

매생이 (*Capsosiphon fulvescens*) 당단백질에 의한 인간 위암세포 사멸기전

김영민·김인혜·남택정*

부경대학교 식품영양학과

Induction of Apoptosis Signaling by a Glycoprotein of *Capsosiphon fulvescens* in AGS Cell

Young-Min Kim, In-Hye Kim and Taek-Jeong Nam*

Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Capsosiphon fulvescens is well-known green sea algae that, in recent years, has been proposed as a potential anticancer drug. In this study, we found that *C. fulvescens* glycoprotein (Cf-GP) had pro-apoptotic effects on human gastric carcinoma cells. By SDS-PAGE, we confirmed that *C. fulvescens* extract contained a glycoprotein. Using H33342 staining, we found that the Cf-GP caused cell death in a dose-dependent manner, while an MTS assay showed decreased cellular viability due to induction of apoptosis. To determine the effect of Cf-GP on apoptosis-related cellular events, cells were treated with Cf-GP and the expression of several apoptosis-related protein was determined by Western blotting. Our results indicate that Cf-GP activated both a caspase cascade and PARP, which is a substrate of caspase-3, caspase-8 and the Bcl-2 family proteins. In addition, we assessed caspase-3, and -8 activation and annexin V staining. Our results revealed a cell cycle arrest, itself leading to an increased percentage of sub-G1 cells. Our findings indicate that Cf-GP may be a source of bio-functional material with therapeutic effects on human gastrointestinal cancer.

Key words: *Capsosiphon fulvescens* extracts, Apoptosis, Gastric cancer, Caspase

서 론

현대인들은 스트레스, 불규칙적인 식습관, 생활환경의 변화 및 약화에 따라 각종 암 질환으로 인한 사망률이 증가하고 있다. 암은 세포 증식 작용이 비정상적일 때 발생하며 그 원인은 바이러스, 음주, 식이 등과 같은 외부적인 요인 및 호르몬과 유전자 변이와 같은 내부적 요인이 복합화 되어서 생기는 병으로 후기에 발병하면 완치가 어렵고 사망에 이를 확률이 높은 질병이다 (Bishop, 1987). 그 중에서도 불규칙한 식습관 및 식이가 가장 중요한 발암 요인 중 하나라고 하였으며 (Park et al., 2003), 특히 식이로 인한 위궤양과 위암 발병도 관련 있음을 보고하고 있다 (Kim, 2009).

최근 패스트푸드와 같은 서양식 식품의 소비량의 증가 추세와 불규칙한 식습관에 따라 위암의 발병률도 증가하고 있으며, 따라서 잘못된 식이로 인한 발병률이 높은 위암은 완치가 어려운 질병 중의 하나이지만 이를 치료하고 예방하기 위한 식이 소재로써 버섯 추출물 등 기능성 식품 개발되고 있다 (Lee et al., 2006). 해조류를 통해서도 이러한 암을 예방·감소시키는 효과를 기대할 수 있는데, 해조류는 우리나라에서 전통적으로 이용되어왔고 이러한 해조류의 단백질 탄수화물 등의 생리기능으로써 항균 및 항암효과 등이 밝혀지면서 (Kim et al., 2006), 근래에 들어서 항암 및 각종 건강 기능성 식품으로서 활용도가 증가하고 있다. 해조류 소비량이 큰 일본에서도

많은 연구가 진행되고 있는데 여러 종의 해조류 성분 분석을 통한 단백질 및 탄수화물의 항암 연구 (Noda et al., 1990) 및 유방암 예방 효과도 연구가 보고 되고 있다 (Funahashi et al., 2001). 또한 국내에서도 해양생물유래 기능성 물질로써 해조류 김 단백질이 간 손상의 보호효과를 가진다는 연구가 보고되고 있다 (Kwon and Nam, 2006). 특히, 해조류 성분 중의 다시마 당단백질로부터 HT-29 대장암세포에서의 항암 효과 (Go et al., 2010), 툫 당단백질로부터 손상된 간세포에서의 회복 효과 (Hwang et al., 2008) 등 해조류의 당단백질을 통한 효과 등이 입증되었으며 해조류 다당류인 후코이당의 폐암에서의 효과 또한 보고되었다 (Boo et al., 2011).

본 연구에 사용된 녹조식물 갈래과과의 매생이 (*Capsosiphon fulvescens*)는 우리나라 남해안이나 서해남부 지방을 중심으로 청정지역에서 널리 분포하며 탄수화물과 단백질, 아미노산 등이 많은 것으로 알려져 있다 (Jung et al., 2005). 이러한 성분 분석을 토대로 매생이의 열수 추출물 희분을 동결건조한 시료가 U937 백혈구암 세포주, NB41A3 신경아종 세포주, C6, HepG2 간암 세포주 등에서 농도 의존적으로 항암효과를 보여주었으며 (Kim et al., 2006), 또한 매생이 열수추출물로 획득한 단백질이 5종의 인체암세포에 대한 세포 독성이 조사되어 *in vivo*에서 장관면역 활성화, 급성 독성시험, 마우스 육종 세포 억제 효과 등도 확인되었다 (Park et al., 2006).

앞선 연구들에서 해조류 김 당단백질, 매생이 열수추출

*Corresponding author: namtj@pknu.ac.kr

물, 다시마 당단백질 등 다양한 해조류의 당단백질 성분이 암 세포주에서 항암효과가 입증, 보고된 사례가 많아 위암 세포주에서도 매생이 당단백질 효과가 있을 것으로 가정하여, 위암세포 사멸 작용 메커니즘을 밝히고자 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

매생이 당단백질의 추출

본 연구에 사용한 매생이 (*Capsosiphon fulvescens*)는 2006년 1월 전라남도 장흥군 내저리 매생이 작업장에서 구입하여 재료로 사용하였다.

매생이 분말을 수세 후 분쇄기를 이용하여 분말화한 다음 3구 플라스크에 매생이 분말 40 g을 증류수 1 L에 침지시킨 후 80°C에서 3시간 동안 교반하여 추출한 후 원심분리 (Supra-22K, Hamil, Korea)를 사용하여 5,000 rpm, 15 min, 4°C 조건으로 원심분리 하였다. 상층액의 3배 vol/vol에 에탄올을 첨가하여 4시간 동안 정지 반응시킨 후 침전된 감압 여과를 하여 당을 제거하고 회수한 여액에 ammonium sulfate를 80% 첨가하여 24시간 교반하였다. Ammonium sulfate는 단백질용액 중에 첨가함으로써 용해도 차이에 따라 단백질이 석출이 된 것을 회수하여 탈이온수로 녹이고 투석막 (Pormembrane MW. 3,500/Spectra of spectrum laboratories inc, USA)을 사용하여 4°C에서 약 5,000 mL의 증류수에 24시간 투석한 후 동결건조 하였으며 이를 *Capsosiphon fulvescens* glycoprotein (Cf-GP)로 명명하였다

당단백질 분자량

15% SDS-PAGE (Laemmli, 1970)로 매생이 당단백질을 10, 20, 40µg/mL 농도로 30 mA에서 2시간 전기영동을 한 후 정제된 당단백질임을 Coomassie brilliant blue staining과 glycoprotein staining을 통해 확인하였다. 즉, 추출한 매생이 당단백질을 SDS-PAGE하고 staining solution (7% Acetic acid, 40% Methanol, 0.1% coomassie brilliant blue R-250), destaining solution (7% Acetic acid, 20% Methanol)을 사용하여 band를 확인하였다. Standard marker는 dual color marker (BIO-RAD, USA)를 사용하였고 bovine serum albumin (BSA)은 Sigma Chemical Co. (Logan, UT, USA) 사용하였으며 glycoprotein staining을 Gelcode® Glycoprotein Staining Kit (Pierce, USA)를 통해 매생이 당단백질의 분자량을 확인하였다.

세포 및 배양

항암 활성 실험에 사용한 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입한 위암 세포주인 AGS gastric cancer cell (ATCC CRL-1739)을 사용하였고, 위 세포주인 IEC-6 intestinal epithelial cell (ATCC CRL-1592)을 사용하였다. 세포 배양에 사용한 Fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) 제품을 사용하였으며 RPMI-1640, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin (P/S)은 Sigma Chemical Co. (Logan, UT, USA)

에서 구입하였다.

AGS 세포는 RPMI-1640 배지에 IEC-6 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지에 10% FBS, P/S를 첨가하여 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며 세포가 100 mm diameter culture dish에 80% 정도 증식하면 부착 세포의 계대배양에 사용되는 trypsin을 사용해 배양 하였다.

MTS assay

세포의 증식율을 측정하는 MTS 실험방법을 토대로 하여 (Gerlier and Thomasset, 1986), Cf-GP가 AGS 세포에 증식억제 효과를 가지면서 IEC-6 세포에서 독성을 유발하는지 확인하기 위해 MTS assay를 실시하였다. 각 세포를 96-well plate에 2×10⁴/cell로 100µL 양의 medium을 분주한 후 Cf-GP를 0, 1, 2 및 3µg/mL 농도별로 처리하고 MTS/PMS solution (Promega Co, USA)를 10µg/mL씩 첨가하여 37°C에서 30분 반응시킨 후 ELISA plate reader (Benchmaker Plus, BIO-Rad, USA)로 490 nm 흡광도에서 측정하였다.

세포와 핵의 형태학적 변화 관찰

AGS 세포를 6-well plate에 배양하고 Cf-GP를 1, 2, 3µg/mL 농도로 24시간 처리하였다. 고정액 (formaldehyde:PBS=1:9)을 첨가하여 10분간 고정한 후 Phosphate buffered saline (PBS)로 1 mL 분주하여 세척한 후, 0.2% Triton X-100을 2 mL 첨가하여 실온에서 10분간 방치하였다. 그런 다음 2µg/mL Hoechst 33342 용액을 첨가해 빛을 차단한 상태로 실온에서 30분 반응시켰다. PBS로 세척 후 100% ethanol을 2 mL 첨가해 탈수처리하고 핵의 형태학적 관찰을 위해 mounting medium을 처리하여 형광현미경 (OLYMPUS IX51, Japan)을 통해 200배 배율로 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

Western blot analysis

단백질 발현 및 분석은 AGS 세포에 Cf-GP를 1, 2, 3µg/mL 농도로 처리하여 300µL의 양으로 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 1 mM sodium fluoride (NaF), 1% NP-40, 1 mM Na₃VO₄, 1µg/mL aprotinin, 1µg/mL leupeptin, 1µg/mL pepstatin, 1 mM phenylsufonyl fluoride (PMSF), 0.25% Na-deoxycholate)를 첨가하여 실험에 사용하였다. 세포질 및 미토콘드리아의 획분 추출은 Emanuele et al. (2004)의 방법으로 buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM ethylene glycol bis-N,N,N',N'-tetra-acetic acid (EGTA), 1 mM 1,4-dithiothreitol (DTT), 250 mM Sucrose)로 회수하여 실험에 사용하였으며, 핵 획분 추출은 문헌의 방법을 이용해 (Park et al., 2005), lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 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 실험에 사용하였다. 단백질 농도를 50µg/mL로 동일하게 취하여 western blotting을 위해 전기영동한 다음 Polyvinylidene Fluoride (PVDF) membrane (Millipore, USA)으로 옮겼다. Membrane은 실온에서 1%

BSA/TBS-T (Tris-Buffered Saline Tween-20) 로 blocking 시킨 후, rabbit 1차 항체를 각각 1% BSA/TBS-T와의 비율을 1:1,000, 2차 항체를 1:10,000으로 희석해 반응시킨 후 super signal west pico stable peroxide solution과 super signal west pico luminol/enhancer solution (Rockford, IL, USA)을 사용해 KODAK X-ray film에 감광시킨 후 단백질 발현 정도를 측정 하였다.

Caspase activity 측정

Caspase activity 측정에 사용된 caspase-3 substrate, caspase-8 substrate, caspase-3 inhibitor는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)을 사용하였고 caspase-8 inhibitor는 R&D system (Minneapolis, MN, USA)을 사용하였다.

AGS 세포에 Cf-GP를 처리하였을 때, caspase-3, -8 활성의 증가를 살펴 보기위해 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지로 희석해 6-well에 분주하였다. 세포가 80% 정도 자라면 SFM으로 배지를 교환하여 4시간 배양하고 이후 Cf-GP를 24시간 처리하였다. 최종 농도인 3 μ g/mL 군은 caspase-3, -8 inhibitor인 (Caspase-3 InhibitorII (Z-D(OMe)E(Ome)VD(OMe)-FMK)), (Z-IETD-FMK)를 1시간 전처리 한 후 Cf-GP를 농도별로 24시간 처리하였다. Lysis buffer (25 mM HEPES, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1% CHAPS)로 세포를 회수하여 100 μ g protein/100 μ L 씩 96-well에 분주하였다. 각각의 substrate (Caspase-3 Substrate I, Colorimetric (Ac-DEVD-pNA), Caspase-8 Substrate I (Ac-IETD-pNA))를 첨가하여 shaking incubator에서 37 $^{\circ}$ C, 4시간 조건으로 반응시킨 후 ELISA plate reader로 흡광도 405 nm으로 측정하였다.

Annexin V-FITC 분석

AGS 세포에 Cf-GP를 처리하였을 때, apoptosis와 그 증가를 확인하기 위해 AGS 세포를 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석해 6-well에 분주하였다. 세포가 80% 정도

자라면 SFM으로 배지를 교환하여 4시간 배양하고 이후 Cf-GP를 24시간 처리하고 PBS에 세포를 부유시켰다. 원심분리 (2,500 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)한 후 pellet을 Annexin V-FITC apoptosis detection kit (Becton Dickinson San Jose, CA, USA)를 사용하였다. Pellet을 1X Annexin V binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) 100 μ L에 희석하여 Annexin V-FITC solution과 propidium iodide (PI) solution을 첨가하고 암실에서 15분 반응 후 1X binding buffer에 희석하여 flow cytometer (FACS Calibur; BD Biosciences)를 사용해 측정하였다.

실험 결과의 통계처리

본 실험에 대한 결과는 mean \pm S.D.로 나타내었고, SPSS ver. 10.0 프로그램을 사용해 ANOVA로 검증한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 실험군간의 유의성 비교를 하였다.

결 과

매생이로부터 당단백질 정제, 분자량 확인

매생이로부터 추출한 물질의 당과 단백질 확인 및 측정하기 위해 coomassie brilliant blue staining과 당단백질 염색을 통해 살펴보았다. 그 결과, 추출물은 농도 의존적으로 당 및 단백질의 함량이 10 kDa 이하의 분자량에서 확인이 되었으며, 추출과정 중에서 에탄올 결합 후 여과 과정을 거쳐도 매생이에 다량 함유된 당 성분이 남아있어 순수한 단백질이 아닌 10 kDa 이하의 분자량을 가지는 당단백질임을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

Cf-GP가 AGS 세포 사멸에 미치는 영향

인간 위암 세포주인 AGS의 세포 사멸에 Cf-GP가 미치는

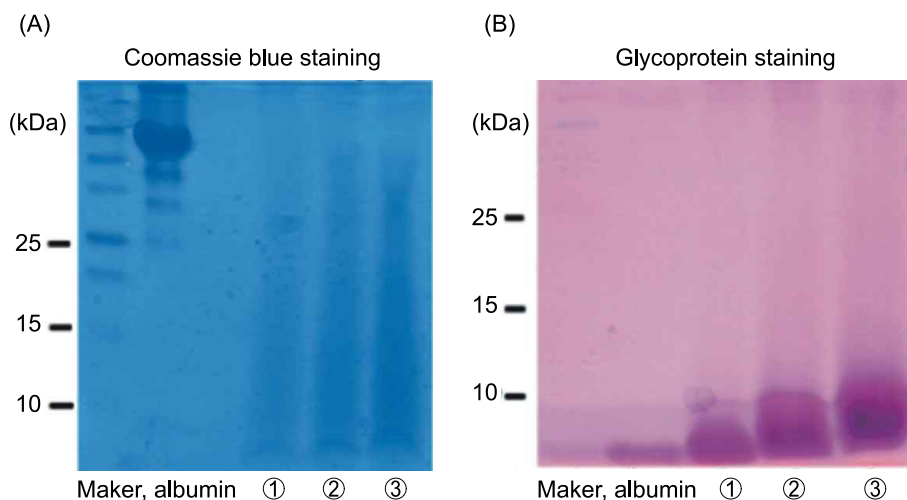


Fig. 1. The glycoprotein extracted *Capsosiphon fulvescens* and the sample were loaded with SDS-PAGE. Then stained with Coomassie brilliant blue and Glycoprotein staining. Fig. 1(A, B) ①, concentration of *Capsosiphon fulvescens*'s glycoprotein (Cf-GP) is 10 μ g/mL; ②, concentration of glycoprotein is 20 μ g/mL; ③, concentration of glycoprotein is 40 μ g/mL. This results indicate that in the range Cf-GP 6-10 kDa.

영향 및 위 세포주인 IEC-6 세포의 독성 유무를 확인하기 위해 MTS assay를 실시하였다. AGS 세포에서 0-5 μ g/mL 처리 시 농도 의존적으로 약 65% 정도 세포증식 억제 효과가 나타났으며, IEC-6 위 세포주에서는 거의 세포증식억제 효과가 없었으므로 암세포에 대한 특이성으로 작용함을 알 수 있다 (Fig. 2). 따라서 IEC-6 위 세포주에서는 독성을 나타내지 않으며 암세포에서는 세포증식 억제효과를 보이는 0-3 μ g/mL 농도로 실험을 진행하였다.

세포의 형태학적 변화

앞 선 MTS 결과에서, Cf-GP를 처리하였을 때 AGS 세포 증식이 감소하는 결과를 보였기 때문에 현미경 상에서 형태학적 변화가 있는지를 살펴보았다.

그 결과, AGS 세포에 Cf-GP를 처리하였을 때 MTS 결과와 동일하게 농도 의존적으로 세포 수가 감소하였다 (Fig. 3A). Cf-GP를 처리하지 않은 군과 비교하였을 때 농도 의존적으로 세포가 사멸함을 알 수 있는데 그 과정에서 세포는 세포 외 기질과 그에 대한 세포막 수용체인 integrin과의 결합력 저하로 인한 focal adhesion complex의 분해로 인하여 정상적인 세포의 형태에서 둥근 형태로 변화하면서 단백질 변화에 의한 형태의 수축, 염색사 응축, 핵의 손상등과 같은 여러 형태, 생화학적인 변화를 일으킨다 (John et al., 1994).

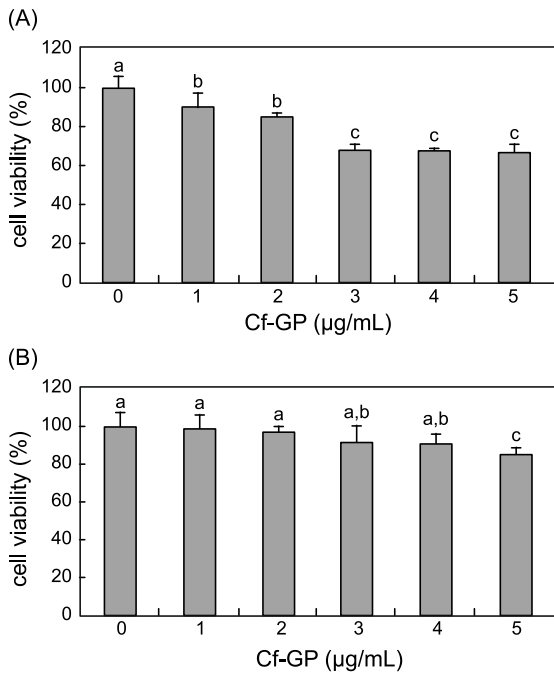


Fig. 2. Effect of Cf-GP on the cell proliferations. (A) Effect of Cf-GP treatment on the growth inhibit of AGS gastric cancer cells. Control or varying concentrations of Cf-GP (0, 1, 2, 3, 4, 5 μ g/mL) for 24 h. (B) Effect of Cf-GP treatment on the non toxic to IEC-6 intestinal epithelial cells. Values are the mean \pm SD; P <0.05 by ANOVA. Values with different letters are significantly different from one another according to Duncan's multiple range test.

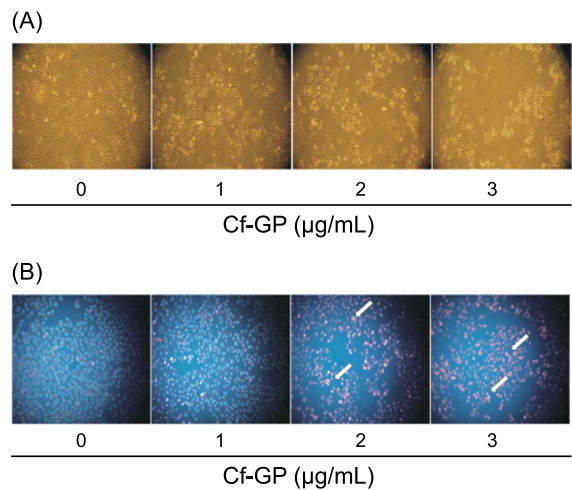


Fig. 3. Morphological changes and Induction of apoptotic bodies by treatment with Cf-GP in AGS cells. (A) and H33342 staining (B) of AGS cells were treated with Cf-GP. Magnification, \times 200.

앞 선 세포의 형태학적 변화에서 세포 수의 감소 결과를 보였으므로 Cf-GP 처리 시 사멸체 (apoptotic body) 형성의 핵의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 Hoechst 33342 염색을 하였다. Hoechst 33342는 세포에 DNA-binding dyes를 붙여 염색할 경우, 생존하고 있는 세포와 사멸된 세포의 DNA를 blue 계열로 염색하며 핵의 형태학전 변화에 이용되고 있다. AGS 세포에 Cf-GP를 처리하였을 때 대조군과는 달리 세포 사멸에 의한 DNA 단편화 현상인 apoptotic body (Arends et al., 1990)를 농도 의존적으로 증가함을 볼 수 있었다 (Fig. 3B).

Apoptosis 조절 단백질 발현 분석

Apoptosis에 관련되는 많은 단백질들은 bcl-2 family proteins 발현의 변화에 의해 활성이 조절되는 것으로 알려져 있는데 이러한 caspases가 활성화되면 actin, gelsolin, fodrin, lamin과 같은 구조단백질과 (Takahashi et al., 1996), Poly ADP-ribose polymerase (PARP)를 포함하는 특정 기질이 절단되어 apoptosis에 의한 세포의 형태학적, 생물학적 변화가 발생 한다. 또한 활성화되어진 caspases는 apoptosis의 전형적인 특징 처럼, 세포의 skeleton, membrane, nucleus에 존재하는 단백질 들을 빠르게 분해한다. 앞서 설명한 caspase-8에 의하여 caspase-3이 활성화되면 핵단백질인 PARP가 잘려져 비활성화 현상이 관찰되는데, 이는 apoptosis 과정에서 핵 DNA 손상에 의해 PARP가 과도하게 활성화되어 PARP 기질인 동시에 세포 에너지원인 ATP와 NADH가 소모되는 것을 억제함으로써 apoptosis 과정 중에 사용되는 에너지를 유지하려는 현상이 발생하게 된다 (Yutaka et al., 1997). Caspase-8은 death receptor를 통하여 활성화되므로 cleaved form이 증가를 하게 되고 bcl-2 family proteins중 하나인 bid를 절단하여 다시 활성화된 caspase-8에 의해 절단된 후 미토콘드리아를 활성화시킴으로서

caspase-3의 활성 또한 증가하게 된다 (Nagata, 1997). 또한 미토콘드리아와 세포질의 cytochrome c의 단백질 발현으로 인하여 caspase-9와 Apaf-1이 결합하면 apoptosome 형성으로 인한 caspase-9의 활성도 증가하게 된다.

본 실험에서 Cf-GP를 1, 2, 3 μ g/mL 농도로 24시간 처리하였을 때 농도 의존적으로 pro-caspase의 감소와 Fas가 나타났으며 cleaved PARP 발현을 확인하였는데, 이는 HeLa 세포에서 DNA 회복에 관여하는 단백질인 PARP 수준을 살펴본 연구에서도 유사한 경향을 보여주었다 (Odile and Felix, 2009). 또한, FADD 및 cleaved caspase-3, -8, -9의 발현이 증가하는 것으로 나타나, Fas signal을 통해 apoptosis가 일어남을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

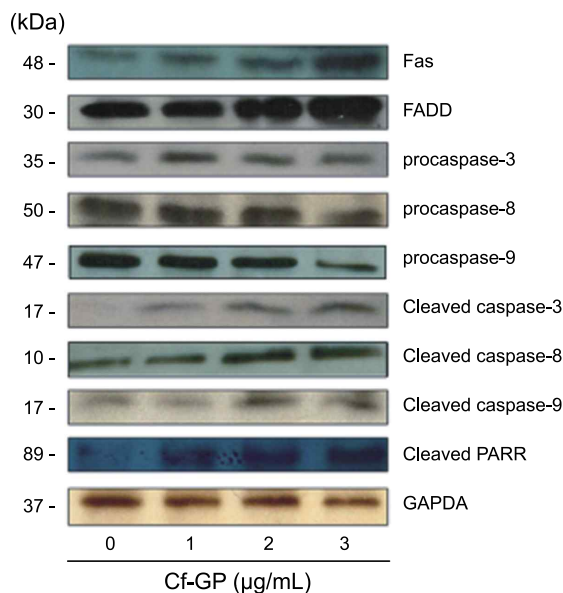


Fig. 4. Effects of Cf-GP on the expression levels of apoptosis related proteins in AGS cells.

Bcl-2 family 단백질 발현 분석

Bcl-2 family proteins은 미토콘드리아의 막 투과성을 조절하는 인자로써 미토콘드리아에 의한 intrinsic apoptosis pathway에 작용하는 단백질로 다양한 종류가 존재한다. 그 종류에 따라서 apoptosis를 일으키기도 하고 anti-apoptosis를 하기도 하는데 bad, bax, bid는 apoptosis에 관여하는 단백질인자로, bcl-2, bcl-XL은 anti-apoptosis로써 그 역할을 가지고 있다 (Sudheer et al., 2006).

Pro-apoptosis중에서 bax sub-family는 bax가 평상시에는 monomer로 존재하면서 bcl-2에 의하여 그 작용이 저해 받게 된다. Apoptosis signal이 들어오면 bad가 bcl-2와 결합하게 되고 bcl-2로부터 떨어져 나온 bid는 bax와 결합하여 그들의 conformational change가 일어나 dimer를 형성하게 되고 미토콘드리아 외막에 작용해 구멍을 만들어 내부의 물질을 유출 시키게 된다. 이 때 나오는 cytochrome c, Apaf-1 등은 apoptosis

에 작용하는 물질들이다. 또한 BH3 sub-family는 bcl-2, bcl-XL에 결합되어 그 작용을 억제하여 bax의 작용을 활성화 시킨다 (Elizabeth et al., 1995). 이 때 bid의 경우 평상시에는 작용이 없으나 apoptosis 신호가 들어오게 되면 활성화된 caspase-8에 의해 잘려나가게 된다.

본 실험에서 Cf-GP를 1, 2, 3 μ g/mL 농도로 24시간 처리하였을 때 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 apoptosis를 저해하는 것으로 알려진 bcl-2, bcl-XL의 단백질 발현 수준은 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보여주었다. 또한, apoptosis에 관여하는 bid의 단백질 발현 수준은 감소되는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

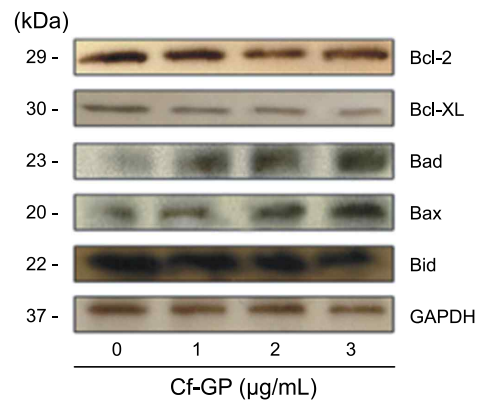


Fig. 5. Effects of Cf-GP on the expression of Bcl-2 family proteins in AGS cells.

Caspases 분석

앞선 실험에서 Cf-GP를 AGS 세포에 처리 했을 시 세포 증식 억제를 확인 하였고 western blot의 결과로 Fas를 통한 apoptosis와 이로 인해 활성화되는 cleaved caspase-3, -8의 발현을 알 수 있었다.

본 실험에서는 이러한 caspase-3, -8의 활성 및 정도가 대조군에 비하여 어느 정도 수준으로 활성이 되는지를 측정해 보았다. 모든 실험에서 기준이 된 동일한 시간, 농도 조건으로 측정을 해 본 결과 농도 의존적으로 caspase-3, -8의 활성이 최종 농도인 3 μ g/mL에서 대조군에 비해 각각 47%, 65% 증가함을 알 수 있었고, inhibitor를 처리한 군에서는 대조군 수준을 유지하는 것을 확인 하였다 (Fig. 6).

Annexin V-FITC 분석

앞선 결과에서, AGS 세포에 Cf-GP 처리 시 세포 사멸이 유도되어 그 수가 감소하였으므로 Annexin V-FITC apoptosis detection kit를 사용해 apoptosis인지 necrosis인지 flow cytometry로 분석하였다. Annexin V-FITC를 통해 apoptosis의 수치를 정량적으로 측정할 수 있다. 세포에서 apoptosis가 발생하면 세포막을 조성하고 있는 인지질의 안쪽에 존재하는 phosphatidylserin (PS)이 세포막 외부로 이동을 하게 되는데 이 때 PS에 결합하는 Annexin V와 PI의 세포막 투과성을 이용

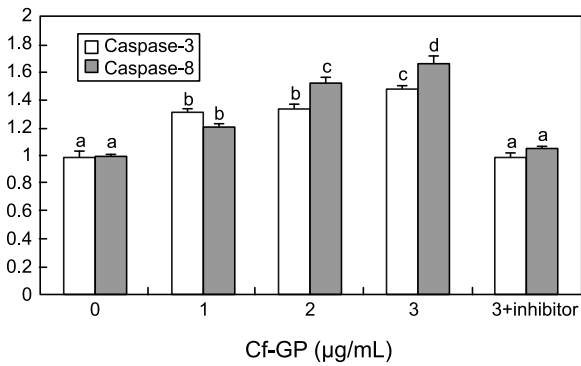


Fig. 6. Activation of caspase-3 and caspase-8 by Cf-GP treatment in AGS cells. The values were the means±SD; $p < 0.05$ by ANOVA. Values with different letters are significantly different from one another according to Duncan's multiple range test.

해 early apoptosis (Annexin V-FITC positive/PI negative)와 late apoptosis (Annexin V-FITC positive/PI positive)의 비율을 알

수 있다.

분석 결과, 대조군에서는 apoptosis cell의 비율이 3.48%였으나 Cf-GP를 1, 2, 3μg/mL 농도로 24시간 처리한 구간에서는 10.27%, 12.48%, 17.36%로 농도 의존적으로 apoptosis cell의 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7). 이에 반하여 necrosis의 경우 대조군에서 4.47%였으나 CF-GP 처리 시 3.84%, 2.47%, 2.72%로 큰 차이가 없었으며 necrosis가 작은 수치나마 발현된 것은 세포를 배양하는 과정에서 SFM 처리에 의하여 영양분이 없었기 때문에 자연사의 과정에 의해 발생한 것으로 보인다.

세포질과 미토콘드리아에서의 Cytochrome C 단백질 발현 분석

앞선 결과에서 caspase-3, 9의 단편화를 확인하였다 (Fig. 4). 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.

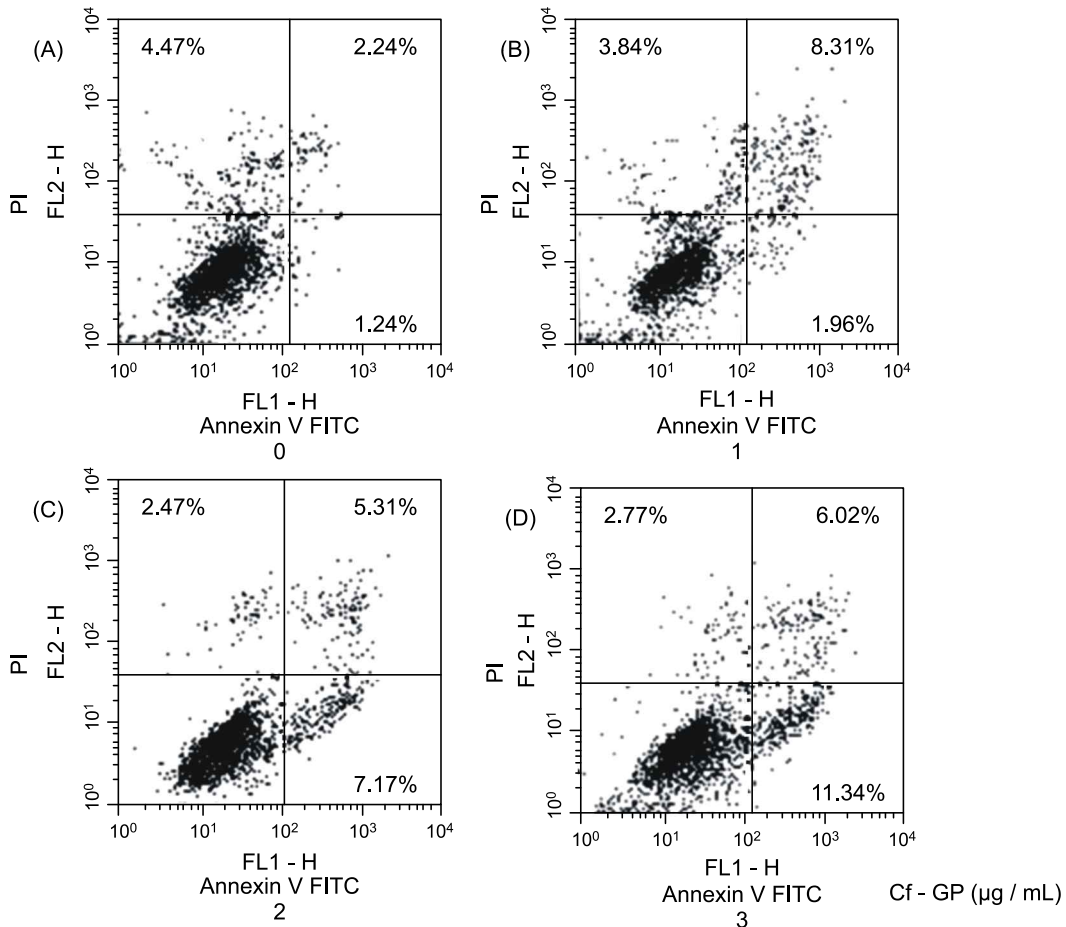


Fig. 7. Induction of apoptosis in AGS cells after treatment with Cf-GP as determined Bivariate annexin V/PI analysis. Bivariate annexin V/PI analysis by Cf-GP treatment in AGS cells. Region lower left contains the vital (double negative). (A) Untreated control cells; (B) Cells treated with 1μg/mL Cf-GP; (C) Cells treated with 2μg/mL Cf-GP; (D) Cells treated with 3μg/mL Cf-GP.

Western blot 결과 AGS 세포에 Cf-GP 처리 시 세포사멸에 관여할 수준으로 bcl-2 family proteins가 작용하는 것을 토대로 세포질에서의 cytochrome c 유출 단계를 확인해 보았다. apoptosis signal에 의해 bcl-2 family proteins와의 작용으로 인하여 미토콘드리아에서 cytochrome c가 유출되면 세포질에서 caspase-9, Apaf-1과 결합을 하여 apoptosome을 형성하게 된다. 이것은 다시 caspase-9를 활성화시켜 caspase-3이 활성을 가지게 되어 apoptosis를 유도하게 된다 (Alan and Reiner, 1999; Lavrik et al., 2005). Apoptosis 동안에 미토콘드리아가 손상됨으로써 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 세포질로 유리된다. Bcl-2는 apoptosis를 유도하는 cytochrome c가 미토콘드리아로부터의 분리되는 것을 막는데 앞서 bcl-2 family proteins의 western blot 결과를 통해 pro-apoptosis가 활성화되고 anti-apoptosis 계열이 감소하는 것을 확인하였으므로 미토콘드리아와 세포질에서의 cytochrome c의 발현을 확인한 문헌의 실험방법을 사용하여 (Agarwal et al., 2002), 미토콘드리아에서 방출된 cytochrome c가 세포질에서 Cf-GP 처리 시 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 세포질 수준의 Apaf-1도 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

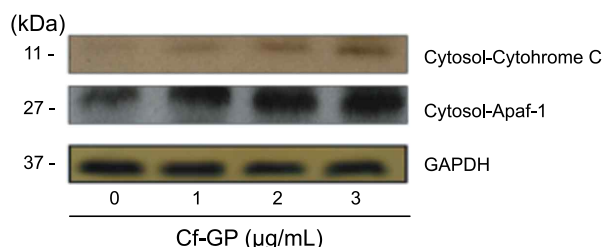


Fig. 8. Effects of Cf-GP on the expression levels of cytochrome C and Apaf-1 proteins in AGS cells.

고찰

본 연구에서 해조류 중 하나인 매생이로부터 추출, 정제한 당단백질을 통해 위암세포인 AGS를 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였고 (Fig. 2), 이를 광학현미경을 통하여 세포수의 감소나 형태학적 변화 또한 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

이러한 결과를 바탕으로 Cf-GP에 의한 세포증식 억제가 apoptosis임을 단백질 발현 등을 통하여 확인할 수 있었는데 일반적으로 apoptosis는 Fas나 TRAIL 등의 경로를 통하여 조절이 된다. 그 중 apoptosis에서 중요 인자인 caspases는 세포의 증식과 유지에 필요한 필수 단백질을 분해하는 역할을 가지는데, 그 종류에 따라 서로 다른 경로에 의해 활성이 일어난다 (Berg et al., 2001). Caspase-8은 cell death ligand가 receptor에 결합이 되면 활성이 일어나 effector caspase를 활성화 시킨다 (Honglin et al., 1998). 또한 apoptosis에 의해 DNA손상이 일부 발생하면 bcl-2 family 계열의 단백질에 변화가 유도되어 미토콘드리아 막의 투과성 증가로 인해 cytochrome c가 세포질로 방출되게 된다 (Emily et al., 2001). 방출된 cytochrome c는 Apaf-1과 결합하여 또 다른 caspase경로인 caspase-9와 결합해

활성이 일어나고 caspase-9는 하위 effector caspase를 활성화 시키게 된다 (Lavrik et al., 2005).

본 연구에서는 Cf-GP로 인한 apoptosis 유도에서의 단백질 발현에서 0, 1, 2 및 3µg/mL 농도로 24시간 처리 시 Fas, cleaved PARP, FADD 및 cleaved caspase-3, -8, -9 변화를 확인하였고 (Fig. 4), bcl-2 family 계열 단백질의 발현 현상과 (Fig. 5) 미토콘드리아 에서 방출된 cytochrome c이 세포질로의 이동 현상도 확인할 수 있었다 (Fig. 9).

또한 본 실험에서 Cf-GP를 처리 하였을 때 cleaved caspases의 발현증가가 일어났는데, 3µg/mL의 Cf-GP 처리 시 대조군에 비해 60% 증가되었으며 (Fig. 6), caspase inhibitor를 처리한 결과 대조군 수준으로 활성이 감소되어, caspases-3과 -8의 신호로 apoptosis가 일어남을 확인하였는데, 에탄올 추출물 처리 시 cleaved caspases의 발현이 증가하였다는 결과와 동일한 경향을 보여주었다 (Jang et al., 2010).

본 연구에서 Annexin V-FITC 분석 결과, 대조군에서는 apoptosis cell의 비율이 3.48%였으나 Cf-GP를 1, 2, 3µg/mL 농도로 24시간 처리한 구간에서는 10.27%, 12.48%, 17.36%로 농도 의존적으로 apoptosis cell의 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7). 이 결과는 Annexin V-FITC을 통해 암환자와 회복군의 세포의 apoptosis 발현정도를 측정한 문헌과 유사한 결과를 보여주었다 (Shen et al., 2002).

따라서, 본 결과는 매생이로부터 추출한 당단백질인 Cf-GP가 AGS 세포에서 caspase-3, -8의 경로를 통해 apoptosis를 유발하여 세포 증식 억제 및 항암효과를 가진다는 것을 확인하였으며, 정제된 해조류의 당단백질 성분은 암 치료 및 예방에 있어서 기능성 식품으로서의 효과를 가져 올 수 있음을 제시하고 있다.

사사

본 연구는 국토해양부 해양생명공학사업의 해양바이오프로세스연구단 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Agarwal C, Singh RP and Agarwal R. 2002. Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. *Carcinogenesis* 23, 1869-1876.
- Alan GP and Reiner UJ. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differ* 6, 99-104.
- Arends MJ, Morris RG, and Wyllie AH. 1990. Apoptosis. The role of the endonucleasa. *Am J Pathol* 136, 593-608.
- Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K and Wesselberg S. 2001. Human mature red blood cells express caspase-3

- and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ* 8, 1197-1206.
- Bishop JM. 1987. The molecular genetics of cancer. *Sci* 235, 305-311.
- Boo HJ, Hyun JH, Kim SC, Kang JI, Kim MK, Kim SY, Cho H, Yoo ES and Kim HK. 2011. Fucooidan from *Undaria pinnatifida* Induces Apoptosis in A549 Human Lung Carcinoma Cells. *Phytother Res* (online published)
- Elizabeth Y, Jiping Z, Jennifer J, Lawrence HB, Cralg BT and Korsmeyer SJ. 1995. Bad, a Heterodimeric Partner for Bcl-X1 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.
- Emily HY, Cheng A, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T and Korsmeyer SJ. 2001. BCL-2, BCL-XL Sequester BH3 Domain-Only Molecules Preventing Bax- and BAK-Mediated Mitochondrial Apoptosis. *Mol Cell* 8, 705-711.
- Funahashi H, Imai T, Mase T, Sekiya M, Yokoi K, Hayashi H, Shibata A, Hayashi T, Nishikawa M, Suda N, Hibi Y, Mizuno Y, Tsukamura K, Hayakawa A and Tanuma S. 2001. Seaweed Prevents Breast Cancer? *Japan J Cancer Res* 92, 483-487.
- Gerlier D and Thomasset N. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*. 94, 57-63.
- Go H, Hwang HJ, and Nam TJ. 2010. A glycoprotein from *Lamimnaria japonica* induces apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Toxicol in Vitro* 24, 1546-1553.
- Jang KJ, Han MH, Lee BH, Kim BW, Kim CH, Yoon HM and Choi YH. 2010. Induction of Apoptosis by Ethanol Extracts of *Ganoderma lucidum* in Human Gastric Carcinoma Cells. *J Acupunct Meridian Stud* 3, 24-31.
- John FRK, Clay MW and Brian VH. 1994 Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.
- Jung KJ, Jung CH, Pyeun JH and Choi YJ. 2005. Changes of Food Components in Mesangi (*Capsosiphon fulvecense*), Gashiparae (*Enteromorpha prolifera*), and Cheonggak (*Codium fragile*) Depending on Harvest Times. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34, 687-693.
- Kim EJ, Lee YJ, Shin HK and Park JHY. 2006. A Study on the Mechanisms by Which the Aqueous Extract of *Inonotus obliquus* Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35, 516-523.
- Kim HS. 2009. *Helicobacter Pylori* Infection and Gastric Cancer. *Helicobacter and Gastrointestinal Research* 9, 22-25.
- Kim IH, Lee HH, Jang JS, Lee SH, Ha JM, Ha JB, and Lee JH. 2006. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Seaweed, *Ulva lactuca*. *Environmental Mutagens & Carcinogens* 26, 48-52.
- Kwon MJ and Nam TJ. 2006. Porphyrin induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Life Sci* 79, 1956-1962.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lavrik I, Golks A and Krammer PH. 2005. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118, 265-267.
- Lee KH, Kwon HJ, Chun SS, Kim JH, Cho YJ, and Cha WS. 2006. Biological Activities of Extracts from *Phellinus linteus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49, 298-303.
- Hwang HJ, Kim IH and Nam TJ. 2008. Food and Chemical Effect of a glycoprotein from *Hizikia fusiformis* on acetaminophen-induced liver injury. *Food and Chemic Toxicol* 46, 3475-3481.
- 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.
- Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Noda H, Amano H, Arashima K and Nisizawa K. 1990. Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologia* 204/205, 577-584.
- Odile C and Felix RA. 2009. Role of PARP-1 and PARP-2 in the expression of apoptosis-regulating gene in HeLa cells. *Cell Biol Toxicol* 25, 379-391.
- Park HS, Lee YS, Koo SJ, Han MJ, Choue RW and Oh SY. 2003. Diet and health 2nd ed Hyoil, Seoul, Korea
- Park HY, Lim CW, Kim YK, Yoon HD and Lee KJ. 2006. Immunostimulating and Anticancer Activities of Hot Water Extract from *Capsosiphon fulvescens*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49, 343-348.
- Park YC, Jeong JH, Park KJ, Choi HJ, Park YM, Jeong

- BK, Higuchi Y and Yoo YH. 2005. Sulindac activates nuclear translocation of AIF, DFF40 and endonuclease G but not induces oligonucleosomal DNA fragmentation in HT-29 cells. *Life Sci* 77, 2059-2070.
- Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A and Ong CN. 2002. Detection of apoptotic alterations in sperm in sub-fertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod* 17, 1266-1273.
- Sudheer KM, Som DS, and Santosh KK. 2006. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 5, 296-308.
- Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH and Earnshaw WC. 1996. Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta- converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8395-8400.
- Yutaka E, Shigeomi S and Yoshihide T. 1997. Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate by Apoptosis. *Cancer Research* 57, 1835-1840.

2011년 2월 25일 접수

2011년 4월 21일 수정

2011년 5월 30일 수리