



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

김(*Porphyra yezoensis*) peptide에
의한 IEC-6 세포 증식 작용
메커니즘



2014년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명과학과

이 민 경

이 학 석 사 학 위 논 문

김(*Porphyra yezoensis*) peptide에
의한 IEC-6 세포 증식 작용
메커니즘

지도교수 남택정

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2014년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명과학과

이 민 경

이민경의 이학석사 학위논문을
인준함.

2014년 2월 21일



주 심 이학박사 류 은 순 (인)

위 원 이학박사 김 재 일 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (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) 시료의 제조 | 5 |
| 2) 세포 배양 | 5 |
| 3) MTS assay | 6 |
| 4) PI3K/MEK inhibitor 처리 | 6 |
| 5) Western blot analysis | 6 |
| ① Total cell lysate 추출 | 6 |
| ② 핵 획분 추출 | 7 |
| ③ 단백질 발현 및 분석 | 7 |
| 6) RT-PCR | 8 |
| ① RNA 추출 및 cDNA 합성 | 8 |
| ② mRNA 발현 및 분석 | 9 |
| 7) Cell cycle analysis | 11 |
| 8) 통계학적 처리 | 11 |

| | |
|--|----|
| III. 결과 및 고찰 | 12 |
| 1. 김 (<i>Porphyra yezoensis</i>) peptide (PY-PE)의 제조 | 12 |
| 2. PY-PE에 의한 IEC-6 정상 소장세포 증식 촉진 효과 | 14 |
| 1) PY-PE가 IEC-6 정상 소장세포 증식에 미치는 영향 | 14 |
| 3. PY-PE에 의한 세포증식 신호전달분석 | 17 |
| 1) IGF-IR과 그 하위인자의 발현에 미치는 영향 | 17 |
| 2) MAPK signaling pathway에 미치는 영향 | 21 |
| 3) PI3K/Akt signaling pathway에 미치는 영향 | 24 |
| 4) EGFR과 Grb2, SOS1의 발현에 미치는 영향 | 28 |
| 5) Ras signaling pathway에 미치는 영향 | 32 |
| 6) AP-1의 발현에 미치는 영향 | 36 |
| 7) MEK와 PI3K의 발현억제가 세포증식기전에 미치는 영향 | 40 |
| 4. 세포 주기에 미치는 영향 | 43 |
| 1) 세포 주기 분석 | 43 |
| 2) 세포 주기 조절 단백질 분석 | 47 |
| IV. 결론 및 요약 | 50 |
| V. 참고 문헌 | 52 |

LIST OF TABLE

Table. 1. Oligonucleotide sequences of the primer used in RT-PCR.



LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Purification of peptide of *P. yezoensis* on Shiseido capcell pak C18 column chromatography.
- Fig. 2. Proliferative effect of PY-PE in IEC-6 cells.
- Fig. 3. PY-PE multiplies IEC-6 cells and photomicrography.
- Fig. 4. PY-PE affect the protein expression of IGF-IR, IRS-1, Shc and PY99 in IEC-6 cells.
- Fig. 5. PY-PE affect the mRNA expression of IGF-IR, IRS-1, Shc and PY99 in IEC-6 cells.
- Fig. 6. Effect of PY-PE on MAPK signaling pathway.
- Fig. 7. Effect of PY-PE treatment on PI3K and Akt protein expression in IEC-6 cells.
- Fig. 8. Effect of PY-PE treatment on PI3K and Akt mRNA expression in IEC-6 cells.
- Fig. 9. PY-PE affect the protein expression of EGFR, Grb2 and SOS1 in IEC-6 cells.
- Fig. 10. PY-PE affect the mRNA expression of EGFR, Grb2 and SOS1 in IEC-6 cells.
- Fig. 11. Effect of PY-PE treatment on Ras signaling protein expression in IEC-6 cells.
- Fig. 12. Effect of PY-PE treatment on Ras signaling mRNA expression in IEC-6 cells.
- Fig. 13. Effect of PY-PE treatment on c-Fos and c-Jun protein expression in IEC-6 cells.
- Fig. 14. Effect of PY-PE treatment on c-Fos and c-Jun mRNA expression in IEC-6 cells.
- Fig. 15. Effect of MEK inhibitor (PD98059) on cell proliferation induced by PY-PE treatment in IEC-6 cells.
- Fig. 16. Effect of PI3K inhibitor (LY294002) on cell proliferation induced by

PY-PE treatment in IEC-6 cells.

Fig. 17. Treatment of IEC-6 cells with PY-PE results in cell cycle progression.

Fig. 18. Effect of PY-PE on cell cycle phase ratio in IEC-6 cells.

Fig. 19. Effect of PY-PE treatment on the levels of cell cycle related proteins in IEC-6 cells.

Fig. 20. The proposed model of proliferation mechanism induced by PY-PE treatment in IEC-6 cells.



ABBREBIATIONS

- AP-1 : activator protein-1
- BCA : bicinchoninic acid
- BSA : bovine serum albumin
- CDK : cyclin-dependent kinase
- CREB : cyclic AMP response element binding
- DEPC : diethylpyrocarbonate
- DMEM : dulbecco's modified eagle's medium
- EGFR : epidermal growth factor receptor
- ERK : extracellular-signal related kinase
- FAK : focal adhesion kinase
- FBS : fetal bovine serum
- Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2
- GTP : guanosine triphosphate
- IGF-IR : insulin-like growth factor-I receptor
- IEC-6 : intestinal epithelial cell-6
- IRS : insulin receptor substrate
- JNK : c-jun amino-terminal kinase
- kDa : kilodalton
- MAPK : mitogen-activated protein kinase
- MEK : MAP kinase/Erk kinase
- M phase : mitotic phase
- MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
- PBS : phosphate-buffered saline
- PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PY-PE : *porphyra yezoensis* peptide

R point : restriction point

RTK : receptor tyrosine kinase

RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction

S phase : synthesis phase

SDS : sodium dodecyl sulfate

SFM : serum free medium



Mechanism of proliferation by peptide of *porphyra yezoensis* through the regulation of IGF-IR and EGFR signaling pathways in IEC-6 cells

Min-Kyeong Lee

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

Abstract

Porphyra yezoensis is a genus of marine red algae and has potential biological activities. *Porphyra yezoensis* mainly contains about 40-45% carbohydrates, 25-50% proteins and 20-40% polysaccharides, lipids and some vitamins. Also, *Porphyra yezoensis* has been extensively studied because of its many biological properties including anti-viral, anti-ulcer, anti-inflammatory and anti-tumor activities. In this study, peptide of *Porphyra yezoensis* (PY-PE) was determined which had a proliferative effect, and examined signal transduction pathways focusing on insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR), epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways.

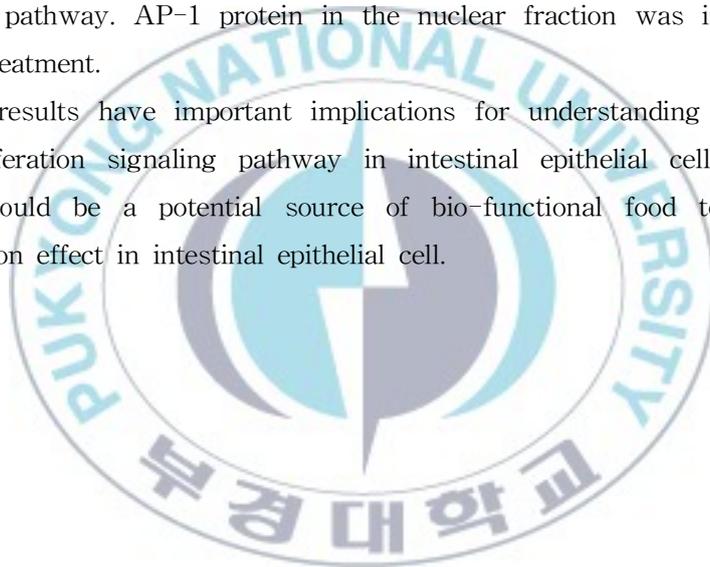
IEC-6 cells were incubated in serum-free medium with various concentrations of PY-PE (0, 125, 250, 500, 1000 ng/ml). Using the MTS assays, we obtained PY-PE induced cell proliferation in a dose-dependent manner.

The IGF-IR and EGFR system plays essential role in the regulation of cell growth, proliferation and survival. PY-PE induced the increased expression of IGF-IR and EGFR. IGF-IR and EGFR induced activation of

multiple intracellular signal transduction cascades, including the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and the Ras signaling pathway. Also we observed that cell cycle analysis and expression of cell cycle related proteins. This result through where cell proliferation has occurred and there has increased G1 percent and increase in expression of cyclin D, cyclin E, Cdk2, Cdk4, Cdk6 and decrease in protein levels of p21, p27.

Activator protein-1 (AP-1) regulates cell proliferation and survival responses. The present study examined the effects of PY-PE on the AP-1 signaling pathway. AP-1 protein in the nuclear fraction was increased by PY-PE treatment.

These results have important implications for understanding the role of cell proliferation signaling pathway in intestinal epithelial cell. Therefore, PY-PE could be a potential source of bio-functional food to have cell proliferation effect in intestinal epithelial cell.



I. 서론

해조류란 바다에서 생산되는 조류식물의 총칭으로, (김영명, 2005) 오래전부터 아시아지역인 한국, 중국, 일본에서 주로 식품으로 이용되어왔으며 가축사료, 의약품, 공업용 원료 등으로도 이용되어온 주요자원이다 (백재민, 2007). 해조류는 영양학적으로 열량이 낮고 단백질, 당질, 식이 섬유, 비타민, 무기질 함량이 풍부하며, 특히 채소에 비해 불포화지방산과 필수아미노산의 함량이 더 높은 것으로 알려져 있다 (Jimenez et al., 1999). 게다가 해조류는 해조류를 구성하고 있는 다당류의 독특한 구조적 특성으로 인하여 항산화, 항응고, 항암, 항염증, 항바이러스 등의 생물학적 활성을 가진 sulphated polysaccharides, peptide, polyphenol 과 같은 생리활성물질의 훌륭한 원천임이 알려지면서 해조류의 기능성 식품으로서의 개발에 관심이 증가하고 있는 추세이다 (Costa et al., 2010). 대표적으로 김(*Porphyra tenera*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마(*Laminaria japonica*), 툃(*Hizikia fusiform*), 파래(*Enteromorpha*) 등의 해조류가 연구에 널리 이용되고 있다.

김은 홍조류에 속하는 해조류로서 인류가 이용한 해조류 중 가장 오래된 것 중 하나이며 독특한 맛과 냄새, 특유한 빛깔과 영양소가 풍부하여 애용되어온 기호식품이다. 김에는 지방을 제외한 당질, 각종 무기질과 비타민이 골고루 함유되어 있으며, 단백질과 비타민 A가 특히 많이 함유되어 있고, 특수 성분으로는 비타민 B군, 오메가 3 지방산인 eicosapentaenoic acid (EPA)와 혈중콜레스테롤을 낮추는 작용을 하는 taurine이 풍부하다 (Nishizawa et al., 1988; Park CK et al., 2000). 그 중 당질은 hemicellulose, porphyran 등으로 이루어져 있는데, porphyran은 황산기를 함유하는 수용성 산성다당의 고분자물질로서 3,6-anhydrogalactose, 6-methylgalactose, D,L-galactose 및 ester sulfate로 구성되어 있어 agarose의 조성 과 매우 유사하나 -OCH₃ 기의 함량의 차이가 있어 한천과 같은 겔화능은 나타

내지 않는다 (Anderson NS et al., 1965). 지금까지 알려진 porphyran의 기능성으로는 식이섬유소로서의 역할 및 면역강화 (Yoshizawa Y et al., 1993; Park JH, 1998), 비만과 대장암 및 당뇨와 관상심장질환 예방 (Jenkins et al., 2000; Leinonen et al., 2000), 항산화 활성 (Jung KJ et al., 2002), 항균효과 및 항암효과 (Kwon MJ et al., 2006) 등의 연구가 진행되어 왔다.

본 연구에서는 생체효능에 영향을 줄 수 있는 기능성을 가지는 김 단백질 추출하고 분리하여 구조를 밝힌 후, peptide를 제작하여 실험에 사용하였다. 위에서 언급했듯이 porphyran에 대한 연구는 많이 보고되고 있지만, 김에서 단백질을 분리하여 구조를 밝히고, 이러한 구조 중에서 어느 부위가 생리활성을 가지며, 특히 세포성장에 관여하는 peptide 구조는 어느 것인지에 관한 연구는 지금까지 거의 없으며, 그 생리활성 작용 메커니즘에 대한 연구는 보고되고 있지 않다.

Insulin like growth factor (IGFs)는 한 개의 사슬로 이루어진 peptide로 생체 내에서 다양한 반응에 관여하는 주요한 성장인자이다 (CS Mantzoros et al., 1997). IGF-I은 세포 표면의 수용체인 IGF-IR와 결합하여 세포 내 다양한 신호전달경로를 활성화 한다 (Axel Ullrich et al., 1986). IGF-IR의 활성화가 유도되면 IGF-IR에 결합하는 단백질인 IRS-1이 인산화 되어 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway와 Ras pathway 같은 세포 내 신호전달 경로를 활성화 시켜 세포의 성장, 분화, 증식을 촉진시키게 된다 (Tai et al., 2003).

Epidermal growth factor (EGF)는 53 amino-acids로 구성된 single-chain polypeptide로, 분자량 170kDa의 막 투과성 당단백질인 EGFR과 결합하게 되면 수용체의 세포 내 domain의 tyrosine kinase를 활성화시켜, downstream 기질을 인산화 시킴으로서 DNA 복제와 세포분열을 야기하여 세포증식을 유도하게 된다 (Pusztai L et al., 1993).

앞선 연구를 살펴보면 다양한 세포주에서 김의 기능성이 입증 보고된 연구가 많이 있었지만, 대부분 김 다당류인 porphyran에서 이루어진 결과이며 아직까지 김 peptide가 정상 소장 상피세포의 증식 및 보호 작용에 미치는 영향에 대한 연구는 없었다. 본 연구에서는 rat에서 유래한 정상 소장 상피세포인 IEC-6 세포에 김 peptide를 처리했을 때 세포의 증식작용을 나타내므로 이에 대한 작용 기전을 밝히고자 본 연구를 수행하게 되었다. 이러한 연구결과들을 토대로 김 peptide가 실제 사람의 몸에서 소장세포의 보호나 증식 효능을 나타 낼 때 기능성 식품의 소재로서도 활용이 가능할 것으로 생각된다.



II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 재료

본 실험에서 사용한 김 peptide는 PEPTRON (Daejeon, Korea) 으로부터 합성하였다. 실험에 사용한 세포는 ATCC로부터 구입한 정상 소장 상피 세포주인 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 위하여 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, MEK inhibitor인 PD98059와 PI3 Kinase Inhibitor인 LY294002는 Cell signaling (Beverly, MA, USA) 제품을 사용하였다. Detection Reagent로 Super signal West Pico Luminol/Enhancer Solution과 Supersignal West Pico Stable Peroxide Solution (Piercem, USA)을 이용해 Kodac film (Rochester, NY, USA)에 감광하였다. Cell cycle test assay는 Muse™ Cell Cycle Reagent (EMD Millipore Co.,

Hayward, CA, USA)를 반응시켜 Muse™ Cell Analyzer (EMD Millipore Co., Hayward, CA, USA)를 이용해 측정하였다.

2. 실험방법

1) 시료의 제조

PY-PE (*Porphyra yezoensis* Peptide)는 PEPTRON (Daejeon, Korea)으로부터 합성하였다. PY-PE는 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 탈이온수에 녹여 HPLC로 정제하였는데, HPLC로 사용한 칼럼은 Shiseido capcell pak C18 Column 이며, 220 nm에서 나타내는 peak를 확인한 후, 0.1% TFA 내 acetonitrile 농도를 10~70% 까지 변화를 주어 1 ml/min 유속으로 용출시켰다.

2) 세포 배양

Rat에서 유래된 소장 상피세포인 IEC-6 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, USA) 으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 사용하여 37 °C CO₂ incubator (5% CO₂, 95% air)에서 배양하였다. 이때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위하여 penicillin (100 units/ml)을 배지에 첨가하였다. 세포가 80% 정도 confluent되면 PBS로 세척한 후 trypsin 처리하여 계대배양 하였으며 배지는 48시간마다 교환해 주었다.

3) MTS assay

PY-PE가 IEC-6 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTS assay를 시행하였다. 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 세포를 동일하게 분주한 후 세포부착을 위하여 24시간 동안 배양하였고, serum Free medium (SFM)으로 4시간 더 배양한 후 PY-PE를 0, 125, 250, 500, 1000 ng/ml 농도별로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. MTS/PMS solution (Promega Co, USA)을 첨가하여 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 ELISA plate reader (BIO-RAD, USA)로 490 nm 흡광도에서 측정하였다.

4) PI3K/MEK inhibitor 처리

IEC-6 세포를 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한 다음 serum free-DMEM 배지로 교환하여 4시간 더 배양하였다. 4시간 경과 후, serum free-DMEM 배지에 PD98059 40 μ M, LY294002 50 μ M의 농도로 처리하였다. 1시간 후 PY-PE를 500 ng/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 세포증식을 확인하였다.

5) Western blot analysis

① Total cell lysate 추출

PY-PE를 처리한 IEC-6 세포를 PBS로 2회 세척하고 protease inhibitor (1 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A, 200 mM Na_3VO_4 , 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 실험에 사용하였다.

② 핵 획분 추출

핵 획분 추출은 Park *et al.* (2005)의 방법을 사용하여 추출하였다. IEC-6 세포에 PY-PE를 농도별로 처리한 다음 PBS로 2회 세척한 후 protease inhibitor (1 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A, 200 mM Na₃VO₄, 500 mM NaF, 100 mM PMSF)를 첨가한 hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂)를 500 μ l 첨가하여 얼음 위에서 lysis 한 후 15분간 방치시켰다. 다시 2.5% NP-40을 65 μ l 첨가하여 4 °C에서 10분간 방치시킨 후 5,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하였다. cell lysate에 nuclear extraction buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT)를 첨가하여 4 °C에서 20분간 방치한 후 원심분리 (14,000 rpm, 4 °C, 10 min)하여 상층액을 핵 획분으로 사용하였다.

③ 단백질 발현 및 분석

IEC-6 세포에 PY-PE를 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 Na₃VO₄, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 0.25% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF)를 첨가하여 4 °C 저온에서 30분 방치한 후 cell lysate를 원심분리한 다음 상층액을 취하여 단백질 농도수준을 측정하였다. 단백질 농도를 30 μ g/ml로 동일하게 정

량한 다음 SDS-PAGE에 전기영동 한 후 PVDF membrane (Millipore, USA)으로 Transfer 하였다. 이때 표준분자량은 dual color marker를 사용하였다. 전기영동 한 membrane은 실온에서 1% BSA/TBS-T로 1시간 30분 동안 blocking 시킨 후 확인하고자 하는 각각의 1차 antibody를 1:1,000으로 희석해 10 °C 16시간 반응시킨 후 TBS-T로 15분간 2회 세척한 다음 2차 antibody를 1:10,000 비율로 희석하여 1시간 30분간 반응시켰다. 반응 시킨 membrane을 다시 TBS-T로 15분간 2회 세척한 후 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 나온 밴드의 강도를 Science Lab 2005 (Fujifilm, Japan)를 이용하여 비교분석하였다.

6) Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

① RNA 추출 및 cDNA 합성

RNA를 추출하기 위하여 TRIzol 용액 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)을 이용한 phenol-chloroform 추출 기법을 사용하였다. TRIzol 용액을 각 well당 각각 1 ml씩 넣고, 200 μ l의 chloroform을 처리하여 잘 섞어준 뒤 4 °C, 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 분리하여 isopropanol과 1:1의 비율로 섞어준 뒤, 4 °C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 생성된 pellet을 DEPC로 희석한 75% EtOH에 씻어내고, 4 °C, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 최종 추출된 pellet을 상온에서 10분간 말린 뒤 0.1% DEPC water 50 μ l에 녹인 후, UV 흡광도 600 nm에서 농도를 측정하였다. cDNA를 합성하기 위해 1 μ g/ μ l의 RNA를 5 \times Buffer 4 μ l, random primer 2 μ l, 2.5 mM dNTP 2

μl , Rnase inhibitor 0.5 μl , 그리고 reverse transcriptase 0.25 μl (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)와 혼합하여 25 °C 10분, 42 °C 60분, 그리고 95 °C 5분간 Revoscript RT premix를 이용해 cDNA를 합성하였다.

② mRNA 발현 및 분석

전체 혼합물 20 μl 에 각각 3 μl 의 cDNA, 5pmol primer, dNTP 0.2 mM, 10 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, Taq polymerase 1 unit을 포함하여 혼합하였다. 사용된 각종 primer는 Cosmo Genetech (Seoul, Korea)에서 주문 제작하여 사용하였다 (Table. 1). 대상 유전자를 각각의 조건에 맞게 polymerase chain reaction 방법으로 증폭시켰다. polymerase chain reaction 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 Red safe™를 이용하여 염색한 후 Ultra violet (UV)하에서 확인하였다.

Table 1. Oligonucleotide sequences of the primer used in RT-PCR.

| Gene name | Primer sequence |
|-----------|--|
| IGF-IR | forward 5'-AAATGTGCCCGAGCGTGTG-3' |
| | reverse 5'-TGCCCTTGAAGATGGTGCATC-3' |
| SOS 1 | forward 5'-GCATCTTATTGGAAGGATTT-3' |
| | reverse 5'-CCTCTCAGGTGAGACTGCTA-3' |
| IRS-1 | forward 5'-ACTTGAGCTATGACACGGCT-3' |
| | reverse 5'-GGTTGGAGCAACTGGATGAA-3' |
| PI3K | forward 5'-GCCGAACACCTTTTTGAGTC-3' |
| | reverse 5'-AGGAGCGGTACAGCAAAGAA-3' |
| PDK1 | forward 5'-AAGGGTACGGGCCTCTCAA-3' |
| | reverse 5'-CCCACGTGATGGACTGAAAGA-3' |
| Akt | forward 5'-CAACTTCTCTGTGGCGCAGTG-3' |
| | reverse 5'-GACAGGTGGAAGAACAGCTCG-3' |
| EGFR | forward 5'-CTCACGCAGTTGGGCACTTT-3' |
| | reverse 5'-TCATGGGCAGCTCCTTCAGT-3' |
| Grb2 | forward 5'-CGGGATCATGGAAGCCATCGCCAAA-3' |
| | reverse 5'-CTAGCTAGCTTAGACGTTCCGGTTCAGT-3' |
| Ras | forward 5'-CCCGTCCTCATGTACTGGTC-3' |
| | reverse 5'-ATCTTGGATACGGCAGGTCA-3' |
| Raf | forward 5'-AAGGCAGTCGTGCAAGCTCA-3' |
| | reverse 5'-GATGATGGCAAACACGGATTC-3' |
| MEK | forward 5'-CGATGGATCCCCCAAGAAGAAGCCGACG-3' |
| | reverse 5'-CGATCTCGAGTTAGACGCCAGCAGCATG-3' |
| ERK | forward 5'-GATTGCTGACCCTGAGCA-3' |
| | reverse 5'-GGGGGCCTCTGGTGCC-3' |
| c-Jun | forward 5'-TCAAATGTTTGCAACTGCTGCG-3' |
| | reverse 5'-ATGACTGCAAAGATGGAAACG-3' |
| c-Fos | forward 5'-GGAGAATCCGAAGGAAGG-3' |
| | reverse 5'-GCTTGGGCTCAGGGTCATTG-3' |
| GAPDH | forward 5'-CAGCCGAGCCACATCG-3' |
| | reverse 5'-TGAGGCTGTTGTCATACTTCTC-3' |

7) Cell cycle analysis

PY-PE에 의한 세포 주기의 분포도 변화를 보기 위해서 IEC-6 세포를 6-well에 10% FBS를 함유한 DMEM 배지를 희석해 분주하였다. 세포가 80% 증식하면 SFM을 4시간 처리하고 이 후 PY-PE를 농도별로 24시간 처리, 배양하였다. PBS로 세포를 부유시켜 원심분리 (5,000 rpm, 10 min, 4 °C) 하여 pellet을 회수해 각 각의 tube에 Cell cycle test Reagent와 섞어 5초간 vortex 한 후 30분간 암실에서 실온 반응하였다. 반응 후 Muse™ Cell Analyzer 장비를 이용해 측정하였다.

8) 통계학적 처리

본 실험의 분석결과는 각각의 군별로 평균과 표준편차 (mean±S.D.)를 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 살펴 보았다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 김 (*Porphyra yezoensis*) peptide의 제조

김 (*Porphyra yezoensis*) peptide는 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 탈이온수에 녹여 Shiseido capcell pak C18 Column의 HPLC로 정제하여 220 nm의 범위에서 peak를 확인한 후 (Fig. 1), 0.1% TFA 내 acetonitrile 농도를 10~70%까지 변화를 주어 1 ml/min 유속으로 용출시켰다. 이와 같은 시료의 분자량은 Mass analysis (HP 1100 Series LC/MSD)를 이용해 1,916 Da 위치에서 확인하였으며 Sequence는 A-L-E-G-G-K-S-S-G-G-G-E-A-T-R-D-P-E-P-T 이다. 따라서 본 실험에 사용된 시료는 김 peptide로써 PY-PE로 명명하였다.



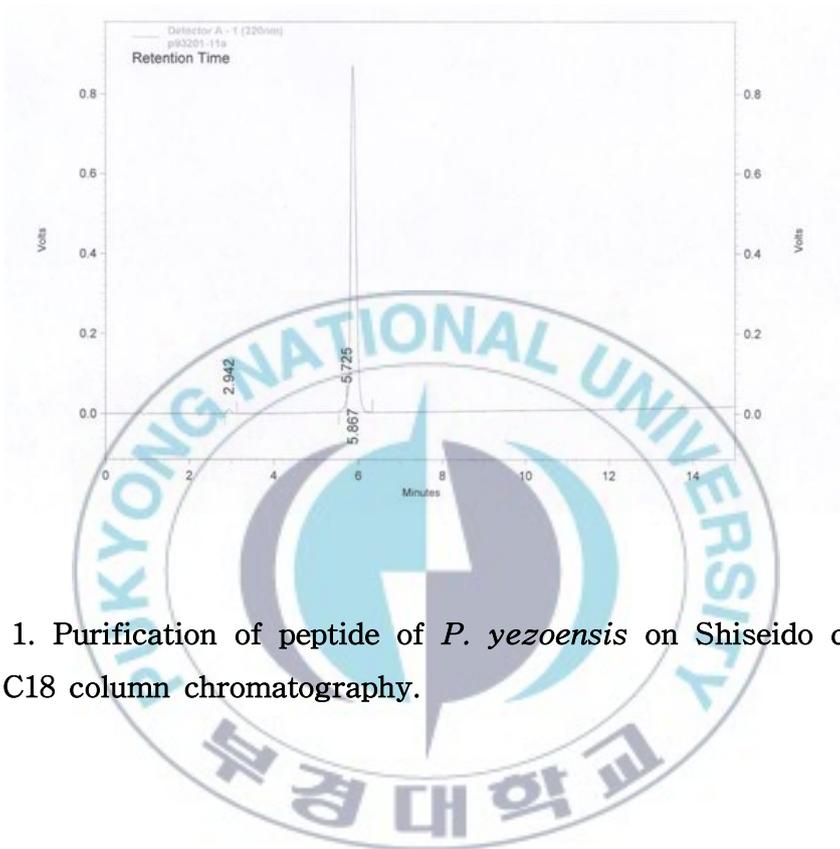


Fig. 1. Purification of peptide of *P. yezoensis* on Shiseido capcell pak C18 column chromatography.

2. PY-PE에 의한 IEC-6 정상 소장 상피세포 성장 촉진 효과

1) PY-PE가 IEC-6 정상 소장 상피세포 증식에 미치는 영향

Rat에서 유래한 정상 소장 상피세포인 IEC-6 세포의 증식에 대하여 PY-PE가 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 MTS assay를 시행하였다. IEC-6 세포에 PY-PE를 0, 125, 250, 500, 1000 ng/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 약 129%, 143%, 159%, 163%로 증식하여 농도 의존적인 세포증식이 관찰되었으며 (Fig. 2), 이 후의 실험에서는 이 농도 범위에서 실험을 진행하였다.

다음으로, IEC-6 세포에 PY-PE를 처리하였을 때 형태학적인 변화를 나타내는지 확인하기 위해 위상차 현미경 상에서 세포의 형태를 관찰하였다 (Fig. 3). 그 결과, PY-PE 처리 시 대조군과 비교하여 세포의 형태학적인 변화는 관찰할 수 없었으나, 세포의 증식이 활발한 것을 확인하였다. 즉, MTS assay와 동일하게 현미경 상에서도 세포의 증식을 확인할 수 있었다.

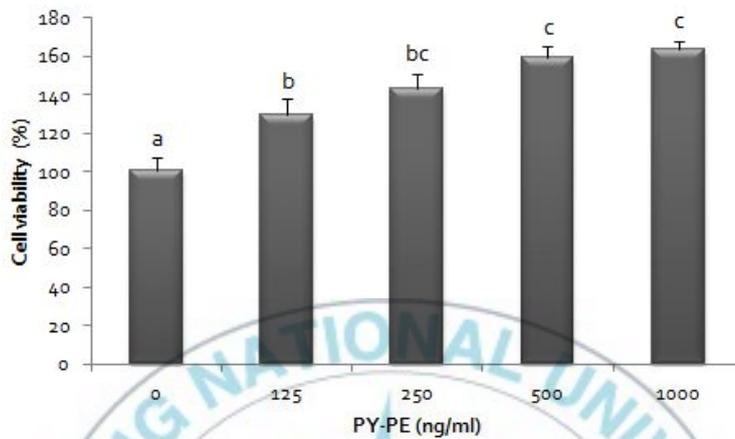


Fig. 2. Proliferative effect of PY-PE on IEC-6 cells.

IEC-6 cells were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well with medium supplemented with 10% FBS. After incubation for 24 h, cells were serum-starved for 4 h and then treated with PY-PE in the indicated concentrations for 24 h. The results indicated mean \pm S.D. in the three independent experiments.

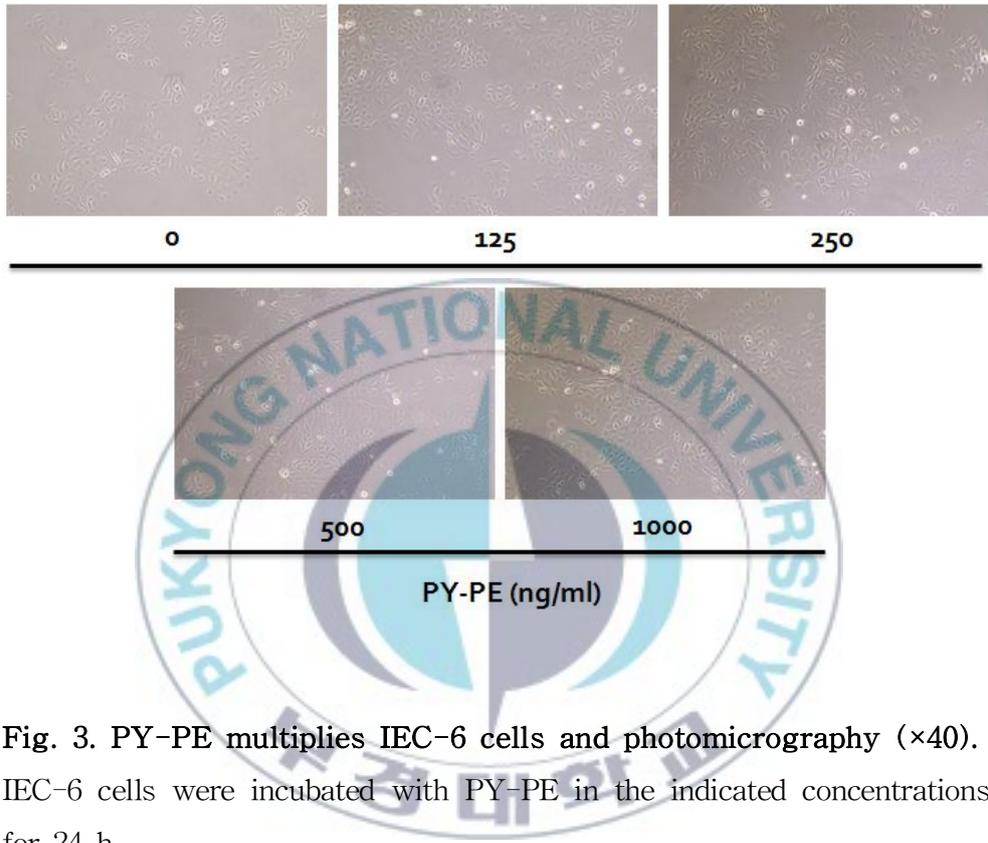


Fig. 3. PY-PE multiplies IEC-6 cells and photomicrography ($\times 40$). IEC-6 cells were incubated with PY-PE in the indicated concentrations for 24 h.

3. PY-PE에 의한 세포증식 신호전달분석

1) IGF-IR과 그 하위인자의 발현에 미치는 영향

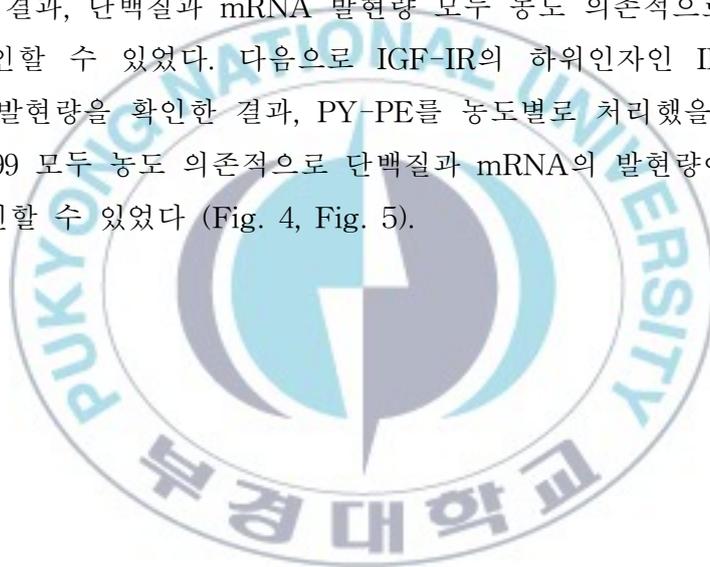
PY-PE를 농도별로 24시간 동안 처리한 IEC-6 세포에서 IGF-IR로 유도 되어진 세포 증식에 미치는 영향에 대해 알아보았다. Western blot을 시행한 결과 농도 의존적으로 IGF-IR의 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었고 이에 따라 하위 단계의 단백질 발현을 확인하기 위한 실험을 진행하였다.

Insulin like growth factors (IGFs)는 한 개의 사슬로 이루어진 polypeptide로서 생체 내에서 다양한 반응에 관여하는 주요한 성장인자이다. 주로 간세포에서 합성되며 일부분은 신장과 같은 다른 조직에서 autocrine과 paracrine에 의해 분비되어 세포의 성장, 분화, 생존을 촉진시킨다 (CS Mantzoros et al., 1997). 이러한 IGF-I의 생체 내 작용은 Type I IGF receptor (IGF-IR)에 의해 매개되며, 이는 IGF-결합단백질 (IGFBP)에 의해 조절된다. IGF-IR은 분자량 300,000 - 350,000의 membrane glycoprotein으로 2개의 α -subunit과 2개의 β -subunit이 β - α - α - β 으로 결합된 $\alpha_2\beta_2$ 형의 heterotetramer 이다. IGF-IR의 disulfide 결합에 의해 연결된 두 개의 α -subunit에 IGF가 결합하게 되면 β -subunit의 tyrosine kinase domain에 autophosphorylation이 일어나게 되어 여러 가지 단백질을 인산화 시키는 tyrosine kinase로 활성화 된다 (Axel Ullrich et al., 1986). 활성화 된 IGF-IR에 결합하는 세포 안의 단백질 중 가장 잘 알려진 것이 insulin-receptor substrate (IRS) family인데 IRS의 PH 또는 PHB domain이 IGF-IR에 결합하게 되면 IRS가 인산화 된다. 이렇게 phosphorylation된 IRS에 결합하는 단백질 중에서 가장 대표적인 것이 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)의 p85 regulatory subunit이다. PI3K는 직접 IGF-IR에 결합되어 활성화되거나 IRS에 의해 활성화되어

Akt를 인산화시킴으로써 cell proliferation을 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Alessi DR et al., 1998; Vanhaesebroeck B et al., 1997).

앞서 우리는 MTS assay를 통하여 소장 상피세포인 IEC-6 세포에 PY-PE를 처리했을 때 세포증식효과를 확인 할 수 있었다. 본 연구에서는 PY-PE의 처리로 세포증식이 유도되는 과정이 세포 증식 신호전달 경로 중 하나인 IGF-IR을 통해 이루어질 것이라 가정하여 IGF-IR의 발현 및 하위 신호전달 경로에 대한 작용을 살펴보았다.

우선, PY-PE를 처리하였을 때 IGF-IR의 발현에 대한 영향을 살펴보았다. 그 결과, 단백질과 mRNA 발현량 모두 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 다음으로 IGF-IR의 하위인자인 IRS-1, Shc, PY99의 발현량을 확인한 결과, PY-PE를 농도별로 처리했을 때 IRS-1, Shc, PY99 모두 농도 의존적으로 단백질과 mRNA의 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4, Fig. 5).



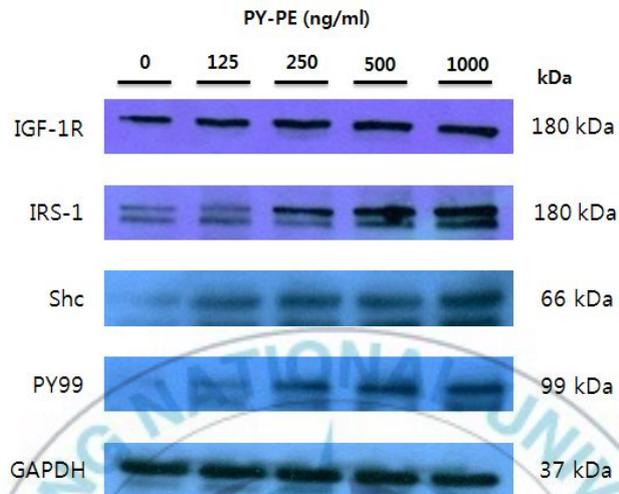


Fig. 4. PY-PE affect the protein expression of IGF-IR, IRS-1, Shc, PY-99 in IEC-6 cells.

Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-IGF-IR, anti-IRS-1, anti-Shc, anti-PY99 and anti-GAPDH antibodies.

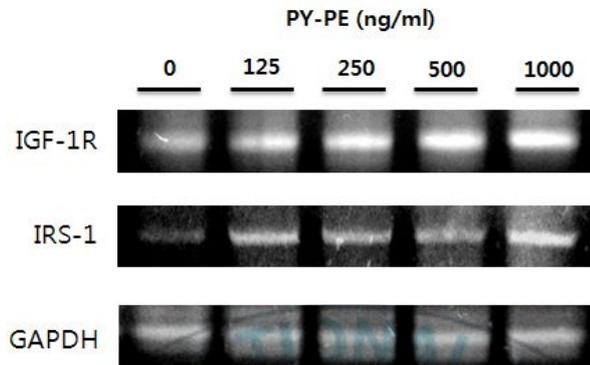


Fig. 5. PY-PE affect the mRNA expression of IGF-IR and IRS-1 in IEC-6 cells.

Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by RT-PCR using IGF-IR, IRS-1 and anti-GAPDH primers.

2) MAPK signaling pathway에 미치는 영향

진핵세포의 성장과 분화는 세포 외부로부터 전달된 신호에 의해 이루어지고, 이때 세포 표면에서의 신호는 세포막에 부착되어 있는 Receptor protein에 의해 감지되며, 세포질을 통하여 핵 내로 신호들이 전달되게 된다. 이러한 신호전달 과정에서 핵심적인 역할을 하는 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)는 cytokine, growth factor, hormone, mitogen 등 세포 외부의 신호전달물질을 세포질을 통해 핵 내로 전달하는 신호전달 과정의 매개체로 세포의 성장, 분화 및 자극에 대한 생리적 반응을 조절 한다 (Levin DE et al., 1993; Garrington TP et al., 1999). MAPK family는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), p38 MAPK (p38) 등으로 나누어지는데 MEK1/2, SEK, MKK3/6 등의 다양한 MAPK kinase에 의해 인산화 되어 활성화되며 표적단백질의 serine/threonine 잔기를 인산화 시킨다 (Seger et al., 1995; Heineke et al., 2006). MAPK 가운데 성장인자에 의한 신호전달 과정에는 MEK에 의해 ERK1/2의 활성화가 일어나며 이는 세포의 생존과 증식, 분열 및 분화를 조절 한다 (Marshall CJ, 1995). 반면에, JNK과 p38 MAPK의 경우 보통 자외선 조사와 열충격, 삼투압 충격과 같은 다양한 스트레스로부터 오는 세포의 반응에 주요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Lee et al., 2002).

앞선 실험에서, PY-PE를 IEC-6 세포에 처리했을 때 IGF-IR의 발현을 농도 의존적으로 증가시키고 IGF-IR에 결합하는 binding protein인 IRS-1, Shc, PY99의 발현 증가로 세포증식이 유도되는 것을 확인하였다 (Fig. 4). 이들의 하위 신호전달 경로에는 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 MAPKs인 ERK, JNK, p38 kinase의 인산화를 살펴보았다.

그 결과, PY-PE를 처리하였을 때, 대조군에 비해 ERK의 인산화가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었고, JNK와 p38의 인산화는

농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 세포증식에 관련된 연구결과를 살펴보면, Chouhury G. G et al. (1997)은 Platelet derived growth factor (PDGF)에 의한 혈관간막세포의 증식과 이동 조절에 MAPK가 관여한다고 하였고, Lovicu et al. (2001)은 fibroblast growth factor (FGF)로 유도된 lens cell의 증식과 분화에 MAPK가 관여한다고 하여 본 연구와 동일한 연구결과를 보여주었다.

이 결과를 바탕으로, PY-PE를 IEC-6 세포에 처리하였을 때 IGF-IR 과 연관된 하위 신호전달경로 중 MAPK가 관여한다고 할 수 있는데, ERK의 활성화 및 JNK, p38의 활성 저해로부터 세포증식이 유도되는 것으로 생각된다.



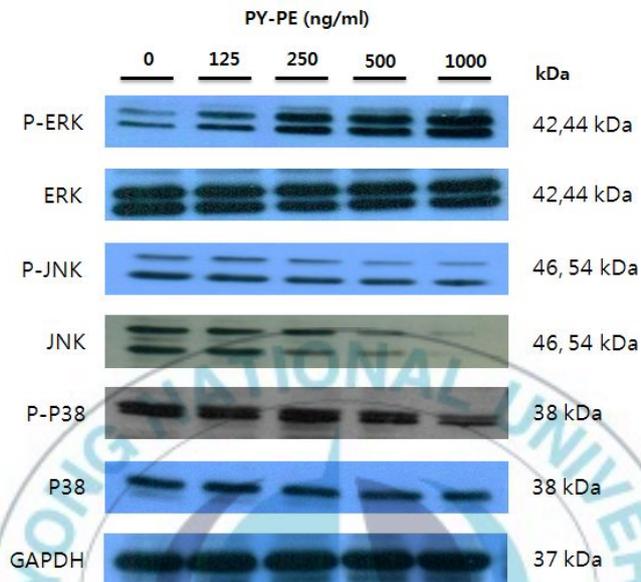


Fig. 6. Effect of PY-PE on MAPK signaling pathway.

Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK, anti-phospho-JNK, anti-JNK, anti-phospho-p38, anti-p38 and anti-GAPDH antibodies.

3) PI3K/Akt signaling pathway에 미치는 영향

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)는 여러 신호전달경로에서 조절 작용을 하는 중요한 단백질 중 하나로 세포의 증식 및 생존, 성장, 분화 등의 세포 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Cantley LC, 2002). PI3K는 두 개의 subunits 즉, 조절작용을 하는 p85와 촉매작용을 하는 p110으로 이루어져 있으며, 이는 IGF-IR, EGFR, non-receptor tyrosine kinase에 의해 활성화 된다 (Klippel et al., 1996). PI3K의 활성화에는 두 가지 경로가 존재하는데 하나는 수용체와 p85 subunit의 SH2 domain과의 상호작용을 통해 활성화 되는 직접적인 경로이고, 다른 한 가지 경로는 focal adhesion 부위가 관여하는 간접적인 경로인데 이를 통해 활성화가 일어나게 된다 (Kilppel et al., 1996 ; Wyman MP et al., 1998). PI3K에 의한 세포증식의 연구를 살펴보면, Ebner S et al. (2000)은 회돌기교 전구세포의 증식과 생존에 PI3K가 관여한다고 하였고, Calabro P et al. (2004)는 ERK1/2와 PI3K 경로를 통하여 resistin의 평활근세포 증식촉진기전이 유도된다고 하였다. 또한 Goncharova E.A et al. (2002)은 폐 평활근 세포의 증식과 이동에 PI3K가 관여한다고 하였다.

Akt는 57 kDa의 serine/threonine kinase로 upstream kinase인 PI3K 경로를 통해 활성화 되는 것으로 알려져 있으며, 세포의 생존과 관련된 증식, 분화, 혈관신생, 세포주기 등의 여러 생리활성을 조절하는 조절자로서 작용한다. PI3K와 Akt 신호경로는 IGF-IR과 같은 자극인자에 의해 PI3K로 신호가 전달되면 Akt의 Serine 473 잔기가 인산화 되어 하위 분자를 활성화시킴으로서 세포의 증식과 분화를 촉진시킨다 (Bellacosa A, 2005).

앞선 실험에서 IEC-6 세포에 PY-PE를 처리했을 때 ERK의 활성화가 세포증식에 관여하는 것을 확인하였기 때문에, PI3K/Akt signaling pathway 또한 IEC-6 세포의 증식에 관여할 것이라 가정하고 관련된 단백질의 발

현에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 그 결과 p85와 p110의 단백질 발현이 대조군에 비해 증가하였고 PDK1의 단백질 발현과 Akt의 인산화 또한 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 7). 또한 PI3K, PDK1 그리고 Akt의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 8). 따라서, IEC-6 세포에 PY-PE 처리 시 IGF-IR에 의해 조절되는 하위 신호전달 경로인 MAPK pathway와 PI3K/Akt pathway의 활성화를 유도하여 IEC-6 세포의 증식이 유도되는 것으로 보여진다.



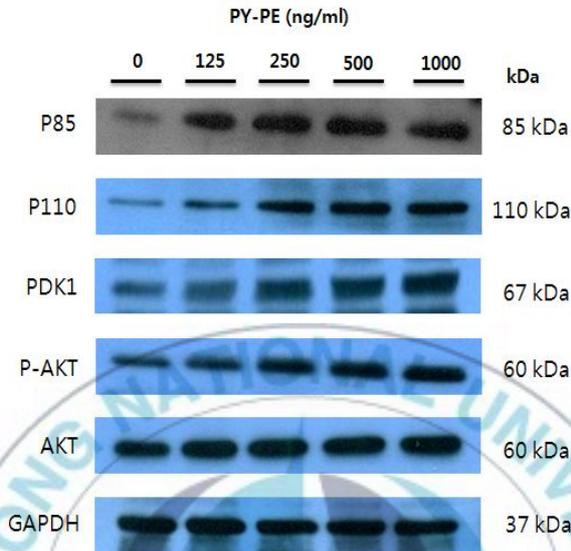


Fig. 7. Effect of PY-PE treatment on PI3K and Akt protein expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-p85 α , anti-p110, anti-PDK1, anti-phospho-Akt1/2/3, anti-Akt1 and anti-GAPDH antibodies.

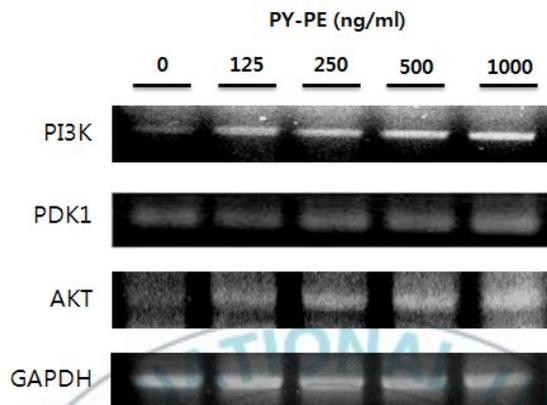


Fig. 8. Effect of PY-PE treatment on PI3K and Akt mRNA expression in IEC-6 cells.

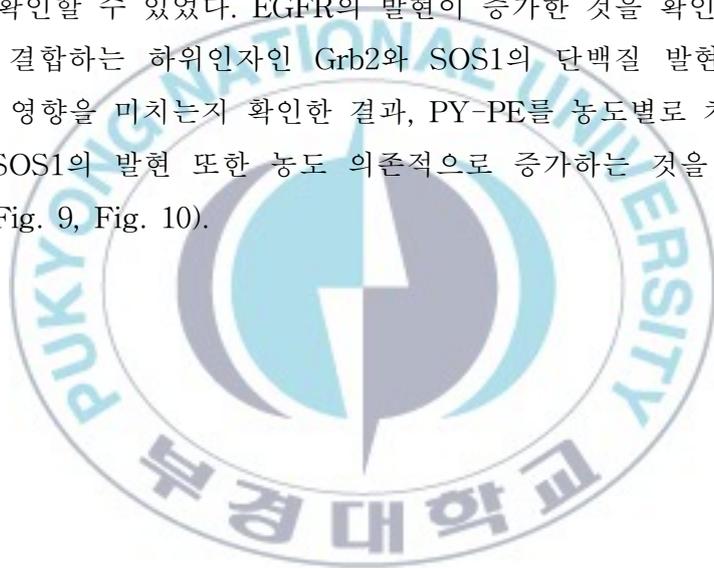
Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by RT-PCR using PI3K, PDK1, Akt and GAPDH primers.

4) EGFR와 Grb2, SOS1의 발현에 미치는 영향

수용체 티로신 키나아제 (receptor tyrosine kinase ; RTK)는 많은 성장인자, cytokine 및 hormone의 신호전달을 위한 세포표면 수용체이다 (Pawson T, 1995). RTK는 정상세포의 증식과 분화 등의 대사과정을 조절할 뿐만 아니라 많은 악성종양의 발암 과정에 중요한 역할을 한다. 대표적인 RTK는 상피성장인자 (EGF : epidermal growth factor) 수용체, PDGF (platelet-derived growth factor) 수용체, 혈관내피성장인자 (VEGF : vascular endothelial growth factor) 수용체 등이 있다 (Robinson DR et al., 2000). 그 중에서 EGF는 53 amino-acids로 구성된 single-chain polypeptide로, tyrosine kinase 활성을 갖고 있는 세포 표면의 수용체 (EGFR)와 결합하여 다양한 형태의 세포증식을 유도하는 강력한 분열 유발성 단백질이다. Cohen 등이 처음으로 생쥐의 악하선 으로부터 추출한 이후 사람의 타액, 세포외액 등에서도 추출하게 되어 많은 연구가 시행되었다 (Cohen S, 1962 ; Cohen S et al., 1975). 상피성장인자수용체 (EGFR, epidermal growth factor receptor)는 다양한 세포의 세포막에 존재하는 분자량 170 kDa의 막 투과성 당단백질로 EGF나 TGF- α 와 같은 다른 성장 인자들이 결합하는 세포외 결합부 (domain)와 짧은 막전위 (transmembrane), 세포내 티로신 키나아제 결합부로 구성되고 (Ishitoya J et al., 1989 ; Zwick E et al., 2001), 상피의 증식이 빠르게 일어나는 여러 종류의 상피세포와 상피조직에서 관찰된다 (Christensen ME et al., 1992). Green et al. (1977)은 피부, 결막, 인두조직에서 유래하는 각화세포의 증식자극에 EGF가 관여한다고 하였고, Cohen et al. (1974)에 의하면 in vivo의 연구에서 EGF는 여러 부위의 상피조직 기저층의 증식을 촉진한다고 보고하였다. 그리고 Niederlechner et al. (2013)은 heat-stress에 노출된 IEC-6 세포의 세포 보호 기전에서 EGFR의 발현은 필수적이라 하였다. EGF나 TGF- α 같은 상피성장인자

가 세포의 세포막에 존재하는 EGFR에 결합하게 되면 수용체의 세포 내 domain의 tyrosine kinase를 활성화 시키게 되는데, 활성화된 tyrosine kinase는 downstream 기질을 인산화 시킴으로써 DNA 복제와 세포분열을 야기한다. 이와 같이 상피성장인자는 EGFR과 결합함으로써 세포 증식 촉진에 중요한 역할을 하므로 (Pusztai L et al., 1993), 본 논문에서는 EGFR의 발현에 대해 살펴보았다.

우선, IEC-6 cell에 PY-PE를 처리하였을 때 EGFR의 단백질과 mRNA 발현량의 변화를 살펴보았다. 그 결과, 농도 의존적으로 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. EGFR의 발현이 증가한 것을 확인하였으므로 EGFR에 결합하는 하위인자인 Grb2와 SOS1의 단백질 발현과 mRNA 발현에도 영향을 미치는지 확인한 결과, PY-PE를 농도별로 처리했을 때 Grb2와 SOS1의 발현 또한 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 9, Fig. 10).



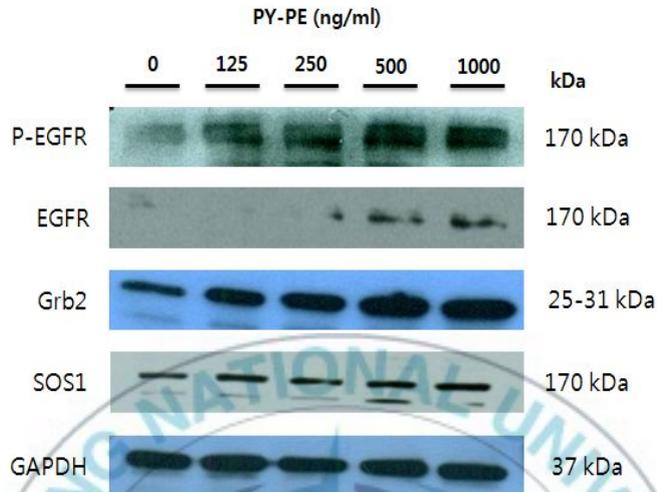


Fig. 9. PY-PE affect the expression of EGFR, Grb2, SOS1 in IEC-6 cells.

Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-phospho-EGFR, anti-EGFR, anti-Grb2, anti-SOS1 and anti-GAPDH antibodies.

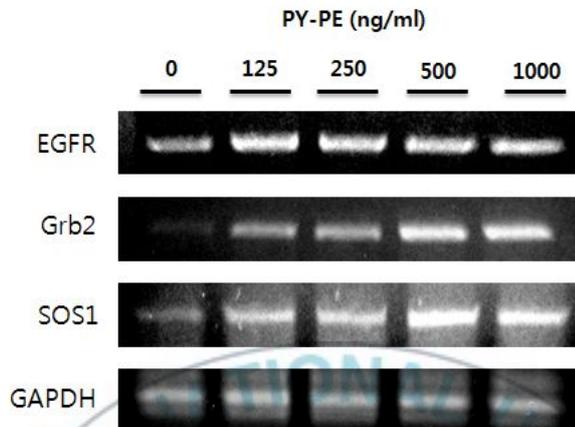


Fig. 10. PY-PE affect the mRNA expression of EGFR, Grb2, SOS1 in IEC-6 cells.

Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by RT-PCR using EGFR, Grb2, SOS1 and GAPDH primers.

5) Ras signaling pathway에 미치는 영향

저분자량 GTP binding protein인 Ras는 세포의 증식과 분화를 포함한 다양한 세포 내 반응에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Bouguski et al., 1987). Ras는 분자량 21 kDa의 종양유전자의 일종으로 guanine nucleotide-binding protein을 code한다. Ras 유전자에는 Kirsten-ras (K-ras), Harvey-ras (H-ras) 및 N-ras의 세 가지 종류가 존재한다. 세 가지 Ras 단백질은 조직 특이적으로 발생과정에서 다르게 발현되는데, 이는 Ras 단백질들이 서로 다른 기능을 나타낼 가능성을 보여주며, Ras 단백질에 의한 신호전달 경로에도 차이가 있다고 알려져 있다 (Carbone et al., 1991). 성장인자가 세포막 수용체에 결합하여 형성된 신호는 일련의 연결 단백질의 결합을 거쳐 Ras 활성화인자인 SOS1 protein을 소집하고, 이는 guanosine triphosphate (GTP)에서 guanine nucleotide 분해를 촉진하여 Ras 단백질과 결합을 촉진함으로써 Ras를 활성화시키게 된다. 활성화된 Ras-GTP는 단백질과 결합하여 다양한 신호전달이 이루어지게 되는데 이 중에서 Raf-MEK (mitogen-activated and extracellular-signal regulated kinase)-ERK (extracellular signal regulated kinase) 경로는 세포의 증식, 생존 및 분화 등을 촉진한다 (Schubbert S et al., 2007).

그리고 또 다른 한 가지 경로인 Ras-PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt 경로 또한 G protein이 매개하는 세포 외 자극에 반응하는 수용체 또는 small GTPase Ras에 의해 활성화되어 (Rodriguez et al., 1994; Rodriguez et al., 1996) 세포 증식, 세포 이동성, 분화 및 apoptosis를 조절한다 (Keely et al., 1997; Yao et al., 1995). 본 실험에서는 PY-PE를 처리한 IEC-6 세포에서 Ras signaling의 단백질 발현량과 mRNA 발현량에 대해 확인해본 결과, Ras의 발현량은 단백질과 mRNA 발현 모두에서 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 그 하위인자인 Raf, MEK, ERK의 발현량 또한 단백질 (Fig. 11)과 mRNA

(Fig. 12) 발현 모두 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.



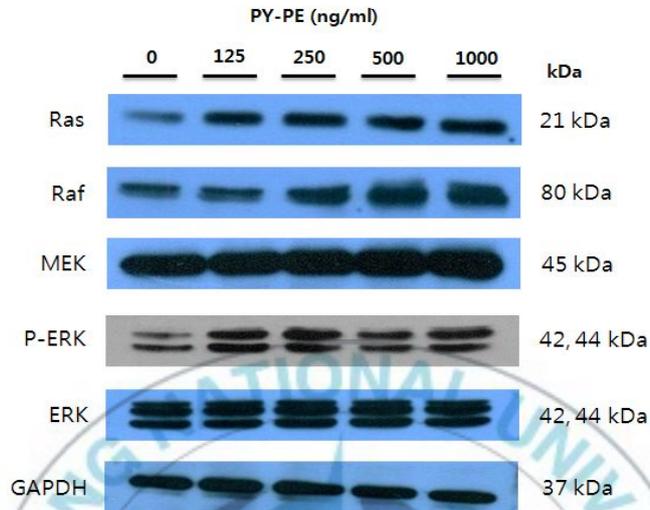


Fig. 11. Effect of PY-PE treatment on Ras signaling protein expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-Ras, anti-Raf, anti-MEK, anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK and anti-GAPDH antibodies.

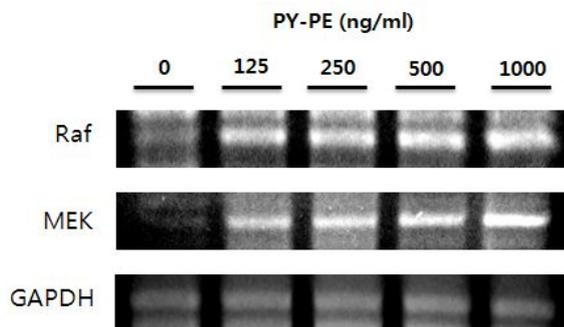


Fig. 12. Effect of PY-PE treatment on Ras signaling mRNA expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by RT-PCR using Raf, MEK and GAPDH primers.

6) AP-1의 발현에 미치는 영향

진핵세포에서 유전자 발현 조절은 염기서열 특이 DNA 결합 단백질이 promoter cis-acting elements와 결합함으로써 증강되게 되는데 Activator protein 1 (AP-1) 과 cyclic AMP response element binding (CREB) 등의 전사인자는 유전자 발현 조절능력이 널리 인정되고 있다 (Branchi et al., 1993 ; Liou & Baltimore., 1993).

AP-1 (Activator protein 1)은 transcription factor로서 특이적으로 일련의 gene 발현 조절에 관여하는데 (Chiu R et al., 1988 ; Morgen I.M et al., 1992), 이는 세포의 증식, 분화, 세포사멸과 전환 등의 광범위한 범주에서 세포 과정 조절에 직접적으로 관여 한다 (Murakami Y et al., 1991 ; Kovary K et al., 1991). AP-1은 Jun족 단백질과 fos족 단백질의 이종이합체로 구성되어 있으며 이들 단백질은 연계하여 하나의 공통 좌위에 결합하는 하나의 leucine zipper domain을 통해 homo-와 heterodimer 복합체를 형성 한다 (Abate C et al., 1990; Angel P et al., 1991; Johnson PF et al., 1989; Karin M., 1995). 이들은 세포 핵 밖에 있는 Ras, Src, Raf, Mos, Sis, ErbB 등이나 Growth factor, Growth factor receptor signal, cytokine 그리고 산화성 스트레스와 같은 다양한 자극에 의하여 activation 됨으로서 세포의 증식과 분화를 촉진 시킨다 (Schonthal A et al., 1988 ; Schonthal A et al., 1992).

위에서 설명한 바와 같이 AP-1은 IGF-IR 그리고 EGFR과 같은 성장 인자에 의해 활성화 되어 최종적으로 세포의 증식을 촉진시키는데, 본 논문에서는 앞서 IGF-IR과 EGFR이 활성화되어 그 하위인자인 MAPK, PI3K/Akt, Ras signaling pathway를 활성화 시킨다는 것을 확인하였으므로 핵 획분을 추출하여 Western blot analysis를 통해 AP-1의 단백질 발현수준을 확인하였고, RT-PCR을 통해 mRNA 발현수준을 확인하였다. 그 결과, PY-PE를 처리하였을 때, 대조군에 비해 c-Jun과 c-Fos의

단백질 발현량과 (Fig. 13) mRNA 발현량이 (Fig. 14) 모두 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, IEC-6 세포에 PY-PE를 처리 하였을 때 IGF-IR, EGFR 신호전달경로가 활성화됨으로서 AP-1이 활성화되어 세포증식이 유도되는 것으로 생각된다.



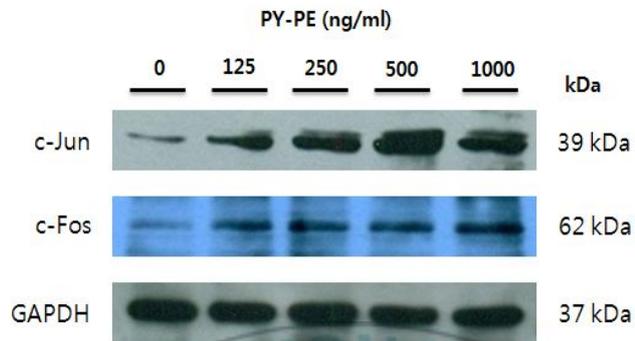


Fig. 13. Effect of PY-PE treatment on c-Jun and c-Fos protein expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. Nuclear extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-c-Jun, anti-c-Fos and anti-GAPDH antibodies.

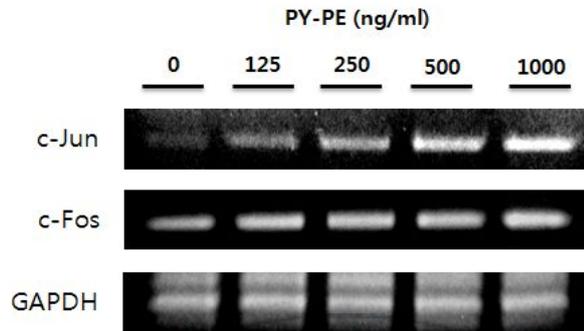
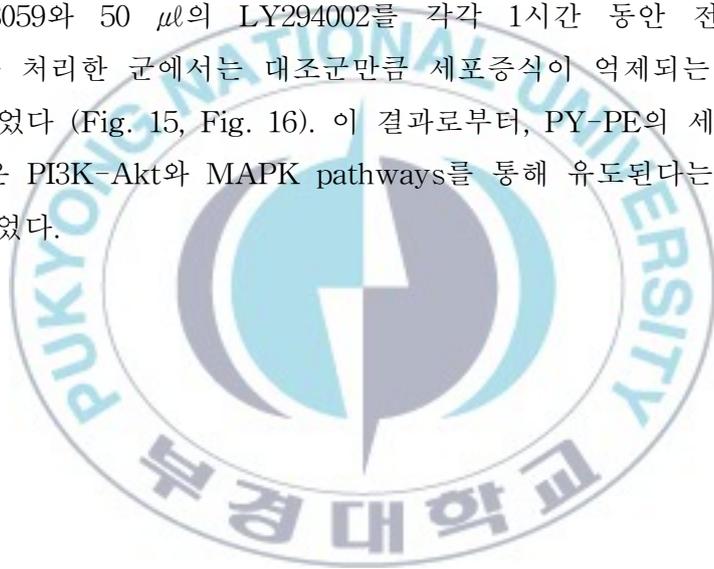


Fig. 14. Effect of PY-PE treatment on c-Jun and c-Fos mRNA expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by RT-PCR using c-Jun, c-Fos and GAPDH primers.

7) MEK/PI3K의 발현 억제가 세포증식기전에 미치는 영향

앞선 실험에서 IEC-6 세포에 PY-PE를 처리하였을 때 MEK와 PI3K의 발현이 증가함으로써 세포 증식이 촉진되는 것을 관찰할 수 있었기 때문에 MEK inhibitor인 PD98059와 PI3K inhibitor인 LY294002를 사용하여 MEK와 PI3K의 발현을 저해시켰을 때 IEC-6 세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 MTS assay를 통하여 세포 증식률을 확인해 보았다. 그 결과, PY-PE 단독 처리군에서는 세포증식이 나타났으나, 40 μ l의 PD98059와 50 μ l의 LY294002를 각각 1시간 동안 전처리한 후 PY-PE를 처리한 군에서는 대조군만큼 세포증식이 억제되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 15, Fig. 16). 이 결과로부터, PY-PE의 세포 증식 촉진 기전은 PI3K-Akt와 MAPK pathways를 통해 유도된다는 것을 증명할 수 있었다.



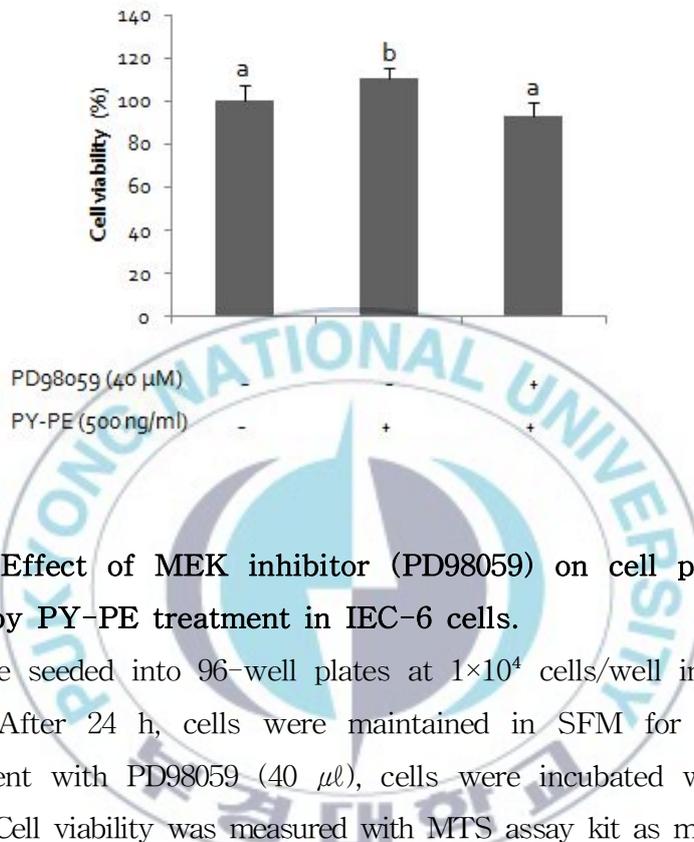


Fig. 15. Effect of MEK inhibitor (PD98059) on cell proliferation induced by PY-PE treatment in IEC-6 cells.

Cells were seeded into 96-well plates at 1×10^4 cells/well in 100 μl of medium. After 24 h, cells were maintained in SFM for 4 h. After pretreatment with PD98059 (40 μl), cells were incubated with PY-PE for 24 h. Cell viability was measured with MTS assay kit as manufacturer's instruction. Values are the mean \pm S.D. Different alphabets are significantly values among the group by Duncan's multiple range test.

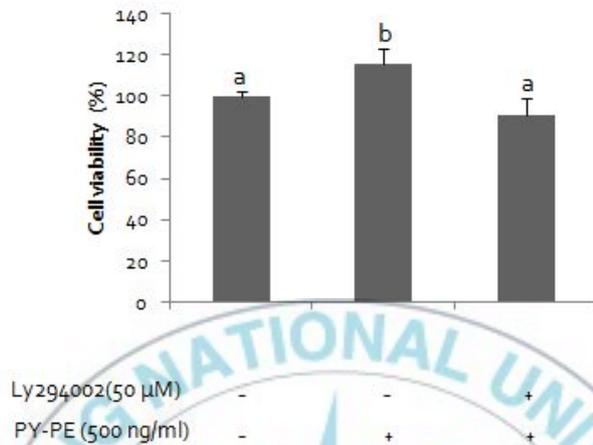


Fig. 16. Effect of PI3K inhibitor (LY294002) on cell proliferation induced by PY-PE treatment in IEC-6 cells.

Cells were seeded into 96-well plates at 1×10^4 cells/well in 100 μ l of medium. After 24 h, cells were maintained in SFM for 4 h. After pretreatment with LY294002 (50 μ l), cells were incubated with PY-PE for 24 h. Cell viability was measured with MTS assay kit as manufacturer's instruction. Values are the mean \pm S.D. Different alphabets are significantly values among the group by Duncan's multiple range test.

4. 세포 주기에 미치는 영향

1) 세포 주기 분석

세포주기란 순차적으로 일어나는 세포 현상으로서 세포가 하나의 분열에서 다음 분열 (유사분열) 할 때까지를 말한다. 이는 4개의 phase 즉, G1기 (Gap 1), S기 (DNA 합성기), G2기 (Gap 2), M기 (유사분열기) 로 나누어진다. 세포의 성장은 이러한 세포주기가 계속적으로 반복, 순환과정을 거치며 이루어지고 세포주기의 진행은 내부적 또는 외부적 신호의 전달을 받아 순차적으로 진행되며 역방향으로 진행되지는 않는다. 세포의 증식은 G1기의 세포가 S기로 전이되어 유사분열이 일어남으로써 발생하게 되는데 이러한 세포주기의 진행 정도가 증식속도를 결정하게 된다 (Nurse P, 1994). G1기는 첫 번째 휴지기로 세포가 분열된 직후 다음의 성장과정을 시작하기 이전에 필요한 세포 내 인자를 준비하는 기간으로 세포의 증식이 이루어진다. S기는 DNA의 복제가 이루어지는 시기로 한 염색체가 동일한 두 염색체로 복제되는 시기이다. 이 후로 세포는 G2기로 넘어가게 되는데 한 세포가 두 세포로 분열하는데 필요한 인자들이 모두 만들어 지게 되고 M기에서는 세포질의 분열이 일어나 세포벽이 생기면서 실제로 세포분열이 일어나게 된다.

세포가 이러한 항상성을 유지하기 위하여 세포 주기는 Check point를 가지고 있는데 먼저 G1기와 S기 사이에 restriction point (R point)가 있어서 외부 환경이 적합하지 않으면 S기로 진행되지 않고 G1기에서 머무르는 단계, 혹은 G0기의 휴식상태로 다시 돌아가게 된다. 정상적인 restriction point (R point)를 지나게 되면 S기에서 DNA 복제 후 G2기로 가게 되는데 여기서도 하나의 check point가 있어 S기에서 진행된 DNA 복제에 이상이 있으면 세포 주기가 정지를 하게 된다. 이상이 없을 경우 세포 주기가 정상적으로 진행되어 M기에서 세포분열이 일어난다.

본 실험에서는 PY-PE 처리 시, IEC-6 세포의 증식 촉진 기전이 세포 주기에도 영향을 미치는지 확인하기 위해 세포주기를 분석하였다. 분석 결과, G1기의 구간 비율이 대조군 47.6%에 비하여 각각 PY-PE를 처리했을 때 50.6%, 56.8%, 62.8%, 64.4% 로 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 17).



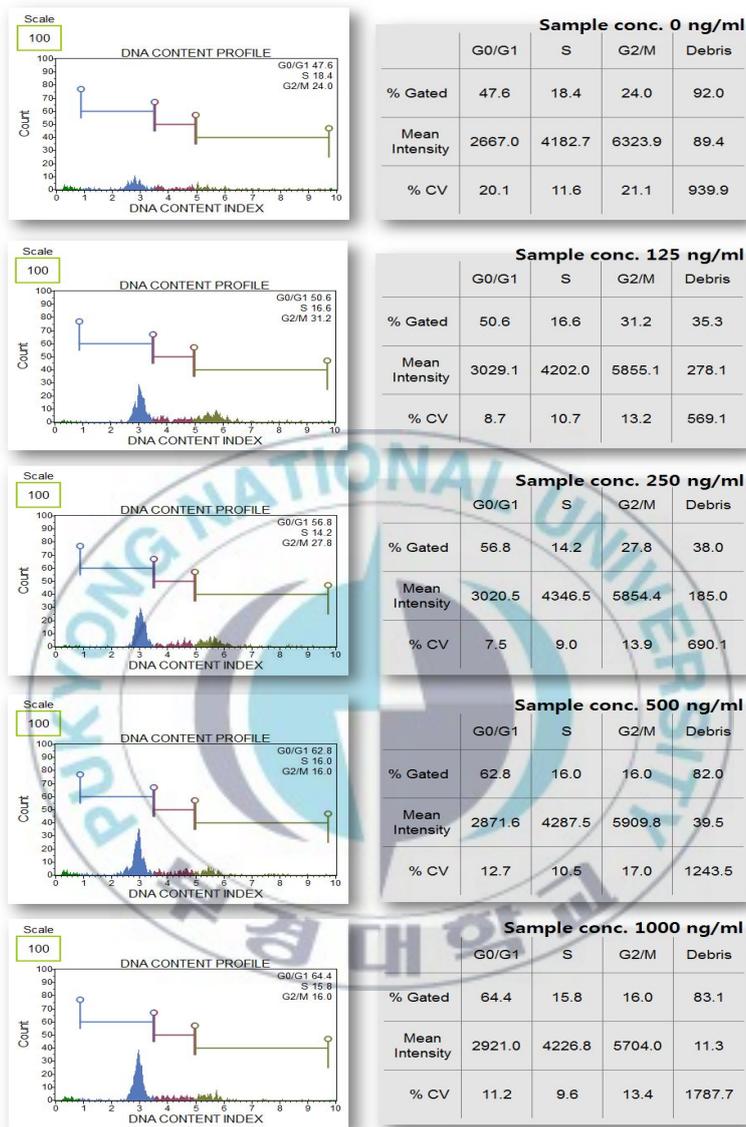


Fig. 17. Treatment of IEC-6 cells with PY-PE results in cell cycle progression.

In the experiments on dose dependence, PY-PE added at the varying concentrations (0, 125, 250, 500, 1000 ng/ml).

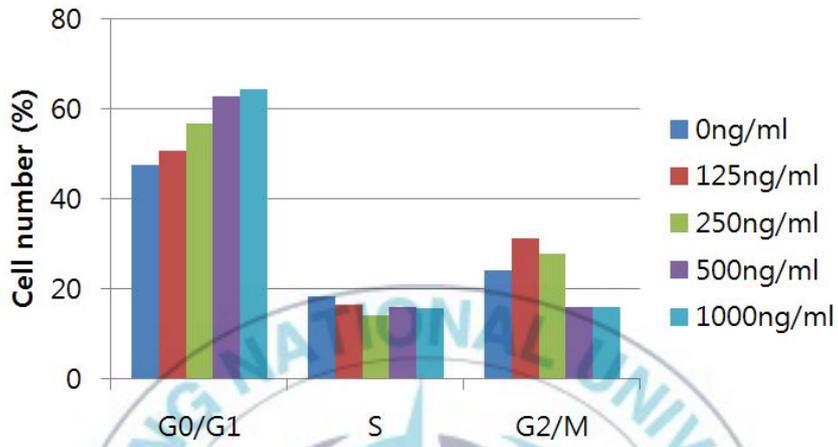


Fig. 18. Effect of PY-PE on cell cycle phase ration in IEC-6 cells.

2) 세포 주기 조절 단백질 분석

세포의 증식은 여러 가지 자극에 의해 결정되며, 자극의 종류와 전달 기전에 따라 세포분열이 일어나거나 멈추게 되는데 이런 세포주기의 진행과 억제에는 여러 세포 주기 조절 관련 단백질이 연관되어 있다. 세포 주기 조절 단백질로는 세포주기 진행에 중요한 역할을 하는 serine/threonine kinase인 cyclin dependent kinase (Cdk) 와 Cdk에 결합하여 활성을 조절하는 cyclin, 그리고 negative regulator인 p21, p27 등이 있다 (Kato J.A. et al., 1994). 세포의 핵 내에는 cyclin이 주기적으로 증가 감소되고 있는데, cyclin의 증가에 의해 Cdk가 활성화 되고, 활성화 된 Cdk는 pRb의 serine 및 threonine을 인산화시킴으로서 E2F, Elf-1과 같은 전사인자들이 활성화되어 세포주기는 G1기에서 S기로 진행되고 이로 인해 세포가 증식하게 된다 (Sherr C.J, 1993).

본 연구에서는 PY-PE를 IEC-6 세포에 처리하였을 때 세포 주기 조절 단백질의 발현을 western blotting을 이용하여 알아보았다. 그 결과, cyclin D1, cyclin E, Cdk2, Cdk4, Cdk6 그리고 pRb의 발현이 모두 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 19A).

세포 주기의 조절에는 cyclin이나 Cdk와 같은 positive regulator 이외에도 p21, p27과 같은 Cdk inhibitor 들이 필수적인데, 이는 Cyclin E 와 Cdk2, Cyclin D와 Cdk4 또는 Cdk6 복합체의 활성을 억제한다.

이들의 발현양상을 확인한 결과, p21과 p27 모두 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 19B).

이러한 결과를 종합하여 볼 때, PY-PE를 처리한 IEC-6 세포는 IGF-IR과 EGFR signaling을 통해 세포증식을 유도하며, Cyclin과 Cdk 복합체의 발현 증가와 p21, p27의 발현 감소에 의해 세포 주기가 조절되어 세포증식이 진행되는 것을 확인할 수 있었다.

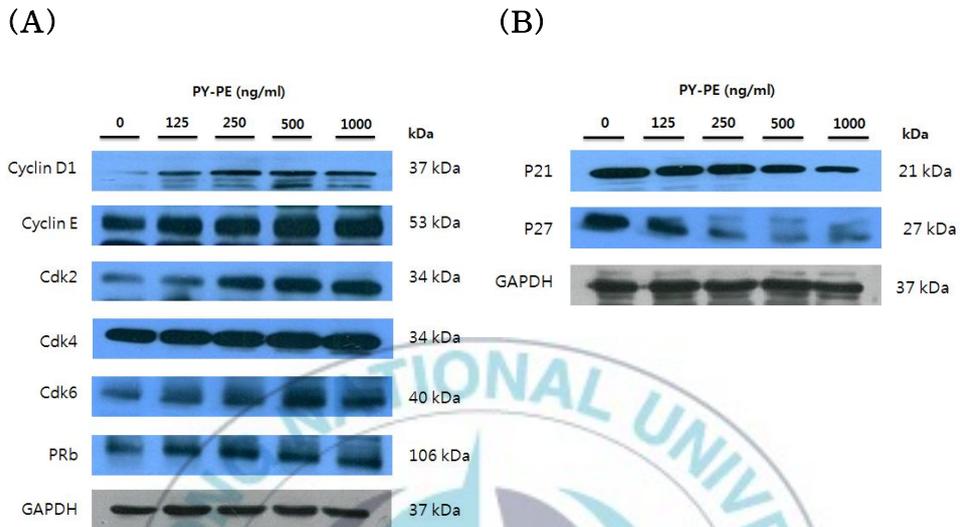


Fig. 19. Effect of PY-PE treatment on the levels of cell cycle related proteins in IEC-6 cells.

Cells were treated with PY-PE after preincubation with SFM for 4 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using (A) anti-cyclin D1, anti-cyclin E, anti-Cdk2, anti-Cdk4, anti-Cdk6, anti-PRb, (B) anti-p21, anti-p27 and anti-GAPDH antibodies.

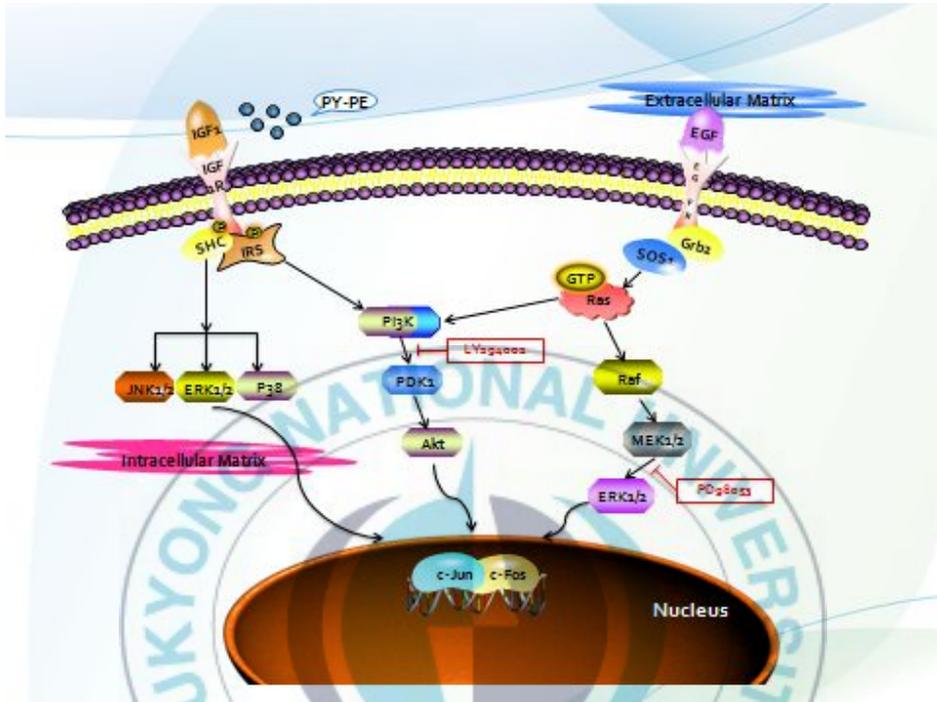


Fig. 20. The proposed model of proliferation mechanism induced by PY-PE treatment in IEC-6 cells.

IV. 결론 및 요약

해조류란 바다에서 생산되는 조류식물의 총칭으로, 오래전부터 아시아 지역에서 주로 식품으로 이용되어 왔으며 의약품, 공업용 원료 등으로 이용되어온 주요자원이다. 최근 해조류를 구성하고 있는 다당류의 독특한 구조적 특성으로 인하여 항산화, 항응고 등의 생물학적 활성을 가진 sulphated polysaccharides, peptide, polyphenol 과 같은 생리활성물질의 훌륭한 원천임이 알려지면서 해조류의 기능성 식품으로서의 개발에 관심이 증가하고 있는 추세이다. 그 중에서 검은 홍조류에 속하는 해조류로 당질, 각종 무기질과 비타민이 골고루 함유되어 있다.

본 연구에서는 생체효능에 영향을 줄 수 있는 김 단백질을 추출하고 분리하여 구조를 밝힌 후, peptide를 제작하여 실험에 사용하였다. 김 (*Porphyra yezoensis*) peptide (PY-PE)를 Rat에서 유래한 정상 소장 상피세포인 IEC-6 세포에 처리하여 생리활성을 검토한 결과, 세포증식효과를 확인하였으며 그 작용기전을 확인하였다. IGF-IR, EGFR과 연관된 신호전달경로를 중점적으로 살펴보고, PY-PE의 세포 증식 촉진 기전이 세포주기에도 영향을 미치는지 확인하였다. 그리고 PI3K와 MEK inhibitor를 처리하여 PI3K와 Ras 경로가 차단됨으로써 PY-PE에 의한 세포증식이 억제됨을 확인하였다.

IEC-6 세포에 PY-PE를 농도별로 처리했을 때, 세포 증식효과를 확인하였으며 IEC-6 세포의 증식이 어떠한 신호전달경로에 의해 진행되는지 알아본 결과, IGF-IR과 EGFR의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

세포증식에 관여하는 MAPK signaling pathway 중 ERK, JNK, p38의 인산화를 확인해 본 결과, ERK의 인산화를 증가시키는 반면에 JNK와 p38의 인산화는 감소시키는 것을 확인 할 수 있었다. PI3K/Akt signaling pathway 중 p85와 p110 그리고 PDK1의 발현이 증가하였고, Akt의 인산화가 증가하는 것을 확인하였다. 또한 Ras signaling pathway 중 Ras의 발

현이 증가하였고, 그 하위인자인 Raf, MEK와 ERK의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 그리고 Growth factor와 cytokine, Ras, Raf에 의해 활성화되어 세포성장을 촉진시키는 transcription factor인 AP-1의 발현에 대해 확인해 본 결과, c-Jun과 c-Fos의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

세포의 증식은 G1기의 세포가 S기로 전이되어 유사분열이 일어남으로써 발생하게 되므로 IEC-6 세포의 증식촉진 작용에서 세포주기의 변화를 확인해 보았다. 그 결과, 세포의 증식이 이루어지는 G1기의 비율이 대조군과 비교하여 PY-PE를 처리한 군에서 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 세포주기 조절에 관여하는 세포주기 조절 단백질을 분석한 결과 Cdk와 cyclin의 발현이 증가하였고 p21과 p27의 발현은 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

PI3K와 MEK는 세포증식 신호전달 경로에서 중심적인 인자이기 때문에 각각의 inhibitor를 처리할 경우 세포증식에 영향을 줄 것이라 예상할 수 있었다. MTS assay를 통해 PI3K와 MEK inhibitor 처리 시 세포의 증식이 대조군 수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 보면, PY-PE의 처리로 인해 IEC-6의 세포증식이 유도되는데, IGF-IR과 EGFR 그리고 전사인자인 AP-1이 활성화되어 최종적으로 세포증식 작용을 나타내는 것으로 확인하였다.

따라서 김 peptide는 인체 내 소장 상피세포의 증식을 촉진하는 효능이 있으므로 기능성 식품 소재로서 활용이 가능할 것으로 생각된다.

V. 참고 문헌

- 김영명. 한국생명과학회. 한국생명과학회 심포지움. 2005. 9: 21-23.
- 백재민. 동아시아식생활학회. 동아시아식생활학회
학술발표대회논문집. 2007. 4: 15-22.
- Abate C., Patel L., Ramcher FJ III., Curran T. 1990. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science*. 246: 1157-1162.
- Alessi DR., Cohen P. 1998. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev*. 8: 55-62.
- Angel P., Karin M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1072: 129-157.
- Anderson NS., Dolan TCS., Rees DA. 1965. Evidence for a common structural pattern in the polysaccharide sulphate of the Rhosophyceae. *Nature*. 13: 1060-1069.
- Bellacosa A., Kumar CC., Cristofano AD., Testa JR. 2005. Activation of Akt kinases in cancer implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res*. 94: 29-86.
- Bouguski MS., McCormick F. 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature (Lond)*. 663: 643-654.
- Calabro P., Samudio I., Willerson JT., Yeh ET. 2004. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation*. 110: 3340.
- Carbone A., Gruber SB., Muschel RJ. 1991. Human Harvey-ras is biochemically different from Kirsten- or N-ras. *Oncogene*. 6:

731-735.

- Cantley LC. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 296: 1657.
- Choudhury GG., Karamitsos C., Hernandez J., Gentilini A., Bardgette J., and Abboud HE. 1997. PI-3-kinase and MAPK regulate mesangial cell proliferation and migration in response to PDGF. *Am J Physiol Renal Physiol*. 273: F931-F938.
- Christensen ME., Therkildsen MH., Hansen BL., Albeck H., Hansen GN., Bretlau P. 1992. Epidermal growth factor receptor expression on oral mucosa dysplastic epithelia and squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 249: 247.
- Chiu R., Boyle WJ., Meek J., Smeal T., Hunter T., Karin M. 1988. The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell*. 54: 541.
- Cohen S., Taylor JM. 1974. Epidermal growth factor; chemical and biological characterization. *Recent Prog Horm Res*. 30: 553.
- Mantzoros CS., Tzonou A., Signorello LD., Stampfer M., Trichopoulos D., Adami H-O. 1997. Insulin-like growth factor I in relation to prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *British Journal of Cancer*. 76(9): 1115-1118.
- Ebner S., Dunbar M., McKinnon RD. 2000. Distinct roles for PI3K in proliferation and survival of oligodendrocyte progenitor cells. *J. Neurosci Res*. 62: 336-345.
- Goncharova EA., Ammit AJ., Irani C., Carroll RG., Eszterhas AJ., Panettieri RA., Krymskaya VP. 2002. PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 283: L363.

- Green H. 1977. Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell*. 11: 405-416.
- Heineke, J., Molkenin, JD. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7: 589-600.
- Ishitoya J., Toriyama M., Oguchi N., Kitamura K., Ohshima M., Asano K., Yamamoto T. 1989. Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer*. 59: 559-562.
- Jimenez-Escring A, Goni CI. 1999. Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. *Arch Latinoam Nutr*. 49: 114-120.
- Johnson PF, McNight SL. 1989. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem*. 58: 799-839.
- Jung KJ., Jung BM., Kim SB. 2002. Effect of porphyran isolated from laver, *Porphyra yezoensis*, on liver lipid peroxidation in hyperlipidemic rats and on immunological functions in mice. *Korean J Food Sci Technol*. 34: 325-329.
- Karin M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*. 270: 16483-16486.
- Kato JA., Matsuoka M., Strom D., Sherr C. 1994. Regulation of cyclin D- dependent kinase 4 (Cdk4) by Cdk 4- activating kinase. *Mol Cell Biol*. 14: 2713-2721.
- Kippel A., Reinhard C., Kavanaugh WM., Apell G., Escobedo MA., Williams LT. 1996. Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol Cell Biol*. 16: 4117-4127.

- Kovary K., and Bravo R. 1991. The Jun and Fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblast. *Mol Cell Biol.* 11: 4466.
- Kwon MJ., Nam TJ. 2006. Porphyrin induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Life Sci.* 79: 1956-1962.
- Lee JS., Bruce CR., Spurrell BE., & Hawley JA. 2002. Effect of training on activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in rat soleus muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29(8): 655-660.
- Lovicu CY., McAvoy JW. 2001. FGF-induced lens cell proliferation and differentiation is dependent on MAPK (ERK1/2) signalling. *Development.* 128: 5075-5084.
- Morgan IM., Ransone LJ., Bos TJ., Verma IM., Vogt PK. 1992. Transformation by Jun : requirement for leucine zipper, basic region and transactivation domain and enhancement by Fos. *Oncogene.* 7: 1119.
- Murakami Y., Satake M., Yamaguchi-Iwai Y., Sakai M., Muramatsu M., Ito Y. 1991. The nuclear protooncogenes c-jun and c-fos as regulators of DNA replication. *Proc. Natl Acad Sci. USA* 88: 394.
- Nishizawa K and S. Murasugi. 1988. The Seavegetable Book. *Kensei Press Tokyo.* pp: 57-66.
- Niederlechner S., Baird C., Petrie B., Wischmeyer E., Wischmeyer PE. 2013. Epidermal growth factor receptor expression and signaling are essential in glutamine's cytoprotective mechanism in heat-stressed intestinal epithelial-6 cells. *American Journal of*

- Physiology*. 304(5): G543–G552.
- Nurse P. 1994. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*. 79: 547–550.
- Pawson T. 1995. Protein modules and signalling networks. *Nature*. 373(6515): 573.
- Park CK., Kang TH. 2000. The nutritional on functional constituents of laver. *Bull Fish Sic Inst, Yosu Nat'l Univ*. 9: 133–137.
- Park JH., Koo JG., Do JR., Yang CB., Woo SK. 1998. Effect of extraction temperature and pH on the chemical properties of crude porphyrin extracted from *Porphyra yezoensis*. *J Korean Fish Soc*. 32: 127–131.
- Pusztai L., Lewis CE., Lorenzen J., McGee O'D J. 1993. Growth factors: Regulation of normal and neoplastic growth. *J Pathol*. 169: 191–201.
- Robinson DR, Schlessinger J. 2000. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*. 19(49): 5548.
- Rodriguez-Viciano P., Warne PH., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry MJ., Waterfield MD., Downward J. 1994. Phosphatidylinositol 3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*. 370: 527–532.
- Rodriguez-Viciano P., Warne PH., Vanhaesebroeck B., Waterfield MD., Downward J. 1996. Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J*. 15: 2442–2451.
- Schonthal A., Herrlich P., Rahmsdorf HJ., Ponta H. 1988. Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phobol esters. *Cell*. 54: 325.

- Schonthal A., Srinivas S., Eckhart W. 1992. Induction of c-jun protooncogene expression and transcription factor AP-1 activity by the polyoma virus middle-sized tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci. USA* 89: 4972.
- Sherr CJ. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell*. 73: 1059-1065.
- Seger R., Krebs EG. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 9: 726-735.
- Tai YT., Podar K., Catley L., Tseng YH., Akiyama M., Shringarpure R., Burger R., Hideshima T., Chauhan D., Mitsiades N., Richardson P., Munshi NC., Ronald C., Mitsiades C., Anderson KC. 2003. Insulin-like growth factor-I induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of β 1-integrin and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Cancer Research*. 63: 362-371.
- Ullrich A., Gray A., W.Tam A., Yang-Feng T., Tsubokawa M., Collins C., Henzel W., Bon TL., Kathuria S., Chen E., Jacobs S., Francke U., J. Ramachandran., Fujita-Yamaguchi Y. 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO journal*. vol 5 no.10 pp.2503-2512.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD. 1997. Phosphoinositide 3-kinase : a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci*. 22: 267-272.
- Wymann MP, Pirola L. 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta*. 1436: 127-50.
- Yoshizawa Y., Enomoto A., Todoh H., Ametani A., Kaminogawa S. 1993. Activation of murine macrophages by polysaccharide from

marine algae (*Porphyra yezoensis*). *Biosci Biotechnol Biochem.* 57: 1862-1866.

Zwick E, Bange Z, Ullrich A. 2001. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer.* 8(3): 161.



감사의 글

2년이란 긴 시간동안 사랑으로 지켜봐주신 고마운 모든 분들께 감사의 인사를 전합니다. 사랑합니다.^

