

상황버섯이 인간 백혈병 세포주인 HL-60 세포의 분화유도 및 증식에 미치는 영향

최은영¹ · 주성민² · 박진모 · 박준호 · 한동민 · 전병훈² · 김원신

원광대학교 자연과학대학 생명과학부, 1: 교육대학원 공통과학교육전공, 2: 한의과대학 병리학교실

Effect of *Phellinus linteus* on Differentiation and Cell Proliferation in Human Leukemia HL-60 cells

Eun Young Choi¹, Seong Min Ju², Jin Mo Park, Jun Ho Park, Dong Min Han, Byung Hun Jeon², Won Sin Kim*

Division of Natural Science, College of Natural Sciences, 1: Graduate School of Education, Common-Science Education, 2: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

We have examined the effect of water extract of *Phellinus linteus*, a raw material of Korean traditional herbal medicine, on the induction of HL-60 cell differentiation. The proliferation of HL-60 cell was inhibited dose-dependently by treatment with various doses of *P. linteus* extract. It also caused a significant change in NBT reduction (7.5 times). The expression of CD11b and CD14 was increased in the cells treated with the extract, especially in those arrested at G0/G1 stage, which suggested that some components in *P. Linteus* extract induced HL-60 cell differentiation to granulocytic and monocyte lineages. Moreover, the expression levels of p21^{WAF1/CIP} and p27^{KIP} were up-regulated during HL-60 cell differentiation induced by *P. Linteus* extract. These results together suggest that *P. Linteus* extract contains potential HL-60 cell differentiation agents.

Key words : HL-60, *P. Linteus*, differentiation, p27, p21, CD11b, CD14

서론

상황버섯 (*Phellinus linteus*)은 분류학적으로 담자균아문 (Basidiomycotina) 민주름버섯목 (Aphyloporales) 소나무비늘버섯과 (Hymenochaetaceae) 진흙버섯속 (*Phellinus*)에 속하는 백색 부후균으로 자실체는 목질로 되어 있다. 뽕나무 줄기에 자생하며 모양이 초기에는 노란 진흙 덩이가 뭉친 것 같은 형태를 유지하다가 다 자란 후의 형태는 그루터기에 헛바닥을 내민 모습이어서 수설 (樹舌)이라고 하며²³, 버섯의 삿갓 표면을 제외하고는 모두 황색이어서 한명 (漢名)으로는 간황 (幹黃)이라고도 한다¹⁸. 상황버섯은 항돌연변이원성 및 세포독성억제 효과¹⁸, 항암 작용 및 체액성 면역과 세포성 면역계 활성화 효과^{12,20}, 항산화 기능³³ 등의 다양한 약리적 효과가 보고되었다. 최근에는 상황버섯의 항암효과가 직접적 효과보다 자연 살해 세포와 대식 세포를 활성화 시켜 면역력 상승에 의하여 항암효과가 발생된다는 간접 효과

과적인 관점에서 연구가 진행되고 있다²³.

백혈병 (Leukemia)의 전형적인 특징은 기능을 가진 성숙 세포의 분화 능력의 상실과 정상세포에 비해 높은 증식상태로 남아 있는 것이다^{27,24}. 따라서 백혈병 세포는 골수와 혈중에 비정상이거나 미성숙 상태의 백혈병 세포가 높은 농도로 존재함으로써 정상적인 백혈병 세포와 적혈구 세포의 기능을 방해하게 된다^{7,8,11,21}.

백혈병 세포는 정상적으로 이끄는 분화 과정을 거치지 않고 미숙한 분화의 단계에 정지 되어 있으며, 분화에 있어서 중요한 유전자들은 chromosomal changes에 영향을 받는다²⁹. 이와 관련된 최근 백혈병 세포의 병리 기작과 진단에 대한 고찰이 확립되었다¹³. 주로 관찰되는 염색체 이상의 전위와 결손이다. 가장 흔한 이상은 염색체 15번과 17번 사이의 전위 (AML gene; retinoic acid receptor α (RAR α) chromosom 17q21, PML gene; chromosom 15q22) 인데, 급성 전골수성 백혈병 (Acute Promyelocytic Leukemia) 일 때 78-80%로 관찰 된다^{9,19,26}.

백혈병 세포와 같이 미분화된 세포의 분화 연구에서 조사해야 할 중요한 점은 첫째, 세포의 증식이 억제되거나 정지해야 하

* 교신저자 : 김원신, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 자연과학대학

· E-mail : wsnkim@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6578

· 접수 : 2007/08/13 · 채택 : 2007/09/19

며³¹⁾ 둘째, 최종분화세포에서 특이적인 기능이 발현해야 한다. 특히 혈구세포에서는 분화과정에서 세포 표면항원이 존재하게 되는데, 어떠한 표면항원이 출현하는지에 의해서 분화 방향성을 알 수 있다²⁾. 최종 분화세포에서 나타나는 기능성 marker 를 보면 혈소판은 peroxydase, PDGF 그리고 TGF β 1 이며 적혈구는 헤모글로빈 생산능력이 있는 benzidine 양성세포의 출현, granulocyte, monocyte/macrophage 의 표면항원인 CD11b, CD14 등을 기능 marker 로 사용하여 세포의 분화 방향성을 확인 할 수 있다²⁹⁾.

본 연구는 미분화된 세포의 분화 연구 중 후자인 최종분화 세포의 발현정도를 살펴보기 위하여 백혈병 세포주인 HL-60 에 상황 물 추출물을 처리하여 백혈병에 대한 치료 목적으로 효과가 있는지 HL-60 세포의 분화 유도제로서의 기능성을 알아보고자 하였다. 상황 물 추출물이 HL-60 세포에 대해 증식의 저해와 성장 억제를 나타내는지를 MTT 분석과 세포 생존율 그리고 FACS 분석을 통해 세포주기를 측정하였다. 또한 세포주기 조절 관련단백질인 cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI), p21과 p27 단백질 발현을 조사하고, NBT 환원 분석과 granulocytic와 monocytic 계통 세포로의 분화 방향성을 제시할 수 있는 표면항원인 CD11b 와 CD14 의 발현 정도를 관찰하여 상황 물 추출물이 분화 유도제로서의 효과가 있는지 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. Cell culture

HL-60 세포주는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul Korea)에서 구입하였고, 세포배양은 10% Fetal bovine serum (FBS)과 1% Antibiotics-antimycotic solution (GIBCO, BRL)이 포함되어 있는 RPMI - 1640 (GIBCO, BRL) 배지에서 100 mm culture dish 에 2×10^5 cells/ml 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

2. Drug and treatment

본 실험에 사용한 상황 (Phellinus linteus)은 우리우통약업사(서울)에서 구입하여 사용하였다. 상황 100 g 에 증류수 1 l 를 가하여 3 시간 끓여서 거즈로 여과하고 3,000 rpm 으로 원심분리한 후, 농축기 (rotary evaporator)로 감압 농축하였다. 이후 -70°C (deep freezer)에서 12 시간 이상 동결시킨 다음 freezer dryer 로 동결 건조시켜 건조 분말 10 g (수득율, 10%)의 시료를 얻었으며, 시료는 4°C 에 저장되어 20 mg/ml 의 농도로 PBS (phosphate-buffer saline)에 녹여 사용하였다.

상황 물 추출물을 처리하기 위해 2×10^5 cells/ml HL-60 을 plate 에 분주한 후 농도가 50~300 μ g/ml 이 되게 처리하였으며 DMSO 는 1.2% 의 농도로 처리하여 배양하였다. 배양시간은 실험에 따라 각각 다른 조건으로 배양하였는데, NBT 환원, MTT 분석, 세포 생존율 분석을 위한 세포는 상황 물 추출물 처리 후 24 시간동안 배양하고, 세포주기 관찰과 CD11b, CD14 의 발현 여부 확인, p21 과 p27 의 단백질 발현 여부를 확인하기 위한 세

포는 상황 물 추출물을 처리한 후 24, 48, 72, 96 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

3. Cell viability of *P. Linteus* by MTT assay

세포의 증식억제를 확인하기 위해 상황 물 추출물을 처리한 세포를 원심분리로 모아서 0.4% trypan blue 로 1분간 염색시킨 후 hemocytometer 를 사용하여 생세포와 사세포의 수를 계측하였다. 세포 수를 셀 때에는 구획내의 200개 이상의 전 세포의 수를 측정한다. 또한 세포에 미치는 상황 물 추출물의 생존율을 확인하기 위해 3-4, 5-dimethylthiazol-2-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma) assay 를 시행하였다. 상황 물 추출물을 50~300 μ g/ml 의 농도로 처리하여 24 시간 동안 처리되었다. MTT 는 20 mg/ml 의 농도로 PBS 에 녹여 사용하였다. 각 농도별로 처리한 세포를 3,000 rpm 으로 4분간 원심분리한 후에 20 mg/ml 농도의 MTT 200 μ l 로 세포를 부유시켜 formazan 을 형성시키기 위해 37°C에서 3 시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 세포는 다시 3,000 rpm 으로 4분간 원심분리한 후 DMSO (dimethyl sulfoxide ; Sigma) 200 μ l 로 풀어주고 96 well plate 에 옮겨 ELISA reader 를 사용해 OD570 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

4. NBT differentiation assay

Nitroblue tetrazolium (NBT ; Sigma) reduction-TPA stimulation 방법을 통해 HL-60 세포가 분화되었는지 확인하였다. 상황 물 추출물을 100, 200 μ g/ml 농도로 처리해 96 시간동안 배양한 후 세포를 3,000 rpm 으로 4분간 원심분리한 후 2 mg/ml 농도의 NBT 용액 100 μ l 에 부유시키고 1 μ g/ml 농도의 TPA (phorbol 12-meristate 13-acetate, Sigma)를 1 μ l 넣어 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨다. 반응시킨 세포는 1 N HCl 을 100 μ l 넣어 섞어 준 뒤 얼음에 5분간 방치하여 반응을 정지시켰다. NBT-reduction 반응이 정지된 세포를 200 μ l 의 DMSO 에 부유시킨 후 96 well plate 에 옮겨 ELISA reader 를 사용해 OD560nm 에서 흡광도를 측정하였다. 전 세포에 대해 NBT-positive 세포의 비율을 확인하기 위해 0.4% trypan blue 를 사용하여 cell counting 을 병행하여 전 세포의 수를 계측한다.

5. Analysis of CD11b and CD14 expression

HL-60 세포가 granulocytic 또는 monocytic 계통의 세포로 분화가 되었는지를 표면항원인 CD11b 와 CD14 의 발현 여부를 확인하였다. 높은 생존율과 NBT-positive 를 보이는 200 μ g/ml 농도로 상황 물 추출물을 처리한 세포를 96 h 처리하여, PBS 로 두 차례 세척하고 100 μ l 의 0.25% BSA (bovine serum albumin) 가 포함된 PBS 에 세포를 부유시켜 RPE-Conjugated anti-CD11b monoclonal antibody (Clone 2LPM19c, DAKO)와 FITC-Conjugated anti-CD14 monoclonal antibody (Clone TÜK4, DAKO)를 각각 10 μ l 를 혼합시킨 뒤 4°C에서 30분 동안 반응시킨다. 반응시킨 후 0.25% BSA 가 포함된 PBS 로 두 차례 세척해 준 뒤 1% formaldehyde가 포함된 PBS 로 고정시켜 fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur (BD

Bioscience, CA, USA) 사용하여 측정하였다.

6. Flow cytometric analysis of cell cycles by PI staining

Propidium iodide (PI, Sigma)를 사용하여 HL-60 세포를 염색하여 세포가 분화되는 동안 세포 주기의 변화를 관찰하였다. HL-60 세포를 2×10^5 cells/ml 이 되도록 분주 하여 분화 유도가 뚜렷이 나타나는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 상황 물 추출물을 처리해 배양한 후, 세포를 모아 얼음에 준비해둔 PBS 를 사용하여 두 차례 세척한 다음 70% ethanol 을 사용하여 4°C에서 고정시킨다 (fixation). 세포를 1 ml 의 PI staining solution PI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 로 resuspension 하여 37°C에서 1 시간 동안 배양하였다. Cell cycle 은 fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur (BD Bioscience, CA, USA) 사용하여 측정하였다. cytometric analysis 은 hypodiploid peak (Sub-G1)와 같은 PI 히스토그램으로 수치화하였다. Sub-G1 세포의 퍼센트는 CellQuest pro (BD Biosciences, CA, USA) software를 사용하여 측정하였다.

7. Western blot analysis

상황 물 추출물이 처리된 HL-60 세포를 용해한 다음 단백질 농도는 Bradford 방법에 따라 정량하고 60 μl 을 15% SDS - polyacrylamide gel 전기영동에 이용하여 분리하였으며, 젤 상에 있는 모든 단백질은 nitrocellulose membrane (Hybond C, Amersham Corp.)으로 옮겨졌다. Membrane 들은 0.5% Tween-20 을 포함한 T-TBS 을 이용하여 만들어진 5% nonfat milk 용액에 넣어서 전처리하였다. Nonfat milk 용액에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 만들어져 있는 p21, p27 일차 항체를 1 시간 동안 4°C에서 membrane 에 처리하여 overnight 하였다. 다음 날 membrane 을 T-TBS 에 의해 10분 간격으로 3번 세척하였고, 일차 항체에 적합한 이차 항체를 이용하여 1시간 동안 4°C에서 membrane 에 반응시켰다. 다시 membrane 은 T-TBS 로 충분히 세척하고 통상적인 ECL 방법으로 발색시켰다.

결 과

1. Effects of *P. Linteus* on the cytotoxicity of HL-60 cells MTT assay

상황 물 추출물의 HL-60 세포에 대한 세포독성효과를 조사하기 위하여 50~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 상황 물 추출물을 24 시간 동안 처리한 후 세포 독성 효과를 MTT assay 를 측정하였다. 대조군의 생존율을 100% 로 정했을 때, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 $92.0 \pm 1.0\%$ 나타났으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 $72.1 \pm 5.3\%$, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 $57.0 \pm 5.1\%$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 $46.3 \pm 8.5\%$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 $27.4 \pm 3.3\%$, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 $11.0 \pm 1.3\%$ 등으로 조사되었다. 그 결과 상황 물 추출물을 처리한 농도에 비례하여 세포 독성이 증가하였음을 알 수 있었다. 특히 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 군의 세포 생존율이 농도에 의존적으로 감소하였다(Fig. 1).

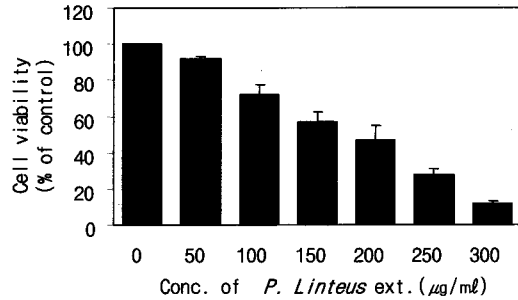


Fig 1. Effect of *P. Linteus* on the cytotoxicity of HL-60 cells. HL-60 cells (2×10^5 cells/ml) were treated with various concentrations of water extract *P. Linteus* for 24 h and the cells were tested for viability by MTT assay. Value are means \pm SD of triplicated determinations.

2. Induction of NBT reduction activity of HL-60 cells by *P. Linteus*

상황 물 추출물이 HL-60 세포에 대해 분화가 유도되는지 확인하기 위해 NBT-reduction assay를 시행하여 전 세포에 대해 NBT-positive 세포의 비율을 분석하였다. HL-60 세포가 NBT 환원력을 최대로 갖출 수 있는 96 시간 동안 배양한 결과 상황 물 추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해서 positive control 로 사용한 1.2% DMSO가 7.5 배의 NBT-positive 를 보이며, 상황 물 추출물을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 세포에서는 1.2 배에서 최대 2.8 배의 NBT 양성세포의 증가를 보이며 분화유도가 효과가 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

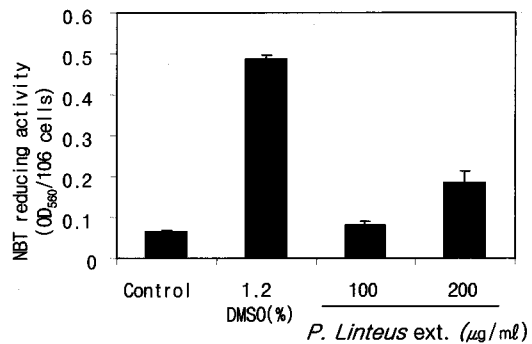


Fig. 2. Induction of NBT reduction in *P. Linteus*-treated HL-60 cells. HL-60 cells (2×10^5 cells/ml) were incubated for 96 h with various concentration of water extract *P. Linteus*. NBT reducing activity was determined and results are mean \pm SD of triplicated determinations.

3. Induction of CD11b and CD14 expression in HL-60 cells

상황 물 추출물에 의해 분화가 유도된 HL-60 세포의 분화 방향성을 확인하기 위해 granulocytic 계통에 특이적으로 발현하는 표면항원인 CD11b 와 monocytic 계통에서 발현하는 CD14 의 발현 여부를 확인하였다. 세포에 대해 독성이 가장 적고 분화 유도가 뛰어난 것으로 보여 지는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 상황 물 추출물을 처리해 96 시간동안 배양하여 FACS 를 통해 분석한 결과 HL-60 세포는 CD11b, CD14 모두에 발현이 보여 진다(Fig. 3). 이와 같은 결과는 상황 물 추출물이 HL-60 세포에 대해 granulocytic 계통과 monocytic 계통의 세포로 분화를 유도하는

것으로 판단된다.

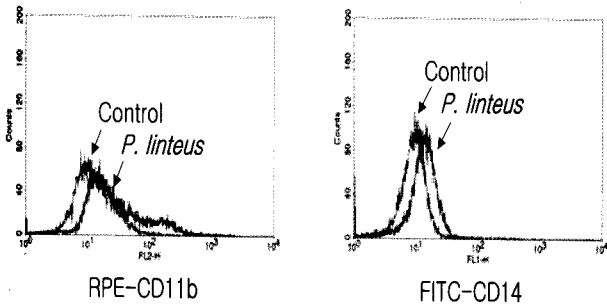


Fig. 3. Expression of *P. Linteus* extract on the expression of CD11b and CD14 antigens. HL-60 cells were treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ water extract *P. Linteus* for 96 h and the analyzed for CD11b and CD14 expression by FACS.

4. Flow cytometric of cell cycle by PI staining

HL-60 세포가 분화 유도되는 동안 일어나는 세포의 증식억제 효과가 상황 물 추출물에 의한 세포주기의 변화 때문인지를 확인하기 위해 상황 물 추출물을 200 $\mu\text{g/ml}$ 처리해 96 시간동안 배양한 후 PI staining 을 실행하여 FACS 분석을 통해 cell cycle 을 확인한 결과, 상황 물 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 세포는 대조군에 비해 G0/G1 기에 정지되어 있는 세포가 35.5% 에서 46.8% 로 증가하였다(Fig. 4).

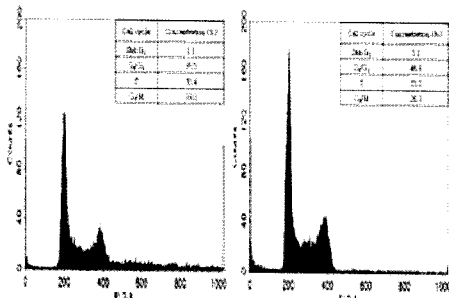


Fig. 4. Effect of *P. Linteus* extract on the cell cycle progression of the HL-60 cells. HL-60 cells (2×10^5 cells/ml) were exposed to 200 $\mu\text{g/ml}$ water extract *P. Linteus* for 96 h, washed and then harvested. The cells were fixed and stained with PI and the cell cycle was analyzed by FACS.

5. Effect of *P. Linteus* on p21 and p27 protein of HL-60 cells

세포증식억제의 결과 어떠한 단백질의 발현과 관계가 있는 것인지를 관찰하기 위하여 세포주기관련 유전자인 p21, p27 에 대하여 western blot 분석을 실시하였다.

먼저 상황 물 추출물 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도를 24, 48, 72, 96 시간대 별로 조정하여 세포로부터 단백질을 추출한 후 western blot 한 결과 p21, p27 는 시간이 지날수록 단백질 발현 정도가 증가하였다. 이러한 p21, p27 의 증가는 직접적으로 CDK 의 활성화를 저해하여 G1 phase arrest를 유발하는데 관여하고 세포사멸을 일으키는 기전을 유도하는 것으로 판단되며 G2/M 기에 있어서 세포주기의 연장이라는 결과를 가져오는 것에 관여함으로써 HL-60 세포의 증식을 억제하는 것으로 생각된다. 또한 이는 처리한 상황 물 추출물의 시간이 지날수록 세포증식을 억제하는 비율이 증가하는 것으로 사료 된다(Fig. 5).

P. Linteus treatment

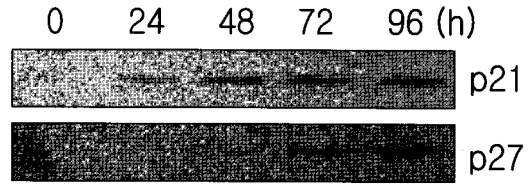


Fig. 5. Effect of *P. Linteus* on the protein expression of p21 and p27 from the HL-60 cells. HL-60 cells (2×10^5 cells/ml) were harvested at the indicated times after incubation with 200 $\mu\text{g/ml}$ water extract *P. Linteus*. Cells were the lysed and the supernatants were subjected to western blot analysis using anti-p21 and anti-p27 antibody.

고 찰

본 연구에서는 APL 환자들에게 치료 목적으로 사용되어지고 있는 화학 치료제들이 약에 대한 내성과 고칼슘혈증과 같은 부작용이 나타날 수 있는 단점이 있어 부작용과 내성이 적은 한약재인 상황 (桑黃, *Phellinus linteus*)을 사용하여 백혈병의 치료와 예방 목적으로 사용할 수 있는지에 대해 확인하고자 하였다. HL-60 세포와 같은 백혈병 세포가 정상적인 기능을 갖춘 최종 분화세포로 분화 유도되는 동안 세포는 증식 억제와 성장 저해가 일어나야한다^{10,31}.

상황 물 추출물이 HL-60 세포에 대해 다른 유도제들과 유사한 증식억제의 효과가 있는지를 알아보기 위해 강력한 분화 유도제로 사용되는 1.2% DMSO 를 positive control 로 사용하여 비교해본 결과 상황 물 추출물은 이들과 유사한 증식 억제의 효과를 나타냈다.

Granulocyte 와 monocyte 로 분화중인 HL-60 세포에서 발생하는 superoxide anion 이 NBT 를 환원시켜 산출되는 blue-black formazan의 흡광도를 측정하여 HL-60 세포에 대해 분화 유도가 일어나는지 확인할 수 있다^{3,28}. 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 상황 물 추출물을 처리한 후 96 시간동안 배양한 세포의 NBT-reduction assay 의 결과 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 상황 물 추출물을 처리한 세포에서 대조군에 비해 1.2 배에서 최대 2.8 배 이상의 NBT-positive 를 보이고 있다. 이로서 상황은 DMSO 와 함께 HL-60 세포의 분화 유도 효과를 증진시키는 것으로 보여 진다. 상황 물 추출물에 의해 분화가 유도된 HL-60 세포의 분화방향성을 알아보기 위해 분화방향성의 marker 인 CD11b 와 CD14 과 같은 표면항원의 발현 여부를 관찰하였다. CD11b 는 granulocyte 에서, CD14 는 monocyte 에서 특이적으로 발현하는 표면항원으로 이미 알려져 있다^{14,15}. 상황 물 추출물을 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리해 표면항원이 발현할 수 있는 96 시간 동안 배양하여 antibody 를 부착시켜 FACS 로 분석한 결과 건강에 의해 분화 유도된 HL-60 세포는 CD11b 과 CD14 의 발현이 모두 나타나는 것을 확인하였다.

NBT-reduction assay 의 결과 NBT-positive 세포의 증가와 granulocyte 의 특이적인 표면항원인 CD11b 와 monocyte 에서 특이적인 표면항원인 CD14 의 발현에서 상황 물 추출물은 DMSO 와 마찬가지로 HL-60 세포를 granulocytic 과 monocytic

계통의 최종 분화세포로 분화를 유도하는 것으로 나타났다. 상황 물 추출물은 HL-60 세포에 대해 분화 유도의 능력을 나타낸 것과 강력한 분화 유도제로 사용되는 DMSO 와 함께 HL-60 세포의 분화 유도제가 포함되어 있는 것으로 보인다.

Lu 등은 종양형성에 관여하는 세포주기조절인자로 촉진인자인 cyclin 계열 단백질과 이들과 결합하여 활성을 나타내는 촉매단위인 cyclin dependant kinase (CDK)와 억제인자인 cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI)들이 있는데, 이러한 세포 주기 조절인자의 이상이 다양한 종양의 발생과 진행과정에 중요한 역할을 한다고 보고 하였다²⁵⁾. Cyclin 계열 단백질 중에서 가장 대표적인 것이 cyclin D1 단백질로, 이 단백질의 작용기전은 세포증식을 조절하는 감시관문으로 가장 중요한 단계인 G1/S 기의 이행단계에 작용하는 주 조절단백질로 이 단백질의 이상발현은 조절되지 않는 세포성장을 초래해 종양의 발생에 관여한다²⁷⁾. CDKI의 cip/kip 군에 속해 있는 p27^{KIP1} 단백질의 주작용은 일종의 종양억제 유전자로 cyclin D1-CDK4 복합체와 결합하여 CDK의 활성을 억제해서 G1 기에서 S 기로 이행하는 과정을 차단함으로써 세포분열을 중단시키는 기능을 한다⁶⁾. 또한 p21^{WAF1/CIP1} 단백질은 cyclin D1-CDK4 복합체를 비활성화 시켜 세포주기를 G1 기에서 머물게 하여 세포주기를 억제 시킨다¹⁾. Western blot 분석을 통해 위의 단백질을 분석한 결과 p21, p27 은 시간이 늘어날수록 현저한 증가를 보였다. 이러한 p21, p27 의 증가는 직접적으로 CDK의 활성화를 저해하여 G1 phase arrest 를 유발하는데 관여하여 HL-60 세포의 증식을 억제하는 것으로 판단된다. 또한 이는 처리한 상황 물 추출물의 시간이 늘어날수록 세포증식을 억제하는 비율이 증가하는 것을 볼 수 있다.

이상의 결과 상황버섯은 급성 백혈병 세포주인 HL-60 세포의 세포사멸 유도 효과가 있으며, 그 기전은 세포 주기의 억제와 연관성이 있는 것으로 보여 진다. 따라서 상황버섯은 치료목적으로 사용되는 화학치료제들과 항암제의 병용에 의한 심각한 부작용 뿐만 아니라 약에 대한 내성을 나타내는 단점까지 보완시켜 백혈병의 치료에 탁월한 synergy 효과를 나타낼 것으로 사료되어진다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(02-PJ9-PGI CO-05-0003)에 의한 것임.

참고문헌

1. Andrei, L.G., Michael, S.S., Angela, L.T. p21-negative regulator of the cell cycle. PSEBM 213: 138-149, 1996.
2. Asterios, S., Tsiotsoglou Ioannis, S. Pappas Ioannis, S. Vizirianakis. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. Pharmacology & Therapeutics 100: 257-290, 2003.
3. Breitman, T.R., Selonick, S.E., Collins, S.J. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 2936-2940, 1980.
4. Brown, G., Drayson, M.T., Durham, J., Toellner, K.M., Hughes, P.J., Choudhry, M.A., Taylor, D.R., Bird, R., Michell, R.H. HL60 cells halted In G1 or S phase differentiate normally. Exp. Cell. Res. 281: 28-38, 2002.
5. Burger, C., Wick, M., Muller, R. Lineage-specific regulation of cell cycle gene expression in differentiating myeloid cells. J. Cell Sci. 107: 2047-2054, 1994.
6. Casteneda, M.V., Lee, M.H., Latres, E. et al. p27^{KIP1}: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. Cancer Res 55: 1211-1214, 1995.
7. Coco, F.L., Nervi, C., Avvisati, G., et al. Acute promyelocytic leukemia: a curable disease. Leukemia. 12: 1866-1880, 1998.
8. Collins, S., Ruscetti, F., Gallagher, R., Gallo, R. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. Proc Natl Sci USA. 75: 2458-2462, 1978.
9. de The H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., Dejean, A. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. Cell. 66: 675-684, 1991.
10. Gianni, M., Ponzanelli, I., Mologni, L., Reichert, U., Rambaldi, A., Terao, M., Garattini, E. Retinoid-dependent growth inhibition, differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. Expression and activation of caspases. Cell Death Differ. 7: 447-460, 2000.
11. Gillis, J.C., Goa, K.L. Tretinoin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and use in the management of acute promyelocytic leukemia. Drugs. 50: 897-923, 1995.
12. Han, S.B., Lee, C.W., Jeon, Y.J., Hong, N.D., Yoo, I.D., Yang, K.H. and Kim, H.M. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. Immunopharmacology, 41: 157-164, 1999.
13. He, L.Z., Merghoub, T., pandolfi, P.P. In vivo analysis of the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia in the mouse and its therapeutic implications. Oncogene. 18: 5278-5292, 1999.
14. Hickstein, D.D., Back, A.L., Collins, S.J. Regulation of expression of the CD11b and CD18 subunits of the neutrophil adherence receptor during human myeloid differentiation. J. Biol. Chem. 264: 21812-21817, 1989.
15. Hickstein, D.D., Baker, D.M., Gollahon, K.A., Back, A.L. Identification of the promoter of the myelomonocytic leukocyte integrin CD11b. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 2105-2109, 1992.

16. Horie, N., Mori, T., Asada, H., Ishikawa, A., Johnston, P.G., Takeishi, K. Implication of CDK inhibitors p21 and p27 in the differentiation of HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 992-997, 2004.
17. Huang, W.W., Yang, J.S., Lin, C.F., Ho, W.J., Lee, M.R. Pycnogenol induces differentiation and apoptosis in human promyeloid leukemia HL-60 cells. *Leuk. Res.* 29: 685-692, 2005.
18. Ji, J.H., Kim, M.N., Chung, C.K. and Ham, S.S. Antimutagenic and Cytotoxicity Effects of *Phellinus linteus* Extracts, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29(2):322-328, 2000.
19. Kakizuka, A., Miller, W.H. Jr., Umesono, K., Warrell, R.P. Jr., Frankel, S.R., Murty VV., Dmitrovsky, E., Evans, R.M. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell.* 66: 663-674, 1991.
20. Kim, H.M., Han Bae S., Oh, G.T., Kim, Y.H., Hong, D.H., Hong, N.D. and I.D. Yoo. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*, *Int. J. Immunopharmac.* 18(5):295-303, 1996.
21. Koeffler, H.P. Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implications. *Blood.* 62: 709-721, 1983.
22. Kong, G., Lee, S.J., Kim, H.J., Surh, Y.J., Kim, N.D. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by 2-(allylthio) pyrazine. *Cancer Lett.* 144: 1-8, 1999.
23. Lee, J.W., Bang, K.W. Biological Activity of *Phellinus* spp., *Food industry and Nutrition* 6(1):25-33, 2001.
24. Löwenberg, B., Downing, J.R., Burnett, A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 341: 1051-1062, 1999.
25. Lu, X., Toki, T., Konishi, I., Nikaido, T., Fujii, S. Expression of p21^{Waf1/cip1} in adenocarcinoma of the uterine cervix: a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis. *Cancer* 82: 2409-2417, 1998.
26. M Ari, D.L. Jonathan, Deconstructing a disease: RAR α , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 93: 3167-3215, 1999.
27. Muller, H., Lukas, J., Schneider, A., Warthoe, P., Bartdk, J., Eilers, M., Strauss, M. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl cad Sci USA* 91: 2945-2949, 1994.
28. Newburger, P.E., Chovaniec, M.E., Greenberger, J.S., Cohen, H.J. Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation. *J. Cell Biol.* 82: 315-322, 1979.
29. Noble, J.M., Ford, G.A., Thomas, T.H. Effect of aging on CD11b and CD69 surface expression by vesicular insertion in human polymorphonuclear leucocytes. *Clin. Sci.* 97: 323-329, 1999.
30. S. Waxman. Differentiation therapy in acute myelogenous leukemia (non-APL). *Leukemia* 14: 491-496, 2000.
31. Sachs, L. Constitutive uncoupling of pathways of gene expression that control growth and differentiation in myeloid leukemia: a model for the origin and progression of malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 6152-6156, 1980.
32. Schwaller, J., Koeffler, H.P., Niklaus, G., Loetscher, P., Nagel, S., Fey, M.F., Tobler, A. Posttranscriptional stabilization underlies p53-independent induction of p21^{WAF1/CIP1}/SDI1 in differentiating human leukemic cells. *J. Clin. Invest.* 95: 973-979, 1995.
33. Song, Y.S., Kim, S.H., Sa, J.H., Jin, C.B., Lim, C.J. and E.H. Park. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*, *Journal of Ethnopharmacology* 88: 113-116, 2003.
34. Zhu, B., Zhang, L.H., Zhao, Y.M., Cui, J.R., Strada, S.J. -chloroadenosine induced HL-60 cell growth inhibition, differentiation, and G(0)/G(1) arrest involves attenuated cyclin D1 and telomerase and up-regulated p21(WAF1/CIP1). *J. Cell Biochem,* 2005.