

차가버섯 물추출물의 대장암세포 증식억제 및 Apoptosis 유도기전 연구

김은지^{1†} · 이용진² · 신현경^{1,3} · 윤정한^{1,3}

¹한림대학교 실버생물산업기술연구센터

²(재)춘천바이오산업진흥원

³한림대학교 식품영양학과

A Study on the Mechanisms by Which the Aqueous Extract of *Inonotus obliquus* Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation in HT-29 Human Colon Cancer Cells

Eun Ji Kim^{1†}, Yong-Jin Lee², Hyun-Kyung Shin^{1,3} and Jung Han Yoon Park^{1,3}

¹Silver Biotechnology Research Center and ³Dept. of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

²Chuncheon Bioindustry Foundation, Chuncheon 200-161, Korea

Abstract

The mushroom *Inonotus obliquus* (*IO*) has been traditionally used for the treatment of gastrointestinal cancer in Russia, Poland, and most of Baltic countries. To explore the possibility that *IO* has chemoprevention effects, we examined whether or not the aqueous extract of *IO* inhibits HT-29 cell growth and investigated the mechanism for this effect. Cells were incubated in the presence of increasing concentrations of the aqueous extract of *IO*. The extract substantially inhibited the viable HT-29 cell number in a dose-dependent manner and inhibited 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation into DNA of HT-29 cells. Annexin-V staining followed by flow cytometry revealed that the extract induced apoptosis of HT-29 cells in a dose-dependent manner. Western blot analysis of total cell lysates revealed that the extract induced cleavage of caspase-8, -9 and -3 and poly (ADP-ribose) polymerase, but did not affect the protein levels of Bax and Bcl-2. In addition, the extract dose-dependently increased the activity of caspase-8, -9 and -3. We have demonstrated that the aqueous extract of *IO* inhibits cell proliferation and induces apoptosis in HT-29 cells, which may be mediated by its ability to activate the caspase pathway.

Key words: *Inonotus obliquus*, apoptosis, caspase, colon cancer

서 론

암의 발생 및 암에 의한 사망률이 증가함에 따라 암을 예방하거나 암을 치료할 수 있는 물질에 대한 관심이 고조되고 있다. 특히 합성된 암예방제나 항암제의 독성 및 부작용이 제기됨에 따라 천연물로부터 항암성분을 찾는 연구가 진행되고 있다. 예로부터 식용 또는 약용으로 사용되어온 버섯은 여러 생리활성 유효성분을 함유하고 있을 뿐만 아니라 항암 효과가 있음(1)이 보고되고 있으므로 항암연구에 좋은 소재가 될 수 있을 것으로 사료된다.

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 북위 45°C 이상의 한랭한 삼림지대에서 자라는 검은 자작나무에 덩이 모양으로 자생하는 버섯으로, 러시아의 시베리아, 미국과 캐나다 등의 북아메리카, 유럽의 스칸디나비아 반도와 일본의 홋카이도 등에서 발견되고 있다. 차가버섯은 상황버섯과 모양이 매우

비슷하며, 주산지인 러시아에서는 소화기계 암과 당뇨병에 효과적이라고 알려져 일찍부터 뜨거운 물에 우려서 복용되고 있다.

차가버섯의 항암효과는 다양한 연구에 의해 입증되고 있다. 차가버섯을 우려낸 물이 항종양활성이 있음이 Bulatov 등(2)에 의해 보고되었으며, Shivrina(3)는 차가버섯에 함유되어 있는 steroides 또는 aromatic polyphenol 화합물이 항종양활성을 나타낸다고 보고하였다. 차가버섯을 n-hexane으로 추출한 후 그 분획물과 구성성분의 항암활성을 비교한 연구에서 3β,22-dihydroxy-lanosta-8,24-dien-7-one(4)과 3β,22-dihydroxyl-anosta-7,9,24-triene(5)이 종양세포인 Walker 256세포와 유방암세포인 MCF-7 세포, 혈액 암세포인 P388 세포에 대하여 강한 세포독성이 있음이 보고되었다. Ham 등(6)은 차가버섯 에탄올 추출물이 항산화활성을 증가시키고 유전독성을 억제한다고 보고하였다. 또한 차가버섯

†Corresponding author. E-mail: myej4@hallym.ac.kr
Phone: 82-33-248-3076. Fax: 82-33-244-1738

에탄올 추출물은 강한 항돌연변이활성을 나타내며, 폐암세포인 A549 세포, 유방암세포인 MCF-7 세포, 위암세포인 AGS 세포의 증식을 억제하였다(7). 차가버섯 물추출물도 자궁경부암 세포인 HeLa S3 세포(8,9), 위암세포인 SNU484 세포와 대장암세포인 HT-29 세포(10)의 증식을 억제하였다. 여러 보고를 통해 차가버섯이 다양한 암세포주의 증식을 억제함을 알 수 있으나 차가버섯의 암세포증식 억제기전에 대해서는 전혀 밝혀지지 않았다.

암은 세포의 증식이 비정상적으로 증가되거나 apoptosis가 적절하게 이루어지지 않고 감소하는 경우에 발생되고 진행된다. 그러므로 암세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 촉진하는 것은 암의 발생과 진행을 막을 수 있는 좋은 방법이라 할 수 있다. Programmed cell death라고도 불리는 apoptosis는 세포가 정상적인 상태 또는 병리학적인 요인에 노출된 후에 죽음에 이르게 되는 생리학적 과정을 일컫는다(11). Apoptotic cell은 세포수축, 핵 농축, chromatin의 응축, DNA절단과 같은 형태학적인 특징을 나타낸다(12). Apoptosis는 세포내·외적인 신호에 의해 시작되어 일련의 과정을 거쳐 이루어지고, Bcl-2 family 단백질(13)과 cysteine acid proteases인 caspase들(14)이 apoptosis의 중요한 조절인자로 작용한다.

Apoptosis 기전의 결함이나 apoptosis 신호 전달이 부적절하게 일어나 apoptosis 조절에 이상이 생기면 세포가 비정상적으로 증식하여 암이 초래될 수 있으므로, apoptosis 기전을 적절하게 회복시키거나 세포의 분화를 유도하는 약품이나 식이성분은 암예방제로 작용할 수 있다(15). 다양한 형태의 항암제들은 암세포의 apoptosis를 유도하여 항암제로서 작용한다(16,17). 그러므로 암세포의 apoptosis는 주요한 항암기전 중의 하나로 간주할 수 있고, 암세포에 apoptosis를 유도하는 식품성분은 항암제로 개발할 수 있는 가능성을 제시한다.

현재 차가버섯은 항암효과가 있는 것으로 알려지고 있으나 차가버섯의 항암기전에 대해 심도 있게 연구된 바가 없다. 본 연구에서는 차가버섯의 항암기전을 규명하기 위해 인간에서 유래한 대장암세포인 HT-29 세포를 사용하여 차가버섯 물추출물이 대장암세포의 apoptosis에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

HT-29 세포(ATCC HTB-38)는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture Ham's F12(DMEM/F12), selenium은 Gibco/BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA 등은

Cambrex Bio Technology(Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. Bovine serum albumin(BSA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), transferrin, anti-β-actin antibody와 본 실험에 사용한 일반적인 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Bcl-2와 Bax antibody는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, cleaved caspase-3, cleaved caspase-8, cleaved caspase-9, cleaved poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)에 대한 antibody는 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Horse radish peroxidase-linked anti-rabbit IgG와 horse radish peroxidase-linked anti-mouse IgG는 Amersham(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

시료추출

실험에 사용한 차가버섯은 러시아에서 수입한 것을 구입하여 사용하였다. 건조하여 분말화한 차가버섯 100g을 증류수 1L에 넣고 heating mantle에서 100°C로 가열하여 12시간 동안 추출하였다. 추출액을 Whatman #1 filter paper로 여과하여 -70°C로 냉동시킨 후 동결건조기로 분말상태가 될 때까지 건조하여 차가버섯 물추출물을 만들었다.

세포배양

HT-29 세포는 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가한 세포 배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ incubator(5% CO₂/95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양접시의 80%정도 차면 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 세포의 단층을 씻어낸 후 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA로 처리하여 계대배양하였고 배지는 2일마다 교환하였다.

세포의 증식측정

차가버섯 물추출물이 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 측정하기 위해 세포를 10% FBS가 첨가된 배지로 희석하여 50,000 cells/well의 밀도로 24 well plate에 분주하였다. 24시간이 지난 후 FBS가 없는 무혈청 배지로 교환하여 24시간 동안 배양하여 혈청의 효과를 제거하였다. 무혈청 배지는 DMEM/F12에 transferrin(5 µg/mL), selenium(5 ng/mL), BSA(0.1 mg/mL)를 첨가하여 만들었다. 세포는 무혈청 배지에서 24시간 배양한 후 무혈청 배지에 여러 농도의 차가버섯 추출물을 첨가한 배지로 교환하여 세포를 배양하였다. 추출물을 첨가하고 0, 1, 2, 3일이 경과한 후 MTT assay(18) 방법을 이용하여 살아있는 세포수를 측정하였다.

5-Bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)가 세포의 DNA에 삽입되는 정도를 측정하여(19,20) 세포의 DNA 합성에 미치는 영향을 조사하였다. 세포를 FBS가 포함된 배지로 희석하여 6,000 cells/well의 밀도로 96 well-plate에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 차가버섯 추출물을 처리하여 42시간 동안

배양하여 cell proliferation ELISA, BrdU(colorimetric) assay kit(Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 제조회사에서 제시한 방법에 따라 세포의 DNA 내로 삽입된 BrdU를 측정하였다. 위와 같은 조건으로 96 well-plate에 세포를 배양하여 MTT assay를 이용하여 살아있는 세포수를 정량한 다음 BrdU 결과를 세포수로 나눠 세포당 삽입된 BrdU 값으로 표시하였다.

Hoechst H 33258 염색

HT-29 세포를 chamber slide에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 차가버섯 추출물을 처리하였다. 추출물 처리 후 48시간이 지난 후에 차가운 PBS로 세포단층을 씻어낸 후 4% formaldehyde로 세포를 고정하였다. 세포에 10 µg/mL Hoechst H 33258 용액을 넣어 어두운 곳에서 1시간 염색하였다. 세포를 PBS로 충분히 헹군 후 형광현미경으로 관찰하였다(21).

Fluorescence-activated cell sorting analysis

세포를 24 well plate에 분주한 후 위와 동일한 방법으로 차가버섯 추출물을 처리하였다. 차가버섯 추출물을 첨가하여 48시간이 경과한 후 trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 수집하여 세포에 phycoerythrin(PE)-conjugated Annexin V와 7-amino-actinomycin D(BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA)를 넣어 15분동안 암실에서 염색한 후 Annexin V 또는 7-amino-actinomycin D에 의해 염색된 세포를 FACSscan™(Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA)을 사용하여 flow cytometry 방법에 의해 측정하였다(22,23). 살아있는 세포에서 세포막 인지질 이중층의 세포 안쪽을 향해 있던 phosphatidyl serine이 apoptotic cell에서는 바깥쪽으로 이동하는데, 이 phosphatidyl serine이 Annexin V에 결합하는 특성을 가지고 있으므로 Annexin V에 의해 염색된 세포는 apoptotic cell을 나타낸다. 7-amino-actinomycin D는 죽거나 손상된 세포막을 투과하여 죽거나 손상된 세포를 염색하므로 7-amino-actinomycin D의 염색 유무에 따라 살아있는 세포와 죽은 세포를 구분할 수 있으므로 Annexin V와 7-amino-actinomycin D를 사용하여 apoptotic cell 수를 정량하였다(22,23).

Western blot analysis

세포를 100 mm dish에서 위와 동일한 방법으로 세포 배양액에 차가버섯 추출물을 첨가하여 48시간 배양한 후 cell lysate를 만들었다. Cell lysate를 만들기 위해 세포를 차가운 PBS로 헹구고, lysis buffer(20 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM Na₃VO₄)를 첨가하여 4°C에서 40분간 교반하였다. 이 때 단백질의 분해를 방지하기 위해서 20 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL antipain, 10 µg/mL leupeptin, 80 µg/mL benzamidin HCl, 0.2 mM phenylsufonyl fluoride를 첨가하였다. 침전물은 13,000×g

에서 10분간 원심 분리하여 제거하고 상층액을 취해 cell lysate로 사용하였다. Cell lysate의 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 측정하였다. Cell lysate(100 µg protein)를 4~20% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분리한 후 polyvinylidene difluoride membrane(Millipore, Bedford, MA, USA)에 이동시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST(20 mM Tris·HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간동안 blocking하고, anti-bcl-2 antibody(1:1000 희석), anti-bax antibody(1:1000 희석), anti-cleaved caspase-3 antibody(1:1000 희석), anti-cleaved caspase-8 antibody(1:1000 희석), anti-cleaved caspase-9 antibody(1:1000, 희석), anti-cleaved PARP(1:1000 희석), anti-β-actin antibody(1:2000 희석) 등 측정하고자 하는 antibody를 각각 첨가하여 4°C에서 16시간동안 또는 상온에서 1시간동안 교반하였다. 그 후 horse radish peroxidase-linked anti-rabbit IgG 또는 horse radish peroxidase-linked anti-mouse IgG를 첨가하여 1시간 교반하였다. 각 protein band는 SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate(Pierce)을 사용하여 enhanced chemiluminescence 방법으로 가시화하였다(24,25).

Caspase 활성측정

차가버섯을 처리하여 48시간동안 배양한 후 세포에 차가운 PBS를 첨가하여 세포를 긁어 세포를 수집하였다. Cell pellet에 차가운 cell lysis buffer(100 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 mM phenylsufonyl fluoride, 5 µg/mL aprotinin, 5 µg/mL pepstatin, 10 µg/mL leupeptin)을 첨가하여 섞은 후 냉동-해동을 3회 반복하여 세포를 lysis한 후 4°C에서 15,000 ×g으로 20분 원심 분리하여 상층액을 얻었다(24). Caspase 활성은 BD ApoAlert™ caspase assay kits(BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 제조회사에서 제시한 방법에 따라 측정하였다.

통계처리

모든 분석수치는 mean ± SEM으로 나타내었다. 수집된 결과는 SAS(Statistical Analysis System) PC 프로그램을 이용하여 통계 분석하였으며, 각 실험군들의 평균치간의 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 analysis of variance와 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

결 과

차가버섯 물추출물이 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향 차가버섯 물추출물이 인간의 대장에서 유래한 암세포인 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 세포 배양액에 0, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 추출물을 첨가하여 세포를 배양한 후 살아있는 세포수를 측정하였다. 차가버섯

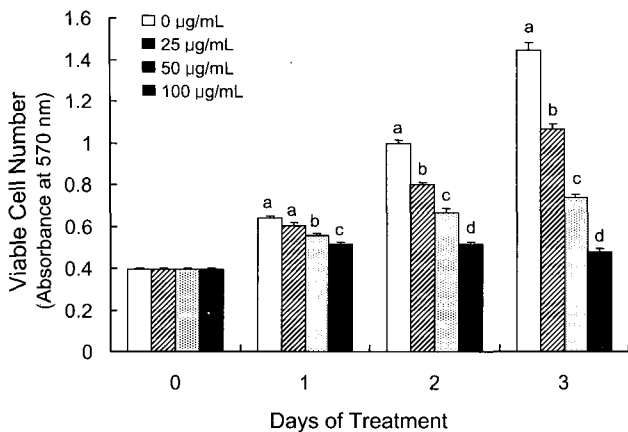


Fig. 1. Effect of the aqueous extract of *Inonotus obliquus* on HT-29 cell growth.

HT-29 cells were plated in 24-well plates at 50,000 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS. One day later, the monolayers were serum-starved with serum-free DMEM/F12 supplemented with 5 µg/mL transferrin, 0.1 mg/mL BSA, and 5 ng/mL selenium for 24 hours. After serum starvation, cells were incubated in serum-free medium in the absence or presence of various concentrations of *Inonotus obliquus* aqueous extract. Cell numbers were estimated by the MTT assay. Each bar represents the mean ± SEM (n=6). Bars with different letters are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test at each time point.

처리 농도가 증가할수록 유의적으로 살아있는 세포수가 감소하였다. 차가버섯에 의한 세포수 감소는 차가버섯 처리 후 24시간부터 나타났으며 시간이 경과함에 따라 세포수 감소 현상은 더욱 현저하게 나타나, 100 µg/mL 농도로 차가버섯을 처리하고 72시간이 지난 경우 차가버섯을 첨가하지 않은 대조군에 비해 67±3% 살아있는 세포수가 감소하였다 (Fig. 1).

차가버섯 추출물에 의해 HT-29 세포의 살아있는 세포수가 감소하였으므로, 차가버섯이 HT-29 세포의 cell proliferation에 미치는 영향을 조사하기 위해 BrdU incorporation assay를 실시하여 DNA 합성에 미치는 영향을 조사하였다. 차가버섯 추출물을 48시간 처리한 후 세포당 BrdU가 세포내로 삽입된 정도를 Fig. 2에 나타내었다. 차가버섯 추출물 처리에 의해 세포내로 삽입된 BrdU는 현저히 감소하였고, 처리 농도에 따라 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 2).

차가버섯 물추출물이 HT-29 세포의 apoptosis에 미치는 영향

암세포의 증식억제는 세포주기 진행의 지연 또는 apoptosis에 의해 이루어진다. 예비 실험을 통해 차가버섯 물추출물이 HT-29 세포의 세포주기 진행에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였으므로 본 연구에서는 차가버섯이 HT-29 세포의 apoptosis에 미치는 영향을 조사하였다. 차가버섯 추출물을 100 µg/mL 농도로 세포 배양액에 첨가하여 세포를 48시간 배양한 후 세포를 Hoechst H 33258로 염색하였다. Fig. 3A

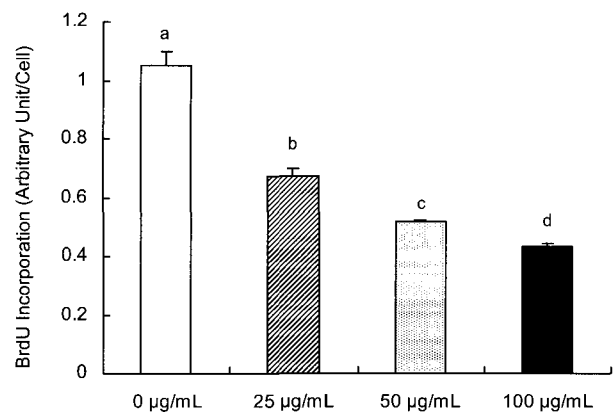


Fig. 2. Effect of the aqueous extract of *Inonotus obliquus* on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation in HT-29 cells.

HT-29 cells were plated and treated with *Inonotus obliquus* aqueous extract for 42 hours as described in Fig. 1. BrdU was added and the incubation was continued for another 6 hours to measure the incorporation into DNA. The incorporation of BrdU was normalized to the viable cell number determined by the MTT assay. Each bar represents the mean ± SEM (n=6). Values with different letters above each bar are significantly different (p<0.05) between concentrations of *Inonotus obliquus* aqueous extract.

에서 보는 바와 같이 차가버섯을 100 µg/mL 농도로 처리한 경우 처리하지 않은 군에 비해 뚜렷하게 apoptotic bodies를 관찰할 수 있었다. 차가버섯에 의해 사멸된 세포수를 정량하기 위해 세포를 Annexin V로 염색한 후 flow cytometry 실시하여 얻은 결과를 Fig. 3B에 나타내었다. 차가버섯 처리 농도가 증가할수록 살아있는 세포는 현저히 감소하였고, early apoptotic cell 수는 유의적으로 증가하였다. 100 µg/mL 농도로 차가버섯을 처리한 경우 차가버섯을 처리하지 않은 대조군에 비해 early apoptotic cell 수는 405±25% 증가하였다(Fig. 3).

차가버섯 물추출물이 Bcl-2와 Bax 단백질발현에 미치는 영향

Bcl-2 family 단백질은 미토콘드리아의 투과성과 cytochrome c의 방출을 제어하여 apoptosis를 조절한다. 차가버섯이 Bcl-2 family 단백질 중 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2와 pro-apoptotic 단백질인 Bax의 단백질 수준에 미치는 영향을 조사하기 위해 차가버섯을 처리하여 얻은 cell lysate로 Western blot을 실시하였다. HT-29 세포에서 분자량 26 kDa인 Bcl-2와 23 kDa인 Bax 단백질을 검출하였다. 그러나 Bcl-2와 Bax 단백질 수준은 차가버섯 처리에 의해 변화하지 않았다(Fig. 4).

차가버섯 추출물이 caspase 활성화에 미치는 영향

Apoptosis를 조절하는 중요 인자인 caspase는 불활성형인 full-length form으로 존재하며, proapoptotic 신호에 의해 분해가 일어나 활성화된다. 따라서 차가버섯 추출물이 caspase의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 cleaved

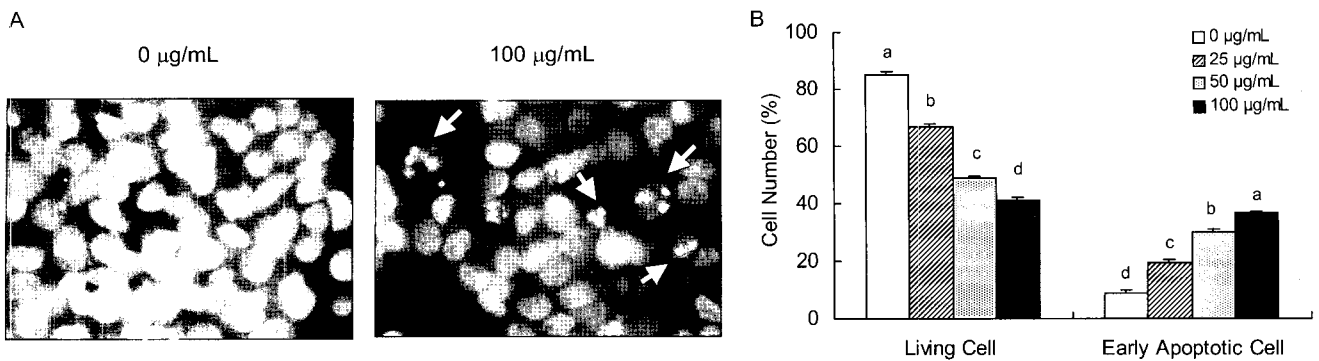


Fig. 3. Effect of the aqueous extract of *Inonotus obliquus* on apoptosis of HT-29 cells.

HT-29 cells were cultured and treated with *Inonotus obliquus* aqueous extract for 2 days as described in Fig. 1. (A) Hoechst H 33258 stain. Cells were stained with Hoechst H 33258 and images were obtained using a fluorescence microscope. Microphotographs are representative of three independent experiments. Magnification, $\times 200$. (B) Fluorescence-activated cell sorting. Cells were trypsinized, stained with 7-amino-actinomycin D and Annexin V, and then analyzed by flow cytometry. The number of living cells and early apoptotic cells is expressed as a percentage of total cell number. Each bar represents the mean \pm SEM ($n=6$). Comparisons between groups that yielded significant differences ($p<0.05$) are indicated by different letters above each bar.

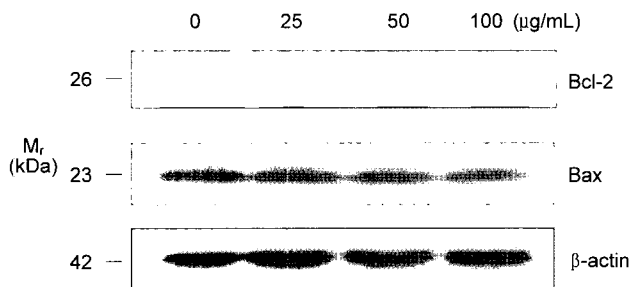


Fig. 4. Effect of the aqueous extract of *Inonotus obliquus* on the protein levels of Bcl-2, and Bax in HT-29 cells.

Cells were cultured and treated with *Inonotus obliquus* aqueous extract for 2 days as described in Fig. 1. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an antibody against Bcl-2, Bax, or β -actin. A photograph of chemiluminescent detection of a blot, which is representative of 3 independent experiments, is shown.

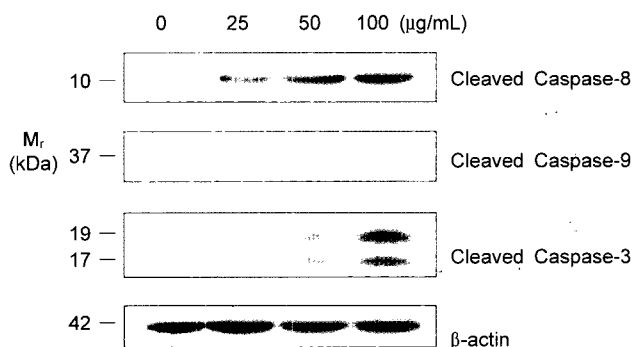


Fig. 5. Effect of the aqueous extract of *Inonotus obliquus* on the protein levels of various caspases in HT-29 cells.

Cells were cultured and treated with *Inonotus obliquus* aqueous extract for 2 days as described in Fig. 1. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an antibody against cleaved caspase-3, cleaved caspase-8, cleaved caspase-9, or β -actin. A photograph of chemiluminescent detection of a blot, which is representative of 3 independent experiments, is shown.

caspase의 단백질 수준을 Western blot을 실시하여 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 분자량 10 kDa인 cleaved caspase-8, 분자량 37 kDa인 cleaved caspase-9, 분자량 19/17 kDa인 cleaved caspase-3은 검출되었으나, cleaved caspase-7은 검출되지 않았다. Initiator caspase인 caspase-8과 caspase-9의 cleaved form 단백질 수준은 차가버섯 추출물 처리에 의해 증가하였다. Cleaved caspase-8의 단백질 수준은 차가버섯 처리 농도에 의존적으로 현저히 증가한 반면 cleaved caspase-9은 차가버섯을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리한 경우에만 나타났다. 주요한 effector caspase인 caspase-3의 cleaved form 단백질 수준은 차가버섯 추출물 처리에 의해 현저히 증가하였다(Fig. 5).

차가버섯에 의해 cleaved caspase-8, cleaved caspase-9, cleaved caspase-3의 단백질 수준이 증가하였으므로 각 caspase의 효소활성을 정량하였다. 차가버섯 처리농도가 증가할수록 caspase-8, caspase-9, caspase-3의 활성은 농도에 의존하여 유의적으로 증가하였다. 차가버섯을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 첨가한 경우 차가버섯을 첨가하지 않은 대조군에 비해 caspase-8은 $655 \pm 4\%$, caspase-9은 $214 \pm 9\%$, caspase-3은 $471 \pm 23\%$ 활성이 증가하였다(Fig. 6).

차가버섯 물추출물이 cleaved poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) 단백질 수준에 미치는 영향

Effector caspase인 caspase-3는 PARP 등 세포의 여러 단백질의 cleavage를 유도하여 apoptosis를 집행한다. 차가버섯이 caspase-3의 활성을 증가시켰으므로 차가버섯이 PARP의 단백질 cleavage에도 영향을 미칠 것으로 생각되어 차가버섯이 cleaved PARP 단백질 수준에 미치는 영향을 조사하였다. 차가버섯을 세포배양액에 첨가하지 않은 경우 분자량 89 kDa인 cleaved PARP는 검출되지 않았다. 차가버섯을 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가한 경우 cleaved PARP band가 나타났

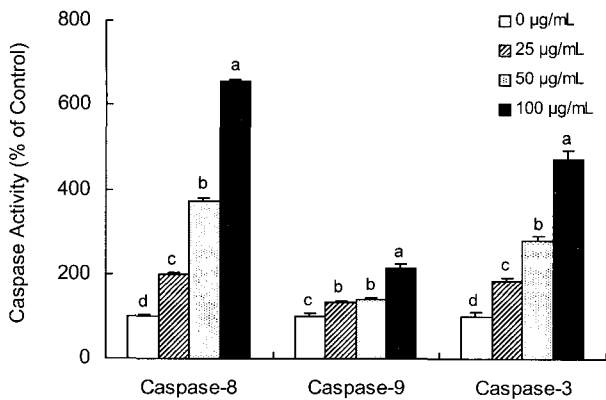


Fig. 6. Effect of the aqueous extract of *Inonotus obliquus* on caspases activity in HT-29 cells.

Cells were plated and treated with *Inonotus obliquus* aqueous extract for 2 days as described in Fig. 1. Cytosolic extracts were prepared from cells, and caspase-3, -8, or -9 activity was determined by measuring the cleavage of the substrate Ac-DEVD-7-amino-4-methoxy coumarin (AMC), Ac-IETD-AMC, or Ac-LEHD-AMC. Each bar represents the mean \pm SEM (n=4). Values with different letters above each bar are significantly different ($p < 0.05$) between concentrations of *Inonotus obliquus* aqueous extract.

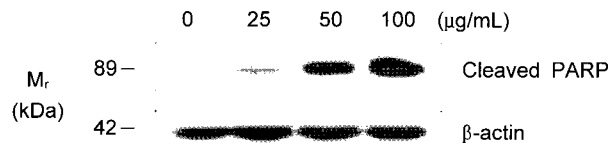


Fig. 7. Effect of the aqueous extract of *Inonotus obliquus* on the protein levels of cleaved PARP in HT-29 cells.

Cells were cultured and treated with *Inonotus obliquus* aqueous extract for 2 days as described in Fig. 1. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with an anti-cleaved PARP or β -actin antibody. A photograph of chemiluminescent detection of a blot, which is representative of 3 independent experiments, is shown.

으며, 차가버섯 첨가농도가 증가할수록 cleaved PARP 단백질 수준은 현저히 증가하였다(Fig. 7).

고 찰

담자균류에 속하는 균식물인 버섯은 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 알려짐에 따라 다각적으로 연구가 진행되고 있다. 특히 Ikekawa 등(26)에 의해 다양한 식용 버섯 물추출물에서 유래한 β -D-glucan이 복수암세포인 sarcoma 180 세포에 대한 강한 항종양활성이 보고된 후 버섯의 항암활성에 대한 연구가 활발히 이루어져 그 연구결과로 표고버섯으로부터 렌티난(lentinan), 구름버섯으로부터 크레스틴(PS-K), 치마버섯으로부터 소니펄란(SPG) 등의 항암제를 개발하였다(27). 항암활성을 가진 버섯유래 다당류는 버섯의 종류에 따라 구조 및 분자량이 다양하고 서로 다른 생리활성을 나타내므로(28), 버섯의 종류에 따라 항암

효과와 항암기전은 다양할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 러시아 등에서 소화기계 암의 예방 및 치료 효과가 있는 것으로 알려진 차가버섯이 인간의 대장에서 유래한 암세포인 HT-29 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 차가버섯 물추출물은 대장 암세포의 증식을 현저히 억제하였고(Fig. 1), DNA 합성을 농도에 의존적으로 감소시켰다(Fig. 2). Burczyk 등(8)과 Rzymowska(9)는 차가버섯 물추출물이 자궁경부암세포인 Hela S3 세포의 증식을 억제함을 보고하였고, Hwang 등(10)도 차가버섯 물추출물이 위암세포인 SNU484 세포의 증식을 억제함을 보고하였다. 차가버섯 물추출물을 분획 후 암세포의 증식에 미치는 영향을 조사한 연구에서 물추출물의 ethylacetate 분획이 유방암세포인 MCF-7 세포, 위암세포인 AGS 세포, 폐암세포인 A549 세포의 증식을 현저히 억제하였다(7). 이상의 결과들은 차가버섯 물추출물이 강력한 암세포증식 억제효과를 나타냄을 제시한다.

암세포의 apoptosis를 유도하는 것은 항암활성을 가진 물질들의 중요한 특징이고(29), 현재 이용되고 있는 대부분의 항암제는 암세포의 apoptosis를 유도함으로써 그 효과를 나타내고 있다(30). 그러므로 암세포의 apoptosis 유도는 암치료 및 암예방의 주요한 기전으로 간주할 수 있다. 본 연구에서 대장 암세포의 증식을 현저히 억제한 차가버섯 물추출물이 HT-29 세포의 apoptosis를 유도하였으며(Fig. 3A), 차가버섯 처리농도가 증가할수록 암세포의 apoptosis는 증가하였다(Fig. 3B). 이는 apoptosis가 차가버섯에 의한 암세포 증식억제 작용의 주요한 기전임을 나타내며, 차가버섯이 암치료 및 암예방제로의 개발 가능성을 제시한다.

Apoptosis는 여러 종류의 단백질이 관여하는 다양한 경로를 통해 조절된다. Bcl-2 family 단백질은 apoptosis를 조절하는 대표적인 단백질이다. Bcl-2 family 단백질은 anti-apoptotic 단백질과 pro-apoptotic 단백질로 구성되어 있으며, 미토콘드리아 막의 투과성과 cytochrome c의 방출을 조절함으로써 apoptosis를 조절한다(13). Pro-apoptotic 단백질인 Bax는 미토콘드리아 막의 투과성을 증가시키고, cytochrome c의 방출을 증가시켜 apoptosis를 유도한다. 반면 anti-apoptotic 단백질인 Bcl-2는 Bax와 결합하여 heterodimer를 형성하여 Bax의 활성을 억제하여 apoptosis를 막는다(31). 본 연구에서 차가버섯 물추출물은 Bax와 Bcl-2의 단백질 수준에 영향을 미치지 않았다(Fig. 4). 이는 차가버섯 물추출물에 의해 유도된 apoptosis는 Bax와 Bcl-2 단백질의 변화에 의한 것이 아닌 다른 경로에 의한 것임을 제시한다.

Cysteine acid proteases인 caspase는 apoptosis의 중요한 조절인자로 작용하며(14), 항암제에 의해 유도된 apoptosis에서도 중요한 조절인자로 작용한다(11,32,33). 암세포의 apoptosis를 유도한 천연물은 caspase의 활성을 증가시키며 보고되었으며(34,35), Kim 등(24)은 HT-29 세포에서 apoptosis를 유도한 복분자 물추출물에 의해 caspase-3의 활성

이 증가되었음을 보고하였다. Caspase는 여러 종류가 존재하며 서로 상호작용을 하여 활성을 조절한다. Death-inducing signal에 의해 활성화되어 하위의 effector caspase를 활성화하는 initiator caspase에는 caspase-8와 caspase-9가 있으며, 두 caspase는 서로 다른 경로에 의해 활성화된다(14,32). Caspase-8은 cell death ligands가 cell death receptor에 결합하면 활성화되어 effector caspase를 활성화한다(36,37). DNA damage가 초래되면 Bcl-2 family 단백질이 변화하여 미토콘드리아 막의 투과성이 증가되어 미토콘드리아 내에 존재하던 cytochrome c가 세포질로 방출된다. 세포질로 방출된 cytochrome c는 Apaf-1과 결합하여 caspase-9를 활성화하고 활성화된 caspase-9는 하위의 effector caspase를 활성화한다(38). 본 연구에서 차가버섯 물추출물을 처리한 경우 활성형인 cleaved caspase-8과 cleaved caspase-9 단백질 수준(Fig. 5)과 Caspase-8과 caspase-9 효소 활성은 증가하였다(Fig. 6). 차가버섯 물추출물 처리에 의한 caspase-8과 caspase-9 단백질 수준과 효소활성 증가폭은 차이를 나타내어 cleaved caspase-8의 단백질 수준은 처리 농도에 의존하여 현저하게 증가하였고 caspase-8 효소활성은 차가버섯을 100 µg/mL 농도로 처리한 경우 처리하지 않은 군에 비해 6.5배 증가하였다. 반면 cleaved caspase-9 단백질 수준은 100 µg/mL의 농도로 처리한 경우에만 소폭 증가하였고 caspase-9 효소활성도 소폭 증가하였다. 이 결과에 의하면 차가버섯 물추출물은 주로 cell-death receptor를 통해 caspase-8을 활성화하여 HT-29 세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

Effector caspase인 caspase-3은 initiator caspase인 caspase-8 또는 caspase-9에 의해 활성화되며, 활성화된 caspase-3은 apoptosis의 형태학적 특징에 관여하는 lamin A, α -fodrin, DNA fragmentation factor(DFF), PARP 등의 단백질을 분해하여 apoptosis를 유도한다(39). 본 연구에서 cleaved caspase-3의 단백질 수준과 caspase-3 활성은 차가버섯 물추출물에 의해 증가하였고(Fig. 5, 6) 또한 cleaved PARP 단백질 수준도 차가버섯 물추출물 처리농도에 의존하여 증가하였다(Fig. 7).

본 연구의 결과는 차가버섯 물추출물이 대장암세포인 HT-29 세포의 apoptosis를 유발하여 암세포의 증식을 억제하며, 차가버섯 물추출물에 의해 caspase-8 경로의 활성증가에 의해 이루어짐을 제시한다. 본 연구결과는 차가버섯을 대장암의 예방이나 치료를 위한 기능성 식품개발에 적용할 수 있는 가능성을 제시한다.

요 약

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 한랭한 삼림지대에서 자라는 자작나무에 자생하는 버섯으로, 항종양 및 항돌연변이 활성이 있는 것으로 보고되고 있으나, 차가버섯의 항암기전

에 대해 밝혀진 바가 없어, 본 연구에서는 인체의 대장암에서 유래한 HT-29 세포를 사용하여 차가버섯 물추출물의 대장암세포 증식 억제기전을 밝히고자 하였다. 차가버섯을 열수추출하여 냉동 건조하여 얻은 물추출물을 HT-29 세포 배양액에 여러 농도(0~100 µg/mL)로 첨가하여 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 세포의 증식은 차가버섯 추출물 농도가 증가할수록 현저히 감소하였다. 차가버섯 물추출물 처리 농도에 비례하여 세포의 DNA 합성은 감소하였고, apoptotic cell의 수는 현저히 증가하였다. Apoptosis의 주요한 조절인자인 Bcl-2 family 단백질 수준은 차가버섯에 의해 변화하지 않았으나, cleaved caspase-8, -9, -3의 단백질 수준은 차가버섯에 의해 증가하였다. Caspase-8, -9, -3의 활성도 모두 차가버섯에 의해 유의적으로 증가하였다. Caspase-3의 표적 단백질로 세포의 생존에 결정적인 역할을 하는 PARP 단백질의 분해도 차가버섯에 의해 현저히 증가하였다. 이 결과로부터 차가버섯 물추출물이 DNA 합성을 억제하고 apoptosis를 유도하여 대장암 세포의 증식을 억제하고, caspase 경로의 활성을 증가하므로써 apoptosis를 유도한다는 결론을 내릴 수 있다. 또한 이 결과는 차가버섯 물추출물을 대장암의 예방이나 치료에 사용할 수 있는 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구논문은 2005년도 한국산업기술평가원 지역협력연구센터사업(한림대학교 실버생물산업기술연구센터 R12-2001-047-00003-0)과 과학기술부 한국과학재단 바이오식품소재기반기술개발사업(M1051014000105N101400111)의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Wasser SP, Weis AL. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol* 19: 65-96.
2. Bulatov PK, Berezina MP, Jakimov PA. 1959. *Tsaga ii ee letseboje primenie pri rake IV*. Stadii, Leningrad. p 326.
3. Shivrina AN. 1967. Chemical characteristic of compounds extracted from *Inonotus obliquus*. *Chem Abstr* 66: 17271-17279.
4. Kahlos K, Kangas L, Hitunen R. 1987. Antitumor activity of some compounds and fractions from an n-butane extract of *Inonotus obliquus*. *Acta Pharm Fenn* 96: 33-40.
5. Mizuno T, Zhuang C, Abe K, Okamoto H, Kiho T, Ukai S, Leclerc S, Meijer L. 1999. Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the Sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. (Aphylllophoromycetidae). *Int J Med Mushrooms* 1: 301-316.
6. Ham SS, Oh SW, Kim YK, Shin KS, Chang HY, Chung GH. 2003. Antioxidant and genotoxic inhibition activity of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1071-1075.
7. Ham SS, Oh SW, Kim YK, Shin KS, Chang HY, Chung GH. 2003. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol

- extract from the *Inonotus obliquus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1088-1094.
8. Burczyk J, Gawron A, Slotwinska M, Smietana B, Terminska K. 1996. Antimitotic activity of aqueous extracts of *Inonotus obliquus*. *Boll Chim Farm* 135: 306-309.
 9. Rzymowska J. 1998. The effect of aqueous extracts from *Inonotus obliquus* on the mitotic index and enzyme activities. *Boll Chim Farm* 137: 13-15.
 10. Hwang YJ, Noh GW, Kim SH. 2003. Effect of *Inonotus obliquus* extracts on proliferation and caspase-3 activity in human gastro-intestinal cancer cell lines. *Korean J Nutr* 36: 18-23.
 11. Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-777.
 12. Reed JC. 1998. Dysregulation of apoptosis in cancer. *Cancer J Sci Am* 4 (Suppl): S8-S14.
 13. Korsmeyer SJ. 1995. Regulators of cell death. *Trends Genet* 11: 101-105.
 14. Debatin KM. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53: 153-159.
 15. Palombo JD, Ganguly A, Bistrrian BR, Menard MP. 2002. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett* 177: 163-172.
 16. Arends MJ, Wylie AH. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32: 223-254.
 17. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH. 1997. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharmacol* 41: 461-499.
 18. Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89: 271-277.
 19. Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S. 1985. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods* 82: 169-179.
 20. Heil J, Reifferscheid G. 1992. Detection of mammalian carcinogens with an immunological DNA synthesis-inhibition test. *Carcinogenesis* 13: 2389-2394.
 21. Latt SA, Stetten G. 1976. Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J Histochem Cytochem* 24: 24-33.
 22. Vermees I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51.
 23. Kim EJ, Houlthuisen PE, Park HS, Ha YL, Jung KC, Park JHY. 2002. *Trans*-10,*cis*-12-conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 colon cancer cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G357-G367.
 24. Kim EJ, Lee YJ, Shin HK, Park JHY. 2005. Induction of apoptosis by the aqueous extract of *Rubus coreanum* in HT-29 human colon cancer cells. *Nutrition* 21: 1141-1148.
 25. Jung JI, Lim SS, Choi HJ, Cho HJ, Shin HK, Kim EJ, Chung WY, Park KK, Park JHY. 2006. Iosiquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells. *J Nutr Biochem* in press.
 26. Ikekawa T, Uehara N, Maeda Y, Nakanishi M, Fukuoka F. 1969. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Res* 29: 734-735.
 27. Mizuno T. 1999. The extraction and development of anti-tumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *Int J Med Mushrooms* 1: 9-29.
 28. Wasser SP. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 258-274.
 29. Frankfurt OS, Krishan A. 2003. Apoptosis-based drug screening and detection of selective toxicity to cancer cells. *Anticancer Drugs* 14: 555-561.
 30. Lowe SW, Lin AW. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21: 485-495.
 31. Farrow SN, Brown R. 1996. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev* 6: 45-49.
 32. Thornberry N, Lazebnik Y. 1998. Caspase: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
 33. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 1999. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6: 1067-1074.
 34. Ye M, Liu JK, Lu ZX, Zhao Y, Liu SF, Li LL, Tan M, Weng XX, Li W, Cao Y. 2005. Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom *Albatrellus confluens*, inhibits tumor cell growth by inducing apoptosis in vitro. *FEBS Lett* 579: 3437-3443.
 35. Jo EH, Kim SH, Ra JC, Kim SR, Cho SD, Jung JW, Yang SR, Park JS, Hwang JW, Aruoma OI, Kim TY, Lee YS, Kang KS, Kang KS. 2005. Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett* 230: 239-247.
 36. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 269-290.
 37. Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptor: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
 38. Nijhawan LP, Budihardjo D, Srinivasula I, Ahmad SM, Alnemri M, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
 39. Baker SJ, Reddy EP. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17: 3261-3270.

(2006년 3월 7일 접수; 2006년 4월 10일 채택)