

합유황 다당체 Fucoidan의 인체 대장암세포(HT-29) 사멸과 Apoptosis에 미치는 영향

김민지 · 정하숙*

덕성여자대학교 과학기술대학 식품영양학과 석사과정생, *덕성여자대학교 과학기술대학 식품영양학과 교수

Effects of Fucoidan, a Sulfur-Containing Polysaccharide, on Cytotoxicity and Apoptosis in HT-29 Human Colorectal Cancer Cells

Min Ji Kim and †Ha Sook Chung*

Graduate Student, Dept. of Food and Nutrition, College of Science and Technology, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea

*Professor, Dept. of Food and Nutrition, College of Science and Technology, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea

Abstract

The purpose of this study was to investigate the biological activity of fucoidan, a sulfur-containing polysaccharide, on cytotoxicity and apoptosis in the human HT-29 colorectal cancer cell line using cell viability, Flow cytometry, Western blot, and RT-PCR analyses. Fucoidan inhibited the proliferation of HT-29 cells by 39.6% at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ for 72 h. The inhibition was dose-dependent and accompanied by apoptosis. Flow cytometric analysis showed that fucoidan increased early apoptosis and late apoptosis by 65.84% and 72.09% at concentrations of 25 and 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Analysis of the mechanism of these events indicated that fucoidan-treated cells exhibited increases in the activation of caspase-3, caspase-8, and PARP in a dose-dependent manner. These results suggest that fucoidan may inhibit the growth of human colorectal cancer cells by various apoptosis-promoting effects, as well as by apoptosis itself.

Key words: fucoidan, sulfur-containing polysaccharide, apoptosis, colorectal cancer, HT-29

서론

우리나라 국민의 신규 암 환자 수는 2015년 이후 매년 증가하는 추세이며, 2019년도 신규 발생 암환자 수는 25만 4,718명(남 13만 4,180명, 여 12만 538명)으로, 2018년(24만 5,874명) 대비 8,844명(3.6%)이며, 남자는 4,356명(3.4%), 여자는 4,488명(3.9%) 증가하였고, 신규 암 발생 1위는 갑상선암(3만 676명), 2위 폐암(2만 9,960명), 3위 위암(2만 9,493명), 4위 대장암(2만 9,030명)이며, 기대수명(83세)까지 생존하는 경우 암에 걸릴 확률은 평균 37.9%로, 남자(80세)는 39.9%, 여자(87세)는 35.8%의 암 발생이 예상된다(Ministry of Health and Welfare 2021).

대장암은 우리나라에서 꾸준히 발병 우위를 차지하고 있으며, 주요 발병요인으로는 과도한 동물성 지방, 당분, 알콜 섭취 증가 및 섬유소, 항산화 비타민, 채소, 과일 섭취 부족 등에 의해 발생한다(Jemal 등 2005; Yoon 등 2007). 대장암은 조기 진단 및 항암제, 방사선 치료, 기능성 소재와의 병용 치료를 통해 상당한 치료 효과를 보이고 있으나, 진단 시 이미 병이 진행되어 수술로 완치 불가능한 경우가 많아 항암제나 방사선 치료를 시도하나 효과가 좋지 않고 부작용 또한 많아 만족할 만한 치료법이 되지 못하고 있다(Kronborg 등 1996; Winawer 등 1996; Shin & Byun 2004). 대장암의 화학예방 약제의 이상적인 조건은 종양 예방효과와 비용의 효율성 및 약물 독성이나 부작용이 없어야 한다. 그러나 이러한 조건을

† Corresponding author: Ha Sook Chung, Professor, Dept. of Food and Nutrition, College of Science and Technology, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea. Tel: +82-2-901-8593, Fax: +82-2-901-8593, E-mail: hasook@duksung.ac.kr

충족하는 약제가 없으므로, 독성이 없으면서 예방효과가 우수한 약제 및 식이 성분에 의한 대장암 화학예방 관련 연구(Zhao 등 1991; Torzsas 등 1996; Lee YR 2013; Na 등 2019) 등 보다 효과적이고 안전한 화합물의 개발이 필요 시 되고 있다.

일명 프로그램화된 세포사멸(programmed cell death)로 알려진 세포자멸사(apoptosis)는 정상적인 발생 단계 및 생리 작용에서 세포 수를 일정하게 유지하기 위해 필수적인 세포사멸 과정이다. 특히, 암의 발생과 진행 과정에서 세포사멸 기전이 손상되는 경우, 정상세포가 암세포로 변화되며(Hu & Kavanagh 2003), 세포 항상성 유지 과정에서 주요한 역할을 하고, 세포질과 염색질 응축, 세포막 수포화 현상, 핵의 단편화 현상 및 apoptotic body 형성 등 세포의 형태적 변화를 초래하며, 이러한 과정은 세포 내부와 외부에서 오는 신호로 조절된다(Choi 등 2009; Cho 등 2012). 세포사멸 과정의 주요 단백질인 Bcl-2 계열의 단백질, p53, Bax, caspases 효소, tumor necrosis factor(TNF)-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)가 단백질의 활성을 증가시키며, 사멸 기전과 관련된 단백질 인산화 효소, 탈인산화 효소, 전사인자 및 세포 표면의 수용체, proteosome 등을 표적으로 하여 세포사멸을 유도한다(Korsmeyer SJ 1995; Trauzold 등 2001; Baetu & Hiscott 2002; Jäättelä M 2002; Reed JC 2002; LeBlanc & Ashkenazi 2003; Debatin KM 2004; Paoluzzi & O'Connor 2010).

Fucoidan은 유황을 함유하는 분자량 20만의 다당체로, fucose(44.1%), sulfate(26.3%), ash(31.1%) 및 소량의 aminoglucose와 monosaccharides를 함유하고 있으며(Nishino 등 1994; Bilan 등 2002), 다시마와 미역 등에 주로 존재하고(Chevolot 등 1999; Chizhov 등 1999; Chevolot 등 2001), 항산화(Piao 등 2004; Ryu & Chung 2016; Bai 등 2020; Fernando 등 2020), 니코틴의 코티닌으로의 전환(Lee & Rhee 2014), 항균, 항스트레스, 콜레스테롤 저하, 항당뇨, 지질 생합성, 항종양(Brunner 등 1998; Del Bigio 등 1999; Jiang 등 2010; Kim 등 2010; Xue 등 2018; van Weelden 등 2019; Daub 등 2020; Dimitrova-Shumkovska 등 2020; Li 등 2020; Fitton 등 2021; Huang 등 2021; Mabate 등 2021; Mustafa 등 2021; Suprunchuk V 2021; Yu 등 2021; Zhu 등 2021) 등의 생리활성이 보고되었다.

본 연구는 천연물로부터 인체 대장암세포 사멸을 유도하는 기능성 소재 탐색에 대한 연구(Ryu & Chung 2011; Ryu 등 2013; Ryu & Chung 2015; Guon & Chung 2016)의 일환으로, 해조류에 다량으로 존재하는 함유량 다당체인 fucoidan의 인체 대장암세포(HT-29) 사멸 및 apoptosis에 미치는 영향을 MTT, Flow cytometry, Western blot 및 RT-PCR analysis를 수행하여 확인하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용한 MTT, fucoidan(F8315, 순도 95% 이상)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA), Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), streptomycin-penicillin, Trypsin-EDTA은 Gibco(Carlsbad, CA, USA), caspase-8, caspase-3, PARP, goat anti-rabbit IgG-HRP는 Cell Signaling Technology Inc.(Danvers, MA, USA), Bcl-2, Bax, p53, goat anti-mouse IgG-HRP은 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Dallas, TX, USA) 제품을 사용하였고, 분석에 사용된 모든 시약은 특급을 사용하였다.

2. 세포주 및 세포 배양

인체 대장암 세포주(Human colorectal epithelial cell)인 HT-29 세포는 Korean Cell Line Bank(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 분양받은 세포주를 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS, Gibco/BRL)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI1640 배지를 사용하여 5% CO₂를 함유한 37°C 배양기(Sanyo, Japan)에서 배양하였다. 2주 이상 계대 배양하여 배양 환경에 충분히 적응시킨 후 세포 밀도가 70~80% 정도 포화되면 0.05% Trypsin-EDTA(Gibco/BRL) 용액을 사용하여 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

3. 세포 독성 실험(MTT assay)

Fucoidan 처리 시 HT-29 세포 증식에 미치는 효과를 3-(3,4-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 방법(Carmichael 등 1987)으로 측정하였다. HT-29 세포를 96 well plate에 1.5×10⁴ cells/well 밀도로 분주하여 24시간 배양 후 시료의 최종 농도가 0, 25, 50, 100 µg/mL가 되도록 처리하여 각각을 24, 48, 72시간 배양하였다. 배양 후 MTT 시약을 2.0 mg/mL 농도로 50 µL를 각 well에 첨가하여 4시간 더 배양 후 배지를 제거하고 dimethylsulfoxide를 150 µL 첨가하여 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시켜 ELISA reader(SpectraMax, Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정(Agilent Inc., Palo Alto, CA, USA)하였다. 세포 증식률은 fucoidan의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

4. 유세포 분석(Flow cytometry analysis)

HT-29 세포에 fucoidan을 처리한 후에 early-apoptotic cell 및 late-apoptotic cell 수를 FACSCalibur Flow cytometry 방법(Ryu 등 2020)으로 측정하였다. HT-29 세포를 6 well plate에 3×10⁵ cells/well 밀도로 분주하여 72시간 배양 후 시료를 농도별로

처리하고 24시간 배양한 후에 배지를 제거하고 PBS로 세포 단층을 씻어낸 후 trypsin-EDTA를 처리하여 원심분리하고 세포들을 모아주었다. 이어서 1×binding buffer(Annexin V-FITC kit, BioBud, Seoul, Korea) 100 µL를 첨가하고, 세포에 annexin 5 µL, PI 0.7 µL를 첨가하여 suspension한 뒤 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 분석을 통해 apoptotic cell 수를 측정하였다.

5. 단백질 발현 실험(Western blott analysis)

세포사멸 및 증식과 관련된 단백질 발현을 확인하기 위해 Western blot(Ryu & Chung 2015)을 실시하였다. HT-29 세포를 10 mm의 dish에 2×10^6 cells/well로 분주하고 시료를 농도별로 처리하여 72시간 배양 후 PBS로 2회 washing한 후에 RIPA buffer(pH 7.4, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 10% glycerol)로 44°C에서 overnight 반응시키고, 용해된 cell lysates를 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 모아 시료로 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) 시약을 사용하였으며, SDS-PAGE gel에 동량의 단백질을 loading하여 단백질을 분리한 후, nitrocellulose membrane에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane은 3% milk/TBST(1.5 M NaCl, 100 mM Tris base, pH 7.4, 1% tween)로 실온에서 1시간 blocking한 후, 1차 antibody인 cleaved caspase-3, cleaved caspase-8, cleaved-PARP, Bcl-2, Bax, p53을 4°C에서 overnight 반응시켰다. 이어서 TBST로 세척 후 다시 goat anti-mouse IgG-HRP, goat anti-rabbit IgG-HRP로 1시간 반응시킨 후에 Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 high molecular weight marker(Amersham, England)로 분자량을 측정하였다.

6. mRNA 발현 실험(RT-PCR)

1) Total RNA 분리

Fucoidan의 HT-29 세포 증식 억제 및 사멸 유도 효과가 mRNA 수준에서도 영향을 미치는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. HT-29 세포를 6 well plate에 3×10^5 cells/well 밀도로 분주하여 fucoidan을 농도별로 처리하고 24시간 후 배지를 제거한 후 Tri reagent 1 mL를 첨가하여 scraper로 세포를 모아 3분간 실온에 방치하였다. 여기에 chloroform 200 µL를 첨가하여 충분히 섞은 후에 10분간 방치하고 4°C, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층을 튜브로 옮겨 담고 isopropanol 500 µL를 첨가하여 상온에서 10분간 방치하고 다시 4°C, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. DEPC water로 희석한 75% ethanol 1 mL를 첨가하여

약하게 vortex하고 4°C, 14,000 rpm에서 5분간 원심분리 후, 상층액을 제거하고 pellet을 충분히 건조시켰다. Pellet은 RNase-free DEPC water 50 µL를 첨가하여 녹인 후에 이것을 RNase-free DEPC water 용액으로 1:100으로 희석하여 260 nm 및 280 nm에서 흡광도(OD)를 측정(Agilent Inc., Palo Alto, CA, USA)하여 OD 260/OD 280 ratio로 RNA의 purity(1.7~2.0)를 확인하고 OD 260 값으로 RNA 농도를 측정하였다.

2) cDNA 합성

정량한 RNA sample 양이 500 ng이 되도록 tube에 준비하고 10 mM dNTP mix, Random hexamers(50 ng/µL)를 포함하여 총량이 10 µL가 되도록 멸균수를 첨가하여 65°C에서 5분간 배양한 후 reaction buffer(10×RT buffer 2 µL, 25 mM MgCl₂ 4 µL, 0.1 M DTT 2 µL, RNase OUTTM 1 µL) 9 µL 첨가하여 실온에서 2분간 배양한 후, superscript™II RT 1 µL를 첨가하여 42°C에서 50분, 70°C에서 15분간 배양하였다. RNase H를 1 µL 첨가하고 37°C에서 20분 배양한 후 -20°C에서 보관하며 시료로 사용하였다.

3) Polymerase chain reaction으로 DNA 증폭

시료 1 µL에 PCR mix buffer(10X PCR buffer 5 µL, 25 mM MgCl₂ 3 µL, 10 mM dNTP mix 1 µL, Taq DNA polymerase 0.4 µL) 9.4 µL와 sense, antisense primer 각각 1 µL, 멸균수 37.6 µL를 혼합하여 RT-PCR(Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) cycle을 실행한 후에 ethidium bromide로 염색한 1% agarose gel로 전기영동을 실시하고, Gel Documentation System으로 band를 관찰하였다. 사용된 primers는 β-actin sense(5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3') antisense(5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3'), Bcl-2 sense(5'-CAGCTGCACCTGACG-3') antisense(5'-ATGCACCTACCCAGC-3'), Bax sense(5'-ATGGA CGGGTCCGGGGAG-3') antisense(5'-TACGCCATCTTCTTCCA-3'), p53 sense(5'-GCTCTGACTGTACCACCATCC-3') antisense(5'-CTCTCGGAACATCTCGAAGCG-3')이다.

7. 통계처리

실험 결과는 SPSS 20.0 프로그램으로 각 실험군의 평균과 표준편차로 계산하고 ANOVA 분석 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 처리군 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. HT-29 세포 증식 변화

MTT assay는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의해 노

란색의 수용성 기질인 MTT가 불용성의 보라색 formazan으로 환원되는 원리를 이용한 방법(Carmichael 등 1987)이며, MTT formazan의 흡광도는 570 nm 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 인체 대장암세포인 HT-29 세포 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 fucoidan을 0, 20, 40, 60, 80 및 100 µg/mL 농도로 제조하여 24, 48 및 72시간 처리하였다. 실험 결과, fucoidan의 농도와 처리시간에 비례하여 HT-29 세포 사멸이 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 특히 100 µg/mL 농도에서 72시간 처리 시 세포 생존율이 39.6%로 급격하게 감소하였다(Fig. 1).

2. HT-29 세포사멸 유도

Fucoidan에 의한 세포사멸이 apoptosis에 기인하는지 확인하기 위하여, 시료를 0, 25, 50 및 100 µg/mL 농도로 처리하여 72시간 배양 후 HT-29 세포사멸을 확인하였다. 실험에 사용된 Flow cytometry 방법(Guon & Chung 2017; Ryu 등 2020)은 apoptosis가 유도될 때 인지질 내부에 존재하던 phosphatidylserine (PS)이 세포 외부로 노출되면서 이에 affinity를 갖는 Annexin V가 결합하는 성질을 이용하는 것으로, popidium iodide(PI)와 double staining을 실시하여 apoptosis의 유발 정도를 정량적으로 측정하였다. PS에 특이적으로 결합하는 Annexin V와 PI의 세포막 투과성을 이용하여 세포 중 early apoptosis (Annexin V-FITC positive, PI negative) 및 late apoptosis (Annexin V-FITC positive, PI positive) 비율을 확인하였다. 실험

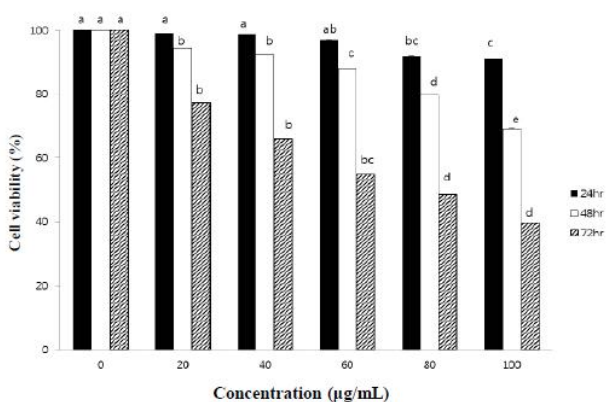


Fig. 1. Cytotoxic effects of fucoidan in HT-29 cells in time and dose dependent manners. After treatment with fucoidan for 24, 48, and 72 hr, the cell viability was investigated as described in the Materials and Methods. The values are mean±S.D. of three independent experiments. Bars with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

결과, 대조군에서는 early apoptosis 및 late apoptosis 모두에서 세포사멸이 발생하지 않았으나, fucoidan 25 µg/mL 농도에서 early apoptosis 65.84%, late apoptosis 6.2%로 총 72.04%의 세포사멸이 진행되었다. 이어서 fucoidan 50 µg/mL 농도에서는 early apoptosis 9.55%, late apoptosis 64.4%로 총 73.95%의 세포사멸이 확인되었고, 100 µg/mL 농도에서는 early apoptosis 12.65%, late apoptosis 72.09%로 총 84.74%의 세포사멸이 진행되었으며, fucoidan 농도가 증가할수록 late apoptosis가 비례적으로 증가하였다(Table 1, Fig. 2).

3. Caspase-3 및 caspase-8의 활성화

HT-29 세포에 fucoidan 처리 시 농도 의존적으로 세포사멸

Table 1. The population of early-apoptosis (Annexin V-FITC positive, PI negative) and late apoptosis (Annexin V-FITC positive, PI positive) treated with fucoidan in HT-29 cells for 72 hr

%	A*	B	C	D
Live	99.8	27.26	4.56	2.23
Early apoptosis	0	65.84	9.55	12.65
Late apoptosis	0	6.2	64.4	72.09
Total	0	72.04	73.95	84.74

* A: 0 µg/mL, B: 25 µg/mL, C: 50 µg/mL, D: 100 µg/mL of fucoidan.

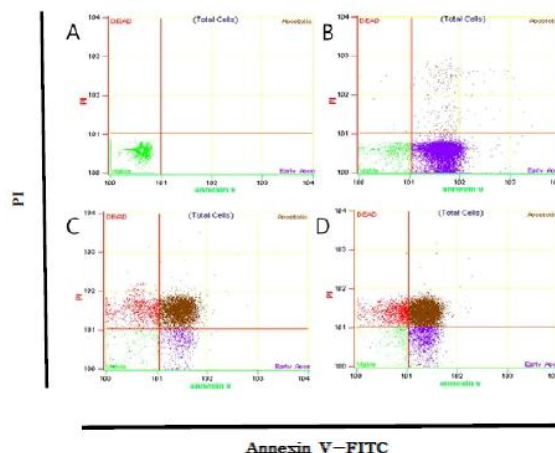


Fig. 2. Effects of fucoidan on apoptosis in HT-29 cells in a dose dependent manner. The right bottom quadrant represents Annexin V-stained cells (early-phase apoptotic cells). The top right quadrant represents PI- and Annexin V-stained cells (late-phase apoptotic cells). A: 0 µg/mL, B: 25 µg/mL, C: 50 µg/mL, D: 100 µg/mL of fucoidan.

이 유도되었으므로, apoptosis의 주요 인자인 cleaved-caspases 및 cleaved-PARP의 발현양상을 단백질 수준에서 관찰하기 위해 Western blot(Ryu & Chung 2015)을 시행하였다. Fucoidan을 25, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 HT-29 세포에 72시간 처리한 후에 cleaved caspases-3 및 cleaved caspase-8의 발현이 fucoidan 농도에 비례하여 증가하였으며, PARP의 발현도 다소 증가하는 것이 확인되었다(Fig. 3). Caspases는 cell repair 효소의 분해와 apoptotic 단백질의 활성화 과정을 통해 apoptosis를 일으키며(Nicholson & Thornberry 1997), apoptosis 과정에서 중요한 역할을 하는 caspase 단백질은 initiator caspases인 caspases-2, -8, -9, -10은 death-inducing 신호로 활성화되며, 활성화된 initiator caspases는 effector caspases인 caspases-3, -6, -7에 작용하여 활성화된다. 활성화된 effector caspases는 lamin A, DNA fragmentation factor, a-fodrin 및 PARP 등 세포 단백질의 분해를 통해 apoptosis를 일으키며 이 때 caspase-8에 의해 caspase-3가 활성화된다(Chai 등 1999; Kim 등 2005; Selvakumar & Sharma 2007; Tsang & Kwok 2008). Apoptosis 과정에서 caspase-3는 apoptosis의 실행자로, PARP를 절단하거나 핵의 응축과 DNA를 절단하여 apoptosis를 유도하며(Nobili 등 2009; Tan 등 2009; Galluzzi 등 2012), cleaved caspase-3는 PARP 기질에 결합하여 세포분해가 촉진되므로, cleaved PARP 단백질이 증가되어 apoptosis가 일어난다. 이번 실험을 통해, fucoidan에 의해 caspase-8 및 caspase-3의 활성이 증가하고, 미미하지만 PARP의 분해를 유도하여 apoptosis가 일어난다는 것을 확인하였다.

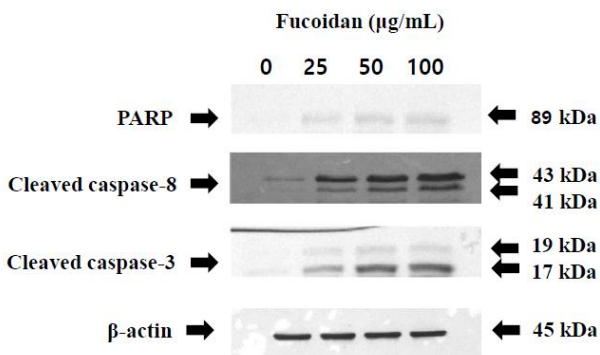


Fig. 3. Effects of fucoidan on the expression of caspase-related proteins in HT-29 cells in a dose dependent manner. Cells were treated with 0, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of fucoidan for 72 hr. The cell lysates were electrophoresed and Western blotting with caspase-8, caspase-3, and PARP antibodies.

4. Bcl-2, Bax 및 p53 발현

Fucoidan에 의한 apoptosis 유도 기전을 규명하기 위해 anti-apoptosis protein인 Bcl-2와 pro-apoptosis protein인 Bax, 종양 억제유전자 산물인 p53의 발현양상을 대조군인 β -actin과 비교 분석하였다. Fucoidan을 25, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 72 시간 처리 시, Bcl-2 발현은 모든 농도에서 감소하였고, apoptosis를 촉진하는 Bax와 p53의 발현이 다소 증가하였다(Fig. 4). 이어서 apoptosis의 지표로 사용되는 Bcl-2/Bax 발현이 대조군과 비교 시 fucoidan의 모든 농도인 25, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의적으로 감소하였고, 최고 농도인 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 44.2% 감소하였다(Fig. 5).

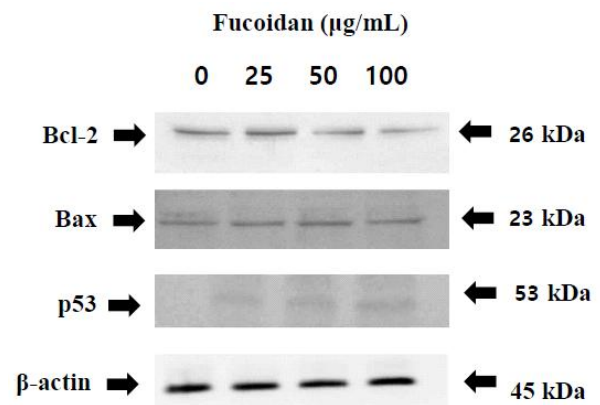


Fig. 4. Effects of fucoidan on the expression of Bcl-2 family related proteins in HT-29 cells in a dose dependent manner. Cells were treated with 0, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of fucoidan for 72 hr.

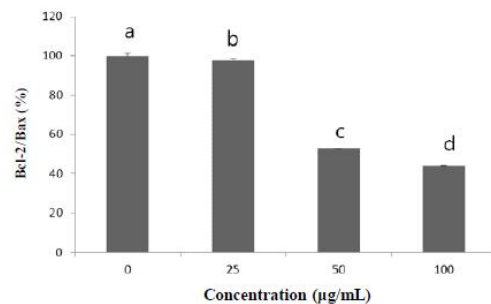


Fig. 5. Effects of fucoidan on Bcl-2/Bax ratio(%) in HT-29 cells. Quantitative analysis of band was estimated by densitometric analysis. The values are mean \pm S.D. of three independent experiments. Bars with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

5. Apoptosis 관련 mRNA 발현

Fucoidan을 25, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때, 모든 농도에서 Bcl-2의 mRNA 발현이 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였으나, 이와는 반대로, Bax mRNA 발현은 대조군과 비교 시, fucoidan 25, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 모두 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 6). 또한 p53의 mRNA 발현도 fucoidan 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 7). Bcl-2 family 단백질은 미토콘드리아 내막에 존재하며 미토콘드리아의 막 투과성과 cytochrome c 방출 제어를 통해 세포사멸을 조절한다. Anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2는 pro-apoptotic 단백질인 Bax와 hetero-dimer를 형성하여 apoptosis를 억제하는 반면, Bax는 미토콘드리아의 막 전위를 유발시켜 cytochrome c의 방출을 일으켜 apoptosis를 유도한다(Chiarugi 등 1994; Youle & Strasser 2008). 또한 p53은 세포 증식을 억제하거나 apoptosis를 유발하는 종양 억제 유전자이며, Bcl-2의 불활성화를 유도한다(Smith 등 2000; Vogelstein 등 2000; Haupt 등 2003).

요약 및 결론

본 연구는 천연물 유래 인체 대장암세포 사멸을 유도하는 소재 발굴을 목적으로, 함유량 다당체인 fucoidan의 HT-29 세

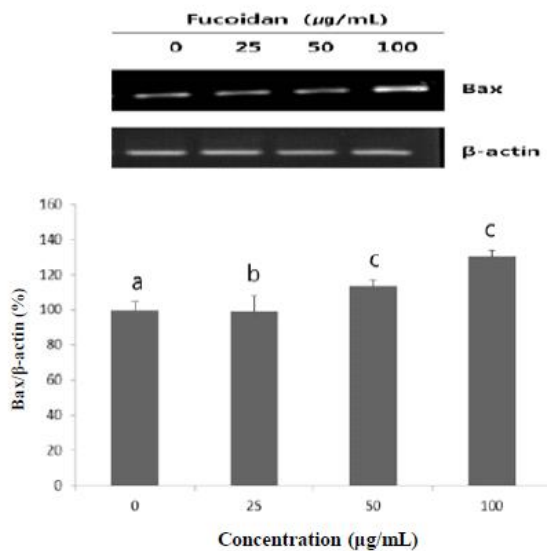


Fig. 6. Effects of fucoidan on Bax mRNA expression in HT-29 cells. Quantitative analysis of band was estimated by densitometric analysis. The values are mean \pm SD of three independent experiments. Bars with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

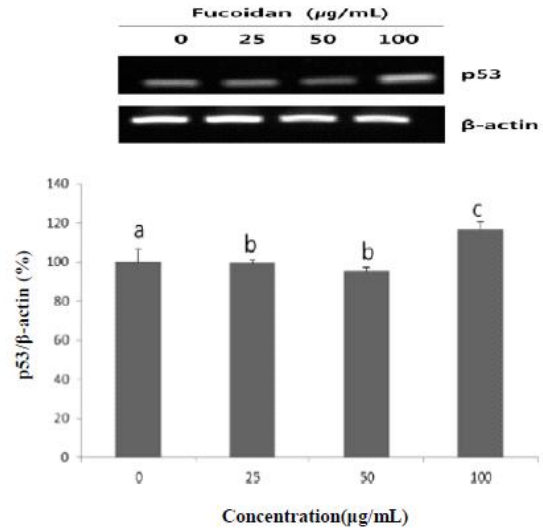


Fig. 7. Effects of fucoidan on p53 mRNA expression in HT-29 cells. Quantitative analysis of the band was estimated by densitometric analysis. The values are mean \pm SD of three independent experiments. Bars with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

포사멸 및 apoptosis 직용기전을 관찰하였다. HT-29 세포에 fucoidan을 0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하고 각각을 24, 48, 72시간 배양하여 MTT assay를 수행한 결과, 모든 실험군에서 농도 의존적으로 HT-29 세포사멸이 증가하였고, fucoidan 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 24시간 배양 시 세포 생존율이 90.4%, 48 및 72시간의 경우 생존율이 각각 69.1%와 39.6%를 나타내어, fucoidan의 농도와 배양 시간이 증가할수록 HT-29 세포사멸이 유의적으로 증가하였다. Fucoidan을 0, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하여 Annexin V-PI staining을 통해 apoptosis로 사멸하는 세포의 함량을 정량적으로 측정된 결과, 각각 0%, 70.04%, 73.95%, 84.74%로 세포사멸이 증가하였다. 세포사멸과 관련된 단백질의 발현을 Western blot analysis를 통해 관찰하고 RT-PCR을 이용하여 apoptosis 관련 유전자들의 mRNA 발현을 관찰한 결과, caspases의 활성형인 cleaved caspase-3, caspase-8의 발현이 농도 의존적으로 증가하였고, PARP의 발현도 다소 증가하였다. 또한 apoptosis 조절에 가장 대표적인 유전자인 Bcl-2 family 단백질과 mRNA 발현은 농도 의존적으로 감소하였고, 이와는 반대로 Bax 및 p53의 발현은 농도 의존적으로 증가하였다. 이상의 결과로, fucoidan이 인체 대장암 세포주인 HT-29의 증식을 억제하고, caspase-8과 caspase-3의 활성화를 일으키며, PARP의 절단과 Bcl-2의 발현 억제, Bax 및 p53의 발현 증가를 통해 apoptosis를 유도하는 것을 확인하였다.

References

- Baetu TM, Hiscott J. 2002. On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:199-207
- Bai X, Wang Y, Hu B, Cao Q, Xing M, Song S, Ji A. 2020. Fucoidan induces apoptosis of HT-29 cells via the activation of DR4 and mitochondrial pathway. *Mar Drugs* 18:220
- Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI. 2002. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydr Res* 337:719-730
- Brunner G, Reimbold K, Meissauer A, Schirmacher V, Erkel LJ. 1998. Sulfated glycosaminoglycans enhance tumor cell invasion *in vitro* by stimulating plasminogen activation. *Exp Cell Res* 239:301-310
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942
- Chai F, Truong-Tran AQ, Ho LH, Zalewski PD. 1999. Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: A review. *Immunol Cell Biol* 77:272-278
- Chevolot L, Foucault A, Chaubet F, Kervarec N, Siquin C, Fisher AM, Boisson-Vidal C. 1999. Further data on the structure of brown seaweed fucans: Relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr Res* 319:154-165
- Chevolot L, Mulloy B, Ratiskol J, Foucault A, Collic-Jouault S. 2001. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr Res* 330:529-535
- Chiarugi V, Magnelli L, Cinelli M, Basi G. 1994. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res* 40:603-612
- Chizhov AO, Dell A, Morris HR, Haslam SM, McDowell RA, Shashkov AS, Nifant'ev NE, Khatuntseva EA, Usov AI. 1999. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr Res* 320:108-119
- Cho BO, Ryu HW, So YK, Jin CH, Byun MW, Kim WG, Jeong IY. 2012. *Ishige sinicola* extracts induce apoptosis via activation of a caspase cascade in human HeLa cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:901-906
- Choi JH, Kim HI, Lee IS. 2009. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. on growth inhibition and apoptosis induction in cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38:1008-1015
- Daub CD, Mabate B, Malgas S, Pletschke BI. 2020. Fucoidan from *Ecklonia maxima* is a powerful inhibitor of the diabetes-related enzyme, α -glucosidase. *Int J Biol Macromol* 151:412-420
- Debatin KM. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53:153-159
- Del Bigio MR, Yan HJ, Campbell TM, Peeling J. 1999. Effect of fucoidan treatment on collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Neurol Res* 21:415-419
- Dimitrova-Shumkovska J, Krstanoski L, Veenman L. 2020. Potential beneficial actions of Fucoidan in brain and liver injury, disease, and intoxication-potential implication of sirtuins. *Mar Drugs* 18:242
- Fernando IPS, Dias MKHM, Madusanka DMD, Han EJ, Kim MJ, Jeon YJ, Ahn G. 2020. Fucoidan refined by *Sargassum confusum* indicate protective effects suppressing photo-oxidative stress and skin barrier perturbation in UVB-induced human keratinocytes. *Int J Biol Macromol* 164:149-161
- Fitton JH, Park AY, Karpinić SS, Stringer DN. 2021. Fucoidan and lung function: Value in viral infection. *Mar Drugs* 19:4
- Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. 2012. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res* 111:1198-1207
- Guon TE, Chung HS. 2016. Induction of apoptosis with *Kigelia africana* fruits in HCT116 human colon cancer cells via MAPKs signaling pathway. *Nat Prod Sci* 22:209-215
- Guon TE, Chung HS. 2017. *Moringa oleifera* fruit induce apoptosis via reactive oxygen species-dependent activation of mitogen-activated protein kinases in human melanoma A2058 cells. *Oncol Lett* 14:1703-1710
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 116:4077-4085
- Hu W, Kavanagh JJ. 2003. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol* 4:721-729
- Huang J, Huang J, Li Y, Lv H, Yin T, Fan S, Zhang C, Li H. 2021. Fucoidan protects against high-fat diet-induced obesity and modulates gut microbiota in institute of cancer research mice. *J Med Food* 24:1058-1067
- Jäättelä M. 2002. Programmed cell death: Many ways for cells to die decently. *Ann Med* 34:480-488
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. 2005. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 55:10-30
- Jiang Z, Okimura T, Yokose T, Yamasaki Y, Yamaguchi K, Oda

- T. 2010. Effects of sulfated fucan, ascophyllan, from the brown Alga *Ascophyllum nodosum* on various cell lines: A comparative study on ascophyllan and fucoidan. *J Biosci Bioeng* 110:113-117
- Kim KJ, Lee OH, Lee BY. 2010. Fucoidan, a sulfated polysaccharide, inhibits adipogenesis through the mitogen-activated protein kinase pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Life Sci* 86:791-797
- Kim R, Emi M, Tanabe K. 2005. Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage. *Oncol Rep* 14:595-599
- Korsmeyer SJ. 1995. Regulators of cell death. *Trends Genet* 11:101-105
- Kronborg O, Fenger C, Olsen J, Jørgensen OD, Søndergaard O. 1996. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* 348:1467-1471
- LeBlanc HN, Ashkenazi A. 2003. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 10:66-75
- Lee KH, Rhee KH. 2014. Conversion effect to cotinine from nicotine by Fucoidan. *Korean J Food Nutr* 27:725-731
- Lee YR. 2013. Antioxidative and anticancer activities of *Xanthium strumarium* extracts prepared from different parts. *Korean J Food Nutr* 26:609-614
- Li J, Guo C, Wu J. 2020. Fucoidan: Biological activity in liver diseases. *Am J Clin Med* 48:1617-1632
- Mabate B, Daub CD, Malgas S, Edkins AL, Pletschke BI. 2021. Fucoidan structure and its impact on glucose metabolism: Implications for diabetes and cancer therapy. *Mar Drugs* 19:30
- Ministry of Health and Welfare. 2021. 2019 Cancer registration statistics. Available from https://www.mohw.go.kr/react/al/sal0301vw.jsp?PAR_MENU_ID=04&MENU_ID=0403&page=1&CONT_SEQ=369164 [cited 20 April 2021]
- Mustafa S, Pawar JS, Ghosh I. 2021. Fucoidan induces ROS-dependent epigenetic modulation in cervical cancer HeLa cell. *Int J Biol Macromol* 181:180-192
- Na E, Lee JW, Lim SY. 2019. Proximate analysis, fatty acid composition of *Lycopus lucidus* Turcz. and its cytotoxic effect in cancer cell lines. *Korean J Food Nutr* 32:208-215
- Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: Killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22:299-306
- Nishino T, Nishioka C, Ura H, Nagumo T. 1994. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydr Res* 255:213-224
- Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res* 59:365-378
- Paoluzzi L, O'Connor OA. 2010. Targeting survival pathways in lymphoma. *Adv Exp Med Biol* 687:79-96
- Piao XL, Park IH, Baek SH, Kim HY, Park MK, Park JH. 2004. Antioxidative activity of furanocoumarins isolated from *Angelicae dahuricae*. *J Ethnopharmacol* 93:243-246
- Reed JC. 2002. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 1:111-121
- Ryu MJ, Chung HS. 2011. Effects on hot water extract of *Schizandra chinensis* on colon cancer cell line. *Food Eng Prog* 15:64-69
- Ryu MJ, Chung HS. 2015. [10]-Gingerol induces mitochondrial apoptosis through activation of MAPK pathway in HCT116 human colon cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 51:92-101
- Ryu MJ, Chung HS. 2016. Fucoidan reduces oxidative stress by regulating the gene expression of HO-1 and SOD-1 through the Nrf2/ERK signaling pathway in HaCaT cells. *Mol Med Rep* 14:3255-3260
- Ryu MJ, Kim AD, Kang KA, Chung HS, Kim HS, Suh IS, Chang WY, Hyun JW. 2013. The green algae *Ulva fasciata* Delile extract induces apoptotic cell death in human colon cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 49:74-81
- Ryu YS, Hyun JW, Chung HS. 2020. Fucoidan induces apoptosis in A2058 cells through ROS-exposed activation of MAPKs signaling pathway. *Nat Prod Sci* 26:191-199
- Selvakumar P, Sharma RK. 2007. Role of calpain and caspase system in the regulation of N-myristoyltransferase in human colon cancer. *Int J Mol Med* 19:823-827
- Shin MK, Byun JS. 2004. The anti-tumor effect of Soonkiwhajungtang with doxorubicin in MKN-45 conclusion. *J Korean Orient Med* 25:98-109
- Smith ML, Ford JM, Hollander MC, Bortnick RA, Amundson SA, Seo YR, Deng CX, Hanawalt PC, Fornace AJ Jr. 2000. p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: Studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol Cell Biol* 20:3705-3714
- Suprunchuk V. 2021. Ultrasonic-treated fucoidan as a promising therapeutic agent. *Polim Med* 51:85-90
- Tan ML, Ooi JP, Ismail N, Moad AIH, Muhammad TST. 2009. Programmed cell death pathways and current antitumor

- targets. *Pharm Res* 26:1547-1560
- Torzsas TL, Kendall CWC, Sugano M, Iwamoto Y, Rao AV. 1996. The influence of high and low molecular weight chitosan on colonic cell proliferation and aberrant crypt foci development in CF1 mice. *Food Chem Toxicol* 34:73-77
- Trauzold A, Wermann H, Arlt A, Schütze S, Schäfer H, Oestern S, Röder C, Ungefroren H, Lampe E, Heinrich M, Walczak H, Kalthoff H. 2001. CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF- κ B contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* 20:4258-4269
- Tsang WP, Kwok TT. 2008. Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. *Apoptosis* 13:1215-1222
- van Weelden G, Bobiński M, Okła K, van Weelden WJ, Romano A, Pijnenborg JMA. 2019. Fucoidan structure and activity in relation to anti-cancer mechanisms. *Mar Drugs* 17:32
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310
- Winawer SJ, St John DJ, Bond JH, Rozen P, Burt RW, Waye JD, Kronborg O, O'Brien MJ, Bishop DT, Kurtz RC, Shike M, Swaroop SV, Levin B, Frühmorgen P, Lynch HT. 1996. Prevention of colorectal carcinoma. Current WHO guidelines for early detection of colorectal carcinoma. World Health Organization Collaborating Center for the prevention of colorectal cancer. *Leber Magen Darm* 26:139-140, 143
- Xue M, Ji X, Liang H, Liu Y, Wang B, Sun L, Li W. 2018. The effect of fucoidan on intestinal flora and intestinal barrier function in rats with breast cancer. *Food Funct* 9:1214-1223
- Yoon YS, Yu CS, Jung SH, Choi PW, Han KR, Kim HC, Kim JC. 2007. Characteristics of colorectal cancer detected at the health promotion center. *J Korean Soc Coloproctol* 23:321-326
- Youle RJ, Strasser A. 2008. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47-59
- Yu C, Lin F, Guo H, Liu G, He X, Wen X. 2021. Dietary fucoidan extracted from macroalgae *Saccharina japonica* alleviate the hepatic lipid accumulation of black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *Food Funct* 12:12724-12733
- Zhao LP, Kushi LH, Klein RD, Prentice RL. 1991. Quantitative review of studies of dietary fat and rat colon carcinoma. *Nutr Cancer* 15:169-177
- Zhu Y, Liu L, Sun Z, Ji Y, Wang D, Mei L, Shen P, Li Z, Tang S, Zhang H, Zhou Q, Deng J. 2021. Fucoidan as a marine-origin prebiotic modulates the growth and antibacterial ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Int J Biol Macromol* 180:599-607

Received 18 March, 2022

Revised 07 June, 2022

Accepted 12 June, 2022