

## 오만둥이(*Styela plicata*) 추출물의 *in vitro* 세포독성 효과

이보배 · 차미란 · 박해룡 · 이승철<sup>†</sup>

경남대학교 식품생명학과

### *In vitro* Cytotoxic Effect of Extracts from *Styela plicata*

Bo-Bae Lee, Mi-Ran Cha, Hae-Ryong Park and Seung-Cheol Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

#### Abstract

The present study describes the preliminary evaluation of the anticancer activity of *Styela plicata*. Freeze-dried *S. plicata* was extracted with methanol, ethanol, acetone, and water, and then anticancer effect of the extracts was measured by the MTT reduction assay and phase-contrast microscopy on the HT-29 human colon carcinoma cells. Among the extracts, acetone extract showed the highest anticancer activity. The cell proliferation rates markedly decreased by 94.0% at the concentration of 500 µg/mL of acetone extract compared with control cells. The acetone extract was further fractionated with hexane, diethyl ether, ethyl acetate, and water layer according to the degree of polarity. The HT-29 cells with hexane layer extract (250 µg/mL) decreased the cell viability to 5.1% of untreated control. The growth of SW620, HeLa, and MCF-7 cells was decreased to about 10%, by the treatment of hexane layer extract 250 µg/mL. These results suggest extracts from *S. plicata* as possible natural cancer therapeutic material.

**Key words:** anticancer activity, *Styela plicata*, extract, MTT reduction assay

#### 서 론

현대 의학의 발달에도 불구하고 암은 여전히 치료하기 힘든 질병 중 하나이며 우리나라에서도 암 발생은 매년 증가하고 있는 추세이다. 현재 암치료를 사용되고 있는 방법으로는 화학요법, 방사선 요법, 외과적 수술 등을 들 수 있으며(1), 그 중 화학요법은 조기암을 비롯한 암치료의 전과정에 대부분 투여되고 있다. 그러나 기존의 항암제가 암세포에 대한 항암효과 이외 정상세포에 대해서조차 강한 독성과 다제내성과 같은 부작용을 나타내기 때문에 항암제의 사용은 환자의 치료에 난제가 되고 있다(2-4). 따라서 이러한 치료방법의 한계점을 극복하기 위해 최근 천연으로부터 부작용이 적은 화학적 항암제 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

일반적으로 천연자원을 이용한 약재 개발은 식물자원이 주류를 이루어 왔으나, 제한된 자원으로 활성성분의 획득에 어려움이 있어 새로운 천연자원으로부터 유용물질을 찾고자 하는 연구의 필요성이 대두되고 있다(1).

한편, 해양은 지구표면의 70% 이상을 덮고 있으면서 전체 생물권의 95% 이상을 차지하고 있다(5). 다양한 해양생물들 중 특히 해양 부착 생물은 생태학적 특이성으로 인해 선천적인 면역시스템을 가지고 있고, 방어기작의 하나로 독성 화학

물질을 생산한다. 그리고 이들 중 대다수는 특이적인 생물학적 기능을 가지기 때문에 약리적 활성을 나타내기도 한다(6). 그리고 또한 해양은 개발의 한계성으로 인해 제한된 연구만이 이루어져 있기 때문에 새로운 생리활성물질 탐색을 위한 천연자원으로서 무한한 잠재력을 지니고 있어 관심의 대상이 되고 있다.

다양한 해양생물 중 흰명게 또는 주름미더덕이라고도 불리는 오만둥이(*Styela plicata*)는 원색동물의 미색류에 속하는 부착생물로서, 패각이나 바위 등에 부착하여 성장하며, 자용동체의 생물로 이와 비슷한 생물로는 미더덕, 명게 등이 잘 알려져 있다(7). 오만둥이는 plicatamide라는 항균성 펩타이드를 가지고 있으며(8,9), 항응고 효능(10,11)과 만성 B형 간염(12)에 효과가 있다는 연구결과가 보고된 바가 있으며 항산화 및 항암활성도 지니고 있는 것으로 알려져 있다(13). 또한 오만둥이와 같은 멧게류의 해양생물로부터 연구되어진 항암 물질로는 ascididemin, didemnin B, ecteinascidin-743 등의 알칼로이드 계열의 물질들이 있으며, 그 외 다양한 해양생물로부터 항암물질을 연구하고자 하는 노력이 많이 이루어졌다(14,15).

본 연구에서는 해양생물자원으로부터 항암활성을 가지는 물질을 탐색하기 위한 목적으로 오만둥이의 동결건조물을

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: sclee@kyungnam.ac.kr  
Phone: 82-55-249-2684, Fax: 82-55-249-2995

이용하여 여러 용매별로 추출물을 제조하고 인간유래의 다양한 암세포에 대한 오만둥이 추출물의 세포독성 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에서 사용된 오만둥이(*Styela plicata*)는 경상남도 마산시 진동면 고현마을에서 2007년 2월에 구입하였다. 구입한 오만둥이는 이물질을 제거하고 물로 깨끗이 여러 번 세척하고 증류수를 이용하여 최종적으로 행구고 물기를 제거한 후, 분쇄기(Mixer MC 811C, (주)노비타, 한국)를 이용하여 분쇄하여 사용하였다. 암세포 성장억제 효과 실험에 사용된 시약 중 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)와 dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였고, 세포주 배양에 사용된 RPMI 1640, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin 등은 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 그 외 연구에 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

### 시료의 추출

신선한 오만둥이를 믹서기(Mixer WWB1, TEFAL, France)로 분쇄한 후, 심온 동결기(Upright Deep Freezer VX 530, Jousn S.A, France)로  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 저장하고, 동결건조기(Freeze Dryer FD 5512, (주)일신랩, 한국)로 4일 동안 완전히 건조시켰다. 건조된 시료는 다시 분쇄기(Mixer HR 2870, Philips, Netherlands)를 이용하여 분말로 만들어 27 mesh의 체로 걸러 분말의 크기를 일정하게 하였다. 시료 5 g을 100 mL의 물(증류수), 메탄올, 에탄올, 아세톤을 가하여 상온에서 정치 상태로 30시간 추출하였다. 각각의 추출물은 여과지(Whatman No. 1)로 여과한 후, 회전감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로  $40^{\circ}\text{C}$ 에서 농축하였다. 세포독성 효과가 높은 아세톤 추출물은 용매의 극성에 따라 순차적으로 용매분획하였다. 즉, 헥산과 물을 같은 비율로 하여 분획하여 분획여두에서 헥산층을 분획하고, 동일한 방법으로 디에틸 에테르, 에틸아세테이트 및 물 층으로 분획하여 각각의 용매 분획물을 얻어 감압농축하였다. 각 추출물 및 분획물은 50 mg/mL로 DMSO에 녹여 적당한 농도로 희석해서 실험에 사용하였다.

### 암세포 배양

오만둥이의 세포독성 효과를 측정하기 위하여 한국세포주은행(KCLB, Seoul)으로부터 대장암 유래의 세포주 HT-29(human colon carcinoma), SW620(human colon carcinoma), 자궁경부암 세포주 HeLa(human cervix adenocarcinoma) 및 유방암 세포주 MCF-7(human breast ad-

enocarcinoma)을 분양받아 본 실험에 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지로는 HT-29, SW620, MCF-7 세포주는 RPMI 1640 medium, HeLa 세포주는 DMEM medium을 사용하였다. 각 배지에 10% FBS, 100 unit/mL의 penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 streptomycin을 처리하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator(MCO-18AIC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

### 암세포의 형태학적 관찰

오만둥이 용매추출물에 대한 HT-29 세포주의 형태학적인 관찰을 위해 6 well plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL로 24시간 동안  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양한 후, DMSO에 녹인 오만둥이 용매별 추출물을 각각 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 후에 inverted microscope(TS 100-F, Nikon, Tokyo, Japan)로 각 well의 세포 형태를 관찰하고, 100배로 사진을 촬영하였다.

### 암세포 성장 억제효과 측정

용매별 오만둥이 추출물 및 분획물의 암세포 성장억제 효과는 MTT assay(16)로 측정하였다. 세포주를  $1 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 맞추고 96 well plate에 각각 100  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하여 24시간 동안  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양한 후(17), DMSO에 녹인 오만둥이 용매별 추출물 및 분획물을 각각 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 각 well에 MTT(5 mg/mL) 용액을 10 mL씩 첨가하여 1시간 동안 다시 배양한 후, 배지를 제거하고 100  $\mu\text{L}$ 의 DMSO로 생성된 formazan을 녹여 ELISA reader(model 680, BioRad, California, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물을 첨가하지 않은 대조구 세포수를 100%로 하여 각 추출물의 상대적인 세포 생존율을 구하였다.

### 통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 이루어졌으며, SAS(Statistical Analysis System)를 이용하여 평균과 표준오차, Newman-Keul's multiple range tests로 평균값들에 대해 유의성을 검정하였다(18).

## 결과 및 고찰

### 암세포 성장 억제에 미치는 오만둥이 추출물의 영향

인간의 대장암 유래의 세포주 HT-29에 대한 오만둥이 추출물의 암세포 성장 억제 효과에 대한 결과를 Fig. 1, 2에 나타내었다. 먼저 오만둥이의 각 용매별 추출물이 HT-29 세포주의 형태학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 inverted microscope로 세포형태를 관찰한 결과, 메탄올, 에탄올, 물 추출물을 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 세포는 대조구와 비슷한 경향으로 암세포가 조밀하게 정상적으로 성장

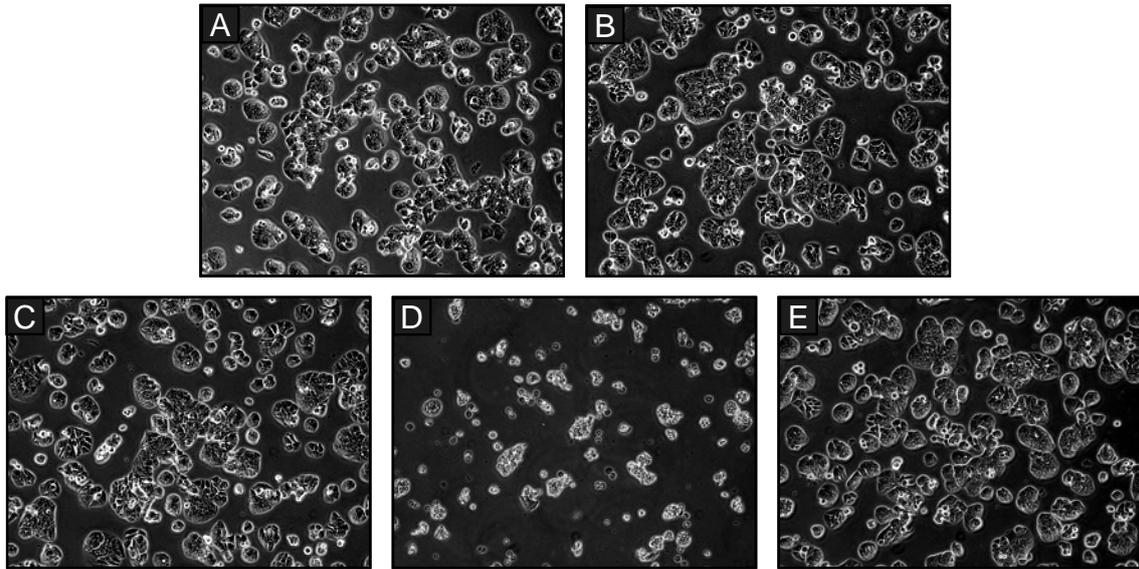


Fig. 1. Morphological change by extracts of *S. plicata* in HT-29 cells ( $\times 100$ ). (A) control, (B) methanol extract, (C) ethanol extract, (D) acetone extract, and (E) water extract.

하는데 반해 아세톤 추출물을 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 세포는 전체적으로 세포수가 현저하게 감소했을 뿐만 아니라 그 세포의 형태도 결속력이 감소되어 세포가 불규칙한 형태로 단일화되면서 응축되어 있었으며 사멸한 세포가 배양용기에서 떨어져 배지에 부유하는 현상을 관찰할 수 있었다. 따라서 오만둥이의 아세톤 추출물이 다른 용매 추출물에

비해 암세포 성장 억제효과에 대한 활성이 현저하게 높음을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

이러한 형태학적인 변화에 따라 각 용매별 추출물의 세포독성 효과를 조사하기 위해 MTT reduction assay 방법(16)을 이용하였으며, 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 용매별 추출물의 암세포 성장 억제효과를 확인하였다.

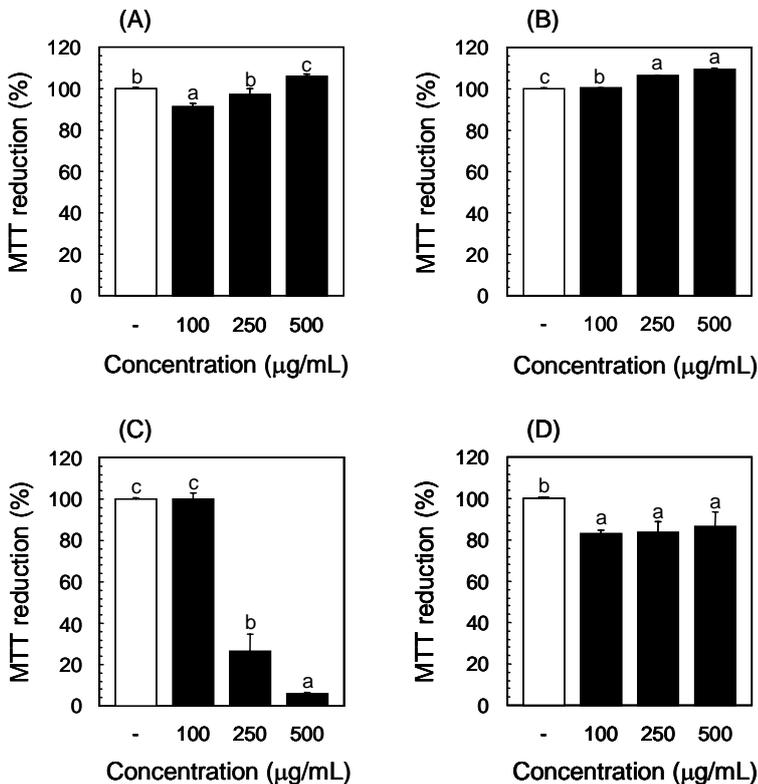


Fig. 2. Inhibitory effect on cell survival of extracts from *S. plicata* in HT-29 cells.

(A) methanol extract, (B) ethanol extract, (C) acetone extract, and (D) water extract. All measurements were done in triplicate, and analysis of variance was conducted by of the General Linear Model using SAS software (18). Different letters (a-d) are significantly different ( $p < 0.005$ ),  $n = 3$ .

오만둥이의 용매별 추출물을 100, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 각각 처리하였을 때 암세포 성장 억제효과를 확인한 결과, HT-29 세포주의 형태학적 변화와 동일한 양상으로 아세톤 추출물에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 2). 즉, 아세톤 추출물을 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리했을 때는 대조구에 비해 26.6%의 생존율을 보였으며, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리했을 때는 6%의 암세포만이 살아남아 매우 높은 세포독성 효과를 보였다. 그러나 메탄올 추출물과 에탄올 추출물에서는 거의 활성을 나타내지 않았으며, 물 추출물의 경우에는 대조구에 비해 약 80%정도가 생존하여 세포 독성 효과가 낮은 것으로 나타났으며 농도에 따른 세포독성 효과의 차이가 없음을 알 수 있었다.

한편, Kim 등(13)의 연구결과에 따르면, 신선한 오만둥이와 동결건조한 오만둥이의 세포독성 효과를 비교했을 때 두 시료간의 활성차이를 보였는데 이는 오만둥이 자체에 포함되어 있는 수분에 의한 추출용매의 극성도 차이에 따른 결과라고 짐작해 볼 수 있다. 본 실험결과에서도 아세톤 추출물에서만 특이적으로 세포독성 효과를 보인 것으로 보아 오만둥이 추출물의 세포독성 효과는 추출용매의 극성도에 매우 민감하다는 것을 알 수 있다.

#### 활성 분획물의 암세포 성장 억제효과

오만둥이 용매별 추출물 중 가장 강력한 세포독성 효과를 나타낸 아세톤 추출물을 이용하여 정제수율을 높여 암세포 성장 억제효과를 확인하기 위한 목적으로 헥산, 디에틸 에테르, 에틸 아세테이트 및 물 순으로 점차 극성을 높이면서 분획 추출하였다(Fig. 3). 각 용매별 분획물의 암세포 성장 억제효과에 대한 결과는 Fig. 4, 5에 나타내었다. 분획물을 HT-29 세포주에 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하고, 24시간 배양

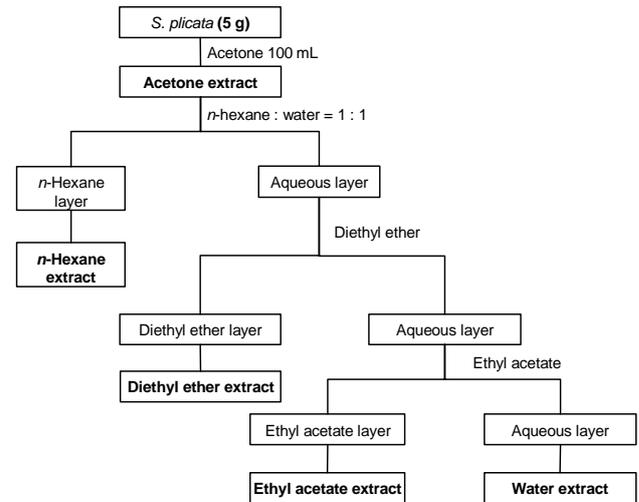


Fig. 3. Fractionation procedure of acetone extracts from *S. plicata*.

후 광학현미경으로 관찰한 결과 대조구의 세포는 세포막을 유지하며 조밀하게 성장하고 있는 반면, 헥산과 디에틸 에테르 분획물을 처리한 세포는 세포 수의 감소와 세포의 응축, 단일화와 같은 세포 사멸시 나타나는 일반적인 경향을 나타내었다(Fig. 4). 특히 헥산을 처리한 세포에서 세포수의 감소나 형태학적 변화가 크게 나타났다. 그러나 물 분획물의 경우에는 대조구와 비교했을 때 세포사멸이나 성장억제 등의 형태학적 특징을 보이지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 분획물을 각각 50, 100, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리하여 MTT reduction assay를 실시한 결과 모든 분획물에서 농도의존적으로 활성이 증가하는 경향을 보였다. 특히 헥산 분획물의 경우 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리했을 때 암세포의 생존율이 5.1%로

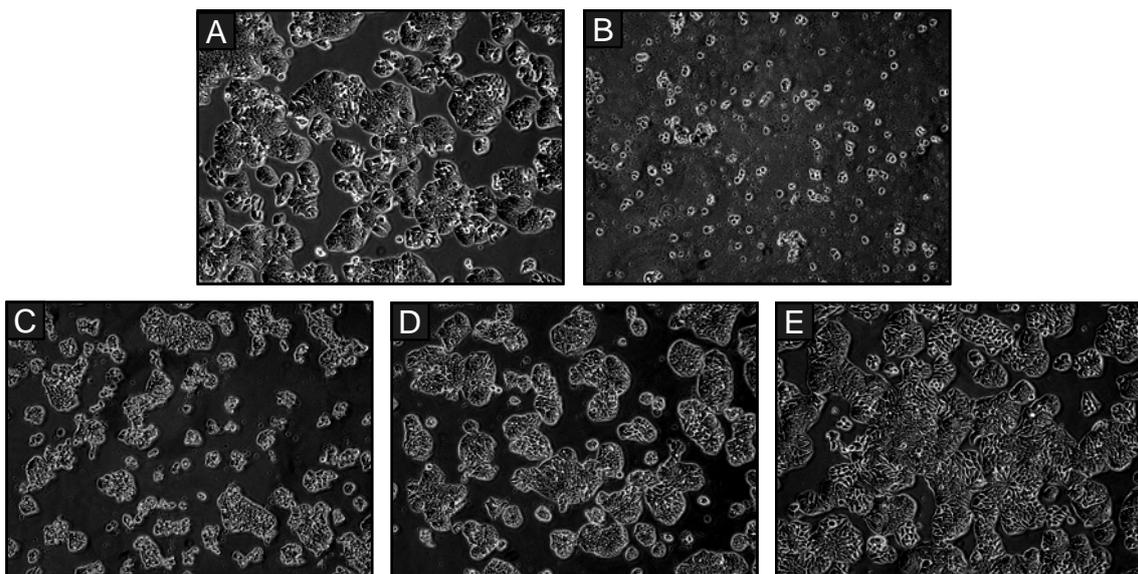


Fig. 4. Morphological change by extracts of *S. plicata* in HT-29 cells ( $\times 100$ ).

(A) control, (B) hexane extract, (C) diethyl ether extract, (D) ethyl acetate extract, and (E) water layer extract.

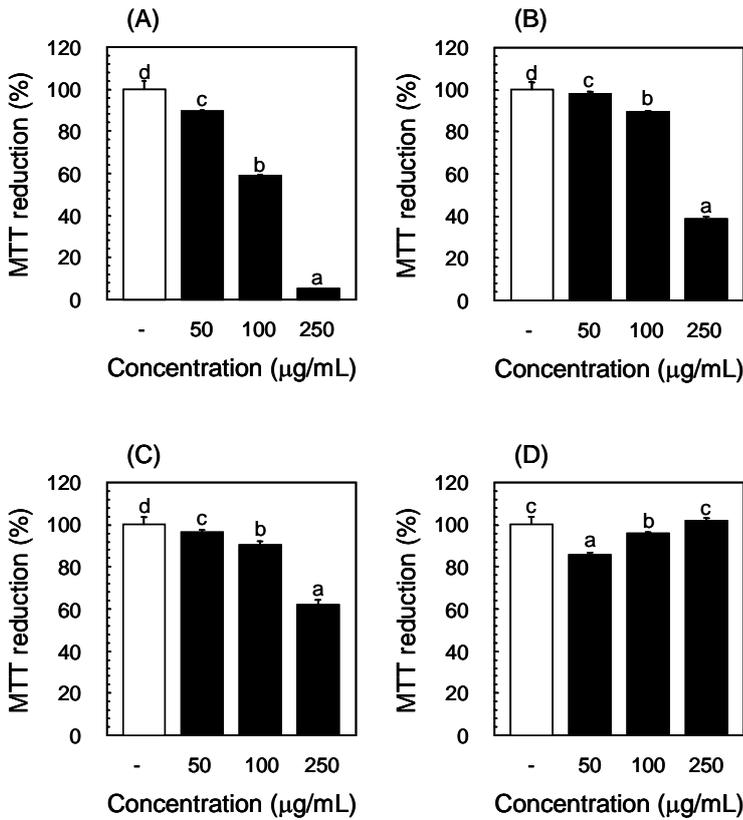


Fig. 5. Inhibitory effect on cell survival of the each fraction of acetone extracts from *S. plicata* in HT-29 cells.

(A) control, (B) hexane extract, (C) diethyl ether extract, (D) ethyl acetate extract, and (E) water layer extract. All measurements were done in triplicate, and analysis of variance was conducted by of the General Linear Model using SAS software (18). Different letters (a-d) are significantly different ( $p < 0.005$ ),  $n=3$ .

높은 세포성장 억제활성을 나타냈으며 50 µg/mL 농도에서도 89.2%로 약간의 세포수의 감소를 보였다. 그리고 디에틸 에테르와 에틸 아세테이트 분획물의 경우에는 250 µg/mL 농도에서 각각 37.9%와 61.8%의 생존율을 나타냈으며, 물 분획물에서는 활성을 보이지 않았다. 따라서 오만둥이의 아세톤 추출물 중 핵산 분획물이 HT-29 세포주에 대한 성장 억제능이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 오만둥이 추출물에 포함되어있는 세포독성 효과를 가지는 물질이 비극성도가 높은 물질임을 짐작할 수

있다.

오만둥이의 혈구(hemocyte)는 인간 K562 종양 세포와 토끼 적혈구에 대한 세포 독성이 있으며(19) 이는 phenol을 quinone으로 전환하여 melanogenic 경로를 시 발하는 phenoloxidase와 관련있다고 보고된 바 있다(20). 한편, 오만둥이와 발생학적으로 유사한 미더덕(*Styela clava*)의 경우 고도 불포화지방산인 ω-3계 지방산인 eicosapentaenoic acid (EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)가 전체 지질 중 각각 18.3%와 14.2% 함유되어 있는데(21), DHA와 EPA는 유방

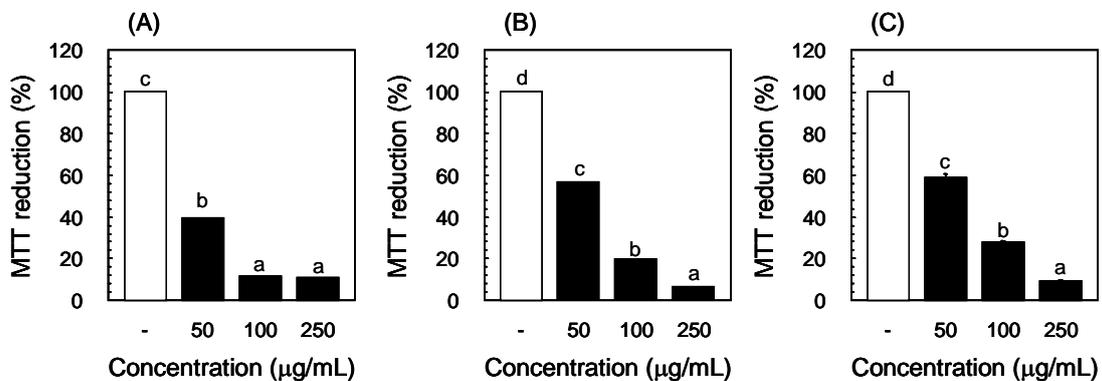


Fig. 6. Inhibitory effect on cell survival of hexane extract on the human cancer cells.

(A) SW620, (B) HeLa, and (C) MCF-7. All measurements were done in triplicate, and analysis of variance was conducted by of the General Linear Model using SAS software (18). Different letters (a-d) are significantly different ( $p < 0.005$ ),  $n=3$ .

암 세포에 대한 항암활성이 있으며(22), 암세포 유전자의 번역 개시를 저해함으로써 항암활성을 보이며(23) 간암세포에서 p53 의존경로로 세포 자살을 유도한다고 보고되었다(24). 오만둥이도 DHA와 EPA를 비롯한 여러 성분들이 세포독성 효과에 관여하는 것으로 생각된다.

#### 핵산 분획물의 암세포 성장 억제효과

오만둥이의 아세톤 추출물의 분획물중 가장 활성이 좋았던 핵산 분획물이 다른 종류의 암세포주에 대해서도 증식억제능을 보이는지를 확인하기 위해 HT-29와는 다른 대장암 세포주 SW620, 자궁 경부암 세포주 HeLa 및 유방암 세포주 MCF-7 에 핵산 분획물을 농도별로 처리해 봄으로써 세포독성 효과를 확인하였다(Fig. 6). 그 결과 SW620, HeLa 및 MCF-7 세 가지 세포주 모두 250 µg/mL 농도에서 대조구에 비해 암세포가 10%정도만이 생존하는 것으로 나타났으며 특히, HeLa 세포 주에서는 250 µg/mL 농도에서 세포수가 대조구의 5.8%로 매우 높은 활성을 보였다. 그리고 처리농도 중 가장 낮은 농도인 50 µg/mL에서는 SW620 세포주에서 생존율이 39.9%로 가장 높은 활성을 나타내었으며, HeLa 와 MCF-7 세포주는 각각 56.1%, 58.8%로 비슷한 활성을 보였다. 따라서 오만둥이 미더덕 추출물의 핵산 분획물이 HT-29 대장암 세포주 뿐만 아니라 다른 세포주에도 세포독성 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

#### 요 약

오만둥이의 세포독성 효과를 알아보기 위해 신선한 오만둥이를 분쇄하고 동결건조하여 분말 형태로 제조한 후 시료 5 g당 메탄올, 에탄올, 아세톤, 물을 각각 100 mL씩 첨가하여 용매별 추출물을 제조하였다. 이 용매별 추출물을 대장암 세포주인 HT-29 cell에 250 µg/mL 농도로 각각 처리하여 형태학적인 변화를 관찰한 결과 대조군에 비해 아세톤 추출물에서 세포의 수가 감소하고 그 형태가 응축되는 현상을 관찰할 수 있었고, 이 결과를 바탕으로 100, 250, 500 µg/mL 농도로 MTT reduction assay를 실시한 결과 아세톤 추출물을 500 µg/mL 농도로 처리했을 때 6%의 암세포만이 생존하는 것으로 나타나 형태학적인 실험결과와 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 아세톤 추출물을 핵산, 디에틸 에테르, 에틸 아세테이트 그리고 물로 분획물을 조제하여 대장암 세포주인 HT-29 cell에 250 µg/mL 농도로 각각 처리하여 형태학적인 변화를 관찰한 결과 핵산 분획물에서 세포의 형태변화가 가장 크게 나타났으며 250 µg/mL 농도로 MTT reduction assay를 실시한 결과에서도 5.1%의 암세포만이 존재하는 것으로 나타나 핵산 분획물이 가장 높은 세포독성 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 다른 암세포주에 대한 영향을 알아보기 위해 핵산 분획물을 SW620, HeLa 및 MCF-7 세포주에 농도별로 처리한 결과, 250 µg/mL 농도에서 10%

내외의 암세포 생존율을 보여 높은 세포독성 효과를 나타내었으며 특히, HeLa 세포주에서는 생존율이 5.8%로 나타나 매우 높은 활성을 보였다. 이상의 결과를 종합하여 미루어 짐작해 볼 때 오만둥이에 함유된 불포화 지방산 등의 지용성 물질이 암세포주의 성장 억제에 중요한 역할을 하리라 생각된다. 따라서 오만둥이 추출물은 다양한 암세포주에 대해 활성을 가지는 해양생물로서의 잠재적인 가능성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

#### 감사의 글

본 논문은 2007학년도 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

#### 문 헌

1. Im HG, Yu MH, Chung DW, Lee IS. 2006. Inhibitory effect of fungal metabolites isolated from foodstuffs on the growth of human cancer cell lines. *Korean J Food Sci Technol* 38: 262-267.
2. Shin YJ, Jung DY, Ha HK, Park SW. 2004. Anticancer effect of *Erythronium japonicum* extract on ICR mouse and L1210 cells with alteration of antioxidant enzyme activities. *Korean J Food Sci Technol* 36: 968-973.
3. Astrow AB. 1994. Rethinking cancer. *Lancet* 343: 494-503.
4. Bailer JC, Gormick HL. 1997. Cancer undefeated. *N Eng J med* 336: 1567-1575.
5. Garcia-Fernandez LF, Reyes F, Sanchez-Puelles JM. 2002. The marine pharmacy: new antitumoral compounds from the sea. *Pharm News* 9: 495-501.
6. Amador ML, Jimeno J, Paz-Ares L, Cortes-Funes H, Hidalgo M. 2003. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Ann Oncol* 14: 1607-1615.
7. Lee EH, Chung SK, Jeon JK, Cha YJ, Chung SY. 1983. A study on the taste compounds of an ascidian, *Styela plicata*. *Korean J Food Sci Technol* 15: 1-5.
8. Tincu JA, Menzel LP, Azimov R, Sands J, Hong T, Waring AJ, Taylor SW, Lehrer RI. 2003. Plicatamide, an antimicrobial octapeptide from *Styela plicata* hemocyte. *J Biol Chem* 278: 13546-13553.
9. Tincu JA, Taylor SW. 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3645-3654.
10. Cardilo-Reis L, Cavalcante MC, Silveira CB, Pavao MS. 2006. In vivo antithrombotic properties of a heparin from the oocyte test cells of the sea squirt *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). *Braz J Med Biol Res* 39: 1409-1415.
11. Cavalcante MC, Allodi S, Valente AP, Straus AH, Takahashi HK, Mourao PA, Pavao MS. 2000. Occurrence of heparin in the invertebrate *Styela plicata* (Tunicata) is restricted to cell layers facing the outside environment. *J Biol Chem* 275: 36189-36196.
12. Wang R, Duan WJ, Zhang X, Zeng FL, Wan XX. 2006. Antiviral treatment of hepatitis B virus-transgenic mice by a marine organism, *Styela plicata*. *World J Gastroenterol* 12: 4038-4043.
13. Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR, Lee SC. 2005.

- Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 937-941.
14. Mayer AM, Custafson KR. 2003. Marine pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds. *Int J Cancer* 105: 291-299.
  15. Jimeno J, Faircloth G, Sousa-Faro JMF, Scheuer P, Rinehart K. 2004. New marine derived anticancer therapeutics - a journey from the sea to clinical trials. *Mar Drugs* 2: 14-29.
  16. Fish B. 1984. Clinical trials for the evaluation of cancer therapy. *Cancer Res* 54: 609-615.
  17. Goodman GY, Yen YP, Cox TC, Crowlly J. 1987. Effect of verapamil on *in vitro* cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in human tumor cells. *Cancer Res* 47: 2295-2311.
  18. SAS Institute. 1995. *SAS/STAT User's Guide*. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
  19. Raftos DA, Hutchinson A. 1995. Cytotoxicity reactions in the solitary tunicate *Styela plicata*. *Dev Comp Immunol* 19: 463-471.
  20. Cammarata M, Arizza V, Parrinello N, Candore G, Caruso C. 1997. Phenoloxidase-dependent cytotoxic mechanism in ascidian (*Styela plicata*) hemocytes active against erythrocytes and K562 tumor cells. *Eur J Cell Biol* 74: 302-307.
  21. Lee EH, Oh KS, Lee TH, Ahn CB, Chung YH, Kim KS. 1985. Lipid components of sea squirt, *Halocynthia roretzi*, and mideuduck, *Styela clava*. *Korean J Food Sci Technol* 17: 289-294.
  22. Siddiqui RA, Zerouga M, Wu M, Castillo A, Harvey K, Zaloga GP, Stillwell W. 2005. Anticancer properties of propofol-docosahexaenoate and propofol-eicosapentaenoate on breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 7: 645-654.
  23. Palakurthi SS, Fluckiger R, Aktas H, Changolkar AK, Shahdafaie A, Harneit S, Kilic E, Halperin JA. 2000. Inhibition of translation initiation mediates the anticancer effect of the n-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid. *Cancer Res* 60: 2919-2925.
  24. Chi TY, Chen GG, Lai PB. 2004. Eicosapentaenoic acid induces Fas-mediated apoptosis through a p53-dependent pathway in hepatoma cells. *Cancer J* 10: 190-200.

(2007년 5월 21일 접수; 2007년 7월 30일 채택)