

# 상황보리 추출물에 의한 p21 및 Bax 발현 증가와 caspase 활성화를 통한 U937 인체백혈병 세포의 apoptosis 유발

박 철 · 김현중 · 정경태<sup>1</sup> · 윤태경<sup>2</sup> · 최병태<sup>3</sup> · 이용태 · 박동일 · 최영현\*

동의대학교 한의과대학 한의학과, 1: 자연과학대학 임상병리학과,  
2: 공과대학 환경공학과, 3: 부산대학교 한의학전문대학원 해부학교실

## Apoptotic Cell Death by Methanol Extract of *Phellinus linteus*-Barley Corn in Human Leukemic U937 Cells through Induction of p21 and Bax, and Activation of Caspase-3

Cheol Park, Hyun Joong Kim, Kyung Tae Chung<sup>1</sup>, Tae Kyung Yoon<sup>2</sup>, Byung Tae Choi<sup>3</sup>,  
Yong Tae Lee, Dong Il Park, Yung Hyun Choi\*

Department of Oriental Medicine, College of Oriental Medicine,  
1: Department of Biomedical Laboratory Science, College of Natural Science,  
2: Environmental Engineering Major, College of Engineering, Dong-Eui University.  
3: Department of Anatomy, Pusan National University Graduate School of Oriental Medicine

*Phellinus linteus* is a well-known Oriental medicinal fungus that has various biological activities, including immunomodulatory and anti-tumor activities, the mechanisms of which are poorly understood. In the present study, we investigated the anti-proliferative activity of the methanol extract of *P. linteus*-Barley corn (MEPLB) in human leukemic U937 cells. It was found that exposure of U937 cells to MEPLB resulted morphological change and growth inhibition in a dose-dependent manner as measured by trypan blue count and MTT assay. Upon treatment with MEPLB, U937 cells developed many of the hallmark features of apoptosis, including condensation of chromatin and an increase in the sub-G1 population suggesting that the anti-proliferative effect of MEPLB is associated with the induction of apoptosis. The anti-proliferative and apoptotic effects of MEPLB were connected with a marked induction of the pro-apoptotic Bax and cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p21 in a p53-independent manner. Additionally, MEPLB treatment significantly induced the caspase-3 activity in U937 cells. Taken together, the present results suggest that apoptotic signals evoked by MEPLB in human leukemic U937 cells may converge caspase-3 activation through an up-regulation of Bax rather than a down-regulation of Bcl-2 or Bcl-xL.

Key words : *Phellinus linteus*, U937, Barley corn, apoptosis, p21, Bax

### 서 론

최근 보고되고 있는 연구결과들에서 버섯은 단순한 식품이상의 약리적인 효능을 가지고 있는 것으로 나타나고 있으며, 특히 면역 증강 및 항암활성에 큰 효능이 있음을 보여주고 있다. 동의보감<sup>1)</sup>에

서 상목이(桑木耳)이라 하여 탕액편에 소개된 바 있는 상황버섯은 본초강목<sup>2)</sup>에서는 木耳, 桑耳, 桑黃 등으로 언급하고 있으며, 약효 효능을 黑桑黃과 金桑黃으로 나누어 설명하고 있으나, 대체적으로 여성 자궁, 남성 생식기, 소화기 계통의 어혈, 혈병, 종양 및 염증성 질환을 치료하는 효능이 있음을 시사하고 있다. 또한 상황버섯은 기원이 다양하고 종류가 많으나, 가장 효능이 탁월하고, 예로부터 인정하고 있는 것은 *Phellinus linteus*로 부터 분리한 단백다당체로서 뽕나무에 이의 균사를 이식하여 재배한 것을 말하며 여성의 자궁 질환 특히 자궁의 종양이나, 장의 염증, 종양 질환 및 속취 등에

\* 교신저자 : 최영현, 부산시 진구 양정 2동 산 45-1 동의대학교 한의과대학

· E-mail : choiyh@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-7413

· 접수 : 2007/07/09 · 채택 : 2007/08/30

효능이 있어 인체의 면역 증강 및 항암 효능이 뛰어나다<sup>3,5)</sup>.

현재까지 상황버섯에 대한 실험적 연구는 주로 항암과 관련된 연구가 주를 이루고 있으며, 면역 증강과 관련된 연구도 상황버섯 단일 추출물질에 국한된 보고이며<sup>6-10)</sup>, 약리효능이 우수한 식품과의 융합에 의한 새로운 제품의 개발 및 기능성에 관한 연구는 거의 이루어지지 못하고 있다. 그러나 최근 들어 버섯을 이용한 제품 개발 사례가 증가하면서 산업 응용의 현실성이 증명되고 있다. 또한 현대인의 습관성 질병 및 난치병 발병의 빈도와 환자의 증대는 장기적 치유 보다는 예방이 최우선이라는 일반적 컨셉이 등장하면서 서양 의학이 아닌 전통의학 및 대체의학의 대중화가 일반인에게 유도되고 있다. 따라서 특정한 기능성을 갖춘 약용버섯과 효능이 검증된 식품제제를 융합시킨다면 보다 새로운 고부가가치 제품이 탄생될 수 있다고 판단된다.

이러한 관점에서 최근 식품으로서의 기능성이 우수한 보리에 상황버섯 균사체를 접목시켜 개발한 상황보리(*P. linteus-Barley corn*)는 wellbeing 소비시장에 맞춘 신기능성 식품으로 버섯 균사체를 발효 공학적 방법으로 응용한 새로운 발효 식품이라 할 수 있으나(특허번호; 10-2005-0017321), 그에 관한 구체적인 자료는 제시된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 상황버섯의 우수한 항암효능에 관한 기존 연구를 상황보리 추출물로서 재확인하고자 인체 백혈병세포 U937을 이용하여, 이들 암세포의 증식에 미치는 상황보리 추출물의 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

상황보리 추출물(methanol extract of *P. linteus-Barley corn*, MEPLB)을 얻기 위하여 잘게 파쇄된 상황보리 100 g을 1,000 ml의 methanol에 48시간 동안 중탕하여 3,000 rpm으로 20분간 원심 분리시켜 침전물을 제거 하였다. 이를 다시 0.45 µm의 여과지를 이용하여 부유 성분을 걸러낸 후 동결건조하여 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 1 g/ml의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20°C에 보관하였고 적정 농도로 배지에 희석하여 처리하였다. mRNA 분석을 위하여 Bioneer (Taejeon, Korea)에서 구입한 primer는 Table 1에 나타내었고 caspases의 in vitro 활성 측정을 위한 colorimetric assay kits는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다.

### 2. 세포의 배양

실험에 사용한 U937 인체혈구암세포는 생명공학연구소 (KRIBB, Taejeon, Korea)에서 분양 받았으며 90%의 RPMI-1640 배지(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)에 1%의 penicillin 및 streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 조건하에서 배양하였고 배지는 매 48시간마다 교환해주었다.

### 3. 도립 현미경을 이용한 세포형태의 관찰

세포 배양용 100 mm petri dishes에 세포를 1 X 10<sup>5</sup> 개/ml

정도로 분주하여 상황보리 추출물을 적정농도로 희석 처리하여 48시간 동안 배양한 후, 도립 현미경(inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배의 배율로 각 농도에 따른 형태의 변화를 관찰한 다음 사진을 촬영하였다.

Table 1. Sequence of primers used for RT-PCR

Gene name		Sequence
GAPDH	Sense	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
Bax	Sense	5'-ATG GAC GGG TCC GGG GAG-3'
	Antisense	5'-TCA GCC CAT CTT CTT CCA-3'
Bcl-2	Sense	5'-CAG CTG CAC CTG ACG-3'
	Antisense	5'-ATG CAC CTA CCC AGC-3'
Bcl-XL	Sense	5'-CGG GCA TTC AGT GAC CTG AC-3'
	Antisense	5'-TGA CGG ACC AGC GGT TGA CC-3'
XIAP	Sense	5'-GAA GAC CCT TGG GAA CAA CA-3'
	Antisense	5'-CGC CTT AGC TGC TCT CTT CAG T-3'
clAP-1	Sense	5'-TGA GCA TGC AGA CAC ATG C-3'
	Antisense	5'-TGA CGG ATG AAC TCC TGT CC-3'
clAP-2	Sense	5'-CAG AAT TGG CAA GAG CTG G-3'
	Antisense	5'-CAC TTG CAA GCT GCT CAG G-3'
survivin	Sense	5'-GCA TGG GTG CCC CGA CGT TG-3'
	Antisense	5'-GCT CCG GCC AGA GGC CTC AA-3'
p21	Sense	5'-CTC AGA GGA GGC GCC ATG-3'
	Antisense	5'-GGG CGG ATT AGG GCT TCC-3'
COX-1	Sense	5'-TGC CCA GCT CCT GGC CGG CCG CTT-3'
	Antisense	5'-GTG CAT CAA CAC AGG CGC CTC TTC-3'
COX-2	Sense	5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3'
	Antisense	5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'
iNOS	Sense	5'-AGA GAG ATC CGG TTC ACA-3'
	Antisense	5'-CAC AGA ACT GAG GGT ACA-3'
hTERT	Sense	5'-AGC CAG TCT CAC CTT CAA CC-3'
	Antisense	5'-GTT CTT CCA AAC TTG CTG ATG-3'
hTR	Sense	5'-TCT AAC CCT AAC TGA GAA GGG CGT AG-3'
	Antisense	5'-GTT TGC TCT AGA ATG AAC GGT GGA AG-3'
TEP-1	Sense	5'-TCA AGC CAA ACC TGA ATC TGA G-3'
	Antisense	5'-CCC CGA GTG AAT CTT TCT ACG C-3'
c-myc	Sense	5'-AAG ACT CCA GCG CCT TCT CTC-3'
	Antisense	5'-GTT TTC CAA CTC CGG GAT CTG-3'
Sp-1	Sense	5'-ACA GGT GAG VTT GAC CTC AC-3'
	Antisense	5'-GTT GGT TTG CAC CTG GTA TG-3'

### 4. Hemocytometer를 이용한 세포 생존율의 측정

정상 및 상황보리 추출물이 함유된 배지에서 자란 세포를 모아 상층액을 제거하고 다시 PBS를 1 ml 첨가하여 잘 섞은 후 세포 부유액과 0.5% trypan blue (Gibco BRL)를 동량으로 섞은 후 2분간 처리한 후 위상차 현미경(Carl Zeiss)을 이용하여 살아 있는 세포를 계수하였다. 이에 따른 결과를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

### 5. MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포 배양용 6 well plate에 분주한 인체혈구암세포에 상황보리 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거하고 적정량의 tetrazolium bromide salt (MTT, Amresco, Solon, OH, USA)를 성장배지로 희석하여 3시간 동안 처리 후, MTT 시약을 깨끗하게 제거하고 DMSO를 1 ml 씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 옮겨서 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정

은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Microsoft EXCEL program을 사용하여 분석하였다.

#### 6. DAPI staining에 의한 세포핵의 형태 관찰

준비된 세포를 모은 다음 3.7% formaldehyde 용액으로 10분 동안 고정 후, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, St. Luis, MO, USA) 용액으로 상온에서 염색시켰다. 15분 정도 염색 시킨 후, PBS로 DAPI 용액을 충분히 세척하고 증류수로 재빨리 세척한 다음 absolute alcohol을 이용하여 탈수과정을 거친 slide glass 위에 mounting solution을 처리한 후 형광 현미경 (Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 400배의 배율로 각 농도에 따른 암세포의 핵의 형태 변화를 관찰한 다음 Axio Vision 프로그램을 이용하여 사진 촬영을 하였다.

#### 7. Flow cytometry 분석

정상 및 상황보리 추출물이 함유된 배지에서 48시간 동안 배양시킨 암세포들을 2,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 세포들만 모았다. 여기에 다시 PBS를 첨가하여 충분히 씻은 다음 2,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상층액만 버리고 남은 세포에 CycleTEST PLUS DNA REAGENT Kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 고정 및 염색을 하여 4℃, 암실에서 30분 동안 반응을 시킨 다음 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 Modifit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

#### 8. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석

준비된 인체혈구암세포를 PBS로 세척하고 TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 처리하여 4℃에서 1시간 동안 반응시켜 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, 각각의 primer, DEPC water 그리고 ONE-STEP RT-PCR PreMix Kit (Intron, Korea)를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 증폭하였다. 각 PCR 산물들을 양적 차이를 확인하기 위하여 1X TAE buffer로 1% agarose gel을 만들고 well 당 각각의 primer에 해당하는 PCR 산물에 DNA gel loading solution을 섞어서 loading 한 후 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동으로 DNA 분리가 끝난 gel을 EtBr를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하고 Picture works' photo enhancer를 이용하여 사진 촬영을 하였다. 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다.

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

상황보리 추출물 처리에 의한 caspases의 활성을 알아보기 위하여 단백질을 추출하고 정량하여 각각 150 µg의 단백질을 fluorogenic peptide 기질 100 uM이 함유된 extraction buffer [40 mM HEPES (pH 7.4), 20% glycerol (v/v), 1 mM EDTA, 0.2%

NP-40 and 10 mM DL-DTT] 50 µ에 혼합하였으며, microtiter plate에 다시 extraction buffer에 희석하여 각 sample 당 총 volume이 100 µ가 되게 하였다. 준비된 plate를 3℃에서 3시간 동안 반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm의 흡광도를 이용하여 반응의 정도를 측정하였다. 실험에 사용된 기질은 caspase-3의 경우에는 Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-p-nitroaniline (pNA)이었고 caspase-9은 Leu-Glu-His-Asp (LEHD)-pNA이다.

#### 10. 통계 처리

상황보리 추출물 처리의 효과에 대한 통계처리는 Student's t-test에 의하였고, p-value는 0.05 미만인 경우에만 유의성을 인정하였다.

## 결 과

#### 1. U937 세포의 형태 및 증식 억제에 관한 상황보리 추출물의 효과

예비실험에 의하여 설정된 다양한 농도 범위 내에서 상황보리 추출물을 48시간 처리 후 도립 현미경에 의하여 관찰된 U937 세포의 형태는 상황보리 추출물 처리 농도의 증가에 따라 다양한 세포의 형태적 변형을 동반하였으며, 고농도 상황보리 추출물 처리군에서는 세포의 단편화를 초래하였다(Fig. 1A). U937 세포의 형태적 변형과 연관된 생존도 저하 및 증식 억제 효과의 정량화하기 위하여 hemocytometer counting 및 MTT assay를 실시한 결과는 Fig. 1B에 나타난 바와 같이 상황보리 추출물의 처리 농도가 증가될수록 살아있는 세포의 수가 현저하게 감소되었음을 확인하였다. 동일 조건에서 MTT assay에 의한 증식억제에 미치는 상황보리 추출물의 영향 역시 상황보리 추출물 처리 농도가 증가할수록 매우 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 1C).

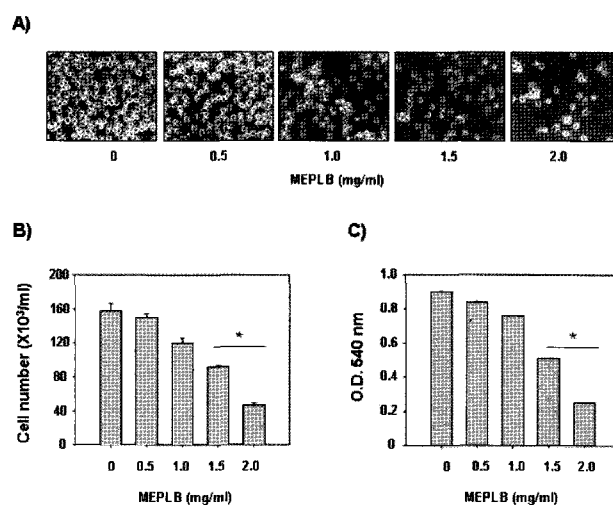


Fig. 1. Effect of methanol extract of *Phellinus linteus*-Barley corn (MEPLB) on the growth of human leukemic U937 cells. (A) U937 cells were treated with variable concentrations of MEPLB for 48 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, X200. (B) The cells were trypsinized and the viable cells were scored by hemocytometer counts of trypan blue-excluding cells. (C) The growth inhibition was measured by the metabolic-by-based MTT assay. The data shown are means  $\pm$  SD of three independent experiments. The significance of differences was determined by Student's t test: \*P < 0.05 versus untreated control.

2. 상황보리 추출물 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발

정상 및 상황보리 추출물이 혼합된 배지에서 48시간 동안 배양된 세포들을 고정 후, 핵의 형태변화를 DAPI 염색 후 형광 현미경 하에서 조사한 결과, Fig. 2A의 결과에서 알 수 있듯이 정상 배지에서 자란 U937 세포들은 핵의 전체가 완전한 형태로 염색되는 양상을 보였으나, 상황보리 추출물을 처리한 경우 처리 농도가 증가할수록 apoptotic body의 형성 정도가 증가되었다. DNA flow cytometry 분석을 통한 세포주기의 sub-G1기에 해당되는 세포들의 빈도를 조사한 결과는 Fig. 2C에 나타난 바와 같이 모두 상황보리 추출물 처리 농도 의존적으로 증가되었음을 알 수 있었다.

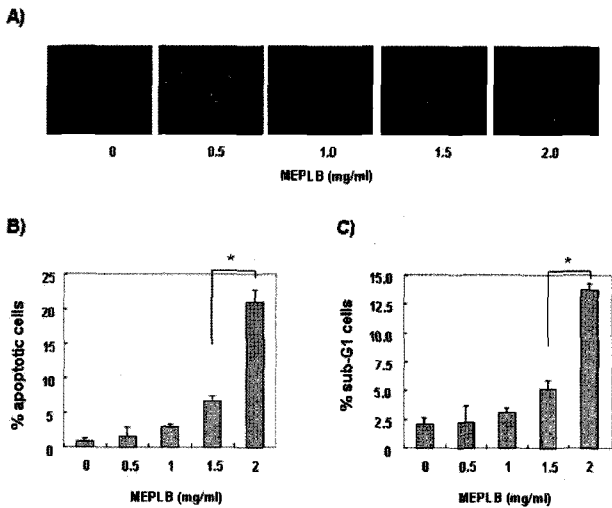


Fig. 2. Induction of apoptosis by MEPLB in human leukemic U937 cells. (A) Cells were treated with MEPLB for 48 h and then stained with DAPI solution. After 10 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and nuclear morphology was photographed with a fluorescent microscope using blue filter. Magnification, X400. (B) The graph demonstrates the percentage of cells with formation of apoptotic bodies. (C) Cells were exposed for 48 h with increasing concentration of MEPLB and then the cells were collected and stained with PI for flow cytometry analysis. The percentages of cells with hypodiploid DNA (sub-G1 phase) contents represent the fractions undergoing apoptotic DNA degradation. The data shown are means  $\pm$  SD of three independent experiments. The significance of differences was determined by Student's *t* test: \**P* < 0.05 versus untreated control.

3. 상황보리 추출물의 처리에 따른 Cdk inhibitor p21 발현의 증가

다음은 상황보리 추출물의 처리에 의한 U937 세포의 증식억제 현상이 세포주기 조절 억제인자 p21의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하였다. Fig. 3의 결과에서 볼 수 있듯이 p21 유전자의 전사 수준에서의 발현이 상황보리 추출물 1.0 mg/ml 처리군에서는 약 3배 정도, 2.0 mg/ml 처리군에서는 약 5배 정도 증가하였음을 알 수 있었다.

4. Bcl-2 및 IAP family에 속하는 유전자의 발현에 미치는 상황보리 추출물의 영향

인체 U937 백혈병 세포에서 상황보리 추출물에 의한 apoptosis 유발에 Bcl-2 및 IAP family 인자들의 관련 여부를 RT-PCR로 조사한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. Fig. 4의 결과에서 알 수 있듯이 apoptosis를 유발하는 것과 관련이 있는

Bax 유전자의 발현은 상황보리 추출물 처리 농도가 증가될수록 증가되는 경향성을 보여주었는데, 1.0 mg/ml 및 2.0 mg/ml 처리군에서 각각 2.8배 및 5.2배 정도로 발현이 증가되었음을 알 수 있었다. 그러나 Bcl-2와 Bcl-XL의 경우는 정상 배지 및 상황보리 추출물이 첨가된 배지에서 배양된 세포 모두에서 큰 변화를 보여주지 않았다. 그리고 Fig. 5의 결과에서 알 수 있듯이 상황보리 추출물에 따른 조사된 4가지 IAP family의 유전자 발현은 전사 수준에서 유의적인 차이점을 발견할 수 없었다.

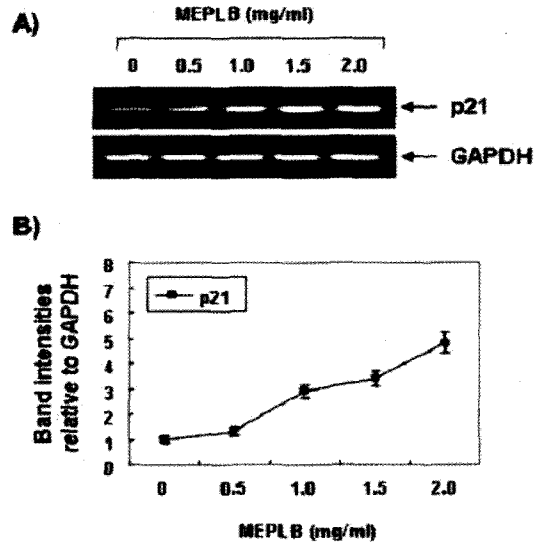


Fig. 3. Induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by MEPLB in human leukemic U937 cells. (A) After 48 h incubation with MEPLB, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with p21 primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) mRNA levels of p21 were normalized against GAPDH.

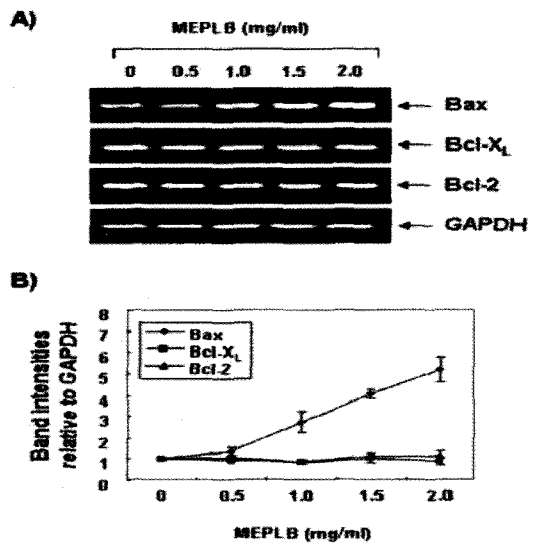


Fig. 4. Effects of MEPLB treatment on the Bcl-2 family expression in U937 cells. (A) After 48 h incubation with MEPLB, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control. (B) mRNA levels of Bax, Bcl-XL and Bcl-2 were normalized against GAPDH.

5. Caspases 활성화 및 몇 가지 부가적인 주요 세포증식 관련 유전자의 발현에 미치는 상황보리 추출물의 영향

상황보리 추출물에 의한 apoptosis 유발과 연관된 caspase-3 및 caspase-9의 활성화 여부를 조사한 결과 caspase-3의 경우, 정상배지에서 배양된 U937 세포에 비하여 2.0 mg/ml의 상황보리 추출물이 처리된 배지에서 배양된 U937 세포에서 약 2.5배 이상의 활성화 증가를 보여주었으나, caspase-9의 경우는 상대적으로 활성화의 정도가 낮게 나타났다(Fig. 6).

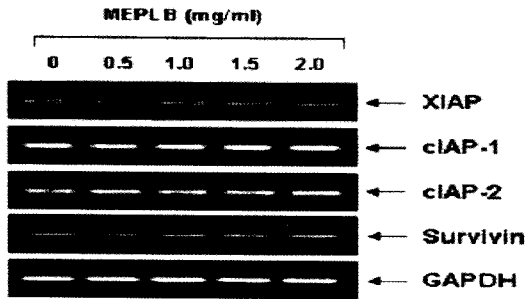


Fig. 5. Effects of MEPLB treatment on the IAP family expression in U937 cells. After 48 h incubation with MEPLB, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control.

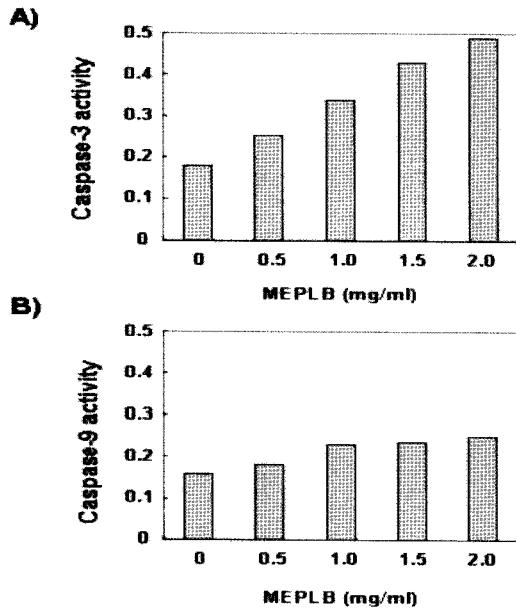


Fig. 6. Activation of caspase-3 by MEPLB treatment in U937 cells. Cells were treated with indicated concentrations of MEPLB for 48 h, collected and then lysed. Aliquots (150 µg proteins) were incubated with DEVD-pNA and LEHD-pNA for caspase-3 and caspase-9 activity, respectively, at 37°C for 3 h. The released fluorescent products were measured. Data represent the mean of two independent experiments.

그러나 cyclooxygenases (COX-1/2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 telomere 조절인자들[human telomerase reverse transcriptase (hTERT), telomere end-binding protein (TEP)-1 및 human telomerase RNA (hTR)]과 그들의 전사조절 인자들의 발현은 상황보리 추출물의 처리에 따른 큰 변화가 없었다(Fig. 7).

고찰

본 연구의 수행을 위하여 예비 조건에서 설정된 상황보리 추출물의 농도 및 처리시간에 따라 인체백혈병 U937 세포에 상황보리 추출물 처리한 후, 형태적 변형에 따른 세포의 생존도 저하 및 증식 억제 효과를 조사한 결과는 Fig. 1B 및 C에 나타난 바와 같다. 두 실험조건의 결과에서 상황보리 추출물 처리 농도가 증가할수록 생존도의 저하 및 증식 억제를 확인하였으며, 이러한 형태적 변형과 생존율 및 증식의 억제효과가 apoptosis 유발과 밀접한 관계가 있는지의 여부를 조사하기 위하여 핵의 형태변화를 DAPI 염색 후 형광 현미경 하에서 조사하였다. Fig. 2A의 결과에서 알 수 있듯이 정상배지에서 자란 세포에서는 관찰할 수 없었던, 전형적인 apoptosis가 유발된 핵에서 관찰되는 핵의 응축에 의한 apoptotic body의 출현이 상황보리 추출물 처리 농도에 따라 증가되었음을 확인하였다. 즉 대조군(2.3%)에 비하여 1 mg/ml 및 2 mg/ml 처리군에서는 각각 6.8% 및 12.1%로 나타나 약 2.9배 및 5.2배의 증가 현상을 보여 상황보리 추출물 처리에 따른 U937 세포의 증식 억제 및 생존율 감소는 apoptosis 유발과 밀접한 연관성이 있음을 보여주었다.

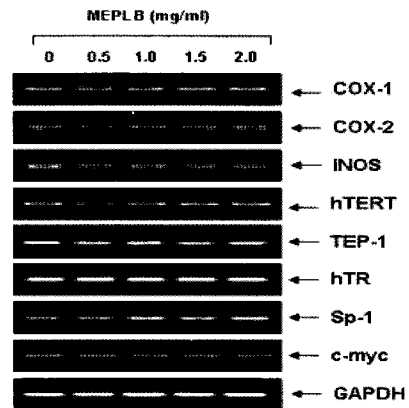


Fig. 7. Effects of MEPLB treatment on the COX-1, COX-2, iNOS, hTERT, TEP-1, hTR, Sp-1 and c-myc expression in U937 cells. After 48 h incubation with MEPLB, total RNAs were isolated and reverse-transcribed. The resulting cDNAs were subjected to PCR with indicated primers and the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by EtBr staining. GAPDH was used as an internal control.

한편 포유동물의 세포주기의 진행 과정에서 cyclin/Cdk complex와 결합하여 그 활성을 억제함으로써 세포증식을 차단 하는데 관여하는 유전자군을 cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)라고 한다<sup>11,12</sup>. 이들 중 CIP/KIP 군에 속하는 p21은 종양 억제유전자인 p53에 의존적인 경로 또는 비의존적인 경로를 통하여 활성화되어 G1, S 및 G2/M기에 관련된 모든 cyclin/Cdk complex에 대한 억제인자로 작용하며, 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 조절인자이다<sup>13-19</sup>. 따라서 상황보리 추출물의 처리에 의한 U937 세포의 증식억제 현상이 세포주기 조절 억제인자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 세포주기의 진행 및 apoptosis 조절에 가장 중요한 역할을 하는 p21(WAF1/CIP1)

의 발현에 미치는 상황보리 추출물의 영향을 RT-PCR법으로 조사하였다. Fig. 3의 결과에서 볼 수 있듯이 p21의 발현은 대조군에 비하여 1.0 mg/ml 및 2.0 mg/ml 처리군에서는 각각 3배 및 5배 이상의 증가를 보여주었는데, 본 연구에 사용된 U937 세포의 경우 종양억제 유전자 p53이 결손된 세포주이므로<sup>23)</sup> 상황보리 추출물 처리에 의한 p21의 발현 증가는 p53과는 무관함을 알 수 있었으며, 상황보리 추출물 처리에 따른 p21의 발현 증가는 U937 세포의 증식억제와 어느 정도 연관성이 있음을 알 수 있었다.

Bcl-2 family에 속하는 몇 가지 중요한 인자들은 apoptosis 유발 조절에 가장 대표적인 유전자로 알려져 있는데, 그 중 Bcl-2와 Bcl-XL은 anti-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발을 억제하는 기능을 가지며, Bax는 대표적인 pro-apoptotic 분자로서 apoptosis의 유발과 관계가 있다<sup>20,21)</sup>. Anti-apoptotic 분자와 pro-apoptotic 분자는 서로 dimer의 형태로 존재하여 균형을 유지하고 있지만 이러한 균형이 깨어지게 되면 mitochondria로부터의 cytochrome c를 유리시켜 cysteine-related protease인 caspase, 종양억제 유전자인 p53, DNA의 단편화와 연관된 endonuclease 등의 활성을 조절하며, apoptosis가 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>20,22)</sup>. 또한 apoptosis에 관여하는 여러 인자들 중 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) family에 속하는 여러 유전자 산물은 곤충세포에서 바이러스 감염에 의한 apoptosis를 억제하기 위한 baculoviral 단백질 군들로서 외부 신호에 의한 세포 내 anti-apoptotic 활성을 지니는 것으로 알려져 있다<sup>24-26)</sup>. 그리고 이들 중 어떤 IAPs는 caspases와의 직·간접적인 결합을 통하여 apoptosis 유발을 막을 수 있는 것으로 밝혀져 있다<sup>25,26)</sup>. 따라서 상황보리 추출물 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발에 이와 같은 Bcl-2 및 IAP family에 속하는 인자들의 발현 변화 유발의 정도를 관찰한 결과, Fig. 4 및 5에 제시된 바와 같이 IAP family에 속하는 유전자는 큰 변화가 없었으나, pro-apoptotic 인자에 해당하는 Bax의 발현은 상황보리 추출물이 처리된 U937 세포에서 유의적으로 증가되었음을 확인하였다. 이는 결국 상황보리 추출물 처리에 의한 apoptosis이 유발에는 최소한 Bcl-2 family가 중요한 역할을 하고 있음을 의미하는 것이며, Bcl-2와 Bcl-XL의 발현 감소보다는 Bax의 상대적 발현 증가로 인한 apoptosis 유발 관련 인자들의 활성화가 이루어지고 있음을 시사하여 주는 것이다.

Caspase protease라는 효소는 apoptosis 유발에 중심적인 조절인자로서 작용하는 것으로 알려져 있는데, 이 단백질들은 핵과 mitochondria의 외막에 불활성 상태인 proenzyme 형태로 존재하다가 Bcl-2 family와 같은 apoptosis 유도를 활성화 시키는 신호에 의해 mitochondria로부터 유리된 cytochrome c에 의하여 활성화된 protease로 전환되어 직접 또는 간접적으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다<sup>27-29)</sup>. 따라서 caspases의 활성화는 apoptosis의 유발에 대한 증거가 될 수 있다는 것이 많은 선행연구 등에서 검증되어 왔다<sup>30)</sup>. 지금까지 알려진 caspases 중 대부분의 apoptosis가 유발된 세포에서 높은 활성도를 보여주는 caspase-3 및 caspase-9의 in vitro 활성에 미치는 상황보리 추출물의 영향을 조사하였다. 이들의 활성 측정

위하여 caspase-3의 경우는 DEVD-pNA를, caspase-9의 활성 측정을 위해서는 LEHD-pNA를 기질로 사용하였다. 본 연구의 결과, caspase-9에 비하여 caspase-3은 상황보리 추출물이 처리된 배지에서 배양된 세포에서 약 2.5배 이상의 활성 증가를 나타내어 상황보리 추출물에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발은 Bax의 발현 증가에 따른 caspases의 활성도가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 염증반응과 함께 세포의 암화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 COXs 및 iNOS, 그리고 노화, 혈관신생 및 면역계질환 등에서 뿐 만 아니라 암의 발생과 진행에 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려진 telomere 조절인자들인 hTERT, TEP-1 hTR 등<sup>33,34)</sup>은 상황보리 추출물의 처리에 따른 큰 변화가 없었다.

이상의 연구 결과에 의하면 상황보리 추출물의 처리에 의한 인체혈구암세포의 성장억제는 apoptosis 유발과 뚜렷한 연관성이 있었으며, 상황보리 추출물에 의한 암세포 증식억제 및 apoptosis 유발과정에는 Cdk inhibitor인 p21의 발현 증가 및 Bax의 발현 증가에 따른 caspase-3의 활성도가 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 이는 선행연구에서 나타난 상황버섯 균사체에 의한 항암활성 효과인 p21과 Bax의 발현 증가 및 caspase-3의 활성화 결과와 매우 유사한 것으로서<sup>9)</sup> 상황버섯 유래 생리활성 물질의 항암작용 유사성을 보여주는 결과로 해석할 수 있을 것이다. 그러나 본 연구의 결과는 in vitro 조건에서 수행된 결과이므로 처리농도와 연관된 추가적인 in vivo 실험에 의한 유효성 검증이 필요하므로 현재의 결과로만은 상황보리 추출물의 항암작용 여부를 논하기는 매우 어렵다. 그리고 상황보리 추출물에서 관찰되는 유효성분의 추출 및 동정이 필요할 것이고 그에 따른 추가적인 실험이 수행되어야 할 것이다. 따라서 본 연구의 결과는 향후 수행될 추가 실험을 위한 기초 자료로서 그 가치가 매우 높을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 논문은 2006년 부산테크노파크 공모과제로 지원되는 연구비로 조성되었습니다.

## 참고문헌

1. 허준. 동의보감. 서울, 남산당, p 719, 1993.
2. 이시진. 본초강목. 서울, 고문사, p 980, 1975.
3. Yamada, S. Mycelial culture method of *Phellinus linteus*. Korean patent, pp 92-1194, 1994.
4. Choi, J.H., Ha, T.M., Kim, Y.H., Rho, Y.D., Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. Kor. J. Mycol. 24: 214-222, 1996.
5. Ji, J.H., Kim, M.N., Chung, C.K., Ham, S.S., Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts, J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 29: 322-328, 2000.
6. Jung, M.E., Ham, S.S., Nam, S.M., Kang, I.J., Kim, S.J.,

- Chung, C.K. Biochemical and histological effects of *Phellinus linteus* methanol extract on liver lipid metabolism of rat fed CCl<sub>4</sub> and high fat, J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 30(2):331-337, 2001
7. Lee, H.J., Lee, H.J., Park, J.M., Song, G.Y., Kang, K.S., Kim, S.H., Study on antitumor and immunomodulatory effects of Cambodian *Phellinus linteus*, Kor. J. Oriental Physiology and Pathology, 16: 332-337, 2002.
  8. Kim, J.S., Kim, J.H., Lee, H.J., Khil, J.H., Kim, S.H., Kim, D.H. A study on cytokine modulating effect of three origins of *Phellinus linteus*, Kor. J. Oriental Physiology and Pathology 17: 898-904, 2003.
  9. Choi, Y.H., Huh, M.K., Ryu, C.H., Choi, B.T., Jeong, Y.K. Induction of apoptotic cell death by mycelium extracts of *Phellinus linteus* in human neuroblastoma cells. Int. J. Mol. Med. 14: 227-232, 2004.
  10. Kim, G.Y., Lee, J.Y., Lee, J.O., Ryu, C.H., Choi, B.T., Jeong, Y.K., Lee, K.W., Jeong, S.C., Choi, Y.H. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70: 1218-1226, 2006.
  11. Elledge, S.J., Harper, J.W. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. Curr. Opin. Cell Biol. 6: 847-852, 1994.
  12. Harper, J.W. Cyclin dependent kinase inhibitors. Cancer Surv. 29: 91-107, 1997.
  13. 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.
  14. Taylor, W.R., Stark, G.R. Regulation of the G<sub>2</sub>/M transition by p53. Oncogene 20: 1803-1815, 2001.
  15. Datto, M.B., Yu, Y., Wang, X.F. Functional analysis of the transforming growth factor  $\beta$  responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. J. Biol. Chem., 270: 28623-28628, 1995.
  16. 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.
  17. Zeng, Y.X., El-Deiry, W.S. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. Oncogene, 12: 1557-1564, 1996.
  19. el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., Wiman, K.G., Mercer, W.E., Kastan, M.B., Kohn, K.W., Elledge, S.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G<sub>1</sub> arrest and apoptosis. Cancer Res, 54: 1169-1174, 1994.
  20. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. Nature, 391: 496-499, 1998.
  21. Osford, S.M., Dallman, C.L., Johnson, P.W., Ganesan, A., Packham, G. Current strategies to target the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer cells. Curr. Med. Chem. 11: 1031-1039, 2004.
  22. Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell, 74: 957-967, 1993.
  23. Donovan, M., Cotter, T.G. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. Biochim. Biophys. Acta. 1644: 133-147, 2004.
  24. Holcik, M., Gibson, H., Korneluk, R.G. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. Apoptosis, 6: 253-261, 2001.
  25. Cheng, J.Q., Jiang, X., Fraser, M., Li, M., Dan, H.C., Sun, M., Tsang, B.K. Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway. Drug Resist. Updat. 5: 131-146, 2002.
  26. Salvesen, G.S., Duckett, C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3: 401-410, 2002.
  27. Nagata, S. Apoptosis by death factor. Cell, 88: 355-365, 1997.
  28. Allen, R.T., Cluck, M.W., Agrawal, D.K. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. Cell Mol. Life Sci. 54: 427-445, 1998.
  29. Rao, L., White, E. Bcl-2 and the ICE family of apoptotic regulators: making a connection. Curr. Opin. Genet. Dev. 7: 52-58, 1997.
  30. Vegran, F., Boidot, R., Oudin, C., Riedinger, J.M., Lizard-Nacol, S. Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance Bull Cancer, 92: 219-226, 2005.
  31. Giercksky, K.E. COX-2 inhibition and prevention of cancer. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol, 15: 821-833, 2001.
  32. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- $\kappa$ B activation. Mutat. Res. 1: 243-268, 2001.
  33. Poole, J.C., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). Gene, 269: 1-12, 2001.
  34. Kyo, S., Inoue, M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy. Oncogene, 21: 688-697, 2002.