

2014년 2월

박사학위논문

박사학위논문

구강암세포에서 메탄올을 이용한  
전호 추출물의 caspase 의존성  
세포사멸 활성화

구강암세포에서 메탄올을 이용한 전호 추출물의 caspase 의존성 세포사멸 활성화

박승철

조선대학교 대학원

치의학과

박 승 철

구강암세포에서 메탄올을 이용한  
전호 추출물의 caspase 의존성  
세포사멸 활성화

Anticancer activity of methanol extract from  
*Anthriscus sylvestris* Hoffmann through caspase  
dependent apoptosis in KB human oral squamous  
cell carcinoma

2014년 2월 25일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

박 승 철

구강암세포에서 메탄올을 이용한  
전호 추출물의 caspase 의존성  
세포사멸 활성화

지도교수 김 수 관

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2013년 10월

조선대학교 대학원

치 의 학 과

박 승 철

# 박승철의 박사학위 논문을 인준함

위원장    조선대학교    교수    이 상 호 (인)

위    원    조선대학교    교수    김 수 관 (인)

위    원    부산대학교    교수    김 욱 규 (인)

위    원    조선대학교    교수    김 춘 성 (인)

위    원    조선대학교    교수    이 건 호 (인)

2013년 12월

조선대학교 대학원

# 목 차

ABSTRACT .....	iii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	5
III. 결과 .....	9
IV. 고찰 .....	17
V. 결론 .....	19
참고문헌 .....	21

## 도 목 차

Figure 1. Effect of the methanol extract of <i>Anthriscus sylvestris</i> Hoffmann on cell viability in KB human oral squamous carcinoma cells .....	10
Figure 2. Fragmentation of inter-nucleosomal DNA by the methanol extract of <i>Anthriscus sylvestris</i> Hoffmann treatment in KB human oral squamous carcinoma cells .....	12
Figure 3. The expression levels of apoptotic related proteins and caspase dependent proteins by the methanol extract of <i>Anthriscus sylvestris</i> Hoffmann in KB oral squamous cell carcinoma. ....	14
Figure 4. Live and dead cell staining of KB oral squamous cell carcinoma by the methanol extract <i>Anthriscus sylvestris</i> Hoffmann .....	16

# ABSTRACT

## Anticancer activity of methanol extract from *Anthriscus sylvestris* Hoffmann through caspase dependent apoptosis in KB human oral squamous cell carcinoma

Park seung cheol

Advisor : Prof. Su-Gwan Kim, Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Recently, biologically activity from wild plants used in herbal medicine have been the center of interest. *Anthriscus sylvestris* Hoffmann is a common wild plant that is indigenous to Europe, North America, Africa, Asia, and New Zealand. The dried root of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann has been used in Korean traditional drugs for the treatment of various diseases, including bronchitis, and as an antipyretic, a cough remedy, and an analgesic herbal drug. However, it has been unknown the anti-cancer effect of the *Anthriscus sylvestris* Hoffmann on the growth of KB human oral squamous cell carcinoma.

In this study, to explore its potential anti-cancer effect on the proliferation of KB human oral squamous cell carcinoma, we examined whether methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann could inhibit the growth of KB human oral squamous cell carcinoma, and investigated its molecular mechanism. Treatment of the methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann in KB oral squamous cell carcinoma reduced cell viability in a dose

dependent manner. To understand of molecular mechanism whether its cell death is related with apoptosis pathway, we performed DNA fragmentation, western blot and LIVE-DEAD cell staining. The formation of a DNA ladder was observed by treatment of the methanol extract from *Anthriscus sylvestris* Hoffmann. In addition, western blot analysis showed that methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann induced the activation of caspase-3, -7, -9, cleaved PARP, and marked reduction of Bcl-2. Furthermore, the dead cell staining (red color) significantly increased by the methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann.

Taken together, these results suggested that the methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann induced cell apoptosis through mitochondrial caspase dependent pathway in KB humans oral squamous cell carcinoma.



## I. 서 론

전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)는 우리나라 전역의 산이나 들에서 자생하는 산형과 (Umbelliferae)에 속하는 여러해살이풀로 어린잎은 식용으로 뿌리는 한방에서 약재로 사용되고 있다. 전호는 방추형으로 근두부에는 줄기와 엽초가 있고 길이는 3-10 cm, 지름 7-15 mm 바깥면은 흑갈색을 띠고 있으며, 위쪽에는 가로줄과 및 뿌리자국이 있다. 꺾인 면은 회백색이며 매끈하나 속이 영성한 것도 있으며 특이한 방향이 있고, 맛은 쓰다(1-3). 지금까지 전호의 성분으로는 디옥시포도필로톡신, 안젤로일 포도필로톡신, 이소안트리신, 포도필로톡신, 야테인과 같은 리그난 계열의 물질과 테커신, 노다케닌과 같은 쿠마린 계열의 물질들이 보고되어져 있다(4). 전호는 예로부터 기침, 천식 및 후두염의 치료제로 사용되어지고 있다. 전호에서 분리한 안젤로일 포도필로톡신은 일시적인 허혈에 유발되는 심근기능의 이상을 호전시키며(5), 최근에는 디옥시포도필로톡신을 처리하여 다양한 암세포주에서 세포사멸을 유도하거나 세포주기를 억제하여 암세포를 죽이는 것으로 알려지고 있다(6, 7).

구강암은 입안의 혀, 밑바닥, 볼점막, 잇몸, 입천장, 입술, 위아래 턱뼈 등에 발생하며 이를 총칭하여 구강암이라고 한다. 구강암의 종류로는 편평 상피세포암종(squamous epidermal carcinoma)이 87%로 가장 흔하고 그 밖에 침샘에서 발생하는 선양낭성암(adenoid cystic carcinoma), 점액 표피양암(mucoepidermoid carcinoma), 선암 등이 있다(8). 원인인자로는 흡연, 음주, 만성적 자극, Human Papilloma Virus(HPV) 감염 등이 있으며, 음주와 흡연을 함께 할 경우에는 정상에 비해 1.5배 높은 구강암 발생률을 보이고 있다(9). 최근 발표된 중앙암 등록본부 자료에 의하면 2009년 우리나라 에서는 연 192,561건의 암이 발생되었는데, 그 중 구강암은 남녀를 합쳐서 연 1,401건으로 전체 암 발생의 0.7%를 차지하였고 남녀의 성비는 1.8 : 1로 남자에게서 더 많이 발생했다고 보고 하였다(9). 구강암은

다른 부위의 암과는 달리 대부분 육안으로 판별이 가능하며 조기진단이 비교적 다른 암에 비해 용이하며 화학방사선요법 혹은 유전자 치료법의 대상으로 훌륭한 모델이 될 수 있음에도 불구하고 구강암은 다른 암에 비해 그 발생기전 등 분자생물학적 접근이 되어있지 않은 암 중의 하나로 알려져 있다(10). 현재까지 구강암 치료는 방사선요법과 5-FU(fluorouracil), cisplatin, bleomycin 등의 항암제를 병행하여 치료하고 있으나 소화기계 합병증, 면역력 저하, 골수기능저하등과 같은 심각한 부작용이 나타나고 있다(11-13).

최근 들어, 각종 질병의 예방 및 치료용 천연생리활성 물질을 약용식물에서 찾고자 하는 노력이 전 세계적으로 활발하게 이루어지고 있는 가운데 자국의 약용작물 보호와 맞물려 새로운 천연생리활성 물질의 탐색 및 활용을 위한 연구개발 노력이 급격히 증대되고 있다(14). 최근 국내외적으로 천연물을 이용한 식품이나 의약품 개발에 관한 관심이 증가되고 있으며, 또한 생리활성 물질 뿐 아니라 다양한 암의 치료를 위한 항암 물질의 원료로도 이용되고 있을 만큼 응용 분야도 다양하다(15). 이처럼 우리나라 자생식물들과 각종 약용식물에 대한 효능 연구가 활발히 진행되어 지고 있으나 그 수준이 기초적인 효능연구에 집중되고 있다. 그러나 차후 연구 방법은 단순한 효능의 분석에 그치지 않고 정확한 기전 연구를 바탕으로 한 임상 적용 및 시장 유통이 될 수 있는 산업적 적용이 가능한 연구가 필요하다. 구강암의 90% 이상이 상피세포 암이며, 발생기전은 신체의 다른 부위에서 발생하는 상피세포암 과 유사하나 정확하게 암 발생기전이 알려져 있지 않다(16, 17). 임상적으로 국소적 침윤 및 경부 임파절 전이를 하며 과거에는 수술이나 방사선과 같은 국소요법이 치료의 근간을 이루어왔다. 현재에는 암 치료에 있어 수술 및 방사선을 이용하여 치료함과 동시에 항암제를 투여하여 치료하는 복합 치료요법이 개발되었다. 또한

면역요법의 개발이 한창이어서 interferon, interleukin 등이 출현하고 있으나 비용도 비싸고 결과도 만족할 만한 정도는 못되어 구강암에는 이용되지 못하고 있다(18). 최근에는 지금까지 이용되고 있는 화학요법의 부작용을 줄이기 위한 노력의 일환으로 진통, 이뇨 강장, 거담, 해열 또는 항염 효과가 있다고 알려진 약용식물의 성분을 추출, 정제하여 구강암 세포주에 처리하여 항암 활성효과를 확인하는 연구들이 활발히 진행중이며, 기존의 화학요법에 사용되어왔던 항암제와 함께 이러한 약용식물을 병용하여 항암활성 효과 증강 및 부작용 억제효과들이 보고되고 있다(19). 본 연구자는 이미 본격적인 기능성 물질 탐색을 위하여 500여 가지 국내자생 추출물을 확보하여 구강암 세포주에 추출물을 처리하여 항암 활성효과를 MTT 기법을 이용하여 탐색하였다.

본 연구에서는 여러 가지 자생식물 중에서 항암 활성효과가 탁월한 전호를 메탄올을 이용하여 추출한 후 구강암 세포주에 처리하여 세포 성장 억제를 확인한 결과 구강암세포의 성장률이 현저하게 감소함을 확인하였으며, 또한 다양한 실험을 수행하기 위해 세포성장 억제농도인 IC (Inhibitory Concentration)<sub>50</sub> 을 확인하였다. 진핵세포에서 세포사멸은 일반적으로 우리 몸 안에 입력되어 있는 생체 프로그램으로 비정상세포, 손상된 세포, 노화된 세포가 체계적인 분자 신호전달 체계에 의해 세포가 스스로 자살해 사멸하거나 화상과 타박, 독극물 등의 자극에 의해 일어나는 세포의 죽음으로 세포의 사고사 또는 돌연사에 의해 세포 밖에서 수분이 유입됨으로써 세포가 팽창하여 죽은 세포피사의 두 형태로 구별된다(20). 세포사멸은 세포치사를 억제하는 단백질 또는 반대로 세포치사를 유도하는 단백질들의 활성의 변화에 의해 일어나며, 이러한 단백질들의 변화에 있어서 기본적으로 알려져 있는 것이 미토콘드리아 외막에 존재하는 apoptosis에 관련된 단백질과 caspase계 단백질이 존재한다(21). 세포사멸

의 외형적 형태로는 초기 염색사의 응축과 더불어 건강한 세포의 경우 세포막 안쪽으로 노출되는 phosphatidylserine 막지질이 세포막 바깥쪽으로 노출되며 annexin-V나 live-dye와 같은 염색약을 세포에 직접 처리하여 살아있는 세포를 확인하거나 PI을 염색하여 죽은 세포를 확인 할 수 있다. 또한 정상세포에서는 chromosomal DNA는 분해되지 않는 단일한 형태를 띠는 반면 세포치사가 된 세포에서는 chromosomal DNA가 잘려지기 때문에 세포의 genomic DNA를 분리하여 아가로즈상에서 전기영동을 수행함으로써 세포치사 여부를 확인 할 수 있다(22). 구강암세포 성장의 억제가 세포사멸에 의한 것인지 확인하기 위해 DNA 분절화 실험을 수행하였으며 미토콘드리아 외막에 존재하는 Bax와 Bcl-2의 변화를 확인하였다. 또한 세포사멸과정에서 특이적으로 활성화되는 caspase계 단백질로 알려져 있는 caspase-3, -7, -9의 활성화와 PARP의 절단을 확인하여 전호 추출물이 구강암세포에서 미토콘드리아 의존성 기작에 의한 세포사멸로 세포성장을 억제함을 확인 하였다.

위와 같은 결과를 통해서 추출물에 의한 단순한 항암효능의 분석에 그치지 않고 추출물의 암세포 사멸에 대한 정확한 발생기전을 연구한다면 구강암 치료 및 새로운 항암제 개발에 많은 도움이 되리라 생각된다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

전호(*Anthriscus sylvestris* Hoffmann)를 영농조합법인 한약사랑에서 구입하여 메탄올을 이용하여 추출 후 동결건조 시킨 것을 Dimethyl Sulfoxide (DMSO; Calbiochem, USA)에 녹인 후 세포 배양액에 희석하여 사용하였다. anti-cleaved caspase-3,-7,-9, cleaved PARP, Bax, Bcl-2(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)과 actin(Santa cruz Biotechnology, Inc)을 구입하여 사용하였으며, 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

### 2. 전호 추출물의 제조

전호 10 kg을 분쇄하여 가루로 만든 후 10 L의 메탄올을 첨가하여 추출 하였다. 추출을 2회 반복 실시한 후 추출물을 여과지로 여과하여 감압 농축하여 50 g의 추출물을 얻어 사용하였다.

### 3. 세포 배양

Human oral fibroblast와 구강암세포(KB, ATCC No, CCL17)는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 항생제 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  penicillin, 100 Unit streptomycin)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, Rockville, MD, USA)을 사용하였다.

### 4. MTT assay

전호 추출물에 대한 KB세포의 생존율을 조사하기 위하여 12 well

culture plate에  $3 \times 10^5$  cells/well 세포를 seeding 하고 12시간 후에 전호 추출물(500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\text{mg}/\text{ml}$ ,  $\mu\text{g}$ , 5  $\text{mg}/\text{ml}$ , 10  $\text{mg}/\text{ml}$ , 50  $\text{mg}/\text{ml}$ , 100  $\text{mg}/\text{ml}$ )을 1  $\mu\text{l}$  처리하였고, 대조군으로 DMSO 1  $\mu\text{l}$ 를 처리하였다. 전호 추출물을 처리한 12 well plate에 있는 배양액을 제거 한 후 450  $\mu\text{l}$ 의 DMEM 배양액과 50  $\mu\text{l}$ 의 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2(MTT)용액을 첨가하였다. MTT용액이 첨가된 12 well plate을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 반응시킨 후 배양액을 제거하고 DMSO 500  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 녹인 후 96 well culture plate에 100  $\mu\text{l}$ 를 분주 후 Microplate Autoreader ELISA (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다.

## 5. DNA fragmentation assay

DNA 분절 현상을 조사하기 위해  $3 \times 10^5$  KB 세포를 12 well plate에 배양 후 전호 추출물(5  $\text{mg}/\text{ml}$ )을 1  $\mu\text{l}$  처리하여 24시간 후 1500 rpm으로 5분 동안 원심분리 하여 세포를 수집 한 후 500  $\mu\text{l}$ 의 lysis buffer로 용해시켜 37°C incubator에 2 시간 동안 반응 시킨 후 12,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol solution을 넣고 -20°C 에서 1시간 동안 보관한 뒤 12,000 rpm으로 20 분 동안 원심분리 하여 genomic DNA을 분리하였다. 분리한 genomic DNA를 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel을 이용하여 150 voltage에서 30분 전기영동하여 UV transilluminator (Spectronics Corporation Westbury, NY, USA)하에서 genomic DNA 분절을 관찰하였다.

## 6. Western blot analysis

$3 \times 10^5$  KB 세포를 12 well plate 에 배양 후 전호 추출물(5 mg/ml)을 1  $\mu$ l 처리하여 24시간 후 1500 rpm으로 5 분 동안 원심분리 하여 세포를 수집 한 후 phosphate buffer saline (PBS)로 두 번 세척하고, protein lysis buffer를 이용하여 단백질을 분리한 후 BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 정량하였다. 50  $\mu$ g 단백질을 12% SDS-PAGE gel에 loading 한 후 120 voltage에서 2 시간 동안 전기 영동 하였다. Gel 상에서 분리 된 단백질은 western blot analysis을 수행 하기 위해 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane에 transfer 한 후, blocking solution(5% nonfat dried milk in TBS containing 0.1% Tween-20)을 이용하여 1시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체 anti-cleaved caspase-3,-7,-9, cleaved PARP, Bax, Bcl-2(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)와 actin (Santa cruz Biotechnology, Inc)을 TBST(TBS containing 0.1% Tween-20)를 이용하여 1:1000 비율로 희석 한 후 4°C 조건하에 16시간 동안 반응하였다. TBST를 이용하여 세 번 세척 후 2차 항체 anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody(Amersham Biociences, UK)는 TBST를 이용하여 1:5,000 비율로 희석하여 1시간 반응 후 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, Oregon, USA)는 생존 세포양과 죽은 세포양을 평가하는데 일반적으로 사용되고 있으며 LIVE-DEAD cell staining kit는 1 mM live-dye 와 2.5 mg/ml 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. live-dye와 PI 형광물질로 염색 시 살아있는 세포에 live-dye에 의해서 녹색으로 염색이 되며, 죽은 세포는 PI에 의해서 붉은색으로 염색 된다. 따라서 본 실험에서는 live-dye와 PI을 동시에 KB 구강암 세포에 처리하였다.

## 8. 실험자료의 통계학적 검정

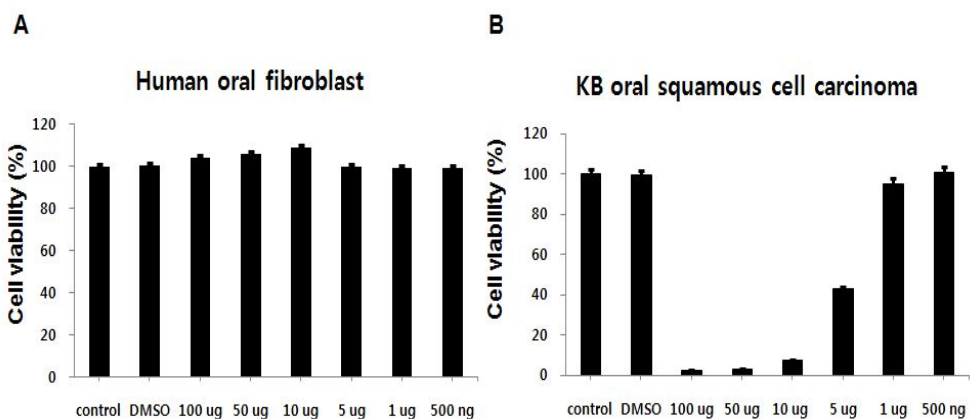
모든 실험성적은  $\text{mean} \pm \text{standard error of the mean}$ 으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 standard t-test를 하였으며, p-value가 0.05 미만(\*,  $p < 0.05$ )과 0.01 미만(\*\*,  $p < 0.05$ )의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.



### Ⅲ. 결 과

#### 1. 전호 메탄올 추출물이 KB세포 성장 억제에 미치는 효과

정상세포주인 human oral fibroblast와 KB세포에 전호의 메탄올 추출물에 의한  $IC_{50}$  및 세포성장 억제 효과를 조사하기 위해 추출물을 다양한 농도(500  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\text{mg/ml}$ , 5  $\text{mg/ml}$ , 10  $\text{mg/ml}$ , 50  $\text{mg/ml}$ , 100  $\text{mg/ml}$ )별로 1  $\mu\text{l}$  처리하여 24시간 후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 정상세포주인 human oral fibroblast에서는 변화가 없었으며 이러한 결과는 전호 추출물이 정상세포에서는 세포독성이 없음을 확인하였다(Fig 1A). 반면 KB 세포에서는 전호 추출물을 처리 후 24 시간 뒤 5  $\text{mg/ml}$  농도에서 1  $\mu\text{l}$ 를 처리한 well에서 약 50% 정도 세포성장이 감소함을 확인하였으며 이러한 결과를 가지고 전호추출물의  $IC_{50}$  값이 5  $\mu\text{g}$ 임을 확인하였으며(Fig 1B), 대조군으로 사용한 DMSO 대조군에서는 세포성장에 영향이 없는 것으로 확인되었다.



**Figure 1.** Effect of the methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann on cell viability in KB human oral squamous carcinoma cells. Cells were treated with various concentration of the methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann in human oral fibroblast (A) and KB human oral squamous carcinoma cells (B). Cells viabilities were determined by the MTT assay. The percentage of cell viability was calculated as a ration of A570 nm. Each data point represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments.

## 2. 전호 메탄올 추출물에 의한 KB세포 genomic DNA의 분절화

전호 메탄올 추출물에 의한 KB세포의 증식억제가 apoptosis에 의해서 나타나는 것임을 확인하기 위해 전호 추출물 5  $\mu$ g를 처리하여 24 시간 동안 배양 후 세포를 수집하여 DNA 분절이 나타남을 확인하였으며 이러한 결과는 세포성장 억제제가 세포사멸에 의한 기작을 통해 나타남을 확인하였다(Fig 2).

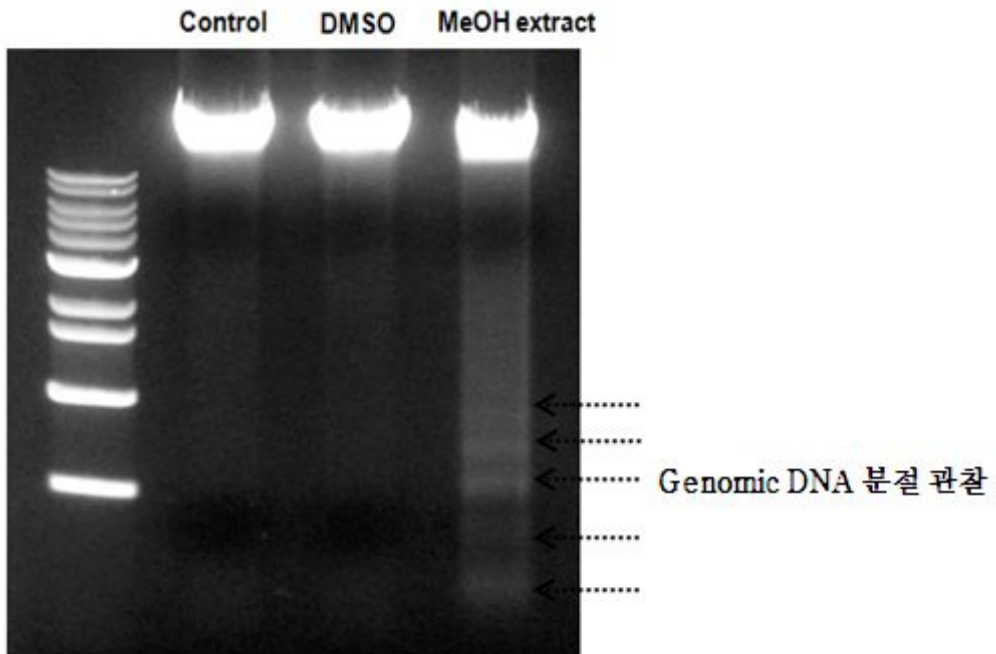
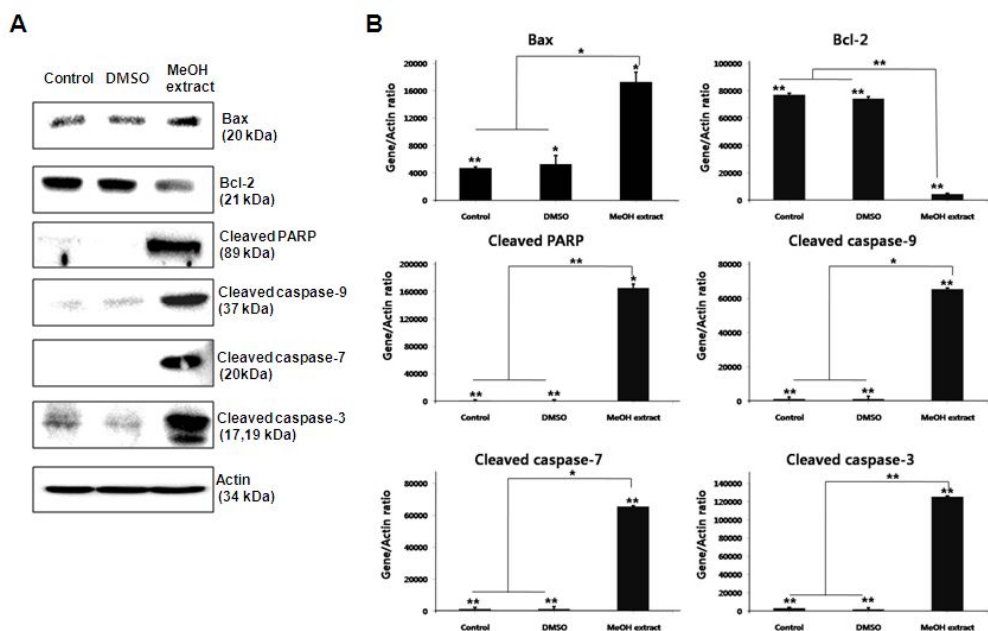


Figure 2. Fragmentation of inter-nucleosomal DNA by the methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann treatment in KB human oral squamous carcinoma cell. Cells were seeded at  $3 \times 10^5$  and then treated with  $5 \mu\text{g}$  of the methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann for 24 h. Genomic DNA was subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis.

### 3. 전호 메탄올 추출물이 anti-apoptotic factor와 pro-apoptotic factor에 의한 caspase-3, -7, -9 의존성에 의한 KB세포 사멸 유도

전호 메탄올 추출물이 KB세포의 성장억제를 일으키는 기전을 확인하기 위해 anti-apoptotic factor로 잘 알려진 Bcl-2와 pro-apoptotic factor로 알려진 Bax의 변화를 확인하고 또한 세포사멸에 가장 중요한 인자로 알려져 있는 caspase의 활성화 확인하였다. 먼저 세포 내 미토콘드리아 외막에 존재하는 Bax와 Bcl-2의 변화를 확인한 결과 추출물을 처리했을 때 Bax의 발현이 증가하였으나 Bcl-2의 발현 변화는 현저하게 감소함을 확인하였다(Fig 3A). 또한 내인성 세포사멸 유도에서 하방에서 활성화되어 신호를 전달하는 caspase-7, -9의 활성화 및 내인성과 외인성 세포사멸경로의 하방에서 신호 전달의 필수적인 역할을 하는 caspase-3 활성화도 확인하였다(Fig 3B). 반면에 대조군으로 사용한 DMSO에서는 caspase-3, -7, -9 활성화가 전혀 나타나지 않음을 확인하였다.



**Figure 3.** The expression levels of apoptotic related proteins and caspase dependent proteins by the methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann in KB oral squamous cell carcinoma. Cells were seeded at  $3 \times 10^5$  and then treated with  $5 \mu\text{g}$  of the methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann for 24 h. Bax, Bcl-2, cleaved caspase-9,-7,-3 and cleaved PARP protein levels were determined by western blot analysis (A) and Quantitative data for western blots (B). Whole lysates were separated by 12% SDS-PAGE. The amount of protein normalized by a comparison with the actin levels. The data are reported as mean $\pm$ SD of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  as determined by the Student's t-test compared to the control.

#### 4. Live-Dead cell staining kit을 이용한 전호 메탄올 추출물에 의한 KB세포 사멸 유도

KB세포에서 전호 메탄올 추출물이 세포사멸에 영향을 확인하기 위해 live-dye와 PI 염색을 통해 확인하였다. LIVE-DEAD cell staining kit(Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)는 생존 세포양과 죽은 세포양을 평가하는데 일반적으로 사용되고 있다. LIVE-DEAD cell staining kit는 1 mM live-dye와 2.5 mg/ml 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. live-dye와 PI 형광물질로 염색 시 살아있는 세포에 live-dye에 의해서 녹색으로 염색이 되며, 죽은 세포는 PI에 의해서 붉은색으로 염색 된다. KB 세포에 전호 메탄올 추출물 5  $\mu$ g을 24 시간 처리하여 배양한 후 염색을 통해 확인한 결과 메탄올 추출물에서 죽은 세포의 염색이 많이 됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

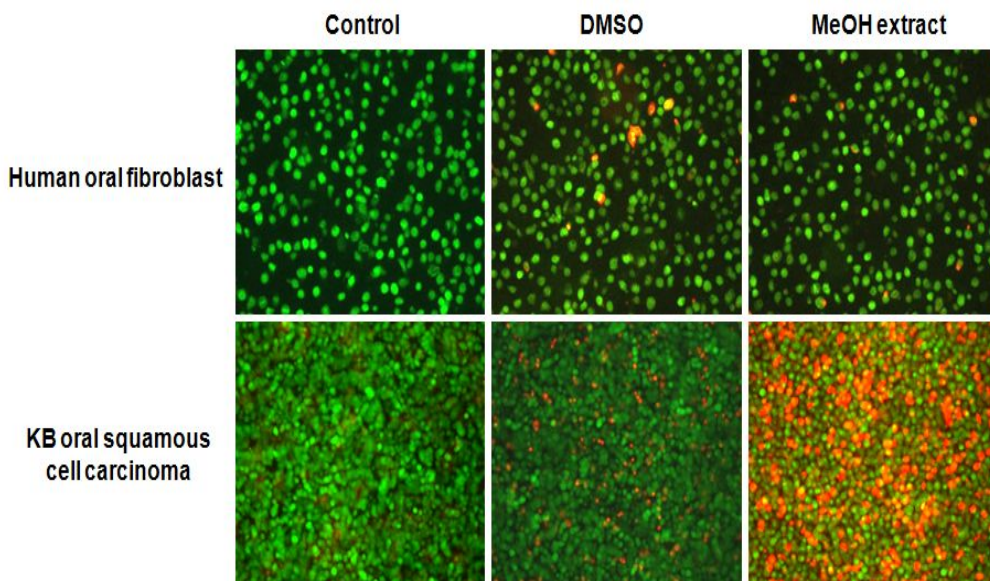


Figure 4. Live and dead cell staining of KB oral squamous cell carcinoma by the methanol extract of *Anthriscus sylvestris* Hoffmann. Cells were treated with 5  $\mu$ g of extract for 24 h. The live cells stained by live-dye (green color) and the dead cells were stained by PI (red color).



## IV. 고 찰

약용식물에 대한 관심이 높아짐에 따라 우리 주변에서 흔히 자생하는 식물의 다양한 생리활성 물질 및 인간에게 유용한 항암 물질을 발굴하기 위한 노력이 활발해 지면서 기존의 전호 효과로 알려져 있는 항염증, 항바이러스 및 소염작용 뿐만 아니라 현재에는 전호의 다양한 성분을 분리하여 여러 가지 암세포에 처리함으로써 항암 효과 등을 나타내는 연구가 활발히 이루어지고 있다(10, 11). 최근에 연구자들이 자생식물을 이용한 용매 추출물을 이용하여 기존에 천연항암제 및 합성항암제의 단점으로 알려진 암세포 내성 발현과 환자에 대한 부작용을 극복하기 위해 많은 실험을 수행하고 있다. 그러나 이러한 자생식물 추출물 중에서도 일부 식물의 경우 낮은 효율과 약물의 세포독성 때문에 전 임상 단계에서 개발이 제한되고 있다(23, 24). 따라서 본 연구에서는 국내에 자생하고 있는 전호를 이용하여 KB세포의 세포성장 억제 및 세포사멸에 의한 항암효과 및 분자적 기전에 대해 연구하였다. 전호 메탄올 추출물을 KB세포에 처리 후 세포성장 억제는 MTT assay 기법을 이용하여 확인하였다. KB세포에 메탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과 처리 후 24 시간 뒤 5  $\mu$ g 에서 세포의 성장을 약 50% 정도 억제시키는 효과를 보였다(Fig 1B). 그러나 정상세포에서는 변화가 없는 것을 확인하였으며(Fig 1A), 이러한 결과는 전호 메탄올 추출물의 세포독성이 없음을 확인하였다. 본 연구결과는 국내에 자생하는 여러 가지 식물의 추출물 보다 더욱 빠르게 세포성장을 억제하는데 효과적임을 확인하였다(25, 26).

본 연구에서는 전호 메탄올 추출물의 KB세포에 대한 성장억제 효과가 세포사멸에 의한 것인지 알아보기 위해 우선 DNA 분절을 확인하였다. DNA 분절 현상은 세포사멸의 대표적 현상으로  $Ca^{2+}$  의존성 endonuclease가 활성화 되어 chromatin의 linker DNA가 절단되어 nucleosomal DNA 분절을 이루게 된다. 이러한 현상을 agarose gel에서 ladder 형태로 관찰

할 수 있다(26, 27). 전호 추출물을 KB세포에 5  $\mu$ g 처리 시 뚜렷한 DNA ladder를 관찰 할 수 있었고 반면 대조군으로 사용된 DMSO 처리 시 어떠한 분절화 현상도 나타내지 않음을 확인하였다. 이러한 결과를 통해서 전호 메탄올 추출물의 KB세포 성장억제가 전형적인 apoptosis의 세포사멸에 의한 결과임을 확인하였다. 이러한 apoptosis의 분자적 기전을 확인하기 위해 미토콘드리아 외막에 존재하는 apoptotic 연계 단백질로 알려져 있는 Bax와 Bcl-2의 단백질 변화 및 caspase-3, -7, -9의 단백질 활성을 western blot analysis를 수행하여 확인한 결과, 전호 메탄올 추출물을 처리 하였을 때 pro-apoptotic인자로 알려져 있는 Bax의 단백질은 증가하였고 anti-apoptotic인자로 알려져 있는 Bcl-2의 발현은 현저하게 감소함을 확인하였다. 또한 미토콘드리아 의존성 caspase-9, -7, -3 의 단백질 활성이 나타남을 확인하였다. 더욱이 미토콘드리아 의존성 caspase 기작에 의해 최종적으로 PARP가 절단되어 KB 세포 성장이 억제됨을 확인하였다. 위와 같은 결과를 토대로 전호 메탄올 추출물을 KB세포에 처리하면 apoptosis의 특징적 경로중 하나로 알려져 있는 미토콘드리아의 caspase family 의존성에 의해 세포성장 억제 및 세포사멸과정을 유도하는 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구에서는 기존의 알려져 있는 자생식물에서 유래된 여러 가지 항암제 보다 강한 효능을 보이는 항암 물질을 개발하기 위해 국내 자생하는 전호를 이용하여 KB세포에 적용하여 연구하였다. 그 결과 KB 세포에 전호 메탄올 추출물을 처리하게 되면 미토콘드리아 caspase family 의존성 세포사멸을 유도하는 분자적 기전을 통해 구강암세포의 성장을 빠른 시간 내에 억제시킬 수 있을 뿐 아니라 효과적인 천연 항암 후보물질이 될 수 있으며, 구강암에 특이적인 항암제로서 개발에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

전호의 성분으로는 전호의 성분으로는 디옥시포도필로톡신, 안젤로일 포도필로톡신, 이소안트리신, 포도필로톡신, 야테인과 같은 비록한 리그난 계열의 물질과 데커신, 노다케닌과 같은 쿠마린 계열의 물질들이 보고되어져 있다(1). 전호는 예로부터 기침 및, 천식 및 후두염의 치료제로 사용되어지고 있다(3). 최근에는 deoxypodophyllotoxin을 처리하여 다양한 암세포에서 세포사멸을 유도하거나 세포주기를 억제하여 암세포를 죽이는 것으로 알려지고 있다(6, 7). 그러나 현재 구강암세포에 대한 세포성장 억제에 대한 연구는 미흡한 상태이다. 본 연구에서 KB 세포를 이용하여 전호 메탄올 추출물이 구강암세포 성장 억제에 미치는 효과와 암세포 성장 억제 및 세포사멸에 대한 분자적 기전을 규명하고자 MTT assay, DNA fragmentation, western blot 및 LIVE-DEAD cell staining등을 수행한 결과 다음과 같은 결과를 확인 하였다.

I. 전호 메탄올 추출물은 5  $\mu$ g에서 KB세포의 성장을 50% 억제 시켰으며 정상세포에서는 변화가 없음을 확인 하였다.

II. 전호 메탄올 추출물은 KB세포의 핵에 존재하는 genomic DNA를 분절화 시킴으로서 세포사멸을 유도하였으며, live-dye와 PI와 같은 염색약을 처리하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 차이를 확인하였다.

III. KB세포 내 미토콘드리아 외막에 존재하는 Bax와 Bcl-2의 발현이 변화하며 또한 caspase-3, 7, 9의 활성화를 유도하고 PARP의 절단에 의해 세포사멸이 유도됨을 확인하였으며 이러한 결과는 미토콘드리아 의존성

caspase 신호전달과정에 의한 분자적 기전이 일어남을 확인하였다.

위의 결과로 토대로 전호 메탄올 추출물을 이용하여 KB세포에서 성장억제에 대한 분자적 기전을 확인 하였고, 더 나아가 구강암세포에 항암활성을 갖는 단일 및 복합성분을 분리하고 동물실험을 이용하여 기존에 알려져 있는 구강암 치료제 보다 나은 새로운 천연 항암제 개발에 대한 기초 연구에 중요한 초석이 될 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Hulten E., Fries M. Atlas of North European Vascular Plants North of the Tropic of Cancer. Koeltz Scientific Books, 1986.
2. Jeong G., Kwon O., Park B., Oh S., Ahn K., Chang M., Oh W., Kim J., Min B., Kim Y., Lee H. Lignans and coumarins from the roots of *Anthriscus sylvestris* and their increase of caspase-3 activity in HL-60 cells. Biol. Pharm Bull 30, 1340-1343, 2007.
3. Magnusson SH., NOBANIS - Invasive Alien Species Fact Sheet - *Anthriscus sylvestris*. - From: Online Database of the North European and Baltic Network on Invasive Alien Species - NOBANIS. Available from. 2006.
4. Hendrawati O., Woerdenbag HJ., Michiels Paul JA., Aantijes HG., Dam AV., Kayser O. Identification of lignans and related compounds in *Anthriscus sylvestris* by LC-ESI-MS/MS and LC-SPE-NMR. Phytochemistry 72, 2172-2179, 2011.
5. Suh SJ., Kim JR., Jin UH., Choi HS., Chang YC., Lee YC., Kim SH., Lee IS., Moon TC., Chang HW., Kim CH. Deoxypodophyllotoxin, flavolignan, From *Anthriscus sylvestris* Hoffm. inhibits migration and MMP-9 via MAPK pathways in TNF- $\alpha$ -induced HASMC. Vascular Pharmacology 51, 13-20, 2009.
6. Jung CH., Kim H., Ahn J., Jung SK., Um MY., Son KH., Kim TW., Ha TY. Anthricin Isolated from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. Inhibits the Growth of Breast Cancer Cell by Inhibiting AKT/mTOR Signaling, and Its Apoptotic Effects Are Enhanced by Autophagy

Inhigation. hindawi publishing corporation, 2013.

7. Yong YJ., Shin SY., Lee YH., Lim YH. Antitumor activity of deoxypodophyllotoxin isolated from *Anthriscus sylvestris*: Induction of G2/M cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19, 4367-4371, 2009.
8. Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer-a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32, 233-245, 2003.
9. Hopper C., Kübler A., Lewis H., Tan I.B., Putnam G. mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 111, 138-146, 2004
10. Bodin I., Jäghagen EL., Isberg A. Intraoral sensation before and after radiotherapy and surgery for and pharyngeal cancer. *Head and Neck* 26, 923-929, 2004.
11. Yamachika E., Habte T., Oda D. Artemisinin: an alternative treatment for oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 24, 2153-2160, 2004.
12. Crown J., O'Leary M., Ooi WS. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *Oncologist* 2, 24-32, 2004.
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* 272, 20317-20320, 1997.
14. Mukherjee AK., Basu S., Sarkar N., Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr. Med. Chem.* 8, 1467-1486, 2001.

15. Pezutto JM. Plant-derived anticancer agents *Bioche. Pharmacol.* 53, 121-133, 1997.
16. Smets LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anti-Cancer Drugs* 5, 3-9, 1994.
17. Konishi T., Shimada Y., Nagao T., Okabe H., Konoshima T. Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium*. *Biol Pharm Bull.* 25(10):1370-2, 2002.
18. Lim SS., Kim JR., Lim HA., Jang CH., Kim YK., Konishi T., Kim EJ., Park JH., Kim JS. Induction of detoxifying enzyme by sesquiterpenes present in *Inula helenium*. *J Med Food.* 10(3):503-10, 2007.
19. Chen CN., Huang HH., Wu CL., Lin CP., Hsu JT., Hsieh HP., Chuang SE., Lai GM. Isocotunolide, a sesquiterpene lactone, induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett.* 8;246(1-2):237-52, 2007.
20. Tsai, I. L., W. Y. Lin, C. T. Chang and I. -S. Chen. Peroxycoumarins from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*. *Journal of Chinese Society* 45, 99-101, 1998.
21. Mun SI., HS Ryu and JS Choi. Inhibition effects of *Zanthoxylum schinifolium* and its active principle on lipid peroxidation and liver damage in carbon tetrachloride-treated mice. *Hanguk Sikkpum Yongyang Kwahak Hoechi* 26, 943-951, 1997.
22. Shoff SM., Grummer M., Yatvin MB., Elson CE. Concentration-dependent increase of murine P388 abd B16

- population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. *Cancer Res* 51, 37-42, 1991.
23. Yang MS., Ha YL., Nam SH., Choi SU and Jang DS: Screening of domestic plants with antibacterial activity. *Agric. Chem. Biotechnology* 38:584-589, 1995.
  24. Lee CH., Lee HK., Park KK., Park CH., Lee BY., Sung RS and Lee SH: Use of Resources a Plant for Biotechnology Industry development. Research Center for Bioresource and Health at Chungbuk National University, 2002.
  25. Yoon YK., Lee SE., Lee DJ., Rho MC., Sung JS., Park CB and Jang YJ: Anti-cancer activity of korean local plant extracts inducing apoptosis in various carcinoma cells. *Kor. J. Pharmacogn* 40:6-12, 2009.
  26. Hyun JH., Kim E., Kang JI., Kim SC., Yoo ES and Kang HK: Apoptosis Induction of HL-60 Keukemia cells by extract of *Crinum asiaticum*. *J. Pharm. Soc. Korea* 52:1-6, 2008.
  27. Zimmermann KC., Bonson C and Green DR: The machinery of programmed cell death. *Pharmacol. Ther* 92:57-70, 2001.