



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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

Phloroglucinol에 의한 HT-29  
대장암 세포 증식 억제 효과



식품생명과학과

강 미 혜

이 학 석 사 학 위 논 문

Phloroglucinol에 의한 HT-29  
대장암 세포 증식 억제 효과

지도교수 남택정

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2014년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

강미혜

강미혜의 이학석사 학위논문을  
인준함.

2014년 2월 21일



주 심 약학박사 최재수 (인)

위 원 이학박사 류은순 (인)

위 원 농학박사 남택정 (인)

# 목 차

LIST OF TABLE .....	i
LIST OF FIGURES .....	ii
ABBREVIATIONS .....	iv
ABSTRACT .....	vi
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
1. 재료 .....	4
1) 시약 및 재료 .....	4
2. 실험방법 .....	5
1) 세포 배양 .....	5
2) 세포 증식을 측정 .....	5
3) 형태학적 변화 .....	6
4) DAPI 염색법 .....	6
5) Caspase activity assay .....	7
6) Western blot analysis .....	7
① Total cell lysate 추출 .....	7
② 세포질 및 미토콘드리아 획분 추출 .....	8
③ 단백질 발현 및 분석 .....	8
④ Fas유도 세포사멸 경로와 IGF-IR 경로 연관성 .....	9
⑤ HRG유도 단백질 수준 .....	9
7) RT-PCR analysis .....	10

① RNA 추출 및 cDNA 합성 .....	10
② mRNA 발현 및 분석 .....	10
8) Annexin V & dead cell assay .....	12
9) Cell cycle analysis .....	12
10) Statistical analysis of experiment result .....	13
III. 결과 및 고찰 .....	14
1. Phloroglucinol에 의한 HT-29 대장암 증식 억제 효과 .....	14
1) Phloroglucinol이 HT-29 대장암 세포사멸에 미치는 영향 .....	14
2) 세포 형태학적 변화 .....	16
3) 핵의 형태학적 변화 .....	18
4) Annexin V & dead cell analysis .....	20
2. Phloroglucinol에 의한 세포사멸 신호전달분석 .....	22
1) Extrinsic and Intrinsic pathway .....	22
2) Bcl-2 family proteins의 신호전달분석 .....	26
3) Cytochrome c에 의한 세포질에서의 신호전달분석 .....	28
4) Caspase-3, -8 activity .....	30
3. 세포 주기에 미치는 영향 .....	33
1) 세포 주기 분석 .....	33
2) 세포 주기 조절 단백질 분석 .....	37
4. 세포 성장 인자에 미치는 영향 .....	40
1) Fas유도 세포사멸 경로와 IGF-IR 경로와의 연관성 .....	40
2) IGF-IR 관련 단백질 및 mRNA 분석 .....	43
3) mTOR 관련 단백질 및 mRNA 분석 .....	47
4) RAS 관련 단백질 및 mRNA 분석 .....	50
5) ErbB 관련 단백질 분석 .....	54
IV. 결론 및 요약 .....	56
V. 참고 문헌 .....	59

## LIST OF TABLE

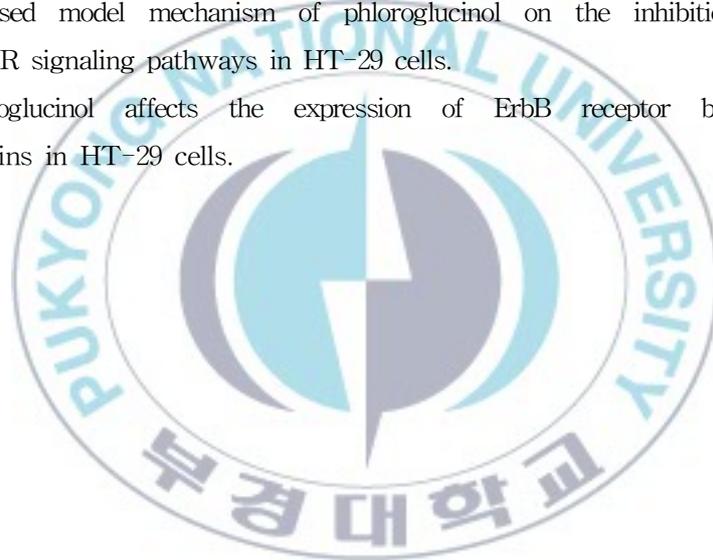
Table 1. Oligonucleotide sequences of the primer used in PCR analyses.



## LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Effect of phloroglucinol on HT-29 cell proliferation.
- Fig. 2. Morphological changes in HT-29 cells after phloroglucinol treatment.
- Fig. 3. Morphological changes of nucleus in HT-29 cells after phloroglucinol treatment.
- Fig. 4. Induction of apoptosis in HT-29 cells after phloroglucinol treatment, as determined annexin v & dead cell analysis.
- Fig. 5. Phloroglucinol affects the expression of the apoptosis related proteins in HT-29 cells.
- Fig. 6. Proteolytic activation of caspase by phloroglucinol treatment in HT-29 cells.
- Fig. 7. Effect of phloroglucinol on the expression levels of Bcl-2 family proteins in HT-29 cells..
- Fig. 8. Effect of treatment with phloroglucinol on cytosolic cytochrome c and Apaf-1 expression in HT-29 cells.
- Fig. 9. (A)Dose dependent activation of caspase-3 by phloroglucinol treatment in HT-29 cells.  
(B)Dose dependent activation of caspase-8 by phloroglucinol treatment in HT-29 cells.
- Fig. 10. Proposed model machanism of the activaion Fas mediated apoptosis by phloroglucinol.
- Fig. 11. Effect of phloroglucinol on cell cycle progression in HT-29 cells.
- Fig. 12. Effect of phloroglucinol on cell cycle phase ratio in HT-29 cells.
- Fig. 13. Effect of phloroglucinol on the expression levels of cell cycle related proteins in HT-29 cells.
- Fig. 14. Effect of phloroglucinol on the caspase inhibitor induced recruitment of PI3K and Akt in HT-29 cells.
- Fig. 15. Proposed model mechanism of Fas induced apoptosis on the IGF-IR associated proteins Akt and PI3K.

- Fig. 16. Phloroglucinol affects the protein expression of the IGF-IR signaling pathways in HT-29 cells.
- Fig. 17. Phloroglucinol affects the mRNA expression of the IGF-IR signaling pathways in HT-29 cells.
- Fig. 18. Effect of phloroglucinol on the expression levels of mTOR, p70S6K, RPS6, eIF4B.
- Fig. 19. Effect of phloroglucinol on the mRNA expression levels of mTOR, P70S6K, RPS6, eIF4B.
- Fig. 20. Effect of phloroglucinol on the expression levels of Ras, Raf, MEK, ERK.
- Fig. 21. Effect of phloroglucinol on the mRNA expression levels of Ras, Raf, MEK.
- Fig. 22. Proposed model mechanism of phloroglucinol on the inhibition of IGF-IR signaling pathways in HT-29 cells.
- Fig. 23. Phloroglucinol affects the expression of ErbB receptor binding proteins in HT-29 cells.



## ABBREVIATIONS

AIF : apoptosis inducing factor  
Cdks : cyclin-dependent kinase  
DISC : death-inducing signaling complex  
DTT : 1,4-dithiothreitol  
DAPI : 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride  
EDTA : trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid  
EGTA : ethylene glycol bis-( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid  
ERK : extracellular-signal regulated kinase  
FACS : fluorescence-activated death domain  
FADD : fas-associated death domain  
FBS : fetal bovine serum  
HRG : heregulin  
IRS : insulin receptor substrate  
kDa : kilodalton  
M phase : mitotic phase  
MAPK : mitogen-activated protein kinase  
MTOR : mammalian target of rapamycin  
MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium  
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis  
PARP : poly (ADP-ribose) polymerase  
PBS : phosphate-buffered saline  
PCR : polymerase chain reaction  
PI : propidium iodide

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PMSF : phenylsufonyl fluoride

PTEN : phosphatase and tensin homolog

R point : restriction point

RPMI 1640 : rosewell park memorial institute 1640

RT : room temperature

S phase : synthesis phase

SDS : sodium dodecyl sulfate

SFM : serum free medium



# Induction of apoptosis by phloroglucinol through the regulation of IGF-IR signaling pathways in human colon cancer HT-29 cells

Mi Hye Kang

Department of Food and Life Science, The Graduate school,  
Pukyong National University

## Abstract

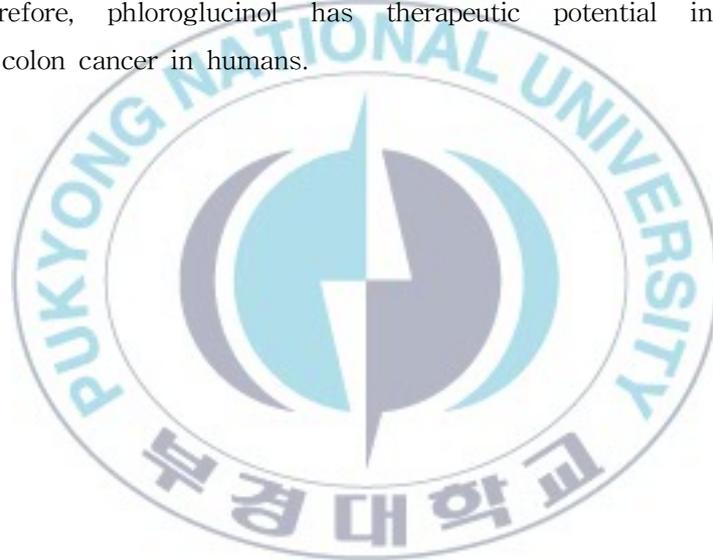
Phloroglucinol, a polyphenol compound, derived from *Ecklonia cava* (known as brown algae) that has beneficial biological activities. In particular, phloroglucinol including anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer activities. In the present study, we investigated the signaling pathways related to the anticancer effects of phloroglucinol in human colon cancer HT-29 cells.

MTS assays revealed that phloroglucinol significantly induced cell death in a dose-dependent manner. Phloroglucinol treatment on HT-29 cell displayed apoptotic features, such as G0/G1 phase of the cell cycle arrest. Consistent with G0/G1 phase arrest, western blotting showed that decreased the expression of cdk4, cdk6, cyclinD1 and the increase of p27 expression was observed.

We analyzed that phloroglucinol induced apoptosis leads to the formation of death-induced signaling complex of Fas, FADD, procaspase-8 and AIF. In addition to, these were accompanied by the mitochondrial membrane potential with activation of the bcl-2 family proteins. Also, This study is analyzed its effect on the insulin-like growth factor (IGF-IR) signaling pathways.

Phloroglucinol inhibited the expression level of IGF-IR and IRS-I, PI3K, Akt. These results in the study also decreased the expression level of mammalian target of rapamycin (mTOR) in critical regulator of cellular growth and proliferation which was localized to downregulated p70S6K, RPS6, eIF4B. Moreover, revealed the inhibition of IGF-IR associated protein expression level of Ras, Raf, MEK, mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as ERK phosphorylation.

These results have important implications for understanding the roles of cell growth pathway in colon cancer cell tumorigenesis. Although further studies are required to the multiple mechanism, these findings suggest that phloroglucinol has effect to inhibit the proliferation of HT-29 human colon cancer cells. These were evaluated by measuring cell death via induction of apoptosis. Therefore, phloroglucinol has therapeutic potential in the pathogenesis of colon cancer in humans.



## I. 서론

급속한 산업 및 경제발달은 각종 스트레스, 불규칙한 식습관, 운동부족, 환경오염 등을 발생시켜 암, 심장질환, 정신질환 등과 같은 만성질환의 발병률을 증가시켰다. 특히, 암은 완치가 어려운 질병 중 하나로 세계 사망 원인 중 1위를 차지하고 있는 질환으로 2020년에는 전 세계적으로 환자가 50% 이상 증가될 것으로 보고되고 있다 (Lanier, 2006; Stewart and Kleihues, 2003). 우리나라의 경우도 서구화된 식습관과 생활습관의 변화 및 고령화로 인해 암의 발생빈도가 빠르게 증가하고 있는 추세이며 (Chi and Chang, 2010), 그 중 대장암은 매년 그 발생증가율이 평균 암 발생증가율의 두 배 이상으로 높은 발생빈도를 나타내고 있어 그 심각성이 대두되고 있다 (Stewart and Kleihues, 2003).

암의 치료에는 일반적으로 화학요법, 방사선요법 등으로 가능하나 화학요법이나 방사선 요법은 정상세포의 저하 및 면역기능저하, 유전자 손상과 같은 여러 부작용을 유발시킬 수 있다고 알려져 있다 (Andersen et al., 2006; Shariati et al., 2010). 이로 인해 암을 치료하고 예방하기 위해 천연 자원 소재들의 연구개발이 요구되는 가운데 (Park et al., 2009) 최근 해조류에 포함된 다양한 생리 활성 기능 물질 등을 이용한 효과가 검증되면서 의약품개발 및 기능성 식품 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Kim et al., 2005). 해조류에는 각종 미네랄과 비타민, 섬유소, 단백질이 풍부하게 함유되어 있는데 특히, 알긴산, 라미나린, 푸칸설페이트 등 수용성 다당류가 풍부하다. 푸칸설페이트와 알긴산 유도체들은 항당뇨, 항 응고, 항염증, 항암 등의 효과가 있다고 알려져 있다 (Kim et al., 2009). 특히, 감태의 주요성분인 phlorotannin은 phloroglucinol을 기본 구성단위로 하는 폴리페놀 화합물로 phlorotannin 생리활성에 관한 연구로는 혈전생성 저해활성, 항산화 활성, 심혈관 보호효과 및 항바이러스 활성 등이 보고되고 있다 (Ahn et al., 2004; Kang et al., 2004).

Apoptosis는 1972년 이후 현재까지 항암 관련 효과로 잠재성 있는 연구가 진행되어 왔으며 (Kerr et al., 1972), 암세포에서의 apoptosis 유도는 선택적 세포를 죽음으로 일으키는 생리적인 과정으로 생체의 발생 및 조직의 항상성을 유지하는데 매우 중요하게 작용하는 필수 조절 작용이다 (Hengather, 2000). 따라서, apoptosis 유발은 형태 형성, 세포의 전환 및 유해한 세포의 제거 등과 같은 많은 생물학적 현상에 필요하며, apoptosis에 의한 세포의 죽음은 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 개체의 생존을 위한 정교한 방어기전이다 (Evans, 1993).

Apoptosis는 세포의 외적인 신호와 내적인 신호에 의해 진행되며, 세포 사멸을 억제하는 단백질과 세포 사멸을 조절하는 단백질의 상호작용에 의해 조절된다 (Jin and El-Deiry, 2005). 따라서 본 연구에서는 감태의 생리활성 기능을 알아보기 위해 감태의 주요 성분인 phloroglucinol이 대장암 세포의 세포 사멸을 유도하는 것인지를 검토하였다.

일반적으로 암의 발생 및 진행 단계에서는 세포 내의 다양한 신호 전달 경로 (signaling pathway)를 자극하고 유전자 전사의 변화를 유도한다. IGF-I와 IGF-IR가 암세포의 사멸을 방해하는 것과 성장을 촉진하는 역할과 같은 신호전달 과정의 조절 이상은 종양형성의 중요한 요소로 작용한다고 알려져 있다.

앞선 연구들에서는 해조류의 생리 활성 물질이 항암 작용 효과가 있다는 보고에 따라 해조류의 다당류에 관한 생리활성 효과에 대한 연구는 다양하지만, 감태의 주요성분인 phloroglucinol이 대장암의 증식에 미치는 영향에 대한 연구는 부진한 실증하다. 또한, phloroglucinol은 강력한 항산화, 라디칼 소거, 항암성, 항 고혈압성, 미백활성 등 여러 가지 기능성들이 밝혀져 있으므로 새로운 기능성 소재로서 충분한 가치가 있는 것으로 알려져 있다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 사실을 바탕으로 phloroglucinol을 인체 유래 대장암 세포주인 HT-29 세포에 처리하여 Fas로 유도되어지는 세포사멸을 확인하였으며, 세포사멸에 따른 IGF-IR, PI3K/Akt/mTOR/RAS 신호전달 경로를 통한 세포 성장신호 감소에 대해서도 검토하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약 및 재료

본 연구에 사용한 phloroglucinol은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 재료로 사용하였다. 실험에 사용한 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입한 대장암 세포주인 HT-29 (Human colon cancer cell)를 사용하였고, 정상 세포에서의 독성 유무를 확인하기 위해 정상 소화관 세포주인 IEC-6 (Intestinal epithelial, Human)를 사용하였다. 세포 배양에 사용한 Fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 제품을 사용하였으며 RPMI-1640, Dulbecco's modified eagle's medium, Penicilin/Streptomycin (P/S)는 Hyclon (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. Phosphate-buffered saline (PBS)은 Gibco/BRL (Invitrogen Co., USA)를 사용하였고, Trypsin, Protease inhibitor, Bovine serum albumin (BSA)은 Sigma Chemical Co. (Logan, UT, USA), 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), detergent는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포의 배양과 생존율을 측정하기 위해 MTS/PMS solution (Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit)은 Promega에서 구입하여 사용하였으며 세포 단백질 농도를 측정하기 위해 BCA Protein Assay Kit (Pierce, USA)를 사용하였다.

Western blot은 protein standard marker는 dual color marker (BIO-RAD, USA)를 사용하였으며, immunoprecipitation에 사용한 antibody는 Santa Cruz (CA, USA), Cell Signaling (Beverly, MA,

USA), BETHYL Laboratories (Mont-gomery, TX)에서 구매하였으며, detection reagent로 Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution과 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution (Pierce, USA)를 이용해 Kodak film (Rochester, NY, USA)에 감광하였다. Caspase activity assay에 사용된 Caspase-3 Substrate I, Colorimetric (Ac-DEVD-pNA), Caspase-8 Substrate I (Ac-IETD-pNA), Insolution™ Caspase-3 Inhibitor II (Z-D(OMe)E(Ome)VD(OMe)-FMK)와 Caspase-8 Inhibitor II는 (Z-IETD-FMK) Calbiochem (San Diego, CA, USA)을 사용하였다. Annexin V & dead cell assay, Cell cycle analysis는 Muse™ cell analyzer (Millipore Billerica, MA)를 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 세포 배양

인체 유래 대장암 세포주인 HT-29는 37 °C, CO<sub>2</sub> incubator (5% CO<sub>2</sub>, 95% air) 에서 RPMI-1640배지에 10% FBS, Penicillin/Streptomycin을 첨가하여 배양 하였으며, 정상 세포주인 IEC-6는 Dulbecco's modified eagle's medium 배지에 HT-29와 동일한 조건에서 배양하였으며 세포 주 모두 배지는 2~3일 마다 교환해 주었다.

### 2) 세포 증식을 측정

Phloroglucinol이 HT-29 세포에 증식억제 효과를 가지면서 동시에 정상세포인 IEC-6 세포에 독성 유무를 확인하기 위하여 MTS assay를 시

행하였다. 각각의 세포를 96-well plate에  $2 \times 10^4$ /well로 동일하게 분주한 다음 세포 부착을 위하여 24시간 배양하였고, Serum free medium (SFM) 으로 6시간 배양 한 후 phloroglucinol을 0, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도별로 24시간 처리하였다. MTS/PMS solution (Promega Co, USA)를 첨가하여 37 °C에서 30분 반응 시킨 후 ELISA plate reader (BIO-RAD, USA)로 490 nm 흡광도에서 측정하였다.

### 3) 형태학적 변화

HT-29 세포에 phloroglucinol을 처리하였을 때 세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 HT-29 세포를 6-well plate에 10% FBS가 함유된 RPMI 1640배지로 희석하여 동일한 양을 분주한 다음 세포가 80% 성장하였을 때 phloroglucinol을 농도별로 24시간 처리하였다. 이 후 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 위상차 현미경을 통하여 200배 배율로 세포 형태를 관찰하였다.

### 4) DAPI 염색법

HT-29 세포에 phloroglucinol을 처리하였을 때 핵의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 DAPI 염색법을 시행하였다. HT-29 세포를 6-well plate에 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석하여 동일한 양으로 분주한 다음 세포가 80% 성장하였을 때 phloroglucinol을 24시간 처리하여 배양하였다. 핵의 형태학적 관찰은 fixing solution (formaldehyde : PBS = 1 : 9)을 첨가하여 실온에서 20분여간 고정한 다음 PBS로 세척한 후 2  $\mu\text{g/ml}$  DAPI 용액을 첨가하여 빛을 차단한 실온에서 30분간 반응시켰다. 이후 PBS로 다시 세척 한 다음 confocal microscopy를 통하여 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

## 5) Caspase activity assay

Caspase activity 측정에 사용된 Caspase-3 Substrate I Colorimetric (Ac-DEVD-pNA), Caspase-8 Substrate I (Ac-IETD-pNA), Insolution™ Caspase-3 Inhibitor II (Z-D(OMe)E(Ome)VD(OMe)-FMK), Insolution™ Caspase-8 Inhibitor II (Z-IETD-FMK)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)을 사용하였다. HT-29 세포가 60% 이상 증식하면 caspase inhibitor 를 1시간 전 처리 한 후 phloroglucinol을 농도별로 24시간 처리하였다. Lysis buffer (25 mM HEPES, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1% CHAPS)로 세포를 회수하여 100 µg protein을 96 well에 분주하였다. 각각의 substrate를 첨가하여 37 °C, 8시간 조건으로 반응시킨 후 ELISA plate reader로 흡광도 405 nm에서 측정하였다.

## 6) Western blot analysis

### ① Total cell lysate 추출

Phloroglucinol을 처리한 HT-29 세포를 PBS로 2회 세척하고 protease inhibitor (1 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A, 200 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 500 mM NaF, 100 mM PMSF)를 첨가한 RIPA lysis buffer (1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 넣어 얼음 위에서 cell lysate를 회수하고 30분간 방치시킨 후 회수한 cell lysate를 원심분리 (12,000 rpm, 4 °C, 10 min)하여 그 상층액을 사용하였다.

## ② 세포질 및 미토콘드리아 획분 추출

세포질 및 미토콘드리아의 획분 추출은 Emanuele et al. (2004)의 방법을 사용하였다. Phloroglucinol을 농도별로 24시간 처리한 다음 PBS-EDTA 1 ml로 회수 하였다. 원심분리 (5,000 rpm, 5 min, 4 °C) 후 cell lysate buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM KCL, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 250 mM Sucrose)를 첨가하여 4 °C에서 20분간 반응시켰다. 원심분리 (5,000 rpm, 5 min, 4 °C)하여 상층액 (Supernatant-1)을 회수하고 나머지 pellet에 buffer를 첨가하여 다시 5,000 rpm, 5 min, 4 °C에서 원심분리하여 상층액 (Supernatant-2)을 회수 하였다. Supernatant-1과 Supernatant-2를 함께 원심분리 (14,000 rpm, 15 min, 4 °C)한 다음 상층액은 세포질 획분 이며 pellet에 buffer를 첨가 한 것은 미토콘드리아 획분이 된다.

## ③ 단백질 발현 및 분석

HT-29 세포에 phloroglucinol을 농도별로 처리하여 lysis buffer (50 mM Tris-HCL, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1% NP-40, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 0.25% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF)를 첨가하여 4 °C 저온에서 30분 방치한 후 cell lysate를 원심분리 한 다음 상층액을 취하여 단백질 농도 수준을 측정하였다. 단백질 농도를 50 µg/ml으로 동일하게 정량한 다음 SDS-PAGE에 전기영동 한 후 PVDF membrane (Millipore, USA)으로 transfer 하였다. 전기영동 한 membrane은 실온에서 1% BSA-TBST로 1시간 blocking 시킨 후 확인하고자 하는 각각의 1차 antibody를 1:1,000 비율로 희석해 10 °C 16시간 반응시킨 후 TBS-T로 15분간 2회 세척한 다음 2차 antibody를 1:10,000 비율로 희석하여 1시간 20분간 반응시켰다.

반응시킨 membrane을 다시 TBS-T로 15분간 2회 세척하여 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/Enhancer solution (Rockford, IL, USA)을 사용하여 KODAK X-ray film에 감광시킨 다음 현상 후 scanning 하여 Science Lab 2005 (Fujifilm, Japan)를 이용하여 분석하였다.

#### ④ Fas유도 세포사멸 경로와 IGF-IR 경로 연관성

HT-29 세포에 phloroglucinol을 농도별로 24시간 처리 하였으며, 최종 농도인 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 caspase inhibitor (Z-VAD(Ome)-FMK)를 20  $\mu\text{M}$  농도로 1시간 처리하였다. PBS-EDTA로 2회 세척한 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 1% NP-40, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, 1  $\mu\text{g/ml}$  pepstatin, 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 0.25% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF)를 첨가하여 4  $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 방치하였다. Cell을 회수 한 다음 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 cell lysate로 사용하였다. 50  $\mu\text{g/ml}$  단백질 농도로 SDS-PAGE로 분리한 후 membrane에 옮겨 단백질 발현을 확인하였다.

#### ⑤ HRG 유도 단백질 수준

HT-29세포에 phloroglucinol을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양 한 후 PBS-EDTA로 2회 세척한 다음 lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 20  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g/ml}$  antipain, 10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 80  $\mu\text{g/ml}$  benzamidine-HCl, 0.2 mM PMSF)를 첨가하여 4  $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 방치하였다. Cell을 회수하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 cell lysate로 사용하였다.

## 7) RT-PCR analysis

### ① RNA추출 및 cDNA 합성

HT-29 세포에 phloroglucinol을 농도별로 24시간 처리한 후, PBS로 세척하고 1 ml의 Trizol reagent (Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA)에 넣고 세포를 회수한 다음, 실온에서 5분간 방치한 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액에 200  $\mu$ l chloroform을 가하여 5분간 반응시킨 후 다시 원심 분리하였다. 상층액을 분리하여 isopropanol과 1:1 비율로 섞어준 뒤 10분간 원심분리 한 다음 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol을 사용하여 RNA를 세척하고 건조하였다. 이후, RNA free water인 0.1% DEPC에 분리 된 RNA를 흡광도 280/260 nm에서 농도를 측정 한 다음 Revoscript RT premix를 이용하여 reverse transcription을 수행함으로써 cDNA를 합성하였다.

### ② mRNA 발현 및 분석

Reverse transcription을 통해 얻은 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자 (Table 1)를 polymerase chain reaction 방법으로 증폭하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 polymerase chain reaction 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma 및 Red safe<sup>TM</sup>, Intron bitechnology)를 이용하여 염색한 후 ultra violet (UV)하에서 확인하였다.

**Table 1. Oligonucleotide sequences of the primer used in PCR analyses**

<b>Gene name</b>		<b>Primer Sequence</b>
PI3K	forward	5'-AGG AGC GGT ACA GCA AAG AA-3'
	reverse	5'-GCC GAA CAC CTT TTT GAG TC-3'
AKT	forward	5'-CAA CTT CTC TGT GGC GCA GTG-3'
	reverse	5'-GAC AGG TGG AAG AAC AGC TCG-3'
PTEN	forward	5'-TGG AAA GGG ACG AAC TGG TG-3'
	reverse	5'-CAT AGC GCC TCT GAC TGG GA-3'
PDK1	forward	5'-AAG GGT ACG GGC CTC TCA AA-3'
	reverse	5'-CCC ACG TGA TGG ACT CAA AGA-3'
mTOR	forward	5'-CGC TGT CAT CCC TTT ATC G-3'
	reverse	5'-ATG CTC AAA CAC CTC CAC C-3'
S6K	forward	5'-TAC TTC GGG TAC TTG GTA A-3'
	reverse	5'-GAT GAA GGG ATG CTT TAC T-3'
RPS6	forward	5'-AAG GAG AGA AGG ATA TTC CTG GAC-3'
	reverse	5'-AGA GAG ATT GAA AAG TTT GCG GAT-3'
Ras	forward	5'-CCC GTC CTC ATG TAC TGG TC-3'
	reverse	5'-ATC TTG GAT ACG GCA GGT CA-3'
Raf	forward	5'-GAT GAT GGC AAA CTC ACG GAT TC-3'
	reverse	5'-AAG GCA GTC GTG CAA GCT CA-3'
MEK	forward	5'-CGATGGATCCCCCAAGAAGAAGCCGAC G-3'
	reverse	5'-CGATCTCGAGTTAGACGCCAGCAGCAT G-3'
GAPDH	forward	5'-CAG CCG AGC CAC ATC G-3'
	reverse	5'-TGA GGC TGT TGT CAT ACT TCT C-3'

## 8) Annexin V & dead cell assay

HT-29 세포의 사멸이 phloroglucinol에 의한 apoptosis임을 확인하기 위하여 Muse™ Annexin V & dead cell kit protocol을 이용하여 실험하였다. HT-29 세포를 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석해 6-well에 분주하였다. 세포가 60% 정도 자라면 SFM으로 배지를 교환하여 4시간 배양하고 이후 1% FBS에 phloroglucinol을 희석하여 24시간 처리하고 PBS에 세포를 부유시켰다. 원심분리 (2,500 rpm, 10 min, 4 °C)한 후 pellet을 각각의 tube에 Muse™ Annexin V & dead cell reagent (EMD Millipore Co., Hayward, CA, USA)와 섞어 5초간 vortex 한 후 20분 동안 암실에서 실온 반응하였다. 반응 후 Muse™ cell analyzer (EMD Millipore Co., Hayward, CA, USA) 장비를 이용해 측정하였다.

## 9) Cell cycle analysis

Phloroglucinol에 의한 세포 주기의 분포도 변화를 보기 위해서 HT-29 세포를 6-well에 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지를 희석해 분주하였다. 세포가 60% 증식하면 SFM을 4시간 처리하고 이 후 phloroglucinol을 농도별로 24시간 처리한 후 배양하였다. PBS로 세포를 부유시켜 원심분리 (2,500 rpm, 10 min, 4 °C)하여 pellet을 회수해 각각의 tube에 cell cycle test reagent (EMD Millipore Co., Hayward, CA, USA)와 섞어 5초간 vortex 한 후 30분간 암실에서 실온 반응하였다. 반응 후 Muse™ cell analyzer (EMD Millipore Co., Hayward, CA, USA) 장비를 이용해 측정하였다.

## 10) Statistical analysis of experiment result

본 실험에 대한 결과는  $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 로 나타내었으며, 실험군 간의 유의성은 SPSS ver. 18.0 프로그램을 사용하여 ANOVA로 검증한 후,  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 유의성을 비교하였다.



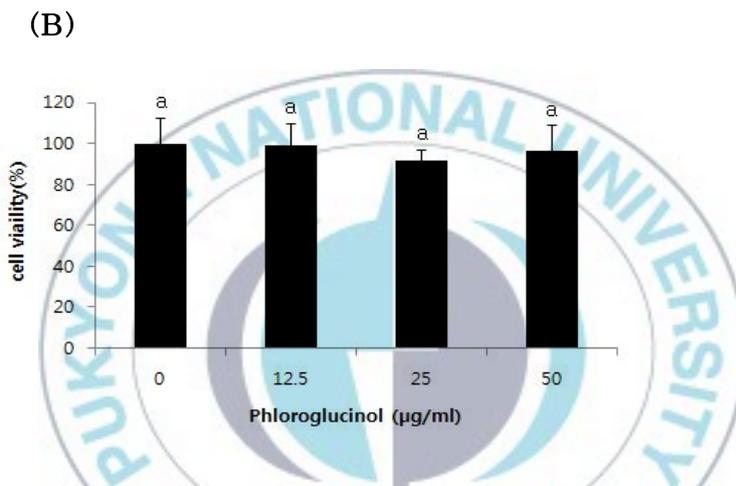
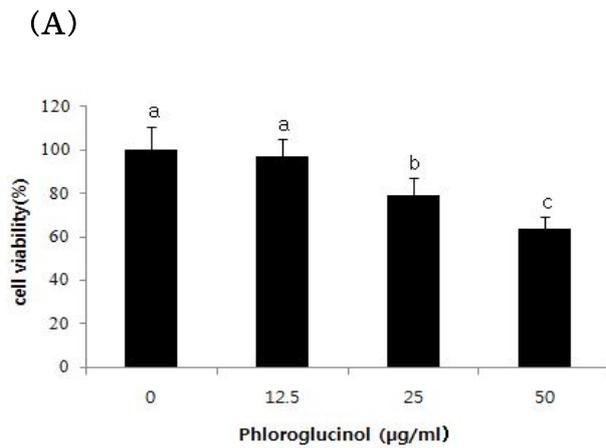
### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. Phloroglucinol에 의한 HT-29 대장암 세포 증식 억제 효과

##### 1) Phloroglucinol이 HT-29 대장암 세포사멸에 미치는 영향

인체 유래 대장암세포인 HT-29 세포 사멸에 phloroglucinol이 미치는 영향을 조사하고 소화관 정상세포인 IEC-6 세포에서의 독성 유무를 확인하기 위해 MTS assay를 하였다. HT-29 세포에서 0, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  처리 시 농도 의존적으로 세포증식 억제효과가 있었으며 IEC-6 정상세포에서 아무런 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 최종 농도인 phloroglucinol 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 약 60%의 세포 생존율을 보였으므로 HT-29 세포에 위와 같은 농도로 실험을 진행하였다 (Fig. 1).



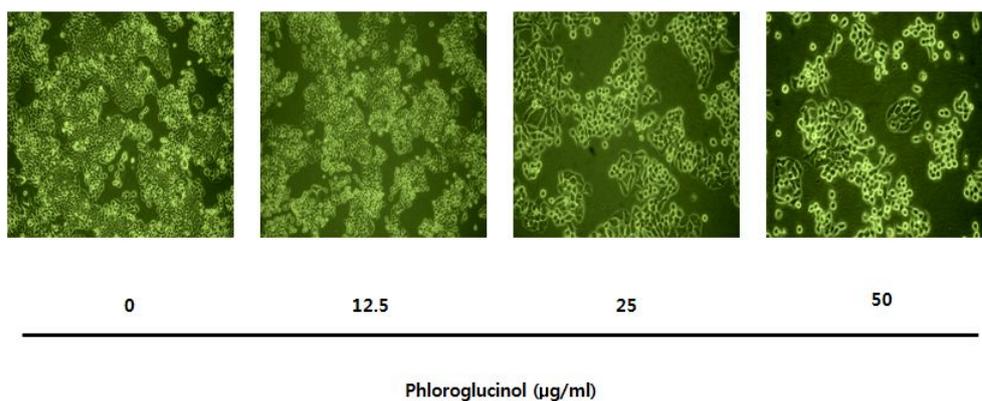


**Fig. 1. Effect of phloroglucinol on HT-29 cell proliferation.** (A) Effect of phloroglucinol treatment on the growth of HT-29 colon cancer cells. Cells were treated with varying concentrations of phloroglucinol (0, 12.5, 25, 50 µg/ml) for 24h. (B) Phloroglucinol toxicity to IEC-6 intestinal epithelial cells. The values were the means  $\pm$  SD;  $P < 0.05$  by ANOVA. Values with different letters are significantly different from one another according to Duncan's multiple range test.

## 2) 세포의 형태학적 변화

앞선 MTS assay의 결과를 바탕으로 HT-29 세포에 phloroglucinol을 처리하였을 때 세포와 핵의 형태학적인 변화를 현미경 상에서 관찰하였다. 그 결과 HT-29 세포에 phloroglucinol을 처리 하였을 때 세포생존을 측정결과와 동일하게 농도 의존적인 세포 감소를 확인하였다. 또한, HT-29 세포에 phloroglucinol 농도가 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포 형태가 변하기 시작하였고 최고 농도인 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 세포가 수축하기 시작하였다. 이와 같이 세포 형태학적 변화를 관찰 할 수 있었으므로 이후 DAPI 염색을 통해 핵의 형태학적 변화를 살펴보았다 (Fig. 2).





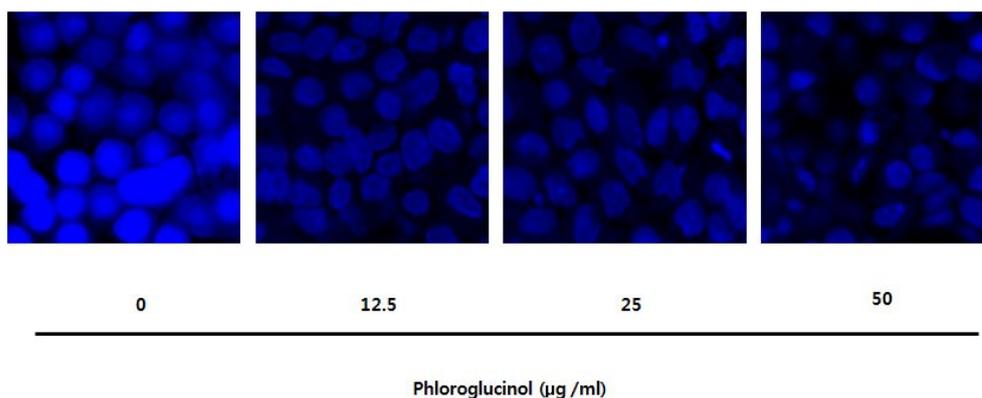
**Fig. 2. Morphological changes in HT-29 cells after phloroglucinol treatment.** After 24h of treated with phloroglucinol (0, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) were measured by an optical microscope. Magnification,  $\times 200$ .



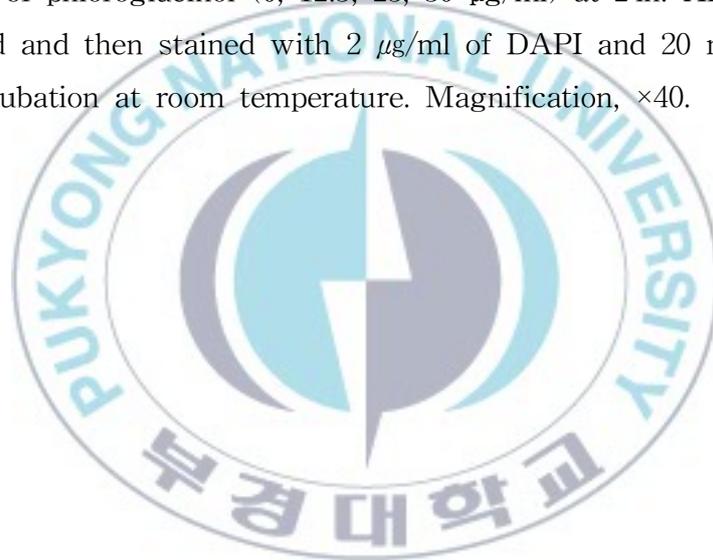
### 3) 핵의 형태학적 변화

앞선 세포의 형태학적 변화에서 세포 수가 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. Phloroglucinol 처리 시 세포사멸 (apoptosis)의 형태학적 특징 중의 하나인 핵의 변화를 관찰하기 위하여 핵 내 DNA에 특이적으로 결합하는 형광 염색제인 DAPI를 사용하여 핵을 염색하고 형광 현미경으로 관찰 하였다. 그 결과 phloroglucinol을 처리하지 않은 군에서는 타원형의 온전한 핵 모양을 관찰 할 수 있는 반면, phloroglucinol을 처리한 세포의 핵은 비교적 작고 모양이 일정하지 않는 것으로 보아 HT-29 세포 주의 사멸에 phloroglucinol이 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3).





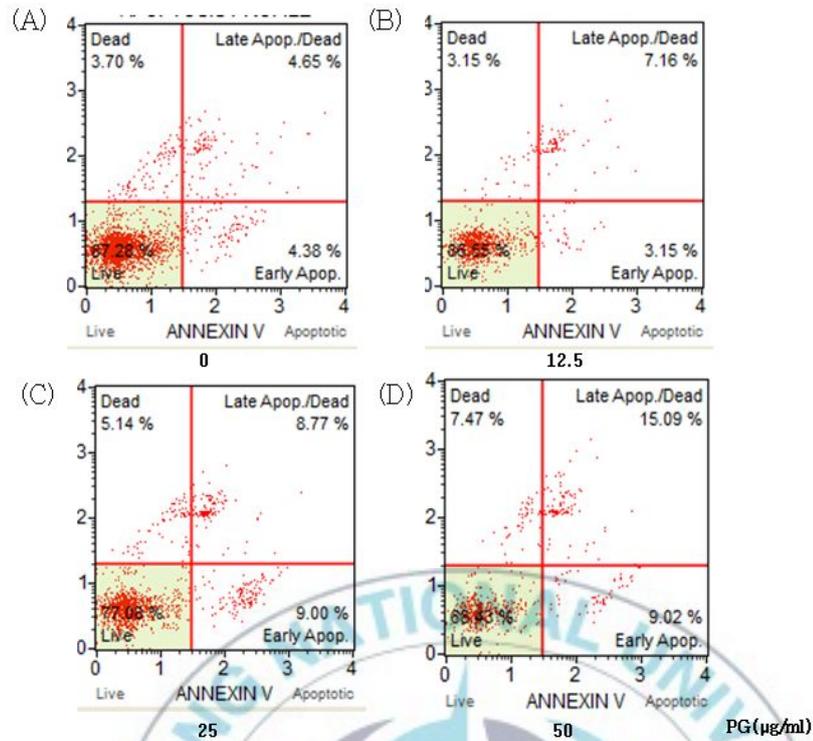
**Fig. 3. Morphological changes of nucleus in HT-29 cells after phloroglucinol treatment.** HT-29 cells were treated with varying concentrations of phloroglucinol (0, 12.5, 25, 50 µg/ml) at 24h. After, cell were fixed and then stained with 2 µg/ml of DAPI and 20 min maintained incubation at room temperature. Magnification, ×40.



#### 4) Annexin V & dead cell analysis

앞선 결과에서, HT-29 세포에 phloroglucinol 처리 시 세포 사멸이 유도되어 그 수가 감소하였으므로 Annexin V & dead cell apoptosis detection kit를 사용해 phloroglucinol에 의해 유도된 apoptosis인지, 혹은 necrosis인지 Muse™ cell analyzer를 통해 분석하였다. Apoptosis나 necrosis와 같은 세포 사멸은 Annexin V와 7-aminoactinomycin D (AAD) staining 된 정도로 그 비율을 확인 하였다. 분석 결과, 대조군에 서는 early apoptosis와 late apoptosis area의 total apoptotic 비율이 9.03% (Fig. 4A)였으나 phloroglucinol을 처리한 구간에서는 10.31%, 17.77%, 24.11%로 농도 의존적으로 apoptosis cell의 비율이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 4B-D).

세포의 사멸은 apoptosis와 necrosis로 구분 할 수 있다. necrosis는 직접적으로 독성이 있거나 물리적 상해 등 외부환경의 변화에 의해 유발되는 수동적 과정으로 염색사의 불규칙한 응집과 세포질의 팽창 과정을 거치게 되고 시간이 지나면 세포막이 파괴되면서 세포가 분해되고 이들은 염증을 유발하게 된다 (Robaye et al., 1991). 이에 반해 apoptosis는 유전적으로 보존된 관련 유전자에 의해 이루어지며, 조절이 가능한 능동적 세포 죽음과정이다. 이 과정은 형태적으로 세포의 감소, 세포막의 파괴, 염색체의 응축 등과 더불어 세포내부의 물질들이 사멸체 (apoptotic body)라는 포낭을 형성하고 형성된 사멸체들은 식세포 작용에 의해 제거됨으로써 염증을 유발하지 않는다 (Clarke and Clarke, 1995). 이러한 apoptosis는 세포가 병리학적 요인에 의하여 사멸하는 생리학적 과정으로 (Hengartner, 2000) 원형질 변화, 세포간질의 변화를 나타내는 necrosis와 차이점이 있다 (Kerr et al., 1972). Apoptosis는 bcl-2 family proteins와 caspase와 같은 signaling pathway 등과 연관되어 있다.



**Fig. 4.** Induction of apoptosis in HT-29 cells after phloroglucinol treatment, as determined Annexin V & dead cell analysis. Phloroglucinol induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells. Cells were cultured in 6-well plates with varying concentrations of phloroglucinol (0, 12.5, 25, 50 µg/ml) for 24h and then collected in medium containing 1% FBS. The percentages of apoptotic and necrotic cells were determined using a Muse™ Annexin V & dead cell kit as described in the materials and methods. Detection of apoptosis were stained V-positive and 7-aminoactinomycin (ADD).

## 2. Phloroglucinol에 의한 세포사멸 신호전달 분석

### 1) Extrinsic and Intrinsic pathway

Phloroglucinol을 농도별로 24시간 처리한 HT-29 세포에 Fas로 유도되어진 세포사멸에 미치는 영향을 알아보았다. Western blot을 시행한 결과 농도 의존적으로 Fas의 발현량이 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며 이에 따라 하위 단계의 단백질 발현을 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 세포사멸은 death receptor 관련 인자들, bcl-2 및 IAP family 인자들, 그리고 caspase 등의 유전자들에 의해 조절되며, 크게 extrinsic (death receptor-mediated) 및 intrinsic (mitochondrial-mediated) pathway 2가지 경로를 통하여 일어난다 (Chen et al., 2010).

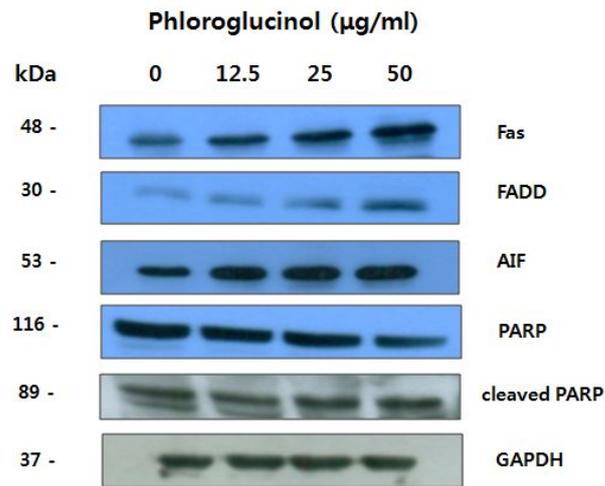
Extrinsic pathway는 mitochondria 비 의존적인 apoptosis 과정으로 tumor necrosis factor (TNF) family의 death receptor들의 활성화에 의해 야기되어 death receptor pathway라고도 한다 (Kim et al., 2009). 다양한 외부 자극을 받게 되면 mitochondria의 막 전위의 변화가 유발되고 균형이 깨어져서 mitochondria 내에 존재하는 cytochrome c와 같은 여러 apoptosis 유발 인자들이 세포질로 방출된다. 방출된 cytochrome c는 apoptotic protease activating factor (Apaf-1)과 caspase-9와 함께 세포질에서 apoptosome 복합체를 형성하는데, 이 apoptosome은 비활성 상태로 존재하고 있는 caspase-3을 활성화시키게 된다 (Colussi and Kumar, 1999).

하지만, 몇몇 세포의 경우에는 활성화 된 caspase-8이 직접적으로 caspase-3을 활성화 시키는 것이 아니라 bcl-2 homology 3 (BH3)-only protein인 bid의 단편화를 통한 truncated bid (tbid)의 형성을 유발시킴으로써 intrinsic pathway를 통한 apoptosis를 유발하기도 한다 (Li et al., 1998).

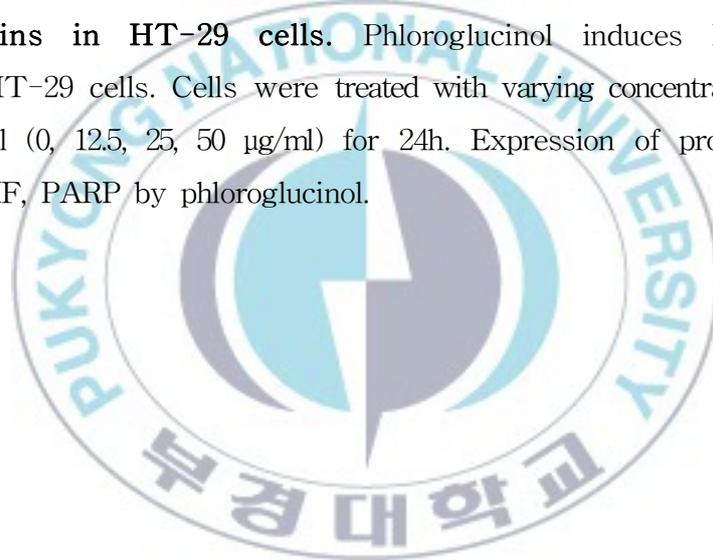
또한, apoptosis 과정인 intrinsic pathway는 여러 종류의 물리적 및 화학적인 자극에 의한 bcl-2 family 단백질들의 발현 변화와 그에 따른 mitochondrial dysfunction에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다 (Li et al., 1997). 이러한 mitochondrial dysfunction은 caspase-9를 활성화 시키고 활성화 된 caspase-9는 caspase-3을 활성화시켜 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 등과 같은 기질 단백질들의 분해를 일으켜 apoptosis를 일으키게 된다 (Han et al., 2008).

본 연구에서 phloroglucinol을 HT-29 세포에 24시간 처리하여 회수한 다음 western blot을 통해 단백질 발현 양을 확인한 결과, phloroglucinol을 통한 세포사멸은 Fas signaling을 유도되는 apoptosis임을 알 수 있었고 이에 따라 이 signaling에 관여하는 FADD, cleaved PARP 등의 발현을 볼 수 있었다 (Fig. 5-6).





**Fig. 5. Phloroglucinol affects the expression of the apoptosis related proteins in HT-29 cells.** Phloroglucinol induces DISC formation in HT-29 cells. Cells were treated with varying concentrations of phloroglucinol (0, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24h. Expression of proteins Fas, FADD, AIF, PARP by phloroglucinol.



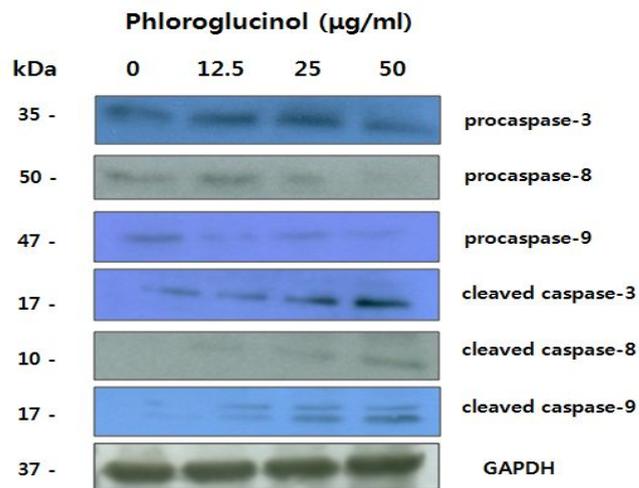
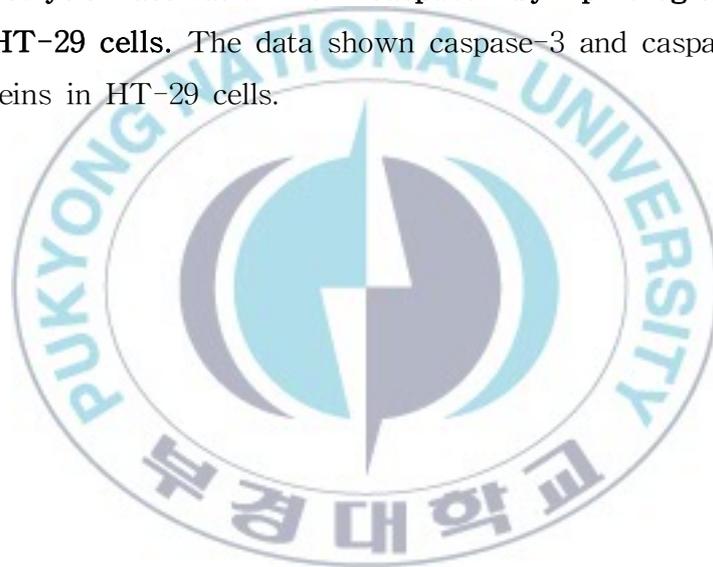


Fig. 6. Proteolytic activation of caspase by phloroglucinol treatment in HT-29 cells. The data shown caspase-3 and caspase-8, caspase-9 proteins in HT-29 cells.



## 2) Bcl-2 family proteins의 신호전달 분석

Bcl-2 family proteins은 미토콘드리아의 막 투과성을 조절하는 인자로써 미토콘드리아에 의한 intrinsic apoptosis pathway에 작용하는 단백질로 다양한 종류가 존재한다. Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있는데, 그 중 bcl-2와 bcl-xL은 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, bax나 bad 등은 대표적인 pro-apoptotic 분자로 그들의 발현 증가는 apoptosis의 유발과 관계가 있다 (Antonsson and Martinou, 2000).

Pro-apoptosis 중에서 bax sub-family는 bax가 평상시에는 monomer로 존재하면서 bcl-2에 의하여 그 작용이 저해 받게 된다. Apoptosis signal이 들어오면 bad가 bcl-2와 결합하게 되고 bcl-2로부터 떨어져 나온 bid는 bax와 결합하여 그들의 conformational change가 일어나 dimer를 형성하게 되고 미토콘드리아 외막에 작용해 구멍을 만들어 내부의 물질을 유출 시키게 된다. 또한, BH3 sub-family는 bcl-2, bcl-xL에 결합되어 그 작용을 억제하여 bax의 작용을 활성화 시킨다 (Elizabeth et al., 1995).

Anti-apoptotic 분자와 pro-apoptotic 분자는 서로 dimer의 형태로 존재하여 균형을 유지하고 있지만 이러한 균형이 깨어지게 되면 mitochondria로부터 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성화를 통하여 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다 (Donovan and Cotter, 2004).

본 연구에서 phloroglucinol 처리에 의한 apoptosis 유발하는 과정에 어떠한 유전자들이 관여하는지 확인하기 위해 bcl-2 family의 발현 변화를 살펴 본 결과 apoptosis signaling pathway에 따라 bad, bax의 증가와 bcl-2, bcl-xL, bid의 감소 경향을 볼 수 있었다 (Fig. 7).

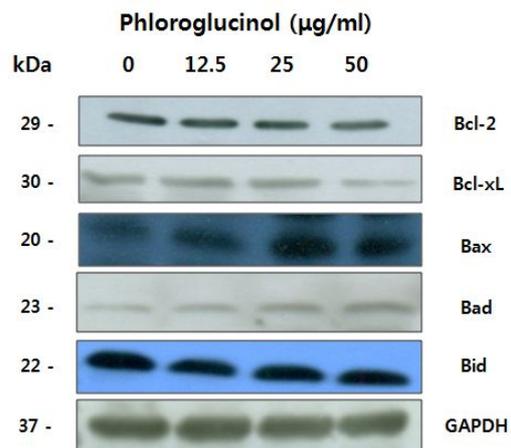
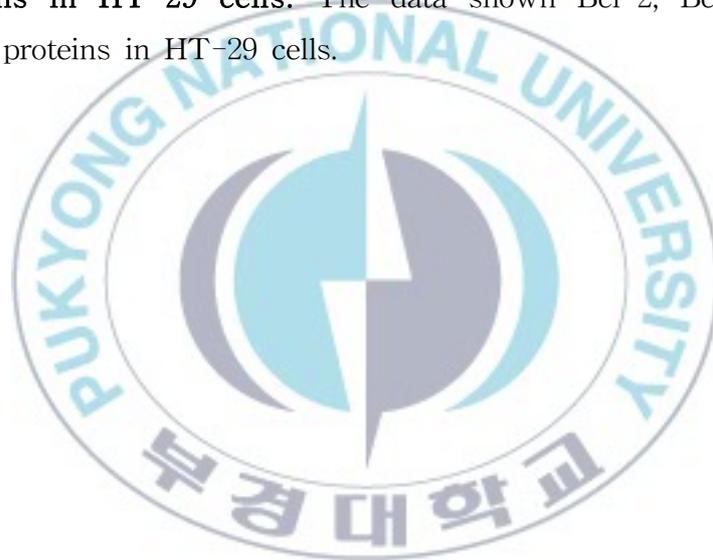


Fig. 7. Effect of phloroglucinol on the expression levels of Bcl-2 family proteins in HT-29 cells. The data shown Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bid, Bad proteins in HT-29 cells.



### 3) Cytochrome c에 의한 세포질에서의 신호전달

앞서 western blot 실험을 통해 발현을 알 수 있었던 bcl-2는 apoptosis가 발생하지 않을 시 미토콘드리아 외막을 유지시켜서 cytochrome c의 분비를 방어해주며 bad, bax와 같은 단백질은 cytochrome c의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다.

Western blot 결과 HT-29 세포에 phloroglucinol을 처리하였을 때 세포 사멸에 관여할 수준으로 bcl-2 family proteins가 작용하는 것을 토대로 세포질에서 cytochrome c의 유출 단계를 확인해 보았다. 특히, anti apoptotic bcl-2 단백질은 미토콘드리아에서 cytochrome c의 유출을 막고 MMP를 조절하여 세포 자멸사를 억제한다 (Groww et al., 1999).

Bcl-2에 의해 억제되는 cytochrome c는 미토콘드리아의 전자 전달계의 구성성분으로 세포 내 칼슘의 급격한 증가에 의해 세포 자멸사의 초기에 관여한다 (Liu et al., 1996). 세포질로 cytochrome c가 분비되면 세포질에서 caspase-9, Apaf-1과 결합을 하여 apoptosome을 형성하게 되는데 이것은 다시 세포 자멸사 활성인자인 caspase-9를 활성화 시키고 활성화 된 caspase-9는 caspase-7과 caspase-3을 활성화 시켜서 DNA 손상 및 세포 자멸사를 일으킨다 (Nijhawan et al., 1997).

본 연구에서 세포질에서의 cytochrome c 발현을 분석한 결과 미토콘드리아에서 방출된 cytochrome c가 세포질에서 phloroglucinol을 처리 시 cytochrome c와 Apaf-1의 발현이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 8).

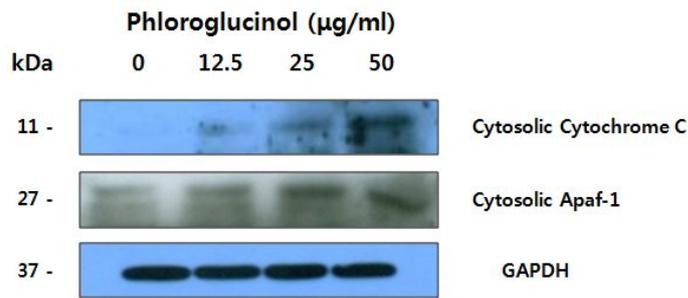


Fig. 8. Effect of treatment with phloroglucinol on cytosolic cytochrome c and Apaf-1 expression in HT-29 cells. The data shown increased cytochrome c and Apaf-1 proteins.



#### 4) Caspase-3, -8 activity

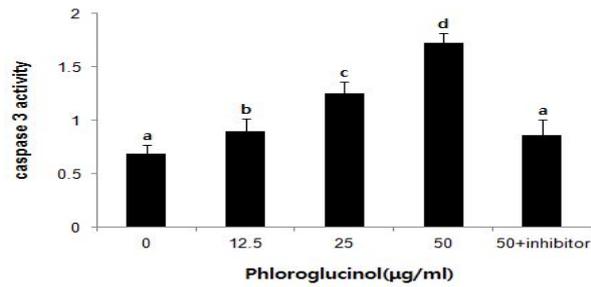
Apoptosis 신호 전달 과정을 통한 caspase 활성화에는 특징이 있는데, 세포 외부로부터 apoptosis 신호가 세포 내부에 있는 caspase로 전달되어 caspase가 활성화된다. Cysteine aspartic acid proteases인 caspase는 세포사멸을 조절하는 주요한 조절 인자로 세포내에서 불활성 형태인 pro enzyme으로 존재하다가 (Jin et al., 2005), 신호 전달 자극이 오게 되면 large subunit과 small subunit으로 절단되며 이는 tetramer를 형성하여 활성화 된다 (Cotter et al., 1992).

Caspase는 initiator caspase와 effector caspase로 구분되며, initiator caspase는 death inducing signal에 의해 활성화되어 effector caspase는 lamin A, DNA fragmentation factor,  $\alpha$ -fodrin과 PARP 등의 단백질의 분해를 유도하여 세포사멸을 유도한다 (Jin and El-Deiry, 2005).

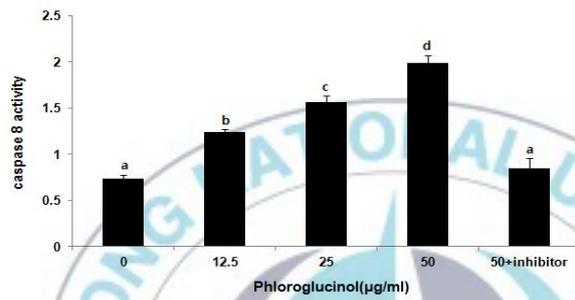
Effector caspase인 caspase-3의 활성화는 initiator caspase인 caspase-8, caspase-9에 의해 활성화 되는 것으로 잘 알려져 있고, caspase-8은 세포막에 존재하는 Fas receptor에 ligand가 결합하면 활성화되는 외적 경로를 통해 활성화 되는 반면, caspase-9는 미토콘드리아 막 투과성 증가에 의해 방출된 cytochrome c에 의한 내적 경로에 의해 활성화 된다 (Budihardjo et al., 1999).

앞선 실험에서 phloroglucinol을 HT-29 세포에 농도별로 처리 했을 시 세포 증식 억제 효과를 확인 하였고, western blot의 결과로 Fas를 통한 apoptosis경로를 확인하였으므로 본 실험에서는 caspase-3, caspase-8의 활성화정도를 측정하였다. 모든 실험에서 기준이 된 동일한 시간 및 농도의 조건으로 측정한 결과, caspase-3, caspase-8의 경우는 phloroglucinol을 처리 하였을 때 농도 의존적으로 활성이 증가 하는 것을 확인하였고, inhibitor를 처리한 군에서는 대조군 수준을 유지하는 것을 확인 하였다 (Fig. 9).

(A)



(B)



**Fig. 9. Dose dependent activation of caspase-3, caspase-8 by phloroglucinol treatment in HT-29 cells.** In the experiments on dose dependence, phloroglucinol added at the varying concentrations (0, 12.5, 25, 50 µg/ml). Also, phloroglucinol was concentration of 50 µg/ml added caspase-3 inhibitor (Z-DEVD-FMK) and caspase-8 inhibitor (Z-IETD-FMK). The values were the means  $\pm$  SD;  $P < 0.05$  by ANOVA. Values with different letters are significantly different from one another according to Duncan's multiple range test.

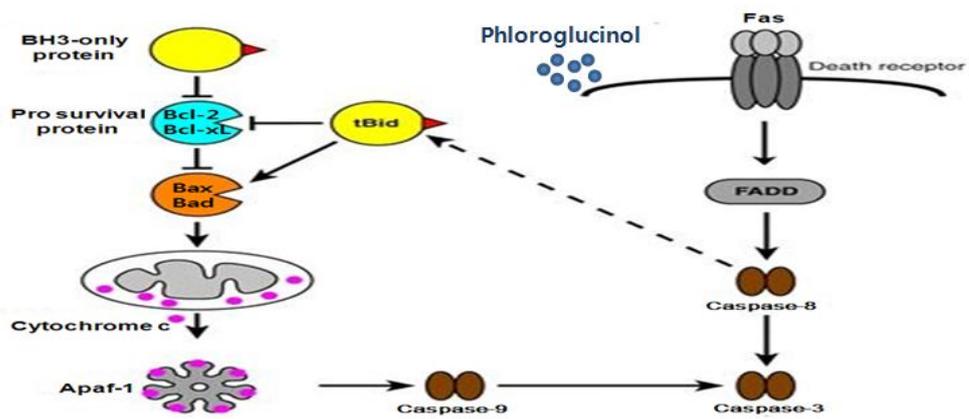


Fig. 10. Proposed model mechanism of the activation Fas mediated apoptosis by phloroglucinol.



### 3. 세포 주기에 미치는 영향

#### 1) 세포 주기 분석

세포주기는 모든 진핵세포들의 성장에 필수적으로 거치는 주기로서 세포는 G1에서 S, G2, M 기를 거치면서 분열, 성장하고 (Hunter, 1993), 반복과정을 거치며 순서가 엄격히 지켜져 역방향으로 진행되지는 않는다. 각 세포 단계별로 관련되는 효소가 정상적으로 조절 받지 못하게 되면 세포는 암세포와 같은 비정상적인 세포성장을 하게 되는 것으로 알려져 있다 (Marx, 1994).

S기에서는 DNA 복제가 일어나며 M기에서는 염색체와 세포의 분열이 일어나게 되는데 이 사이 과정이 각각 G1, G2기이며 G1기에서는 세포의 증식이 이루어지며 분열이 완전히 진행 되었는지를 확인하며, G2기에서는 DNA의 복제가 완전히 종결 되었는지 확인 한 후 세포주기가 마무리 되어진다. 세포주기는 복제와 분열을 반복하는 과정이지만 DNA 복제는 sister chromatid가 완전히 분리된 후에만 발생하고 반대로 chromosome의 분열은 DNA의 복제가 종결된 후에 일어난다.

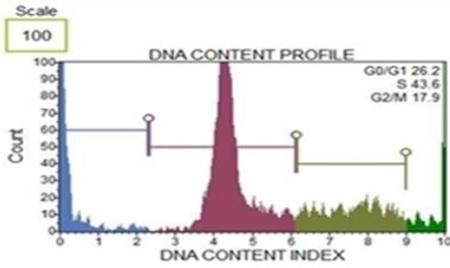
세포가 이러한 항상성을 유지하기 위하여 세포주기에서 check point를 가지고 있는데 먼저 G1기와 S기 사이에 restriction point (R point)가 있어서 외부 환경이 적합하지 않으면 S기로 진행되지 않고 G1에서 머무르는 단계, 혹은 G0기의 휴식상태로 다시 돌아가게 된다. 정상적인 restriction point (R point)를 지나게 되면 S기에서 DNA복제 후 G2기로 가게 되는데 여기서도 하나의 check point가 있어 S기에서 진행된 DNA 복제에서 이상이 있으면 세포주기가 정지를 하게 된다. 이상이 없을 경우 세포주기가 정상적으로 진행되어 M기에서 세포 분열이 일어난다.

본 연구에서는 HT-29 세포의 증식 억제가 세포주기에도 영향을 미치는지를 확인하기 위해 cell cycle analyst를 통해 분석하였다. 분석 결과,

정상적인 세포주기와는 달리 G0/G1기의 구간 비율이 대조군 26.2%에 비하여 각각 phloroglucinol을 처리했을 때 농도 의존적으로 29.5%, 32.5%, 44.2% 로 증가한 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 11). 따라서 phloroglucinol을 HT-29 세포에 처리 하였을 때, S기 G2, M기가 감소하고 G0/G1기가 증가하였음은 cell cycle arrest가 동반되었음을 추측할 수 있다.

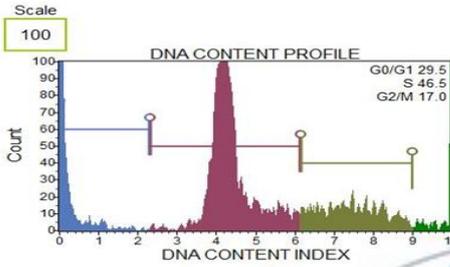


**Control**



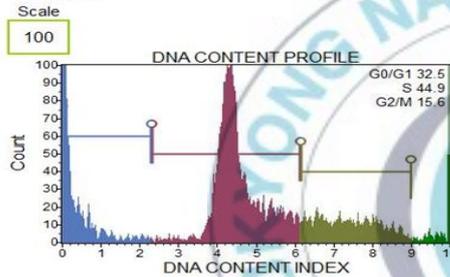
	G0/G1	S	G2/M	Debris
% Gated	26.2	43.6	17.9	0.0
Mean Intensity	187.6	4456.4	7563.4	9581.1
% CV	204.7	12.5	10.3	6.2

**12.5 µg/ml**



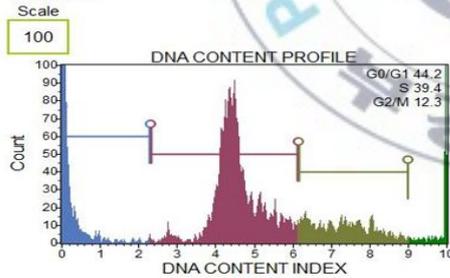
	G0/G1	S	G2/M	Debris
% Gated	29.5	46.5	17.0	0.0
Mean Intensity	142.4	4381.7	7447.1	9998.0
% CV	211.5	13.6	10.2	0.0

**25 µg/ml**



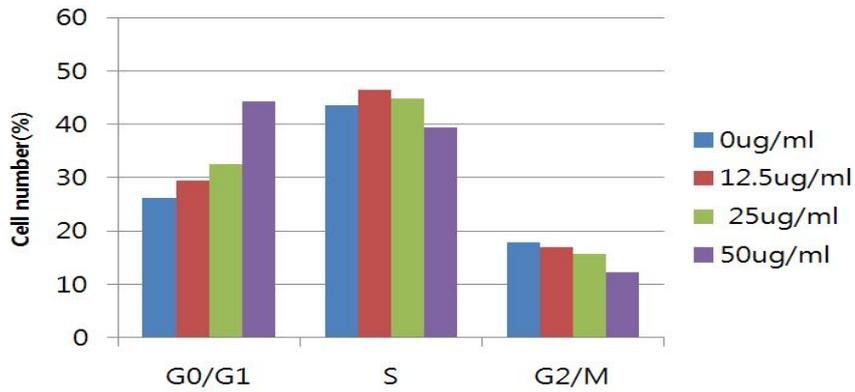
	G0/G1	S	G2/M	Debris
% Gated	32.5	44.9	15.6	0.1
Mean Intensity	222.2	4554.1	7385.9	6678.7
% CV	188.3	14.1	10.3	86.1

**50 µg/ml**



	G0/G1	S	G2/M	Debris
% Gated	44.2	39.4	12.3	0.0
Mean Intensity	97.9	4568.4	7324.8	1.9
% CV	262.7	14.0	10.1	0.0

**Fig. 11. Effect of phloroglucinol on cell cycle progression in HT-29 cells. In the experiments on dose dependence, phloroglucinol added at the varying concentrations (0, 12.5, 25, 50 µg/ml).**



**Fig. 12. Effect of phloroglucinol on cell cycle phase ratio in HT-29 cells.** In the experiments on dose dependence, phloroglucinol added at the varying concentrations (0, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ ). Increase of G0/G1 cell population by phloroglucinol treatment in HT-29 cells.



## 2) 세포 주기 조절 단백질 분석

세포 증식과 연관된 세포주기의 조절은 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되는 양성 조절인자인 cyclins에 의하여 cdk와 complex 형성을 통한 연속적인 활성화와 불활성이 결정되어진다 (Sherr, 1993).

세포주기 조절의 관점에서 암세포는 세포주기의 비정상화에 기인된 질병으로 정의될 수 있으며, 특정 시기의 세포주기 억제제 또는 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과 발현에 의한 것으로 요약될 수 있다. 세포주기 특이적인 cyclin-dependent kinases (cdks)의 기능이 세포주기 진행에 필수적임이 밝혀졌으며, 이것이 cyclins에 의해 활성화된다는 것도 알려지게 되어 cyclin-cdk 복합체가 세포주기 변환 시 주요 조절자로 작용한다 (Elledge and Harper, 1994).

그 중에서도 cyclin B와 cdc2 복합체는 유사분열 단계인 M기를 유도하고 cyclin A와 cdk2는 DNA 합성단계인 S기와 G2기 동안에 복합체를 형성하여 S기 조절에 관여한다고 보고되고 있으며, cyclin D는 cdk2, cdk4, cdk6과 복합체를 형성하고 cyclin E는 cdk2와 복합체를 형성하여 DNA 합성의 시작 단계인 G1기 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Pagano et al., 1992; Xiong et al., 1991).

세포주기에서 G1 초기에는 cdk4, cdk6 등이 활성화되어 작용을 하게 되고 G1기 후기와 S기 초기에 cdk2가 작용을 한다. cdk 활성화에는 cyclin과의 결합이 필수적이고 cdk4, cdk6은 cyclin D와 결합을 해서 활성화되며 cdk2는 cyclin E와 결합을 한다 (Bruna et al., 2000).

또한, 암세포에서는 세포주기 조절 효소인 cyclin/cdk가 비정상적으로 과 활성화 되어져 있으며 이들 cyclin/cdk 복합체의 활성을 저해하는 단백질인 p16, p21, p27 등의 변이도 나타나는 것으로 보고되고 있다 (Marx, 1994).

따라서, 세포주기 조절은 특정 물질의 암세포 증식 억제 기전 해석의 필수적인 과정으로 인식되고 있어 cyclin/cdk, p21, p27 등의 세포주기 조절인자들의 활성조절은 암의 발생과 이상증식을 조절할 수 있을 것이다. 앞선 실험에서 이러한 세포주기에서 check point에서의 세포 증식 조절이 이루어지지 않고 정지가 됨으로 apoptosis에 의한 G0/G1기의 arrest를 확인 할 수 있었다. 정상적인 세포주기가 아닌 apoptosis에 의한 세포 증식의 억제를 본 실험에서 다루고 있으므로 cdk 및 cyclin/cdk 복합체 활성 저해 단백질인 p27, p21 등 western blot으로 살펴보았다 (Fig. 13).

p27 단백질은 세포주기에서 S기를 유도하는 cyclin/cdk complex에 결합해 cdk2, cdk4, cdk6 kinase의 활성을 저해함으로써 pRb의 인산화를 억제시켜 세포주기를 넘어가지 못하게 하며 G1기 상태에서 유지시키게 한다. 이러한 단백질은 phloroglucinol 처리에 의하여 pRb는 감소하며, p27은 증가하는 결과를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 phloroglucinol을 처리한 HT-29 세포는 Fas signaling을 통해 apoptosis 신호전달을 유도하며 세포주기 중 G0/G1기의 arrest로 인하여 세포성장이 저해되면서 세포사멸이 진행되는 것을 확인 할 수 있었다.

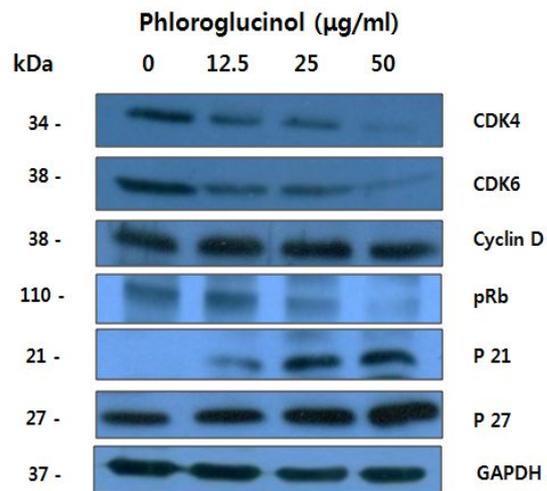
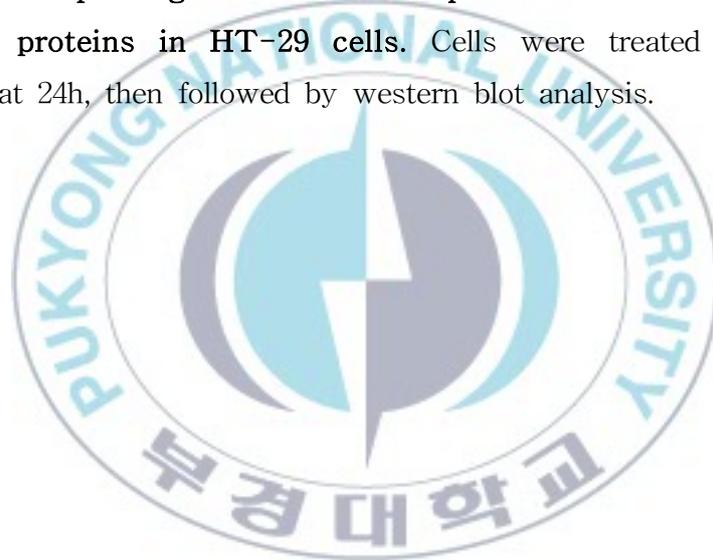


Fig. 13. Effect of phloroglucinol on the expression levels of cell cycle related proteins in HT-29 cells. Cells were treated with phloroglucinol at 24h, then followed by western blot analysis.



#### 4. 세포 성장 인자에 미치는 영향

##### 1) Fas유도 세포사멸 경로와 IGF-IR 경로 연관성

앞선 결과들을 종합해 보았을 때 phloroglucinol을 처리한 HT-29 세포 사멸은 Fas 경로를 통하여 FADD를 활성화 시킨 다음 caspase-8, caspase-9에 의해 caspase-3의 활성화로 세포 사멸이 진행되는 것을 확인하였다. 위 결과들을 토대로 본 실험에서는 phloroglucinol 처리로 인한 세포사멸은 Fas 경로를 통하여 이루어지는데 이 세포사멸 경로와 IGF-IR를 통한 세포 성장 경로와의 연관성을 확인하고자 하였다. IGF-1에 의해서 활성화 된 PI3K-Akt 신호경로는 caspase-9와 같은 pro-apoptotic protein의 발현을 저해하여 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다 (Carnero, 2010; Osaki et al., 2004). Apoptosis에서 caspase 역할은 앞에서 설명한 바와 같이 apoptosis 유발에서 가장 핵심적인 역할을 하며 caspase는 세포 사멸 관련 도메인을 가진 단백질간의 상호작용을 통하여 활성이 일어난다. 따라서 본 실험에서는 세포 사멸에 주 실행자인 caspase 활성을 저해시키기 위해 caspase inhibitor를 사용하여 caspase 활성을 저해 시킨 다음 세포 성장 신호 전달 경로인 IGF-IR 통한 PI3K-Akt pathway와의 연관성을 확인하였다. 그 결과 HT-29세포에 phloroglucinol을 처리하였을 때 PI3K와 Akt 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었지만 최고 농도인 50 µg/ml의 phloroglucinol 처리 군에 caspase inhibitor를 처리하였을 때는 PI3K와 Akt의 농도의 발현이 증가 하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, phloroglucinol로 유도된 대장암 세포 증식 억제는 Fas signaling을 통하여 apoptosis 신호전달에 이어 IGF-IR signaling을 통한 세포 성장 저해도 동시에 일어나며 caspase가 활성화로 인해 세포성장 단백질인 Akt와 PI3K 활성을 저해 시킨다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 14).

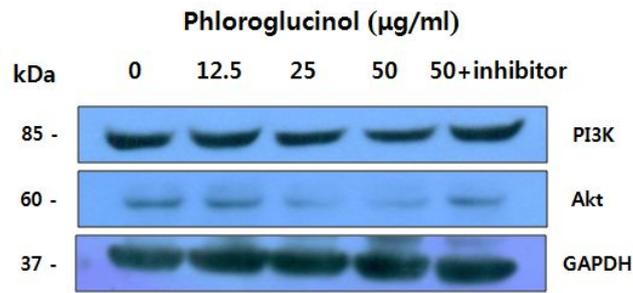


Fig. 14. Effect of phloroglucinol on the caspase inhibitor induced recruitment of PI3K and Akt in HT-29 cells. Phloroglucinol added at the varying concentrations (0, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ ). HT-29 cells were treated for 1h with or without caspase inhibitor. Also, phloroglucinol was concentration of 50  $\mu\text{g/ml}$  added caspase inhibitor (Z-VAD(Ome)-FMK).



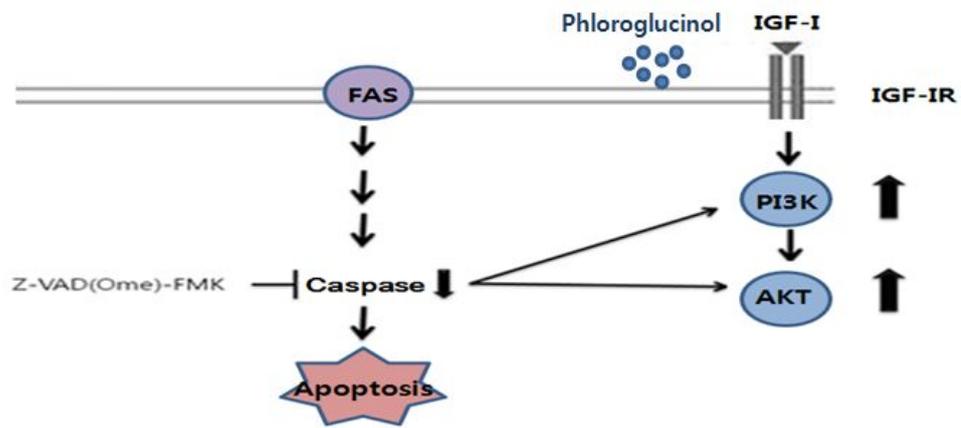
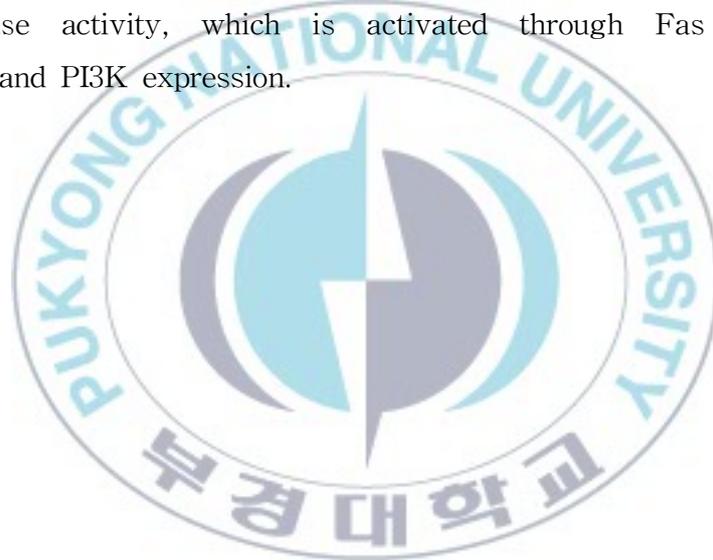


Fig. 15. Proposed model mechanism of Fas induced apoptosis the IGF-IR associated proteins Akt and PI3K. Z-VAD(Ome)-FMK inhibits caspase activity, which is activated through Fas and increases Akt and PI3K expression.



## 2) IGF-IR 관련 단백질 및 mRNA 분석

Insulin like growth factors (IGFs) 체계는 세포증식, 분화, 세포 자멸사 (apoptosis), 그리고 전환 (transformation) 등을 조절하는 작용을 하면서 종양형성에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Yu and Rohan, 2000). 다양한 암세포들의 성장을 조절 할 뿐만 아니라 다른 암과 관련 되는 분자들과도 상호작용을 한다고 지속적으로 밝히고 있다 (Kelly et al., 1996). 대부분의 IGF의 세포 내 작용은 type I IGF receptor (IGF-IR)에 의하여 매개되어지며, 작용은 IGF 결합 단백질 (IGF binding proteins)들에 의하여 조절된다 (LeRoith et al., 1995).

IGF는 한 개의 사슬로 이루어진 polypeptide로 proinsulin의 아미노산 구조와 유사하며, 정상 또는 악성 조직에서 항 세포 사멸 인자 또는 mitogenic으로 작용한다. 또한, endocrine mechanism 뿐 아니라 체내 각 조직에서 생성되어 그 조직 내에서 autocrine/paracrine mechanism으로도 세포의 증식과 분화를 조절하며 (Jones and Clemmons, 1995), IGF 결합 단백질 (IGF binding proteins)들은 IGF에 결합하여 세포에서 생성된 IGF를 다른 조직이나 세포로 운반하거나 IGF가 수용체에 결합하는 것을 증가 또는 감소시킴으로서 IGF의 작용을 촉진하거나 억제한다고 알려져 있다 (Rosenfeld et al., 1990).

IGF-IR는  $\alpha_2\beta_2$  형의 heterotetramer로 이루어진 glycoprotein으로  $\alpha$ -subunit과  $\beta$ -subunit이 disulfide bonds로 연결되어 있다.  $\alpha$ -subunit은 extracellular domain으로 IGF가 이에 결합하고, 세포막을 통과하는  $\beta$ -subunit은 cytoplasmic tyrosin-specific protein kinase domain을 포함하고 있는데 (Czech, 1989), 이 receptor에는 가장 활성이 높은 IGF-IR에 IGF-I이 결합하게 되고 IGF-IR의 활성은 IGF-I이나 IGF-II의 두 가지 ligand 중 하나가 IGF-IR에 결합함으로써 세포 내의 cytoplasmic domain의 tyrosin 잔기가 인산화 됨으로써 시작된다.

IGF-I이 IGF-IR의  $\alpha$ -subunit에 결합하게 되면,  $\beta$ -subunit에 자가 인산화가 일어나게 되고, 이것은 receptor의 tyrosine kinase 활성을 촉진함과 동시에, 세포내 여러 기질들의 인산화를 촉진하는 것으로 알려져 있다 (LeRoith et al., 1995).

세포 내에는 활성화 된 IGF-IR에 결합하여 신호를 전달하는 adaptor protein family들이 존재 하는데 그 중 대표적인 것이 IRS family고, 인산화 된 IRS에 결합하여 인산화 되는 단백질 중 가장 대표적인 것이 PI3K의 p85 regulatory subunit으로 알려져 있다. PI3K는 직접 IGF-IR에 결합되어 활성화되거나 또는 IRS에 의하여 활성화 된 다음 Akt를 활성화 시켜 세포사멸을 억제시키고 세포성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Alessi et al., 1998; Vanhaesebroeck et al., 1997).

앞선 결과들에서 phloroglucinol이 인체 유래 대장암 세포주인 HT-29의 사멸기전에 관여 한다는 것을 확인 하였으며, 이 결과를 바탕으로 세포 성장 신호전달에도 영향을 미치는지 검토하기 위해 대표적인 세포 성장 signal인 IGF-IR 신호전달 단백질의 발현을 분석하였다. 또한, IGF-IR은 Ras-MAPK와 PI3K-Akt pathways의 두 가지 전달체계를 통해 작용하게 된다 (Valentinis et al., 1998). IGF의 세포 내 신호전달 조절자인 IGF 결합 단백질 (IGF binding proteins)들 중 PI3K는 직접 IGF-IR에 결합되어 활성화 되거나 IRS에 의해 활성화 되어 serine threonine kinase의 일종인 Akt를 PDK-1에 의해 인산화 되는 Thr308과 PDK-2에 의해 인산화 되는 Ser473 부위에서 인산화가 일어나면서 활성화 시키므로 세포사멸을 억제 시키며, 본 실험에서 phloroglucinol을 농도별로 처리하였을 때 PI3K, Akt 또한 발현이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 16-17).

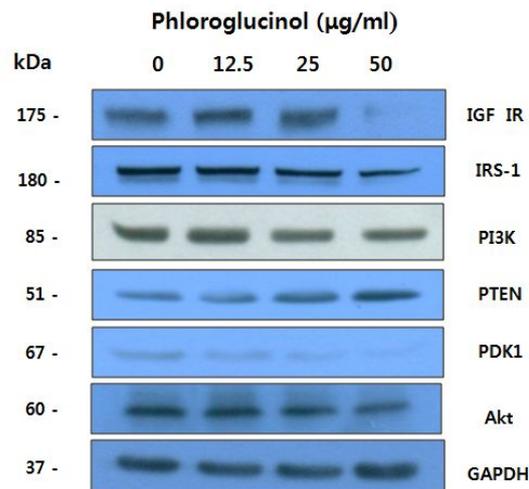
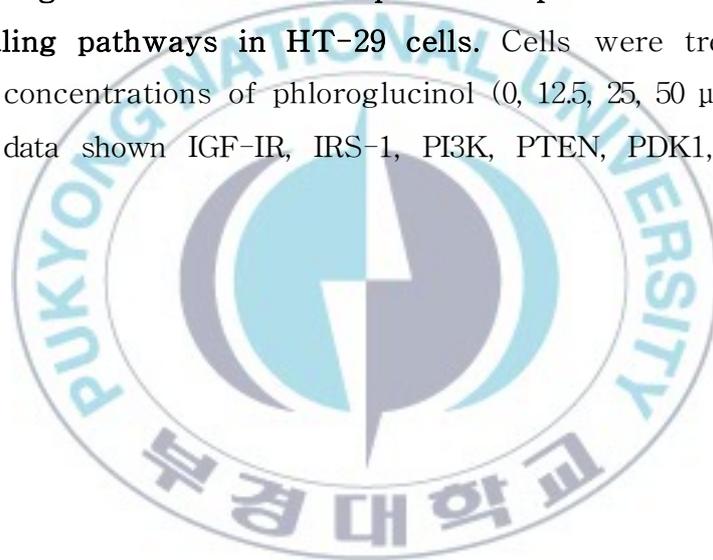


Fig. 16. Phloroglucinol affects the protein expression of the IGF-IR signaling pathways in HT-29 cells. Cells were treated with varying concentrations of phloroglucinol (0, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24h. The data shown IGF-IR, IRS-1, PI3K, PTEN, PDK1, Akt proteins.



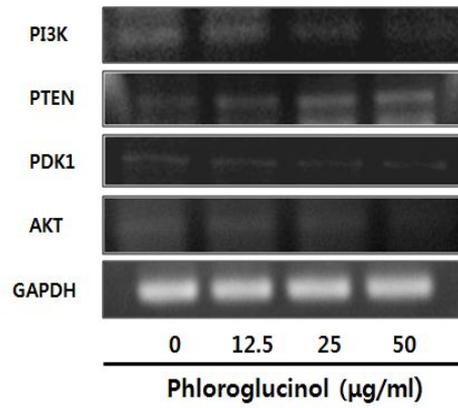
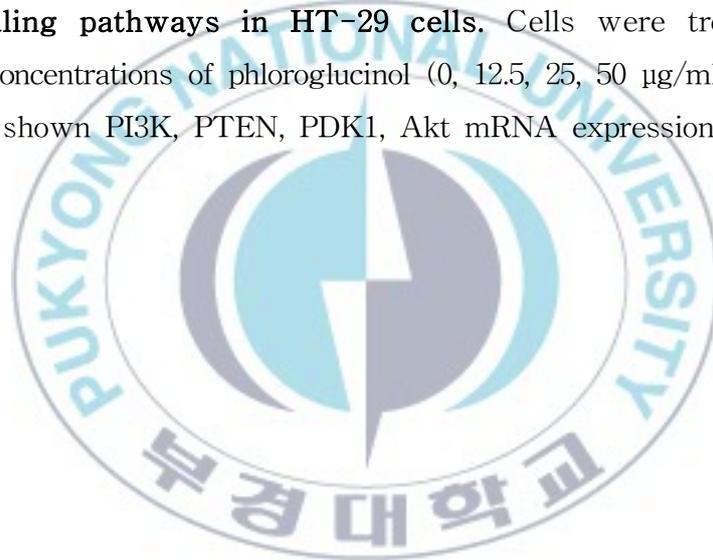


Fig. 17. Phloroglucinol affects the mRNA expression of the IGF-IR signaling pathways in HT-29 cells. Cells were treated with varying concentrations of phloroglucinol (0, 12.5, 25, 50 µg/ml) for 24h. The data shown PI3K, PTEN, PDK1, Akt mRNA expression.



### 3) mTOR 관련 단백질 및 mRNA 분석

mTOR (Mammalian target of rapamycin)는 serin-threonine kinase의 일종으로 단백질 번역, 세포 성장, 증식 등의 물질대사 조절에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Howe et al., 2001). mTOR은 세포에서 mTORC1과 mTORC2의 두 가지 복합체로 존재 하는데, 그 중 mTORC1은 암세포에서 과 발현 되며, 단백질 번역과정에 관여하는 인자들을 활성화시킴으로 암 성장을 촉진하는 것으로 밝혀졌다 (Lee et al., 2009). mTOR은 진핵세포의 개시인자인 4E-binding protein 1 (4EBP1)과 S6 kinase 1 (S6K1)을 인산화 시킴으로써 eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)의 활동을 자유롭게 하여 세포 증식, 성장, 혈관신생을 촉진하는 것으로 보고되었다 (Meric-Bernstam and Gonzalez-Angulo, 2009).

또한, mTOR은 다양한 암세포에서 PI3K/Akt/mTOR 신호경로를 통해 암세포의 성장과 증식을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Stylianou et al., 2011). PI3K-Akt 신호전달에 의한 mTOR의 활성이 세포 내에서 다양한 성장신호를 통합하는 중요한 기능을 수행하는 중심 신호전달 기전으로 mTOR의 활성화는 다시 p70S6K 혹은 4EBP1을 경유하는 독립된 두 가지 pathway로 진행 될 수 있다. 즉, mTOR을 중심으로 Akt/mTOR/p70S6K로 이어지는 신호전달 경로가 세포분열, 전이, 세포자멸사의 억제와 같은 과정을 촉진하며, phosphatase and tensin homolog (PTEN)은 PIP3, Akt를 탈인산화 하여 이 과정을 억제하는데 관여한다. 그 결과, phloroglucinol을 HT-29 세포에 처리 하였을 때 농도 의존적으로 PTEN의 작용과 함께 mTOR, p70S6K의 발현양이 감소하는 것을 확인 하였으며, PDK1, RPS6과 eIF4B도 농도 의존적으로 발현이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서, 세포 내부의 매우 다양한 신호전달체계와 서로 연결 된 상호작용과정에서 HT-29 세포에 phloroglucinol을 처리 하므로 인하여 mTOR signaling pathway에도 영향을 주는 것으로 추측된다 (Fig. 18-19).

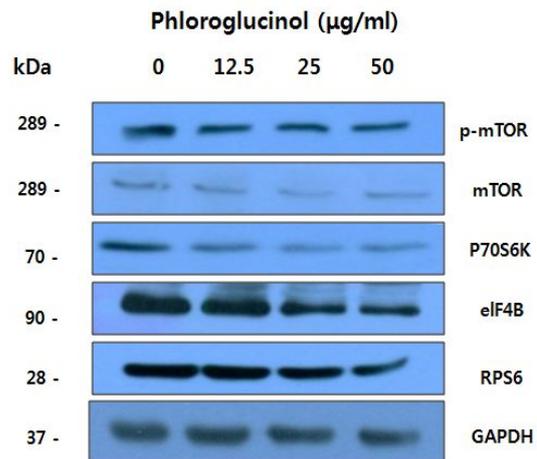


Fig. 18. Effect of phloroglucinol on the expression levels of mTOR, p70S6K, RPS6, eIF4B. Cells were lysed and the cell lysates were analysed by western blot with mTOR, p70S6K, RPS6, eIF4B antibody.



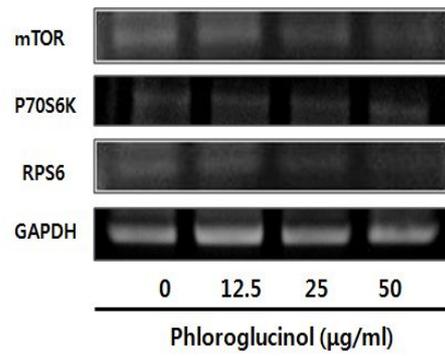
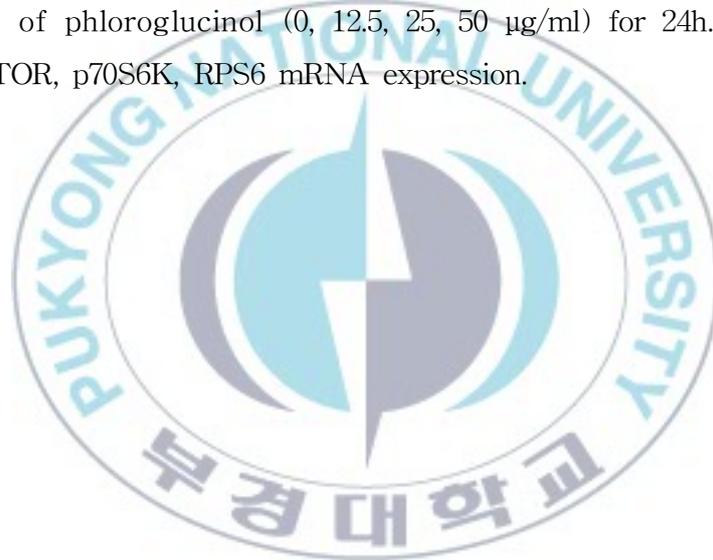


Fig. 19. Effect of phloroglucinol on the mRNA expression levels of mTOR, p70S6K, RPS6, eIF4B. Cells were treated with varying concentrations of phloroglucinol (0, 12.5, 25, 50 µg/ml) for 24h. The data shown mTOR, p70S6K, RPS6 mRNA expression.



#### 4) RAS 관련 단백질 및 mRNA 분석

성장인자가 세포막 수용체에 결합하여 형성된 신호는 일련의 연결 단백질의 결합을 거쳐 SOS1 단백질을 소집하고, 이는 guanosine triphosphate (GTP)에서 guanine nucleotide 분해를 촉진하여 Ras 단백질과 결합을 촉진하여 Ras 단백질을 활성화 시킨다. 활성화 된 Ras-GTP는 GRPase-activating protein의 촉매작용으로 Ras-GDP로 변화되어 활성이 억제된다. 활성화 된 Ras-GTP는 단백질과 결합하여 다양한 신호전달이 이루어지는데 Raf-MEK (mitogen-activated and extracellular-signal regulated kinase)-ERK (extracellular signal-regulated kinase) 경로는 세포의 증식, 생존 및 분화 등 성장 발달과 큰 관계를 보이며 암 발생과도 연관되는 것으로 알려져 있다 (Schubbert et al., 2007). 대부분의 성장인자의 종류로는 표피성장인자 (epidermal growth factor, EGF), 혈관 내피 성장 인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 인슐린 성장인자 (insulin growth factor, IGF) 등이 있다. Tyrosine kinase receptor와 연관된 세포막 내부 표면에서 Ras 단백질에 의해 세포 신호체계 경로가 활성화된다. 위에서 언급된 바와 같이 Ras 단백질은 Ras/Raf/MEK/ERK 순서의 연쇄 반응을 활성화 시킨다. 이를 MAPK 경로 (mitogen-activated protein kinase pathway)라고 하며, 이 경로는 유전자의 전사인자를 활성화 시켜 순환성 단백질의 유전자 전사를 증가시키게 되며 (Welling, 2007), MAPKs는 cell cycle progression, 세포분화, 활성, apoptosis에 중요한 protein으로 RET 수용체가 활성화 되면 downstream cascade인 Ras-MAPK (ERK) 경로가 활성화된다. 본 연구에서 phloroglucinol을 처리한 HT-29 세포를 회수하여 Ras의 발현 양과 하위단계인 Raf, MEK, phospho-ERK의 발현이 농도 의존적으로 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 HT-29 세포에 phloroglucinol을 처리 하므로 인해 Ras-MAPK (ERK) signaling pathway에도 영향을 주는 것으로 추측된다 (Fig. 20-21).

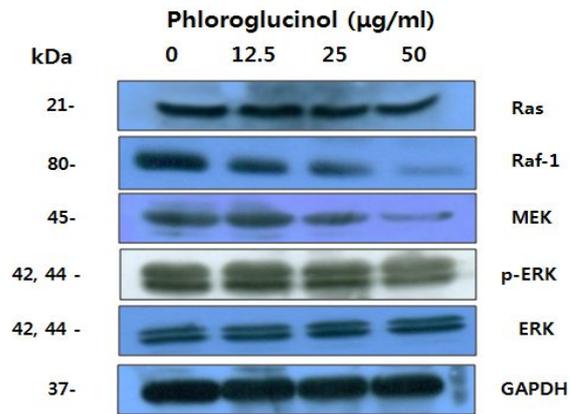
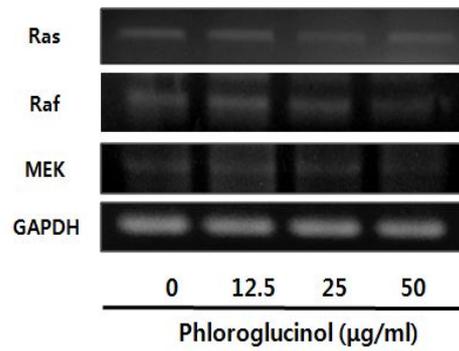
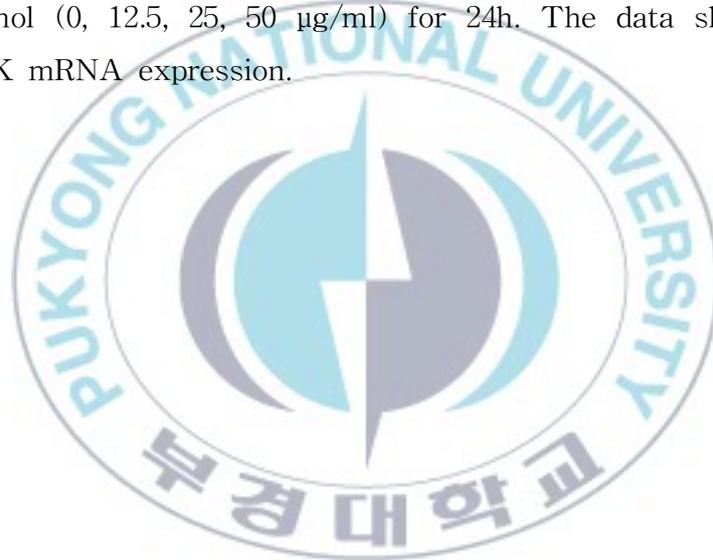


Fig. 20. Effect of phloroglucinol on the expression levels of Ras, Raf, MEK, ERK. Cells were lysed and the cell lysates were analysed by western blot with Ras, Raf, MEK, ERK antibody.





**Fig. 21. Effect of phloroglucinol on the mRNA expression levels of Ras, Raf, MEK.** Cells were treated with varying concentrations of phloroglucinol (0, 12.5, 25, 50 µg/ml) for 24h. The data shown Ras, Raf, MEK mRNA expression.



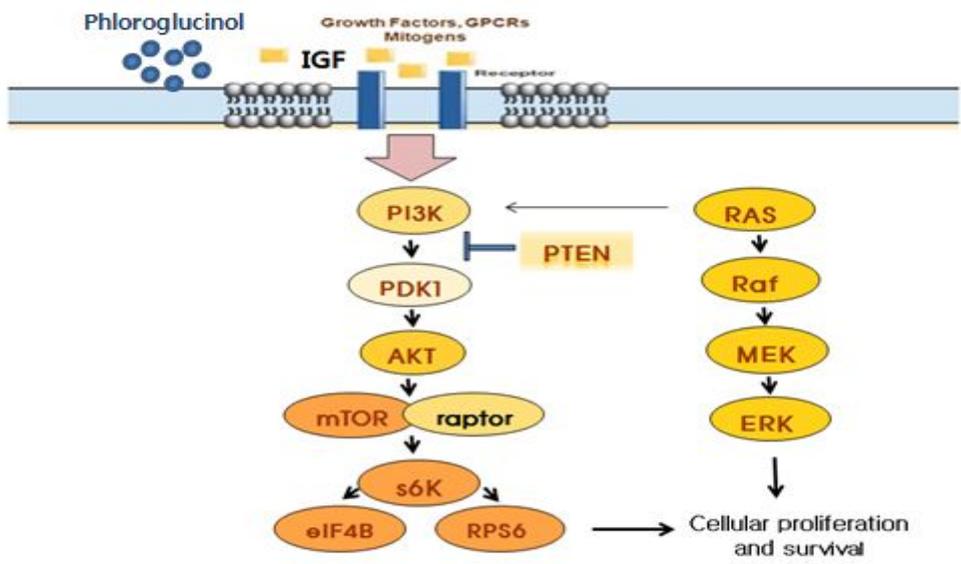
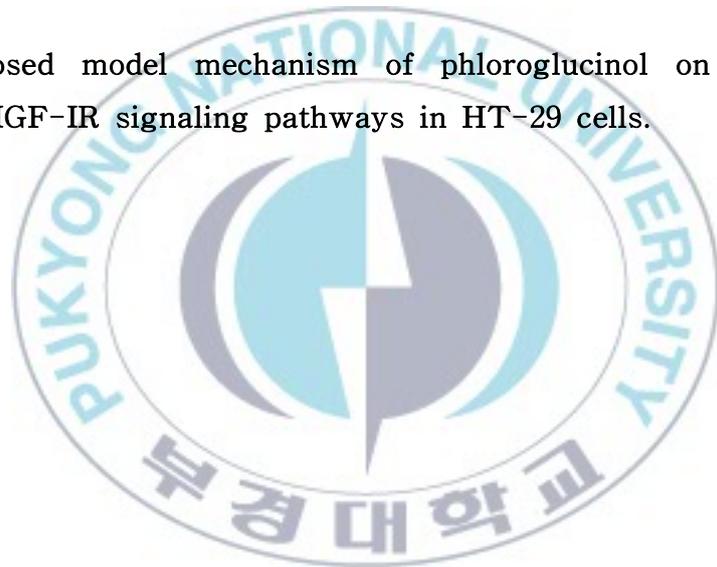


Fig.22. Proposed model mechanism of phloroglucinol on the inhibition of IGF-IR signaling pathways in HT-29 cells.



## 5) ErbB 관련 단백질 분석

ErbB receptor family 신호 전달 과정을 통해 세포의 증식 및 분화, 사멸, 혈관 생성에 관여하며 이들은 lateral signaling을 통해서 같은 family 안에서 상호작용을 하기도 한다. 따라서, ErbB receptor family 활성화의 비정상적인 조절이 암 발생의 중요한 원인으로 보고되고 있다 (Engelman and Cantley, 2006). Receptor tyrosine kinase인 ErbB receptor family는 표피 성장인자 수용체 (Epidermal growth factor receptor)인 ErbB1 (HER1)을 포함한 ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3), ErbB4 (HER4)의 구성원으로 알려져 있으며, 단량체 형태로 존재하는 막 당 단백질이다 (Lemmon and Schlessinger, 1994). ErbB receptor의 경우 여기에 결합하는 ligand는 여러 종류가 있는데 EGF와 transforming growth factor- $\alpha$ 는 EGFR에 결합하고, heregulin (HRG)은 ErbB3와 ErbB4에 결합한다. 또한, HRG는 ErbB2와 coexpress되며 ErbB2는 ErbB3와 heterodimerization을 통하여 autocrine activation 된다 (Venkateswarlu et al., 2002). Ligand가 ErbB receptor의 extracellular domain에 결합하면 receptor의 dimerization이 일어나며 intrinsic tyrosin kinase가 활성화되어 receptor의 cytoplasmic domain의 tyrosine 잔기의 인산화가 일어난다. 인산화 된 tyrosine 잔기는 intracellular signaling protein의 결합자리의 역할을 하게 된다 (Toker et al., 1997).

본 연구에서는 phloroglucinol을 처리한 HT-29 세포를 회수하여 western blot을 통해 ErbB receptor와 Shc, Grb2의 발현양을 확인하였다. 그 결과, phloroglucinol을 HT-29 세포에 처리 하였을 때 ErbB2, ErbB3와 하위 단계인 Shc, Grb2의 발현양이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 HT-29 세포에 phloroglucinol을 처리 하므로 인하여 ErbB receptor를 통한 signaling pathway에도 영향을 주는 것으로 추측된다 (Fig. 23).

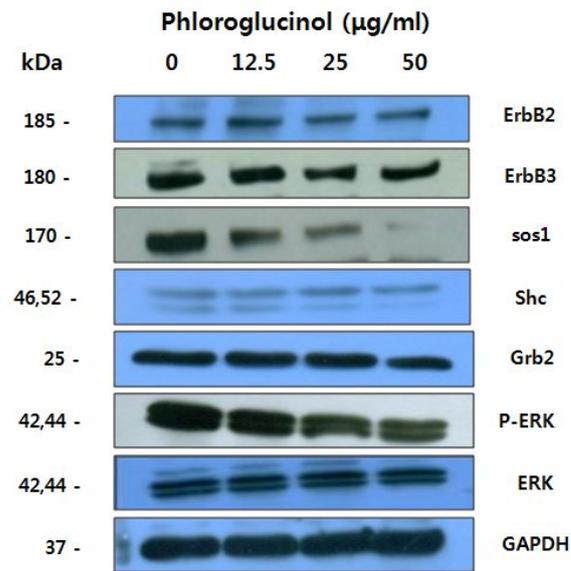


Fig.23. Phloroglucinol affects the expression of ErbB receptor binding proteins in HT-29 cells. Cells were treated with varying concentrations of phloroglucinol (0, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) for 24h. The data shown ErbB2, ErbB3, shc, Grb2 proteins.

#### IV. 결론 및 요약

최근 생활수준의 향상으로 식습관에 기인하는 여러 가지 만성질환의 증가로 인해 평균 수명의 연장과 건강에 대한 관심이 높아지면서 면역증진 개선, 항산화, 항암 등의 생리활성을 갖는 천연물에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Sun and Tanumihardjo, 2007). 그 중 해조류로부터 다양한 생리활성 물질들의 구조와 생리기능들이 확인되면서 기능성 식품으로서의 개발도 활발하게 진행되고 있다.

본 연구에서는 phloroglucinol이 인체 유래 대장암 세포 (HT-29) 증식에 어떠한 영향을 미칠 것인가에 대한 연구를 수행한 결과, 세포 생존율이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인 하였으며 위 장관 정상세포인 IEC-6 세포에서는 세포독성이 없는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 또한, 생존한 세포와 사멸된 세포의 DNA를 DAPI 염색법을 통하여 핵의 형태학적 변화를 살펴 본 결과 농도 의존적으로 일정하지 않은 핵의 형태를 확인할 수 있었다 (Fig. 2-3). 이러한 결과를 바탕으로 phloroglucinol에 의한 세포증식 억제와 세포사멸사인 것을 단백질 발현 등을 통하여 확인하였다. 세포사멸경로는 Fas나 TRAIL 경로를 통하여 조절되며, Fas 매개 세포사멸 경로에서 하위단계에 caspase라는 효소가 관여를 하는데, 이 효소는 세포의 유지와 증식에 필요한 단백질을 분해하는 효소로서 세포사멸의 실행자로 작용하며 (Chuns et al., 1998), caspase-8은 cell death ligand가 receptor에 결합이 되면 활성이 일어나 effector caspase인 caspase-3을 활성화 시킨다 (Li et al., 1998). 본 연구에서는 caspase activity의 발현을 측정 한 결과, phloroglucinol에 의해 caspase-3, caspase-8의 활성이 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 9). Apoptosis 유도에서 phloroglucinol을 0, 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도별로 24시간 처리하였을 때, Fas, FADD, cleaved PARP, cleaved caspase 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 5-6).

Bcl-2 family 단백질들은 미토콘드리아의 막 투과성을 조절하는 단백질로 미토콘드리아를 통한 apoptosis의 경로를 조절하는데 중요한 역할을 담당하며 종류에 따라 apoptosis를 유도하는 반면, anti apoptosis를 조절하기도 한다. 그 중 bax는 apoptosis가 발생할 경우에는 미토콘드리아 내에 cytochrome c의 세포질 방출을 방어해 주는 역할을 하며, 세포질로 방출되어진 cytochrome c는 Apaf-1과 결합하여 apoptosome을 형성한 후 caspase-3의 활성을 유도하여 세포사멸에 이르게 한다 (Lavrik et al., 2005). 따라서 본 연구에서는 bcl-2 family proteins의 발현으로 인한 apoptosis를 확인 하였으며, cytochrome c가 미토콘드리아에서 세포질로의 방출이 phloroglucinol을 농도별로 처리 하였을 때, 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 7-8). 세포주기는 복제와 분열을 반복하는 과정으로 일정한 순서에 의해 이루어지는데 이 순서들의 조절이 불균형해지면 세포주기의 유지가 어려워지게 된다. 불규칙해진 세포주기로 인하여 암이 발생할 수 있는 요인이 되거나 암세포의 성장이 억제되는 것을 통하여 항암효과를 기대 할 수 있다. Phloroglucinol을 HT-29 세포에 처리한 결과 농도 의존적으로 암세포의 성장이 억제 되었으며, 이는 세포주기에서 G0/G1기 arrest 유발에 의한 것으로 확인 할 수 있었다 (Fig. 11-12). 또한, phloroglucinol에 의한 HT-29 세포에서 G0/G1 arrest가 일어날 때 세포주기를 조절하는 단백질들의 발현을 확인 한 결과, 불균형해진 세포주기의 변화를 확인 할 수 있었다 (Fig. 13). Phloroglucinol을 인체 유래 대장암 세포주인 HT-29 세포에 처리하여 Insulin like growth factor인 IGF-I receptor pathway와 PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, Ras/MAPK (ERK) signaling pathway와 관련된 단백질 및 mRNA 발현 확인을 통해 phloroglucinol에 의한 HT-29 세포의 성장 저해를 확인하였다 (Fig. 16-21). 세포성장은 여러 가지 인자들에 의해 조절되는데 IGF-I은 인슐린과 유사한 구조를 가지며 성장 촉진 및 세포사멸 억제효과를 나타내며, 세포 표면의 IGF-IR와 결합하여 세포내

다양한 신호전달경로를 활성화 한다. IGF-IR가 활성화되면 Insulin receptor substrate (IRS) family 단백질들이 인산화 되어 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway와 Mitrogen-activated protein kinase (MAPK) pathway와 같은 세포 내 신호전달경로를 활성화 시켜 세포증식 및 생존을 유도하게 된다 (Vanhaesebroeck et al., 1997). Phloroglucinol 처리로 인한 세포사멸은 Fas를 통하여 이루어지는데 세포 사멸경로와 IGF-IR를 통한 세포성장 경로와의 연관성을 caspase inhibitor 처리로 확인하였다 (Fig 14). IGF-IR를 통한 세포성장경로와 관련하여 mTOR은 세포증식, 성장, 물질대사 등 여러 가지 중요한 역할을 하며, 다양한 암세포에서 PI3K/Akt/mTOR 신호경로를 통해 암세포의 성장과 증식을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이 과정에서 Ras/MAPK (ERK) 신호경로가 활성화되어 mTOR 경로와 서로 영향을 주고 받으며, phloroglucinol에 의한 HT-29 세포의 성장신호 전달과정 억제를 확인 할 수 있었다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때, phloroglucinol 처리에 의한 HT-29 세포에서 Fas의 경로를 통해 caspase가 활성화되어 apoptosis를 유발하여 인체 유래 대장암 세포의 증식을 억제하는 것을 확인하였으며, 세포의 증식과 성장에 관여하는 IGF-I receptor signaling pathway와 PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, Ras/MAPK (ERK) signaling pathway의 저해도 동시에 일어나는 것으로 확인하였다 (Fig. 16-21).

이러한 결과들은 phloroglucinol에 의한 인체 유래 대장암 세포주인 HT-29 세포에서 Fas의 경로를 통해 caspase가 활성화되어 apoptosis를 유발하여 암세포의 증식이 억제되었으며, 세포성장과 증식에 관여하는 IGF-I receptor signaling pathways와 ErbB receptor family의 하위인자의 저해도 동시에 일어나는 것을 확인하였다. 따라서, phloroglucinol을 이용하여 암 예방 또는 항암작용을 가지는 항암소재 또는 기능성 식품 개발에 응용할 수 있음을 제안 할 수 있다.

## V. 참고 문헌

- Ahn MJ, Yoon KD, Min SY, Lee JS, Kim JH, Kim TG, Kim SH, Kim NK, Huh H, Kim JW. (2004). Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*. *Biol Pharm Bull.* 27, 544-547.
- Andersen C, Adamsen L, Moeller T, Midtgaard J, Quist M, Tveteraas A, Rorth M. (2006). The effect of a multidimensional exercise programme on symptoms and side-effects in cancer patients undergoing chemotherapy the use of semi-structured diaries. *Eur J Oncol Nurs.* 10, 247-262.
- Antonsson B, Martinou JC. (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.* 256, 50-57.
- Bruna P, Margaret K, Antonio G. (2000). Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia.* 42, 291-299.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15, 269-290.
- Carnero A. (2010). The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des.* 16, 34-44.
- Chen S, Fu L, Raja SM, Yue P, Khuri FR, Sun SY. (2010). Dissecting the roles of DR4, DR5 and c-FLIP in the regulation of geranyltransferase I inhibition-mediated augmentation of TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer.* 9, 23-37.
- Chi BH, Chang IH. (2010). Prostate cancer: recent trends in Korea. *Urol Int.* 85, 88-93.

- Chuns SY, Hsueh AJW. (1998). Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod Immunol.* 39, 63-75.
- Clarke PG, Clarke S. (1995). Historic apoptosis. *Nature.* 6554, 230.
- Colussi PA, Kumar S. (1999). Targeted disruption of caspase genes in mice: what they tell us about the functions of individual caspases in apoptosis. *Immunol Cell Biol.* 77, 58-63.
- Cotter TG, Glynn JM, Echeverri F, Green DR. (1992). The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle. *Anti cancer Res.* 12, 773-779.
- Czech MP. (1989). Signal transmission by the insulin like growth factors. *Cell.* 59, 235-238.
- Donovan M, Cotter TG. (2004). Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase independent cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1644, 133-147.
- Elizabeth Y, Jiping Z, Jennifer J, Lawrence HB, Cralg BT, Korsmeyer SJ. (1995). Bad, a heterodimeric partner for bcl-xl and bcl-2 displaces bax and promotes cell death. *Cell.* 80, 285-291.
- Elledge SJ, Harper JW. (1994). Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol.* 6, 847-852.
- Engelman JA, Cantley LC. (2006). The role of the ErbB family members in non-small cell lung cancers sensitive to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Clin Cancer Res.* 12, 4372-4376.
- Evans VG. (1993). Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int.* 17, 461-476.

- Giannakakis L, Nakopoulou, Daphnis E. (2011). The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin. *Nephrol Dial Transplant.* 26, 498-508.
- Groww A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899-1911.
- Han SI, Kim YS, Kim TH. (2008). Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep.* 41, 1-10.
- Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 207, 770-777.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM, Dannenberg AJ. (2001). Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine Relat Cancer.* 8, 97-114.
- Hunter T. (1993). Breaking the cycle. *Cell.* 75, 839-841.
- Jin Z, El-Deiry WS. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 4, 139-163.
- Jones JL, Clemmons DR. (1995). Insulin like growth factor and their binding proteins: biological actions. *Endocrins Rev.* 16, 3-34.
- Kang HS, Chung HY, Kim JY, Son BW, Jung HA, Choi JS. (2004). Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reaction oxygen species (ROS) generation. *Arch Pharm Res.* 26, 286-293.
- Kelly KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG. (1996). Insulin like growth factor binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol.* 28, 619-637.

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26, 239-257.
- Kim GM, Lee AR, Lee KW, Park JY, Chun J, Cha J, Song YS, Kim JH. (2009). Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from cheonggukjang. *J Microbiol Biotechnol*. 19, 997-1004.
- Kim JW, Kim DK, Park JS, Lee YK, Beik KY, Kim SD. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of shark collagens and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. *Korean J Food Preserv*. 16, 419-426.
- 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.
- Lanier J. (2006). Alarming increase in alaska natives. *Int J Cancer*. 18, 409-412.
- Lavrik I, Golks A, Krammer PH. (2005). Death receptor signaling. *J Cell Sci*. 118, 265-267.
- Lee YK, Park SY, Kim YM, Park OJ. (2009). Regulatory effect of the AMPK-COX-2 signaling pathway in curcumin-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sci*. 1171, 489-494.
- Lemmon MA, Schlessinger J. (1994). Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*. 19, 459-563.

- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts AT. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin like growth factor I receptor. *Endocrins Rev.* 16, 143-163.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. (1998). Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94, 491-501.
- Li H, Yuan J. (1999). Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol.* 11, 261-266.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91, 479-489.
- Liu X, Kim C, Yang J, Jemmerson R, Wang X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86, 147-157.
- Marx J. (1994). How cells cycle toward cancer. *Science.* 263, 319-321.
- Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM. (2009). Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol.* 27, 2278-2287.
- Nijhawan LP, Budihardjo D, Srinivasula I, Ahmad SM, Alnemri M, Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91, 479-489.
- Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* 11, 961-971.

- Osaki M, Oshimura M, Ito H. (2004). PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 9, 667-676.
- Park KU, Kim JY, Seo KI. (2009). Antioxidative and cytotoxicity activities against human colon cancer cells exhibited by edible crude saponins from soybean cake. *Korean J Food Preserv*. 16, 754-758.
- Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. (1991). Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol*. 138, 447-453.
- Rosenfeld RG, Lamson G, Pham H, Conover C, De Leon DD, Domovan SM, Ocrant I, Giuglice L. (1990). Insulin like growth factor binding proteins. *Rec Prog Horm Res*. 46, 99-163.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*. 7, 295-308.
- Shariati A, Haghghi S, Fayyazi S, Tabesh H, Kalboland MM. (2010). The effect of exercise on the severity of the fatigue in colonectal cancer patients who received chemotherapy in Ahwaz. *Iran J Nurs Midwifery Res*. 15, 145-149.
- Sherr CJ. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell*. 73, 1059-1065.
- Stewart BW, Kleihues P. (2003). World Cancer Report. *IARC Press Lyon France*. 183-187.
- Stylianou KI, Petrakis V, Mavroeydi S, Stratakis E, Vardaki K, Perakis S, Stratigis A, Passam E, Papadogiorgaki K, Sun T, Tanumihardjo SA. (2007). An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *J Food Sci*. 72, 159-165.

- Toker A, Cantley LC. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*. 387, 673-676.
- Vanhaesebroeck B, Leeyers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. (1997). Phosphoinositide 3-kinase: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci*. 22, 267-272.
- Valentinis B, Reiss K, Baserga R. (1998). Insulin like growth factor-I mediated survival from anoikis: role of cell adhesion and focal adhesion kinases. *J Cell Physiol*. 176, 648-657.
- Venkateswarlu S, Dawson DM, St Clair P, Gupta A, Willson JK, Brattain MG. (2002). Autocrine heregulin generates growth factor independence and blocks apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*. 21, 78-86.
- Welling DB, Packer MD, Chang LS. (2007). Molecular studies of vestibular schwannomas: a review *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 15, 3410-3416.
- Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D. (1991). Human D type cyclin. *Cell*. 65, 691-699.
- Yu H, Rohan T. (2000). Role of the insulin like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst*. 92, 1472-1489.

## 감사의 글

연구에 전념 할 수 있도록 아낌없는 격려와 저를 믿어주시고  
늘 사랑해주시는 모든 분들께 감사드립니다.

