J Korean Soc Food Sci Nutr
41(7), 901~906(2012)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.7.901

# 넓패 추출물이 HeLa 자궁암세포의 세포사멸에 미치는 영향

조병옥[1] · 류형원[1] · 소양강[1] · 진창현[1] · 변명우[2] · 김왕근[3] · 정일윤[1†]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소
[2]우송대학교 외식조리영양학부
[3]기초과학연구원 중이온가속기구축사업단

# *Ishige sinicola* Extracts Induce Apoptosis via Activation of a Caspase Cascade in Human HeLa Cells

Byoung Ok Cho[1], Hyung Won Ryu[1], Yang Kang So[1], Chang Hyun Jin[1], Myung-Woo Byun[2], Wang-Geun Kim[3], and Il Yun Jeong[1†]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeonbuk 580-185, Korea*
[2]*Dept. of Culinary Nutrition, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea*
[3]*Rare Isotope Science Project Team, Institute for Basic Science, Daejeon 305-811, Korea*

## Abstract

The purpose of this study was to elucidate the anti-proliferative effect and the mechanisms underlying apoptosis induced by a methanol extracts from *Ishige sinicola* (ISE) in HeLa cells. ISE treatment for 24 hr significantly inhibited cell viability in a dose-dependent manner. Apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining and an annexin V/PI assay after 24 hr treatment. Moreover, ISE treatment triggered the cleavage of caspase-8, -9, -3, and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in dose-dependent and time-dependent manners. In addition, z-VAD-fmk, a general caspase inhibitor, blocked ISE-induced cell death. Taken together, these results suggest that ISE-induced apoptosis is mediated by the activation of a caspase cascade in HeLa cells.

**Key words:** *Ishige sinicola*, apoptosis, caspase, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)

## 서 론

전 세계적으로 인간의 생명을 위협하는 가장 중요한 요소 중 하나인 암은 서양에서 높은 사망률을 보이고 있을 뿐만 아니라, 국내에서도 서구화된 식생활과 환경 변화로 인하여 암의 발생 및 사망률이 계속 증가하고 있다(1). 기존에 암에 대한 치료방법으로 외과적 수술, 화학요법, 및 방사선 요법이 사용되고 있지만 다양한 부작용이 유발되어 최근에는 인체에 안전하고 부작용이 나타나지 않는 천연물로부터 항암물질을 검색하는 연구가 많이 진행되고 있다(1,2). 기존의 연구에 의하면 많은 천연물로부터 유래한 화합물들이 암세포의 apoptosis를 유도함으로써 항암효과를 나타낸다고 보고하고 있다(3).

일반적으로 apoptosis는 면역체계 조절, 분화, 유해세포 제거, 항상성 유지 같은 생물학적 현상에서 중요한 역할을 하며, 유전적으로 정교하게 조절되어진다. Apoptosis에 의한 세포의 죽음은 미토콘드리아의 기능 변화, 염색질 응축, 세포의 수축, 세포막 수포화 현상, 핵의 단편화 현상, apoptotic body의 형성, 세포표면에 phosphatidylserine의 발현 및 caspase 활성화 등과 같은 형태적 또는 생화학적인 변화에 의해 유발되어진다(1-4).

최근 들어 해조류는 다양한 생리활성을 나타내는 신규 천연물질 탐색을 위한 유용한 자원으로 이용되고 있으며, 특히 갈조류에서 항암, 항혈액 응고, 항균, 항염증 및 항산화 효과가 있는 생리활성 물질이 풍부한 것으로 알려져 있다(5-11). 넓패(*Ishige sinicola*)는 갈조식물문(Phaeophyta), 민가지말목(Chordariales), 패과(Ishigeaceae)에 속하는 갈조류로서, 남부 해안 각지, 제주도, 일본 및 중국에 분포하고, 파도가 조용한 곳의 조간대에서 서식하며, 식용으로도 이용되고 있다(12). 현재까지 넓패에 대한 연구는 열수 추출물의 항혈액 응고 효과(7), 메탄올 추출물의 메티실린 내성 황색포도상구균에 대한 항균 효과(8), 메탄올 추출물의 tyrosinase 억제 효과(13)와 넓패에서 분리한 glycerolipids의 살조 활성(14) 등이 연구되었지만, 넓패 유래 천연물에 대한 항암 작용 연구는 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서는 넓패 추출물을 암 예방 치료제로 사용하기 위한 기초자료를 제공하기 위하여 넓패 추출물이 HeLa 암세포에 미치는 영향을 추출물 처리농도에 따라 세포의 사

†Corresponding author. E-mail: iyjeong@kaeri.re.kr
Phone: 82-63-570-3150, Fax: 82-63-570-3159

멸에 미치는 영향을 세포독성측정, 핵 염색법, flow cytometry 분석을 통하여 확인하였고, 세포사멸 기전과 관련된 PARP, caspase-8, caspase-9 및 caspase-3의 단백질 발현을 western blot을 통해 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에서 사용한 넓패 메탄올 추출물(분양번호: AP038)은 제주유용생물자원추출물은행에서 분양받아 사용하였다. 1차 antibody(caspase-3, caspase-8, cleaved caspase-3, cleaved caspase-8, cleaved caspase-9)는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서, β-tubulin은 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)는 BD Pharmingen(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 2차 antibody anti-mouse IgG HRP-conjugated와 anti-rabbit IgG HRP-conjugated antibody는 Zymed(San Francisco, CA, USA)와 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)에서 각각 구입하였다.

### 암세포 배양

본 실험에서 사용한 인체 자궁암세포주 HeLa는 한국세포주은행(KCLB, Seoul)에서 분양받아 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclone, Logan, UT, USA)와 100 units/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin을 첨가한 RPMI-1640 배지(Invitrogen)를 사용하여 37°C, 5% $CO_2$ incubator에서 배양하였으며, 세포 밀도가 높아지면 trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

### 세포독성 측정

세포독성은 EZ-Cytox cell viability assay kit(DAEIL lab, Seoul, Korea)를 사용하여, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. 먼저, 자궁암 세포를 최종농도 $1\times10^5$ cells/mL가 되도록 96 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% $CO_2$ incubator에서 24시간 배양한 다음, 넓패 추출물(ISE)을 25, 50, 100, 150, 200 μg/mL의 농도로 첨가하여 배양하였다. 24시간이 지난 후 EZ-Cytox 시약 10 μL를 넣고 4시간 동안 배양한 후 microplate reader(Benchmark Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성은 대조군에 대한 생존율로 나타내었다.

### 핵의 형태변화 관찰

HeLa 자궁암 세포를 최종농도 $2\times10^5$ cells/mL가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% $CO_2$ incubator에서 24시간 배양한 다음, 넓패 추출물을 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 well에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간이 지난 후 well에서 세포를 회수하여 PBS로 2회 세척하고 메탄올로 고정하였다. 그런 다음, 200 μL의 Hoechst 33258(1 μg/mL)을 첨가하여 실온에서 15분 동안 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(ECLIPSE TE2000-E, Nikon, Tokyo, Japan)으로 세포를 관찰하였다.

### 세포사멸 분석

세포사멸은 MEBCYTO apoptosis kit(MBL International, Nagoya, Japan)를 사용하여, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다. HeLa 자궁암 세포를 최종농도 $2\times10^5$ cells/mL가 되도록 희석하여 6 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% $CO_2$ incubator에서 배양하였다. 24시간이 지난 후, 넓패 추출물을 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 well에 처리하여 24시간 배양하였다. 배양이 종료된 well에서 세포를 회수하여 PBS로 세척하고, kit에 포함된 85 μL의 binding buffer로 다시 부유한 후, 10 μL의 annexin V-FITC와 5 μL의 propidium iodide를 첨가하여 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 그런 다음 400 μL의 binding buffer를 첨가하여 flow cytometry(Cytomics FC500, Beckman, Miami, FL, USA)를 이용하여 분석하였다.

### Caspase inhibitor 측정

넓패 추출물에 의한 HeLa 자궁암 세포의 사멸이 caspase에 의존하여 일어나는지를 확인하기 위해 z-VAD-fmk(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 확인하였다. HeLa 자궁암 세포를 최종농도 $1\times10^5$ cells/mL가 되도록 희석하여 96 well plate에 분주한 후, 37°C, 5% $CO_2$ incubator에서 배양하였다. 24시간이 지난 후, 25 μM의 z-VAD-fmk를 전처리하고 1시간 후에 넓패 추출물을 200 μg/mL의 농도로 well에 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간이 지난 후 EZ-Cytox 시약 10 μL를 넣고 4시간 동안 배양한 후 microplate reader(Bio-Rad)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

### Western blot을 이용한 단백질 발현 분석

HeLa 자궁암 세포를 최종농도 $2\times10^5$ cells/mL가 되도록 희석하여 100 mm dish에 분주한 후, 37°C, 5% $CO_2$ incubator에서 24시간 배양한 다음, 50, 100, 200 μg/mL의 넓패 추출물을 처리하여 24시간 동안 배양 또는 200 μg/mL의 추출물을 0, 2, 4, 8, 16, 24시간 동안 처리하여 배양하였다. 배양 후 dish에서 세포를 회수하여 PBS로 세척하고 1 mM PMSF와 proteinase inhibitor를 첨가한 NP40 cell lysis buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 얼음에서 30분간 세포를 용해한 후, 4°C, 12,000 rpm으로 30분간 원심분리 하였다. 세포 용해액에 sample buffer를 섞어 5분간 끓인 후, SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동으로 분리한 후 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer 하였다. 그런 다음 membrane을 5% skim milk로

실온에서 1시간 동안 blocking하고 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 하루 밤 동안 반응시킨 다음, TBS-T buffer로 10분간 3번 세척하고 2차 antibody를 처리하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TBS-T buffer로 10분간 3번 세척하고 enhanced chemiluminescence detection system(Amersham Pharmacia, Bucks, UK)를 사용하여 특정 단백질의 발현을 분석하였다.

### 통계분석

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 대조군과 실험군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 이용하여, $p<0.05$일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

## 결과 및 고찰

### 암세포 증식 억제효과

먼저 넓패 메탄올 추출물의 HeLa cell에 대한 세포증식 억제효과를 조사하기 위하여 수용성 tetrazolium salt의 하나인 WST-1을 사용하여 WST-1의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도로 측정하였다. HeLa cell에 넓패 메탄올 추출물을 25, 50, 100, 150, 200 μg/mL의 농도로 처리하여 24시간이 지난 후 확인 결과 넓패 메탄올 추출물의 HeLa cell에 대한 세포증식 억제효과는 100 μg/mL에서 10.42%, 150 μg/mL에서 33.12%, 200 μg/mL에서 41.96%의 억제효과가 농도 의존적으로 나타났다(Fig. 1A). Kim 등(15)의 연구에서 다섯 가지 해조류 에탄올 추출물을 HeLa 자궁암세포, MCF-7 유방암세포, SNU-638 위암세포에 0.02~1 mg/assay 농도로 72시간 동안 첨가하였을 때 암세포증식을 유의적으로 억제하는 것으로 보고하였는데, 본 연구결과 농도와 시간은 다르지만 해조류 에탄올 추출물보다 성장억제효과가 높은 것으로 나타났다. 또한, Ham 등(16)은 HeLa 자궁암세포에 잔대 추출물 및 분획물들을 250 μg/mL 농도로 48시간 처리한 결과 에탄올 추출물은 16.43%, 핵산 분획물은 20.14%, 클로로폼 분획물은 24.12%, 에틸 아세테이트 분획물은 36.60%, 부탄올 분획물은 13.75% 그리고 물 분획물은 25.14%의 성장억제효과를 보였다고 보고하였는데, 본 연구에서는 200 μg/mL에서 41.96%의 억제효과를 보여 잔대 추출물보다 성장억제효과가 높은 것으로 나타났다. 최근 연구에 의하면 식용 갈조류에는 polysaccharides(e.g., fucoidan, laminaran), phlorotanins(e.g., phloroglucinol, eckol, dieckol, diphlorethohydroxycarmalol), diterpenes(e.g., dictyodial, dictyol C, dicytol H), pigments(e.g., fucoxanthin) 등과 같은 다양한 생리활성 및 항암효과를 나타내는 성분 등이 들어있으며(17), 넓패와 같은 패과인 패(*Ishige okamurae*)에서도 phloroglucinol, dieckol, diphlorethohydroxycarmalol, fucoxanthin이 들어있어 항산화 및 항암효과를 나타낸다고 보고되었다(5,18). 본 실험에서 넓패 메탄올 추출물의 암세포 증식억제효과는 갈조류에 함유되어 있는 다양한 생리활성물질들과 연관성이 있을 것으로 생각된다.

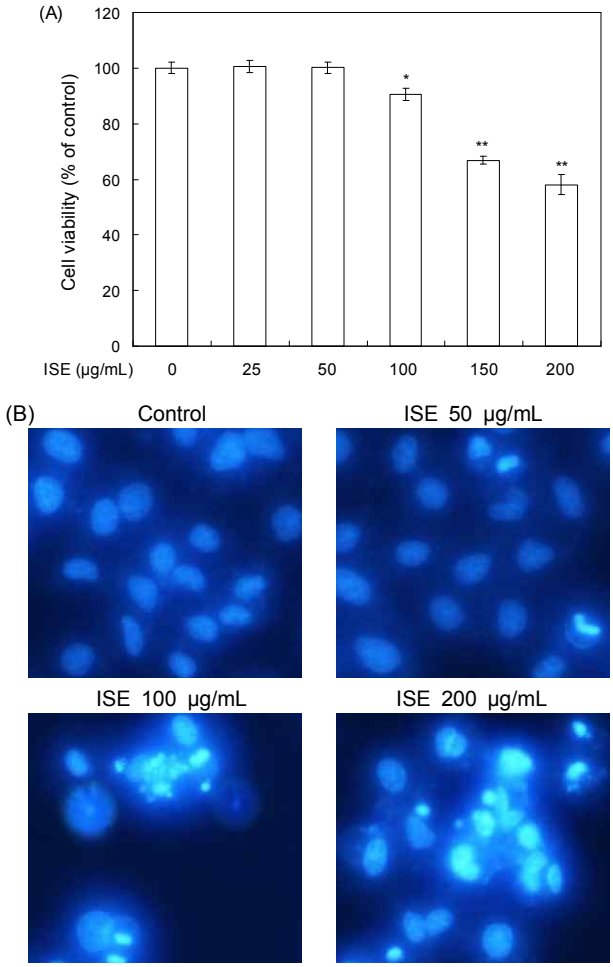


**Fig. 1. Effect of *Ishige sinicola* extracts (ISE) on the cell viability and the morphological changes in HeLa cells.** (A) Cells were treated with various concentrations of ISE for 24 hr, and cell viability was assessed using the EZ-Cytox cell viability assay kit. Error bars represent the mean±SD. Significant differences were compared with the control at $^{*}p<0.01$ and $^{**}p<0.001$ using the Student's *t*-test. (B) Morphological changes. Cells were treated with 50, 100 and 200 μg/mL of ISE for 24 hr. The nuclear morphology of the cells was observed under a fluorescence microscope after Hoechst 33258 staining (200×magnification).

### 넓패 메탄올 추출물에 의한 HeLa 세포의 apoptosis 유도

넓패 메탄올 추출물에 의한 HeLa cell의 세포증식 억제효과가 apoptosis에 의한 것인지를 확인하기 위하여 Hoechst 33258 염색을 통한 핵의 형태 변화(Fig. 1B) 및 annexin-V FITC와 PI double staining을 통한 flow cytometric 분석(Fig. 2)을 통해 apoptosis를 확인하였다. Fig. 1B에서 나타난 바와 같이, 넓패 메탄올 추출물을 처리하지 않은 대조군의 핵은 모양이 정상적으로 염색된 반면에 넓패 메탄올 추출물을 100과 200 μg/mL의 농도로 처리 시 핵 응축 현상과 apoptotic bodies를 관찰할 수 있었다. 또한 유세포 분석을 통하여 apoptotic 세포를 정량적으로 분석한 결과, 넓패 메탄

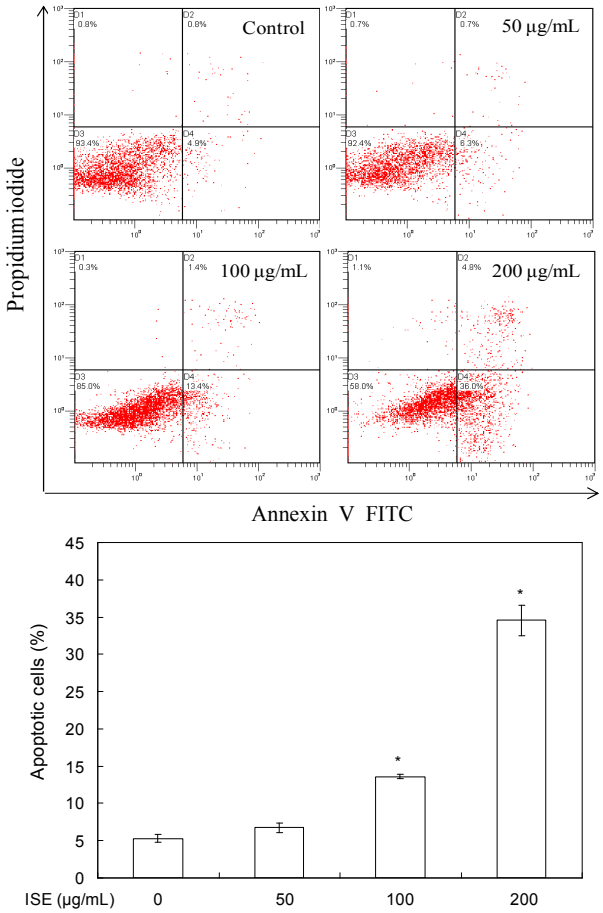


**Fig. 2. Effect of *Ishige sinicola* extracts (ISE) on the apoptosis induction in HeLa cells.** Cells were treated with 50, 100 and 200 μg/mL of ISE for 24 hr. Apoptotic cells were detected by flow cytometry with annexin V FITC in combination with PI staining. Significant differences were compared with the control at $^{*}p<0.01$ using the Student's *t*-test.

올 추출물을 처리하지 않은 대조군의 apoptotic 세포는 5.30 %였으나, 넓패 메탄올 추출물을 처리 시 농도가 증가함에 따라 유의적으로 apoptotic 세포가 증가하였으며($p<0.01$), 100 μg/mL에서 13.60%, 200 μg/mL에서 34.55%의 수치를 나타내었다(Fig. 2). PARP는 DNA 복구에 관여하는 단백질로서 핵 안에 존재하며, apoptosis 과정 중 caspaspe-3에 의해 116 kDa의 단백질이 89 kDa으로 절단되는 특징이 있다(4). 이에 넓패 메탄올 추출물에 의해 PARP 단백질이 절단되는지를 western blotting을 통해 관찰하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는바와 같이 넓패 메탄올 추출물 처리 시 농도가 증가하거나 또는 시간이 지남에 따라 89 kDa의 밴드가 증가하였다. 이는 세포독성과 핵의 형태 변화 및 apoptosis 분석과 일치하는 결과를 보여준다. 이러한 결과들은 넓패 메탄올 추출물에 의한 HeLa 세포의 사멸이 apoptosis 유도와 연관이 있음을 나타낸다.

### 넓패 메탄올 추출물에 의한 caspase 활성

Caspase의 activation은 apoptotic process에서 매우 중요

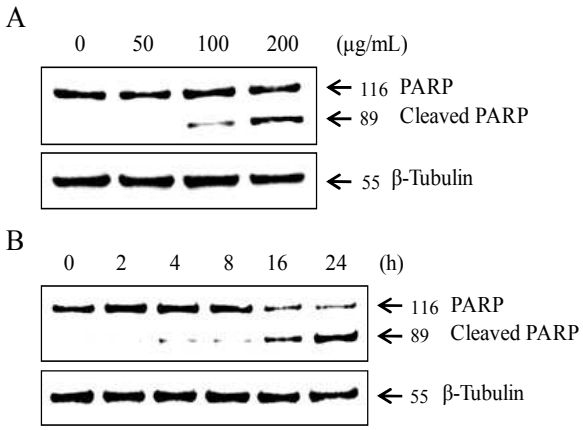


**Fig. 3. Effect of *Ishige sinicola* extracts (ISE) on the degradation of PARP in HeLa cells.** (A) Cells were treated with 50, 100 and 200 μg/mL of ISE for 24 hr. (B) Cells were treated with 200 μg/mL of ISE for the indicated times. Cells were harvested and samples were prepared for analysis of the cleavage of PARP using western blot analysis. β-Tubulin was used as a loading control.

한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 시스테인계의 단백질인 caspase는 다양한 isoform이 존재하며, initiator caspase와 effector caspase로 구분된다. Initiator caspase에 해당하는 caspase-8은 death 신호에 의해 활성화 되어 직접 effector caspase인 caspase-3를 활성화 하거나 또는 Bcl-2 family 단백질인 Bid cleavage를 통하여 mitochondria의 기능이상을 유발하여 mitochondria 내에 존재하는 cytochrome c를 cytosol로 방출하여 Apaf1과 결합하여 apoptosome을 형성함으로써 차례로 caspase-9과 caspase-3를 활성화시킴으로써 세포의 증식과 생존에 중요한 역할을 하는 PARP를 절단하거나 직접적으로 핵의 응축과 DNA 절단에 영향을 주어 apoptosis를 유도한다(1-4). Fig. 3에 나타낸 바와 같이 caspase-3에 의해 분할되어지며, apoptosis의 특징적인 marker이면서 nuclear enzyme인 PARP가 분할되는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 넓패 메탄올 추출물에 의해 일어난 apoptosis가 caspase cascade와 관련되어 있는지 western blot을 통해 확인하였다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이 caspase-8, caspase-3의 protein levels는 넓패 추출물 처리 농도와 시간에 따라 감소되었으며, 활성화된 cleaved caspase-8, caspase-9, caspase-3의 protein levels는 넓패 추출물 처리 농도와 시간에 따라 증가하는 것을 확인하였다. 이는 넓패 메탄올 추출물 처리에 의한 HeLa cells의 apoptosis 유도에 caspase의 활성화가 연관되어 있음을 보여주는 결과이다. 또한 넓패 메탄올 추출물에 의한 세포사멸이 caspase-dependent pathway를 통하여 일어나는지 general caspase inhibitor인 z-VAD-fmk를 투여하여 넓패 메탄올 추출물에 의한 HeLa cells의 세포사멸이 억제되는지 세포생존율을 측정하여 확인하였다. 그 결과 넓패 메탄올 추출물 처리 전에 25 μM의 z-VAD-fmk를 1시간 전 처리한 군은 넓패 메탄올 추출물을 단독으로 처리한 군과 비교하여 HeLa cells의 세

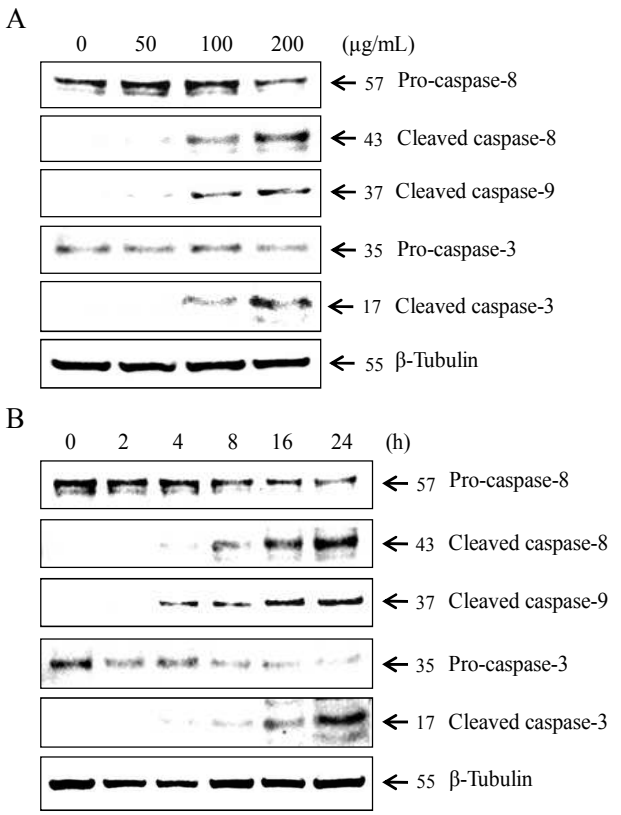


**Fig. 4. Effect of *Ishige sinicola* extracts (ISE) on the activation of caspases in HeLa cells.** (A) Cells were treated with 50, 100 and 200 μg/mL of ISE for 24 hr. (B) Cells were treated with 200 μg/mL of ISE for the indicated times. Cells were harvested and samples were prepared for analysis of the caspase activation using western blot analysis. β-Tubulin was used as a loading control.

포생존율이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다($p<0.05$) (Fig. 5). Fig. 4와 Fig. 5의 결과들은 넓패 메탄올 추출물에 의한 apoptosis 과정은 caspase-dependent pathway가 관여함을 시사하고 있다.

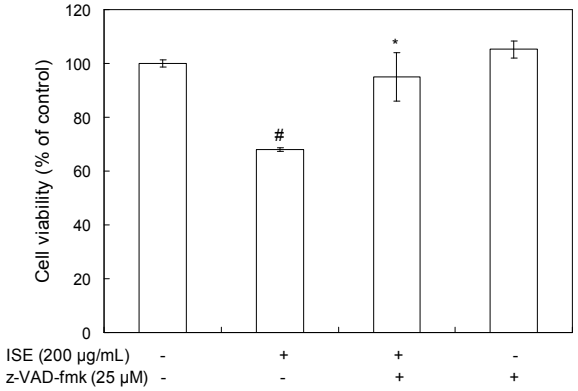


**Fig. 5. Effect of caspase inhibitor (z-VAD-fmk) on the *Ishige sinicola* extracts (ISE)-induced cell death in HeLa cells.** Cells were pretreated with 25 μM of z-VAD-fmk for 1 hr and then treated with 200 μg/mL of ISE for an additional 24 hr. Cell viability was assessed using the EZ-Cytox cell viability assay kit. Error bars represent the mean±SD. Significant differences were compared with the control at $^{\#}p<0.01$ and the ISE alone at $^{*}p<0.05$ using the Student's *t*-test.

## 요 약

본 연구에서는 넓패 메탄올 추출물의 농도별 처리가 인체 자궁암 세포 HeLa의 세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포독성 측정, Hoechst 33258 staining, flow cytometry 분석을 통하여 세포사멸을 확인하였다. 넓패 메탄올 추출물 처리 시 HeLa 세포에서 농도 의존적으로 세포의 증식을 억제하였으며, 또한 넓패 메탄올 추출물은 농도 의존적으로 핵을 응축하고 apoptotic bodies을 생성하였다. 유세포 분석을 통하여 apoptosis를 측정한 결과, 넓패 메탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 apoptotic 세포가 증가하였다. Western blot을 통해 PARP 단백질의 절단 현상을 분석한 결과, 넓패 메탄올 추출물의 처리 농도와 시간에 따라 PARP 단백질의 절단 현상이 증가하였다. 또한 넓패 메탄올 추출물은 caspase-8, caspase-9 및 caspase-3 활성을 농도와 시간에 따라 증가시켰으며, caspase 저해제인 z-VAD-fmk로 처리 시 넓패 메탄올 추출물에 의한 세포사멸이 유의적으로 감소되어 넓패 메탄올 추출물에 의한 HeLa 세포의 apoptosis 유도에 caspase가 중요한 역할을 하고 있음을 확인하였다. 따라서 넓패 메탄올 추출물은 HeLa 자궁암 세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 나타나 넓패의 항암효과 가능성을 제시하였다.

## 감사의 글

본 연구는 한국원자력연구원 기본연구사업 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

## 문 헌

1. Kang HI, Kim JY, Cho HD, Park KW, Kang JS, Seo KI. 2010. Resveratrol induces apoptosis in primary human prostate cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1119-1125.
2. Tan ML, Ooi JP, Ismail N, Moad AIH, Muhammad TST. 2009. Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharm Res* 26: 1547-1560.
3. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res* 59: 365-378.
4. Chae YH, Shin DY, Park C, Lee YT, Moon SG, Choi YH. 2011. Induction of apoptosis in human colon carcinoma HCT116 cells using a water extract of *Lepidium virginicum* L. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 649-659.
5. Kim KN, Heo SJ, Kang SM, Ahn G, Jeon YJ. 2010. Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway. *Toxicol in Vitro* 24: 1648-1654.
6. Das SK, Ren R, Hashimoto T, Kanazawa K. 2010. Fucoxanthin induces apoptosis in osteoclast-like cells differentiated from RAW 264.7 cells. *J Agric Food Chem* 58:

6090-6095.
7. Athukorala Y, Lee KW, Kim SK, Jeon YJ. 2007. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresour Technol* 98: 1711-1716.
8. Kim IH, Lee JH. 2008. Antimicrobial activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from macroalgae. *J Ind Eng Chem* 14: 568-572.
9. Heo SJ, Yoon WJ, Kim KN, Ahn GN, Kang SM, Kang DH, Affan A, Oh C, Jung WK, Jeon YJ. 2010. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol* 48: 2045-2051.
10. Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol* 96: 1613-1623.
11. Iwashima M, Mori J, Ting X, Matsunaga T, Hayashi K, Shinoda D, Saito H, Sankawa U, Hayashi T. 2005. Antioxidant and antiviral activities of plastoquinones from the brown alga *Sargassum micracanthum*, and a new chromene derivative converted from the plastoquinones. *Biol Pharm Bull* 28: 374-377.
12. Lee IK, Kim YH. 1999. Biodiversity and distribution of marine benthic organisms and uses of algal resources in the coastal zone of Korea and Japan I. Benthic marine algae in the East coast of Korea. *Algae* 14: 91-110.
13. Heo SJ, Ko SC, Kang SM, Cha SH, Lee SH, Kang DH, Jung WK, Affan A, Oh CH, Jeon YJ. 2010. Inhibitory effect of diphlorethohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage. *Food Chem Toxicol* 48: 1355-1361.
14. Hirao S, Tara K, Kuwano K, Tanaka J, Ishibashi F. 2012. Algicidal activity of glycerolipids from brown alga *Ishige sinicola* toward red tide microalgae. *Biosci Biotechnol Biochem* 76: 372-374.
15. Kim SA, Kim J, Woo MK, Kwak CS, Lee MS. 2005. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 451-459.
16. Ham YA, Choi HJ, Kim SH, Chung MJ, Ham SS. 2009. Antimutagenic and antitumor effects of *Adenophora triphylla* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 25-31.
17. Gupta S, Abu-Ghannam N. 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends Food Sci Tech* 22: 315-326.
18. Zou Y, Qian ZJ, Li Y, Kim MM, Lee SH, Kim SK. 2008. Antioxidant effects of phlorotannins isolated from *Ishige okamurae* in free radical mediated oxidative systems. *J Agric Food Chem* 56: 7001-7009.

(2012년 3월 23일 접수; 2012년 4월 19일 채택)