

참그물 바탕말 추출물에 의한 Wnt/ β -Catenin 신호전달체계 저해

조문주 · 오상택*

인제대학교 약물유전체연구센터

Inhibition of Wnt/ β -Catenin Pathway by *Dictyota dichotoma* Extract. Munju Cho, Sangtaek Oh*. *Pharmacogenomics Research Center, Inje University, Busan 614-735, Korea*

Abstract Abnormal activation of the Wnt/ β -catenin pathway and subsequent up-regulation of β -catenin response transcription (CRT) are associated with the development of colon cancer. Thus, the Wnt/ β -catenin pathway is an attractive target for chemoprevention and treatment of this cancer. In this study, we used a cell-based screen to identify a methanol extract of *Dictyota dichotoma* (EDD) that suppresses the Wnt/ β -catenin pathway without altering the level of β -catenin protein and reduces the expression of cyclin D1, which is a known β -catenin/T cell factor (TCF)-dependent gene. EDD inhibited the growth of various colon cancer cells. Our findings suggest that EDD can potentially be used as a chemopreventive agent against colon cancer.

Key words : Wnt/ β -catenin pathway, colon cancer, extract of *dictyota dichotoma* (EDD)

서 론

Wnt/ β -catenin 신호전달체계는 세포의 분화, 발생, 증식 및 암의 형성에 중요한 역할을 한다 [10,14,16]. Wnt/ β -catenin 신호전달체계의 조절은 세포 내의 β -catenin 단백질의 양에 결정되며 이러한 세포내 β -catenin 단백질의 양은 β -catenin N-말단 부위의 인산화와 밀접한 관계가 있다. Wnt 리간드 단백질이 세포 외에 존재하는 경우, Wnt가 수용체인 Frizzled와 보조 수용체인 LRP5/6 (lipoprotein receptor-related protein 5/6)의 복합체에 결합함으로써 세포내의 신호전달이 시작한다. 수용체와 결합한 Wnt 단백질은 dishevelled (Dsh)를 활성화 시키고 활성화된 Dsh 단백질은 GSK-3 β 의 활성을 저해함으로써 β -catenin이 proteasome에 의해 분해되는 경로로 진행되는 것을 저해함으로써 β -catenin의 세포 내 농도를 증가시킨다 [3,11,18]. Wnt 리간드가 없을 시에는 세포 내에 존재하는 β -catenin 단백질이 casein kinase 1 (CK1)/Axin/ adenomatous

polyposis coli (APC)/glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)로 구성되어 있는 단백질 복합체에 의해 β -catenin의 Ser45이 먼저 인산화 되고 이로 인하여 β -catenin의 41, 37, 33 serine/ threonine 잔기가 순차적으로 인산화 된다 [4,5,12, 13,15]. 33, 37 Ser잔기가 인산화 되어진 β -catenin은 β -TrCP (β -transducin repeat-containing protein)에 의해서 유비퀴틴표지 (ubiquitylation)가 되고 이는 proteasome에 의해 분해된다 [1,17].

대장암은 전 세계적으로 3번째로 많이 발생하는 암으로서 매해마다 약 100,000 여명의 새로운 환자가 발생하고 있다. 대장암은 Wnt 신호전달체계의 주요 단백질인 adenomatous polyposis coli (APC) 또는 β -catenin의 유전자 변이와 밀접한 관계가 있음이 보고되었다 [4,12,15]. APC 또는 β -catenin의 변이에 의해 세포내에 β -catenin의 양이 증가하게 되고 증가된 β -catenin이 핵으로 이동하여 전사인자인 TCF4와 결합하여 oncogene으로 알려져 있는 *c-myc*, *cyclin D1*, *MMP7*, *PPAR- γ* 등의 발현을 활

* Corresponding author

Phone: +82-51-890-6438, Fax: +82-51-893-1232

E-mail: ohsa@inje.ac.kr

성화시켜 암으로의 전이가 일어난다 [6,7,20,21]. 그러므로 Wnt/ β -catenin 신호전달체계의 효과적인 억제제는 암예방과 대장암 치료를 위한 중요한 표적이 된다.

본 연구에서는 세포기반 초고속 스크리닝 기법을 사용하여 Wnt/ β -catenin 신호를 저해하는 참그물 바탕말 추출물을 발굴하였다. 참그물바탕말 추출물은 β -catenin reponse transcription (CRT)를 농도 의존적으로 저해할 뿐 아니라 β -catenin의 표적 유전자인 cyclin D1의 발현을 감소시킴으로써 대장암의 성장을 억제한다.

재료 및 방법

세포배양, 플라스미드, transfection, luciferase 분석

실험에 사용한 HEK293, Wnt3a를 분비하는 L 세포주, HCT116, SW480, HCT15, DLD-1 세포주들은 American Type Culture Collection(Roville, MD, USA)로부터 분양 받았다. 세포배양에 필요한 배지 Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM)과 배지에 첨가하는 항생제 (120 μ g penicillin/ml, and 200 μ g streptomycin/ml) 및 우태아 혈청(fetal bovine serum)은 Hyclone (Logan, UT) 제품을 사용하였다. Wnt3a를 분비하는 L 세포주는 10%의 우태아 혈청이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 4일간 배양한 후, 배양액을 모아 0.22-mm 필터로 멸균하였다. 신선한 배지를 첨가 후 3일간 더 배양 후, 배양액을 모아 이전의 배양액과 혼합하였다. 인간 Frizzled cDNA는 PCR 방법을 이용하여 SW480 cDNA (Clontech)로부터 합성한 후 pCDNA3.1 (Invitrogen)에 클로닝하였다. pTOPflash reporter 플라스미드는 Upstate biotechnology (Lake Placid, NY, USA)에서 구입하였다. Transfection은 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)의 사용 설명서를 참고하여 수행하였다. Luciferase 분석법은 dual luciferase assay kit (Promega)를 사용하여 수행하였다.

해조류 추출물

2004년 2월부터 4월까지 제주도 해안에서 제주 대학교 해양 과학학부에서 2004년 2월부터 4월까지 제

주도 해안에서 수집된 해양 조류 126종을 연구에 사용하였다. 조류는 깨끗이 한 후, 동결 건조 시키고 미세한 가루로 만들었다. 가루로 된 샘플 (1g)은 80% 메탄올과 함께 24시간 동안 실온에서 계속적으로 흔들며 추출하였다. 메탄올 추출물은 진공 농축기를 이용하여 40°C에서 농축 시키고 4°C에 보관하였다.

세포기반 탐색

HEK293 reporter 세포주는 HEK293 세포주에 hFz-1와 TOPFlash를 발현하는 플라스미드를 동시에 transfection한 후, G418을 포함하는 배지를 사용하여 확립하였다. 세포들은 96well plate에 1.5×10^5 /ml로 분주하여 배양하였다. 24시간 배양 후에 Wnt3a CM 배지를 첨가하고 각 well에 추출물을 첨가하였다. 15시간 후에 firefly luciferase 활성과 cell viability를 분석하였다.

Western blot 분석

세포질과 핵 분리액은 이전에 기술된 것과 같은 방법으로 준비하였다. 단백질은 4-12% gradient SDS-PAGE (Invitrogen)을 이용하여 분리하고 nitrocellulose membrane에 옮겼다 (Amersham Bioscience). Membrane 5% 탈지 분유로 blocking 시킨 후 일차 항체인 anti- β -catenin (Santa Cruz Biotechnology), anti-cyclinD1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-actin (Cell signaling)을 처리하였다. 일차 항체 처리 후 TBS-T로 5회 씻어내고, 이차 항체인 anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) 또는 anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) 처리하였다. 밴드는 ECL detection system (Santa Cruz Biotechnology)을 사용하여 확인하였다.

세포 성장억제 분석

세포 배양용 96well plate에 각 암세포주를 적정량 분주하고 24시간 동안 안정화 시킨 후 참그물 바탕말 추출물을 적정량 처리하고 48시간 동안 배양하였다. Cell titer-Glo kit (Promega)를 사용하여 cell viability를 측정하였다.

결과 및 고찰

Wnt/ β -catenin 신호전달계 억제 물질 탐색

Wnt/ β -catenin 신호전달계를 조절하는 생리활성 물질을 탐색하기 위하여 인간배아 신장 세포인 HEK293 세포로 TOPflash 표지 플라스미드와 인간 Frizzled-1 (hFz-1)를 발현하는 플라스미드를 동시에 전달하고 이 두 플라스미드가 안정적으로 발현되는 세포주를 확립하였다 (HEK293 reporter cell) (Fig. 1A). 이 세포주를 이용하여 Wnt/ β -catenin 신호전달 체계를 억제하는 해조류 추출물을 탐색하였다. HEK293 reporter 세포주를 Wnt3a CM (conditioned medium)를 첨가한 경우 TOPFlash reporter의 활성이 급격히 증가함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1B). 이 시스템을 이용하여, 126종의 해조류 메탄올 추출물을 탐색하였고 그 결과, 참그물 바탕말 (*Dictyota dichotoma*) 추출물이 Wnt/ β -catenin 신호전달계를 저해함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1B). 또한 Fig. 1C의 결과에서 보듯이 Wnt3a CM에 의해 활성화된 β -catenin response transcription (CRT)가 참그물 바탕말 추출물의 농도에 의존적으로 감소함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1C)

참그물 바탕말 추출물이 β -catenin 수준에 미치는 영향

참그물 바탕말 추출물에 의한 Wnt/ β -catenin 신호전달계 저해 기전을 연구하기 위하여 HEK293 reporter 세포주에 참그물 바탕말 추출물과 GSK-3 β 의 선택적 저해제로 알려져 있는 LiCl를 처리한 후 CRT를 측정하였다. Fig. 2A의 결과에서 보듯이, 기존의 연구 결과와 일치하게 LiCl의 처리에 의하여 CRT가 증가함을 관찰할 수 있었고 [9], 또한 참그물 바탕말 추출물에 의해 LiCl에 의해 증가된 CRT가 농도 의존적으로 감소함을 관찰할 수 있었다. 이 결과로부터 참그물 바탕말 추출물이 β -catenin에 직접 작용하거나 β -catenin 하위 신호전달 부위에 작용함으로써 Wnt/ β -catenin 신호전달체계를 저해함을 알 수 있다. Wnt/ β -catenin 신호전달체계에서 CRT는 유비퀴틴 의존적 분해에 의해 조절되는 β -catenin 단백질의 양과 밀접한 관련이 있다. 따라서 참그물 바탕말 추출물이 세포내 β -catenin 단백질의 양에 영향을 미치는지를 측정하기 위하여 β -catenin에 특이적인

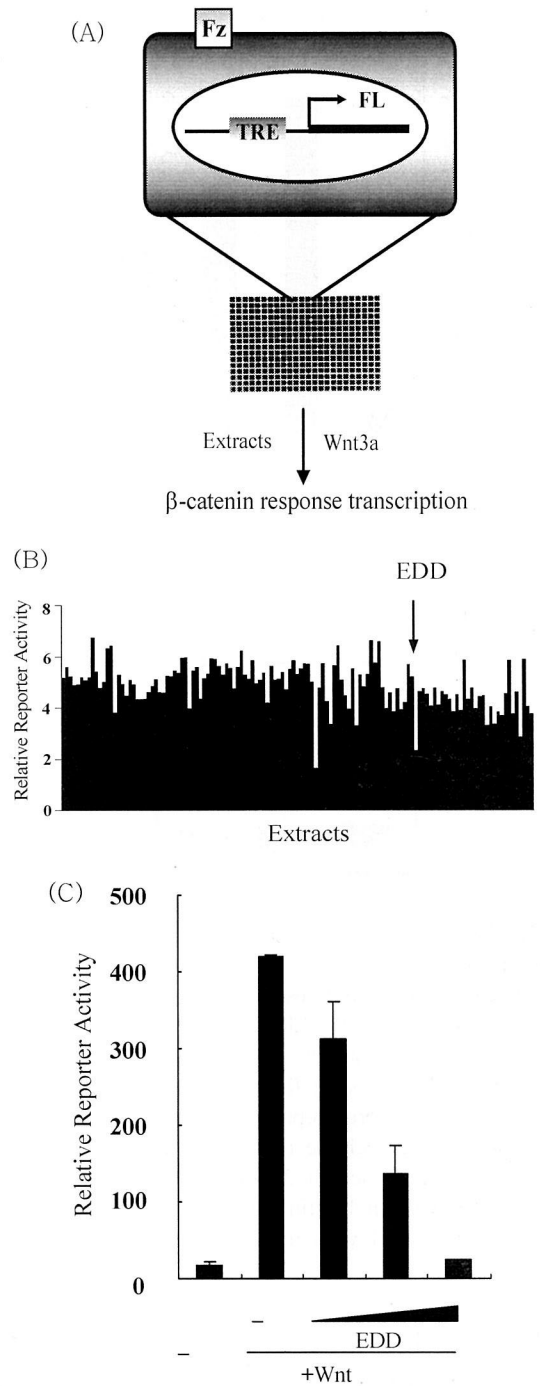


Fig. 1. Identification of *Dictyota dichotoma* extract as an inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling. (A) A schematic of the screening system. (B) Screening of extracts that inhibit Wnt/ β -catenin signaling. Extracts modulating TOPFlash reporter activity were screened using the HEK293 reporter cells. The controls were assayed in the presence or absence of Wnt3a CM. TOPFlash activities were normalized with Cell titer-Glo (Promega) activity. (C) HEK293 reporter cells were incubated with increasing concentrations of EDD (10, 20 and 40 mg/ml) in the presence of Wnt3a CM. After 15 h, luciferase activity was determined. The results are the average of three experiments, and the bars indicate standard deviations.

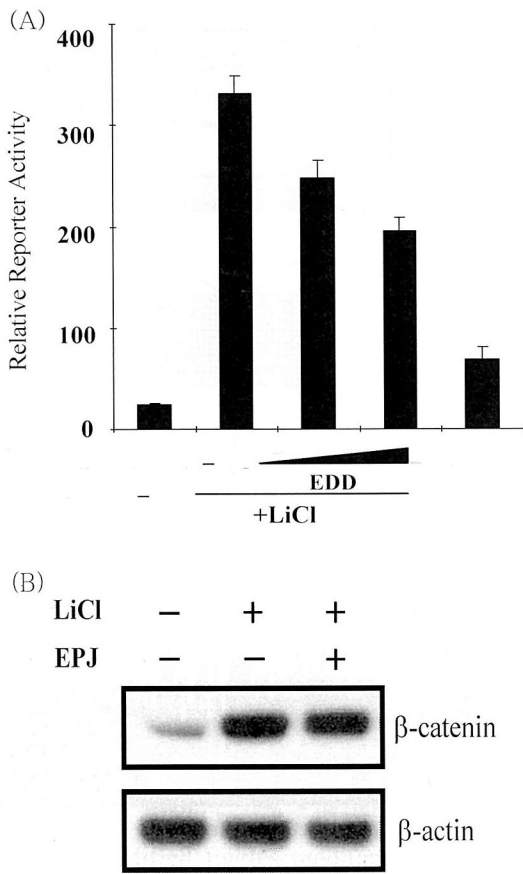


Fig. 2. EDD inhibits Wnt/ β -catenin signaling without altering β -catenin levels. (A) HEK293 reporter cells were incubated with increasing concentrations of EDD (10, 20 and 40 mg/ml) in the presence of 20 mM LiCl. After 15 h, luciferase activity was determined. The results are the average of three experiments, and the bars indicate standard deviations. (B) Cytosolic proteins were prepared from HEK293 reporter cells treated with either vehicle (methanol) or EDD (20 and 40 mg/ml) in the presence of 20 mM LiCl for 15 h and then subjected to Western blotting with β -catenin antibody. The blots were re-probed with anti-actin antibody as a loading control.

항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다. Fig. 2B의 결과에서 보듯이 LiCl에 의해 세포내 β -catenin 단백질의 양이 증가함을 관찰할 수 있었고 참그물 바탕말 추출물은 LiCl 처리에 의해 증가된 β -catenin 단백질 수준에 영향을 미치지 않음을 관찰할 수 있었다.

참그물 바탕말에 의한 대장암 세포주의 증식 억제

Cyclin D1 유전자는 β -catenin에 발현이 조절되는 유전자로서 대장암 발생에 중요한 역할을 한다

[2,23]. 따라서 대장암 세포주인 HCT116 세포주에서 참그물 바탕말 추출물이 cyclin D1의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 연구하였다. HCT116 세포주에 참그물 바탕말 추출물을 15시간동안 처리 후 cyclin D1 단백질의 발현량을 Western blot 분석을 통해 측정하였다. Fig. 3A의 결과에서 보듯이 참그물 바탕말 추출물이 cyclin D1 단백질의 발현을 저해함을 확인할 수 있었다. 이전의 연구를 통하여 β -catenin의 기능을 저해함으로써 대장암 세포의 증식이 감소된다는 사실이 보고되었다 [19,24]. 따라서 β -catenin 활성을 저해하는 참그물 바탕말 추출물 또한 대장암 세포의 증식을 저해할 것 이라는 가설을 바탕으로 참그물 바탕말 추출물이 SW480, HCT116, HCT15을 포함하는 인체 대장암 세포주의 증식에

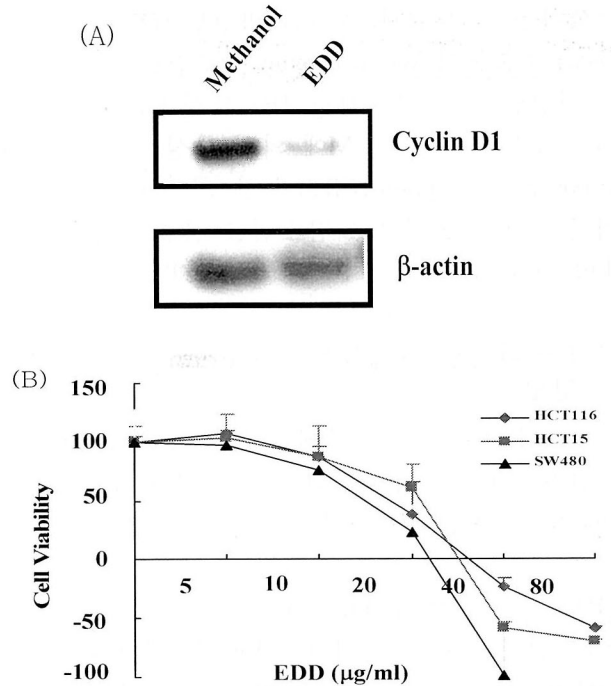


Fig. 3. The effect of EDD on colon cancer cells. (A) EDD inhibits the expression of the TCF/ β -catenin target gene. SW480 cells were incubated with the vehicle (methanol) or EDD (40 mg/ml) for 15h. Nuclear extracts were prepared for Western blotting with anti-cyclin D1 antibody. To confirm equal loading, the blot was re-probed with anti-actin antibody. (B) Cytotoxic effect of EDD on colon cancer cells. Cells were incubated with the indicated concentrations of EDD for 48h in 24-well plates, and cell viability was determined as described in Materials and Methods. To calculate the inhibition of growth, the value at time 0 was first subtracted. The results shown are the average of three experiments, and the bars indicate standard deviations.

미치는 영향을 관찰하였다. 세포주를 다양한 농도의 참그물 바탕말 추출물과 함께 배양한 후 세포 생존능을 측정한 결과 참그물 바탕말에 의해 대장암 세포주들의 증식이 효과적으로 저해됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3B).

기존의 연구를 통하여 Wnt/ β -catenin 신호전달체계의 주요 인자 (APC, β -catenin)의 변이는 β -catenin response transcription (CRT)을 증가시킬 뿐 아니라 대장암 및 흑색종과 같은 암의 발병과 밀접한 관련이 있음이 보고였다 [4,8]. 본 연구에서 Wnt/ β -catenin 신호전달체계가 참그물 바탕말 (*Dictyota dichotoma*) 추출물에 의해 저해됨을 밝혔다. 또한 참그물 바탕말 추출물은 GSK-3 β 에 비의존적이고 세포내 β -catenin 단백질 수준에 영향을 미치지 않고 CRT를 감소시킴을 확인할 수 있었다. 참그물 바탕말 추출물의 처리에 의해 β -catenin/TCF에 의해 조절되는 유전자 중의 하나인 cyclinD1의 발현을 저해하였다. 게다가 참그물 바탕말 추출물은 다양한 대장암의 증식을 저해 하였다. 대부분의 암세포들은 암 억제 인자인 p53에 변이를 가짐으로서 항암제에 대한 내성을 가진다. 참그물 바탕말 추출물은 정상 p53 (HCT116) 와 변이 p53 (SW480) 을 가진 대장암 세포주 증식을 모두 억제하였다. 더욱이 항암 치료에 심각한 문제를 일으키는 다재내성 (multidrug-resistant)을 가진 대장암 세포주 (HCT15)의 성장을 효과적으로 저해하였다. 이상의 결과들을 통해 참그물 바탕말 추출물이 대장암을 포함하는 새로운 암예방 치료제로 사용될 수 있을 것이다.

요 약

Wnt/ β -catenin 신호전달계의 비정상적인 활성화는 β -catenin response transcription (CRT)를 증가시킬 뿐 아니라 대장암의 발생과 밀접한 관련이 있다. 따라서 Wnt/ β -catenin 신호전달계는 대장암에 대한 항암제 개발 및 대장암 치료에 중요한 표적이 된다. 본 연구에서는 세포기반 초고속 스크리닝 기법을 사용하여 Wnt/ β -catenin 신호를 저해하는 참그물 바탕말 추출물을 발굴하였다. 참그물 바탕말 추출물은 세포내 β -catenin 단백질 수준에는 영향을 미치지 않았으며 β -catenin/TCF에 의해 조절되는 유전자 중의 하나인 cyclin D1의 발현을 저해하였다. 또한 참그물 바

탕말 추출물은 다양한 대장암의 증식을 저해하였다. 본 연구의 결과들로부터 참그물 바탕말 추출물이 잠재적으로 대장암을 포함하는 새로운 암 예방 및 치료제로 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 2005년도 인제대학교 학술연구조성비 보조에 의한 것임.

참 고 문 헌

1. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. 1997. β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**, 3797 - 3804.
2. Amson, R. B., Nemani, M., Roperch, J. P., Israeli, D., Bougueleret, L., Le Gall, I., Medhioub, M., Linares-Cruz, G., Lethrosne, F., Pasturaud, P., Piouffre, L., Prieur, S., Susini, L., Alvaro, V., Millasseau, P., Guidicelli, C., Bui, H., Massart, C., Cazes, L., Dufour, F., Bruzzoni-Giovanelli, H., Owadi, H., Hennion, C., Charpak, G., Telerman, A., et al. 1996. Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3953 - 3957.
3. Dominguez, I. and Green, J. B. 2000. Dorsal down-regulation of GSK3 β by a non-Wnt-like mechanism is an early molecular consequence of cortical rotation in early *Xenopus* embryos. *Development* **127**, 861-868.
4. Fearnhead, N. S., Britton, M. P. and Bodmer, W. F. 2001. The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 721-733.
5. Giles R. H., van Es, J. H. and Clevers, H. 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1653**, 1-24.
6. He, T. C., Chan, T. A., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. 1999. PPAR δ is an APC-regulated target of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99**, 335-345.
7. He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. 1998. Identification of c-Myc as a target of the APC pathway. *Science* **281**, 1509-1512.
8. Karim, R., Tse, G., Putti, T., Scolyer, R. and Lee, S. 2004. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology* **36**, 120-128.
9. Klein, P. S. and Melton, D. A. 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10330-10334.
10. Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Clevers, H. 1997. Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* **275**, 1784-1787.
11. Lee, E., Salic, A., Kruger, R., Heinrich, R. and Kirschner, R.

- M. W. 2003. The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol.* **1**, 116-132.
12. Liu, J., Stevens, J., Rote, C. A., Yost, H. J., Hu, Y., Neufeld, K. L., White, R. L. and Matsunami, N. 2001. Siah-1 mediates a novel β -catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol. Cell* **7**, 927 - 936.
 13. Matsuzawa, S. I. and Reed, J. C. 2001. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for β -catenin degradation linked to p53 responses. *Mol. Cell* **7**, 915 - 926.
 14. Miller, J. R. 2001. The Wnts. *Genome Biol.* **3**, 3001.1 - 3001.15.
 15. Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. 1997. Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* **275**, 1787-1790.
 16. Morin, P. J. 1999. β -catenin signaling and cancer. *Bioessays* **21**, 1021-1030.
 17. Orford, K., Crockett, C., Jensen, J. P., Weissman, A. M. and Byers, S.W. 1997. Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of β -catenin. *J. Biol. Chem.* **272**, 24735 - 24738.
 18. Polakis, P. 2002. Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr. Biol.* **12**, R499-R501.
 19. Roh, H., Green, D. W., Boswell, C. B., Pippin, J. A. and Drebin, J. A. 2001. Suppression of β -catenin inhibits the neoplastic growth of APC-mutant colon cancer cells. *Cancer Res.* **61**, 6563-6568.
 20. Takahashi, M., Tsunoda, T., Seiki, M., Nakamura, Y. and Furukawa, Y. 2002. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the β -catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene* **21**, 5861-5867.
 21. Tetsu, O. and McCormick, F. 1999. β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422-426.
 22. Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P. J. and Yang, Y. 2003. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent β -catenin degradation. *J. Cell Biol.* **162**, 899-908.
 23. Utsunomiya, T., Doki, Y., Takemoto, H., Shiozaki, H., Yano, M., Sekimoto, M., Tamura, S., Yasuda, T., Fujiwara, Y. and Monden, M. 2001. Correlation of β -catenin and cyclin D1 expression in colon cancers. *Oncology* **61**, 226 - 233.
 24. Verma, U. N., Surabhi, R. M., Schmaltieg, A., Becerra, C. and Gaynor, R. B. 2003. Small interfering RNAs directed against β -catenin inhibits the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1291-1300.