creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

이 학 석 사 학 위 논 문

라미나린에 의한 HT-29 인간 대장암 세포 증식 억제 기전

2012년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

박 희 경

이 학 석 사 학 위 논 문

라미나린에 의한 HT-29 인간 대장암 세포 증식 억제 기전

지도교수 남 택 정

이 논문을 이학 석사 학위논문으로 제출함

2012년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명과학과

박 희 경

박희경의 이학석사 학위논문을
인준함.

2012년 2월 24일

주 심 약학박사 최 재 수 (인)

위 원 공학박사 류 홍 수 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (인)

목 차

LIST OF FIGURES ····· iii
ABBREVIATIONS ····· iv

ABSTRACT ····· v

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 4
1. 재료 ····· 4
1) 시약 및 재료 ····· 4
2. 실험방법 ····· 5
1) 세포 배양 ····· 5
2) 세포 증식율 측정 ····· 5
3) 형태학적 변화 ····· 6
4) Hoechst 33342 염색법 ····· 6
5) Caspase activity assay ····· 7
6) Western blot analysis ····· 7
① Total cell lysate 추출 ····· 7
② 세포질 및 미토콘드리아 획분 추출 ····· 8
③ 핵 획분 추출 ····· 8
④ 단백질 발현 및 분석 ····· 9
⑤ IGF-IR 신호전달 분석 ····· 9
⑥ Fas유도 세포사멸 경로와 IGF-IR 경로 연관성 ····· 10
⑦ HRG 유도 단백질 수준 및 ErbB 신호전달 분석 ····· 10
7) FACS analysis ····· 11
8) 통계학적 처리 ····· 12

Ⅲ. 결과 및 고찰 ····· 13
1. 라미나린에 의한 HT-29 대장암 증식 억제 효과 ····· 13
1) 라미나린이 HT-29 대장암 세포사멸에 미치는 영향 ····· 13
2) 세포 형태학적 변화 ····· 15
3) 핵의 형태학적 변화 ····· 17
2. 라미나린에 의한 세포사멸 신호전달분석 ····· 19
1) Extrinsic and Intrinsic pathway ····· 19
2) Bcl-2 family proteins의 신호전달분석 ····· 22
3) Cytochrome c에 의한 미토콘드리아, 세포질에서의 신호전달분석 24
4) Caspase-3, -8 activity ····· 26
3. 세포 주기에 미치는 영향 ····· 30
1) 세포 주기 분석 ····· 30
2) 세포 주기 조절 단백질 분석 ····· 33
4. 세포 성장 인자에 미치는 영향 ····· 36
1) IGF-IR 관련 단백질 분석 ····· 36
2) Fas유도 세포사멸 경로와 IGF-IR 경로와의 연관성 ····· 39
3) ErbB 관련 단백질 분석 ····· 42
4) ErbB 신호 전달 분석 ····· 45
Ⅳ. 결론 및 요약 ····· 47
Ⅴ. 참고 문헌 ····· 51

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Effects of Laminarin on the cell proliferations.
Fig. 2. Morphological changes of HT-29 cells were treatment with Laminarin.
Fig. 3. Laminarin caused by induction of apoptotic body in HT-29 cells were measured by an fluorescence microscope.
Fig. 4. Laminarin affect the expression of apoptosis realated proteins in HT-29 cells.
Fig. 5. Effect of Laminarin treatment on the expression of Bcl-2 family proteins.
Fig. 6. Effect of Laminarin treatment on the expression of increased cytochrome c and Apaf-1 from cytosol in HT-29 cells.
Fig. 7. (A) Dose dependent activation of caspase-3 by Laminarin treatment in HT-29 cells.
(B) Laminarin did not affect caspase-8 in HT-29 cell.
Fig. 8. Model for the activation of Fas mediated apoptosis by laminarin.
Fig. 9. Effect of Laminarin on cell cycle progression in HT-29 cells.
Fig. 10. Effect of laminarin treatment on the levels of cell cycle related proteins in HT-29 cells.
Fig. 11. Laminarin affects the expression of IGF-IR binding proteins in HT-29 cells.
Fig. 12. Akt, PI3K activation protect HT-29 cells from Fas-induced apoptosis.
Fig. 13. Model of Fas induced apoptosis of inhibition IGF-IR associated proteins of Akt, PI3K.
Fig. 14. Effect of laminarin on the expression of ErbB2, ErbB3, PI3K, JNK and GAPDH.
Fig. 15. Effect of laminarin on HRG-induced phospho-Akt and GAPDH.

ABBREBIATIONS

Cdks : Cyclin-dependent kinase

DISC : death-inducing signaling complex

DTT : 1,4-dithiothreitol

EDTA : trypsis-ethylendiamine tetraacetic acid

EGTA : ethylene glycol bis-(β-aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetra acetic acid

FACS : fluorescence-activated death domain

FADD : fas-associated death domain

FBS : fetal bovine serum

kDa : kilodalton

M phase : mitotic phase

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

PAGE : polyacrylamide gel electroresis

PARP : poly (ADP-ribose) polymerase

PBS : phosphate-buffered saline

PI : propidium iodide

PMSF : phenylsufonyl fluoride

R point : restriction point

RPMI 1640 : rosewell park memorial institute 1640

RT : room temperature

S phase : synthesis phase

SDS : sodium dodecyl sulfate

SFM : serum free medium

Induction of apoptosis by laminarin through the regulation of IGF-IR and ErbB signaling pathways in HT-29 human colon cells

Hee-Kyoung Park

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

Abstract

Laminarin is found in marine brown algae and has potential biological activities. Algae has been highlighted as an anticancer medicine and laminarin is a tropical seaweed traditionally used in Chinese medicine. Laminarin is used as a carbohydrate food reserve for phytoplankton. But laminarin has not been investigated for biological activity. In this study, we examined how laminarin regulates HT-29 cells and the influence of laminarin from on the Fas signaling and mitochondria pathway, IGF-IR and ErbB signaling pathway.

HT-29 cells were incubated in serum-free medium with various concentrations of Laminarin (0, 1.25, 2.5, 5 mg/ml). Using the MTS assay, we obtained laminarin induced celldeath in a dose-dependent manner and H33342 staining thought the reduction of cells was observed through a microscope. While, IEC-6 cells viability was compared with the control cells no affect of laminarin. Also, we observed through Western blotting in the Fas signaling and mitochondria pathway. In the result of western blot, we obtained laminarin activated caspase-cascade and PARP, which is a

substrate of caspase-3, -8 and proteins expression of bcl-2 family. We observed that cell cycle test assay and expression of cell cycle related proteins. This result through where arrest has occurred and there has increased sub-G1 percent and decrease in cell cycle related protein expression of Cdk2, 6 and increase p21.

Insulin-like growth factor (IGF-I) regulates the growth of colon cancer cell. The Western blotting revealed that decreased the phosphorylation of MAPK and ERK. Decreased proliferation was dependent on IGF-IR, which was localized to downregulated MAPK/ERK.

The present study also determined whether the growth inhibition effect of laminarin. Laminarin inhibited HRG - stimulated phosphorylation of ErbB2, ErbB3. Decreased proliferation was dependent on ErbB, which was localized to activated JNK.

These results have important implications for understanding the roles of cell growth pathway in colon cancer cell tumorigenesis. Therefore, laminarin could be a potential source of bio-functional food to have anticancer effect in human colon cancer.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

Ⅰ. 서 론

불규칙적인 식습관으로 인해 발병률이 높은 현대인의 고질병 중 하나인 암은 완치가 어려운 질병 중 하나이다. 따라서 이를 치료하고 예방하기 위한 많은 천연물 소재들이 연구개발 되고 있는데 그 중 하나가 해조류이다. 최근에 해조류에 포함된 생리 활성 기능 물질들의 항암효과가 밝혀지면서 각종 기능성 소재 및 약품으로써의 활용도가 증가하고 있다.

특히, 해조류에 포함된 생리 활성 물질 중 하나인 해조류의 다당류는 조체 골격을 구성하는 구조 다당류인 셀룰로즈와 세포벽과 세포 간격을 충진하는 점질 다당류가 있다. 해조류 중 갈조류는 건물기준으로 탄수화물을 약 30 ~ 60% 함유하고 있으며, 이 갈조류가 함유하는 다당류의 구성의 대부분은 알긴산, 라미나린 및 후코이단 등이다. 갈조류의 세포막 또는 세포간 물질을 구성하는 주성분인 알긴산은 갈조류 건물중의 70 ~ 80% 함유하고 있으며 , 2종의 우론산의 중합체로 중합도가 80이고 분자량 1500 정도이다. 또한 알긴산은 식품, 화장품 및 의약품 산업에 광범위하게 이용되어지고 있다. 다당류 중에서 후코이단은 다시마를 비롯한 갈조류에 많이 함유 되어 있으며 건조중량의 4% 전후로 함유되어 있고 분자량이 200,000을 넘는 거대 다당류이다. 수용성 다당류인 후코이단은 L-fucose의 에스테르화 황산을 주성분으로 하여 소량의 galactose, xylose, glucuronic acid등을 함유하는 항산화 다당이며 항산화 활성을 가지는 후코이단의 경우 항암작용, 항혈응고작용, 항혈전작용, 항염증작용, 항바이러스작용과 같은 생리 활성 작용을 가지고 있는 것으로 잘 알려져있다 (Frank C et al., 1989).

해조류에 포함된 다당류 중 하나인 라미나린은 고등식물의 녹말에 상당하는 저장성 다당류로 갈조류인 다시마속에서 처음 발견되었다. 갈조류로부터 저분자 라미나린은 가용성 라미나린과 불용성 라미나린으로 나눌 수 있으며, 이들은 구조적으로 β-1,3 결합 glucan으로 구성되어있으나,

가용성 라미나린에는 소수의 β-1,6 결합을 35% 정도 함유하고 있다고 보고 되어져 있다 (Painter Tj, 1997). 또한 이러한 구조적 특성으로 인해 β-glucan과 유사한 생리활성을 가지며, 식물과 동물의 면역증진효과, 항암효과, 항박테리아 활성에 관여한다고 보고되고 있다 (Zvyagintseva et al., 1997).

해조류 생리 활성 효과중 하나인 Apoptosis에 대한 항암 관련 연구는 1972년 이후 지금까지 진행되어 왔으며 (Kerr et al., 1972), 이는 선택적 세포를 죽음으로 일으키는 생리적인 과정으로 이 과정은 조직의 항상성을 유지하는데 필수 조절작용이다 (Hengather MO, 2000). Apotpsis는 세포의 내적인 신호와 외적인 신호에 의해 진행되며, 세포사멸을 조절하는 단백질과 세포사멸 억제 단백질의 상호작용에 의하여 조절되어진다 (Jin Z et al., 2005). 현재 이용되고 있는 많은 항암제 또는 건강기능식품의 암 억제 및 암 예방은 암세포의 세포 사멸 (apoptosis) 을 유도한다. 따라서 본 연구에서는 해조류 다당류인 라미나린이 암세포의 세포 사멸 (apoptosis)을 유도하는 것 인지를 검토하였다.

또한, 암은 세포 증식작용이 정상적으로 조절되지 않은 경우에도 발생하며, 비정상적인 세포 증식은 세포내 신호전달체계에 문제를 일으키며 야기된다. IGFs와 Receptor tyrosine kinase인 ErbB receptor familiy는 정상조직의 세포증식을 촉진 할 뿐만 아니라 종양생성과 암세포 증식에 중요한 역할 하는 것으로 잘 알려져 있다. IGF-I과 IGF-IR가 근래에 종양발생에 있어 주요 역할을 함이 제안되었으며 여러 암세포에서 IGF-I이 세포 사멸을 방해 할 뿐 아니라 성장을 촉진하는 역할이 있음이 밝혀지고 있다. 인간 대장암에서는 정상적인 주위의 점막 조직과 비교하여 IGF-IR의 수가 증가되었다는 연구가 보고되어져 있다 (Guo Y et al., 1992). 또다른 성장인자인 ErbB receptor의 경우도 여러 암에서 발현이 증가한다고 보고 되었다 (Salmon DS et al., 1995). 대장암에서도 정상세포에 비해 ErbB2와 ErbB3의 단백질 수준이 증가하였다고 보고되어져 있으며 (Maurer CA et al., 1998), ErbB receptor famliy 신호전달 과정

의 조절 이상은 암발생과 진전에 중요한 요소로 작용한다고 알려져있다.

앞선 연구들에서 해조류의 생리 활성 물질이 항암효과가 있다고 보고되어짐에 따라 해조류의 다당류에 관한 생리활성 효과에 대한 연구는 다양하지만, 그 중 하나인 라미나린이 가지는 생리 활성에 관한 연구들은 미미하며, 라미나린의 생리활성에 관한 메커니즘 규명에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 또한 해조류의 다당류인 라미나린의 항암활성에 대해서는 보고가 되고 있으나, 대장암의 증식에 미치는 영향에 대한 연구는 부진하다.

따라서, 본 연구에서는 이러한 사실을 토대로 라미나린을 인간 대장암 세포주인 HT-29 세포에 처리하여 Fas로 유도되어진 세포사멸을 확인하였으며, 그 세포사멸에 따른 IGF-IR, ErbB를 통한 세포 성장신호 감소에 대해서도 검토하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 재료

본 연구에 사용한 라미나린은 Sigma aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 재료로 사용하였다.

실험에 사용한 세포는 ATCC로부터 구입한 대장암 세포주인 HT-29 (Human colon cancer cell)를 사용하였고, 정상 세포에서의 독성 유무를 확인하기 위해 정상 소화관 세포주인 IEC-6 (intestinal epithelial, Human)를 사용하였다. 세포 배양에 사용한 Fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Life Technlogies, Gibco BRL, Gaitherberg, MD, USA) 제품을 사용하였으며 RPMI-1640, Dulbecco's modified Eagle's medium, penicilin/streptomyocin (P/S)는 Hyclon (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. Phosphate-buffered saline (PBS)은 Gibco/BRL (Invitrogen Co., USA)를 사용하였고, trypsin, protease inhibitor, bovine serum albumin (BSA), Hoechst 33342, detergent는 Sigma Chemical Co. (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 세포의 배양과 생존률을 측정하기 위해서 MTS/PMS solution (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit)은 Promega에서 구입, 사용하였으며 세포 단백질 농도를 측정하기 위해 BCA protein Assay Kit (Pierce, USA)를 사용하였다.

Western blot은 protein standard marker는 dual color marker (BIO-RAD, USA)를 사용하였으며, immunoprecipitation에 사용한 antibody는 Santa Cruz (CA, USA), Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구매하였으며 detection regent로 SuperSignal West Pico

Luminol/Enhancer Solution과 SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution (Pierce, USA)를 이용해 Kodak film (Rochester, NY, USA)에 감광하였다.

Caspase activity assay 에 사용된 Caspase-3 Substrate I, Colorimetric (Ac-DEVD-pNA), Caspase-8 Substrate I (Ac-IETD-pNA), InSolution™ Caspase-3 Inhibitor II (Z-D(OMe)E(Ome)VD(OMe)-FMK)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)을 사용하였다.

Annexin V-FITC, Cell cycle test analysis는 Annexin V-FITC apoptosis detection kit (Becton Dickinson, CA, USA)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 세포 배양

인간 대장암 세포주인 HT-29는 37℃ CO_2 incubator (5% CO_2, 95% air) 에서 RPMI-1640배지에 10% FBS, P/S을 첨가하여 배양하였으며, 정상 세포주인 IEC-6는 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지에 HT-29와 동일한 조건에서 배양하였으며 두세포주 모두 배지는 2 ~3일 마다 교환해 주었다.

2) 세포 증식율 측정

라미나린이 HT-29 세포에 증식억제 효과를 가지면서 동시에 정상세포인 IEC-6 세포에 독성 유무를 확인하기 위하여 MTS assay를 시행하였다. 각 세포를 96-well plate에 2×10^4 /well로 동일하게 분주한 후 세포

부착을 위하여 24시간 배양하였고, Serum Free medium (SFM) 으로 6시간 배양 한 후 라미나린을 0, 1.25, 2.5, 5 mg/ml 농도별로 24시간 처리하였다. MTS/PMS solution (Promega Co, USA)를 첨가하여 37℃에서 30분 반응 시킨 후 ELISA plate reader (BIO-RAD, USA)로 490nm 흡광도에서 측정하였다.

3) 형태학적 변화

HT-29 세포에 라미나린을 처리 하였을 때 세포의 형태학적 변화를 관찰 하기 위해 HT-29 세포를 6-well plate에 10% FBS가 함유된 RPMI 1640배지로 희석하여 동일한 양 분주한 다음 세포가 80% 성장하였을 때 라미나린을 농도별로 24시간 처리 하였다. 이 후 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 위상차 현미경으로 세포 형태를 관찰 하였다.

4) Hoechst 33342 염색법

HT-29 세포에 라미나린을 처리 하였을 때 핵의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 Hoechst 33342 염색법을 시행하였다. HT-29 세포를 6-well plate에 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석하여 동일한 양으로 분주한 다음 세포가 80% 성장하였을 때 라미나린을 24시간 처리하여 배양하였다. 핵의 형태학적 관찰은 fixing solution (formaldehyde : PBS = 1 : 9)을 첨가하여 실온에서 다시 10분간 고정한 후 PBS로 세척하고 0.2% Triton X-100을 첨가하여 실온에서 10분간 방치하였다. 이 후 2 ㎍/ml Hoechst 33342 용액을 첨가하여 빛을 차단한 다음 실온에서 30분간 반응시켰다. PBS로 다시 세척 한 다음 100% EtOH를 첨가하여 탈수처리하고 mounting medium(Sigma, M1289) 처리 후 형광 현미경을 통하여 200배 배율로 핵의 형태학적 변화를 관찰 하였다.

5) Caspase activity assay

Caspase activity 측정에 사용된 Caspase-3 Substrate I Colorimetric (Ac-DEVD-pNA), Caspase-8 Substrate I (Ac-IETD-pNA), InSolution™Caspase-3 InhibitorII (Z-D(OMe)E(Ome)VD(OMe)-FMK)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)을 사용하였다.HT-29 세포가 60% 증식하면 caspase-3 inhibitor 를 1시간 전처리 한 후 Cf-GP를 농도별로 24시간 처리하였다. Lysis buffer (25mM HEPES, 5mM EDTA, 2mM DTT, 0.1%CHAPS)로 세포를 회수하여 80 μg protein을 96 well에 분주하였다. 각 각의 substrate를 첨가하여 37℃, 8시간 조건으로 반응시킨 후 ELISA plate reader로 흡광도 405nm에서 측정하였다.

6) Western blot analysis

① Total cell lysate 추출

라미나린을 처리한 HT-29세포를 PBS로 2회 세척하고 protease inhibitor (1 ㎎/㎖ aprotinin, 1 ㎎/㎖ leupeptin, 1 ㎎/㎖ pepstatin A, 200 mM Na_3VO_4, 500 mM NaF, 100 mM PMSF)를 첨가한 RIPA lysis buffer (1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 50mM Tris-HCl, PH 7.5)를 넣어 얼음 위에서 cell lysate를 회수하고 30분간 방치시킨 후 회수한 cell lysate를 원심분리 (12,000 rpm, 4℃, 10 min)하여 그 상층액을 사용하였다.

② 세포질 및 미토콘드리아 획분 추출

세포질 및 미토콘드리아의 획분 추출은 Emanuele et al. (2004)의 방법을 사용하였다. 라미나린을 농도별로 24시간 처리한 다음 PBS-EDTA 1ml로 회수 하였다. 원심분리(5,000 rpm, 5 min, 4℃) 후 cell lysate buffer (20mM HEPES, pH 7.4, 10mM KCL, 1.5mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 250mM Sucrose)를 첨가하여 4℃에서 20분간 반응시켰다. 원심분리(5,000rpm, 5min, 4℃)하여 상층액(Supernatant-1)을 회수하고 나머지 pellet에 buffer를 첨가하여 다시 5,000rpm, 5min, 4℃에서 원심분리하여 상층액(Supernatant-2)을 회수하였다. Supernatant-1과 Supernatant-2를 함께 원심분리(14,000 rpm, 15 min, 4℃)한 다음 상층액은 세포질 획분이며 pellet에 buffer를 첨가한 것은 미토콘드리아 획분이 된다.

③ 핵 획분 추출

핵 획분 추출은 Park et al. (2005)의 방법을 사용하여 추출하였다. HT-29 세포에 라미나린을 농도별로 처리한 다음 PBS-EDTA 1ml로 회수 하였다. 원심분리(12,000 rpm, 10min, 4℃)하여 cell lysate에 Hypotonic lysis buffer (10mM HEPES, pH 7.9, 10mM KCL, 1.5mM $MgCl_2$)를 첨가하여 4℃에서 15분간 반응 시켰다. 그 후 2.5% NP-40을 첨가하여 4℃에서 10분 반응시킨 다음 원심분리(5,000 rpm, 5 min, 4℃)하여 cell lysate에 Nuclear extraction buffer (10mM HEPES, pH 7.9, 100mM NaCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.1mM EDTA, 0.1mM DTT)를 첨가하여 4℃에서 20분간 반응 후 원심분리(14,000 rpm, 10 min, 4℃)하여 상층액을 핵 획분으로 사용하였다.

④ 단백질 발현 및 분석

HT-29 세포에 라미나린을 농도별로 처리하여 Lysis buffer (50mM Tris-HCL, pH 7.4, 150mM N_aCl, 1mM EDTA, 1mM NaF, 1% NP-40, 1mM Na_3VO_4, 1㎍/㎖ aprotinin, 1㎍/㎖ leupeptin, 1㎍/㎖ pepstatin, 0.25% Na-deoxycholate, 1mM PMSF)를 첨가하여 4℃ 저온에서 30분 방치한 후 cell lysate를 원심분리한 다음 상층액을 취하여 단백질 농도 수준을 측정하였다. 단백질 농도를 50㎍/㎖으로 동일하게 정량한 다음 SDS-PAGE에 전기영동 한 후 PVDF membrane (Millipore, USA)으로 Transfer 하였다. 전기 영동 한 membrane은 실온에서 1% BSA-TBST로 1시간 blocking 시킨 후 확인하고자 하는 각 각의 1차 antibody를 1:1,000dmfh 희석해 10℃ 16시간 반응시킨 후 TBS-T로 15분간 2회 세척한 다음 2차 antibody를 1:10,000 비율로 희석하여 1시간 45분간 반응시켰다. 반응 시킨 membrane을 다시 TBS-T로 15분간 2회 세척하여 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/ Enhancer solution (Rockford, IL, USA)을 사용하여 KODAK X-ray film에 감광시킨 다음 현상 후 scaning 하여 Science Lab 2005 (Fujifilm, Japan)를 이용하여 분석하였다.

⑤ IGF-IR 신호전달 분석

HT-29 세포에 라미나린을 농도별로 24시간 처리 하였다. PBS-EDTA로 2회 세척한 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 1% NP-40, 1 mM Na_3VO_4, 1 ㎍/㎖ aprotinin, 1 ㎍/㎖ pepstatin, 1 ㎍/㎖ leupeptin, 0.25% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF)를 첨가하여 4℃에서 30분간 방치 하였다. cell을 회수 한 다음 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 cell lysate로 사용하였다. 50 ㎍/㎖ 단백질 농도로 SDS-PAGE로 분리한 후 membrane에 옮겨 단백질

발현을 확인하였다.

⑥ Fas유도 세포사멸 경로와 IGF-IR 경로 연관성

HT-29 세포에 라미나린을 농도별로 24시간 처리 하였으며, 최종농도인 라미나린 5 mg/ml 농도에서 pan caspase inhibitor(Z-VAD(Ome)-FMK)를 20μm 농도로 1시간 처리하였다. PBS-EDTA로 2회 세척한 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 1% NP-40, 1 mM Na_3VO_4, 1 ㎍/㎖ aprotinin, 1 ㎍/㎖ pepstatin, 1 ㎍/㎖ leupeptin, 0.25% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF)를 첨가하여 4℃에서 30분간 방치 하였다. cell을 회수 한 다음 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 cell lysate로 사용하였다. 50 ㎍/㎖ 단백질 농도로 SDS-PAGE로 분리한 후 membrane에 옮겨 단백질 발현을 확인하였다.

⑦ HRG 유도 단백질 수준 및 ErbB 신호 전달 분석

HT-29세포에 라미나린을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. PBS-EDTA로 2회 세척한 다음 lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na_3VO_4, 20 ㎍/㎖ aprotinin, 10 ㎍/㎖ antipain, 10㎍/㎖ leupeptin, 80 ㎍/㎖ benzamidine-HCl, 0.2 mM PMSF)를 첨가하여 4℃에서 30분간 방치 시켰다. cell을 회수하여 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리 한 후 상층액을 cell lysate로 사용하였다. 동량의 cell lysate를 SDS-PAGE로 분리 한 후 membrane에 옮겨 단백질발현을 확인하였다.

또한, HRG로 유도된 HT-29 대장암 세포에서 라미나린을 처리 하였을 때 암세포 증식 억제 효과가 ErbB 신호 전달 경로를 통하여 일어나는지 확인하기 위하여 다음과 같이 검토 하였다. HT-29에 5 ㎎/㎖의 라미나

린을 24시간 처리한 다음 회수 직전에 100 ng/㎖의 HRG을 0, 5, 10, 30 분간 처리하여 lysis buffer를 첨가하여 회수 하였다. 세포를 회수하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 cell lysate로 사용 하였다. 동일한 양의 cell lysate (750 ㎍/㎖ protein)에 anti-ErbB2 항체를 처리하여 4℃에서 16시간 반응 시킨 후, Protein A-Sepharose를 넣어 4℃에서 2시간 반응 시켜 14,000 rpm에서 2분간 원심 분리하여 항체와 결합한 단백질을 Protein A-Sepharose와 함께 침전시켰다. Protein A-Sepharose를 buffer로 3회 세척하고 0.1M DTT가 들어있는 1X sample buffer를 첨가하여 100℃에서 끓인 후 spin down 한 다음 sample buffer만 회수하여 SDS-PAGE로 분리 후 단백질 발현을 확인하였다.

7) FACS analysis

라미나린이 세포 주기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HT-29 세포를 6well에 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지를 첨가하여 동량으로 분주하였다. 세포가 80% 증식하면 SFM을 6시간 처리하고 라미나린을 농도별로 24시간 처리 하였다. PBS로 세포를 부유시킨 다음 원심분리 (25,000 rpm, 10 min, 4℃) 하여 pellet을 회수하여 cycle testTM Plus DNA reagent kit (Becton Dickinson San Jose, CA, USA)를 사용하여 실험 하였다. Kit에 포함된 buffer solution으로 세척하고 Cycle Test PLUS solution A, B를 사용하여 실온에서 30분간 염색하고 nylon mesh cell strainer (Beckton Dickinson San Jose, CA, USA)에 통과키셔 세포를 monolayer로 분리 하였다. 이것을 다시 DNA flow cytometry (Beckton Dickinson San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 의한 histogram을 Mo야 Fit LT (Beckton Dickinson San Jose, CA, USA)로

분석하였다.

8) 통계학적 처리

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

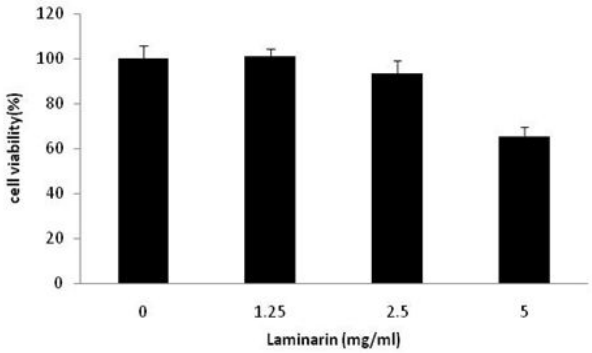
Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 라미나린에 의한 HT-29 대장암 세포 증식 억제 효과

1) 라미나린이 HT-29 대장암 세포사멸에 미치는 영향

인간 대장암세포인 HT-29 세포 사멸에 라미나린이 미치는 영향을 조사하고 소화관 정상세포인 IEC-6 세포에서의 독성 유무를 확인하기 위해 MTS assay를 하였다. HT-29 세포에서 0, 1.25, 2.5, 5 mg/ml 처리 시 농도 의존적으로 세포증식 억제효과가 있었으며 IEC-6 정상세포에서 아무런 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 최종 농도인 라미나린 5 mg/ml 농도에서는 약 65%의 세포 생존률을 보였으므로 HT-29 세포에 위와 같은 농도로 실험을 진행하였다 (Fig. 1).

(A)



(B)

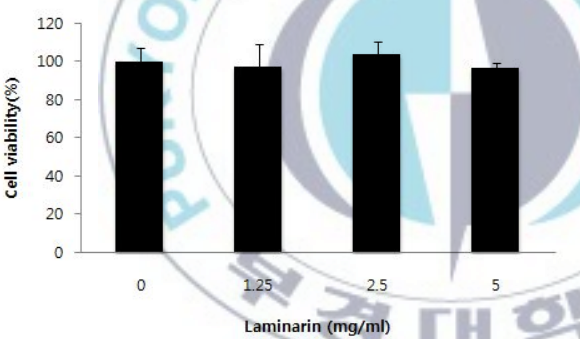


Fig. 1. Effects of laminarin on the HT-29 cells proliferation. (A) Effect of laminarin treatment on the growth inhibit of HT-29 colon cancer cells. Control or varying concentrations of laminarin (0, 1.25, 2.5, 5 mg/ml) for 24 h. (B) Effect of laminarin treatment on the non toxic to IEC-6 intestinal epithelial cells.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

2) 세포의 형태학적 변화

앞선 MTS assay의 결과를 바탕으로 HT-29 세포에 라미나린을 처리하였을 때 세포와 핵의 형태학적인 변화를 현미경 상에서 관찰하였다.

그 결과 HT-29 세포에 라미나린을 처리 하였을 때 세포생존율 측정결과와 동일하게 농도의존적인 세포 감소를 확인하였다. 또한, HT-29 세포에 라미나린 농도가 2.5 mg/ml에서 세포 형태가 변하기 시작하였고 최고 농도인 5 mg/ml에서는 세포가 수축하기 시작하였다. 이와 같이 세포 형태학적 변화를 관찰 할 수 있었으므로 이 후 Hoechst 33342 염색을 통해 세포 사멸체 형성 등의 변화를 살펴보았다 (Fig. 2).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

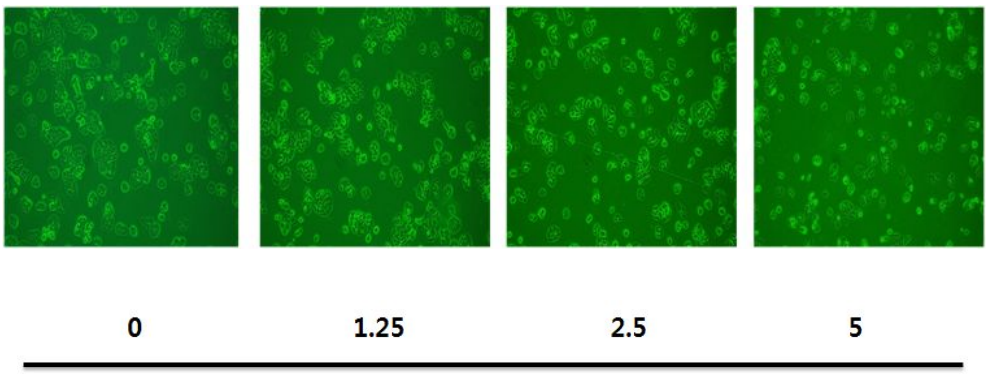


Fig. 2. Morphological changes of HT-29 cells were treatment with laminarin.

After 24 hours of treated with laminarin(0 - 5 mg/ml) were measured by an optical microscope. Magnification, ×200.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

3) 핵의 형태학적 변화

앞 선 세포의 형태학적 변화에서 세포 수가 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. 라미나린 처리 시 세포사멸 (apoptosis)의 형태학적 특징 중의 하나인 핵의 변화를 관찰하기 위하여 핵 내 DNA에 특이적으로 결합하는 형광 염색제인 Hoechst 33342를 사용하여 핵을 염색하고 형광 현미경으로 관찰 하였다. 그 결과 라미나린을 처리하지 않은 군에서는 타원형의 온전한 핵 모양을 관찰 할 수 있는 반면, 라미나린을 처리한 경우에는 apoptotic body가 핵 주변에서 관찰 할 수 있는 것으로 보아 HT-29 세포주의 사멸에 라미나린이 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

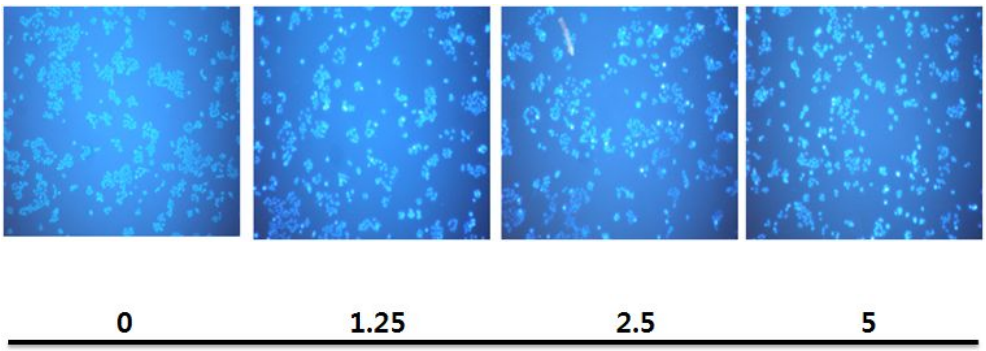


Fig. 3. Laminarin caused by induction of apoptotic body in HT-29 cells were measured by an fluorescence microscope.

HT-29 cells were treated with varying concentratons of Laminarin (0, 1.25, 2.5, 5 mg/ml) at 24 h. After, cell were fixed and then stained with 2 μg/ml of Hoechst 33342 and 20 min maintained incubation at room temperature. Magnification, ×200.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

2. 라미나린에 의한 세포사멸 신호전달 분석

1) Extrinsic and Intrinsic pathway

라미나린을 농도별로 24시간 처리한 HT-29 세포에 Fas로 유도되어진 세포사멸에 미치는 영향을 알아보았다. Western blot을 시행한 결과 농도 의존적으로 Fas의 발현량이 증가하는 것을 확인 할 수 있었고 이에 따라 하위 단계의 단백질 발현을 확인하기 위한 실험을 진행하였다.

세포사멸에는 Fas나 종양괴사인자와 같은 death receptor를 통하여 caspase-8이 활성화되는 기전과 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 분비 후 caspase가 활성화되는 두 가지 경로로 나눌 수 있다. 세포 사멸을 유도하는 기전 중 Fas (CD95/APO-1) 및 Fas ligand (FasL)는 암의 발생기전에 중요한 역할을 담당한다 (Tachibana O et al., 1995). Fas는 세포내 domain과 특이적으로 결합하는데 그 중하나가 Fas associated death domain 단백질인 FADD이다 (Chinnaiyan AM et al., 1996). FADD 유전자는 두 개의 exon으로 구성되며 208개의 amino acid를 포함하고, 70개의 C-terminal amino acid가 death domain을 형성하며 Fas의 death domain과 반응하는데 필요하고 76개의 N-terminal amino acid는 death effector domain을 형성하여 caspase-8의 prodomain과 반응 하면서 death inducing signal complex를 형성한다. 이러한 FADD 단백질은 Fas에 의한 세포사멸 신호전달체계에 필수적이라 할 수 있다 (Strasser A et al., 1999).

Fas를 통한 세포사멸은 pro-caspase인 caspase-8이 활성화되면 다시 하위단계에 있는 caspase를 활성화시켜 세포사멸을 유도한다. Caspase-8이나 capase-9가 활성화되면 caspase-3가 직접 활성화되는데 이는 다시 caspase-1, capase-2 또는 caspase-3을 활성화시켜 세포사멸을 유도할 수 있다 (Li H et al., 1999).

일반적으로 caspase-8은 cell death ligand가 receptor에 결합이 되면 활

성이 일어나 effector caspase (caspase-3) 를 활성화 시키지만(Honglin et al., 1998), 최근에 연구보고에 따르면 Fas로 매개되어진 세포사멸의 경우에서 caspase-8에 비 의존적으로 caspase-3의 활성이 일어나는 경로가 있다. 본 연구에서는 caspase activity를 측정한 결과, caspase-3의 활성은 라미나린에 의해 농도 의존적으로 증가하였고 caspase-8의 활성은 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 4). 이는 caspase X라는 새로운 효소의 경로를 통하여 Fas로 매개된 세포사멸경로로 추측된다 (Feng et al., 2004).

앞서 설명한 caspase-3이 활성화되면 핵단백질인 Poly ADP-ribose polymerase (PARP)가 cleaved되면 활성을 잃게 되는데 이는 핵 내에 DNA 손상에 의해 PARP가 과도하게 활성화되어 PARP 기질인 ATP와 NADH가 소모를 억제함으로서 apoptosis 과정 중에 사용되는 에너지를 유지하려는 현상이 발생하게 된다 (Endres M et al., 1997). 이는 apoptotic cell의 형태학적 변화와 생물학적 변화를 가져오게 된다.

본 연구에서 라미나린을 HT-29 세포에 24시간 처리하여 회수한 다음 western blot을 통해 단백질 발현양을 확인한 결과 라미나린을 통한 세포사멸은 Fas signaling을 유도되는 apoptosis임을 알 수 있었고 이에 따라 이 signaling에 관여하는 FADD, cleaved PARP등의 발현을 볼 수 있었다 (Fig. 4).

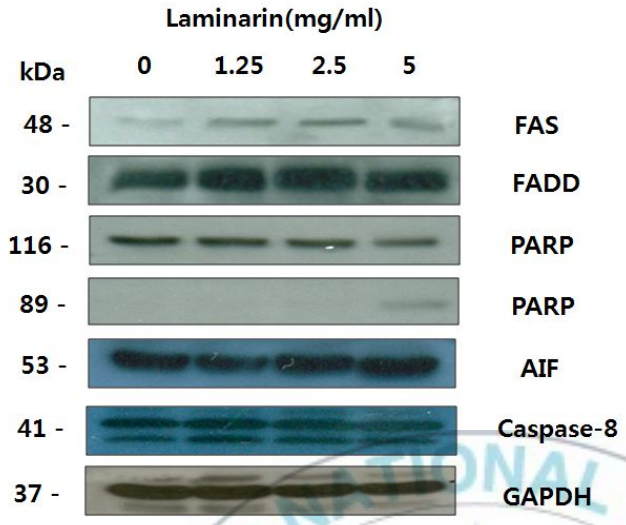


Fig. 4. Laminarin affect the expression of apoptosis related proteins in HT-29 cells.

Laminarin induces DISC formation in HT-29 cells. Cells were treated with varying concentrations of laminarin (0 - 5 mg/ml) for 24 h. (A) Expression of protein FAS, FADD, PARP, AIF and Caspase by laminarin.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

2) Bcl-2 family proteins의 신호전달 분석

Bcl-2 family proteins은 미토콘드리아의 막 투과 조절 인자로써 미토콘드리아에 의한 intrinsic apoptosis pathway에 작용하며 그 종류가 다양하다. 그 종류에 따라서 apoptosis를 유도하거나 apoptosis를 저해하기도 하는데 bad, bax, bid의 경우에는 apoptosis에 관여하는 단백질인자이며 bcl-2, bcl-xl은 apoptosis 저해를 조절한다 (Huang and Strasser, 2000; Kelekar and Thompson, 1998).

세포사멸을 억제하는 Bcl-2계열 단백질들은 Bax 활성을 저해함으로써 미토콘드리아로부터 세포질내로 cytochrome c의 분비를 방해하거나, 활성화되어진 apoptosome 형성을 저해하는데 이는 세포사멸 유도 단백질과 세포사멸 저해 단백질간의 비에 의해 결정된다고 볼 수 있다 (Kluck RM et al., 1997).

Apotosis가 시작되면 bad가 bcl-2와 결합하게 되고 bid는 bcl-2로부터 떨어져나오는데 이는 bax와 결합하여 conformational change가 일어나 dimer를 형성하게 되며 미토콘드리아 외막에 작용해 내부의 물질을 유출 시키게 되는데 이 때 나오는 물질들이 cytochrome c, Apaf-1등 이다. (Elizabeth Y et al., 1995).

본 실험에서는 HT-29세포에 라미나린을 24시간동안 처리하였을 때 bad, bax의 증가와 bcl-2의 감소 경향을 볼 수 있었다 (Fig. 5).

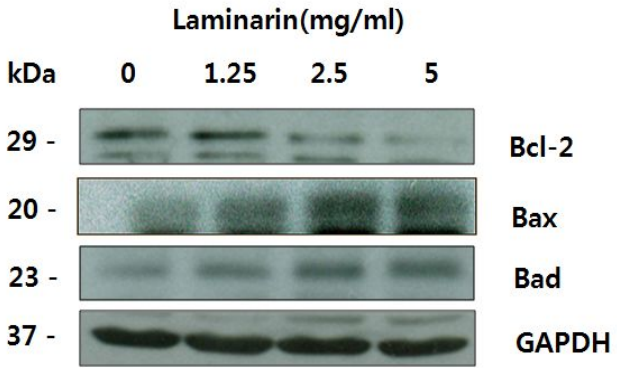


Fig. 5. Effect of laminarin treatment on HT-29 cells, the expression of Bcl-2 family proteins.

The data shown Bcl-2, Bax, Bad proteins in HT-29 cells.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

3) Cytochrome c에 의한 미토콘드리아, 세포질에서의 신호전달

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

Western blot 결과 HT-29 세포에 라미나린을 처리하였을 때 세포질에서의 cytochrome c 유출 단계를 확인해 보았다.

미토콘드리아에서 cytochrome c가 유출되면 세포질에서 caspase-9, Apaf-1과 결합을 하여 apoptosome을 형성하게 되는데 이것은 다시 caspase-9를 활성화시켜 caspase-3이 활성을 가지게 되어 apoptosis를 유도하게 된다 (Nijhawan LP et al., 1997).

Bcl-2는 apoptosis를 유도하는 cytochrome c 가 미토콘드리아로부터의 분리되는 것을 막는데 앞서 bcl-2 family proteins의 western blot 결과를 통해 pro-apoptosis가 활성화되고 anti-apoptosis 계열이 감소하는 것을 확인하였음으로 미토콘드리아와 세포질에서의 cytochrome c 발현을 분석한 결과 미토콘드리아에서 방출된 cytochrome c가 세포질에서 라미나린 처리 시 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험에서는 세포질에서의 cytochrome c와 Apaf-1의 발현이 농도 의존적으로 증가하는 것을 western blot으로 확인하였다 (Fig. 6).

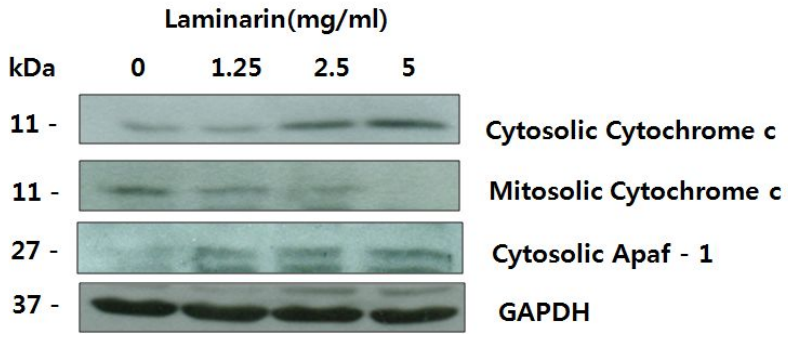


Fig. 6. Effect of laminarin treatment on HT-29 cells, the expression of increased cytochrome c and Apaf-1 from cytosol.
The data shown increased cytochrome c and Apaf-1 proteins. On the other hand, in the mitochondrial cytochrome c is reduced.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

4) Caspase-3, -8 activity

Apoptosis 신호 전달 과정에서 세포 외부로부터 apoptosis 신호가 세포 내에 있는 caspase로 전달되어 caspase가 활성화된다.

Caspase는 세포사멸이 유도될 때 활성화되는 시스틴 단백질 분해 효소로 pro-caspase로 합성되어 있다가 신호 전달 자극이 오게 되면 large subunit과 small subunit으로 절단되며, 이는 tetramer를 형성하여 활성화된다. 이렇게 활성화되어진 caspase는 PARP를 포함한 중요한 기질들을 분해하여 oligonucleotide DNA fragmentation에 관여하게된다. Caspase는 bcl-2 familiy에 속하며 apoptosis의 신호 전달을 촉진하는 기능을 가진 bid는 세포막에서 시작하는 caspase 활성화 경로와 미토콘드리아에서 시작하는 caspase활성화 경로를 연결시키는 신호전달인자로 작용하게된다 (Cotter TG et al., 1992; Nagata S. 1997).

Caspase -8,-9와 같은 caspase 기시체는 caspase-3,-7과 같은 caspase 효과체를 직접 또는 간접적으로 활성화시키기 때문에 결과적으로 caspase의 분해 작용은 세포를 파괴시키므로 caspase-3의 경우는 세포사멸의 초기 지표가 된다.

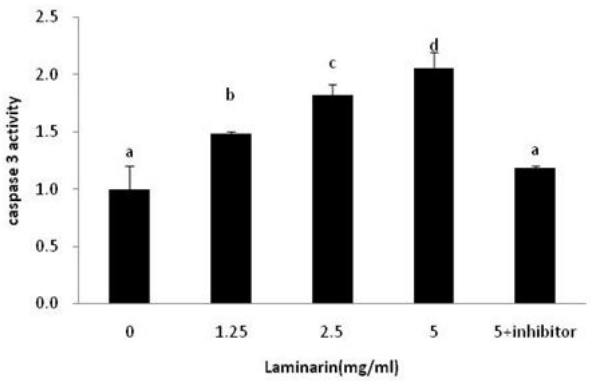
앞선 실험에서 라미나린을 HT-29세포에 농도별로 처리 했을 시 세포 증식 억제를 확인 하였고 western blot의 결과로 Fas를 통한 apoptosis경로를 확인하였으므로 본 실험에서는 caspase-3. -8의 활성정도를 측정하였다. 모든 실험에서 기준이 된 동일한 조건으로 측정한 결과 caspase-3 의 경우는 라미나린 농도 의존적으로 활성이 증가 하는 것을 확인하였고 inhibitor를 처리한 군에서는 대조군 수준을 유지하는 것을 확인 하였다. 하지만 caspase -8의 경우 caspase-3과는 다르게 유의차가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

일반적으로 caspase-8은 cell death ligand가 receptor에 결합이 되면 활성이 일어나 effector caspase (caspase-3)를 활성화 시키지만 (Honglin et al., 1998), 최근에 연구보고에 따르면 Fas로 매개되어진 세포사멸의

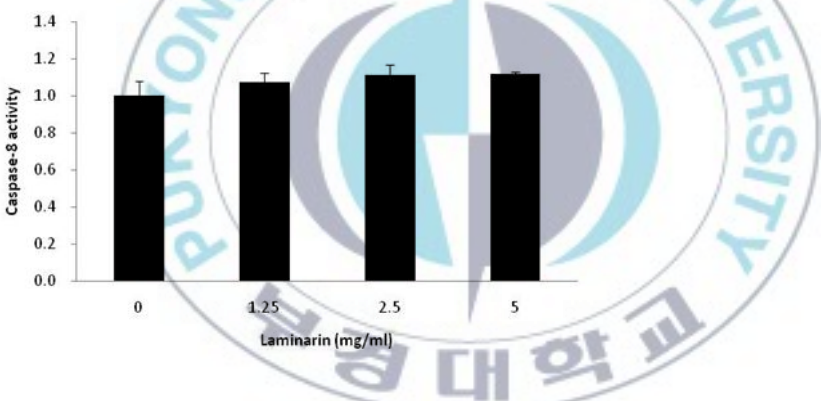
경우에서 caspase-8에 비 의존적으로 caspase-3의 활성이 일어나는 경로가 있다. 이는 caspase X라는 새로운 효소의 경로를 통하여 Fas로 매개된 세포사멸경로로 추측된다 (Hanping Feng et al., 2004)..

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

(A)



(B)



PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

Fig. 7. (A) Dose dependent activation of caspase-3 by laminarin treatment in HT-29 cells. In the experiments on dose dependence, laminarin added at the varying concentrations (0, 1.25, 2.5, 5 mg/ml). Also, laminarin was concentration of 5 mg/ml added caspase-3 inhibitor (Z-DEVD-FMK). **(B) Laminarin did not affect caspase-8 in HT-29 cell.** The values were the means ± SD; $P < 0.05$ by ANOVA. Values with different letters are significantly different from one another according to Duncan's multiple range test.

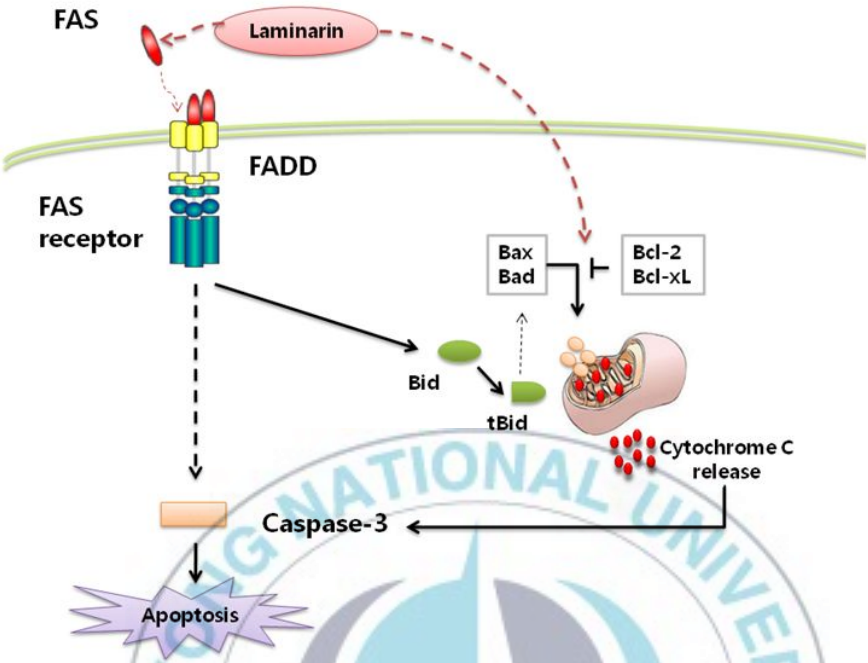


Fig. 8. Model for the activation of Fas mediated apoptosis by laminarin.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

3. 세포 주기에 미치는 영향

1) 세포 주기 분석

세포 주기의 조절은 특정 물질의 항암성 기전 해석의 기초적인 과정으로 인시되어지고 있다. 또한 암의 증식과 발생에 있어 비정상적인 세포 주기 조절은 중요한 치료 및 예방법으로 각광받고 있다.

세포주기는 모든 진핵세포들의 성장에 필수적으로 거치는 과정이며 세포는 G1에서 S, G2, M 기를 거치면서 분열, 성장하고 (Hunter T, 1993), 반복과정을 거치며 순서가 엄격히 지켜져 역방향으로 진행되지는 않는다.

S기에서는 DNA 복제가 일어나며 M기에서는 염색체와 세포의 분열이 일어나게 되는데 이 사이 과정이 각각 G1, G2기이며 G1기에서는 세포의 증식이 이루어지며 분열이 완전히 진행되었으면, G2기에서는 DNA의 복제가 완전히 종결되었는가를 확인 후 세포주기가 마무리되어진다.

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

본 실험에서는 HT-29세포의 증식 억제가 세포주기에도 영향을 미치는지를 확인하기 위해 DNA flow cytometry로 분석 하였다.

정상적인 세포 주기와는 달리 분석 결과 sub-G1기의 구간 비율이 대

조군 8.28 %에 비하여 각각 라미나린을 처리했을 때 농도 의존적으로 25.25 %, 19.78 %, 63.48 % 로 증가한 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 9). 따라서 라미나린을 HT-29에 처리 하였을 때, S기 G2, M 기가 감소하고 G0/G1기가 증가하였음은 cell cycle arrest가 동반되었음을 추측할 수 있다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

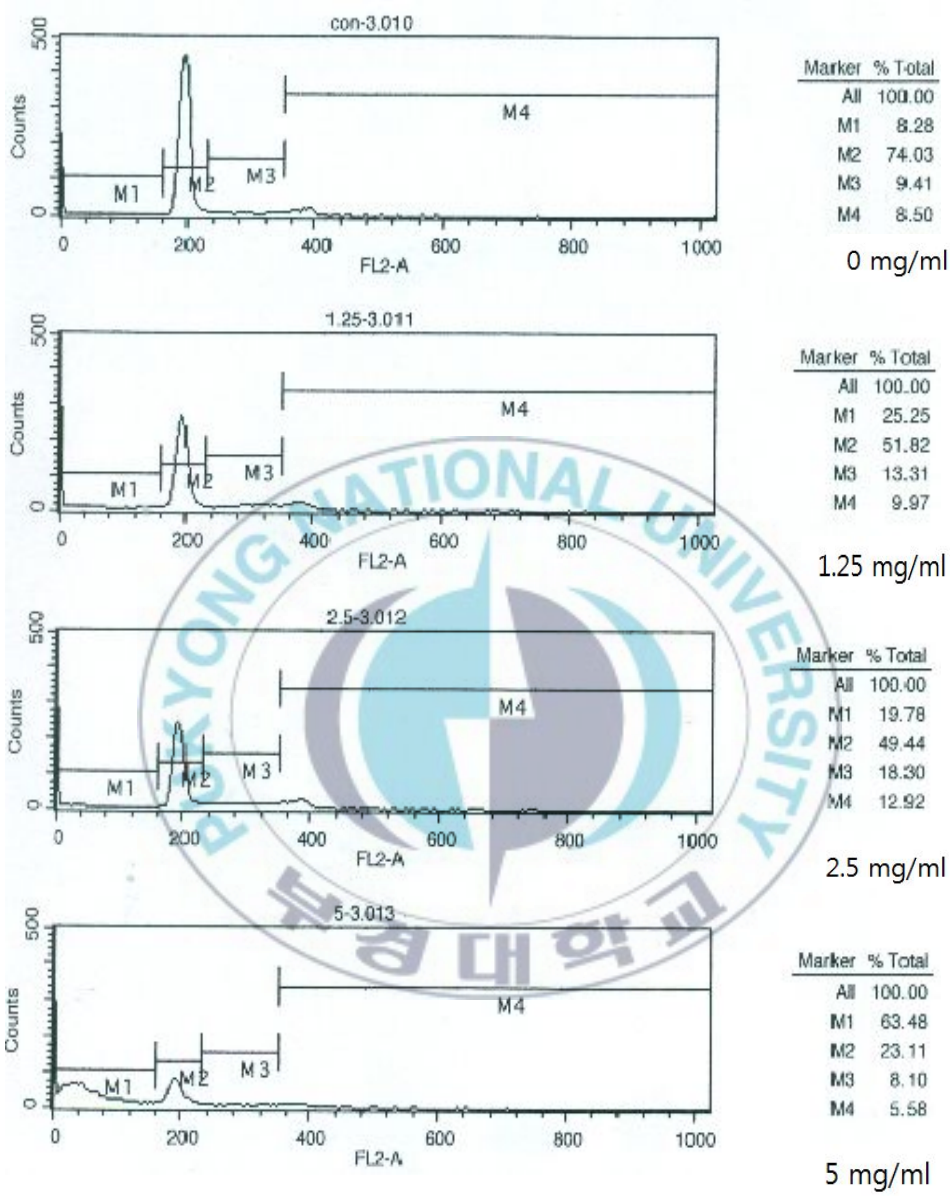


Fig. 9. Treatment of HT-29 cells with laminarin results in cell cycle progression.

In the experiments on dose dependence, laminarin added at the varying concentrations (0, 1.25, 2.5, 5 mg/ml).

2) 세포 주기 조절 단백질 분석

모든 진핵세포들의 성장에 필수적으로 거치는 세포주기의 단계별로 관련되는 효소가 정상적으로 조절 받지 못하게 되면 세포는 암세포와 같은 비정상적인 세포성장을 하게 되는 것이다 (Marx J, 1994).

특히 cyclin-c아 복합체가 세포주기 변환 시 주요 조절자로 작용하는데 그중에서 cyclin B와 cdc2 복합체는 유사 분열 단계인 M기를 유도하고 cyclin A와 cdk2는 DNA 합성단계인 S기와 G2기 동안에 복합체를 형성하여 S기 조절에 관여한다고 보고 되고 있다. 또한 cyclin D는 cdk2, 4, 6와 복합체는 형성하고 cyclin E는 cdk2와 복합체를 형성하며 DNA 합성 시작단계인 G1기 조절에 관여한다고 보고되어져 있다 (Pagano M et al., 1992; Xiong Y et al., 1991).

이러한 암세포에서는 이러한 세포 주기 조절인자들의 비정상적인 활성이 암세포 발현에 영향을 주기도 하는데 대부분의 암세포에서는 cyclin/CDK 가 비정상적으로 과 활성화 되어져있는 경우가 대부분이다. 세포 주기에서 G1 초기에는 Cdk4, 6등이 활성화되어 작용을 하게 되고 G1기 후기와 S기 초기에 Cdk2가 작용을 한다. Cdk 활성에는 cyclin과의 결합이 필수적이고 Cdk4, 6은 cyclin D와 결합을 해서 활성형이 되며 Cdk2는 cyclin E와 결합을 한다 (Bruna P et al., 2000).

이들 cyclin/CDK 복합체의 활성을 저해 하는 단백질인 p16, p21, p27, p53등의 변이도 함께 나타나는 것으로 보고되고 있다 (Marx J, 1994). 따라서 암의 이상증식을 cyclin/CDK, p16, p21, p27, p53등의 세포 주기 조절인자들의 활성 조절이 가능해진다면 암세포 이상증식을 조절할 수 있을 것이라 추측된다.

이전 실험에서 이러한 세포 주기에서 check point에서의 세포 증식 조절이 이루어지지 않고 정지가 됨으로 apoptosis에 의한 sub-G1기의 arrest를 확인 할 수 있었다.

이렇듯이 정상적인 세포 주기가 아닌 apoptosis에 의한 세포 증식의

억제를 본 실험에서 다루고 있으므로 Cdk 및 cyclin/CKD 복합체 활성 저해 단백질인 p27과 암세포 성장인자인 c-myc 발현정도를 western blot으로 살펴 보았다 (Fig. 10).

p27 단백질은 세포 주기에서 S기를 유도하는 cyclin/Cdk complex에 결합해 Cdk2/4/6 kinase의 활성을 저해함으로써 pRb의 인산화를 억제시켜 세포 주기를 넘어가지 못하게 하며 G1기 상태에서 유지시키게 한다. 이러한 단백질은 라미나린 처리에 의하여 pRb는 감소하며, p27은 증가하는 결과를 확인 할 수 있었다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때 라미나린을 처리한 HT-29 세포는 Fas signaling을 통해 apoptosis 신호전달을 유도하며 세포 주기 중 sub-G1기의 arrest로 인하여 세포성장이 저해되면서 세포사멸이 진행되는 것을 확인 할 수 있다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

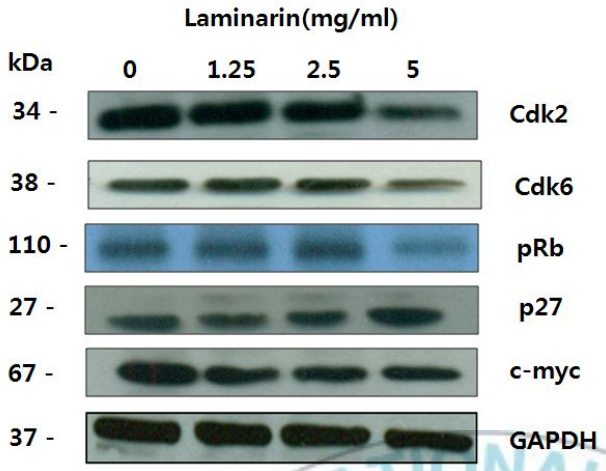


Fig. 10. Effect of laminarin treatment on the levels of cell cycle related proteins in HT-29 cells.

Cells were treated with laminarin at 24 h, then followed by Western blot analysis.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

4. 세포 성장 인자에 미치는 영향

1) IGF-IR 관련 단백질 분석

암의 형성에 있어서 IGF system의 비정상 적인 변화는 여러 종류의 암을 유발하는 요인으로 간주되고 있다.

Insulin-like growth factors(IGFs)는 한 개의 사슬로 이루어진 폴리펩타이드로서 정상 또는 악성 조직에서 mitogenic 또는 항세포사멸(antiapoptosis) 인자로 작용하기도 한다. 대부분의 IGF의 세포내 작용은 type I IGF receptor(IGF-IR)에 의하여 매게 되어지며, 작용은 IGF-결합 단백질 (IGF binding proteins)들에 의하여 조절된다. IGF-IR는 $\alpha_2\beta_2$ 형의 heterotetramer로 이루어진 glycoprotein으로 α-subunit과 β-subunit의 분자량은 각각 130,000과 95,000 정도된다. IGF가 extracellular domain인α-subunit에 결합하면 β-subunit이 tyrosine kinase domain에 autophosphorylayion이 일어나므로 인하여 tyrosine kinase로 활성화되어 여러 가지 단백질을 인산화 시킨다 (LeRoith D et al., 1995). 활성화된 IGF-IR에 결합하는 단백질 중 가장 잘 알려진 것이 insulin-receptor substrate(IRS) family이고, 인산화 된 IRS에 결합하는 가장 대표적인 것이 phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)의 p85 regulatory subunit이다. PI3K는 직접 IGF-IR에 결합되어 활성화되거나 또는 IRS에 의하여 활성화된 다음 Akt를 활성화시켜 apoptosis를 억제시키고 cell survival를 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Alessi DR et al., 1998; Vanhaesebroeck B et al., 1997).

앞선 결과들에서 라미나린이 인간 대장암세포주인 HT-29의 사멸 기전에 관여 한다는 사실을 확인하였다. 이 결과를 토대로 라미나린이 세포사멸기전뿐 아니라 세포 성장 신호전달에도 영향을 미치는지 검토하기 위해 대표적인 세포성장 signal인 IGF-IR신호전달 단백질의 발현을 분석하였다. IGF-IR은 RAS/MAPK 와 PI3K/Akt pathway의 두가지 전달

체계를 통해 작용하게 된다 (Valentinis et al., 1998). 대부분의 IGF의 세포내 효과는 type1 IGF receptor(IGF-IR)에 의해 매게되며, 이 신호전달은 IGF-bingding protein(IGFBP)들에 의해 조절되어진다. 이들 binding protein 중 PI3K는 직접 IGF-IR에 결합되어 활성화되거나 IRS에 의해 활성화되어 Akt를 활성화시키므로 세포사멸을 억제 시키나 본 실험에서 라미나린을 농도별로 처리하였을 때 PI3K는 발현이 60% 감소하였고 Akt의 경우 80% 감소하였고, PY99 및 MAPK 또한 발현이 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 11).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

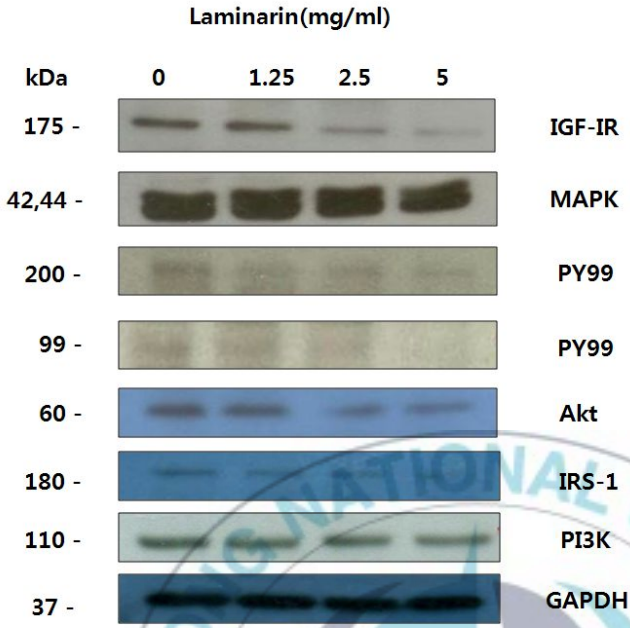


Fig. 11. Laminarin affect the expression of IGF-IR binding proteins in HT-29 cells.

Cells were treated with varying concentrations of laminarin (0 - 5 mg/ml) for 24 h. The data shown IGF-IR, MAPK, PY99, Akt, IRS-1, PI3K proteins.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

2) Fas유도 세포사멸 경로와 IGF-IR 경로 연관성

앞선 결과들을 종합해 보았을 때 라미나린을 처리한 HT-29 세포사멸은 Fas 경로를 통하여 FADD를 활성화 시킨 다음 마지막으로 caspase-3의 활성화로 세포 사멸이 진행되는 것을 확인하였다. 또한, 최근들어 암세포 발생률과 강력한 양의 상관관계를 가지며, 세포 성장에 관여하는 cell growth factor 인 IGF-I의 경우, HT-29 세포에 라미나린을 처리 하였을 때 IGF-I receptor를 통하여 이루어지는 세포 성장 신호를 저해 하므로서 세포 성장신호전달을 차단시켜 주는 것을 확인할 수 있었다. 위 결과들을 토대로 본 실험에서는 라미나린 처리로 인한 세포사멸은 Fas를 통하여 이루어 지는데 이 세포사멸 경로와 IGF-IR를 통한 세포 성장 경로와의 연관성을 확인하고자 하였다.

Aptoptosis에서 caspase 역할은 앞에서 설명한 바와 같이 세포 사멸 경로를 실행하는 실행자의 역할을 하며 이 실행자인 caspase는 세포 사멸 관련 도메인을 가진 단백질간의 상호작용을 통하여 활성이 일어난다. 따라서 본 실험에서는 세포 사멸에 주 집행자인 caspase의 활성을 저해시키기 위해 pancaspase inhibitor를 사용하여 caspase 활성을 저해 시킨 다음 세포 성장 신호 전달 경로인 IGF-IR 통한 PI3K/AKT pathway와의 연관성을 확인하였다. 그 결과, HT-29세포에 라미나린을 처리하였을 때는 Akt와 PI3K 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었지만 최고농도인 5 mg/ml의 라미나린 처리 군에 pancaspase inhibitor를 처리하였을 때는 Akt 와 PI3K 발현이 증가 하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 12). 이러한 결과를 종합하여 볼 때 라미나린으로 유도된 세포증식 억제는 Fas signaling을 통하여 apoptosis 신호전달을 받음과 동시에 IGF-IR singaling을 통한 세포 성장 저해도 동시에 일어나며 caspase가 활성화되어 세포성장 단백질인 Akt와 PI3K 활성을 저해 시킨다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 13)

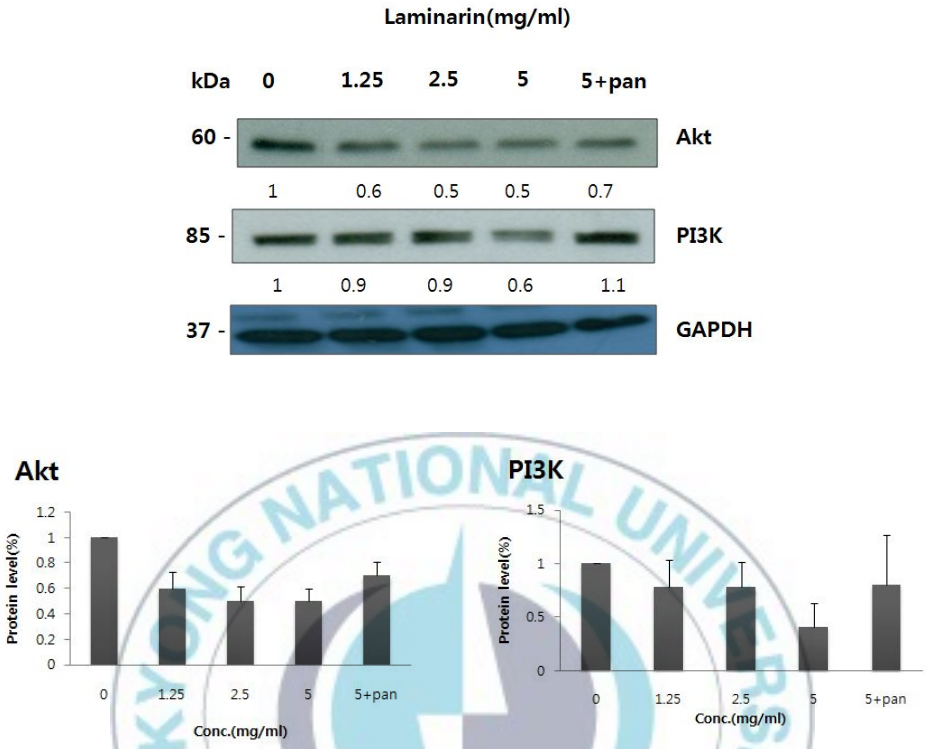


Fig. 12. Effect of laminarin on pancaspase inhibitor-induced recruitment of the PI3K and Akt in HT-29 cells.

Laminarin added at the varying concentrations (0, 1.25, 2.5, 5 mg/ml). HT-29 cells were treated for 1hr with or without pancaspase inhibitor. Also, laminarin was concentration of 5 mg/ml added pancaspase inhibitor (Z-VAD(Ome)-FMK). Each bar is quantitative analysis of immunoblots.

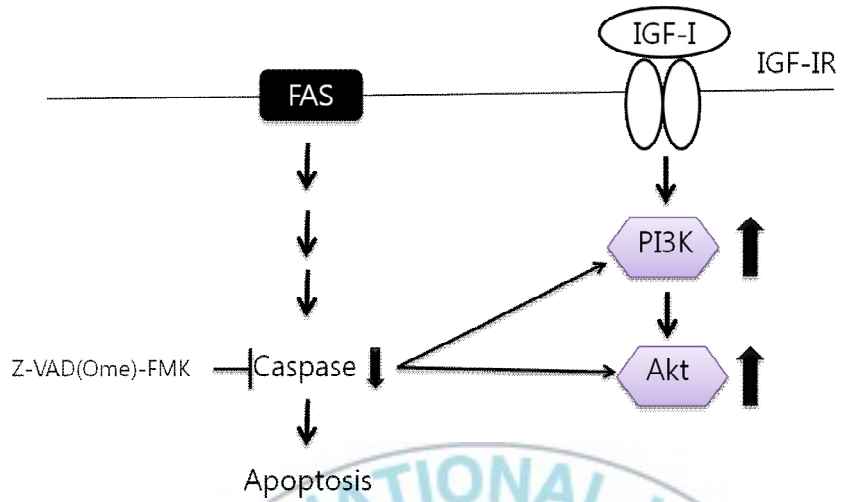


Fig. 13. Model of Fas induced apoptosis of inhibition IGF-IR associated proteins of Akt, PI3K.

Z-VAD(Ome)-FMK inhibits caspase activity that is activated through Fas, increased expression of Akt and PI3K.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

3) ErbB 관련 단백질 분석

ErbB receptor family 신호전달 과정의 조절 이상은 폐, 유방, 전립선암, 대장암, 십이지장암 등 여러 암에서 과 발현 되며, ErbB receptor family 활성의 비정상적인 조절이 암 발생의 중요한 원인으로 보고되고 있다 (Salomon DS et al., 1995). Receptor tyrosine kinase인 ErbB receptor family는 epidermal growth factor receptor(EGFR or ERbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4로 구성되어있으며 암의 발생에 중요한 인자로 알려져있다. ErbB recpetor의 경우 여기에 결합하는 ligand는 여러 종류가 있는데 EGF와 trans forming growth factor-α는 EGFR에 결합하고, heregulin(HRG)은 ErbB3와 ErbB4에 결합한다. 또한 HRG는 ErbB2와 coexpress 되며 ErbB2는 ErbB3와 heterodimerization을 통하여 autocrine activation 된다 (Venkateswarlu S et al., 2002). Ligand가 ErbB receptor의 extracellular domain에 결합하면 receptor의 dimerization이 일어나며 instrinsic tyrosin kinase가 활성화되어 receptor의 cytoplasmic domain의 tyrosine 잔기의 인산화가 일어난다. 인산화된 tyrosine 잔기는 intracellular signaling protein의 결합자리의 역할을 하게 된다. 이 결합자리에 subunit이 결합하게 되면 phosphatidylinositide-3-kinase(PI3K)가 활성화 되고 활성화되어진 PI3K로 인하여 생성되는 phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate는 Akt의 인산화를 촉진하여 활성화한다 (Varticovski L et al., 1994; Toker A et al., 1997; Klippel A et al., 1997). 이 활성화된 Akt는 apoptosis에 관여하는 단백질을 인산화하여 불활성화 시키고 이 후 apoptosis를 억제 하면서 cell survival을 촉진 한다고 알려져 있다 (Datta SR et al., 1995).

본 실험에서는 라미나린을 처리한 HT-29 세포를 회수하여 western blotting 한 다음 ErbB receptor의 발현양과 PI3K, JNK 발현양을 확인하였다. 그 결과, 라미나린을 HT-29 세포에 처리 하였을 때 농도 의존적으로 ErbB2 , ErbB3 발현양이 감소하는 것을 확인하였으며, 또한 하위

단계인 PI3K와 JNK도 농도 의존적으로 발현이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 HT-29 세포에 라미나린을 처리 하므로 인하여 ErbB signaling pathway에도 영향을 주는 것으로 추측된다 (Fig. 14).

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

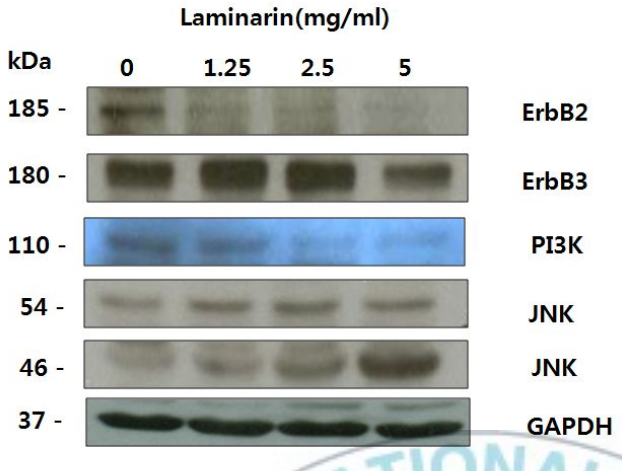


Fig. 14. Effect of laminarin on the expression of ErbB2, ErbB3, PI3K, JNK and GAPDH.

Cells were lysed and the cell lysates were analysed by Western blotting with ErbB2, ErbB3, PI3K, JNK antibody.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

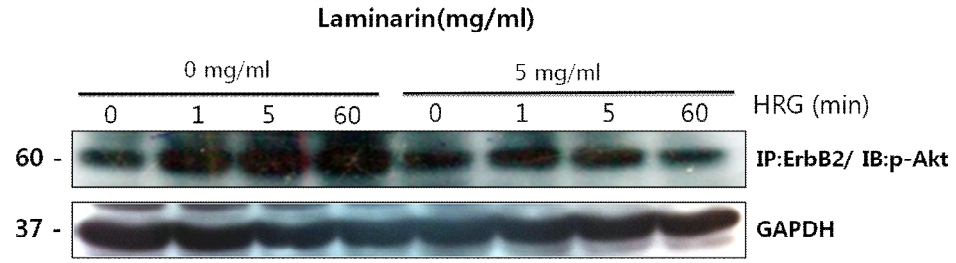
4) ErbB2 신호 전달 분석

라미나린에 의한 HT-29 세포에서 ErbB pathway에 따른 단백질 수준 감소를 확인하였으므로, HRG로 유도된 HT-29 대장암 증식세포의 억제가 HRG/ErbB2 신호전달 경로에 영향을 주는지 확인하기 위해 실험을 진행하였다.

먼저, ErbB2의 활성화는 세포 증식과 생존 조절인자인 p-Akt의 활성을 가져오게 되는데, 라미나린이 시간의존으로 HRG로 유도된 p-Akt의 발현에 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. Akt는 PI3K의 downstream target으로 세포 사멸 억제에 중요한 역할을 한다. 본 실험에서는 라미나린을 처리 하지 않은 군에서는 HRG로 유도되어진 Akt발현이 시간 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었지만, 라미나린을 2 mg/ml 처리한 후 HRG로 유도되어진 p-Akt 발현정도는 HRG를 1분 5분 처리 시에는 대조군에 비해 p-Akt 발현이 약간 증가하였지만 마지막 60분 처리 시에는 대조군에 비해 확연히 Akt 발현이 감소하는 것을 확인하였다.

이는 라미나린 처리로 인하여 HRG로 유도되어진 p-Akt의 발현 시간을 지연시켜주는 역할을 하는 것으로 보인다 (Fig. 15). 따라서 라미나린이 ErbB pathway에 속하는 단백질들의 발현을 감소시키는 것이 세포가 HRG에 반응 할 수 있는 능력 자체를 감소시키는 원인의 하나가 되는 것 같다.

(A)



(B)

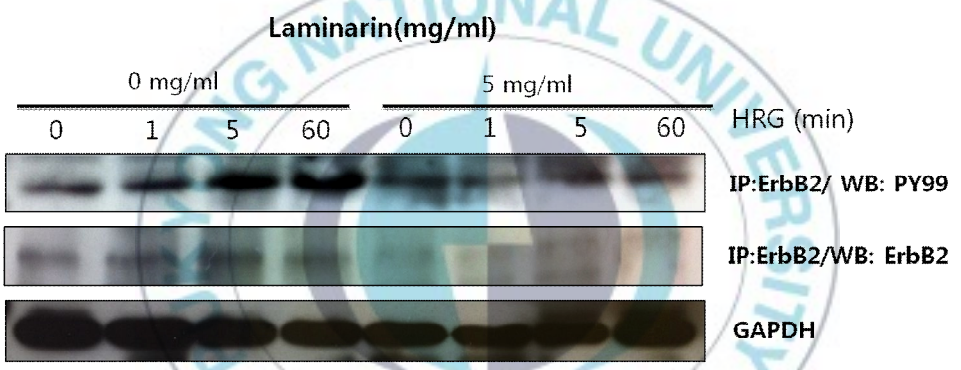


Fig. 15. Effect of laminarin on HRG-induced phospho-Akt and PY99.

HRG (100 ng/ml) was added 0 ~60 min immediately prior to lysate (750 μg) preparations. (A) Cell lysates were incubated anti-ErbB2 antibody and Protein A-Sepharose to immunoprecipitate proteins with HRG. Total lysates were analyzed by immunoblotting for phopho-Akt. (B) The resulting proteins were analyzed by Western blotting analysis.

Ⅳ. 결론 및 요약

암은 유전자, 나이, 생활습관, 성장인자가 암의 주요 위험인자로 작용하며, 또한 암 치료를 위해 현재 사용되고 있는 항암제를 대체 할 수 있는 좋은 소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 대부분의 항암제는 다양한 부작용을 일으키고 있는데 이는 암세포뿐 만 아니라 정상세포에도 영향을 미치는 독성을 가진다. 따라서 독성과 부작용이 없는 항암제 연구에 좋은 소재로 천연물로부터 항암성분을 찾는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그중 해조류로부터 분리, 정제된 물질을 통한 항암효과에 대한 관심이 증가되고 있는데, 지구 표면의 70%를 차지하는 해양에서는 지구상의 모든 생물종의 80% 이상의 많은 해양 생물이 서식하고 있으며 최근에는 해양생물에서 유용물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행 중에 있다. 특히 해양생물 중 해조류는 영양소 뿐 아니라 다양한 생리 활성 물질을 함유하고 있어 항암제의 좋은 소재가 될 수 있을 것으로 추측된다.

해조류 속 다양한 생리활성 물질 중 항암활성을 지닌 물질들은 암세포에 있어서 세포 사멸을 유도 하는 것이 특징이며 (Fischer and Schulze-Osthoff, 2005), 이런 물질은 apoptosis를 유도 하여 암세포에 항암효과를 나타내는 것으로 보고 되고 있다.

본 연구에서는 해조류 다당류중 하나인 라미나린을 인간 대장암세포인 HT-29에 처리하여 세포 생존율이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 또한 위 장관 정상세포인 IEC-6 세포 에서는 세포 독성이 없는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 또한 위 결과를 근거로 세포 수 감소와 형태학적 변화를 관찰하였으며, 생존한 세포와 사멸된 세포의 DNA를 blue 계열로 염색하며 핵의 형태학적 변화에 이용되고 있는 Hoechst 33342 염색법을 통하여 apoptotic body가 농도 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 2-3).

이러한 결과를 바탕으로 갈조류에 포함한 다당류인 라미나린에 의한 세

포증식 억제가 apoptosis임을 단백질 발현 등을 통하여 확인이 가능하였다. 일반적인 세포사멸경로는 Fas나 TRAIL 경로를 통하여 조절된다. Fas 매개 세포사멸 경로에서 하위단계에 caspase 라는 효소가 관여를 하는데, 이 효소는 세포의 증식과 유지에 필요한 단백질을 분해하는 효소로서 세포사멸의 실질적 집행자로 작용한다 (Chun S-Y et al., 1998). 일반적으로 caspase-8은 cell death ligand가 receptor에 결합이 되면 활성이 일어나 effector caspase (caspase-3)를 활성화 시키지만 (Honglin et al., 1998), 최근에 연구보고에 따르면 Fas로 매개되어진 세포사멸의 경우에서 caspase-8에 비 의존적으로 caspase-3의 활성이 일어나는 경로가 있다. 본 연구에서는 caspase activity의 발현을 측정한 결과, caspase-3의 활성은 라미나린에 의해 농도 의존적으로 증가하였고 caspase-8의 활성은 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 7). 이는 caspase X라는 새로운 효소의 경로를 통하여 Fas로 매개된 세포사멸 경로로 추측된다 (Hanping Feng et al., 2004).

본 연구에서는 라미나린으로 인한 apoptosis 유도에서 라미나린을 0, 0.125, 2.5, 5 mg/mL 농도별로 24시간 처리하였을 때 Fas, cleaved PARP, FADD 및 capase cleaved 발현을 확인하였다 (Fig. 4).

Bcl-2 family proteins의 경우, 미토콘드리아의 막 투과성을 조절하여 instrinsic apoptosis pathway에 작용하는 단백질 중 하나이다. 그 중에서도 종류에 따라서는 apoptosis를 유도하는 인자가 있는 반면, anti-apoptosis를 조절하기도 하는데, bax는 apoptosis에 관여하고, Bcl-2의 경우는 그 반대의 역할을 가지고 있다 (Sudheer KM et al., 2006). Bcl-2 family proteins중 Bax는 apoptosis가 발생할 경우에는 미토콘드리아 내에 cytochrome c의 세포질 방출을 방어해 주는 역할을 한다. 이렇게 세포질로 방출되어진 cytochrome c는 Apaf-1과 결합하여 apoptosome을 형성한 후 capase-3의 활성을 유도하여 세포 사멸에 이르게 한다 (Lavrik I et al., 2005).

Fig.5와 Fig.6에서는 Bcl-2 family proteins의 발현으로 인한 apoptosis

를 확인 하였으며, cytochrome c가 미토콘드리아에서 세포질로의 방출이 라미나린을 농도별로 처리 하였을 때 농도 의존적으로 증가 하는 것을 확인하였다.

세포에 있어 세포주기는 복제와 분열을 반복하는 과정을 말한다. 세포주기는 일정한 순서에 의하여 이루어 지는데 이 순서들이 뒤바뀌거나 조절이 불규칙해 지면 세포주기의 유지가 어려워지게 된다. 불균형해진 세포 주기로 인하여 암이 발생할 수 있는 요인이 되거나 혹은 암세포의 성장이 정지되는 것을 통하여 항암효과를 기대 할 수 있다. 라미나린을 HT-29 세포에 처리한 결과 농도 의존적으로 세포의 성장이 억제 되었는데 세포 주기 측면에서는 sub-G1기 arrest 유발에 의한 것으로 확인할 수 있었다 (Fig. 9). 또한 , Fig.9 에서는 라미나린을 처리하였을 때 인간 대장암세포인 HT-29세포에서 sub-G1 arrest 가 일어날 때 세포주기를 조절하는 단백질들의 발현을 확인하였으며, 이는 Fig. 8에서 확인한 sub-G1 arrest를 비롯하여 세포주기 변화를 확인할 수 있었다.

또한, 라미나린 처리에 있어 Insulin-like growth factor (IGF)인 IGF-I receptor pathway와 ErbB signaling pathway와 관련된 단백질 발현을 통하여 라미나린에 처리로 의한 HT-29 세포의 성장 신호 감소를 확인하였다 (Fig. 11, Fig. 14). 세포의 성장 및 증식은 여러 가지 인자들에 의해 조절되는데 그 중 IGF system은 인체 내 대부분의 기관계에 영향을 미친다. IGF-I은 인슐린과 유사한 구조를 가지며 성장 촉진 및 세포사멸 억제효과를 나타내며, 세포 표면의 IGF-IR와 결합하여 세포내 다양한 신호전달경로를 활성화한다. IGF-IR가 활성화되면 insulin receptor substrate (IRS) family 단백질들이 인산화되어 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway와 mitrogen-activated protein kinase (MAPK) pathway와 같은 세포내 신호전달 경로를 활성화 시켜 세포증식 및 생존을 유도하게 된다 (Vanhaesebroeck B et al., 1997). MAPKs는 세포 내에서 성장 및 분화에 관련된 신호전달 경로에서 중요한 역할을 담당하는 인산화효소로 세포 외 자극을 전달하는데 중심적인 역할을

한다 (Alessi DR et al., 1998).

또한, 라미나린 처리로 인한 세포사멸은 Fas를 통하여 이루어 지는데 이 세포사멸 경로와 IGF-IR를 통한 세포 성장 경로와의 연관성을 inhibitor 처리로 확인하였다 (Fig 12-13).

또 다른 세포성장인자인 ErbB receptor family 신호전달 과정의 조절 이상은 폐, 유방, 전립선암, 대장암, 십이지장암 등 여러 암에서 과 발현 되며, ErbB receptor family 활성의 비정상적인 조절이 암 발생의 중요한 원인으로 보고되고 있다 (Salomon DS et al., 1995). Receptor tyrosine kinase인 ErbB receptor family는 epidermal growth factor receptor(EGFR or ERbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4로 구성되어있으며 암의 발생에 중요한 인자로 알려 있는데 인간 대장암세포인 HT-29 세포에 라미나린 처리로 이러한 ErbB recptor famaily의 신호 전달 과정 억제를 확인할 수 있었다. 또한, HT-29세포에 HRG를 처리 한 다음 ErbB pathway에 downstream 단백질의 발현을 확인 한 결과, HRG와 라미나린을 함께 처리 한 군에서 HRG로 유도된 ErbB downstream 단백질 발현이 지연되는 것을 확인하였다 (Fig. 15).

위의 결과들을 종합하여 볼 때, 라미나린 처리에 의한 HT-29 세포에서 Fas의 경로를 통해 caspase가 활성화되어 apoptosis를 유발하여 세포 증식 억제를 확인하였으며, 세포 성장과 증식에 관여하는 IGF-I receptor signaling pathway와 ErbB signaling pathway의 감소도 동시에 일어나는 것으로 확인하였다. 이로 인하여 라미나린이 인간 대장암세포에서에 농도 의존적으로 항암효과를 가지는 것을 확인하였고, 이는 라미나린이 항암효과를 가지는 기능성 식품의 소재로서 이용가치가 있음을 제안 할 수 있다.

Ⅴ. 참고 문헌

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

Bruna P, Margaret K, Antonio G. 2000. Cell cycle and Apoptosis. *Neoplasia* 4.2, 291-299.

Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S. 1996. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor- induced apoptosis. *J Biol Chem*;271:4961-5.

Chuns S-Y, Hsueh AJW. 1998. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod Immunol*. 39, 63-75.

Cotter TG, Glynn JM, Echeverri F, Green DR. 1992. The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle. *Anticancer Res* 12, 773±779

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

Elizabeth Y, Jiping Z, Jennifer J, Lawrence HB, Cralg BT, Korsmeyer SJ. 1995. Bad, a Heterodimeric Partner for Bcl-Xl and Bcl-2 Displaces Bax and Promotes Cell Death. *Cell* 80, 285-291.

Emanuele S, D'Anneo A, Bellavia G, Vassallo B, Lauricella M, De Blasio A, Vento R and 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.

Endres M., Wang Z.-Q., Namura S., Waeber C., and Moskowitz M. A. 1997. Ischemic brain injury is mediated by the activation of

poly(ADP-ribose)polymerase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17,1143-1151.

Fischer U and Schulze-Osthoff K. 2005. Apoptosis-based therapies and drug targets. Cell Death Differ 12, 942-961.

Frank C. Church, James B. Meade, Rita E. Treanor, and HerberCt . Whinna .1989. Antithrombin Activity of Fucoidan. *The Journal of biological chemistry*. 264, 3618-3623.

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.

Hanping Feng, Yi Zeng, Michael W, Luke Whitesell, and Emmanuel Katsanis. 2004. Evidence for a Novel, Caspase-8-Independent, Fas Death Domain- Mediated Apoptotic Pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 41-52.

Hengarther MO. 2000. The biochemistry of apoptosis.*Nature* 407: 770-776.

Honglin Li, Zhu H, Xu Cj, and Yuan J. 1998. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Huang, D.C., and Strasser, A. 2000. BH3-only proteins－-essential of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839-842.

Hunter T. 1993. Breaking the cycle. *Cell* 75: 839-841.

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

Kelekar, A., and Thompson, C.B. 1998. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol. 8*, 324-330.

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

Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D, Williams LT. 1997. A specific

product of phophatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol* 17: 338-344.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-6

Lavrik I , Golks A, Krammer PH. 2005. Death receptor signailing. *J Cell Sci* 118, 265-267.

LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CTJr.1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16: 143-163.

Li H, Yuan J. 1999. Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol* ;11:261-6

Marx J. 1994. How cells cycle toward cancer. *Sceince* 263:319-321.

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

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

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

Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G.1992. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 11: 961-971.

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.

Strasser A, Newton K.1999. FADD/MORT1, a signal transducerthat can promote cell death or cell growth. *Int J Biochem cell Biol*;

31:533-7

Sudheer KM, Som DS, Santosh KK. 2006. Berbrine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinomal cells. *Mol Cancer Ther* 5.2, 296-308.

Tachibana O, Nakazawa H, Lampe J, Watanabe K, Kleihues P,Ohgaki H.1995. Expression of Fas/APO-1 during the progression of astrocytoma. *Cancer Res*; 55: 5528-30.

Toker A, Cantley LC. 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387:673-676.

Valentinis B, Reiss K, Baserga R. 1998. Insulin-like growth factor-I mediated survival from anoikis: role of cell affrefation and focal adhesion kinases. *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.

Varticovski L, Harrison-Findik D, Keeler ML, Susa M. 1994. Role of PI3-kinase in mitogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1226: 1-11.

Venkateswarlu S, Dawson DM, St Clair P, Gupta A, WillsonJK, and Brattain MG. 2002. Autocrine heregulin generates growth factor independence and blocks apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 21: 78-86.

Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D. 1991. Human D type cyclin. *Cell* 65: 691-699.

Zvyagintseva TN, Shevchenko NM, Nazarova IV, Scobum AS, Luk'yanov PA, Elyakova LA. 2000. Inhibition of complement activation by r aizwater-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. *Comp Biochem physiol* 126C: 209-215.