

잔가시모자반 추출물의 비소세포폐암 세포주에 대한 항암효과

박현지^{1#} · 박선은^{1#} · 지규용¹ · 최영현² · 박신행^{1*}

1: 동의대학교 한의과대학 병리학교실, 2: 동의대학교 한의과대학 생화학교실

Anti-cancer Effects of *Sargassum micracanthum* Extract on Non-small Cell Lung Cancer Cells

Hyun-Ji Park^{1#}, Seon-Eun Park^{1#}, Gyoo-Yong Chi¹, Yung-Hyun Choi², Shin-Hyung Park^{1*}

1: Department of Pathology, College of Korean Medicine, Dong-eui University,
2: Department of Biochemistry, College of Korean Medicine, Dong-eui University

Sargassum micracanthum (SM), a brown macroalga widely distributed along the Korean coastline, is known for its diverse pharmacological activities, including anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer effects. While its ability to inhibit the migration and invasion of head and neck cancer cells has been reported, its cytotoxic activity against non-small cell lung cancer (NSCLC) cells remains largely unexplored. In this study, we evaluated the anticancer effects of an ethanolic extract of SM (ESM) on NSCLC cells, focusing on apoptosis induction. ESM significantly reduced the viability of H1299, PC9, and H1975 human NSCLC cells in a dose- and time-dependent manner. Treatment with ESM increased the sub-G1 cell population, annexin V-positive cells, and apoptotic nuclear condensation in a concentration-dependent fashion. ESM also upregulated cleaved PARP expression across all tested cell lines. Collectively, these findings indicate that ESM exerts anticancer effects in NSCLC cells by promoting apoptosis, highlighting its potential as a natural source for novel therapeutic agents against NSCLC.

keywords : *Sargassum micracanthum*, Apoptosis, Non-small cell lung cancer

서 론

폐암은 세계적으로 유방암, 전립선암에 이어 가장 많이 진단되는 암종이자, 수십 년간 암으로 인한 사망률 1위를 차지하고 있다¹⁾. 폐암으로 인한 사망자 수는 암 사망률 2위인 대장암에 비해 2.5배나 많은 실정이다¹⁾. 다행히 흡연이 폐암을 일으키는 주요 위험인자임이 알려지면서 강화된 금연 정책과 흡연을 감소에 힘입어 2006년 이후 남성에서 매년 약 2.5%씩 폐암 발생률이 감소하고 있다¹⁾. 또한 조기 진단 기술과 치료법의 발전으로 폐암 사망률도 지속적으로 감소하는 추세이다^{1,2)}. 그러나 여전히 전체 폐암 환자의 5년 생존율은 약 25%에 불과하며, 원격전이로 이뤄진 4기 환자의 경우 5년 생존율이 10% 내외에 그친다^{1,3)}. 폐암은 조직학적으로 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC)과 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)으로 나뉘며, 이 중 NSCLC가 약 85%를 차지하여 주요 치료대상이 된다⁴⁾. 폐암의 치료법으로서 수술, 항암화학요법, 방사선치료, 표적치료, 면역치료 등이 폭넓게 활

용되고 있다. 특히 상피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR) 돌연변이를 가진 NSCLC 환자에서 osimertinib과 같은 EGFR 티로신키나제 억제제(tyrosine kinase inhibitor, TKI)가 무진행생존기간(progression free survival, PFS)을 유의하게 연장하며 표준치료로 자리잡았다⁵⁾. 또한 pembrolizumab과 같은 면역항암제는 진행성 NSCLC 환자의 객관적 반응을(objective response rate, ORR)과 전체생존기간(overall survival, OS)을 개선시켜 단독 혹은 항암화학요법과 병행하여 사용되고 있다⁶⁾. 그러나 지속적인 내성 발생과 부작용으로 인해 새로운 치료대책이 절실히 요구되는 실정이다^{7,8)}.

1990년대 이후 paclitaxel, doxorubicin 등 천연물 유래 항암제가 폐암 치료에 도입되었으며^{9,10)}, 그 이후 인삼, 강황, 녹차 등 수백 종의 천연물에서 유래된 화합물들이 폐암 세포 및 동물실험에서 항암 활성을 보여 일부는 임상시험 단계까지 진입하였다¹¹⁾. 이들은 단독 혹은 항암제와 병용하여 암세포의 아포토시스(apoptosis) 유발, 세포주기 정지, 전이 및 혈관신생 억제, 종양 미

* Corresponding author

Shin-Hyung Park, Department of Pathology, College of Korean Medicine, Dong-eui University, 47227, Yangjeong-ro, Busanjin-gu, Busan, Republic of Korea.

E-mail : omdpark@deu.ac.kr · Tel : +82-51-890-3332

Received : 2025/07/21 · Revised : 2025/08/20 · Accepted : 2025/08/20

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2025.10.39.5.120

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

Both authors contributed equally to this work

세환경 조절, 면역세포 활성화, 항암제 내성 극복 등 다양한 기전을 통해 항암 활성을 나타내었다⁹⁻¹¹⁾. 또한 현대의 나노기술과 결합하여 천연물 고유의 낮은 용해도와 체내흡수율을 개선하려는 연구도 본격적으로 진행되고 있다¹²⁾. 특히 인삼 유래 ginsenoside Rg3는 NSCLC 환자에서 백금기반 항암화학요법과 병용 시 생존율과 ORR을 개선하여 중국에서 단일 성분 항암 보조제로 승인된 바 있다¹³⁾. 따라서 천연물은 새로운 항암 치료제 개발의 중요한 원천으로 주목받고 있다.

해양 조류 유래 천연물의 항암효과 역시 활발히 연구되는 분야이다. 대표적으로 미역, 다시마 등 갈조류에 풍부하게 포함된 fucoidan은 지난 20여 년간 폐암 연구에서 가장 많이 조사된 해조류 성분 중 하나이다¹⁴⁾. 2024년 보고된 임상연구에서는 진행성 폐암 환자에 저분자 fucoidan을 경구 투여했을 때 6개월 생존율과 면역 지표가 개선되는 경향이 관찰되었다¹⁵⁾. 그 외 fucoxanthin, phycocyanin 등 다양한 해조류 성분이 폐암 억제 효과를 보인 바 있어 항후 해조류 유래 물질들의 항암효과를 지속적으로 탐색할 필요가 있다^{16,17)}. 특히 해조류는 공통적으로 연경(軟堅)효과를 가지는 함미(鹹味)를 띠므로 한의학적으로 항종양 효과가 있을 것으로 기대된다.

잔가시모자반(*Sargassum micracanthum*)은 동아시아 연안, 특히 제주도과 일본 남부 해역에 서식하는 갈조류이다¹⁸⁾. 최근 약리학적 연구에서 잔가시모자반의 항산화, 항염증, 항바이러스, 항종양 활성이 보고되었다¹⁸⁻²⁰⁾. 이 해조류에서 분리된 plastoquinone은 지질 과산화 억제 및 DPPH 라디칼 소거능 등 강력한 항산화 활성을 보였고¹⁹⁾, isoketocharbrolic acid는 LPS로 유도한 대식세포의 염증반응을 억제하였다¹⁸⁾. 특히 잔가시모자반 메탄올 추출물은 두경부암 세포의 Tie2 경로를 억제함으로써 이동능과 침윤능을 저해하였다²⁰⁾. 그러나 잔가시모자반의 NSCLC에 대한 항암효과는 아직 연구된 바 없다. 본 연구는 잔가시모자반의 에탄올 추출물(ethanolic extract of *Sargassum micracanthum*, ESM)이 NSCLC 세포주의 증식에 미치는 영향을 아포토시스 유발에 초점을 맞추어 조사한 결과 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료

잔가시모자반 에탄올 추출물(ESM)은 해양생명자원통합시스템(<https://www.mbris.kr/>)을 통해 해양바이오뱅크에서 분양받았다. 대한민국 제주특별자치도 서귀포시 성산읍(N 33° 26' 6" E 126° 56' 43")에서 2011년 9월 26일 채집한 잔가시모자반을 70% 에탄올로 초음파 추출한 분말을 분양받았으며, 이를 dimethylsulfoxide(DMSO; Amresco, Solon, OH, USA)에 100 mg/mL 농도로 녹여 사용하였다.

2. 세포 배양

H1299, PC9, H1975 인간 NSCLC 세포주는 서울대학교 약학대학 이호영 교수님으로부터 분양받았다. 모든 세포는 RPMI-1640(WelGENE, Seoul, Korea)에 10% fetal bovine

serum(FBS; WelGENE), 100,000 U/ℓ penicillin(WelGENE), 100 mg/ℓ streptomycin(WelGENE)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3. MTT assay

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. H1299, PC9, H1975 세포를 96 well plate에 well당 2×10³개씩 분주하고, 다음 날 ESM을 농도별(10-100 µg/mL)로 처리하였다. 처리 후 24-72시간이 경과한 뒤, 각 well에 최종 농도 0.5 mg/mL가 되도록 MTT 용액(Duchefa, Haarlem, The Netherlands)을 첨가하고 2시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 이후 생성된 formazan 결정은 DMSO를 이용하여 완전히 용해시킨 후, microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 약물 처리를 하지 않은 대조군의 흡광도를 기준으로 하여, 각 군의 흡광도를 백분율로 환산하여 계산하였다.

4. Trypan blue exclusion assay

Trypan blue exclusion assay를 통해 세포 생존율을 평가하였다. H1299 세포는 12 well plate에 well당 1×10⁴개, PC9 및 H1975 세포는 24 well plate에 well당 1.5×10⁴개씩 분주하였다. 다음 날 ESM을 농도별(25-100 µg/mL)로 처리하고 48-72시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 수거하여 PBS에 현탁하고 0.4% Trypan blue 용액(WelGENE)과 3:1의 비율로 혼합하였다. 혼합액을 hemocytometer에 주입한 후, 현미경 하에서 파란색으로 염색된 사멸 세포를 제외하고 염색되지 않은 생존 세포만을 계수하였다. 세포 생존율은 약물 처리를 하지 않은 대조군의 생존 세포 수를 기준으로 하여, 각 군의 생존 세포 수를 백분율로 환산하여 계산하였다.

5. Annexin V-FITC/PI 염색을 통한 아포토시스 측정

Annexin V-FITC/PI 염색법을 이용하여 아포토시스를 분석하였다. H1299 및 PC9 세포를 6 well plate에 well당 각각 5×10⁴개, 1×10⁵개 분주한 뒤, 다음 날 ESM을 50-100 µg/mL의 농도로 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 수거하여 Annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA)의 사용 지침에 따라 염색하였다. 염색된 세포는 유세포 분석기(FACSCaliber, Becton Dickinson and Company)를 이용하여 분석하였으며, Annexin V+/PI- 세포를 초기 아포토시스 세포로, Annexin V+/PI+ 세포를 후기 아포토시스로 해석하였다.

6. Sub-G1 분석을 통한 아포토시스 측정

세포주기 중 sub-G1 분석을 통해 아포토시스를 평가하였다. H1299 세포는 6 well plate에 well당 5×10⁴개, H1975 세포는 well당 1×10⁵개 분주하였으며, 다음 날 ESM을 50-100 µg/mL의 농도로 처리하였다. 48시간 배양 후, 세포를 수거하여 4°C에서 80% 에탄올

로 1시간 동안 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 1회 세척한 후, propidium iodide (PI, 50 µg/ml; Sigma-Aldrich) 및 RNase A(30 µg/ml; Sigma-Aldrich)를 포함한 염색용 buffer에 현탁하여 실온에서 30분간 암반응시켰다. 염색된 세포는 유세포 분석기 (FACSCaliber)를 이용하여 분석하였고, 전체 세포주기 중 sub-G1 영역에 해당하는 세포 비율을 아포토시스 지표로 해석하였다.

7. DAPI 염색

세포의 핵 형태 변화를 관찰하기 위해 DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich) 염색을 수행하였다. H1299 세포는 6 well plate에 well당 5×10^4 개, PC9 세포는 well당 1×10^5 개 분주하였으며, 다음 날 ESM을 50-100 µg/ml의 농도로 처리하였다. H1299 세포는 ESM 처리 48시간 후, PC9 세포는 48시간 후 각각 수거하여 3.7% paraformaldehyde 용액 (Sigma-Aldrich)을 사용하여 15분간 고정하고 PBS로 세척하였다. 그 후 Cytospin (Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA)을 이용하여 세포를 슬라이드 글라스에 부착시키고, DAPI 용액(최종농도 2.5 µg/ml)으로 10분간 암실에서 염색하였다. 이후 PBS로 2차례 세척하고 mounting 하여 형광현미경(Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany)으로 핵 형태를 관찰하였다. 응축되거나 분절된 형태의 핵을 가진 세포를 아포토시스 세포로 판별하였다.

8. 웨스턴 블롯

웨스턴 블롯을 통해 단백질 발현을 분석하였다. H1299 세포는 6 well plate에 well당 5×10^4 개, PC9 및 H1975 세포는 well당 1×10^5 개 분주하였으며, 다음 날 ESM을 50-100 µg/ml의 농도로 처리하였다. ESM 처리 48시간 후 각각 수거하여 RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)에 protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) 및 phosphatase inhibitors (1mM Na_3VO_4 및 100 mM NaF)를 첨가하여 용해하였다. 용해된 세포는 4°C에서 1시간 반응시킨 후 $12,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 상층액을 모았다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 수행하였고, 각 샘플당 20 µg의 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동(SDS-PAGE)한 후, PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 transfer 하였다. Membrane은 3% bovine serum albumin (BSA, GenDEPOT, Barker, TX, USA) 용액으로 실온에서 30분간 blocking 한 뒤, 1차 항체를 3% BSA 용액에 1:1000으로 희석하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. 다음 날, TBST로 1시간 동안 수차례 세척한 후, HRP-conjugated 2차 항체를 3% skim milk (MBcell, Seoul, Korea)에 1:5000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 TBST로 30분간 세척한 후, D-Plus ECL Femto System (Donginbio, Seoul, Korea)를 이용하여 단백질 밴드를 검출하였다. Cleaved PARP 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고, Actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

9. 통계 분석

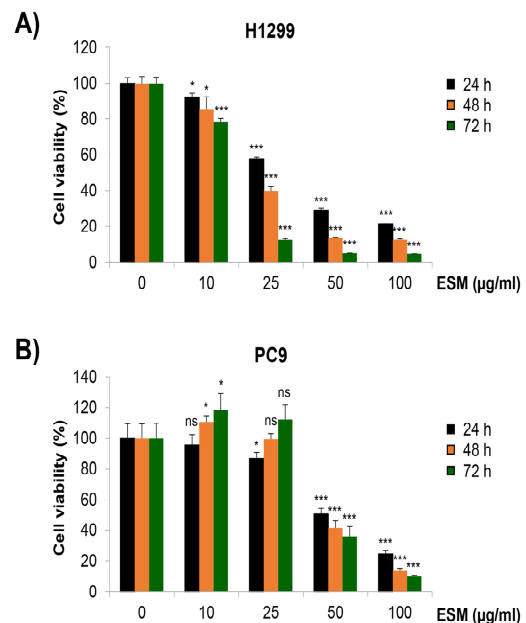
모든 실험 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 통계 분석은 일원분산분석(one-way ANOVA) 후 Tukey의 사후 검정(Tukey's post hoc test)을 통해 $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 10.4.2(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 이용하여 수행하였다.

결 과

1. ESM이 NSCLC 세포 생존율에 미치는 영향

ESM이 NSCLC 세포의 증식에 미치는 영향을 평가하기 위해 H1299, PC9, H1975 세포주에 ESM을 다양한 농도(10-100 µg/ml) 및 시간(24-72시간)으로 처리한 후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, 세 세포주 모두에서 ESM 처리에 따라 농도 및 시간 의존적으로 세포 생존율이 감소하는 양상이 관찰되었으며(Fig. 1A-C), 이 중 H1299 세포가 가장 높은 감수성을 나타냈다. 반면, PC9 및 H1975 세포는 25 µg/ml 이하 농도에서는 유의한 세포독성이 나타나지 않았으나, 50 µg/ml 이상에서는 현저한 세포증식 억제 효과를 보였다(Fig. 1A-C).

MTT assay는 세포의 미토콘드리아 효소 활성을 기반으로 세포 생존율을 간접적으로 평가하는 방법²¹⁾이므로, 이를 보완하고자 trypan blue exclusion assay를 통해 살아 있는 세포 수를 직접 계수하여 생존율을 측정하였다. 그 결과, H1299, PC9, H1975 세포 모두에서 ESM 처리 48시간 및 72시간 후 농도 의존적인 생존율 감소가 확인되었으며(Fig. 2A-C), 특히 H1299 세포는 가장 큰 반응성을 보여 MTT assay 결과와 일치하였다. 이상의 결과를 종합하면, ESM은 NSCLC 세포주의 증식을 효과적으로 저해하며, 그 중에서도 H1299 세포에 가장 강한 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있다.



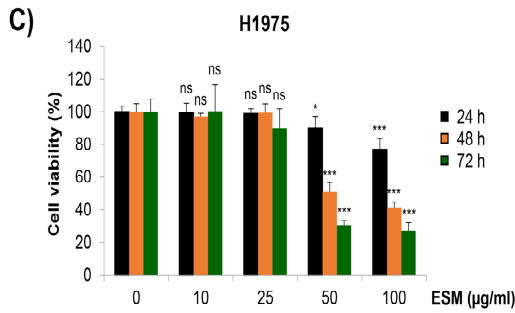


Fig. 1. Effects of ESM on the viability of NSCLC cells assessed by MTT assay. (A–C) H1299 (A), PC9 (B), and H1975 (C) human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells were treated with ethanolic extract of Sargassum micracanthum (ESM) at concentrations of 10–100 µg/ml for 24–72 h. Cell viability was evaluated using the MTT assay. Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (ns, not significant; * P < 0.05, *** P < 0.001 vs. untreated control).

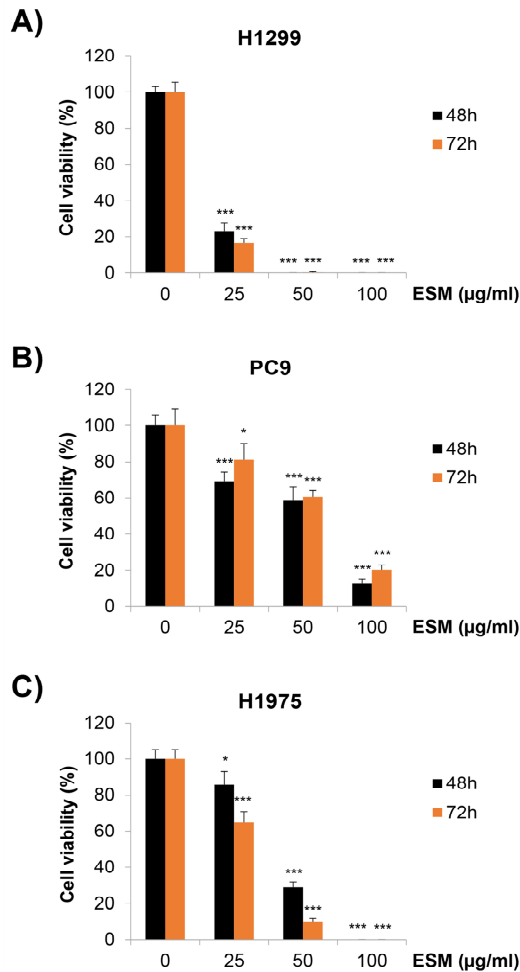


Fig. 2. Effects of ESM on the viability of NSCLC cells assessed by trypan blue exclusion assay. (A–C) H1299 (A), PC9 (B), and H1975 (C) human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells were treated with ethanolic extract of Sargassum micracanthum (ESM) at concentrations of 25–100 µg/ml for 48–72 h. Cell viability was determined using the trypan blue exclusion assay. Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (* P < 0.05, *** P < 0.001 vs. untreated control).

2. Annexin V/PI 염색을 통한 ESM의 아포토시스 유발 평가

앞서 확인한 ESM의 세포증식 억제 효과가 아포토시스 유발에 의한 것인지를 확인하기 위해 annexin V/PI 염색 후 유세포 분석을 수행하였다. Annexin V는 아포토시스 초기에 세포막 외측으로 노출되는 phosphatidylserine과 결합하여 형광을 나타내며, propidium iodide (PI)는 세포막이 손상된 경우 세포 내로 침투하여 DNA와 결합함으로써 강한 형광을 발현한다. 따라서 annexin V⁺/PI⁻ 세포는 초기 아포토시스 상태, annexin V⁺/PI⁺ 세포는 후기 아포토시스 또는 괴사 상태의 세포로 분류된다²²⁾. 실험 결과, H1299 및 PC9 세포에 ESM을 처리한 경우 annexin V⁺/PI⁻ 및 annexin V⁺/PI⁺ 세포의 비율이 모두 증가하였으며, 두 세포주 모두에서 annexin V 양성 세포의 총 비율이 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 3A, B). H1299 세포에서는 미처리 대조군에서 annexin V 양성 세포 비율이 8.59 ± 1.07%였으나, ESM 50 µg/ml 처리 시 23.47 ± 2.16%, 100 µg/ml 처리 시 93.07 ± 0.70%로 급격히 증가하였다. PC9 세포에서도 각각 14.68 ± 0.01% (미처리 대조군), 25.96 ± 1.07% (50 µg/ml), 58.54 ± 7.54% (100 µg/ml)로 농도 의존적인 증가를 나타냈다(Fig. 3B). 이러한 결과는 ESM이 NSCLC 세포에서 아포토시스를 유발함을 의미한다.

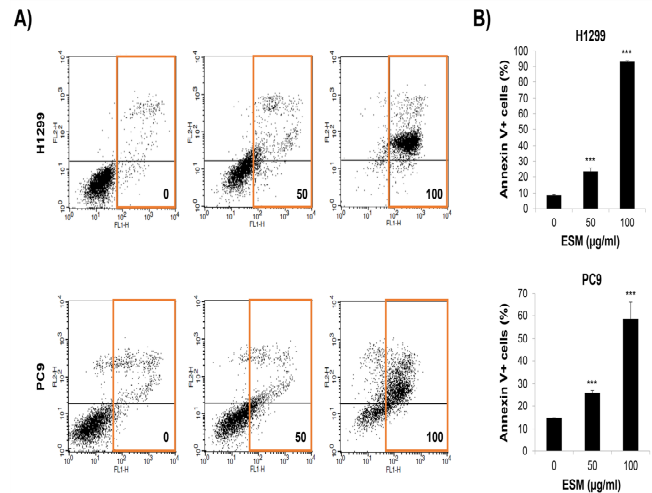


Fig. 3. Induction of apoptosis by ESM in NSCLC cells assessed by annexin V/PI staining. (A, B) H1299 and PC9 human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells were treated with ethanolic extract of Sargassum micracanthum (ESM) at concentrations of 50 or 100 µg/ml for 48 h. Cells were stained with annexin V-FITC and propidium iodide (PI), followed by flow cytometric analysis. Representative dot plots from three independent experiments are shown. The orange box highlights the annexin V-positive population, indicating apoptotic cells (A). The percentage of annexin V-positive cells was quantified (B). Data are presented as the mean ± SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (***) P < 0.001 vs. untreated control).

3. Sub-G1 분석을 통한 ESM의 아포토시스 유발 평가

ESM에 의한 아포토시스 유발 여부를 추가로 확인하기 위해 유세포 분석을 통한 sub-G1 정량 분석을 수행하였다. Sub-G1 영역에 위치한 세포는 G1기 정상 세포보다 DNA 함량이 낮은 세포로, 이는 주로 아포토시스 과정에서 DNA가 단편화되며 나타나는

현상이다²³). 실험 결과, H1299 세포에서 sub-G1 세포의 비율은 미처리 대조군에서 $5.23 \pm 2.04\%$ 였으나, ESM을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리했을 때 각각 $12.18 \pm 2.23\%$, $92.12 \pm 3.62\%$ 로 농도 의존적으로 현저히 증가하였다(Fig. 4A, B). H1975 세포 역시 동일한 경향을 보여 대조군에서는 sub-G1 세포 비율이 $6.25 \pm 1.01\%$ 였고, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군에서는 각각 $16.50 \pm 1.84\%$, $44.48 \pm 4.94\%$ 로 증가하였다(Fig. 4A, B). 이러한 sub-G1 분석 결과는 앞서 수행한 annexin V/PI 염색 결과와 일관되며, ESM이 NSCLC 세포에서 아포토시스를 유도함을 추가적으로 입증한다.

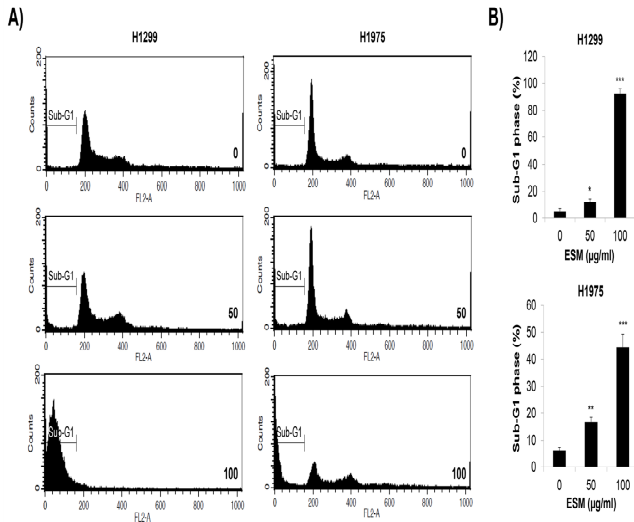


Fig. 4. Induction of apoptosis by ESM in NSCLC cells assessed by sub-G1 analysis. (A, B) H1299 and H1975 human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells were treated with ethanolic extract of *Sargassum micracanthum* (ESM) at concentrations of 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h. Apoptosis was evaluated by measuring sub-G1 DNA content using flow cytometry. Representative histogram plots from three independent experiments are shown (A). The percentage of cells in the sub-G1 phase, indicative of apoptosis, was quantified (B). Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. untreated control).

4. 핵 형태 관찰을 통한 ESM의 아포토시스 유발 평가

ESM에 의한 아포토시스 유도를 뒷받침하는 또 다른 증거로, DAPI 염색을 통해 핵의 형태 변화를 관찰하였다. 정상 세포는 핵이 둥글고 균일하게 염색되지만, 아포토시스가 일어난 세포는 염색체 응축으로 인해 밝은 형광을 띠며, 핵이 단편화되어 여러 개의 작은 조각으로 관찰된다²⁴). H1299 및 PC9 세포에 ESM을 농도별로 처리한 후 DAPI로 염색하여 형광현미경으로 관찰한 결과, 두 세포주 모두에서 아포토시스에 특징적인 밝고 단편화된 핵 형태가 농도 의존적으로 증가하는 것이 확인되었다(Fig. 5). 이러한 결과는 annexin V/PI 염색 및 sub-G1 분석 결과와 일치하며, ESM이 NSCLC 세포에서 아포토시스를 유도함을 형태적으로 뒷받침한다.

5. Cleaved PARP 발현 조사를 통한 ESM의 아포토시스 유발 평가

ESM에 의한 아포토시스 유도를 분자적 수준에서 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 통해 cleaved PARP의 발현을 분석하였다. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)는 DNA 손상에 반응하여

복구를 유도하는 핵 내 효소로, 아포토시스 과정에서 caspase-3에 의해 특이적으로 절단되므로 cleaved PARP는 아포토시스의 대표적인 분자 마커로 활용된다²⁵). 실험 결과, H1299, PC9, H1975 세포에 ESM을 농도별로 처리하자 3개 세포주 모두에서 cleaved PARP 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이러한 결과는 앞서 확인한 annexin V/PI 염색, sub-G1 분석, DAPI 염색 결과와 일관되는 것으로서 ESM이 NSCLC 세포에서 아포토시스를 유도함을 분자적으로 입증하는 것이다.

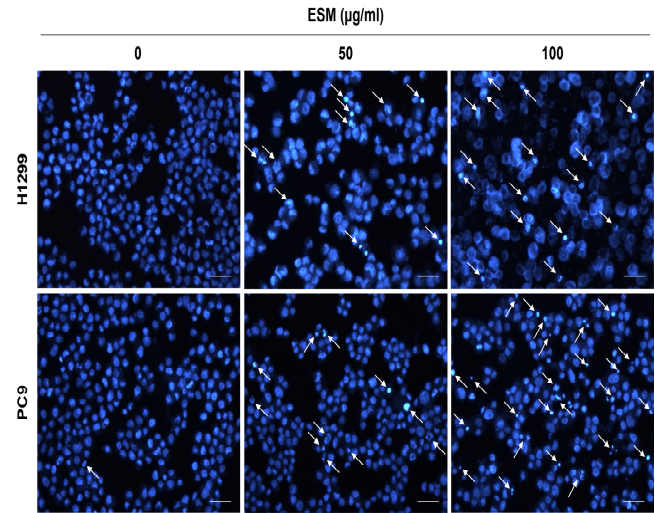


Fig. 5. Induction of apoptosis by ESM in NSCLC cells assessed by nuclear observation. H1299 (upper panel) and PC9 (lower panel) human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells were treated with ethanolic extract of *Sargassum micracanthum* (ESM) at concentrations of 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h. Nuclei were stained with DAPI solution and observed under a fluorescence microscope at 100 \times magnification (scale bar = 50 μm). Representative images from three independent experiments are shown. White arrows indicate condensed and fragmented apoptotic nuclei.

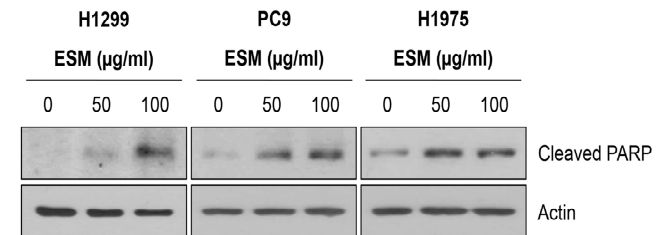


Fig. 6. Induction of apoptosis by ESM in NSCLC cells assessed by Western blot analysis. H1299, PC9, and H1975 human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells were treated with ethanolic extract of *Sargassum micracanthum* (ESM) at concentrations of 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h. Apoptosis was evaluated by examining the expression of cleaved PARP via Western blot analysis. Actin was used as a loading control. Representative blot images from three independent experiments are shown.

고 찰

본 연구는 해양 천연물 중 높은 개발 잠재력을 지닌 잔가지 모자반(*Sargassum micracanthum*)의 항암 활성을 아포토시스 유

도 측면에서 평가하였다. 잔가시모자반은 전통적인 본초서에 구체적인 한약명으로 기재되어 있지는 않으나, 유사한 생리활성을 가질 것으로 예측되는 한약재로서 해조(海藻)를 들 수 있다. 대한민국약전외한약(생약)규격집에 따르면, 해조(海藻)의 기원식물로서 툯(Sargassum fusiforme)과 알송이모자반(Sargassum pallidum C. Agardh)이 등재되어 있으며²⁶⁾, 잔가시모자반은 현행 규격집에 명시되어 있지 않으나, 동일한 모자반속(Sargassum spp.)에 속하는 갈조류로서 유사한 생리활성을 지닐 가능성이 있다. 해조는 한의학적으로 성(性)은 한(寒), 미(味)는鹹(鹹)하며, 연건산결(軟堅散結), 소담(消痰)의 효능이 있어, 현대의 갑상선종에 해당하는 영유(癭瘤), 경부 임파선 결핵에 해당하는 나력(癰癧) 등에 활용되어 왔다²⁷⁾. 잔가시모자반도 해양에 서식하는 갈조류로서 함미(鹹味)를 가지므로 종괴를 형성하는 암에 대해서 치료 가능성이 있을 것이라는 한의학적 가설을 토대로, 본 연구에서는 잔가시모자반 에탄올 추출물(ESM)의 NSCLC 세포에 대한 항암효과를 규명하고자 하였다. 현재까지 잔가시모자반의 항암효과에 대한 연구로서 메탄올 추출물이 두경부암 세포의 이동 및 침윤을 억제한다는 보고²⁰⁾가 있을 뿐, 그 항암효과 전반에 대한 연구는 매우 미비하였다. 이에 본 연구는 잔가시모자반이 NSCLC 세포에 대해 아폽토시스를 유도함으로써 항암효과를 가진다는 점을 최초로 입증하였다는 데 의의가 있다.

본 연구의 주요 결과는 다음과 같다. 첫째, ESM은 NSCLC 세포의 생존율을 농도 및 시간 의존적으로 감소시켰으며, 특히 H1299 세포에서 가장 강력한 억제 효과를 나타냈다. 둘째, 이러한 ESM의 세포 증식 억제 효과는 아폽토시스 유도에 기인한 것으로, ESM 처리에 따라 annexin V 양성 세포 및 sub-G1기 세포의 비율이 증가하였고, 핵 응축 및 단편화가 유도되었으며, cleaved PARP의 발현이 증가한 것이 이를 뒷받침한다. 특히 H1299, PC9, H1975 세포 중 H1299가 가장 높은 감수성을 보였는데, 이는 각 세포주가 지닌 EGFR 유전자 상태의 차이에 기인할 가능성이 있다. H1299는 EGFR wildtype 세포주이고, PC9은 EGFR exon 19 deletion 돌연변이를 가져 gefitinib과 같은 1세대 EGFR TKI에 민감한 세포주이며, H1975는 EGFR L858R + T790M 돌연변이(secondary mutation)를 가져 1세대 TKI에 저항성을 갖는 세포주이다. 본 연구 결과는 ESM이 EGFR 돌연변이를 가진 NSCLC보다 EGFR wildtype NSCLC에서 더욱 탁월한 항암효과를 보일 수 있음을 시사하며, 향후 in vivo 및 임상 연구를 통해 EGFR 타입별 반응성에 대한 검증이 필요하다.

한편, 본 연구의 독창성과 의의에도 불구하고, 향후 다음과 같은 보완 연구가 요구된다. 첫째, ESM이 NSCLC 세포에서 아폽토시스를 유도하는 분자적 기전을 규명해야 한다. 본 연구는 ESM이 다양한 NSCLC 세포주의 증식을 억제하고 아폽토시스를 유발함을 여러 실험적 근거를 통해 입증하는 데 초점을 두었으므로, 직접적 분자 타겟 발굴이 향후 중요한 과제가 될 것이다. 둘째, ESM의 항암효과에 기여하는 주요 유효 성분을 규명하는 연구도 필요하다. 잔가시모자반에는 plastoquinone 유래 화합물(sargaquinoic acid, sargachromenol 등), chromenes, butenolides, 스테롤(fucosterol), 지방산 유래 isoketocharbroic acid 등 다양한 생리활성 성분이 포함되어 있다^{18,28-30)}. 특히, fucosterol은 NSCLC를

포함한 다양한 암종에서 아폽토시스 유도 활성을 보이며, ERK 및 STAT3 신호 억제를 통해 작용하는 것으로 알려져 있다³¹⁻³⁴⁾. 또한, plastoquinone 유도체는 비록 폐암세포에 대한 직접적 항암효과는 보고되지 않았으나, 림프계 종양세포에서 아폽토시스를 유도하고 대장암 및 유방암 세포의 생존율을 감소시킨다는 보고가 있다^{35,36)}. Chromene 유도체 역시 간암, 대장암, 유방암 등 여러 암세포에서 아폽토시스와 세포주기 정지를 유도하는 항암활성이 보고되었다³⁷⁾. 이 외에도, 직접적인 항암효과가 입증되지 않은 성분들 역시 항염증 및 항산화 작용을 통해 종양미세환경을 조절함으로써 간접적인 항암효과를 발휘할 가능성이 있다. 이러한 성분 간의 복잡한 상호작용 및 시너지 효과는 최근 각광받고 있는 네트워크 약리학적 접근을 통해 보다 체계적으로 규명될 필요가 있다.

결론

본 연구에서는 잔가시모자반(*Sargassum micracanthum*) 에탄올 추출물(ESM)의 인간 비소세포폐암(NSCLC) 세포에 대한 항암효과를 평가하였다. 그 결과, ESM은 H1299, PC9, H1975를 포함한 다양한 NSCLC 세포주에서 농도 및 시간 의존적으로 세포 생존율을 감소시켰으며, 특히 H1299 세포에서 가장 강력한 억제 효과를 나타냈다. 또한 ESM은 annexin V 양성 세포 및 sub-G1기 세포의 비율을 농도 의존적으로 증가시켰고, 핵 응축과 단편화를 유도하였으며, cleaved PARP의 발현을 증가시켜 세포사멸이 아폽토시스를 통해 유도되었음을 확인할 수 있었다. 종합하면, 상기한 연구 결과는 잔가시모자반이 NSCLC의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 잠재적 항암 천연물임을 시사하며, 향후 폐암 치료제 개발을 위한 갈조류 기반 자원의 활용 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 논문은 2024학년도 동의대학교 연구년 지원 및 동의대학교 교내특별연구과제 지원(과제번호 202500620001)에 의해 연구되었음.

References

1. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J. Clin.* 2024;74(1):12-49. doi: 10.3322/caac.21820. Erratum in: *CA Cancer J. Clin.* 2024;74(2):203. doi: 10.3322/caac.21830.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021;71(3):209-49. doi: 10.3322/caac.21660.
3. Jeon DS, Kim HC, Kim SH, Kim TJ, Kim HK, Moon MH, Beck KS, Suh YG, Song C, Ahn JS, Lee JE, Lim JU, Jeon

- JH, Jung KW, Jung CY, Cho JS, Choi YD, Hwang SS, Choi CM. Five-year overall survival and prognostic factors in patients with lung cancer: results from the Korean Association of Lung Cancer Registry (KALC-R) 2015. *Cancer Res. Treat.* 2023;55(1):103-11. doi: 10.4143/crt.2022.264.
4. Inamura K. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Front. Oncol.* 2017;7:193. doi: 10.3389/fonc.2017.00193.
 5. Boucharad N, Daaboul N. Lung cancer: targeted therapy in 2025. *Curr. Oncol.* 2025;32(3):146. doi: 10.3390/curronc32030146.
 6. Mountzios G. Immunotherapy with or without chemotherapy in advanced NSCLC—a delicate balance of harm and benefit. *JAMA Oncol.* 2025. doi: 10.1001/jamaoncol.2025.0897.
 7. Koulouris A, Tsagkaris C, Corriero AC, Metro G, Mountzios G. Resistance to TKIs in EGFR-mutated non-small cell lung cancer: from mechanisms to new therapeutic strategies. *Cancers (Basel).* 2022;14(14):3337. doi: 10.3390/cancers14143337.
 8. Zhou K, Li S, Zhao Y, Cheng K. Mechanisms of drug resistance to immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Front. Immunol.* 2023;14:1127071. doi: 10.3389/fimmu.2023.1127071.
 9. Wen T, Song L, Hua S. Perspectives and controversies regarding the use of natural products for the treatment of lung cancer. *Cancer Med.* 2021;10(7):2396-422. doi: 10.1002/cam4.3660.
 10. Yang Y, Li N, Wang TM, Di L. Natural products with activity against lung cancer: a review focusing on the tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(19):10827. doi: 10.3390/ijms221910827.
 11. Memarzia A, Saadat S, Asgharzadeh F, Behrouz S, Folkerts G, Boskabady MH. Therapeutic effects of medicinal plants and their constituents on lung cancer, in vitro, in vivo and clinical evidence. *J. Cell Mol. Med.* 2023;27(19):2841-63. doi: 10.1111/jcmm.17936.
 12. Siddiquee T, Bhaskaran NA, Nathani K, Sawarkar SP. Empowering lung cancer treatment: harnessing the potential of natural phytoconstituent-loaded nanoparticles. *Phytother. Res.* 2024;38(8):3899-920. doi: 10.1002/ptr.8241.
 13. Zhuang Z, Chen Q, Zhong X, Chen H, Yu R, Tang Y. Ginsenoside Rg3, a promising agent for NSCLC patients in the pandemic: a large-scale data mining and systemic biological analysis. *J. Ginseng Res.* 2023;47(2):291-301. doi: 10.1016/j.jgr.2022.09.006.
 14. Yu H, Zhang Q, Farooqi AA, Wang J, Yue Y, Geng L, Wu N. Opportunities and challenges of fucoidan for tumors therapy. *Carbohydr. Polym.* 2024;324:121555. doi: 10.1016/j.carbpol.2023.121555.
 15. Liu TC, Shih CJ, Chiou YL. Oral administration of oligo fucoidan improves the survival rate, quality of life, and immunity in patients with lung cancer. *Food Nutr. Res.* 2024;68. doi: 10.29219/fnr.v68.10674.
 16. Mei C, Zhou S, Zhu L, Ming J, Zeng F, Xu R. Antitumor effects of Laminaria extract fucoxanthin on lung cancer. *Mar. Drugs.* 2017;15(2):39. doi: 10.3390/md15020039.
 17. Hao S, Yan Y, Li S, Zhao L, Zhang C, Liu L, Wang C. The in vitro anti-tumor activity of phycocyanin against non-small cell lung cancer cells. *Mar. Drugs.* 2018;16(6):178. doi: 10.3390/md16060178.
 18. Ham YM, Yoon WJ, Lee WJ, Kim SC, Baik JS, Kim JH, Lee GS, Lee NH, Hyun CG. Anti-inflammatory effects of isoketocharbroic acid from brown alga, *Sargassum micracanthum*. *EXCLI J.* 2015;14:1116-21. doi: 10.17179/excli2015-555.
 19. Kim C, Lee IK, Cho GY, Oh KH, Lim YW, Yun BS. *Sargassumol*, a novel antioxidant from the brown alga *Sargassum micracanthum*. *J. Antibiot (Tokyo).* 2012;65(2):87-9. doi: 10.1038/ja.2011.107.
 20. Ahn MH, Shin JA, Yang SO, Choi WS, Jang S, Kang SC, Cho SD. Metabolite profiling of a *Sargassum micracanthum* methanol extract with in vitro efficacy against human head and neck squamous cell carcinoma aggressiveness. *Arch. Oral Biol.* 2022;137:105386. doi: 10.1016/j.archoralbio.2022.105386.
 21. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, Soni R, Dwarakanath BS, Bhatt AN. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci. Rep.* 2018;8(1):1531. doi: 10.1038/s41598-018-19930-w.
 22. Lakshmanan I, Batra SK. Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *Bio Protoc.* 2013;3(6):e374. doi: 10.21769/bioprotoc.374.
 23. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* 2006;1(3):1458-61. doi: 10.1038/nprot.2006.238.
 24. Archana M, Bastian, Yogesh TL, Kumaraswamy KL. Various methods available for detection of apoptotic cells—a review. *Indian J. Cancer.* 2013;50(3):274-83. doi: 10.4103/0019-509X.118720.
 25. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M. Role of poly(ADP-ribose)

- polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J. Biol. Chem.* 1999;274(33):22932-40. doi: 10.1074/jbc.274.33.22932.
26. Ministry of Food and Drug Safety Korean Herbal Pharmacopoeia (Herbal Medicine Standards). Ministry of Food and Drug Safety, Republic of Korea: 2023.
27. The Jointly Published Textbook Compilation Committee of Oriental College of Medicine Nationwide Department Herbology. Seoul: Younglim Press: 2004.
28. Mori J, Iwashima M, Wakasugi H, Saito H, Matsunaga T, Ogasawara M, Takahashi S, Suzuki H, Hayashi T New plastoquinones isolated from the brown alga, *Sargassum micracanthum*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 2005;53(9):1159-63. doi: 10.1248/cpb.53.1159.
29. Mori J, Hayashi T, Iwashima M, Matsunaga T, Saito H Effects of plastoquinones from the brown alga *Sargassum micracanthum* and a new chromene derivative converted from the plastoquinones on acute gastric lesions in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2006;29(6):1197-201. doi: 10.1248/bpb.29.1197.
30. Kim JY, Lee JM, Kim HS, Ki DW, Yim MJ, Ko SC, Shin JM, Lee MS, Park YG, Lee DS. A new Butenolide Derivative from the Brown Alga *Sargassum micracanthum*. *Nat. Prod. Commun.* 2022;17(1):1934578X2110686. doi: 10.1177/1934578X211068606.
31. Bae H, Lee JY, Song G, Lim W Fucosterol suppresses the progression of human ovarian cancer by inducing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Mar. Drugs.* 2020;18(5):261. doi: 10.3390/md18050261.
32. Ji YB, Ji CF, Yue L Study on human promyelocytic leukemia HL-60 cells apoptosis induced by fucosterol. *Biomed. Mater. Eng.* 2014;24(1):845-51. doi: 10.3233/BME-130876.
33. Mao Z, Shen X, Dong P, Liu G, Pan S, Sun X, Hu H, Pan L, Huang J Fucosterol exerts antiproliferative effects on human lung cancer cells by inducing apoptosis, cell cycle arrest and targeting of Raf/MEK/ERK signalling pathway. *Phytomedicine.* 2019;61:152809. doi: 10.1016/j.phymed.2018.12.032.
34. Park HJ, Park SH The ethanolic extract of *Dictyopteris divaricata* induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells by inhibiting STAT3 activity. *Nutr. Cancer.* 2024;76(3):305-15. doi: 10.1080/01635581.2024.2301795.
35. Ciftci H, Sever B, Bayrak N, Yıldız M, Yıldırım H, Tateishi H, Otsuka M, Fujita M, TuYuN AF In vitro cytotoxicity evaluation of plastoquinone analogues against colorectal and breast cancers along with in silico insights. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(10):1266. doi: 10.3390/ph15101266.
36. Santos-Pirath IM, Walter LO, Maioral MF, Philippus AC, Zatelli GA, Horta PA, Colepicolo P, Falkenberg MB, Santos-Silva MC Apoptotic events induced by a natural plastoquinone from the marine alga *Desmarestia menziesii* in lymphoid neoplasms. *Exp. Hematol.* 2020;86:67-77.e2. doi: 10.1016/j.exphem.2020.05.003.
37. Mohamed HM A comprehensive review on chromene derivatives: potent anti-cancer drug development and therapeutic potential. *Orient. J. Chem.* 2025;41(2). doi: <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/410229>.