

아가리쿠스로부터 분리한 β -glucan과 그 올리고당류의 HT-29 인체 대장암 세포에 대한 항암 활성에 관한 연구

이미영 · 김기훈¹ · 김예운 · 장현길 · 이동석^{1,*}

인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과, 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터

¹인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과, BK21 식의약생명공학사업단

최을 첨가하여 배양한 아가리쿠스버섯(*Agaricus blazei* Murill)으로부터 열수 추출, gel filtration chromatography, DEAE ion exchange chromatography를 통하여 아가리쿠스 β -glucan (AG)을 추출하였다. 추출한 아가리쿠스 β -glucan에 *Bacillus megaterium* 유래의 endo- β -(1 \rightarrow 6)-glucanase를 처리하여 올리고당류(AO)를 얻었다. 이렇게 얻은 AG와 AO를 이용하여 HT-29 인체 대장암 세포에 대한 항암 활성을 조사한 결과, 암세포의 성장 억제 효과는 시료의 처리 농도에 의존적으로 증가하였으며, apoptosis assay에서 암세포의 apoptosis 유발이 농도에 의존적으로 증가되었다. 또한, 암세포의 세포 주기를 분석한 결과, apoptosis 발생을 뜻하는 G0 (sub-G1)기와 G1기의 비율이 증가한 반면 S기와 G2/M기는 대조군에 비해 감소되었다. 이러한 결과를 바탕으로 암세포의 apoptosis 증가에 대한 AO의 작용이 어떤 유전자와 연관이 있는지를 알아보기 위하여 cDNA microarray를 통해 유전자의 발현을 검색한 결과, apoptosis의 내부·외부 경로에 영향을 주는 유전자(TNFSF9, TNFRSF9, FADD, CASP8, BAD, CRADD, CASP9 등)의 발현이 증가되었고, 세포 분열 주기의 진행과 관련된 유전자(CCND2와 CDK2)의 발현이 감소되었으며, 세포 분열 주기를 지체시키는 유전자(CDKN2A)의 발현은 증가되었다. 또한, 사이토카인을 암호화하는 유전자(IL6, IL18, IL6R 등)와 tumor suppressor와 관련된 유전자(CEACAM1, TP53BP2, IRF1 및 PHB)의 발현이 2배 이상 증가된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 HT-29 인체 대장암 세포에 대한 AO의 성장 억제 작용은 G0/G1기를 지체시켜 암세포 증식을 억제하고 apoptosis에 의해 암세포를 사멸시키는 항암 활성을 나타내는 것으로 확인되었으며, 특히 AO가 AG보다 현저한 활성을 보였다. 더 나아가 아가리쿠스 β -glucan (AG)과 올리고당류(AO)는 항암 활성을 가진 대체 의약 소재로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

Key words □ *Agaricus blazei*, anti-cancer activity, apoptosis, cDNA microarray, cell cycle, β -glucans, HT-29, oligosaccharides

국내에서도 암은 사망원인 1위를 차지하는 질병으로, 암 중에서도 대장암은 급격히 증가하여 암 발생 빈도나 사망률에 있어서 전체 암 중 4위를 차지하고 있으며, 지속적인 증가 추세를 보이고 있다. 이는 경제 발전으로 인한 생활 수준의 향상과 그에 따른 식생활 형태 변화로 열량 섭취와 동물성 식품의 소비가 늘어난 반면 곡류와 채소 등 식물성 식품의 섭취가 감소하였기 때문인 것으로 보인다. 암은 식습관, 환경의 변화 및 수명 연장으로 인해, 10년 전과 비교해 볼 때 매우 급격히 증가하고 있으며 인류가 극복하지 못한 많은 질환 중에서도 위협적인 질환으로서 인간의 수명 연장을 위해 극복해야 할 과제로 인식되고 있다.

최근들어 약용·식용 식물을 이용한 생리 활성 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 천연물에서 유래한 다당체는 다양한 생물 활성을 나타내어, 기능성 및 대체 의약 소재 분야에서 크게 주목 받고 있다. 최근에는 버섯들의 항암 효과에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, 담자균류 등으로부터 분리된 이들 항암

성분들은 대개 다당체 또는 단백질 다당체(protein-bound polysaccharide)이며(3, 6), 이들은 기존의 세포 독성 항암제와는 달리 뚜렷한 부작용이 없을 뿐만 아니라 항암제와 병행 투여하였을 경우 항암제가 가지고 있는 고유의 독성이나 부작용을 완화시켜주는 작용도 가지고 있고(7, 9), 항암 활성의 상승 효과를 나타낸다고 알려져 있다(21).

버섯들 중에 항암효과가 가장 뛰어난 것으로 알려져 있는 아가리쿠스버섯(*Agaricus blazei* Murill)은 흰들버섯, 신평버섯이라고도 하며 주름버섯목, 주름버섯과, 주름버섯속에 속하는 버섯으로 겉모양은 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)과 유사하지만, 버섯대가 두껍고 길며 향기가 강력한 것이 특징이다. 민간에서는 아가리쿠스버섯의 대표적인 약리 작용으로 제암 작용, 암의 예방 효과, 혈당 강하 작용, 혈압 강하 작용, 콜레스테롤 저하 작용, 항혈전 작용 등이 있는 것으로 알려져 있고(8, 19), 생리 활성을 갖는 물질로는 혈구 응집 작용을 나타내는 lectin이 대표적이다(13). 그러나 아가리쿠스버섯으로부터 유래한 다당체나 올리고당류에 대한 보고는 미비하고 특히 항암 활성에 대한 과학적이고 체계적인 생리 활성 규명은 전무한 실정이다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-55-320-3262, Fax: 82-55-334-3426
E-mail: mbdslee@inje.ac.kr

한편, 올리고당은 생리 활성 효과를 가진 기능성 생물 소재로서 각광을 받고 있는데, 올리고당이란 당분자를 2~10 정도 포함하고 있는 oligomer를 지칭하는 것으로서 이중에서 인체 효소에 의해 분해, 흡수가 되지 않는 난소화성 올리고당을 기능성 올리고당이라고 지칭한다(4). 대부분의 올리고당은 장에서 비피더스균을 선택적으로 증식시켜 우수한 probiotics 효능을 나타내므로 이들의 작용 기작이나 영양소와의 상호작용, 면역 활성, 항암 효과 등에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(10, 22). 특히 본 연구자들은 *Bacillus megaterium*으로부터 유래한 endo- β -(1 \rightarrow 6)-glucanase를 이용하여 새로운 올리고당류를 제조하고 이들의 활용 가능성을 탐색하고자 한다.

따라서 본 연구에서는 식용 및 약용으로서의 가치가 매우 높은 것으로 알려져 있는 아가리쿠스버섯으로부터 β -glucan을 추출하고 올리고당화하여 이들의 HT-29 인체 대장암 세포에 대한 항암 활성을 알아보고, 더 나아가 항암 활성에 관련된 유전자들의 발현에 미치는 양상을 탐색하여 아가리쿠스의 β -glucan과 그 올리고당류가 바이오헬스 소재 및 대체 의약 소재로 개발될 수 있는 가능성을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

아가리쿠스로부터 β -glucan (AG)의 추출·분리

침출 배지로서 키운 아가리쿠스(장춘 침아가리쿠스 농장, 경남 김해시 소재)를 건조시킨 후 분말화하여 사용하였다. 아가리쿠스 분말을 80% 에탄올에 48시간 침지해 전처리하여 지질 등의 저분자 물질을 제거한 다음 전처리한 분말을 100°C, 3시간 동안 3번 열수 추출하였다. 이 추출물을 10배 농축하여 gel filtration chromatography를 통해 분자량을 확인하고 그 다당체 분획을 받았다. 이 분획을 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0에 용해하여 DEAE-sephadex A-25로 충전된 column에 적정한 다음 buffer로 용출한 후 같은 buffer에 0~0.2 M NaCl 농도의 용매로 용출하여 분획을 받았으며, 이 분획을 β -glucan (AG)으로 추정하였다. 분획은 phenol-H₂SO₄법으로 총당량을 측정하였고, dextran을 standard로 하여 분획의 분자량을 추정하였으며, 단백질은 UV₂₈₀으로 확인하였다(12).

아가리쿠스 β -glucan의 올리고당(AO)화

Bacillus megaterium 유래의 endo- β -(1 \rightarrow 6)-glucanase는 β -1,6-glucan에만 특이적으로 활성을 나타내어 아가리쿠스 β -1,6-glucan의 올리고당화에 사용하였다. 아가리쿠스로부터 추출한 AG에 *B. megaterium* 유래의 효소액을 다음과 같이 준비하여 반응시켰다(11). *B. megaterium*은 LB 액체 배지를 사용하여 37°C에서 18시간 동안 진탕 배양 후 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액만 분리하였다. 기질인 1% AG에 효소액 1ml을 넣고 55°C에서 24시간 반응시켰다. 70°C에서 10분 동안 두어 효소를 불활성화한 후에 10,000×g, 20분 동안 원심분리하여 상등액은 버린 뒤에 침전물은 건조시켜 이를 올리고당류(AO)로 사용하였다(12).

암세포주 및 배양 조건

한국세포주은행으로부터 HT-29 인체 대장암 세포(human colon cancer cell)를 분양받아 10%의 우태아혈청(FBS, fetal bovine serum, Hyclone)과 1%의 5,000 units/ml penicillin, 5,000 μ g/ml streptomycin (Gibco BRL, USA)이 포함된 RPMI 1640 배지(Gibco BRL, USA)를 사용하여 배양하였다. 세포는 5% CO₂가 공급되고 습도가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하였으며, 2일 간격으로 배지를 교환해주고 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 0.25% trypsin, 1 mM EDTA (Gibco BRL, USA)를 처리하여 일주일에 1~2회 계대배양하였다.

암세포의 성장 억제 효과

MTT assay는 Cell Proliferation Kit I (Roche)을 사용하여 다음과 같이 진행하였다. 세포배양용 96 well plate의 well에 1×10⁵ cells/ml 농도의 HT-29 인체 대장암 세포를 100 μ l씩 분주하여 24시간 동안 안정화시켰다. AG 및 AO는 D.W를 이용하여 농도별로 희석한 후, 각 well당 10 μ l씩 첨가하고 대조군에는 D.W만 10 μ l 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 5 mg/ml의 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 plate의 각 well에 10 μ l씩 첨가해주고 다시 37°C에서 4시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 종료 후 생성된 formazan 결정을 녹이기 위하여 solubilization buffer를 100 μ l씩 첨가한 후 하룻밤 배양하고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해서 환원된 양을 나타내며, 각 well에 존재하는 생존수와 비례한다.

Annexin V를 이용한 apoptosis 분석

세포배양용 12 well plate의 well에 3×10⁵ cells의 HT-29 인체 대장암 세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시켰다. 실험군에는 AG 및 AO를 1~4 mg/ml의 농도가 되도록 희석 처리하고 대조군에는 동량의 D.W를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 0.25% trypsin, 1 mM EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 배지를 가하여 현탁하고 15 ml tube에 옮긴 후 1,000×g에서 5분 동안 원심분리하였다. 침전물을 차가운 PBS로 2번 washing한 후 1×binding buffer를 첨가하여 재부유시켰다. 부유된 세포를 100 μ l만 5 ml tube로 옮긴 후 Annexin V-FITC 5 μ l와 PI 10 μ l를 첨가하여 암실, 실온(20~25°C)에서 15분 간 반응하였다. 반응 후 1×binding buffer 400 μ l를 첨가하고 1시간 이내에 FACSCalibur™ (Becton Dickinson)로 분석하였다(24).

PI를 이용한 세포주기의 분석

세포 주기의 분석은 CycleTEST™PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson)를 사용하여 다음과 같이 진행하였다. 세포배양용 12 well plate의 well에 3×10⁵ cells의 HT-29 인체 대장암 세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시켰다. AG 및 AO는 각각 2 mg/ml, 4 mg/ml의 농도가 되도록 희석 처리하고 대조군으로는 동량의 D.W를 처리한 후 24시간, 48시간 배양하였다. 배양 후 0.25% trypsin, 1 mM EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 배지를

가하여 현탁하고 15 ml tube에 옮긴 후 1,000×g에서 5분 동안 원심분리를 하였다. 침전물에 buffer solution 1 ml을 첨가하여 현탁한 다음 5 ml tube로 옮긴 후, 1,000×g에서 5분 동안 원심분리하고 상등액을 제거하였다. Solution A 250 μ l를 넣고 손으로 가볍게 tapping하여 섞은 후 실온에서 10분간 반응하였다. 이어서 Solution B 200 μ l를 넣고 역시 가볍게 tapping하여 섞은 후 실온에서 10분간 반응하였다. 마지막으로 차가운 Solution C 200 μ l를 넣고 섞은 후 암실, 4°C에서 10분간 반응하였다. 반응 후 3 시간 이내에 FACSCalibur™로 분석하였다.

아가리쿠스 올리고당류에 의한 cDNA microarray 유전자 발현물의 검색

세포배양용 petri dish에 1×10^7 cells의 HT-29 인체 대장암 세포를 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후 세포를 PBS로 세척하고 4 mg/ml의 AO를 첨가하였으며, 대조군에는 동량의 D.W.를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. Total RNA는 RNAgents® Total RNA Isolation System (Promega)을 이용하여 분리하였고, total RNA는 spectrophotometer와 전기영동을 통하여 농도와 순도를 측정하였다. 각각의 RNA 시료는 MICROMAX™ Direct cDNA Microarray System (PerkinElmer™)을 이용하였으며, Cyanine 3-dUTP (Cy-3)와 Cyanine 5-dUTP (Cy-5)를 사용한 역전사 합성법으로 cDNA probe를 제작하였다. MICROCON YM-100 (Millipore)을 이용하여 합성된 cDNA probe를 정제하였고, 정제된 probe와 25% formamide hybridization 용액을 잘 섞어 준비한 뒤에 GenePloer™ TwinChip™ Cancer-1K microarray 칩에 loading한 후 55°C, 18시간 동안 hybridization하였다. Hybridization 반응이 끝나면 세척용액 I (1×SSC, 0.1% SDS)으로 58°C, 10분 동안 세척한 후, 곧이어 세척용액 II (0.1×SSC, 0.1% SDS)로 25°C, 10분 동안 세척해 주고, 마지막으로 세척용액 III (0.1×SSC, No SDS)로 25°C, 10분 동안 세척하였다. ScanArray® Express Scanner System (Perkin Elmer™)을 이용하여 Cy-3와 Cy-5의 형광 이미지를 각각 scanning하고 형광 강도를 측정하였다. QuantArray™ Analysis Software (PerkinElmer™)를 이용하여 microarray상의 housekeeping 유전자를 대조군으로 설정한 후 녹색과 적색 파장에서의 두 형광 이미지를 표준화하였다.

결과 및 고찰

아가리쿠스로부터 β -glucan 추출·분리 및 올리고당화

Fig. 1에 나타난 바와 같이 아가리쿠스를 에탄올에 전처리하여 지질 등 저분자 물질을 제거하고 열수 추출과 gel filtration chromatography를 통해 아가리쿠스 β -glucan (AG)을 추출하였다. AG의 분자량은 phenol-H₂SO₄법에 의해 30~50 kDa으로 추정되었고 DEAE ion exchange chromatography를 통해 단백질과 결합하고 있는 것을 확인하였다. *B. megaterium* 유래의 endo- β (1→6)-glucanase를 이용하여 β -(1→6) 결합인 아가리쿠스 β -glucan을 가수 분해하여 dioligosaccharide와 trioligosaccharide를 생성하

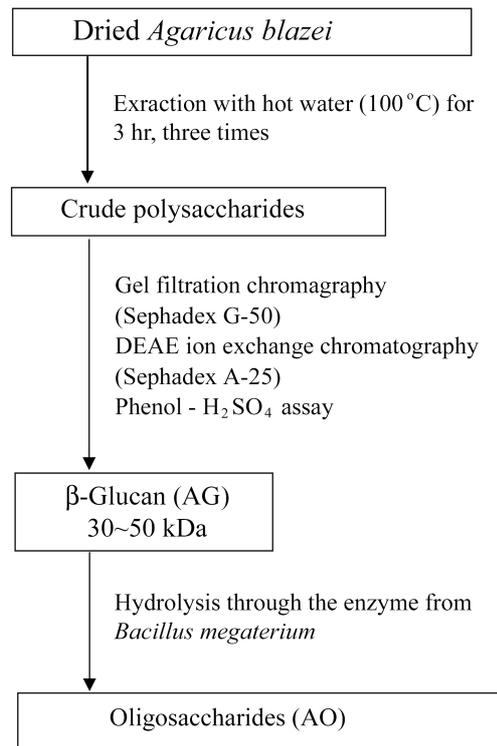


Fig. 1. Purification of β -glucans from *A. blazei* and preparation of their oligosaccharides

였고, 이를 AO라 명명하였다(12). 이렇게 생성된 새로운 올리고당은 β -glucan의 기능성을 가질 뿐만 아니라 체내 흡수율이 높아 더욱 다양한 생리 활성을 나타낼 것으로 기대된다.

아가리쿠스 β -glucan 및 올리고당류의 암세포 성장 억제 효과

HT-29 인체 대장암 세포의 성장에 미치는 아가리쿠스의 영향을 분석하기 위하여 AG 및 AO의 처리 농도에 따른 암세포 생존율을 MTT assay법으로 조사하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 D.W.를 처리하고 48시간 배양한 대조군을 100% 생존군으로 보았을 때, 암세포의 성장이 시료의 처리 농도에 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. AO는 비교적 AG보다 높은 억제 효과를 나타내었다.

아가리쿠스 β -glucan 및 올리고당류에 의한 apoptosis 유발

AG 및 AO의 처리에 의한 암세포 증식의 억제가 암세포의 apoptosis를 통하여 발생하는지 알아보기 위하여 대조군 및 실험군의 암세포들을 Annexin V-FITC와 PI로 염색하여 apoptosis의 정도를 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. AG 및 AO를 1~4 mg/ml의 농도로 첨가한 후 48시간 동안 배양하였을 때 농도에 의존적으로 apoptotic death가 증가함을 알 수 있었고 MTT assay 결과처럼 AO가 AG보다 apoptosis를 더 많이 유발하는 것으로 확인되었다. 한편, apoptotic death를 초기 apoptosis와 후기

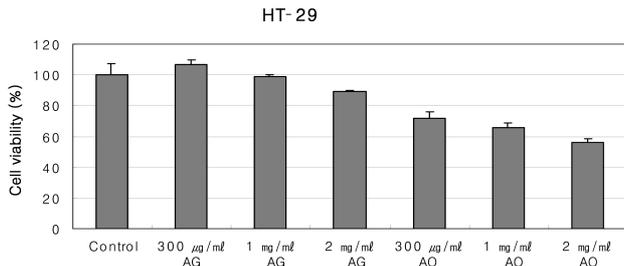


Fig. 2. Dose-dependent effect of AG or AO on viability of HT29 cells. Cells were cultured with different concentrations for 48 hr, and cell viability was determined by the MTT assay. All experiments were performed in triplicates.

apoptosis 내지 necrosis로 나누어 살펴본 결과, 4 mg/ml 농도의 AG 및 AO를 처리한 후 48시간 배양하였을 때 초기 apoptosis의 비율이 대조군에 비하여 각각 약 2배, 3배 증가하였음을 확인하였다(Fig. 3). 이러한 결과로 미루어보아 AG 및 AO가 HT-29 인체 대장암 세포의 초기 apoptotic death의 비율을 증가시킴으로써 apoptosis에 의한 세포 사멸을 유도하는 것으로 판단된다.

아가리쿠스 β-glucan 및 올리고당류의 처리에 따른 암세포 주기의 분석

세포 주기란 세포가 성장, 분열하여 딸세포를 만드는 일련의 주기적 과정으로, 전형적으로 4기로 구분되는데, G0기는 세포 주기에서 벗어나 분열을 중지한 세포나 apoptosis가 유발된 세포들이 있는 단계이고 G1기와 G2기는 휴지기(gap period), S기는 DNA를 두 배로 합성하는 단계, M기는 세포 분열이 일어나는 분열기(mitosis)이다. Table 1에서 나타나는 바와 같이 대조군에

서는 G1기와 S기, G2/M 기에 있는 세포 집단이 전형적인 분포를 나타내고 있으며 G0기의 비율이 1.4%로 apoptosis 현상을 거의 관찰할 수 없었으나, AG 및 AO를 처리한 세포군에서는 apoptosis 발생을 뜻하는 G0 (sub-G1)기와 G1기의 비율이 증가한 반면 S기와 G2/M기는 대조군에 비해 감소되었다. 이러한 결과로 AG 및 AO는 HT-29 인체 대장암 세포의 G0/G1기를 지체시켜 S기로의 전환을 방해함으로써 apoptosis를 유발하여 항암 활성을 나타내는 것으로 유추해 볼 수 있다.

아가리쿠스 올리고당류 처리에 따른 유전자 발현의 변화

HT-29 인체 대장암 세포에 대한 AO의 작용이 어떤 유전자와 연관되어 있는지를 확인하기 위하여 GenePloer™ TwinChip™ Cancer-1K를 이용하여 AO에 의해 영향을 받는 유전자들을 검색하였다. 앞선 실험 결과에서 암세포의 성장 억제 효과 및 apoptosis의 유발이 AG보다 AO를 처리하였을 때 더 높은 효과를 나타내었기 때문에 AO에 대한 cDNA microarray를 수행하였다. AO를 첨가하였을 때 대조군과 비교하여 발현이 증가하거나 감소하는 유전자들을 Table 2에 나타나 바와 같이 확인하였다. cDNA microarray 결과 978개의 유전자 중에서 103개인 11%의 유전자들의 발현이 2배 이상 증가되거나 감소되었는데, 그 중 항암 활성과 관계가 있는 유전자들을 조사하였다.

Apoptosis는 생명체의 발생과 분화에 매우 중요한 과정으로서 apoptosis의 작용 경로에는 여러 가지 설이 있으나 주로 두 가지 경로가 받아들여지고 있는데, death receptor를 통한 수용체 매개성(외인성) 세포 사멸 경로와 세포외적 요인이나 DNA 손상 등의 내적 요인에 의해 유발되는 미토콘드리아 매개성(내인성) 세포 사멸 경로가 있다. 유전자 조사 결과, 외부 경로에 영향을 주는 TNFSF9, TNFRSF9, FADD 및 CASP8 등의 유전자가 2배

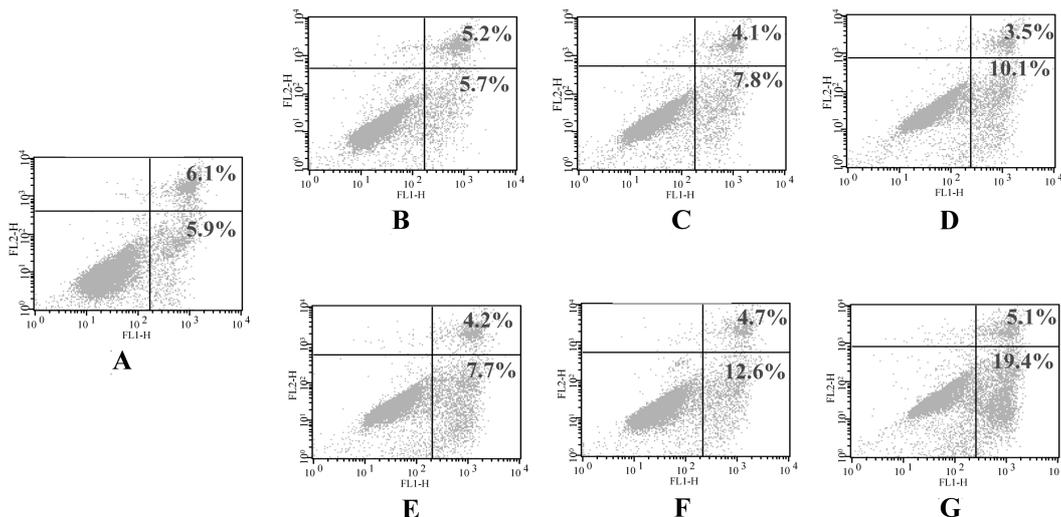


Fig. 3. Flow cytometry analysis of apoptotic death in HT-29 cells. HT-29 cells were treated with graded concentrations of AG or AO for 48 hr and then stained with Annexin V-FITC and PI. Annexin V-FITC-/PI- (LL), indicating that they were viable and not undergoing apoptosis. Annexin V-FITC+/PI-(LR), indicating that they were undergoing apoptosis. Annexin V-FITC+/PI+ (UR), indicating that they were in end stage apoptosis or already dead. All experiments were performed in triplicates. Symbol : (A), control; (B), AG 1 mg/ml; (C), AG 2 mg/ml; (D), AG 4 mg/ml; (E), AO 1 mg/ml; (F), AO 2 mg/ml; (G), AO 4 mg/ml. *LL : lower left, LR : lower right, UR : upper right

Table 1. Effect of AG or AO on the cell cycle distribution in HT-29 cells

Reaction Time (hr)	G0(%)	G1(%)	S(%)	G2/M(%)
Control	1.4±0.8	34.4±2.1	39.7±1.2	24.9±1.9
AG				
24	2.4±1.4	41.5±1.6	37.2±1.3	19.1±2.2
48	9.3±1.1	40.0±2.5	31.5±3.2	19.6±1.5
AO				
24	2.1±1.0	36.6±2.1	44.6±1.9	17.2±1.2
48	12.4±1.1	39.4±3.0	24.0±1.4	25.0±1.8

The values represent the mean±standard deviation for triplicate experiments.

이상 발현이 증가되었다. TNFSF는 tumor cell과 transformed cell에서 apoptosis를 유도하며, TNFRSF와 결합하여 MAPK8/JNK, caspase 8 및 caspase 3의 activation을 일으킨다(5). 또한, FADD는 Fas의 death domain과 작용하여 caspase 8과 caspase 10을 활성화시켜 apoptosis의 진행을 시작한다. FADD와의 결합을 통하여 활성화된 caspase 8은 effector caspase (caspase 3 또는 caspase 7)를 활성화시켜 일련의 연쇄적인 효소들의 작용을 통해 세포 사멸을 유발한다(2, 26). 한편, 미토콘드리아를 중심으로 하는 apoptosis의 내부 경로에 영향을 주는 BAD, CRADD 및 CASP9 등과 같은 유전자가 2배 이상 발현이 증가되었다. Bcl-2 family에 속하며, apoptosis를 촉진하는 기능을 가진 BAD는 세포 내에서 미토콘드리아로 이동되어 Bcl-2나 Bcl-xL의 작용을 억제하여 미토콘드리아로부터 cytochrome c의 분비를 촉진시켜, ATP 하에 Apaf-1과 procaspase 9과 aposome을 형성하여

caspase 9을 활성화하고 apoptosis의 최종 작용 물질인 caspase 4, 6, 7 등을 활성화시켜 세포의 DNA를 분해함으로써 apoptosis를 유발한다(15, 16). CRADD는 death domain (DD)를 가지는 adaptor이며, apoptosis cascade의 activation을 유도한다(1). 이와 같이 apoptosis의 외인성 경로와 내인성 경로에 영향을 주는 유전자들의 발현 증가는 apoptosis를 증진시키는 효과를 나타내어 HT-29 인체 대장암 세포의 사멸을 촉진하는 것으로 보인다.

AO에 의해 영향을 받는 유전자 중에서 세포 분열 주기와 관련된 유전자들을 살펴보면, CCND2와 CDK2 등의 유전자들의 발현이 감소되고 CDKN2A의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 종류에 따라 약간의 차이는 있지만 포유동물 세포의 G1기의 초기에는 주로 cyclin D와 CDK2, CDK4, CDK6 등이 결합된 복합체들이 활성화되고, G1기의 말기에는 cyclin E가 합성되기 시작하여 CDK2와 결합해서 G1/S 주기 이행을 담당하는데(20), 세포 분열 주기에 관련된 유전자 중에서 CCND2와 CDK2 유전자의 발현 감소는 G1기에서 S기로의 진행을 감소시킬 것으로 사료된다. 세포 주기 진행을 억제하는 대표적인 조절 인자 중 하나인 CDKN2A는 G1-S 전이에서 G1기의 cyclin D-CDK complex에 특이적인 억제 인자로 작용하여 세포 주기의 시작을 조절하는 것으로 알려져 있으며, CDKN2A가 발현될 경우 G0/G1기의 초기에 나타나는 CDK4와 CDK6에 강하게 결합하여 이들의 kinase 활성을 억제한다(18). 이와 같이 CCND2와 CDK2 유전자의 발현 감소와 CDKN2A 유전자의 발현 증가는 G1기에서 S기로의 진행을 감소시키고 G0/G1기를 지체시켜 암세포의

Table 2. Significant genes up- and down-regulated by AO treatment

Genes	Fold of expression
Tumor necrosis factor superfamily, member 7 (TNFSF7)	+5.13
Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease (CASP8)	+4.88
CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (CFLAR)	+4.55
Tumor necrosis factor superfamily, member 6 (TNFSF6)	+4.35
Caspase 7, apoptosis-related cysteine protease (CASP7)	+4.04
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8 (TNFRSF8)	+3.60
Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease (CASP3)	+3.59
Caspase 9, apoptosis-related cysteine protease (CASP9)	+3.49
Fas (TNFRSF6)-associated via death domain (FADD)	+3.48
Tumor necrosis factor superfamily, member 9 (TNFSF9)	+3.45
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9 (TNFRSF9)	+3.45
BCL2-antagonist of cell death (BAD)	+3.25
Tumor necrosis factor superfamily, member 10 (TNFSF10)	+2.20
CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain (CRADD)	+2.01
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)	+3.63
Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2)	-2.70
Cyclin D2 (CCND2)	-3.73
Interleukin 12A (IL12A)	+5.03
Interleukin 18 (IL18)	+4.08
Interleukin 4 (IL4)	+3.94
Interleukin 6 (IL6)	+3.58
Interleukin 6 receptor (IL6R)	+3.57
Tumor protein p53 binding protein, 2 (TP53BP2)	+5.04
Interferon regulatory factor 1 (IRF1)	+4.02
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1)	+3.82
Prohibitin (PHB)	+2.99

증식을 억제시키는 것으로 사료된다.

AO에 영향을 받은 유전자들 중에서 IL6, IL18 및 IL6R 등의 사이토카인을 암호하는 유전자의 발현이 2배 이상 증가된 것을 확인할 수 있었다. 사이토카인은 면역 세포에 의해 분비되는 면역 조절성 수송 단백질로 세포 상호간의 작용을 매개하는 역할을 하며, 수송성 세포의 단백 또는 당단백으로 세포 내의 결정적인 매개와 집합체뿐만 아니라 염증에 대한 자기 방어와 세포의 성장, 분화, 사멸 및 혈관 형성, 항상성의 회복과 발달에 중요한 작용을 한다. IL-6는 IL-6R과 결합하여 단핵구/대식세포, 내피세포, T림프구, B림프구 등에서 분비되고 광범위한 조직과 세포에 작용하여 표적세포에 따라 세포 증식 촉진 작용, 세포 증식 억제 작용, 분화 유도 작용 등 여러 가지 기능을 가진 소위 다기능 사이토카인으로 면역 조절에 중요한 역할을 한다(23). IL-18은 NK 세포 활성화와 T 세포의 증식을 높이며, 세포 독성 T 세포의 항암 반응과 관련된 Th1 type cytokine의 생산을 증가시킨다(27). 이와 같이 IL6, IL18 및 IL6R 유전자의 발현 증가는 면역 조절 단백질의 성장, 분화 및 세포 사멸 등을 촉진하는 것으로 사료된다. 따라서 AO는 간접적으로 면역 활성을 증가시켜 항암 활성 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

또한, tumor suppressor와 관련된 유전자들 중에서 CEACAM1, TP53BP2, IRF1 및 PHB의 발현이 2배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었는데, CEACAM1은 tumor angiogenesis를 억제하여 tumor의 suppressor로 기능하며(25), TP53BP2는 p53의 tumor suppression 기능을 조절한다(14). IRF1는 발암성 cell lines의 apoptosis를 유도하는 tumor suppressor transcription factor로서 작용하고(28), PHB는 E2F1의 기능을 조절하여 잠재적인 tumor suppressor의 역할을 한다(17). 위와 같은 유전자의 발현의 증가는 HT-29 인체 대장암 세포의 성장을 억제하여 항암 활성을 나타내는 것으로 보인다.

따라서 유전자 발현율을 분석해 본 결과 AO가 HT-29 인체 대장암 세포에 작용하여 apoptosis의 내부·외부 경로에 영향을 주는 유전자(TNFSF9, TNFRSF9, FADD, CASP8, BAD, CRADD 및 CASP9 등)의 발현을 증가시켜, 세포 분열 주기의 진행과 관련된 유전자(CCND2 및 CDK2)의 발현을 감소시켰으며, 세포 분열 주기를 지체시키는 유전자(CDKN2A)의 발현은 증가시켰을 뿐만 아니라 사이토카인을 암호하는 유전자(IL6, IL18 및 IL6R 등)와 tumor suppressor와 관련된 유전자(CEACAM1, TP53BP2, IRF1 및 PHB)의 발현을 2배 이상 증가시킨 것을 확인하였는데, 이는 앞서 기술한 HT-29 인체 대장암 세포의 apoptosis 유발과 암세포 주기 분석에서 나타난 결과와 일치한다.

이상의 연구 결과 AG 및 AO는 배양된 HT-29 인체 대장암 세포의 성장 억제 효과를 보였으며, 이런 효과가 apoptosis의 유발과 연관되어 있음을 확인하였고, 세포 주기에 변화를 일으켜 G0/G1기를 지체시켰음을 확인하였다. AO에 의해 영향을 받은 유전자를 검색해 본 결과 apoptosis의 외부 경로 및 내부 경로에 영향을 주는 유전자와 세포 주기에 관여하는 유전자, 사이토카인을 암호하는 유전자, tumor suppressor와 관련된 유전자의 발현이 증가되거나 감소된 것으로 보아, AO는 세포 분열 주기 중

G0/G1기를 지체시켜 암세포 증식을 억제하고 apoptosis에 의해 암세포의 사멸을 유발시키는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 얻어진 아가리쿠스로부터 분리한 AG와 AO는 항암 활성을 갖는 고기능성 바이오헬스 소재 및 새로운 대체 의약 소재로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 2005년도 인제대학교 학술연구조성비 보조에 의한 것임.

참고문헌

1. Ahmad, M., S.M. Srinivasula, L. Wang, R.V. Talanian, G. Litwack, T. Fernandes-Alnemri, and E.S. Alnemri. 1997. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res.* 57, 615-619
2. Chang, H.Y. and X. Yang. 2000. Proteases for cell suicide: Functions and regulations of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 821-846
3. Choi, J.W., D.Y. Ryu., Y.K. Kim, E.G. Hong, M.S. Kwun, and J.S. Han. 2000. Extraction and purification of bioactive materials from *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 15, 293-298
4. Choi, Y.B., K.S. Kim, K.H. Lee, and H.S. Sohn. 1995. Development of soy oligosaccharides. *Korea Soybean Digest.* 12, 68-74
5. Collette, Y., A. Gilles, P. Pontaroti, and D. Olive. 2003. A co-evolution perspective of the TNFSF and TNFRSF families in the immune system. *Trends Immunol.* 24, 387-394
6. Ebina, T. and Y. Fugimiya. 1998. Antitumor effects of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. *Biotherapy.* 11, 259-265
7. Ishii, K., T. Kita, J. Hirata, T. Tode, Y. Kikuchi, and I. Nagata. 1993. Antitumor effect of PSK and its combined effect with CDDP on ovarian serous adenocarcinoma-bearing nude mice. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 45, 333-339
8. Kawagishi, H., A. Nomura, T. Yumen, T. Mizuno, T. Hagiwara, and T. Nakamura. 1988. Isolation and properties of a lectin from the fruiting bodies of *Agaricus blazei*. *Carbohydr. Res.* 183, 150-154
9. Kidd, P.M. 2000. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Altern. Med. Rev.* 5, 4-27
10. Kim, J.Y., W.K. Kim, H.Y. Kim, M.H. Kim, and S.H. Kim. 2000. Effects of soyoligosaccharides and varying dietary fats on intestinal microflora, lipid profiles and immune responses in rats. *Korean J. Nutrition.* 33, 597-612
11. Kim, K.H., Y.O. Kim, B.S. Ko, H.J. Youn, and D.S. Lee. 2004. Overexpression of the gene(*bglBC1*) from *Bacillus circulans* encoding an endo- β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)-glucanase useful for the preparation of oligosaccharides from barley β -glucan. *Biotechnol. Lett.* 26, 1749-1755
12. Kim, Y.W., K.H. Kim, H.J. Choi, and D.S. Lee. 2005. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnol. Lett.* 27, 483-487
13. Lee, M.H., H.J. Lee, and I.S. Cho. 1998. Chemical composition of *Agaricus blazei* Murill fruiting bodies cultivated in a Korea local

- farm. *J. Fd Hyg. Safety*. 13, 94-98
14. Liu, Z.J., X. Lu, and S. Zhong. 2005. ASPP-Apoptotic specific regulator of p53. *Biochim. Biophys. Acta*. 1756, 77-80
 15. Moon, B.K. 2002. Anesthesiology and apoptosis. *Korean J. Anesthesiol.* 42, 563-574
 16. Zha, J., H. Harada, K. Osipov, J. Jockel, G. Waksman, and S.J. Korsmeyer. 1997. BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* 272, 24101-24104
 17. Mishra, S., L.C. Murphy, B.L.G. Nyomba, and L.J. Murphy. 2005. Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol. Med.* 11, 192-197
 18. Peris, K., G. Stanta, M.C. Fagnoli, S. Bonin, A. Felli, A. Amantea, and S. Chimenti. 1999. Reduced expression of CDKN2a/p16^{INK4a} in mycosis fungoides. *Arch. Dermatol. Res.* 291, 207-211
 19. Seo, B.I. 2003. A study on *Agaricus blazei*. *J. Appl. Oriental Medicine*. 3, 83-89
 20. Sherr, C.J. 1995. Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 107, 181-186
 21. Suzuki, M., S. Higuchi, Y. Taki, S. Taki, K. Miwa, and J. Hamuro. 1990. Induction of endogenous lymphokine-activated killer activity by combined administration of lentinan and interleukin 2. *Int. J. Immunopharmacol.* 12, 613-623
 22. Taper, H.S. and M.B. Roberfroid. 2002. Inulin/oligofructose and anticancer therapy. *British J. Nutrition.* 87, S283-S286
 23. Tsukamoto, K., N. Ohta, Y. Shirai, and M. Emi. 1998. A highly polymorphic CA repeat marker at the human interleukin 6 receptor (IL6R) locus. *J. Hum. Genet.* 43, 289-290
 24. Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* 184, 39-51
 25. Volpert, O., W. Luo, T.J. Liu, V.T. Estrera, C. Logothetis, and S.H. Lin. 2002. Inhibition of prostate tumor angiogenesis by the tumor suppressor CEACAM1. *J. Biol. Chem.* 277, 35696-35702
 26. Wehrli, P., I. Viard, R. Bullani, J. Tschopp, and L.E. French. 2000. Death receptors in cutaneous biology and disease. *J. Invest. Dermatol.* 115, 141-148
 27. Yamanaka, R., J. Honma, N. Tsuchiya, N. Yajima, T. Kobayashi, and R. Tanaka. 2005. Tumor lysate and IL-18 loaded dendritic cells elicits Th1 response, tumor-specific CD8⁺ cytotoxic T cells in patients with malignant glioma. *J. Neuro-Oncol.* 72, 107-113
 28. Zhou, Y., S. Wang, A. Gobl, and K. Öberg. 2000. The interferon- α regulation of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 has therapeutic implications in carcinoid tumors. *Ann. Oncol.* 11, 707-714

(Received November 30, 2006/Accepted December 21, 2006)

ABSTRACT : Study on the Anti-HT-29 Human Colon Cancer Activity of β -Glucans and Their Enzymatically Hydrolyzed Oligosaccharides from *Agaricus blazei* Murill

Mi-young Lee, Ki-Hoon Kim¹, Yea-Woon Kim, Hun Gil Chang and Dong Seok Lee^{1*}

(Department of Biomedical Laboratory Science and Biohealth Products Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea, ¹Department of Biomedical Laboratory Science, BK21 Smart Food & Drug Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea)

β -Glucans (AG) were prepared from *Agaricus blazei* cultured in the medium fortified with the roots of *Pueraria* spp. by repeated extraction with hot water, gel filtration chromatography and DEAE ion exchange chromatography. Oligosaccharides (AO) were derived from the hydrolysis of AG by an endo- β -(1 \rightarrow 6)-glucanase from *Bacillus megaterium*. The anti-HT-29 human colon cancer activity of AG or AO was investigated using MTT assay, apoptosis assay, cell cycle analysis, and cDNA microarray. AG and AO both inhibited proliferation and growth of HT-29 cells, and stimulated apoptosis of the cells in a dose-dependent manner. In cell cycle analysis, treating HT-29 cells with AG or AO resulted in the increase of cells in the G₀ (sub-G₁) and G₁ phase. Especially, AO was more effective in inducing G₀/G₁ cell cycle arrest than AG. To screen the genes involved in the increase of apoptosis, the gene expression profile of the HT-29 cells treated with AO was examined by cDNA microarray. While several genes involved in cell cycle progression (CCND2 and CDK2) were down-regulated, many genes involved in apoptosis (TNFSF9, TNFRSF9, FADD, CASP8, BAD, CRADD, CASP9 etc), cell cycle inhibitor (CDKN2A), immune response (IL6, IL18, IL6R etc), and tumor suppressor (CEACAM1, TP53BP2, IRF1, and PHB) were up-regulated. These results suggest that AO could inhibit the proliferation and growth of HT-29 cells by G₀/G₁ cell cycle arrest and induction of apoptosis.