

The Cytotoxic Effect of Chaga Mushroom (*Inonotus Obliquus*) Water Extract on HepG2 Hepatoma Cells

Jin-Kyung Kim[†] and Heun-Ok Yang

Department of Cosmetics, Wonkwang Health Science University, Iksan, Jeonbuk 570-750, Korea

Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract has been known to have therapeutic effects, such as anti-inflammatory, hepato-protective, anti-oxidant and anti-tumor effect. In this study, we evaluated the effects of Chaga extract on the cytotoxic actions of cisplatin in HepG2 hepatoma cells. The viability of the HepG2 cells was decreased to 10% at 3 μ M cisplatin and to 20% at 500 μ g/ml Chaga extract as measured by the MTT assay. The viability of HepG2 cells co-treated with cisplatin (3 μ M) and Chaga extract (500 μ g/ml) was decreased to 50% in compared with the control cells. The cytotoxicity of two drugs was revealed as apoptosis characterized by the chromatic condensation, nuclear fragmentation and the cleavage of pro caspase-3 in HepG2 cells. Also, the cells treated with combination of two drugs showed synergistically the loss of mitochondrial membrane potential and increase of intracellular ROS levels. Therefore, these results suggest that the combination treatment of cisplatin and Chaga extract induces apoptotic cell death in HepG2 cells and has more potential anti-tumor effect than cisplatin alone.

Key Words: Chaga, Cisplatin, Apoptosis, HepG2, *Inonotus obliquus*

서 론

최근 항암요법은 수술요법, 방사선요법과 더불어 항암 화학요법이 널리 이용되고 있으며, 화학요법 치료는 정상 세포에 독성을 나타내지 않으면서 암세포만을 선택적으로 사멸하거나, 항암제 내성 증가로 인한 암세포 사멸 효과의 저하를 극복하는 방법으로 접근하고 있다 (Maeda et al., 2004; Monica et al., 2005). 그러나 임상적으로 암세포의 선택적 사멸은 극히 제한적이며, 정상적인 세포에 독성을 나타낸다 (Cersosimo, 1993). 따라서 항암제의 독성을 최소화하면서 암세포의 사멸을 유도하거나, 단일 항암제의 내성획득으로 인한 항암치료의 한계를 극복하고자 다양한 시도가 이루어지고 있는데, 특히 두 종류의 화학요법을 저용량으로 병합치료하거나, 저용량 화학요법과 보조요법을 병행하는 방법으로 암세포 사멸의 효과를 향상시키는 연구들이 보고되고 있다 (Fujita et al., 1999;

Baumgartner et al., 2004; Rave-Frank et al., 2007).

Cisplatin (CDDP, cis-diamminedichloroplatinum)은 백금원자를 함유하는 무기 착화합물로서, 난소암을 비롯한 자궁경부암, 대장암, 폐암, 고환암, 전립선암, 방광암, 위암 등에 대한 주된 항암화학요법제로 사용되고 있다 (Ravi and Somani, 1995; Jordan and Carmo-Fonseca, 2000). Cisplatin의 항암작용기전은 암세포의 DNA에 비가역적으로 반응하여 Guanin residue 사이에 intra, inter-strand crosslink를 형성함으로써 DNA 합성을 억제한다. 따라서 Cisplatin은 세포사멸을 유도하거나, calcium transduction channel을 방해하여 세포에 손상을 주거나, 세포 내 과도한 활성산소를 형성하여 세포에 손상을 주는 것으로 알려져 있다. 이러한 cisplatin의 항암화학요법은 환자의 신장이나 간장, 골수세포와 청각세포 등에 독성을 나타내어 항암화학요법의 장애로 대두되고 있다 (Cepeda et al., 2007; Lee et al., 2011). 그러나 아직까지 cisplatin의 세포독성을 줄이면서 항암작용을 증가시킬 수 있는 방법의 개발은 충분하지 않다.

천연물의 항암작용에 대한 관심이 증대되면서 천연물로부터 항암효능을 갖는 물질의 개발이 국내외에서 활발하게 진행되고 있는데, 최근 버섯의 일종인 차가버섯 (*Inonotus obliquus*)이 암의 발생 예방과 치료에 효과가 있

* 접수일: 2010년 8월 18일 / 수정일: 2010년 9월 21일
채택일: 2010년 9월 24일

[†] 교신저자: 김진경, (우) 570-750 전북 익산시 신용동 344-2,
원광보건대학교 미용피부관리과
Tel: 063-840-1436, Fax: 063-840-1439
e-mail: kommando@hanmail.net

다는 논문이 보고되고 있다 (Hwang et al., 2003; Youn et al., 2008; Park et al., 2007). 차가버섯은 북위 45° 이상에서 자생하는 자작나무에 기생하여 자라는 버섯의 일종으로서, 러시아나 시베리아에서 소화기 질환이나 암 치료에 사용되어온 민간약재이다 (Burczyk et al., 2006; Campbell et al., 1938). 특히, 면역조절효과, 간보호 효과, 항산화효과 및 항암효과 등 다양한 약리작용을 나타내는 생리활성성분을 다량 함유하고 있는 것으로 알려져 있어서, 차가버섯의 다양한 추출방법의 개발 뿐만 아니라 성분에 대한 효능연구가 활발하게 이루어지고 있다 (Kim et al., 2005; Cui et al., 2005). 차가의 항암효과에 대한 연구는 항암작용기전에 대한 연구가 몇 편 보고된 게 있는데, 아직까지 차가에 대한 정확한 암세포 사멸 기전이나 다양한 암세포에서의 항암효과는 많은 연구가 필요한 실정이다 (Rzymowska, 1998). 간암세포의 경우 화학요법 저항성을 가지고 있어서 효율적인 항암치료가 어렵고, 아직 차가에 의한 항암효과는 보고가 미약하다. 본 논문에서는 차가에 의한 항암효과 및 항암작용기전을 알아보기 위하여, 사람의 간암세포주에서 광범위 항암화학요법제인 cisplatin과 천연물인 차가를 저농도로 병행투여 하였을 때, 효과적으로 암세포 사멸을 유도할 수 있는지를 조사하였다.

재료 및 방법

세포주

간암세포주인 HepG2 세포 (KCLB, 88065)는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였다.

시료

차가버섯은 러시아로부터 구입하였다. 차가버섯 물 추출물은 차가버섯 (100 g)을 분쇄하여 증류수 2,200 ml에 녹인 후 100°C에서 2~3시간 끓이고, 필터페이퍼 (grade 1, Watmmanin Ltd., Banbury, UK)에 거른 후 냉동 건조하여 분말형태로 만들었다. 분말은 증류수에 50 mg/ml의 농도로 녹이고 -20°C에 보관하였으며, 실험조건에 따라 배지에 희석하여 사용하였다

시약 및 기기

실험에 필요한 minimum essence medium (MEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)는 GIBCO BRL사 (Grand Island, NY)에서 구입하였으며 배양용기

(24-well plate, 10 cm dish)는 Falcon사 (Becton Dickinson, San Jose, CA)에서 구입하여 사용하였다. Methylthiozyl-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide (MTT), propidium iodide (PI)와 Hoechst 33342와 cis-diamminedichloroplatinum (cisplatin)은 Sigma사 (St. Louis, Missouri)로부터 구입하여 사용하였다. procaspase-3, Bak and β -actin 등에 대한 항체들은 모두 Santa Cruz사 (San Diego, CA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit (ECL kit)는 Amersham사 (Buckinghamshire, England)에서 각각 구입하여 사용하였다.

세포생존율 측정

세포생존율은 세포 배양판 (24-well plate)에 세포 (1×10^5 cells/ml)를 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, 배양액 최종 부피의 1/10 MTT 용액 (5 mg/ml in PBS)을 첨가하여 4시간 반응하였다. 생존세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 10% sodium-dodesyl sulfate (SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 100 μ l/well을 세포에 첨가하여 용해시킨 다음 분광광도계 (ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하고, 대조군과 비교하여 세포생존율을 백분율 (%)로 표시하였다.

DAPI 염색

차가와 cisplatin을 처리한 세포를 PBS로 2회 세척 후, 4% formaldehyde 용액에 실온에서 10분간 고정시킨다. PBS로 세척해 내고, 10 μ M Hoechst 33342 용액으로 실온에서 20분간 염색한 후 다시 PBS로 세척한다. 염색된 세포는 형광현미경 (Leica MPS60, Germany)으로 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

H₂O₂ 생성의 측정

차가에 의한 세포 내 활성화 산소의 생성 변화를 측정하기 위하여 형광 probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma)를 이용하였다. 비형광물질인 DCF-DA는 세포 내 hydrogen peroxide와 관련된 peroxides 존재 시 형광의 DCF로 변환되어 녹색의 형광을 발한다. HepG2 세포에 차가를 처리한 후 세포를 수확하기 전에 5 μ M DCF-DA를 처리하여 37°C에서 30분 배양하였다. 배양한 세포는 PBS (pH 7.4)로 세척하여 1% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고, 다시 PBS로 세척하여 Flow

cytometry (FACS, Calibur, BD, Biosciences)로 형광을 측정하였고, Cell Quest software (Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.

미토콘드리아 막전위 측정

미토콘드리아 막전위의 변화를 측정하기 위하여, 차가 처리된 세포들은 PBS로 2회 세척하고 Rhodamine 123으로 20분간 37°C 염색되었다. 세포들은 포집되고, PBS로 세척 후, 500 µl FACS buffer로 행군 후, 유세포분석기로 형광을 측정하였다.

Western blot 분석

전구지방세포는 MDI와 히비스커스를 동시 처리 후 포집하여, 차가운 Hank's balanced salt solution (HBSS, pH 7.4)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액 (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)과 4°C에서 30분간 반응하였다. 세포 파쇄액은 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여, 상층액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포 파쇄액 (단백질: 200 µg)은 2× sample buffer와 혼합하여 100°C에서 5분 가열한 후에 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8 mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane 상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응하여 비특이적 항체결합을 예방하였다. Procaspase-3, Bak, β-actin에 대한 항체는

0.01% (v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1,000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후, 이차항체 (anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase)와 1시간 반응하였다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

결과 산출 방법

표시된 결과는 4번 이상의 독립적인 실험 결과이며, 이들의 평균 (mean)과 표준편차 (standard deviation, S.D.)를 산출하여 결과를 표시하였다. 통계처리는 paired student's *t*-test 검정을 통하여 수행하였으며, *P* 값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

차가추출물과 cisplatin의 병합 처리가 간암세포주인 HepG2의 세포주의 세포생존율에 미치는 영향

간암세포주인 HepG2 세포에 차가추출물과 cisplatin을 병합 처리하여, 세포주에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험에서 일차적으로, 차가와 cisplatin 단독 처리에 의한 HepG2 세포독성을 조사하였다. HepG2 세포에 차가 (250~ 1,000 µg/ml)와 cisplatin (0.5~30 µM)을 다양한 농도로 각각 48시간 처리 한 후 세포생존율을 MTT assay로 측정하였는데, 데이터로 보여지진 않았지만, 차가의 경우 500 µg/ml의 농도부터 HepG2 세포주에 유의한 세포독성을 초래하였고, cisplatin의 경우 5 µM의 농도부터 HepG2 세포주에 유의하게 세포생존율을 억제하였다. 대조군과

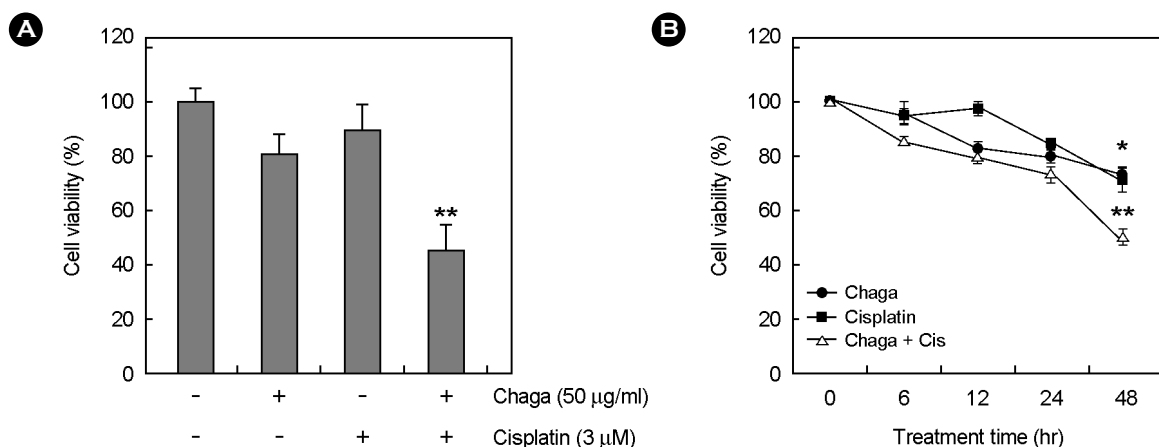


Fig. 1. The effect of cisplatin and Chaga extract on the proliferation of HepG2 cells. Cells were treated with the combination of cisplatin (3 µM) and Chaga extract (500 µg/ml), or respectively for 48 hr (A) or for the indicated time (B). Then, cell viability was determined by MTT assay. *, *P*<0.01 and **, *P*<0.05 by student *t*-test, significantly different from only control cells.

비교하였을 때, 20% 정도 세포생존을 감소를 보이는 차가 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도와 10% 정도 세포생존을 감소를 보이는 cisplatin 3 μM 농도가 HepG2 세포주에 병합 처리 농도로 채택되었고, HepG2 세포주에 48시간 동안 차가 500 $\mu\text{g/ml}$ 와 cisplatin 3 μM 이 병합 처리된 결과, 대조군과 비교하여 50% 이상 세포생존을 감소를 보여, 병합 처리에 의한 세포사멸효과의 상승을 확인할 수 있었다 (Fig. 1A and B).

차가추출물과 cisplatin의 병합 처리 시 HepG2 세포주의 세포사멸 성격규명

차가와 cisplatin의 병합 처리 시 세포고사 현상의 형태학적 특징인 핵 분절을 관찰하기 위하여 HepG2 세포의 핵을 Hoechst로 염색하여 현미경으로 확인하였다. HepG2

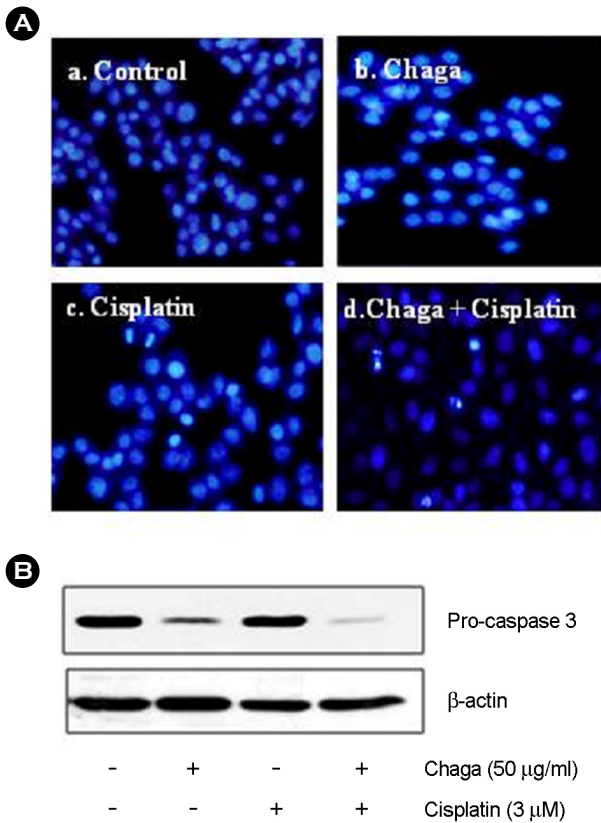


Fig. 2. The changes of apoptotic hallmarks by cisplatin and Chaga extract on HepG2 cells. (A) Cells were treated with cisplatin and Chaga extract, stained with Hoechst 33342. The nuclei of cells were observed under the fluorescent microscope. (B) Cells were treated with the combination of cisplatin and Chaga extract, were incubated for 48 hr. The equal amount of protein from the cell lysate was subjected on 12.5% SDS-PAGE, transferred on PVDF membranes, and immunoblotted with anti-procaspase 3 and anti β -actin antibodies respectively. The immuno-reactive signals were visualized by ECL kit.

세포주에 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 차가와 3 μM 의 cisplatin의 농도를 각각 48시간 처리하였을 때, 대조군과 유사하게 핵 분절이 나타나지 않았으나 (Fig. 2A), 차가와 cisplatin을 48시간 동안 병용 처리한 군에서는 세포고사의 형태학적 특징인 핵 분절이 명확하게 나타남을 확인하였다 (Fig. 2A). 또한, 차가와 cisplatin의 병합 처리가 세포고

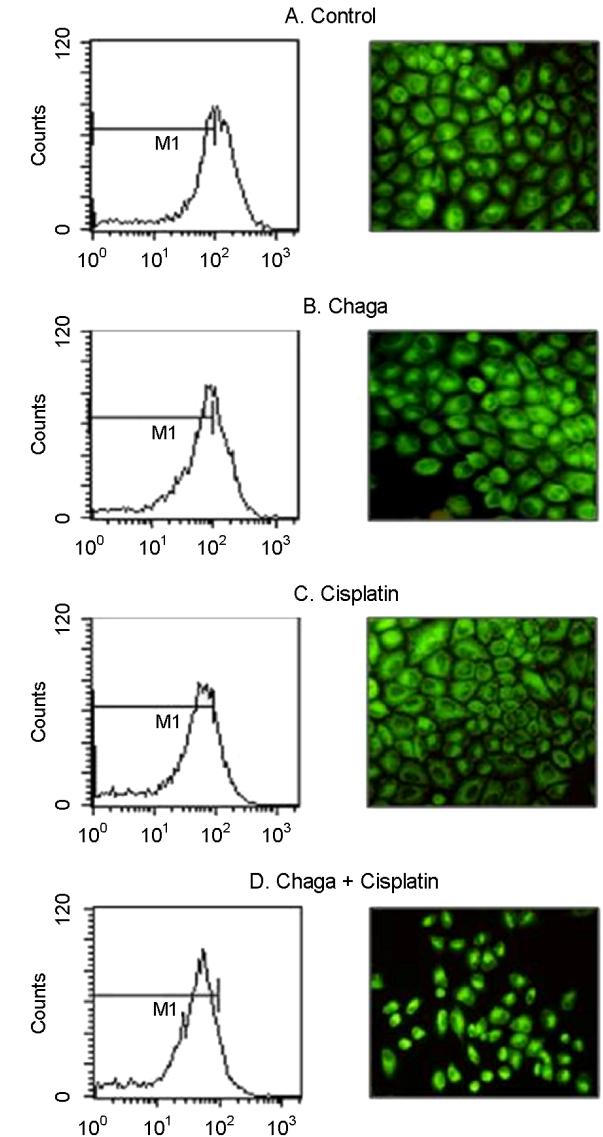


Fig. 3. The change of the mitochondrial membrane potential transition by the combined treatment of cisplatin and Chaga extract in HepG2 cells. Cells were treated without (A) or with cisplatin (3 μM) (B), Chaga extract (500 $\mu\text{g/ml}$) (C) or cisplatin (3 μM) and Chaga extract (500 $\mu\text{g/ml}$) (D) for 48 hr. Then, cells were incubated with 50 nM Rhodamine 123 for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ and used to analyze MMPT with flow cytometry. The horizontal axis reveals the relative fluorescence intensity and the vertical axis shows the relative cell number. Also, the total shape of cells were observed under the fluorescent microscope.

사 유도기전의 주 매개역할을 하는 caspase-3의 protease 활성에 미치는 영향을 Western 방법을 통해 확인하였다. HepG2 세포주에 500 µg/ml 농도의 차가와 3 µM의 cisplatin의 농도를 각각 48시간 처리하였을 때, 차가 처리군의 경우 현저하게 protease의 활성으로 인한 pro-caspase-3의 분절이 확인되었고, cisplatin 처리군의 경우 대조군에 비해 미약한 분절이 확인되었으나 (Fig. 2B), 차가와 cisplatin을 48시간 동안 병용 처리한 군은 pro-caspase-3의 분절이 완전히 이루어져 protein 양이 거의 사라진 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 차가와 cisplatin의 병용 처리는 HepG2 세포주를 세포고사에 의한 세포죽음으로 유도했음을 확인할 수 있었다.

차가추출물과 cisplatin의 병합 처리가 미토콘드리아 막전위 (MMP)의 변화에 미치는 영향

차가와 cisplatin의 병합 처리에 의한 pro caspase-3의 분절이 확인되었기에, 이 둘 병합 처리에 의한 미토콘드리아 기능 변화 가능성이 간접적으로 확인되었다. 병합 처리에 의한 미토콘드리아 막전위차 변화를 확인하기 위하여 HepG2 세포주에 Rhodamin 123 염색을 실시하였다. HepG2 세포주에 500 µg/ml 농도의 차가와 3 µM의 cisplatin의 농도를 병합 처리한 세포의 막전위가 현저하게 변화하여 유세포분석기의 FL 1 형광의 세기가 왼쪽으로 크게 이동한 양상을 나타냈다 (Fig. 3D). 또한, 염색한 HepG2 세포들을 현미경을 통해 확인해 본 결과, 정상 대조군의 미토콘드리아와 차가나 cisplatin의 단독 처리군의 미토콘드리아의 경우 핵을 제외한 세포질에 점상 상태 (functuated form)로 녹색 형광이 분포하였지만 (Fig. 3A-C), 차가와 cisplatin 병용 처리군의 경우, 핵을 포함한 세포 전체에 미만성 (diffuse form)으로 산재하는 녹색 형광을 나타내었다 (Fig. 3D). 따라서, 차가와 cisplatin의 병합 처리가 미토콘드리아 막전위를 포함한 미토콘드리아 기능 이상을 유도하였음을 확인할 수 있었다.

차가와 cisplatin의 병합 처리가 세포 내 활성산소 생성에 미치는 영향

차가와 cisplatin의 병합 처리가 미토콘드리아 막전위 손실을 유도한 것을 확인하였기 때문에, 본 실험에서는 차가와 cisplatin의 병합 처리에 의한 세포고사가 HepG2 세포 내 활성산소의 생성에 관련이 있는지 실험하였다. Hydrogen peroxide와 연관된 peroxides 생성을 DCF-DA로 염색하여 유세포분석기로 분석하였다 (Fig. 4A). 결

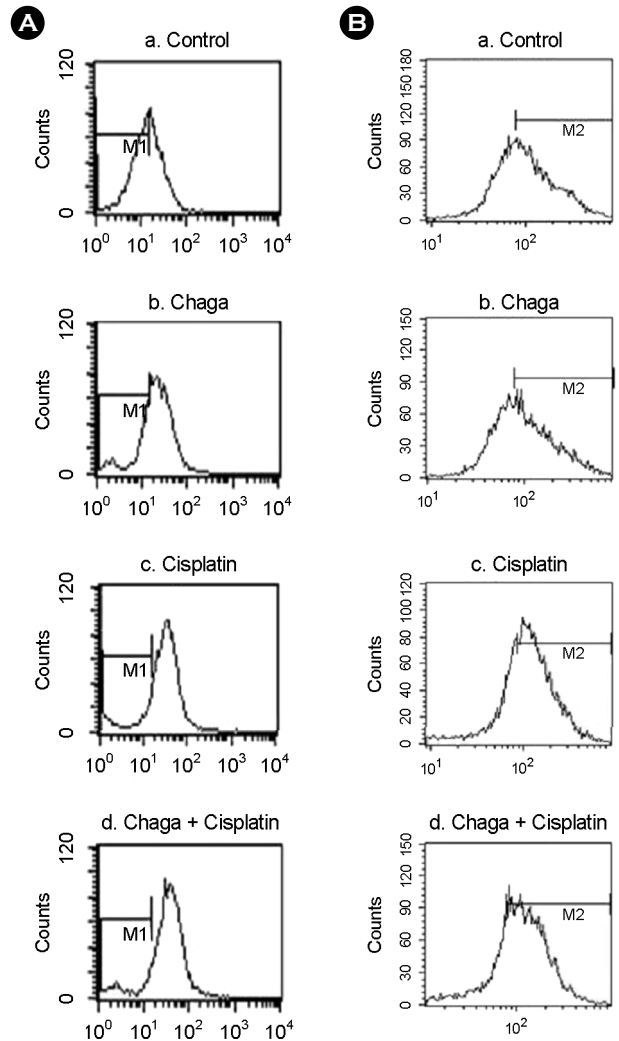


Fig. 4. The alteration of intracellular ROS level by combination treatment with cisplatin and Chaga extract in HepG2 cells. Cells were treated with cisplatin (3 µM) with Chaga extract (500 µg/ml) for 48 hr. After harvesting, cells were stained with DCF-DA (A) and hydro-ethidium (B), were analyzed by flow cytometry to estimate the level of intracellular ROS.

과처럼 차가와 cisplatin의 병합 처리는 처리 48시간 후에 peroxide 계 활성산소를 현저히 증가시켜, 각각의 차가나 cisplatin 단독 처리군에 비해 현저하게 histogram을 오른쪽으로 이동시켰다 (Fig. 4A). 또한, 차가와 cisplatin의 병합 처리 시 superoxide anion의 생성 변화를 확인하기 위하여 hydroethidium (HE)로 염색한 후 유세포분석기로 분석하였는데, 역시 차가와 cisplatin 병합 처리군의 histogram이 크게 이동하여 cisplatin이나 차가 단독 처리군에 비해서 superoxide anion의 생성이 크게 증가하였음을 할 수 있었다 (Fig. 4B). 이 실험으로 차가와 cisplatin의 병합 처리가 세포 내 활성산소를 현저하게 증가시켜

HepG2 세포고사에 영향을 미쳤음을 확인할 수 있었다.

고 찰

Cisplatin은 사람의 암 치료에 가장 널리 활용되어지는 화학요법제 중 하나이나, 내이신경독성과 신장독성 뿐 아니라 다른 많은 부작용의 위험성 때문에, 항암효과를 극대화시키기 위한 더 많은 용량의 사용이 어려운 실정이라서 많은 환자들에게 적절한 치료의 장애가 되고 있다 (Humes, 1999; Mukherjea and Rybak, 2011). 따라서, 임상에서 정상세포에 대한 세포독성을 최소한으로 줄이기 위해서 cisplatin을 저용량으로 사용하면서도 효과적으로 암세포 사멸을 유도할 수 있는 연구가 국내외에서 지속되고 있다.

최근에 인체 내 약리효과를 가진 것으로 알려진 천연물 중에 차가버섯의 암세포 사멸효과에 대한 연구가 진행되고 있다. 차가에서 추출된 주성분인 endopolysaccharide가 색소암세포인 B16F10과 마우스에서 현저한 항암효과를 가진 것이 2006년에 보고되었고 (Kim et al., 2005), 2007년에 색소암세포의 주 세포사멸 기전은 세포주기의 억제에 의한 것이임이 보고되어 있으며 (Youn and Song, 2007), 차가가 대장암세포에서 caspase-3의 활성화와 생장에 영향을 주어 세포사멸을 유도하였음이 보고된 바 있으나 (Hwang et al., 2003), 아직까지 간암세포주의 항암효과는 밝혀진 바 없다.

예비실험에서 차가 단독 처리에 의하여 사람 간암세포주인 HepG2의 세포생장이 농도 의존적으로 현저하게 억제된 것을 확인하였기에, 본 실험에서는 cisplatin과 차가를 병합 처리하여 cisplatin의 농도를 낮추면서도 효과적으로 간암세포주인 HepG2 세포의 세포죽음을 유도할 수 있는지 조사하였다. HepG2 세포주에 크게 세포생존율에 영향을 미치지 않는 생존율 감소가 시작되는 차가 500 µg/ml의 농도와 cisplatin 3 µM 농도가 병합 처리 농도로 채택되어 두 시약을 병합 처리 시 세포생존율에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군에 비해 50% 이상 세포생존율 감소를 보여, 병합 처리에 의한 세포죽음 상승효과를 확인하였다 (Fig. 1A & B). 이러한 병합 처리에 의한 세포죽음 상승효과는 cisplatin의 단독 처리에 비해 cisplatin의 용량을 적게 사용해도 효과적으로 세포죽음에 대한 효과를 기대할 수 있기 때문에 임상에서 화학요법제를 사용할 때 부작용을 크게 줄일 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 인체 내 발생하는 세포죽음은 크게 세포

고사 및 세포괴사 과정을 통해 이루어지는데, 두 과정은 세포 생리학적으로 다른 기전에 의한 현상이다 (Cohen, 1993; Searle and Kerr, 1982). 세포괴사의 경우 세포막의 항상성이 상실되어 형태학적으로 세포질 및 세포소기관들이 팽창되면서 세포 내 소포가 발생되지 않고, 세포전체가 파괴되며, ATP 없이 생화학적 반응이 저온에서도 발생하는 염증성 반응이며, 세포고사의 경우는 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상으로, 세포막이 유지되면서 세포 탈수 현상에 의한 세포 수축, 세포막 기포화 현상, 세포질 내 칼슘 농도의 증가, 염색질 응축, DNA 분절 현상, 핵 절단 및 세포고사 소체 형성이 동반되는 계획된 세포죽음이다 (Wyllie and Kerr, 1980). 이 과정에서 여러 protease의 활성이 관찰되는데 특히 caspase 효소는 세포고사를 마무리 하는 효소로 활성화되면 poly (ADP)-ribosyl polymerase (PARP), lamin 및 다른 caspase 등의 여러 표적 단백질에 작용해서 세포 내의 여러 신호전달을 조절한다 (Widmann and Gibson, 1998). 그리고 미토콘드리아에 영향을 미쳐 세포질 내로 cytochrome c의 방출을 통해 하부경로의 caspase-3 등의 단백질을 활성화 시켜 세포고사에 이르게 한다. 특히, 미토콘드리아에 영향을 크게 미치는 인자인 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide radical (·O₂⁻) 그리고 hydroxyl radical (·OH)이 있는데 이들은 항암치료 시 불활성 산화환원 작용의 물질로 인하여 생성되어지며, 이러한 산화물질은 세포 내 다각적 손상을 유도하여 세포고사의 과정에서 중요한 요소로 작용되어진다 (Chandra et al., 2000).

본 실험에서는 병합 처리에 의한 세포죽음이 세포고사에 의한 것인지 확인하기 위하여 간암세포주인 HepG2 세포에 cisplatin과 차가를 병합 처리하였는데, 세포고사의 전형적인 형태학적 변화인 핵 분절과 핵 응축이 확실하게 관찰되었고 (Fig. 2A), 세포고사에서 하부 신호전달의 종착지인 pro caspase-3의 분절이 병합 처리에 의해 강하게 나타난 것을 확인하여 (Fig. 2B), 이로써 이들 병합 처리에 의한 세포죽음이 세포고사에 의한 세포죽음을 확인할 수 있었다. 또한, 이들 pro caspase-3의 분절은 미토콘드리아 막전위의 변화를 예상할 수 있기에 이들 병합 처리에 의한 미토콘드리아의 막전위 변화를 유세포 분석기로 확인해 본 결과, cisplatin과 차가의 단독 처리보다 이들 시약의 병합 처리가 현저하게 미토콘드리아 막전위에 변화를 준 것을 확인할 수 있었다. 여기에 미토콘드리아 막전위 변화가 세포 내 활성산소의 증가에 의

한 것인지 확인하기 위해 세포 내 활성산소인 hydrogen peroxide와 superoxide anion의 생성을 유세포분석기로 확인하였는데, 병합 처리에 의해 이들 활성산소가 현저하게 생성된 것을 확인하였다. 요약하면, cisplatin과 차가의 병합 처리에 의한 세포사멸이 세포고사에 의한 세포죽음이며, 이들 병합 처리는 각각의 단독 처리에 비해 증대된 세포사멸효과를 보여주었다. 또한, 이들 cisplatin과 차가의 병합 처리에 의한 세포사멸은 세포 내 활성산소들을 현저하게 증가시키고, 미토콘드리아 막전위를 변화시켜 궁극적으로 caspase들 즉, pro-caspase-3의 분해를 초래해 세포고사를 유도한 것으로 생각되어 진다.

본 결과로부터 단독 처리 시 미비한 세포독성을 보이는 낮은 농도의 cisplatin을 낮은 농도의 차가와 병합 처리할 시 고농도의 cisplatin의 처리와 유사하게 효과적인 세포고사를 보였다. 이는 고농도의 항암제의 사용으로 얻어지는 부작용이나 내성을 극복할 수 있는 가능성을 제시할 수 있으리라 사료되며, 또한 두 약제의 병합 처리에 의한 세포고사 향상기전에 대해 심도있는 연구를 진행한다면, 보다 안전하고 효과적인 항암치료로서 임상에서 응용될 수 있을거라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 원광보건대학교 2011년 교내연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

Baumgartner M, Sturlan S, Roth E, Wessner B, Bchleitner-Hfmann T. Enhancement of arsenic trioxide-mediated apoptosis using Docosahesanoic acid in arsenic trioxide resistant solid tumor cells. *Int J Cancer*. 2004. 112: 707-712.

Burczyk J, Gawron A, Slotwinska M, Smietana B, Terminska K. Antimitotic activity of aqueous extracts of *Inonotus obliquus*. *Boll Chim Farm*. 1996. 135: 306-309.

Campbell WA, Davidson RW. A Poria as the fruiting stage of the fungus causing the sterile conks on birch. *Mycologia*. 1938. 30: 553-560.

Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007. 7: 3-18.

Cersosimo RJ. Hepatotoxicity associated with cisplatin chemotherapy. *Ann Pharmacother* 1993. 27: 438-441.

Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of

apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2000. 29: 323-333.

Cohen JJ. Apoptosis, *Immuno Today*. 1993. 14: 126-130.

Cui Y, Kim DS, Park KC. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *J. Ethnopharmacol* 2005. 4: 79-85.

Fujita M, Tsuchida T, Higashino K. Effect of vesnarinone in combination with anti-cancer drugs on lung cancer cell lines. *Anticancer Drugs*. 1999. 10: 119-127.

Humes HD. Insights into ototoxicity. Analgesics to nephrotoxicity. *Ann NY Acad Sci*. 1999. 884: 15-18.

Hwang, YJ, Noh GW, Kim SH. Effect of *Inonotus obliquus* extract on proliferation and caspase-3 activity in human gastrointestinal cancer cell lines. *Korea J Nutr*. 2003. 36: 18-23.

Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity *Cell Mol Life Sci*. 2000. 57: 1229-1235.

Kim YO, Han SB, Lee HW, Ahn HJ, Yoon YD, Jung JK, Kim HM, Shin CS. Immuno-stimulating effect of the endopolysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Life Sci*. 2005. 77: 2438-2456.

Lee CK, Shin JI, Cho YS. Protective Effect of Minocycline Against Cisplatin-induced Ototoxicity. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2011. 4: 77-82.

Lee MW, Park SC, Yang YG, Yim SO, Chae HS, Bach JH, Lee HJ, Kim KY, Lee WB, Kim SS. The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *FEBS Lett*. 2002. 512: 313-318.

Maeda H, Hori S, Ohizumi H, Segawa T, Kakehi Y, Ogawa O, Kakizuka, A. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthioninesulfoximene. *Cell death and Differentiation*. 2004. 11: 737-746.

Monica N, Poma P, Perri D, Dusanochet L, Cervello M, D'alessandro N. Antitumor effects of curcumin, alone or combination with cisplatin or doxorubicin, on human hepatic cancer cells. Analysis of their possible relationship to changes in NF-κB activation levels and in IAP gene expression. *Cancer Letters*. 2005. 224: 53-65.

Mukherjee D, Rybak LP. Pharmacogenomics of cisplatin-induced ototoxicity. *Pharmacogenomics*. 2011. 12: 1039-1050.

Park KC, Kil KJ, Lee YJ. The Comparative Study of the Effects of Fructification *Inonotus Obliquus* Aqueous Extract according to the Extraction Temperature(2) -Anti-oxidative Activity, anti-inflammatory effect and cancer cell multiplication inhibition effect. *The Korea Association of Herbology*. 2007. 22: 177

-185.

- Rave-Frank M, Schmidberger H, Christiansen H, Boll C, Lehmann J, Weiss E. Comparison of the combined action of oxaliplatin or cisplatin and radiation in cervical and lung cancer cells. *Int J Radiat Biol.* 2007. 83: 41-47.
- Ravi R, Somani SM. Mechanism of cisplatin ototoxicity antioxidant system. *Pharmacology & toxicology.* 1995. 76: 386-394.
- Rzymowska J. The effect of aqueous extracts from *Inonotus obliquus* on the mitotic index and enzyme activities. *Boll Chim Farm.* 1998. 137: 13-15.
- Searle J, Kerr JF. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982. 17: 229-259.
- Widmann C, Gibson S. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Bio Chem.* 1998. 273: 7141-7247.
- Wyllie AH, Kerr JF. Cell death ; the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980. 68: 251-301.
- Youn MJ, Kim JK, Park SY, Kim Y, Kim SJ, Lee JS, Chai KY, Kim HJ, Cui MX, So HS, Kim KY, Park R. Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) induces G0/G1 arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *World J Gastroenterol.* 2008. 14: 511-517.
- Youn MJ, Song JH. Chaga Mushroom water extract induces G0/G1 arrest in B16-F10 melanoma cells. *Korea J. Oriental Physiology & pathology.* 2007. 21: 204-208.
-