[UCI]I804:24011-200000

2014년 8월
박사학위논문

*Pleurotus ostreatus*에서 분리한 ostreolysin에 의한 FaDu 하인두 편평 세포암의 세포사멸 유도

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 은 식

2014년 8월 박사학위논문 *Pleurotus ostreatus*에서 분리한 ostreolysin에 의한 FaDu 하인두 편평 세포암의 세포사멸 유도 김 은 식

*Pleurotus ostreatus*에서 분리한 ostreolysin에 의한 FaDu 하인두 편평 세포암의 세포사멸 유도

2014년 8월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 은 식

dCollection @ chosun

*Pleurotus ostreatus*에서 분리한 ostreolysin에 의한 FaDu 하인두 편평 세포암의 세포사멸 유도

지도교수 오 지 수

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2014년 4월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 은 식

dCollection @ chosun

김은식의 박사학위 논문을 인준함

위원장 단국대학교 교 수 김 경 욱 (인)

위 원 서울대학교 겸임교수 여 환 호 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 수 관 (인)

위 원 조선대학교 교 수 김 춘 성 (인)

위 원 조선대학교 교 수 오 지 수 (인)

2014년 6월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

목 차

ABSTRACT ····· iv

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 3

Ⅲ. 결 과 ····· 6

Ⅳ. 고 찰 ····· 12

Ⅴ. 결 론 ····· 14

참고문헌 ····· 15

dCollection @ chosun

표 목 차

Table. Determination of N-terminal sequence analysis ····· 8

dCollection @ chosun

도 목 차

Figure 1. Effect of *P.ostreatus* on cell viability in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinom ····· 6

Figure 2. Purification of ostreolysin from *P.ostreatus* ····· 7

Figure 3. Effect of ostreolysin purified from *P.ostreatus* on cell viability in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma ····· 9

Figure 4. Fragmentation of inter-nucleosomal DNA by ostreolysin purified from *P.ostreatus* on cell viability in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma ····· 10

Figure 5. The expression levels of apoptotic related proteins and caspase dependent proteins by the ostreolysin purified from *P.ostreatus* on cell viability in FaDu human hypo-pharyngeal squamous cell carcinoma ····· 11

dCollection @ chosun

ABSTRACT

Anticancer activity of ostreolysin purified from *Pleurotus ostreatus* through caspase dependent apoptosis in FaDu human hypopharyngeal squamous carcinoma

By Kim, Eun-Sik
Advisor : Prof. Ji-Su Oh D.D.S. Ph.D.
Department of Dentistry,
Graduate School of Chosun University

There is a common saying, "Medicines and foods have a common origin". Edible mushrooms are a manifestation of this idea in constituting both a nutritionally functional food and a source of physiologically beneficial medicine. in several centuries ago, medicinal properties of edible mushrooms have been recognized in Korea. Although from ancient times, edible mushrooms have been treated as a special kind of functional foods, they have received a remarkable interest in recent decades. Major medicinal properties attributed to edible mushrooms includes anticancer activity, antibiotic activity, antiviral activity, immune response-stimulating effects, anti-hypertensive and blood lipid lowering effects. Some edible mushrooms have gained special consideration due to their various medicinal values in addition to high nutritional value. For example, *Lentinus edodes* were reported to possess anti-tumor, anti-hypertensive, hypocholesterolemic and antibacterial activities. The beta-glucan polysaccharide has potential application in immune surveillance and chemoprevention of cancer. Furthermore, ostreolysin, an acidic, 15 kDa protein from the edible oyster mushroom such as *Pleurotus ostreatus*

dCollection @ chosun

(*P. ostreatus*), is a toxic, pore-forming cytolysin from cancer cells.

To explore its potential anti-cancer effect on FaDu human hypopharyngeal squamous carcinoma cells, we examined whether the purified ostreolysin from *P. ostreatus* could inhibit the growth of FaDu human hypopharyngeal squamous carcinoma cells and investigated molecular mechanism of anti-cancer activity. Purification was performed by size exclusion gel filtration in Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) using Superdex 200 100/300 column. FaDu human hypopharyngeal squamous carcinoma cells were treated with different concentrations of ostreolysin purified from *P. ostreatus* for 24 hours. Then, the cell viability was determined using colorimetric MTT assay. Ostreolysin (15 kDa) purified from *P. ostreatus* caused a significant inhibition on the growth of cancer cells in a dose-dependent manner. To understand of molecular mechanism whether its cell death is related with apoptosis pathway, we performed DNA fragmentation assay. The formation of a DNA ladder was observed by treatment of ostreolysin (15 kDa) purified from *P. ostreatus.* In addition, western blot analysis showed that ostreolysin (15 kDa) purified from *P. ostreatus* decreased the pro-caspase 9, 3, and activated cleaved PARP. These results might suggest of adjuvant chemotherapy that the ostreolysin (15 kDa) purified from *P. ostreatus* induced cell apoptosis through mitochondrial caspases dependent pathway in FaDu human hypopharyngeal squamous carcinoma cells.

dCollection @ chosun

I. 서 론

구강암은 혀, 혀밑바닥, 구강저, 잇몸, 입천장, 입술, 턱뼈 등에 발생하며 편평 상피세포암종(squamous celll carcinoma)이 87%로 가장 흔하고 그 밖에 침샘에서 발생하는 선양낭성암(adenoid cystic carcinoma), 점액표피양암(mucoepdermoid carcinoma), 선암 등이 있다. 원인인자로는 흡연, 음주, 만성적 자극, 인간유두종 바이러스 감염 등이 있으며, 음주와 흡연을 함께 할 경우에는 정상에 비해 1.5배 높은 구강암 발생률을 보이고 있다(1). 최근 발표된 중앙 암등록본부 자료에 의하면 구강암 발병률은 전체 암환자의 약 0.7%를 차지하였고 남녀의 성비는 1.8:1로 남자에게서 더 많이 발병했다고 보고하였다. 구강암은 다른 부위의 암과는 달리 대부분 육안으로 판별이 가능하며 조기진단이 비교적 다른 암에 비해 용이하며 화학방사선요법 혹은 유전자치료법의 대상으로 훌륭한 모델이 될 수 있음에도 불구하고 구강암은 다른 암에 비해 발생기전 등 분자생물학적 연구가 미흡하다.

구강암은 임상적으로 국소적 침윤 및 경부 임파절 전이를 하며 외과적 수술이나 방사선 치료 및 항암치료가 치료의 근간을 이루어왔다. 항암 치료시 5-FU, 시스플라틴, 블래오마이신등의 항암제를 사용하여 치료하고 있으나 소화기계 합병증, 면역력 저하, 골수기능저하와 같은 심각한 부작용이 나타나고 있다. 최근에는 암치료에 대한 부작용을 줄이기 위해 수술 및 방사선을 이용하거나, 또는 interferon이나 interleukin과 같은 면역관련 제제를 투여하여 치료하는 복합 치료요법을 수행하여 항암제에 대한 부작용을 줄일 수 있었으나 면역제제의 비용도 비싸고 항암효과도 기존의 항암제에 비해 낮은 결과를 보이고 있다(2). 이러한 항암제 부작용을 줄이기 위해 항암 효과가 있다고 보고된 다양한 자생식물의 성분을 추출 및 단일물질을 정제하여 다양한 암세포주에 처리하여 항암 활성효과를 확인하는 연구들이 활발히 진행 중이며, 기존의 화학요법에 사용되어 왔던 항암제와 함께 이러한 약용식물을 병용하여 항암 활성효과 증강 및 부작용을 억제하는 효과에 대한 결과가 보고되어지고 있다(3).

식용버섯은 다양한 암세포에서 항암효과 뿐만 아니라, 콜레스테롤 수치 감소, 항산화 활동, 면역활성을 증가시킬 수 있다고 보고되어있다(4). 식용버섯으로 알려져 있는 느타리버섯의 조추출물이 PC-3 갑상선 암세포에 대해 항암 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 느타리버섯에서 추출한 수용성 다당류로 알려져 있는 베타 글루칸은 HT-29

dCollection @ chosun

대장암세포에서 미토콘드리아 의존성 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다(5, 6). 그러나 다양한 암세포에서 세포사멸 및 세포증식 억제에 대한 정확한 분자적 기전에 대한 연구는 미흡한 상태이다(7). 이와 같이 식용 가능한 자생식물을 이용한 식품이나 의약품 개발에 관한 관심이 증가되고 있으며 생리활성 물질 뿐만 아니라 다양한 암의 치료를 위한 항암 물질의 원료로도 이용되고 있을 만큼 응용분야도 다양하다(8-10). 이처럼 우리나라 자생식물들과 각종 약용식물에 대한 효능연구가 활발히 진행되고 있으나 그 수준이 기초적인 효능연구에 집중되고 있다(11, 12). 그러나 차후 연구방법은 단순한 효능의 분석에 그치지 않고 정확한 분자적 기전 연구를 바탕으로 한 임상 적용 및 시장 유통이 될 수 있는 산업적, 의학적 적용이 가능한 연구가 필요하다(13, 14).

dCollection @ chosun

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험재료

느타리버섯을 구입하여 증류수로 추출한 후 에탄올을 이용하여 침전시켜 얻은 조단백질을 phosphate buffer saline(PBS)에 녹인 후 세포 배양액에 희석하여 사용하였다. Pro-caspase 9, 3, cleaved PARP and actin(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)을 구입하여 사용하였으며, 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

2. Ostreolysin 분리

느타리버섯에서 추출한 조단백질을 sodium phosphate buffer에 녹인 후 친화성 크로마토그래피를 이용하여 ostreolysin을 분리하였다.

3. 세포 배양

FaDu 하인두 편평세포(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.

4. 세포증식 효과 검증

느타리버섯에서 추출한 조단백질 및 ostreolysin에 대한 FaDu 세포의 생존율을 조사하기 위하여 12 well culture plate에 3×10^5 cells/well 세포를 seeding하고 24 시간 후 조단백질 및 osteolysin을 처리 후 12 well plate에 있는 배양액을 제거한 후, 450 ㎕ DMEM 배양액과 50 ㎕ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2 (MTT) 용액을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 4 시간 반응시킨 후 배양액을 제거하고 DMSO를 500 ㎕ 첨가하여 녹인 후 96 well culture plate에 100 ㎕를 분주하여 Microplate Autoreader ELISA (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)를 사용하여 562 ㎚ 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 확인하였다.

dCollection @ chosun

5. DNA 분절화 확인

DNA 분절 현상을 조사하기 위해 3×10^5 FaDu 세포를 12 well plate에 배양 후 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin을 처리하여 24 시간 경과 후 세포를 수집하였다. 세포를 500 ㎕ lysis buffer로 용해시켜 37℃ incubator에 2 시간 동안 반응시킨 후 12,000 rpm으로 5 분 동안 원심분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 동량의 PCI(phenol/chroloform/isoamylalchol) solution을 넣고 -20℃에서 1 시간 동안 보관 한 뒤 12,000 rpm으로 20 분 동안 원심분리하여 genomic DNA을 분리하였다. 분리한 genomic DNA를 ethidium bromide가 포함된 1.2% agarose gel을 이용하여 150 voltage에서 30분 동안 전기영동하여 UV transilluminator(Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)하에서 genomic DNA 분절을 관찰하였다.

6. 젤 여과 분석 및 N-terminal 단백질 서열 분석

분자 크기의 차이를 이용한 분리로 망상구조를 가지는 resin(gel)의 분자체 효과에 의해 저분자는 resin의 내부까지 침투하여 천천히 이동하는 반면 고분자는 resin 입자 사이를 빠르게 이동함으로서 시료 내 존재하는 다양한 단백질을 분리할 수 있다. 분리된 단백질을 SDS-PAGE을 이용하여 전기영동 후 PVDF membrane에 단백질을 이동시킨 후 분석하고자 하는 부위의 membrane을 절단하여 서울 기초과학지원연구원 단백질 염기서열 분석팀에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

7. 단백질 면역 발색법

3×10^5 FaDu 세포를 12 well plate에 배양 후 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin (5 ㎍/㎖)을 5 ㎕ 처리하여 24 시간 후 1500 rpm으로 5 분 동안 원심분리 하여 세포를 수집 한 후 인산완충용액으로 두 번 세척하고, protein lysis buffer를 이용하여 단백질 분리한 후 BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockgord, IL, USA)을 이용하여 단백질을 정량하였다. 50 ㎍ 단백질을 12% SDS-PAGE에 loading 한 후 120 voltage에서 2시간 동안 전기영동 하였다. 젤 상에서 분리 된 단백질은 western blot analysis을 수행하기 위해 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane에 이동한 후, blocking solution(5% nonfat dried milk in TBS containing 0.1% Tween-20)을 이용하여 1시간 동안 반응하였다. 1차 항체 pro-caspase 9, 3, 그리고 cleaved PARP(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)과 actin

dCollection @ chosun

(Santa cruz Biotechnology, Inc)를 TBS-T를 이용하여 1:1000 비율로 희석한 후 4℃ 조건하에 16 시간 동안 반응하였다. TBS-T를 이용하여 세 번 세척 후 2차 항체 anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody(Amersham Biociences, UK)는 TBST를 이용하여 1:5,000 비율로 희석하여 1 시간 반응 후 ECL kit(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)을 이용하여 western blot analysis를 수행하였다.

8. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 평균 ± 표준편차로 나타냈고, 각 실험군간 유의성 검정은 ANOVA 후에 student t-test를 하였으며, p-value가 0.05 미만(*, $p<0.05$)과 0.01 미만(**, $p<0.05$)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

dCollection @ chosun

Ⅲ. 결 과

1. 느타리버섯 단백질 추출물을 FaDu 세포에 처리하여 세포성장 억제 효과

FaDu 세포에 느타리버섯 단백질 추출물을 처리하여 IC_{50} 및 세포성장 억제 효과를 조사하기 위해 단백질 추출물을 다양한 농도(100 ㎍/㎖, 125 ㎍/㎖, 150 ㎍/㎖, 175 ㎍/㎖, 200 ㎍/㎖)로 10 ㎕ 처리하여 24 시간 후 MTT assay 을 수행하였다. 느타리버섯 단백질 추출물을 FaDu 세포에 24 시간 처리 후 125 ㎍/㎖ 농도에서 10 ㎕ 처리한 well에서 약 50%의 세포성장이 감소함을 확인하였다.(Fig. 1).

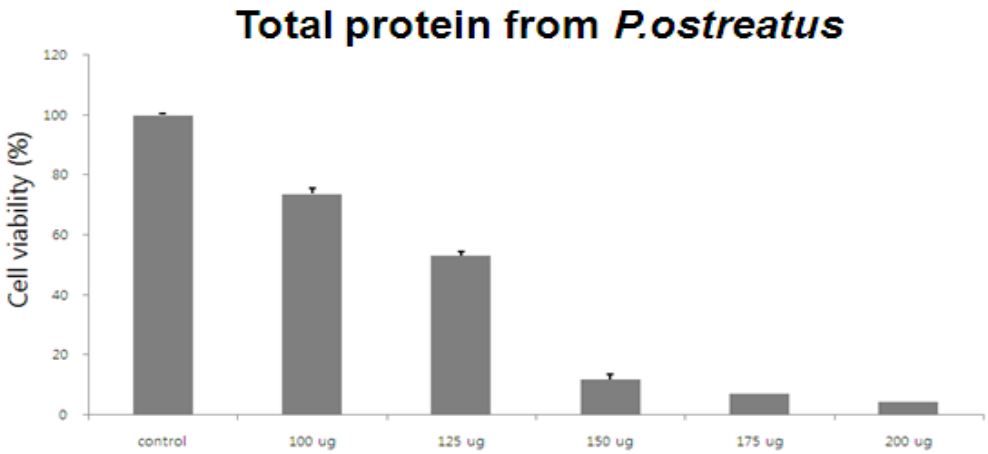

Figure 1. Effect of total protein from *P.ostreatus* on cell viability in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Cells were treated with various concentration of the total protein purified from *P.ostreatus* in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Cells viabilities were determined by the MTT assay. The percentage of cell viability was calculated as a ration of A570 nm. Results were expressed as percent of the control. Each data point represents the mean±SD of three independent experiemtns.

dCollection @ chosun

2. 젤 여과 크로마토그래피를 이용하여 느타리버섯에서 ostreolysin 분리 및 SDS-PAGE 전기영동으로 ostreolysin 크기 확인

젤 여과 크로마토그래피를 이용하여 느타리버섯에서 약 15 kDa의 ostreolysin을 분리하였다. 분리한 ostreolysin을 12% SDS-PAGE에 전기영동하여 ostreolysin의 크기를 확인하였다.(Fig. 2).

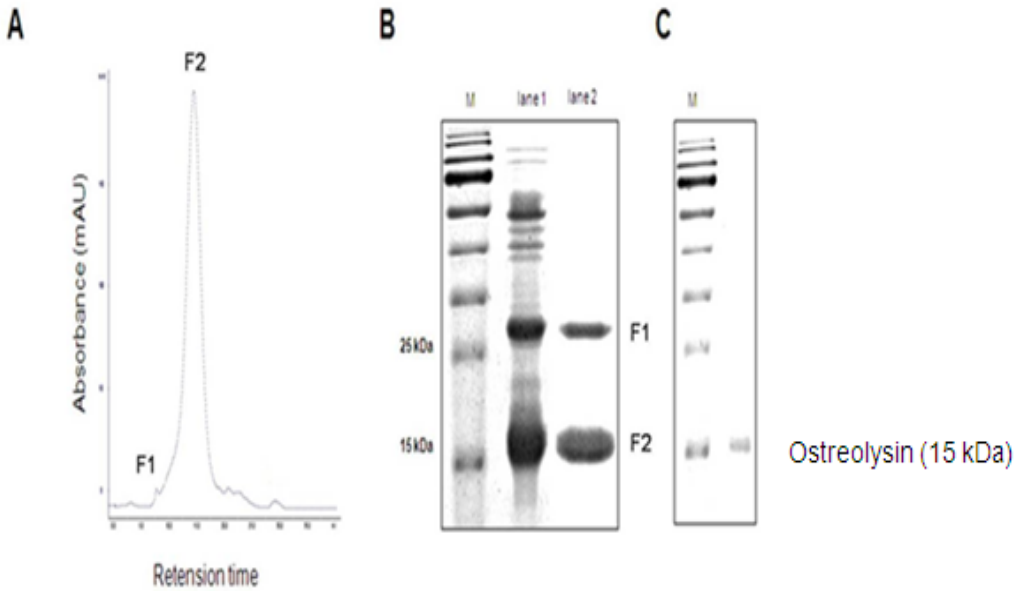

Figure 2. Purification of ostreolysin from *P.ostreatus*. (A) Size exclusion gel filtration chromatography on Superdex 200 100/300. (B) SDS-PAGE of active fractions from various purification steps. Proteins obtained from each purification step were electrophoresed on 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 to visualize. Lane 1, crude extract; lane 2, from Superdex 200 100/300 size exclusion column chromatography. Approximately ostreolysin of 15 kDa in size is indicated (C). SDS-PAGE of osteolysin purified from *P.ostreatus* purified osteolysin was electrophoresed on 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 to visualize

dCollection @ chosun

3. 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin 단백질 서열 분석

N-terminal 단백질 아미노산 서열분석을 통해 아미노산 서열을 분석한 결과 서열이 Ala-Tyr-Ala-Glu-Try-Val-Iso-Iso로 확인되었으며 이를 NCBI data base를 이용하여 분석한 결과 ostreolysin과 높은 상동성을 갖고 있는 단백질임을 확인하였다. (Table 1)

Table 1. Determination of N-terminal sequence analysis

Alignment of the N-terminal amino sequences of purified enzyme with *P. ostreatus*

product	N-terminal amino acid sequences	NCBI accession
ostreolysin	A Y A Q W V I I	AAX21097.1
ostreolysin purified from *P. ostreatus*	A Y A Q W V I I	

dCollection @ chosun

4. 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin이 FaDu 세포 성장억제에 미치는 효과

FaDu 세포에 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin의 의한 IC_{50} 및 세포 성장억제 효과를 조사하기 위해 추출물을 다양한 농도(1 ㎍/㎖, 5 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖, 20 ㎍/㎖)로 각 well에 5 ㎕ 처리하여 24 시간 후 MTT assay을 수행하였다. FaDu 세포에서 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin을 처리 후 24 시간 후 10 ㎍/㎖ 농도의 ostreolysin을 5 ㎕ 처리한 세포에서 약 50% 세포성장이 감소함을 확인하였으며 이러한 결과를 가지고 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin의 IC_{50} 반수치사량은 5 ㎍임을 확인하였다(Fig. 3).

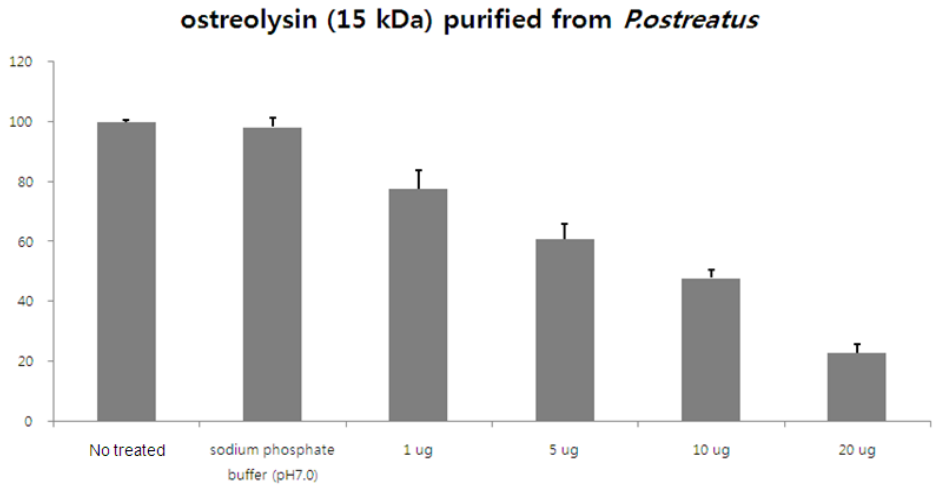

Figure 3. Effect of ostreolysin purified from *P.ostreatus* on cell viability in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Cells were treated with various concentration of the ostreolysin purified from *P.ostreatus* in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Cells viabilities were determined by the MTT assay. The percentage of cell viability was calculated as a ration of A570 nm. Results were expressed as percent of the control. Each data point represents the mean ± SD of three independent experiemtns.

dCollection @ chosun

5. 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin에 의한 FaDu 세포의 genomic DNA 분절화

느타리버섯에서 분리한 ostreolysin에 의한 FaDu 세포 성장억제가 세포사멸에 의해서 나타나는 것임을 확인하기 위해 5 ㎍의 ostreolysin을 처리하여 24 시간 후 세포를 수집하여 DNA 분절이 나타남을 확인하였으며 이러한 결과는 세포사멸에 의해 세포성장이 억제됨을 확인하였다(Fig 4).

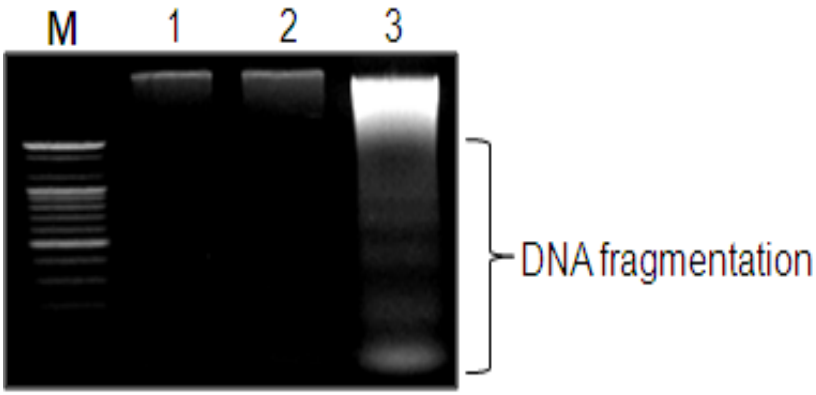

Figure 4. Fragmentation of inter-nucleosomal DNA by osteolysin purified from *P.ostreatus* on cell viability in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Cells were seeded at 3×10^5 and then treated with 5 ㎍ of ostreolysin purified from *P.ostreatus* for 24 hours. Genomic DNA was subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis. Lane 1, no treated; lane 2, sodium phosphate buffer (pH 7.0); lane 3, ostreolysin.

dCollection @ chosun

6. 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin이 미토콘드리아 의존성 caspase family 단백질 발현에 의한 FaDu 세포사멸 유도

느타리버섯에서 분리한 ostreolysin이 FaDu 세포 성장억제를 일으키는 분자적 기전을 확인하기위해 세포사멸에 중요한 인자로 알려져 있는 caspase의 활성화를 확인하였다. 내인성 세포사멸 유도에서 하방에서 활성화 되어 신호를 전달하는 pro-caspase 9, 3의 발현이 감소함을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 caspase 활성화가 유도되어 PARP의 절단이 일어나서 세포가 사멸되는 것을 알 수 있었다.

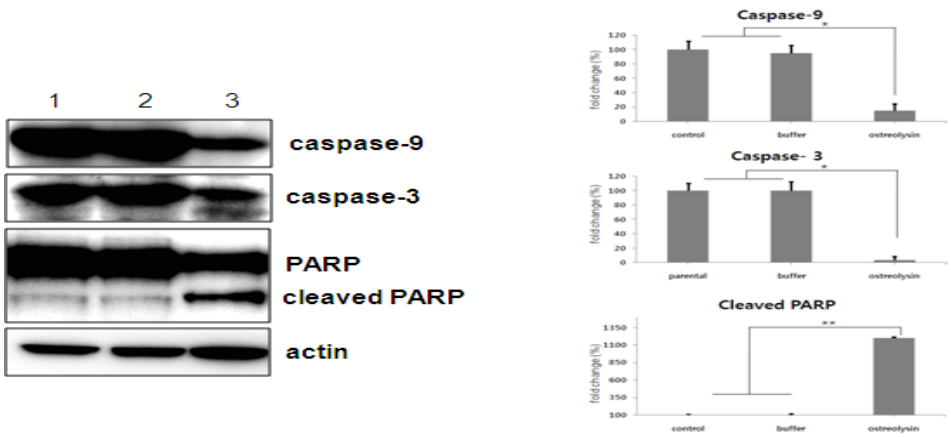

Figure 5. **The expression levels of apoptotic related proteins and caspase dependent proteins by the ostreolysin purified from *P.ostreatus* on cell viability in FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma.** Cells were seeded at 3×10^5 and then treated with 5 ㎍ of the ostreolysin purified from *P.ostreatus* for 24 h. Pro-caspase 9, 3 and cleaved PARP protein levels were determined by western blot analysis. Whole lysates were seperated by 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. Lane 1, no treated; lane 2, sodium phosphate buffer (pH 7.0); lane 3, ostreolysin.

dCollection @ chosun

Ⅳ. 고 찰

약용식물에 대한 관심이 높아짐에 따라 우리 주변에서 흔히 자생하는 식물의 다양한 생리활성 물질이나 인간에게 유용한 항암물질을 발굴하기 위한 노력이 활발해지면서 기존에 알려져 있는 상황버섯이나 눈꽃 동충하초에서 알려져 있는 항암효과를 토대로 다양한 식용버섯에서 여러 가지 용매를 이용한 단백질 및 다당체를 분리한 후 암세포주에 처리하여 항암효과를 확인하고 있다(15, 16). 최근에 연구자들이 자생식물을 이용한 용매 추출물을 가지고 기존에 천연항암제 및 합성항암제의 단점으로 알려진 암세포 내성 발현과 환자에 대한 부작용을 극복하기위해 많은 실험을 수행하고 있다. 그러나 이러한 자생식물 추출물 중에서도 일부 식물의 경우 낮은 효율과 약물의 세포독성 때문에 전 임상 단계에서 개발이 제한되고 있다(17-19).

본 연구에서는 국내에 식용버섯으로 판매하고 있는 느타리버섯 추출물을 FaDu 암세포에 처리하여 세포 성장억제 및 세포사멸에 의한 항암효과 및 분자적 기전에 대한 실험을 수행하였다. 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin을 FaDu 암세포에 처리 후 MTT assay 기법을 이용하여 세포 성장억제를 확인하였다. FaDu 암세포에 ostreolysin을 다양한 농도로 처리하여 24 시간 후 ostreolysin 5 ㎍에서 세포성장을 50% 억제시키는 효과를 확인하였다(Fig. 3). 본 연구결과는 이미 항암효과가 알려져 있는 상황버섯이나 눈꽃 동충하초에 함유되어진 성분보다 빠르게 세포성장을 억제하는데 효과적임을 확인하였다. 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin의 FaDu 암세포 성장억제 효과가 세포사멸에 의한 것인지 알아보기 위해 DNA 분절화가 되는지 확인하였다. DNA 분절화 현상은 세포사멸의 대표적 현상으로 Ca^{2+} 의존성 endonuclease가 활성화 되어 크로마틴의 링커 DNA가 절단되고 nucleosomal DNA 분절을 이루게 된다. 이러한 현상을 아가로스 젤에서 분절화 형태로 관찰할 수 있다. 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin을 FaDu 암세포에 ostreolysin 5 ㎍ 처리 시 뚜렷한 DNA ladder를 관찰하였으며, 대조군으로 사용된 sodium phosphate buffer(pH7.0)를 처리 시 어떠한 분절화 현상도 나타나지 않음을 확인하였다. 이러한 결과를 통해서 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin을 FaDu 암세포에 처리하였을 때 세포사멸에 의한 분자적 기전에 의해 세포성장이 억제됨을 확인하였다. 또한 세포사멸의 분자적 기전에 관여하는 단백질의 발현을 확인하기 위해 미토콘드리아 외막에 존재하는 세포사멸 연계 단백질로 알려져 있는 pro-caspase 9, 3,의 단백질 발현의 감소 및 PARP 활성화를 확인하기

dCollection @ chosun

위해 단백질 면역 발색법을 수행하였다. 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin을 처리하였을 때 미토콘드리아 의존성 pro-caspase 9, 3의 단백질 발현이 감소함을 확인하였으며 또한 미토콘드리아 의존성 caspase 기작에 의해 최종적으로 PARP가 절단됨을 확인하였다. 위와 같은 여러 가지 결과를 토대로 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin을 FaDu 암세포에 처리하면 세포사멸의 특징적 경로중 하나로 알려져 있는 미토콘드리아 caspase family 의존성에 의한 세포사멸을 유도하는 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구에서는 기존의 항암효과가 있는 것으로 알려져 있는 버섯보다 강한 효능을 보이는 항암 물질을 개발하기 위해 국내 자생하는 느타리버섯을 이용하여 FaDu 암세포에 적용하여 연구하였다. 그 결과 ostreolysin을 처리하게 되면 미토콘드리아 caspase family 의존성 세포사멸을 유도하는 분자적 기전을 통해 FaDu 암세포의 성장을 빠른 시간 내에 억제시킬 수 있을 뿐 아니라 효과적인 천연 항암 후보물질이 될 수 있으며, 하인두암에 특이적인 항암제로서 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

dCollection @ chosun

Ⅴ. 결 론

본 연구에서 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin의 세포사멸에 대한 분자적 기전을 규명하고자 MTT assay, DNA 분절화, 및 단백질 면역발색법 등을 수행하여 얻은 결과를 다음과 같이 정리하였다.

1. 느타리버섯에서 분리한 조단백질 125 ㎍을 FaDu 암세포에 처리 시 50% 세포성장 억제를 확인하였다.

2. 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin 5 ㎍을 처리 시 FaDu 암세포에 50% 세포 성장 억제를 확인하였다.

3. 느타리버섯에서 분리한 ostreolysin은 FaDu 암세포의 핵에 존재하는 genomic DNA를 분절화 시킴으로서 세포사멸을 유도함을 확인하였다.

4. Pro-caspase 9, 3의 단백질 발현을 감소시키며 PARP의 절단에 의해 세포사멸이 유도됨을 확인하였으며 이러한 결과는 미토콘드리아 의존성 caspase 신호전달 과정에 의한 세포사멸 분자적 기전이 일어남을 확인하였다.

위와 같은 결과는 ostreolysin을 이용하여 FaDu 암세포 사멸에 대한 분자적 기전을 확인하였고, 더 나아가 항암활성을 갖는 단일물질을 동물실험에 이용하여 기존에 알려져 있는 하인두암 치료제 보다 나은 새로운 천연 항암제 치료제 및 보조제 개발에 대한 기초 연구에 중요한 초석이 될 것으로 사료된다.

dCollection @ chosun

참고문헌

1. Barros L, Baptista P, Estevinho LM. Ferreira ICFR Bioactive properties of the medicinal mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium obtained in the presence of different nitrogen sources, *Food Chem*. 2007;105: 179-186.
2. Sarikurkcu C, Tepe B, Yamac M. Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir-Turkey: Lactarius deterrimus, Suillus collitinus, Boletus edulis, Xerocomus chrysenteron, *Bioresour Techno*l. 2008;99:6651-6655.
3. Synytsya A, Mickova K, Synytsya A, Jablonsky I, Spevacek J, Erban. V Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms Pleurotus ostreatus and *Pleurotus eryngii*: structure and potential prebiotic activity, *Carbohydr Polym*. 2009;76:548-556.
4. Kidd PM. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer, treatment, *Altern Med Rev*. 2000;5:4-27.
5. Zaidman B-Z, Yassin M, Mahajna J, Wasser SP. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;67:453-468.
6. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharide, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;60: 258-274.
7. Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, Wang Q. Anti-tumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity, *Trends Food Sci Technol*. 2007;18:4-19.
8. Ferreira ICFR, Vaz JA, Vasconcelos MH, Martins A. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential, Anti-Cancer Agents *Med Chem*. 2010 ;10:424-436.

dCollection @ chosun

9. Peng Y, Zhang L, Zeng F, Xu Y. Structure and anti-tumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium, *Carbohydr Polym*. 2003;54:297-303.
10. Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HFJ. Anti inflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites, *Mediat Inflamm*. 2005;2:63-80.
11. Zhanga M, Zhua L, Cui SW, Wanga Q, Zhou T, Shen H. Fractionation, partial characterization and bioactivity of water soluble polysaccharides and polysaccharide-protein complexes from *Pleurotus geesteranus*, *Int J Biol Macromo*l. 2011;48:5-12.
12. Sun Y, Liu J. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatu*s, *Bioresour Techno*l. 2009;100:983-986.
13. Cho EJ, Oh JY, Chang HY, Yun JW. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom Tremella fuciformis, *J Biotechnol*. 2006;127:129-140.
14. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*. 2008;58:71-96.
15. Bobek P, Ozdin L, Kuniak L: Antioxidative effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in hypercholesterolemic rat, *Pharmazie.* 1995;50:441-442.
16. Paulik S, Svrcek J, Mojzisova J, Durove A, Benisek Z, Huska M. The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leucocytes in mice, *Z V Medicine*. 1996;43:129-135.
17. Gu YH, Sivam G. Cytotoxic effect of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells, *J Med Food* 9. 2006;196-204.
18. Lavi I, Friesem D, Geresh S, Hadar Y, Schwartz B: An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*

dCollection @ chosun

induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells, *Cancer Lett*. 2006;244: 61-70.

19. Al-Deen, I.H.S., Twaij, H.A.A., Al-Badr, A.A., Istarabad, T.A.W. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostreatus* mushroom in mice, *J Ethnopharm*. 1987;21:297-305.

dCollection @ chosun