

# 사상성 곰팡이 (*Monascus sp.*) 유래 항암 물질의 탐색

신영민<sup>1</sup> · 박혜련 · 안원근\*

부산대학교 치과대학 구강병리학교실, 1: 부산지방식품의약품안전청 시험분석실

## Screening of Anti-cancer Compounds Originated from Filamentous Fungi (*Monascus sp.*)

Yeong-Min Sin<sup>1</sup>, Hae Ryoung Park, Won Gun An\*

Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Pusan National University,  
1: Test & Analytical Lab., Busan Regional Food & Drug Administration

In this study, we investigated the antioxidant effect of extract from *Monascus pillosus*, on the human wild-type p53 and p21 expressing A549 lung epithelial cell line and MCF-7 mammary adenocarcinoma cell line stimulated by NO. P21<sup>wal/cip1</sup> was identified as a gene induced in senescent cells. It is a cyclin-dependent kinase inhibitor and has been shown to cause cell cycle arrest and apoptosis. While p53-regulated stimulation of p21 appears to be central for the permanent growth-arrest, the role of p21 in p53-triggered cell death is unclear. Low dose of sodium nitroprusside (SNP) induced the development of senescence associated with increased expression of p53 and p21 in A549 cells. Inhibition of p21 transactivating activity requires high level correlates with the amount of p53 necessary to cause cell death. Association of p21 and p53 results in inhibition of p21-stimulated transcription. This requires a higher p53 level than is necessary for transcriptional activation of endogenous p53-responsive gene but correlates well with the level of p53 necessary to cause cell death. Exposure to W-1 inhibited oxidative stresses-induced senescence-like arrest, resulting in a significant reduction in p53 and p21 steady state levels. These results suggest that p53 and p21 play a central role in the onset of senescence. Thus, it is important to emphasize control of oxidative balance in tumor prevention and aging.

Key words : *Monascus sp.*, antioxidant effect, apoptosis, p53, p21

### 서 론

활성산소들은 일반적으로 세포의 산소호흡의 부산물로 생성되어 세포에 유해한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 생체막을 자유로이 투과할 수 있는 저분자 물질인 이러한 활성산소들로는 산화질소 (NO), superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등을 포함한다<sup>1-3)</sup>.

Nitric oxide (NO)는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되며, 그 반응 산물로서 활성산소종 (ROS; reactive oxygen species)을 만든다. NO는 세포의 정상 대사과정 중에 대량으로 생성되는 활성산소의 하나인 superoxide

anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)과 반응하여 강력한 산화제인 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)를 생성함으로써 세포 내 oxidative stresses를 야기시켜 세포 또는 조직에 손상을 가하여 신경계 질환, 퇴행성 질병, 암 또는 노화의 원인이 되는 것으로 보고되고 있다<sup>4-7)</sup>. 특히 oxidative stresses는 DNA의 손상을 초래하기도 하고 단백질과 지질의 산화를 초래하여 노화 현상을 촉진시키는 것으로 보고되었다<sup>8)</sup>.

ROS에 대한 새로운 연구결과들이 꾸준히 발표되면서, 이들이 세포에 미치는 영향에 대하여 아직 밝혀지지 않은 부분도 상당히 많이 밝혀질 것으로 기대되는데, 근래에 p53 (17번 염색체)과 pRb (13번 염색체) 단백질이 세포주기의 조절인자로서 중요한 역할을 담당하고 있음이 밝혀지면서 세포노화와 관련지어 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>9-12)</sup>.

ROS는 transcription factor의 하나인 hypoxia inducible factor (HIF)-1 활성을 자극하는 신호를 일으키며<sup>13)</sup> HIF-1은 혈관

\* 교신저자 : 안원근, 부산시 서구 아미동 1가 10 부산대학교 치과대학

· E-mail : wgan@pusan.ac.kr, · Tel : 051-240-7945

· 접수 : 2005/03/22 · 수정 : 2005/04/25 · 채택 : 2005/05/27

내피 증식인자인 vascular endothelial growth factor (VEGF)의 전사를 조절한다<sup>14,16)</sup>. 또 다른 transcription factor인 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)는 번역과 염증 반응에 관여하는데, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 같은 ROS는 NF- $\kappa$ B의 activator로써 작용함이 알려져 있다<sup>17)</sup>.

사상성 곰팡이는 오랜 인류 역사와 더불어 식품 및 약용의 형태로 이용되어 왔으며 각종 heterologous protein, organic acid, 색소 등을 포함한 생리활성을 띠는 기능성 물질들이 이들로부터 분리되고 있다. 그중에서도 紅黴(붉은곰)로 알려진 *Monascus*는 붉은색을 띠는 자낭균류의 곰팡이로서 중국, 한국, 일본, 대만 및 동남아 등지에서 쌀 등의 곡류에 발효시켜 홍주, 홍두부, 색소 및 육고기의 천연보존제 형태로 이용되어 왔다. 특히 중국과 대만에서는 육류 및 야채의 착색료 및 방부 효과를 목적으로 이용되어 왔다. 특히 중국의 의서 본초강목에서는 약성이 완화하고 독성이 없으며 소화불량과 설사를 다스리는데 유용하며 혈액순환을 촉진하고 소화기능을 튼튼하게 한다고 적혀 있어 다양한 생리 효능이 있는 것으로 기술되어 있으며 최근 들어서 중요한 한방 생약재로도 사용되고 있다. 국내에서는 주로 합성 착색료를 대신할 천연색소로 일본에서 수입이 되어 왔으나 1979년 일본의 아키라 엔도가 *Monascus* sp.의 배양물로부터 콜레스테롤 합성계의 HMG-Co A 환원효소를 특이적으로 억제하는 Monacolin K라는 물질을 발견하면서 이들 홍국에 대한 관심이 증대되었고 현재 국내에서도 여러 건강식품회사 및 제약회사 등에서 이를 응용한 항콜레스테롤 제품이 출시가 되고 있다.

이 Monacolin K라는 물질은 lovastatin으로도 불리며 *Aspergillus terreus*에서 많은 양이 생성되고 있으며 Merk사에서 Mevacor란 이름의 고지혈증 치료제로 판매되고 있다. 이들은 약간의 구조적인 형태에 따라 lovastatin (monacolinK), mevastatin, simvastatin, cerivastatin 등의 다양한 이름으로 불리고 있으며 이들 모두를 statin계열 물질이라고 한다. 상기의 Lovastatin의 경우 콜레스테롤 저해제로서 현재 많이 소개되고 있으며 cerivastatin은 anti-angiogenic effect를 가지며 심장병의 심혈관 치료에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 특히 Yasukawa 등<sup>18)</sup>은 *Monascus*에서 생성된 색소의 경구투여를 통하여 mouse의 skin에 발생하는 tumor의 promotion을 억제한다고 하였다. 또한 Pritchard는 statin이 breast cancer의 대한 항암물질의 가능성을 제시하였다. 이런 다양한 statin계열 물질 및 색소를 포함한 각종 생리활성 기능을 가지는 물질을 생산하는 홍국균은 현재 연구의 주 target이 식품에 응용하는 색소의 연구나 콜레스테롤 억제 및 혈행 개선 물질 등에 주로 초점이 맞추어져 있으며 항암기능에 대한 연구는 국외에서도 초보적인 단계이며 국내에서는 전혀 이루어지지 않고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 NO donor인 sodium nitroprusside (SNP)<sup>19)</sup> 처리하여 폐암 세포주인 A549 세포와 유방암 세포주인 MCF-7 세포에 oxidative stresses를 야기시킨 후 p53, p21 그리고 NF- $\kappa$ B의 발현 양상을 확인하였다. 그리고 *Monascus pillosus*의 배양물에서 추출한 물질을 함께 처리했을 때 oxidative stress의 세포손상에 의한 스트레스 억제 효과를 분석함으로써 종양 치료의 효과증진을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

*Monascus pillosus* 배양을 위하여 사용된 yeast extract는 difco 사의 제품을 사용하였으며, 다른 배지성분은 sigma 사로부터 구입하였다. Sodium nitroprusside (SNP)는 sigma 사의 제품을 사용하였으며, 배지와 혈청은 gibco BRL (Grand Island, NY) 사의 dulbecco's modified eagle medium (DMEM)와 fetal bovine serum (FBS)을 사용하였다.

실험에 사용된 A549 세포 (p53 wild-type human lung carcinoma cell line, ATCC CCL-185)와 MCF-7 세포 (Human mammary adenocarcinoma cell line, ATCC HTB-22)는 ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD)로부터 구입하였다. Penicillin과 streptomycin 등 antibiotics는 gibco BRL 사의 제품을 사용하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)와 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 sigma 사로부터 구입하였으며, formaldehyde 등 그의 실험에 사용된 모든 시약은 고순도의 특급시약을 사용하였다.

### 2. 균주의 배양 및 배양액의 추출

실험에 사용된 균주는 (주)엠바이오에서 분양받아 사용하였다. 배양을 위하여 사용된 배지조성은 yeast extract (2%), glucose (0.5%), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.5%), MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0.5%), CaCl<sub>2</sub> (0.1%)였으며, 30℃에서 5일 동안 배양하였다. 배양액 (100ml)을 원심분리하여 균체와 배양액으로 분리한 후, 배양액을 ethyl acetate(100ml)로 3회 추출하여 ethyl acetate층을 농축하여 D.W.로 ppm단위로 조제하여 시험물질로 하였다.

### 3. 세포배양

A549 세포와 MCF-7 세포를 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 및 100 mg/ml streptomycin이 함유된 dulbecco's modified eagle medium 에 부유시켜 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배지를 2-3일 간격으로 교체하였고 세포가 합류 (confluent growth) 되었을 때 배지를 완전히 제거한 후, dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, Gibco BRL)로 1회 세척하고 0.25% trypsin-0.02% EDTA를 처리하여 세포를 분리하였다.

### 4. Western Blot Analysis

SNP에 반응하는 유전자의 발현 변화를 관찰하기 위해 western blot analysis를 실시하였다. Western blot analysis를 위해 whole-cell pellets를 모아서 추출용액 50 $\mu$ l (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 및 5 mM EDTA)을 첨가하여 4℃에서 10분간 방치하여 단백질을 분리하였다. 단백질의 농도는 bio-rad assay (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)를 이용하여 정량하였다. 동일한 농도의 단백질을 sodium dodecyl sulfate (SDS)가 포함되어 있는 polyacrylamide gel에서 전기영동하였고, polyacrylamide gel에 nitrocellulose membrane

## 결 과

(Amersham Life Science)을 겹쳐 놓고 15V의 전기를 걸어 단백질들을 흡착지로 이전시켰다. 비특이적 결합을 없애기 위해 흡착지를 5% skim milk가 함유된 TBS-T 완충액에서 1시간 반응시킨 다음, 일차항체 (p53, p21 Oncogene, 1:1,000)를 포함한 보합결합 용액과 함께 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 일차항체 반응이 끝난 흡착지를 진탕기 위에 놓고 천천히 흔들면서 세척하여 결합하지 않은 일차 항체들을 제거하였다. 흡착지는 다시 이차항체와 반응시킨 후 세척하여 western lightning chemiluminescence (Perkin Elmer)로 발색반응을 관찰하였다.

### 5. 세포독성효과

SNP에 대한 세포독성효과를 MTT법<sup>20)</sup>으로 관찰하였다. 각 세포를  $3 \times 10^4$  cells/ml의 밀도로 96-well microplate에 200 $\mu$ l 씩 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air 에서 배양하였다. SNP를 0~640ppm의 농도로 세포에 첨가하여 24시간, 48시간 후 세포의 생존율을 측정하였다.

MTT solution은 5mg의 MTT를 PBS 1ml에 녹인 후 0.2 $\mu$ m의 syringer filter로 필터하여 DMEM 배지로 10배 희석하여 사용하였다. 배지 상층부를 140 $\mu$ l 제거하고 MTT solution을 100 $\mu$ l 첨가하여 알루미늄 호일로 plate를 싼 후 37 °C에서 4시간 반응시켰다. 그리고 배지 상층부를 100 $\mu$ l 제거하고 DMSO를 100 $\mu$ l 넣어서 실온에서 20분간 shaking한 후 ELISA reader로 570nm와 650nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 세포수와 비례한다.

### 6. Fluorescence-activated cell sorter (FACS)

SNP에 의한 세포의 DNA content를 분석하기 위하여 세포를 6-well plate에 심어 24시간동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air에서 배양하였다. SNP를 10, 20, 100, 200, 500ppm의 농도로 24시간, 48시간 동안 처리한 후 세포를 분리하였다. 분리한 세포를 원심 분리하여 침전물을 PBS로 2회 수세한 다음, 5분간 차가운 70% 에탄올로 고정하였다. 고정이 끝난 후 원심분리 (1000×g, 5분)하여 회수한 세포를 propidium iodide 용액 (100 $\mu$ g/ml PI, 100 $\mu$ g/ml RNase, 10 $\mu$ g/ml 10% NP-40)으로 염색하여 유식세포 계측기 (flow cytometry, Becton Dickinson, FACS Calibur, France; PI detect : excitation 488 nm, emission 585 nm)로 분석하였다.

### 7. DCF-DA assay

DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate : H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probe, Eugene, Oregon, USA)를 DMSO에 녹이고 최종농도가 20 $\mu$ M이 되게끔 PBS (0.01M)로 희석하였다. 세포는 6-well plate에  $4 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 배양하고 ROS 측정을 위해 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 30분간 배양하였다. 새 배지로 갈아주고 안정화시킨 뒤 SNP를 처리하여 16시간 배양하였다. 그리고 PBS (0.01M)로 3회 수세하여 배지를 제거하고, 형광측정은 confocal microscopy를 이용하여 발광파장 485nm, 흡광파장 530nm에서 관찰하였다.

### 1. p53, p21 및 NF- $\kappa$ B의 상호작용

p53 및 그 target 유전자인 p21 활성변화, NF- $\kappa$ B와의 correlation 및 이들 factors의 hypoxia의 관련성을 규명하기 위해 SNP에 의해 유도된 세포예정사의 증거를 western blot analysis로 조사하였다 (Fig. 1). p53의 level은 SNP의 농도가 20ppm~500ppm에서는 변화가 나타나지 않았지만 높은 농도 (1,000ppm)에서는 급격히 증가하였다. Adherent cell 수의 급격한 감소는 SNP의 toxicity에 의한 cell death의 결과로 보여진다. p21의 level은 0~100ppm농도에서는 서서히 증가하다가 200ppm이상의 농도에서는 감소함을 나타내고 있다. SNP의 농도가 증가할수록 NF- $\kappa$ B의 level은 조금씩 증가하였다.

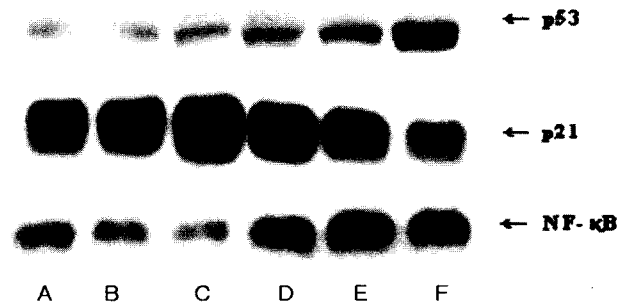


Fig. 1. Change of gene regulating aging or apoptosis in the A549 cell. A:control, B:SNP (20ppm), C:SNP (100ppm), D:SNP (200ppm), E:SNP (500ppm), F:SNP (1,000ppm).

### 2. 세포독성효과

SNP에 대한 세포독성효과를 MTT법을 이용하여 대조군에 대한 백분율로 얻은 상대 생존율을 Table 1, 및 Fig. 2, 3에 나타내었다. SNP에 대해 A549 세포와 MCF-7세포는 농도와 시간의 존적으로 세포독성효과가 있음이 관찰되었다. MCF-7 세포의 경우 IC<sub>50</sub>의 농도는 24시간 노출시 약 260ppm, 48시간 노출시 155ppm이었고, A549 세포의 경우 IC<sub>50</sub>의 농도는 24시간 노출시 약 270ppm, 48시간 노출시 165ppm이었다. SNP 처리 후 세포 독성 효과는 MCF-7세포가 A549세포에 보다 크게 나타났다.

Table 1. SNP-induced cytotoxicity in the A549 and MCF-7 cell lines as measured by the MTT assay

Conc. of SNP (ppm)	A549 cell Viability (%)		MCF-7 cell Viability (%)	
	24h	48h	24h	48h
0	100	100.0	100.0	100.0
2.5	93.7	95.4	93.8	87.1
5	91.1	90.5	90.5	86.2
10	93.4	95.6	89.5	90.1
20	89.4	87.5	86.5	88.0
40	80.7	77.8	81.4	74.8
80	76.8	73.8	74.1	57.9
160	71.5	52.5	61.0	49.7
320	43.6	29.6	44.1	23.5
640	38.8	20.5	34.4	17.6

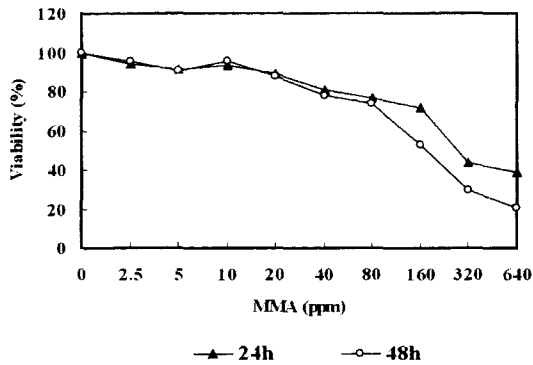


Fig. 2. Cytotoxicity of A549 cell treated with MMA.

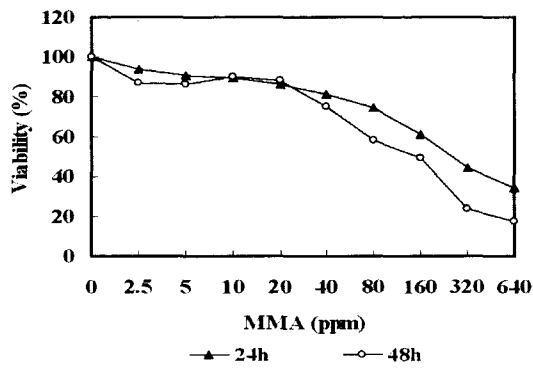


Fig. 3. Cytotoxicity of MCF-7 cell treated with MMA.

3. Fluorescence-activated cell sorter (FACS)

SNP가 세포의 DNA 농도에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여 유식세포 계측기로 세포주기를 관찰하였다 (Table 2, 3). SNP를 처리한 MCF-7 세포와 A549 세포에서 세포의 G1단계가 점차 증가하였다. A549 세포의 경우 SNP을 200ppm의 농도로 24시간 처리하였을 때 대조군 보다 G1 단계가 17%이상 증가하였고, MCF-7세포의 경우에는 7% 이상 증가하였다. 이러한 결과는 SNP이 세포의 G1단계에 arrest를 일으키는 것임을 알 수 있었다.

Table 2. Cell cycle distribution of A549 cell treated with SNP at the indicated concentrations.

(A)						
Stage \ SNP(ppm)	Control	10	20	100	200	500
G1	58.88	51.67	53.9	60.41	76.13	61.92
S	20.37	24.84	23.17	20.56	10.84	13.59
G2	20.86	23.93	23.21	19.45	13.07	24.75

(B)						
Stage \ SNP(ppm)	Control	10	20	100	200	500
G1	68.26	69.64	73.41	75.44	75.14	78.26
S	12.11	12.43	10.46	10.72	11.68	7.31
G2	19.83	18.1	16.03	13.93	13.18	14.35

Results were obtained by flow cytometric analysis of propidium iodide-stained cells at 24h(A) and 48h(B) of treatment. Data are the results of one experiment representative of three.

Table 3. Cell cycle distribution of MCF-7 cell treated with SNP at the indicated concentrations.

(A)				
Stage \ SNP(ppm)	Control	10	50	200
G1	47.51	42.60	49.57	55.19
S	25.39	26.54	21.47	18.04
G2	27.46	29.76	26.36	22.67

(B)				
Stage \ SNP(ppm)	Control	10	50	200
G1	62.20	63.44	71.38	69.45
S	19.97	26.26	16.25	17.62
G2	18.05	13.44	12.58	13.10

Results were obtained by flow cytometric analysis of propidium iodide-stained cells at 24h(A) and 48h(B) of treatment. Data are the results of one experiment representative of three.

4. SNP의 세포독성에 있어서 antioxidant 효과

Oxidative stresses에 의한 세포의 손상, 그리고 aging과 관련된 유전자들의 발현 양상을 *Monascus pillosus*에서 추출액을 이용하여 western blotting으로 분석하였다 (Fig. 4). 세포를 G1기에 머무르게 하면서 p53의 표적 유전자이기도 한 p21의 level이 증가하였고, p21의 발현을 유도하는 p53의 level 또한 증가하였다. 여기에 추출액을 처리하면 농도에 따라 level이 감소하였으며, 추출액의 농도가 200ppm일 경우에는 거의 정상상태로 회복되었다. 또한, SNP를 처리한 세포에서 p53의 안정화가 저해될 경우에는 노화관련 유전자로 알려진 p21의 발현도 저해되었다.

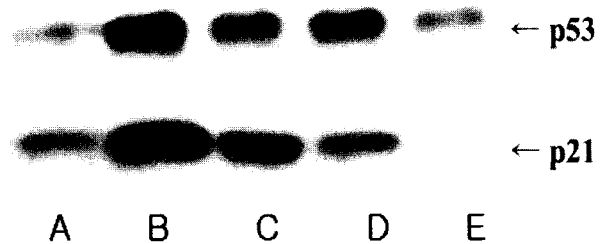


Fig. 4. Expression of p53 and p21 on the A549 cell. 549 cell was treated with SNP and extract for 16h. Whole cell lysates were prepared and subjected to Western blot analysis for p53 and 21. A:Control, B:SNP (200ppm), C:SNP + Extract (10ppm), D:SNP + Extract (100ppm), E:SNP + Extract (200ppm).

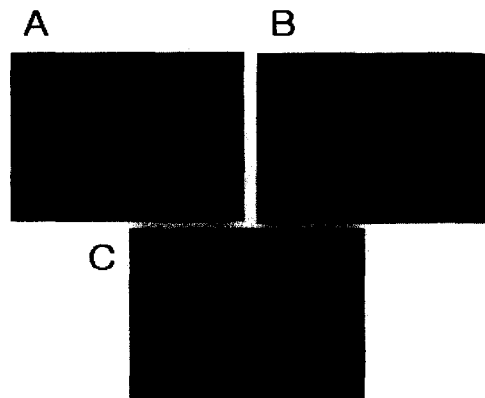


Fig. 5. Effect of extract on intracellular ROS generation. Intracellular peroxide production was measured using the oxidant-sensitive fluorescent probe DCFHDA with confocal microscopy. A:Control, B:SNP (200ppm), C:SNP + Extract (200ppm)

### 5. DCF-DA assay

SNP가 생성한 NO에 의해 ROS가 유도되었을 가능성을 확인하기 위하여 DCF-DA assay를 실시하였다 (Fig. 5). Oxidative stresses를 유도하여 세포내에 ROS를 생성하는 것으로 알려진 SNP를 같은 조건으로 처리하였다. ROS 양에 의한 내피세포의 영향성은 DCF 형광의 세기로 알 수 있었다. ROS 형성은 초록색 형광으로 관측되며, SNP를 처리하였을 때는 대조군과 비교하여 형광이 급증하였다. 추출액과 동시에 처리되면 추출액의 농도가 증가할수록 형광의 세기가 점차 감소하였다.

## 고찰

고혈압, 고혈당, 저산소증, 산소라디칼 및 콜레스테롤 등의 유발인자에 의해 혈관내피세포의 활성화내지는 손상은 암, 동맥경화, 관절염, 알츠하이머병 등 노화와 관련된 질병의 원인이 된다. 생체 내에서 끊임없이 생성되고 있는 ROS (reactive oxygen species)는 세포의 운명을 결정짓는 중요한 요인이 되며 노인성 질병의 원인이다. 인간을 비롯한 산소를 이용하는 생명체의 대사는 산화환원과정의 연속이며, 이 과정 중 산소를 필수적으로 요구하는 생물체에서는 superoxide radical ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ )와 같은 프리라디칼을 비롯한 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 등 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 발생이 필연적이다. 정상적인 대사과정 외에도 X-선, 자외선, 외부약물 등의 외적인 요인과 세균의 침범을 대항한 식균작용 과정에서 NADPH oxidase, myeloperoxidase에 의해 많은 활성산소종이 발생한다.

또한 정상적인 생명현상인 발아, 분화, 수정 과정에서도 활성산소종이 발생한다는 보고들이 있다. 활성산소종은 산소의 85% 이상을 소비하는 미토콘드리아의 전자전달계에서 주로 발생되며 이러한 활성산소종은 노화를 비롯하여 세포예정사 (apoptosis), 암, 당뇨병, 관절염, 치매, 동맥경화증 등 퇴행성 질병의 원인으로 알려지고 있다. 활성산소종은 세포의 구성물질인 지질의 과산화를 유도하고 단백질의 산화를 유발함으로써 효소의 활성저해, ras 등 신호전달 물질의 화학적 변환, 그리고 DNA의 손상을 유도함으로써 돌연변이를 유발하여 세포의 손상과 아울러 세포의 기능조절에 변화를 초래한다. 최근에는 지금까지 널리 알려진 활성산소종 외에도 singlet oxygen ( $^1O_2$ ), nitric oxide (NO), 그리고 NO와 superoxide anion이 반응하여 생성된 peroxynitrite (ONOO $^-$ ), 지질과산화 과정에 수반되어 생성되는 이차적 라디칼들이 세포손상과 질병의 조건에 이르게 한다는 보고들이 있다<sup>4,8)</sup>.

본 연구에서는 A549 세포와 MCF-7 세포에서 SNP를 이용하여 oxidative stresses 상태를 야기시킨 후, *Monascus pillosus*로부터 추출한 시료를 처리하여 세포 내의 oxidative stress 유발원을 제거함으로써 변화되는 p53, p21 그리고 NF- $\kappa$ B의 발현양상을 조사하고자 하였다. 더 나아가서 그 물질의 작용기전을 규명하여 활성산소 및 활성질소 화합물들과 이들의 반응산물인 peroxynitrite의 생성 및 제거능력을 검토하여 oxidative stress에 의한 암 방지 효과가 있는지를 객관적으로 규명하고자

하였다.

Oxidative stress 유도원인 SNP만을 처리하였을 때 p53, p21 및 NF- $\kappa$ B의 level 이 증가하였으며, SNP를 1,000ppm 농도로 처리하였을 때 p53의 발현이 증가하였다. 여기에 추출액을 동시에 처리하면 농도 200ppm일 때 그 level들이 크게 감소하였으며, p53의 level이 거의 SNP를 처리하지 않은 상태로 회복되었다. p53 발현과 축적에 의한 전사 활성 정도를 결정하기 위하여 p53의 표적 유전자인 p21의 발현을 조사하였다. SNP를 처리한 세포에서 p53 발현과 축적이 저해될 경우 노화관련 유전자로 알려진 p21의 발현도 저해됨을 관찰하였다.

SNP는 A549 세포의 cytotoxic effect를 야기시켰다. 이 때 세포의 생존률이 감소하였으며 추출액을 동시에 처리하면 세포의 생존률이 증가하였다. DCF-DA assay로 ROS에 의한 세포변화의 관찰에서는 200ppm의 SNP를 처리하였을 때 DCF의 양이 급증하였으나 추출액을 함께 처리하였을 때 그 양이 점차로 감소하였다. 추출액이 SNP에 의해 생성되는 ROS의 작용을 억제하여 세포를 다시 정상으로 회복시키는 것을 추측할 수 있었다.

Oxidative stresses는 암, 바이러스성, 그리고 노화 관련 질병 등의 원인으로 알려져 있으며 이들의 세포 내 기작에 대한 연구는 여러 가지 질병의 치료제 개발을 위한 기초자료를 제공될 수 있을 것이다. 또한, NO와 같은 2차 신호전달물질의 생성, 제거, 및 그 조절에 관한 기작연구를 통해 새로운 약제의 개발에 도움을 줄 것이며, 개발된 약물의 생리적 가치를 평가하고 약리 기능을 향상시킬 수 있을 것으로 기대되어진다.

## 결론

본 연구에서는 A549 세포와 MCF-7 세포에서 나타나는 p53, p21 및 NF- $\kappa$ B의 상호작용을 통해서 *Monascus pillosus*에서 추출한 물질의 항산화 효과를 조사하였다. P21<sup>waf/cip1</sup>는 노화 세포에서 induction되는 유전자로 확인되었다. p21은 cyclin-dependent kinase inhibitor이며, 세포주기에서 arrest와 apoptosis의 원인이 된다고 알려져 있다. p21의 p53의 조절작용이 영구 growth-arrest의 원인이 되지만, p53에서 시작된 cell death에서는 p21의 역할이 분명하지 않다. Senescence 발생을 야기하는 적은 량의 SNP가 A549세포에서 p53과 p21의 expression의 증가와 관련이 있다. p21 transactivating activity의 inhibition은 cell death를 일으키기 위해서 필요되어지는 p53의 양과 상호작용하는 high level의 양이 필요하다. p53과 p21의 연관성은 p21-stimulated transcription의 inhibition을 초래한다. 이것은 cell death를 일으키기 위해서 필요한 만큼은 아니나 endogenous p53-responsive gene의 transcriptional activation에 필요한 만큼보다는 높은 p53 level이 필요하다. 추출액을 함께 처리했을 경우 p53 과 p21의 수준이 SNP를 처리하지 않았을 경우 만큼 감소하여 oxidative stresses를 저해함을 알 수 있었다. 이들 결과는 노화의 과정에서 p53과 p21이 중요한 역할을 하고 있음이 보여주며, 암 예방과 노화에 있어서 oxidative balance의 중요성을 확인시켜 주었다.

## 감사의 말

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2001-002- D00251).

## 참고문헌

- Chen, Q.M., Bartholomew, J.C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J.D., Ames, B.N. Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J.* 332, 43-50, 1998.
- Daudu, P.A., Roy, A., Rozanov, C., Mokashi, A., Lahiri, S. Extra- and intracellular free iron and the carotid body responses. *Respir Physiolo Neurobiol.* 130, 21-31, 2002.
- Frossi, B., Tell, G., Spessotto, P., Colombatti, A., Vitale, G., Pucillo, C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces translocation of APE/Ref-1 to mitochondria in the Raji B-cell line. *J. Cell Physiol.* 93, 180-186, 2002.
- Albrecht, E.W., Stegeman, C.A., Tiebosch, A.T., Tegzess, A.M., Goor, H. Expression of inducible and endothelial nitric oxide synthases, formation of peroxynitrite and reactive oxygen species in human chronic renal transplant failure. *Am. J. Transplant.* 2, 448-453, 2002.
- Haskew, R.E., Mongin, A.A., Kimelberg, H.K. Peroxynitrite enhances astrocytic volume-sensitive excitatory amino acid release via a src tyrosine kinase-dependent mechanism. *J. Neurochem.* 82, 903-912, 2002.
- Gasparo, M. Angiotensin II and Nitric Oxide Interaction. *Heart Fail Rev.* 7, 347-358, 2002.
- Stokes, K., Cooper, D., Tailor, A., Granger, D., Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med.* 33, 1026-1032, 2002.
- Martin, G.M., Austad, S.N., Johnson, T.E., Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature Genet.* 13, 25-34, 1996.
- Hangen, T.M., Yowe, D.L., Bartholomew, J.C., Wehr, C.M., Do, K.L., Park, J.Y., Ames, B.N. Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3064-3069, 1997.
- Salvador, M., Makoto, L., Li, F., Angus, C., Pan, Z.Q., Sam, W.L., Stuart, A.A. 2002, Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J.* 21, 2180-2188, 2002.
- Sharpless, N.E., DePinho, R.A. p53: good cop/bad cop. *Cell.* 10, 9-12, 2002.
- Sugrue, M.M., Shin, D.Y., Lee, S.W., Aaronson, S.A. Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc. Natl Acad. Sci.* 94, 9648-9653, 1997.
- Konstantin, S., Su, W., Blagosklonny, M.V., Costa, M. Carcinogenic Metals Induce hypoxia-inducible factor-stimulated transcription by reactive oxygen species-independent mechanism. *Cancer Res.* 60, 3375-3378, 2000.
- Seagroves, T.N., Ryan, H.E., Lu, H., Wouters, B.G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute, K., Johnson, R.S. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the Pasteur effect in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3436-3444, 2001.
- Semeza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:588-594, 1998.
- Minchenko, A., Leshchinsky, I., Opentanova, I., Sang, N., Srinivas, V., Armstead, V., Caro, J. Hypoxia-inducible factor(HIF-1) mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3(PFKFB3) gene: its possible role in the Warburg effect. *J. Biol. Chem.* 277, 6183-6187, 2002.
- Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10, 2247-52, 1991.
- Yasukawa, K., Takahashi, M., Yamanouchi, S., Takido, M. Inhibitory effect of oral administration of Monascus pigment or tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology.* 53(3):247-249, 1996.
- Yasushi, T., Masaro, T., Atsushi, T., Takashi, U., Toshiro, O. Ceramide generation in nitric oxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 10654-10660, 1999.
- Mizutani, Y., Bonavida, B. Overcoming cis-diamminedichloro-platinum II resistance of human ovarian tumor cells by combination treatment with cis-diamminedichloroplatinum II and TNF- $\alpha$ . *Cancer.* 72, 809-818, 1993.