



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

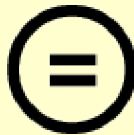
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



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

방사무늬 김 (*Pyropia yezoensis*)에서
얻은 Cyclophilin의 소장상피세포
증식 효과



2018년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 생 명 과 학 과

정 재 훈

이 학 석 사 학 위 논 문

방사무늬 김 (*Pyropia yezoensis*)에서
얻은 Cyclophilin의 소장상피세포
증식 효과

지도교수 남 택 정

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2018년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식 품 생 명 과 학 과

정 재 훈

정재훈의 이학석사 학위논문을
인준함.

2018년 2월 23일



위 원 장 이학박사 최 재 수 (인)

위 원 이학박사 류 은 순 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (인)

목 차

LIST OF FIGURES.....	iii
LIST OF TABLE.....	iv
ABBREVIATIONS.....	v
ABSTRACT.....	vii
 I. 서론.....	 1
 II. 재료 및 방법.....	 5
1. 재료.....	5
가. 시약 및 재료.....	5
2. 실험방법.....	6
가. 시료의 제조.....	6
(1) pyCyp의 제조.....	6
(2) SDS-PAGE electrophoresis.....	8
나. Cell culture.....	8
다. Cell proliferation assay.....	8
라. Wound healing assay.....	9
마. Western blot.....	9
(1) Total cell lysate 추출.....	9
(2) 단백질 발현 및 분석.....	10
바. Cell cycle analysis.....	10

사. 통계학적 처리.....	11
III. 결과 및 고찰.....	12
1. pyCyp의 정제 및 확인.....	12
2. pyCyp에 의한 IEC-6 정상 소장 상피세포 증식 촉진 효과.....	15
가. pyCyp가 IEC-6 정상 소장 상피세포 증식에 미치는 영향.....	15
나. pyCyp에 의한 IEC-6 세포의 Wound healing 효과.....	19
3. pyCyp에 의한 세포증식 신호전달분석.....	21
가. IGF-IR과 그 하위인자의 발현에 미치는 영향.....	21
나. PI3K/Akt signaling pathway에 미치는 영향.....	24
다. mTOR signaling pathway에 미치는 영향.....	27
라. PI3K의 발현억제가 세포증식에 미치는 영향.....	29
마. EGFR signaling pathway에 미치는 영향.....	31
바. Ras signaling pathway에 미치는 영향.....	33
4. 세포 주기에 미치는 영향.....	35
가. 세포 주기분석.....	35
나. 세포 주기조절 관련 단백질 발현 분석.....	38
IV. 결론 및 요약.....	42
V. 참고문헌.....	46

LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Expression and purification of full length pyCyp protein.
- Fig. 2. Proliferative effect of pyCyp on IEC-6 cells.
- Fig. 3. Photomicrography of pyCyp treatment in IEC-6 cells.
- Fig. 4. pyCyp affect migration of IEC-6 cells.
- Fig. 5. pyCyp affect the protein expression of IGF-IR related protein in IEC-6 cells.
- Fig. 6. Effect of pyCyp treatment on PI3K/Akt signaling related protein expression in IEC-6 cells.
- Fig. 7. Effect of pyCyp treatment on mTOR signaling protein expression in IEC-6 cells.
- Fig. 8. Effect of the PI3K inhibitor (LY294002) on the pyCyp-induced IEC-6 cells.
- Fig. 9. Effect of treatment with pyCyp on EGFR related protein expression levels in IEC-6 cells.
- Fig. 10. Effects of treatment with pyCyp on Ras signaling related protein expression levels in IEC-6 cells.
- Fig. 11. Representative DNA histograms on cell cycle profile of IEC-6 cells.
- Fig. 12. Effect of pyCyp treatment on cell cycle related proteins expression in IEC-6 cells.
- Fig. 13. The proposed model of proliferation mechanism by pyCyp treatment in IEC-6 cells.

LIST OF TABLE

Table. 1. The primer of Cyclophilin from *P. yezoensis* used in PCR



ABBREBIATIONS

BCA : Biinchoninic acid

BSA : Bovine albumin serum

CBB : Coomassie blue brilliant

Cdk : Cyclin dependent kinase

Cyp : Cyclophlin

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

EGF : Epidermal growth factor

EGFR : Epidermal growth factor receptor

ERK : Extracellular-signal regulated kinase

FBS : Fetal bovine serum

FGFR : Fibroblast growth factor receptor

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GEF : Guanine nucleotide exchange factor

Grb2 : Growth factor receptor-bound protein

GTP : Guanosine triphosphate

HGFR : Hepatocyte growth factor recprtor

IGF : Insulin-like growth factors

IGF-IR : Insulin-like growth factor receptor

IPTG : Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside

IRS : Insulin receptor substrates

kDa : kildalton

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MEK : Mitogen-activated and extracellular-signal regulated kinase

mTOR : mammalian Target of rapamycin

MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

M phase : Mitotic phase

PBS : Phosphate-buffered saline

PDK1 : Phosphoinositide-dependent kinase-1

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PLC : Phospholipase C

PPIase : Peptidylprolyl-isomerase

pyCyp : *pyropia yezoensis* Cyclophilin

P/S : Penicillin/streptomycin

Rb : Retinoblastoma protein

RTK : Receptor tyrosine kinase

R point : Restriction point

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SFM : Serum free medium

SH : Src homology

Shc : Src homology collagen domain protein

S phase : Synthesis phase

VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor

VSMC : Vascular smooth muscle cell

The proliferative effect of Cyclophilin from *Pyropia yezoensis* in intestinal epithelial cells

Jae Hun Jung

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

Abstract

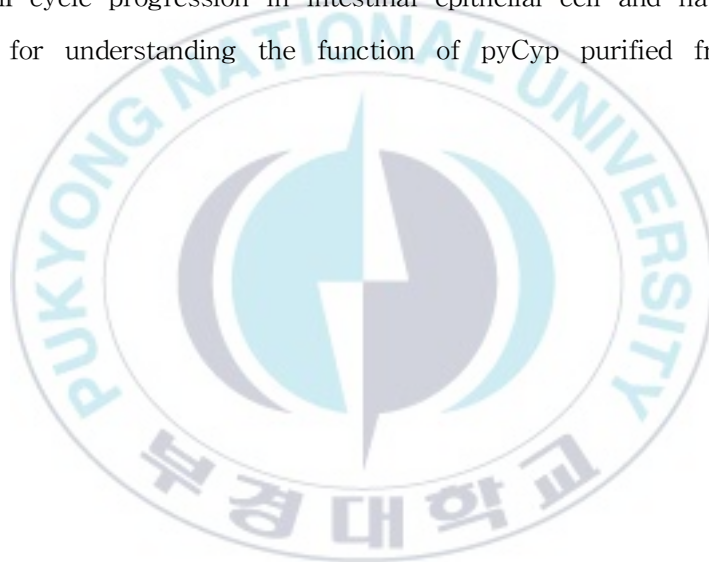
Pyropia yezoensis (*P. yezoensis*) is a marine algae that has antioxidant, anti-inflammatory, antitumor and anti-aging activities. Cyclophilin (Cyp), known as Peptidyl-prolyl isomerase (PPIase), has many function that include immune response regulation, antioxidants, cell proliferation regulation etc. Recombinant Cyp from red algae, is known to effect on development and growth of organism and it has effect of antioxidants and antifungal activity. But, other biological effect of recombinant Cyp is unclear.

Intestinal epithelial cells have a life span of 3 to 5 days and maintain their population by periodic proliferation. When they are damaged, they recover the injured area through proliferation. So, intestinal epithelial cell proliferation is essential. In this study, we examined effect of recombinant Cyp from *Pyropia yezoensis* (pyCyp) on IEC-6 cells. First, the MTS assay showed that pyCyp increased cell proliferation in a dose-dependent manner.

We focused on two cell proliferation mechanism. One is IGF-IR signaling pathway, the other is EGFR signaling pathway. Both of the signaling pathway are essential in regulation of cell growth, proliferation and survival. pyCyp stimulate IGF-IR that induce intracellular signal transduction cascades,

including the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway and mTOR pathway. EGFR stimulated by pyCyp induce intracellular signaling pathway including Ras signaling pathway. Also, we observed cell cycle related protein. pyCyp increased expression of Cyclin A, Cyclin E, Cdk2 and decreased in protein levels of p27 and p21. It means pyCyp promote Cell cycle progression by increasing S phase percent.

These results indicate that pyCyp stimulate cell proliferation via IGF-IR and EGFR signaling pathway that induce downstream signaling pathway and promote cell cycle progression in intestinal epithelial cell and have important implication for understanding the function of pyCyp purified from *Pyropia yezoensis*.



I. 서론

대양, 바다는 지구에서 대륙보다 넓은 면적을 차지하고 많은 해양 유기체들이 살고 있으며 풍부한 자원을 제공하고 있다. 이 중에서 해조류는 광합성을 하며 바다에 서식하는 식물을 통틀어 일컫는 말로 전 세계적으로 약 25,000종이 있으며, 우리나라 연안에는 600여종 이상 서식하고 있다. 기원전 3000 여 년부터 아시아, 그리스/로마를 비롯한 유럽, 아메리카, 하와이 등 여러 나라에서 이용되어 왔다. 식량을 위한 음식만이 아니라 갑상선, 설사, 타박상, 창상 등 상처와 질병을 치료하거나 예방하기 위한 의약품으로도 이용되어왔고 최근에는 피부노화방지, 자외선으로부터 피부보호를 위한 화장품의 소재로도 활용되고 있다 (Maryam A et al, 2017). 그리고 해조류가 지닌 다당류, 단백질 및 천연물들이 항고혈압, 항당뇨, 항암 그리고 간질환 예방 효과가 있는 것이 알려져 주목받기 시작하였고, 이들을 분리/정제하는 기술개발연구와 함께 이들이 작용하는 활성메커니즘을 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 해조류에서 분리한 생리활성물질은 식품 및 의약소재로서 활용되어 고부가가치 산업으로 자리매김하고 있다 (Lee, 2011). 해조류 중에서도 방사무늬 김 (*Pyropia yezoensis*)은 홍조류에 속하는 해조류로서 우리나라를 비롯한 중국, 일본에서 전통적으로 식품으로써 많이 소비되어 왔으며 해조류 중에서도 양질의 단백질과 포피란, polysaccharide, 비타민 등 각종 대사산물들을 많이 함유하고 있다 (Cian et al, 2015). 방사무늬 김에서 유래한 펩타이드는 항암효과를 가지고 있고 (Park et al, 2015) 이 외에도 항염증효과 (Lee et al, 2015), 피부 콜라겐 합성촉진 효과 (Kim et al, 2017) 및 상피세포증식효과 (Lee et al, 2015) 등 다양한 생리활성기능을 가진 것으로 알려져 있다.

Cyclophilin (Cyp)은 Immunophilin 중 하나로서 PPIase activity를 가지고 있으며 (Kumari et al, 2013; Nigro et al, 2013) prokaryotes와 eukaryotes를 포함한 대부분의 유기체, 세포들에게서 존재한다 (Hoffmann and Schiene-Fischer, 2014). Cyp는 면역세포에 영향을 주고 (Yurchenko et al, 2010), 항산화효과 (Kim et al, 2015) 등 다양한 기능을 가지고 있고 Vascular smooth muscle cell (VSMC) 등 일부세포의 성장을 촉진시키기도 한다고 알려져 있다 (Sato et al, 2008). 이 외에도 Cyp는 Cell migration을 통해 손상된 조직을 완화시키는 기능도 있다 (Obchoei, 2009). 그리고 Cyp은 Cyp A, Cyp B, Cyp C, Cyp D 등 다양한 종류가 있는데 사람의 경우 18종류의 Cyp을 가지고 있으며 (Hoffmann and Schiene-Fischer 2014) 식물처럼 광합성을 하는 기관에 풍부하다고 하는데 대표적으로 애기장대 식물인 *Arabidopsis* 속에는 29개의 Cyp 유전자가 존재하고 있다 (Chou and Gasser, 2004). 해조류 역시 광합성을 하기 때문에 Cyp가 많이 존재한다고 알려져 있는데 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*에는 26개의 Cyp 유전자가 존재하고 (Vallon, 2005) 모무늬돌김 (*Pyropia seriata*), 참김 (*Pyropia tenera*), 방사무늬 김 (*Pyropia yezoensis*)을 포함한 김에서도 Cyp 유전자가 존재한다. 생리활성과 관련한 Cyclophilin의 기능이 알려지긴 했으나 아직 소화기관과 관련한 생리활성기능은 밝혀지지 않은데다 특히, 해조류가 가진 Cyclophilin이 인체의 생리활성에 미치는 효과는 아직까지 밝혀지지 않았다.

소장상피세포는 영양소의 흡수 및 소화를 담당하고 외부항원이나 유해물질로부터 보호하는 기능을 가지고 있다 (Kohlhofer et al, 2016). 그러나 이들은 대개 3일에서 5일정도 수명을 가지고 있기 때문에 수명이 다한 세포는 Apoptosis에 의해 자연사멸하고 새로이 증식하여 일정하게 개체 수를 유지한다 (Park et al, 2015). 이러한 특성을 가진 소장상피세포는 다양한

인자에 의한 세포의 증식 또는 Apoptosis 효과에 관한 연구에 많이 이용되어 왔다 (Grajek W and Olejnik A, 2004). 수명이 다한 소장상피세포는 소화기능을 수행하지 못하기 때문에 이를 주기적으로 대체해야만 소화기능을 유지할 수 있다. 뿐만 아니라, 노화 혹은 기타 염증반응에 의해 세포의 사멸이 증가하여 소장상피세포 수의 균형이 무너지게 되면 헬리코박터, 살모넬라 등과 같은 병원균에 감염되어 소장관련 질병에 걸릴 확률이 높아지게 된다 (Negroni et al, 2015). 따라서 소장상피세포의 증식은 일정수준에서 항상 유지되어야 한다.

Insulin like growth factor I receptor (IGF-IR)는 세포의 생존 및 증식과 관련한 신호전달 메커니즘에서 중요한 역할을 수행한다 (Galvan et al, 2003). IGF-IR은 세포 표면에 존재하여 IGF-I과 결합하고 수용체가 인산화 되면서 활성을 나타내고 세포 내 다양한 신호전달경로를 진행시킨다 (Annunziata et al, 2011). IGF-IR가 활성화되면 여기에 결합하는 단백질인 IRS1, Shc 등 관련인자들이 결합하게 되고 특히, IRS1은 인산화 된 IGF-IR에 결합하여 인산화 되면서 이후 Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway와 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway 같은 하위 신호전달경로를 활성화시켜 세포의 성장 및 분화, 증식을 촉진시킨다.

IGF-IR와 마찬가지로 세포증식에 관여하는 EGFR 역시 세포의 증식과 관련한 신호전달 메커니즘에서 중요한 역할을 수행한다. EGFR은 Epidermal growth factor (EGF)와 결합하면서 인산화에 의해 활성을 띠게 되어 세포 내 신호전달경로를 진행시킨다. 활성화된 EGFR에 Grb2, Sos1 이 결합하여 Ras를 비롯하여 PI3K/Akt 등 다양한 신호전달 경로를 활성화시키고 이후 MEK-ERK 등 하위 신호전달경로를 진행시켜 세포 성장, 증식을 촉진시키게 된다 (Wee and Wang, 2017).

앞서 설명한 Cyclophilin이 일부세포의 성장을 촉진시키기도 한다고 알려져 있지만 제한적이고, 소화기관과 관련된 세포에는 어떠한 효과가 있는지 아직 밝혀지지 않았다. 그리고 해조류가 가진 Cyclophilin이 소장상피세포에 대한 효과는 알려져 있지 않기 때문에 본 연구에서는 방사무늬 김에서 얻은 Cyclophilin이 소장상피세포인 IEC-6 cell에 어떠한 효과가 나타나는지 살펴보고 그 효과와 관련하여 세포신호전달이 어떤 메커니즘으로 이루어지는지 같이 살펴보았다.



II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 시약 및 재료

본 실험에서 사용한 세포는 ATCC에서 구입한 정상 소장상피세포주인 IEC-6 (Intestinal epithelial cell-6, Rat)를 사용하였다. 세포배양에 사용된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), Penicillin/streptomycin (P/S), Phosphate-buffered saline (PBS)는 Gibco BRL (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)제품을 사용하였고 Trypsin, Bovine serum albumin (BSA), Protease inhibitor 등은 Sigma Chemical CO. (Logan, UT, USA)제품을 사용하였다. 세포의 배양과 생존율을 측정하기 위해 MTS/PMS Solution (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay kit)은 Promega에서 구입, 사용하였으며 세포 단백질 농도를 측정하기 위해 BCA protein Assay kit (Pierce, USA)를 구입, 사용하였다.

Western blot에서 Protein standard marker는 Dual color marker (BIO-RAD, USA)제품을 사용하였고, 사용한 각종 antibody는 Santa Cruz (CA, USA), Cell signaling (Beverly, MA, USA), Bethyl (Montgomery, TX, USA)에서 구입하였으며, Detection Reagent로 Supersignal West Pico Luminol/Enhancer Solution과 Supersignal West Pico Stable Peroxide Solution (Pierce, USA)을 이용해 Bioanalytical Imaging System C300 (Azure Biosystems, Inc., Dublin, CA, USA) 분석 장비로 단백질 밴

드를 정량하였다.

2. 실험방법

나. 시료의 제조

(1) pyCyp의 제조

*Pyropia yezoensis*의 genomic DNA (residue 1-165; Genbank: KJ728870.1)에서 Cyp gene의 open reading frame을 PCR로 증폭하여 얻은 다음 DNA 조각을 *E.coli* BL21 (DE3)의 expression vector에 주입하였다 (Table. 1). *E.coli*는 ampicillin (50 µg/mL)을 포함한 LB medium에서 배양하였고, 흡광도 (OD₆₀₀)가 0.6 ~ 0.8을 기록했을 때, 37°C에서 0.5 mM Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 처리하여 Cyp 발현을 유도하였다. 이후 Cell은 8000 g, 4°C, 10분 간 원심분리하여 모은 다음, lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM β-mercaptoethanol)를 사용하여 sonication으로 분해하였다. lysate는 25,000 g, 30분 간 원심분리하여 insoluble material을 제거하였다. 상층은 Ni-NTA affinity resin과 혼합하여 1시간 동안 4°C에서 교반하였다. 그런 다음 Column에 로딩하여 unbound protein은 20 mM imidazole을 채운 lysis buffer를 통해 용출시켰고, Cyp는 250 mM의 imidazole을 채운 lysis buffer에 의해 용출되었다. 이후 TEV protease를 넣고 실온에서 O/N incubation 하여 His-tag를 제거하였고, Centriprep을 이용하여 Cyp를 농축시킨 후 HiPrep Sephacryl S-200 HR을 사용하여 정제하였다.

Table. 1. The primer of Cyclophilin from *P. yezoensis* used in PCR

Gene name	Primer sequence
Cyclophilin (<i>P. yezoensis</i>)	Forward : 5'-GGCCATGGCAATGGGGAACCCGCAGGTGTTCTTTGAC-3' Reverse : 5'-CACTAACGCCTGACGCCGCTCGAGATCGAGCTCGGG-3'

(2) SDS-PAGE eletrophoresis

pyCyp가 발현이 되었는지 확인하기 위해 Ni-NTA affinity chromatography로 분리한 fraction들을 SDS-PAGE에 loading하였고 이를 Coomassie blue brilliant (CBB) Staining을 통해 밴드를 확인하였다. 그리고 Sephacryl S200을 이용한 Size exclusion chromatography를 통해 pyCyp만을 분리하였고, 이를 SDS-PAGE에 loading하고 CBB Staining을 통해 밴드를 확인하였다.

나. Cell Culture

Rat에서 유래된 소장 상피세포인 IEC-6 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, USA) 으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지에 10% FBS와 P/S를 첨가하여 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 세포가 100 mm diameter culture dish에 80% 정도 증식하면 PBS로 세척한 후 trypsin을 사용해 계대배양 하였고 배지는 2일 마다 교환해 주었다.

다. Cell proliferation assay

pyCYP가 IEC-6 세포의 증식을 촉진시키는 효과가 있는지 알아보기 위해 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 세포를 분주한 후 세포부착을 위해 24시간 배양하고, SFM 배지로 4시간 더 배양한 다음 pyCyp를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. MTS/PMS solution (Promega Co,

USA)를 첨가하여 37℃에서 30분 반응시킨 후 ELISA plate reader (BIO-RAD, USA)로 490nm 흡광도에서 측정하였다.

라. Wound Healing assay

pyCyp에 의한 Cell migration의 효과를 확인하기 위해, 6-well plate에 세포를 분주한 후 24시간 뒤 200 µl 피펫의 tip으로 well의 정 가운데 부분을 일직선으로 scratch 하였다. 그 다음 PBS로 세척 후 현미경으로 사진을 촬영하였고, pyCyp를 농도별로 48시간 처리한 다음 배지를 suction하고 PBS로 세척 후 현미경으로 사진을 촬영하였다.

마. Western Blot

(1) Total cell lysate 추출

pyCYP를 처리한 IEC-6 세포를 PBS로 2회 세척하고 protease inhibitor (1 mg/mL aprotinin, 1 mg/mL prpstatin A, 200 mM Na_3VO_4 , 500 mM NaF, 100 mM PMSF) 가 포함된 RIPA lysis buffer(1% Triton X-100, Sodium chloride, sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5% EDTA 2 mM, Tris-HCl, pH 7.5)를 넣어 얼음 위에서 cell lysate를 회수하고 -70℃에 O/N 보관한 다음 원심분리 (12,000 g, 4 °C, 20 min)하여 그 상층액을 회수하여 실험에 사용하였다.

(2) 단백질 발현 및 분석

단백질 농도를 50µg/mL로 정량하여 취한 다음 SDS-PAGE 전기영동한 다음 PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)으로 Membrane은 실온에서 1% BSA-TBS-T로 1시간 blocking 시킨 후 발현을 보고자 하는 각 각의 1차 항체를 1:1,000으로 희석해 4 °C에서 16시간 반응시켰다. TBS-T로 15분간 2회 세척을 하고 2차 항체를 1:10,000 ~ 1:40,000의 범위로 희석해 2시간 반응시킨 후, 다시 TBS-T 15분간 2회 세척하였다. Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/ Enhancer solution (Rockford, IL, USA)을 사용해 Bioanalytical Imaging System C300 이미지 분석 장비로 단백질 밴드를 현상한 후 밴드의 밀도를 측정하였다.

바. Cell cycle analysis

세포주기의 분포도 변화를 살펴보기 위해 P100 plate에 IEC-6 세포를 10% FBS를 함유한 DMEM 배지를 희석해 분주하였고 세포가 60% 증식하면 SFM을 처리하여 4시간 동안 Incubation 한 다음 pyCyp를 농도별로 처리한 다음 48시간 동안 배양하였다. PBS와 Trypsin-EDTA로 세포를 떼어내어 원심분리 하여 상층은 제거하고 pellet만 회수하여 각 군의 tube에 Cell cycle test Reagent와 섞어 5초간 vortex 한 후 실온에서 30분간 암실에 두어 반응시켰다. 반응 후 Muse Cell analyzer 장비를 이용해 측정하였다.

사. 통계학적 처리

본 실험의 분석결과는 각각의 군별로 평균과 표준편차를 사용하여 표기하였으며, 모든 자료는 Window용 SPSS 프로그램 (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 처리하였고, 반복측정에 의한 ANOVA test와 Duncan's multiple range test를 적용하였다. 이 때, 모든 통계적 유의도 수준은 $p < 0.05$ 에서 살펴보았다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. pyCyp의 정제 및 확인

pyCyp를 얻기 위해 실험방법에서 설명한대로 방사무늬 김이 가지고 있는 Cyp의 cDNA를 *E.coli*에 삽입하였다. *E.coli*는 성장속도가 빠르고 높은 밀도에서도 배양가능하며 재조합 단백질 생산속도가 빠르며 비용도 저렴하기 때문에 *E.coli*를 이용하여 원하는 단백질을 발현시키는 방법은 많이 활용되고 있다 (Rosano and Ceccarelli, 2014). *E.coli* 내 단백질 발현을 유도하기 위해 IPTG를 처리하는데 이것은 *E.coli*의 lac operon에서 전사가 이루어지는데 lactose가 존재할 때 lac operon에 결합되어 있는 inhibitor와 반응하여 operon으로부터 이탈시키면서 전사가 진행된다. IPTG는 lactose와 구조가 유사한 물질로 내부에서 분해되지 않기 때문에 인위적으로 단백질 발현을 유도하기 위해 많이 사용되고 있다 (Marbach and Bettenbrock, 2012). pyCyp의 서열을 가지고 있는 *E.coli*가 pyCyp를 발현하는지 확인하기 위해 IPTG로 발현을 유도하기 전 *E.coli*, IPTG로 발현을 유도한 *E.coli* 그리고 IPTG로 발현을 유도한 후 원심분리하여 pellet을 모아 lysis buffer에 넣은 fraction, 이후 Ni-NTA affinity chromatography로 분리한 fraction 별로 그룹을 나누어 SDS-PAGE에 loading하였고 CBB Staining으로 확인한 결과, IPTG로 발현을 유도하기 전과 발현을 유도한 후의 *E.coli*, 원심분리 후 모은 pellet, affinity chromatography로 분리한 unbound fraction과 pyCyp가 발현되어 elution된 fraction들이 나타났다. pyCyp가 발현되어 elution된 fraction들의 lane을 살펴보면 20 kDa 부근에

서 두꺼운 밴드를 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). 그리고 Size exclusion chromatography로 분리 후 SDS-PAGE 및 CBB staining을 한 결과 18 kDa 근처에서 하나의 두꺼운 밴드만 나타난 것을 확인하였다 (Fig. 1B). 이를 통해 pyCyp의 염기서열을 주입한 *E.coli*에서 pyCyp가 발현되었고 이를 분리, 정제되었음을 확인할 수 있었다.



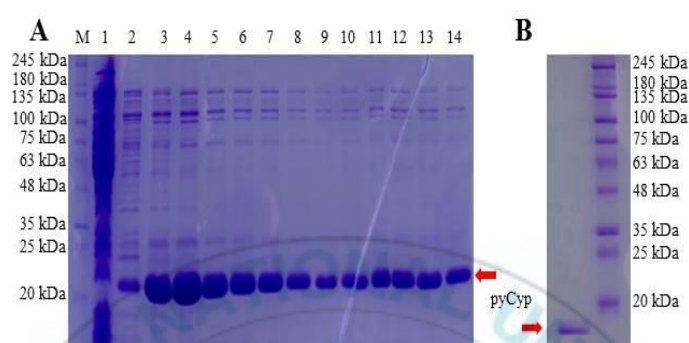


Fig. 1. Expression and purification of full length pyCyp protein.

(A) SDS-polyacrylamide gel shows the expression of the pyCyp. The arrow indicates the pyCyp protein. The whole cell lysate before induction and after induction are shown in lanes 1 and 2. After centrifuge, pellets are shown in lane 3. During the Ni-NTA affinity chromatography, the washing and unbound fractions are shown in lane 4. The elution fractions are shown in lanes 5 to 14. Gel was stained with CBB. Protein molecular weight standards (kDa) are shown in lane M. (B) pyCyp is purified by size exclusion chromatography. One visible band indicates pyCyp completely separated.

2. pyCYP에 의한 IEC-6 정상 소장 상피세포 성장촉진 효과

가. pyCYP가 IEC-6 정상 소장 상피세포 증식에 미치는 영향

소장 상피세포인 IEC-6 세포의 증식과 관련하여 pyCyp가 어떤 효과를 나타내는지 확인하기 위해 MTS assay를 실시하여 viability의 변화를 살펴 보았다. 세포의 viability를 측정할 때 여러 가지 방법이 있지만, 그 중에서도 tetrazolium salt를 이용한 viability 측정법을 많이 사용하고 있다. tetrazolium salt는 3개의 aromatic group과 결합한 화합물로 환원형 화합물 또는 효소와 쉽게 반응하여 발색한다 (Marshall et al, 1995). tetrazolium salt를 이용한 viability 측정법에는 MTT assay, XTT assay, MTS assay 등이 있다. MTS assay는 MTT assay와 마찬가지로 시약이 aromatic group이 결합된 화합물인 tetrazolium salt를 기반으로 하고 있어 세포 내 존재하는 환원효소들과 반응하여 formazan을 생성한다. 생성된 formazan은 490nm에서 흡광도를 측정하여 생성량을 알 수 있다. MTS 시약과 반응하는 세포 내 환원효소는 NADH dehydrogenase와 NADPH dehydrogenase가 있다. 이들 효소는 살아있는 세포에서 활성을 나타내기 때문에 살아있는 세포 수와 formazan의 생성량, 즉 490nm에서 측정한 흡광도 값과 직접 비례한다. MTS와 환원효소들에 의해 생성된 formazan은 수용성을 나타내어 별도의 추가과정 없이 바로 well에서 흡광도 값을 측정하여 처리할 수 있다 (Cory et al, 1991). 이러한 특성으로 MTS assay는 MTT assay에 비해 간편하게 사용할 수 있는 장점이 있다. IEC-6 세포에 pyCyp를 0, 5, 25, 50 pg/mL의 농도로 처리한 다음 48시간 동안 incubation 하였다. 그 결과, pyCyp를 5, 25, 50 pg/mL을 처리했을 때 약 120%, 130%, 140%로 증식하여 농도 의존적인 세포증식이 관찰되었고

(Fig. 2) 현미경 상에서도 pyCyp의 농도에 따라 세포가 증식하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 이 후 실험들은 다음과 같은 농도로 설정하여 진행하였다.



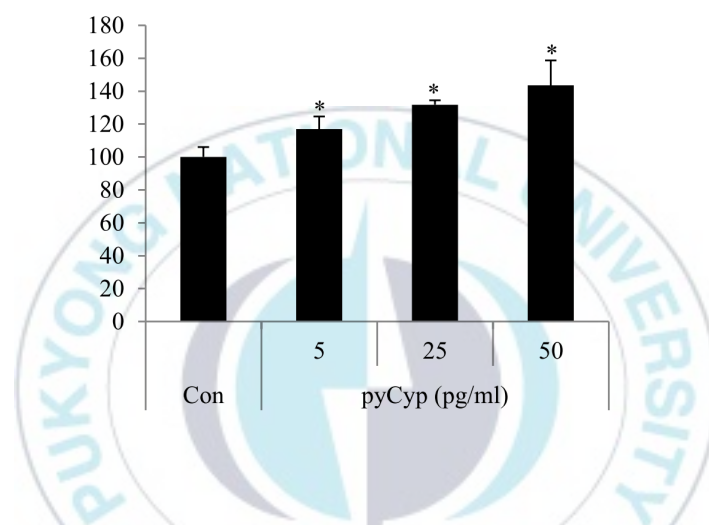


Fig. 2. Proliferative effect of pyCyp on IEC-6 cells.

IEC-6 cells were seeded in 48-well plates at a density of 2×10^4 cells/well with DMEM supplemented with 10% FBS. After incubation for 48 h, cells were serum-starved for 4 h and then treated with pyCyp in the indicated concentrations for 48 h. The results indicated mean $\pm$ S.D. in the three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. corresponding control group.

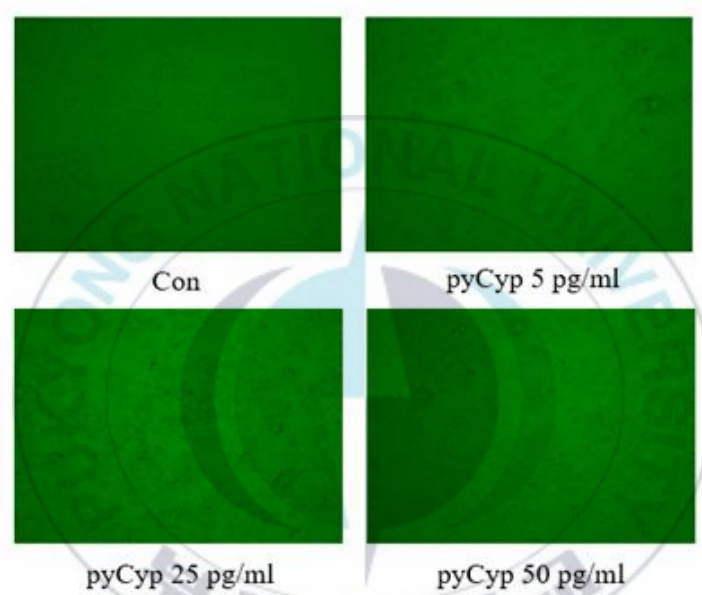


Fig. 3. Photomicrography of pyCyp treatment in IEC-6 cells.

IEC-6 cells were incubated with pyCyp varying concentrations (0, 5, 25 and 50 pg/mL) for 48 h.

나. pyCyp에 의한 IEC-6 세포의 Wound healing 효과

소장상피세포는 손상을 입게 되면 세포의 migration을 촉진하여 손상된 부위를 덮고, 세포가 증식함으로써 소장상피세포의 균형을 유지한다 (Zhang et al., 2014). 앞서 pyCyp가 농도의존적으로 세포증식에 영향을 미치는 것을 확인하였고 본 실험에서는 세포증식을 통한 Cell migration 효과를 확인하기 위해 세포가 배양된 Well 한 가운데 일직선으로 Scratch를 낸 다음 pyCyp를 5, 25, 50 pg/mL 씩 처리하여 48시간 후 Scratch가 난 부분을 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 Control 군에 비해 pyCyp를 처리한 군에서 Scratch가 난 부분이 농도 의존적으로 좁혀졌음을 확인하였다 (Fig. 4A). 그리고 Scratch 간격을 측정하여 비교한 결과, 0.75 mm에서 0.5 mm, 0.45 mm, 0.32 mm, 0.16 mm로 각각 줄어들었다 (Fig. 4B). 이것은 세포증식을 통한 Cell migration이 진행되어 Scratch가 난 부분이 Wound healing이 되었음을 의미한다.

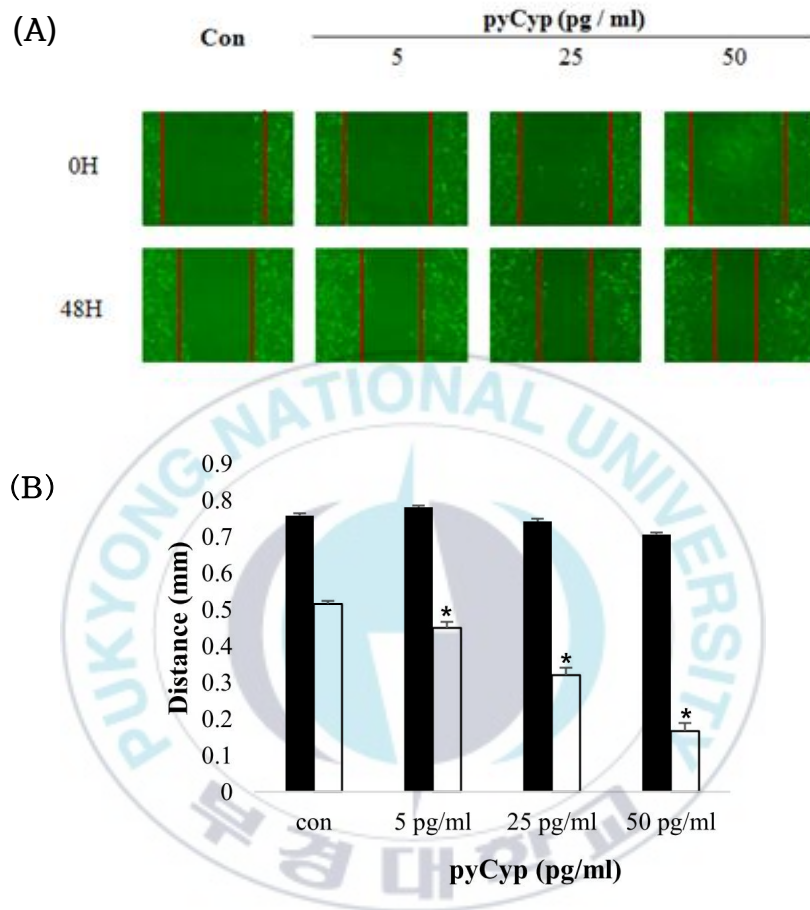


Fig. 4. pyCyp affect migration of IEC-6 cells.

Measurement of cell migration by wound-healing assay to examine the effect of pyCyp treatment on IEC-6 cell migration. pyCyp was treated each concentration (0, 5, 25 and 50 pg/mL) and incubated for 48h (A). Cell migration distance was quantified by distance of monolayer-wounding (B).

3. pyCYP에 의한 세포증식 신호전달분석

가. IGF-IR과 이와 관련된 인자의 발현에 미치는 영향

pyCyp를 농도별로 48시간 동안 처리한 IEC-6 세포에서 IGF-IR와의 결합에 의해 유도된 세포 증식에 미치는 영향에 대해 살펴보았다. IGF-IR에 의한 세포신호전달은 세포증식과 관련한 메커니즘에서 대표적인 신호전달 경로이다.

Insulin-like growth factors (IGF)는 1개의 사슬로 이루어진 polypeptide 이고 이는 생체 내에서 다양한 반응에 관여하는 주요 성장인자 중 하나이다. 주로 간세포에서 합성되지만 일부는 다른 조직에서 autocrine과 paracrine에 의해 분비되는 경우도 있으며 주요 기능은 세포의 성장, 분화, 생존을 촉진시킨다. IGF-I의 생체 내 기능은 IGF receptor type 1과 결합하였을 때 발현된다. IGF-IR는 2개의 α -subunit과 2개의 β -subunit으로 구성되어 있는데, β -subunit은 transmembrane domain, juxtamembrane domain, tyrosine kinase domain과 C-말단 꼬리로 구성되어있다 (Annunziata et al, 2011). IGF-IR에 결합하게 되면 autophosphorylation이 되어 Insulin receptor substrates (IRSs), Src homology (SH), collagen domain protein (shc)을 통해 세포 내 신호전달 경로가 진행된다 (Butler et al., 1998). 앞서 우리는 MTS assay를 통해 pyCyp에 의한 세포 증식효과를 확인하였다 (Fig. 3). pyCyp에 의한 세포증식효과가 IGF-IR로부터 시작하는 세포신호전달에 의한 것이라고 가정하고 IGF-IR 활성화 및 그 하위 인자들의 신호전달경로 활성화에 대하여 살펴보았다. pyCyp를 처리하였을 때 인산화에 의한 IGF-IR의 활성화가 농도의존적으로 증가하였음을 확인할 수 있었고 그 하위인자인 IRS1의 인산화와 Shc의 발현량 모두 증가하였음

을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 이후 다음 실험에서는 IGF-IR 신호전달경로의 하위경로인 PI3K/Akt pathway를 살펴보았다.



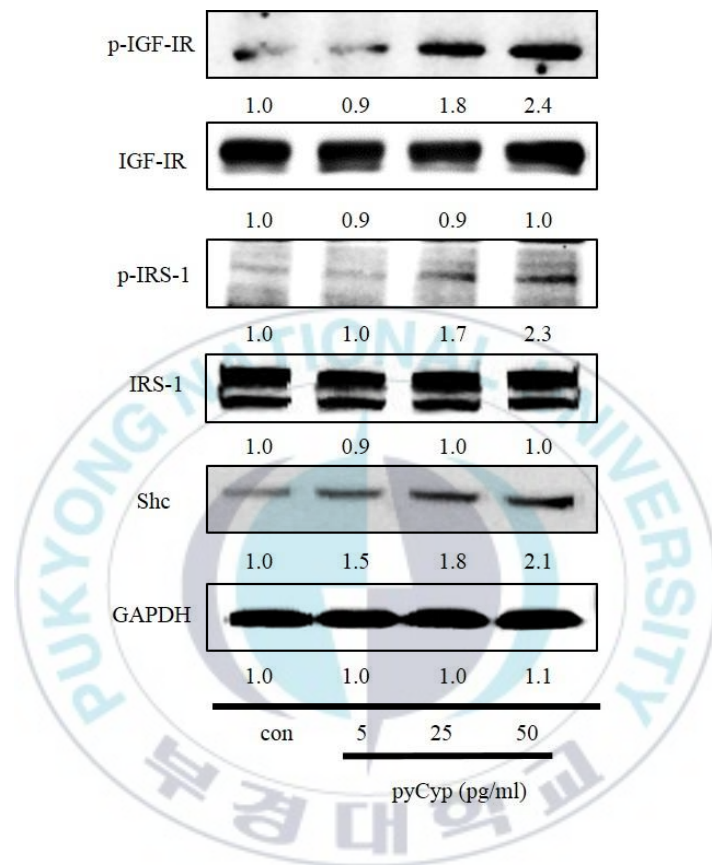


Fig. 5. pyCyp affect the protein expression of IGF-IR related protein in IEC-6 cells.

Cells were treated with pyCyp after preincubation with SFM for 4 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-IGF-IR, anti-p-IGF-IR, anti-IRS-1, anti-p-IRS-1, anti-Shc, and anti-GAPDH antibodies.

나. PI3K/Akt signaling pathway에 미치는 영향

앞선 실험에서 pyCyp에 의한 IGF-1R와 관련인자들의 활성을 살펴보았다. PI3K/Akt signaling pathway에서 PI3K는 다양한 신호전달경로에서 조절작용을 하는 중요한 인자로 알려져 있다. 주로 조절하는 것은 세포의 증식 및 생존, 성장, 분화 등의 세포 기능이다. 이것은 2개의 subunit 즉, p85와 p110으로 이루어져 있으며 각각 조절작용과 촉매작용을 하는 것으로 알려져있고 IGF-1R, EGFR, non-receptor tyrosine kinase에 의해 활성화된다 (Krasilnikov, 2000). PI3K의 활성화에는 두 가지 경로가 있는데 하나는 receptor와 p85 subunit의 SH2 domain과 상호작용하여 활성화 되는 직접적인 경로이고, 나머지 다른 하나는 focal adhesion 부위가 관여하는 간접적인 경로를 통해 활성화된다. PI3K에 의한 세포증식효과에 대한 연구를 살펴보면 혈관평활근세포의 증식효과에 PI3K가 관여하고 있으며 (Liu et al, 2010) 혈관내피 전구세포 증식효과에도 영향을 주고 있다 (Li et al, 2012). 뿐만 아니라 관상동맥의 내피세포 역시 eNOS, PKA 및 PI3K에 의해 증식하는 것으로 알려졌다 (Erdogdu et al, 2010). Akt는 57 kDa의 serine/threonine kinase로 Akt1/ α , Akt2/ β , Akt3/ γ 3가지 형태로 존재한다. Akt는 Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1)에 의해 Thr 308 부위가 인산화되고 C-말단의 Ser 473 부위가 인산화되면서 형태가 변함으로써 완전히 활성화되는데 N-말단의 PH 부위가 PIP3와 상호작용하게 된다 (Song et al, 2005). 활성화된 Akt는 apoptosis를 차단하고 세포의 증식과 분화, 생존에 관여하는 것으로 알려져 있다.

Sheng et al. (2003)의 연구에 따르면 PI3K가 소장상피세포의 증식을 조절한다고 하였다. 따라서, pyCyp를 IEC-6 세포에 처리했을 때 PI3K/Akt signaling pathway가 활성화되어 IEC-6 세포의 증식에 영향을 줄 것이라 가

정하고 이와 관련된 인자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 그 결과 p85의 인산화와 PDK1의 단백질 발현이 농도의존적으로 증가하였고, Akt의 인산화 역시 증가하였다 (Fig. 6).



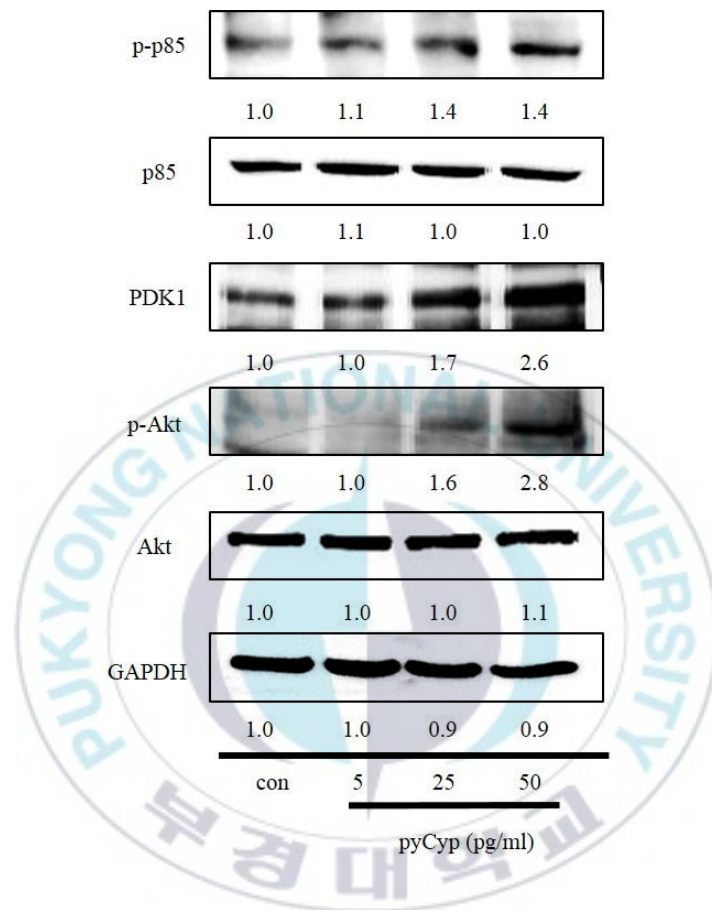


Fig. 6. Effect of pyCyp treatment on PI3K/Akt signaling protein expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with pyCyp after preincubation with SFM for 4h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-p85 α , anti-p-p85 α , anti-PDK1, anti-phospho-Akt, anti-Akt and anti-GAPDH antibodies.

다. mTOR signaling pathway에 미치는 영향

mTOR signaling pathway는 앞서 설명한대로 PI3K에 의해 활성화되는 신호전달경로 중 하나로써 (Yu and Cui, 2016) 세포의 성장과 생존, apoptosis 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Huang and Fingar, 2014). mTOR가 활성화되면 하위인자인 p70s6k가 활성화되면서 세포증식, 단백질 합성 등의 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Berven and Crouch, 2000). Rhoads et al. (2006)은 mTOR signaling이 소장상피세포의 증식과 migration에 영향을 준다고 하였다. 본 연구에서는 앞서 pyCyp에 의한 PI3K의 활성을 확인하였고 이어서 하위신호전달경로인 mTOR signaling pathway에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 pyCyp를 농도별로 처리했을 때 mTOR의 인산화에 의해 mTOR의 활성이 증가하였음을 확인하였고, 그 하위인자인 p70s6k 역시 인산화하면서 활성이 증가하였음을 확인하였다. 이번 실험에서 pyCyp는 IEC-6 세포증식에 PI3K의 하위신호전달 경로인 mTOR signaling pathway도 활성화시키는 것을 확인하였다 (Fig. 7).

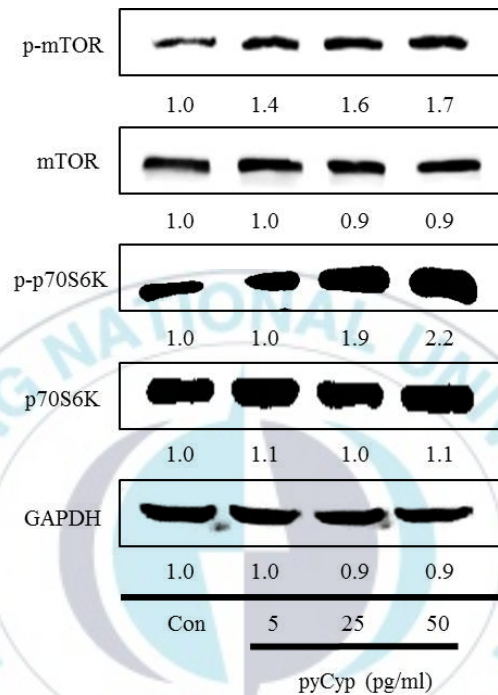


Fig. 7. Effect of pyCyp treatment on mTOR signaling protein expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with pyCyp after preincubation with SFM for 4 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-mTOR, anti-phospho-mTOR, anti-p70S6K, anti-phospho-p70S6K and anti-GAPDH antibodies.

라. PI3K의 발현억제가 세포증식에 미치는 영향

앞의 실험에서 IEC-6 세포에 pyCyp를 처리하였을 때 PI3K의 발현이 증가하여 세포증식이 촉진되는 것을 확인하였다. 이에 PI3K inhibitor인 LY294002를 사용하여 PI3K의 발현을 저해하였을 때 IEC-6 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 MTS assay를 이용하여 세포증식률의 변화를 확인하였다. 그 결과, pyCyp를 단독으로 처리하였을 때는 세포가 대조군에 비해 증식하였으나, 10 μ M 농도의 LY294002를 1시간 전처리를 하고 나서 pyCyp를 처리한 군에서는 대조군과 비슷한 수준으로 나타났다 (Fig. 8). 이 결과로부터 pyCyp는 PI3K/Akt pathway를 통해 세포증식을 촉진시킨다는 것을 증명할 수 있었다.



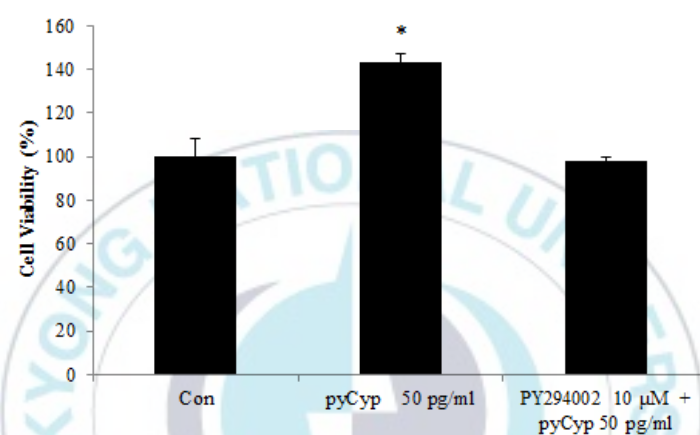


Fig. 8. Effects of the PI3K inhibitor (LY294002) on the pyCyp-induced IEC-6 cells.

Cells were seeded in 48-well plates at 2×10^4 cells/well in medium. After 24 h, the cells were maintained in SFM for 4 h. Following pre-treatment with LY294002 (10 μ M), the cells were incubated with pyCyp for 48 h. Cell viability was measured using MTS assay kit as the manufacturer's instructions. The results represent the means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ vs. corresponding control group.

마. EGFR signaling pathway에 미치는 영향

RTK (수용체 티로신 키나아제)는 많은 성장인자, 호르몬의 신호전달을 위한 세포표면에 존재하는 수용체이다. RTK는 정상세포의 증식과 분화와 같은 대사과정을 조절하기도 하고 암세포의 성장 및 증식에도 중요한 역할을 한다 ((Zwick et al, 2001). RTK에는 IGFR, Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), Fibroblast growth factor receptor (FGFR), Hepatocyte growth factor receptor (HGFR) 등이 있는데, 대표적인 RTK 중 하나인 상피 성장인자 (EGF) 수용체 EGFR은 EGF와 결합하였을 때, 다양한 형태의 세포 증식을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Wee and Wang, 2017). EGFR은 피부, 결막 등과 같은 여러 종류의 상피세포에서 관찰되며 EGF와 결합하였을 때 세포막 내 수용체 domain의 tyrosine kinase를 활성화 시키게 되는데, 이렇게 활성화된 kinase는 downstream 기질을 인산화시킴으로써 Shc, Grb2와 같은 단백질이 결합하게 된다. Grb2가 결합한 것에 이어서 Sos 역시 결합하게 되는데 이는 Ras의 활성을 보조하여 Ras-Raf1-MEK-ERK로 이어지는 Ras signaling을 진행시킨다. Ras signaling 외에도 EGFR은 PI3K/Akt/mTOR signaling, Phospholipase C (PLC)와 Src와도 관련된 세포신호전달 경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 EGFR 역시 IGF-IR와 더불어 세포 증식 작용에서 중요한 역할을 하고 있고 소장상피세포에서의 EGFR 관련인자들의 변화를 살펴보기 위해 본 연구에서는 EGFR과 관련된 세포 신호전달경로를 살펴보았다.

우선, pyCyp를 처리하였을 때, EGFR의 인산화가 농도의존적으로 증가하였고, 하위인자인 Grb2, Sos1의 단백질 발현 역시 증가하였다 (Fig. 9). pyCyp에 의해 EGFR의 인산화가 증가되어 Grb2, Sos1 또한 증가하였으므로 다음 실험에서는 downstream 기질의 변화에 대해서 살펴보기로 하였다.

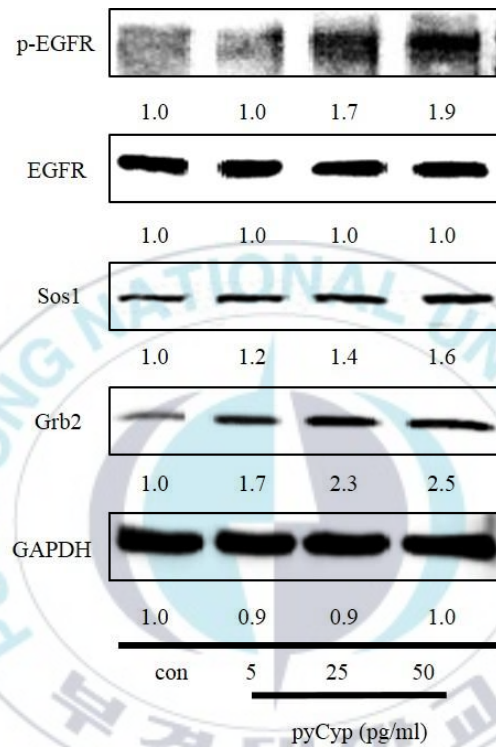


Fig. 9. Effect of treatment with pyCyp on EGFR related protein expression levels in IEC-6 cells.

Cells were treated with pyCyp after preincubation with SFM for 4h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-EGFR, anti-phospho-EGFR, anti-Sos1, anti-Grb2 and anti-GAPDH antibodies.

바. Ras signaling pathway에 미치는 영향

Ras는 세포 내 반응에서 세포의 증식과 분화를 포함하여 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. Ras 유전자에는 K-Ras, H-Ras, N-Ras, R-Ras, M-Ras 등이 있다 (Saad et al, 2014). 각각의 Ras 단백질은 조직 특이적으로 발생과정에서 다르게 발현되어 각각의 기능에서 차이가 나타난다고 알려져 있다. 성장인자가 세포막의 수용체에 결합되어 형성된 신호는 Sos를 결합하는데 Sos는 Guanine nucleotide exchange factor (GEF)로 작용하여 GDP가 결합되어있는 Ras를 GTP가 결합된 Ras로 전환하여 Ras를 활성화시키게 된다 (Rajalingam et al, 2007). 이렇게 활성화된 Ras는 PI3K, PKC 등에 영향을 주어 다양한 신호전달을 하게 되는데 이 중에서 Raf-1-MEK (Mitogen-activated and extracellular-signal regulated kinase)-ERK (Extracellular signal regulated kinase) 경로는 세포의 증식, 생존 및 분화 등을 촉진한다 (McCurbey et al, 2007). 그리고 Ras-PI3K/Akt 경로 역시 세포의 증식, 이동성, 분화 및 apoptosis를 조절한다 (Castellano and Downward, 2011). 본 실험에서는 pyCyp를 처리한 IEC-6 세포에서 Ras signaling과 관련된 인자들의 발현을 확인해본 결과, Ras를 비롯하여 그 하위인자인 Raf-1, MEK의 발현량과 ERK의 인산화 역시 농도의존적으로 증가하였음을 확인하였다 (Fig. 10).

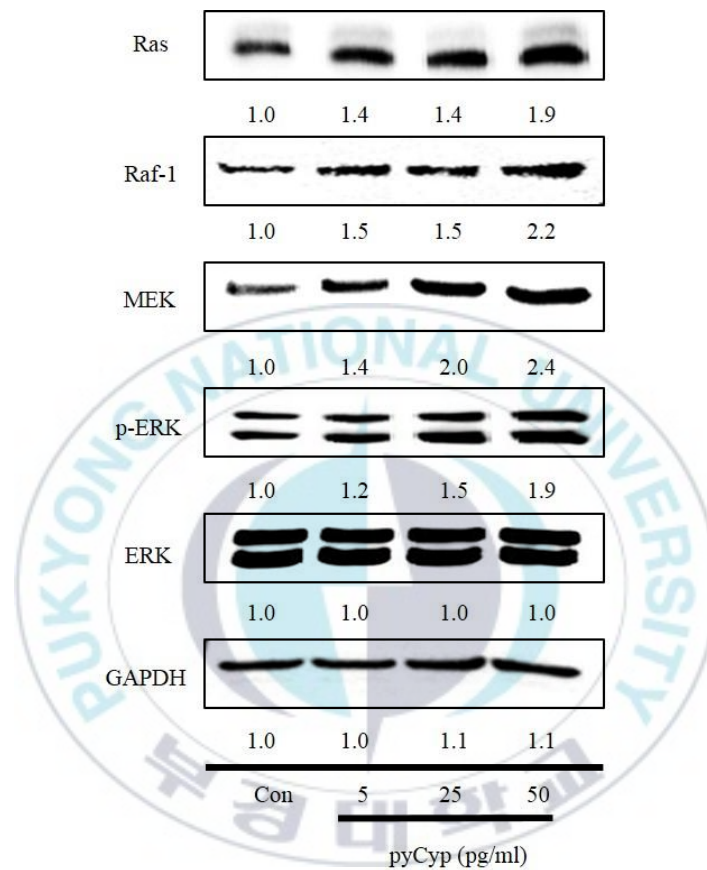


Fig. 10. Effects of treatment with pyCyp on Ras signaling related protein expression levels in IEC-6 cells.

Cells were treated with pyCyp after preincubation with SFM for 4 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot analysis using anti-Ras, anti-Raf-1, anti-MEK, anti-p-ERK, anti-ERK and anti-GAPDH antibodies.

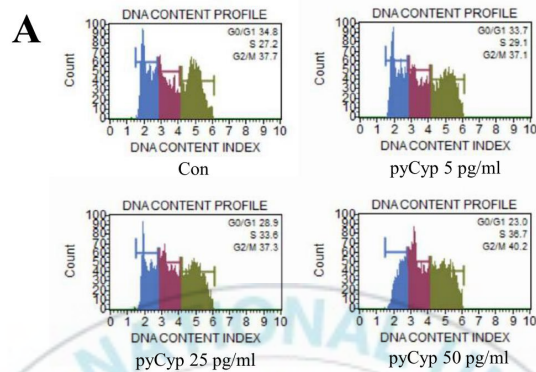
4. 세포 주기에 미치는 영향

가. 세포 주기 분석

세포주기란 하나의 세포가 분열에서 다음 분열 (유사분열) 할 때까지 순차적으로 일어나는 세포현상을 말한다. 이 과정은 G1기 (Gap 1), S기, G2기 (Gap 2), M기 총 4개의 phase를 거치며 진행된다. 세포의 성장과 증식은 이러한 세포주기가 지속적으로 진행, 반복하면서 이루어지고 세포주기의 진행은 내부적 또는 외부적 신호자극에 의해 이루어진다 (Jones and Kazlauskas, 2001). 그리고 G1기의 세포가 S기로 넘어가면서 유사분열이 일어남으로써 발생하게 되는데 세포주기의 진행 정도가 세포증식의 속도를 결정하는 요인이 된다. G1기는 첫 번째 휴지기로 세포가 분열된 직후 다음 분열을 진행하기 위한 필요한 세포 내 인자들을 준비하는 기간이다. 이 준비가 모두 끝나면 다음 phase인 S기로 넘어가게 된다 (Vermeulen et al, 2003). 그러나 외부 환경이 적합하지 않거나 세포 내외의 신호전달에 의해 정지명령을 받게 되면 다음 phase로 진행하지 않고 G0기라 부르는 휴식상태로 돌아가게 된다. 그래서 G1기와 S기 사이에 Check point를 가지고 있고 이를 Restriction point (R point)라 부르기도 한다 (Blagosklonny and Pardee, 2002). S기는 세포분열을 위해 본격적으로 DNA 복제가 이루어지는 시기로써 하나의 염색체가 동일한 두 개의 염색체로 복제되는 시기이다. 이 후 세포는 G2기로 넘어가게 되고 하나의 세포가 두 개의 세포로 분열하는데 필요한 인자들이 모두 만들어지는 시기를 지나 M기로 넘어간 세포는 세포질의 분열이 일어나 세포벽이 생기면서 하나의 세포가 완전히 두 개의 세포로 분열되는 시기이다 (Schafer, 1998). G1/S기의 Check point에 이어 G2기와 M기 사이에도 또 하나의 Check point가 있는데 S기에서 진

행된 DNA 복제에 이상이 있거나 손상되었을 경우 세포주기진행을 정지하고 손상된 DNA를 회복한다. 이 부분을 G2/M DNA damage check point라 부르기도 한다. 복제된 DNA에 이상이 없다면 세포주기가 계속 진행되어 M기로 넘어가고 세포분열이 일어나게 된다 (Barnum and O'Connell, 2014). 따라서 위와 같은 세포주기의 진행이 빠를수록 세포증식이 더 촉진된다. Obchoei et al. (2015)에 따르면 Cyp가 세포주기 중에서 G1/S phase에 영향을 주어 세포증식을 진행시킨다고 하였다.

본 실험에서는 pyCyp에 의한 세포증식과 관련된 신호전달 메커니즘을 확인하였고, pyCyp의 농도에 따라 IEC-6 세포의 주기진행단계에 차이가 있는지 확인하기 위해 세포주기를 분석하였다. 분석 결과 pyCyp의 농도가 높을수록 G0/G1 phase의 구간 비율이 34%에서 23%까지 줄어들고 S phase의 구간 비율이 27.2%에서 36.7%까지 농도의존적으로 증가하는 것으로 보아 pyCyp를 처리한 IEC-6 세포는 G1 phase를 지나 S phase로의 진행을 촉진시킴으로써 세포증식을 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 11).



B

pyCyp (pg/ml)	G0/G1	S	G2/M
Con (0)	34.8 %	27.2 %	37.7 %
5	33.7 %	29.1 %	37.1 %
25	28.9 %	33.6 %	37.3 %
50	23 %	36.7 %	40.2 %

Fig. 11. Representative DNA histograms on cell cycle profile of IEC-6 cells.

In the dose dependence experiments, pyCyp was added at varying concentrations (0, 5, 25 and 50 pg/mL) for 48h. Cell was harvested and fixed by 70% ethanol at least more than 3h. Cell cycle was analyzed by using flow cytometry (Muse cell analyzer).

나. 세포 주기 조절 단백질 분석

세포가 증식하는 것은 다양한 자극과 그에 따른 전달기전에 의해 결정되며, 이에 따라 세포분열이 일어나거나 멈추게 되는데 세포주기를 진행시키거나 억제시키는 데에는 여러 세포 주기 조절 단백질이 연관되어있다. 세포 주기 조절 단백질로는 Cyclin dependent kinase (Cdk)와 이 Cdk에 결합하여 활성을 조절하는 Cyclin과 같은 positive regulator가 있고, 그리고 p21, p27 등과 같은 negative regulator 있다. 세포주기 단계에 따라 Cyclin이 주기적으로 증가하거나 감소하는데, 특정한 세포주기 단계마다 각각의 Cyclin과 Cdk가 복합체를 형성하여 세포주기 진행을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Gerard and Goldbeter 2014). G1 phase는 G0 phase로 진입하여 분열을 중지할 것인지 아니면 S phase로 진행하여 DNA를 복제하여 분열을 계속 진행할 것인지 결정하는 세포주기 조절 지점이다. E2F와 같은 전사인자들이 활성화되면서 세포주기는 G1 phase에서 S phase로 진행하게 되는데 이들 전사인자는 pocket protein인 Retinoblastoma protein (Rb)가 결합하여 활성이 억제되어 있다 (Bertoli et al, 2013). 앞서 세포주기 분석에서 pyCyp를 처리했을 때 농도에 따라 S phase의 비율이 증가하였음을 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 세포 주기 조절 단백질 중에서 S phase와 관련된 단백질 변화를 확인하였다. G1 phase에서 S phase로의 진행을 촉진시키는 인자는 Cyclin E와 Cdk2가 있고 S phase를 진행을 촉진시키는 Cyclin A가 있다. 앞서 설명한대로 CDK와 Cyclin이 복합체를 형성하여 Rb를 인산화시킴으로써 전사인자들과의 결합을 해제하고 전사인자들이 활성화되어 세포주기를 진행시킨다. 그리고 Cdc25a는 Rb의 인산화를 더욱 촉진시키는 것으로 알려져 있다 (Brenner et al, 2014). 반대로 negative regulator인 p27과 p21은 CDK-cyclin 복합체에 결합하여 복합체의 기능을

억제하여 세포 주기 진행을 방해하는 것으로 알려져있다. 세포증식과 관련하여 Cyp는 G1/S phase에 주로 영향을 주어 일부 세포의 증식에 관여하는 것으로 보고된 바 있다 (Obchoei et al, 2015).

앞서 pyCyp를 IEC-6 세포에 처리하였을 때 나타나는 세포주기의 변화를 살펴보았고 본 연구에서는 이와 관련하여 세포 주기 조절 단백질의 발현을 Western blotting을 통해 알아보았다. 그 결과, 세포 주기 조절에 있어 positive regulator인 Cyclin A, Cyclin E, Cdk2, pRb의 발현이 증가하였고, negative regulator인 p27, p21은 발현이 농도의존적으로 감소하였다.

위 결과를 종합하여 볼 때, pyCyp를 처리한 IEC-6 세포는 G1 phase를 지나 S phase로 세포주기진행을 촉진시키는 것을 세포주기분석을 통해 확인하였다. 그리고 세포주기 중 S phase 진행에 관련이 있는 Cyclin A, Cyclin E와 Cdk2의 발현이 증가 및 Cdc25a의 발현이 증가하여 Rb가 인산화된 형태인 pRb가 증가하였고 이와 반대로 Cyclin과 Cdk에 의한 세포주기진행을 억제하는 p27, p21의 발현이 감소함으로써 세포주기를 조절하는 인자들의 발현변화와 함께 세포주기가 S phase 단계에서 진행이 촉진되어 세포증식이 진행되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 12).

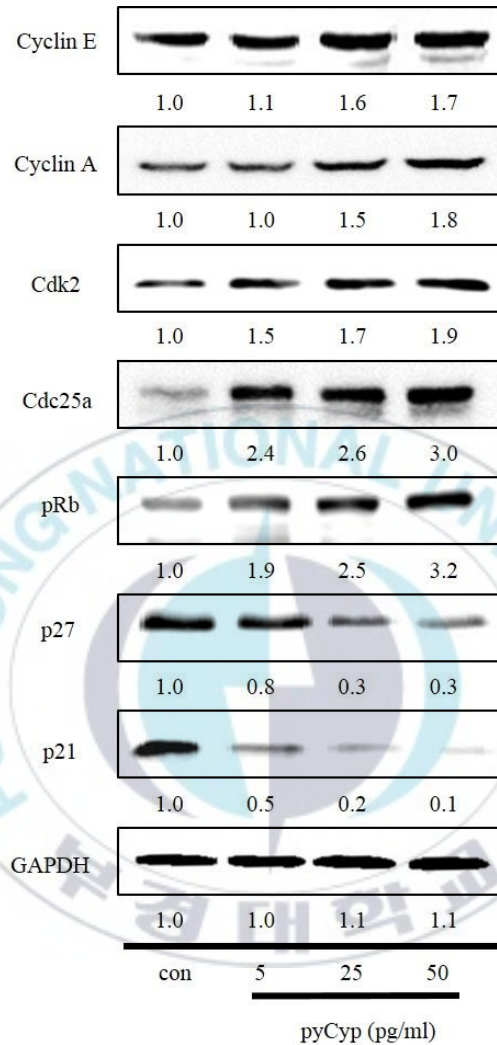


Fig. 12. Effect of pyCyp treatment on cell cycle related proteins expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with pyCyp after preincubation with SFM for 4h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-Cyclin E anti-Cyclin A, anti-Cdk2, anti-Cdc25a, anti-pRb, anti-p27, anti-p21 and anti-GAPDH.

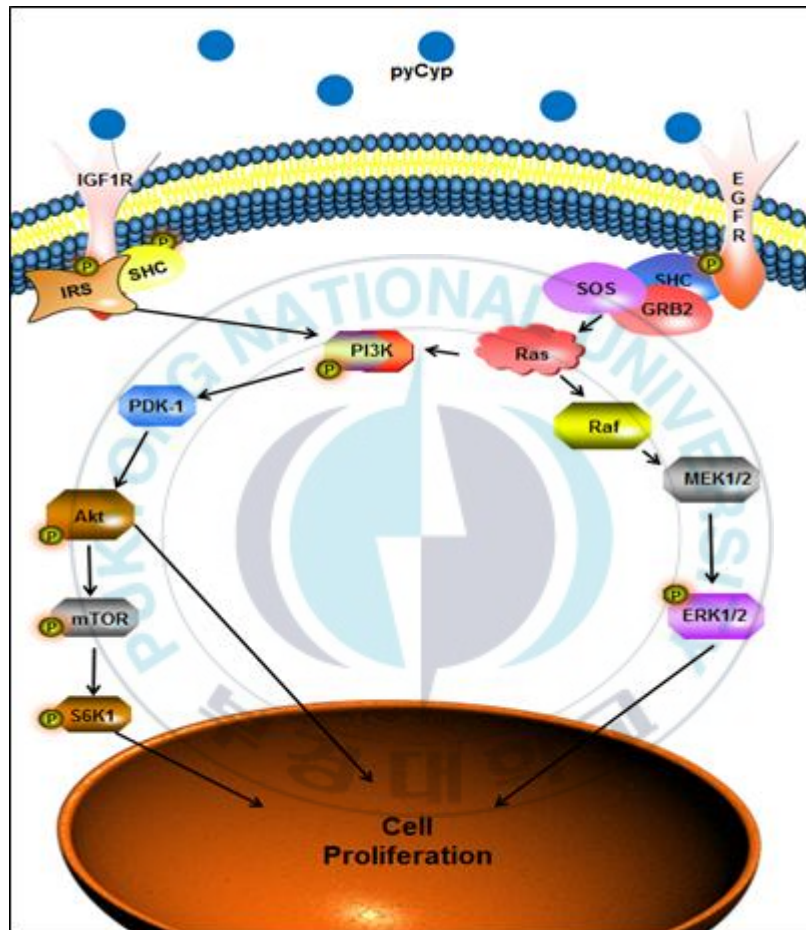


Fig. 13. The proposed model of proliferation mechanism by pyCyp treatment in IEC-6 cells.

IV. 결론 및 요약

해조류는 바다에서 생산되는 조류식물들을 총칭하는 것으로, 오래전부터 아시아 지역에서는 주로 식품으로 이용되어 왔으며 서양에서도 역시 음식 및 사료 그리고 의약품으로도 이용되어 왔다. 이러한 역사적 기록에 근거하여 그 효능에 관한 메커니즘의 연구가 진행되었으며 이들 해조류의 다양한 생리활성이 과학적으로 밝혀지면서 식·의약 소재 및 기능성 식품으로 많은 관심을 받고 있다. 분리정제 기술 및 BT기술이 발전함에 따라 해조류가 지니고 있는 유용성분 이외에도 다양한 생리활성 물질과 활용성 증진에 관한 연구결과가 많이 보고되고 있다. 특히 유전자 재조합 기술이 발전하면서 해조류에 극미량으로 포함된 유용물질이나 생리활성물질을 비용을 줄이고 효율성을 높여 대량으로 생산함으로써 새로운 고부가가치 기능성 소재의 자원이 될 것이다. 해조류 중에서도 김은 홍조류에 속하는 해조류로 단백질 함량이 높아 김에서 추출한 단백질, 당단백질, 다당류 등을 대상으로 많은 연구가 진행되고 있다.

Cyclophilin (Cyp)은 PPIase activity를 가지고 있으며 prokaryotes와 eukaryotes를 포함한 대부분의 유기체, 세포들에게서 존재한다. Cyp A, Cyp B, Cyp C, Cyp D 등 여러 종류의 Cyp가 존재하고 사람의 경우 18개, 해조류의 경우 많게는 20여 개 이상의 Cyp가 존재한다고 한다.

소장은 인체 내 소화기관 중 하나로 음식물을 소화시키고 특히 소장상피세포는 영양소를 흡수하는 것 외에도 외부에서 유입된 항원이나 유해성 물질의 진입을 차단시키는 역할도 수행한다. 소장상피세포는 짧은 수명을 가지고 있어 Apoptosis를 통해 자연사멸하게 되는데 사멸 후 부족해진 세포수는 주기적으로 증식함으로써 상피세포 수의 균형을 유지하고 있다. 그리

고 어떠한 요인에 의해 손상을 입었을 경우 세포가 손상부위로 migration을 진행하고 증식을 통해 손상부위를 회복하며 세포 수를 일정하게 유지하기 때문에 소장상피세포의 증식은 유지되어야 한다.

본 연구에서는 방사무늬 김에서 지닌 Cyclophilin을 합성하여 얻은 *Pyropia yezoensis* Cyclophilin (pyCyp)을 가지고 Rat에서 유래한 정상 소장상피세포인 IEC-6 cell에서 생리활성을 확인해 본 결과, 세포가 pyCyp의 농도에 대비하여 증식하였음을 확인하였으며, 손상 후 Migration 역시 pyCyp의 농도에 따라 증가하였다.

pyCyp에 의한 소장상피세포의 증식이 어떠한 메커니즘으로 이루어지는지 확인하기 위해 대표적인 세포 성장 및 증식 신호전달 경로인 IGF-IR signal과 EGFR signal을 중심으로 하위 신호전달경로인 PI3K/Akt/mTOR pathway와 Ras pathway를 살펴보았다. pyCyp의 처리농도에 따라 IGF-IR의 인산화가 증가하면서 여기에 결합하는 인자인 IRS1 역시 인산화가 증가함으로써 활성을 나타내었고 Shc의 발현도 증가하였다. 이후 이어지는 하위 신호전달경로에서 PI3K를 구성하는 p85의 인산화가 pyCyp의 농도에 따라 증가하였고, 이어서 PDK1의 발현 역시 증가함에 따라 Akt의 인산화가 증가하는 것을 확인하였다. 이후 Akt에 의해 활성화되는 mTOR 역시 세포의 증식과 생존을 조절하는데 관여하는데 pyCyp의 농도에 따라 인산화에 의한 활성이 증가하였고 하위인자인 p70S6K도 인산화에 의한 활성이 증가하였다. 그리고 EGFR도 pyCyp의 농도에 따라 인산화가 증가하면서 활성을 크게 나타내었고 여기에 결합하는 Sos1, Grb2의 발현도 크게 증가하였다. 이어서 Ras signaling 역시 Ras의 발현부터 시작하여 Raf-1, MEK의 발현이 pyCyp의 농도에 따라 비례하게 증가하였고 이에 영향을 받아 ERK의 인산화 역시 증가하였다. 이를 통해 pyCyp에 의한 세포증식 효과의 메커니즘은 IGF-IR/PI3K/Akt/mTOR signaling과 EGFR-Ras

signaling에 의한 세포 증식메커니즘을 확인하였다.

세포의 증식은 G1기에서 분열을 준비하고 S기로 넘어가 DNA를 복제하여 G2기와 M기를 거치면서 하나의 세포가 2개의 딸세포로의 분열과정인 세포주기를 지속적으로 진행시키면서 이루어진다. 그러므로 pyCyp를 처리했을 때 IEC-6 세포의 세포주기가 어떻게 변화하는 지 확인해 보았다. G1 phase에 머무른 세포의 비율이 줄고 S phase에 머무른 세포의 비율이 증가하는 것으로 보아 G1 phase에서 S phase로 진행이 촉진되었음을 알 수 있었다. 그리고 세포주기 조절에 관여하는 단백질 중에서도 특히 G1/S phase 사이에서 세포주기 진행에 관여하는 Cdk2와 Cyclin E의 발현이 증가하였고 Cyclin과 Cdk에 의해 pRb의 발현 역시 증가하였다. 그리고 S phase의 진행을 촉진시키는 Cyclin A도 증가하였을 뿐만 아니라 이러한 Cyclin에 영향을 주는 Cdc25a의 발현 역시 증가하였고 이와 반대로 세포주기 진행을 억제하는 인자인 p27, p21의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

위 결과들을 종합하면, Cyp를 ICE-6 세포에 처리했을 때 세포 증식효과가 나타났고, 그 작용기전은 IGF-IR signaling에 의한 PI3K/Akt signaling pathway, mTOR signaling pathway에 의한 것과 EGFR signaling에 의한 Ras/ERK signaling에 의한 것이었다. 그리고 pyCyp에 의해 세포주기와 관련된 인자들의 발현이 증가되거나 혹은 억제됨으로써 세포주기의 진행이 더 촉진되어 최종적으로 세포를 더욱더 증식시키는 방향으로 진행하는 것을 확인하였다.

따라서 방사무늬 김에서 얻은 pyCyp가 정상 소장상피세포의 증식을 촉진하는 효능이 있으므로 소장상피세포의 기능을 더 건강하게 유지하여 나이가 들어서도 영양소 흡수를 원활하게 하고 유해물질이 체내에 유입되지 않도록 하여 건강한 생활을 유지할 수 있을 것이다. 소장상피세포 뿐만 아니

라 pyCyp가 가진 생리활성기능을 바탕으로 더 많은 연구가 진행되어 기능성 식품의 소재로써 활용될 가치가 있다고 사료된다.



V. 참고문헌

- Lee SH. (2011). Current Status and Prospect of Nutraceuticals from Marine Algae. *Bulletin of Food Technology*, 24, 165-175.
- Anis Maryam., Ahmed Salman., Hasan, Mohtasheem. (2017). Algae as nutrition, medicine and cosmetic: The forgotten history, present status and future trends. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 1934-1959.
- Annunziata M., Granata R., Ghigo E. (2011). The IGF System. *Acta Diabetol*, 48, 1-9.
- Artis D. (2008). Epithelial-Cell Recognition of Commensal Bacteria and Maintenance of Immune Homeostasis in the Gut. *Nat. Rev. Immunol*, 8, 411-420.
- Barnum KJ., O'Connell MJ. (2014). Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol. Biol*, 1170, 29-40.
- Bertoli C., Skotheim JM., de Bruin RA. (2013). Control of Cell Cycle Transcription during G1 and S Phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 518-528.
- Berven LA., Crouch MF. (2000). Cellular Function of p70S6K: A Role in Regulating Cell Motility. *Immunol Cell Biol*, 78, 447-451.
- Blagosklonny MV., Pardee AB. (2002). The Restriction Point of the Cell Cycle. *Cell Cycle*, 1, 103-110.
- Brenner AK., Reikvam H., Lavecchia A., Bruserud O. (2014).

- Therapeutic targeting the Cell Division Cycle 25 (CDC25) Phosphatases in Human Acute Myeloid Leukemia—the Possibility to Target several Kinases through Inhibition of the various CDC25 Isoforms. *Molecules*, 19, 18414–18447.
- Butler AA., Yakar S., Gewolb IH., Karas M., Okubo Y., LeRoith D. (1998). Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Signal Transduction: At the Interface between Physiology and Cell Biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 121, 19–26.
- Castellano E., Downward J. (2011). RAS Interaction with PI3K: More than just another Effector Pathway. *Genes Cancer*, 2, 261–274.
- Chou IT., Gasser CS. (1997). Characterization of the Cyclophilin Gene Family of *Arabidopsis Thaliana* and Phylogenetic Analysis of Known Cyclophilin Proteins. *Plant Mol Biol*, 35, 873–892.
- Cian RE., Drago SR., de Medina FS., Martinez-Augustin O. (2015). Proteins and Carbohydrates from Red Seaweeds: Evidence for Beneficial Effects on Gut Function and Microbiota. *Mar Drugs*, 13, 5358–5383.
- Cory AH., Owen TC., Barltrop JA., Cory JG. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*, 3, 7, 207–212.
- Edelblum K.L., Yan F., Yamaoka T., Polk DB. (2006). Regulation of Apoptosis during Homeostasis and Disease in the Intestinal Epithelium. *Inflamm Bowel Dis*, 12, 413–424.
- Erdogdu O., Nathanson D., Sjoholm A., Nystrom T., Zhang Q. (2015). Exendin-4 Stimulates Proliferation of Human Coronary Artery

- Endothelial Cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-Dependent Pathways and Requires GLP-1 Receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 325, 26-35.
- Galvan V., Logvinova A., Sperandio S., Ichijo H., Bredesen DE. (2003). Type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1). *J Biol Chem*, 278, 15, 13325-13332
- Gerard C., Goldbeter A. (2014). The Balance between Cell Cycle Arrest and Cell Proliferation: Control by the Extracellular Matrix and by Contact Inhibition. *Interface Focus*, 4, 20130075.
- Grajek Włodzimierz., Olejnik Anna. (2004). Epithelial cell culture in vitro as a model to study functional properties of food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 13, 5-24
- Hoffmann H., Schiene-Fischer C. (2014). Functional Aspects of Extracellular Cyclophilins. *Biol Chem*, 395, 721-735.
- Huang K., Fingar DC. (2014). Growing Knowledge of the mTOR Signaling Network *Semin Cell Dev Biol*, 36, 79-90.
- Jones SM., Kazlauskas A. (2001). Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Lett*, 490, 3, 110-116.
- Kim CR., Kim YM., Lee MK., Kim IH., Choi YH., Nam TJ. (2017). *Pyropia Yezoensis* Peptide Promotes Collagen Synthesis by Activating the TGF-beta/Smad Signaling Pathway in the Human Dermal Fibroblast Cell Line Hs27. *Int J Mol Med*, 39, 31-38.
- Kim EY., Choi YH., Choi CG., Nam TJ. (2017). Effects of the Cyclophilin-Type Peptidylprolyl Cis-Trans Isomerase from *Pyropia Yezoensis* Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in

- HepG2 Cells. *Mol Med Rep*, 15, 4132–4138.
- Kim K., Oh IK., Yoon KS., Ha J., Kang I., Choe W. (2015) Antioxidant Activity is Required for the Protective Effects of Cyclophilin A Against Oxidative Stress. *Mol Med Rep*, 12, 712–718.
- Kohlhofer BM., Thompson CA., Walker EM., Battle MA. (2016). GATA4 Regulates Epithelial Cell Proliferation to Control Intestinal Growth and Development in Mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2, 189–209.
- Krasilnikov MA. (2000). Phosphatidylinositol-3 Kinase Dependent Pathways: The Role in Control of Cell Growth, Survival, and Malignant Transformation. *Biochemistry (Mosc)*, 65, 59–67.
- Kumari S., Roy S., Singh P., Singla-Pareek SL., Pareek A. (2013). Cyclophilins: Proteins in Search of Function. *Plant Signal Behav*, 8, e22734.
- Lee HA., Kim IH., Nam TJ. (2015). Bioactive Peptide from *Pyropia Yezoensis* and its Anti-Inflammatory Activities. *Int J Mol Med*, 36, 1701–1706.
- Lee MK., Kim IH., Choi YH., Choi JW., Kim YM., Nam TJ. (2015). The Proliferative Effects of *Pyropia Yezoensis* Peptide on IEC-6 Cells are Mediated through the Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway. *Int J Mol Med*, 35, 909–914.
- Lee MK., Kim IH., Choi YH., Nam TJ. (2015). A Peptide from *Porphyra Yezoensis* Stimulates the Proliferation of IEC-6 Cells by Activating the Insulin-Like Growth Factor I Receptor Signaling Pathway. *Int J Mol Med*, 35, 533–538.

- Li W., Wang H., Kuang CY., Zhu JK., Yu Y., Qin ZX., Liu J., Huang L. (2012). An Essential Role for the Id1/PI3K/Akt/NFkB/survivin Signalling Pathway in Promoting the Proliferation of Endothelial Progenitor Cells in Vitro. *Mol. Cell. Biochem*, 363, 135-145.
- Liu C., Su T., Li F., Li L., Qin X., Pan W., Feng F., Chen F., Liao D., Chen L. (2010). PI3K/Akt Signaling Transduction Pathway is Involved in Rat Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Induced by Apelin-13. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42, 396-402.
- Marbach A., Bettenbrock K. (2012). lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *J Biotechnol*, 157, 1, 82-88.
- Marshall NJ., Goodwin CJ., Holt SJ. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul*, 5, 2, 69-84.
- McCubrey JA., Steelman LS., Chappell WH., Abrams SL., Wong EW., Chang F., Lehmann B., Terrian DM., Milella M., Tafuri A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK Pathway in Cell Growth, Malignant Transformation and Drug Resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1263-1284.
- Negróni A., Cucchiara S., Stronati L. (2015). Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. *Mediators Inflamm*, 2015, 250762.
- Nigro P., Pompilio G., Capogrossi MC. (2013). Cyclophilin A: A Key

- Player for Human Disease. *Cell Death Dis*, 4, e888.
- Obchoei S., Sawanyawisuth K., Wongkham C., Kasinrerak W., Yao Q., Chen C., Wongkham S. (2015). Secreted Cyclophilin A Mediates G1/S Phase Transition of Cholangiocarcinoma Cells Via CD147/ERK1/2 Pathway. *Tumour Biol*, 36, 849–859.
- Obchoei S., Wongkham S., Wongkham C., Li M., Yao Q., Chen C. (2009). Cyclophilin A: potential functions and therapeutic target for human cancer. *Med Sci Monit*, 15, 11, RA221–32.
- Park JH., Kotani T., Konno T., Setiawan J., Kitamura Y., Imada S., Usui Y., Hatano N., Shinohara M., Saito Y. (2016). Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: Role of Short-Chain Fatty Acids. *PLoS One*, 11, e0156334.
- Park SJ., Ryu J., Kim IH., Choi YH., Nam TJ. (2015). Activation of the mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer MCF7 Cells by a Peptide Derived from *Porphyra Yezoensis*. *Oncol Rep*, 33, 19–24.
- Rajalingam K., Schreck R., Rapp UR., Albert S. (2007). Ras Oncogenes and their Downstream Targets. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1177–1195.
- Rhoads JM., Niu X., Odle J., Graves LM. (2006). Role of mTOR Signaling in Intestinal Cell Migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291, G510–7.
- Rosano GL., Ceccarelli EA. (2014). Recombinant Protein Expression in *Escherichia Coli*: Advances and Challenges. *Front Microbiol*, 5, 172.

- Saad II., Saha SB., Thomas G. (2014). The RAS Subfamily Evolution – Tracing Evolution for its Utmost Exploitation. *Bioinformation*, 10, 293–298.
- Satoh K., Matoba T., Suzuki J., O'Dell MR., Nigro P., Cui Z., Mohan A., Pan S., Li L., Jin ZG. (2008). Cyclophilin A Mediates Vascular Remodeling by Promoting Inflammation and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circulation*, 117, 3088–3098.
- Schafer KA. (1998). The cell cycle: a review. *Vet Pathol*, 1998, 35, 6, 461–478.
- Sheng H., Shao J., Townsend CM Jr., Evers BM. (2003). Phosphatidylinositol 3-Kinase Mediates Proliferative Signals in Intestinal Epithelial Cells. *Gut*, 52, 1472–1478.
- Song G., Ouyang G., Bao S. (2005). The Activation of Akt/PKB Signaling Pathway and Cell Survival. *J Cell Mol Med*, 9, 59–71.
- Vallon O. (2005). Chlamydomonas Immunophilins and Parvulins: Survey and Critical Assessment of Gene Models. *Eukaryot Cell*, 4, 230–241.
- Vermeulen K., Van Bockstaele DR., Berneman ZN. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36, 3, 131–149.
- Wee P., Wang Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*, 9, 10.3390/cancers9050052.
- Yu JS., Cui W. (2016). Proliferation, Survival and Metabolism: The Role

- of PI3K/AKT/mTOR Signalling in Pluripotency and Cell Fate Determination. *Development*, 143, 3050–3060.
- Yurchenko V., Constant S., Eisenmesser E., Bukrinsky M. (2010). Cyclophilin-CD147 Interactions: A New Target for Anti-Inflammatory Therapeutics. *Clin Exp Immunol*, 160, 305 –317.
- Zhang CL., Ren HJ., Liu MM., Li XG., Sun DL., Li N., Ming L. (2014). Modulation of Intestinal Epithelial Cell Proliferation, Migration, and Differentiation in Vitro by Astragalus Polysaccharides. *PLoS One* 9, e106674.
- Zwick E., Bange J., Ullrich A. (2001). Receptor Tyrosine Kinase Signalling as a Target for Cancer Intervention Strategies. *Endocr Relat Cancer*, 8, 161–173.

