

## 차가버섯 추출물에 의한 신경교모세포종 U-87 MG 세포의 증식 억제 효과

신정아<sup>1</sup> · 박주현<sup>1</sup> · 김선희<sup>1</sup> · 송관영<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>서울의료원 의학연구소

<sup>2</sup>서울의료원 신경외과

### Inhibition Effect of Cell Proliferation and Apoptosis by *Inonotus obliquus* in Human Glioblastoma U-87 MG Cells

Jung-A Shin<sup>1</sup>, Joo Hyun Park<sup>1</sup>, Sun Hee Kim<sup>1</sup>, and Kwan Yong Song<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Clinical Research Medical Institute and <sup>2</sup>Dept. of Neurosurgery,  
Seoul Medical Center, Seoul 131-865, Korea

**ABSTRACT** Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) was considered a functional food with an anti-cancer effect in colon, gastric, and lung cancer. Therefore, this study was conducted in order to elucidate the effect of chaga mushroom extract in brain cancer. Glioblastoma U-87 MG cells were used in investigation of cell survivability, apoptosis, and cell cycle arrest analysis. Treatment with various concentrations of chaga mushroom extract resulted in inhibition of cell proliferation and cell cycle arrest. Although caspase-3 expression was increased over 100 µg/mL of chaga mushroom extract treatment, apoptosis factors with Bcl-2, Bax and p53 did not change. In analysis of cell cycle regulatory factors, expression of cyclin D1 and CDK2 decreased in a dose-dependent manner. We have demonstrated the anti-cancer effect of chaga mushroom extract in glioblastoma, which may be mediated by activation of the caspase pathway and induction of cell cycle arrest.

**Key words:** *Inonotus obliquus*, U-87 MG, proliferation, cell cycle arrest

## 서 론

신경교모세포종(glioblastoma)은 원발성 뇌종양 중에서 가장 일반적인 형태이자 가장 악성인 종양으로서 빈도가 높게 발생하는 반면 치료에 대한 효과가 낮고 예후가 극히 불량한 종양으로 잘 알려져 있다. 종양치료에는 방사선 요법이나 화학 항암 요법, 유전자 치료 등 여러 방법이 동원되고 있지만 부작용과 많은 후유증을 가지고 있는 관계로 안전한 뇌종양 치료제를 찾고 또 그 작용 기전을 알아내는 연구는 매우 중요하다(1-3).

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 러시아 시베리아와 북유럽 등 북위 45도 이상의 지역에서 검은 자작나무에 자생하는 버섯으로 차가버섯 추출물의 효능에 대해 산화스트레스 예방(4,5), 항염(6-8), 통증완화(6) 등에 대한 많은 연구 논문이 있다. 그러나 무엇보다도 차가버섯 추출물은 흑색종 세포 B16-F10(9), 대장암 세포 DLD-1(10), 자궁경부암 세포 HeLa S3(11) 그리고 위암세포 SNU-484(12) 등 다양한 암 세포주에서 증식을 억제하며 항암작용에 효능이 있는 것으로 잘 알려져 있으나 그 작용기전에 대한 연구는 미미하며

신경교모세포종의 항암 효능에 대해서는 알려진 바가 없다.

세포사멸(apoptosis)은 세포가 성장 및 분화과정을 거쳐 그 기능을 끝낸 후에 맞는 예정된 죽음으로 생리학적 과정을 일컫는다. 이는 세포막이 유지되면서 세포 탈수현상에 의한 세포수축, DNA 절편화, 세포막 낭형성, 미토콘드리아 막전위, 핵 절단 및 세포사멸 소체 형성이 동반된다(13,14). 세포사멸은 세포주기에 의해 결정되어지며 세포주기가 진행될 때 중심 역할을 하는 것이 사이클린 의존성 키나아제(CDK: cyclin dependent kinase)와 cyclin이다. 세포주기 중 G<sub>1</sub>기는 외부에서 증식 및 억제 신호를 받아들이는 유일한 시기이며, 이 시기에 cyclin D는 CDK4 또는 CDK6과 결합하고 cyclin E는 CDK2와 복합체를 형성한다. 이 결합체들은 RB 단백질을 인산화 시켜 전사조절인자인 E2F를 활성화함으로써 세포를 S기로 이행시킨다.

차가버섯 추출물의 항암효과에 대한 여러 방면에 연구가 진행되고 있으나 뇌종양에 관한 연구는 현재 대두된 적이 없다. 또한 대부분의 차가버섯 관련 연구가 추출법에 따른 효능 및 성분 분석에만 초점을 맞춰 연구가 진행되고 있으며 정확한 항암기전의 해석이 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 차가버섯 추출물이 신경교모세포종에서 항암효과를 확인하고 세포사멸에 관련된 Bcl-2, Bax, p53 단백질의 발현과 caspase-3 활성화, 세포주기 조절인자인 CDK2,

Received 22 March 2013; Accepted 13 May 2013

\*Corresponding author.

E-mail: nssky@lycos.co.kr, Phone: 82-10-6342-8511

cyclin D1의 발현 차이를 분석하고 세포주기의 진행에 큰 영향을 미치는 인산화된 RB 단백질과의 연관성을 통해 차가버섯 추출물의 세포 증식 억제를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

U-87 MG 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, VA, USA)에서 구입하였다. 세포배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), antibiotics, trypsin-EDTA는 Well gene(Daegu, Korea)의 제품을 사용하였다. 본 실험에서 사용한 차가버섯은 (주)대호양행(Gyeonggi, Korea)으로부터 구입하였으며 demethylsulfoxide(DMSO) 등의 일반적인 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Cell counting kit-8(CCK-8)은 Dojindo molecular technologies Inc.(Gaithersburg, MD, USA)의 제품을 사용하였다. Bcl-2, Bax, p53, p-p53, cyclin D, CDK2, RB와 p-RB antibody는 Cell Signaling(Beverly, MA, USA)의 제품이었고, bovine anti-rabbit IgG-HRP, bovine anti-mouse IgG-HRP는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

### 신경교모세포종 세포주 배양

사람의 뇌종양 교모세포종 세포주 U-87 MG 세포를 DMEM 배지에 10% FBS와 1% antibiotics를 첨가한 세포 배양액을 사용하여 배양하였다. 배양액을 매 48시간 주기로 교체하였으며 차가버섯 추출물 0~100 µg/mL의 농도를 처리한 뒤 항암효과 및 세포사멸 기전을 분석하였다.

### 차가버섯 추출 및 동결건조

러시아산 차가버섯을 건조하여 분말화한 후 75 g을 물 2 L에 넣고 95°C에서 20시간 동안 추출하였다. 추출액을 여과하여 동결건조 하여 분말화 시키고, 이 분말을 증류수에 10 mg/mL 녹인 후 여과하여 -20°C에 보관하였으며 실험 조건에 따라 배지에 희석하여 사용하였다.

### 세포 생존율 측정

차가버섯 추출물이 U-87 MG 세포의 증식에 미치는 영향을 측정하기 위해 CCK-8 assay를 이용하였다.  $5 \times 10^3$  cells/well의 세포 부유액을 96-well plate에 분주 후 CO<sub>2</sub> 배양기 안에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 1% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 각각의 농도로 차가버섯 추출물을 plate에 첨가한 후 배양기 안에서 48시간 배양하였다. 세포가 배양된 plate에 10 µL의 CCK-8 용액을 첨가하고 3시간 동안 반응시킨 후 ELISA 분석기(Sunrise™, TECAN, Mannedorf, Switzerland)로 450 nm 파장에서 흡광도를 측

정하였다.

### Caspase-3 활성 측정

신경교모세포종에 차가버섯 추출물을 처리한 후 48시간 후 세포들을 lysis 시켜 세포 추출액을 얻었다. 세포용액완충액(cell lysis buffer)으로 세포를 충분히 파쇄하고 냉동-해동 과정을 3번 반복하였다. 이후 3,000×g에서 15분 동안 원심분리 한 후 상층액을 수거하여 단백질 총량을 정량하였다. 96-well plate에 30 µg의 단백질을 넣고 DTT, DMSO, caspase buffer를 첨가하였으며, 2 µL의 DEVD-pNA substrate(10 mM stock)를 모든 well에 첨가하고 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 형광기질은 ELISA 분석기(Sunrise™ TECAN)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(15).

### Western blot을 이용한 단백질 분석

배양된 U-87 MG 세포에서 배양액을 제거하고 단백질 추출액 400 µL를 넣은 후 scraper를 이용하여 세포를 수거하였다. 100초 동안 vortexing을 하여 세포를 충분히 파쇄한 뒤 20분 동안 -20°C 냉동고에 정치시켰다. 이후 시료를 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 상층액만을 분리하여 모은 뒤 Bradford 방법에 근거하여 단백질을 kit로 정량하였다(Roti®-Quant, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). 정량된 시료는 5× sample buffer와 혼합하여 100°C에서 5분 끓인 후, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동 후 바로 nitrocellulose membrane에 1시간 30분 동안 transfer를 실시한 뒤 5%(w/v) fat-free milk powder가 혼합된 TBS-T로 상온에서 1시간 blocking을 실시하였다. 이후 1%(w/v) fat-free BSA가 혼합된 TBS-T에 Bcl-2, Bax, p-p53, p53, GAPDH, cyclin D1, CDK2, RB, pRB 등의 primary antibody들을 1:500으로 희석시킨 후 4°C에서 16시간 동안 또는 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. Secondary antibody인 bovine anti-rabbit, anti-mouse IgG-HRP를 5%(w/v) fat-free milk powder가 혼합된 TBS-T에 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 WEST-ZOL® plus Western Blot Detection System(iNTRON Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)을 처리하여 반응을 시킨 뒤 필름에 노출시켜 단백질의 발현을 확인하였다(16).

### FACS 분석을 통한 세포사멸 분석

차가버섯 추출물을 0, 50, 100 µg/mL 농도로 48시간 처리한 U-87 MG 세포를 scraper를 사용하여 수확한 후 BD Cycletest™ Plus-DNA Reagent Kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)의 세포주기 관찰 시약을 처리하고 세포에 propidium iodide(PD)를 염색시킨 후 세포 주기를 유세포 분석기(FACSCalibur, BD Biosciences)를 이용하여 측

정하였다(17).

## 결과 분석

모든 측정결과는 mean±SEM으로 표시하였고, 실험 결과의 분석은 Student's t-test를 이용하여  $P < 0.05$ 를 유의한 것으로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

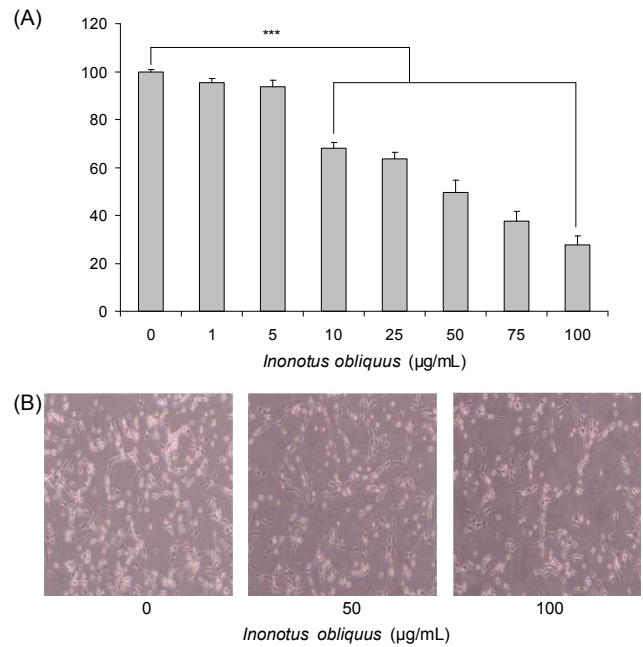
### 차가버섯 추출물에 의한 뇌종양 세포의 성장과 분화 억제

최근 암 예방제나 항암제의 독성 및 부작용이 제기되고 있으며, 이를 보완하기 위해 생리활성물질을 함유하고 있는 천연물의 항암효과에 대한 연구가 진행되고 있다. 생리활성물질은 항암효과, 면역기능 조절작용(18,19) 그리고 항암제로 유발되는 부작용 감소(20) 등의 효능이 있다고 알려져 있다. 그중 버섯은 여러 생리활성 유효성분을 함유하고 있으며 특히 다당체의 일종인 베타글루칸( $\beta$ -glucan)이 항암효과를 가지고 있는 것으로 밝혀졌고(21), 차가버섯은 다른 버섯에 비해 5~10배 이상의 베타글루칸의 함유량을 가진 것으로 나타나 항암연구에 좋은 소재로 사료된다. 또한 차가버섯은 크로모겐, 이노시톨, 플라보노이드, 폴리페놀 등의 성분이 다량 함유되어 있어 베타글루칸뿐만 아니라 복합적인 작용에 의해 항암효능을 가진 것으로 사료되어 차가버섯을 직접 구매하여 본 연구에 이용하였다.

차가버섯 추출물이 신경교모세포종인 U-87 MG 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 세포 배양액에 0~100  $\mu\text{g/mL}$ 의 범위의 다양한 농도로 추출물을 첨가하여 세포생존율을 측정하였다. 차가버섯을 다양한 농도로 48시간 처리하였을 때, U-87 MG 세포는 농도 의존적으로 생존율이 감소하였으며, 특히 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 차가버섯 추출물을 처리하였을 때 정상대조군에 비하여 49.48±5.24%의 수준의 세포생존율을 나타냈다(Fig. 1(A)). 차가버섯 추출물이 처리된 U-87 MG 세포의 세포독성을 세포모양 변화로 확인하였다. 차가버섯 추출물의 농도가 커질수록 세포 수가 점차 감소되었으며, 더불어 세포들 사이의 세포 모양이 대조군에 비해서 응축되어 있는 모습이 관찰되었다(Fig. 1(B)). 따라서 차가버섯 추출물은 뇌종양세포의 세포사멸을 유도할 수 있다고 사료된다.

### 차가버섯 추출물에 의한 세포사멸 관찰

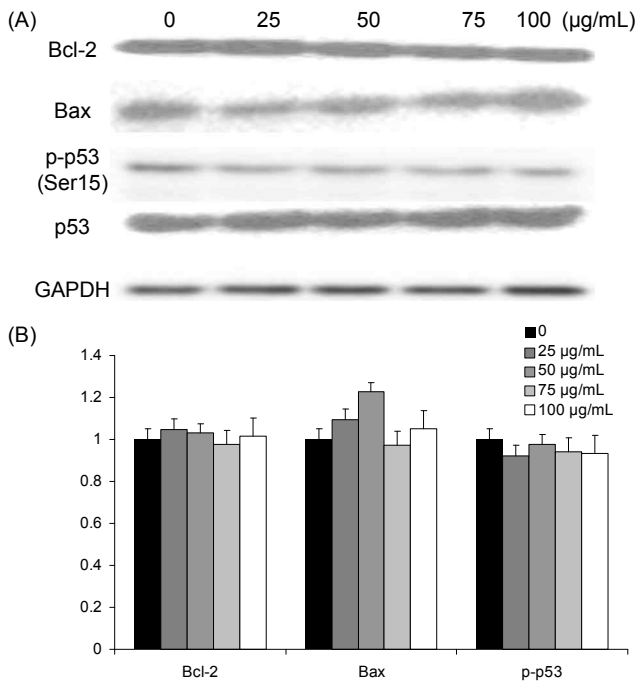
**차가버섯 추출물이 세포사멸 관련 단백질의 발현에 미치는 영향:** Bcl-2 family는 세포사멸을 초래하는 대표적인 단백질로 이들 단백질들을 다양한 조건에서 상호작용을 통하여 세포의 생존과 사멸을 유도한다. Bax는 Bcl-2 family 단백질 중 하나로 미토콘드리아의 막전위를 감소시키고 cytochrome c를 방출함으로써 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 그 반면 Bcl-2는 Bax의 활성을 억제하여 세포사멸을 억제시키며(22) 특히 암세포에서 Bcl-2 단백질



**Fig. 1.** Cytotoxic effect of *Inonotus obliquus* extract on human glioblastoma U-87 MG cells. (A) The cells were treated with various doses of *Inonotus obliquus* extract for 48 h and cell viability was measured by CCK-8 assay. Data represented as mean±SEM of five independent experiments.  $***P < 0.001$ , compared with control cells. (B) The morphological changes of U-87 MG cells after exposure to *Inonotus obliquus* extract for 48 h. The photomicrographs were representative of three independent experiments and taken under an inverted microscope. Magnification,  $\times 40$ .

들의 상호전달에 불균형이 초래되어 세포의 성장 신호가 지연된다고 알려져 있다. 사람 신경교모세포종 U-87 MG 세포에서 차가버섯 추출물 처리 후 사멸을 조절하는 Bcl-2와 Bax 단백질에서의 발현 차이를 확인하기 위해 western blot을 수행하였다. Bax 단백질의 발현을 확인한 결과 차가버섯 추출물 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 처리 군에서는 대조군에 비해 증가하였으나 전반적으로 유의적인 차이는 없었다. Bcl-2 단백질에서도 전체적으로 대조군과 비교하였을 때 발현의 차이가 발견되지 않았다(Fig. 2). 이는 Bcl-2와 Bax에 의해서가 아닌 다른 경로의 세포사멸이 이루어졌음을 알 수 있으며 Kim 등(10)의 논문에도 차가버섯 추출물이 대장암세포인 HT-29에 Bax와 Bcl-2의 단백질 수준에 영향을 미치지 않았다고 보고하고 있다.

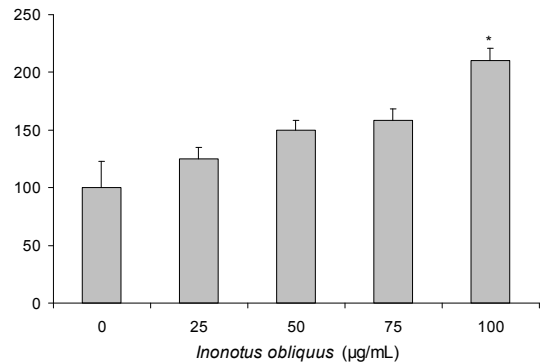
자외선, 방사선 등의 스트레스에 의한 DNA 손상은 MDM2와 결합되어 불활성을 지니던 p53이 분리되어 ser-15의 인산화가 유도된다. Total p53의 경우에는 농도에 따른 유의적 차이가 없었으며, ser-15에 인산화된 p53은 차가버섯의 농도에 따른 발현량의 차이를 보이지 않았고 통계적으로도 의미 있는 변화를 보이지 않았다(Fig. 2). HepG2 세포에서 향버섯 추출물이 p53 단백질의 발현에 시료의 처리시간에 대비하여 증가하였지만(23), Youn 등(9)의 연구와 마찬가지로 차가버섯 추출물을 흑색종인 mela-



**Fig. 2.** Effect of *Inonotus obliquus* on the expression of apoptosis relative proteins in human glioblastoma cells. Cell were treated with *Inonotus obliquus* extract (0~100 µg/L) for 48 h. Total cellular protein extracts are prepared and western blot analysis was performed with 20 µg protein using Bcl-2 and Bax with GAPDH, p-p53 (ser-15) with p53 as a loading control. Data represented as mean±SEM of four independent experiments.

noma 세포에 처리하였을 경우에도 p53, p27 단백질의 발현이 감소되었다고 보고하였으며, 본 논문에서는 차가버섯 추출물이 최종분화(terminal differentiation)와의 연관성에 의한 것으로 추측되고 있다. 또한 폐암세포 A549에 신령버섯 추출물의 처리에 따른 p53 단백질 발현 변화가 관찰되지 않았으며 신령버섯 추출물은 p53 비의존적인 경로를 통해 G<sub>2</sub>/M arrest에 관여하고 있다고 설명하였다. p53은 세포증식과 세포변형을 억제하는 암억제 유전자이지만 돌연변이형 p53 유전자는 세포변형을 촉진하여 오히려 암 발생을 유발하는 것으로 알려져 있고(24,25), p53 단백질의 경우 반감기가 짧아 돌연변이형 p53 단백질이 발현되었다고 생각해 볼 수 있으나, 여러 연구들을 종합해볼 때 버섯들의 항암효능이 p53 단백질과의 연관성에 대해서는 상반된 견해를 보이고 있으며 아직 확실하게 밝혀지지 않았다. 본 연구는 Bcl-2, Bax와 p-p53(ser-15) 단백질의 변화를 관찰할 수 없었고 차가버섯 추출물의 성장 억제는 이들 단백질과 연관이 없고 다른 경로에 의한 것임을 제시할 수 있다.

**차가버섯 추출물에 의한 caspase-3 활성 측정:** 차가버섯의 세포사멸 기전 확인을 위해 세포사멸 신호전달계의 중요분자인 caspase-3의 활성을 조사하는 방법으로 caspase 3-like protease의 활성을 측정하였다. Caspase는 세포사멸에서 중요한 조절인자로 작용하며(26), 세포사멸 과정의 마지막 단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다

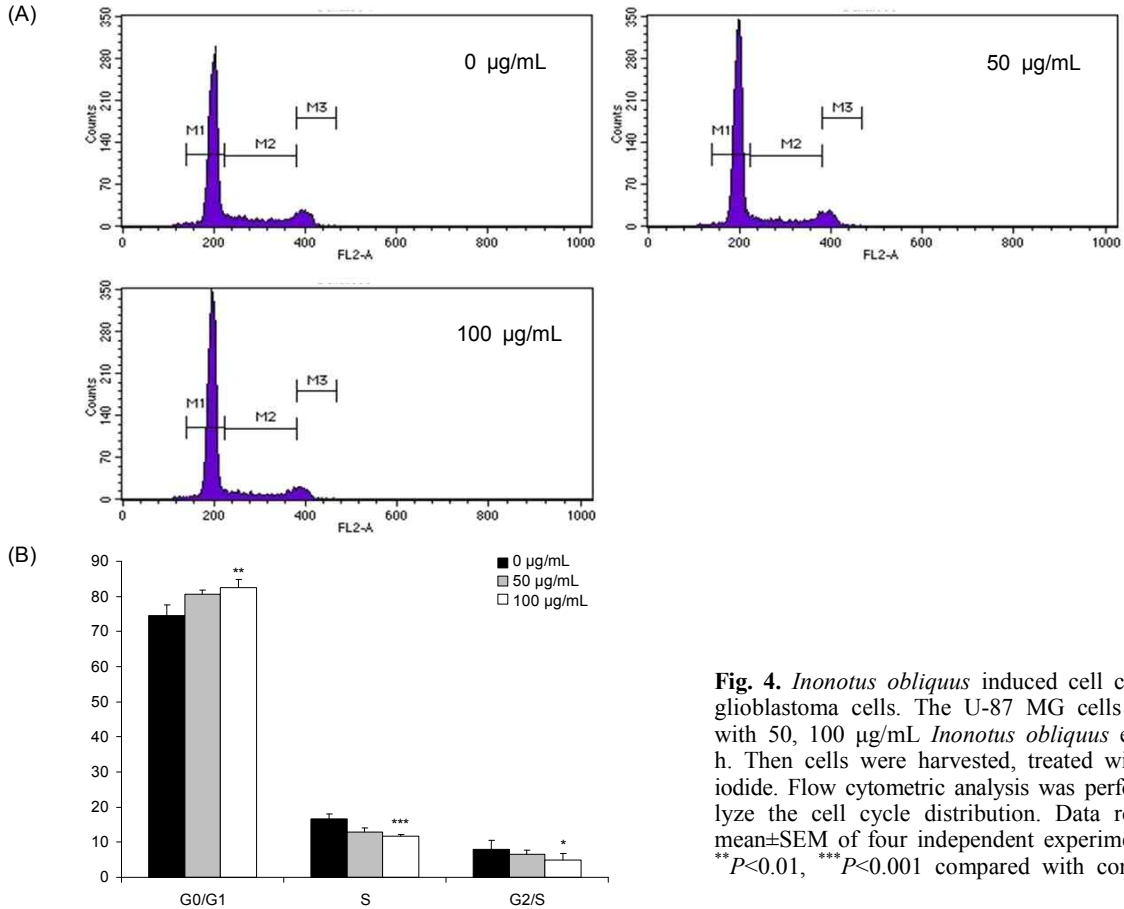


**Fig. 3.** The estimation of caspase-3 activity on U-87 MG cells treated with *Inonotus obliquus* extract for 48 h. The effect of *Inonotus obliquus* extract in cells was determined using caspase-3 assay kit. The values are shown as the mean±SEM of three independent experiments. \*P<0.05, compared with control cells.

(27). 따라서 caspase는 항암물질의 효과를 검증하는데 있어 유용한 마커로 여겨지며, 복분자 추출물이 대장암세포에서 caspase의 활성이 증가되었다는 보고(28)를 비롯하여 천연물에 의한 항암작용에 있어서도 caspase에 대한 연구가 많이 진행되어 왔다(29,30). Fig. 3에서와 같이 농도에 따라 caspase-3의 활성이 증가하였으며, 100 µg/mL의 차가버섯추출물을 처리하였을 때 대조군에 비해 2.1배 이상의 유의적인 활성을 나타냈다. Caspase 활성에 의한 세포사멸에는 죽음 수용체(FAS)를 매개하는 외인적 경로와 mitochondria를 매개하는 내인적 경로로 구분된다(31,32). 이들 경로는 caspase 3의 활성화를 야기하고 활성화된 caspase 3는 lamin A, DNA fragmentation factor와 PARP 등의 단백질의 분해를 유도하여 세포사멸을 시킨다(33). Fig. 2와 3의 결과를 종합하여 볼 때, 차가버섯 추출물은 신경교모세포종에서 미토콘드리아 막 투과성에 의한 내적 경로에 관여하는 Bcl-2, Bax 단백질에는 영향을 끼치지 않았고, caspase-3의 활성에만 영향을 끼친 것으로 보아 Fas receptor에 ligand가 결합하면 활성화되는 외적 경로인 죽음 수용체 경로(death receptor pathway)에 의한 직접적인 세포사멸이라고 판단된다.

**차가버섯 추출물이 세포 주기에 미치는 영향**

**차가버섯 추출물에 의한 U-87 MG 세포의 세포주기 변화:** 천연물 추출물에 의해 암세포 사멸효과로 세포주기 억제 기전이 보고되고 있다(34). 차가버섯 추출물의 농도양세포에서 세포사멸 기전을 확인하기 위하여 유세포 분석기를 이용한 세포주기 분석을 실시하였다. 그 결과 차가버섯 추출물 50 µg/mL와 100 µg/mL를 처리한 세포의 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 구간에서 대조군에 비해 세포가 각각 4.35%, 8.21%가 증가하였으며, S기와 G<sub>2</sub>/M기 또한 차가버섯 추출물의 농도가 증가할수록 대조군에 비해 그 비율이 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이는 뇌종양세포에 차가버섯 추출물을 48시간 처리하였



**Fig. 4.** *Inonotus obliquus* induced cell cycle arrest in glioblastoma cells. The U-87 MG cells were treated with 50, 100 µg/mL *Inonotus obliquus* extract for 48 h. Then cells were harvested, treated with propidium iodide. Flow cytometric analysis was performed to analyze the cell cycle distribution. Data represented as mean±SEM of four independent experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with control cells.

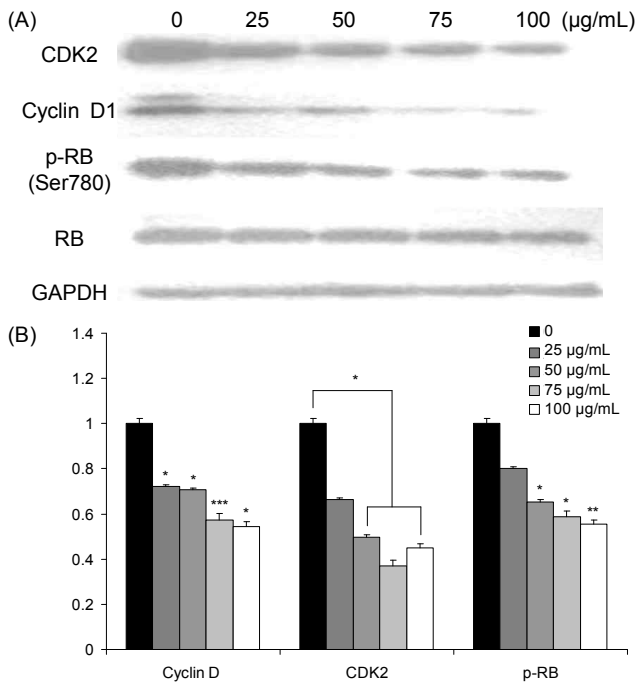
을 때 G<sub>1</sub> 단계에서 세포주기를 머물게 하여 세포 성장을 지연시키는 것을 의미한다. 따라서 뇌종양세포에서 차가버섯의 항암 활성은 세포주기와 연관되어 있으며, 특히 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>기의 세포주기를 지연시켜 신경교모세포종 U-87 MG의 성장에 영향을 끼쳤다고 판단된다.

**차가버섯 추출물이 세포주기 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 관련 단백질의 발현에 미치는 영향:** 다양한 조절인자와 조절 단백질 복합체의 작용에 의해 세포주기가 조절된다(35). 앞서 뇌종양세포에서 차가버섯이 세포주기에 영향을 미친다는 것이 확인되었고(Fig. 4) 정확한 기전을 조사하기 위하여 세포주기 관련 인자를 분석하였다. Cyclin D1 단백질은 세포주기 G<sub>1</sub> 단계에서 CDK4 혹은 CDK6와 복합체를 형성하여 RB 단백질을 인산화시킴으로 인해 E2F와의 복합체 형성을 억제한다(36). 신경교모세포종에서 cyclin D1의 발현을 분석한 결과 차가버섯 추출물 처리 농도가 증가할수록 cyclin D1 발현량도 현저히 감소하였다(Fig. 5). Cyclin E 단백질과 결합하여 세포주기의 G<sub>1</sub>기에서 S기로 이행시키는 역할을 수행하는 CDK2 단백질 또한 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 세포 주기에서 중요한 역할을 수행하는 단백질이다. U-87 MG 세포에서 차가버섯 추출물의 영향을 받아 대조군에 대비하여 농도 의존적으로 CDK2 단백질의 수준이 의미 있는 감소를 하였다. 그리고 E2F가 분해되어 활성화 형태를 지닌 후 세포주기의 S기로 이행되는

데 결정적인 역할을 하는 p-RB 단백질의 수준 또한 cyclin D1와 CDK2 단백질의 영향을 받아 차가버섯 추출물에 의해 농도 의존적으로 상당히 감소한 것을 확인하였다(Fig. 5).

RB 단백질은 G<sub>1</sub>기 초기에 인산화하지 않은 형태로 E2F와 결합하여 각종 유전자 발현을 저해함으로써 S기로의 이행을 억제한다. 그러나 cyclin D1-CDK4 복합체와 CDK2-cyclin E 복합체가 RB 단백질을 인산화를 유도함으로써 E2F와의 복합체 형성을 억제하기 때문에 전사조절인자인 E2F가 활성화되고 세포가 G<sub>1</sub>기에서 S기로 이행되어 DNA 합성이 시작되게 된다. 따라서 G<sub>2</sub>, M기의 세포주기 중에는 RB 단백질은 인산화 형태로만 존재하며 인산화 형태의 RB 단백질이 감소한다는 것은 세포주기가 S기로 이행되는 것을 방해할 뿐만 아니라 S기, M기로 이행된 전체 세포의 수가 감소되었을 가능성을 제시할 수 있다. 이는 유세포 분석을 통한 세포주기의 변화에서 차가버섯 추출물을 처리하였을 때 대조군과 대비하여 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 단계의 세포가 증가하였고 이후 단계인 S기, G<sub>2</sub>/M기에서는 감소한 결과에서도 확인할 수 있다(Fig. 4).

본 연구의 결과는 차가버섯 추출물이 신경교모세포종에 caspase-3 활성화에 의한 죽음 수용체 경로에 의한 직접적인 세포사멸을 유발하며 세포주기 조절에 관여하는 cyclin D1, CDK2 그리고 p-RB의 농도 의존적인 단백질 발현 감소에



**Fig. 5.** Effect of *Inonotus obliquus* on the expression of cell cycle regulatory proteins in human glioblastoma cells. Cell were treated with *Inonotus obliquus* extract (0~100 µg/mL) for 48 h. Total cellular protein extracts were prepared and western blot analysis was performed with 20 µg protein using CDK2, cyclin D1, phospho-RB, RB with GAPDH as a loading control. Data represented as mean±SEM of four independent experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with control cells.

의해 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>의 세포주기 정지를 유도함을 제시한다. 따라서 본 연구는 차가버섯이 신경교모세포종의 성장을 지연시켜 항암제 및 보조제로서의 가능성을 제시하였다.

### 요 약

러시아에서 여러 민간요법으로 사용되어지고 있는 차가버섯은 대장암, 위암 등에서 항암효능이 있다고 알려져 있다. 그러나 뇌종양에 대한 연구는 현재 이루어지지 않고 있으며 차가버섯의 항암 효능에 대한 기전 연구도 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 신경교모세포종 U-87 MG 세포주에 대한 성장억제 효과를 확인하고자 세포생존을 변화와 형태학적 변화, 세포주기에 미치는 영향과 세포사멸 관련 단백질 및 세포주기 조절 단백질의 발현 변화를 조사하였다. 그 결과 차가버섯 추출물을 처리한 U-87 MG 세포 생존율이 유의하게 감소하였으며, Bcl-2, Bax와 p-p53 단백질 수준 차이는 없었고 caspase-3 활성에 영향을 미쳐 죽음 수용체 경로에 의한 세포사멸이 이루어졌다. 또한 세포주기를 관찰한 결과 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 세포주기에서 성장 억제를 확인하였으며, 이는 cyclin D1, CDK2 단백질 발현량의 감소와 RB 단백질의 인산화 억제 때문이라는 결론에 도달하였다. 본 연구결과는 차가버섯을 뇌종양의 치료 및 보조제로서 역할을 수행할 수

있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구 논문은 2010~2011년 서울특별시 서울의료원 연구과제로 서울시의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Kim DW, Kim TY, Park JT, Kim JM. 2001. Apoptosis induced by cisplatin in human glioblastoma A172 cells. *J Korean Neurosurg Soc* 30: S5-S12.
- Madajewicz S, Chowhan N, Tfayli A, Roque C, Meek A, Davis R. 2000. Therapy for patients with high grade astrocytoma using intraarterial chemotherapy and radiation therapy. *Cancer* 88: 2350-2356.
- Vick NA, Khandekar JD, Bigner DD. 1977. Chemotherapy of brain tumors. *Arch Neurol* 34: 523-526.
- Najafzadeh M, Reynolds PD, Baumgartner A, Jerwood D, Anderson D. 2007. Chaga mushroom extract inhibits oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with inflammatory bowel disease. *Biofactors* 31: 191-200.
- Lee IK, Kim YS, Jang YW, Jung JY, Yun BS. 2007. New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 6678-6681.
- Park YM, Won JH, Kim YH, Choi JW, Park HJ, Lee KT. 2005. In vivo and in vitro anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *J Ethnopharmacol* 101: 120-128.
- Kim HG, Yoon DH, Kim CH, Shrestha B, Chang WC, Lim SY, Lee WH, Han SG, Lee JO, Lim MH, Kim GY, Choi S, Song WO, Sung JM, Hwang KC, Kim TW. 2007. Ethanol extract of *Inonotus obliquus* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *J Med Food* 10: 80-89.
- Sung B, Pandey MK, Nakajima Y, Nishida H, Konishi T, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2008. Identification of a novel blocker of IκBα kinase activation that enhances apoptosis and inhibits proliferation and invasion by suppressing nuclear factor-κB. *Mol Cancer Ther* 7: 191-201.
- Youn MJ, Kim JK, Park SY, Kim Y, Park C, Kim ES, Park KI, So HS, Park R. 2009. Potential anticancer properties of the water extract of *Inonotus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16-F10 cells. *J Ethnopharmacol* 121: 221-228.
- Kim EJ, Lee YJ, Shin HK, Yoon Park JH. 2006. 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. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 516-523.
- Burczyk J, Gawron A, Slotwinska M, Smietana B, Termanska K. 1996. Antimitotic activity of aqueous extracts of *Inonotus obliquus*. *Boll Chim Farm* 135: 306-309.
- Hwang YJ, Noh GW, Kim SH. 2003. Effect of extracts on proliferation and caspase-3 activity in human gastro-intestinal cancer cell lines. *Korean J Nutr* 36: 18-23.
- Cohen JJ. 1993. Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130.
- Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. 1982. Necrosis and apoptosis: Distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 17: 229-259.

15. Okragly A, O'Brien M. 1999. Death check<sup>TM</sup> assay systems for monitoring apoptosis. *Promega Notes* 72: 3-6.
16. Burnette WN. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203.
17. Hiddemann W, Schumann J, Andreef M. 1984. Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 5: 445-446.
18. Kuo ML, Huang TS, Lin JK. 1996. Curcumin, an anti-oxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1317: 95-100.
19. Beaulieu JF, Quaroni A. 1991. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J* 280: 599-608.
20. Rho SN, Hong JY. 1998. Antitumor effect and the change of chemosensitivity of chitosan in human lung cancer cell line. *Korean J Nutr* 31: 739-746.
21. Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, Wang Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol* 18: 4-19.
22. Farrow SN, Brown R. 1996. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev* 6: 45-49.
23. Bae JT, Chang JS, Lee KR. 2002. Effect of *Sarcodon aspratus* extract on expression of cycle-associated proteins in HepG2 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 329-332.
24. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456.
25. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. 1988. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 8: 531-539.
26. Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
27. Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22: 299-306.
28. Kim YK, Kim HJ, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim JM. 2005. Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. *J Appl Toxicol* 25: 374-382.
29. Ye M, Liu JK, Lu ZX, Zhao Y, Liu SF, Li LL, Tan M, Weng XX, Li W, Cao Y. 2005. Grifolin, a potential anti-tumor natural product from the mushroom *Albatrellus confluens*, inhibits tumor cell growth by inducing apoptosis in vitro. *FEBS Lett* 579: 3437-3443.
30. 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. 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.
31. Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. 2001. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem* 2: 20-29.
32. Fulda S, Debatin KM. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25: 4798-4811.
33. Pardee AB. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-608.
34. Elledge SJ. 1996. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274: 1664-1672.
35. Alao JP. 2007. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic intervention. *Mol Cancer* 6: 24.