[UCI]I804:24011-200000

2014년 8월
박사학위논문

KB 사람 구강 편평 암세포에서 *Lyophyllum shimeji*로부터 분리한 단백질 추출물의 항암활성

조선대학교 대학원

치 의 학 과

정 종 원

2014년 8월 박사학위논문 KB 사람 구강 편평 암세포에서 *Lyophyllum shimeji*로부터 분리한 단백질 추출물의 항암활성 정 종 원

KB 사람 구강 편평 암세포에서 *Lyophyllum shimeji*로부터 분리한 단백질 추출물의 항암활성

Anti-cancer activity of the protein extract from *Lyophyllum shimeji* in KB human oral squamous cell carcinoma

2014년 8월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

정 종 원

dCollection @ chosun

KB 사람 구강 편평 암세포에서 *Lyophyllum shimeji*로부터 분리한 단백질 추출물의 항암활성

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2014년 4월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

정 종 원

dCollection @ chosun

정종원의 박사학위 논문을 인준함

위원장 강릉대학교 교 수 박 영 욱 (인)

위 원 조선대학교 교 수 정 재 헌 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 춘 성 (인)

위 원 조선대학교 교 수 오 지 수 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 수 관 (인)

2014년 6월

조선대학교 대학원

dCollection @ chosun

목 차

ABSTRACT ····· iii

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 3

Ⅲ. 결 과 ····· 6

Ⅳ. 고 찰 ····· 10

Ⅳ. 결 론 ····· 12

참고문헌 ····· 13

dCollection @ chosun

List of figures

Figure 1. Effect of the protein extract from *Lyophyllum shimeji* on cell viability in KB human oral squamous cell carcinoma 6

Figure 2. Fragmentation of inter-nucleosomal DNA by the protein extract from *Lyophyllum shimeji* in KB human oral squamous cell carcinoma 7

Figure 3. The expression levels of apoptotic related factors by the protein extract from *Lyophyllum shimeji* in KB human oral squamous cell carcinoma 8

Figure 4. Live/dead assay of KB oral squamous cell carcinoma by the protein extract from *Lyophyllum shimeji* 9

dCollection @ chosun

ABSTRACT

Anti-cancer activity of the protein extract from *Lyophyllum shimeji* in KB human oral squamous cell carcinoma

By Jung, Jong Won
Advisor : Prof. Su-Gwan Kim D.D.S., Ph.D.
Department of Dentistry,
Graduate School of Chosun University

There are various mushroom proteins with interesting biological activities, such as flavonoid, lectins, ribosome inactivating proteins and other proteins, which have become popular sources of natural anti-tumor agents. Many mushrooms have been reported to have cancer-preventing properties. However, little research has been conducted verifying the anti-tumor activities of *Lyophyllum shiemeji* mushrooms.

This study examined the effect of protein extract from *Lyophyllum shiemeji* on anti-cancer effect and molecular mechanism of KB human oral squamous cell carcinoma. To understand of molecular mechanism whether its cell death is related with apoptosis pathway, performed DNA fragmentation, western blot and LIVE-DEAD cell staining. to explore the anti-cancer activity of the protein extract from *Lyophyluum shimeji,* we performed MTT assay. KB cells were treated with protein extract from *Lyophyllum shiemeji* at 100 ㎍/㎖, 125 ㎍/㎖, 150 ㎍/㎖, 175 ㎍/㎖ and 200 ㎍/㎖ for 24 hours. The protein extract from *Lyophyllum shiemeji* displayed the inhibitory activity

dCollection @ chosun

against KB cells with an IC_{50} value of 150 ㎍/㎖ and the strongest inhibition percent was 91.66% at the concentration of 200 ㎍/㎖. It was observed that the protein extract from *Lyophyllum shiemeji* induced genomic DNA ladder formation. In addition, it was confirmed that protein extract from *Lyophyllum shiemeji* induced significantly increase cleaved caspase-7 activation and PARP cleavage in KB cells. Activation of cleaved caspase-9 induced by protein extract from *Lyophyllum shiemeji* suggested that protein extract from *Lyophyllum shiemeji* -induced signaling was mediated through a mitochondrial related pathway. Furthermore, protein extract from *Lyophyllum shiemeji* treatment KB cells dramatically increase the red color (apoptotic cell) by fluorescence microscopy.

These findings demonstrated that protein extract from *Lyophyllum shiemeji* -induced apoptosis in KB human oral squamous cell carcinoma involves the mitochondrial intrinsic apoptotic signaling pathway. It also suggest that protein extract from *Lyophyllum shiemeji* be developed as a chemotherapeutic agent and adjvant for the management of oral squamous cell carcinoma.

dCollection @ chosun

I. 서 론

구강암은 구강 및 인후부에 발생하는 악성종양으로 90% 이상이 입 안의 점막을 구성하는 상피세포에서 기원한 편평 세포암(squamous cell carcinoma)이다(1). 이외에 구강점막의 작은 침샘에서 발생되는 타액선암, 턱뼈나 안면부의 근육 등에 발생되는 육종, 구강점막의 협점막, 잇몸 등에 검은 반점을 형성하는 악성흑색종 그리고 악성림프종 등이 있다(2, 3). 구강암의 정확한 발병기전은 아직 밝혀지지 않았지만 일반적으로 알려진 구강암의 발병 요인으로는 흡연과 음주, 바이러스, 방사선이나 자외선, 식습관과 영양결핍이 알려져 있다(4, 5). 2013년에 발표된 한국 중앙 암등록 본부 자료에 의하면 2011년에 우리나라에서는 연 218,017건의 암이 발생되었는데, 그 중 구강암은 남녀를 합쳐 연 533건으로 전체 암 발생의 0.2%를 차지하였다. 최근 노령화에 의해 연령대별로는 60대가 28.0%로 가장 많고, 70대가 25.0%, 50대가 22.0%이며 우리나라뿐만 아니라 세계 여러 국가에서도 비슷한 동향과 유형을 보이며 구강 및 인후암으로 인한 발생률과 사망률이 계속 증가하고 있다(6, 7). 구강암은 육안으로 판별이 가능하여 조기진단이 용이하고 다른 암에 비해 발생빈도는 낮으나, 악성도가 높아 5년 이내 생존률이 50% 정도로 매우 치명적이다(8). 현재까지 구강암 치료는 일반적으로 외과적 수술 및 방사선치료이며 부가적인 방법으로 약물치료를 병행하는 경우가 있다. 그러나 외과적 수술 후 안면 결손으로 인한 수술 후 재건 과정이 힘들고, 환자의 삶의 질을 심각하게 떨어뜨리므로 이를 고려하여 약물에 의한 구강암 치료 개발이 요구된다(9). 현재 임상적으로 5-Fluorouracil (5-FU), cisplatin, carboplatin, taxol 등의 항암제를 사용하고 있으나 백혈구 감소증, 소화기계 합병증, 골수기능 저하, 면역력 저하 등과 같은 심각한 부작용으로 인해 사용에 큰 제한을 받고 있다(10-13). 항암제의 부작용을 최소화하기 위해 최근에는 국내·외적으로 버섯, 해초류 그리고 수산물과 같은 천연물로부터 항암효과를 가지는 생리활성 물질을 찾는 연구가 활발하게 이루어지고 있다(14-16).

버섯은 예로부터 항암 효과, 항산화효과, 혈행 개선, 콜레스테롤 수치 감소, 면역 체계 강화 등 다양한 생리활성효과를 가지고 있는 것으로 보고되었다(17, 18). 만가닥 버섯(*Lyophyllum shimeji*)은 국내 식용버섯으로 알려져 있으며 주요성분으로는 polyphenol, flavonoid, lyophyllin, lyophyllum 등이 포함되어 있으며 항암, 항산화, 항균효과가 있는 것으로 알려져 있다(19). 자실체에는 리보좀 억제 단백질(ribosome inactivating

dCollection @ chosun

protein)로 알려져 있는 20 kDa인 lyophyllin 식물성 독소 단백질이 존재하며, 세포 내에서 리보좀의 불활성화에 의한 단백질 합성이 억제됨으로써 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다(20, 21). 리보좀의 불활성화에 의한 세포독성을 갖는 식물성 독소로는 아브린(abrin), 로비닌(robinin), 리신(ricin), 크로틴(crotin) 등이 존재한다. 식물성 독소로 알려져 있는 아브린(abrin)을 Junket 혈액암 세포에 처리하였을 때 미토콘드리아 외막에 존재하는 Bcl-2 세포사멸 억제 단백질의 발현을 감소시켜 세포질로 cytochrome C를 방출하여 caspase -3, -9을 활성화 시켜 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다(22). 만가닥 버섯 단백질 추출물을 인간유래 혈액암 세포주 HL60에 처리하였을 때 종양 증식 억제 효과가 있으며(23), 만가닥 버섯의 메탄올 추출물과 헥산, 클로로포름 분획 추출물을 간암 세포주 HepG2와 결장암 세포주 HT29에 처리 하였을 때 세포주기 조절인자로 알려져 있는 G1 cycline의 발현이 감소함으로서 세포주기의 G1 단계를 차단하여 종양 억제효과가 있는 것으로 보고되었다(24). 위와 같이 만가닥 버섯의 다양한 생리활성 물질이 다양한 암세포에서 면역 활성을 증가 시켜 항암효과를 나타내는 점에서 주목 받고 있다(25, 26). 본 연구에서는 KB 사람 구강 편평 암세포에 만가닥 버섯 단백질 추출물을 처리하여 항암효과를 확인하고 나아가 분자적 기전을 연구하여 구강암에 대한 새로운 천연물 유래 항암제 개발에 초석이 될 것으로 사료된다.

dCollection @ chosun

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 만가닥 버섯 단백질 추출물의 제조

만가닥 버섯 100 g을 분쇄하여 물 200 ㎖을 첨가한 후 4℃에서 하루 동안 추출하고, 추출물을 여과지를 이용하여 1번 여과하고 4배의 에탄올을 희석한 후, 4℃에서 6 시간 동안 침전시켜 초고속 원심분리기를 이용하여 10 g의 단백질 추출물을 얻어 사용하였다. 단백질 추출물은 인산완충액에 녹인 후 세포 배양액에 희석하여 사용하였다. Anti-cleaved caspase-9, -7, PARP(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)와 actin (biocam)을 사용하였다.

2. 세포 배양

사람 구강 편평 암세포(KB, ATCC No, CCL17)는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 항생제(100 ㎍/㎖ penicillin, 100 Unit streptomysin)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)을 사용하였다.

3. MTT assay

만가닥 버섯 단백질 추출물에 대한 KB 사람 구강 편평 암세포의 생존율을 조사하기 위하여 12 well culture plate에 2×10^5 cells 세포를 seeding 하고 24 시간 후 만가닥 버섯 단백질 추출물을 100 ㎍/㎖, 125 ㎍/㎖, 150 ㎍/㎖, 175 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖의 다양한 농도로 처리하였다. 만가닥 버섯 단백질 추출물을 처리한 12 well plate에 있는 배양액을 제거 한 후 100 ㎕ MTT 용액을 첨가 하였다. MTT 용액이 첨가된 12 well plate를 37℃, 5% CO_2 배양기에서 4 시간 반응시킨 후 배양액을 제거하고 500 ㎕의 DMSO를 첨가하여 세포를 녹인 후 96 well culture plate에 100 ㎕ 샘플을 분주하여 microplate autoreader ELISA(Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT)를 사용하여 562 ㎚ 흡광도로 세포 생존률을 확인하였다.

5. DNA fragmentation assay

DNA 분절 현상을 조사하기 위해 4×10^5으로 KB 사람 구강 편평 암세포를 6 well

Collection @ chosun

plate에 배양 하여 만가닥 버섯 단백질 추출물을 ㎖당 150 ㎍ 처리하고 24 시간 후 세포를 수집하였다. 수집한 세포에 500 ㎕ 인산완충액과 55 ㎕ lysis buffer로 용해시켜 4℃에 20 분 동안 반응 시킨 후 원심분리 하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 동량의 phenol:chloroform:isoamylalchol(25:24:1) solution을 넣고 상온에서 5 분 동안 반응 한 뒤 원심분리 하여 genomic DNA을 분리하였다. 분리한 genomic DNA를 2배의 100% ethanol과 1/10의 3M sodium acetate를 넣어 -20℃에서 10 분간 반응한 뒤 원심분리 하여 genomic DNA를 농축시켰다. genomic DNA를 3차 증류수에 용해시켜 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel을 이용하여 100 voltage에서 40 분 전기영동 하여 UV transilluminator(Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)하에서 genomic DNA 분절을 관찰하였다.

6. Western blot analysis

2×10^5의 KB 세포를 12 well plate 에 배양 후 만가닥 버섯 단백질 추출물을 ㎖당 150 ㎍ 처리하고 24시간 후 원심분리 하여 세포를 수집하여 인산완충액으로 두 번 세척하고 단백질 lysis buffer를 이용하여 단백질 추출물을 분리하여 BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockgord, IL, USA)을 이용하여 정량하였다. 단백질 추출물 20 ㎍을 8%, 12% SDS-PAGE에 loading 한 후 120 voltage에서 2 시간 동안 전기영동 하였다. 젤상 에서 분리 된 단백질은 western blot analysis을 수행하기 위해 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 이동시킨 후, blocking solution(5% nonfat dried milk in TBS containing 0.1% Tween-20)을 이용하여 1 시간 동안 blocking하였다. 1차 항체 cleaved caspase -7, -9, PARP(Cell Signaling Technology)과 actin (Biocam)을 TBS-T(TBS containing 0.1% Tween-20)를 이용하여 1:2,000 비율로 희석한 후 4℃ 조건하에 16 시간 동안 반응하였다. TBS-T를 이용하여 세 번 세척 후 2차 항체 anti-rabbit(Amersham Biociences, UK)은 TBS-T를 이용하여 1:2,000 비율로 희석하여 1 시간 반응하고 ECL kit(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 western blot analysis를 수행하였다.

7. Live/Dead cell staining

LIVE/DEAD cell staining kit(Invitrogen, Molecular Probes, Eugene,

dCollection @ chosun

Oregon, USA)는 생존 세포양과 죽은 세포양을 평가하는데 일반적으로 사용되고 있으며 LIVE/DEAD cell staining kit는 1 mM live-dye(FITC-annexin V)와 2.5 ㎎/㎖ propidium iodide(PI)로 구성되어 있다. live-dye는 막 투과성이며 모든 세포막을 통과하여 핵산에 염색되어 녹색 형광을 나타낸다. 반면 PI는 막비투과성이며 세포막이 손상된 세포의 핵산에 염색되고 붉은색 형광을 나타낸다. FITC-annexin V와 PI 형광물질로 염색 시 살아있는 세포에 FITC-annexin V에 의해서 녹색으로 염색이 되며, 죽은 세포는 PI에 의해서 붉은색으로 염색 된다. 따라서 본 실험에서는 FITC-annexin V와 PI을 동시에 KB 사람 구강 편평 세포암에 처리하였다.

8. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 평균 ± 표준편차로 나타냈고, 각 실험군간 유의성 검정은 ANOVA 후에 student t-test를 하였으며, p-value가 0.05 미만(*, $p<0.05$)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

dCollection @ chosun

Ⅲ. 결 과

1. 만가닥 버섯 단백질 추출물이 KB 사람 구강 편평 암세포의 성장 억제효과

KB 사람 구강 편평 암세포에서 만가닥 버섯 단백질 추출물에 의한 세포성장 억제효과를 조사하기 위해 단백질 추출물을 100 ㎍/㎖, 125 ㎍/㎖, 150 ㎍/㎖, 175 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖의 농도로 처리하여 24 시간 후 MTT assay 을 수행하였다. 그 결과 KB 사람 구강 편평 암세포에 ㎖당 150 ㎍ 농도로 처리한 well에서 50% 세포성장이 감소함을 확인하였으며 IC_{50} 값이 150 ㎍/㎖ 임을 확인하였으며 ㎖당 200 ㎍ 농도에서 90% 이상 세포성장이 억제됨을 확인하였다(Fig. 1).

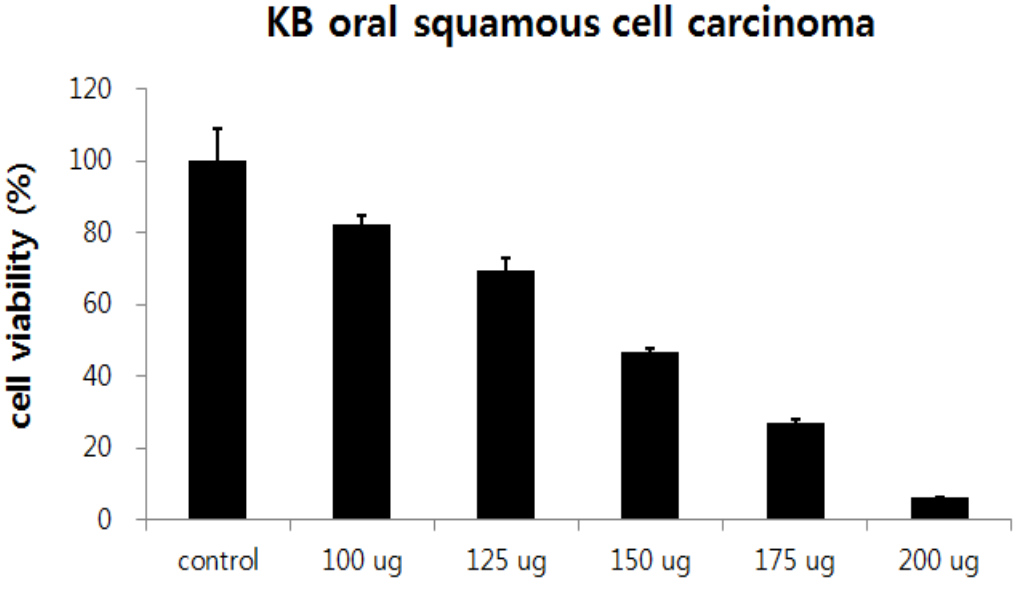

Figure 1. Effect of the protein extract from *Lyophyllum shimeji* on cell viability in KB human oral squamous cell carcinoma. Cells were treated with various concentration of the protein extract from *Lyophyllum shimeji* in KB human oral squamous cell carcinoma. Cells viabilities were determined by the MTT assay. The percentage of cell viability was calculated as a ration of 562 nm. Results were expressed as percent of the control. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiemtns.

dCollection @ chosun

2. 만가닥 버섯 단백질 추출물에 의한 KB 사람 구강 편평 암세포 핵 내 세포사멸의 형태학적 특성 확인

만가닥 버섯 단백질 추출물에 의한 KB 사람 구강 편평 암세포의 성장억제가 세포사멸에 의해서 나타나는 것임을 확인하기 위해 ㎖당 150 ㎍ 농도로 처리하여 24 시간 동안 배양 후 세포를 수집하여 genomic DNA 분절이 일어남을 확인하였다(Fig. 2).

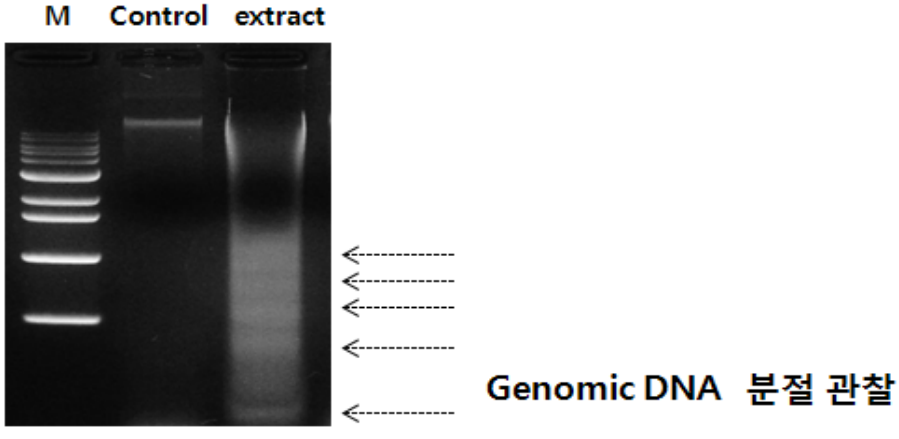

Figure 2. The protein extract from *Lyophyllum shimeji* induced DNA Fragmentation in KB human oral squamous cell carcinoma. Cells were seeded at 4×10^5 and then treated with 150 ㎍/㎖ of the protein extract from *Lyophyllum shimeji* for 24 hours. Genomic DNA was subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis.

3. 만가닥 버섯 단백질 추출물이 KB 사람 구강 편평 암세포의 세포사멸 유도 분자적 기전

만가닥 버섯 단백질 추출물이 KB 사람 구강 편평 암세포의 세포사멸을 일으키는 분자적 기전을 확인하기 위해 세포사멸에 가장 중요한 인자로 알려져 있는 caspase의 활성화를 확인하였다. 내인성 세포사멸 유도의 하방에서 활성화 되어 신호를 전달하는 cleaved caspase -7, -9의 발현을 확인하고, caspase 활성화가 유도됨에 따라 PARP의 절단이 일어나 세포사멸이 유도됨을 확인하였다. 반면 추출물을 처리하지 않은 KB 사람 구강 편평 암세포에서는 활성화가 일어나지 않았다(Fig. 3).

dCollection @ chosun

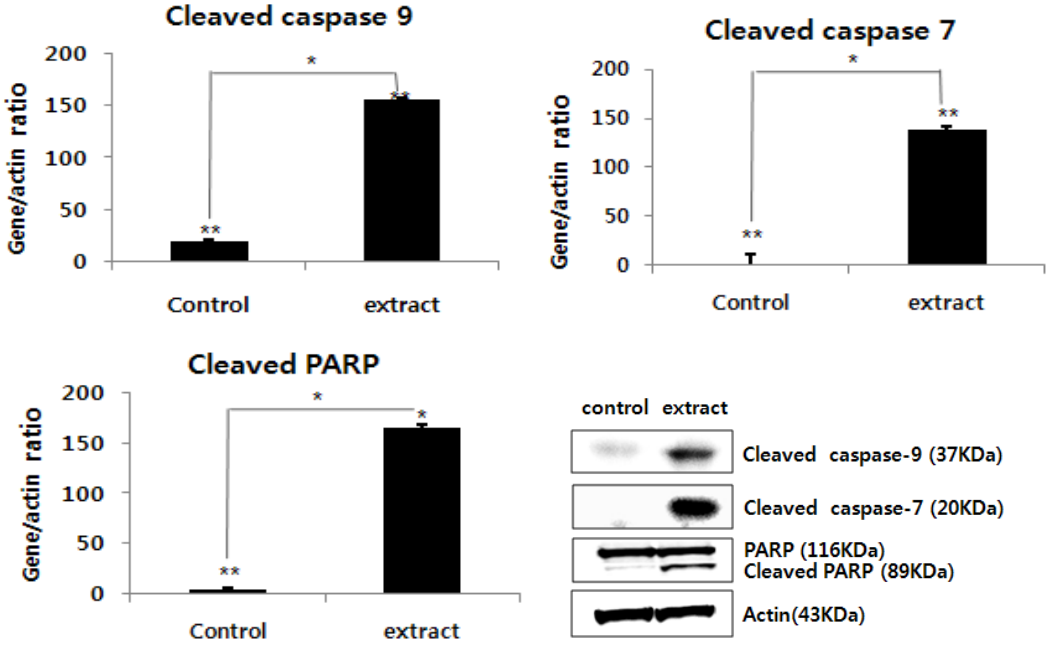

Figure 3. The expression levels of apoptotic related proteins by the protein extract from *Lyophyllum shimeji* in KB oral squamous cell carcinoma. Cells were seeded at 2×10^5 and then treated with 150 ㎍/㎖ of the protein extract from *Lyophyllum shimeji* for 24 hours. cleaved caspase -9, -7 and PARP protein levels were determined by western blot analysis. Whole lysates were seperated by 8%, 12% SDS-PAGE. The amount of protein normalized by a comparison with the actin levels. The data are reported as mean±SD of three independent experiemtns. *P 〈 0.05, **P 〈 0.01 as determined by the Student's t-test compared to the control.

4. Live-Dead cell staining kit을 이용한 만가닥 버섯 단백질 추출물에 의한 KB 사람 구강 편평 암세포의 세포사멸

KB 사람 구강 편평 암세포에서 만가닥 버섯 단백질 추출물이 세포사멸에 영향을 확인하기위해 live-dye와 PI 염색을 통해 확인하였다. LIVE-DEAD cell staining kit (Invitrogen)는 생존 세포양과 죽은 세포양을 평가하는데 일반적으로 사용 되고 있다. LIVE-DEAD cell staining kit 1 mM live-dye와 2.5 ㎎/㎖ propidium iodide (PI)로 구성되어 있다. live-dye는 막 투과성이며 모든 세포막을 통과하여 핵

dCollection @ chosun

산에 염색되어 녹색 형광을 나타낸다. 반면 PI는 막 비투과성 이며 세포막이 손상된 세포의 핵산에 염색되고 붉은색 형광을 나타낸다. KB 사람 구강 편평 세포에 만가닥 버섯 단백질 추출물 24 시간 처리 후 염색을 통해 확인한 결과 단백질 추출물을 처리한 세포에서 붉게 염색 되는 것을 확인하였다(Fig. 4).

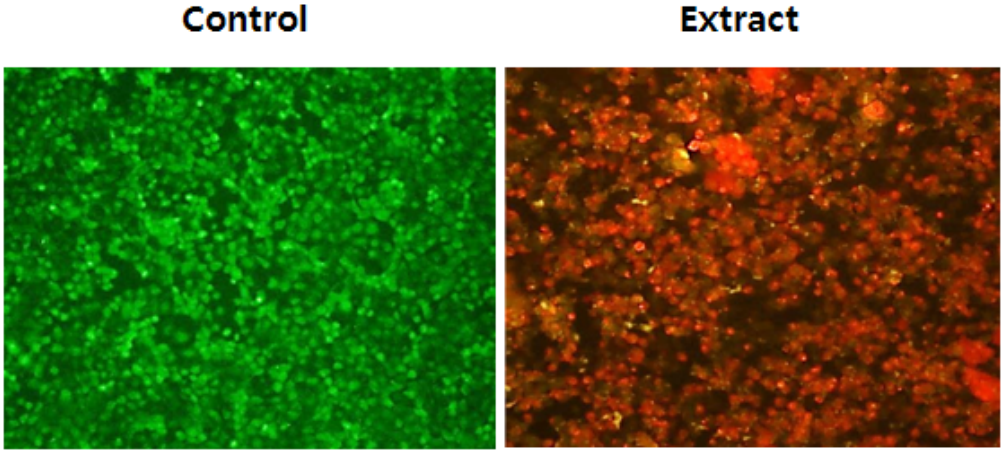

Figure 4. Live and dead cell showed by the protein extract from *Lyophyllum shimeji* treatment in KB human oral squamous cell carcinoma. Cells were treated with 150 ㎍/㎖ of the protein extract from *Lyophyllum shimeji for* 24 hours. The cells stained using live-dye/PI. The live cells stained by live-dye(green color) and the dead cells were stained by PI(red color).

dCollection @ chosun

Ⅳ. 고 찰

만가닥 버섯의 주요성분으로는 polyphenol, flavonoid와 같은 화학성분과 lyophyllin, lyophyllum등의 단백질이 있다. 이러한 화학성분이나 단백질은 항암효과, 항산화 효과 가있는 것으로 알려져 있다. 최근 연구보고에 의하며 만가닥 버섯 메탄올 추출물 및 분획물들이 사람의 간암세포 HepG2와 결장암세포 HT 29, 위암세포인 SNU638의 세포 성장에 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 위와 같이 용매를 이용하여 만가닥 버섯에서 화학성분을 추출하여 다양한 암세포 성장 억제에 대하여 많은 실험이 수행되고 있으나, 최근까지 만가닥 버섯에서 단백질을 분리하여 암세포 성장 억제에 대한 연구는 미비한 상태이다. 본 연구에서는 만가닥 버섯 단백질 추출물을 KB 사람 구강 편평 세포암에 처리하여 MTT assay, DNA fragmentation, western blot analysis, live-dead 염색과 같은 다양한 실험을 수행하여 세포성장 억제효과 및 분자적 기전에 대하여 연구하였다.

만가닥 버섯 단백질 추출물을 KB 사람 구강 편평 세포암에 처리하여 세포성장을 확인하기 위해 100 ㎍/㎖, 125 ㎍/㎖, 150 ㎍/㎖, 175 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖의 농도로 24시간 동안 처리하여 MTT assay를 수행하여 세포성장 억제를 확인하였다. 만가닥 버섯 단백질 추출물을 ㎖당 150 ㎍ 처리한 농도에서 50% 세포성장 억제되었으며 200 ㎍/㎖ 처리 시 90% 이상 세포성장이 억제됨을 확인하였다(Fig 1). 위와 같이 만가닥 버섯 단백질 추출물의 KB 사람 구강 편평 세포암의 세포성장 억제효과는 기존에 항암활성이 우수한 상황버섯이나 동충하초 추출물보다 뛰어난 억제효과를 나타냈다(27, 28). 만가닥 버섯 단백질 추출물이 KB 사람 구강 편평 세포의 성장 억제효과가 세포사멸에 의한 것인지 알아보기 위하여 핵 내 genomic DNA의 분절을 확인하고자 DNA fragmentation을 수행하였다. Genomic DNA 분절 현상은 세포사멸의 대표적인 형태학적 특성으로 알려져 있으며 세포 내 Ca^{2+} 의존성 endonuclease가 활성화 되어 염색사의 링커 DNA가 절단되어 nucleosomal DNA의 분절이 나타난다. 만가닥 버섯 단백질 추출물을 ㎖ 당 150 ㎍을 24 시간 처리 후 genomic DNA lysis buffer을 이용해 세포 내 genomic DNA를 분리하여 아가로스 젤에 전기영동 하여 확인 한 결과 genomic DNA 분절화를 확인하였다(Fig 2). 위와 같은 실험 결과를 토대로 만가닥 버섯 단백질 추출물의 KB 사람 구강 편평 세포의 성장 억제효과는 세포사멸에 의해 일어나는 것으로 사료된

dCollection @ chosun

다. 세포사멸의 기본적인 분자적 기전은 미토콘드리아 의존성 세포사멸이 있다. 미토콘드리아로부터 cytochrome C가 방출되고 미토콘드리아 막전위의 소실이 발생함으로서 caspase family의 활성화가 일어나며 최종적으로 PARP를 절단함으로서 핵 내 DNA를 절단하여 세포성장을 억제한다. 만가닥 버섯 단백질 추출물이 세포사멸의 분자적 기전을 통해 일어나는지 확인하기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. KB 사람 구강 편평 세포에 만가닥 버섯 단백질 추출물을 ㎖당 150 ㎍ 처리하여 세포사멸에 특이적으로 활성화되는 cleaved caspase -7, -9의 발현이 증가하고, PARP가 절단되는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 만가닥 버섯 단백질 추출물을 KB 사람 구강 편평 세포에 처리 하였을 때 미토콘드리아 caspase family 의존성 분자적 기전에 의해 세포사멸이 유도되었다(Fig. 3). 그러나 다른 연구보고에서 만가닥 버섯의 추출물을 HepG2의 간암세포와 HT29의 결장암 세포에 처리 하였을 때 세포주기 조절인자로 알려져 있는 G1 cycline dependent kinase의 발현이 감소하여 세포주기 G1 단계 차단에 의하여 일어나는 세포주기 억제 분자적 기전에 의하여 암세포 성장을 억제하는 것을 보고 한 바 있다(24). 위와 같은 실험 결과에 의하여 만가닥 버섯 단백질 추출물이 KB 구강 편평 세포에 처리하여 직접 세포 내 생존 세포량과 죽은 세포량을 평가하기 위하여 LIVE-DEAD cell 염색을 수행하였다. 일반적으로 살아있는 세포는 esterase 활성이 높고 세포막이 완전하여 live-dye의 비형광물질이었던 것이 살아있는 세포에서 estrase에 의해 분해되면서 녹색을 띄게 되고, 죽은 세포는 esterase 활성이 낮고 손상된 세포막으로 PI가 들어가 핵산과 결합 하면서 붉은색으로 나타나게 된다. 만가닥 버섯 단백질 추출물을 ㎖당 150 ㎍을 24 시간 처리하여 확인한 결과 KB 구강 편평 세포에서 붉게 염색되는 것을 형광현미경으로 확인 하였다(Fig 4).

본 연구는 기존의 알려져 있는 항암제보다 부작용을 최소화하고 항암효과가 뛰어난 천연물 유래 항암제를 개발하고자 만가닥 버섯에서 단백질을 추출하여 KB 사람 구강 편평 세포에 처리하여 다양한 실험을 통해 세포성장 억제효과 및 미토콘드리아 caspase 단백질 발현 활성화에 의한 세포사멸을 유도하는 분자적 기전임을 밝혔다.

dCollection @ chosun

V. 결 론

만가닥 버섯 단백질 추출물을 이용하여 KB 사람 구강 편평 암세포의 성장 억제효과와 세포사멸의 분자적 기전을 규명하고자 MTT assay, DNA fragmentation, western blot 및 LIVE-DEAD cell staining을 수행하여 다음과 같은 결과를 확인 하였다.

첫째, 만가닥 버섯 단백질 추출물을 KB 사람 구강 편평 암세포에 다양한 농도로 처리하였을 때 150 ㎍에서 세포의 성장을 50% 억제 시켰으며 200 ㎍ 처리하엿을 때 90% 이상 세포가 억제됨을 확인하였으며, 처리하지 않은 대조군에는 변화가 없음을 확인 하였다.

둘째, 만가닥 버섯 단백질 추출물은 KB 사람 구강 편평 암세포의 핵 내에 존재하는 genomic DNA를 분절화 시킴으로서 세포사멸을 유도하였으며, live-dye와 PI 염색약을 처리하였을 때 살아있는 세포와 죽은 세포의 차이를 비교하여 세포사멸을 확인 하였다.

셋째, KB 사람 구강 편평 세포 내 cleaved capase-7, -9 활성화를 유도하고 PARP를 절단함에 따라 세포사멸이 유도됨을 확인하였으며 이러한 결과는 미토콘드리아 의존성 caspase 신호전달과정에 의한 분자적 기전이 일어남을 확인하였다.

위의 같은 결론은 만가닥 버섯(*Lyophyllum shimeji*) 단백질 추출물에 의한 KB 사람 구강 편평 암세포의 성장억제에 대한 분자적 기전을 확인 하였고, 더 나아가 구강암 세포에 항암활성을 갖는 단일 단백질을 분리하여 구강암 치료제의 부작용을 최소화 할 수 있는 보다 나은 새로운 천연물 유래 항암제 개발에 대한 기초 연구에 중요한 초석이 될 것으로 사료된다.

dCollection @ chosun

참 고 문 헌

1. National Cancer Information Center. http://www.cancer.go.kr/cms/cancer_is/01/1190424_1221.html.
2. Kim HD. Factors influencing knowledge about early signs and causes of oral cancer in Korean elder, *J Korean Acad Dent Health*. 2004;28:570-582.
3. Petersen PE. Oral cancer prevention and control the approach of the World Health Organization, *Oral Oncol*. 2009;45:454-460.
4. Kwon KH. Oral & maxillofacial surgery, *Daehannarae Seoul.*. 2008;2:195-201.
5. Maria TC, Susan SD. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, *Oral Oncol*. 2002;38:610-617.
6. National Cancer Information Center. http://www.cancer.go.kr.
7. Han JH, Kim EK, Lim SH, Kim C.H. Literature Review on the Incidence and Risk Factor of Oral Cancer, *J Dent Hyg Sci V 12*. 2012;5:451-458.
8. Stephen Hsu, Baldev Sin, George Schuster. Induction of apoptosis I oral cancer cell : agents and mechanisms for potential therapy and prevention, *Oral Oncology*. 2004;40:461-473.
9. Yun PY, Ok YJ, Myoung H, Lee JH, Kim MJ. Anticancer effect of CKD-602 on the oral cancer cell lines, *J Kor Oral Maxillofac Surg*. 2005;31:7-12.
10. Park SA. Current trend of apoptosis-inducing materials research on oral cancer, *Chonnam National University*. 2013.
11. Yamachika E, Habte T, Oda D. Artemisinin: an alternative treatment for oral squamous cell carcinoma, *Anticancer Res*. 2004;24:2153-2160.
12. Crown J, O'Leary M, Ooi WS. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience, *Oncologist*.

dCollection @ chosun

2004;2:24-32.
13. Datta R, Kojima H, Yoshida K, and Kufe D. Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis, *J Biol Chem*. 1997;272:20317-20320.
14. Kish JA, Drelichman A, Jacobs J. Clinical trial of cislatin and 5-fluorouracil infusion as initial treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck, *Cancer treat res.* 1982;66: 471-474.
15. Mukherjee AK, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products, *Curr Med Chem*. 2001;8: 1467-1486.
16. Pezutto JM. Plant-derived anticancer agents Bioche, *Pharmacol*. 1997;53:121-133.
17. Datta R, Kojima H, Yoshida K, and Kufe D. Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis, *J Biol Chem*. 1997;272:20317-20320.
18. Kish JA, Drelichman A, Jacobs J. Clinical trial of cislatin and 5-fluorouracil infusion as initial treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck, *Cancer treat res.* 1982;66: 471-474.
19. Lam TB Ng. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and antifungal protein from a mushroom Lyophyllum shimeji together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Archives of Biochemistry & Biophysics.* 2001;393:271-280.
20. Stirpe, F. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon*, 2004;44:371-383.
21. Hartley MR, Lord JM. Cytotoxic ribosome inactivating lectins from plant, *Biochim Biophys Acta*. 2004;1701:1-14.
22. Morimoto H, Bonavida B. Diphtheria toxin and pseudomonas A toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with

dCollection @ chosun

tumor necrosis factor-alpha, *J Immunol.*, 1992;149:2089-2094
23. Kim HJ, Bae JT, Lee JW, Bo MHH, Im HG, Lee IS. Antioxidant Activity and Inhibitive Effects on Human Leukemia Cell of Edible Mushrooms Extrats, *Korean J Food Preserv*. 2005;12:80-85.
24. Chang JS. Study on the Mechanism of Cancer Chemoprevention of *Hypsizigus Marmoreus, Yeungnam University*. 2002.
25. Kim H J, J T Bae, J W Lee, M H Hwangbo, H G Im, I S Lee. Antioxidant activity and inhibitive effects on human leukemia cells of edible mushrooms extracts, *Korean J Food Preserv*. 2005;12:80-85.
26. Choi Y, J B Ku, H B Chang, J Lee. Antioxidant activities and total phenolics of ethanol extracts from several edible mushrooms produced in Korea, *Food Sci Biotech*. 2005;4:700-703.
27. Jin CY, Kim GY, Choi YH. Induction of apoptosis by aqueous extract of Cordyceps militaris through activation of caspases and inactivation of Akt in human breast cancer MDA-MB-231 Cells, *J Microbiol Biotechnol*. 2008;18:1997-2003.
28. Zhu T, Guo J, Collins L, Kelly J, Xiao ZJ, Kim SH, Chen CY. Phellinus linteus activates different pathways to induce apoptosis in prostate cancer cells, B*r J Cancer*. 2007;26;96:583-590.

dCollection @ chosun