

# 차가버섯추출물에 의한 흑색종의 세포주기 억제효과

윤명자 · 송정훈<sup>1\*</sup>

원광대학교 의과대학 전정와우센터, 1: 성형외과학교실

## Cha-ga Mushroom Water Extract induces G0/G1 Arrest in B16-F10 Melanoma cells

Myung Ja Youn, Jeong Hoon Song<sup>1\*</sup>

*Vestibulocochlear Research Center & Department of Microbiology,  
1: Plastic & Reconstructive Surgery, Wonkwang University School of Medicine*

Chaga mushroom extract is well known as immune modulator and anti-cancer agent. However, the molecular mechanism by which Chaga exerts cell cycle arrest and apoptosis of cancer cells is poorly understood. In this study, we demonstrated anti-proliferative effects of Chaga extract on murine melanoma B16 cells. Chaga extract dose-dependently inhibited cell growth along with the arrest of G0/G1 phase and the induction of apoptotic cell death. Treatment with Chaga extract resulted in a decrease of cyclin E, cyclin D1, cdk 2, cdk 4 expression levels. Furthermore, in vivo inoculation study of B16 melanoma cells into Balb/c mice Chaga extract markedly suppressed the metastatic growth of tumor cells (6 folds,  $p < 0.05$ ). These results indicate that Chaga mushroom extract induces apoptosis of B16 melanoma cells through arrest of G0/G1 phase in cell cycle.

Key words : Chaga mushroom, apoptosis, cell cycle arrest

### 서 론

천연물로부터 항암 효능을 갖는 물질을 개발하기 위한 연구가 세계 각국에서 활발하게 진행 중이며, 국내에서도 많은 연구가 수행되어지고 있다<sup>1,3</sup>. 버섯류는 영양적으로 유용하며 약리작용을 나타내는 생리활성물질들을 다량 함유하고 있다<sup>3,4</sup>. 이러한 생리활성을 갖는 물질들은 세포주기를 억제하고 세포고사를 유도한다.

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 북위 45° 이상에서 자생하는 검은 자작나무에 착생하고 러시아 시베리아, 캐나다 및 일본 홋카이도 지역에서 자생하며, 러시아 시베리아 지역에서 소화기 질병이나 다양한 암 치료를 위한 민간요법으로 사용된다. 특히, 차가버섯은 항암, 면역체계 조절 및 당뇨병 치료 등의 효능이 알려져 있다. 최근 우리나라에서도 차가버섯의 효능에 대한 관심이 높아지고 있으며, 다양한 추출방법 및 성분에 대한 효능연구가 진행 중이다<sup>2,4</sup>.

세포의 증식과 고사는 세포주기에 의해 결정되어지며, 세포

주기는 cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs) 그리고 cyclin dependent kinase inhibitor 같은 세포주기 조절인자에 의해 조절된다. Cyclin은 활성화되는 단계에 따라 분류하며, 다양한 원인에 의하여 정상세포의 DNA가 손상을 받으면 세포주기는 G1기에서 멈추고 DNA를 복구한 후에 S기로 진행되어진다. 이때 손상이 심하여 복구가 불가능하면 세포고사 기전이 작동하여 비정상적인 세포의 증식을 방지하며 이 시기를 R point 혹은 G1 check point라고 명명하고 여기에 관여하는 cyclin은 cyclin D1과 cyclin E 이다<sup>5,6</sup>. 또한 DNA 합성 후 G2기에서 M기로의 진행에 관여하는 cyclin은 cylin B1이고, G2 check point에서 정상세포에서 암세포로의 전환이 이루어진다<sup>7</sup>. Cyclin 발현조절에 이상이 발생하면 비정상적인 세포 성장과 암 변성이 일어나게 된다. 특히 G1-S 세포주기 진행에 관여하는 cylin D1의 경우 암세포 게놈(genome)에서 염색체 11q13의 전위나 유전자 증폭을 통하여 cylin D1이 과표현된다. 암의 50%에서 cyclin D1 단백질의 과 발현이 보고되었다<sup>8,9</sup>.

악성 흑색종(melanoma)은 피부 및 다른 장기의 멜라닌 세포에서 유래하는 악성 종양이다. 최근 우리나라에서 그 발생 빈도가 점차 증가하는 추세에 있으며 종양의 발생 시 높은 사망률을

\* 교신저자 : 송정훈, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학

· E-mail : jhsong71@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-1291

· 접수 : 2007/01/22 · 수정 : 2007/01/31 · 채택 : 2007/02/16

보인다.<sup>10)</sup>

따라서, 본 연구에서는 흑색종 세포주인 B16-F10을 이용하여 차가버섯 추출물의 암세포 사멸효과 및 그 기전을 조사하고, 인위적으로 마우스에 흑색종 세포주인 B16-F10 세포로 종양을 발생시켜 차가추출물의 효능을 확인 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

차가버섯은 러시아로부터 구입하였다. 차가버섯 물 추출물(차가)은 건조된 차가버섯 (100 g)을 분쇄하여 증류수 (2,200 ml)에 녹인 후 100℃에서 2~3시간 끓이고, 여과지에 거른 후 냉동 건조하여 분말 형태로 만들었다. 분말은 증류수에 50 mg/ml의 농도로 녹이고 -20℃에 보관, 실험 조건에 따라 배지에 희석하여 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

실험에 필요한 DMEM, trypsin 및 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사 (Grand Island, NY, USA)에서, 배양용기 (24-well plate, 10cm dish)는 Falcon사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 그리고, methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide (MTT), PI (propidium iodide)는 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다, CDK4, CDK2, cyclin E, cyclin D1, actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 3. B16-F10 세포주 배양

흑색종 세포주 B16-F10는 ATCC (American Type Culture Collection, U.S.A)로부터 구입하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37℃ 배양기에서 10% FBS를 함유한 DMEM으로 배양하였으며, 48시간 주기로 0.05% Trypsin-EDTA를 사용하여 계대 배양하였다.

### 4. 세포생존율 측정

세포생존율은 세포 (2×10<sup>5</sup> cells/ml)를 세포 배양관 (24-well plate)에 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포배양기 안에서 안정시킨 후, 차가를 다양한 농도로 처리하여 48시간 배양한 다음, 배양액 최종부피의 1/10 MTT 용액 (5 mg/ml in PBS)을 첨가하여 4시간 반응하였다. 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan은 DMSO로 용해시킨 후 분광광도계 (THERMO max, U.S.A.)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하고, 대조군과 비교하여 세포생존율을 백분율(%)로 표시하였다.

### 5. 세포의 형태적 변화 측정

세포의 형태적 변화를 조사하기 위하여 B16-F10 세포에 차가 처리 후, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하였다. 세포는 포름 알데히드 (3.7%)로 실온에서 5분간 고정 한 후 PBS로 세척하여 위상차 현미경 (Phase contrast

microscope, Nikon, TE300, Japan)으로 관찰하였다.

### 6. 세포주기 분석

세포에 차가를 처리하여 48 시간 후에 포집하여 PBS로 두 번 세척하였다. 세척한 세포의 DNA는 PI 용액 (0.1% Triton X-100, 20 µg/ml PI, 200 µg/ml RNase) 600 µl와 20분 반응 후 flow cytometry를 이용하여 형광의 세기를 측정하였다. Flow cytometry로 얻어진 정보는 CellQuest software를 이용하여 세포 주기를 분석하였다.

### 7. Western blot 분석

배양된 세포는 포집하여, 차가은 PBS로 2회 세척하고 파쇄 용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)과 4℃에서 30분 반응하여 13,000 rpm에서 20분 원심 분리후 상층액을 수거하였다. 상층액은 정량하여 동량의 단백질 (40 µg)을 3× sample buffer와 혼합하여 가열하여 단백질의 변성을 유도한 후 12.5% 및 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 electrotransfer system (Ellard Inc, Seattle, WA, USA)을 이용 (0.8 mA/cm<sup>2</sup>)하여 nitrocellulose membrane으로 이동시키고, blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 2시간 반응하였다. Cyclin D1, CDK4, cyclin E, CDK2 및 β-actin 등에 대한 1차 항체는 tris-buffered saline (TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 상온에서 4시간 반응하였으며, 2차 항체인 anti-goat, anti-rabbit igG conjugated horse-radish peroxidase (HRP)를 TBS-T로 희석 (1:3000)하여 상온에서 2시간 반응 한 후 enhanced chemilluminescence (ECL) kit (Amersham, England)를 이용하여 ECL 필름에 감광, 현상하였다.

### 8. 동물 실험

생후 6주된 수컷 Balb/c 마우스는 다물 사이언스 (대전, 한국)로부터 구입하였다. 흑색종 생성을 유도하기 위하여 B16-F10 세포 (2×10<sup>5</sup> cells)를 마우스 복강에 주사하였고, 차가는 B16-F10 세포 복강 주입 5일전부터 (1)경구 투여군 (200 mg/kg/day)과 (2)복강 투여군 (20 mg/kg/day) 으로 구분하여 5일 동안 투여하고, 후처리군은 (3)B16-F10 세포 주입 후 복강으로 10일 동안 차가를 처치하였으며, 각 실험군은 마우스 10씩으로 하였다. 흑색종의 생성 정도는 체중 변화를 3일 간격으로 측정하였고, 각 실험군은 B16-F10 세포 주입 15일 후에 개복하여 생성된 흑색종을 적출하고, 각 무게를 측정하여 비교하였다.

## 결 과

### 1. 차가가 흑색종 B16-F10 세포 생존율에 미치는 영향

차가가 흑색종 B16-F10 세포주의 세포생존율에 미치는 영향을 조사하고자 다양한 농도 (250 µg/ml ~ 1000 µg/ml)의 차가를 처리하여 48시간 배양한 후 세포 생존율의 변화를 MTT 방법으

로 분석하였다. 그 결과, B16-F10 세포는 차가 농도 의존적인 세포생존율의 감소를 보였으며, 특히 750 µg/ml 농도의 차가 처리 시 대조군에 비하여 약 50%의 세포생존율을 보였다(Fig. 1A). 또한 차가에 의한 B16-F10 흑색종의 세포 성장 억제의 형태적 변화를 살펴보기 위하여 현미경 시하에서 관찰하였다(Fig. 1B). B16-F10 세포는 차가 처리 시 대조군에 비하여 증식이 억제되었으며 특히 750 µg/ml 농도의 차가 처리시 현저히 억제된 세포수의 차이를 보였다. 이상의 결과, 차가는 B16-F10 세포주에서 세포증식 억제를 통하여 세포독성을 초래함을 시사하였다.

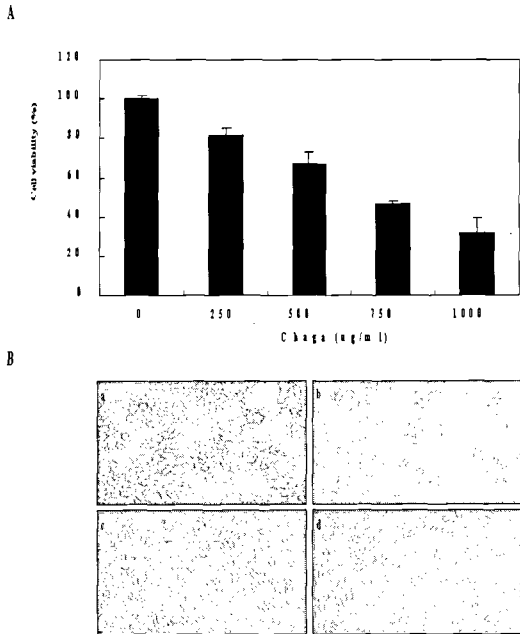


Fig. 1. Effect of Chaga mushroom water extract on the growth of murine B16-F10 melanoma cells. A) Cells were treated with various concentrations of Chaga extract for 48 hr and growth inhibition was measured using trypan blue assay. The data show the mean ± SD of three independent experiments. \* p < 0.05 compared with the control. B) Cells were incubated with various concentrations of OGM for 48 hr and examined under light microscopy. Magnification, x 200.

2. B16-F10 세포에서 차가에 의한 세포주기의 변화

암세포 사멸효과에 대한 천연물의 세포주기 억제 기전이 보고되어 있다<sup>6,11)</sup> 따라서 본 연구에서도 차가에 의한 B16-F10 세포의 세포주기의 변화를 확인하기 위하여 PI 염색을 통한 Flow cytometry 분석을 시행하였다. 그 결과, 차가 처리시 농도 의존적으로 B16-F10 세포의 G0/G1기가 억제되었으며(Fig. 2) 750 µg/ml 농도의 차가 처리시 대조군 (69.4%)에 비하여 증가 (82.51%) 하였다. 각 세포주기에 속하는 세포비율을 분석하여 표로 정리하였다(Table 1).

Table 1. Cell-Cycle Analysis of B16-F10 melanoma cells After Treatment with Chaga M water extract

Chaga (µg/ml)	Cell cycle (%)				
	Sub G0/G1	G0/G1	S	G2/M	
0	0.68	69.40	15.41	14.51	
500	3.05	76.8	7.67	12.48	
750	5.05	82.51	4.74	7.70	
1000	7.96	69.86	6.23	15.95	

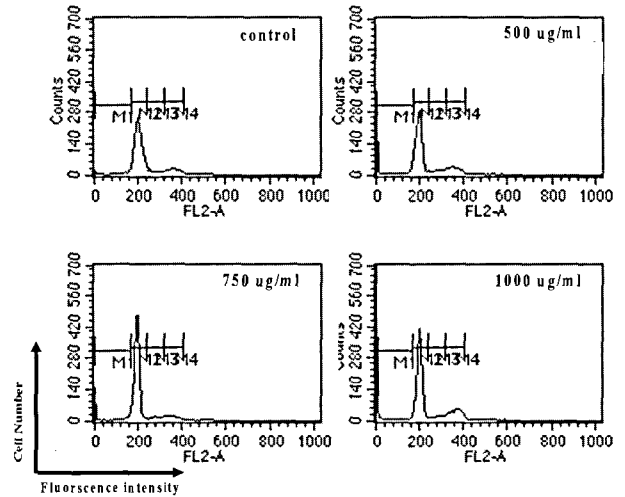


Fig. 2. Effects of Chaga mushroom water extract on cell cycle progression of murine B16-F10 melanoma cells. After incubation with various concentrations of Chaga extract for 48 hr, cells were harvested, treated with Propidium iodide and propidium iodide. Flow cytometric analysis was performed to analyze the cell cycle distribution.

3. B16-F10 세포에서 차가에 의한 세포주기 조절 단백질의 발현 변화

세포주기 조절은 다양한 조절인자와 조절 단백질 복합체의 작용으로 진행된다<sup>12,13)</sup>. 차가에 의한 B16-F10 세포주의 세포주기 억제에 관여하는 조절인자들의 발현 양상을 Western blot으로 확인하였다. 앞에서 차가에 의한 B16-F10 세포의 성장 억제 및 G0/G1기 억제를 확인하였으므로, G0/G1기의 억제에 관련된 세포주기 조절 단백질의 발현 양상을 조사하였다. 그 결과, 차가는 농도 의존적으로 B16-F10 세포에서 G0/G1기 조절 단백질인 CyclinD1, Cdk4, CyclinE 및 Cdk2 단백질의 발현 감소를 유도하였다(Fig. 3).

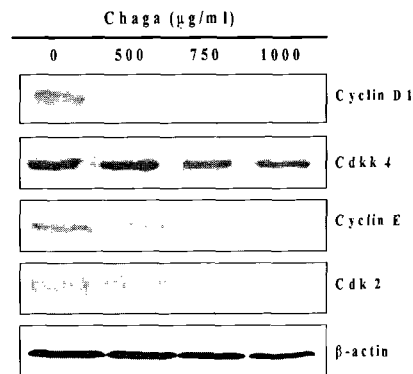


Fig. 3. Effects of Chaga mushroom water extract on the expression of cell cycle regulatory proteins in B16-F10 cells. Cells were treated with various concentrations of Chaga extract for 48 hr, harvested and cell lysate was then subjected to SDS-PAGE to probe for cyclin D1, cyclin E, Cdk 2 and Cdk 4. The expression of β-actin was used to verify the equal loading of gel.

4. Balb/c 마우스에서 차가에 의한 암발생 억제 효과

앞에서 B16-F10에 대한 차가의 세포주기 억제를 통한 세포 증식 억제효과를 확인하였으므로, Balb/c 마우스에서 차가의 효과를 조사 하였다. 먼저, B16-F10 세포를 마우스복강에 주입하여 흑색종 생성을 유도하였다. 각 조건에 따라 차가를 투여한 후 일

정한 간격으로 체중을 측정하였다. 또한 B16-F10 세포 주입 15일 후 복강 내 흑색종을 적출하여 무게를 측정하였다. Table 2에서와 같이 차가는 전처리군에서 유의한 효과를 보였으며, 구강투여에 비하여 복강 내 투여 시 흑색종의 생성이 현저하게 억제되었다. 특히 차가를 복강 내로 후 처리시 (1.479 ± 0.5 g) 대조군 (6.19 ± 3.8 g)에 비하여 흑색종의 생성이 약 6배 억제되었다. 이러한 차가의 흑색종 생성 억제 효과는 육안으로 식별이 가능하였다(Fig. 4).

Table 2. The effects on body weight and tumor growth of B16-F10 tumor-bearing mice.<sup>a</sup>

	Change in body weight (g±S.D)		Total tumor mass (g±S.D)	
	Pre-T.	Post-T.	Pre-T.	Post-T.
Control (positive)	7.8±2.3		6.19±3.8	
Control (negative)	1.3±0.3		0	
Oral	4.1±1.2	3.6±0.5	3.82±0.8	3.03±0.74
Intra peritoneal	5.6±1.8	1.9±0.7	4.01±1.3	1.479±0.5*

a Values are mean ± S.D. \* p<0.05 compared with positive control

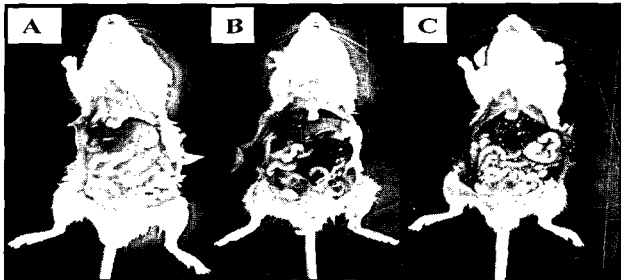


Fig. 4. Suppressive effect of Chaga mushroom water extract on the metastatic inoculation of B16 melanoma cells in vivo. Balb/c mice were introduced with B16-F10 murine melanoma cells and followed by the administration of Chaga extract either intraperitoneally (intraperitoneal : 20 mg/kg per day) or orally (oral : 200 mg/kg per day) for 10 days. Control mice were given with either 0.85% NaCl as a vehicle or tumor cells. Mice were sacrificed and the target organs of metastatic tumor were dissected to weight on day 15. A, negative control (vehicle); B, B16-F10 melanoma implantation only; C, intraperitoneally treated with Chaga extract (20 mg/kg per day).

## 고찰

최근 암 유도와 발전에 관여하는 다양한 기능적, 생물학적 변수들이 논의되고 있으며, 이러한 인자들의 대부분은 세포증식과 세포고사의 조절과 관계있거나, 혹은 이들이 세포성장인자와 그 수용체에 직접 작용하는 것으로 알려져 있다. 세포주기 조절 인자에 대한 다양한 연구 결과 세포주기의 장애가 암 발생의 중요한 과정이라고 밝혀졌으며 이 세포주기에 관여하는 여러 구성성분의 이상이 여러 형태의 인체 종양에서 보고되고 있다<sup>11,12,14</sup>). 또한 세포주기 조절에 관련된 cyclins, CDK 그리고 cyclin dependent kinase inhibitors의 발견과 이들에 관한 활발한 연구는 세포주기를 조절하는 분자생물학적 기전을 이해하는데 도움이 되었다. 특히, 암억제 유전자인 p53과 Rb는 세포주기 조절 단백질들과 밀접한 상호관계를 갖으면서 세포분열, 분화, 암발생, 세포고사 등의 다양한 현상을 조절한다<sup>9,15-17</sup>). Cyclin D1은 식도암, 두경부암, 간암, 유방암 등 많은 종양에서 발현이 증가되어 있으며<sup>12</sup>, cyclin D1/cdk4 복합체는 저인산화상태에서 세포주기

를 조절하고, 유전인자를 조절하는 핵단백질인 Rb를 인산화시킴으로서 pRb가 포함하고 있는 유전 전사인자인 E2F의 방출을 유발하여 세포주기가 S기 로 진행되도록 조절한다<sup>10</sup>).

흑색종의 발생과 증식은 유전자 결손이나 돌연변이 등 종양 억제 유전자의 불활성화가 관여하며, 최근 세포주기 조절 단백질을 생성하는 p53, pRb 등의 종양억제 유전자의 변이에 의한 세포주기 조절점 (check point)에서의 조절 능력 상실이 악성 흑색종의 발생 및 분화과정에 중요하다. 특히 세포주기의 조절에서 가장 중요한 단계는 G1/S 전환단계이며, 이 단계에서 다양한 cyclin과 cdk가 복합체를 이루고, 세포주기를 조절 한다<sup>12,18</sup>). 악성 흑색종을 이용한 세포주기 조절 및 관련 단백질 발현 변화, 흑색종 생성 억제에 대한 연구가 활발히 진행중이다<sup>10,19</sup>).

차가버섯은 여러 질병 치료에 오랫동안 사용하여 왔으나, 그 효능이나 추출방법이 다양하다<sup>2,4,20</sup>). 본 연구에서는 차가버섯 물 추출물로, 기존의 추출방식과는 달리 고온에서의 추출하여 실험에 사용하였는데, 황 등<sup>21</sup>이 고온 물 추출물로 대장암 HT-29 세포주에 대한 사멸효과를 보고하였다. 본 연구에서는 고온에서 추출한 차가버섯 처리시 B16-F10 세포독성은 농도 의존적으로 증가하였으며, 형태학적 변화 및 세포증식 억제 현상을 확인하였다. 또한 차가버섯 추출물은 G0/G1기의 세포주기 정지를 유도하였다. 이러한 결과는 세포주기 억제 유도 기전과 관련되어 보고된 많은 천연물의 사멸효과 기전과 유사한 기전임을 알 수 있었다<sup>20,21</sup>). 생리작용을 갖는 천연물의 작용 중 세포주기 조절에 관여하여 세포독성이 많이 알려져 있다. 황련 추출물인 berberine은 LNCap, DU145, PC-3 등의 다양한 암세포에서 G0/G1기 억제를 유도하여 세포독성을 보였다<sup>13</sup>). 또한 녹차는 HepG2 세포에서 농도 의존적으로 G2기를 억제하여 세포고사를 유도하였다<sup>6</sup>). 본 연구에 사용한 차가버섯 물 추출물의 경우에서도 유사하게 세포주기 조절에 관여하여 세포독성을 보임을 알 수 있었다. 특히 세포주기 조절에 관여하는 cyclin/cdk 복합체인 cyclin D1/cdk4과 cyclin E/cdk2 복합체의 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 그러나 G0/G1기의 조절인자인 p53, Rb 인자에 대한 확인이 요구 되어진다.

흑색종 B16-F10 세포주를 이용한 in vitro의 결과를 바탕으로 마우스를 이용해서 흑색종 생성 억제에 대한 차가버섯 추출물의 효능을 확인하였다. 복강 내로 주입된 B16-F10 세포주에 의해 생성된 흑색종에 대한 차가버섯 추출물의 억제 효과는 전처리 보다 후 처리시 뚜렷하게 억제되는 효과를 보였으며, 이러한 결과는 차가버섯의 효능이 생체내 면역체계 조절이나 생리작용에 의한 결과이기 보다 복강 내 주입에 의한 직접적인 세포 사멸 효과일 가능성을 제시하였다. 따라서 본 연구결과에 제시되진 않았으나 꼬리 정맥을 통한 B16-F10 세포 주입과 피하주입을 통한 흑색종 생성을 시도하였으나 유의한 결과는 얻지 못하였다. 그러나, 꼬리 정맥을 통해 주입된 B16-F10 세포는 허파 및 간에서 흑색종이 생성되었다.

이상의 결과를 종합하면, 흑색종 B16-F10 세포에 대한 차가버섯 물 추출물 처리는 농도 의존적으로 세포증식을 억제하였으며, 세포주기 조절 복합체인 cyclin D1/cdk4 와 cyclin E/cdk2

단백질의 발현 감소를 통하여 G0/G1기를 억제하였다. 또한 마우스 복강 내에 생성되는 흑색종은 차가버섯 물 추출물의 복강 내 투여로 현저히 감소되었으며, 이는 차가버섯 물 추출물의 다양한 세포주에 대한 사멸효과 및 기전 연구와 차가버섯의 성분 분석 등의 연구를 통해 항암치료제로의 가능성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

차가버섯 물 추출물에 대한 흑색종 B16-F10 세포주에 대한 생성억제 효과를 확인하고자, 세포생존을 변화와 형태적 변화, 세포주기에 미치는 영향 그리고 조절단백질의 발현 변화를 조사하였다. 그 결과 B16-F10 세포에 차가버섯 추출물 처리시 농도 의존적으로 세포생존율이 감소하였으며, 차가버섯 추출물은 농도 의존적으로 G0/G1 세포주기를 억제하며, 이는 세포주기 조절 단백질인 cyclin D1, cdk4, cyclin E 및 cdk2 농도의존적인 발현감소에 의함을 확인하였다. 또한 in vitro 결과를 바탕으로 동물 모델 (in vivo)을 이용하여 복강 내에 주입한 B16-F10 세포주의 흑색종 생성변화를 확인한 결과, 차가버섯 추출물은 복강 내 후 처리시 흑색종 생성을 뚜렷하게 억제하였으며, 이러한 결과는 차가버섯 물 추출물의 흑색종 생성 억제와 치료에 적용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

## 감사의 글

본 연구는 원광대학교 2007년 교내연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

## 참고문헌

- Bae, J., Jang, K., Yim, H., Jin, H. Polysaccharide isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. *Cancer Letter* 218:43-52, 2005.
- Hwang, Y.J., Noh, G.W., Kim, S.H. Effect of *Inonotus Obliquus* extract on proliferation and caspase-3 activity in human gastro-intestinal cancer cell lines. *Korean J Nutr.* 36(1):18-23, 2003.
- Kwang, W.H., Jeong, S.C., Lee, D.H., Park, J.S., Lee, J.S. Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the medicinal mushroom, *Inonotus obliquus*. *Peptides* 27:1173-1178, 2006.
- Kahlos, K. Antifungal activity of cysteine, its effect on C-21 oxygenated lanosterol derivatives and other lipid in *Inonotus obliquus*, in vitro. *Applied Microbiology and Biotechnology* 3:339-385, 1994.
- Lukas J., Aagaar L., Strauss M., Barteek J. Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control. *Cancer Res.* 55: 4818-4823, 1995.
- Pardee, A.B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science.* 246:603-608, 1989.
- Pines and Hunter T. Human cyclin A is adenovirus E1A associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 346:760-763, 1990.
- Milde-Langosch, K., Riethdorf, S. Role of cell-cycle regulatory protein in Gynecological cancer. *J. Cell Physiol.* 196:224-244, 2003.
- Park, S.H., Kim, Y.T., Kim, J.W., Kim, J.H., Kim, S.H., Yoon, B.S. et al. Correlation between SCC antigen and the prognosis of cervical cancer patients following concurrent. *Korean J Gynecol Oncol* 16:123-132, 2005.
- Saida, T. Recent advances in melanoma research. *J. Dermatol Sci.* 26:1-13, 2001.
- Cordan-Cardo, C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol.* 147:545-560, 1995.
- Buckley, M.F., Sweeny, K.J., Hamilton, J.A. Expression and amplification of cyclin genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 196:1010-1016, 1993.
- Elledge, S.J. Cell cycle checkpoints : preventing an identity crisis. *Science* 274:1664-1672, 1996.
- Lee, M.H., Yang, H.Y. Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci* 58:1907-1922, 2001.
- Kang, G.C., Park, U.S., Park, Y.G., Chi, K.C., Lee, J.H., Chang, I.T., Park, S.I. The influence of expressions of cyclin B1 and D1 on Clinicopathologic Prognostic factors and survival rate in gastric cancer. *J Korean Surg Soc.* 67:25-30, 2004.
- Sherr, C.J. Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-1677, 1996.
- Zhu, L., Skoultchi, A.I. Coordinating cell proliferation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 11:91-97, 2001.
- Sanchz and Dynlacht. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16:311-321, 2005.
- Kim, Y.O., Park, H.W., Kim, J.H., Lee, J.Y., Moon, S.H., Shin, C.S. Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. *Life Science* 79:72-80, 2006.
- Mantena, S.K., Sharma, S.D., Katiyar, S.K. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 5(20):296-308, 2006.
- Jia, X.D., Han, C., Chen, J.S. Tea pigments induces cell-cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *World J Gastroenterology* 11(34):5273-5276, 2005.