

상황을 이용한 보건기능 개선제의 인체폐암세포 apoptosis 유발에 관한 연구

박 철 · 이용태¹ · 강경화¹ · 최병태² · 정영기³ · 최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실, 1: 생리학교실, 2: 해부학교실 및 한의학연구소,
3: 동의대학교 자연과학대학 미생물학과

Induction of Apoptotic Cell Death by Healthful Decoction Utilizing *Phellinus Linteus* in Human Lung Carcinoma Cells

Cheol Park, Yong Tae Lee, Kyung Hwa Kang¹, Byung Tae Choi², Young Kee Jeong³, Yung Hyun Choi*

Department of Biochemistry, 1: Department of Physiology,
2: Department of Anatomy, Dongeui University College of Oriental Medicine and Research Institute of Oriental Medicine,
3: Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Dongeui University

In the present study, we investigated the effects of aqueous extract of the healthful decoction utilizing *Phellinus linteus* (HDPL) on the cell growth of human lung carcinoma tumor cell line A549. Exposure of A549 cells to HDPL resulted in growth inhibition and induction of apoptosis in a dose-dependent manner as measured by hemocytometer counts, fluorescence microscopy and flow cytometric analysis. This increase in apoptosis was associated with inhibition and/or degradation of apoptotic target proteins such as poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), b-catenin and phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) protein. HDPL treatment induced the down-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 expression, an anti-apoptotic gene, however, the level of Bax, a pro-apoptotic gene, was increased by HDPL treatment. In addition, HDPL-induced apoptosis of A549 cells was connected with activation of caspase-3 and caspase-9 protease in a dose-dependent manner, however, the levels of inhibitor of apoptosis proteins family were remained unchanged. Taken together, these results indicated that the anti-proliferative effects of HDPL were associated with the induction of apoptotic cell death through regulation of several major growth regulatory gene products such as Bcl-2 family expression and caspase protease activity, and HDPL may have therapeutic potential in human lung cancer.

Key words : HDPL, apoptosis, Bcl-2, caspase

서 론

버섯은 각종 영양소를 다양하게 함유하고 있어 오래 전부터 식용 및 민간전통 약재로 친숙하게 사용되어져 왔으며, 버섯류가 생산하는 각종 기능성 생리활성물질은 면역기능 강화 및 항암효과가 탁월하다는 연구가 최근 국내·외 연구자들에 의하여 많이 밝혀지고 있다. 본 연구진에서는 기존 한방에서 탁월한 효과를 보였으며, 추가적으로 기능성 식의약으로 개발가능성이 높은 처방에 새로운 기능이 동정된 약재를 첨가하거나 교체함으로써 부

작용은 줄이면서 효능은 향상된 새로운 한의학적 복합 처방전의 개발의 필요성에 관하여 연구를 하여왔다. 이러한 관점에서 상황버섯(*Phellinus linteus*)과 신령버섯(*Agaricus blazei* Murill)을 십전대보탕과 팔물탕의 구성성분에 해당되는 주요 약재와 혼합한 한의학적 보건기능 개선제(Healthful decoction utilizing *Phellinus linteus*, HDPL)의 효능을 조사한 바 있다^{1,2}.

상황버섯(목질진흙버섯)과 신령버섯의 탁월한 암예방 및 항암효과는 이미 잘 알려져 있으며³⁻¹⁰, 그 외 암과 관련된 면역증강, 항염증, 항돌연변이 등의 효과들뿐 만 아니라 다양한 생리활성의 기능을 조절함으로써 인체에 매우 유익한 작용들이 있는 것으로 알려져 그 활용성에 대한 기대가 매우 높아지고 있다^{5,10-16}. 이러한 관점에서 HDPL의 효능을 조사한 선행연구에 의하면,

* 교신저자 : 최영현, 부산시 진구 양정동 산 45-1, 동의대학교 한의과대학
· E-mail : choiyh@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8649
· 접수 : 2004/03/18 · 수정 : 2004/04/21 · 채택 : 2004/05/19

HDPL은 염증유발 관련 인자들의 발현 조절을 통하여 사염화탄소에 의해 손상된 간 손상의 완화 및 지질대사 활성화에 매우 유의적인 효과가 관찰된다¹⁾. 염증 유발과 관련된 후속적인 연구에서 HDPL은 염증발현에 가장 중요한 역할을 하는 cyclooxygenases (COXs)의 두 가지 동위효소 중 COX-2의 발현만을 선택적으로 억제하는 것으로 나타났다²⁾. 또한 COX-2의 발현저하는 인체폐암세포의 생존을 저하와 연관성이 있었으며, 그 과정에 염색체 말단의 telomere의 조절관련 유전자 중 가장 중요한 역할을 하는 human telomerase reverse transcriptase (hTERT)의 발현 또한 억제된 바 있으나 암세포의 세포주기의 진행에는 큰 영향이 없었다²⁾. 따라서 COX-2 및 hTERT의 선택적 발현 억제와 연관된 HDPL의 처리에 의한 암세포의 생존을 감소는 세포주기 비 특이적인 apoptosis 유발과 관련이 있을 것으로 추정되어 본 연구에서는 HDPL의 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발 기전에 관한 생화학적 접근을 시도하였다.

Apoptosis는 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 인체방어기전이란 점에서 necrosis와 구별된다¹⁷⁻¹⁸⁾. 또한 apoptosis는 개체보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이며, 정상적인 세포주기의 이탈이나 특정 세포주기 조절인자 활성화의 변화가 apoptosis의 주원인이 될 수 있다¹⁹⁾. Apoptosis의 유발에 p53이나, Bcl-2 및 Bax와 같은 유전자와 연관된 caspase protease가 관여한다는 사실이 알려지면서 apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다²⁰⁻²¹⁾. 본 연구에서는 HDPL에 의한 암세포의 생존을 저하가 직접적인 apoptosis 유발에 의한 것임을 보였으며, 이때 p53 및 inhibitor of apoptosis proteins (IAP) family 비의존적인 Bcl-2 family의 발현 변화에 따른 caspase의 활성화가 HDPL에 의한 apoptosis 유발에 관여함을 제시하였다.

재료 및 방법

1. 암세포배양 및 시료의 처리

본 연구에 사용된 A549 인체 폐암세포는 한국생명공학연구소에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양을 위해 90 % RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10 % fetal bovine serum (FBS)에 1 %의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하였다. 본 실험에 사용된 시료는 선행연구¹⁾에서 사용된 것과 동일한 처방(HDPL)이었으며, Park et al.²⁾과 동일한 방법으로 HDPL 수용액 추출물을 준비하며 암세포에 처리하였다.

2. Hematocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

세포배양용 6 well plate를 이용하여 plate당 2x10⁴개의 암세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후, HDPL을 적정농도로 희석하여 처리하였다. 72시간 동안 HDPL이 처리된 세포를 phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 수세한 후, trypan blue (Gibco BRL, Gaithersburg, MA, USA)로 염색하였다. 이를 hematocytometer에 옮긴 후 위상차 현미경(x 200) 하에서 살아

있는 세포의 수를 측정하여 대조군과 상호 비교 분석하였다.

3. DAPI 염색을 통한 핵의 관찰

HDPL의 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유발 여부를 확인하기 위한 핵의 형태변화 관찰을 위하여 HDPL이 처리된 세포들을 PBS로 세척하고 3.7 % paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정시킨 후 형광 염색물질인 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 이용하여 10분간 염색하였다. 이들 세포를 다시 PBS로 2회 수세한 후 형광현미경을 이용하여 핵의 형태 변화를 정상군과 비교하였다.

4. Flow cytometry 분석

정상 및 HDPL이 함유된 배지에서 자란 암세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, 고정액(70 % ethyl alcohol, 0.5 % Tween 20)을 첨가하여 4 °C에서 고정시킨 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 µg/ml; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하고 4 °C에서 1시간동안 염색하였다. 이를 다시 PBS로 두 번 씻어낸 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

5. 단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

선행 방법에 준하여 정상 및 HDPL이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다²²⁾. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시킨 후, 특정 단백질에 대한 항체와 그에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

6. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction 분석

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNAzol B (TEL-TEST, Inc., Texas, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 선행방법²²⁾에 준하여 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다(Table 1). 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사

용하였다. 각 PCR 산물들을 1 % agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name		Sequence
XIAP	Sence	5'GAA-GAC-CCT-TGG-GAA-CAA-CA-3'
	Antisence	5'-CGC-CTT-AGC-TGC-TCT-CTT-CAG-T-3'
cIAP-1	Sence	5'-TGA-GCA-TGC-AGA-CAC-ATG-C-3'
	Antisence	5'TGA-CGG-ATG-AAC-TCC-TGT-CC-3'
cIAP-2	Sence	5'-CAG-AAT-TGG-CAA-GAG-CTG-G-3'
	Antisence	5'-CAC-TTG-CAA-GCT-GCT-CAG-G-3'
Survivin	Sence	5'-GCA-TGG-GTG-CCC-CGA-CGT-TG-3'
	Antisence	5'-GCT-CCG-GCC-AGA-GGC-CTC-AA-3'
Bax	Sence	5'-ATG-GAC-GGG-TCC-GGG-GAG-3'
	Antisence	5'-TGG-AAG-AAG-ATG-GGC-TGA-3'
Bcl-xL	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
Bcl-2	Sence	5'-CAG-CTG-CAC-CTG-ACG-3'
	Antisence	5'-GCT-GGG-TAG-GTG-CAT-3'
GAPDH	Sence	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	Antisence	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

7. In vitro caspase-9 및 caspase-3의 활성 측정

Fluorometric assay에 의한 caspase-3 및 caspase-9의 in vitro 활성 측정을 위하여 사용된 kit는 CLONTECH Lab. (Palo Alto, CA, USA) 및 R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Germany)에서 각각 구입하였다. 활성 측정을 위하여 정상 및 HDPL이 처리된 배지에서 72시간 배양된 암세포를 모아서 ice-cold PBS로 2회 수세하고 준비된 buffer를 이용하여 lysis를 시켜 10,000 rpm으로 30분간 원심분리 시켰다²³⁾. 상층액을 모아 단백질의 양을 정량하고 대조군 및 HDPL이 처리된 실험군에서 각각 20 µg의 단백질을 취하여 fluorogenic peptide 기질 100 µM 이 함유된 extraction buffer 50 µl에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 µl가 되게 하였다²³⁾. 이때 사용된 기질은 caspase-3의 경우는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이며, caspase-9의 경우는 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37 °C에서 2시간동안 incubation 시킨 후 VERSAmix tunable microplate reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

결 과

1. 암세포의 생존에 미치는 HDPL의 영향

준비된 HDPL을 적정농도로 희석하여 인체 폐암세포 A549에 72시간 동안 처리한 후, trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 살아있는 세포의 수를 계수하여 HDPL이 처리되지 않은 대조군과 비교한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 처리된 HDPL의 농도가 증가될수록 암세포의 생존율은 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었으며, 특히 5 mg/ml 처리군에서의 생존율은 20 % 미만으로 나타나 HDPL이 처리된 배지에서 배양된 암세포의 증식이 거의 이루어지지

않았음을 알 수 있었다.

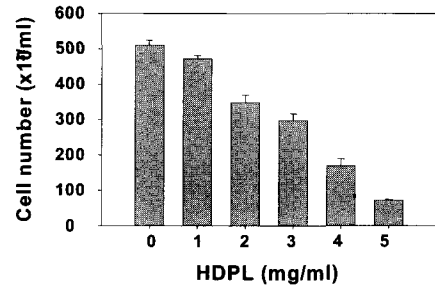


Fig. 1. Effect of HDPL on the viability in A549 human lung carcinoma cells. Cells were seeded as described in materials and methods, and the viable cells were counted after HDPL treatment for 72 h. Results are expressed as average from two separate experiments

2. HDPL 처리에 의한 apoptosis 유도

이상의 HDPL의 처리에 따른 암세포의 증식 억제에는 암세포의 전체적인 모양에서 다양한 형태적 변형을 유발하였으며 (data not shown), 이러한 암세포의 성장억제와 형태적 변형이 apoptosis 유발과 상관성이 있는지를 조사하기 위하여 DAPI staining을 실시하여 핵의 형태를 조사하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 HDPL이 처리되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 HDPL이 처리된 암세포의 경우, 염색질 응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body가 HDPL 처리 농도 의존적으로 증가되었다.

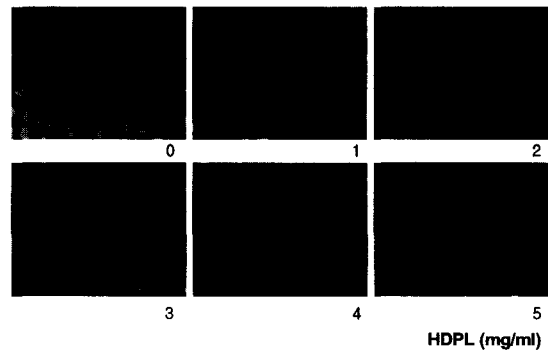


Fig. 2. Induction of apoptotic bodies by HDPL treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with HDPL for 72 h, and fixed and then stained with DAPI. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescence microscope using blue filter. Magnification, X400.

3. PARP, β-catenin 및 PLC-γ1의 발현에 미치는 HDPL의 영향

다음은 HDPL 처리에 의한 apoptosis의 유발을 생화학적으로 증명하기 위하여 apoptosis 유발시 특이하게 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질의 발현에 미치는 HDPL의 영향을 Western blot analysis 방법으로 조사하였다. Fig. 3A에서 볼 수 있듯이 HDPL의 처리 농도 증가에 따라 세포내 골격의 유지와 부착성 세포의 전사 조절에 중요한 β-catenin²⁴⁻²⁵⁾ 및 DNA repair와 genomic stability에 관여하는 PARP 단백질²⁶⁻²⁷⁾의 발현이 다소 감소되었으며, 세포의 성장과 증식에 중요한 역할을 하는

phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1)²⁸⁻²⁹ 단백질의 발현 또한 HDPL의 처리 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 이상의 형태적·생화학적인 분석에서 HDPL에 의한 암세포의 증식억제는 apoptosis 유발과 직접적인 관련이 있었기에 HDPL 처리에 따른 apoptosis 유발의 정도를 flow cytometry를 이용하여 정량적인 분석을 한 결과는 Fig. 3B와 같다. 즉 정상 배지에서 자란 암세포에서의 자연적 apoptosis 유발 빈도는 0.89 %에 불과하였지만 HDPL의 처리 농도가 증가될수록 apoptosis의 유발 정도가 다소 증가(3 mg/ml 처리군에서 3.95 % 및 4 mg/ml 처리군에서 4.56 %)되었음을 알 수 있었다.

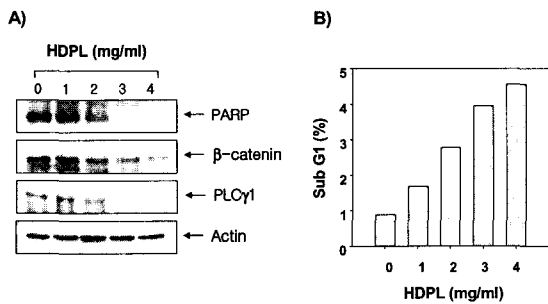


Fig. 3. (A) Effects of HDPL treatment on the levels of PARP, β -catenin and PLC- γ 1 protein in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with HDPL for 72 h and total cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-PARP, anti- β -catenin and anti-PLC- γ 1 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control. **(B) Increased sub-G1 population by HDPL treatment in A549 human lung carcinoma cells.** Cells were incubated with HDPL for 72 h and then analyzed by flow cytometry as described in materials and methods. Results are expressed as average from two separate experiments

4. Bcl-2 family의 발현에 미치는 HDPL의 영향

다음은 HDPL의 처리에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 기전을 탐색하기 위하여 Bcl-2 family에 속하는 유전자의 발현 수준을 RT-PCR 및 Western blot analysis 방법으로 조사하였다. Fig. 4A는 mRNA 전사수준을 RT-PCR법으로 조사한 결과로서, apoptosis 유발 억제에 관여하는 Bcl-2의 발현이 고농도 HDPL 처리군에서 다소 감소하였으며, apoptosis 유도에 관여하는 Bax의 발현은 HDPL 처리 농도 의존적으로 점차 증가하였음을 알 수 있었다. Fig. 4B에 나타난 단백질 발현의 정도에서, Bax의 발현은 RT-PCR의 결과에서와 유사한 경향성을 보여주었으며, Bcl-2 member 단백질에 속하는 Bcl-Xs/L의 발현은 현저하게 감소되었음을 알 수 있었다. 즉 HDPL에 의한 apoptosis의 유발에는 apoptosis의 유발에 관여하는 Bax 유전자의 발현은 증가하였지만 apoptosis 유발 억제에 관여하는 유전자들의 발현은 상대적으로 감소되었음을 알 수 있었다.

5. Caspase의 발현 및 활성화에 미치는 HDPL의 영향

한편 caspase protease라는 효소 역시 apoptosis 유발 경로에 중요한 조절인자로서 작용하는데, 이들 family에 속하는 단백질들은 세포에서 핵과 mitochondria의 외막에 존재하며, Bcl-2/Bax family 발현의 변화에 따라 이들의 활성도가 조절되는 것으로 알

려져 있다^{20,21}). 따라서 지금까지 알려진 caspase 중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3 및 caspase-9의 발현에 미치는 HDPL의 영향을 조사하였다. Fig. 5의 결과에서 볼 수 있듯이 HDPL의 처리에 의하여 불활성형인 pro-caspase-3 단백질의 발현은 HDPL 처리 농도 의존적으로 감소되었으나 활성형 caspase-3의 발현은 상대적으로 증가되었다. 이러한 현상을 caspase-9에서도 유사한 경향성을 보여 주었으나 뚜렷한 활성형의 단백질 발현 증가를 정확히 관찰하기는 어려웠다. 따라서 이상의 Western blotting에 의한 결과를 재확인하기 위하여 caspase의 활성 정도를 직접 분석한 결과, HDPL이 처리된 암세포에서는 처리 농도 의존적으로 caspase-3 및 caspase-9의 활성이 모두 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 6). 즉 HDPL의 처리에 의한 폐암세포의 apoptosis 유발은 Bcl-2/Bax family의 발현 변화와 연관된 caspase의 활성화와 직접 관련이 있음을 알 수 있었다.

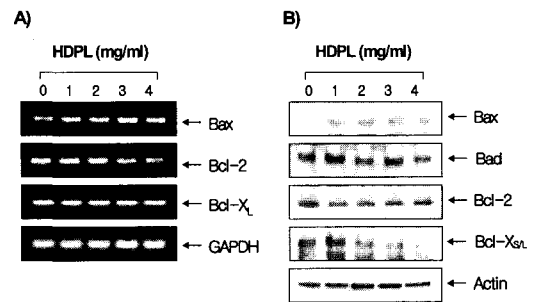


Fig. 4. Effects of HDPL treatment on the levels of Bcl-2 family gene products in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with HDPL for 72 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with HDPL for 72 h, lysed and cellular proteins were separated by 12 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

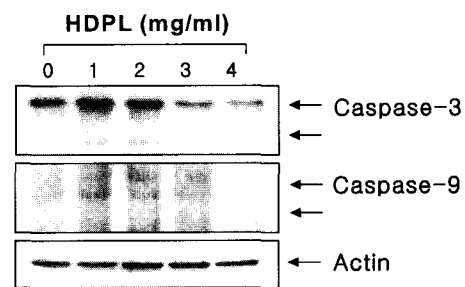


Fig. 5. Proteolytic cleavage of caspase-3 and caspase-9 protein by HDPL treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were incubated with HDPL for 72 h, lysed and cellular proteins were separated by 12 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-caspase-3 and anti-caspase-9 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

6. IAP family의 발현에 미치는 HDPL의 영향

다음은 apoptosis 유발에 중요한 caspase의 활성 조절인자인 IAP family³⁰⁻³¹ 유전자 산물의 변화를 RT-PCR 및 Western blotting을 이용하여 조사하였다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 조사

된 몇 가지 IAP family의 mRNA 및 단백질 발현에서 HDPL 처리에 따른 큰 변화는 관찰할 수 없었다. 따라서 HDPL 처리에 의한 apoptosis에서의 caspase 활성은 IAP family의 발현 변화와는 무관한 것 같지만 이에 관한 정확한 기전 해석에는 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

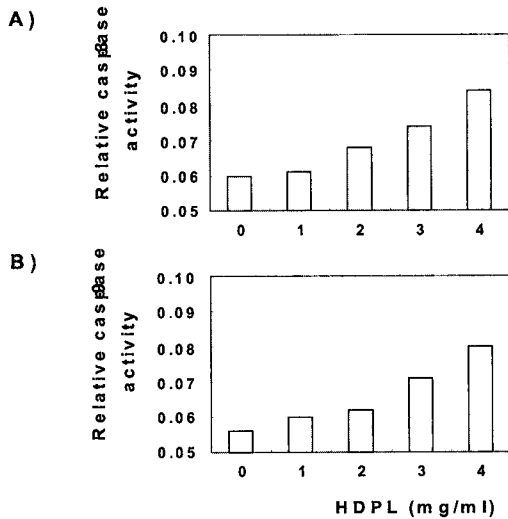


Fig. 6. Activation of caspase-3 and caspase-9 by HDPL treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with indicated concentrations of HDPL for 72 h, collected and then lysed. Aliquots (20 µg protein) were incubated with DEVD-pNA (A) and LEHD-pNA (B) for caspase-3 and caspase-9 activity, respectively, at 37 °C for 1 h. The released fluorescent products were measured. Data represent the mean of two independent experiments.

고찰

본 연구에서는 인체 폐암세포의 성장에 미치는 상황 및 실험버섯이 함유된 한방복합처방 보건기능 개선제(HDPL)의 영향을 조사하기 위하여 HDPL이 함유된 배지에서 자란 암세포의 생존율을 정상배지에서 자란 대조군과 비교하였다. Fig. 1에서 알 수 있듯이 HDPL의 첨가농도 의존적으로 암세포의 생존율은 감소되었으며, 이는 MTT assay에 의해 보고된 선행연구와 매우 유사한 결과였다²⁾. 이러한 폐암세포 증식 억제 및 형태 변화의 관찰에서 HDPL의 처리에 의한 암세포 증식의 억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련성이 있을 것으로 기대되어 이에 대한 증거를 제시하기 위하여 암세포의 핵 형태 변화를 관찰한 결과(Fig. 2), 대조군의 경우 모든 암세포에서 핵의 형태가 뚜렷하게 정상으로 염색이 되었으나 HDPL이 처리된 암세포의 경우, HDPL 처리 농도 의존적으로 염색질 응축에 의한 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body의 증가 현상을 관찰할 수 있었다¹⁷⁻¹⁸⁾. 즉 이는 nucleosome의 linker DNA 부분의 절단에 의한 DNA 단편화의 결과^{21,32)}이므로 HDPL의 처리에 의한 암세포의 증식억제 및 형태적 변형이 암세포의 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있음을 시사하여 주는 것으로 사료된다. 아울러 flow cytometry 분석에 의한 apoptosis 유발 세포군에 해당하는 sub-G1기에 속하는 세포들의 빈도 역시 HDPL 처리 농도 의존적으로 증가되어 HDPL 처리에 따른 암세포의 증식 억제는

apoptosis 유발과 직접적인 연관이 있음을 알 수 있었다.

다음은 전형적인 apoptosis 유발시 분해가 일어나는 몇 가지 표적 단백질의 발현에 미치는 HDPL의 영향을 조사하였다. 먼저 조사된 PARP 단백질은 DNA repair나 genomic stability의 유지에 매우 중요한 역할을 하며²⁶⁾, apoptosis 유발과정 중 활성화된 caspase 단백질 분해 효소에 의하여 분해가 일어나면 PARP의 효소적 기능의 상실로 인하여 정상적인 DNA repair 과정이 억제되어진다²⁶⁻²⁷⁾. 정상적인 세포의 경우 PARP 단백질은 116 kDa의 분자량을 가지지만 apoptosis가 일어난 경우 85 kDa 크기의 단편이 관찰되거나 주 band의 발현이 감소된다³³⁻³⁴⁾. 따라서 HDPL 처리에 의한 apoptosis 유발과정에서도 이러한 현상이 관찰되는지의 여부를 조사하였다. Fig. 3A에서 볼 수 있는 바와 같이 정상 배지에서 배양된 암세포의 경우 116 kDa 위치에 강한 주 band를 볼 수 있었으며, HDPL이 처리된 세포에서 뚜렷한 85 kDa의 band는 관찰되지는 않았으나 HDPL 농도의 증가에 따라 전체적인 발현이 매우 감소되는 경향성을 보여 주었다. 다음 조사된 β-catenin 단백질은 세포내 골격의 유지와 다양한 부착성 세포의 전사 조절에 중요하며 세포 유착과 관계된 apoptosis 조절과 연관성을 가지고 있다²⁴⁻²⁵⁾. 정상 세포의 경우 β-catenin은 92 kDa의 분자량을 가지나 세포 유착성(adherent cell) apoptosis가 일어나면 62-72 kDa로 단편화가 일어난다³⁵⁻³⁶⁾. A549 폐암세포에서 β-catenin의 발현에 미치는 HDPL의 영향을 immunoblotting 방법으로 조사한 결과 단편화 현상은 관찰되지 않았으나 β-catenin의 발현은 HDPL의 처리 농도가 증가될수록 정상군에 비하여 다소 감소되었음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 이러한 변화는 HDPL에 의한 apoptosis 유발에서 암세포의 형태변화에서 관찰된 것과 같이 β-catenin의 발현 감소로 인한 세포 유착 소실과 밀접한 관계를 가질 수 있을 것으로 추정되어진다. 한편 다양한 세포성장 촉진인자들은 apoptosis 유발을 억제할 수 있을 것으로 보고되어지고 있는데, 이들 성장인자의 수용체들은 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), G-protein 및 PLC-γ1 등과 같은 주요 신호전달 분자들을 활성화시킬 수 있다²⁸⁻²⁹⁾. 특히 PLC-γ1은 protein kinase C activator인 diacylglycerol 및 세포내 Ca²⁺ 조절에 중요한 역할을 하는 inositol 1,4,5-trisphosphate를 생산에 중요한 역할을 한다³⁷⁾. 따라서 PI3K나 Ras와 같은 세포성장 신호분자와 같이 PLC-γ1 역시 세포의 증식에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁸⁾. 그러나 apoptosis가 유발될 경우 활성화된 caspase에 의하여 분해될 수 있기 때문에 PARP 및 β-catenin 등과 함께 apoptosis 유발의 생화학적 표식자로 사용이 가능하다³⁹⁻⁴⁰⁾. 따라서 HDPL의 처리에 의한 apoptosis 유발과정에서 PLC-γ1 단백질 발현의 정도를 조사한 결과, HDPL 추출물의 처리 농도가 증가될수록 PLC-γ1의 발현은 감소하였음을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과들에서 HDPL이 함유된 배지에서 자란 폐암세포의 성장 억제는 β-catenin, PARP 및 PLC-γ1 단백질의 분해와 연관된 apoptosis와 밀접한 관련성이 있음을 알 수 있었다.

다음은 HDPL의 처리에 의한 apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 탐색을 위하여 apoptosis와 연관성을 가지는 가장 대표적

인 유전자인 Bcl-2 family에 속하는 유전자의 발현을 조사하였다. 그중 Bcl-2 member는 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax member에 속하는 인자들은 pro-apoptotic 분자로 apoptosis의 유발과 관계가 있다²¹). 이들은 세포 내 소기관 중 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 종양억제 유전자인 p53, cysteine-related protease인 caspase, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절한다^{21,41,42}). 이들은 서로 dimer의 형태로 존재하며 그들의 발현 수준에 변화가 초래되면 apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다^{42,43}). Fig. 4A는 다양한 농도의 HDPL이 함유된 배지에서 배양된 암세포를 대상으로 mRNA 전사수준을 RT-PCR법으로 조사한 결과이다. 조사된 유전자 중 Bcl-2 mRNA는 HDPL 처리농도 의존적으로 발현이 감소되었으며, Bax mRNA의 경우는 HDPL 처리에 따라 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 이와 유사한 결과는 단백질 발현의 수준에서도 관찰할 수 있었다(Fig. 4B). 즉 HDPL에 의한 A549 폐암세포의 apoptosis의 유발에는 apoptosis를 억제하는 유전자의 발현이 감소되는 반면, apoptosis 유발에 관여하는 유전자의 발현이 증가되었음을 알 수 있었다.

한편 caspase protease family 단백질들은 핵과 mitochondria의 외막에 존재하며, 이들의 활성화는 Bcl-2 family 단백질들의 발현 정도에 의존적인 경우도 있다^{20,21,27}). 이들은 proenzyme의 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성형으로 전환되어 세포 내 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다. 따라서 지금까지 알려진 caspase 중 초기 apoptosis의 유발과정에서 중요한 역할을 하는 caspase-9과 apoptosis가 유발된 세포에서 전체적으로 높은 활성도를 보여주는 caspase-3의 발현 정도를 정상 및 HDPL이 처리된 배지에서 배양된 세포를 대상으로 비교 조사하였다(Fig. 5). Caspase-3의 경우 활성화된 형태로 관찰된다면 불활성 형태인 32 kDa form의 발현이 상대적으로 줄어들거나 활성형인 17 및 19 kDa 분자량을 가지는 단백질이 검출되어야 한다. 본 실험의 결과에서 알 수 있듯이 활성형인 저분자의 발현은 저 농도에서 다소 증가된 반면 비활성 band의 발현은 고농도에서 매우 감소되었다. Caspase-9의 경우 활성형 band의 현저한 증가현상은 관찰할 수 없었으나 비활성형 band 발현의 정도는 HDPL 처리 농도 의존적으로 감소되었음을 알 수 있었다. Western blot analysis에 의한 caspase의 양적 변화와 연관된 caspase의 활성 여부를 재확인한 결과, HDPL 처리 농도 의존적으로 caspase-3 및 caspase-9 모두가 활성이 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 6). 따라서 HDPL의 처리에 의한 표적단백질들의 분해(Fig. 3A)는 Bax의 발현 증가(Fig. 4)와 연관된 caspase의 활성화에 의한 것으로 추정할 수 있었다.

또한 apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중 최근 밝혀진 IAP family에 속하는 여러 단백질은 곤충세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군들로서 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지닌다^{30,31}). 그리고 이들 중 몇 가지는 caspase와의 직접적인 결합을 통하여 그들의 apoptotic 활성을 억제할 수 있을 것으로 밝혀졌으며³⁰,

이들 IAP family의 발현은 전사 조절인자인 nuclear factor kappa B에 의해 조절 받는 것으로 밝혀져 apoptosis의 신호전달 연구에서의 새로운 영역을 제시하여 주고 있다⁴⁴). 그러나 Fig. 7의 결과에서 알 수 있듯이 HDPL이 처리된 암세포에서 조사된 몇 가지 IAP family에 속하는 유전자들의 mRNA 및 단백질의 발현 수준은 HDPL의 처리에 따른 유의적인 발현의 변화를 관찰할 수 없었다. 따라서 HDPL의 처리에 의한 apoptosis의 유발은 IAP family 유전자 비의존적인 caspase의 활성화에 의한 것인지는 더 연구를 해야 할 것으로 사료된다.

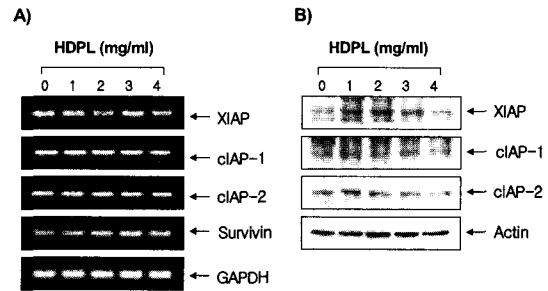


Fig. 7. Effects of HDPL treatment on the levels of IAP family gene products in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with HDPL for 72 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with HDPL for 72 h, lysed and cellular proteins were separated by 12 % SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

이상의 결과에서 HDPL에 의한 인체 폐암세포의 성장억제는 apoptosis 유발과 밀접한 관련이 있었으며, apoptosis 유발에는 Bax 유전자의 상대적인 발현 증가 및 caspase의 활성화에 의한 표적 단백질들의 발현 저하와 직접적인 연관성이 있음을 관찰할 수 있었다. 그러나 본 연구의 결과만으로 HDPL의 항암작용 여부를 직접적으로 논하기에는 매우 어렵기 때문에, 선행보고된 암세포의 증식 억제³와 연관된 다양한 추가적인 실험이 필수적으로 수행되어야 할 것이며 HDPL에서 관찰되는 유효성분의 추출과 동정 또한 필요할 것이므로 본 연구의 결과는 향후 수행될 추가 실험을 위한 기초 자료로서 그 가치가 매우 높을 것으로 사료되며 생각된다.

감사의 말

본 연구의 일부는 웨이블랙(주) 및 농림부, 농림기술개발사업(첨단기술개발분야)의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Kang, K.H., Lee, J.H., Choi, Y.H., Choi, B.T., Lee, Y.T., The effects of healthful decoction utilizing *Phellinus linteus* in carbon tetrachloride-injected rats. Kor. J. Oriental Physiol. Pathol. 18, 114-121, 2004.

2. Park, C., Lee, Y.T., Lee, S.H., Jeong, Y.K., Choi, B.T., Choi, Y.H., Down-regulation of COX-2 and hTERT expression by healthful decoction utilizing *Phellinus linteus* in human lung carcinoma cells, Kor. J. Oriental Physiol. Pathol., (submitted), 2004.
3. Ikekawa, T., Nakanish, M., Uehara, N., Chihara, G., Fukuoka, E., Antitumor activity of some basidiomycetes. especially *Phellinus linteus*. Gann 59, 155-157, 1968.
4. Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. Carbohydr. Res. 189, 267-273, 1989.
5. Mizuno, T., Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murill: medicinal and dietary effects. Food Rev. Int. 11, 167-172, 1995.
6. Fujimiya, Y., Kobori, H., Oshiman, K., Soda, R., Ebina, T., Tumorcidal activity of high molecular weight polysaccharides derived from *Agaricus blazei* via oral administration in the mouse tumor model. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 45, 246-252, 1998.
7. Lee, H.J., Lee, H.J., Park, J.M., Song, G.Y., Kang, K.S., Kim, S.H., Study on antitumor and immunomodulatory effects of Cambodian *Phellinus linteus*. Kor. J. Oriental Physiol. Pathol. 16, 332-337, 2002.
8. Lee, K.Y., Han, M.J., Park, S.Y., Kim, D.H., *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. Kor. J. Food Sci. Technol. 32, 477-480, 2000.
9. Chun, H.S., Choi, E.H., Kim, H.J., Choi, C.W., Hwang, S.J., *In vitro* and *in vivo* antitumor activities of water extracts from *Agaricus blazei* Murill. Food Sci. Biotechnol. 10, 335-340, 2001.
10. Cho, J.H., Cho, S.D., Hu, H., Kim, S.H., Lee, S.K., Lee, Y.S., Kang, K.S., The roles of ERK1/2 and p38 MAP kinases in the preventive mechanisms of mushroom *Phellinus linteus* against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide. Carcinogenesis 23, 1163-0069, 2002.
11. Kim, D.H., Choi, H.J., Bae, E.A., Effects of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacterial enzymes and rat intestinal β -glucosidases. J. Fd. Hyg. Safety 13, 20-23, 1998.
12. Kim, H.M., Han, S.B., Oh, G.T., Kim, Y.H., Hong, D.H., Hong, N.D., Yoo, I.D., Stimulation of hormonal and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. Int. J. Immunopharm. 18, 295-303, 1996.
13. Ji, J.H., Kim, M.N., Choi, K.P., Chung, C.K., Ham, S.S., Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Agaricus blazei* extracts. Kor. J. Food Sci. Technol. 32, 1371-1378, 2000.
14. Ji, J.H., Kim, M.N., Chung, C.K., Ham, S.S., Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 29, 322-328, 2000.
15. Oh, G.T., Han, S.B., Kim, H.M., Han, M.W., Yoo, I.D., Immunostimulating activity of *Phellinus linteus* extracts to B-lymphocyte. Arch. Pharm. Res. 15, 379-381, 1992.
16. Pyo, M.Y., Hyun, S.M., Yang, K.S., Effects of *Phellinus linteus* extracts on the hormonal immune response in normal and cyclophosphamide-treated mice. J. Applied Pharmacol. 9, 194-2000, 2001
17. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H., Apoptosis. The role of the endonuclease. Am. J. Pathol. 136, 593-608, 1990.
18. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. Cell Biol. Int. 17, 461-476, 1993.
19. Shi, L., Nishioka, W.K., Th'ng, J., Bradbury, E.M., Litchfield, D.W., Greenberg, A.H., Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. Science 263, 1143-1145, 1994.
20. Nagata, S., Apoptosis by death factor. Cell 88, 355-365, 1997.
21. Chiarugi, V., Magnelli, L., Basi, G., Apoptosis and the cell cycle. Cell. Mol. Biol. Res. 40, 603-612, 1994.
22. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P., Jang, J.S., Lee, J., Wu, M.L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P.A. and Trepel, J.B., Regulation of cyclin D1 by calpain protease. J. Biol. Chem. 272, 28479-28484, 1997.
23. Choi, Y.H., Kong, K.R., Kim, Y.A., Jung, K.O., Kil, J.H., Rhee, S.H., Park, K.Y., Induction of Bax and activation of caspases during β -sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. Int. J. Oncol. 23, 1657-1661, 2003.
24. Johnson, J.P., Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. Cancer Metastasis. Rev. 18, 345-357, 1999.
25. Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N., Pignatelli, M., E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. Br. J. Surg. 87, 992-1005, 2000.
26. Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., Dixit, V.M., Yama/ CPP32, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. Cell 81, 801-809, 1995.
27. Miyashita, T., Reed, J.C., Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 80, 293-299, 1995.
28. Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. Cell 88, 435-437, 1997.
29. Bae, Y.S., Cantley, L.G., Chen, C.S., Kim, S.R., Kwon, K.S. and Rhee, S.G., Activation of phospholipase C-gamma by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J. Biol. Chem. 273, 4465-4469, 1998.
30. Salvesen, G.S., Duckett, C.S., IAP proteins: blocking the road

- to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 401-410, 2002.
31. Holcik, M., Gibson, H., Korneluk, R.G., XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 6, 253-261, 2001.
 32. Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R., The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 92, 57-70, 2001.
 33. Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E., Poirier, G.G., Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 53, 3976-3985, 1993.
 34. Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C., Cleavage of poly ADP-ribose polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-347, 1994.
 35. Fukuda, K., Apoptosis-associated cleavage of β -catenin in human colon cancer and rat hepatoma cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31, 519-529, 1999.
 36. LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G., MacKenzie, A.E., The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17, 3247-3259, 1998.
 37. Rhee, S.G., Suh, P.G., Ryu, S.H., Lee, S.Y., Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 244, 546-550, 1989.
 38. Chang, J.S., Noh, D.Y., Park, I.A., Kim, M.J., Song, H., Ryu, S.H., Suh, P.G., Overexpression of phospholipase C-1 in rat 3Y1 fibroblast cells leads to malignant transformation. *Cancer Res.* 57, 5465-5468, 1997.
 39. Myklebust, J.H., Blomhoff, H.K., Rusten, L.S., Stokke, T., Smeland, E.B., Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 30, 990-1000, 2002.
 40. Bae, S.S., Perry, D.K., Oh, Y.S., Choi, J.H., Galadari, S.H., Ghayur, T., Ryu, S.H., Hannun, Y.A., Suh, P.G., Proteolytic cleavage of phospholipase C-gamma1 during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J.* 14, 1083-1092, 2000.
 41. Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E., p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957-967, 1993.
 42. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C., Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499, 1998.
 43. Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J., Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251, 1993.
 44. Choi, Y.H., Bae, J.H., Yoo, M.A., Chung, H.Y., Kim, N.D., Kim, K.W., Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* 17, 565-571, 2000.