

영지(*Ganoderma lucidum*)의 액체배양에 의한 세포의 다당의 항암활성과 세포증식 및 분화에 미치는 영향

Antitumor Activity and Effect on Cell Proliferation and Differentiation of Exopolysaccharide Produced by Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum*

이 신 영* 강 태 수** 문 순 옥***
Lee, Shin-Young Kang, Tae-Su Moon, Soon-Ok

Abstract

Exopolysaccharide (CBP) from submerged culture broth of *Ganoderma lucidum* mycelium and the water soluble (BWS) and water insoluble (BWI) fractions of CBP were prepared by gel filtration. Antitumor activity and effects on proliferation and differentiation of human cancer cells and mouse NIH 3T3 cells were studied. Cytotoxicity test of CBP, BWS and BWI fractions on human cancer cell lines was performed by using sulforhodamine B (SRB) assay. A549 (lung carcinoma), Colo320 DM and HSR (colon carcinoma), and NIH 3T3 cells were used. BWI fraction showed the strongest cytotoxicity (maximum 20% survival) to all human cells tested. However it did not induced apoptosis. Interestingly BWI fraction did not exert cytotoxic effect on NIH 3T3 cells at low concentration of cells (5×10^4) but strong toxic effect at high concentration of cells (5×10^5) which showed transformed morphology. These results suggest that BWI may have cancer cell specific anticancer activity. However, BWI fraction did not effect the amount of pRb and c-myc protein, which implied that BWI fraction did not act at the early stage of signal transduction pathway. CBP fraction induced differentiation of human leukemic cell line, HL-60 cells suggesting the carcinogenesis prevention of normal cell and possible induction of normalization for cancer cell.

키워드 : 영지 균사체, 액체배양, 세포외 다당류, 항암활성, 세포독성, 세포증식 및 분화
Key words: *Ganoderma lucidum*, submerged culture, exopolysaccharide, antitumor activity, cytotoxicity, cell proliferation and differentiation

1. 서론

영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 항종양, 항염 및 면역조절 등의 다양한 생리학적 활성을 가지는

것으로 알려지고 있다[1,2]. 주로 다당류가 유효성분의 본체인데, 영지 유래 다당의 성분이나 구조분석 및 생물활성에 대한 연구는 균사체나 자실체 추출물에 국한되어왔다[3]. 저자 등은 새로운 생물산업 소재화 연구의 일환으로 이들과는 다른 세포외 다당을 영지의 액체배양에 의해 얻었으며, 그동안 이의 생산, 구조특성 및 몇몇 생물활성에 대해서 보고하였다[4-13].

그동안의 연구에 의하면 이 세포외 다당은 수용

* 강원대학교 바이오산업공학부 교수, 공학박사
** 충북과학대학 식품생명과학과 교수, 공학박사
*** 수원대학교 유전공학과 교수, 이학박사

성 다당(BWS)과 불용성 다당(BWI)으로 분획되며, BWS와 BWI는 연갈색의 분말로, 전당 함량이 각각 97.8 및 99%에 달한다. BWS와 BWI의 구성당은 다른 버섯류와 마찬가지로 glucose, galactose, xylose, mannose 및 fucose를 공통으로 함유한다. 하지만 gel permeation chromatography로 구한 분자량은 각각 1.2×10^6 및 1.0×10^6 dalton으로 매우 높았으며, 다른 버섯 다당류에서는 보이지 않는 겔 형성능을 보였고, 구성당의 몰비 (glucose: galactose: xylose: mannose: fucose)도 각각 3.6:1:1.5:0.5:2.1: trace 및 1.7:1.9:1.0:1.2:0.2로 그동안의 보고와는 매우 달랐다[6].

따라서 이들 세포의 다당류에 대한 생리적 특성에 대한 검토의 필요성이 매우 높은 데 아직은 매우 미흡한 실정이다. 특히, 암세포에 특이적인 세포독성이나 동물에서 세포의 정상적인 multi-cellular organism을 형성하는 중요한 mechanism 중의 하나인 세포분화와 증식에 대해서는 전혀 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 영지균사체의 액체배양에 의한 세포의 기능성 다당의 생물학적 활성을 연구하고자 배양된 동물세포를 이용하여 cytotoxicity, 세포증식 및 세포분화에 미치는 영향 등을 검토하고 그 작용기작을 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

본 연구에서 사용한 재료는 *Ganoderma lucidum* (영지 1호)의 액체배양의 배양여액으로부터 다음과 같은 방법으로 얻은 세포외 다당(CBP, BWS 및 BWI)이었다. P.D.A.배지에서 보존하였던 영지 1호를 10L 용량의 jar fermenter (Bioengineering, L1523, Switzerland)를 이용하여 접종량 5%(v/v), pH 5.0, 온도 30°C, 교반속도 100rpm 및 통기량 0.5vvm으로 7일간 배양하였으며, 이 때 사용한 배지의 조성은 glucose 5%, yeast extract 0.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% 및 KH_2PO_4 0.05%(w/v)이었다.

얻어진 배양액을 2500xg에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하고 배양여액을 얻었으며, 이를 배제분자량이 100,000인 환외여과장치(Sartocon Mini SM 17521, Germany)로 농축하여 얻어진 농축액에 2배량의 acetone을 가하였고, 생성된 침전물을 투석 및 동결건조하여 세포외 조다당(CBP)으로 하였다. CBP는 다시 실온의 증류수로 24시간 동안 교반 용해하고 원심분리(2500xg, 30분)하여 상정액과 불용성의 침전물을 얻었으며, 각 분획은 농축후 gel chromatography하여 각각 수용성(BWS) 및 불용성(BWI) 다당으로 분획, 정제하여 시료로 하였다.

2.2. 세포주 배양

본 연구에서 항암활성을 검색하는데 이용된 세포는 promyelocytic leukemia인 HL-60 (Peripheral blood, human) 세포, A549 (Lung carcinoma, human) 세포, Colo320(Colon adenocarcinoma, human) 세포 및 Mouse fibroblast 세포인 NIH3T3 세포이었다. Mouse NIH3T3 세포배양에는 DMEM 배지에 5% bovine calf serum (BCS, Hyclone)이 첨가된 배지가 이용되었다. 반면, 나머지 세포들은 RPMI 1640 배지 (Gibco)와 heat inactivation시킨 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Hyclone)과 100 units의 penicillin-streptomycin (Gibco)를 첨가한 배지를 사용하여 배양하였다.

2.3. 세포독성 및 활성의 측정

세포독성 및 활성은 SRB, MTT 및 NBT법에 의하여 다음과 같이 측정하였다.

2.3.1. SRB assay

Sulforhodamin B (SRB) assay를 사용하여 cytotoxicity를 다음과 같이 측정하였다. 96 well plate (Falcon)에 $5 \times 10^5/\text{ml}$ cells의 농도로 A549 cell을 분주하여 24시간 동안 배양한 후 시료를 처리하고 일정 시간 경과 후, 10% TCA를 처리하여 4°C에서 고정시켰다. TCA로 고정된 후 tap water로 5회 washing함으로써 growth medium, low molecular weight metabolites와 serum protein을 제거한 후 건조시켰다. 건조후 0.4% SRB solution (in 0.1% acetic acid)을 첨가하여 30분간 상온에서 염색시켰다. 염색 후 1% acetic acid로 5회 washing하여 unbound된 SRB dye를 제거한 후 완전히 건조하였다. 10 mM Tris-Cl로 bound dye를 녹인 후 spectrophotometer (Hitachi)를 이용하여 520nm wavelength에서 흡광도를 측정하였다 [14].

2.3.2. MTT assay.

세포를 24 well plate에 분주하고 CO₂ incubator에서 일정시간 배양한 후 각 agent를 처리하였다. 일정 시간 배양 후 100 μl MTT solution을 가하고 CO₂ incubator에서 4시간 동안 배양한 후 원심분리로 배지를 제거하고 1 ml DMSO (IBI)로 녹여 540nm wave length에서 흡광도를 측정하였다[15].

2.3.3. NBT assay.

세포 배양액으로부터 0.2 ml의 세포를 취한 후 1% NBT (Sigma)와 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TPA (Sigma)를 동량 가한 후 30분 동안 37°C에서 배양하여 현미경으로 염색된 세포를 관찰하였다[16].

2.4. NIH 3T3 세포로의 c-myc DNA transfection.

영지(*Ganoderma lucidum*)의 액체배양에 의한 세포의 다당의 항암활성과 세포증식 및 분화에 미치는 영향

DNA transfection은 calcium phosphate-based transfection 방법을 사용하였다[17]. NIH 3T3 세포를 1×10^6 농도로 분주하고 CO₂ incubator에서 overnight 배양한 후 멸균된 microtube에 2.5 M CaCl₂ 용액을 멸균수로 10배 희석하여 0.5 ml 첨가한 후 200 μ g (TE buffer) mouse c-myc DNA를 첨가한 후 0.5 ml 2 \times HEPES-buffered saline [280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES (Sigma), pH 7.1]으로 처리하여 20분 동안 room temperature에서 방치하였다. Culture flask를 잘 swirling 하면서 혼합물을 세포에 처리한 후 잘 흔들어 주고 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. Aspiration으로 배양액을 제거한 후 10 ml의 PBS로 씻어 주었다. 2 ml의 15% glycerol (in distilled water)을 첨가하고 swirling으로 골고루 퍼지도록 하여 1분 동안 방치한 후 aspiration으로 배양액을 제거하고 새 배지를 첨가하고 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다.

2.5. Western blot analysis.

단백질을 SDS PAGE로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 electrotransfer하였다. 단백질이 blot된 membrane을 blocking buffer [10 mM Tris·Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 3.0% (w/v) nonfat dry milk]로 1시간 동안 처리한 후 polyclonal pRb antibody (Ab-2, Oncogene science) 또는 polyclonal c-Myc antibody (UBI)를 첨가한 binding Buffer [10 mM Tris·Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.5% (w/v) nonfat dry milk]에서 1시간 반응시킨 후 alkaline phosphatase가 label된 goat anti-rabbit IgG를 1시간 동안 처리하였다. Alkaline phosphatase의 활성은 X-phosphate 및 NBT를 기질로 사용하여 color reaction으로 확인하였다.

2.6. DNA fragmentation analysis.

세포를 원심분리에 의하여 모은 후 15분 동안 room temperature에서 lysis buffer [5 mM Tris·Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 0.5% triton X-100]을 처리하여 세포를 파괴시킨 후 15000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 pellet을 제거하고 1 μ l RNase를 1시간 동안 처리한 후 1 μ l proteinase K (20 mg/ml), 1% SDS를 처리하여 2시간 동안 50 $^{\circ}$ C에서 방치하였다. 동량의 phenol/chloroform (v/v, 1:1)을 처리하여 잘 섞어 준 후 4 $^{\circ}$ C, 15000 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후 상등액을 옮긴 후 1/10 volume의 3M sodium acetate (pH 5.2)와 2.5 volume의 ethanol을 가하고 -70 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 방치한 후 4 $^{\circ}$ C, 15000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 pellet을 TE buffer로 녹인 후 1.5% agarose gel로 전기영동하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. SRB assay에 의한 항암활성

SRB(sulforhodamin B)는 밝은 핑크빛을 띠는 aminocanthene dye로 2개의 charged-SO₃ group이 있어서 약산성인 조건에서 단백질 분자의 positive charge에 결합한다. Trichloroacetic acid(TCA)로 세포를 고정시킨 후 SRB dye로 세포내 단백질을 염색하여 관찰하는데[15], 이 방법은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay[18,19]와 더불어 항암 물질의 검색에 광범위하게 사용되며, 특히 항암 물질 탐색에 있어서 short term assay에 적합하다.

한편, 암세포주인 Colo320 DM 및 HSR과 A549 세포는 모두 인체 암세포에서 빈번히 발생되는 대표적인 oncogene의 하나인 c-myc gene이 정상 세포에 비해 20배 이상 증폭된 세포들로 잘 알려져 있다.

본 연구에서는 이들 인체 암세포 및 mouse NIH 3T3 세포를 이용하여 세포의 다당의 항암활성을 sulforhodamin B(SRB) assay로 측정하였다. 즉, 영지의 액체배양에 의한 세포의 다당 및 분획(이하 BWI, BWS 및 CBP로 표기)의 인체 암세포(A549, Colo320 DM 및 HSR)와 mouse NIH 3T3에 대한 항암효과를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 1 및 2와 같다.

각각의 세포주를 5×10^4 , 1×10^5 및 5×10^5 의 농도로 seeding하고 24시간 경과 후 BWI, BWS 및 CBP를 0.2 μ g/ μ l ~ 1.0 μ g/ μ l 농도로 24시간 처리하여 SRB assay를 실시하였는데, BWS 분획의 cytotoxicity는 모든 세포에서 관찰되지 않았고, CBP도 NIH 3T3 세포를 제외한 나머지 세포주에서 미미한 세포독성을 보였을 뿐이다. 하지만 BWI는 모든 세포주에 농도 의존적인 항암활성을 나타내었으며, 특히, A549 및 NIH 3T3 세포에 대해서 강한 활성을 나타내었다(20% viability). 또 BWI는 세 시료중 가장 강한 활성을 보였지만, Colo320 세포에서는 세포독성이 미미하여 BWI의 활성이 species specific한 반응일 가능성이 있는 것으로 생각되었다.

따라서 BWI가 인체 암세포주 및 NIH 3T3 세포에 미치는 영향을 검토하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. BWI 분획은 NIH 3T3 세포에 대해 A549 세포에서와 비슷한 maximum cytotoxicity를 보였지만 그 거동은 다른 흥미로운 결과를 보였다. 즉, BWI 분획이 위의 인체 암세포에 대해서는 낮은 농도의 세포에 대하여 가장 효율적인 항암활성을 나타내었으나 NIH 3T3 세포의 경우에는 가장 높은 농도의 세포에 대하여 가장 강한 독성을 나타낸 점이다.

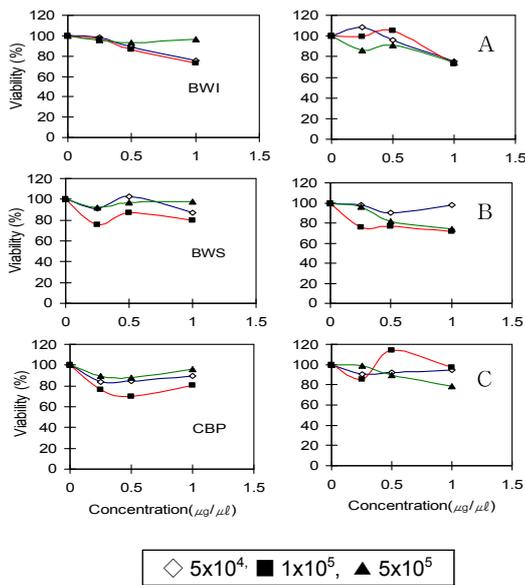


Fig. 1. SRB assay. Various amount of A549(left) and NIH 3T3(right) cells ($5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ cells/ml) were incubated with three different extracts.

A, BWI; B, BWS; C,

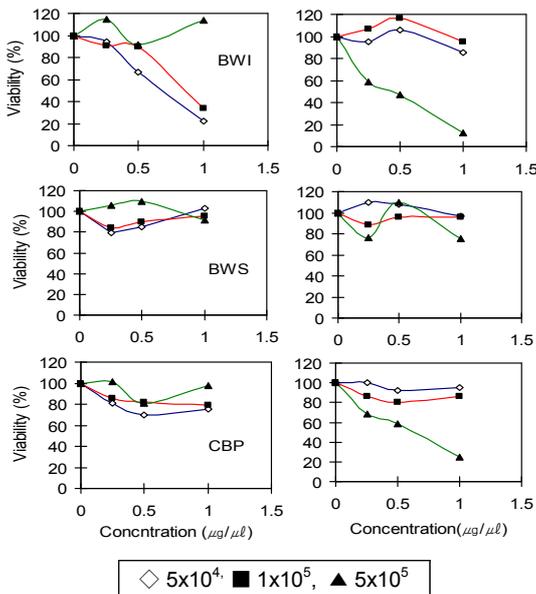


Fig. 2. SRB assay. Various amount of Colo320 DM and HSR cells ($5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ cells/ml) were incubated with three different extracts(BWI, BWS and CBP)

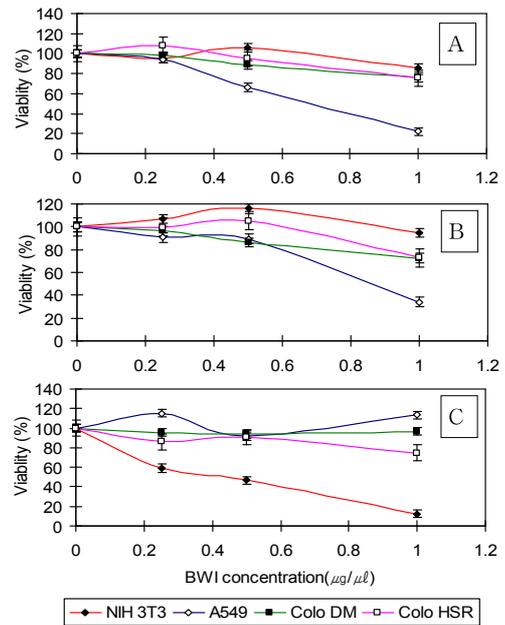


Fig. 3. SRB assay. Four different cell lines were incubated with various concentration of BWI.

A, 5×10^4 ; B, 1×10^5 ; C, 5×10^5 cells/ml.

이 차이를 알아보기 위해 NIH 3T3 세포의 형태를 위상차 현미경으로 관찰하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다.

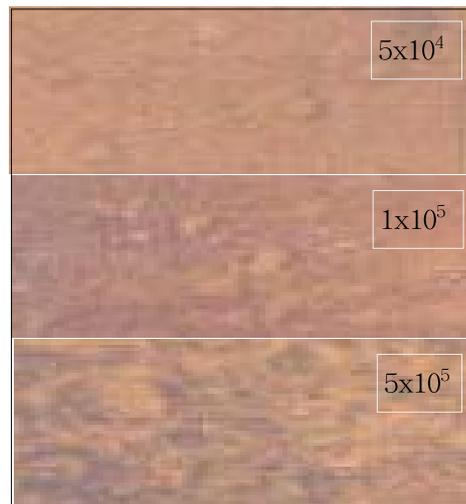


Fig. 4. Phase contrast microscopic photographs of NIH 3T3 cells with different concentrations (x400).

영지(*Ganoderma lucidum*)의 액체배양에 의한 세포의 다량의 항암활성과 세포증식 및 분화에 미치는 영향

그림에서 보는 바와 같이, 고농도에서 세포의 morphology에 변형이 초래됨을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 BWI 분획이 정상적인 NIH 3T3 세포에는 작용하지 않으나 암세포와 같은 morphology를 가지는 고농도의 세포에 대하여는 효과적으로 작용한다는 것을 보여주고 있다.

따라서 이의 확인을 위해 두 종류의 transform된 NIH 3T3세포를 이용하여 역시 위상차 현미경으로 관찰하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, 그 하나는 long culture에 의하여 spontaneous하게 변형된 세포 (ST)이며, 다른 하나는 mouse *c-myc* gene의 transfection에 의하여 변형된 세포 (MT)이다.

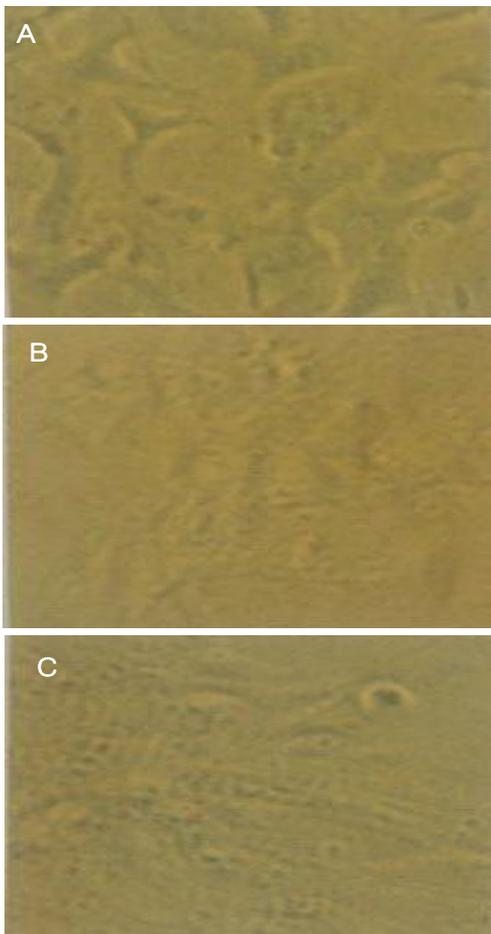


Fig. 5. Phase contrast microscopic photographs of NIH 3T3 cells (x400).

- A: normal NIH 3T3 cells
- B: spontaneously transformed NIH 3T3 cells
- C: c-myc tranfected cells

따라서 이들 암세포와 같이 변형된 이상의 NIH 3T3 세포와 정상의 NIH 3T3 세포를 이용하여 BWI 분획의 효과를 MTT assay로 검토하였으며, 그 결과는 Fig. 6과 같다.

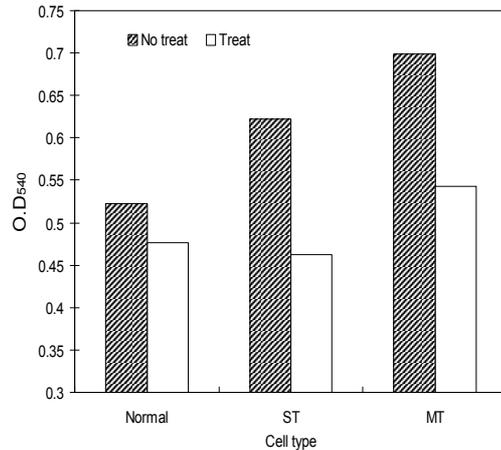


Fig.6. MTT assay. Three different kinds of NIH 3T3 cells were incubated with 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of BWI for 24hrs, ST, spontaneously transformed; MT, c-myc transfected cells.

정상 세포에서는 9%의 저해가 관찰된 반면, ST 및 MT 세포에서는 각각 26% 및 22%의 저해가 관찰되었다. 이 결과는 BWI분획의 cytotoxic 효과가 암세포에 특이적인 반응일 가능성을 암시하고 있다. 그 동안 버섯 유래 다당류의 항암활성은 주로 숙주 매개성으로 알려져 왔다.

3.2 NIH 3T3 세포 주기에 미치는 영향

BWI 분획의 NIH 3T3 세포에 대한 특이적 세포 독성 효과를 보다 더 상세히 알아보기 위해 세포 주기의 어느 단계에서 작용하는지를 검토하고자 하였다. 이를 위해 serum starvation에 의해 G₀에 머문 NIH 3T3 세포를 5% serum에 의해 모든 세포들이 동시에 G₀에서 G₁ phase로 진행하도록 한 후 일정 시간이 경과한 후에 BWI 분획을 처리하여 검토하였다. 즉, NIH 3T3 세포를 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 으로 24-well plate에 분주한 후 5% serum으로 2일간 배양한 후, 0.5% serum 배지로 교체하여 2일간 배양해 모든 세포들이 G₀ 상태에 머물도록 하였다. 다시 5% serum배지로 교체하여 세포들이 동시에 세포 주기를 시작하도록 해준 후 각각 0, 0.5, 1, 3, 6, 12시간 경과 후에 배양액 추출물을 처리하여 세포의 어느 주기에서 활성을 나타내는가를 MTT assay로 분석하였으며, 그 결과는 Fig. 7과 같다. MTT assay는 tetrazolium-based compound가

mitochondria의 dehydrogenase에 의한 환원 반응으로 blue formazan을 생산해서 살아 있는 세포에서만 반응이 일어나는 것을 기초로 해서 DNA 함성을 간접적으로 측정할 수 있는 방법이다[18,19].

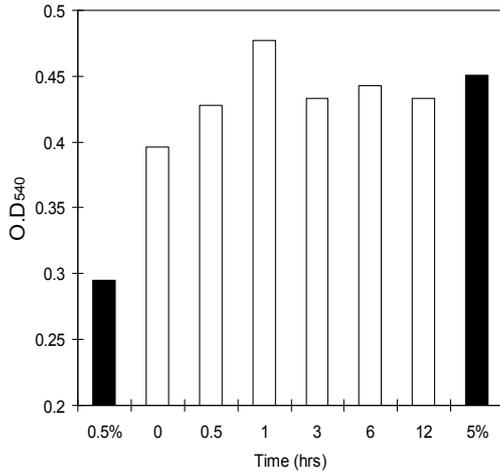


Fig. 7. The effect of BWI on the cell cycle.

After NIH3T3 cells were synchronized by serum starvation, fresh media containing 5% BCS was added and BWI was treated at different time point after 5% BCS addition.

Fig. 7에서와 같이, serum에 의해 세포들이 활성화된 후 30분 이내에 시료를 처리하는 것이 세포 성장억제 효과가 약간 있었다. 그러나 그 후에 처리했을 때는 억제 효과가 관찰되지 않았으며, 1시간 이후의 처리시에는 오히려 약간의 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 BWI분획이 NIH 3T3 세포 주기에 별로 영향을 미치지 않음을 나타내고 있다. 한편, BWI분획의 세포 증식의 효과를 분석하기 위하여 serum starvation에 의하여 quiescent세포를 만든 후 serum이 첨가되지 않은 상태에서 BWI 분획의 성장촉진 효과를 MTT assay에 의하여 관찰한 결과는 Fig. 8 및 9와 같다. 실험한 BWI의 모든 농도에서 강한 cytotoxic 활성을 나타내었으며, 따라서 BWI 분획의 세포증식에 대한 저해효과를 확인할 수 있었다.

3.3. 세포분화에 미치는 대한 영향

HL-60(Human promyelocytic leukemia) 세포는 c-myc gene의 증폭이 일어난 사람의 백혈병 세포로 다양한 분화 유도물질에 의해 세포 분화가 일어나며, 다양한 방법에 의해 분화의 정도를 관찰할 수 있다. HL-60 세포는 macrophage (monocyte)와

granulocyte (myeloid)로 분화될 수 있다. Vitamin D₃, sodium butyrate, TPA 등은 monocytes로의 분화를 유도하고, DMSO, retinoic acid등은 granulocyte로 유도한다[20,21]. 분화된 monocyte는 길쭉한 모양으로 관찰되며, granulocyte는 분화가 되지 않은 세포와 현미경상으로 구별하기 어려우나 nitro-blue tetrazolium chloride(NBT) assay로 분화의 정도를 측정할 수 있다 [16].

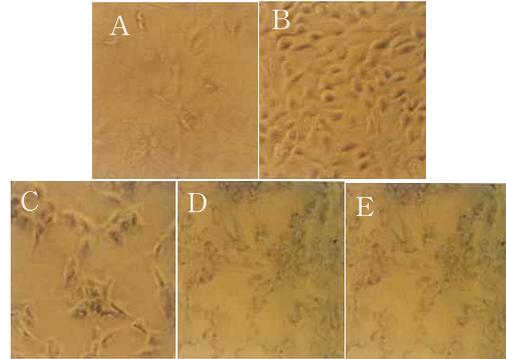


Fig. 8. The effect of BWI fraction on the proliferation of quiescent NIH 3T3 cells.

Serum starvated quiescent NIH 3T3 cells were treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (C), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (D) and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (E) of BWI fraction for 36hrs. Cells were incubated in 0.5% serum media (A) or 10% serum media(B).

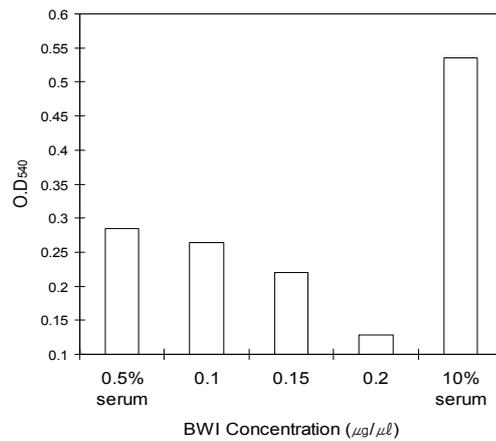


Fig. 9. Effect of BWI fraction on the quiescent NIH 3T3 cells.

Serum starvated quiescent NIH 3T3 Cells were treated with 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (C), 0.15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of BWI fraction for 36 hrs. Cells were incubated in 0.5% serum media (A) or 10% serum media MTT assay was performed.

영지(*Ganoderma lucidum*)의 액체배양에 의한 세포의 다량의 항암활성과 세포증식 및 분화에 미치는 영향

따라서 HL-60 세포를 24-well plate에 분주한 후 BWI, CBP-A 및 CBP-B 분획을 처리하여 24시간에서 72시간까지 관찰한 결과, Fig 10에서와 같이 48시간 이후 CBP분획에서 세포의 형태 변화가 관찰되었다.

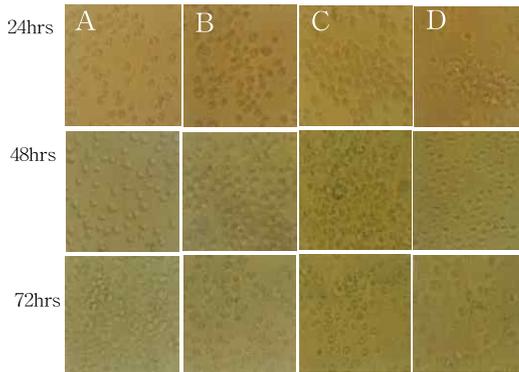


Fig. 10. Phase contrast microscopic photographs of HL-60 cells (x400).

HL-60 cells were treated with BWI(A), BWS(B), CBP-A(C) and CBP-B(D) fraction for indicated times.

HL-60 세포의 분화 측정 방법은 세포의 형태 변화 관찰 외에 여러 가지가 있는데, 분화된 세포에서 왕성하게 나타나는 specific surface marker를 인식하는 Mo1, Mo2, My4 등과 같은 antibody marker 이용하는 방법이 있으며, 본 실험에 사용된 NBT assay 방법이 있다. NBT는 생체내 superoxide에 의해 환원되어 푸른색의 formazan을 형성하는 물질이다. HL-60 세포가 분화되었을 때 이들 분화된 monocyte와 granulocyte는 TPA에 의한 자극에 의하여 superoxide를 생성하게 되고, 이것은 NBT와 반응하여 blue formazan을 형성한다[16]. 이러한 원리로 HL-60 세포를 24-well plate에 분주한 후 BWI, CBP-A 및 CBP-B 분획을 처리하여 24 및 48시간 후에 NBT assay로 blue formazan의 형성을 관찰한 결과는 Fig. 11과 같다.

CBP-A와 CBP-B분획 처리후 48시간 경과한 후 blue formazan의 형성이 증가한 것으로 관찰되었다. 이 결과는 CBP 분획이 HL-60세포의 분화와 밀접한 관계를 갖고 있는 것을 암시하고 있다. BWI 분획이 암세포주의 분화를 유도하는 것으로 보아 정상 세포의 carcinogenesis 방지와 암세포의 정상 세포화를 유도할 가능성이 있음을 암시하고 있다. 일반적으로 세포에 분화가 유도되면 세포증식이 정지되므로 MTT assay를 시행하여 세포 증식에 미치는 영향을 재검토하였으며, 그 결과는 Fig.12

와 같다.

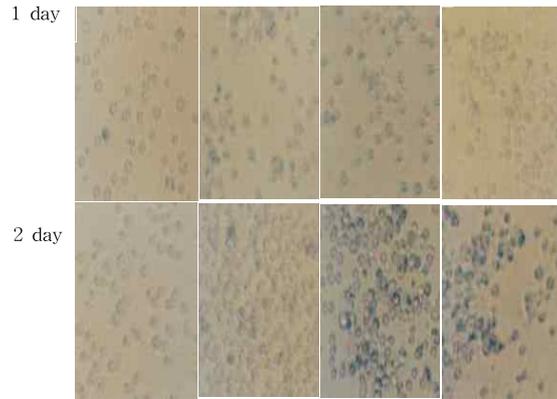


Fig. 11. The effect of BWI, CBP-A and CBP-B fraction on the differentiation of HL-60 cells.

After cells were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of each fraction for 24 or 48hrs., NBT assay was performed.

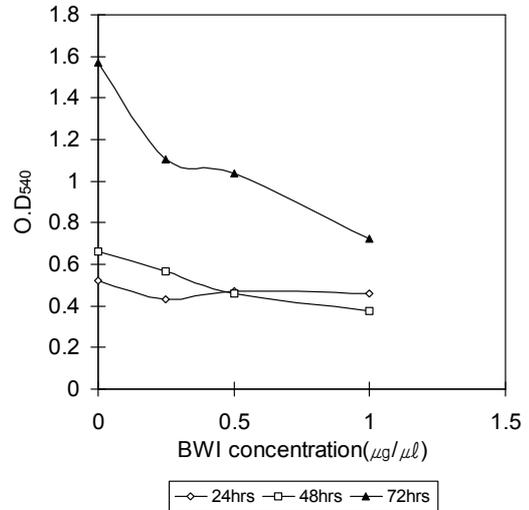


Fig .12. Effect BWI fraction on the HL-60 cells. After cells were treated with BWI for the indicated

세포의 수는 72시간 이후부터 급격히 감소함을 MTT assay로 확인할 수 있었고 따라서 분화의 유도로 세포증식이 정지됨을 확인할 수 있었다.

3.4. A549 세포의 apoptosis

암세포에 특이적으로 작용하는 항암제 개발의 target으로 주목받고 있는 물질들 중의 하나는 암 세포의 분화 또는 apoptosis 유도물질이다.

Cytotoxic drug나 외부의 물리적 자극에 의해 apoptosis가 일어날 수 있는데, 이 때 세포의 형태적, 생화학적 변화를 관찰할 수 있다(Ellis et al., 1991). Apoptosis의 유도인자는 ionizing radiation, Ca²⁺ ionophore등으로 알려지고 있으며, apoptosis의 억제 인자들로는 phorbol ester, nerve growth factor(NGF), serum, interleukin과 같은 cytokine 등이 알려져 있다[22].

Apoptosis 발생시 동반되는 현상으로는 세포의 형태 변화와 DNA fragmentation, *c-myc* gene 발현의 변화 등을 들 수 있다[23, 24]. A549 세포에서 BWI의 항암활성이 apoptosis를 동반하는 지 알아보기 위하여 BWI 분획을 처리한 후 DNA를 분리하여 전기영동으로 분석한 결과는 Fig. 13과 같다.

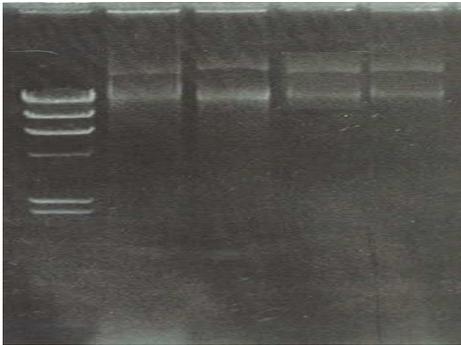


Fig. 13. Agarose gel analysis of DNA fragmentation in A549 cells.

A(λ -HindIII standard), B(Control), C(25 μ g/ml), D(50 μ g/ml) and E(100 μ g/ml) of BWI fraction was treated for 24hrs.

DNA fragmentation의 특징인 ladder band는 확인되지 않았으며, 따라서 BWI 분획은 A549세포의 apoptosis를 야기하지 않는 것을 알 수 있었다.

3.5. *c-myc* 및 pRb 단백질에 미치는 영향

인체 암세포에서 이상이 발견되는 대표적인 oncogene의 하나인 *c-myc* gene은 대부분의 암세포에서 발현 정도가 매우 높은 것으로 알려지고 있다. Human hepatocellular carcinoma에서도 *c-myc* oncoprotein이 정상 간세포에 비해 증가된 것으로 나타났다[25]. 또한 *c-myc* proto-oncogene은 정상 세포의 성장과 분화 조절에도 중요한 역할을 한다. 이들 proto-oncogene은 정지된 세포주기를 돌게 하는데 필요하며, 여러 항암활성 물질들이 oncogene의 발현을 조절하는 기능을 가지는 것으로 보고되고 있다. 생체내에서 cholesterol과 더불어 isoprenoid compound의 전구체인 mevalonate

의 생합성을 억제하는 mevinolin을 사람의 fibroblast 세포에 처리했을 때 serum stimulation 하에서도 *c-myc* gene의 발현이 억제된 것이 관찰되었다[26,27]. Bernard 등[27]의 실험에서는 본 연구에서도 사용된 human colon carcinoma인 Colo320 세포에 대해 alkylating agent의 처리 시간에 따라 *c-myc* gene의 발현이 감소하고 있음을 보여주고 있다.

한편, Karl 등[28]의 연구에 의하면 bovine placenta로부터 분리한 biological factor DIF는 정상 세포에 비해 종양 세포에 대해 증식 억제 기능이 있으나 처리 농도에 따라 달라지며, *c-myc* gene의 발현이 약간 감소하는 것으로 나타났다. Phorbol ester를 이용해 세포가 분화하는 동안 각 oncogene의 발현 정도를 관찰한 David 등[29]의 실험에서는 human T leukemia line인 JURKAT 세포에 TPA를 처리했을 때 세포 증식이 억제되었으며, *c-myc* mRNA가 감소하는 것으로 관찰되었다. 이밖에 synthetic androgen mibolerone (7 α -17 α -dimethyl- 19-nortestosterone)에 의한 human prostate carcinoma인 LNCaP 세포의 증식 억제 및 *c-myc* 발현 억제 효과가 증명되었으며[30], leukemic cell line인 HL-60과 U937에 대한 interferon의 작용(Mirian et al., 1985), HeLa cell에서의 interferon- γ 와 tumor necrosis factor (TNF)의 작용(Anat et al., 1986)과 같이 *c-myc* 발현에 대한 각종 cytokine의 영향에 관한 연구도 시도되고 있다. 몇몇 연구자들은 anti-leukemic therapy에 이용되는 glucocorticoid에 대한 실험에서 glucocorticoid는 세포의 성장과 조직 유지에 필요한 유전자의 발현을 억제한다고 제안하였는데, 이때 *c-myc* gene 발현이 저해된다고 보고하고 있다. 그 증거로 S49 mouse lymphomas, P1798 mouse lymphosarcoma, CEM-C7 human leukemia에서 glucocorticoid에 의해 *c-myc* gene 발현이 현저히 감소됨을 볼 수 있다. 즉 *c-myc* 발현의 억제로 암세포의 죽음을 유도하는 것이 가능하다는 것을 시사해 주고 있다.

본 연구에서는 A549 세포에 항암활성을 나타내는 BWI 분획이 *c-myc* 발현의 억제를 동반하는 지를 Western blot 분석을 통하여 검토하였고, 그 결과를 Fig. 14에 나타내었다.

본 실험에서 처리한 모든 농도의 BWI에서 *c-Myc* 단백질의 감소는 관찰되지 않았다. 이 결과는 다양한 종양 세포에 cytotoxicity가 있는 것으로 널리 알려진 cisplatin의 *c-myc*에 대한 영향을 실험했으나 커다란 효과는 없는 것으로 나타난 결과(Spandidos et al., 1991)와 유사하였다.

한편, 세포의 성장 및 분화와 밀접한 관계를 가지는 anti-oncoprotein 가운데 가장 많은 연구가 되고 있는 것 중의 하나는 pRb이다. 인산화되지 않

영지(*Ganoderma lucidum*)의 액체배양에 의한 세포의 다당의 항암활성과 세포증식 및 분화에 미치는 영향

은 pRb는 G₀ phase에서 세포의 성장을 억제하는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며 세포 주기의 진행에 따라 인산화되어 S, G₂ 및 M phase에서는 인산화된 pattern을 유지하는 것으로 알려지고 있다.



Fig. 14. Western blot analysis of A549 cells. Cells were incubated with 100 μ g/ml of BWI fraction and total protein was prepared. 50 μ g of protein was electrophoresed, transferred into nitrocellulose membrane and incubated polyclonal pRb antibody(oncogene science). pRb antibody was detected by alkaline phosphatase labeled goat anti rabbitlg Ig G antibody. A(Control), B(25 μ g/ml), C(50 μ g/ml), D(100 μ g/ml) and E(200 μ g/ml) of BWI fraction was treated for 24hrs.

pRb는 인산화의 정도에 따라 SDS-PAGE에서 이동하는 정도가 다르므로써 Western blot 분석에 의하여 확인할 수 있는 장점을 가지고 있다. BWI 분획의 항암활성이 pRb의 발현의 증가 또는 탈인산화의 축진을 동반하는 지를 알아보기 위하여 Western blot 분석을 행한 결과는 자료화하지는 않았으나 pRb 단백질의 양이나 인산화 pattern에는 영향이 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과는 BWI 분획의 항암활성 작용기작이 세포의 신호전달체계의 초기과정 수준에서 이루어지지 않음을 시사하고 있다. 그러나 CBP 분획이 HL-60 세포의 분화를 유도하는 작용을 하는 결과로 미루어 이들이 세포의 종류에 따라 다르게 작용할 가능성을 시사하고 있다. 앞으로 이들 분획이 어떤 기작에 의하여 HL-60 세포의 분화를 유도하는 지를 밝히는 것은 각 분획의 작용기작을 밝히는데 중요할 뿐만 아니라 각 분획의 항암제로써의 개발에도 중요한 기여를 할 것으로 생각된다.

4. 결론

영지 균사체의 액체배양에 의해 생산된 세포의 다당(CBP) 및 이의 gel chromatography에 의한 수용성 및 불용성 분획(BWS, BWI)의 항암활성을 배양된 동물세포(A549; lung carcinoma, Colo 320 DM and HSR; colon carcinoma, mouse NIH

3T3)를 이용하여 조사, 검토하였다. 이들 BWS, BWI 분획 및 CBP를 사용하여 인체 암세포인 A549, Colo 320 DM 및 HSR, mouse NIH 3T3세포에 대한 cytotoxicity를 SRB를 이용하여 검토한 결과, A549에 대해 apoptosis를 야기하지 않았다. BWI 분획은 모든 세포에 대하여 강한 cytotoxicity (20% survival)를 나타내었다. 또 저농도의 NIH 3T3 세포에 대해서는 독성을 나타내지 않았으나 transformed morphology를 보이는 고농도의 NIH 3T3 세포에 대해서는 강한 세포독성을 나타내어 영지 버섯의 세포의 다당 분획이 암세포에 특이적으로 작용하는 것으로 추정되는 결과를 얻었다. 그러나 BWI의 항암활성은 pRb 단백질 발현의 증가나 인산화의 pattern 및 c-myc 발현에는 영향을 주지 않았으며, 따라서 항암활성의 작용이 세포 신호전달 체계의 초기과정 수준에서는 이루어지지 않음을 시사하였다. 한편, CBP 분획은 암세포주(HL-60)의 분화를 유도하여 정상세포의 carcionogenesis의 방지와 암포의 정상화를 유도할 가능성을 암시하였다.

참 고 문 헌

- [1] Jong, S.C. and Birmingham, J.M., "Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*," *Advances in Applied Microbiology*, 37, 101-134, 1992.
- [2] Jong, S.C. Birmingham, J.M., and Pai, S.H. "Immunomodulatory substances of fungi origin," *J. Immunol. Immunopharmacol.* 11, 115-122, 1991.
- [3] Lee, S.Y. "Characterization and production of antitumor active polysaccharide from mushroom origin." *Biotechnology News*, 3(2), 95-109
- [4] Lee, S.Y., Kang, T.S. "Production conditions and characterization of the exo-polymer produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium." *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24(1), 111-118, 1996.
- [5] Lee, S.Y., Kang, T.S., Moon, S. O., Lew, I. D., Lee, M. Y. "Fractionation and antitumor activity of the water soluble exo-polysaccharide by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium." *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24(4), 459-464, 1996.
- [6] Lee, S.Y., Kang, T.S. "Structural analysis of the antitumor active exo-polysaccharide produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium." *The Korean Journal of*

- Mycology, 27(1), 76-81, 1999.
- [7] Lee, K. M., Lee, S.Y., Lee, H.Y. "Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air lift fermenter." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(6), 646-650, 1999.
- [8] Lee, K. M., Lee, S.Y., Lee, H.Y. "Effect of ammonium phosphate on mycelial growth and exopolysaccharides production of *Ganoderma lucidum* in an air lift fermenter." *J. Microbiol. Biotechnol.*, 9(6), 726-731, 1999.
- [9] Lee, S. Y., Lee, K. M. "Effect of different pH processes on branched β -1,3-glucan production from submerged culture of *Ganoderma lucidum*." *Journal of Industrial Technology(Kangwon Nat'l Univ.)*, 20A, 45-50, 2000.
- [10] Lee, H.S., Jung, J.H., Lee, S.Y. "Effects and batch kinetics of agitation and aeration on submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*." *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 16(3), 307-313, 2001.
- [11] Chung, W.T., S.H. Lee, J.D. Kim, Y.S. Park, B. Hwang, S.Y. Lee, H.Y. Lee, "Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines." *J. Biosci. Bioeng.*, 92(6), 550-555, 2001.
- [12] Kang, T. S., Lee, M. Y., Lee, S.Y. "Characteristics of extracellular insoluble β -glucan isolated from the culture broth of *Ganoderma lucidum* mycelium." *Journal of Industrial Science and Technology Institute (Chungbuk Provincial University)*, 6, 1-10, 2003.
- [13] Mun, H.C., Lee, H.S., Park, J.H., Kim, D.H., Lee, S.Y. Lee, H.Y. "Enhancement of immune activities of *Ganoderma lucidum* mycelium cultured with garlic enhanced medium." *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12(1), 24-30, 2004.
- [14] Philip, S., Rita, S., Dominic, S., Anne, M., James, M., David, V., Jonathan, T., Heidi, B., Susan, K. and Michael, R. B. *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening.* *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107-1112, 1990.
- [15] Rubinstein, L. V., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Simon, R. M., Tosini, S., Skehan, P., Scudiero, D. A., Monks, A. and Boyd, M. R. "Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay a diverse panel of human tumor cell lines." *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1113-1118, 1990.
- [16] Andrew, Y. and Guernsey, L. "Increased *c-myc* RNA levels associated with the precommitment state during HL-60 myeloid differentiation. *Cancer Res.*" 46, 4156~4161, 1986.
- [17] Ausubel, F.M., Brent, Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G., and Struhl, K. *Current protocols in molecular biology*, Wiley interscience, Inc, 1991.
- [18] Yamaue, H., Tanimura, H., Noguchi, K., Hotta, T., Tani, M., Tsunoda, T., Iwahashi, M., Tamai, M. and Iwakura, S. "Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumour cells using the MTT assay." *Br. J. Cancer* 66, 794-799, 1992.
- [19] Teruaki, H., Yuji, F. and Yoshio, I. "An in vitro chemosensitivity test for the screening of anti-cancer drugs in childhood leukemia." *Cancer* 65, 1263-1272, 1990.
- [20] Andrew, Y. Debra, B., and Justin, F. "Control of HL-60 Monocytic Differentiation." *Exp. Cell Res.* 168, 247-254, 1987.
- [21] Andrew, Y. Mary, F., Gwen, D., and Justin, F. "Control of HL-60 cell differentiation lineage specificity, a Late event occurring after precommitment." *Cancer Res.* 47, 129-134, 1987.
- [22] Fesus, I., Davies, P. and Piacentini, M. "Apoptosis: Molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur. J. Cell Biol.* 56, 170-177, 1991.
- [23] Ellis, R. E., Yuan, J. and Horvitz, M. R. "Mechanisms and functions of cell death." *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 663-698, 1991.
- [24] Seamus, J. M., Douglas, R. G. and Thomas, G. C. "Decing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery." *TIBS.* 19, 26-30, 1994.
- [25] Patrick, A., Michael, K. and Wyn, F. "*c-fos* and *c-myc* oncoprotein expression in human hepatocellular carcinomas." *Anticancer Res.* 11, 921-924, 1991.
- [26] Barbu, V. and Dautry, F. "Mevalonate

- deprivation alters the induction of fos and myc by growth factors." *Oncogene* 5, 1077-1080, 1990.
- [27] Bernard, W. F. and Leonard, C. E. "Changes in *c-myc* and *c-fos* expression in a human tumor cell line following exposure to bifunctional alkylating agents." *Cancer Res.* 50, 62-66, 1990.
- [28] Karl, L. M. and Can, S. "Inhibition of DNA synthesis and oncogene expression in tumor cells by the biological factor DIF." *Anticancer Res.* 11, 981-986, 1991.
- [29] David, M., Michael, C., Samuel, Y., Katherine, B., James, A., Vikas, S. and John, C. R. "Phorbol ester-mediated inhibition of growth and regulation of proto-oncogene expression in the human T cell leukemia line JURKAT." *Oncogene* 6, 455-460, 1991.
- [30] Wolf, D. A., Kolhuber, F., Schulz, P., Fittler, F. and Eick, D. Transcriptional down-regulation of *c-myc* in human prostate carcinoma cells by the synthetic androgen mibolerone. *Br. J. Cancer* 65, 376-382, 1992.
- [31] Mirian, E., Dalia, R. and Adi, K. "Close link between reduction of *c-myc* expression by interferon and G₀/G₁ arrest." *Nature* 313, 597-600, 1985.
- [32] Anat, Y. and Adi, K. "Tumor necrosis factors reduces *c-myc* expression and cooperates with interferon- γ in HeLa cells *Science*," 234, 1419-1421, 1986.
- [33] Spandidos, D. A., Zoumpourlis, V. and Lang, J. C. "Cis-platin responsive sequences in the human *c-myc* promotor." *Anticancer Res.*, 11, 1339-1342, 1991.