁이(*Atriplex gmelinii* C. A. Mey. ex Bong.)는 명아주과 갯능쟁이속에 속하는 한해살이 염생식물로 좁은잎갯능쟁이 또는 가는명아주라고 불리며, 우리나라 전역의 바닷가 조간대, 모래땅, 간척지 등과 세계적으로는 중국 북부, 러시아 사할린, 일본, 북아메리카 등에 분포한다. 예로부터 식용뿐만 아니라 약용식물로서 백전풍, 충독, 한창, 개선 등의 질환에 사용되었고, 어린잎과 줄기는 사료로도 이용되었다(국립생물자원관 2011).

본 연구에서는 염생습지에서 서식하는 가는갯능쟁이로부터 항산화, 항염증, 항암과 같은 생리활성 효과를 탐색하고 항산화 및 항염증, 항암의 소재로의 활용 가치를 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

실험에 사용된 가는갯능쟁이(*Atriplex gmelinii*)는 2007년 전라남도 무안군 현경면 현화리에서 채집하였다. 서늘한 곳에서 건조한 후 추출하기 전까지 -25°C 에서 냉동보관하였다.

2.2 시약 및 기기

2.2.1 추출, 분획 및 분리

추출과 분획, 분리에 사용한 용매는 모두 DUKSAN (경기도 안산시)과 SK chemicals (경기도 성남시)에서 구매한 일급 용매를 사용하였다. Column packing materials 는 RP-18 (YMC-Gel ODS-A, 12 nm, S-75 μm)을 사용하였고, TLC plate 는 Silica gel 60 F254 (1 mm, Merck)를 사용하였다. HPLC에 사용한 column 은 YMC pack ODS-A를 (250 \times 10 mm, S 5 μm , 12 mm)을 사용하였고, guard column (7.5 \times 4.6 mm, Alltech)을 사용하였다.

2.2.2 활성 실험 시약

MTT assay를 위한 kit (MTT cell proliferation Assay)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. 항산화 활성 실험에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), 3-morpholinsydnonimine (SIN-1), 과 penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methyl-butanoic acid과 dihydrorhodamine 123 (DHR 123)은 Sigma aldrich (ST Louis, MO, USA)에서 구입하였고, peroxyxynitrite (ONOO^-)는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. ROS 측정에 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.

MMP 발현 측정에 사용된 12-myristate-13acetate (PMA)와 RIPA buffer는 Sigma aldrich (USA)에서 구입하였다. Trizol은 ambion life technologiesTM (USA)에서 구입하였고 MMP-2와 MMP-9과 β -actin의 primer와 agarose gel 염색에 사용하는 ethidium bromide (EtBr)은 Bioneer (USA)에서 구입하였다. Western blot에 사용되는 MMP-9, MMP-2, β -actin의 1차 antibody와 2차 antibody는 cell signaling (USA)에서 구입하였다.

2.2.3 기기

¹H-NMR과 ¹³C-NMR, two-dimensional (2D) NMR 실험은 모두 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였다. Varian RI detector와 high performance liquid chromatography (HPLC, Dionex p580, USA)를 사용하여 화합물을 정제·분리하였다. 농축에 사용된 농축기는 rotary evaporator와 aspirator, water bath는 Buchi사 (Switzerland) 기기를 사용하였다. MTT 실험의 흡광도 측정에 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic, England), Victor3 1402 multilabel counter (Perkin Elmer, USA)를 사용하였다. 세포의 배양은 CO₂ incubator는 Forma Scientific (Japan)를 사용하였다. PCR 증폭에 사용한 thermal cycler는 Bio-rad (USA)에서 구입한 기기를 사용하였다. Agarose gel 전기영동 및 SDS-PAGE gel의 이미지 현상에는 Davinch-K사(서울시 금천구)의 CAS-400SM Davinch-Chemi imagerTM를 사용하여 현상하였다.

2.2.4 세포 배양

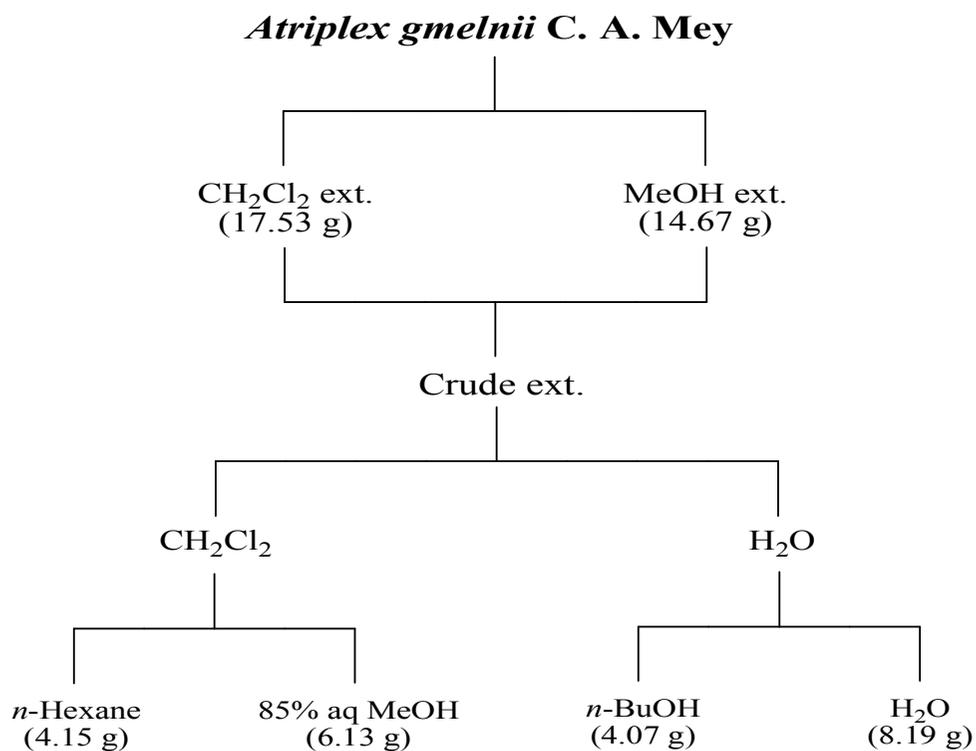
세포 배양에 사용된 RPMI-1640과 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), FBS (Fetal Bovine Serum)은 GenDEPOT (USA)에서 구입하였고, penicillin-streptomycin solution과 0.05% Trypsin-0.02% EDTA solution은 Gibco

(USA)에서 구입하였다. 세포 세척에 사용된 PBS는 바이오세상(경기도 성남시)에서 구입하여 사용하였다. 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 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank)으로부터 분양 받아 배양하여 실험에 사용하였다. HT-1080, HT-29와 AGS 세포는 10% FBS와 100 units/mL penicillin-streptomycine을 첨가한 RPMI-1640 배지를 사용하여 배양하였고, MCF-7과 Raw 264.7 세포는 100 units/mL penicillin-streptomycine과 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 가는갯능쟁이(*Atriplex gmelinii*)의 추출 및 분리

2.3.1 추출 및 분획

가는갯능쟁이(*Atriplex gmelinii*)를 추출에 용이하게 세절한 뒤, methylene chloride (CH_2Cl_2) 용매로 24시간 침지 후 여과하여 용매 추출물을 얻었으며 이를 2회 반복하였다. 여과하고 남은 잔사에 동량의 methanol (MeOH) 용매를 넣어 위의 과정을 반복한 후, 각 추출액을 감압 농축하여 CH_2Cl_2 추출물 17.53 g 과 MeOH 추출물 14.67 g을 얻었다. 조추출물을 혼합하고 그 중에 일부(25.20 g)를 용매의 극성에 따라 단계적으로 분획하여 *n*-hexane 층 (4.15 g), 85% aqueous methanol 층 (6.13 g), *n*-butanol 층 (4.07 g), water 층 (8.19 g)을 얻었다(Scheme 1).

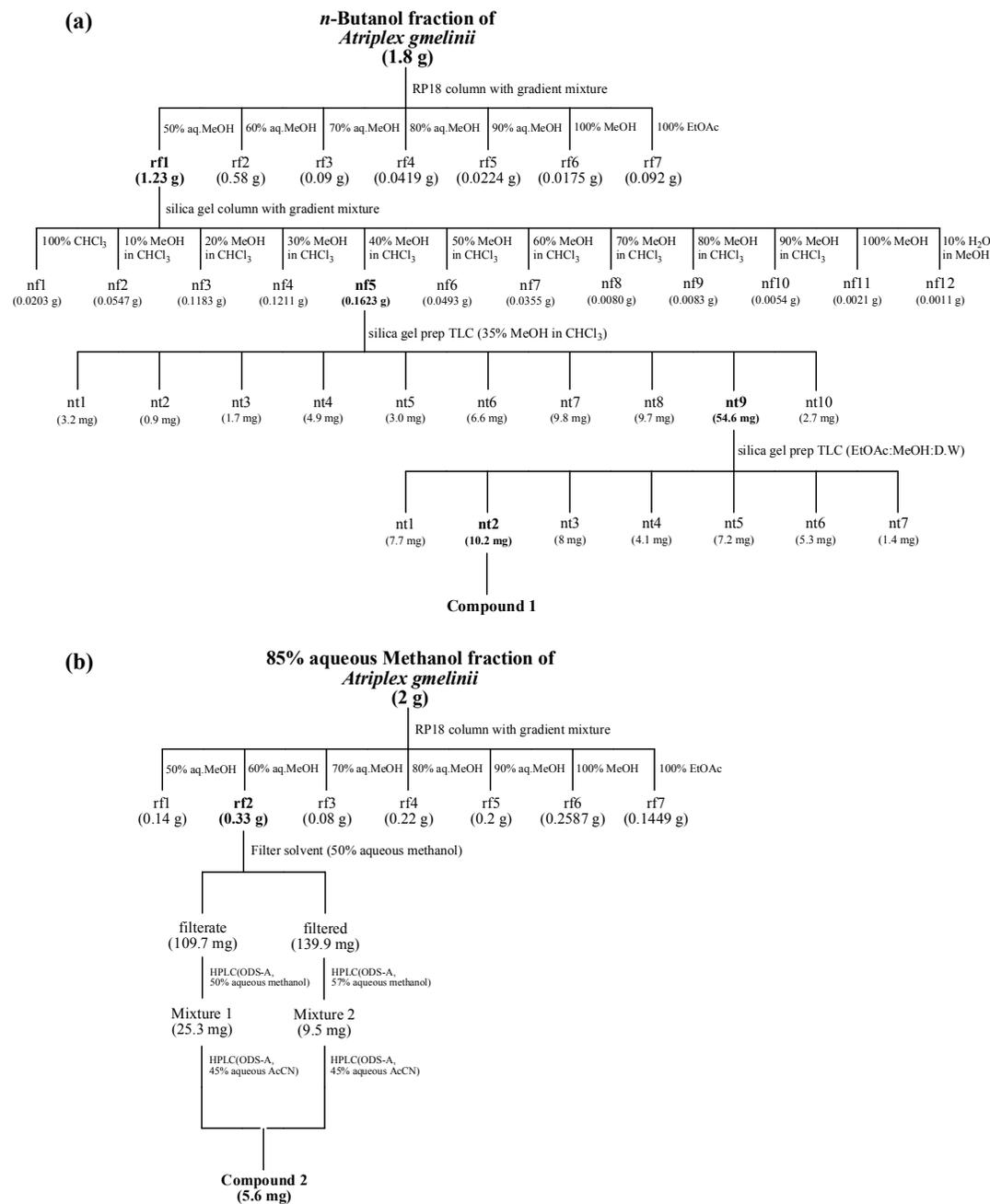


Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*.

2.3.2 가는갯능쟁이의 화합물 분리

가는갯능쟁이 분획층의 활성 검토 후 *n*-butanol과 85% aqueous methanol (aq.MeOH) fraction을 선정하였고, *n*-butanol fraction을 C₁₈ reversed-phase column chromatography를 통하여 7개의 fraction으로 나눴다[용리용매: 50%, 60%, 70%, 80%, 90% aq.MeOH, 100% MeOH, 100% ethyl acetate (EtOAc)]. 이 중 50% aq.MeOH fraction을 methanol과 chloroform의 혼합용매를 사용하여 silica normal-phase vacuum chromatography를 실시하였으며 모두 12개의 분획 (용리용매: 100% CHCl₃, 10% MeOH/CHCl₃, 20% MeOH/CHCl₃, 30% MeOH/CHCl₃, 40% MeOH/CHCl₃, 50% MeOH/CHCl₃, 60% MeOH/CHCl₃, 70% MeOH/CHCl₃, 80% MeOH/CHCl₃, 90% MeOH/CHCl₃, 100% MeOH, 10% H₂O/MeOH)을 얻었다. 이 중 40% MeOH in CHCl₃ fraction에 대하여 silica gel prep-TLC (전개용매: 35% MeOH in CHCl₃)를 진행하여 mixture 1을 얻었다. 이 mixture 1에 대해서 다시 EtOAc/MeOH/D.W (30/5/4)를 전개용매로 사용하여 silica gel prep-TLC를 실시하여 compound 1 (10.2 mg)을 얻었다[Scheme 2 (a)].

85% aq.methanol fraction은 C₁₈ reversed-phase column chromatography를 통하여 7개의 fraction으로 나눴다[50%, 60%, 70%, 80%, 90% aq.MeOH, 100% MeOH, 100% ethyl acetate (EtOAc)]. 이 중 60% aq.MeOH fraction은 (C18 Cartridges, Sep-Pak® Plus)에서 50% aq.MeOH로 여과하여 여과액과 여과 잔류물을 얻었다. 여과액에 대해서는 reversed-phase HPLC (ODS-A, 50% aq.MeOH)를 진행하여 mixture 1을 얻었고 다시 reversed-phase HPLC (ODS-A, 45% aq.AcCN)를 진행하였다. 여과 잔류물은 reversed-phase HPLC (ODS-A, 57% aq.MeOH)로 분리를 시도하여 mixture 2을 얻었으며 다시 이에 대한 reversed-phase HPLC (ODS-A, 45% aq.AcCN)를 진행하여 compound 2 (5.4 mg)를 얻었다[Scheme 2 (b)].



Scheme 2. Separation procedure of compounds 1 and 2 from *A. gmelinii*.

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).

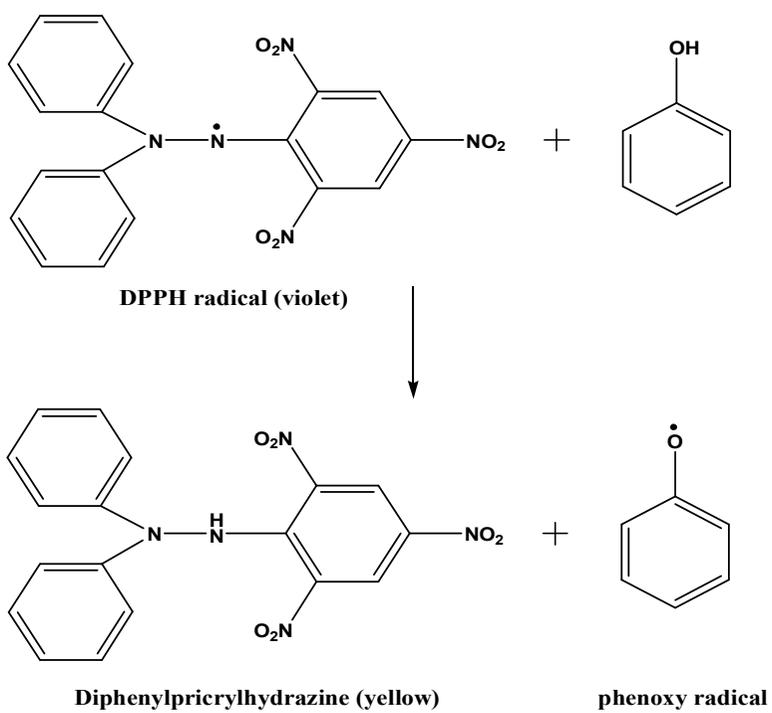
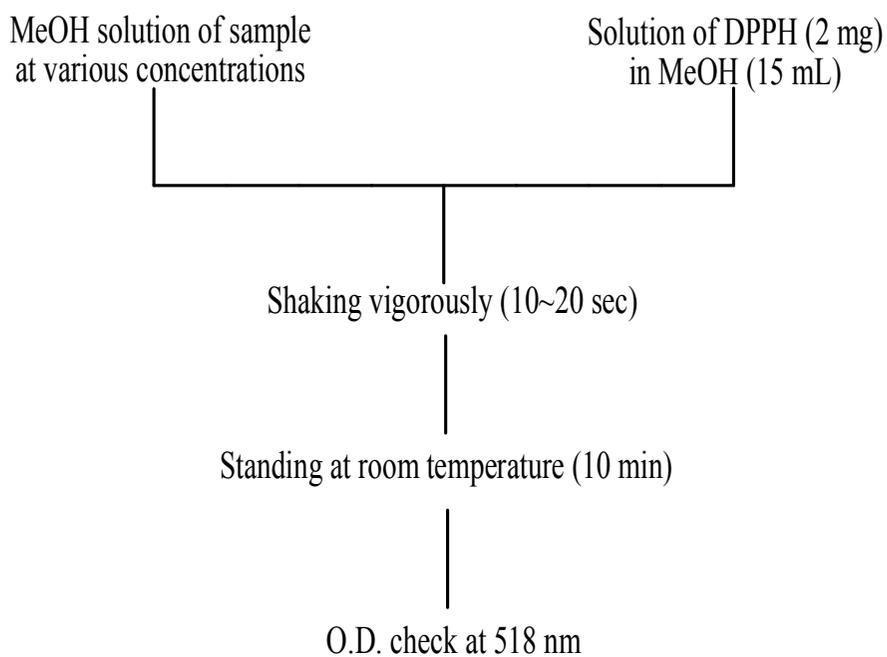


Figure 1. Scavenging of the DPPH radical by phenol



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 측정하여 나타내었다(**Figure 2**). DHR 123은 dimethylformamide (DMF)에 녹여 질소로 purge시켜 -80°C 에 보관하였고, DHR 123 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서 조제하여 사용하였다. Buffer는 90 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합하여 pH를 7.4로 조절한 뒤 100 μM diethylenetriaminepenta acetic acid (DTPA)를 혼합하여 냉장 보관하였고, buffer로 DHR 123을 5 μM 로 희석하여 실험에 사용하였다. DHR 123 buffer 용액에 화합물과 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 방치 후, Victor3 1402 multilabel counter (PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 동일한 방법으로 실시하여 1시간동안 방치한 후 측정하였다. 이는 SIN-1이 $\text{NO}\bullet$ 와 $\text{O}_2\bullet^-$ 를 동시에 발생시켜 ONOO^- 를 생성시키는 화합물로, authentic peroxynitrite의 급속한 DHR 123의 산화와는 달리 점진적으로 산화가 일어나기 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).

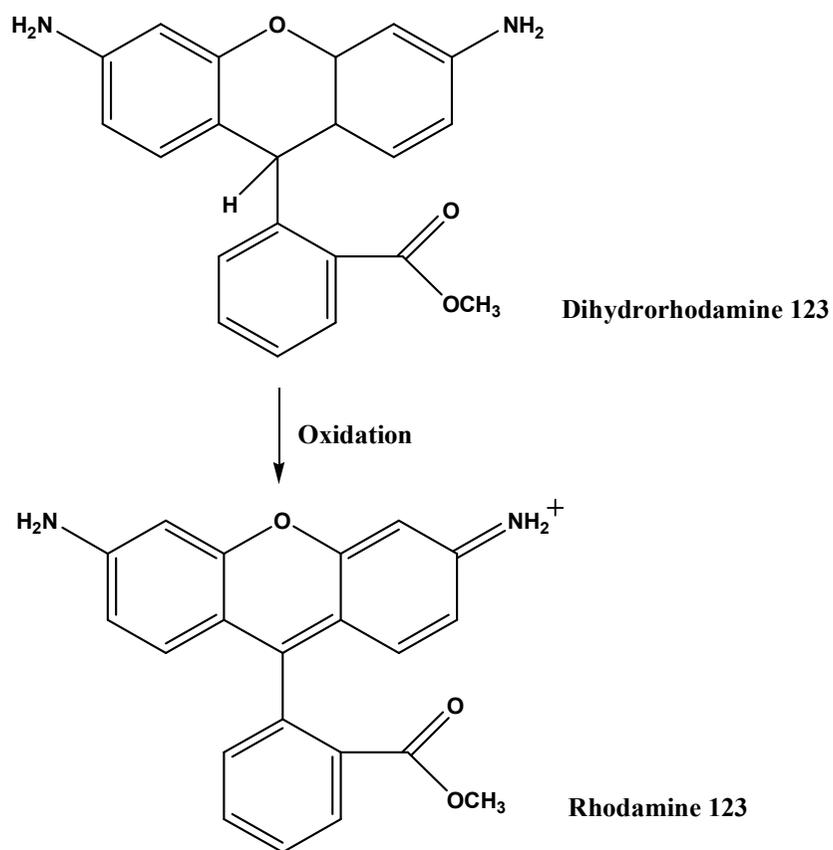


Figure 2. Peroxynitrite(ONOO⁻) mediated oxidation of DHR 123

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 fluorescence 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 50°C에서 20분 동안 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid 0.2 mL를 첨가한 뒤, 10000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 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) 측정

2.4.4.1 HT-1080 세포 생존율 측정

가는갯능쟁이로부터 추출된 추출물과 분획물들의 세포 증식 억제 효과를 확인하기 위하여 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]시약을 이용하여 HT-1080 세포에 대한 세포독성을 측정하였다. 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 formazan이 된다. 세포가 많을수록 MTT formazan을 많이 생성하게 되며 이를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 배양된 HT-1080 세포는 5×10^3 cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 새 배지로 교체한 뒤 농도별로 준비한 시료를 처리한 후 다시 24시간동안 배양하였다. 시료처리 후 배양된 세포에 1 mg/mL의 MTT 시약을 처리하여 4시간동안 배양하여 formazan이 형성되면 MTT시약이 처리된 배지를 제거한 후, 형성된 formazan을 DMSO에 녹여 Victor3 multilabel plate reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율(%)을 구하였다.

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

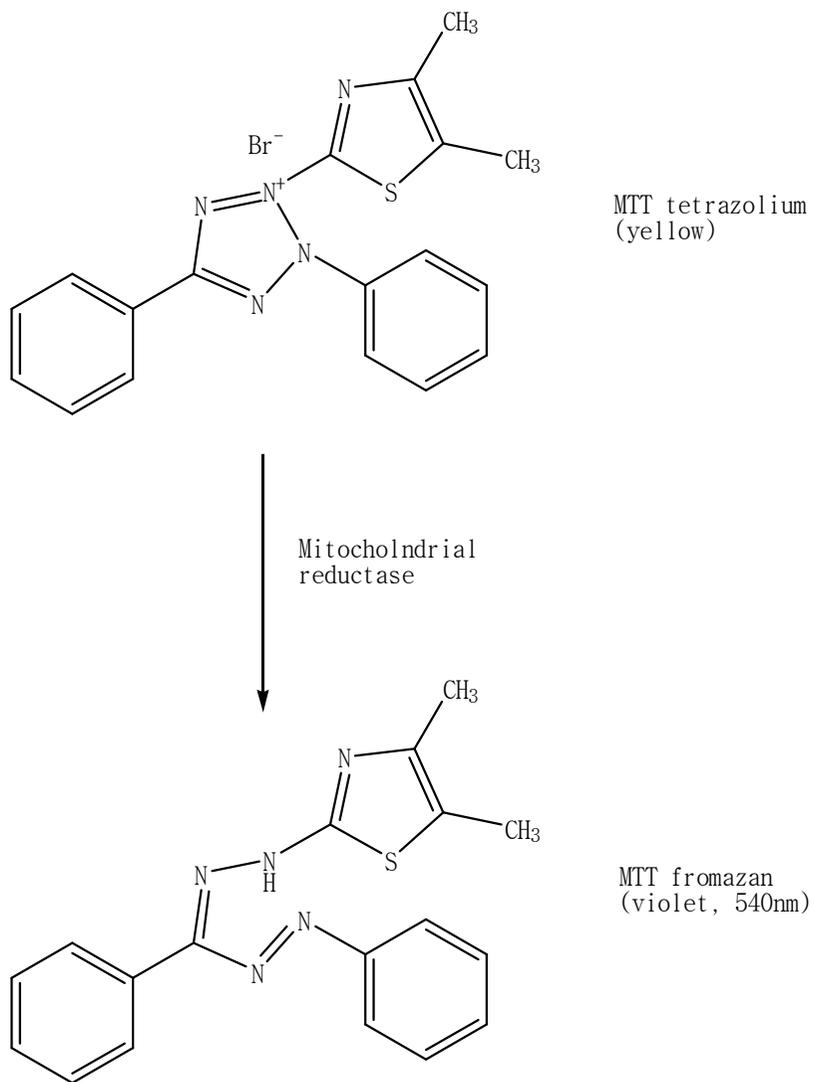


Figure 3. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.

2.4.4.2 세포내 활성 산소종 (ROS) 측정

세포내 ROS free radical 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다. HT-1080 세포를 96 well plate에 2×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 PBS로 씻은 후 20 µM DCFH-DA를 각 well에 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각각의 well에 농도별로 준비한 시료를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 incubation한 후, DCFH-DA를 제거하고 PBS로 씻은 후 500 µM H₂O₂를 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 Victor3 1402 multilabel counter로 측정하였다(Figure 4; Okimoto, 2000).

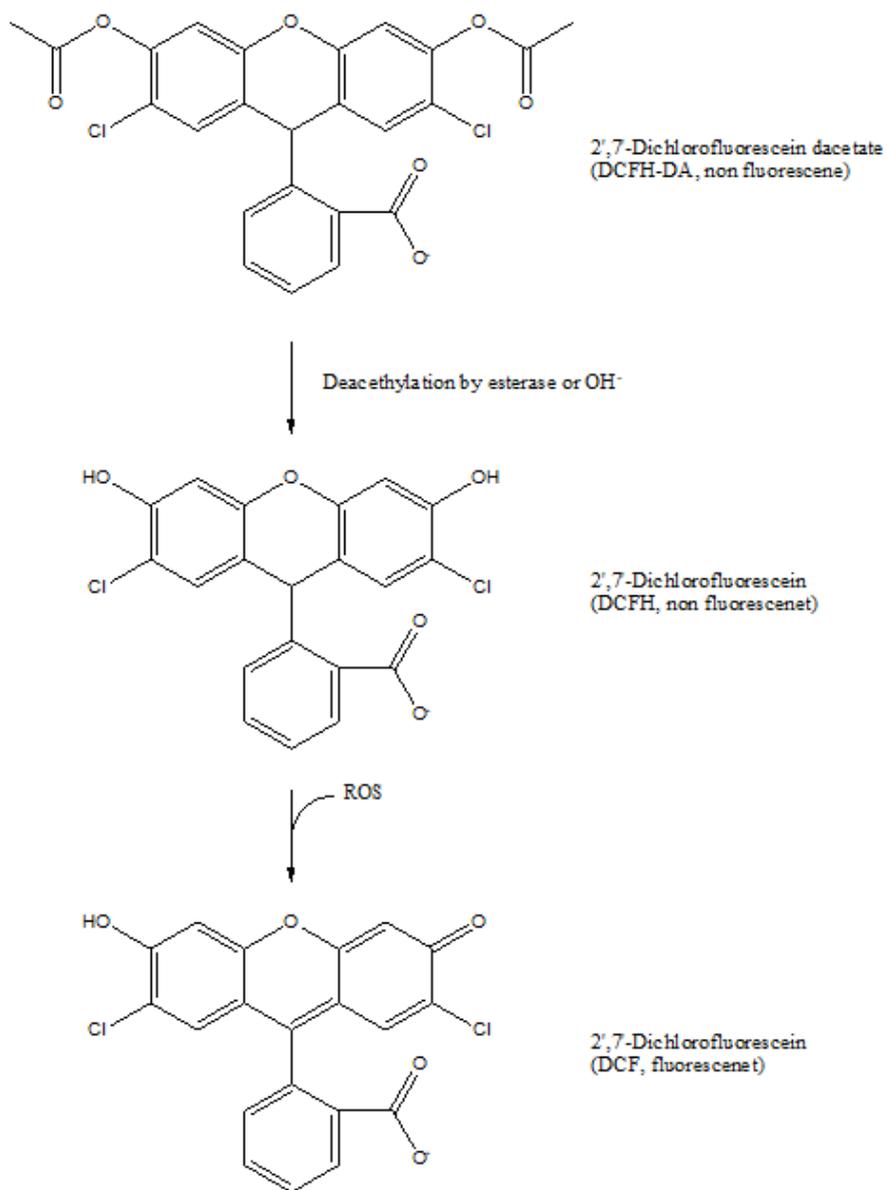


Figure 4. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.

2.4.5 Genomic DNA 추출 및 Genomic DNA의 산화 생성물 측정

실험에 사용한 genomic DNA는 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction kit (Bioneer Inc., USA)를 이용하여 HT-1080 세포로부터 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 260 nm와 280 nm의 파장에서 그 흡광도를 측정하여 순도와 농도를 정량한 후, -20°C에서 냉동 보관하여 사용하였다. 0.5 ~ 1.0 µg의 genomic DNA에 4 µL 화합물과 600 µM의 FeSO₄, 0.5 mM의 H₂O₂를 각각 10 µL 씩 가하여 genomic DNA를 30분간 상온에서 산화시킨 뒤 130 mM의 EDTA를 가하여 반응을 중지시켰다. 산화된 genomic DNA는 6X agarose gel loading buffer와 mix하여 1% agarose gel에 loading하여 100 mV로 전기영동하였다. 전기영동을 마친 gel은 5 µg/mL EtBr에 20~30분간 염색시켜 UV를 통해 산화된 정도를 확인하여 사용된 시약의 농도와 양을 조절하여 실험하였다.

2.5. 항염증 활성 실험

2.5.1 RAW 264.7 세포 생존율 측정

가는갯능쟁이로부터 추출된 추출물과 분획물들의 세포 증식 억제 효과를 확인하기 위하여 MTT시약을 이용하여 RAW 264.7 세포에 대한 세포독성을 측정하였다. 배양된 RAW 264.7 세포는 5×10^3 cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 새 배지로 교체한 뒤 농도별로 준비한 시료를 처리한 후 다시 48시간동안 배양하였다. 시료처리 후 배양된 세포에 1 mg/mL의 MTT 시약을 처리하여 4시간동안 배양하여 formazan이 형성되면 MTT시약이 처리된 배지를 제거한 후, 형성된 formazan을 DMSO에 녹여 Victor3 multilabel plate reader를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율(%)을 구하였다.

2.5.2. Nitric oxide (NO) 억제 활성 측정

대식세포인 RAW 264.7 세포를 96-well plates에 1×10^3 cells/well로 well당 100 μ L씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후, 실험에 사용하였다. 페놀레드가 제거된 새로운 배지로 교체한 다음 농도별로 준비한 시료를 세포주에 처리한 후 NO생성을 유도하기 위해 LPS를 1 μ g/mL 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간동안 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 Griess reagent (Sigma-Aldrich Co. USA)와 1 : 1의 비율로 혼합하여 10분간 실온에서 암반응시킨 후, ELISA reader (Bio-Tek instruments, Winooski, VT)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO (μ M)의 농도는 표준물질인 sodium nitrate (NaNO₂)용액의 표준곡선을 기준으로 하여 계산하였다.

2.5.3. 염증 발현 인자 억제 활성 측정

HT-1080 세포에서 배지제거 후 PBS buffer로 세척한 뒤, Trizol reagent (Ambion, USA)을 사용하여 RNA를 추출하고 chloroform을 가하여 phenol 성분을 제거하였다. 상등액과 동량의 isopropanol을 넣어 RNA를 침전시킨 뒤 알코올을 가하여 세척 및 건조하였다. 건조한 RNA에 DEPC water 30 μ L를 첨가한 후 spectrophotometer를 이용하여 260 nm / 280 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA농도를 정량하였다. 분리한 동량의 RNA (2 μ g)로부터 components mixture (Invitrogen, USA)를 추가하여 cDNA를 합성하였다. PCR Premix (Bioneer, Korea)에 합성된 cDNA와 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin-1 β (IL-1 β) 및 IL-6 , TNF- α primer를 반응시킨 다음, T100 Thermal cycler (Bio-Rad, USA)를 이용하여 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denature, 95 $^{\circ}$ C에서 45초간 denature, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing cycle, 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 extension 과정을 30번 반복함으로써 증폭시킨 뒤, 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 final-extension을 시키고 4 $^{\circ}$ C에서 반응을 종결, 보관하였다. 증폭된 PCR 산물들은 TAE buffer (Biosesang, Korea)를 전해질로 사용한 1.5% agarose gel을 이용하여 100 V에서 30분간 전기영동시킨 후 ethidium bromide (Bioneer, Korea) 용액에서 30분간 반응시킨 후 UV (Davinch-Chemi imagerTM, CAS-400SM, Davinch-K, Korea)하에서 mRNA 발현 정도를 관찰하였다. PCR 산물들을 이용한 전기영동의 band intensity도 Quantity One (Bioneer, Korea) 프로그램을 사용하여 면적을 측정하였으며 그래프로 나타내었다.

2.6. 항암 활성 실험

2.6.1. 인체 유래 암세포에 대한 세포 증식 억제활성측정

암세포 증식 억제 효과를 확인하기 위하여 MTT시약을 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 formazan이 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.

2.6.2. 기질 금속단백질분해효소(Matrix metalloproteinase) 저해 활성실험

2.6.2.1. Gelatin zymography를 통한 MMP 활성 측정

HT-1080 세포를 serum free medium을 사용하여 24 well plate에 2×10^5 cells/well이 되도록 분주한 후 24시간 동안 고착시킨 후 준비한 시료를 $100 \mu\text{L}$ 처리하여 1시간 동안 배양 후, MMP를 발현을 유도하기 위하여 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 10 ng/mL) (Sigma aldrich, USA)를 첨가하여 24시간 배양시킨 후 상등액을 얻었다. 이 상등액에 포함된 단백질 함량을 Bradford 단백질 정량법을 이용해 같은 양의 단백질을 포함하는 조정배지가 되게 하여 1.5 mg/mL gelatin (Sigma Aldrich, USA)을 함유한 10 % sodium dodecylsulfate-polyacrlamide gel (비환원조건, Duksan Korea)에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후에 polyacrylamide gel은 실온에서 2.5 % Triton X-100 (JUNSEI, Japan)이 함유된 50 mM Tris - HCl (pH 7.5)로 30분씩 2회 세척 후, 10 mM CaCl_2 , 50 mM Tris-HCl 및 150 mM NaCl를 함유한 developing buffer를 이용하여 37°C 에서 48시간 배양하여 MMP에 의한 gelatin 가수분해를 유도하였다. MMP에 의해 가수분해되어 나타난 gelatin의 영역은 0.5% Coomassie brilliant blue 250 (LPS solution, Korea)으로 gel을 30분간 염색한 뒤 탈색용액 (methanol : acetic acid : water = 50 : 10 : 40)으로 탈색하여 관찰하였으며 gelatin이 분해되어 투명하게 나타나는 band intensity는 Quantity One (Bioneer, Korea) 프로그램을 사용하여 면적을 측정하였으며 그래프로 나타내었다.

2.6.2.2. mRNA 추출과 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)

HT-1080 세포에서 배지제거 후 PBS buffer로 세척한 뒤, Trizol reagent (Ambion, USA)을 사용하여 RNA를 추출하고 chloroform을 가하여 phenol 성분을 제거하였다. 상등액과 동량의 iso-propanol을 넣어 RNA를 침전시킨 뒤 알코올을 가하여 세척 및 건조하였다. 건조한 RNA에 DEPC water 30 μ L를 첨가한 후 spectrophotometer를 이용하여 260 nm / 280 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA농도를 정량하였다. 분리한 동량의 RNA (2 μ g)로부터 components mixture(Invitrogen, USA)를 추가하여 cDNA를 합성하였다. PCR Premix (Bioneer, Korea)에 합성된 cDNA와 MMP-2 (Forward :5'-TGA-AGG-TCG-GTG-TGA-ACG-GA-3'/Reverse : 5'-CAT-GTA-GCC-ATG-AGG-TCC-ACC-AC-3') / MMP-9 (Forward : 5'-CAC-TGT-CCA-CCC-CTC-AHA-GC-3'/Reverse : 5'-CAC-TTG-TCG-GCG-ATA-AGG-3') / β -actin (Forward : 5'-CCA-CAG-CTG-AGA-GGG-AAA-TC-3'/Reverse : 5'-AAG-GAA-GGC-TGG-AAA-AGA-GC-3') primer를 반응시킨 다음, T100 Thermal cycler (Bio-Rad, USA)를 이용하여 95°C에서 5분간 pre-denature, 95°C에서 45초간 denature, 60°C에서 1분간 annealing cycle, 72°C에서 45초간 extension 과정을 30번 반복함으로써 증폭시킨 뒤, 72°C에서 10분 동안 final-extension을 시키고 4°C에서 반응을 종결, 보관하였다. 증폭된 PCR 산물들은 TAE buffer (Biosesang, Korea)를 전해질로 사용한 1.5% agarose gel을 이용하여 100 V에서 30분간 전기영동시킨 후 ethidium bromide (Bioneer, Korea) 용액에서 30분간 반응시킨 후 UV (Davinch-Chemi imagerTM, CAS-400SM, Davinch-K, Korea)하에서 mRNA 발현 정도를 관찰하였다. PCR 산물들을 이용한 전기영동의 band intensity도 Quantity One (Bioneer, Korea) 프로그램을 사용하여 면적을 측정하였으며 그래프로 나타내었다.

2.6.2.3. Western blot을 통한 MMP 발현 측정

MMP-2/ MMP-9의 단백질 수준에서의 발현을 측정하기 위해 Western Blot 실험을 진행하였다. HT-1080 세포를 24 well plate에 2×10^5 cells/well이 되도록 분주한 후 24시간 동안 배양 후 농도 별로 준비한 시료를 처리한 뒤, RIPA lysis buffer (Sigma Aldrich, USA)를 사용하여 단백질을 추출했다. 추출한 단백질은 Bradford 단백질 정량법을 통해서 정량하였고, loading하는 시료에 함유된 단백질의 양($20 \mu\text{g}$)을 모두 동일하게 하여 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 nitrocellulose transfer membrane (Whatman®,UK)에 transfer한 뒤, 5% skim milk in 1 X TBST로 blocking하였다. Blocking한 membrane를 세척한 뒤, 1차 antibody (MMP-2 / MMP-9 / β -actin)를 이용해 특이적 항원-항체 반응을 유도했다. 24시간 후 세척하여 2차 antibody를 상온에서 1시간 동안 반응시켜 detection시킨 뒤, Western blotting detection reagent kit (GE healthcare, UK)를 membrane 위에 도포하여 UV (Davinch-Chemi imager™, CAS-400SM, Davinch-K, Korea)를 통해 단백질 발현 정도를 관찰하였다.

2.7 통계처리

실험결과는 평균±표준편차 (Mean±Standard deviation, SD)로 표시하였으며, SPSS+/WIN12.0(StatisticalPackageforSocialScience,version12.0)통계프로그램을 이용하여 통계적 유의성을 검토하였다. 집단 간의 유의성을 검정하기 위해 일원배치 분산분석 (Oneway Analysis Of Variance: ANOVA)을 통해 분석하였고, 사후검증은 Duncan's multiple range test를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

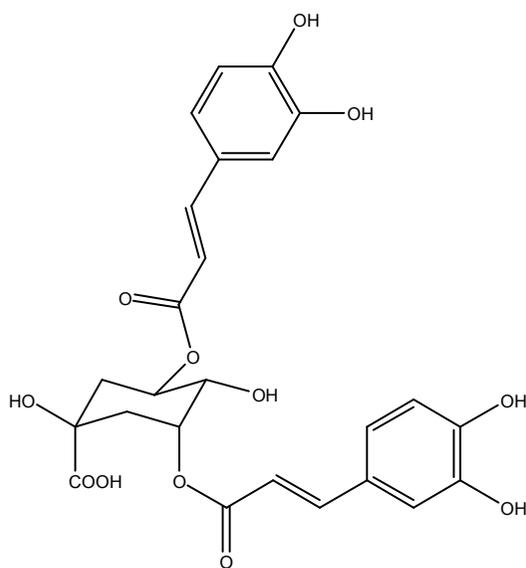
3.1 염생식물 *Atriplex gmelinii*에서 분리된 물질의 구조결정

Compound 1은 흰색의 고체로 분리되었으며 이 물질의 구조는 NMR 분광 데이터와 문헌에 보고된 값을 비교하여 3,5-dicaffeoyl-*epi*-quinic acid로 결정되었다(Kim and Lee. 2005; Kim et al. 2007; Lee et al. 2009).

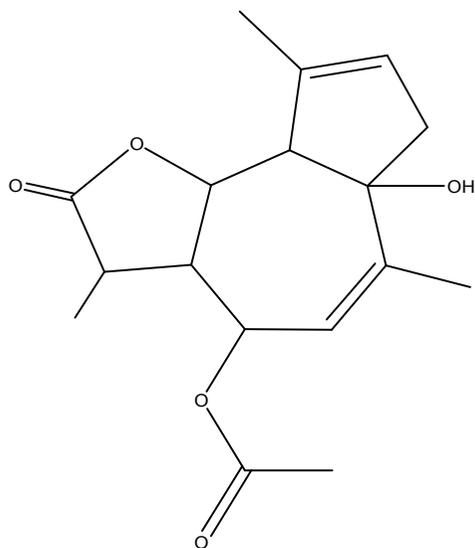
Compound 1: ^1H NMR(300 MHz, CD_3OD) δ 7.59 and 7.57 (each 1H, d, $J=15.8$ Hz, H-7'), 7.06 and 7.04 (each 1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.94 and 6.93 (each 1H, dd, $J=8.2, 2.0$ Hz, H-6'), 6.76 (2H, d, $J=8.2$ Hz, H-5'), 6.40 and 6.20 (each 1H, d, $J=15.8$ Hz, H-8'), 5.53 (1H, td, $J=12.9, 5.4$ Hz, H-3), 5.37 (1H, m, H-5), 3.90 (1H, dd, $J=9.9, 3.3$ Hz, H-4), 2.11 (2H, m, H-2), 2.27 (1H, dd, $J=15.1, 3.0$ Hz), 2.04 (1H, m); ^{13}C NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 181.4 (C, COOH), 169.8 (C, C-9'), 169.2 (C, C-9'), 149.4 (C, C-4'), 149.2 (C, C-4'), 146.7 (C, C-3'), 146.6 (C, C-3'), 127.9 (C, C-1'), 127.7 (C, C-1'), 122.8 (CH, C-6'), 116.4 (CH, C-5'), 115.9 (CH, C-8'), 115.0 (CH, C-2'), 114.5 (CH, C-8'), 76.4 (C, C-1), 74.5 (CH, C-5), 73.3 (CH, C-4), 72.4 (CH, C-3), 41.0 (CH_2 , C-2), 37.8 (CH_2 , C-6)

Compound 2는 옅은 노란색의 고체로 분리되었으며 2D NMR 분광 분석데이터와 문헌에 보고된 유사한 물질과의 비교에 의해서 이 물질의 구조는 1-hydroxyguai-3,9-dien-6,12-olide-8-O-acetate로 결정되었다(Das et al. 1983).

Compound 2: ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 5.46 (1H, s, H-3), 5.42 (1H, dt, 2.0 Hz, H-8), 5.31 (1H, dt, 2.0, 1.5 Hz, H-9), 4.06 (1H, dd, 10.5, 10.5 Hz, H-6), 2.62 (1H, m, H-11), 2.61 (1H, d, 10.5 Hz, H-5), 2.54 (2H, m, H-2), 2.45 (1H, q, 10.5 Hz, H-7), 2.08 (3H, s, OAc), 1.89 (6H, br s, H-14, -15), 1.26 (3H, d, 7.0 Hz, H-12); ^{13}C NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 180.2 (C, C-13), 171.6 (C, OAc), 143.2 (C, C-4), 141.5 (C, C-10), 124.2 (CH, C-3), 123.6 (CH, C-9), 83.6 (C, C-1), 80.9 (CH, C-6), 75.3 (CH, C-8), 66.3 (CH, C-5), 52.8 (CH, C-7), 47.1 (CH_2 , C-2), 42.0 (CH, C-11), 24.4 (CH_3 , C-14), 21.1 (CH_3 , OAc), 18.3 (CH_3 , C-15), 15.9 (CH_3 , C-12).



Compound 1



Compound 2

Figure 5. Chemical structure of compounds **1** and **2** from the halophyte *Atriplex gmelinii*.

3.2 *In vitro* 항산화 활성

3.2.1. DPPH radical 소거 활성

염생식물 *Atriplex gmelinii*의 methylene chloride 추출물과 methanol 추출물을 합하여 얻어진 조추출물(crude extract)을 용매 극성에 따라 분획하여 *n*-hexane 분획층, 85% aq.MeOH 분획층, *n*-BuOH 분획층, H₂O 분획층을 얻었다. 조추출물(crude extract)과 네 개의 분획층을 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하였고, 대조군으로 BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene)와 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

가장 활성이 뛰어났던 85% aq.MeOH 분획층이 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군 BHA와 비교하여 비슷한 radical 소거율을 나타내었고, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 합성 항산화제로 이용되는 대조군 BHA를 10 $\mu\text{g/mL}$ 처리한 것과 비슷한 효과를 가져왔다. 그 외 추출물과 용매 분획물들에서는 큰 활성을 나타내지 않았다 (Figure 6).

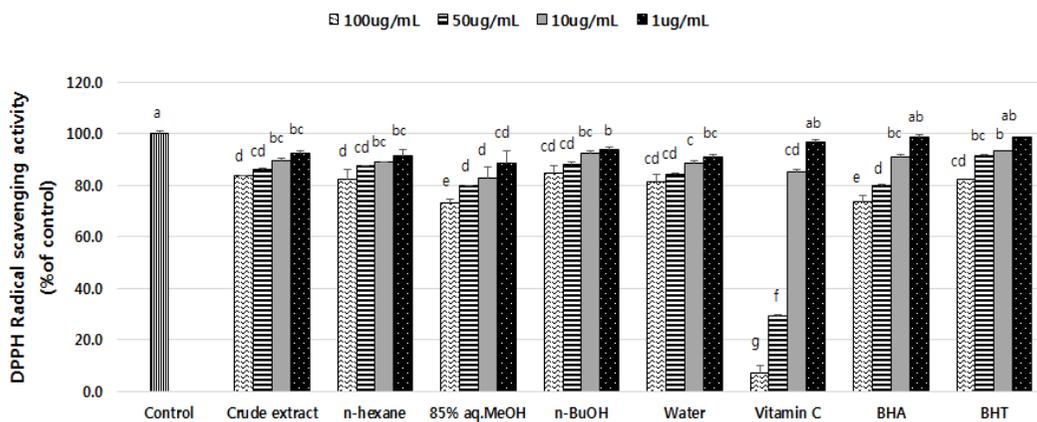


Figure 6. DPPH radical scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. ^{a-g} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.2.2. Peroxynitrite 소거 활성

조추출물(crude extract)과 네 개의 분획층을 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 희석하였고, 대조군으로는 Vitamin C (L-ascorbic acid)와 Penicillamine을 사용하였다.

모든 시료에서 authentic peroxynitrite가 유의적으로 소거되는 것이 보였다. 모든 시료가 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 약 60% 이상의 소거율을 보였으며, 특히, 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획층이 소거율 98.2%와 96.8%로 매우 좋은 소거활성을 나타내었다. 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획층은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서도 70.4%와 69.9%의 높은 소거활성을 보였다(Figure 7).

SIN-1의 분해로부터 유도되는 ONOO⁻의 소거활성 측정결과에서도 모든 시료들이 유의적인 소거활성을 나타내었으며 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 조추출물(crude extract)과 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, water 분획층은 각각 91.8%, 67.3%, 99.2%, 97.73%, 76.4% 소거율을 보였다. 특히 85% aq.MeOH과 *n*-BuOH 분획층은 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서도 63%의 소거율을 나타내어 Penicillamine과 유사한 소거활성을 보였다(Figure 8).

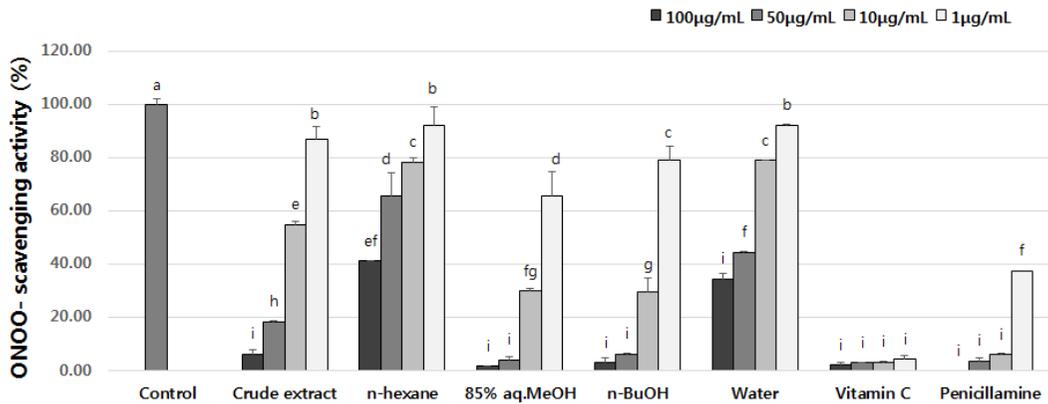


Figure 7. Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on authentic ONOO⁻ (% of control). ^{a-i} Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

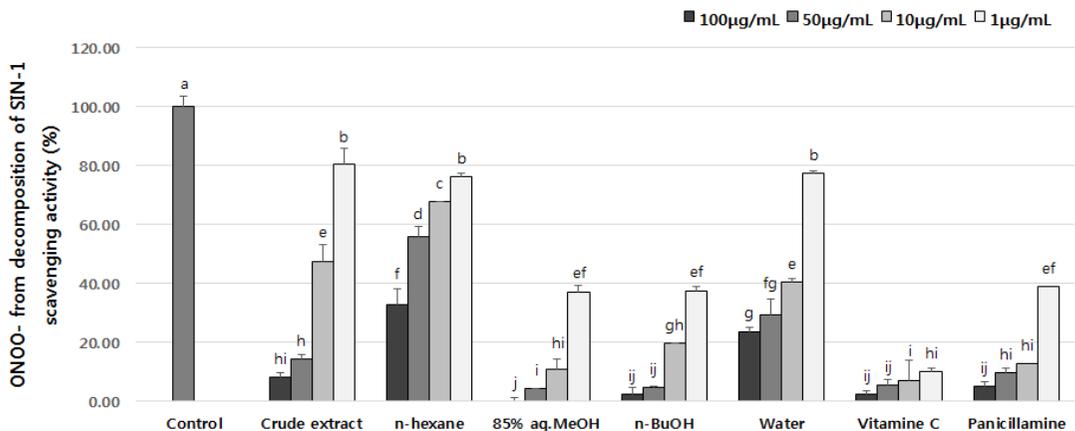


Figure 8. Scavenging activity of crude extract and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on ONOO⁻ from SIN-1 (% of control). ^{a-j} Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

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

환원력의 측정은 항산화물질이 노란색의 ferricyanide 착화합물(potassium ferricyanide)에 존재하는 Fe^{3+} 이온을 Fe^{2+} 이온의 형태로 환원시켜 파란색의 Perl's prussian blue가 생성되는 정도를 700 nm에서 측정한 것으로 항산화 활성과 환원력은 밀접한 관계가 있다. Crude extract와 네 개의 분획층을 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 희석하였고, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 모든 시료들이 농도 의존적으로 환원력을 보여주었으며 그 중에서 85% aq.MeOH과 n-BuOH 분획층에서 높은 환원력이 관찰되었다. 85% aq.MeOH과 n-BuOH 분획층은 100과 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 83.0%와 74.9%, 88.4%와 82.7%의 환원력을 보였다(Figure 9).

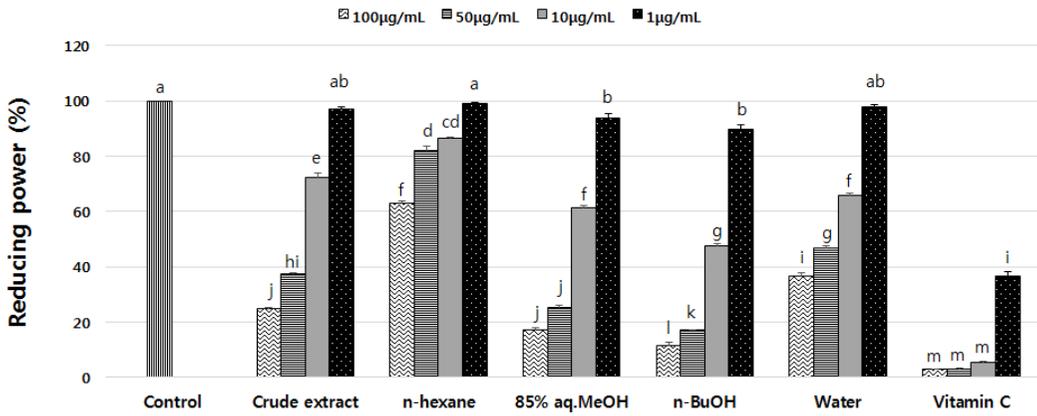


Figure 9. Ferric reducing antioxidant power of crude extract and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. (% of control). ^{a-m} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.3. 세포내 항산화 활성

3.3.1. HT-1080 세포 생존율 측정

가는갯능쟁이의 세포 수준에서의 항산화 활성을 측정하기 위해 추출물과 그리고 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O 네 개의 용매 분획층이 섬유육종세포인 HT-1080세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. 이때 시료는 각각 200, 100, 50, 10 μ g/mL의 농도로 희석하여 사용하였다. MTT assay를 이용한 세포생존율 측정 결과 추출물과 H₂O 분획층이 200 μ g/mL 농도에서 74.8%, 69.5%로 각각 세포독성을 나타내었다. 하지만 추출물과 모든 용매 분획물들이 100 μ g/mL농도 이하에는 모두 77% 이상의 생존율을 보여 주었기 때문에, 이를 바탕으로 100, 50, 10, 1 μ g/mL의 농도에서 활성실험을 진행하였다(Figure 10).

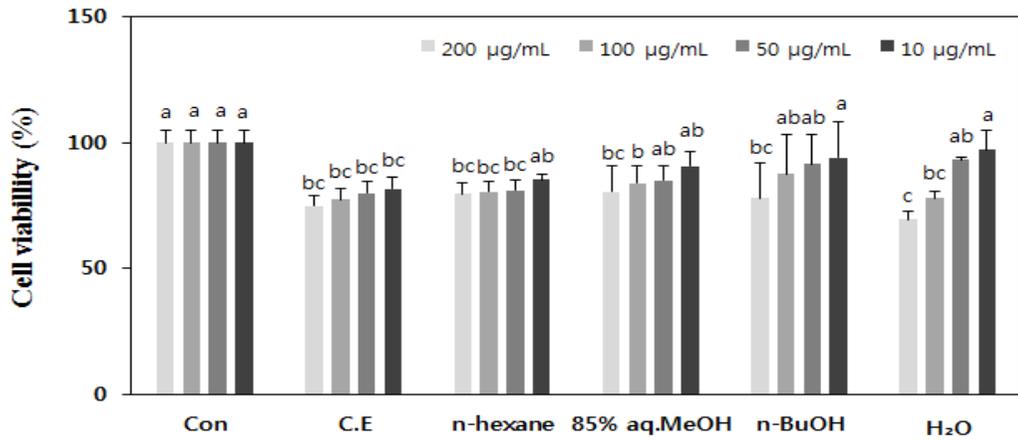


Figure 10. Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on viability of HT-1080 cells. ^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.3.2. 세포내 활성 산소종 (ROS) 소거 활성 측정

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어내는 DCFH-DA를 사용하여 0~120분까지 30분 간격으로 DCF fluorescence값의 변화를 측정하였다. 500 μ M의 H₂O₂로 처리한 세포에 다시 추출물과 각 용매 분획물의 100, 50, 10, 1 μ g/mL의 농도로 처리하였고, 시료를 처리하지 않고 500 μ M의 H₂O₂만 처리한 control과 시료와 H₂O₂ 모두로 처리하지 않은 blank를 대조군으로 사용하여 비교하였다. Control은 시간이 지날수록 DCF fluorescence 값이 지속적으로 증가하였으나 blank의 경우 그 값의 변화가 없이 같았다. 대부분의 시료들이 농도의존적으로 ROS의 생성을 억제하였으며, 100 μ g/mL의 농도에서 2시간 후 ROS 소거효과를 측정하였을 때 85% aq.MeOH, *n*-hexane, 추출물(CE), H₂O 그리고 *n*-BuOH 분획층의 순으로 높은 소거능을 보였다. 다른 시료들보다 매우 높은 소거활성을 보인 85% aq.MeOH의 경우, 100 μ g/mL농도에서는 blank와 거의 동등한 소거율을 보였고 10 μ g/mL농도에서도 48.7%의 높은 소거율을 보였다(Figure 11).

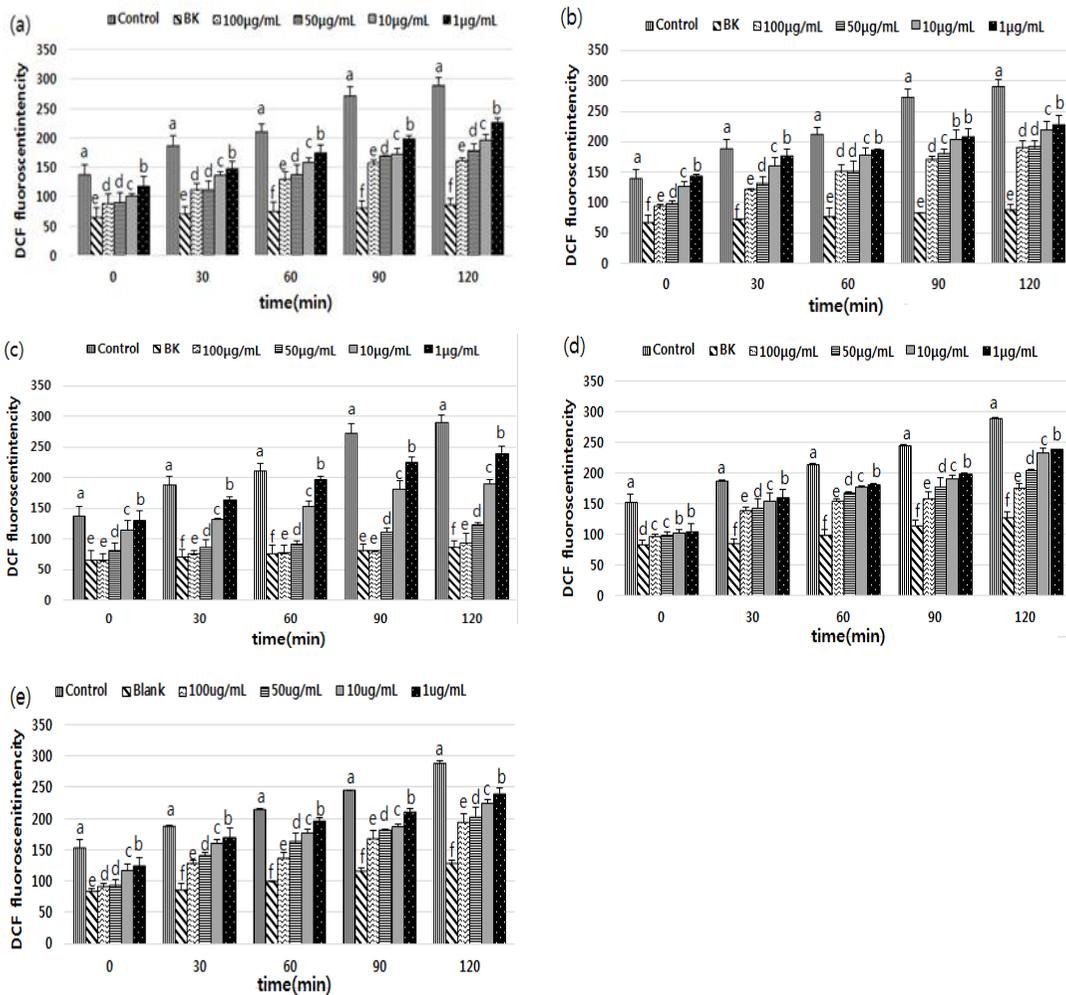


Figure 11. Scavenging effects of crude and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells. (a) Crude extract; (b) *n*-hexane; (c) 85% aqueous methanol; (d) *n*-butanol; (e) H₂O. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.3.3. Genomic DNA 산화억제능 측정

HT-1080 세포로부터 추출한 genomic DNA에 대한 항산화능을 측정하였다. 추출한 genomic DNA에 추출물과 네 개의 용매분획물을 100, 50, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하고 H_2O_2 와 FeSO_4 로 산화시켜 추출물과 각 용매 분획물들이 DNA 산화를 방지하는 정도를 측정하였다. 대조군으로는 시료로 처리하지 않고 H_2O_2 와 FeSO_4 만 처리한 control과 H_2O_2 와 FeSO_4 도 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다.

모든 시료에서 농도의존적인 산화 억제가 나타났으며 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 85% aq.MeOH 분획층이 99.3%로 거의 완전한 산화 억제율을 보여주었으며, 그 다음으로 *n*-BuOH 분획층, H_2O 분획층의 항산화 활성이 뛰어났었다. 전반적으로 농도구배적인 산화 억제 활성을 나타내었으며, control과 비교하였을 때 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 *n*-BuOH, 85% aq.MeOH, crude extract, H_2O , *n*-hexane 분획층이 각각 71.8%, 71.0%, 62.9%, 62.9, 42.7% 순으로 산화 억제율을 보여주었다(Figure 12).

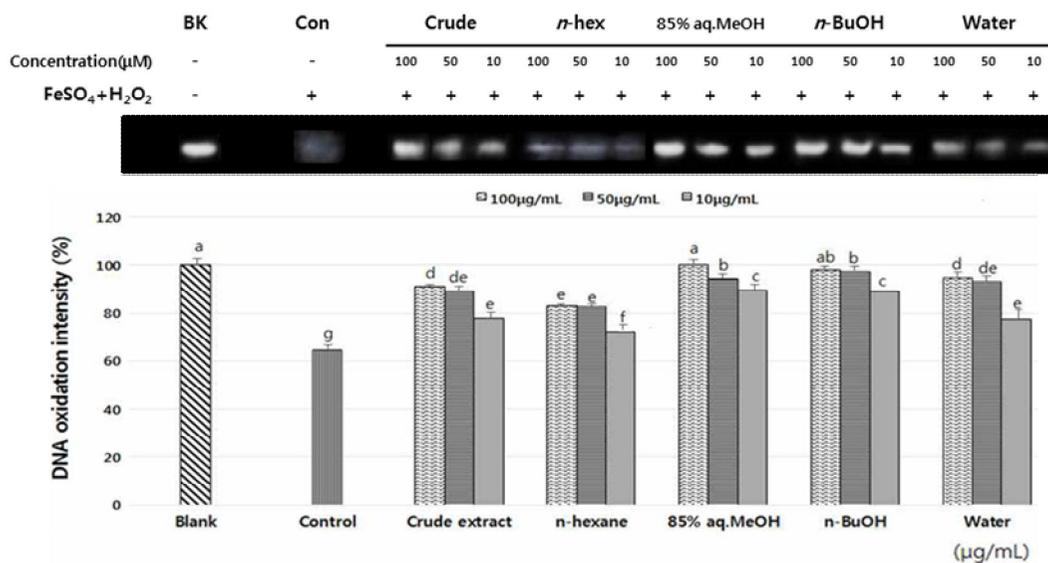


Figure 12. Antioxidant activity of crude and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on genomic DNA in HT-1080 cells. Band sizes were calculated and depicted as percentage compared to blank group. ^{a-g} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.4. 항염증 활성

3.4.1. RAW264.8 세포생존율 측정

가는갯능쟁이의 세포 수준에서의 항염증 활성을 측정하기 위해 추출물과 그리고 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획층이 RAW264.7 대식세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 알아보았다. 이때 시료는 각각 200, 100, 50 µg/mL의 농도로 희석하여 사용하였다. MTT assay를 이용한 세포생존율 측정 결과 *n*-hexane 분획층과 H₂O 분획층의 200 µg/mL농도에서 75.3%, 61.1%의 세포 생존율을 보여 각각 세포독성이 있음이 확인되었다. 추출물 및 모든 용매분획물이 100 µg/mL농도에서 77% 이상의 생존율을 보였으며, 이를 바탕으로 100, 50, 10 µg/mL의 농도로 활성실험을 진행하였다(Figure 13).

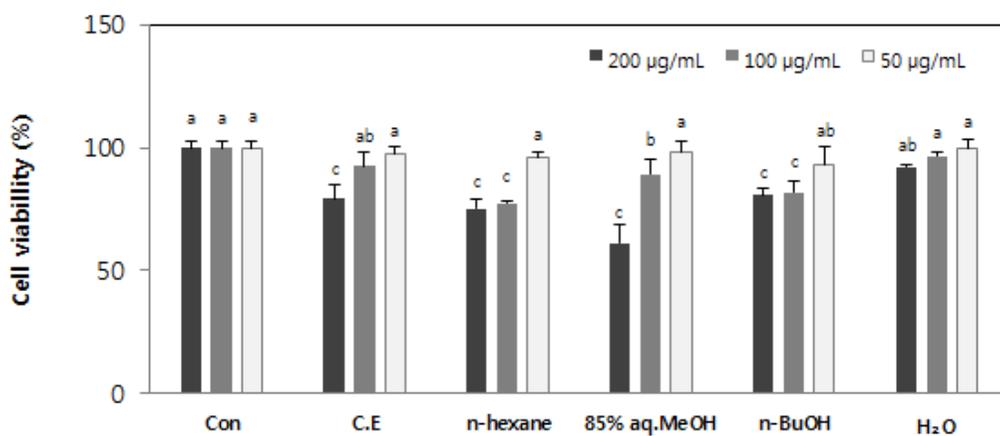


Figure 13. Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on viability of RAW264.7 cells. ^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.4.2. NO생성 억제효과

가는갯능쟁이 추출물을 극성순서에 따라 순차적으로 분획하여 얻은 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획층의 항염증활성을 검토하기 위해 세포내 독성을 나타내지 않는 농도하에서 RAW264.7 세포를 이용하여 이들 분획물이 NO 생성에 미치는 효과를 측정하였다. 측정된 결과 시료를 처리하지 않고 LPS 1 μ g/mL 를 처리한 대조군에 비해 모든 분획층들이 유의적으로 높은 NO 생성 억제 효과를 나타내었다. 특히 85% aq.MeOH 분획이 가장 높은 활성을 나타내었으며, 계속해서 *n*-BuOH, *n*-hexane, H₂O 분획의 순서로 NO 생성 억제효과를 나타내었다. 100 μ g/ml의 농도에서 NO 생성 억제 정도를 비교한 결과 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획이 각각 63.2%, 79.1%, 69.6%, 58.5%의 저해율을 나타내었다(Figure 14).

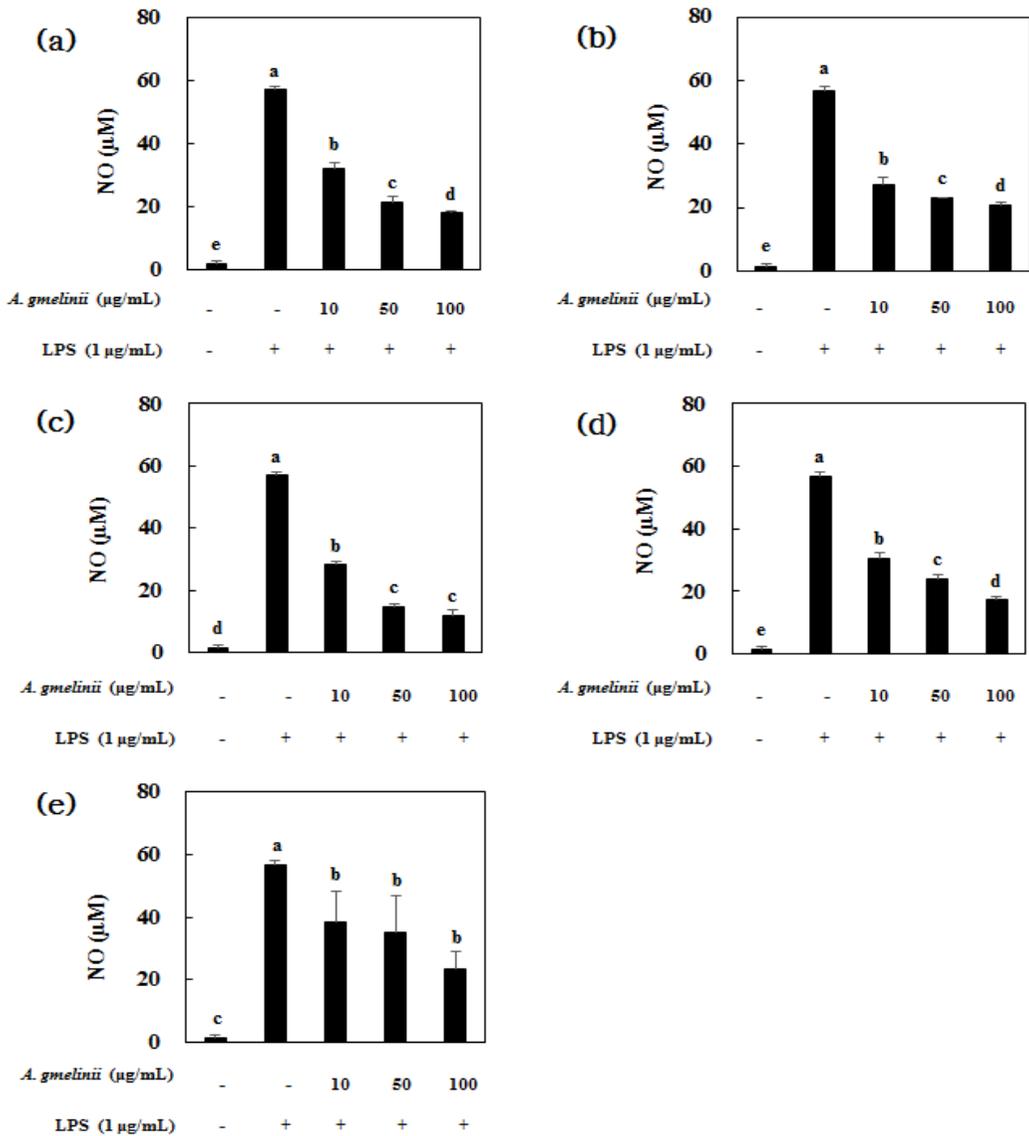


Figure 14. Effects of crude extract (a) and its solvent fractions (*n*-hexane (b), 85% aq. MeOH(c), *n*-BuOH(d), H₂O(e)) from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on nitrite production in RAW264.7 cells. ^{a-e} Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

3.5. 항암 활성

3.5.1. 인체 유래 암세포에 대한 세포 증식 억제 효과

3.5.1.1. HT-1080 세포 증식 억제 효과

인체 섬유 육종 세포인 HT-1080 세포에 대한 추출물과 네 개의 용매분획층의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. 추출물과 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획층은 200, 100, 50, 10, 1 μ g/mL의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 추출물과 네 개의 용매분획층은 모두 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. 85% aq.MeOH, *n*-hexane 및 *n*-BuOH 분획층은 200 μ g/mL 농도에서 각각 93.6%, 92.1%, 74.2%의 억제율을 보여 주었으며, 특히 85% aq.MeOH 분획층은 1 μ g/mL의 농도에서도 50% 정도의 좋은 세포 증식 억제율을 나타내었다. *n*-Hexane 분획층 또한 50 μ g/mL 농도까지 50%가 넘는 뛰어난 세포 증식 억제 효과를 보여주었다. *n*-BuOH 분획층의 경우, 200 μ g/mL 농도에서는 50%가 넘는 세포 증식 억제 효과를 보였으나 더 낮은 농도 희석한 경우 그 효과가 큰 차이로 감소하였다(Figure 15).

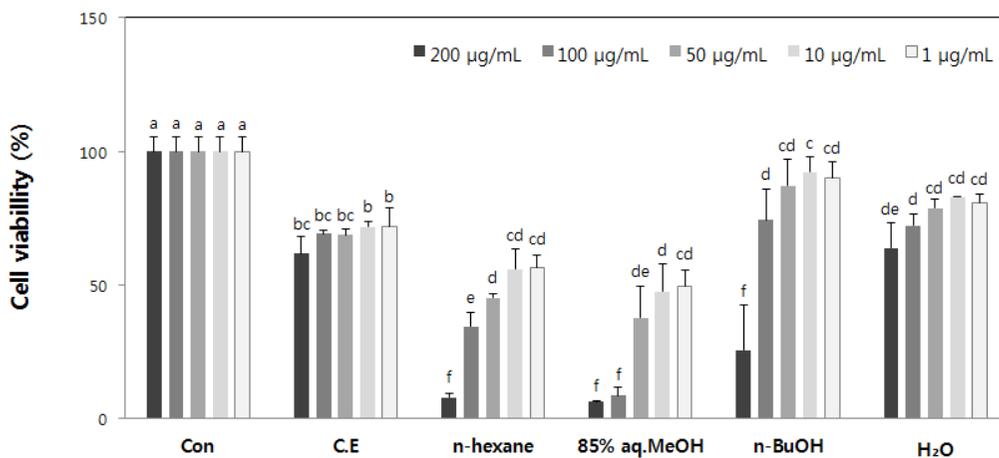


Figure 15. Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on viability of HT-1080 cells. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.5.1.2. HT-29 세포 증식 억제 효과

인체 결장암 세포인 HT-29 세포에 대한 추출물과 네 개 용매 분획층의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. 추출물, *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획층은 각각 200, 100, 50, 10, 1 μ g/mL 의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

추출물과 네 개의 용매 분획층 모두 유의적인 세포 증식 억제 활성을 나타내었다. 그 중 85% aq.MeOH 분획층과 *n*-hexane 분획층은 200, 100 μ g/mL 농도에서는 좋은 억제효과를 나타내어 각각 89.5%, 79.9% 그리고 84.6%, 74.9%의 억제율을 나타내었으며 1 μ g/mL의 농도에서도 약 60%의 억제율을 보여 주었다 (Figure 16).

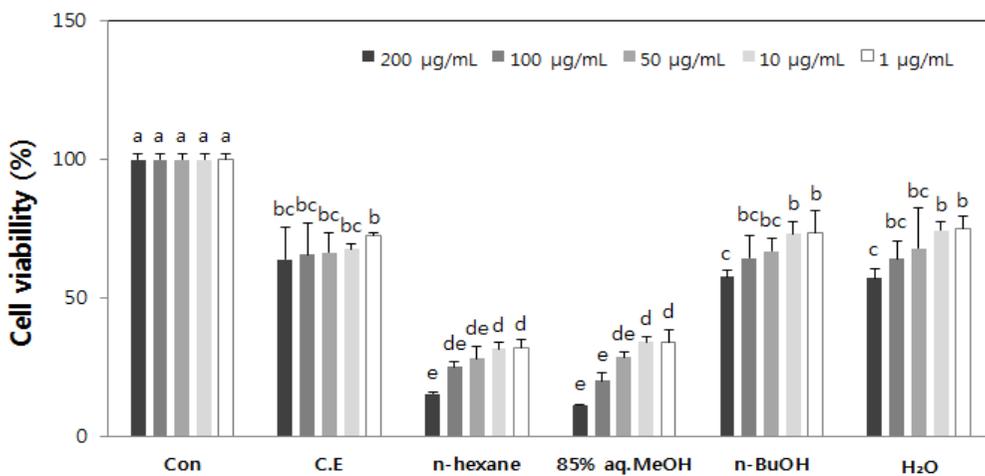


Figure 16. Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on viability of HT-29 cells. ^{a-e} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.5.1.3. AGS 세포 증식 억제 효과

인체 위암 세포에 대한 추출물과 네 개의 용매 분획층의 세포 증식 억제효과를 MTT assay를 통해 측정하였다. 추출물과 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획층은 200, 100, 50, 10, 1 μ g/mL 의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

추출물과 네 개의 용매 분획층은 비교적 뛰어난 세포 증식 억제 활성을 보여 주었다. 추출물은 200 μ g/mL 농도에서 89.9%의 억제활성을 나타내었고 추출물을 극성에 따라 분획한 용매 분획들중에서는 85% aq.MeOH와 *n*-hexane 분획층이 100 μ g/mL 농도에서 91.9%, 86.3%의 억제 활성을 나타내었으며 1 μ g/mL 의 농도에서도 약 50% 정도의 유의적인 억제활성을 나타내었다(Figure 17).

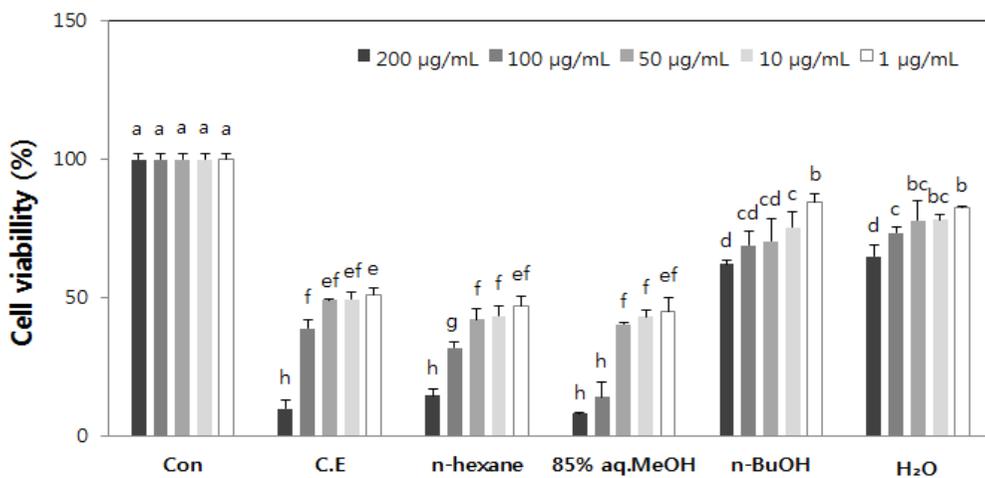


Figure 17. Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on viability of AGS cells. ^{a-h} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.5.2. 기질 금속단백질분해효소(Matrix metalloproteinase) 저해활성 효과

3.5.2.1. Gelatin zymography를 통한 MMP-9과 MMP-2의 발현

가는갯능쟁이 추출물과 용매 분획물이 HT-1080 세포에서 MMP-9과 MMP-2의 발현에 미치는 영향을 측정하기 위해 gelatin zymography를 실시하였다. HT-1080 세포에 추출물과 용매 분획물을 100 μ g/mL씩 처리하고 blank를 제외한 나머지에 PMA 10 μ g/mL씩을 처리해 MMP-9과 MMP-2의 발현을 유도하였다.

85% aq.MeOH 분획층이 MMP-9, MMP-2를 각각 18.6%, 29.1% 발현시켰는데, 이는 아무것도 처리하지 않은 blank수준보다 더욱 좋은 발현억제 활성을 나타낸 것이었다. 85% aq.MeOH 분획층 다음으로는 MMP-9에서는 58.1%로 *n*-hexane 분획층이, MMP-2에서는 85% aq.MeOH 분획층을 제외한 모든 용매 분획층이 50% 정도의 발현을 나타내었다(Figure 18).

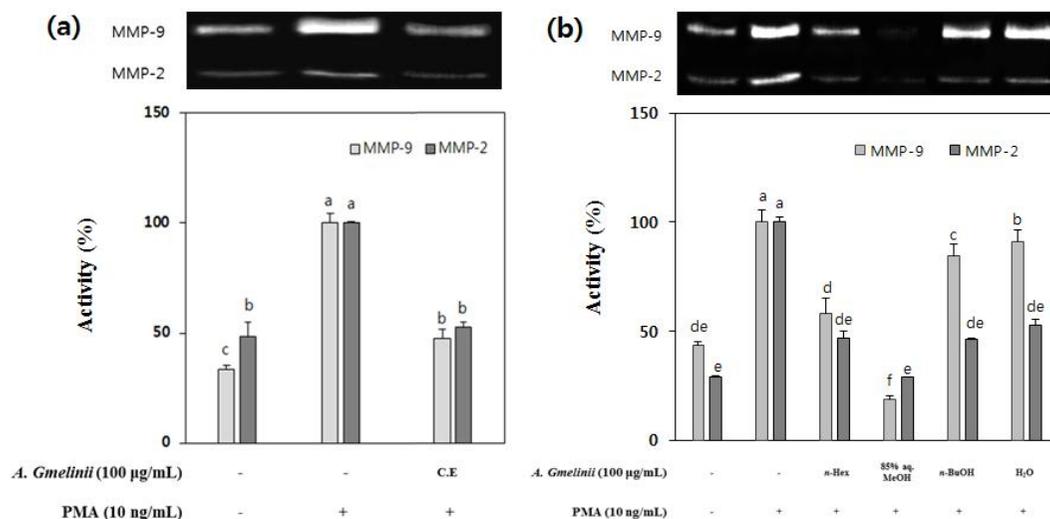


Figure 18. Effects of crude extract (a) and its solvent fractions (b) from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on enzymatic activity of MMP-9 and MMP-2 determined by gelatin zymography in HT-1080 cells. Gelatinolytic activities of MMP-9 and MMP-2 on gelatin containing 10% polyacrylamide gel. Band sizes were calculated and depicted as percentage compared to control group. Values are means \pm SD. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.5.2.2. RT-PCR과 Western Blot을 통한 MMP-9과 MMP-2의 mRNA와 protein level의 발현

가는갯능쟁이로부터 얻어진 유기용매 추출물과 그것의 용매 분획물들을 100 μ g/mL씩 처리한 HT-1080 세포에서 MMP-9와 MMP-2의 mRNA와 protein level 발현을 확인하기 위해 RT-PCR과 Western blot을 실시하였고, 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 blank와 PMA를 처리한 control을 사용하였으며, House keeping gene으로 β -Actin을 사용하였다.

추출물과 네 개의 용매 분획층 모두 mRNA의 발현량을 현저히 감소시키는 것을 관찰할 수 있었고, 그 중 추출물과 *n*-BuOH 분획층을 처리한 경우 MMP-9의 mRNA 발현량은 각각 25.1%, 24.5%였고, MMP-2의 mRNA 발현량은 27.4%, 27.3%로 아무것도 처리하지 않은 blank수준까지 MMP-9과 MMP-2의 mRNA발현량이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

Protein level 발현에서는 추출물의 경우, MMP-9의 protein 발현량은 62.2%, MMP-2의 protein 발현량은 39.8%로 MMP-9보다는 MMP-2에서 좋은 발현억제효과를 보였고, 네 개의 분획물에서는 *n*-BuOH 분획층과 85% aq.MeOH 분획층이 각각 MMP-9은 30.3%, 34.4%, MMP-2는 41.5%, 45.3%로 분획물 중 가장 높은 억제활성을 가짐을 관찰할 수 있었다(Figure 19).

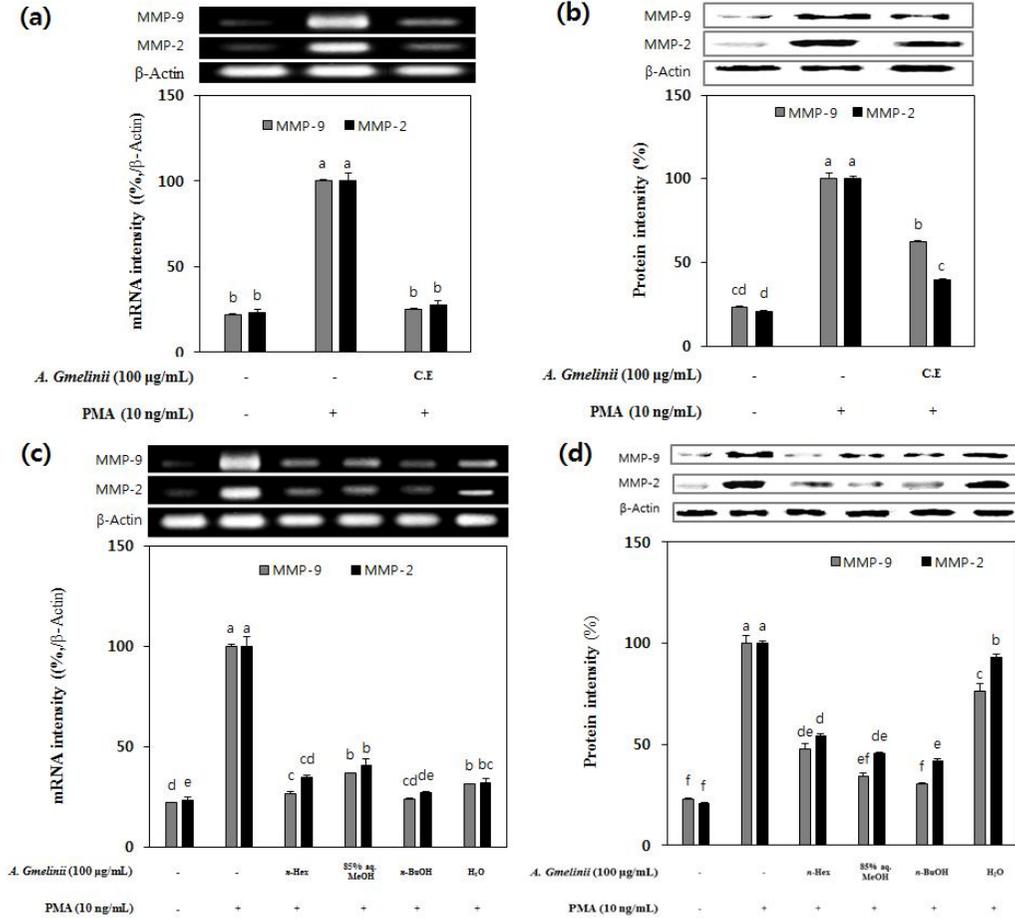


Figure 19. Effects of crude extract and its solvent fractions from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on mRNA levels (a and c) and protein levels (b and d) of MMP-9 and MMP-2 determined by RT-PCR and Western blot in HT-1080 cells. β -Actin was used as an internal standard. Band sizes of RT-PCR and Western blot were calculated and depicted as percentage compared to control group. Values are means \pm SD. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.6. 화합물의 항산화 활성

3.6.1. DPPH radical 소거 활성

염생식물 *Atriplex gmelinii*의 85% aq.MeOH 분획층, *n*-BuOH 분획층에서 분리한 compounds **1**, **2**를 50, 10, 5 μ g/mL 농도로 희석하였고, 대조군으로 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene)와 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다.

Compounds **1**, **2** 둘 다 뛰어난 radical 소거율을 보였으며, compound **1**의 경우, 50, 10 μ g/mL의 농도에서 대조군 BHT, BHA와 비교하여 vitamin C 다음으로 가장 좋은 활성을 나타내었다. Compound **2**의 경우, 10 μ g/mL의 농도에서 대조군 BHA를 10 μ g/mL 처리한 것과 비슷한 효과를 가져왔다(**Figure 20**).

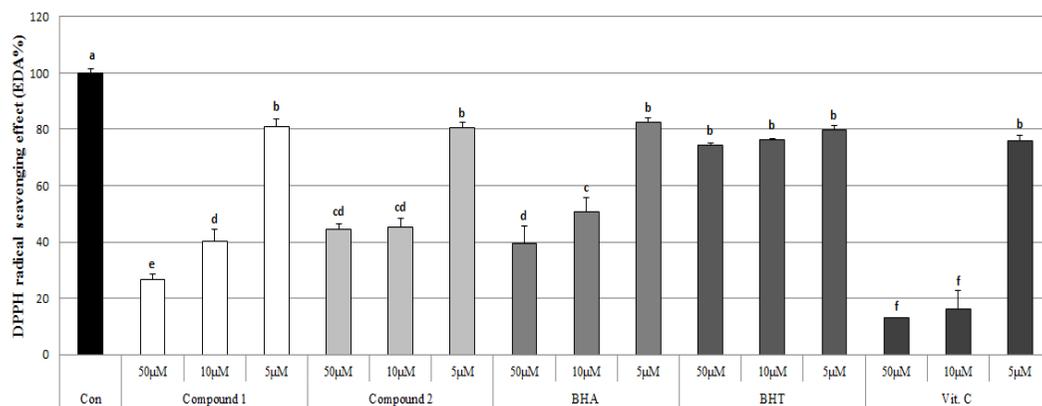


Figure 20. DPPH radical scavenging activity of compounds **1** and **2** from the halophyte *Atriplex gmelinii*. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.7. 화합물의 항염증 활성

3.7.1. RAW264.7 세포에 대한 독성

가는갯능쟁이의 항염증 활성을 측정하기 위해 compounds 1, 2가 대식세포인 RAW264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 알아보았다. 이때 시료는 각각 50, 10, 5, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석하여 사용하였다. MTT assay를 이용한 세포생존율 측정 결과 모든 농도에서 모두 80% 이상의 생존율을 보였으며, 이를 바탕으로 10, 5, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 활성실험에 사용하였다 (Figure 21).

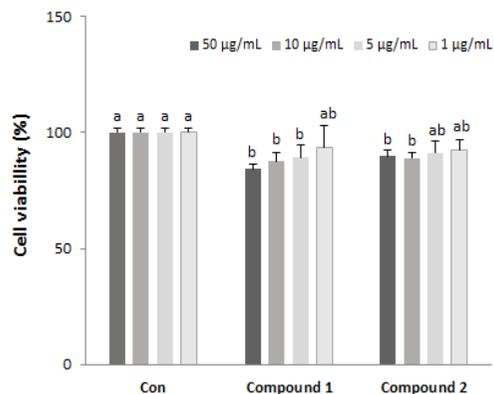


Figure 21. Effects of compounds **1** and **2** from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on viability of RAW264.7 cells. ^{a-c} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.7.2. 화합물의 NO생성 억제 효과

가는갯능쟁이에서 compound 1과 2의 항염증활성을 검토하기 위해 세포내 독성을 나타내지 않는 농도 이하에서 LPS 자극에 의해 활성화된 RAW264.7 세포를 이용하여 이들 분획물이 NO 생성에 미치는 효과를 측정하였다. 측정된 결과, 시료를 처리하지 않고 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 대조군에 비해 모든 화합물들이 63% 이상의 NO 생성 억제 효과를 나타내었다(Figure 22).

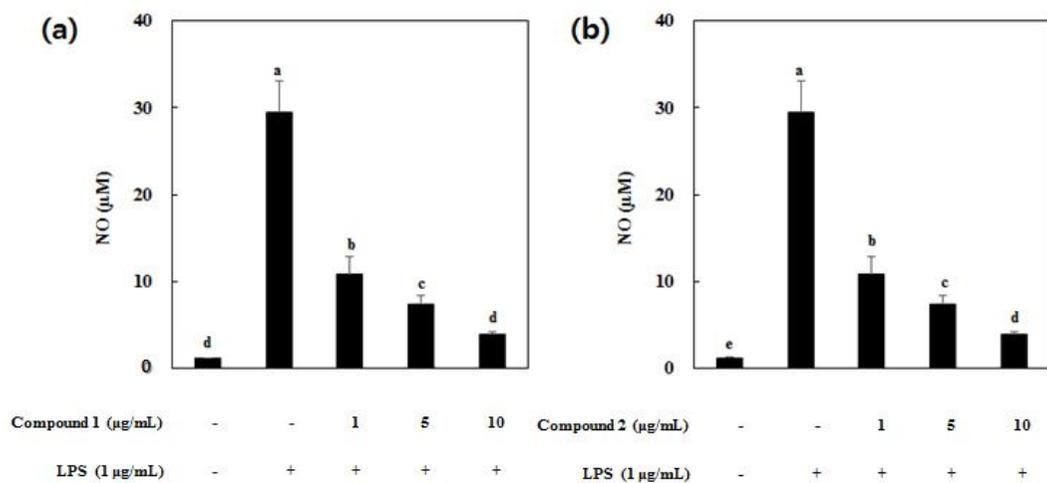


Figure 22. Effects of compounds **1** and **2** from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on nitrite production in RAW264.7 cells. ^{a-e} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.7.3. 화합물의 염증 유발 인자 억제 효과

가는갯능쟁이에서 분리한 compound 1의 추가적인 항염증활성을 검토하기 위해 항염증 유발 인자에 대한 RT-PCR을 진행하였다. iNOS와 COX-2, TNF- α 는 면역세포의 활성화를 통해 염증반응을 유발하는 물질로 염증상태에서는 NO와 같은 염증매개물질의 생성을 유도하며, 전염증성 사이토카인인 IL-1 β 및 IL-6는 활성화된 대식세포에서 과도하게 생성되어 발열, 조직손상 및 염증반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 따라서 가는갯능쟁이 분획물로부터 얻어진 화합물은 IL-1 β 을 제외한 4가지 염증 유발인자의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였으며, 가장 유의적인 억제 활성을 보인 COX-2의 경우 100 μ g/M의 시료를 처리한 결과 control 대비 mRNA 발현을 50% 억제시켰다(Figure 23).

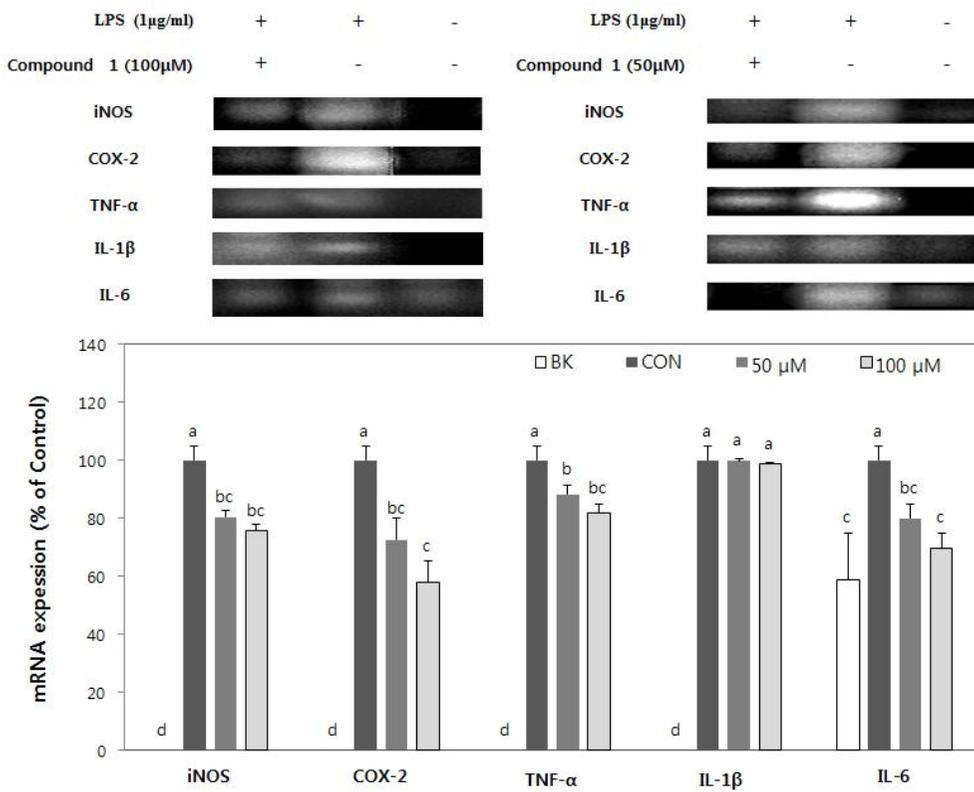


Figure 23. Effects of compound **1** from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on mRNA level in HT-1080 cells. ^{a-e} Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

3.8. 화합물의 항암 활성

3.8.1. 화합물의 인체 유래 암세포에 대한 세포 증식 억제 효과

3.8.1.1. HT-1080 세포 증식억제 효과

인체 섬유 육종 세포인 HT-1080 세포에 대한 compounds 1과 2의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. compounds 1과 2는 50, 10, 5, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 실험에 사용하였으며 측정한 결과 1과 2는 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 35.9%, 31%로 세포 증식 억제 효과를 보여주었다[Figure 24 (a)].

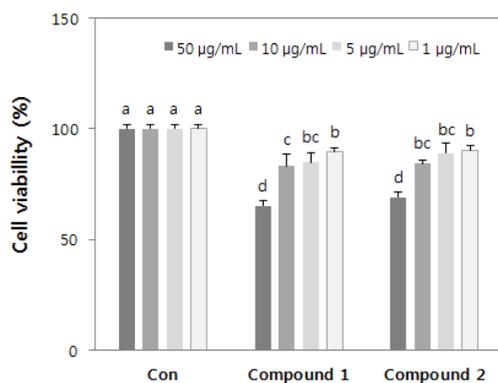
3.8.1.2. HT-29 세포 증식 억제 효과

인체 결장암 세포인 HT-29 세포에 대한 compounds 1과 2의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. Compounds 1과 2는 50, 10, 5, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. Compounds 1과 2는 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 37.2%, 33.6%로 세포 증식 억제 효과를 보여주었다[Figure 24 (b)].

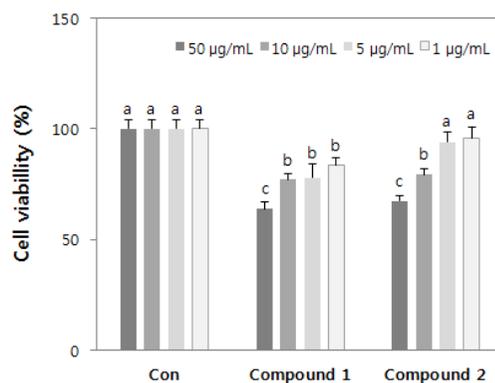
3.8.1.3. AGS 세포 증식 억제 효과

인체 위암 세포인 세포에 대한 compounds 1과 2의 세포 증식 억제 정도를 MTT assay를 통해 측정하였다. Compounds 1과 2는 50, 10, 5, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. Compounds 1과 2는 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 29.3%, 39.5%로 세포 증식 억제 효과를 보여주었다[Figure 24(c)].

(a) HT-1080



(b) HT-29



(c) AGS

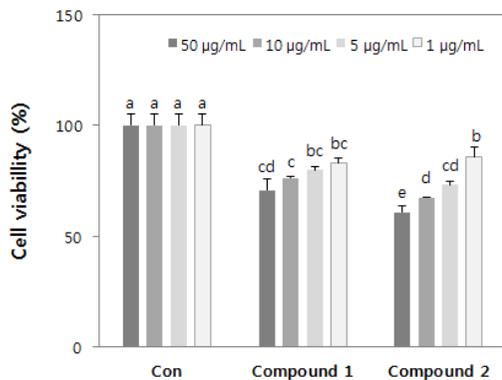


Figure 24. Effects of compounds 1 and 2 from the halophyte *Atriplex gmelinii*. on viability of HT-1080 (a), HT-29 (b), and AGS (c) cells. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.8.2. 화합물의 기질 금속단백질분해효소(Matrix metalloproteinase) 저해 활성

3.8.2.1. 화합물의 gelatin zymography를 통한 MMP-9과 MMP-2의 발현 효과

배양된 HT-1080 세포에 10 ng/mL PMA와 compound 1을 각각 1, 5, 10 μ g/mL 농도로 24시간 동안 반응시킨 후, 상등액을 얻어 gelatin zymography를 실시하였다. 그 결과 PMA를 단독 처리한 양성대조군과 비교 시 compound 1의 처리에 의해 농도 의존적으로 MMP-9의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 그러나 compound 1의 처리에 따른 MMP-2의 발현 감소는 나타나지 않았다. Compound 2의 처리에 따른 MMP-9/ MMP-2의 발현은 감소하는 경향을 보였으나 농도 구배와 같지는 않았다(Figure 25).

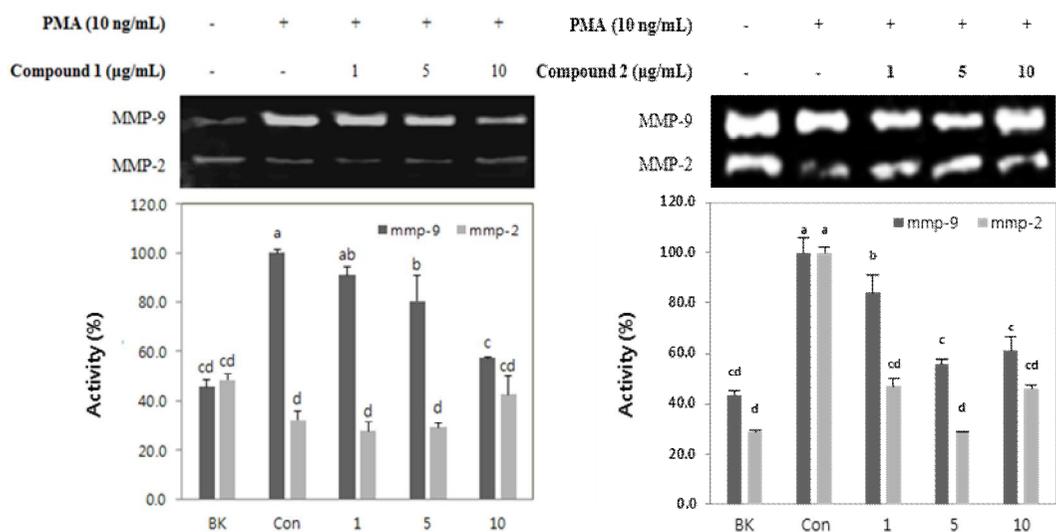


Figure 25. Effects of compounds 1 and 2 from the halophyte *Atriplex gmelinii* on enzymatic activity of MMP-9 and MMP-2 determined by gelatin zymography in HT-1080 cells. Gelatinolytic activities of MMP-9 and MMP-2 on gelatin containing 10% polyacrylamide gel. Band sizes were calculated and depicted as percentage compared to control group. Values are means \pm SD. ^{a-f} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

4. 결론 및 고찰

염생식물 *Atriplex gmelinii*를 유기용매로 추출하여 추출물(crude extract)을 얻은 후에 이 추출물을 용매극성에 따라 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획층으로 분획하였으며 이들에 대한 항산화, 항염증, 항암효과를 탐색하였다.

가는갯능쟁이 추출물은 우수한 peroxy-nitrite 소거능과 genomic DNA 산화 방지능, 그리고 비교적 좋은 세포내 ROS 소거능을 가지고 있었으며 DPPH radical 소거효과의 경우에는 절대적인 수치 자체는 그렇게 높지 않았으나 가장 활성이 뛰어났던 85% aq.MeOH 분획층이 합성 항산화제로 많이 사용되는 BHA와 비슷한 정도의 소거능을 보였다. Authentic peroxy-nitrite와 SIN-1에서 유도된 peroxy-nitrite에 대해서는 200, 100 μ g/mL의 농도에서 85% aq.MeOH 분획층과 *n*-BuOH 분획층이 대조군인 vitamin C와 penicillamine과 비교할 만한 활성을 보여주었고 두 분획층은 genomic DNA 산화 억제능에 있어서도 좋은 활성을 띠었다. 환원력 측정에서는 *n*-BuOH 분획층이 좋은 활성을 나타내었으며 HT-1080 세포내에 생성되는 활성산소종(ROS)에 대한 소거능을 측정한 실험에서는 추출물을 포함한 모든 시료들이 좋은 소거능을 보여주었으며 그 중 85% aq.MeOH 분획층이 가장 활성이 뛰어났다. LPS로 처리한 RAW 264.7 세포에서 생성되는 NO에 대한 억제효과 실험에서도 추출물과 네 개의 용매분획층이 모두 NO 생성 억제 효과를 보여 주었으며, 그 중에서 85% aq.MeOH 분획층이 가장 뛰어난 NO 생성 억제 효과를 보여주었다.

인체 암세포 증식 억제활성 검색에서는 모든 시료들이 인체 유래 암세포에 대해 농도의존적인 증식 억제활성을 보여 주었으나 특히 *n*-hexane과 85% aq.MeOH 분획층이 뛰어난 억제활성을 보여주었다. 또한 암전이 과정에 중요한 역할을 한다고 알려진 MMPs 발현에 대한 추출물과 분획물의 억제효과를 알아보기 위해 gelatin zymography, RT-PCR과 Western blot 실험을 진행하였다. 추출물과 용매 분획물 대부분이 분비된 MMPs, mRNA 수준에서의 MMP발현, protein 수준에서의 MMP발현을 억제하였고, 그 중 85% aq.MeOH, *n*-hexane,

n-BuOH 분획층이 가장 훌륭한 발현 억제 효과를 가져왔다.

추출물과 용매분획물에 대한 생리활성 검색결과를 분석해 보면 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, *n*-hexane 분획층에서 좋은 활성이 확인되었다. 따라서 이 t 세 분획층으로 물질분리를 시도하였으며 결과적으로 두 개의 화합물 3,5-dicaffeoyl-*epi*-quinic acid (1)과 1-hydroxyguai-3,9-dien-6,12-olide-8-O-acetate (2)가 얻어졌다.

분리된 두 개의 화합물들에 대해 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과 compounds 1과 2 둘 다 우수한 radical 소거활성을 보였으며, 1의 경우에는 합성 항산화제로 널리 사용되는 BHA 보다 더 좋은 활성을 나타내었고 2의 경우에는 BHA와 비슷한 소거효과를 보여 주었다. RAW264.7 세포를 이용하여 NO 생성에 미치는 효과를 측정한 결과, 모든 화합물들이 63% 이상의 NO 생성 억제 효과를 나타내었다. 가는갯능쟁이의 주대사산물인 compound 1의 추가적인 항염증 활성을 검토하기 위해 진행된 항염증 유발 인자에 대한 RT-PCR 발현 실험에서 compounds 1과 2는 IL-1 β 을 제외한 4가지 염증 유발인자의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였으며, 가장 유의적인 억제 활성을 보인 COX-2의 경우 100 μ g/M의 시료를 처리한 결과 control 대비 mRNA 발현을 50% 억제시켰다. Compounds 1과 2는 50 μ g/mL 농도에서 HT-29, AGS, HT-1080의 인체 유래 암세포에 대해 약 30% 정도의 억제효과를 나타내었으며, 암세포의 전이 및 침윤과 밀접한 연관이 있는 MMP-9/ MMP-2의 발현 또한 억제시키는 것을 확인할 수 있었다.

가는갯능쟁이 추출물과 용매 분획물 및 분리된 화합물들은 항산화, 항염증 및, 항암효과를 확인하는 다방면의 실험에서 우수한 활성을 나타내어 가는갯능쟁이가 기능성 물질을 개발할 수 있는 잠재적 소재가 될 수 있음을 보여 주었다. 따라서 이러한 연구결과는 국내 해안에 서식하는 염생 식물자원들로부터 새로운 생리활성 기능성 소재를 개발할 수 있는 지표가 될 것으로 사료된다.

5. 참고문헌

- Bae JJ, Yoon HS, Choo YS, Song SD (2003) The responses of antioxidative enzymes and salt tolerance of *Atriplex gmelini*. Korean J Ecol **26**:273-280
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature **181**:1199-1200
- Das, S., Baruah, R. N., Sharma, R. P., Baruah, J. N., Kulanthaivel, P., and Herz, W. (1983) Phytochemistry **22**:1989-1991.
- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer **2**:161-174
- Foyer, C., and G. Noctor (2005) Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell **17**:1866-1875
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V (1997) Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. Science **277**:225-228
- Ha KT, Kim JK, Kang SK, Kim DW, Lee YC, Kim HM, Kim CH (2004) Inhibitory effect of Sihoga-Yonggol-Moryo-Tang on matrix metalloproteinase-2 and-9 activities and invasiveness potential of hepatocellular carcinoma. Pharmacol Res **50**:279-285
- Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO (2011) Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. FEBS J **278**:28-45
- Hamed, K. B., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A. and Abdelly, C. (2007) Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. Plant Growth Regul **53**:185-194
- Hernández, J. A., Campillo, A., Jiménez, A., Alarcón, J. J., and F. Sevilla (1999) Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl

- in pea plants. *New Phytol* **141**:241-251
- Hu J, Van den Steen PE, Sang Q, Opdenakker G (2007) Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* **6**:480-498
- Jin, K. S., Lee, J. Y., Kwon, H. J. and Kim B. W. (2014) Antioxidative and anti-inflammatory activities of *Ardisia arborescens* ethanol extract. *Korean J. Life Sci.* **24**:713-720
- Jithesh, M. N., Prashanth, S. R., Sivaprakash, K. P. and Parida, A. K. (2006) Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *J. Genet.* **85**:237-254
- Kang J-H, Han I-H, Sung M-K, Yoo H, Kim Y-G, Kim J-S, Kawada T, Yu R (2008) Soybean saponin inhibits tumor cell metastasis by modulating expressions of MMP-2, MMP-9 and TIMP- 2. *Cancer Lett* **261**:84-92
- Kim EK (2013) Halophytes of Korea. *Nature and Ecology*, Seoul, p368
- Kim, H. J. and Lee, Y. S. (2005) Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* Ramar and their antioxidant activities. *Planta Med.* **71**:871-876.
- Kim, H. J., Jin, C., and Lee, Y. S. (2007) Isolation and antioxidative activities of caffeoylquinic acid derivatives and flavonoid glycosides from leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *J. Appl. Pharmacol.* **15**:46-51.
- Kim H, Kong C-S, Seo Y (2017) Inhibitory activity of *Ligustrum japonicum* fructus on MMP-2 and MMP-9. *KSBB Journal* **32**:328-334
- Kim J, Kong C-S, Seo Y (2018) Inhibitory effects of *Carex pumila* extracts on MMP-2 and MMP-9 activities in HT-1080 cells. *Ocean Polar Res* **40**:249-257
- Kim S-K (2018) If you know the sea, you will see the future (Marine biological resources that have become economically useful due to the 4th industrial revolution). *World Science*, Seoul, pp283-290
- Kim, Y. J. and Son, D. Y. (2014) Inflammatory mediator regulation of the

- Zizyphus jujube* leaf fractions in the LPS-stimulated Raw264.7 mouse macrophage. Korean J. Food Preserv **21**:114-120
- Kooy, N.W., Royall, J.A., Ischiropoulos, H. & Beckman, J.S., (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radical Biology & Medicine **16**:149-156
- Kong, C. S. (2014) Anti-inflammatory activity of the solvent-partitioned fractions from *Spergularia marina* in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Prev. Nutr. Food Sci. **19**:261-267
- Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magne, C. and Abdelly, C. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. Food Chem. Toxicol. **47**:2083-2209
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A. and Abdelly, C. (2008) Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. Comp. Ren. Biol **331**:865-873
- Lee, J. Y., Song, D.-G., Lee, E. H., Jung, S. H., Nho, C. W., Cha, K. H., and Pan, C.-H. (2009) Inhibitory effects of 3,5-O-dicaffeoyl-epi-quinic acid from *Gymnaster koraiensis* on AKR1B10 J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. **52**:731-734.
- Legrand C, Gilles C, Zahm JM, Polette M, Buisson AC, Kaplan H, Birembaut P, Tournier JM (1999) Airway epithelial cell migration dynamics: MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. J Cell Biol **146**:517-529
- Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A (1981) Reporting results of cancer treatment. Cancer **47**:207-214
- Møller, I. M., Jensen, P. E., and A. Hansson (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. Annu Rev. Plant Biol **58**:459-481
- Mook ORF, Frederiks WM, Van Noorden CJF (2004) The role of gelatinases in

- colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1705**:69-89
- Mun, O. J., Kwon, M. S., Bae, M. J., Ahn, B. N., Fatih, K., Kim, M. H., Lee, S. H., Yu, K. H., Kim, Y. Y., Seo, Y. W. and Kong, C. S. (2015) Anti-inflammatory activity of *Hizikia fusiformis* extracts fermented with *Lactobacillus casei* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **30**:38-43
- National Institute of Biological Resources (2011) Biodiversity of the Korean Peninsula. https://species.nibr.go.kr/home/mainHome.do?cont_link=009&subMenu=009002&contCd=009002&ktsn=120000060646. Accessed 25 Mar 2019
- Okimoto, Y., Watanabe, A., Niki, E., Yamashita, T., & Noguchi, N. (2000) A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS letters* **474**:137-140
- Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A. H., and I. Turkan (2013) Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. *Funct. Plant Biol* **40**:832-847
- Sang QXA, Jin Y, Newcomer RG, Monroe SC, Fang X, Hurst DR, Lee, SW, Cao Q, Schwartz MA (2006) Matrix metalloproteinase inhibitors as prospective agents for the prevention and treatment of cardiovascular and neoplastic diseases. *Curr Top Med Chem* **6**:289-316
- Seo UK, Lee YJ, Kim JK, Cha BY, Kim DW, Nam KS, Kim CH (2005) Large-scale and effective screening of Korean medicinal plants for inhibitory activity on matrix metalloproteinase-9. *J Ethnopharmacol* **97**:101-106
- Son J, Kim H, Kong C-S, Seo Y (2018) Anti-invasive effect of the solvent-partitioned fractions from viticis fructus in PMA-induced HT-1080 cells. *J. Life Sci* **28**:293-299
- Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:463-516

- Yang J-L, Lin J-H, Weng S-W, Chen J-C, Yang J-S, Amagaya S, Funayana S, Wood WG, Kuo C-L, Chung J-G (2013) Crude extract of *Euphorbia formosana* inhibits the migration and invasion of DU145 human prostate cancer cells: The role of matrix metalloproteinase-2/9 inhibition via the MAPK signaling pathway. *Mol Med Rep* **7**:1403-1408
- Yildiztugay, E., Sekmen, A. H., Turkan, I., and M. Kucukoduk (2011) Elucidation of physiological and biochemical mechanisms of an endemic halophyte *Centaurea tuzgoluensis* under salt stress. *Plant Physiol. Biochem* **49**:816-824
- Zhang C, Kim SK (2009) Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi) from marine natural products: the current situation and future prospects. *Mar Drugs* **7**:71-84
- Zheng L, Zhang Y-M, Zhan Y-Z, Liu C-X (2014) *Momordica cochinchinensis* seed extracts suppress migration and invasion of human breast cancer ZR-75-30 cells via down-regulating MMP-2 and MMP-9. *Asian Pac J Cancer Prev* **15**:1105-1110

6. 부록

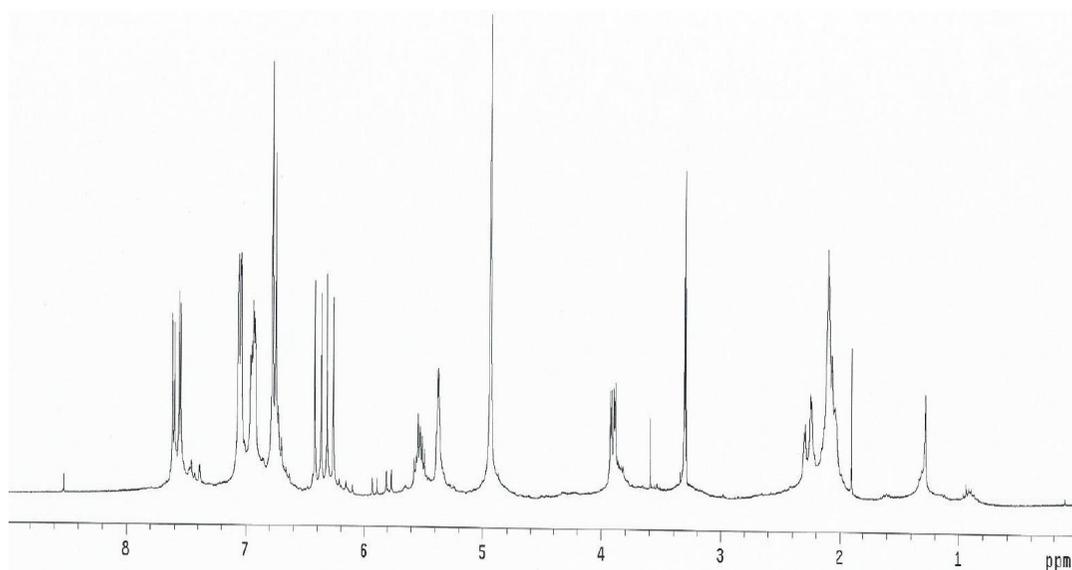


Figure 26. ¹H NMR spectrum of compound **1** isolated from the halophyte *Atriplex gmelinii* in CD₃OD

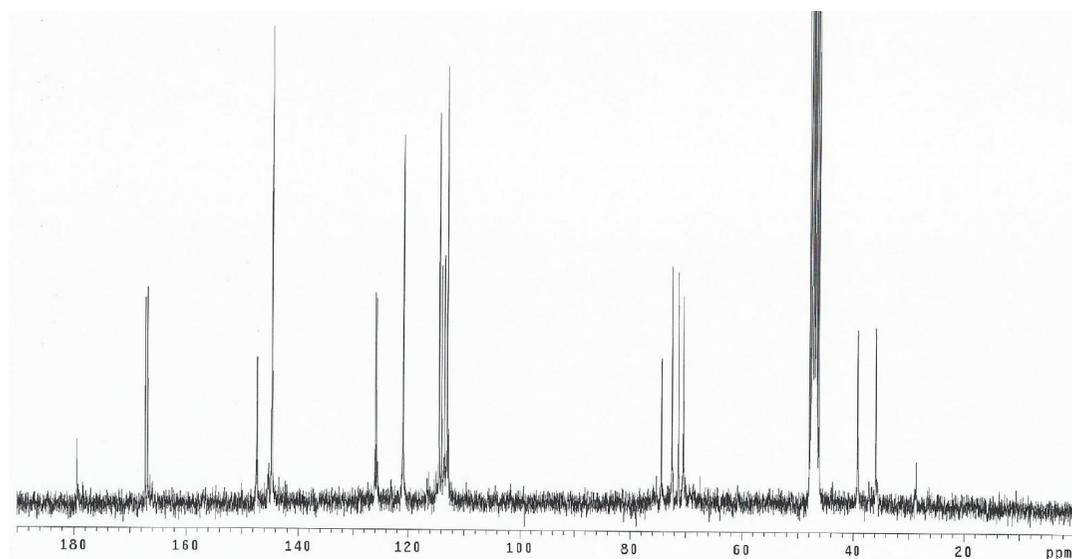


Figure 27. ¹³C NMR spectrum of compound **1** isolated from the halophyte *Atriplex gmelinii* in CD₃OD

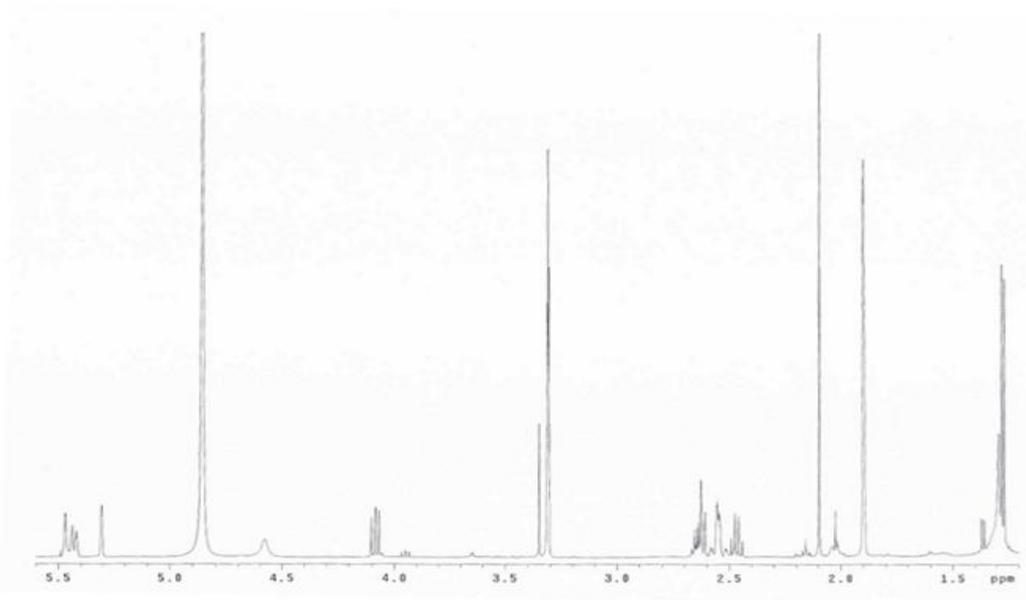


Figure 28. ¹H NMR spectrum of compound **2** isolated from halophyte *Atriplex gmelinii* in CD₃OD

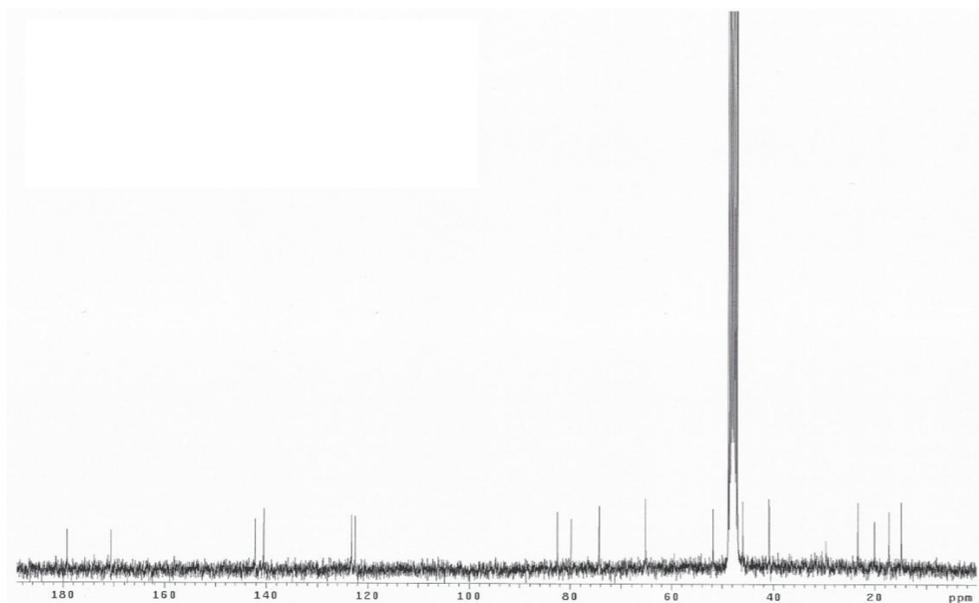


Figure 29. ¹³C NMR spectrum of compound **2** isolated from the halophyte *Atriplex gmelinii* in CD₃OD

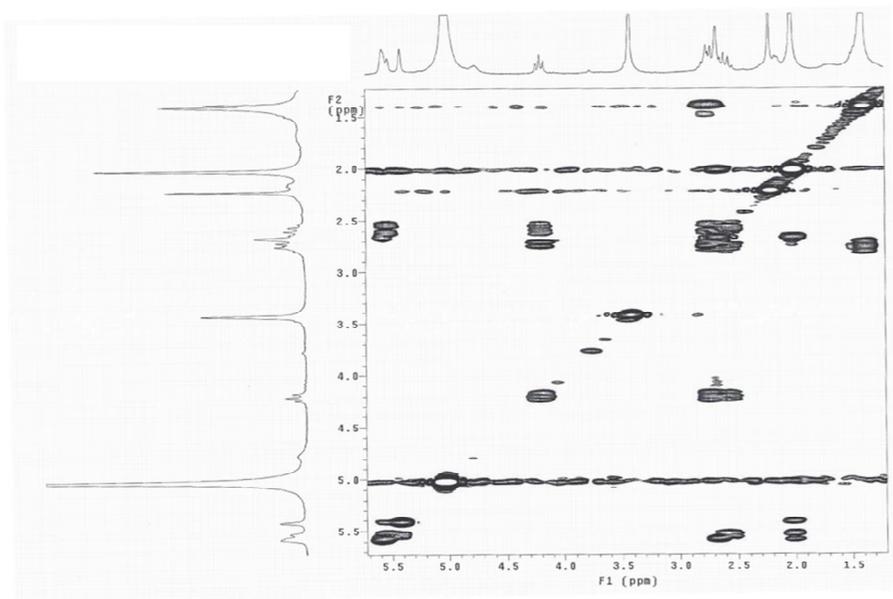


Figure 30. COSY spectrum of compound **2** isolated from the halophyte *Atriplex gmelinii* in CD₃OD

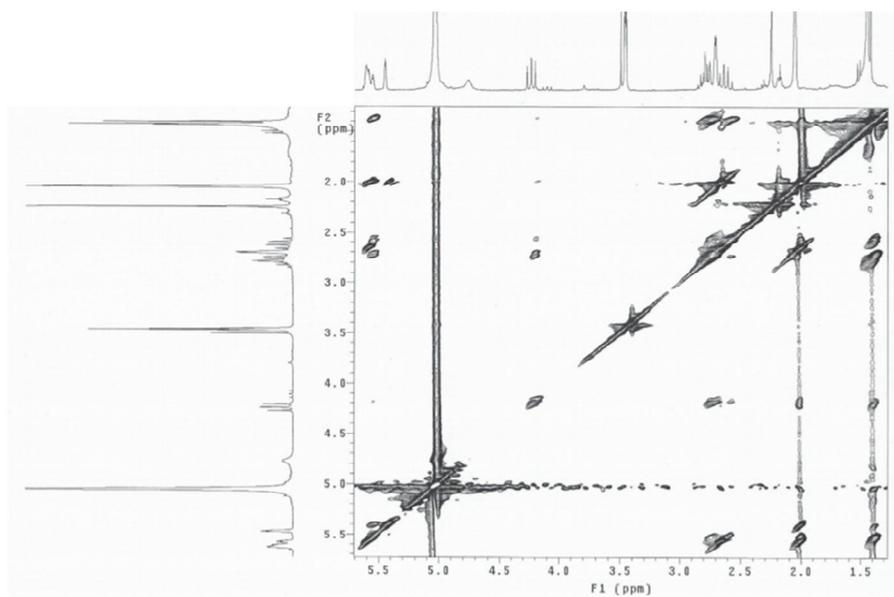


Figure 31. TOCSY spectrum of compound **2** isolated from the halophyte *Atriplex gmelinii* in CD₃OD

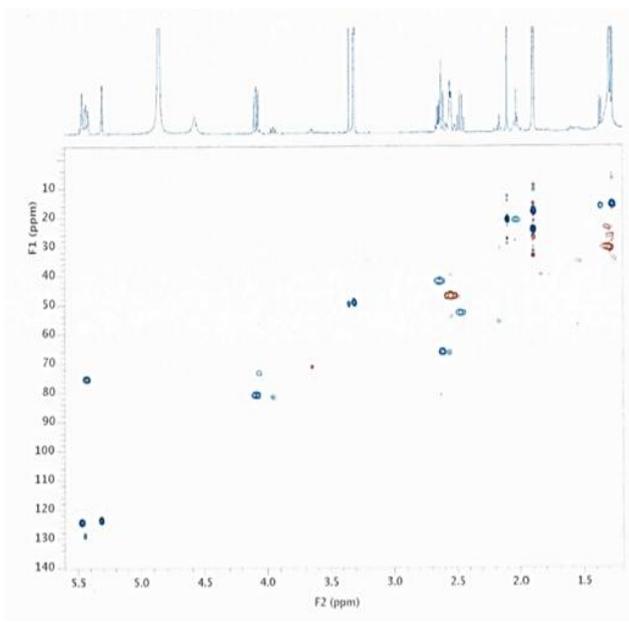


Figure 32. gHSQC spectrum of compound **2** isolated from the halophyte *Atriplex gmelinii* in CD₃OD

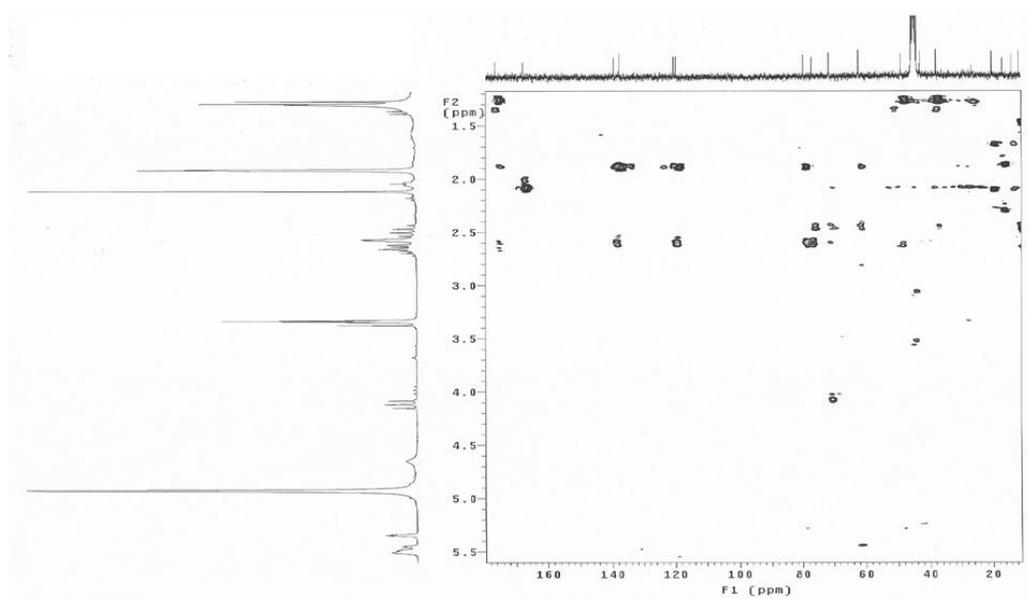
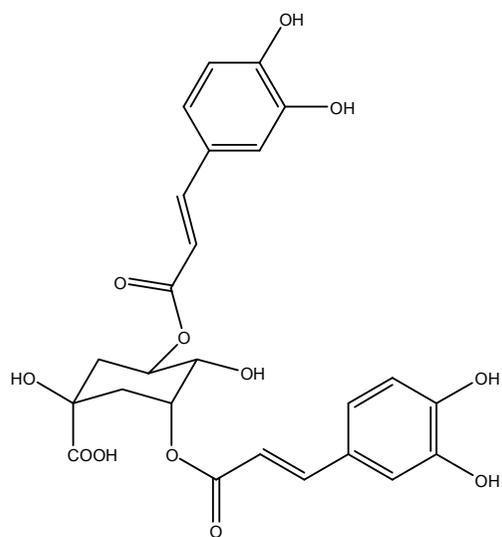
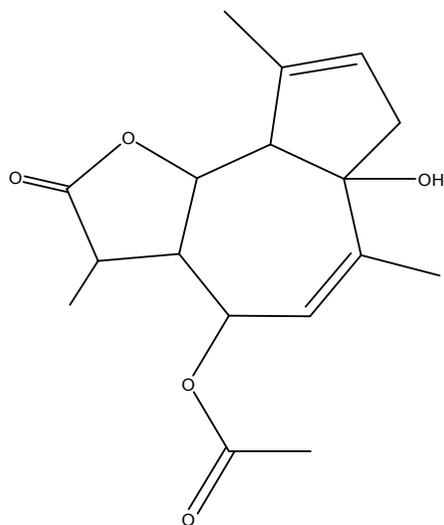


Figure 33. gHMBC spectrum of compound **2** isolated from the halophyte *Atriplex gmelinii* in CD₃OD



Compound 1



Compound 2

Figure 34. Chemical structure of compounds **1** and **2** from the halophyte *Atriplex gmelinii*

감사의 글

늦은 나이에 시작하기로 마음먹은 대학원 생활, 인연이 닿은 모든 분들에게 고마운 마음을 담아 전합니다. 먼저 2년간의 학위 과정을 시작할 수 있게 또 잘 마무리할 수 있게 조언과 가르침을 주신 서영완 교수님께 감사드립니다.

또한 바쁘신 와중에도 석사 학위 논문 심사위원을 맡아주시고 아낌없는 조언을 해주신 문기환 교수님, 임선영 교수님께도 감사드립니다.

대학원 생활을 시작함에 두려움이 앞선 저에게 응원과 조언을 아끼지 않은 연경언니, 멀리 떨어져 있어도 늘 잘 하고 있는지 걱정해주던 형택선배, 새벽의 논문오타 수정에도 내 일인 듯 봐주던 오창선배, 늘 먼저 연락해서 안부를 물어주던 준엽선배와 대학원 생활을 함께 겪으며 요령과 고충을 나눴던 형미, 결혼이란 인생의 한 과정을 먼저 나아간 소영이와 지영이, 표현이 서툴지만 늘 응원해주던 기애, 또 늘 멀리 떨어져있지만 힘들 때 위로가 되어주던 태훈이 오빠에게도 고마움을 전합니다.

또한 실험실에 처음 왔을 때부터 많이 챙겨주어서 늘 고마운 호준 박사님, 서툰 저를 챙겨주던 재민이와 나이는 어리지만 함께여서 늘 든든했던 준세, 함께 대학원 생활을 한 민주, 열심히 배우려는 모습이 예쁜 막내이 셋 유진이, 지현이, 은성이, 기숙사 조교자리를 알려준 고마운 형주 조교님, 식품방 실험실원임에도 많이 도와준 정우와 은이, 같이 있으면 즐거웠고 공감해주던 신라대 정환박사님과 부산대 지연이에게도 감사인사를 전합니다.

마지막으로 우리 가족들, 아버지와 내동생 시흥이, 할머니, 큰어머니, 큰아버지, 웅권오빠, 재권오빠, 아홉이까지 타지에서 생활하는 데 늘 힘든 건 없는지 걱정해준 가족들이 있기에 이렇게 무사히 학위과정을 마치고 새로운 시작을 준비할 수 있게 되었습니다.

조금 더딘 시작이었지만 저를 아껴주고 응원해준 모든 이들에게 감사로 전하며 사회에 나가서도 더 성장하는 사람이 되도록 노력하겠습니다.

박 민 정 드림