

동충하초 추출물에 의한 U937 인체 백혈병 세포의 성장억제 효과

홍상훈* · 박동일 · 서상호 · 최영현¹

동의대학교 한의과대학 내과학교실, 1: 생화학교실 및 한방바이오연구센터

Anti-proliferative Effects by Aqueous Extract of Cordyceps Militaris in Human Leukemic U937 Cells

Sang Hoon Hong*, Dong Il Park, Sang Ho Seo, Yung Hyun Choi¹

Department of Internal Medicine,

1: Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Donggeui University · Biomedical Research Center of Oriental Medicine

Cordyceps militaris is a medicinal fungus, which has been used for patient suffering from cancer in Oriental medicine. It was reported previously that *C. militaris* extracts are capable of inhibiting tumor growth, however, the anti-proliferative effects of human cancer cells have not been poorly understood. In this study, to elucidate the growth inhibitory mechanisms of human cancer cells by treatment of aqueous extract of *C. militaris* (AECM) we investigated the anti-proliferative effects of AECM in human leukemia U937 cell line. AECM treatment inhibited the growth of U937 cells and induced the apoptotic cell death in a concentration-dependent manner, which was associated with morphological changes. We observed the up-regulation of cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21(WAF1/CIP1) by p53-independent manner and activation of caspase-3 in AECM-treated U937 cells, however, the activity of caspase-9 was remained unchanged. Additionally, AECM treatment caused a dose-dependent inhibition of the expression of telomere regulatory gene products such as human telomere reverse transcriptase (hTERT) and telomerase-associated protein-1 (TEP-1). Taken together, these findings suggest that AECM-induced inhibition of human leukemic cell proliferation is associated with the induction of apoptotic cell death via modulation of several major growth regulatory gene products, and *C. militaris* may have therapeutic potential in human lung cancer.

Key words : Cordyceps militaris, U937, p21, telomere

서 론

세포의 여러 가지 활동 중 세포의 사멸은 necrosis와 apoptosis로 구분되며, 이것은 세포의 형태학적 및 생화학적 특성에 의하여 구분될 수 있다. Apoptosis는 개체의 발생단계나 DNA 손상, 바이러스 감염 등에 의한 유전적 조절 하에서 일어나는 정교한 방어기전이라는 점에서 생리적이거나 화학적인 외상에 의한 세포의 죽음인 necrosis와는 구별된다^{1,2)}. 또한 apoptosis는 개체보존수준에서 손상된 세포들의 제거를 위한 중요한 수단이기도 하다. Apoptosis의 유발에 p53이나 Bcl-2 family와 같은 유전자가 관여한다는 사실이 알려지면서

apoptosis와 연관된 분자적 기전이 최근 많이 밝혀지고 있다³⁾. 그중 caspase라고 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family 역시 apoptosis 유발에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 이들은 proenzyme 형태로 존재하다가 apoptosis 유도를 활성화시키는 신호에 의해 활성화된 cysteine-related protease로 되어 직접 또는 간접으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여하게 된다^{4,5)}. 한편 세포의 성장과 생존에서 세포주기에 관한 개념은 20세기 이전에 광학 현미경의 관찰을 통한 간기세포와 유사 분열기 세포들의 구별이 가능해진 후, 1950년대에 Swift 및 Howard에 의해 G1, S, G2 및 M기에 대한 정의가 내려지면서 성립되었다⁶⁾. 그 후 생화학 및 분자생물학적 실험방법들의 폭발적인 성장과 더불어 1983년 세포주기조절 인자들이 동정되었으며, 많은 선행 연구자들은 이들 인자들의 합성, 인산화 및 분해 과정 등의 연구를 통해서 이들이 전 세포주기에 걸쳐 매우 다양하게

* 교신저자 : 홍상훈, 부산시 부산진구 양정동 산45-1 동의대학교 한의과대학

· E-mail : shhong@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8810

· 접수 : 2005/01/26 · 수정 : 2005/02/17 · 채택 : 2005/03/23

존재한다는 것이 알려지게 되었다⁷⁾. 이런 세포주기 조절 인자와 그 외의 분자들의 상호 작용에 의해 특정 세포의 증식이 조절되어지며, 또한 그 인자들의 변화에 의해 억제 또는 증폭 되는 것이다. 따라서 세포주기와 연관된 apoptosis 유발 해석에 대한 연구는 암세포의 과다한 증식과 성장억제에 대한 연구에 필연적인 것으로 사료된다.

冬蟲夏草는 자낭균강(Ascomycetes), 맥각균목(Claviciales), 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속하며 현재까지 전 세계적으로 약 800여종, 국내에는 78종 정도가 알려져 있다⁸⁾. 동충하초는 포자가 곤충의 유충, 번데기 또는 성충 내로 침입하여 기주 안에서 내생균핵을 만든 후 밖으로 자실체를 형성하고, '성숙된 자실체는 다시 포자를 형성함으로써 다른 곤충에 기생하는 특이한 생활주기를 가진다⁹⁾. 따라서 식물체를 기주로 하여 발생하는 영지버섯, 표고버섯, 느타리버섯 등과는 전혀 다른 동물성과 식물성 유효성분들이 같이 존재하는 버섯이다. 자실체를 형성하는 동충하초속 균으로는 *Cordyceps* 속이 대표적이며, 고대로부터 중국에서 결핵, 천식, 해독, 자양강장제 등의 한방약재로 사용되어온 대표적인 동충하초는 *C. militaris*와 *C. sinensis*이다¹⁰⁾. 최근까지 본 연구와 관련 있는 결과들을 살펴보면, *C. sinensis*의 추출물 또는 유효성분들은 백혈병세포 증식억제효과^{11,12)}, 폐암세포의 전이 억제 효과¹³⁾, 항염증효과¹⁴⁾, 암세포 apoptosis 유도 효과¹²⁾ 등이 있는 것으로 보고된 바 있다. 그리고 *C. militaris* 역시 세포독성 및 유전독성 억제효과¹⁵⁾, 항산화성 및 항돌연변이 효과¹⁶⁾, 혈관신생 및 종양생성 억제 효과¹⁷⁾ 및 고형암 성장 억제 및 면역활성 작용¹⁸⁾, apoptosis 유발에 의한 암세포증식억제 효과¹⁹⁾ 등이 있는 것으로 알려져 있으나, 특히 항암작용과 연관된 보고들에서 아직까지 정확한 항암을 기술한 예는 거의 없다.

본 연구에서는 인체 백혈병 세포의 증식에서 동충하초 추출물이 미치는 영향을 조사하였으며, 몇 가지 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다. 이를 위하여 U937 세포주가 사용되었으며, 동충하초 추출물 처리에 의한 U937 세포의 증식억제 효과, 형태변화, 세포주기 변화 및 apoptosis 유발 여부 등을 조사하였으며, 이와 연관된 주요 유전자들의 발현 변화를 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 암세포배양

실험에 사용한 U937 백혈병 세포(human leukemic cells)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양을 위해 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10%의 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)가 포함된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

2. 동충하초 수용액의 추출 및 처리

본 연구에 사용된 동충하초(*C. militaris*)는 대전대학교 한의과대학 부속 한방병원에서 공급받았으며 100 g을 1,000 ml의 증

류수에 3시간 이상 끓인 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리시켜 침전물을 제거하였다. 이를 다시 0.45 μm의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 수용성분을 동결 건조하여 사용하였다. 동충하초 수용액 추출물(aqueous extract of *C. militaris* (AECM))의 처리를 위하여 적정 농도로 배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22 μm의 pore size를 가진 주사기용 필터유닛을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다.

3. MTT assay를 이용한 세포 증식률의 측정

세포 배양용 6 well plate에 U937 세포를 3 X 10⁴개/ml의 개수로 well 당 2 ml씩 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 동충하초 추출물을 배지에 적정 농도로 처리한 후 48시간동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, Ohio, USA)를 0.5 mg/ml 농도가 되게 배지에 희석하여 2 ml씩 처리 후, 3시간동안 CO₂ incubator에서 반응시킨 다음 MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 1 ml씩 처리하여 well에 생성된 formazan을 모두 녹인 후 96 well에 200 μl씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3번의 측정값을 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석하였다.

4. DNA flow cytometry에 의한 세포주기 분석

동충하초 추출물의 처리에 따른 세포주기 별 분포도를 정량적으로 분석하기 위하여 flow cytometry 분석을 실시하였다. 이를 위하여 정상 및 동충하초 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포들을 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, nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

5. SDS-polyacrylamide gel 전기영동 및 Western blot analysis

세포배양용 패트리 접시에 6 × 10⁵개/ml 정도로 U937 세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 다음 동충하초 추출물을 처리하였다. 48시간까지 배양한 후, 세포를 PBS로 씻어내고 다음 원심분리를 하여 세포를 모았다. 이렇게 모아진 세포에 적당량의 lysis buffer [250 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA pH 8.0, 1% NP-40, 0.1 M phenylmethylsulfonyl fluoride ; PMSF, 1 M 1,4-dithio-DL-threitol ; DTT, protease inhibitor cocktail]를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후, 13,500 rpm으로 30분간 원심분리하여 그 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad,

Hercules, CA, USA)의 사용법에 따라 동량으로 맞춘 다음 동량의 Laemmli sample buffer (β-mercaptoethanol 5%, Laemmli sample buffer 95%, Bio-Rad)를 섞어서 sample을 만들었다. 이렇게 만든 sample 동량을 sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다.

단백질발현 분석을 위한 Western blot analysis를 위하여 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 담구어 상온에서 2시간 정도 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 PBS-T로 15분(5분간 3번씩) 정도 세척하였다. 세척 후 1차 항체(PBS-T에 1:500 또는 1:1000으로 희석하여 사용)를 처리하여 상온에서 1시간 이상 또는 4°C에서 over night시킨 다음 PBS-T로 세척(15분간 1번, 5분간 5번)하고 처리된 1차 항체에 적절한 2차 항체(PBS-T로 1:1500으로 희석하여 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 정도 반응시켰다. 다시 PBS-T로 세척(10분간 3번 및 5분간 3번)하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정단백질의 발현 양상을 비교 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

6. Reverse transcription-polymerase chain reaction 분석

동일한 조건에서 배양된 U937세포를 대상으로 RNAzol B(TEL-TEST, Inc., Texas, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, Choi et al.²⁰⁾의 방법에 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).

Table 1. Gene-specific primers for RT-PCR

Gene name	Sequence
p53	Sence 5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3' Antisence 5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3'
p21	Sence 5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3' Antisence 5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3'
hTERT ¹	Sence 5'-AGC-CAG-TCT-CAC-GTT-CAA-CC-3' Antisence 5'-GTT-GTT-CCA-AAC-ITG-CTG-ATG-3'
hTERT-1 ²	Sence 5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3' Antisence 5'-CCC-CGA-GTG-AAT-GTT-TCT-ACG-C-3'
hTR ³	Sence 5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3' Antisence 5'-GTT-TGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3'
c-myc	Sence 5'-AAG-ACT-CCA-GCC-CCT-TCT-CTC-3' Antisence 5'-GTT-TTC-CAA-CTC-CGG-GAT-CTG-3'
GAPDH ⁴	Sence 5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3' Antisence 5'-AGC-GTT-CTC-CAT-GGT-GGI-GAA-GAC-3'

1:telomerase reverse transcriptase, 2:telomerase-associated protein, 3:telomeric repeat binding factor, 4:glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

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

Caspase-3와 caspase-9의 in vitro 활성 측정을 위한 colorimetric assay kits는 CLONTECH Lab. (Palo Alto, CA, USA) 및 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 각각 구입하였으며, 제시된 방법에 준하여 활성의 증감 여부를 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 동충하초 추출물이 처리된 배지에서 48시간 배양된 세포를 모은 뒤 단백질을 추출하고 정량하여 각각 20 μg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 μM이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2% NP-40 and 10 mM DL-dithiothreitol] 50 μl에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 μl가 되게 하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이었으며, caspase-9의 경우에는 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA였다. 준비된 plate를 37°C에서 2시간동안 incubation 시킨 후 VERSAmax tunable microplate reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 동충하초 추출물이 U937 세포의 증식에 미치는 영향

먼저 U937 세포의 증식에 미치는 동충하초 추출물의 영향을 알아보기 위하여 실험재료 및 방법에서 서술한 것처럼 인체 U937 세포를 적정 시간 안정화 시킨 후 48시간 동안 배지에 동충하초 추출물을 적정 농도로 희석하여 처리한 후, MIT assay를 실시하여 Fig. 1에 나타내었다.

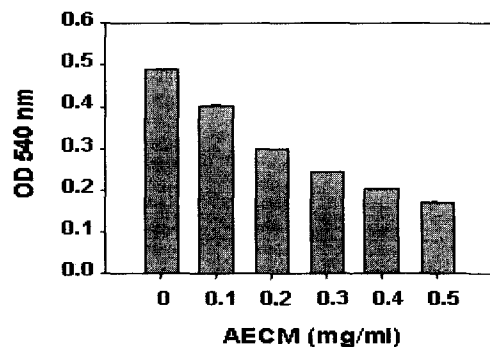


Fig. 1. Anti-proliferative effect of an aqueous extract of Cordyceps militaris (AECM) on the growth in U937 human leukemic cells. Cells were seeded as described in materials and methods, and treated with various concentrations of AECM. After 48 h incubation with AECM, MIT assay was performed. Results are means ± SD of three separate experiments.

Fig. 1에 나타낸 바와 같이 48시간 동안 정상 배지에서 자란 U937 세포에 비하여 동충하초 추출물이 함유된 배지에서는 동충

하초 추출물의 첨가 농도 의존적으로 세포의 증식이 감소하였음을 알 수 있었다. 즉 0.1 mg/ml 처리군의 경우 대조군에 비하여 17% 이상 세포증식이 억제되었으며, 0.3 mg/ml 처리군에서는 약 55% 정도의 세포증식 억제현상을 관찰할 수 있었다. 그리고 0.5 mg/ml 처리군에서는 생존율이 25% 정도로 암세포가 정상적인 생존을 하지 못하였음을 알 수 있었다. 그러나 동일 조건에서 수행된 선행연구인 A549 인체 폐암세포의 결과와 비교해 볼 때, A549 암세포의 50% 정도 증식억제 효능을 나타낸 동충하초 추출물의 농도가 약 2.0 mg/ml 정도였으며, 5.0 mg/ml 처리군에서 약 80% 정도의 증식억제 효과를 나타낸 것에 비하여¹⁹⁾ U937 세포에서는 저농도에서 매우 강력한 증식억제 효과를 나타내었다. 따라서 동충하초 추출물이 암세포 증식억제 효능이 폐암세포에서 보다 백혈병 세포에서 보다 강력함을 알 수 있었다.

2. 동충하초 추출물이 U937 세포의 형태에 미치는 영향

동충하초 추출물의 처리에 따른 상기 증식억제와 연관된 U937 세포의 형태변화를 조사하였다. 이를 위하여 동충하초 추출물을 각 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 동충하초 추출물의 처리농도가 증가하면 할수록 U937 세포의 membrane shrinking 현상을 관찰할 수 있었으며, 세포 내 과립형성과 같은 apoptosis가 유발되었을 경우 관찰되는 세포변형 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 초기에 대조군과 같은 수로 분주하여 배양한 세포임에도 불구하고 동충하초 추출물을 처리한 세포의 밀도는 농도 의존적으로 현저하게 감소하였다. 따라서 인체 백혈병 세포의 동충하초 추출물 처리 농도 의존적인 형태적 변화와 밀도의 감소는 동충하초 추출물 처리에 따른 세포 증식 억제와 부합되는 결과임을 알 수 있었다.

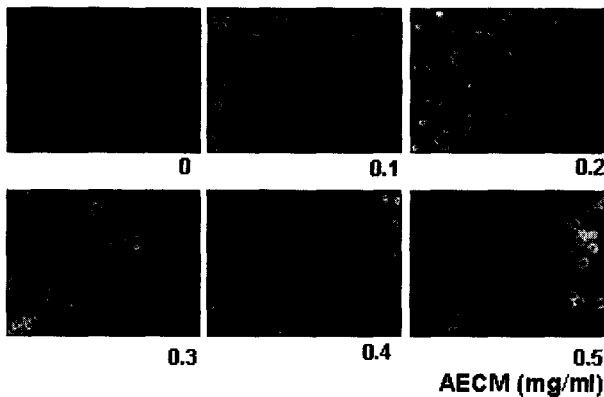


Fig. 2. Morphological changes of U937 human leukemic cells following incubation with AECM. Exponentially growing cells were incubated with AECM for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200.

3. 세포주기의 분포에 미치는 동충하초 추출물의 영향

다음은 동충하초 추출물의 처리에 의한 백혈병 세포의 증식억제가 세포주기 특정 시기의 교란 현상과 연관성이 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 동충하초 추출물이 함유된 배지에서 48시간 동안 배양된 세포를 대상으로 DNA flow cytometry 분석을 실시하였으며, 그 결과는 Fig. 3 및 Table 2에 나타난 바

와 같다. 제시된 결과에서 알 수 있듯이 정상 배지에서 자란 U937 세포의 경우 G1기가 전체의 약 51.61%를 차지하고 있었으며, S기와 G2/M기에 속하는 세포가 각각 28.21% 및 20.18% 정도였다. 그리고 0.2 mg/ml의 동충하초 추출물 농도에서 48시간 배양된 세포의 경우 G1기가 57.39%로 다소 증가되었으며, S기와 G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 약 23.15% 및 19.46%로 상대적으로 약간 감소되었다. 그러나 0.4 mg/ml 및 0.5 mg/ml 처리군의 경우 정상 배지에서 배양된 세포와 유사한 결과를 보여 동충하초 추출물에 의한 U937 세포의 증식억제 현상은 세포주기 빈도에 큰 영향을 미치는 것 같지는 않았다. 그러나 apoptosis 유발을 의미하는 sub-G1에 속하는 세포들의 빈도는 정상 배지에서 배양된 세포의 경우 약 2% 미만이었으나, 동충하초 추출물의 처리 농도가 높아질수록 증가되어 0.3 mg/ml 처리군에서는 약 9.2%를, 0.5 mg/ml 처리군에서는 약 14.9%를 나타내어 동충하초 추출물의 처리에 의한 U937 세포의 증식억제는 apoptosis 유발과는 어느 정도 직접적인 연관성이 있음을 알 수 있었다.

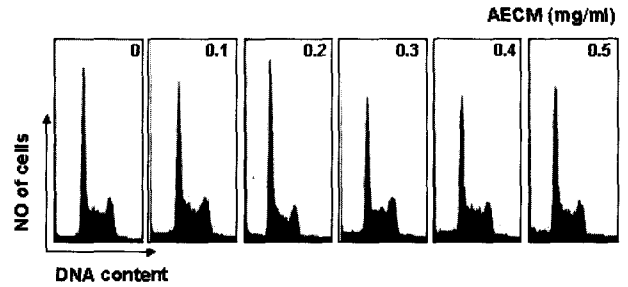


Fig. 3. DNA-fluorescence histogram after AECM treatment in U937 cells. Exponentially growing cells were incubated with various concentrations of AECM for 48 h. Cells were trypsinized and pellets were collected. The cells were fixed and digested with RNase, and then cellular DNA was stained with PI. DNA flow cytometric cell cycle analysis was performed comparing untreated controls with cells treated with WEAB.

Table 2. Fractions of each cell cycle phase of human leukemic U937 cells cultured in the presence or absence of various concentrations of AECM, each phase was analysed by DNA flow cytometry after 48 h treatment with AECM.

AECM (mg/ml)	% of cell		
	G1	S	G2/M
0	51.61	28.21	20.18
0.1	47.17	29.23	23.60
0.2	57.39	23.15	19.46
0.3	48.81	28.87	22.32
0.4	47.44	31.56	20.00
0.5	50.90	24.85	24.25

4. 종양억제유전자 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현에 미치는 동충하초 추출물의 영향

Cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor는 cyclin/Cdk complex와 결합하여 그 활성을 억제하는 것으로 알려져 있는데²¹⁾, 특히 CIP/KIP 군에 속하는 p21은 종양 억제유전자인 p53에 의하여 활성화되어 세포의 전반적인 증식을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있으나^{22,23)}, 세포의 종류 및 환경의 조건에 따라 p53 비의존적인 경로를 통하여 활성화될 수도 있다²⁴⁻²⁸⁾. 따라서 본 실험에서는 동충하초 추출물의 처리에 의한 인체 백혈병 세포의

증식억제 효과가 이들 두 유전자의 발현과 연관성이 있는지를 RT-PCR 및 Western blot analysis를 통하여 조사하였다. Fig. 4의 결과에서 알 수 있듯이 p53은 동충하초 추출물의 처리에 따른 변화가 관찰되지 않았으나, p21은 번역 수준에서 발현의 정도가 다소 증가되었다. 특히 p53의 인산화 형태인 phospho-p53의 단백질 수준의 변화도 관찰되지 않았기에 동충하초 추출물 처리에 의한 p21의 발현 증가는 p53 비의존적인 경로를 통하여 조절되는 것으로 생각되어지며, 동충하초 추출물 처리에 의한 U937 백혈병 세포의 증식억제에 p21이 어느 정도 관여할 수 있을 것으로 추정되어 진다.

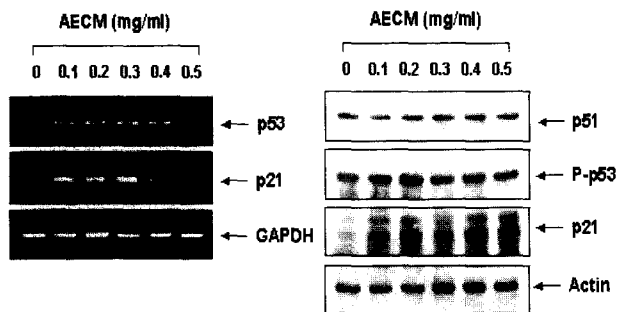


Fig. 4. Induction of Cdk inhibitor p21 expression by AECM treatment in U937 cells. (A) Cells were incubated with AECM for 48 h and total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using p53 and p21 primers described in materials and methods. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) After 48 h incubation with AECM, 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.

5. Caspase-3 및 caspase-9의 발현과 활성화에 미치는 동충하초 추출물의 영향

세포의 내·외부의 자극에 의해 apoptosis가 일어나면 세포의 증식에 중요한 역할을 하는 poly (ADP-ribose) polymerase과 같은 특정 단백질들의 분해가 수반되어지는데^{29,30}, 이는 apoptosis 과정 중 caspase라는 효소의 활성화에 의해 나타나는 현상이다. 따라서 동충하초 추출물의 처리에 의한 apoptosis 유발에도 이러한 caspase의 활성화 현상들이 관련되어 있는지의 여부를 조사하였다. Caspase는 세포의 apoptosis 유발에 핵심적인 역할을 하는 인자로서 세포내의 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태로 존재하다가 apoptosis를 유도하는 자극에 의하여 활성화될 수 있다³¹. 이를 위하여 동일한 조건에서 배양된 U937 세포들을 대상으로 caspase-3 및 caspase-9의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 5에 나타난 바와 같다. Fig. 5의 결과에서 보여주듯이 caspase-3와 caspase-9의 단백질 발현은 정상 배지에서 배양된 세포나 동충하초 추출물이 함유된 배지에서 배양된 세포 모두에서 유의적인 큰 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 두 종류 caspase의 활성화의 정도를 in vitro caspase activity assay를 통하여 실험해본 결과는 caspase-9은 큰 변화가 없었으나, caspase-3의 경우 0.3 mg/ml 처리군에서 약 1.9배 증가하였고, 0.5 mg/ml 처리군에서는 약 2.7배 정도로 매우 증가되어 동충하초 추출물의 처리에 따른 apoptosis 유발에 caspase-3가 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 아울러 pro-apoptotic Bax

member에 속하는 Bad의 발현은 고농도 처리군에서 다소 증가되었다. 이는 동충하초 추출물 처리에 의한 apoptosis 유발이 Bcl-2 member의 발현 감소에 따른 Bax member의 상대적인 발현 증가에 기인한다는 선행연구와 어느 정도 연관성이 있는 결과라고 할 수 있겠다. 반면 caspase-3 활성화와 연관된 대부분의 apoptosis가 일어난 세포에서 관찰되는 β -catenin 단백질의 단편화 현상은 본 실험 조건에서 관찰할 수는 없었다.

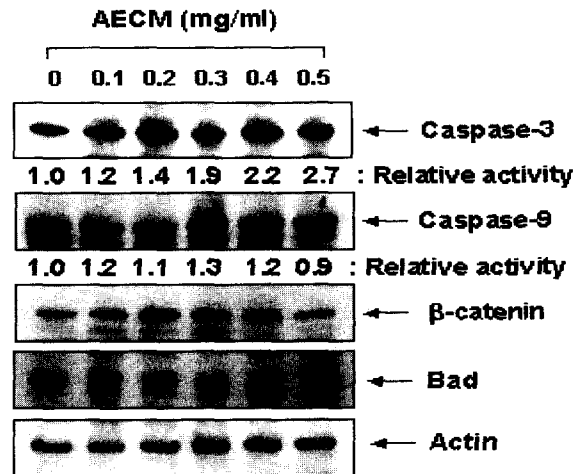


Fig. 5. Effects of AECM treatment on the protein levels of caspase-3 and caspase-9, and activities of caspase-3 and caspase-9 in U937 cells. Cells were incubated with AECM for 48 h, lysed and cellular proteins were separated by SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the indicated antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Additionally, cells were lysed and then aliquots (20 μ g protein) were incubated with DEVD-pNA and LEHD-pNA 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.

6. Telomere 조절인자들의 발현에 미치는 동충하초 추출물의 영향

Telomere는 모든 진핵세포의 염색체 말단에 존재하는 간단한 DNA 절편으로서 인간의 경우에는 (TTAGGG)_n의 염기서열이 계속 반복되는 구조를 가지고 있으며 비정상적인 DNA 재조합을 억제하며 염색체가 핵막으로 부착되는 것을 돕고, mitotic clock으로서의 기능을 할 것이라는 사실이 밝혀짐에 따라 종양 형성(tumorigenesis)의 이해와 그 예방에 이용될 가능성을 제시해 주고 있으며^{32,33}, telomere의 손실은 p53의 발현과 세포주기 교란에도 관여를 하는 것으로 알려져 있다³⁴. 따라서 본 연구에서는 동충하초 추출물의 처리가 이러한 telomere 조절 관련 유전자들의 발현에 영향을 미칠 수 있을지의 가능성을 조사하여 보았다. Fig. 6에서 보여주는 바와 같이 telomere와 관련된 human telomere reverse transcriptase (hTERT), human telomerase RNA (hTR), mammalian telomerase-associated protein-1 (TEP-1), 그리고 transcription control factor인 c-myc과 Sp1 등의 인자 등을 조사해 본 결과, telomerase 활성화에 가장 중요한 역할을 하는 hTERT 및 TEP-1의 발현이 동충하초 추출물 처리에 따라 다소 감소되는 경향성을 보였으나, 나머지 인자들은 큰 변화가 없었다. 이는 동충하초 추출물이 hTERT 및 TEP-1의 발현 억제를 통하여 telomerase 활성을 조절할 수 있는 가능성을 제시하여 주는 결과로서 이에 관한 부가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

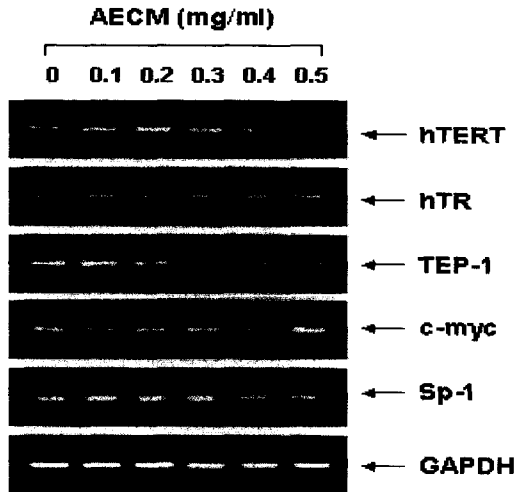


Fig. 6. Effects of AECM treatment on the levels of telomere regulatory genes in U937 human leukemic cells. Cells were treated with various concentrations of AECM. After 48 h incubation, total RNAs were isolated and RT-PCR analyses were performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

결론

본 연구에서는 동충하초 열수 추출물의 처리에 의한 인체 백혈병 세포의 증식 억제에 관한 기전 해석을 시도하였다. 이를 위하여 U937 세포주가 사용되었으며 다음과 같은 결과를 얻었다. 동충하초 추출물의 처리 농도 의존적으로 U937 세포의 증식율이 현저하게 감소되었으며, 이러한 암세포 증식억제 효과는 암세포의 심한 형태적 손상과 연관이 있었다. 동충하초 추출물 처리에 의한 U937 세포의 증식억제에는 세포주기 특이적인 교란은 없었으나 처리된 동충하초 추출물의 농도가 증가할수록 apoptosis 유발 증가 현상을 수반하였다. 동충하초 추출물 처리에 의한 U937 세포의 증식억제에는 p53 비의존적인 p21의 발현 증가 현상이 관찰되었으며, apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는 caspase-3가 활성화되었다. 그리고 동충하초 추출물의 처리에 따라 telomere의 조절인자 중 hTERT 및 TEP-1의 발현이 감소되어 telomerase 활성이 감소되었을 가능성을 보여 주었다. 그러나 본 연구의 결과만으로 동충하초에 의한 인체 백혈병 세포의 성장억제 기전을 명확하게 제시할 수는 없으며, 암세포의 세포주기 교란 및 apoptosis 유발 기전해석과 관련된 후속 연구들이 수행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 2004년 동의대학교 교내 연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

참고문헌

1. Lieberthal W., Koh, J.S., Levine, J.S. Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol* 18, 505-518, 1998.
2. Zimmermann, K.C., Bonzon, C., Green, D.R. The machinery

- of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92, 57-70, 2001.
3. Chiarugi, V., Magneli, L., Cinelli, M., Basi, G. Apoptosis and the cell cycle. *Cell Mol Biol Res*, 40, 603-612, 1994.
4. Evans, V.G. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int* 17, 461-476, 1993.
5. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365, 1997.
6. Howard, A., Pelc, S.R. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 6, 261, 1953.
7. Minshull, J., Pines, J., Golsteyn, R., Standart, N., Mackie, S., Colman, A., Blow, J., Ruderman, J.V., Wu, M., Hunt, T. The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci Suppl* 12, 77-97, 1989.
8. Sung, J.M., Yu, Y.B., Cha, D.Y. Mushroom science. *Kyohaksa, Seoul*, pp.569-570, 1998.
9. Sung, J.M., Lee, H.K., Choi, Y.S., Kim, Y.O., Kim, S.H., Sung, G.H. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungal species from Korea. *Kor J Mycol* 25, 231-252, 1997.
10. Buenz, E.J., Bauer, B.A., Osmundson, T.W., Motley, T.J. The traditional Chinese medicine Cordyceps sinensis and its effects on apoptotic homeostasis. *J Ethnopharmacol* 96, 19-29, 2005.
11. Chen, J.L., Greider, C.W.. Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita. *Trends Biochem Sci* 29, 183-192, 2004.
12. Buenz, E.J., Weaver, J.G., Bauer, B.A., Chalpin, S.D., Badley, A.D. Cordyceps sinensis extracts do not prevent Fas-receptor and hydrogen peroxide-induced T-cell apoptosis. *J Ethnopharmacol* 90, 57-62, 2004.
13. Nakamura, K., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Kwon, Y.M., Shinozuka, K., Kunitomo, M.. Inhibitory effect of Cordyceps sinensis on spontaneous liver metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice. *Jpn J Pharmacol* 79, 335-341, 1999.
14. Shahed, A.R., Kim, S.I., Shoskes, D.A. Down-regulation of apoptotic and inflammatory genes by Cordyceps sinensis extract in rat kidney following ischemia/reperfusion. *Transplant Proc* 33, 2986-2987, 2001.
15. Kim, M.N., Cui, C.B., Lee, D.S., Ham, S.S. Cytotoxicity and antigenotoxic effect of Cordyceps militaris extracts. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 30, 921-927, 2001.
16. Kim, M.N., Oh, S.W., Lee, D.S., Ham, S.S. Antioxidative and antimutagenic effects of the ethanol extract from Cordyceps militaris. *Kor J Posthavest Sci Technol* 8, 109-117, 2001.
17. Yoo, H.S., Shin, J.W., Cho, J.H., Son, C.G., Lee, Y.W., Park, S.Y., Cho, C.K. Effects of Cordyceps militaris extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta Pharmacol Sin* 25,

- 657-665, 2004
18. Lee, H., Lee, Y., Park, T. Tumor growth inhibitory and immunomodulatory activities of *Cordyceps militaris* water extracts in ICR mice bearing Sarcoma-180 solid tumor. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 33, 59-65, 2004.
 19. Hong, S.H., Kam, C.W., Park, D.I. Induction of apoptotic cell death by an aqueous extract of *Cordyceps militaris* in A549 human lung carcinoma cells. *Kor J Oriental Physiol Pathol* 18, 1102-1106, 2004.
 20. 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, 2001
 21. Harper, J.W. Cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Surv* 29, 91-107, 1997.
 22. Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A., Xiong, Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 9, 2261-2268, 1994.
 23. Taylor, W.R., Stark, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815, 2001.
 24. Datto, M.B., Yu, Y., Wang, X.F. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* 270, 28623-28628, 1995.
 25. Choi, Y.H., Lee, W.H., Park, K.Y., Zhang, L. 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, 2000.
 26. Jiang, H., Lin, J., Su, Z.Z., Collart, F.R., Huberman, E., Fisher, P.B. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* 9, 3397-3406, 1994.
 27. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704, 1993.
 28. Zeng, Y.X., El-Deiry, W.S. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. *Oncogene* 12, 1557-1564, 1996.
 29. 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.
 30. 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.
 31. Reed, J.C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17, 3225-3236, 1998.
 32. Mathieu, N., Pirzio, L., Freulet-Marriere, M.A., Desmaze, C., Sabatier, L. Telomeres and chromosomal instability. *Cell Mol Life Sci* 61, 641-656, 2004.
 33. Greenwood, M.J., Landsorp, P.M. Telomeres, telomerase, and hematopoietic stem cell biology. *Arch Med Res* 34, 489-495, 2003.
 34. Homayoun, V., Sam, B. 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, 1996.