

Polymannuronate의 HT-29 대장암 세포 증식억제 효과

김인혜 · 조인선 · 최재수 · 남택정

부경대학교 식품생명공학부

서론

암은 세포 증식 작용이 정상적으로 조절되지 않은 경우에 생기며, 비정상적인 세포 증식은 세포내 신호 전달의 이상에 의해 야기된다. Protein tyrosin kinase (PKT)는 세포내 신호전달 조절인자로 작용하여 PKT에 의한 신호전달이 정상적으로 조절되지 않으면 암 발생의 원인이 된다. Receptor tyrosine kinase인 ErbB receptor family는 암의 발생과 진행에 관여하는 데, signaling pathway를 거쳐 최종적으로 apoptosis에 관여하는 단백질을 인산화하여, 불활성화시켜 세포의 apoptosis를 억제하고 세포의 생존율을 증가시킨다고 알려져 있다. 여러 암에서 ErbB receptor gene의 발현이 증가한다고 보고되고 있는데, 십이지장 및 대장암에서도 정상세포에 비해 ErbB2와 ErbB3의 mRNA의 발현과 단백질의 수준이 증가하였으며, 또한 ErbB receptor family 신호 전달 과정의 조절 이상은 암 발생과 진행에 중요한 요소로 작용하고 있다. 그 중에서 대장암은 식생활의 서구화로 발병률이 증가하고 있는 추세이며, 대장암의 발병증가는 고지방/저섬유 식이의 섭취와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되어 있으나 그에 대한 기전은 정확히 밝혀져 있지 않다.

해조류의 항암관련 생리활성에 관한 연구는 꾸준히 진행되어 왔으며, 그 중 갈조류에 존재하는 알긴산은 혈청 지질의 개선효과와 성인병 및 암 등의 예방 및 치료 등에 효과가 큰 것으로 알려져 있으며, HT-29 대장암 세포에 알긴산을 첨가 시 세포증식이 감소됨이 보고되었다. 이러한 효과들은 알긴산의 분자량이 작아질수록 현저히 증대하며, 알긴산의 구성성분 중 mannuronic acid의 함유 비율이 높을수록 효과가 높아진다는 보고도 있어 polymannuronate의 생리기능성에 대한 관심이 높아지고 있다.

따라서, 본 연구에서는 HT-29 대장암 세포에 polymannuronate를 첨가하였을 때 대장암 증식에 어떠한 영향을 미치는지 signaling pathway의 변화를 검토하였다.

재료 및 방법

재료 : polymannuronate는 미역으로부터 산·알칼리법으로 추출하여 (alginate ;

whole molecular) 초산으로 저분자화시켜 분리 정제하였다.

세포배양: HT-29 세포는 100mm plate에 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640배지로 37°C, 5% CO₂가 유지되는 CO₂ 배양기에 배양하였다. 세포가 6-70% 정도 confluent되면 polymannuronate를 첨가하여 sample 처리하였다.

세포 생존율 측정: 96-well plate에 50,000 cells/well의 밀도로 분주한 후, 농도별로 polymannuronate를 처리하여 MTS assay 방법을 이용하여 측정하였다.

[³H] Thymidine incorporation 측정: 24-well plate에 10,000 cells/well의 밀도로 분주하였다. 농도별로 polymannuronate를 처리한 후 [³H] Thymidine을 첨가하여 24시간 incubation 하여 β-counter로 측정하였다.

DNA fragmentation 측정: 60mm plate에 세포를 분주한 후, polymannuronate를 첨가하여 DNA lysis buffer로 추출한 후 agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

Western blot 분석: 100mm plate에 50,000 cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. Polymannuronate를 첨가하여 세포를 배양한 뒤 lysis 하고 단백질 정량하여 western blot 및 immunoprecipitation 방법으로 분석하였다.

결과 및 요약

본 연구에서는 HT-29 대장암세포에 polymannuronate를 첨가하였을 때 미치는 영향을 보고자 하였다. 배양액에 polymannuronate를 농도별로 첨가하여 살아있는 세포 수를 측정한 결과 세포의 증식이 감소됨을 확인하였다. 또, 세포의 증식을 촉진하고 대장암에서 발현이 증가되는 ErbB receptor family 중에서 polymannuronate가 ErbB3 signaling을 억제하는지를 살펴보았을 때 Polymannuronate는 ErbB2 단백질의 감소와 ErbB3 단백질의 변화를 보였다. 그 결과, polymannuronate가 대장암 세포의 증식을 억제하여 DNA 합성을 억제하고 apoptosis를 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Lee, D. S., J. W. Lee and J. H. Pyeun. 2000. Isolation of polymannuronate with low molecular weight from alginates hydrolyzed by organic acids. Submitting to J. Food Biochemistry.
- Salmon, D. S, R. Brandt, F. Ciardiello and N. Normanno. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Cirt. Res. Oncol. Hematol. 19: 183-232.
- Shimi, S. M., D. Hopwood, E. L. Newman and A. Cuschievi. 1991. Microencapsulation of human cells: its effects on growth of normal and tumor cells *in vitro*. Br. J. Cancer. 63: 675-680.
- Kim, E. J., J. I. Jung, H. S. Lee., I. J. Kang, F. Khachik. and J. H. Yoon. 2003. Effect of carotenoids on the growth of HT-29 human colon cancer cells. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 428-436.