pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 27, No. 4, pp. 406~414 (2012)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Fucoidan의 면역세포 활성 및 위암 세포주에서의 항암효과

안인정[1†] · 조성대[2†] · 권중기[1] · 김혜리[1] · 유현주[2] · 정지윤[1]*
[1]공주대학교 특수동물학과, [2]전북대학교 구강병리학교실

The Effects of Fucoidan on the Activation of Macrophage and Anticancer in Gastric Cancer Cell

In-Jung An[1†], Sung-Dae Cho[2†], Jung-Ki Kwon[1], Hye-Ri Kim[1], Hyun-Ju Yu[2], and Ji-Youn Jung[1]*
[1]*Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan 340-702, Korea*
[2]*Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Institute of Oral Bioscience, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea*
(Received September 26, 2012/Revised October 21, 2012/Accepted November 9, 2012)

ABSTRACT - This study was designed to investigate the effect of fucoidan on the activation of macrophage and on induction of apoptosis in AGS cell. To measure the activity of macrophages, NO and TNF-α assays were performed in Raw 264.7 cell. Treatment with fucoidan significantly increased production of NO and TNF-α, indicating activation of macrophages. The result of MTT assay shows that cell viability was significantly decreased in a dose and time-dependent manner. Fucoidan increased to enhance mitochondrial membrane permeability, as well as the cytochrome c release from the mitochondria. Fucoidan decreased Bcl-2 and XIAP expression, whereas the expression of Bax was increased in a time-dependent manner compared to the control. In addition, the active forms of caspase-9 were increased, and the inactivation of Akt was decreased in a time-dependent manner. Caspase inhibitor, z-VAD-FMK, canceled the apoptosis of fucoidan, expression of Bax and caspase-9 were decrease. These results indicate that fucoidan induces activation of macrophage and apoptosis through activation of caspase on AGS cell.

Key words: fucoidan, macrophage, anticancer, AGS cell, caspase

서 론

위암은 한국인에게 발생빈도가 가장 높은 암이며 불규칙한 식습관 및 식이가 가장 중요한 발암 요인 중 하나라고 알려져 있다. 특히 식이로 인한 위궤양과 위암 발병도 관련 있음을 보고하고 있다[1]. 위암의 발생 및 위암에 의한 사망률이 증가함에 따라 예방하거나 치료할 수 있는 물질에 대한 관심이 고조되고 있다. 이를 해결하기 위해 식이 소재로써 버섯 추출물 등 기능성 식품이 개발되며[2], 최신 의약의 연구와 더불어 면역력을 증진시켜 질병에 대한 방어력을 증가시키는 천연물질 및 생약재에 대한 관심이 높아지고 있으며, 천연산물로부터 생리활성 물질을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다[3,4].

해조류를 통해서도 이러한 암을 면역력을 증진시켜 예방하고 감소시키는 효과를 기대할 수 있는데 우리나라는 오랜 시간 해조류를 섭취해왔으며 항균 및 항암효과 등이 밝혀지면서, 근래에 들어서 항암 및 각종 건강 기능성 식품으로서 활용도가 증가하고 있다. 본 연구에 사용된 fucoidan은 대표적으로 다시마, 미역에 함유되어 있고 건물중량으로 3~4% 정도 존재한다. Fucoidan은 분자량이 20만 달톤을 넘는 고분자 물질로 황산기를 가진 산성의 수용성 다당류로서 끈적끈적한 점질 구조로 구성되어있다. L-foucose에 에스테르화 황산을 주성분으로 하여 소량의 galactose, xylose, glucuronic acid 등을 함유하는 복합황산화 다당류이며, 점성이 낮고 용해성이 우수한 특징을 갖는다[5]. Fucoidan은 heparin의 대체물질로서 항혈액응고작용, 항트롬빈 작용을 가지며[6,7], 사람 림프종암세포[8], 대장암세포[9], 간암세포[10], 유방암세포[11]에서 암세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 유도하여 항암효과가 있다고 입증되고 있다. 그 뿐만 아니라 비장세포[12], 대식세포[13], 자연살

†The first two authors contributed equally to this work.
*Correspondence to: Ji-Youn Jung, Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan Chungnam, 340-702, Korea
Tel: 82-41-330-1526, Fax: 82-41-330-1529
E-mail : wangza@kongju.ac.kr

해세포[14], 수지상세포[15]와 같은 다양한 면역세포에 대해 면역조절기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

암은 세포의 증식이 비정상적으로 증가되거나 apoptosis가 적절하게 이루어지지 않고 감소하는 경우에 발생되고 진행된다. 그러므로 암세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 촉진하는 것은 암의 발생과 진행을 막을 수 있는 좋은 방법이다[16]. 또한 인체의 면역조절작용에서 대식세포(macrophage)는 직접적 또는 간접적으로 암세포를 억제하는 항암효과를 나타내기도 하는데, 대식세포에서 분비하는 nitric oxide (NO), TNF-α 등이 중요한 역할을 한다[17-19].

Apoptosis는 세포 내·외적인 신호에 의해 시작되어 일련의 과정을 거쳐 이루어지고 세포 내 신호는 미토콘드리아 기전이고 세포 외 신호는 death receptor 기전이다. 세포 외 신호 Fas-associated death domain (FADD)이 결합함으로써 caspase-8을 활성화시켜 apoptosis 신호를 개시하는 것으로 알려져 있다[20,21]. Caspase-8은 caspase-3, -6, -7 등의 말단 효능 caspase들을 직접 활성화시키거나[22] Bax를 활성화시켜 미토콘드리아로부터 cytochrome c를 분비시킴으로써 caspase들을 활성화시키기도 한다[23]. 세포 내 신호는 미토콘드리아에서 분비된 cytochrome c가 caspase-9를 활성화시키고 활성화된 caspase-9는 caspase-3를 활성화시켜 apoptosis를 일으킨다[24]. 세포사멸 억제 물질인 Bcl-2는 미토콘드리아에 존재하면서 고유의 신호전달경로를 통하여 apoptosis를 억제하고[25] XIAP는 caspase-3에 직접 결합하여 말단의 caspase 효능을 저해하는 것으로 알려져 있다[26]. Akt는 serine/threonine protein kinase의 일종으로 세포의 증식이나 분화, 성장에 관여하는 것으로 알려져 있으며, Bax나 caspase-9와 같은 pro-apoptotic protein의 발현을 저해하여 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다[27,28].

본 연구는 인간에서 유래한 위암 세포인 AGS를 사용하여 fucoidan이 면역세포의 활성화 및 위암 세포 성장억제와 세포 내 작용으로 apoptosis를 유도하는지 확인하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 시험물질

본 연구에서는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받은 Raw 264.7, AGS, WB 세포주를 사용하였다. 이들 세포주의 세포배양액은 DMEM, RPMI (Hyclone Laboratoris Inc., Logan, UT, USA)에 10% fetal bovine serum, 1% streptomycin/penicillin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 첨가하여 사용하였다. 이들 세포주는 37ºC, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 시험물질은 Sigma (St Louis, MO, USA)사로부터 구입한 fucoidan을 본 시험에 사용하였다. 본 연구에 사용한 일반적인 시약은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.

Fucoidan에 의한 세포증식 효과 측정

Raw 264.7 macrophage 세포주, AGS 위암 세포주와 WB 정상 간 세포주를 96 well plate에 각각 5×10^4, 2×10^4, 1×10^5 cells/mL로 분주한 후, 24시간 동안 배양시킨 다음 세포주에 fucoidan을 6.25 μg/mL, 12.5 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL 의 농도로 24시간과 48시간 처리하였다. Caspase의 저해제인 z-VAD-FMK와 병행 처리시에는 z-VAD-FMK를 2시간 먼저 처리하고 fucoidan을 50 μg/mL의 농도로 24시간 처리하였다. 이 후 각각의 well에 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheny ltetrazolium bromide] 용액(5 mg/mL, Sigma-Aldrich)을 20 μL 첨가하여 2시간 동안 37ºC에서 배양하고, 이후 상층액을 제거한 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co.)를 100 μL/well로 첨가하여 shaker에서 5분간 흔들어 준 후 ELISA-reader (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대식세포 내 일산화질소의 측정

NO assay는 CAYMAN (Denver, CO, USA)의 NO kit를 사용하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/mL로 분주한 후에 24시간 동안 배양시킨 다음, Raw 264.7 세포주에 fucoidan을 6.25 μg/mL, 12.5 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 상등액을 취하였다. 상등액 중 100 μL Griegrie Reagent (1% sulfanilamide, 0.1% napthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% H_3PO_4)를 넣고 10분간 실온에서 방치한 후 ELISA-reader (Bio-Rad Laboratories Inc, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrite 검량선으로부터 세포가 분비하는 nitric oxide를 계산하였다.

대식세포 내 종양괴사인자-알파의 측정

TNF-α assay는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)의 TNF-α kit를 사용하였다. Raw 264.7 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/mL로 분주한 후에 24시간 동안 배양시킨 다음, Raw 264.7 세포주에 fucoidan을 6.25 μg/mL, 12.5 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 상등액을 취하였다. 상등액 중 50 μL를 취하여 TNF-α antibody-coated 처리된 96 well plate에 옮긴 후 standard diluents buffer와 biotinylated anti-TNF-α solution을 각각 50 μL 첨가한 후 90분간 실온에서 배양하였다. 배양 후, wash buffer를 이용하여 4번 washing 한 후 steptavidin-HRP 100 μL를 첨가하고 30분간 실온에서 반응시켰다. 이를 4번 washing 한 후 stabilized chromogen을 각 well에 100 μL 첨가한 후, 차광하여 30분간 실온에서 반응시켰다. 각 well에 stop solution 100 μL를 첨가한 후 30분 이내로 ELISA-reader (Bio-Rad Laboratories Inc)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DAPI 염색

AGS 위암 세포주를 12 well plate에 4×10^4 cells/mL로 분주한 후, 24시간 동안 배양시킨 다음 세포주에 fucoidan을 50 μg/mL 농도로 처리하여 24시간, 48시간 배양한 후 PBS로 조심스럽게 세척 한 후에 4% paraformaldehyde를 1 mL/well첨가하여 10-~20분간 배양 하였다. PBS로 다시 세척 후 PBS로 10배 희석한 DAPI stain 용액을 500 μL/well 처리하였다. 처리 후 암실에서 형광현미경으로 관찰하였다.

Apoptosis 측정

Apoptosis는 annexin V staining kit (Becton Dickinsin, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용해 측정하였다. AGS 위암 세포주를 75-cm^2 flask에 배양하여 fucoidan을 0, 25, 100 μg/mL 처리한 후 24시간이 지난 뒤 trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 부유상태로 만들어 세포를 원심 분리하여 pellet을 얻었다. 차가운 PBS로 두 번 세척 후 원심 분리하여 cell pellet을 얻은 후 1X binding buffer을 이용하여 AGS 세포를 1×10^6 cells/mL로 만들었다. Fluorescein isothiocyanate (FICT)-conjugated annexin V와 phycoerythrin (PE)-conjugated propidium iodide을 첨가하여 15분간 반응시킨 후 유세포 분석을 통해 측정하였다.

웨스턴 블로팅

AGS 위암 세포주를 60-mm dish에서 세포 배양액과 fucoidan을 첨가하여 48시간 배양한 후 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 떼어낸 후 원심분리(1,000 rpm, 5 min, 4°C) 하였다. Whole Cell lysate를 만들기 위해 세포를 차가운 PBS에 세척하고, cell lysis buffer (Invitrogen)를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시켰다. Lysate는 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 취해 cell lysate로 사용하였다. Cytosol cell lysate는 세포를 차가운 PBS로 세척하고 0.05% digitonin을 포함한 plasma membrane extraction buffer를 첨가하여 상온에서 1분 동안 반응시켰다. 15,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 취해 cytosol cell lysate로 사용하였다. Whole cell lysate (30 μg), Cytosol cell lysate (60 μg)을 웨스턴 블로팅에 사용하였다. Cell lysate의 단백질 농도는 Bradford assay를 사용하여 측정하였다. Cell lysate를 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후 nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories)에 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST (20 mM Tris·HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking하고, anti-Bax(1:1000 희석), anti-Bcl-2(1:1000 희석), anti-caspase-9 (1:1000 희석), anti-cytochrme c(1:1000 희석), anti-XIAP (1:1000 희석), anti-Akt(1:1000 희석), anti-p-Akt(1:1000 희석), anti-β-actin(1:1000 희석) 등 측정하고자 하는 antibody (Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 각각 첨가하여 4°C에서 overnight을 하였다. 그 후 goat anti-mouse Ig G 또는 anti-rabbit Ig G를 첨가하여 1시간 반응시켰다. 각 protein band는 SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce)을 사용하여 enhanced chemiluminescence 방법으로 가시화하였다[29,30]. 각 밴드는 imaging program인 Image J Launcher (provided by NCBI)를 이용하여 밀도를 측정하였다.

미토콘드리아의 전압 측정

AGS 위암 세포주를 96 well plate에 2×10^4 cells/mL로 분주한 후, 24시간 동안 배양시킨 다음 세포주에 fucoidan을 0 μg/mL, 50 μg/mL의 농도로 24시간 처리하였다. 이후 미토콘드리아 전압을 측정하기 위해 JC-1 mitochondrial membrane potential assay kit (cayman, Denver, USA)를 사용하였다. 각 well에 assay buffer 200 μL씩 세척한 후 JC-1 stain을 20 μL 첨가하여 15분 동안 37°C에서 배양하고, 이후 상층액을 제거한 후 assay buffer 200 μL씩 세척한 후 암실에서 형광현미경으로 관찰하였다.

통계학적 처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 사용하여 나타내고 각 군간 비교는 one-way ANOVA에 이은 t-test 분석을 실시하였다. 대조군과 비교하여 P값이 0.05 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

대식세포에 대한 Fucoidan의 세포독성능 평가

Fucoidan에 의한 면역세포 독성능이 미치지 않는 농도를 찾기 위하여 MTT assay를 사용하여 측정하였다(Fig. 1).

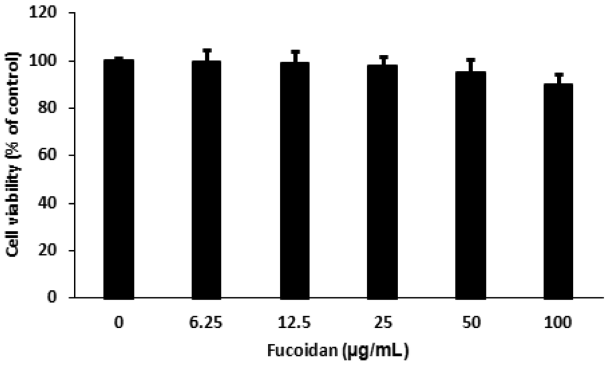

Fig. 1. Effect of fucoidan on the cell viability of Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells (5×10^4 cells/mL) were treated with 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL fucoidan in RPMI-1640 medium containing 5% FBS for 24h. The growth inhibition was measured by the MTT assay. Data are mean standard deviation (SD) for three samples. The significance was determined by Student's t-test (*P < 0.05 compared with untreated control).

마우스 대식세포주인 Raw 264.7 세포에 fucoidan을 6.25 μg/mL, 12.5 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL의 농도로 24시간 동안 처리하였다. Fucoidan의 저농도인 6.25 μg/mL부터 고농도인 100 μg/mL까지 대식세포의 성장에 영향을 미치지 않았으므로 본 연구에 사용된 농도는 세포 독성에 의한 장애를 받을 수준은 아닌 것으로 사료된다.

Fucoidan에 의한 대식세포의 NO 및 TNF-α 분비

Macrophage가 분비하는 암세포 독성물질로 알려진 NO는 혈관 완화, 신경전달, 혈소판 응집 그리고 면역 조절과 같은 중요한 역할을 한다[31-33]. Macrophage에 세포독성이 일어나지 않는 fucoidan 농도에서 NO의 분비의 발현이 어떻게 변화하는지 확인해 보았다. Hang 등[34]에 의하면 fucoidan을 1, 5, 10, 50 μg/mL의 농도로 처리한 결과 농도 유의적인 증가를 확인하였다. Raw 264.7 세포주를 seeding 한 후 fucoidan을 6.25 μg/mL, 12.5 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. NO의 분비는 농도 유의적으로 증가하였으며, 12.5 μg/mL 인 농도부터 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 2A). TNF-α는 주로 LPS에 의해 자극된 macrophage가 분비하는 cytokine으로 알려져 있으며 항암작용 및 염증반응에 매우 중요한 역할을 나타낸다[35]. Fucoidan에 의한 대식세포의 TNF-α의 분비에 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보았다(Fig. 2B). Raw 264.7 세포주를 seeding 한 후 fucoidan을 6.25 μg/mL, 12.5 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. TNF-α의 분비는 농도 유의적으로 증가하였다. NO 및 TNF-α의 분비는 대식세포의 탐식능을 증가시키고 항암활성을 더욱 증가시킬 수 있다고 보고되고 있다[36-38]. Fucoidan이 macrophage인 Raw 264.7 세포를 활성화시켜 암세포 파괴 등을 매개할 수 있는 NO 및 TNF-α의 사이토카인 분비를 통해 면역 활성을 유도하여 암세포 성장 억제를 촉진하는 것으로 사료된다.

Fucoidan에 의한 AGS 세포의 성장에 미치는 영향

Fucoidan이 AGS 위암 세포주의 성장에 영향을 주는지

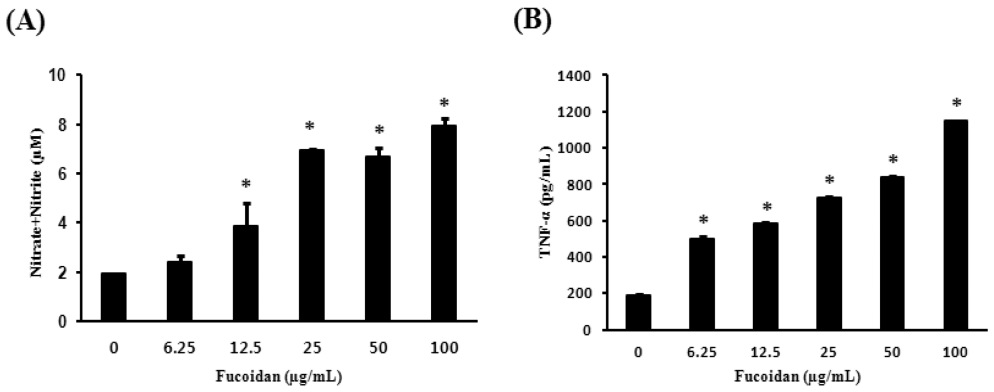

Fig. 2. Effect of fucoidan on nitric oxide (NO) and TNF-α production in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL fucoidan in RPMI-1640 medium containing 5% FBS for 24h. (A) nitric oxide (NO) and (B) TNF-α production were determined by NO and TNF-α assay as described in Materials and Methods. Data are mean standard deviation (SD) for three samples. The significance was determined by Student's t-test (*P < 0.05 compared with untreated control).

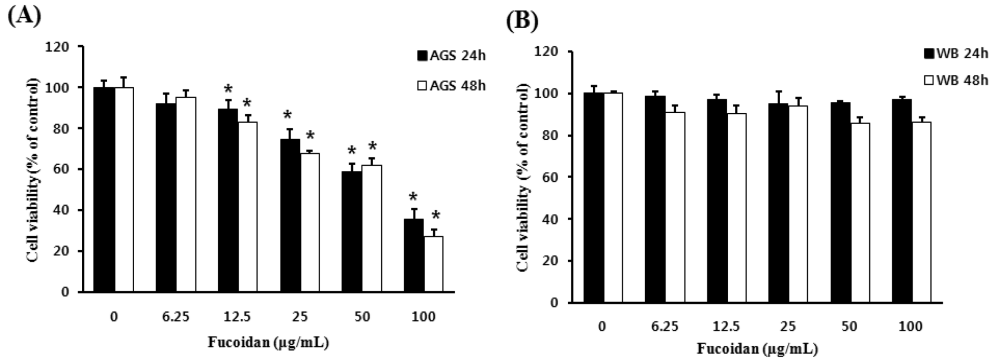

Fig. 3. Effect of fucoidan on the cell viability of AGS cells and WB cells. (A) AGS cells (2×10^4 cells/mL) and (B) WB cells (1×10^5 cells/mL)were treated with 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL fucoidan in RPMI-1640 medium containing 5% FBS for 24, 48 h. The growth inhibition was measured by the MTT assay. Data are mean standard deviation (SD) for three samples. The significance was determined by Student's t-test (*P < 0.05 compared with untreated control).

확인하기 위해 MTT assay를 시행하였다. Fucoidan은 Aisa 등[8], Hyun 등[9], Nagamine 등[10], Yamasaki-Miyamoto 등[11]에서 암세포의 증식 억제가 입증되고 있다. Hyun 등[9]에 의하면 HCT-15 결장암 세포주에서 1, 10, 30, 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포성장을 억제하였다. 본 연구에서 AGS 위암 세포주를 seeding 후 24시간 동안 배양시킨 다음 fucoidan을 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 24시간과 48시간 동안 처리하였다. 대조군은 지속적으로 세포성장이 일어나는데 비해 fucoidan 24시간과 48시간 처리군 에서는 12.5 μg/mL에서부터 농도, 시간 의존적으로 세포의 성장이 지연되며 부유하는 세포들이 증가하며 유의적으로 세포가 감소하였다(Fig. 3A). Fucoidan의 안전성을 평가하기 위하여 WB 정상 간 세포주에 fucoidan을 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 24시간과 48시간 동안 처리하였다. 대조군에 비해 부유하는 세포나 세포의 형태가 변형된 세포는 보이지 않았으며 또한 농도, 시간 의존적으로 유의적인 감소를 보이지 않았다(Fig. 3B). MTT assay 결과 macrophage와 정상 간 세포 에서 최대 100 μg/mL의 fucoidan에서 독성이 나타나지 않았다. Fucoidan 12.5 μg/mL의 농도는 AGS 위암 세포의 성장 억제 효과를 나타냈으며 본 연구에서는 50 μg/mL fucoidan의 농도를 사용하였다.

Fucoidan에 의한 apoptosis 유도

Fucoidan이 AGS 위암 세포주에 apoptosis를 유도하는지를 알아보기 위해 DAPI 염색을 통하여 확인하였다(Fig. 4A). AGS 위암 세포에 fucoidan을 50 μg/mL의 농도로 24시간과 48시간 동안 처리하였다. 시간 의존적으로 세포의 성장이 감소한 것과 동일하게 DAPI 염색에서도 시간 의존적으로 apoptotic body와 chromatin 응축이 유의적으로 증가되었다. 이는 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한 DNA 단편화의 결과[39]이므로 fucoidan 처리에 의한 암세포의 성장 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다. 또한 annexin V/propodium iodide staining을 이용하여 fucoidan을 25, 50 μg/mL의 농도로 처리하고 24시간 뒤 apoptosis가 일어난 세포를 측정한 결과, fucoidan 처리 농도에서 각각 15.88%, 16.04%, 25.66%의 apoptotic cell이 관찰되었으며 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 4B). 따라서 fucoidan은 AGS 위암 세포에서 apoptosis를 유발시키는 것으로 사료되며, 이에 따라 apoptosis에 관련된 단백질을 western blotting을 통해서 알아보았다.

Fucoidan에 의한 세포 내 신호경로

Fucoidan을 50 μg/mL 농도로 시간대 별로 처리했을 때 세포 내 신호경로를 알아보기 위해 western blotting을 실시하였다. Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있는데, 그 중 Bcl-2는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 대표적인 pro-apoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다. Anti-apoptotic 분자와 pro-

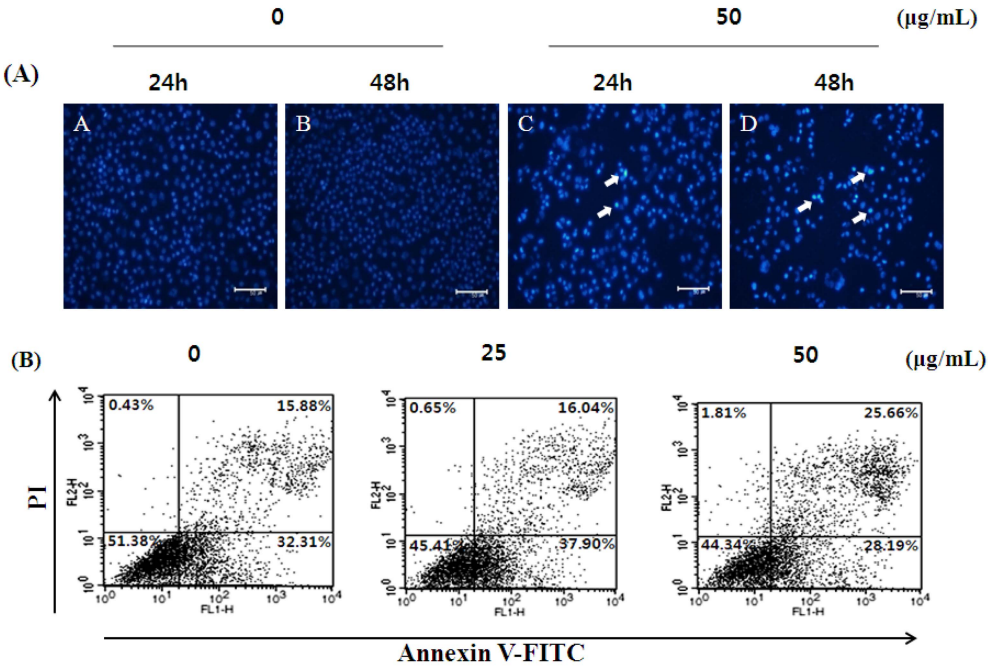

Fig. 4. Effect of fucoidan on the chromatin condensation in AGS cells. (A) AGS cells were treated with 0, 50 μg/mL fucoidan or vehicle in RPMI-1640 medium containing 5% FBS for 24, 48h and stained with DAPI. Chromatin condensation, representing apoptotic cell death (arrow), was examined using a fluorescence microscope (× 200). (B) AGS cells were treated with 0, 25, 50 μg/mL fucoidan for 24h. Apoptosis was measured by annexin V and PI double staining. Apoptotic cells were analyzed by FACS analysis (n = 5).

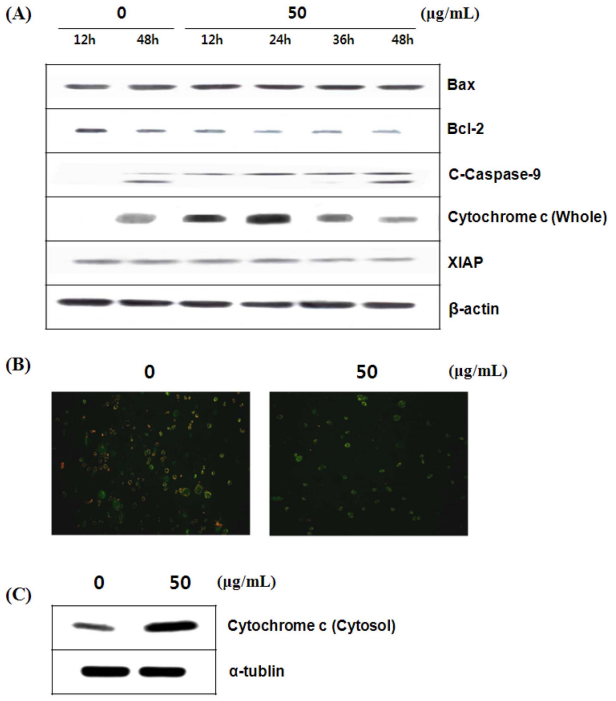

Fig. 5. Effect of fucoidan on the mitochondiral pathway and cell death receptors in AGS cells. Cell was treated with fucoidan 0, 50 μg/mL for 12, 24, 36, 48h. Cell lysates were prepared as described under Materials and Methods and analyzed by 12% SDS-PAGE followed by Western blot assay. (A, C) The membranes were incubated with anti-Bax, anti-Bcl-2, anti-caspase-9, anti-cytochrome c and anti-XIAP antibodies. (B) Cells were treated with fucoidan for 24h. Cells were loaded with JC-1 stain. The numbers of cells with normal polarized mitochondrial membranes (red) and with depolarized mitochondrial membranes (green) are expressed.

apoptotic 분자는 서로 dimer의 형태로 존재하여 균형을 유지하고 있지만 이러한 균형이 깨어지게 되면 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 세포질로 방출되어서 cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성화를 통하여 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다[40,41]. 그리고 미토콘드리아 세포질의 cytochrome c와 Smac/Diablo의 세포질로의 방출이 증가되면 caspase-9의 활성을 촉진시킨다[42,43]. Fig. 5A에 나타낸 바와 같이 anti-apoptotic 분자인 Bcl-2와 XIAP는 시간 의존적으로 감소했으며, pro-apoptotic 분자인 Bax, cleaved caspase-9과 cytochrome c (Whole)가 증가하였다. 따라서 Bax의 증가와 Bcl-2의 감소에 의해 cytochrome c가 방출이 되어 연쇄적으로 caspase-9을 활성화시키는 것을 알 수 있다. 또한 fucoidan이 AGS 위암 세포의 미토콘드리아에 탈분극을 유발시키는지 확인하기 위해 50 μg/mL 로 24시간 처리 후 JC-1 stain으로 미토콘드리아의 막 전위를 확인하였다(Fig. 5B). 대조군 보다 50 μg/mL 농도로 처리하였을 때 높은 막전위(intact mitochondria)를 유지하고 있는 붉은색 파장의 형광이 감소하고, 낮은 막전위(damaged mitochondria)를 가진 초록색 파장의 형광이 증가하였다. Fucoidan을 24시간 처리하였을 때 cytochrome c (cytosol)가 대조군 보다 발현이 증가 한 것을 확인하였다(Fig. 5C). 이 결과 fucoidan을 위암 세포에 처리하였을 때 일어나는 apoptosis가 미토콘드리아 내의 탈분극으로 cytochrome c가 세포질로 방출되고 결과적으로 cleaved caspase-9을 활성화시킨다고 사료된다.

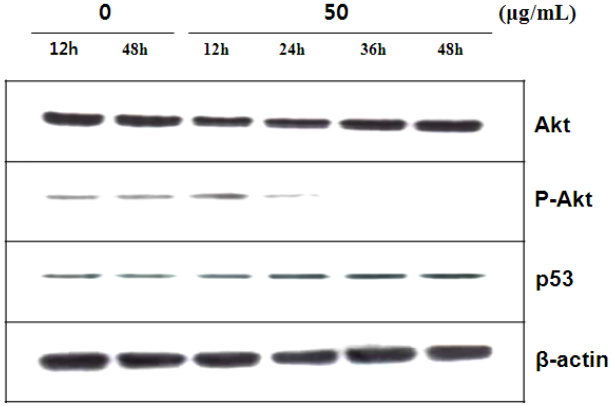

Fig. 6. Effect of fucoidan on the activation of Akt and p53 in AGS cells. Western blot analyses of phosphorylation of Akt. The AGS were treated with fucoidan 0, 50 μg/mL for 12, 24, 36, 48h. Anti-Akt, anti-p-Akt and anti-p53 antibodies. The blot was also probed with anti-β-actin antibody to confirm equal loading of samples.

Fucoidan에 의한 세포 내 Akt의 인산화

Fucoidan이 Akt의 인산화를 억제시키는 지 확인하기 위해 western blotting을 실시하였다. PI3K/Akt 신호경로는 세포의 증식이나 분화에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 여러 암종에서 Akt가 과활성화 되는 것으로 밝혀져 있다[44]. p53과 AMPK가 세포질 내에서 결합하여 핵 내로 들어가 세포증식에 관여하는 신호분자들의 발현을 저해하고 세포의 apoptosis를 유도함이 보고되었다[45]. Aisa 등[8], Hyun 등[9]에 의하면 fucoidan을 100 μg/mL로 처리 시 시간 의존적으로 caspase-3의 활성과 Akt의 인산화 억제를 통해 항암효과를 입증하였다. Fig. 6에 나타낸 바와 같이 위암 세포에서도 시간 의존적으로 anti-apoptosis인 Akt의 인산화가 유의적으로 감소하였으며 종양억제유전자인 p53의 발현은 유의적으로 증가하였다.

Caspase 억제제가 AGS 세포주의 증식에 미치는 영향

AGS 세포주에 fucoidan을 처리하였을 때 caspase에 의하여 apoptosis를 유도를 확인하기 위하여 caspase inhibitor인 z-VAD-FMK을 처리하였다. Kim 등[29]에 의하면 대장암 세포에 caspase inhibitor와 fucoidan을 병용 처리 하였을 때 대장암세포의 성장억제를 차단하였으며, 또한 fucoidan에 의해 증가된 cleaved caspase-9, -3와 t-Bid, cleaved PARP의 발현을 caspase inhibitor 선 처리에 의하여 감소

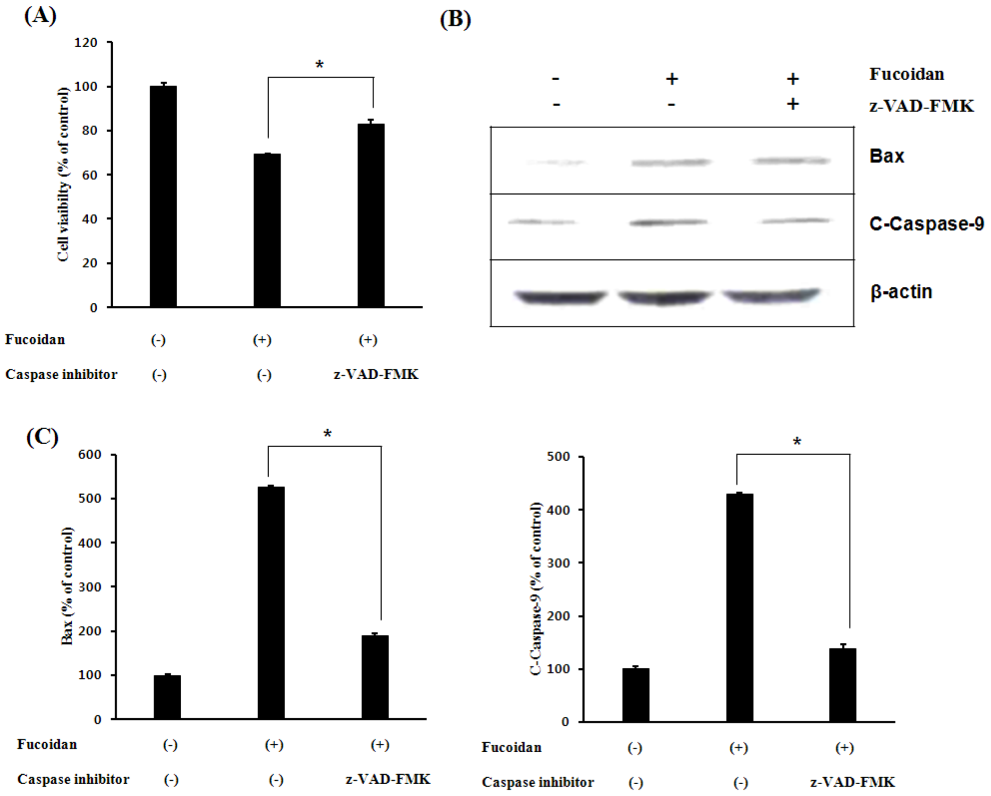

Fig. 7. Effect of caspase inhibitors for fucoidan-induced apoptosis in AGS cells. (A) AGS cells were pretreated with caspase inhibitors (40 μM) for 2h and treated with 50 μg/mL fucoidan or vehicle in RPMI-1640 medium containing 5% FBS for 24h. The growth inhibition was measured by the MTT assay. Data are mean standard deviation (SD) for three samples. The significance was determined by Student's t-test (*P < 0.05 compared with untreated control). (B) Cell were pretreated with caspase inhibitors (40 μM) for 2h and treated with 50 μg/mL fucoidan or vehicle in RPMI-1640 medium containing 5% FBS for 24h. Anti-Bax and anti-caspase-9 antibodies. The blot was also probed with anti-β-actin antibody to confirm equal loading of samples. (C) Intensity of bax and c-caspase-9 bands are represented by graph (each experiment's n = 3).

되었다. Fig. 7A를 보면 fucoidan을 24시간 처리하였을 때 위암 세포의 성장이 감소하였고 caspase inhibitor와 병용 처리하였을 때는 caspase inhibitor에 의해 위암 세포의 성장 억제를 차단하였다. 동일한 조건에서 caspase inhibitor가 caspase-9 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 western blotting으로 측정해 본 결과, fucoidan에 의해 발현이 증가된 bax, cleaved caspase-9이 z-VAD-FMK를 병용 처리 하였을 때 발현이 감소하였다(Fig. 7B). 본 실험 결과 fucoidan에 의해 유발되는 apoptosis는 caspase가 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 fucoidan이 macrophage의 활성과 항암효과를 확인하기 위하여 수행되었다. Fucoidan을 Raw 264.7 세포에 처리한 후 MTT assay로 측정한 결과 고농도 100 μg/mL까지 세포독성은 없었으며, NO 및 TNF-α의 분비를 농도 유의적으로 증가시켰다. 또한 AGS 위암 세포 성장저해 효과를 확인하기 위하여 MTT assay를 하였고 그 결과 농도와 시간 의존적으로 암 세포 성장이 유의적으로 감소하였다. Apoptosis로 인해 암 세포 성장이 감소하였는지 확인하기 위하여 DAPI 염색을 한 결과 apoptotic body와 세포질 응축이 시간 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 또한 fucoidan은 미토콘드리아의 투과율을 향상시키며 미토콘드리아에서 방출되는 cytochrome c의 발현을 증가시켰다. Western blotting의 결과 시간 의존적으로 anti-apoptotic 분자인 Bcl-2 와 XIAP 발현 감소와 반대로 pro-apoptotic 분자인 Bax 발현이 증가하였다. Cleaved-caspase-9의 발현이 증가하였으며 Akt 의 인산화는 시간 의존적으로 감소하였다. Caspase 억제제인 z-VAD-FMK 처리 시 Bax, caspase-9의 발현을 감소시켜 apoptosis 유도를 억제하였으며 이러한 결과는 caspase가 apoptosis 유도에 중요한 역할을 하는 것으로 나타낸다. 본 실험의 AGS 위암 세포주에서 대조군에 비하여 fucoidan 처리군에서 면역세포 활성 및 AGS 위암 세포주에서 caspase 활성을 통해 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Risch, H.A., Jain, M., Choi, N.W., Fodor, J.G., Pfeiffer, C.J., Howe, G.R., Harrison, L.W., Craib, K.J. and Miller, A.B. : Dietary factors and the incidence of cancer of the stomach. *Am. J. Epidemiol,* **122**, 947-959 (1985).
2. Lee, K.H., Kown, H.J., Chun, S.S., Kim, J.H., Cho, Y.J. and Cha, W.S. : Biological activities of extracts from phellinus linteus. *J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem,* **49**, 298-303 (2006).
3. Kim, S.W. and Kim, E.S. : Studies on the immunomodulating effect of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on machrophage. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr,* **26**, 148-153 (1997).
4. Lee, M.K., Choi, G.P., Ryu, L.H., Lee, G.Y., Yu, C.Y. and Lee, H.Y. : Enhanced immune activity and cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thub. extracts against human cell lines. *Korean. J. Med. Crop. Sci,* **12**, 36-42 (2004).
5. Schaeffer, D.J. and Krylov, V.S. : Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria, *Ecotoxicol. Environ. Saf,* **45**, 208-227 (2000).
6. Dobashi, K., Nishino, T., Fujihara, M., and Nagumo, T. : Isolation and preliminary characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides with blood -anticoagulant activity from the brown seaweed Hizikia fusiforme. *Carbohydr. Res,* **194**, 315-320 (1989).
7. Nishino, T., Nishioka, C., Ura, H. and Nagumo, T. : Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan vesiculosus fucoidan. *Carbohydr. Res,* **255**, 213-214 (1994).
8. Aisa, Y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, K., Ikeda, Y. and Kizaki, M. : Fucoidan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *Am. J. Hematol,* **78**, 7-14 (2005).
9. Hyun, J.H., Kimg, S.C., Kang, J.I., Kim, M.K., Boo, H.J., Kwon, J.M., Koh, Y.S., Hyun, J.W., Park, D.B., Yoo, E.S. and Kang, H.K. : Apoptosis inducing activity of fucoidan in HCT-15 colon carcinoma cells. *Biol. Pharm. Bull,* **32**, 1760-1764 (2009).
10. Nagamine, T., Hayakawa, K., Kusakabe, T., Takada, H., Nakazato, K., Hisanaga, E. and Iha, M. : Inhibitory effect of fucoidan on Huh 7 hepatoma cells through down-regulation of CXCL12. *Nutr. Cancer,* **61**, 340-347 (2009).
11. Yamasaki-Miyamoto, Y., Yamasaki, M., Tachibana, Ha. and Yamada, K. : Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells. *J. Agric. Food. Chem,* **57**, 8677-8682 (2009).
12. Ko, E.J. and Joo, H.G. : Immunostimulatory effects of fucoidan on mouse splenocytes. *Lab. Anim. Res,* **25**, 195-200 (2009).
13. Yang, J.W., Yoon, S.Y., Oh, S.J., Kim, S.K. and Kang, K.W. : Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun,* **346,** 345-350 (2006).
14. Maruyama, H., Tamauchi, H., Iizuka, Ma. and Nakano, T. : The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from Undaria pinnatifida sporophylls. *Planta. Med,* **72**, 1415-1417 (2006).
15. Kim, N.H. and Joo, H.G.: Immunostimulator effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. *Immunol. Lett,* **115**, 138-143 (2008).
16. Hengrtner, M.O. : The biochemistry of apoptosis. *Nature,* **407**, 770-777 (2000).
17. Hamsa, T.P. and Kuttan, G. : Evalution of the anti-inflammatory and anti-tumor effect of ipomoea obscura(L) and its mode of action through the inhibition of proinflammatory cytokines, nitric oxide and COX-2. *Inflammation,* **34**, 171-183 (2011).
18. Kang, N.S. and Sohn, E.H. : Immunomodulatory effects of fructus and semen from *Rosa rugosa* on macrophages. *J. Korean. Plant. Res,* **23**, 399-405 (2010).
19. Zhang, L., Zhu, Y., Lun, D., Yu, B. and Zhu, X. : Proteomic analysis of macrophages: a potential way to identify novel proteins associated with activation of macrophages for tumor cell killing. *Cell. Mol. Immunol,* **4**, 359-367 (2007).
20. Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J. and Tschopp, J. : TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell. Biol,* **2**, 241-243 (2000).
21. Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J. and Ashkenazi, A. : Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity,* **12**, 611-620 (2000).
22. Cohen, G.M. : Caspase: the executioners of apoptosis. *Biochem. J,* **326**, 1-16 (1997).
23. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. : Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell,* **94**, 491-501 (1998).
24. Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmever, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R. and Martin, S.J. : Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspase-2, -3, -6, -7, -8 and -10 in a caspase-9 dependent manner. *J. Cell. Biol,* **144**, 281-292 (1999).
25. Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. and Korsmeyer, S.J. : Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature,* **348**, 334-336 (1990)
26. Deveraux, Q.L. and Reed, J.C. : IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes. Dev,* **13**, 1899-1911 (1999)
27. Carnero, A. : The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr. Pharm,* **277**, 34-44 (2010)
28. Osaki, M., Oshimura, M. and Ito, H. : PI3K-Akt pathway: its functions and altherations in human cancer. *Apoptosis,* **9**, 667-676 (2004)
29. Kim, E.J., Park, S.Y., Lee, J.Y. and Park, J.H. : Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC. Gastroenterol,* **10**, 96-107 (2010)
30. Jung, J.I., Lim, S.S., Choi, H.J., Cho, H.J., Shin, H.K., Kim, E.J., Chung, W.Y., Park, K.K. and Park, J.H. : Iosliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. *J. Nutr. Biochem,* **17**, 689-696 (2006).

31. Palmer, R.M., Ferrige, A.G. and Moncada, S. : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature,* **327**, 524-526 (1987)
32. Moncada, S. and Higgs, A. : The L-arginine nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med,* **329**, 2002-2012 (1993)
33. Yang, W.W. and Krukoff, T.L. : Nitric oxide regulates body temperature, neuronal activation and interleukin-1β gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus in response to immune stress. *Neuropharmacology,* **39**, 2075-2089 (2000).
34. Hang, D., Choi, H.S., Kang, S.C., Kim, K.R., Sohn, E.S., Kim, M.H., Pyo, S. and Son, E. : Effects of fucoidan on NO production and phagocytosis of macrophages and the proliferation of neuron cells. *J. Food. Sci. Nutr,* **10**, 344-348 (2005).
35. Strieter, R., Kunkel, S. and Bone, R. : Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit. Car. Med,* **21**, 447-463 (1993).
36. Adams, D.O. and Hamilton, T.A. : The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol,* **2,** 283-318 (1984).
37. Nathan, C.F. : Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest,* **79**, 319-326 (1987).
38. Vishvakarma, N.K. and Slingh, S.M. : Immunopotentiating effect of proton pump inhibitor pantoprazole in a lymphoma-bearing murine host: Implication in antitumor activation of tumor-associated macrophages. *Immunol. Lett,* **134**, 823-92 (2010).
39. Evans, V.G. : Multiple pathways to apoptosis. *Cell. Biol. Int,* **17**, 461-476 (1993).
40. Donovan, M. and Cotter, T.G. : Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim. Biophys. Acta,* **1644**, 133-147 (2004).
41. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. and Bomer, C. : Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature,* **391**, 496-499 (1998).
42. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. : Cytochrome c and ATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell,* **91**, 479-489 (1997).
43. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. : Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrom c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell,* **102**, 33-42 (2002).
44. Yoeli-Lemer, M., Yiu, G.K., Rabinovitz, I., Erhardt, P., Jauliac, S. and Toker, A. : Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol. Cell,* **20**, 539-550 (2005).
45. Okoshi, R.T., Ozaki, H., Yamamoto, K., Ando, N., Koida, S., Ono, T., Koda, T., Kamijo, A., Nakagawara, A. and Kizaki, H.: Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *J. Biol. Chem,* **283**, 3979-3987 (2008).