이 학 박 사 학 위 논 문

Fucoidan에 의한 HT-29 인간 대장암 세포 사멸 유도 기전

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

2008년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

김 인 혜

이 학 박 사 학 위 논 문

Fucoidan에 의한 HT-29 인간 대장암 세포 사멸 유도 기전

지도교수 남 택 정

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함

2008년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

김 인 혜

김인혜의 이학박사 학위논문을 인준함

2008년 2 월 26 일

주 심 공학박사 류 홍 수 ㊞

위 원 의학박사 변 대 석 ㊞

위 원 의학박사 김 윤 진 ㊞

위 원 이학박사 최 영 현 ㊞

위 원 농학박사 남 택 정 ㊞

목 차

LIST OF TABLE ····· iv
LIST OF FIGURES ····· v
ABBREVIATIONS ····· vii

ABSTRACT ····· ix

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 6
1. 재료 ····· 6
1) 세포 및 시료 ····· 6
2) 시약 ····· 6
2. 실험방법 ····· 7
1) 세포 배양 ····· 7
2) 세포 증식율 측정을 위한 MTS assay ····· 7
3) 세포 독성 분석 ····· 8
4) [^{3}H] thymidine incorporation 분석 ····· 8
5) 형태학적 관찰 ····· 9
6) Hoechst 33342 염색 ····· 9
7) Annexin V-FITC 분석 ····· 9
8) FACS 분석 ····· 10
9) Western blot analysis ····· 10
① 단백질 발현 분석 ····· 10
② 세포질 및 미토콘드리아 획분 추출 ····· 11

③ 핵 획분 추출 ····· 12
④ IGF-I 단백질 수준 및 IGF-IR 신호 전달 분석 ····· 12
⑤ HRG 단백질 수준 및 ErbB3 신호 전달 분석 ····· 13
10) 실험 결과의 통계처리 ····· 14

Ⅲ. 결과 및 고찰 ····· 16
1. HT-29 대장암 세포의 후코이단에 의한 증식 억제 ····· 16
1) HT-29 대장암 세포와 MC3T3-E1 세포의 증식에 미치는 영향 ·· 16
2) 세포 독성 검토 ····· 19
3) DNA 합성 억제 ····· 21
4) 세포의 형태학적 변화 ····· 23
5) 핵의 형태학적 변화 ····· 25
6) Annexin V-FITC 분석 ····· 27
2. 세포 내 신호 전달에 미치는 영향 ····· 30
1) Extrinsic pathway 신호 전달 ····· 33
2) Intrinsic pathway 신호 전달 ····· 38
3) PARP 신호 전달 ····· 41
4) Bcl-2 family 중 anti-apoptotic factor의 신호 전달 ····· 44
5) Bcl-2 family 중 pro-apoptotic factor의 신호 전달 ····· 47
3. Translocation 신호 전달에 미치는 영향 ····· 49
1) Bax 단백질의 세포질과 미토콘드리아 신호 전달 ····· 49
2) Cytochrome c 단백질의 세포질과 미토콘드리아 신호 전달 ····· 52
4. 세포 주기에 미치는 영향 ····· 55
1) 세포 주기 분석 ····· 55
2) 세포 주기 단백질 분석 ····· 57
3) β-catenin의 발현 분석 ····· 62
5. NF-κB 신호 전달에 미치는 영향 ····· 65

1) 이론적 배경 ····· 65
2) NF-κB 신호 전달 분석 ····· 68
3) NF-κB의 세포질과 핵의 신호 전달 분석 ····· 70
4) 염증 반응 분석 ····· 73
6. 세포 성장 인자에 미치는 영향 ····· 77
1) IGF-IR 단백질 수준 분석 ····· 77
2) IGF-IR 신호 전달 분석 ····· 82
3) HRG 단백질 수준 분석 ····· 86
4) ErbB3 신호 전달 분석 ····· 89

Ⅳ. 결론 및 요약 ····· 93

Ⅴ. 참고 문헌 ····· 96

감사의 글 ····· 120

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

LIST OF TABLE

Table 1. Antibodies used in the present study

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Effect of fucoidan on the growth of HT-29 colon cancer cells.

Fig. 2. Effect of fucoidan on the growth of MC3T3-E1 fibroblast cells.

Fig. 3. Effect of fucoidan on cytotoxicity in HT-29 cells.

Fig. 4. Effects of fucoidan on [^{3}H]thymidine incorporation in HT-29 cells.

Fig. 5. Morphological changes by treatment with fucoidan in HT-29 cells.

Fig. 6. Induction of apoptotic bodies by treatment with fucoidan in HT-29 cells.

Fig. 7. Flow cytometry analysis by treatment with fucoidan in HT-29 cells.

Fig. 8. Schematic representation of apoptotic events.

Fig. 9. The Fas signaling pathway and its molecular control.

Fig. 10. Effects of fucoidan treatment on the levels of Fas and pro-caspase-8 protein in HT-29 cells.

Fig. 11. Effects of fucoidan treatment on the levels of pro-caspase-9, -7 and -3 protein in HT-29 cells.

Fig. 12. Effects of fucoidan treatment on the levels of cleaved-PARP protein in HT-29 cells.

Fig. 13. Effects of fucoidan treatment on the levels of Bcl-2 and Bcl-xL protein in HT-29 cells.

Fig. 14. Effects of fucoidan treatment on the levels of Bad, Bax and Bid protein in HT-29 cells.

Fig. 15. Effects of fucoidan treatment on the levels of Bax protein from cytosol into mitochondria in HT-29 cells.

Fig. 16. Effects of fucoidan treatment on the levels of cytochrome c protein from mitochondria into cytosol in HT-29 cells.

Fig. 17. Effect of fucoidan treatment on the cell cycle progression in

HT-29 cells.
Fig. 18. The G1/S checkpoint of the cell cycle.
Fig. 19. Effects of fucoidan treatment on the levels of Cyclin D1, phospho-RB and E2F protein in HT-29 cells.
Fig. 20. Effects of fucoidan treatment on the levels of β-catenin protein in HT-29 cells.
Fig. 21. Model for the activation of NF-κB by a variety of inducers and for the nuclear response controlled by NF-κB.
Fig. 22. Effects of fucoidan treatment on the levels of IKKα, phsopho-IκBα and IκBα protein from cytosol in HT-29 cells.
Fig. 23. Effects of fucoidan treatment on the levels of NF-κB protein from cytosol into nuclear in HT-29 cells.
Fig. 24. Effects of fucoidan treatment on the levels of phospho-p38, phospho-JNK, COX-2 and iNOS protein in HT-29 cells.
Fig. 25. Effects of fucoidan treatment on the levels of pro IGF-IR, IGF-IR, phospho-tyrosine, IRS-1, Akt and ERK 1/2 protein in HT-29 cells.
Fig. 26. Effect of fucoidan on IGF-I-induced phospho-tyrosine, pro-IGF-IR and IGF-IR of IGF-IRβ in HT-29 cells.
Fig. 27. Effect of fucoidan on IGF-I-induced phospho-AKT, AKT, phospho-ERK 1/2 and ERK 1/2 of IGF-IRβ in HT-29 cells.
Fig. 28. Effects of fucoidan treatment on the levels of ErbB2, ErbB3, HRG, phospho-tyrosine, Akt and ERK 1/2 protein in HT-29 cells.
Fig. 29. Effect of fucoidan on HRG-induced phospho-tyrosine and ErbB3 of ErbB3 in HT-29 cells.
Fig. 30. Effect of fucoidan on HRG-induced phospho-AKT, AKT, phospho-ERK 1/2 and ERK 1/2 of ErbB3 in HT-29 cells.

ABBREVIATIONS

AIF	:	apoptosis inducing factor
CAKs	:	cdk-activate kinases
CARD	:	caspase recruitment domain
cdks	:	cyclin-dependent kinase
CIP	:	cdk inhibitor protein
CKIs	:	cdk inhibitor
COXs	:	cyclooxygenases
DED	:	death effector domain
DISC	:	death-inducing signaling complex
DTT	:	1,4-dithiothreitol
EDTA	:	trypsis-ethylendiamine tetraacetic acid
EGFR	:	epidermal growth factor receptor
EGTA	:	ethylene glycol bis-(β-aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetra-acetic acid
ERK	:	extracellular-signal regulated kinase
FACS	:	fluorescence-activated cell sorting
FADD	:	fas-associated death domain
FBS	:	fetal bovine serum
GSK	:	glycogen synthase kinase
HRE	:	hypoxia-responsive element
HRG	:	heregulin
HRP	:	horseradish peroxidase
ICAD	:	inhibitor of the caspase-activated deoxynuclease
IFN	:	interferon
IGF-BP	:	insulin-like growth factor binding protein
IGF-I	:	insulin-like growth factor
IGF-IR	:	insulin-like growth factor receptor
IKK	:	ikappaB kinase
IL	:	interleukine
INK4	:	inhibitor of cyclin-dependent kinase 4
IP	:	immunoprecipitation
IRS	:	insulin receptor substrate
JNKs	:	c-jun N-terminal kinases

KCLB	:	Korean cell line bank
kDa	:	kilodalton
M phase	:	mitotic phase
MAPK	:	mitogen-activated protein kinase
MC3T3-L1	:	mouse embryo/fetus calvaria fibroblast
MEK	:	MAP kinase/Erk kinase
α-MEM	:	minimum essential medium alpha medium
MTS	:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxiphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NAD	:	nicotinamide adenine dinucleotide
NF-κB	:	nuclear factor kappa B
NOS	:	nitric oxide synthase
NP-40	:	Nonidet P40
NR	:	neutral red
PARP	:	poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	:	phosphate-buffered saline
PCNA	:	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	:	platelet-derived growth factor
PI	:	propidium iodide
PI3K	:	phosphatidylinositol 3-kinase
PMSF	:	phenylsufonyl fluoride
PS	:	phosphatidylserine
R point	:	restriction point
RB	:	retinoblastoma protein
RPMI 1640	:	rosewell park memorial institute 1640
RT	:	room temperature
S phase	:	synthesis phase
SDS-PAGE	:	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SFM	:	serum free medium
STAT	:	transducer and activator transcription
tBid	:	truncated-Bid
TCA	:	trichloroacetic acid
TNF	:	tumor necrosis factor

Mechanisms of fucoidan-induced apoptosis in HT-29 human colon cancer cells

In-Hye Kim

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

Abstract

Fudoidan is the collective name for algal sulfated polysaccharides extracted from the edible brown seaweeds. Fucoidan has been extensively studied because of its many biological properties including anti-coagulant, anti-viral, anti-inflammatory and anti-tumor activities. The present study examined whether fucoidan inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and the mechanisms underlying its effects.

HT-29 cells were incubated in serum-free medium with various concentrations of fucoidan (0~1,000 μg/mL). Fucoidan decreased cell growth in a concentration- and time-dependent manner. Fucoidan markedly inhibited [^{3}H]thymidine incorporation into DNA in HT-29 cells. Following fucoidan treatment, the cells showed apoptotic bodies, typical of cells undergoing apoptosis, morphological changes, and H33342 staining. Fluorescence-activate cell sorting analysis results

revealed that the apoptotic cell percentage was increased after treatment with fucoidan.

Western blot analysis revealed that fucoidan decreased levels of pro-caspase proteins, such as caspase-9, -8, -7 and -3. Furthermore, bcl-2 and bcl-xL protein levels were decreased, but bax, t-bid, and Fas protein levels were increased by fucoidan treatment. These results indicate that fucoidan induced apoptosis through both the extrinsic and intrinsic pathways. Fucoidan also induced sub-Gl phase arrest in the cell cycle, and Gl cell cycle protein expression levels were decreased by down-regulating retinoblastoma protein (pRB) and E2F.

Nuclear factor kappa B (NF-κB) regulates cell growth, differentiation, immune responses, and inflammatory responses. The present study examined the effects of fucoidan on the NF-κB signaling pathway. Western blot analysis of cytosolic fractions revealed that fucoidan decreased IKK, IκB and phosphorylated IκB protein levels. NF-κB protein in the cytosol and the nuclear fraction was also decreased by fucoidan treatment. These results indicate that fucoidan induced apoptosis involved decreased NF-κB expression levels in the cytosolic and nuclear fractions. NF-κB protein levels were decreased as a result of down-regulating the phosphorylation of p38, c-jun N-terminal kinases (JNK), i nitric oxide synthesis (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2).

Insulin-like growth factor (IGF-I) regulates the growth of colon cancer cells by an autocrine mechanism. The present study examined the effects of fucoidan on the IGF-I receptor (IGF-IR) signaling pathway. Western blot analysis of total cell lysates revealed that fucoidan decreased IGF-IR, phospho-tyrosine, insulin receptor

substrate (IRS)-1, AKT and extracellular-signal regulated kinase (ERK) protein levels in a dose-dependent manner. Immunoprecipitation/ Western blot studies showed that fucoidan decreaed IGF-I-induced phosphorylation of IGF-IR. However, the expression of IGF-I-induced phosphorylation of AKT and ERK were inceresed by fucoidan treatment. These results suggest that fucoidan inhibited cell proliferation and stimulated apoptosis of HT-29 cells via inhibition of IGF-IR signaling pathway, partly.

Over-expression of ErbB2 and ErbB3 genes is a frequent event in several human cancers. The present study also determined whether the growth inhibitory effect of fucoidan was related to changes in ErbB protein levels and the ErbB receptor signaling pathway in HT-29 cells. Fucoidan decreased ErbB2 and ErbB3 and phospho-tyrosine protein levels. Immunoprecipitation/Western blot studies revealed that fucoidan were decreased heregulin (HRG)-induced phosphorylation of ErbB3 but, increased phosphorylation of AKT and ERK. These results indicate that down-regulation of ErbB2/ErbB3 signaling may be a mechanism by which fucoidan inhibits HT-29 cell growth.

Thus, fucoidan induced apoptosis, markedly decreasing DNA synthesis and cell growth through sub-G1 cell cycle arrest, the extrinsic and intrinsic pathways, and the NF-κB signaling pathway, involves down-regulation of IGF-IR signaling and the ErbB2/ErbB3 signaling pathway, partly.

Ⅰ. 서 론

20 세기 이후 산업과 의학의 눈부신 발전으로 인류의 생활수준 향상과 더불어 평균 수명은 길어졌으나 스트레스, 불규칙적인 식생활, 생활환경의 약화 등에 따라, 암, 뇌혈관 질환, 심장 질환과 같은 각종 질병의 발생률 및 이로 인한 사망률은 증가하는 경향을 보이고 있다(통계청, 2007). 그 중에서도 암은 세포 증식 작용이 정상적으로 조절되지 않은 경우에 발생하며 한국을 포함하여 전 세계적으로 매년 7백만 명 이상의 환자가 암으로 사망하고 있다. 암의 발생원인은 방사선, 바이러스, 대기오염, 음주, 식이 등과 같은 외부적 요인과 호르몬, 면역체계, 유전자 변이 등의 내부적 요인들이 알려져 있다. 또 환경오염, 스트레스, 고지방 식이, 흡연 인구의 증가 및 노령화 등 다양한 사회적, 환경적인 요인들에 의해 발병률이 증가하는 추세이다(Surh, 1999; Bishop, 1987).

국내에서 암은 사망원인 1위를 차지하는 질병으로 통계청이 발표한 2006년 사망원인 통계에 따르면 암 사망자가 전체 사망자의 27%를 차지하며, 암 종류별로는 폐암이 전체의 28.8%로 가장 많았고, 다음은 간암, 위암, 대장암, 췌장암 등의 순으로 나타났다. 최근 10년간(1996-2006년 대비) 암에 의한 사망률 변화를 보면 폐암, 대장암, 전립샘암, 췌장암 순으로 증가하였고 위암, 자궁암 순으로 감소하였는데, 그 중에서도 대장암에 의한 사망률이 남여 모두에서 점점 증가되고 있는 것으로 나타났다.

미국의 경우 대장암은 소화기암중에 가장 흔하며, 사망률도 2위를 차지할 정도로 매우 흔한 암이다(Jemal et al., 2005). 우리나라에서는 서구에 비해 상대적으로 대장암의 유병율이 낮지만 식생활 습관이 서구화 되어감에 따라 점차 증가 추세에 있는 악성 종양으로 2005년 현재 전체 암종의 9.8%를 차지하고 있는 것으로 알려져 있다(보건복지부, 2005). 대장암을 비롯한 여러 암은 유전적 요인과 환경적 요인에 의해 발생되고 있으며 역학조사에 의하면 암

발생의 원인 중 75~80%는 식품 및 오염 등의 환경요인으로 알려져 있다. 특히, 그 중에서도 매일 섭취하는 음식물이 가장 중요한 발암 요인이라고 하였으며(Park et al., 2003), 사망률의 35%는 여러 환경적 요인 중에서 식이에 의한 것이고(Doll, 1992), 대장암은 식이 요인과 가장 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 연구유형이나 연구 대상 집단에 따라 그 결과가 일치하는 않으나 대장암과 관련된 식이 요인으로는 과도한 동물성 지방, 당분, 알콜 섭취와 섬유소, 항산화 비타민, 야채나 과일의 섭취 부족과 같은 서구식 식이가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Oh et al., 2004; Kim and Mason, 1996; Kim, 2002; Potter et al., 1993; West et al., 1989). 동물성 지방과 육류를 많이 섭취하게 되면 채소나 곡물 등의 섬유질 식품을 섭취할 때에 비해 분변 양이 적고 내용물이 대장을 통과하여 배설되는 시간이 길어지게 된다. 또, 동물성 지방을 많이 섭취하는 경우 담즙산과 스테롤의 배설이 증가하며 대장 내에 존재하는 세균종의 구성에도 변화를 일으켜 이들 물질을 화학적으로 변화시키는 세균의 종류가 증가하게 된다. 따라서 발암물질이 많이 생성되고 발암물질이 대장 내에 머물고 접촉하는 시간도 길어져서 대장암 발생을 유발시킬 수 있는 가능성이 높아지게 된다. 이러한 대장암은 상피세포에서 시작되기 때문에 식이적 요인이 암 발생에 아주 큰 영향을 미친다고 하였다(Surh, 1999). 이를 바탕으로 국내에서 증가하고 있는 대장암의 발생도 80년대 이후 한국인의 식이섭취 변화와는 무관하지 않다고 하였으며, 식이와 관련된 암의 원인물질 검색뿐만 아니라 일상에서 섭취하는 식품 중에서 항암제로 이용하기 위한 물질에 대한 관심이 증가하고 있다. 또한, 식이에서는 예방을 위한 방법으로 식이섬유의 섭취를 권장하고 있다.

식이섬유는 인체 내에서 콜레스테롤 및 중성지방의 흡수를 저해하여 고지방 식이로 인한 혈관 순환기계 질환의 예방과 치료에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Spiller and Amen, 1975). 해조류는 열량소로서의 역할을 제대로 하지 못하는 특성 때문에 과거에는 식품으로써 큰 각광을 받지 못하여 왔으나, 근래에 들어서 식이섬유의 생리기능적인 역할이 중요시됨에 따라(Kim

and Kim, 1998) 해조류의 섭취를 통해 해결하려는 연구가 증가하게 되었다 (Kim and Lee, 1995; Lee et al., 1996; Park et al., 1996; Kim et al., 1998). 해조류는 영양, 생리효과가 뛰어난 것으로 알려져 있는데(Lee and Sung, 1980), 이 중 30~67% 정도(건물 기준)가 다당류로 존재하며(Cho et al., 1995), 알긴산, 후코이단, 라미나란, 카라기난 등으로 구성되어 있다(Lahaye, 1991). 해조 탄수화물 중 산성 다당류에서 항혈액 응고효과(Nishide et al., 1988)를 가지며, 알긴산은 혈장 콜레스테롤 저하효과(Watanabe et al., 1992; Tsuji et al., 1968), 고지혈증 예방효과(Tsai et al., 1976), 성인병 예방(Choi et al., 1999a), 노화 억제(Choi et al., 1999b) 및 항종양활성(Fujihara and Nagumo, 1993) 등을 가지고, 갈조류의 라미나란은 면역력 증강 효과 및 항암효과 (Tatiana et al., 1999), 홍조류의 카라기난은 항혈액 응고효과(Nishino and Nagumo, 1992) 등의 다양한 생리적 효과를 가지는 것으로 알려져 있다.

또 후코이단을 이용한 연구도 많이 진행되어 왔으며(Nishino and Nagumo, 1987; Dobashi et al., 1989; Pereira et al., 1999), 갈조류에 주로 함유되어 있으나 종에 따라 구조와 생리활성의 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Kwon et al., 2006). 후코이단은 갈조류의 세포벽의 구성 성분으로 이루어진 함황 다당류로서, 항염증(McClure et al., 1992), 혈행 개선(Chevolot et al., 1999), 항혈액 응고효과(Koo et al., 2001; Kim et al., 1998; Church et al., 1989; Mori et al., 1982; Abdel-Fattah et al., 1974; Bernardi and Springer, 1962), 항바이러스(Patankar et al., 1993; Cooper et al., 2002; Baba et al., 1988; Ponce et al., 2003; Preeprame et al., 2001), 신장질환 개선(Quanbin et al., 2003), 성인병과 노화의 억제효과 및 스트레스 해소 효과(Choi et al., 1999a; b; c) 등이 있으며, 그 외에 여러 질환과 관련하여 많은 연구 결과들이 연구되고 있다. 최근에는 후코이단이 항암효과를 가진다는 보고가 증가하고 있는데(Aisa et al., 2005; Koyanagi et al., 2003; Funahashi et al., 2001; Ooi and Liu, 2000; Zhuang et al., 1995; Hajime et al., 1994; Itoh et al., 1993; Chida and Yamamoto, 1987; Yamamotoet et al., 1981), sarcoma-189 (육종

암), L-1210 (백혈구암), melanoma(피부암) 등과 같은 암세포의 성장을 크게 저해한다고 하였다(Yamamoto et al., 1981; Yamamoto et al., 1984; Cho et al., 1990; Kim et al., 1994). 또한, 후코이단의 sulfation 정도에 따라 세포의 증식이나 항혈액 응고효과를 가진다고 하였으며(Haroun-Bouhedja et al., 2000), oversulfate 후코이단은 항혈관신생과 항암활성을 증가시킨다고 하였다(Teruya et al., 2007; Koyanagi et al., 2003). 이들 암세포의 증식 억제 효과는 대체로 apoptosis에 의한 세포 사멸 작용에 의한 것이라는 보고가 많다.

Apoptosis는 1972년 이래 지난 30년 동안 암의 치료에 있어 가능성 있는 표적으로 연구되어 왔다(Kerr et al., 1972). Apoptosis는 성숙한 세포가 특정한 cell death gene의 발현에 의해 여러 유전자 및 단백질들의 발현과 활성이 조절되어 일어나는 능동적인 사멸로서 다세포 생물체에서 불필요하거나 위험한 요소를 가진 세포를 주변의 정상적인 세포들로부터 제거하여 구조적 기능적으로 조직의 항상성을 유지하게 함으로서 적절한 발생과 기능의 형성에 있어 중요한 역할을 한다. 일반적으로 DNA가 손상된 세포들은 사멸되거나 적절히 손상된 부위를 복구하여 항상성을 유지하게 되나, apopotosis에 이상이 생길 경우에는 병리학적 변이를 초래하게 되어 많은 종류의 질환을 일으키게 되는데, apoptosis가 비정상적으로 억제되면 세포가 변형적으로 증식되어 암을 유발하게 되는 원인이 될 수 있다(Kuchino and Kitanaka, 1996). Apoptosis는 종양세포의 죽음에 있어 유일한 형태는 아니지만 대부분의 종양에 있어서 가장 잘 알려진 세포 죽음의 한 형태로 알려져 있다(Sarraf and Bowen, 1988). 암세포의 apoptosis 유도는 암세포 증식 억제 기전 중의 하나이며(Kim et al., 2006), 암세포의 apoptosis 유도는 항암활성을 가지고 있는 성분들의 중요한 특징 중의 하나라고 알려져 있다(Frankfurt and Krishan, 2003). 현재 이용되고 있는 많은 항암제가 암세포의 apoptosis를 유도함으로써 그 효과를 나타내는 것으로 알려지고 있기 때문에 암 치료나 발암유전자에 대한 관심이 증가하고 있다(Kanno et al., 2004; Hannun, 1997; Mesner et al., 1997; Arends and Wylie, 1991). Apoptosis는 세포 내·외적인 신호에 의

해 시작되고 여러 종류의 apoptosis 조절 단백질에 의해 상호 유기적으로 조절된다. Apoptosis를 유도하는 다양한 물질들은 표적으로 하는 apoptosis 조절 단백질이 달라 서로 다른 경로를 통해 apoptosis를 유도하게 된다(Kim et al., 2005; 2006; 2007). 그러므로 apoptosis를 유도하는 각 성분의 apoptosis 유도 기전 연구는 apoptosis 유도를 통해 항암활성을 나타내는 항암제 개발에 매우 중요하다고 볼 수 있다. 현재, 천연물에서 독성이 낮으며 높은 활성을 가진 항암물질을 찾기 위한 시도가 활발히 진행되고 있다. 많은 다당류는 암세포에서 apoptosis을 유도하는 것으로 알려져 있으며(Aisa et al., 2005; Lin et al., 2001; Zhang and Huang, 2005), 대장암 세포와 관련하여 apoptosis에 관한 연구가 진행 되고 있다(Butler et al., 1999; Rupnarain et al., 2004). 그러나, apoptosis를 겪고 있는 종양세포의 사멸은 악성 종양의 가능성이나 화학치료 저항성을 가져오기도 하는 것으로 알려져 있다(Huerta et al., 2006).

후코이단의 생리 기능 효과는 다양하며 최근 들어 항암성에 대한 연구 보고는 증가하고 있으나, 항암 작용에 대한 작용 기전은 거의 밝혀져 있지 않다. 따라서, 본 논문에서는 후코이단에 의한 대장암 세포의 증식 억제와 연관된 apoptosis에 관한 연구를 시도하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 세포 및 시료

실험에 사용된 인간의 대장암 세포주인 HT-29는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank; KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, fibroblast인 MC3T3-E1은 경희의대로부터 제공받았다. 본 실험에 사용한 crude fucoidan (F5631; *Fucus vesiculosus*)은 Sigma (St. Louis, Mo, USA) 제품을 사용하였다.

2) 시약

세포 배양에 사용한 Roswell park memorial institute 1640 medium (RPMI 1640), fetal bovine serum (FBS)는 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. Penicillin-streptomycin, phosphate-buffered saline (PBS), phenol-red free RPMI 1640은 Gibco/BRL (Gaitherburg, MD, USA) 제품을 neutral red, trypsin, Hoechst 33342, RNase A, protein A sepharose, IGF-I (insulin-like growth factor-I), heregulin-α (HRG) 등은 Sigma 제품을 사용하였다. Transfer에 사용한 Immobilon™-P membrane은 millipore (Bedford, MA, USA)에서 각종 antibody는 Santa cruz (CA, USA), Cell signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Western blotting에 사용한 Supersignal® West Dura Extended Duration Substrate와 단백질을 정량하기 위한 BCA protein assay kit는 Pierce (Rockford, IL, USA)에서, film은 Kodak (Rochester, NY, USA)에서 구입하였다. 세포 생존율을 측정하기 위한 Celltiter 96® AQueous non-radioactive cell proliferation assay kit는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다.

2. 실험방법

1) 세포 배양

인간의 대장암 세포주인 HT-29와 MC3T3-E1 정상 세포는 37℃ CO_2 incubator (5% CO_2, 95% air)에서 RPMI 1640 배지와 α-MEM 배지를 사용하여 배양하였다. 실험에 사용할 세포를 유지하기 위하여 각 배지에 10% FBS, 100 units/ml penicillin- streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포가 80% 자라면 PBS로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 계대배양하고 배지는 2~3일 마다 교환해주었다.

2) 세포 증식율 측정을 위한 MTS assay

정상 세포주인 MC3T3-E1 세포 및 대장암 세포주인 HT-29 대장암 세포에 후코이단을 첨가하여 농도와 시간에 따른 세포 증식 정도를 알아보고자 MTS 분석을 하였다. 96-well plate에 MC3T3-E1 세포는 3×10^4, 대장암 세포주인 HT-29 세포는 4×10^4 cell/well의 농도로 분주하고, 10% FBS를 함유한 α-MEM, RPMI 1640 배양액으로 희석하여 배양하였다. 배양액 내의 FBS에 함유되어있는 여러 성분들을 제거하기 위해 24시간이 지난 후 serum-free α-MEM, RPMI 1640으로 배지를 교환하여 serum starvation 시켰다. 12시간 후 serum-free medium (SFM)에 후코이단을 농도별로 처리한 후 24, 48시간이 경과한 후 tetrazolium compound인 MTS를 첨가하고 일정시간 동안 배양하였다. 배양하는 동안 MTS는 세포내 미토콘드리아에서 생산되는 succinate dehydrogenase에 의해 수용성의 formazan으로 변하고 이렇게 생성된 formazan의 양을 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포의 생존율은 대조군에 대한 실험군의 %로 계산하였다.

3) 세포 독성 분석

HT-29 세포에 후코이단을 처리하였을 때 세포 독성을 나타내는지 확인하기 위해 Wadsworth와 Koop (1999)의 방법을 일부 변형한 Neutral Red (NR) assay로 분석하였다. HT-29 세포는 96-well plate에 4×10^4 cell/well의 농도로 분주하고, 10% FBS를 함유한 배양액으로 희석하여 배양하고 24시간 후 SFM으로 교환하여 serum starvation 시켰다. 12시간 후 SFM에 후코이단을 농도별로 처리한 후 24, 48시간이 경과한 후 배양액을 제거하고 10 μg/ml NR을 첨가하여 37℃에서 90분간 방치하였다. PBS로 세척한 후에 50 mM sodium citrate ·50% EtOH (pH 4.2)를 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후에 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포의 독성율은 대조군에 대한 실험군의 %로 계산하였다.

4) [^{3}H] thymidine incorporation 분석

후코이단의 암세포 증식 억제 효과가 DNA 합성을 감소시킴으로서 나타나는 것인지 확인하기 위해 HT-29 세포를 13 mm diameter cell culture coverslip (Thermanox plastic coverslips, Nunc, Rochester, NY, USA)을 넣은 24-well plate에 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지로 희석하여 배양하였다. 세포가 50~60% 정도 자라면, SFM으로 교환하여 48시간 배양한 후, 후코이단을 농도별로 처리하였다. [^{3}H]thymidine (Amersham Biosciences, UK)을 200,000 cpm/well의 농도로 첨가하여 37℃에서 24시간 배양시킨 다음, 생성된 DNA에 삽입된 [^{3}H]thymidine을 측정하였다. 즉, 5% TCA (trichloroacetic acid)를 첨가하여 실온에서 10분간 방치, 다시 탈이온수로 2회 세척한 후 70% 에탄올을 첨가하여 실온에 5분간 방치하였다. Cell culture coverslip을 liquid scintillation cocktail (Wallac, Amersham Phamacia Co., UK)에 넣고 liquid scintillation counter (Wallac 1409)로 시료별 cpm을 측정하여 DNA 합성정도를 계산하였다.

5) 형태학적 관찰

HT-29 세포에 후코이단을 처리하였을 때 형태학적인 변화를 보이는지 살펴보았다. 즉, HT-29 세포를 24-well plate에 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배양액으로 희석하여 24시간 동안 배양하였다. SFM으로 교환하여 12시간 배양한 다음 후코이단을 농도별로 처리하였다. 48시간 후, 세포를 PBS로 2회 씻은 후 위상차현미경 상에서 세포의 형태를 관찰하였다.

6) Hoechst 33342 염색

HT-29 세포에 후코이단을 처리하였을 때 핵의 형태학적 변화에 어떠한 영향을 미치는 지 살펴보았다. 즉, HT-29 세포를 24-well plate에 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배양액으로 희석하여 후코이단을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 fixing solution (formaldehyde : PBS = 1 : 9)을 첨가하여 실온에서 10분간 고정한 후에 PBS로 세척하였다. 0.2% Triton X-100을 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후에 2 μg/ml Hoechst 33342 용액을 첨가하여 빛을 차단한 상태에서 실온에서 30분간 반응시켰다. PBS로 세척한 후에 100% EtOH을 첨가하여 탈수 처리시켰다. 세포에 mounting medium (Sigma, M1289)을 1방울 떨어뜨린 후 커버글라스로 덮어주었다. 형광현미경을 이용하여 200배의 배율로 농도에 따른 핵의 형태 변화를 관찰하였다.

7) Annexin V-FITC 분석

HT-29 세포에 후코이단을 처리하였을 때, 세포의 사멸이 apoptosis인지 necrosis인지를 확인하기 위해 HT-29 세포를 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석하여 100 mm diameter culture dish에 분주하였다. 50~60% 정도 자라면 새로운 SFM으로 교환하고 후코이단을 농도별로 처리하여 48시간 배양하였다. 48시간 후 PBS-EDTA를 처리하여 PBS에 세포를 부유시켰다. 원심분리(4℃, 3,000 rpm, 5 min)하여 남은 pellet을 Annexin V-FITC apoptosis detection kit

(Becton Dickinson San Jose, CA, USA)를 사용하여 실험을 수행하였다. 즉, 1X Annexin V binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl) 100 μl에 pellet을 희석하였다. Annexin V-FITC solution과 PI solution을 첨가한 후 암실에서 15분간 반응시키고 1X binding buffer에 희석한 후 flow cytometer (FACSCalibur; BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

8) FACS 분석

세포 주기의 분포도에 미치는 후코이단의 영향을 살펴보기 위해 HT-29 세포를 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석하여 100 mm diameter culture dish에 분주하였다. 50~60% 정도 자라면 새로운 SFM으로 교환하고 후코이단을 농도별로 처리하여 48시간 배양하였다. 48시간 후 trypsin을 처리하여 PBS에 세포를 부유시켰다. 원심 분리(4℃, 3, 000 rpm, 5 min)하여 남은 pellet을 Cycle Test^{TM} Plus DNA reagent kit (Becton Dickinson San Jose, CA, USA)를 사용하여 실험을 수행하였다. 즉, kit에 포함된 buffer solution으로 세척한 후 Cycle TEST PLUS solution A와 B를 상온에서 각각 10분씩 처리한 후 Cycle TEST PLUS solution C를 처리하여 4℃에서 30분간 염색하였다. 이를 nylon mesh cell strainer (Becton Dickinson San Jose, CA, USA)에 통과시켜 세포를 monolayer로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modi Fit LT (Becton Dickinson, USA) 프로그램으로 분석하였다.

9) Western blot analysis

① 단백질 발현 분석

HT-29 세포를 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석하여 100 mm diameter culture dish에 분주하였다. 50~60% 정도 자라면 새로운 SFM으로 교환하고 후코이단을 농도별로 처리하여 48시간 배양하였다. PBS로 2회 세척하고, lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM

EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4, 1 μg/ml leupeptin, 1 mM PMSF)를 사용하여 4℃에서 30분간 방치하였다. 그런 다음 얼음 위에서 cell lysate를 회수하고, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 동량의 Cell lysate를 SDS-PAGE로 분리하여 membrane에 옮겼다. Membrane은 실온에서 1% BSA-TBST로 1시간 동안 blocking 시킨 후, 각 각의 항체를 첨가하여 4℃에서 16시간 반응시켰다. TBS-T로 씻어낸 다음, 다시 2차 항체를 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후 Supersignal® West Dura Extended Duration Substrate kit를 이용하여 X-ray 필름에 감광시키고 현상하여 단백질 발현 정도를 Muti Gauge (FUJI photo film) software version 3.0 프로그램을 사용하여 확인하였다.

② 세포질 및 미토콘드리아 획분 추출

세포질 및 미토콘드리아 획분 추출은 Emanuele et al. (2004)의 방법을 사용하여 회수하였다. 즉, HT-29 세포를 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석하여 100 mm diameter culture dish에 분주하였다. 50~60% 정도 자라면 새로운 SFM으로 교환하고 후코이단을 농도별로 처리하여 48시간 배양하였다. PBS-EDTA로 2회 세척하고, trypsin-EDTA를 첨가하여 세포를 수축시켜 PBS 1 ml로 회수하였다. 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 cell lysate에 Buffer A (20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 250 mM Sucrose)를 첨가하여 잘 섞은 후에 4℃에서 20분간 방치하였다. 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상청액 (S1)을 회수하고 다시 cell pellet에 Buffer A를 첨가하여 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상청액 (S2)을 회수하였다. 상층액 (S1)과 (S2)를 합하여 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액은 세포질 획분으로 분리하였다. 다시, pellet에 buffer A를 첨가한 것을 미토콘드리아 획분으로 분리하여 동량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하여 Western blot membrane에 옮긴 후, 단백질

발현 정도를 확인하였다.

③ 핵 획분 추출

핵 획분 추출은 Park et al. (2005)의 방법을 사용하여 회수하였다. 즉, HT-29 세포를 PBS-EDTA로 2회 세척하고, trypsin-EDTA를 첨가하여 세포를 수축시켜 PBS 1 ml로 회수하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 cell lysate에 Hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$)를 첨가하여 잘 섞은 후에 4℃에서 15분간 방치하였다. 다시 2.5% NP-40을 첨가하여 잘 섞은 후에 4℃에서 10분간 방치하였다. 5,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상청액을 제거하였다. Cell lysate에 Nuclear extraction buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT)를 첨가하여 4℃에서 20분간 방치하고 원심 분리하여 (14,000 rpm, 10 min) 상청액을 핵 획분으로 사용하였다.

④ IGF-I 단백질 수준 및 IGF-IR 신호 전달 분석

HT-29 세포에 후코이단을 농도별로 첨가하여 48시간 배양하였다. PBS-EDTA로 2회 세척하고, lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1% NP-40, 1 mM Na_3VO_4, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml pepstatin, 1 μg/ml leupeptin, 0.25% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF)를 첨가하여 4℃에서 30분간 방치하였다. 얼음 위에서 cell을 회수하고, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상청액을 취해 cell lysate로 사용하였다. 동량의 cell lysate (50 μg/ml protein)를 SDS-PAGE로 분리하여 membrane에 옮긴 후, 단백질 발현 정도를 확인하였다.

또한, IGF-I으로 유도된 HT-29 대장암 세포에 암세포 증식 억제 효과가 IGF-IR 신호 전달 경로를 매개로 일어나는지 알아보기 위하여 살펴보았다. 즉, HT-29 세포에 500 μg/ml의 후코이단을 첨가하여 48시간 배양하였다. 회수

직전 100 ng/ml의 IGF-I을 0, 5, 10, 60분간 처리한 후, lysis buffer를 첨가하여 4℃에서 30분간 방치하였다. 얼음 위에서 cell을 회수하고, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상청액을 취해 cell lysate로 사용하였다. 동량의 cell lysate (750 μg/ml protein)에 anti-IGF-IRβ 항체를 처리하여 (1:300) 4℃에서 16시간 반응시킨 후, Protein A-Sepharose (Sigma Co., USA)를 넣어 4℃에서 2시간 반응시키고 14,000 rpm에서 2분간 원심 분리하여 항체와 결합한 단백질을 Protein A-Sepharose와 함께 침전시켰다. 침전물은 lysis buffer로 3번 반복하여 세척하고 0.1 M DDT를 함유하는 1× sample buffer 넣어 10분간 끓인 후, sample buffer만 조심스럽게 회수하여 5% SDS-PAGE에서 단백질을 분리하고 membrane에 옮긴 후, 단백질 발현 정도를 확인하였다.

⑤ HRG 단백질 수준 및 ErbB3 신호 전달 분석

HT-29 세포에 후코이단을 농도별로 첨가하여 48시간 배양하였다. PBS로 2회 세척하고, lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na_3VO_4, 20 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml antipain, 10 μg/ml leupeptin, 80 μg/ml benzamidine-HCl, 0.2 mM PMSF)를 첨가하여 4℃에서 30분간 방치하였다. 얼음 위에서 cell을 회수하고, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상청액을 취해 cell lysate로 사용하였다. 동량의 cell lysate (50 μg/ml protein)를 SDS-PAGE로 분리하여 membrane에 옮긴 후, 단백질 발현 정도를 확인하였다.

또한, HRG로 유도된 HT-29 대장암 세포에 암세포 증식 억제 효과가 HRG/ErbB3의 신호 전달 경로를 매개하여 일어나는지 알아보기 위하여 다음과 같이 검토하였다. 즉, HT-29 세포에 500 μg/ml의 후코이단을 첨가하여 48시간 배양하였다. 회수 직전 100 ng/ml의 HRG을 0, 5, 10, 60분간 처리한 후, lysis buffer를 첨가하여 4℃에서 30분간 방치하였다. 얼음 위에서 세포를 회수하고, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상청액을 취해 cell lysate로 사용

하였다. 동량의 cell lysate (750 μg/ml protein)에 anti-ErbB3 항체를 처리하여 (1:300) 4℃에서 16시간 반응시킨 후, Protein A-Sepharose를 넣어 4℃에서 2시간 반응시키고 14,000 rpm에서 2분간 원심 분리하여 항체와 결합한 단백질을 Protein A-Sepharose와 함께 침전시켰다. Protein A-Sepharose는 lysis buffer로 3번 반복하여 세척하고 0.1 M DDT를 함유하는 1× sample buffer 넣어 10분간 끓인 후, sample buffer만 조심스럽게 회수하여 5% SDS-PAGE에서 단백질을 분리하고 membrane에 옮긴 후 단백질 발현 정도를 확인하였다.

10) 실험 결과의 통계처리

본 실험에 대한 모든 실험 결과는 mean ± S.E.로 나타내었고, 실험군 간의 유의성은 SPSS ver. 10.0 프로그램을 사용하여 ANOVA로 검증한 후, $p<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 비교하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Table 1. Antibodies used in the present study

Antibody	Origin	Company
Fas	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
pro-caspase-8	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
pro-caspase-9	rabbit polyclonal	Cell Signaling
pro-caspase-7	rabbit polyclonal	Cell Signaling
pro-caspase-3	rabbit polyclonal	Cell Signaling
cleaved PARP	rabbit polyclonal	Cell Signaling
Bax	rabbit polyclonal	Cell Signaling
Bad	rabbit polyclonal	Cell Signaling
Bid	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-2	rabbit polyclonal	Cell Signaling
Bcl-xL	rabbit polyclonal	Cell Signaling
cytochrome c	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
E2F	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
phospho-RB	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Cyclin D1	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
β-catenin	rabbit polyclonal	Cell Signaling
IKKα	rabbit polyclonal	Cell Signaling
phospho-IκBα	rabbit polyclonal	Cell Signaling
IκBα	rabbit polyclonal	Cell Signaling
NF-κB	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
phospho-p38	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
phospho-JNK	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
COX-2	goat polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
iNOS	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
IGF-IRβ	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
phospho-tyrosine	mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
IRS-1	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
AKT	goat polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
phospho-AKT	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
MAPK	rabbit polyclonal	Cell Signaling
phospho-MAPK	rabbit polyclonal	Cell Signaling
HRG	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
ErbB2	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
ErbB3	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
β-actin	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. HT-29 대장암 세포의 후코이단에 의한 증식 억제

1) HT-29 대장암 세포와 MC3T3-E1 세포의 증식에 미치는 영향

HT-29 대장암 세포와 MC3T3-E1 정상 세포에 후코이단을 처리하여 농도와 시간에 따른 세포 증식 정도를 알아보고자 MTS 분석을 하였다. 세포에 후코이단을 농도별로 처리하여 24 또는 48시간이 경과한 후 살아있는 세포의 미토콘드리아에서 생산되는 succinate dehydrogenase에 의해 수용성의 formazan으로 변하는 원리를 이용한 MTS 분석을 수행하였다.

먼저, HT-29 대장암 세포는 100 μg/ml의 후코이단 처리군에서 유의적으로 세포 증식율이 감소하기 시작하였는데, 농도 의존적인 경향을 보여주었다. 또한, 24시간 처리보다 48시간 처리 시 세포 증식율이 좀 더 감소하는 것으로 나타났는데, 48시간에서 IC_{50}은 약 500 μg/ml으로 나타났다(Fig. 1).

다음으로, MC3T3-E1 정상 세포에 후코이단을 농도별로 첨가하여 세포 증식정도를 살펴보았다. 그 결과, MC3T3-E1 정상 세포의 경우 후코이단 처리는 농도와 시간에 관계없이 증식에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 2).

따라서, 각 세포에 후코이단을 처리하였을 때, MC3T3-E1 정상 세포의 세포 증식에는 영향을 주지 않았으며, HT-29 대장암 세포의 경우에는 농도 의존적, 시간 의존적으로 세포 증식율의 감소를 가져오는 것으로 나타났다.

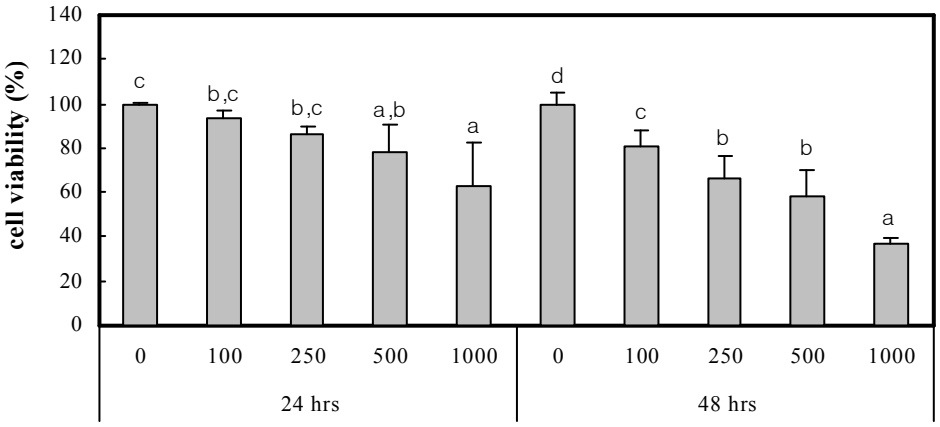


Fig. 1. Effect of fucoidan on the growth of HT-29 colon cancer cells.

HT-29 cells were seeded in 96-well plates at a density of 4×10^4 cells/well with medium supplemented with 10% FBS. Twenty-four hrs after seeding, the cells were serum-starved for 12 hrs. The cells were treated for 24 hrs or 48 hrs with fucoidan (0~1,000 μg/ml), and viable cells were estimated by the MTS assay. Each bar represents the mean ± S.E. Mean with different letters are significantly different at the 0.05 level of significances as determined by Duncan's multiple range test.

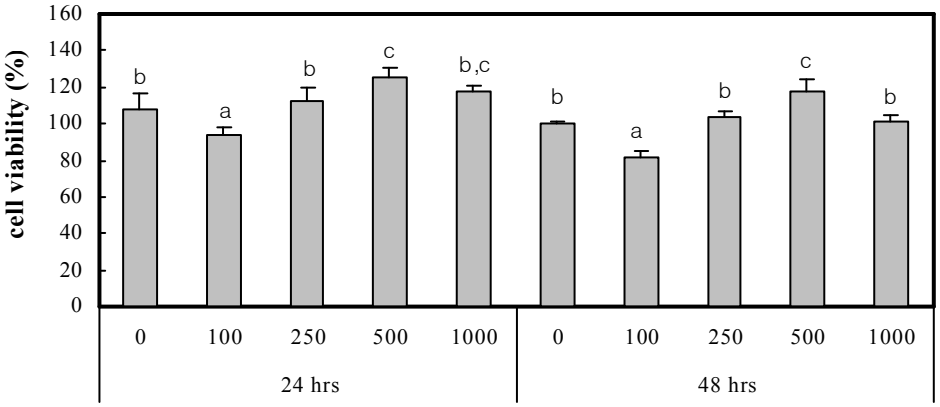


Fig. 2. Effect of fucoidan on the growth of MC3T3-E1 fibroblast cells.

MC3T3-E1 cells were seeded in 96-well plates at a density of 3×10^4 cells/well with medium supplemented with 10% FBS. Twenty-four hrs after seeding, the cells were serum-starved for 12 hrs. The cells were treated for 24 hrs or 48 hrs with fucoidan (0~1,000 μg/ml), and viable cells were estimated by the MTS assay. Each bar represents the mean ± S.E. Mean with different letters are significantly different at the 0.05 level of significances as determined by Duncan's multiple range test.

2) 세포 독성 검토

앞선 실험에서 HT-29 세포에 후코이단을 처리하였을 때 세포 증식율이 감소하는 것으로 나타났으므로, 이러한 세포 증식율의 감소가 세포 독성을 나타내는지 Wadsworth와 Koop (1999)의 방법을 일부 변형한 NR assay를 통해 살펴보았다. 그 결과, HT-29 대장암세포에 후코이단을 농도별, 시간별로 처리하였을 때, 농도와 시간에 따른 세포 독성을 보이지 않았다(Fig. 3).

이와 관련한 연구 결과들이 많이 보고되고 있는데, 다시마 유래 후코이단을 4,000 mg/kg/body weight 수준으로 경구 투여한 단회 독성 시험 결과 특이한 병변 현상을 관찰할 수 없었다고 하였으며, 2,500 mg/kg의 후코이단을 180일간 wister rat에 투여했을 때 혈액응고 지연 이외에 특이한 독성은 발견되지 않았다고 하였다(Li et al., 2005). 또한, 후코이단을 1,000~2,500 mg/kg/body weight 수준으로 2년에 걸쳐 장기 투여했을 때도 특이한 부작용은 발견되지 않았다고 하여(Cooper et al., 2002) 후코이단은 장기 섭취에 있어서도 안전한 물질로 평가되고 있다. 따라서, HT-29 대장암 세포에 후코이단 처리 시 세포 독성에 관계없이 세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 앞으로의 실험에서는 후코이단에 의한 세포 증식 억제 메카니즘을 확인키 위해 후코이단을 48시간 처리하여 검토하고자 하였다.

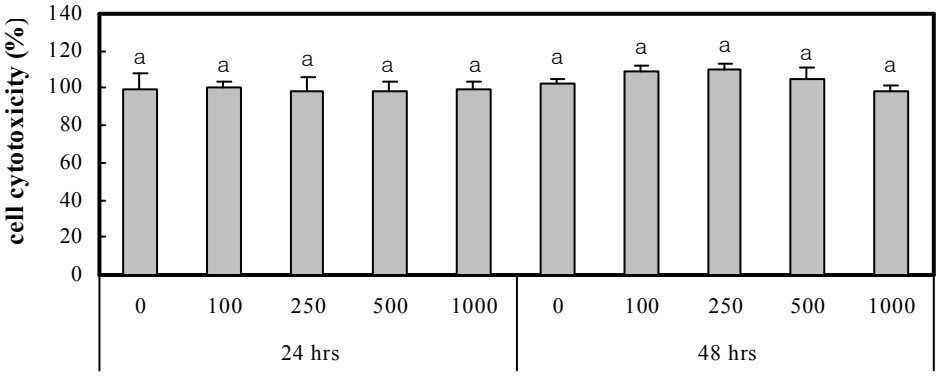


Fig. 3. Effect of fucoidan on cytotoxicity in HT-29 cells.

HT-29 cells were seeded in 96-well plates at a density of 4×10^4 cells/well with medium supplemented with 10% FBS. Twenty-four hrs after seeding, the cells were serum-starved for 12 hrs. The cells were treated for 24 hrs or 48 hrs with fucoidan (0~1,000 μg/ml), and viable cells were estimated by the NR assay. Each bar represents the mean ± S.E. Mean with different letters are significantly different at the 0.05 level of significances as determined by Duncan's multiple range test.

3) DNA 합성 억제

HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, 세포 증식 억제가 DNA 합성과 관련된 것인지를 살펴보기 위해 [^{3}H]thymidine incorporation을 측정하였다. 세포에 후코이단을 농도별로 48시간 처리한 후, [^{3}H]thymidine을 200,000 cpm/well의 농도로 첨가하여 24시간 배양시킨 다음, 생성된 DNA에 삽입된 [^{3}H]thymidine의 시료별 cpm을 측정하여 DNA 합성정도를 확인하였다.

그 결과, DNA에 삽입된 [^{3}H]thymidine의 양은 100 μg/ml 후코이단 처리 시 DNA 합성이 50% 저해되었으며, 1,000 μg/ml의 후코이단의 90% 합성을 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 따라서, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 세포 증식이 감소되는 것은 DNA 합성 수준의 감소로 인해 발생하는 것으로 보여진다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

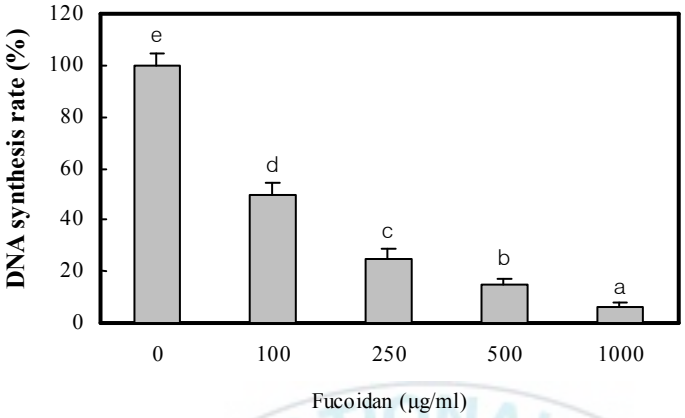


Fig. 4. Effects of fucoidan on [^{3}H]thymidine incorporation in HT-29 cells. HT-29 cells treated for 48 hrs with fucoidan (0~1,000 μg/ml). [^{3}H]Thymidine was then added, and the incubation were continued for another 24 hrs to measure the incorporation into DNA. DNA synthesis rates of cells were estimated by the [^{3}H]thymidine incorporation assay. Each bar represents the mean ± S.E. Mean with different letters are significantly different at the 0.05 level of significances as determined by Duncan's multiple range test.

4) 세포의 형태학적 변화

앞선 결과에서, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 세포의 독성에 관계없이 세포 증식이 감소하였으므로, 후코이단 처리 시 형태학적인 변화를 보이는지 현미경 상에서 살펴보았다.

그 결과, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 세포 증식율(Fig. 1)과 DNA 합성(Fig. 4)의 결과와 동일하게 농도 의존적으로 세포 수가 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 250 μg/ml의 후코이단 처리 시 세포의 형태가 변하기 시작하였으며, 500 μg/ml의 후코이단을 처리하였을 때는 세포의 응축현상이 나타나기 시작하였다(Fig. 5).

세포 사멸과정에서 세포는 세포 외 기질과 세포 외 기질에 대한 세포막 수용체인 integrin과의 결합력 약화로 인한 focal adhesion complex의 분해 때문에 일차적으로 평평한 모양에서 둥근 형태로 모양이 변하고, 세포 내 골격 단백질의 변화로 인한 세포의 수축, 염색사 응축, 핵의 붕괴, DNA의 분해 등과 같은 다양하고 특이한 형태적, 생화학적인 변화를 일으키는 것으로 알려져 있다(John et al., 1993). 따라서, 본 연구 결과에서도 후코이단에 의해 세포 사멸에 의한 형태적 변화가 일어나고 있음을 보여주었다.

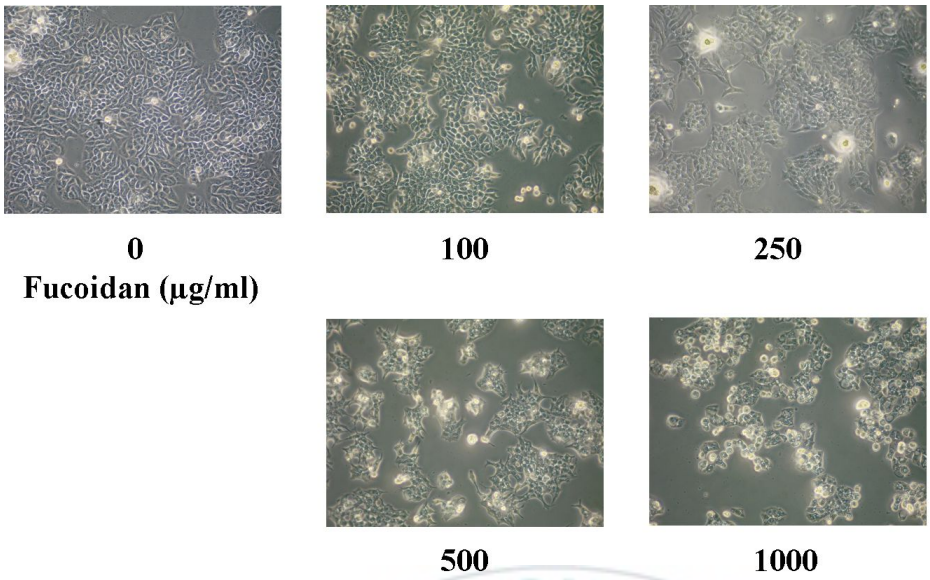


Fig. 5. Morphological changes by treatment with fucoidan in HT-29 cells.

HT-29 cells were treated with fucoidan (0~1,000 μg/ml). After 48 hrs incubation cells were examined under light microscopy. Magnification, ×200.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

5) 핵의 형태학적 변화

앞선 결과에서, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, 농도가 증가함에 따라 세포의 성장이 감소하였으며, 형태학적인 현미경 관찰에서도 세포의 형태가 변하는 것을 확인하였다. 따라서, 후코이단의 처리 시 세포 사멸의 직접적인 증거를 제시하기 위하여 핵의 형태학적인 변화를 살펴보고자 하였다. 일반적으로, 세포 사멸의 과정에서 세포막의 파괴 및 염색체의 응축과 더불어 사멸체(apoptotic body) 형성 등의 형태학적인 변화가 일어나게 되는데 이를 Hoechst 33342 염색을 통해 살펴보았다.

Hoechst 33342는 세포에 DNA-binding dyes를 붙여 염색할 경우, 살아있는 세포와 죽은 세포 DNA 모두를 blue로 염색하게 되며, 핵의 형태학적인 변화를 살펴볼 수 있는 방법으로 사용되고 있다. HT-29 대장암 세포에 후코이단 처리 시 대조군에서 관찰할 수 없는 세포 사멸 유발 특이적인 핵 내 DNA 단편화에 의한 apoptotic body의 출현(Arends et al., 1990; Evans, 1993; Chiarugi et al., 1994)이 농도 의존적으로 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 6). 이로써, 후코이단 처리에 의한 HT-29 대장암 세포의 성장 억제는 DNA 합성 감소와 함께 세포 사멸 유발과 밀접한 연관성이 있는 것으로 보인다.

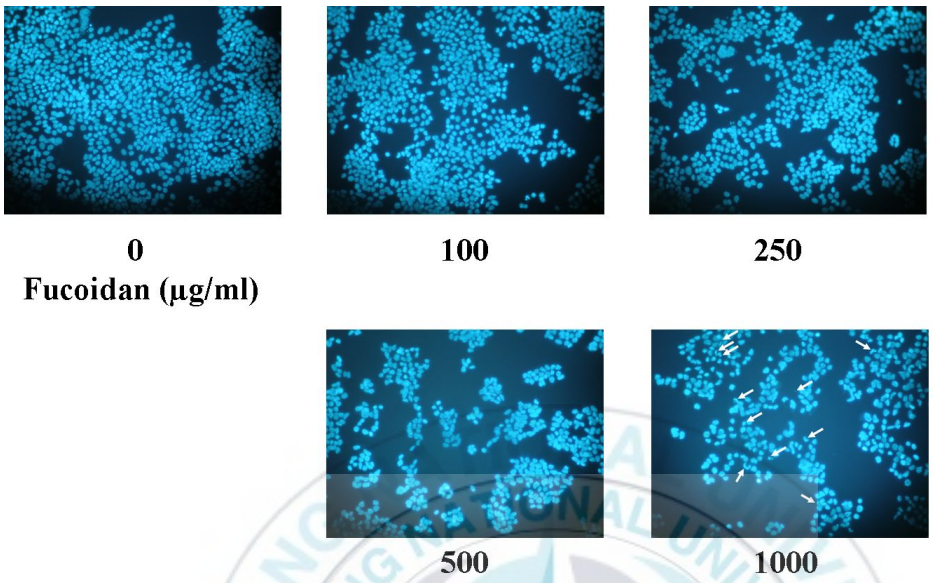


Fig. 6. Induction of apoptotic bodies by treatment with fucoidan in HT-29 cells.

HT-29 cells were treated with fucoidan (0~1,000 μg/ml). After 48 hrs incubation cells were fixed and then stained with Hoechst 33342 (2 μg/ml). After 20 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence using blue filter. Arrows indicate typical apoptotic cells with apoptotic body. Magnification, ×200.

6) Annexin V-FITC에 의한 apoptosis 분석

앞선 결과에서, HT-29 대장암 세포에 후코이단 처리 시 세포 사멸이 유도되었으므로, 후코이단에 의한 세포의 증식 억제가 apoptosis인지 necrosis에 기인하는지 확인하기 위해 Annexin V-FITC apoptosis detection kit를 사용하여 flow cytometery로 분석하였다. Annexin V-FITC는 apoptosis를 겪고 있는 세포의 퍼센트를 정량적으로 측정할 수 있는 분석법이다. 살아있는 세포에서 Apoptosis가 일어나면 세포막을 조성하는 인지질의 안쪽에 위치한 phosphatidylserine (PS)이 세포막 밖으로 이동하는 원리를 이용한 방법으로 PS에 특이적으로 결합하는 Annexin V와 propidium iodide (PI)의 세포막 투과성을 이용하여 세포 중의 early apoptosis (Annexin V-FITC positive, PI negative), late apoptosis (Annexin V-FITC positive, PI positive)의 비율을 살펴보았다.

Annexin V-FITC 분석 결과, living cell에 있어서 대조군의 경우는 81%였으나, 후코이단 처리 시 56%로 감소하였다(Fig. 7). 뿐만 아니라, apoptic cells에 있어서, 대조군의 경우는 5%였으나 후코이단을 농도별로 처리하였을 때, 100 μg/ml의 후코이단의 경우 7% 수준에 머물던 것이 1,000 μg/ml의 후코이단 처리 시 23%로 증가하는 것으로 나타났다. 이로써, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 발생하는 세포 사멸은 주로 apoptosis에 의한 것임을 확인하였다.

Apoptosis는 예정된 세포 사멸(programmed cell death)이라고도 하며, 세포가 정상적인 상태 또는 병리학적 요인에 노출된 후에 죽음에 이르게 되는 생리학적 과정을 말한다(Hengartner, 2000). Apoptosis는 염증반응을 동반하지 않는 단일 세포의 사멸로 염색질 농축, DNA 분절화와 apoptotic body 형성 등의 조직학적 특징을 나타내므로 또 다른 세포사인 괴사(necrosis)와는 구분이 된다(Kerr et al., 1972). Apoptotic cell은 세포의 위축(shrinkage), 핵의 농축, chromatin의 응축, DNA 분절(DNA fragmentation), caspase로 알려

져 있는 cysteine protease의 활성과 같은 형태학적인 특징을 나타내는 것으로 알려져 있다(Reed, 1998; Earnshaw, 1995). Apoptosis는 세포 내·외적인 신호에 의해 시작되어 일련의 과정을 거쳐 이루어지고, bcl-2 family 단백질(Korsmeyer, 1995)과 cysteine acid protease들(Debatin, 2004)이 apoptosis의 중요한 조절인자로 작용하는 것으로 알려져 있다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

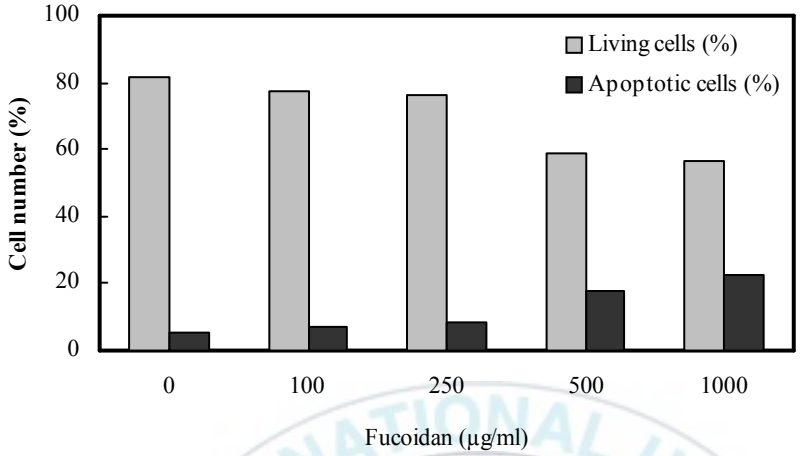


Fig. 7. Flow cytometry analysis by treatment with fucoidan in HT-29 cells.

HT-29 cells treated for 48 hrs with fucoidan (0～1,000 μg/ml). The cells were trypsined, loaded with PI and Annexin V, and then analyzed by flow cytometry. The number of living cells and apoptotic cells are expressed as a percentage of total cell number.

2. 세포 내 신호 전달에 미치는 영향

Apoptosis는 종양세포의 죽음에 있어 유일한 형태는 아니지만 대부분의 종양에 있어서 가장 잘 알려진 세포 죽음의 한 형태로 알려져 있으며(Sarraf and Bowen, 1988), 세포 증식에 대해 상호 보완적이면서 반대역할을 하여 세포 수를 조절하고 항상성을 유지하는 데 apoptosis의 증가 혹은 감소로 인해 세포 사멸-세포 증식의 균형이 깨어지면 종양, 자가 면역 질환 등 여러 질환이 발생하는 것으로 알려져 있다(Thompsos, 1995; Watson, 1995; Que and Gores, 1996). 현재 이용되고 있는 많은 항암제가 암세포의 apoptosis를 유도함으로써 그 효과를 나타내는 것으로 알려지고 있기 때문에 암 치료나 발암 유전자에 대한 관심이 증가하고 있다(Kanno et al., 2004; Hannun, 1997; Mesner et al., 1997; Arends and Wylie, 1991). Apoptosis를 유도하는 다양한 물질들은 표적으로 하는 apoptosis 조절 단백질이 달라 서로 다른 경로를 통해 apoptosis를 유도하게 된다(Kim et al., 2006 ; Kim et al., 2007 ; Kim et al., 2005). 그러므로 apoptosis 유도 기전 연구는 apoptosis 유도를 통해 항암활성을 나타내는 항암제 개발에 있어서 매우 중요한 부분이기도 하다.

일반적으로 apoptosis는 수용체 매개 경로(Extrinsic pathway; Death-receptor pathway)와 화학적 물질이 유도하는 apoptosis 경로(Intrinsic pathway; Mitochondrial pathway)의 두개의 경로를 통해 일어나는 것으로 알려져 있다(Elmore, 2007; Jin and El-Deiry, 2005). 첫 번째 경로에는 tumor necrosis factor (TNF) family와 같은 cytokine이 그들의 death receptor와 작용하여 결과적으로 caspase-3을 활성화시켜 apoptosis를 유도하는 것이다. 이와는 달리 화학적 물질에 의해 유도되는 apoptosis 경로에는 caspase-8에 의한 Bid의 분해과정, 미토콘드리아로부터의 cytochrome *c*의 분비 촉진, caspase-9의 활성화를 통한 caspase-3의 활성을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Fig. 8).

앞선 실험에서, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, 세포의 증식 억제가 DNA 합성 감소와 apoptosis에 의한 것으로 나타났다. 따라서, 이후의 실험에서는 후코이단의 apoptosis에 대한 신호전달 기전을 중심으로 검토하고자 하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

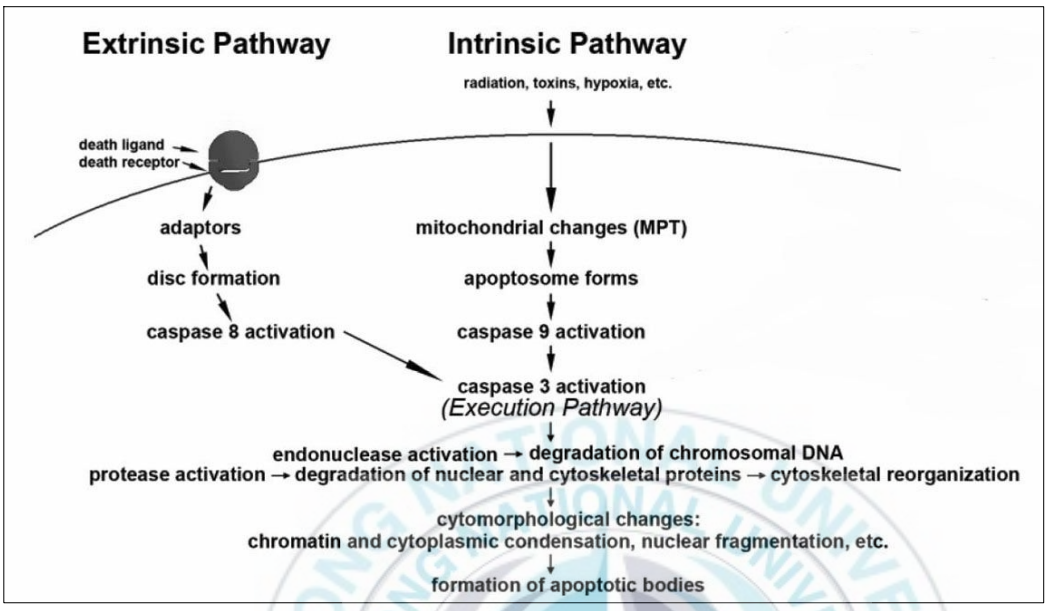


Fig. 8. Schematic representation of apoptotic events.

The two main pathways of apoptosis are extrinsic and intrinsic pathway. Each requires specific triggering signals to begin an energy-dependent cascade of molecular events. Each pathway activates its own initiator csapase (8, 9, 10) which in turn will activate the executioner caspase-3. The execution pathway results in characteristic cytomorphological features including cell shrinkage, chromatin condensation, formation of cytoplasmic blebs and apoptotic bodies and finally phagocytosis of the apoptotic bodies by adjacent parenchymal cell, neoplastic cells of macrophages (Elmore, 2007).

1) Extrinsic pathway 신호 전달

HT-29 대장암 세포에 후코이단을 48시간 처리하고 Fas와 pro-caspase-8 항체를 사용하여 extrinsic pathway에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과, 후코이단을 처리하였을 때, Fas 단백질 발현이 농도 의존적으로 증가하였고, pro-caspase-8의 단백질 발현이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 10).

Fas를 포함하는 receptor들은 apoptosis의 생리학적 조절에 중요한 역할을 수행하는 인자들이며, 이들 인자들에 의해 실행되는 apoptosis는 다양한 종양이나 면역체계의 이상으로 일어나는 질병들에 대한 방어수단으로 작용하기도 하며 생명체내 항상성을 유지시켜주는 중요한 기작이다(Wajant, 2002; Siegel et al., 2000). Fas에 Fas ligand가 결합하여 Fas receptor가 활성화되면 cytoplasmic tail의 death domain에 Fas-associated death domain (FADD)가 결합하여 death-inducing signaling complex (DISC)가 형성되고, 이어서 pro-caspase-8이 FADD의 death effector domain (DED)에 결합한다. FADD에 결합된 pro-caspase-8은 자신을 autocleavage함으로써 활성화된다(Budihardjo et al., 1999; Cohen, 1997; Thornberry and Lazebnik, 1998). 이렇게 활성화된 caspase-8은 effector caspase (caspase-3, -7)를 활성화시켜 일련의 연쇄적인 효소들이 작용을 통해 세포 사멸을 유발하게 된다(Chang and Yang, 2000; Wehrli et al., 2000; Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1997) (Fig. 9). 다른 연구에서도 HT-29 대장암 세포에서 보라우무 메탄올 추출물에 의해 Fas 단백질 수준이 증가하여 death receptor에 의한 extrinsic pathway에 의해 apoptosis가 유도된다고 하여(Kim et al., 2007), 본 실험과 동일한 결과를 보여주었다.

다양한 세포에서 caspase의 활성이 apoptosis에 관여하는 것으로 보고되고 있다(Grütter, 2000; Chiarugi et al., 1994; Antonsson and Martinou, 2000; Choi et al., 2001; Hengartner, 2000; Slee et al., 1999; Grimm et al., 1996; Polverino and Patterson, 1997). Cysteine protease의 family인 caspases는 세

포에서 핵과 미토콘드리아의 외막에 존재하며, 대부분의 모든 세포에서 불활성형 proenzymes으로 발현되어 있고(Debatin, 2004; Enari et al., 1996; Thornberry and Lazebnik, 1998), 이들 family에 속하는 많은 단백질들은 bcl-2/bax family 발현의 변화에 따라 이들의 활성화가 조절되는 것으로 알려져 있다(Chiarugi et al., 1994; Miyashita and Reed, 1995; Antonsson and Martinou, 2000). Caspases가 활성화되면 이러한 효소들은 actin, gelsolin, fodrin, lamin과 같은 구조단백질(Kothakota et al., 1997; Takahashi et al., 1996), Poly ADP-ribose polymerase (PARP) (Nagata, 1997), ICAD (Sakahira et al., 1998)를 포함한 특정한 기질이 절단되어 apoptotic cell에서 형태학적 변화와 전형적인 생물학적인 변화를 가져오게 된다(Kohler et al., 2002). 각각의 caspase들은 외부자극이 없을 때에는 불활성 전구체 상태로 있지만, 외부에서 세포 사멸 신호가 전달되면 N-terminal prodomain이 절단되어 서로 다른 크기의 subunit들이 서로 heterotetramer를 형성하여 활성화된다. 가장 upsteram의 활성화된 initiation caspase는 downstream의 불활성 caspase를 절단하여 활성화를 유도한다. 세포 내에서 이러한 신호전달을 caspase cascade라고 하는데, 이들 중 가장 아래의 effector caspase가 활성화되면 세포 내의 다양한 기질들을 절단하여 비로소 세포 사멸을 유도하여 최종적인 apoptosis를 일으키게 된다(Drexler, 1997; Kauffmann and Hengartner, 2001). Fas 매개성 caspase 활성을 통한 세포 사멸은 두 개의 경로로 나뉘는데, 활성화된 caspase-8의 양이 충분하여 직접 caspase-3을 활성화시켜 세포 사멸을 유도하는 경로와(Ashkenazi and Dixit, 1998; Scaffidi et al., 1999), 활성화된 caspase-8의 양이 너무 적어서 미토콘드리아가 세포 사멸 신호의 enhancer로 작용하는 것이다(Green and Reed, 1998). 즉, Bcl-2 family에 속하는 단백질 중 하나인 Bid를 절단하여 절단된 형태의 tBid가 활성화된 caspase-8에 의해 절단된 후 미토콘드리아로 이동하여 미토콘드리아를 활성화시킴으로서 간접적으로 caspase-3을 활성화시키는 것이다(Nagata 1997; Scaffi야 et al., 1999). 이 과정에서 신호는 더욱 증폭되며 미토콘드리아에서 cytochrome *c*가 방출

된다. 방출된 cytochrome *c*는 Apaf-1과 결합하고(Li et al., 1997), Apaf-1의 caspase recruitment domain (CARD)에 caspase-9이 결합하여 apoptosome을 형성하는데, 이것이 caspase-3를 절단하여 활성화시켜서 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다(Fulda et al., 2001).

따라서, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, Fas 단백질 발현이 고농도에서 증가하였고, pro-caspase-8의 단백질 발현이 감소하는 것으로 나타났는데, 이는 부분적으로, 후코이단이 extrinsic pathway를 통해 apoptosis를 유도하는 것으로 보인다(Fig. 10).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

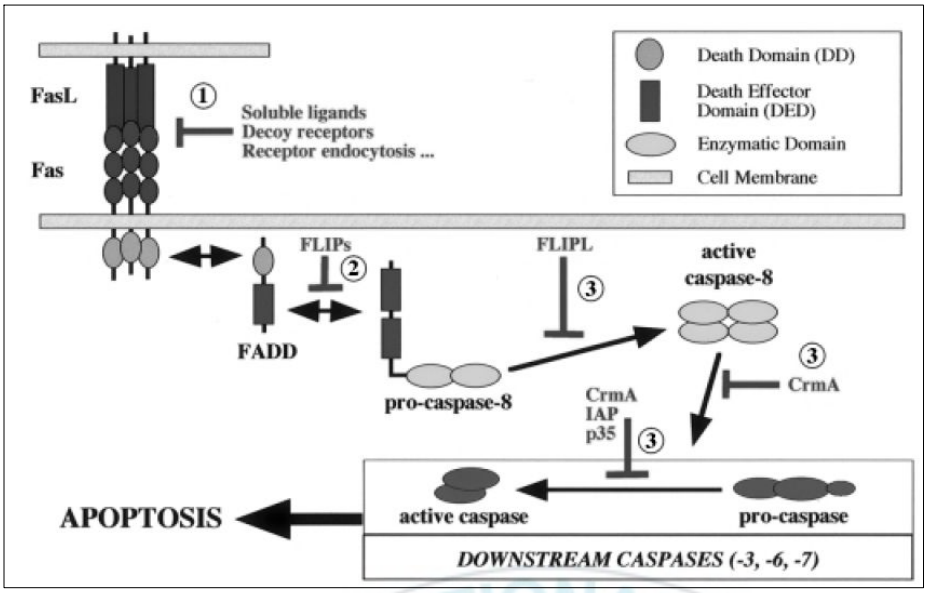


Fig. 9. The Fas signaling pathway and its molecular control.

Fas signaling is triggered on target cells by receptor tri(multi)merization induced upon contact with membrane bound FasL. Subsequent recruitment of FADD and pro-caspase-8 leads to upstream caspase (caspase-8) autoactivation that initiates apoptosis by subsequent cleavage of downstream effector caspases (caspases-3, -6, -7). Death receptor apoptosis can be inhibited at different points: receptor level ①, initiator stage ②, and effector stage ③ (Wehrli et al., 2000).

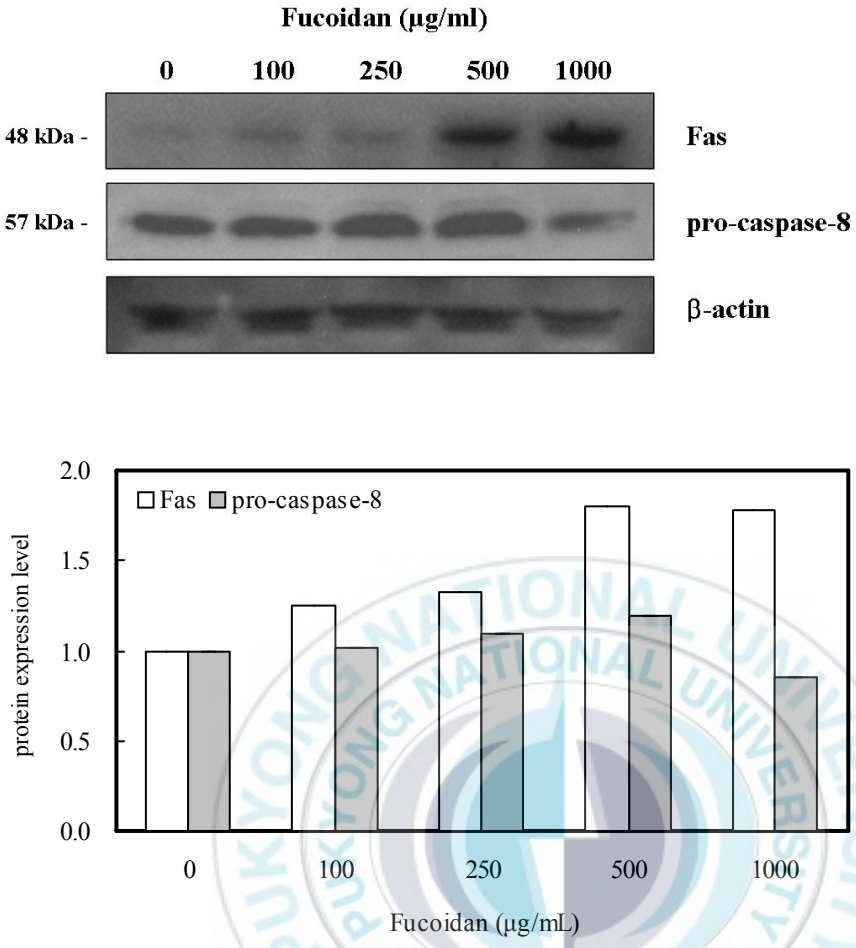


Fig. 10. Effects of fucoidan treatment on the levels of Fas and pro-caspase-8 protein in HT-29 cells.

HT-29 cells were lysed and then total proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were visualized by Western blotting using indicated antibodies. β-actin was used as an internal control.

2) Intrinsic pathway 신호 전달

앞선 실험에서 extrinsic pathway를 통한 신호전달에서, HT-29 세포에 후코이단 처리 시 Fas의 단백질 발현이 증가되었고, pro-caspase-8의 단백질 발현이 감소되어 최종적으로 apoptosis에 관련이 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 실험에서는 intrinsic pathway를 통해 후코이단 처리 시 apoptosis를 유도하는지 검토하고자 하였다. 즉, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 첨가하여, intrinsic pathway의 최종단계인 pro-caspase-9와 -7및 -3 단백질 발현 수준을 확인하였다. Fig. 10과 마찬가지로 pro-caspase-9, -7, -3의 단백질 수준이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 11).

Intrinsic pathway에서, caspase-9는 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 방출에 의해 활성화되는데, 활성화가 되기 위해서는 dATP, Apaf-1, 그리고 방출된 cytochrome c와의 결합을 필요로 한다. cytochrome c는 세포질에서 caspase-9, Apaf-1과 결합하여 apoptosome을 형성하고 caspase-9를 활성화시키고 caspase-3을 활성화시켜 apoptosis를 유도하게 된다(Lahusen et al., 2003; Adams and Cory, 2001; Kauffmann and Hengartner, 2001). Caspase-3는 caspase-8과 caspase-9의 신호를 증폭시키면서 최종적으로 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있으며(Grutter, 2000), 세포 사멸 과정에서 형태학적 특징에 관여하는 PARP, lamin A, α-fodin, ICAD와 같은 기질을 분해한다는 것이 알려져 있다(Baker and Reddy, 1998). 이러한 물질들은 세포 내 골격을 형성하거나 핵 내 DNA를 온전히 보존하는 데 필요한 중요한 물질들로서 이 물질들이 분해 또는 활성화가 일어나면 세포의 응축과 DNA의 분절화를 유발시켜 apoptosis를 유도하게 된다. 또한 caspase-9은 핵공을 파괴하거나 크게 만들어 caspase-3가 핵 안으로 들어가 작용할 수 있도록 도와주는 것으로 알려져 있다(Hengaartner, 2000).

본 실험에서 HT-29 대장암 세포에 후코이단 처리 시 pro-caspase-9, -7, -3의 단백질 수준이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났는데, 활성형의

caspase-9, -7, -3의 형태로 바뀌어 최종적으로 apoptosis를 유도하였다고 보여진다. 다른 연구에서도 인체 leukemia U937 세포에서 세포사멸 유도물질 첨가 시 용량 의존적으로 caspase-3의 발현이 감소하였고, 대장암 세포인 SW480 세포와 인체의 신장 caki 세포에서도 cleaved-caspase-3 활성 증가에 의한 세포 사멸이 유도되었다고 하였는데, 본 연구에서도 이와 동일한 결과를 나타내었다.

따라서, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 apoptosis에 의한 세포 사멸은 extrinsic pathway와 intrinsic pathway의 두 경로를 거쳐 일어나는 것으로 보인다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

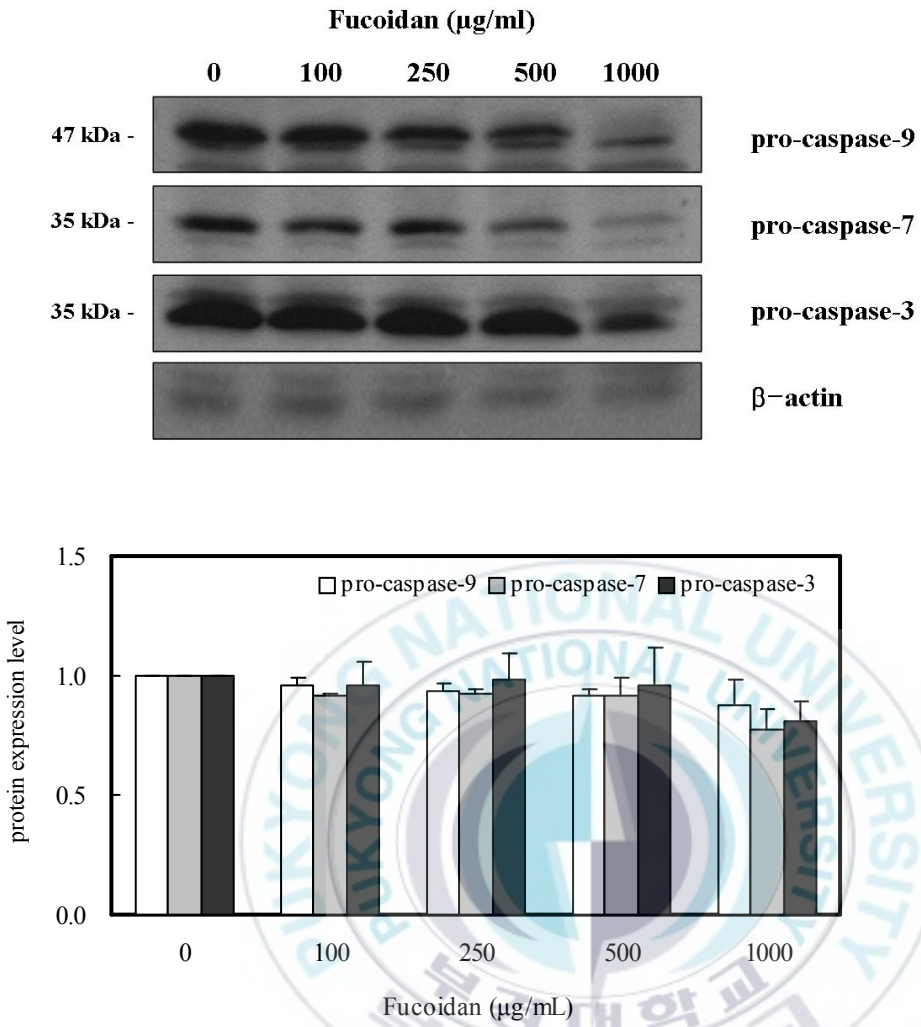


Fig. 11. Effects of fucoidan treatment on the levels of pro-caspase-9, -7 and -3 protein in HT-29 cells.

HT-29 cells were lysed and then total proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were visualized by Western blotting using indicated antibodies. β-actin was used as an internal control.

3) PARP 신호 전달

HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 pro-caspase-9, -7, -3 활성 억제로 인한 세포 사멸 유도를 살펴보았으므로(Fig. 11), 세포 사멸 기전의 최종 단계라고 볼 수 있는 cleaved-PARP 단백질 발현 정도를 살펴본 결과, PARP 단편이 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 12).

PARP 단백질은 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+)에서 poly(ADP-ribose)의 생성을 촉매하는 효소로 DNA repair에 관여하여 세포의 생존 유지에 주요한 역할을 담당한다(Satoh and Lindahi, 1992; Tewari et al., 1995). Apoptosis 유발과정 중 활성화된 caspase에 의하여 단백질의 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제 되는 것으로 알려져 있다(Miyashita and Reed, 1995; Tewari et al., 1995). 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 진행되는 경우 chromatin이 조각나는 등 수선될 부위가 많아지면 PARP가 과발현되게 되고 그 결과 PARP에 의해 ATP가 고갈되게 된다. ATP가 고갈되면 세포는 삼투압을 유지할 수 없게 되어 터져버리게 되는데(necrosis), caspase-3는 PARP를 단편화해서 활성을 잃게 하여 세포가 necrosis로 가는 것을 막고 apoptosis로 진행하도록 하여 85 kDa 크기의 단편이 관찰되거나 주 band의 발현이 감소하게 된다(Lazebnik et al., 1994; Kaufmann et al., 1993).

PARP는 caspase-3의 주요한 표적 단백질 중의 하나로 (Nichoson et al., 1995), caspase-3에 의해 단편화되어 불활성화 되면 활성화된 cleaved caspase-3은 PARP 기질에 결합하여 세포의 분해가 촉진되므로, cleaved PARP 단백질이 증가되어 apoptosis가 일어난다고 하였다(Tian et al., 2000; Oliver et al., 1998). 다른 연구에서도 HT-29 대장암 세포에서 보라우무 메탄올 추출물에 의해 cleaved PARP 단백질 수준이 증가하였고(Kim et al., 2007), K562 세포에서 세포 사멸 유도 물질 첨가 시 cleaved-PARP가 증가되었다고 하여, 본 연구에서도 이와 동일하게 HT-29 대장암 세포에서 후코이단

에 의한 세포 사멸 유도는 최종적으로 caspase-3의 불활성화로 인하여 PARP의 단편이 증가되었다고 보여진다(Fig. 12).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

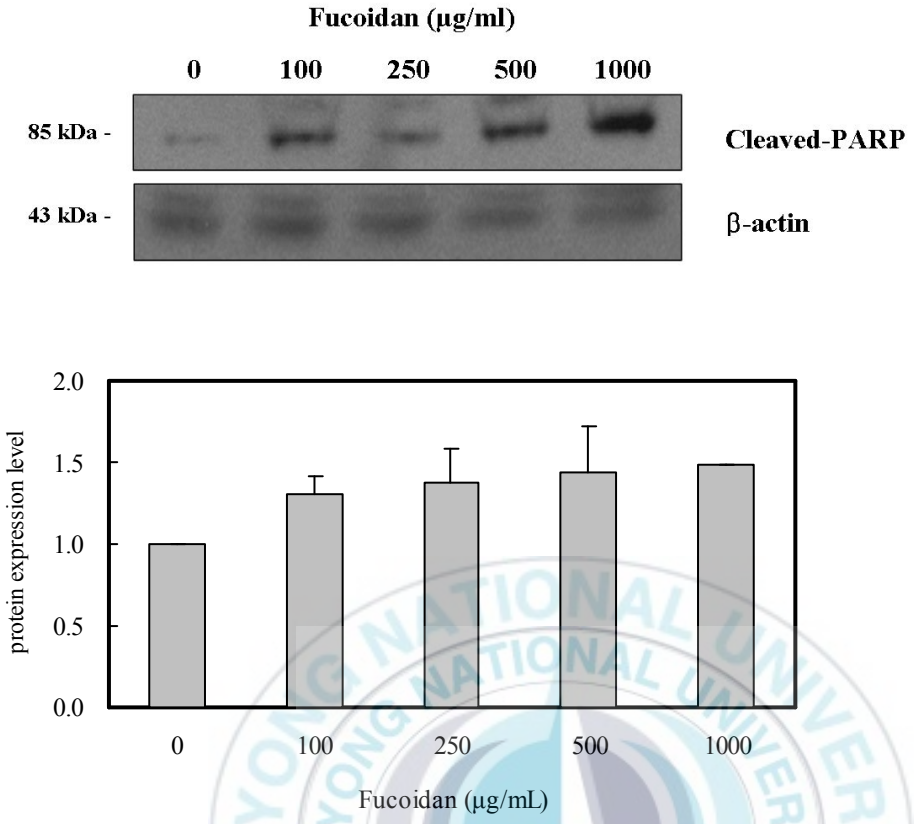


Fig. 12. Effects of fucoidan treatment on the levels of cleaved-PARP protein in HT-29 cells.

HT-29 cells were lysed and then total proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were visualized by Western blotting using indicated antibodies. β-actin was used as an internal control.

4) Bcl-2 family중 anti-apoptotic factor의 신호 전달

Bcl-2 family 단백질은 미토콘드리아의 막 투과성을 조절하는 단백질로 미토콘드리아를 통한 내적 경로에 의한 apoptosis의 중요한 조절인자로 알려져 있다. Bcl-2 family 단백질은 기능과 아미노산 서열의 유사성에 따라 세포사멸을 억제하는 단백질과 촉진시키는 단백질, Bcl-2 homology domain (BH)-3 only 단백질로 구성되어 있다(Cory et al., 2003; Lu et al., 1996). 세포사멸을 억제하는 단백질에는 Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W가 있고, 세포사멸을 촉진시키는 단백질에는 Bax, Bad, Bak 등이 대표적이며 Bcl-2와 Bax의 균형이 apoptosis를 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Chiarugi et al., 1994; Antonsson and Martinou, 2000; LeBrun et al., 1993).

따라서 본 실험에서는 후코이단이 Bcl-2 family 신호 전달에 영향을 미치는지 살펴보았다. HT-29 대장암 세포에서 후코이단을 처리하여 apoptosis를 유도한 후에 Bcl-2와 Bcl-xL의 발현을 Western blot으로 검토하였다. 그 결과, apoptosis 억제 인자인 Bcl-2와 Bcl-xL의 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 13).

Apoptosis를 억제하는 단백질로는 Bcl-2가 잘 알려져 있으며(Boise et al., 1993), 이와 유사한 아미노산 서열을 갖는 단백질들을 Bcl-2 family라고 부르고 있다. 모든 Bcl-2 family protein들이 apoptosis를 억제하는 것은 아니며, Bcl-2 family에 속하는 단백질들은 크게 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic protein들과 apoptosis를 촉진시키는 pro-apoptotic protein들로 나뉜다. 이들은 서로간의 상호작용을 통하여 apoptosis를 유발하거나 혹은 억제하는 기능을 수행하고 있다. Bcl-2나 Bcl-xL과 같은 anti-apoptotic protein들은 Bax와 결합하여 heterodimer를 형성하여 bax의 활성을 억제하여 apoptosis를 막거나(Farrow and Brown, 1996), 미토콘드리아로부터의 cytochrome c 해리를 억제함으로써 apoptosis를 방해하는 것으로 알려져 있다. 한편 apoptosis를 촉진하는 pro-apoptotic Bcl-2 marker들은 크게 Bcl-2의 구조와 유사한 Bax, Bak, Bok 등이 포함되는 Bax subfamily와 Bcl-xL과 같은 anti-apoptotic

protein들의 길항제로 작용함으로써 apoptosis를 유발하는데 관여하고 있다. extrinsic pathway를 경유하지 않는 apoptosis의 조절에는 Bcl-2 family protein들이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Extrinsic pathway-independent apoptosis의 경우 apoptotic 신호의 중요 표적은 Bcl-2 family 유전자들로 보고 있다. 또, 미토콘드리아는 여러 가지 세포 사멸 유발 인자(Smac/DIABLO, Endo G, AIF, cytochrome *c*, Htr2/Omi)를 함유하고 있으며, 이 인자들의 분비 조절은 Bcl-2 family가 관여하는 것으로 알려져 있다. 즉, 세포 사멸을 유발하는 Bcl-2 family (pro-apoptotic Bcl-2 members)은 cytochrome c, Smac/DIABLO 그리고 Htr2/Omi 같은 세포 사멸 유발인자들을 선택적으로 미토콘드리아에서 세포질로 방출하게 하여 caspases의 활성을 유도하게 된다(Arends et al., 1990; Lazebnik et al., 1994). 이런 활성 caspase에 의해 Endo G 혹은 AIF 통로의 개방을 유발하게 되면서 세포사멸이 진행된다고 알려져 있다.

따라서, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 apoptosis의 유도는 Bcl-2와 Bcl-xL의 단백질 발현의 감소로 일어나는 것으로 보이며, 다른 연구에서도 Bcl-2와 Bcl-xL의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발된다고 하여(Miyashita and Reed, 1995; Antonsson and Martinou, 2000; Lazebnik et al., 1994) 본 실험과 동일한 결과를 보여 주었다.

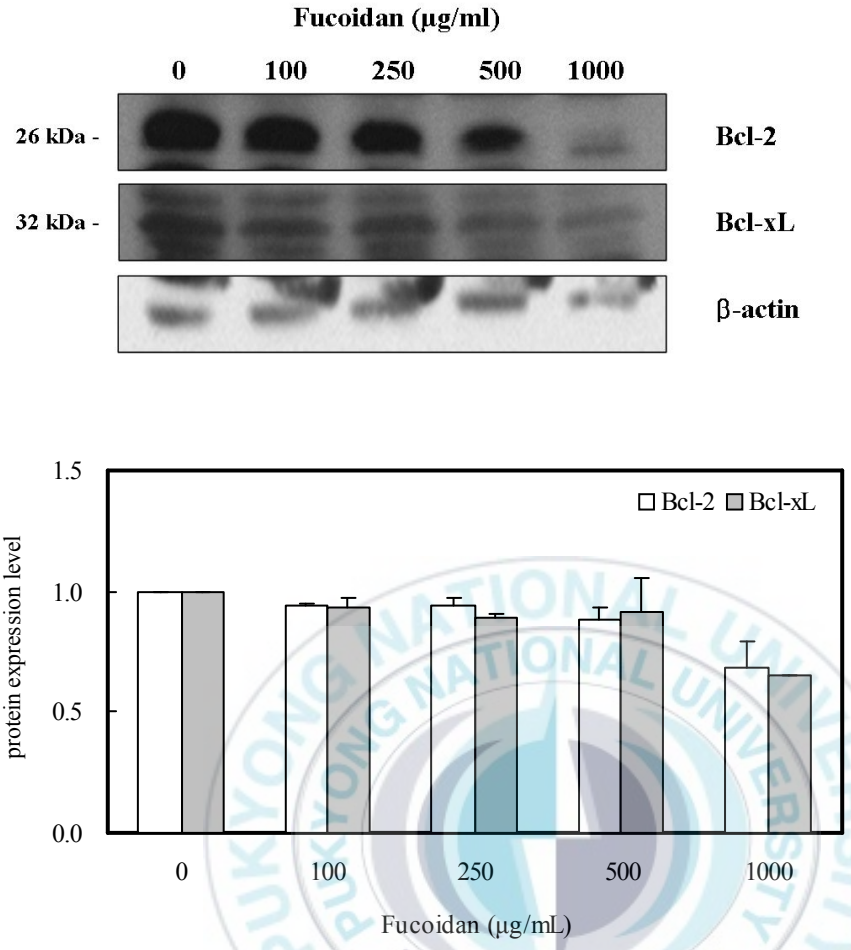


Fig. 13. Effects of fucoidan treatment on the levels of Bcl-2 and Bcl-xL protein in HT-29 cells.

HT-29 cells were lysed and then total proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were visualized by Western blotting using indicated antibodies. β-actin was used as an internal control.

5) Bcl-2 family중 pro-apoptotic factor의 신호 전달

HT-29 대장암 세포에서 후코이단을 처리하여 apoptosis를 유도한 후에 apoptosis를 촉진하는 단백질인 Bad, Bax, Bid의 발현을 Western blot으로 살펴보았다.

Bad는 세포내에서 미토콘드리아로 이동되어 Bcl-2나 Bcl-xL의 작용을 억제하여 미토콘드리아로부터 cytochrome *c*의 분비를 촉진시켜, Apaf-1과 pro-caspase-9와 apotosome을 형성하여 caspase-9을 활성화하고 apoptosis의 최종 작용 물질인 caspase 4-, -6, -7 등을 활성화시켜 세포의 DNA를 분해하여 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있으나(Moon, 2002; Zha et al., 1997; Korsmeyer, 1995), Bad 단백질 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 14).

그러나, Bax의 단백질 발현 수준은 후코이단 처리 시 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 14). 또한, apoptosis를 유도하는 단백질 중 Bid는 22 kDa의 분자량을 가지는 단백질로 세포질에서 caspase-8에 의해 분해되어 15 kDa의 tBid로 전환된다. 세포질에 있던 tBid는 미토콘드리아로 이동하여 Bax와 결합하고, Bax의 구조적 변화를 초래하여 cytochrome *c*의 세포질로의 방출을 유도한다고 알려져 있다(Luo et al., 1998). 따라서, Bid의 단백질 발현 수준은 후코이단 처리 시 감소하였으며, t-Bid 단백질 발현이 증가하는 경향을 나타내어 후코이단 처리 시 Bcl-2 family에 의해 apoptosis를 유도하는 것으로 나타났다. 이 결과는 후코이단이 t-Bid의 단백질 발현 수준을 증가시켜 미토콘드리아의 막 투과성을 증가시켜 apoptosis를 유도하는 것으로 여겨진다.

즉, HT-29 세포에서 후코이단에 의한 apoptosis 유도는 apoptosis 억제에 관여하는 Bcl-2 member의 상대적인 발현이 감소하였으며, apoptosis 유발에 관여하는 Bax의 상대적인 발현 증가로 인해 일어난다는 것을 확인하였다.

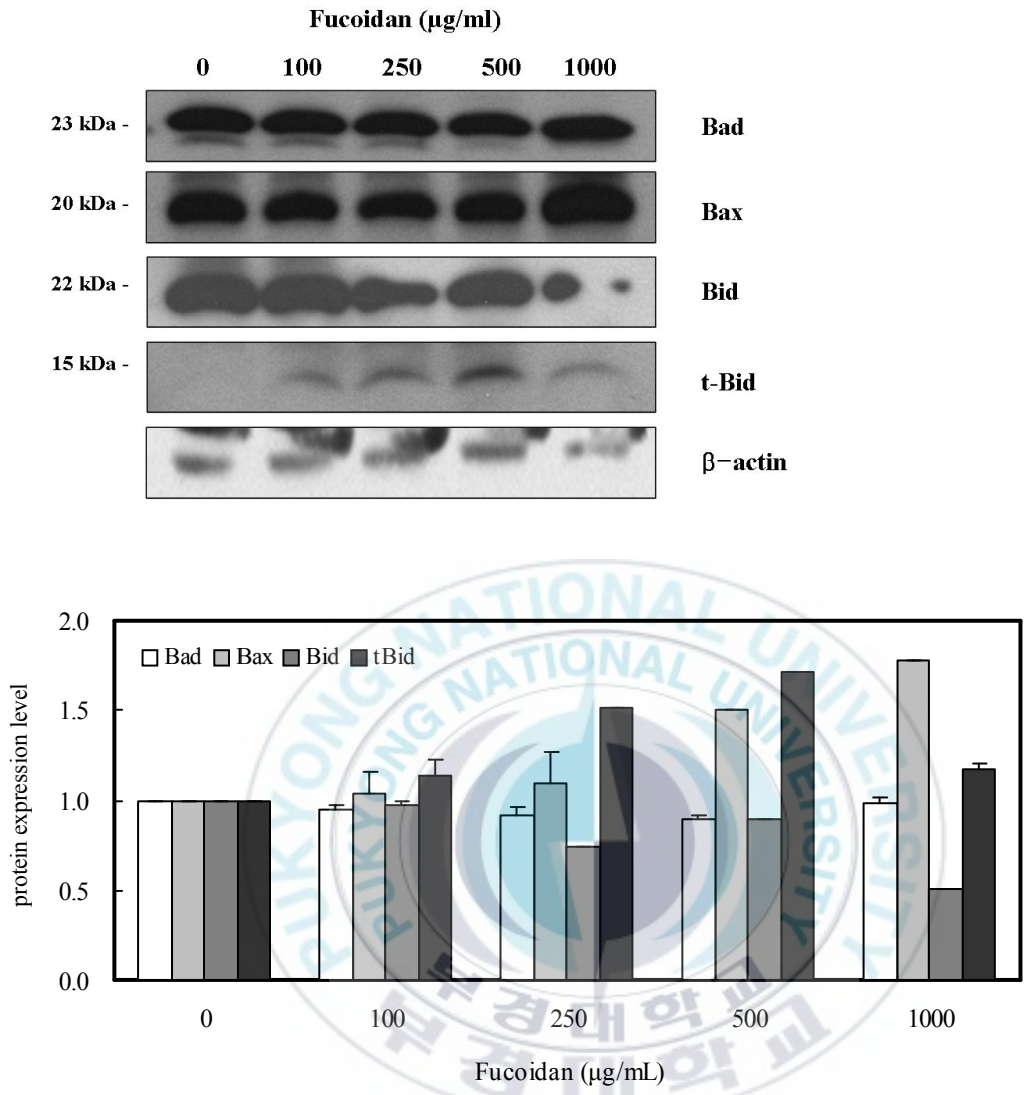


Fig. 14. Effects of fucoidan treatment on the levels of Bad, Bax and Bid protein in HT-29 cells.

HT-29 cells were lysed and then total proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were visualized by Western blotting using indicated antibodies. β-actin was used as an internal control.

3. Translocation 신호 전달에 미치는 영향

1) Bax 단백질의 세포질과 미토콘드리아 신호 전달

Fig. 14에서 전체 Bax 단백질 발현수준이 증가하였으므로 세포질에서 미토콘드리아로 이동하는 Bax 단백질의 발현을 살펴보았다. 그 결과, 세포질의 Bax 단백질은 500, 1,000 μg/ml 농도에서 감소하였으며, 미토콘드리아의 Bax 단백질에서도 500, 1,000 μg/ml 농도에서 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 15).

Bax는 건강한 세포에서는 세포질에서 비활성형으로 존재하다가 세포 사멸 자극에 의해 미토콘드리아로 이동하며(Hsu et al., 1997), 활성화된 미토콘드리아는 cytochrome *c*, AIF와 다른 세포 사멸 요인들을 막간 공간에서 세포질로 분비하게 하며 이와 동시에 미토콘드리아의 막 전위는 감소하게 된다(Green and Reed, 1998). 이어서 cytochrome *c*, Apaf-1, pro-caspase-9로 구성된 apoptosome은 caspase-9를 활성화시킴으로써 세포 사멸이 진행되게 된다.

많은 세포 사멸 모델의 연구에서는 세포사멸 자극에 대한 반응으로 Bax는 미토콘드리아의 막 전위를 붕괴시키면서 미토콘드리아의 손상을 유도하여 cytochrome *c*의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Murphy et al., 2000; Wood and Newcomb, 2000; Bosen-de Cock et al., 1999). 미토콘드리아의 막의 투과성은 내막의 adenine nucleotide translocator (ANT)로 구성된 단백질 복합체인 permeability transition pore complex (PTPC), 외막의 전압 의존성 음이온 채널 등 여러 다양한 단백질과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. Bcl-2 단백질은 아마도 PTPC와 상호작용하여 투과력을 조절하는 것으로 여겨지고 있다. BH3-only proteins이 세포질이나 세포 골격에서 death sensor로 작용할 것으로 여겨지며 사멸 신호가 전달된 후에 이들이 Bax subfamily의 member와 상호작용하고 이러한 상호작용이 끝난 후에 Bax 단백질은 형태적 변화가 일어나서 미토콘드리아 막으로 들어간 후에 oligomerize되어 단백질 투과성 채널을 형성하는 것으로 알려져 있다(Oda et al., 2000). 즉, Bax가 미토콘드리아로 이동하는 것은 Bax의 pro-apoptotic 기능에 필수적이며 미토콘

드리아 막과 Bax의 결합의 조절이 세포 사멸 신호가 전달되는 결정적 단계이다(Deng and Wu, 2000). 이는 세포 사멸에 미토콘드리아의 caspases pathway가 관련이 있음을 제시하는 것이다. 그러나 어떤 기전을 통해서 신호가 이러한 효소들에게 전달되는 지는 아직까지 명확하지 않다.

본 실험에서 세포질의 Bax 단백질은 고농도에서 감소하였으며, 미토콘드리아의 Bax 단백질에서도 고농도에서 감소하는 것으로 나타났는데, Fig. 14의 whole lysate 수준의 Bax 단백질은 고농도에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 후코이단이 Bax 단백질을 세포질에서는 감소를 유도하였고 미토콘드리아에서는 일정한 수준으로 유지시키는 것으로 보아, Bax 단백질을 세포질에서 미토콘드리아로 translocation을 유도하는 것으로 보인다(Fig. 15).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

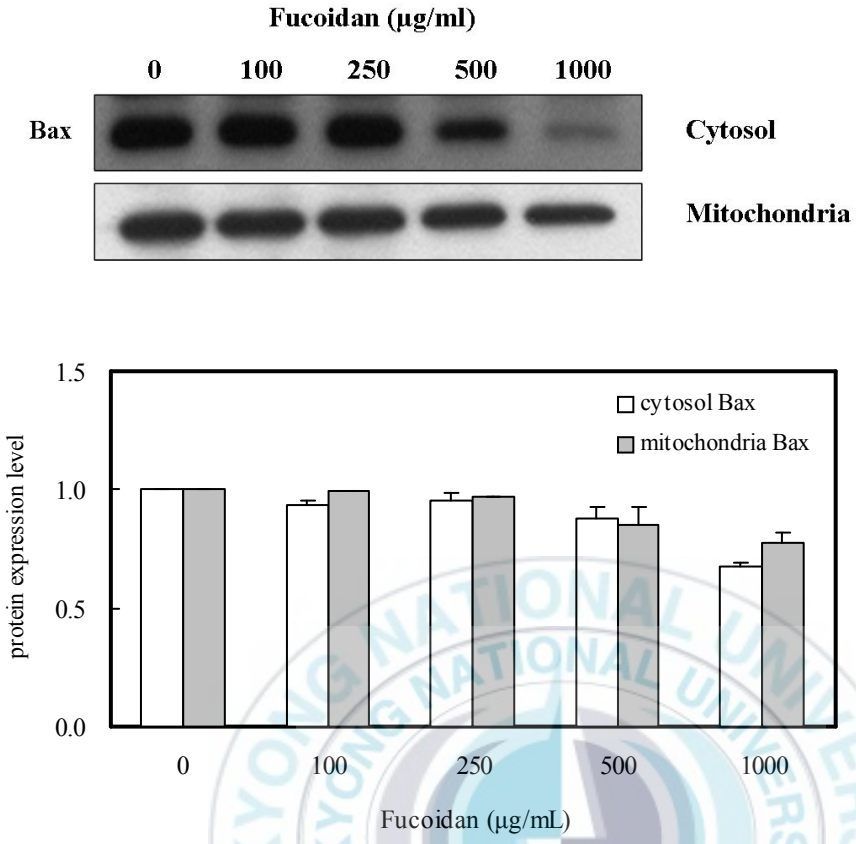


Fig. 15. Effects of fucoidan treatment on the levels of Bax protein from cytosol into mitochondria in HT-29 cells.

HT-29 cells were incubated with fucoidan (0~1,000 μg/ml) for 48 hrs. Cytosol and mitochondria fraction extracts were prepared and analyzed by Western blot using indicated antibody.

2) Cytochrome *c* 단백질의 세포질과 미토콘드리아 신호 전달

HT-29 대장암 세포에 후코이단 처리 시 미토콘드리아와 세포질의 cytochrome *c*의 단백질 발현 수준을 검토하였다. 그 결과, 미토콘드리아의 cytochrome *c*의 단백질 발현 수준은 후코이단 500, 1,000 μg/ml 농도에서 증가하였으며, 세포질에서도 500, 1,000 μg/ml 농도에서 증가하여 두 획분 모두에서 동일한 경향으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 16).

Cytochrome *c*는 세포질에서 caspase-9, Apaf-1과 결합하여 apoptosome을 형성하고 caspase-9를 활성화시키고 caspase-3을 활성화시켜 apoptosis를 유도하게 된다(Lahusen et al., 2003; Adams and Cory, 2001; Kauffmann and Hengartner, 2001; Nijhawan et al., 1997). ATP 생성을 포함한 다양한 기능에 있어 필수적인 미토콘드리아에서 cytochrome *c*는 막전위 생성에 결정적인 역할을 한다. Cytochrome *c*가 미토콘드리아에서 방출되는 기전으로는 apoptosis를 유발하는 Bcl-2 계열의 일부 혹은 전적인 작용으로 미토콘드리아의 외막에 있는 통로를 통한다고 알려져 있다(Green, 2000). Bcl-2 family 중 Bcl-2와 Bcl-xL은 미토콘드리아 외막을 직간접적으로 유지시켜서 cytochrome *c*의 분비와 미토콘드리아 매개성 세포 사멸을 방지하고(Schmizu et al., 1999), Bax, Bak은 미토콘드리아의 cytochrome *c* 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이들 단백질들이 미토콘드리아의 외막으로 들어가게 되면 미토콘드리아의 막전위의 소실과 cytochrome *c*를 포함한 apoptosis 유발 인자들의 방출이 일어나게 된다. 일반적으로, 미토콘드리아에서 증가된 Bax는 cytochrome *c*의 발현을 증가시켜 세포질로의 방출을 유도한다고 하였다. 또, 방출된 cytochrome *c*는 Apaf-1, pro-caspase-9와 결합하여 apoptosome을 형성하므로, cytochrome *c*의 증가에 따라 즉, 후코이단에 의한 apoptosis는 Bax에 의하여 세포질로 cytochrome *c*의 방출을 유도하고 Apaf-1과 결합하여 apoptosome을 형성하는 것으로 알려져 있다.

Fig. 15에서 미토콘드리아의 Bax 수준은 후코이단 처리에 의해 감소하는 경향을 보여 주었으나, 미토콘드리아와 세포질의 cytochrome *c*의 단백질 발

현 수준은 증가하는 경향을 나타내고 있다(Fig. 16). 그러나, 세포질에서 증가된 cytochrome *c*의 단백질 수준은 미토콘드리아 단독으로 translocation 되었다고 보기에는 어렵다. 결국, 이는 후코이단에 의해 일부 Bax와 cytochrome c의 경로를 거치며, 최종적으로 caspase의 활성화와 PARP를 활성화시켜 apoptosis를 유도하는 것으로 보인다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

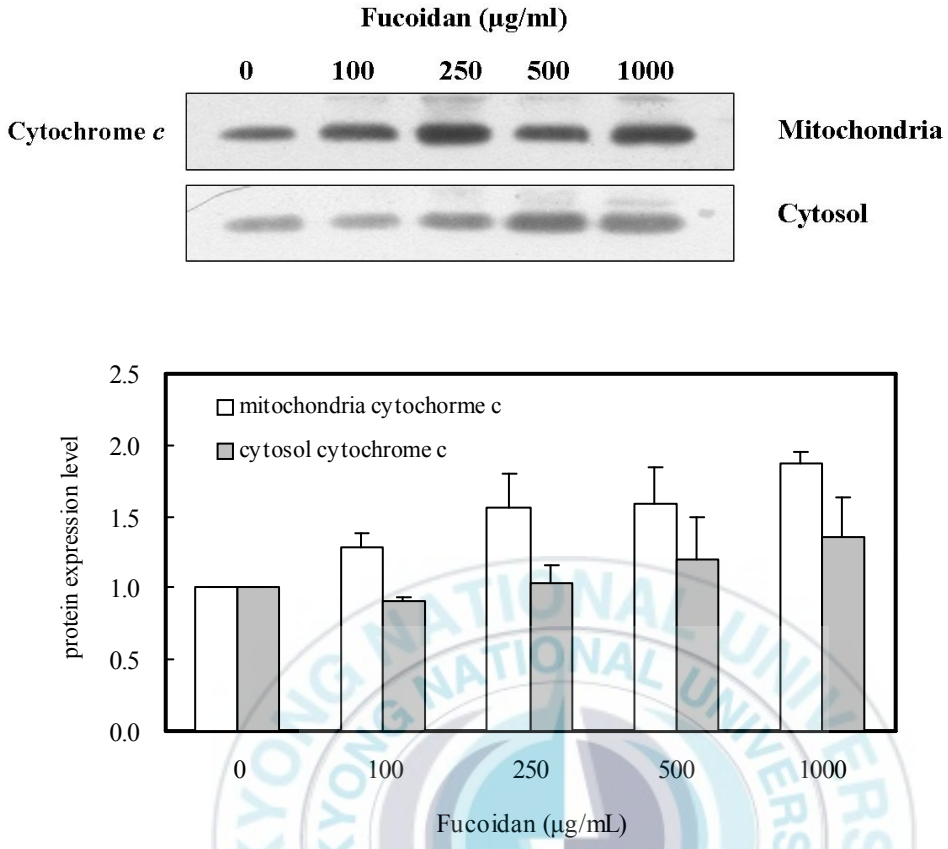


Fig. 16. Effects of fucoidan treatment on the levels of cytochrome *c* protein from mitochondria into cytosol in HT-29 cells.

HT-29 cells were incubated with fucoidan (0~1,000 μg/ml) for 48 hrs. Mitochondria and cytosol fraction extracts were prepared and analyzed by Western blot using indicated antibody.

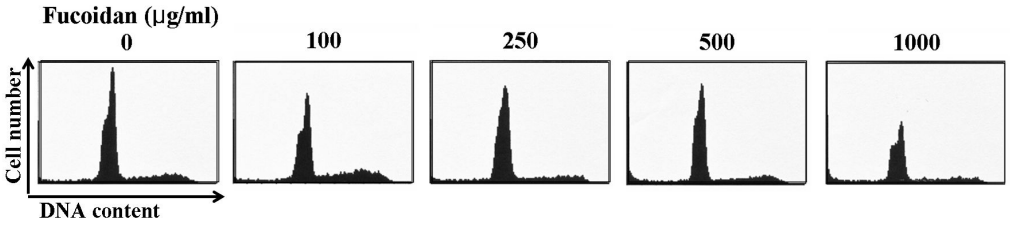
4. 세포 주기에 미치는 영향

1) 세포 주기 분석

세포의 가장 중요한 특징 중의 하나는 그 구성성분을 두배로 하여 둘로 나눔으로써 증식이 가능하며 이 과정은 세포 성장, 염색체 복제, 세포 분열 등의 세부적인 과정들을 포함하고 있다(Heichman and Roberts, 1994). 세포 주기는 한 세포가 두 개의 딸세포로 나뉘는 일련의 과정을 뜻하며, G0/G1→S→G2/M 순서로 엄격하게 지켜지며 결코 역방향으로 진행되지 않는다. 세포 외부의 성장 신호에 의해 세포는 G0기에서 DNA 복제를 준비하는 G1기로 넘어가게 된다. G1기와 S기 사이에는 restriction point (R point)가 있어 세포 주기의 진행을 결정하게 되는데 외부의 환경이 적절하지 않다고 판단되면 세포 주기는 S기로 진행되지 않고 G1기에 머물거나 G0기의 휴식상태(arrest)로 돌아가게 된다. S기에서는 DNA 복제가 이루어지고 그 이후에는 G2기로 진행하는데 G2기에도 check point가 있어 DNA 복제에 이상이 있을 경우 세포 주기가 정지되게 된다. M기에서는 세포 분열이 일어나게 된다(Menon et al., 2003; Johnson and Walker, 1999; Maity et al., 1995; Nurse, 1994).

앞선 실험에서 HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, 세포 증식을 억제하는 것을 확인하였으므로, 후코이단이 세포 주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DNA flow cytometry로 분석하였다. 그 결과, HT-29 대장암 세포에 대조군에 존재하는 sub-G1기의 비율이 약 10%로 apoptosis 현상을 관찰할 수 없었으나, 후코이단을 처리 시 apoptosis 발생을 뜻하는 sub-G1기의 비율이 증가한 반면, G1, S, G2/M기가 대조군에 비해 상대적으로 감소되었다(Fig. 17). 이러한 결과를 통해 후코이단은 HT-29 대장암 세포의 세포 주기에 변화를 일으켜 세포 증식을 저해하는 것으로 보인다.

(A)



(B)

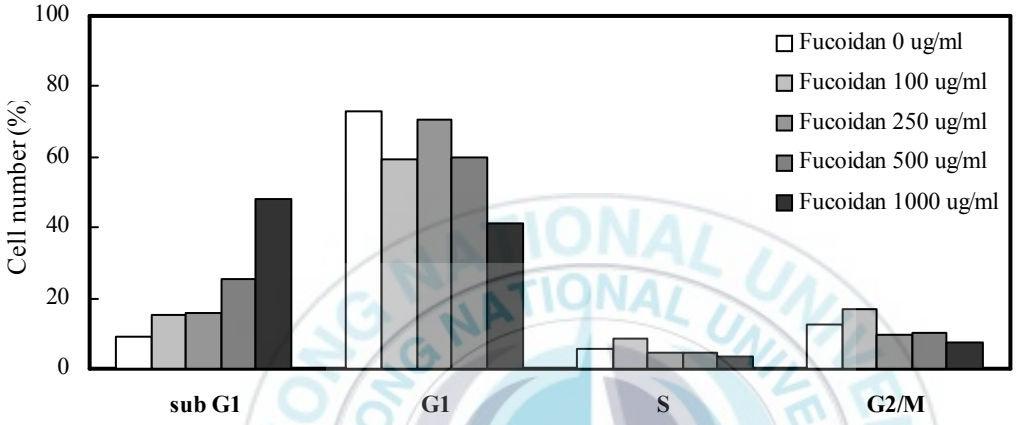


Fig. 17. Effect of fucoidan treatment on the cell cycle progression in HT-29 cells.

(A) DNA-fluorescence histogram of HT-29 cells nuclei after treatment with fucoidan (0~1,000 μg/ml) for 48 hrs, and then analyzed by flow cytometry as described in 'Materials and Methods'. (B) Increase of sub-G1 cell population by fucoidan treatment in HT-29 cells. The percentages of cells with hypodiploid DNA (sub-G1 phase) contents represent the fractions undergoing apoptotic DNA degradation.

2) 세포 주기 단백질 분석

암이 일어나는 중요한 원인은 세포 주기의 진행과 세포 사멸의 균형이 깨지는 것이다. 세포 주기는 DNA 합성을 준비하는 G1기, DNA를 합성하는 S기, 세포 분열을 준비하는 G2기, 분열 시기인 M기의 4단계로 구분할 수 있다. 이 중 G1기와 G2기는 세포 주기의 checkpoint라고 일컫는데(Hartwell and Weiner, 1989; Paulovich et al., 1997; Ning and Knox, 1999; Baber-Furnari et al., 2000), 이 checkpoint에서의 세포 증식 조절이 제대로 이루어지지 않고 세포 증식이 급속히 진행될 때 암 등을 비롯한 다양한 난치성 인체 질환의 원인이 될 것으로 추측하고 있다(Bunz et al., 1998; Haimovitz-Friedman, 1998; Raleigh and O'Connell, 2000). 암세포에서는 세포 주기를 직접적으로 조절하는 유전자가 손상되어 세포 증식이 조절되지 않고 암세포로 전환되는 것으로 알려져 있으며(Sherr, 1996), 특정 시기의 세포 주기 억제는 세포 주기 조절 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과발현에 의한 것으로 볼 수 있다(Elledge and Harper, 1994).

세포 증식과 연관된 세포 주기의 조절은 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포 주기의 checkpoint에 요구되는 양성 조절 인자인 cyclins에 의하여 Cdks와 복합체 형성을 통해 인산화, 탈인산화 됨으로써 순차적으로 Cdks가 활성화 되어 조절된다(Nojima, 2004; Bardon et al., 2002; Weinberg, 1995) 즉, 세포의 G1기 초기에는 주로 cyclin D와 Cdk2, Cdk4, Cdk6 등이 결합된 복합체들이 활성화되고, G1기 말에는 cyclin E가 합성되기 시작하여 Cdk2와 결합해서 G1/S기로의 이행을 담당하는 것으로 알려져 있다. 세포 분열이 완료되거나 DNA 복제가 완료되면 더 이상의 kinase 활성이 필요치 않으므로 cyclin-Cdk 복합체의 cyclin이 ubiquitin 단백질과 결합하여 분해되어 Cdk의 활성이 사라지게 된다(Fig. 18).

Fig. 17의 세포 주기 분석 결과, HT-29 대장암 세포에 후코이단 처리 시 sub-G1기를 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서, G1기의 세포 주기를 조절하는 단백질들의 변화를 살펴보기 위해 Western blot을 수행하였다.

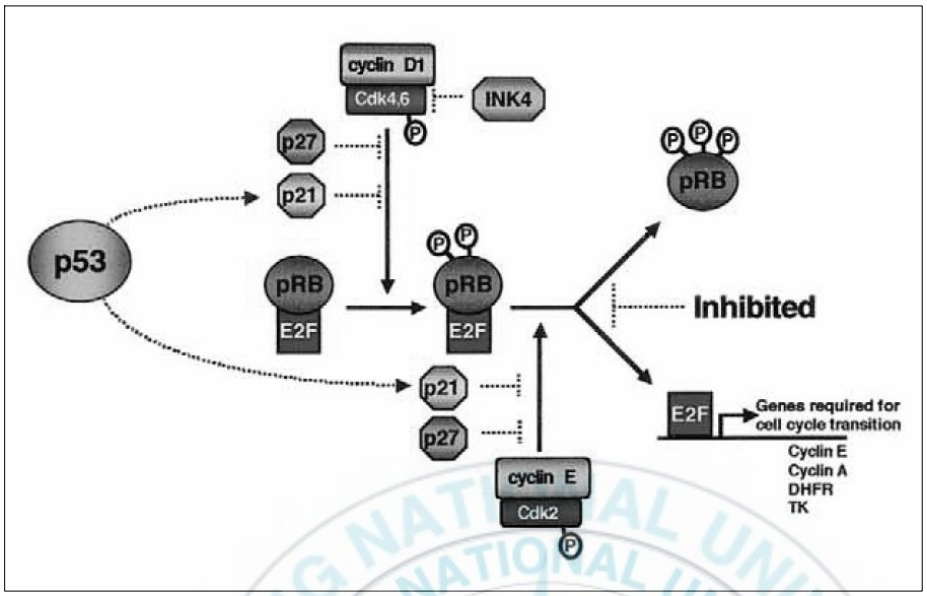


Fig. 18. The G1/S checkpoint of the cell cycle.

During G1 progression, there is sequential activation of cyclin D1 and cyclin E complexes. Cyclin D1 binds to Cdk4,6 and cyclin E binds to Cdk2. These complexes undergo activating phosphorylation and once active, phosphorylat pRB. In its hypo phosphorylated state, pRB binds to E2F to inhibit S phase entry; however, once hyper-phosphorylated, pRB releases E2F. The release of E2F results in activation of genes required for S phase entry. Cdk inhibitors, including p21 (a p53 downstream target), p27, and p16 can bind and inhibit the indicated Cdk or cyclin/Cdk complexes and effectively block the progression of cells from G1 into S-phase (Pietenpol and Stewart, 2002).

먼저, cyclin D1의 단백질 발현 수준을 살펴보았다. 그 결과, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, cyclin D1의 단백질에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 19). 세포 내에서 Cdks는 proliferating cell nuclear antigen (PCNA), cyclin, CKIs와 결합하여 있는데 CKIs에 의해 kinase 활성이 억제되어 있다. 하지만 세포 외부의 성장 인자에 의해 kinase 활성이 억제되어 있다. 그러나 세포 외부의 성장 인자에 의해 Ras와 같은 세포 내 신호가 전달되면 Cdk4와 Cdk6의 활성을 조절하는 단백질인 cyclin D1의 발현이 증가되고 이 단백질과 복합체를 이루는 Cdk4, Cdk6가 Cdk-activatinf kinase (CAK)에 의해 인산화되어 활성화되는 것으로 알려져 있지만, 후코이단에 의한 cyclin D1의 단백질 발현에는 영향을 주지 않았다. 그러나, 육종암, 대장 종양, 흑색종을 포함한 많은 암에서 cyclin D1이 과발현 되었다고 하여(Hall and Peters, 1996) 본 결과와는 다른 양상을 보여주었다.

두 번째로, G1에서 S기의 이행을 조절하는 pRB 단백질의 인산화 수준을 살펴보았다. 그 결과, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, pRB의 인산화 수준이 농도 의존적으로 감소하여 G1기에 세포를 머무르도록 하는 것으로 나타났다(Fig. 19). 세포 주기를 조절하는 cyclin-Cdk complex의 활성은 Cdk inhibitor (CdkI)에 의해서도 조절된다. 세포 주기를 조절하는 CdkI는 크게 CIP (Cdk inhibitor protein) family와 Cdk4, 6의 활성을 저해하는 inhibitor of cyclin-dependent kinase 4 (INK4; p15, p16, p18, p19) 두 가지로 분류할 수 있다. CIP family에는 G1 checkpoint에서 DNA가 손상되었을 때 작용하는 p21, p27 단백질이 존재하는데, DNA가 손상되면 tumor suppressor gene인 p53에 의해 p21, p27 유전자가 발현되게 된다. p21, p27 단백질은 S기를 유도하는 cyclin-Cdk complex에 결합하여 Cdk4/6/2 kinase 활성을 저해함으로써 retinoblastoma protein (pRB)의 인산화를 억제하여 세포를 G1기에 머물게 한다. 본 실험에서 후코이단 처리시 pRB의 인산화 수준이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났는데, 다른 연구에서도 전립선

암에서 ursodeoxycholic acid와 chenodeoxycholic acid 유도체 및 대장암 세포에서 tangeretin이 G1기를 저해한다고 하여 본 연구 결과와 동일한 결과를 보여주었다(Pan et al., 2002; Choi et al., 2003).

세 번째로, G1기에서 pRB와 결합하여 작용이 억제되어 있는 것으로 알려져 있는 E2F의 단백질 발현 수준을 살펴보았다. 그 결과, E2F 단백질의 발현 수준은 후코이단 처리 시 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 핵 내에서 E2F 전사 조절 인자는 pRB와 결합하여 작용이 억제되어 있는데(Sherr and McCormic, 2002), cyclin D1/Cdk4 또는 6복합체는 pRB를 인산화시켜 E2F를 유리시키게 된다. 그 결과 E2F가 핵 안으로 들어가 cyclin E를 포함한 DNA 합성과 연관된 많은 유전자들의 발현을 증가시키고, cyclin E의 발현 증가는 Cdk2를 활성화시켜 pRB를 더욱 인산화시켜 세포 주기가 G1기에서 머무르지 못하고 S기로 진행되도록 한다. S기 초기에는 cyclin D, cyclin E는 분해되게 하고 cyclin A가 증가하여 Cdk2를 활성화시켜 S기가 진행되도록 한다. 또한 cyclin A는 G2기에서 cdc2 (Cdk1)과 결합하여 M기로의 이행에 필수적인 역할을 담당하고 cyclin B는 cdc2와 결합하여 핵 안으로 이동하여 M기에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(Menon et al., 2003; Dan and Yamori, 2001; Morgan, 1997). 즉, pRB가 인산화되면 pRB와 결합되어 있던 E2F가 유리되어 핵으로 들어가 전사를 촉진하여 DNA 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Dyson, 1998; Weinberg, 1995; Weintraub, 1992). 따라서, 본 연구에서도 후코이단 처리 시 농도 의존적으로 E2F의 단백질 수준이 감소하는 것으로 나타났다.

이러한 결과를 통해, 앞선 실험에서 DNA 합성의 감소(Fig. 4)는 E2F 단백질과 pRB 단백질이 복합체를 이루어 pRB의 인산화를 억제하여 G1기에 머무르도록 하여, 최종적으로 전사를 억제하는 것으로 보여진다(Fig. 19).

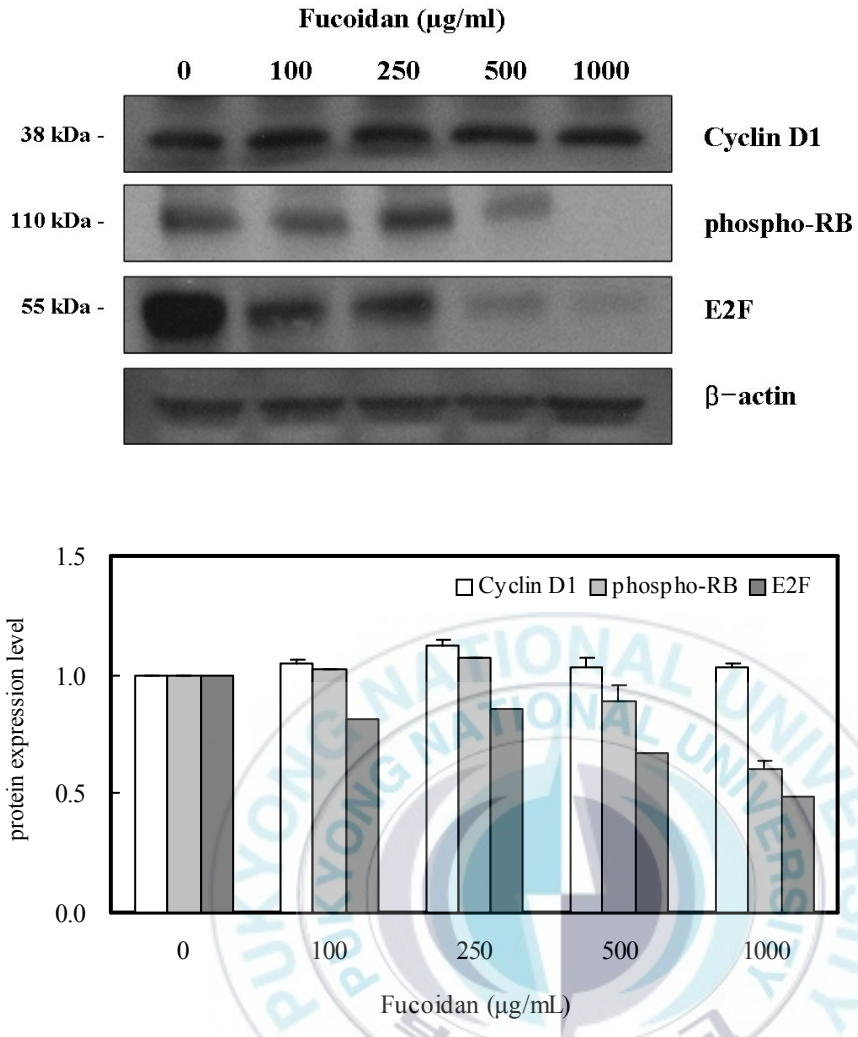


Fig. 19. Effects of fucoidan treatment on the levels of Cyclin D1, phospho-RB and E2F protein in HT-29 cells.

HT-29 cells were lysed and then total proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were visualized by Western blotting using indicated antibodies. β-actin was used as an internal control.

3) β-catenin의 발현 분석

β-catenin은 세포 내 골격 유지와 다양한 부착성 세포의 전사조절에 관여하며 세포 유착(cell adherent)과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다. 따라서, HT-29 대장암 세포에 후코이단 처리에 의한 세포 사멸이 세포 유착과 전이에 관계가 있는지 살펴보기 위해 β-catenin의 발현을 살펴보았다. Western blot을 통해 β-catenin의 발현 수준을 검토한 결과 후코이단 처리 시 감소하는 경향을 보여주었다(Fig. 20).

정상 세포의 경우 β-catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성 apoptosis가 일어나면 72, 62 kDa으로 단편화되는 것으로 알려져 있다(Choi et al., 2000; Debruyne et al., 1999; Steinhusen et al., 2000). β-catenin은 cadherin 및 actin과 결합하여 유착접합(adherens junction)을 형성하며, 세포막에서 E-cadherin/catenin 복합체는 세포 형태유지 및 세포간의 결합에 관여하고, 세포질에서는 APC 단백, GSK-3β, axin, conduction 등과 상호 작용을 통하여 세포 외 성장 인자에 대한 자극을 핵으로 전달하여 세포의 성장 및 분화를 조절하는 단백질로 Catenin family에 속한다(Kemler, 1993; Johnson, 1999; Wijnhoven et al., 2000; Takayama et al., 1998; Rimm et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999; Damalas et al., 1999; Brabletz et al., 1999; Shtutman et al., 1999; Herter et al., 1999; Hugh et al., 1999).

그 중 Catenin-cadherin-actin 복합체는 발생 과정, 세포 손상 및 복구 과정에 관여하며, 이 복합체 결합의 소실은 특히 악성 종양에 있어 원격 전이와 밀접한 연관성이 있는 것으로 밝혀졌다(Hugh et al., 1999). 특히 침윤부에 위치하는 결·직장암종의 암세포에서 β-catenin의 세포질과 핵 내로 발현되는 빈도가 증가하여 결·직장암종의 진행과 전이와도 연관성이 있을 것으로 보고있다. 또한, β-catenin은 위암, 대장암, 간암 및 췌장암의 발생에 일부 관여하며, 특히 대장암 샘종에서 악성화의 초기 진행에 APC 유전자와 β-catenin 변이로 세포질 및 핵 내 β-catenin 증가가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Rubinfeld et al., 1993; Sheng et al., 1998). 따라서, 본 실험에서

HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리한 결과, β-catenin의 발현 수준은 500, 1,000 μg/ml 농도에서 87%, 71%로 감소하여 세포 유착을 억제하여 세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 20).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

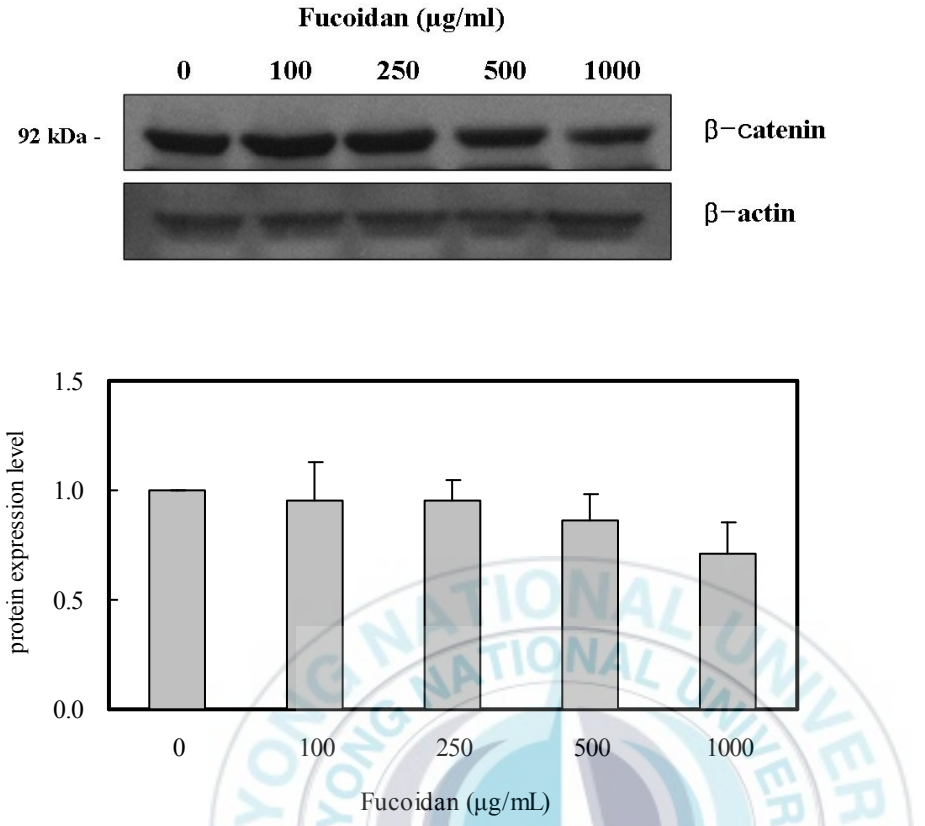


Fig. 20. Effects of fucoidan treatment on the levels of β-catenin protein in HT-29 cells.

HT-29 cells were lysed and then total proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were visualized by Western blotting using indicated antibodies. β-actin was used as an internal control.

5. NF-κB 신호 전달에 미치는 영향

1) 이론적 배경

Cyclooxygenase-2 (COX-2)를 비롯한 모든 단백질 인자들의 발현은 발현 유도 물질에 의해 대개 전사단계에서부터 조절을 받게 되므로, 면역과 염증 반응에 관련된 전사조절 motif 및 관련된 세포내 인자를 탐색하게 되었다. 그 중 가장 많이 연구된 전사 조절 인자 중 하나인 NF-κB는 면역, 염증 반응뿐만 아니라 세포 성장, 분화 및 세포 사멸에 이르기까지 수많은 세포 반응에 관여하고 있으며, RelA/p65, RelB, p50/P105, p52/p100의 5가지로 구성되어 있다(Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998; Barkett and Gilmore, 1999; Pahl, 1999; Mayo and Baldwin,. 2000; Baeuerle and Henkel, 1994). 이들 subunit 모두 Rel homology domain으로 불리는 부위를 공유하고 있으며, 이 부위를 통하여 subunit간 homologous, DNA binding, heterologous dimerization, nuclear translocation, IκB inhibitor와의 결합이 이루어지게 되는데, NF-κB는 IκB와 함께 복합체로 세포질에 존재하고 있다. 즉 세포 외부로부터 자극이 없는 상태에서는 IκB가 NF-κB dimer의 nuclear translocation sequence를 masking하여 NF-κB를 세포질에 위치시킨다. 그러나, cytokine 자극, 세균 또는 바이러스 감염, 그리고 oncogenic signal과 같은 여러 가지 자극에 의해서, 혹은 tumor necrosis factor (TNF) receptor, interleukine-1 (IL-1) receptor, 그 외 toll-like receptor와 같은 수용체들의 활성에 의해서 세포 내 신호 전달의 연속 단계가 시작되면, NF-κB 활성이 일어난다. 이 과정은 IKKα, IKKβ, IKKγ로 이루어진 IκB kinase complex에 의해 조절된다. 세포 외부의 신호에 의해서 IKK complex가 활성화되면, regulatory subunit인 IKKγ를 제외한 두 subunit의 특정 serine 잔기의 인산화가 일어나게 되고, 이는 ubiquitination 및 그 다음 단계의 proteasome-dependent degradation으로 이어진다. 일단 IκB degradation이 일어나면, NF-κB nuclear localization sequence가 노출되어, NF-κB는 핵 내로 이동, 축적되고, 최종적으로 DNA

binding 및 target gene의 전사적 활성을 유도하는 것으로 알려져 있다 (Ghosh and Karin, 2002; Gilmore et al., 1996) (Fig. 21).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

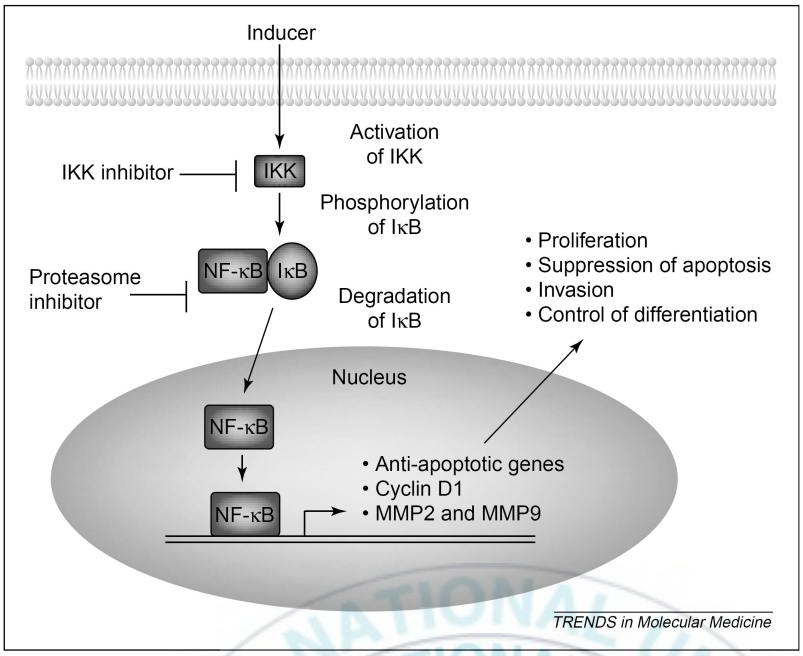


Fig. 21. Model for the activation of NF-κB by a variety of inducers and for the nuclear response controlled by NF-κB.

Model for the activation of NF-κB by a variety of inducers and for the nuclear response controlled by NF-κB. Inducers of NF-κB activate IKK, which leads to phosphorylation of IκB subunits on N-terminal serines. Phosphorylated IκB is ubiquitinated and subsequently degraded by proteasome activity, allowing the accumulation of NF-κB in the nucleus. In the nucleus, NF-κB binds to regulatory regions in promoters and enhancers to stimulate transcription of genes associated with oncogenesis, suppression of apoptosis, and invasion. IKK inhibitors block NF-κB activation through suppression of IκB phosphorylation and proteasome inhibitors block IκB degradation (Orlowski and Baldwin, 2002).

2) NF-κB 신호 전달 분석

본 실험에서는 후코이단을 처리하고 세포질을 분리하여 단백질을 분리한 후 Western blot을 수행하여 IKKα, phsopho-IκBα, IκBα의 단백질 발현 수준을 검토하였다.

먼저, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 500, 1,000 μg/ml 농도에서 IKKα 단백질 발현 수준은 73%, 67%로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 22). 또, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, IκB의 인산화 수준은 고농도(1,000 μg/ml)에서 감소하였고, IκB의 단백질 수준 또한 고농도로 후코이단을 처리하였을 때 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 22).

NF-κB는 p65/p50의 heterodimer로 구성되어 있으며 IκB와 결합한 NF-κB:IκB 복합체는 핵으로 이동할 수 없게 되며 그것에 의해 NF-κB는 불활성 상태로 유지되어 진다(Surh et al., 2001). NF-κB 신호 전달은 일반적으로 classical 혹은 alternative pathway 둘 중 하나를 통해서 일어난다고 여겨지고 있다(Bonizzi and Karin, 2004). Classical pathway의 경우 NF-κB는 TNF와 같은 신호에 의해 자극을 받아 활성화되면 IKK 복합체의 β-subunit의 활성화를 초래하게 된다(Karin, 1999). 이어서 β-subunit의 활성화는 IκB 단백질들의 N-terminal에 존재하는 두 개의 serine 잔기를 인산화시킨다. 이렇게 인산화된 IκB 단백질들은 ubiquitin ligase 기구에 의해 인식되고 proteasome에 의해 분해되며 IκB들로부터 유리된 NF-κB dimer들은 핵으로 이동하게 된다(Karin and Ben-Neriah, 2000; Baeuerle and Baichwal, 1997).

본 실험에서 HT-29 대장암 세포에 후코이단 처리 시 IKKα, phsopho-IκBα, IκBα의 단백질 발현 수준을 억제하여 세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다.

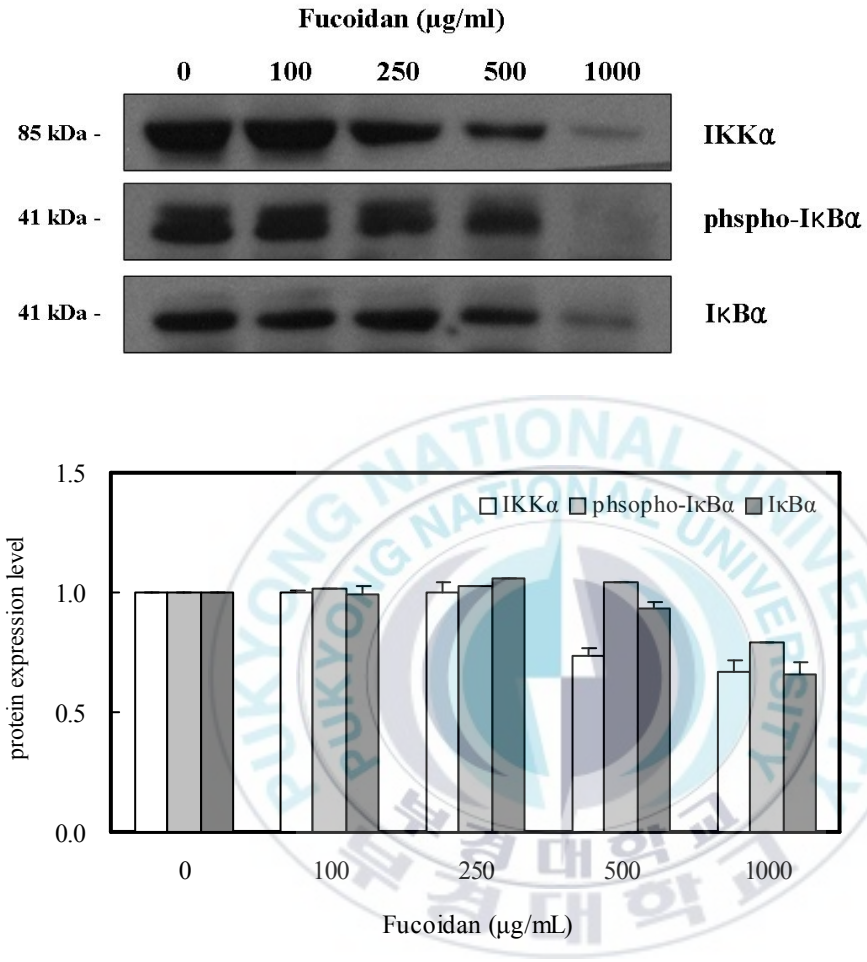


Fig. 22. Effects of fucoidan treatment on the levels of IKKα, phsopho-IκBα and IκBα protein from cytosol in HT-29 cells.

HT-29 cells were incubated with fucoidan (0~1,000 μg/ml) for 48 hrs. Cytosol fraction extracts were prepared and analyzed by Western blot using indicated antibody.

3) NF-κB의 세포질과 핵의 신호 전달 분석

Fig. 22에서 HT-29 대장암 세포에서 후코이단 처리 시 IκB의 분해가 감소하였으므로 downstream인 NF-κB의 p65/p50이 세포질과 핵으로의 translocation 정도를 살펴보았다. HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하고 핵과 세포질을 추출한 획분에 NF-κB p65 항체를 이용하여 Western blot으로 분석하였다. 그 결과, 대조군에서 NF-κB p65는 대부분 세포질에 존재하며 일부 핵으로 이동하고 있는 것으로 나타났으나, 후코이단 처리 시 NF-κB p65 발현 수준이 세포질 획분의 경우 500, 1,000 μg/ml 농도에서 89%, 65% 수준으로 감소하였고, 핵 획분의 경우 1,000 μg/ml 농도에서 87% 수준으로 두 획분 모두에서 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 23).

NF-κB는 TNF-α, IL-1과 같은 염증 유발성 사이토카인을 비롯하여 자외선, mitogenes, 세포 사멸을 유발하는 여러 가지 자극에 의해 활성화되게 된다(Makarov, 2000). 즉, NF-κB에 결합된 IκB의 인산화가 일어나면 인산화된 IκB는 NF-κB로부터 분리되고 이 IκB는 proteosome에 의해 분해되며, NF-κB는 핵으로 이동하여 염증, 세포 사멸, 종양 발생, 바이러스 복제 등에 관여하게 되고, 대상 유전자가 있는 specific consensus DNA element에 대한 NF-κB의 결합은 TNF-α, inducible nitric oxide synthase (iNOS), COX-2, IL-6의 전사를 개시하는 것으로 알려져 있다(Kuprash et al., 1995). 또한 대식세포에서 NF-κB는 다른 전사요소와의 연관 기전을 통해 iNOS를 encoding하는 유전자 발현을 조절하며(Mandrika et al., 2001; Pan et al., 2000; Spink et al., 1995), TNF-α를 포함한 많은 사이토카인을 up-regulation함으로서 면역 세포의 활성화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Kopp and Ghosh, 1995). 특히, 대장암 세포 주에서 NF-κB의 활성화는 세포 사멸을 억제하고(Payne et al., 1998; Qiao et al., 2000), 대장 선종이나 대장암 조직에서 NF-κB의 활성도가 증가한다고 하여(Hardwick et al., 2001; Lind et al., 2001) NF-κB의 활성화는 대장 종양의 생존 신호 전달 경로를 활성화시켜 대장암의 발생에 관여한다는

것을 제시한다.

따라서, 본 연구를 통해 HT-29 대장암 세포에서 후코이단은 IKKα, phsopho-IκBα, IκBα의 단백질 발현 수준을 억제하고 핵으로의 NF-κB의 이동 또한 저해하여 최종적으로 세포 증식을 저해하여 세포 사멸을 유도하는 것으로 보여진다. 이러한 결과는 대장암 발생의 억제 효과가 알려진 butyrate가 대장암 세포 사멸을 억제하는 NF-κB의 활성을 감소시켜 TNF-α 매개 세포 사멸을 촉진시킨다는 연구(Lührs et al., 2002)와 동일한 결과를 보여주었다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

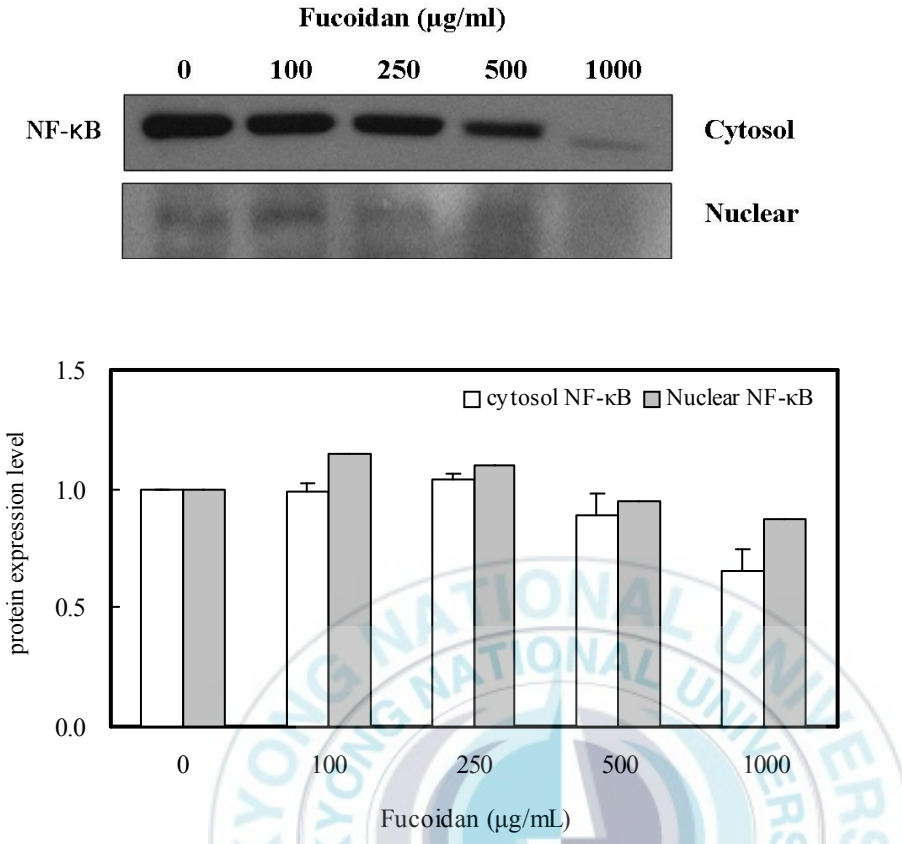


Fig. 23. Effects of fucoidan treatment on the levels of NF-κB protein from cytosol into nuclear in HT-29 cells.

HT-29 cells were incubated with fucoidan (0~1,000 μg/ml) for 48 hrs. Cytosol and nuclear fraction extracts were prepared and analyzed by Western blot using indicated antibody.

4) 염증 반응 분석

최근 연구에 의하면 만성염증은 피부암, 위암 등을 포함한 많은 조직에서의 암 진행을 촉진한다고 한다(Li et al., 2005; Tan and Coussens, 2007; Arias et al., 2005). 염증의 진행에 있어서도 NF-κB 단백질이 관여하는 것으로 알려져 있다. NF-κB는 전사인자로서 COX-2, iNOS 등을 포함한 많은 염증인자의 발현을 조절하며(Karin and Greten, 2005), 이러한 염증인자들은 암의 진행과 전이에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 NF-κB의 활성을 억제하는 것은 염증의 진행과 암을 예방하는 데 있어서 매우 중요한 의미를 가진다. 실제로 Matsumoto(2005) 등의 연구결과에 의하면 유방암 모델 마우스에 NF-κB 저해제 처리 시 암의 성장을 유의성 있게 억제하였다고 하였다(Matsumoto et al., 2005.). 따라서 천연적인 NF-κB 저해제들에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

먼저, 염증 관련 대사에서 중요한 역할을 하는 단백질들인 p38과 JNK의 인산화 수준을 살펴보았다. p38은 NF-κB 신호를 조절함으로써 VCAM과 COX-2의 발현을 조절하는 중요한 단백질이다(Lin et al., 2007). 본 실험에서 HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, p38의 인산화 수준은 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 1,000 μg/ml 농도에서 75%로 감소하여 인산화 억제가 나타났다(Fig. 24).

두 번째로, 후코이단이 JNK 신호 전달 경로에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, JNK의 인산화 수준이 500, 1,000 μg/ml 농도에서 78%, 64%로 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 24). 세포 생존 신호 활성 억제는 NF-κB 전사 인자를 억제함으로써 세포 사멸을 유도한다고 할 수 있는데, JNK 활성 지속은 NF-κB 신호 전달 경로의 진행을 저해시킨다고 하였고(Guo 1998; Tobiume et al., 2001), parthenolide의 JNK 신호 전달 경로의 활성 유지를 통해 NF-κB 신호 전달 경로의 억제로 항암 효과가 유지된다고 하여(Nakshatri et al., 2004; Zhang et al., 2004) 본 실험과 유사한 결과를 보여주었다.

그 다음으로, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 COX-2의 단백질 수준을 살펴보았다. 그 결과 COX-2 단백질 수준은 100 μg/ml 농도에서부터 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 24). COX-2 유전자의 promoter region에 존재하는 positive 전사적 요소의 하나로서 NF-κB binding motif가 존재하고 있다(Kim et al., 1997). 이점에 착안하여 후코이단에 의한 COX-2 발현에 NF-κB 활성이 관여하고 있는지 여부를 살펴보았다. COX는 arachidonic acid 대사의 속도 조절 효소로 COX-1은 대부분의 조직에서 지속적으로 발현하여 인체의 항상성에 관여하며 COX-2는 유도성 COX로 사이토카인, 암 촉진제, 성장 인자 등에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다(Jones et al., 1993; Herschman, 1996; Xie and Herschman, 1996; Sheng et al., 1998; Haertel-Wiesmann et al., 2000). 각종 암에서 COX-2의 과발현은 세포 증식의 촉진(Sheng et al., 1998), 혈관 형성의 촉진(Tsujii et al., 1998), 면역 기전의 억제(Huang et al., 1998), 세포 자연사의 억제 및 종양의 침윤성 증가 등(Tsujii and DuBois, 1995)과 관련이 있다고 알려져 있다. 또한, COX-2는 정상 대장 조직에서는 없거나 미미한 정도로 발현되는데(Sano et al., 1995), 대장암에서는 85-100% 발현되고 있으며(Eberhart et al., 1994), 여러 암종에서 증가되어 있다고 하여(Joo et al., 2003), 암의 개시, 진행 및 전이에 관여할 것이라는 가능성이 제시되고 있다. 따라서, 본 실험에서 HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 COX-2의 단백질 수준이 농도에 따라 감소하여, 암 억제제로 사용될 가능성을 제시하고 있다(Fig. 24).

마지막으로, NF-κB에 의해 발현이 조절되는 대표적인 염증관련 인자중의 하나인 iNOS의 단백질 수준을 살펴보았다. 그 결과, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, iNOS의 단백질 발현 수준은 1,000 μg/ml의 고농도에서만 74%로 감소하였다(Fig. 24). NF-κB는 염증 반응과 염증성 질환에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 생쥐의 iNOS promote는 -85 base pair 위치에 NF-κB 결합부위가 있고, 이것이 iNOS 유전자의 발현에 관계되어 있다(Xie et al., 1994). NOS는 L-arginine을 기질로 하여 NO를 생성하는 효소로

(Nathan and Xie, 1994), constitutive NOS (cNOS) 및 iNOS로 크게 구분하며, iNOS는 세포 내의 칼슘 농도와는 무관하게 LPS 및 IFN-ɣ, IL-1, TNF-α와 같은 사이토카인류에 의해 발현된다(Hobbs et al., 1999; MacMicking et al., 1997; Coleman, 2001). 사람 및 마우스 iNOS 유전자의 5′-flanking region에는 NF-κB, IFN-ɣ responsive elements, TNF responsive element, hypoxia-responsive element의 consensus sequence를 포함하고 있어서(Lowenstein et al., 1993; Kröncke et al., 1998; Chartrain et al., 1994), NF-κB, AP-1 및 STAT-1과 같은 전사 인자들이 iNOS의 발현에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Xie et al., 1994; Kristof et al., 2001; Ganster et al., 2001; Kleinert et al., 1998). iNOS에 의해 생성되는 NO는 cNOS에 의한 NO와는 달리 외부 자극에 의해 고농도로 지속적으로 생성되며(Coleman, 2001), 외부의 박테리아, 바이러스 및 암세포를 죽이는 역할을 하거나(MacMicking et al., 1997) NO 자체가 iNOS의 발현을 억제하여 면역 반응이 과도해지는 것을 억제하는 등(Hinz et al., 2000), 체내 방어와 면역 반응을 조절하는 작용을 한다. 실제로 대장암, 위암, 폐암, 흑색종 등에서 COX-2 및 iNOS가 과발현되어 있는 것으로 알려져 있어(Sano et al., 1995; Hao et al., 2001; Rajnakova et al., 2001; Hosomi et al., 2000; Ekmekcioglu et al., 2000), COX-2 및 iNOS는 염증 질환 뿐만 아니라 암과도 밀접한 연관이 있음을 알 수 있다. 또, 민간에서 염증 치료용 약제로 사용되어온 선복화(*Inula britannica* var *chinensis*)에서 추출한 ergolide는 NOS와 COX-2의 억제를 통해 NF-κB 신호 전달 경로를 차단하였고, 기본적인 수준의 NF-κB 활성까지도 감소시키는 것으로 나타나(Whan et al., 2001), 본 연구 결과와 동일한 결과를 보여주었다.

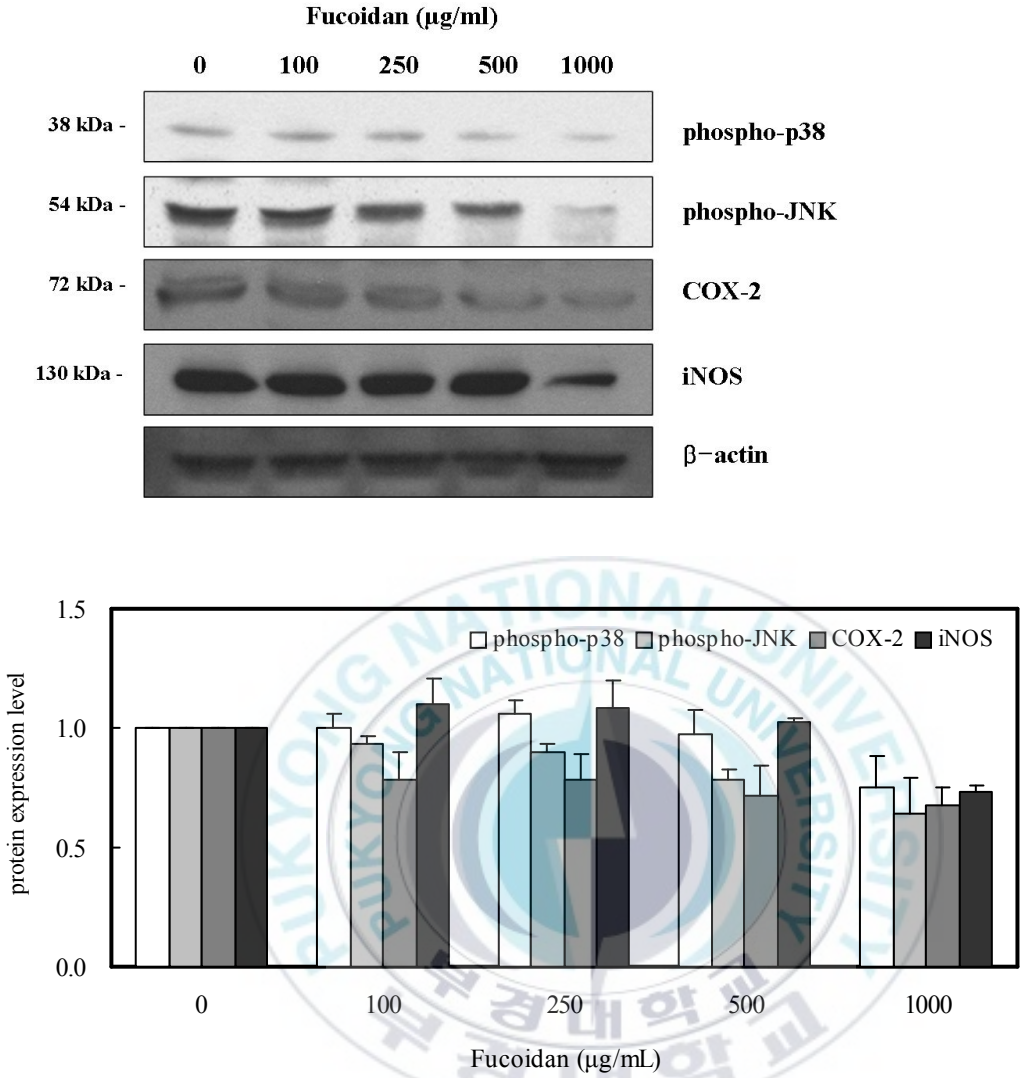


Fig. 24. Effects of fucoidan treatment on the levels of phospho-p38, phospho-JNK, COX-2 and iNOS protein in HT-29 cells.

HT-29 cells were lysed and then total proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were visualized by Western blotting using indicated antibodies. β-actin was used as an internal control.

6. 세포 성장 인자에 미치는 영향

1) IGF-IR 단백질 수준 분석

암세포들이 급속도로 증식하는 원인 중의 하나는 각 조직 내에서 국소적으로 생성되는 성장인자들이 autocrine 또는 paracrine mechanism으로 세포 증식을 촉진하기 때문이다. 특히, IGF-I, IGF-II, IGF-receptor, IGFBP가 여러 종류의 종양이나 암세포에서 발현되는 것이 발견된 이후(Macauley, 1992) 암의 형성에 있어서 이러한 IGF system의 비정상적인 변화는 여러 종류의 암을 유발하는 원인 중 하나로 간주되고 있어(Burroughs et al., 1999; Cullen et al., 1991; Beserga, 1995), IGF system에 관한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다(Macauley, 1992). 여러 연구에서 대장암은 주위의 정상적인 대장 점막조직에 비해 IGF-II mRNA와 protein의 발현이 30~40% 증가한다고 하였고(Singh and Rubin, 1993; Lambert et al., 1990; Tricoli et al., 1986), 혈 중 IGF-I과 IGFBP-3의 농도가 높으면 유방암, 전립선암, 대장암과 폐암의 발병률이 증가한다고 하였다(Hankinson et al., 1998). 또, 혈 중 IGF-I은 전립선암과 유방암 발생률과 강력한 양의 상관관계를 가지며(Chan et al., 1998), 인간의 대장암은 정상적인 주위 점막조직과 비교하여 IGF-IR의 수가 증가하였고(Guo et al., 1992), 방광암 세포에서도 IGF-IR가 과발현되었다고 하여(Iwamura et al., 1993), IGF-I과 IGF-IR가 종양 발생에 주요한 역할을 하는 것으로 보고 있다. 또한 IGF-IR에 ligand가 결합하게 되면 세포 사멸을 억제한다(Beserga, 1995; LeRoith et al., 1997)고도 하여 IGF system의 작용을 변화시키는 물질에 대한 연구가 진행되게 되었다.

따라서, 본 연구에서는 HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, 암세포 증식 억제 효과가 IGF-I 단백질 수준에 어떠한 영향을 미치는지 검토하였다. 먼저, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, pro-IGF-IR 단백질 수준은 500, 1,000 μg/ml 농도에서 87%, 75%로 감소하였으며, IGF-IR 단백질 수준은 500 μg/ml 농도까지는 변화가 없다가 1,000 μg/ml에서 69%

로 감소하였다. 또, 인산화 수준은 500, 1,000 μg/ml에서 87%, 69%로 감소하였으며, IRS-1 단백질은 500 μg/ml 농도까지는 큰 변화가 없다가 1,000 μg/ml에서 85%로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 25).

IGF는 한 개의 사슬로 이루어진 폴리펩타이드로 proinsulin의 아미노산 구조와 유사하며, 정상 또는 악성 조직에서 mitogenic 또는 항 세포 사멸 인자로 작용한다. IGF들은 endocrine mechanism 뿐 아니라 체내 각 조직에서 생성되어 그 조직 내에서 autocrine/paracrine mechanism으로도 세포의 증식과 분화를 조절하며(Jones and Clemmons, 1995), IGFBP는 IGF에 결합하여 세포에서 생성된 IGF를 다른 조직이나 세포로 운반하거나 IGF가 수용체에 결합하는 것을 증가 또는 감소시킴으로서 IGF의 작용을 촉진하거나 억제한다고 알려져 있다(Rosenfeld et al., 1990). IGF의 효과는 세포 표면의 plasma membrane에 존재하는 receptor에 IGF들이 결합되어 그 작용이 세포내로 전달됨으로 이루어진다. IGF-IR는 insulin receptor와 유사한 형태를 가지고 있으며(LeRoith et al., 1995) IGF-IR는 $\alpha_2\beta_2$형의 heterodimer로 이루어진 glycoprotein으로 α-subunit과 β-subunit이 disulfide bond들로 연결되어 있다. α-subunit은 extracellular domain으로 IGF가 이에 결합하고, 세포막을 통과하는 β-subunit은 cytoplasmic tyrosin-specific protein kinase domain을 포함하고 있다(Czech, 1989). 이 receptor에는 insulin, IGF-I, IGF-II이 결합을 하지만, 가장 활성이 높은 IGF-IR에 IGF-I이 결합하게 된다. IGF-IR은 세포 분열을 촉진하고 암세포로의 전환이나 여러 가지 apoptotic 손상으로부터 세포를 보호하여 암 발생과 진전을 촉진한다고 알려져 있다. IGF-IR의 활성은 IGF-I이나 IGF-II의 두 가지 ligand 중 하나가 IGF-IR에 결합함으로서 세포내의 cytoplasmic domain의 tyrosin 잔기가 인산화 됨으로서 시작된다. IGF-I이 IGF-IR의 α-subunit에 결합하게 되면, β-subunit에 autophosphorylation이 일어나게 되고, 이것은 receptor의 tyrosin kinase 활성을 촉진함과 동시에, 세포내 여러 기질들의 인산화를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Kato 1993; LeRoith et al., 1997). 본 연구에서 HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하

였을 때 인산화 수준이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 25).

세포 내에는 활성화된 IGF-IR에 결합하여 그 신호를 전달하는 5가지의 adaptor protein family들이 존재하는데, Grb family, SHC family, IRS family, CRK family, PI3K의 p85 regulatory subunit이 이에 속한다. 이 adaptor protein 중 가장 대표적인 것이 IRS family이고, 인산화된 IRS에 결합하여 인산화되는 단백질 중 가장 대표적인 것이 PI3K의 p85 regulatory subunit으로 알려져 있다. 본 연구에서 down-regulation인 IRS-1의 단백질 수준을 검토한 결과, 후코이단에 의한 IRS-1의 단백질 수준은 1,000 μg/ml의 고농도에서 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 25).

IGF-IR는 RAS/MAPK와 P13K/AKT pathway의 이 두 가지의 중요한 세포 내 신호 전달체계를 가지고 있다(Valentinis et al., 1998). AKT는 PI3K의 downstream target으로써 여러 성장 인자에 의해 활성화되는데, AKT가 세포 사멸을 억제함으로서 세포 생존을 촉진시킨다는 증거들이 최근 여러 연구를 통해 제시되고 있다(Alessi and Cohen, 1998; Vanhaesebroeck et al., 1997; Franke et al., 1997; Marina et al., 1997). AKT는 Thr308과 Ser473의 인산화에 의해 활성화되며, PDK1이 Thr308에서 AKT를 활성화시키는 kinase로 알려져 있다(Stephens et al., 1998). PI3K의 직접적인 downstream에 있는 AKT/protein kinase B는 세포의 생존을 촉진하고, 성장 인자의 억제, 세포 주기의 방해, 세포 부착과 같은 여러 가지 자극에 의한 세포의 apoptotic death를 억제한다고 알려졌다(Jiang et al., 2000). 따라서, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 AKT의 단백질 수준을 살펴보았다. 그 결과, 후코이단의 농도에 따라 AKT의 단백질 수준이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 25). 현재까지 알려진 바에 의하면, PI3K와 반응하여 생성된 phospatidylinositol-3-phosphate가 AKT와 결합하게 되면 AKT를 세포막으로 이동시킨 후 인산화되어 활성을 갖게 된다. 활성화된 AKT는 다시 Bcl-2 family나 Bad, caspase-9와 같은 세포의 생존과 관계한 target들을 인산화시켜 세포 사멸을 저해하고 세포 생존을 촉진하게 된다고 하였다(Datta et al.,

1997; Cardone et al., 1998). 따라서, 본 실험 결과와 앞선 결과들을 통해, AKT의 단백질 수준의 감소는 Bcl-2 family, bad, caspase-9 등의 신호 전달에 영향을 주어 세포 사멸을 유도하는 것으로 보인다.

또 다른 IGF-IR 신호 전달 체계인 MAPK는 4개의 subfamily로 구성되어 있다. 이는 extracellular signal-regulated kinases로 알려진 ERK 1/2(또는 p44/42 MAPK pathway), SAPKs로 알려진 JNKs, ERK5/BMK1, p38 MAPKs가 포함되며 특히 p44/42 MAPK pathway는 세포 내 신호전달 과정의 주요 단백질로서, 세포 증식, 발생, 분화, 세포 주기와 같은 중요한 세포 내 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다(Ono and Han, 2000). 즉, IGF-IR의 인산화가 SHC를 통해 Ras pathway를 활성화하고 이는 다시 Raf serine/threonine kinase를 활성화시켜, MEK, MAP kinase등을 활성화시키면, MAPK는 전사 인자들의 인산화를 유도하여 mitogenesis를 촉진하게 된다. 또한, 성장인자나 ctyokines 또는 그 밖의 여러 자극은 MAPK 활성을 개시할 수 있고, 활성화된 MAPK는 전사 인자, 세포 골격 단백질, 그 하위의 kinase 등을 인산화하여 유전자 발현의 변화를 가져오게 된다. 따라서, HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때 ERK 1/2의 단백질 수준을 살펴보았다. 그 결과, 후코이단의 농도에 따라 ERK 1의 단백질 수준이 감소하는 것으로 나타나, HT-29 대장암 세포에서 후코이단은 MAPK 신호에 영향을 미쳐 세포 증식과 세포 주기에 영향을 미치는 것으로 보인다(Fig. 25). 이를 종합하면 HT-29 대장암 세포에서 후코이단의 처리는 IGF-IR 단백질및 그 하위 수준을 억제하여 암 발생이나 진전을 억제하는 것으로 보인다.

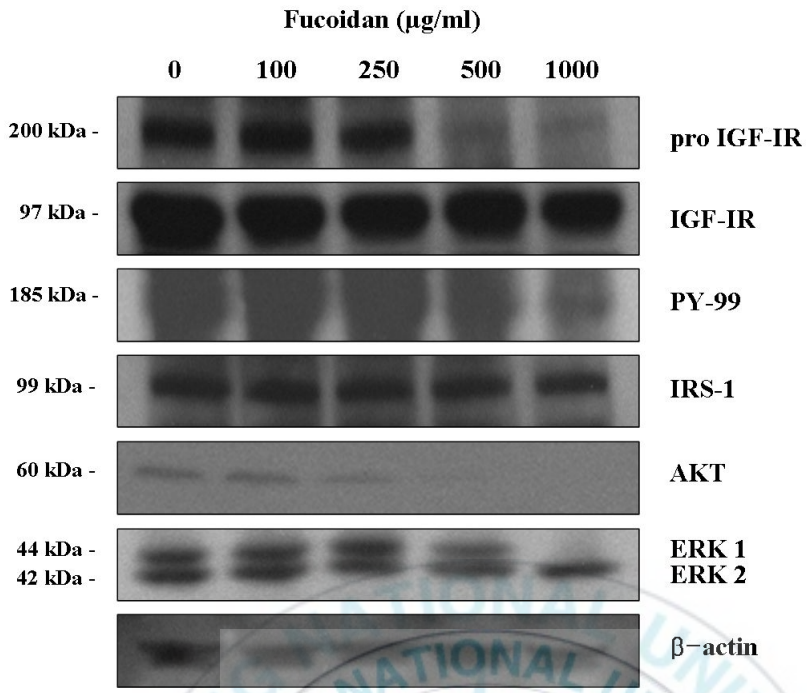


Fig. 25. Effects of fucoidan treatment on the levels of pro IGF-IR, IGF-IR, phospho-tyrosine, IRS-1, Akt and ERK 1/2 protein in HT-29 cells.

HT-29 cells were lysed and then total proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were visualized by Western blotting using indicated antibodies. β-actin was used as an internal control.

2) IGF-IR 신호 전달 분석

Fig. 25에서 HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, IGF-IR 및 그 하위 에 속하는 단백질 발현 수준이 대부분 감소하는 것으로 나타났다. 따라서, Exogenous한 IGF-I로 유도된 HT-29 대장암 세포에 IGF-IR 신호 전달 체계를 활성화시킨 후 IGF-IR과 immunoprecipitation (IP) 되는 단백질을 찾아 살펴보고, 암세포 증식 억제 효과가 IGF-IR 신호 전달 경로를 매개로 일어나는지 살펴보았다.

IGF-I이 IGF-IR의 α-subunit에 결합하게 되면, β-subunit에 autophosphorylation이 일어나게 되고, 이것은 receptor의 tyrosin kinase 활성을 촉진함과 동시에, 세포내 여러 기질들의 인산화를 촉진하는 것으로 알려져 있다(Kato 1993; LeRoith et al., 1997). 그 결과, HT-29 대장암 세포에 IGF-I을 0, 5, 10, 60분 처리하고 IGF-IR로 IP한 대조군의 경우 인산화 수준이 60분까지 지속되는 것으로 나타났으나, 후코이단 처리군의 경우 5분까지 증가하다가 60분까지 회복되지 않았다(Fig. 26). 그 다음으로 인산화 단백질은 IGF-IR 단백질로 신호를 전달하게 된다. 그 결과, 대조군의 경우 IGF-IR 단백질이 시간에 따라 감소하는 것으로 나타났으며, 후코이단 처리군의 경우 시간에 따라 감소하는 것으로 나타났으나 대조군의 경우보다 단백질 수준이 낮게 나타났다(Fig. 26).

IGF-IR는 RAS/MAPK와 P13K/AKT pathway의 이 두 가지의 중요한 세포내 신호 전달체계를 통해 작용하게 된다(Valentinis et al., 1998). PI3K의 직접적인 downstream에 있는 AKT/protein kinase B는 세포의 생존을 촉진하고, 성장 인자의 억제, 세포 주기의 방해, 세포 부착과 같은 여러 가지 자극에 의한 세포의 apoptotic death를 억제한다고 알려졌다(Jiang et al., 2000). 따라서, HT-29 대장암 세포의 AKT 단백질 수준을 살펴보았다. 그 결과, 후코이단 처리에 상관없이 시간에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 그러나, 대조군의 경우 phospho-AKT 수준은 5분에서 증가하다가 서서히 감소하였으나, 후코이단 처리군의 경우 5분에서 증가하기 시작하여 60분까지 계속 증가

하는 것으로 나타났다(Fig. 27).

또 다른 IGF-IR 신호 전달 체계인 MAPK는 세포 내 신호전달 과정의 주요 단백질로서, 세포 증식, 발생, 분화, 세포 주기와 같은 중요한 세포 내 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다(Ono and Han, 2000). 즉, IGF-IR의 인산화가 SHC를 통해 Ras pathway를 활성화하고 이는 다시 Raf serine/threonine kinase를 활성화시켜, MEK, MAP kinase등을 활성화시키면, MAPK는 전사 인자들의 인산화를 유도하여 mitogenesis를 촉진하게 된다. 따라서, HT-29 대장암 세포의 ERK 1/2의 단백질 수준을 검토한 결과, 후코이단 처리에 관계없이 ERK 1/2의 단백질 수준에는 아무런 영향을 미치지 못하였다. 그러나, 대조군의 경우 시간에 따라 ERK 1의 인산화 단백질의 수준이 감소하는 것으로 나타났으며, 후코이단 처리군의 경우 ERK 1의 인산화 단백질의 수준은 감소한 상태로 60분간 지속되었으나, ERK 2의 인산화 단백질의 수준은 시간에 따라 조금씩 증가하는 것으로 나타났다. 이로써, HT-29 대장암 세포에서 후코이단은 IGF-IR의 단백질 수준과 인산화 수준의 감소로 인해 세포의 성장이 감소되는 것으로 보인다.

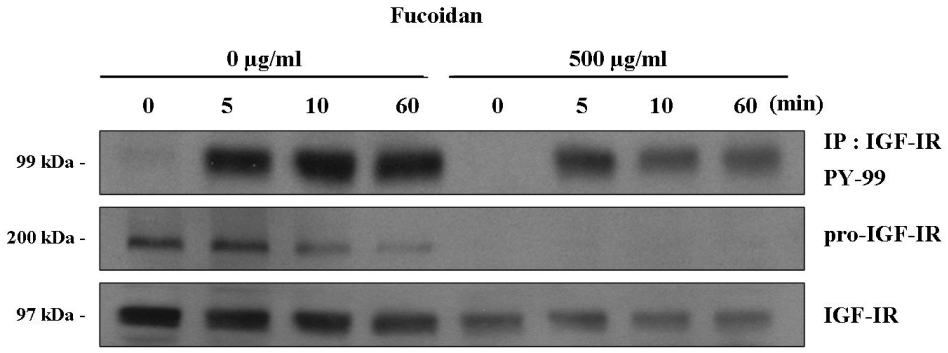


Fig. 26. Effect of fucoidan on IGF-I-induced phospho-tyrosine, pro-IGF-IR and IGF-IR of IGF-IRβ in HT-29 cells.

HT-29 cells were incubated with fucoidan (500 μg/ml) for 48 hr. IGF-I (100 ng/ml) was added for 0~60 min immediately prior to lysate preparations. Cell lysates (750 μg protein) were incubated anti-IGF-IRβ antibody and Protein A-Sepharose to immunoprecipitate proteins associated with IGF-IR. The resulting proteins were analyzed by Western blot for phospho-tyrosine, pro-IGF-IR, and IGF-IR.

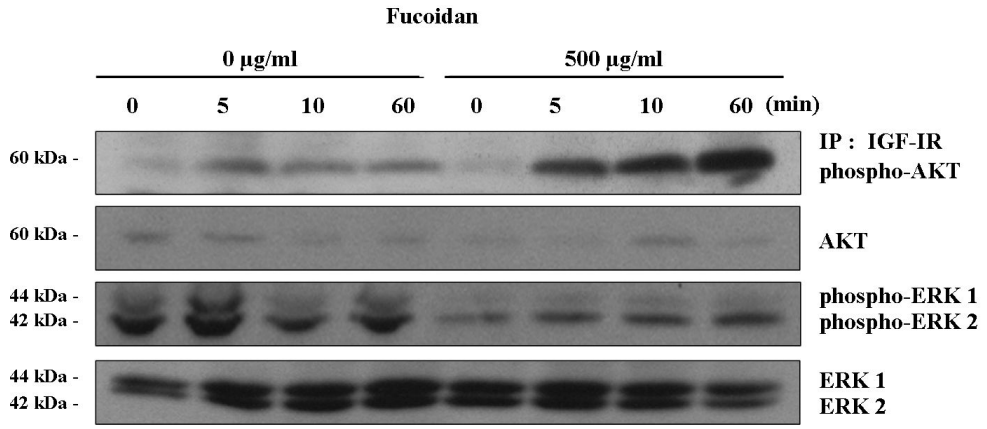


Fig. 27. Effect of fucoidan on IGF-I-induced phospho-AKT, AKT, phospho-ERK 1/2 and ERK 1/2 of IGF-IRβ in HT-29 cells.

HT-29 cells were incubated with fucoidan (500 μg/ml) for 48 hr. IGF-I (100 ng/ml) was added for 0~60 min immediately prior to lysate preparations. Cell lysates (750 μg protein) were incubated anti-IGF-IRβ antibody and Protein A-Sepharose to immunoprecipitate proteins associated with IGF-IR. The resulting proteins were analyzed by Western blot for phospho-AKT, AKT, phospho-ERK 1/2, and ERK 1/2.

3) HRG 단백질 수준 분석

암은 세포의 증식 작용이 정상적으로 조절되지 않거나 세포 사멸이 억제됨으로써 그 진행이 촉진되고 비정상적인 세포 증식은 세포 내 신호전달의 이상에 의해 일어난다. 인간 대장암 세포와 primary colon tumor는 TGF-α, TGF-β, IGF-I, IGF-II 그리고 PDGF를 포함하여 몇몇의 positive, negative growth regulator들을 생성, 분비한다. Ligand들의 수용체들도 대장암에서 발현되어 성장 인자들이 autocrine mechanism으로 대장암의 성장을 조절하게 된다(Ciardiello et al., 1991). 이러한 신호들의 매개체 중의 하나인 RTK는 세포 내 신호 전달에서 중요한 조절 인자로 작용하며 RTK에 의한 신호 전달이 정상적으로 조절되지 않으면 암이 발생하므로 이것 역시 암 발생 원인이 될 수 있다(Blume-Jensen and Hunter, 2001; Hackel et al., 1999). 암 발생에 기여하는 것으로 알려진 protein kinase들은 세포막을 관통하는 RTK들과 세포 안에 존재하는 protein kinase들이다. 성장 인자가 RTK에 결합하면 RTK가 인산화되어 세포 밖의 신호가 세포질의 protein kinase들의 인산화를 통해 세포 내로 전달되어 세포 증식이 촉진된다. 잘 알려져 있는 RTK인 ErbB receptor family는 EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4로 구성되어 있고 다양한 조직에서 발현되어 발달, 증식, 분화에 관여하며 암의 발생과 진전에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. ErbB receptor에 결합하는 여러 종류의 ligand들이 존재하는데 EGF와 TGF-α는 EGFR에 결합하고(Toyoda et al., 1995), HRG은 ErbB3, ErbB4에 결합하는 것으로 알려져 있다(Tzahar et al., 1994).

ErbB receptor family는 대장암 유방암, 난소암, 십이지장암 등 여러 암에서 과발현된다고 하였으며(Maurer et al., 1998; Salomon et al., 1995; Salomon et al., 1989; Safran et al., 2001), ErbB receptor family 활성의 비정상적인 조절이 암 발생의 중요한 원인으로 제안되었다. ErbB receptor family가 과발현되는 암세포에서는 세포 증식, 세포 생존, invasion, angiogenesis 등 과정이 촉진된다고 보고되었으므로 이 receptor를 억제하게 되면 암의 예

방제나 치료제의 목적으로 대체할 가능성이 제시되고 있다(Anderson and Ahmad, 2002).

따라서, 본 연구에서는 HT-29 대장암 세포에서 후코이단을 처리하였을 때 세포 증식 및 세포 사멸을 유도한다는 결과를 바탕으로 하여 후코이단이 HRG/ErbB3의 단백질 수준에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

Ligand가 ErbB receptor의 extracellular domain에 결합하면 receptor의 dimerization이 일어나고 intrinsic tyrosine kinase가 활성화되어 receptor의 cytoplasmic domain의 tyrosin 잔기의 인산화가 일어나게 된다. 그 중에서 ErbB receptor family의 단백질 수준을 살펴보았는데, 그 중 후코이단 농도가 증가할수록 ErbB2와 ErbB3 단백질 발현이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 28). 그러나, HRG의 단백질 수준에는 아무런 영향을 미치지 않았다(Fig. 28). 본 연구에서는 인산화된 tyrosine 단백질은 200 kDa과 99 kDa에서 나타났는데, 후코이단의 농도의 증가에 따라 인산화된 단백질 수준은 감소하였다(Fig. 28).

인산화된 tyrosine 잔기에 SH2 domain을 포함한 여러 가지 신호전달 물질들이 결합한다. 이 자리에 결합하는 단백질 중 하나가 p85로 세포 내의 지질을 인산화 시키는 효소인 PI3K의 regulatory subunit이다(Rordorf-Nikolic et al., 1995). 활성화된 p85는 PI3-kinase의 실질적인 활성을 나타내는 p110 catalytic subunit을 통하여 inositol ring의 3번째 탄소의 인산화를 유도하고 이는 AKT의 활성을 촉진시킨다. 활성화된 AKT는 caspase-9, Bad, transcription factor 등 세포 사멸에 관여하는 단백질들을 인산화하여 불활성화시키므로서 세포 사멸을 억제하고 세포 생존을 촉진한다(Datta et al., 1999). 또한 ErbB3의 활성화는 Ras-MAPK signaling 경로를 활성화 할 수 있다(Yarden, 2001). 본 연구에서 후코이단 처리시 AKT의 단백질 수준은 감소하는 것으로 나타났으나, ERK 1/2 단백질 수준에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 28).

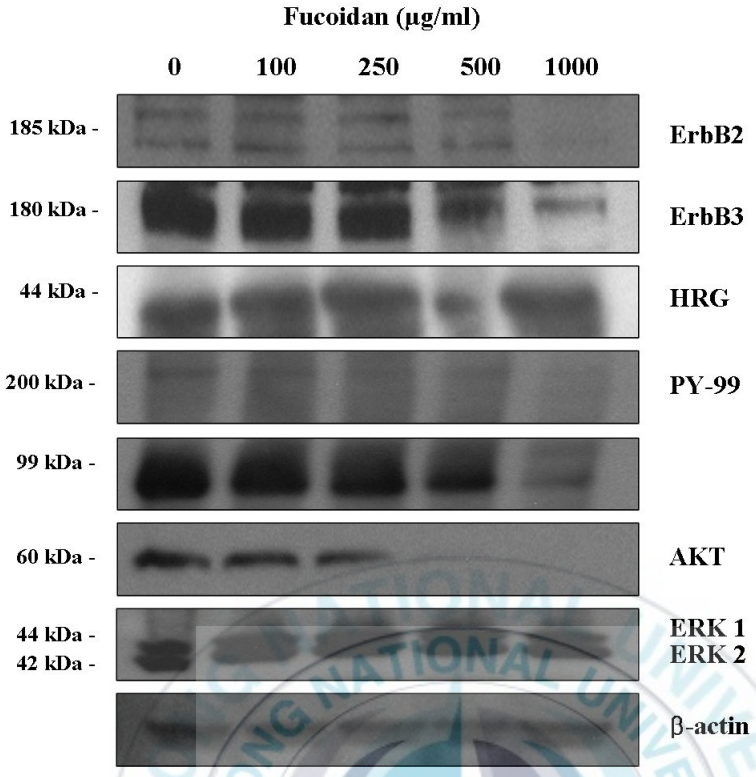


Fig. 28. Effects of fucoidan treatment on the levels of ErbB2, ErbB3, HRG, phospho-tyrosine, Akt and ERK 1/2 protein in HT-29 cells.

HT-29 cells were incubated with fucoidan (0~1000 μg/ml) for 48 hr. Equal amounts of cell lysates were subjected to electrophoresis and analyzed by Western blot for ErbB2, ErbB3, HRG, phospho-tyrosine, Akt, and ERK 1/2. β-actin was used as an internal control.

4) ErbB3 신호 전달 분석

Fig. 28에서 HT-29 대장암 세포에서 후코이단에 의해 ErbB2와 ErbB3의 단백질 수준이 감소하는 것으로 나타났으므로, HRG으로 유도된 HT-29 대장암 세포에 증식 억제가 HRG/ErbB3의 신호 전달 경로를 매개하여 일어나는지 알아보고자 하였다.

Ligand인 HRG가 ErbB3에 결합하면 intrinsic tyrosine kinase의 활성이 없는 ErbB3(Guy et al., 1994)는 orphan receptor로 알려진 ErbB2와 hetrodimer를 형성하므로써 인산화되고 활성화 되는 것으로 알려져 있다(Alroy and Yarden, 1997). 따라서, 대조군과 후코이단 처리군에서 ErbB3 단백질 수준과 tyrosine의 인산화 수준을 살펴보았다. 그 결과, 대조군에서 tyrosine의 인산화 수준은 5분에서 증가하여 60분까지 동일하게 지속되었으나, 후코이단 처리군의 경우 tyrosine의 인산화 수준이 거의 발현되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 29). 또한, ErbB3의 단백질 발현 수준 또한, tyrsoine의 경우와 동일하게 대조군에서는 발현이 되었으나, 후코이단 처리군에서는 거의 발현되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 29).

ErbB3의 활성화는 세포의 증식과 생존의 조절 인자로 작용하는 PI3K의 활성화를 가져오는 데 이 과정은 PI3K의 regulatory subunit인 p85와 ErbB3의 결합을 필요로 한다. 활성화된 p85는 PI3-kinase의 실질적인 활성을 나타내는 p110 catalytic subunit을 통하여 inositol ring의 3번째 탄소의 인산화를 유도하고 이는 AKT의 활성을 촉진시키게 된다. 본 실험에서 AKT 단백질 수준은 후코이단 처리에 관계없이 영향을 미치지 않았으나, AKT의 인산화 수준은 후코이단 처리군에서 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 30).

또한 ErbB3의 활성화는 Ras-MAPK signaling 경로를 활성화 할 수 있으며(Yarden, 2001), 일련의 과정을 거쳐 활성화된 ERK1/2는 세포 증식에 영향을 미치게 되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 ERK 1/2 단백질 수준은 두 군 모두에서 아무런 영향을 미치지 않았으나 ERK 1/2의 인산화 단백질 수

준은 후코이단 처리군에서 ERK 1의 감소가 나타났는데, 이에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 보인다(Fig. 30).

따라서, 본 연구에서 후코이단에 의한 세포 증식 억제는 ErbB2의 절대적인 감소 때문에 ErbB3의 ligand인 HRG를 첨가했을 때 ErbB3의 활성을 회복시킬 수 없었고, tyrosine의 인산화 수준과 세포 내의 AKT와 ERK 1/2의 인산화 수준의 감소로 인한 것으로 나타났다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

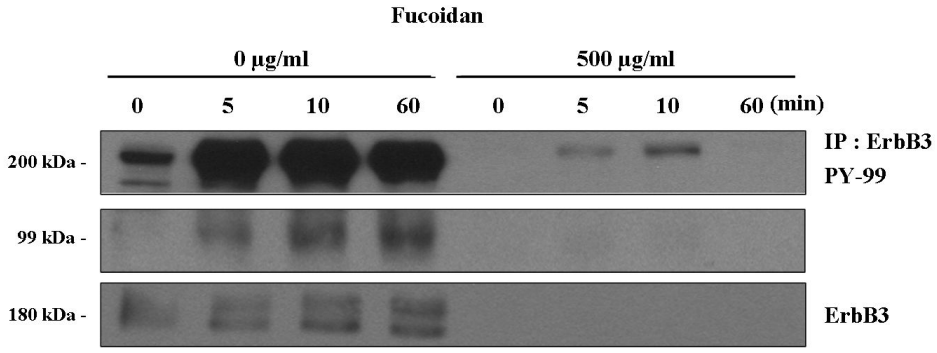


Fig. 29. Effect of fucoidan on HRG-induced phospho-tyrosine and ErbB3 of ErbB3 in HT-29 cells.

HT-29 cells were incubated with fucoidan (500 μg/ml) for 48 hr. HRG (100 ng/ml) was added for 0~60 min immediately prior to lysate preparations. Cell lysates (750 μg protein) were incubated anti-ErbB3 antibody and Protein A-Sepharose to immunoprecipitate proteins associated with HRG. The resulting proteins were analyzed by Western blot for phospho-tyrosine, ErbB3.

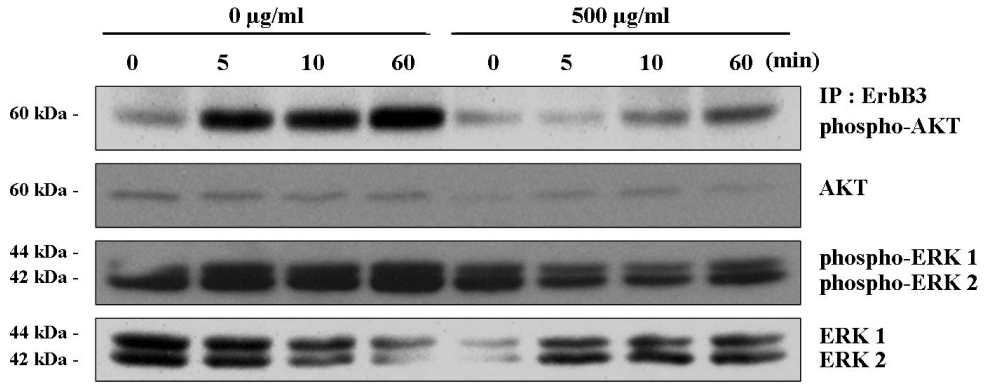


Fig. 30. Effect of fucoidan on HRG-induced phospho-AKT, AKT, phospho-ERK 1/2 and ERK 1/2 of ErbB3 in HT-29 cells.

HT-29 cells were incubated with fucoidan (500 μg/ml) for 48 hr. HRG (100 ng/ml) was added for 0~60 min immediately prior to lysate preparations. Cell lysates (750 μg protein) were incubated anti-ErbB3 antibody and Protein A-Sepharose to immunoprecipitate proteins associated with HRG. The resulting proteins were analyzed by Western blot for phospho-AKT, AKT, phospho-ERK 1/2, and ERK 1/2.

Ⅳ. 결론 및 요약

후코이단의 암세포 사멸 유도 메카니즘을 검토하기 위해 인체 대장암 세포주인 HT-29 세포에서 살펴본 결과는 다음과 같다.

1. HT-29 대장암 세포의 후코이단에 의한 증식 억제

HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, 독성에 의한 영향 없이 농도 의존적으로 세포 증식이 감소하였고, DNA 합성율이 매우 억제되는 것으로 나타났는데, 정상 세포인 MC3T3-E1 세포에 증식에는 영향을 미치지 않았다. 또한, 세포의 형태학적 변화와 핵의 형태학적 변화를 통해 세포 증식이 억제되는 것을 확인하였으며, Annexin V-FITC 분석을 통해 apoptosis에 의해 세포 사멸이 유도되는 것을 확인하였다.

2. 후코이단에 의한 신호 전달 기전 억제

HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, Fas 단백질의 증가, pro-capase-8 단백질 수준 감소로 Extrinsic pathway와 pro-caspase-9, -7, -3 단백질 수준의 감소로 Intrinsic pathway에 부분적으로 관여하여 세포 사멸을 유도하는 것으로 나타났다. 또한, Bcl-2 family 중 anti-apoptotic factor인 Bcl-2와 Bcl-xL 단백질 수준이 감소, pro-apoptotic factor인 Bax와 tBid 단백질 발현 수준이 증가로 인해, 최종적으로 cleaved-PARP 단백질 발현 수준이 증가하여 세포 사멸을 유도하는 것으로 나타났다.

3. 후코이단에 의한 translocation 신호 전달 기전 억제

HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, Bax 단백질 발현 수준은 세포질과 미토콘드리아에서 농도 의존적으로 감소하였으며, cytochrome *c* 단백질 발현 수준은 세포질과 미토콘드리아에서 농도 의존적으로 증가하는 것으로

나타나 세포 사멸에 영향을 미치는 translocation 단백질 신호 전달 경로에 관여하여 세포 사멸을 유도하는 것으로 나타났다.

4. 후코이단에 의한 세포 주기 억제

HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, FACS 분석을 통해 sub G1기를 증가시켰으며, phospho-RB 단백질과 E2F 단백질이 복합체를 이루어 phospho-RB의 인산화 저해로 인해 G1기를 저해하여 전사를 억제하는 것으로 나타났다. 그리고 β-catenin 단백질 발현 수준의 감소로 세포 유착을 억제하여 세포 증식을 저해하는 것으로 나타났다.

5. 후코이단에 의한 NF-κB 신호 전달 기전 억제

HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, 세포질에서 IKKα, phsopho-IκBα, IκBα의 단백질 발현 수준을 억제하였으며, 세포질에서 핵으로의 NF-κB 이동을 억제하여, NF-κB와 DNA 결합을 억제하여 세포 사멸을 유도하는 것으로 나타났다. 또한, p38과 JNK의 인산화 단백질 수준의 감소와 iNOS와 COX-2 단백질 발현 수준의 감소로 최종적으로 NF-κB 활성을 억제하여 세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다.

6. 세포 성장 인자에 미치는 영향

대장암 세포에서 IGF-I은 autocrine mechanisms에 의해 증식을 조절하고 있다. HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, IGF-IR, phospho-tyrosine, IRS-1, AKT, ERK 1의 단백질 발현 수준이 감소되었으며, IGF-IR으로 IP하여 IGF-IR 신호 전달 기전을 살펴본 결과, IGF-IR과 phospho-tyrosine의 단백질 발현 수준이 감소되었으나 phospho-AKT와 phospho-ERK 2 단백질 발현 수준은 증가하여 IGF-IR 신호 전달 기전에 의해 세포 증식이 억제되었다. HT-29 대장암 세포에 후코이단을 처리하였을 때, ErbB3, phospho-tyrosine, AKT 단백질 발현 수준이 감소되었으며, ErbB3로 IP하여 ErbB3 신호 전달 기전 살펴본 결

과, ErbB3, phospho-tyrosine, phospho-ERK 1의 단백질 발현 수준이 감소되었으나 phospho-AKT의 단백질 발현 수준은 증가하여 ErbB 신호 전달 기전에 의해서도 세포 증식을 억제하는 것으로 나타났다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

Ⅴ. 참고 문헌

Abdel-Fattah AF, Hussein MMD, Salem HM. 1974. Some structural feature of sagassan, a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*. *Carbohyd. Res.* 33, 19-24.

Adams JM, Cory S. 2001. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *TIBS* 26, 61-66.

Aisa Y, Miyakawa Y, Nakazato T, Shibata H, Saito K, Ikeda Y, Kizaki M. 2005. Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathway. *Am. J. Hematol.* 78, 7-14.

Alessi DR, Cohen P. 1998. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 55-62.

Alroy I, Yarden Y. 1997. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.* 410, 83-86.

Anderson NG, Ahmad T. 2002. ErbB receptor tyrosin kinase inhibitions as therapeutic agents. *Front Biosci.* 7, 1926-1940.

Antonsson B, Martinou JC. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256, 50-57.

Arends MJ, Morris RG, Wylli AH. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136, 593-608.

Arends MJ, Wylie AH. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32, 223-254.

Arias JI, Aller MA, Arias J. 2005. The use of inflammation by tumor cells. *Cancer* 104, 223-228.

Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Baba M, Snoeck R, Pauwels R, Clercq ED. 1988. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herps simples virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1742-1745.

Baber-Furnari BA, Rhind N, Boddy MN, Shanahan P, Lopez-Girona A, Russell P. 2000. Regulation of mototic inhibitor Mik 1 helps to enforce the DNA damage checkpoint. *Mol. Biol. Cell* 11, 1-11.

Baeuerle PA, Baichwal VR. 1997. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv. Immunol.* 65, 111-137.

Baeuerle PA, Henkel T. 1994. Fuction and activation of NF-kappaB in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141-179.

Baker SJ, Reddy EP. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17, 3261-3270.

Baldwin AS Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 649-683.

Bardon S, Foussard V, Fournel S, Loubat A. 2002. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Lett.* 181, 187-194

Barkett M, Gilmore TD. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6910-6924.

Bernardi G, Springer GF. 1962. Properties of highly purified Fucan. *J. Biol. Chem.* 273, 75-80.

Beserga R. 1995. Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* 79, 927-930.

Bishop JM. 1987. The molecular genetics of cancer. *Sciences* 235, 305-311.

Blume-Jensen P, Hunter T. 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411, 355-365.

Boesen-de Cock JG, Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. 1999. Common regulation of apoptosis signaling induced by CD95 and the DNA-damaging stimuli etoposide and gamma-radiation downstream from caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 274, 14255-14261.

Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nuñez G, Thompson CB. 1993. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

Bonizzi G, Karin M. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 5, 280-288.

Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. 1999. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am. J. Pathol.* 155, 1033-1038.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269-290.

Bunz F, Dutriaus A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Requirements for P53 and P21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1500.

Burroughs KD, Dunn SE, Barrett JC, Taylor JA. 1999. Insulin-like growth factor-I: a key regulator of human cancer risk? *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 579-581.

Butler LM, Hewett PJ, Fitridge RA, Cowled PA. 1999. Deregulation of apoptosis in colorectal carcinoma: theoretical and therapeutic implications. *Aust. N. Z. J. Surg.* 69, 88-94.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Friscj S, Reed JC. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J. 1998. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 279, 563-566.

Chang HY, Yang X. 2000 Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 821-846.

Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS. 1994. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 269, 6765-6772.

Chevolot L, Foucault A, Kervarec N, Sinquin C, Fisher AM, Boisson-Vidal C. 1999. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohyd. Res.* 319, 154-165.

Chiarugi V, Magnelli L, Basi G. 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol. Biol. Res.* 40, 603-612.

Chida K, Yamamoto I. 1987. Antitumor activity of a crude fucoidan fraction prepared from the roots of kelp (*Laminaria* species). *Kitasato Arch Exp. Med.* 60, 33-39.

Cho DM, Kim DS, Lee DS, Kim HR, Pyeun JH. 1995. Trace components and

functional saccharides in seaweed-1. Changes in proximate composition and trace elements according to the harvest season and places. *Bull. Korean Fish. Soc.* 28, 49-59.

Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull. Korean Fish. Soc.* 23, 345-352.

Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Lee JS, Ryu JH, Chung YS. 1999a. Effects of sea tangle (*Lamninaria japonica*) and fucoidan components on chronic degenerative diseases. *Kor. J. Life Sci.* 9, 430-438.

Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Lee JS, Ryu JH, Chung YS. 1999b. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) and fucoidan components on anti-aging action. *Kor. J. Life Sci.* 9, 439-452.

Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Lee JS, Ryu JH, Chung YS. 1999c. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) and fucoidan components on socippsychological stress. *Kor. J. Life Sci.* 9, 537-547.

Choi YH, Bae JH, Yoo MA, Chung HY, Kim ND, Kim KW. 2000. Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* 17, 565-571.

Choi YH, Im EO, Suh H, Jin Y, Yoo YH, Kim ND. 2003. Apoptosis and modulation of cell cycle control by synthetic derivatives of unsodeoxycholic and chenodeoxydholic acid in human prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 199, 157-167.

Choi YH, Im EO, Suh HS, Jin YE, Lee WH, Yoo YH, Kim KW, Kim ND. 2001. Apoptotic acitivity of novel bile acid derivatives in human leukemic T cells through the activation of caspases. *Int. J. Oncol.* 18, 979-984.

Church FC. Meade JB, Treanor RE, Whinna HC. 1989. Antithrombin activity of fucoidan. The interaction of fucoidan with heparin cofactor Ⅱ, antithrombin Ⅲ, and thrombin. *J. Biol. Chem.* 264, 3618-3623.

Ciardiello F, Kim N, Saeki T, Dono R, Persico MG, Plowman GD, Garrigues J, Radke S, Todaro GJ, Salomon DS. 1991. Differential experimental expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectral tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7792-7796.

Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16.

Coleman JW. 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* 1, 1397-1406.

Cooper R, Dragar C, Elliot K, Fitton JH, Godwin J, Thompson K. 2002. GFS, a preparation of Tasmanian *Undaria pinnatifida* is associated with healing and inhibition of reactivation of Herpes. BMC Complement. *Altern. Med.* 2, 11-17.

Cory S, Huang DC, Adams JM. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.

Cullen KJ, Yee D, Rosen N. 1991. Insulin like growth factors in human malignancy. *Cancer Invest.* 9, 443-454.

Czech MP. 1989. Signal transmission by the insulin like growth factors. *Cell* 59, 235-238.

Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I, Shtutman M, Leal JF, Zhurinsky J, Geiger B, Oren M. 1999. Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO J.* 18, 3054-3063.

Dan S, Yamori T. 2001. Repression of cyclin B1 expression after treatment with adriamycin, but not cisplatin in human lung cancer A549 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 861-867.

Datta SR, Brunet A, Greenberg M. 1999. Cellular survival: a play in a three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905-2927.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. 1997. Akt phosphoylation of BAD couples survival signals to the cell in trinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

Debatin KM. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 153-159.

Debruyne P, Vermeulen S, Mareel M. 1999. The role of the E-cadherin/catnin complex in gastrointestinal cancer. *Acta. Gastroenterol. Belg.* 62, 393-402.

Deng Y, Wu X. 2000. Peg3/Pw1 promotes p53-mediated apoptosis by inducing Bax translocation from cytosol to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 12050-12055.

Dobashi K, Nishino T, Fujihara M, Nagumo T. 1989. Isolation and preliminary characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides with blood-anticoagulant activity from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr. Res.* 194, 315-320.

Doll R. 1992. The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res.* 52, 2024S-2029S.

Drexler HC. 1997. Activation of the cell death program by inhibition of

proteasome function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 855-860.

Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes. Dev.* 12, 2245-2262.

Earnshaw WC. 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 337-343.

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. 1994. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 107, 1183-1188.

Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Smid CM, Prieto VG, Munsell M, Buzaid AC, Grimm EA. 2000. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clin. Cancer Res.* 6, 4768-4775.

Elledge SJ, Harper JW. 1994. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 847-852.

Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495-516.

Emanuele S, D'Anneo A, Bellavia G, Vassallo B, Lauricella M, De Blasio A, Vento R, Tesoriere G. 2004. Sodium butyrate induces apoptosis in human hepatoma cells by a mitochondria/caspase pathway, associated with degradation of beta-catenin, pRb and Bcl-XL. *Eur. J. Cancer* 40, 1441-1452.

Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. 1996. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380, 723-726.

Evans VG. 1993. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Int.* 17, 461-476.

Farrow SN, Brown R. 1996. New members of the bcl-2 family and their protein partners. *Curr. Opin. Benet. Dev.* 6, 45-49.

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88, 435-437.

Frankfurt OS, Krishan A. 2003. Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells. *Anticancer Drugs* 14, 555-561.

Fujihara M, Nagumo T. 1993. An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity. *Carbohydr. Res.* 243, 211-216.

Fulda S, Meyer E, Friesen C, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM. 2001. Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in

drug-induced apoptosis. *Oncogene* 20, 1063-1075.

Funahashi H, Imai T, Mase T. 2001. Seaweed prevents breast cancer? *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 483-487.

Ganster RW, Taylor BS, Shao L, Geller DA. 2001. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8638-8643.

Ghosh S, Karin M. 2002. Missing pieces in the NF-κappaB puzzle. *Cell* 109, S81-S96.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225-260.

Gilmore TD, Koedood M, Piffat KA, White DW. 1996. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* 13, 1367-1378.

Green DR. 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102, 1-4.

Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Grimm S, Bauer MK, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K. 1996. Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J. Cell Biol.* 134, 13-23.

Grutter MG. 2000. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 649-655.

Guo Y, Narayan S, Yallampalli C, Singh P. 1992. Characterization of insulin like growth factor I receptors in human colon cancer. *Gastroenterology* 102, 1101-1108.

Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL. 1994. Insect cell-expressed p180 erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8132-8136.

Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. 1999. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11, 184-189.

Haertel-Wiesmann M, Liang Y, Fantl WJ, Williams LT. 2000. Regulation of cyclooxygenase-2 and periostin by Wnt-3 in mouse mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 32046-32051.

Haimovitz-Friedman A. 1998. Radiation-induced signal transduction and stress response. *Radiat. Res.* 150, S102-S108.

Hajime O, Yasushi S, Kanko Y, Isamu U, Koichi K. 1994. Possible antitumor

promoting properties of marine algae and *in vivo* activity of Wakame seaweed extract. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 994-999.

Hall M, Peters G. 1996. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and CDK inhibitors in human cancer. *Adv. Cancer Res.* 68, 67-108.

Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA. 1998. Circulating concentration of insulin-like growth factor I and risk of breast cancer. *Lancet* 351, 1393-1396.

Hannun AY. 1997. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 89, 1845-1853.

Hao XP, Pretlow TG, Rao JS, Pretlow TP. 2001. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is expressed similarly in multiple aberrant crypt foci and colorectal tumors from the same patients. *Cancer Res.* 61, 419-422.

Hardwick JC, van den Brink GR, Offerhaus GJ, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. 2001. NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps. *Oncogene* 20, 819-827.

Haroun-Bouhedja F, Ellouali M, Sinquin C, Boisson-Vidal C. 2000. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thromb. Res.* 100, 453-459.

Hartwell L, Weiner T. 1989. Checkpoint : controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.

Heichman KA, Roberts JM. 1994. Rules to replicate by. *Cell* 79, 557-562.

Hengartner MO. 2000. The biochemisty of apoptosis. *Nature* 407, 770-777.

Herschman HR. 1996. Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta.* 1299, 125-140.

Herter P, Kuhnen C, Müller KM, Wittinghofer A, Müller O. 1999. Intracellular distribution of beta-catenin in colorectal adenomas, carcinomas and Peutz-Jeghers polyps. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125, 297-304.

Hinz B, Brune K, Pahl A. 2000. Nitric oxide inhibits inducible nitric oxide synthase mRNA expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 353-357.

Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 191-220.

Hosomi Y, Yokose T, Hirose Y, Nakajima R, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A. 2000. Increased cyclooxygenase 2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 30,

73-81.

Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3668-3672.

Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. 1998. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res.* 58, 1208-1216.

Huerta S, Goulet EJ, Livingston EH. 2006. Colon cancer and apoptosis. *Am. J. Surg.* 191, 517-526.

Hugh TJ, Dillon SA, O'Dowd G, Getty B, Pignatelli M, Poston GJ, Kinsella AR. 1999. beta-catenin expression in primary and metastatic colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer.* 82, 504-511.

Itoh H, Noda H, Amano H. Zhuaug C, Mizuno T, Ito H. 1993. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae. *Anticancer Res.* 13, 2045-2052.

Jemal A, Murray T, Ward E. Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. 2005. Cancer statistics, 2005. *CA. Cancer J. Clin.* 55, 10-30.

Jiang K, Coppola D, Crespo NC, Nicosia SV, Hamilton AD, Sebti SM, Cheng JQ. 2000. The phosphoinositide 3-OH kinase/AKT2 pathway as a critical target for farnesyltransferase inhibitor-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 20, 139-148.

Jin Z, El-Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 4, 139-163.

John FRK, Clay MW, Brian VH. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.

Johnson DG, Walker CL. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 295-312.

Johnson JP. 1999. Cell adhension molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 18, 347-357.

Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. 1993. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J. Biol. Chem.* 268, 9049-9054.

Jones JL, Clemmons DR. 1995. Insulin-like growth factor and their binding proteins: biological actions. *Endocrins. Rev.* 16, 3-34.

Joo YE, Rew JS, Seo YH, Choi SK, Kim YJ, Park CS, Kim SJ. 2003. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J. Clin. Gastroenterol.* 37, 28-33.

Kanno S, Shouji A, Hirata R, Asou K, Ishikawa M. 2004. Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *Life Sci.* 75, 353-365.

Karin M, Ben-Neriah Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 621-663.

Karin M, Greten FR. 2005. NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 749-759.

Karin M. 1999. How NF-κB is activated: the role of the IκB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18, 6867-6874.

Kato H, Faria TN, Stannard B, Roberts CT, Jr LeRoith D. 1993. Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J. Biol. Chem.* 268, 2655-2661.

Kauffmann SH, Hengartner MO. 2001. Programmed cel death: alive and well in the new millunnium. *Trends Cell Biol.* 11, 526-534.

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985.

Kemler R. 1993. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 9, 317-321.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.

Kim EJ, Lee YJ, Shin HK, Park JHY. 2005. Induction of apoptosis by the aqueous extract of *Rubus coreanum* in HT-29 human colon cancer cells. *Nutrition* 21, 1141-1148.

Kim EJ, Lee YJ, Shin HK, Park JHY. 2006. A study on the mechanism by the aqueous extract of *Inonotus obliquus* induces apoptosis and inhibits proliferation in HT-29 human colon cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*

35, 516-523.

Kim EJ, Park SY, Shin HK, Kwon DY, Surh YJ, Park JHY. 2007. Activation of caspase-8 contributes to 3,3′-diindolymethane-induced apoptosis in colon cancer cells. *J. Nutr.* 137, 31-36.

Kim EJ, Park YP, Hong JE, Shin MJ, Lim SS, Shin HK, Park JHY. 2007. Inhibitory effect of the methanolic extract of *Symphyocladia latiuscula* on the growth of HT-29 human colon cancer cells. *J. Korean Soc. Sci. Nutr.* 36, 431-438.

Kim HS, Kim GJ. 1998. Effect of the feeding *Hijikia fusiforme* (Harver) Okamura on lipid composition of serum in dietary hyperlipidemic rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 27, 718-723.

Kim IS, Kim SB, Park YH. 1994. Desmutagenic of seaweed and vegetable extracts aginst mutagenicity of Maillard reacting products. *Bull. Korean Fish. Soc.* 27, 139-141.

Kim KI, Seo HD, Lee HS, Jo HY, Yang HC. 1998. Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts of *Hizikia fusiforme*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 27, 1204-1210.

Kim SH, Park HY, Park WK. 1998. Determination and physical properties of dietary fiber in seaweed products. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 17, 320-325.

Kim YH, Lee SS. 1995. The effect of diet containing different fiber sources on the serum lipid level and bowel function in rats. *Korean J. Nutr.* 28, 825-833.

Kim YI, Mason JB. 1996. Nutrition chemoprevention of gastrointestinal cancers: A critical review. *Nutr. Rev.* 54, 259-279.

Kim YI. 2002. Nutrition and Cancer. In: Bowman BA, Russell RM, eds. Present knowledge in nutrition, 8th ed., ILSI Press. Washington DC.

Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR. 1997. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J. Biol. Chem.* 272, 1402-1411.

Kleinert H, Wallerath T, Fritz G, Ihrig-Biedert I, Rodriguez-Pascual F, Geller DA, Förstermann U. 1998. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. *Br. J. Pharmacol.* 125, 193-201.

Kohler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. 2002. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J. Immunol. Methods* 265, 97-110.

Koo JG, Choi YS, Kwak JK. 2001. Blood-anticoagulant acitivy of fucoidans from

sporophylls of *Undaria pinnatifida, Laminaria religiosa, Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* in Korea. *J. Korean Fish. Soc.* 34, 515-520.

Kopp EB, Ghosh S. 1995. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.* 58, 1-27.

Korsmeyer SJ. 1995. Regulators of cell death. *Trends Genet.* 11, 101-105.

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.

Koyanagi S, Tanigawa N, Hakagawa H, Soeda S, Hhimeno H. 2003. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem. Pharmacol.* 65, 173-179.

Kristof AS, Marks-Konczalik J, Moss J. 2001. Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. *J. Biol. Chem.* 276, 8445-8452.

Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 113, 147-156.

Kuchino Y, Kitanaka C. 1996. Apoptosis in cancer. *Hum. Cell* 9, 223-228.

Kuprash DV, Udalova IA, Turetskaya RL, Rice NR, Nedospasov SA. 1995. Conserved kappa B element located downstream of the tumor necrosis factor alpha gene: distinct NF-kappa B binding pattern and enhancer activity in LPS activated murine macrophages. *Oncogene* 11, 97-106.

Kwon DJ, Lim ST, Chung YJ, Park SH, Kweon DK. 2006. Comprehension and practical use of fucoidan extracted from brown sea weeds. *Food Science and Industry.* 39, 73-80.

Lahaye M. 1991. Marine algae as sources of fibers: Determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 54, 587-594.

Lahusen T, De Siervi A, Kunick C, Senderowicz AM. 2003. Alsterpaullone, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, induces apoptosis by activation of caspase-9 due to perturbation in mitochondrial membrane potential. *Mol. Carcinog.* 36, 183-194.

Lambert S, Vivario J, Bonviver J, Gol-Winkler R. 1990. Abnormal expression and structural modification of the insulin-like growth-factor-II gene in human colorectal tumors. *Int. J. Cancer.* 46, 405-410.

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. 1994. Cleavage of poly ADP-ribose polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347.

LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML. 1993. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am. J. Pathol.* 142, 743-753.

Lee HS, Choi MS, Lee YK, Park SH, Kim YJ. 1996. A study on the development of high-fiber supplements for the diabetic patients - Effect of seaweed supplementation on the lipid and glucose metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J. Nutr.* 29, 296-306.

Lee JH, Sung VJ. 1980. The content of minerals in algea. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 9, 51-58.

LeRoith D, Parrizas M, Blaksley VA. 1997. The insulin-like growth factor-I receptor and apoptosis. Implications for the aging progress. *Endocrine* 7, 103-105.

LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. 1995. Molecular and cellular aspects of the IGF-IR. *Endocr. Rev.* 16, 143-153.

Li N, Zhang Q, Song J. 2005. Toxicological evaluation of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* in wister rats. *Food Chem. Toxicol.* 43, 421-426.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

Li Q, Withoff S, Verma IM. 2005. Inflammation-associated cancer: NF-κB is the lynchpin. *Trends Immunol.* 26, 318-325.

Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC. 2000. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4262-4266.

Lin WN, Luo SF, Lee CW, Wang CC, Wang JS, Yang CM. 2007. Involvement of MAPKs and NF-κB in human tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal.* 19, 1258-1267.

Lin X, Cai YJ, Li ZX, Liu ZL, Yin SF, Zho JC. 2001. Cladonia furcata polysaccharide induced apoptosis in human leukemia K562 cells. *Acta. Pharmacol. Sin.* 22, 716-720.

Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, Moldawer LL, Copeland EM 3rd, Mackay S. 2001. Nuclear factor-kappa B is upregulated

in colorectal cancer. *Surgery* 130, 363-369.

Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ. 1993. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 9730-9734.

Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN. 1996. bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum. Pathol.* 27, 102-110.

Lührs H, Kudlich T, Neumann M, Schauber J, Melcher R, Gostner A, Scheppach W, Menzel TP. 2002. Butyrate-enhanced TNFalpha-induced apoptosis is associated with inhibition of NF-kappaB. *Anticancer Res.* 22, 1561-1568.

Luo X, Budiharjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Iwamura M, Sluss PM, Casamento JB, Cockett AT. 1993. Insulin-like growth factor I: action and receptor characterization in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 22, 243-252.

Macauley M. 1992. Insulin-like growth factors and cancer. *Br. J. Cancer* 65, 311-320.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323-350.

Maity A, Mckenna WG, Muschel RJ. 1995. Evidence for post-transcriptional regulation of cyclin B1 mRNA in the cell cycle and following irradiation in HeLa cells. *EMBO. J.* 14, 604-609.

Makarov SS. 2000. NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. *Mol. Med. Today.* 6, 441-448.

Mandrika I, Muceniece R, Wikberg JE. 2001. Effects of melanocortin peptides on lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced NF-kappaB DNA binding and nitric oxide production in macrophage-like RAW 264.7 cells: evidence for dual mechanisms of action. *Biochem. Pharmacol.* 61, 613-621.

Marina HM, David KM, David RE, Rebekka D, Albert JW. 1997. Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Por. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12419-12424.

Matsumoto G, Namekawa J, Muta M, Nakamura T, Bando H, Tohyama K. Toi

M, Umezawa K. 2005. Targeting of NF-κB pathways by DHMEQ, a novel inhibitor of breast carcinomas: anti-tumor and anti-angiogenic activity *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* 11, 1287-1293.

Maurer CA, Friess H, Kretschmann B, Zimmermann A, Stauffer A, Baer HU, Korc M, Buchler MW. 1998. Increased expression of erbB3 in colorectral cancer is associated with concomitant increase in the level of erbB2. *Hum. Pathol.* 29, 771-777.

Mayo MW, Baldwin AS. 2000. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 470, M55-M62.

McClure MO, Moore JP, Blanc DF, Scotting P, Cook GM, Keynes RJ, Webber JN, Davies D, Weiss RA. 1992. Investigation into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV-infection in vitro. AIDS. *Res. Hum. Retrovir.* 8, 19-26.

Menon SG, Sausour EH, Spitz DR, Higashikubo R, Sturm M, Zang H, Goswami PC. 2003. Redox regulation of the G1 to S phase transition in mouse embryo fibroblast cell cycle. *Cancer Res.* 63, 2109-2117.

Mesner P, Budihardjo I, Kaumann SH. 1997. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv. Pharmacol.* 41, 461-499.

Miyashita T, Reed JC. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.

Moon BK. 2002. Anesthesiology and apoptosis. *Korean J. Anesthesiol.* 42, 563-574.

Morgan DO. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 216-291.

Mori H, Kamei H, Nishide H, Nisizawa K. 1982. Sugar constituents of some sulfated polysaccharides from the sporophylls of wekkame (*Undaria pinnatifida*) and their biological activities. Proc. 10th Intern. Seaweed Symp. 10, 109-121.

Murphy KM, Streips UN, Lock RB. 2000. Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N terminus and Bax mitochondrial translocation. *J. Biol. Chem.* 275, 17225-17228.

Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM. 1997. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J. Biol. Chem.* 272, 2952-2956.

Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.

Nakshatri H, Rice SE, Bhat-Nakshatri P. 2004. Antitumor agent parthenolide

reverses resistance of breast cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through sustained activation of c-Jun N-terminal kinase. *Oncogene* 23, 7330-7344.

Nathan C, Xie QW. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 269, 13725-13728.

Nichoson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43.

Nijhawan FP, Budihardjo D, Srinivasula I, Ahmad SM, Alnemri M, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

Ning S, Knox SJ. 1999. G2/M-phase arrest and death by apoptosis of HL60 cells irradiated with exponentially decreasing low-dose-rate gamma radiation. *Radiat. Res.* 151, 659-669.

Nishide E, Kinoshita Y, Anzai H, Uchida N. 1988. Distribution of hot-water extractable material, water-soluble alginate and alkali-soluble alginate in different parts of *Undaria pinnatifida*. *Nippon Susian Gakkaishi.* 54, 1619-1622.

Nishino T, Nagumo T. 1987. Sugar constituents and blood-anticoagulant activities of fucose-containing sulfated polysaccharides in nine brown seaweed species. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* 61, 361-363.

Nishino T, Nagumo T. 1992. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucan. *Carbohydr. Res.* 229, 355-362.

Nojima H. 2004. G1 and S-phase checkpoint, chromosome instability, and cancer. *Methods Mol. Biol.* 280, 3-49.

Nurse P. 1994. Ordering of S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79, 547-550.

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.

Oh SY, Lee JH, Kim HJ. 2004. Analyses on the factors associated with dietary behavior regarding colon cancer risk. *Kor. Nutr. Soc.* 37, 202-209.

Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM. 1998. Importeance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J. Biol. Chem.* 273,

33533-33539.

Ono K, Han J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* 12, 1-13.

Ooi VE, Liu F. 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexs. *Curr. Med. Chem.* 7, 715-729.

Orlowski RZ, Baldwin AS Jr. 2002. NF-κB as a therapeutic target in cancer. *Trends. Mol. Med.* 8, 385-389.

Pahl HL. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.

Pan MH, Chen WJ, Lin-Shiau SY, HO CT, Lin JK. 2002. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating CDK inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 23, 1677-1684.

Pan MH, Lin-Shiau SY, Lin JK. 2000. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1665-1676.

Park HS, Lee YS, Koo SJ, Han MJ, Choue RW, Oh SY. 2003. Diet and health. 2nd ed. Hyoil, Seoul

Park JC, Jang YI, Doo MD, Kim SH, Choi JW. 1996. Effect of methanolic extract of *Pachymeniopsis elliptica* on lipids component of hyperlipidemic rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 25, 958-962.

Park, YC, Jeong JH, Park, KJ, Choi HJ, Park YM, Jeong BK, Yoshihiro Higuchi, Yoo YH. 2005. Sulindac activates nuclear translocation of AIF, DFF40 and endonuclease G but not induces oligonucleosomal DNA fragmentation in HT-29 cells. *Life Sci.* 77, 2059-2070.

Patankar S, Oehniger S, Barnett T, Williams RL, Clark GF. 1993. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological acitivities. *J. Biol. Chem.* 268, 21770-21776.

Paulovich AG, Toczyski DP. Hartwell LH. 1997. When checkpoints fail. *Cell* 88, 315-321.

Payne CM, Crowley C, Washo-Stultz D, Briehl M, Bernstein H, Bernstein C, Beard S, Holubec H, Warneke J. 1998. The stress-response proteins poly(ADP-ribose) polymerase and NF-kappaB protect against bile salt-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 5, 623-636.

Pereira MS, Mulloy B, Mourao PAS. 1999. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. *J. Biol. Chem.* 274, 7656-7667.

Pietenpol JA, Stewart ZA. 2002. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182, 475-481.

Polverino AJ, Patterson SD. 1997. Selective activation of caspases during apoptotic induction in HL-60 cells. Effects Of a tetrapeptide inhibitor. *J. Biol. Chem.* 272, 7013-7021.

Ponce NMA, Pujol CA, Damonte EB, Flores ML, Stortz CA. 2003. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr. Res.* 338, 153-165.

Potter JD, Slatterly ML, Bostick RM. Gapstur SM. 1993. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epideminol. Rev.* 15, 499-545.

Preeprame S, Hayashi K, Lee JB, Sankawa U, Hayashi T. 2001. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 484-485.

Qiao D, Chen W, Stratagoules ED, Martinez JD. 2000. Bile acid-induced activation of activator protein-1 requires both extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 15090-15098.

Quanbin Z, Zhien L, Zuhong X, Xizhen N, Hong Z. 2003. Effects of fucoidan on chronic renal failure in rats. *Planta. Med.* 69, 537-541.

Que FG, Gores GJ. 1996. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology* 110, 1238-1243.

Rajnakova A, Moochhala S, Goh PM, Ngoi S. 2001. Expression of nitric oxide synthase, cyclooxygenase, and p53 in different stages of human gastric cancer. *Cancer Lett.* 172, 177-185.

Raleigh JM, O'Connell MJ. 2000. The G2 DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc 25. *J. Cell. Sci.* 113, 1727-1736.

Reed JC. 1998. Dysregulation of apoptosis in cancer. *Cancer J. Sci. Am.* 4 (Suppl) S8-S14.

Rimm DL, Caca K, Hu G, Harrison FB, Fearon ER. 1999. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am. J. Pathol.* 154, 325-329.

Rordorf-Nikolic T, Van Horn DJ, Chen D, White MF, Backer JM. 1995. Regulation of phosphatidylinositol 3′-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa

regulatory subunits. *J. Biol. Chem.* 270, 3662-3666.

Rosenfeld RG, Lamson G, Pham H, Conover C, De Leon DD, Domovan SM, Ocrant I, Giugice L. 1990. Insulin-like growth factor binding proteins. *Rec. Prog. Horm. Res.* 46, 99-163.

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Müller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. 1993. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262, 1731-1734.

Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K. 2004. Colon cancer: genomics and apoptotic evnets. *Biol. Chem.* 385, 449-464.

Safran H, Steinhoff M, Mangray S, Rathore R, King TC, Chai L, Berzein K, Moore T, Iannitti D, Reiss P, Pasquariello T, Akerman P, Quirk D, Mass R, Goldstein L, Tantravahi U. 2001. Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am. J. Clin. Oncol.* 24, 496-499.

Sakahira H, Enari M, Nagata S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.

Salomon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF. 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 19, 183-232

Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. 1995. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 55, 3785-3789.

Sarraf CE, Bowen ID. 1988. Proportions of mitotic and apoptotic cells in a range of untreated experimental tumors. *Cell Tissue Kinet* 21, 45-49.

Satoh MS, Lindahi T. 1992. Rol of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 356, 356-358.

Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME. 1999. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J. Biol. Chem.* 274, 22532-22538.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. 1998. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 58, 362-366.

Sheng H, Shao J, Williams CS, Pereira MA, Taketo MM, Oshima M, Reynolds

AB, Washington MK, DuBois RN, Beauchamp RD. 1998. Nuclear translocation of beta-catenin in hereditary and carcinogen-induced intestinal adenomas. *Carcinogenesis* 19, 543-549.

Sheng H, Williams CS, Shao J, Liang P, DuBois RN, Beauchamp RD. 1998. Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 22120-22127.

Sherr CJ. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.

Sherr CJ, McCormic F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483-487.

Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5522-5527.

Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. 2000. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 1, 469-474.

Singh P, Rubin N. 1993. Insulin-like growth factors and binding proteins in colon cancer. *Gastroenterology* 105, 1218-1237.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 1999. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 1067-1074.

Spiller GA, Amen RJ. 1975. Dietary fiber in human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7, 39-66.

Spink J, Cohen J, Evans TJ. 1995. The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by nuclear factor-kappa B. *J. Biol. Chem.* 270, 29541-29547.

Steinhusen U, Badock V, Bauer A, Behrens J, Wittman-Liebold B, Dorken B, Bommert K. 2000. Apoptosis-induced cleavage of β-catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J. Biol. Chem.* 275, 16345-16353.

Stephens L, Anderson K, Stokoe D. 1998. Protein kinase B kinases that mediated phophatidylinositol 3,4,5-trisphosphated dependent activation of protein kinase B. *Science* 279, 710-714.

Surh Y. 1999. Molecular mechanism of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res.* 428, 305-327.

Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemical: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation. *Mutat. Res.* 480, 243-268.

Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. 1996. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8395-8400.

Takayama T, Shiozaki H, Doki Y, Oka H, Inoue M, Yamamoto M, Tamura S, Shibamoto S, Ito F, Monden M. 1998. Aberrant expression and phosphorylation of beta-catenin in human colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 77, 605-613.

Tan TT, Coussens LM. 2007. Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 209-216.

Tatiana NZ, Nataliya MS, Irina BP, Vladimir VI, Andrey SS, Elena VS, Lyudmila AE. 1999. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds. *Carbohydr. Res.* 322, 32-39.

Teruya T, Konishi T, Uechi S, Tamaki H, Tako M. 2007. Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 41, 221-226.

Tetsu O, McCormick F. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.

Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. 1995. Yama/CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-809.

Thompsos CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Thornberry N, Lazebnik Y. 1998. Caspase: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Tian R, Zhang GY, Yan CH, Dai YR. 2000. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS Lett.* 474, 11-15.

Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H. 2001. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* 2, 222-228.

Toyoda H, Komurasaki T, Ikeda Y, Yoshimoto M, Morimotos. 1995. Molecular cloning of mouse epiregulin, a novel epidermal growth factor-related protein, expressed in the early stage of development. *FEBS Lett.* 377, 403-407.

Tricoli JV, Rall LB, Karakousis CP. 1986. Enhanced levels of insulin-like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. *Cancer Res.* 46, 6169-6179.

Tsai AC, Ellias J, Kelley J, Lin RC, Robson JRK. 1976. Influence of certain dietary fibers on serum and tissue cholesterol levels in rats. *J. Nutr.* 106, 118-123.

Tsuji K, Oshima S, Matsuzaki E, Nakamura A, Innami S, Tezuka T. 1968. Effect of polysaccharides on cholesterol metabolism (Part 1). Studies on konnyaku powder, sodium alginate and pectin. *Jpn. J. Nutr.* 26, 113-122.

Tsujii M, DuBois RN. 1995. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83, 493-501.

Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. 1998. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93, 705-716.

Tzahar E, Levkowitz G, Karunagaran D, Yi L, Peles E, Lavi S, Chang D, Liu N, Yayon A, Wen D. 1994. ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/heregulin isoforms. *J. Biol. Chem.* 269, 25226-25233.

Valentinis B, Reiss K, Baserga R. 1998. Insulin-like growth factor-I mediated survival from anoikis: role of cell aggregation and focal adhesion kinase. *J. Cell. Physiol.* 176, 648-657.

Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. 1997. Phosphoinositide 3-kinase: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* 22, 267-272.

Wadsworth TL, Koop DR. 1999. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7

macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 57 941-949.

Wajant H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635-1636.

Watanabe K, Iwata K, Tanadai Y, Nishizawa M, Yamagishi T, Yoshizawa I. 1992. Effects of soluble alginates on the excretion of cholesterol, Trp-p-1 and aflatoxin B1 in rats. *Jpn. J. Toxicaol. Environ. Health* 38, 258-262.

Watson AJ. 1995. Necrosis and apoptosis in the gastrointestinal tract. *Gut* 37, 165-167.

Wehrli P, Viard I, Bullani R, Tschopp J, French LE. 2000. Death receptors in cutaneous biology and disease. *J. Invest. Dermatol.* 115, 141-148.

Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.

Weintraub SJ, Prater CA, Dean DC. 1992. Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358, 259-261.

West WD, Slattery LM, Robinson ML. 1989. Dietary intake and colon cancer: Sex and anatomic site-specific associations. *Am. J. Epidemiol.* 130, 883-894.

Han JW, Lee BG, Kim YK, Yoon JW, Jin HK, Hong SY, Lee HY, Lee KR, Lee HW. 2001. Ergolide, sesquiterpene lactone from Inula britannica, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages through the inactivation of NF-kappaB. *Br. J. Pharmacol.* 133, 503-512.

Wijnhoven BP, Kinjens WN, Pignatelli M. 2000. E-cadeherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.* 87, 992-1005.

Wood DE, Newcomb EW. 2000. Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Exp. Cell Res.* 256, 375-382.

Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. 1994. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 4705-4708.

Xie W, Herschman HR. 1996. Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. *J. Biol. Chem.* 271, 31742-31748.

Yamamoto I, Nagumo T, Takahasi M, Fujihara M, Suzuki Y, Iizima I. 1981. Antitumor effect of seaweeds Ⅲ. Antitumor effect of an extract from *Sargassum Kjellmanianum*. *J. Exp. Med.* 51, 187-189.

Yamamoto L, Takahashi M, Tamura E, Maruyama H, More H. 1984. Antitumor activity of edible marine algae: Effect of crude fucoidan fraction prepared

freom edible brown sea weeds L-1210 leukemia. *Hydrobiologia* 116, 145-150.

Yarden Y. 2001. The EGFR family and its ligans in human cancer. signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer Suppl.* 374, S3-S8.

Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ. 1997. BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* 272, 24101-24104.

Zhang CX, Huang KX. 2005. Apoptosis induction on HL-60 cells of a novel polysaccharide from the mucus of the loach, Misgunus anguillicaudatus. *J. Ethnopharmacol.* 99, 385-390.

Zhang S, Lin ZN, Yang CF, Shi X, Ong CN, Shen HM. 2004. Suppressed NF-kappaB and sustained JNK activation contribute to the sensitization effect of parthenolide to TNF-alpha-induced apoptosis in human cancer cells. *Carcinogenesis* 25, 2191-2199.

Zhuang C, Itoh H, Mizuno T, Ito H. 1995. Antitumor active fucoidan from brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thunbergii*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 563-567.

보건복지부. 2005. 암발생통계 (1999~2001). 37-38.

통계청. 2007. 2006년 사망 및 사망원인통계결과. 15-20.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

감사의 글

1997년 부경대학교에 입학하여 오늘에 이르기까지 저의 이십대를 모두 이곳에서 보내게 되었고 이제 마지막 발걸음을 내딛게 되었습니다. 뒤돌아보니 지금 이 자리에 있기까지 많은 분들의 도움이 있었기에 올 수 있었던 것 같습니다. 이 지면을 빌어 다시 한 번 감사드립니다. 학부생부터 실험실의 인연으로 석사, 그리고 지금에 이르기까지 실험하는 사람의 마음가짐과 행동을 보여주셨으며 언제나 저의 든든한 후원자가 되어주셨던 남택정 지도교수님께 다시 한 번 감사드립니다. 학부시절부터 지금까지 세심한 검토와 가르침으로 미비한 점을 다듬어 주신 류홍수 교수님, 바쁘신데도 불구하고 저에게 관심 가져주시고 도움주셨던 변대석 교수님께도 뜨거운 감사의 마음을 전합니다. 부족한 논문을 새로운 시각으로 바라봐 주시고 격려해주시던 부산대학교 김윤진 교수님, 부족한 면을 날카롭게 지적해주시고 충고를 아끼지 않으셨던 동의대학교 최영현 교수님께도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 학문적 성숙이 있기까지 자상한 마음으로 성원을 보내주신 최진호 교수님, 최재수 교수님, 류은순 교수님, 김형락 교수님께도 진심으로 깊은 감사를 드립니다. 또, 정년퇴임 후에도 학문하는 사람의 모습을 몸소 보여주셨으며 언제나 칭찬과 격려를 아끼지 않으셨던 변재형 교수님께도 고개 숙여 감사드립니다.

학부생부터 지금에 이르기까지 3층에서 함께 지냈던 많은 선후배님들께도 감사의 마음을 전합니다. 학부생때부터 지금에 이르기까지 항상 힘이 되어주었던 지영언니, 실험하는 사람의 모습과 어떤 길을 가야하는 지 보여주셨던 권미진 선생님과 황혜정 선생님, 작은일 하나에도 따뜻한 배려와 관심을 가져주었던 화진언니와 민정이, 여전히 공부에 바쁜 예쁜 은진, 박사 진학하는 고우 히로에, 열심히 실험하는 은영씨, 석사 과정에 진학한 은순, 어느덧 노련한 영양사가 되어있는 경려, 혜정, 창은, 경은, 제2의 실험맨들인 하영, 준형, 3학년생 정욱, 회연, 연정, 2학년생 송이와 아라에게도 고마운 마음을 전합니다. 또, 박사 졸업동기인 나영이와 유정언니에게도 고마운 마음을 전합니다. 바쁘신데도 불구하고 실험에 많은 도움을 주신 동의대학교 박철 선생님께도 감사의 마음을 전합니다.

학부생부터 지금에 이르기까지 긴 시간 동안 함께 하며 충고와 격려를 아끼지 않는 내년 졸업준비로 바쁜 효영과 정필근님, 97학번 동기면서 길잡이가 되어준 생리학실의 민수, 생화학실의 민수, 미국에서 박사과정 중인 생리학실의 봉기에게도 고마운 마음을 전합니다. 고등학교 동창으로 자주 만나지 못하는 바쁜 나를 위해 언제나 든든한 힘이 되어주었던 혜경이와 인영이에게도 고마운 마음을 전합니다.

지금에 이르기 까지 공부하는 저를 기쁘게 여기셨으며 제가 하는 모든 일을 걱정하셨고 아무 말 없이 믿음으로 지켜봐주셨던 저에게는 태산 같은 존재인 아버지, 어머니께 진심으로 고개 숙여 감사드립니다. 울산에서 부산까지 누나 집을 다녀가며 아무 불평없이 언제나 도움과 웃음을 주었던 국인이와 석사 과정 중 서로 가장 힘든 시기에 누나 마음을 다독여주며 더 아파했던 정말 많이 아팠던 막내 동생, 지금은 나의 삶을 지탱해주는 애교 많았던 관태에게 이 논문을 바치며 그 빈자리를 채우고자 합니다.

지금까지 많은 분들이 도와주시지 않았다면 결코 이 학위를 마칠 수 없었을 것입니다. 학부생, 석사과정, 박사과정 동안 도움을 주셨고, 저에게 칭찬과 격려를 아끼지 않으셨던 모든 분들께 진심으로 감사드리며, 앞으로도 실험하는 사람의 마음으로 세상을 바라보며 살겠습니다. 고맙습니다.