

툫(*Hizikia fusiformis*) 당단백질에 의한 HepG2 세포 증식 억제기전

류진아 · 황혜정 · 김인혜 · 남택정*

부경대학교 식품생명과학과

Mechanism of Inhibition of HepG2 Cell Proliferation by a Glycoprotein from *Hizikia fusiformis*

Jina Ryu, Hye-Jung Hwang, In-Hye Kim and Taek-Jeong Nam*

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

Hizikia fusiformis, a brown alga that is widely consumed in Korea, Japan, and China, possesses a number of potentially beneficial compounds, including antioxidants and anticoagulants. However, the molecular mechanisms of *H. fusiformis* in hepatoma cells have not been elucidated. This study investigated the antiproliferative effect and mechanism of action of a glycoprotein from *H. fusiformis* (HFGP) in HepG2 human hepatoma cells. In an MTS assay, 25 µg/mL HFGP inhibited the proliferation of HepG2 cells by 52.36±2.37%. HFGP caused the dose-dependent growth inhibition of HepG2 cells by inducing apoptosis and a sub-G1 phase arrest. The antiproliferative activity of HFGP was confirmed based on the expression of several apoptosis-related proteins, which was assessed by Western blot analysis. The expressions of Fas, Fas-associated death domain protein, Bax, and Bad was significantly up-regulated in HFGP-treated cells, and HFGP induced the translocation of Bax to mitochondria and the release of cytochrome c into the cytosol. Therefore, HFGP might be useful in the treatment of liver cancer.

Key words: *Hizikia fusiformis* glycoprotein (HFGP), HepG2, Apoptosis

서론

암 치료를 위해서 사용하고 있는 항암제들은 암의 종류에 따라 효능이 다를 뿐만 아니라 치료 후의 부작용으로 인한 문제점이 대두되고 있으므로 치료효능이 뛰어나면서 부작용이 거의 없는 새로운 물질의 개발이 필요한 실정이다. 이러한 필요에 의해서 천연물에 관심을 가지게 되었으며, 암 치료는 물론 예방 차원에서 인류가 오랫동안 경험을 통해 안전성이 확인된 성분을 이용하려는 노력이 진행되고 있다. 최근에는 육상생물 자원으로부터 얻을 수 있는 의약품 또는 산업소재에 비해 엄청난 잠재력을 가지고 있지만 상대적으로 연구가 많이 이루어지지 않은 해양생물자원에 관심이 높아지면서 해양동물, 해조류, 해양미생물 등에서의 생리활성물질에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Kim and Lee 2004; Jung et al., 2006).

본 연구에 사용된 툫(*Hizikia fusiformis*)은 갈조식물문(Phaeophyta) 모자반과(Sargassaceae)에 속하며 한국, 중국, 일본에

만 분포하는 다년생 천연자원식물로서 면역활성과 더불어 생체조절기능이 있는 것으로 보고되고 있다(Li et al., 2006). 툫에 대한 연구는 항균효과(Lim et al., 1995), 항응고작용(Koo et al., 2001; Kim et al., 1998), 항고지혈증(Jung et al., 2006), 항산화(Ryu et al., 1989; Park et al., 2005; Ko et al., 2002) 등 다양한 약리학적 효능이 밝혀지고 있으나 많은 연구가 이루어진 미역이나 다시마 등에 비해 툫의 항암효과에 관한 구체적인 연구는 아직 미비한 상태이다.

Apoptosis (programmed cell death)는 개체의 발달과정과 기능유지 조절에 중요한 역할을 하는 정상적인 생리학적 현상으로서, 이 과정의 조절이상은 암, 퇴행성질환, AIDS 및 자가면역 질환의 발생에 관여하며 apoptosis 유도에 따른 종양의 세포사멸은 항암치료에 있어서 중요한 기전으로 보고되고 있다(Kanno et al., 2004). 이러한 apoptosis 과정에는 다양한 기전

Article history;

Received 18 July 2012; Revised 23 September 2012; Accepted 9 October 2012

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5846 Fax: +82. 51. 629. 5842

E-mail address: namtj@pknu.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 45(6) 553-560, December 2012

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0553>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science. All rights reserved

들이 관여하며 크게 extrinsic death receptor initiated pathway와 intrinsic mitochondrial pathway의 두 가지 pathway가 존재한다. Extrinsic pathway는 FasL, TNF α 와 같은 death-promoting ligands와 관련된 death receptor (Fas, TNFR1)와의 결합을 통해 일어나며, ligand와의 결합은 death receptors의 oligomerization을 유도하고 Fas-associated death domain protein (FADD)와 같은 관련분자와의 결합을 촉진시킨다(Boldin et al., 1996). 이 후 initiator caspase인 procaspase-8은 death effector domain인 FADD를 통하여 결합된 death-inducing signaling complex를 회복시켜 procaspase-8의 autocatalytic cleavage를 촉진하여 caspase-8를 활성화시킨다. Intrinsic pathway는 주로 미토콘드리아에서 cytochrome c의 방출에 의해 진행되며 apoptosis-activating factor 1과 procaspase-9이 결합하여 생성된 apoptosome은 caspase-9의 활성화를 촉진시킨다. 이는 Bcl-2 family의 pro-apoptotic members (e.g., Bax, Bad)와 anti-apoptotic members (Bcl-2, Bcl-xL)에 의해 조절이 되어 이들의 발현 비율에 따라 apoptosis가 유도된다. Bax/Bcl-2 또는 Bad/Bcl-2 비율의 증가는 mitochondria에서 세포질로 cytochrome c의 방출을 자극하며 initiator caspases인 caspase-8과 caspase-9는 downstream의 caspase를 분절화하여 apoptosis를 유도하게 된다.

따라서 본 연구에서는 톳으로부터 인간 간암세포(HepG2 cell) 증식 억제 효능을 가진 당단백질을 추출하였으며 apoptotic pathway에 초점을 맞춰 그 작용 기전을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 톳은 전라남도 완도 톳 양식장에서 구입하여 사용하였으며, 톳 당단백질(*H. fusiformis* glycoprotein, HFGP)을 얻기 위해 환류 냉각장치가 장착된 추출기를 이용하여 톳 분말 40 g 당 증류수 1 L를 가하여 80°C에서 3시간 동안 추출하였다. 이를 원심분리기(Supra-22K, Hanil, Korea)를 사용하여 4,416 g, 4°C, 30분 조건에서 분리하고 상층액 3배 부피의 95% ethyl alcohol을 첨가하여 4°C, overnight 후 whatman filter paper (No.2)로 걸러내어 당을 제거하였으며 최종농도 80% (w/v)가 되도록 ammonium sulfate를 첨가하여 4°C에서 24시간동안 교반하여 당단백질을 흡착시켰다. 당단백질에 흡착된 ammonium sulfate는 투석막(Spectra/Por membrane MWCO 3,500, CA, USA)을 이용하여 제거하였으며 0.1 M NaIO₄를 25°C, 4시간 동안 처리한 후 20% ethylene glycol을 첨가하여 반응을 정지시킨 뒤, 감압농축기(EYELA N-N series, Tokyo rikakikai co., LTD, JAPAN)와 동결건조기(EYELA FDU-2100, Tokyo rikakikai co., LTD, JAPAN)를 사용하여 회수한 분말을 실험에 사용하였다(Fig. 1).

이상에서 추출한 HFGP 내 단백질의 존재를 확인하기 위해

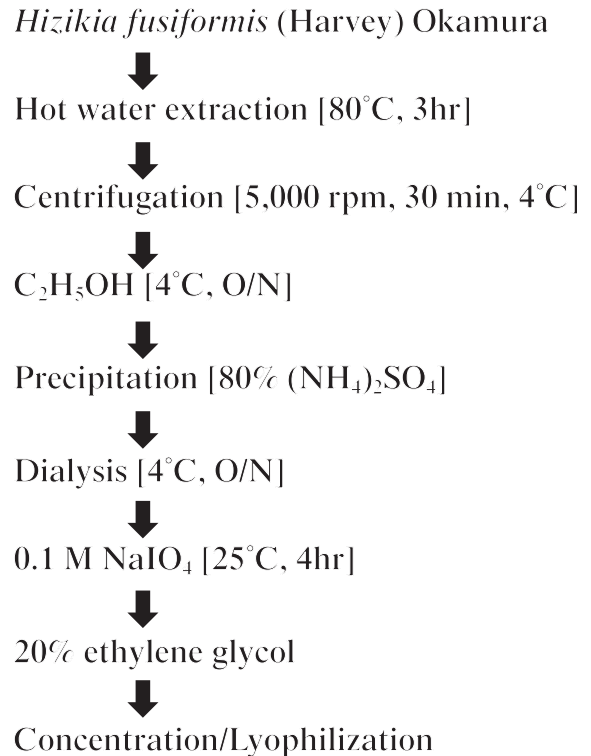


Fig. 1. The systematic purification of *Hizikia fusiformis* glycoprotein (HFGP).

silver staining을 실시하였다. 15% SDS-gel에 전기영동 후 fixing solution (40% methanol, 10% acetic acid)에 20분간 고정 후 증류수로 5분씩 2회 세척하였다. 이 후 silver staining solution (1 g/L silver nitrate, 0.15 mL/L 37% formaldehyde)을 30분간 처리하여 염색하고 develop solution (30 g sodium carbonate, 20 μ L 0.4 M sodium thiosulfate, 1.5 mL/L 37% formaldehyde)에서 band가 확인될 때까지 반응시켰으며 stop solution (40% methanol, 10% acetic acid)으로 반응을 정지시켜 최종 확인하였다. 이때 standard marker는 dual color marker (BIO-RAD, USA)를 사용하였다. 또한, HFGP 내 당 함량을 확인하기 위하여 400 μ L에 0.5 mM glucose, 5% phenol, H₂SO₄ 2 mL 첨가하여 반응시킨 후 Ultrospec[®]2100pro (amersham pharmacia biotech, Little Chalfont, UK)를 사용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포배양

본 실험에 사용한 HepG2 (#HB-8065) 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)과 100 units/mL의 penicilin-

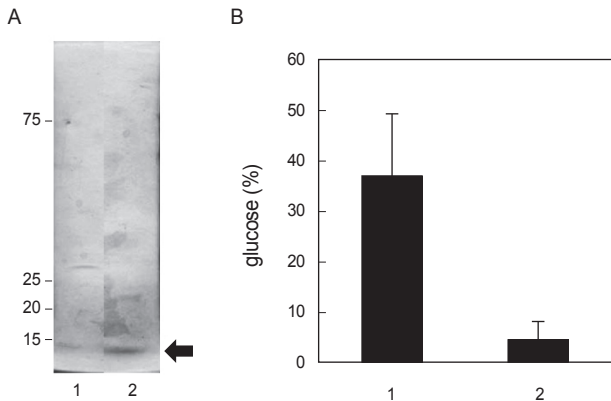


Fig. 2. (A) The glycoprotein extracted *Hizikia fusiformis* was loaded with SDS-PAGE and stained with silver staining. 1, protein marker; 2, *H. fusiformis* glycoprotein (HFGP) (B) The glycoprotein extracted *H. fusiformis* was measured with sulfate-phenol method. 1. *H. fusiformis* hot water extract; 2. *H. fusiformis* glycoprotein (HFGP).

streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 혼합한 minimum essential medium eagle (MEM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)배지를 사용하였으며 37°C, 5% CO₂ 조건에서 confluence 80% 배양 시 실험을 진행하였다.

세포 생존율 측정

HFGP 처리에 따른 HepG2 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해 96-well plate에 2 × 10⁴ cells/well로 세포를 분주한 후 HFGP를 0, 6.25, 12.5, 25 µg/mL 농도로 배지에 희석하여 배양하였다. 24시간 배양한 후 MTS/PMS solution (Promega Co., USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 30 분간 발색반응 시킨 후, ELISA reader (Benchmaker, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포의 형태학적 변화

HFGP 처리에 따른 세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 HFGP를 0, 6.25, 12.5, 25 µg/mL 로 24시간 처리하였으며, 이후에 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하여 위상차현미경(Olympus IX51, Japan)을 이용하여 400배 배율로 관찰하였다.

세포주기 분석

HFGP 처리에 의하여 apoptosis가 유발된 HepG2세포들의 정량적 비교를 위하여 준비된 HepG2 세포를 회수하고 PBS로 세척한 후 CycleTEST Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 고정 및 propidium

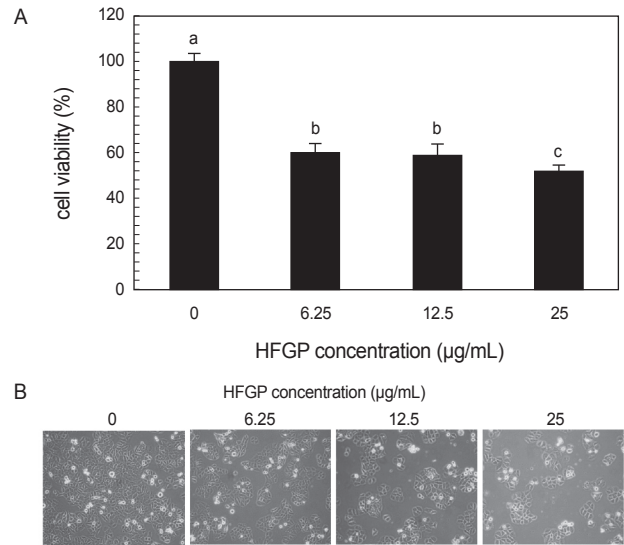


Fig. 3. *Hizikia fusiformis* glycoprotein (HFGP) inhibited HepG2 cells growth in a dose-dependent manner. (A) The cells were treated with indicated doses of HFGP for 24h, and cell viability was assayed by the MTS assay. ^{a,b,c}Values having different superscripts are significantly different at *P*<0.05. (B) The cells were visualized with Olympus optic microscope. Magnification, ×400.

iodide (PI) 염색을 실시하였다. 염색 후 DNA flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 Modifit LT (Becton Dickinson) program을 이용하여 형광반응에 따른 histogram을 각 처리 농도로 분석하였다.

Western blot에 의한 단백질 발현 분석

단백질 발현 변화를 관찰하기 위해 HFGP를 농도별로 처리한 세포에 RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 1 mM sodium fluoride (NaF), 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL pepstatin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 0.25% sodium deoxycholate]를 첨가하여 단백질을 회수하였다. 세포질 및 미토콘드리아 핵분 추출은 lysis buffer [20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM ethylene glycol bis-N,N,NN'-tetra-acetic acid (EGTA), 1 mM 1, 4-dithiothreitol (DTT), 250 mM sucrose]를 첨가하여 실험에 사용하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 하는 BCA protein assay kit를 사용하여 37°C, 30분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 4°C에서 30분간 반응시킨 후 상층액을 분리하고 단백질 농도를 동일하게 취하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동

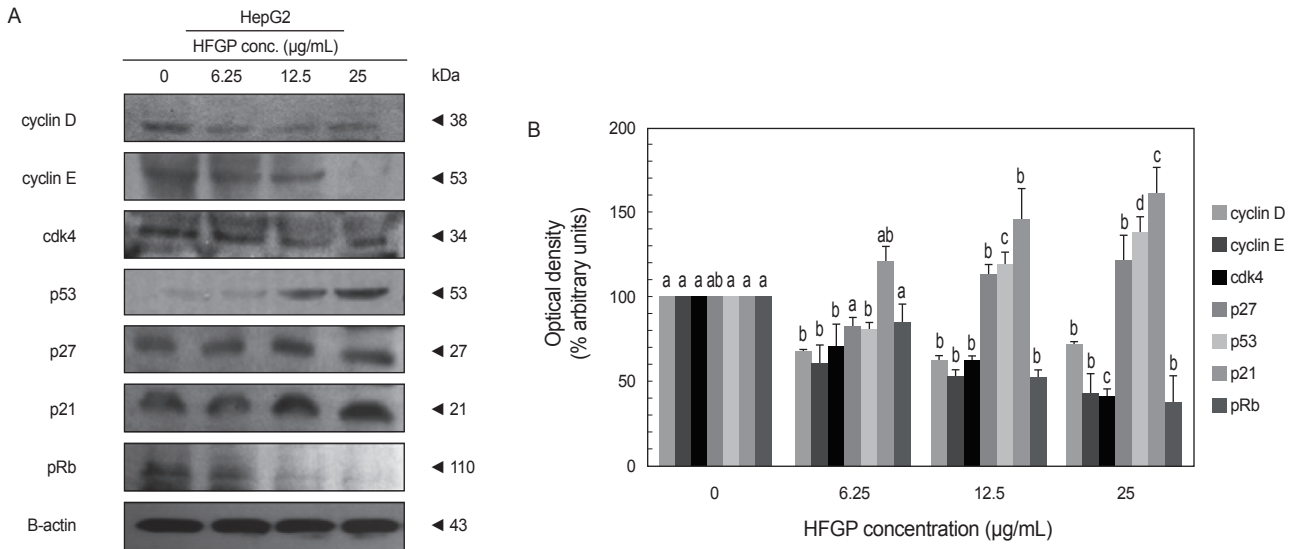


Fig. 4. Effect of *Hizikia fusiformis* glycoprotein (HFGP) on the expression of cell cycle-associated proteins in HepG2 cells. (A) Cell lysates were separated by SDS-PAGE gel, and protein levels were assayed by western blotting using specific antibodies. (B) Densitometric quantification of the bands of western blot analysis. ^{a,b,c}Values having different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

하여 분리한 후 polyvinylidene fluoroide (PVDF) membrane (Milipore, USA)에 전이시켰다. Membrane은 실온에서 1% BSA를 첨가한 Tris-buffered saline containing Tween 20 [TBS-T; 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 (pH 7.5)]에서 blocking 과정을 거친 후에 1차 항체를 TBS-T에 1:1,000비율로 희석하여 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후, 2차 항체를 TBS-T에 1:10,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰으며 super signal west pico stable peroxide solution과 super signal west pico luminol/enhancer solution (Rockford, IL, USA)을 사용하여 KODAK X-ray film에 감광시켜 나타나는 밴드로 단백질 활성을 관찰하고 단백질 발현 수준을 densitometer (FujiFilm, JAPAN)로 나타내었다.

통계처리

본 연구의 모든 실험분석 결과는 평균과 표준편차(mean \pm S.D.)로 나타내었으며, SPSS (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 ANOVA test로 검증한 후, 유의적인 차이가 있는 항목에 대하여 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 평균값 간의 차이에 대한 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

톳 당단백질(HFGP)의 추출 및 분자량 확인

본 연구에서는 톳 당단백질에 의한 인체 간암세포주인 HepG2 세포의 증식저해 및 apoptosis 유발의 기전을 밝히고자

HFGP를 분리하였다(Fig. 1). HFGP는 silver staining으로 15 kDa의 분자량의 단백질을 band로 확인하였으며(Fig. 2A), 황산페놀을 이용하여 당의 함량을 측정된 결과 톳 열수추출물(36.7%)에 비하여 32.3% 감소한 4.5%의 당이 존재하였다(Fig. 2B). 따라서 본 실험에 사용된 HFGP는 4.5%의 당을 함유하는 15 kDa의 톳 당단백질을 확인하였다.

HFGP에 의한 HepG2 세포 증식 저해효과

HepG2 세포의 증식에 HFGP가 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 세포생존율을 분석한 결과, Fig. 3A에서 나타난 바와 같이 HFGP 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $60.47 \pm 3.85\%$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $59.05 \pm 5.17\%$, 25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 $52.36 \pm 2.37\%$ 의 농도의 의존적 증식 억제를 하는 것으로 나타났다. Fig. 3B는 HFGP에 의한 세포증식 억제 현상에 따른 세포형태 변화를 보여주는 결과로서, 세포의 크기가 축소되고 세포질 응축 및 부착력 상실에 의해 부유세포가 증가하는 현상이 관찰되었다. 또한 apoptosis 발생 시 관찰되는 세포 밀도의 감소에 따른 membrane shrinking을 동반한 세포 내 과립 형성과 같은 세포변형 현상이 관찰되었다. 즉, HFGP 처리에 의한 암세포의 증식 억제 및 형태변화는 HepG2 세포의 apoptosis 유발에 직접적 관련이 있음을 의미하는 것으로 보여진다.

HFGP에 의한 sub-G1 arrest

세포는 성장 분열을 하기 위해서 G1 세포주기를 거쳐 S 세포주기로 이행되며 대부분 종말 분화 세포들은 Sub-G1/G1 세포주기에 머물러 있다가 결국 apoptotic cell death를 맞게 된

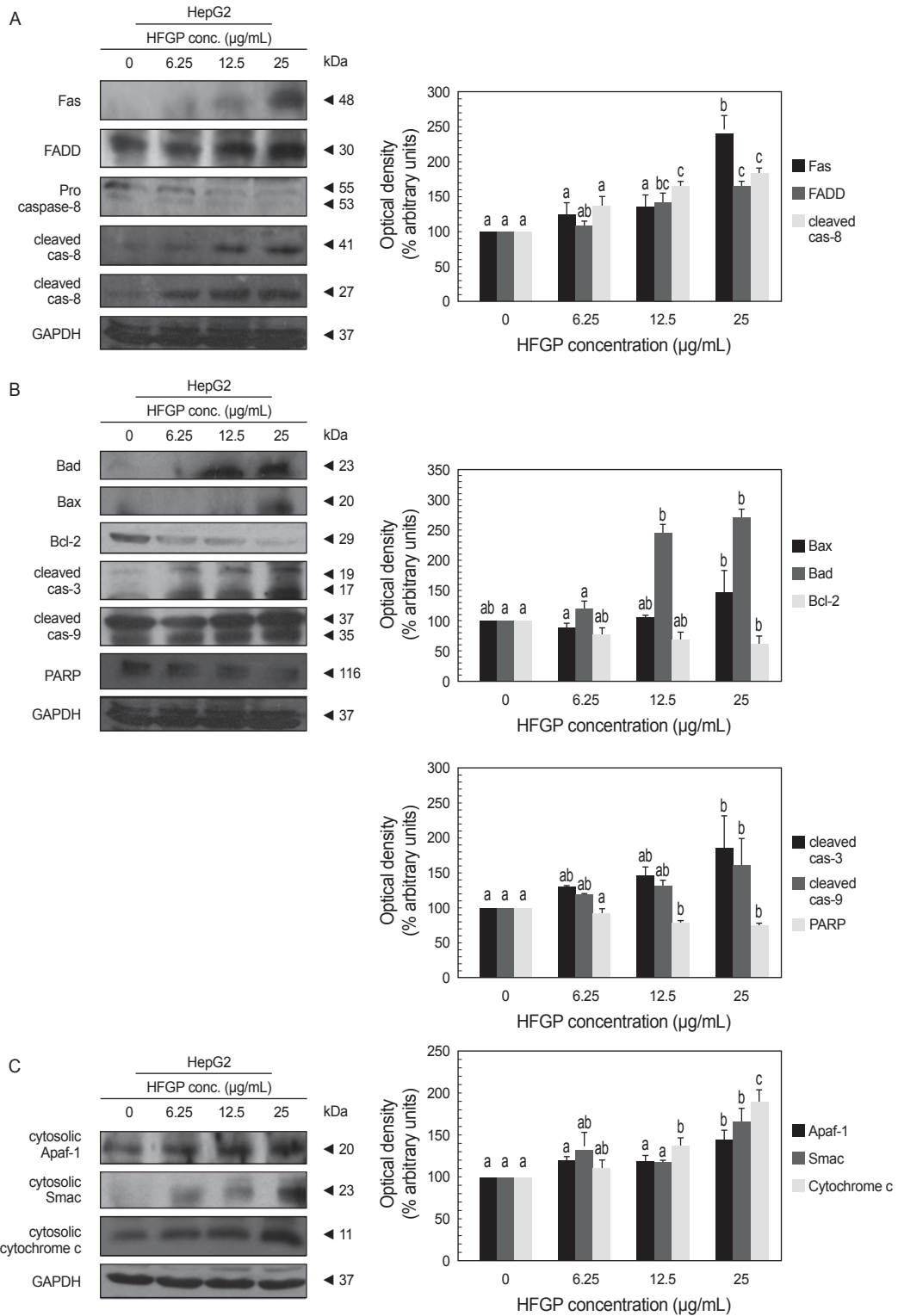


Fig. 5. Changes of apoptosis related protein expressions in HepG2 cells. (A) The protein levels of Fas, FADD and caspase-8 were examined after treatment with different concentrations of HFGP. (B) HFGP treatment induced activation of the mitochondrial proapoptotic pathway. (C) Effects of HFGP exposure on location of Apaf-1, Smac and cytochrome *c*. Densitometric quantification of the bands of western blot analysis. ^{a,b,c}Values having different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

Table 1. Effect of *Hizikia fusiformis* glycoprotein (HFGP) on the HepG2 cell cycle

HFGP concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Number of cells (%)			
	sub-G1	G1	S	G2/M
0	2.92	65.08	17.78	14.36
6.25	5.61	65.66	15.7	13.29
12.5	7.88	65.38	14.33	12.59
25	10.45	64.5	14.4	10.75

다. 세포가 손상을 입게 되면 세포분열을 하기 전에 G1 세포주기에 머물면서 apoptosis 유도도 갈 것인지, 혹은 손상을 회복한 후 재분열 할 것인지를 결정하게 된다(Kohn, 1999). HFGP 처리에 의한 HepG2 세포의 증식억제가 apoptosis 유도에 의한 것인지를 확인하기 위해 flow cytometry를 이용하여 sub-G1에 속하는 세포의 빈도를 측정하여 apoptosis의 정량화를 실시하였다. 분석 결과, 세포의 사멸을 의미하는 sub-G1비율이 대조군에서 2.92%로 나타났으며, HFGP 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 5.61%, 7.88%, 10.45% 농도 의존적인 비율 증가를 보였다(Table 1). 따라서 HFGP에 의해 G1 arrest가 유도되면서 sub-G1 hypodiploid 세포가 증가된다는 본 결과는 Fig. 3의 암세포 증식 억제 현상이 apoptosis 유도에 의해 일어남을 뒷받침해 줄 수 있는 결과로 보여진다.

Cyclin은 G1 및 G2기에서 세포분열 주기와 연관된 유전자들과 상호작용을 하여 세포주기를 조절하는 것으로 알려져 있으며(Singh et al., 2003), CDK와 cyclin complex의 경우 정상시에는 활성화되어 세포주기를 진행시키지만 외부환경 변화나 자극에 의한 세포 손상 시 특정 세포주기 비율의 증가를 통해 세포 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(Jacks and Weinberg, 1996). 이와 관련하여 Biliran et al. (2005)는 cyclin D의 과발현에 의해 G1/S기로 세포주기가 빠르게 진행되어 암 발생을 유도한다고 보고하였다. 세포주기 조절자의 조절에 의해 손상된 DNA의 합성과 세포분열을 억제하고 암세포의 세포증식을 저해하여 궁극적으로 apoptosis를 유도할 수 있으므로 본 실험에서는 G1/S기로 넘어가는 중요 세포주기 조절자인 cyclin과 cdk의 발현 변화에 따라 HFGP에 의한 HepG2 세포 성장을 저해하는지 확인하였다. 단백질 발현을 분석한 결과, HFGP를 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리시 cyclin D의 경우 25.9%, cyclin E는 65.4%, cdk4는 62.2% 발현 감소를 나타내었다(Fig. 4). 즉, HFGP에 의한 cyclin D, E, cdk 4의 발현 감소를 통해 세포주기 조절이 이루어지며 이로써 HepG2 세포의 성장을 억제시킨다는 결과를 보여주고 있다.

한편 세포에 DNA 손상이 일어나면 p53 암 억제 단백질에 의해 p21 단백질의 발현이 촉진되고 cdk를 억제하여 Rb 인산화를 억제함으로써 세포의 G1기 비율이 증가하게 된다. 따라서 cyclin과 cdk 단백질 발현 감소에 따른 G1기의 분포 증가와 연

관성 있는 p53과 p21의 발현을 확인한 결과, HFGP 처리 시 단백질 수준이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였으며, Sub-G1기의 비율에 관여하는 Rb의 인산화 정도는 감소함을 나타내었다. 세포분열 억제 단백질 중 하나인 p27의 경우 cdk의 활성을 억제시켜 G1기 비율을 증가시키고 세포분열을 차단하는 역할을 하며 본 연구결과 역시 HFGP에 의한 농도 의존적 발현 증가를 보였다(Fig. 4). 이상의 결과로 HFGP에 의한 HepG2 세포의 성장 억제효과는 세포 내 p53 단백질을 활성화시켜 apoptosis를 유도하고, Sub-G1기의 증가 및 G1기의 정지를 통한 손상된 DNA 합성을 억제하여 비정상적 세포 증식을 차단하여 나타나는 결과로 사료된다.

HFGP에 의한 HepG2 세포 사멸기전

Apoptosis는 TRAIL 또는 FasL과 같은 death receptor들에 의해 조절되며 caspase-8은 이 과정에서 중요한 initiator caspase로 작용한다(Galluzzi et al., 2006; Jeong and Seol, 2008). Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily에 속하는 Fas에 FasL가 결합하면 Fas-associated death domain protein (FADD) 및 procaspase-8에 의해 death-inducing signaling complex (DISC)를 형성하게 되며, caspase-8의 활성화에 의한 caspases cascade에 의하여 apoptosis가 유발된다(Jeong and Seol, 2008). 따라서 HFGP 처리에 의한 apoptosis 유도에 death receptor pathway에 속하는 단백질들이 관여하는지를 확인하기 위하여 연관성이 매우 높은 몇 가지 단백질들의 발현 변화를 western blot analysis로 확인하였으며, 그 결과 Fas, FADD, caspase-8의 활성화가 유의적으로 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 5A).

또한 Bcl-2 family에 속하는 단백질들은 미토콘드리아 기능의 보존과 미토콘드리아에 의한 apoptosis를 조절하는 중요한 조절자로 알려져 있다 (Fernandez-Luna, 2008; Yin, 2006). 이들은 apoptosis를 억제하는 anti-apoptotic member인 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w 및 Mcl-1과 apoptosis를 유발하는 pro-apoptotic member인 Bax, Bad, Bak, Bid 및 Bcl-Xs로 구성되어 있다(Labi et al., 2006; Zeitlin et al., 2008). 이러한 anti-apoptotic 및 pro-apoptotic member의 비율에 따라 세포생존 및 세포사멸이 결정되며, 이들간의 균형이 깨어지게 되면 미토콘드리아에서 세포질로 cytochrome c가 방출되어 cysteine-related proteases인 caspases, 종양억제 유전자인 p53, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 유도하여 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다(Bowen et al., 2006; Shroff et al., 2007; Reed, 2008).

따라서 Bcl-2 family에 속하는 유전자들 간의 조절이 HFGP에 의해 유발되는 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는지 확인한 결과, 세포생존에 관여하는 anti-apoptotic member인 Bcl-2 발현의 감소 및 세포사멸에 관여하는 pro-apoptotic member인 Bax와 Bad는 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 5B).

이를 통해 Bcl-2 family의 작용기전에 의해 apoptosis가 유도됨을 확인하였다.

현재까지 apoptosis 관련 유전자가 많이 알려져 있으며, 그 중에서 공통적인 경로는 단백질 분해 효소 활성화와 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. 특히 시스테인계의 단백질 분해 효소인 caspase는 apoptosis 유발에 중요한 조절인자로서 작용하며 이 단백질들은 세포에서 핵과 미토콘드리아 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하고 있다(Cheng et al., 2006; Jeong and Seol, 2008). 많은 caspase들 중 caspase-8은 활성화된 death receptor에 의해 형성된 DISC에 의해 활성화되어 effector caspase인 caspase-3을 활성화시키며, 활성화된 caspase-3은 여러 종류의 caspase와 PARP를 절단하거나 직접적으로 핵의 응축과 DNA 절단에 영향을 주어 apoptosis를 유도하게 된다(Berg et al., 2001). 이들 표적 단백질 중의 하나인 PARP 단백질은 DNA 수선, 유전자 전사, 세포주기 진행, chromatin function, 유전체 안정성 및 세포사멸을 조절하는 것으로 알려져 있다(Schreiber et al., 2006). Effector caspase인 caspase-3 및 -7이 활성화되면 116 kDa의 분자량을 가진 PARP 단백질의 Asp214와 Gly215 사이에서 분해가 일어나며 85 및 24 kDa의 단편으로 잘리게 되고(Lazebnik et al., 1994; Kaufmann et al., 1993) 정상적인 수선 기능의 상실이 일어나게 된다(Nagata, 1997). Caspase-9의 활성화는 미토콘드리아에서 유리된 cytochrome c에 의해서 형성된 apoptosome에 의하여 유발되며 활성화된 caspase-9은 caspase-3을 활성화하여 apoptosis를 일으키는 것으로 보고되었다(Nataga, 1997). 따라서 본 연구에서 caspase cascade 발현 및 활성에 미치는 HFGP의 영향을 western blot analysis로 확인한 결과, HFGP 처리에 의하여 intrinsic pathway에 관여하는 것으로 알려진 caspase-3의 활성화를 확인하였고, 그 상위기전인 caspase-9 역시 caspase-3의 발현 경향과 마찬가지로 활성형 단백질의 발현이 증가하며 caspase-3 활성화에 의하여 기질인 PARP (116 kDa)의 발현감소 및 단편화 현상이 HFGP 농도의존적으로 관찰되었다(Fig. 5B). 이는 anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2에 의해 하위 기전인 caspase-9와 caspase-3가 활성화되어 apoptosis의 유도가 이루어지는 것으로 보여진다.

Procaspase-9의 활성화는 미토콘드리아에서 세포질 내로 구리함유 효소 단백질인 cytochrome c의 방출을 통해 이루어지며, 유리된 cytochrome c는 Apaf-1과 결합하여 caspase-9 및 하위 effector caspase의 활성화를 유도한다. Smac은 미토콘드리아 내부에 격리되어 있으나 apoptosis가 시작되면 세포질로 유리되어 IAPs (inhibitors of apoptosis)에 결합하여 caspase를 활성화함으로써 apoptosis가 진행된다. 본 연구에서도 cytochrome c의 방출을 유도하는 Bax와 Bad의 단백질 발현이 증가하고 cytochrome c의 방출을 억제하는 Bcl-2의 발현이 감소함으로써(Fig. 5B) cytochrome c의 세포질 내 방출이 진행됨을 확인하였다(Fig. 5C). 또한 세포질내의 Apaf-1, Smac 단

백질의 발현이 HFGP 처리에 의해 농도 의존적으로 증가하는 것으로 보아 이를 통해 apoptosis가 일어나는 것으로 보여진다(Fig. 5C).

이러한 결과로 볼 때 툫으로부터 분리한 HFGP는 HepG2 세포주기 중 Sub-G1 비율을 증가시키고 G1/S기로의 진행을 조절하는 인자인 cyclin D와 E의 발현을 억제시키고 p53, p27, p21 단백질을 활성화 시킴과 동시에 pRb 작용을 억제하여 세포주기를 조절함으로써 암세포 증식을 억제한 것으로 추정된다. 또한 HFGP에 의한 HepG2 세포의 apoptosis 유발은 intrinsic 및 extrinsic pathway를 통한 caspases 활성화와 직접 관련이 있음을 확인하였다.

사 사

이 논문은 2010년 국토해양부의 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행되었습니다 (부산 인근 해역에서 생산되는 해양식물로부터 신기능성 단백질 소재 개발). 이에 감사드립니다.

참고문헌

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.

Biliran H Jr, Wang Y, Banerjee S, Xu H, Heng H, Thakur A, Bollig A., Sarkar FH and Liao JD. 2005. Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line. *Clin Cancer Res* 11, 6075-6086.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV and Wallach D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.

Bowen JM, Gibson RJ, Cummins AG and Keefe DM. 2006. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Support Care Cancer* 14, 713-731.

Cheng WC, Berman SB, Ivanovska I, Jonas EA., Lee SJ, Chen Y, Kaczmarek LK, Pineda F and Hardwick JM. 2006. Mitochondrial factors with dual roles in death and survival. *Oncogene* 25, 4697-4705.

Fernandez-Luna JL. 2008. Regulation of pro-apoptotic BH3-only proteins and its contribution to cancer progression and chemoresistance. *Cell Signal* 20, 1921-1926.

Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N, and Kroemer G. 2006. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4812-4830.

- Jacks T and Weinberg RA. 1996. Cell-cycle control and its watchman. *Nature* 381, 643-644.
- Jeong SY and Seol DW. 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* 41, 11-22.
- Jung YH, Jung BM, Shin MO and Bae SJ. 2006. Anticarcinogenic effects of extracts from *Gloiopeltis tenax*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35, 395-401.
- Kanno S, Shouji A, Hirata R, Asou K, Ishikawa M. 2004. Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *Life Sci* 75, 353-365.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE and Poirier GG. 1993. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53, 3976-3985.
- Kim JA and Lee JM. 2004. The change of biologically functional compounds and antioxidant activities in *Hizikia fusiformis* with drying methods. *Korean J Food Culture* 19, 200-208.
- Kim KI, Seo HD, Lee HS, Jo HY and Yang HC. 1998. Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts of *Hizikia fusiforme*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27, 1204-1210.
- Ko MS, Shin KM and Lee MY. 2002. Effect of *Hizikia fusiforme* ethanol extract on antioxidative enzymes in ethanol-induced hepatotoxicity of rat liver. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31, 87-91.
- Kohn KW. 1999. Molecular interaction map of the mammalian cell cycle control and DNA repair systems. *Mol Biol Cell* 10, 2703-2734.
- Koo JG, Choi YS and Kwak JK. 2001. Blood-anticoagulant activity of fucoidans from sporophylls of *Unbaria pinnatifida*, *Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* in Korea. *J Korean Fish Soc* 34, 515-520.
- Labi V, Erlacher M, Kiessling S and Villunger A. 2006. BH3-only proteins in cell death initiation, malignant disease and anticancer therapy. *Cell Death Differ* 13, 1325-1338.
- Lazebnik YA., Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG and Earnshaw WC. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347.
- Li B, Wei XJ, Sun JL and Xu SY. 2006. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr Res* 341, 1135-1146.
- Lim SB, Kim SH, Ko YH, Oh CK, Oh MC, Park JS and Ko YG. 1995. Extraction yields of *Hizikia fusiforme* and *Aloe vera* linne by supercritical carbon dioxide and antimicrobial activity of their extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27, 68-73.
- Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Park KE, Jang MS, Lim CW, Kim YK, Seo Y, and Park HY. 2005. Antioxidant activity on ethanol extract from boiled-water of *Hizikia fusiformis*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48, 435-439.
- Reed JC. 2008. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 111, 3322-3330.
- Ryu BH, Kim DS, Cho KJ and Sin DB. 1989. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korea J Food Sci Technol* 21, 595-600.
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC and de Murcia G. 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 517-528.
- Shroff EH, Snyder C and Chandel NS. 2007. Role of Bcl-2 family members in anoxia induced cell death. *Cell Cycle* 6, 807-809.
- Singh RP, Agarwal C and Agarwal R. 2003. Inositol hexaphosphate inhibits growth, and induces G1 arrest and apoptotic death of prostate carcinoma DU145 cells: modulation of CDK1-CDK-cyclin and pRb-related protein-E2F complexes. *Carcinogenesis* 24, 555-563.
- Yin XM. 2006. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. *Gene* 369, 7-19.
- Zeitlin BD, Zeitlin IJ and Nöör JE. 2008. Expanding circle of inhibition: small-molecule inhibitors of Bcl-2 as anticancer cell and antiangiogenic agents. *J Clin Oncol* 26, 4180-4188.