

상황을 이용한 한의학적 보건기능 개선제에 의한 인체 폐암세포의 증식억제에 관한 연구

박 철 · 이용태¹ · 정영기² · 최병태³ · 이상현⁴ · 최영현*

동의대학교 한의과대학 생화학교실, 1: 생리학교실, 2: 동의대학교 자연과학대학 미생물학과, 3: 해부학교실 및 한의학연구소, 4: 신라대학교 생명공학과

Down-regulation of COX-2 and hTERT Expression by Healthful Decoction Utilizing *Phellinus Linteus* in Human Lung Carcinoma Cells

Cheol Park, Yong Tae Lee¹, Young Kee Jeong², Byung Tae Choi³, Sang Hyeon Lee⁴, Yung Hyun Choi*

Department of Biochemistry, 1: Department of Physiology, 2: Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Dongeui University
3: Department of Anatomy, Dongeui University College of Oriental Medicine and Research Institute of Oriental Medicine
4: Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University

The objective of the present study was to investigate the effects of aqueous extract from the healthful decoction utilizing *Phellinus linteus* (HDPL) on the growth of human lung carcinoma A549 cells. HDPL treatment declined the cell viability of A549 cells in a concentration-dependent manner and the anti-proliferative effects by HDPL treatment were associated with morphological changes such as membrane shrinking and cell rounding up. HDPL treatment did not affect the distribution of the cell cycle. Western blot analysis and RT-PCT data revealed that the levels of tumor suppressor p53 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in HDPL-treated A549 cells were remained unchanged. However, HDPL treatment inhibited the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA and protein in a concentration-dependent fashion. Additionally, the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), a main determinant of the telomerase enzymatic activity, was progressively down-regulated by HDPL treatment. Taken together, these findings suggest that HDPL-induced inhibition of human lung cancer cell proliferation is associated with the inhibition of several major growth regulatory gene products, such as COX-2 and hTERT, and HDPL may have therapeutic potential in human lung cancer.

Key words : HDPL, COX-2, hTERT

서 론

버섯은 진균류에 속하는 담자균과 자낭균 중 자실체를 형성하는 고등 균류로서 각종 영양소를 다양하게 함유하고 있어 오래전부터 식용 및 민간전통 약재으로 친숙하게 사용되어져 왔다. 버섯류가 생산하는 각종 기능성 생리활성물질은 부작용이 적어 독성면에서는 안전하며 면역기능 강화 및 항암효과가 탁월하다는 연구가 최근 국내·외 연구자들에 의하여 많이 밝혀지고 있다. 그중 상황버섯(목질진흙버섯, *Phellinus linteus*)은 자실체의

열수 추출물이 고형암세포의 종양 형성 저지율이 매우 높았다는 결과가 발표되면서 많은 사람들의 관심의 대상이 되어왔다¹⁾. 그리고 들버섯속 송이과에 속하는 브라질이 원산인 신령버섯 (*Agaricus blazei* Murill) 역시 식용은 물론 풍부한 각종 생리활성 물질의 함유로 약용으로서의 가치가 매우 높은 것으로 최근 평가되어지고 있다²⁾. 상황버섯은 직접적인 항암활성효과^{3,5)} 이외에도, 들연변이 유발 억제⁶⁾ 및 대장암과 방광암 등의 원인이 될 수 있는 장내 세균 유해효소의 활성억제에 매우 효과가 높았으며⁷⁾, 기타 다양한 실험 결과를 통하여 면역활성 증진 효과 역시 매우 큰 것으로 보고 되어지고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 또한 각종 소화기 장애 및 월경불순, 자궁출혈을 포함한 성인여성 질병의 예방에도 탁월한 효과가 있는 것으로 알려지고 있다. 신령버섯 역시 강력한 항암활

* 교신저자 : 최영현, 부산시 부산진구 양정동 산45-1, 동의대학교 한의과대학
· E-mail : choiyh@deu.ac.kr Tel : 051-850-8649
· 접수 : 2004/01/29 · 수정 : 2004/02/25 · 채택 : 2004/03/30

성 및 면역증강 작용을 포함하여¹¹⁻¹³⁾, 항돌연변이원성¹⁴⁾, 혈당강하 작용, 혈압강하 작용 및 콜레스테롤 형성 억제작용 등 다양한 생리활성 작용들이 있는 것으로 알려져 그 활용성에 대한 기대가 매우 높아지고 있다²⁾.

최근 기존 한방에서 사용 중인 처방에 새로이 기능이 동정된 약재를 첨가하거나 교체함으로써 부작용은 줄이면서 기능성은 향상된 새로운 한의학적 복합 처방전의 개발이 많은 관심을 끌고 있다. 본 연구진에서는 이러한 시도를 위한 접근으로 십전대보탕과 팔물탕의 구성성분에 해당되는 주요 약재에 상기 두 가지 종류의 버섯을 혼합한 한의학적 보건기능 개선제(Healthful decoction utilizing *Phellinus linteus*, HDPL)의 개발을 시도하여 선행연구를 실시한 결과, 염증유발 관련 인자들의 발현 조절을 통하여 사염화탄소에 의해 손상된 간 손상의 완화 및 지질대사 활성효과를 관찰한 바 있다¹⁵⁾.

따라서 생체 내 HDPL의 항암·염증 효과의 생화학적 기전의 해석을 좀더 명확히 조사하기 위하여 HDPL 추출물이 암세포의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 인체 폐암세포의 성장에 미치는 HDPL의 영향을 조사하였으며, 암세포의 세포주기 분포도에 미치는 HDPL의 영향, 몇 가지 중요한 세포성장 조절 인자의 발현에 미치는 HDPL의 영향, 염증발현에 가장 중요한 역할을 하는 cyclooxygenase (COX)의 발현 및 염색체 말단의 telomere의 조절관련 유전자 산물의 발현에 미치는 HDPL의 영향등을 조사하여 유의적인 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 암세포배양 및 시료의 처리

본 연구에 사용된 인체 폐암세포 A549는 한국생명공학연구원소에서 분주 받아 사용하였으며, 암세포의 배양을 위해 90 %의 RPMI-1640 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 10 % fetal bovine serum (FBS)에 1 %의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37 °C, 5 % CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

2. 시료의 준비 및 처리

본 실험에 사용된 시료는 선행연구¹⁵⁾에서 사용된 것과 동일한 처방(HDPL)이었으며 처방구성 내용은 Table 1에 나타난 바와 같다. HDPL 수용액 추출물을 얻기 위하여 약재 1 g당 증류수 1 mL을 가하여 환류 냉각장치가 장착된 가열기에서 2시간 이상 끓이고, 이를 3,000 rpm에서 20분간 원심분리시킨 후, 그 상층액을 Whatman 필터 (No. 2)로 걸러내고 감압 농축과 가열을 통해 고형성분을 얻어내어 막자사발로 잘게 마쇄하고 밀봉시켜 초저온 냉동고에 보관하였다. 이를 암세포에 처리하기 위해서 적정 농도로 성장배지에 첨가하여 녹인 다음, 0.22 μm의 pore size를 가진 주사기용 필터유닛을 사용하거나 1회용 펌프 필터 유닛을 사용하여 미생물 및 불순물을 걸러낸 다음, 세포의 성장배지를 갈아주면서 직접 처리하였다.

Table 1. The Composition of healthful decoction utilizing *Phellinus linteus* (HDPL)

| 한약명 | 생약명 | 용량(g) |
|------|----------------------------------|-------|
| 상황버섯 | <i>Phellinus linteus</i> | 4 |
| 신령버섯 | <i>Agaricus blazei</i> Murill | 4 |
| 인삼 | <i>Ginseng Radix</i> | 4 |
| 백출 | <i>Atractylodis Rhizoma Alba</i> | 4 |
| 백복령 | <i>Poria</i> | 4 |
| 감초 | <i>Glycyrrhizae Radix</i> | 4 |
| 숙지황 | <i>Rehmanniae Radix Preparat</i> | 4 |
| 백작약 | <i>Paeoniae Radix Alba</i> | 4 |
| 천궁 | <i>Cnidii Rhizoma</i> | 4 |
| 당귀 | <i>Angelicae Gigantis Radix</i> | 4 |
| 황기 | <i>Astragali Radix</i> | 4 |
| 육계 | <i>Cinamomi Cortex</i> | 4 |
| 오미자 | <i>Schizandrae Fructus</i> | 4 |
| 맥문동 | <i>Liriopeis Tuber</i> | 8 |
| 생강 | <i>Zingiberis Rhizoma</i> | 4 |
| 대추 | <i>Zizyphi Jujubae Fructus</i> | 4 |
| 총량 | | 68 g |

3. MTT assay에 의한 세포 성장억제 조사

세포배양용 96 well plate에 2 × 10⁴개/mL로 희석한 암세포를 함유한 배지를 100 μL/well로 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 다음 HDPL 추출물을 배지에 희석하여 처리한 후 배양하였다. 72시간 후 배지를 제거하고 tetrazolium bromide salt (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 시약을 0.5 mg/mL 농도로 희석하여 200 μL씩 분주하고 3시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 100 μL씩 분주하여 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 세 번을 하였으며, 그에 대한 평균값과 표준 오차를 Sigma Plot 4.0 프로그램 (SPSS Ins.)으로 구하였다.

4. Flow cytometry를 이용한 세포주기 분석

암세포의 세포주기 분포도에 미치는 HDPL의 영향을 알아보기 위하여 정상 및 HDPL이 함유된 배지에서 자란 암세포들을 PBS로 두세 번 씻어내고, 고정액 (70 % ethyl alcohol, 0.5 % Tween 20)을 첨가하여 4 °C에서 고정시킨 후, 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DNA intercalating dye propidium iodide (PI, concentration, 50 μg/mL; Sigma)와 10 kunit의 RNase (Sigma)를 처리하고 4 °C에서 1시간동안 염색하였다. 이를 다시 PBS로 두 번 씻어낸 후, nylon mesh로 세포를 하나씩으로 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson) 프로그램으로 분석하였다.

5. 단백질의 분리, 전기영동 및 Western blotting

선행 방법에 준하여 정상 및 HDPL이 처리된 배지에서 자란 세포들을 lysis buffer로 용해한 후, 고속원심분리로 세포 내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다¹⁶⁾. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene,

NH, USA)으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10 % skim milk를 함유한 PBS-T (0.1 % Tween 20 in PBS)에 4 °C에서 1시간 이상 배양하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 특정 단백질에 대한 항체를 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 ECL (Enhanced Chemiluminescence) 용액 (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, USA)을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 본 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 이차 항체로 사용된 horseradish peroxidase-labeled donkey anti-rabbit immunoglobulin 및 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였다.

6. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNAzol B(TEL-TEST, Inc., Texas, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, Choi et al.¹⁷⁾의 방법에 준하여 oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 관찰 대상 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였다(Table 2). 이때 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1 % agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

Table 2. Sequences of primer used for RT-PCR

| Gene name | | Sequence |
|-----------|-----------|--|
| hTERT1 | Sence | 5'-AGC-CAG-TCT-CAC-CTT-CAA-CC-3' |
| | Antisence | 5'-GTT-CTT-CCA-AAC-TTG-CTG-ATG-3' |
| TEP-12 | Sence | 5'-TCA-AGC-CAA-ACC-TGA-ATC-TGA-G-3' |
| | Antisence | 5'-CCC-CGA-GTG-AAT-CTT-TCT-ACG-C-3' |
| hTR3 | Sence | 5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3' |
| | Antisence | 5'-GTT-TGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3' |
| c-myc | Sence | 5'-AAG-ACT-CCA-GCG-CCT-TCT-CTC-3' |
| | Antisence | 5'-GTT-TTC-CAA-CTC-CGG-GAT-CTG-3' |
| Sp-1 | Sence | 5'-ACA-GGT-GAG-VTT-GAC-CTC-AC-3' |
| | Antisence | 5'-GTT-GGT-TTG-CAC-CTG-GTA-GT-3' |
| iNOS | Sence | 5'-AGA-GAG-ATC-CGG-TTC-ACA-3' |
| | Antisence | 5'-CAC-AGA-GCT-GAG-GGT-ACA-3' |
| p53 | Sence | 5'-GCT-CTG-ACT-GTA-CCA-CCA-TCC-3' |
| | Antisence | 5'-CTC-TCG-GAA-CAT-CTC-GAA-GCG-3' |
| p21 | Sence | 5'-CTC-AGA-GGA-GGC-GCC-ATG-3' |
| | Antisence | 5'-GGG-CGG-ATT-AGG-GCT-TCC-3' |
| COX-1 | Sence | 5'-TGC-CCA-GCT-CCT-GGC-CCG-CCG-CTT-3' |
| | Antisence | 5'-GTG-CAT-CAA-CAC-AGG-CGC-CTC-TTC-3' |
| COX-2 | Sence | 5'-TTC-AAA-TGA-GAT-TGT-GGG-AAA-AT-3' |
| | Antisence | 5'-AGA-TCA-TCT-CTG-CCT-GAG-TAT-CTT-3' |
| GAPDH4 | Sence | 5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3' |
| | Antisence | 5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3' |

1telomerase reverse transcriptase 2telomerase-associated protein 3telomeric repeat binding factor 4glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

결과 및 고찰

1. 폐암세포의 증식에 미치는 HDPL의 영향

준비된 HDPL 시료를 인체 폐암세포 A549에 72시간 동안 처리한 후, MTT assay법에 준하여 HDPL 처리에 의한 폐암세포의 세포증식 억제 정도를 조사하였다. 실험방법에 서술한 것처럼 HDPL 추출물이 처리된 A549 세포를 대상으로 ELISA reader를 이용하여 얻은 흡광도 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 알 수 있듯이 저농도 처리군(1 및 2 mg/ml)서는 대조군에 비하여 큰 차이가 없었으나, HDPL 처리 농도가 증가될수록 흡광도는 더욱 감소되어 3 mg/ml 및 4 mg/ml 처리군에서는 각각 60 % 및 10 % 정도로 떨어졌다. 즉 HDPL의 추출물이 적정 농도이상 처리된 배지에서 자란 암세포는 HDPL 처리농도 의존적으로 세포증식이 강하게 억제되었음을 알 수 있었다.

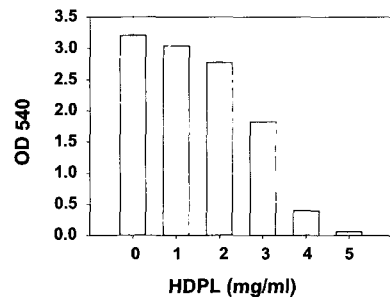


Fig. 1. Inhibition on the cell proliferation by HDPL treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were seeded as described in materials and methods, and treated with various concentrations of HDPL. After 72 h incubation with HDPL, MTT assay was performed. Results are expressed as average from three separate experiments.

2. 인체 폐암세포의 형태 변형에 미치는 HDPL의 영향

HDPL 처리에 의한 암세포의 증식 억제와 연관된 암세포의 형태 변화 관찰을 위하여 다양한 농도 범위로 HDPL 추출물을 72시간 동안 처리한 후 위상차 현미경을 이용하여 정상 및 HDPL 추출물이 처리된 조건에서 배양된 암세포의 모양을 관찰하였다.

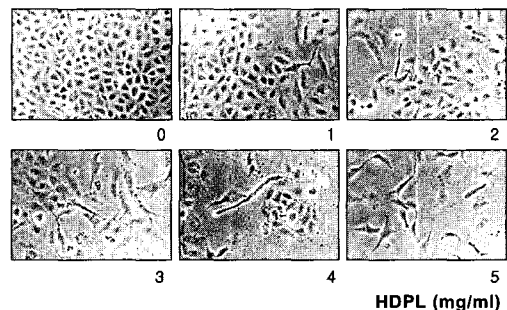


Fig. 2. Morphological changes in A549 human lung carcinoma cells following incubation with HDPL. Exponentially growing cells were incubated with either vehicle alone (0) or HDPL for 72 h. Cell morphology was visualized by light microscopy. Magnification, ×200.

Fig. 2에서 볼 수 있듯이 HDPL의 농도 증가에 따른 세포의 심한 형태적 변형이 관찰되었는데, 처리된 HDPL 추출물의 농도

가 증가될수록 전체적으로 세포질이 응축되었다. 또한 세포의 모양이 길어지면서 돌기와 같은 형태가 분지를 이루기 시작하였고, 고농도 처리군에서는 많은 암세포들이 부착 능력이 상실되어 배지위로 부유하기 시작하였으며 배양 접시에 부착된 세포들도 심한 형태적 변이를 수반하였다.

3. 세포주기 분포에 미치는 HDPL의 영향

세포주기의 조절은 각 주기별 관여하는 다양한 유전자들에 의해 조절되는데, 기본적으로 세포주기 checkpoint 각 시기에 요구되어지는 양성 조절인자인 cyclins에 의하여 cyclin-dependent kinases (Cdk)의 연속적인 활성화와 불활성이 결정되어진다¹⁸⁻¹⁹.

세포주기 조절의 관점에서 암세포는 세포주기의 비정상화에 기인된 질병으로 정의 될 수 있으며, 특정 시기의 세포주기 억제제는 세포주기 조절 양성인자의 발현 저하 또는 음성 조절 인자의 과발현에 의한 것으로 요약될 수 있다²⁰⁻²¹. 따라서 HDPL의 처리에 의한 암세포의 성장억제가 세포주기 특정 시기의 진행억제와 연관성을 지니는지의 여부를 조사하기 위하여 세포주기 분포에 미치는 HDPL의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 다양한 농도의 HDPL이 처리된 배지에서 72시간 배양한 후 flow cytometry를 이용하여 분석한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. 즉 HDPL이 함유되지 않은 정상 배지에서 자란 암세포의 경우 G1, S 및 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 약 69 %, 15 % 및 16 % 정도였다. 그러나 HDPL이 처리된 배지에서 자란 암세포에서도 대조군에 비하여 별다른 차이점을 거의 관찰할 수 없었다(3 mg/ml 처리군에서 63 %, 17 % 및 18 %, 4 mg/ml 처리군에서 63 %, 19 % 및 14 %). 대부분의 항암성 효과를 가지는 다양한 약 불이나 복합물의 처리에 의한 암세포의 성장억제가 세포주기 특정 시기의 진행 억제와 관련이 있는 점으로 미루어 본 연구의 결과는 세포주기 비의존적 암세포의 성장억제란 점에서 매우 특이적인 결과로 생각되어진다. 하지만 apoptosis에 의한 암세포의 사멸을 의미하는 sub-G1기에 해당하는 세포군의 빈도는 HDPL 농도 의존적으로 증가하였다.

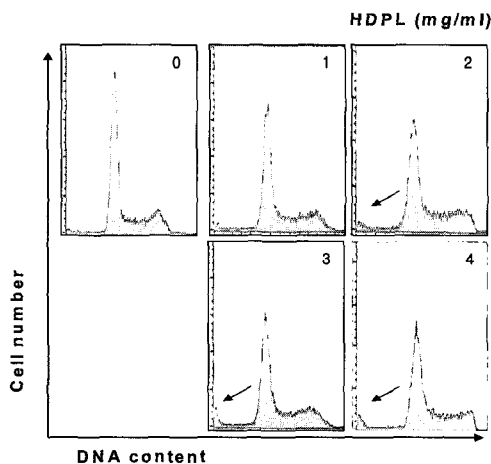


Fig. 3. Effects of HDPL on cell cycle distribution of human lung carcinoma A549 cells. Exponentially growing cells have been grown in different concentration of HDPL for 72 h, then analyzed by flow cytometry as described in materials and methods.

4. p53 및 p21WAF1/CIP1의 발현에 미치는 HDPL의 영향

HDPL 추출물의 처리에 의한 폐암세포의 증식억제에 따른 종양억제 유전자 또는 세포주기 조절 억제자들의 발현 변화와 상관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 현재까지 알려진 종양억제 유전자 및 Cdk inhibitor 중 가장 많은 연구가 이루어졌으며, 세포주기 전반에 걸쳐 매우 중요한 조절자 역할을 하는 p53 및 p21WAF1/CIP1의 전사 및 번역수준에서의 발현을 RT-PCR 및 Western blotting으로 조사하였다. Fig. 4A 및 B의 결과에서 볼 수 있듯이 HDPL 처리에 따른 암세포의 성장억제에 두 유전자의 전사 및 번역 수준 모두에서 별다른 차이점이 발견되지 않았으며, p53 단백질의 인산화에도 아무런 영향을 미치지 않았다. Cdk inhibitor인 p21WAF1/CIP1은 p53의 발현 증가에 의하여 전사 수준이 조절될 수 있으며²¹⁻²⁴, 암세포의 증식 억제, apoptosis 및 분화 유도에 중요한 역할을 하는 세포주기 전반에 걸친 가장 중요한 조절인자란 점^{20,25}에서 HDPL 추출물의 처리에 의한 발현의 변화가 없었다는 것은 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 HDPL의 처리에 의한 암세포의 증식이 특정 세포주기의 교란과 연관성이 없는 매우 특이적인 결과라고 추측되어진다. 그러나 본 연구의 결과만으로 HDPL에 의한 폐암세포의 세포주기 교란에 관한 명확한 증거는 제시할 수 없으며, 세포주기 분석과 관련 유전자들의 kinase 활성화도 검사 등을 통한 후속적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

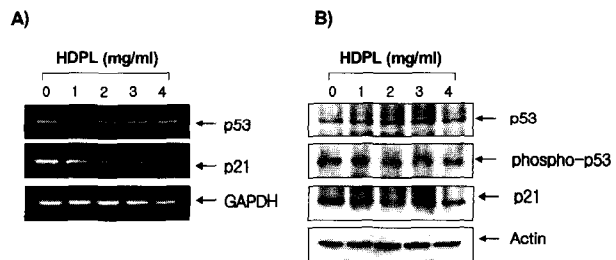


Fig. 4. Effects of HDPL treatment on the levels of tumor suppressor p53 and Cdk inhibitor p21 mRNA and protein in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with HDPL for 72 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using p53 and p21 primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with HDPL for 72 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% or 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-p53 and anti-p21 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

5. COXs의 발현에 미치는 HDPL의 영향

염증을 포함한 다양한 생체 반응에서 prostaglandin은 세포 분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다²⁶. Prostaglandin의 합성에서 2가지의 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하며, COX-2는 암을 포함한 세포의 성장 및 분화와 연관된 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다²⁷⁻²⁸. 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2와 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 높은 수준으로 발현되고 있으며 이들 두 유전자의 발현을 증대시킬 경우

apoptosis에 대한 저항성을 가지는 점으로 보아 특히 염증반응과 함께 세포의 암화에 COX-2는 iNOS와 밀접한 관계를 가진다고 볼 수 있다^{26,29}). 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관 신생 및 전이능이 높아지고 apoptosis를 막는다는 점과 COX-2 특이적 저해제에 의한 angiogenesis와 종양형성의 억제 등의 결과에서 이 유전자의 선택적 조절에 의한 암 예방전략이 대두되고 있다^{29,30}). 한편 암 뿐만 아니라 면역계 질환, 심혈관 질환, 당뇨 등과 관련된 유전자의 promoter 영역에 결합하여 그들의 유전자발현을 유도하는 nuclear factor kappa B에 의하여 COX-2 발현이 조절된다는 보고들에서도 COX-2의 중요성을 잘 알 수 있다^{29,31}). 이러한 COX-2의 최근 연구 방향은 이러한 전사활성 요소와 연관된 상위 신호전달 경로에 많은 관심이 모아지고 있으며 이들의 활성을 조절할 수 있는 물질의 탐색작업에 많은 비중을 두고 있다. 따라서 HDPL이 처리된 A549 폐암세포를 대상으로 COXs 및 iNOS의 mRNA 발현 변화 가능성을 먼저 조사하여 보았다. Fig. 5의 결과에서 볼 수 있듯이 HDPL의 처리에 의한 COX-1 및 iNOS의 발현에는 아무런 영향이 없었으나, COX-2의 경우 HDPL 처리 농도 의존적으로 다소 감소되었음을 알 수 있었다. 단백질 발현의 수준에서도 COX-2 선택적으로 HDPL 처리에 따라 발현이 다소 감소되었다.

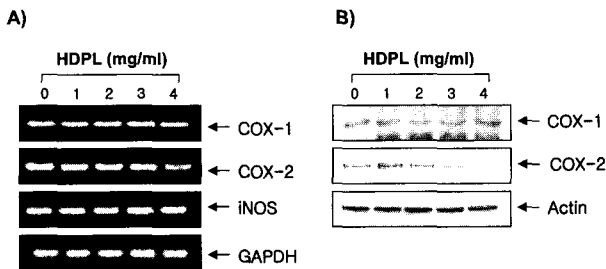


Fig. 5. Down-regulation of COX-2 expression by HDPL treatment in A549 human lung carcinoma cells. (A) Cells were incubated with HDPL for 72 h and total RNAs were isolated and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene. (B) Cells were incubated with HDPL for 72 h, lysed and cellular proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were probed with the anti-COX-1 and anti-COX-2 antibodies. Proteins were visualized using ECL detection system. Actin was used as a loading control.

6. Telomerase 관련 조절인자의 발현에 미치는 HDPL의 영향

Telomere는 염색체의 말단 부위에 repeat sequences (TTAGGG)로 이루어져 있으며, 이런 반복구조의 형성 및 유지에 관여하는 효소가 telomerase이다³²). 정상 체세포에서는 telomerase의 활성이 없기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90 % 이상에서는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 hTERT가 과발현되어 있고 이로 인한 높은 telomerase의 활성을 나타내고 있다. 따라서 노화, 혈관신생 및 면역계질환 등에서 뿐 만 아니라 암의 발생과 진행도 이들과 밀접한 연관성이 있으며, 암의 진단과 진행의 정도를 나타내는 지표로 사용될 수 있음을 시사하여 준다^{32,33}). 노화의 개념에서 결국 telomere의 소실은 염색체의 안정성이 상실되는 것이며 이는 DNA damaging agent에 의한 p53 및

p21WAF1/CIP1의 발현증가로 인한 cell cycle arrest 유발로 설명되어지고 있다^{34,35}). 특히 암과 연관된 부분에서 telomerase의 활성은 hTERT 유전자의 발현 조절에 의한 것이고, hTERT 유전자의 promoter 부위에는 다른 유전자의 promoter 보다 훨씬 더 많은 전사조절인자의 결합부위를 보유하고 있어 activator 또는 repressor로 작용할 수 있다^{32,36}). 이러한 중요성을 고려하여 HDPL의 처리에 의한 폐암세포의 증식 억제가 폐암세포 염색체 말단에 존재하는 telomere의 조절과 어떤 관계가 있는지를 조사하였다. Fig. 6의 결과에서 알 수 있듯이 HDPL 추출물의 처리에 의하여 hTERT 유전자의 전사수준은 HDPL 처리 농도 의존적으로 가장 많이 감소되었으며, 또 다른 조절인자인 TEP-1도 다소 감소되었다. 그러나 hTERT의 전사조절에 중요한 역할을 하는 c-myc 및 Sp-1의 발현에는 큰 변화가 없었다.

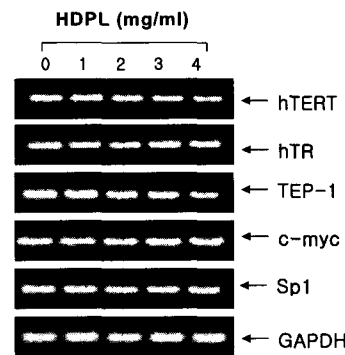


Fig. 6. Down-regulation of hTERT mRNA by HDPL treatment in A549 human lung carcinoma cells. Cells were treated with various concentrations of HDPL. After 72h incubation, total RNAs were isolated, and RT-PCR was performed using indicated primers. GAPDH was used as a house-keeping control gene.

이상의 연구 결과에 의하면 HDPL의 처리에 의한 인체폐암 세포의 성장억제는 apoptosis 유발과 뚜렷한 연관성이 있었으며, HDPL에 의한 암세포 증식억제 및 apoptosis 유발과정에는 세포 주기 특정기의 교란 없이 COX-2 특이적 발현 억제 및 염색체의 telomere 길이 조절에 중요한 역할을 하는 hTERT 유전자의 발현 저하가 연관되어 있었다. 특히 COX-2의 선택적 저해효과는 HDPL이 항암효과뿐만 아니라 항염증작용 및 면역증진효과도 매우 높을 것으로 추측되어진다. 이러한 연구 결과는 새롭게 조성된 버섯 복합 한방처방의 생화학적 항암기전 해석을 이해와 향후 지속적인 연구를 위한 귀중한 자료가 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구의 일부는 웨이블텍(주) 및 농림부 농림기술개발사업 (첨단기술개발분야)의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Ikekawa, T., Nakanish, M., Uehara, N., Chihara, G.,

- Fukuoka, E., Antitumor activity of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. Gann 59, 155-157, 1968.
2. Mizuno, T., Kawariharatake, *Agaricus blazei* Murill: medicinal and dietary effects. Food Rev. Int. 11, 167-172, 1995.
 3. Lee, K.Y., Han, M.J., Park, S.Y., Kim, D.H., *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. Kor. J. Food Sci. Technol. 32, 477-480, 2000.
 4. Cho, J.H., Cho, S.D., Hu, H., Kim, S.H., Lee, S.K., Lee, Y.S., Kang, K.S., The roles of ERK1/2 and p38 MAP kinases in the preventive mechanisms of mushroom *Phellinus linteus* against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide. Carcinogenesis 23, 1163-0069, 2002.
 5. Lee, H.J., Lee, H.J., Park, J.M., Song, G.Y., Kang, K.S., Kim, S.H., Study on antitumor and immunomodulatory effects of Cambodian *Phellinus linteus*, Kor. J. Oriental Physiol. Pathol. 16, 332-337, 2002.
 6. Ji, J.H., Kim, M.N., Chung, C.K., Ham, S.S., Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 29, 322-328, 2000.
 7. Kim, D.H., Choi, H.J., Bae, E.A., Effects of artificially cultured *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacterial enzymes and rat intestinal β -glucocidases. J. Fd. Hyg. Safety 13, 20-23, 1998.
 8. Oh, G.T., Han, S.B., Kim, H.M., Han, M.W., Yoo, I.D., Immunostimulating activity of *Phellinus linteus* extracts to B-lymphocyte. Arch. Pharm. Res. 15, 379-381, 1992.
 9. Kim, H.M., Han, S.B., Oh, G.T., Kim, Y.H., Hong, D.H., Hong, N.D., Yoo, I.D., Stimulation of hormonal and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. Int. J. Immunopharm. 18, 295-303, 1996.
 10. Pyo, M.Y., Hyun, S.M., Yang, K.S., Effects of *Phellinus linteus* extracts on the hormonal immune response in normal and cyclophosphamide-treated mice. J. Applied Pharmacol. 9, 194-200, 2001.
 11. Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. Carbohydr. Res. 189, 267-273, 1989.
 12. Fujimiya, Y., Kobori, H., Oshiman, K., Soda, R., Ebina, T., Tumorcidal activity of high molecular weight polysaccharides derived from *Agaricus blazei* via oral administration in the mouse tumor model. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 45, 246-252, 1998
 13. Chun, H.S., Choi, E.H., Kim, H.J., Choi, C.W., Hwang, S.J., *In vitro* and *in vivo* antitumor activities of water extracts from *Agaricus blazei* Murill. Food Sci. Biotechnol. 10, 335-340, 2001.
 14. Ji, J.H., Kim, M.N., Choi, K.P., Chung, C.K., Ham, S.S., Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Agaricus blazei* extracts. Kor. J. Food Sci. Technol. 32, 1371-1378, 2000.
 15. Kang, K.H., Lee, J.H., Choi, Y.H., Choi, B.T, Lee, Y.T., The effects of healthful decoction utilizing *Phellinus linteus* in carbon tetrachloride-injected rats. Kor. J. Oriental Physiol. Pathol., 18, 114-121, 2003.
 16. Choi, Y.H., Lee, S.J., Nguyen, P. Jang, J.S., Lee, J., Wu, M., Takano, E. Maki, M., Henkart, P., Trepel, J.B., Regulation of cyclin D1 by calpain protease. J. Biol. Chem. 272, 28479-28484, 1997.
 17. Choi, Y.H., Kong, K.R., Kim, Y.A., Jung, K.O., Kil, J.H., Rhee, S.H., Park, K.Y., Induction of Bax and activation of caspases during β -sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. Int. J. Oncol. 23, 1657-1661, 2003.
 18. Sherr, C.J., The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. Cancer Res. 60, 3689-3695, 2000.
 19. Weinberg, R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 81, 323-330, 1995.
 20. Elledge, S.J., Harper, J.W., Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. Curr. Opin. Cell Biol. 6, 847-852, 1994.
 21. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J., The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75, 805-816, 1993.
 22. El-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., Wiman, K.G., Mercer, W.E., Kastan, M.B., Kohn, K.W., Elledge, S.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. Cancer Res. 54, 1169-1174, 1994.
 23. Miyashita, T., Reed, J.C., Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 80, 293-299, 1995.
 24. Xiong, Y., Hannon, G., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D., p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 366, 701-704, 1993.
 25. Evans, V.G., Multiple pathways to apoptosis. Cell Biol. Int. 17, 461-476, 1993.
 26. Giercksky, K.E., COX-2 inhibition and prevention of cancer. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 15, 821-833, 2001.
 27. Vainio, H., Is COX-2 inhibition a panacea for cancer prevention? Int. J. Cancer 94, 613-614, 2001.
 28. Dempke, W., Rie, C., Grothey, A., Schmoll, H.J., Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? J. Cancer Res. Clin. Oncol. 127, 411-417, 2001.

29. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee, S.S., Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutat. Res.* 480, 243-268, 2001.
30. Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S., Hori, M., Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab. Invest.* 79, 1469-1477, 1999.
31. Yamamoto, Y., Gaynor, R.B., Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 107, 135-142, 2001.
32. Poole, J.C., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O., Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 269, 1-12, 2001.
33. Kyo, S., Inoue, M., Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy. *Oncogene* 21, 688-697, 2002.
34. Vaziri, H., West, M.D., Allsopp, R.C., Davison, T.S., Wu, Y.S., Arrowsmith, C.H., Poirier, G.G., Benchimol, S., ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J.* 16, 6018-6033, 1997.
35. Narayan, S., Jaiswal, A.S., Multani, A.S., Pathak, S., DNA damage-induced cell cycle checkpoints involve both p53-dependent and -independent pathways: role of telomere repeat binding factor 2. *Br. J. Cancer* 85, 898-901, 2001.
36. Cerni, C., Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat. Res.* 462, 31-47, 2000.