

A549 인체폐암세포의 증식에 미치는 신령버섯 추출물의 영향에 관한 연구

최우영^{1,2} · 박 철¹ · 이재운³ · 김기영⁴ · 박영민⁴ · 정영기⁵ · 이원호² · 최영현^{1*}

¹동의대학교 한의과대학 생화학교실, ²부산대학교 생물학과
³(주)청원농산, ⁴부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학교실
⁵동의대학교 미생물학과

Anti-proliferative Effects of Water Extract of *Agaricus blazei* Murill in Human Lung Cancer Cell Line A549

Woo Young Choi^{1,2}, Cheol Park¹, Jae-Yun Lee³, Gi-Young Kim⁴, Yeong Min Park⁴,
Yong-Kee Jeong⁵, Won Ho Lee² and Yung Hyun Choi^{1*}

¹Dept. of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea

²Dept. of Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

³Cheongweon Industrial Farm, Gimhae 621-843, Korea

⁴Dept. of Microbiology and Immunology, Pusan National University College of Medicine,
Busan 602-739, Korea

⁵Dept. of Microbiology, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

Abstract

Agaricus blazei Murill is a medicinal mushroom native to Brazil. It used to be a source of antitumor and immunoactive compounds and considered a health food in many countries. In the present study, it was examined the effects of water extract of *A. blazei* (WEAB) on the growth of human lung carcinoma cell line A549 in order to investigate the anti-proliferative mechanism by WEAB. Treatment of A549 cells to WEAB resulted in the growth inhibition, morphological change and induction of apoptotic cell death in a dose-dependent manner as measured by MTT assay and flow cytometric analysis. Flow cytometric analysis revealed that WEAB caused G2/M phase arrest of the cell cycle, which was associated with a down-regulation of cyclin A in both transcriptional and translational levels. WEAB treatment induced a marked up-regulation of cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21, however, the levels of Cdk2, Cdc2, Wee1, Cdc25C and p53 expression were remained unchanged in WEAB treated cells. In addition, WEAB treatment inhibited the levels of cyclooxygenase (COX)-2 mRNA and protein without alteration of COX-1 expression. Taken together, these findings suggest that WEAB may be a potential chemotherapeutic agent for the control of human lung carcinoma cells and further studies will be needed to identify the active compounds that confer the anti-cancer activity of WEAB. Once such compounds are identified, the mechanisms by which they exert their effects can begin to be characterized.

Key words: *Agaricus blazei* Murill, G2/M arrest, apoptosis, p21

서 론

고등 균류에 속하는 버섯은 각종 영양소를 다양하게 함유하고 있어 오래전부터 식용 및 민간전통 약재 등으로 친숙하게 사용되어져 왔다. 버섯류가 생산하는 각종 기능성 생리활성물질은 부작용이 적어 독성면에서는 안전하며 면역기능 강화 및 항암효과가 탁월하다는 연구가 최근 국내·외 연구자들에 의하여 많이 밝혀지고 있다. 최근 국내의 일부 지역에서 재배되기 시작한 신령버섯(*Agaricus blazei* Murill)은 생물 분류학상으로 균계, 진균문, 담자균아문, 주름버섯목, 주름버섯과의 주름버섯속에 속하며, 양송이와 같은 속으로, 송

이버섯, 팽이버섯, 느타리버섯과 같은 목에 속하는 버섯으로써 면역증강 활성물질이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(1).

신령버섯은 1940년대 초반에 미국에서 처음 발견되었으며, 본포 지역은 미국의 플로리다와 중남미의 중원지대에 자생되는 버섯으로 알려져 있으며 국내에서 자생되지는 않는다(1). 현재는 일본과 브라질에서 다량의 재배가 이루어지고 있는 버섯으로 매우 고가의 버섯 중 하나이며 우리나라에서도 아직은 소규모지만 재배를 하고 있다. 또한 많은 연구가 일본이나 중국의 학자들에 의해서 이루어지고 있으며, 특히 일본의 학자들은 중남미의 잉카지역 주민들이 암 관련 질환

*Corresponding author. E-mail: choiyh@deu.ac.kr
Phone: 82-51-850-8649. Fax: 82-51-853-4036

이나 각종 생활습관병 환자가 적으며 장수하는 사람이 유난히 많다는 점에 주목하고, 이 지역 주민들의 장수 원인에 대한 비밀을 연구하였는데, 그 원인이 지역주민들이 즐겨 식용하는 버섯에 있음을 밝혀내게 되었다(2-4). 현재까지 실험적으로 확인된 신령버섯의 주요 효과로는 항종양, 면역증강, 항염작용, 혈당강화작용, 강심작용, 혈압강화작용, 콜레스테롤저하 작용, 치매개선 효과, 비만억제 효과, 고혈압, 고지혈증 등의 다양한 성인병 개선 및 미용 효과가 있는 것으로 연구 발표되고 있으며(5-9), 건강보조식품으로도 각광을 받고 있어서 앞으로 더욱 더 많은 관심을 야기시킬 것으로 생각된다.

한편 세포의 증식과 암의 발생 측면에서 세포주기 조절의 교란에 의하여 세포가 끊임없이 증식되는 것을 암세포라고 할 수 있다(10,11). 세포주기에 관한 개념은 20세기 이전에 광학 현미경의 관찰을 통한 간기세포와 유사분열기 세포들의 구별이 가능해진 후, 1950년대에 Swift 및 Howard에 의해 G1, S, G2 및 M기에 대한 정의가 내려지면서 성립되었다(12). 그 후 생화학 및 분자생물학적 실험방법들의 성장과 더불어 1983년 세포주기조절의 양성인자라 할 수 있는 cyclin 및 이들과 복합체를 이루는 cyclin-dependent kinase(Cdk)들이 동정되었으며, 많은 선형 연구자들은 cyclin/Cdk 복합체의 형성과 연관된 인산화 및 단백질 분해 과정 등의 연구를 통해서 이들이 전 세포주기에 걸쳐 매우 다양하게 존재한다는 것을 발견해 내었다(10,11,13). 세포가 G1기로 접어들면서 D-type cyclin의 발현이 증가되어 Cdk4 및 Cdk6와 복합체를 형성하면서 G1기 조절을 담당하며(14,15), G1기 후반에는 cyclin E, S기를 포함한 G2/M기 진행은 cyclin A의 발현에 따른 cyclin B의 발현이 증가되어 각각 Cdk2 및 Cdc2 등과의 결합을 이루어서 각 세포주기 진행이 원활하게 수행되도록 한다(14-17). 그리고 Cdks는 다양한 세포증식 억제 신호들에 의해 유도되는 Cdk inhibitor에 의하여 그 활성이 억제될 수 있는데, 현재까지 밝혀진 Cdk inhibitor는 두 가지의 family로 분류(INK4 및 CIP/KIP family)되고 있다(18,19). G1기 arrest 유발에 대부분 관여하는 INK4 family에 비하여 Cdk2와 결합하면서 그들의 활성을 저해하는 것으로 처음 알려진 CIP/KIP family에 속하는 p21은 세포주기 전체에 걸친 음성 조절인자로서 작용을 하며, p27 역시 G1기뿐만 아니라 G2/M기의 진행을 선택적으로 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다(19,20). 이러한 세포분열에 의한 증식의 조절은 세포주기 조절관련 유전자들 외에도 다양한 유전자 산물들의 상호작용이 관여할 수 있으며, 특정 물질의 항암성 기전 해석 및 항암제 개발을 위해서는 세포주기 조절 및 세포성장과 연관된 유전자들의 발현 정도를 정확하게 평가하는 것이 가장 기초적인 과정으로 인식되어지고 있다.

본 연구에서는 아직까지 정확한 항암기전 해석이 이루어지고 있지 않은 신령버섯 추출물의 암세포 증식억제 기전 해석을 위하여 인체 암세포의 증식에 미치는 신령버섯 수용성 추출물(water extracted *A. blazei* Murill, WEAB)의 영향을

조사하였다. 이를 위하여 인체 폐암세포 A549의 성장에 미치는 WEAB의 영향을 조사하였으며, 암세포의 세포주기 분포도에 미치는 WEAB의 영향 및 몇 가지 중요한 세포주기 조절인자의 발현에 미치는 WEAB의 영향을 조사하였다. 아울러 최근 중요성이 재확인되고 있는 염증발현 및 세포의 성장 조절에 중요한 조절인자인 cyclooxygenase(COX)의 발현과 세포분열 가능 횟수 조절에 결정적으로 기여하는 염색체 말단의 telomere 길이 조절관련 유전자 산물의 발현에 미치는 WEAB의 영향들을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 세포배양

본 실험에 사용된 신령버섯(*Agaricus blazei* Murill)은 김해시 소재 청원농산에서 제공받았으며, 100 g을 1,000 mL의 증류수에 3시간 이상 끓인 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심분리시켜 침전물을 제거하였다. 이를 다시 0.45 μ m의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 수용성분(water extracted *A. blazei* Murill, WEAB)을 동결 건조하여 사용하였다. A549 인체 폐암세포는 생명공학연구소(KRIBB, Daejeon, Korea)에서 분양 받았으며, 세포의 배양을 위해 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 10%의 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL)과 1%의 penicillin-streptomycin(Gibco BRL) 등이 포함된 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였고, 배지는 매 48시간마다 교환해주었고, 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.05% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA, Gibco BRL)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 적정한 수의 세포를 분주하여 재배양하였다.

MTT assay를 이용한 세포 성장률의 측정

세포 배양용 6 well plate에 인체 폐암세포를 6×10^4 개/mL로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 WEAB를 배지에 희석하여 각 well 당 1~5 mg/mL의 농도로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt(MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/mL 농도가 되게 성장배지로 희석하여 2 mL씩 분주하고 3시간 동안 CO₂ incubator에서 배양시킨 다음 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 dimethylsulfoxide(DMSO, Amresco)를 1 mL씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well에 200 μ L씩 옮겨서 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3번의 측정값을 평균값과 표준 오차를 Microsoft Excel program을 이용하여 분석하여 그래프로 나타내었다.

위상차 현미경을 이용한 세포 성장과 형태의 관찰

세포 배양용 100-mm petri dishes에 3.5×10^5 개/mL의 정도로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후 WEAB를 배지에

회석하여 1~5 mg/mL의 각각의 농도로 처리한 후 48시간 동안 배양시켰다. 48시간 후에 위상차 현미경을 이용하여 200 배의 배율로 세포 형태를 비교하였다

Flow cytometry에 의한 세포 주기의 분석

정상 및 WEAB를 처리한 배지에서 48시간 동안 배양시킨 암세포를 phosphate-buffered saline(PBS)으로 씻어 내고 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 세포만 취하였다. 여기에 다시 PBS를 첨가하여 충분히 씻은 다음 1,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액만 버리고 남은 세포에 0.5 mL의 PBS로 잘 부유시키고, 차가운 ethanol 0.5 mL를 첨가하여 4°C에서 한 시간 동안 고정시켰다. 5×10^6 개의 고정된 세포를 원추형 vial에 넣어서 1,000 rpm으로 수 분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 1% bovine serum albumin(BSA, Sigma, St. Louis, Mo, USA)이 함유된 PBS로 두 번에서 세 번 가량 수세과정을 거친 후 다시 수 분간 원심 분리하였다. 세포 침전물에 1% BSA가 들어간 PBS 0.8 mL로 부유시키고 DNA intercalating dye인 propidium iodide (PI, concentration, 50 µg/mL; Sigma)와 10 knuit의 RNase (Sigma)를 처리하여 암실(4°C)에서 1시간 동안 염색과정을 거쳤다. PBS로 두 번 수세 과정을 거친 후, 부유액을 만들고, 35 µm pore size의 nylon mesh에 부유액을 pipette으로 통과시켜 단일세포로 분리시킨 후 flow cytometry(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT(Becton Dickinson) program을 사용하여 분석하였다.

Western blotting에 의한 단백질 발현의 분석

정상 및 WEAB가 처리된 배지에서 48시간 자란 세포들을 모아 적정량의 lysis buffer[25 mM Tris-Cl(pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 5 mM dithiothreitol(DTT)]를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 14,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 그 사용방법에 따라 정량한 다음 동량의 Laemmli sample buffer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 섞어서 sample을 완성한 후, 분석하고자 하는 단백질의 분자량에 따라서 각각 다른 %의 sodium dodecyl sulphate(SDS)-polyacrylamide gel에서 전기영동법을 이용하여 분리하였다. 분리된 gel을 nitrocellulose membrane(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 2~3시간 가량 전이시켰다. 그 후 membrane의 비특이적 단백질에 대한 blocking을 위해 10% skin milk를 함유한 PBS-T(0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 1시간 처리하고 PBS-T로 15분(5분씩 나누어 3번)정도 수세하였다. 준비된 membrane에 각각의 항체를 처리하여 4°C에서 1시간 이상 반응시킨 다음

PBS-T로 수회 수세과정을 거쳤다. 그 후, 처리된 1차 항체에 대응하는 2차 항체(PBS-T로 1:1000으로 희석하여 사용)를 처리하고 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 PBS-T로 10분간 3번, 5분간 3번의 washing을 하고 enhanced chemiluminescence(ECL) 용액(Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 처리한 다음 암실에서 Kodak X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 양을 분석하였다.

RT-PCR에 의한 mRNA 발현의 분석

동일 조건에서 준비된 세포에 TRIzol reagent(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 4°C에서 1시간 동안 처리하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 spectrometer를 이용하여 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase(RT)를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 만들어진 RT product(template cDNA)에 2.5 mM dNTP, 10×buffer, DEPC water, premixed primer(Geno-Tech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 Mastercycler gradient(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)로 증폭하였다(Table 1). 이때 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자를 housekeeping gene으로서 internal control로 사용하였다. 각 PCR product의 양적인 차이를 확인하기 위하여 1×TAE buffer로 1% agarose gel을 만든 후 각 well에 PCR product와 DNA gel loading solution(5x, Quality Biological Inc., Gaithersburg, MD, USA)을 섞어서 loading한 후 100 V에서 전기 영동하였다. 분리가 끝난 gel을 ethidium bromide(EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하고 Picture works photo enhancer program을 이용하여 촬영하였다.

결과 및 고찰

신령버섯 추출물(WEAB)이 인체 폐암 세포의 생존율 및 형태에 미치는 영향

인체 폐암 세포 A549의 생존율에 미치는 WEAB의 영향을 알아보기 위하여 실시된 MTT assay에 의한 실험결과는 Fig. 1에서 나타난 바와 같다. 정상배지에서 배양된 세포들에 비하여 WEAB 처리 농도가 증가함에 따라 세포의 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었는데, 2 mg/mL 처리군에서 생존율이 이미 50% 정도로 감소되었으며 최고 농도인 5 mg/mL에서는 20% 정도까지 저하되었다. 즉 WEAB가 적정 농도 이상 처리된 배지에서 자란 암세포는 WEAB 처리 농도의 의존적으로 세포증식이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다. 이러한 생존율 저하 경향성은 trypan blue 염색에 의한 결과와도 유사하였다(데이터 미제시).

다음은 WEAB 처리에 따른 A549 암세포의 처리 농도의존적인 증식 억제와 연관된 암세포의 전체적인 형태 변화를 알아보기 위하여 WEAB를 각 농도별로 처리하여 48시간

Table 1. Sequences of primers used for RT-PCR

	Primer	Sequence	
		5'	3'
GAPDH	Sense	CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT	
	Antisense	AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC	
Cyclin B1	Sense	AAG AGC TTT AAA CTT TGG TCT GGG	
	Antisense	CTT TGT AAG TCC TTG ATT TAC CAT G	
Cyclin A	Sense	TCC AAG AGG ACC AGG AGA ATA TCA	
	Antisense	TCC TCA TGG TAG TCT GGT ACT TCA	
Cyclin E	Sense	AGT TCT CGG CTC GCT CCA GGA AGA	
	Antisense	TCT TGT GTC GCC ATA TAC CGG TCA	
Cdc2	Sense	GGG GAT TCA GAA ATT GAT CA	
	Antisense	TGT CAG AAA GCT ACA TCT TC	
Cdk2	Sense	GCT TTC TGC CAT TCT CAT CG	
	Antisense	GTC CCC AGA GTC CGA AAG AT	
p53	Sense	GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC	
	Antisense	CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG	
p21	Sense	CTC AGA GGA GGC GCC ATG	
	Antisense	GGG CGG ATT AGG GCT TCC	
p27	Sense	AAG CAC TGC CGG GAT ATG GA	
	Antisense	AAC CCA GCC TGA TTG TCT GAC	
COX-1	Sense	TGC CCA GCT CCT GGC CCG CCG CTT	
	Antisense	GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC TTC	
COX-2	Sense	TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA AT	
	Antisense	AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT	
hTERT	Sense	AGC CAG TCT CAC CTT CAA CC	
	Antisense	GTT CTT CCA AAC TTG CTG ATG	
hTR	Sense	TCT AAC CCT AAC TGA GAA GGG CGT AG	
	Antisense	GTT TGC TCT AGA ATG AAC GGT GGA AG	
TEP-1	Sense	TCA AGC CAA ACC TGA ATC TGA G	
	Antisense	CCC CGA GTG AAT CTT TCT ACG C	
c-myc	Sense	AAG ACT CCA GCG CCT TCT CTC	
	Antisense	GTT TTC CAA CTC CGG GAT CTG	
Sp1	Sense	ACA GGT GAG VTT GAC CTC AC	
	Antisense	GTT GGT TTG CAC CTG GTA TG	

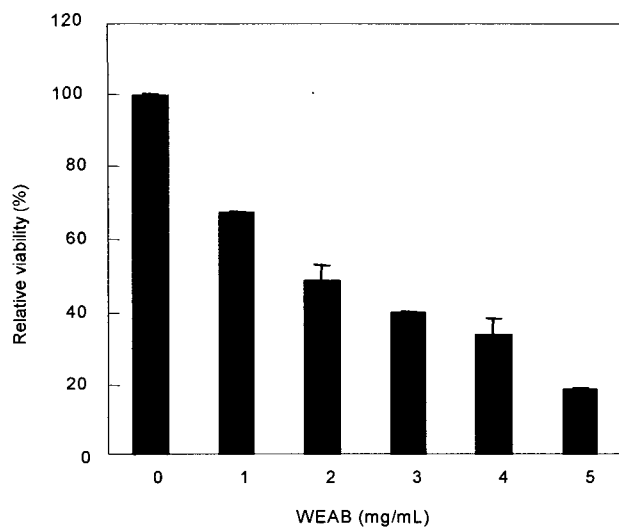


Fig. 1. Anti-proliferative effects of water extract of *Agaricus blazei* Murill (WEAB) treatment in A549 human carcinoma cells.

Cells were treated with various concentrations of WEAB. After 48 h incubation with WEAB, MTT assay was performed. Results are expressed as average from two separate experiments.

동안 배양한 후 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 WEAB의 처리농도가 증가할수록 세포의 밀도가 감소되면서 길고 분지를 형성하는 듯한 dendrite-like한 구조로 바뀌었으며, 부착력을 상실하고 배지 위로 부유되는 경향성이 증가함을 알 수 있었다. 이는 인체 폐암 세포에 WEAB의 처리 농도 의존적인 형태적 변화와 밀도의 감소는 WEAB 처리에 따른 생존율 감소와 성장 억제에 부합되는 결과였다.

세포주기 진행에 미치는 신령버섯 추출물(WEAB)의 영향
세포주기의 조절은 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 양성 조절인자인 cyclins에 의하여 Cdk의 연속적인 활성화와 불활성이 결정되어진다(9,10). 세포주기 조절의 관점에서 암세포는 세포주기의 비정상화에 기인된 질병으로 정의될 수 있으며, 특정 시기의 세포주기 억제는 세포주기 조절 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과발현에 의한 것으로 요약될 수 있다. 따라서 WEAB의 처리에 의한 인체 폐암세포의 생존율 감소에 따른 증식 억제가

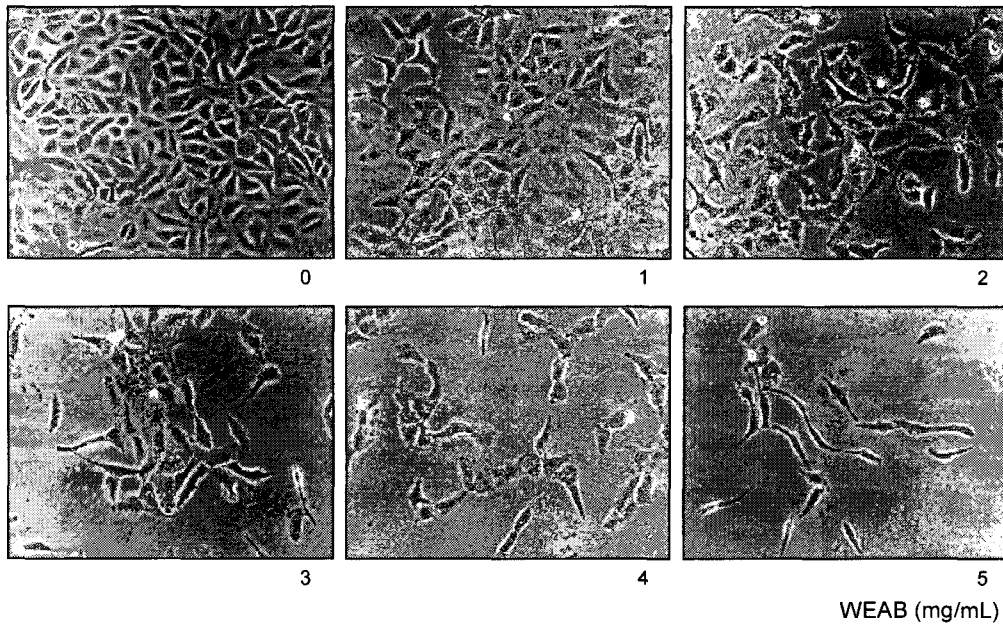


Fig. 2. Morphological changes of A549 human lung carcinoma cells following incubation with WEAB. Exponentially growing cells were incubated with WEAB for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

세포주기 진행과 어떤 연관성이 있는지를 먼저 조사하였다. 이를 위하여 각 농도별로 WEAB를 48시간 처리한 후 PI 염색 후 flow cytometry 분석을 실시하였으며, 각 시기별 histogram의 빈도를 Table 2에 나타내었다.

Table 2의 결과에서 알 수 있듯이 WEAB가 처리되지 않은 정상 배지에서 배양된 세포의 경우 G1기에 해당되는 빈도는 약 65.3% 정도였으며, S기 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 각각 17% 및 15.5% 정도였다. 그리고 apoptosis의 빈도를 의미하는 sub-G1기에 해당되는 빈도는 2.6% 정도였다. 그러나 WEAB의 처리 농도가 증가할수록 G1기에 해당되는 세포의 빈도는 매우 감소되었으며, G2/M기 및 sub-G1기에 해당되는 빈도는 상대적으로 증가되었음을 알 수 있었다. 그리고 sub-G1기를 제외한 나머지 세포군을 고려해 볼 때, WEAB 처리 농도의 증가에 따른 암세포의 증식 억제에는 S기의 부분적 증가 및 특히 G2/M arrest와 직접적인 연관성이 있음을 알 수 있었다. 또한 3 mg/mL 처리군에서 apoptosis가 유발된 세포의 빈도는 정상 배지에서 자란 세포들에 비하여 약 7배 정도 증가되었으며, 5 mg/mL 처리군에

서는 약 10배 정도 증가되어 WEAB 처리에 따른 암세포의 증식 억제는 apoptosis 유발과도 밀접한 연관성이 있음을 알 수 있었다.

Cyclins의 발현에 미치는 신령버섯 추출물(WEAB)의 영향

이상의 결과에서 A549 인체 폐암세포의 증식억제는 G2/M arrest와 연관된 apoptosis 유발과 직접적인 관련이 있음을 알 수 있었다. 따라서 WEAB 처리에 따른 암세포 증식 억제기전 해석을 위하여 G2/M기의 조절과 관련이 있는 cyclin A와 cyclin B1의 발현에 미치는 WEAB의 영향을 먼저 조사하였다(22,23). 이를 위하여 해당 유전자의 primer 및 항체를 이용하여 RT-PCR 및 Western blot 분석으로 전사 및 번역 수준에서의 발현 변화를 조사하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 전사 및 단백질 발현 수준에서 WEAB 처리에 의하여 처리 농도 의존적으로 cyclin A의 발현은 모두 감소하였으나 cyclin B1은 큰 변화가 없었다. 그리고 세포주기 분석의 결과, 고농도의 WEAB 처리군에서 S기에 속하는 빈도도 상대적으로 다소 증가되었으나 S기의 진행에 중요한 cyclin E(16,17)의 발현에는 WEAB가 큰 영향을 미치지 못하였다. 따라서 세포주기 양성 조절인자인 cyclin의 발현조절의 측면에서 WEAB 처리에 의한 A549 세포의 증식억제는 cyclin A의 선택적 발현 억제와 연관성이 있음을 알 수 있었다.

Cdks, Wee1 및 Cdc25C의 발현에 미치는 신령버섯 추출물(WEAB)의 영향

많은 선행 연구들에 의하여 다양한 cyclin들은 특정한 Cdks와 선택적 결합을 통한 cyclin/Cdk 복합체를 형성하여 세포 주기의 진행을 조절한다고 알려져 있다(18). 특히 Cdk2

Table 2. Fractions of each cell cycle phase of human lung carcinoma cell line A549 cultured in the presence or absence of various concentrations of WEAB. Each phase was analyzed by flow cytometry after 48 h treatment with WEAB

WEAB (mg/mL)	% of cell			
	Sub G1	G1	S	G2/M
0 (control)	2.59	65.29	16.99	15.52
1	3.87	63.09	18.76	14.89
2	18.63	59.93	13.34	8.46
3	21.16	53.21	8.04	17.77
4	29.62	30.67	14.85	25.05
5	38.84	16.42	21.33	23.68

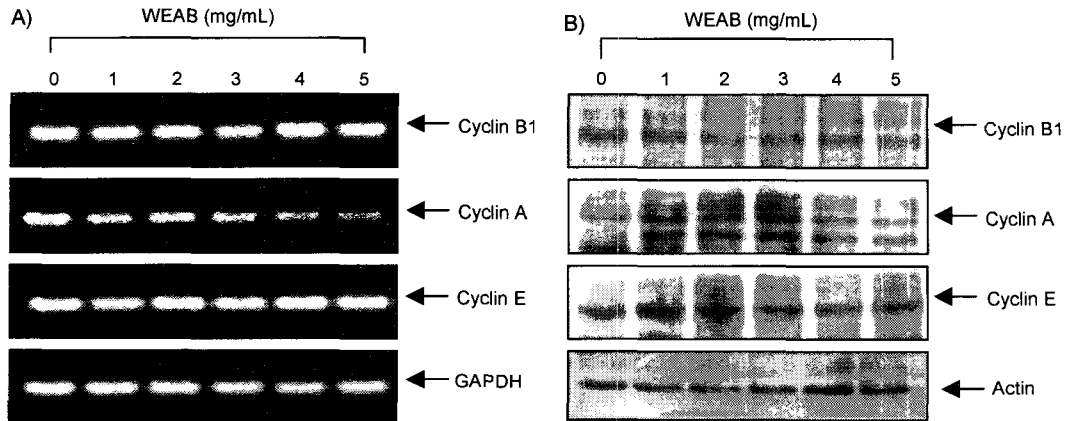


Fig. 3. Effects of WEAB treatment on the levels of cyclins in A549 human lung carcinoma cells.

(A) After 48 h incubation with WEAB, total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with various concentrations of WEAB for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

는 cyclin A와 결합하여 G2기 진행에 중요한 역할을 하고, Cdc2는 cyclin B1과 결합하여 핵막의 histone H1과 lamin의 인산화에 의해 kinase 활성이 증가하여 핵막의 붕괴 및 chromosome의 재배열을 유발시켜 M기의 진행을 유도한다(18, 22, 23). 따라서 G2/M기 조절과 관련된 cyclin A 및 cyclin B1과 선택적으로 결합을 하는 Cdk2 및 Cdc2의 발현에 미치는 WEAB의 영향을 조사하였다. Fig. 4A와 B에서와 같이 Cdk2의 경우 단백질 수준에서 약간 증가하는 경향을 보였지만 전반적으로 전사수준 및 단백질 발현 모두에서 유의적인 발현의 변화가 관찰되지 않았다.

한편 Cdc2의 활성 조절과 연관된 인자인 Wee1 단백질은 Cdk2의 활성을 감소시켜 균형을 이루도록 하며, Cdc25C는 탈인산화 효소기능을 가지는 단백질로서 Cdc2를 탈인산화하여 활성화시키는 중요한 역할을 수행한다. 즉 Cdc25C가 인산화되면 더 이상 Cdc2를 탈인산화/활성화 할 수 없게 된다. 그 결과 Cdc2의 불활성화로 세포는 G2기에서 M기로 진행할 수 없다고 알려져 있다(9, 24). 따라서 Wee1과 Cdc25c의 발현에 미치는 WEAB의 영향을 조사해본 결과는 Fig. 4C와

같으며, Cdc25C가 WEAB 처리 농도 의존적으로 약간 증가하였지만 있듯이 두 유전자 산물의 발현에 WEAB의 처리가 큰 영향을 주지 못하였음을 알 수 있었다.

Cdk inhibitor의 발현에 미치는 신령버섯 추출물(WEAB)의 영향

Cyclin과는 달리 Cdk inhibitor는 특정 Cdk와의 결합을 통하여 그들의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데(18, 21), 특히 Cdk inhibitor의 CIP/KIP군에 속하는 p21은 종양 억제 유전자인 p53에 의하여 활성화되어 G1기 뿐만 아니라 G2/M기의 진행 억제에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(25, 26). p21의 활성화에는 p53이 관여하는 것이 일반적이지만 세포주나 신호전달 유발 인자의 종류에 따라 p53 비의존적인 경로를 통하여 p21이 활성화될 수도 있다(27-31). 비록 대부분의 DNA damaging agent에 의한 세포주기 G2/M arrest 유발에는 p21이 많이 관여하는 것으로 알려져 있지만, p27도 G2/M기 조절에 있어서 중요한 역할을 할 수 있는 것으로 알려져 있다(29, 31-34). 따라서 WEAB의 처리에 의한

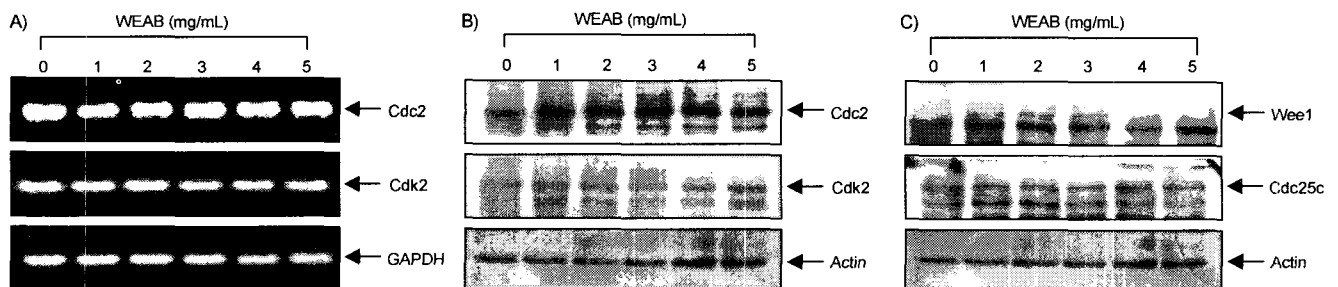


Fig. 4. Effects of WEAB treatment on the levels of Cdks, Wee1 and Cdc25C expression in A549 human lung carcinoma cells.

(A) After 48 h incubation with WEAB, total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using Cdk2 and Cdc2 primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B and C) A549 cells were incubated with various concentrations of WEAB for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system.

인체 폐암세포의 G2/M arrest 유발에 종양 억제 유전자 p53 및 p21 그리고 p27과 같은 Cdk inhibitor 들의 관련 여부를 조사하였으며 그 결과는 Fig. 5에 나타낸 바와 같다. Fig. 5에서 알 수 있듯이 p53(인산화 여부 포함)과 p27은 전사수준과 단백질 수준 모두에서 WEAB 처리에 따른 발현 변화가 관찰되지 않았으나, p21은 전사 및 번역 수준에서 모두 그 발현이 증가되었다. 이는 WEAB 처리에 의한 A549 폐암세포의 G2/M arrest에는 p21의 선택적 발현 증가가 관여하고 있으며, 이는 p53 비의존적인 경로를 통할 수 있음을 의미한다.

COXs의 발현에 미치는 신령버섯 추출물(WEAB)의 영향 한편 염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin 계열 물질들은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다(35,36). Prostaglandin의 합성에서 2가지의 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여한다. 반면 COX-2는 성장인자, cytokines, 종양 촉진인자들에 의해 자극에 의한 유도성 isoform으로서 COX-2의 활성화는 세포성장 촉진을 유발하고 apoptosis를 억제하며 세포의 유동성 및 부착성을 강화시키는 것으로 알려져 있다(36,37). 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 저해제에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다(35). 따라서 본 연구에서는 WEAB 처리에 의한 A549 인체 폐암세포의 증식억제가 COX-2의 선택적 발현 억제와 관련이 있는지의 여부를 조사하였다. 상기에서와 동일 조건에서 얻어진 암세포들을 대상으로 COX-1 및 COX-2의 발현에 미치는 WEAB의 영향을 조사한 결과, Fig. 6에서

알 수 있듯이 COX-1은 전사수준과 단백질 발현 양쪽에서 변화가 없었지만 COX-2는 전사수준과 단백질 발현 모두에서 WEAB의 처리의 농도 의존적으로 그 발현의 양이 점차 감소하였다. 따라서 WEAB 처리에 의한 암세포의 증식억제에는 COX-2의 선택적 발현 억제와 연관된 세포주기 교란 및 apoptosis의 유발과의 연관성을 알 수 있었으며, 이로 인한 prostaglandins의 합성 저해 작용이 있을 것으로 예상된다.

Telomere 조절관련 유전자의 발현에 미치는 신령버섯 추출물(WEAB)의 영향

Telomere는 모든 진핵세포의 염색체 말단에 존재하는 간단한 DNA 절편으로서 인간의 경우에는(TTAGGG)의 염기 서열이 계속 반복된 구조로 구성되어 있으며, 비정상적인 DNA 재조합을 억제하며 염색체가 핵막으로 부착되는 것을 돕고, mitotic clock으로서의 기능을 할 것이라는 사실이 밝혀짐에 따라 종양 형성의 이해와 그 예방에 이용될 가능성을 제시해 주고 있다(38,39). 정상 체세포에서는 telomere의 반복구조의 형성 및 유지에 관여하는 효소인 telomerase의 활성이 없거나 매우 낮기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90% 이상에서는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 human telomere reverse transcriptase(hTERT)가 과발현되어 있고 이로 인한 높은 telomerase의 활성을 나타내고 있다(39, 40). 또한 telomere의 손실은 p53의 발현과 세포주기 교란에도 관여를 하는 것으로 알려져 있다(41). 이러한 중요성을 고려하여 WEAB의 처리에 의한 폐암세포의 증식 억제가 폐암 세포 염색체 말단에 존재하는 telomere의 조절과 연관된 유전자의 발현에 어떠한 영향을 주는지를 조사하였다. 그러나 Fig. 7에서 나타낸 바와 같이 telomere 조절에 직접적으로 관여하는 인자들[hTERT, human telomerase RNA(hTR) 및

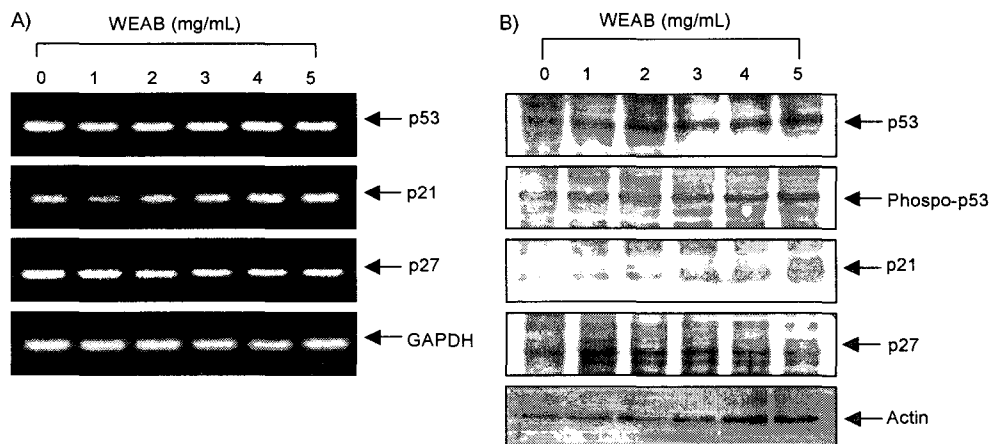


Fig. 5. Induction of Cdk inhibitor p21 expression by WEAB treatment in A549 human lung carcinoma cells.

(A) Cells were incubated with WEAB for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using indicated primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After 48 h incubation with WEAB, cells were lysed and cellular proteins were separated by 8 or 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.

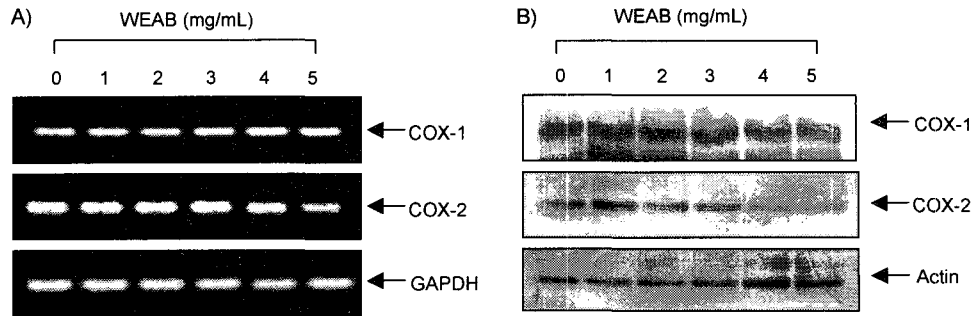


Fig. 6. Effects of WEAB on the levels of COXs expression in A549 human lung carcinoma cells.

(A) After 48 h treatment with WEAB, total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using COX-1 and COX-2 primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with WEAB for 48 h, and then lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with anti-COX-1 and anti-COX-2 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

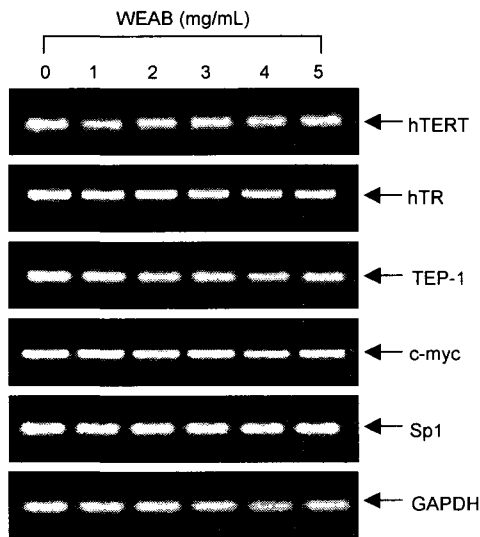


Fig. 7. Effects of WEAB on the levels of telomere regulatory genes in A549 human lung carcinoma cells.

Cells were treated with various concentrations of WEAB. After 48 h incubation, total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using indicated primers described. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

telomerase-associated protein(TEP1)]뿐만 아니라, hTERT의 promoter 영역의 조절인자에 해당하는 c-myc과 Sp1 등 (39,40,42)의 발현에도 큰 변화가 없었다. 따라서, WEAB의 처리에 의해 인체 폐암세포의 telomere 조절인자에는 큰 영향을 끼치지 않는다고 할 수 있지만, 좀 더 심도 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 신령버섯 수용액 추출물의 A549 인체 폐암세포에 대한 증식억제 효과는 세포주기 G2/M arrest를 통한 apoptosis 유발에 의한 것이었으며, 암세포의 증식 억제에는 cyclin A의 발현 감소, Cdk inhibitor p21의 발현 증가 및 COX-2의 선택적 저해 작용 등이 관여함을 알 수 있었다. 따라서 신령버섯 추출물의 항암기전을 완전히 이해하기 위해서는 추출물 각 조성 성분에 관한 보다 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이며, 신령버섯은 새로운 항암 및 암예방 식

의약 소재로서의 개발 가능성이 매우 높을 것으로 생각된다.

요 약

브라질 기원인 신령버섯(*A. blazei murill*)은 강력한 항암 및 면역강화 작용을 가진 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 신령버섯 수용성 추출물(water extracted *A. blazei* Murill, WEAB)이 A549 인체 폐암세포 증식에 미치는 영향을 조사하였으며, 증식억제와 연관된 기전 해석을 시도하였다. WEAB가 처리된 A549 세포는 처리 농도 의존적으로 생존율이 감소되었으며, WEAB 처리는 암세포의 다양한 형태적 변형을 유발하였다. Flow cytometry 분석 결과로서 WEAB 처리에 의한 A549 폐암세포의 증식억제는 세포주기 G2/M arrest 및 apoptosis 유발과 직접적으로 연관성이 있음을 알 수 있었다. WEAB가 처리된 암세포에서 전사 및 번역 수준에서 cyclin A 발현의 감소 및 Cdk inhibitor p21 발현의 증가 현상이 관찰되었으나, cyclin B1, Cdk2, Cdc2, Wee1, Cdc25C 및 p53 등의 발현에는 큰 변화가 관찰되지 못하였다. 또한 WEAB의 처리는 COX-2 선택적 발현 저하를 유발하였으나, telomere 조절 관련 유전자들의 발현에는 큰 영향을 주지 못하였다. 이상의 결과는 신령버섯 추출물이 강력한 항암 및 암예방 효능의 잠재력을 가지고 있음을 의미하며, 이에 관한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 농림부 농림기술개발사업(첨단기술 개발분야)의 연구비 지원에 의해 이루어진 결과의 일부분이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Ito H, Shimura H, Itoh M, Kaurode M. 1997. Antitumour effects of a new polysaccharideprotein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade Strain 101) Himem

- atsuke and its mechanisms in tumour-bearing mice. *Anti-cancer Res* 17: 277-284.
2. Ebina T, Fujimiya Y. 1998. *Agaricus blazei*. *Biotherapy* 11: 259-265.
 3. Mizuno TK. 1995. Bioactive biomolecules of mushrooms. food, function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Rev Int* 11: 7-21.
 4. Mizuno TK. 1995. *Agaricus blazei* Murill: medicinal and dietary effects. *Food Rev Int* 11: 167-172.
 5. Kuo YC, Huang YL, Chen CC, Lin YS, Chuang KA, Tsai WJ. 2002. Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. *Natl Res Inst Chin Med* 155: 176-187.
 6. Takaku T, Kimura Y, Okuda H. 2001. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *J Nutr* 131: 1409-1413.
 7. Guterrez ZR, Mantovani MS, Eira AF, Ribeiro LR, Jordao BQ. 2004. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murill *in vitro*. *Toxicol In Vitro* 18: 301-309.
 8. Bellini MF, Giacomini NL, Eira AF, Ribeiro LR, Mantovani MS. 2003. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicol In Vitro* 17: 465-469.
 9. Martins de Oliveira J, Jordao BQ, Ribeiro LR, Ferreira da Eira A, Mantovani MS. 2002. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells *in vitro*. *Food Chem Toxicol* 40: 1775-1780.
 10. Sherr CJ. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60: 3689-3695.
 11. Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330.
 12. Howard A, Pelc SR. 1953. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 6: 261.
 13. Minshull J, Pines J, Golsteyn R, Standart N, Mackie S, Colman A, Blow J, Ruderman JV, Wu M, Hunt T. 1989. The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci* 12 (Suppl): 77-97.
 14. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. 1994. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14: 2066-2076.
 15. Meyerson M, Harlow E. 1994. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14: 2077-2086.
 16. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM. 1992. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257: 1689-1694.
 17. Ohtsuda M, Roberts JM. 1993. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259: 1908-1912.
 18. Elledge SJ, Harper JW. 1994. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol* 6: 847-852.
 19. Morgan DO. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131-134.
 20. Gu Y, Truck CW, Morgan DO. 1993. Inhibition of CDK2 activity *in vivo* by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366: 707-710.
 21. Harper JW. 1997. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* 29: 91-107.
 22. Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ. 1991. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 67: 1169-1179.
 23. Guadagno TM, Ohtsubo M, Roberts JM, Assoian RK. 1993. A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science* 262: 1572-1575.
 24. Bulavin DV, Amundson SA, Fornace AJ. 2002. p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. *Curr Opin Genet Dev* 12: 92-97.
 25. Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, Xiong Y. 1994. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 9: 2261-2268.
 26. Taylor WR, Stark GR. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20: 1803-1815.
 27. Datto MB, Yu Y, Wang XF. 1995. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* 270: 28623-28628.
 28. Jiang H, Lin J, Su ZZ, Collart FR, Huberman E, Fisher PB. 1994. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* 9: 3397-3406.
 29. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366: 701-704.
 30. Zeng YX, El-Deiry WS. 1996. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* 12: 1557-1564.
 31. Choi YH, Lee WH, Park KY, Zhang L. 2000. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 91: 164-173.
 32. Dulic V, Stein GH, Far DF, Reed SI. 1998. Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol* 18: 546-557.
 33. Tchou WW, Rom WN, Tchou-Wong KM. 1996. Novel form of p21 (WAF1/CIP1/SDII) protein in phorbol ester-induced G2/M arrest. *J Biol Chem* 271: 29556-29560.
 34. Musgrove EA, Davison EA, Ormandy CJ. 2004. Role of the CDK inhibitor p27 (Kip1) in mammary development and carcinogenesis: Insights from knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9: 55-66.
 35. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat Res* 480-481: 243-268.
 36. Wang D, Dubois RN. 2004. Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer. *Semin Oncol* 31: 64-73.
 37. Yang C, Stephen MP. 2002. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 190: 279-286.
 38. Mathieu N, Pirzio L, Freulet-Marriere MA, Desmazes C, Sabatier L. 2004. Telomeres and chromosomal instability. *Cell Mol Life Sci* 61: 641-656.
 39. Rezler EM, Bearss DJ, Hurley LH. 2002. Telomeres and telomerases as drug targets. *Curr Opin Pharmacol* 2: 415-423.
 40. Cong YS, Wright WE, Shay JW. 2002. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 407-425.
 41. Homyoun V, Sam B. 1996. From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: The telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol* 31: 295-301.
 42. Horikawa I, Barrett JC. 2003. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* 24: 1167-1176.