

HepG2세포에서 향버섯 추출물이 세포주기 조절단백질에 미치는 영향

배준태 · 장종선 · 이갑량[†]
영남대학교 식품영양학과

Effect of *Sarcodon aspratus* Extract on Expression of Cell Cycle-Associated Proteins in HepG2 Cells

Jun-Tae Bae, Jong-Sun Chang and Kap-Rang Lee[†]

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract

We investigated the effect of *Sarcodon aspratus* extract on expression of cell cycle regulators. Methanol extract of *Sarcodon aspratus* showed a growth suppression on HepG2. As shown by western blot analysis, the expressions of cyclin A and D1 known as cell cycle regulators were decreased after treatment of *Sarcodon aspratus* extract. On the other hand, the expression of cyclin B1 was increased in the presence of *Sarcodon aspratus* extract. Furthermore, the expression of p53, a tumor suppressor gene, and p27, a cell cycle dependent protein kinase inhibitor, were increased, whereas the expression of PCNA was decreased. In conclusion, our study suggests that growth inhibitory effect of *Sarcodon aspratus* methanol extract on HepG2 is induced by cell cycle arrest in the G1 phase caused by decrease in cyclin A, D1 expressions and increases in p53, p27 expression.

Key words: *Sarcodon aspratus*, cell growth, cell cycle-associated proteins

서 론

세포주기는 모든 진핵세포들의 성장에 필수적으로 거치는 주기로서 세포는 G1에서 S, G2, M 기를 거치면서 분열, 성장한다(1). 각 세포 단계별로 관련되는 효소가 정상적으로 조절받지 못하게 되면 세포는 암세포와 같은 비정상적인 세포 성장을 하게 되는 것으로 알려져 있다(2). 특히 cyclin-cdk 복합체가 세포주기 변환시 주요 조절자로 작용하며 그 중에서도 cyclin B와 cdc2 복합체는 유사분열 단계인 M기를 유도하고 cyclin A와 cdk2는 DNA 합성단계인 S기와 G2기 동안에 복합체를 형성하여 S기 조절에 관여한다고 보고되고 있으며 cyclin D는 cdk2, 4, 6와 복합체를 형성하고 cyclin E는 cdk2와 복합체를 형성하여 DNA 합성의 시작 단계인 G1기 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다(3,4). 또한 암세포에서는 세포주기 조절 효소인 cyclin/CDK가 비정상적으로 과활성화되어 있으며 이들 cyclin/CDK 복합체의 활성을 저해하는 단백질인 p16, p21, p27 등의 변이도 나타나는 것으로 보고되고 있다(2). 이에 이상증식을 하는 암세포에서 cyclin/CDK, p21, p27, p53 등의 세포주기 조절인자들의 활성 조절이 가능하다면 암세포의 증식을 조절할 수 있을 것이라 사료된다. 최근 항암화학 요법제들의 부작용을 극복하는 새로운 항암

제의 개발을 위하여 항암효과가 있는 천연물에 대하여 항암 효과의 검색 및 그 작용기전 연구가 많이 진행되고 있다(5). 그 중 향버섯(*Sarcodon aspratus*)은 예로부터 맛과 향기가 뛰어난 기호성 식품으로 궁중요리에 이용하였을 뿐만 아니라 소화불량의 치료 목적으로도 사용되어져 왔다. 향버섯에 관한 연구로는 향버섯에 21종의 아미노산과 무기질이 많이 함유되어 있다는 식품분석학적인 연구뿐만 아니라(6-8), 향버섯으로부터 분리한 fucogalactan이 마우스 대식세포에서 tumor necrosis factor-alpha와 nitric oxide의 방출을 유도하는 것으로 보고되었다(9). 그리고 향버섯 물 추출물이 Sarcoma 180 세포주에 대한 항종양 활성 효과를 나타냄을 보고하였으며(10), 또한 본 연구자 등은 향버섯 메탄올 추출물 및 분획물들이 직, 간접 발암물질에 대하여 암의 개시단계에서 일어날 수 있는 돌연변이 유발 억제 효과를 가짐을 Ames test로 확인하였다(11). 이와 같은 연구 보고들로부터 향버섯에는 항암활성 물질을 포함하여 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있음을 추측할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 사람의 간암세포인 HepG2 세포를 대상으로 향버섯 메탄올 추출물의 암세포 성장 저해 효과를 살펴보고 또한 암세포 성장 억제 효과의 기전을 분석하기 위해 향버섯 메탄올 추출물이 암세포주의 세포주기 조절인자

[†]Corresponding author. E-mail: krlee@yeungnam.ac.kr
Phone: 82-53-810-2871. Fax: 82-53-813-3813

들의 발현을 어떻게 변화시키는지 조사하였다.

재료 및 방법

시료조제

본 실험에 사용한 향버섯은 김천 황악산에서 채취한 후 건조하여 사용하였다. 건조된 향버섯의 자실체(50 g)를 먼저 분쇄기로 600×g에서 15분 동안 분쇄한 다음, 10배의 메탄올을 가한 후 12시간 동안 3회 반복 추출하였으며, 그 상등액을 모아 여과한 다음 감압농축시킨 후 동결 건조하여 메탄올 추출물(6.6 g)을 제조하였다. 시료는 소량의 DMSO에 용해하여 사용하였다.

향버섯 추출물의 암세포 성장 저해 효과

Cell line : 본 실험에 사용한 세포주는 사람의 간암세포인 HepG2 cell을 사용하였다. 세포배양시에는 DMEM 배지에 10% FBS, 1% antibiotics(penicillin G/ streptomycin)을 첨가하여 배양하였으며 이 세포들은 37°C, 5% CO₂ 배양기에 적응시켜 배양하였으며 2~3일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

Cytotoxicity 측정 : 동물세포에 대한 시료의 cytotoxicity를 측정하기 위하여 Green 등(12)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 먼저 배양된 세포에서 배지를 제거한 다음 PBS를 첨가하여 가볍게 섞은 후 PBS를 다시 제거하고 0.25% trypsin-EDTA를 첨가하여 37°C에서 5분간 배양하여 세포가 culture dish의 바닥으로부터 완전히 분리되었는지 현미경으로 관찰한 후, culture 배지를 첨가하여 잘 혼합한 다음 세포수를 1×10⁶ cells/mL로 조정하여 실험에 사용하였다. 한편 향버섯 메탄올 추출물은 적당한 농도로 DMSO에 용해시킨 후 membrane filter로 여과한 후 사용하였다. 96-well microtiter plate에 준비된 세포를 198 μL씩 분주한 후 24시간 배양하였다. 배양한 후 각 농도의 시료를 2 μL씩 well에 첨가한 후 37°C의 5% CO₂하에서 48시간 배양하였다. 배양 후 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(0.5 mg/mL)] 용액을 각 well에 가해주고 다시 4시간 더 배양하였다. 배양 종료시 600×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 DMSO 200 μL를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader (Bio-Rad Co., Hercules, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정 한 후 다음과 같이 cytotoxicity를 구하여 세포 성장 억제효과의 지표로 하였다.

Cytotoxicity (%) =

$$\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

향버섯 추출물의 세포주기 조절 단백질 발현

세포배양 : HepG2 cell은 DMEM 배양액에서 5% CO₂와 습도가 일정하게 유지되는 37°C 배양기에서 1×10⁶ cells/mL

의 농도로 배양하였다. 시료의 농도는 0.5 mg/mL과 1 mg/mL로 정하여 24시간, 48시간 배양하였다.

Cell lysate의 제조 : 세포주기 조절 단백질의 발현 정도를 관찰하기 위하여 먼저 배양한 HepG2 cell을 1×10⁶ cells/mL로 준비하여 향버섯 메탄올 추출물을 500 μg/mL과 1 mg/mL 농도로 각각 첨가한 후 37°C에서 24시간 및 48시간 각각 배양하였다. 이 때 시료를 처리하지 않은 HepG2 cell(1×10⁶ cells/mL)를 대조군으로 사용하였다. 시료를 처리한 세포와 대조군 세포를 각각 원심 분리하여 상층액을 제거하고 난 다음 그 침전물에 Triton-lysis buffer(1% Triton X-100, 0.350 M NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride)를 가하여 4°C에서 30분간 방치한 후 10,000×g에서 20분간 원심 분리하여 그 상층액을 cell lysate로 얻었다.

Western blotting : Cell lysate를 Bradford(13) 방법으로 단백질을 정량한 후 5×SDS sample buffer를 섞은 후 100°C에서 4분간 변성시켰다. 20 μg의 단백질을 loading하여 SDS-PAGE한 다음 gel을 nitrocellulose membrane에 transfer시킨 후 5% skim milk(Difco lab. USA)를 가한 TTBS(25 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20)용액에서 30분간 반응시킨 후 TTBS 용액으로 세척하고 polyclonal rabbit primary antibody(Santacruz Biotech., CA, USA, 1:200 dilution)를 가하여 2시간 상온에서 배양하였다. Membrane을 세척한 후 horseradish peroxidase가 결합되어 있는 secondary antibody(Santacruz Biotech., CA, USA, 1:2,000 dilution)를 가하여 2시간 반응시킨 후 TTBS 용액으로 세척하고 ECL(Enhanced chemiluminescence) assay system을 사용하여 단백질을 검출하였다.

결과 및 고찰

향버섯 추출물의 암세포 증식 저해효과

향버섯 메탄올 추출물이 간암세포인 HepG2 세포의 성장에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 세포증식과 세포독성을 *in vitro*에서 분석하는데 매우 유용하게 사용되어온 MTT assay를 행하였으며 실험에 사용한 메탄올 추출물의 농도는 예비 실험을 통하여 결정하였다. 그 결과 Table 1에서와 같이 향버섯 메탄올 추출물은 HepG2세포에 대해 0.5 mg/mL 및 1 mg/mL 농도에서 각각 72%, 69% 정도의 성장 저해효과를 보였다. 따라서 향버섯 추출물이 암세포에 선택적 효과를 나타내는지를 알아보기 위해 정상 간세포에 대한 세포 증식 저

Table 1. Inhibitory effects of *Sarcodon aspratus* methanol extract on the growth of HepG2

Sample added (mg/mL)	Cytotoxicity (%)
0	0
0.5	72
1	69

해 효과를 검토한 결과 정상 간세포인 Chang cell에 대해서는 시료와 농도에 관계없이 증식 저해 효과가 크게 나타나지 않았다(data not shown). 이것으로 향버섯 메탄올 추출물의 세포 증식 저해 효과는 모든 세포에 대한 것보다는 특정 암세포에 대해 선택적으로 작용하여 나타난 효과로 사료된다. 이러한 결과를 토대로 암세포의 지속적인 성장 및 분열을 조절하는 세포주기 조절 단백질의 발현 정도를 간암세포인 HepG2 세포에서 살펴보았다. 간암은 아시아와 아프리카에서 가장 많이 나타나는 암으로 향버섯에 의한 간암세포인 HepG2 세포의 증식 억제 작용의 기작 규명은 큰 의의가 있을 것으로 사료된다.

Cyclin 단백질의 발현 변화

Cyclin은 세포주기에서 특히, G1 및 G2기에서 cell division cycle 유전자들과 상호작용을 하면서 세포주기를 조절하는 물질로 밝혀지고 있다(14). 이들 세포주기 조절인자의 활성 억제를 통해 DNA 합성 및 세포분열을 억제하여 암세포의 성장을 저해하며 궁극적으로 apoptosis를 유도함으로써 암세포의 선택적 폐사를 유도할 수 있다는 실험적 증거가 보고되고 있다(15). 이에 본 실험에서는 HepG2 세포에 향버섯 메탄올 추출물을 첨가했을 때 향버섯 추출물이 세포주기의 어느 단계를 차단하여 암세포 성장 저해 효과를 나타내는지 살펴 보았다. 단백질 발현정도를 Western blot으로 분석한 결과 향버섯 추출물의 작용으로 cyclin A의 발현은 대조군에 비해 감소되었고 특히, 농도 1 mg/mL, 48시간 처리시 대조군에 비해 36%의 감소를 나타내었다(Fig. 1). Cyclin B1의 발현은 대조군에 비하여 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). Cyclin D1은 0.5 mg/mL 농도에서 24시간, 48시간 처리하였을 때 대조군에 비하여 각각 23%, 21% 감소하였으며, 1 mg/mL 농도에서는 24시간 처리시 대조군에 비하여 24%, 22% 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). Cyclin E는 전반적으로 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(Fig. 1). 이와 유사한 결과로 Lee 등(16)은 U937세포를 사용하여 ceramide의 세포증식 억제작용을 살펴본 결과 G1기 분포를 증가시켰으며 cyclin D1 발현을 억제시켰다고 보고하였다.

암억제 단백질 p53과 PCNA의 발현

HepG2 세포에서 향버섯 메탄올 추출물이 p53과 PCNA 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 p53 단백질의 발현은 시료농도 0.5 mg/mL에서 24시간, 48시간 처리한 경우 대조군에 비하여 각각 76%, 69% 증가하였고 시료농도 1 mg/mL에서 24시간, 48시간 처리시 대조군에 비하여 각각 60%, 31% 증가된 것으로 나타났으며 특히 0.5 mg/mL, 24시간에서 단백질의 발현이 가장 높게 나타났다(Fig. 1). 이와 대조적으로 PCNA 단백질의 발현은 농도와 시간에 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). 이와같이 p53과 PCNA 단백질은 서로 연관되어 시간의 경과에 따라 PCNA 단백질은 감소되는 반면 p53 단백질은 높은 수준을 유지하였다. 한편

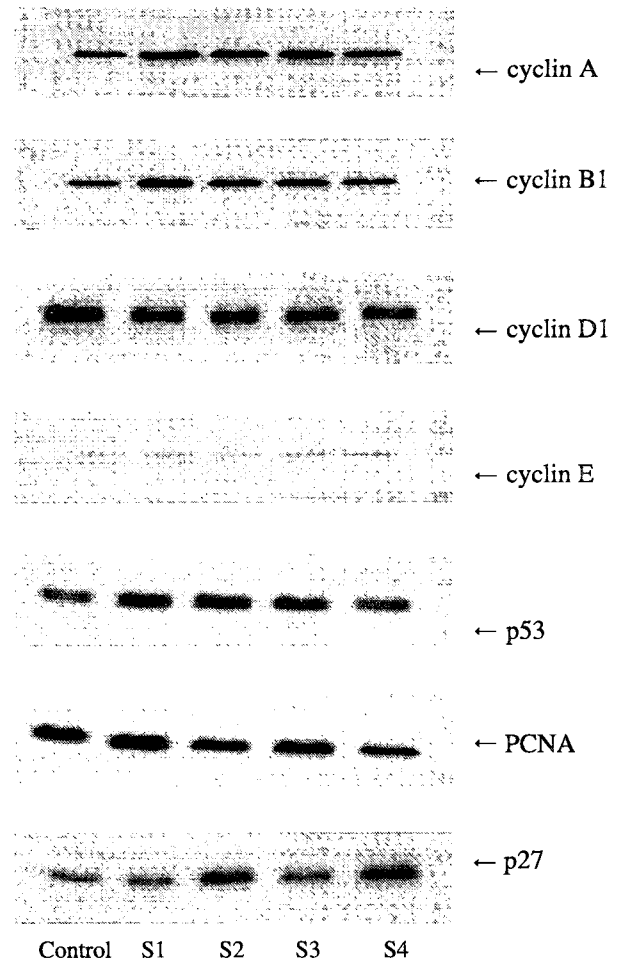


Fig. 1. Effect of *Sarcodon aspratus* methanol extract on the expression of cell cycle-associated proteins in HepG2 cells. Control: HepG2 cell line, S1: HepG2 cell line + *Sarcodon aspratus* methanol extract (0.5 mg/mL, 24 h), S2: HepG2 cell line + *Sarcodon aspratus* methanol extract (0.5 mg/mL, 48 h), S3: HepG2 cell line + *Sarcodon aspratus* methanol extract (1 mg/mL, 24 h), S4: HepG2 cell line + *Sarcodon aspratus* methanol extract (1 mg/mL, 48 h).

자의선이나 화학물질, 기타 원인에 의해 세포의 DNA에 손상이 오게 되면 p53 암 억제 단백질의 작용으로 p21 단백질의 발현이 촉진되고 p21 단백질은 cyclin E-CDK2, cyclin D-CDK4 및 기타 CDK들을 억제하여 RB의 인산화를 억제함으로써 세포를 G1기에 정지시킨다고 보고되고 있다(17). 또한 p53 단백질은 손상된 DNA에 결합하여 DNA복구에 관여하는 PCNA 단백질과 결합하여 DNA복제 및 세포주기 S기의 진행을 저해하므로 p53 단백질은 세포주기 조절기능 및 능동적 세포사 조절기능을 함으로써 세포의 유전정보를 안전하게 보호하여 결국에는 세포의 정상적인 증식과 기능을 가능하게 하는 역할을 한다고 알려져 있다(17). 유사한 결과로 Lee 등(18)에 의한 권백의 물 분획물이 human ovarian cell line A2780에서 p53 단백질의 발현을 증가시켜 G1 arrest를 유도하여 세포주기 진행을 차단시켰으며 또한 MNNG로 처리한 rat에서 권백이 PCNA를 유의적으로 감소시켰다는

보고가 있다. 따라서 이상의 결과로 향버섯 메탄올 추출물의 암세포에 대한 성장 저해 효과는 세포 내 p53 단백질을 활성화시키고 PCNA 작용을 억제함으로써 apoptosis를 유도하고, 세포주기 중 G1기의 정지가 일어나서 손상된 DNA복제가 중단되어 비정상적인 세포의 증식을 막음으로서 나타난 결과로 추정된다.

세포분열 억제단백질 p27의 발현

세포분열 억제 단백질 중의 하나인 p27은 cyclin E-CDK2, cyclin D-CDK4 복합체에 강력하게 결합하여 CDK의 활성도를 억제시켜 세포를 G1기에 머무르게 하여 세포분열을 차단시킨다(19)고 알려져 있다. HepG2 세포에서 향버섯 추출물에 의한 p27 단백질의 발현은 농도와 시간에 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 시료농도 0.5 mg/mL과 1 mg/mL 농도에서 48시간 처리시 각각 104%와 144%의 현저한 증가를 보였다(Fig. 1). 이와 유사한 결과로 Xiaolin 등(20)이 전립선 암세포인 DU 145 cell에 milk thistle로부터 분리한 flavonoid antioxidant인 silymarin을 처리한 결과 p27 단백질 발현이 농도와 시간에 의존적으로 증가하였다고 보고하였다.

요 약

본 연구는 사람의 간암세포인 HepG2 세포를 대상으로 강력한 암 예방 효과물질인 향버섯 메탄올 추출물을 함유하고 있을 것으로 추측되는 향버섯 메탄올 추출물의 암세포 성장 저해 효과를 검토하고 또한 암세포 성장 억제 효과의 분자생물학적 기전을 파악하기 위하여 암세포주인 세포주기 조절인자들의 발현을 조사하였다. 향버섯 메탄올 추출물의 HepG2 세포에 대한 성장 저해 효과를 MTT assay로 검토한 결과 높은 암세포 성장 저해 효과를 나타내었으며 사람의 정상 간세포인 Chang cell에서는 세포독성이 나타나지 않았다. 또한 향버섯 추출물의 작용으로 HepG2 세포에서 cyclin A와 D1 단백질의 발현이 억제되었으며 cyclin B1 단백질의 발현은 증가하는 경향을 나타내었다. 그리고 암 억제 단백질인 p53의 발현은 전반적으로 증가되었으며, 이와 대조적으로 PCNA 단백질은 감소하는 경향을 나타내었고 세포분열 억제 단백질 p27의 발현은 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 향버섯 메탄올 추출물은 간암세포의 세포주기 중 G1기에서 S기로의 진행을 조절하는 인자인 cyclin A와 cyclin D1 발현을 억제시키고 p53, p27 단백질을 활성화 시키고 동시에 PCNA 작용을 억제함으로써 세포주기 중 G1/S기 차단을 유도하여 암세포 증식을 억제하는 것으로 추정된다.

문 헌

1. Hunter T. 1993. Breaking the cycle. *Cell* 75: 839-841.

2. Marx J. 1994. How cells cycle toward cancer. *Science* 263: 319-321.
3. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. 1992. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 11: 961-971.
4. Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D. 1991. Human D type cyclin. *Cell* 65: 691-699.
5. Kimbrell RF. 1987. The development of ideas about the effect of DNA repair on the induction of gene mutation and chromosomal aberration by radiation and by chemicals. *Mutat Res* 1: 186-192.
6. Lee TK. 1989. Studies on the primary structure of the alkaline protease in Neugee *Sarcodon aspratus* (Berk) S. Ito. *J Kor Pharm Sci* 19: 81-161.
7. Park WH. 1983. Studies on components of *Sarcodon aspratus* (I). *Kor J Mycol* 11: 85-90.
8. Park WH. 1983. Studies on components of *Sarcodon aspratus* (II). *Kor J Mycol* 11: 159-163.
9. Mizuno M. 2000. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. *Immunopharmacol* 46: 113-121.
10. Maruyama H, Yamazaki K, Murofushi S, Konda C, Ikekawa T. 1989. Antitumor activity of *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito and *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *J Pharmacobiodyn* 12: 118-123.
11. Bae JT, Lee KR. 2000. Antimutagenic and DNA topoisomerase I inhibition effects of *Sarcodon aspratus* extracts. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 29: 917-921.
12. Green LM, Reade JL, Ware CF. 1984. Rapid colometric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods* 70: 257-263.
13. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-268.
14. Beijersbergen RL, Bernards R. 1996. Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochem Biophys Acta* 1278: 103-120.
15. Annette JH, Christopher AS, Leslie CS, Victoria EAS, Vanessa LL, Aedin CC, Gwyn TW. 1996. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 236: 1-26.
16. Lee JH, Choi KS, Kim MY. 1997. Effect of ceramide on cell growth and cell cycle related proteins in U-937 cells. *Yakhak Hoeji* 41: 94-98.
17. Jose M, Coco M, Astrid B, Tom V, Francois L, Rob M. 1999. Cyclin D1 overexpression enhances radiation induced apoptosis and radiosensitivity in a breast tumor cell line. *Cancer Res* 59: 1134-1140.
18. Lee IS, Kim HJ, Kim HS, Nishikawa A, Furukawa F, Nakamura H, Miyauchi M, Hirose M, Kim SU. 1999. Effect of *Selagenella tamariscina* on the expression of p53, G1 arrest in cell lines and glandular stomach carcinogenesis in rats initiated with MNNG. *Proceedings of the International gastric congress*, Seoul, Korea. April, p 191-199.
19. Charles JS, James MR. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9: 1149-1153.
20. Xiaolin Z, Adam W, Grasso A, Kung HJ, Rajesh A. 1998. A flavonoid antioxidant, silymarin, inhibits activation of erbB1 signaling and induces cyclin dependent kinase inhibitors, G1 arrest, and anticarcinogenic effects in human prostate carcinoma DU145 cells. *Cancer Res* 58: 1920-1929.

(2001년 12월 31일 접수; 2002년 3월 21일 채택)