



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

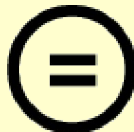
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

클로렐라 열수추출물이 IEC-6세포의 세포증식에 미치는 영향



2011년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

송 서 현

이학석사 학위논문

클로렐라 열수추출물이 IEC-6세포의 세포증식에 미치는 영향

지도교수 남택정

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.



2011년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

송서현

송서현의 이학석사 학위논문을
인준함.

2011년 2월 25일



주 심 약학박사 최 재 수 (인)

위 원 이학박사 류 은 순 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (인)

목 차

LIST OF TABLES	iii
LIST OF FIGURES	iv
ABBREVIATIONS	v
ABSTRACT	vii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
가. 시약 및 재료	4
2. 실험방법	5
가. 시료의 제조	5
1) 클로렐라 열수추출물(CVE)의 제조	5
2) SDS-PAGE electrophoresis	5
나. 세포배양	7
다. FAK inhibitor 처리	7
라. MTS assay	7
마. Western blot	8
1) Total cell lysate 추출	8
2) 세포질 획분 추출	8
3) 핵 획분 추출	8
4) Western blotting	9
바. 통계처리	10
III. 결과 및 고찰	11

1. CVE의 제조 및 일반성분 분석	11
2. CVE의 IEC-6 세포 성장 촉진 효과	14
가. CVE의 세포증식에 대한 영향	14
3. CVE의 세포증식작용 기전	17
가. IGF-IR와 FAK/Src 발현에 미치는 영향	17
나. MAPK signaling pathway에 미치는 영향	20
다. PI3K/Akt signaling pathway에 미치는 영향	23
라. Wnt signaling pathway에 미치는 영향	26
마. FAK의 발현억제가 canonical Wnt signaling pathway에 미치는 영향	29
IV. 요약 및 결론	34
V. 참고문헌	36
감사의 글	45



LIST OF TABLES

Table 1. Proximate composition of *Chlorella vulgaris* and hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CVE).



LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Extraction process from *Chlorella vulgaris*.
- Fig. 2. **SDS**-PAGE bands of CVE.
- Fig. 3. Proliferative effect of CVE on IEC-6 cells.
- Fig. 4. CVE multiplies IEC-6 cells and photomicrography.
- Fig. 5. Effects of CVE treatment on IGF-IR, FAK and Src expression in IEC-6 cells.
- Fig. 6. Effects of CVE treatment on MAPK pathway regulators expression in IEC-6 cells.
- Fig. 7. Effects of CVE treatment on PI3K and Akt expression in IEC-6 cells.
- Fig. 8. Effects of CVE treatment on canonical Wnt pathway regulators expression in IEC-6 cells.
- Fig. 9. Effect of FAK inhibitor on cell proliferation induced by CVE treatment in IEC-6 cells.
- Fig. 10. Effect of FAK inhibitor on canonical Wnt pathway regulators expression in IEC-6 cells.
- Fig. 11. The proposed model of proliferation mechanism induced by CVE in IEC-6 cells.

ABBREVIATION

APC : adenomatous polyposis coli
BCA : bicinchoninic acid
BRM : biological response modifier
BSA : bovine serum albumin
CGF : chlorella growth factor
CVE : hot water extract of *Chlorella vulgaris*
DMEM : dulbecco's modified eagle's medium
ECM : extracellular matrix
EGFR : epidermal growth factor receptor
ERK : extracellular-signal related kinase
FAK : focal adhesion kinase
FBS : fetal bovine serum
FGF : fibroblast growth factor
GSK3 β : glycogen synthase kinase-3 β
IGF-IR : insulin-like growth factor-I receptor
IRS : insulin receptor substrate
JNK : c-jun amino-terminal kinase
kDa : kilodalton
LEF : lymphoid enhancer-binding factor
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MEK : MAP kinase/Erk kinase
MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt)
NSAID : non steroidal anti-inflammatory drugs
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
PAS : periodic acid-Schiff

PBS : phosphate buffered saline
PCP : planar cell polarity
PDGFR : platelet-derived growth factor receptor
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PMS : phenazine methosulfate
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF : polyvinylidene fluoride
SDS : sodium dodecyl sulfate
SFKs : Src family kinases
SH2 : Src homology 2
TBS-T : tris-buffered saline containing 0.1% tween 20
TCF : T cell-specific factor
VSMC : vascular smooth muscle



The effects of hot water extract from *Chlorella vulgaris* on the IEC-6 cells' proliferation

Seo-Hyeon Song

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

Abstract

Chlorella is a unicellular microalgae that is ubiquitous in freshwater environments. It contains highly nutritious substances such as protein, carbohydrates, vitamins, minerals, fatty acids, dietary fibers and nucleic acids and exerts various biological effects. Hot water extract of *Chlorella* is a biological response modifier (BRM) which modulates immune responses against tumors, bacteria and viruses. But the effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on normal cell proliferation has not been studied.

In this study, the hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CVE) was gained which had a proliferative effect, and examined signal transduction pathways focusing on insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR), focal adhesion kinase (FAK)/Src signaling and Wnt pathways. The IGF system plays essential role in the regulation of cell growth, proliferation and survival. FAK is a protein tyrosine kinase that appears to have many functions in cells, linking integrin signaling to down stream targets, acting as part of a survival signal pathway and having connection with cell motility. CVE induced the increased expression of IGF-IR and the activation of FAK and Src. IGF-IR and FAK induce activation of multiple intracellular signal transduction cascades, including the phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. In this study,

CVE induced the activation of ERK but not the activation of JNK and p38. And it induced the increased expression of p85 and the activation of Akt.

At least three different Wnt pathways are currently recognized: the canonical Wnt pathway, which is mediated via β -catenin and T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) factors; the planar cell polarity (PCP) pathway; and the Wnt-Ca²⁺ pathway. The canonical Wnt pathway is essential for cell proliferation and development. As a result of the experiments, CVE induced the increased expression of nuclear β -catenin and cyclin D1.

Tyr-397 site of FAK can mediate interactions with SH2 domains of a number of other signaling proteins including PI3K, PLC- γ , Shc, Grb7, Src and Nck2. Because we confirmed that CVE has proliferative effect on IEC-6 cells via FAK activation, we examined whether FAK inhibitor can effect on canonical Wnt pathway. As a result, the treatment of FAK inhibitor induced the decreased expression of nuclear β -catenin, cyclin D1, c-myc and increased expression of cytosol β -catenin.

These results indicate that CVE stimulates cell proliferation via MAPK pathway, PI3K/Akt pathway and canonical Wnt signaling pathway. And activation of FAK influences canonical Wnt signaling pathway: translocation of cytosolic β -catenin to nucleus. Gastrointestinal damage associated with the use of non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and chemotherapy. Therefore CVE has a potential application as functional foods for protecting gastro-intestinal tract.

I. 서 론

생명공학관련 과학기술의 발전으로 천연물로부터 새로운 생리활성물질을 찾으려는 연구가 많이 진행되고 있다. 그 중 미세조류가 미래 생물자원의 하나로 주목받고 있다. 미세조류는 주로 광합성을 통해 세포 성장과 번식이 이루어지는 식물군으로 일반 미생물에 비해 그 종류가 다양하고 수가 많다고 알려져 있으며, 이것은 새로운 생리활성물질이 발견될 수 있는 가능성을 암시한다 (Becker, 1994). 미세조류는 지상 식물보다 성장속도가 빠르고, 담수나 해수에서 빛 에너지가 존재하는 환경에서 쉽게 생육할 수 있으며, 특정 생리 기능을 갖는 물질을 고농도로 생산할 수 있다는 점에서 중요한 생물 산업 소재로서 가능성이 충분하다고 할 수 있다 (주, 2000). 대표적인 종으로는 *Chlorella* sp., *Spirulina* sp., *Dunaliella* sp., *Porphyridium* sp., *Phaeodactylum* sp. 등이 연구에 이용되고 있으며 (Pulz and Gross, 2004), *Chlorella* sp.이 가장 널리 연구되어진 조류로 산업적 이용 범위가 넓다.

클로렐라는 호수나 연못 등의 담수나 해수에서 생육이 가능한 구형의 단세포 미세조류로 녹조류의 일종이다. 분류학상 *Chlorophyceae* 강, *Chlorococcum* 목, *Chlorella* 속으로 주요 종(species)으로는 *vulgaris*, *pyrenoidosa*, *ellipsoidea*가 널리 알려져 있다. 대표적인 고 영양가 식품인 우유와 계란에 비해 단백질, 비타민, 무기질의 함량이 높으며 (Atsushi, 1999), 특히 단백질 함량이 60% 정도의 고단백질 식품으로 필수 아미노산이 전체 아미노산의 36% 정도를 함유하며 그 균형이 잘 잡혀 있다. 지금까지 알려진 클로렐라의 기능성으로는 환경호르몬인 다이옥신의 체내 배출작용 (Morita *et al.*, 1999), 중금속의 축적 억제 및 배설작용 (Kim *et al.*, 2009), 환경독성물질의 생물학적 분해와 폐수중의 중금속 제거작용 (Tam *et al.*, 2002; Travieso *et al.*, 2002), 동맥경화 및 간장 장애의 억제작용 (Singh *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2009), 항산화작

용 (Lee *et al.*, 2010), 식품의 풍미 향상 및 보습효과 (Park *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003), 이산화탄소 고정화 작용 (Yun *et al.*, 1996; Sung *et al.*, 1998) 등의 연구가 진행되어 왔다.

클로렐라 추출물은 클로렐라 원말을 열수에서 유효성분을 추출한 후 원심분리법으로 균체의 불용성 물질을 제거한 후 이것을 농축, 분말화한 것이다. 클로렐라 추출물에는 단백질, 아미노산, 펩타이드, 당류, 핵산, 비타민, 무기질 및 CGF (*Chlorella growth factor*)를 함유하고 있으며 (Kang *et al.*, 2004), 면역기능 향상 (An *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2010), 항암작용 (Konishi *et al.*, 1996), 성장촉진작용 (Kanno *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002), 뇌졸중 개선 및 예방, 세포 재생 등의 효과가 있다고 알려져 있다.

클로렐라 단백질에 관한 연구들도 많이 보고되고 있는데 Sheih *et al.* (2009)은 *Chlorella vulgaris*의 부산물로부터 pepsin 가수분해 후 항산화 활성을 가지는 peptide를 분리했으며, Chu *et al.* (2006)은 *Chlorella pyrenoidosa*로부터 새로운 단백질인 haemagglutinin을 분리하였다. Kang *et al.* (2004)은 trypsin을 처리하여 가수분해한 *Chlorella vulgaris*로부터 생리활성을 나타내는 단백질을 분리하였고, Noda *et al.* (1996)은 클로렐라 배양액 내에 함유된 glycoprotein을 분리하여 항암효과를 확인하였다. 클로렐라에 관한 연구는 대부분 담수 클로렐라에 집중되어 있었으나 최근 해수 클로렐라 열수추출물이 신경세포의 분화를 촉진한다는 연구결과와 항암 및 면역활성이 보고되었다 (Lee *et al.*, 2003). 그리고 Choi *et al.* (2010)은 해수산 클로렐라의 유기용매 추출물로부터 항염증 효과를 확인하였다. 이와 같이 클로렐라 단백질에 대한 연구는 많이 보고되고 있지만, 세포 성장과 관련하여 IGF-IR와 Wnt 단백질이 관여하는 메커니즘에 대한 연구는 거의 보고되고 있지 않다.

세포의 성장 및 증식은 여러 가지 인자들에 의해 조절되는데 그 중 insulin-like growth factor (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 세포 내 다양한 신호전달경로를 활성화한다 (LeRoith and Roberts Jr., 2003). IGF-IR가 활성화되면 insulin receptor substrate (IRS) family 단백질들이 인산화되어 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway와 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway와 같은 세포 내 신호전달경로를 활성화시켜 세포증식 및 생존을 유도하게 된다 (Tai *et al.*, 2003). MAPKs는 세포 내에서 성장 및 분화에 관련된 신호전달경로에서 중요한 역할을 담당하는 인산화효소로 세포 외 자극을 전달하는데 중심적인 역할을 한다. MAPK group에는 extracellular-signal related kinase (ERK), c-jun amino-terminal kinase (JNK), p38 MAPK가 있는데 주로 ERK는 세포의 증식 및 분화를 조절하고, JNK와 p38은 염증반응과 세포사멸에 관여한다 (Zhang and Liu, 2002).

Wnt 단백질은 세포의 성장 및 증식 등의 다양한 발달과정을 조절한다고 알려져 있다 (Logan and Nusse, 2004). 세 가지의 경로가 존재하는데 canonical wnt pathway, planar cell polarity (PCP) pathway, Wnt-Ca²⁺ pathway로 이들 중 β -catenin과 TCF/LEF 인자들을 통해 전달되는 canonical Wnt pathway가 세포증식에 필수적이다 (Pinto *et al.*, 2003).

클로렐라는 그 기능성이 입증되어 있고 산업적으로 널리 응용되고 있지만 대부분 *in vivo*에서 증명된 결과들이다. 세포 수준에서 클로렐라 열수추출물의 생리활성을 검색하고 그 작용기전을 밝힌 연구는 면역, 항염증 등에 관한 보고가 있으나, 아직 위장관 정상세포의 증식작용에 관한 연구는 없었다. 본 연구에서는 rat에서 유래한 정상 소장 상피세포인 IEC-6 세포에 클로렐라 열수추출물을 처리했을 때 생리활성을 검토하였으며, 그 작용기전을 살펴보고자 하였다. 이 후 생리활성기능을 나타내는 특정 성분을 분리 및 분석하여 위장관을 보호하는 기능성식품으로 활용할 수 있는 가능성을 제안할 수 있을 것으로 생각된다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 시약 및 재료

본 실험에 사용된 클로렐라는 (주)대상에서 구입한 분말상태의 원말 (*Chlorella vulgaris*)을 사용하였다. 세포 배양에 사용된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin-streptomycin은 HyClone (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. Phosphate-buffered saline (PBS)은 Gibco/BRL (Invitrogen Co., USA) 제품을 사용하였고, trypsin, protease inhibitor 등은 Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Western blotting에 사용한 각종 antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA, USA)에서 구입하였고, focal adhesion kinase (FAK) inhibitor (1,2,4,5-benzenetetramine tetrahydrochloride)는 Tocris Bioscience (Missouri, USA) 제품을 사용하였다. Bovine serum albumin (BSA)는 Bio Basic Inc. (Markham, Ontario, Canada)에서 구입하였고, protein standard marker로 dual color marker는 Bio-Rad Laboratories, Inc. (CA, USA) 제품을 사용하였다. Detection reagent인 SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate와 세포 단백질농도를 측정하기 위한 bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay Kit는 Pierce (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. 세포 생존율을 측정하기 위한 CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit는 Promega Corp. (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 세포배양용 culture dish, 48-/96- well plate, corning tube, scrapper는 Corning (USA)와 Falcon (Becton Dickinson Labware, USA)

제품을 사용하였다.

2. 실험방법

가. 시료의 제조

1) 클로렐라 열수추출물 (Hot water extract of *Chlorella vulgaris*, CVE)의 제조

2009년 7월에 (주)대상에서 구입한 분말 클로렐라 (*chlorella vulgaris*) 40 g을 증류수 2 L에 넣고 교반한 후 초음파 처리를 1시간 동안 하였다. 121℃에서 15분간 고온고압상태에서 추출한 다음 원심분리 (8,000 rpm, 30 min, 4℃)하여 상층액을 감압농축 하였다. 이것을 동결건조 후 분말화하여 시료로 이용하였으며, 이를 클로렐라 열수추출물 (Hot water extract of *Chlorella vulgaris*, CVE)로 명명하였다.

2) SDS-PAGE electrophoresis

15% SDS-PAGE (Laemmli, 1970)로 전기영동을 한 후 CVE의 단백질을 coomassie blue staining을 통해 band를 확인하였다. 즉, staining solution (7% Acetic acid, 40% Methanol, 0.1% Bromo phenol blue)으로 실온에서 일정시간 동안 반응시킨 후 destaining solution (7% Acetic acid, 20% Methanol)으로 탈색시킨 후 band를 확인하였다. 그리고 periodic acid-Schiff (PAS) staining을 통해 CVE의 glycoprotein 부분을 확인하였다. PAS staining은 Pierce[®] Glycoprotein Staining Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용하였다.

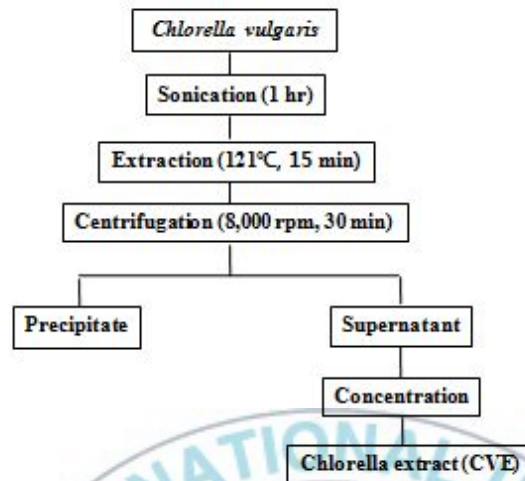


Fig. 1. Extraction process from *Chlorella vulgaris*.

나. 세포배양

Rat에서 유래된 소장 상피세포인 IEC-6 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂가 유지되도록 배양하였다. 이 때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 penicillin (100 units/ml)과 streptomycin (100 µg/ml)을 배지에 첨가하였다. 세포가 80%정도 confluent되면 PBS로 세척한 후 trypsin처리하여 계대배양 하였으며 배지는 48시간마다 교환하였다.

다. FAK inhibitor 처리

IEC-6 세포를 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한 다음 serum free-DMEM 배지로 교환하여 12시간 더 배양하였다. 12시간 경과 후, serum free-DMEM 배지에 FAK inhibitor를 2 µM의 농도로 처리하였다. 1시간 후 CVE를 25 µg/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 다음 세포증식을 확인하였다.

라. MTS assay

CVE가 IEC-6 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 세포를 분주한 후 세포부착을 위해 24시간 배양하고, phenol red free-DMEM 배지로 12시간 더 배양한 다음 CVE를 농도별로 처리하여 24시간동안 배양하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)/ phenazine methosulfate (PMS) solution을 첨가하고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 ELISA plate reader (BIO-RAD, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. Western blot

1) Total cell lysate 추출

CVE를 처리한 IEC-6 세포를 PBS로 2회 세척하고 protease inhibitor (1 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A, 200 mM Na_3VO_4 , 500 mM NaF, 100 mM PMSF)가 든 RIPA lysis buffer (1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 넣어 얼음 위에서 cell lysate를 회수하고 30분 간 방치시켰다. 회수한 cell lysate는 원심분리 (12,000 rpm, 4°C, 10 min) 하여 그 상층액을 실험에 사용하였다.

2) 세포질 획분 추출

세포질 획분 추출은 Lin *et al.* (2007)의 방법을 사용하였다. 즉, CVE를 처리한 IEC-6 세포를 PBS로 2회 세척하고, buffer A (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 250 mM sucrose)를 첨가하여 얼음 위에서 lysis 한 후 30분간 방치시켰다. 3,500 g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 분리하고 다시 원심분리 (1,400 g, 4°C, 15 min) 하여 그 상층액을 세포질 획분으로 사용하였다.

3) 핵 획분 추출

핵 획분 추출은 Park *et al.* (2005)의 방법을 사용하였다. 즉, CVE를 처리한 IEC-6 세포를 PBS로 2회 세척하고, hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2)를 500 μl 첨가하여 얼음 위에서 lysis 한 후 15분간 방치시켰다. 다시 2.5% NP-40을 첨

가하여 4℃에서 10분간 방치시킨 후 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. cell lysate에 nuclear extraction buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT)를 첨가하여 4℃에서 20분간 방치하고 원심분리 (14,000 rpm, 4℃, 10 min)하여 상층액을 핵 획분으로 사용하였다.

4) Western blotting

BCA protein assay kit를 이용해 각 획분의 단백질 농도를 측정하였다. 단백질 농도를 50 µg/lane으로 동일하게 취하여 SDS-PAGE로 전기영동한 다음 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, USA)으로 옮겼다. 이때 표준분자량은 dual color marker를 사용하였다. 분리된 단백질은 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate를 이용하여 단백질 발현을 확인하였다. 0.1% BSA이 포함된 Tris-buffered Saline-Tween 20 (TBS-T, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.1% Tween 20)에서 1시간동안 blocking한 다음 TBS-T로 15분간 2회 세척하였다. 세척한 membrane에 1차 항체를 1% BSA-TBS-T에 1:1,000 또는 1:500으로 희석하여 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. TBS-T로 15분간 2회 세척시킨 membrane을 2차 항체 (1:10,000)로 2시간 반응시킨 후, 다시 TBS-T로 15분간 2회 세척하고 SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution과 SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution을 사용하여 KODAK X-ray 필름에 감광시켰다. X-ray 필름을 현상한 후 scanning하여 나온 밴드의 강도를 Science Lab 2005 (Fujifilm, Japan)를 이용하여 비교분석하였다.

바. 통계처리

실험의 분석결과는 각각의 군별로 평균과 표준편차 (mean±S.D.)를 사용하여 표기하였으며, 모든 자료는 window용 SPSS 프로그램 (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 처리하였고, 반복측정에 의한 ANOVA test와 Duncan's multiple range test를 적용하였다. 이때, 모든 통계적 유의도 수준은 $p<0.05$ 에서 살펴보았다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. CVE의 제조 및 일반성분 분석

클로렐라 원말로부터 열수추출물 (hot water extract of *Chlorella vulgaris*, CVE)을 제조하는 과정은 Fig. 1에 제시하였다. 클로렐라 분말 40 g으로부터 6.96 g의 최종 추출물을 얻을 수 있었고, 이것은 약 17.4%의 수율로 나타났다. 클로렐라 원말의 일반성분을 Association of Analytical Communities (AOAC) 방법에 의해 분석한 결과, 수분이 $3.48 \pm 0.03\%$, 조단백질이 $54.53 \pm 0.11\%$, 조회분이 $3.88 \pm 0.02\%$, 그리고 탄수화물이 38.11%로 단백질이 가장 많은 비율을 차지하는 것을 확인하였다. 121°C 에서 열수추출 후 얻은 추출물인 CVE의 일반성분을 분석한 결과 수분이 $5.17 \pm 0.08\%$, 조단백질이 $61.41 \pm 0.18\%$, 조회분이 $14.24 \pm 0.10\%$, 그리고 탄수화물이 19.18%로 단백질이 가장 많은 양을 차지하는 것을 확인하였다 (Table 1).

CVE에 존재하는 단백질과 당 획분을 확인하기 위해 15% SDS-PAGE로 전기영동 한 후 coomassie blue staining을 통해 단백질 band를 확인하였다 (Fig. 2). 그 결과, CVE에 존재하는 단백질과 당의 획분은 다양한 분자량의 범위에 걸쳐 존재하는 것으로 나타났다.

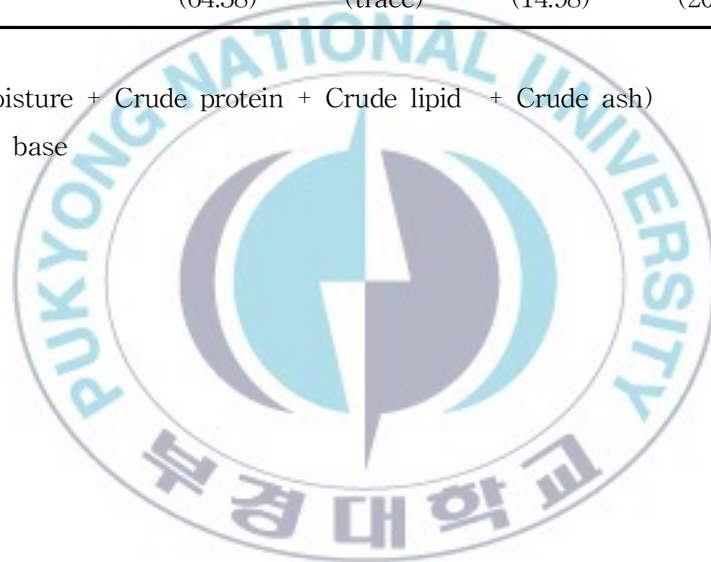
Table 1. Proximate composition of *Chlorella vulgaris* and hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CVE).

(%)

	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Carbo- hydrate ^{*1}
<i>Chlorella vulgaris</i>	3.48±0.03	54.53±0.11 (56.43)	trace (trace)	3.88±0.02 (4.02)	38.11 (39.44)
CVE	5.17±0.08	61.41±0.18 (64.58)	trace (trace)	14.24±0.10 (14.98)	19.18 (20.17)

¹100 - (Moisture + Crude protein + Crude lipid + Crude ash)

() = Dry base



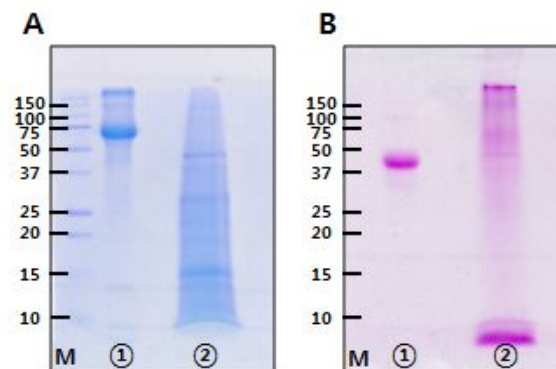


Fig. 2. SDS-PAGE bands of CVE.

CVE was separated by 15% SDS-PAGE, and then stained with coomassie blue staining and PAS staining. A: coomassie blue staining. ①: positive control (albumin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ②: CVE (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) B: PAS staining. ①: positive control (horseradish peroxidase, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ②: CVE (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) M: protein standard

2. CVE의 IEC-6 세포 성장 촉진 효과

가. CVE의 세포증식에 대한 영향

본 실험에서 사용된 IEC-6 세포는 rat에서 유래한 정상 소장 상피세포로, CVE를 24시간 처리한 후 tetrazolium compound인 MTS를 투여하고 일정시간동안 반응시켜 MTS가 세포 내 미토콘드리아에서 생산되는 succinate dehydrogenase에 의해 수용성 formazan으로 만들어진 것을 490nm에서 측정하여 세포의 증식 정도를 확인하였다.

먼저, IEC-6 세포증식에 대하여 CVE가 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 0, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간동안 처리하여 MTS assay로 분석하였다. 그 결과, CVE를 농도별로 처리하였을 때, 약 124%, 135%, 155%로 증식하여 농도 의존적으로 세포증식이 관찰되었으며 (Fig. 3), 이 후의 실험에서는 이 농도범위에서 실험을 진행하였다. Kim *et al.* (2002)은 열수추출 후 얻은 CGF를 keratinocyte에 0.015, 0.15, 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 4일 동안 처리했을 때 세포 수가 증가하였으며, 10분 동안의 단기간 자극 시에는 같은 농도에서 완만한 성장을 보이다가 150 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 급격한 extracellular acidification rate (ECAR) 증가율이 나타남을 보고하였다. 시료를 처리한 농도와 시간의 차이가 있지만 본 실험에서와 같이 낮은 농도에서 세포의 증식효과가 나타나는 결과를 보여주는 것이다.

다음으로, IEC-6 세포에 CVE를 처리하였을 때 형태학적인 변화를 보이는지 위상차 현미경 상에서 세포의 형태를 관찰하였다 (Fig. 4). 그 결과, CVE 처리 시 대조군과 비교하여 세포의 형태학적인 변화는 관찰할 수 없었으나, 세포의 증식이 활발한 것을 확인하였다. 즉, MTS assay와 동일하게 현미경 상에서도 세포의 증식을 확인할 수 있었다.

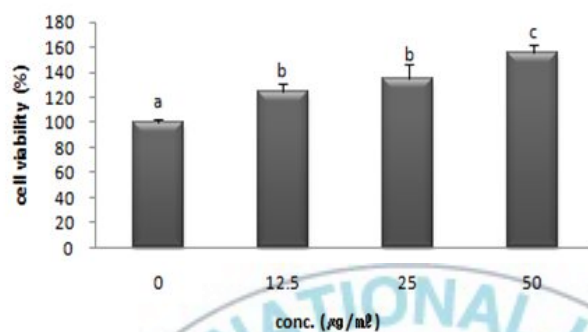


Fig. 3. Proliferative effect of CVE on IEC-6 cells.

IEC-6 cells were seeded in 48-well plates at a density of 2×10^4 cells/well with medium supplemented with 10% FBS. After incubation for 24hrs, cells were serum-starved for 12hrs and then treated with CVE in the indicated concentrations for 24hrs. The results indicated mean $\pm$ S.D. in three independent experiments.

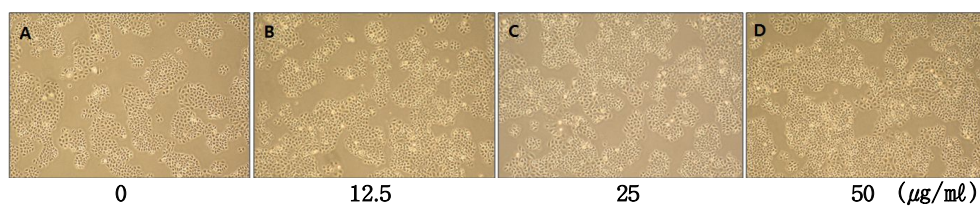
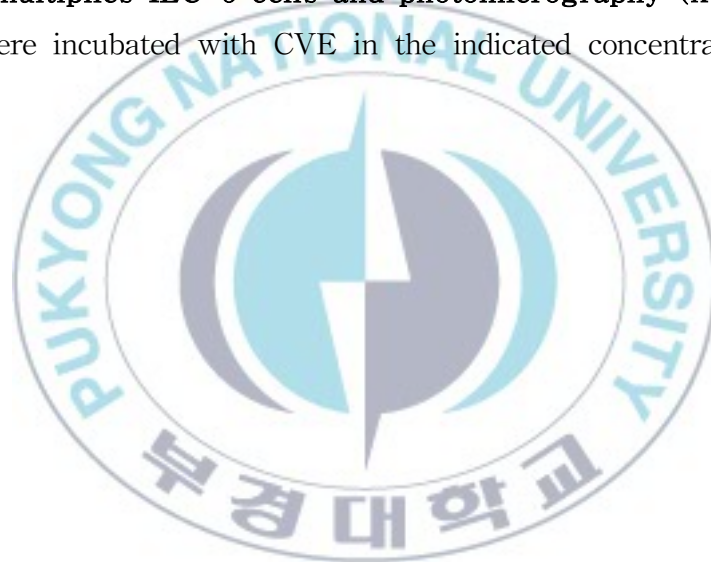


Fig. 4. CVE multiplies IEC-6 cells and photomicrography (x40).
IEC-6 cells were incubated with CVE in the indicated concentrations for 24hrs.



3. CVE의 세포증식작용 기전

가. IGF-IR와 FAK, Src 발현에 미치는 영향

위장관의 조직의 성장은 어느 성숙점에 도달하게 되면 편평곡선을 그리게 되며, 조직의 성장과 성숙에는 다양한 영양소, peptide, 호르몬 등이 필요하다. Insulin-like growth factors (IGFs)는 세포의 대사, 성장 및 분화를 조절하는 중요한 단백질로 우리 몸의 대부분의 세포에서 발현된다. IGF-I은 IGF-IR와 결합하여 세포의 증식, 세포주기 진행 및 세포분화, 초기 종양생성에 관여하며 apoptosis 억제작용을 나타낸다 (Baserga *et al.*, 1997). IGF-IR는 2개의 α -subunit과 2개의 β -subunit으로 구성되어 있는데, β -subunit은 transmembrane domain, juxtamembrane domain, tyrosine kinase domain과 C-말단 꼬리로 구성되어 있다. Ligand가 결합하면 자동적 인산화가 일어나고, insulin receptor substrates (IRSs), Src homology (SH), collagen domain protein (shc)을 통해 세포 내 신호전달 경로가 진행된다. 크게 두 가지의 주요 하위 경로가 존재하는데, MAPK와 PI3K/Akt 경로이다 (Parrizas *et al.*, 1997; Kulik *et al.*, 2008).

Focal adhesion kinase (FAK)는 여러 종류의 인간 암세포에서 과발현되는 non-receptor tyrosine kinase로, integrin과 growth factor의 신호전달을 조절하고 세포의 생존, 증식과 이동을 촉진시키는 기능이 있다. 또한 Integrin에 의해 활성화되어 extra cellular matrix (ECM) 과의 세포 부착에 관여하며, 세포 내 MAPK pathway와 PI3K/Akt pathway를 조절하기도 한다 (Andersson *et al.*, 2009). Jeon *et al.* (2010)은 뚝갈 (*Patrinia villosa*) 추출물이 FAK의 활성화로 angiogenesis를 유도한다고 하였고, Avraham *et al.* (2003)은 내피세포의 생존과 이동에 FAK가 관여한다고 보고하였다. 그리고 in vitro 실험에서 FAK가 결실되면 뇨세관 형성, 세포의 생존, 증식, 이동을 감소시킨다는 보고가 있다 (Shen *et al.*

2005).

Src는 세포의 증식, 부착 및 이동을 조절하는 non-receptor tyrosine kinase로 SFKs (Src family kinases)는 Src, Fyn, Yes, Lck, Hck, Blk, Fgr, Lyn, Yrk의 9가지 단백질로 구성되어 있다. 이들은 각각 N-말단에 SH3와 SH2 부위, tyrosine kinase 부위가 있고, C-말단에 negative regulatory element를 가진다 (Thomas and Brugge, 1997). Src와 FAK는 Src의 SH2 영역이 FAK의 자가 인산화 부위에 결합하여 서로 상호작용하게 된다. 그 후 Src가 FAK의 다른 부위를 인산화 시키고 하위 신호전달 경로에 영향을 미치게 되는 것이다.

앞서 우리는 소장 상피세포인 IEC-6세포에 CVE를 처리했을 때 MTS assay 결과로 세포증식효과를 확인할 수 있었다. 클로렐라 열수추출물 내 함유된 CGF가 사람각질형성 세포주인 HeCaT cell에서 EGF와 유사한 반응성을 나타내었고, 세포의 대사 및 증식에 영향을 미쳤다는 보고가 있다 (Kim *et al.*, 2002). 본 연구에서는 CVE의 처리로 세포증식이 유도되는 과정이 세포 증식 pathway 중 하나인 IGF-IR를 통해 이루어질 것이라고 가정하여 IGF-IR의 발현 및 하위 신호전달 경로와 어떻게 연관되고 작용하는지 살펴보았다.

우선, CVE의 처리로 인해 IGF-IR의 발현에 영향을 미치는지 살펴보았다. 그 결과, 농도 의존적으로 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. CVE의 처리가 FAK와 Src의 발현에도 영향을 미치는지 확인한 결과, CVE를 농도별로 처리했을 때 FAK의 인산화가 대조군에 비해 증가하는 것을 확인하였고, Src의 인산화 또한 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

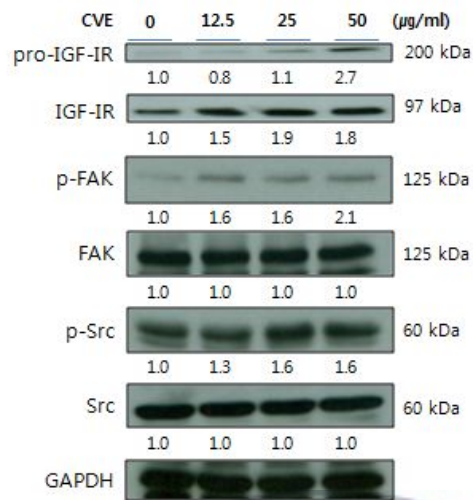


Fig. 5. Effects of CVE treatment on IGF-IR, FAK and Src expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with CVE after preincubation with SFM for 12hrs. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-IGF-IR β , anti-phospho-FAK, anti-FAK, anti-phospho-Src, anti-Src and anti-GAPDH antibodies.

나. MAPK signaling pathway에 미치는 영향

MAPK cascade는 세포 외 신호를 세포 내로 전달하는데 중심적인 역할을 한다고 알려져 있으며, MAPKs는 extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, C-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), p38 kinase가 있다. MAPK pathway는 세포의 증식, 분화, 면역반응, apoptosis 등의 생리적 반응에 관여한다. 일차적으로 세포막에 존재하는 성장인자들에 의해 세포증식이 조절되고, MAPK pathway를 포함한 여러 protein kinase cascade는 세포증식 조절에 필수적인 역할을 하게 되는 것이다 (Zhang and Liu, 2002). MEK1/2에 의해 ERK1/2가 활성화되면 전사인자들이 활성화되고 성장, 분화 및 유사분열을 촉진시키게 된다. JNK의 활성화는 종양유전자의 형질전환과 여러 성장인자들과 관련되는 경로와 연관된다. 이 과정에서 c-Jun의 transactivation이 중요한 역할을 하게 되는데 JNK는 신호를 변환시킬 수 있어서 apoptosis와 세포성장 경로에 모두 연관될 수 있다. p38 kinase는 UV 조사, 열충격, 삼투압 충격, lipopolysaccharide (LPS), 단백질 합성 억제제, IL-1이나 TNF- α 와 같은 proinflammatory cytokine, mitogen 등의 세포의 스트레스로 활성화된다 (Kyriakis and Avruch, 2001). p38 kinase는 세포의 생존, 증식, 분화, 염증반응, apoptosis, 다른 스트레스 반응에서 주요 역할을 한다고 알려져 있다. 주로 Cdc42로 유도된 세포주기인 G1/S기를 arrest하여 cyclin D1의 발현을 저해시킨다고 알려져 있지만 (Molnar *et al.*, 1997), 최근 Nebread (2000)은 p38의 활성화는 척추동물의 지방세포, 심근세포, 조연골세포, 적아세포, 근아세포, 신경세포 등의 분화과정에 관여한다고 하였다.

앞선 실험에서, CVE를 IEC-6 세포에 처리했을 때 IGF-IR의 발현을 증가시키고 FAK와 Src의 인산화로 세포증식이 유도되는 것을 확인하였다 (Fig. 5). 이들의 하위 신호전달 경로에는 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위해 MAPKs인 ERK, JNK, p38 kinase의 인산화를 살펴보았다. 그

결과, CVE 처리 시 대조군에 비해 ERK의 인산화가 증가하였으나 JNK와 p38의 인산화에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 6). 세포증식과 관련된 연구 결과를 살펴보면, Page *et al.* (1993)은 fibroblast의 세포증식에 있어서 p42/p44 MAPK가 필수적이라고 하였고, Lovicu and McAvoy (2001)은 fibroblast growth factor (FGF)로 유도된 lens cell의 세포증식에 MAPK가 관여한다고 하여 본 연구와 동일한 결과를 보여주었다.

이 결과를 바탕으로, CVE를 IEC-6 세포에 처리하였을 때 IGF-IR과 FAK와 연관된 하위 신호전달경로 중 MAPK pathway가 부분적으로 관여한다고 할 수 있는데, ERK의 활성화로 세포증식이 유도되는 것으로 생각된다.



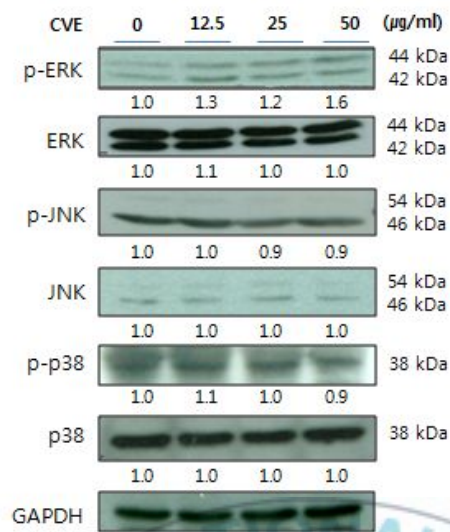


Fig. 6. Effects of CVE treatment on MAPK pathway regulators expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with CVE after preincubation with SFM for 12hrs. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-phospho-ERK1/2, anti-ERK, anti-phospho-JNK, anti-JNK, anti-phospho-p38, anti-p38 and anti-GAPDH antibodies.

다. PI3K/Akt signaling pathway에 미치는 영향

앞선 실험에서 IEC-6 세포에 CVE를 처리했을 때 ERK의 활성화가 부분적으로 세포증식에 관여한다고 하였기 때문에, PI3K/Akt signaling pathway 또한 IEC-6 세포의 증식에 관여할 것이라고 가정하고 관련된 단백질의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다 (Fig. 7). 그 결과 p85의 발현이 대조군에 비해 증가하였고 Akt의 인산화 또한 증가하는 것으로 나타났다.

PI3K는 여러 신호전달경로에 포함되는 중요한 조절 단백질 중의 하나로 세포의 성장, 증식, 분화 및 운동성 등의 세포 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Cantley, 2002). 이는 두 가지의 subunits (p85, p110)로 구성되며, 이들은 IGF-IR, EGFR, PDGFR나 non-receptor tyrosine kinase를 통해 활성화된다. PI3K가 세포분열을 조절하는데 2가지 작용기전이 알려져 있는데 (Klippel *et al.*, 1996), PI를 생성하는 PI3K lipid kinase activity와 세포 내 신호 단백질과의 직접적인 상호작용을 하는 PI3K protein kinase activity이다. 지금까지 phosphatidylinositides가 세포성장을 조절하는 것은 세포분열시 receptor tyrosine kinase에 의해 활성화되는 효소인 phospholipase C에 의한 것이라고 받아들였으나, 세포에 phospholipase C에 의해 생성된 phosphatidylinositides (inositol phosphates, diacylglycerol)의 가수분해 생성물이 protein kinase C (PKC)를 활성화시키고 가장 중요한 신호전달 경로를 자극한다고 밝혀졌다 (Krasilnikov, 2000). Calabro *et al.* (2004)은 ERK1/2와 PI3K 신호전달경로를 통해 resistin으로 인한 평활근세포의 증식이 유도된다고 하였고, Duan *et al.* (2000)은 IGF-I으로 유도된 vascular smooth muscle (VSMC)의 증식과 이동에 PI3K가 관여한다고 하였다.

Akt는 분자량이 57kDa인 serine/threonine protein kinase로 3가지 형태인 Akt1/ α , Akt2/ β , Akt3/ γ 가 존재한다. Akt는 phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1)에 의해 Thr308 부위가 인산화되고 C-말단

의 Ser473 부위가 인산화되면서 형태가 변하여 완전하게 활성화되는데 N-말단의 PH 부위가 PIP_3 와 상호작용하게 된다 (Alessi *et al.*, 1997). Akt가 활성화되면 세포질과 핵으로 이동하고 핵으로 이동한 Akt가 apoptosis로 진행되는 것을 차단한다. 현재까지 100여 가지의 Akt 기질들이 분리되었고 그 중 40여 가지의 기질들이 세포의 생존, 증식, 분화에 관여한다고 알려져 있다 (Manning and Cantley, 2007).

따라서, IEC-6 세포에 CVE 처리 시 IGF-IR와 FAK에 의해 조절되는 하위 신호전달 경로인 MAPK pathway와 PI3K/Akt pathway가 활성화를 유도하여 IEC-6 세포의 증식이 유도되는 것으로 보여진다.



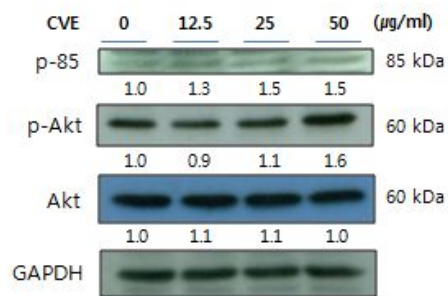


Fig. 7. Effects of CVE treatment on PI3K and Akt expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with CVE after preincubation with SFM for 12hrs. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-p85 α , anti-phospho-Akt1/2/3, anti-Akt1 and anti-GAPDH antibodies.

라. Wnt signaling pathway에 미치는 영향

지금까지 세 가지의 Wnt signaling pathway가 알려져 있는데, canonical wnt pathway, planar cell polarity (PCP) pathway, Wnt-Ca²⁺ pathway이다 (Staal *et al.*, 2008). 이 세 가지 경로 중 β -catenin과 T cell-specific factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) 인자들을 통해 전달되는 경로인 canonical Wnt pathway가 세포증식에 필수적인 것으로 알려져 있다 (Pinto *et al.*, 2003). 세포가 Wnt에 의해 자극이 되지 않을 경우, 세포질 내 β -catenin은 Axin과 adenomatous polyposis coli (APC) 단백질복합체 내에서 glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)에 의해 인산화되고 분해되어 그 수준이 낮게 유지된다. 그러나 Wnt의 자극이 발생할 경우, Axin이 유리되고 GSK3 β 의 활성이 저해되어 세포질 내 β -catenin의 수준이 높게 유지되고 안정화된다. 안정화된 β -catenin은 핵으로 이동하여 전사인자인 TCF/LEF와 결합하여 다양한 유전자의 발현을 조절하게 된다 (Staal and Luis, 2010). 현재까지 Wnt 신호전달에 의해 조절되는 유전자로 약 50여 가지가 밝혀져 있는데, 그 중 세포 주기를 조절하는 c-myc과 cyclin D1, 초기 발생을 조절하는 전사인자인 siamois와 brachyury 등이 대표적이다 (Dang, 1999; Arnold *et al.*, 2000).

β -catenin은 canonical Wnt signaling pathway의 주요한 effector이다. Wnt/ β -catenin signaling pathway를 통해 신경세포의 분화를 촉진시켜 신경계의 발달에 중요한 역할을 하는 것이 알려져 있다 (Muroyama *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2010). Cui *et al.* (2010)은 저산소증 상태에서 신경줄기세포가 증식하는데 있어 β -catenin과 그 목적 유전자인 cyclin D1 단백질의 발현 수준이 증가하는 것을 확인하였고, 부분적으로 세포증식에 관여한다고 하였다. 그리고 Rulifson *et al.* (2007)은 Wnt 신호전달경로가 췌장의 β -세포의 증식에 관여한다고 하였다.

앞선 결과에서, CVE를 IEC-6 세포에 처리했을 때 MAPK pathway와

PI3K/Akt pathway를 통해 세포증식이 유도되는 것을 확인하였다. CVE가 세포증식에 관여하는 것으로 알려진 canonical Wnt signaling pathway에도 영향을 미치는지 살펴보기 위해 세포질 내 β -catenin, 핵 내 β -catenin, 목적 유전자인 cyclin D1 과 c-myc의 단백질 발현 수준을 확인해 보았다. 그 결과, IEC-6 세포에 CVE 처리 시 세포질 내 β -catenin의 발현량은 변화가 없었으나, 핵 내 β -catenin의 단백질 발현수준이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 목적 유전자인 cyclin D1의 수준은 농도 의존적으로 증가하였으나, c-myc의 수준에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 8).

따라서, IEC-6 세포에 CVE 처리 시 IGF-IR, FAK/Src와 canonical Wnt 신호전달경로가 활성화되어 세포증식이 유도되는 것으로 생각된다.



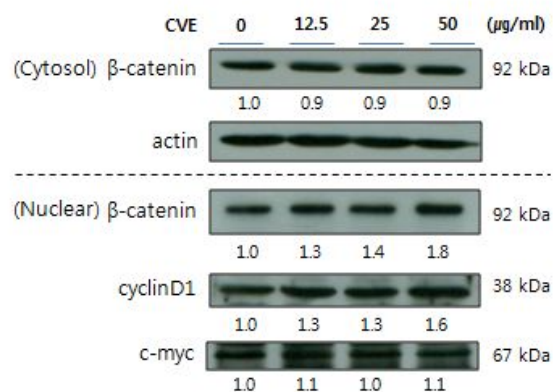


Fig. 8. Effects of CVE treatment on canonical Wnt pathway regulators expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with CVE after preincubation with SFM for 12hrs. Cytosolic fraction and nuclear fraction were prepared and analyzed by western blotting using anti-β-catenin, anti-c-myc, anti-cyclin D1 and anti-actin antibodies.

마. FAK의 발현억제가 canonical Wnt signaling pathway에 미치는 영향

앞에서, CVE 처리 시 FAK가 활성화되어 IEC-6 세포의 증식에 관여하는 것을 확인하였다 (Fig. 5). FAK의 자가인산화 부위인 Tyrosine(Y) 397은 하위 신호전달경로의 중요한 구성성분으로, SFKs의 결합부위를 제공한다. 활성화된 Y397-FAK와 Src의 상호작용은 FAK의 다른 부위의 인산화를 진행시키고, p130^{CAS}, paxillin과 같은 분자들을 인산화시켜 세포골격의 변화와 다른 하위 신호전달경로를 활성화시킨다 (Schlaepfer *et al.*, 2004). 또한 Y397은 PI3K, Grb-7, Shc 그리고 다른 단백질들과의 결합부위이기도 하다. 따라서 FAK의 신호전달에 있어서 Y397은 중요한 인산화부위라고 할 수 있다 (Hanks *et al.*, 2003).

본 연구에서는 FAK의 Y397 부위 인산화를 저해시키는 FAK inhibitor 14 (1,2,4,5-Benzenetetramine tetrahydrochloride)를 사용하여 FAK의 인산화를 저해시켰을 때 IEC-6 세포의 성장에 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다 (Fig. 9). 우선, MTS assay로 확인한 결과, CVE 단독 처리 군에서는 세포증식이 나타났으나, 2 μ M의 FAK inhibitor를 1시간동안 전처리한 후 CVE를 처리한 군에서는 대조군만큼 세포증식이 억제되었다. 이를 증명하기 위해 CVE 처리 시에도 FAK의 인산화가 inhibitor의 처리로 인해 감소하는 것을 western blotting을 이용하여 확인하였다. Jeon *et al.* (2010)은 FAK inhibitor를 처리한 인혈 제대정맥 내피세포에서 FAK와 Akt의 인산화가 감소하여 세포증식이 저해된다고 하였다. 이 외에도 FAK inhibitor는 암세포에 적용시켜 항암치료제로 활용하기 위한 연구가 많이 진행되고 있다 (Golubovskaya *et al.*, 2008; Tanjoni *et al.*, 2010).

FAK inhibitor를 처리했을 때 대조군과 유사한 수준으로 세포증식이 억제되었기 때문에 FAK의 활성화가 canonical Wnt 신호전달경로에도 영향을 줄 것이라고 가정하여 western blotting으로 살펴보았다. FAK의

활성화와 연관된 단백질의 발현을 살펴 본 결과, 세포질 내 β -catenin의 발현이 증가하였고 핵 내 β -catenin의 발현이 감소하였는데, 이것은 FAK inhibitor의 처리로 인해 세포질 내 β -catenin이 핵으로 이동하는 것이 저해되어 세포질 내에 축적된 것으로 보인다. 또한, 목적 유전자인 cyclin D1과 c-myc 또한 FAK inhibitor를 처리한 군에서 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 10). FAK inhibitor의 처리 후 MTS assay 결과에서는 대조군 수준만큼 세포증식이 감소되었으나, western blotting 결과에서는 대조군 수준만큼 FAK의 인산화가 감소하는 결과는 얻을 수 없었다. 이것은 FAK의 활성화를 저해시키면, 세포증식과 연관된 여러 신호전달 경로가 부분적으로 차단된 결과라고 생각된다.

이상의 결과를 그림으로 도식화하였다 (Fig. 11) 즉, IEC-6 세포에 CVE를 처리하면 세포막의 receptor에 자극이 발생되어 하위 신호전달경로인 MAPK와 PI3K/Akt 경로를 활성화 시키고, canonical Wnt 신호전달경로를 활성화시켜 결과적으로 IEC-6 세포의 세포증식이 유도된다. 또한, IEC-6 세포에 FAK inhibitor를 처리하면 CVE에 의한 세포증식이 억제되었는데, 이것은 IGF-IR와 연관된 하위 신호전달경로가 활성화되는 것을 저해하고, canonical Wnt 신호전달경로에서 세포질 내 β -catenin이 핵으로 translocation되는 것을 저해하여 세포증식이 억제되는 것으로 보인다. 따라서 FAK의 활성화는 canonical Wnt 신호전달경로와 연관된 단백질의 발현, 특히 세포질 내 β -catenin의 translocation에 영향을 미치는 것으로 추론할 수 있었다.

따라서, CVE에 의해 IEC-6 세포의 증식이 유도될 때 MAPK, PI3K/Akt, canonical Wnt pathway가 관여하는데, FAK의 활성화가 주요한 조절자의 역할을 하는 것으로 보인다. CVE에 함유된 특정 성분이 직접적으로 세포막의 receptor를 자극시키는 것인지는 더 많은 연구가 진행되어야 증명될 수 있을 것으로 생각된다. 앞으로 추가적인 연구를 통해 위장관 보호효과를 가지는 기능성 식품으로 CVE가 응용될 수 있는 가능성을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

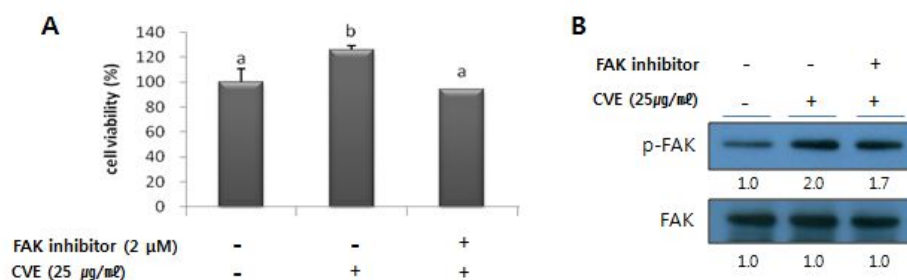


Fig. 9. Effect of FAK inhibitor on cell proliferation induced by CVE treatment in IEC-6 cells.

(a) Cells were seeded onto 96-well plates at 1.5×10^4 cells/well in 100 μ l of medium. After 24 hrs, cells were maintained in SFM for 12 hrs. After pretreatment with FAK inhibitor (2 μ M), cells were incubated with CVE for 24 hrs. Cell viability was measured with MTS assay kit as manufacturer's instruction. Values are the mean $\pm$ S.D. Different alphabets are significantly values among the group by Duncan's multiple range test. (b) Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-phospho-FAK, anti-FAK antibodies.

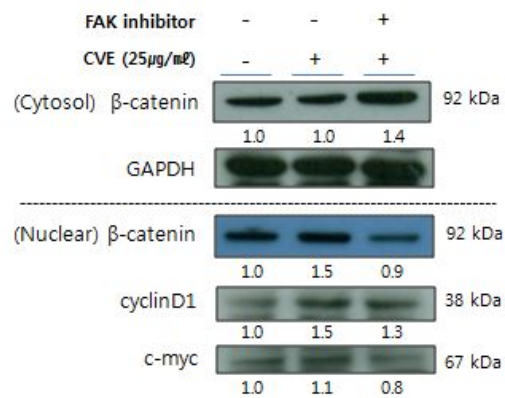


Fig. 10. Effect of FAK inhibitor on canonical Wnt pathway regulators expression in IEC-6 cells.

Cells were pretreated with FAK inhibitor (2 μM) and then incubated with CVE for 24 hrs. Cytosolic fraction and nuclear fraction were prepared and analyzed by western blotting using anti-β-catenin, anti-c-myc, anti-cyclin D1 and anti-GAPDH antibodies.

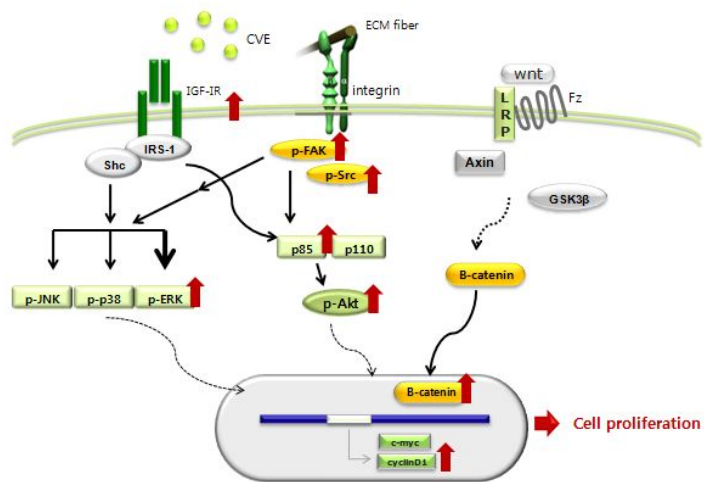


Fig. 11. The proposed model of proliferation mechanism induced by CVE in IEC-6 cells.



IV. 요약 및 결론

생명공학관련 과학기술의 발전으로 해양천연물로부터 새로운 생리활성 물질을 찾으려는 연구가 많이 진행되고 있다. 최근 미세조류가 미래 생물자원의 하나로 주목받고 있으며, 그 중 클로렐라는 산업적으로 많이 응용되고 있으며 다양한 기능성이 알려져 있다. 클로렐라는 호수나 연못 등의 담수나 해수에서 생육이 가능한 구형의 단세포 미세조류로 녹조류의 일종이다. 클로렐라 추출물은 클로렐라 원말을 열수에서 유효성분을 추출한 후 원심분리법으로 균체의 불용성 물질을 제거한 후 이것을 농축, 분말화한 것으로 항암효과, 면역활성, 성장촉진 등의 기능성을 나타낸다고 알려져 있다. 본 연구에서는 클로렐라 열수추출물(CVE)을 rat에서 유래한 정상 소장 상피세포인 IEC-6 세포에 처리하여 생리활성을 검토한 결과, 세포증식효과를 확인하였으며 그 작용기전을 확인하였다. IGF-IR와 연관된 신호전달경로와 Wnt 신호전달경로를 중점적으로 살펴 보았으며, FAK inhibitor를 처리하여 CVE에 의한 세포증식이 억제됨을 확인한 후, FAK의 활성화가 canonical Wnt signaling pathway에 관련된 단백질들의 발현에 어떻게 영향을 미치는지 확인하였다.

CVE의 일반성분을 분석한 결과 수분이 $5.17 \pm 0.08\%$, 조단백질이 $61.41 \pm 0.18\%$, 조회분이 $14.24 \pm 0.10\%$, 그리고 탄수화물이 19.18% 로 단백질이 가장 많은 양을 차지하는 것을 확인하였다. 그리고 coomassie blue staining과 PAS staining을 이용하여 CVE에 포함되어 있는 단백질이 다양한 분자량에 걸쳐 존재함을 확인하였다.

IEC-6 세포에 CVE를 농도별로 처리했을 때 세포 증식효과를 확인하였으며, IEC-6 세포의 증식이 어떤 신호전달경로에 의해 진행되는지 확인한 결과, IGF-IR의 발현이 증가하였고, integrin에 의해 활성화되며 IGF-IR와도 연관되어 있다고 알려진 FAK와 Src의 단백질 인산화 또한 증가하는 것을 확인하였다.

세포증식에 관여하는 MAPK signaling pathway 중 ERK, JNK, p38의 인산화를 살펴 본 결과, ERK의 인산화를 증가시키고 JNK와 p38의 인산화에는 영향을 미치지 않았다. CVE 처리 시 PI3K/Akt signaling pathway 중 p85의 발현이 증가하였고 Akt의 인산화가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

CVE의 처리 후 canonical Wnt signaling pathway와 관련된 단백질의 발현을 살펴본 결과, cytosol 내 β -catenin의 단백질 발현 수준에는 영향을 주지 않았으나, 핵 내 β -catenin과 cyclin D1의 발현 수준이 증가하는 것을 확인하였다. 그러나 c-myc의 발현량에는 영향을 미치지 않았다.

FAK는 integrin과 ECM과의 세포부착에 관여하며, IGF-IR 신호전달 경로와 연관되는 단백질이기 때문에 FAK inhibitor를 처리할 경우 세포증식에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상할 수 있었다. MTS assay를 통해 FAK inhibitor 처리 시 세포의 증식이 대조군 수준으로 감소하였고, FAK의 인산화는 FAK inhibitor 처리로 인해 저해되었다. FAK의 활성화가 canonical Wnt signaling pathway에도 영향을 줄 수 있다고 가정하여 관련된 단백질의 발현을 미치는지 살펴보았다. 그 결과, FAK inhibitor를 처리한 군에서 세포질 내 β -catenin의 발현이 증가하였고, 핵 내 β -catenin의 발현이 감소하였다. 그리고 목적 유전자인 cyclin D1과 c-myc의 발현량이 감소하는 것을 확인하였다.

이상의 결과를 종합해보면, CVE의 처리로 인해 IEC-6 세포의 세포증식이 유도되는데 IGF-IR, FAK/Src와 canonical Wnt pathway가 활성화되어 최종적으로 세포증식이 일어나게 되는 것으로 보인다. 또한, FAK inhibitor의 처리 후 확인된 결과들로부터 FAK의 활성화는 canonical Wnt signaling pathway에 관여함을 추론할 수 있었다.

V. 참고문헌

- 주동식 (2000) 생물자원소재로서 미세조류. *BioWave* 2, 1-24.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. J., Reese, C. B., and Cohen, P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Ba. *Current Biology* 7, 261-269.
- An, H. J., Rim, H. K., Jeong, H. J., Hong, S. H., Um, J. Y., and Kim, H. M. (2010) Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* improve immune function in protein-deficient weanling mice and immune cells. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 1-8.
- Andersson, S., D'Arcy, P., Larsson, O., and Sehat, B. (2009) Focal adhesion kinase (FAK) activates and stabilizes IGF-1 receptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 387, 36-41.
- Arnold, S. J., Stappert, J., Bauer, A., Kispert, A., Herrmann, B. G., and Kemler, R. (2000) *Brachyury* is a target gene of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mechanisms of Development* 91, 249-258.
- Atsushi, M. (1999) What is chlorella, *Food Industry* 9, 122-138.
- Avraham H. K., Lee T. H., Koh, Y., Kim, T. A., Jiang, S., Sussman, M., Samarel, A. M., and Avraham, S. (2003) Vascular endothelial growth factor regulates focal adhesion assembly in human brain microvascular endothelial cells through activation of the focal adhesion kinase and related adhesion focal tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 19, 36661-36668.
- Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M., and Valentini, B. (1997) The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1332, 105-126.

- Becker, E. W. (1994) *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Calabro, P., Samudio, I., Willerson, J. T., and Yeh, E. T. H. (2004) Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation* 110, 3335-3340.
- Cantley, L. C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Choi, Y. J., Jo, W. S., Kim, H. J., Nam, B. H., Kang, E. Y., Oh, S. J., Lee, G. A., and Jeong, M. H. (2010) Anti-inflammatory effect of *Chlorella ellipsoidea* extracted from seawater by organic solvents. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43, 39-45.
- Chu, C. Y., Huang, R., and Ling, L. P. (2006) Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33, 967-973.
- Cui, X. P., Xing, Y. J., Chen, M., Dong, S. W., Ying, D. J., and Yew, D. T. (2010) Wnt/beta-catenin is involved in the proliferation of hippocampal neural stem cells induced by hypoxia. *Irish Journal of Medical Science* DOI 10.1007/ s11845-010-0566-3.
- Dang, C. V. (1999) c-myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Molecular and Cellular Biology* 19, 1-11.
- Dantas, D. C., and M. L. Queiroz. (1999) Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Immunopharmacology* 21, 499-508.
- Duan, C., Bauchat, J. R., and Hsieh, T. (2000) Phosphatidylinositol

- 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circulation Research* 86, 15-23.
- Golubovskaya, V. M., Nyberg, C., Zheng, M., Kweh, F., Magis, A., Ostrov, D., and Cance, W. G. (2008) A small molecule inhibitor 1,2,4,5-Benzenetetraamine tetrahydrochloride, targeting the Y397 site of Focal Adhesion Kinase decreases tumor growth. *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 7405-7416.
- Hanks, S. K., Ryzhova, L., Shin, N. Y., and Brabek, J. (2003) Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Frontiers in Bioscience* 8, 982-996
- Hasegawa, T. K., Ito, S., Ueno, S., Kumanoto, Y. A., and Yasunobu, Y. (1999) Oral administration of hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein in mice. *International Journal of Immunopharmacology* 21, 311-323.
- Hsu, H. Y., Jeyashoke, N., Yeh, C. H., Song, Y. J., Hua, K. F., and Chao, L. K. (2010) Immunostimulatory bioactivity of algal polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* activates macrophages via toll-like receptor 4. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 927-936.
- Jeon, J., Lee, J., Kim, C., An, Y., and Choi, C. (2010) Aqueous extract of the medical plant *Patrinia villosa* Juss. induces angiogenesis via activation of focal adhesion kinase. *Microvascular Research* 80, 303-309.
- Kang, C. M., and Hong, S. G. (2000) The study on the CO₂ fixation and algae reproduction by microalgae *Chlorella ellipsoidea*. *Korean Journal of Sanitation* 15, 39-45.

- Kang, M. S., Sim, S. J., and Chae, H. J. (2004) Chlorella as a functional biomaterial. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering* 19, 1-11.
- Kang, M. S., Sim, S. J., and Chae, H. J. (2004) Partial purification of anticancer and anticoagulant proteins from chlorella hydrolysate. *Food Engineering Progress* 8, 98-104.
- Kanno, T., Shinpo, K., Masada, M., and Tamura, G. (1996) Growth-promoting factor for an extract of *Chlorella vulgaris* CK-5. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81, 159-162.
- Kilppel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W. M., Apell, G., Escobedo, M. A., and Williams, L. T. (1996) Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Molecular and Cellular Biology* 16, 4117-4127.
- Kim, S. S., Park, M. K., Oh, N. S., Kim, D. C., Han, M. S., and In, M. J. (2003), Studies on quality characteristics and shelf-life of chlorella soybean (Tofu). *Journal of the Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology* 46, 12-15.
- Kim, Y. H., Hwang, Y. K., Kim, Y. Y., Ko, S. M., Hwang, J. M., and Lee, Y. W. (2002) Effect of Chlorella growth factor on the proliferation of human skin keratinocyte. *The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences* 8, 229-234.
- Kim, Y. J., Kwon, S. H., and Kim, M. K. (2009) Effect of *Chlorella vulgaris* intake on cadmium detoxification in rats fed cadmium. *Nutrition Research and Practice* 3, 89-94.
- Konishi, F., Mitsuyama, M., Okuda, M., Tanaka, K., Hasegawa, T., and Nomoto, K. (1996) Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* against myelosuppression

- by 5-fluorouracil. *Cancer Immunology Immunotherapy* 42, 268–274.
- Krasilnikov, M. A. (2000) Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Moscow)* 65, 59–67.
- Kulik, G., Klippel, A., and Weber, M. J. (1997) Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Molecular and Cellular Biology* 17, 1595–1606.
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews* 81, 807–869.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15, 680–685.
- Lee, H. S., Lee, S. H., Mun, H. C., and Lee, H. Y. (2003) Effect of neuronal differentiation activity of hot water extracts of marine alga, *Chlorella capsula*, *Korean Journal of Biotechnology and Biotechnology* 31, 165–170.
- Lee, H. S., Lee, S. H., Mun, H. C., and Lee, H. Y. (2003) Screening of the immuno-stimulatory activity of the marine alga *Chlorella capsulata*. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering* 18, 19–24.
- Lee, S. H., Kang, H. J., Lee, H. J., Kang, M. H., and Park, Y. K. (2010) Six-week supplementation with *Chlorella* has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. *Nutrition* 26, 175–183.
- LeRoith, D., and Roberts, C. T. Jr. (2003) The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Letters* 195, 127–137.
- Lin, J. C., Ho, Y. S., Lee, J. J., Liu, C. L., Yang, T. L., and Wu, C. H. (2007) Induction of apoptosis and cell-cycle arrest in human colon cancer cells by meclizine. *Food and Chemical Toxicology* 45,

935-944.

- Liu, T. J., LaFortune, T., Honda, T., Ohmori, O., Hatakeyama, S., Meyer, T., Jackson, D., de Groot, J., and Yung, W. K. (2007) Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 1357-1367.
- Logan, C. Y., and Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 781-810.
- Lovicu, F. J., and McAvoy, J. W. (2001) FGF-induced lens cell proliferation and differentiation is dependent on MAPK (ERK1/2) signalling. *Development* 128, 5075-5084.
- Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Molnar A., Theodoras A. M., Zon L. I., and Kyriakis J. M. (1997). Cdc42Hs, but not Rac 1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/ERK. *Journal of Biological Chemistry* 272, 13229-13235.
- Morita, K. Matsueda, T. Iida, T., and Hasegawa, T. (1999) Chlorella accelerates dioxin excretion in Rats. *Journal of Nutrition* 129, 1731-1736.
- Muroyama, Y., Kondoh, H., and Takada, S. (2004) Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, 915-921.
- Nebread A. R. (2000) p38 MAP kinase: beyond the stress response. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 257-260.
- Noda, K., Ohno, N., Tanaka, K., Kamiya, N., Okuda, M., Yadomae, T., Nomoto, K., and Shoyama, Y. (1996) A water soluble antitumor

- glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Planta Medica* 62, 423–426.
- Pa rrizas, M., Saltiel, A. R., and LeRoith, D. (1997) Insulin-like growth factor-1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 154–161.
- Pages, G., Lenormand, P., L'allemain, G., Chambard, J. C., Meloche, S., and Pouyssegur, J. (1993) Mitogen-activated protein kinases p42^{mapk} and p44^{mapk} are required for fibroblast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 8319–8323.
- Park, M. K., Lee, J. M. Park, C. H., and In, M. J. (2002) Quality characteristics of Sulgidduk containing chlorella powder, *Korean Journal of Society of Food Science and Nutrition* 31, 225–229.
- Park, Y. C., Jeong, J. H., Park, K. J., Choi, H. J., Park, Y. M, Jeong, B. K., Higuchi, Y., and Yoo, Y. H. (2005) Sulindac activates nuclear translocation of AIF, DFF40 and endonuclease G but not induces oligonucleosomal DNA fragmentation in HT-29 cells. *Life Sciences* 77, 2059–2070.
- Peng, H. Y., Chu, Y. C., Chen, S. J., and Chou, S. T. (2009) Hepatoprotection of chlorella against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. *in vivo* 23, 747–754.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003) Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes and Development* 17, 1709–1713.
- Pulz, O., and Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology* 65, 635–648.
- Rulifson, I. C., Karnik, S. K., Heiser, P. W., Berge, D., Chen, H., Gu, X., Taketo, M. M., Nusse, R., Hebrok, M., and Kim, S. K. (2007) Wnt signaling regulates pancreatic β cell proliferation. *Proceedings of*

- the *National Academy of Sciences* 104, 6247–6252.
- Schlaepfer, D. D., Mitra, S. K., and Ilic, D. (2004) Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1692, 77–102.
- Sheih, I. C., Wu, T. K., and Fang, T. J. (2009) Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technology* 100, 3419–3425.
- Shen, T. L., Park, A. Y., Alcaraz, A., Peng, X., Jang, I., Koni, P., Flavell, R. A., Gu, H., and Guan, J. L. (2005) Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis. *Journal of Cell Biology* 20, 941–952.
- Singh, A., Singh, S. P., and Bamezai, R. (1998) Perinatal influence of *Chlorella vulgaris* (E-25) on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation. *Anticancer Research* 18, 1509–1514.
- Staal, F. T., and Luis, T. C. (2010) Wnt signaling in hematopoiesis: Crucial factors for self-renewal proliferation and cell fate decisions. *Journal of Cellular Biochemistry* 109, 844–849.
- Staal, F. T., Luis, T. C., and Tiemessen, M. M. (2008) Wnt signaling in the immune system: Wnt is spreading its wings. *Nature Reviews Immunology* 8, 581–593.
- Sung, G. D., Lee, J. S., Shin, C. S., Kim, M. S., Park, S. C., and Kim, S. W. (1998) CO₂ fixation by *Chlorella* HA-1 cultured in bubble columns. *Biotechnology and Bioengineering* 10, 401–405.
- Tai, Y. T., Podar, K., Catley, L., Tseng, Y. H., Akiyama, M., Shringarpure, R., Burger, R., Hideshima, T., Chauhan, D., Mitsiades, N., Richardson, P., Munshi, N. C., Ronald, C., Mitsiades, C., and

- Anderson, K. C. (2003) Insulin-like growth factor-I induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of β 1-integrin and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Cancer Research* 63, 5850–5858.
- Tam, N. F. Y., Chong, A. M. Y., and Wong, Y. S. (2002) Removal of tributyltin (TBT) by live and dead microalgal cells. *Marine Pollution Bulletin* 45, 362–371.
- Tanjoni, I., Walsh, C., Uryu, S., Tomar, A., Nam, J. O., Mielgo, A., Lim, S. T., Liang, C., Koenig, M., Sun, C., Patel, N., Kwok, C., McMahon, G., Stupack, D. G., and Schlaepfer, D. D. (2010) PND-1186 FAK inhibitor selectively promotes tumor cell apoptosis in three-dimensional environments. *Cancer Biology and Therapy* 10, 764–777.
- Thomas, S. M., and Brugge, J. S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13, 513–609.
- Travieso, L., Pellón, A., Benítez, F., Sánchez, E., Borj, R., O’Farrill, N., and Weiland, P. (2002). BIOALGA reactor: preliminary studies for heavy metals removal. *Biochemical Bioengineering Journal* 33, 87–91.
- Vincent, A. M., and Feldman, E. L. (2002) Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Hormone and IGF Research* 12, 193–197.
- Yun, Y. S., Park, J. M., and Yang, J. W. (1996) Enhancement CO₂ of tolerance of *Chlorella vulgaris* by gradual increase of CO₂ concentration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 10, 713–716.
- Zhang, W., and Liu, H. T. (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* 12, 9–18.

감사의 글

석사과정을 마치기까지 많은 분들의 도움이 있어 이렇게 무사히 마무리할 수 있다고 생각합니다. 2년 동안 가르쳐주고 이끌어주신 많은 분들께 감사함을 표현하고 싶습니다.

석사과정을 시작하면서 영양학실험실의 일원이 되어 많은 사람들과 생활을 하면서 한 단계 성숙할 수 있었습니다. 우선 인자함으로 저희를 보살펴주시고, 연구적인 면에서는 열정적으로 지도해주신 남택정 교수님께 감사드립니다. 아낌 없이 많은 가르침을 주셨던 류은순 교수님, 최재수 교수님, 김형락 교수님, 변대석 교수님, 류홍수 교수님, 김재일 교수님께도 감사함을 전합니다. 그리고 정년퇴임 후에도 언제나 좋은 말씀을 아끼지 않으셨던 변재형 교수님께도 감사하다는 말씀을 드리고 싶습니다.

가족들보다 많은 시간을 함께한 실험실 식구들에게도 고마움을 전해야 할 것 같습니다. 실험을 배우기 시작할 때 많은 도움을 주셨던 혜정쌤, 세심하게 신경써주고 가르쳐준 인혜언니, 내 도시락 파트너이자 짝꿍이었던 히로애언니, 알콩달콩 신혼생활 중인 진아언니, 택배아저씨 절친 쇼핑쟁이 담배쟁이 영민선배, 술담배랑 한몸인 친절하신 게으름뱅이 정옥선배, 잠깐 나갔다 돌아온 화장해야 훨씬 이쁜 희경이, 아메리카노를 사랑하는 목소리 최고 미경언니, 항상 열정적인 정 많으신 선옥쌤, 말투는 딱딱해도 마음은 따뜻한 경옥쌤, 실험 잘 할 수 있게 뒤에서 열심히 수고해 주었던 학부생들.. 나보다 먼저 사회생활 중인 이쁜이들 큰송이랑 아라, 호주에서 신나게 관광 중인 개미 목소리 준형, 묵묵히 많은 일들을 해준 이쁜이들 경화랑 작은송이, 못들은척 잘하는 막내같지 않은 든든한 아람이에게 고마움을 전합니다.

마지막으로 힘들 때 위로가 되어준 사랑하는 친구들과 우리 가족들.. 나의 든든한 지원자이신 부모님, 특히 맛난 반찬을 손수 준비해주신 박경애 여사님 사랑합니다. 시집가도 자주 놀러 와서 즐거움을 준 우리 언니, 형부, 세상에 태어나 항상 기쁨을 주는 가운이, 무뚝뚝함의 지존 내 동생이 있었기에 힘을 낼 수 있었습니다. 먼저 연락하지 못해도 이해해주고 기다려준 친구들.. 고맙고 사랑합니다.